

## Adenine Induces Apoptosis Markers in B16-F10 Melanoma Cells: Inhibiting Akt and mTOR and Increasing Bax/Bcl-2 Ratio

Seung-Kiel Park<sup>†,\*</sup>

Department of Biochemistry, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 35015, Korea

Free adenine is mainly made during the polyamine synthesis in proliferating cells. Adenine molecule itself acts biological modulator in inflammation and cell death. In the previous report, we showed that adenine induces apoptotic cell death of B16-F10 mouse melanoma cells by eliciting of PARP and caspase 3 cleavages. In this study, we examined the adenine effect on other apoptotic molecules affecting caspase activation in B16-F10 melanoma cells. Adenine treatment make pro-apoptotic molecules active states. Bax/Bcl-2 ratio was increased and phosphorylation of mTOR and Akt was decreased in a dose dependent manner. These results showed the possibility that Bax/Bcl-2, Akt and mTOR are engaged in adenine induced apoptosis of melanoma cells.

**Key Words:** Adenine, Melanoma, Apoptosis, Bcl-2, Akt, mTOR

### 서론

퓨린 염기인 아데닌은 핵산의 구성 분자이다. 아데닌 합성은 핵산 분해 과정에서 만들어지지 않고, 주로 폴리 아민 합성 과정에서 생성되는 5'-methylthioadenosine (MTA)에서 만들어진다(Avila et al., 2004). 증식하는 림프아 세포에서 만들어지는 아데닌의 85% 이상은 MTA에서 만들어진다(Kamatani and Carson, 1981). 아데닌은 구제반응을 통해 AMP로 바뀌어 ADP와 ATP를 생성한다. 아데닌은 퍼킨제세포와 혈구세포의 생존을 증가시키며(Watanabe et al., 2003; Simon et al., 1962), 반면에 림프아세포의 성장을 억제한다(Hershfield et al., 1977; Snyder et al., 1978). 또한 세포와 실험동물 수준에서 비만세포의 알리지 반응을 억제한다(Silwal et al., 2015).

흑색종은 피부암 중에서 가장 전이성이 크고 치료하기 어렵다(Paluncic et al., 2016). 암 치료 방법 중 하나는 암세

포에서 세포자멸을 유도해 암세포 제거하는 것이다. 흑색종을 화학요법으로 치료하는 것은 성과가 좋지 않은데 그 이유는 암세포에서 세포자멸이 적절하게 일어나지 않기 때문이다. 그렇기 때문에 세포자멸을 잘 일으킬 수 있는 방법을 개발하는 것은 흑색종 치료에 매우 중요하다(Lowe and Lin, 2000). 또한 세포자멸 촉진 여부는 항암물질의 유효성을 평가하는 중요한 수단이다(Debatin, 2004).

세포자멸은 적극적으로 조절되는 세포 죽음 과정이다(Kerr et al., 1972). 이 과정은 에너지를 필요로 하며 caspases 활성화를 수반한다(Elmore, 2007). Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) 가족 단백질은 억제성(Bcl-2, Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large) 그리고 Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1)) 그리고 촉진성(Bid, Bax, and Bad) 세포자멸 분자들을 포함하며 이들은 특별히 caspase 활성화에 중요하다(Cory and Adams, 2002). phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mTOR 신호전달은 촉진성과 억제성 세포자멸 조절 분자인 Bcl-2 가족 단백질의 활성화를 조절하기 때문에 PI3K/

Received: July 21, 2023 / Revised: August 8, 2023 / Accepted: August 8, 2023

\*Professor.

<sup>†</sup>Corresponding author: Seung-Kiel Park. Department of Biochemistry, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 35015, Korea. Tel: +82-42-580-8224, Fax: +82-42-580-8121, e-mail: parksk@cnu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©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.

