발생과 생식 제 12권 제 3호, 297~303 (2008)
Dev. Reprod. Vol. 12, No. 3, 297~303 (2008)

세포사멸을 유도하는 새로운 단백질인 MCL-1ES BH3M의 클로닝 및 기능연구

김재홍[1] · 박미라[1] · 하혜정[2] · 이강석[2,†] · 배지현[1,†]

[1]포천중문의과대학교 생명과학전문대학원, [2]중앙대학교 생명과학부

Cloning and Functional Studies of Pro-Apoptotic MCL-1ES BH3M

Jae-Hong Kim[1], Mira Park[1], Hye-Jeong Ha[2], Kangseok Lee[2,†] and Jeehyeon Bae[1,†]

[1]Graduate School of Life Science and Biotechnology, Pochon CHA University School of Medicine, Seongnam 463-836, Korea

[2]Dept. of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

ABSTRACT : BCL-2 family members are essential protein for the regulation of cell death and survival consisting both anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins. In the present study, we designed and cloned a new apoptotic molecule MCL-1ES BH3M coding a modified protein of MCL-1L. Compared to MCL-1L protein, MCL-1ES BH3M lacks the PEST motifs known to be involved in MCL-1L protein degradation and has seven mutated residues in BH3 domain critical for dimerization with BCL-2 family members. Overexpression of MCL-1ES BH3M induced death of different cells, and its cell killing effect was not blocked by forced expression of the pro-survival protein MCL-1L. Expression of MCL-1ES BH3M protein led to the activation of caspase 9 and caspase 3, suggesting apoptotic cell death, and confocal fluorescent microscopic analyses showed that MCL-1ES BH3M was partially localized in mitochondria. In conclusion, we reported a new apoptotic molecule and determined its cell death activity in cells.

Key words : Apoptosis, MCL-1L, MCL-1ES BH3M, BH3 domain, BCL-2 family.

요 약 : 본 논문은 인공적인 단백질인 MCL-1ES BH3M에 관한 것으로 MCL-1ES BH3M를 과발현시 세포사멸을 유도한다. MCL-1L을 주형으로 재조합 PCR을 통해서 MCL-1ES BH3M를 클로닝하였다. 새롭게 클로닝한 단백질인 MCL-1ES BH3M 단백질은 안정성을 유지하기 위해서 PEST 도메인이 제거되어 있으며, 다른 BCL-2 패밀리 단백질과의 결합을 조절하기 위해서 BH3도메인의 Leu-Arg-Arg-Val-Gly-Asp-Gly 서열을 7개의 Ala 잔기로 인위적으로 돌연변이를 유도하였다. MCL-1ES BH3M를 293T 세포에서 과발현할 경우 세포사멸을 유도하였고, 항-세포사멸 단백질인 MCL-1L을 같이 과발현하더라도 세포사멸을 유도하였다. 또한, 과발현시 Caspase 9과 3를 활성화하였으며 면역염색법을 통해서 MCL-1ES BH3M 과발현시 미토콘드리아에 MCL-1ES BH3M 단백질이 부분적으로 위치하는 것을 확인하였다. 이상의 결과로 MCL-1ES BH3M는 Caspase 9과 3의 활성을 통해서 세포사멸을 유도한다. 결론적으로 본 연구는 세포사멸을 유도하는 새로운 molecule을 클로닝하였고, 이 molecule에 의한 세포사멸 기능을 확인하였다.

서 론

세포사멸(programmed cell death 또는 apoptosis)은 세포 교체, 조직 리모델링, 상해를 입은 세포의 제거에 있어 중요한 메커니즘이다(Thompson, 1995). BCL-2 패밀리 단백질이 이러한 세포사멸에 중추적인 역할을 담당하며, 이러한 *bcl-2* 유

† 교신저자: 배지현, 경기도 성남시 분당구 야탑동 222번지, 포천중문의대, (우) 463-836, (전) +82-31-725-8396, (팩) +82-31-725-8350, E-mail: jeehyeon@cha.ac.kr
이강석, 서울시 동작구 흑석동 221번지, 중앙대학교 자연과학대학, (우) 156-756, (전) +82-2-820-5241, (팩) +82-2-822-5241, E-mail: kangseok@cau.ac.kr

