



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2015 년 2 월
석사학위 논문

TLR 매개성 Sestrin2 유도발현 조절기전 연구

조선대학교 대학원

약 학 과

김 미 광

TLR 매개성 Sestrin2 유도발현 조절기전 연구

The regulation of Toll-like receptor mediated Sestrin2 induction

2015 년 02 월 25 일

조선대학교 대학원

약 학 과

김 미 광

TLR 매개성 Sestrin2 유도발현 조절기전 연구

지도교수 기 성 환

이 논문을 약학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2014 년 10 월

조선대학교 대학원

약 학 과

김 미 광

김미광의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 최홍석 인

위 원 조선대학교 교수 신상미 인

위 원 조선대학교 교수 기성환 인

2014 년 11 월

조선대학교 대학원

Content

Contents -----	i
List of Figures -----	iv
List of Abbreviations -----	v
Abstract -----	vii
I. 서론 -----	1
II. 재료 및 방법 -----	4
1. 시약 및 재료-----	4
2. 실험 세포주 배양-----	4
3. Mice 골수에서 분리한 마크로파지 배양 및 분화-----	4
4. 아데노바이러스 준비-----	5
5. 동물실험-----	5
6. Gal/LPS 유도 감염-----	6
7. TUNEL 염색-----	6
8. Glutathione 확인-----	6

9. 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응법 및 RNA 분리-----	7
10. 플라스미드 제조 및 리포터 유전자 분석-----	7
11. 면역화학적 분석법-----	7
12. 면역침강법-----	8
13. ROS 생성 및 측정-----	8
14. 통계처리-----	9
Ⅲ. 실험결과-----	10
1. RAW264.7 세포에서 LPS에 의한 Sestrin2 발현 유도-----	10
2. LPS에 의한 Sesn2 유도의 산화환원 조절-----	10
3. LPS에 의한 Sesn2 유도에서 Nrf2 활성화 역할-----	11
4. LPS에 의한 Sestrin2 발현에서 AP-1 활성화 역할-----	11
5. LPS에 매개된 Sesn2 유도에서 p38 및 PI3K 역할-----	12
6. polyubiquitination에 의한 Sestrin2의 번역 후 조절-----	13
7. <i>in vivo</i> 에서 LPS에 의한 Sesn2 유도와 세포보호역할-----	14
Ⅳ. 결론 및 고찰-----	15
Ⅴ. 참고문헌-----	32

국문초록-----37

List of Figures

- Figure 1.** The effect of lipopolysaccharide (LPS) on the expression of Sestrin2 (Sesn2) in macrophage
- Figure 2.** Redox regulation of Sesn2 induction by LPS
- Figure 3.** The role of Nrf2-ARE in the induction of Sesn2
- Figure 4.** AP-1-dependent Sesn2 gene induction by LPS
- Figure 5.** Association of p38 MAPK and PI3K with LPS-induced Sesn2 expression
- Figure 6.** Role of ubiquitin-proteasome system on Sesn2 expression
- Figure 7.** Induction of Sesn2 by Gal/LPS in mice

List of Abbreviations

ActD	actinomycin-D
AP-1	activating protein-1
ARE	antioxidant response element
BHA	butylated hydroxyanisole
CHX	cycloheximide
CQ	chloroquine
DPI	diphenyleneiodonium
Gal	d-galactosamine
LPS	lipopolysaccharide
LY	LY 294002
MG132	Z-Leu-Leu-Leu-al
NAC	N-acetyl-l-cysteine
NF-κB	nuclear factor-kappa B
Nrf2	NF-E2-related factor 2
PGN	peptidoglycan
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PolyI:C	polyinosinic-polycytidylic acid
ROT	rottlerin
SB1	SB 203580
SB2	SB 216763

Sesn2 sestrin2
TLR Toll-like receptor
WO wortmannin

ABSTRACT

The regulation of Toll-like receptor mediated Sestrin2 induction

Mi Gwang Kim

Adviser : Prof. Sung Hwan Ki, Ph.D.

College of Pharmacy,

Graduate School of Chosun University

The Sestrin2 (Sesn2) is an evolutionary conserved enzyme that scavenges reactive oxygen species and regulates autophagy through the AMPK-mTOR pathway. The present study was aimed at determining whether Toll-like receptor (TLR) signaling regulates Sesn2 expression and identifying the underlying molecular mechanism. Lipopolysaccharide (LPS), a representative TLR4 ligand, significantly increased the levels of Sesn2 protein in macrophages. LPS also increased Sesn2 mRNA levels and luciferase reporter activity; however the mRNA levels of Sesn1 were not affected by LPS. Moreover, treatment of macrophages with other TLR ligands (e.g., polyI:C or peptidoglycan) also induced Sesn2 expression. We found that LPS-mediated Sesn2 induction was transcriptionally regulated by AP-1 and Nrf2, and that overexpression of c-Jun or Nrf2 increased Sesn2 protein levels and Sesn2 promoter-driven luciferase reporter activity. Moreover, deletion of the antioxidant response element (ARE) in the *Sesn2* promoter or Nrf2 knockout abolished LPS-mediated induction of Sesn2. LPS induced Sesn2 gene expression through p38 and PI3K activation. Surprisingly, treatment with

the proteasome inhibitor MG132, but not the lysosomal inhibitor chloroquine, caused Sesn2 to accumulate in the cells. In the presence of MG132, we observed that Sesn2 was ubiquitinated. However, LPS treatment attenuated MG132-induced Sesn2 ubiquitination, which resulted in Sesn2 accumulation. Mice treated with D-galactosamine (Gal)/LPS exhibited enhanced Sesn2 expression in the liver. Moreover, infection with a recombinant adenovirus encoding Sens2 markedly reduced the number of Gal/LPS-induced TUNEL-positive cells. Our results suggest that TLR-mediated Sesn2 induction is dependent on AP-1, Nrf2, and the ubiquitin-proteasome system and might protect cells against endotoxin stress.

I. 서론

대식세포 내 활성산소(ROS)는 세균감염 등에 의한 선천적 면역반응에 매우 중요하며 대식세포에서 ROS의 과다 발생 및 세포 내 항산화 체계의 감소는 다양한 염증성질환의 발병과 관련되어 있다 [1,2]. 특히 전문적인 식세포의 활성화는 주로 세포 내 NADPH oxidase (NOX) 활성화에 의해 활성산소를 유도함으로써 매개된다 [3,4]. 예를 들어, 간에 존재하는 대식세포인 쿠퍼세포는 외부자극에 반응하여 과량의 ROS를 생성함으로써 T-세포 매개 감염, 바이러스성 감염, 알코올성 간질환을 포함한 간 질환의 발생 및 진행을 촉진한다 [5].

대식세포는 lipopolysaccharide (LPS, a TLR4 ligand), peptidoglycan (PGN, a TLR2 ligand), 또는 polyinosinic-polycytidylic acid (PolyI:C, a TLR3 ligand)와 같은 병원균 관련 분자 패턴을 인식하도록 세포 표면에 톨 유사 수용체(TLR)를 발현한다 [6]. 여러 연구에서 TLR 신호는 선천적 면역 반응의 필수인자로 증명되었다. TLR리간드(TLRs)의 TLR의 자극은 초기 신호 전달계를 조절하는 AP-1, NF- κ B와 같은 핵심전사인자를 활성화 시키며 염증과 관련된 다양한 유전자의 발현을 조절한다 [6,7]. 또한, 산화적 스트레스와 TLR 신호간의 관계는 잘 확립되어 있다 [8]. 특히 TLR 활성화는 ROS 생성유도 및 TLR와 NOX간의 직접적인 상호작용을 통해 NF- κ B를 활성화 시킴이 증명되었다 [9].

또한 TLRs는 antioxidant response elements (AREs) 를 통해 친전자체 및 산화적 스트레스에 대응하여 항산화 유전자 발현을 조절하는 중요한 전사인자인 NF-E2-related factor 2 (Nrf2)의 활성화 및 핵 내 이동을 증가시킨다 [10,11]. 자극이 없는 상태에서 Nrf2는 Cullin3-Keap1 ligase에 의해 ubiquitination 되어 세포질에서 제거 및 분해된다. 활성산소 신호 및 친전자체 물질은 Keap1으로부터 Nrf2를 유리시키고

안정화된 Nrf2는 핵 안으로 이동 및 전사활성화 되어 타겟 유전자 발현을 증가시켜 산화손상에 대응하여 세포를 보호한다 [12]. LPS처치에 의해 대식세포에서 HO-1의 발현이 증가되고 이는 Keap1-Nrf2 의존적임이 규명되었다 [13]. 또한 Nrf2 활성화는 NF- κ B의 신호를 직접적으로 억제함으로 세포사멸과 염증반응을 억제시킴이 보고되었다 [14]. 그리고 Nrf2-ARE 시스템은 carrageenan에 의해 유도된 마우스 염증 모델에서 염증세포 활성을 조절함으로 급성 염증반응을 조절한다 [15].

최근 새로운 Nrf2 타겟 유전자로써 Sestrin2(Sesn2)를 규명하였으며 Sesn2의 항산화 역할을 증명하였다 [16]. Sesn2은 항산화 방어에 중요한 역할을 하며 과산화 및 촉매 비활성 peroxiredoxin을 재생하여 세포 내 ROS를 감소시킨다 [17]. 특히 과산화수소, 저산소증, 허혈 및 바이러스에 대응하여 Sesn2의 발현이 유도되어 외부자극으로부터 세포를 보호한다 [18,19,20]. Sesn2의 발현은 Nrf2뿐 아니라 HIF-1 α 및 p53을 포함한 스트레스 반응을 조절하는 여러 전사인자에 의해 조절된다. 최근에 NO donor가 Sesn2 발현을 증가시킴이 보고되었으나[18] 염증자극에 대한 Sesn2 유전자 발현 조절 및 분자적 기전에 대해 연구가 전무하며 특히 Sesn2의 발현에 대한 TLR 신호의 역할이 전혀 알려진 바가 없다.

