

2006年度 2月

碩士學位論文

Noxa와 Mcl-1의 상호작용이
Noxa에 의한 세포사의 조절

朝鮮大學校大學院

生物新素材學科

朴善英

Noxa와 Mcl-1의 상호작용이 Noxa에 의한 세포사 조절

**Regulation of Noxa-mediated cell death
interaction between Noxa and Mcl-1**

2006年 2月 24日

朝鮮大學校大學院
生物新素材學科
朴善英

Noxa와 Mcl-1의 상호작용이
Noxa에 의한 세포사의 조절

指導教授 김 태 형

이 論文을 理學碩士學位 論文으로 提出함.

2005 年 10 月 日

朝鮮大學校大學院

生物新素材學科

朴 善 英

朴善英의 碩士學位 論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 _____ 이병래 印

委員 朝鮮大學校 教授 _____ 김태형 印

委員 朝鮮大學校 教授 _____ 오재욱 印

2005年 11月 日

朝鮮大學校 大學院

CONTENTS

| | |
|---|----|
| I. ABSTRACT | 1 |
| II. 서론 | 3 |
| III. 실험재료 및 방법 | 8 |
| 1. 시약 | 8 |
| 2. 세포배양조건 | 8 |
| 3. Competent cell 준비 | 8 |
| 4. Transformation | 9 |
| 5. Plasmid DNA 분리 | 9 |
| 6. Expression plasmid의 transfection | 10 |
| 7. 세포용해 | 10 |
| 8. 단백질 정량 | 10 |
| 9. SDS-PAGE gel 전기영동 | 11 |
| 10. Western blotting | 11 |
| 11. Immunoprecipitation | 11 |

| | |
|--|-----------|
| IV. 결과 | 13 |
| 1. Yeast two-hybrid | 13 |
| 2. Noxa와 Mcl-1의 결합 | 16 |
| 3. Noxa에 의해 유도되는 apoptosis를 억제하는 Mcl-1 | 18 |
| 4. Mcl-1의 degradation | 21 |
| 5. Caspase에 의한 Mcl-1의 degradation | 24 |
| V. 고찰 | 26 |
| VI. 적요 | 29 |
| VII. REFERENCES | 30 |

LIST OF FIGURES

Figure 1. Schematic representation of Bcl-2 family member.

Figure 2. Yeast two hybrid screening

Figure 3. Mcl-1 interacts with Noxa

Figure 4. Mcl-1 was inhibited Noxa-induced apoptosis in HCT-116 cells

Figure 5. Degradation of Mcl-1

Figure 6. Degradation of Mcl-1 was inhibited by z-VAD-fmk

Figure 7. Schematic diagram of death signaling pathways induced by mitochondria

ABSTRACT

Regulation of Noxa-mediated cell death by interaction between Noxa and Mcl-1

Park, Sun-Young

Advisor: Prof. Kim, Tae-hyoung, Ph. D.

Department of Bio-material Engineering,

Graduate School of Chosun University

The Bcl-2 family proteins play critical roles in regulation of apoptosis, and the interaction of pro- and anti-apoptotic member is important to determine the fate of cells. Noxa belong to a Bcl-2 homology 3 (BH3)-only member of pro-apoptotic Bcl-2 family member. It has been originally identified to be upregulated by p53 in response to DNA damage. To understand the mechanism by which Noxa-induced cell death is regulated, we screened the binding partner using the yeast two hybrid screening. We found that Mcl-1 binds to Noxa. The binding of Noxa to Mcl-1 was confirmed by immunoprecipitation with anti-Mcl-1 in HCT 116 cells. Since Mcl-1 is known to inhibit cell death through

interaction with anti-apoptotic Bcl-2 family members, we investigated whether Mcl-1 can inhibit the Noxa-induced cell death. As expected, Mcl-1 significantly inhibits the Noxa-induced cell death in HCT 116 cells. To find out the mechanism, we investigated degradation of Mcl-1 by Noxa. Mcl-1 degradation was inhibited by z-VAD-fmk, a pan-caspase inhibitor. The results suggest that Mcl-1 might be a necessary event in Noxa-induced cell death.

서론

예정된 세포사인 apoptosis는 다세포 생물의 발생, 항상성 유지, 암을 방지하는데 매우 중요한 역할을 한다. Apoptosis가 진행중인 cell에서는 cell 수축, membrane blebbing, 그리고 염색질 응축과 같은 형태적인 변화를 관찰할 수 있고, 두 가지의 주된 signaling에 의해서 유도된다. 첫번째로, transmembrane의 death receptor에 특정 단백질 리간드의 결합을 통한 extrinsic pathway가 있다. 대표적인 death receptor에는 tumor necrosis factor receptor (TNFR, TNF에 대한 receptor), Fas receptor (FasR, Fas-Ligand에 대한 receptor), 그리고 TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAILR, TRAIL에 대한 receptor) 등이 있다. FasR는 FasL가 결합한 후, adaptor 단백질인 Fas-associated death domain (FADD)과 pro-cysteiny aspartate-specific proteases (caspase)-8과 함께 death-inducing signaling complex (DISC)를 형성하고, 활성화된 caspase-8은 effector caspase를 활성화시켜 apoptosis를 유도한다 (1). Caspase는 기본적으로 약 20 kDa의 large subunit과 약 10 kDa인 small subunit로 구성되어있고 initiator caspases, effector caspases 두 그룹으로 나눌 수 있다 (2). initiator caspases는 death effector domain (DED)과 caspase recruitment domain (CARD) 구성된 large pro-domain을 가지며, caspase-2, -8, -9, -10, -11, -12이 이에 속한다. Caspase-3, -6, -7이 포함된 effector caspase는 20-30개 아미노산의 short pro-domain으로 구성되어있다. Caspase는 pro-domain 내에 위치하는 특정 아미노산인 aspartate에서 절단이 일어난 후 2개의 large subunit와 2개의 small subunit가 tetramer를 형성하여 활성화 되어진다. Caspase의 활성화는 몇 가지 단백질에 의해 조절된다. Caspase-8은 DISC형성 단계에서 cellular-FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) 단백질에

의해 그 활성이 억제되고, caspase-3, -7, -9은 inhibitor of apoptosis protein (IAP)에 의해서 억제되어 활성이 조절된다 (3).

