

Cell Cycle, Cell Death and Apoptosis

원자력병원 방사선영향연구실 선임연구원

이 수 재

Cell Cycle

세포의 자기 복제 과정은 세포주기라는 복잡한 조절과정을 거쳐 그 과정을 다시 진행하고 반복할 수 있는 모세포와 아주 닮은 딸세포를 만들도록 조절된 특이적인 조절 network으로 이루어진 분자생물학적 산물이라고 말할 수 있다.

세포주기는 네 가지 phase로 나누어져 있는데, 염색체의 복제가 일어나는 S phase, 염색체의 응축과 분리가 일어나는 M phase, M phase와 S phase 사이에 존재하는 G1 phase 그리고 S phase와 M phase 사이에 놓여있는 G2 phase로 구분된다. 한 phase에서 다른 phase로의 세포주기의 진행은 한 과정이 완전히 성공적으로 완료되어질 때까지 다른 과정의 수행이 방지되어지는 정밀한 순서로 이루어져 있는 조절 기전에 의해 일어나는데, 예를 들어, 염색체의 복제는 세포에서 mitosis가 완전히 종료될 때까지 일어날 수 없고1), mitosis는 염색체 복제가 종료될 때까지 일어날 수 없다2). 이처럼 하나의 세포주기 진행과정은 다른 과정의 완료에 의존하여 나타나는데 이것을 'checkpoint' 라고 부른다3). Checkpoints는 세포주기의 진행을 위하여 반드시 만족되어야 하는 세포 내적인 조건들의 set으로 여겨진다. 세포주기의 진행과정 동안 많은 checkpoints가 존재하는데, 이것들이 독특한 세포주기 진행과정의 수행을 모니터링 한다 (DNA synthesis, spindle assembly, DNA repair 등). 즉, checkpoints는 수정 보완되지 않은 에러가 존재할 때 세포주기를 멈추게 함으로써 궁극적으로 나타나는 세포의 복제 과정 중의 돌이킬 수 없는 에러에 대항하는 safeguard로써 작용하는 것이다.

Hormone이나 growth factor 같은 외부 신호들은 주로 세포주기의 G1 phase를 통하여 세포의 증식을 조절한다. 예를 들어, 동물세포는 S phase로 들어가기 2시간 전까지 growth factor들이 요구되는데 세포가 일단 어떤 point를 지나게되면 그 세포들은 growth factor의 존재 여부와는 관계없이 세포주기의 진행을 종료할 수 있다4). 동물세포에서 외부 신호에 관계없이 세포주기의 진행이 가능하게 되는 이러한 point를 'restriction point' 라고 한다. Single organism에서는 외부 영양상태에 따라 동물세포와 유사하게 G1 phase를 통하여 세포의 증식을 조절하는데 예를 들어 'Start' 라고 불리는 효모에서의 세포주기의 진행으로 들어가는 point는 동물세포에서의 'restriction point'와 아주 유사하게 작용한다5). 더구나 restriction point를 조절하는 molecule들 또한 Start를 control 하는 molecule들과 아주 유사하다. 이처럼, 세포주기를 조절하는 요소들은 다양하지만 진화과정을 통하여 극도로 보존적인 것으로 알려져 있다.

이처럼 세포주기는 외부환경과 세포의 상태에 따른 'restriction point'와 다양한 'check points'의 조절을 통하여 진행되고, 이들 각 'points'의 조절 또한 복잡하고 다양한 분자들의 발현과 활성에 의존하여 이루어진다. 따라서 본 review에서는 포유동물세포의 세포주기 조절에 관여하는 다양한 분자들의 기능과 역할에 대하여 간략하게 언급하고자 한다.

Cyclins

동물세포의 세포주기 진행을 위해서는 growth factor나 mitogen등의 세포 외부의 자극이 필요하다. 휴지상태 (quiescent stage)의 세포가 Growth factor

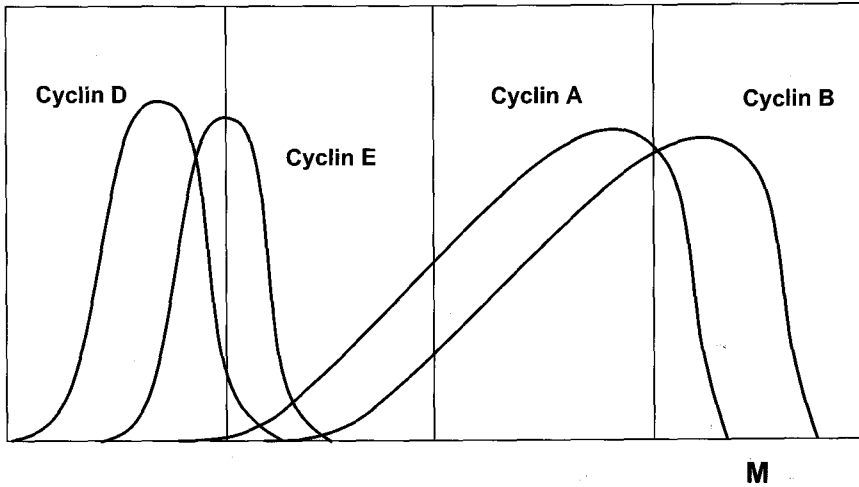


그림 1. 세포주기에 따른 cyclins의 발현

등의 첨가로 인하여 세포주기의 진행이 자극되면 mid G1에서 D-type cyclins (cyclin D1, D2, D3), late G1 동안에는 cyclin E, S phase 동안에는 cyclin A 그리고 G2와 mitosis 동안에는 B-type cyclin이 각각 강하게 발현되어진다 (Fig. 1). 세포주기의 특이적인 시기에 발현되어진 cyclins들은 세포주기의 변화에 큰 영향을 받지 않고 항상 일정한 양으로 발현되어지는 cyclin-dependent kinases (CDKs)들과 특이적으로 결합하여 CDKs의 효소 기능을 조절함으로써 세포주기진행에 그 역할을 한다. 앞에서 언급한 대로 이러한 cyclin들의 파트너인 CDKs는 항상 일정한 양이 안정한 상태로 발현되어져 존재하는데 간혹 growth factor의 자극에 의해 그 발현이 약간의 영향을 받기도 하는 것으로 알려져 있다.

