

Protein Kinase C Inhibitor (PKCI)에 의한 방사선 민감도 변화와 c-fos Proto-oncogene의 전사 조절

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 방사선종양학과*, 아산생명과학연구소†

최은경*† · 장혜숙*† · 이연희† · 박건구†

목적 : Ataxia-Telangiectasia (AT) 증은 여러 가지 유전적 결함을 갖는 질병으로 방사선 민감도가 비정상적으로 상승되어 있는 것이 특징이다. AT 환자에서 공통적으로 존재하는 ATM 유전자는 현재까지 방사선 신호전달에 관여하는 것으로 알려진 PI-3 kinase와 유사한 구조임이 알려져 ATM이 방사선 신호전달 경로에 중요한 작용을 할 것으로 추정하게 되었다. 본 연구에서는 AT 세포와 정상세포에 PKCI를 과발현 시킴으로써 방사선 신호전달에 관여하는 PKC를 억제하여 이것이 방사선 민감도에 미치는 영향을 관찰하고, 방사선에 의해 유도되는 early response gene인 c-fos transcription의 차이를 측정하여 ATM과 PKCI에 의한 신호전달이 c-fos 유전자 전사에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

대상 및 방법 : PKCI expression vector를 작제한 후 정상세포인 LM217과 AT세포인 AT5BIVA에 transfection 시킨 후 plasmid의 genomic DNA에 결합된 것은 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 확인하였고 PKCI의 mRNA 발현 여부는 northern blotting으로 확인하였다. 방사선 민감도는 아포토시스로 측정하였으며 PKCI가 과발현된 각 세포주에 5 Gy의 방사선을 조사한 후 48시간에 세포를 모아 TUNEL 방법으로 아포토시스 세포의 수를 측정하였다. c-fos 유전자의 전사는 reporter 유전자로 c-fos CAT plasmid를 β -gal expression vector와 같이 각 세포주에 transfection 시키고 36시간이 지난 후 CAT assay를 하여 activity를 측정하고 동시에 β -gal assay를 시행하여 transfection 효율을 보정해 주었다. PKCI, Ras의 영향을 보기 위하여는 PKCI, Ras expression vector와 c-fos CAT plasmid를 cotransfection하고 CAT activity로 측정하였다.

결과 : 이 실험의 결과 LM과 AT 세포에서 PKCI가 방사선 민감도에 미치는 영향과 c-fos 전사에 미치는 영향을 처음으로 보여주었다. PKCI의 과발현이 LM 세포에서는 방사선 민감도를 증가시켰지만 AT 세포에서는 오히려 약간 감소시키는 작용을 나타내었다. c-fos 전사는 AT 세포에서 LM 세포에 비하여 70배 낮게 나타났는데 PKCI가 과발현 됨으로써 LM 에서는 c-fos의 전사가 감소되었지만 AT 세포에서는 영향이 없었다. Ras 단백질로 c-fos를 유도시키고 여기에 PKCI 발현 벡터를 cotransfection 하면 LM 세포에서는 induction 이 감소되었지만 AT 세포에서는 영향이 없었다. 즉 LM과 AT 세포에서의 PKCI에 의한 반응의 차이는 Ras와 관련된 signal transduction pathway라는 것을 알 수 있었다.

결론 : PKCI는 정상세포에서는 방사선에 의한 세포 손상을 증가시키지만 AT 세포에서는 별 영향을 보이지 않는 것을 알 수 있었으며, 두 세포간의 이러한 차이는 c-fos proto-oncogene의 전사차이로 설명할 수 있겠다. 이러한 차이가 AT 세포의 방사선 민감도의 한 원인일 것으로 생각된다.

핵심용어 : 방사선민감도, 혈관확장성 운동실조증, PKCI, c-fos

서 론

방사선 민감도나 방사선 저항도가 유전적으로 결정된다는 증거는 Ataxia-Telangiectasia (AT) 환자 세포의 방사선 민감도

이 논문은 1997년 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음

이 논문은 1999년 10월 26일 접수하여 1999년 12월 2일 채택되었음.

책임저자: 최은경, 서울중앙병원 방사선종양학과
Tel: 02)2224-4432, Fax: 02)486-7258
E-mail: ekchoi@www.amc.seoul.kr

가 비정상적으로 상승되어 있는 것으로 입증되었다.¹⁾ AT 증은 autosomal recessive로 유전되는 질환으로 특히 AT 환자에서 얻어 배양된 AT 세포는 방사선에 의한 민감도가 비정상적으로 증가 되어 있으며 방사선에 의한 G1/S와 G2기의 세포주기 지연기전에 장애가 있음이 밝혀져 있고, 그외 염색체 손상 회복 장애와 세포내 cytoskeletal 단백질의 불균일 분포로 인한 세포구조 장애들이 있다.²⁾ 그간 AT 유전자를 밝히 고자 하는 연구가 계속적으로 진행되어와 1995년 6월 Israel의 Shiloh 그룹에 의하여 다양한 phenotype을 보이는 모든 환자에서 공통적으로 존재하는 ATM 유전자를 11번 염색체에

