본 연구는 대학부설연구소 연구비의 지원을 받아 수행되었음.
이 논문은 1999년 5월 12일 접수하여 1999년 6월 9일 채택되었음
책임 저자 : 김재철, 경북대학교병원 치료방사선과
Tel:053)420-5352, Fax:053)420-5350

HL60 세포주의 분화 시 감소 특성을 보이는 Glutathione S-Transferase의 클로닝

경북대학교 의과대학 치료방사선과학교실*, 내과학교실†, 면역학교실‡
김재철* · 박인규* · 이규보†· 손상균†· 김문규‡· 김정철‡

목 적: HL60 세포주에서 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate) 및 DMSO(dimethylsulfoxide)에 의해 분화가 유도될 때 감소되는 특성을 보이는 K872 클론에 대한 염기 서열, 조직 분포, 단백 분리 등을 시행하였다.

재료 및 방법: QlA plasmid extraction kit(Qiagen GmbH, Germany)를 이용하여 사람의 모유두 세포 pBluescript phagermid cDNA library로부터 K872 클론을 추출하였다. Sanger's dideoxy nucleotide chain-termination method을 이용하여, 추출한 K872 클론의 염기 서열을 분석하였다. BLAST(Basic Local Alignment Search Tools) 프로그램으로 유전자은행의 염기 서열과의 상동성을 검색하였다. K872 클론으로 만든 probe로 다양한 인간 조직 및 암세포주로부터 분리한 RNA에 대하여 northern blot을 시행하였다. His-Patch Thifusion expression system을 이용하여 대장균 배지에 0.1mM IPTG (isopropyl-β-thiogalactopyranoside)를 첨가해서 결합단백의 유전자 발현을 유도하였다. 결합단백이 함유된 용출액을 SDS-PAGE에 걸어서 발현된 단백을 확인하였다.

결 과: K872 클론은 675개의 코딩 영역과 280개의 코딩과 관련없는 영역으로 구성된 1006개의 염기로 구성됨을 관찰하였다. 해독틀로 추정되는 부분은 시작 코돈을 포함하여 226개의 아미노산을 형성하고 단백 산물의 분자량은 25,560 Da으로 추정되었다. 추정 아미노산 배열은 쥐의 glutathione S-trasferase kappa 1(rGSTK1)의 아미노산 배열과 70%의 상동성을 보였다. Northern blot에 따른 발현 양상은 심장, 수의근, 말초혈액 백혈구 등의 조직에서 높은 발현을 보였으며 방사선 내성과 관련지어 볼 때 대장암 및 흑색종 세포주에서 발현이 높았던 점은 특기할 만하였다.

결 론: 상동성 검색 결과 K872 유전자는 항암제 및 방사선 내성과 관련이 있는 rGSTK1에 대한 사람의 상동유전자로 사료되며 향후 이와 관련한 기능 분석이 필요할 것으로 사료된다.

핵심용어: Glutathione S-Transferase, 방사선내성, HL60 세포주

서 론

Glutathione S-transferase(GST)는 glutathinone이 다양한 세포독성 물질과 결합하는 반응에서 촉매역할을 하며 다양한 세포분획에서 발견된다.[1] 여러 가지 독성 물질 중에 악성 종양의 치료와 관련하여 항암제에 대한 내성의 발현과 glutathione 및 GST가 관련이 있다는 보고가 많이 있다.[2~7] Glutathione 및 GST가 방사선 내성에 관여하는 지 그 여부에 대해서는 현재까지 어느 정도 개연성이 있을 것으로 추측되나 아직까지 그 명확한 기전이 밝혀져 있지 않다.[8~12] 또한 GST는 일부 암세포에서 그 발현이 높은 것으로 보고되고 있으며 비록 그 기전이 명확하게 밝혀지지 않았지만 항암제나 방사선 치료에 대한 효과 및 치료 결과에 따른 예후와 밀접한 관련이 있다는 보고도 있다.[13~15] 따라서 방사선 감수성 또는 내성과 관련하여 GST에 대한 기능 연구의 필요성이 대두되고 있다.

