대한방사선종양학회지 2003;21(3):227 ~ 237

K562 세포의 방사선 감수성 변화에 영향을 미치는 신호전달인자

원자력의학원 방사선종양학과*, 을지의과대학교 방사선종양학과†,
동아대학교 의과대학 의과학 연구소‡, 동아대학교 의과대학 치료방사선과학교실§

양광모*·윤선민†·정수진‡·장지연‡·조월순‡·도창호‡
유여진‡·신영철‡·이형식§·허원주§·임영진‡·정민호‡

목 적: 만성 골수성 백혈병 세포인 K562 세포주는 방사선 및 다양한 항암제에 대한 apoptosis에 저항성을 가진다. 지난 연구에서 K562 세포는방사선에 대하여내성반응을 보이며, 세포내 PTK의작용을억제하고자방사선조사와 함께 투여한 herbimycin A (HMA)에의하여방사선에대한 apoptosis와 같은감수성반응이 유도되는반면, genistein에 의하여방사선에 대한 apoptosis 반응이저해됨을 확인하였다. 본 연구에서는타이로신 인산화효소억제에 의한 K562 세포의 방사선 반응변화를 조절하는 신호전달경로를 조사하였다.

대상 및 방법: K562 세포를 지수증식기의세포들만 선택하여 실험에이용하였다. 방사선조사는 6 MeV 선형가속기(Clinac 1800C, Varian)를 이용하여 200 ~ 300 cGy/min 선량률로 0.5 ~ 12 Gy를 균일하게 조사하였다. HMA와 genistein은 각각 0.25 μM, 25 μM을 방사선 조사 후 즉시 투여하였다. 실험에서 신호전달 경로로 abl kinase, MAPK family, NF-κB, c-fos, c-myc, thymidine kinase1 (TK1) 등에서의 단백질 또는 유전자 발현 및 활성을 조사하였다. 또한 약제 투여에 따른 유전자 발현차이(differential gene expression)를 조사하였다.

결 과: Abl kinase의 발현 및 활성 변화를 조사하였으나 PTK 저해제에 의한 방사선 유도 세포사의 변화와의 연관성을 찾을수없었다. 세포생존및사멸의신호전달체계에서주요조절과정인 MAPKfamily의관여여부확인에서 방사선으로 인한 SAPK/JNK의 활성화의 유도가 관찰되었으나, PTK 저해제에 따른 변화는 없었으며, 또한 MAPK/ERK와 p38MAPK 활성은 모든 조건에서 변함 없이일정하였다. 전사인자 활성화에 대한 조사에서 방사선 조사와 함께 genistein을 투여한 경우에 NF-κB 활성이 증가하였다. 유전자 발현 차이의 조사에서 genistein 투여에 의한 TK 1 유전자 발현 및 단백질 활성이 증가하였다.

결 론: PTK 억제에 의한 K562 세포의 방사선에 대한 반응 변화는 bcr-abl kinase 활성과는 무관하게 진행되며, MAPK family 경로 외의 다른 경로를 통한 전사인자 활성화 과정이 연관되어 있음을 확인하였다.

핵심용어: 만성 골수성 백혈병, K562 세포, 방사선유도 apoptosis, Herbimycin A, Genistein, 신호전달

서 론

세포는 세포 외부에서 오는 정보를 수집하고 이 정보에대응하는반응을함으로서세포자신뿐만아니라그세포가속한 개체의특성을결정한다. 방사선을포함한항암치료에 적용되는 공통적인 세포반응의 하나로 apoptosis의 유도가 인정되고 있다.[1] 그러나 현재까지 연구 결과로는 방사선에 특이적인 신호전달경로는 분명하지 않은 것으로 알려져 있다. 세포의 stress 신호, 성장 신호, 산화-환원 신호등의 신호전달경로들과 부분적으로 중첩되어 있다.

일반적으로 방사선에 의해 유도되는 여러 가지 유전자의 활성화 과정에 protein kinase (PK)의 작용이 관여한다고 알려져 있다. 방사선에 의하여 활성화되는 여러 가지 PK 중에서도 PKC의 역할에 대해서는 많이 연구가 되었으며 staurosporine과 같은 PKC 억제제가 다양한 세포에서 방사선 감수성을 증강시킨다.[2] 이러한 PKC의 활성화는 전 단계 과정에서 tyrosine 인산화를필요로한다.[3] 또한방사선에의하여 c-abl tyrosine kinase를 비롯하여 아직 밝혀지지 않은 것

본연구는 2000년 동아대학교학술연구조성비에의하여연구되었음.
이 논문은 2003년 3월 21일접수하여 2003년 7월 28일채택되었음.
책임저자 : 정민호, 동아대학교 의과학 연구소
Tel: 051)240-5343, Fax: 051)242-7265
E-mail: kmyang@kcch.re.kr

을 포함한 다양한 protein tyrosine kinase (PTK)들이 활성화된다.[4] 따라서 다양한 PTK가 활성화되므로 세포내 신호전달 과정 중 PTK가 방사선에 대한 반응에 중요한 역할을 하고 있음이 분명하다. PTK 신호는 small GTP- binding protein인 ras의 기능을 활성화시키고 downstream의 serine/threonine kinase 신호로 연결된다. Serine/threonine kianse의 주된 경로가 MAPK family를 경유하며, 여기에는 p44/42 MAPK /ERK1/2, SAPK/JNK, p38 MAPK (HOG1) 등[5~7]이 알려져 있다. 첫 번째경로는세포의성장과분화에중요하며, growth factor receptor tyrosine kinase, heteromeric G-protein과 연관된수용체 및 특이적인수용체들의 활성으로보통 ERK 경로를 활성화시킨다.[8] 나머지 두 경로는 세포 성장의 정지, apoptosis 혹은 면역과 세망내피계 세포의 활성에 관여하며, 자외선, 삼투압 변화 등의 세포에 대한 stress와 단백질합성 효소의 저해제, lipopolysaccharide, 염증발생을 야기하는 cytokine 등 다양한 자극에의하여활성화된다.[9] MAPK 신호는 Elk-1, c-jun, ATF-2, 등의 전사인자로 이어진다.[10] 또한 NF-κB의 upstream으로 MAPKfamily에의한활성화가알려져 있으며,[11] NF-κB 활성의 차이가 세포의 방사선 감수성을 조절하기도 한다. 이러한 전사인자들은 발현 양이 변하거나 인산화 또는탈인산화등의변형을통해특정한유전자의발현을 유발하여 세포반응을 조절한다.

