

DNA-PK-null 세포주의 adriamycin 처리에 의한 G₂/M 세포주기 변화

김충희¹ · 김종수¹ · Dang Van Cuong · 김나리 · 김의용 · 한 진*

인제대학교 의과대학 생리학교실
¹경상대학교 수의과대학 (동물의학연구소)

Enhanced Sensitivity and Long-Term G₂/M Arrest in Adriamycin-treated DNA-PK-null Cells are Unrelated to DNA Repair Defects

Chung-Hui Kim¹, Jong-Shu Kim¹, Dang Van Cuong, Nari Kim, Euiyong Kim and Jin Han*

Department of Physiology & Biophysics, College of Medicine, Inje University, Kimhae 621-749, Korea
¹College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University (Institute of Animal Medicine), Jinju 660-701, Korea

Abstract

While the DNA-protein kinase (DNA-PK) complex, comprised of DNA-PKcs and Ku80, is primary involved in the repair of DNA double-strand breaks, it is also believed to participate in additional cellular processes. Here, treatment of embryo fibroblasts (MEFs) derived from either wild-type (Wt) or DNA-PKcs-null (DNA-PKcs^{-/-}) mice with various stress inducing agents revealed that adriamycin was markedly more cytotoxic for Ku80^{-/-}MEFs and led to their long-term accumulation in the G₂/M phase. This differential response was not due to differences in DNA repair, since adrimycin-triggered DNA damage was repaired with comparable efficiency in both Wt and Ku80^{-/-}MEFs, but was associated with differences in the expression of important cell cycle regulatory genes. Our results support the notion that Ku80-mediated cytoprotection and G₂/M-progression are not only dependent on the cell's DNA repair but also may reflect Ku80's influence on additional cellular processes such as gene expression.

Key words – DNA-protein kinase, Ku80, adriamycin, DNA repair

서 론

산화제, 유전자 독성물질, 대사 독성물질, 또는 높은 온도 등과 같은 스트레스 약제들에 포유동물 세포들이 노출되면 이에 대처하기 위한 반응이 시작되는데 이를 “cellular stress response”라고 한다. 이러한 반응에는 신호전달체계, 유전자 발현 그리고 세포 구성 인자들의 변화 등을 포함한

다. 이러한 반응의 결과로 세포는 사멸의 증가로부터 생존의 증가까지 증식, 분화 또는 성장정지 등 여러 형태의 반응이 나타난다[1].

Nucleic acid에 산화손상을 일으키는 cisplatin, 5-hydroxymethyluracil, thymine glycol 그리고 8-oxyguanine와 같은 물질들은 nucleic acid와 결합함으로써 adduct를 형성하여 single-strand breaks (SSB)를 유발한다.[15] 산화는 다른 형태의 DNA 손상 즉, double-strand breaks (DSB)를 유발하기도 한다[12]. Adriamycin에 의해 DSB가 유발되면 이를 회복하기 위해 절단된 DNA 부위에 DNA-depen-

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-51-890-6727, Fax : 82-51-894-4500
E-mail : phyhanj@ijnc.inje.ac.kr

dent protein kinase (DNA-PK) complex가 결합하여 회복 기전이 일어난다. DNA-PK complex는 465 kDa Serine/threonine Kinase catalytic subunit (DNA-PKcs)와 DNA End-Binding Ku70/Ku80 heterodimer의 복합체로 이루어져 있다. 이들 단백질은 포유동물의 DSB 손상으로부터 DNA를 회복하기 위해서 필수적인 요소들이다. DNA의 손상종류(예, base-excision repair, nucleotide excision repair, recombinational repair, direct restitution)에 따라 특정 효소들이 작용하여 회복기전을 나타내는 보고가 잘 알려져 있다[18]. 이 들 중에서 DSB 형태의 DNA 손상은 유전자 손상이 크며 대부분 세포를 사멸로 까지 이르게 한다[14, 18,20].

