상호작용체 분석을 통한 PDCD5 세포사멸 조절 기전 규명

연세대학교 대학원

의과학과

한 은 정

상호작용체 분석을 통한 PDCD5 세포사멸 조절 기전 규명

지도교수 윤 호 근

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2014년 6월

연세대학교 대학원

의과학과

한 은 정

한은정의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____윤호근_____ 인

심사위원 _____이재면_____ 인

심사위원 _____이윤한_____ 인

연세대학교 대학원

2014 년 6 월

감사의 글

어느덧 2 년이라는 시간이 흘러 학위과정을 마무리 하게 되었습니다. 여러가지로 부족한 저에게 도움을 주신 분들께 감사의 마음을 전하고자 합니다.

먼저 아무것도 모르는 저를 제자로 받아들여 주신 윤호근 교수님께 감사하다고 말하고 싶습니다. 교수님의 관심과 격려 덕분에 제가 조금 더 성장할 수 있었습니다. 바쁘신 와중에도 저의 논문에 관심을 갖고, 아낌없는 조언을 해 주신 이재면, 이윤한 자문교수님께도 감사의 말씀을 전하고 싶습니다. 또한 가까이에서 가르침을 주신 생화학 분자 생물학 교실의 김건홍교수님, 김경섭교수님, 안용호교수님, 박상욱교수님, 김재우교수님, 전경희교수님께도 감사의 마음을 전합니다.

실험실 생활과 실험의 모든 과정을 옆에서 도와준 효경언니, 실험뿐만 아니라 웃긴 영상도 보여준 수연언니, 귀찮아~하면서도 많이 알려준 승현오빠, 매번 어려울 때 찾게 되는 재성오빠, 이제는 자매가 된 것 같은 동기 혜정이, 실험실의 재미있는 에피소드를 만들어준 후배 혜리와 미선에게도 고맙습니다. 지금은 실험실에 없지만 처음 실험을 할 때 많은 도움을 준 향단선생님과 미희언니에게도 감사하고, 같이 실험실 생활을 하지 않았지만 많이 챙겨주신 최경철 교수님께도 감사하다고 말하고 싶습니다.

조금 더 편하게 생활할 수 있게 도와주신 권석철 선생님께도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 실험실에서 활력소가 되어준 귀여운 한슬이와 수빈이, 동갑내기 친구들 해민, 혁구, 선혁, 격려를 해주신 양경미선생님, 석준쌤, 희은언니, 성호오빠와 주만오빠, 동인언니, 민경언니, 나래언니, 동국오빠, 정환오빠, 현우오빠 그리고 혜영, 예슬에게도 고맙다고 말하고 싶습니다.

잘 챙겨준것도 없는데 학위기간동안 시간 내서 찾아와준 소중한 구공탄 (현순, 은미, 희원, 찬미), 스팸 (경실, 엘리, 정은), 꼬망 친구들 (영곰, 민경)과 진아, 진미, 성희, 수지 그리고 대학교 때 만나 항상 얘기를 들어주고 힘이 되어준 나라, 혜정, 경희, 현주, 빛나, 민정에게도 고맙다고 말하고 싶습니다.

무엇보다 철없는 딸을 항상 믿어주시며 응원해 주신 아빠 엄마께 사랑한다고 말하고 싶고, 엄마를 대신해서 보살펴 주신 이모에게도 감사합니다. 효도하겠습니다. 그리고 무뚝뚝하지만 챙겨주는 동생한테도 사랑한다고 말하고 싶습니다.

차 례

국문요약 ····· 1

I. 서론 ····· 3

II. 재료 및 방법

1. 세포배양과 시약 ····· 7
2. Plasmids ····· 7
3. Yeast-two hybrid screening ····· 8
4. Western blot analysis ····· 8
5. Immunoprecipitation assay ····· 9
6. Lentivirial shRNA 를 이용한 knockdown 세포주 제작 10
7. RNA 분리와 cDNA 합성 ····· 11
8. Site-directed mutagenesis ····· 12
9. MTT assay ····· 12
10. Colony formation ····· 13

11. statistical analysis ····· 13

III. 결과

1. Yeast-two hybrid 를 통한 PDCD5 의 신규결합 단백질 동정 ····· 14

2. STK31 과발현에 의한 p53 활성화 유도 ·····19

3. PDCD5 의존적 STK31 의 p53 활성화 유도 ····· 23

4. PDCD5 안정화를 통한 STK31 의 p53-의존적 세포 사멸 신호 기전 촉진 ····· 27

5. PDCD5 의존적 STK31 의 세포고사 촉진 ····· 32

IV. 고찰 ····· 35

V. 결론····· 40

참고문헌 ····· 41

영문요약 ····· 48

그림 차례

그림 1. PDCD5 결합 단백질 동정 ····· 14

그림 2. STK31 의 과발현을 통한 p53 경로의 활성화 ····· 19

그림 3. STK31 의 과발현은 PDCD5 를 경유하여 p53 경로 ····· 22

그림 4. STK31 의 PDCD5 를 매개로 etoposide 에 의한 p53 신호 전달 활성조절 ····· 26

그림 5. 세포증식에서 STK31 의 영향 ····· 30

표 차례

표 1. Yeast-two hybrid 를 통해 동정된 PDCD5 결합 유전자 ····· 15

국문요약

상호작용체 분석을 통한 PDCD5 세포사멸 조절 기전 규명

PDCD5 (programmed cell death5)는 세포사멸에 중요한 역할을 한다고 알려진 유전자이다. 평상시에는 핵과 세포질에 약하게 존재하다가 UV 스트레스와 같은 사포사멸을 유발하는 자극이 주어졌을 때 세포질에서 핵으로 빠르게 이동하여 기능을 한다고 알려져 있지만 아직까지 이에 따른 PDCD5의 분자 네트워크는 불분명한 상황이다.

PDCD5는 성상세포종, 유방암, 만성골수성백혈병, 위암, 간암 등의 다양한 암 종에서 발현의 감소가 확인되었으며, 종양의 진행과 예후에도 관련 있음이 보고되어 있다. 여러 선행 연구들을 통해 PDCD5가 종양발달 억제 유전자로서 중요한 역할을 한다고 보여주고 있기 때문에, 본 연구에서는 분자수준에서 PDCD5의 세포사멸 기능을 연구하고자, yeast-two hybrid를 통하여 PDCD5의 신규 결합단백질인 STK31 (serine/threonine kinase31)을 동정하였다.

Co-IP을 통하여 PDCD5와 STK31의 세포 내 결합을 확인하였고, STK31의 과발현 실험을 통해 PDCD5가 STK31 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 STK31 과발현에 따른 PDCD5의 안정화는 p53이 매개하는 세포사멸과 p53의 전사 활성을 증가시켰다.

shRNA를 이용하여 제작한 PDCD5의 저발현 세포에서 수행한 STK31 과발현 실험을 통하여 STK31에 의한 세포사멸 증가가 PDCD5 의존적이라는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과를 통하여 STK31-PDCD5-p53의 활성경로는 암세포 사멸에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

핵심 되는 말: pdcd5, p53, stk31, 세포고사, 세포사멸, serine/threonine kinase

상호작용체 분석을 통한 PDCD5 세포사멸 조절 기전 규명

<지도교수 **윤 호 근**>

연세대학교 대학원 의과학과

한 은 정

I. 서론

PDCD5 (Programmed cell death 5)는 세포사멸을 유발한다고 알려진 유전자로서, TFAR19 (TF-1 cell apoptosis-related gene 19)으로 처음 클로닝 되었다[1]. PDCD5가 세포사멸을 유발한다는 것은 이미 많은 보고들을 통해서 알려진 사실이다. 예를 들어, Hela 세포와 MGC-803 세포에 PDCD5를 과발현 시킨 후 GM-CSF 또는 serum-deprivation을 처리하여 확인 했을 때 세포사멸이 증가한 것을

확인하였고[2], 반대로 Hela 세포에 anti-PDCD5를 처리하거나 PDCD5에 대한 siRNA를 처리하였을 때 세포사멸이 억제 되는 것을 확인하였다[3]. PDCD5는 세포사멸이 유도될 때 안정화되어 세포질로부터 핵으로 빠르게 이동하여 세포의 사멸을 유도한다고 알려져 있다[4]. 또한 미토콘드리아 막으로 이동하여 BAX단백질을 조절하여 caspase-3활성을 증가시키며[5], TAJ/TROY에 의한 pro-apoptosis like cell death를 일으킨다고 보고되었다[6].

