

2007년 2월
석사학위논문

Apurinic/aprimidinic endonuclease-
1/redox factor-1 (APE)가 과발현되는
인간 유래의 fibroblast 세포주에서
산화성 스트레스에 의한
cyclooxygenase (COX) 2 그 발현
유도에 관한 연구

조선대학교 대학원

생물신소재학과

이 민 영

Apurinic/aprimidinic endonuclease-
1/redox factor-1 (APE)가 과발현되는
인간 유래의 fibroblast 세포주에서
산화성 스트레스에 의한
cyclooxygenase (COX) 2 그 발현
유도에 관한 연구

The inhibition of cyclooxygenase (COX) 2 by H₂O₂-oxidative stress in
apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE)
human fibroblast GM00637 cell line

2007년 2 월 일

조선대학교 대학원

생물신소재학과

이 민 영

Apurinic/aprimidinic endonuclease-
1/redox factor-1 (APE)가 과발현되는
인간 유래의 fibroblast 세포주에서
산화성 스트레스에 의한
cyclooxygenase (COX) 2 그 발현
유도에 관한 연구

지도교수 유 호 진

이 논문을 이학석사 학위신청논문으로 제출함.

2006 년 10 월 일

조선대학교 대학원

생물신소재학과

이 민 영

CONTENTS

I . ABSTRACT	1
II . 서론	5
III . 실험재료 및 방법	10
1. antibody	10
2. APE 발현 벡터의 클로닝	10
3. transformation	10
4. plasmid DNA 분리	10
5. 형질전환 세포주 확립	11
6. 세포주 및 세포배양조건	12
7. 시약 처리	12
8. RNA 추출, cDNA 합성 그리고 RT-PCR	13
9. Luciferase activity assay	14
10. 세포용해	15
11. 단백질 정량	15
12. SDS-PAGE gel 전기영동	15

13. Western blotting	15
IV. 결과	17
1. H ₂ O ₂ 처리 후의 COX2의 발현	17
2. H ₂ O ₂ 처리 후 COX2 단백질의 발현 유도 확인	23
3. H ₂ O ₂ 처리 후 COX2 mRNA의 발현 유도 확인	26
4. H ₂ O ₂ 처리 후 IκBα degradation의 확인	31
5. TNFα와 CdCl ₂ 처리 후 IκBα degradation의 확인	34
6. MG132 처리 후 IκBα phosphorylation 확인	36
V. 고찰	37
VI. REFERENCE	42

CONTENTS OF FIGURES

Fig. 1 Intracellular signaling pathways mediating COX-2 induction

Fig. 2 COX2 expression after treatment of H₂O₂ by Western

Fig. 3 The expression level of COX2 protein in GM00637 cells after the treatment of H₂O₂

Fig. 4 The expression level of COX2 protein after the treatment of H₂O₂ in time dependent manner

Fig. 5 The expression level of COX2 mRNA in GM00637 cells after the treatment of H₂O₂

Fig. 6 Luciferase activity after the treatment of H₂O₂ using COX2 promoter-containing reporter vector

Fig. 7 The degradation of I κ B α after in GM00637 cells after the treatment of H₂O₂

Fig. 8 I κ B α degradation in GM00637 cells after the treatment of H₂O₂ 30

Fig. 9 I κ B α degradation in GM00637 cells after the treatment of TNF α and CdCl₂

Fig. 10 I κ B α phosphorylation in GM00637-APE cells after the treatment of MG132 or H₂O₂

ABSTRACT

The inhibition of cyclooxygenase (COX) 2 by H₂O₂-oxidative stress in apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE) human fibroblast GM00637 cell line.

Lee Min-Young

Advisor: Prof. You Ho-Jin

Apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE) is a DNA repair protein induced by oxidative stress or DNA damage-related stresses. The APE also involved in the transcriptional regulation of target genes in response to the oxidative stresses by enhancing the DNA binding ability of their transcription regulatory factors. The COX2 was reported to be a regulator of cancer-angiogenesis induced by oxidative stresses. Therefore, we investigate in this study the relationship between COX2 and APE in human fibroblast GM00637 cells in response to H₂O₂-oxidative stress.

COX2 expression was induced by H₂O₂ treatment in normal fibroblast GM00637 cells, but not in the APE-overexpressed GM00637 cells. Since it was reported that COX2 expression is regulated by NF- κ B, whose binding ability is enhanced by APE in response to oxidative stresses, we examined the phosphorylation and degradation of I κ B α , an inhibitor of NF- κ B, by Western blot analysis GM00637-APE cells after H₂O₂-treatment. The I κ B α was phosphorylated and degraded by the H₂O₂-treatment in GM00637 cells in a time course manner, however, its phosphorylation was comparatively down-regulated in GM00637-APE cells. The degradation of I κ B α in the H₂O₂-induced GM00637-APE was not clearly identified because of the higher level of its basal expression. The degradation of I κ B α could be detected in the TNF α -treated

or CdCl₂-treated GM00637, and only in the TNF α -treated GM00637-APE cells. When we analyzed the COX2 promoter activity, the activity in the GM00637-APE was decreased to 35% in comparison with that in the GM00637.

Taken together, although the H₂O₂-induced phosphorylation and degradation of I κ B α is comparatively decreased in GM00637-APE cells, it is not clear because of the high level of its basal expression in comparison with that in GM00637, that may be related with the low levels of both basal COX2 promoter activity and H₂O₂-induced COX2 expression.

<국문초록>

Apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE)가 과발현되는 인간 유래의 fibroblast 세포주에서 산화성 스트레스에 의한 cyclooxygenase (COX) 2 그 발현 유도에 관한 연구

이 민 영

(지도교수 : 유 호 진)

조선대학교 대학원 생물신소재학과

APE는 산화성 스트레스와 DNA에 손상을 주는 여러가지 스트레스에 의해 발현이 유도되는 DNA 손상 복구 단백질이다. 그리고 몇 가지 transcription factor들의 DNA 결합능력을 증진시켜 그 표적 유전자들의 전사를 촉진하거나 저해할 수 있는 조절인자로 작용을 한다고 알려져 있다. 또한 COX2는 산화성 스트레스에 의해 발현이 유발되어 혈관 신생성을 통한 암의 원인으로 보고된 바 있다. 본 논문에서는 APE가 과발현되는 인간의 fibroblast 세포주 (GM00637-APE)에서 산화성 스트레스에 의한 DNA 손상 복구 및 세포내 반응을 연구하면서, COX2와 APE의 상관관계를 알아보고자 하였다.

정상적인 fibroblast 세포주 (GM00637)에서는 H_2O_2 의 처리에 의해 COX2의 발현이 유도되지만 GM00637-APE 세포에서는 H_2O_2 의 처리 후에도 COX2의 발현이 유도되지 않았다. 또한 산화성 스트레스에 의해 활성화되어 COX2의 발현에 영향을 주며 APE에 의해 DNA 결합능력이 증가한다고 알려진 NF- κ B의 활성화를 알아보기 위해, H_2O_2 를 처리한 후 NF- κ B의 inhibitor인 I κ B α 의 phosphorylation과 degradation 정도를 확인하였다. H_2O_2 처리 후 GM00637 세포주에서는 시간이 지남에 따라 I κ B α 가 phosphorylation되고 degradation되는 것으로 보이지만, GM00637-APE 세포에서는 I κ B α 의 phosphorylation 정도가 상대적으로 감소되어 있고, H_2O_2 처리 전의 I κ B α 의 발현양도 상당히 높아 그 degradation을 확인하기 어려웠다. NF-

κB 를 활성화시킬 수 있는 $TNF\alpha$ 혹은 $CdCl_2$ 를 처리한 경우, GM00637 세포에서는 $I\kappa B\alpha$ 의 degradation을 확인할 수 있었지만, GM00637-APE 세포에서는 $TNF\alpha$ 를 처리한 경우에서만 $I\kappa B\alpha$ 의 degradation을 확인할 수 있었다. COX2 promoter activity를 측정한 결과, GM00637-APE 세포주에서는 GM00637 세포에 비해 COX2 promoter activity가 65% 정도 감소되어 있는 것으로 보였다.

이상의 결과로써, GM00637-APE 세포에서는 산화성 스트레스에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 phosphorylation과 degradation이 일어나긴 하지만, $I\kappa B\alpha$ 의 발현양이 높아 degradation되는 정도가 상대적으로 미약하고, 이로 인해 정상상태의 COX2 promoter activity도 낮을 뿐 아니라, 산화성 스트레스에 의한 COX2 발현 유도에도 영향을 미치는 것으로 여겨진다.

1. 서론

COX (cyclooxygenase) 또는 prostaglandin H2 synthase는 염증 반응을 조절하는 PGs의 생합성과 다른 중요한 생리화학적 과정에서 중요한 효소이다. 일찍이 1990년도에 COX는 2개의 별개의 isoform들로 존재한다고 밝혀졌다 (Arch Biochem Biophys 1993). COX-1 (cyclooxygenase-1)은 housekeeping 효소로서 거의 모든 조직에 발현이 일정하게 된다. 반면에 염증을 조절하는 세포들에 의해 발현되는 COX2 (cyclooxygenase-2)는 병리학 상의 prostanoid들의 합성 특히, 치명적이고 만성적 염증과 관련하여 첫 번째로 인식하는 isoform으로 알려져 왔다 (Arch Biochem Biophys. (1993)).

COX2의 과발현은 증가된 전사와 mRNA 안정성의 둘 사이에 중요하게 나타났다 (Lancet Oncol. (2001), J Biol Chem. (2000)). 동물 종에 무관하게 COX2 유전인자의 promoter 지역은 기본적인 TATA box 와 NF- κ B, NF-IL-6/C/EBP, PEA3, NFAT, CRE, AP-2 그리고 SP-1 등과 같은 다양한 추정된 전사적인 조절 요소를 포함하고 있다 (Eur J Biochem. (1994)) (Fig. 2).

COX2의 promoter 부분에는 NF- κ B가 결합할 것으로 추정되는 부분이 두 군데 있는 것으로 확인되었으며, 이 부분을 통해 NF- κ B는 COX2의 발현을 조절한다고 한다 (FEBS Lett. (1997)). NF- κ B를 자극할 수 있는 특별한 자극이 오면 NF- κ B와 결합하고 있던 I κ B α 가 phosphorylation 되고 degradation되어, I κ B α 로부터 자유로워진 NF- κ B는 활성화되어 세포핵으로의 진입이 가능해진다. 핵 내의 NF- κ B는

여러가지 유전자의 전사에 관여를 하게된다. 지난 몇 년간 많이 밝혀진 NF- κ B (Nuclear factor- κ B) 는 세포 생존과 세포의 유착, 염증, 분화, 성장에서 내포된 유전인자의 발현을 조절하는 전사 요소로 알려져 왔다 (Marcel Dekker Inc. (1992), J Biochem Mol Biol. (2002), FASEB J. (1995), Am J Pathol. (2001)).