대식세포에서 TLR신호에 의한 Sesn2 유전자발현 조절 및 근본적인 분자 기전을 규명하고자 하였다. 마우스 골수로부터 얻은 대식세포와 Raw264.7 세포에서 TLRs에 의한 Sesn2 발현이 AP-1 및 Nrf2의 활성화 의존적임을 증명하였다. LPS에 의한 Sesn2의 유도에 있어 p38 MAPK 및 PI3K 활성화가 요구되었다. 더욱이, Sesn2의 유도에 있어서 유비퀴틴화를 최초로 증명하였으며 LPS에 의해 매개된 Sesn2의 유도가 proteasomal 분해 억제와 관련되어있음을 규명하였다. 뿐만 아니라, D-galactosamine (Gal)/LPS를 투여한 마우스 간에서 Sesn2 발현 증가가 관찰되었다.

또한 *Sesn2* 재조합 아데노바이러스를 감염시킨 마우스에서 TUNEL염색을 통해 Gal/LPS에 의해 유도된 간 손상을 *Sesn2*이 보호함을 증명하였다. 종합적으로 TLR활성화를 통한 *Sesn2*의 유도는 AP-1 및 Nrf2-ARE 경로를 통한 전사적 조절과 유비퀴틴-프로테아좀 시스템에 의해 번역 후 조절을 모두 받고 있으며 TLR 자극에 의한 *Sesn2* 유도는 내독소 스트레스를 억제시킴을 규명함으로 다양한 염증 질환의 치료 표적으로써 *Sesn2*의 가능성을 제시하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시약 및 재료

Nrf2와 p65에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. Ubiquitin 과 c-Jun 항체는 Cell Signaling Technology (Danver, MA)에서 구입하였다. Sesn2 항체는 Proteintech (Chicago, IL)에서 구입하였다. LPS (Escherichia coli 055:B5), PGN, polyI:C, Gal, diphenyleneiodonium chloride (DPI), N-acetyl-l-cysteine (NAC), butylated hydroxyanisole (BHA), cycloheximide (CHX), Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132), chloroquine (CQ), actinomycin-D (ActD), β -actin 항체는 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하였다. PD98059, SB203580, SP600125, SB216763, wortmannin, LY294002는 Calbiochem (Billerica, MA)에서 구입 하였다.

2. 세포배양

Raw264.7 와 HEK293 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) 로부터 구입하였다. Nrf2 Knockout 및 wild-type MEF 세포는 Dr. MK Kwak (Catholic University, Korea) 에서 제공받았다. 세포는 6 well plate에 well당 1×10^5 으로 배양하였고, 70~80% 정도 포화도를 갖는 상황에서 실험 하였다. 세포는 10% 우태혈청 (fetal bovine serum), 50U/ml 페니실린 및 50 μ g/ml streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 에서 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂ 조건 하에 배양하였다.

3. Mice 골수에서 분리한 마크로파지 배양 및 분화

BMDM 배양 시, 골수세포는 mice의 대퇴골과 경골에서 분리하였고, 10% FBS를 함유한 minimum essential medium alpha(α -MEM)에서 배양하였다. 세포는 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, 10ng/ml; PeproTech, Rocky Hill, NJ)에서 plate에 overnight 배양하였다. 부착되지 않은 세포들을 수집하여 M-CSF 처치 후 3일동안 배양하였다. 부착되지 않은 세포는 제거하고 부착한 세포는 BMDM으로 사용되었다.

4. 아데노바이러스 준비

아데노바이러스 *Sesn2* 제작 시, 쥐의 *Sesn2* ORF는 *attB*-fused *Sesn2*-specific primers를 사용하여 증폭 시켰고, 증폭은 BP 재조합 반응 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 통해 empty 플라스미드 pDONRTM221안에 삽입하였다. 재조합바이러스는 제조사 설명 (Invitrogen) 에 따라 pAD/CMV/V5-DEST gateway plasmid를 사용하여 제작 하였다. 재조합 아데노바이러스의 DNA 시퀀스는 ABI7700 DNA cycle sequencer 사용으로 확인 하였다. *in vivo* 연구 시, 재조합 아데노바이러스는 CsCl₂ 원심분리로 정제 하였다. 바이러스 적정 농도는 *in vitro* 연구를 위해 TCID₅₀ 방법으로 계산 하였고 *in vivo* 연구는 흡광도 260nm로 하였다. 아데노바이러스가 발현된 LacZ를 컨트롤로 사용하였다.

5. 동물실험

6주된 수컷 ICR mice는 Oriental Bio (Sunnam, Korea)로부터 얻어 1주동안 적응시켰다. Mice (N = 5/group)는 20°C \pm 2°C에서 12시간 낮/밤 주기로 적응시키며 50% \pm 5% 의 상대습도, 무병원균 공기, 음식과 물은 자유식으로 이용하도록 하였다.

6. Gal/LPS에 의해 유도된 전격성 감염

급성간염은 5 μ g/kg LPS (Sigma-Aldrich) 및 700 mg/kg Gal (Sigma-Aldrich) 감염을 복강 내 주사(i.p.)로 유도하였다. 마우스는 8시간 투여 후 안락사 시켰다. PBS에 희석한 아데노바이러스 입자는 Gal/LPS 주입 전에 꼬리 정맥으로 48시간 동안 주입하였다.

7. TUNEL 염색

말단전이효소에 매개된 dUTP nick-end labeling (TUNEL) 분석은 제조사 지시에 따라 Millipore S7101 ApopTag[®] Plus Peroxidase kit를 통해 실시하였다. TUNEL 양성 세포는 현미경(Zeiss, Germany)을 사용하여 관찰하였다.

8. GSH 함량 확인

간 글루타티온 함량은 GSH kit (BIOXYTECH GSH-400; Oxis International, Portland, OR)를 사용하여 측정하였다. 방법은 간략하게 두 단계의 화학 반응에 기초한다. 첫 번째 단계는 시료 내 존재하는 모든 mercaptans(RSH)와 4-chloro-1-methyl-7-trifluoromethyl-quinolinium methylsulfate에 의한 thioether의 형성이다. 두 번째 단계는 알칼리성 조건 하에서의 β -elimination 반응이다. 보다 구체적으로 첫 번째 단계에서 얻어진 thioether가 30% NaOH와 반응하여 400nm에서 극대 흡광도를 나타내는 chromophoric thione을 형성한다.

9. RNA 분리 및 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응법(Real-time RT-PCR)

총 RNA는 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 추출하였다. cDNA는 고성능 cDNA 합성 kit(Bioneer, Daejeon, Korea)와 thermal cycler(Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 증폭시켰다. Real-time PCR은 SYBR green premix(applied Biosystems)와 STEP ONE(Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 제조사의 지시된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 프라이머는 Bioneer 에서 합성 제작되었다. PCR 결과는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 상대적인 값으로 보정하였다. 증폭된 산물의 특이성은 melting curve 분석을 통하여 확인하였다. mouse *Sesn2* sense 5-TAGCCTGCAGCCTCACCTAT-3 and antisense 5-TATCTGATGCCAAAGACGCA-3, mouse *Sesn1* sense 5-GGACGAGGAAGCTTGGAAATCA-3 and antisense 5-ATGCATCTGTGCGTCTTCAC-3.

10. 플라스미드 제조 및 리포터 유전자 분석

Human *Sesn2* luciferase 유전자인 pGL4-phSESN2는 RIKEN BRC에 의해 공급받았다. Murine *Nrf2*가 암호화된 pCDNA-mNrf2는 Dr.Yamamoto로부터 증여 받았다 [16]. pGL3-phSESN2- Δ ARE 플라스미드에서 ARE의 제거는 PCR에 기초한 방법에 의해 만들어졌다 [16]. *Sesn2*프로모터의 활성은 dual-luciferase 리포터 분석 시스템을 사용하여 확인하였다 (Promega) [16].

11. 면역화학적 분석

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 및 면역분석법은 이전에 확립된

절차에 따라서 수행하였다 [19]. 획득한 세포 분획의 단백질 또는 핵 추출물은 7.5% 와 12% 젤 전기 이동에 의해 분리 되었고, nitrocellulose지에 전기영동 전달장치를 이용하여 전이시켰다. nitrocellulose지는 1차 항체와 반응시킨 후 이어서 Horseradish peroxidase(HRP)와 결합된 2차 항체(Zymed Laboratories, San Francisco, CA)와 반응시키고 ECL iluminescence detection kit(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 발색 하였다.

12. 면역침강법

유비퀴틴된 Sesn2의 레벨을 평가하기 위하여, 세포에 Ubiquitin plasmid를 transfection 시켰다. 세포 lysate(300µg/ml)는 Sesn2 항체를 이용하여 overnight 면역침강 되었고 이후 4°C에서 2시간 동안 protein G-agarose를 가하였다. 면역복합체는 2×Laemmli 버퍼에 용해되었다. 단백질 샘플은 용해하였고 항-유비퀴틴 항체로 immunobloting을 하였다.