Cyclin-dependent Kinases (CDKs)

세포주기 조절 기전에 관한 연구는 효모에 대한 유전학적 연구로부터 시작되었다. Hartwell 등은 효모에서의 Start transition의 조절이 cdc28 유전자의 산물에 의해 일어난다는 것을 보였고, Nurse 등은 G2에서 M phase로의 세포주기의 진행이 cdc2 유전자의 산물에 의해 조절되어진다는 것을 증명하였다. 또한 Xenopus oocyte의 연구에서 meiotic 세포주기의 진행을 자극하는 주기성을 가진 단백질 인자의 본질을 발견하였는데, 이 단백질을 ‘maturation-promoting factor’ (MPF), 또는 후에 이 단백질의 세포주기에서

의 역할을 감안하여 ‘mitosis-promoting factor’ 라고 한다. MPF의 주기적 활성은 oocyte의 meiosis과정 중 G2로부터 M phase로의 진행에 필수적인 것이지만 anaphase와 cytokinesis 동안에는 반드시 불 활성화 되어져야한다.

cdc2/cdc28 유전자는 32-34kd 크기의 단백질을 encode하고 있다. 포유동물 세포의 유전자에는 약 10 여개 이상의 cdc2/cdc28 family가 존재하는데, 그 중 최소한 4개는 세포주기의 각 단계에서 중요한 작용을 하는 것으로 보여진다. 이 유전자 family의 산물들은 그들이 활성을 갖기 위해서는 반드시 cyclin subunit와 holoenzyme으로 assembly 되어져야 하기 때문에 cyclin-dependent kinases (CDKs) 라고 명명되었다 (Fig. 2). 포유동물세포에서 이들 family 중 CDK2, 4, 6는 모두 G1이나 S phase에서 역할을 하는 반면 Cdc2는 다른 CDK들과는 달리 mitosis에서 그 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

MPF의 주기적 활성은 세포주기동안 그 양이나 활성이 변화하는 MPF의 요소 (cyclin)가 발견되면서 설명 가능하게 되었다. MPF cyclin (cyclin B)은 세포를 mitosis로 인도하는데 있어서 만 역할을 하는 반면, 다른 cyclin들 (D-type cyclins, cyclin E, cyclin A)은 세포주기의 각 phase를 진행하는데 있어 필수적으로 요구되어진다. 즉, 포유동물세포에서 cyclin B는 mitosis를 위하여 필수적인 요소이고, cyclin A는 S phase를 조절하며, cyclin D과 cyclin E

그림 2. CDKs와 기질 단백질들

Kinases	Regulatory Subunit	Putative Substrates
Cdc2p34	Cyclin A & B	Rb, Nf,histone H1
Cdk2	Cyclin A ,E & D	Rb, p27
Cdk3	Cyclin E	E2F-1/DP-1
Cdk4	Cyclin D1,D2,D3	Rb
Cdk5	p35	NF,Tau
Cdk6	Cyclin D1,D2,D3	RB
Cdk7	Cyclin H	Cdc2, Cdk4/6
Cdk8	Cyclin C	RNA pol II
Cdk9	Cyclin T	Rb, MBP

는 G1 phase를 통하여 포유동물세포의 세포주기진행을 조절한다. 모든 cyclin들은 cyclin box라고 불리는 고도로 보존적인 100 여개의 amino acid 잔기를 가지고 있는데, 이 부위를 통하여 CDK와 interaction 함으로써 그 활성이 조절된다. 또한 cyclin들은 transcriptional expression과 proteolysis에 의해 활성이 조절되어지지만, CDK들은 인산화에 의한 posttranslational modification으로 그 활성이 조절되어진다. CDK에서 인산화가 일어나는 주요 아미노산 잔기는 Thr160, Tyr15 그리고 Tyr14 등인데, Thr160의 인산화는 CDK의 활성화를 위하여, 그리고 Tyr15/Tyr14의 인산화는 cyclin-CDK

complex의 불 활성화를 위하여 각각 필수적으로 요구되어진다 (Fig. 3).

Cyclin-dependent Kinase Inhibitors

포유동물세포들은 cyclin-CDK complex에 결합하여 그 활성을 억제하는 단백질 군을 발현하는데 이들을 cyclin-depedent kinase inhibitors (CKIs)라고 한다. CKI는 크게 두 가지 단백질 군으로 나누어지는데 그것은 p21/p27 군과 p16 군이다 (Fig. 4). p16 군들은 cyclin D-CDK complex에 특이적인 억제인자로 작용하여 궁극적으로 pRb의 인산화 만을 조절하는 반면 p21/p27 군들은 G1, S, G2, M phase에 관련

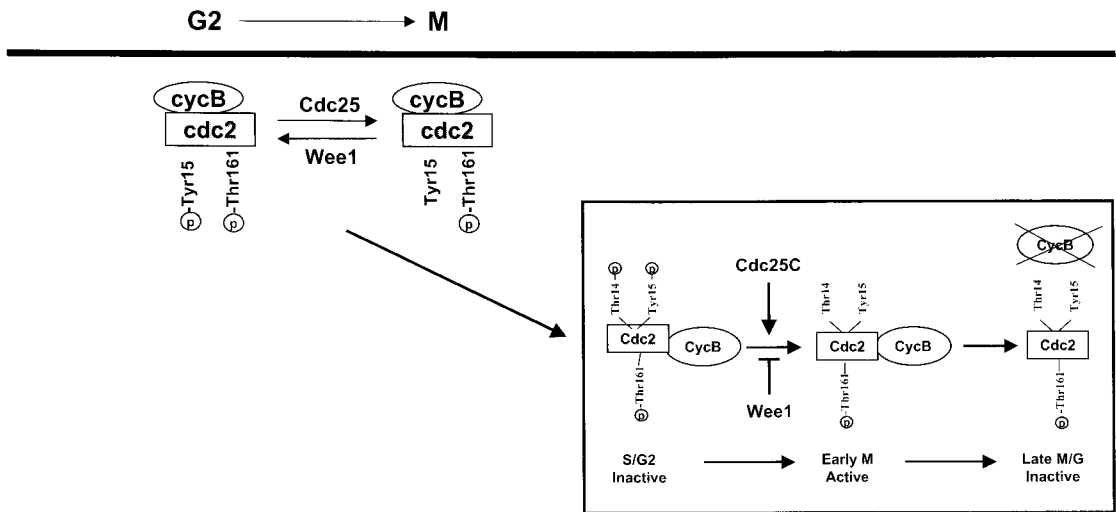


그림 3. 인산화에 따른 Cdc2의 활성조절

cell cycle stage	cyclin-Cdk complexes	inhibitors						
		p15	p16	p18	p19	p21	p27	p57
G1	cyclin D-Cdk4/6	+	+	+	+	+	+/-	+/-
G1/S	cyclin E-Cdk2	-	-	-	-	+	+	+
S	cyclin A-Cdk2	-	-	-	-	+	-	+
G2/M	cyclin B-Cdc2	-	-	-	-	+	-	-

그림 4. Cyclin-CDK complex와 CKIs

된 모든 cyclin-CDK complex에 대한 억제인자로 작용한다. 일반적으로 CKI들은 세포증식을 negative하게 조절하는 요소들에 의해서 또는 정상적인 세포 성장 억제 상태 (quiescence나 terminal differentiation)에서 그 발현이 유도되어 지는 것으로 알려져 있다.

