

CT-26 대장암 세포에서 Dominant Negative ATM 유전자에 의하여 유도되는 세포자멸사의 경로

전북대학교 의과대학 소아과학교실, 생화학교실*

이정창 · 이호근 · 김선영 · 이대열 · 황평한 · 박진우*

Apoptotic Pathway Induced by Dominant Negative ATM Gene in CT-26 Colon Cancer Cells

Jung Chang Lee, M.S., Ho Keun Yi, Ph.D., Sun Young Kim, M.S., Dae Yeol Lee, M.D.
Pyoung Han Hwang, M.D. and Jin Woo Park, M.D., Ph.D.*

Department of Pediatrics, Department of Biochemistry, School of Medicine,
Chonbuk National University, Jeonju, Korea*

Purpose : Ataxia telangiectasia mutated(ATM) is involved in DNA damage responses at different cell cycle checkpoints, and signalling pathways associated with regulation of apoptosis in response to ionizing radiation(IR). However, the signaling pathway that underlies IR-induced apoptosis in ATM cells has remained unknown. The purpose of this study was, therefore, to investigate the apoptotic pathway that underlies IR-induced apoptosis in a CT-26 cells expressing dominant negative ATM (DN-ATM).

Methods : We generated a replication-deficient recombinant adenovirus encoding the DN-ATM(Ad/DN-ATM) or control adenovirus encoding no transgene(Ad/GFP) and infected adenovirus to CT-26 cells. After infection, we examined apoptosis and apoptotic pathway by [³H]-thymidine assay, DNA fragmentation, and Western immunoblot analysis.

Results : DN-ATM gene served as the creation of AT phenotype in a CT-26 cells as revealed by decreased cell proliferations following IR. In addition, IR-induced apoptosis was regulated through the reduced levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2, the increased levels of the apoptotic protein Bax, and the activation of caspase-9, caspase-3, and PARP.

Conclusion : These results indicate that the pathway of IR-induced apoptosis in CT-26 cells expressing DN-ATM is mediated by mitochondrial signaling pathway involving the activation of caspase 9, caspase 3, and PARP. (**J Korean Pediatr Soc 2003;46:679-686**)

Key Words : Dominant negative ATM, Ionizing radiation, Apoptotic pathway

서 론

모세혈관 확장성 조화운동 불능(ataxia-telangiectasia, AT)은 선천성 유전 질병으로 소아 때부터 불안정한 보행을 보이며, 눈이나 피부 등에 모세 혈관의 확장이 나타난다¹⁾. AT 환자의 또 다른 특징은 방사선 조사에 아주 예민한 민감성을 보인다. 대부분의 AT 환자는 염색체 11q23.1 영역에 존재하는 AT 유

전자의 배열에 이상이 있으며, 이러한 변이가 나타난 유전자를 ataxia telangiectasia mutated(ATM)이라 한다. AT 유전자는 Savitsky 등²⁾에 의하여 위치 클로닝(positional cloning) 방법으로 최초로 동정되었고 66개 엑손과 3,056개의 아미노산으로 구성되어 그 길이만도 150 kb에 달한다³⁾. 이 유전자는 phosphatidylinositol(PI) 3-kinase family 단백질이며, PI 3-kinase 영역은 카르복실기 말단에 존재하고 있으며²⁾ 실제로 세포내에서 p53을 인산화시킨다⁴⁾.

AT 환자로부터 분리한 AT 유전자에 이상이 있는 세포도 방사선에 예민한 민감성과 세포주기의 비정상화가 보여진다⁵⁾. AT 세포의 방사선 민감성과 세포주기의 이상은 AT 유전자의 변이에 기인하며 특히 AT 유전자의 변이가 p53의 상부에 존재하면서 *Chk1*과 *Chk2* 등을 인산화시키지 못하여 나타나는 것으로

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2--1-000159-0)지원으로 수행되었음.

접수 : 2003년 3월 6일, 승인 : 2003년 4월 30일

책임저자 : 황평한, 전북대학교병원 소아과

Tel : 063)250-1472 Fax : 063)250-1464

E-mail : hwaph@moak.chonbuk.ac.kr

추측하고 있다⁶⁾. 그렇지만 ATM 세포의 방사선에 대한 민감성에 관한 기전은 현재 정확히 알려져 있지 않다.

AT 환자의 유전자 변이는 특정 부위에 한정된 hot point가 없이 매우 다양하게 보고되고 있으며 격자이동(frame shift), 삽입(insertion), 결손(deletion) 등의 변이가 절단된 여러 변이형태(truncated type)의 ATM 단백질을 형성하여 본래의 AT 유전자의 기능을 저해한다⁷⁾. 특히 ATM의 변이는 AT 유전자의 기능으로 추측되는 PI-3 kinase의 기능이 저하되며 이로 인한 세포주기의 이상화와 생존력의 저하로 세포자멸사(apoptosis)가 유도되는 것으로 추측하고 있다⁸⁾. ATM 단백질은 세포가 세포자멸사가 진행되는 과정에서 분절화(fragmentation)되는 현상이 나타난다⁹⁾. 분절화된 ATM 단백질은 자신이 갖고 있는 단백질 활성화효소(kinase)의 활성이 없어지게 되지만 반면 DNA와 결합 능력은 유지하고 있다. 현재로서는 이러한 분절화된 ATM 형태가 AT 환자에서 나타나는 많은 절단된 형태와 동일하게 ATM 기능이 제거되었는지 확실하지는 않다. 하지만, 본 연구는 이상으로부터 ATM의 단백질 활성화효소의 활성은 제거되지만 DNA의 결합능력은 갖고 있는 형태가 어떠한 DNA의 복구 혹은 DNA 복구경로를 방해하여 세포자멸사를 유발시키는 것이 가능한 dominant negative ATM(DN-ATM) 형태로서 방사선의 민감성을 이용한 암의 방사선치료에 응용이 가능 할 것으로 생각되어 연구를 시작하였다.

