

Downregulation of SGK1 Expression is Critical for TGF- β -induced Apoptosis in Mouse Hepatocytes Cells

In-Koo Nam and Jiyun Yoo*

Department of Microbiology/Research Institute of Life Science, College of Natural Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Received September 5, 2012 / Revised November 20, 2012 / Accepted November 21, 2012

Transforming growth factor (TGF)- β -dependent apoptosis is important in the elimination of damaged or abnormal cells from normal tissues, especially in liver, *in vivo*. To investigate which gene expressions are critical for TGF- β -induced apoptosis in hepatocytes, gene expression profiling experiments were performed with TGF- β -treated and non-treated mouse hepatocytes AML12 cells. Findings showed that serum and glucocorticoid-inducible protein kinase1 (SGK1) expression is markedly down-regulated during TGF- β -induced apoptosis. Findings confirmed that expression of SGK1 protein, as well as mRNA, is also markedly decreased with TGF- β treatment. Infection of adenoviral vector encoding constitutively active SGK1 (CA-SGK1), but not kinase dead SGK1 (KD-SGK1), attenuated TGF- β -induced apoptosis. All of these results suggest that downregulation of SGK1 expression is critical for TGF- β -induced apoptosis in AML12 cells.

Key words : Transforming growth factor- β , Apoptosis, hepatocytes, serum and glucocorticoid-inducible protein kinase1 (SGK1), AML12 cells

서 론

여러 조직에서 세포의 수는 세포의 성장과 사멸에 의해 정교하게 조절되고 있다. 세포의 성장과 사멸의 정확한 조절은 정상적인 세포의 형태 유지에 필수적이며, 만약 이들 간의 균형이 깨지면 암세포로 변형되기도 한다. Transforming growth factor- β (TGF- β)는 세포의 성장을 억제하거나 세포사멸을 유도하는 여러 가지 유전자들의 발현을 조절하여 세포 내에서 다양한 기능을 가지는 단백질이다[12,14]. TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸 과정은 생체내의 정상조직에서 손상을 입은 세포들을 제거하는데 중요한 역할을 한다. 예를 들면, TGF- β 는 인체 내에서 간의 크기를 조절하는데 중요한 기능을 담당하고 있으며, 간세포에 과발현될 경우 세포사멸을 유도하게 된다[3,10,13].

TGF- β 에 의한 신호전달 과정은 serine/threonine kinase인 type I과 type II receptor로 이루어진 heteromeric receptor complex에 의해 전달된다. TGF- β 가 type II receptor에 결합하면 type II receptor는 type I receptor와 heteromer를 형성하고 type I receptor를 인산화 시킨다. 인산화를 통해 활성화된 type I receptor는 TGF- β 신호전달 과정의 세포질 내 신호전달 단백질인 Smad2와 Smad3 단백질을 인산화 시킨다. Type I Receptor에 의해 인산화된 Smad2와 Smad3 단백질은 Smad4와 결합하게 되고 핵 내로 이동하게 되며, 핵 내에서 다른 전사

인자와의 상호 작용을 통해 여러 가지 유전자들의 발현을 조절하게 된다[5,8,21,27]. 현재까지 TGF- β 에 관한 연구는 TGF- β 에 의해 유도되는 여러 가지 현상 가운데 세포주기를 억제하는 기작에 치중되어 왔으며, 상대적으로 TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸 과정의 작용기작에 관한 연구는 아직 미진한 상황이다. 현재까지 알려진 바로는 oxidative stress의 증가, Bcl-2 family 유전자들의 발현 억제, Bax와 같은 세포사멸 촉진 유전자들의 발현 증가와 여러 가지 caspase 단백질들의 활성화 등이 TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸 과정에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다[1,2,7,18,19,20,24]. 최근에 여러 가지 세포내 신호전달 단백질들이 TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸에 관여한다는 보고들이 나오고 있지만 아직까지 그 자세한 작용기작은 알려져 있지 않다[6,16,22,25].

