

에스트로젠 수용체알파에 의한 Hypoxia Inducible Factor-1의 전사 활성조절

유광희 · 이영주[#]

세종대학교 생명공학과

(Received September 24, 2009; Accepted December 3, 2009)

Activation of Hypoxia Inducible Factor-1 Alpha by Estrogen Receptor Alpha

KwangHee Ryu and YoungJoo Lee[#]

College of Life Science, Institute of Biotechnology, Department of Bioscience and Biotechnology,
Sejong University, Seoul 143-747, Korea

Abstract — Our previous results showed that hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activated estrogen receptor (ER) in the absence of ligand. In this study, we have studied the effect ER overexpression on the activation of HIF-1. ER overexpression induced transcription activation of hypoxia response element driven luciferase and vascular endothelial growth factor. As a negative control, the effect of ER on androgen receptor response element was used. Our result indicate that the two ER α and HIF-1 signaling pathways shares part of the activation pathway.

Keywords □ hypoxia, ER α , HIF-1, VEGF

저산소 상태는 혈관신생, 에너지대사, 적혈구생성 등 세포 내 다양한 반응을 조절한다.¹⁾ 저산소 상태에서의 대표적인 조절인자는 hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)로 정상 상태에서는 분해되어 전사활성이 없는 반면 저 산소 상태에서는 안정화 되어 산소 항상성 유지에 필요한 당 대사, 혈관신생에 관련된 유전자들의 발현을 조절하는 중요한 역할을 수행한다.²⁾ HIF-1 α 는 Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator(ARNT)와 dimer로 작용을 한다.³⁾ ARNT 단백질은 HIF-1 α 의 파트너로서의 역할 이외에도 에스트로젠 수용체의 coactivator로서도 작용하고 ARNT의 또 다른 파트너인 AhR 역시 에스트로젠 수용체와의 결합을 통하여 작용을 조절함이 발표되었다.^{4,5)} 이러한 일련의 연구결과를 통하여 저산소의 신호 전달 체계가 에스트로젠 수용체 및 기타 핵 호르몬 수용체의 전사 활성에 영향을 미친다는 주요 연구 결과들이 축적되고 있다. 하지만 역으로 핵호르몬 수용체가 저산소의 신호 전달에 영향을 미친다는 연구 결과는 아직 거의 없다.

에스트로젠 수용체는 핵수용체 superfamily의 한 멤버이며, 에스트로젠에 의해 활성화되는 전사인자이다.⁶⁾ 에스트로젠의 작용 모델은 세포 내에 있는 에스트로젠 수용체와 호르몬이 결합하여

특정 유전자의 거울상의 염기서열을 가진 15 bp의 인핸서 (hormone responsive element)에 결합하여 basal transcription machinery와 각종 coregulator와 결합하여 전사 활성을 조절한다고 알려져 있다.⁶⁾ 여성 호르몬인 에스트로젠은 난소에서 생성되어 혈관을 통해 표적 세포에 도달하여 단순확산에 의해 표적 세포 내로 들어가, 표적세포의 핵 내에 존재하는 전사인자인 에스트로젠 수용체를 통하여 표적 유전자의 전사 활성도에 영향을 미침으로써 그 기능을 나타낸다.⁶⁾ 에스트로젠 수용체는 성장인자 경로와의 cross-talk에 의한 활성, DNA 결합 없이 AP-1과의 interaction에 의한 활성, 세포막에 존재하는 수용체를 통한 nongenomic 경로 등에 의해서도 세포 내 여러 작용에 영향을 미친다고 알려져 있다.^{7,9)} 많은 연구결과들에 의해 에스트로젠의 신호전달 체계에 관여하는 약 300종류의 단백질들과 복잡한 조절 기전이 밝혀져 있다.¹⁰⁾