본 연구실에서는 PTK 억제제인 Herbimycin A (HMA)와 genistein을 이용하여 K562 세포의 방사선에 의한 세포사멸 효과의 변화를유도한바있다.[12] K562 세포는 blast crisis 상태의 chronic myelogenous leukemia (CML) 환자에서 유래한 세포주이다.[13] 이 세포는 22번 염색체의 일부가 9번 염색체로 translocation된 Philadelphia chromosome (Ph)을가짐으로서 PTK의 활성도가 증가된 chimeric bcr/abl oncoprotein ($p210^{bcr/abl}$)을 발현한다. 지속적으로 증가된 PTK의 활성화가 cytokine withdrawl, Fas ligation 및항암약물치료등에의한 apoptosis의 유도를 억제하고, 실제 CML 환자의 치료에장해요인으로 인식되고 있다.[14] 이 세포의 또 다른 특징으로 p53이 변이된 대립형질을 가진다.[15]

실험에사용한 PTK의 억제제들은암세포의성장과사멸을 연구하는데 많이 이용되고 있는 것들이다. HMA는 non-receptor PTK에선택적으로작용하며, $p210^{bcr/abl}$의 활성을 저해하여 Ph를 가지는 세포의 증식을 우선적으로 억제한다.[16] Genistein은 receptor-type PTK에 선택적으로 작용하며 bcr/abl oncoprotein을 발현하는 세포의 증식을 우선적으로 억제하지 못한다.[16,17] 두 가지 PTK 억제제는 방사선에 대한 감수성의 변화와 함께 세포사멸의 형태와 apoptosis 유도에 있어서도 극명한 차이를 나타내었다. K562 세포는 방사선 단독조사에 내성인 양상을 보였으며, 방사선에 의하여 유도되는 세포사멸은 oncoticnecrosis, cytoplasmic apoptosis 및 mitotic catastrophe를의심할수있는형태학적인소견을보였다. 그러나 HMA는 방사선에 대한 감수성 증가와 방사선에 의한 세포사멸을 촉진할 뿐만 아니라, 초기에 유도되는 세포사멸은전형적인 apoptosis에 의한것이었다. 반면 genistein은 방사선에 의한 세포사멸을 지연시켰다.[12]

이와 같은 기존의 실험결과를 바탕으로저자는 K562 세포의 HMA와 genistein에의하여유도된방사선감수성및세포사의 변화에 관여하는 신호전달 인자를 알고자 하였다. 본 연구에서는 K562 세포의 apoptosis 내성에 관여한다고 알려져있는 bcr-abl 융합단백질의발현과활성을일차적으로관찰하고,PTK 신호전달의 주경로인 MAPK family 단백질의 발현과 활성 그리고 전사인자 NF-κB의 활성 변화를 추적하였으며 관련된 유전자의 발현 차이까지 조사하였다.

대상 및 방법

1. 대상 세포

K562 세포는 한국세포주 은행에서 구입하였으며, 10회 이내의 계대배양을거치면서 지수증식기의 세포들만 선택하여 실험에 이용하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100μg/mL streptomycin을 함유한 RPMI-1640 medium (GIBCO)을 이용하여 37°C, 5% CO_2 조건에서 실시하였다. 세포는 2×10^5/ml로 분주하면서 1주에 2 ~ 3회씩 계대배양하고, 1개월 단위로 교체하였다.

2. 방사선 조사 및 약물 투여

지수증식기의 세포에 6 MeV 선형가속기(Clinac 1800C, Varian)를 이용하여 200 ~ 300 cGy/min 선량률로 0.5 ~ 12 Gy의 방사선량을 균일하게 조사하였다. 실험이 진행되는 동안 세포는 37°C를 유지시키고 방사선 조사를 받을 때에만 20°C 실온에서 조사하였다. 방사선에 대한 세포반응의 변화를유도하기 위한 HMA와 genistein (Calbiochem)은 dimethyl-sulfoxide (DMSO, Sigma)에 고농도로 녹이고 -70°C에 보관하면서 실험에 이용하였다. 실험에는 K562 세포의증식을 50% 억제하는농도인 HMA 0.25μM, genistein 25μM을 방사선 조사 후 즉시 투여하였으며, DMSO의 최종농도는 0.1%를 넘지 않도록 조정하였다.

3. Western blot

세포를 회수하여 1 ml의 차가운 PBS로 12,000 g, 2분간 원심분리하여 세척하고 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma)가 포함된 1×lysis buffer(0.5% NP-40, 120 mM NaCl, 40mM Tris-HCl, pH 8.0) 250μl에서 4°C, 30분 이상 용해하였다. 상등액을 12,000 g, 30분간 원심분리하여 취하였으며, Protein Assay Kit (Bio-Rad)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 단백질을 포함한 시료를 12% SDS-PAGE로 전기영동하였다. [Mini-PROTEAN Ⅱ Dual Slab Cell (Bio- Rad); 200 volts (Model 1000/500 Power Supply, Bio-Rad), 1시간] 단백질 발현 변화(c-abl, phospho-tyrosine (PY99), phospho-JNK, phospho-ERK, phospho-p38, c-fos)는 각각에 대한 항체 (Santa Cruz)를 이용하여 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham)로 반응시킨 다음 Fujifilm luminescent analysis system (LAS)-1000 Luminescent Image Analyzer로 현상하고 Fujifilm Image Gauge Version 3.11 software을 이용하여 분석하였다.

4. Abl kinase 활성

1) c-abl immunoprecipitation 및 immunoblotting

Abl kinase에 의한 인산화 정도의 확인은 Kharbanda S 등의 방법[18]에 따라 실시하였으며 Blocking은 5%bovine serum albumin (BSA)로 하였으며, 일차항체는 anti-phospho-tyrosine (PY99) 항체로 이차항체는 mouse immunoglobulin HRPO-linked whole antibody로 하였다.

2) c-abl immunoprecipitation 및 immune complex kinase assay

Abl kinase 활성은 Dorsey JF 등의 방법[19]에 따라 측정하였다. 상기와 동일한 방법으로 면역 복합체를 형성하였으며, 펩타이드 인산화를 위해서는 100μM의 abl 펩타이드 (EAIYAAPFAKKK MW=1366, NEB), 100μM ATP (Promega), 5 μCi [γ-^{32}P]dATP (3000 Ci/mmol, Amersham)를 abl kinase buffer와 혼합하여 30°C, 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 25μl를 phosphocellulose discs (Gibco BRL)에 spotting하고 1% 인산(Sigma)와 아세톤(Junsei)으로 세척한 후에 Beckman LS 5801 Liquid Scintillation System으로 [^{3}H]-thymidine의 결합을 측정하였다.

5. MAPK family 활성

1) SAPK/JNK Assay는 SAPK/JNK Activity Assay Kit (NEB)를 이용하여 제조자의 지침에 따라 실시하였다.

2) p44/42 MAPKinase Assay는 p44/42 MAPKinase Activity Assay Kit (NEB)를 이용하여제조자의 지침에따라실시하였다.

3) p38 MAPKinase Activity Assay는 p38 MAPKinase Activity Assay Kit (NEB)를 이용하여 제조자의 지침에 따라 실시하였다.

6. c-myc 발현

처리된 1×10^{7}개의 세포를 회수하고 PBS로 세척한 다음 Ultraspec-Ⅱ RNA Isolation System (Biotecx Laboratories)을 사용하여 Total RNA를 분리하였다. 역전사반응은 Reverse Transcription System (Promega)을 이용하였으며 반응 혼합물은 42°C에서 1시간 반응시키고, 99°C에서 5분간 가열하여 효소를 불활성화시켰다.