본 연구에서는 TGF- β 에 의한 세포사멸 과정에서 중요한 기능을 담당하는 유전자를 탐색하기 위해 TGF- β 에 의해 세포사멸이 유도되는 mouse hepatocytes AML12 세포에서 TGF- β 처리시 발현이 변화되는 유전자들을 탐색하였고, 그 결과 여러 가지 유전자들의 발현 변화를 관찰하였다. 이 가운데 세포사멸과 관련성이 높은 유전자들의 발현을 RT-PCR과 Western blot analysis를 통해 검증하였으며, 특히 TGF- β 에 의한 serum and glucocorticoid-inducible protein kinase1 (SGK1)의 발현 감소가 TGF- β 에 의해 유도되는 간세포의 사멸에 필수적임을 확인하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-5947, Fax : +82-55-759-5199

E-mail : yooj@gsnu.ac.kr

재료 및 방법

세포 배양

Murine hepatocytes cell line인 AML12 세포는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 구입하였으며, insulin (5 µg/ml), transferrin (5 µg/ml), selenium (5 µg/ml), dexamethasone (40 ng/ml)과 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Invitrogen)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F12 (DMEM/F12) medium을 이용하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 키웠다.

세포사멸 유도 및 확인

TGF-β에 의한 AML12 세포의 사멸과 세포주기 분석을 위해서 TGF-β를 시간 별로 처리한 후 AML12 세포를 75% ethanol에서 냉장상태로 24시간 동안 고정하였다. 고정된 세포의 핵을 propidium iodide (PI, 50 µg/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 37°C에서 30분간 염색하고, 유세포 측정기를 이용하여 세포주기와 사멸율을 분석하였다.

Microarray analysis

Microarray analysis는 Digital Genomics (Seoul, South Korea)에 의뢰하여 robotic operation에 의한 전자동 시스템으로 수행되었다. Total RNA는 TGF-β를 처리하지 않거나 한 시간 동안 처리한 AML12 세포로부터 RNeasy Mini Kit (QIAGEN Valencia, CA, USA)를 사용하여 제품 protocol에 따라 분리하였다. TGF-β를 처리하지 않은 AML12 세포로부터 추출한 RNA는 reverse-transcription 후 cDNA를 Cyanine3로 labeling하였으며, TGF-β를 한 시간 처리한 AML12 세포로부터 추출한 RNA는 역전사시킨 후 cDNA를 Cyanine5로 labeling하였다. Labeling을 위해서는 Quick Amp Labeling

Kit (Agilent Technologies Inc. USA)를 사용하였으며, 각각의 labeling된 cDNA들은 약 12,000개의 독립적인 mouse cDNA sequence를 가지는 Agilent Whole Mouse Genome 44K 4Plex cDNA microarray (Agilent Technologies Inc. USA)와 co-hybridization시켰다. Hybridization은 dye-swapping과 함께 3번 반복해서 실시하였으며, data는 scatter plot smoother 'LOWESS' 방법을 사용한 intensity-dependent 방법으로 표준화하였다.

RT-PCR 분석

분리한 RNA를 260 nm에서 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 정량 한 후 Maxime RT-PCR Premix kit (Intron, Korea)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 세포에서 분리한 total RNA 250 ng에 각각의 유전자에 특이적인 primer를 20 pmole씩 첨가한 후 RNase-free water로 전체 volume이 20 µl가 되게 하였다. 이 혼합물을 Maxime RT-PCR Premix와 섞은 후 45°C에서 30분간 reverse transcription 반응 후 94°C에서 5분 간 가열하여 reverse transcriptase의 활성을 없애고 PCR 반응을 수행하였다. PCR은 94°C에서 45초, 72°C에서 45초로 25회 반복 반응하였다. 얻어진 PCR product를 1.5% agarose gel에서 전기영동 한 후, ethidium bromide로 염색하여 각 유전자들의 발현 정도를 확인하였다. 실험에 사용한 각 유전자에 특이적인 primer sequence는 Table 1에 기술하였다.

