

## CLK3 is a Novel Negative Regulator of NF- $\kappa$ B Signaling

Byeol-Eun Jeon, Chan-Seong Kwon, Ji-Eun Lee, Ye-Lin Woo and Sang-Woo Kim\*

Department of Biological Sciences, College of Natural Science, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received March 20, 2022 /Revised November 4, 2022 /Accepted November 4, 2022

Chronic inflammation has been shown to be closely associated with tumor development and progression. Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) is composed of a family of five transcription factors. NF- $\kappa$ B signaling plays a crucial role in the inflammatory response and is often found to be dysregulated in various types of cancer, making it an attractive target in cancer therapeutics. In this study, CDC-like kinase 3 (CLK3) was identified as a novel kinase that regulates the NF- $\kappa$ B signaling pathway. Our data demonstrate that CLK3 inhibits the canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B pathways. Luciferase assays following the transient or stable expression of CLK3 indicated that this kinase inhibited NF- $\kappa$ B activation mediated by Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), which are known to activate NF- $\kappa$ B signaling via the canonical pathway. Consistent with data on the ectopic expression of CLK3, CLK3 knockdown using shRNA constructs increased NF- $\kappa$ B activity 1.5-fold upon stimulation with TNF $\alpha$  in HEK293 cells compared with the control cells. Additionally, overexpression of CLK3 suppressed the activation of this signaling pathway induced by NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) or CD40, which are well-established activators of the non-canonical pathway. To further examine the negative impact of CLK3 on NF- $\kappa$ B signaling, we performed Western blotting following the TNF $\alpha$  treatment to directly identify the molecular components of the NF- $\kappa$ B pathway that are affected by this kinase. Our results revealed that CLK3 mitigated the phosphorylation/activation of transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1), inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase alpha/beta (IKK $\alpha/\beta$ ), NF- $\kappa$ B p65 (RelA), NF- $\kappa$ B inhibitor alpha (I $\kappa$ B $\alpha$ ), and Extracellular signal-regulated kinase 1/2-Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2-MAPK), suggesting that CLK3 inhibits both the NF- $\kappa$ B and MAPK signaling activated by TNF $\alpha$  exposure. Further studies are required to elucidate the mechanism by which CLK3 inhibits the canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B pathways. Collectively, these findings reveal CLK3 as a novel negative regulator of NF- $\kappa$ B signaling.

**Key words :** Cancer, CLK3, inflammation, MAPK, NF- $\kappa$ B

### 서 론

암은 현재 대한민국 사망 원인 1위를 차지하고 있다. 통계청이 발표한 ‘2019년 사망원인 통계결과’에 따르면 암으로 인한 사망자는 전체 사망자의 27.5%에 달하며 2019년 한 해 동안 인구 10만 명당 남성은 196.3명, 여성은 120.2명이 암으로 사망하였다. 암으로 인한 사망률은 사망 원인 2위인 심장질환(남성 59.6명, 여성 61.3명)에 비하여 두 배 이상 높다.

많은 암이 만성적인 염증을 앓고 있는 부위에서 발생한다[4].

염증은 감염 또는 손상에 대한 반응이며 조직 손상을 억제하고 재생을 돕는다. 하지만 조직이 장기간에 걸쳐 지속적인 손상을 입으면 염증반응 또한 만성으로 발전하게 되는데, 만성염증은 세포 스트레스를 강화하고 DNA 손상을 축적 시키면서 세포를 변형시킨다[1, 17]. 변형된 세포가 세포 사멸(Apoptosis) 기능을 잃게 되면 죽지 않고 계속적으로 증식하며 초기 종양세포 형성에 기여하게 된다[7]. 더불어 만성염증은 염증 인자를 모집하여 세포의 증식을 촉진시켜 종양 형성을 가속화한다[18]. 염증반응을 매개하는 중요인자 중의 하나로 NF- $\kappa$ B 전사인자를 들 수 있다.

NF- $\kappa$ B는 면역 체계와 염증 반응에 중심축을 이루는 다섯 개의 전사 인자(NF- $\kappa$ B1/p105, NF- $\kappa$ B2/p100, RelA/p65, RelB, 그리고 c-Rel)로 구성된 단백질 군(protein family)으로 시토카인(TNF $\alpha$ , IL-6, GM-CSF), 키모카인(MIP-1 $\alpha$ , MCP1, IL-8), 접착분자(E-selectin, VCAM, ICAM-1) 등의 발현을 조절한다[16]. 뿐만 아니라 NF- $\kappa$ B는 세포 증식 및 세포 사멸과 관련된 유전자(c-IAPs, FLICE inhibitory pro-

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2260, Fax : +82-51-581-2962

E-mail : [kimsw@pusan.ac.kr](mailto:kimsw@pusan.ac.kr)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

tein, TRAF1, TRAF2 등)와 혈관 형성에 관여하는 중요한 인자(VEGF)들의 발현을 증가시키는데, 이는 종양 표현형 (oncogenic phenotype) 유지에 중요한 역할을 한다[21]. 실제로 대다수의 암종 세포주에서 NF- $\kappa$ B의 비정상적인 활성화가 보고되었으며 NF- $\kappa$ B가 활성화되면 항암치료의 효과도 현저히 떨어진다[6, 12, 13]. 따라서 종양의 성장과 전이를 막고 항암 치료의 효과를 높이기 위해서는 NF- $\kappa$ B 활성화에 대한 기작과 조절자들을 밝히고, 이를 바탕으로 비정상적인 NF- $\kappa$ B 활성을 억제 해야 하며[5, 8] NF- $\kappa$ B 활성화 선택적으로 저해하는 치료제 개발이 시급하다.

