

중양억제 단백질 PDCD5의
기능조절 시 탈인산화효소의 역할
규명

연세대학교 대학원
의과학과
오혜정

중양억제 단백질 PDCD5의
기능조절 시 탈인산화효소의 역할
규명

지도교수 윤 호 근

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2014년 6월

연세대학교 대학원

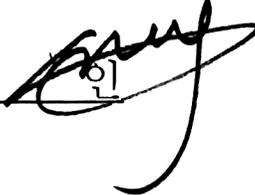
의과학과

오 혜 정

오혜정의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 윤호근 

심사위원 _____ 김경섭 

심사위원 _____ 조남훈 

연세대학교 대학원

2014년 6월

감사의 글

지난 2 년 동안 부족한 저를 믿고 배움의 기회와 가르침을 주신 윤호근 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 바쁘신 와중에 더 좋은 졸업논문이 될 수 있도록 아낌없이 조언해주신 김경섭 교수님과 조남훈 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 수업과 전체세미나를 통해 가르침을 주신 생화학분자생물학교실의 안용호 교수님, 김건홍 교수님, 박상욱 교수님, 허만욱 교수님, 김재우 교수님 그리고 전경희 교수님께도 감사 드립니다. 아는 것보다 모르는 것이 많아 정신 없이 바쁘게 지내온 2 년동안 지치고 힘들었지만 교수님들께서 해주신 격려를 통해 다시 힘을 낼 수 있었습니다. 다시 한번 감사 드립니다.

학위논문이 완성될 수 있도록 많은 도움을 주신 효경 언니, 많은 실험을 가르쳐주신 수연 언니, 격려의 말씀 해주신 최경철교수님, 실수 할 때마다 도움을 준 재성 오빠, 다양한 지식을 알려준 승현 오빠, 많이 친해지지 못한 누리 오빠, 학위과정 동안 가족보다 더 많은 시간을 보낸 동기 은정이, 실험할 수 있도록 도와준 막내 혜리와 미선이 다들 고맙습니다.

학위과정 동안 따뜻하게 대해주신 교실원분들께 감사의 말을 전합니다. 같은 팀 같이 잘 챙겨준 성호 오빠와 주만 오빠, 87 년생 동갑내기지만 언니 같은 해민이, ‘혁구야~’

혁구, ‘안녕~’ 선혁이, 아프면 엄마처럼 챙겨준 예쁜 동생들
한슬이와 수빈이, 전체 세미나 때 많은 도움 준 부남 오빠,
늘 반갑게 인사해주신 양경미선생님, 동인언니, 민경언니,
석준 오빠, 정환 오빠, 결혼관련 상담해준 과 선배 성락
오빠, 웃음주신 동국 오빠, 자주 못 봐서 아쉬운 나래 언니,
많이 친해지지 못한 현우 오빠, 예슬이, 혜영이 모두에게
행운을 빕니다.

바쁜 와중에 시간 내어 신촌 찾아준 의신이, 고민을
나누며 서로에게 힘이 되어준 보라 언니와 선애, 멀리
캐나다에서 응원해준 아영이, 서울대에서 열심히 연구 중인
도연이, 생명공학실험실 인연 기현 오빠, 해냄이에게도
고마운 마음을 전합니다.

아낌없이 응원해주신 할머니, 이모할머니, 이모, 삼촌,
고모 감사 드립니다. 믿고 든든한 지원군이 되어주신 엄마,
아빠, 언니처럼 챙겨준 동생 현정이, 늘 옆에서 힘이 되어준
정석씨 우리 가족 모두 감사하고 사랑합니다. 마지막으로
석사과정을 무사히 마칠 수 있게 해주신 하나님께 감사
드립니다.

2014년 6월
오혜정 올림

차 례

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	9
1. 항체 제작 및 정제	9
2. 세포 배양 및 시약	9
3. Cloning	10
4. Western blotting 분석	10
5. 면역침강법 (Immunoprecipitation, IP)	11
6. 유비퀴틴 assay	12
7. Lentiviral shRNA 를 이용한 CK2 α knockdown 안정세포주 제작	12
8. RNA 추출과 RT-PCR	12
9. MTT 측정	13

III. 결과

1. PDCD5-S119 의 인산화를 인지하는 특이항체 제작 및 검증	15
2. CK2 α 의 과발현으로 인한 PDCD5 인산화 및 발현 증가...	18
3. CK2 α 에 의한 PDCD5 단백질의 안정화	23
4. CK2 α 의 저발현에 의한 PDCD5 의 인산화, 발현 및 세포고사 신호 감소	26
5. PDCD5-S119 의 인산화를 탈인산화시키는 효소 단백질 동정	29
6. PPEF-1 에 의한 PDCD5-S119 인산화 감소	32
7. PPEF-1 과발현에 의한 약물저항성 증가	37
IV. 고찰	39
V. 결론.....	42
참고문헌	43
영문요약	47

그림 차례

그림 1. PDCD5-S119의 인산화 항체 제작 및 검증	17
그림 2. CK2 α 의 발현이 PDCD5에 미치는 영향...	22
그림 3. CK2 α 과발현에 따른 PDCD5의 유비퀴틴화 변화	25
그림 4. CK2 α 의 저발현이 세포사멸 유도시 PDCD5와 p53 활성화에 미치는 영향	28
그림 5. PDCD5-S119의 인산화를 탈인산화시키는 효소 단백질 동정	31
그림 6. PDCD5와 PPEF-1의 상호작용 기작.....	36
그림 7. PPEF-1 과발현이 세포사멸에 미치는 영향	38

국문요약

종양억제 단백질 PDCD5의 기능조절 시 탈인산화효소의 역할 규명

Programmed Cell death 5 (PDCD5)는 세포고사 (apoptosis) 유도시 그 발현이 증가되어, 세포질로부터 핵으로 빠르게 이동한다. 핵뿐만 아니라 미토콘드리아로도 이동하여 Bax와 caspase-3를 활성화시킴으로써 세포고사를 유도한다. 또한 아세틸화효소인 Tip60와 결합하여 p53의 아세틸화를 촉진시킴으로써 세포고사를 증가시킨다. 최근 PDCD5가 세포고사를 조절하는 데 있어 핵심단백질인 p53과 결합하여 양성자로서 역할 한다고 보고되었다. PDCD5와 p53의 결합은 p53이 MDM2에 의해 분해되는 것을 억제하고, p53을 안정화시킴으로써 p53을 경유한 세포고사를 증가시킨다고 밝혀졌다.

PDCD5가 다른 단백질들과 결합하여 세포고사를 조절하는 기전에 대해서는 연구가 활발히 진행되고 있지만, PDCD5 자체의 활성화와 관련하여 세포고사가 조절되는 기전에 대해서는 연구가 미흡하다. 이에 관련된 연구로는 유일하게 PDCD5의 119번째 serine 잔기가 CK2 α 에 의해 인산화되어 세포고사를 증가시킨다는 것 이외에 보고된 것이 없다. CK2 α 에 의한 PDCD5의 인산화는 PDCD5의 기능조절 기전을 연구하는 데 있어 중요하다. 단백질의 인산화는 단백질의 활성화를 결정하는 중요한 번역 후 수식 (posttranslational modification) 기작으로, 세포 내 신호전달을 조절하는 핵심요소이기 때문이다.

이를 바탕으로 본 연구는 CK2 α 에 의한 PDCD5-S119의 인산화가 세포고사 조절에 중요한 역할을 한다는 이전 보고를 바탕으로, pPDCD5-S119에 대한 항체를 제작 및 정제하여 CK2 α 의 과발현이 PDCD5-S119의 인산화와 PDCD5의 발현을 증가시킴으로써 세포고사가 촉진된다는 것을 증명하였다. 또한 pPDCD5-S119를 탈인산화시키는 효소인 PPEF-1를 동정하여, PPEF-1의 과발현이 CK2 α 와 반대로 PDCD5-S119의 인산화 및

PDCD5의 발현과 세포고사를 감소시킨다는 것을 확인하였다.
PDCD5의 세포고사 조절 기능 시 PPEF-1의 역할을
규명함으로써 PDCD5의 가역적 인산화가 세포고사조절에
중요한 역할을 한다는 근거를 제시하였다.