Apoptosis의 두번째 기작으로 mitochondria와 관련된 intrinsic pathway가 있다. Mitochondria는 이중막 구조로 되어있고 에너지를 생산하는 세포 내 중요기관이다. Mitochondria는 DNA damage와 같은 요인에 의해서 기능장애가 발생하게 된다. Pro-apoptotic 단백질인 Bax와 Bak, anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2와 Bcl-xL간의 균형에 의해서 mitochondria의 permeabilization이 결정된다 (4). Mitochondria의 외막에 Bax와 Bak에 의해 permeability pore가 생기게 되면 intermembrane space에서부터 cytosol로 pro-apoptotic factor인 cytochrom c, second mitochondria-derived activator of caspase (smac)/Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI (DIABLO), apoptosis-inducing factor (AIF)가 방출된다. 방출된 단백질 중 하나인 cytochrome c는 apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1), procaspase-9과 복합체 7개가 모여 apoptosome을 형성하고 이로 인해 활성화된 caspase-9은 또 다른 caspase-3, -7의 절단을 유도하여 활성화시켜서 caspase에 관련하여 apoptosis를 일으킨다. 반면에 AIF는 caspase 비의존적 기작으로써 DNA fragmentation에 의한 apoptosis를 유도한다. Mitochondria의 permeabilization은 이외에도 inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP₃)를 발생시키는 자극에 의해 생기고 (5), Bax와 Bak으로 인해서 endoplasmic reticulum (ER)로부터 mitochondria로 이동된 Ca²⁺의 증가로 인해 나타나기도 한다. Bcl-2, Bax, Bak은 세포내 중요한 secondary messenger인 Ca²⁺의 저장고인 ER내에도 위치하고 있고, mitochondria와 근접하게 위치하고 있어서 Ca²⁺이 방출되었을 때 mitochondria-ER connection에 의해서 mitochondria가 쉽게 받아들일 수 있다. 이 경우 Bcl-2 또는 Bcl-xL의 overexpression이나 Bax와 Bak의 손실로 ER 내에 있는 Ca²⁺의 농도를 감소시킬 뿐만 아니라 ER에서 mitochondria로 이동되는 Ca²⁺의 양

까지 감소시켜서 apoptosis를 억제할 수 있다 (6).

위에서 볼 수 있듯이 Bcl-2 family protein은 mitochondria 뿐만 아니라 ER에 관련된 apoptosis 기작에서 중요한 역할을 담당하고 있다. Bcl-2 family protein은 Bcl-2 homology (BH) region에 의하여 3가지 type으로 나눌 수 있다. BH region은 Bcl-2 family protein간의 protein-protein 상호작용에 관여하고, apoptosis 조절에 중요한 역할을 한다. Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-2, Mcl-1은 프로그램된 세포사를 억제하는 것으로 3-4개의 BH region, BH1-BH4를 포함하고 있고, 세포사를 촉진하는 단백질인 Bax와 Bak의 경우 BH1-BH3, 3개의 BH region을 지니고 있다. 마지막으로 BH3 region 만을 포함하고 있는 BH3-only protein 을 들 수 있다. 이 단백질에는 Bid, Bad, Bik, Puma, Noxa, Bmf, Hrk 가 있고, BH3 region이 anti-apoptotic proteins과 결합을 통해 이들을 불활성화시키거나 Bax나 Bak 단백질의 oligomerization을 일으켜 apoptosis를 촉진한다고 알려져 있다 (7). 이러한 Bcl-2 family protein 중에서 Bax와 Bak은 mitochondria와 가장 인접해있는 단백질로, Bax는 cytosol이나 mitochondria의 외막 가까이에 위치하고, Bak은 mitochondria의 외막 내에 위치한다. Caspase-8에 의한 Asp59에서의 cleavage로 활성화된 BH3 only protein인 Bid와 Bim은 cytosol에서 mitochondria 표면으로 이동한 후, Bax와 Bak의 oligomerization을 유도하고 이어서 outer membrane의 permeabilization이 일어나게 되고 cytochrome c와 같은 pro-apoptotic factor들이 방출되어 apoptosis로 이끈다. Noxa protein 역시 mitochondria에서 cytosol로 cytochrome c를 방출시키고 caspase 9을 활성화시켜 apoptosis를 유도하지만 Bak의 oligomerization은 필요치 않는다. 특히 Noxa의 BH3 domain과 mitochondrial targeting domain는 cytochrome c 방출에 필수적인 것으로 알려졌다 (8).

최근에는 종양억제 단백질인 p53이 Bcl-xL이나 Bcl-2의 DNA-binding domain에 결합하여 복합체를 형성한 후, mitochondria 외막의 permeabilization을 직접적으로 유도한다고 보고되었다 (9). 또한 p53 단백질은 전사인자로서, DNA damage, hypoxia 등과 같은 세포 스트레스에 의해 안정화되어 단백질 level이 증가하게 되면 BH3-only protein인 Noxa, puma, Bim 등의 pro-apoptotic gene의 전사를 활성화시키고 Bcl-2, IAPs의 전사를 억제시킴으로써 apoptosis에 관여한다 (10, 11, 12). Oncoprotein인 MDM2는 p53의 transactivation domain에 결합하여 전사활성을 억제하고 E3 ubiquitin ligase로서 p53의 ubiquitination, degradation을 유도해서 핵에서 cytosol로 나가게 한다. 즉, p53의 transcriptional activity에 의해서 MDM2가 발현되고, 발현된 MDM2에 의해서 p53이 감소하게 되는 negative feedback loop에 의해서 p53 단백질 자신의 안정성을 조절한다 (13). 정상세포에서 Ras와 c-myc과 같은 oncogene이 생기면 p53이 활성화되기 전에 alternative reading frame, ARF가 발현된다. P16INK4a와 함께 INK4a/ARF locus에서 암호화된 단백질 중 하나인 ARF는 종양억제 인자로서 핵 내에 위치하고 있다. ARF는 MDM2와 직접적으로 결합하여 MDM2에 의한 p53의 ubiquitination, degradation과 cytosol로 방출되는 것을 억제한다. 이 결과 p53이 핵 내에 축적되어 cell cycle arrest와 apoptosis를 유도할 수 있다 (14).

Bcl-2 family protein의 anti-apoptotic protein과 pro-apoptotic protein간의 균형과 상호작용은 apoptosis에서 매우 중요하다. anti-apoptotic protein중 하나인 Myeloid cell leukaemia-1 (Mcl-1)을 그 예로 들 수 있다. 350개의 아미노산으로 구성된 Mcl-1 protein은 다른 anti-apoptotic protein처럼 BH1-3 region을 포함하지만, BH4 region은 없다. 그리고 C-terminal에 transmembrane (TM) region이 있어 특히 mitochondria의

