

## 난소암 세포에서 IEX-1과 MCL-1 단백질들의 세포 사멸 기능에 관한 상호작용

윤성민<sup>1</sup> · 나순영<sup>1</sup> · 김홍만<sup>2</sup> · 이강석<sup>2</sup> · 배지현<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>CHA 의과대학과 생명과학대학 의생명과학과

<sup>2</sup>중앙대학교 자연과학대학 생명과학과

## Mutual Activities of IEX-1 and MCL-1 on the Apoptosis of Ovarian Cancer Cells

Seongmin Yoon<sup>1</sup>, Soon-Young Na<sup>1</sup>, Hong-Man Kim<sup>2</sup>, Kangseok Lee<sup>2</sup> and Jeehyeon Bae<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biomedical Science, College of Life Science, CHA University, Seongnam 463-836, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Life Science, College of Natural Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

**ABSTRACT** : Apoptosis is a crucial mechanism for the proper regulation of homeostasis. BCL-2 family proteins are key molecules which control cellular survival and apoptosis. MCL-1 (myeloid cell leukemia-1) is a pro-survival member of BCL-2 family that promotes the survival of cells, and is highly expressed in diverse cancers including ovarian cancer, leukemia, and cervical cancer. Previously we identified IEX-1 (immediate early response gene X-1) as a binding partner of MCL-1. In the present study, we demonstrated that overexpression of IEX-1 induced apoptosis of ovarian cancer cells. Moreover, IEX-1 significantly attenuated the pro-survival function of MCL-1 in these cells. Also, IEX-1-induced cell death activity was able to be modulated by changes in the expression level of MCL-1. Thus, these results suggest that both IEX-1 and MCL-1 modulate each other's function controlling cellular survival and death and the inhibitory activity of IEX-1 toward MCL-1 may be applied for the development of chemotherapeutics.

**Key words** : Apoptosis, MCL-1, IEX-1, BCL-2 family, Ovarian cancer cell.

**요 약** : 세포 사멸(apoptosis)은 세포의 항상성을 적절하게 유지하기 위한 중요한 메커니즘이다. BCL-2 family 단백질들은 세포의 생존과 세포 사멸을 조절하는 중요한 단백질이다. MCL-1 단백질은 세포의 생존을 촉진시키는 기능을 하는 pro-survival BCL-2 family member이며, 난소암, 혈액암, 자궁 경부암과 같은 다양한 암 조직에서 높게 발현하고 있다. 이전 연구에서, 본 연구진에 의해서 IEX-1 단백질은 MCL-1의 결합 단백질로 밝혀졌다. 본 연구에서는, 난소암 세포에서 IEX-1의 과다 발현에 의한 세포 사멸이 유도되는 것을 밝혔다. 더욱이, IEX-1 단백질은 MCL-1 단백질의 세포 생존을 위한 기능을 감소시켰으며, IEX-1에 의한 세포 사멸 효과는 MCL-1의 발현 정도의 변화에 의해서 그 기능이 영향을 받고 있었다. 그러므로 이러한 결과들은 IEX-1과 MCL-1은 세포 사멸과 생존을 조절하는 서로의 기능에 영향을 미치고, MCL-1의 기능에 대한 IEX-1의 세포 생존을 억제 효과는 항암치료 방법의 개발에 응용될 수 있는 가능성을 제시해 준다.

## 서 론

세포 예정사(apoptosis 혹은 programmed cell death)는 세포가 유전자에 의해 제어되어 죽어가는 방식의 한 형태로 세

포의 괴사(necrosis)와는 구별되는 현상이다. 세포 예정사는 유전자의 단편화(DNA fragmentation), 염색체 응축(chromosome condensation), 세포 사멸체(apoptotic body) 형성 등 형태학적인 특징을 가지고 있다. Apoptosis는 세포 조직이 스스로 파괴되는 현상으로, 세포의 생존과 사멸을 조절함으로써 항상성을 유지한다(Thompson, 1995). 세포 예정사의 신호 전달(apoptosis signaling)은 FAS(CD95), TNF-R(tumor

\* 교신저자: 경기도 성남시 분당구 야탑동 222 CHA 의과대학과 의 생명과학과. (우) 463-836, (전) 031-725-8377, (팩) 031-725-8350, E-mail: jeehyeon@cha.ac.kr

necrosis factor-receptor), TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand) receptor 등과 같은 death receptor에 ligand와 결합을 통해서 전달되는 extrinsic pathway와 미토콘드리아에 의존적으로 신호가 전달되는 intrinsic pathway가 존재한다.

