2006년8월 박사학위논문

유전자반응에 관여하는 센서에 대한 연구

조 선 대 학 교 대 학 원 의 학 과 김 장 만

유전자반응에 관여하는 센서에 대한 연구 Study of Sensors Related to DNA Response

2006년 8 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원 의 학 과 김 장 만

유전자반응에 관여하는 센서에 대한 연구

지 도 교 수 장 인 엽

이 논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함.

2006년 4 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원 의 학 과 김 장 만

김 장 만의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 부교수 유 호진 인 위원 조선대학교 부교수 임용 인 위원 조선대학교 부교수 전 제열 인 위원 조선대학교 부교수 전 영진 인 위원 조선대학교 부교수 장 인엽 인

2006년 6 월 일

조선대학교대학원

목 차

도 목 차 ————	2
영 문 초 록	-3
서 론	4
재료 및 방법	9
결 과	12
고 찰	16
결 론	26
참 고 문 헌	27
사진부도설명	36
사 지 부 도	

도 목 차

Fig. 1————————————————————————————————————	39
Fig. 2—	40
Fig. 3	41
Fig. 4	42
Fig. 5————————————————————————————————————	43
Fig. 6————————————————————————————————————	4 4

-Abstract-

Study of Sensors Related to DNA Response

Jang-Man Kim
Advisor: In-Youb Chang, MD. Ph.D.
Department of Medicine,
Graduate School of Chosun University

The sensors for the DNA response is divided into two main categories, DNA injury and DNA repair. This paper shows expressions γ -H2AX as the marker of DNA injury, and H-Ras dependant Ku80 expression for the DNA repair each. A role for γ -H2AX phosphrylation has been studied in DNA injury and repair, cell cycle checkpoints. In this paper, we examine the γ -H2AX and Ku80 expression on γ -ray or H2O2 treatment induced cytotoxicity using immunohistochemical and western blot methods. This paper shows that the expression of the Ras increased the Ku80 level, which is one of the key enzymes involved in repairing double-stranded DNA breaks(DSBs) at the sites of nucleus and cytoplasm. After exposing the cells to γ -irradiation or H2O2 treatment, γ -H2AX immnuoreactive nuclear granules were dramatically increased in the site of DSB in the parenchyme of nucleus. And it was also found that the expression of γ -H2AX was increased in after treating cytotoxic agent.

Activated H-Ras expression in human fibroblast cell lines increases the activity of Ku80 to bind injuried DNA, reduces γ -H2AX expression by UV irradiation, and increases the activity of DSB repair. These results suggest that the increased γ -H2AX expression and the Ku80 expression may play important role in recognizing and protecting cells against celluar DNA damage.

Key words: DNA repair, DNA damage, y-H2AX, Ku80, Ras

Ⅰ 서 론

여러 DNA손상을 초래하는 인자들에 의해 DNA손상이 세포에 가해지면, 경미한 DNA손상은 DNA 수복 관련인자들에 의해 정상적으로 복구되고, 심 각한 손상인 경우에는 세포자멸사로 유도되기도 한다. 그러나 DNA의 복구 가 정확하게 재구성되지 않으면 주요 유전자들을 불활성화 시키거나, 심각 한 염색체 변이를 초래하기도 한다(Rich 등, 2000; van Gent 등, 2001).

DNA 기본 구조가 핵산염기(nucleic acid base)의 반복적인 단위로 구성되듯이, chromatin의 기본적인 구조는 nucleosome이 형성한다. Nucleosome은 DNA 147개의 염기와 8개 histone 단백질 분자로 구성된중심부로 이루어져 있다. 이들 DNA 염기들이 중앙의 histone들을 1과 7/10 바퀴정도를 감고 있으며, 중앙 histone은 각각 2개의 H2A, H2B, H3, H4로 이루어진 100kDa인 단백복합체를 이루고 있다(Lugar 등, 1997).

각각의 histone은 histone-histone과 histone-DNA 결합에 작용하는 공모양영역(globular domain) 그리고 COOH와 NH2-말단의 꼬리부위(tail motif)로 구성되어 있다. 또 H1은 선모양 nucleosome 배열을 압박하여 30 mm chromatin fiber로 만들어 한층 치밀한 구조를 갖게 된다. 최근 몇 종류의 histone 이형들은 DNA를 nucleosome 안에 압축하여 저장하는 것 외에, 특별한 생물학적 기능을 수행하는 것으로 알려지고 있다. 특히 histone H2A와 H2AX는 세포대사와 유전체 안정성의 유지에 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀지고 있다.

West와 Bonner(1980)에 의해 사람에서 histone H2A가 8개의 유사 단백질로 이루어진 것이 밝혀진 이래, 사람 H2AX는 독특한 짧은 C-말단(short

carboxy-terminal)을 갖고 있음이 알려졌다(Mannironi 등, 1989). 이런 짧은 C-말단은 다른 포유동물에서는 존재치 않고 하등 진핵생물에서만 존재한다. H2AX는 H2A의 주요 구성성분으로 포유동물에서 세포주, 조직의 종류에 따라 2-25/。를 차지한다(Zweidler, 1976; Rogakou 등, 1998; Dobner 등, 1991). histone의 H2AX는 다른 histone과 마찬가지로 여러 변형된 형태를 갖게 되는데, 대표적으로 세린(Ser 1)의 인산화, 리신(Lys 5)의 아세틸화 등이 여기에 해당된다(Wu 등, 1986).세포가 DNA손상을 받게되면, 급격히 H2AX의 꼬리에 위치한 세린에 인산화가 발생하게 되어 χ -H2AX를 생성하게 된다 (Rogakou 등, 1998).

이중나선구조 손상(Double-strand break: DSB)는 가장 심각한 문제를 초 래하는 DNA손상 형태 중 하나이다. 단순한 DSB는 세포자멸사로 유도되 거나(Rich 등, 2000), 직접 주요 유전자를 불활성화 시킬 수 있고, 심각한 염색체 변이를 초래하기도 한다(van Gent 등, 2001). 포유동물세포의 파손 된 DNA 이중가닥 복구(double strands break repair :DSBR)의 방식은 상동 성재조합(homologous recombination: HR)과 비상동성 말단결합 (non-homologous end joining: NHEJ)의 2가지 주 경로를 가지고 있다. NHEJ는 염기배열(sequence)에 관계없이 끊어진 말단을 재결합시키는 상동 형-비의존성 기작(homology-independent mechanism)인 반면. HR은 손상 되지 않은 동종의 DNA모형으로 부터 완전한 정보를 복사하여 정확한 DNA 수 복(DSBR)을 수행한다(Khanna 와 Jackson SP. 2001; van Gent 등. 2001) 이런 고도의 조직적 복구가 이루어지려면, 제멋대로 끊어진 DNA 말단들이 센 서들에 의해 감지되어 일련의 과정이 수행되어야 만 한다(D'Amours 와 Jackson, 2002). 최근 MRE11/RAD50/NBS1복합체(MRN complex)는 DSB 초기 과정에 작동하는 센서로 작동할 뿐만 아니라, 다음에 발생하는 DNA 손상반응을 활성화시키는 작용을 하는 것으로 추측된다(Petrini 와 Stracker, 2003; Van Den Bosch 등, 2003; Uziel 등, 2003). 또 DSB에 의해 맨 처음 반응하는 과정 중의 하나가 H2AX의 꼬리에 일어나는 다량의 인산화인데, 인산화된 H2AX에 의해 형성되는 초점들(foci)이 DSB장소에서 재빠르게 나타나는 데, 이는 DNA손상반응에 관여하는 단백질들의 보충에 밀접한 관련이 있는 것으로 추측되고 있다.

발생되면, 급속하게 kinase에 바탕을 둔 신호전달경로 DSBsフト (kinase-based signaling pathway)가 활성화되어 DNA복구와 세포주기검 사점(cell-cycle checkpoint) 사이의 조화가 이루어지게 한다(Rouse와 2000). Zhou와 Elledge. 주요 경로는 Jackson. 2002; phosphatidylinositol-3 kinase-like family of kinase (PIKK)인데, 최소한 4 개의 PIKK family 요인들이 손상된 DNA에서 기원한 신호전달에 관여한다. 인산화는 ataxia telangiectasia (ATM). H2AX mutated ataxia telangiectasia related(Rad 3; ATR), ATM related kinase(ATX), DNA dependant protein kinase (DNA-PK) 등의 ATM단백질에 의존적으로 발생 한다(Hammond 등, 2003; Huang 등, 2003; Foray 등, 2003). 특히 ATM 이 결핍되면 유전자불안전증후군(genomic instability syndrome)의 일종인 ataxia-telangiectasia가 발병하게 되어, 신경변성, 면역결핍, 방사선 과민 감성, 암전단계 등의 증상을 나타내게 된다(Shiloh, 2003).

