

폐암세포주에서 PS-341에 의한 아포프토시스에서 JNK와 GSK-3 β 의 역할 및 상호관련성

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐 연구소

이경희, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수, 유철규

PS-341-Induced Apoptosis is Related to JNK-Dependent Caspase 3 Activation and It is Negatively Regulated by PI3K/Akt-Mediated Inactivation of Glycogen Synthase Kinase-3 β in Lung Cancer Cells

Kyoung-Hee Lee, M.Sc., Choon-Taek Lee, M.D., Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D.

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul; Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital; Lung Institute, Medical Research Center, Seoul National University College of Medicine

Background : PS-341 is a novel, highly selective and potent proteasome inhibitor, which showed cytotoxicity against some tumor cells. Its anti-tumor activity has been suggested to be associated with modulation of the expression of apoptosis-associated proteins, such as p53, p21^{WAF/CIP1}, p27^{KIP1}, NF- κ B, Bax and Bcl-2. c-Jun N-terminal kinase (JNK) and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) are important modulators of apoptosis. However, their role in PS-341-induced apoptosis is unclear. This study was undertaken to elucidate the role of JNK and GSK-3 β in the PS-341-induced apoptosis in lung cancer cells.

Method : NCI-H157 and A549 cells were used in the experiments. The cell viability was assayed using the MTT assay and apoptosis was evaluated by proteolysis of PARP. The JNK activity was measured by an in vitro immuno complex kinase assay and by phosphorylation of endogenous c-Jun. The protein expression was evaluated by Western blot analysis. Dominant negative JNK1 (DN-JNK1) and GSK-3 β were overexpressed using plasmid and adenovirus vectors, respectively.

Result : PS-341 reduced the cell viability via apoptosis, activated JNK and increased the c-Jun expression. Blocking of the JNK activation by overexpression of DN-JNK1, or pretreatment with SP600125, suppressed the apoptosis induced by PS-341. The activation of caspase 3 was mediated by JNK activation. Blocking of the caspase 3 activation suppressed PS-341-induced apoptosis. PS-341 activated the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway, but its blockade enhanced the PS-341-induced cell death via apoptosis. GSK-3 β was inactivated by PS-341 via the PI3K/Akt pathway. Overexpression of constitutively active GSK-3 β enhanced PS-341-induced apoptosis; in contrast, this was suppressed by dominant negative GSK-3 β (DN-GSK-3 β). Inactivation of GSK-3 β by pretreatment with lithium chloride or the overexpression of DN-GSK-3 β suppressed both the JNK activation and c-Jun up-regulation induced by PS-341.

Conclusion : The JNK/caspase pathway is involved in PS-341-induced apoptosis, which is negatively regulated by the PI3K/Akt-mediated inactivation of GSK-3 β in lung cancer cells. (*Tuberc Respir Dis* 2004; 57:449-460)

Key words : PS-341, Apoptosis, JNK, Caspase, PI3K/Akt, GSK-3 β , Lung cancer.

서 론

Proteasome은 모든 세포의 핵과 세포질에 존재하는

Address for correspondence : Chul-Gyu Yoo, M.D., Ph.D.

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine,
Department of Internal Medicine, Seoul National
University Hospital, 28 Yongon-dong, Chongno-gu,
Seoul 110-744, Korea.

Phone : 02-760-3760 Fax : 02-762-9662

E-mail : cgyoo@snu.ac.kr

Received : Sep. 20. 2004.

Accepted : Oct. 26. 2004.

multicatalytic enzyme complex로서, 세포가 ubiquitin과 ATP에 의존하여 신속하게 단백을 분해할 때 사용하는, lysosome을 통하지 않는 세포의 기본적인 장치이다¹⁻³. 다양한 단백질, 특히 cyclin, cyclin-dependent kinase inhibitor와 myc, p53, NF- κ B, I κ B, c-fos, c-jun 등과 같은 각종 전사 인자들이 proteasome을 통해 분해되며⁴⁻⁹, 이러한 조절 단백질의 분해 과정은 세포 주기 조절, 신호 전달, 전사 조절, 수용체들의 down-regulation, endocytosis 등에 매우 중요한 역할을 하고 있다. Proteasome 억제제가 세포에 미치는 가

장 잘 알려져 있는 효과는 세포의 생존에 미치는 영향이다. 즉, proteasome 억제제가 일부 암세포주에서 아포프토시스를 일으키는 사실이 알려졌다¹⁰, 본 교실에서도 proteasome 억제제에 의한 폐암세포주의 아포프토시스를 보고하였다¹¹.

PS-341은 dipeptidyl boronic acid로서 최근에 개발된 강력하고 특이적인 proteasome 억제제로서, 일부 암세포주에서 효과적인 항암효과를 보이는 약제이다. Proteasome 억제제의 항암효과는 아포프토시스 유발 물질, 즉 p53¹², p21^{Waf1}¹⁰과 p27^{Kip1}¹³등의 발현 증가와 관련이 있는 것으로 제시되고 있고, 세포질내 IkB의 분해억제에 의한 NF- κ B의 활성화 차단도 기여하는 것으로 이해되고 있다¹⁴. c-jun N-terminal kinase (JNK)는 여러 스트레스에 의한 아포프토시스의 초기에 중요한 역할을 하는 것으로 제시되고 있지만¹⁵⁻¹⁷, PS-341에 의한 아포프토시스에서의 역할은 잘 알려져 있지 못한 실정이다. Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)는 세포내 신호전달경로에서 다양한 작용을 보이는 serine/threonine kinase이다. GSK-3 β 에 의해 인산화되는 대부분의 단백질이 불활성화되고 다른 kinase와 달리 GSK-3 β 는 기저상태에서 활성화된 상태로 존재하기 때문에 세포의 정상적인 성장 조건하에서 GSK-3 β 는 세포내 신호전달경로의 지나친 활성화를 억제하는 기능을 보인다. GSK-3 β 는 외부자극에 의해 억제됨으로써 조절되는데, 아미노기쪽의 9번 serine이 인산화되어 불활성화되고, 이는 PI3K/Akt 경로의 활성화에 의한 것으로 알려져 있다¹⁸. 최근에 아포프토시스 유발 물질에 의해 GSK-3 β 가 활성화되고, GSK-3 β 의 억제로 아포프토시스가 억제되어, GSK-3 β 의 아포프토시스에서의 역할이 제시되었다¹⁹. 그러나, PS-341에 의한 아포프토시스에서 GSK-3 β 의 역할과 JNK와의 관련성 여부에 관해서는 아직 규명되지 못한 상태이다.

대상 및 방법

1. 세포 배양

폐암 세포주인 A549 세포와 NCI-H157 세포를 37°C, 5% CO₂의 조건하에서 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml)이 첨

가된 RPMI 1640 (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배지에 배양하였다.

