Metallothionein 발현이 NF-κB 활성에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

김 철 훈

Metallothionein 발현이 NF-κB 활성에 미치는 영향

지도 안 영 수 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

1999년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 철 훈

김철훈의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

1999년 12월 일

감사의 글

어색한 손으로 실험기구들을 처음 만지던 때가 엊그제 같은데, 벌써 학위논문을 준비하는 막중한 책임이 주어졌습니다. 이 자리까지 오게 된 것은 처음부터 시종 일관 저를 이끌어주신 많은 선생님들의 덕분입니다. 저를 가장 가까이에서 지도해주시고 항상 좋은 길로 인도해주신 안영수 선생님께 감사드리며 저에게 모든 도움과 격려를 아끼지 않으신 김경환 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 세심한 지도와 충고를 주신 김동구 선생님, 안용호 선생님, 박전한 선생님께 감사드립니다. 연구기간 중 힘이 되어주신 교실의 모든 교수님들께 감사드립니다.

실험생활 중에 큰 도움이 된 교실원들과 진지하게 실험에 대해 토론해 준 동료, 후배들에게 감사의 마음을 전합니다. 특히, 실험의 동고동락을 같이한 김주희 선생에게 고마운 마음을 표합니다. 작은 아들을 항상 믿어주시고 때때로 건강을 챙겨주시는 부모님께 감사드립니다. 항상 실험실 생활 때문에 약속 한번 제 때 못 지키는 것을 알면서도 믿음과 사랑으로 이해해 준 아내에게 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

저 자 씀

목 차

국문요약 1

I. 서 론 2

II. 재료 및 방법 3
1. 세포 배양 3
2. 핵 단백 추출 3
3. 젤 지연 분석법 4
4. 아연이온의 실시간 형광분석 4
5. Western blotting 5
6. 역전사 중합효소 연쇄반응 5
7. MT-IIA 발현 DNA construct의 제조 5
8. MT-IIA 발현 DNA construct의 transfection과 과발현유도 6
9. Luciferase assay 6

III. 결 과 7
1. PDTC, pyrithione 또는 아연 이온이 Tet-On HeLa 세포의 NF-κB 활성에 미치는 영향 7
2. PDTC에 의한 세포내 아연 이온의 증가 8
3. Cadmium과 dexamethasone에 의한 MT-IIA의 발현 9
4. Cadmium 또는 dexamethasone을 전처리한 Tet-On HeLa세포에서 PDTC에 의한 NF-κB 활성 조절 변화 10
5. Doxycycline에 의해 MT-IIA가 과발현되는 Tet-On HeLa 세포 시스템 제작 11
6. MT-IIA가 과발현되었을 때 PDTC에 의한 NF-κB 활성 조절 변화 11

IV. 고 찰 12

V. 결 론 14

참고문헌 15

영문요약 18

그 림 목 차

그림 1. 아연 이온이 Tet-On HeLa 세포의 NF-κB 활성에 미치는 영향 7

그림 2. PDTC와 pyrithione이 NF-κB 활성에 미치는 영향 8

그림 3. PDTC가 세포내 아연 이온 농도에 미치는 영향 9

그림 4. Cadmium과 dexamethasone에 의한 MT-IIA 발현 유도 10

그림 5. Cadmium 또는 dexamethasone 전처리한 Tet-On HeLa 세포에서 PDTC에 의한 NF-κB 억제효과의 변화 10

그림 6. Doxycycline에 의해 MT-IIA가 과발현되는 Tet-On HeLa 세포 시스템 제작 11

그림 7. MT-IIA의 과발현이 PDTC에 의한 NF-κB 활성 억제에 미치는 영향 12

국문요약

Metallothionein 발현이 NF-κB 활성에 미치는 영향

Metallothionein (MT)은 금속이온과 결합하거나 또는 결합되어 있던 금속이온을 유리하여 세포내 금속 항상성을 조절하는 저분자 단백이다. 최근 전사인자인 nuclear factor kappa B (NF-κB) 활성이 금속이온의 세포 내 농도변화에 영향을 받는 것이 알려졌다. 특히, 소 뇌혈관 내피세포에서 아연이온은 NF-κB 활성을 강력하게 억제하는 것으로 보고되었다. 따라서, 본 연구에서는 MT의 발현이 아연이온에 의한 NF-κB 활성조절에 영향을 미치는 요소로 작용하는지를 알아보고자 하였다.

우선, Tet-On HeLa 세포주에서 아연이온은 농도 의존적으로 NF-κB 활성을 억제함을 젤 지연 분석법을 통해 확인하였다. 아연 ionophore인 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)와 pyrithione은 NF-κB 활성을 억제하였고, 이는 Cu-EDTA에 의해서는 억제되었지만, Zn-EDTA에 의해서는 억제되지 않았다. PDTC에 의해 Tet-On HeLa 세포내 아연 특이성 신호로서 mag-fura-2의 형광신호가 증가되는 것을 관찰하였다. MT-IIA 발현을 유도하기 위하여 Cadmium과 dexamethasone을 처리하였을 때 16시간째에 농도 의존적으로 MT-IIA transcripts 발현이 증가함을 관찰하였다. 그러나, 이들 약물 자체에 의해서는 NF-κB 활성이 변하지 않았다. Cadmium과 dexamethasone 처리로 MT-IIA 발현을 증가시킨 상태에서는 PDTC에 의한 NF-κB 억제효과가 감소되었다. Doxycycline에 의해 발현이 조절되는 유전자 발현 시스템을 이용하여 MT-IIA를 선택적으로 과발현시켰을 때에도 마찬가지로 PDTC에 의한 NF-κB 억제가 봉쇄되었다. 위의 결과들을 종합하면, MT-IIA의 아연 항상성 조절 기능이 MT-IIA에 의한 NF-κB 활성 조절과 연관되어 있는 것으로 생각된다.

핵심되는 말: metallothionein, nuclear factor kappa B (NF-κB), 아연, Tet-On HeLa 세포

Metallothionein 발현이 NF-κB 활성에 미치는 영향

<지도 안 영 수 교수>

연세대학교 대학원 의학과

김 철 훈

I. 서 론

Metallothionein (MT)은 세포내 대표적인 금속 결합 단백으로서, 그 아미노산 구성의 1/3이 cysteine기로 이루어져 있으며 특징적으로 aromatic 아미노산은 포함하지 않는 구조를 가지고 있다. 이들 cysteine기들과 더불어 non-aromatic 아미노산들이 모여 MT의 입체적인 구조를 형성함으로써 금속이온이 쉽게 결합할 수 있는 구조를 만든다(Kägi 및 Schaffer, 1988). MT와 결합하는 대표적인 금속들로는 카드뮴, 수은, 아연, 구리 등이 있으며, 이는 MT가 세포내 금속 항상성을 조절하며, 다량의 금속에 의한 세포독성에 방어능을 가지는 특성과 밀접하게 연관되어 있다(Masters 등, 1994). MT는 현재까지 MT-I, MT-II, MT-III, MT-IV 등 크게 4개의 주요 아형이 존재하는 것으로 알려져 있다(Kägi 및 Schaffer, 1988; Uchida 등, 1991; Palmitier 등, 1992). 이중 MT-I과 MT-II는 cysteine기 외의 다른 아미노산 구성 차이만 있을 뿐 분포 조직에는 차이가 없으나, MT-III는 신경계에 분포하고, MT-IV는 상피세포계에 국한되어 존재하는 특징을 가지고 있다(Kägi 및 Schaffer, 1988).