Ku는 Ku70과 Ku80(또는 Ku86)으로 알려진 70과 80kDa의 두 개의 단백 질요소로 구성된 이형이량체로 DNA에 결합하는 복합체(heterodimeric DNA binding complex)로 존재한다(Jin과 Weaver,1997). 이 복합체는 원래 일본

의 경피증-다발성근염 중복증후군(scleroderma polymyositis overlap syndrome) 환자들의 자가항체의 타겟으로 20년 전에 알려졌었다. Ku에 대 한 자가항체들은 전신성홍반성낭창과 경피증을 포함한 여러 자가면역질환을 앓고 있는 환자들에게서 발견되고 있다(Mimori 등. 1981). Ku70/Ku80 이형 이량체는 유사분열 도중 세포질에 존재하다가 세포분열주기 G1 단계에 이르 면 다시 핵으로 들어간다고 밝혀졌다(Bakalkim 등, 1998; Koike 등, 1999a). 하지만 이러한 세포내의 이동은 모든 동물에서 이루어지는 것이 아니라. 지 금까지 밝혀진 바로는 사람과 원숭이에서만 보고되었다(Koike 등, 1999b). Ku는 손상된 DNA 복구에 있어서 결정적인 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있 다. 세포의 DNA 복구의 실패는 면역결핍과 종양감수성 뿐만 아니라 DNA손 상 과민성과 유전자 불안정성을 초래한다: 즉 세포내에 정상적인 기능을 수 행하는 Ku 단백질들의 존재는 유전자 안정성을 유지시키고. 더 나아가 세포 와 장기의 생체활성의 유지에 결정적으로 필요한 요소라고 추측되고 있다. DNA복구에서 중대한 역할 이외에도, 세포분열 M과 G2 phase의 조절 뿐만 아니라 특이유전자의 전사와 세포자멸사(apoptosis)의 조절. 열성 쇽-유도 반응들을 조절. 유전자말단길이(telomere) 유지. 항원수용체 유전자 배열 (e.g., Variable (Diversity) Joining {V(D)J}recombination) 등을 포함한 다 른 여러 세포과정에도 Ku가 관련되어 있다는 여러 보고가 있다(; Li 등, 1998; Tuteja 와 Tuteja, 2000; Lim 등, 2001; Lim 등, 2002; Sawadw 등, 2003). 이런 과정들에서의 Ku의 정확한 기능은 아직 명확하지 않지만, 세포 와 장기에서 기초 세포대사에 관여하는 중요한 단백질이라고 여겨지고 있 다.

여러 형태의 악성종양들에서 H-Ras 유전자에 돌연변이 증가가 방사선 조사 후 세포생존율의 상승과 관련이 있는 것으로 알려지고 있는데, H-Ras 유전자가 활성화됨에 따라 NIH3T3세포주의 방사선저항성이 증가한다는 사실이 처음 밝혀진 이후(Sklar, 1988), 설치류 REF 섬유아세포와 횡문근육종양세포(Ling과 Endlich, 1989; Mckenna 등, 1990; Hermens 와 Bentvelzen, 1992; Pirollo 등, 1993), 사람의 Ras-형질전환 방광암세포, DLD-1 큰창자종양세포, HT1080섬유육종세포 등(Miller 등, 1993; Bernhard 등, 2000)에서 재차 확인되었다. Ras의 활성화를 통한 방사선저항성에 반하여, Ras활성성도를 억제함으로써 방사선민감도를 높일 수있다. 예를 들어 Ras에 대한 antisense vector 또는 Ras에 대한 항체를형질도입시켜, Ras 활성도를 억제시킴으로써 방사선민감도를 높일 수있다고 보고 되었다(Russell 등, 1999; Rait 등, 2000). 이와 유사하게 Ras 활성을 저하시키면 방사선민감도를 증가시킬 수 있다고 알려지고 있다(Bernhard 등, 1996; Bernhard 등, 1998). 따라서 Ras 단백질과 방사선저항성 사이에 밀접한 관련이 있음을 추측할 수 있으나, 이러한 효과를 뒷받침할 수 있는 분자생물학적 기작은 아직 잘 알려져 있지 않은 실정이다.

본 실험에서는 이러한 DNA 손상반응 및 수복에 관여하는 물질들 중 인산화된 H2AX(y-H2AX)와 Ku80을 대상으로 노화 및 여러 유해물질의 투여에 따른 변화를 알아보고, H-Ras의 활성화에 따른 하류표적유전자들 (downstream target genes) 중 Ku80의 발현과 y-H2AX의 변화를 조사하였다.

Ⅱ.실험재료 및 방법

배양세포와 동물조직

본 실험에 이용된 배양세포는 NIH3T3세포,Ras를 transfection(형질변환) 시켜 주입시킨 NIH3T3-clone 7세포, WI-38세포, Mo59J세포, Mo59K세포, IMR90세포 등, 동물조직은 수술적으로 유도된 정류고환, Olett rat의 창자조직, 8주와 54주 흰쥐 고환조직 등을 각각 사용하였다.

세포배양과 DNA 형질변환

세포배양 방법 및 DNA 처리과정에 대해서 간략히 서술하면 다음과 같다. ((American Type Culture Collection) 은 10% fetal bovine serum (FBS). 100 units of penicillin/ml 와 100 µg of streptomycin/ml 로 upplemen한 EMEM(Earle's minimum essential medium)에 보존유지시켰다. 가습 배양기 조건은 온도는 37도 온도, 5%이산화 탄소/95%산소를 유지했 다. dominant positive V12-H-Ras의 구조는 별도로 기술한다(22). 생쥐 Ku80 cDNA는 Ku80 oligo primer를 이용 RT-PCR에 의해 증식시겼다. (5 \ - ATGGCGTGGTCGGTAAATAAGGC-3 \), 5`-CTATATCATGTCCAGTAAATCA-3`). PIND는 Invitrogen으로 보충했다 (Carlsbad, CA).미세배열 분석리보핵산은 TriReagent (Sigma)으로 분리해서 manufacturer's instructions에 따라 RNAEasy (Qiagen)방법으로 정제했다. Hybridization은 Cy5을 표지한 oncogenic H-Ras expressing cells와 Cy3로 표지한 control transfected samples의 oncogenic H-Ras expressing cells 을 사용하였다. Scanning은 GenePix 4000A scanner (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA)를 이용하고, Axon GenePix image software과 PathwayAssist (Ariadne Genomics, Rockville, MD). 을 이용해 영상을 얻었

다. 이러한 실험결과들은 모두 조선대학교 유전자 복구실험실의 도움을 받아 실시하였다.

흰쥐 수술적 정류고환의 유발

출생후 12주 Sprague-Dawley 흰쥐를 pentobarbital (3mg/100g)으로 복강마취 후 배앞벽 정중절개를 통하여 왼쪽콩팥으로 접근한 후 대정맥과 연접한 왼콩팥정맥을 노출시켰다. 왼콩팥정맥과 평행하게 직경 0.8mm 탐식자 (probe)를 정맥과 함께 3.0 silk을 이용하여 묶은 후, 탐식자를 제거하여 콩팥정맥의 직경을 50%정도로 감소시켰다(수술군). 또 배앞벽정중절개를 통하여 왼콩팥정맥을 만진 다음 다시 봉합한 흰쥐(sham-operated)를 대조군으로 이용하였다.

면역조직화학염색

(1) 동물조직의 냉동절편제작 및 염색

paraformaldehyde으로 4℃에서 24시간 고정한 조직을 30% sucrose가 함 유된 phosphate buffered saline(PBS)에서 탈수시켜 냉동에 따른 조직손상 을 최소화하여 10-15 ሥ 두께로 잘라 슬라이드에 부착시켰다. PBS로 수 차 례 세척하여 고정액을 제거하고. 0.3% Triton X-100이 함유된 PBS를 실온 에서 1시간. 1% bovine serum albumin(BSA)가 함유된 PBS를 실온에서 1 시간 각각 반응시켜 비특이적 반응을 억제하였다. 제 1항체는 anti-Ku80(1:100 in PBS, Santa Cruz Biotechnology, USA)와 anti-y -H2AX(Upstate, 1:100 in PBS, Lake Placid, NY, USA)를 4℃에서 24시간 반응시켰다. PBS로 수차례 세척한 후 2차 항체인 Alexa Fluor 488 또는 568(Molecular Probe. USA)을 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반 응시켰다. 이중염색은 두 종류의 1차 항체를 섞어서 상기 방법과 동일하게 처리하고. 또 두 종류의 2차 항체를 반응시켜 관찰하였다. 대조군으로는 제

1항체들을 생략하고 2차 항체만 반응시킨 조직을 사용하였다.

(2)배양세포의 고정 및 처리

세포를 cover slip위에서 배양시킨 다음, methanol로 10분 동안 고정한 다음 PBS로 수차례 세척하여 잔여 고정액을 제거시킨 후 조직의 염색 방법과동일하게 실시하였다. 염색반응이 끝난 cover slip을 유리 슬라이드에 얹어서습윤 봉입제로 마무리하였다.