서 찾음으로써 이것이 AT 질환의 유일한 유전자임이 밝혀졌다.³⁾ 또한 이 유전자는 현재까지 방사선 신호전달에 관여하는 것으로 알려진 phosphatidyl inositol 3-kinase (PI-3 kinase),⁴⁾ Rad 3, Mec 1과 유사한 염기배열을 가짐이 알려져 ATM 유전자가 방사선 신호전달 경로에 중요한 작용을 할 것으로 추정하게 되었다.⁵⁻⁷⁾ 또한 protein kinase C (PKC)는 종양세포에서 방사선 신호전달에 관여하여 c-raf, c-mos와 c-fos protooncogene 들을 발현시켜 방사선 저항성에 관여함이 알려져 있다. 따라서 이러한 PKC를 inhibition 하면 종양세포를 방사선에 민감하게 만들 수 있다.⁸⁾ 또한 ATM 유전자는 방사선에 의한 p53 apoptotic pathway의 upstream으로 ras related GTP binding protein (rheb)과 PKCI 등과 상호작용하며 방사선에 의한 세포내 signal transduction pathway에 깊이 관여할 것으로 생각되고 있다. 최근의 연구에 의하면 activation 된 암유전자 산물인 raf, ras 등이 세포를 암세포화 할 뿐 만 아니라 동시에 방사선 치료에 저항성을 갖게 한다는 보고가 있다. 특히 방사선에 의한 signal transduction과 raf, ras에 의한 세포의 transformation에 중요한 mediator인 c-fos의 transcription이 ATM과 상호작용하는 인자에 의하여 어떻게 조절되는 지는 전혀 알려진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 AT 세포⁹⁾와 정상세포인 LM에 PKCI를 과발현 시킴으로써 방사선 신호전달에 관여하는 PKC를 억제하여 이것이 방사선 민감도에 어떤 영향을 미치는 지를 관찰하고자 하였다. 또한 AT와 LM에서 c-fos protooncogene의 transcription이 이미 차이가 나고 있는데 이 차이가 PKCI에 의하여 어떻게 영향을 받는지도 연구하였다.

대상 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

세포주는 정상섬유모 세포 LM217과 AT 환자의 섬유모 세포 AT5BIVA를 사용하였다. 모든 세포주는 배양용기의 기저면에서 단층으로 증식하는 특징을 가지고 있으며 두 세포주는 같은 배지를 이용하여 배양하였다. 배지는 DMEM에 FBS 10%, NaHCO₃ 24 mM 및 penicillin/streptomycin 등을 첨가하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 세포배양기(NUAIR, CO₂ water jacket incubator)로 배양하였다.

2. PKCI 과발현 세포주 확립

LM217과 AT5BIVA 두 세포에 PKCI 단백질이 과발현 되는 system을 만들기 위하여 PKCI expression vector를 작제하였다. PKCI의 coding sequence를 제한 효소인 EcoRI으로 cutting 하

고 gel에 전기 동하여 정제한 후 pCI neo vector (Promega)의 EcoRI site에 ligation 하고 insertion 된 fragment의 방향을 sequencing에 의하여 결정하였다. 이 vector는 PKCI 단백질이 CMV에 의하여 eukaryotic cell 에서 발현이 되도록 되어있고 SV40 enhancer, early promoter에 의하여 neo gene이 발현되므로 G418을 세포에 가하여 이 plasmid가 transfection 된 세포만을 selection 하는데 이용할 수 있는 vector 이다. PKCI의 expression vector를 AT, LM 세포주에 각각 transfection 시키고 G418에 resistant한 세포만을 selection 한 후 plasmid 의 genomic DNA에 integration 된 것을 PCR로 detection하였다. 또한 PKCI의 mRNA가 발현되는지의 여부는 northern blotting 으로 확인하였다. 즉 각각의 세포주에서 total RNA를 전기영동하여 nylon membrane에 transfer 하고 fix 한 후 PKCI를 위의 membrane과 hybridization 하여 필름에 autoradiography 하였다.

3. 방사선에 의한 아포토시스 측정

5 Gy의 방사선 조사 후 48시간에 culture dish의 세포를 모두 모아 poly-L-lysine coated slide glass에 100 μl씩 분주하고 이를 말린 후 chilled 100% acetone으로 soaking 하고 proteinase K, Hydro-peroxide (H₂O₂), enzyme complex 100 μl (TdT enz : TdT buffer = 1:1~2), DAB (0.016 g/ml)을 차례로 반응시킨 후 hematoxylin으로 염색하여 아포토시스 세포의 수를 측정하였다.