MT의 발현을 활성화시키는 자극으로는 카드뮴, 아연, 구리, 수은 등의 금속이온과 glucocorticoid, interferon, thrombin 등이 있다(Karin 및 Herschman, 1991; Kaji 등, 1993). 특히, 금속이온에 의한 활성화 과정에는 금속이온 반응성 단백이 존재하여 이들이 선택적인 신호 전달에 관여함으로 MT 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 금속이온을 제외한 다른 자극에 의한 MT 발현 조절 기전에 대해서는 명확하게 알려지지 않고 있다.

MT는 세포내에서 다양한 기능을 수행한다. 첫째로는 세포 내 금속이온 항상성 조절 기능을 갖는다(Kägi 및 Schaffer, 1988). 둘째로는 다양한 자극에 대한 세포방어 기능을 갖는데, 금속독성에 대한 보호효과뿐 아니라, 허혈, 산화성 스트레스, 항암제 등에 의한 세포사망도 억제한다(Chubatsu 및 Meneghini, 1993; Lazo 및 Pitt, 1995). 셋째로는 주로 전사조절단백과의 상호작용으로 이루어지는 유전자 발현 조절이다. 대표적인 예가 zinc-finger 단백이

며, estrogen receptor, Sp1, TFIIIA (Zeng 등, 1991a, b; Cano-Gauci 및 Sarkar, 1996) 등이 MT와 아연이온을 주고 받으면서, 활성이 조절되는 것으로 알려져 있다.

NF-κB는 전사조절단백의 일종으로 염증반응, 면역반응, 세포사망 등에서 중요한 역할을 하는 물질로 알려져 있으며(Ghosh 등, 1998), 특히, 항암제 등에 대한 암세포의 저항성에 관여된다고 생각되고 있다(Wang 등, 1996). NF-κB는 MT에 의해 조절되는 전사 조절단백과는 달리 zinc-finger를 가지고 있지 않다. 그러나, MT와 NF-κB는 공통적으로 암세포에서 과발현 또는 활성화되는 경우가 많으며, 항암제에 저항성을 나타낸다(Cherian 등, 1993; Lazo 및 Pitt, 1995; Wang 등, 1996). 특히, 최근에 Abdel-Mageed 및 Agrawal (1998)은 MT와 NF-κB가 직접 결합하여 NF-κB 활성이 증가될 가능성을 제시하였으나 Sakurai 등(1999)은 이를 부정하는 등 상반된 보고가 나오고 있다. 따라서, MT와 NF-κB의 상호연관 관계에 대한 명확한 규명이 아직 이루어지지 못하고 있다.

NF-κB 활성을 조절하는 신호전달경로로는 여러가지 세포내 kinase와 산화-환원 환경이 중요한 것으로 알려지고 있다(Ghosh 등, 1998). 그러나, 최근에는 아연을 포함한 금속이온이 NF-κB의 활성을 조절할 수 있음을 보여주는 보고들이 점차 증가하고 있다(Connel 등, 1997; Shumilla 등, 1998; Kim 등, 1999a, b). 따라서, 본 연구에서는 MT에 의한 NF-κB 조절은 금속이온 항상성을 조절하는 MT의 특성과 연관되어 있을 가능성이 매우 클 것이라는 가설아래 아연에 의한 NF-κB의 억제가 MT발현에 의해 영향을 받을 수 있는지를 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양

사람의 자궁경부암 세포주인 HeLa (ATCC CCL 2)에 pTet-On regulator plasmid (Gossen 등, 1995)가 stable transfection되어 있는 세포주인 Tet-On HeLa (Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 배양하여 사용하였다. 세포는 정상적으로 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM)에서 배양하였다. 세포는 사용 전까지 37°C, 5% CO_2 환경에서 배양상태를 유지시켰다.

2. 핵 단백 추출

핵 단백은 Lee 등(1988)의 방법에 따라 얻었다. 요약하면, 세포를 5×10^6되게 모은 다음 차게한 phosphate buffered saline (PBS)용액으로 씻어주고, 1 packed cell volume (PCV)의 저장성 완충액 A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1 μg/ml of leupeptin, 1 μg/ml of aprotinin)에서 부유시켰다. 부유된 세포들은 얼음 위에서 10분간 세워둔 후 27-gauge 바늘에 5번 통과시켜, 세포막을 파괴시켰다. Microcentrifuge에서 원심

분리하여 핵을 침전시킨 후 얻은 핵을 완충액 A로 두 번 씻어주었다. 그 후 핵 침전물에 2/3 PCV의 차게한 완충액 B (20 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 25% glycerol, 1 μg/ml of leupeptin, 1 μg/ml of aprotinin)를 넣어 얼음 위에 세워두고 자주 진탕해주어 핵 단백이 추출되도록 하였다. 얼음에 차게한 2/3 PCV의 완충액 C (10 mM HEPES, pH 7.9, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1 μg/ml of leupeptin, 1 μg/ml of aprotinin)를 튜브에 첨가한 후, microcentrifuge에서 최대속도로 4°C에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이와 같이 얻은 핵 추출물을 새로운 튜브에 분주하고 dry ice에서 급속 냉동시켜 −80°C에서 보관하였다. 시료의 단백질 농도는 Lowry법(Lowry 등, 1951)으로 정량하였다.

3. 젤 지연 분석법

전사 조절 단백인 NF-κB의 활성화 정도는 Xu 등(1997)의 방법을 변형한 젤 지연 분석법(electrophoretic mobility shift assay)을 통해 확인하였다(Kim, 1999a). [γ-^{32}P]-ATP를 소식자로 표지한 NF-κB consensus oligonucleotide (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAG GC-3') 0.0175 pmoles ($>10^4$ CPM)와 1 μg의 poly dI · dC를 포함한 20 μl의 binding buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5% glycerol)를 5 μg 핵 단백과 섞어주었다. 얼음 위에서 30분간 반응시킨 다음, 반응물을 non-denaturing 6% polyacrylamide gel에 부하하였다. 부하전 200 V에서 1시간 먼저 영동한 후, 부하 후 180 V에서 2시간 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝나면 젤을 건조시킨 후 자가 방사법으로 기록하였다. Competition assay에서는 소식자가 표지되지 않은 NF-κB oligonucleotide나 mutant NF-κB oligonucleotide (G to C substitution; 5'-GTTGAGGCGACTTTCCCAGGC-3') 또는 비특이 oligonucleotide를 표지소식자보다 100배 많이 첨가하여 반응시켰다. Supershift 분석에서는 NF-κB 아형인 p50 또는 p65에 대한 항체(Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA)를 각각 1 μl씩 핵 단백과 30분 동안 반응시킨 후, 결합 반응을 위와 동일하게 실시하였다.

4. 아연이온의 실시간 형광분석

세포내 아연이온 농도의 변동을 Sensi 등(1997)의 방법을 변형하여 측정하였다. 약술하면, Tet-On HeLa 세포를 coverslip위에 부착시켜 배양한 후 세포에 3 μM의 mag-fura-2를 30분간 loading하였다. 이 coverslip을 세포 chamber의 바닥에 부착시킨 후 위상차 현미경의 대위에 고정시켰다. 세포를 고정한 coverslip이 바닥을 이루고 있는 세포 chamber에 110 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1 mM NaH_2PO_4, 1 mM $MgSO_4$, 5 mM HEPES-Na, 5 mM HEPES, 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM D-glucose가 포함된 HEPES 완충용액을 관류시켰다. 약물은 HEPES 완충용액에 일정 농도로 혼합하여 관류시킴으로써 처리하였다. 아연이온의 증감은 real time spectrofluorometer (Photon Technology International, Brunswick, NJ, USA)에서 mag-fura-2를

340 nm과 380 nm 파장에서 excitation시켰을 때 방출되는 형광신호를 510 nm 파장에서 받아들여 측정하였다.