13. ROS 생성 및 측정

DCFH-DA는 세포-투과성, 비-형광 검사이며 세포 내 esterases에 의해 절단되어 그 H₂O₂와 반응 할 때 높은 형광 dichlorofluorescein으로 변환된다. 처리 후, RAW264.7 세포는 37°C에서 30분 동안 10µM DCFH-DA으로 염색하였다. H₂O₂ 생성은 dichlorofluorescein 형광으로 확인하였다. 세포에서의 형광 강도는 485nm/530nm인 자극/방출 파장에서 형광 마이크로 플레이트 리더 (SpectraMAX, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 측정하였다.

14. 통계처리

One-way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 분석 하였다. 통계적으로 유의성이 있는 그룹에 대해서는 Newman-Keuls test로 그룹간 평균을 비교하였다. 데이터는 평균 \pm S.D로 표기하였으며 통계적 유의성은 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 을 기준으로 하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. RAW264.7 세포에서 LPS에 의한 Sesn2 유전자 발현 유도

먼저, RAW264.7 세포에 LPS 처치 후 Sesn2 유전자 유도를 조사하였다. Sesn2는 LPS 처치 1-12 시간 후에 발현이 증가되었다. 반면에 LPS 처치 18 시간 후에 Sesn2 발현은 감소하였다 (Fig 1A, 왼쪽). 이어서, LPS에 의한 Sesn2 유도에 있어서 농도의존성을 조사하였다 (Fig. 1A, 오른쪽). LPS 0.3 μ g-1 μ g/ml 농도에서 Sesn2 발현이 유의적으로 증가하였다. LPS에 의한 Sesn2 유도는 마우스 BMDM에서 확인되었다 (Fig. 1B). LPS (TLR4 ligand) 뿐 아니라 peptidoglycan (TLR2 ligand) 및 PolyI:C (TLR3 ligand)를 RAW264.7 세포에 처치 시 Sesn2 발현이 증가되었다 (Fig. 1C). Sesn2 mRNA 레벨이 LPS 처치에 의해 유의하게 증가되었으나 Sesn1 mRNA 레벨에서는 LPS 처치에 의해 영향을 받지 않았다 (Fig. 1D). Sesn2 유전자 리포터 분석은 RAW264.7 세포에 Sesn2 프로모터 영역을 포함하는 플라스미드를 제작하여 세포 내로 형질도입으로 수행하였다 (-1,129 to 192 bp). 형질 도입된 세포에 LPS를 처치한 결과 pGL4-phSESN2의 luciferase 활성이 유의하게 증가되었다 (Fig. 1E). 전사 억제제인 Actinomycin-D(ActD)를 LPS 또는 vehicle에 30분 전처치하여 Sesn2 단백질 발현을 측정된 결과 ActD 처치 시 LPS에 의해 유도된 Sesn2 레벨이 억제되었다. 이러한 결과는 대식세포에서 Sesn2 유도가 TLR을 매개해서 일어나며 이는 전사의존적임을 제시한다.

2. LPS에 의한 Sesn2 유도의 산화환원 조절

LPS에 유도된 ROS/RNS가 Sesn2 발현에 관여 하는지 확인하기 위해 항산화제인

N-acetyl-cysteine (NAC), butylated hydroxyanisole (BHA) 및 NOX 억제제 diphenyleneiodonium chloride(DPI)를 RAW264.7 세포에 처치하였다. LPS에 의해 증가된 ROS가 항산화제 및 NOX 길항제를 통하여 완전히 억제된 반면 (Fig. 2A), LPS에 의해 증가된 *Sesn2* 발현은 DPI에 의해서만 완전히 억제되었다 (Fig. 2B). 이러한 결과는 대식세포에서 LPS에 의해 증가된 *Sesn2* 유도가 NOX를 통한 ROS 생성을 매개함을 시사한다.

3. LPS에 의한 *Sesn2* 유도에서 *Nrf2* 활성의 역할

Nrf2-ARE 경로가 *Sesn2* 유전자 발현에 필수적으로 요구되며 *Nrf2* 매개성 *Sesn2* 유도는 산화적 스트레스에 대하여 세포를 보호 할 수 있음을 증명하였다. 또한, LPS는 human monocyte에서 *Nrf2* 활성화 및 타겟 유전자의 발현을 증가시킨다 [13]. 결과대로 HEK293 세포에 *Nrf2*의 과발현은 *Sesn2* 단백질 발현(위) 및 luciferase 활성을(아래) 증가시켰다 (Fig. 3A). *Sesn2* 프로모터 활성화에서 *Nrf2*의 역할을 조사하기 위해 *Sesn2* 프로모터의 ARE 사이트를 제거하였다. *Sesn2* 프로모터 유전자에서 ARE의 제거는 LPS 매개된 luciferase 리포터 활성 증가를 억제하였다 (Fig. 3B). *Nrf2* 결손세포를 활용하여 LPS에 의한 *Sesn2* 유도여부를 조사하였다. *Sesn2* 발현은 LPS 처치에 의해 wild-type (WT) MEF 세포에서 증가 하였다; 그러나 *Nrf2* knockout(KO)에서는 LPS에 의해 유도된 *Sesn2* 발현이 완전히 억제 되었다 (Fig. 3C). 이와 같은 결과들은 *Nrf2* 활성화가 LPS에 의한 *Sesn2*의 유도에 있어 요구됨을 의미한다.

4. LPS에 의한 *Sestrin2* 발현에서 AP-1 활성 역할

AP-1, NF- κ B는 TLR 매개 염증 반응의 조절에 관련된 다양한 유전자에 필수적인

전사 인자이다. LPS에 의한 *Sesn2* 유도에서 AP-1의 역할을 확인하기 위해 먼저 AP-1 전사 인자의 주요 구성인자인 *c-Jun* plasmid 를 luciferase 리포터 유전자에 형질주입 하였다. *c-Jun*의 과발현은 *Sesn2* 단백질 레벨 및 luciferase 활성을 증가시켰다 (Fig. 4A). *c-Jun* 발현 및 활성여부는 AP-1 의존적 luciferase (AP-1-Luc)를 활용하여 확인하였다. LPS에 의해 유도된 *Sesn2* 유도에서 NF- κ B 활성화 역할을 조사하기 위해 NF- κ B complex의 주성분인 p65 플라스미드를 발현 시켰다. 예상대로, NF- κ B에 의존하는 luciferase 활성(NF- κ B-luc)은 p65의 발현에 의해 증가되었다; 그러나 *Sesn2*의 프로모터 활성은 p65 과발현에 의해 영향을 받지 않았다 (Fig. 4B). 이러한 결과는 LPS 의한 *Sesn2*유도에서 AP-1의 활성화가 선택적으로 요구됨을 제시한다.

5. LPS에 매개된 *Sesn2* 유도에서 p38 및 PI3K 역할

LPS에 의한 *Sesn2* 유도의 구체적인 분자기전을 조사하기 위해, 우리는 AP-1 및 Nrf2 신호 전달 경로 활성화와 관련된 다양한 상위 인산화 효소 활성화 여부를 조사하였다. LPS 노출 시 MAPKs 활성화가 증가됨이 잘 알려져 있다. 우리는 p38의 MAPK를 억제 시 LPS에 의한 *Sesn2* 유도가 억제됨을 관찰하였다. 하지만 ERK 및 JNK 활성화는 LPS에 의한 *Sesn2* 유도에 관여하지 않았다 (Fig. 5A). protein kinase C (PKC), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) 등 여러 인산화 효소가 LPS 처치에 의해 활성화 되어 Nrf2 활성을 조절함이 보고 되어 있다. Wortmannin 및 LY294002와 같은 PI3K 길항제는 LPS에 의한 *Sesn2*의 유도를 억제하였으나, 억제하지 않은 길항제는 *Sesn2* 발현에 영향을 주지 못하였다 (Fig. 5B). 이러한 결과는 LPS에 의한 p38 MAPK 또는 PI3K의 활성화가 LPS에 의한 *Sesn2* 유도에 필요함을 의미한다.

6. polyubiquitination에 의한 Sestrin2의 번역 후 조절

Sesn2에 대한 단백질 안정성의 효과를 분석하기 위해 RAW264.7 세포에 단백질 합성을 차단하는 cycloheximide(CHX)를 처치 하였다. CHX를 처치에 의해 Sesn2의 단백질 발현이 신속하게 감소 하였다 (Fig. 6A). 대조군으로 사용된 β -actin은 CHX에 의해 영향을 받지 않았다. 이는 Sesn2가 신속하게 분해 및 합성됨을 나타낸다. 다음으로, LPS에 의해 유도된 Sesn2 발현이 CHX 처치에 의해 영향을 받는지를 조사하였다. LPS에 의한 Sesn2 유도에 의해 Sesn2 합성이 증가하여 CHX 처치의 LPS에 의한 Sesn2의 발현을 완전히 차단하였다 (Fig. 6B). CHX에 의해 Sesn2의 발현 감소가 proteasome 또는 lysosome 경로를 통한 단백질 분해에 기인하는지를 확인하기 위해, 우리는 RAW264.7 세포에 proteasome 억제제 (MG132 [MG]) 또는 lysosome 억제제 (chloroquine [CQ])를 각각 처치 하였다. 그 결과 CHX에 의한 Sesn2 단백질의 발현 감소는 MG132 전처치에 의해 차단된 반면, CQ 전처치에는 별다른 영향을 주지 못했다 (Fig. 6C). 게다가, MG132 처치에 의해 basal Sesn2의 양이 증가했으며 이는 Sesn2 발현이 proteasome 분해를 통해 조절됨을 보여준다 (Fig. 6D). Sesn2 분해에서 ubiquitin-proteasome system의 관련성을 결정하기 위해 HEK293 세포에 His-tagged ubiquitin (Ubi) 와 Sesn2 plasmid를 형질 주입하였다. MG132 또는 vehicle을 overnight 배양 후, 세포를 lysis시켰다. Lysate는 anti-Sesn2 항체로 면역 침강한 다음, anti-ubiquitin 항체로 immunoblotting 하였다. Sesn2의 ubiquitination이 MG132의 존재하에서 확인되었다 (Fig. 6E). 또한, MG132에 의해 유도된 Sesn2의 polyubiquitination이 LPS 처치에 의해 현저히 억제됨을 관찰하였다 (Fig. 6F). 이러한 결과는 Sesn2이 ubiquitin-proteasome pathway에 의해 분해되고, LPS에 의한 Sesn2 유도는 ubiquitin-proteasome system 억제와 관련됨을 시사한다.