전자는 B-cell 림프종과 연관된 at(14, 18)염색체 전좌(chromosomal translocation)의 중단 점에서 초기 암유전자로서 발견되었다(Tsujimoto, 1984). BCL-2 패밀리 단백질은 세포사멸 억제와 촉진의 두 가지 효과로 나누어진다. 세포사멸 촉진 단백질(pro-apoptotic protein)로는 BAX, BAK, BIM, BID, HRK, NOXA이 있으며, 세포사멸을 억제하는 항-세포사멸 단백질(anti-apoptotic protein)로는 BCL-2, MCL-1L, BCL-xL, BCL-W, Bfl-1이 있으며, 세포사멸이 비정상적으로 조절되면 암, 자가면역 질환(autoimmune diseases), 퇴행성 신경이상(neurodegenerative disorders), 바이러스 감염(viral infection) 등의 각종 질환이 유발된다.

세포사멸은 항-세포사멸 단백질 또는 친-세포사멸 단백질 간의 결합을 통해서 조절이 되며 BH3 도메인을 매개로 서로 이종이합체(heterodimerization)를 형성함으로써 세포의 생존과 사멸을 조절하는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2006). 특히, 친-세포사멸 BCL-2 패밀리 단백질들은 MCL-1L과 같은 항-세포사멸 BCL-2 패밀리 단백질들과 결합하여 항-세포사멸 단백질들을 격리(sequester)시킴으로써 세포사멸을 유도하는 것으로 보고되었다(Wang et al., 2007). 이에, 항-세포사멸 BCL-2 패밀리 단백질에 친-세포사멸 BCL-2 패밀리 단백질들의 결합을 막음으로써 세포사멸을 유도하는 항암치료제들이 개발되고 있다(Labi F, 2008; Adams & Cory, 2007). 또한, 최근 연구 동향에 의하면 새로운 항암제이자 세포사멸 유도물질인 세플라토닌(Ceflfatonin)은 임상연구 결과 Caspase 9 또는 3를 활성화 시키며, 항-세포사멸 단백질인 MCL-1L의 전환을 일으킨다. 이는 항암치료제로서 세포사멸 유도 물질이 쓰일 수 있으며 MCL-1L의 전환이 세포사멸에 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

MCL-1L 단백질은 항-세포사멸 BCL-2 패밀리 단백질로, 인간 골수성 백혈병 세포주의 분화과정에서 초기 유도 유전자로 발견되었다(Kozopas et al., 1993). MCL-1L 단백질은 다른 BCL-2 관련 단백질에서 발견되는 BH(BCL-2 homology) 도메인인 BH1, BH2, BH3와 C-말단의 transmembrnae 도메인(TM)을 공통적으로 가지고 있으며, 다른 BCl-2 패밀리와는 특이적으로 N-말단에 프롤린, 글루탐산, 세린, 트레오닌 잔기가 많은 PEST 서열을 가진다. 또한 MCL-1S(myeloid cell leukemia-1 short)은 이러한 *MCL-1* gene의 alternative splicing variant이며, MCL-1L과 비교하여 볼 때, C-말단의 BH1, BH2, TM 도메인이 결여되어 있고, BH3 도메인만 가지고 있으며 세포사멸 촉진의 기능을 수행한다(Bae et al., 2000).

또한, MCL-1L의 과발현(upregulation)은 세포의 불멸화(immortalization)와 암세포 전환(tumorigenic conversion)을 통해 각종 암을 유발하며, 또한 항암제의 내성유발, HIV 감염, 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis)과 연관되어 있음이 보고되었다(Warr & Shore, 2008; Hill et al., 2005). 따라서 본 연구는 이러한 MCL-1L의 발현양상과 상관없이 세포사멸을 유도하는 새로운 단백질인 MCL-1ES BH3M에 대한 연구를 통해서 세포사멸 유도 기능이 있는 MCL-1ES BH3M 인공적인 단백질의 기능적 단위 클로닝을 통해서 새로운 항암치료제 개발을 모색하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 플라스미드 제작 및 클로닝