Akt/mTOR 신호전달 억제물질은 세포자멸을 조절할 수 있다(Marone et al., 2009). PI3K/Akt 신호전달 경로는 세포자멸 저항성, 세포생존, 세포 이동 등을 조절한다(Franke et al., 1997). 이 경로는 많은 암세포와 전이성 흑색종 세포에서 활성화되어 있다(Slipicevic et al., 2005). 따라서 흑색종 치료제 개발의 주된 타겟이다(Madhunapantula et al., 2011). PI3K 신호전달 네트워크는 여러 가지 하위 신호전달 경로가 있는데 그 중 하나는 mTOR 활성화이다(Shaw and Cantley, 2006).

이전 연구에서 우리는 아데닌은 흑색종 세포에서 caspase를 활성화시켜 세포자멸을 유도함을 보였다(Silwal and Park, 2020). 이 연구에서는 caspase 활성화를 조절하는 Bcl 단백질과 이를 조절하는 PI3K/Akt/mTOR 신호전달 경로를 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

다음의 재료들은 표시한 회사로부터 구매하였다: adenine 구입처는 Sigma-Aldrich, ST Louis, MO, USA; fetal bovine serum (FBS) 구입처는 Gibco/Life Technologies; Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 구입처는 Welgene, South Korea; anti-Akt, anti-phospho-Akt (Ser473 and Thr308), anti-phospho mTOR (Ser2448), anti-mTOR, anti-phospho-p70S6K (Thr389), anti-Bcl-2, anti-Bax antibodies 구입처는 Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA; ECL chemiluminescence kit 구입처는 Millipore, MA, USA; B16 melanoma cell line 구입처는 American Type Culture Collection.

### 방법

**세포배양:** B16 melanoma 세포는 10% FBS를 함유하는 DMEM에서 배양하였다. 공기 CO<sub>2</sub> 농도를 5%로 온도를 37°C 유지하는 배양기에서 배양하였다. 세포를 여러 농도로 아데닌을 24시간 동안 처리하였다.

**Western Blot 분석:** 처리가 끝난 세포를 얼음 상태에서 냉각된 PBS로 세척하고 용해 완충액을 넣고 얼음 위에서 30분간 용해시켰다. 용해물을 모아 12,000 rpm, 4°C 조건으로 20분간 원심분리 한 다음 용해된 물질을 모아 동량의 4× SDS 샘플 완충액을 넣고 5분간 끓인 다음 SDS-PAGE를 수행하였다. SDS-PAGE로 젤 상에서 분리된 단백질을 PVDF 멤브레인으로 이동시켰다. 블로킹 용액 조

성은 5% 탈지 분유와 0.1% Tween 20을 함유하는 pH 8의 10 mM Tris 완충액(TBS-T)을 사용하였다. 4°C에서 일차 항체와 단백질이 옮겨진 멤브레인을 밤새 반응시켰다. TBS-T로 멤브레인을 세척하고 멤브레인을 5% 탈지분유를 포함하는 TBS-T에 옮겨주고 horseradish peroxidase와 결합된 이차 항체를 넣고 1시간 반응시켰다. 세척한 다음 chemiluminescence kit를 사용하여 일차 항체와 반응하는 단백질을 검출하였다. 농도분석은 ImageJ를 사용하였다.

## 결 과

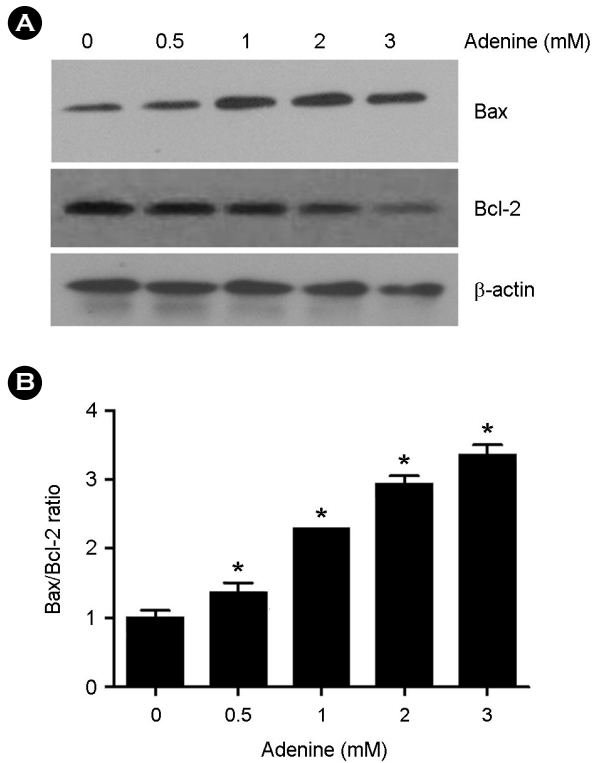
### 아데닌 처리는 흑색종 세포 B16에서 Bax/Bcl2 비율을 증가시킨다