4. c-fos protooncogene의 transcription activity 측정

CMV promoter, SV40 early promoter, c-fos의 5' flanking region (-450/+50)이 CAT (chloramphenicol acetyl transferase) gene의 발현을 조절할 수 있도록 작제한 plasmid를 각각의 세포주에 β-galactosidase expression vector (pCMV β-gal)와 같이 transfection 시키고 36시간이 지난 후에 세포의 lysis 용액을 만들었다. 각각의 용액을 CAT assay 하여 CAT activity를 측정하고 β-Gal assay를 따로 각각 측정하여 transfection efficiency를 보정해주었다. 이 방법은 각 세포주가 균등한 조건에 있을 때 reporter gene의 transcription rate를 반영한다. 또한 AT와 LM에서 c-fos transcription이 PKCI에 의하여 어떻게 영향을 받는지를 보기 위하여 c-fos CAT plasmid와 PKCI expression plasmid를 cotransfection 하고 CAT assay를 하여 c-fos의 전사속도의 변화를 CAT activity의 변화로 나타내었다. Ras와 PKCI의 작용에 의한 c-fos 전사속도의 변화는 Ras protein으로 c-fos를 induction 시키고 여기에 PKCI expression vector를 cotransfection 시켜 c-fos CAT assay를 시행하였다.

5. CAT assay

배양세포에 plasmid를 transfection 시키고 36 시간이 지난 후 세포를 수확하였다. protein을 0.25 M Tris, pH 7.8에 녹이고 80 μ l가 되도록 한 후 2 μ l의 14 C-chloramphenicol (7.4 MBq/ml, 2.11 GBq/mmol)을 가하고 6.6 μ l butyl-coenzyme A (5 mg/ml)을 가해 반응을 시작시켰다. 1시간 후 1 ml xylene 을 가해 30초간 추출한 후 원심분리하여 xylene 층만 모은 후 동량의 물을 가하여 back extraction 한 후 scintillation counting 하였다.

결 과

1. 방사선 민감도 변화

PKCI expression vector (Fig. 1)를 작제 한 후 LM 세포와 AT 세포에 transfection 시켜 plasmid의 genomic DNA에 integration 된 것은 PCR로 detection 하였으며 (Fig. 2) 또한 PKCI 의 mRNA의 발현 여부는 northern blotting 으로 확인하였다. (Fig. 3)

이러한 결과는 도입된 plasmid 에 의하여 나타나는 specific 한 결과이었다. PCR 결과 Fig. 2에서 보는바와 같이 PKCI를 도입한 세포주에서는 AT, LM 세포주 공히 specific band가 나타났지만 PCI neo 만을 transfection한 세포주는 같은 위치

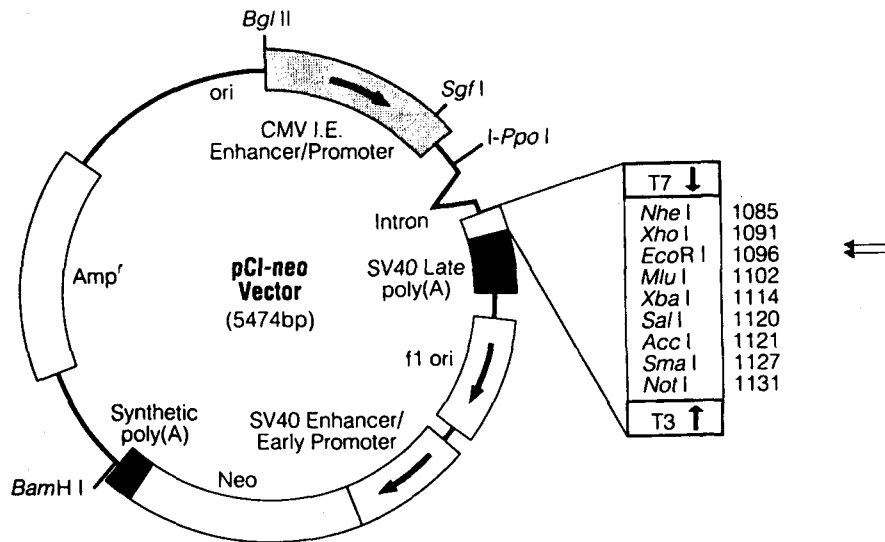


Fig. 1. Mammalian expression vector for PKCI.

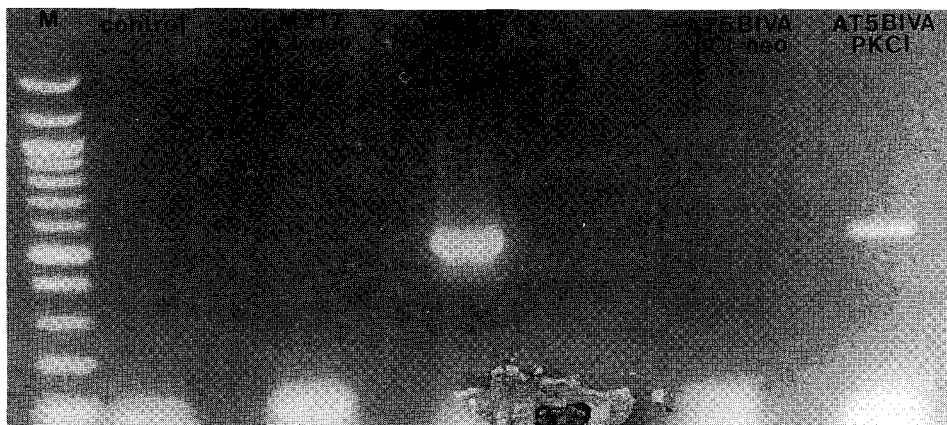


Fig. 2. PCR detection of PKCI after stable transfection in AT5BIVA and LM cells.