BCL-2 family 단백질은 미토콘드리아 의존적인 세포 사멸에 중요한 역할을 수행하며, 그 종류는 다양하다. BCL-2 family 단백질은 기능적으로 크게 두 그룹으로 분류된다. 세포의 생존을 유도하는 pro-survival BCL-2 family 단백질은 MCL-1, BCL-2, BCL-xL, BCL-W, A1이 있으며, 구조적으로는 multi-BH(BCL-2 homolog) domain을 가진다. 이들 대부분 단백질은 pro-apoptotic protein과 결합하여 세포의 생존을 유도한다. 또한 세포 사멸을 유도하는 pro-apoptotic BCL-2 family 단백질은 BAX, BAK, BOK과 같이 multi BH domain을 가진 단백질과, BH3 domain만 가진 BIM, BAD, BID, NOXA, PUMA, BIK, BMF 등이 있다.

미토콘드리아는 세포의 성장에 중요한 기관이며, intrinsic pathway에 의한 apoptosis 신호전달에 중추적인 역할을 하는 세포 소기관이다. Pro-apoptotic BCL-2 단백질에 의하여 미토콘드리아에 존재하는 BAX, BAK 단백질의 중합체가 형성(oligomerization)이 되고, 기질막의 붕괴가 일어난다. 또한, 미토콘드리아 기질막의 전위(mitochondria membrane potential) 차이가 형성이 된다. 미토콘드리아 기질막의 파괴로 인해 세포질로 cytochrome c의 분비가 촉진되고, caspase가 활성화 되는 것으로 보고되고 있다(Reers et al., 1995).

MCL-1(myeloid cell leukemia-1)은 human myeloblastic leukemia cell의 분화초기에 많이 발현되는 단백질로서, anti-apoptotic BCL-2 sub-family에 속한다(Kozopas, 1993). MCL-1 단백질은 세포의 사멸과 성장을 결정짓는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Nijhawan et al., 2003; Opferman et al., 2005). MCL-1은 cell cycle, proliferation, immortalization에 관여하는 여러 가지 단백질과 결합하고 있으며, 다른 BCL-2 family protein과도 결합하는 것으로 밝혀졌다(Bae et al., 2003; Chen et al., 2005; Jamil et al., 2005; Yoon et al., 2009; Zhang et al., 2002). BIM, BID, PUMA와 같은 BH3 only protein은 BAX, BAK을 활성화 시켜서 세포 사멸을 유도할 수 있으며, 이들은 pro-survival BCL-2 family에 의해 억제되고 있는 것으로 보고되고 있다(Kim et al., 2006; Kuwana et al., 2005).

IEX-1(immediate early response gene X-1)(Kondratyev et al., 1996) 단백질은 IER3, Dif-2, gly96 또는 p22/PRG-1으로 알려져 있으며, stress 혹은 성장인자(growth factor), 사이토카인(cytokines), 방사선 조사(irradiation)에 의한 여러 가지 상황에서 초기에 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다(Kumar et al., 1998). IEX-1은 세포의 사멸을 유도하거나, 세포의 성장을 촉진하는 신호 체계에 관여하는 등 서로 상반된 기능을 하는 단백질로 보고되어 있다. IEX-1은 NF- $\kappa$ B의 표적 단백질로서 apoptosis를 저해하고(Wu et al., 1998), hematopoietic cell line에서 TPO(thrombopoietin)에 의해 ERK(extracellular signal-regulated kinase)를 활성화하여 세포의 성장을 촉진시키며(Garcia et al., 2002), T-cell lymphoma를 선택적으로 성장을 촉진시키는 기능을 수행하는 것으로 밝혀졌다(Zhang et al., 2003). 이러한 결과와 다르게, apoptotic stimulants의 자극에 의한 apoptosis 신호전달에 IEX-1이 관여하고 있으며(Arlt et al., 2003), keratinocyte에서 champtothecin에 의해 과다 발현하는 IEX-1에 의해서 apoptosis가 유도된다는 사실도 밝혀졌다(Schilling et al., 2001). Non-cancer cell line인 293T 세포에서 IEX-1의 과다 발현에 의한 세포 사멸을 유도하는 것으로 보고되었다(Yoon et al., 2009). 이러한 IEX-1의 기능들은 cell type에 따라 상반된 기능을 보여주며, 다양한 신호전달 체계에 의해 제어되고 있음을 시사해 준다.