Bcl2 가족 단백질은 세포자멸과 연관성이 높은 각인이다. 세포자멸 촉진성인 Bax 단백질과 억제성인 Bcl2의 비율(Bax/Bcl2)이 세포자멸 유도에 중요하다. 이전 연구에서 아데닌은 흑색종 B16 세포의 세포자멸을 일으켰기 때문에 B16에 24시간 동안 여러 농도의 아데닌을 처리한 다음 Bax/Bcl2 비율을 측정하였다. 아데닌 처리 농도에 의존적으로 Bax 단백질 발현은 증가하였고, Bcl2 발현양은 감소하였다(Fig. 1A). 그에 따라 Bax/Bcl2 비율은 증가하였다(Fig. 1B). 이러한 결과는 아데닌이 흑색종 세포 B16의 세포자멸을 일으키는 이유는 Bax/Bcl2 비율을 증가시키기 때문일 것이라 추론할 수 있다.

### 아데닌 처리는 흑색종 세포 B16에서 Akt와 mTOR 신호전달을 억제한다

PI3K/Akt 신호전달 경로는 암 발생에서 중요한 역할을 하고 있다. Akt 억제는 세포자멸에 의한 세포 죽음을 촉진하여 암세포의 성장을 감소시킨다(Madhunapantula et al., 2011). 따라서 B16 세포에서 여러 농도의 아데닌을 24시간 처리하고 Akt 신호전달을 조사하였다(Fig. 2). 아데닌 처리 농도에 의존적으로 Akt 활성화 인산화(Akt의 Ser 473과 Thr308 위치의 인산화)를 억제하였다. 이러한 결과는 아데닌이 세포자멸을 일으키는 이유는 Akt 인산화를 억제하기 때문일 것으로 추론할 수 있다.

또한 Akt는 mTOR를 인산화시켜 암 진행을 촉진하는 일을 한다(He et al., 2021; Thorpe et al., 2015). mTOR가 활성화되면 암세포의 성장과 분열이 촉진되고, 세포자멸이 억제되어 암세포가 죽지 못하게 한다. 따라서 mTOR는 암의 치료에 중요한 타겟이 되고 있다. 따라서 아데닌 처리가 mTOR의 활성화 인산화(mTOR의 Ser2448 인산화)

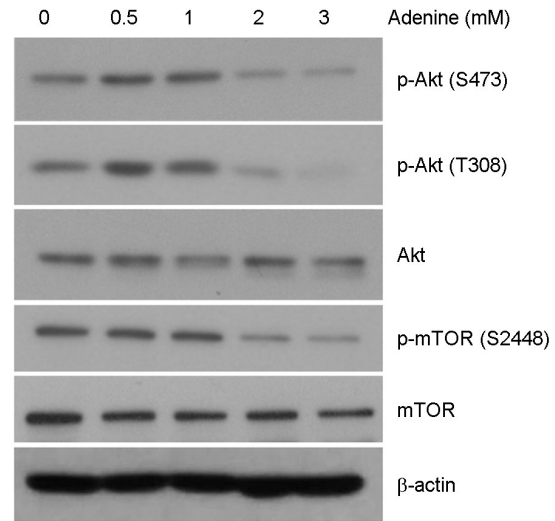


**Fig. 1.** Adenine modulates Bax and Bcl-2 protein levels. (A) B16-F10 cells were exposed to various doses of adenine for 24 h in complete media. Cell lysates were used for Western blotting to detect indicated proteins. (B) Densitometry analysis of Bax and Bcl-2 done using ImageJ software and ratio of Bax and Bcl-2 was calculated. Data presented after normalizing the ratio with untreated control group. The data shown are representative of three independent experiments. Significant difference against control group is indicated as  $*P < 0.05$ .