핵심되는 말: pcd5, 인산화, 탈인산화효소, 암세포, 세포사멸

종양억제 단백질 PDCD5의 기능조절 시 탈인산화효소의 역할 규명

<지도교수 윤 호 근>

연세대학교 대학원 의과학과

오 혜 정

I. 서론

세포가 항상성 (homeostasis)을 유지하기 위해서는 세포의 분열 (mitosis), 분화 (differentiation), 사멸 (death)의 균형이 중요하다¹. 이 중 세포사멸이 적절하게 조절되지 못하면 질병이 발생하는데, 세포사멸이 과도하게 일어나는 경우 신경퇴화, 면역 결핍, 불임 등의

질병이 초래되고, 반대로 세포사멸이 억제되어 과도한 증식이 일어나는 경우 암 또는 자가면역질환이 유발된다². 세포사멸은 자가포식 (autophagy), 세포고사 (apoptosis), 괴사 (necrosis)로 분류되는데³, 이 중 세포고사 (apoptosis)는 손상되어 불필요한 세포를 제거하는 세포예정사 (programmed cell death)이다⁴.

세포의 항상성 유지에 중요한 세포사멸 기전을 조절하는 단백질로 종양억제단백질 (tumor suppressor)인 p53이 핵심적인 역할을 한다고 알려져 있다⁵. 정상세포에서 p53은 E3 유비퀴틴 ligase인 MDM2에 의해 분해되어 낮은 수준으로 발현되지만, 세포가 저산소증, 영양결핍, 암유전자의 활성화, 지속적인 DNA 손상과 같은 스트레스를 받게 되면 p53은 인산화효소나 아세틸화효소에 의해 인산화 또는 아세틸화되어 활성화되어 핵으로 이동하게 된다. 핵으로 이동한 p53은 사중체 (homotetramer) 복합체를 형성하여 전사인자으로써 세포고사와 cell cycle arrest 관련 유전자들인 PUMA, Bax, p21등을 발현시킴으로써 세포고사를 유도한다⁶. 이 과정에서 p53은 인산화, 아세틸화, 유비퀴틴화, 수모화 등 다양한 번역 후 수식 (post-translational modification)을 통해 활성이 조절되고⁷, 이외에도

단백질 상호작용 (protein-protein interaction)을 통해 세포고사를 조절한다 ⁸.

최근 세포고사 관련 유전자인 PDCD5 (programmed cell death 5) 단백질이 p53과 결합하여 양성자로서 역할 한다는 것이 보고되었다 ⁹. PDCD5는 경쟁적으로 MDM2가 결합하는 p53의 부분에 결합하여 p53이 핵에서 세포질로 이동하는 것 (nuclear export)을 억제함으로써 p53을 안정화시킨다. 안정화된 p53은 전사인자로서 세포고사 관련 표적 유전자인 p21와 Bax의 전사를 증가시키고 이를 통해 G1 arrest 와 세포고사를 유도한다고 보고되었다.

세포고사 조절에 있어 핵심단백질인 p53을 조절한다고 밝혀진 PDCD5는 1999년에 TF-1 세포에서 TFAR19 (TF-1 cell apoptosis related gene-19) 라는 명칭으로 클로닝되어 처음 발견되었다 ¹⁰. 정상세포에서 PDCD5는 핵과 세포질에 균일하게 존재하지만, 세포고사 유도 시 고발현되어 세포질로부터 핵으로 빠르게 이동한다 ¹¹. PDCD5는 유방암 (breast cancer) ¹², 위암 (gastric cancer) ¹³, 신경교종 (astrocytic glioma) ¹⁴, 간세포 암 (hepatocellular carcinoma) ¹⁵, 간엽연골육종

(chondrosarcoma) ¹⁶ 등 다양한 암에서 그 발현이 감소되었음이 보고되었다.

PDCD5의 기능으로는 세포고사 유도시 Bax를 세포질에서 미토콘드리아로 이동시킴으로써 cytochrome c의 방출을 촉진시켜 caspase-3를 활성화시킨다고 보고되었다 ¹⁷. Bax 뿐만 아니라, 히스톤 아세틸화효소 (histone acetyltransferase, HAT) 인 Tip60와 결합하여 효소의 아세틸화 활성을 증가시키고, PDCD5에 의해 활성이 증가된 Tip60는 p53의 Lysine 120번째 잔기를 아세틸화시켜 p53을 경유한 세포고사를 촉진한다고 밝혀졌다 ¹⁸.

PDCD5는 p53, Bax, Tip60와 같이 다양한 단백질들과 결합하여 세포고사를 조절하는 세포의 항상성 유지에 중요한 단백질이다. 그러나, 그 중요성에 비해 PDCD5 자체의 조절에 대한 연구는 미흡하다. 세포고사 유도시 많은 인산화 또는 아세틸화에 의해 조절된다고 알려진 p53에 비해 ⁷, PDCD5는 CK2 α 에 의해 119번째 serine 잔기가 인산화된다는 것 외에 보고되지 않았다 ¹⁹. 단백질의 인산화는 단백질 기능의 다양성을 제공함으로써 신호전달경로 (signal transduction pathway)의 활성조절에 유용한데 ²⁰, 이를 근거로 PDCD5의

인산화가 세포고사를 조절하는 데 중요한 역할을 할 것이라고 예상하였다.

따라서 이번 연구에서는 PDCD5 119번째 serine 잔기의 인산화가 세포고사 조절에 중요한 역할을 한다는 것을 바탕으로, PDCD5의 기능 조절 시 pPDCD5-S119를 탈인산화 시키는 serine/threonine 탈인산화효소를 동정하고, 역할을 밝힘으로써 PDCD5-S119 가역적 인산화에 의한 세포고사조절기전을 규명하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 항체 제작 및 정제

PDCD5 119번째 serine 잔기에 특이적인 항체를 제작하기 위해 fnrrkvmd(pS)dedddy sequence의 peptide를 합성하고 혈청을 Lab Frontier (Anyang-si, Gyeonggi-do, Korea)에서 얻었다. 항체 정제는 SulfoLink® Coupling Resin (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)을 사용하였다. Resin column을 준비하기 위해, 2 ml의 coupling buffer로 column을 equilibrium 시켰다. 1 ml의 50% slurry 상태의 resin을 넣어 column에 resin을 고정 시킨 후, 4 ml coupling buffer로 column을 washing 하였다. Resin에 peptide를 고정하기 위해, peptide를 coupling buffer로 1 mg/ml의 농도로 만들어 1 mg peptide와 resin을 실온에서 30 분 동안 coupling 반응을 시켰다. Peptide가 resin에 고정되었는지 확인하기 위해, column을 통과한 용액을 280 nm으로 단백질의 efficiency를 측정한 후, 값이 0.1 mg/ml 이하로 나오면 column을 사용하였다. 비특이성 결합을 억제하기 위해 coupling buffer 에 희석한 50 mM L-Cysteine*HCl를 2 ml 넣어 15 분 반응시킨 후, 6 ml의 1 M NaCl으로 washing 하였다. Peptide가 고정된 column을 6 ml 1xPBS로 washing 하고, 5 ml의 혈청과 1xPBS로 최종 볼륨이 7 ml이 되도록 하고, 이를 column에 넣고 30 분 간 incubation 시켰다. 12 ml의 PBS로 column을 washing하고, 8 ml의 elution buffer로 정제하여 1 ml씩 fraction을 모은 뒤, efficiency를 측정하였다. 가장 높은 농도의 fraction의 항체를 0.02% sodium azide가 첨가된 1xPBS을 이용하여 투석 (dialysis)한 후, 4°C에 보관하여 사용하였다.

2. 세포 배양 및 시약

폐암 세포주인 A549, 대장암 세포주인 HCT116, 유방암 세포주인

MCF7, 간암 세포주인 HepG2는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicilin과 0.1 mg/ml streptomycin (Hyclone, Logan, UT, USA)이 첨가 된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)배지를 이용하여 37°C에서 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. MG-132와 etoposide (AG scientific, Darmstadt, Germany)는 DMSO (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 에 녹여 각각 10 µM, 50 µM의 농도로 사용하였다. Transient transfection reagent는 TransIT® -2020 (Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA)와 Polyexpress (Excel gene, Rockville, MD, USA)을 사용하였다.

3. Cloning

Wild type의 PDCD5, PDCD5-S119A, Ubiquitin, CK2 α 와 PPEF-1, PPP1C, PPP1CA, PPP2CB, PPP3CB, PPP3CC, PPP6C, PPM1A, PPM1B, PPM1D, PPM1G, PPM1K 탈인산화효소의 construct는 PCR을 이용하여 증폭하였고, 플라스미드 벡터인 pSG5-KF2M1-FLAG, -HA (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)와 pcDNA-MycTM 3.1 myc-His(-) (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)에 cloning 하였다. 모든 플라스미드 construct는 DNA sequencing을 통해 확인하였다.