5. Western blotting

세포를 냉장시킨 PBS로 두 번 씻은 다음 50 mM Tris, pH 7.2, 2 mM EDTA, 1% triton X-100, 0.2 mM PMSF, 5 μg/ml aprotinin, 5 μg/ml leupeptin이 포함된 단백질 추출 완충액을 넣고 얼음위에서 5분간 방치하였다. 그 후 추출 완충액을 회수하여 15,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 얻어 단백을 정량하였다. 50 μg의 단백질을 12% polyacrylamide gel electrophoresis로 분리하고, nitrocellulose membrane에 옮겼다. 5% 탈지분유로 blocking한 후 1 : 1000의 mouse anti-rat metallothionein antibody (Stressgen, Victoria BC, Canada)와 1 : 2000 anti-mouse secondary antibody (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA)를 연이어 반응시켰다. 신호의 검출을 위해 secondary antibody는 horse radish peroxidase가 달려있는 IgG를 사용하였고, 발광반응의 측정에 enhanced chemiluminiscence kit (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK)을 사용하였다.

6. 역전사 중합효소 연쇄반응

일정시간 동안 약물을 처리한 Tet-On HeLa 세포를 scraper로 모은 다음, RNeasy Mini Kit (Qiagen, Santa Claris, CA, USA)를 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. RNA에 대한 first-stranded complementary DNA를 얻기 위하여 1 μg의 RNA 시료와 0.1 O.D.의 random hexamer (Pharmacia, Uppsala, Sweden)와 200 unit의 Molony murine leukemia virus 역전사 효소 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 역전사반응을 일으켰다. 얻어진 cDNA를 이용하여 MT-IIA 또는 human β-actin 대한 forward primer와 reverse primer를 이용하여 GeneAmp PCR system (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)에서 중합효소 연쇄반응을 일으켰다. 중합효소 연쇄반응의 완충용액은 10 mM Tris-HCl (pH 10), 2.0 mM $MgCl_2$이었으며, 1.25 unit의 *Taq* polymerase (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)를 이용하여 시행하였다. 연쇄반응 조건으로 denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 59°C에서 30초, extension은 72°C에서 1분간 실시하였고, 이러한 연쇄반응을 24회 실시하였다. MT-IIA primer 염기서열은 sense primer; 5'-CCCAAGCTTACCATGGATCCCAACTGCTCCTGCG-3', anti-sense primer; 5'-GCTCTAGATCAGGCGCAGCAGCTGCACTTG-3'였다. β-actin 염기서열은 sense primer, 5'-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3', anti-sense primer, 5'-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'였다.

7. MT-IIA 발현 DNA construct의 제조

Tet-On HeLa 세포에서 전체 RNA를 분리한 후, 위와 같은 방법으로 random hexamer와

reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 하고, MT-IIA primer를 사용하여 MT-IIA 유전자를 중합효소 연쇄반응으로 증폭시켰다. 증폭된 MT-IIA 유전자를 Hind III, Xba I 두 제한효소로 처리하고 이를 pTRE2 expression vector (Clontech, Palo Alto, CA, USA)의 Hind III, Xba I cloning site에 ligation하여 집어넣었다. 제조된 DNA construct의 염기서열을 분석하여 MT-IIA의 orientation과 클로닝을 확인하였다. 이 DNA construct를 pTRE2-MT-IIA로 명명하였다.

8. MT-IIA 발현 DNA construct의 transfection과 과발현유도

pTRE2-MT-IIA vector를 60～70% confluency의 Tet-On HeLa 세포에 Lipofectamine plus (Gibco BRL)를 사용하여 transient transfection하였다. Transfection 과정은 제조사의 방법에 따랐다. Transfection시킨 후 30시간 후에 doxycycline 2 μg/ml을 12시간 동안 처리하여 MT-IIA의 과발현을 유도하였다. MT-IIA의 발현은 Western blotting으로 확인하였다.

9. Luciferase assay

Luciferase DNA construct는 NF-κB reporter gene plasmid, p(IL6B)$_3$50hu.IL6P-luc+를 사용하였다. p(IL6B)$_3$50hu.IL6P-luc+ (Vanden Berghe 등, 1998)는 Dr. Guy Haegeman (University of Gent, Belgium)으로부터 제공받았다. Tet-On HeLa 세포를 confluence가 60%에 도달하도록 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 1～2일 배양하였다. 이후, Lipofectamine plus (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 NF-κB reporter gene plasmid를 transfection하였다. DNA는 6 well plate에서 각 well 당 pTRE-MT-IIA를 2 μg, reporter construct를 0.2 μg, pEGFP plasmid (Clontech, Palo Alto, CA, USA) 0.2 μg을 각각 사용하였다. Lipofectamine reagent 4 μl가 들어있는 100 μl serum-free DMEM에 DNA를 희석하여 15분 동안 실온에 방치하였다가, 6 μl의 plus reagent가 들어있는 100 μl의 serum-free DMEM과 섞은 후 15분 동안 다시 상온에서 방치하였다. 이 혼합액을 serum-free DMEM이 800 μl씩 들어있는 well에 천천히 plate를 흔들어주면서 떨어뜨렸다. 4시간 후에 complete DMEM media를 더해주고 15시간 후 다시 fresh complete DMEM media로 바꾸어주었다. Transfection한 후 30시간째에 doxycycline 2 μg/ml을 섞어주어 이후 12시간 동안 두었다. 배지를 바꾸어주면서 약물을 처리한 다음 10시간 후에 PBS로 3번 세척하고 500 μl lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA)로 세포내용물을 추출하였다. 이 용액을 4°C에서 13,000×g로 10분간 원심분리한 후 상층액을 얻었다. 상층액 중 일부를 취해서 단백질의 양을 정량하였고, 일부는 enhanced green fluorescence protein (EGFP)의 형광 활성을 spectrofluorophotometer (SLM instrument, Urbana, IL, USA)에서 측정하였으며, 나머지 전부는 luciferase 활성을 측정하였다. Luciferase 활성 측정에 이용할 세포 추출 용액의 양은 단백질 정량 결과와 EGFP 형광값에 따라 보정하여 사용하였다. Luciferase activity는 luminometer (EG&G Berthold, München,

Germany)에서 측정하였다.