APE1/Ref-1 (Apurinic/aprimidinic endonuclease/redox effctor factor)유전자는 14번 chromosome에 위치하고 있고 4개의 intron 과 5개의 exon으로 구성되어 있다 (Hum. Mol. Genet. (1992)). 사람의 APE mRNA는 약 1.4 kb 길이이고 954 nucleotide 의 coding 부분을 포함하고 있다. SDS gel에서 recombinant APE의 이동으로 추정되는 분자량은 36.5 kDa에 해당한다고 한다 (Biochim. Biophys. Acta. (1992)). APE의 N-terminal domain은 nuclear localization sequence를 포함하고 있고 (Cell. (1991)) C-terminal domain은 DNA binding과 단백질의 AP-endonuclease activity에 중요한 역할을 하는 것으로 보여졌다 (Nucleic Acids Res. (1995), Carcinogenesis. (1998)). APE1/Ref-1는 2개의 domain들로 구성 되어진 구형의 α/β 단백질이다. 이 2개의 domain 각각은 α helice들에 둘러 싸여진 six-stranded β -sheet들로 구성 되어있다. 이 단백질은 exonuclease III와 DNase I 이 포개진 모양을 닮은 4겹의 α/β -sandwich 형태로 생겼다 (Embo. J. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1994)). APE1/Ref-1의 단백질은 인간의 넓은 범위의 세포에서 발현된다 (Histopathology 33. (1998)). Cell 형태에 따라 APE1/Ref-1는 핵 또는 세포질 혹은 두 곳 모두에 위치 한다고 한다

(Histopathology 33. (1998)). 사람의 APE1/Ref-1는 산화성 스트레스뿐만 아니라 (Cancer Res., (1998)) 다른 스트레스에서도 오는 DNA 손상을 복구하고 전사를 촉진하거나 저해할 수 조절자로서 작용한다 (Biochemistry., (1996)). 조절되는 전사인자로는 AP-1 (Fos, Jun), Nuclear factor- κ B (NF- κ B), polyoma virus enhancer-binding protein2 (PEBP2), early growth response-1 (Egr-1), Myb, members of the ATF/CREB family, HIF-1a (hypoxia inducible factor-1a), HLF (HIF-like factor), Pax-5, 그리고 Pax-8과 같은 것들이 있다고 보고 되어졌다 (J. Biol. Chem. (1997), Embo. J. (1999), J. Biol.Chem. (1996), DNA Cell Biol. (1993), J.Biol. Chem. (2000), Embo. J. (1992), Embo. J. (1992), Mol. Cell. Biol. (1994)).) (table1)

본 실험실에서는 APE가 세포내의 산화성 스트레스에 미치는 영향을 알아보기 위해 APE가 과발현되는 세포주를 확립하였다. 그 중 정상적인 GM00637 세포주에서는 산화성 스트레스에 의해 COX2 발현이 유도됨을 확인할 수 있었는데, APE가 과발현된 GM00637-APE 세포주에서는 산화성 스트레스에 의해 COX2의 발현이 유도되지 않음을 확인하였다. 본 연구에서는 APE가 과발현된 GM00637-APE 세포주에서 산화성 스트레스에 의한 COX2의 발현 유도가 되지 않는 이유를 알아보고자 한다.

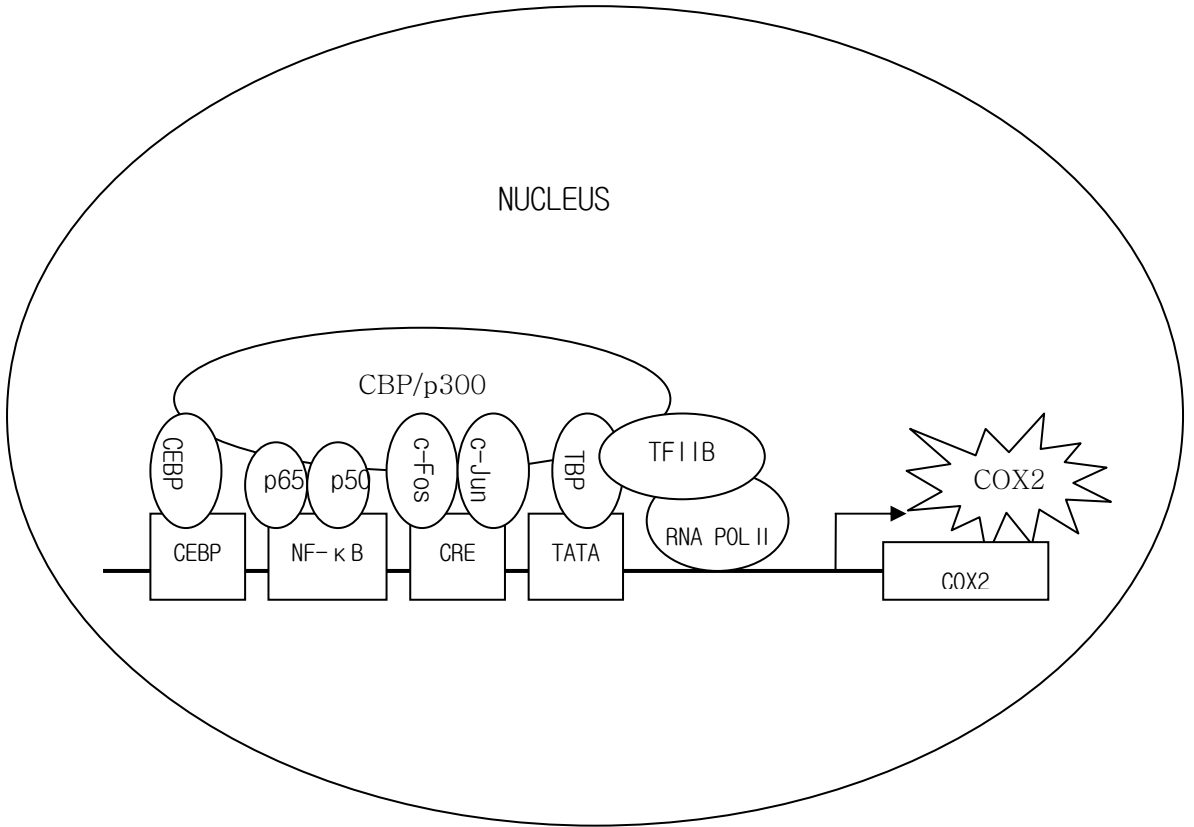


Fig. 1

Fig.1 Intracellular signaling pathways mediating COX-2 induction

Table1. APE 1/Ref-1 enhances DNA binding of transcription factor

Transcription factor	Name of transcription factor
AP-1	Activator protein 1
CREB	Cyclic AMP response binding protein
ATF	Activating transcription factor
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
Myb	Myb
Pax-5, Pax-8	Paired box containing family of genes
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
HLF	HIF-like factor
PEBP2	Polyoma virus enhancer-binding protein 2
Egr-1	Early growth response-1
NF-Y	Nuclear factor-Y
p53	p53

II. 실험재료 및 방법

1. antibody

Anti-actin antibody와 anti-APE (Ref-1) antibody는 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY사의 각각 sc-1615와 sc-5572를 사용하였으며, anti-COX2 antibody는 BD Technologies의 610203, anti-I κ B α antibody와 anti-pI κ B α antibody는 Cell Signaling Technology사의 9242와 9241S를 각각 사용하였다

2. APE 발현 벡터의 클로닝

사람의 섬유아세포인 GM00637 세포의 cDNA로부터 APE 유전자 (F 5'-GGA TCC ATG CCG AAG CGT G -3', R 5'-GAA TTC TCA CAG TGC TAG GTA TAG GGT G -3')를 PCR 방법으로 증폭시켰다. pGEM-T-easy vector (Promega)에 유전자를 삽입하여 클로닝한 후 그 염기서열을 확인했다. APE 유전자는 제한효소 BamH1 과 EcoR1 (New England Biolab)을 이용하여 절단한 후, 해당하는 제한효소로 미리 절단해 둔 pcDNA3.1(+)-neo (Invitrogen) vector 에 cloning 했다.

3. transformation

competent cell (One Shot TOP10, invitrogrn) 100ul에 ligation을 마친 DNA 20 μ l를 넣고 조심스레 섞어준 다음 얼음에서 1시간 동안 정치했다. 42°C에서 1분 30초 동안 heat shock을 준 뒤 얼음에서 2분 정도 정치했다. Tube에 LB배지에 500 μ l 을 첨가하여 37°C incubator에서 1시간 동안 반응 시켰다. 배양한 세포를 원심 분리하여 100 μ l를 제외한 상층 액을 모두 제거하고 세포를 현탁 시킨 후 ampiciline 을 첨가하여 만든 LB 고체 배지에 도말하여 37°C incubator에서 15시간 정도 키웠다.

4. plasmid DNA 분리

plasmid DNA 분리는 DNA-spin™ Plasmid DNA Extraction Kit(iNtRON Biotechnology)를 이용하여 수행하였다. 37°C에서 15 ml conical tube 에 진탕배양한 세포를 원심 분리하여 세포를 침전 시킨 후 상층액을 완전히 제거한다. Pellet에 solution 1 250 μ l를 첨가하여 현탁 시키고 solution 2 250 μ l를 넣고 1차례 조심스레 섞어주고 solution 3 350 μ l를 넣고 1차례 조심스레 또 섞어준 뒤 5분 동안 얼음에서 방치했다. 4°C에서 13000 rpm으로 15분 동안 원심 분리하여 상층액만을 새로운 column 에 넣고 상온에서 13000 rpm으로 1분 동안 원심 분리 한다. column 하층액은 버리고 column 을 solution 4, solution 5, 로 각각 500 μ l, 700 μ l로 씻어준 후 13000 rpm으로 1분 동안 원심 분리 한다. Column을 상온에서 13000 rpm으로 1분 동안 원심 분리하여 column 을 말린 후 DW (distilled water) 로 DNA를 녹였다.

5. 형질전환 세포주 확립

plasmid의 transfection 은 FuGENE 6 (Roche)시약을 이용하여 수행하였다. 해당하는 세포를 transfection하기 24시간 전에 6 well plate에 4×10^4 개수로 갈아준다. 먼저 1.5 microcentrifuge tube에 배양액 97 μ l와 FuGENE 6 시약 3 μ l 을 상온에서 5분 동안 반응 시킨 후 그 tube에 DNA를 1 μ g을 첨가하여 상온에서 20분 동안 반응 시켰다. 20분 후 새로운 배양액으로 교체된 세포에 넣어주고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 incubation 한 뒤 4시간 후 배양액을 새것으로 교체한 후 2 ~ 3일 후에 100 mm culture dish에 옮겼다. 15 ~ 30일동안 해당하는 antibiotic (neomycin) 을 처리한 배양액에서 키운 후 colony가 보이면 marker 펜으로 colony 위치를 체크한 후 colony isolation을 시작한다. 먼저 배양액을 제거하고 1X PBS (pH 7.4)로 두번 씻어주었다. 그런다음 멸균된 tip에 바세린을 바르고 colony 위치에 떨어지지 않게 붙였다. 그위에 Trypsine EDTA를 20 ~ 40 μ l씩 떨어뜨리고 37°C incubator에서 3 ~ 5분 놔두었다. 세포가 떨어졌는지를 현미경으로 확인한 후 배양액을 20 ~ 40 μ l을 넣어주고 세포를 회수하여 원심분리 후 12 well plate에 옮겼다. 2 ~ 3일 해당하는 antibiotic (neomycin) 을 처리한

배양액에서 키운 후 100 mm culture dish에 옮겼다. 세포가 자란 후 Western blotting과 RT-PCR로 세포주가 확립 되었는지 확인 하였다.