외막에 주로 위치해서 apoptosis 동안에 일어나는 mitochondria의 변화에 중요한 역할을 한다 (15). Mcl-1은 mitochondria로부터 cytochrome c를 방출하는 초기단계에서 이를 억제하여 cell survival을 촉진하는데, 이는 Bim, Bak과 같은 pro-apoptotic protein과의 heterodimer를 형성함으로써 이루어진다. 또한 Mcl-1의 BH1 region이 Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis)의 BH3 region과 결합하면 Mcl-1의 안정성이 증가되어 Puma에 의해 유도되는 apoptosis를 억제한다고 보고되고 있다 (16). Mcl-1은 3개의 exon으로 구성되어 있지만 alternative splicing form인 Mcl-1S/ Δ TM은 두 번째 exon이 소실되어 BH1, 2, transmembrane region이 존재하지 않는다. 이 결과, Mcl-1S/ Δ TM은 pro-apoptotic Bcl-2 family protein인 BH3-only protein과 유사한 구조를 가지게 되어 anti-apoptotic protein에서 pro-apoptotic protein으로 기능이 바뀌게 된다 (17). Mcl-1의 N-terminal에는 2개의 PEST (proline, glutamic acid, serine, threonine) region을 포함하며, 이 region에 있는 두 개의 aspartic acid (Asp127, Asp157)에서 caspase에 의한 cleavage가 주로 일어난다. 특히 Asp127에서의 cleavage로 인해 생성된 C-terminal 방향의 단백질은 세포의 apoptosis를 촉진한다.

이처럼 apoptosis에서 Bcl-2 family의 anti-apoptotic protein과 pro-apoptotic protein의 균형은 매우 중요하다. 이 논문에서는 그 중 p53의 표적 유전자인 Noxa에 결합하는 Mcl-1을 yeast two hybrid screening을 통해 찾아내었고 Mcl-1이 Noxa에 의해 유도되는 apoptosis를 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 transfection하거나 5-FU를 사용하여 Noxa의 발현을 유도했을 때 Mcl-1이 degradation되는 것을 관찰할 수 있었고, pan-caspase inhibitor인 z-VAD-fmk에 의해 억제되는 것으로 보여 caspase와 관련된 기작이라고 생각된다.

실험재료 및 방법

1. 시약과 antibodies

Anti-Mcl-1 antibody와 anti-Noxa antibody는 ONCOGENE RESEARCH PRODUCTS에서, anti-actin antibody는 CHEMICON international에서 구입하였다. 나머지 대부분의 시약은 SIGMA에서 구입하였다.

2. 세포배양조건

결장암세포인 HCT 116 세포를 10 % fetal bovine serum (FBS)가 포함된 McCoy`5A medium에서 37°C, 5 % CO₂가 있는 조건으로 배양하였다. 배지는 2-3일에 한번 교체해주었다.

3. Competent cell의 준비

E.coli DH5 α 를 사용하여 competent cell을 만들었다. LB 5ml에서 DH5 α 를 37°C에서 15시간 진탕배양한 후 LB 배지 200 ml에 100배로 희석하여 넣고 600 nm에서 OD 0.35 - 0.5가 될 때까지 진탕배양한다. 4°C에서 2700 rpm으로 7분 동안 원심분리하여 상층액을 완전히 제거하고 얼음에 넣어둔 CaCl₂ 용액 (60 mM CaCl₂, 15 % Glycerol, 10 mM PIPES) 1 ml을 이용하여 현탁한 후 50 ml의 CaCl₂ 용액을 다시 첨가하여 얼음에서 30분 동안 방치한다. 원심분리에 의해서 상층액을 모두 제거하고 pellet 크기에 적당한 양의 CaCl₂ 용액을 첨가하여 현탁한 후 1.5 ml tube에 100 μ l씩 분주하여 -70°C에서 보관한다.

4. Transformation

준비된 competent cell 100 μ l에 DNA를 넣고 조심스레 섞어준 다음 얼음에서 30분 동안 정치한다. 42°C에서 90초 동안 heat shock을 준 뒤 얼음에서 2분 정도 정치한다. Tube에 LB배지 1 ml을 첨가하여 37°C incubator에서 45분 동안 반응시킨다. 배양한 세포를 원심분리하여 100 μ l를 제외한 상층액을 모두 제거한다. 세포를 현탁시킨 후 ampiciline 이나 kanamycine을 첨가하여 만든 LB 고체배지에 도말하여 37°C incubator에서 15시간 정도 키운다.

5. Plasmid DNA 분리

37°C 에서 진탕배양한 세포를 1.5 ml tube에 넣고 원심분리하여 cell을 침전시킨 뒤 상층액을 완전히 제거한다. Pellet에 solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA) 100 μ l를 첨가하여 현탁시키고 0.2 N NaOH 와 1 % SDS가 포함된 solution II 200 μ l를 넣고 5차례 조심스레 섞어주고 4분 동안 얼음에서 방치한다. Solution III (5 M potassium acetate, glacial acetic acid) 150 μ l를 넣고 얼음에서 5분 방치한다. 13000 rpm에서 10분 동안 원심분리해서 상층액만을 새로운 tube에 분리하고 상층액과 동량의 phenol : chloroform을 넣고 vortex에 의해 잘 섞어준 후 4°C, 13000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 분리한다. 상층액 2배 volume의 100 % Ethanol을 넣고 다시 원심분리하여 DNA를 침전시킨다. 상층액을 제거하고 실온에 보관된 70 % Ethanol 500 μ l를 첨가한 후 원심분리하여 상층액을 완전히 제거하고 실온에서 건조시킨다. Ethanol이 모두 제거되면 멸균된 물이나 TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 50 μ l로 DNA를 녹인다.

6. Expression plasmid의 transfection

plasmid의 transfection은 effectene transfection reagent (Qiagen, Chatsorth, CA)을 사용하여 수행하였다. HCT 116 cells ($2.0-8.0 \times 10^4$)을 transfection하기 하루 전에 24well plate에 seeding한다. 1.5 ml eppendorf tube에 $0.5\mu\text{g}$ Noxa (1-54) 또는 Mcl-1의 플라스미드와 EC buffer, enhancer를 넣고 1초 동안 vortex를 이용하여 섞어준다. 실온에서 2-5분간 반응시킨 후 Effectene reagent를 넣고 10초간 vortexing하고 실온에서 5-10분간 반응시켰다. 여기에 McCoy`5A medium (10 % FBS 포함) $350\ \mu\text{l}$ 를 넣고 2번 정도 pipetting한 후 새로운 medium으로 교체된 cell에 넣어주고 37°C , 5 % CO_2 incubator에서 24시간 동안 culture한 뒤 microscope (Leica)를 통해 관찰하였다.

7. 세포용해

Cell의 media를 제거한 후 1 X phosphate buffered saline (PBS, NaCl, KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , KCl, pH7.4)로 씻어준다. Protease inhibitor (Aprotinin, pepstatin A, phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)가 포함된 1 X RIPA buffer (1 % NP-40, 0.5 % Sodium Deoxycholic acid, 0.1 % SDS, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl)를 이용하여 4°C 에서 30분 동안 반응시켜서 lysis한 후 13000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상층액만을 얻어낸다.