7. *in vivo*에서 LPS에 의한 Sesn2 유도과 세포보호역할

*in vivo*에서 LPS에 의해 Sesn2 발현이 증가하는지 확인하기 위해 우리는 8시간 동안 Gal/LPS로 투여 후, 마우스의 간에서 Sesn2 발현을 조사 하였다. 마우스 간 조직에서 Sesn2 단백질 레벨이 Gal/LPS 투여에 의해 현저하게 증가 된 것으로 나타났다 (Fig. 7A). real-time RT-PCR에 의한 Sesn2 mRNA 발현을 조사한 결과 Sesn2 mRNA 역시 Gal/LPS 투여에 의해 증가하였다 (Fig. 7B). Gal/LPS에 의한 간 손상에서 Sesn2의 효능을 규명하고자 Sesn2 재조합 아데노바이러스 (Ad-Sesn2) 와 대조군 아데노바이러스 (Ad-LacZ)를 쥐에 감염시킨 후 TUNEL 분석을 실시하였다. Gal/LPS에 의해 증가된 TUNEL-positive cell 이 Ad-Sesn2에 의하여 현저히 감소 되었다 (Fig. 7C). 또한 간 조직 중 감소된 GSH의 함량이 Ad-Sesn2에 의하여 복원되었다 (Fig. 7D). 이는 Sesn2이 *in vivo* 에서 Gal/LPS에 의해 증가된 Sesn2가 급성 감염에 의한 손상을 방어할 수 있음을 의미한다.

IV. 결론 및 고찰

Sesn2는 저산소증, DNA 손상 및 산화적 스트레스를 포함하는 다양한 외부 스트레스에 반응하여 유도되는 진화적으로 잘 보존되어 있는 항산화 단백질이다 [20,21,22]. Sesn2의 발현은 스트레스반응에 의해 활성화되는 전사인자인 p53, HIF-1 α 및 Nrf2에 의해 조절된다 [16,20,22]. 또한 프리라디칼을 제거하는 peroxiredoxins의 재생을 촉진함으로써 항산화 반응을 매개한다 [17]. 대식세포에 TLRs의 자극이 Nrf2 및 AP-1 활성화를 통하여 Sesn2의 발현을 전사적으로 조절함을 보여준다. 게다가 LPS에 의해 증가된 Sesn2의 발현이 ubiquitin-proteasome을 통한 단백질 분해 억제와 관련된다. LPS의 TLR4 결합은 다양한 세포신호전달경로를 통하여 활성산소를 생성한다 [23]. 또한, 대식세포에서 ROS 생성은 주로 phagosomal NOX machinery를 사용하여 이루어짐이 잘 알려져 있다 [24]. LPS에 의해 증가된 ROS가 항산화제 및 NOX 길항제를 통하여 완전히 억제된 반면, LPS에 의한 Sesn2 발현은 DPI 에 의해서만 억제되었다 (Figure 2).

ActD 처치에 의해 LPS 유도성 Sesn2 발현이 완전히 차단됨을 통하여 (Fig. 1F) LPS에 매개된 Sesn2 발현의 상향조절이 전사수준에서 일어남을 확인할 수 있었다. 본 연구실의 최근 연구 결과에 따르면 Sesn2가 항산화 효소의 발현에 필수 전사인자인 Nrf2에 의해 유도되는 것으로 나타났다 [16]. 실제 Sesn2 프로모터는 -550 bp에서 -539 bp의 인접 영역에서 Nrf2에 대한 바인딩 사이트인 AREs를 가지고 있다 [16]. LPS가 monocyte에서 Nrf2의 핵 내 이동 및 전사적 활성화와 관련되어 있음이 보고되어있다 [13]. Nrf2 과발현에 의해 wild-type 세포에서는 Sesn2 발현이 증가된 반면, Nrf2 knockout 세포에서는 Sesn2 발현 유도 억제가 억제되었다. 또한, Sesn2 유전자의 프로모터 영역에서 AREs의 선택적 제거는 LPS 매개된 유도로

인한 *Sesn2* luciferase 활성을 억제하였다 (Fig. 3B). 이러한 결과는 Nrf2-ARE 경로가 LPS에 의한 *Sesn2* 발현에 필수적임을 나타낸다.

AP-1 및 NF- κ B은 선천성 면역반응 동안 면역효과분자의 합성에 중요한 역할을 하고 있고, 이들은 산화환원-민감성 전사인자로 간주된다 [25]. 염증반응에서 중요한 역할을 하는 c-Jun의 과발현은 *Sesn2* 단백질 수준과 luciferase 활성을 증가시켰다. 그러나 p65의 과발현은 *Sesn2*의 발현에 영향을 주지 않았다. 최근 Rao et al. 보고에 의하면 HUVECs에 angiotensin II 처치 시, AP-1 경로의 활성화를 통해 *Sesn2* 발현이 유도되었다 [26]. AP-1 활성은 일반적으로 MAPKs에 의해 조절된다. *Sesn2* 발현은 p38 MAPK의 길항제에 의해 선택적으로 억제되었다. 이러한 결과는 AP-1의 활성화가 LPS 매개성 *Sesn2*의 발현에 필요함을 제시한다.

놀랍게도, *Sesn2* 발현이 ubiquitin-proteasome system에 의해 조절되는 것을 처음으로 증명하였다. ubiquitin-proteasome system은 진핵세포 내의 단백질 분해에 중요하다 [27]. 최근 연구결과에 의하면, *Sesn2*의 항산화 기능은 p62 의존적인 Keap1의 자가식포 분해를 통한 Nrf2의 활성화에 의한 것으로 보고 되었다. *Sesn2*는 Nrf2 repressor인 Keap1, autophagy 기질인 p62 및 ubiquitin ligase Rbx1와 complex 복합체를 형성함이 보고되었다 [28]. 정상 조건에서 Nrf2는 빠르게 Keap1와 직접 결합을 통해 분해된다 [11]. Keap1은 Cul3-Rbx-based E3 ligase system에서 기질 어댑터 분자 기능을 함으로 Nrf2의 ubiquitin-proteasome 분해를 조절한다 [29]. 하지만 Keap1 과발현은 *Sesn2* 발현에 영향을 미치지 않았다 (data not shown). 본 연구실에서는 *Sesn2*의 ubiquitination에 관여하는 E3 ligase 및 *Sesn2* ubiquitination의 생리적 기능에 대한 추가연구를 실시 중이다.

Gal/LPS에 유도된 전격성 간손상 모델은 내독소에 유도된 간 질환에 대한 급성 간부전 메커니즘연구와 신규 치료제 개발을 할 수 있는 보편적으로 사용되는 실험

동물 모델이다 [30,31]. 간의 대식세포인 쿠퍼세포는 Gal/LPS에 의해 활성화되어 급성간손상을 촉진한다 [32]. 또한, 우리는 최근에 Sesn2 아데노바이러스가 Gal/LPS에 의해 유도된 급성 전격성 간염으로부터 보호함을 보고했다 (Yang et al., in revision). Ad-Sesn2는 Gal/LPS에 유도된 ALT, AST, 간세포 변성을 억제 하였다. Gal/LPS가 투여된 간 조직에서는 Sesn2의 단백질과 mRNA의 레벨이 증가한 것으로 나타났다 (Fig. 7A, 7B). 게다가 TUNEL 염색 및 GSH 측정에 의해 입증된 바와 같이, Gal/LPS에 의해 증가된 간 세포 사멸을 Sesn2이 억제하였다 (Fig. 7C, 7D). 이러한 결과는 Sesn2가 내독소에 의한 급성 간염에 대해 보호작용이 있음을 의미하며 Sesn2이 내독소에 유도된 염증질환의 예방 및 치료를 위한 유망한 치료 표적이 될 수 있음을 제시한다.