진핵세포들은 손상된 DNA들이 회복하는 기전들이 잘 발달되어 있으며, 그 결과로 DSB는 non-homologous-end joining (NHEJ)로 전환 된다[2]. NHEJ 체계의 주요 구성역시 DNA-PKcs와 Ku70/80 heterodimer로 구성된다[3, 21]. NHEJ는 Ku70/80 복합체가 DNA 말단에 결합하여 DNA-PKcs와 함께 DNA의 회복에 관여하는 다른 단백질들을 인산화 시킨다. 이들 3개의 유전자들은 V(D)J 유전자 분절의 특이적 위치 재조합에 관여한다. DNA-PK 복합유전자 각각은 아주 밀접한 상호관계를 가지고 있다. 하지만 DNA-PKcs knock-out 그리고 Ku knock-out 생쥐를 이용한 실험에서 NHEJ 과정에서의 이들의 기능은 다른 양상으로 관찰되었다[17]. Ku knockout 생쥐에서 체격이 작으며, 미성숙상태에서의 노화현상이 관찰되었다[6,17,19]. 이러한 이유로 Ku80는 포유동물 telomeric 구조에서 DNA-PKcs와 관련이 없음을 보여준다[13,16]. 그리고 포유동물의 Ku는 telomere 유지기능을 가지는 것으로 추측되었다.[8] 따라서 복제능력의 저하 그리고 미성숙 상태에서의 노화 표현형의 주제로 telomere 유지와 관련된 Ku의 기능에 대해 많은 연구가 필수적일 것이다. 하지만, DNA 회복기전과 세포주기 변화의 상호관계에 대해서는 아직 명확히 밝혀지지 않았으며, 회복과 관련된 효소들과 세포주기와의 관계에 대한 연구도 알려진 바가 거의 없다. 따라서 본 실험에서는 DNA 회복과 관련된 효소들의 기능을 알아보기 위해 DNA-PKcs-null mice 및 Ku80-null mice로부터 유래된 MEF (mouse embryo fibroblasts) 세포주를 이용하였으며, 각 세포주에 손상 유발 물질을 투여하여 대조군과 비교하는 형태로 실험하였다. 여러 가지 손상 유발 약제를 투여했

을 때 Ku80^{+/+} (Wt)MEFs 유래세포주에서 보다 Ku80^{-/-} 유래세포주가 더욱 세포독성효과를 보였으며 특히 adriamycin 처리시 현저한 차이를 보였다. Ku80^{-/-}MEFs 유래세포주에 adriamycin을 처리하면 DNA-PKcs^{-/-} 유래세포주보다 DSB 회복 기능이 현저히 감소되었다. 또한 adriamycin을 처리한 Ku80^{-/-}MEFs 세포주에서 G₂/M phase가 장시간 정체되었다. 이상의 결과로부터 Ku80은 G₂/M 시기를 조절함으로써 DSB 회복기전에 관여할 것으로 사료된다.

재료 및 방법

세포주 및 세포배양

본 실험에서는 mice 유래 Wt, DNA-PKcs-null (DNA-PKcs^{-/-})와 Ku80-null (Ku80^{-/-}) mice 유래 세포주를 Dr. Lee (Indiana university, USA)로부터 제공받아 사용하였다. 세포배양을 위해서 10% fetal bovine serum이 포함된 Dulbecco's modified essential medium (DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배양액과 5% CO₂를 공급하고 37°C로 유지하였다. 배양세포는 3일마다 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착한 세포를 떼어내고 분할한 다음 refeeding 하여 계대배양 하면서 실험에 사용하였다.

MTT assay를 사용한 adriamycin의 세포주 성장 억제 효과 실험

Wt, DNA-PKcs^{-/-} 그리고 Ku80^{-/-} mice 유래 세포주들에 대한 adriamycin, mitomycin 그리고 cisplatin의 세포독성을 측정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. MTT assay를 이용하여 세포의 효소활성을 측정하였다. 세포들은 96 well plate에 1×10⁴ cells/well 이 되게 200μl씩 분주하여 24시간 배양하였다. 각 well에 시약을 농도별로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ Incubator에서 72시간 배양하였다. Stock MTT 10μl (0.5 g/L)을 첨가하고 4시간 더 배양한다음 HCl 0.04 mol/L가 함유된 isopropanol 100μl을 첨가하여 O/N 하였다.

570nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였고, 성장억제효과(Growth inhibitory effect (%)) = [(대조군의 흡광도 - 시표처리구의 흡광도) / 대조구의 흡광도]×100)를 구하여 death ratio(%)로 나타내었다.