8. 단백질 정량

분리된 단백질은 Bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent A, B (PIERCE, Rockford, IL)를 50:1의 비율로 섞은 solution에 넣어 37°C 에서 20분 동안 반응시킨 후 OD 540에서 측정하여 정량 하였다. Protein standard로는 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였다.

9. SDS-PAGE gel 전기영동

Acrylamide solution (Acrylamide, N,N'-Methylenbis acrylamide), Tris buffer, SDS, APS TEMED가 포함된 15 % SDS-PAGE gel에 protein marker (Bio-Rad, Hercules, CA) 와 100℃에서 5분 동안 끓인 protein sample을 loading하고, 1 X running buffer (Tris, glycine, SDS, pH8.3)을 이용하여 전기영동을 하였다.

10. Western blotting

원하는 단백질만을 검출하기 위하여 western blotting을 수행하였다. 전기영동한 gel을 4℃에서 0.2 A로 약 12시간 동안 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad)에 transfer하였다. Membrane은 5 % skim milk가 들어있는 1X TBS-T buffef (Tris, Nacl, 0.05 % Tween 20, pH7.6) 사용하여 1시간 동안 실온에서 blocking시킨 후 anti-Mcl-1 antibody, anti-Noxa antibody, anti-β actin antibody 등에 반응시킨다. 두 시간 후 1 X TBS-T buffer로 10분씩 3번 씻어주고, secondary antibody인 anti-mouse antibody에 한 시간 동안 둔다. 1 X TBS-T buffer로 10분씩 3번 씻은 뒤 ECL (enhanced chemiluminescence) solution A (250 mM luminol, 90 mM P-coumaric acid, 1 M Tris-Cl, pH 8.5)와 solution B (30 % H₂O₂, 1M Tris-Cl, pH 8.5)를 사용하여 film에 현상한다.

11. Immunoprecipitation

1 X RIPA buffer에 의해 분리된 단백질을 anti-Mcl-1 antibody와 함께 4℃에서 한 시간 동안 반응시키고 protein A bead (PIERCE)를 첨가한 후 4℃, rocking platform에서 한 시간 반응시켰다. 원심분리에 의해 상층액을 제거하고 1 X RIPA buffer로 bead를 3번 씻어준 후, SDS-PAGE gel loading buffer (200 mM Tris-HCl, 400 mM DTT,

8 % SDS, 0.4 % bromophenol blue, 40 % Glycerol, 2 % 2-mercaptoethanol)를 첨가하여 100℃에서 5분간 끓인다. 15 % SDS-PAGE gel에 전기영동한 후 anti-Noxa antibody 와 anti-Mcl-1 antibody를 이용하여 Mcl-1과 Noxa가 결합한 것을 확인하였다.

결과

1. Yeast two-hybrid screening

Bcl-2 family protein은 Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1과 같은 anti-apoptotic protein과 BH1, 2, 3로 구성된 pro-apoptotic protein, 그리고 BH3 region만을 포함하고 있는 Bid, Noxa, Puma와 같은 pro-apoptotic BH3 only protein으로 나눌 수 있다 (Fig. 1). BH region은 Bcl-2 family protein 간의 상호작용에 관련되고, 특히 BH3 region은 세포사를 촉진하는 역할을 하는 것으로 알려졌다. Bcl-2 family protein의 anti-apoptotic protein과 pro-apoptotic protein의 균형은 apoptosis를 조절하는데 매우 중요하다. 이 논문에서는 pro-apoptotic protein중 하나인 Noxa에 의한 세포사를 어떻게 조절하는지에 관한 실험을 하였다. 먼저 yeast two-hybrid system을 통해 Noxa와 결합하는 유전자를 찾아보았다 (Fig. 2). DNA-binding domain (BD)을 포함하고 Noxa를 cloning한 pGBT9 vector와 activation domain (AD)과 human liver cDNA library를 가지는 pACT2 vector를 사용하여 실험한 결과 Mcl-1과 A1이 Noxa와 결합하고 있다는 것을 알았다. 이중에서 anti-apoptotic protein인 Mcl-1과 Noxa와의 관계에 대해 알아보았다.

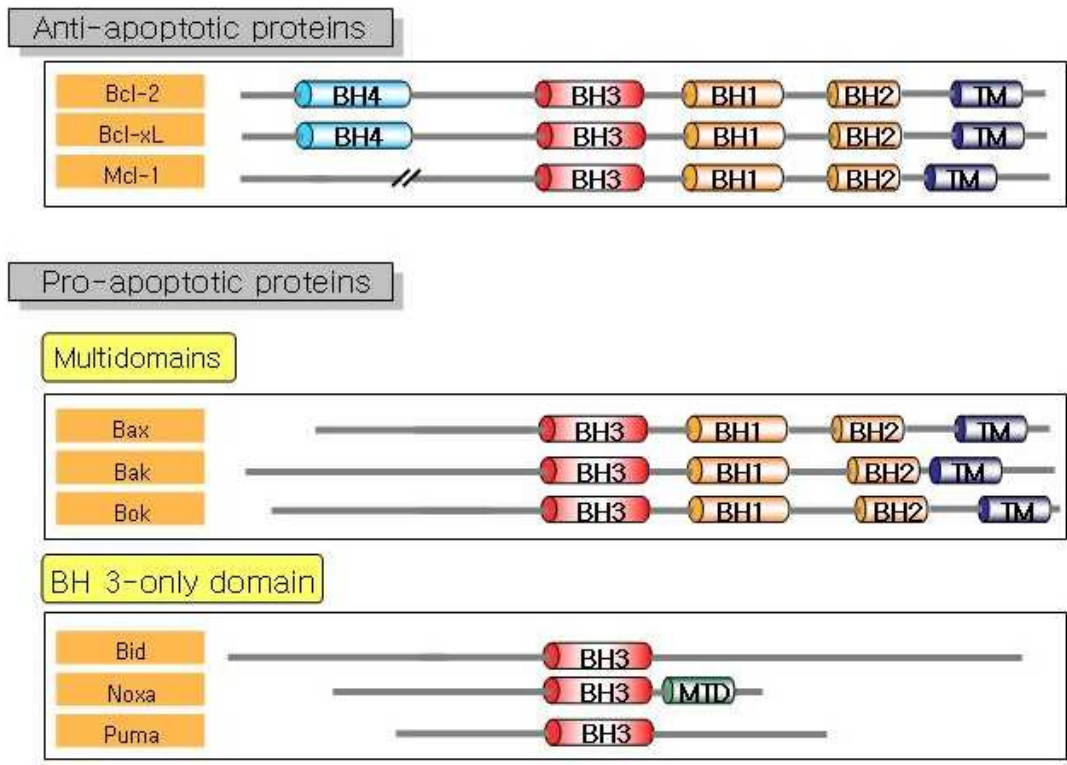
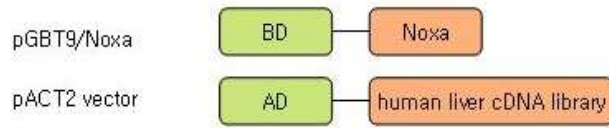


Figure 1. Schematic representation of Bcl-2 family members.