6. 세포주 및 세포배양조건

사람의 섬유아 세포인 GM00637 세포주는 Coriell Cell Repositories에서 구입하였으며, 이 세포에 pcDNA3.1벡터가 형질도입된 GM00637-pcDNA3.1 세포주 그리고 pcDNA3.1벡터에 APE 유전자를 삽입하여 클로닝한 pcDNA-APE 벡터를 형질도입된 GM00637-APE (APE 과발현 stable cell) 세포주를 사용하였다.

신경 세포인 Neuro2A 세포주 ATCC로부터 구입하였고 Neuro2A 세포주에 APE 발현벡터인 pcDNA-APE가 형질도입된 Neuro2A-APE 세포주는 모두 10% fetal bovine serum(FBS) 가 포함된 Eagle's minimum essential medium (EMEM)에서 37°C, 5% CO₂가 있는 조건으로 배양하였다.

사람의 결장암 세포인 SW480 세포주는 ATCC로부터 구입하였고 SW480 세포주에 APE 발현벡터인 pcDNA-APE가 형질도입된 SW480-APE (세포 내에 APE가 과발현된 stable cell) 세포주는 모두 10% fetal bovine serum(FBS) 가 포함된 RPMI 1640 medium 에서 37°C, 5% CO₂가 있는 조건으로 배양하였다.

사람의 결장암 세포인 DLD1 세포주는 ATCC로부터 구입하였고 DLD1 세포주에 APE 발현벡터인 pcDNA-APE가 형질도입된, DLD1-APE(세포 내에 APE가 과발현된 stable cell) 세포주는 모두 10% fetal bovine serum(FBS) 가 포함된 RPMI 1640 medium 에서 37°C, 5% CO₂가 있는 조건으로 배양하였다.

7. 시약 처리

각각의 세포를 48시간 동안 키운 후 8.8 M의 H₂O₂ (Sigma, 31642) 용액을 PBS (phosphate-buffered saline)에 각각 25 μM, 50 μM, 80 μM, 100 μM 의 농도가 되게 희석한 후 각각의 세포에 처리하였다.

각각의 세포를 48시간 동안 키운 후 10 μg/ml의 TNF α (Sigma, T0157)를 PBS에

희석하여 최종 농도가 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 각각의 세포에 처리하였다

각각의 세포를 48시간 동안 키운 후 1M CdCl_2 (Sigma, 202908)를 PBS에 희석하여 최종 농도가 5 μM 이 되도록 각각의 세포에 처리하였다.

Proteosome inhibitor인 MG132 (Sigma, 2211)는 DMSO (Dimethyl sulfoxide, minimum 99.5% GC. Sigma, D5879) 에 녹여 100 mM의 stock solution을 만들고 최종농도가 10 μM 이 되게 각각의 세포에 처리하였다.

8. RNA 추출, cDNA 합성 그리고 RT-PCR

100 mm culture dish에 충분히 배양된 세포 (90% confluency)에서 배양액을 제거하고 1X PBS (pH 7.4)로 한번 씻어주었다. 1 ml의 TRIzol (Invitrogen)을 넣고 시약과 세포가 골고루 잘 반응하도록 한 후 pipette을 이용하여 용해된 세포 추출물을 모두 회수하고 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겼다. 200 μl 의 chloroform을 넣고 충분히 잘 혼합한 후 냉장원심분리기를 이용하여 phenol층을 분리했다. 상층의 400 μl 를 조심히 pipette을 이용하여 새로운 microcentrifuge tube에 옮겼다. 동량의 isopropanol을 넣어 RNA를 침전시킨 후 냉장원심분리기에 넣어 침전시켰다. 침전된 RNA pellet을 70% ethanol 용액 1 ml을 넣어 염분을 제거하고 공기중에서 가볍게 말려 남아있는 ethanol 용액이 모두 제거되도록 했다. 추출된 RNA는 10 ~ 20 μl 의 DEPC-DW (Diethylpyrocarbonate-distilled water)에 녹인 후 spectrophotometer를 이용하여 농도 및 순도를 확인했다.

전체 RNA의 5 μg 을 M-MLV RT 역전사 효소(invitrogen)를 이용하여 역전사를 하였다. 반응조건으로는 RNA의 5 μg 과 1 μl 의 oligo (dT) (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 그리고 1 μl 10 mM dNTP Mix (10mM each dATP, dGTP, dCTP 그리고 dTTP) 를 DW (distilled water) 12 μl 에 용해 시킨 것을 5분 동안 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 열처리를 하였다. 그 다음 그 열처리한 sample 안에 5X First-Strand Buffer 4 μl 와 0.1 M DTT 2 μl 를 넣어주고 섞어준 다음 1 μl 의 (200 units) M-MLV RT를 넣어주고 섞어준다. 반응조건은 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 30분, 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 반응 시킨다.

반응 시켜 나온 50 ng의 RNA에 해당하는 cDNA를 주형으로 하고 COX2 유전자를

PCR (Polymerase Chain Reaction) 방법으로 증폭하였다. 반응조건은 DW (distilled water) 17.4 μl 에 10X buffer 2.5 μl , 2.5 mM dNTP 1 μl , COX2 primer 각각 1 μl (F 5'- TCC ACC AAA AGT GCT TGG CT -3', R 5'- CAT CCC CTT CTG CCT GAC AC -3'), polymerase 0.1 μl 를 섞어 반응 시켰다. 증폭 반응은 eppendorp의 mastercycler을 사용하여 실시하였으며, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 하였으며 반응이 29회 반복되도록 하였다. 각각의 반응에서 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, F 5'- ATT TGG TCG TAT TGG GCG CC -3' R 5'- CTG ATG ATC TTG AGG CTG TTG TCA TAC -3')를 대조구로 이용하였다. PCR 에서 얻은 생성물은 EtBr (Ethidium bromide) 을 포함하고 있는 1.3% 의 agarose gel에서 확인하였다.

9. Luciferase activity assay

Luciferase activity는 pRL-CMV plasmid를 포함한 renilla luciferase gene 을 이용하여 측정하였다. plasmid의 transfection 은 FuGENE 6 (Roche)시약을 이용하여 수행 하였다. GMO0637, GMO0637-APE(2×10^4)을 transfection하기 24시간 전에 12 well plate에 세포를 갈아주었다. 먼저 1.5 microcentrifuge tube에 배양액 48.5 μl 와 FuGENE 6 시약 1.5 μl 을 상온에서 5분 동안 반응 시킨 후 그 tube에 DNA를 0.5 μg 을 첨가하여 상온에서 20분 동안 반응 시켰다. 20분 후 새로운 배양액으로 교체된 세포에 넣어주고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 culture 한 뒤 4시간 후 배양액을 새것으로 교체한 후 24시간 후에 세포를 1X PBS로 씻어준 후 1X passive lysis buffer(5X PLB, Promega) 100 μl 로 세포를 상온에서 10분 동안 용해 시킨다. 용해 시킨 세포를 모아 각각 1.5 ml microcentrifuge tube 에 넣어준다. 용해시킨 세포 2 μl 와 10 μl firefly luciferase measuring buffer(promega)를 섞고 spectrophotometer를 이용하여 firefly 값을 측정한다. 또 다시 용해시킨 세포 2 μl 와 10 μl renilla luciferase measuring buffer(promega)를 섞고 renilla 값을 측정한다. Firefly 값과 renilla 값을 표준화 해서 값을 정리한다.

10. 세포용해

Western blot에 사용한 단백질은 M-PER (PIERCE) buffer를 사용하여 준비하였다. 세포의 배양액을 제거하고 1X phosphate buffered saline(PBS pH 7.4) 세척한 후 세포 용해를 위해 Protease Inhibitor (Complete mini, Roche) 를 포함한 M-PER (PIERCE) buffer 100~300 μ l 를 넣고 단백질 용액을 얻어낸다.

11. 단백질 정량

B 분리된 단백질 용액을 정량 하기 위해 bradford (Bio-Rad) 시약을 1:5의 비율로 3차증류수에 희석하여 Bradford reagent working solution을 만든다. 그리고 protein standard로 1 mg/ml BSA (bovine serum albumin, New England Biolab) 을 준비한다 (2 μ g, 4 μ g, 6 μ g, 8 μ g, 16 μ g). 1 ml Bradford reagent working solution에 BSA standard와 분리된 단백질을 각각 1 μ l씩 넣어주고 spectrophotometer를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정했다.

12. SDS-PAGE gel 전기영동

Acrylamide solution (Acrylamide, N,N'-Methylenbis acrylamide), Tris buffer, SDA, APS, TEMED) 가 포함된 10% SDS-PAGE gel에 protein marker 5 μ l와 100°C에서 5분 동안 끓인 protein sample (actin과 APE를 검출하기 위한 5 μ g, COX2의 검출을 위한 70 μ g, I κ B α 와 pI κ B α 를 검출하기 위한 30 μ g)을 냉장원심분리기에 넣어 침전시켜 loading을 하고, 1X running buffer (25 mM Tris , 192 mM glycine, 0.1% SDS)을 이용하여 전기영동을 하였다.

13. Western blotting

전기영동이 끝난 gel을 4°C에서 90 V로 약 2시간 동안 1X transfer buffer (25 mM Tris, 0.2 M glycine, 20% methanol, pH8.5) polyvinylidene difluoride(PVDF)

membrane (PALL corporation) 에 transfer하였다. Transfer가 끝난 Membrane은 5% skim milk가 들어있는 1X TBS-T buffer(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH7.4)를 사용하여 1시간 30분 동안 실온에서 blocking시킨 후 4°C에서 16시간 동안 anti-actin antibody, anti Ref-1(APE) antibody, anti-COX2 antibody, anti-I κ B α antibody, anti-pI κ B α antibody를 5% skim milk가 들어있는 1X TBS-T buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH7.4) 에 희석하여 각각 8 μ l 을 membrane위에 도포하고 4°C, rocking platform에서 16시간 정도 반응시켰다. 사용한 antibody의 종류와 희석배수는 다음과 같다 Anti-actin antibody와 anti-APE (Ref-1) antibody는 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY사의 각각 sc-1615와 sc-5572를 사용하였으며, 각각 1:2000으로 희석하였고 anti-COX2 antibody는 BD Technologies의 610203를 사용하여 1:200으로 희석하였다. anti-I κ B α antibody와 anti-pI κ B α antibody는 Cell Signaling Technology사의 9242와 9241S를 각각 사용하였고 1:2000으로 희석하였다. 반응이 끝난 antibody 용액을 제거한 후 16시간 후 1X TBS-T buffer(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH7.4) 로 5분씩 5번 씻어주고 1XPBS로 5분씩 2번 씻어준다. 2차 antibody (Jackson ImmunoResearch) 인 anti-goat antibody는 5% skim milk가 들어있는 1X TBS-T buffer(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH7.4) 1:4000으로 anti-mouse antibody는 1% skim milk가 들어있는 1X TBS-T buffer(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH7.4) 1:200으로, anti-rabbit antibody는 1% skim milk가 들어있는 1X TBS-T buffer(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH7.4) 1:2000으로 희석하여 상온에서 1시간 30분 동안 반응 시켰다. 반응하지 않은 과량의 2차 항체 용액을 제거하기 위해 1X TBS-T buffer로 5분씩 5번 씻어주고 1XPBS로 5분씩 2번 씻은 뒤 ECL(enhanced chemiluminescence) (iNtRON Biotech) solution A와 solution B를 각각 800 μ l를 사용하여 발광시켜 X-ray film으로 현상하였다.