공초점 주사현미경

모든 면역형광염색된 세포 및 조직표본을 공초점주사현미경(FV300 & FV1000. Olympus, Japan)를 사용하여 관찰하였다. 레이저 광선의 흥분파장으로는 488 nm 파장과, 568nm 파장을 각각 사용하였다. Flow View Softwave program (olympis, Japan)을 사용하여 최종 3차원적 영상으로 재조립한 후 컴퓨터에 저장하고 인쇄하였다.

Western blotting

세포들을 PBS로 수세한 후 완충액(20 mM Hepes, PH 7.4, 2 mM EGTA, 50 mM-glycerol phosphate, 1% triton X-100, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 mg/ml leupeptin, 10 μg/ml aprotinin, 1 mM Na3VO4, 5 mM NaF)내에서 30분간 썹씨 0도에서 용해시켰다. 단백질 농도는 Bio-Rad dye-binding microassay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정했다. 10% SDS polyacrylamide gels상에서 각 lane당 20μg의 단백질이 전기영동됐다. 단백질은 Hybon ECL membranes에 blotting한 후 anti-Ku80, anti-y-H2AX α-tubulin(Santa Cruz Biotech, CA, USA), H-Ras antibodies(BD Biosciences, San Diego, CA)를 이용해 blotting 했다. enhanced chemiluminescence detect system(iNtRON, Biotech., Seoul, Korea)을 이용하여 blotted proteins을 찾아냈다.

Ⅲ. 결 과

본 실험에서 DNA 손상반응 및 수복에 관여하는 물질인 인산화된 H2AX(y -H2AX)와 Ku80이 노화세포 및 조직, 여러 유전자 손상을 유발하는 물질들의 투여에 따른 세포내 변화를 관찰하였다. DNA 이중나선구조의 손상 부위에 y-H2AX과 Ku80의 발현이 증가하였으며, H-Ras로 형질변환시킨 세포들에서 Ku80활성이 증가되어 DNA손상 수복이 활성화됨을 알 수 있었다.

1. 배양세포 및 조직에서 Ku80 발현의 변화

A. 배양세포

세포는 DNA 손상(이중나선구조의 파괴)을 받으면, 일단 이를 복구하려는 시도를 하나, 만약 손상이 심하면 세포자멸사 등을 통해 죽음에 이르게 한다. 본 실험에서 NIH3T3 cells에 ɣ-선을 조사시켜 DNA 손상(이중나선구조 손상)을 유도함에 따라, 핵에서 발현 과립들(화살표)이 방사선 조사에 따라 증가하였다(Fig. 1A). 이러한 Ku80발현의 증가를 통하여 완전 복구, 일부 복구, 또는 DNA 염기쌍이 잘못 짝지어진 경우(mismatch repair)에는 돌연변이가 발생할 수 있다. 이러한 Ku80의 반응은 유전자 복구 뿐 만 아니라 손상반응의 중요한 센서로 작용하리라 사료된다. 또 다른 실험으로 지속적인 계대배양으로 노화 WI-38 세포 (24p)와 젊은 WI-38세포(6p)에서 Ku80 발현의 차이를 관찰한 결과, 면역형광염색 및 western blot 방법 모두 노화세포에서 젊은 세포에 비해 유전자 손상복구물질인 Ku80 발현이 감소하였다(Fig. 1B-C).

B.조직

이러한 배양세포의 결과를 바탕으로 수술적으로 유도한 흰쥐 정류고환 정세관의 정자형성세포들에서 Ku80발현을 조사한 결과, 대조군으로 사용된 거짓수술군(sham operation)에서 나타난 Ku80발현은 정세관의 가장자리에 적는 수로

관찰되었으며, 수술적으로 정류고환을 유도한 실험군의 정세관 바깥쪽 대부분 세포에서 발현이 증가 되었다(Fig. 2A). 새로 발현된 세포들은 형태 및 위치로 보아 정모세포(spermatocyte)와 정자세포(spermatid)들로 여겨진다. 면역형광 염색소견에서 나타난 Ku80 발현의 차이는 western blot 방법에서도 비슷한 발현양상을 나타내었다(Fig. 2B). 그러나 Ku80의 발현변화에 비해 Ku70은 변화가 없었다.

2. 배양세포 및 조직에서 V-H2AX발현의 변화

A. 배양세포

사람 교아세포종(glioblastoma)에서 뽑아낸 DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) 활성 결함을 보이는 Mo59J세포와 정상적인 DNA-PK활성Mo59K세포에 각각 bleomycin과 H2O2을 처리하고 면역형광염색 및 단백질 정량을 실시하였다. Y-H2AX 발현을 보면 3-12시간 사이 Y-H2AX 발현 과립들이 시간에 따라 증가하였고, 24시간 에서는 감소하는 양상이었다(Fig. 3A,C). 산화성 손상을 통해 DNA 파괴를 유발하는 H2O2를 Mo59K세포처리하면 Y-H2AX발현이 3-12시간에서 Y-H2AX 발현 과립들이 증가하였고, 24시간 이후에는 감소하기 시작하여 24시간에는 정상 수준으로 복귀하는 것으로 관찰되었다(Fig. 3B,C). Mo59J세포에 처리한 결과와 비교하여 볼 때 Mo59K세포에서 매우 낮은 발현율을 보였다. 또 섬유아세포의 일종인 IMR90세포에 Bleomycin을 처리하여 Y-H2AX 발현을 면역조직화학 방법과 단백질 정량방법으로 조사한 결과 12시간 -24시간 사이에서 Y-H2AX 발현 과립들이 증가하였고, 48시간에는 정상 수준으로 복귀하는 것으로 관찰되었다(Fig. 4A,B). 이러한 형광염색 결과들을 좀 더정확히 산출하기위해 공초점주사현미경 응용프로그램을 이용하여 재구성하면 과립의 크기 및 염색정도 등을 비교 할 수 있다(Fig. 4C).

B.조직

노화에 따라 점차 당뇨를 유발하는 흰쥐(Olett rat)의 큰창자에서 ɣ-H2AX발현은 114주 쥐에서 54주 보다 증가하였다(Fig. 5A). 또 노화 흰쥐(Sprague-Dawley)에서도 정자형성세포들의 ɣ-H2AX 발현이 젊은 쥐에 비해 증가하였다(Fig. 5B,C). 노화 쥐에서 ɣ-H2AX 발현이 증가하는 것을 통해 노화세포의 돌연변이증가 및 발암여부를 추정할 수 있다. 이는 노화에 따라 유전자 불안정성이 증가함에 따라 특정 암의 발병이 증가한다는 주장들과 관련된 결과로 여겨진다. 수술적으로 유발시킨 정류고환에서 정자형성세포들의 ɣ-H2AX 발현이 증가하였다(Fig. 5D). 아직 잘 밝혀지지 않은 정류고환의 병인에 DNA 이중나선구조의 손상이 관련된 것으로 사료된다. 따라서 배양세포 뿐 만 아니라 동물실험조직에서도 ɣ-H2AX 발현은 세포손상의 표지자로 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

3. Ras 형질변환 배양세포에서의 x-H2AX과 Ku80발현 변화

발암성 신호전달인자인 Ras에 의한 Ku80의 활성화 및 Y-H2AX 발현을 알아보기 위하여 Ras를 형질변환 시켜 주입시킨 NIH3T3-clone 7세포를 만들었다. Ras를 발현하는 유전자운반체(vector)에 있는 프로모터(promotor)를 활성물질인 Ponasterone A로 활성화시킨 후 Ras 및 Ku80의 발현을 실험하였다. Ponasterone A의 작용으로 프로모터 가 활성화되고, Ras 형질전환이 된 NIH3T3 clone-7세포의 활성화에 대한 검증으로 Northern Blots 방법을 통하여 Ku80 RNA 발현을 검증하였다(data not shown). 또 western blots방법으로 Ponasterone A 투여량에 따라 정량적으로 NIH3T3 clone-7세포의 Ku80단백질과 Ras발현이 증가됨을 확인 하였다(Fig.6A).

이러한 생화학적 결과를 면역형광염색으로 재차 검증한 결과, Ras를 형질변환

시켜 주입시킨 NIH3T3-clone 7세포에서 유전자 손상복구, 특히 이중나선구조의 손상을 복구하는 Ku80 발현이 증가되었다(Fig.6B).

여러 자극에 의한 y-H2AX의 발현 양상을 알아보기 위하여 웨스턴 블롯을 실시한 결과 H2O2, UV 등을 가하면 y-H2AX의 발현이 증가하는 것을 알 수 있었다 또 발암성 신호전달인자 Ras를 주입시킨 세포에 UV를 조사하였더니,

NIH3T3-clone 7 세포에서 y-H2AX 발현이 억제 됨을 알 수 있었다. 이런 결과는 Ras 에 의해 Ku80가 활성화 된다는 본 실험 결과와 조합하여 고려할 때 다음과 같은 추정이 가능하다 Ras를 형질변환시킨 세포들은 Ku80 단백질의 활성화를 유도하고, 이러한 Ku80의 상승은 DNA damage의 손상을 억제 하는 것으로 사료된다.