Bcl-2 family proteins are composed with three subfamilies. There are anti-apoptotic subfamily, pro-apoptotic multidomain and pro-apoptotic BH3-only domain subfamily.

(A)



(B)

pACT2 vector sequences

```
TGGCTTACCCATACCGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCAATGGCCATGGAG GCC CCG
GGG ATC CGA ATT CGC GGC CGC GTC GAC CGC GTG AGC GAG GCG GTT AAG AGC TCC GGA
GCT GAC GGC TCG CTG CCC TCC ACG CCG CCG CCT GAG GAG GAA GAC GAC GAG CTG
TAC CGC CAG TCG CTG GAG ATC ATC TCC CGC TAC CTG CCG GAG CAG GCG ACG GGC TCC
AAG GAC GCG AAG CCT CTG GGC GAG GCC GGC GCA GCG GGC CCG AGG GCG CTG GAG ACC
CTG CCG CCG GTG GGC GAC GGC GTG CAG CCG AAC CAC GAG ACG GCC TTC CAG GGC ATG
CTT CCG AAA CTG GAC ATT AAA AAC GAG GAC GAT GTT AAA TCT TTT TCT CGA GTG ATG
ACC CAT GTT TTC AAA GAT GGC GTA ACA AAC TGG GGC AGG ATT GTG ACT CTT ATT TCT
TTT GGC GCC TTT GTG GCC AAA CAC TTA AAG AGC ATA AAC CAA GAA AGC TGC ATC GAA
CCT TTA GCA GAA AGT ATC ACA GAC GTT CTT GTA AGG ACC AAA CCG GAC TTG GTT GTG
```

Mcl-1 sequences

Figure 2. Yeast two-hybrid screening

(A) Full-length of Noxa has been used as a bait, and cDNA library from human liver were screened in Yeast.

(B) Plasmid DNA from a positive clone was sequenced.

2. Noxa와 Mcl-1의 결합

Mammalian cell에서도 Noxa와 Mcl-1이 결합하는 지를 확인하기 위해 immunoprecipitation 실험을 실행하였다. HCT 116 cell에 GFP-Noxa plasmid를 transfection한 후 anti-Mcl-1 antibody를 이용하여 immunoprecipitation을 하였다. Anti-Noxa antibody와 anti-Mcl-1 antibody에 대한 western blotting을 한 결과 Noxa와 Mcl-1이 결합한다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

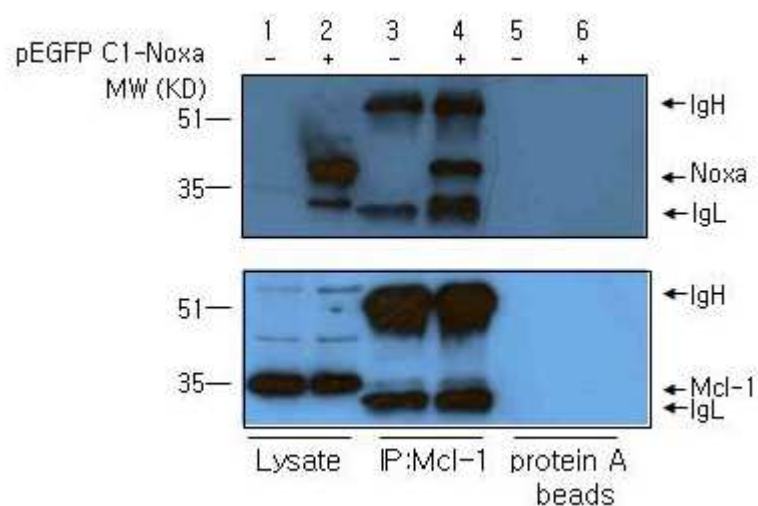
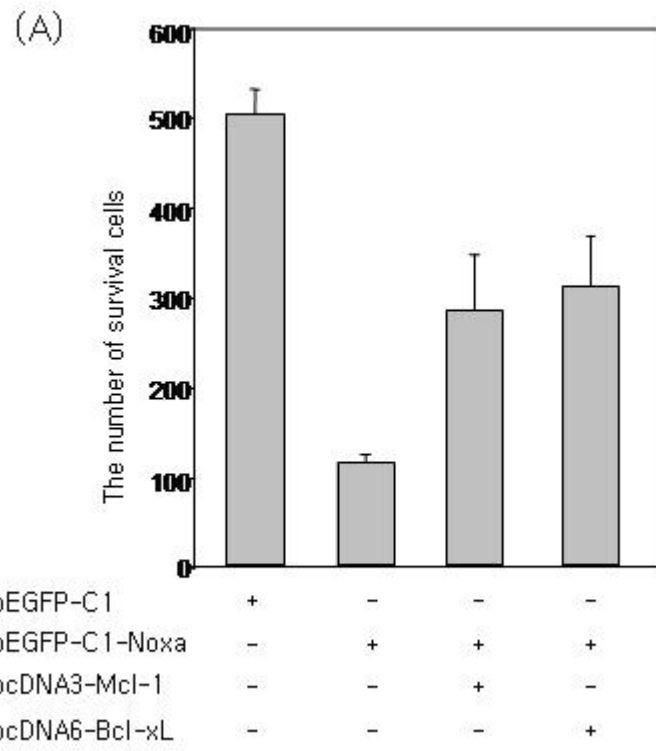


Figure 3. Mcl-1 interacts with Noxa

HCT 116 cells in 100 mm dish (2.0×10^6 cells) were transfected with pEGFP C1-Noxa by Effectene transfection kit. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Mcl-1 antibody and protein A beads. Protein samples were analysed by 15 % SDS-PAGE, and then detected Noxa by western blotting of anti-Noxa antibody.