MCL-1L의 플라스미드를 주형으로 하여 pc Flag MCL-1L 정방향 프라이머(5'-AGTGGATCCATGGACTACAAAGACGACGACGACAAATTTGGCCTCAAAAGAAAC-3') 및 MCL-1L BH3 7AA mutant 역방향 프라이머(5'-GAGCACCAACGCGACGTGACGACGACGACGACGACGCCAGAGGTCGCGGAAGGACGA)를 이용하여 PCR을 수행하여 PCR 산물을 얻고, 플라스미드 pc MCL-1L를 주형으로 하여 MCL-1L BH3 7AA mutant 정방향 프라이머(5'-GGTCTCCAGCGCCTTCCTGCT)와 pc MCL-1L 역방향 프라이머(5'-CTAGAATTCTTACAGTAAGGCTATCTT)를 이용 PCR을 수행하여 PCR 산물을 얻었다. 얻어진 두 개의 PCR 산물을 재조합 PCR 방법을 수행하여 pc Flag MCL-1L 정방향 프라이머와 pc MCL-1L 역방향 프라이머를 사용 PCR하여 최종 PCR 산물을 얻었다. pcDNA3(Invitrogen, Calsbad, CA, U.S.A.)의 다중 클로닝 부위를 제한효소 BamHl/EcoRl으로 처리한 다음, 앞서 얻어진 PCR 산물을 클로닝하여 재조합 플라스미드 pc Flag MCL-1L BH3M를 얻었다. 이후 Sanger 방법을 통해 서열분석을 수행한 결과, 재조합 플라스미드 pc Flag MCL-1L BH3M 염기서열을 갖는 DNA를 포함하고 있음을 확인하였다. pc Flag MCL-1L BH3M의 플라스미드 DNA를 주형으로 pc Flag MCL-1L 정방향 프라이머와 MCL-1L ΔPEST 역방향 프라이머(5'-CCGGTGGCCAAAAGTC)를 사용 PCR 산물을 얻고 pc MCL-1L 역방향 프

라이머와 MCL-1L 정방향 프라이머(5'GACTTTTGGCCACCGG)를 사용 PCR 산물을 얻어 위의 MCL-1L BH3M 플라스미드 제작에 사용한 재조합 PCR 방법을 이용 pcDNA3의 다중 클로닝 부위에 BamHl/EcoRl의 제한효소로 클로닝하였다.

2. 세포주 및 세포배양

본 실험에서는 인간 배아 신장세포인 293T을 사용하였다. 세포배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Welgene, Daegu, Korea)을 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (Welgene)을 첨가하여 37℃ 5% CO_2의 환경 하에서 배양하였다.

3. 면역 형광 염색(Immunofluorescence)

MCL-1ES BH3M가 세포내에서 어느 위치에 존재하는지 알아보기 위해서 면역형광염색을 실시하였다. 24-well 배양접시에 각 well마다 cover slip을 깔고 세포의 부착을 위해 0.1% poly-L-Lysin(Sigma, St, Louis, MO, U.S.A.) 300 ㎕ 넣고 15분간 반응 후 phosphate-buffered saline(PBS)를 이용하여 3회 세척하였다. 이후 293T 세포를 2.0×10^4 숫자로 분주하여 37℃ 5% CO_2의 환경 하에서 배양하였다. 배양 후 Welfect-EX(Welgene)를 이용하여 100 ng의 pc Flag MCL-1ES BH3M plasmid DNA를 형질감염시켰다. 37℃ 5% CO_2의 조건에서 24시간 배양 후 4% paraformaldehyde를 넣고 실온에서 15분간 고정 후 PBS로 3회 세척 후 0.2% triton-X100을 넣은 PBS에 15분간 반응시켰다. 이후 2% FBS가 함유된 PBS에 1시간 반응하여 비 특이적 반응을 억제하였다. Anti Flag 항체(Sigma)와 MitoTracker(Invitrogen)을 1:100으로 PBS-Tween 20 용액에 희석하여 실온에서 1시간 반응 하였다. PBS-Tween 20으로 3회 세척한 후 2차 항체인 anti-mouse 546 IgG(Invitrogen)을 1:1,000으로 희석하여 실온에서 30분간 반응 후 PBS-Tween 20으로 3차례 세척 후 mounting gel로 슬라이드 글라스에 고정하여 Zeiss LSM 510 META conforcal fluorescence microscopy(Carl Zeiss, Gottingen, Germany)를 이용하여 세포를 관찰하였다.