Ⅳ 고 안

1. y-H2AX의 DNA 이중가닥절단(double strand breaks)에 대한 반응

DNA 이중가닥절단(double strand breaks DSBs)에 대한 복구 과정은 보통 두 가지 경로를 통하는데 하나는 비상동말단결합(non-homologous end joining: NHEJ)과 다른 하나는 상동재결합(homologous recombination: HR)이다 (Khanna와 Jackson, 2001).

DNA손상 반응에 대한 H2AX의 역할은 two-dimentional gel analysis 방법 을 이용한 실험을 통해 방사선에 노출된 세포에서 급속히 H2AX의 인산화 가 발생함을 발견함으로써 알려지기 시작하였는데. DSBs 주위에 x-인산화 된 H2AX가 나타남을 보고하였다(Rogakou 등, 1998). 또 x-H2AX에 대한 항체를 이용한 면역조직화학염색을 실시한 결과. DSBs를 chromatin에서 H2AX가 대량으로 인산화 됨을 밝혀내었는데(Rogakou 등, 1999). 이를 핵초점들(nuclear foci)이라고 불려지게 되었다. H2AX 인산화 의 급격한 생성과 증폭으로 인해 γ-H2AX 초점들과 DSBs는 거의 1:1로 상응하게 되어(Sedelnikova 등, 2002), y-H2AX를 염색하는 것은 DSBs를 검출하는 가장 유용한 방법으로 사료되고 있다. 본 실험에서도 여러 유해 자극들에 의한 DNA 손상을 유도하여 DSBs 발생 유무를 검증해 본 결과, 시간경과에 따른 변화, 자극 종류에 따른 변화, 특정 유전자 복구단백질에 대한 siRNA 처리에 따른 변화 등을 관찰할 수 있었다. 통상 y-H2AX 초점 들은 자극을 준 후 3-12시간 전후에 가장 강한 반응 및 양성 숫자를 보였 다. 이후에 x-H2AX 초점들이 감소되는데 이 현상은 유전자 복구 단백질들 에 의해 복구됨에 따른 감소로 사료된다. 특정 유전자 복구단백질에 대한

siRNA를 처리한 세포들에서는 24-48시간 까지 ɣ-H2AX 초점들이 지속되고, 반응양상도 강하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 ɣ-H2AX 발현의 특성을 고려하여 볼 때, 유전자 손상 및 복구 반응에서 ɣ-H2AX의 세포내 변화를 관찰하는 것은 매우 중요한 유전자 반응의 표지자라고 사료된다.

2.y-H2AX 초점과 손상복구단백질/신호전달단백질의 보충

DSBs에 반응하여 나타나는 H2AX의 인산화는 외부자극에 의하 DSBs(Rogakou 등, 1998; 1999; Paull 등, 2000), DNA 복제(Ward와 Chen ; 2001; Furuta 등. 2003). 세포사멸의 초기단계(Rogakou 등. 2000). 비정상 적으로 기능을 수행하는 염색체말단(telomere: Fagagna 등, 2003; Takai 등. 2003) 에서 관찰할 수 있다. 형광면역염색을 바탕으로 한 연구들이 v -H2AX 초점(foci)의 반응정도를 이용하여 DSBs의 역할, 시간, 분포 등에 대 한 의문점들을 해결하고자 하였다. 예를 들면. v-H2AX 초점의 정량화를 통 해 NHEJ가 모든 세포주기 단계마다 매우 중요한 요소라는 것을 증명하였고. HR은 S/G2M의 세포주기에서 집중적으로 발생함을 알 수 있었다 (Rothkamm 등, 2003). 생쥐 생식세포들에서 나타나는 x-H2AX 염색(DSBs 형성)은 감수분열재결합(meiotic recombination)과정에서 DSBs가 발생한다 는 것을 의미한다(Mahadevaiah 등, 2001 ; Forand 등, 2004). 또 임파구에 서 면역글로빈의 재결합의 일종인 V(D)J 재결합과 class-switch 재결합도 DSBs에 따른 NHEJ로 재결합된다고 알려지고 있으며, 그 외 DSBs에 따른 x -H2AX가 형성되는 과정은 노화. 면역결핍증 등의 병소에서 활발하게 발생 한다고 알려지고 있다(Chen 등, 2000; Petersen 등, 2001; Fagagna 등, 2003).

3.x-H2AX과 손상복구단백질/신호전달단백질의 보충

DNA 손상은 DNA 손상신호 전달단백질과 DNA 복구단백질들을 유전자 손상장소에 보충되는 것을 촉진시킨다. DNA손상반응에 관여하는 요소들인 ATM, BRCA1, 53BP1, MDC1, RAD51, MRE11/RAD50/NBS1(MRN)복합체 등은 방사선에 의해 유발된 손상초점(ionizing radiation induced foci ; IRIF) 를 형성하여 y-H2AX초점과 공존(co-localize)하게 된다(Paull 등, 2000; Schultz 등, 2000; Goldberg 등, 2003; Lou 등, 2003; Stewart 등. 2003). 이 핵내영역(IRIF)들은 DSB 주변에 수백 내지 수천 개의 물질들이 모여 있는 것으로 추측되고 있다. 이러한 x-H2AX가 DNA 손상에 대한 손상복구단백 질/신호전달단백질의 보충에 필수적이라는 추측의 근거는 다음과 같다 : 첫 째. x-H2AX IRIF 형성은 DNA 복구단백질이 IRIF에 결합하는 것보다 먼저 역동적으로 나타난다(Rogakou 등, 1998; Paull 등, 2000) ; 둘째, x-H2AX 는 53BP1, NBS1, BRCA1, MDC1 등 많은 인자들이 초점을 형성하는데 필 요하다(Paull 등, 2000; Bassing 등, 2002; Celeste 등, 2002; Stewart 등, 2003). 셋째, x-H2AX는 NBS1, 53BP1, MDC1등과 상호작용을 일으킨다(Kobayachi 등, 2002; Stewart 등, 2003; Ward 등, 2003 ; Xu 와 Stern, 2003). 그러나 H2AX 결핍세포(H2AX^{-/-})에서 여러 인자들이 초점을 만들지 못하지만. IR에 노출되면 H2AX없이도 광범위하게 인산화가 발생하고. 방사 선과 레이저 조사에 의해 유도된 DSBs 실험에서 H2AX와 무관하게 복구/신 호전달 요소들이 보충된다는 사실(Celeste 등, 2003)들로 미루어 x-H2AX 매개에 의한 초점형성이 세포전달요소나 DNA 복구단백들의 보충과 완전히 일치하지 않는다는 추측도 대두되고 있다. 본 실험 결과 노화에 따라 흰쥐의 큰창자 및 고환의 x-H2AX발현이 늙은 쥐에서 젊은 쥐에 비해 상대적으로 증가 하였는데, 이는 노화에 따라 여러 유전자손상 복구시스템의 작동이 원활하게 수행되지 못하면, 유전자 불안정성이 증가하여 큰 창자, 고환 등의 암 발병이 증가할 수 있다고 추측된다. 따라서 연령과 암발병 사이에 형성되는 관련성에 유전자 손상과 복구 능력이 관여하는 것으로 추측된다.

초점을 형성하는 DNA복구/신호전달 인자들의 초기 보충과 그 후 계속되는 인자들의 축적 사이에는 어떤 영향이 있는지? 이러한 흥미로운 현상을 Fernandez-Capetillo 등(2004)은 모델을 통해서 y-H2AX가 복구/신호전달 단백질을 DSB발생 Chromatin 부위에 모이도록 조절하는 역할을 하는지를 알아보았다. 복구/신호전달 인자들이 국소적으로 저류되고, 이에 따라 농도 가 증가되는 이유는 H2AX 꼬리에 있는 SQ motif(인산화에 의해 변형되는 수 천개 정도)와 복구/신호전달 단백질 특정영역 사이의 약한 상호작용 때문 으로 추측하였다. 이 모델에 대한 정확성에 대한 검증은 DNA손상이 발생된 살아있는 세포에서 GFP-표지 단백질(GFP-tagged protein)의 분석을 통하 여 확실한 결론을 내릴 수 있으리라 사료된다(Fernandez-Capetillo 등. 2003a; 2004; Reina-San-Martin 등, 2003). 따라서 IRIF형성은 손상부위에 서 단백질-단백질 사이의 직접적인 상호작용보다는 H2AX의존성 chromatin 농축에 의해 발생될 가능성이 높다(Fernandez-Capetillo 등, 2003b). 본 실 험 면역형광염색 소견에서 세포내 v-H2AX발현 양상이 유해자극 처리 후 3-12시간 단계에서 대체로 많은 수의 작은 과립 형태로 나타나고. 시간 경 과에 따라 과립이 크지만 숫자적으로 감소되는 양상을 보이는 것은 chromatin 농축에 따른 y-H2AX의 변화일 가능성이 높다. 또한 세포에 따 라서는 x-H2AX의 반응이 균일하게 핵에서 증가하는 경우도 관찰할 수 있었 다.