세포질 내에 있는 사람과 주의 가용성 GST는 이중체 단백으로 구성된 유전자군을 구성하는데 아미노산 배열의 상동성에 따라 α,μ,π,θ,σ 등 5개의 군으로 분류된다. 최근에 Pemble 등[16] 은 세포질 내에 있는 α,μ,π,θ,σ 등과 확연히 구분되는 특성을 가진 GST를 쥐에서 클로닝하여 kappa 군으로 구분하고 rGSTK1으로 명명하였다.

사람의 골수백혈병 세포주인 HL60는 유도 물질에 따라 과립세포 혹은 대식세포 계열로 분화되는 특성을 갖고 있다. 즉 HL60 세포주를 PMA(phorbol 12-myrisate 13-acetate)로 처리하면 과립세포 계열로 분화하고, DMSO(dimethylsulfoxide)로 처리하면 대식세포 계열로 분화된다.[17] 저자들은 HL60 세포주에서 PMA 및 DMSO에 의해 분화가

유도될 때 각각 그 발현이 감소되는 특성을 보이는 K872 클론을 확인하였다. 상동성 검색 결과 그 염기서열이 rGSTK1과 유사함을 발견하고 분자생물학적 분석을 목적으로 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. HL60 세포주의 분화 및 K872 클론

HL60 세포주 10^6/ml의 PMA를 첨가하고 48 시간동안, 그리고 1.3% DMSO를 첨가하여 72시간동안 배양하여 HL60세포주의 분화를 유도하였다. 분화된 HL60 세포주의 RNA로부터 역전사 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA로 probe를 만들어 사람의 모유두 세포 cDNA의 클론을 dot blot한 membrane에 hybridization 시킨 결과 PMA 및 DMSO에 의해 분화가 유도될 때 각각 그 발현이 감소되는 특성을 보이는 K872 클론을 확인하였다. (Fig. 1).

2. K872 유전자의 추출

QIA plasmid extraction kit(Qiagen GmbH, Germany)을 이용하여 사람의 모유두 세포 pBluescript phagemid cDNA library로부터 K872 클론을 추출하였다. Sanger's dideoxy nucleotide chain-termination method[18])를 이용하여, 추출한 K872 클론의 염기서열을 분석하였다. BLAST(Basic Local Alignment Search Tools) 프로그램[19])으로 유전자은행의 염기서열과의 상동성을 검색하였다.

3. Nothern blot 분석

K872 클론으로 만든 probe로 다양한 인간 조직 및 암세포주로부터 분리한 2ug의 RNA에 대하여 northern blot을 시행하였다. Blot은 68°C ExpressHyb hybridization solution(Clontech U.S.A.)에서 1시간동안 결합시킨 후 상온에서 40분동안 2 X SSC/0.05% SDS로 세척하고 다시 40분동안 50 °C 0.1 X SSC/0.1% SDS로 세척하였다.

4. 결합단백의 합성 및 추출

먼저 pBluescript의 EcoRI-XhoI 분획을 pGEX-4T-3(Pharmacia, Uppsala, Sweden)의 EcoRI과 XhoI 부위에 서브클로닝 하였다. 다음 pGEX-4T-3의 EcoRI-XhoI 분획을 His-Patch Thifusion expression system(Invitrogen, U. S. A.)의 벡터인 pThioHisA의 EcoRI와 NotI 부위에 서브클로닝하였다. 대장균 배지에 0.1mM isopropyl-β-thiogalactopyransoside(IPTG)를 첨가해서 2시간동안 배양하여 결합단백의 유전자 발현을 유도하였다. 배양된 대장균을 원심분리하여 모은 후 1XPBS solution(1.9mM sodium phosphate, monobasic, 8.1mM sodium phosphate, dibasic, 154mM sodium chloride, pH 7.3)에 다시 현탁액으로 만들었다. Sonicated cell lysate를 Triton X-100과 30분동안 혼합하여 1% 용액으로 만들고 4°C에서 10분간 원심분리하였다. HP-Thioredoxin/K872 결합단백이 함유된 상청액을 1XPBS로 미리 평형을 맞춘 glutathione-sepharose 4B column에 통과시킨 후 glutathione elution buffer(10mM glutathione in 50mM Tris, pH 8.0)로 녹여내었다. 결합단백이 함유된 용출액을 12% SDS-PAGE에 걸어서 단백을 확인하였다.

