

Busulfan Inhibits PCNA Expression but Induces The Expression of pRB

천영신, 주학진, 권득남, 김진희

경상대학교 대학원 응용생명과학부 낙농학전공

일반적으로 세포는 방사능이나 항암제 등의 자극에 의해 DNA가 손상받았을 때 DNA를 합성하기 전, DNA변이를 복구하기 위해 cell cycle을 정지시키게 된다. pRB (retinoblastoma protein)는 이러한 cell cycle의 조절기작에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. G1기에서 S기로 진행되는 것을 조절하는 단백질인 pRB은 E2F(cell cycle transcription factor)와 상호작용하여 cell cycle 진행에 필요한 전사 활성을 억제, PCNA (proliferating cell nuclear antigen)의 합성을 저해한다. 또한, E2F와 결합된 pRB는 apoptosis를 제어하는 유전자를 조절하는 것으로 알려져 있다. Cell cycle에 영향을 미치는 항암제의 일종인 busulfan을 처리하면, 정소 내에 존재하는 대부분의 생식세포들은 사멸되고 spermatogonia만 남는 것으로 알려져 있다. 그러나 그 기작에 대해서는 자세히 연구된 바가 없다. 본 연구에서는 busulfan처리 시 spermatogonial stem cell이 어떤 기작에 의해 손상받지 않고 유지되는지를 알아보고자 실험을 수행하였다. Busulfan을 처리한 마우스 (항암제 투여 후 5주)와 정상적인 13주령의 마우스의 정소로부터 각각 세포를 분리하였다. LSC (laser scanning cytometry)를 이용하여 처리군(busulfan treated mice)과 대조군(normal mature mice)에 대해 각각 DNA함량을 비교·분석한 결과 G0/G1(2N)에 머물러 있는 세포 비율이 처리군에서 현저하게 증가했다 ($79.3 \pm 5.5\%$: $8.1 \pm 1.3\%$). Cell cycle의 G1/S check point인 pRB와 PCNA 발현을 Western blot과 면역조직화학적 방법(immunohistochemistry)을 이용하여 조사하였다. PCNA는 대조군과 비교해, 처리군에서 매우 낮은 수준으로 발현되었다. 면역염색된 정소단면을 살펴보면, 대조군에서는 모든 세정관에서 PCNA를 발현하는 세포가 높은 비율로 검출되었고, 처리군에서는 소수의 세정관에서 세포들이 낮은 수준으로 검출되었다. 반면에, pRB의 경우 PCNA와는 상반된 결과를 나타내어, 대조군에서는 거의 발현이 되지 않는 반면, 처리군에서는 대부분의 세정관내, 기저막을 따라 위치한 세포들에서 발현되었다. 이상의 결과는 busulfan에 의해 pRB의 인산화가 억제, pRB와 결합된 E2F는 전사 활성이 억제되어, PCNA 합성을 저해하는 것으로 설명되어질 수 있다. 결론적으로, 인산화가 억제된 pRB (underphosphorylated RB protein)이 quiescent spermatogonial stem cell에서 만 특이하게 발현하는 단백질이며, 이러한 pRB의 발현은 apoptosis를 제어하는 역할을 담당해 busulfan처리에 의해 손상받지 않고 남아있는 것으로 시사된다.

(Key word) *busulfan*, *PCNA*, *pRB*, *spermatogonial stem cell*, *apoptosis*