[UCI]I804:24011-200000233847

2007년 2월

석사학위 논문

Glucose 결핍시 유도되는 PI3K 의존적인 cytochrome C 방출과 caspase-9을 경유하는 apoptosis 경로

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

최 정 은

Glucose 결핍시 유도되는 PI3K 의존적인 cytochrome C 방출과 caspase-9을 경유하는 apoptosis 경로

Glucose depletion induces apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase dependent cytochrome C release and caspase-9 activation.

2007년 2월 일

조선대학교대학원

바이오신약개발학과

최 정 은

Glucose 결핍시 유도되는 PI3K 의존적인 cytochrome C 방출과 caspase-9을 경유하는 apoptosis 경로

지도교수 임성철, 이인화

이 논문을 이학석사학위신청 논문으로 제출함

2006년 10월 18일

조선대학교대학원

바이오신약개발학과

최 정 은

최정은의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 최 철희 (인)

위원 조선대학교 교수 임 성철 (인)

위원 조선대학교 교수 한 송이 (인)

2006년 11월 30일

조선대학교 대학원

목 차

LIST OF TABLES……III
LIST OF FIGURES……IV
ABSTRACT……VI

Ⅰ. 서론……1

Ⅱ. 재료 및 실험방법……4
1. 세포배양……4
2. 포도당 결핍과 약물처리……4
3. Hoechst 33342와 propidium iodide (PI)의 염색……5
4. Reactive oxygen species (ROS) 측정……5
5. Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정……5
6. Catalase 활성 분석……6
7. 세포주기(cell cycle) 측정……6
8. Western blot 분석……7
9. Immunoprecipitation……8
10. 핵 분리……9
11. 미토콘드리아와 세포질 분리……10

Ⅲ. 실험결과……11
1. 포도당 결핍이 유도하는 괴사와 항산화제에 의한 자멸사로의 전환……11
2. 포도당 결핍 시 항산화제에 의한 자멸사로의 전환에 관여하는 PI3K의 역할 ……12

3. PI3K 억제제인 LY294002가 p53의 발현에 미치는 영향……13
4. 다른 암 세포주에서 포도당 결핍의 영향……14

Ⅳ. 고찰……26

Ⅴ. 결론……30

Ⅵ. 감사의 글……31

Ⅶ. 참고문헌……32

LIST OF TABLES

Table. 1. Effects of LY294002 treatment on the antioxidants/glucose depletion (GD)-induced cell death and cell cycle distribution…19

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Antioxidants switches glucose deppetion (GD)-induced necrosis to apoptosis in A549 cells……15

Fig. 2. Glucose depletion (GD)-induced ROS production is suppressed by catalase and N-acetyl-cysteine (NAC) in A549 cells……15

Fig. 3. Glucose depletion (GD) decreases activity and amount of Cu/ZnSOD, which are restored in the presence of antioxidants ……16

Fig. 4. The PI3K inhibition decreases catalase/glucose depletion (GD)-induced apoptosis in A549 cells……17

Fig. 5. The PI3K inhibition decreases N-acetyl-cysteine (NAC)/glucose depletion (GD)-induced apoptosis in A549 cells……18

Fig. 6. PI3K inhibitor, LY294002 inhibits antioxidants/glucose depletion (GD)-induced caspase-3, caspase-9 cleavage and PARP cleavage……21

Fig. 7. The PI3K inhibitor, LY294002 reduces the protein level, phosphorylation, and nuclear translocation of p53 protein in A549 cells……23

Fig. 8. Changes in the activites of Cu/ZnSOD, MnSOD and catalase in a variety of cancer cells……25

ABSTRACT

Glucose depletion induces apoptosis through phosphatidylinositol 3 kinase-dependent cytochrome C release and caspase-9 activation

Choi Jeong-Eun

Advisor: Prof. Sung-Chul Lim, M.D., Ph.D.
Department of Bio New Drug Development
Graduate School of Chosun University

Glucose metabolism is an essential process in maintaining the balance between life and death. Glucose depletion (GD) results in ATP depletion and this in turn triggers the death cascade. Severe ATP depletion usually leads to necrosis because ATP is required for many steps of apoptosis. Decreased glucose uptake and glycolysis result in oxidative stress and this alteration of the redox status in the cell triggers variable signal transduction pathways resulting in cell death. We previously observed that GD induced necrosis in A549 cells which was switched to apoptosis in the presence of antioxidant when reactive oxygen species (ROS) production is suppressed by catalase and N-acetyl-cysteine (NAC) in A549 cells.

In this study, we investigated the relationship between phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) pathway and mitochondrial downstream death effectors, such as cytochrome C and caspase-3 and -9 in the GD-induced

apoptotic pathway in A549 cells. PI3K inhibition decreased antioxidants/GD-induced apoptosis in A549 cells, and PI3K inhibitor LY294002 had inhibitory effect on antioxidants/GD-induced caspase-3 and, caspase-9 cleavage and PARP cleavage. LY294002 also reduced protein levels, phosphorylation, and nuclear translocation of p53 in A549 cells which are observed in the apoptotic condition.

GD induces apoptosis through PI3K-dependent cytochrome C release and caspase-9 and -3 activation.

1. 서 론

포도당의 운반과 물질대사는 세포 생장에 중요한 역할을 하고 있다[1]. 포도당 결핍은 세포 내의 주 에너지원인 adenosine triphosphate (ATP) 감소를 유도하고 미토콘드리아와 관련된 사멸 경로를 자극하며, 당원분해를 통해 산화적 스트레스를 발생시킨다[2,3]. 그 결과 세포 내의 환원 상태를 변화시켜 스트레스와 관련된 신호 분자들의 활성화를 유도하여 세포 죽음의 결과를 가져온다[4-6].

세포 내에서는 부족한 에너지원을 보충하기 위해 다른 고분자를 분해하여 에너지로 사용하게 된다[2]. 지방이나 당원의 분해로 세포는 많은 활성산소를 발생시킨다. 포도당 결핍이 가져오는 세포 내의 산화적 스트레스는 주로 미토콘드리아의 생화학적 경로에 의해서 발생된다[3]. 미토콘드리아의 호흡 사슬을 통한 에너지 공급이 중단되면 superoxide와 hydrogen peroxide의 농도가 증가하고 활성산소를 청소하는 효소들의 활동이 증가하게 된다.

산화적 스트레스에 대한 주요 방어효소로서 superoxide dismutase (SOD), catalase와 glutathione peroxidase 등이 있다[7]. 이 효소들은 산화적 반응에 의한 세포 손상을 최소화 시켜주는 역할을 한다. 그 중 SOD는 superoxide로부터 H_2O_2와 O_2 형성을 촉매 하는 효소이다. 인간의 경우 Cu/Zn 동위 효소가 세포질에 나타나고, Mn을 포함한 동위 효소는 미토콘드리아 기질에서 발견된다[8,9]. 그리고 catalase는 H_2O_2를 사용하여 다른 기질을 산화하는 heme을 함유하는 효소이다. H_2O_2가 과량으로 존재할 때 catalase는 이를 H_2O로 전환시킨다[10].

selenium을 포함한 glutathione peroxidase는 세포 내 peroxide 수준을 통제하는 주요한 효소이다. 이 효소는 GSH에 의해 다양한 기질을 환원시킨다. H_2O_2를 환원시켜 H_2O를 만들 뿐만 아니라 glutathione peroxidase는 organic peroxide를 alcohol로 전환시킨다[11]. 세포 내 활성산소의 형성은 이러한 세포 내 항산화제 방어 기작에 의해 최소화 되고 있지만 방어 기작의 붕괴로 세포는 효소의 불활성화, 다당류 분해, DNA 절단, 세포막의 파괴 등의 손상을 가져와 결국에는 세포사멸을 유도하게 된다[12,13].

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)는 lipid kinases 하위의 구성 요소로 세포막에 있는 phosphatidylinositol의 inositol ring의 3번 위치가 인산화 되고, 탈 인산화 되면서 세포 외 환경에 반응한다[14]. 이 세포질 내 효소는 85 kDa의 regulatory subunit와 110 kDa의 catalytic subunit으로 구성되어 있다[15]. PI3K는 세포 성장, 생존, 종양 분화 및 세포의 이동 등 다양한 분야에 걸쳐 중요한 역할을 한다[16,17]. 대부분의 연구가 PI3K의 생장 촉진 역할에 초점을 맞춰 진행되고 있으며 종양원성 경로에서도 많은 연구가 진행되고 있다[17,18]. 한편, PI3K가 인터페론 알파에 의한 암세포 사멸을 유도하고[18], Fas 발현을 조절함으로써 세포사멸을 유도하는 경우도 드물게 보고되어 있다[19,20].

본 연구에 앞서 폐암, 간암, 대장암 세포주를 이용하여 포도당 결핍에 대한 예비 실험을 하였다. 각 세포에 포도당을 결핍 시켰을 때와 항산화제(antioxidant), 그리고 세포 생존에 관여하는 kinases 억제제를 사용하였을 때 나타나는 세포사멸을 관찰하였다.

본 연구에서는 PI3K가 저농도 활성산소 환경에서 포도당 결핍에 의해 세포사멸을 유도하는 역할을 발견하고 PI3K가 세포사멸을 유도하는 또 하나의 새로운 경로를 보고한다. 대부분 세포에서는 포도당을 단독으로 결핍시키거나 항산화제를 처리하였을 때 주로 괴사(necrotic death)가 나타났지만 폐암 세포 중 A549 세포에서는 괴사에서 자멸사(apoptotic death)로 전환되었다[21].