Antibodies and western blot analysis

PAC1, TDAG51, EGR2, GFP에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다. PARP, SGK1, PLK2, ALCAM에 대한 항체는 Cell Signaling Technology에서 구입하였으며, Flag과 α-tubulin에 대한 항체는 Sigma로부터 구입하였다. TGF-β를 시간 별로 처리한 AML12 세포의 lysates를 7.5-15%

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR analyses

Name of Gene	Direction	Nucleotide sequences
PAC1	Sense	5'- ACTGTCCGGATCTGTGCTCT-3'
	Antisense	5'- CCCCATGAACTGAAGTTGG-3'
TDRG51	Sense	5'- CTGAAGGAAGGAGTGCTGGA-3'
	Antisense	5'- TGGTAGACTTGACCGCCAGT-3'
EGR2	Sense	5'- CAGTGACTGCCACCCCTTAT-3'
	Antisense	5'- GACCAGAGGCTGAAGACTGG-3'
SGK1	Sense	5'- TTGGGCTCTGCAAAGAGAAT-3'
	Antisense	5'- CTCGGTAACTCGGGATCAA-3'
PLK2	Sense	5'- GGCAAGAAGGACAAAGCAAG-3'
	Antisense	5'- CCCAAAGCCATATTTGTTGG-3'
ALCAM	Sense	5'- CAGGCCTTGATGGTACACT-3'
	Antisense	5'- TGATGTTGCCATCTGGGTAA-3'
b-actin	Sense	5'- GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'
	Antisense	5'- CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'

SDS-PAGE로 분리한 후 polyvinylidene difluoride membrane (Amersham Bioscience)으로 transfer 하였다. 비 특이적인 단백질들의 결합을 방지하기 위해 5% skim milk가 첨가된 TBST 용액(150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.05% Tween20)으로 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 적당한 1차 항체와 반응시켰다. Horseradish peroxidase가 붙어있는 적당한 2차 항체와의 반응 후 enhanced chemiluminescence reagents (ECL, Amersham Bioscience)를 사용하여 각 단백질들의 발현 변화를 확인하였다.

Adenoviral vectors

Constitutive active (CA, T256D) mutant SGK1과 kinase dead (KD, K127M) mutant SGK1을 발현하는 adenoviral vector와 GFP를 발현하는 adenoviral vector들은 모두 허강민 교수(충남대학교 의과대학)로부터 제공 받아 본 실험에 사용하였다[23].

결과 및 고찰

TGF-β에 의한 세포사멸 과정 동안 발현이 변화되는 유전자들의 탐색

TGF-β는 여러 종류의 세포에서 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다. 본 연구에서 사용한 AML12 세포는 쥐의 간세포로서 TGF-β에 의해 세포사멸이 유도된다는 것이 알려져 있다 [25]. 본 연구에서는 TGF-β에 의한 세포사멸 과정에서 중요한 기능을 담당하는 유전자를 탐색하기 위해 AML12 세포에 TGF-β를 처리하였을 때 발현이 변화되는 유전자를 microarray analysis를 통해 탐색하고자 하였다. 먼저 AML12 세포에 TGF-β를 처리하였을 때 세포사멸이 일어나는지 검증하였다. AML12 세포에 5 ng/ml의 TGF-β를 처리한 후 세포의 형태를 위상차 현미경을 이용하여 관찰한 결과 24 시간 후부터 세포의 부피 감소와 더불어 세포사멸 정도가 급격히 증가하였으며, 36시간 후에는 거의 모든 세포들이 사멸됨을 볼 수 있었다(Fig. 1A). 또한 유세포분석기(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS)를 사용하여 TGF-β에 의한 AML12 세포의 사멸 정도를 확인해 본 결과 세포사멸을 나타내는 Sub G1기의 세포 수가 TGF-β를 12시간 처리하였을 때 7.73%, 24시간 처리시 25.58%, 36시간 후에는 39.31%의 세포사멸이 일어남을 확인하였다(Fig. 1B). 이와 유사한 실험으로 세포사멸 과정에서 활성화되는 caspase 단백질에 의해 절단되는 PARP 단백질의 cleavage를 관찰한 결과 TGF-β를 처리한 세포의 경우 24시간 이후부터 PARP 단백질의 cleavage가 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1C). 이러한 결과들을 통해 TGF-β에 의해 AML12 세포의 세포사멸이 유도됨을 검증할 수 있었다.