본 연구에 사용한 AT 변형유전자는 AT 유전자로부터 PI-3 kinase 영역을 제거시키고, 반면 p53의 결합영역과 루이신 지퍼 영역(leucine zipper domain)이 포함된 DN-ATM 유전자를 제작하였다. 이러한 DN-ATM의 배경에는 AT 환자의 절단된 형태의 ATM 단백질을 기본구조로 하였으며¹⁰⁾, 이를 복제 결핍 아데노바이러스(Ad/DN-ATM)에 재조합하였다. 본 연구에서는 DN-ATM 유전자의 기능을 규명하기 위하여 방사선에 의해서 유도되는 세포자멸사와 세포자멸사의 경로를 추적하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

세포주는 한국 세포주 은행으로부터 분양 받은 Balb/C 마우스 유래 대장암세포주 CT-26을 실험에 사용하였다. 세포 배양액은 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL, Gaithersburg, MD USA) 배지에 56°C에서 30분간 가열하여 비활성화시킨 10% 우태아 혈청(FBS, Hyclone, Logan, Utah USA), penicillin(100 unit/mL), streptomycin(100 µg/mL), 300 µg/mL-glutamine를 첨가하여 제조하였다. 세포주는 위의 배양액을 사용하여 37°C, 95% 습도, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였고, 통상적으로 세포가 서로 융합되기 직전인 3-4일 간격으로 계대 배양을 하였으며, 실험에는 총 30계대 이하인 세포만을 사용하였다.

2. AT 유전자의 클로닝과 DN-ATM 유전자 제작

AT 유전자의 클로닝은 사람의 유방암 세포주인 MCF7에서 분리하였다. 융합 직전의 세포로부터 RNA를 분리하여 Takara pyrobest DNA polymerase(Takara, Otsu, Shiga, Japan)를 이용하여 94°C 1분과 68°C 15분으로 40 주기를 실시한 후 원하는 약 9.3 kb 길이의 AT 유전자를 발현 벡터인 pcDNA3에 재조합하였다. 유전자 분리에 이용한 시발체는 Savitsky 등²⁾이 분리한 염기 배열로부터 단백질의 전사 영역이 포함되도록 sense: 5'-GGT TGA TAC TAC TTT GAC CT-3'와 antisense: 5'-TTC ATA TAC TGA AGA TCA AC-3'를 제작하였다. AT 유전자의 확인은 제한효소를 이용한 지도화(mapping)와 아미노기 말단 부위와 카르복실 영역의 PI-3 kinase 영역을 자동염기 배열 분석기로 염기배열을 확인하였다. DN-ATM 유전자는 아미노기 말단으로부터 1,303개의 아미노산을 재클로닝하여 아데노바이러스 벡터에 재조합하였으며 이는 p53의 결합영역과 DNA와 결합하는 루이신 지퍼영역이 포함되어 있다.

3. Recombinant DN-ATM adenovirus (Ad/DN-ATM) 제작

Ad/DN-ATM의 제작은 Quantum Biotechnologies(Maisonneuve West, Montreal, Canada)의 AdEasy Vector System을 이용하였다. DN-ATM 유전자를 CMV 촉진자(promoter)가 결합된 전달 벡터에 재조합 시키고, 재조합된 플라스미드를 pAdEasy-1 벡터와 대장균 BJ5183에서 동종 재조합(homologous recombination)을 시켰다. 동종 재조합의 확인은 제한효소 PacI을 이용하여 전체 유전자의 크기와 Kpn I으로 클로닝 영역을 재확인하였다. 이상의 재조합된 DN-ATM 벡터를 대장균 DH5 α에 형질전환시켜 안정된 DN-ATM 아데노바이러스 벡터를 대량 정제하였다. 재조합된 DN-ATM 벡터를 PacI으로 선형화(linearizing)를 시킨 후, 인산석회(calcium phosphate) 방법(Promega, Madison, WI, USA)으로 QBI293A(human embryonic kidney) 세포에 핵산전달감염(transfection)시켜 재조합 바이러스를 제작하였다. QBI293A 세포의 배양은 MEM(minimum essential medium, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배양액에서 통상적인 배양방법으로 배양하였고, 유전자 도입 2-3주일 후 아데노바이러스가 생성된 배양 용기로부터 바이러스를 분리하였다. 분리된 바이러스로부터 DN-ATM 유전자의 확인은 위와 동일하게 제한효소를 이용하였고, 확인된 바이러스를 QBI293A에 재감염 시켜 중복 염화세슘구배원심분리법(double CsCl gradient centrifugation)으로 다량의 바이러스를 정제하였다. 이후 바이러스의 보관은 10% 글리세롤이 함유된 투석 완충액(10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂)와 함께 -80°C로 저장하였다. 실험에는 대조바이러스로 녹색형광단백(green fluorescent protein, GFP)가 재조합된 Ad/GFP를 이상과 동일하게 제작하여 사용하였고, CT-26 세포에 바이러스의 감염과 유전자의 발현의 여부를 대조바이러스로 확인하였다.