III. 결 과

1. PDTC, pyrithione 또는 아연 이온이 Tet-On HeLa 세포의 NF-κB 활성에 미치는 영향

PDTC와 pyrithione은 아연 ionophore로 작용하여 소 뇌혈관 내피세포에서 NF-κB 활성을 억제한다(Kim 등, 1999a, b). 또한, 아연 이온 자체도 소 뇌혈관 내피 세포에서 NF-κB의 활성을 억제한다(Kim 등, unpublished data). 이번 연구에서는 이러한 조절체계가 Tet-On HeLa 세포에서도 작용하는지를 PDTC, pyrithione, $ZnSO_4$ 처리 후 우선 확인하였다. NF-κB의 활성도 변화를 젤 지연 분석법을 이용하여 확인하였다. Tet-On HeLa 세포는 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 배양하였는데, 이때 기초 NF-κB 활성이 존재하는 것이 확인되었다(그림 1A). Tet-On HeLa 세포에 100～400 μM $ZnSO_4$를 4시간 동안 처리하였을 때, NF-κB 활성이 농도 의존적으로 억제되었다(그림 1A). NF-κB를 나타나는 띠의 결합 특이성을 확인하기 위하여, 방사선 동위원소를 붙이지 않은 wild-type NF-κB oligonucleotide (wt-NF-κB; 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3')와 mutant NF-κB oligonucleotide (mt-NF-κB; 5'-AGTTGAGGCGACTTTCCCAGGC-3')를 과량(100배) 사용하여 competition assay를 수행하였다. 과량의 wt-NF-κB oligonucleotide에 의해서는 화살표로 표시된 두 띠가 사라졌지만,

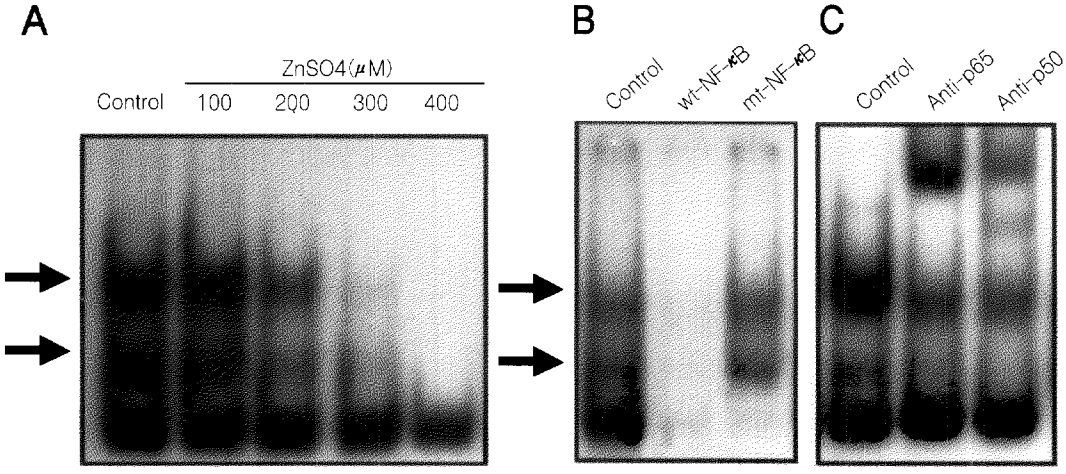

그림 1. 아연 이온이 Tet-On HeLa 세포의 NF-κB 활성에 미치는 영향. (A) 아연 이온을 농도별로 Tet-On HeLa 세포에 4시간 동안 처리하여 핵단백을 추출하여 젤 지연 분석법을 시행하였다. 대조군(Control)의 세포는 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 4시간 두었다. (B) NF-κB 결합 띠의 특이성을 확인하기 위하여 방사성 동위원소를 붙이지 않은 wt-NF-κB oligonucleotide와 mt-NF-κB oligonucleotide를 probe에 비해 100배 양을 주고 competition assay를 수행하였다. (C) NF-κB 아형인 p65와 p50에 대한 항체를 사용하여 supershift assay를 수행하였다.

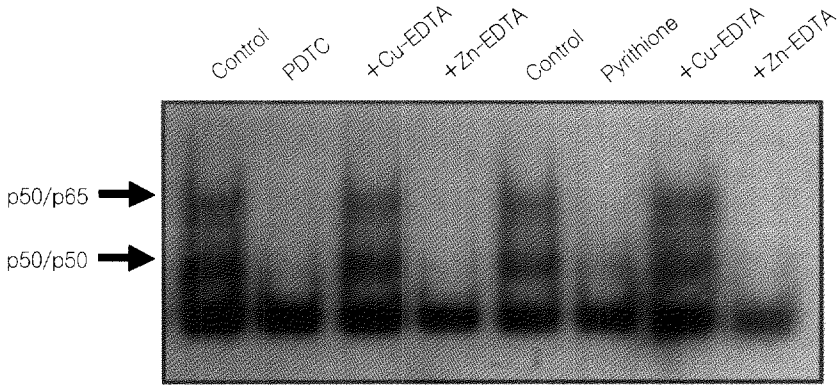

그림 2. PDTC와 pyrithione이 NF-κB 활성에 미치는 영향. PCTC (150 μM) 또는 pyrithione (5 μM)을 4시간 동안 Tet-On HeLa 세포에 처리한 후 젤 지연 분석법을 통하여 NF-κB 활성을 측정하였다. EDTA 실험에서는 Cu-EDTA (20 μM) 또는 Zn-EDTA (20 μM)를 PDTC 또는 pyrithione과 동시에 투여하였다.

동일 양의 mt-NF-κB oligonucleotide에 의해서는 표시된 두 띠가 사라지지 않았다(그림 1B). 그러므로 화살표의 두 띠가 NF-κB의 특이 결합에 의해 형성됨을 확인하였다. 각 띠가 어떤 NF-κB 아형을 나타내는지를 확인하기 위하여 supershift 분석을 수행하였다. 항 p50 항체에 의해서는 아래, 위 두 띠가 모두 이동되었지만, 항 p65 항체에 의해서는 위 띠만 이동되었다. 따라서, 위 띠는 p50-p65 heterodimer, 아래 띠는 p50-p50 homodimer로 생각되었다(그림 1C). PDTC에 의해 기초 NF-κB 활성이 억제되는 지를 확인하기 위하여, PDTC 150 μM을 10% FBS가 포함된 DMEM에 섞어준 후 배지를 갈아줌으로써 세포에 처리하였다. PDTC 150 μM을 4시간 처리하였을 때, 대조군 세포에 비해 NF-κB의 활성이 억제되었다(그림 2). 이때, copper가 포화되어 있는 EDTA인 Cu-EDTA 20 μM을 사용하여 세포외액의 금속이온을 제거하였을 때는 PDTC의 NF-κB 활성 억제 효과가 봉쇄되었다. 그러나, Zn-EDTA 20 μM을 처리하였을 때는 NF-κB에 대한 PDTC의 효과가 봉쇄되지 않았다(그림 2). 이 결과로 PDTC에 의한 NF-κB의 활성화 억제가 아연이온에 의한 현상임을 재확인 하였다. 마찬가지로 아연 ionophore인 pyrithione 5 μM에 의한 NF-κB 활성 억제도 20 μM Cu-EDTA에 의해서는 회복되나, Zn-EDTA 20 μM에 의해서는 회복되지 않았다(그림 2).

