



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](#)

교육학석사학위논문

별불가사리(*Asterina pectinifera*)에서 유래한
펩타이드 호르몬(SFIII)에 대한 Breast Cancer
Cell에서의 세포신호전달 연구



2010년 2월

부경대학교교육대학원

생물교육전공

공 호 진

교육학석사학위논문

별불가사리(*Asterina pectinifera*)에서 유래한
펩타이드 호르몬(SFIII)에 대한 Breast Cancer
Cell에서의 세포신호전달 연구

지도교수 김 군 도

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함

2010 년 2 월

부경대학교교육대학원

생물교육전공

공 호 진

공호진의 교육학석사 학위논문을 인준함



주 심 이학박사 김 영 태 (인)

위 원 이학박사 송 영 환 (인)

위 원 이학박사 김 군 도 (인)



목 차

Abstract	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	7
Antibodies	7
세포배양	7
Western blotting	7
MTT assay	8
cAMP assay	9
III. 결 과	10
SFⅢ가 MAP kinase 에 미치는 영향	10
SFⅢ가 Raf kinase 에 미치는 영향	12
SFⅢ가 PKC 에 미치는 영향	14
SFⅢ가 p21 activated kinase 에 미치는 영향	16
SFⅢ에 의한 cAMP 농도변화	18
SFⅢ을 처리한 유방암세포의 생존율 조사	20

IV. 고 찰.....	22
V. 요 약.....	24
VI. 참고 문헌	26



Abstract

The kinase families of Mitogen-activated protein kinase (MAPK) or Extracellular signal regulated kinase (Erk1/2) was recognized of diverse iso-forms. And the best famous process was signal transmission channel progress with the three kinases (Raf-MEK1/2-Erk1/2). MAPK was the representative signal transmission channel related to that was delivering extracellular impetus from cell membrane to nucleus. Also, MAPK proved to that play a pivotal role in the intracellular signal transmission – related to differentiation, proliferation, existence of cell. On this account, MAPK is progressing to Cancer Target Protein; cause of MAPK has the ability to phosphorylate impedimenta in relation to treatment of cancer.

I want to that contribute this thesis to developing of anti-cancer medicine and medical supplies, using asteroid, which called over the representative noxious marine organism, extracts. So, First of all, I]lended the SFⅢ which was the peptide hormone for revitalization of the muscle relaxant from *Asterina pectinifera*. And, I prescribed the SFⅢ to the MDA-MB-231 which culture cell of breast cancer. Lastly, I observed the mechanism of signal transmission related to the SFⅢ.

At the process of experimentation which SFⅢ was prescribed to the MDA-MB-231, I used the calcitonin (CT) to the control group; cause of CT was alike in molecular structure to the SFⅢ. CT was known that inhibit a formation of cancer which due to the MDA-MB-231, and that inhibit a phosphorylation of ERK. I make progress the western blotting at the diversity of SFⅢ concentrations to the MDA-MB-231. Consequently, I observe phospholyate activation of MEK1/2 (second kinase). And, I make progress the western relate to the time. Like the preceding, I observe the phospholyate activation of MEK1/2-Erk1/2 after 1 hour (from prescribe the SFⅢ).

At the trace of signal transmission which connect with MAPK families, I observe that is suppressed the protein kinase C (PKC) α/β phosphorylation which take charge of Ca^{+} depending signal transmission. Finally, I observe that accelerate a phosphorylation of on/off switch (Raf kinase), due to the PKC and MEK1/2 phosphorylation of stimulated by p21-activated kinase, not via Raf kinase

Key word: MAPK (Mitogen-activated protein kinase), Erk1/2 (Extracellular signal regulated kinase), *Asterina pectinifera* (Asteroid), SFIII, MDA-MB-231 (culture cell of breast cancer), PKC (protein kinase C), Westren blotting



I. 서론

불가사리는 수산양식산업에 큰 피해를 주는 대표적인 해적생물로 지정되어 있다. 불가사리의 포식성에 의한 직접적인 산업 피해 뿐만 아니라 양식장으로 몰려드는 개체를 제거하는데 소모되는 비용 또한 많은 산업적인 손실을 야기해왔다. 그러나 최근 해양생물이 가진 자원에 대한 관심이 높아지면서 불가사리를 활용하여 유용한 생물자원을 개발하고자 많은 연구가 진행되어지고 있다.(Jang, 2003)

본 실험은 부경대학교 수산과학대학소속 바이오메디컬사이언스 연구실이 별불가사리(*Asterina pectinifera*)에서 발견한 신경성 펩타이드인 SFⅢ의 활용방안을 찾고자 이에 필요한 세포생물학적인 기초자료를 얻고자 연구를 수행하였다.

SFⅢ는 별불가사리(*Asterina pectinifera*)로부터 근육이완 활성을 나타낸 물질을 분리·정제하여 찾은 신경성 펩타이드이다.(Kim, 2004) 극피동물인 불가사리에 대한 생태적인 연구는 많이 이루어져있지만 SFⅢ처럼 불가사리의 생리활성과 관련된 물질에 대한 국내연구는 미비한 실정이다. 국외에서도 많은 연구가 이루어진 것은 아니지만 실제로 활용단계까지 진행된 연구 성과로는 북대서양에 서식하는 불가사리 종인 *Asterins rubens* 와 *Asterias forbesi* 에서 얻어진 S1 과 S2 에 대한 연구 보고가 있다.(Elphick *et al.* 1991)