4. Western Blot

293T 세포를 1×10^6 세포의 양으로 60 ㎜ 배양접시에 37℃에서 24시간 동안 배양한 후 pc Flag MCL-1ES BH3M를 3 ㎍을 형질감염하고 pc Flag MCL-1L과 pc Flag MCL-1ES BH3M을 각각 1.5 ㎍씩 Welfect-EX(Welgene)를 이용하여 형질감염시켰다. 37℃에서 24시간 동안 배양한 후 scraper를 이용해 세포를 모은 다음, 모아진 세포를 4℃ 5,000 rpm 3분간 원심분리 후 PBS로 세척하였다. 모아진 세포에 100 ㎕ NP-40 용해 완충액(50 mM Tris-HCl at pH 8.0, 0.15 M NaCl, 1% NP-40; Sigma)을 이용하여 단백질을 샘플링하였다. Bicinchoninic acid(BCA)™ protein assay(Pierce, Rockford, IL, U.S.A.)을 이용하여 각 샘플을 정량하였다. 총 단백질을 SDS sample buffer(Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 50% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 14.4 mM 2-mercaptoethanol; Sigma)와 혼합하여 100℃에서 10분간 끓인 후, SDS-PAGE 전기 영동을 실시하였다.

전기영동 후 gel을 PVDF membrane(Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K.)에서 100 V 전압 하에서 90분간 transfer를 실시하였다. Transfer가 끝난 후 5% Skim milk PBS-Tween 20으로 2시간 blocking하였다. Blocking 후 3% Skim milk PBS-Tween 20에 anti-Flag-M2 monoclonal antibody(Sigma)를 1:1,000 비율로 처리 후 4℃에서 12시간 반응 후 PBS-Tween 20으로 3회 세척하였다. 2차 항체인 anti-goat-mouse IgG-horseradish peroxidase(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.)로 6시간 반응 후 PBS-Tween 20으로 3회 세척한 후 Luminescence image analyzer (Fujifilm Life Science, Stamford, CT, U.S.A.)에서 단백질 발현을 관찰하였다.

5. 세포생존율 검사

293T 세포주를 3.5×10^4 세포량으로 48-well 배양접시에서 37℃에서 24시간 동안 배양한 후, pc Flag MCL-1ES BH3M을 단독으로 혹은 pc MCL-1L과 함께, 총 DNA가 10, 30, 50 및 100 ng이 되도록 Welfect-EX(Welgene)를 사용하여 형질감염시켰다. 이때, 10 ng의 녹색형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)을 발현하는 플라스미드(Clontech, Mountain View, CA, U.S.A.)를 함께 형질감염시켜 24시간 후 GFP를 발현하는 세포만 카운팅하여 세포의 사멸정도를 측정하였다.

6. 통계학적 분석(Statistical Analysis)

세포생존율(cell viability)의 변화는 각 실험시 triplecate로 3회 반복 실시하여 평균값 및 표준 오차를 계산하였다. 각 실

험에서 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 통해 분석하였으며, *p*-value 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 해석하였다.

결 과

1. MCL-1ES BH3M의 클로닝

MCL-1ES BH3M를 클로닝하기 위해서 프라이머를 제작하였으며, pc MCL-1L 플라스미드를 주형으로 사용하였다. 재조합 단백질의 제작에 있어서 PEST 도메인은 MCL-1L 단백질의 반감기에 중요한 역할을 하며, 이를 제거함으로써 MCL-1ES BH3M 단백질의 안정성을 높여주고자 하였다. 또한, 다른 BCL-2 패밀리와 결합하는 도메인으로 알려진 BH3도메인의 Leu-Arg-Arg-Val-Gly-Asp-Gly 아미노산 서열을 7개의 Ala 아미노산 서열로 인위적인 돌연변이를 유도하여 다른 BCL-2 패밀리 단백질과의 결합능력을 조절하고자 하였다. 이렇게 제작된 재조합 단백질인 MCL-1ES BH3M는 MCL-1L과 비교하여 PEST 도메인이 부분적으로 제거되어 있으며 재조합 PCR 방법을 통해서 BH3 도메인에 7개의 Ala 돌연변이를 인위적으로 유도되어 있다(Fig. 1).