CLK3는 CDC 유사 키네이스(CLK1-4)에 속하며 세린/트레오닌 및 티로신 기질 모두에 작용하는 이중 특이성 키네이스(Dual specificity kinase)이다. CLK3는 spliceosome 복합체의 SR 단백질을 인산화 함으로써 스플라이싱 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근, 조혈모세포 (hematopoietic stem cell, HSC)의 기능 조절에 관여하는 주요 유전자는 특이한 선택적 스플라이싱(alternative splicing) 패턴을 나타내는데 CLK3가 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. CLK3는 HMGA2 (High mobility Group AT-Hook 2)의 splicing kinase로 역할 하면서 CLK3-HMGA2 축을 형성하여 발달 중인 HSC 특성에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. CLK3가 splicing을 조절한다는 기능적 연구 결과는 보고되었지만 NF- $\kappa$ B 신호경로와의 연관성은 구체적으로 밝혀진 바가 없다. 본 연구 논문에서는 CLK3가 NF- $\kappa$ B 활성화를 조절함과 그에 대한 기작을 밝혔다.

## 재료 및 방법

### 세포주 배양 및 항체

인간 대장암 유래 세포주(HCT116; Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea) 및 인간 배아 신장 유래 세포주(HEK 293)는 10%의 FBS (Fetal Bovine Serum, Hyclone), 1% L-glutamine, 1% HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid), 그리고 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM (Welgene; Gyeongsan, Korea) 배지에서 5% 이산화탄소와 37°C 환경 하에 배양되었다.

Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)사에서 phospho-ERK1/2 (#9101), phospho-IKK $\alpha$ / $\beta$  (#2697), phospho-p65 (#3033), phospho-TAK1 (#4531), phospho-JNK (#4668), phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (#9247), phospho-p38 (#4511), phospho-JNK (#4668) 1차 항체를 구매하였고, Santa cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)사에서 anti-I $\kappa$ B $\alpha$  (#sc-1643)와  $\beta$ -actin (#sc-47778)을 구매하여 사용하였다. 2차항체는 Bethyl (Montgomery, TX, USA)사에서 HRP conjugated anti-rabbit 및 anti-mouse (A120-101p 및 A90-116p-33) 항체를 구매하여 사용하였다.

### Luciferase reporter 분석

NF- $\kappa$ B 활성을 Luciferase reporter 분석으로 확인하기 위하여, HEK293 세포주를 24-well plate에  $3 \times 10^4$  cells/well로 배양하여 24시간 후 세포가 plate에 완전히 부착한 것을 확인하고 NF- $\kappa$ B luciferase constructs (Firefly luciferases, 10 ng)와 pCMV-Renilla Luciferase constructs (0.5 ng) 및 pcDNA-CLK3 또는 vector 대조군을 공동 형질주입시켰다. 또는, CLK3 과발현 HCT116 세포주를 24 well plate에  $3 \times 10^4$  cells/well로 배양하여 24시간 후 세포가 plate에 완전히 부착한 것을 확인하고 NF- $\kappa$ B luciferase constructs (10 ng)와 Renilla luciferase constructs (0.5 ng)를 공동 형질 주입시켰다. 형질 주입 후 24시간 후에 세포를 수확하여 Firefly/Renilla Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega; Madison, WI, USA)으로 Luciferase 활성을 측정하였다. Firefly luciferases 활성은 Renilla luciferases 활성으로 정규화 하였고 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표기하였다[10].

### CLK3 과발현 HCT116 세포주 제작

CLK3를 MSCV-puro vector에 클로닝하기 위하여, Forward : 5'-TTTGGATCCATGCATCACTGTAA-3', Reverse : 5'-TTTGCTAGCATCTGCTTGGGT-3' primer를 이용하여 CLK3 암호화 영역을 PCR로 증폭시켰다. 확보한 CLK3 cDNA를 MSCV-puro vector의 BamHI과 NheI 제한효소 자리에 클로닝하였다.

CLK3를 안정적으로 발현하는 세포주 제작을 위하여, HEK293 세포주에 MSCV construct와 pKAT 및 VSVG를 Co-transfection 시켜 24시간 후 바이러스 배양액을 얻었다. 바이러스 배양액을 HCT116 세포주에 처리하고 puromycin (1 mg/ml)으로 형질도입된 세포주를 선별하였다.

### CLK3 knockdown HEK293 세포주 제작

CLK3 유전자에 대한 lentivirus small hairpin (shRNA) constructs를 Open BioSystems (Huntsville, AL, USA)에서 구입하였고, HEK293 세포주에 Packaging vector와 함께 co-transfection 시켰다. 대조군으로는 CDH-scramble vector를 HEK293 세포주에 Packaging vector와 함께 co-transfection 하였다. Transfection으로부터 24시간 후 바이러스 배양액을 얻어 HEK293 세포주에 처리하고 GFP 발현 세포주를 초고속 유세포 자동분리분석기(BD Aria fusion)를 이용하여 선별하였다.

### Western blot 실험

HEK293 세포주에 vector 또는 CLK3를 형질주입하고, TNF $\alpha$ 를 시간별로 처리한 후 TAK1, IKK $\alpha$ / $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , p65, MAPK 등의 인산화 정도를 Western blot으로 분석하였다. Na-vanadate (1 mM),  $\beta$ -glycerophosphate disodium salt (50 mM), ProteaseArrestTM (G-Biosciences; Maryland Height,

MO, USA),  $\beta$ -mercaptoethanol (142 mM), 그리고 EDTA (5 mM)을 함유한 RIPA buffer (ELPIS Biotechnology; Daejeon, Korea)를 사용하여 세포를 용해시킨 후, 100°C에서 10분간 가열한 다음 Polyacrylamide gel 전기영동(PAGE)을 수행하였다. 전기영동 후 단백질은 PVDF membrane (Immobilon P)에 옮겨 1% BSA (MP Biomedicals; Santa Ana, CA, USA)를 이용하여 blocking 하였다. 1차 항체를 4°C에서 16시간 동안 처리한 뒤 Tween-20 (P1362; Duchefa Biochemie; Haarlem, Netherlands)가 포함된 Tris-buffered saline (TBST)로 10분간 3번 세척한 후, 2차 항체를 실온에서 1시간 처리하였다. 마지막으로 membrane을 TBST에 10분간 3번 상온에서 세척한 뒤 chemiluminescent substrate (EZWestLumi plus; ATTO, Osaka, Japan)을 처리하고 Luminograph II (ATTO Technology; Osaka, Japan)를 이용해 단백질 band를 시각화하였다[11].