5. HL60 세포주의 분화 시 K872 발현 분석

Modified guanidium thiocyanate/phenol/chloroform method(Molecular Research Center Inc., Montgomery RD, USA)를 이용하여 HL60 세포주로부터 2ug의 RNA를 분리하였다.

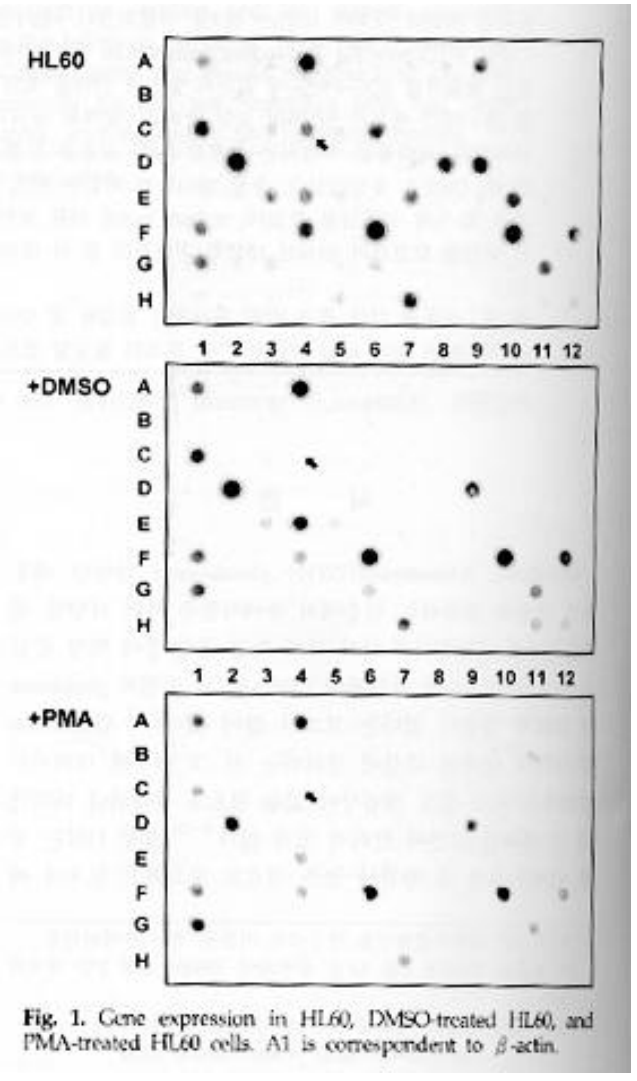

Fig. 1. Gene expression in HL60, DMSO-treated HL60, and PMA-treated HL60 cells. A1 is correspondent to β-actin.

K872클론으로 만든 probe로 HL60 세포주로부터 분리한 RNA에 대하여 northern blot을 시행하였다.

결 과

1. K872 클론의 염기서열

K872 클론은 1006개의 염기로 구성되는데, 675개의 염기로 구성된 코딩 부분과 280개의 염기로 구성된 코딩과 관련없는 부분이 관찰되었다. 3' 단의 17개 아테노신 residue는 poly(A) tail의 기시부위로 추정되고 consensus polyadenylation signal(AAATAAA) 은 958번째 염기에서 관찰되었다. (Fig. 2). 염기서열로부터 추정한 아미노산의 수는 시작 codon인 methionine을 포함하여 226개였으며 그에 따른 단백의 분자량은 25,560 Da으로 추정되었다. K872 클론의 해독클로부터 추정된 아미노산 서열은 rGSTK1의 아미노산 서열과 70%의 상동성을 나타내었다. (Fig. 3.).