2. MCL-1L와 MCL-1ES BH3M의 Caspase 9, 3 활성 확인

MCL-1ES BH3M의 Caspase 9과 3의 활성을 측정하기 위해서 MCL-1ES BH3M를 293T 세포에서 과발현하였고, 이를 Western blot 실험방법을 사용하여 Caspase 9의 활성과 Caspase 3의 활성을 측정하였다(Fig. 2). 실험결과 MCL-1ES BH3M을 발현시킨 세포에서 정상적으로 25 KDa의 위치에서 MCL-1ES BH3M 단백질이 안정적으로 발현하는 것을 확인하였다(Fig. 2). MCL-1ES BH3M만 발현시킨 세포 역시

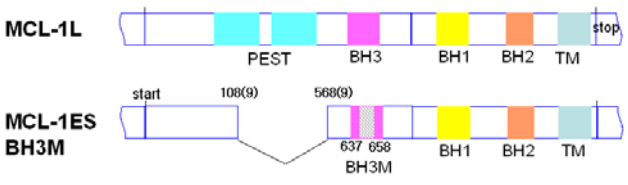

Fig. 1. Diagrammatic representation of the human MCL-1L and MCL-1ES BH3M. In comparison with MCL-1L, MCL-1ES BH3M lacks the PEST motifs and has seven mutated residues to alanines in BH3 domain.

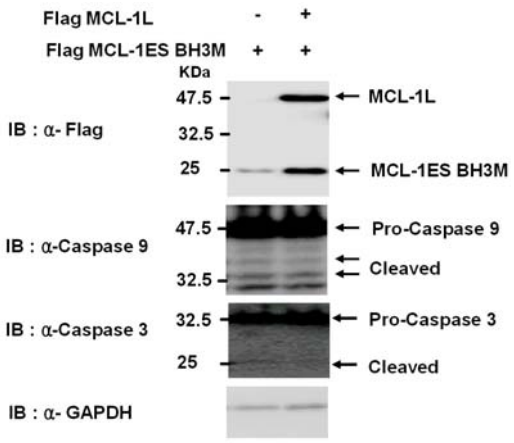

Fig. 2. MCL-1ES BH3M-induced activation of caspase 9 and 3. 293T cells (1.0×10^6) were transfected with 1.5 μg of plasmids coding Flag MCL-1ES BH3M, or Mcl-1L. The cell lysates were prepared after 24 h of incubation. Activation of caspases was assessed by immunoblot analyses with anti-caspase 9 and anti-caspase 3. Expression of Flag-MCL-1L and Flag MCL-1ES BH3M proteins were determined by Western blotting with anti-Flag antibody.

Caspase 9과 Caspase 3가 활성화 된 것을 확인하였으며, MCL-1L와 MCL-1ES BH3M를 같이 발현시킨 세포에서도 Caspase 9와 Caspase 3가 활성화 된 것을 확인하였다(Fig. 2). 또한, 항-세포사멸 역할을 하는 MCL-1L과 같이 과발현 시 MCL-1ES BH3M만 독립적으로 발현한 세포보다 더 많은 MCL-1ES BH3M 단백질이 발현되었음을 확인하였으며, Caspase 9과 Caspase 3의 활성에 변화가 없는 것을 확인하였다. 이는 MCL-1L의 발현이 MCL-1ES BH3의 Caspase 9과 Caspase 3의 활성에 영향을 주지 못하며, 이는 MCL-1L의 항-세포사멸 역할과 상관없이 MCl-1ES BH3M가 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였다. 또한, MCL-1ES BH3M에 대한 Caspase의 활성은 세포괴사가 아닌 세포사멸(Apoptosis)을 유도하는 단백질임을 확인할 수 있다.

3. 293T 세포주에서의 MCL-1ES BH3M의 위치확인

미토콘드리아와 MCL-1ES BH3M의 세포에서 위치를 확인하기 위해서 세포면역염색실험을 진행하였다. MCL-1ES BH3M를 293T 세포에서 과발현하였고 confocal fluorescent microscopy를 사용하여 MCL-1ES BH3M과 미토콘드리아의 세포 내 위치를 알아보았다. 미토콘드리아를 염색하기 위

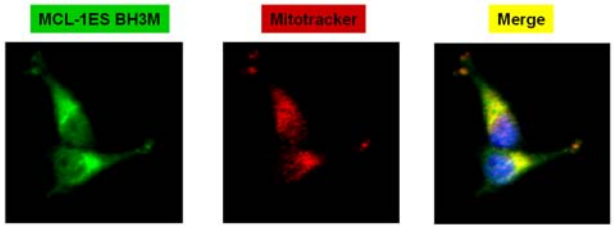

Fig. 3. Intracellular localization of MCL-1ES BH3M in 293T cells. 293T cells(1.5×10^4) were transfected 100 ng of Flag-MCL-1ES BH3M. After 24 h of incubation, the cell were fixed, stained with anti-Flag antibody and MitoTractor, and visualized using 488 goat anti-rabbit IgG.