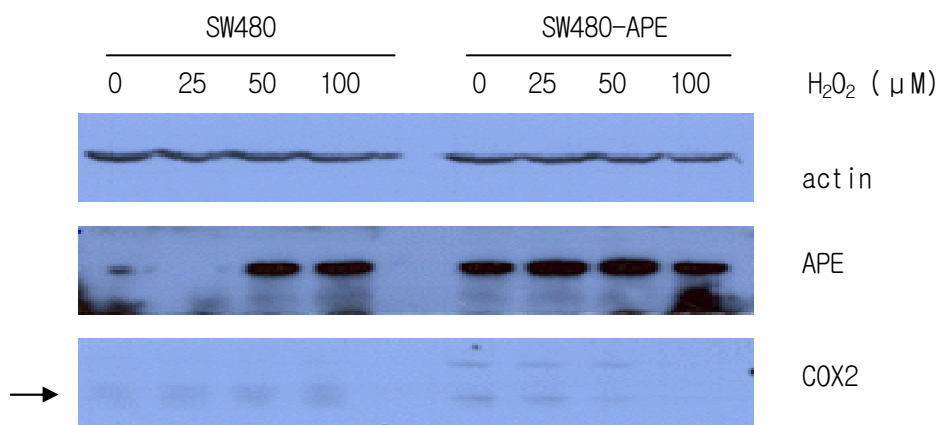
III. 결과

1. H₂O₂ 처리 후의 COX2의 발현

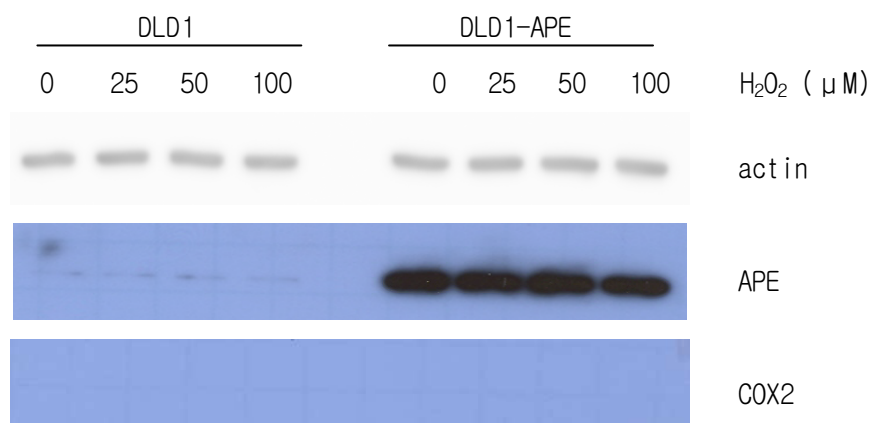
본 실험실에서는 APE가 세포내의 산화성 스트레스에 미치는 영향을 알아보기 위해 Neuro2A, DLD1, SW480 세포주에서 APE가 과발현되는 세포주 Neuro2A-APE, DLD1-APE, SW480-APE를 재료 및 방법에 기술한대로 확립하였다.

음성대조군 세포주들과 APE가 과발현되는 세포주에 H₂O₂를 처리 한 후 COX2의 단백질의 발현을 확인하기 위해 Western blot을 수행하였다. 각각 25, 50, 100 μ M의 H₂O₂를 세포에 처리하고 24시간 후에 세포를 회수하고 용해시켜 얻은 여액을 사용하여 COX2의 발현을 확인하였다. Fig. 2에서 보여지는 결과로 세포주 모두에서 COX2의 발현 유도를 하기 어려웠다.

(A)



(B)



(C)

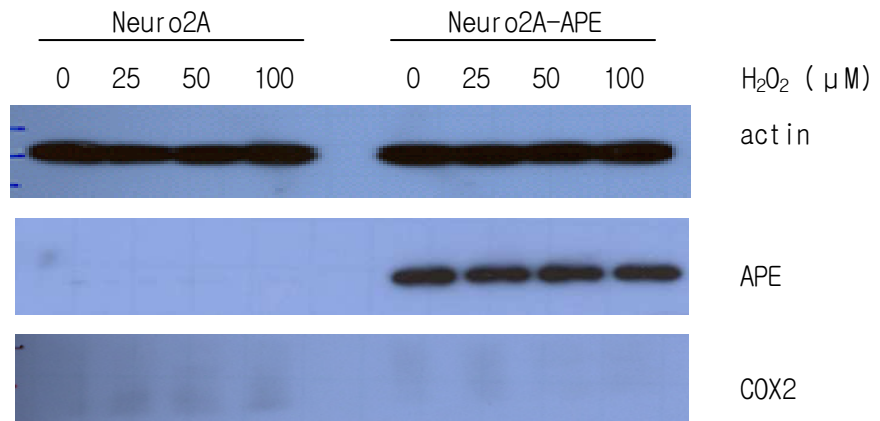


Fig.2

Fig.2 COX2 expression after treatment of H₂O₂ by Western

Cells were cultured for 48hr and then treated with H₂O₂ (0, 25, 50, 100 μM) and harvested 24h after the treatment. COX2 expression was detected by Western blot analysis using anti-COX2 antibody (BD Technologies, 610203) and HRP-conjugated anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch, 115-035-003). (A) SW480 and SW480-APE, (B) DLD1 and DLD1-APE and (C) Neuro2A and Neuro 2A-APE cells.

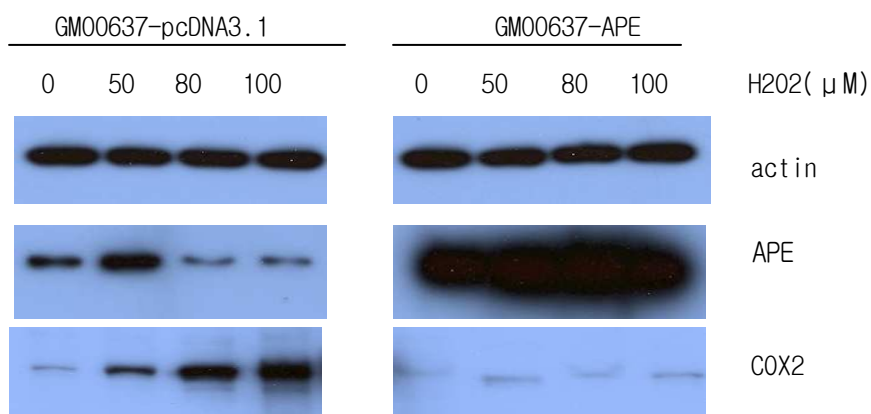
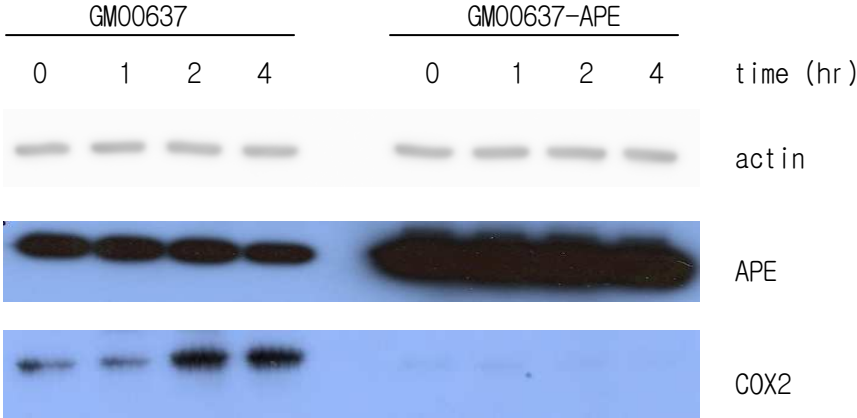


Fig. 3

Fig. 3. The expression level of COX2 protein in GM00637 cells after the treatment of H₂O₂

GM00637 cells and GM00637-APE cells were cultured for 48hr and then treated with H₂O₂ (0, 50, 80, 100 μM). Cells were harvested 24h after the treatment. COX2 expression was detected by Western blot analysis using anti-COX2 antibody (BD Technologies, 610203) and HRP-conjugated anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch, 115-035-003).

(A)



(B)

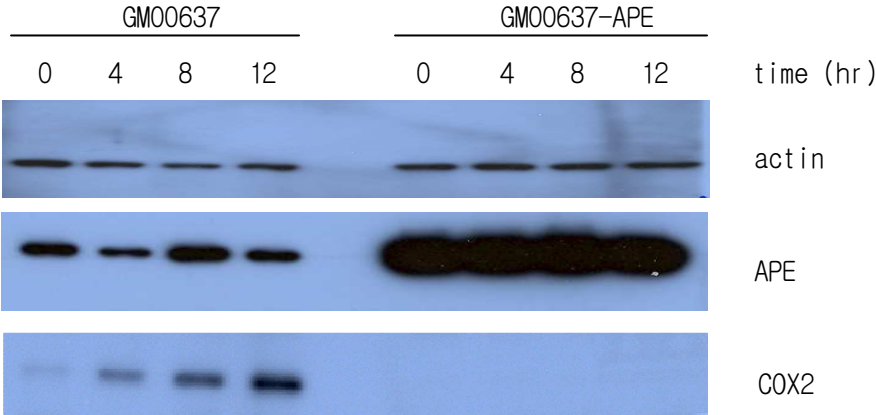


Fig. 4

Fig. 4. The expression level of COX2 protein after the treatment of H₂O₂ in time dependent manner

GM00637 cells and GM00637-APE cells were cultured for 48hr and then treated with H₂O₂ (50 μM). Cells were harvested 1, 2, 4, 8 or 12 hr after the treatment. COX2 expression was detected by Western blot analysis using anti-COX2 antibody (BD Technologies, 610203) and HRP-conjugated anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch, 115-035-003).

2 . H₂O₂ 처리 후 COX2 단백질의 발현 유도 확인

GM00637-APE 세포에 대한 음성 대조군으로는 GM00637-pcDNA3.1 세포를 사용하였으며, GM00637-APE세포주와 GM00637-pcDNA3.1 세포주는 재료 및 방법에 기술한대로 확립하였다.