4. Western blotting 분석

세포는 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.2% Triton-X100, 0.3% NP-40, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 2 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (USB, Cleveland, OH, USA), protease inhibitor cocktail 로 구성된 pH 7.5의 lysis 완충용액으로 용해시켰다. 용해된 세포를 초음파 분쇄기로 세포벽을 깬 후 4°C에서 13,000 rpm으로

15 분간 원심 분리하였다. 용해된 세포들의 상등액만 모아 새로운 튜브에 옮겨 세포내의 단백질을 추출하였다. 단백질의 정량은 660 nm protein assay reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하였다. 동일한 양의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 하였고, nitrocellulose transfer membranes (Whatman, Dassel, Germany) 에 transfer 하였다. Membrane 은 0.1% (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 이 포함된 PBS 와 5% (v/v) non-fat Difco™ skim milk (BD Biosciences, Sparks, MD, USA)에 30 분간 blocking 하고 4℃에서 overnight으로 1차 항체와 반응시켰다. 항체는 PDCD5 (Proteintech, Chicago, IL, USA), p53 (DO-1), p21, HA tag (Santa Cruz Biothechnology Inc., CA, USA), Bax (AbCam, Cambridge, MA, USA), Flag tag, β-actin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), Myc (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)을 3% BSA에 희석하여 사용하였다. 2차 항체는 5% skim milk에 희석하여 실온에서 1 시간 반응시켰다. 결과 분석은 Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) 제품의 사용법에 따라 수행하였다.

5. 면역침강법 (Immunoprecipitation, IP)

세포는 western blotting 분석과 동일한 방법으로 단백질을 추출 및 정량 하였다. 500 µg의 단백질에 1 µg의 HA, Myc (Santa Cruz Biothechnology Inc., CA, USA)의 항체와 50% slurry 상태의 15 µl의 G plus/protein A-agarose (Santa Cruz Biothechnology Inc., CA, USA) 또는 8 µl의 Flag-specific M2 agarose (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)를 첨가하여 4℃에서 rotator로 overnight 반응 시켰다. 다음 날, bead를 4℃에서 2,000 rpm에 2 분씩 3번 washing buffer로 washing 하였다. 마지막 washing 후, bead를 침전 시킨 후, 상등액을 제거한 뒤 5X SDS loading buffer를 12 µl 넣은 후 5 분간 95℃에 끓인 후 western blotting을 수행하였다.

6. 유비퀴틴 assay

HCT116 세포를 100 mm dish에 confluency가 50% 되도록 배양하였다. Transfection reagent인 Polyexpress (Excel gene, Rockville, MD, USA)로 1 μg 의 HA-ubiquitin, 2 μg 의 wild type Flag-PDCD5 또는 PDCD5-S119A, 2 μg 의 Myc-CK2 α 를 transfection 시켰다. Transfection 30 시간 후, MG-132를 10 μM 의 농도로 6 시간 처리 한 후 anti-Flag으로 IP를 수행하고, anti-HA를 통해 western blotting을 수행하였다.

7. Lentiviral shRNA를 이용한 CK2 α knockdown 안정세포주 제작

293 FT세포를 confluency가 60% 되도록 100 mm dish에 배양하였다. Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 packaging 벡터인 VSVG (PMDG) 4 μg , RSV-REV 4 μg , PMDLg/pPRE 4 μg 와 표적 shRNA 12 μg 을 transfection하였다. Transfection 48 시간 후, 세포배양액만 걸어서 0.45 μm filter Unit Durapore PVDF membrane으로 필터링하여 virus를 생성하였다. CK2 α knockdown 시킬 표적 세포인 MCF7, HepG2, A549 세포의 confluency가 70% 되도록 배양한 뒤 배지 1 ml을 제거하고 Lenti-virus 1 ml과 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 polybrene를 첨가하였다. 다음 날, 새로운 배지로 갈아주고 virus infection 72 시간 후, selection marker 인 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 puromycin을 통해 knockdown 세포만을 선별하였다. 최종적으로 RT-PCR과 western blotting을 통해 CK2 α 가 knockdown됨을 확인하였다.

8. RNA 추출과 RT-PCR

세포를 Trizol 시약 (TaKaRa BIO, Shiga, Japan) 500 μl 을 이용하여 harvest하여 용해시켰다. Chloroform 100 μl 을 넣어 다시 15 초 동안 vortexing 한 후 5 분 동안 ice에서 incubation 하였다. 4°C에서 13,000

rpm으로 20분간 원심분리 한 후, 상등액의 투명한 층만 200 μ l를 취해 새 튜브에 옮기고 1대 1의 비율로 isopropanol 200 μ l씩 넣어 inverting하여 실온에 10분간 반응시켰다. 4°C에서 13,000 rpm으로 15분간 원심분리 한 후 상등액은 제거하고 pellet에 70% EtOH의 1 ml을 넣어준 뒤, 다시 4°C에서 13,000 rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 상등액을 제거하고 5분간 air dry한 뒤, 50 μ l의 RNA elution buffer를 넣어 RNA를 얻었다. 추출한 RNA의 2 μ g을 사용하여 cDNA 합성하였고, 다음과 같은 primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다.

GAPDH: F-5'-GATGGCATGGACTGTGGTCA-3'

GAPDH: R-5'-GCAATGCCTCCTGCACCACC-3'

CK2 α : F-5'-CGAAAATTAGGCCGAGGTAA-3'

CK2 α : R-5'-CGAAAATTAGGCCGAGGTAA-3'

PDCD5: F-5'-AAAGCACAGGGAAGCAGAAA-3'

PDCD5: R-5'-TTGTCCATATCTTGCCATCTG-3'

p21: F-5'-GTGGAGAGCATTCATCCCT-3'

p21: R-5'-TGGATGCAGCTTCCTCTCTG-3'

Bax: F-5'-TCTACTTTGCCAGCAAAGTGGTGC-3'

Bax: R-5'-TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT-3'

9. MTT 측정

A549 세포를 24-well plate에 well 당 3×10^4 의 세포로 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. 50 ng의 pSG5-KF2M1-FLAG 과 Flag-PPEF-1를 transfection 시켰다. Transfection 24 시간 후, 50 μ M의 농도로 etoposide를 24 시간 처리하였고, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 시약을 5 mg/ml로 50 μ l씩 넣은 후 차광시킨 뒤 37°C에서 2 시간 동안 반응 시켰

다. 반응으로 인해 보라색으로 변한 것이 확인되면 100% DMSO 200 μ l씩 넣어 반응을 멈추고, 96-well plate에 150 μ l씩 옮겨 Microplate reader (Molecular Devices, Orleans Anenue, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 살아있는 세포의 농도를 측정하였다.

III. 결과

1. PDCD5-S119의 인산화를 인지하는 특이항체 제작 및 검증

PDCD5의 인산화의 기능적 중요성을 연구하기 위해 CK2 α 에 의하여 인산화 된다고 알려진 serine 119번째 잔기에 특이적인 phospho-peptide를 이용하여 항체를 제작 및 정제하였다 (그림1, 가). 항체는 토끼에 peptide를 주사하여 면역반응을 통해 제작하였다. 채혈을 통해 혈청에 포함된 항체를 얻은 뒤, SulfoLink® Coupling Resin (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)을 사용하여 항체 정제를 수행하였다. 정제방법은 peptide의 thiol group이 resin과 thioether bond를 형성하는 원리를 사용하였다. Peptide가 고정된 resin에 항체가 제작된 혈청을 반응시킨 뒤, Glycine-HCl로 용출하고 PBS로 투석 (dialysis)함으로써 항체를 정제하였다.

정제된 항체의 특이성을 확인하기 위해 HCT116 세포에 Flag-PDCD5의 wild type 또는 inactive mutant form인 PDCD5-S119A를 과발현시킨 후, 제작한 항체를 사용하여 western blotting을 수행하였다 (그림1, 나). pPDCD5-S119 항체가 PDCD5의 mutant form에는 반응하지 않고, wild type에 작용하는 것을 확인하였다. 다음은 anti-flag를 통해 IP를 수행한 후, western blotting을 수행하여 항체의 특이성을 확인하였다 (그림1, 다). (가) 와 동일하게, pPDCD5-S119 항체가 wild type의 PDCD5에 특이적으로 반응하는 것을 확인하였다.

위의 결과를 통해, 제작된 항체가 인산화된 PDCD5 119번째 serine 잔기에 특이적으로 작용하는 것을 알 수 있었다.

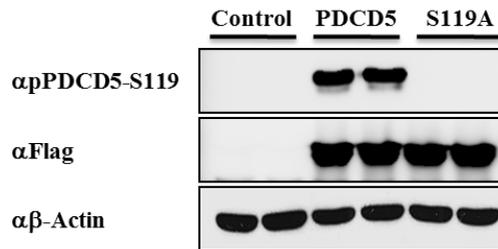
가.