본 연구를 진행함에 있어서 SFⅢ와 관련된 선행연구를 찾을 수가 없었기에 SFⅢ와 비슷한 시스테-시스테인 결합 고리구조를 지닌 칼시토닌의 연구 결과를 참조하였다.(fig 1) 칼시토닌은 체내에 칼슘대사와 관련된 대표적인 펩타이드 호르몬인데, 몇몇 암에서 종양형성을 억제하며 신호전달 분자인 Mitogen activated protein 인산화효소(MAP Kinase)의 인산화를 억제하는 효과가 있다.(Misa. N et al. 2007)

MAP Kinase 는 세포의 생존과 성장, 분화에 관여하는 단백질 신호전달 인산화 효소로서 포유동물에서 크게 4 가지 그룹으로 분류되어 활발하게 연구되고 있다.(fig 2) 이중 가장 많은 연구가 이루어지고 있는 것은 Raf kinase-ME Kinase-MAP Kinase 의 3 개 단백질을 묶은 신호전달경로가 있다. (Mccubbrery et al. 2007)MAP Kinase 는 세포막의 외부에서 신호전달 분자가 수용체에 결합하게 되면 Protein Kinase A(PKA)또는 Protein Kinase C(PKC)와 같은 신호전달 분자들에 의해 세포생장과 분화에 관련된 여러 단백질들의 발현에 영향을 주게 된다.(Zuber et al, 2000) (Schulze et al, 2004) 또한 이들 분자는 암세포의 세포생리에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 암치료를 목표로 많은연구가 이루어지고 있다. (Robert. PJ et al. 2007) 따라서 본 연구는 SFⅢ에 의한 MAP Kinase 의 인산화 활성의 변화와 이들의 인산화에 영향을 주는 세포내의 신호전달 분자들을 조사하였다.

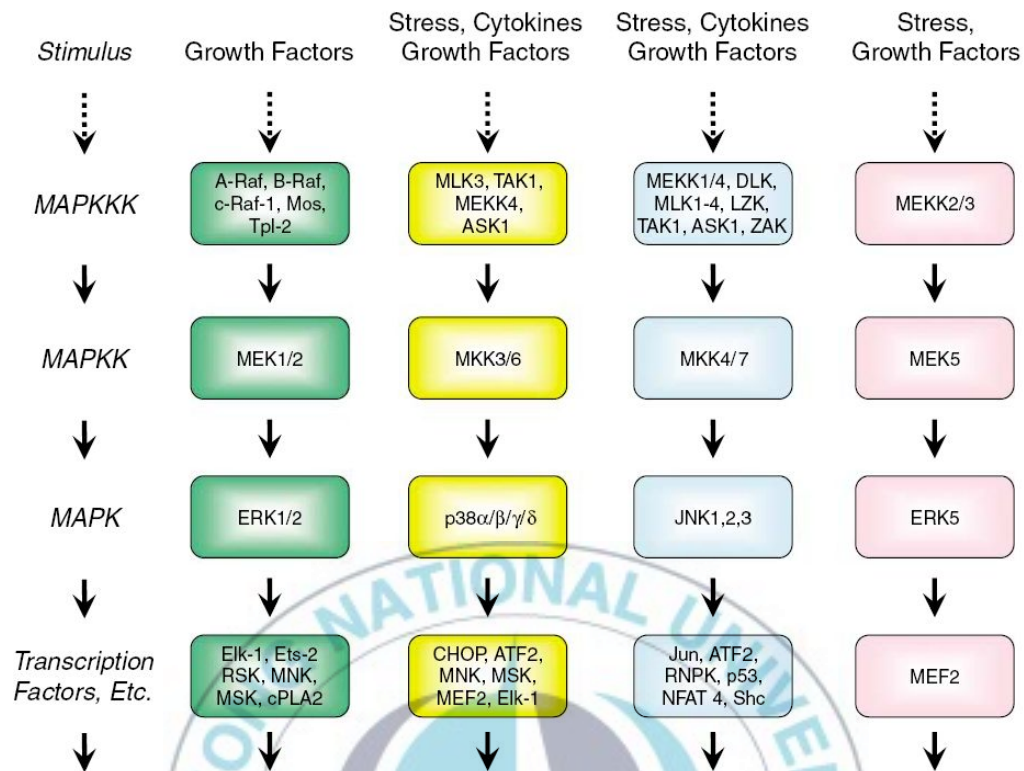


Figure 2. Four major Mammalian MAPKKK-MAPKK-MAPK protein kinase cascades.

from PJ Roberts, CJ Der(2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3293 fig 2.

II. 재료 및 방법

1. Antibodies

Anti-MAPK p44/p42 (pT202/pY204), Anti-MEK1/2 (pS217/221), Anti-C-Raf (pS338), Anti-C-Raf (pS259), Anti-B-Raf (pS445), Anti-PKC α/β II (pT638/641), Anti-PAK1/PAK2 (pS199-204/pS192-197), Anti- β actin.

2. 세포배양

계대 보존 중인 사람의 유방암 세포주인 MDA-MB-231 를 해동시켜 Fetal bovine serum(Thermo Sci/Hyclone, USA)10%와 페니실린 1%를 , 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(Thermo Sci/Hyclone, USA)을 배양액으로 사용, 37℃, 5 % CO₂ 배양기에서 3~4 일 기간으로 계대배양하여 실험에 사용하였다.