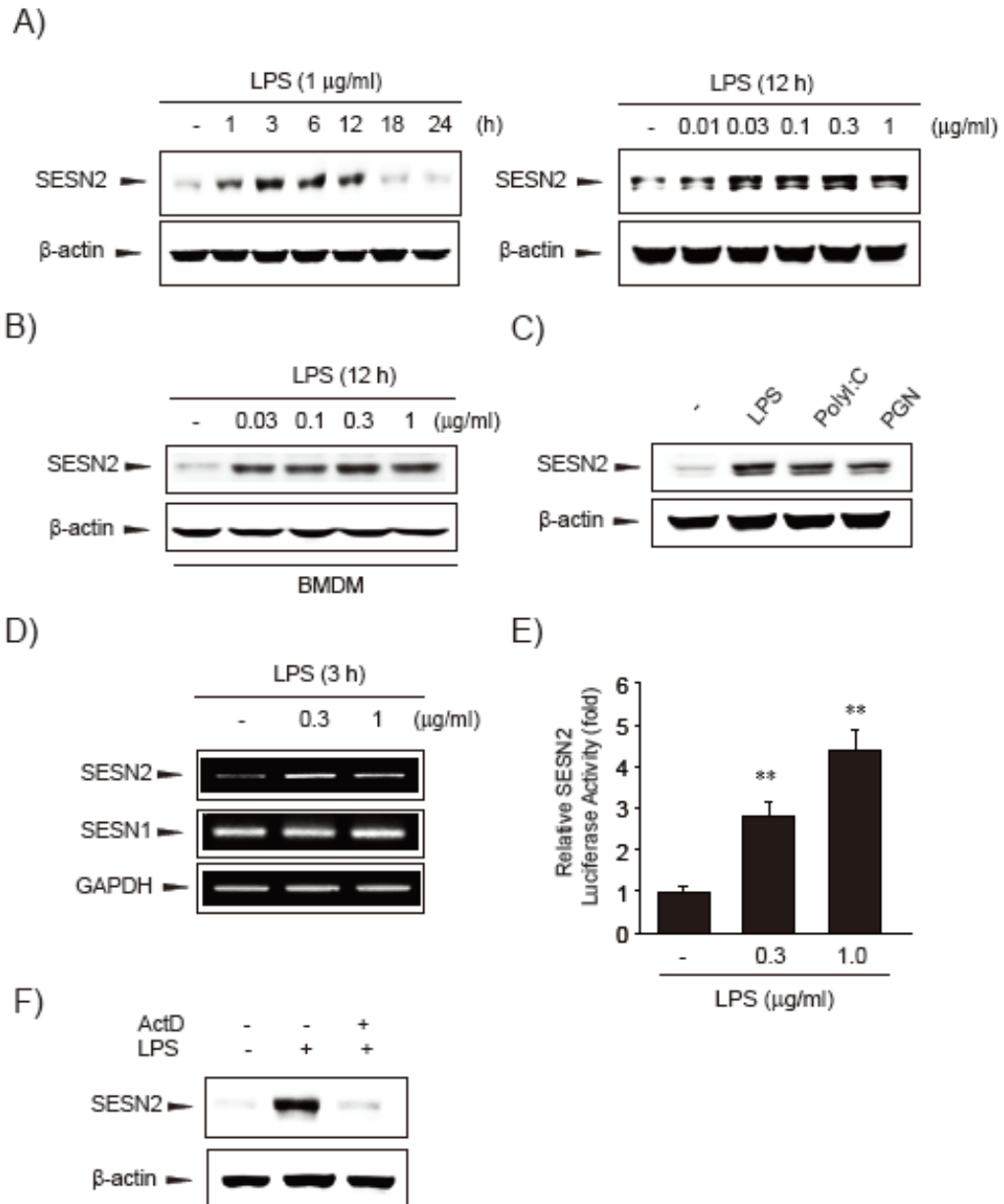


Figure 1. The effect of lipopolysaccharide (LPS) on the expression of Sestrin2 (Sesn2) in macrophages

Figure 1. The effect of lipopolysaccharide (LPS) on the expression of Sestrin2 (Sesn2) in macrophages

A. The effect of LPS treatment on Sesn2 induction. RAW264.7 cells were treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 1 h–24 h. Sesn2 protein levels in cell lysates were measured by immunoblotting (left). The dose responses of Sesn2 expression were determined in cells treated with 0.01 $\mu\text{g/ml}$ –1 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 12 h (right). *B.* The effect of LPS on Sesn2 induction in bone marrow-derived macrophages (BMDMs). The immunoblot results were confirmed in repeated experiments. *C.* The effect of TLR ligands (TLRLs) on Sesn2 induction. Cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), poly I:C (50 $\mu\text{g/ml}$), or peptidoglycan (PGN; 30 $\mu\text{g/ml}$) for 12 h, and then Sesn2 expression in cell lysates was determined by immunoblotting. *D.* RT-PCR analysis. Cells were treated with 0.3 $\mu\text{g/ml}$ or 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 3 h. Sesn2 transcript levels were determined by RT-PCR using GAPDH used as an internal control. *E.* Sesn2 luciferase assay. Cells were transfected with a Sesn2 promoter-luciferase construct. Transfected cells were treated with LPS (0.3 or 1 $\mu\text{g/ml}$) for 12 h. Results are mean \pm SD of three replicates; ** $P < 0.01$ versus the vehicle-treated control. *F.* transcriptional regulation of Sesn2 by LPS. Sesn2 expression in LPS-treated cells after actinomycin-D (ActD) pre-treatment for 3 h was detected by immunoblotting.

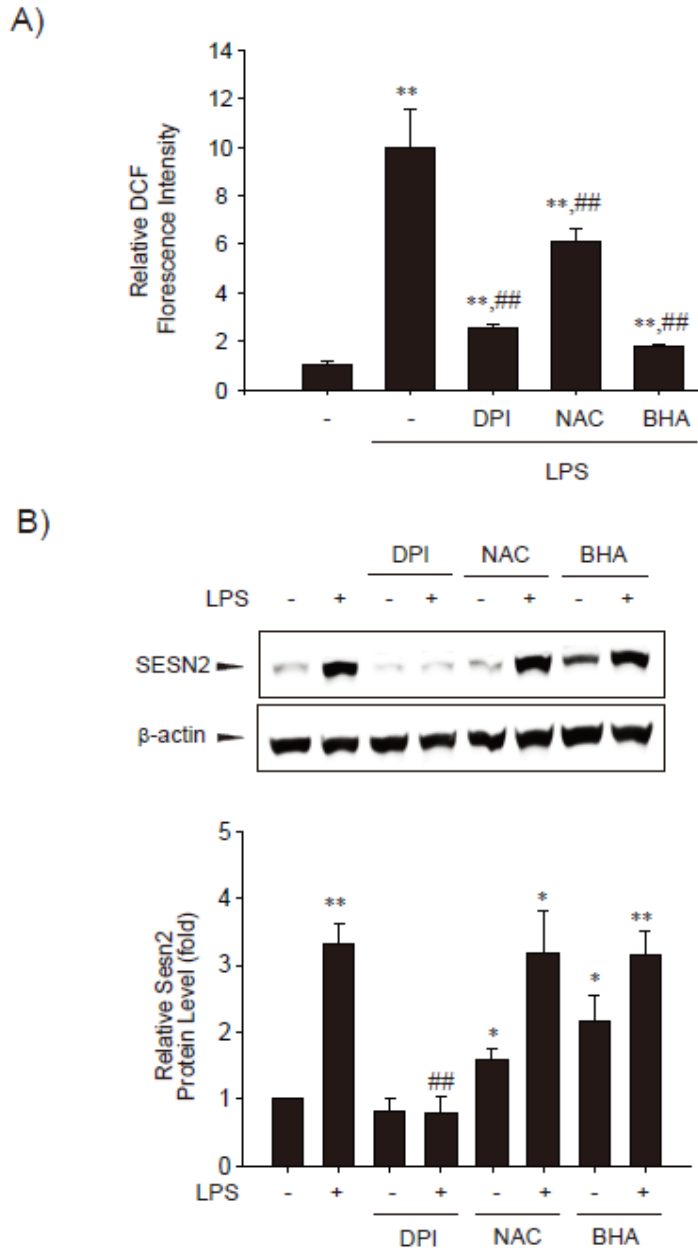


Figure 2. Redox regulation of Sesn2 induction by LPS

Figure 2. Redox regulation of Sesn2 induction by LPS

A. DCFH-DA analysis. RAW264.7 cells were exposed to LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 12 h after pretreatment with diphenyleneiodonium (DPI, 0.5 μM), N-acetylcysteine (NAC, 5 mM), or butylated hydroxyanisole (BHA, 100 μM) for 30 min. Intracellular fluorescence intensities were measured using a fluorescence microplate reader. B. Cells were treated as described A, and then Sesn2 protein levels in cell lysates were measured by immunoblotting. The immunoblot results were confirmed in repeated experiments. Results are mean \pm SD of four replicates; *P < 0.05, **P < 0.01 versus the vehicle-treated control; ##p < 0.01 versus the LPS alone.