PDCD5-Homo Sapiens

1	Madeelear	rqrlaelqak	hgdpqdaaq	eakhreaemr	nsilaqvldq
51	sararlsnla	lvkpektkav	enyliqmary	gqlsekvseq	glieilkkvs
101	qqtkktttvk	fnrrkvmd	Sd	eddy	

Peptide sequence: fnrrkvmd(pS)eddy

나.



다.

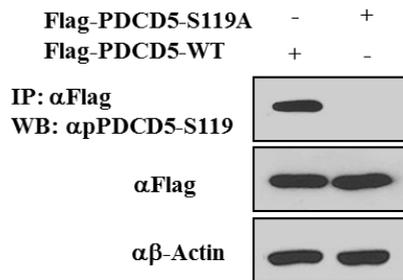


그림 1. PDCD5-S119의 인산화 항체 제작 및 검증. (가) 항체제작 및 정제를 위해 그림과 같은 특이적인 phospho-peptide를 제작하였다. (나) HCT116 세포에 transfection reagent인 Polyexpress로 2 μ g의 pSG5-KF2M1-FLAG, Flag-PDCD5, Flag-PDCD5-S119A를 transfection 시켰다. Transfection 30 시간 후, western blotting을 수행하였다. (다) HCT116 세포에 Polyexpress로 2 μ g의 Flag-PDCD5와 Flag-PDCD5-S119A를 transfection 시켰다. Transfection 30 시간 후, anti-Flag으로 Immunoprecipitation (IP)를 수행하고, 제작한 항체를 통해 western blotting을 수행하였다.

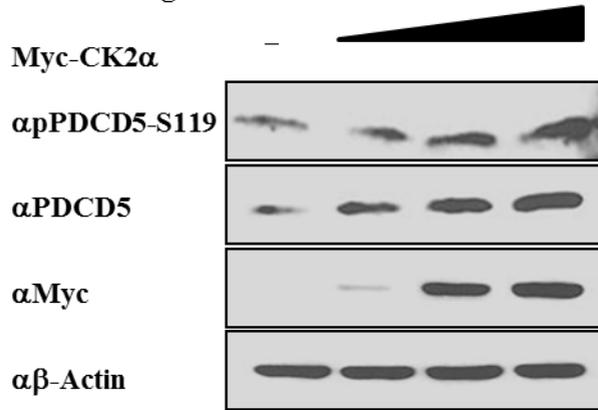
2. CK2 α 의 과발현으로 인한 PDCD5 인산화 및 발현 증가

제작한 항체를 통해 CK2 α 의 발현이 PDCD5의 발현에 미치는 영향에 대해 알아보고자 Myc-CK2 α 를 A549세포에 과발현시킨 후 PDCD5의 인산화와 발현변화를 western blotting을 통해 관찰하였다 (그림2, 가). CK2 α 의 발현이 증가함에 따라 PDCD5-S119의 인산화와 PDCD5의 발현이 모두 증가되었음을 확인하였다. CK2 α 에 의한 PDCD5의 발현 증가가 PDCD5의 전사를 조절함으로써 나타난 결과인지 확인하고자 CK2 α 를 과발현시킨 후 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, CK2 α 의 발현이 증가하여도 PDCD5의 mRNA의 양은 변화가 없음을 확인하였다 (그림2, 나). 이를 통해, CK2 α 는 PDCD5를 mRNA 수준이 아닌 단백질 수준에서 조절한다는 것을 알 수 있었다.

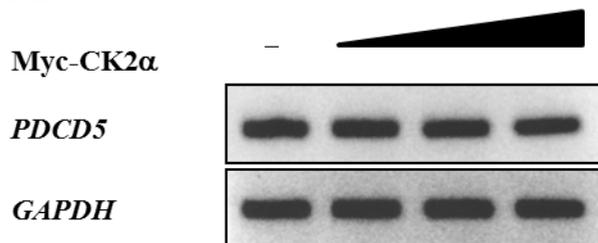
반대로 CK2 α 가 저발현되는 경우 PDCD5의 발현 변화를 관찰하기 위해 Lentiviral vector-mediated shCK2 α 를 유방암 세포주인 MCF7, 간암 세포주인 HepG2, 폐암세포주인 A549에 infection시킴으로써 CK2 α knockdown 안정세포주를 확립하였다. 확립된 세포주를 RT-PCR을 통해 CK2 α 가 knockdown됨을 확인하였다 (그림2, 다). 확립된 CK2 α knockdown 안정세포주를 이용하여 CK2 α 의 저발현에 따른 PDCD5의 발현변화를 western blotting을 통해 관찰하였다 (그림2, 라). 그 결과, 공통적으로 CK2 α 가 저발현되는 세포주에서 PDCD5의 인산화 및 발현이 감소되는 것을 확인하였다.

위의 결과들을 통해, CK2 α 의 과발현은 PDCD5-S119의 인산화와 PDCD5의 발현양을 단백질 수준에서 증가시킨다는 것을 알 수 있었다.

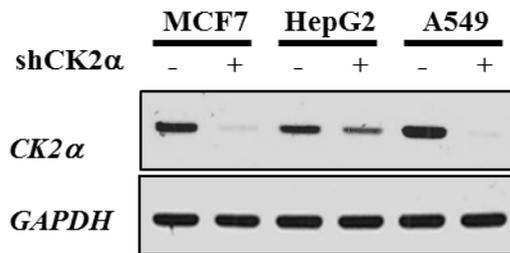
가. Western blotting



나. RT-PCR



다. RT-PCR



라. Western blotting

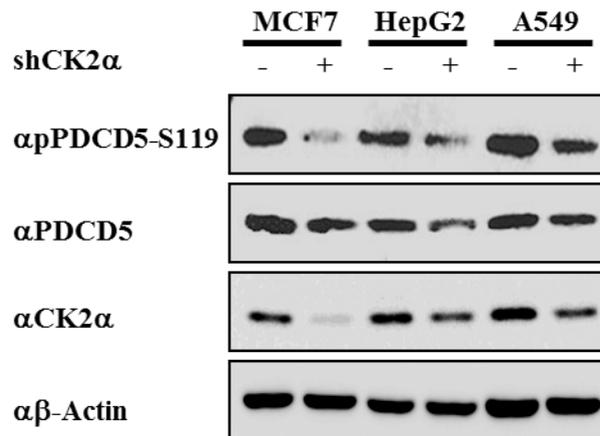


그림 2. CK2 α 의 발현이 PDCD5에 미치는 영향. (가) A549 세포에 Myc-CK2 α 를 dose-dependent 하게 농도 별로 transfection 시킨 후, transfection 36 시간 후 세포를 회수하여 lysis buffer 에 용해시켰다. 용해 시킨 세포 lysate 중 pPDCD5-S119를 확인 하기 위해 30 μ g의 단백질로 western blotting을 수행하였다. PDCD5, Myc-CK2 α , β -actin을 확인하기 위해 10 μ g의 단백질로 western blotting을 수행하였다. (나) (가)와 동일하게 Myc-CK2 α 를 transfection 시킨 후, transfection 36 시간 후 trizol을 이용하여 세포를 건어 RNA를 추출한 후 RNA 2 μ g을 cDNA으로 합성하였다. 합성된 cDNA에 D.W 30 μ l을 넣어 희석한 후 2 μ l을 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. (다) MCF7, HepG2, A549에 Lentiviral vector를 매개로한 shRNA를 이용하여 CK2 α knockdown 안정 세포주를 확립한 뒤 CK2 α 가 knockdown 되었는지 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. (라) CK2 α knockdown 안정세포주를 hemocytometer 방법으로 세포 수를 세어 5×10^5 세포로 60mm에 배양하였다. 세포가 안정화됨을 확인 후 western blotting을 수행하였다.

3. CK2 α 에 의한 PDCD5단백질의 안정화

앞의 실험을 통해 CK2 α 의 과발현이 PDCD5-S119의 인산화와 발현을 증가시킨다는 것을 확인하였다. CK2 α 과발현에 의한 PDCD5의 안정화는 PDCD5의 유비퀴틴화와 관련이 있을 것이라 예상하여, CK2 α 과발현시킨 후 유비퀴틴 assay를 수행하였다 (그림3, 가). 그 결과, CK2 α 가 과발현됨으로써 PDCD5의 유비퀴틴화가 감소되는 것을 관찰하였다.

