

Role of Reactive Oxygen Species in Cell Death Pathways

Sang Won Kang

Department of Life Science, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Reactive oxygen species (ROS) are the chemical species that includes the superoxide anion, hydrogen peroxide and hydrogen radical. These ROS are simply thought as a group of molecules harmful to cells because they oxidize proteins, lipids and DNA, and they mediate cell death including apoptosis or necrosis. On the other hand, ROS have been shown to act as essential intracellular second messengers for certain cytokines and growth factors. Although the importance of ROS in the execution of cell death is controversial, ROS are likely to be involved in the signal transduction mechanism for cell death as signaling intermediates in death receptor initiated signaling pathways, specifically in the tumor necrosis factor alpha-tumor necrosis factor receptor 1 (TNF α -TNFR1) pathway. In this review, using TNF α -TNFR as the model system, we attempt to address the involvement of intracellular ROS in TNF α induced cell death, including apoptosis, necrosis and an alternative form of programmed cell death, necroptosis.

Key Words: Reactive Oxygen Species; Tumor Necrosis Factor-alpha; Apoptosis; Necrosis

Correspondence to: Sang Won Kang
우120-750, 서울시 서대문구 이화여대길
52 종합과학관 C동 504호
Science Bldg. C/ Room 504,
52 Ewhayeodae-gil, Seodaemun-gu,
Seoul 120-750, Korea
Tel: +82-2-3277-3352
Fax: +82-2-3277-3760
E-mail: kangsw@ewha.ac.kr

Received 12 March 2013
Revised 23 April 2013
Accepted 26 April 2013

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.

서 론

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 정상적인 세포 내 활성작용 과정에서 생성되며 세포분화, 유전자의 발현, 시토카인에 대한 반응 정도를 포함한 다양한 생물학적 과정에 연관되어 있다 [1,2]. 따라서 이러한 ROS의 항상성을 유지하는 것은 세포 성장과 생존에 매우 중요하다. 산화스트레스는 ROS의 생성과 이를 제거하는 항산화 반응 간의 불균형으로 인해 세포 내의 ROS가 증가하여 DNA나 단백질, 지질(lipid)과 반응하여 손상시키는 현상이며 이는 노화나 심장과 관련된 질병들의 핵심 원인으로 알려져 있다 [1,3]. 이렇게 ROS는 지금까지 단순히 단백질이나 DNA, 지질 등을 산화시켜 세포괴사를 일으키는 역할을 하는 물질로 인식되어 왔지만 또한 세포 내의 필수적인 second messenger로서 특정 시토카인이나 성장 인자의 신호 전달에 중요한 역할을 수행한다[4,5]. 비록

ROS와 세포사멸과의 관계는 서로 상반된 보고가 있지만 확실한 것은 ROS가 세포사멸에 있어 중간 신호 매개체의 역할을 하며, 신호를 전달하고 있다는 점이다. 따라서 본 중설에서는 특히 종양괴사인자 알파-종양괴사인자수용체 유형 1 (TNF α -TNFR1)에 의한 세포사멸 전달체계 내에서 이러한 ROS가 실제 각각의 세포사멸에 있어 어떤 역할을 수행하는지 알아보기로 한다.

본 론

1. ROS와 세포자멸사(apoptosis)

세포자멸사는 유전적으로 보존된 관련 유전자에 의해 이루어지며, 조절이 가능한 능동적 세포 사멸 과정이다. 이 과정은 형태적으로 세포의 비증감소, 세포막의 파괴, 염색체의 응축 등과 더불어 세포내부의 물질들이 사멸체(apoptotic body)라는 포낭을 형성하면