정제된 바이러스의 생물학적 활성은 플라크형성단위(plaque forming unit, PFU/mL)를 측정하여 실험세포주에 일정수의 바이러스를 감염시켰다. QBI293A 세포 3×10^5 개를 60 mm 배양 용기에 하룻밤 배양시키고 정제 후 희석된 바이러스 1 mL과 1.25% SeaPlaque agarose(FMC, Rockland, Maine, USA) 1 mL(42°C)을 서서히 섞은 후 세포위에 부었다. 통상적으로 2주일 전후하여 나타나는 플라크의 숫자를 세어 PFU를 계산하였다.

CT-26 세포주에 바이러스를 10, 100, 200 multiplicity of infection(MOI, number of active virus particle/cell number)로 감염시켰으며, 감염은 우태아 혈청이 함유되지 않는 배양액에 5 분 간격으로 흔들어주면서 37°C에서 1시간 시켰다.

4. 방사선 조사와 세포성장 측정

실험 세포주에 Ad/DN-ATM과 Ad/GFP 바이러스를 감염시키고, 도입 유전자의 발현이 이루어지는 2일째에 방사선을 조사하였다. 조사는 세슘원(^{137}Cs source)의 감마방사선조사기(γ -irradiator, JL Shepherd & Associates)로 5 Gy와 10 Gy 선량을 조사하였다. 방사선 조사 후 세포를 96 well 플레이트에 1×10^4 개 분주 시키고, 측정 4시간 전에 $1 \mu\text{Ci}$ [^3H] methyl-thymidine(^3H]TdR, New England Nuclear, Boston, MA, USA)을 첨가하였다. 세포에 트립신을 첨가하여 부유시키고 유리섬유 필터(glass-fiber filter)에 부착시킨 후 DNA에 삽입된 [^3H] methyl-thymidine의 정량을 액상 섬광방출 측정기(liquid scintillation counter, Packard Instrument)를 이용하여 측정하였다. 생존세포수의 정도를 측정하기 위하여 60 mm 배양용기에 1×10^4 개의 세포를 배양시키고, 100 MOI 각각의 바이러스를 감염시키고 48시간 후 5 Gy의 방사선을 조사하였다. 방사선 조사 24, 48시간 후 배양용기를 50% 메탄올로 고정시키고 PBS로 3회 세척하여 생존세포만을 용기에 부착시켰다. 부착된 세포를 크리스탈바이올렛(crystal violet)으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

5. DNA 단편화

CT-26 세포에 Ad/DN-ATM 아데노바이러스를 감염시킨 48시간 후 10 Gy 방사선을 조사하였다. 방사선 조사 후 24시간과 48시간 후에 세포에서 일어나는 DNA의 단편화를 다음과 같이 실험하였다. 세포들을 찬 PBS로 2번 세척하여 작은 튜브에 옮기고 용해 완충액(10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) 500 μL 를 첨가하여 얼음에서 30분간 용해시키고, 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 세포 찌꺼기를 제거한 뒤 상층액을 새 튜브에 옮겼다. 페놀/클로르포름 500 μL 을 처리하여 천천히 섞고 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 기타의 단백질을 제거하였다. 순수 DNA를 새 튜브에 옮기고 1/10 volume의 3 M 아세트산나트륨(sodium acetate)와 2배의 에탄올을 넣어 얼음에서 30분간 방치하여 침전시켰다. 4°C, 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 DNA 침사를 얻어 70% 에탄올로 세척하고, 공기 중에 건조시킨 후 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ RNase A

가 함유된 TE 완충액(pH 8.0) 20 μL 에 녹여 1.5% 한천 겔에서 전기영동 하였다.

6. Western hybridization

CT-26 세포에 Ad/DN-ATM 아데노바이러스를 감염시킨 48시간 후 방사선을 조사하였다. 방사선 조사 24시간과 48시간 후 세포로부터 총 단백질을 분리하였다. 세포를 2-3회 차가운 PBS로 세척 후 100 mm 배양용기에 1 mL의 PBS-TDS(1×PBS, 1% Triton X-100, 0.05% sodium deoxycholate, 0.01% SDS, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 1 mM EDTA, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatin, 0.2 mM PMSF) 용액을 첨가, 15분간 얼음 위에서 방치 후 13,000 rpm에서 5분간 원심하여 세포막 성분 등을 제거하였으며, 단백질 농도는 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하였다. 10 μg 의 용해질을 7.5% mini gel(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) SDS-PAGE(poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하였고, 이를 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane, Hybond-C Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 60 V로 2시간 동안 전기적으로 이동하였다. 막의 차단은 5% 탈지분유가 함유된 TBS(TBS+0.1% Tween 20) 용액으로 상온에서 1시간 동안 실시하였다. 아래에 열거한 단백질의 발현을 측정하기 위한 1차 항체를 1:1,000으로 TBS 용액에 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TBS 용액으로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 horse radish peroxidase(HRP)가 결합된 anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 1:5,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응하였다. TBS 용액으로 3회 세정 후 ECL 기질(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)과 30-60초간 반응 후 X-Ray 필름에 감광시켰다.

본 실험에 사용한 항체는 다음과 같다.

Anti-phospho-Akt : #9276S, Cell Signaling, Bervelvy, MA, USA

Anti-Akt : #9272, Cell Signaling, Bervelvy, MA, USA

Anti-caspase 3 : sc-7148, Santa Cruz, CA, USA

Anti-caspase 9 : sc-7885, Santa Cruz, CA, USA

Anti-PARP : sc-1561, Santa Cruz, CA, USA

Anti-Bax : #554106, PharMingen, San Diego, CA, USA

Anti-Bcl-2 : sc-7382, Santa Cruz, CA, USA

7. 통계처리

통계 방법은 Student's t-test를 사용하여 검정하였으며 P값은 0.05 미만일 때 통계적인 유의성으로 인정하였다.