GM00637-pcDNA3.1 세포와 GM00637-APE 세포에 H₂O₂를 처리 한 후 COX2의 단백질의 발현을 확인하기 위해 Western blot을 수행하였다. 각각 50, 80, 100 μ M의 H₂O₂를 세포에 처리하고 24시간 후에 세포를 회수하고 용해시켜 얻은 여액을 사용하여 COX2의 발현을 확인하였다. Fig. 3에서 보여지는 결과로 음성대조군인 GM00637-pcDNA3.1 세포주에서는 H₂O₂에 의한 COX2 유도 발현을 확인 할 수 있었지만 APE가 과발현된 GM00637-APE 세포에서는 H₂O₂에 의한 COX2 발현이 증가되지 않았다.

발현유도의 시점을 좀 더 정교하게 분석하기 위하여 50 μ M의 H₂O₂를 세포에 처리한 후 1시간부터 12 시간까지 세포의 H₂O₂에 대한 노출 시간을 조절하면서 COX2의 발현 정도를 확인하였다. 음성대조군에서는 COX2의 발현이 H₂O₂ 처리 후 2시간 후부터 증가하기 시작하여 12시간까지 그 발현 정도가 지속되지만 APE가 과발현되는 세포주에서는 COX2의 발현 정도에 변화가 없는 것으로 보였다 (Fig. 4).

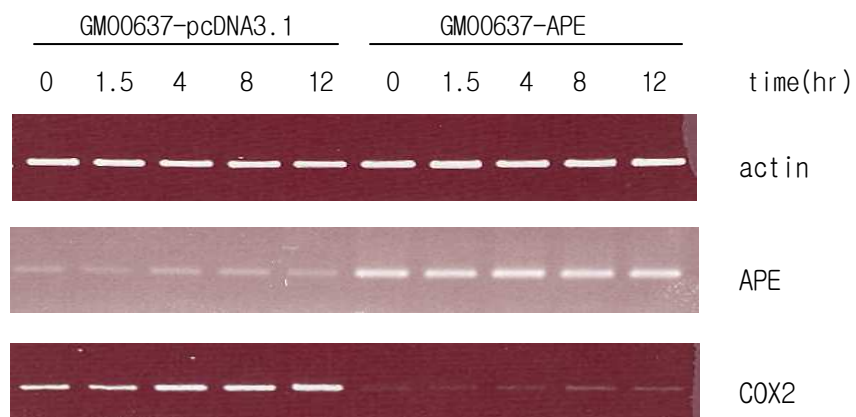


Fig. 5

Fig. 5 The expression level of COX2 mRNA in GM00637 cells after the treatment of H₂O₂

GM00637 cells and GM00637-APE cells were cultured for 48hr and then treated with H₂O₂ (50 μM). Cells were harvested 1.5, 4, 8 or 12 hr after the treatment. COX2 expression was detected by RT-PCR.

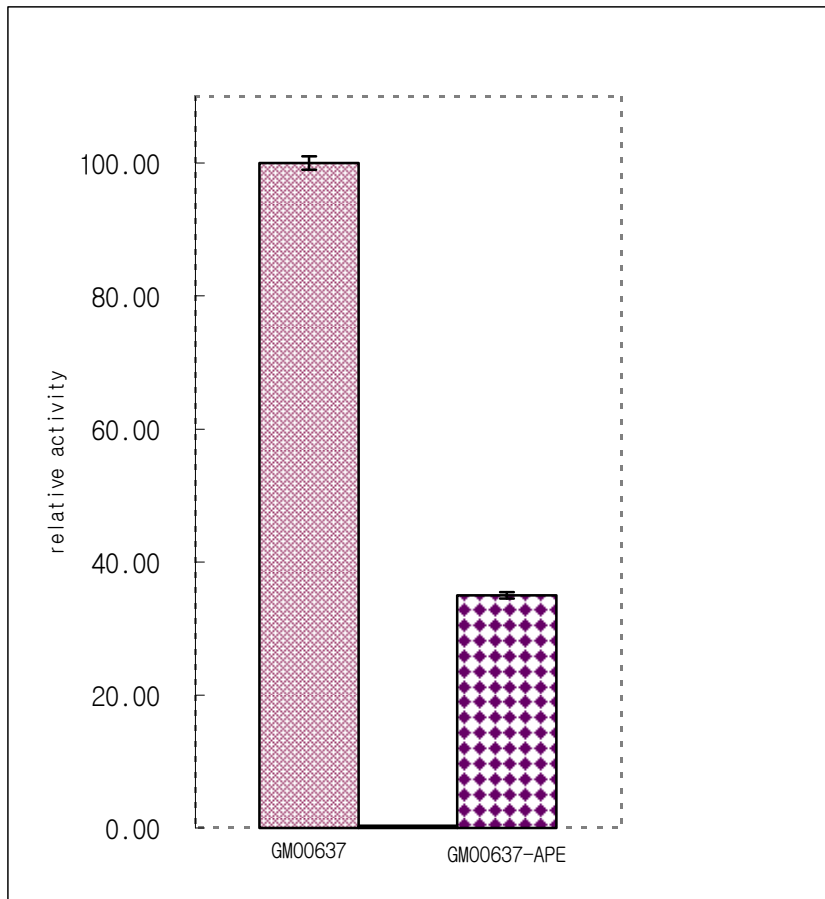


Fig. 6

Fig. 6 Luciferase activity after the treatment of H₂O₂ using COX2 promoter-containing reporter vector

GM00637 cells and GM00637-APE cells (2×10^4) were cultured for 24hr and then transfected with promoter-less reporter vector (pGL₃-basic) as a negative control and pGL₃-COX2 vector containing about 2 kb COX2 promoter region. Cells were harvested 24hr after the transfection. Luciferase activity was measured by Luciferase assay system (promega)

3. H₂O₂ 처리 후 COX2 mRNA의 발현 유도 확인

GM00637-pcDNA3.1 세포와 GM00637-APE 세포에 H₂O₂를 각각 50 μM의 농도가 되게 처리 한 후 COX2 mRNA의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. Fig. 4의 Western blot 결과와 마찬가지로 음성대조군인 GM00637-pcDNA3.1 세포주에서는 H₂O₂에 의한 COX2 mRNA의 발현을 확인 할 수 있었지만 APE가 과발현된 GM00637-APE 세포에서는 H₂O₂에 의한 COX2 mRNA의 발현이 상당히 억제되고 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

또한 APE가 과발현된 세포에서 H₂O₂를 처리하기 전의 정상상태에서도 COX2의 발현이 상당히 저해되고 있는 것으로 여겨져, COX2의 upstream 영역 2 kb 부분을 포함하는 pGL₃-COX2 벡터를 사용하여 COX2의 promoter의 활성을 확인하였다. Fig. 6의 결과에 의하면, GM00637-APE 세포에서의 COX2 promoter의 활성은 GM00637 세포에서의 활성에 비해 65%가 감소되어 있는 것으로 보였다. 이는 GM00637-APE 세포에서 COX2의 발현이 이미 상당히 억제되고 있음을 의미하는 것으로 여겨진다.

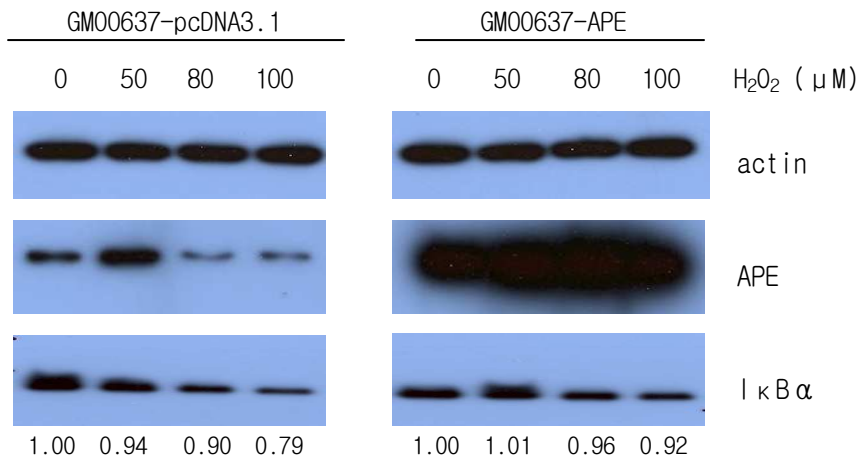
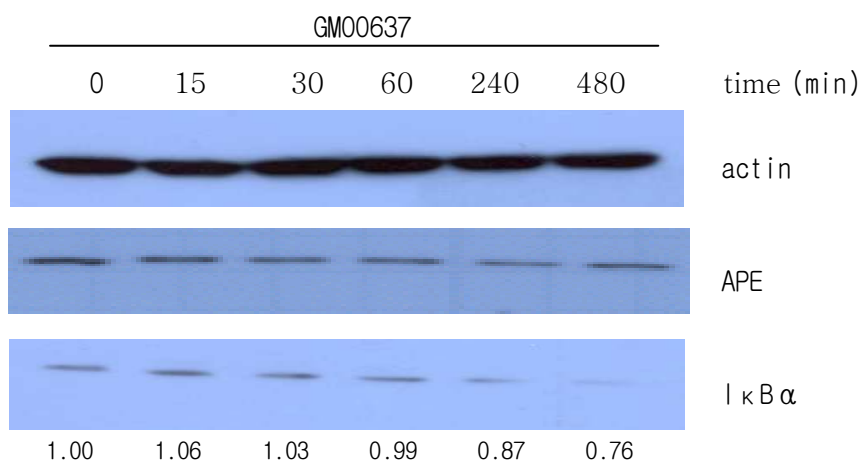


Fig.7

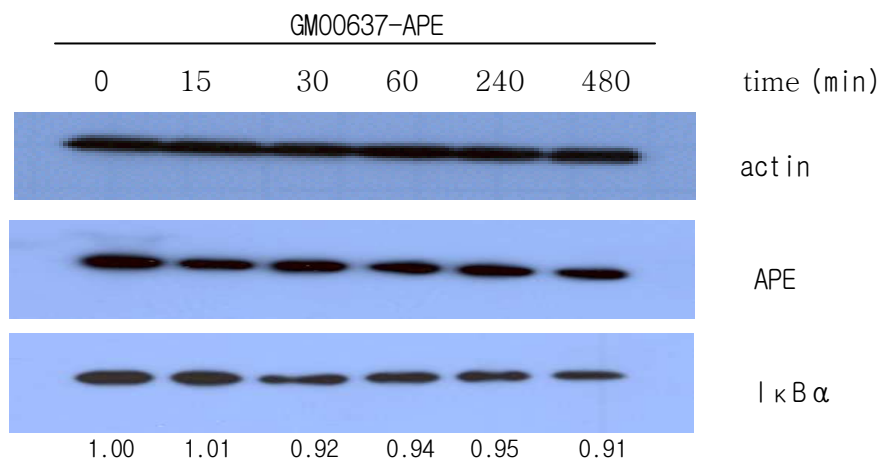
Fig. 7 The degradation of IκBα after in GM00637 cells after the treatment of H₂O₂

GM00637 cells and GM00637-APE cells were cultured for 48hr and then treated with H₂O₂ (0, 50, 80, 100 μM). Cells were harvested 24h after the treatment. COX2 expression was detected by Western blot analysis using anti-IκBα antibody (Cell Signaling Technology, 4812) and and HRP-conjugated anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch, 111-035-003).

