

동물학논단

Radiation-Induced Signal Transduction Pathway



이 윤 실

- 1985년 이화여대 약학과 졸
- 1988년 이화여대 약학과 석사학위 취득
- 1994년 이화여대 약학과 박사학위 취득
- 1995~1996년 미국 NCI Postdoc (Lab of Cellular Carcinogenesis/Tumor Promotion)
- 1996~현재 원자력병원 방사선영향연구실 선임연구원

1. 서 론

방사선에 의한 세포 손상은 2개의 cellular target 으로부터 시작되는데 그 하나가 DNA이고 다른 하나는 plasma membrane이다 (Fig. 1). DNA 손상은 single 또는 double strand break를 지칭하는 것으로 이러한 손상은 일반적으로 방사선 피폭 후 빠른 시일 내에 회복되지만 남아 있는 unrepaired 또는 misrepaired double strand breaks가 genetic instability, 돌연변이 발생빈도의 증가 및 chromosome aberration을 유도한다. Lethal mutation 또는 chromosomal aberration은 clonogenic cell death를 유도하는데 보통 mitotic cycle 후에 일어난다. 방사선에 의한 DNA 손상에서 아직 기전이 정확히 알려지지는 않았지만 Pro-apoptosis pathway에 의한 apoptosis가 있다.

이 글에서는 signal transduction mechanism에 의한 방사선 유도 세포사에 대해 알아보려고 하며 특히 stress-induced apoptosis인 sphingomyelin/ ceramide signal transduction pathway 및 anti-apoptotic mechanism인 protein kinase C (PKC) pathway를 중

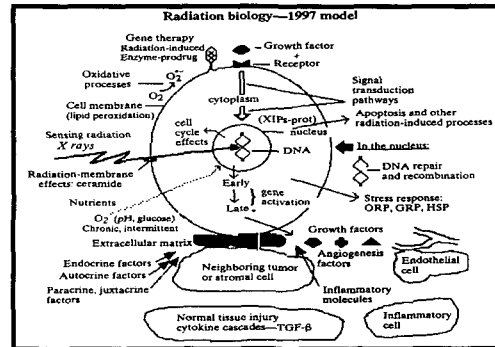


Fig. 1. Radiation biology in 1997-potential targets for translational research. For each of the pathways detailed molecular and cellular knowledge is becoming available that will help explain the cellular phenotype and provide novel therapeutic targets.

심으로 그 기전 및 이를 극복할 수 있는 방법에 대해 논의해 보겠다.

2. Cell Membrane-Initiated Apoptosis

Apoptosis는 이미 program된 pathway로서 칼슘 및 마그네슘 dependent endonuclease에 의한 일련의 biochemical event이다. 이 효소는 특정 internucleosomal linker site에서 nuclear chromatin을 자르는 역할을 수행하여 그 결과 180~200 base pair의 nuclear fragments를 생성한다. Apoptosis는 inducible process인데 몇몇의 세포에서는 불활성 형태로 계속적으로 발현되지만 대부분의 경우 활성화됨에 따라 나타나는 현상이다. 이 과정은 여러 가지 물리적 및 stress에 의해 시작되고 caspase라 불리는 여러 종류의 cystein protease의 활성을 유도한다. 조직손상을 유도할 수 있는 toxic한 intracellular component없이도 membrane bound vesicle에서 subcellular structure의 와해를 유도한

다. 근접한 phagocyte가 염증 반응없이 apoptotic body를 제거하며 caspase의 종류에 따라 apoptosis의 기전에 다르게 작용한다고 알려졌다. 방사선에 의한 apoptosis 조절은 현재 극히 일부만이 규명되어 있다. 최근에는 방사선 자체가 apoptosis를 유도하기 위해 cell membrane에서 signal을 시작시킨다고 발표되었고 방사선에 의해 유도되는 oxygen radical이 cell membrane의 phospholipid layer를 손상시키고 apoptosis를 유도한다고 하였다. 선량 측정에 의하면 α -particle 방사선의 경우 주로 cell membrane에 영향을 주어 sphingomyelin signaling system을 유도함이 보고되었다.

