

Analysis of Genes Regulated by HSP90 Inhibitor Geldanamycin in Neurons

Young Mo Yang¹, Seung-Whan Kim² and O-Yu Kwon^{3,†}

¹Department of Emergency Medicine, Eulji University Hospital, 302-120 Taejon, Korea

²Department of Emergency Medicine, ³Department of Anatomy, Chungnam National University, Taejon 301-747, Korea

Geldanamycin is a benzoquinone ansamycin antibiotic that binds to cytosol HSP90 (Heat Shock Protein 90) and changes its biological function. HSP90 is involved in the intracellular important roles for the regulation of the cell cycle, cell growth, cell survival, apoptosis, angiogenesis and oncogenesis. To identify genes expressed during geldanamycin treatment against neurons of rats (PC12 cells), DNA microarray method was used. We have isolated 2 gene groups (up- or down-regulated genes) which are geldanamycin differentially expressed in neurons. Granzyme B is the gene most significantly increased among 204 up-regulated genes (more than 2 fold over-expression) and Chemokine (C-C motif) ligand 20 is the gene most dramatically decreased among 491 down-regulated genes (more than 2 fold down-expression). The gene increased expression of Cxcl10, Cyp11a1, Gadd45a, Gja1, Gpx2, Ifna4, Inpp5e, Sox4, and Stip1 are involved stress-response gene, and Cryab, Dnaj1, Hspal1, Hspa8, Hspca, Hspcb, Hspd1, Hspe1, and Hsph1 are strongly associated with protein folding. Cell cycle associated genes (Bcl3, Brca2, Ccnf, Cdk2, Ddit3, Dusp6, E2f1, Il1a, and Junb) and inflammatory response associated genes (Ccl2, Ccl20, Cxcl2, Il23a, Nos2, Nppb, Tgfb1, Tlr2, and Tnf) are down-regulated more than 2 times by geldanamycin treatment. We found that geldanamycin is related to expression of many genes associated with stress response, protein folding, cell cycle, and inflammation by DNA microarray analysis. Further experimental molecular studies will be needed to figure out the exact biological function of various genes described above and the physiological change of neuronal cells by geldanamycin. The resulting data will give the one of the good clues for understanding of geldanamycin under molecular level in the neurons.

Key Words: Geldanamycin, PC12 cells, HSP90, DNA microarray

DNA microarray는 핵산의 hybridization 원리를 사용한 것으로서 수천 개의 DNA를 nitrocellulose membrane 이 아닌 slide glass위에 고밀도로 고정화한 것이다. DNA microarray 분석의 최대 장점은 단 한번의 실험으로 동시에 다수의 gene expression 양상을 탐색할 수 있으며, 또한 유전자의 진단, 돌연변이, 의약품의 효과 확인 및 질병 진단용 등에 널리 응용될 수 있는 high-throughput screening system이다 (Dharmadi & Gonzalez, 2004).

Geldanamycin의 화학분자식은 $C_{29}H_{40}N_2O_9$ 이며 분자량은 560.64이며 IUPAC name은 (4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-13-hydroxy-8,14,19-trimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-

3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-yl carbamate이다 (Hu et al., 2004). 그리고 가장 잘 알려진 세포내 기능은 HSP90에 binding하여 HSP90이 관여하는 cell cycle, cell growth, cell survival, apoptosis, angiogenesis, oncogenesis를 변형시킨다 (Shimamura & Shapiro, 2008; Powers & Workman, 2006). 특히, HSP90은 암세포의 성장과 생존을 촉진하는 여러 가지 돌연변이성, 또는 과다발현성 신호전달 단백질이 기능을 발휘하는데 필요하다 (Drysdale, 2006). 이는 HSP90 저해제가 anti-cancer medicine의 효과를 가질 수 있음을 의미한다 (Xiao et al., 2006). HSP90 저해제의 진정한 장점은 암세포의 다양한 측면을 동시에 표적으로 한다는 점이다. 이는 매우 강력한 항암효과를 발휘하면서 종양의 내성획득을 어렵게 한다는 장점이 있다. 이런 이유에서 본 연구는 신경 세포인 PC12 세포에 geldanamycin을 처리함으로써 유전자의 발현이 up 혹은 down되는 유전자를 분류하여 세포

*논문 접수: 2009년 1월 5일

수정재접수: 2009년 2월 23일

†교신저자: 권오유, (우) 301-747 대전광역시 중구 문화동 6, 충남대학교 의과대학 해부학교실
Tel: 042-580-8206, Fax: 042-586-4800
e-mail: oykwon@cnu.ac.kr

내 항상성유지와 HSP90 단백질의 분자생리에 관련되는 연구를 모색하기 위한 토대를 형성하려고 한다 (López-Maderuelo et al., 2001).