세포주기 분포측정

세포주기의 G₀/G₁, S 그리고 G₂/M phase 구성은 flow cytometric analysis로 측정하였다. 세포에 trypsin을 처리하여 96-well plate로부터 분리한 다음 PBS로 한번 세척하고 70% ethanol로 고정하였다. 여기에 RNase를 첨가하여 4°C에서 4시간 배양하였다. Propidium iodide (Boehringer Mannheim, Germany)으로 염색 한 후 FACScan flow cytometer을 이용하여 측정하였다.

결 과

Stress 약제에 의한 세포독성 효과

DNA-PKcs^{-/-}와 Ku80^{-/-}MEFs 유래세포주의 세포독성차이를 조사하기 위하여 stress 약제인 adriamycin, mitomycin-C 그리고 cisplatin을 투여하였다. Fig. 1.은 stress 약제들의 용량에 따른 독성효과를 보여주고 있다. 모든 실험은 96-well cluster plates를 이용하여 약제 투여 후 24시간 뒤, 살아 있는 세포를 crystal violet로 염색하여 hemacytometer로 측정하였다. 특히 adriamycin을 처리하였을 때 Wt에 비하여 Ku80^{-/-}MEFs 유래 세포주의 세포독성 효과가 현저하게 관찰되었다.

DNA-PKcs^{-/-}와 Ku80^{-/-}MEFs에 adriamycin 처리시 G₂/M arrest의 유지

DNA-PKcs^{-/-}MEFs 유래세포주에 adriamycin 처리하면 G₂/M phase의 분포는 Wt 세포주에 비해 전반적으로 10% 정도 높은 양상을 나타내었다. 특히, 18시간 경과하였을 때 36.5%로 가장 높았으며, 이후 감소하기 시작하여 30시간 경과 후 정상수준으로 회복하였다. 그러나 Ku80^{-/-} MEFs 유래세포주에서는 adriamycin을 처리한 후 G₂/M phase가 증가하기 시작하여 18시간 경과하였을 때 가장 높았으며 36시간 경과 후 까지 여전히 지속되었다(Fig. 2). 이러한 변화는 adriamycin 150 nM (Fig. 3A)과 300 nM (Fig. 3B)에서 모두 같은 양상을 보였다.

DNA-PKcs^{-/-}와 Ku80^{-/-}MEFs에 adriamycin 처리시 S-phase의 변화

Adriamycin을 150 nM 처리하였을 때 Wt 세포주의 S-phase는 6시간 경과 후 다소 증가하였으며, 12시간 경과한

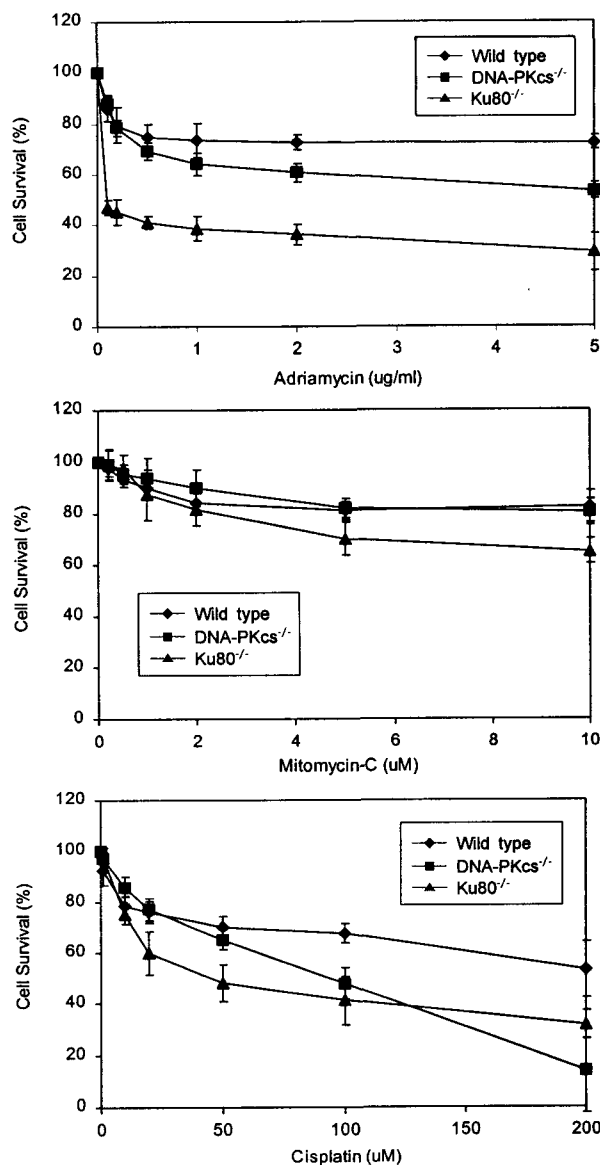


Fig. 1. Cytotoxic influence of various stresses on Wt, DNA-PKcs^{-/-} or Ku80^{-/-}MEFs. Cells were seeded in 96 well plates (for adriamycin, mitomycin, cisplatin) as described in the Materials and Methods section. Data represent the mean ± SEM of at least three independent experiments.