2. PDTC에 의한 세포내 아연 이온의 증가

세포내 아연 이온의 증감을 형광염색시료인 mag-fura-2를 이용한 실시간 형광 측정법으로 관찰하였다. 소 뇌혈관 내피세포에서 PDTC가 세포내 아연 이온의 농도를 증가시키는 것은 아연 선택성 형광시료인 TSQ (N-(6-methoxy-8-quinolyl)-*para*-toluenesulfonamide)와 mag-fura-2를 사용한 측정법을 통해 밝혀졌다(Kim 등, 1999b, c). Tet-On HeLa 세포에서도

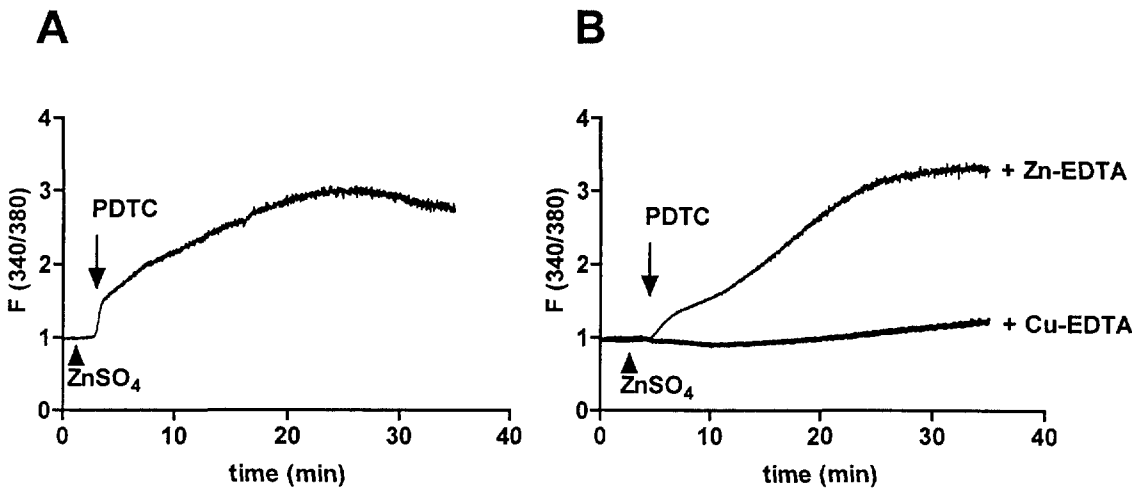

그림 3. PDTC가 세포내 아연 이온 농도에 미치는 영향. (A) 세포내 아연 농도를 측정하기 위하여 mag-fura-2 (3 μM)을 Tet-On HeLa 세포에 loading 한 후 $ZnSO_4$ (3 μM)를 3분 동안 관류시킨 다음 PDTC (150 μM)를 관류액에 더해 주었다. (B) PDTC와 동시에 Cu-EDTA (20 μM) 또는 Zn-EDTA (20 μM)를 관류액에 더해 주었다. 형광신호의 변동은 실시간 형광분석기를 사용하여 측정하였다.

마찬가지로 PDTC가 세포내 아연 농도를 증가시키는지를 확인하였다. Tet-On HeLa 세포에서 관류액에 3 μM $ZnSO_4$를 첨가하였을때 그 자체만으로는 세포내 아연 특이 형광 신호가 증가하지 않았다(그림 3A, 3B). 그러나, 150 μM PDTC를 관류액에 첨가하여 주었을 때는 아연 이온 특이 형광 신호가 처리 직후부터 증가하기 시작하여, 30~40분대에 정점을 이루었다(그림 3A). 신호 증가는 동시 투여된 20 μM Cu-EDTA에 의해 억제되고, 20 μM Zn-EDTA에 의해서는 억제되지 않았다(그림 3B). 따라서, PDTC에 의해 증가된 mag-fura-2 형광 신호는 아연 이온에 특이적인 신호임을 확인할 수 있었다.

3. Cadmium과 dexamethasone에 의한 MT-IIA의 발현

MT의 발현이 아연 이온에 의한 NF-κB 활성조절에 영향을 미치는지 알아보기 위해, MT의 발현을 유도하는 것으로 알려진 cadmium과 dexamethasone을 사용하였다(Karin 및 Herschman, 1991; Kaji 등, 1993). $CdCl_2$ (0.5, 1, 5 μM)과 dexamethasone (10, 50 μM)을 16시간 동안 처리한 후, MT-IIA mRNA transcripts의 변화를 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하여 확인하였다. $CdCl_2$과 dexamethasone은 농도 의존적으로 MT-IIA mRNA transcripts양을 증가시켰다(그림 4). 동일양의 RNA를 통해 역전사 중합효소 연쇄반응이 일어났는지를 확인하기 위하여, 동일 시료를 β-actin primers를 이용하여 24회 증폭시켰을 때, 각 군과의 차이가 없었다. 이후 실험에서 MT-IIA의 발현을 유도하기 위하여 cadmium 또는 dexamethasone을 16시간 동안 처리하여 실험하도록 결정하였다.

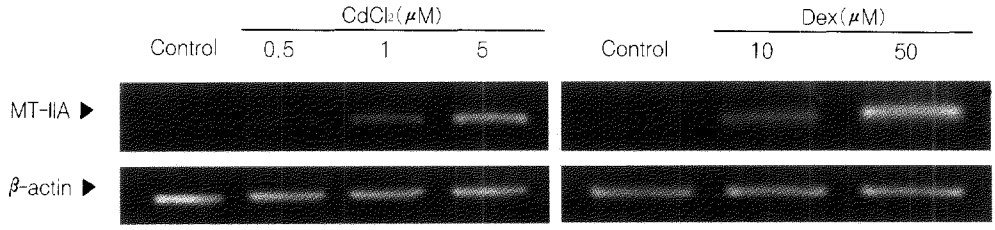

그림 4. Cadmium과 dexamethasone에 의한 MT-IIA 발현 유도. $CdCl_2$ 또는 dexamethasone을 농도별로 16시간 동안 Tet-On HeLa 세포에 투여한 후 MT-IIA mRNA transcript의 변화를 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하여 측정하였다. β-actin을 internal control로 사용하였다.

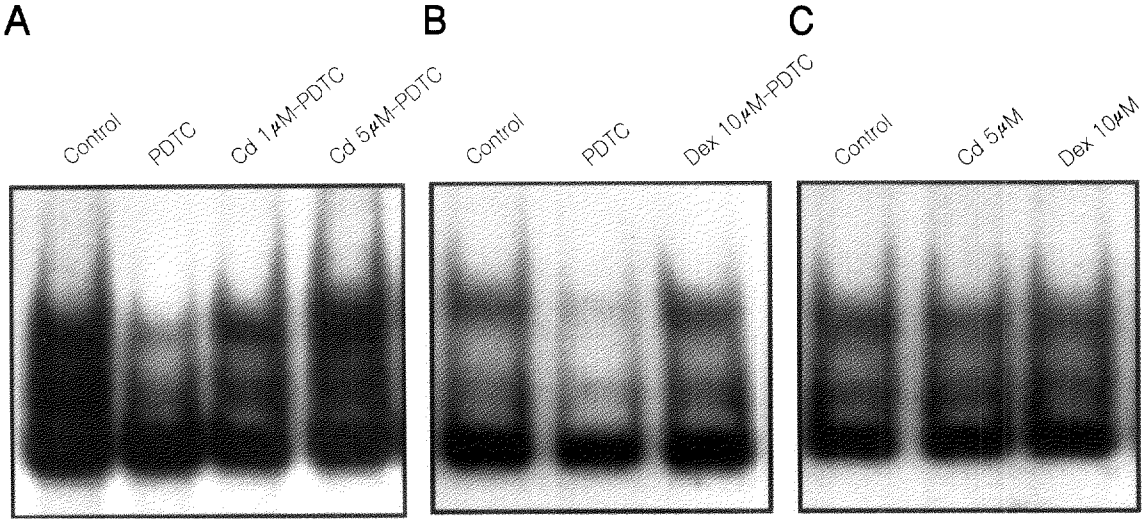

그림 5. Cadmium 또는 dexamethasone 전처리한 Tet-On HeLa 세포에서 PDTC에 의한 NF-κB 억제효과의 변화. (A) $CdCl_2$ 또는 (B) dexamethasone (DEX)을 16시간 동안 전처리한 후 배지를 갈아주면서 PDTC (150 μM)를 4시간 동안 처리하여 젤 지연 분석법을 시행하였다. (C) $CdCl_2$ 또는 dexamethason만을 16시간 동안 처리한 후의 젤 지연 분석 결과이다.