언급한바와 같이 CKI들의 발현은 세포주기의 진행을 자극하거나 억제하는 signal들에 의한 세포주기 조절 기전과 밀접하게 관련되어 있다. p27은 mitogenic factor에 의해 발현이 억제되고 TGF- β 와 같은 anti-mitogenic factor에 의해 발현이 유도된다. p21은 mitogen factor 뿐만 아니라 다른 종류의 signal에도 반응하는데, 예를 들어 p21은 DNA-damaging agent에 반응하여 그 발현이 증가한다. DNA-damaging agent에 의한 p21의 발현 증가는 p53이라는 종양 억제 인자의 활성화에 의존적이므로 p53과 관련된 DNA repair를 위한 세포주기 조절 기전에 있어 p21의 발현은 필수적인 요소라고 생각된다. p21은 CDKs들의 기능만을 억제하는 것이 아니라 DNA의 leading strand의 복제에 관여하는 polymerase δ 의 활성화 진행인자인 PCNA의 복제활성 (replicative activity) 또한 억제한다. 그러나 p21은 PCNA의 gap filling repair/synthesis 기능은 억제하지 못하는 것으로 밝혀졌는데, 이 결과는 p21이 DNA가 damage를 받았을 때 PCNA의 복제활성을 억제함으로써 DNA합성의 조절에는 관여하는 것으로 생각되지만 DNA damage에 반응하여 일어나는 DNA repair에서의 PCNA의 기능은 억제하지 않음

으로써 DNA repair는 허용하는 것을 의미한다.

G1 phase의 진행과 G1/S Transition

Cyclin D1은 nuclear protein으로 이것의 발현은 G1 phase의 진행에 있어 필수적인 것 일 뿐 만 아니라 rate-limiting factor로서 작용하는 것으로 여겨진다. 즉, cyclin D1을 과 발현하면 G1 phase의 시간이 단축되는 반면, G1 phase 초기에 cyclin D1 antibody를 microinjection하여 cyclin D1의 작용을 저해하면 세포들은 S phase로 들어가지 못하고 세포주기를 멈추게된다. 이 결과로 알 수 있는 것은 cyclin D1이 mid-G1의 진행을 조절하여 세포들을 late-G1에 이르게 하고, 이때 또 다른 signal이 작용하여 S phase로의 진행을 자극하게된다는 것이다. Cyclin D1의 대표적인 파트너는 CDK4와 CDK6이며 이것의 활성화는 CAK (CDK Activating Kinase)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다.

Cyclin D1-CDK4의 주된 기질은 retinoblastoma gene product (pRb)인데 pRb는 transcription factor인 E2F의 활성을 조절하므로써 G1/S transition에 중추적인 역할을 한다. E2F는 DNA 합성에 관련된 많은 유전자들의 전사를 조절하는 전사 조절 인자로 알려져 있는데 여기에 pRb가 결합하게 되면 전사 인자로서의 기능이 상실된다. 한편 E2F를 불활성화시키는 pRb의 기능은 pRB 자체의 인산화 상태에 따라 조절된다. Cyclin D1-CDK4 complex는 pRb에 직접 결합하여 mid-G1에서 late-G1동안 이를 인

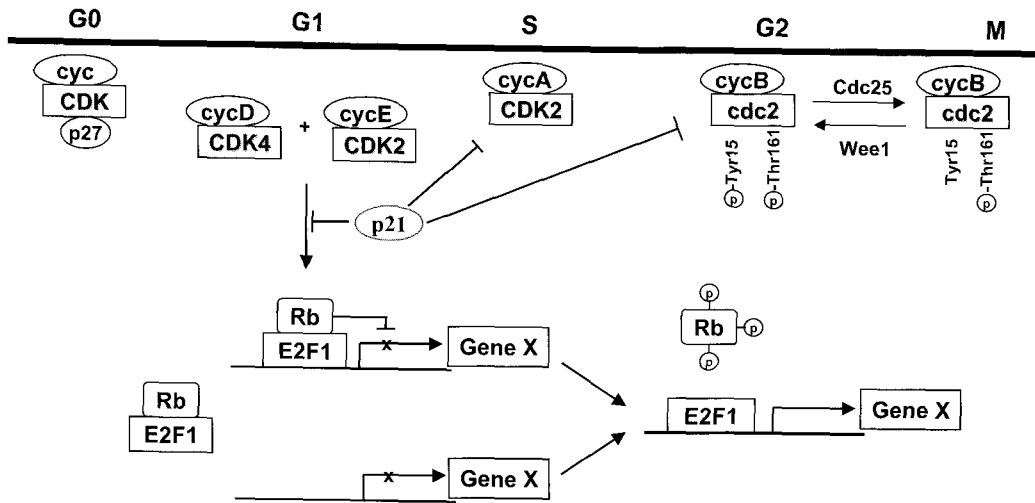


그림 5. 동물세포주기조절 기전

산화 하는데 이렇게 pRb가 과 인산화되어 E2F와 결합하지 못하게되면, 자유롭게된 E2F는 S phase를 위하여 필수적인 유전자의 발현을 촉진 가능하게되어 세포주기는 G1 phase에서 S phase로 진행하게 되는 것이다. 그러므로, cyclin D1-CDK4 complex의 기본적인 기능은 pRb를 인산화시켜 pRb의 E2F에 결합하는 능력을 불 활성화하는 것으로 생각된다 (Fig. 5).

포유동물세포에서 cyclin E의 발현은 cyclin D1보다 늦게 일어난다. 그리고 cyclin E-CDK2 kinase 활성은 세포가 S phase로 들어가기 직전에 일어난다. Cyclin E 또한 cyclin D1과 마찬가지로 과 발현하면 G1 phase의 단축을 야기하고, 항체를 microinjection 하여 그 기능을 방해하면 세포들은 S phase로 들어가지 못하고 세포주기를 정지하게된다. Cyclin E 또한 CDK2와 complex를 만들어 pRb를 과인산화하므로써 E2F의 기능을 조절하여 세포주기의 진행을 촉진한다 (Fig. 5). 그러나 cyclin D1과는 달리 pRb가 기능을 하지 못하는 세포의 G1/S transition에서도 cyclin E는 여전히 요구되어 지는데, 이것은 cyclin E-CDK2 complex가 Cdc25라는 단백질을 인산화하여 활성화시키므로써 S phase의 진행에도 역할을 하기 때문인 것으로 생각되지만 아직 그 정확한 작용 기전은 알려지지 않고 있다.