서 식세포 작용을 거친다[6,7]. 1991년에 ROS가 이러한 세포자멸사를 유도하며 이를 catalase가 저해한다는 내용을 시작으로 ROS와 세포자멸사와의 관계에 대한 연구가 시작되었고 이후 많은 연구자들이 호중구나 암세포에서 이 같은 연구를 진행하였다. 특히 ROS를 second messenger로 사용하여 신호전달체계를 구축하여 세포자멸사를 일으키는 것으로 잘 알려진 것이 TNF-R1이다. TNF α 는 감염에 반응하여 활성화된 대식세포나 T 림프구에 의해 주로 생산되며 세포자멸사뿐만 아니라 전사인자인 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activator B cells (NF- κ B)와 activator protein 1 (AP-1)을 활성화시킴으로써 다양한 염증반응과 면역반응에 관여한다. ROS는 이러한 TNF α 의 자극으로 인해 생성되어 다양한 신호 단백질을 산화시킴으로써 caspase를 통한 세포자멸사 신호경로와 NF- κ B를 통한 생존경로를 조절한다[8]. ROS가 TNF α 신호전달에 중요하다는 사실은 TNF α 를 처리하였을 때 세포 내 ROS가 증가한다는 점, butylated hydroxyanisole (BHA)나 N-acetylcysteine (NAC)과 같은 항산화 물질을 처리하였을 때 TNF α 에 의한 세포자멸사가 감소한다는 점[9,10], 그리고 TNF α 를 처리한 세포에서 이황결합(disulfide bond) 형성 등과 같은 단백질의 산화환원반응 변화가 일어남으로써 신호전달이 바뀐다는 것을 통해서 알 수 있다[11, 12]. 세포 내에서 대부분의 thiol기는 GSH/GSSG 비율이 >100:1이나 될 정도로 환원되어있는 상태이고, GSH에 의해 조절되는 단백질의 산화환원 상태는 glutaredoxin과 thioredoxin에 의해 함께 조절된다[13,14]. ROS에 의한 이러한 thiol기의 산화는 TNF α 에 의한 세포자멸사에 있어 중요한 단백질들의 활성 여부와 밀접한 관련이 있게 되는데 그 중 가장 대표적인 예가 c-Jun N-terminal kinase (JNK)를 포함한 mitogen-activated protein kinase (MAPK)이다.

1) Mitogen activated protein kinase (MAPK)

MAPK는 여러 가지 외부자극에 의해 세포의 성장, 사멸, 분화 등에 관여하는데 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK/SAPK), p38 kinase로 구성되어 있으며, 전사조절인자들을 인산화함으로써 다양한 유전자들의 발현을 조절한다. 특히 JNK는 stress-activated protein kinase (SAPK)라고도 불리는데 세 가지 isoform이 있으며 ROS를 포함한 물리적, 화학적 스트레스 또는 TNF α 와 같은 시토카인에 대해 활성화되어 세포자멸사를 증가시킨다. 간세포(hepatocyte)를 포함한 다양한 세포에서 TNF α 자극에 의해 JNK가 활성화되는데, 활성화된 상태가 유지되는 기간에 따라 세포의 운명이 증식 또는 세포사멸로 결정된다. 즉, NF- κ B 또는 MAP kinase phosphatases (MKP)와 같은 억제제의 작용으로 JNK가 단시간(30-60분) 동안 활성화 되면 세포가 증식하나, 활성화가 장시간(120분 이상) 지속될 경우 세포자멸사가 증가한다. 다른 보고에 따르면 길어진 JNK 활성화는 아세트아미노펜(acetaminophen)에 의한 간 손상과 허혈/재관류(ischemia/re-

perfusion) 손상에 주요 물질로 작용한다는 것이 확인되었다[15,16]. 한편 TNF α 자극 이외에도 일차배양 신경세포나 간세포, 그리고 이외의 다양한 세포에서 외부적으로 H₂O₂를 처리하게 되면 JNK가 활성화된다는 것이 알려져 있다[15,17]. ROS로 인해 JNK의 활성화가 변하는 것은 크게 두 가지 상황으로 나누어 설명할 수 있는데 첫 번째는 ROS로 인한 JNK의 불활성화의 저해이다. ROS로 인해 JNK의 억제제인 MKP의 시스테인기가 산화되어 탈인산화 효소로서의 활성을 잃게 되고 게다가 산화된 MKP는 즉각적으로 ubiquitin-proteasome 경로에 의해 분해되기 때문에 JNK의 감소하지 않고 유지된다[11].