이렇게 포도당 결핍에서 오는 산화적 스트레스로 인해 발생되는 활성산소를 항산화제인 catalase와 N-acetyl-cysteine (NAC)이 제거하여 저농도의 활성산소 수준이 유지되는 동안에 괴사의 신호전달이 자멸사로 전환되는 기전과 포도당의 결핍과 항산화제에 의한 자멸사의 신호 전달에 관하여 살펴보도록 한다.

2. 재료 및 실험방법

1. 세포배양

56℃에서 30분간 열처리하여 비활성화 시킨 5% fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL, USA) 과 1% 항생제(0.85% NaCl에 antibiotic-antimycotic, 10,000 units/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin 및 25 μ/ml amphotericin B, WelGENE Inc., South Korea)를 함유한 RPMI-1640 (GIBCOBRL, USA) 배지를 사용하여 폐암 세포주인 A549 세포를 37℃, 5% CO_2와 습윤화 된 배양기(SANYO, Japan) 내에서 배양하였다. 2-3일에 한번 씩 배양액을 교체하였으며 세포는 트립신 처리를 하여, hemacytometer로 세포 수를 측정하고 100 mm culture dishes에는 1.0×10^6/dish, 60 mm culture dishes에 5.0×10^5/dish, 35 mm culture dishes는 2.0×10^5/dish로 일정하게 분주하여 배양하였다.

2. 포도당 결핍과 약물처리

세포는 phosphate buffer saline (PBS, WelGENE Inc., South Korea)로 1-2번 가볍게 헹궈준 다음 포도당이 결여되어 있는 RPMI 1640 (5% dialyzed FBS, 1% antibiotics 함유) 배양액으로 교체하였다. Catalase (SIGMA-ALDRICH CO., USA)는 1,000 units/ml, NAC (SIGMA-ALDRICH CO., USA)는 10 mM로 포도당이 결핍된 배양액으로 교체할 때 같이 처리하였다. LY294002 (A.G. SCIENTIFIC, Inc., USA)는 10 μM, UO126 (A.G. SCIENTIFIC, Inc., USA)는 10 μM, wortmannin (A.G. SCIENTIFIC, Inc., USA)은 100 nM로 포도당이 결핍된 배양액으로 교체하기 전 30분 처리를 하고, 포도당이 결핍된 배양액으로 교체한 후에 다시 같은 농도로 재처리하였다.

3. Hoechst 33342와 propidium iodide (PI)의 염색

자멸사와 괴사를 구분하기 위해 핵을 염색시켰다[22]. 35 mm dishes에 A549 세포를 분주하여 포도당이 결핍된 배양액과 항산화제를 처리한 후 Hoechst 33342 (5 μg/ml)와 PI (10 μg/ml)를 각각 넣고 10분간 37℃에서 반응시켰다. 트립신 처리하여 세포를 모은 다음 2,000 rpm, 4℃에서 5분 원심분리 후 상층액은 제거하고, 4% formaldehyde를 500 ㎕ 넣고 얼음에서 10분간 반응시켰다. 세포 부유물을 cytospin하여 슬라이드에 세포를 부착시킨 후 mounting하여 형광현미경(LEICA DM 5000 B, Germany)으로 관찰하였다.

4. Reactive oxygen species (ROS) 측정

60 mm dishes안에 coverslips을 덮고, 그 위에 세포를 분주하였다. 24시간 안정화를 시킨 후에 각각의 dishes에 포도당 결핍과 항산화제를 처리하여 배양시켰다. 18시간의 배양이 끝난 후에는 50 μM dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA, Molecular Probes, USA)와 10 μM dihydroethidium (HE, Molecular Probes, USA)을 넣고 30분간 37℃에서 반응시켰다[23]. Coverslips를 PBS로 씻은 후 mounting하여 형광현미경으로 관찰하였다.

5. Superoxide dismutase (SOD) 활성 분석

세포 내에 있는 SOD의 활성을 관찰하기 위하여 SOD 활성도를 염색하여 관찰하였다[24]. 세포를 60 mm dishes에 분주하고, 포도당이 결핍된 배양액과 항산화제를 처리하여 세포를 모았다. 2번 세척한 세포에 extraction buffer (0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100, 1 mM phenylmethanesulfony fluoride, 0.01X Halt^{TM} protease inhibitor cocktail)를 넣고 15분 정도 vortexing하여 12,000 rpm, 4℃에서 15분 동안 원심분리하고 상층액을 새 튜브로 옮겼다.

Sodium dodecyl sulphate (SDS)를 넣지 않은 7%의 separating gel과 4.3% stacking gel을 제조하여 Tris-glycine buffer (SDS-free)를 이용하여 4℃에서 100 V로 2시간 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 50 mM phosphate buffer (pH 7.2)로 가볍게 씻은 후 Solution A (50 mM phosphate buffer (pH 7.2), 0.3 mM nitro blue tetrazolium, 260 μM riboflavin, 0.1 mM EDTA)에 담궈 20분간 상자에 넣어 반응시켰다. 그리고 증류수로 2-3번 씻은 후에 Solution B (50 mM phosphate buffer (pH 7.2), 86 mM TEMED, 0.1 mM EDTA)를 넣고 천천히 발색시켰다.

6. Catalase 활성 분석

세포 내에 있는 catalase의 활성을 관찰하기 위해 catalase 활성도를 염색하였다[25]. 세포를 60 mm dishes에 분주하고, 포도당이 결핍된 배양액과 항산화제를 처리하여 세포를 모았다. 2번 세척한 세포에 extraction buffer를 넣고 15분 vortexing하여 12,000 rpm, 4℃에서 15분 동안 원심분리하고 상층액을 새 튜브로 옮겼다. SDS를 넣지 않은 7%의 separating gel과 4.3% stacking gel을 만들어 Tris-glycine buffer (SDS-free)를 사용하여 4℃에서 100V로 3시간 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후에 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 horseradish peroxidase (50 μg/ml)을 첨가하고 45분간 상자에 넣어 반응시켰다. 여기에 5.0 mM H_2O_2를 넣고 계속해서 10분 반응시켰다. 증류수로 gel을 2-3번 씻어준 후에 diaminobenzidine (0.5 mg/ml)이 들어 있는 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)를 넣고 완전히 염색될 때까지 반응시켰다.

7. 세포주기(cell cycle) 측정

Ormerod 등이 사용한 방법을 참고하여 세포주기를 측정하였다[26]. 세포를 60 mm dishes에 분주하고, 포도당이 결핍된 배양액과 항산화제, 그리고 억제제를 처리하여 세포를 모았다.

PBS로 씻어주고 남은 pellet에 0.8 ml PBS와 차가운 95% ethanol과 0.5% Tween 20이 들어간 reagent를 2.2 ml 넣어주고, 4℃에서 30분 고정시켰다. 반응이 끝난 후에는 2,000 rpm 4℃에서 10분 원심분리 후, 상층액을 제거하였다. 그리고 1% BSA가 함유된 PBS로 가볍게 씻어주고, 다시 한번 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고, 11 kunits/ml RNase와 PI (50 μg/ml)을 넣고, 4℃에서 40분 반응시켰다. 반응이 끝난 후에 원심분리하여 상층액을 제거하고, 0.5 ml 1% BSA가 함유된 PBS를 넣고 파이펫으로 pellet을 잘 풀어주었다. 빛에 민감하므로 주의하여 flow cytometer (Becton Dicknson, USA)로 측정한다.

8. Western blot 분석

세포를 60 mm dishes에 분주하고, 포도당이 결핍된 배양액과 항산화제, 그리고 억제제를 처리하여 세포를 모았다. 세포를 수집하여 PBS로 세척한 후에 lysis buffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EGTA, 20 mM NaF, 50 mM β-glycerophosphate, 2 mM phenylmethanesulfony fluoride, 1 mM Sodium orthovanadate, 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml aprotinin, 0.01X Halt™ protease inhibitor cocktail, EDTA-Free (Pierce Biotechnology, USA)를 넣고 20분간 vortexing하여 반응시켰다. 그 후에 15,000 rpm 4℃에서 15분 동안 원심분리하고 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 단백질 추출물은 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, USA)를 사용하여 농도를 측정하였다(595nm, ELISA, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC, South Korea). 각각의 샘플은 동량의 단백질과 2X SDS-PAGE sample buffer (1.5 mM Tris (pH 6.8), 20% SDS, glycerol, β-mercaptoethanol, 1.8 mg bromophenol blue) 혹은 4X SDS-PAGE sample buffer를 넣고 잘 섞어준 후 5-15분 동안 끓였다.

재빨리 얼음에 식힌 후 8-12% SDS-polyacrylamide gel에 loading하여 100 V에서 2시간 정도 전기영동 하였다. 이렇게 분리한 단백질은 nitrocellulose membrane으로 200 mA에서 3시간 transfer하였다. Membrane은 ponceau S solution (5% acetic acid, 0.1% ponceau S)으로 확인 후 5% skim milk로 상온에서 2시간 반응 시키고, 1차 항체는 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 1차 항체의 반응이 끝난 후에 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시켰다. 이 반응이 끝난 후에 0.1% Tween 20이 포함되어 있는 Tris-buffered saline (TBT)로 3번 씻어준 후에 enhanced chemiluminescence detection kit (ECL, Pierce Biotechnology, USA) solution을 넣고 현상하였다.