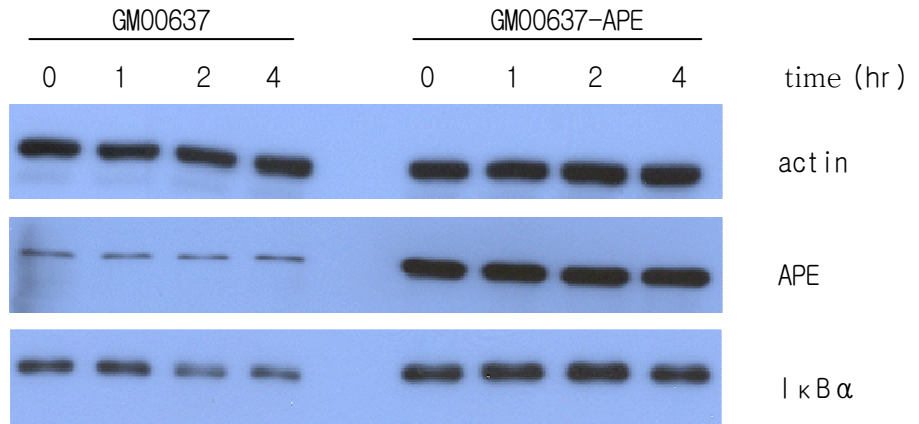
(A)



(B)



(C)



(D)

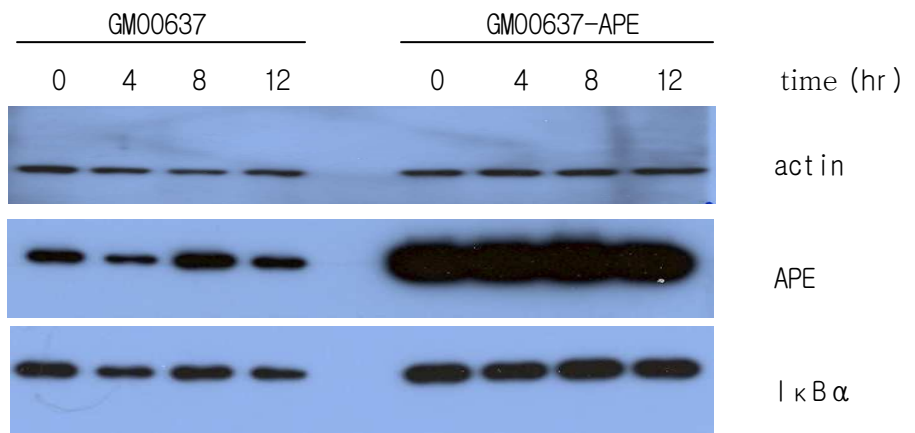


Fig. 8

Fig. 8 I κ B α degradation in GM00637 cells after the treatment of H₂O₂

GM00637 and GM00637-APE cells were cultured for 48hr and then treated with H₂O₂ to 50 μ M. I κ B α degradation was detected by Western blot analysis using anti-I κ B α antibody (Cell Signaling Technology, 4812). (A and B) Cells were harvested 15, 30, 60, 120 or 240 minutes after the treatment. (B) Cells were harvested 1, 2 or 4 hours after the treatment. (C) Cells were harvested 4, 8 or 12 hours after the treatment.

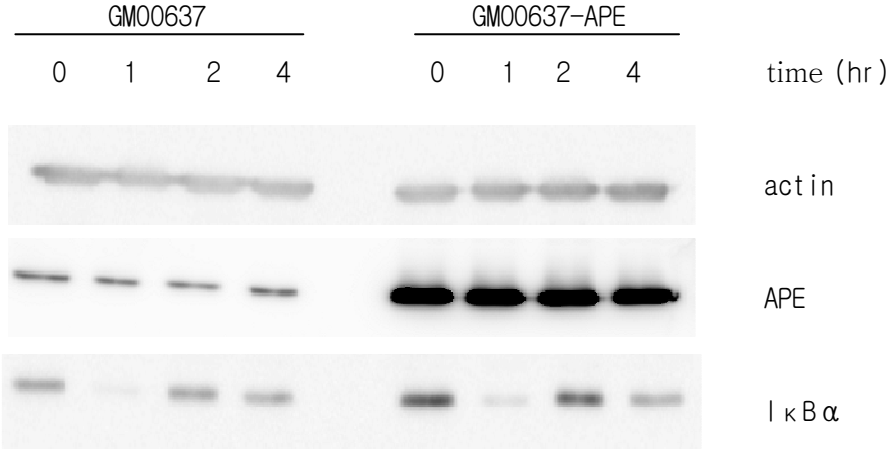
4. H₂O₂ 처리 후 IκBα degradation의 확인

세포 내에서 COX2 의 발현에 영향을 주는 전사 요소로는 Fig.1 에서 보이는 바와 같이 CRE, NF-κB, CEB 가 알려져 있으며 APE 에 의해 DNA 결합능력이 증가되는 전사 요소로는 AP-1, CREB, ATF, NF-κB, Myb, Pax-5, Pax-8, HIF-1, HLF, PEBP2, Egr-1, NF-Y, p53 가 있다고 알려져 있다 (table.1).

APE와 관련하여 관계가 있는 전사 요소 중에 산화성 스트레스에 가장 민감하게 반응하여 COX2의 발현을 조절하는 것으로 알려진 NF-κB와의 관계를 먼저 알아보기로 했다. NF-κB를 활성화시키기 위해서는 IκBα의 phosphorylation과 degradation이 선행되어야 하므로 IκBα degradation을 Western blotting으로 확인하였다. GM00637-pcDNA3.1과 GM00637-APE 세포에 각각 50, 80, 100 μM의 H₂O₂를 처리하고 24시간 후에 세포를 회수하고 용해시켜 얻은 여액을 사용하여 Western blot으로 확인하였다. Fig. 7의 결과로부터 GM00637-pcDNA3.1 세포에서는 IκBα의 degradation이 일어나는 것이 확인되었고, GM00637-APE 세포에서는 IκBα의 degradation이 일어나지 않은 것처럼 보였다.

Degradation의 시점을 좀 더 정교하게 분석하기 위하여 최종농도가 50 μM이 되게 H₂O₂를 세포에 처리한 후 1시간부터 12 시간까지 H₂O₂에 대한 노출 시간을 조절하면서 IκBα의 degradation 정도를 확인하였다. 음성대조군 (GM00637-pcDNA3.1)에서는 H₂O₂ 처리 후 2시간부터 IκBα의 degradation이 12시간까지 지속되지만 APE가 과발현되는 세포에서는 IκBα의 degradation 되는 정도가 음성대조군에 비해 상당히 미약했으며 H₂O₂에 대한 노출 시간이 길어질수록 APE가 과발현되는 세포에서는 IκBα의 degradation을 확인하기 어려웠다 (Fig. 8).

(A)



(B)

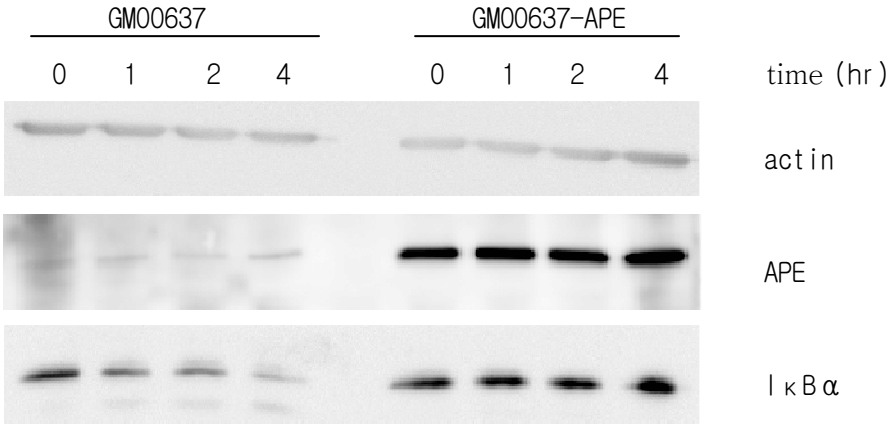


Fig.9

Fig.9 I κ B α degradation in GM00637 cells after the treatment of TNF α and CdCl₂

GM00637 cells and GM00637-APE cells were cultured for 48hr and then treated with 10 μ g of TNF α (A) or 5 μ M of CdCl₂ (B). Cells were harvested 1, 2 or 4 hours after the treatment. I κ B α degradation was detected by Western blot analysis using anti-I κ B α antibody (Cell Signaling Technology, 4812).

5. TNF α 와 CdCl₂ 처리 후 I κ B α degradation의 확인

앞의 실험에 의하면, GM00637 세포에서는 산화성 스트레스에 의해 I κ B α 가 degradation 되지만 APE가 과발현된 세포에서는 기본적인 I κ B α 의 발현양이 높기도 하지만 NF- κ B를 활성화 시킬 만큼 I κ B α 가 degradation되는 것 같지는 않았다. I κ B α 의 phosphorylation과 degradation에 의한 NF- κ B의 활성화 가능성을 알아보기 위해, TNF α 와 CdCl₂ 처리 후 I κ B α 의 degradation을 확인하였다. 음성대조군 GM00637 cells 과 APE가 과발현된 세포주 GM00637-APE cells 에 각각 TNF α (10 μ g), CdCl₂ (5 μ M)를 처리하고 1시간에서 4시간 후에 세포를 회수하고 용해시켜 얻은 여액을 사용하여 I κ B α degradation을 Western blot으로 확인하였다 (Fig. 9). TNF α 에 의한 I κ B α 의 degradation은 GM00637과 GM00637-APE 세포 모두에서 확인되었지만 (Fig. 9(A)), CdCl₂에 의한 I κ B α 의 degradation은 GM00637 세포에서만 확인되었다 (Fig. 9(B)).

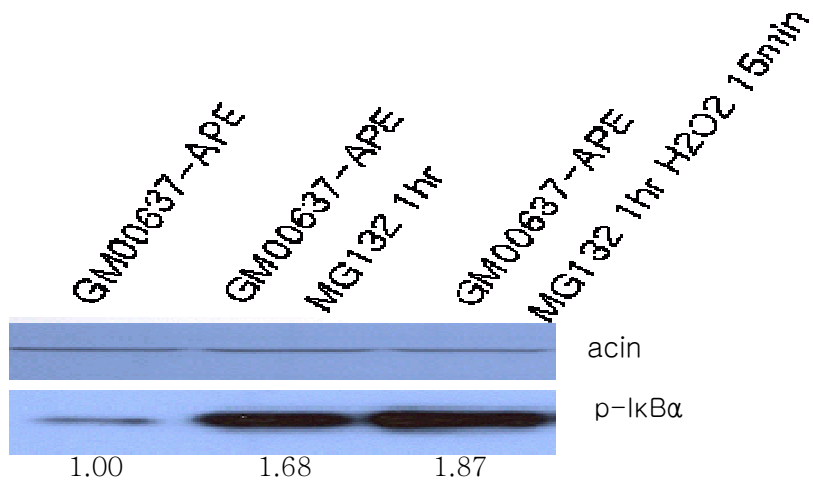


Fig.10

Fig.10 IκBα phosphorylation in GM00637-APE cells after the treatment of MG132 or H₂O₂

GM00637 cells and GM00637-APE cells were cultured for 48hr and then treated with MG132 (10 μM). H₂O₂ (50 μM) was added to the cells 1 hour after the treatment of MG132 and then harvested. IκBα degradation was detected by Western blot analysis using anti-pIκBα antibody (Cell Signaling Technology, 9241).