Sphingomyelin pathway는 sphingomyelinase라는 sphingomyelin-specific 형태의 phospholipase C에 의해 가수분해되어 ceramide가 생성되는 pathway를 칭한다. Ceramide는 second messenger로서 kinase cascade 및 transcription factor를 자극하고 IL-1beta에 의한 IL-2 signaling의 유도, TNF-alpha에 의한 HIV-1 replication 및 세포성장의 억제, NGF에 반응하여 neurite을 형성, NF-kB의 활성화 및 CD28 자극에 의한 mitogenesis 및 TNF-alpha 또는 Fas ligand에 의한 apoptosis등을 유도한다. 55-KDa TNF receptor의 cytoplasmic domain mutant를 이용한 연구에서 TNF receptor domain은 서로 다른 sphingomyelinase와 link 되었음을 확인하였다. 예를 들어 neutral sphingomyelinase는 ERK cascade 및 pro-inflammation pathway와 연결되어 있고 acidic sphingomyelinase는 death domain인 carboxyl terminus와 연결되어 있다.

방사선 및 산화적 물질, 열, 항암제 및 항체들은 apoptosis와 연관된 이러한 sphingomyelin pathway와 관련됨이 보고되고 있다. Ceramide의 생성은 수초내에 일어나고 방사선 치료에 사용하는 방사선 용량에서도 생성된다. Ceramide 생성의 ED50 값은 human monoblastic leukemia cell (BAEC)의 경우 1.5 Gy이고 U937 세포의 경우 5 Gy이며 이들 세포에서 apoptosis가 유도되는 LD50 용량(3 Gy)과 관련이 있다. Ceramide의 특성은 cell-permeable ceramide analog에 의해 규명되고 있는데 stress 또는 직접적인 apoptosis 유발 시와 유사한 기전을 보여주었다. Phorbol ester는 ceramide의 enzyme 생성을 억제하고 apoptosis를 감소시키는

반면 phorbol ester를 제거하고 외부에서 ceramide를 넣어주면 apoptosis가 다시 회복됨을 관찰할 수 있다. 방사선 역시 cell membrane을 손상하여 apoptotic lipid를 생성한다. Nuclei-free membrane에 방사선을 조사한 경우에도 sphingomyelin의 가수분해가 촉진되어 intact cell에서와 같은 효과를 보여주었다. 따라서 방사선은 cell membrane에 자극을 주어 apoptosis를 유발하는데 이는 손상된 DNA에 의한 signal이 필요하지 않다. 방사선에 의한 apoptosis에서 acid sphingomyelinase의 역할을 살펴보면 acid sphingomyelinase가 결여된 마우스의 경우 방사선에 의한 ceramide 및 apoptosis 생성이 나타나지 않으며 p53 dependent한 apoptosis와는 다른 기전으로 유도되었다. 따라서 방사선에 의한 apoptosis는 2가지 기전에 의해 유도됨을 알 수 있는데 이 두 기전은 membrane에 기초한 sphingomyelin pathway와 2 차적인 DNA 손상에 의한 p53-dependent한 apoptosis로 간주되어 진다.

3. Apoptosis Induced By DNA Damage

방사선에 의한 DNA 손상은 apoptosis를 유도하고 이는 ^{125}I dUrd를 DNA에 넣어 준 실험에서 관찰할 수 있다. Incorporation ^{125}I 는 DNA double-strand break를 유도하였고 이 모든 것이 ^{125}I dUrd가 incorporation된 장소로부터 5 base pair 내에서 일어났다. Incorporation된 ^{125}I 는 apoptosis를 유발하는데 DNA double strand break에 의해 apoptosis signaling이 자극되어진다. 따라서 방사선은 DNA double strand break를 유도하여 이로 인해 세포사를 유발하였다. 최근의 실험에서 DNA 손상에 의한 ceramide 생성 및 apoptosis를 보고하였는데 이 경우 ceramide는 sphingomyelinase의 활성화와는 상관없는 것처럼 보였다. 방사선에 의한 DNA 손상은 apoptosis를 유도하기 위한 ceramide synthase를 활성화한다고 하였다. Ceramide synthase의 특이적 inhibitor인 Fumonisin B1은 ceramide 생성 및 apoptosis를 억제하였다. 따라서 방사선은 sphingomyelinase 활성화에 의해 apoptosis를 유도하기도 하지만 DNA 손상에 의한 ceramide synthase에 의해서도 apoptosis를 유도하였다.