4. Cadmium 또는 dexamethasone을 전처리한 Tet-On HeLa 세포에서 PDTC에 의한 NF-κB 활성 조절 변화

MT에 의한 세포내 금속이온 조절이 PDTC에 의한 NF-κB 활성 조절 변화에 미치는 영향을 조사하기 위해 $CdCl_2$ (1, 5 μM) 또는 dexamethasone 10 μM을 16시간 동안 Tet-On HeLa 세포에 처리한 후 세포 배지를 바꾸어 주면서 PDTC를 첨가하였다. PDTC를 150 μM 농도로 4시간 동안 처치한 후의 NF-κB 활성도 변화를 젤 지연 분석법으로 측정하였다. $CdCl_2$가 전처리 된 세포에 PDTC를 처리하였을 때, $CdCl_2$를 전처리하지 않은 세포에 비하여 PDTC에 의한 NF-κB의 억제정도가 미약함을 관찰할 수 있었다(그림 5A). Dexametha-

sone을 전처리한 경우에도 마찬가지로 전처리군에서 비처리군에 비해 PDTC에 의한 NF-κB 억제정도가 감소되었다(그림 5B). MT-IIA의 발현을 유도하기 위하여 사용한 cadmium과 dexamethasone 농도들에서 이들 두 물질 자체에 의한 NF-κB 활성도 변화는 없었다(그림 5C). 따라서, cadmium과 dexamethasone에 의해 활성화된 MT-IIA가 PDTC의 효과를 억제하였음을 예상할 수 있었다.

5. Doxycycline에 의해 MT-IIA가 과발현되는 Tet-On HeLa 세포 시스템 제작

MT-IIA primer는 Karin 및 Richards (1982)의 MT-IIA sequence 분석 결과에 기초하여 제작하였다. pTRE2-MT-IIA를 pTet-On regulator plasmid가 stable transfection되어 있는 Tet-On HeLa 세포에 다시 transfection시킨 후 30시간 후에 doxycycline 2 μg/ml을 12시간 동안 처리하여 MT-IIA의 과발현을 선택적으로 유도하였다. Anti-metallothionein 항체를 이용한 Western blotting을 수행하여 MT-IIA 단백이 doxycycline 처리에 의하여 과발현되는지를 관찰하였다. Transfection은 되었지만, doxycycline을 처리하지 않은 대조군에 비해, doxycycline을 처리한 세포에서 MT-IIA의 발현이 증가되었다(그림 6).

6. MT-IIA가 과발현되었을 때 PDTC에 의한 NF-κB 활성 조절 변화

Tet-On HeLa 세포에 pTRE2-MT-IIA DNA construct를 transfection시킨 후 30시간 후에 doxycycline을 2 μg/ml 농도로 12시간 동안 처리하였다. 대조군에서도 pTRE2-MT-IIA DNA construct를 transfection시켰지만, doxycycline 대신 10 μl의 증류수만을 처리하였다. Doxycycline 처리 12시간 후 배지를 바꾸어 주면서 PDTC 150 μM을 4시간 동안 처리하였다. 처리 4시간째의 세포들을 회수하여 핵 단백을 얻어 겔 지연 분석법을 시행하였다. 대조군에 비해 doxycycline을 투여했던 세포들에서 PDTC에 의한 NF-κB 억제효과가 감소하는 것을 관찰하였다(그림 7A). 이러한 변화가 실제 transactivation의 변화로도 나타나는지 확인하기 위하여 luciferase assay를 수행하였다. NF-κB reporter DNA construct와 pTRE-2-MT-IIA

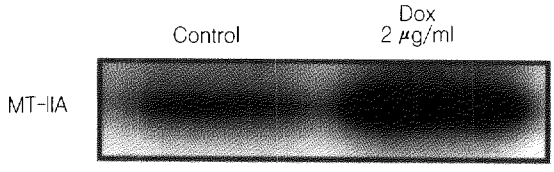

그림 6. Doxycycline에 의해 MT-IIA가 과발현되는 Tet-On HeLa 세포 시스템 제작. Tet-On HeLa 세포에 pTRE2-MT-IIA를 transfection한 다음 30시간 후에 doxycycline (2 μg/ml)을 12시간 동안 처리하였다. 동량의 단백을 얻은 후 anti-MT-IIA 항체를 이용하여 웨스턴 블로팅을 수행하였다.

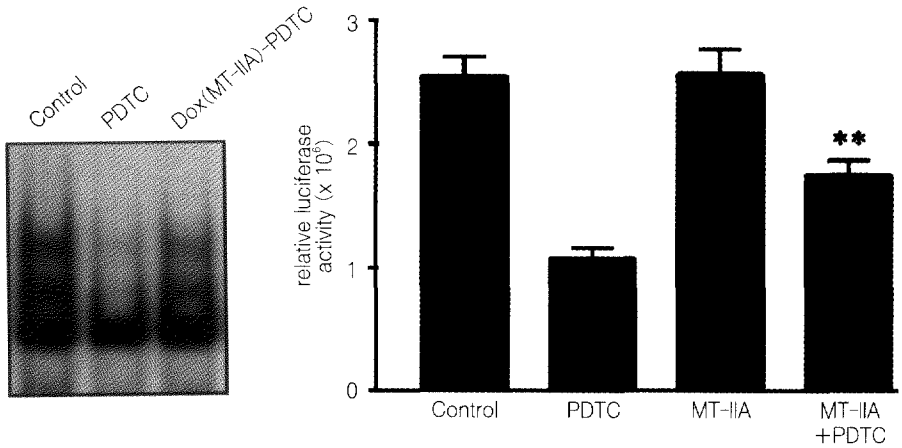

그림 7. MT-IIA의 과발현이 PDTC에 의한 NF-κB 활성 억제에 미치는 영향. (A) Tet-On HeLa 세포에 pTRE2- MT-IIA을 transfection시킨 세포에 PDTC (150 μM) 단독으로 4시간 또는 Doxycycline (2 μg/ml)을 12시간 동안 처리하여 MT-IIA 과발현을 유도시킨 후 PDTC (150 μM)를 4시간 동안 처리한 다음 젤 지연 분석법을 수행하였다. (B) NF-κB luciferase reporter DNA construct를 같이 transfection 시킨 후 doxycycline (2 μg/ml)을 12시간 동안 처리하여 MT-IIA 과발현을 유도시킨 다음 PDTC (150 μM)를 10시간 처리하였다. Luciferase 활성은 PDTC 처치 후 10시간째에 측정하였다. 독립된 실험을 3회 시행하였다. **P<0.01

DNA construct를 transfection시킨 후 30시간 후에 doxycycline 2 μg/ml 농도로 12시간 처리하였다. 위와 마찬가지 방법으로 PDTC를 150 μM을 처리한 후 10시간째에 세포를 회수하여 luciferase activity를 측정하였다. Doxycycline을 처리한 세포들에서 doxycycline을 처리하지 않은 세포들에 비해서 PDTC에 의한 luciferase activity 감소가 적게 나타났다(그림 7B).