에서 전혀 band가 나타나지 않았으며 마찬가지로 northern blotting에서도 Fig. 3과 같이 AT 세포주에서 약간 expression 정도가 약하였지만 transfection된 세포에서만 PKCI가 특이적으로 발현됨을 알 수 있었다.

Fig. 4는 방사선 민감도를 apoptosis로 측정된 결과를 나타내는 것으로 LM 세포주와 AT5BIVA 세포주에 5 Gy의 방사

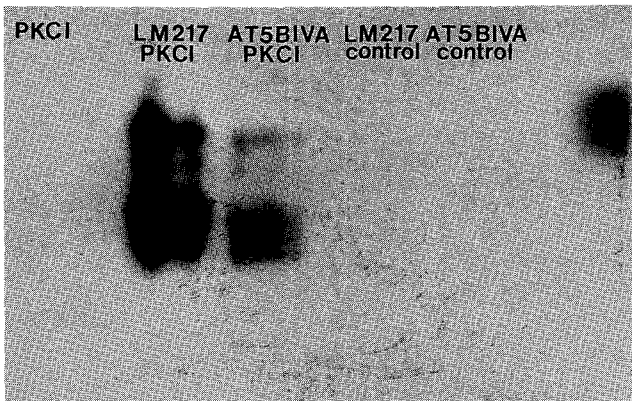


Fig. 3. Northern blotting after transfection of PKCI plasmid in AT5BIVA and LM cells.

선을 조사하여 형광현미경으로 관찰하였을 경우 그림에서 보는 바와같이 apoptotic cell death를 확인 할 수 있었다. 그리고 이 세포주에 PKCI expression plasmid를 transfection 하였을 경우 apoptotic cell 수의 변화가 있음을 관찰할 수 있었다. 뿐만 아니라 PKCI expression vector만을 transfection 하였을 경우에는 세포의 현미경상의 변화는 관찰되지 않음을 알 수 있었다. 세포의 숫자, 방사선 조사량, staining 방법, transfection 조건들을 변화시켜가며 적절한 조건을 확립하고 AT 및 LM 세포주에 PKCI expression plasmid를 도입시킨 후 5 Gy의 방사선을 조사하고 세포사멸된 세포의 숫자를 세어 Fig. 5에 보여주었다. PKCI의 과발현이 LM 세포주의 방사선 민감도는 증가시켰지만 AT 세포주의 방사선 민감도는 35%의 세포사멸을 17%로 감소시키는 작용을 한 것을 알 수 있었다.

2. PKCI에 의한 c-fos proto-oncogene의 transcription 조절

c-Fos 단백질은 방사선의 신호전달 및 방사선조사에 의한 세포의 반응에 매우 중요한 역할을 하는 signal molecule로 AT와 LM 두세포간에 c-fos gene의 transcription에 차이가 날 것으로 가설을 세우고 이를 reporter gene의 transfection 방법

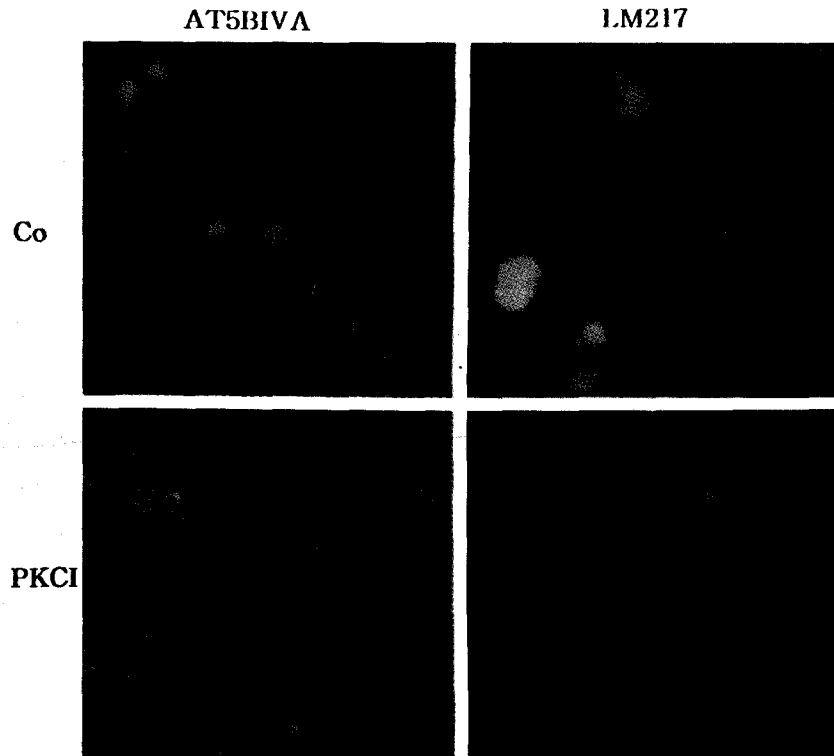


Fig. 4. Apoptosis detection after transfection of PKCI expression plasmid in AT5BIVA and LM cells.