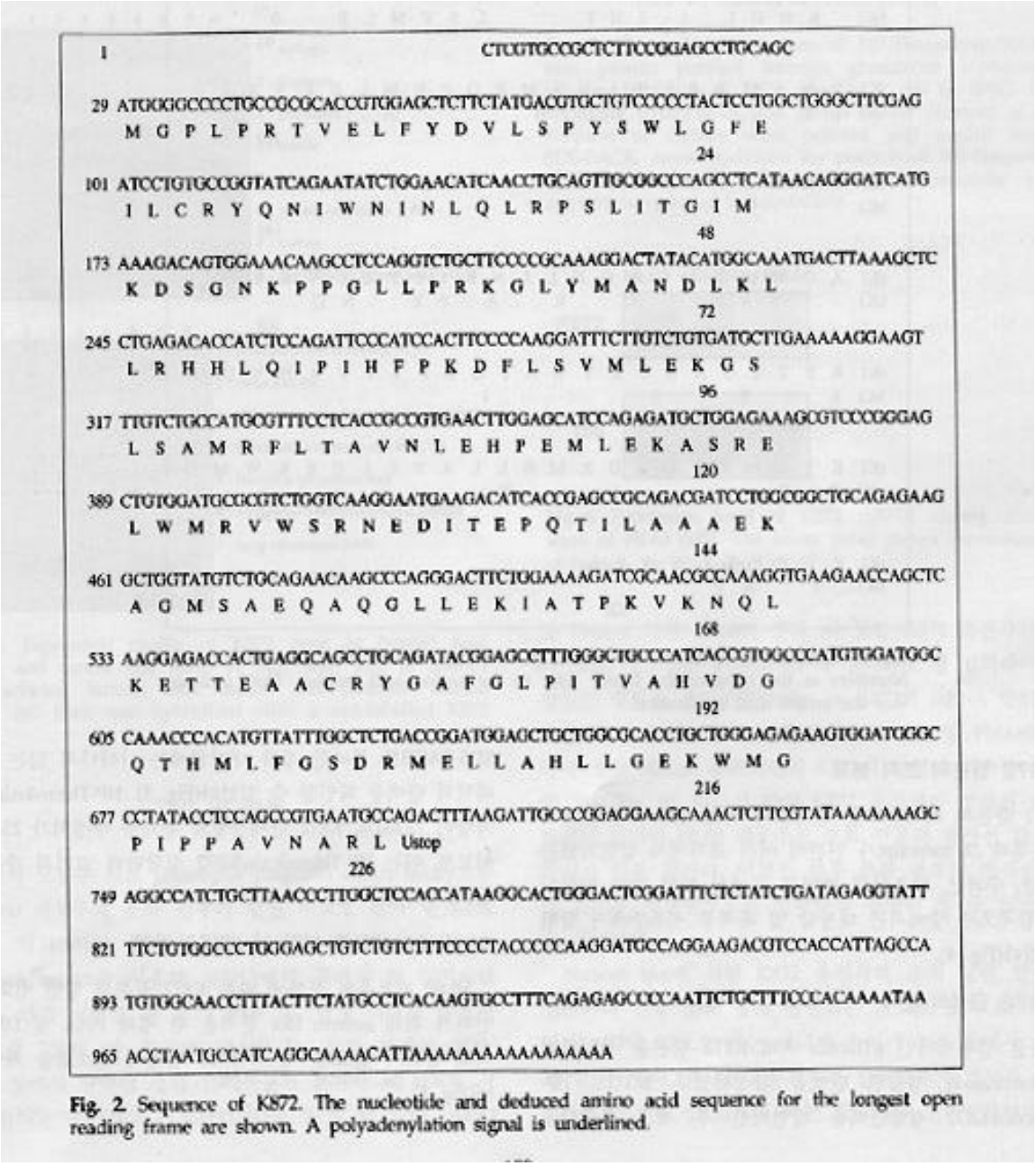

Fig. 2. Sequence of K872. The nucleotide and deduced amino acid sequence for the longest open reading frame are shown. A polyadenylation signal is underlined.