본 연구에서는 인간 난소암 세포주인 SK-OV-3 세포에서 IEX-1의 과다 발현에 의한 현상을 확인하고자 하였다. SK-OV-3 세포에서의 IEX-1의 과다 발현은 세포 사멸을 유도하였으며, MCL-1에 의한 세포 생존율을 감소시켰다. 그러므로 MCL-1 단백질의 과다 발현에 따른 생존율 상승효과는 IEX-1에 의해서 억제 가능하며, 이런 결과를 통해서 IEX-1을 이용하여 MCL-1의 기능을 조절할 수 있는 가능성을 제시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포주 및 세포배양

본 연구에 사용된 인간 상피성 난소암 세포주인 SK-OV-3는 the American Tissue Culture Collection(ATCC, U.S.A)로부터 구입하였다. 세포 배양을 위해 RPMI-1640(Welgene, Korea) 배지를 이용하였으며, 10% fetal bovine serum(Wel-

gene)과 1% penicillin streptomycin(Welgene)을 첨가하여 사용하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경의 세포 배양기를 이용하여 배양하였다.

## 2. 프라이머 제작 및 클로닝

pcDNA3 IEX-1과 pcDNA3 MCL-1 플라스미드 DNA 클로닝 방법은 기존에 발표된 논문에 설명되었다(Bae et al., 2003; Yoon et al., 2009).

## 3. Stable Cell Line 제작

MCL-1 단백질을 안정적으로 발현 저하시키는(knock-down) 세포주를 만들기 위하여 short hairpin RNA(shRNA)을 pSUPER puro vector system(OligoEngine, U.S.A)에 클로닝하여 이용하였다. shRNA 염기 서열을 RNAi Codex (<http://codex.cshl.edu>)를 통하여 획득하였으며, 클로닝 방법은 기존에 발표된 논문에 설명되었다(Yoon et al., 2009). 2.5×10<sup>6</sup>개의 SK-OV-3 세포를 100 mm 배양 용기에 준비하여 24시간 동안 배양한 후, 6 µg의 pSUPER puro shMCL-1 vector를 준비된 세포에 transfection하였다. Puromycin (Sigma, U.S.A)을 배양 용액에 5 µg/ml 첨가하여, 2~3주간 selection하였다. MCL-1을 안정적으로 과다 발현하는 세포주를 만들기 위하여 pcDNA6/myc-His vector(Invitrogen, U.S.A)를 이용하였으며, 클로닝 방법은 발표된 논문에 설명되었다(Yoon et al., 2009). 24시간 동안 배양된 2.5×10<sup>6</sup>개의 SK-OV-3 세포에 6 µg의 pcDNA6/myc-His MCL-1 플라스미드를 transfection하였다. Blasticidin(Invitrogen)을 배양액에 15 µg/ml를 첨가하여 2~3주간 배양하면서, MCL-1을 특이적으로 과다 발현하는 세포를 확보하였다.