IV. 고 찰

Tet-On HeLa 세포에 아연을 주었을 때나 아연 ionophore인 PDTC, pyrithione을 주었을 때 모두 NF-κB 활성이 강력히 억제되는 것으로 보아 앞서 소 뇌혈관 내피세포에서 보았던 아연의 NF-κB 억제 효과(Kim 등, 1999a, b)가 이번 실험에 사용된 Tet-On HeLa 세포에서도 나타남을 확인하였다. 또한, 아연의 NF-κB 억제효과가 세포 특이적으로 나타나지 않음을 알 수 있었으며, 암 세포에서도 아연이 NF-κB를 강력히 억제할 수 있음을 보여주었다. 또한, mag-fura-2를 이용한 Tet-On HeLa 세포내 아연 농도 측정에서 PDTC가 mag-fura-2 형광신호를 증가시킴을 확인하였다. PDTC에 의한 아연의 증가와 NF-κB 억제가 모두 Cu-EDTA에 의해서는 억제되지만 Zn-EDTA에 의해서는 억제되지 않는 것을 확인함으로써 Tet-On HeLa 세포에서 PDTC가 아연을 매개로 하여 NF-κB를 억제함을 알게 되었다.

NF-κB와 MT은 공통적으로 항암제에 대한 저항성을 나타내는 기전으로 보고될 뿐 아니

라(Cherian 등, 1993; Wang 등, 1996), 최근의 연구에서는 MT의 전사를 조절하는 인자인 metal-regulatory transcription factor-1 null 생쥐와 NF-κB null 생쥐에서 간의 발달이 안되고 태아 사망을 보이는 유사 phenotype을 보임으로써 이들이 밀접한 연관 관계가 있을 것임을 시사하였다(Günes et al, 1998). 본 실험에서는 이러한 NF-κB와 MT과의 연관 관계를 설명할 수 있는 기전들 중의 하나로서 아연의 매개 역할을 상정하였다. 이제까지 zinc finger 전사조절 단백들의 경우에는 MT와의 사이에서의 아연 이동으로 인한 활성조절기전이 보고되고 있었지만(Zeng 등, 1991a, b; Cano-Gauci 및 Sarkar, 1996), NF-κB는 zinc finger 구조를 가지고 있지 않기 때문에 이런 범주의 전사조절인자로 고려되지 않았었다. 그러나, 본 실험의 Tet-On HeLa 세포에서 보이는 바와 같이 아연이 NF-κB의 강력한 억제자로서 작용하기 때문에, NF-κB도 마찬가지로 MT에 의한 직접적 영향을 받을 가능성이 매우 높다고 생각할 수 있다. 따라서, 이러한 사실을 증명하기 위하여, 먼저 MT의 유도 발현이 아연에 의한 NF-κB 억제에 어떻게 영향을 미치는지 관찰하고자 하였다. 사람세포에서는 MT의 아형 중에서 MT-IIA가 가장 중요한 역할을 담당하기 때문에, 이의 발현을 유도하였다. Cadmium과 dexamethasone을 이용하여 MT-IIA의 transcripts의 증가를 관찰하였는데, 이들 유도제들의 농도에 의존적으로 증가하였다. HeLa 세포에서 이들의 발현 정도는 16시간을 전후에서 정점에 이르기 때문에(Karin 등, 1981), 16시간을 약물 처리시간으로 정하였다. Cadmium 또는 dexamethasone 전처리에 의해 MT-IIA의 발현이 증가된 상태에서 PDTC를 처리하면 PDTC의 NF-κB 억제 효과가 대조군 세포에 비해 현저히 감소한 것으로 보아 일단 MT-IIA의 발현이 아연에 의한 NF-κB 활성 억제에 영향을 줄 가능성이 매우 큼을 확인하였다. 또한, 생리적인 자극에 의해서 발현되는 정도의 MT-IIA 양에서도 이러한 조절기능이 충분히 나타날 수 있음을 알 수 있었다. 그러나, 실험에서 사용된 cadmium과 dexamethasone은 MT-IIA의 발현 유도 이외에도 많은 다양한 세포내 기능에 영향을 미치기 때문에 위의 효과가 MT-IIA 발현에 의한 효과인지를 확증하기 위하여, MT-IIA를 과발현하는 DNA construct를 Tet-On HeLa 세포 내에 transfection한 후 그 효과를 관찰하였다. MT-IIA는 그 발현 지속 정도에 따라 같은 자극에 대해서도 상이한 효과를 나타냄이 보고되었기 때문에(Renan 및 Dowman, 1989), 본 실험에서는 발현 시간과 지속 정도를 통제하기 위하여 Tet-On 시스템(Gossen 등, 1995)을 사용하여 MT-IIA를 과발현시켰다. Doxycycline 투여에 의해 MT-IIA가 과발현되었을 때 위의 결과와 마찬가지로 PDTC에 의한 NF-κB 억제 정도가 감소하는 것으로 보아 MT-IIA의 발현이 아연에 의한 NF-κB 활성 억제를 감소시키는 것을 확인하였다. 이는 NF-κB-luciferase reporter construct를 이용한 luciferase assay를 통해서도 확인을 하였다. 따라서 이와 같은 결과들은 MT-IIA가 아연과의 상호 작용에 의하여 NF-κB 활성에 영향을 미칠 수 있음을 보여준다고 할 수 있다.

Abdel-Mageed 및 Agrawal (1998)은 MT의 발현이 NF-κB의 활성을 직접적으로 증가시킨다고 보고하였다. 즉, MT가 NF-κB와 직접 결합함으로써 NF-κB 활성을 증가시킨다고 주

장하였다. 그러나, 둘 사이의 결합이 어떻게 NF-κB 활성으로 이어지는지를 밝혀지는 못하였다. 이와는 반대로, Sakurai 등(1999)의 연구에서 앞 연구자들의 실험방법과 동일하게 anti-MT 항체를 이용하여 NF-κB 띠를 supershift를 시켜보았으나 전혀 띠의 이동이 관찰되지 않았다. 본 실험의 luciferase 활성 측정결과에서도 MT의 발현 자체가 NF-κB의 활성 자체를 증가시키지는 않았다. 따라서, MT의 발현자체가 NF-κB의 활성을 직접 증가시키는지 또는 둘 사이의 직접적인 결합이 존재하는지의 여부는 더 많은 연구를 통해 규명되어야 할 것으로 생각된다. 한편, Sakurai 등(1999)의 실험에서는 MT가 유전적으로 제거되었을 때는 오히려 TNFα 등에 의한 NF-κB 활성이 더 잘 일어나는 현상이 관찰되었다. 즉, MT가 NF-κB 활성을 오히려 억제하는 기능이 있음을 시사하였다. 그러나, 이와 같이 지속적으로 MT가 존재하지 않는 조건에서는 세포내 금속 항상성의 조절이 보통의 경우와는 많이 틀릴 가능성이 있다. MT는 실제로 세포외부로부터 안으로 금속이온을 끌어당기는 작용도 가지고 있고, 세포내의 금속이온을 결합하거나 유리시키면서 세포내 금속 항상성을 조절하는 역할을 가지고 있다. 그러므로 MT가 지속적으로 존재하지 않는 상황에서는 정교한 세포내 금속이온의 구배 조절이 불가능하므로 다른 기전을 통해 세포내 금속이온의 항상성을 유지하도록 적응되었을 가능성이 높다. 따라서, 여기에 나타나는 적응 기전이 NF-κB 활성 조절에 영향을 미칠 가능성이 적지 않다. 그러므로, 이에 대한 연구는 다각적인 방법으로 진행되어야 할 것으로 생각된다.