3. Western blotting.

10mm 크기의 세포배양 접시에 3.0 x 10⁵ cell 씩 분주하여 72 시간 배양하여 SFIII 200nM 농도에서 각각 30 분, 1 시간, 3 시간 ,12 시간 동안 배양한 후, 배양액들을 제거하고 4℃, PBS 용액을 이용하여 배양액을 세척,

완전제거 후 RIPA(Cell Signaing Tech, USA)용액 50 μ l씩 사용하여 세포 용해 과정을 실행하였다. 세포의 용해액은 SDS-sample buffer(6.25mM Tris-HCl(pH 6.8), 2% w/v SDS, 10% 글리세롤, 50nM DTT, 0.1% w/v bromophenol blue)를 첨가하여 끓는 물에서 4 분간 변성과정을 거쳐서 사용하였다. 변성된 단백질을 8% 또는 10%, 12% Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel 에서 40 μ g/well 로 분리 한 후 완충액 (20% methanol, 25mM Tris, 192mM glycine)을 사용하여 nitro cellulose membrane(Schleicher & Schuell, USA)으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 것을 2 시간 동안 blocking(5% skim milk powder/10mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20)한 후 4℃, 12 시간 동안 일차 항체를 다음과 같은 조건으로(5% skim milk powder or 5% Bovine serum albumine/10mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20) 반응시켰다. 일차반응 후 nitro cellulose membrane 을 세척하고 1 시간 동안 Horseradish peroxidase(HRP)가 표지된 이차 항체 (Cell Signaing Tech, USA)를 사용하여 단백질 표본에 표지를 달았다. 이차반응까지 끝난 membrane 은 세척과정을 거친 이후 Enhance chemiluminescence(Cell Signaing Tech, USA)을 사용하여 확인하였다.

4. MTT assay

MDA-MB-231 1.0×10^4 세포를 FBS 가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(Thermo Sci/Hyclone, USA)배지 100 μ l를 96-well 세포 배양판에 분주한다. 37℃, 5 % CO₂ 배양기에서 36 시간 배양 후 FBS 가 없는 배지에서 12 시간 동안 안정화 하였다. 준비된 세포에는 각각 SFIII(0 μ l/ml), SFIII100nM (0.01 μ l/ml), SFIII250nM (0.25 μ l/ml),

SFIII500nM ($0.5 \mu\text{l/ml}$)를 첨가한 후, 37°C , 5 % CO_2 배양기에서 12 시간 동안 반응을 시킨 후 EZ-Cytox Enhanced Viability assay kit 의 WST-1 $10 \mu\text{l}$ 를 각각의 well 에 넣은 후 37°C , 5 % CO_2 배양기에서 6 시간 반응 시킨 후 450nm 에서 흡광도를 측정하였다.

5. cAMP assay

MDA-MB-231 1×10^5 세포를 FBS 가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(Thermo Sci/Hyclone, USA)배지 1 ml를 12-well 세포 배양판에 분주하여 37°C , 5 % CO_2 배양기에서 배양 후 FBS 가 없는 배지에서 12 시간 동안 안정화 하였다. 준비된 세포에는 각각 SFIII($0 \mu\text{l/ml}$), SFIII250nM ($0.25 \mu\text{l/ml}$), SFIII500nM ($0.5 \mu\text{l/ml}$)를 첨가한 후, 37°C , 5 % CO_2 배양기에서 30 분 동안 반응을 시킨 후 세포를 모두 수거하여 cAMP assay kit(Assay Design, USA)를 사용한 후 405nm 에서 흡광도를 측정하였다

III 결 과

1. SFⅢ가 Mitogen Activated Protein kinase (ERK1/2)의 인산화에 미치는 영향

SFⅢ에 의한 세포신호전달 경로를 연구하기 위해 우선 SFⅢ와 구조적으로 유사하다고 생각되는 인간 유래 칼시토닌의 연구결과를 참조하였다. MDA-MB-231 유방암 세포에 인간 유래 칼시토닌을 처리하였을 경우 MAP Kinase 의 인산화가 억제된다는 연구논문을 참조()하여 실험을 수행한 결과 인간 유래 칼시토닌 10nM 과 50nM 농도 모두 ERK1/2 의 인산화가 억제 되고 있음을 관찰 할 수 있었다.(Figure (A)) 반면 SFⅢ를 처리한 MDA-MB-231 유방암 세포에서는 SFⅢ 처리후 1 시간까지 대조군보다 더욱 인산화가 촉진되었다가 다시 감소되는 것으로 관찰할 수 있었다.

또한 MAP Kinase 의 상위단계의 신호전달 분자인 MEK 1/2 의 인산화 변화도 SFⅢ를 처리한 ERK1/2 와 같이 SFⅢ처리 후 1 시간까지 인산화가 촉진되었다가 다시 감소하는 결과가 관찰 되었다. 이를 종합하여 볼 때 SFⅢ에 의해서 ERK1/2 의 인산화가 촉진된다는 것을 알 수 있었다. 따라서 SFⅢ는 인간 유래 칼시토닌과 서열 앞부분의 일부 Cys-Cys 의 고리 구조가 유사한 형태일 뿐 MDA-MB-231 유방암 세포에 다른 작용을 하는 물질로 생각된다.