2. 시 약

PS-341은 Millennium Pharmaceuticals(Cambridge, MA)에서 제공받았다. Rabbit polyclonal anti-PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) 항체, anti-pro-caspase 3 항체, anti-JNK1 항체, anti-c-Jun 항체, anti-GSK-3 α / β 항체, anti-hemagglutinin(HA) 항체, 그리고 recombinant GST-c-jun은 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Rabbit polyclonal anti-phosphorylated Akt 항체, anti-phosphorylated GSK-3 β 항체는 Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)와 DAPI는 Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO)에서 구입하였다. Horseradish peroxidase (HRP)가 conjugation된 goat anti-rabbit 이차 항체는 Promega(Madison, WI, USA)에서, protein-G sepharose beads와 ECL kit는 Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden)에서, protease 억제제는 RocheMannheim, Germany)에서, [γ -³²P]ATP는 ICN Pharmaceuticals, Inc. (Costa Mesa, CA, USA)에서 각각 구입하였다.

3. 세포 생존율의 측정

세포 생존율은 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에서 배양된 세포에 MTT 용액을 0.5 mg/ml까지 첨가하고 37°C에서 4 시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 50 μ l의 DMSO를 첨가하여 녹이고 분광광도계를 이용하여 590 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. 아포프토시스의 분석

아포프토시스 유무는 Western 분석으로 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)의 분해 유무와 DAPI 염색 후 아포프토시스때 특징적으로 관찰되

는 세포의 위축과 chromatin의 compaction을 관찰하여 평가하였다.

5. Western 분석

Whole lysis buffer (0.1% Nonidet P-40, 5 mM EDTA, 50 mM Tris (pH 7.5~8.0), 250 mM NaCl, 50 mM NaF)를 이용하여 총세포 단백을 추출하였다. 20 µg의 세포 단백을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 시켰다. 4시간 동안 400 mA의 일정한 전류로 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer시키고, 이 membrane을 blocking solution (5% skim milk in 1 X PBS/Tween 20)으로 1시간동안 block시킨 후 일차 항체를 1:1,000으로 첨가하여 12시간 동안 반응시켰다. 세척 후 이차 항체를 1: 2,000으로 첨가하여 반응시킨 후 면역신호의 검출은 ECL Western blotting detection system을 이용하였다.

6. JNK 활성화에 대한 immunocomplex kinase assay

JNK 활성도를 immunocomplex kinase assay로 평가하였다. 총세포 단백 추출액을 1:100으로 희석된 anti-JNK1 항체에 반응시키고, protein-G sepharose bead를 첨가한 상태에서 밤새 반응시켜 immunoprecipitated resin을 얻었다. 여기에 kinase reaction buffer (20 mM HEPES, pH 7.6, 20 mM β-glycerophosphate, 0.1 mM sodium orthovanadate, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT), 1 µg/ml GST-c-jun, 10 µCi [³²P]ATP를 가하여 30°C에서 30분간 반응시켰다. SDS protein sample buffer를 가하여 반응을 종료시킨 후 10% SDS-PAGE를 시행하고 nitrocellulose membrane에 transfer하여 autoradiography를 시행하였다. 또한, 동량의 JNK가 immunoprecipitation 되었는지를 확인하기 위하여 같은 membrane을 이용하여 anti-JNK1 항체로 immunoblot을 시행하였다.

7. Adenovirus vector를 이용한 유전자 이입

세포를 6 well tissue culture plate에 한 well당 1 X

10⁵개씩 분주하고 밤새 배양하였다. 혈청이 첨가되지 않은 RPMI 배지에 adenovirus vector를 50 multiplicities of infection (moi)로 첨가하고 조심스럽게 흔들어주면서 1시간 동안 배양하였다. PBS로 세포를 세척한 후, 새로운 배양액을 넣어주고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 48시간이 경과한 후 실험에 이용하였다.

8. Plasmid vector를 이용한 유전자 이입

6 well tissue culture plate에 한 well당 1 X 10⁵개씩 분주하고 밤새 배양하였다. Plasmid vector 1 µg으로 lipofectamin 2000을 이용해 제조사의 설명에 따라 transfection을 시켰다. 48시간이 경과한 후 실험에 이용하였다.

결 과

1. PS-341 이 폐암세포주의 생존능과 아포프토시스에 미치는 영향

PS-341이 폐암 세포의 생존에 미치는 영향을 평가하기 위하여, NCI-H157 세포주에 PS-341을 투여하고 시간 경과 및 농도에 따른 세포의 생존율을 측정하였다. 50 nM의 PS-341 투여하고 24시간이 경과한 후 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 세포의 생존율이 감소하였고, 48시간 후에는 더욱 감소하였다(Fig. 1A). 여러 농도의 PS-341을 투여하고 24시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. 10 nM 에서부터 세포의 생존율이 감소하기 시작해 농도를 증가시킴에 따라 농도 의존성으로 세포의 생존율이 감소하였다(Fig. 1B). PS-341의 투여에 의해 관찰되는 세포 생존율의 감소가 아포프토시스에 의한 것인지를 확인하기 위하여, 아포프토시스때 특징적으로 관찰되는 PARP의 분해 유무를 Western 분석으로 평가하였다. NCI-H157과 A549 세포에서 50 nM의 PS-341을 투여하고 24시간이 경과한 후 PARP의 86 kD 분절이 관찰되었다(Fig. 2A). PS-341에 의한 폐암세포주의 아포프토시스를 재확인하기 위하여, DAPI 염색 후 아포프토시스때 특징적으로 관찰되는 세포의 위축과 chromatin의 compaction을 관찰하였다. PS-341을 투여하고 24시

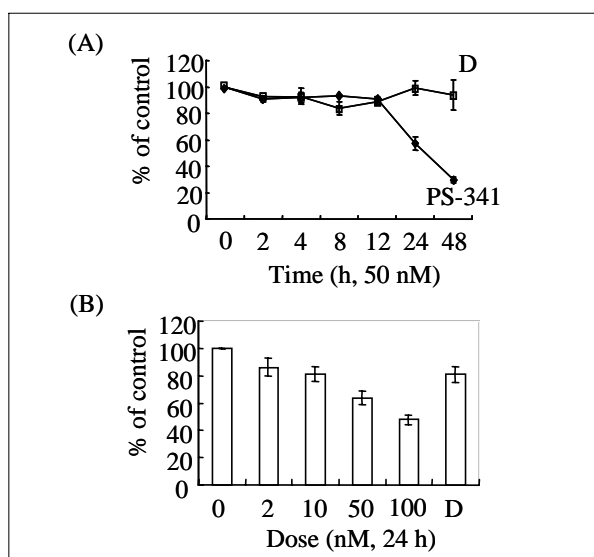


Figure 1. PS-341 reduced cell viability time- and dose-dependently. (A) NCI-H157 cells were treated with 50 nM PS-341 or DMSO (D) for the indicated times. (B) Cells were incubated with PS-341 (2, 10, 50 and 100 nM) or DMSO for 24 h. The cell viability was determined using the MTT assay. Data are shown as the mean percentage of the control \pm standard deviation of three separate experiments.

간이 경과한 후 아포프토시스의 특징을 보이는 세포가 관찰되었다 (Fig. 2B). 이상의 결과는 PS-341에 의한 폐암세포주의 생존을 감소가 아포프토시스 유발로 이루어짐을 시사하는 소견이다.