결 과

1. Ad/DN-ATM에 의한 CT-26 세포의 세포자멸사 유도

DN-ATM 유전자는 AT 유전자 아미노기 말단으로부터 p53 결합 영역과 DNA와 결합하는 루이신 지퍼 영역을 포함한 1303 개의 아미노산만을 발현시켜 AT 환자에서 많이 나타나는 절단된 형태의 인위적인 DN-ATM을 표현하고 있다(Fig. 1A). DN-ATM 유전자를 전달을 위하여 아데노바이러스를 제작하였으며, 실험 세포주인 CT-26에서 효과적인 유전자의 전달과 발현을 검토하였다. 유전자의 발현과 대조군으로 사용된 Ad/GFP 바이러스를 CT-26 세포에 10, 100, 200 MOI를 감염시키고 48 시간 후 형광단백질의 발현을 관찰하였다(Fig. 1B). 형광 단백질의 발현은 24시간부터 관찰되었으며, 48시간을 정점으로 72시간과는 큰 차이가 없었으며, 감염의 정도에 따라서 발현의 차이가 나타났다.

DN-ATM 유전자가 CT-26 세포의 성장과 세포자멸사의 유도에 미치는 영향을 검토하였다. 세포에 Ad/DN-ATM을 10에서 200 MOI를 감염시킨 결과 100 MOI부터 세포의 성장 억제가 뚜렷이 나타났으며, 200 MOI에서는 세포사가 유도되었다(Fig. 2A). 이후 실험에서는 세포 성장은 억제되지만 급격한 세

포사가 유도되지 않는 100 MOI를 감염시켜 실험하였다. 다음으로 DN-ATM에 의한 방사선의 민감성을 검토하였다. 100 MOI의 Ad/DN-ATM과 Ad/GFP를 감염시키고 48시간 후에 5 Gy와 10 Gy의 방사선을 조사시킨 결과 Ad/DN-ATM 세포는 Ad/GFP 세포의 성장에 비교하여 현저히 감소하였다(Fig. 2B). 방사선 조사 후 Ad/DN-ATM 세포를 크리스탈바이올렛으로 염색하여 성장하는 세포를 관찰한 결과 24시간 후에는 약간의 세포가 존재하지만 48시간 후에는 거의 생존세포가 존재하지 않았다(Fig. 3A). Ad/GFP 대조세포 또한 10 Gy의 방사선 조사에서 약간의 성장의 억제가 보여졌으며, 48시간 후에는 DNA의 단편화가 유도되었다. 하지만 Ad/DN-ATM 세포에 비교하여서는 월등히 낮은 수준의 성장의 억제와 세포자멸사가 유도되었다(Fig. 3B). 따라서 Ad/DN-ATM 세포는 방사선에 강한 민감성을 나타내고 있음을 확인하였다.

2. Ad/DN-ATM에 의한 CT-26 세포의 방사선 조사 후 세포자멸사 유도 경로

본 연구에서 DN-ATM 유전자는 세포의 성장을 억제시키고 또한 방사선을 조사시키면 세포자멸사를 유도시키는 기능을 갖고 있었다. 이는 마치 AT 환자의 세포가 나타내는 방사선에 예민한 민감성을 보이는 것과 동일하게 정상 세포를 AT 세포의 표현형으로 변화가 가능함을 알 수 있었다. 다음으로 DN-ATM

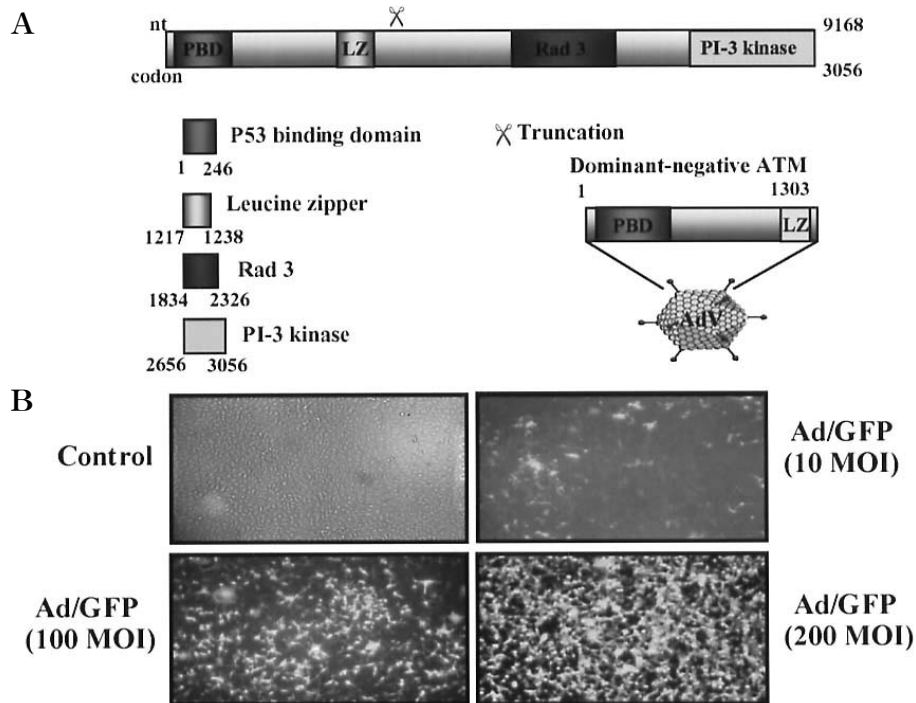


Fig. 1. Schematic representation of structure of AT gene and the construction of dominant negative ATM used in this study(A). Adenoviral titer monitored by GFP expression in CT-26 cells transduced with Ad/GFP marker gene(B). Fluorescence microscopy of the infected cells was performed 2 days later. PBD: p53 binding protein, LZ: leucine zipper, Ad: adeno virus.