PDCD5의 mRNA와 단백질 양의 분석을 통해 성상세포종[7], 유방암[8], 위암[9], 간암[10], 만성골수성백혈병[11], 난소암[12], 폐암[13], 연골육종[14], 과 같은 다양한 종양에서 발현이 감소 된 것을 확인하였고, PDCD5를 재결합 단백질 또는 adenovirus를 통해 발현시켰을 때 화학치료에 민감성을 증가시킴이 보고되었다[15]. 이러한 보고들에 기반하여 감소된 PDCD5의 발현은 종양의 형성과 환자의 예후와 관여하며, PDCD5가 종양 발달 억제인자로서 암 치료의 중요한 표적 단백질이 될 수 있음을 보여준다.

최근 논문에 따르면, PDCD5가 p53과 직접적으로 결합하여 cell cycle arrest와 세포사멸을 유도하고[16], p53의 안정화에 중요한 역할을

하는 히스톤 아세틸화 효소인 Tip60와 결합하여 p21, bax와 같은 p53 표적유전자들의 활성화 및 세포사멸을 증가시킨다는 연구가 보고되었다[17]. 또한 종양억제자로 알려진 von-Hippel-Lindau가 PDCD5를 매개로 하여 Mdm2를 degradation 시켜 p53을 안정화 시킨다는 것이 알려졌다[18]. 이는 p53과의 상호작용을 통한 PDCD5의 활성기전 연구가 활발히 진행되고 있음을 보여주고 있다. 하지만 아직까지 세포사멸이 일어 날 때, PDCD5 자체의 조절에 관한 기전 연구는 미흡한 상황이다.

p53은 cell cycle, DNA repair, apoptosis, senescence, angiogenesis를 조절하는 전사인자로써 대표적인 종양억제인자로 알려져 있다[19]. 정상적인 상황에서는 Mdm2, Pirh2, COP1과 같은 E3 ligase와 결합하여 p53이 계속적으로 degradation 되지만, DNA damage와 같은 세포의 스트레스 상황이 주어지면 안정화되어 표적 유전자들을 조절하는 전사인자로서의 기능이 활성화 된다[20-22]. p53의 기능은 다른 단백질과의 상호작용과 phosphorylation, acetylation, ubiquitination과 같은 post-translational modification에 의해 조절된다고 알려져 있다[23].

이번 연구에서, PDCD5와 결합하는 신규 단백질을 동정하여 세포사멸이 일어날 때 PDCD5의 기능을 밝히고자 yeast-two hybrid screening을 수행하였다. 그 결과로, serine/threonine kinase 31(STK31)이 PDCD5와 결합하는 단백질로 동정되었다. STK31은 PDCD5의 단백질 양을 증가시키고, STK31에 의해 안정화된 PDCD5는 p53을 활성화 시켜 p53 표적 유전자들을 증가 시킴으로써 세포사멸을 유도함을 알 수 있었다. 결과적으로, 본 연구는 STK31에 의한 PDCD5의 안정화를 통해 p53을 매개로 한 세포사멸을 촉진시키는 PDCD5의 새로운 조절기전을 제시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양 및 시약

실험에 사용된 A549 세포와 HCT116 세포는 ATCC (American Type Culture Collection)에서 구입하여 사용하였다. 이들 세포는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에 10% FBS (Fetal bovine serum), 100 units/ml penicilin과 0.1 mg/ml streptomycine을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 공기조성에서 배양하였다. Etoposide는 (Calbiochem Darmstadt, Germany) 로부터 구입하였다. 과발현 실험은 polyexpress (Excel gene, Rockville, MD, USA)를 사용하여 수행하였다.

2. 플라스미드 (Plasmids)

PCR에 의해 증폭된 PDCD5, STK31 constructs를 pSG5-KF2M1-FLAG 또는 -HA plasmid vector에 cloning하였다(Sigma-Aldrich). 모든 DNA construct들은 DNA sequencing을 통해 확인하였다.

3. Yeast two-hybrid screening

Yeast two-hybrid screening이 Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) 제품의 protocol에 따라 사용되었다. PDCD5 (pGBKT7-PDCD5)를 yeast strain Y2H GOLD에 transformation 시켰다. Bait plasmid를 포함하고 있는 transformant를 인간 Ovary & Plate cDNA library와 교배 시킨다. Tryptophan, leucine, adonosine, histidine이 빠져있고, β-galactosidase와 Aureobasidin A selection이 포함된 최소배지에 positive clone을 성장시켜 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 DNA sequencing을 통하여 동정하였다.

4. Western blot analysis

세포들을 (1% triton X-100, 20 Tris-Cl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1.5% $MgCl_2$, 1 mM EDTA 1mM Na_2VO_4, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)와 protease inhibitor cocktail)로 구성된 완충용액으로 용해시켰다. 용해된 세포들은 4℃에서 13,000 rpm으로 30분간 원심 분리하였다. 상등액만 모아서 새로운 튜브에 옮겨 담고 peirce 660 nm protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) 를 이용하여 단백질 정량을 하였다. 같은 양의 단백질을 SDS (Sodium dodecyl sulfate)-polyacrylamide

gel에 전기영동 하였고, nitrocellulose transfer membranes (Whatman, Dassel, Germany) 에 transfer하였다. Membrane은 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich) 이 포함된 PBS와 5% nonfat Difco™ skim milk (BD Biosciences, Sparks, MD, USA)에 blocking하고, 1차 항체를 붙였다. 사용한 1차 항체는 PDCD5 (Rabbit) (Proteintech, Chicago, IL, USA), HA tag (Rabbit)(Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA), p53 (DO-1)(Mouse)(Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA), p21 (Rabbit)(Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA), STK31 (Rabbit)(Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA), Myc tag(Rabbit))(Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA), BAX (Rabbit)(AbCam), Flag tag(Mouse) (Sigma-Aldrich), β-actin(Mouse)(Sigma-Aldrich)이다. 결과 분석은 Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) 제품의 protocol에 따라 수행하였다.

5. 면역침강법 (Immunoprecipitation)

세포를 완충용액을 이용하여 용해시킨 뒤 4℃에서 13,000 rpm으로 30분간 원심 분리했다. 상등액을 peirce 660 nm protein assay kit

(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질 정량을 하였다. 그리고 500 ug으로 맞추어 G plus/protein A-agarose bead (Santa Cruze)와 항체를 넣고 4℃에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 4℃, 2000 rpm, 2분간 원심분리 후 IP washing buffer로 세 차례 washing 한 후 SDS sample buffer을 10 ul 넣고 5분 동안 끓인다. IP를 통해 얻은 단백질은 western blotting 분석을 수행한다.

6. Lentiviral shRNA를 이용한 knock down 세포주 제작

Stable knock down 세포주 확립을 위하여, target MISSON shRNA (Sigma-Aldrich)를 구입하였다. Lentiviral particles를 만들기 위하여 pLKO. 1-PURO PDCD5를 MDLg/pRRE, envelope pRSV-REV와 pMD2. G plasmid와 함께 Mirus2020 (Mirus, USA)을 사용하여 293FT 세포에 transduction 시킨 후, 48시간 동안 배양한 뒤 상등액을 걸러냈다. HCT116 또는 A549 세포에 lentivirus particle을 transfection시켰다. 이틀 동안 배양한 후에 1 ug/ml puromycine (Sigma-aldrich)을 처리하여 선별하였다. Lentivirus PURO shRNA를 대조군으로 사용하기 위하여 제작하였다.