후 28%로 감소하였다. DNA-PKcs^{-/-}MEFs 유래세포주는 12시간 경과 후 38%로 가장 높았으며, 이후 감소하여 30시간 경과 후 정상수준으로 회복하였다(Fig. 4A). 그리고 adriamycin 300 nM 처리한 군도 위와 비슷한 결과를 나타내었다(Fig. 4B). S-phase의 경우 Ku80^{-/-}MEFs 유래세포주는 Wt 세포주와 별다른 양상을 보이지 않았다.

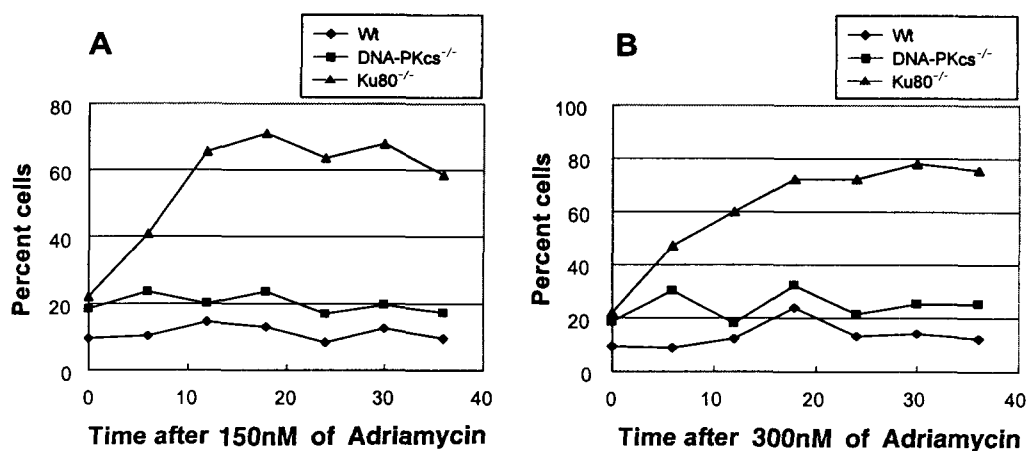


Fig. 2. Influence of MEFs on cell cycle distribution after exposure to adriamycin.

MEFs population that either expressed Wt, DNA-PKcs^{-/-} or Ku80^{-/-} MEFs were exposed to 150 nM (A) or 300 nM (B) of adriamycin. FACS analysis performed at the times indicated there after. The apoptotic population appearing after in Ku80^{-/-} MEFs following adriamycin is indicated in the 6 h time point.