ROS에 의해 JNK가 활성화될 수 있는 두 번째 방법은 JNK의 활성화를 촉진시키는 방법이다. JNK는 신호전달과정에서 상위에 존재하는 단백질 인산화 효소인 MAP kinase kinase (MAPKK)와 MAP kinase kinase kinase (MAPKKK)에 의해 활성화된다. JNK를 활성화시킬 수 있는 MAPKK로 mitogen-activated protein kinase 4 (MKK4)와 MKK7이 존재하며 그 상위로는 apoptosis signal-regulated kinase 1 (ASK1)이 작용한다. ASK1은 평소에 thioredoxin (Trx)과 결합함으로써 불활성화되어 있지만 Trx 내에 있는 주요 thiol기가 H₂O₂나 다른 oxidant에 의해 산화되면 ASK1로부터 분리되어 비로소 ASK1이 활성화되게 된다. 이렇게 활성화된 ASK1은 하위단계의 MKK를 인산화시키고 따라서 다음 단계로 JNK를 포함한 MAPK가 활성화된다[18,19].

그러나 TNF α 신호전달체계와 JNK에 의한 세포사멸은 세포특이적이다. 야행형(wild type, WT)보다 유전자결손마우스인 JNK1^{-/-}과 JNK2^{-/-}로부터 유래한 마우스배아섬유모세포(mouse embryonic fibroblast, MEF)에서 TNF α 에 의한 세포자멸사가 증가하여 JNK의 관련성을 시사하나, 최근 보고에 따르면 concanavalin A (Con A)에 의한 간염(hepatitis)에서는 JNK의 활성화는 연관이 없다는 것이 알려졌다[20,21]. 따라서 TNF α 에 의한 세포자멸사에서 JNK의 연관관계는 세포에 따라 다를 것이며 아직까지도 논란의 여지가 남아 있을 것이라 판단된다.

2) 미토콘드리아

미토콘드리아 내에 존재하는 전자전달계(respiratory chain)의 complex I (NADH dehydrogenase)과 complex III (ubiquinone oxidoreductase)를 통해 만들어진 산소라디칼(oxygen radical)은 미토콘드리아 기질(matrix)에서 즉시 manganese-dependent superoxide dismutase (Mn-SOD)에 의해 H₂O₂로 변환되고 변환된 H₂O₂는 미토콘드리아 내에 존재하는 항산화 기전인 peroxiredoxin (Prx) 혹은 glutathione peroxidase (GPx)에 의해 물로 환원되거나 세포질로 확산된다[22]. 미토콘드리아의 전자 전달계는 세포 내에서 nicotinamide dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase를 제외한 유일한 ROS의 주요 생성 장소이므로 미토콘드리아가 TNF α 에

의한 세포자멸사에 관여하는 부분을 감안하면 아마도 TNF α 에 의한 세포자멸사 동안 생성되는 ROS의 주요 공급원으로 생각된다. 이러한 미토콘드리아에서의 ROS의 생성과 세포질로의 방출은 TNF α 와 같은 세포자멸사 신호에 의해 미토콘드리아의 막의 내구성이 약화됨으로써 더욱 활발히 진행되게 된다[23,24].

TNF α 유도세포사멸의 신호전달은 크게 두 가지인데, 하나는 외인성 세포자멸사(extrinsic apoptosis) 전달체계로 세포막에 위치한 죽음수용체를 활성화하여 직접 caspase를 활성화시켜 세포사멸을 유도한다[25]. 다른 하나는 내재성 세포자멸사(intrinsic apoptosis) 전달체계로서 세포 내에 저장된 경로에 의해 세포자멸사가 일어나는 기전이다[26]. 이는 주로 미토콘드리아를 통해 이루어지기 때문에 이때 다양한 단백질들이 여기에 관여하게 되는데 그 예로 Bak와 Bax는 평상시에는 monomer로 존재하면서 anti-세포자멸사 단백질인 Bcl-2에 의해 그 작용이 저해를 받게 된다. 세포자멸사 신호가 들어오면 Bax와 Bak의 형태 변화가 일어나 이량체(dimer)를 형성하여 미토콘드리아 외막에 작용하여 구멍을 만들고 미토콘드리아 내부의 물질을 밖으로 유출시킨다. 이때 나오는 물질은 cytochrome C, apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1), second mitochondria-driven activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI (Smac/Diablo), apoptosis inducing factor (AIF) 등으로 세포질에서 adenosine triphosphate (ATP)와 함께 단위체를 만들어 하위의 caspase를 활성화시켜 결국 세포자멸사를 더욱 빠르게 진행하게 된다.