7. RNA 분리와 cDNA 합성

RNA는 Trizol 시약 (TaKaRa BIO, Shiga, Japan)을 사용하여 분리하였다. 60 mm dish에 배양한 세포들을 Trizol 500 ul씩 넣고 1.5 ml tube에 모아 세포들이 시약에 잘 녹아 들도록 한 후 chloroform 100 ml 넣어 다시 vortexing하여 4℃에서 13,000 rpm으로 15분간 원심분리 한 후 상등액 200 ul를 취해 새 튜브에 옮기고 isopropanol 200 ul씩 넣어 inverting하여 실온에 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 다시 4℃에서 13,000 rpm으로 15분간 원심 분리 한 뒤 상층액은 버리고 RNA 침전물을 얻었다. 75% ethanol 1 ml넣어 4℃에서 13,000 rpm으로 5분간 원심 분리하는 과정으로 RNA 침전물을 세척하고 실온에서 건조시켰다. 건조된 침전물은 DEPC로 처리된 증류수 50 ul에 잘 녹인 후 농도를 측정하여 사용하였다.

cDNA를 합성하기 위하여 1.5 ug의 RNA를 10 pM oligo dT와 2.5 mM dNTP로 4 ul가 되도록 혼합하여 65℃에서 5분간 열처리 후 역전사효소와 반응 완충용액, 증류수의 부피가 10 ul가 되도록 첨가한 다음 42℃에서 60분 65℃에서 10분 동안 역전사 반응을 시켜 단일 가닥

의 cDNA를 합성하였다.

GAPDH: F-5’-GATGGCATGGACTGTGGTCA-3’

GAPDH: R-5’-GCAATGCCTCCTGCACCACC-3’

PDCD5: F-5’-AAAGCACAGGGAAGCAGAAA-3’

PDCD5: R-5’-TTGTCCATATCTTGCCATCTG-3’

8. Site-direct ed mutagenesis

다양한 mutants를 QuickChange kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 제작하였다. PCR cycling 은 18 cycle로 다음과 같은 조건에 따라 진행되었다. 94℃에서 30초 동안 denaturation 과정을 거치고, 55℃에서 1분 동안 annealing 과정을 거친 뒤 68℃ 에서 10분 동안 extension 과정을 거친다. 증폭된 PCR 산물에 Dpn1 (Agilent Technologies)를 처리한 뒤 37℃에서 한 시간 반 동안 incubation한 뒤 competent E.coli를 사용하여 transformation하였다. 모든 construct는 DNA sequencing을 통해 확인하였다.

9. Colony formation assay

1000개의 세포를 60 mm culture dish에 분주하고 DMEM 배지로 10일 동안 배양하였다. Colony를 PBS로 washing한 뒤 0.5% crystal violet을 혼합하여 염색하였다. colony들의 수를 세어 수치화 하였다.

10. 통계분석

T-test를 사용하여 실험의 통계적 유의성을 확인하였다. 두 그룹을 비교하여 standard deviation 으로 나타냈다. P values 값이 0.05 이하를 갖을 때 유의하다고 판단하였다.

III. 결과

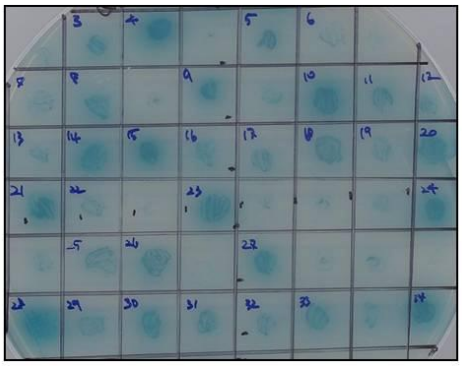
1. Yeast-two hybrid를 통한 PDCD5의 신규 결합 단백질 동정

세포사멸 기전 시 PDCD5의 조절네트워크를 규명하고자, yeast-two hybrid를 수행한 후 PDCD5의 결합 단백질을 동정하였다. pGBKT7 vector에 cloning 된 PDCD5를 bait로 사용하고 (그림 1, 가), 인간 ovary cDNA library를 사용하여 교배시킨 후 sequence 분석을 통해 후보 유전자들이 동정되었다 (표 1). PDCD5와 후보 유전자들 사이의 세포 내 결합을 확인하고자, HCT116 세포에 PDCD5와 동정된 유전자들을 co-transfection 시켜 면역침강법을 수행하였다 (그림 1, 나). 그 결과 Pim2, STK31, TES, MRPL3와의 결합을 확인하였고, 반복 된 실험을 통해 STK31과 PDCD5의 강한 상호작용을 관찰함으로써 최종적으로 STK31을 선택하여 다음 실험을 진행하였다.

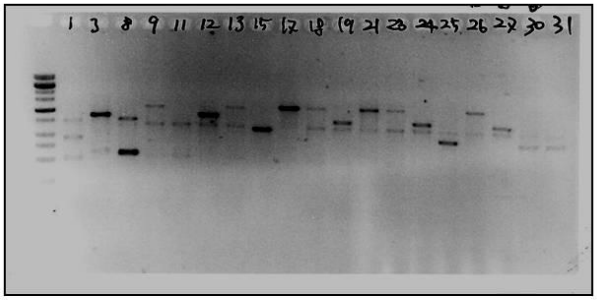
표 1. 동정된 PDCD5 결합 유전자

동정된 유전자 목록	참고
Left-light determination factor2 (LEFTY2)	35
Pim-2 oncogene (PIM2)	36
Pyruvate degydrogenase kinase, isoenzyme1 (PDK1)	37
Proteasome maturation protein (POMP)	38
Extracellular link domain containing1 (XLKD1)	39
Galectoside-binding, soluble (LGALS1)	40
OUT domain-containing5 (OTUD5)	41
Growth independent 1 transcription repressor (GFI1)	42
Mitochondrial ribosomal protein L3 (MRPL3)	43
Serine/threonine kinase 31 (STK31)	44
ATPase NA+K+ transporting beta1, polypeptide (ATP1B1)	45
Testis drived transcript (3LIM domain) (TES)	46

가



SD-Ade/His/Leu/Trp/X-gal/Aureobasidin A selection



cDNA library PCR (Prey)

Sequencing

Sequencing analysis(Pubmed)

나

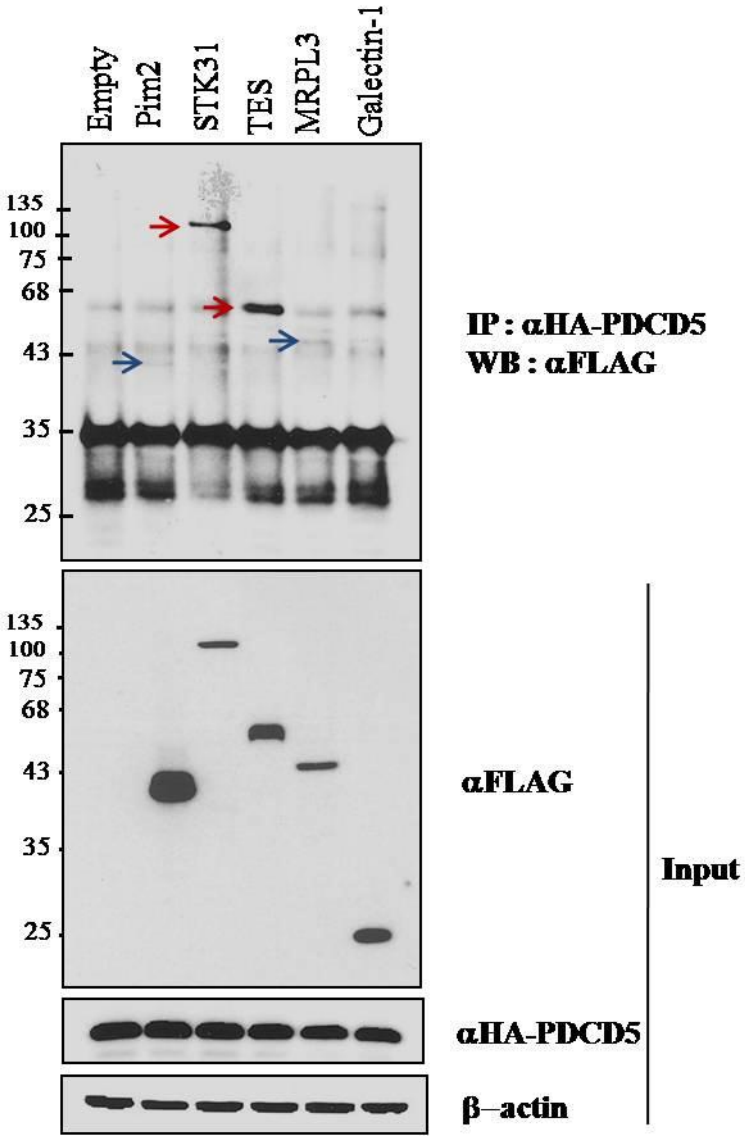

Empty
Pim2
STK31
TES
MRPL3
Galectin-1
135
100
75
68
43
35
25
IP : αHA-PDCD5
WB : αFLAG
αFLAG
αHA-PDCD5
β–actin
Input