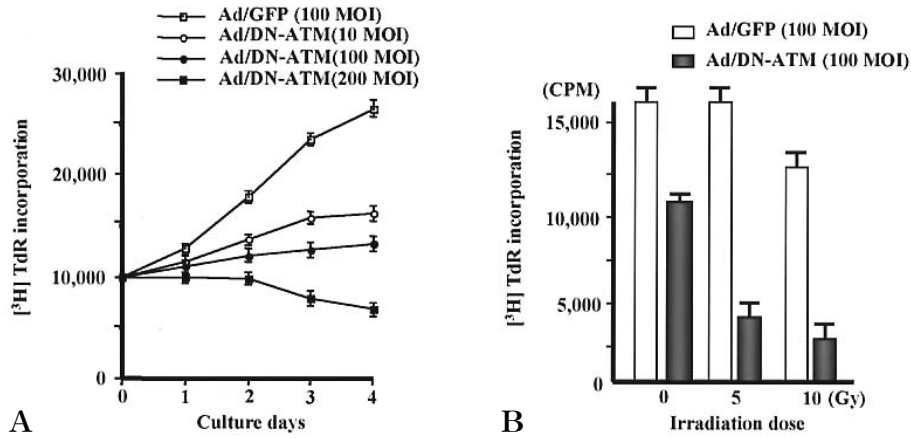


Fig. 2. Inhibited proliferation of Ad/DN-ATM infected CT-26 cells(A) and enhanced radiosensitivity in Ad/DN-ATM infected CT-26 cells(B). Cells were infected Ad/DN-ATM and Ad/GFP at indicated MOI for 1 hour. Proliferation was determined by [³H]-thymidine incorporation assay and data are presented as the means±SD of three independent experiments. *P<0.05(Student's t test).

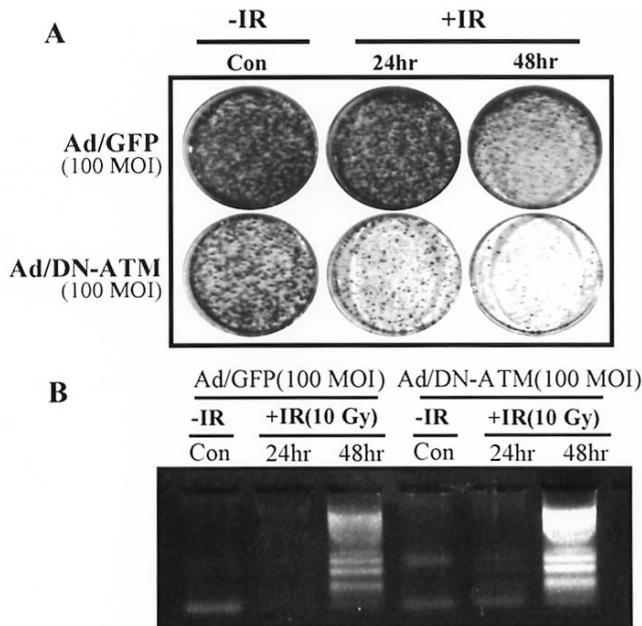


Fig. 3. Enhancement of induced apoptosis in Ad/DN-ATM infected CT-26 cells after irradiation by crystal violet assay (A) and DNA fragmentation(B). Cells were infected Ad/DN-ATM and Ad/GFP at indicated MOI for 1 hour. Cells were fixed and stained with crystal violet 10 days later after irradiation(A). DNA was extracted from transduced CT-26 cells and analyzed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel and visualized with ethidium bromide staining(B).

유전자가 방사선에 민감성을 나타내어 유도되는 세포자멸사의 경로를 추적하였다. 일반적으로 세포내에서 일어나는 세포자멸사는 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor, TNF)에 의해서 유도되어지는 경로와 미토콘드리아를 매개로 나타나는 경로로 구분되어진다. CT-26 세포에 DN-ATM 유전자를 발현시키고 5

Gy의 방사선을 조사시켰다. 5 Gy의 방사선의 조사에서 대조세포는 약간의 성장의 억제는 나타났지만 DNA 단편화는 유도되지 않았다(결과 미기재). 반면 DN-ATM 세포는 세포자멸사가 유도되었기 때문에 DN-ATM 유전자의 방사선 민감성으로 나타나는 세포자멸사와 그 경로를 추적적으로 100 MOI의 감염과 5 Gy의 방사선을 조사하였다.

TNF에 의해서 유도되는 세포자멸사는 caspase 8이나 caspase 10의 활성이 나타난다. 반면 미토콘드리아를 매개로 유도되어지는 세포자멸사는 caspase 9번과 caspase 3번이 활성화된다. 이러한 caspase 활성을 기초로 검토한 결과 Ad/DN-ATM 세포에서는 caspase 9번이 활성화가 나타났다(Fig. 4). Caspase 9번의 활성화에 이어 caspase 3번이 활성화 되었으며, 핵내에 존재하는 PARP의 활성화로 이어졌다(Fig. 4). Ad/DN-ATM 세포의 방사선 조사 후 나타나는 세포자멸사는 미토콘드리아를 매개로 유도되었다.