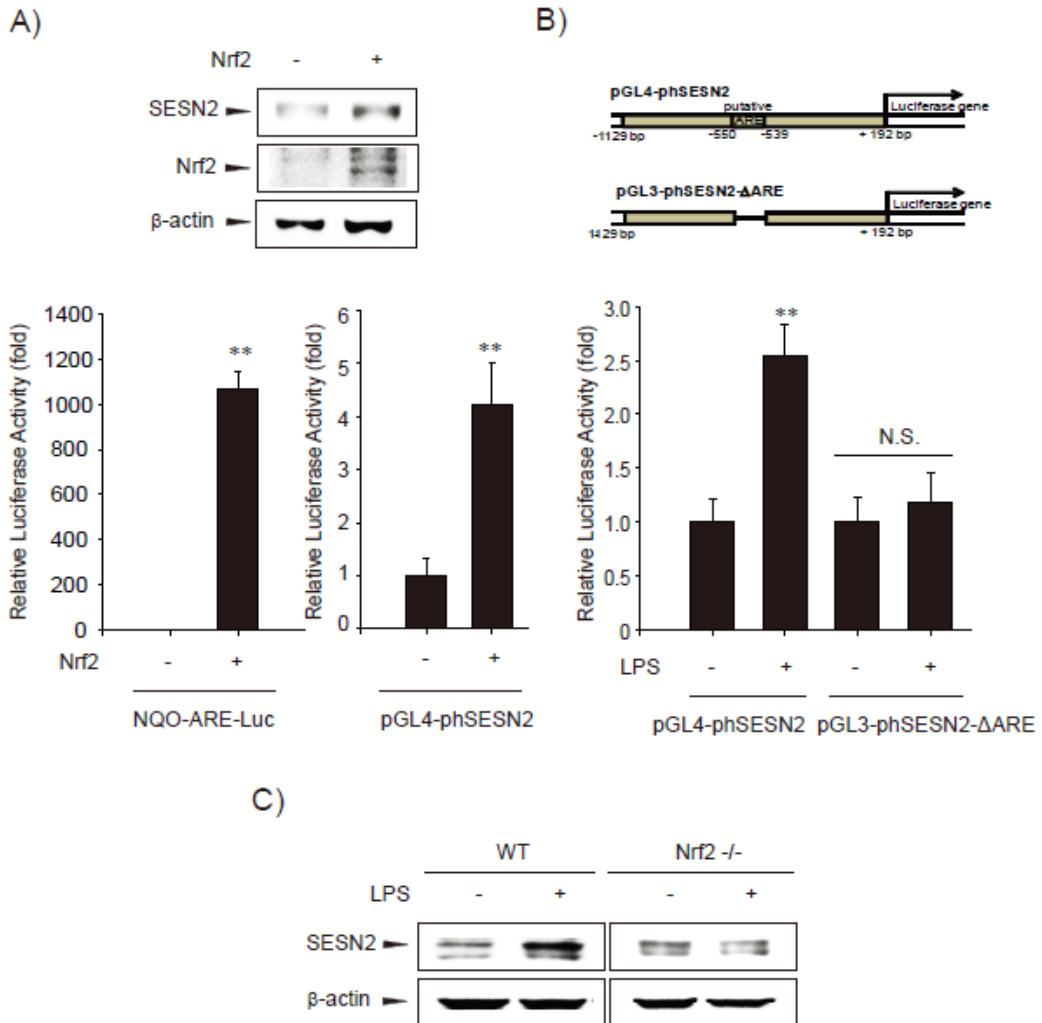


Figure 3. The role of Nrf2-ARE in the induction of Sesn2

Figure 3. The role of Nrf2-ARE in the induction of Sesn2

A. HEK293 cells were transfected with a plasmid encoding Nrf2, and then the cell lysates were immunoblotted. An empty plasmid was used in the mock transfection. The expression of Nrf2 was evaluated by immunoblotting using an anti-Nrf2 antibody (upper). Sesn2-luciferase transactivation was determined in the lysates of HEK293 cells transfected with an Nrf2 expression construct along with either a Sesn2 (pGL4-phSESN2) or Nrf2-dependent (NQO-ARE) luciferase reporter for 24 h (lower). B. The effects of deleting the ARE in the *Sesn2* promoter on LPS-mediated induction of luciferase activity. Luciferase reporter assays were performed on the lysates of HEK293 cells transfected with pGL4-phSESN2 or pGL3-phSESN2- Δ ARE in the presence or absence of LPS (1 μ g/ml). C. The effect of LPS on Sesn2 induction in wild-type (WT) and Nrf2 knockout (Nrf2^{-/-}) MEF cells. Sesn2 levels in the lysates of WT or Nrf2^{-/-} cells treated with LPS for 12 h were measured by immunoblotting.

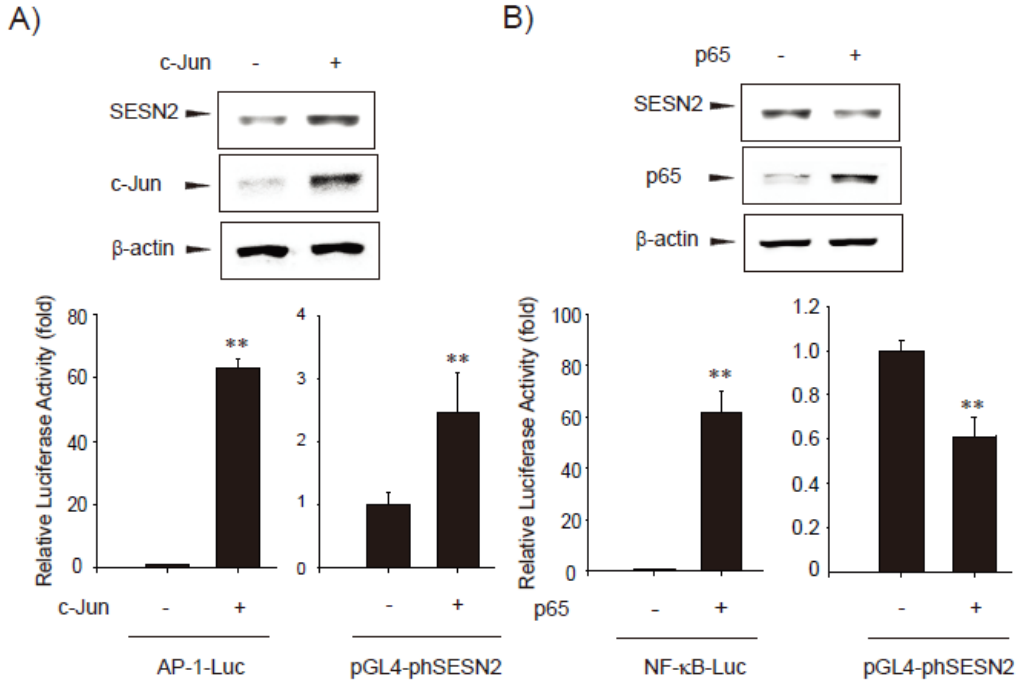


Figure 4. AP-1-dependent Sesn2 gene induction by LPS

Figure 4. AP-1-dependent Sesn2 gene induction by LPS

A. AP-1-dependent regulation of Sesn2 expression. HEK293 cells were transfected with a c-Jun expression construct for 24 h. Then, the expression of Sesn2 or c-Jun in these cells was evaluated by immunoblotting using an anti-Sesn2 antibody or an anti-c-Jun antibody, respectively (upper). Sesn2-luciferase transactivation was determined in the lysates of HEK293 cells transfected with a c-Jun expression construct and a Sesn2 (pGL4-phSESN2) or AP-1-dependent luciferase (AP-1-Luc) reporter for 24 h (lower). **B.** NF- κ B-independent regulation of Sesn2 expression. HEK293 cells were transfected with a p65 expression plasmid for 24 h. Then, the expression of Sesn2 or p65 was evaluated by immunoblotting using an anti-Sesn2 antibody or an anti-p65 antibody, respectively (upper). Sesn2-luciferase transactivation was determined in the lysates of HEK293 cells transfected with a p65 expression plasmid and a Sesn2 (pGL4-phSESN2) or NF- κ B-dependent luciferase reporter (NF- κ B-Luc) for 24 h (lower).