S phase의 진행

세포주기의 S phase 진행에 관여하는 세포주기 관련 분자는 cyclin A와 CDK2로 알려져 있다 (Fig. 5). Cyclin A의 발현과 활성화는 late G1과 early S 동안에 증가하였다가 mitosis 동안에 감소하는데, *in vivo*에서나 cell free system에서의 실험적 증거들로 인해 cyclin A는 DNA 합성의 조절에 관여한다고 알려져 있다. S phase 초기에 발현된 cyclin A는 CDK2와 결합하여 CDK2의 활성을 조절한다. 지금까지 cyclin A-CDK2 complex의 정확한 substrate는 알려져 있지 않으나 replication origin에서 single strand DNA에 결합하여 DNA 합성 동안 DNA의 재결합을 방지해 주는 replication protein A (RPA)가 가능한 substrate일 것으로 생각된다. 또한 cyclin A-CDK2는 S phase 동안 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)와 complex를 이루어 DNA replication origin에 위치하는 것으로 알려져 있다. 이러한 보고들로 볼 때 cyclin A-CDK2는 DNA 합성 과정에서 그 역할을 하여 S phase의 진행을 조절하는 것으로 사료된다. 그러나 cyclin A-CDK2 complex가 replication factor를 인산화하여 그들의 활성을 조절한다는 *in vivo*에서의 직접적인 증거는 아직 알려지지 않고 있다.

G2/M Transition

G2 phase로부터 M phase로의 진행을 위해서는 B-type cyclin들의 발현이 필수적으로 요구된다. Cyclin B의 발현은 early G2에서 증가하여 late G2와 early M phase에서 가장 높게 나타난다 (Fig. 1). G1/S phase transition을 위해 cyclin E와 결합하여 활성을 나타내는 CDK2가 필요한 것처럼 G2/M의 진행을 위해서는 cyclin B와 결합하여 활성을 나타내는 Cdc2의 존재가 필수적이다. Cdc2의 활성은 cyclin B와의 결합에 의해서 뿐 만 아니라 Cdc2 자체의 인산화 정도에도 영향을 받는다. 즉 Cdc2의 Tyr15 잔기가 탈 인산화 된 상태에서 cyclin B와 결합한 경우에만 Cdc2는 활성을 띄게 되고 비로소 세포주기는 mitosis로 진행 가능하게 된다. Cdc2를 인산화하여 그 활성을 조절하는 kinase는 Wee1으로 알려져 있는데 Wee1은 세포가 mitosis로 들어갈 수 있는 조건이 될 때까지 Cdc2의 Tyr15 잔기를 인산화하여 그 활성을 억제한다. Wee1 또한 mitosis 동안 그 활성이 억제되어야 하는데, Wee1의 불활성화를 위하여 작용하는 kinase들은 Cdc2와 nim1/cdr 등으로 알려져 있다. 이렇게 인산화된 Wee1은 late G2과 mitosis동안 불활성화된 상태로 유지되어진다. Cdc2에 대한 Wee1의 작용과 반대로 작용하여, 세포주기를 G2로부터 mitosis로 진행하는데 역할을 하는 단백질은 phosphatase인 Cdc25이다. Cdc25는 Cdc2의 Tyr15 잔기를 탈 인산화하여 Cdc2를 활성화한다. 즉 Late G2에서 Cdc25의 활성은 증가하고 Wee1의 활성은 억제되어 Cdc2가 탈 인산화된 상태로 활성화되므로써 세포주기는 Mitosis로 진행하게 되는 것이다 (Fig. 5).

Cyclin B-Cdc2 complex는 mitosis동안 세포에서 일어나는 구조적 변화를 조절하는 수많은 단백질들과 상호 결합한다. Cyclin B-Cdc2의 활성화는 metaphase를 통하여 일어나고, 이것의 불활성화는 anaphase를 마친 세포에서 일어나는 것으로 보이는데 이 과정은 cyclin B의 분해에 의존적인 것으로 보여진다. Anaphase 동안에 나타나는 cyclin B의 분해과정은 ubiquitin pathway를 통하여 일어나는데 이 과정은 cyclin B-Cdc2 complex 자체가 anaphase 말기에 ubiquitin pathway를 자극하므로써 그 자신의

분해를 조절하는 것으로 여겨진다.

Cell Death and Apoptosis

Apoptosis는 세포 내부에 프로그램 된 신호를 따라 여러 유전자 및 단백질들의 발현과 활성이 조절되어 일어나는 능동적인 death이며, 그 과정을 통해 생성된 apoptotic body 들은 주변의 세포들이나 대식세포 (macrophage) 등의 식세포 작용에 의해 제거됨으로서, 염증 (Inflammation)을 유발하지 않는다. Apoptosis의 형태적, 생리적 특징으로는 cytoplasm shrinkage, membrane blebbing, chromatin condensation, DNA fragmentation, 세포막을 이루는 지질인 phosphatidylserine의 세포 외보로의 노출, apoptotic body 형성 등이 보고되어 있다. 반면에, 세포괴사는 외부적 환경의 변화에 의해 급격히 일어나는 수동적 죽음이며, 염색사의 irregular clumping과 세포질의 팽창 (swelling of cytoplasm) 과정을 거치게 되고, 최종적으로 세포들의 분해를 통해 세포 파편 (cell debris)이 생성되고, 이들이 염증을 유발하게 된다 (Fig. 6).

Apoptosis는 생명체의 여러 정상적인 생리적 현상에서 쉽게 관찰된다. 예를 들면, Apoptosis는 생명체의 초기 발생단계에서 관찰되는 여러 형태적 변화과정 (morphogenesis)과 면역계 또는 신경계의 functional self-organization과정에서 중요한 역할을 담당한다. 또한, 성인이 된 이후에도 tissue homeostasis, 세포 수의 조절, 손상된 세포의 제거, 감염 (infection)에 대한 방어 기작으로서 필수적으로 작용한다. Apoptosis는 여러 질환들의 발병과정에도 깊이 관여하는데 비정상적인 Apoptosis의 발생은 퇴행성뇌신경질환 (neurodegenerative disorder), 면역계 이상 (immune disorder), 그리고 심장 혈관계 질환 (cardiovascular disease) 등의 원인이 될 수 있으며, Apoptosis의 비정상적인 억제는 암의 원인이 될 수 있다. 세포사멸이 정상적인 조절과정에서 벗어나 비정상적으로 발행하거나 억제되어 나타나는 질병은 좀더 자세히 살펴보면, p53, p16와 Bcl-2 등의 유전자의 이상 발현에 의해 유도되는 암들, HIV, Herpes 및 influenza 바이러스들에 의한 감염증, 그