4. Induction of the Stress-Signaling Pathway by Radiation

방사선 피폭된 세포에서의 apoptosis 신호전달은 MEKK1, SEK1, SAPK 및 JUN을 포함하는 stress-activated protein kinase (SAPK/JNK)에 의해서 일어난다. 방사선에 의해 유도된 ceramide는 SAPK 활성화를 유도하고 apoptosis를 유발하였다. 방사선, H₂O₂, UV-C, 열, 및 TNFalpha는 ceramide 생성을 증가시키고 apoptosis를 유도하는 SAPK를 활성화한다. 반면에 다른 lipid second messenger인 1,2-diacylglycerol, arachidonic acid 및 phosphatidic acid 등은 apoptosis도, SAPK의 활성화도 유도하지 않았다. Dominant/negative JUN 및 SEK1 mutant를 이용한 실험에서 ceramide 및 stress에 의해 매개되는 apoptosis가 억제됨을 관찰할 수 있었다. 만약 세포사를 유도하는 것으로 알려진 CD95 (Fas/APO1) 또는 TNF를 처리하면 caspase 8 또는 10 같은 initiator caspase가 활성화되어 caspase 3, 6 또는 7같은 executioner caspase를 직, 간접적으로 활성화한다. 최근의 보고에 의하면 Fas/CD95/APO1은 initiator caspase를 통한 acidic sphingomyelinase를 활성화하여 ceramide를 생성하고 JNK 또는 p38-K 활성화 및 apoptosis를 유도한다고 보고하였다. 방사선에 의한 PKCdelta cleavage 및 apoptosis도 보고되고 있는데 ICE like protease의 inhibitor Y-VAD에 의해 이러한 현상이 감소되었다. UV선은 cytokine receptor의 trimerization 및 activation을 유도하였고 ICE/Ced-3 protease의 upstream 및 downstream이 방사선에 의한 apoptosis를 유도하는데 관여한다고 보고하였다. Caspase-3에 의한 PARP의 cleavage도 specific inhibitor인 DEVD처리에 의해 감소됨이 확인되었다. 세포의 회복 능력 안에 있는 적은 양의 DNA 손상은 postmitotic arrest를 유발하지만 심한 정도의 손상은 caspase를 통한 세포사를 유도한다. 향후 서로 다른 caspase의 방사선에 의한 apoptosis에서의 역할 규명이 필요할 것으로 사료된다.

5. Anti-Apoptosis Signaling

Ceramide mediated apoptosis는 1,2-diacylglycerol

(DAG)/PKC pathway를 통한 상호 조절기능이 있다. PKC pathway의 활성화는 방사선에 의한 세포사의 negative modulator로 작용하는데 Phorbol ester는 여러 가지 system에서 TNF에 의한 ceramide-mediated apoptosis의 antagonist로 작용하였다. 어떠한 PKC isozyme이 anti-apoptosis 반응에 관여하는지는 아직 모르지만 DAG/PKC pathway가 sphingomyelin pathway의 여러 site에서 ceramide-induced apoptosis를 차단시켰다. 이와 유사하게 basic fibroblast growth factor (FGF2)는 endothelial cell에서 방사선에 의한 apoptosis에 대해 방어작용을 함이 알려졌는데 이 과정에서 alpha isoform이 관여한다고 보고되었다. Phorbol ester도 FGF2와 유사하게 방사선 방어효과가 밝혀졌다. 또한 PKC가 inhibition되면 anti-apoptotic effect가 사라졌다 (Fig. 2). Phorbol ester를 이용한 직접적인 PKC의 활성화는 방사선에 의한 sphingomyelinase enzyme의 활성화를 억제하고 방사선에 의한 sphingomyelin의 가수분해 및 ceramide 생성을 소실시킨다. FGF2나 TPA는 PKC의 downstream인 MAPK