에스트로젠 수용체는 유방암 세포 성장에 관여하는 많은 유전자와 신호를 조절함으로써 유방암의 발달과 진행에 매우 중요한 역할을 한다.¹¹⁾ 에스트로젠 수용체는 유방암의 치료와 진행 추이를 결정하는데 매우 중요한 요소이다.¹¹⁾ 최근 저산소에 의해 에스트로젠 수용체 단백질이 조절된다고 보고된바 있으며, 에스트로젠 수용체 양성 유방암에서 HIF-1 α 의 양이 높다는 관찰이 보고된 바도 있다.^{12,13)} 그리고 HIF-1 α 양성 유방종양에서 에스트로젠 수용체의 농도가 적어도 관찰되었다.¹³⁾ 이러한 일련의

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-3408-3640 (팩스) 02-3408-4334
(E-mail) yjlee@sejong.ac.kr

관찰은 저산소와 에스트로젠 수용체가 상호 조절 함으로서 tumorigenesis에 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 의미한다. 본 논문에서는 에스트로젠 수용체 알파가 저산소 신호에 영향을 미치는 가능성에 대해 고찰해보았다.

실험방법

실험재료

E₂는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 100% 에탄올에 녹였다. RPMI 역시 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Fetal Bovine Serum(FBS), Trizol Reagent, 그리고 penicillin/streptomycin은 GIBCO Invitrogen(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 또한 HRE-Luc DNA는 서울대학교 김규원 박사님께 제공 받았으며, ARE-Luc DNA는 Rochester 대학의 Dr. Chawnsang Chang에게 제공 받았다.

세포배양 및 저산소 처리

본 실험에서는 유방암 세포주인 MCF-7 세포주를 사용하였다. MCF-7 세포주는 10% FBS를 함유하는 RPMI에서 배양하였다. 플라스미드의 트랜스펙션에는 PEI(Polysciences)를 사용하였다. 배지는 1~2일 간격으로 교환하고 시약을 처리할 때 새 배지로 갈아주었으며, 약물을 처리시에는 최소 24시간 이상 석탄으로 처리한 혈청을 사용한 배지에서 배양한 후 약물을 처리하였다. 대조군에는 에탄올 용매를 처리하였다. 저산소 상태에서의 세포는 5%의 CO₂ level과 1% 미만의 O₂ 그리고 N₂로 balance가 맞춰진 Hypoxia chamber(Forma)를 사용하여 배양하였다.

루시페라아제 활성 측정

플라스미드를 트랜스펙션한 세포를 PBS로 세척하고 lysis buffer(125 mM Tris pH 7.8, 10 mM CDTA, 10 mM DTT, 50% glycerol, 5% Triton X-100)를 넣고 세포를 파괴한 후 상층액을 얻었다. 루시페라아제 활성측정은 20 µl cell extract에 20 µl assay buffer(Promega)를 가한 후 light emission을 Luminometer(LUMAT LB 9501/16)를 사용하여 20초간 측정하였다.

RNA 분리 및 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

Total RNA 추출은 Trizol Reagent(Invitrogen)를 이용하였다. cDNA 합성은 5 µg의 total RNA와 Random primer(Promega), 그리고 8 µl DEPC 처리된 물을 넣고 70°C에서 5분 동안 둔다. 그리고 40 unit의 M-MuLV 역전사효소(Promega), 5× reaction buffer(250 mM Tris-HCl; pH 8.3 at 25°C, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT)와 1 mM dNTP mixture, 그리고 ribonuclease inhibitor 20 unit을 넣고 37°C에서 1시간 반응시

키고 70°C에서 10분 동안 반응시킨다. 만들어진 cDNA 2 µl, 10× buffer(100 mM Tris-HCl; pH 8.3 at 25°C, 500 mM KCl, 15 mM MgCl) 5 µl, 25 unit의 rTaq polymerase(Takara, Japan), 4 µl의 2.5 mM dNTP mixture, 100 pmoles의 primer(Geno Tech), total volume 50 µl로 PCR을 하였다.