역전사 반응산물에증류수를 첨가하여 최종부피가 100 μl가 되도록 희석하여 이 중 10μl를 PCR을 위한 주형 DNA로 사용하였다. 반응혼합물은 최종부피 100μl가 되도록 다음의 조성으로 준비하였다. *Taq* DNA polymerase(Promega), 1 mM $MgCl_2$, 10×reverse transcription buffer, forward와 reverse primer (각각 50 pmoles, Bioneer). 반응혼합물을 94°C에서 5분간 가열한 후 다음의 조건으로 중합효소연쇄반응을 30 cycles 실시하였다. 94°C, 1분; 50°C, 1분; 72°C, 3분; 그리고 마지막으로 72°C, 10분, 1 cycle. PCR 반응은 Perkin Elmer 2400 PCR machine을 사용하였으며, 1.5% agarose 겔 전기영동으로 확인하였다. 농도보정을 위하여 house keeping gene β-actin의 발현을 측정하였다. PCR primer의 염기서열은 다음과 같다.

* c-myc (292 bp)
sense; 5'-TCGGAAGGACTATCCTGCTG-3'
antisense; 5'-GCTTTTGCTCCTCTGCTTGG-3'

* β-actin (250 bp)
sense; 5'-CGTGGGCCGCCGCCCTAGGCACCA-3'
antisense; 5'-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'

Northern hybridization은 다음의 과정에 따라 시행하였다. pBR322 vector에 c-myc (insert size, 9 Kb; ATCC 41010 pHSR-1) 유전자가 클로닝된 *E. coli* 균주로 부터 Wizard Plus SV Miniprep Plasmid DNA Purification System (Promega)을 이용하여 plasmid DNA를 분리 정제하였다. 분리된 DNA를 주형으로 *AccuPower* PCR PreMix (Bioneer)을 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR 산물을 1.5% agarose gel 전기영동하여 확인한 후 QIAEX Ⅱ Gel Extraction Kit (Qiagen)을 이용하여 정제하였다. Probe labelling은 *redi*prime Random Primer La-

belling Kit (Amersham)를 이용하였다.

Total RNA 30 μg을 1.5% agarose-formaldehyde 겔전기영동한 다음 Sambrook 등의 방법에 따라 Hybond N-Plus membrane (Amersham)으로 capillary 방법에 의하여 이동시켰다. Membrane은 Spectrolinker XL-1000 UV crosslinker (Spectronics)을 이용하여 고정하였다. Membrane을 hybridization buffer(DIF 5 ml, 1 M phosphate buffer, pH 7.2 1.25 ml, 20% SDS 3.5 ml, 5M NaCl 0.5 ml/10 ml)에 넣고 42°C에서 2시간 동안 전혼성화 반응을 실시하였다. 새로운 buffer로 교체하고 95°C에서 5분간 가열한 [α-^{32}P]dCTP로 표지된 cDNA probe를 첨가하여 42°C에서 하룻밤 반응시켜 혼성화하였다. Membrane 세척은 42°C에서 2×SSC (17.53% sodium chloride, 8.82% sodium citrate, pH 7.0)/0.1% SDS, 1×SSC/0.1% SDS, 마지막으로 0.1×SSC/0.1% SDS의 순서로 각각 5분씩 2회 실시한 다음 랩을 씌우고 X-ray 필름으로 -80°C에서 24시간 감광시킨 후 Fuji FPM 1200 방사능자동현상기로 현상하였다.

7. NF-κB 활성

NF-κB 활성은 Electrophoresis mobility shift assay (EMSA)을 이용하여 측정하였다. 실험에 사용된 NF-κB consensus sequences는 다음과 같다.

5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'
3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5'

준비된 시료는 100 volts에서 20분간 prerunning한 5% polyacrylamide native gel에 가하여 100 volts에서 약 4 ~ 5시간 전기영동하였다. 겔을 유리판으로부터 조심스럽게 분리하여 겔건조기(Hoeffer)에서 건조한 후 X-ray film (Kodak)으로 -80°C에서 12시간 감광하고 Fuji FPM 1200 방사능 자동현상기로 현상하였다.

8. Differential gene expression

1) Subtraction hybridization은 PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech)을 사용하여 제조자의 지침에 따라 실시하였다.

2) DNA 클로닝은 PCR-selected cDNA subtraction으로부터 증폭된 cDNA를 pGEM-T easy vector system (Promega)을 이용하였다.

3) PCR-selected dot hybridization은 PCR-Selected Differential Screening Kit (Clontech)을 사용하여 제조자의 지침에 따라 실시하였다.

4) DNA sequencing은 선별된 클론들에서 plasmid DNA를 추출하였으며, Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)을 이용하였다. ALP *express* AutoCycle Sequencing Kit (Pharmacia Biotech)을 이용하여 염기서열을 분석하였으며 DNA 염기서열분석에 사용된 primer의 염기서열은 다음과 같다.

* ARF*red* M13 ~ 40 primer
  5'-cyanine-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'
* ALF*red* MB Reverse primer
  5'-cyanine-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'

분석된 DNA의 염기서열은 EMBL과 GenBank database에서 조사하여 그 상동성을 비교하였다.

5) Northern hybridization은 Probe의 제조를 위하여 선별된 클론들을 LB 액체배지에 배양한 다음, Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)를 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 이후 과정은 전술한 바와 같다.

9. Thymidine Kinase1 (TK1)의 활성측정

Chang ZF 등의 방법에 따라 실시하였다.[20] Cytosolic 단백질 30 μg과 90 μM thymidine (Sigma), 5 mM ATP (adenosine triphosphate), 2 μCi [^{3}H] thymidine (Sigma) (25 Ci/mmol; Amersham)을 kinase buffer와 혼합하여 최종부피를 100 μl로 조정하고 37°C에서 30분간 반응하였다. 반응물을 phosphocellulose disc (Gibco BRL)에 spotting하고 1% phosphoric acid (Sigma)와 증류수로 세척하였다. Beckman LS 5801 Liquid Scintillaion System을 사용하여 [^{3}H]-thymidine의 결합을 측정하였다.

결 과

1. Abl kinase의 발현 및 활성

K562 세포는 p210 bcr-abl과 p145 c-abl 두 가지 PTK를 모두 발현하였다. 이들의 발현은 HMA와 genistein에 의하여 억제되지 않았으며, 방사선단독조사 및 방사선과 PTK 억제제의 병합처리에서도 큰 변화를 보이지 않았다. 뿐만 아니라 p210 bcr-abl과 p145 c-abl의 인산화 정도도 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다. 이들 효소의 활성도를 측정하고자 Abl kinase activity 또한 유사한 결과를 보였다(Fig. 1). 따라서 본 실험의 PTK 억제제에 의한 K562 세포의 방사선감수성 변화는 HMA와 genistein의 abl kinase 억제효과에 의한 것이 아