## 4. Western Blot

배양 세포를 수거하여 4°C, 2,000×g에서 원심분리하여 PBS(phosphate buffered saline)를 이용해 세포를 세척하였다. NP-40(Nonidet P-40) 용액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.15 M NaCl, 1% NP-40: Sigma)을 이용하여 세포 내 전체 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질의 정량을 위하여 Bicinchoninic acid(BCA)<sup>TM</sup> protein assay(Pierce, U.S.A.)를 실시하였다. 30 µg의 단백질을 5×SDS(sodium dodecyl sulfate)-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis) sample buffer(Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 50% glycerol, 0.1%

bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol: Sigma)를 혼합하여 끓는 물에 denaturing시켜 전기영동을 실시하였다. PVDF(polyvinylidene fluoride) membrane(Amersham, U.K)에 transfer하여 5% skim milk in PBS-Tween 20 용액에서 1시간 동안 blocking하였다. MCL-1 단백질을 확인하기 위하여 anti-MCL-1 항체(Santa Cruz Biotechnology, U.S.A)를 3% skim milk가 포함된 PBS-Tween 20에 1:1,000으로 희석하여 배양하였다. GAPDH를 확인하기 위해서 anti-GAPDH 항체(Ab Frontier, Korea)를 사용하였다. 2차 항체 goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase(Santa Cruz Biotechnology)를 1시간 배양 후 Luminescence image analyzer(Fujifilm Life Science, Japan)을 이용하여 확인하였다.

## 5. 세포생존율 분석

SK-OV-3 세포를 3×10<sup>4</sup>개로 48 well 배양 용기에서 24시간 동안 배양한 후, human MCL-1 또는 IEX-1 단백질을 발현할 수 있는 플라스미드 DNA를 전체 100 ng을 Welfect-EX(Welgene)를 이용하여 transfection하였다. Transfection된 세포를 counting하기 위하여 녹색 형광 단백질(Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP)을 발현할 수 있는 pEGFP-N1 vector를 10% co-transfection하였다. 24시간 후, 세포를 수거하여 형광 현미경 상에서 EGFP만 발현하는 세포를 확인하여 생존율을 분석하였다.

## 6. Apoptotic 세포 분석

Apoptosis 신호 전달을 확인하기 위하여 FACS(fluorescent activated cell sorter)를 이용하였다. 1×10<sup>6</sup> 세포를 60 mm 배양 용기에서 24시간 동안 배양한 후 3 µg의 pcDNA3 IEX-1 또는 pcDNA3 MCL-1 vector를 transfection하였다. 24시간 후 세포를 수거하여, ApoScan<sup>TM</sup>(BioBud, Korea)를 이용하여 Annexin V 염색을 실시하였다. 15분간 상온에서 FITC-conjugated Annexin V를 염색하고 PBS를 이용하여 세척하였다. 준비된 세포에 propidium iodide(PI)를 첨가하여 FACS Caliber(BD Biosciences, U.S.A)를 통해서 Annexin V-positive하고, PI-negative한 세포의 분포를 분석하였다.

## 7. 통계학적 분석(Statistical Analysis)

생존율 실험은 duplicate로 진행하여 독립적으로 세 번 반

복실험을 하였으며, 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 통하여 분석하였고, apoptotic cell 분석 실험은 one-way ANOVA test를 실시하였다. *p*-value 0.05 이하일 때 유의성 있는 실험으로 해석하였다.