또한 BH3 only protein으로 분류되는 Bid와 같은 물질은 활성화된 caspase에 의해 잘려서 truncated Bid (tBid)가 되고 이는 Bcl-2, Bcl-xL에 결합하여 그 작용을 억제함으로써 Bax와 Bak의 작용을 활성화시킨다[26-28]. 간세포에서 tBid가 미토콘드리아로 이동한 결과 ROS의 생성이 증가되었고, Bid 유전자결핍마우스에서 추출한 간세포에서도 TNF α 와 Actinomycin D 처리 시 세포자멸사나 ROS의 증가가 거의 보이지 않았다[9]. 한편 야생형 세포에 비해 Bcl-2를 과발현한 세포는 다양한 세포자멸사 자극원을 처리했을 때 생성된 ROS의 양도 적고 지질과산화(lipid peroxidation)가 저해되어, Bcl-2가 강력한 항산화 역할을 지닌 것으로 보고 되었다[29]. 이와 같이 TNF α 로 인한 세포자멸사가 일어날 때 미토콘드리아와 이에 관련된 단백질들이 주요 매개체 역할을 수행하여 ROS를 생성, 또는 억제하는 기전을 일으키는 것을 종합해 볼 때, 세포자멸사와 ROS와의 연관성이 있음을 알 수 있다.

2. ROS와 괴사(necrosis)

1) Caspase와 receptor-interacting protein 1 (RIP1)

괴사는 연구 초창기에는 명확한 진행 기전을 수반하지 않고 상처나 박테리아 등에 의한 감염뿐만 아니라 영양의 부족, pH, 온도의 변화 등 환경적인 요인에 의해서도 유도되는 수동적인 세포의

죽음으로 인한 조직의 염증의 유발원인이라고 알려졌다[30]. 그러나 이후 연구자들은 괴사 역시 세포자멸사와 마찬가지로 TNF α 와 같은 죽음 수용체(death receptor)에 의해 일어날 수 있다는 것을 L929 세포주에서 발견하였다[31]. 그리고 여기에 pan-caspase 저해제인 benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe)-fluoromethylketone (zVAD-fmk)나 cytokine response modifier (CrmA)를 처리하면 TNF α 에 의한 괴사가 더 증가하는 것을 확인하였다. 마찬가지로 T 림프구, 호중구, MEF 등에서 강력한 세포자멸사 리간드인 Fas ligand (FasL)나 Tumor necrosis factor-related apoptosis-including ligand (TRAIL)의 자극에 zVAD-fmk로 caspase에 의한 세포자멸사를 저해하였을 때 괴사로 인한 세포사멸이 크게 일어나는 것이 보고되었다[32-34]. 이를 통해 괴사는 세포자멸사와 달리 다양한 분자생물학적 과정들이 다른 단계의 세포 내 상황에서 서로간의 교차를 통해 이루어지며 caspase와 무관하게 일어나는 괴사(necrosis)와 같은 세포사멸은 정상적으로 일어나는 caspase에 의존적인 세포자멸사가 실패했을 경우 일어나는 대체 과정이다[35]. 그리고 TNF α 에 의한 괴사는 세포자멸사보다 ROS에 더 밀접하게 관련되어 있는데, 예를 들어 L929의 괴사와 같은 세포사멸은 미토콘드리아로부터 유래된 ROS에 의한 것이라는 보고들이 있으며[36,37], 괴사를 유도하기 위해 caspase를 저해하게 되면 ROS가 증가한다는 점을 미루어 볼 때[31], 죽음 수용체에 의한 괴사와 ROS는 서로 positive feedback을 형성한다는 것을 알 수 있다.

Caspase 외에 괴사에 관여하는 또 다른 중요한 단백질은 receptor-interacting protein 1 (RIP1)이다. RIP1은 TNFR1 신호전달 콤플렉스의 주요 단백질이지만 이 외에도 지난 몇 년간 RIP1의 세포 내 스트레스 반응에 대한 역할에 대한 연구는 꾸준히 있어왔다[32,38]. 이전 보고에 따르면 RIP1이 T 림프구에서 FasL나 TNF α , TRAIL에 의한 괴사에 중요하다는 것이 알려졌으며[32], virus에 감염된 Jurkat 세포주에 TNF α 를 처리한 결과 역시 마찬가지로 RIP1이 괴사에 주요 단백질이라는 것을 밝혀내었다[39]. TNF α 나 FasL의 자극에 의해 세포자멸사가 일어나 이로 인해 활성화된 caspase로 인해 RIP1이 잘려서 괴사가 저해된다는 사실도 RIP1이 necrosis에 중요하다는 사실을 시사한다[40]. 그리고 RIP1 야생형 마우스 배아모세포에서는 TNF α 에 의한 괴사에서 ROS가 증가하지만 RIP1 유전자결핍마우스 배아모세포에서는 ROS가 훨씬 감소하였으며[34] 같은 마우스 배아모세포에서 TNF α 가 아닌 H₂O₂로 자극을 주었을 때 RIP1 유전자결핍마우스 배아모세포의 경우에는 괴사가 일어나지 않아 괴사가 일어날 때 RIP1과 ROS가 함께 작용한다는 점을 제시한다[41].