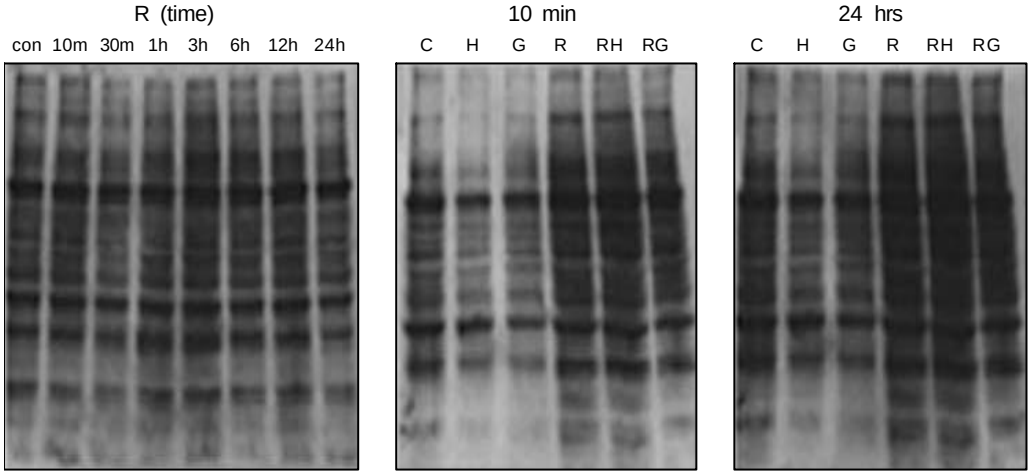

Fig. 2. Western blot analysis of phospho-tyrosine protein in K562 cells. Cells were exposed to 10 Gy of X-rays (R) andtreated with 250 nM of herbimycin A (RH) or 25 μM of genistein (RG). The reaction mixture wasincubatedfortheindicated time. The bands were detected by electrochemiluminescence system.

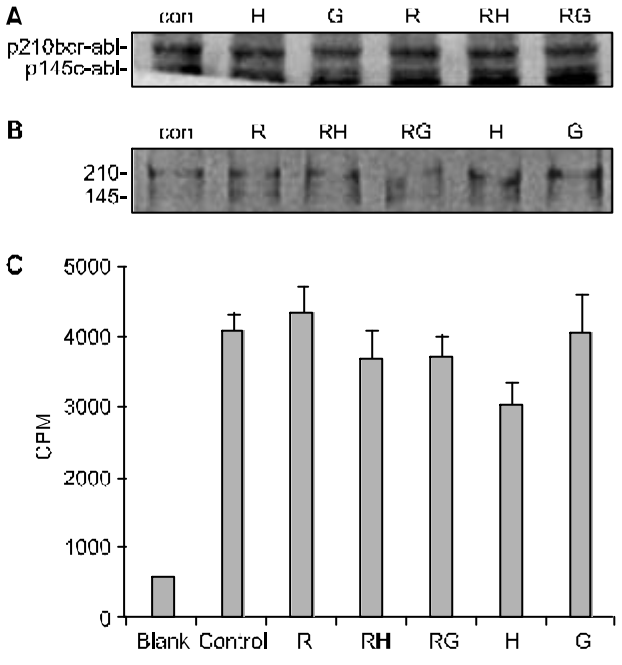

Fig. 1. Expression andactivity of abl kinase in K562cells. Cells were exposed to 10 Gy of X-rays (R)andtreated with 250 nM of herbimycin A (RH)or25 μM of genistein (RG). The reaction mixturewasincubatedfortheindicatedtime. Westernblotanalysis (A), immunoprecipition with anti-c-abl and immunoblotting with anti-phospho-tyrosine (B) and activity by immune complex assay (C)areshown.

님을 알 수 있다.

2. Phospho-tyrosine kinase

Abl-kinase 이외의 PTK에 대한 작용여부를 확인하고자 인산화하여 활성화된 형태인 phospho-tyrosine kinase를 조사하였다. 방사선 단독조사시 10분에서 24시간까지 변화를 관찰한 결과 시간경과에 따른 증가를 볼 수 있었다. 방사선 또는방사선과함께 HMA와 genistein을 투여했을 때 각각의 초기 반응과 후기 반응에서의 차이를 관찰하고자 하고 10분 및 24시간 뒤의 phospho-tyrosine kinase를 조사한 결과 방사선 단독조사시와비교하여 약물을함께투여한경우에도뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다. HMA와 genistein 단독투여시에서는 전반적으로감소되는양상을보여약물들의 PTK 억제제로서의 기능은 확인되었다(Fig. 2).

3. MAPK family 활성

SAPK 활성은 방사선 단독조사시 증가하였으나, HMA와 genistein을 단독처리 하였을 때는 방사선 단독 조사시와 동일한 수준이었고, 방사선과함께약물을투여한경우에는증가가 없었다. 그러나 방사선 단독조사시 증가된 SAPK의 활성은 양성 대조군으로 사용한 300μM sorbitol을 처리한세포의활성과비교하여매우낮은수준이었다. p44/42 MAPK 및 p38 MAPK는 그들의 발현과 마찬가지로 방사선단독처리 및 PTK 억제제 병합처리한 경우에도 변화가 없었다(Fig. 3). 이들 일차항체에 대한 western blotting에서도 IP의 결과와 같았다.

4. c-myc의 발현

방사선 및 방사선과 HMA 혹은 genistein을 12, 24, 48시간

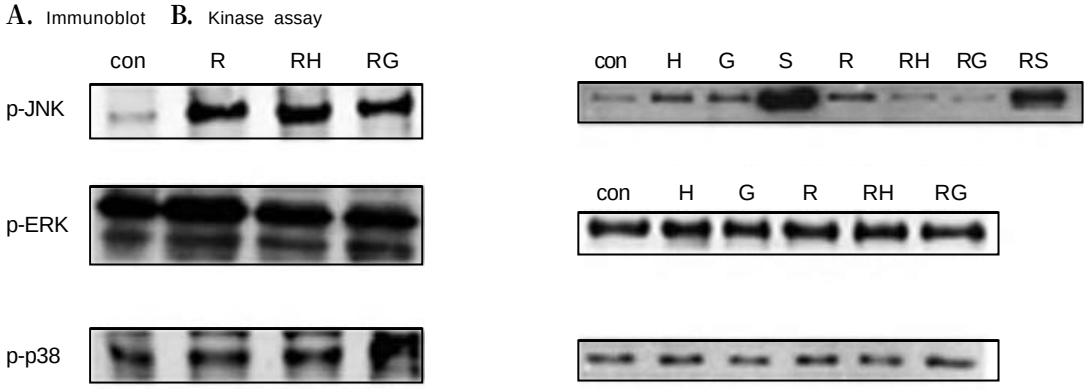

Fig. 3. MAPK familyactivity of K562cells. Cells wereexposed to10GyofX-rays(R)andtreatedwith250nMofherbimycinA(RH) or 25μM of genistein (RG). Western blot analysis (A) and kinase assay (B) are shown. The bands were detected by electro-chemiluminescence system.