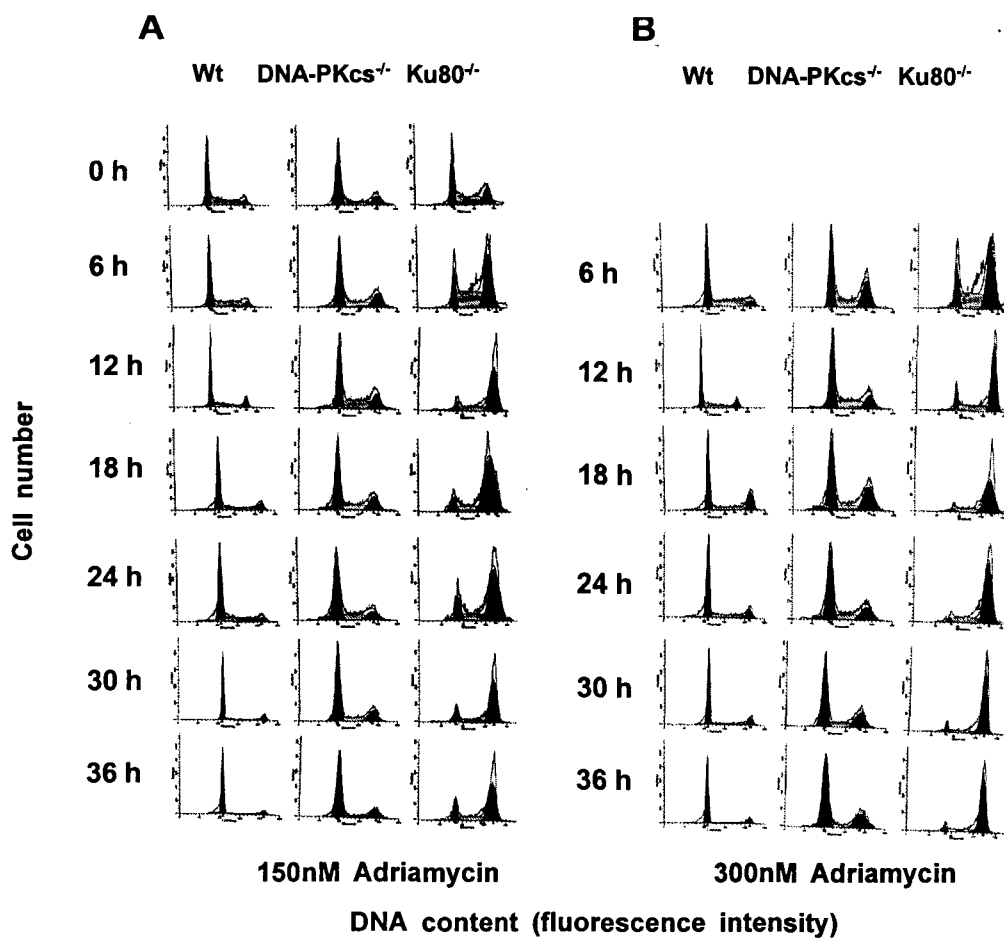


Fig. 3. S-phase analysis of Wt, DNA-PKcs^{-/-} or Ku80^{-/-} MEFs populations at various times of recovery following for 36 h incubation period with 150 nM (A) or 300 nM (B) of adriamycin.

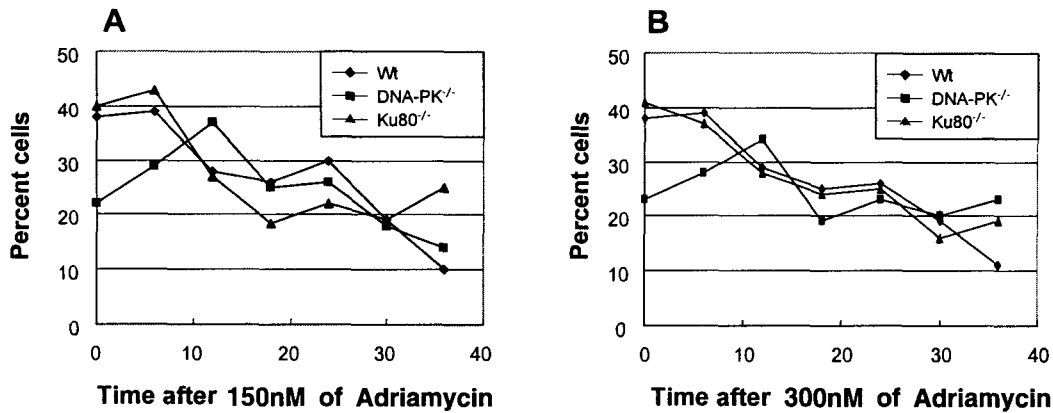


Fig. 4. G₂/M-phase analysis of Wt, DNA-PKcs^{-/-} or Ku80^{-/-} MEFs populations at various times of recovery following for 36 h incubation period with 150 nM (A) or 300 nM (B) of adriamycin.

고찰

본 연구에서는 대조군 (Wt), DNA-PKcs-null (DNA-PKcs^{-/-}) 또는 Ku80-null (Ku80^{-/-}) mice에서 유래된 embryo fibroblasts에 adriamycin을 처리하여 DNA-PKcs와 Ku80가 세포에 미치는 영향을 조사하였다.