본 연구에서는 TGF-β에 의한 세포사멸 과정에서 중요한 기능을 담당하는 유전자를 탐색하고자 TGF-β를 1시간 동안

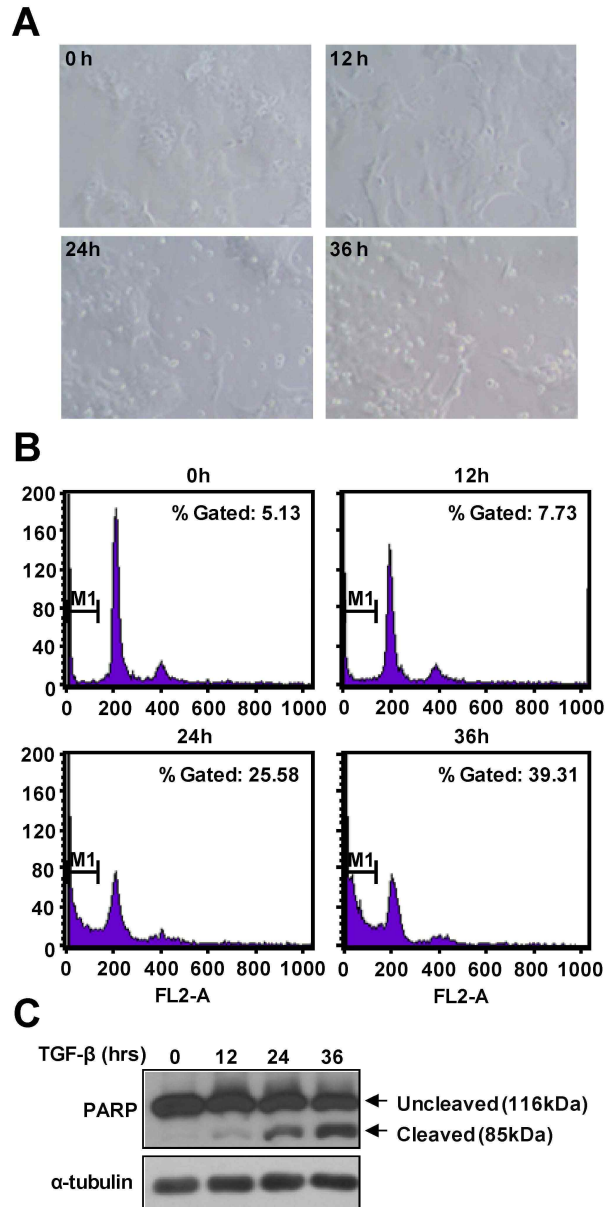


Fig. 1. TGF-β induces apoptosis in murine hepatocytes AML12 cells. Induction of apoptosis in AML12 cells by TGF-β was verified by cell morphology (A) and FACS analysis (B). (C) Representative immunoblots for PARP cleavage after TGF-β treatment in AML12 cells for the indicated time periods.

처리한 AML12 세포와 TGF-β를 처리하지 않은 AML12 세포로부터 RNA를 분리한 후 microarray analysis를 통해 TGF-β에 의해 발현이 변화되는 유전자들을 탐색하였다. 그 결과 AML12 세포에서 TGF-β에 의해 932개의 유전자들의 발현이 변화됨을 확인하였고, 이 가운데 5배 이상 발현이 증가한 유전자들과 60% 이상 발현이 감소하는 유전자들을 일차적으로 선별하였다(Table 2).

Table 2. Differentially expressed genes during TGF- β -induced apoptosis in AML12 cells

No.	Upregulated genes during TGF- β -induced apoptosis in AML12 cells	Fold	Accession number
1	Dual specificity phosphatase 2 (PAC1)	9.1	Q05923
2	Snail homologue 1	9.0	P11161
3	Early growth response 2 (EGR2)	8.5	Q8WV24
4	Fibroblast growth factor 21	7.7	Q07687
5	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (TDAG51)	6.7	O95863
6	Jun-B oncogene	5.8	Q9NSA1
7	Distal-less homeobox 2	5.6	Q5U079
8	Mus musculus MAD homolog 7 (Smad7)	5.0	O15105
9	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta (Gadd45b)	5.0	O75293
No.	Downregulated genes during TGF- β -induced apoptosis in AML12 cells	Fold	Accession number
1	Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)	0.11	Q13740
2	Forkhead box A2	0.15	O00141
3	Serum/glucocorticoid regulated kinase 1 (SGK1)	0.17	Q9NYY3
4	Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 1	0.24	O14792
5	Glycerol kinase	0.27	P32189
6	Polo-like kinase 2 (PLK2)	0.29	O95992
7	Cholesterol 25-hydroxylase	0.36	Q9Y261
8	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	0.39	P36873