## 결 과

### 1. IEX-1의 과다 발현에 따른 세포 사멸

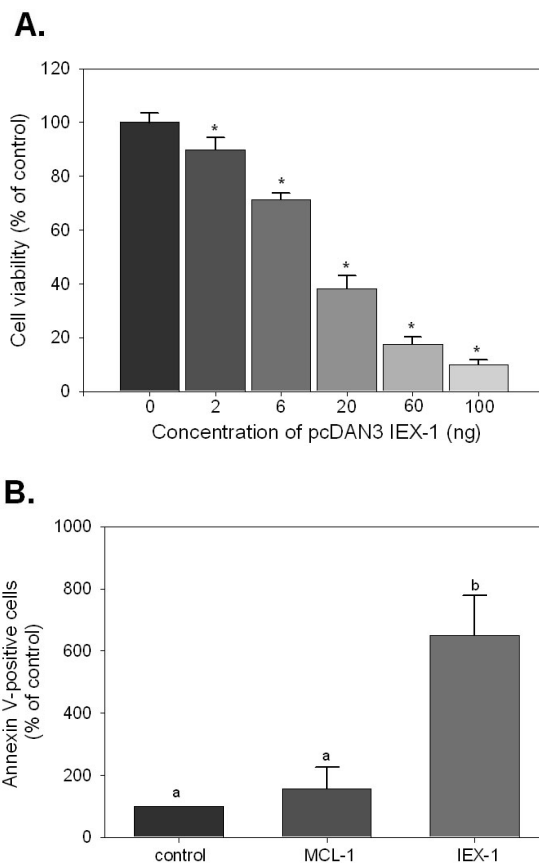
SK-OV-3 세포에서 IEX-1 단백질의 세포 내에서 기능을 확인하기 위하여 pcDNA3 vector에 클로닝하여, SK-OV-3 세포에 일시적인 과다 발현 방법을 통하여 과다 발현시켰다. pcDNA3 IEX-1 플라스미드 DNA를 최고 100 ng까지 농도를 달리하여, IEX-1의 발현 정도에 따라서 세포의 생존율이 어떤 변화가 있는지 확인해 보았다. DNA의 농도 의존적으로 세포의 생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). IEX-1 과다 발현에 따른 생존율의 저하 현상이 세포 예정사(apoptosis)에 의한 세포 사멸인지를 확인하기 위하여 Annexin V-staining 방법을 통하여 확인하였다. pcDNA3 IEX-1을 1.5  $\mu$ g transfection한 실험군에서 동일한 양의 pcDNA3 empty vector를 발현시킨 대조군에 비해 Annexin V에 염색된 세포를 평균 6배 정도 많이 검출하였다(Fig. 1B).

### 2. IEX-1에 의한 MCL-1 기능변화

Ovarian cancer cell에서 IEX-1이 MCL-1의 기능을 변화할 수 있는 지 확인하기 위해, SK-OV-3세포에서 pcDNA3 MCL-1을 50 ng으로 고정하고 pcDNA3 IEX-1의 농도를 증가시켰다. MCL-1 단백질의 과다 발현에 의해서 대조군보다 20% 정도 생존율이 상승하였다. 그러나 IEX-1을 과다 발현시켰을 때 MCL-1에 의한 생존율의 상승효과는 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 2A).

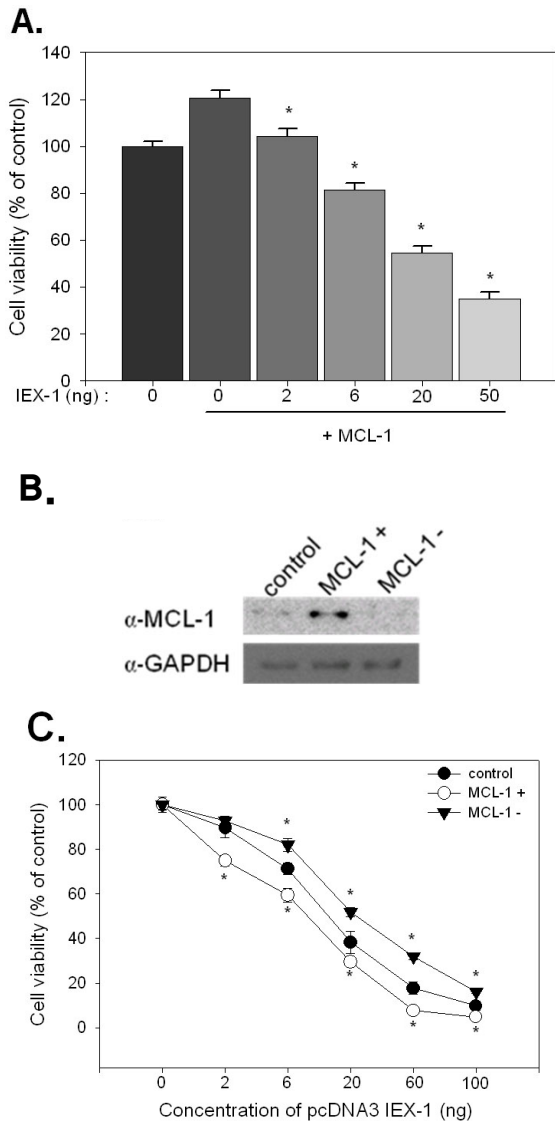
### 3. MCL-1 단백질을 Overexpression 또는 Knock-down 된 Stable 세포에서 생존율 검사