해서 미토콘드리아의 마커인 MitoTracker를 사용하였으며, Flag MCL-1ES BH3M을 염색하기 위해서 Flag tag을 사용하였다. Confocal fluorescent microscopy를 이용하여 위치를 확인해본 결과 MCL-1ES BH3M는 부분적으로 미토콘드리아에 존재하고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 3). 따라서 다른 BCL-2 패밀리들과 같이 받은 신호를 통하여 세포사멸 신호를 미토콘드리아에 직간접적으로 전달 세포사멸을 유도하는 것으로 보여진다.

4. 293T 세포에서의 MCL-1ES BH3M의 세포생존율 확인

293T 세포에서 MCL-1ES BH3M의 세포생존율을 측정하기 위해서 MCL-1ES BH3M을 coding하는 플라스미드를 0, 10, 30, 50, 100 ng 농도로 dose-dependant하게 형질감염시켜 세포생존율을 측정한 결과 농도가 증가할수록 세포생존율은 점차 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). *MCL-1* 유전자의 두 가지 이성체(isoform)인 MCL-1L, MCL-1S을 100 ng의 농도에 발현하여 세포생존율을 확인해본 결과 MCL-1L은 control과 비교하여 항-세포사멸 효과를 확인하였으며, 세포사멸 단백질인 MCL-1S은 MCL-1ES BH3M의 세포생존율과 유사한 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 4). 또한, MCL-1L 50 ng과 Mcl1-ES BH3M을 0, 10, 30, 50 ng의 농도로 dose-dependant하게 같이 과발현하였을 때 세포생존율의 변화는 MCL-1ES BH3M만 발현하였을 때의 세포생존율과 비교해서 변화가 없으며, 이는 MCL-1L 항-세포사멸 효과와 상관없이 세포사멸을 유도한다는 것을 보여준다. 또한, 난소암 세포주인 SK-OV3에서 같은 방법으로 세포생존율을 측정하여 본 결과 293T 세포주의 결과와 유사한 것을 확인하였다(data not shown).

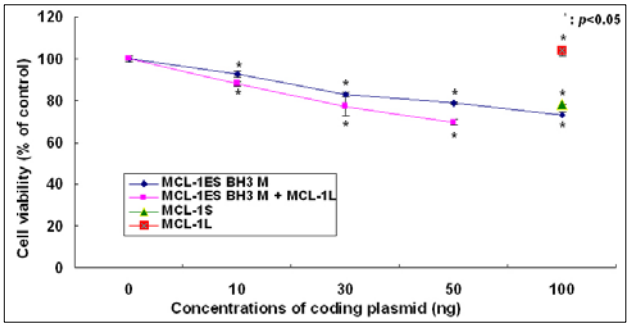

Fig. 4. Cell death activity of MCL-1ES BH3M. 293T cells (3.5×10^4) were transfected with increasing amounts of plasmids coding MCL-1ES BH3M (0, 10, 30, 50 and 100 ng) MCL- 1L (100 ng) and MCL-1S (100 ng). GFP-positive cells were counted under the fluorescence microscope after adding Trypan blue. Three independent experiments in triplicate were performed. Data are expressed as the percentage (mean±S.E.M) of viable cells relative to the control transfected with 100 ng of pcDNA3 empty vector. Asterisks represent statistical significance relative to the control ($p<0.05$).