항체의 구입과 희석 배율의 조건은 다음과 같다.

Anti-PARP (dilution 1:500) 및 anti-cytochrome C (1:500)는 Pharmingen (USA)로부터 구입하였다. Anti-SOD-1 (1:2000), anti-SOD-2 (1:1000), anti-bax (1:200), anti-p53 (1:1000), anti-total ERK (1:1000) 및 anti-rabbit IgG (1:5000)은 Santa Cruz Biotechnology (USA)로부터 구입하였다. Anti-cleaved caspase-3 (1:500), anti-cleaved caspase-9 (1:500) 및 anti-p-p53 (1:500)은 Cell Signaling Technology Inc. (USA)로부터 구입하였고, anti-mouse IgG (1:2000)는 Zymed (USA)로부터 구입하였다.

9. Immunoprecipitation

Harlow의 실험수기법[27]에 제시된 실험방법을 참고하여 실험하였다. 100 mm dishes에 세포를 분주하여 안정화 시킨 뒤 포도당이 결핍된 배양액과 항산화제, 그리고 PI3K 억제제인 LY294002를 각각 처리하였다. PBS로 세척한 후 lysis buffer를 넣고 20분간 vortexing하여 반응시켰다. 그 후에 15,000 rpm, 4℃에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 새 튜브로 옮겼다.

각각의 샘플의 단백질이 1.5 mg/ml이 되게 하여 가장 많은 샘플에서 오차만큼의 lysis buffer를 넣어주고 protein A-agarose와 protein G-agarose (Santa Cruz Biotechnology, USA)을 20 ㎕ 씩 동량으로 넣어주었다. 그리고 4℃에서 1시간 동안 잘 섞어주었다. 반응이 끝난 후에는 5,000 rpm, 4℃에서 1분 동안 원심분리하여 상층액을 새 튜브로 옮겼다. p53항체를 1 μg/ml이 되게 넣어주고, 4℃에서 철야로 반응시켰다. 하루가 지나고 protein A-agarose와 protein G-agarose를 25 ㎕ 씩 넣고, 가볍게 섞어준 후 5,000 rpm, 4℃에서 1분 동안 원심분리하여 상층액만 제거하였다. 남은 pellet에 TBS + 0.5% Triton X-100 buffer를 넣고 5번 세척하였다. 세척이 끝난 pellet에는 2X SDS-PAGE sample buffer를 넣고 잘 섞어준 후 5-15분 동안 끓였다. 재빨리 얼음에 식힌 후 12% SDS-polyacrylamide gel에 loading하여 전기영동 하였다. 이후 Western blot 방법은 위에서 설명한 바와 동일하다.

10. 핵 분리

Panet 등의 방법[28]을 응용하여 핵과 세포질 단백질을 분리하였다. 100 mm dishes에 세포를 분주하고, 포도당에 결여된 배양액과 각각의 약물을 처리한 후 세포를 수집하였다. 수집한 세포는 PBS로 가볍게 세척한 후에 Sol A (1 M HEPES, 1 M MgCl2, NP-40)를 넣고 15분 동안 얼음에 꽂아 반응시켰다. 3,000 rpm, 4℃에서 5분 원심분리 한 후에 세포질을 함유한 상층액은 분리하고, 핵을 포함한 pellet은 PBS로 2번 세척하였다. 이 pellet에 K buffer (1 M HEPES, 0.5 M EDTA, 1 M MgCl2, 0.1 M DTT, glycerol, PMSF, 2.5 M KCl)를 넣어주고, 30분 vortexing하여 15,000 rpm, 4℃, 20분 동안 원심분리하고 상층액을 새 튜브로 옮겼다.

11. 미토콘드리아와 세포질 분리

세포질로 방출된 단백질의 수준과 미토콘드리아 내에 잔재해 있는 단백질의 수준을 비교하기 위해 미토콘드리아와 세포질에 있는 단백질을 분리하였다[29]. 세포를 수확하여 PBS로 세척한 후에 lysis buffer (75 mM NaCl, 8 mM Na_2HPO4, 1 mM NaH_2PO_4, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 350 μg/ml digitonin)를 넣고 잘 섞어준 후에 3-5분 얼음에 꽂아 반응시켰다. 반응이 끝난 후 15,000 rpm, 4℃에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 여기서 상층액은 세포질에 있는 단백질이고, 남은 pellet은 미토콘드리아를 포함한 세포 소기관들의 찌꺼기이다. Pellet에 lysis buffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EGTA, 20 mM NaF, 50 mM β-glycerophosphate, 2 mM phenylmethanesulfony fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml aprotinin, 0.01X Halt™ protease inhibitor cocktail, EDTA-Free (Pierce Biotechnology, USA))를 넣어주고, 20-30분 동안 vortexing하여 반응시켰다. 그 후에 15,000 rpm, 4℃에서 15분 동안 원심분리하고 상층액을 새 튜브로 옮겼다.

3. 실험결과

1. 포도당 결핍이 유도하는 괴사와 항산화제에 의한 자멸사로의 전환

A549 세포를 포도당이 결핍된 배양액에서 배양하면 Hoechst 33342와 PI 이중 염색에서 보는 바와 같이 괴사가 유발되었다. 대조군에서는 세포 모양이 그대로 유지되면서 Hoechst 33342에는 양성, PI에는 음성으로 염색이 되지만, 포도당이 결핍된 샘플에서는 대조군에 비해 핵 모양이 불규칙적이며 핵으로 PI가 끼어 들어가 붉게 염색되어 괴사가 유도됨을 쉽게 확인할 수 있었다(Fig. 1).

이전 연구에서 보고한 바와 같이 항산화제인 catalase는 1,000 units/ml, NAC는 10 mM을 각각 포도당이 결핍된 배양액과 함께 처리하여 세포 내 활성산소의 수준을 낮추어 주면 포도당 결핍에 의한 괴사가 자멸사로 전환됨을 재확인 하였다. 이러한 결과는 포도당 결핍 시 유도되는 세포사멸은 세포 내의 활성산소의 농도에 의존적으로 다른 사멸 경로를 선택하게 됨을 시사하는 결과이다. 실제로 Fig. 2에서 보는 바와 같이 DCFH-DA와 DHE를 이용하여 활성산소의 발생을 조사한 결과, 단독의 포도당 결핍 시에는 매우 높은 농도의 H_2O_2와 O_2^-가 발생하지만 포도당 결핍과 항산화제인 NAC와 catalase을 각각 함께 처리하자 활성산소의 발생이 현저히 저하되었다. 이는 본 연구팀이 이전 연구에서 보고한 바와 같이 세포 내 superoxide의 제거를 담당하는 Cu/ZnSOD의 활성이 세포사멸 경로의 결정과 밀접하게 연관되어 있음을 SOD 활성 분석, catalase 활성 분석, Western blot 분석을 통해 재확인하였다(Fig. 3). 포도당 결핍 시 시간이 지남에 따라 MnSOD와 catalase는 차이가 없지만 Cu/ZnSOD는 점차 감소함을 SOD 활성 분석과 Western blot에서 볼 수 있었다.

하지만 항산화제인 catalase와 NAC를 첨가하자 감소되었던 Cu/ZnSOD의 활성이 회복함을 살펴볼 수 있었다. 이처럼 포도당 결핍 상태에서 Cu/ZnSOD효소의 저하는 세포 내 과다한 활성산소를 축적시키고 그 결과 괴사를 유발하지만, 항산화제 존재 하에서와 같이 활성산소의 수준이 낮게 유지되는 상태에서는 자멸사가 유발됨을 확인하였다.

2. 포도당 결핍 시 항산화제에 의한 자멸사로의 전환에 관여하는 PI3K의 역할

활성산소 수준이 낮게 유지되는 상태에서 포도당 결핍이 유발하는 자멸사 현상이 어떠한 신호 전달 경로를 통해 일어나는지를 조사하였다. 여러 신호경로를 차단하여 그 효과를 관찰한 결과 PI3K의 억제제인 LY294002를 처리한 경우 catalase/포도당 결핍 처리 군에서 보였던 자멸사 유발 정도를 억제하였다(Fig. 4A). 그러나 MEK 억제제인 UO126를 처리한 경우에서는 오히려 항산화제 존재 하에서 포도당 결핍에 의해 유발되었던 자멸사를 괴사로 다시 전환시켰다(Fig. 4A). 또 다른 특이적인 PI3K 억제제인 wortmannin에서도 역시 catalase 존재 하에서 포도당 결핍에 의해 유발되는 자멸사를 50% 수준으로 억제하였다(Fig. 4B). 항산화제 일종인 NAC 역시 catalase와 같은 효과를 보였다(Fig. 5). 이는 저농도 활성산소 환경에서 포도당 결핍에 의한 자멸사가 PI3K를 통해 진행됨을 암시하는 결과이다. PI3K 억제제인 LY294002는 포도당 결핍 단독의 괴사가 일어나는 조건에서는 세포사멸을 억제하지 않지만, 자멸사 조건에서는 세포 주기를 G_0/G_1기에서 정지시키고 NAC/포도당 결핍에 의한 사멸과 catalase/포도당 결핍에 의한 사멸을 각각 42%, 57%로 억제하였다(Table 1).