2. PS-341에 의한 아포프토시스와 JNK 경로와의 관련성

NCI-H157 세포에 PS-341을 처리하고 4시간 후부터 JNK의 활성도가 증가하였고, 이는 8시간까지 지속되었으며, 24시간 후에는 기저수준으로 회복되었다 (Fig. 3A). PS-341을 8시간동안 처리하였을 때 50 nM 이상의 농도에서 JNK의 활성화가 관찰되었다 (Fig. 3B). 같은 시간에 JNK의 substrate인 c-Jun의 인산화가 증가되어, PS-341에 의한 JNK의 활성화가 확인되었다 (Fig. 3C). 흥미롭게도 PS-341 처리로 c-Jun의 발현이 증가되었다 (Fig. 3C). JNK 경로의 활성화가 PS-341에 의한 아포프토시스에 관여하는지를 확인하기 위하여, dominant negative JNK1 (DN-JNK1)의 과발현이 PS-341에 의한 아포프토시스에 미치는 영

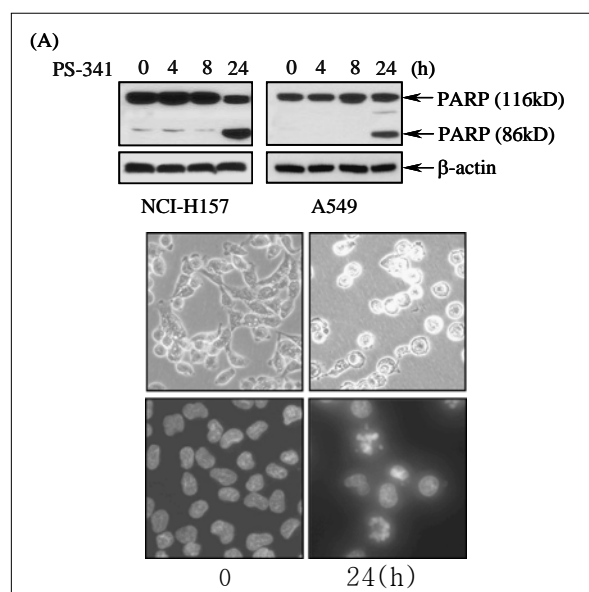


Figure 2. PS-341 induced apoptosis. (A) NCI-H157 or A549 cells were treated with PS-341 (50 nM) for the indicated times. PARP proteolysis was assayed by Western blot analysis. PARP (116kD) and PARP (86kD) represent the intact PARP and proteolyzed PARP, respectively. (B) NCI-H157 cells treated with PS-341 (50 nM) for the indicated times. Cells were examined by phase contrast microscopy (upper figures). Cells were fixed in methanol containing 1 mg/ml DAPI to label the nuclear DNA and examined by fluorescence microscopy (lower figures). Arrows represent the fragmented nuclei of apoptotic cells. Results are representative of three separate experiments.

향을 평가하였다. Plasmid vector를 이용한 DN-JNK1의 과발현은 JNK에 대한 Western 분석으로 확인되었고, 이때 PS-341에 의한 c-Jun과 인산화 c-Jun의 발현 증가가 효과적으로 억제되었다 (Fig. 3D). DN-JNK1의 과발현으로 PS-341에 의한 PARP의 분절화가 효과적으로 억제되었다 (Fig. 3E). JNK 억제제인 SP600125 전처리로도 같은 결과가 확인되었다 (Fig. 3F). 이상의 결과는 PS-341에 의한 아포프토시스가 JNK 경로의 활성화에 의존함을 시사하는 소견이다.