MCL-1 단백질이 안정적으로 과다 발현(overexpression)되거나 발현이 저하(knock-down)되었을 때, IEX-1의 과다 발현으로 인한 세포 사멸 효과에 어떤 변화가 있는지 확인하기 위하여 stable cell을 제작하여 실험에 이용하였다. MCL-1 단백질이 안정적으로 과다 발현하고, 발현 저하되는 세포만을 확보하기 위하여, selection marker에 의해 선택적으로



**Fig. 1. IEX-1 induces apoptosis in SK-OV-3 cells.** (A) Cell viability assays were performed using SK-OV-3 cells. The cells ( $3 \times 10^4$ ) were transfected with increasing amounts of pcDNA3 IEX-1 and analyzed after 24 h. At zero concentration, 100 ng of empty vector was used. Three independent viability tests in duplicate were performed. Data were presented as mean  $\pm$  S.E.M of viable cells. The significant values compared to the control were indicated with \* ( $p < 0.05$ ). (B) The cells ( $1 \times 10^6$ ) were transfected with 1.5  $\mu$ g of pcDNA3 MCL-1 or IEX-1. Control cells were transfected with an empty vector. At 24 h post-transfection, cells were harvested and stained with FITC-conjugated Annexin V for FACS analysis. Three independent experiments were conducted, and Annexin V-positive and PI-negative cells were quantified and expressed as fold changes relative to the control.

살아남은 세포를 배양하였고, MCL-1 단백질의 발현 변화를 확인하기 위하여 western blot을 실시하였다. MCL-1 단백질이 안정적으로 과다 발현되는 세포에서는 대조군 세포보다 MCL-1의 양이 증가되었고, 발현이 저하되는 세포에서는 감소된 것을 확인함으로써 stable cell 제작이 성공적임을 확인하였다(Fig. 2B). MCL-1 단백질의 양이 안정적으로 과



**Fig. 2. IEX-1 modulates pro-survival activity of MCL-1.** (A) SK-OV-3 cells were transfected with pcDNA-3 MCL-1, IEX-1, or both. The cells were transfected with 50 ng of pcDNA3 MCL-1 and increasing amounts of pcDNA3 IEX-1. Asterisks represent statistically significant values relative to the cells that were transfected with the MCL-1-coding plasmid ( $p < 0.05$ ). (B) Altered expression levels of MCL-1 in the stable cells produced were verified by immunoblot analysis; wild-type (control), overexpressed stable (MCL-1+), and stably knock-downed (MCL-1-) cells. (C) The cells were transfected with increasing amounts of pcDNA3 IEX-1 and analyzed after 24 h. At zero concentration, 100 ng of empty vector was used. Significant values between wild type and MCL-1+ or MCL-1- at the respective concentrations of IEX-1-encoding plasmid were indicated with \* ( $p < 0.05$ ).

다 발현되거나, 발현이 저하된 세포에서도 대조군 세포에서 확인되었던 IEX-1 과다 발현에 의한 세포 사멸은 유도되었다(Fig. 2C). 그러나 MCL-1의 발현이 증가된 세포보다 발현이 저하된 세포에서의 IEX-1에 의한 세포 사멸이 훨씬 민감하게 일어나는 것이 관찰되었다(Fig. 2C).