자멸사가 일어날 때 PI3K 경로의 역할을 재확인하기 위하여 자멸사 유발에서 매우 중요한 역할을 하는 caspases와 PARP cleavage를 조사하였다. Fig. 6A, B에서 보는 바와 같이 18시간대에서 catalase/포도당 결핍과 NAC/포도당 결핍을 처리한 샘플에서 나타나는 caspase-9, -3 및 PARP 분열이 LY294002에 의해 억제되었다.

또한 cytochrome C의 방출 역시 LY294002 처리 시에는 억제되거나 감소되었다(Fig. 6C). 하지만 bcl family의 하위에 속하는 bax는 미토콘드리아 내부로 이동하지 않고, 단백질의 양만 감소함을 살펴볼 수 있었다(Fig. 6D).

3. PI3K 억제제인 LY294002가 p53 단백질의 발현에 미치는 영향

PI3K 하위에 있는 AKT는 Bad, p53 단백질, NF-κB 등의 하위그룹에 영향을 미칠 수 있다. 세포의 생존과 분화, 성장에 연관이 있는 AKT는 포도당의 운반에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[16]. 일반적으로는 AKT의 인산화는 MDM2의 활성을 유도하고 결과적으로 p53 단백질의 감소를 가져온다고 알려져 있다[17]. PI3K를 억제함으로 하위에 있는 p53 단백질의 변화를 Western blot 분석과 immunoprecipitation을 통해 살펴보았다. 그 결과 Fig. 7A, B에서 볼 수 있듯이 괴사가 유발되는 포도당 결핍 샘플에서는 시간에 상관없이 p53 단백질의 수준이 낮았지만, 항산화제를 처리한 샘플에서는 p53 단백질의 양이 증가되었다. 그리고 이러한 p53 단백질의 양적 증가는 PI3K 억제제인 LY294002에 의해 억제되었다. p53단백질의 안정성은 p53의 인산화와 밀접하게 관련되어 있으므로 p53의 인산화의 변화를 조사하였다. 먼저 p53 단백질 항체를 이용하여 전체 p53 단백질을 immunoprecipitation 한 후 phospho-p53으로 Western blot하여 확인한 결과 NAC/포도당 결핍, catalase/포도당 결핍 샘플에서는 phospho-p53 단백질의 수준이 증가하였으며, LY294002에 의해 감소하였다(Fig. 7C). 또한 p53이 전사인자로 작용하여 자멸사를 유발하는 단백질들의 발현 조절에 관여하기 위해서는 핵 내로 이동한다[30]. 핵 내에 존재하는 p53 단백질의 양을 조사한 결과 공통적으로 LY294002가 처리된 샘플에서는 그 양이 저하되어 있었다(Fig. 7D). 이러한 결과는 PI3K 경로에 의한 자멸사 유도가 p53 단백질의 인산화, 핵으로의 이동 과정에 관련되어 있음을 제시하는 결과이다.

4. 다른 암 세포주에서 포도당 결핍의 영향

다양한 암세포에서도 A549 세포처럼 포도당이 결여 되었을 때의 괴사가 항산화제의 처리로 자멸사로 전환되는지 확인하였다. 대장암 세포 HT-29, 간암 세포 HepG2, Hep3B 그리고 U-2Os (결과 미제시)로 A549 세포와 같은 환경과 조건으로 포도당이 결핍된 배양액으로 일정 시간 배양시켰을 때 반응을 살펴보았다(Fig. 8). HT-29는 포도당 결핍 시 A549에서와 유사하게 괴사가 나타났지만 항산화 효소의 활성을 조사한 결과, Cu/ZnSOD의 활성에는 변화가 없었고 catalase 활성은 감소되었다(Fig. 8A). HepG2, U-2Os (결과 미제시)에서는 A549와 마찬가지로 포도당 결핍이 Cu/ZnSOD 활성을 저하시켰고, NAC/포도당 결핍 처리 군에서는 약하게, catalase/포도당 결핍 처리 군은 강하게 Cu/ZnSOD 수준을 회복시켰다(Fig. 8B). 반면 Hep3B는 포도당 결핍 처리 시간이 경과하여도 사멸 정도가 현저히 낮고 60시간이 지나도 대부분 생존하였으나, 이때의 Cu/ZnSOD의 활성 역시 감소하지 않고 일정하게 유지되었고, 포도당 결핍에 매우 둔감하게 반응하였다(Fig. 8C).

이들의 결과로 미루어 볼 때 세포마다 포도당 결핍이 유도하는 산화적 스트레스에 반응하는 방식이나 민감도가 다양하며, 이는 세포가 갖는 고유한 특이적 미세 환경, 즉 항산화 효소의 발현 양, 조절 신호계 등이 다르게 작동되기 때문으로 생각된다.

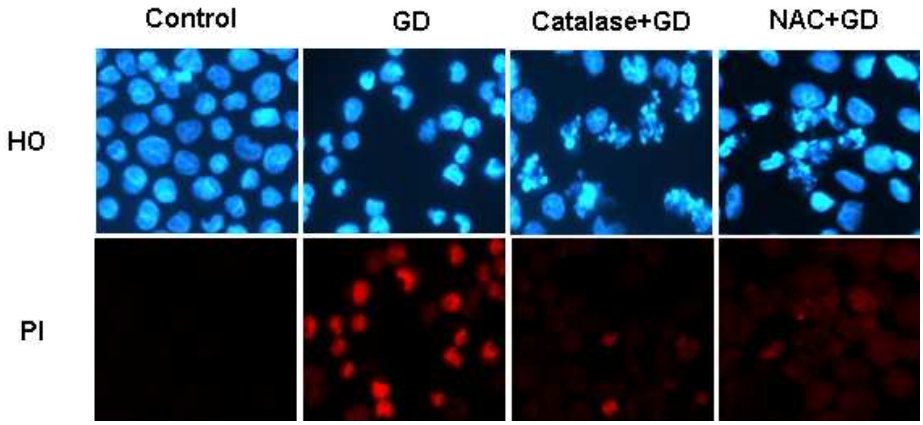


Fig. 1. Antioxidants switches glucose depletion (GD)-induced necrosis to apoptosis in A549 cells.
HO, Hoechst 33342; PI, Propidium iodide

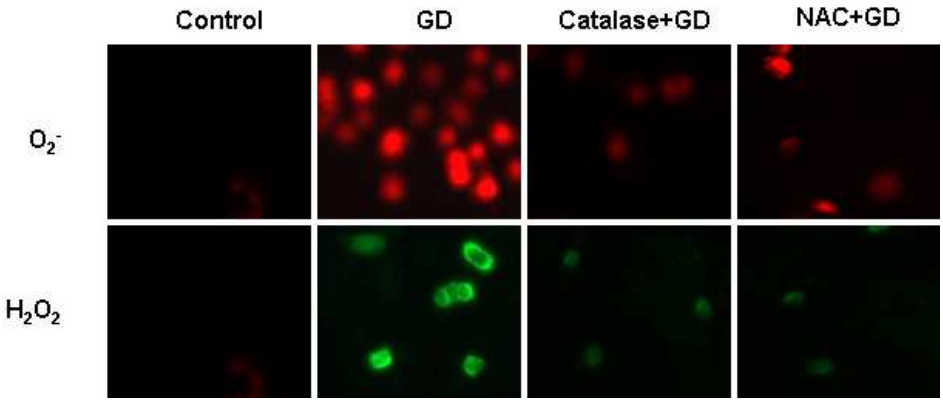


Fig. 2. Glucose depletion (GD)-induced ROS production is suppressed by catalase and N-acetyl-cysteine (NAC) in A549 cells.

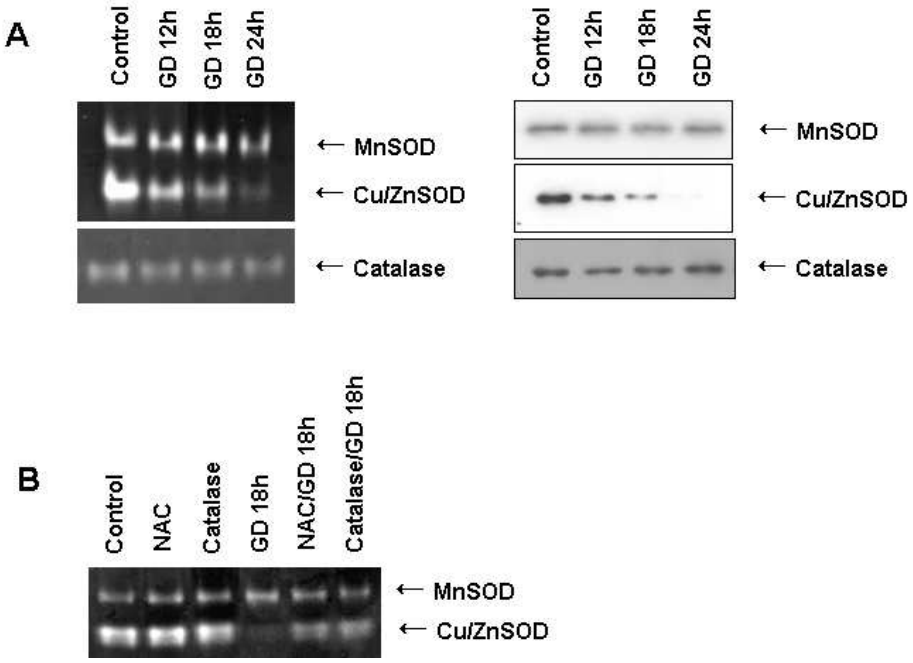


Fig. 3. Glucose depletion (GD) decreases activity and amount of Cu/ZnSOD, which are restored in the presence of antioxidants.
NAC, N-acetyl-cysteine