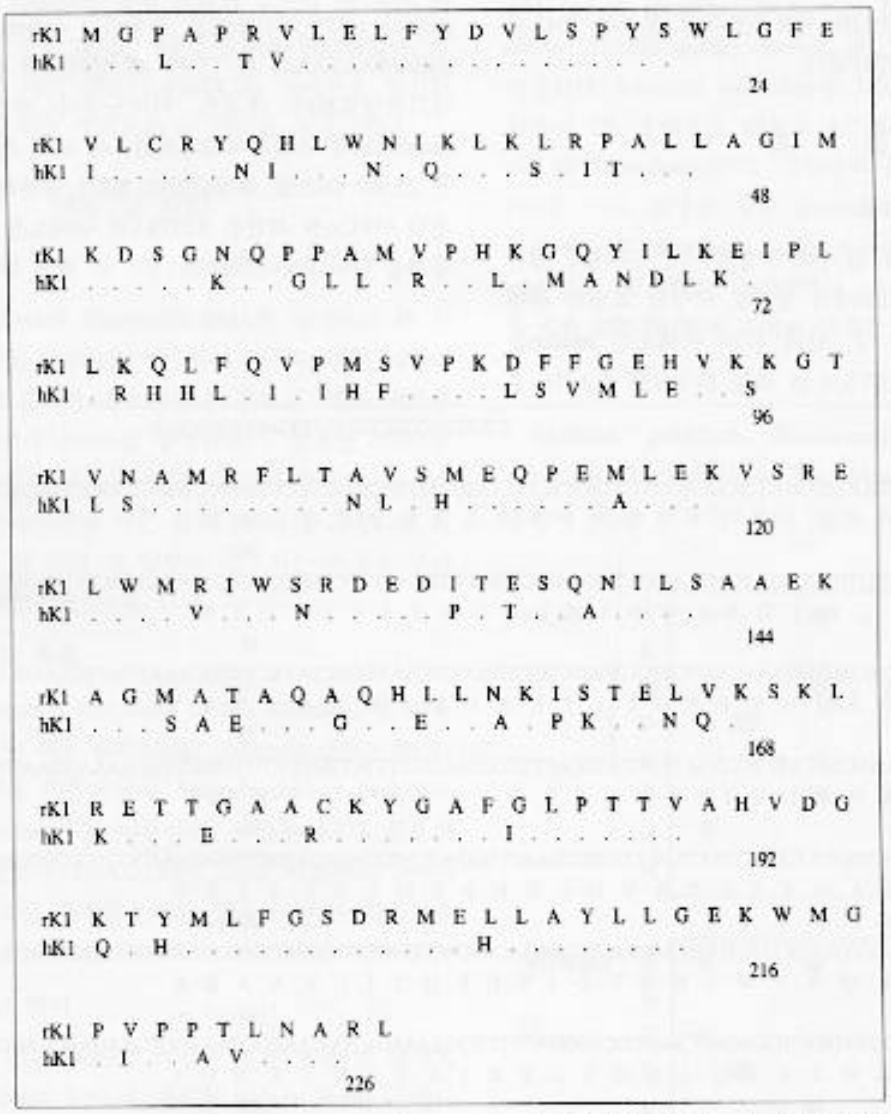

Fig. 3. Comparison of the amino acid sequences for rGSTK1 (rK1) and K872 (hK1). Numbers at the right of the figure refer to the amino acid residue. Dots indicate that the amino acid is identical.

2. K872 클론의 조직 분포

K872 클론의 조직분포를 알아보기 위해 northern blot 분석을 한 결과 그 transcript가 인간의 여러 조직에서 발현되었는데 심장, 수의근, 말초혈액 백혈구 등에서 특히 많이 발현되었다. 암세포주 중에서는 대장암 및 흑색종 세포주에서 발현이 높았다. (Fig.4).

3. K872 단백의 분리

대장균 발현벡터인 pThioHis A에 K872 클론을 삽입하여 HP-Thioredoxin와 결합한 단백을 합성하였다. IPTG로 HP-Thioredoxin/K872 결합단백을 발현시킨 후 세포 용출액을 SDS-PAGE로 분리한 결과 대장균에는 나타나지 않는 40kDa대역의 단백을 확인할 수 있었다.(Fig. 5.).

HP-Thioredoxin의 분자량이 12.8kDa, K872 단백산물의 분자량 추정치가 25.6 kDa이므로 이는 HP-Thioredoxin/K872 결합단백 크기의 추정치와 잘 일치하였다.

4. HL60 세포주 분화 시 K872 발현

HL60 세포주의 분화에 따른 K872 클론의 발현 변화를 확인하기 위해 northern blot 분석을 한 결과 PMA 및 DMSO에 의해 분화가 유도될 때 각각 그 발현이 감소함을 확인하였다. (Fig. 6.).