TGF- β 에 의해 발현이 변화되는 유전자들의 mRNA 및 단백질 발현 양상 확인

일차적으로 선별된 유전자들 가운데 세포사멸과 관련이 있다는 보고가 있는 6개의 유전자들(TGF- β 에 의해 발현이 증가한 유전자 PAC1, TDAG51, EGR2와 감소한 유전자 SGK1, PLK2, ALCAM)을 선택하여 각 유전자들의 발현이 TGF- β 에 의해 변화되는지 RT-PCR과 Western blot analysis를 통해 검증하였다. RT-PCR을 통해 각 유전자의 mRNA 발현 정도를 조사한 결과 ALCAM을 제외한 5개 유전자의 발현이 microarray analysis 실험 결과와 일치함을 확인하였다(Fig. 2). 하지만 단백질 발현의 경우 TGF- β 에 의해 발현이 증가한 유전자의 경우 TDAG51과 발현이 감소한 유전자인 SGK1만이 mRNA 발현과 동일한 결과를 나타냄을 확인하였다(Fig. 3).

TGF- β 에 의한 세포사멸 과정에서 SGK1의 기능 규명

앞선 실험결과 TDAG51의 발현이 TGF- β 에 의해 증가함을 확인하였기 때문에 이후에는 TGF- β 에 의한 세포사멸 과정에서 TDAG51의 발현이 미치는 영향을 확인하기 위해 siRNA를 이용하여 TDAG51의 발현을 억제하였을 때 TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸이 억제되는지 확인하고자 하였다. 하지만 TDAG51의 발현을 억제하여도 TGF- β 에 의한 세포사멸에 아무런 영향을 미치지 못함을 확인하였다(data not shown). TGF- β 에 의해 발현이 감소하는 유전자로 확인된 SGK1의 경우 많은 보고들을 통해 여러 가지 세포사멸 인자들의 활성을 억제하여 세포사멸을 억제한다는 보고가 있어[4,11,17], 본 연구에서는 SGK1의 발현 감소가 TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸 과정에 필수적인지 확인하고자 하였다. 이를 위해서

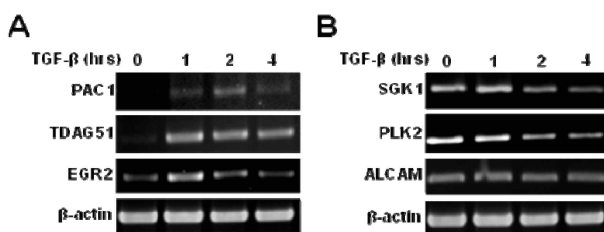


Fig. 2. mRNA expression of the genes those are differentially expressed during TGF- β -induced apoptosis in AML12 cells. (A) mRNA expression of PAC1, TDAG51, and EGR2 after TGF- β treatment in AML12 cells for the indicated times. (B) mRNA expression of SGK1, PLK2, and ALCAM after TGF- β treatment in AML12 cells for the indicated time periods.

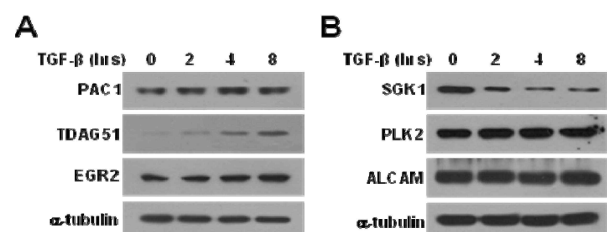


Fig. 3. Protein expression levels of the genes those are differentially expressed during TGF- β -induced apoptosis in AML12 cells. (A) Representative immunoblots for PAC1, TDAG51, and EGR2 after TGF- β treatment in AML12 cells for the indicated times. (B) Representative immunoblots for SGK1, PLK2, and ALCAM after TGF- β treatment in AML12 cells for the indicated time periods.