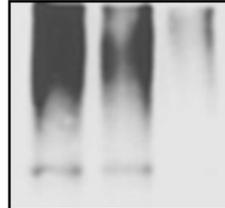
이러한 CK2 α 과발현에 의한 PDCD5의 유비퀴틴화 억제가 CK2 α 가 PDCD5의 119번째 serine 잔기를 특이적으로 인산화시킴으로써 일어나는지 알아보하고자 Flag-PDCD5의 wild type과 inactive mutant form인 PDCD5-S119A를 Myc-CK2 α 와 과발현 시킨 후 PDCD5의 유비퀴틴 assay를 수행하였다 (그림3, 나). 그 결과, wild type의 경우 CK2 α 가 PDCD5-S119를 인산화 시킴으로써 PDCD5의 유비퀴틴화가 감소되었지만, mutant form의 경우 CK2 α 가 PDCD5-S119를 인산화시키지 못하여 PDCD5의 유비퀴틴화가 억제되지 못함을 확인하였다.

위의 결과들을 통해, CK2 α 는 특이적으로 PDCD5-S119를 인산화시키고, PDCD5의 유비퀴틴화를 억제하여 PDCD5 단백질을 안정화시킨다는 것을 알 수 있었다.

가.

HA-Ub	+	+	+
Flag-PDCD5	+	+	+
Myc-CK2α	-	+	++
MG-132	+	+	+
(10 μM, 6 hr)			

IP: α Flag
WB: α HA



α Flag



α Myc



α β -Actin



나.

HA-Ub	+	+	+	+	+
Flag-PDCD5^{WT}	-	+	+	-	-
Flag-PDCD5^{S119A}	-	-	-	+	+
Myc-CK2α	-	-	+	-	+
MG-132	+	+	+	+	+
(10 μM, 6 hr)					

IP: α Flag
WB: α HA



α Flag



α Myc



α β -Actin

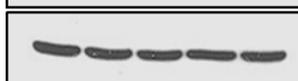


그림 3. CK2 α 과발현에 따른 PDCD5의 유비퀴틴화 변화. (가) HCT116 세포를 100 mm dish에 배양한 뒤, 1 μ g의 HA-Ubiquitin (Ub), 2 μ g의 Flag-PDCD5, 1 μ g 또는 2 μ g의 Myc-CK2 α 를 co-transfection 시켰다. Transfection 30 시간 후, DMSO에 용해된 MG-132 (10 μ M)을 6 시간 처리하였고, western blotting을 수행하였다. (나) HCT116 세포에 1 μ g의 HA-ubiquitin (Ub), 2 μ g의 Flag-PDCD5 또는 Flag-PDCD5-S119A, 2 μ g의 Myc-CK2 α 를 co-transfection 시켰다. Transfection 30 시간 후, DMSO에 용해된 MG-132 (10 μ M)을 6 시간 처리하였고, western blotting을 수행하였다.

4. CK2 α 의 저발현에 의한 PDCD5의 인산화, 발현 및 세포고사신호 감소

PDCD5는 세포고사에 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있기 때문에 세포고사 유도 시 CK2 α 의 발현이 PDCD5의 세포고사 조절 기능에 미치는 영향을 알아보았다. 우선, etoposide 를 50 μ M의 농도로 6 시간 처리하여 세포고사 유도 후 western blotting을 통해 pPDCD5-S119, PDCD5, p53, p21, Bax의 발현이 모두 증가하는 것을 확인하였다 (그림4, 가).

Etoposide에 의해 세포고사가 유도되는 조건하에 shCK2 α 를 이용하여 CK2 α 를 저발현 시킨 후 western blotting을 수행하였다 (그림4, 나). A549 shCK2 α 세포에서 etoposide에 의해 증가되었던 pPDCD5-S119, PDCD5, p53, p21, Bax의 발현 정도가 A549 ShControl 세포에 비해 감소하는 것을 확인하였다.

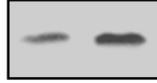
위의 결과를 통해, CK2 α 가 저발현되면서 PDCD5-S119의 인산화와 PDCD5의 단백질양이 감소되고 p53의 활성화가 저해되어 p21, Bax의 발현양이 감소된다는 것을 알 수 있었다.

가.

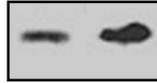
Etoposide
(50 μ M, 6 hr)

- +

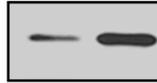
α pPDCD5-S119



α PDCD5



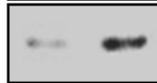
α p53



α p21



α Bax



α β -Actin



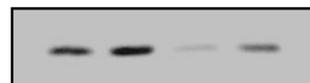
나.

Etoposide
(50 μ M, 6 hr)

shCon **shCK2 α**

- + - +

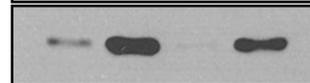
α pPDCD5-S119



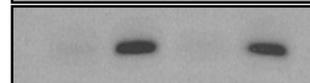
α PDCD5



α p53



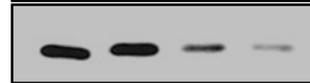
α p21



α Bax



α CK2 α



α β -Actin



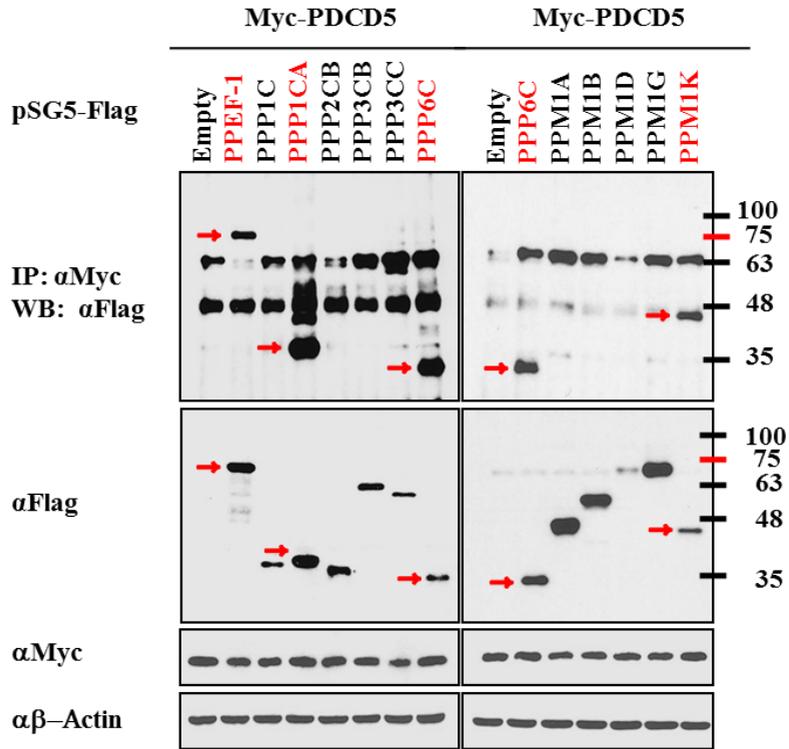
그림 4. CK2 α 의 저발현이 세포사멸 유도시 PDCD5와 p53 활성화에 미치는 영향. (가) 세포의 confluency가 80% 되도록 배양한 뒤, etoposide를 DMSO에 녹여 50 μ M의 농도로 6 시간 처리한 뒤 western blotting을 수행하였다. (나) A549 shControl 과 shCK2 α 안정 세포주를 hemocytometer 방법으로 세포 수를 세어 6×10^5 세포를 60mm 에 배양하였다. 세포가 안정화된 것을 확인한 후, 50 μ M의 농도로 etoposide를 6 시간 처리한 뒤 western blotting을 수행하였다.

5. PDCD5-S119의 인산화를 탈인산화시키는 효소 단백질 동정

단백질 인산화는 탈인산화효소에 의해 가역적으로 제어되므로 ²¹, PDCD5-S119의 탈인산화를 주도하는 효소 단백질을 동정하였다. Serine/threonine 탈인산화효소 중 phosphoprotein phosphatase (PPP)계열의 PPEF-1, PPP1C, PPP1CA, PPP2CB, PPP3CC, PPP6C와 metal-dependent protein phosphatases (PPM)계열의 PPM1A, PPM1B, PPM1D, PPM1G, PPM1K을 대상으로 Myc-PDCD5와 과발현시킨 후 IP를 수행한 결과 (그림5, 가), PPEF-1, PPP1CA, PPP6C, PPM1K가 PDCD5와 결합하는 것을 확인하였다. 이를 탈인산화효소 단백질들 중 PDCD5-S119의 인산화를 직접적으로 억제하는 효소 단백질을 선별하고자 탈인산화효소들을 과발현시킨 후 PDCD5의 인산화변화를 관찰하였다 (그림5, 나). 그 결과, 다른 PPP1CA, PPP6C, PPM1K에 비해 PPEF-1의 과발현에 의해 pPDCD5-S119, PDCD5 및 p53의 발현이 가장 현저히 감소됨을 확인하였다.