#### 통계처리

통계 처리를 위하여 모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타냈으며, 통계적으로 유의미한 차이는 GraphPad Prism (Version 5.03)을 이용하여 two-tailed Mann-Whitney 또는 one-way ANOVA test를 수행하여 결론 지었다. 모든 데이터는 최소 3번 이상의 반복실험을 통하여 재현성을 검증하였다.

## 결 과

#### CLK3에 의한 정규 NF- $\kappa$ B 활성 저해

NF- $\kappa$ B의 활성화 경로는 정규 활성화 경로(Canonical pathway)와 비정규 활성화 경로(Non-canonical pathway)로 나뉜다[9]. 우리는 먼저 CLK3가 정규 NF- $\kappa$ B 활성화 경로에 영향을 미치는지 검증하기 위하여 인간 배아 신장 유래 세포주 HEK293에 pcDNA3 vector 또는 CLK3를 형질주입하였다. 24시간 후에 정규 NF- $\kappa$ B 활성 유도제로 잘 알려진 TNF $\alpha$ 를 세포에 처리하고 루시퍼레이스 분석을 통하여 NF- $\kappa$ B의 활성을 확인하였다. Vector가 도입된 경우 TNF $\alpha$ 는 NF- $\kappa$ B 루시퍼레이스 활성을 효율적으로 증가시켰으나, CLK3가 도입된 세포의 NF- $\kappa$ B의 활성은 대조군에 비하여 2-3배 감소하였다(Fig. 1A). 이 결과는 CLK3가 TNF $\alpha$ 에 의한 정규 NF- $\kappa$ B 활성화 경로를 저해함을 의미한다. 또 다른 정규 NF- $\kappa$ B 활성화 유도제인 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)는 PKC (protein kinase C)를 활성화시키며, 이는 IKK 복합체(IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  및 IKK $\gamma$ )를 통한 NF- $\kappa$ B의 활성화로 이어진다. 대조군에 비하여 CLK3를 형질주입한 경우 루시퍼레이스 활성이 약 7배 정도 감소하였으며, 이는 CLK3가 PKC-IKK 경로에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화를 저해함을 나타낸다. 우리는 위의 결과가 HEK293 세포주 특이적으로 나타나는 현상임을 확인하기

위하여 인간 대장암 유래 세포주인 HCT116에 MSCV vector 또는 CLK3 (MSCV-CLK3)를 형질도입하여 안정적으로 과발현시킨 후 루시퍼레이스 분석을 진행하였다(Fig. 1C - Fig. 1E). MSCV vector를 형질도입한 경우 TNF $\alpha$  처리 시 NF- $\kappa$ B 활성이 약 2.8배 증가한 반면, CLK3 과발현 세포주에서는 TNF $\alpha$  처리와 미처리 그룹 간에 루시퍼레이스 활성에 차이가 없었다(Fig. 1D). 마찬가지로의 결과를 PMA 처리 그룹에서도 관찰할 수 있었다(Fig. 1E).

#### CLK3 knockdown으로 인한 NF- $\kappa$ B 활성 증가

앞선 결과로 CLK3 과발현이 NF- $\kappa$ B 활성을 저해하는 것을 보였으므로 우리는 CLK3 저해 시 NF- $\kappa$ B 활성이 증가할 것이라는 가설을 세웠다. 이를 확인하기 위하여 CLK3에 특이적인 shRNA construct를 이용하여 HEK293 세포주에서 CLK3를 Knock-down 시켰다(Fig. 2A). 대조군인 HEK293 CDH-scramble 과 CLK3가 Knock-down된 HEK293 shRNA-CLK3 세포주에 TNF $\alpha$ 를 처리하여 NF- $\kappa$ B 활성을 유도시킨 결과 대조군 대비 CLK3 knock-down 세포주에서 NF- $\kappa$ B 활성이 1.5배 증가하였다(Fig. 2B).

위 실험결과를 종합하면, HEK293과 HCT116 세포주에 형질주입과 형질도입 방식으로 CLK3의 발현을 조절함에 따라 정규 NF- $\kappa$ B 활성이 CLK3에 의해 저해됨을 나타낸다.

#### CLK3에 의한 비정규 NF- $\kappa$ B 활성 저해

다음으로 우리는 CLK3가 비정규 NF- $\kappa$ B 활성화 경로에 미치는 영향을 조사하기 위하여 HEK293 세포에 비정규 NF- $\kappa$ B 경로를 활성화시키는 유도제와 함께 CLK3를 공동 도입하여 24시간 후 루시퍼레이스 분석으로 NF- $\kappa$ B 활성을 확인하였다. NF- $\kappa$ B 유도 카이네이즈 NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase)은 활성화 되면서 동종 이합체 IKK $\alpha$ 를 자극시켜[15] RelB:p100 이합체의 p100를 직접 인산화 한다. 인산화 된 p100은 유비퀴틴화로 인해 부분 분해되어 p52를 형성한다. p52는 RelB와 결합하여 RelB:p52 이합체로 형태가 바뀌고 핵 내로 이동하여 표적 유전자의 활성을 향상시킨다[19, 22]. NF- $\kappa$ B 전사적 활성은 NIK 처리시 매우 효율적으로 증가하였으나 CLK3와 공동 도입한 경우 3배 이상까지 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 우리는 비정규 NF- $\kappa$ B 활성을 유도할 수 있는 또 다른 방법을 이용하여 CLK3가 비정규 NF- $\kappa$ B 경로에 미치는 영향을 분석하였다. NIK의 상위 신호전달 분자에 해당하는 CD40은 CD40L (CD154)에 의해 활성화되며, 이때 CD40은 cIAP1/2 및 TRAF2/3 복합체와 결합한다. 이 복합체는 자극이 없을 때는 NIK의 유비퀴틴화 및 분해를 유도하나[14, 20] CD40과 결합하게 되면 TRAF3가 분해되면서 NIK이 활성화 되어 NF- $\kappa$ B2의 신호전달경로가 전개된다[2, 3]. 우리는 CD40를 이용하여 비정규 NF- $\kappa$ B 경로를 활성화하고,