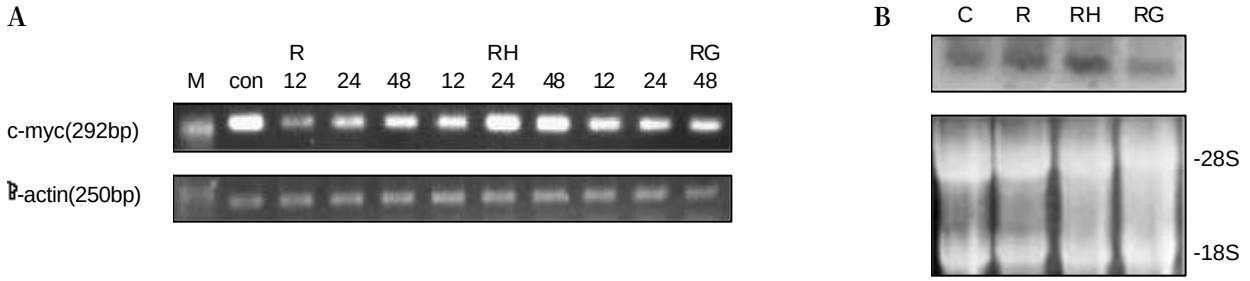

Fig. 4. Expression of c-myc mRNA in K562 cells. Cells were exposed to 10GyofX-rays(R)andtreatedwith 250 nM of herbimycin A (RH) or 25μM of genistein (RG). RT-PCR (A)andNorthern hybridization at 24 hrs after irradiation (B) are shown.

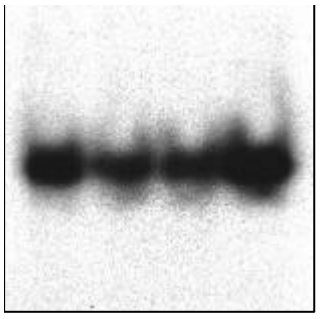

Fig. 5. NF-κB activity inK562cellsbyEMSA.Cellswereexposed to10GyofX-rays(R)andtreatedwith250nMofherbimycin A (RH) or 25μM of genistein (RG). The reaction mixture was incubated for 1 hr.

처리한 세포에 대하여 RT-PCR을 실시하였다. HMA와 병합처리시 24시간 경과 후의뚜렷한증가를관찰할수있었다. 이는 Northern hybridization을 통하여 재확인되었다(Fig. 4).

5. NF-κB 활성

방사선 단독조사시와 HMA와병합처리시의 활성은 감소되었으나, genistein과 병합처리 시에는 매우 증가하였다(Fig. 5).

6. Subtraction hybridization

방사선 단독조사한 실험군을 ‘driver’로 방사선과 HMA 혹은 genistein을 병합처리한 실험군을 각각 ‘tester’로 설정하였다. Driver와 tester의 mRNA로부터 합성된 각각의 cDNA에 두 차례의 혼성화를 실시한 다음 각각 일차와 이차 PCR을 실시하여 PCR 산물을 획득하였다.T/Avector에클로닝하여 클론들을 선별한 다음 Nested PCR primer 1과 2R을 사용하여 PCR을 실시하여 삽입된 cDNA를 확인하였다. PCR 산물에 대하여 dot blotting을실시하여 각각 67개와 124개의 차별발현되는 클론들을 검출하였다. 선별된 클론들의 DNA 염기서열을 분석하여 blast 검색하여 유전자들을 확인하였

```
RG4 - 37        GTACCACTCCGTGTGTCGGCTCTGCTACTTCAAGAAGGCCTCAGGCCAGCCTGCCGGGCC
Thymidine       GTACCACTCCGTGTGTCGGCTCTGCTACTTCAAGAAGGCCTCAGGCCAGCCTGCCGGGCC
                ************************************************************

RG4 - 37        GGACAACAAAGAGAACTGCCCAGTGCCAGGAAAGC-AGGGGAAGCCGTGGCTGCCAGGAA
Thymidine       GGACAACAAAGAGAACTGCCCAGTGCCAGGAAAGCCAGGGGAAGCCGTGGCTGCCAGGAA
                ********************************** ************************

RG4 - 37        GCTCTTTGCCCCACAGCAGATTCTGCAATGCAGCCCTGCCAACTGAGG
Thymidine       GCTCTTTGCCCCACAGCAGATTCTGCAATGCAGCCCTGCCAACTGAGG
                ************************************************
```

Fig. 6. Sequences comparison of differential expressed genes.

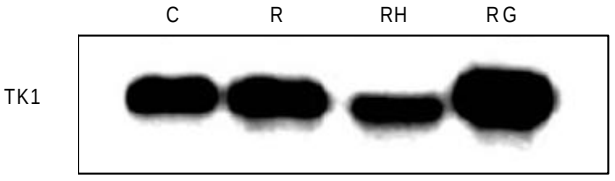

Fig. 7. Northern hybridization analysis of differential expressed genes. Cells were untreated (C), 10 Gy X-ray irradiated (R), treated with irradiation and 250 nM HMA (RH)andtreatedwith irradiation and25μM genistein (RG).

다. 방사선과 HMA를병합처리에대한경우에는 특별한유전자의발현이 나타나지 않았다. 반면 방사선과 genistein을 병합처리한것에서는 thymidine kinase (TK) 1와높은상동성을 나타내었다(Fig. 6). Northern hybridization을 통하여 세 가지 조건간의 mRNA 발현을 비교하였다(Fig. 7). 모두 방사선과 genistein을 병합처리한 것에서 가장 발현이 높았으며, HMA와 병합처리한 것에서 가장 낮았다.

7. Thymidine kinase 1의 활성

방사선 단독조사시와 방사선과 HMA를 동시처리시의 TK1의 활성은 거의 변화가없었다. 방사선과 HMA의 병합처리시 0시간부터 96시간까지 거의 평형을유지하였고, 방사선단독처리시는 48시간에 가장 높았다. 방사선과 genistein의 동시투여시는 뚜렷한 활성의 증가가 나타났다. 시간경과에 따라 증가하였으며 10시간까지는거의변화가없었으나 24시간부터 증가하기 시작하여 72시간에 최고치를 나타내었다(Fig. 8).

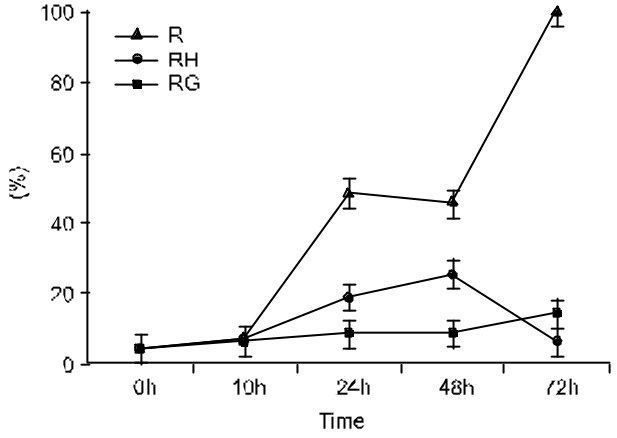

Fig. 8. Thymidine kinase 1 activity of K562 cells. Cells were irradiated with10Gy(R)andtreatedwith250nMHerbimycinA (RH) or 25μM genistein (RG), and incubated for indicated time.