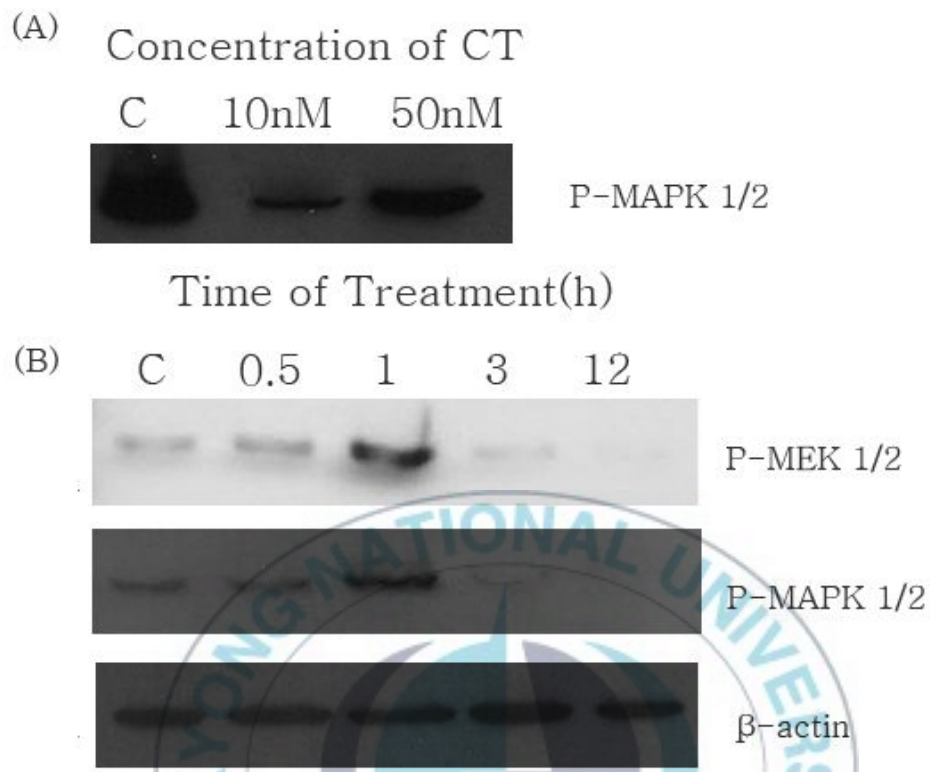


Figure.3 Western blotting result for ERK1/2 &MEK1/2

(A) Human calcitonin suppresses phosphorylation of ERK1/2 in MDA-MB-231 cells were treated with 30 min

(B) Time dependence analysis of the effect on MEK1/2 and ERK1/2 phosphorylation in MDA-MB-231 cells were treated with 250nM of SFIII

2. SFⅢ가 Raf kinase 의 인산화에 미치는 영향

ERK1/2 와 MEK 1/2 모두 SFⅢ에 의해 인산화가 촉진되는 경로를 찾고자 세포막에서 전달된 신호를 ERK1/2 와 MEK 1/2 에 전달해주는 MAP kinase 신호전달의 첫 단계에 위치한 Raf Kinase 의 인산화 조절에 의해 조절된다.(Hindley et al, 2002) 이를 관찰하기 위해 Western blotting 을 수행하였다.

Raf kinase 는 3 가지 형태의 동형효소가 알려져있는데, 이들 중 가장 연구가 많이 진행된 효소는 C-Raf(Raf-1)인데 아미노산인 세린잔기의 인산화 부위와 14-3-3 단백질 그룹과의 상호작용에 따라 세포내에서 활성이 조절된다. (Shengfeng et al, 1995) MDA-MB-231 유방암 세포에 SFⅢ 250nM 을 처리하고 시간에 따른 Raf kinase 의 인산화 변화를 관찰한 결과, Ca^{2+} 또는 Small GTPase 인 Ras 에 의해 활성을 가지는 PKC 로부터 오는 신호를 전달해주는 C-Raf Kinase 의 Ser338 잔기가 대조군에 비해 인산화 억제가 일어나고 있는 것을 관찰할 수 있었다. (Figure4, (A)) 반면 C-Raf 가 비활성화 상태일 때 인산화가 촉진되는 C-Raf Kinase 의 Ser259 잔기는 대조군에 비해서 인산화가 촉진되고 있는 것으로 관찰되어 (Figure4, (B)) C-Raf Kinase 로부터 ERK1/2 의 인산화 활성화에 영향을 주는 신호가 전달되지 않는 것으로 관찰 되었다.

cAMP 농도 의존적으로 활성이 유도되는 PKA 의 신호를 받아 MAP Kinase 에 신호를 전달하는 B-Raf Kinase 의 경우는 SFⅢ에 의한 영향을 받지 않는 것으로 관찰되어 B-Raf Kinase 역시 MAPK 1/2 와 MEK 1/2 의 인산화에 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다.