위의 결과를 통해, PPEF-1이 PDCD5와 상호작용하고 PDCD5-S119 인산화, PDCD5 및 p53의 발현양을 감소시키는 것으로 보아, PPEF-1 효소 단백질이 PDCD5-S119 인산화 제어와 세포고사 조절기능을 규명하는 데 있어 중요한 역할을 할 것으로 예상하였다.

가.



나.

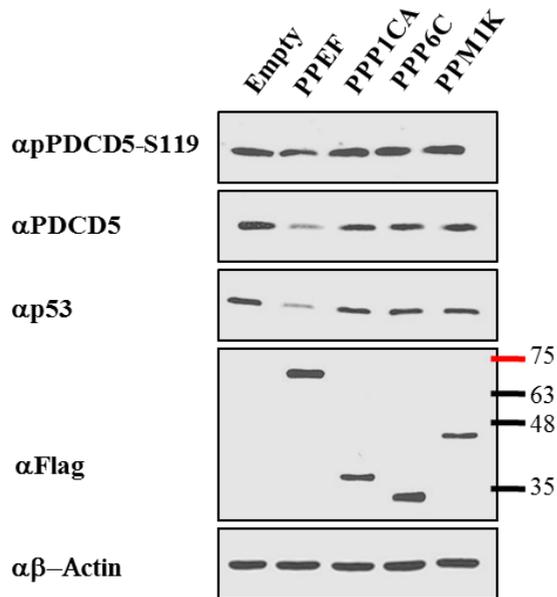


그림 5. PDCD5-S119의 인산화를 탈인산화시키는 효소 단백질 동정.

(가) 탈인산화효소들을 동정하기 위해 13 개의 serine/threonine 탈인산화효소들을 pSG5-KF2M1-FLAG 에 cloning하였다. HCT116 세포에 1 μ g의 Myc-PDCD5와 2 μ g의 Flag으로 태그된 인산화효소들을 과발현시킨 후, anti-Myc으로 IP를 수행하였고, anti-Flag으로 western blotting 을 수행하였다. (나) 실험 (가)를 통해 PDCD5와 결합하는 동정된 탈인산화효소들을 A549세포에 2 μ g씩 과발현시킨 뒤 western blotting을 수행하였다.

6. PPEF-1에 의한 PDCD5-S119 인산화 감소

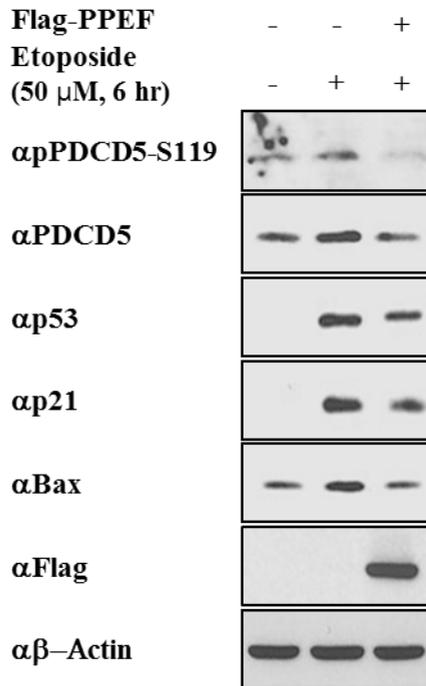
앞의 실험을 통해 동정된 PPEF-1 (protein phosphatase with EF calcium-binding domain)가 PDCD5와 결합하고 pPDCD5-S119를 감소시킴으로써 PDCD5의 세포사멸 기능 제어에 관여할 것이라 예상하였다. 또한 PPEF-1의 발현양상과 관련한 논문으로 최근 N-terminus가 없는 PPEF-1의 variant가 림프종세포 (lymphoma cell)에서 과발현되어있다는 보고가 있다²². 이를 바탕으로 PPEF-1이 PDCD5-S119의 인산화를 감소시키고, 종양형성 (tumorigenesis)과 관련되어 있는 것으로 보아 PPEF-1이 PDCD5를 탈인산화 시킴으로써 세포고사를 억제하는 역할을 할 것이라 가설을 설정하였다.

PDCD5의 세포고사조절 기능에 있어 PPEF-1의 역할을 알아보고자 etoposide를 이용하여 세포고사를 유도하고, PPEF-1을 과발현시킨 후 western blotting을 수행하였다 (그림6, 가). 그 결과, 세포고사 유도로 증가되었던 PDCD5, p53, p21, Bax의 발현이 과발현된 PPEF-1에 의해 감소되는 것을 확인하였다.

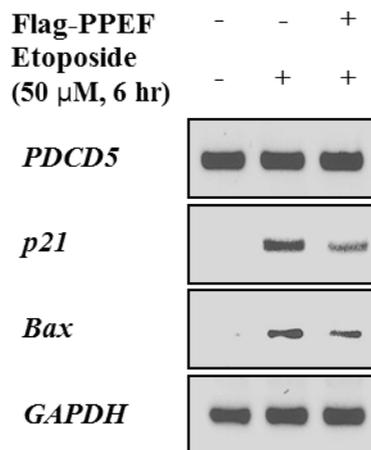
PPEF-1의 발현이 PDCD5의 전사에 영향을 주는지 알아보기 위하여 (가)와 동일한 조건으로 RT-PCR을 수행하여 PDCD5, p21, Bax의 mRNA 변화를 관찰하였다 (그림6, 나). 그 결과, PDCD5의 mRNA에는 영향을 주지 않았고, p53의 표적 유전자인 p21, Bax의 mRNA가 감소되는 것을 확인하였다. 위의 실험을 통해 세포고사 유도시 PPEF-1의 과발현이 PDCD5의 발현과 p53의 활성을 감소시키는 것을 확인하였다.

PPEF-1의 과발현이 PDCD5의 세포고사조절 기능을 저해한다는 것을 바탕으로, PPEF-1에 의한 PDCD5 조절기전을 규명하고자 PDCD5가 PPEF-1의 어느 부분과 결합하는 지 알아보았다. PPEF-1를 (그림6, 다)와 같이 IQ domain, catalytic domain, Full-length domain으로 나누어 IP를 수행하였다 (그림6, 라). 그 결과, 모든 domain들이 PDCD5와 결합하는 것을 확인하였다. Domain 1과 2는 공통적으로 1-120 아미노산을 포함하고 있어 이 부분이 PDCD5와 PPEF-1가 결합하는 데 있어 중요한 부분이라고 추측하였다. 위의 실험결과를 바탕으로 1-120 아미노산의 domain을 다시 IQ motif를 포함한 1-60 아미노산과 포함하지 않은 61-120 아미노산으로 나누어 추가적인 상호작용 기작을 수행해야 할 것이다.

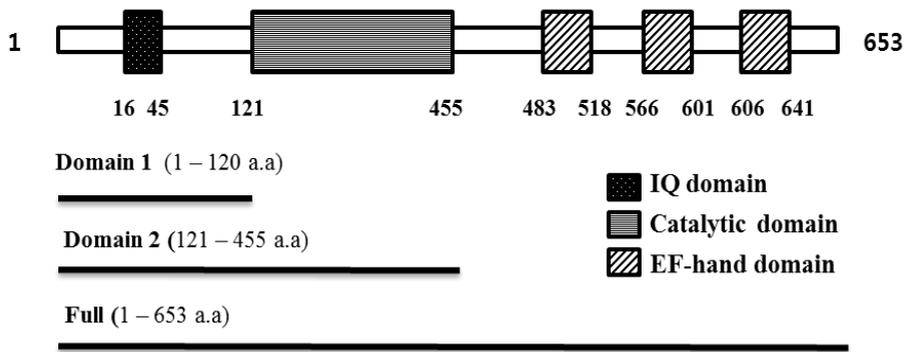
3. Western blotting



4. RT-PCR



다. PPEF-1-Homo Sapiens



라.

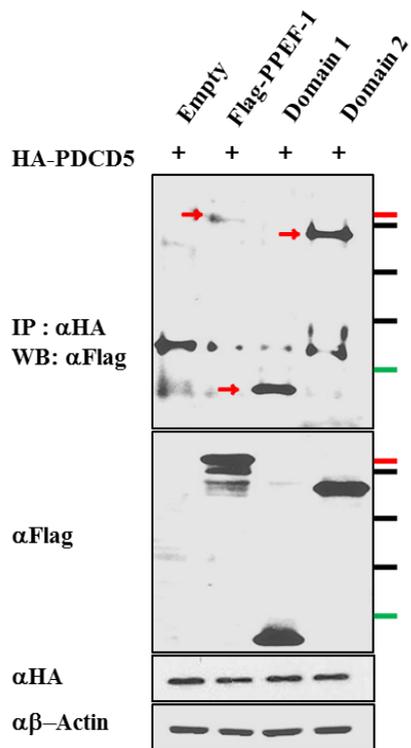


그림 6. PDCD5와 PPEF-1의 상호작용 기작. (가) A549 세포에 2 μ g의 pSG5-Flag 또는 Flag-PPEF-1를 과발현시켰다. Transfection 30 시간 후, 50 μ M의 etoposide를 6 시간 처리하였고, western blotting을 수행하였다. (나) 실험 (가)와 동일한 조건으로 RT-PCR을 수행한 후, PDCD5, p21, Bax의 mRNA 변화를 관찰하였다. (다) Flag-PPEF-1을 domain에 따라 나누는 그림이다. (라) HCT116 세포에 2 μ g의 Flag-PPEF-1 domain들과 1 μ g의 HA-PDCD5를 과발현시킨 후 IP를 수행하였다.