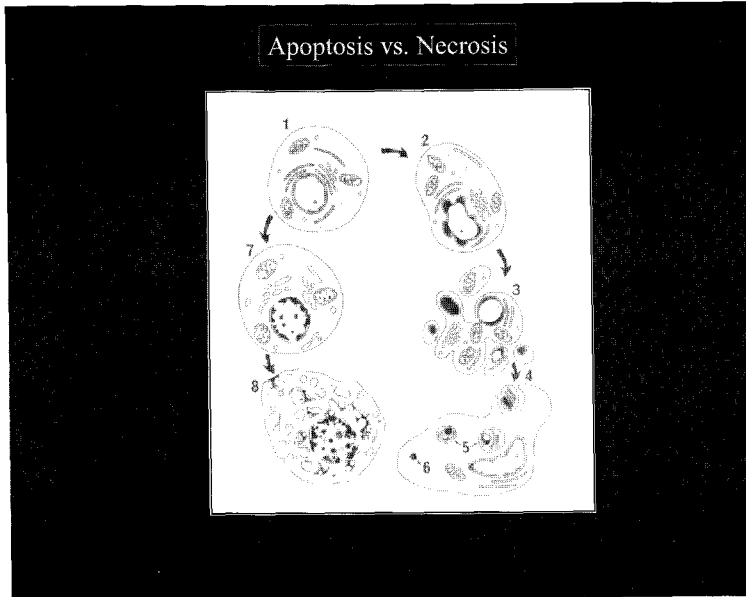


그림 6. Apoptosis 와 Necrosis

리고 당뇨 (Type 1 diabetes), 류마티스 관절염 (Rheumatoid arthritis), 다발성 경화증 (multiple sclerosis)과 근무력증 (Myasthenia gravis) 등과 같은 자가면역 질환 (Autoimmune Diseases)들이 있다. 또한, stroke/Ischemia, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, Amyotrophic lateral sclerosis 등과 같은 심장혈관계 질환 (Cardiovascular Diseases), 그리고, 박테리아 감염과, Ocular Disorders, Osteoporosis, Cystic fibrosis 등의 질병과도 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다. 이와 같이, Apoptosis는 생명체의 다양한 생리작용을 정상적으로 유지하는데 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 여러 질병들의 발병과정에도 밀접한 관련이 있다.

Apoptosis 조절인자들

세포들은 외부의 여러 자극들의 변화에 의해 매우 민감하게 반응하며, 자극의 종류나 강도에 따라, 필요시 매우 정밀한 세포사멸 신호전달과정을 작동하게 된다. 지난 십여년간의 연구를 통하여 세포사멸 과정을 유도하거나, 조절할 수 있는 여러 세포인자들이 밝혀졌다. 예를 들면, TNFR (tumor

necrosis factor receptor), CD95/Fas/Apo1, DR (death receptor) 3, DR4, DR5, NGFR (nerve growth factor receptor)와 같은 세포막 수용체와 이들의 리간드 (ligand)들, p53, pRb 및 CDK inhibitor와 같은 세포주기 조절인자들, calpain이나 caspase와 같은 단백질 분해효소들이 Apoptosis 관련 세포신호전달 과정에 관여한다. Bcl-2 family에 속하는 여러 단백질들도 세포사멸에서 중요한 역할을 한다. 이들 중, Bax, Bad, Bid, Bcl-XS 등은 Apoptosis를 촉진하는 역할을 하며, Bcl-2나 Bcl-XL 등은 Apoptosis를 억제한다. Apoptosis의 대표적인 신호전달 효소인 caspase의 활성을 억제하는 IAP (inhibitor of apoptosis protein) 단백질들 (DIAP, HIAP, XIAP, NIAP 등)도 대표적인 Apoptosis 억제인자들이다. 이 외에도 ROS (reactive oxygen species)나 NO (nitrogen oxide), cell adhesion protein들, PI3K 및 Akt 인산화 효소들, 그리고, unfolded protein response에 관여하는 단백질들이 Apoptosis 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Fig. 7).

Apoptosis과정의 분자생물학적 기작은 진화의 정도와 관련 없이 대부분의 생물체에서 비교적 공

Cellular Factors Modulating Cell Death

<p><u>Cell Surface Receptors & Its Ligands</u></p> <p>TNF receptors CD95 (Fas/Apo1) DR3/DR4/DR5 NGF receptors</p> <p><u>Cell Cycle Regulators</u></p> <p>p53 pRb CDK inhibitors</p> <p><u>Proteolytic Enzymes</u></p> <p>Calpain Caspases</p>	<p><u>Bcl-2 Family</u></p> <p>Bcl-2/Bcl-XL Bax/Bad/Bid/Bcl-Xs</p> <p><u>Inhibitors of Apoptosis Proteins</u></p> <p>DIAP HIAP XIAP NIAP p35</p> <p><u>Other Signals</u></p> <p>Oxidative Mechanisms: ROS/NO Cell Adhesion Proteins PI3K/Akt signaling ER Stress: unfolded protein response</p>
---	--

그림 7. Apoptosis를 조절하는 인자들

Programmed cell death in *C. elegans*

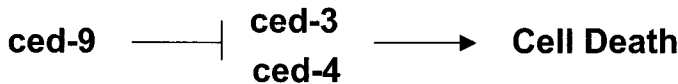


그림 8. Programmed cell death in *C. elegans*

통적으로 보존되어 있다. 특히, Apoptosis에 관한 분자생물학적 연구는 *Caenorhabditis elegans*를 이용한 유전학적인 연구를 통해 큰 진전이 이루어졌다. 미국 MIT의 Horvitz 그룹은 *C. elegans*의 Apoptosis를 외형적인 변화에 따라 크게 4단계로 나누고, 각각의 단계에 해당하는 *C. elegans*의 유전자 변이주들을 찾아내어, 유전학적, 분자생물학적 연구를 통하여 *ced-3*, *ced-4*와 *ced-9* 등의 유전자가 Apoptosis와 직접 관련됨을 발견하였다 (Fig. 8).

*Ced-3*는 포유류에 존재하는 ICE (interleukin-1β-converting enzyme)와 같은 cysteine계 단백질 분해효소들과 구조적, 기능적으로 유사성을 가지는 것으로 밝혀졌다. 이후, 포유동물세포에는 여러 ICE-like

protease들이 존재함이 확인되었으며, 현재 이들 효소 군들을 caspase(Cysteineprotease cleaving after ASPartic acid)라 한다. 지금까지 14종류 이상의 caspase들이 발견되었다. 이들 단백질 분해효소들은 공통적으로 proenzyme 형태로 만들어지며, 활성화 과정에서 단백질 분해과정을 통하여 pL(large subunit)와 pS(small subunit)으로 절단하고, (pL/pS)₂의 tetramer를 형성하여 활성화된다 (Fig. 9).