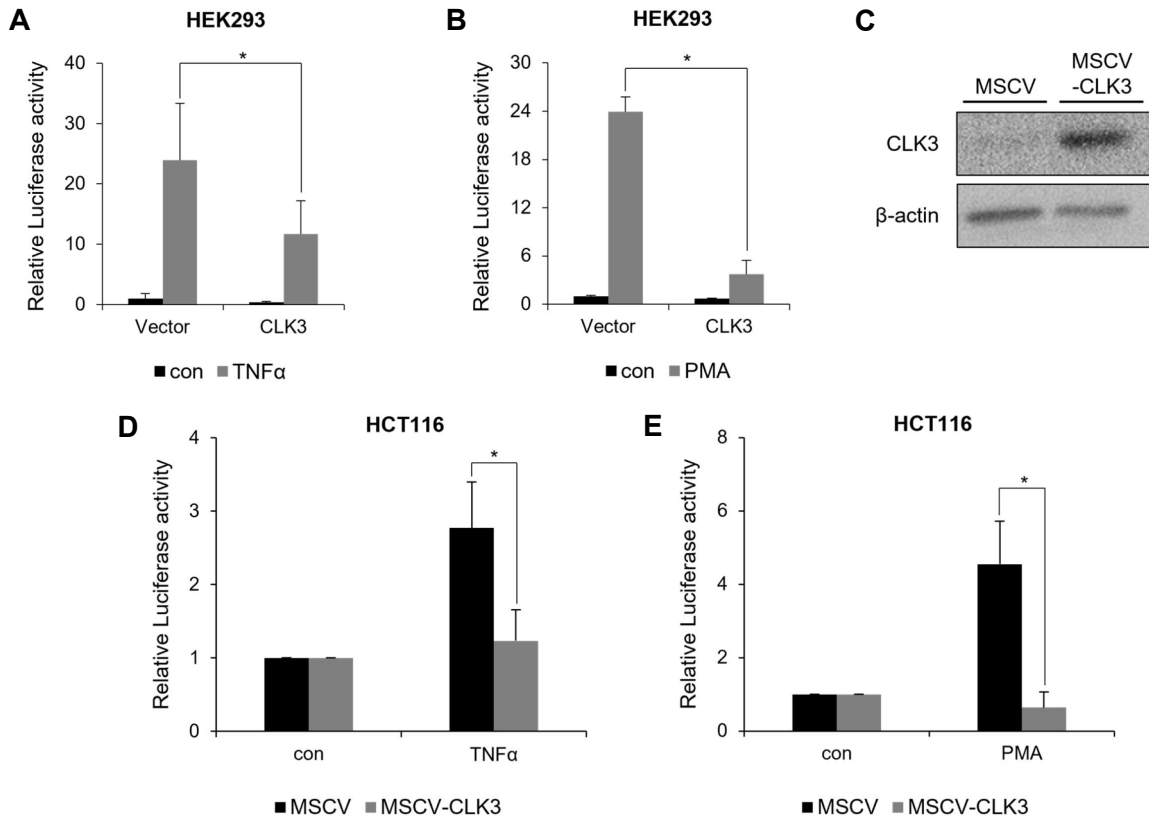


Fig. 1. CLK3 inhibits canonical NF-κB signaling. HEK293 cells were transfected with either vector control or CLK3 along with NF-κB luciferase constructs (firefly) and renilla constructs and incubated for 24 hr. Then, cells were exposed to TNFα (100 ng/ml) (A) or PMA (200 ng/ml) (B). After 6 hr incubation, dual luciferase reporter assays were performed. NF-κB firefly luciferase activity was normalized to renilla luciferase activity. Statistical significance was calculated using the two-tailed one-way analysis of variance (ANOVA) test (\* $p < 0.05$ ). (C) Human colorectal cancer cell line HCT116 cells transduced with either MSCV vector control or MSCV-CLK3 were lysed and ectopic expression of CLK3 was analyzed by Western blot. (D) HCT116 cells stably expressing either vector control or CLK3 were treated with vehicle or TNFα (100 ng/ml) (D) or for PMA (200 ng/ml) (E), followed by dual luciferase reporter assays. The two-tailed Mann-Whitney test was used to calculate statistical significance (\* $p < 0.05$ ).