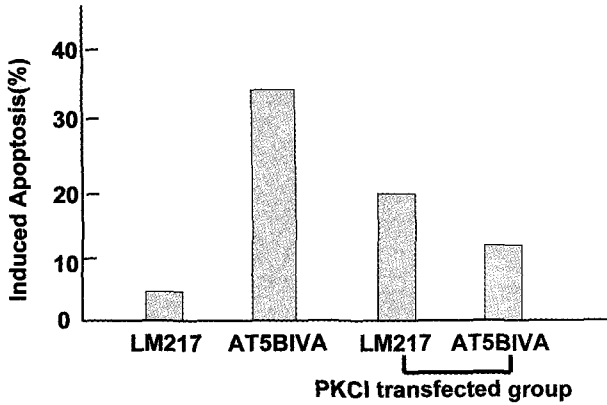


Fig. 5. Percentage of apoptotic cells after 5 Gy irradiation.

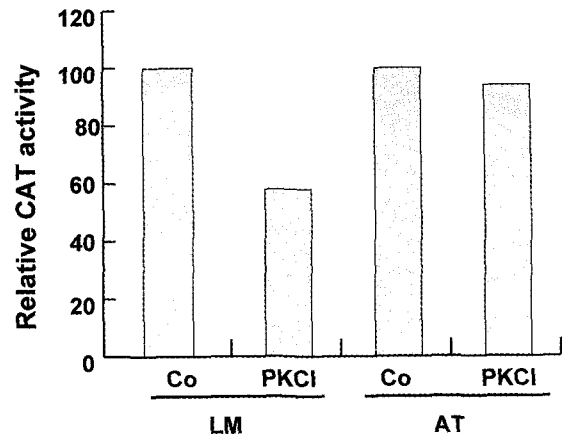


Fig. 7. Repression of c-fos promoter by overexpression of PKCI in LM cells but not in AT cells.

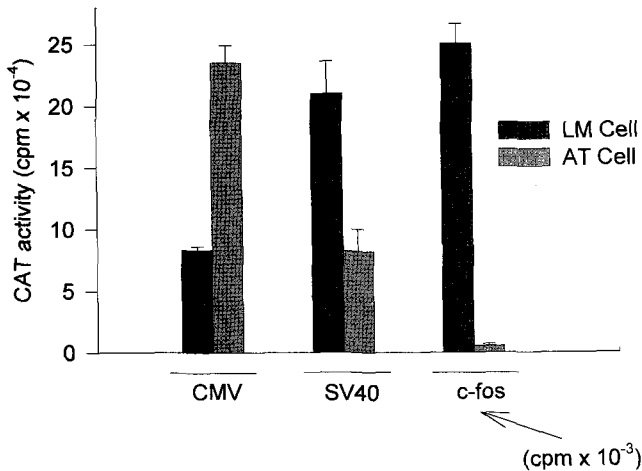


Fig. 6. Low transcription of c-fos in AT5BIVA cell.

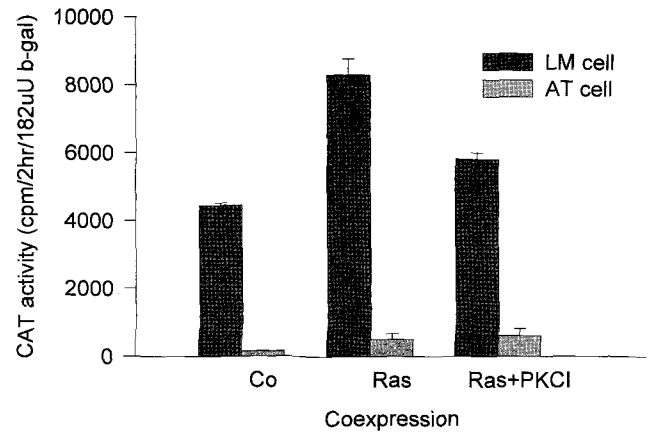


Fig. 8. c-fos CAT between LM and AT after cotransfection of Ras and PKCI.