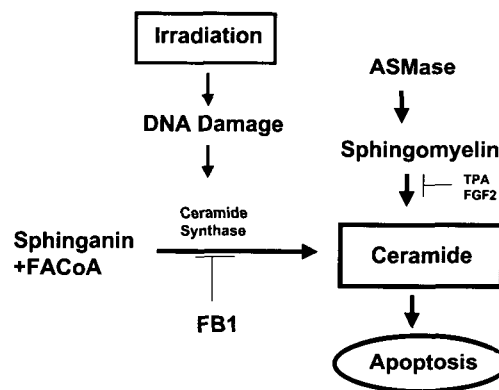


Fig. 2. Mechanism of action of radiation. Radiation appears to target both the plasma membrane and nucleus to induce two different signaling systems. Activation of different enzymes for generation of ceramide is involved. Generation of ceramide mediated by activation of ASMase induces "early-phase" apoptosis and is regulated by the PKC pathway, while "late-phase" apoptosis is mediated by activation of CS, which is inhibited by FB1.

cascade를 활성화한다. 따라서 이러한 방사선에 의한 PKC활성화가 방사선의 radio-resistance를 제공할 것이라 생각되어진다. PKC 활성화는 방사선 조사후 1분 이내에 일어나고 방사선에 의한 PKC 반응은 cell type specificity를 가지는 것으로 알려졌다.

7. 결 론

이 글에서는 ceramide와 DAG에 의한 apoptosis와 anti-apoptosis와의 signaling balance에 대해 서술하였다. 방사선에 의한 signaling은 plasma membrane에 의해 시작되기도 하고 방사선에 의해 손상된 DNA에 의해서도 이루어진다. 이 과정에서 ceramide는 second messenger로 작용하며 이 두 상반된 기전은 common pathway를 공유한다. 이러한 기전의 올바른 이해는 현재 radiotherapy에서 문제가 되고 있는 radioresistance나 정상세포의 방사선 피폭시 야기되는 여러 가지 손상을 극복하는 방법으로서의 이용 가능하게 될 것이다.

참 고 문 헌

- Dewy WC, Miller HH and Leeper DB, PNAS, 68: 667-671, 1971.
- Steel GG, McMillan TJ and Peacock HJ, Int J Radiat Biol, 56: 525-537, 1989.
- Fuks Z, Persaud A, Alfieri A, McLoughlin M, Schwartz JL, Seddon AC, Cordon-Cardo C, Haimovitz-Friedman, Cancer Res, 54: 2591-2597, 1994.
- Hallahan DR, Virudachalam S, Grdina D, Weichselnaum RR, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 24: 687-692, 1992.
- Uckun FM, Schieven GL, Tuel-Ahlgren LM, Dibirdik U, Myers DE, Ledbetter JA, PNAS, 90: 252-256, 1993.
- Martin SJ, Ruetelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader JA, Rob C, can Schie AA, LaFace DM, Green DR, J Exp Med, 182: 1545-1556, 1995.
- Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S, Nature, 380:723-726, 1996.
- Lin A, Minden A, Martinetto H, Claret FX, Lange-Carter C, Mercurio F, Johnson GL, Karin M, Science, 268: 286-290, 1995.
- Yan M, Dai T, Deak JC, Kyriakis M, Son LI, Woodgett JR, Templeton DJ, Nature, 272: 798-800, 1994.
- Hannun YA, Science, 274:1855-1859, 1996. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR, Nature, 369: 156-160, 1994.