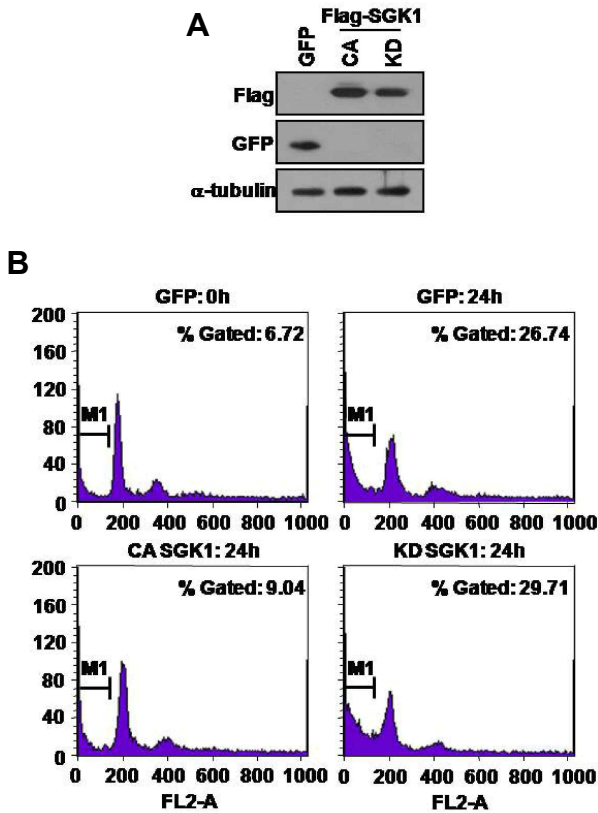


Fig. 4. Expression of SGK1 inhibits TGF- β -induced apoptosis in AML12 cells. (A) AML12 cells were infected with adenoviral SGK1 (CA), SGK1 (KD) or control adenovirus (GFP), and the cells were harvested after 48 h after infection and subjected western blot analysis. (B) Induction of apoptosis in adenoviral SGK1 (CA or KD) or GFP-infected AML12 cells by TGF- β was verified by FACS analysis.

adenoviral vector를 이용하여 AML12 세포에 constitutive active (CA, T256D) mutant SGK1 혹은 kinase dead (KD, K127M) mutant SGK1을 발현시킨 후 각 세포에서 TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸이 어떠한 영향을 받는지 확인하고자 하였다. Control로는 GFP 단백질을 발현하는 adenoviral vector를 사용하였다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이, GFP나 kinase dead form의 SGK1을 과발현시켰을 경우에는 TGF- β 에 의해 세포사멸이 유도되지만 constitutive active 형태의 SGK1을 과발현시킨 AML12 세포의 경우 TGF- β 에 의한 세포사멸이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 TGF- β 에 의한 SGK1 유전자 발현의 감소가 TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸 과정에 필수적임을 의미하는 것이다.

SGK는 phosphoinositide 3-kinase (PI-3 kinase)의 하위 신호전달 단백질인 phosphoinositide dependent kinase (PDK)에 의한 인산화를 통해 활성화되는 protein kinase B (PKB 또는 Akt), p70S6, PKA, PKC들을 포함하는 A/G

protein kinase subfamily에 속해 있다[15]. 특히, SGK1은 nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B)와 Bcl-2 family 단백질들과의 결합을 통해 cellular survival 및 metabolism을 조절한다고 알려진 Akt와 catalytic domain의 염기서열이 약 54% 정도 일치하며, 인산화 되는 자리 또한 RXXXXS/T로 유사하다고 보고된 바 있다. 이러한 SGK1은 IKK β 와 결합하여 IKK β 를 인산화 시켜 nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B)의 활성을 유도하고 이를 통해 여러 암세포의 세포사멸을 억제한다고 알려져 있다[26]. 향후에는 어떠한 기작을 통해 TGF- β 에 의해 SGK1의 발현이 감소하게 되는지 확인하고, TGF- β 에 의한 세포사멸 과정에서 중요한 기능을 담당하는 여러 가지 단백질들의 활성화에 미치는 SGK1의 역할을 규명하는 연구가 수행되어야 할 것이다.