으로 증명하였다. 이 방법은 각 세포주가 균등한 조건에 있을 때, reporter gene의 transcription rate를 반영한다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 CMV promoter activity는 LM에 비하여 AT 세포에서 약 3배 높았으며 SV 40 promoter activity는 AT 세포에서 약 50%로 감소되어 있었다. 같은 조건에서 c-fos의 transcription은 LM에 비하여 AT 세포에서 70배 낮은 차이가 나고 있는데 이 차이가 PKCI에 의하여 어떻게 영향을 받는지를 연구하였다. c-fos CAT plasmid와 PKCI expression plasmid를 cotransfection 하고 CAT assay를 하여 c-fos의 전사 속도의 변화를 CAT activity의 변화로 나타내었다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 LM 세포주에서는 PKCI가 c-fos의 전사를 감소시켰지만 AT 세포에서는 영향이 없었다. 이러한 현상이 어떤 pathway에 미치는 영향 때문인지를 보기 위하여 방사선 신호전달에 관여하는 Ras protein으로 c-fos를 induction 시키고 여기에 PKCI expression vector를 cotransfection 하면 LM 세포에서는 그 induction이 감소하였지만 AT 세포에서는 영

향이 없었다(Fig. 8). 즉 LM과 AT 세포에서의 PKCI에 의한 반응의 차이는 Ras와 관련된 signal transduction pathway라는 것을 알 수 있었다.

고안 및 결론

배양중인 세포이든, 개체의 조직을 구성하고 있는 세포이든, 살아있는 세포는 끊임없이 세포막 바깥 세계와 communication을 유지하고 있다. 이러한 communication을 통하여 각 세포는 세포 외부에서 오는 정보를 수집하고 이 정보에 대응하는 response를 함으로써 세포 자신뿐만 아니라 그 세포가 속한 개체의 특성을 결정 지운다. 세포 외부로부터 오는 중요한 정보 가운데 하나가 바로 방사선에 관한 정보일 것이다. 세포의 radiation induced signal transduction에는 한가지

분자만 관여하는 경우는 없다. 여러 가지 세포분자들이 관여하고 이들 상호간의 interaction이 시간적으로 순차적으로 일어나므로 "신호의 전달"이라는 개념의 사용이 불가피하다. 이들 분자들 사이에 작용순서가 있으면, 어떤 한 분자를 기준으로 시간적으로 먼저 작용하는 분자를 upstream, 나중에 작용하는 분자를 downstream signal 이라고 한다. 지금까지의 연구결과로는 radiation 반응에만 특이하게 이용되는 신호전달 경로는 없는 것으로 알려져 있다. 경우에 따라 세포의 stress signal transduction pathway, growth signal transduction pathway 들과 부분부분 중첩되어 있다. 따라서 세포의 종류와 처한 환경에 따라 같은 radiation에 의해서도 여러 가지 signal transduction pathway가 있을 수 있다.

Ionizing radiation signal은 세포의 어떤 분자가 radiation의 도착을 인식하는 receptor에서부터 출발할 것이다. 그러나 지금까지 정확한 ionizing radiation receptor는 알려져 있지 않고 H₂O 분자의 해리에 의한 free radical의 생성이 signal 발생의 주 mechanism으로 생각된다. 이 free radical은 세포막의 지질을 공격하여 damage를 줄 수 있고 핵산을 공격하여 변형시킨다. 뿐만 아니라 세포막의 지질이 직접 공격을 받아 signal을 발생시킬 수도 있다. Radiation signal의 출발점은 여러 point에서 동시 다발적으로 진행될 가능성을 배제할 수 없어 signal transduction pathway의 종류가 몇 가지인지 알기 어렵다. 따라서 radiation signal transduction은 세포의 위치에 따라 세포의 밖에서 핵을 향하여 전달되는 것으로 이해된다. Radiation signal은 세포막 밖으로 secretion 되는 factor인 class 1, 세포막에 insertion 되는 factor인 class 2, 세포질 내에 존재하는 factor인 class 3를 거쳐 전달되며 마지막으로 핵속의 class 4, transcription factor에 도달하고 그 정보를 gene expression으로 변환한 후 종결된다. 이중 class 3 signal factor에는 비교적 많은 구성원들이 있고 자신이 효소 활성을 갖고 있는 것이 많다. 대부분 kinase function을 가지고 있고 Ras와 같이 GTPase 기능이 있는 것도 있다. 이들은 어떤 partner와 상호작용 하느냐에 따라 specific signal transduction pathway가 결정된다. 이중 radiation signal과 관련하여 많이 연구된 signal molecule 이 c-ras, c-raf, MAPK 등이다.

Ras는 growth factor의 mitogenic signal 에 필수적이다. class 2 signal molecule의 receptor tyrosine kinase는 guanine nucleotide exchange factor (GEF)인 SOS protein과 SH₃-/SH₂- domain-containing-adaptor protein인 Grb2를 매개로 상호작용 하는데 이 과정을 통하여 Ras로 signal이 넘어오게 된다. Ras의 downstream effect로 가장 연구가 많이 된 것이 serine/threonine kinase인 c-raf 1 이다.¹⁰⁾ Raf 1은 protein kinase C에

의하여도 activation 될 수 있다. GEF를 trapping 하여 Ras를 inhibition 하는 transdominant negative mutant인 Ras-N17은 PKC에 의한 Raf-1의 activation에는 영향이 없는 것으로 보아 직접적인 상호작용에 의한 것으로 생각된다. Kasid 등은 human laryngeal squamous carcinoma cell인 PCI-04A을 15 Gy의 dose로 조사하였을 경우 Raf-1이 인산화되어 activation됨을 증명하였다.¹¹⁾ Raf의 downstream effector로 MKK이 알려져 있고 MKK signal은 다음 ERK로 전달된다. ERK는 결국 핵으로 translocation 되어서 앞에서 받은 signal을 핵속의 class 4 signal molecule로 넘겨준다. ERK의 activity는 방사선에 의해 induction 되는 MAPK-specific dual phosphatase 인 HVH1에 의하여 억제 되는 방식으로 feedback이 조절된다. 최근에 cloning 된 Ras related protein인 Rheb¹²⁻¹⁴⁾ Ras signal을 antagonize 하고 Raf와 상호 작용한다는 보고와 관련하여 방사선에 의한 신호전달에서의 역할이 더 연구되어야 할 것이다.