7. PPEF-1 과발현에 의한 약물저항성 증가

이전 실험을 통해 PPEF-1을 과발현시킴으로써 PDCD5-S119의 인산화와 PDCD5, p53, p21, Bax의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 이는 PPEF-1이 PDCD5의 세포고사기능 조절을 감소시키기 때문에 세포에 손상을 주었을 때 세포의 생존력 (cell viability)을 증가시킬 것이라 예상하였다. 이를 확인하기 위해 A549 세포에 PPEF-1을 과발현 시키고, etoposide를 24 시간 동안 50 μ M의 농도로 처리한 후, MTT를 수행하였다 (그림7, 가). 그 결과, 세포의 etoposide에 의한 세포사멸이 대조군에 비해 PPEF-1을 과발현시킨 군에서 감소됨을 확인하였다.

앞의 실험결과들을 토대로 PPEF-1의 과발현이 단백질 수준에서 PDCD5의 탈인산화를 통해 단백질 안정성을 감소시키고, 그 결과 p53에 의한 세포고사가 줄어들어 세포의 생존력이 증가한다는 결론을 얻을 수 있었다.

가.

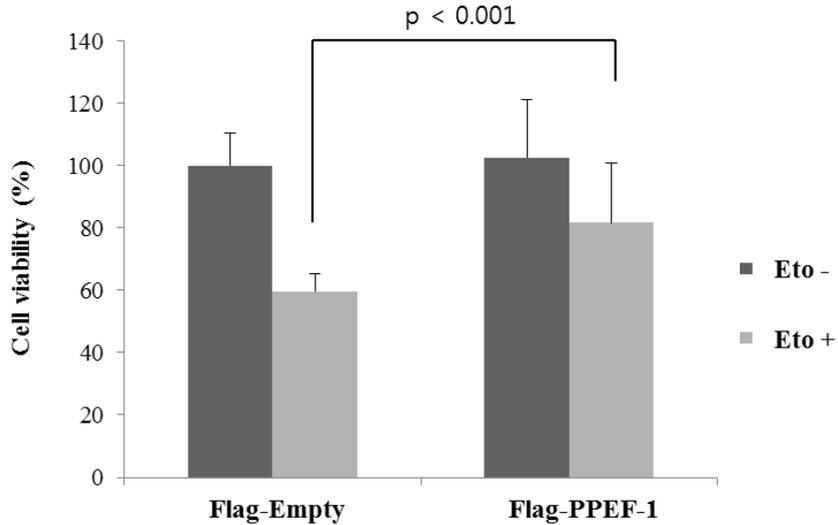


그림 7. PPEF-1 과발현이 세포사멸에 미치는 영향. (가) A549 세포를 24-well plate에 well 당 3×10^4 cells로 배양한 뒤, 50 ng의 Flag-empty 또는 Flag-PPEF-1를 transfection 하였다. Transfection 24 시간 후, 50 μ M의 etoposide를 24 시간 처리하였다. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)시약을 5 mg/ml로 50 μ l씩 넣은 후 차광시킨 뒤 37°C에서 2 시간 동안 반응 시킨 후, 100% DMSO를 200 μ l씩 넣어 반응을 멈추고, 96-well plate에 150 μ l씩 옮겨 Microplate reader를 이용하여 570 nm에서 살아있는 세포의 농도를 측정하였다.

IV. 고찰

PDCD5의 119번째 serine 잔기의 인산화가 세포고사를 증가시킨다는 것이 밝혀졌는데¹⁹, 이는 PDCD5-S119의 가역적 인산화가 세포고사조절기능에 있어 중요한 역할을 할 것이라 예상하였다. PDCD5의 가역적 인산화기전을 규명하기 위해 pPDCD5-S119을 특이적으로 인지하는 항체를 제작 및 정제하였다.

정제된 인산화 특이적 항체를 이용하여 CK2 α 의 과발현이 PDCD5-S119의 인산화와 PDCD5의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 이러한 조절은 CK2 α 를 과발현시킨 후 RT-PCR을 수행하여 PDCD5의 mRNA가 변하지 않는 것으로 보아 CK2 α 가 PDCD5의 발현을 단백질 수준에서 조절한다는 것을 알았다. 단백질의 안정화에는 유비퀴틴화가 관여함이 널리 알려져 있기에, 이를 확인하기 위해 CK2 α 를 과발현시킨 후 PDCD5의 유비퀴틴화의 변화를 관찰하였다. CK2 α 의 과발현으로 인해 wild type의 PDCD5의 유비퀴틴화는 감소하고, inactive mutant form인 PDCD5-S119A의 유비퀴틴화는 감소되지 못하는 것을 확인하였다. 위의 실험을 통해 CK2 α 가 PDCD5의 119번째 serine 잔기를 인산화시킴으로써, PDCD5의 유비퀴틴화가 억제되고 그 결과 PDCD5가 안정화된다는 결론을 얻을 수 있었다.

CK2 α 는 세포의 survival에 관여하는 oncogene으로 알려져 있다²³. CK2 α 가 IP6K2를 인산화시킴으로써 세포고사기전을 억제하여 세포의 survival를 촉진하는 기전이 보고되었다²⁴. 이는 이번 연구를 통해

열은 CK2 α 가 PDCD5를 인산화시킴으로써 세포고사를 강화시킨다는 결론과 반대되는 결론이다. CK2 α 의 경우 인지하는 기질이 300개 넘게 존재한다²⁵. 수많은 기질 중 CK2 α 와 반응하는 기질은 자극 (stimuli)에 따라 결정된다²⁶. 즉, 자극과 기질에 따라 CK2 α 가 관여하는 기전이 달라지게 되는 것이다. CK2 α 가 세포고사를 촉진시키는 기전에 관여한다는 연구로 CK2 α 가 p53을 인산화시킴으로써 p53이 DNA에 결합하는 것을 강화시켜 세포고사를 촉진한다는 보고가 있다²⁷. 이처럼 CK2 α 는 세포고사와 세포증식 모두에 관여하는 bifunctional 효소이다. 추후 연구를 통해 CK2 α 가 어떠한 기전에 의해 활성화되어 PDCD5의 인산화를 촉진시키는 지에 대해 규명할 필요가 있다.

PPEF-1은 *Drosophila* retinal degeneration C (rdgC) 유전자와 높은 유사성을 지닌 sensory neuron differentiation에 관여하는 serine/threonine 탈인산화효소로 처음 발견되었다²⁸. PPEF-1은 N-terminus에 IQ motif, 가운데 부분에는 catalytic domain, C-terminus에 3개의 EF-hand domain로 구성되어있으며, Ca²⁺를 통해 두 가지 방법으로 조절 될 수 있다. 하나의 방법은 N-terminal domain의 IQ motif에 calcium-binding messenger인 calmodulin이 결합함으로써 Ca²⁺의 조절을 받을 수 있고, 다른 하나의 방법은 C-terminal domain의 Ca²⁺-binding domain을 통해 조절 받을 수 있다²⁹. 다른 탈인산화효소들에 비해 PPEF-1 기능에 대해 많이 보고되지 않았다. PPEF-1은 *Drosophila* retinal degeneration C (rdgC) 유전자와 유사한 구조로 구성되어있기 때문에³⁰, rdgC에 대한

연구를 근거하여 동물세포에서의 PPEF-1의 역할을 유추할 수 있다. RdgC에 관한 연구로는 rdgC의 loss-of-function mutation이 light-dependent photoreceptor 세포고사를 야기시킨다는 보고가 있다²⁹. 즉, rdgC의 과발현으로 인해 light-dependent photoreceptor 세포고사 억제된다는 연구 결과이다. 이는 이번 연구를 통해 밝힌 PPEF-1 과발현이 PDCD5-S119 인산화 및 세포고사를 감소시킨다는 결과와 동일한 맥락으로써 PPEF-1의 과발현이 PDCD5의 세포고사조절 기능을 억제한다는 결론을 뒷받침해준다. 이를 바탕으로 Ca^{2+} 의 조절을 받는 PPEF-1의 역할과 연관 지어 PDCD5가 세포고사 유도시 Ca^{2+} 신호기전에 의해 조절받는 지에 대해 연구를 진행한다면 PDCD5의 세포내 기능을 보다 더 명확히 규명하는 데 있어 추가적 정보를 제시할 수 있을 것이다.