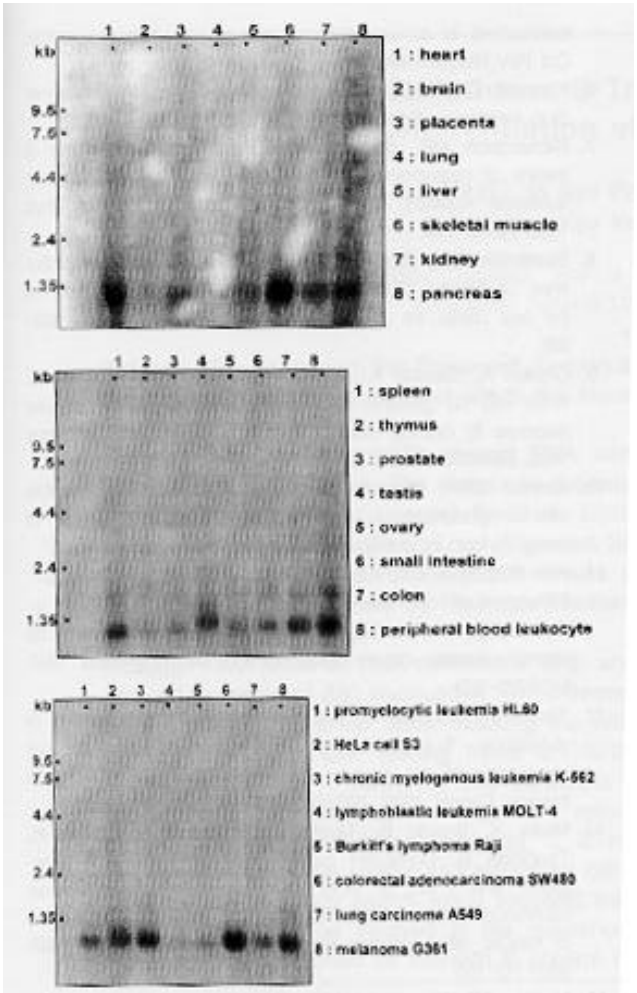

Fig. 4. Expression profile of K872 gene in human fetal tissues and cancer cell lines. A blot with 2ug of mRNA from selected human fetal tissues and different human cancer cell lines was hybridized with a radolabelled K872 cDNA

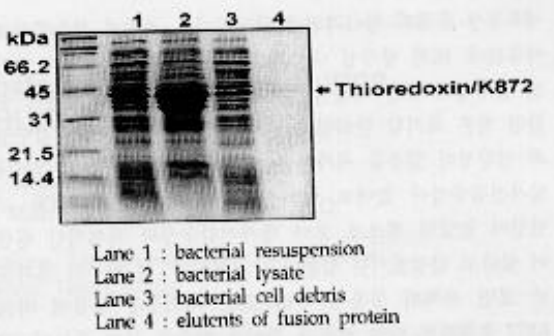

Fig. 5. Electrophoretic pattern of HP-Thioredoxin/K872 fusion protein purified through glutathione sepharose 4B column. Induction of K872 gene in *E. coli* by IPTG. *E. coli* harboring pThioHis A was grown in the presence of IPTG. Aliquots of culture were pelleted and loaded on 12% SDS-PAGE. Arrow indicates the position of HP-Thioredoxin/K872 fusion peptide. The positions of molecular weight markers were noted in kilodaltons.

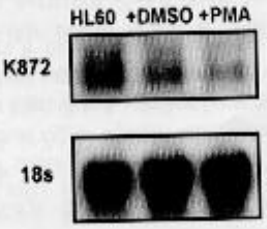

Fig. 6. Expression level of K872 mRNA during differentiation of HL60 cells. The lower panel shows expression level of human 18s ribosomal RNA.

고안 및 결론

사람의 모유두 세포 pBluescript phagemid cDNA library로부터 HL60 세포주의 분화 직후의 발현 비교로 찾아 낸 K872 클론의 염기 서열 분석에 의한 결과와 His-Patch Thifusion expression system을 이용한 결합단백의 결과가 잘 일치하였다. 즉, 염기 서열로 본 크기 1006 bp, 염기 서열로 추정한 아미노산 226개 및 분자량 22,560 Da 등의 자료가 SDS-PAGE 상에서 발현된 결합 단백산물의 분자량 40 kDa과 서로 부합되는 증거라고 사료되었다. (Fig. 2,3,5)