6. MG132 처리 후 I κ B α phosphorylation 확인

APE가 과발현된 세포주 GM00637-APE에서는 I κ B α 의 phosphorylation을 억제하는 어떤 신호가 있어 I κ B α 의 degradation가 일어나지 않았을 것이라는 추정으로 GM00637-APE cells에 proteasome inhibitor인 MG132(10 μ g)를 처리하여 I κ B의 degradation을 억제시켜 I κ B α 의 phosphorylation을 Western blotting 으로 확인해 보았다 (Fig.10). MG132 10 μ g을 APE가 과발현된 세포주 GM00637-APE에 1시간만 처리 하고 세포를 회수하여 용해 시켰다. 그리고 MG132 10 μ g을 1시간 처리한 세포에 H₂O₂ 50 μ M을 15분 동안 처리하여 세포를 회수하여 용해 시켰다. 그 결과 Fig. 11 과 같이 GM00637-APE cell에서도 I κ B α 의 phosphorylation 신호는 전달되고 있는 것을 확인 하였다. MG132 10 μ g에 H₂O₂를 15분 이상 처리한 실험을 실행하였으나 세포 내로 MG132가 영향을 주지 못해 I κ B α 의 phosphorylation이 더 이상 증가하지 않은 것으로 보여졌다. MG132의 세포내로 영향을 더 많이 주기위해 MG132의 양을 늘렸던 실험에서는 세포의 특성상 약물들에 너무 약해 회수 할 수 없을 정도로 세포들이 죽어버렸다(data not shown).

IV. 고찰

APE는 산화성 스트레스뿐만 아니라 DNA에 손상을 줄 수 있는 여러가지 스트레스에 의해 발현이 유도되는 DNA 손상 복구단백질이며 몇 가지 transcription factor의 DNA 결합능을 증가시켜 전사를 촉진하거나 저해할 수 있는 조절자로도 작용을 한다고 알려져 있다 (Cancer Res., (1998), Biochemistry., (1996)) . 본 실험실에서는 APE가 세포내의 산화성 스트레스에 미치는 영향을 알아보기위해 사람의 섬유아 세포와 신경세포, 사람의 결장암 세포에 각각 APE를 과발현 시킨 세포주를 확립하였다. 각각 세포에 산화성 스트레스를 주고 Western blotting으로 확인하던 중 음성대조군인 GM00637-pcDNA3.1 세포주에서는 H₂O₂를 처리했을 때 COX2의 발현이 유도됨을 확인 하였고, APE가 과발현 된 사람의 섬유아 세포인 GM00637-APE 세포주에서는 산화성 스트레스에 의한 COX2의 발현 유도가 되지 않음을 확인하였다. 지금까지 COX2는 외부에서 NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) 를 처리하면 COX2의 발현이 억제됨이 알려져왔다 (J. Biol. Chem (1993), J. Pharmacol. Exp. Ther (1994), Mol. Pharmacol (1994), Biochem. J (1995)). 하지만 본 실험은 외부에서 COX2의 억제제를 처리하지 않아도 APE에 의해서 COX2의 발현이 유도 되지 않는 것을 확인 하고 그 원인을 알아보았다. 발현 유도의 시점을 좀 더 정교하게 분석하기 위하여 2시간부터 12시간까지 H₂O₂를 처리하고 COX2의 발현을 본 결과 여전히 GM00637-pcDNA3.1 세포주에서는 H₂O₂를 처리했을 때 2시간부터 COX2의

발현이 유도됨을 확인 하였고. APE가 과발현 된 사람의 섬유아 세포인 GM00637-APE 세포주에서는 산화성 스트레스에 의한 COX2의 발현 유도가 되지 않음을 확인하였다. mRNA 단계에서도 GM00637-APE 세포주에서는 산화성 스트레스에 의한 COX2의 발현 유도가 되지 않았다. APE가 과발현된 세포에서 H₂O₂를 처리하기 전의 정상상태에서도 COX2의 발현이 상당히 저해되고 있는 것으로 여겨져, COX2의 upstream 영역 2 kb 부분을 포함하는 pGL₃-COX2 벡터를 사용하여 COX2의 promoter의 활성을 확인하였다. GM00637-APE 세포에서의 COX2 promoter의 활성은 GM00637 세포에서의 활성에 비해 65%가 감소되어 있는 것으로 보였다. 이는 GM00637-APE 세포에서 COX2의 발현이 이미 상당히 억제되고 있음을 의미하는 것으로 여겨진다.

APE와 COX2의 발현의 관계를 세포 내 염증반응과 발생과정에 중요한 신호전달 물질인 (Marcel Dekker Inc (1992), J Biochem Mol Biol (2002), FASEB J (1995), Am J Pathol (2001)) NF- κ B로 알아 보기로 했다. NF- κ B는 APE에 의해 DNA 결합능이 증대 한다고 알려졌으며 (Gene 145 (1994), Embo. J. 11 (1992)), TNF α 와 IL-1과 같은 염증을 일으키는 cytokine과 H₂O₂에 의해 활성화가 된다고 알려졌다 (Annu Rev Immunol (1994), EMBO J (1995), Am J Physiol (1996), Proc Natl Acad Sci U S A (1995), Biochemical Pharmacology (2000)). NF- κ B는 I κ B를 phosphorylation시키면 두 단백질은 분리되고 I κ B는 ubiquitylation되어 proteosome에서 분해된다. NF- κ B의 nuclear localization signal이 열리면 핵

안으로 들어갈 수 있게 되며 핵안으로 들어간 NF- κ B는 coactivator와 함께 target gene을 전사 시킨다고 알려졌다. (Biochemical Pharmacology 68 (2004))(Fig.11). GM00637 세포주와 GM00637-APE 세포주에 각각 1시간부터 12시간까지 H₂O₂에 대한 노출 시간을 조절하면서 I κ B α 의 degradation 정도를 확인하였다. 그 결과 GM00637 세포주에서는 I κ B α 가 degradation되는 정도가 2시간부터 12시간까지 증가하는 것을 확인하였다. 하지만 GM00637-APE 세포주에서는 H₂O₂처리전의 I κ B α 발현 양도 상당히 높아 I κ B α 의 degradation을 확인하기 어려웠다. NF- κ B를 활성화 시킬 수 있는 또 다른 약물 반응에서의 I κ B α 의 Degradation되는 정도를 확인해 보기로 하였다. 먼저 TNF α 를 10 μ g처리한 것은 GM00637 세포와 GM00637-APE 세포주 모두 I κ B α 가 degradation되었다. 반면에 CdCl₂를 처리한 것은 GM00637 세포는 I κ B α 가 degradation 되었고, GM00637-APE 세포주는 I κ B α 가 degradation이 일어나지 않았다. 또한 흥미롭게도 산화성 스트레스 전 정상 상태의 I κ B α 가 GM00637 세포주에서보다 GM00637-APE 세포주에서 더 많이 존재하는 것으로 보였다.

APE가 과발현된 세포주 GM00637-APE에서는 I κ B α 의 phosphylation을 억제하는 어떤 신호가 있어 I κ B α 의 degradation가 일어나지 않았을 것이라는 추정으로 GM00637-APE 세포주에 proteasome inhibitor인 MG132 (Neurosci. Lett., (1990), Cell., (1995), J. Biol. Chem., (1996))를 처리하여 보았다. proteasome inhibitor는 그 결과 GM00637-APE 세포주에서도 I κ B α 의 phosphylation 신호는

전달 되고 있는 것을 확인 하였다. MG132 10 μ g에 H2O2를 15분 이상 처리한 실험을 실행 하였으나 세포 내로 MG132가 영향을 주지 못해 I κ B α 의 phosphorylation이 더 이상 증가하지 않은 것으로 보여졌다. 세포 내로 MG132가 영향을 주지 못해 I κ B α 의 phosphorylation이 더 이상 증가하지 않은 것으로 보여졌다. MG132의 세포내로 영향을 더 많이 주기위해 MG132의 양을 늘렸던 실험에서는 세포의 특성상 약물들에 너무 약해 회수 할 수 없을 정도로 세포들이 죽어버렸다.

이상의 결과로 미루어보아, GM00637-APE 세포에서는 I κ B α 의 발현양이 증가되어 있으며, 산화성 스트레스에 의한 I κ B α 의 phosphorylation과 degradation이 일어나긴 하지만 I κ B α 의 발현양이 높아 degradation되는 정도가 상대적으로 미약하고 이로인해 정상상태의 COX2 promoter activity도 낮을 뿐 아니라, 산화성 스트레스에 의한 COX2 발현 유도에도 영향을 미쳤던 것으로 여겨진다.

앞으로 NF- κ B가 아닌 다른 전사 요소에 의해서도 COX2 발현 유도가 되는지 알아보고 APE에 의해 정말 COX2의 발현유도가 된다면 APE가 없으면 COX2 발현유도와 I κ B α 의 degradation 어떻게 되는지에 대한 실험을 수행하여야한다. 또한 다른 세포들에서도 산화성 스트레스에 의해 COX2 발현유도와 I κ B α 의 degradation에 대한 실험도 수행하여야 한다.