Ras의 두 번째 signal effector는 phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) 이다. PI-3K는 Ptd Ins, PtdIns4P, PtdIns(4,5)P의 3-OH를 인산화시키는 효소로 second messenger인 diacylglycerol (DAG)와 PtdIns(1,4,6)P의 생성에 관여하고 있다. DAG는 serine/threonine protein kinase C (PKC)에 binding 하여 PKC를 activation 시킨다. PI-3K domain을 갖는 중요한 signal molecule이 Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM) 이다.⁴⁾ 이런 ATM의 기능손실은 이온화방사선에 대한 세포의 민감도를 극적으로 증가시킨다. 또한 PKC β와 상호작용한다고 알려진 protein kinase C inhibitor (PKCI)의 IR-induced signal transduction에서의 역할 연구는 매우 흥미로운 과제이다. 이 PKCI는 Ataxia Telangiectasia Group D (ATDC) 단백질도 상호작용하여 신호전달에 관여한다.¹⁵⁾ 따라서 PKCI에 의해서 PKC를 inhibition 하면 세포의 방사선 민감도가 달라지며 이것은 정상세포와 AT 세포에서 서로 다르게 나타날 것으로 가정하였으며 실제 실험의 결과 PKCI 과발현으로 LM 세포주의 방사선민감도는 증가되었으며 AT 세포주의 방사선민감도는 거의 변화가 없거나 약간 감소하는 경향을 보여 ATM, PKCI가 작용하는 신호전달 체계가 정상세포와 AT 세포가 다르다는 것을 확인 할 수 있었고 이러한 결과는 AT 세포의 ionizing radiation에 의한 hypersensitivity의 원인일 가능성이 있다.

c-fos는 class 4 signal factor로 여기에 속하는 signal molecule 들은 대부분 transcription factor로 DNA의 specific element (enhancer)에 binding 하거나 binding할 factor와 상호작용하는 특성이 있다. class 1, 2, 3에서 전달된 signal을 결국에는 이 group의 signal molecule이 받아서 gene expression으로 변환하면서 신호전달을 종결하는 단계이기도 하다. Transcription

factor는 signal이 오기전에 소량 합성되어 존재하는 pre-synthesized form과 signal이 온 후 새로 합성되는 new form의 전사인자가 있다. 전자가 signal을 직접 받아서 즉시 새로운 형태의 transcription factor 합성을 유도하여 약한 signal을 증폭시키는데 c-fos는 여기에 속하는 유전자로 immediate early gene (primary responsive gene) 의 일종이다.

LM 세포와 AT 세포에서 c-fos transcription의 차이를 보면 AT 세포에서는 c-fos의 transcription이 정상세포에 비하여 현저히 떨어져 있는 것을 알 수 있었으며 LM에서는 PKCI과 발현이 c-fos의 전사를 감소시켰지만 AT에서는 영향이 없었다. Ras에 의해 c-fos를 induction 한 후 PKCI의 효과를 보면 LM에서는 Ras에 의해 c-fos가 증가된 것이 PKCI에 의해 억제되지만 AT에서는 PKCI에 의해 억제되지 않는 것을 알 수 있었다. 이는 PKC가 c-fos의 induction에 관여하며 Ras는 c-Raf를 activation시켜 c-fos promoter인 SRE (Serum Response Element) 에 작용하여 c-fos의 transcription을 증가시킨다는 보고¹⁶⁾와 일치한다고 할 수 있다. 또한 AT와 LM에서의 차이는 serum에 의한 c-fos promoter인 SRE의 activation에 ATM과 유사구조를 가지는 PI-3 kinase가 관여하는 결과¹⁷⁾ 일 것으로 생각된다.

이상의 연구결과 PKC inhibitor는 정상세포에서는 방사선에 의한 세포 손상을 증가시키지만 AT 세포에서는 별 영향을 보이지 않는 것을 알 수 있었으며, 두 세포간의 이러한 차이는 c-fos proto-oncogene의 transcription의 차이로 설명할 수 있겠다.