2) NADPH oxidase

이렇게 세포자멸사와 마찬가지로 수용체를 통한 괴사가 일어나기 위해서 ROS는 밀접하게 연관되어있지만 괴사에 관련된 ROS 공

급원은 미토콘드리아 이외에 하나 더 있다고 알려져 있다. NADPH oxidase는 원래는 면역계의 대식세포에서 침입한 세균이나 이물질을 손상시키고 죽이는데 ROS를 사용하기 위해 존재하는 세포막 효소 복합체이며 그 활성체와 소단위체의 종류에 따라 NADPH oxidase 1 (Nox1), Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, dual oxidases 1/2 (DUOX1/2) 등으로 분류된다. 이는 면역계에만 국한되는 것은 아니며 암세포나 다른 일차배양 세포에서도 조직 특이적으로 발현되어 있고 TNFα를 포함한 다양한 리간드에 의해서도 활성화된다는 것이 알려져 있다. 몇몇 보고에 따르면 TNFα가 NADPH oxidase의 활성체나 소단위체들의 발현을 증가시키거나 활성도를 증가시키며 또는 Nox2의 활성화에 기여할 수 있다고 하지만 아직 그 기전은 밝혀지지 않았다. 오히려 2007년 한 연구에서는 Nox2가 아닌 Nox1 NADPH oxidase가 L929 세포주에서 TNFα에 의한 괴사에서 활성화되어 ROS를 생성함으로써 괴사를 촉진시킨다는 내용을 발표하였다[42]. 즉, L929 세포에 TNFα를 처리하였을 때 30-45분 이내에 superoxide가 생성되며 이렇게 생성된 superoxide가 Nox1에 의한 결과물이고 이로 인해 JNK가 활성화되어 괴사가 일어난다는 것이다. 지금까지 괴사로 인해 생성된 ROS에 대한 연구가 TNFα를 처리하고 몇 시간 후, 즉 단순히 세포가 이미 죽기 시작하였을 때 생성되는 비특이적인 것이었음을 감안하면 이 연구로 인해 지금까지 TNFα로 인한 괴사에서의 ROS의 생성 기전을 좀 더 특이적이고 명확히 규명 지을 수 있는 계기가 될 수 있을 것이라 생각한다.

3. ROS와 necroptosis

위에서 언급한 것처럼 최근에는 괴사가 단순한 물리적 손상에 의한 수동적인 반응이 아닌, 역시 세밀하게 조절되어 있는 능동적인 세포 사멸 기전으로 밝혀지면서 예정 괴사(programmed necrosis) 혹은 necroptosis로 불리게 되었다. 괴사와 형태적으로는 구별되지 않지만 necroptosis는 주로 TNFα와 같은 신호에 의해 활성화되며 바이러스 감염 등의 다양한 상황에서 caspase-8의 활성이 저해되었을 때 활성화되는 것이지만 necroptosis라는 명칭이 생긴 것은 RIP1-RIP3로 구성된 necroptosome complex가 발견되면서부터이다[43-45].

1) RIP3와 necroptosome

RIP3는 RIP1군의 일종으로 최근 necroptosis에 연관되어 있다는 사실이 보고되면서 각광받고 있는 단백질이다. RIP3는 C-말단 부분의 RIP homotypic motif (RHIM) 영역(domain)을 통해 RIP1과 결합하며 N-말단부분에는 인산화활성을 가진 영역이 있다. 이 두 영역 모두 necroptosis가 일어나는데 중요하다. RIP3가 발현되지 않는 세포에 RIP3 유전자를 발현시키면 necroptosis가 일어나지만 인산화 활성 돌연변이인 K50A 유전자를 발현시키면 necroptosis가 일어나지 않는 것으로 미루어 RIP3 인산화 활성이 necropto-