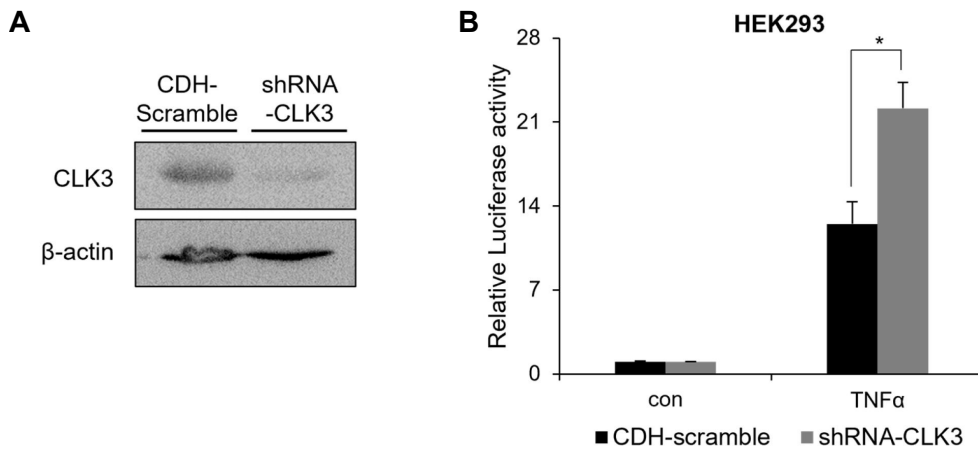


Fig. 2. Knock-down of CLK3 activates canonical NF-κB signals. (A) HEK293 cells transduced with either CDH-scramble vector control or shRNA-CLK3 were lysed and downregulation of CLK3 was analyzed by Western blot. (B) HEK293 cells stably expressing either vector control or shRNA-CLK3 were treated with vehicle or TNFα (100 ng/ml), followed by dual luciferase reporter assays. Statistical significance was calculated using the two-tailed Mann-Whitney test (\* $p < 0.05$ ).

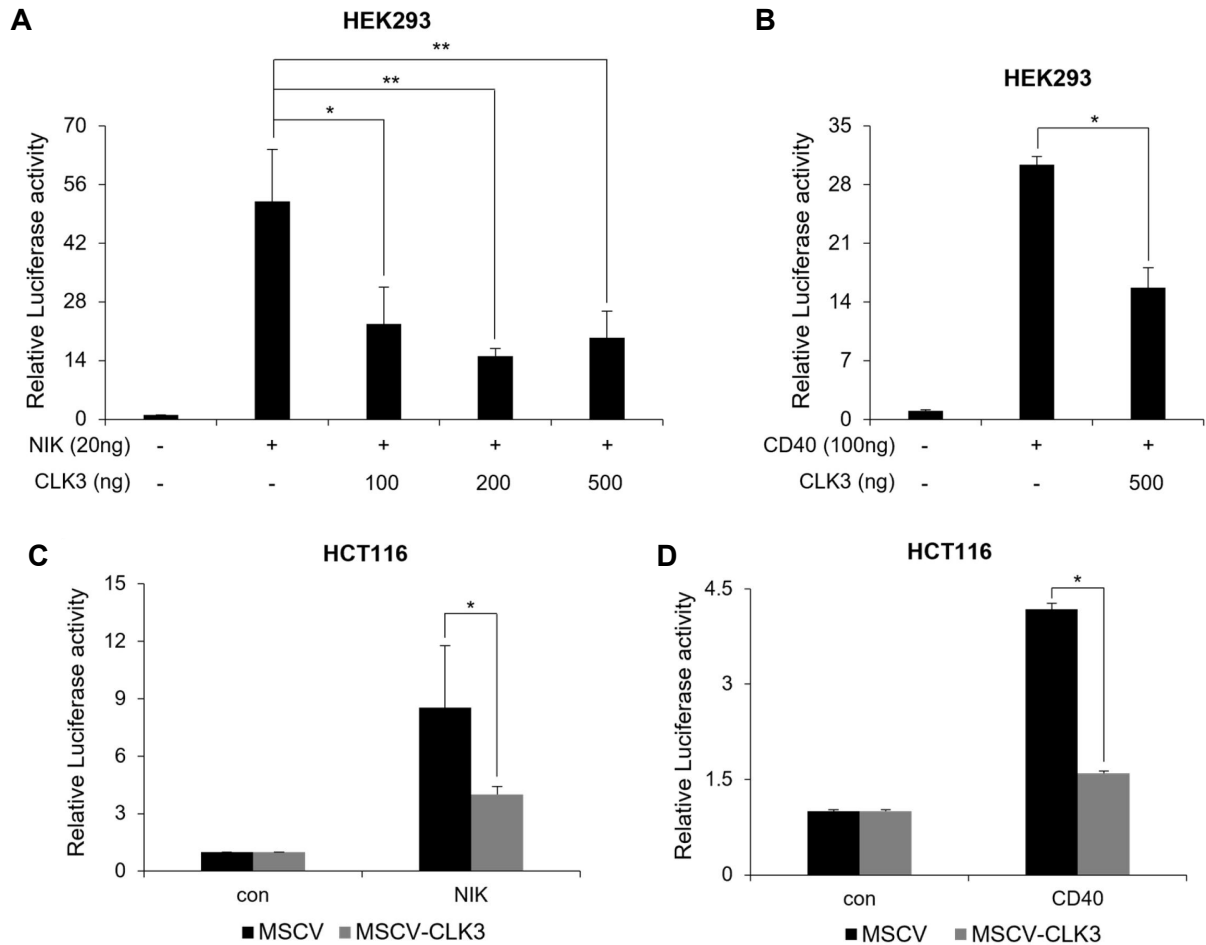


Fig. 3. CLK3 inhibits non-canonical NF-κB signaling. HEK293 cells were transfected with either NIK (40 ng/ml) (A) or CD40 (100 ng/ml) (B) in the presence or absence of CLK3, followed by dual luciferase reporter assays. Statistical significance was calculated using the two-tailed one-way analysis of variance (ANOVA) test (\* $p < 0.05$ ). HCT116 cells transduced with either MSCV or MSCV-CLK3 were transfected with NIK (80 ng/ml) (C) or CD40 (100 ng/ml) (D), followed by assessment of NF-κB activity by dual luciferase reporter assays. NF-κB firefly luciferase activity was normalized to renilla luciferase activity. The two-tailed Mann-Whitney test was used to calculate statistical significance (\* $p < 0.05$ ).