3. Noxa에 의해 유도되는 apoptosis를 억제하는 Mcl-1

Mcl-1과 Noxa의 결합이 cell에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 HCT 116 cell에 Mcl-1과 Noxa를 co-transfection시켰다 (Fig. 4A). Noxa만을 transfection한 cell은 pEGFP C1 vector만을 transfection cell에 비해 많이 죽은 것을 확인하였고, Noxa와 Mcl-1을 같이 transfection했을 경우 살아있는 세포의 수가 많이 증가한 것을 볼 수 있었다. 마지막 lane에서는 또 다른 anti-apoptotic protein인 Bcl-xL을 Noxa와 함께 cell에 transfection한 결과 Mcl-1과 비슷하게 apoptosis가 일어났다. Noxa에 의해 유도되는 apoptosis가 Mcl-1에 의해 억제된다는 것을 재확인하기 위해 일정한 농도의 Noxa와 다양한 농도의 Mcl-1을 co-transfection하였을 때 상대적인 세포사 비율을 관찰하였다 (Fig. 4B). 그 결과 Noxa에 대한 Mcl-1의 농도가 증가할수록 세포사 비율이 줄어드는 것을 볼 수 있었다. Fig. 4C에서는 Noxa, Mcl-1과 함께 renilla luciferase reporter vector인 pRL-CMV vector와 pGL2 promotor를 transfection하여 luciferase를 이용한 promoter assay를 하였다. 여기에서도 위의 실험과 같은 결과가 나왔다. 위 실험들을 통하여 Mcl-1이 Noxa에 의해 유도되는 apoptosis를 억제함을 알 수 있었다.



(B)

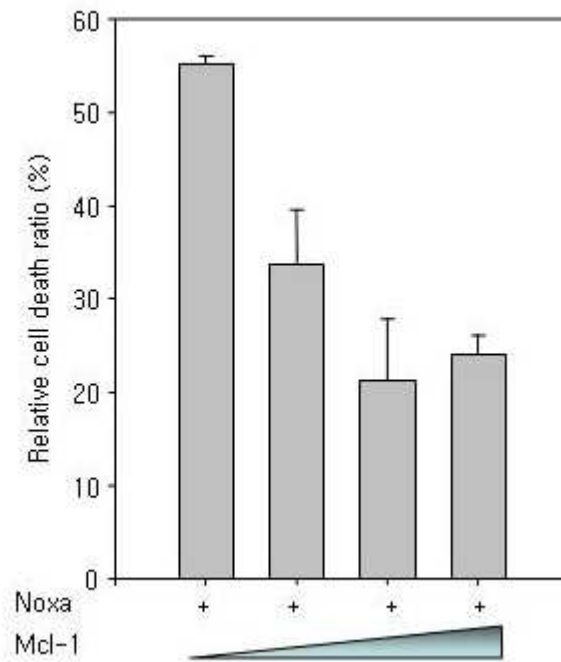


Figure 4. Mcl-1 inhibits Noxa-induced apoptosis in HCT 116 cells

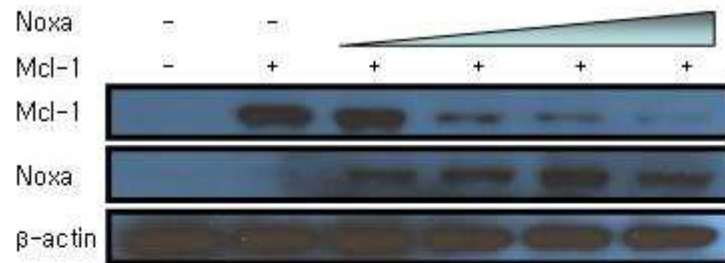
(A) HCT 116 cells were transfected with control vector, pEGFP vector containing Noxa, Mcl-1, or Bcl-xL. After 30 hours of transfection, survival cells that expressed EGFP were counted.

(B) HCT 116 cells were transiently transfected with 0.5 μg of pEGFP-Noxa and increasing doses of Mcl-1 (0.2, 0.4, and 0.6 μg). After 30 hours of transfection, relative cell death was counted as the ratio propidium iodide (PI)-positive cells to the EGFP expressing cells.

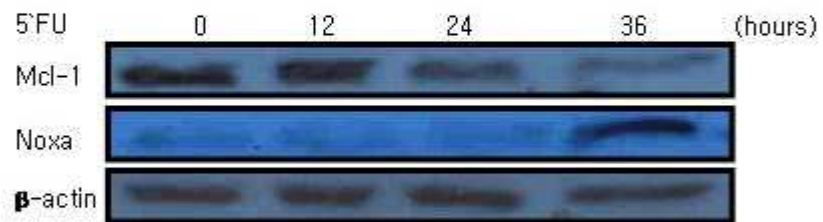
4. Mcl-1의 degradation

Mcl-1과 Noxa가 결합하여 Noxa에 의해 유도되는 세포사를 억제하는 동안 Mcl-1과 Noxa protein의 변화를 알아보기 위해 western blotting을 수행하였다. HCT 116 cell에 일정한 양의 Mcl-1과 다양한 양의 Noxa plasmid를 함께 transfection한 후 anti-Mcl-1 antibody를 이용하여 western blotting을 수행하였다. 그림 5A에서 보는 것 처럼, Noxa가 증가할수록 Mcl-1이 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 즉, 위 실험에서는 exogenous Mcl-1 protein이 Noxa에 의존적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. endogenous Mcl-1의 변화를 알아보기 위해 HCT 116 wild type (WT)과 p53^{-/-} cell에 각각 5-fluorouracil (5-FU)를 처리한 후 시간 별로 관찰하였다 (Fig. 5B,C). 5-FU는 DNA damage를 일으켜 p53의 level을 증가시키고 이로 인해 Noxa의 전사를 활성화시킨다고 알려져 있다. WT cell에서는 5-FU 처리 후 36시간 뒤부터 Mcl-1 protein이 감소하고 있음을 확인하였으나 p53^{-/-} cell의 경우는 아무런 변화가 관찰되지 않았다. 결론적으로 p53에 의해 유도되는 protein인 Noxa에 의해 Mcl-1의 degradation이 일어난다고 생각된다.

(A)



(B) HCT 116 WT



(C) HCT 116 p53^{-/-}

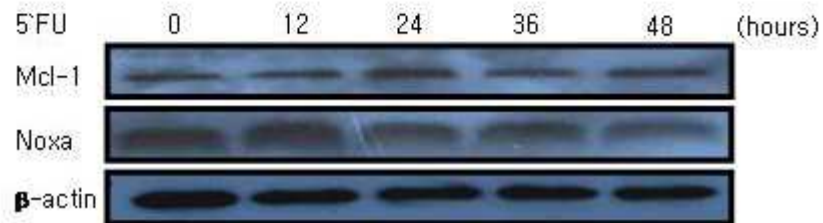


Figure 5. Degradation of Mcl-1

- (A) HCT 116 cells were co-transfected with increasing doses of Noxa (0, 0.2, 0.4, 0.6, and 0.8 μg) and 0.5 μg of Mcl-1 construct for 24 hours. Then, lysates were subjected to western blot analysis using anti-Mcl-1 and anti-Noxa antibodies.
- (B) After treated various times (0, 12, 24, 36 and 48 hours) of 5`FU (200 ug/ml) in wild type HCT 116 cells, the cells lysate were separated by 15 % SDS-PAGE. Proteins blotted on PVDF membrane were detected with anti-Mcl-1 antibody and anti- β -actin antibody.
- (C) HCT 116 p53^{-/-} cells were treated with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 5`FU. Western blotting analysis were carried out as mentioned in (B).