β-actin, VEGF, ERα의 oligonucleotide 서열은 β-actin: sense; 5'-CCTGACCCTGAAGTACCCCA-3', antisense; 5'-CGTCATGCAGCTCATAGCTC-3', VEGF: sense; 5'-ATGAACTTTCTGCTCTCTCTGG-3', antisense; 5'-TCATCTCTCTCTATGTGCTGGC-3', ERα: sense; 5'-CATAACGACTATATGTGTCCAGCC-3', antisense; 5'-AACCGAGATGATGTAGCCAGCAGC-3'이다. 그리고 VEGF와 ERα의 PCR조건은 다음과 같다. 94°C에서 3분, 94°C 45초, 55°C 45초, 72°C 45초(24 cycle), 마지막으로 72°C에서 10분간 반응시킨다. 그리고 β-actin은 20 cycle로 조건을 잡았다. 이는 β-actin을 20 cycle 이상으로 할 경우 포화상태에 이르러 정량 분석을 하기가 힘들기 때문이다. 정량적 분석은 각 실험 sample의 cDNA를 희석하는 방법을 사용하였다. PCR산물은 2% gel로 전기영동 하여 분석하였다. bands의 상대적 강도는 Gel Doc 2000(BIO-RAD, USA)을 통해 정량화되었다.

실험결과 및 고찰

에스트로젠 수용체 알파에 의한 Hypoxia Response Element(HRE)-Luciferase의 증가

HRE(Hypoxia Response Element)-Luciferase와 에스트로젠 수용체 알파 플라스미드를 293 세포에 농도별로 24 h transfection하여 HRE-luciferase 활성을 측정된 결과 luciferase의 활성이 증가하였다(Fig. 1A). 하지만 Androgen Response Element(ARE)-Luciferase와 에스트로젠 수용체 알파 플라스미드를 함께 transfection하여 negative control로 실험한 ARE-luciferase 측정 결과에서는 luciferase의 활성이 보이지 않았으며(Fig. 1B), 에스트로젠 수용체 알파의 ligand로 알려진 E2를 같이 처리하여 HRE-luciferase를 측정하였을 때 synergy한 활성효과는 관찰할 수 없었다(Fig. 1C). 이 결과들은 에스트로젠 수용체의 과발현이 HIF-1에 의한 전사에 영향을 미칠 수 있다는 것을 제시한다.

에스트로젠 수용체 알파에 의한 Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF) 발현

VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)는 성체에서 혈관 생성뿐만 아니라 배아발달과정에서 혈관발달을 조절하는 중요한 인자이며, HIF-1α와 ARNT가 interaction을 이뤄 HRE서열부위에 결합하여 발현되는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾ 에스트로젠 수용