sis에 중요함을 알 수 있다[43]. RIP1에 의한 것인지 확실히 알려지지 않았지만 RIP3의 199번째 위치인 세린 잔기의 인산화도[44], 비록 세포 밖에서는 RIP1이 RIP3를 인산화시키지 않는다는 실험 결과가 있었지만 RIP1의 인산화 활성이 RIP3의 인산화를 일으키는 바탕으로 RIP3의 인산화를 통한 necroptosis의 발생에 RIP1이 간접적으로 역할을 수행함을 제시할 수 있었다. 그리고 RHIM 영역을 통한 RIP1과 RIP3와의 결합이 necroptosis를 유발하는 자극원이 주어졌을 때에만 일어나는 것으로 보아 둘 간의 결합이 necroptosis에 중요함을 알 수 있다. 이렇게 necroptosis가 일어나는 세포에서 RIP1과 RIP3가 결합한 소단위체를 complex IIb 혹은 necroptosome이라 한다(Fig. 1). 한편, 괴사에 중요한 인자라는 것만 알려졌던 RIP1의 새로운 기전이 necroptosis의 연구 과정에서 밝혀졌는데 RIP1이 cellular inhibitor of apoptosis 1/2 (cIAP1/2)의 신속한 분해를 유도하는 인자인 smac mimetics인 IAP antagonist의 자극에 대해서는 necroptosis에 관여하지 않았기 때문이다[46]. 예를 들어 TNFα와 smac을 처리하였을 때는 fas-associated death domain (FADD)을 포함한 소단위체에 RIP1이 포함되면서 세포자멸사가 일어났지만 TNFα와 zVAD를 함께 처리하였을 때에는 RIP1과

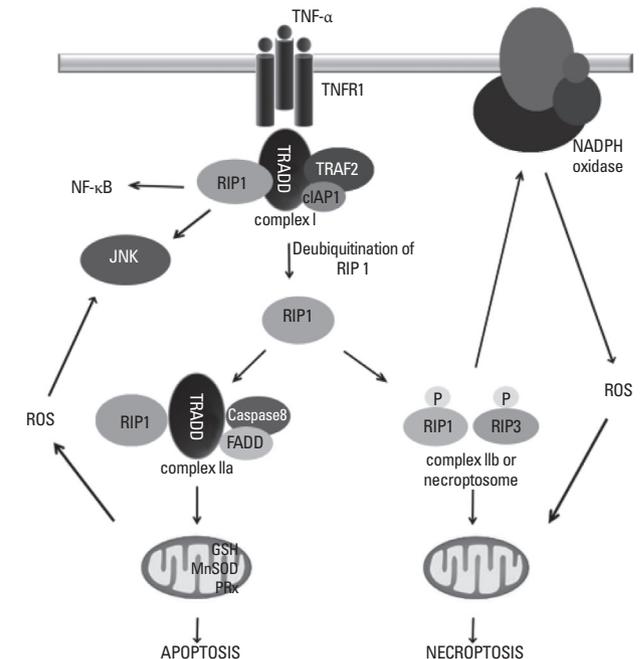


Fig. 1. TNFα induced formation of apoptotic and necroptotic signaling complexes. TNFR1, tumor necrosis factor receptor 1; TRADD, TNF receptor type 1-associated death domain protein; TRAF2, TNF receptor-associated factor 2; cIAP1, cellular inhibitor of apoptosis 1; JNK, c-Jun N-terminal kinase; RIP1, receptor-interacting protein 1; FADD, Fas-associated death domain; GSH, glutathione; MnSOD, manganese-dependent superoxide dismutase; PRx, peroxiredoxin-3; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activator B cells; ROS, reactive oxygen species.

RIP3를 포함한 necrosome이 형성되면서 necroptosis가 일어나는 것을 Panc-1 세포에서 확인하였다. Smac에 의한 cIAP1/2의 분해로 인해 RIP1이 어떻게 세포사멸사를 유도하는 소단위체로 이동하는지는 알 수 없지만 cIAP1/2가 RIP1의 유비퀴틴화(ubiquitination)를 시키는 E3 ligase로 작용한다는 점을 감안할 때 RIP1의 유비퀴틴화 여부가 세포사멸의 운명을 결정짓는데 중요한 역할을 한다는 점은 명확한 것 같다.