3. PS-341에 의한 아포프토시스와 caspase와의 관련성

Caspase의 활성화에 의한 단백질해가 아포프토시스의 특징적인 소견이다³². PS-341에 의한 아포프토

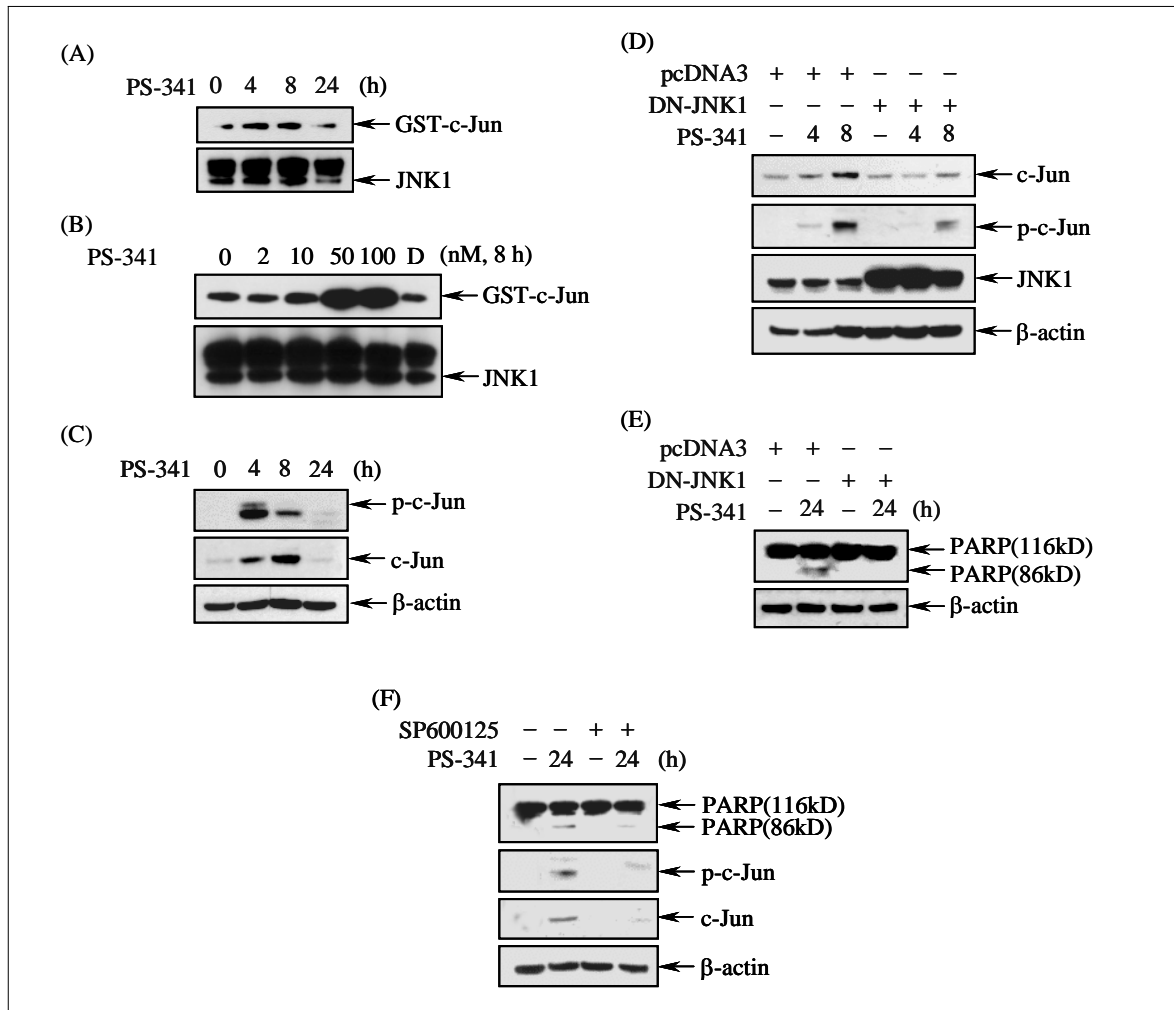


Figure 3. PS-341-induced apoptosis was mediated by JNK activation. NCI-H157 cells were treated with PS-341 (50 nM) for the indicated times (A, C) or with PS-341 (2, 10, 50 and 100 nM) for 8 h (B). Cells were transfected with plasmid encoding dominant negative JNK1 (DN-JNK1) or control plasmid (pcDNA3) (C, E). PS-341 (50 nM) was added to the culture medium 48 h after transfection, for the indicated times. Cells were pretreated with SP600125 (5 nM) for 1 h, and then treated with PS-341 (50 nM) for 24 h (F). JNK1 was immunoprecipitated using anti-JNK1 antibodies. The kinase activities of JNK were then assayed using GST-cJun as a substrate (upper panel). The amounts of immunoprecipitated JNK1 were evaluated by Western blot analysis (lower panel). The levels of c-Jun and phosphorylated c-Jun (p-c-Jun) expression were assayed by Western blot analysis. PARP proteolysis was assayed by Western blot analysis. Results are representative of three distinct experiments. D: DMSO

시스와 caspase 경로와의 관련성을 평가하였다. PS-341 처리로 procaspase 3의 발현이 감소하였다 (Fig. 4A). Procaspase 3는 단백분해 과정을 통해 12 kD으로 분해되어 활성화되기 때문에, procaspase 3의 발현 감소는 caspase 3의 활성화를 의미한다. 이는 활성화된 caspase 3에 대한 Western 분석으로 확인되었다 (Fig. 4A). JNK의 활성화와 caspase 3의 활성화와의 관련성을 평가하기 위하여, DN-JNK1의 과발현과

JNK 억제제인 SP600125 전처리가 PS-341에 의한 caspase 3의 활성화에 미치는 영향을 평가하였다. 이상의 두가지 다른 방법으로 JNK의 활성화를 억제한 상태에서 PS-341에 의한 caspase 3의 활성화가 차단되었다(Fig. 4B). 이 결과는 caspase 3의 활성화가 JNK의 downstream에 있음을 시사하는 소견이다. 다음 단계로 PS-341에 의한 아포프토시스에서 caspase 3의 역할을 규명하기 위하여, caspase 3의 활성화 차

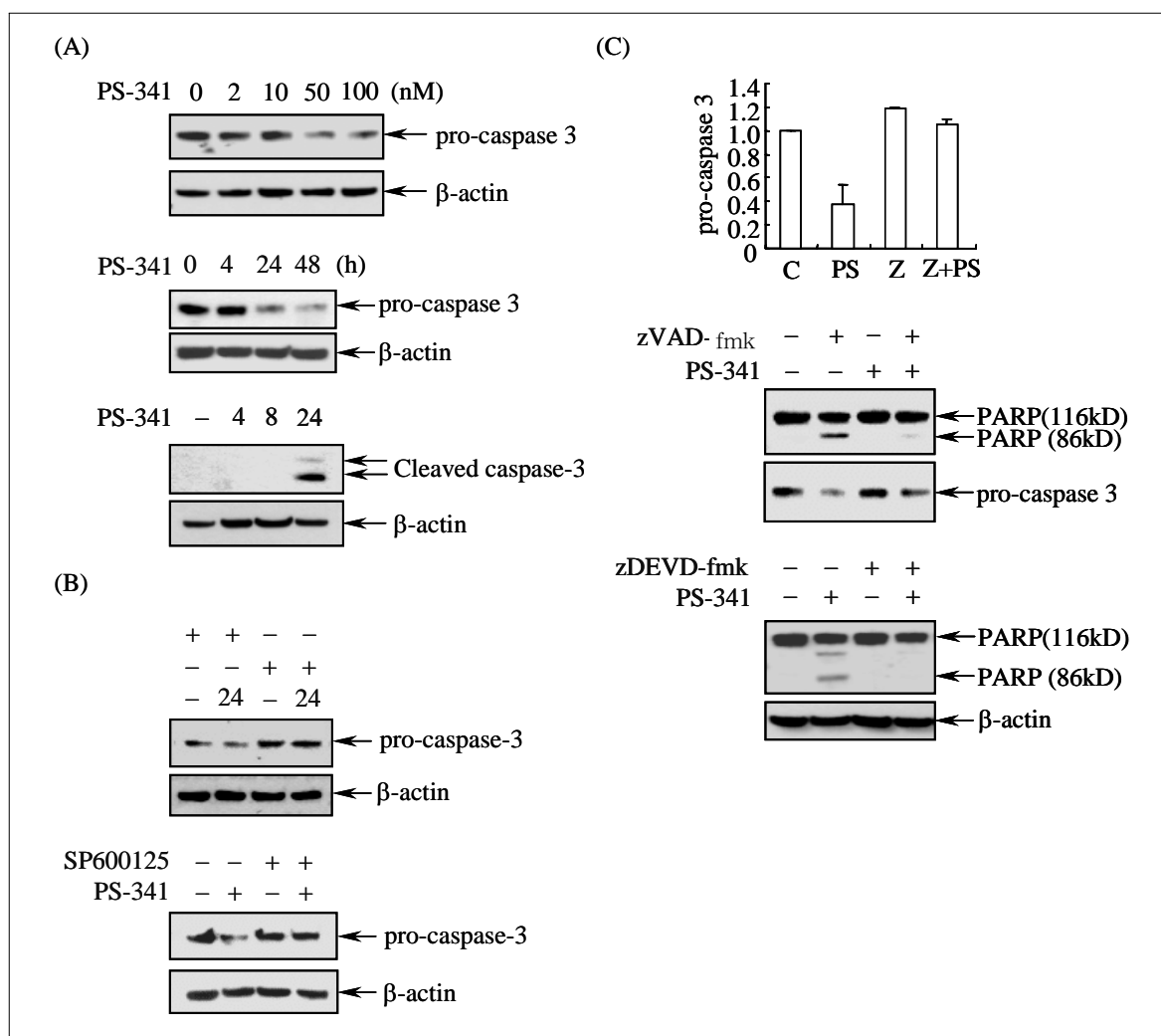


Figure 4. PS-341-induced apoptosis was associated with JNK-mediated caspase 3 activation. (A) NCI-H157 cells were treated with PS-341 (2, 10, 50 and 100 nM) for 24 h or with PS-341 (50 nM) for the indicated times. (B) Cells were pretreated with 20 mM of the pan-caspase inhibitor, zVAD-fmk, or the caspase 3 specific inhibitor, zDEVD-fmk (Z), for 1 h, and then incubated for 24 h with PS-341 (50 nM). (C) Cells were transfected with plasmid encoding dominant negative JNK1 (DN-JNK1) or the control plasmid (pcDNA3). After 48 h transfection, cells were incubated with PS-341 (50 nM) for 24 h. (D) Cells were pretreated with SP600125 (5 nM) for 1 h, and then treated with PS-341 (50 nM) for 24 h. The levels of pro-caspase 3 expression and PARP proteolysis were evaluated by Western blot analyses. Results are representative of three separate experiments.