미토콘드리아로부터 caspase의 활성은 유리되는 시토크롬(cytochrome) C에 의해서 조절되며 발암유전자 *Bcl-2*는 시토크롬 C의 분비를 억제시키고 이와는 다르게 *Bax*는 유도를 시킨다. Fig. 4의 Ad/DN-ATM 세포에서 나타나는 caspase 9, 3, 그리고 PARP의 활성의 유도는 시토크롬 C의 분비를 조절하는 *Bcl-2*와 *Bax*의 발현에 영향을 미쳤다. 대조바이러스 세포에서는 *Bcl-2*의 변화가 없었지만 Ad/DN-ATM 세포에서는 *Bcl-2*의 발현의 감소와 *Bax*의 증가가 뚜렷이 나타났다(Fig. 5). 또한 Ad/DN-ATM 세포는 *Bcl-2*의 상부에서 세포의 생존력과 성장을 유도하는 *Akt/PKB*의 활성화가 감소되었다(Fig. 6). 이로써 DN-ATM 유전자는 방사선 조사에 의한 세포자멸사를 유도시키며, 그 과정은 상부의 *Akt/PKB*의 활성화가 억제되며 이로부터 *Bcl-2*의 저하로 미토콘드리아로부터 시토크롬 C의 분비가 촉진되어 caspase 3, 9와 PARP의 활성화가 나타나는 연속적

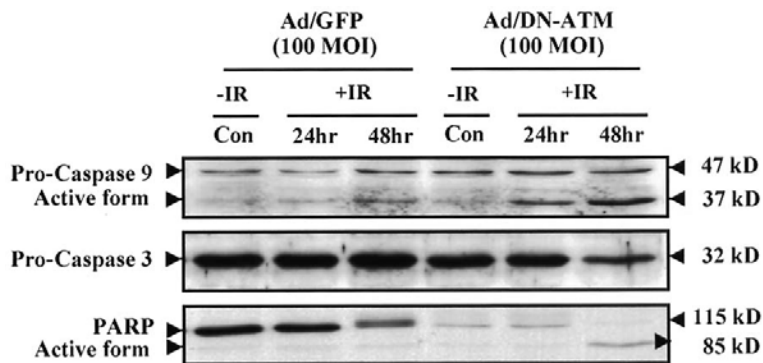


Fig. 4. Increment of apoptosis-specific cleavage of caspase 9 and caspase 3 and PARP in Ad/DN-ATM infected CT-26 cells after irradiation. Cells were infected Ad/DN-ATM and Ad/GFP at indicated MOI for 1 hour. Lysates obtained from infected cells were analyzed for caspase-3, -9, and PARP expression by Western immunoblot analysis.

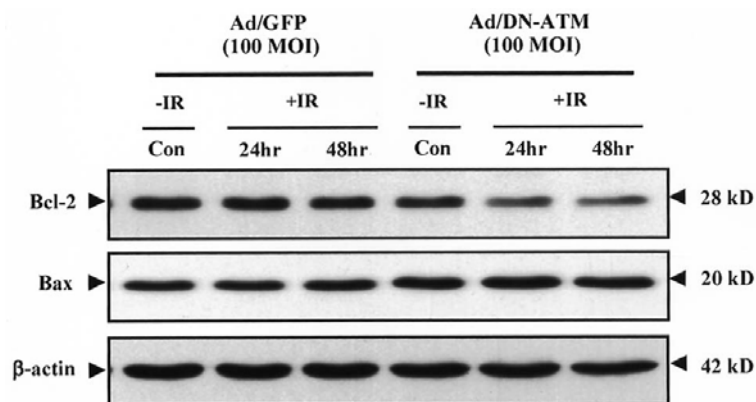


Fig. 5. Down-regulation of *Bcl-2* expression and up-regulation of *Bax* expression in Ad/DN-ATM infected CT-26 cells after irradiation. Cells were infected Ad/DN-ATM and Ad/GFP at indicated MOI for 1 hour. Lysates obtained from infected cells were analyzed for *Bcl-2* and *Bax* expression by Western immunoblot analysis with anti *Bcl-2* and *Bax* antibody.

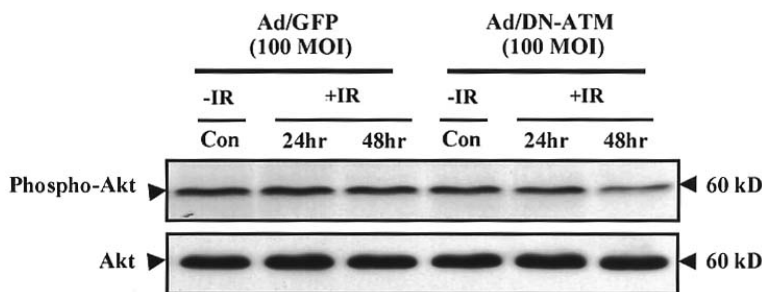


Fig. 6. Inhibition of *Akt/PKB* signal pathway activation in Ad/DN-ATM infected CT-26 cells after irradiation. Cells were infected Ad/DN-ATM and Ad/GFP at indicated MOI for 1 hour. Lysates obtained from infected cells were analyzed for *Akt/PKB* and phospho-*Akt/PKB* expression by Western immunoblot analysis with anti-phospho *Akt* and *Akt* antibody.

인 미토콘드리아를 매개로 나타나고 있었다.