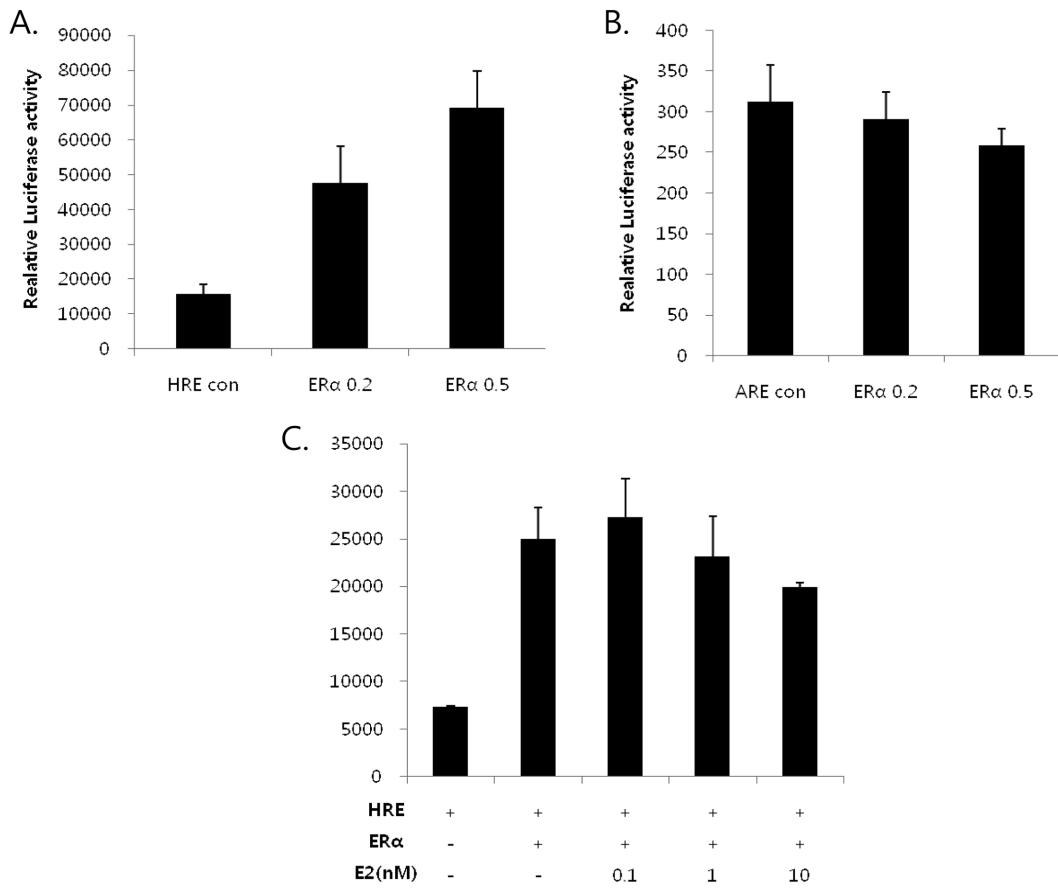


Fig. 1 – HRE-luciferase activation was assessed by cotransfection of the ERα (0.2, 0.5 μg) with either HRE-luciferase (A) or ARE-luciferase (B) expression plasmids in HEK 293 cells, using the PEI method. At 24 h post-transfection, cells were treated with 0.1, 1 and 10 nM E₂ (C). Cell extracts were prepared by reporter lysis buffer and analyzed using a luciferase assay.

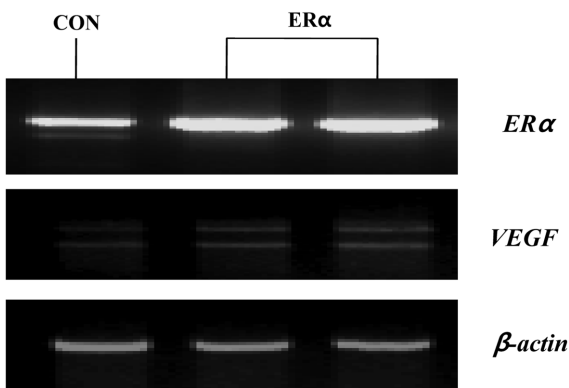


Fig. 2 – MCF-7 cells were transiently transfected with ERα using the PEI method. Total RNA was prepared and analyzed for ERα, VEGF and β-actin mRNA expression by RT-PCR.

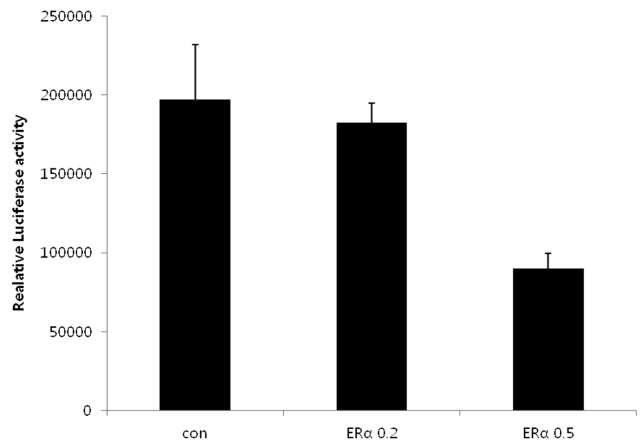


Fig. 3 – HEK 293 cells were transiently transfected with ERα (0.2, 0.5 μg) and HRE-luciferase using the PEI method. At 24 h post-transfection, cells were incubated for 24 h hypoxic condition. Cell extracts were prepared by reporter lysis buffer and analyzed using a luciferase assay.