그림 1. PDCD5 결합 단백질 선별.

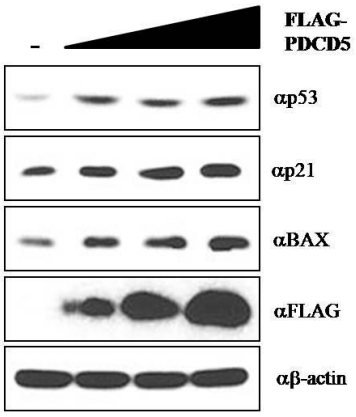
가, Yeast-two hybrid를 인간 ovary cDNA library를 사용하여 수행하였다. pGBKT7-PDCD5를 Gal4 DNA-binding domain을 갖고있는 Y2H Gold yeast strain에 transformaiton시켰다. Bait과 library 융합 단백질이 결합할 경우 파란색 colony가 선택배지 plate에 보인다. 각각의 colony를 배양하여 DNA를 추출하고, PCR로 증폭한 뒤 sequencing을 수행하였다. 나, Flag-tagging이 달린 후보 단백질들과 HA-PDCD5를 HCT116 세포에 co-transfection시켜 HA 항체로 면역침강법을 수행한 뒤 Flag 항체로 immunoblotting 하여 확인하였다. 대조군으로는 같은 단백질 sample에서 immunoblotting을 수행하여 β-actin의 단백질 양을 확인하였다.

2. STK31 과발현에 의한 p53 활성화 유도

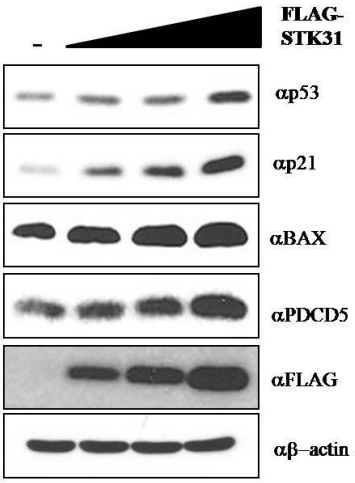
PDCD5는 p53과의 직접적인 결합을 통해 p53을 안정화 시킴으로서 세포사멸을 유도한다는 것이 이미 알려져 있다. 따라서 PDCD5의 발현량을 증가시켜 p53과 표적 유전자인 p21, bax의 단백질 양을 확인한 결과 p53을 매개로 한 세포사멸 경로가 활성화 되는 것을 확인하였다 (그림2, 가). PDCD5와 결합하는 STK31에 의한 p53 경로 활성의 변화를 관찰하기 위하여, STK31을 HCT116 세포에 농도별로 과발현 시켜 immunoblot 분석을 수행하였다. 그 결과 STK31은 p53과 표적단백질인 p21, bax의 단백질 양을 농도 의존적으로 증가시켰다. 흥미롭게도, STK31의 과발현은 PDCD5의 단백질 양 자체에도 농도 의존적으로 증가시킴을 확인하였다 (그림2, 나). 앞선 실험 결과를 통해 PDCD5와 STK31 모두 p53 경로를 활성화 시킨다는 것을 확인하였다. 이러한 영향은 PDCD5와 STK31를 동시에 과발현 시켜 확인했을 때 더욱 증가됨을 확인하였다 (그림2, 다). 이를 통해 STK31은 PDCD5와 함께 p53 경로 활성화에 영향을 미치는 양성조절자 역할을 할 것이라고 생각하였다. PDCD5의 증가가 전사수준에서 조절되는 것인지

번역수준에서 조절되는 것인지 알아보고자 Flag-STK31을 농도별로 과발현 시켜 PDCD5의 mRNA level을 reverse transcription PCR (RT-PCR)을 통해 확인하였다. 그 결과 PDCD5의 mRNA의 변화는 확인 할 수 없었다. 이와 같은 결과들로부터 STK31은 PDCD5의 단백질을 안정화 시킴으로써 p53을 매개로한 세포사멸 경로를 활성화 시켜 표적 유전자들인 p53, p21, bax의 단백질 level을 향상시킨다는 것을 알 수 있었다.

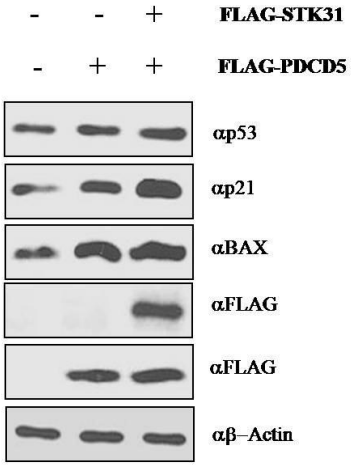
가


-
FLAG-
PDCD5
αp53
αp21
αBAX
αFLAG
αβ-actin

나


-
FLAG-
STK31
αp53
αp21
αBAX
αPDCD5
αFLAG
αβ–actin

다


- - + FLAG-STK31
- + + FLAG-PDCD5
αp53
αp21
αBAX
αFLAG
αFLAG
αβ–Actin

라

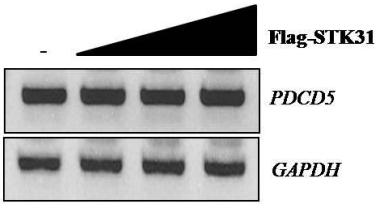

RT-PCR
-
Flag-STK31
PDCD5
GAPDH

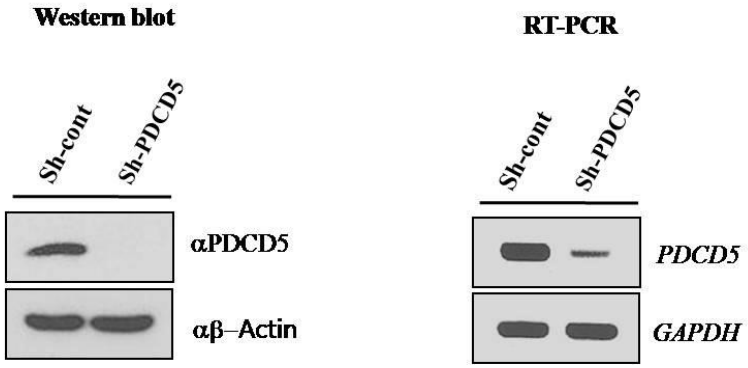
그림 2. STK31의 과발현을 통한 p53 경로의 활성화.