고 찰

ATM 세포주는 방사선에 예민한 민감성을 나타내어 세포자멸사가 유도되는 특징을 나타내며⁵⁾, 이는 변이된 ATM 유전자가 DNA의 회복 과정에서 결함을 갖고 있기 때문에 나타나는 현상으로 이해하고 있다⁶⁾. DNA 회복 과정에서 AT 단백질은 DNA의 결함 부위에 결함을 하며 단백질 활성화효소의 활성화로 하부의 p53 혹은 *Chk1*, *Chk2* 등을 인산화시켜 세포주기를 정지시키는 것으로 추측하고 있다^{4, 6)}. ATM 유전자는 다양한 변이 형태가 존재하지만 대부분이 카복실 말단에 존재하는 활성화소 영역의 활성이 소실되어 하부의 신호체계의 결함이 방사선의 민감성을 나타내는 주요 원인으로 생각된다^{6, 7)}. AT 유전자로부터 방사선 민감성을 표현시키기 위하여 활성화효소의 활성을 제거시키고 반면 단백질과 DNA는 결합이 가능하도록 프롤린 풍부한 영역과 루이신 지퍼 영역이 포함시킨 DN-ATM 유전자를 제작하였다. 제작한 DN-ATM 유전자는 암세포를 ATM 표현형으로 변화시켜 방사선에 민감성을 나타내어 세포자멸사를 유도시켜 이를 방사선치료와 병행을 목적으로 하게 된다.

실험세포주인 CT-26에 DN-ATM의 발현 유도는 아데노바이러스를 이용하였으며, 대조바이러스인 Ad/GFP를 감염시킨 결과 실험세포주에서 잘 발현되었다(Fig. 1B). Ad/DN-ATM을 100 MOI 감염시킨 결과 세포의 성장은 약 50% 이상 감소되었으며(Fig. 2A), 여기에 저용량의 방사선을 조사한 결과 세포는 성장을 멈추고 세포수가 현저히 감소하였으며(Fig. 2B), 방사선 조사 후 세포 성장의 감소는 DNA의 단편화로 나타나는 세포자멸사가 유도되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 DN-ATM 유전자가 목적대로 암세포를 AT 환자의 세포 형태로 변환시키고 방사선에 민감성을 나타내어 세포자멸사를 유도시키는 결과를 얻을 수 있었다. Morgan 등¹⁰⁾은 이와 같이 루이신 지퍼 영역만을 포함한 분절화된 변이형태에서도 세포가 방사선에 민감성을 나타내는 것을 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 방사선 민감성 외에도 DN-ATM 유전자만의 발현에서도 세포의 생존력의 저하가 두드러지게 나타나는 특징을 갖고 있었다(Fig. 2A). DN-ATM 유전자가 어떻게 세포생존력을 저하시키는지는 알 수 없지만 Fig. 6의 결과에서 바이러스 감염 2일째이며 방사선 조사 전의 세포에서 이미 Akt/PKB의 활성이 감소되어 있었다. Akt/PKB의 활성의 감소는 세포의 성장의 둔화와 생존력의 억제로 이어질 것이며¹¹⁾, 또한 방사선 조사 후에 유도되는 인자의 변화에도 영향을 미쳐 세포자멸사의 유도되는 것으로 생각된다. 방사선 조사를 비롯하여 외부적인 자극에 대해서 세포의 생존력을 유지시키기 위한 대표적인 인자로 *NF-kB*가 있으며¹²⁾, *NF-kB*는 상부의 Akt/PKB의 신호경로의 제어를 받고 있다¹³⁾. 따라서, 방사선을 조사하지 않는 경우의 Ad/DN-ATM 세포의 성장 억제에는 Akt/PKB의 활성의 저하와 이로 인한 *NF-kB* 등의 유도의 감소가 원인으로 사료된다.

일반적으로 세포내 세포자멸사가 유도되는 경로는 중앙 피사 인자 수용체 계(TNF receptor family)로부터 유도되어 caspase 8과 caspase 10의 활성화로 이어지는 경로¹⁴⁾와 미토콘드리아를 중심으로 시토크롬 C의 분비가 촉진되어 caspase 3의 활성화로 이어지는 경로로 구분된다¹⁵⁾. 방사선 조사는 TNF나 Fas-L로부터 유도되어 수용체를 매개하는 경로와는 다르게 DNA의 손상에 의한 세포 내부로부터의 세포자멸사가 초래되는 경로로 해석된다. 본 실험에서 Ad/DN-ATM 세포에 낮은 용량의 방사선 조사 시 나타나는 세포자멸사는 미토콘드리아를 매개되는 것으로 나타났다(Fig. 4). 미토콘드리아의 시토크롬 C의 분비를 제어하는 대표적 인자로는 발암유전자 *Bcl-2*와 *Bax*가 있으며^{16, 17)}, Ad/DN-ATM 감염세포에서의 *Bcl-2*의 저하와 *Bax*의 증가가 이 경로의 활성을 유도시켜 하부의 caspase 3의 활성을 증가시키는 것으로 보여진다(Fig. 5). Ad/DN-ATM 세포의 *Bcl-2*의 발현 감소는 *NF-kB*의 핵내 이동의 감소에 의한 전사기능의 저하로 해석되며, 이러한 상부의 가장 중심이 되는 인자로는 Akt/PKB의 활성의 억제로 이해된다.