고 찰

BCL-2 패밀리 단백질들은 세포의 생존에 관여하는 효과에 따라 세포사멸을 촉진하는 단백질과 세포사멸을 억제하는 단백질로 나눌 수 있다. BCL-2 패밀리는 크게 항-세포사멸 조절자와 친-세포사멸 조절자로 나눠진다. 이러한 BCL-2 패밀리들은 미토콘드리아에서 작용을 하게 되는데 친-세포사멸 조절자는 cytochrome *c*의 유출에 관여함으로써 Apaf-1 복합체를 형성하여 세포사멸을 유도하게 되고, 항-세포사멸 조절자는 반대로 유출을 막아 세포사멸을 막는 역할을 한다(Cozzolino et al., 2006). 이러한 BCL-2 패밀리 단백질들은 보존된 BH도메인을 가지고 있으며, BH1, BH2, BH3, BH4로 정의되어 있다. 이 중 BH1, BH2 도메인은 세포사멸을 억제하는 기능을 하며, BH3 도메인은 세포사멸을 유도하는 단백질로 알려져 있다(Klein et al., 2004). BH3 도메인을 가진 단백질들은 세포사멸을 유도하는 외부 신호를 받게 되면 친양쪽성(amphipathic)인 BH3 도메인이 다른 BCL-2 패밀리 단백질들의 소수성 부위와 결합하게 된다. BH3-only 단백질이 세포에서 BCL-2 패밀리와 결합하느냐에 따라 BAX 또는 BAK의 활성화 과정이 2가지로 구분된다. 첫 번째로 이들 단백질이 BAX 또는 BAK이 활성을 억제하고 있는 친-세포사

멸 계열의 BCL-2 패밀리 단백질을 억제함으로써 BAX와 BAK이 자유롭게 활성화 될 수 있도록 유도하는 과정(de-repression)과 두 번째로 BAX 또는 BAK이 단백질과 직접적으로 결합하여 BAX 또는 BAK이 단백질의 미토콘드리아 이동을 촉진하는 과정(direct activation)이 있다(Kuwana et al., 2005). 이러한 BCL-2 패밀리의 결합양상에 따라 활성화 된 BAX와 BAK은 세포질 내로 미토콘드리아 내의 cytochrome *c*를 분비하여 Caspase 9과 3를 활성화 시키며 이는 최종적으로 세포사멸을 유도하게 된다.

BCL-2 패밀리 중 하나인 *MCL-1*은 alternative splicing에 따라 MCL-1L과 MCL-1S의 두 가지 이성체 형태로 발현된다. MCL-1L은 세포 생존(cell survival)을 증진시키지만 MCL-1S는 세포사멸을 유도한다. 두 가지 이성질체를 가진 *MCL-1* 유전자는 서로 상반된 기능을 가지고 있으며, 이를 바탕으로 MCL-1L 단백질의 재조합을 통해 세포사멸을 유도하는 새로운 세포사멸 물질을 만들어내게 되었다. 재조합 PCR 방법으로 MCL-1L 단백질의 반감기에 관여하는 PEST 도메인을 제거하여 단백질의 세포에서의 안정적인 발현을 유도하였으며, 다른 BCL-2 패밀리와 결합하는 도메인으로 알려진 BH3 도메인의 Leu-Arg-Arg-Val-Gly-Asp-Gly 아미노산 서열에 인위적으로 7개의 Ala 잔기 돌연변이를 유도하여, BCL-2 패밀리들과 결합하지 않으리라고 예상되는 세포사멸 단백질을 유도하는 신규한 펩타이드 단백질을 클로닝하였다.

본 연구를 통해서 MCL-1ES BH3M은 세포에서 안정적으로 발현하며 세포사멸을 유도한다. 또한, 다른 친-세포사멸 단백질과 결합하여 세포사멸을 막아줌으로써 항-세포사멸 단백질 역할을 하는 MCL-1L의 발현양상과 상관없이 세포사멸을 유도한다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, MCL-1ES BH3M은 미토콘드리아에 부분적으로 위치해 있으며, 이는 미토콘드리아가 관련된 세포사멸을 유도하는 것으로 확인되었다. 또한, 세포사멸에 중심적인 역할을 담당하는 Caspase 9 또는 3를 활성화하여 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였다.

현재 암세포치료제로 알려진 시스플라틴(cisplatin)이나 캄포테신(camptothecin)은 항암치료와 병용 사용하면서 통상적으로 쓰이는 항암제의 양을 줄여주어 부작용을 막아주는 형태로 암세포치료에 공헌하고 있다(Damsma et al., 2007). 그러나 이러한 암세포 치료제는 암세포와 건강한 세포를 구분하지 못하여 모든 세포에 손상을 주며 암세포가 내성을 획득하게 됨으로써 암세포 치료에 어려움을 가지고 있다. 새롭게 계발되어진 암세포 치료제 후보물질인 ABT-737은 종양 또는 암세포에서 과다하게 발현하는 BCL-2와 결합하여 항-세포사멸 작용을 억제하여 기존의 암세포와는 달리 급성 골수성 백혈병 모세포(blast)를 비롯해 전구세포(progenitor cell), 심지어 줄기세포(stem cell)까지 파괴시킴으로써 치료제로서의 효과를 보여주었다(Delft et al., 2006). 이렇게 최근 암세포 치료제 연구는 BCL-2 패밀리의 상호 결합에 관여하는 BH3 domain에 대한 agonist와 antagonist 개발에 중점을 두고 있으며, 암세포 특이적 암세포 치료제를 계발하고자 하고 있다.