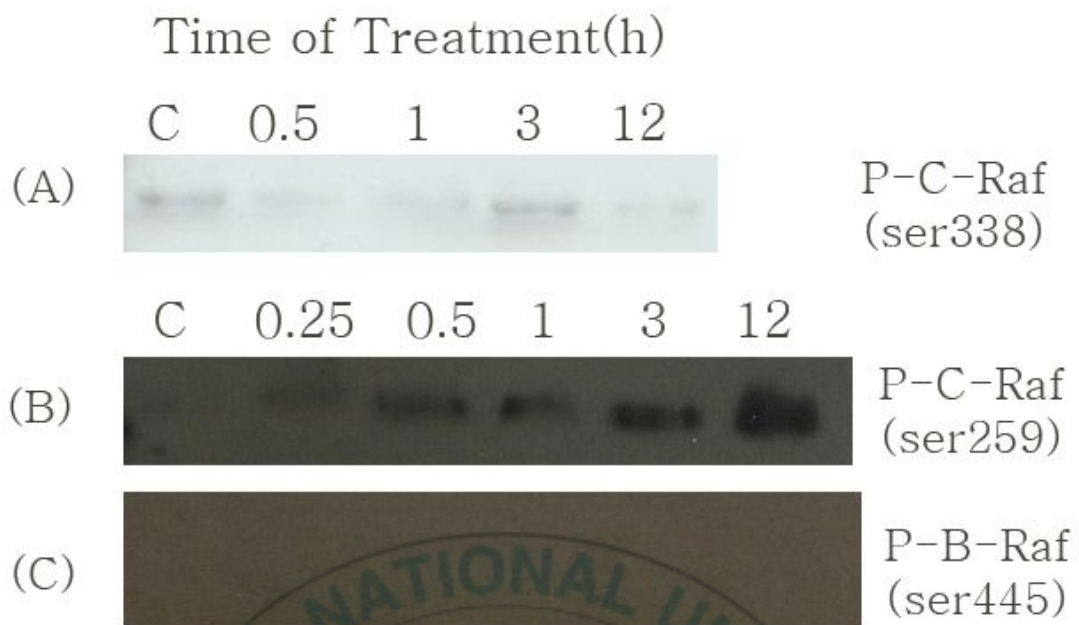


Figure 4. Western blotting result for Raf kinases

- (A) Time dependence analysis of the effect on Ser³³⁸-C-Raf phosphorylation in MDA-MB-231 cells were treated with 250nM of SFIII
- (B) Time dependence analysis of the effect on Ser²⁵⁹-C-Raf phosphorylation in MDA-MB-231 cells were treated with 250nM of SFIII
- (C) Time dependence analysis of the effect on Ser⁴⁴⁵-B-Raf phosphorylation in MDA-MB-231 cells were treated with 250nM of SFIII

3. SFⅢ가 Protein Kinase C의 인산화에 미치는 영향

MDA-MB-231 유방암 세포에 SFⅢ를 처리하였을 때 C-Raf Kinase와 MAPK 1/2와 MEK 1/2의 인산화 관찰결과를 보다 자세하게 확인해보고자 PKC α / β Ⅱ의 인산화 변화를 관찰해 보았다.

SFⅢ 250nM을 MDA-MB-231 유방암 세포에 처리한 후 western blot을 수행하였다.

SFⅢ를 처리하고 난 후 PKC α / β Ⅱ는 대조군에 비해 인산화가 억제된 비활성 형태로 관찰되었고 점차 시간이 지나면서 인산화가 촉진되는 모습이 관찰되다, C-Raf Kinase의 western blot 실험결과와 PKC의 실험결과가 연속되고 있는 것을 관찰 할 수 있었다.



Time of Treatment(h)



Figure 5. Time dependence analysis of the effect on Thr^{638/641}PKCα/βII phosphorylation in MDA-MB-231 cells were treated with 250nM of SFIII



4. SFⅢ가 P21-Activated Kinase 의 인산화에 미치는 영향

Raf Kinase 가 아닌 다른 세포신호전달 경로를 거쳐서 ERK1/2 와 MEK 1/2 인산화가 촉진되는 경로를 찾고자 관련 분자들을 확인하던 중 P21-Activated Kinase 가 MEK 1/2 의 인산화 촉진을 유발할 수 있다는 것을 확인하고 이를 관찰하고자 western blot 을 수행하였다.

MDA-MB-231 유방암 세포에 SFⅢ 250nM 을 처리하고 인산화를 관찰한 결과 SFⅢ를 처리한 후 약 15 분부터 대조군에 비해서 인산화가 촉진되어있는 결과를 보이고 있으며 SFⅢ처리 30 분 이후부터는 대조군과는 큰 차이가 없는 것을 관찰할 수 있었다. (Figure6, (A))

이 결과를 바탕으로 P21-Activated Kinase 의 인산화에 영향을 줄 수 있는 신호전달 분자들을 확인하고자 몇몇 신호전달 분자들의 Western blotting 을 관찰해본 결과 세포막의 수용체로부터 신호를 받아 세포내부로 신호전달을 해주는 Small GTPase 계열의 신호전달 분자인 Ras 의 활성 변화가 관찰되었다. (Figure6, (B))

Ras 의 인산화 활성변화 실험은 MDA-MB-231 유방암 세포에 SFⅢ 250nM 을 처리한 후 약 30 분 후부터 계속적으로 활성을 나내고 있는 것을 관찰할 수 있었고 이 결과들로 인해 Raf Kinase 를 거치지 않는 경로로 ERK1/2 와 MEK 1/2 의 인산화가 촉진 될 수 있음을 설명할 수가 있었다.

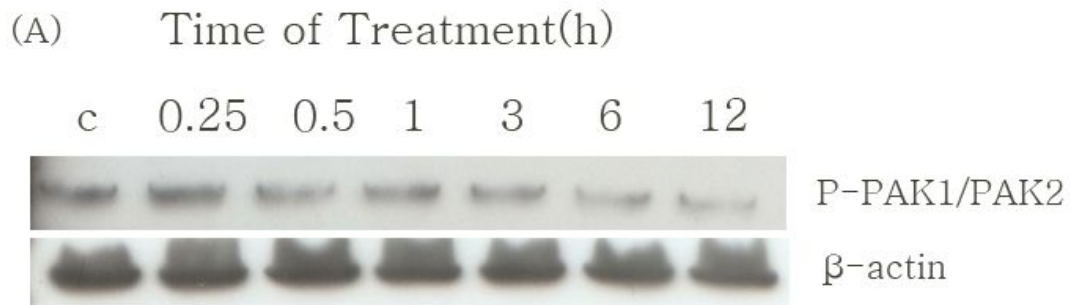


Figure 6. Western blotting result for PAK1/2 & Ras

- (A) Time dependence analysis of the effect on Ser^{199/204}PAK1/Ser^{192/197}PAK2 phosphorylation in MDA-MB-231 cells were treated with 250nM of SFIII
- (B) Time dependence analysis of the effect on Ras activation in MDA-MB-231 cells were treated with 250nM of SFIII

5. SFⅢ가 cAMP 의 농도변화에 미치는 영향

MDA-MB-231 유방암 세포에 SFⅢ를 처리하였을 때 Protein Kinase A 의 신호전달 경로에 영향을 주는 cAMP 의 농도변화를 관찰해보고자 SFⅢ를 각각 250nM, 500nM 을 처리하였다. (Figure 7) 실험결과 250nM 의 SFⅢ를 처리한 MDA-MB-231 유방암 세포에서는 0.414pM, 500nM 의 SFⅢ를 처리한 MDA-MB-231 유방암 세포에서는 0.4pM 농도의 cAMP 를 확인하였다. 그러나 관찰된 결과들의 신뢰도 값이 유의미한 범위를 벗어난 결과가 많았으며 산출된 값들을 대조군의 0.389pM 과 비교해봤을 때 역시 SFⅢ에 의한 세포질 내의 cAMP 의 농도변화에 유의미한 영향을 주지 못하는 것으로 여겨진다.