Ku80는 heterodimeric Ku autoantigen의 subunit으로써 adriamycin을 Ku80^{-/-} MEFs에 처리하였을 때 대조군에 비하여 높은 세포독성효과를 나타내었으며, G₂/M arrest에서 다음 단계로의 전환능력이 소실되었다. 이상의 결과는 G₂/M 다음 단계로 넘어가기 위한 세포주기조절 유전자의 발현이 DNA-PKcs 보다 Ku80와 더욱 밀접한 관련이 있음을 보여준다. 이러한 세포주기조절 유전자 발현의 차이는 다른 세포주에서도 관찰되었으며, 세포 생존력도 유사한 양상을 나타내었다.[9] 반면에 adriamycin에 의한 DNA-PKcs^{-/-}와 Ku80^{-/-} mice의 S-phase는 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았다. S-phase는 손상된 DNA를 회복하기 위하여 DNA 복제가 정지되는 주기로써 이는 adriamycin 처리에 따른 세포의 감수성효과는 DSB 회복과 관련된 것이 아님을 보여준다[4]. Ku의 다른 기능들을 탐색하기 위해서 Ku의 helicase 활성[5]과 DNA-PKcs 사이의 상호연관성에 대한 연구는 필수적일 것으로 사료된다. 본 연구결과와 대조적으로, 이 등은 G₂/M의 전환을 위해서는 DNA-PK 활성이 요구된다고 주장하였다[12,13]. 최근의 보고에 의하면 topoisomerase II와 같은 adriamycin의 기능은 50-100 kb 정도의 고분자를 손상시킴으로써 사멸을 유도하는 것으로

알려졌다.[11,13] 고분자 DNA 절편에 의한 세포사멸의 유도와 관련된 Ku80의 역할은 앞으로 많은 연구가 필요한 상태이다.

Adriamycin에 의한 세포독성은 DNA supercoiling의 유지기능을 떨어뜨리고 DNA의 형태를 변화시키며, 또한 S phase로부터 G₂/M phase의 정상적 진행을 변화시켜 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다[22-24]. 만일 Ku80가 topoisomerase II와 기능적 상호관계를 갖는다면 Ku80^{-/-} cell에서 G₂/M arrest와 adriamycin에 의한 세포사멸의 관계를 다음과 같이 설명 할 수 있을 것이다. Adriamycin에 노출되어 topoisomerase II의 활성이 변화되면 정상적인 DNA supercoiling의 장애로 인해 세포독성이 증가되고 세포주기 조절의 장애가 나타날 것으로 예측된다. 또한 Ku80은 DNA-PK를 매개로한 transcription factor의 인산화를 통하여 직접적으로 세포주기조절 유전자의 변화에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

결론적으로 Ku80^{-/-} cell에 adriamycin을 투여하면, 세포주기 분포의 변화는 G₂/M phase에서 관찰되었다. Ku는 DNA 손상약제를 투여하거나 방사선을 조사할 때 세포보호기능을 나타내는데, Ku가 결핍된 세포주에서는 이러한 보호기능이 소실되어 투여한 DNA 손상약제에 높은 감수성을 나타내었다. 이러한 높은 감수성은 DNA 손상약제나 DNA 손상약제가 아닌 경우 모두에서 나타났다. 이러한 결과로 Ku80의 역할은 DNA 회복과 관련이 없고, G₂/M 다음 단계로 넘어가기 위한 세포주기조절 유전자의 발현과 밀접한 관련이 있음을 보여준다.

요 약

DNA 손상 유발을 위해 cisplatin, mitomycin 그리고 adriamycin을 농도별로 처리하여 세포독성 효과 및 세포주기 분포를 조사하였다. 이들 약제중 adriamycin의 감수성이 가장 높았으며 특히 Ku80^{-/-}MEFs가 현저한 세포독성 감수성 효과를 나타내었다. DNA 회복과 관련된 S phase의 분포도를 알아보기 위하여 adriamycin을 처리한 결과 DNA-PKcs^{-/-}MEFs와 Ku80^{-/-}MEFs 모두에서 S phase는 대조군과 비슷하게 나타났다. 그리고 DNA-PKcs^{-/-}MEFs에 adriamycin 처리시 6시간 경과 후 G₂/M phase가 증가되었으나 30시간 경과시 정상으로 회복되었다. 그러나 Ku80^{-/-}MEFs는 6시간 경과 이후 36시간 경과시 까지 G₂/M phase가 지속적으로 증가하다 결국 사멸되었다. 따라서 Ku80는 세포주기 조절 유전자의 발현을 위해 필수적인 단백질이며 Ku80의 결핍은 G₂M phase에서 다음 단계로의 세포주기 변화를 상실하여 사멸하게 된다. 그러므로 Ku80^{-/-}MEFs가 대조군과 다른 반응을 나타내는 것은 DNA 회복정도의 차이에서 오는 것이 아니라 세포주기 조절유전자 발현의 차이에서 오는 것으로 사료된다.