References

- Chen, R. H. and Chang, T. Y. 1997. Involvement of Caspase family proteases in transforming growth factor-beta-induced apoptosis. *Cell Growth Differ.* **8**, 821-827.
- Fukuchi, Y., Kizaki, M., Yamato, K., Kawamura, C., Umezawa, A., Hata, J., Nishihara, T. and Ikeda, Y. 2001. Mcl-1, an early-induction molecule, modulates activin A-induced apoptosis and differentiation of CML cells. *Oncogene* **20**, 704-713.
- Fukuda, K., Kojiro, M. and Chiu, J. F. 1993. Induction of apoptosis by transforming growth factor-beta 1 in the rat hepatoma cell line McA-RH7777: a possible association with tissue transglutaminase expression. *Hepatology* **18**, 945-953.
- Hsu, W. L., Chiu, T. H., Tai, D. J., Ma, Y. L. and Lee, E. H. 2009. A novel defense mechanism that is activated on amyloid-beta insult to mediate cell survival: role of SGK1-STAT1/STAT2 signaling. *Cell Death Differ.* **16**, 1515-1529.
- Ikushima, H. and Miyazono, K. 2011. Biology of transforming growth factor-beta signaling. *Curr. Pharm Biotechnol.* **12**, 2099-2107.
- Jang, C. W., Chen, C. H., Chen, C. C., Chen, J. Y., Su, Y. H. and Chen, R. H. 2002. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat. Cell Biol.* **4**, 51-58.
- Koseki, T., Yamato, K., Krajewski, S., Reed, J. C., Tsujimoto, Y. and Nishihara, T. 1995. Activin A-induced apoptosis is suppressed by BCL-2. *FEBS Lett.* **376**, 247-250.
- Lan, H. Y. and Chung, A. C. 2011. Transforming growth factor-beta and Smads. *Contrib. Nephrol.* **170**, 75-82.
- Larisch, S., Yi, Y., Lotan, R., Kerner, H., Eimeri, S., Tony Parks, W., Gottfried, Y., Birkey Reffey, S., de Caestecker, M. P., Danielpour, D., Book-Melamed, N., Timberg, R., Duckett, C. S., Lechleider, R. J., Steller, H., Orly, J., Kim, S. J. and Roberts, A. B. 2000. A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat. Cell Biol.* **2**, 915-921.