*Ced-9*의 포유류 세포의 Bcl-2와 유사한 역할을 하는 Apoptosis의 억제인자로 밝혀졌으며, *Ced4*는 포유동물 세포의 Apaf1의 유사체로 확인되었다. Apaf1은 mitochondria에서부터 cytoplasm으로 방출된 cytochrome C와 결합하여 caspase-9의 활성화를

Proteolytic Processing and Oligomerization of Caspases

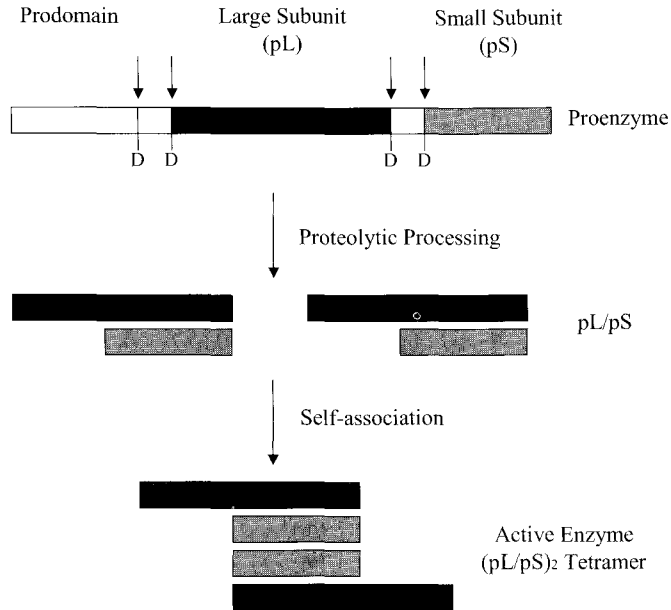


그림 9. Activation of caspases

유도함이 밝혀졌다. 세포 외부로부터 발생된 Apoptosis의 신호가 세포 내부로 전달되는 과정이 체계적으로 잘 밝혀진 연구 분야는 면역세포의 분화 과정에서 일어나는 Apoptosis이며, 특히, TNFR (tumor necrosis factor receptor)군 (family)을 통한 Apoptosis 유도 과정이 잘 연구되어있다. 이들 수용체들은 공통적으로 세포 외부에 노출된 N-말단 부위에 cyteine-rich 구조를 갖고 있어, 이 구조를 통하여 각각의 리간드(ligand)들과 반응할 수 있다. TNFR군에는 TNFR1과 CD95/Fas/Apo-1, p75 NGFR, CD40등이 속한다.

TNFR1과 Fas는 공통적으로 세포질 방향으로 노출된 부위에 death domain이라는 구조를 갖고 있어서, 이를 통해 세포 내에 존재하는 death domain을 보유하는 다른 단백질들과 단백질-단백질 결합을 형성할 수 있다. 수용체들과 상호 작용을 하는 death domain을 갖고 있는 세포 내부 단백질들에는 FADD (Fas-associated death domain protein), RIP (receptor-interacting protein), TRADD (TNFR-associated

death domain protein) 등이 있다 (Fig. 10).

Fas를 발현하는 세포의 외부에서 Fas-L가 Fas에 결합하면, Fas의 구조적인 변화가 일어나 그 결과 세포 내부에서는 Fas와 FADD가 각각의 death domain을 통하여 결합하게된다. Fas와 결합한 FADD는 다시 FADD에 존재하는 DED (death effector domain)을 통하여 caspase-8의 DED과 결합하게 된다. FADD와의 결합을 통하여 활성화된 caspase-8은 다른 caspase들을 활성화시킴으로써 Apoptosis를 유도하게 된다. 한편, Fas는 FADD-caspase-8를 통한 세포사멸 이외에도 Daxx/DAP6 (death-associated protein 6)와 반응하여 ASK1의 활성을 촉진함으로써 세포사멸을 유도할 수도 있다. 즉, Fas의 death domain에 Daxx의 C-말단 부위가 직접 반응하여 Daxx가 활성화되고, 활성화 된 Daxx는 ASK1를 활성화시킴으로써 JNK/SAPK 및 p38 kinase 신호전달계를 활성화시켜 세포사멸을 촉진할 수 있다.

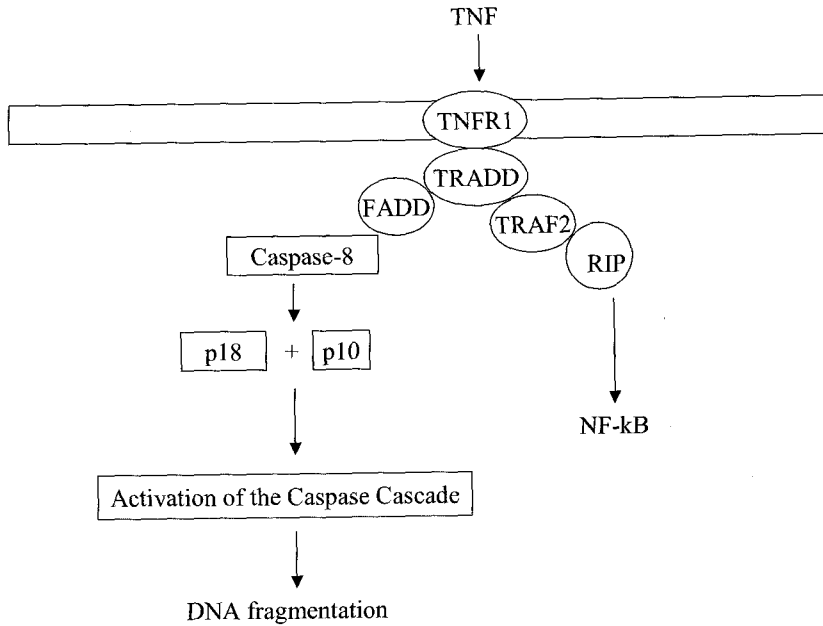


그림. 10. TNF-induced apoptosis pathway

TNF가 세포막에 존재하는 TNFR에 결합하면 TNFR는 homo-oligomerization을 통해 활성화되면 세포질에 존재하는 TRADD가 TNFR의 DD부위에 결합하게 된다. TNFR와 결합된 TRADD에 다시 FADD가 결합하게 되고 그 결과 caspase-8이 활성화된다. 한편, TRADD-TNFR1 결합체는 TRAF2 (TNFR-associated factor 2)와도 반응할 수 있으며, TNFR1-TRADD-TRAF2결합체는 NF- κ B의 활성화를 촉진시키거나, TRAF2에 다시 ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1)이 결합하여 JNK/ASPK (c-JUN N-terminal kinase/stress-activated protein kinase)와 p38 kinase 신호 과정을 활성화할 수 있다.