Ku80의 DNA손상반응에 대한 작용

비상동성 말단결합(NHEJ)에 있어서의 Ku의 중요한 역할들이 밝혀져 왔다. 생화학적 및 구조적 연구들을 통하여 DNA DSBs수복의 인지, 안정화, 촉진 등에 관여하는 Ku의 DNA수복에 대한 기능이 증명되었다. 유전체 안정화 유지를 위한 기능적&필수적 역할 이외에 Ku는 염색체 말단 유지, 항원-수용체-유전자 배열(NHEJ,V(D)J재조합), 특정 유전자 전사 및 세포자멸사의 조절, 열자극에 의해 유발되는 반응의 조절, 세포주기 G2와 M 에서의 기능 들을 수행하는 것으로 밝혀졌다(Tuteja와 Tuteja, 2000). 이런 다양한 Ku의 기능들을 고려할 때, DNA DSBs수복에 대한 역할과는 완전히 다른, 아직 밝혀지지 않은 생물학적 기능이 존재할 가능성이 있는 것으로 추측된다.

1. DNA 수복과정에서의 Ku역할

DNA 수복과정에 관여하는 Ku단백질과 DNA-PKcs 둘다 DNA말단들과 독립적으로 결합하지만, 대부분의 경우 DNA-PKcs 자체보다는 Ku70/Ku86 이량체(heterodimer)에 의존해서 이루어진다(Wu와 Lieber, 1996; Cary 등, 1997). 사실 Ku 단백질은 DNA-PKcs의 DNA말단에 대한 친화도를 100배정도 증가시켜 DNA-PKcs가 DNA에 효과적으로 결합할 수 있도록 하여 결과적으로 DNA 복구(subsequent repair of DNA)가 잘 이루어지게 한다(Hammarsten과 Chu, 1998) .따라서 본 실험결과에 나타난 정류고환조직에서 y-H2AX 및 Ku80발현이 증가되는 변화로 알 수 있는 것은, 첫째, 정류고환에 의해 DSB손상이 초래된다는 사실, 둘째, 이렇게 발생된 DSB손상의 복구에 Ku80이 관여한다는 사실이다. 또 노화세포 및 조직에서 y-H2AX 및 Ku80발현이 변화하는 것은 노화에 따라 Ku80발현이 감소하여 젊은 세포에 비해 DSB가 제대로

수복되지 못하여 V-H2AX발현이 증가되는 것으로 여겨진다. 또 본 실험에서 정류고환을 유도한 실험군의 정세관 바깥쪽에 증가된 Ku양성세포들은 형태 및 위치로 보아 분열 및 분화이 왕성한 정모세포와 정자세포들이 대부분이므로, DNA손상은 분열 및 분화능력이 높은 상황이 상대적으로 심한 유전자불안 정성을 보이는 것으로 여겨진다.

Ku단백질은 DNA복구 중에 파괴된 DNA 말단들을 끌어당겨 근접시켜주는 조임쇠(vice)와 같은 역할을 수행한다. 이런 방식으로 DNA Ligase와 XRCC4를 구성하는 단백질 복합체를 통해서 DNA 복구를 촉진시킨다. 성공적인 DNA복구 후에 DNA-PK에 의해 복구된 DNA가 유리되려면 완전효소군(holoenzyme complex)의 단백용해가 필요한데(Cary 등, 1997; Walker 등, 2001), 그 이유는 Ku70/Ku86이량체에 의해 DNA strand가 둘러싸이기 때문이다.

2.정상세포에서 Ku단백질의 역할

정상세포에서의 Ku단백질의 주된 역할은 DNA 복구를 중재하는 것이지만. 그 외에도 Ku단백질은 telomere 유지, 세포자멸사의 억제, 종양억제, 그리고 특이 유전자들의 복제를 포함한 다른 세포 과정에도 연관되어있다(Giftin 등, 1996; Li 등, 1998; Lim 등, 2001;2002; Sawada 등, 2003).

유핵세포에서 일어나는 DSB복구과정은 HR 과 NHEJ라는 두 가지 주 경로에 의존하고 있다. 세포내 Ku 단백질의 존재가 유전자 안정성 유지에 절대적으로 필요하고, 또 세포 생체활성에 중요하다. Ku80이 HR에 절대적으로 중요하지는 않다고 생각되지만, 최근 연구들에 따르면 돌연변이 Ku80을 보이는 쥐에서는 HR 빈도수가 감소했으며 또한 발달지연을 나타내고 있음이 밝혀지고 있다(Reliene 등, 2004). 중증 중복 면역결핍쥐에서 발견되는 유전적 결함의 원인이 DNA-PKcs의 c-말단 변이 때문에 나타나고(Blunt 등, 1995), xrs6

햄스터 세포주에서 얻은 Ku80 결핍 세포의 NHEJ 활성도가 크게 감소하고, 염기쌍들 사이의 상호작용 정확도가 감소하는 것으로 나타났다(Feldmann 등, 2000). 체세포에서 NHEJ 이 DSB복구과정의 주요한 기전이므로, 이들 세 포에서 Ku의 작용은 유전자 안정성 유지와 암세포의 증식과 생존에 있어서도 절대적으로 필수적인 것으로 사료된다. 본 연구에서 Ku80에 대한 항체를 이 용하여 웨스턴 블롯을 실시하여 NIH3T3 clone-7 세포주에서 Ku80 단백질의 수준이 더 높게 나타나고, 방사선 조사에 대한 세포 DNA손상이 감소된 결과 는 상기 기술된 Ku 단백질의 기능과 연관성이 있다고 사료된다.

3.생쥐 녹아웃 모델에 의한 Ku단백질의 생물학적 기능

Ku80^{-/-}, Ku70^{-/-}, DNA-PKcs^{-/-}들을 나타내는 생쥐 녹아웃 모델과 상동성돌연변이 생쥐모델에서 방사선조사에 대한 Ku와DNA-PKcs의 조절기능을 알아냄으로써 DSB복구에서의 Ku의 중요성을 밝혀내었다(Nussenzweig 등, 1996; Gu 등, 1997; Kurimasa 등, 1999). Ku86, Ku70, 또는 DNA-PKcs 결핍 생쥐에서는 방사선 민감성과 면역결핍증상 등의 거의 공통적인 특징을 보이게 된다. Ku86^{-/-}, Ku70^{-/-}생쥐는 성장장애와 염색체 이상을 보이는데, 이러한 현상은 Ku86결핍 사람체세포에 방사선을 조사했을 때도 유사한 증상을보인다(Li 등, 2002).정상 DNA-PKcs를 갖는 세포대사에서는 방사선에 의해유발된 DNA DSB와 DNA수복인자 사이에 일어나는 재결합에 문제가 많이 발생하지 않지만, Ku결핍세포에서 나타나는 성장장애는 이러한DNA DSB와 재결합하지 못하기 때문에 발생한다(Nussenzweig 등, 1997). 본 연구진들이 Ku에 대한 siRNA를 이용하여 실험한 결과, DSB의 수복기능이 감소되었는데, 이러한 결과는 상기 기술한 주장들과 일치하였다

4. 종양생성에 관계하는 Ku단백질의 생물학적 기능

포유동물 유전체는 염색체 DNA 손상에 의한 돌연변이 위험을 항상 가지고 있다. DNA DSBs는 수복되지 않으면 세포사멸이나 염색체이상을 초래하는 유해한 DNA손상 중 하나이다. DSB 수복결핍은 염색체 전좌(translocation)를 초래하기 쉽고, 세포항상성을 유지하는데 필수적인 요소들의 균형이 깨져 유전자 증폭의 시작과 관련이 깊다. 또 전좌와 유전자 증폭은 종양유전자의 활성화를유 도하여 세포형질전환 및 종양형성에 관여한다(Kinzler와 Vogelstein, 1997; Difilippantonio, 2000; Khanna와 Jackson, 2001). 포유동물세포는 HR 또는 NHEJ을 통하여 DSB를 수복하는데, 둘 중 하나라도 잘못되면 중대한 유전자 불완전성, 면역결핍, 종양민감성(tumor susceptibility) 등이 나타난다. CD40L을 포함한 특정 신호가 MM 의 유전자불안정성을 증가시키는데 이는 Ku 발현의 변화와 관련이 있는 것으로 추정되고 있다(Hwang 등, 2006). 최근 이두 가지 DSB 수복과정의 결함이 암의 발생과 연관이 있다는 증거가 제시되었다(Khanna 와 Jackson, 2001).