고안 및 결론

방사선 유도 신호전달의 연구는 암치료에 방사선을 효과적으로 적용하기 위하여 이루어진다. K562 세포는 방사선에 저항성을 나타나며 이들이 발현하는 bcr-abl 유전자가 방사선 내성과 관련되어 있음이 알려져 있다.[14] 그러나 본 연구의 결과로는 방사선 조사시 Abl kinase의 발현과 활성에 있어서 증감이 없었으며, HMA 혹은 genistein과병합처리시에도 특별한 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 즉 HMA와 genistein에 의한 K562 세포의 방사선 유도 세포사의 변화는 bcr-abl의 작용과 무관하게 일어남을 알 수 있다.

Fitzgerald 등과 Sklar은 포유동물세포의 방사선에 대한 반응의 조사에서 ras의 활성화를 보고하였으며,[21] raf 또한 방사선 내성과 관련이 있음이 알려졌다.[22] 방사선에 대한 세포반응에서 ras와 raf를재료로사용한초기연구들이많이이

루어졌으나, 이들은 세포막에 존재하기 때문에 핵에서의 DNA 손상과 연결하기에는 불충분하였다.[23] 그러나 근자에 들어 작은 GTP 결합 단백질과 연속으로 일어나는 MAPK family를 통한 신호경로와 상부의 c-abl과 같은 PTK 활성이 연계되어 있음이 밝혀졌다.[24~26] 또한 이온화 방사선에 의한 MAPK와 PP90^{rsk}의 활성화 또는 SAPK의 활성화 등과 함께 apoptosis 유도시의 SAPK/JNK의 활성화 또는 MAPK 활성의 억제 등[27~29] 이온화방사선과 MAPK family와의 관련성은 여러 문헌에서 보고되고 있다. 본 연구에서도 MAPK,SAPK 그리고 p38 MAPK를 포함하는 MAPK family의 활성 변화를 조사한 바, 방사선 조사에 의한 K562 세포의 SAPK/JNK 활성 증가를 관찰할 수 있었으나 HMA와 genistein 병합투여에 의한 활성 변화는 볼 수 없었다(Fig. 3). 한편 이와 유사하게 사람의 섬유세포에서도 UV 조사에 의한 ERK 및 JNK의 활성 증가는 damnacanthal 병합처리에 의하여 억제되지만 HMA나 genistein의 효과는 거의 없다고 보고되었다.[30] 즉 HMA와 genistein에 의한 K562 세포의 방사선감수성 및 세포사의 변화는 MAPK family를 경유하는 신호전달 경로와도 무관하게 조절되는 것임을 알 수 있다.

전사인자 NF-κB는 이온화 방사선에 대한 세포반응에서 중요한 인자 중의 하나이다. 이온화 방사선에 노출된 세포에서 NF-κB의 DNA 결합과 PTK 억제제에 의한 NF-κB 활성 억제 등이 보고된 바 있다.[31,32] 본 연구 결과 K562 세포에서 NF-κB의 활성은 방사선 조사시 감소되었으며, HMA와 genistein 병합처리에 의하여 활성의 뚜렷한 변화를 유발하였다(Fig. 5). 즉 genistein에 의한 K562 세포의 방사선 내성 증가와 관련된 조절기전에 NF-κB가 중요하게 작용하고 있음을 시사한다. 이와 관련하여 NF-κB의 역조절이 AT (ataxia telangiectasia)의 방사선 감수성과 관련이 있고, AT 환자의 섬유세포에 NF-κB가 과발현된 경우 방사선 내성이 상당히 증가되는 등[33], NF-κB의 antiapoptotic 기능이 다양한 문헌에서 보고되고 있다.[34,35] 그러나 NF-κB의 활성과 관련된 분자적 기전은 아직 파악되지 않고 있다. NF-κB의 upstream으로 MAPK 경로, reactive oxygen intermediate (ROI)[36] 매개 등[37] 매우 다양한 경로들이 관여한다. 본 실험에서는 NF-κB의 활성화는 MAPK 경로와 무관하게 일어나는 것으로 나타났다. NF-κB antiapoptotic 활성을 위한 downstream도 caspase-8의 억제, anti-apoptotic 단백질인 TRAF-1, TRAF-2, cellular inhibitor of apoptotic protein (cIAP)-1, 및 cIAP-2의 활성 등 다양한 인자가 관련되어 있다고 알려져 있다.[38]

전사인자의 활성화로 인한 유전자의 차별 발현은 다양한 방법으로 조사되고 있다. DD-PCR 법은 적은 양의 시료가 필요하고 두 개이상의 조건의 비교가 가능한 장점을 지니고 있으나 false positive의 위험성이 있고 재증폭이 어려우며, 비특이적 발현이 많고 시간이 많이 소요된다는 단점이 있어 subtractive hybridization 방법이 대체되어 사용된다. 전통적으로 수행되어온 subtraction 방법은 수 차례의 혼성화 반응을 반복해야 하는 방법상의 까다로운 단점이 있으며, 특히 유전자 발현이 미약한 경우 성공적으로 수행될 가능성이 희박하였다.[39] 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 상대적으로 발현되는 유전자 서열만을 선택적으로 증폭시키는 PCR-selected cDNA subtraction 방법을 이용하였으며,[40] 증폭과정에서 표적이 되는 유전자와 무관한 요소들이 동반되어 증폭되는 것을 막기 위하여 suppression PCR을 함께 사용하였다.[41] 방사선 단독조사에 비하여 방사선 감수성 및 apoptosis의 증가를 보인 방사선과 HMA 병합처리에서는 특별한 유전자의 발현을 관찰할 수 없었다. 반면 방사선과 genistein 병합처리에서 thymidine kinase 1 (TK1) 유전자가 검출되었으며(Fig. 6), TK 유전자의 mRNA 발현정도는 방사선 반응에 대한 내성의 강도에 따라 비례하였다. 즉 방사선과 genistein을 병합처리한 경우 가장 높았으며, HMA와 병합처리한 경우 가장 낮았다(Fig. 7). 또한 TK의 활성 변화도 mRNA의 발현 양상과 일치하였다.

암세포와 같이 계속하여 분열하는 세포는 일련의 check-point가 존재하는 세포주기 과정을 반복한다. 세포주기는 DNA 합성과 세포 분열을 위하여 필요한 대사상태에 의존적으로 진행된다. 특히 DNA 합성을 위한 polymerases와 deoxynucleotide triphosphate의 제공에 관여하는 유전자들의 활성화는 필수불가결한 요소이다. Triphosphate를 제공하는 대사과정은 S기 동안에 왕성한 활성을 보이는 de novo pathway와 DNA 손상을 복구하는 repair synthesis와 같이 비교적 소량을 공급하는 salvage pathway가 존재한다. Salvage pathway에 관여하는 효소 중에서도 모든 세포에서 항상 일정하게 발현되는 deoxycytidine kinase와 달리 thymidine과 deoxyuridine의 ATP-dependent phosphorylation을 촉매하는 TK는 de novo enzyme들처럼 세포주기에 따라 엄격히 조절되어 DNA 합성 동안에 최고치에 이르고 휴지기 동안에 낮게 유지된다.[42] 또한 이 효소는 반감기가 짧고, 단백질 발현 양이 세포주기와 관련한 다른 인자들에 영향을 거의 받지 않으므로 S기 유전자의 indicator로 알려져 있으며, S기 조절이상으로 인한 암세포로의 transformation 과정에 관여함이 보고되고 있다.[43]