참 고 문 헌

1. Gatti RA. Localizing the genes for ataxia-telangiectasia: A human model for inherited cancer susceptibility. *Adv Cancer Res* 1991; 56:77-104
2. Beamish H, Khanna KK, Lavin MF. Ionizing radiation and cell cycle progression in ataxia-telangiectasia. *Rad Res* 1994; 138:130-133
3. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995; 268:1749-1753

4. Yan J, Khanna KK, Lavin MF. Induction of inositol 1,4,5 triphosphate receptor genes by ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1996; 69(5):539-546
5. Yao R, Cooper GM. Requirement for phosphatidyl inositol-3 kinase in the prevent of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 1995; 267:2003-2006
6. Divech N, Irvine RF. Phospholipid signaling. *Cell* 1995; 80: 269-278
7. Kapeller R, Cantley LC. Phosphatidyl inositol 3-kinase. *Bioessays* 1994; 16:565-576
8. Hallahan DE, Virudachalam S, Schwantz JL, et al. Inhibitor of protein kinases sensitizes human tumor cells to ionizing radiation. *Rad Res* 1998; 129:345-350
9. Beamish H, Lavin MF. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: anomalies in radiation-induced cell cycle delay. *Int J Rad Biol* 1994; 65:175-184
10. Suy S, Anderson WB, Dent P, et al. Association of Gbr2 with Sos and Ras with Raf-1 upon gamma irradiation of breast cancer cells. *Oncogene* 1997; 57:3600-3605
11. Kasid U, Pfeifer A, Weichselbaum RR, et al. The Raf oncogene is associated with a radiation-resistant human laryngeal cancer. *Science* 1987; 237:1039-1041
12. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991; 349:117-127
13. Gromov PS, Madsen P, Tomerup N, et al. A novel approach for expression cloning of small GTPase: Identification, tissue distribution and chromosome mapping of the human homolog of Rheb. *FEBS Letters* 1995; 377:221-226
14. Yamagata K, Snaders RK, Karfmann WE, et al. Rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel ras-related protein. *J Biol Chem* 1994; 269:16333-16339
15. Brzoska PM, Chen HY, Zhu YF, et al. The product of the ataxia-telangiectasia group D complementing gene, ATDC, interacts with a protein kinase C substrate and inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7824-7828
16. Soh JW, Lee EH, Prywes R, Weinstein IB. Novel Roles of specific isomers of protein kinase C in activation of c-fos serum response element. *Mol Cell Biol* 1998; 19:1313-1324
17. Wang Y, Falasca M, Schlessinger J, et al. Activation of the c-fos serum response element by phosphatidyl inositol 3-kinase and pathways in Hela cells. *Cell Growth Diff* 1998; 9:513-552

Abstract

**Effect of Protein Kinase C Inhibitor (PKCI) on
Radiation Sensitivity and c-fos Transcription Activity**

Eun Kyung Choi, M.D.*[†], Hyesook Chang, M.D.*[†], Yun-Hee Rhee, M.S.[†]
and Kun-Koo Park, Ph.D.[†]

*Department of Radiation Oncology, Asan Medical Center, College of Medicine, University of Ulsan,

[†]Asan Institute for Life Sciences

Purpose : The human genetic disorder ataxia-telangiectasia (AT) is a multisystem disease characterized by extreme radiosensitivity. The recent identification of the gene mutated in AT, ATM, and the demonstration that it encodes a homologous domain of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K), the catalytic subunit of an enzyme involved in transmitting signals from the cell surface to the nucleus, provide support for a role of this gene in signal transduction. Although ionizing radiation was known to induce c-fos transcription, nothing is known about how ATM or PKCI mediated signal transduction pathway modulates the c-fos gene transcription and gene expression. Here we have studied the effect of PKCI on radiation sensitivity and c-fos transcription in normal and AT cells.

Materials and Methods : Normal (LM217) and AT (AT5BIVA) cells were transfected with PKCI expression plasmid and the overexpression and integration of PKCI was evaluated by northern blotting and polymerase chain reaction, respectively. 5 Gy of radiation was exposed to LM and AT cells transfected with PKCI expression plasmid and cells were harvested 48 hours after radiation and investigated apoptosis with TUNEL method. The c-fos transcription activity was studied by performing CAT assay of reporter gene after transfection of c-fos CAT plasmid into AT and LM cells.

Results : Our results demonstrate for the first time a role of PKCI on the radiation sensitivity and c-fos expression in LM and AT cells. PKCI increased radiation induced apoptosis in LM cells but reduced apoptosis in AT cells. The basal c-fos transcription activity is 70 times lower in AT cells than that in LM cells. The c-fos transcription activity was repressed by overexpression of PKCI in LM cells but not in AT cells. After induction of c-fos by Ras protein, overexpression of PKCI repressed c-fos transcription in LM cells but not in AT cells.

Conclusion : Overexpression of PKCI increased radiation sensitivity and repressed c-fos transcription in LM cells but not in AT cells. The results may be a reason of increased radiation sensitivity of AT cells. PKCI may be involved in an ionizing radiation induced signal transduction pathway responsible for radiation sensitivity and c-fos transcription. The data also provided evidence for novel transcriptional difference between LM and AT cells.

Key Words : Radiation sensitivity, Ataxia-Telangiectasia, PKCI, c-fos