쥐 (*Rattus norvegicus*; rat)의 갈색 세포종에서 유래한 PC12 세포를 10% horse serum과 5% calf serum이 함유된 RPMI 1640 (McCoy's 5A modified media)배지 내에서 배양하였다. 배양기의 조건은 37°C, 5% 이산화탄소, 90% 이상의 습도가 유지되는 환경이며 배지를 2~3일마다 교환하고 7~10일 마다 passage를 시행하였다 (Yoo et al., 2008). Total RNA의 분리에는 RNAzol-B Kit (TEL-TEST, Inc. TX, USA)를 사용하였다. 충분히 자란 PC12 세포들 상대로 geldanamycin을 처리한 후 차가운 phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척 후 긁어모은 후 RNAzol-B 1 ml에 homogenization 시켰다. 그 다음 chloroform 200 µl을 첨가하여 잘 섞어주고 12,000 rpm (4°C)에서 15분간 원심 분리하여 얻은 500 µl의 상층액에 500 µl의 isopropanol을 첨가하여 4°C에서 15분간 방치 후 다시 12,000 rpm (4°C)에서 10분간 원심 분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물에 75% ethanol 1 ml을 첨가하고 잘 교반하여 10,000 rpm (4°C)에서 5분간 원심 분리하여 RNA를 얻었으며 spectrophotometer로 RNA 양을 측정하였다. 본 실험에서 사용된 Operon Rat Whole 27 K Oligo chip은 Operon사에서 보유하고 있는 Rat Whole Genome Oligo subsets V3.0 중 Exon sequence oligo (22,167개), transcript sequence oligo (4,795개)와 chip의 quality 확인과 normalization을 위하여 control sample (1,070개)이 점적되어 있다. Operon Rat Whole 27 K Oligo chip에 spotting되어 있는 spot은 control 유전자를 포함하여 총 28,032개의 spot이 포함되어 있으며 이들은 25개의 column과 24개의 row로 48개의 block에 584개씩 분산되어 구성되어 있다. 26,962개의 oligo에는 18,822개의 기능이 알려진 known gene과 아직 기능이 밝혀지지 않은 transcript, EST sequence 등이 8,140개가 포함되어 있다. 기능이 알려진 known gene들은 biological process에 관여하는 유전자는 12,633개가 포함되어 있고, cellular component에 관여하는 유전자는 11,667개가 포함되어 있으며, molecular function에 관여하는 유전자는 13,820개가 포함되어 있다.

Geldanamycin에 의해서 유전자 발현에 변화가 확인된 것 중, 총 695개의 유전자들이 microarray에서 유의한 수준인 2 fold 이상의 over-/down-expression 발현 변화를 나타냈다. 그 중에 Cryab, Dnaj1, Hspal1, Hspa8, Hspca, Hspcb, Hspd1, Hspe1, Hsph1 gene 등의 protein folding (GO:

6457, p-value:1.22e-28)에 관여하는 유전자들 및 Cxcl10, Cyp11a1, Gadd45a, Gjal, Gpx2, Ifna4, Inpp5e, Sox4, Stip1 gene 등의 response to stress (GO:6950, p-value:2.08e-12)에 관여하는 유전자들을 포함하여 204개의 유전자들이 2 fold 이상 over expression을 나타냈다. 그 외에 Bcl3, Brca2, Ccnf, Cdk2, Ddit3, Dusp6, E2f1, Il1a, Junb gene 등의 cell cycle (GO:7049, p-value:1.01e-10)에 관여하는 유전자들 및 Ccl2, Ccl20, Cxcl2, Il23a, Nos2, Nppb, Tgfb1, Tlr2, Tnf gene 등의 inflammatory response (GO:6954, p-value:6.96e-9)에 관여하는 유전자들을 포함하여 491개의 유전자들이 microarray에서 유의한 수준인 2 fold 이상 down expression을 나타냈다.

신경세포에서 geldanamycin에 의해서 특이적으로 조절되는 대부분의 유전자들의 기능이 밝혀지지 않은 상태임으로, 이들의 기능을 이해하는 것이 신경세포에서 geldanamycin이 stress response 및 protein folding 과정에서 유전자들의 발현을 증강시키며, 세포의 cell cycle, inflammatory response에서 유전자들의 발현을 억제시킴으로서 세포 항상성이 유지되는지에 답할 수 있는 분자수준의 실마리를 제공할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호: 20070401034024)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Dharmadi Y, Gonzalez R. DNA microarrays: experimental issues, data analysis, and application to bacterial systems. *Biotechnol Prog.* 2004. 20: 1309-1324.
- Drysdale MJ, Brough PA, Massey A, Jensen MR, Schoepfer J. Targeting Hsp90 for the treatment of cancer. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2006. 9: 483-495.
- Hu Z, Liu Y, Tian ZQ, Ma W, Starks CM, Regentin R, Licari P, Myles DC, Hutchinson CR. Isolation and characterization of novel geldanamycin analogues. *J Antibiot (Tokyo).* 2004. 57: 421-428.
- López-Maderuelo MD, Fernández-Renart M, Moratilla C, Renart J. Opposite effects of the Hsp90 inhibitor Geldanamycin: induction of apoptosis in PC12, and differentiation in N2A cells. *FEBS Lett.* 2001. 490: 23-27.
- Powers MV, Workman P. Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors.

Endocr Relat Cancer 2006. Suppl 1: S125-135.
Shimamura T, Shapiro GI. Heat shock protein 90 inhibition in
lung cancer. J Thorac Oncol. 2008. 6 Suppl 2: S152-159.
Yoo YB, Lee KR, Kim SW, Kwon K, Goo TW, Kwon OY.

Deferoxamine induces endoplasmic reticulum stress in PC12
cells. Z Naturforsch [C]. 2008. 63: 308-310.
Xiao L, Lu X, Ruden DM. Effectiveness of hsp90 inhibitors as
anti-cancer drugs. Mini Rev Med Chem. 2006. 6: 1137-1143.