방사선은 분열중인 세포의 세포주기 정체를 유발한다. 이

미 보고한 바와같이 K562 세포도 방사선 조사에 의하여 48 시간까지 G2 arrest가 지속되다가 이후에 sub-G1 DNA content를 보이는 세포들이 출현하였다. 이러한 결과는 본 실험의 TK 활성의 kineticchange와일치하며 48시간 이후로 G2 arrest가 해소되면서 세포주기의재순환이일어났음을시사한다. 방사선과 함께 HMA를 투여한 경우에는 TK 활성 변화를 보이지 않으며 이는 S기로 전환하는 세포가 거의 없음을 의미한다. 즉 G2 arrest와 함께 G1 arrest가 동반되어 나타났음을 시사한다. 반면 방사선과 함께 genistein을 투여한 경우에는 96시간 이후까지 TK 활성이 지속적으로 증가하면서 G2 arrest가 유지되었다. 이와 관련하여 HL60 세포에서 nocodazole에의한세포의 M기정체유지에도 TK1의 과인산화가 관여한다고 보고되었다.[21] 즉 본 실험에서도 방사선과 genistein의 병합처리시의 G2/M arrest 유지에 TK1이 중요하게 역할을 담당한 것으로 생각한다. 이러한 G2/M arrest의 지속과방사선유도세포사에대한내성관계는이전논문에서 보고하였으며,[12] TK1과 방사선에 대한 apoptosis 반응과의 관련성도 다른 문헌에서 보고된 바 있다.[44] TK를 포함한 대부분의 S기 유전자들의 promotor는 일반적으로 전사인자 E2F에 의하여 조절된다.

E2F는 다시 retinoblastoma gene product (pRb)와 NF-κB 등에 의하여 조절된다고 알려져 있다.[45,46] 본 실험 모델에서 NF-κB 활성과 방사선에 대한 apoptosis 반응과의 관련성도 관찰하였다. 실험결과로 NF-κB의 upstream signal을 정확하게 알 수 없지만, NF-κB 활성화에 의한 downstream의 E2F 활성화, TK 활성화, G2/M arrest 및 방사선에 대한 apoptosis 반응의 저해로 이어지는 일련의과정을확인할수있었다.

결론적으로 본 실험에서 PTK 억제에의한 K562 세포의 방사선에 대한 반응 변화는 MAPK 경로와는 무관하게 진행되는 것으로여겨지며 MAPKfamily 경로 외에다른경로가존재할 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 결과는 방사선 내성 암세포에 대한 방사선치료 전략을 수립하는데 도움을 줄 수 있을것으로 생각된다. 또한방사선 내성에 관여하는 경로의 더 많은 조사로 방사선 내성 극복에 새로운 근거를 마련하여, 최근에 시도되고 있는 신호전달 차단 약물개발등의향후 방사선 치료의 효과를 증강시킬 수 있는 방편을 개발하기 위한 기반을 구축할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 1997;88:355-365
2. Hallahan DE,Virudachalam S, Schwartz JL, Panje N, Mustafi R, Weichselbaum RR. Inhibition of protein kinases sensitizes human tumor cells to ionizing radiation. Radiat Res 1992;129:345-350
3. Uckun FM, Tuel-Ahigren L, Song CW, et al. Ionizing radiation stimulates unidentified tyrosine-specific protein kinases in human B-lymphocyte precursors, triggering apoptosis and clonogenic cell death. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:9005-9009
4. GoodmanPA,NiehoffLB, Uckun FM. Role of tyrosine kinase in induction of the c-jun protooncogene in irradiated B-lineage lymphoid cells. J Biol Chem 1998;273:17742-17748
5. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, et al. ERKs: a family of protein- serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and TNF. Cell 1991;65:663-675
6. Derijard B, Hibi M, Wu IH, et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain.Cell1994;76:1025-1037
7. Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). J Biol Chem 1996;271:17920-17926
8. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. FASEB J 1995;9:726-735
9. Kyriakis JM, Avruch J. Sounding the alarm: protein kinase cascade is activated by stress and inflammation. J Biol Chem 1996;271:24313-24316
10. Coffer PJ, Burgering BM, Peppelenbosch MP, Bos JL, Kruijer W. UV activation of receptor tyrosine kinase activity. Oncogene 1995;11:561-569
11. Noguchi K, Yamana H, Kitanaka C, Mochizuki T, Kokubu A, Kuchino Y. Differential role of the JNK and p38 MAPK pathway in c-Myc- and s-Myc-mediated apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 2000;267:221-227
12. Jeong SJ, JinYH,MoonCW,etal. PTK inhibitors modulatethe radiosensitivity and radiation-induced apoptosis following ionizing radiation of K562 cells. Radiat Res 200;156:751-760
13. LozzioCB,LozzioBB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. Blood 1975;45:321-334
14. BediA,ZehnbauerBA,BarberJP,SharkisSJ,JonesRJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. Blood 1994;83:2038-2044
15. Sugimoto K, Toyoshima H,Sakai R, et al. Frequent mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines. Blood 1992;79:2378-2383
16. Okabe M, Kawamura K, Miyagishima T, et al. Effect of

herbimycin A, an inhibitor of tyrosine kinase, on protein tyrosine kinase activity and phosphotyrosyl proteins of Ph1-positive leukemia cells. Leuk Res 1994;18:213-220

17. SatoS,HonmaY,HozumiM,etal. Effects of herbimycin A and its derivatives on growth and differentiation of Ph1-positiveacute lymphoid leukemia celllines.LeukRes 1994;18:221-228

18. Kharbanda S, Bharti A, Pei D, et al. The stress response to ionizing radiation involoves c-Abl-dependent phosphorylation of SHPTP1.Proc Natl AcadSciUSA1996;93: 6898-6901

19. Dorsey JF, Jove R, Kraker AJ, Wu J. The pyrido [2,3-d]pyrimidine derivative PD180970 inhibits p210Bcr-Abl tyrosine kinase and induces apoptosis of K562 leukemic cells. Cancer Res 2000;60:3127-3131

20. ChangZF,HuangDY,HsueNC. Differential phosphorylation of human thymidine kinase in proliferating and M phase-arrested human cells. J Biol Chem 1994;269: 21249-21254

21. FitzGerald TJ, Daugherty C, Kase K,Rothstein LA, McKenna M, GreenbergerJS. Activated human N-ras oncogene enhances x-irradiation repair of mammalian cells in vitro less effectively at low dose rate. Implications for increased therapeutic ratio of low dose rate irradiation. Am J Clin Oncol 1985;8:517-522

22. PirolloKF,GarnerR,YuanSY,LiL,BlattnerWA,ChangEH. Raf involvement in the simultaneous genetic transfer of the radioresistant and transforming phenotypes. Int J Radiat Biol 1989;55:783-796

23. Weichselbaum RR, Hallahan DE, Sukhatme V, Dritschilo A, Sherman ML, Kufe DW. Biological consequences of gene regulation after ionizingradiation exposure.J NatlCancer Inst 1991;83:480-484