CLK3의 효과를 분석하였다. CD40 단일 처리 시 NF-κB 활성이 약 10배 증가하였으나 CLK3를 공동 도입한 경우 CD40 단일 처리에 비하여 NF-κB 활성이 2배가량 줄어들었다(Fig. 3B). 다른 세포주를 이용하여 위 실험의 재현성을 확인하기 위하여, CLK3를 안정적으로 과발현하는 HCT116 세포주에 vector 및 NIK 또는 CD40을 형질 주입하였다. MSCV vector가 형질도입된 HCT116 세포주에 NIK을 형질 주입한 경우 NF-κB 활성이 약 8.5배 증가한 반면, CLK3 과발현 세포주(MSCV-CLK3)에서는 NIK 처리 시 NF-κB 활성이 약 4배 증가하였다(Fig. 3C). 마찬가지로 CD40 형질 주입 시 HCT116-MSCV 세포주에서는 NF-κB 활성이 약 4배 증가하는 데에 비해 CLK3 과발현 세포주(MSCV-CLK3)는 약 1.5배 증가하였다(Fig. 3D). 위 결과들을 종합해보면 CLK3는 정규 및 비정규 NF-κB 신호전달 경로를 저해함을 나타낸다.

### CLK3의 NF-κB 활성 저해 기작 규명

앞의 연구에서 CLK3가 NF-κB의 정규/비정규 신호경로에 관여함을 보였다. NF-κB 전사인자의 활성화는, 리간드에 의해 수용체가 활성화되고, 수용체 하류에 있는 TRADD, TRAF, RIP, TAK1, IKK complex, IκBα 등을 포함한 여러 분자들이 관여하는 것으로 알려져 있다. 우리는 CLK3가 NF-κB 경로의 활성화에 관여하는 여러 분자중에서 어떤 분자에 영향을 미치는지 조사하기로 하였다. HEK293 세포주에 CLK3를 형질주입하고 24시간 후에 TNFα (100 ng/ml)를 0~8시간 처리 후 웨스턴 블롯을 진행하여 TAK1, IKKα/β, IκBα 그리고 p65의 인산화/활성화 및 IκBα의 단백질 발현 정도를 분석하였다(Fig. 4A). Vector를 형질주입하고 TNFα를 처리한 경우 보고된 바와 같이 인산화가 효율적으로 증가하였다. 반면에 CLK3를 도입한 경우에는 시간이 지남에 따라 이들 분자 모두의 인산화/활성화 정도