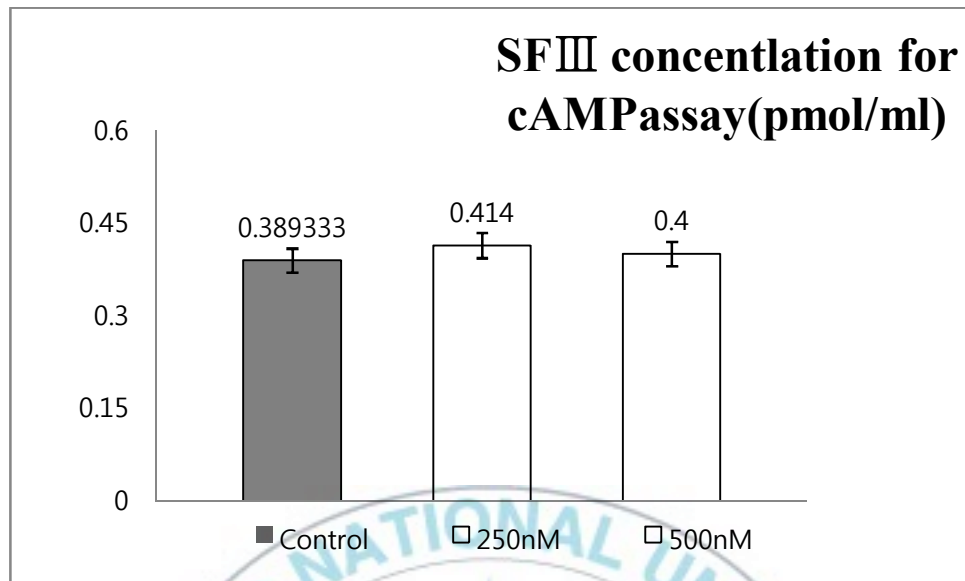


Figure 7.

Measurement of intracellular cAMP concentration in MDA-MB-231 cells were incubated with SFIII 250nM(0.25 μ l/ml), 500nM(0.5 μ l/ml) added to the cells and incubation for 30min in 37 °C, 5 % CO₂ condition (**p<0.01 ,*p<0.05)

6. SFⅢ의 농도에 따른 세포 생존율에 미치는 영향

SFⅢ이 MDA-MB-231 유방암 세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰하고자 MTT assay 를 실행하였다.

대조군의 결과를 100%로 기준을 놓고 각각 SFⅢ 100nM, 250nM, 500nM 을 처리하였을 때 상대적인 생존율을 비교한 결과 SFⅢ 100n 에서 96%의 생존율을 보였고, 250nM 에서 108%의 생존율, 500nM 에서 103%의 생존율을 나타내었다. 관찰된 결과를 비교해보면 MDA-MB-231 유방암 세포는 SFⅢ에 의해 생존률이 크게 향상되거나 생존률이 크게 감소하는 어떤 현상도 관찰할 수 없었다. 따라서 SFⅢ가 세포의 생존율에는 영향을 주지 못하는 것으로 여겨진다.



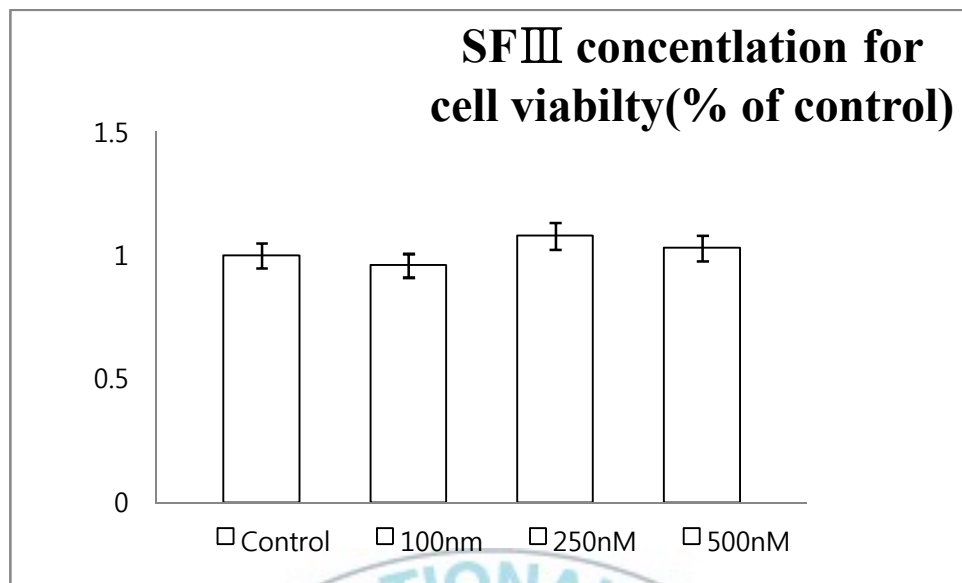


Figure8.