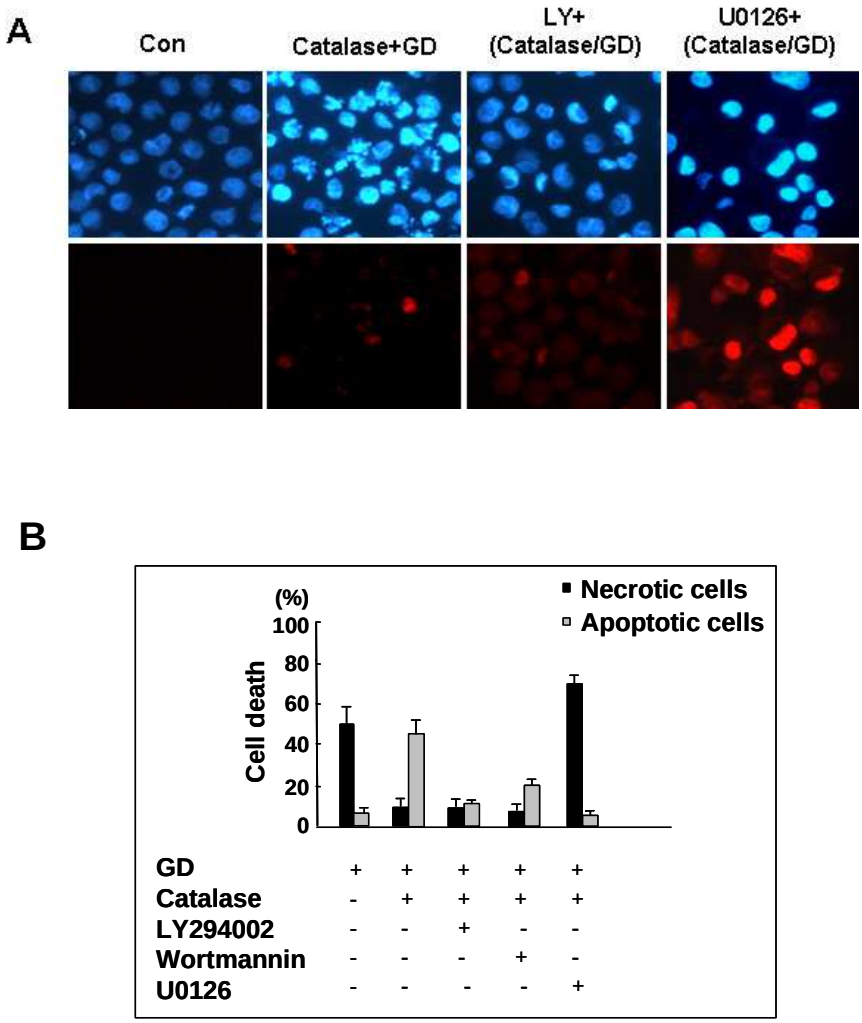


Fig. 4. The PI3K inhibition decreases catalase/glucose depletion (GD)-induced apoptosis in A549 cells.

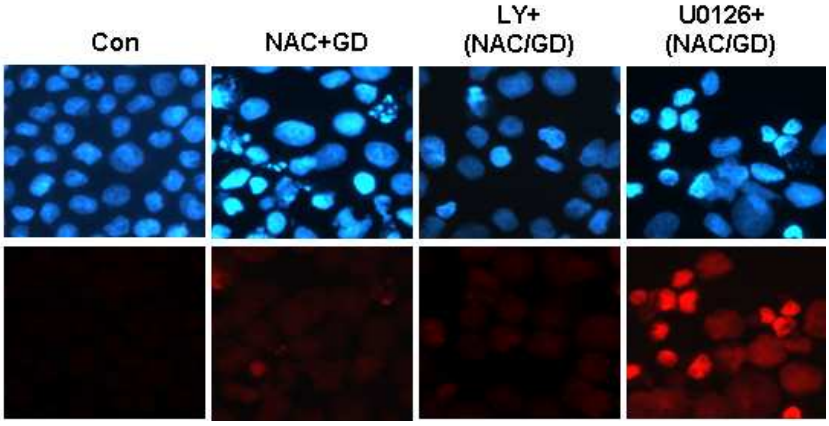


Fig. 5. The PI3K inhibition decreases N-acetyl-cysteine (NAC)/glucose depletion (GD)-induced apoptosis in A549 cells.

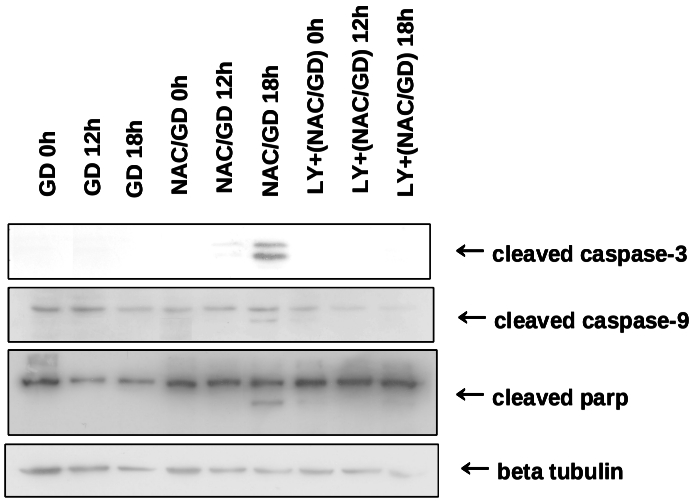
Table. 1. Effects of LY294002 treatment on the antioxidants/glucose depletion (GD)-induced cell death and cell cycle distribution

(%)

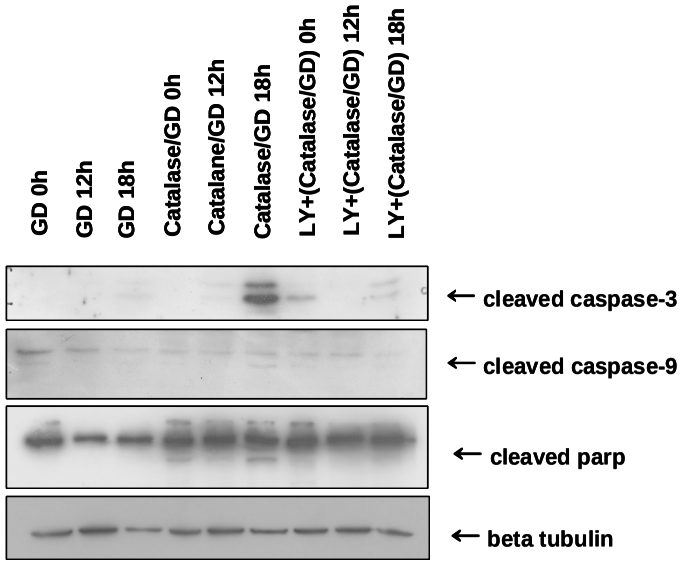
	Control	GD	NAC/GD	Catalase/GD
Dead	3.04	86.64	29.69	59.60
G_0/G_1	42.73	9.45	36.57	21.98
S	6.46	1.61	5.14	2.55
G_2/M	23.36	1.81	16.02	8.56
	LY+Control	LY+GD	LY+NAC/GD	LY+Catalase/GD
Dead	5.61	95.96	12.61	34.20
G_0/G_1	49.86	3.15	43.51	44.23
S	2.27	0.58	5.26	4.05
G_2/M	19.98	0.25	22.20	10.23

NAC, N-acetyl-cysteine

A


GD 0h
GD 12h
GD 18h
NAC/GD 0h
NAC/GD 12h
NAC/GD 18h
LY+(NAC/GD) 0h
LY+(NAC/GD) 12h
LY+(NAC/GD) 18h
cleaved caspase-3
cleaved caspase-9
cleaved parp
beta tubulin

B


GD 0h
GD 12h
GD 18h
Catalase/GD 0h
Catalane/GD 12h
Catalase/GD 18h
LY+(Catalase/GD) 0h
LY+(Catalase/GD) 12h
LY+(Catalase/GD) 18h
cleaved caspase-3
cleaved caspase-9
cleaved parp
beta tubulin