ROS의 생성은 이러한 necroptosis가 일어나는데 있어 매우 강력한 결정인자로 작용하는데 여기에는 다양한 증거가 존재한다. 이는 미토콘드리아의 에너지 대사가 과사 일어나는 데 중요하게 작용하기 때문이다. 물론 모든 종류의 TNF α 에 의한 necroptosis에 있어서 ROS의 생성이 필수적인 것은 아니지만 TNFR1 신호 전달에 있어서 RIP3의 인산화 활성도는 미토콘드리아의 생물학적 에너지 대사와 ROS의 과도한 생성여부와 밀접한 관련이 있어 보인다. RIP3는 glucogen phosphorylase (PYGL)와 glutamate dehydrogenase 1 (GLUD1)를 포함한 대사효소들과 결합함으로써 이들을 활성화시킨다. 이는 이러한 대사효소들의 RNAi를 이용한 발현 저해 실험을 통해 증명하였다[45]. PYGL은 글리코젠을 glucose-1-phosphate로 분해시켜 해당 기질인 glucose-6-phosphate로 전환하여 결국에는 ROS의 발생에 기여하는 효소이다. 또한 GLUD1은 산화적 인산화 과정에 있어 매우 중요한 효소로 알려져 있다. 게다가 RIP3는 이러한 대사에 관련된 효소들의 활성을 증진시킴으로써 세포사멸을 일으키는 주요 결정 요인으로 작용하는 것으로 보인다[47]. Necroptosis와 미토콘드리아 ROS와 관련된 또 다른 보고에 따르면, necroptosome이 일어날 때 RIP1이 RIP3의 227번째 세린 잔기를 인산화시켜서 미토콘드리아 단백질 탈인산화 효소인 phosphoglycerate mutase 5L (PGAM5L)과 mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL)을 인산화시킨다는 것이었다[48,49]. 이는 RIP3-PGAM5L을 포함한 necroptosome이 미토콘드리아막에 존재하는 PGAM5에 결합하여 미토콘드리아 결합 조절인자인 Drp1을 활성화시켜 결국 활성화된 dynamin-related protein 1 (Drp1)이 미토콘드리아막을 손상시켜 결국 세포 내 ROS가 증가된다는 결과를 내놓았다. 그리고 미토콘드리아와 독립적으로 ROS가 necroptosis와 연관된다는 또 다른 연구에서는 TNF α 를 처리하였을 때 riboflavin kinase (RFK)가 TNFR1과 TNFR type 1-associated death domain protein (TRADD)와 결합한다는 보고가 있었다. RFK는 곧 Nox1과 Nox2, p22^{phox}를 TNFR로 끌어들이어 ROS를 생성시켜 necroptosis를 유도하였다[50].

결론

TNF 또는 같은 군에 속하는 리간드에 의한 신호 전달 체계는 복잡한 생물학적 체계 내에서 결정된다. 수용체 하위 경로에는 매우

중요한 기점이 되는 부분이 다양하게 존재하며 결국 이를 조절할 수 있는 부분은 관련 유전자 전사 조절, 혹은 신호 전달 경로 내에 있는 다양한 주요 단백질들의 항산화 상태의 조절 여부가 될 것이다. 산화물질(oxidant)과 항산화 물질(antioxidant)은 죽는지 사는지에 국한되는 세포의 운명을 결정짓는 것뿐 아니라 세포사의 경로에도 영향을 주는 신호회로를 바꾸어 놓을 수도 있을 것이다. 지금까지 살펴본 것처럼 ROS가 TNF α 에 의한 다양한 세포사멸과 분화의 자극에 있어서 그 민감도를 결정하는 만큼 좀 더 세밀하고 논리적으로 각각의 다양한 세포사멸에 있어서의 ROS의 역할을 규명하는 것이 매우 중요할 것이다.