가, Flag-PDCD5를 HCT116 세포에 농도별로 과발현 시켜 36시간 동안 배양한 뒤 단백질을 추출하여 immunoblot으로 확인하였다. 대조군으로 β-actin의 단백질 양을 확인하였다. 나, Flag-STK31을 HCT116세포에 농도별로 과발현 시켜 36 시간동안 배양한 뒤 단백질을 추출하여 immunoblot으로 확인하였다. 대조군으로 β-actin의 단백질 양을 확인하였다. 다, Flag-STK31과 Flag-PDCD5를 co-transfection시켜 36시간 동안 배양한 뒤 단백질을 추출하여 immunoblot으로 확인하였다. 대조군으로 β-actin의 단백질 양을 확인하였다. 라, Flag-STK31을 농도별로 과발현 시켜 36시간 동안 배양한 뒤 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 뒤 RT-PCR을 수행하여 PDCD5의 유전자 양을 측정하였다. 대조군으로는 같은 RNA sample에서 RT-PCR을 수행하여 GAPDH의 유전자 양을 확인하였다.

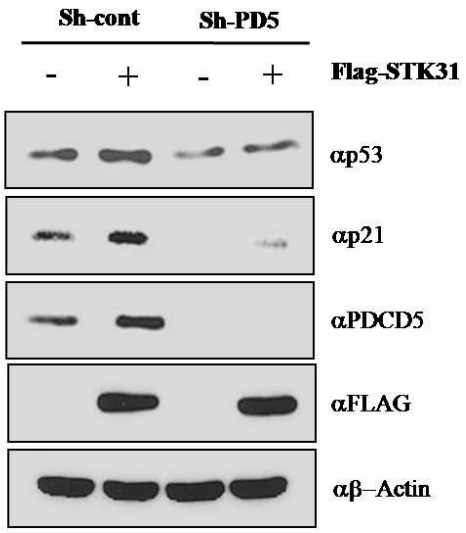
3. PDCD5 의존적 STK31의 p53 활성화 유도

STK31에 의한 p53 경로의 활성화가 PDCD5를 통한 작용인지 확인하기 위하여 PDCD5 knockdown 세포주를 제작하였다. Western blot과 RT-PCR을 수행하여 PDCD5의 knockdown을 확인하고 (그림3, 가), shPDCD5와 shControl- A549 세포주에 STK31을 과 발현 시켰다. 그 결과 PDCD5 knockdown 세포에서 control 세포에 비하여 p53과 target 단백질의 현저하게 낮은 단백질 양을 확인 하였다 (그림3, 나). 같은 방법으로 SKT31을 농도별로 증가시켜 확인하였을 때도 control세포에 비하여 PDCD5 knockdown 세포에서 증가되지 못함을 확인하였다. 이러한 결과를 통하여 STK31이 PDCD5를 매개로 하여 p53 활성경로를 촉진시키는 것을 알 수 있었다.

가


Western blot
Sh-cont
Sh-PDCD5
αPDCD5
αβ–Actin
RT-PCR
Sh-cont
Sh-PDCD5
PDCD5
GAPDH

나


Sh-cont
Sh-PD5
-
+
-
+
Flag-STK31
αp53
αp21
αPDCD5
αFLAG
αβ–Actin

다

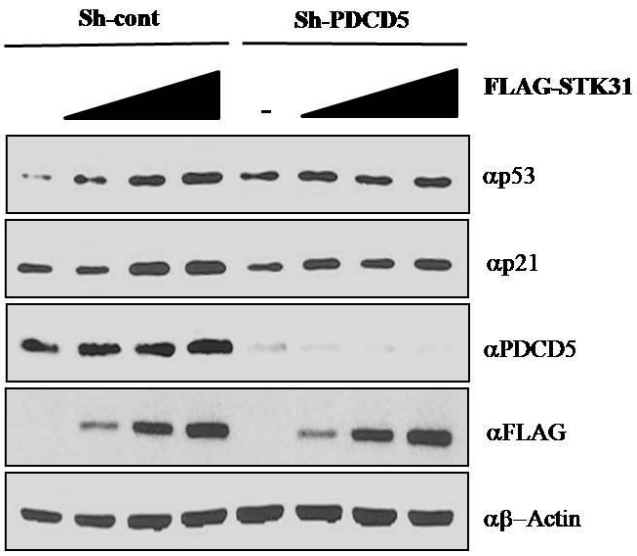

Sh-cont
Sh-PDCD5
-
FLAG-STK31
αp53
αp21
αPDCD5
αFLAG
αβ–Actin

그림 3. STK31의 과발현은 PDCD5를 경유하여 p53 경로를 활성화.

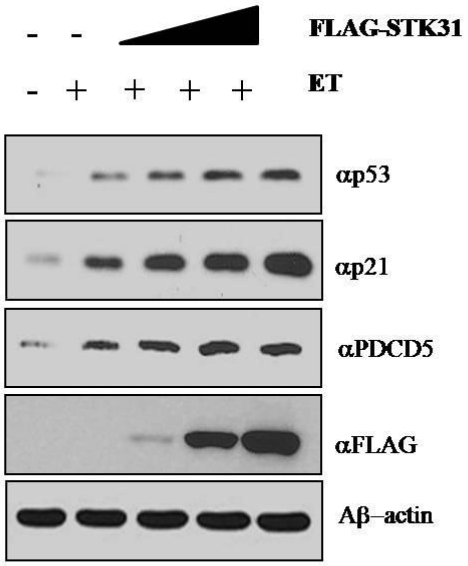
가. 왼쪽 그림은 shcontrol-A549와 shPDCD5-A549 세포를 western blot을 한 뒤 PDCD5 항체를 이용하여 PDCD5의 knockdown을 확인한 것이고, 오른쪽 그림은 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 뒤 RT-PCR을 수행하여 PDCD5의 유전자 양을 측정하였다. 대조군으로는 같은 RNA sample에서 RT-PCR을 수행하여 GAPDH의 유전자 양을 확인하였다. 나. PDCD5 knockdown 세포를 사용하여 Flag-STK31을 과발현 시켜 36시간 후에 immunoblot을 수행하여 단백질 양을 확인하였다. 대조군으로는 같은 단백질 sample에서 immunoblotting을 수행하여 β-actin의 단백질 양을 확인하였다. 다. PDCD5 knockdown 세포를 사용하여 Flag-STK31을 농도별로 처리한 뒤 immunoblot을 수행하여 단백질 양을 확인하였다. 대조군으로는 같은 단백질 sample에서 immunoblotting을 수행하여 β -actin의 단백질 양을 확인하였다.

4. PDCD5를 안정화를 통한 STK31의 p53-의존적 세포사멸 신호기전 촉진

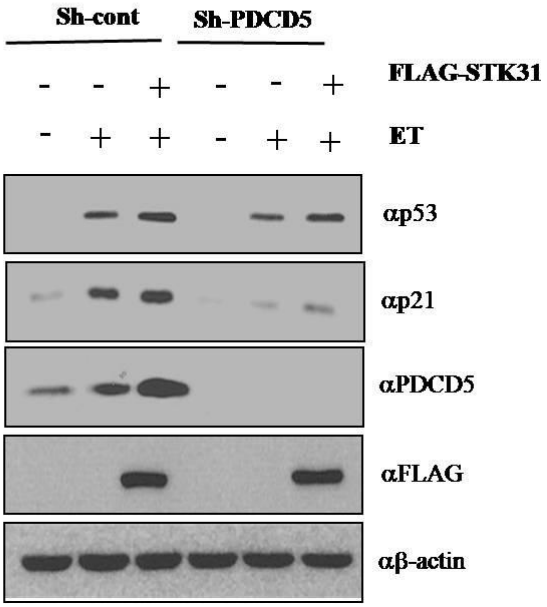
PDCD5의 안정화는 DNA damage와 같은 스트레스 상황에서 유도된다고 알려져 있으므로, 세포사멸을 유도할 수 있는 cytotoxic agent인 etoposide를 사용하여 실험을 수행하였다. 앞선 실험 결과에서 STK31의 과발현은 p53을 활성경로를 촉진시켰기 때문에 genotoxic stress 상황에서의 변화를 관찰하고자 HCT116 세포에 Flag-STK31을 농도별로 과발현 시킨 뒤 etoposide를 처리하여 확인하였다. 그 결과 p53과 target 단백질인 p21이 농도별로 증가하였고, PDCD5의 단백질 양 또한 농도별로 증가하였다 (그림4, 가). STK31의 과발현을 통한 p53 경로의 신호전달 증가가 PDCD5를 매개로 한 것인지 확인하고자 PDCD5의 knockdown 세포주에서 확인하였다. STK31의 과발현 시킨 뒤 etoposide를 처리하였을 때 p53 경로의 활성화가 control 세포에 비하여 PDCD5 knockdown 세포에서 낮은 증가를 보였다 (그림4, 나). p53 신호전달 기전 활성화가 PDCD5와 STK31의 결합과 관련이 있는지 확인하고자 PDCD5와 STK31을 동시에 과발현 시켜 etoposide를 처리하고 면역침강법을

수행하여 결합의 변화를 확인한 결과 etoposide를 처리하였을 때 PDCD5와 STK31의 결합이 증가하였다. 이 결과를 통하여 DNA damage 상황에서 STK31과 PDCD5의 결합이 증가되어 p53을 매개로 한 세포사멸 신호 기전을 더욱 활성화 시킨다는 것을 알 수 있었다 (그림4, 다).