DN-ATM 유전자는 AT 유전자의 카복실 영역에 존재하는 PI-3 kinase 영역이 존재하지 않는다. AT 유전자의 PI-3 kinase의 활성화에 관해서는 정확히 밝혀져 있지 않지만, 많은 AT 환자의 유전자에서는 활성화효소의 활성 억제가 세포의 생존력의 저하와 방사선 민감성의 원인으로 인식하고 있다^{2, 8, 18)}. 현재로서는 DN-ATM이 어떻게 Akt/PKB 경로의 활성을 저하시키는 기전에 관해서는 알 수 없지만 하부의 PI-3 kinase의 결여가 궁극적인 원인으로 생각된다. Morgan 등¹⁰⁾의 결과에서도 PI-3 kinase의 외부적인 활성 유도는 AT 세포의 방사선 민감성을 회복시키는 것으로 나타나고 있다. 따라서 DN-ATM 유전자의 PI-3 kinase의 활성의 제거는 방사선 조사 후 세포의 생존력을 증가시키는 하부의 신호체계가 가동되지 않으며, 이로 인해서 세포자멸사가 유도되는 방사선 민감성을 보여주는 것으로 설명된다.

요 약

목적 : AT는 드물게 발생하는 상염색체성 열성질환으로, 소아의 퇴화에 의한 운동장애와, 암 발생의 소인이 증가하는 등 많은 임상적 징후가 보인다. AT 질환을 유발하는 ATM 유전자는 DNA 손상시 세포주기 정지를 유도시키지 못하며, 방사선 조사 후 세포 생존력을 유지시키지 못하여 세포자멸사를 유도하게 된다. 따라서 암세포에 DN-ATM 유전자를 발현시켜 AT 세포의 표현형으로 변화시킨다면, 이러한 암세포는 방사선에 의해 유도되는 세포자멸사가 훨씬 더 증가된다. 그러나 지금까지 ATM 세포에서 방사선에 의해 야기되는 세포자멸사 경로는 밝혀져 있지 않다. 그러므로 본 연구에서는 DN-ATM이 발현되는 CT-26 대장암 세포를 이용하여 방사선 조사 후에 유도되는 세포자멸사 경로를 구명하고자 하였다.

방법 : DN-ATM 아데노바이러스(Ad/DN-ATM)와 표식 유

전자 GFP만을 함유한 대조 아테노바이러스(Ad/GFP)를 제작하여 CT-26 세포에 감염시켰다. DN-ATM이 발현되는 CT-26 세포에서 방사선 조사로 유도되는 세포자멸사 경로는 [³H]-thymidine assay, DNA fragmentation, 및 Western immunoblot analysis으로 실험하였다.

결 과 : 실험 결과에서 방사선 조사 후 세포의 성장이 감소하는 것으로 보아 CT-26 대장암 세포가 AT 환자에서 보여지는 표현형으로 변화되었다는 것을 보여주었고, 방사선 조사에 의한 세포자멸사가 유도되었다. 방사선 조사 후 시간이 지날수록 *Bcl-2*의 발현이 감소되고, *Bax*의 발현이 증가하며, caspase 9, caspase 3 및 PARP가 활성화되었다.

결 론 : 이러한 실험 결과들은 DN-ATM이 발현되고 있는 CT-26 세포에서 방사선 조사 후 야기되는 세포자멸사 경로는 미토콘드리아를 통하여 caspase 9, caspase 3와 PARP의 활성화에 의해 일어나는 세포자멸사임을 시사한다

참 고 문 헌

- 1) Spacey SD, Gatti RA, Bebb G. The molecular basis and clinical management of ataxia telangiectasia. *Can J Neurol Sci* 2000;27:184-91.
- 2) Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995;268:1749-53.
- 3) Chen G, Lee EYHP. The product of ATM gene is a 370 kDa nuclear phosphoprotein. *J Biol Chem* 1996;271:33693-7.
- 4) Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998;281:1674-7.
- 5) Rotman G, Shiloh Y. ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene* 1999;18:6135-44.
- 6) Delia D, Mizutani S, Panigone S, Tagliabue E, Fontanella E, Asada M, et al. ATM protein and p53-serine 15 phosphorylation in ataxia-telangiectasia(AT) patients and at heterozygotes. *Br J Cancer* 2000; 82:1938-45.
- 7) Wright J, Teraoka S, Onegut S, Tolun A, Gatti RA, Ochs HD, et al. A high frequency of distinct ATM gene mutations in ataxia-telangiectasia. *Am J Hum Genet* 1996;59: 839-46.
- 8) Lohrer HD. Regulation of the cell cycle following DNA damage in normal and ataxia telangiectasia cells. *Experientia* 1996;52:316-28.
- 9) Smith GC, d'Adda di Fagagna F, Lakin ND, Jackson SP. Cleavage and inactivation of ATM during apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999;19:6076-84.
- 10) Morgan SE, Lovly C, Pandita TK, Shiloh Y, Kastan MB. Fragments of ATM which have dominant-negative or complementing activity. *Mol Cell Biol* 1997;17:2020-9.
- 11) Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 1999;253:210-29.
- 12) Jung M, Dritschilo A. NF-kappa B signaling pathway as a target for human tumor radiosensitization. *Semin Radiat Oncol* 2001;11:346-51.
- 13) Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 1999;9:601-4.
- 14) Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E, Beyaert R, Vandenaabee P, Fiers W. Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding. *FEBS Lett* 1997;410:96-106.
- 15) Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C. *Cell* 1996;86:147-57.
- 16) Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275: 1132-6.
- 17) Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome C from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:4997-5002.
- 18) Suzuki K, Kodama S, Watanabe M. Recruitment of ATM protein to double strand DNA irradiated with ionizing radiation. *J Biol Chem* 1999;274:25571-5.