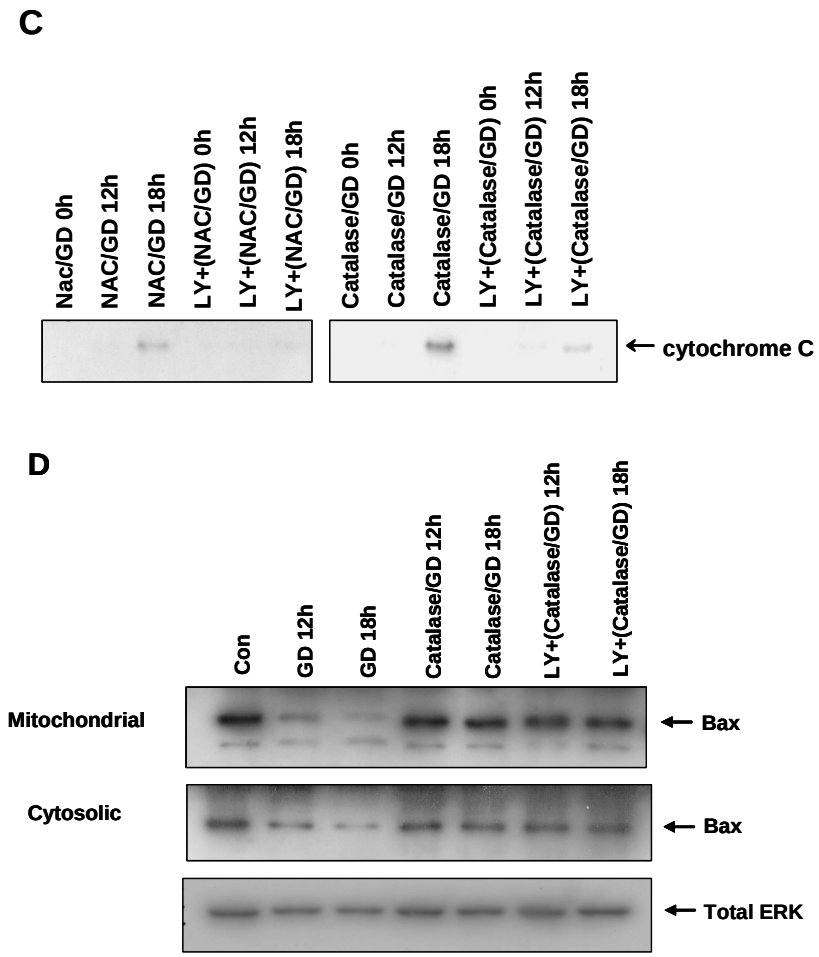
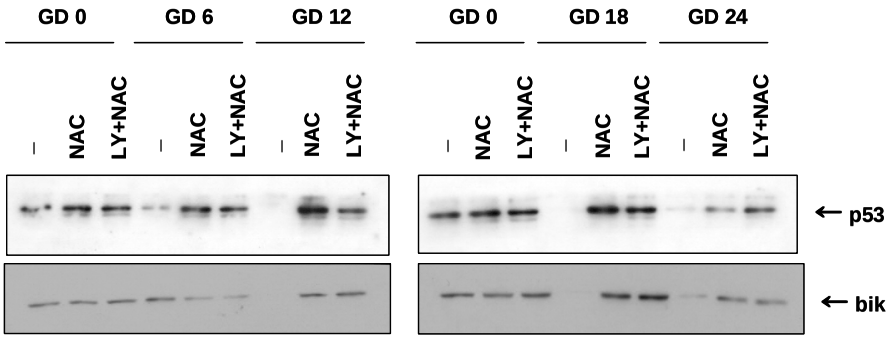
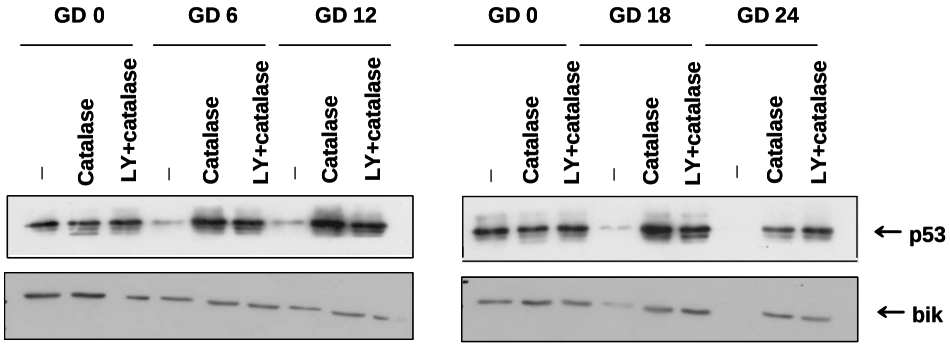


Fig. 6. PI3K inhibitor, LY294002 inhibits antioxidants/glucose depletion (GD)-induced caspase-3, caspase-9 cleavage and PARP cleavage. NAC, N-acetyl-cysteine; LY, LY294002

A


GD 0
GD 6
GD 12
GD 0
GD 18
GD 24
–
NAC
LY+NAC
p53
bik

B


GD 0
GD 6
GD 12
GD 0
GD 18
GD 24
–
Catalase
LY+catalase
p53
bik

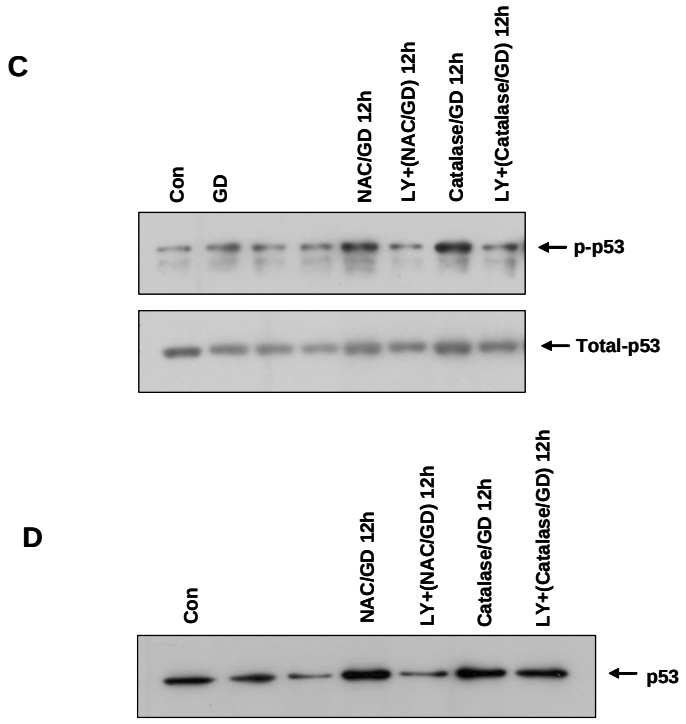
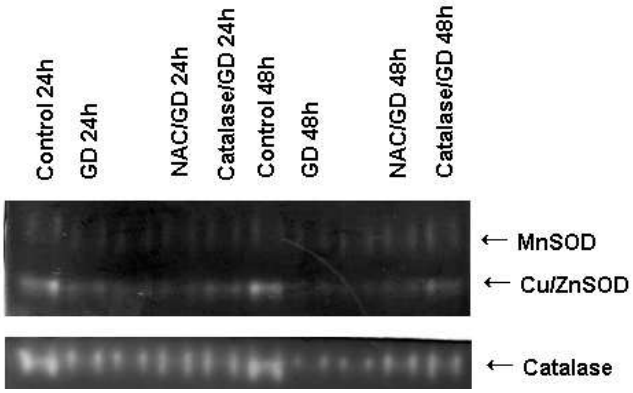
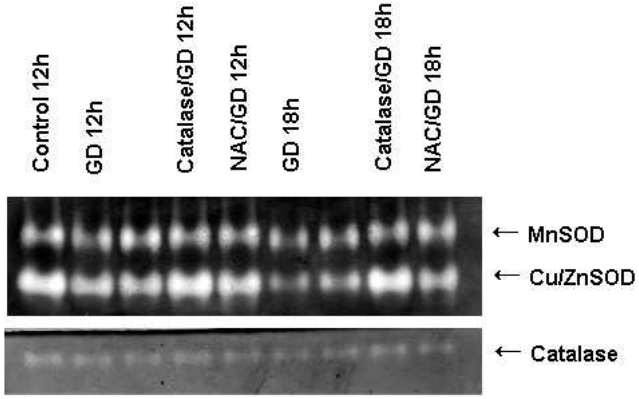


Fig. 7. The PI3K inhibitor, LY294002 reduces the protein level, phosphorylation and nuclear translocation of p53 protein in A549 cells.
GD, glucose depletion; NAC, N-acetyl-cysteine; LY, LY294002

A


Control 24h
GD 24h
NAC/GD 24h
Catalase/GD 24h
Control 48h
GD 48h
NAC/GD 48h
Catalase/GD 48h
← MnSOD
← Cu/ZnSOD
← Catalase

B


Control 12h
GD 12h
Catalase/GD 12h
NAC/GD 12h
GD 18h
Catalase/GD 18h
NAC/GD 18h
← MnSOD
← Cu/ZnSOD
← Catalase

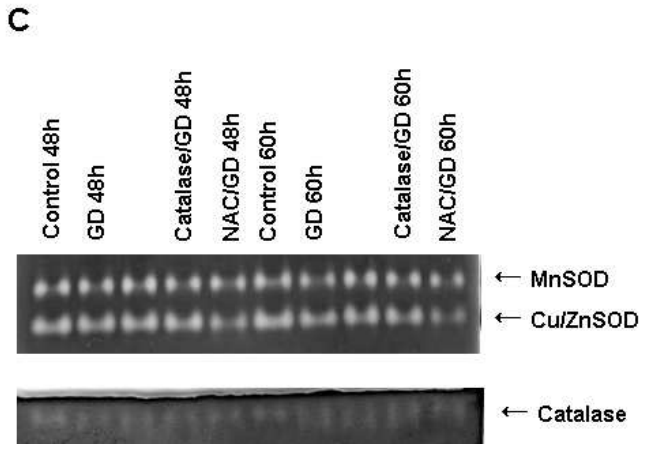


Fig. 8. Changes in the activities of Cu/ZnSOD, MnSOD and catalase in a variety of cancer cells.