단 PS-341에 의한 아포프토시스에 미치는 영향을 평가하였다. 전체 caspase를 억제하는 zVAD-fmk 또는 caspase 3만 선택적으로 억제하는 zDEVD-fmk 전 처치로 PS-341에 의한 아포프토시스가 완전히 차단되었다(Fig. 4C). 이상의 결과는 PS-341에 의한 폐암 세포주의 아포프토시스는 caspase 3의 활성화를 경유하고, caspase 3의 활성화는 JNK 활성화에 의한 것임을 시사하는 소견이다.

4. PI3K/Akt 경로의 활성화가 PS-341에 의한 아포프토시스에 미치는 영향

일반적으로 세포가 아포프토시스를 유도하는 물질에 노출되면, 항 아포프토시스 경로가 동시에 활성화되어 아포프토시스가 최소화되는 경향을 보인다. PI3K/Akt 경로는 세포생존에 관여하는 대표적인 경로 중 하나이다. PS-341이 PI3K/Akt 경로에 미치는

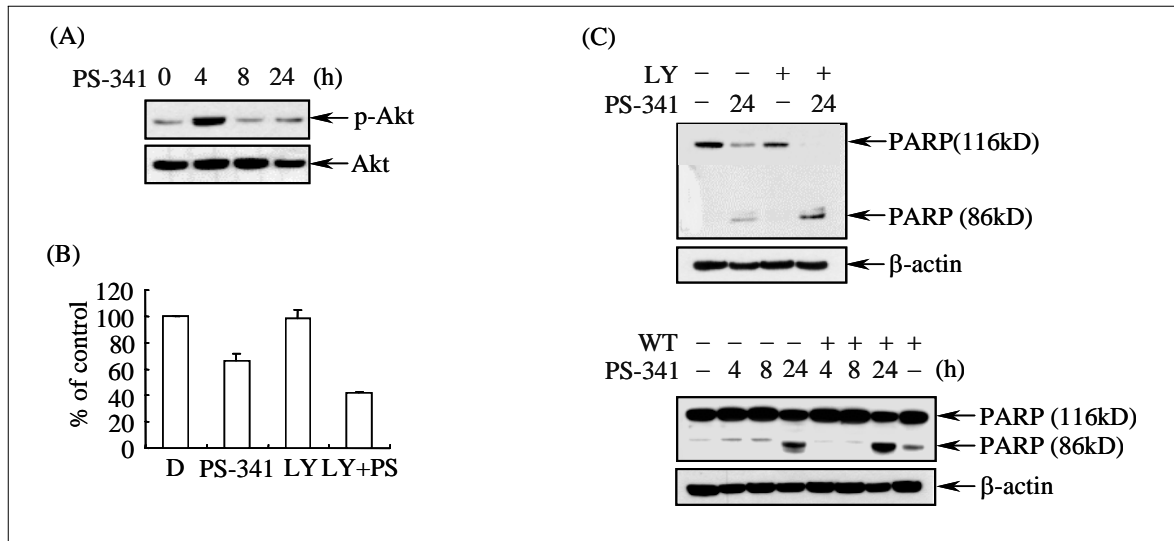


Figure 5. Blocking of PI3K/Akt pathway enhanced apoptosis by PS-341. **(A)** PS-341 activated Akt. NCI-H157 cells were treated with PS-341 (50 μ M) for the indicated times. Total cell lysates were subjected to Western blot analyses for phosphorylated active Akt (p-Akt) and total Akt (Akt). **(B)** Blocking of the PI3K/Akt pathway enhanced the PS-341 induced cell death. Cells were incubated with 50 mM LY294002 (LY) or DMSO (D) for 2 h, and then treated with PS-341 (50 μ M) for 24 h in the presence or absence of LY. The cell viability was evaluated using the MTT assay. Data are shown as the mean percentage of DMSO control \pm standard deviation. **(C)** Blocking of the PI3K/Akt pathway enhanced PS-341-induced apoptosis. Cells were incubated with LY294002 (LY, 50 mM) or wortmannin (WT, 50 nM) for 2 h, and then treated with PS-341 (50 nM) for the indicated times. Western blot analyses for PARP and β -actin were performed. Results are representative of three separate experiments.

영향을 평가하였는데, PS-341을 처리하고 4시간이 경과한 후에 활성화된 인산화 Akt의 발현이 증가하였고, 8시간 후에 기저 상태로 회복되었다(Fig. 5A). PI3K 억제제인 LY294002 전처리 자체가 세포의 생존능에 영향을 미치지 않는 것 같았지만, PS-341에 의한 세포 생존능의 감소가 심화되었다(Fig. 5B). 또한, PS-341에 의한 아포프토시스가 PI3K 억제제인 LY294002 또는 wortmannin 전처리로 증가되었다 (Fig. 5C). 이상의 결과는 PI3K/Akt 경로의 활성화가 PS-341에 의한 폐암세포주의 아포프토시스에 대한 음성 되먹이기 기전으로 작용함을 시사하는 소견이다.

5. PI3K/Akt 경로의 활성화에 의한 GSK-3 β 의 불활성화가 PS-341에 의한 아포프토시스에 미치는 영향

GSK-3 β 는 Akt의 down-stream molecule로 잘 알려져 있고, 최근의 연구결과로 GSK-3 β 와 아포프토시스와의 관련성이 제시되어¹⁹, PS-341에 의한 아포프

토시스에서 GSK-3 β 의 역할을 평가하였다. 폐암세포주에서 PS-341 처리로 9번 serine이 인산화되어 불활성화된 GSK-3 β 의 발현이 증가하였고, 이는 LY 294002 전처리로 억제되었다(Fig. 6A). 이는 PS-341에 의한 GSK-3 β 불활성화는 PI3K/Akt 경로의 활성화에 의한 것임을 시사하는 소견이다. PS-341에 의한 아포프토시스에서 GSK-3 β 의 역할을 평가하기 위하여 GSK-3 β 불활성화의 차단이 PS-341에 의한 아포프토시스에 미치는 영향을 관찰하였다. PS-341에 의한 GSK-3 β 의 불활성화를 차단하기 위하여, GSK-3 β 의 9번 serine이 alanine으로 치환되어 외부 자극에 의해 인산화되지 않는 mutant, 즉 constitutively active GSK-3 β (S9A)를 adenovirus vector를 이용해 과발현 시켰다. S9A의 과발현은 HA에 대한 immunoblotting으로 확인되었다(Fig. 6B). 대조 adenovirus vector (β -gal)를 감염시킨 세포와 비교해 S9A를 과발현 시킨 세포에서 PS-341 처리 후 caspase 3의 활성화와 아포프토시스가 증강되었다(Fig. 6B). GSK-3 β 의 85번 lysine이 alanine으로 치환된 dominant