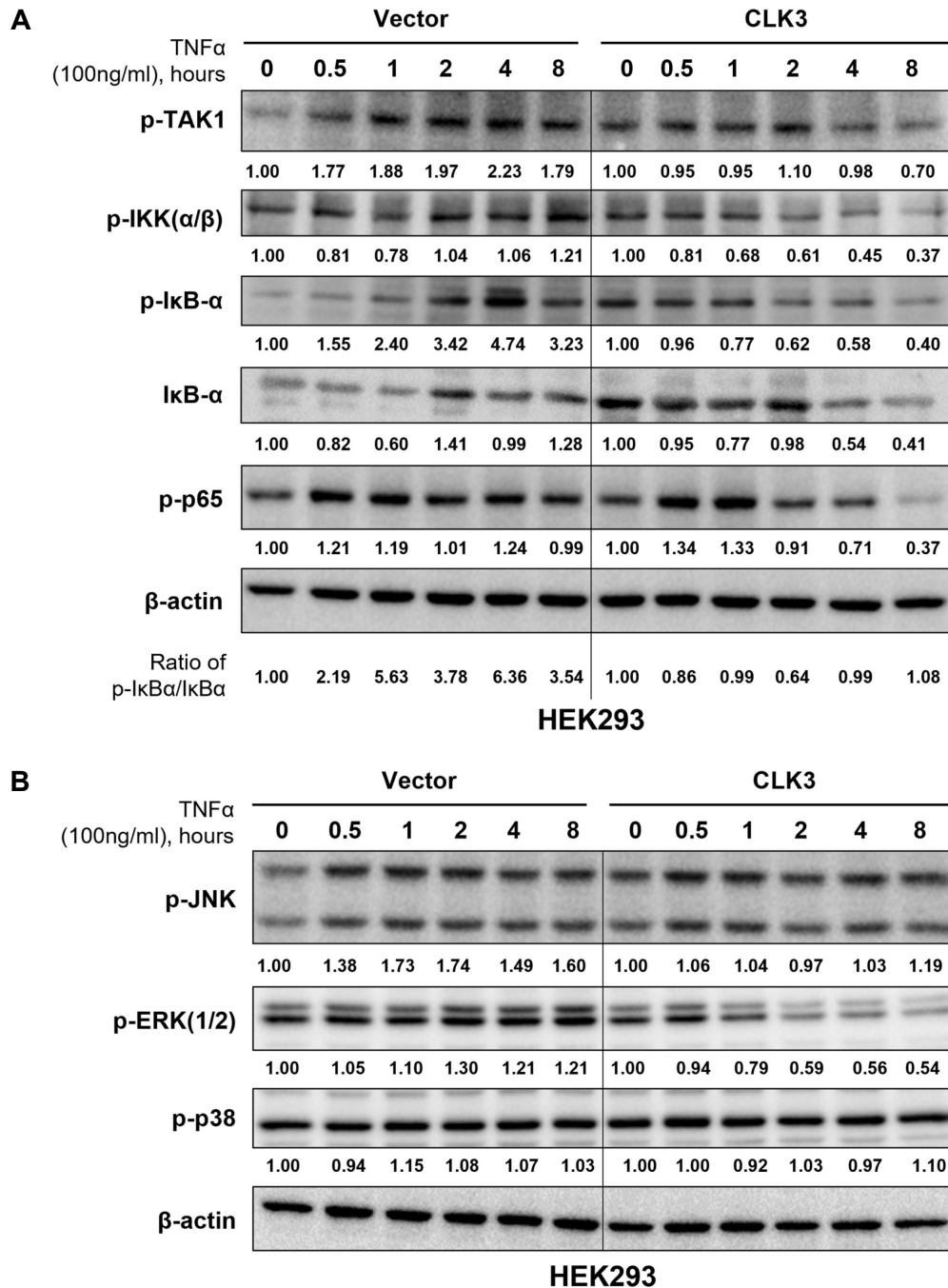


Fig. 4. CLK3 modulates TNF $\alpha$ -induced phosphorylation/activation of molecular components of NF- $\kappa$ B and MAPK pathway. HEK293 was transfected with either CLK3 (1  $\mu$ g/ml) or vector. Twenty four hours later, cells were treated with TNF $\alpha$  (100 ng/ml) for 0~8 hr. (A) Protein expression levels of I $\kappa$ B $\alpha$ , and phosphorylation levels of TAK1, IKK $\alpha/\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , and p65 were detected by Western blot. (B) Phosphorylation levels of JNK, ERK1/2 and p38 MAPKs were measured by Western blot.  $\beta$ -actin is used as a loading control.

가 감소함을 확인하였다. 특히 NF- $\kappa$ B 활성화에 가장 중요한 역할을 맡고 있는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화에서 큰 차이가 나타났다. I $\kappa$ B $\alpha$ 는 평상시 NF- $\kappa$ B 이합체에 결합하여 활성화를 억제 시키며, 정규 NF- $\kappa$ B 신호전달경로 활성화 시 인산화와 polyubiquitination 과정을 거쳐 proteasome에 의해 분해된

다. I $\kappa$ B $\alpha$ 로부터 풀려난 NF- $\kappa$ B 이합체는 핵 내로 이동한 후 DNA와 결합하여 전사인자로 작용한다. TNF $\alpha$  처리 후 시간이 경과함에 따라 Vector 대조군에서는 I $\kappa$ B $\alpha$  대비 인산화-I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현이 증가하였으나 CLK3에서는 차이가 없었다. 이는 CLK3 형질주입이 TAK1, IKK $\alpha/\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$  그리

고 p65의 활성을 감소시킴으로써 TNF $\alpha$ 에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B 신호경로의 활성을 저해한다는 것을 나타낸다.

TNF $\alpha$ 가 수용체에 결합하여 TAK1이 활성화되면, TAK1은 IKK $\alpha$ / $\beta$  complex를 인산화시킬 뿐만 아니라, MAP kinase kinase (MAPKK 또는 MEK)를 활성화시킨다. 활성화된 MAPKK는 MAPK를 활성화시켜 결국 AP1 전사인자를 인산화/활성화시켜 핵으로의 이동을 촉진시키고 염증반응에 관여하는 유전자의 발현이 향상된다. CLK3가 MAPK의 활성에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 vector 또는 CLK3를 HEK293 세포주에 형질주입 후 TNF $\alpha$ 를 처리하고 JNK, ERK1/2, p38의 인산화 정도를 분석하였다(Fig. 4B). Vector를 형질주입하였을 경우, p38의 경우는 인산화 정도의 변화가 없었으며, ERK1/2의 경우는 약하게, JNK의 경우는 강하게 인산화의 증가를 보였다. CLK3를 형질주입하였을 때, JNK의 인산화가 증가하지 못했고, ERK1/2는 인산화 정도가 감소하는 경향을 보였다. 이는 CLK3가 TNF $\alpha$ 에 의해 활성화되는 NF- $\kappa$ B 뿐만 아니라 MAPK의 활성도 억제함을 시사한다.

## 고 찰

NF- $\kappa$ B는 염증 반응 조절과 면역 체계 조절의 중심축을 이루고 있으며 세포 증식, 분화, 사멸 등에 관여하는 전사인자이다. 대다수의 종양 조직에서 NF- $\kappa$ B 과발현이 보고되고 있으며 NF- $\kappa$ B의 활성은 사이토카인, 키모카인과 같은 여러 염증 인자를 유도하고 혈관 신생을 촉진하기 때문에 종양 세포의 성장과 증식을 도와 항암 치료의 효과를 현저히 떨어뜨린다. 따라서 NF- $\kappa$ B의 선택적 비활성화를 표적으로 하는 치료제 개발은 지속적으로 이루어져야 하며, 이를 위하여 NF- $\kappa$ B 신호경로에 대한 더 깊은 이해가 반드시 필요하다.

본 연구에서는 HEK293에 CLK3를 형질주입하거나 CLK3를 형질도입하여 안정적으로 과발현시키는 HCT 116 세포주를 제작하고, 다양한 방법을 이용하여 정규 및 비정규 NF- $\kappa$ B 활성을 유도한 뒤 CLK3가 NF- $\kappa$ B 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, CLK3는 정규와 비정규 NF- $\kappa$ B 신호 경로를 저해함을 밝혔다. CLK3가 세린/트레오닌 및 티로신 기질 모두에 작용하는 이중 특이성 키네이스라는 점을 고려하여, NF- $\kappa$ B 활성에 관여하는 특정 분자를 인산화시킴으로써 NF- $\kappa$ B 활성을 저해할 것으로 사료되지만, CLK3의 정확한 기질과 함께 NF- $\kappa$ B 활성화 저해 기전은 현재 연구 중에 있다.