24. Kharbanda S, Bharti A, Pei D, et al. The stress response to ionizing radiation involoves c-Abl-dependent phosphorylation of SHPTP1. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93: 6898-6901

25. Kharbanda S, Pandey P, Jin S, et al. Functional interaction between DNA-PK andc-AblinresponsetoDNAdamage. Nature 1997;386:732-735

26. ShiCS,TuscanoJM,WitteON,KehrlJH. GCKRlinks theBcr-Abl oncogene and Ras to the stress-activated protein kinase pathway. Blood 1999;93:1338-1345

27. Kharbanda S, Yuan ZM, Rubin E, Weichselbaum R, Kufe D. Activation of Src-like p56/p53lyn tyrosine kinase by ionizing radiation. J Biol Chem 1994;269:20739-20743

28. Verheij M, Ruiter GA, Zerp SF, et al. The role of the stress-activated proteinkinase (SAPK/JNK) signaling pathway in radiation-inducedapoptosis.RadiotherOncol 1998; 47:225-232

29. XiaZ,DickensM,RaingeaudJ,DavisRJ,GreenbergME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science 1995;270:1326-1331

30. HiwasaT,Arase Y, Chen Z, Kita K, Umezawa K,ItoH,SuzukiN. Stimulation of ultraviolet-induced apoptosis of human fibroblast UVr-1 cells by tyrosine kinase inhibitors. FEBS Letter 1999;444:173-176

31. Prasad AV, Mohan N, Chandrasekar B, Meltz ML. Activation of nuclear factor kappa B in human lymphoblastoid cells by low-dose ionizing radiation. Radiat Res 1994;138:367-372

32. UckunFM,SchievenGL,Tuel-AhlgrenLM,etal. Tyrosine phosphorylation is a mandatory proximal step in radiation-induced activation of the protein kinase C signaling pathway in human B-lymphocyte precursors. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:252-256

33. Jung M, Zhang Y, Lee S, Dritschilo A. Correction of radiation sensitivity in ataxia telangiectasia cells by a truncated I kappa B-alpha. Science 1995;268:1619-1621

34. Aota K,Azuma M, Yamashita T, et al. 5-Fluorouracil induces apoptosis through the suppression of NF-kappaB activity inhuman salivary glandcancercells. BiochemBiophysRes Commun 2000;273:1168-1174

35. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. Science 1996; 274: 782-784

36. Noguchi K, Yamana H, Kitanaka C, Mochizuki T, Kokubu A, Kuchino Y. Differential role of the JNK and p38 MAPK pathway in c-Myc- and s-Myc-mediated apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 2000;267:221-227

37. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive tive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. EMBO J 1991;10:2247-2258

38. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaBantiapoptosis: inductionof TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 tosuppress caspase-8 activation. Science 1998;281:1680-1683

39. Duguid JR, DinauerMC. Libratysubtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. Nucleic Acids Res 1990;18:2789-2792

40. Diatchenko L, Chenchik A,SiebertP. Suppression subtractive hybridization: A method of generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:6025-6030

41. Story MD, Voehringer DW, Malone CG, Hobbs ML, Meyn RE. Radiation-inducedapoptosisin sensitiveandresistantcells isolated from a mouse lymphoma. Int J Radiat Biol 1994;66:659-668

42. Sherley JL, Kelly TJ. Human cytosolic thymidine kinase. Purification and physical characterization of the enzyme from HeLa cells. J Biol Chem 1988;263:375-382

43. Shiotani T,HashimotoY,TanakaT,IrinoS. Behavior of activities of thymidine metabolizing enzymes in human leukemia-lymphoma cells. Cancer Res 1989;49: 1090-1104

44. Boothman DA, DavisTW,SahijdakWM. Enhanced expression of thymidine kinase in human cells following ionizing

radiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994;30:391- 398
45. Kundu M, Guermah M, Roeder RG, Amini S, Khalili K. Interaction between cell cycle regulator, E2F-1, and NF-kappaB mediates repression of HIV-1 gene transcription. J Biol Chem 1997;272:29468-29474
46. Tamami M, Lindholm PF, Brady JN. The retinoblastoma gene product (Rb) induces binding of a conformationally inactive nuclear factor-kappa. Br J Biol Chem 1996;271: 24551-24556

Signal Transduction Factors on the Modulation of Radiosusceptibility in K562 Cells

Kwang Mo Yang, M.D.* Seon-Min Youn, M.D.†, Soo-Jin Jeong, Ph.D.‡, Ji-Yeon Jang, B.S.‡, Wol-Soon Jo, B.S.‡, Chang-Ho Do, M.D.‡, Yeo-Jin Yoo, M.D.‡, Young-Cheol Shin, M.D.‡, Hyung Sik Lee, M.D.§, Won Joo Hur, M.D.§, Young-Jin Lim, M.D.‡ and Min-Ho Jeong, M.D.‡

*Korea Institute of Radiological & Medical Sciences, Seoul, Korea, †Department of Radiation Oncology, Eulji University School of Medicine, Daejeon, Korea, ‡The Institute of Medical Science (BK21 program), §Department of Radiation Oncology, Dong-A University Hospital, College of Medicine, Pusan, Korea

Purpose: The human chronic myelogenous leukemia cell line, K562, expresses the chimeric bcr-abl oncoprotein, whose deregulated protein tyrosine kinase activity antagonizes the induction of apoptosis via DNA damaging agents. Previous experiments have shown that nanomolar concentrations of herbimycin A (HMA) coupled with X-irradiation have a synergistic effect in inducing apoptosis in the Ph-positive K562 leukemia cell line, but genistein, a PTK inhibitor, is non selective for the radiation-induced apoptosis of $p210^{bcr/abl}$ protected K562 cells. In these experiments, the cytoplasmic signal transduction pathways, the induction of a number of transcription factors and the differential gene expression in this model were investigated.

Materials and Methods: K562 cells in the exponential growth phase were used in this study. The cells were irradiated with 0.5-12 Gy, using a 6 MeV Linac (Clinac 1800, Varian, USA). Immediately after irradiation, the cells were treated with 0.25㎛M of HMA and 25㎛M of genistein, and the expressions and the activities of abl kinase, MAPK family, NF-㎸B, c-fos, c-myc, and thymidine kinase1 (TK1) were examined. The differential gene expressions induced by PTK inhibitors were also investigated.

Results: The modulating effects of herbimycin A and genistein on the radiosensitivity of K562 cells were not related to the bcr-abl kinase activity. The signaling responses through the MAPK family of proteins, were not involved either. In association with the radiation-induced apoptosis, which is accelerated by HMA, the expression of c-myc was increased. The combined treatment of genistein, with irradiation, enhanced NF-㎸B activity and the TK1 expression and activity.

Conclusion: The effects of HMA and genistein on the radiosensitivity of the K562 cells were not related to the bcr-abl kinase activity. In this study, another signaling pathway, besides the MAPK family responses to radiation to K562 cells, was found. Further evaluation using this model will provide valuable information for the optional radiosensitization or radioprotection.

Key Words: Chronic myelogenous leukemia, K562 cell, Radiation-induced apoptosis, Herbimycin A, Genistein, Signal transduction