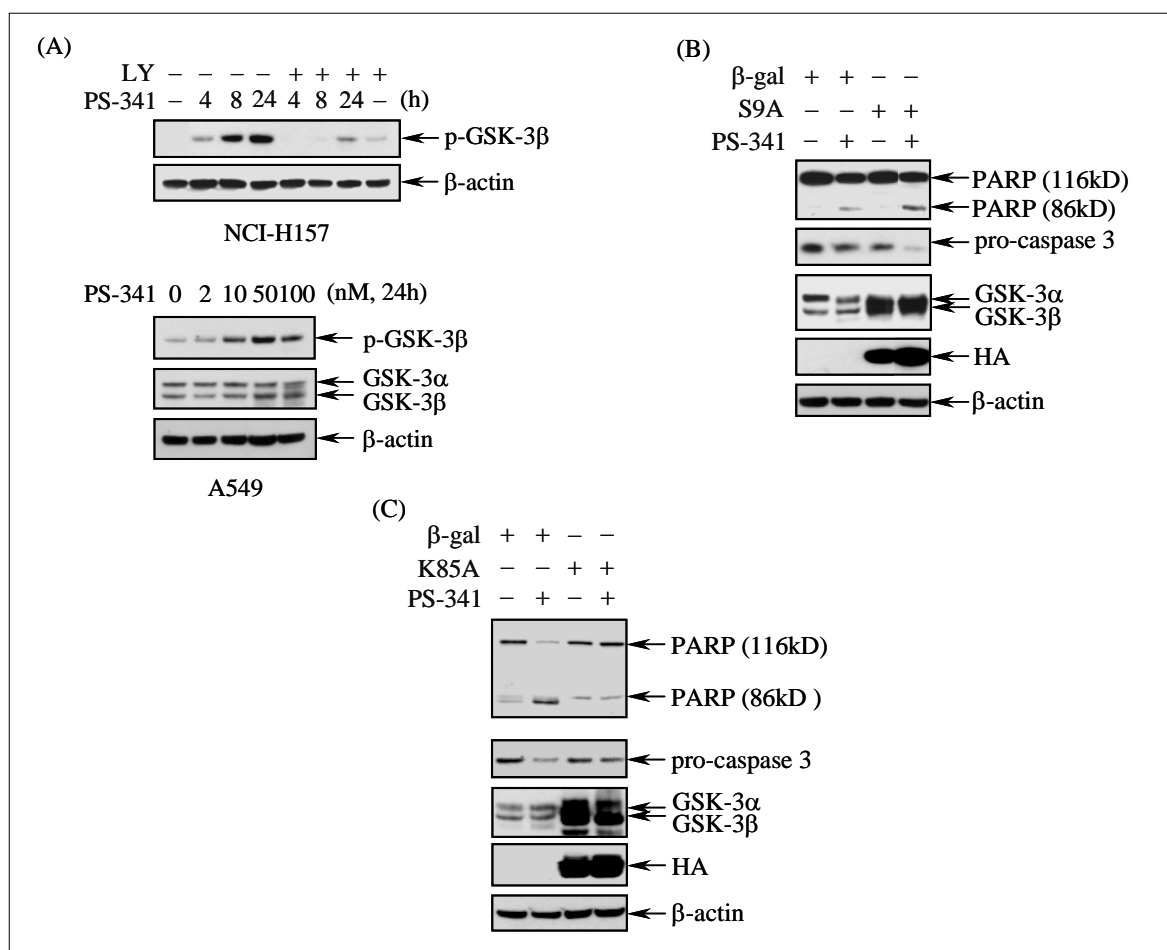


Figure 6. Inactivation of GSK-3 β via PI3K/Akt pathway was responsible for the suppression of PS-341-induced apoptosis. (A) PS-341 inactivated GSK-3 β via the PI3K/Akt pathway. NCI-H157 cells were pretreated with 50 mM LY294002 (LY) or DMSO for 2 h, and then incubated with PS-341 (50 nM) for the indicated times in the presence or absence of LY. (B) Overexpression of constitutively active GSK-3 β enhanced PS-341-induced apoptosis. Cells were infected with adenovirus vectors expressing hemagglutinin (HA)-tagged GSK-3 β cDNA in which the serine 9 was substituted with a non-phosphorylatable alanine (S9A) or control adenovirus (β -gal). Forty eight hours after transduction, the cells were treated with PS-341 (50 nM) for 24 h. (C) Overexpression of dominant negative GSK-3 β suppressed PS-341-induced apoptosis. Cells were infected with adenovirus vectors expressing HA-tagged catalytically inactive GSK-3 β (K85A) or a control adenovirus at 50 moi. Forty eight hours after transduction, the cells were treated with PS-341 (50 nM) for 24 h. Total cell lysates were subjected to Western blot analysis for phosphorylated GSK-3 β (p-GSK-3 β), HA, pro-caspase 3, PARP, and β -actin. Results are representative of three distinct experiments.

negative GSK-3 β (K85A)의 과발현이 PS-341에 의한 아포프토시스에 미치는 영향을 관찰하였는데, S9A를 과발현시킨 세포에서와 반대로 PS-341 처리 후 caspase 3의 활성화와 아포프토시스가 억제되었다 (Fig. 6C). 이상의 결과로 폐암세포주의 PS-341에 의한 아포프토시스에서 PI3K/Akt 경로의 활성화에 의한 음성 되먹이기 기전은 GSK-3 β 의 불활성화를 통해 이루어지는 것으로 판단된다.

6. GSK-3 β 의 불활성화가 JNK 경로에 미치는 영향

위의 결과로 폐암세포주에서 PS-341에 의한 아포프토시스는 JNK의 활성화를 경유하고, 동시에 PI3K/Akt 경로의 활성화에 의한 GSK-3 β 의 불활성화가 PS-341에 의한 아포프토시스를 억제하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 GSK-3 β 의 불활성화에 의한 아포프토시스의 억제가 JNK 경로와 관련이 있을 가능성을

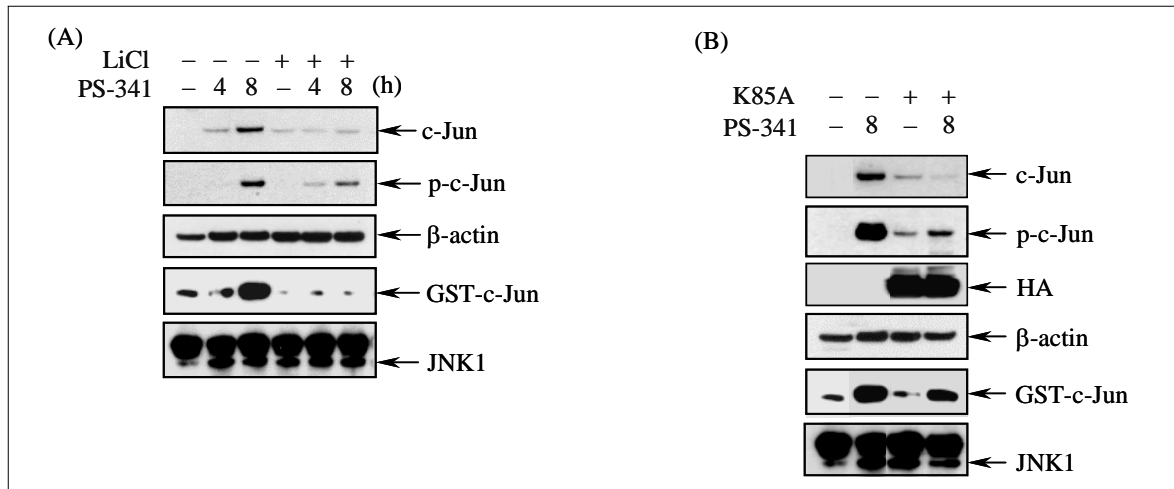


Figure 7. GSK-3 β inactivation suppressed PS-341-induced JNK activation and the up-regulation of c-Jun. **(A)** NCI-H157 cells were incubated with lithium chloride (LiCl, 10 mM) for 1 h, and then cells were treated with PS-341 (50 nM) for 4 or 8 h in the presence or absence of LiCl. **(B)** NCI-H157 cells were infected with adenovirus vectors expressing hemagglutinin (HA)-tagged catalytically inactive GSK-3 β (K85A) at 50 moi. Forty eight hours after transduction, the cells were treated with PS-341 (50 nM) for 8 h. JNK activity was assayed by an in vitro immune complex kinase method. Total cellular extracts were subjected to c-Jun, phosphorylated c-Jun (p-c-Jun), HA, and β -actin. Results are representative of three separate experiments.