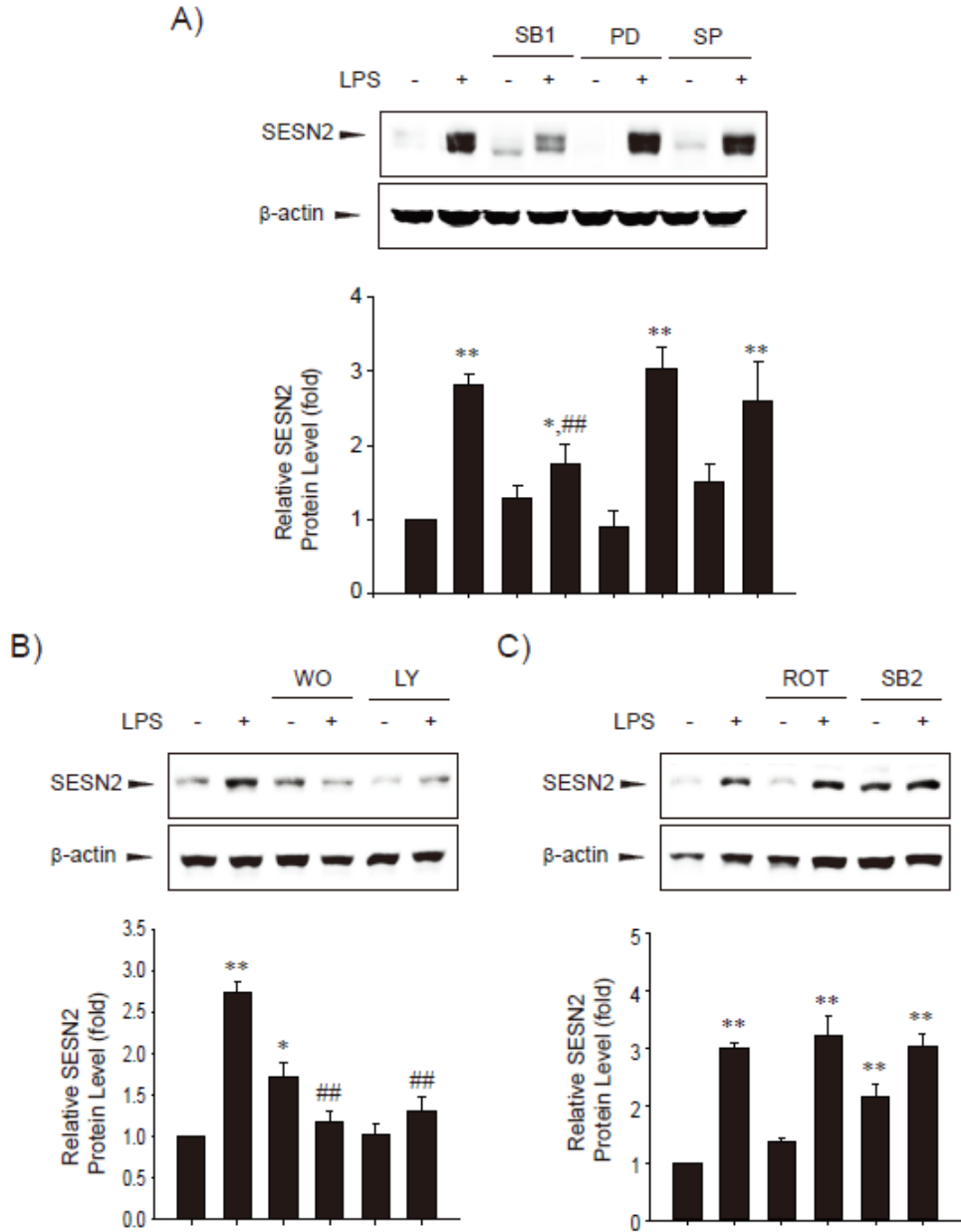


Figure 5. Association of p38 MAPK and PI3K with LPS-induced Sen2 expression

Figure 5. Association of p38 MAPK and PI3K with LPS-induced Sesn2 expression

A. Inhibition of Sesn2 expression by chemical inhibitors. Cells were treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS and 10 μM SB203580 (SB1), 10 μM PD98059 (PD), or 10 μM SP6001245 (SP) for 12 h. B. Cells were treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS and 10 nM wortmannin (WO) or 10 μM LY294002 (LY) and C. 0.5 μM rottlerin (ROT), or 10 μM SB216763 (SB2) for 12 h. The immunoblot results were confirmed in repeated experiments. Results are mean \pm SD of three replicates; *P < 0.05, **P < 0.01 versus the vehicle-treated control; ##p < 0.01 versus the LPS alone.

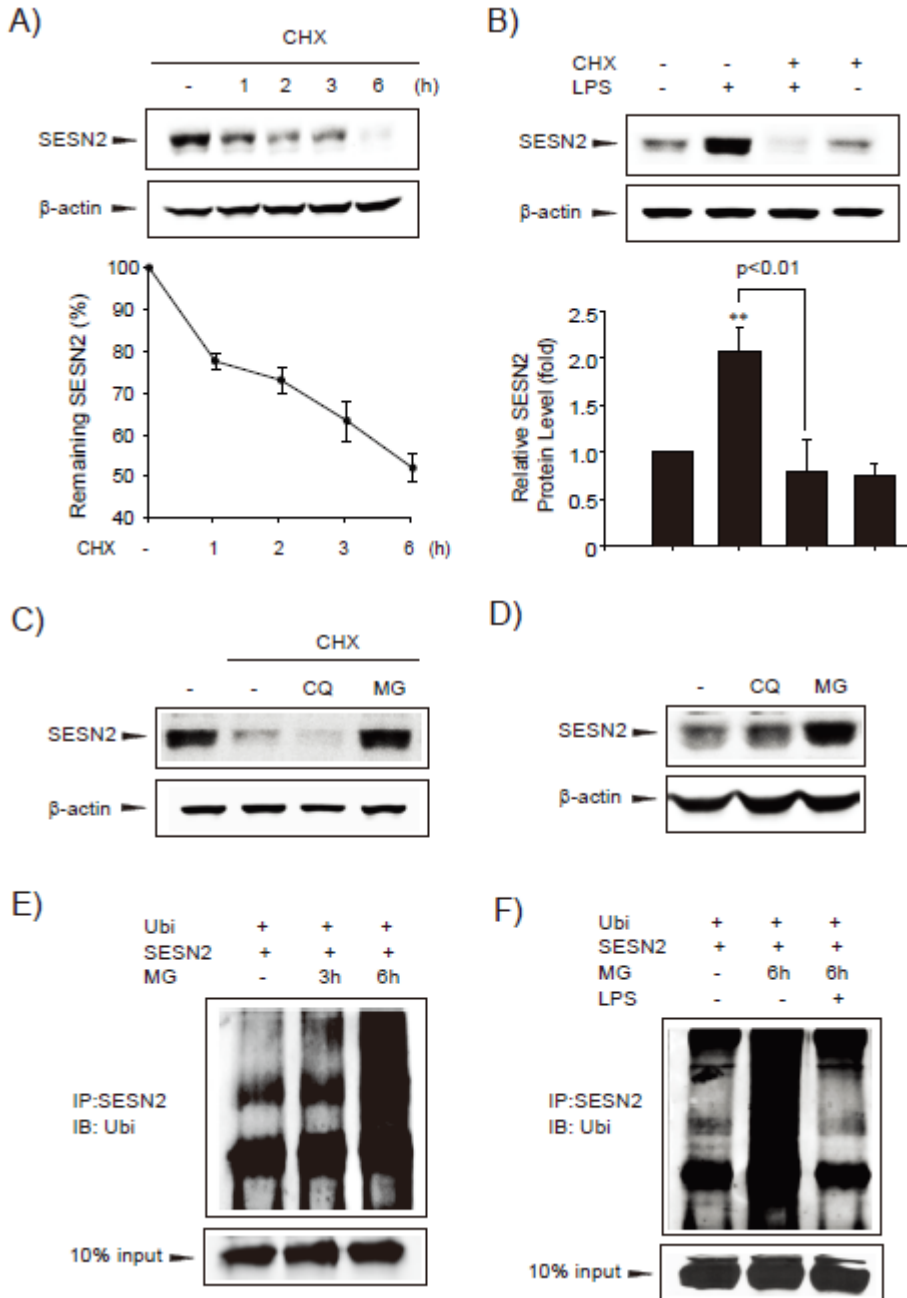
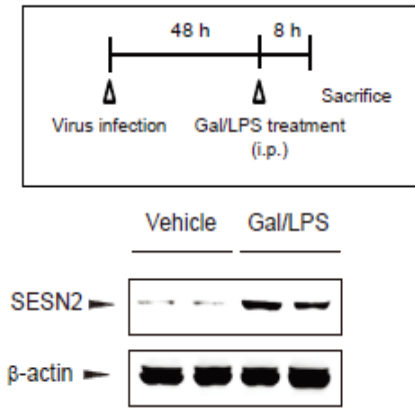


Figure 6. Role of ubiquitin-proteasome system on Sesn2 expression

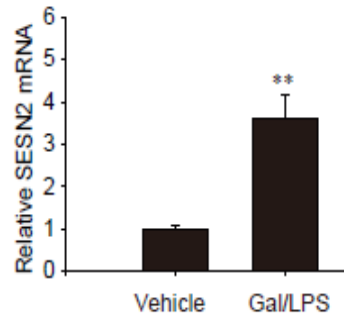
Figure 6. Role of ubiquitin-proteasome system on Sesn2 expression

A. The effect of cycloheximide on Sesn2 expression. RAW264.7 cells were cultured in the presence of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide (CHX) for the indicated periods. The amount of Sesn2 protein was quantified. *B.* Inhibition of LPS-induced Sesn2 expression by CHX. RAW264.7 cells were pretreated with CHX (0.5 mg/mL) for 1 h before treatment with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for another 12 h. *C.* Restoration of CHX-mediated Sesn2 degradation by treatment with a proteasomal inhibitor. RAW264.7 cells were treated with CHX in the presence or absence of the lysosomal inhibitor chloroquine (CQ, 100 $\mu\text{g/mL}$) or the proteasomal inhibitor MG132 10 μM for 6 h. *D.* Sesn2 upregulation by proteasome inhibition. Cells were treated with CQ or MG132 for 3 h, and then Sesn2 expression in the cell lysates was assessed by immunoblotting. *E.* Ubiquitination of Sesn2. HEK293 cells were transiently transfected with a plasmids encoding His-tagged ubiquitin (Ubi) and Sesn2 for 12 h. Cells were treated with MG132 for 3 h–6 h. Polyubiquitinated Sesn2 was immunoprecipitated with an anti-Sesn2 antibody, and then immunoblotted with an anti-Ubi antibody. *F.* Attenuation of Sesn2 polyubiquitination by LPS treatment. Cells were transiently transfected as described in *E*, and then treated with MG132 for 6 h in the presence or absence of LPS. Cell lysates were immunoprecipitated with an anti-Sesn2 antibody and then immunoblotted with an anti-Ubi antibody.

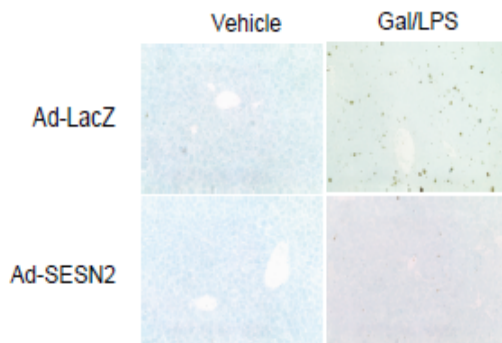
A)



B)



C)



D)

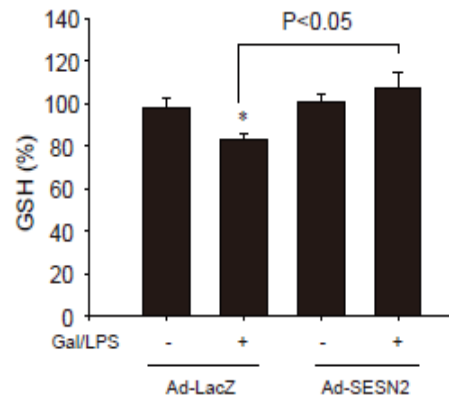


Figure 7. Induction of *Sesn2* by Gal/LPS in mice

Figure 7. Induction of Sesn2 by Gal/LPS in mice

A. Mice were infected with adenovirus particles (1×10^9 pfu) via the tail vein 48 h prior to injection with Gal (700 mg/kg)/LPS (5 μ g/kg). Mice were sacrificed 8 h after Gal/LPS treatment (upper). Sesn2 expression in liver homogenates of mice treated with Gal/LPS was assessed by immunoblotting (lower). B. Sesn2 mRNA levels. The levels of Sesn2 mRNA were analyzed by real-time RT-PCR, using the mRNA level of GAPDH as a normalizing reference. Data represent the mean \pm SD of all treated mice. The statistical significance of differences between Gal/LPS and vehicle-treated mice (**P < 0.01). C. Inhibition of Gal/LPS-induced apoptosis by Sesn2. Apoptosis was detected by the terminal transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) assay. Representative TUNEL staining images of liver sections from mice treated with Gal/LPS or vehicle for 48 h and then infected with adenovirus LacZ (Ad-LacZ) or adenovirus Sesn2 (Ad-SESN2). D. Hepatic GSH content. Mice were injected with Gal/LPS as described in C. GSH concentration was measured in mouse liver homogenates. Data represent mean \pm SD of all treated mice; *P < 0.05 versus the vehicle-treated control.