를 억제하는 지 조사하였다. 아데닌 처리 농도에 의존적으로 mTOR 활성화 인산화를 억제하였다(Fig. 2). 이러한 결과는 아데닌이 B16 세포의 세포자멸을 일으키는 이유는 mTOR 활성화를 억제하기 때문일 가능성이 있다.

## 고 찰

본 연구에서는 아데닌 처리에 의한 흑색종 세포 B16의 세포자멸 과정에서 세포자멸 관련 분자들을 측정하였다. 세포 내 Bax/Bcl2 비율이 증가하고 Akt와 mTOR의 활성화 인산화를 억제되었다. 세포자멸은 Bcl-2 가족 단백질에 의해 조절된다(Cory and Adams, 2002). 이들은 세포자멸을 실행시키는 caspase를 활성화시킨다(Ola et al., 2011). 이전 연구에서 아데닌은 caspase 활성화를 일으켜 세포를 세포자멸로 죽게 하는 현상을 보고하였다(Silwal and Park,



**Fig. 2.** Adenine inhibits Akt/mTOR signaling. B16-F10 cells were exposed to various doses of adenine for 24 h in complete media and were used for Western blotting to detect phosphorylation of indicated proteins. The data shown are representative of three independent experiments.

2020). 본 연구에서 아데닌 처리는 세포자멸 촉진성 분자 Bax를 증가시키고 세포자멸 억제성 Bcl-2를 감소시킴을 관찰하였다. 즉, 아데닌 처리가 caspase를 활성화시키는 이유는 Bax/Bcl2 비율을 증가시키기 때문임을 보여주고 있다. 이러한 결과는 많은 흑색종 세포에서 Bax/Bcl-2 비율 감소는 암 진행과 연관 있다는 보고와 일치한다(Leiter et al., 2000).

PI3K/Akt 신호전달 경로는 세포의 증식과 생존뿐 아니라 흑색종을 포함하는 암세포 전이에 중요한 역할을 한다(Slipicevic et al., 2005). Akt의 높은 인산화 정도는 흑색종에서 관찰되며 환자의 생존 정도에 좋지 않다(Dai et al., 2005). Akt 활성화는 세포자멸을 촉진하는 분자들을 증가시키고 억제하는 분자들을 감소시킨다(Franke et al., 1997). 그러므로 암 치료제 개발 연구는 PI3K/Akt 신호전달 경로(Deng et al., 2012)와 그의 하위 표적인 mTOR에 중점을 두고 있다(Shaw and Cantley, 2006). 세포자멸에 중요한 Bcl-2 가족 단백질 양 조절은 PI3K/Akt 신호전달에 의존한다. 즉, PI3K/Akt 신호전달은 Bax를 감소시키고 Bcl-2는 증가시켜 세포자멸을 억제한다. 본 연구에서 흑색종 세포에 아데닌을 처리하니 Bax/Bcl-2 비율이 증가하였다. 이러한 결과들은 아데닌이 PI3K/Akt 신호전달 경로를 억제하여 Bax/Bcl-2 비율을 증가시켜 세포자멸을 증가시켰다고 생각할 수 있다.

결론적으로 본 연구는 아데닌이 흑색종 B16 세포를 세포자멸을 통해 죽이는 기전은 아데닌이 PI3K/Akt 신호전달을 억제함으로써 Bax/Bcl-2 비율을 증가시키고 mTOR 활성을 억제하기 때문이라고 추측할 수 있다. 이 연구가 항암제 개발에 기여할 수 있기를 바란다.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This work was financially supported by research funds of Chungnam National University.