가


- -
FLAG-STK31
- + + + +
ET
αp53
αp21
αPDCD5
αFLAG
Aβ–actin

나


Sh-cont
Sh-PDCD5
- - + - - +
FLAG-STK31
- + + - + +
ET
αp53
αp21
αPDCD5
αFLAG
αβ-actin

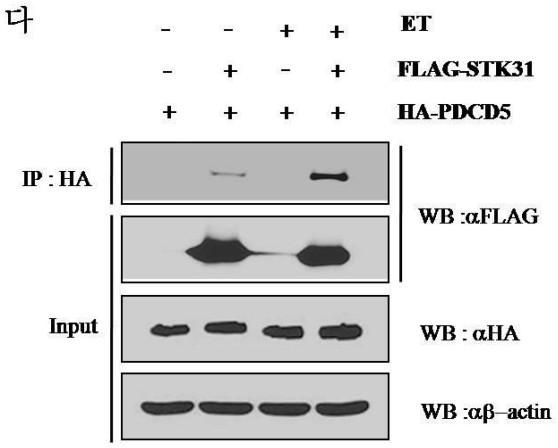


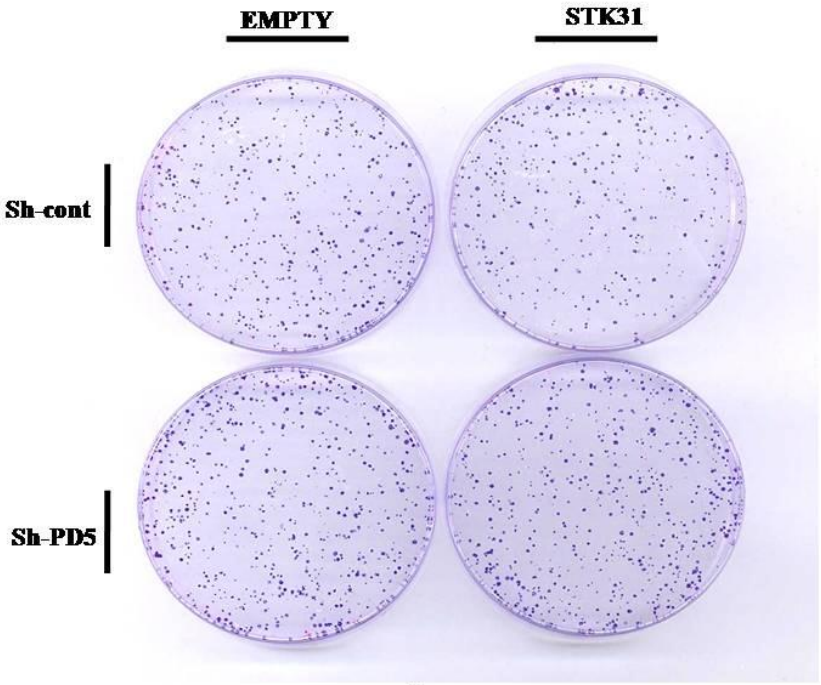
그림 4. STK31은 PDCD5를 매개로 하여 etoposide에 의한 p53 신호전달 활성 조절

가, HCT116 세포에 Flag-STK31을 농도별로 과발현 시켜 36시간동안 배양한 뒤 25 mM의 etoposide를 4시간 처리하여 immunoblotting 분석하였다. 나, PDCD5 knockdown A549 세포주와 control A549 세포주를 이용하여 Flag-STK31을 과발현 시키고 25 mM etoposide를 처리하여 immunobloting으로 확인하였다. 다, HCT116 세포에 HA-PDCD5와 Flag-STK31을 co-transfection 시켜 50 mM의 etoposide를 처리한 뒤 4시간 뒤에 harvest하였다. HA로 IP 하여 Flag으로 immunobloting을 수행하여 확인하였다. 대조군으로 β-actin을 사용하였다.

5. PDCD5 의존적 STK31의 세포고사 촉진

앞선 결과를 통해 STK31의 과발현이 PDCD5의 단백질 양을 증가시키고, 안정화된 PDCD5로 인한 p53 경로의 활성화를 확인하였다. 최종적으로 PDCD5의 생물학적 기능을 확인하기 위해 Colony formation assay를 수행하여 세포의 증식을 측정하였다. HCT116 Control세포와 shPDCD5 세포에 STK31을 과발현 시켰을 때 Control 세포의 증식이 다소 감소하였지만, PDCD5의 knockdown 세포에서는 증식이 전혀 감소하지 않았다. 이 결과를 통해 STK31이 PDCD5 의존적으로 세포고사를 촉진시키는 것을 증명하였다.

가


EMPTY
STK31
Sh-cont
Sh-PD5

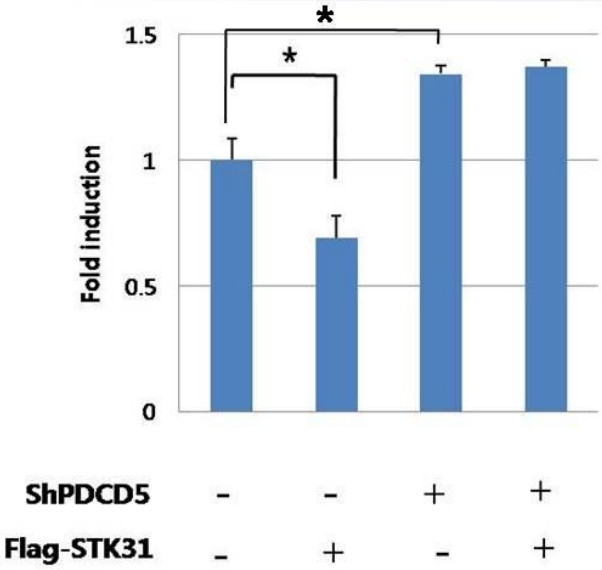

*
*
1.5
1
0.5
0
Fold induction
ShPDCD5 - - + +
Flag-STK31 - + - +

그림 5. 세포증식에서 STK31의 영향.

가. Flag-STK31을 과발현 시킨 shControl과 shPDCD5-HCT116세포를 $1X10^3$ 으로 심은 후 10일 동안 배양한 다음 0.5% crystal violet을 이용하여 염색하고 colony개수를 측정하였다. Error bars, SD (n=3), *P values<0.05

IV. 고찰

세포고사는 비정상정인 세포 또는 손상된 세포를 선택적으로 제거함으로써 세포의 수를 유지하며 조직의 항상성을 유지시켜 준다 [24]. 정상적인 경우 세포사멸을 유도하는 유전자들과 세포의 생존을 유도하는 유전자들간의 균형을 유지하지만 이러한 균형이 깨지게 되면 암, 신경퇴화, 면역결핍과 같은 질환이 발생할 수 있다. 일반적으로 암세포의 경우에는 이러한 균형이 비정상적으로 조절되어 생존을 유도하는 유전자들이 증가되어 있고, 세포고사를 유도하는 유전자들이 변이가 있거나 감소되어 있는 것이 발견된다 [25]. 대표적인 종양억제 인자로 알려진 p53은 DNA damage와 같은 여러 스트레스 상황에서 세포고사를 유도하지만 [26], 다수의 종양에서 p53의 변이가 관찰되고 [27], 이는 종양의 진행과 전이를 유도한다는 것이 잘 알려져 있다 [28]. 따라서 세포고사 관련 유전자들을 통한 정교한 세포사멸의 조절은 종양의 발생과 치료에 있어서 중요하다는 것을 알 수 있다.