또한 DMSO 및 PMA에 의한 HL60의 분화 시 보인 K872 유전자의 감소가 HL60 세포주의 northern blot의 결과와도 잘 일치하여 일관성있는 결과를 보여주었다.(Fig. 6). K872의 mRNA 양이 암세포인 HL60에서는 높게 발현되다가 DMSO 및 PMA에 의해 각각 정상 세포로 분화되면서 K872의 발현이 감소한다고 볼 수 있다.(Fig. 6). 따라서 만약 K872 유전자가 방사선 내성과 관련이 있다면 HL60 세포주의 분화 전후의 방사선 감수성에 차이가 있을 것이다. 이것은 향후 분화 전후의 방사선 감수성 차이를 비교함으로써 명확하게 증명이 될 수 있을 것으로 기대된다.

Nothern blot에 의한 K872 유전자의 조직 발현 양상에서 심근이나 근육 등에 높게 발현되는 것으로 보아 K872 유전자가 ATP를 필요로 하는 에너지 소비가 높은 곳에서 요구됨을 알 수 있다. 즉 K872 유전자가 항산화제의 기능과 관련이 있다고 추정할 수 있으며 이는 항암제나 전리방사선과 같은 세포독성 물질의

방어기전에 관여한다는 사실과 부합한다고 사료된다. 또한 방사선 내성과 관련지어 볼 때 비교적 방사선 감수성이 낮은 대장암 및 흑색종 세포주에서 발현이 높았던 점은 특기할 만하였다. 즉 세포 자체의 방사선 감수성과 연관성이 있음을 시사하는 소견이라 할 수 있다. 그러나 방사선감수성이 높다고 알려진 말초혈액 백혈구에서도 그 발현이 높았던 점으로 보아 방사선감수성과 직접적인 관련이 있다고 단정짓기는 힘들다고 사료된다. 본 연구의 결과로만 보면 조직의 종류에 따라 또는 세포주의 종류에 따라 K872 유전자의 발현 정도가 차이가 있음을 보여 주는데, 전리 방사선이나 항암제 등의 독성 물질에 의해서 그 발현이 어떻게 변화되는 지에 대해서는 더 연구가 필요할 것으로 사료된다. 더불어 K872 유전자의 과발현 및 발현 억제 시 방사선 감수성 변화도 연구해 볼 필요성이 있을 것이다.