### 고찰

본 연구에서는 난소암 세포주를 이용하여 진행되었으며, IEX-1의 과다 발현에 따라서 세포 사멸을 유도하는 것은 MCL-1의 기능을 억제함으로써 가능하였다. MCL-1을 일시적으로 과다 발현시키거나, 안정적으로 과다 발현 또는 발현 저하된 stable cell에서도 대조군 세포에서 확인할 수 있었던 IEX-1에 의한 세포 사멸이 일어났다(Fig. 2A, C). 이러한 결과는 MCL-1의 세포 성장 기능을 IEX-1에 의하여 억제할 수 있다는 것을 말해준다. 그러나 MCL-1이 안정적으로 과다 발현된 세포에서는 IEX-1에 의한 효과가 대조군 세포에 비해서 약화되었으며, MCL-1이 안정적으로 발현 저하된 세포에서는 IEX-1의 효과가 훨씬 강하였다(Fig. 2C). 이런 결과는 MCL-1에 의한 세포의 성장을 촉진하는 기능이 IEX-1의 세포 사멸 기능에 의해서 변화될 뿐만 아니라, IEX-1의 세포 사멸 기능 역시 MCL-1의 세포 성장을 유도하는 기능에 의해서 영향을 받는다는 것을 의미한다. 기존의 연구 결과에서는 IEX-1의 과다 발현에 의한 세포 사멸의 기전은 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하여 생존율을 감소시켰고(Arlt et al., 2003), ERK와 AKT(RAC-alpha serine/threonine-protein kinase)의 신호전달 체계를 제어함으로써 세포의 성장을 촉진시키는 기전에도 관여를 하고 있다. 이런 결과를 종합해 보면, IEX-1과 MCL-1이 apoptosis 신호전달에서 서로의 역할을 조절하는 것은 다른 요소들이 복합적으로 관여하고 있는 것을 시사해 준다.

Pro-survival BCL-2 family는 종양의 발생과 성장의 주요한 원인이 되고 있다. MCL-1은 고형종양(solid tumors)에서 높이 발현하고 있을 뿐 아니라, 원발성 간암(hepatocellular carcinoma), 췌장암(pancreatic cancer), 고환암(testicular cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 비소세포폐암(non-small cell lung cancer), 흑색종(melanoma) 난소암(ovarian cancer) 환자에서 높이 발현되고 있는 단백질로 보고되었다(Warr & Shore, 2008; Kazushi et al., 2002). 현재 pro-survival BCL-2 family

member의 기능을 억제하는 물질을 이용한 항암제 개발이 시도되고 있으며(Warr & Shore, 2008), MCL-1에 의한 세포 성장 촉진 기능을 억제하는 IEX-1의 기능은 항암치료를 위한 새로운 MCL-1의 기능 억제를 위한 약제 개발에 응용될 수 있다.

난소는 그 위치가 복강 내에 있기 때문에 초기 난소암이 발생되더라도 증상 없이 진행되는 것이 대부분이다. 그러한 이유로 난소암의 70%는 3기 이상 진행되어서야 발견될 만큼 조기 발견이 힘든 암 중에 하나이다(Hand et al., 1993). 그러나 발생환자의 대부분이 초기에는 platinum-based cancer drug에 반응을 하지만, 재발되는 대부분의 환자는 시스플라틴(cisplatin) 또는 카보플라틴(carboplatin)과 같은 백금 항암제에 대한 내성을 가지게 되며(Sakai et al., 2008; Spriggs, 2003), 결국 사망에 이르게 된다. 그러므로 난소암 치료를 위한 항암치료는 항암제의 감수성을 높여서 치료의 성공률을 높이기 위해 많은 연구가 진행되고 있으며, pro-survival BCL-2 family의 기능을 억제하는 것도 항암제의 감수성을 높이기 위한 방법으로 시도되고 있다. 본 연구를 통해서 IEX-1은 ovarian cancer cell인 SK-OV-3 세포에서도 과다 발현에 따른 세포 사멸이 유도된다는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라 MCL-1의 과다 발현에 의한 생존을 상승도 IEX-1의 과다 발현에 의하여 억제되었다(Fig. 2A). 이런 결과들은 IEX-1의 세포 사멸을 유도하는 기능이 ovarian cancer에서 MCL-1의 기능을 억제할 수 있는 항암제 개발을 위해 사용될 수 있는 가능성을 말해준다.