Pannel A. HT-29 cells.

Pannel B. HepG2 cells.

Pannel C. Hep3B cells.

GD, glucose depletion; NAC, N-acetyl-cysteine

4. 고 찰

종양 세포 내의 환경은 정상적인 세포가 가진 환경보다 매우 열악하다. 종양 조직이 커지게 되면 내부에 있는 종양의 환경은 더욱 악화된다. 산소, 에너지원인 포도당 그리고 각종 성장인자들의 결핍으로 이런 환경은 종양 세포 내 신호 전달을 변화시켜 세포의 사멸과 성장을 조절하게 된다. 그러므로 종양세포의 사멸을 유도하는데 산소, 포도당 및 성장인자들의 결핍 조절이 유용하게 쓰일 수 있다[2].

포도당은 세포의 생존과 세포 사멸에 있어 유동적인 중개자 역할을 한다. 세포의 주 에너지원인 포도당 결핍이 유도하는 산화적인 스트레스는 세포독성을 나타내며, 신호 전달을 조절하여 종양세포의 사멸과 성장, 생존에 영향을 미친다. 세포는 에너지원인 포도당이 결핍되면 대체 에너지원인 지방을 분해하거나, 저장되어 있는 당원을 분해한다. 이는 세포 내 에너지를 생성하고 호흡사슬에 주 역할을 하는 미토콘드리아에 과부하를 유발하여 pro-oxidant 생성이 증가되는 결과를 가져오는데, 대부분의 pro-oxidant는 세포 내에 있는 항산화 효소들에 의해 처리되지만, 감당할 수 있는 정도를 넘는 과량의 pro-oxidant가 생성되면 세포 내 여러 단백질들의 기능에 손상을 주어 결국 세포 사멸을 유도하게 된다[4,6].

여러 세포주를 포도당 결핍의 환경에 노출시키면 다양한 적응력과 사멸 패턴을 나타내는데, A549 세포에서는 포도당이 결핍되면 전형적인 괴사의 형태로 빠르게 사멸하였다. 자멸사의 많은 단계에서 ATP를 요구하기 때문에 심각한 ATP의 결핍은 괴사로 진행하도록 하는 유리한 환경을 제공하는 것으로 보인다[2-6].

본 연구팀은 이전 연구에서, 항산화제인 catalase와 NAC을 각각 포도당 결핍된 환경에 첨가하여 세포 내에서 발생되는 활성산소의 수준을 낮추어 포도당 결핍에 의한 괴사가 자멸사로 전환됨을 보고하였다(In press, *J. Cell Physiol*).

이는 항산화제가 세포 내에서 발생하는 과도한 산화적 스트레스를 줄여줌으로써 세포사멸의 패턴을 전환시킬 수 있으며[21], 이 연구 결과는 포도당 결핍 시 유도되는 세포사멸은 세포 내의 활성산소의 농도가 세포 사멸 경로를 선택 하는데 결정적인 역할을 하는 주요 인자임을 제시하는 결과이다.

본 연구에서는 포도당 결핍이 유도하는 이러한 스트레스를 항산화제를 첨가함으로써 활성산소를 제거 및 억제하여 자멸사로 전환될 때 자멸사 신호의 경로를 조사하였다.

포도당 결핍 시 세포 내 항산화 효소의 활성 변화를 조사한 결과 catalase의 활성과 발현은 변함이 없었으나 Cu/ZnSOD의 활성이 현저히 떨어져 있었으며, Cu/ZnSOD 단백질 양 저하로 기인된 결과였다. 이때 항산화제인 catalase와 NAC 존재 하에서 포도당 결핍 시 Cu/ZnSOD의 단백질 양과 활성이 회복되었는데, 이는 세포사멸의 경로 선택에 있어 중요한 역할을 하는 세포 내 활성산소의 발생이 Cu/ZnSOD에 의해 조절되고 있음을 알 수 있는 결과이다.

Catalase/포도당 결핍 처리와 NAC/포도당 결핍 처리에 의해 유도되는 자멸사가 PI3K 억제제인 LY294002에 의해 현저하게 억제됨을 자멸소체 형성, caspase-3와 caspase-9 분열, PARP 분열, cytochrome C 방출을 통하여 확인하였다. 미토콘드리아 외막과 내막 사이에 존재하는 cytochrome C는 세포 내 신호를 받아 세포질로 방출되는데 이는 caspase의 효소 전구체에 결합하여 다른 효과자의 활성화를 촉진한다.

결국엔 이렇게 활성화 된 효과자 caspase가 세포 내 단백질들을 대량으로 분해하기 때문에 세포사멸의 중요한 원인이 된다. 하지만 PI3K 경로를 차단하게 되면 이러한 경로가 차단됨으로써 세포의 자멸사를 억제하고 있는 것으로 보인다. 미토콘드리아를 경유하는 세포사멸 조절에는 bcl family protein이 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어 이를 탐색하고자 시도하였으나, bax, Bik, bid 등 pro-apoptotic한 bcl family proteins의 특별한 변화를 발견하지 못하였으며, 본 연구 조건에서는 이외의 다른 인자를 통해 cytochrome C가 방출될 것으로 생각된다[31]. PI3K 억제제인 LY294002는 다른 억제제들에 비해 ATP binding pocket에 매우 경쟁적인 억제제로 효과가 뛰어나다[32]. PI3K의 특이적인 다른 억제제인 wortmannin에서도 저농도 활성산소 존재 시 포도당이 결핍된 환경에서 전환된 세포 자멸사를 억제하는 유사한 효과가 보였다.

또한 p53 단백질은 종양 억제자로 암에서 중요한 기능을 하는 단백질이다. 대부분 암에서는 정상적인 p53 단백질의 기능을 제대로 수행하지 못한다. 동물의 knockout 모델에서 p53 단백질이 없을 때 현저하게 암의 발생이 증가됨을 볼 수 있다[33]. DNA의 손상을 유도하는 약물에 의해 활성화 된 p53 단백질은 세포사를 통해 암세포를 제거한다[32,33]. PI3K에 의한 자멸사가 p53 단백질을 경유하여 조절되는지 Fig. 7을 통해 알아보았다. 정상적인 세포, 즉 스트레스가 없는 세포에서 p53 단백질의 수준은 ubiquitin-proteasome 통로에 의해 빠르게 붕괴되기 때문에 대부분 낮은 수준을 유지한다. 하지만 신호 전달에 의해 핵 안으로 이동이 일어나면서 유전자의 전사가 활발히 일어나게 되어 p53 단백질의 양이 증가하게 된다[33].

본 연구에서는 세포질에서 p53의 양적인 변화와 p53 단백질의 인산화 수준의 변화, p53 단백질의 핵 안으로의 이동을 동시에 살펴보았다. 이때 LY294002가 처리되면 자멸사를 감소시킴과 동시에 p53 단백질의 양, 인산화, 그리고 핵으로의 이동을 함께 감소시켰는데, 이는 PI3K의 자멸사 촉진 기능이 p53 단백질에 의존적으로 작용한다는 것을 제시한다[34,35].

마지막으로 A549 세포에서처럼 다른 세포에서는 포도당이 결핍된 환경이 어떻게 영향을 미치는지 폐암, 간암, 대장암 세포주로 실험하였다. 그런데 대부분의 다른 세포 주에서는 포도당 결핍에서 나타나는 괴사가 항산화제 존재 하에서도 자멸사로 전환되지 못하였고 단순히 괴사를 지연시키거나 그 정도를 저하시키는데 그쳤으며, 간암세포주인 Hep3B에서는 포도당 결핍에 대해서 매우 둔감하게 반응하였다. 이러한 결과는 세포가 발현하고 있는 고유 신호체계에 따라 포도당 결핍이라는 환경에 반응하는 결과가 다를 수 있다는 것을 암시한다. 또한 괴사를 자멸사로 전환하기 위해서는 저농도 활성산소 환경과 함께 또 다른 조건이 필요하며, A549 세포의 미세 환경에서는 그러한 조건이 충족되지만, 다른 세포들에서는 그 조건이 결핍되어 있어 자멸사로 전환이 되지 못하는 것으로 보인다. 저농도 활성산소 환경에서 포도당 결핍에 의한 자멸사 유도에 관여하는 PI3K의 활성화도 자멸사로의 전환을 유발하는 하나의 후보 가능성이 있으나 이를 확인하기 위해서는 앞으로 더욱 심도 있는 연구가 진행되어야 할 것이다.

5. 결 론

폐암 세포주인 p53 wild type의 A549 세포에서는 포도당 결핍에 의해 다른 세포에서와 같이 괴사를 보였으나, 항산화제인 catalase와 NAC를 같이 처리하자 자멸사로 전환됨을 알 수 있었다. 항산화제가 포도당 결핍으로 생긴 과도한 활성산소를 제거함으로써 세포독성으로부터 세포를 보호하고, 손상이 심한 세포에서는 오히려 자멸사를 유도한다. 그리고 포도당과 같은 성장인자와 관련있는 PI3K 경로를 억제하는 LY294002를 사용하면 이 같은 자멸사가 현저하게 줄어든다. 자멸사가 나타났을 때 분명하게 인지할 수 있는 caspase-9 및 -3, 그리고 PARP의 분열과 미토콘드리아에서 세포질로의 cytochrome C의 방출을 살펴보면 항산화제와 포도당이 결핍된 배양액을 처리했을 때보다 LY294002를 함께 처리하면 이들의 활성이 감소한다. 또한 PI3K 억제제인 LY294002를 처리하면 p53 단백질을 경유하는 자멸사를 감소시킨다.