체 알파가 발현되는 cell line이며, 유방암 세포인 MCF-7세포에 에스트로젠 수용체 알파 플라스미드를 1 μg의 농도로 24 h transfection하여 과발현 시켰으며, 저산소 상태에서 HIF-1에 의해 발현되는 VEGF의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR로 측정하였

다. 그 결과 에스트로젠 수용체 알파의 과발현에 의해서도 VEGF의 mRNA가 발현되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2).

저산소 상태에서 에스트로젠 수용체 알파의 활성 변화

저산소 상태에서 HRE와 에스트로젠 수용체 알파를 293 cell에 농도 별로 24 h transfection하여 HRE-luciferase를 측정 한 결과 normoxia 상태와는 다르게 HRE-luciferase의 활성이 약하게 저하되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과는 에스트로젠 수용체 알파가 정상상태와 저산소 상태에서 HIF-1에 미치는 영향이 다를 수 있음을 의미한다.

결 론

우리는 Normoxia 상태에서 Hypoxia Response Element (HRE) 부위에 에스트로젠 수용체 알파가 관여를 하여 HRE-luciferase의 활성을 증가시키는 것을 보았다. 다른 Response Element 부위에서는 에스트로젠 수용체 알파가 어떠한 관여도 하지 않는 것으로 보이며, ligand인 E2 역시 HRE-luciferase의 활성을 추가적으로 증가시키지 못하는 것으로 밝혀졌다. 또한 에스트로젠 수용체 알파의 과발현은 저산소 상태에서 HIF-1에 의해 조절되는 VEGF와 같은 유전자를 발현시켰다. 그러나 저산소 상태에서 에스트로젠 수용체 알파에 의한 HRE-luciferase 활성 증가는 Normoxia 상태와는 달리 약한 감소를 보였다. 이러한 결과는 에스트로젠 수용체와 HIF-1 α 가 서로 작용이 있음을 의미하며 그 상호 작용이 정상상태와 저산소 상태에서 동일하지 않음을 암시한다. 에스트로젠 수용체와 HIF-1 α 의 상호 작용에 대해서는 향후 추가 연구가 요구된다.

감사의 말씀

이 논문은 2008년도 세종대학교 교내연구비 지원에 의한 논문임.

참고문헌

- 1) Taylor, C. T. and Colgan, S. P. : Therapeutic targets for hypoxia-elicited pathways. *Pharm. Res.* **16**, 1498 (1999).
- 2) Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. : Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* **423**, 545 (2003).
- 3) Wang, G. L., Jiang Bing-Hua., Rue, E. A. and Semenza, G. L. : Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS

heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5510 (1995).

- 4) Brunnberg, S., Pettersson, K., Rydin, E., Matthews, J., Hanberg, A. and Pongratz, I. : The basic helix-loop-helix-PAS protein ARNT functions as a potent coactivator of estrogen receptor-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6517 (2003).
- 5) Gu, Y.-Z., Hogenesch, J. B. and Bradfield, C. A. : The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 519 (2000).
- 6) Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M. and Gustafsson, J. A. : Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.* **81**, 1535 (2001).
- 7) Kato, S. : Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer* **8**, 3 (2001).
- 8) Weatherman, R. V. and Scanlan, T. S. : Unique protein determinants of the subtype-selective ligand responses of the estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) at AP-1 sites. *J. Biol. Chem.* **276**, 3827 (2001).
- 9) Kelly, M. J. and Levin, E. R. : Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab.* **12**, 152 (2001).
- 10) Lonard, D. M. and O'Malley, B. W. : Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol. Cell.* **27**, 691 (2007).
- 11) Shao, W. and Brown, M. : Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res.* **6**, 39 (2004).
- 12) Stoner, M., Saville, B., Wormke, M., Dean, D., Burghardt, R. and Safe, S. : Hypoxia induces proteasome-dependent degradation of estrogen receptor alpha in ZR-75 breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **16**, 2231 (2002).
- 13) Bos, R., Zhong, H., Hanrahan, C. F., Mommers, E. C., Semenza, G. L., Pinedo, H. M., Abeloff, M. D., Simons, J. W., van Diest, P. J. and van der Wall, E. : Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 309 (2001).
- 14) Kazi, A. A. and Koos, R. D. : Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor-1 alpha, vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Endocrinology* **148**, 2363 (2007).