본 연구에서 TNF와 diphtheria toxin, cisplatin, adriamycin, cytokine drug 등에 내성을 가진 것으로 알려진 SK-OV-3 세포를 이용하여 처음으로 IEX-1의 과다 발현에 의한 세포 사멸을 밝히고, MCL-1의 세포 성장을 촉진하는 기능을 저해하는 현상을 확인하였다. 본 연구는 MCL-1 기능의 억제제의 개발 가능성을 시사하고 있으며, 특히, 재발의 위험성이 높은 난소암 발달을 이해하고, 치료제 개발을 위한 연구에 초석이 될 수 있을 것으로 기대한다.

## 감사의 글

This work was supported by the Basic Science Research Program (2009-0066379; 2010-009498) and the Priority Research Centers Program (2009-414-E00006) through the

National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology.

## 인용문헌

- Arlt A, Kruse ML, Breitenbroich M, Gehrz A, Koc B, Minkenberg J, Fölsch UR, Schäfer H (2003) The early response gene IEX-1 attenuates NF-kappaB activation in 293 cells, a possible counter-regulatory process leading to enhanced cell death. *Oncogene*. 22:3343-3351.
- Bae J, Donigian JR, Hsueh AJ (2003) Tankyrase 1 interacts with Mcl-1 proteins and inhibits their regulation of apoptosis. *J Biol Chem* 278:5195-5204.
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17:393-403.
- Garcia J, Ye Y, Arranz V, Letourneux C, Pezeron G, Porteu F (2002) IEX-1: a new ERK substrate involved in both ERK survival activity and ERK activation. *EMBO J* 21:5151-5163.
- Hand R, Fremegen A, Chmiel SJ, Recant W, Berk R, Sylvester J, Sener S (1993) Staging procedures, clinical management and survival outcome for ovarian carcinoma. *J Am Med Assoc* 269:1119-1122.
- Jamil S, Sobouti R, Hojabrpour, Raj M, Kast J, Duronio V (2005) A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem J* 387:659-667.
- Kazushi S, Osamu K, Yuko S, Shoji, Keiji M, Nobutaka N, Koso O (2002) Increased MCL-1 expression is associated with poor prognosis in ovarian carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 93:542-550.
- Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH (2006) Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 8:1348-1358.

- Kondratyev AD, Chung KN, Jung MO (1996) Identification and characterization of a radiation-inducible glycosylated human early-response gene. *Cancer Res* 56:1498-1502.
- Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW (1993) MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3516-3520.
- Kumar R, Kobayashi T, Warner GM, Wu Y, Salisbury JL, Lingle W, Pittelkow MR (1998) A novel immediate early response gene, IEX-1, is induced by ultraviolet radiation in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 253:336-341.
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17:525-535.
- Nijhawani D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X (2003) Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 17:1475-1486.
- Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, Suh H, Mizuno S, Akashi K, Korsmeyer SJ (2005) Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* 307:1101-1104.
- Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB (1995) Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol* 260:406-417.
- Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, Agarwal MK, Higgins J, Friedman C, Villegas E, Jacquemont C, Farrugia DJ, Couch FJ, Urban N, Taniguchi T (2008) Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* 451:1116-1120.
- Schilling D, Pittelkow MR, Kumar R (2001) IEX-1, an immediate early gene, increases the rate of apoptosis in keratinocytes. *Oncogene* 20:7992-7997.
- Spriggs D (2003) Optimal sequencing in the treatment of recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 90:S39-43.
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
- Warr MR, Shore GC (2008) Unique biology of Mcl-1: therapeutic opportunities in cancer. *Curr Mol Med* 8:138-147.
- Wu MX, Ao Z, Prasad KV, Wu R, Schlossman SF (1998) IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science* 281:998-1001.
- Yoon S, Ha HJ, Kim YH, Won M, Park M, Ko JJ, Lee K, Bae J (2009) IEX-1-induced cell death requires BIM and is modulated by MCL-1. *Biochem Biophys Res Commun* 382:400-404.
- Zhang D, Li F, Weidner D, Mnjayan ZH, Fujise K (2002) Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. *J Biol Chem* 277:37430-37438.
- Zhang Y, Finegold MJ, Porteu F, Kanteti P, Wu MX (2003) Development of T-cell lymphomas in Emu-IEX-1 mice. *Oncogene* 22:6845-6851.

---

(received 8 March 2010, received in revised form 27 April 2010, accepted 28 April 2010)