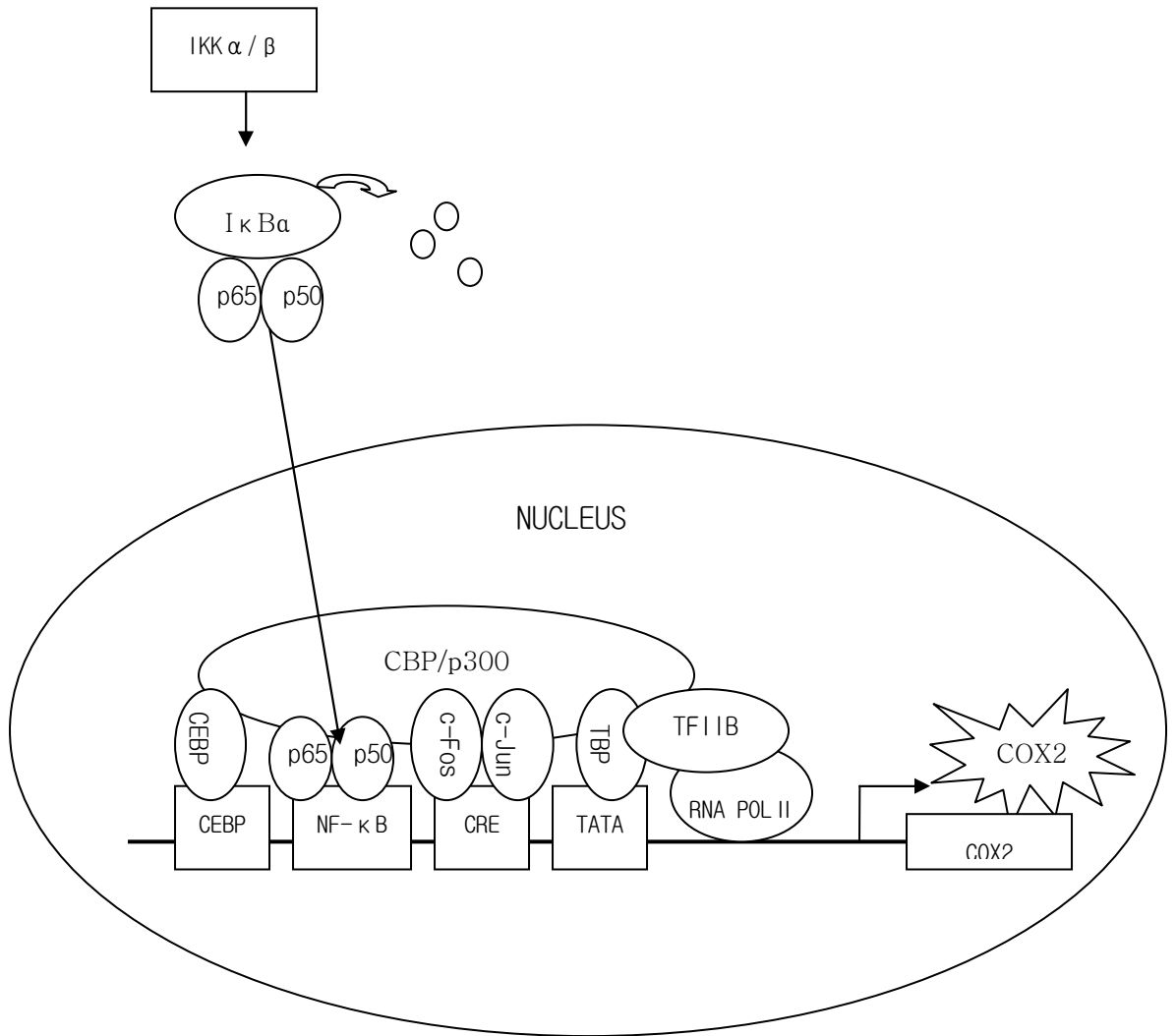


Fig. 11

Fig. 11. Intracellular signaling of NF-κB pathways mediating COX-2 induction

A growing body of evidence indicates that NF-κB plays a central role in general inflammatory as well as immune responses. The promoter region of COX-2 contains two putative NF-κB binding sites. Thus, NF-κB has been shown to be a positive regulator of COX-2 expression. NF-κB is activated in response to a wide variety of stimuli that promote the dissociation of IκBα through phosphorylation followed by ubiquitination, and degradation.

V. 참고문헌

- Aggarwal BB, Vilcek J. New York: Marcel Dekker Inc., (1992).
- B. Christy, D. Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., (1989) 8737-8741.
- B. Demple, L. Annu. Rev. Biochem., (1994) 915-948.
- B. Demple, T. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., (1991) 11450-11454.
- Baeuerle PA and Henkel T, Annu Rev Immunol., (1994) 12:141-179.
- Biochemical Pharmacology, Vol. 59, pp., (2000) 13-23
- Chen F, Castranova V, Shi X. Am J Pathol., (2001) 159:387-97.
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. FASEB J., (1995);9:899-909.
- D. Lando, I. Pongratz, L. Poellinger, M.L. Whitelaw, J.Biol. Chem., (2000) 4618-4627.
- D.A. Diamond, A. Parsian, C.R. Hunt, S. Lofgren, D.R. Spitz, P.C. Goswami, D. Gius, J. Biol. Chem., (1999) 16959-16964.
- D.S. Chen, C. Law, P. Keng, Radiat. Res., (1993) 405-410.
- D.S. Chen, T. Herman, B. Demple, Nucleic Acids Res., (1991) 5907-5914.
- D.S. Chen, Z.L. Olkowski, Ann. NY Acad. Sci., (1994) 306-308.
- D' Acquistio F, Iuvone T, Rombola L, Sautebin L, Di Rosa M, Carnuccio R. FEBS Lett., (1997) 418:175-8.

Dannenberg AJ. Cyclo-oxygenase 2: *Lancet Oncol.*, (2001) 2:544-51.

E. Babiychuk, S. Kushnir, M. Van Montagu, D. Inze. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91., (1994) 3299-3303.

Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chanmugam P, Soyoola E, et al. *Arch Biochem Biophys.*, (1993) 307:361-8.

G. Barzilay, C.D. Mol, C.N. Robson, L.J. Walker, R.P. *Nat. Struct. Biol.*, (1995) 561-568.

G. Barzilay, I.D. Hickson, *Bioessays.*, (1995) 713-719.

G. Barzilay, L.J. Walker, C.N. Robson, I.D. Hickson, *Nucleic Acids Res.*, (1995) 1544-1550.

Gierse, J. K., Hauser, S. D., Creely, D. P., Koboldt, C., Rangwala, S. H., Isakson, P. C. & Seibert, K. *Biochem. J.*, (1995) 305,479-484.

J. Robbins, S.M. Dilworth, R.A. Laskey, C. Dingwall, *Cell.*, (1991) 615-623.

J.R. Duguid, J.N. Eble, T.M. Wilson, M.R. Kelley, *Cancer Res.*, (1995)

Janssen YM, Barchowsky A, *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, (1995) 92: 8458-8462.

K. Akiyama, S. Seki, T. Oshida, M.C. Yoshida, *Biophys. Acta.*, (1994) 15-25.

K. Mitomo, K. Nakayama, K. Fujimoto, X. Sun, S. Seki, K. Yamamoto, *Gene.*, (1994) 197-203.

K.S. Yao, S. Xanthoudakis, T. Curran, P.J. O' Dwyer, *Mol. Cell. Biol.*,

(1994) 5997-6003.

Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, et al. *Eur J Biochem.*, (1994) 221:889-97.

L. Harrison, G. Ascione, J.C. Menninger, D.C. Ward, B. Hum. *Mol. Genet.*, (1992) 677-680.

L.E. Huang, Z. Arany, D.M. Livingston, H.F. Bunn, *J. Biol.Chem.*, (1996) 32253-32259.

Laneville, O., Breuer, D. K., Dewitt, D. L., Hla, T., Funk, C. D. & Smith, W. L. *J. Pharmacol. Exp.*, (1994) 271: 927-934.

M. Edwards, D.K. Rassin, T. Izumi, S. Mitra, J.R. Perez-Polo, *J. Neurosci. Res.*, (1998) 635-638.

M. Edwards, T.A. Kent, H.C. Rea, J. Wei, M. Quast, T. Izumi, S. Mitra, J.R. Perez-Polo, *Neuroreport.*, (1998) 4015-4018.

M. Ema, K. Hirota, J. Mimura, H. Abe, J. Yodoi, K. Sogawa, L. Poellinger, Y. *Embo. J.*, (1999) 1905-1914.

M. Ema, K. Hirota, J. Mimura, H. Abe, J. Yodoi, K. Sogawa, L. Poellinger, Y. Fujii-Kuriyama, *Embo. J.*, (1999) 1905-1914

M.A. Chaudhry, M. Weinfeld, *Nucleic Acids Res.*, (1995) 3805-3809.

M.A. Gorman, S. Morera, D.G. Rothwell, E. de La Fortelle, C.D. *Mol, J.A.*

- Tainer, I.D. Hickson, P.S. Freemont, *Embo. J.*, (1997) 6548-6558.
- Meade, E. A., Smith, W. L. & DeWitt, D. L. *J. Biol. Chem.*, (1993) 6610-6614.
- Mol. Pharmacol.*, (1994) 45:245-254.
- O' Neill, G. P., Mancini, J. A., Kargman, S., Yergey, J., Kwan, M.
- P. Carrero, K. Okamoto, P. Coumilleau, S. O' Brien, H. Tanaka, L.
- Poellinger, *Biol.*, (2000) 402-415.
- P.D. Boucher, M.P. Piechocki, R.N. Hines, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 5144-5155
- P.W. Doetsch, R.P. Cunningham, *Mutat. Res.*, (1990) 173-201.
- Pahl HL and Baeuerle PA, *EMBO J.*, (1995) 14:2580-2588.
- R.A. Bennett, D.M. Wilson III, D. Wong, B. Demple, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (1997) 7166-7169.
- R.P. Huang, E.D. Adamson, *DNA Cell Biol.*, (1993) 265-273.
- S. Grosssch, G. Fritz, B. Kaina, *Cancer Res.*, (1998) 4410-4416.
- S. Kakolyris, L. Kaklamanis, A. Giatromanolaki, M. Koukourakis, I.D. Hickson,
- G. Barzilay, H. Turley, R.D. Leek, P. Kanavaros, V. Georgoulas, K.C.
- Gatter, A.L.S. Seki, M. Hatsushika, S. Watanabe, K. Akiyama, K. Nagao, K.
- Tsutsui, *Biochim. Biophys. Acta.*, (1992) 287-299.
- S. Xanthoudakis, G. Miao, F. Wang, Y.C. Pan, T. Curran, *Embo. J.*, (1992)

3323-3335.

S. Xanthoudakis, G.G. Miao, T. Curran, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,

(1994) 23-27.

S. Xanthoudakis, T. Curran, Embo. J., (1992) 653-665.

Shao J. J Biol Chem., (2000) 275:33951-6.

Shen Y, Rattan V, Sultana C and Kalra VK, Am J Physiol., (1996) 270:H1624-

H1633.

Shishodia S, Aggarwal BB. J Biochem Mol Biol., (2002) 35:28-40.

T. Asai, F. Kambe, T. Kikumori, H. Seo. Biochem. Biophys. Res. Commun.,

(1997) 71-74.

T. Izumi, S. Mitra, Carcinogenesis., (1998) 525-527.

T. Izumi, W.D. Henner, S. Mitra, Biochemistry., (1996) 14679-14683.

U. Chung, T. Igarashi, T. Nishishita, H. Iwanari, A. Iwamatsu. Suwa, T.

Mimori, K. Hata, S. Ebisu, E. Ogata, T. Fujita, T. Okazaki, J. Biol.

Chem., (1996) 8593-8598.

Y. Akamatsu, T. Ohno, K. Hirota, H. Kagoshima, J. Yodoi, K. Shigesada, J.

Biol. Chem., (1997) 14497-14500.

저작물 이용 허락서

학 과	생물신소재학과	학 번	20057254	과 정	석 사
성 명	한글 : 이 민 영 한문 : 李 民 英 영문 : Lee Min Young				
주 소	광주광역시 서구 금호동 무지개아파트 103동 701호				
연락처	E-MAIL : minyoung0209@hanmail.net				
논문제목	<p>한글: apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE)가 과발현되는 인간 유래의 fibroblast 세포주에서 산화성 스트레스에 의한 cyclooxygenase (COX) 2 그 발현 유도에 관한 연구</p> <p>영문: The inhibition of cyclooxygenase (COX) 2 by H₂O₂-oxidative stress in apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE) human fibroblast GM00637 cell line.</p>				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

2006년 12 월 일

저작자: 이 민 영(서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하