1990년대 중반, Ziaodong Wang 그룹은 HeLa 세포를 원심분리하여 얻은 세포질 상층액(S-100 cytosolic supernatant fraction)에 caspase-3를 활성화시킬 수 있는 단백질들이 존재함을 발견하였다. 크로마토그래피를 이용한 단백질 분리과정을 통하여 각각의 단백질들을 분리하여 이들을 Apaf1, Apaf2, Apaf3 (Apoptotic protease activating factor 1, 2, 3)로 명명하였다. 이들 중 Apaf2는 15 kDa의 cytochrome c로 밝혀짐으로써, Apoptosis에 미토콘드리아가 중

요한 역할을 담당함을 확인하게 되었으며 cytochrome c가 미토콘드리아로부터 세포질로 방출될 수 있음이 밝혀졌다. 또한, Apaf3는 caspase9/Mch6/ICE-LAP6로 판명되었으며, caspase9은 caspase 신호전달 과정에서 initiator caspase로 작용하여 caspase-3등의 downstream caspase들을 활성화시킴을 확인하였다. 한편, Apaf1은 130 kDa의 새로운 단백질로서, N-terminal 85 아미노산 부위는 *C. elegans*의 CED4와 높은 상동성 (homology)을 나타내는 것으로 판명되었다. 이들의 연구 결과를 종합해 보면, 미토콘드리아의 intermembrane space에 존재하는 cytochrome c가 세포질로 방출되면, cytochrome C가 dATP나 ATP 존재 하에서, Apaf1과 결합하게되며, 그 결과 cytochrome c/Apaf1 결합체에 caspase9이 결합함으로써 caspase-9의 활성화가 유도된다. caspase-9은 caspase-3 등의 다른 caspase들을 활성화시킴으로써 Apoptosis를 유도하게 된다.

최근 연구에서 Apoptosis 과정 중에 미토콘드리아에서부터 세포질로 방출되는 또 하나의 중요한 단백질이 발견되었다. Smac (second mitochondria-derived activator of caspase) 혹은 DIABLO

(DIRECT IAP-BINDING PROTEIN WITH LOW pI)로 명명된 이 단백질은 IAP와 결합하여 IAP의 세포사멸 억제기능을 차단함으로써 Apoptosis를 촉진할 수 있음이 확인되었다.

이미 앞에서 언급한 바와 같이, Apoptosis 자극 (apoptotic stimuli)에 의해 미토콘드리아로부터 cytochrome C가 방출되어 cytochrome c/Apaf1/caspase-9의 apoptosome 형성을 통해 Apoptosis가 유도될 수 있다. 그러나, 어떤 세포에서는 cytochrome c가 세포질로 방출되어도 세포사멸이 일어나지 않는 현상이 관찰된다. 이는 IAP라는 단백질들이 caspase들과 결합하여 caspase의 활성화를 억제함으로써 Apoptosis가 억제되기 때문이다. 이러한 경우 cytochrome c와 함께 Smac/DIABLO가 세포질로 방출되는 세포에서는 IAP의 존재 하에서도 Apoptosis가 촉진된다.

미토콘드리아에서 세포질로 방출되는 또 다른 세포사멸 조절단백질로 AIF (apoptosis inducing factor)가 있다. AIF는 PDCD8 (programmed cell death 8)로도 불리어지는 57 kDa의 flavoprotein으로써, 박테리아의 oxidoreductases와 유사성을 가지며, 2개의 mitochondrial localization sequences와 2개의 nuclear localization signal을 갖고 있다. 미토콘드리아의 intermembrane space에 존재하는 AIF는 Apoptosis 신호에 의해 세포질로 이동되며, 이 중 일부 AIF는 핵으로 이동하여 chromatin condensation이나 large scale DNA fragmentation을 촉진한다. 이외에도 AIF는 cytochrome c의 방출, 미토콘드리아의 transmembrane potential의 dissipation, 세포막에서의 phosphatidylserine의 세포 외부로의 노출 등을 증가시킨다. 이러한 AIF의 기능은 caspase inhibitor에 의해서 억제되지 않음으로 미루어 보아 AIF에 의해 유도되는 Apoptosis에는 caspase가 관여하지 않을 것으로 추측된다.

이와 같이, 미토콘드리아를 통한 Apoptosis 과정은 caspase-dependent pathway와 AIF-dependent pathway로 나눌 수 있다. Caspase-dependent pathway의 경우에는, Apoptosis 자극에 의해 미토콘드리아 외막(outer membrane)의 permeabilization이 유도되고, cytochromec가 세포질로 방출되어 Apaf1과의 결합을 통하여 caspase-9은 caspase-3를 활성화

시키고, caspase-3는 ICAD (inhibitor of the caspase-activated deoxyribonuclease)를 포함한 여러 기질단백질들을 절단하여 Apoptosis를 촉진하게 된다. CAD (caspase-activated deoxyribonuclease)와 결합하고 있던 ICAD가 caspase-3에 의해 절단되면, CAD가 활성화하여 핵에 존재하는 염색체 DNA를 절단함으로써 DNA fragmentation을 유도하게 된다. caspase-dependent apoptotic pathway는 proapoptotic Bax, Bid와 antiapoptotic Bcl2, Bcl-XL등의 Bcl2 군의 단백질들, cytochrome C, IAP, Smac/DIABLO 등의 여러 단백질들에 의해 조절된다. 반면에, AIF-dependent apoptotic pathway는 caspase cascade와는 무관하게 Apoptosis를 유도한다. 세포사멸을 유발시키는 자극에 의해 AIF가 미토콘드리아에서 세포질 혹은 핵으로 이동되면, large-scale DNA fragmentation, cytochrome c 방출 증가, phosphatidylserine의 세포 외부로의 노출 증가 등의 현상이 관찰된다. 그러나, AIF에 의한 이러한 변화가 어떤 경로를 통하여 발생되고 조절되는지의 작용기전은 아직 불분명하다.

Caspase cascade 활성화 경로

앞에서 언급하였듯이, caspase cascade의 활성화와 관련하여 두 가지의 주요 경로가 알려져 있다. 한 경로는 세포막에서부터 시작되는 경로로서 대표적으로 TNF 혹은 Fas 신호전달에 의한 caspase의 활성화 경로이고, 다른 하나는 미토콘드리아에서부터 시작되는 경로로서 UV등의 스트레스에 의한 caspase의 활성화 경로이다.

이와 같은 caspase cascade 활성화에 관여하는 두 신호전달 과정은 여러 다른 단백질들에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, c-FLIP (cellular FLICE inhibitory protein)은 FADD에 의한 caspase-8의 활성화를 억제할 수 있다. c-FLIP은 CFLAR (caspase8 and FADD-like apoptosis regulator), I-FLICE (inhibitor of FLICE), CASPER (caspase-eight-related protein), FLAME1 (FADD-like antiapoptotic molecule 1), CASH (caspase homolog), CLARP (caspase-like apoptosis regulatory protein), MRIT (MACH-related inducer of toxicity) 등으로도 알려져

단백질로써, FADD의 DED (death effector domain) 과 유사한 module과 caspase-8와 유사한 protease domain을 갖고 있다. 그러나, c-FLIP은 caspase 활성화는 가지고 있지 않으며 FADD, caspase-8, caspase-3, TRAF1, TRAF2 등과 결합함으로써 Apoptosis를 조절하는 것으로 알려져 있다. Bcl-2 family에 속하며 Apoptosis를 촉진하는 기능을 가진 Bid는 세포막에서부터 시작되는 caspase 활성화 경로와 미토콘드리아에서부터 시작되는 caspase 활성화 경로를 연결시키는 신호전달인자로 작용할 수 있다. 즉, 세포막에서부터 시작된 Apoptosis 신호전달에 의해 활성화된 caspase-8가 Bid를 절단하여 truncated Bid (t-Bid)가 생성되면, t-Bid는 미토콘드리아로 이동하여 cytochrome c가 세포질로 이동되는 것을 촉진시킴으로써 caspase-9의 활성화를 유도한다. 이러한 t-Bid의 기능은 Bcl-XL에 의해 억제될 수 있다.