V. 결론

이전 논문을 통해 밝혀진 세포고사 조절에 대한 PDCD5의 119번째 serine 잔기 인산화의 중요성을 규명하고자 pPDCD5-S119의 항체를 제작하였다. 제작한 항체를 통해 PDCD5-S119의 인산화가 인산화효소인 CK2 α 에 의해 증가되며, 증가된 pPDCD5-S119는 PDCD5를 안정화시켜, 세포고사를 촉진시킨다는 것을 확인하였다.

또한 단백질 상호작용 분석을 통해 PDCD5-S119의 인산화를 탈인산화시키는 효소로서 PPEF-1를 동정하였고, PPEF-1의 과발현에 의해 세포고사 유도시 증가되었던 pPDCD5-S119, PDCD5, p53, p21, Bax의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 최종적으로 MTT assay를 통해 PPEF-1의 과발현이 유의성 있게 세포고사를 감소시킨다는 것을 확인하였다.

즉, 이번 연구를 통해 PDCD5-S119가 CK2 α 에 의해 인산화되어 세포고사를 촉진시키고, 실험을 통해 동정된 탈인산화효소인 PPEF-1에 의해 탈인산화되어 세포고사를 감소시킨다는 것이 증명되었다. 이를 바탕으로 PDCD5의 세포고사조절 기능 시 새롭게 동정한 PPEF-1의 역할을 규명함으로써 PDCD5 기능조절의 명확한 분자모델을 확립하는 데 기여할 것이라 판단된다.

참고문헌

1. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2, 277-88.
2. Walensky LD. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death and Differentiation* 2006; 13, 1339-50.
3. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* 2009; 16, 3-11
4. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* 2005; 73 . 4 1907-16.
5. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell.* 2003; 11(3):577-90.
6. Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(12):909-23.
7. Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(10):793-805.
8. Fernandez-Fernandez MR, Sot B. The relevance of protein-protein interactions for p53 function: the CPE contribution. *Protein Eng Des Sel.* 2011; 24(1-2):41-51.
9. Xu L, Hu J, Zhao Y, Hu J, Xiao J, Wang Y, et al. PDCD5 interacts with p53 and functions as a positive regulator in the p53 pathway. *Apoptosis.* 2012; 17(11):1235-45.

10. Liu H, Wang Y, Zhang Y, Song Q, Di C, Chen G, et al. TFAR19, a novel apoptosis-related gene cloned from human leukemia cell line TF-1, could enhance apoptosis of some tumor cells induced by growth factor withdrawal. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 254(1):203-10.
11. Chen Y, Sun R, Han W, Zhang Y, Song Q, Di C, et al. Nuclear translocation of PDCD5 (TFAR19): an early signal for apoptosis? *FEBS Lett.* 2001; 509(2):191-6.
12. Sudbø J, Reith A, Lingjaerde OC. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 539-48.
13. Yang YH, Zhao M, Li WM, Lu YY, Chen YY, Kang B, et al. Expression of programmed cell death 5 gene involves in regulation of apoptosis in gastric tumor cells. *Apoptosis* 2006; 11: 993-1001.
14. Li H, Wang Q, Gao F. Reduced expression of PDCD5 is associated with high-grade astrocytic gliomas. *Oncol Rep* 2008; 20:573-9.
15. Fu DZ, Cheng Y, He H, Liu HY, Liu YF. PDCD5 expression predicts a favorable outcome in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 2013; 43(3):821-30.
16. Chen C, Zhou H, Xu L, Liu X, Liu Z, Ma D, et al. Prognostic significance of downregulated expression of programmed cell death 5 in chondrosarcoma. *J Surg Oncol.* 2010; 102(7):838-43.
17. Chen LN, Wang Y, Ma DL, Chen YY. Short interfering RNA against the PDCD5 attenuates cell apoptosis and caspase-3 activity induced by Bax overexpression. *Apoptosis.* 2006; 11(1):101-11.
18. Xu L, Chen Y, Song Q, Xu D, Wang Y, Ma D. PDCD5 interacts with Tip60 and functions as a cooperator in acetyltransferase activity and DNA damage-induced apoptosis. *Neoplasia.* 2009; 11(4):345-54.

19. Salvi M, Xu D, Chen Y, Cabrelle A, Sarno S, Pinna LA. Programmed cell death protein 5 (PDCD5) is phosphorylated by CK2 in vitro and in 293T cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 387(3):606-10.
20. Wang YC, Peterson SE, Loring JF. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Research* 2014; 24:143–60.
21. Shi Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell.* 2009; 139(3):468-84.
22. Ho P, Dai KS, Chen HL. Molecular cloning of a novel PPEF-1 gene variant from a T-cell lymphoblastic lymphoma cell line. *Recent Pat DNA Gene Seq.* 2012; 6(1):72-7.
23. Volodina IuL, Shtil' AA. Casein kinase 2, the versatile regulator of cell survival. *Mol Biol (Mosk).* 2012; 46(3):423-33.
24. Chakraborty A, Werner JK Jr, Koldobskiy MA, Mustafa AK, Juluri KR, Pietropaoli J, et al. Casein kinase-2 mediates cell survival through phosphorylation and degradation of inositol hexakisphosphate kinase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(6):2205-9.
25. Meggio F, Pinna LA. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* 2003; 17(3):349-68.
26. Filhol O, Cochet C. Protein kinase CK2 in health and disease: Cellular functions of protein kinase CK2: a dynamic affair. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(11-12):1830-9.
27. Maclaine NJ, Hupp TR. The regulation of p53 by phosphorylation: a model for how distinct signals integrate into the p53 pathway. *Aging (Albany NY).* 2009; 1(5):490-502.
28. Montini E, Rugarli EI, Van de Vosse E, Andolfi G, Mariani M, Puca AA, et

- al. A novel human serine-threonine phosphatase related to the *Drosophila* retinal degeneration C (*rdgC*) gene is selectively expressed in sensory neurons of neural crest origin. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(7):1137-45.
29. Kutuzov MA, Solov'eva OV, Andreeva AV, Bennett N. Protein Ser/Thr phosphatases PPEF interact with calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 293(3):1047-52.
30. Kiselev A, Socolich M, Vinós J, Hardy RW, Zuker CS, Ranganathan R. *Neuron.* A molecular pathway for light-dependent photoreceptor apoptosis in *Drosophila*. 2000; 28(1):139-52.

Abstract

The role of phosphatase in the regulation of tumor suppressor PDCD5

Hye-Jeong Oh

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Ho-Geun Yoon)

Programmed Cell death 5 (PDCD5) is highly expressed in apoptosis, and rapidly translocated from the cytoplasm to the nucleus. Besides the nucleus, it is also translocated to the mitochondria and then activates Bax and caspase3, promoting the process of apoptosis. PDCD5 also regulates apoptosis by interacting with other proteins. It binds to Tip60, increases the acetylation of p53 and induces p53-mediated apoptosis pathway. Recently, it is reported that PDCD5 functions as a positive regulator by directly interacting with p53 and by stabilizing p53 from the degradation by MDM2. The study of the PDCD5-mediated apoptosis regulation by interactions with other proteins is

ongoing; however, the regulation by posttranslational modifications of PDCD5 remains poorly characterized. Until now, only the phosphorylation of PDCD5 on serine 119 is reported to enhance the apoptosis pathway. The protein phosphorylation is a key posttranslational modification in the regulation of signal transduction pathways because it determines the activation of the protein.

According to the previous study, it is proved that the CK2 α phosphorylation of PDCD5-S119 enhances the apoptosis pathway. To investigate the significant role of pPDCD5-S119, the antibody specific for pPDCD5-S119 is established. With the pPDDCD5-S119 antibody, it is confirmed that the overexpression of CK2 α increases the phosphorylation of PDCD5-S119 and the expression of PDCD5, promoting apoptosis. The phosphatase targeting PDCD5 at serine 119 is screened through IP experiment and PPEF-1 is selected. The overexpression of PPEF-1 reduces the phosphorylation of PDCD5-S119 and the apoptosis pathway. These data demonstrated that the reversible phosphorylation of PDCD5-S119 plays an important role in the regulation of apoptosis pathway.

Key words: pdcd5, phosphorylation, phosphatase, cancer cell, apoptosis