10. Lin, J. K. and Chou, C. K. 1992. In vivo apoptosis in the human hepatoma-cell line induced by transforming growth factor-beta1. *Cancer Res.* **52**, 385-388.
11. Melhem, A., Yamada, S. D., Fleming, G. F., Delgado, B., Brickley, D. R., Wu, W., Kocherginsky, M. and Conzen, S. D. 2009. Administration of glucocorticoids to ovarian cancer patients is associated with expression of the anti-apoptotic genes SGK1 and MKP1/DUSP1 in ovarian tissues. *Clin. Cancer Res.* **15**, 3196-3204.
12. Meulmeester, E. and ten Dijke, P. 2011. The dynamic roles of TGF-beta in cancer. *J. Pathol.* **223**, 205-218.
13. Oberhammer, F., Bursch, W., Tiefenbacher, R., Froschl, G., Pavelka, M., Purchio, T. and Schulte-Hermann, R. 1993. Apoptosis is induced by transforming growth factor-beta1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of the DNA. *Hepatology* **18**, 1238-1246.
14. Pardali, K. and Moustakas, A. 2007. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1775**, 21-62.
15. Park, J., Leong, M. L., Buse, P., Maiyar, A. C., Firestone, G. L. and Hemmings, B. A. 1999. Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J.* **18**, 3024-3033.
16. Perlman, R., Schiemann, W. P., Brooks, M. W., Lodish, H. F. and Weinberg, R. A. 2001. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat. Cell Biol.* **3**, 708-714.
17. Rusai, K., Prókai, A., Szebeni, B., Fekete, A., Treszl, A., Vannay, A., Müller, V., Reusz, G., Heemann, U., Lutz, J., Tulassay, T. and Szabó, A. J. 2010. Role of serum and glucocorticoid-regulated kinase-1 in the protective effects of erythropoietin during renal ischemia/reperfusion injury. *Biochem. Pharmacol.* **79**, 1173-1181.
18. Saltzman, A., Munro, R., Searfoss, G., Franks, C., Jaye, M. and Ivashchenko, Y. 1998. Transforming growth factor-beta-mediated apoptosis in the Ramos B-lymphoma cell line is accompanied by caspase activation and Bcl-XL downregulation. *Exp. Cell Res.* **242**, 244-254.
19. Sanchez, A., Alvarez, A. M., Benito, M. and Fabregat, I. 1996. Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocytes primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *J. Biol. Chem.* **271**, 7416-7422.
20. Selvakumaran, M., Lin, H. K., Sjin, R. T., Reed, J. C., Liebermann, D. A. and Hoffman, B. 1994. The novel primary response gene MyD118 and the proto-oncogenes myb, myc, and bcl-2 modulate transforming growth factor beta 1-induced apoptosis of myeloid leukemia cells. *Mol. Cell Biol.* **14**, 2352-2360.
21. Shi, Y. and Massague, J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700.
22. Valderrama-Carvajal, H., Cocolakis, E., Lacerte, A., Lee, E. H., Krystal, G., Ali, S. and Lebrun, J. J. 2002. Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat. Cell Biol.* **4**, 963-969.
23. Won, M., Park, K. A., Byun, H. S., Kim, Y. R., Choi, B. L., Hong, J. H., Park, J., Seok, J. H., Lee, Y. H., Cho, C. H., Song, I. S., Kim, Y. K., Shen, H. M. and Hur, G. M. 2009. Protein kinase SGK1 enhances MEK/ERK complex formation through the phosphorylation of REK2: Implication for the positive regulatory role of SGK1 on the ERK function during liver regeneration. *J. Hepatol.* **51**, 67-76.
24. Yamamoto, M., Fukuda, K., Miura, N., Suzuki, R., Kido, T. and Komatsu, Y. 1998. Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction. *Hepatology* **27**, 959-966.
25. Yoo, J., Ghiassi, M., Jirmanova, L., Balliet, A. G., Hoffman, B., Fornace Jr., A. J., Liebermann, D. A., Bottinger, E. P. and Roberts, A. B. 2003. Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 43001-43007.
26. Zhang, L., Cui, R., Cheng, X. and Du, J. 2005. Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating Ikb kinase. *Cancer Res.* **65**, 457-464.
27. Zi, Z., Chapnick, D. A. and Liu, X. 2012. Dynamics of TGF-beta/Smad signaling. *FEBS Lett.* **586**, 1921-1928.

초록 : TGF- β 에 의한 간세포의 세포사멸 과정에서 SGK1 발현 감소의 중요성

남인구 · 유지윤*

(경상대학교 자연과학대학 미생물학과/생명과학연구원)

Transforming growth factor- β (TGF- β)에 의해 유도되는 세포사멸 과정은 간에서 손상 받은 조직이나 비정상적인 조직을 제거하는데 중요한 역할을 담당한다. 간세포에서 TGF- β 에 의해 유도되는 세포사멸 과정 동안 중요한 기능을 담당하는 유전자를 탐색하고자 쥐의 간세포인 AML12 세포를 이용하여 TGF- β 처리 전후에 발현이 변화되는 유전자를 microarray analysis를 통해 확인하였다. TGF- β 에 의해 여러 가지 유전자들의 발현이 변화됨을 확인하였는데, 그 가운데 여러 가지 세포사멸 인자들의 활성을 억제하여 세포사멸을 억제한다고 알려져 있는 SGK1의 발현 감소를 확인하였다. TGF- β 에 의해 SGK1의 mRNA와 단백질 level이 모두 감소함을 확인하였고, 항상 active한 형태의 SGK1 (CA-SGK1)을 발현시켰을 때 TGF- β 에 의한 세포사멸이 억제됨을 확인하였다. 이러한 결과들은 간세포에서 SGK1의 발현 감소가 TGF- β 에 의한 세포사멸을 유도하는데 중요한 기능을 담당할 가능성이 높음을 의미하는 것이다.