5. caspase에 의한 Mcl-1의 degradation

Mcl-1의 PEST region에 있는 Asp127과 Asp157에서 caspase에 의해 cleavage가 일어난다고 보고 되어 있다. 그래서 Noxa와 결합하는 Mcl-1의 degradation도 caspase와 관련된 것인가를 확인하기 위해 caspase inhibitor인 z-VAD-fmk를 처리하였다 (Fig. 6). HCT 116 cell에 z-VAD-fmk를 처리한 후 Mcl-1 0.5 μ g과 0.2 μ g, 0.6 μ g의 hNoxa를 각각 transfection하였다 (lane 5,6,7). z-VAD-fmk를 처리한 경우 처리하지 않은 것 (lane 2,3,4)에 비하여 Mcl-1의 degradation이 감소되는 것으로 보여 Noxa와 관련된 Mcl-1의 degradation이 caspase에 의한 기작으로 생각된다.

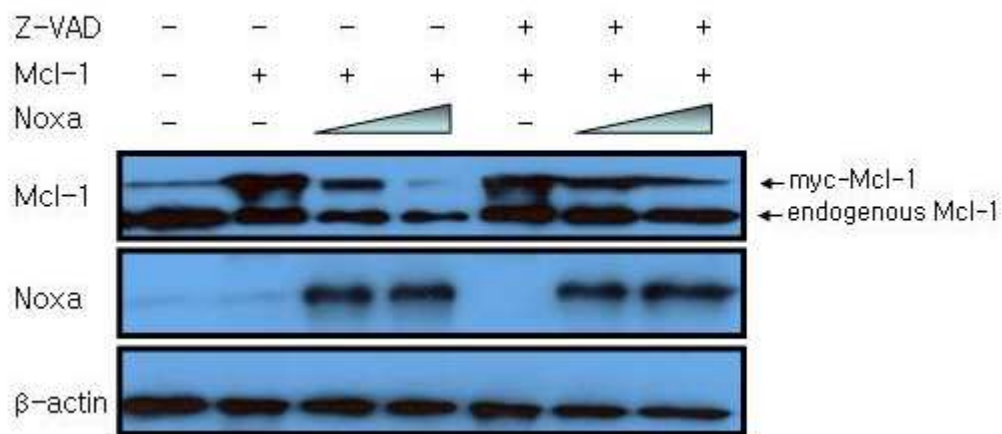


Figure 6. Degradation of Mcl-1 was inhibited by z-VAD-fmk

HCT 116 cells were transiently transfected with 0.5 μ g of Mcl-1 and various doses of Noxa (0.2, 0.6 μ g) with or without z-VAD-fmk (100 μ M). Lysate proteins were analyzed by western blotting with anti-Mcl-1 antibody, anti-Noxa antibody, and anti- β -actin antibody.

고찰

p53 target 유전자인 Noxa 단백질은 Bcl-2 family protein 중 BH3 only protein으로 mitochondria의 기능장애를 유발해서 apoptosis를 일으키는 중요한 역할을 한다. Proapoptotic- protein인 Noxa와 관련된 단백질을 찾기 위해 Yeast two hybrid를 수행한 결과 Noxa와 Mcl-1이 결합한다는 것을 확인하였다. Mcl-1은 mitochondria에 위치하는 Bcl-2 family protein으로 cytochrome c 방출과 caspase활성화를 억제하여 apoptosis를 억제한다. Bcl-2 family protein의 anti-apoptotic protein과 pro-apoptotic protein의 상관관계는 apoptosis에 매우 중요하기 때문에 Noxa와 Mcl-1의 관계를 연구하였다. Noxa와 Mcl-1을 co-transfection시키거나 5-FU를 처리하여 Noxa의 발현을 유도하여 Mcl-1을 관찰한 결과 degradation되는 것을 관찰할 수 있었다. 최근 Mcl-1 cleavage에 대한 논문이 많이 발표되고 있다. TRAIL이나 FAS ligand에 의한 apoptosis에서 caspase에 의해 Mcl-1의 PEST region에 위치하고 있는 Asp127과 Asp157에서 cleavage가 주로 일어난다 (18). 그리고 caspase에 의해 절단된 Mcl-1의 C-terminal region은 apoptosis를 유도하는 것으로 그 기능이 변하게 된다. 하지만 이 실험에서는 Mcl-1이 Noxa와 결합한 후 degradation은 일어났으나 오히려 Noxa에 의해 유도되는 apoptosis를 억제하는 것으로 보여졌다. 이와는 달리 Ultraviolet (UV)에 노출되면 Mcl-1이 proteasome에 의해서 빠르게 degradation되고 이로 인해 mitochondria에서 cytochrome c가 방출되어 apoptosis가 일어난다 (19). 그리고 최근 연구에 의하면 ARF binding protein인 Mule (Mcl-1 ubiquitin ligase E3)/ARF-BP1이 Mcl-1의 polyubiquitination을 유도하여 apoptosis를 조절한다고 알려져 있다 (20, 21). HCT 116 cell에 proteasome inhibitor인 MG132를 처리하여

proteasome이 Mcl-1 degradation에 미치는 영향을 관찰하고자 하였으나 MG132가 cell에 toxic하여 이를 보기가 어려웠다. 하지만 caspase inhibitor인 z-VAD-fmk를 처리했을 때 Mcl-1의 degradation이 억제됨을 확인하여 Noxa에 의한 Mcl-1의 degradation은 caspase관련 pathway라고 생각된다.

앞으로 Mcl-1과 Noxa가 결합하는 각각의 정확한 site를 찾아내는 실험을 수행해야한다. 또한 Noxa와 Mule/ARF-BP1의 상호관계에 의한 Mcl-1의 degradation에 관한 연구도 수행하여야 한다.