#### CONFLICT OF INTEREST

The author has no conflict of interest with regards to this study.

#### REFERENCES

- Avila MA, Garcia-Trevijano ER, Lu SC, Corrales FJ, Mato JM. Methylthioadenosine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004. 36: 2125-2130.
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002. 2: 647-656.
- Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol.* 2005. 23: 1473-1482.
- Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2004. 53: 153-159.
- Deng W, Gopal YN, Scott A, Chen G, Woodman SE, Davies MA. Role and therapeutic potential of PI3K-mTOR signaling in de novo resistance to BRAF inhibition. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012. 25: 248-258.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007. 35: 495-516.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell.* 1997. 88: 435-437.
- He Y, Sun MM, Zhang GG, Yang J, Chen KS, Xu WW, Li B. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021. 6: 425.
- Hershfield MS, Snyder FF, Seegmiller JE. Adenine and adenosine are toxic to human lymphoblast mutants defective in purine salvage enzymes. *Science.* 1977. 197: 1284-1287.
- Kamatani N, Carson DA. Dependence of adenine production upon polyamine synthesis in cultured human lymphoblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1981. 675: 344-350.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972. 26: 239-257.
- Leiter U, Schmid RM, Kaskel P, Peter RU, Krahn G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res.* 2000. 292: 225-232.
- Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 2000. 21: 485-495.
- Madhunapantula SV, Mosca PJ, Robertson GP. The Akt signaling pathway: an emerging therapeutic target in malignant melanoma. *Cancer Biol Ther.* 2011. 12: 1032-1049.
- Marone R, Erhart D, Mertz AC, Bohnacker T, Schnell C, Cmiljanovic V, Stauffer F, Garcia-Echeverria C, Giese B, Maira SM, Wymann MP. Targeting melanoma with dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors. *Mol Cancer Res.* 2009. 7: 601-613.
- Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2011. 351: 41-58.
- Paluncic J, Kovacevic Z, Jansson PJ, Kalinowski D, Merlot AM, Huang ML, Lok HC, Sahni S, Lane DJ, Richardson DR. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2016. 1863: 770-784.
- Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature.* 2006. 441: 424-430.
- Silwal P, Shin K, Choi S, Kang SW, Park JB, Lee HJ, Koo SJ, Chung KH, Namgung U, Lim K, Heo JY, Park JI, Park SK. Adenine suppresses IgE-mediated mast cell activation. *Mol Immunol.* 2015. 65: 242-249.
- Silwal P, Park SK. Adenine Inhibits B16-F10 Melanoma Cell Proliferation. *Biomedical Science Letters.* 2020. 26: 179-185.
- Simon ER, Chapman RG, Finch CA. Adenine in red cell preservation. *J Clin Invest.* 1962. 41: 351-359.
- Slipicevic A, Holm R, Nguyen MT, Bohler PJ, Davidson B, Florenes VA. Expression of activated Akt and PTEN in malignant melanomas: relationship with clinical outcome. *Am J Clin Pathol.* 2005. 124: 528-536.
- Snyder FF, Hershfield MS, Seegmiller JE. Cytotoxic and metabolic effects of adenosine and adenine on human lymphoblasts. *Cancer Res.* 1978. 38: 2357-2362.
- Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer.* 2015. 15: 7-24.
- Watanabe S, Yoshimi Y, Ikekita M. Neuroprotective effect of adenine on purkinje cell survival in rat cerebellar primary cultures. *J Neurosci Res.* 2003. 74: 754-759.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2023.29.3.201>

**Cite this article as:** Park SK. Adenine Induces Apoptosis Markers in B16-F10 Melanoma Cells: Inhibiting Akt and mTOR and Increasing Bax/Bcl-2 Ratio. *Biomedical Science Letters*. 2023. 29: 201-205.

---