V. 참고문헌

1. Cross, A. R., and Segal, A. W. (2004). The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* **1657**(1), 1-22.
2. Geiszt, M., and Leto, T. L. (2004). The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J Biol Chem* **279**(50), 51715-8.
3. Forman, H. J., and Torres, M. (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* **166**(12 Pt 2), S4-8.
4. Kirkham, P. (2007). Oxidative stress and macrophage function: a failure to resolve the inflammatory response. *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 2), 284-7.
5. Roberts, R. A., Ganey, P. E., Ju, C., Kamendulis, L. M., Rusyn, I., and Klaunig, J. E. (2007). Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Sci* **96**(1), 2-15.
6. O'Neill, L. A., Golenbock, D., and Bowie, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**(6), 453-60.
7. Zhang, G., and Ghosh, S. (2001). Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* **107**(1), 13-9.
8. Gill, R., Tsung, A., and Billiar, T. (2010). Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic Biol Med* **48**(9), 1121-32.

9. Park, H. S., Jung, H. Y., Park, E. Y., Kim, J., Lee, W. J., and Bae, Y. S. (2004). Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol* **173**(6), 3589-93.
10. Vijayan, V., Baumgart-Vogt, E., Naidu, S., Qian, G., and Immenschuh, S. (2011). Bruton's tyrosine kinase is required for TLR-dependent heme oxygenase-1 gene activation via Nrf2 in macrophages. *J Immunol* **187**(2), 817-27.
11. Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2004). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* **10**(11), 549-57.
12. Itoh, K., Mimura, J., and Yamamoto, M. (2010). Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. *Antioxid Redox Signal* **13**(11), 1665-78.
13. Rushworth, S. A., Chen, X. L., Mackman, N., Ogborne, R. M., and O'Connell, M. A. (2005). Lipopolysaccharide-induced heme oxygenase-1 expression in human monocytic cells is mediated via Nrf2 and protein kinase C. *J Immunol* **175**(7), 4408-15.
14. Li, W., Khor, T. O., Xu, C., Shen, G., Jeong, W. S., Yu, S., and Kong, A. N. (2008). Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol* **76**(11), 1485-9.

15. Itoh, K., Mochizuki, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Kawamoto, Y., Kelly, V., Sekizawa, K., Uchida, K., and Yamamoto, M. (2004). Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin j(2). *Mol Cell Biol* **24**(1), 36-45.
16. Shin, B. Y., Jin, S. H., Cho, I. J., and Ki, S. H. (2012). Nrf2-ARE pathway regulates induction of Sestrin-2 expression. *Free Radic Biol Med* **53**(4), 834-41.
17. Budanov, A. V., Sablina, A. A., Feinstein, E., Koonin, E. V., and Chumakov, P. M. (2004). Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* **304**(5670), 596-600.
18. Essler, S., Dehne, N., and Brune, B. (2009). Role of sestrin2 in peroxide signaling in macrophages. *FEBS Lett* **583**(21), 3531-5.
19. Jin, S. H., Yang, J. H., Shin, B. Y., Seo, K., Shin, S. M., Cho, I. J., and Ki, S. H. (2013). Resveratrol inhibits LXRalpha-dependent hepatic lipogenesis through novel antioxidant Sestrin2 gene induction. *Toxicol Appl Pharmacol* **271**(1), 95-105.
20. Budanov, A. V., and Karin, M. (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* **134**(3), 451-60.
21. Budanov, A. V., Shoshani, T., Faerman, A., Zelin, E., Kamer, I., Kalinski, H., Gorodin, S., Fishman, A., Chajut, A., Einat, P., Skaliter, R., Gudkov, A. V., Chumakov, P. M., and Feinstein, E. (2002). Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability. *Oncogene* **21**(39), 6017-31.

22. Lee, J. H., Budanov, A. V., and Karin, M. (2013). Sestrins orchestrate cellular metabolism to attenuate aging. *Cell Metab* **18**(6), 792-801.
23. Ryan, K. A., Smith, M. F., Jr., Sanders, M. K., and Ernst, P. B. (2004). Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect Immun* **72**(4), 2123-30.
24. Minakami, R., and Sumimoto, H. (2006). Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of the NADPH oxidase (nox) family. *Int J Hematol* **84**(3), 193-8.
25. Surh, Y. J., Kundu, J. K., Na, H. K., and Lee, J. S. (2005). Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. *J Nutr* **135**(12 Suppl), 2993S-3001S.
26. Yi, L., Li, F., Yong, Y., Jianting, D., Liting, Z., Xuansheng, H., Fei, L., and Jiewen, L. (2014). Upregulation of sestrin-2 expression protects against endothelial toxicity of angiotensin II. *Cell Biol Toxicol* **30**(3), 147-56.
27. Bhattacharyya, S., Yu, H., Mim, C., and Matouschek, A. (2014). Regulated protein turnover: snapshots of the proteasome in action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(2), 122-33.
28. Bae, S. H., Sung, S. H., Oh, S. Y., Lim, J. M., Lee, S. K., Park, Y. N., Lee, H. E., Kang, D., and Rhee, S. G. (2013). Sestrins activate Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic degradation of Keap1 and prevent oxidative liver damage. *Cell Metab* **17**(1), 73-84.

29. Kobayashi, A., Kang, M. I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* **24**(16), 7130-9.
30. Riedemann, N. C., Guo, R. F., and Ward, P. A. (2003). The enigma of sepsis. *J Clin Invest* **112**(4), 460-7.
31. Schiodt, F. V., and Lee, W. M. (2003). Fulminant liver disease. *Clin Liver Dis* **7**(2), 331-49.
32. Matsuo, R., Ukida, M., Nishikawa, Y., Omori, N., and Tsuji, T. (1992). The role of Kupffer cells in complement activation in D-Galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatic injury of rats. *Acta Med Okayama* **46**(5), 345-54.

국문초록

TLR매개성 Sestrin2 유도발현 조절기전 연구

김 미 광

지도교수 : 기 성 환

약학과

조선대학교 대학원

Sestrin2(Sesn2)는 다양한 종류의 스트레스에 의해 유도되어 세포보호 작용을 갖은 진화적으로 잘 보존되어 있는 항산화 효소이다. Toll-like receptor(TLR) 신호 활성화가 Sesn2 유전자 발현조절 여부 및 그 분자적 기전을 규명하고자 하였다. 대표적 TLR4 ligand 인 lipopolysaccharide(LPS)는 대식세포에서 시간, 농도 의존적으로 Sesn2 단백질 발현을 유의적으로 증가시켰다. LPS 에 의한 Sesn2 mRNA 레벨과 luciferase 리포터 활성도 증가시켰다. 그러나 LPS 에 의한 Sesn1 mRNA 레벨은 영향을 받지 않았다. 다른 TLR ligand (PolyI:C or peptidoglycan)도 대식세포에서의 Sesn2 발현이 증가되었다. LPS 에 의한 Sesn2 유도는 AP-1 와 Nrf2 를 통해 전사적으로 조절되었고 c-Jun 또는 Nrf2 과발현은 Sesn2 단백질 발현과 Sesn2 Promoter-driven luciferase reporter 활성을 증가시켰다. 게다가 Sesn2 프로모터 혹은 Nrf2 knockout 에서 산화 방지제 반응 성분(ARE) 제거는 LPS 에 의해 매개된 Sesn2 의 유도를 억제시켰다. LPS 에 의한 Sesn2 의 발현 증가는 p38 및

PI3K 의존적이었다. 단백질분해효소복합체 억제제인 MG132 를 처치 하였을 때 Sesn2 단백질 분해가 확인되었다. 그러나 LPS 처치는 MG132 에 의해 유도된 Sesn2 단백질 분해를 약화시켰고, 결과적으로 Sesn2 의 축적을 야기했다. D-galactosamine(Gal)/LPS 에 의해 급성간염이 유도된 Mice 의 간에서 Sesn2 발현이 증가되었다. 또한 Sesn2 재조합 아데노바이러스 감염은 Gal/LPS 에 의해 유도된 간세포 사멸에서 현저히 억제시킴을 관찰하였다. 본 결과는 TLR 에 의해 매개된 Sesn2 유도가 AP-1, Nrf2, Ubiquitin-Proteasome System 의존적이며, 내독소 스트레스로부터 세포를 보호하는 새로운 기전임을 제시한다.