MDA-MB-231 cells were incubated with SFIII 100nM($0.1\mu\text{l}/\text{ml}$) 250nM($0.25\mu\text{l}/\text{ml}$), 500nM($0.5\mu\text{l}/\text{ml}$), added to the cells and incubation for 12hr in 37 °C, 5 % CO₂ condition (**p<0.01 ,*p<0.05)

IV. 고 찰

SFⅢ에 대한 유방암세포 MAP Kinase 의 인산화 활성을 조사하였고 이를 바탕으로 세포막에서 MAP Kinase 까지 이어지는 세포내의 신호전달 경로를 조사하였다.

SFⅢ에 대한 사전 연구자료가 없었기에 칼시토닌과의 비교를 초기 연구 방향으로 설정하고 진행을 하였다. 칼시토닌에 의해서 인산화가 억제되는 ERK1/2 는 SFⅢ에 의해 인산화가 더욱 촉진되는 western blot 실험결과를 보여주었고 이는 단순히 칼시토닌과 SFⅢ는 비슷한 고리구조만 있을 뿐 생리활성이 다르다는 것을 추측할 수가 있었다.

MAP Kinase 신호전달의 첫 단계의 Raf Kinase 의 인산화 western blot 실험결과에서는 주로 cAMP 와 PKA 의 활성화에 의해 인산화가 촉진되는 B-Raf 와 Ras 및 PKC 에 의해 주요 신호전달을 받아 활성화 되는 C-Raf(Kolch et al, 1993)모두 인산화 활성이 억제되고 있는 것을 관찰하였다. 이는 SFⅢ에 의한 MDA-MB-231 세포의 MAP Kinase 신호전달 경로가 Raf Kinas 를 경유하지 않고 아래단계인 MEK1/2 의 인산화를 촉진하는 경로로 세포신호 전달이 이루어 지는 것으로 추측되었다.

P21 활성 인산화효소(PAK1/2)의 동형효소 그룹들은 세포골격 제조정, MAP Kinase 신호전달, 세포자살관련 신호전달, 등에 관여(Knaus et al, 1998)하는 신호전달 분자이다. PAK1/2 가 Raf 를 경유하지 않고 직접

MEK1/2 의 인산화 활성을 유발할 수 있다는(Park et al, 2007) 기존 연구를 참고하여 이후 실험을 진행 한 결과 실제로 SFⅢ에 의해 활성화된 Small GTPase 인 Ras 를 경유하여 PAK1/2 가 MEK1/2 의 인산화 촉진에 영향을 주는 western blot 실험결과를 확인 할 수 있었다.

SFⅢ는 암세포의 성장을 억제 시키는 반응을 나타내지는 않았지만 세포의 생존과 성장·분화에 많은 관여가 있는 MAP Kinase 의 인산화 활성화에 관여하는 것으로 보아 세포의 성장 촉진과 관련된 인자들에 대한 연구를 계속 진행하면 또 다른 연구성과를 얻을 수 있는 물질로 생각된다. 또한 SFⅢ가 Ca^{+2} 에 의존적인 PKC 의 인산화 활성화에 영향을 주고 있는 것으로 보아 세포질 내의 Ca^{+2} 의 농도 변화가 일어나고 있는 것으로 추측된다. 따라서 SFⅢ에 의한 세포내의 Ca^{+2} 에 관련된 물질대사 연구, 조골세포 혹은 파골세포의 SFⅢ에 대한 반응에 대한 파생연구도 가능할 것으로 생각된다.

V. 요약

Mitogen-activated protein kinase(MAPK) 또는 Extracellular signal regulated kinase(Erk1/2)라고 불리는 인산화 효소 그룹은 매우 다양한 동형 효소가 존재하는데 가장 연구된 그룹은 Raf-MEK1/2-Erk1/2 의 3 개의 kinase 를 거쳐가는 신호전달경로이다. MAPK 는 세포외의 자극을 세포막에서 세포내 핵까지 전달하는 매우 대표적인 신호전달 경로이며, 세포의 분화 및 증식, 생존과 관련된 세포내 신호전달에 중추적인 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 기능 때문에 현재 MAPK 의 인산화 저해현상을 활용하여 암치료에 사용하고자 MAPK 를 표적단백질로하여 많은 연구가 이루어지고 있다.

본 연구의 목적은 대표적인 해적생물로 지목되고 있는 불가사리에서 얻은 해양자원을 유용하게 활용하고자 별불가사리(*Asterina pectinifera*)로부터 분리·정제된 근육이완활성을 나타낸 펩타이드 호르몬인 SFⅢ를 이용하여 항암치료제 및 의약품으로서의 개발에 기초연구자료를 제공하고자 인간 유방암세포주인 MDA-MB-231 세포주에 SFⅢ를 투여하여 MAPK 를 포함하여 이와 연결된 세포신호전달 기작을 확인하였다.

MDA-MB-231 세포주에 SFⅢ을 처리하면서 분자구조가 유사한 칼시토닌(Calcitonin)을 대조군으로 사용하였다. CT 은 MAPK 의 인산화를 억제시키면서 MDA-MB-231 에 의한 종양형성을 억제한다고

보고되어져있다. MDA-MB-231 세포주에 SFⅢ을 다양한 농도로 반응시켜 Western blotting 을 수행한 결과 MAPK 의 상위단계에 있는 인산화 효소인 MEK1/2 에서 인산화를 촉진하는 것을 관찰하였고, 시간의존적인 실험결과에서도 역시 SFⅢ를 투여 1 시간 경과 후에 MEK1/2-MAPK 의 인산화효소 모두 인산화활성을 관찰 할 수 있었다. MAPK 그룹으로 이어지는 신호전달경로의 상위단계 중에 하나로 Ca^{+2} 의존적인 신호전달을 담당하는 Protein kinase C(PKC) α/β Ⅱ의 인산화는 억제되는 것을 관찰 할수 있었고, 하위단계에 있는 Raf kinase 의 on/off 스위치가 PKC 의 실험결과를 따라가는 것을 관찰 할 수가 있었다. 또한 Raf 를 경유하지 않는 MAP kinase 신호전달을 탐색하여 p21-activated 인산화효소가 MEK1/2 의 인산화 촉진을 유도하는 것을 확인하였다.