REFERENCES

1. Rhee SG. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* 2006;312:1882-3.
2. Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* 2000;2000:pe1.
3. Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci* 2007;96:2181-96.
4. Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, Woo HA. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:183-9.
5. Rhee SG, Chang TS, Bae YS, Lee SR, Kang SW. Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:S211-5.
6. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:269-90.
7. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000;29:323-33.
8. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10:45-65.
9. Ding WX, Ni HM, DiFrancesca D, Stolz DB, Yin XM. Bid-dependent generation of oxygen radicals promotes death receptor activation-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Hepatology* 2004;40:403-13.
10. Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, et al. NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J* 2003;22:3898-909.
11. Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 2005;120:649-61.
12. Sullivan DM, Wehr NB, Fergusson MM, Levine RL, Finkel T. Identification of oxidant-sensitive proteins: TNF- α induces protein glutathiolation. *Biochemistry* 2000;39:11121-8.
13. Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:G1-7.
14. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1191-212.
15. Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N. Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J Biol*

- Chem 2008;283:13565-77.
16. Liu H, Lo CR, Czaja MJ. NF-kappaB inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through a sustained activation of JNK and c-Jun. *Hepatology* 2002;35:772-8.
 17. Zhou Q, Lam PY, Han D, Cadenas E. c-Jun N-terminal kinase regulates mitochondrial bioenergetics by modulating pyruvate dehydrogenase activity in primary cortical neurons. *J Neurochem* 2008;104:325-35.
 18. Liu Y, Min W. Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ Res* 2002;90:1259-66.
 19. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 1998;17:2596-606.
 20. Hochedlinger K, Wagner EF, Sabapathy K. Differential effects of JNK1 and JNK2 on signal specific induction of apoptosis. *Oncogene* 2002;21:2441-5.
 21. Das M, Sabio G, Jiang F, Rincon M, Flavell RA, Davis RJ. Induction of hepatitis by JNK-mediated expression of TNF-alpha. *Cell* 2009;136:249-60.
 22. Han D, Canali R, Rettori D, Kaplowitz N. Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Mol Pharmacol* 2003;64:1136-44.
 23. De Vos K, Goossens V, Boone E, Vercammen D, Vancompernelle K, Vandenabeele P, et al. The 55-kDa tumor necrosis factor receptor induces clustering of mitochondria through its membrane-proximal region. *J Biol Chem* 1998;273:9673-80.
 24. Thomas WD, Zhang XD, Franco AV, Nguyen T, Hersey P. TNF-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of melanoma is associated with changes in mitochondrial membrane potential and perinuclear clustering of mitochondria. *J Immunol* 2000;165:5612-20.
 25. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996;85:803-15.
 26. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:621-32.
 27. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.
 28. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, et al. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 2001;410:112-6.
 29. Tyurina YY, Tyurin VA, Carta G, Quinn PJ, Schor NF, Kagan VE. Direct evidence for antioxidant effect of Bcl-2 in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Arch Biochem Biophys* 1997;344:413-23.
 30. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 1999;18:7719-30.
 31. Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, et al. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1998;187:1477-85.
 32. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 2000;1:489-95.
 33. Kawahara A, Ohsawa Y, Matsumura H, Uchiyama Y, Nagata S. Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J Cell Biol* 1998;143:1353-60.
 34. Lin Y, Choksi S, Shen HM, Yang QF, Hur GM, Kim YS, et al. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J Biol Chem* 2004;279:10822-8.
 35. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:589-98.
 36. Matthews N, Neale ML, Jackson SK, Stark JM. Tumour cell killing by tumour necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology* 1987;62:153-5.
 37. Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 1992;267:5317-23.
 38. Meylan E, Tschopp J. The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci* 2005;30:151-9.
 39. Chan FK, Shisler J, Bixby JG, Felices M, Zheng L, Appel M, et al. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J Biol Chem* 2003;278:51613-21.
 40. Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu ZG. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:2514-26.
 41. Shen HM, Lin Y, Choksi S, Tran J, Jin T, Chang L, et al. Essential roles of receptor-interacting protein and TRAF2 in oxidative stress-induced cell death. *Mol Cell Biol* 2004;24:5914-22.
 42. Kim YS, Morgan MJ, Choksi S, Liu ZG. TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Mol Cell* 2007;26:675-87.
 43. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 2009;137:1112-23.
 44. He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* 2009;137:1100-11.
 45. Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 2009;325:332-6.
 46. Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 2008;133:693-703.
 47. Nicotera P, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 2004;23:2757-65.
 48. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 2012;148:213-27.
 49. Wang Z, Jiang H, Chen S, Du F, Wang X. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell* 2012;148:228-43.
 50. Yazdanpanah B, Wiegmann K, Tchikov V, Krut O, Pongratz C, Schramm M, et al. Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase. *Nature* 2009;460:1159-63.