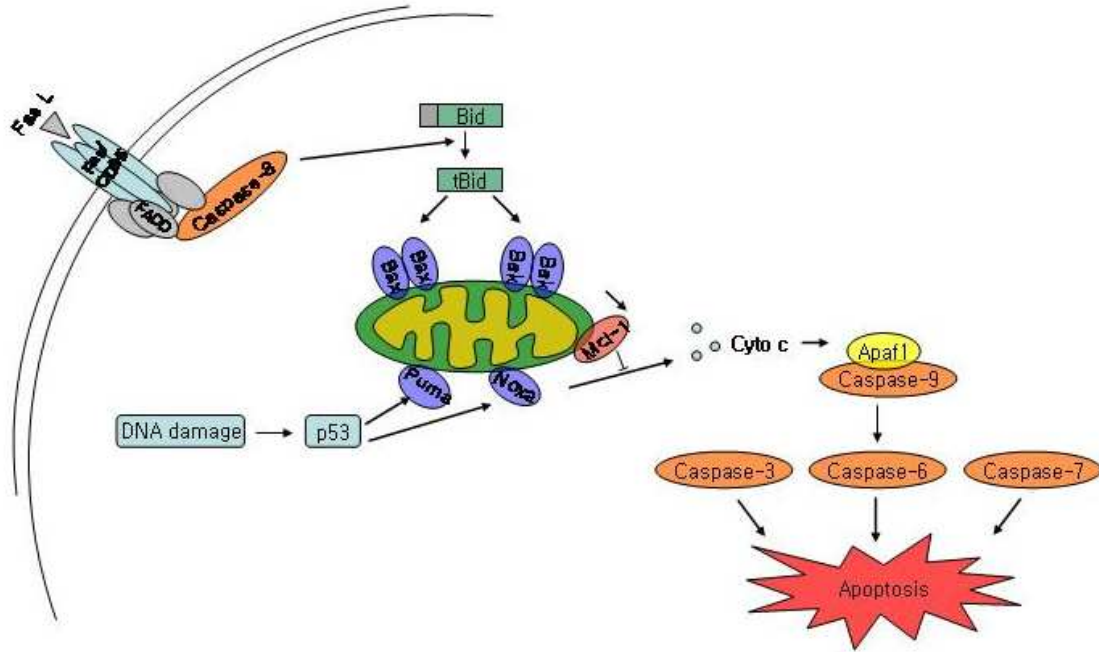


Figure 7. Schematic diagram of death signaling pathways induced by mitochondria

적요

Bcl-2 family protein의 anti-apoptotic protein과 pro-apoptotic protein의 균형은 세포사를 결정짓는 데 있어서 매우 중요한 역할을 한다. Pro-apoptotic Bcl-2 family member중 Bcl-2 homology 3 (BH 3) only protein에 속하는 Noxa는 DNA damage에 반응하는 p53에 의해 유도된다. Noxa에 의해 유도되는 세포사의 기작을 알기 위해 Yeast two hybrid screening을 통해 Noxa와 anti-apoptotic protein인 Mcl-1이 결합한다는 것을 찾았고, HCT 116 cells에서의 immunoprecipitation으로 재확인하였다. Mcl-1이 pro-apoptotic protein과의 상호작용으로 세포사를 억제한다고 알려져 있기 때문에 Noxa에 의한 세포사를 억제할 수 있을 거라고 예상했다. 예상대로 Mcl-1에 의해 Noxa에 의해 유도되는 세포사가 억제되는 것을 확인하였다. Mammalian cells에 transfection하거나 p53반응을 유도하는 5-FU를 처리하여 Noxa의 발현을 유도한 후 Mcl-1을 관찰한 결과 degradation되었음을 볼 수 있었다. Pan-caspase inhibitor인 z-VAD-fmk를 처리했을 때 Mcl-1의 degradation이 억제되는 것으로 보여 caspase와 관련된 기작이라 생각된다.

REFERENCE

1. Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., and Peter M. E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1(Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14: 5579-5588.
2. Nancy A. Thornberry, Yuri Lazebnik (1998) Caspases: Enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
3. Inna N. Lavrik, Alexander Golks, and Peter H. Krammer (2005) Caspase: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* 115: 2665-2672.
4. Shigeomi Shimizu, Masashi Narita, Yoshihide Tsujimoto (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399: 483-487.
5. Rosario Rizzuto, Marisa Brini, Marta Murgia, Tullio Pozzan (1993) Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262: 744-747.
6. Oakes SA, Opferman JT, Pozzan T, Korsmeyer SJ, Scorrano L (2003) Regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} dynamics by proapoptotic Bcl-2 family members. *Biochem Pharmacol* 66: 1335.

7. Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T, Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1996) BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev.* 10: 2859-2869.

8. Young-Woo Seo, Jin Na Shin, Kang Hee Ko, Jong Hee Cha, Jae Yoon Park, Byoung Rai Lee, Cheol-Won Yun, Young Myeong Kim, Dai-Wu Seol, Dong-Wook Kim, Wiao-Ming Yin, and Tae-hyoung Kim (2003) The molecular mechanism of Noxa-induced mitochondrial dysfunction in p53-mediated cell death. *J.Biol.Chem.* 278: 48292-48299.

9. Motohiro Mihara, Susan Erster, Alexander Zaika, Oleksi Petrenko, Thomas Chittenden, Petr Pancoska, and Ute M. Moll (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. cell* 11: 522-590.

10. Bert Vogelstein, David Lane, Arnold J. Levine (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310

11. Katsunori Nakano and Karen H. Vousden (2001) PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Mol. Cell* 7: 683-694.

12. Eri Oda, Rieko Ohki, Hideki Murasawa, Jiro Nemoto, Tsukasa Shibue, Toshiharu Yamashita, Takashi Tokino, Tadatsugu Taniguchi, and Nobuyuki Tanaka (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288: 1053-1058.

13. David P. Lane and Peter A. Hall (1997) MDM2-arbiter of p53's destruction. *Trends.Biochem.Sci.* 22: 372-374.

14. Pomerantz J., SchreiberAgus N., Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, CordonCardo C, and Depinho RA. (1998) The *Ink4a* Tumor Suppressor Gene Product, p19^{Arf}, Interacts with MDM2 and Neutralizes MDM2's Inhibition of p53. *Cell* 92: 713-723.

15. T Yang, KM Kozopas and RW Craig (1995) The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J.Cell Biol.* 128: 1173-1184.

16. Yide Mei, Wenjing Du, Yonghui Yang, Mian Wu (2005) Puma*Mcl-1 interaction is not sufficient to prevent rapid degradation of Mcl-1. *oncogene* 24: 7224-7237

17. Colin D. Bingle, Ruth W. Craig, Brenka M. Swales, Vanessa Singleton, Ping Zhou, and Moira K. B. Whyte (2000) Exon skipping in Mcl-1 results in a Bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J.Biol.Chem.* 275: 22136-22146.

18. Changjiang Weng, Yuan Li, Dan Xu, Yong Shi, and Hong Tang (2005) Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in jurkat leukemia T cells. *J.Biol.Chem.* 280: 10491-10500.

19. Deepak Nijhawan, Min Fang, Elie Traer, Qing Zhong, Wenhua Gao, Fenghe Du, and Xiaodong Wang (2003) Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* 17: 1475-1486.

20. Qing Zhong, Wenhua Gao, Fenghe Du, and Xiadong Wang (2005) Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 121: 1085-1095.

21. Delin Chen, Ning Kon, Muyang Li, Wenzhu Zhang, and Wei Gu (2005) ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 121: 1071-1083.