VI. 참고 문헌

Elphick, M.R., Price, D. A., Lee, T.D. and Thorndyke, M.c. (1991).
The SALMFamides: a new family of neuropeptides in the starfish
Asterias rubens. J. Exp. Biol. 198, 2519-2525

Hindley, A. and Kolch, W. (2002) Extracellular signal regulated
kinase(ERK)/mitogen activated protein kinase(MAPK)-independent
functions of Raf kinase. J. Cell. Sice. 115, 1575-1581

Jang, J.S. (2004) 불가사리의 활용에 대한 기술 동향. (2004).
한국특허정보원.

Kim, E.J., and Park, N.K. (2004) 별불가사리(*Asterina pectinifera*)로
부터 새로운 신경성 펩타이드들의 분리·정제 및 생리활성. 부경대학교

Knaus, U. G. and Bokoch, G. M. (1998). The p21Rac/Cdc42-
activated kinase(PAKs). J. Bioc. Cell Bio. 30, 857-862

Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzell, G., Marme, D., Rapp U, R. (1993). Protein kinase C alpha activates Raf-1 by direct phosphorylation. Nat. 364(6434), 249-252

Mccubrery, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W.H., Abrams, S. L., Wang, E. A., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D, M., Milella, M., Taturi, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J. and Franklin, R,A. (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, Malignant transformation and Drug resistance. Bioch. Biophys. Acta. 1773(8), 1263-1284

Misa, N., Bo. H., Toshihide, N., Yanhua, B., and Kennichi, K. (2007). Calcitonin targets extracellular signal regulated kinase signaling pathway in human cancers. J. Mol. Endo. 39, 375-384

Park, E.R., Eblen, S.T., Catling, A.I. (2007). MEK1 activation by PAK: A novel mechanism. Cellular signaling. 19, 1488-1496

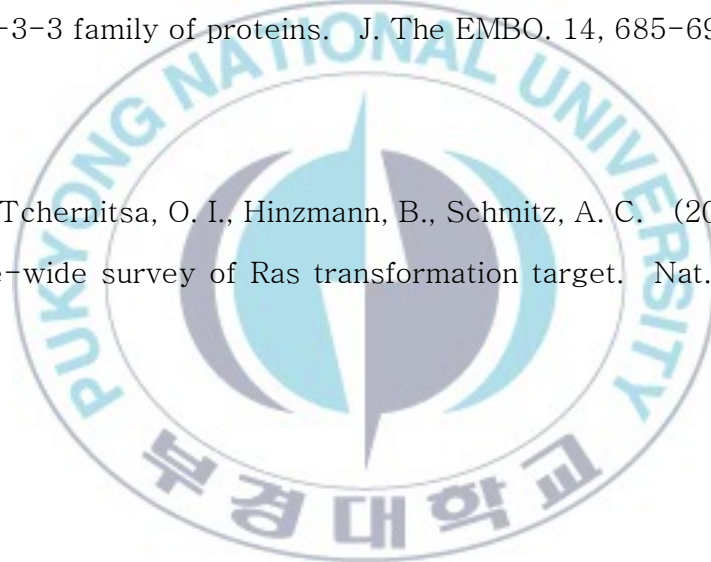
Robers, P.J. and Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK Mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. Oncogene. 26, 3291-3310

Schulze, A., Nicke, B., Warne, P. H., Tomlinson, S., Downward, J. (2004)

The transcriptional response to Raf activation is almost completely dependent on mitogen-activated protein kinase kinase activity and shows a major autocrine component. Mol. Biol. Cell, 15, 3450-3463

Shengfeng, L., Petra, J., Masao, T., Rosenfeld, G. C., Mischak, H., Kolch, W. and Sedivy, J. M. (1995) Regulation of Raf-1 kinase activity by the 14-3-3 family of proteins. J. The EMBO. 14, 685-696

Zuber, J., Tchernitsa, O. I., Hinzmann, B., Schmitz, A. C. (2000)
A genome-wide survey of Ras transformation target. Nat. Genet, 24, 144-152



감사의 글

먼저 부족한 것이 많은 제자가 학위과정을 마칠 수 있도록 많은 지도와 지원을 아끼지 않고 베풀어 주신 김군도 교수님께 정말 감사드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 논문을 검토해주신 김영태 교수님과 송영환 교수님께도 감사드리며, 2 년여의 시간 동안 많은 가르침을 주신 미생물학과의 이원재 교수님, 이훈구 교수님, 이명숙 교수님, 최태진 교수님, 최만공 교수님, 자원생물학과의 유명숙 교수님, 남기완 교수님, 김수암 교수님, 백혜자 교수님, 오철웅 교수님, 김현우 교수님, 김진구 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다.

그리고 논문준비에 필요한 여러 가지에 대해 많은 도움을 주었던 실험실의 철우, 진수, 지영, 성자야 정말 고맙다. 늘 뒤에서 아낌없이 조언을 해주던 재호형과 동균이, 항상 건강 걱정해주시는 성영애 선생님과 학원의 원장선생님 내외분들, 힘들고 지칠 때 버팀목이 되어준 동생들과 친구들 그리고 꼬맹이들, 일일이 언급 못하지만 그 동안 도움주신 분들 모두 감사합니다.

마지막으로 타지에서 혼자 고생하며 지낸다고 늘 마음 써주시는 할머니, 부모님께 감사합니다.