생각할 수 있다. 이를 규명하기 위하여 GSK-3 β 의 불활성화가 JNK 경로에 미치는 영향을 평가하였다. GSK-3 β 의 불활성화는 GSK-3 β 의 억제제인 lithium chloride (LiCl) 처리와 dominant negative GSK-3 β 인 K85A의 과발현으로 유도하였다. LiCl 처리로 불활성화된 인산화 GSK-3 β 의 발현이 증가하였고, JNK의 활성도 증가, 전체 c-Jun의 발현 증가가 억제되었다 (Fig. 7A). Dominant negative GSK-3 β 의 과발현으로도 같은 결과가 관찰되었다 (Fig. 7B). 이상의 결과로부터 GSK-3 β 의 불활성화에 의한 아포프토시스의 억제제는 PS-341에 의한 JNK 경로 활성화의 차단에 기인하는 것으로 판단된다.

고 찰

아포프토시스는 암세포의 성장을 억제하는 중요한 인체의 방어 기전 중 하나이다. 최근의 연구에서 ubiquitin-proteasome system이 아포프토시스에 의한 세포사멸과 관련성이 있음이 제시되어, proteasome이 암치료에서 중요한 타겟으로 관심을 끌고 있다²⁰. Proteasome 억제제가 세포의 아포프토시스에 미치는 영향은 세포 종류에 따라 차이를 보이고 있다. 즉,

분화가 완료된 혹은 빠르게 분열하지 않는 세포들에서는 proteasome 억제제를 투여하면 아포프토시스가 억제되지만^{21,22}, 빠르게 분열하는 세포들에서는 반대로 아포프토시스가 유발된다는 것이다^{12,23,24}. 따라서 proteasome 억제제는 세포의 종류에 따라 세포의 생존을 촉진하기도 하고 아포프토시스를 유도하기도 한다.

여러 종류의 proteasome 억제제 중에서 PS-341은 임상시험이 시도된 유일한 약제로서, 다발성 골수종 환자에 투여하여 좋은 성적이 보고되고 있다. 본 연구에서는 두 종류의 폐암세포주를 사용하였는데, 두 세포 모두에서 PS-341에 의해 아포프토시스가 유도되어, 폐암의 치료에 PS-341이 이용될 수 있음을 시사하였다. 그러나 PS-341에 의한 항암효과는 아포프토시스 유발 단백질의 발현 증가와 관련이 있는 것으로 제시되고 있지만, JNK의 역할에 관해서는 자료가 부족한 실정이고, 세포의 생존에 관련된 경로에 미치는 영향은 밝혀져 있지 못한 상태이다. 수 년 전에 proteasome 억제제인 MG132에 의해 JNK의 활성도가 유도되고, JNK 경로의 활성화 차단으로 MG132에 의한 아포프토시스가 억제되어, proteasome 억제제에 의한 아포프토시스에서 JNK 경로의 중요성이 시사되

었다²⁵. 그러나 PS-341에 의한 아포프토시스에서 JNK의 역할에 관한 연구는 거의 없었고, 다발성 골수종에서 PS-341에 의해 내인성 인산화 c-Jun의 발현이 증가된다는 보고가 유일하였다²⁶. 본 연구에서도 PS-341 처리로 내인성 인산화 c-Jun의 발현이 증가됨을 확인하였다. 본 연구에서는 in vitro에서 JNK의 활성도를 직접 측정하여 PS-341에 의해 JNK가 활성화됨을 확인하였고, 흥미롭게도 PS-341에 의해 JNK의 substrate인 c-Jun의 발현이 증가됨을 확인하였다. 본 교실에서는 proteasome 억제제에 의해 caspase가 활성화됨을 보고하였는데¹¹, 본 연구에서는 PS-341에 의한 caspase의 활성화가 JNK에 의존적이고, caspase 억제제로 PS-341에 의한 아포프토시스가 억제되었다. 이상의 결과로부터 폐암세포주에서 PS-341에 의한 아포프토시스는 JNK 활성화에 의한 caspase의 활성화에 의한 것으로 생각된다.

일반적으로 항암제는 세포의 생존경로를 동시에 활성화 시킴으로써 항암 효과가 줄어든다. PI3K/Akt는 세포의 생존에 관여하는 잘 알려져 있는 경로이다. 본 연구에서 폐암세포주에서 PS-341에 의한 Akt의 활성화가 PS-341에 의한 아포프토시스를 억제하는 것으로 밝혀졌다. 이 결과는 다발성 골수종 세포에서 constitutively active Akt의 과발현으로 PS-341에 의한 아포프토시스가 억제된 기존의 보고와 일치하는 결과이다²⁶. 따라서 PS-341에 의한 아포프토시스는 PI3K/Akt 경로의 활성화에 의해 제한되는 것으로 판단된다. PS-341 처리 후 아포프토시스가 유도되기 전에 Akt가 활성화되고, 아포프토시스가 유도되었을 때는 Akt의 활성도가 기저수준으로 회복되었다. 이런 사실로부터 Akt 활성화가 아포프토시스에 미치는 효과는 다른 신호전달 경로를 경유할 것으로 생각되었다.

Akt의 substrate로서 아포프토시스에 관여하는 것으로 알려져 있는 GSK-3 β 의 역할을 평가하였다. 기존의 연구와 마찬가지로 PS-341에 의한 GSK-3 β 의 불활성화는 Akt에 의존적인 것으로 관찰되었고, constitutively active GSK-3 β 의 과발현으로 PS-341에 의한 아포프토시스가 증폭되었고, DN-GSK-3 β 의 과발현으로 아포프토시스가 억제되었다. 따라서 폐암

세포주의 PS-341에 의한 아포프토시스에서 PI3K/Akt 경로의 활성화에 의한 음성 되먹이기 기전은 GSK-3 β 의 불활성화를 통해 이루어지는 것으로 판단된다.