세포고사를 유도한다고 알려진 또 다른 유전자인 PDCD5는 세포고사가 일어나는 과정에서 안정화되어, 세포질에서 핵으로

빠르게 이동한다[4]. 이미 여러 암종에서 PDCD5의 낮은 발현이 확인되었고, PDCD5의 낮은 발현은 종양의 형성과 예후와 관련이 있음이 보고되어 되었다[7-14]. 또한 PDCD5는 일반적으로 쓰이는 항암제인 cisplatin에 유도되는 세포고사의 민감도를 높여준다는 여러 보고를 볼 때[29-31], PDCD5가 종양발달 억제자로서 중요한 역할을 할 것을 알 수 있다. 하지만, PDCD5의 중요도에 비하여 지금까지 밝혀진 PDCD5의 조절기전은 PDCD5가 genotoxic stress를 받았을 때 세포질에서 미토콘드리아 막으로 이동하여 BAX 단백질의 조절을 통한 세포고사를 유도한다는 것과[5], p53과 직접적으로 결합하여 cell cycle arrest와 세포고사를 유도 한다는 것[16], p53 안정화에 중요한 역할을 하는 아세틸화 효소인 tip60와 결합하여 apoptosis유도한 다는 것[17] 외에 PDCD5 자체의 조절기전 연구에 대해서는 보고된 것이 없다.

본 연구에서는 Yeast-two hybrid를 통하여 PDCD5의 신규 결합 단백질인 STK31을 동정하였고, co-immunoprecipitation를 통하여 세포 내 결합을 확인하였다. 다양한 실험을 통해 STK31은 PDCD5를 안정화 시키며 세포사멸을 촉진하는 것을 확인할 수 있었다.

먼저 PDCD5는 p53과 결합하여 p53 경로에 양성조절자 역할을 한다고 알려져 있기 때문에, PDCD5를 농도 별로 과발현 시켰을 때 p53과 타겟 유전자들이 농도 별로 증가한 것을 확인하였고, STK31를 과 발현 시켰을 때에도 p53 경로를 활성화 시켰기 때문에 STK31과 PDCD5를 모두 과 발현 시켜 p53 활성화에 synergistic 영향을 확인하였다. PDCD5의 mRNA를 측정한 결과 변화가 없었기 때문에 STK31과 PDCD5의 상호작용은 번역수준에서 조절되는 것을 알 수 있었다. PDCD5가 저발현 되어있는 knockdown 세포주를 사용한 실험에서 STK31 과발현에 의한 p53 경로활성의 감소를 확인하여, STK31이 PDCD5를 매개로 한 세포사멸을 유발할 것이라고 생각하였다. PDCD5는 DAN damage와 같은 자극이 왔을 때 세포고사를 유도한다고 알려져 있기 때문에, 세포고사를 유발할 수 있는 cytotoxic reagent인 etoposide를 사용한 실험에서 PDCD5를 매개로 STK31이 p53 경로를 활성화 시키는 것을 확인하였다. Etoposide를 처리하였을 때 PDCD5와 STK31의 결합이 증가하였기 때문에 p53 신호전달 경로 활성에 PDCD5와 STK31의 결합이 중요하다는 것을 확인하였다.

최종적으로 colony formation assay를 통한 세포의 증식을 확인하였을 때 STK31이 과발현 된 세포의 증식이 감소를 확인한 반면 PDCD5의 저발현 세포 주에서는 감소가 보이지 않았다.

본 연구에서 STK31은 PDCD5-p53-세포고사 경로의 양성조절자로서 기능을 하며, STK31, PDCD5, p53이 ternary 복합체를 형성하고, interregulatory network의 가능성을 제시하였다. 결과적으로, STK31-PDCD5-p53의 새로운 molecular pathway가 암 세포 사멸의 치료적 타겟이 될 수 있을 것이라고 생각한다. 더 나아가 STK31이 어떠한 기전으로 PDCD5의 stability를 조절하는지의 연구가 필요하다.

Serine-threonine kinase31(STK31)은 tudor domain과 kinase domain이 보존되어 있어 다양한 기능을 할 것으로 예상되지만 아직까지 암세포에서 STK31의 기능은 불분명하다[32]. 최근 STK31이 colon cancer 세포의 undifferentiated state를 조절한다는 보고가 있었고[33], 또한 STK31의 과 발현은 암세포의 전이와 침윤이 가속화 시키고 STK31을 knockdown시켰을 때 apoptosis가 증가된다는 보고가 있었다[34].

비록 이전의 보고들이 STK31가 종양형성에 기여한다는 내용이지만, 본 연구에서 PDCD5 결합단백질로서 p53 signaling pathway를 통한 세포사멸의 조절을 밝혀 STK31의 pro-apoptosis 조절자로서 기능을 증명하였고, STK31이 p53이 정상적인 상황에서 PDCD5를 경유한 활성화는, 최종적으로 세포사멸을 유도함을 증명하였다.

V. 결론

p53을 매개로 한 암 세포 사멸에서, PDCD5의 기전을 연구하기 위해 PDCD5와 결합하는 새로운 단백질인 STK31을 yeast-two hybrid를 통해 발굴하였다. STK31은 PDCD5의 단백질 양을 증가시키며, STK31에 의한 PDCD5 단백질의 양적 증가는 p53을 활성화 시켜 p53을 매개로 하는 세포고사를 촉진시킨다. 이번 연구를 통해 밝혀진 STK31-PDCD5-p53의 분자네트워크는 암세포 사멸에 있어서 중요한 역할을 할 것이라고 생각된다.

참고문헌

1. Liu H, Wang Y, Zhang Y. TFAR19, a novel apoptosisrelated 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; 254:203–10.
2. Uchida M, Watanabe T , Kunitama M, Mori M, Kikuchi S, . Yoshida K, et al. Erythropoietin Overcomes Imatinib-Induced Apoptosis and Induces Erythroid Differentiation in TF-1/bcr-abl Cells3. EPO. Stem Cells 2004;22:609–16
3. Min R, Yingyu C, Yingmei Z, Dalong M. Transfer of anti-TFAR19 monoclonal antibody into HeLa cells by in situ electroporation can inhibit the apoptosis. Gene 329 (2004); 39–49
4. Chen Y, Sun R, Han W, Zhang Y, Song Q. Nuclear translocation of PDCD5 (TFAR19): an early signal for apoptosis? FEBS Lett 2001;509(2):191-6

5. 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.

6. Wang Y, Li X, Wang L, Ding P, Zhang Y, Han W, et al. An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression. J Cell Sci 2004;117:1522-32

7. Li H, Wang Q, Gao F. Reduced expression of PDCD5 is associated with high-grade astrocytic gliomas. Oncol Rep2008;20:573–79.

8. Sudob J, Reith A, Lingjaerde OC. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. N Engl J Med 2001;344(26):2029

9. Yang YH, Zhao M, Li WM. Expression of programmed cell death 5 gene involves in regulation of apoptosis in gastric tumor cells. Apoptosis2006;11:993– 1001.

10. Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ, Zhu ZD, Yan Q, et al. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98(26): 15089-94

11. Runa GR, Qin YZ, Chen SS, Li JL, Ma X, Chang Y, et al. Abnormal expression of the programmed cell death 5 gene in acute and chronic myeloid leukemia. Leuk Res 2006;30(9):1159-65

12. Zhang X, Wang X, Song X, Wei Z, Zhou C, Zhu F, et al. Clinical and prognostic significance of lost or decreased PDCD5 expression in human epithelial ovarian carcinomas. Oncol Rep 2001;25(2):353-8

13. Spinola M, Meyer P, Kammerer S, Falvella FS, Boettger MB, Hoyal CR, et al. Association of the PDCD5 Locus With Lung Cancer Risk and Prognosis in Smokers. J Clin Oncol 2006;24(11):1672-8

14. 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. Journal of Surgical Oncology 2010;102:838–43

15. Chen C, Zhou H, Xu L, Xu D, Wang Y, Zhang Y, et al. Recombinant human PDCD5 sensitizes chondrosarcomas to cisplatin chemotherapy in vitro and in vivo. Apoptosis (2010) ;15:805–13

16. Xu L , Hu J , Zhao Y, Hu J ,Xiao J. PDCD5 interacts with p53 and functions as a positive regulatorin the p53 pathway. Apoptosis (2012) ;17:1235-45

17. 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;11:345-54

18. PB Essers, TD Klasson, TC Pereboom, DA Mans, M Nicastro. The von Hippel–Lindau tumor suppressor regulates programmed cell death 5-mediated degradation of Mdm2. Oncogene (2014);1–9

19. Laptenko O, Preices C. Transcriptional regulational regulation by p53 : one protein, many possibilities. Cell Death Differ 2006;13:951-61

20. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. Nature 1997; 387:299-303

21. Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, et al. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. Cell 2003;112:779-91

22. Dornan D, Wertz I, Shinmizu H, Arnott D, Frantz GD. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. Nature 2004;429:86-92

23. Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. Nat Rev cancer 2004 4:793-805

24. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2001;41:367–401

25. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. Science. 1998;281(5381):1317-22.

26. Brady CA, Jiang D, Mello SS, Johnson TM, Jarvis LA, Kozak MM, et al. Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. Cell 2001;145:571-83

27. allace-Brodeur RR, Lowe SW. Clinical implications of p53 mutations. Cell Mol Life Sci 1999; 55(1):64-75

28. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. Carcinogenesis. 2000 Mar;21(3):485-95

29. Li H, Zhang X, Song X, Zhu F, Wang Q, Guo C, et al. PDCD5 promotes cisplatin-induced apoptosis of glioma cells via activating mitochondrial apoptotic pathway. Cancer Biol Ther 2012 Jul; 13(9):822-30

30. Hui-Yu Xu, Zhi-Wei Chen , Yuan-Ming Pan, Li Fan, Jie Guan, You-Yong Lu. Transfection of PDCD5 Effect on the Biological Behavior of Tumor Cells and Sensitized Gastric Cancer Cells to Cisplatin-Induced Apoptosis. Dig Dis Sci (2012) 57:1847–56

31. Yin A, Jiang Y, Zhang X, Zhao J, Luo H. Transfection of PDCD5 sensitizes colorectal cancer cells to cisplatin-induced apoptosis in vitro and in vivo. European Journal of Pharmacology 649 (2010): 120–6

32. Sabeur K, Barry A. Ball. Characterization of a Novel, Testis-Specific Equine Serine/Threonine Kinase. Molecular production and development 2008; 75:867–73

33 Fok KL, Chung CM, Yi SO, Jiang X, Sun X, Chen H, et al. STK31 maintains the undifferentiated state of colon cancer cells. Carcinogenesis , 2012: 2044–53

34. Pao-Lin Kuo, Yung-Ling Huang, Christine Chin-Jung Hsieh. STK31 Is a Cell-Cycle Regulated Protein That Contributes to the Tumorigenicity of Epithelial Cancer Cells. PLoS ONE 9(3): e93303.

35. C Cavallari, V Fonsato, MB Herrera, S Bruno, C Tetta, G Camussi. Role of Lefty in the anti tumor activity of human adult liver stem cells. Oncogene (2013) 32, 819 – 26.

36. Baytel D, Shalom S, Madgar I, Weissenberg R, Don J. The human Pim-2 proto-oncogene and its testicular expression. Biochimica et Biophysica Acta 1442 (1998) 274^85

37. Koukourakis M, Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter,K, Harris AL. Pyruvate Dehydrogenase and Pyruvate Dehydrogenase Kinase Expression in Non Small Cell Lung Cancer and Tumor-Associated Stroma. Neoplasia. Jan 2005; 7(1): 1–6.

38. Rodriguez V, Hart JS, Freireich EJ, Bodey GP, McCredie KB, Whitecar JP, et al. Pomp combination chemotherapy of adult acute leukemia. Cancer. 1973 Jul;32(1):69-75.

39. Prevo R, Banerji S, Ferguson DJ, Clasper S, Jackson DG.. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. J Biol Chem. 2001 Jun 1;276(22):19420-30.

40. Gillenwater A, Xu XC, Estrov Y, Peter G. Sacks, Lotan D, et al. Modulation of galectin-1 content in human head and neck squamous carcinoma cells by sodium butyrate. Int. J. Cancer: 75, 217–24 (1998)

41. Kayagaki N, Phung Q, Chan S, Chaudhari R, Quan C, O'Rourke KM, et al. DUBA : a deubiquitinase that regulates type I interferon production. Science 2007;318(5856):1628-32

42. Grimes L, Gilks B, Tung O. Chan, Porter S, Philip N, et al. The Gfi-1 protooncoprotein represses Bax expression and inhibits T-cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Dec 10;93(25):14569-73.

43. Galmiche L, Serre V, Beinat M, Assouline Z, Lebre AS, Chretien D, et al. Exome Sequencing Identifies MRPL3 Mutation in Mitochondrial Cardiomyopathy. HumMutat 32:1225–31, 2011.

44. Yokoe T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Ohmachi T, Kusunoki M, et al. Efficient Identification of a Novel Cancer/Testis Antigen for

Immunotheraphy Using Three-Step Microarray Analysis. Cancer Res 2008;68:1074-82.

45. Shull MM, Pugh DG, Lane LK, Lingrel JB. MspI and PvuII polymorphisms in the Na,K-ATPase beta subunit gene ATP1B1. Nucleic Acids Res. 1990 Feb 25;18(4):1087.

46. Sarti M, Sevignani C, George A. Calin, et al. Adenoviral Transduction of TESTIN Gene into Breast and Uterine Cancer Cell Lines Promotes Apoptosis and Tumor Reduction In vivo. Clin Cancer Res. 2005 Jan 15;11(2 Pt 1):806-13.

Abstract (in English)

Unraveling the apoptotic role of PDCD5 by analysis of interactome

Eun-Jeong Han

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Ho-Geun Yoon)

Programmed cell death 5 (PDCD5) plays a significant role in cellular apoptosis. When Apoptosis in induced, PDCD5 is translocated from the cytoplasm to the nucleus. Decreased PDCD5 expression has beed reported in various human tumor, such as astrocytic glioma, breast cancer, chronic myelogemous leukemia, gastric cancer, hepatocellular carcinoma, and it is associated with tumor formation and malignat progression. Previous studies showed that PDCD5 plays significant role as a tumor suppressor However, the molecular mechanism of PDCD5 is still unclear.

In this study, PDCD5-binding proteins were screened using yeast two hybrid assay to examine the function of PDCD5 in the regulation of cell death, and finally STK31 (serine/threonine kinase31) was identified as a novel protein that interacts with PDCD5.

The interaction between PDCD5 and STK31 was confirmd by immunoprecipitation in vivo cell system. Increased STK31 expression upregulate level of PDCD5. Upregulation of PDCD5 expression by STK31 stabilizes p53 mediated apoptosis and increase activation of p53 transcription. In PDCD5 knocking-down cells, p53 and expression of target proteins were not changed even with overexpression of STK31. Therefore, colony formation assay showed that overexpression of STK31 could not affect cell proliferation in PDCD5 knocking-down cells. These results suggest that STK31 promotes p53 pathway via PDCD5. This novel STK31-PDCD5-p53 signaling pathway plays significant role in apoptotic cell death in cancer cells.

Key words: pdcd5, stk31, p53, apoptosis, cell death, serine/threonine kinase