종양민감성 유전자는 DNA수복에 관련된 문지기(caretakers)와 세포사멸과 세포증식에 관련된 감시자(gatekeepers)로 나눌 수 있는데, 이런 두 가지 유전자기능이 소실되면 종양발생 가능성이 증가된다(Kinzler와 Vogelstein, 1997). Ku86와 p53은 기능적으로 밀접하게 연관되어 있는 대표적인 문지기-감시자쌍에 해당된다. Ku86은 염색체재배열(chromosomal rearrangements) 억제를통해 게놈의 완전성을 유지하는 문지기유전자로 알려져 있다(Difilippantonio 등. 2000). Ku86결핍생쥐는 염색체손상, 전좌, 이수성(aneuploidy) 등을 포함한 심각한 염색체이상을 초래하지만 암에 대한 반응은 비록 저하될지라도 여전히 수행하게 된다. 그러나 p53의 소실과 Ku86의 소실이 동시에 발생하면 종양발생, 특히 전B-세포림프종(pro-B-cell lymphomas)을 촉진하게 된다

Ku86의 소실은 암의 발생뿐만 아니라, 특정 암의 진행과도 연관이 있다. 위암세포의 과다증식은 COX-2의존적으로 Ku70과 Ku86의 과발현 또는 핵속 농도의 증가와 관련이 있는데, 이는 위암세포의 NF-κB 활성화에 의해 매개되는 것으로 알려지고 있다(Lim 등, 2002). COX-2 와 그 생산물인 prostaglandin E2 (PGE2)는 세포사멸을 억제하고 종양세포의 분열을 조장하는 것으로 알려지고 있다(Lim 등, 2001; Raz, 2002). 사람 큰창자세포의 경우 PGE2가 Bcl-2 발현을 유도하고(Sheng 등, 1998), 만성 B-세포 백혈병에서 세포자멸사를 억제하는 Bcl-2와 Ku86 발현수준은 서로 긍정적인 상관관계가 있고(Klein 등, 2000), 악성 유방암에서 Ku70과 Ku86이 정상조직에 비해 훨씬 높게 발현된다는 것이 밝혀졌다(Pucci 등, 2001). 이런 결과들을 바탕으로 COX-2에 의해 생성되는 PGE2는, 높은 수준의 Bcl-2, Ku 및 암세포 증식과 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다.

5. 종양치료와 Ku단백질의 기능

많은 항암치료요법은 부산물형성 또는 DNA가닥손상을 유도하여 DNA를 표적으로 손상시키는 작용을 하게 된다. 그러나 mitomycin C, bleomycin, y-방사선조사 등을 포함한 항암치료의 효율은 세포독성에 대한 세포들의 감수성에 따라 제약을 받게 된다. 종양세포들이 정상세포에 비해 훨씬 유전자손상복구기작에 의존적이기 때문에, 종양세포들의 유전자복구경로를 차단하였을때, 더욱 민감하게 특정 DNA손상을 가할 수 있다(Kashishian 등, 2003). DNA-PK가 DSB복구에 중요한 역할을 수행하기 때문에 종양세포에 DNA-PK활성도가 증가되어 있으면, 항암제에 내성이 있다는 지표로 이용될 수 있다. 또 DNA-PK복합체의 kinase 활성도가 Ku의 DNA말단결합(DNA end-binding; DEB) 활성도에 의해 조절되므로(Hammarsten과 Chu, 1998),

Ku발현과 기능의 조절은 항암요법에 대한 암세포내성에 핵심적인 역할을 할 것으로 사료된다. 사람 만성림프세포백혈병(CLL), MM, 생쥐 백혈병모델에서 Ku86발현, Ku-DEB 활성도, DNA-PK 활성도의 증가는 방사선치료 및 항암치료에 대한 암세포의 내성과 관련된다(Muller 등, 1998; Frit 등, 1999; Tai 등, 2000). 본 연구에서 H-Ras를 발현하는 NIH3T3-clone 7세포주 조절인자인 ponasterone A를 이용하여 H-Ras의 활성에 따른 Ku80 및 Y-H2AX발현을 알아본 결과 Ku80 단백질의 발현이 ponasterone A를 처치한NIH3T3 clone-7세포주에서 Ras가 발현되지 않는 세포에 비해 유의하게증가하였다. 또 UV 조사에 따른 Y-H2AX발현 정도가 NIH3T3 clone-7세포주에서 Ras가 발현되지 않는 세포에 비해 유의하게 감소하였다. 이러한결과로 미루어 종양유전자 H-Ras에 의하여 Ku80이 상승조절되어 DNA이중가닥손상의 복구를 촉진함을 알 수 있었다. 또 종양유전자 H-Ras발현세포들이 Ku80 단백질의 상승조절을 이용하여 치료목적 Y-방사선조사에도 불구하고 저항성을 키워 생존하는데 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

결론적으로 유해 물질을 비롯한 여러 자극에 의해 유발되는 DNA 손상에 대한 여러 감지자 중 γ -H2AX와 Ku80이 유전자 손상에 대한 직접적 또는 간접적 표지자로 작용함을 알 수 있었고, 이러한 작용은 유해자극의 종류, 세포주, 반응시간, 조직 장기에 따라 다양한 반응성을 보였다. 또한 γ -H2AX와 Ku80은 DNA 이중나선구조의 손상을 수복하는 역할을 수행함에 있어서 Ras 신호전달에 의해 조절된다고 생각된다.

결 론

DNA 손상반응 및 수복에 관여하는 물질들 중 인산화된 H2AX(γ-H2AX)와 Ku80을 대상으로 노화 및 여러 유해물질의 투여에 따른 변화를 알아보고, H-Ras의 활성화에 따른 표적유전자들 중 Ku80의 발현과 γ-H2AX의 변화를 조사한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다..

유해 물질을 비롯한 여러 자극에 의해 유발되는 DNA 손상에 대한 여러 감지 자 중 Y-H2AX와 Ku80이 유전자 손상에 대한 직접적 또는 간접적 표지자로 작용하였고, 이러한 Y-H2AX와 Ku80작용은 유해자극의 종류, 세포주, 반응시간, 조직 장기의 종류에 따라 다양한 반응성을 보였다. Ras로 형질전환시킨 세포에서 나타나는 Y-H2AX와 Ku80의 DNA 손상에 대한 반응을 통하여, Ku 단백질은 종양유전자 Ras 신호전달에 의해 DNA 이중나선구조의 손상을 수복하는 역할을 수행한다는 것을 알 수 있었다. DNA손상에 대한 감지체계와 수복체계의 활성화 정도와 세포의 정상적인 기능 수행 사이의 관계에 대한 더 많은 연구가 필요하다.

참고문헌

Bakalkin G, Yakovleva T, Hurd YL, Nussenzweig A, Li GC and Terenius L: Autoantigen Ku in the brain. Developmentally regulated expression and subcellular localization, *NeuroReport 9: 2147-2151,1998.*

Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, Monroe BC, Ciccone DN, Yan C, Vlasakova K, Livingston DM, Ferguson DO, Scully R and Alt FW: Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX, *Proc Natl Acad Sci USA 99: 8173–8178,2002.*

Bassing CH, Suh H, Ferguson DO, Chua KF, Manis J, Eckersdorff M, Gleason M, Bronson R, Lee C and Alt FW: Histone H2AX. A dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors, *Cell* 114: 359-370,2003.

Bernhard EJ, Kao G, Cox AD, et al: The farnesyltransferase inhibitor FTI-277 radiosensitizes H-ras-transformed rat embryo fibroblasts, *Cancer Res* 56: 1727-1730.1996.

Bernhard EJ, McKenna WG, Hamilton AD, et al: Inhibiting Ras prenylation increases the radiosensitivity of human tumor cell lines with activating mutations of ras oncogenes. *Cancer Res* 58: 1754-1761.1998.

Bernhard EJ, Stanbridge EJ, Gupta S, et al: Direct evidence for the contribution of activated N-rasand K-ras oncogenes to increased intrinsic radiation resistance in human tumor cell lines, *Cancer Res 60: 6597-6600,2000*.

Blunt T, Finnie NJ, Taccioli GE, Smith GC, Demengeot J, Gottlieb TM, Mizuta R, Varghese AJ, Alt FW and Jeggo PA: Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation, *Cell* 80: 813-823,1995.

Cary RB, Peterson SR, Wang J, Bear DG, Bradbury EM and Chen DJ: DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase, *Proc Natl Acad Sci USA 94:* 4267-4272.1997.

Celeste A, DifilippantonioS, Difilippantonio MJ, Fernandez-Capetillo O, Pilch DR, Sedelnikova OA, Eckhaus M, Ried T, Bonner WM and Nussenzweig A: H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility, *Cell 114:* 371-383,2003.

Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA,Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Olaru A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM,Nussenzweig MC and Nussenzweig A: Genomic instability in mice lacking histone H2AX, *Science 296: 922-927,2002.*

Chen HT, Bhandoola A, Difilippantonio MJ, Zhu J, Brown MJ, Tai X, Rogakou EP, Brotz TM, Bonner WM, Ried T and Nussenzweig A: Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX, *Science 290: 1962-1965,2000.*

d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, T. Von Zglinicki, Saretzki G, CarterNP and Jackson SP: A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence, *Nature 426: 194-198,2003.*

Difilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, Meffre E, Nussenzweig MC, Max EE, Ried T and Nussenzweig A: DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation, *Nature 404: 510-514,2000.*

Feldmann E, Schmiemann V, Goedecke W, Reichenberger S and Pfeiffer P: DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining, *Nucleic Acids Res* 28: 2585-2596,2000.

Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD, Bonner WM, Manova K, Burgoyne P and Nussenzweig A: H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell 4: 497-508.2003a.*

Fernandez-Capetillo O, Celeste A and Nussenzweig A: Focusing on Foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors, *Cell Cycle 2: 426-427, 2003b.*

Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A: H2AX: the histone guardian of the genome, *DNA Repair(Amst)* 3(8-9):959-967,2004.

Forand A, Dutrillaux B, Bernardino-Sgherri J: Gamma-H2AX expression pattern non-irradiated in neonatal mouse cells and after low-dose germ relationships gamma-radiation: between chromatid breaks and DNA double-strand breaks, Biol Reprod, 71(2):643-649,2004.

Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M,

Ashworth A, Jeggo P: A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein, *EMBO J. 2;22(11):2860-2871,2003.*

Friedberg EC and Meira LB: Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage, *Version 5 DNA Repair 2: 501-530,2003.*

Frit P, Canitrot Y, Muller C, Foray N, Calsou P, Marangoni E, Bourhis J and Salles B: Cross-resistance to ionizing radiation in a murine leukemic cell line resistant to cis-dichlorodiammineplatinum(II): role of Ku autoantigen, *Mol Pharmacol* 56: 141-146.1999.

Furuta T, Takemura H, Liao ZY, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, Pilch DR, Rogakou EP, Celeste A, Chen HT, Nussenzweig A, Aladjem MI, Bonner WMand Pommier Y: Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes, *J Biol Chem 278: 20303-20312.2003.*

Giffin W, Torrance H, Rodda DJ, Prefontaine GG, Pope L and Hache RJ: Sequence-specific DNA binding by Ku autoantigen and its effects on transcription, *Nature 380: 265-268,1996.*

Goldberg M, Stucki M, Falck J, D'Amours D, Rahman D, Pappin D, Bartek J and Jackson SP: MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint, *Nature 421: 952-956.2003.*

Gu Y, Seidl KJ, Rathbun GA, Zhu C, Manis JP, S.N. van der, Davidson L, ChengHL, Sekiguchi JM, Frank K, Stanhope-Baker P, Schlissel MS, Roth DB and Alt FW: Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice, *Immunity 7: 653-665,1997.*

Hammarsten O and Chu G: DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku, Proc, Natl Acad Sci USA 95: 525-530,1998.

Hammond EM, Dorie MJ, Giaccia AJ: ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. *J Biol Chem, 4;278(14):12207-12213,2003.*

Hermens AF, Bentvelzen PA: Influence of the H-ras oncogene on radiation responses of a rat rhabdomyosarcoma cell line. *Cancer Res* 52: 3073-3082.1992.

Huang X, Traganos F, Darzynkiewicz Z: DNA damage induced by DNA topoisomerase I– and topoisomerase II–inhibitors detected by histone H2AX phosphorylation in relation to the cell cycle phase and apoptosis, *Cell Cycle*, 2(6):614–619.2003.

Hwang WY, Gullo CA, Shen J, Poh CK, Tham SC, Cow G, Au M, Chan EW, Teoh G: Decoupling of normal CD40/interleukin-4 immunoglobulin heavy chain switch signal leads to genomic instability in SGH-MM5 and RPMI 8226 multiple myeloma cell lines. *Leukemia*, 20(4):715-23, 2006

Jin S and Weaver DT: Double-strand break repair by Ku70 requires heterodimeriza –tion with Ku80 and DNA binding functions, *EMBO J 16: 6874–6885,1997*.

Kashishian A, Douangpanya H, Clark D, Schlachter ST, Eary CT, Schiro JG, Huang H, Burgess LE, Kesicki EA and Halbrook J: DNA-dependent protein kinase inhibitors as drug candidates for the treatment of cancer, *Mol Cancer Ther 2:* 1257-1264.2003.

Khanna KK and Jackson SP: DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet 27: 247-254,2001*.

Kinzler KW, Vogelstein B: Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers, *Nature 386: 761-763,1997.*

Klein A, Miera O, Bauer O, Golfier S and Schriever F: Chemosensitivity of B cell chronic lymphocytic leukemia and correlated expression of proteins regulating apoptosis, cell cycle and DNA repair, *Leukemia* 14: 40–46,2000.

Kobayashi J, Tauchi H, Sakamoto S, Nakamura A, Morishima K, Matsuura S, Kobayashi T, Tamai K, Tanimoto K and Komatsu K: NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with theFHA/BRCT domain, *Curr Biol 12:* 1846-1851,2002.

Koike M, Awaji T, Kataoka M, Tsujimoto G, Kartasova T, Koike A and Shiomi T: Differential subcellular localization of DNA-dependent protein kinase components Ku and DNA-PKcs during mitosis, *J Cell Sci 112: 4031-4039,1999a*.

Koike M, Ikuta T, Miyasaka T, Shiomi T: The nuclear localization signal of the human Ku70 is a variant bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex, *Exp Cell Res.* 1;250(2):401-413,1999b.

Kurimasa A, Ouyang H, Dong LJ, Wang S, Li X, Cordon-Cardo C, Chen DJ and Li

GC: Catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase: impact on lymphocyte development and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA 96: 1403-1408.1999.*

Li G, Nelsen C and Hendrickson EA: Ku86 is essential in human somatic cells, *Proc Natl Acad Sci USA 99: 832-837.2002.*

Li GC, Ouyang H, Li X, Nagasawa H, Little JB, Chen DJ, Ling CC, Fuks Z and Cordon-Cardo C: Ku70: a candidate tumor suppressor gene for murine T cell lymphoma, *Mol Cell 2: 18,1998.*

Lim JW, Kim H and Kim KH: Expression of Ku70 and Ku80 mediated by NF-kappa B and cyclooxygenase-2 is related to proliferation of human gastric cancer cells, *J Biol Chem 277: 46093-46100.2002.*

Lim JW, Kim H and Kim KH: Nuclear factor-kappaB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells, *Lab Invest 81:* 349-360,2001.

Ling CC, Endlich B: Radioresistance induced by oncogenic transformation. *Radiat Res* 120: 267-269.1989.

Lou Z, Minter-Dykhouse K, Wu X and Chen J: MDC1 is coupled to activated CHK2 in mammalian DNA damage response pathways, *Nature 421: 957-961,2003*.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF and Richmond TJ: Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 resolution, *Nature 389: 251–260,1997*.

Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, P. de Boer, Blanco-Rodriguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM and Burgoyne PS: Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis, *Nat Genet 27: 271-276, 2001.*

Mannironi C, Bonner WM and Hatch CL: H2A.X. a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals, *Nucleic Acids Res 17: 9113–9126,1989.*

McKenna WG, Weiss MC, Endlich B, et al: Synergistic effect of the v-myc oncogene with H-ras on radioresistance, *Cancer Res 50: 97-102,1990.*

Miller AC, Kariko K, Myers CE, Clark EP, Samid D: Increased radioresistance of EJras-transformed human osteosarcoma cells and its modulation by lovastatin, an inhibitor of p21ras isoprenylation, *Int J Cancer 53: 302-307,1993.*

Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S andHomma M: Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap, *J Clin Invest* 68: 611-620,1981.

Muller C, Dusseau C, Calsou P and Salles B: Human normal peripheral blood B-lymphocytes are deficient in DNA-dependent protein kinase activity due to the expression of a variant form of the Ku86 protein, *Oncogene 16: 1553-1560,1998.* Nussenzweig A, Chen C, da CS, Sanchez VM, Sokol K, Nussenzweig MC and Li GC: Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination,

Nature 382: 551-555,1996.

Nussenzweig A, Sokol K, Burgman P,Li L and Li GC: 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:* 13588-13593.1997.

Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M and Bonner WM: A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage, *Curr Biol* 10: 886-895, 2000.

Petrini JH, Stracker TH: The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators, *Trends Cell Biol.* 13(9):458-462,2003

Petersen S, Casellas R, Reina-San-Martin B, Chen HT,Difilippantonio MJ, Wilson PC, Hanitsch L, Celeste A, Muramatsu M, Pilch DR, Redon C, Ried T, Bonner WM, Honjo T, Nussenzweig MC and Nussenzweig A: AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching, *Nature* 414: 660-665,2001.

Pirollo KF, Tong YA, Villegas Z,Chen Y, Chang EH: Oncogene- transformed NIH 3T3 cells display radiation resistance levels indicative of a signal transduction pathway leading to the radiation-resistant phenotype, *Radiat Res* 135: 234-243.1993.

Pucci S, Mazzarelli P, Rabitti C, Giai M, Gallucci M, Flammia G, Alcini A, Altomare V and Fazio VM: Tumor specific modulation of KU70/80 DNA binding activity in breast and bladder human tumor biopsies, *Oncogene 20: 739-747,2001*.