GSK-3 β 의 불활성화가 아포프토시스를 억제하는 구체적인 기전에 관해서는 잘 밝혀져 있지 못한 실정이다. GSK-3 β 가 in vitro에서 c-Jun의 239번 threonine, 243번과 249번 serine의 3군데에 인산화를 유도한다는 보고가 있어²⁷, GSK-3 β 의 불활성화가 PS-341에 의한 JNK 경로의 활성화에 미치는 효과를 평가하였다. Lithium chloride 전처리로 PS-341에 의한 JNK의 활성도 증가와 전체 c-Jun의 발현 증가가 억제되었다. 이는 lithium이 신경 세포에서 GSK-3 β 의 불활성화를 통해 세포성장인자 부족에 의한 c-Jun의 발현 증가와 아포프토시스를 억제하였다는 결과와 부합되는 소견이다²⁸. Lithium은 GSK-3 β 의 선택적인 억제제로 제시되었다²⁹. GSK-3 β 가 lithium에 가장 예민한 kinase로 알려져 있지만³⁰, GSK-3 β 에만 특이적이지는 않고 inositol phosphatase 등의 다른 효소를 억제하는 작용도 있음이 밝혀졌다³¹. 따라서 lithium 전처리에 의한 본 연구의 결과가 GSK-3 β 의 억제가 아닌 다른 효과에 의한 결과임을 배제할 수 없다. 그러나, DN-GSK-3 β 의 과발현으로도 같은 결과가 관찰되었기 때문에 lithium 전처리에 의한 결과가 비특이적 효과에 의한 것임을 배제할 수 있었다. 이상의 결과로부터 GSK-3 β 의 불활성화에 의한 아포프토시스의 억제는 PS-341에 의한 JNK 경로 활성화의 차단에 기인하는 것으로 판단된다.

결론적으로 PS-341의 항암효과를 최대화하기 위해서는 PI3K/Akt 경로를 통한 GSK-3 β 의 불활성화를 차단하는 치료법이 병행되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

연구배경 :

PS-341은 최근에 개발된 강력하고 특이적인 proteasome 억제제로서, 일부 암환자에 투여하여 좋은 성적이 보고되고 있다. Proteasome 억제제의 항암효과는 아포프토시스 유발 물질, 즉 p53, p21^{WAF/CIP1}, p27^{KIP1},

NF- κ B, Bax, Bcl-2 등의 발현 증가와 관련이 있는 것으로 생각되고 있다. JNK와 GSK-3 β 도 아포프토시스에 관여하는 것으로 잘 알려져 있지만, PS-341에 의한 아포프토시스에서의 역할은 규명되지 못한 상태이다. 본 연구에서는 폐암세포주에서 PS-341에 의한 아포프토시스에서 JNK와 GSK-3 β 의 역할을 규명하고자 하였다.

방 법 :

NCI-H157과 A549 폐암세포주를 실험에 사용하였다. 세포생존능은 MTT 방법으로 평가하였고, 아포프토시스는 PARP의 분해로 평가하였다. JNK의 활성도는 in vitro immuno complex kinase 방법과 내인성 c-Jun의 인산화로 측정하였다. 각종 단백질의 발현은 Western 분석으로 평가하였다. JNK1과 GSK-3 β 의 과발현은 각각 plasmid vector와 adenovirus vector를 이용하였다.

결 과 :

PS-341 치료로 아포프토시스에 의한 세포생존율의 감소가 관찰되었다. PS-341 치료로 JNK가 활성화되었고, c-Jun의 발현이 유도되었다. Dominant negative JNK1의 과발현 또는 SP600125 전치치로 JNK의 활성화를 차단하면 PS-341에 의한 아포프토시스가 억제되었다. PS-341 치료로 JNK 활성화에 의존적으로 caspase 3의 활성화가 유도되었다. Caspase 활성화의 차단으로도 PS-341에 의한 아포프토시스가 억제되었다. PS-341에 의해 Akt 가 활성화되었고, Akt 활성화의 차단으로 PS-341에 의한 아포프토시스가 심화되었다. PS-341에 의한 Akt 활성화로 GSK-3 β 가 불활성화되었다. Constitutively active GSK-3 β 의 과발현으로 PS-341에 의한 아포프토시스가 심화되었고, dominant negative GSK-3 β 의 과발현으로 PS-341에 의한 아포프토시스가 감소되었다. Lithium chloride 전치치와 dominant negative GSK-3 β 의 과발현으로 PS-341에 의한 JNK의 활성화와 c-Jun의 발현 증가가 억제되었다.

결 론 :

폐암세포주에서 PS-341에 의한 아포프토시스는 JNK/caspase 경로가 관여하며, 이는 PI3K/Akt 경로를 통한 GSK-3 β 의 불활성화에 의해 억제되는 것으로

판단된다. 따라서 PS-341의 항암효과를 최대화하기 위해서는 PI3K/Akt 경로를 통한 GSK-3 β 의 불활성화를 차단하는 치료법이 병행되어야 할 것으로 판단된다.

참 고 문헌

1. Goldberg AL, Stein R, Adams J. New insights into proteasome function: from archaeobacteria to drug development. *Chem Biol* 1995;28:503-8.
2. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996;65:801-47.
3. King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 1996; 274:1652-9.
4. Elledge SJ, Harper JW. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:847-52.
5. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* 1994;78:773-85.
6. Stancovski I, Gonen H, Orian A, Schwartz AL, Ciechanover A. Degradation of the proto-oncogene product c-Fos by the ubiquitin proteolytic system in vivo and in vitro: identification and characterization of the conjugating enzymes. *Mol Cell Biol* 1995;15: 106-16.
7. Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995; 269:682-5.
8. Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res* 1996;56:2649-54.
9. Pagano M. Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *FASEB J* 1997;11:1067-75.
10. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 1999;59:2615-22.
11. Kim CH, Lee KH, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS, et al. The mechanism of proteasome inhibitor-induced apoptosis in lung cancer cells. *Tuberc Respir Dis* 2003;54:403-14.
12. Lopes UG, Erhardt P, Yao R, Cooper GM. p53-dependent induction of apoptosis by proteasome

- inhibitors. *J Biol Chem* 1997;272:12893-6.
13. Drexler HC, Risau W, Konerding MA. Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. *FASEB J* 2000;14: 65-77.
14. Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, Yeh N, Crowl BC, Sausville E, et al. Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7: 1419-28.
15. Chen YR, Wang X, Templeton D, Davis RJ, Tan TH. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem* 1996;271: 31929-36.
16. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270:1326-31.
17. Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996;380:75-9.
18. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 2003;116: 1175-86.
19. Bhat RV, Shanley J, Correll MP, Fieles WE, Keith RA, Scott CW, et al. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:11074-9.
20. Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B, Orlowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2003;9:6316-25.
21. Grimm LM, Goldberg AL, Poirier GG, Schwartz LM, Osborne BA. Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis. *EMBO J* 1996;15:3835-44.
22. Sadoul R, Fernandez PA, Quiquerez AL, Martinou I, Maki M, Schroter M, et al. Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons. *EMBO J* 1996;15: 3845-52.
23. Drexler HC. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:855-60.
24. Cui H, Matsui K, Omura S, Schauer SL, Matulka RA, Sonenshein GE, et al. Proteasome regulation of activation-induced T cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7515-20.
25. Meriin AB, Gabai VL, Yaglom J, Shifrin VI, Sherman MY. Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:6373-9.
26. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14374-9.
27. Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, Angel P, Woodgett JR, Karin M, et al. Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 1991;64:573-84.
28. Hongisto V, Smeds N, Brecht S, Herdegen T, Courtney MJ, Coffey ET. Lithium blocks the c-Jun stress response and protects neurons via its action on glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol* 2003;23: 6027-36.
29. Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8455-9.
30. Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* 1996; 6:1664-8.
31. Phiel CJ, Klein PS. Molecular targets of lithium action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:789-813.
32. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-6.