K872 클론의 해독틀로부터 추정된 아미노산 서열이 rGSTK1의 아미노산 서열과 70%의 상동성을 나타내고, 조직발현 양상 등의 소견으로 볼 때 K872 클론은 rGSTK1에 대한 사람의 상동유전자로 추정된다. 즉 그동안 알려진 사람의 다섯 가지 GST 군 즉, α,μ,π,θ,δ와 구별되는 새로운 사람의 GST kappa 유전자군으로 사료된다. 방사선 내성과 관련하여 새로운 kappa 유전자군도 기존 GST 유전자군과 동일한 특성을 가지고 있는 지, 아니면 다른 특성을 가지고 있는 지와 관련하여 기능 분석에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Board P, Coggan M, Hohnston P, Ross V, Suzuki T, Webb G. Genetic heterogeneity of the human alutathione transferases: A complex of gene families. Pharmacol Ther 1990; 48:357-369
2. Britten RA, Green JA, Warenius HM. Cellular glutathione(GSH) and gluatthione S-transferase(GST) activity in human ovarian tumor biopsies following exposure to alkylating agents. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992; 24:527-531
3. Wihelm D, Bender K, Knebel A, Angel P. The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transolution pathways including jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. Mol Cell Biol 1997; 17(8):4792-4800
4. Hansson J, Edgren MR, Egyhazi S, Hao XY, Mannervik B, Ringborg U. Increased cisplatin sensitivity of human fibroblasts from a subject with glutathione deficiency. Acta Oncol 1996; 35(6):683-90
5. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione s-transferase supergene family: regulation of GST and the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit Rev Biochem Mol Biol 1995; 30(6):445-600
6. Kenneth DT. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. Cancer Res 1994; 54:4313-4320
7. Richardson ME, Siemann DW. Thiol manipulation as a means of overcoming drug resistance in a novel cyclophosphamide resistant cell line. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992; 22:781-784
8. Bhattathiri V N, Sreelekha TT, Sebastian P, et al. Influence of plasma GSH level on acute radiation mucositis of the oral cavity. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994; 29:383-386
9. Cholon A, Giaccia AJ, Lewis AD, Hickson I, Brown JM. What role do glutathione S-transferase play in the cellular response to ionizing radiation? Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992; 22(4):759-763
10. Jadhav GKR, Bhanumathi P, Devi PU, et al. Possible role of glutathione in predicting radiotherapy response of cervix cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998; 41(1):3-5
11. Kim SG, Nam SY, Kim CW, Kim JH, Cho CK, Yoo SY. Enhancement of radiation-inducible hepatic glutathione stransferases Ya,Yb1,Yb2,Yc1, and Yc2 gene expression by oltipraz: possible role in radioprotection. Mol Pharmacol by oltipraz:possible role in radioprotection. Mol Pharmacol 1997; 51(2):225-233
12. Tanita J, Tsuchida S, Hozawa J, Sato K. Expression of glutathione S-transferase-pi in human squamous cell carcinomas of the pharynx and larynx. Loss after radiation therapy. Cancer 1993; 72(2):569-576
13. Miura K, Suzuki S, Tanita J, Shinkawa H, Satoh K, Tsuchida S. Correlated expressionof glutathione s-transferase and c-jun or other oncogene products in human squamous cell carcinomas of the head and neck: relevance to relapse after radiation therapy. Jpn J Cancer Res 1997;88(2)143-151
14. Mulder TP, Verspaget HW, Sier CF, et al. Glutathione S-transferase pi in colorectal tumors is predictive for overall survival. Cancer Res 1995; 55(12);2696-2702
15. Sasano H, Miuazaki S, Shiga K, Goukon Y, Nishihira T, Nagura H. Glutathione s-transferase in human esophageal carcinoma. Anticancer Res 1993; 13:363-368
16. Pemble SE, Wardle AF, Taylor JB. Glutathione s-transferase class kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homoloque. Biochem J 1996; 319:749-754
17. Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. Blood 1987; 70:1233-1244
18. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74:5443-5467
19. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alinment search tool. J Mol Biol 1990; 215:403-410

Abstract

Cloning of a Glutathione S-Transferase Decreasing During Differentiation of HL60 Cell Line

Jae Chul Kim, M.D.*, ln Kyu Park, M.D.*, Kyu Bo Lee, M.D. †,
Sang Kyun Sohn, M.D. †, Moo Kyu Kim, M.D. ‡, and Jung Chul Kim, M.D. ‡

*Department of Radiation Oncology, †Internal Medicine, ‡Immunology, School of Medicine, Kyungpook National University, Taegu, Korea

Purpose : By sequencing the Expressed Sequence Tags of human dermal papilla cDNA library, we identified a clone named K872 of which the expression decreased during differentiation of HL60 cell line

Materials and Methods : K872 plasmid DNA was isolated according to QIA plasmid extraction kit(Qiagen GmbH, Germany). The nuacleotide sequencing was performed by Sanger's method with K872 plasmid DNA. The most updated GenBank EMBL nucleic acid banks were searched through the internet by using BLAST(Basic Local Alignment Search Tools) program. Nothern bots were performed using RNA isolated from various human tissues and cancer cell lines. The gene expression of the fusion protein was achieved by His-Patch Thiofusion expression system and protein product was identified on SDS-PAGE

Results : K872 clone is 1006 nucleotides long, and has a coding region of 675 nucleotides and a 3' non-coding region of 280 nucleotides. The presumed open reading frame starting at the 5' terminus of K872 encodes 226 amino acids, including the initiation methionine residue. The amino acid sequence deduced from the open reading frame of K872 shares 70% identity with that of rat glutathione S-transferase kappa 1 (rGSTK1). The transcripts were expressed in a variety of human tissues and cancer cells. The levels of transcript were relatively high in those tissues such as heart, skeletal muscle, and peripheral blood leukocyte. It is noteworthy that K872 was found to be abundantly expressed in colorectal cancer and melanoma cell lines.

Conclusion : homology search result suggests that K872 clone is the human homolog of the rGSTK1 which is known to be involved in the resistance of cytotoxic therapy. We propose that meticulous functional analysis should be followed to confirm that.

Key Words :Glutathione S-Transferase, Radioresistance, HL60 cell