## 감사의 글

본 연구는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Bartsch, H. and Nair, J. 2006. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck's Arch. Surg.* **391**, 499-510.
- Bishop, G. A. and Hostager, B. S. 2013. CD40-mediated activation of the NF- $\kappa$ B2 pathway. *Front. Immunol.* **4**, 376.
- Coope, H., Atkinson, P., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M., Klaus, G., Johnston, L. and Ley, S. 2002. CD40 regulates the processing of NF- $\kappa$ B2 p100 to p52. *EMBO Rep.* **21**, 5375-5385.
- Coussens, L. M. and Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-867.
- Davis, J. N., Kucuk, O. and Sarkar, F. H. 1999. Genistein inhibits NF- $\kappa$ B activation in prostate cancer cells. *Nutr. Cancer* **35**, 167-174.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J. and Matias-Guiu, X. 2005. NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* **446**, 475-482.
- Evan, G. I. and Vousden, K. H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**, 342-348.
- Ghasemi, F., Shafiee, M., Banikazemi, Z., Pourhanifeh, M. H., Khanbabaee, H., Shamshirian, A., Moghadam, S. A., ArefNezhad, R., Sahebkar, A. and Avan, A. 2019. Curcumin inhibits NF- $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways in cervical cancer cells. *Pathol. Res. Pract.* **215**, 152556.
- Gilmore, T. D. 2006. Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684.
- Kim, J., Jeong, D., Nam, J., Aung, T. N., Gim, J. A., Park, K. U. and Kim, S. W. 2015. MicroRNA-124 regulates glucocorticoid sensitivity by targeting phosphodiesterase 4B in diffuse large B cell lymphoma. *Gene* **558**, 173-180.
- Kim, J., Kim, J. N., Park, I., Sivtseva, S., Okhlopko, Z., Zulfugarov, I. S. and Kim, S. W. 2020. Dracocephalum palmatum Stephan extract induces caspase- and mitochondria-dependent apoptosis via Myc inhibition in diffuse large B cell lymphoma. *Oncol. Rep.* **44**, 2746-2756.
- Kojima, M., Morisaki, T., Sasaki, N., Nakano, K., Mibu, R., Tanaka, M. and Katano, M. 2004. Increased nuclear factor- $\kappa$ B activation in human colorectal carcinoma and its correlation with tumor progression. *Anticancer Res.* **24**, 675-682.
- Li, W., Tan, D., Zenali, M. J. and Brown, R. E. 2010. Constitutive activation of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **3**, 238.
- Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E. W. and Sun, S. C. 2004. Regulation of the NF- $\kappa$ B-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degrada-

- tion. *J. Biol. Chem.* **279**, 26243-26250.
15. Ling, L., Cao, Z. and Goeddel, D. V. 1998. NF- $\kappa$ B-inducing kinase activates IKK- $\alpha$  by phosphorylation of Ser-176. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 3792-3797.
  16. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. and Sun, S. C. 2017. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* **2**, 1-9.
  17. Meira, L. B., Bugni, J. M., Green, S. L., Lee, C. W., Pang, B., Borenshtein, D., Rickman, B. H., Rogers, A. B., Moroski- Erkul, C. A. and McFaline, J. L. 2008. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J. Clin. Investig.* **118**, 2516-2525.
  18. Shacter, E. and Weitzman, S. A. 2002. Chronic inflammation and cancer. *Oncology* **16**, 217-226.
  19. Thu, Y. M. and Richmond, A. 2010. NF- $\kappa$ B inducing kinase: a key regulator in the immune system and in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 213-226.
  20. Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P. H., Keats, J. J., Wang, H., Vignali, D. A., Bergsagel, P. L. and Karin, M. 2008. Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF- $\kappa$ B signaling. *Nat. Immunol.* **9**, 1364-1370.
  21. Xia, Y., Shen, S. and Verma, I. M. 2014. NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 823-830.
  22. Xiao, G., Harhaj, E. W. and Sun, S. C. 2001. NF- $\kappa$ B-inducing kinase regulates the processing of NF- $\kappa$ B2 p100. *Mol. Cell* **7**, 401-409.

### 초록 : NF- $\kappa$ B 신호경로에서 CLK3의 새로운 음성 조절자로서의 기능

전별은 · 권찬성 · 이지은 · 우예린 · 김상우\*  
(부산대학교 자연과학대학 생명과학과)

만성 염증은 종양의 발생 및 진행과 밀접하게 연관되어 있다. 핵인자 kappa B (NF- $\kappa$ B)는 5개의 전사인자로 구성되며 염증 반응에 필수적인 역할을 한다. 다양한 암에서 NF- $\kappa$ B의 조절장애가 보고되고 있으며 NF- $\kappa$ B 조절이 암 치료에 있어 핵심 표적이 된다. 본 연구에서는 CDC Like Kinase 3 (CLK3)를 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로를 조절하는 새로운 키네이스임을 확인하였다. 우리는 CLK3가 정규 및 비정규 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로를 억제하는 것을 밝혔다. CLK3 과발현 또는 knock-down 세포주를 이용한 루시퍼레이즈 분석 결과, 이 키네이스는 TNF $\alpha$ 와 PMA가 유도하는 정규 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로 활성을 억제하였다. 또한 CLK3 과발현은 잘 알려진 비정규 NF- $\kappa$ B 신호경로 유도제인 NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) 또는 CD40에 의한 NF- $\kappa$ B 활성을 저해하였다. 추가적으로 CLK3의 NF- $\kappa$ B 신호전달 저해기전을 설명하고자 TNF $\alpha$  처리 후 웨스턴 블롯 분석으로 이 키네이스 영향권 내에 있는 NF- $\kappa$ B 신호경로 분자들을 식별하였다. 그 결과 CLK3가 TAK1, IKK $\alpha/\beta$ , p65, I $\kappa$ B $\alpha$  및 ERK1/2-MAPK의 인산화/활성화를 저해하여 TNF $\alpha$  처리로 유도된 NF- $\kappa$ B 및 MAPK 신호경로를 모두 억제함을 밝혔다. 앞으로의 연구는 CLK3가 정규 및 비정규 NF- $\kappa$ B 경로를 억제하는 기작을 밝히는데 초점을 맞출 것이다. 위 연구 결과들을 토대로 CLK3가 NF- $\kappa$ B 신호전달경로의 새로운 음성 조절자로서 기능함을 제시하였다.