지금까지 동물세포의 세포주기의 진행과 apoptosis에 관여하는 인자들의 발현과 활성화, 그리고 이에 따른 세포주기 진행과 apoptosis의 조절기전에 대하여 간략하게 서술하였다. 생명체에서의 이러한 세포주기와 apoptosis 조절에 대한 폭넓은 이해는 기초적 또는 임상적으로 '세포의 증식 조절' 및 '항상성 유지'에 대한 응용적 측면에서 괄목할 만한 성과를 보여 왔는데 Tolmach나 Painter등이 처음 radiation에 의한 세포주기조절과 세포사멸에 대하여 언급한 이후 지금까지 세포주기 및 세포사멸 조절 분야에 대한 수많은 연구들이 수행되어졌고 또한 엄청난 진전을 가져왔다. 현재는 세포주기 및 apoptosis의 조절기전에 대한 radiation이나 다른 genotoxic agent의 효과는 비단 Radiobiologist 나 Oncologist 뿐 만 아니라 많은 다른 분야의 연구자들에게도 매우 흥미로운 일이 되었다. 이 과정에서 새롭게 발견되는 흥미로운 기전들은 실용적으로 응용이 가능한데 특히 궁극적으로는 cancer treatment에 응용되어 질 수 있을 것으로 사료된다. 또한 포유동물세포의 세포주기 조절 및 apoptosis에 관한 연구는 방사선이나 Carcinogen이 어떻게 세포의 malignancy를 증가시키는가에 대한 이해를 도와 cancer prevention에의 임상적 진전에도 많은 도움을 주고있다. 즉, 세포주기 조절의 기전에 관한 연구로

non-malignant한 세포들이 방사선 조사나 Carcinogen으로 damage를 받은 DNA를 'checkpoint control'의 loss로 인하여 repair 없이 세포사멸을 유발하지 않고 divide 하고 그 결과 chromosome abnormality를 축적하여 transformation process에 어떻게 역할을 하는지에 대한 실마리를 제공할 수 있을 것이다. 또 이 기전을 이해함으로써 정상인들의 cancer prevention 뿐 만 아니라 특히 radiation 이나 chemotherapy를 하는 환자들에서의 2차 적인 malignant neoplasm의 방지에도 많은 도움을 줄 수 있을 것이다. 또한 세포주기 및 apoptosis 조절과 관련하여 방사선이나 chemotherapeutic agent에 의해 발현되어지고 그 활성이 조절되어져서 방사선이나 chemotherapy에 대한 민감도에 영향을 주는 유전자와 그 product 들의 활성기전을 밝히는 것은 chemotherapy나 방사선의 치료 효과를 예측 가능하게 하여 chemotherapy나 방사선의 암에 대한 치료 효과를 극대화하는데 있어서도 큰 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Heichman, K.A. and Roberts, J.M. (1994) Rules to replicate by. *Cell* 79:557-562
2. Nurse, P. (1994) Ordering of S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79:547-550
3. Hartwell, L., and Weinert, T. (1989) Checkpoints:controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629-634
4. Rossow, P., Riddle, V. and Pardee, A. (1979) Synthesis of labile, serum-dependent protein in early G1 controls animal cell growth. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 76:4446-4450
5. Johnston, G., Pringle, J. and Hartwell, L. (1977) Coordination of growth with cell division in the yeast *S.cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* 105:79-98
6. Hartwell, L., Culotti, J., Pringle, J. (1974) Genetic control of the cell division in yeast. *Science*, 183, 46-52
7. Nurse, P. (1994) Universal control mechanism

- regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 503-7.
8. Sherr, C. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73:1059-1065
 9. Poon, R., and Hunt, T. (1992) Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol. Biol. Cell.* 3:1279-1294
 10. Nurse, P. (1994) Genetic control of cell cycle at cell division in yeast. *Nature*, 256: 457-461
 11. Mueller, P.R., Coleman, T.R., and Dunphy, W.G. (1995) Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase. *Mol. Biol. Cell.* 6:119-134
 12. Igarashi, M., Nagata, A., Jinno, S. (1991) Wee1-like gene in human cells. *Nature* 353:80-83
 13. Coleman, T.R., Tang, Z. and Dunphy, W.G. (1993) Negative regulation of the Wee1 protein kinase by direct action of the Nim1/Cdr1 mitotic inducer. *Cell* 72:919-929
 14. Kumagai, A. and Dunphy, W.G. (1991) The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* 64:903-914
 15. Strausfield, V., Lavve, J.C., Fesquet, O. (1991) Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human cdc25 protein. *Nature* 35:242-245
 16. Quelle, D., Ashmun, R., Shurtleff, S. (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase of rodent fibroblasts. *Genes Dev.* 7:1559-1571
 17. Kato, J., Matsushima, H., Hiebert, S.W. (1993) Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin-dependent kinase cdk4. *Genes Dev.* 7:331-342
 18. Nevins, J. (1992) E2F: a link between Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258:424-429
 19. Ohtsubo, M. and Roberts, J.M. (1993) Cyclin-dependent regulation of the G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259:1908-1912
 20. Ohtsubo, M., Theodoros, A., Schumacher, J. (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1 to S phase transition. *Mol. Cell. Biol.* 15:2612-2624
 21. Cardosa, M., Leonhardt, H., and Nadel-Ginard, B. (1993) Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* 74:979-992
 22. Felix, M., Labbe, J., Doree, M. (1990) Triggering of cyclin degradation in interphase extracts of amphibian eggs by cdc2 kinase. *Nature* 346:379-384
 23. Polyak, K., Kato, J., Solomon, M. (1994) p27kip1, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 8:9-22
 24. El-Eeiry, W., Tzukino, T., Velculescu, V. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825
 25. Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D. (1993) Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev.* 7:1572-1583
 26. Lane, D.P. (1992) p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16
 27. Lane, D.P. (1993) A death in the life of p53. *Nature* 362:786
 28. Li, R., Waga, S., Hannon, G. (1994) Differential effects by the p21 cdk inhibitor on PCNA dependent DNA replication and DNA repair. *Nature* 371:534-537