감사의 글

This work was supported by the Advanced Backbone Information Technology Development Project from the Korean Ministry of Information and Communication.

참 고 문 헌

1. Beckman, K. B. and B. N. Ames. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**, 547-581.
2. Boulton, S. J. and S. P. Jackson. 1998. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO. J.* **17**, 1819-1828.
3. Chu, G. 1997. Double strand break repair. *J. Biol. Chem.* **272**, 24097-24100.
4. Difilippantonio, M. J. and J. T. Zhu. 2000. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature.* **404**, 510-514.
5. Gravel, S., M. Larrivee and P. Labrecque. 1998. Yeast

- Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science.* **280**, 741-744.
6. Gu, Y., K. J. Seidl, G. A. Rathbun, C. Zhu and J. P. Manis. 1997. Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity.* **7**, 653-665.
7. Henle, E. S. and S. linn. 1997. Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **272**, 19095-19098.
8. Hsu, H. L., D. Gilley and E. H. Blackburn. 1999. Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12454-12458.
9. Kim, S. H., D. Kim, J. S. Han and C. S. Jeong. 1999. Ku autoantigen affects the susceptibility to anticancer drugs. *Cancer Res.* **59**, 4012-4017.
10. Kuhn, A., T. M. Gottlieb and S. P. Jackson. 1995. DNA-dependent protein kinase: a protein inhibitor of transcription by RNA polymerase I. *Genes Dev.* **9**, 193-203.
11. Larsen, A. K. and A. Skladanowski. 1996. The roles of DNA topoisomerase II during the cell cycle. *Prog. Cell Cycle Res.* **2**, 229- 239.
12. Lee, S. E., R. A. Mitchell, A. Cheng and E. A. Hendrickson. 1997. Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1425-1433.
13. Lee, S. E., J. K. Moore and A. Holmes. 1998. Saccharomyces Ku70, mre II/rad50 and RPA proteins regulate adaption to G₂/M arrest after DNA damage. *Cell.* **94**, 399-409.
14. Lu, R., H. M. Nash and G. L. Verdine. 1997. A mammalian DNA repair enzyme that excise oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. *Curr. Biol.* **7**, 397-407.
15. Mitra, S., T. Lzumi, I. Blodogh and C. V. Ramana. 1999. Repair of oxidative DNA damage and aging. *Advance in DNA damage and repair.* 295-311.
16. Munoz, P., M. Z. Zdzienicka, J. M. Blanchard and J. Piette. 1998. Hyper-sensitivity of Ku-deficient cells toward the DNA topoisomerase II inhibitor ICRF-193 suggests a novel role for Ku antigen during the G₂ and M phase of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5797-5808.
17. Nussenzweig, A., K. Sokol and P. Burgman. 1997, Hypersensitivity of Ku80-deficient cell lines and mice to DNA damage: the effects of ionizing radiation on

- growth, survival, and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13588-13593.
18. Rosequist, T. A., D. O. Zharkov and A. P. Grollman. 1997. Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7429-7434.
 19. Singh, N. P., M. T. McCoy and R. P. Tice. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* **175**, 184-191.
 20. Slupska, M. M., C. Baikalov, W. M. Luther, Y. F. Chiang and J. H. Miller. 1996. Cloning and sequencing of a human homolog (hMYH) of the *Escherichia coli* mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* **178**, 3885-3892.
 21. Smith, G. C. M. and S. P. Jackson. 1999. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* **13**, 916-934.
 22. Vaughan, A. T. M. and D. J. Gordon. 1992. Hydrogen peroxide lethality is associated with a decreased ability to maintain positive DNA supercoiling. *Exp. Cell. Res.* **202**, 376-380.
 23. Vogel, H., D. S. Lim, G. Karsenty and M. Finegold. 1999. Deletion of Ku86 causes early onset of senescence in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10770-10775.
 24. Wang, X. W., Q. Zhan, J. D. Couresn and M. A. Khan. 1999. GADD45 induction of a G₂/M cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3706-3711.

(Received January 8, 2003; Accepted May 13, 2003)