Rait A, Pirollo K, Will DW, et al: 3'-End conjugates of minimally

phosphorothioate-protected oligonucleotides with 1-O-hexadecylglycerol: synthesis and anti-ras activity in radiation-resistant cells, *Bioconjug Chem 11:* 153-160.2000.

Rappold I, Iwabuchi K, Date T and Chen J: Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways, *J Cell Biol 153:* 613-620.2001.

Raz A: Is inhibition of cyclooxygenase required for the anti-tumorigenic effects of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs (NSAIDs)? In vitro versus in vivo results and the relevancefor the prevention and treatment of cancer, *Biochem Pharmacol 63:* 343-347.2002.

Reina-San-Martin B, Difilippantonio S, Hanitsch L, Masilamani RF, Nussenzweig A and Nussenzweig MC: H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation, *J Exp Med 197: 1767–1778,2003.*

Reliene R, Bishop AJ, Li G and Schiestl RH: Ku86 deficiency leads to reduced intrachromosomal homologous recombination in vivo in mice, *DNA Repair (Amst)* 3: 103-111,2004.

Rich T, Allen RL, Wyllie AH: Defying death after DNA damage, *Nature*. 12;407:777-783, 2000

Rogakou EP, Boon C, Redon C and Bonner WM: Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo, *J Cell Biol 146: 905-916, 1999.*

Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y and Bonner WM: Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139, *J Biol Chem 275: 9390-9395,2000.*

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS and Bonner WM: DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139, *J Biol Chem 273:* 5858-5868,1998.

Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH and Lobrich M: Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle, *Mol Cell Biol 23:* 5706-5715,2003.

Rouse J and Jackson SP: Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 297: 547-551.2002.

Russell JS, Lang FF, Huet T, et al: Radiosensitization of human tumor cell lines induced by the adenovirus-mediated expression of an anti-Ras single-chain antibody fragment, *Cancer Res 59: 5239-5244,1999.*

Sawada M, Sun W, Hayes P, Leskov K, Boothman DA and Matsuyama S: Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria, *Nat Cell Biol 5:* 320–329,2003.

Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A and Halazonetis TD: p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks, *J Cell Biol* 151: 1381-1390,2000.

Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG and Bonner WM: Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody, *Radiat Res* 158: 486-492,2002.

Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD and DuBois RN: Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells, *Cancer Res 58: 362-366,1998.*

Shiloh Y: ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity, *Nat Rev Cancer 3: 155-168,2003.*

Sklar MD: The ras oncogenes increase the intrinsic resistance of NIH 3T3 cells to ionizing radiation, *Science 239: 645-647,1988.*

Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM and Elledge SJ: MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint, *Nature 421: 961-966,2003.*

Tai YT, Teoh G, Lin B, Davies FE, Chauhan D, Treon SP, Raje N, Hideshima T, Shima Y, Podar K and Anderson KC: Ku86 variant expression and function in multiple myeloma cells is associated with increased sensitivity to DNA damage, *J Immunol* 165: 6347-6355, 2000.

Takai H, Smogorzewska A and T. de Lange: DNA damage foci at dysfunctional telomeres, *Curr Biol 13: 1549-1556,2003.*

Tuteja R and Tuteja N, Ku autoantigen: a multifunctional DNA-binding protein, *Crit. Rev, Biochem Mol Biol 35: 133,2000.*

Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L and Shiloh Y: Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage, *EMBO J 22:* 5612-5621.2003.

van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF: The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes, *EMBO Rep*, 4(9):844-849,2003. van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R: Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection, *Nat Rev Genet*, 2(3):196-206,2001.

Walker JR, Corpina RA and Goldberg J: Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair, *Nature 412:* 607614.2001.

Ward IM and Chen J: Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress, *J Biol Chem 276: 47759-47762,2001*.

Ward IM, Minn K, Jorda KG and Chen J: Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX, *J Biol Chem 278*: 19579–19582,2003.

West MH and Bonner WM: Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry* 19: 3238-3245,1980.

Wu RS, Panusz HT, Hatch CL and Bonner WM: Histones and their modifications, *CRC Crit Rev Biochem 20: 201–263,1986.*

Wu X and, Lieber MR: Proteinprotein and proteinDNA interaction regions within the DNA end-binding protein Ku70/Ku86, *Mol Cell Biol 16: 51865193,1996.*

Xu X and Stern DF: NFBD1/MDC1 regulates ionizing radiation-induced focus formation by DNA checkpoint signaling and repair factors, *FASEB J 17:* 1842-1848.2003.

Zhou BB and Elledge SJ: The DNA damage response: putting checkpoints in perspective, *Nature 408: 433-439,2000.*

Zweidler A: Complexity and variability of the histone complement, *Life Sci Res Rep* 4: 187–196, 1976.

그 림 설 명

- **Fig. 1.** Expression of Ku80. **A.** Expression of Ku80 in NIH3T3 cells after γ-irradiation. Expression of Ku80 is increased after γ-irradiation in NIH3T3 cells and numerous Ku80-immunopositive granules in the damaged cellular nucleus revealed 30min and 3h(arrows). According to this data, Ku80 analysis may be used for DSB sensor or DSB repair marker. Upper panel: Immunofluorescence, lower panel: Western blot assay. **B.** Expressional changes of Ku80 according to passage(aging) in WI-38 cells. The Ku80 expression of 24p was lower than the young(6p) passage. Immunoreactivity of Ku80-positive cells in the 24p was markedly diminished bothe nucleus and cytoplasm, compared to 6p in upper panel(Immunofluorescence). Lower panel: Western blot assay. Scale bar=50μm
- **Fig. 2.**Increased expression Ku proteinins in the rat testicular varicocele, which obtained from Dr. HY Moon(Chosun university, Medical School). At the postoperative 4 weeks, the spermatogenic cells of the varicocele group are showed increased immunolabeling with Ku80 antibody, not Ku70. A. Immunofluorescence, B.Western blot assay
- **Fig. 3.** Expression of γ-H2AX in the Mo59J and Mo59K cells: Response to Bleomycin treatment. **A.** Mo59J cells were isolated from human glioblastoma, and lack DNA-dependent protein kinase activity. Expression of γ-H2AX was markedly increased during 3-24h after bleomycin treatment, and then slowly decreased. **B.** Mo59K cells were isolated from human glioblastoma, and express normal level of DNA-dependent protein

kinase activity. Expression of γ -H2AX was slightly increased during 3-12h after bleomycin treatment, and at the time of 24h, decreased to nearly normal level. Comparing with the expression of γ -H2AX, Mo59J has a little DNA doble strands break(DSB) repair activity. **C.** Protein expression of γ -H2AX. Western blot assay revealed the same results of immunofluorescence(A,B)

Fig. 4. Expression of γ -H2AX in the IMR90 cells: Response to bleomycin treatment. **A-B.** Expression of γ -H2AX was highest at the time of 12h and 24h, after that the expression started to slightly diminish in both immunohistochemistry and protein assay. **C.** Confocal images of γ -H2AX expression were 3-dimentionally reconstructed with software program(FV 1000, Olympus, Japan), so the density and numbers of reactive cells are clearly defined. So γ -H2AX staining(A,C) and γ -H2AX protein analysis(B) may be useful method to detect double strand breaks.

Fig. 5. γ-H2AX expression in the colon of old rat and varicocele model. **A.**γ -H2AX expression of old rat(114wks) was increased in the Olett rat(arrows). **B.**γ-H2AX expression in the testis of old rat. γ-H2AX expression of old rat(54wks) was higher than young(8wks) in seminiferous tubular cells. **C.** Also increased γ-H2AX protein level was detected in western blot assay. **D.** Increased γ-H2AX expression in the rat testicular varicocele. γ-H2AX expression of seminiferous tubule was increased in the testicular varicocele model which obtained from Dr. HY Moon(Chosun university, Medical School). At the postoperative 3 weeks, the positive cells shown are sprmatids and spermatocytes(arrows).

Fig. 6. Ku80 activation by oncogenic ras. A. Ras conveying oncogenic signal was transfected into NIH3T3 (NIH3T3-clone 7-Ras). Western blot analysis revealed that the treatment of NIH3T3-clone 7-Ras with 1µM and 5 µM ponasterone A resulted in an increase in the expressions of Ku80 and Ras in a dose-dependent manner. B. Expression of Ku80 is increased in NIH3T3 cells transfected with oncogenic Ras (NIH3T3 clone 7) compared to NIH3T3. This data shows the oncogenic Ras-dependent increase in the DNA repair activity of Ku80. C. y-H2AX protein expression increase in the H2O2 and Ultraviolet(UV) treated NIH3T3 cell line. Dose-dependant increase of y-H2AX protein expression was observed in H2O2 treated NIH3T3 cell line(upper panel). x-H2AX protein expression was increased in the NIH3T3 cell line after UV-irradiation(middle panel). C, y-H2AX protein expression was also compared the effect of UV-irradiation in the NIH3T3 cell and Ras-transfected NIH3T3-clone7 cell. This western blot data shows the oncogenic Ras-dependent increase in the DNA repair activity(Ku) and decrease in the double strand breaks in the NIH3T3-clone7 cell line .