일반적으로 생존과 증식에 관련된 것으로 알려진 PI3K가 포도당이 결핍된 환경에서는 자멸사와 연관이 있다는 것을 이 연구에서 알 수 있다. 하지만 포도당이 결핍된 환경에서 모든 세포가 동일한 결과를 가져오는 것은 아니고 세포의 특성상 그리고 항산화제를 효과적으로 사용하는 능력에 따라 각기 다른 결과를 가져온다.

6. 감사의 글

2004년 11월.. 처음 이 곳을 방문하던 때가 엊그제 같은데 벌써 이곳에서의 생활이 2년이 지났습니다. 보다 더 열심히, 노력하고, 공부한다는 욕심으로 석사 생활을 시작했었는데 지금 돌아보면 많은 아쉬움이 남습니다. 석사과정을 밟으면서 아무 걱정 없이 공부할 수 있도록 모든 면에서 힘써 주시고, 이끌어 주신 임성철 교수님께 정말 감사하다는 말이 부족할 정도로 인사드립니다. 그리고 늦게나마 저를 맡아 주시고, 이 논문이 나올 수 있게 도와주시며, 연구자의 열성적인 면모를 보여주신 한송이 박사님께 고개 숙여 감사드립니다. 또 내 성세포연구센터의 최철희 교수님, 신성희 교수님, 김태형 교수님께도 감사드립니다. 2년 동안 같은 그룹 안에서 동고동락을 함께 한 동료인 Quan, 언제나 든든한 언니처럼 챙겨주시고, 친구처럼 함께 있어 주신 정귀애 선생님, 처음 센터에 왔을 때 낯설음을 환한 웃음으로 반겨주신 라영언니와 미화언니, 겉으론 무뚝뚝하지만 속마음은 아이처럼 순수하신 이태범 선생님, 당당하고 카리스마 있는 현이언니, 뭔가 필요하다 싶으면 뒤에서 몰래 도와주신 맘 따뜻한 주미언니, 뒷바라지로 바쁘셨던 행정실에 준희 선생님, 이것저것 많이 가르쳐 주셨던 준휘오빠, 늘 밝은 모습으로 먼저 인사해주시는 지윤언니, 그리고 석사과정을 시작하면서 많은 것을 가르쳐 주셨던 오선희 박사님, 그 외 저를 도와주시고 힘을 실어주신 분들에게 모두 감사드립니다.

남들이 말하는 편하고 좋은 자리를 뒤로하고, 대학원을 선택했을 때 다그치지 않으시고 언제나 뒤에서 든든한 후원자가 되어 주신 부모님께 감사드리고, 마지막으로 저 먼 곳에서 항상 돌봐주시는 외할아버지께 이 논문을 바칩니다.

7. 참고문헌

1. Liu Y., Song X.D., Liu W., Zhang TY., Zuo JI., Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line, *J. Cell Mol. Med.,* 7: 49-56, 2003

2. Moley K.H., Mueckler M.M., Glucose transport and apoptosis, *Apoptosis*, 5: 99-105, 2000

3. Jelluma N., Yang X., Stokoe D., Evan G.I., Dansen T.B., Haas-Kogan D.A., Glucose withdrawal induces oxidative stress followed by apoptosis in glioblastoma cells but not in normal human astrocytes., *Mol. Cancer Res.*, 4: 319-30, 2006

4. Spitz D.R., Sim J.E., Ridnour L.A., Galoforo S.S., Lee Y.J., Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism?, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 899: 349-362, 2000

5. Blackburn R.V., Spitz D.R., Liu X., Galoforo S.S., Sim J.E., Ridnour L.A., Chen J.C., Davis B.H., Corry P.M., Lee Y.J., Metabolic oxidative stress activates signal transduction and gene expression during glucose deprivation in human tumor cells, *Free Radic. Biol. Med.,* 26: 419-430, 1999

6. Almeida A., Delgado M., Bolanos J.P., Medina J.M., Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture, *J. Neurochem.,* 81: 207-217, 2002

7. Davies K.J., Oxidative stress: the paradox of aerobic life, *Biochem. Soc. Symp.,* 61: 1-31, 1995

8. Fridovich I.. Superoxide radical and superoxide dismutases, *Annu. Rev. Biochem.*, 64: 97-112, 1995

9. Beyer W., Imlay J., Fridovich I., Superoxide dismutases, *Prog. Nucleic Acids Res.*, 40: 221-253, 1991

10. Chance B., Sies H., Boveris A., Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rev.*, 59: 527-605, 1979

11. Commoner B., Townsend J., Pake G.E., Free radicals in biological materials, *Nature*, 174: 689-691, 1954

12. Ames B.N., Gold L.S., Willett W.C., The causes and prevention of cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 5258-5265, 1995

13. Morel Y., Barouki R., Repression of gene expression by oxidative stress, *Biochem. J.*, 342: 481-496, 1999

14. Cantley L.C., Auger K.R., Carpenter C., Duckworth B., Graziani A., Kapeller R., Oncogenes and signal transduction, *Cell*, 64: 281-302, 1991

15. Carpenter C.L., Cantley L.C., Phosphoinositide kinases, *Biochemistry*, 29: 11147-56, 1990

16. Paez J., Sellers W.R., PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling, *Cancer Treat. Res.*, 115: 145-67, 2003

17. Vivanco I., Sawyers C.L., The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer, *Nat. Rev. Cancer,* 2: 489-501, 2002

18. Thyrell L., Hjortsberg L., Arulampalam V., Panaretakis T., Uhles S., Dagnell M., Zhivotovsky B., Leibiger I., Grande´r D., Pokrovskaja K., Interferon α-induced apoptosis in tumor cells is mediated through the phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway, *J. Biol. Chem.*, 279: 24152-24162, 2004

19. N. Ivanov V., Krasilnikov M., Ronai Z., Regulation of Fas expression by STAT3 and c-Jun is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling, *J. Biol. Chem.*, 277: 4932-4944, 2002

20. Holmstrom T.H., Eriksson J.E., Phosphorylation-Based signaling in Fas receptor-mediated apoptosis, *Crit. Rev. Immunol.,* 20: 121-52, 2000

21. Nicotera P., Melino G., Regulation of the apoptosis-necrosis switch, *Oncogene*, 23: 2757-2765, 2004

22. Saito T., Kijima H., Kiuchi Y., Isobe Y., Fukushima K., beta-amyloid induces caspase-dependent early neurotoxic change in PC12 cells: correlation with H_2O_2 neurotoxicity, *Neurosci. Lett.*, 305: 61-64, 2001

23. Wang H., Joseph J.A., Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radic. Biol. Med.*, 27: 612-616, 1999

24. Beauchamp C., Fridovich I., Superoxide dismutase. Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels, *Anal. Biochem.*, 44: 276-287, 1971

25. Clare D.A., Duong M.N., Darr D., Archibald F., Fridovich I., Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Anal. Biochem.*, 140: 532-537, 1984

26. Ormerod M.G., Flow Cytometry A Practical Approach, Second Ed. Oxford University Press, Inc., 1992

27. Harlow E., Lane D., Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, *Laboratory Press*, 469, 1988

28. Panet H., Barzilai A., Daily D., Melamed E., Offen D.. Activation of nuclear transcription factor kappa B (NF-kappaB) is essential for dopamine-induced apoptosis in PC12 cells, *J. Neurochem.*, 77: 391-8, 2001

29. Koubi D., Jiang H., Zhang L., Tang W., Kuo J., Rodriguez A.I., Hunter T.J., Seidman M.D., Corcoran G.B., Levine R.A., Role of Bcl-2 family of proteins in mediating apoptotic death of PC12 cells exposed to oxygen and glucose deprivation, *Neurochem. Int.*, 46: 73-81, 2005

30. Michael D., Oren M., The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system, *Cancer Biol.,* 13: 49-58, 2003

31. Cho S.G., Choi E.J., Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases, *J. Biochem. Mol. Biol.*, 35: 24-27, 2002

32. Akashia T., Nishimuraa Y., Wakatabeb R., Shiwab M., Yamori T., Proteomics-based identification of biomarkers for predicting sensitivity to a PI3-kinase inhibitor in cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 352: 514-521, 2006

33. Vousden K.H., Lu X., Live or let die: the cell's response to p53, *Nat. Rev. Cancer,* 2: 594-604, 2002

34. Bar J., Lukaschuk N., Zalcenstein A., Wilder S., Seger R. and Oren M., The PI3K inhibitor LY294002 prevents p53 induction by DNA damage and attenuates chemotherapy-induced apoptosis, *Cell Death and Differentiation*, 12: 1578-1587, 2005

35. Ren S., Gao C., Zhang L., Koike K., Tsuchida N., PI3K inhibitors changed the p53-induced response of Saos-2 cells from growth arrest to apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308: 120-125, 2003