본 연구에서의 MCL-1ES-BH3M의 BH3 도메인에 돌연변이를 유도하였으며, PEST domain을 제거하여 신규한 세포사멸 단백질을 클로닝하였다. 이러한 신규한 단백질인 MCL-1ES BH3M는 293T세포 또는 난소암세포에서 안정적으로 세포사멸을 유도하였으며, 항-세포사멸 단백질인 MCL-1L과 같이 과발현하더라도 세포사멸을 유도하였다. 본 연구 결과로서 MCL-1ES BH3M 단백질은 세포사멸 유도제의 역할을 할 수 있으며, 항-세포사멸 단백질인 MCL-1L이 과발현하는 암세포내에서 세포사멸을 MCL-1L에 대한 내성 없이 효과적으로 유도할 수 있는 가능성을 보여준다. 앞으로의 연구를 통하여 MCL-1ES BH3M 단백질의 최소기능적 단위를 찾아 내어서 다른 재조합 단백질 개발의 주요한 화학적 틀을 제공하여야 하며, 관련 치료제 개발을 위해서 세포사멸 유도기작에 대한 심도 있는 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

This work was supported by Seoul R & BD grant (10550).

인용문헌

Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267:1456-1462.

Damsma GE, Alt A, Brueckner F, Carell T, Cramer P (2007) Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA. Nat Struct Mol Biol 14:1127-1133.

Klein D, Ribeiro MM, Mendoza V, Jayaraman S, Kenyon NS, Pileggi A, Molano RD, Inverardi L, Ricordi C, Pastori RL (2004) Delivery of Bcl-XL or its BH4 domain by

protein transduction inhibits apoptosis in human islets. Biochem Biophys Res Commun 15:473-478.

Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH (2006) Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. Nat Cell Biol 8:1348-1358.

Bae J, Leo CP, Hsu SY, Hsueh SY (2000) MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. J Biol Chem 275:25255-25261.

Adams JM, Cory S (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. Oncogene 26:1324-1337.

Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW (1993) MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. Proc Natl Acad Sci USA 90:3516-3520.

Cozzolino M, Ferri A, Ferraro E, Rotilio G, Cecconi F, Carri MT (2006) Apaf1 mediates apoptosis and mitochondrial damage induced by mutant human SOD1s typical of familial amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Dis 21: 69-79.

Warr MR, Shore GC (2008) Unique biology of Mcl-1: therapeutic opportunities in cancer. Curr Mol Med 8:138-147.

Hill SC, Youde SJ, Man S, Teale GR, Baxendale AJ, Hislop A, Davies CC, Luesley DM, Blom AM, Rickinson AB, Young LS, Eliopoulos AG (2005) Activation of CD40 in cervical carcinoma cells facilitates CTL responses and augments chemotherapy-induced apoptosis. J Immunol 174:41-50.

Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. Mol Cell 17:525-535.

Labi V, Grespi F, Baumgartner F, Villunger A (2008) Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? Cell Death Differ 15:977-987.

Wang YF, Jiang CC, Kiejda KA, Gillespie S, Zhang XD, Hersey P (2007) Apoptosis induction in human melanoma cells by inhibition of MEK is caspase-independent and mediated by the Bcl-2 family members PUMA, Bim, and Mcl-1. Clin Cancer Res 13:4934-4942.

van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, Willis SN, Scott CL, Day CL, Cory S, Adams JM, Roberts AW, Huang DC (2006) The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. Cancer Cell 10:389-399.

Wacheck V, Selzer E, Gunsberg P, Lucas T, Meyer H, Thallinger C, Monia BP, Jansen B (2003) Bcl-x(L) antisense oligonucleotides radiosensitise colon cancer cells. Br J Cancer 89:1352-1357.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. Science 226:1097-1099.

(received 27 October 2008, received in revised form 24 November 2008; accepted 25 November 2008)