아연은 중추신경계에서 허혈성 질환이나, 치매, Parkinson 병 등에서 중요한 원인인자로 생각되어지고 있다(Choi 및 Koh, 1998). NF-κB와 MT 역시 이러한 조건들에서 세포의 활성 및 기능에 영향을 주는 중요 후보 물질들로 생각되어지고 있다(Aschner 등, 1997; Mattson, 1998). 또한, 항암제에 대한 저항성 발현에 NF-κB와 MT가 역시 주요한 역할을 함이 밝혀져 있다(Cherian 등, 1993; Lazo 및 Pitt, 1995; Wang 등, 1996). 본 실험에서 제시된 바와 같이 MT에 의한 NF-κB 조절에서 아연에 의한 매개 기전이 존재한다는 것은 이러한 질병의 병리기전을 이해하는데 큰 도움이 될 것으로 생각되며, 실제로 아연이 핵심적인 역할을 하는 질병 모델에서 MT에 의한 NF-κB 활성 조절과 세포 기능에 미치는 영향에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

아연에 의한 NF-κB 조절 양상을 조사하고 그 결과에 기초하여 아연 결합 단백인 MT-IIA를 발현시켰을 때 아연에 의한 NF-κB 조절이 어떻게 변화되는지를 Tet-On HeLa 세포에서 추구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Tet-On HeLa 세포에서 PDTC와 pyrithione, 아연 이온은 NF-κB 활성을 억제하였으며 PDTC는 세포 외부로부터 선택적으로 아연 이온을 세포안으로 이동시켜 세포내 아연 농도

를 증가시켰다.

2. Cadmium과 dexamethasone은 농도 의존적으로 MT-IIA 발현을 증가시켰다.

3. Cadmium과 dexamethasone에 의해 MT-IIA의 발현이 유도되었을 때, PDTC에 의한 NF-κB 억제효과는 봉쇄되었다.

4. Doxycycline 유도 유전자 발현 시스템을 이용하여, MT-IIA를 특이적으로 과발현시켰을 때 PDTC에 의한 NF-κB 억제효과는 봉쇄되었다.

위의 결과들로 미루어 metallothionein-IIA는 아연에 의한 NF-κB 활성 조절 과정에서 NF-κB 활성을 조정할 수 있는 주요 인자임을 알 수 있었으며, 금속이온의 항상성을 조절하는 metallothionein의 특성이 NF-κB 활성 조절기전과 연관되어 있는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

Abdel-Mageed AB, Agrawal KC: Activation of nuclear factor κB: potential role in metallothionein-mediated mitogenic response. *Cancer Res 58: 2335-2338, 1998*

Aschner M, Cherian MG, Klaassen CD, Palmiter RD, Erickson JC, Bush AI: Metallothioneins in brain-the role in physiology and pathology. *Toxicol Appl Pharmacol 142: 229-242, 1997*

Cano-Gauci DF, Sarkar B: Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor zinc finger. *FEBS Lett 386: 1-4, 1996*

Cherian MG, Huang PC, Klaassen CD, Liu YP, Longfellow DG, Waalkes MP: National cancer institute workshop on the possible roles of metallothionein in carcinogenesis. *Cancer Res 42: 922-925, 1993*

Choi DW, Koh JY: Zinc and brain injury. *Annu Rev Neurosci 21: 347-375, 1998*

Chubatsu LS, Meneghini R: Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *Biochem J 291: 193-198, 1993*

Connel P, Young VM, Toborek M, Cohen DA, Barve S, McClain CJ, Hennig B: Zinc attenuates tumor necrosis factor-mediated activation of transcription factors in endothelial cells. *J Am Coll Nut 16: 411-417, 1997*

Ghosh S, May MJ, Kopp EB: NF-κB and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol 16: 225-260, 1998*

Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H: Transcriptional activation by tetracycline in mammalian cells. *Science 268: 1766-1769, 1995*

Günes C, Heuchel R, Georgiev O, Mller K, Lichtlen P, Blthmann H, Marino S, Aguzzi A, Schaffner W: Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *EMBO J 17: 2846-2854, 1998*

Kägi JHR, Schaffer A: Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry 27: 8509-8515, 1988*

Kaji T, Yamamoto C, Tsubaki S, Ohkawara S, Sakamoto M, Sato M, Kozuka H: Metallothionein induction by cadmium, cytokines, thrombin and endothelin-1 in cultured vascular endothelial cells. *Life Sci 53: 1185-1191, 1993*

Karin M, Anderson RD, Herschman HR: Induction of metallothionein mRNA in HeLa cells by dexamethasone and by heavy metals. *Eur J Biochem 118: 527-531, 1981*

Karin M, Herschman HR: Induction of metallothionein in HeLa cells by dexamethasone and zinc. *Eur J Biochem 113: 267-272, 1981*

Karin M, Richards RI: Human metallothionein genes: molecular cloning and sequence analysis of the mRNA. *Nucl Acids Res 25: 3165-3173, 1982*

Kim CH, Kim JH, Hsu CY, Ahn YS: Zinc is required in pyrrolidine dithiocarbamate inhibition of NF-κB. *FEBS Lett 449: 28-32, 1999a*

Kim CH, Kim JH, Hsu CY, Ahn YS: Pyrithione, a zinc ionophore, inhibits NF-κB activation. *Biochem Biophys Res Commun 259: 505-509, 1999b*

Kim CH, Kim JH, Xu J, Hsu CY, Ahn YS: Pyrrolidine dithiocarbamate induces bovine cerebral endothelial cell death by increasing intracellular zinc level. *J Neurochem 72: 1382-1488, 1999c*

Kim CH, Kim JH, Hsu CY, Ahn YS: Pyrrolidine dithiocarbamate-induced NF-κB inhibition in bovine cerebral endothelial cells is redox independent. in preparation

Lazo JS, Pitt BR: Metallothioneins and cell death by anticancer drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol 35: 635-653, 1995*

Lee KA, Bindereif A, Green MR: A small-scale procedure for preparation of nuclear extracts that support efficient transcription and pre-mRNA slicing. *Gene Anal Tech 5: 22-31, 1988*

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem 193: 265-275, 1951*

Masters BA, Kelly EJ, Quaife CJ, Brinster RL, Palmitier RD: Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA 91: 584-588, 1994*

Mattson MP: Free radicals, calcium, and the synaptic plasticity cell death continuum: emerging roles of the transcription factor NF kappaB. *Int Rev Neurobiol 42: 103-168, 1998*

Palmitier RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM: MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci USA 89: 6333-6337, 1992*

Renan MJ, Dowman PI: Increased radioresistance of tumor cells exposed to metallothionein-inducing agents. *Radiat Res 120: 442-455, 1989*

Sakurai A, Hara S, Okano N, Kondo Y, Inoue J, Imura N: Regulatory role of metallothionein in NF-κB activation. *FEBS Lett 445: 55-58, 1999*

Sensi SL, Canzoniero LMT, Yu SP, Ying HS, Koh JY, Kerchner GA, Choi DW: Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurons: routes of entry. *J Neurosci 17: 9554-9564, 1997*

Shumilla JA, Wetterhahn KE, Barchowsky A: Inhibition of NF-κB binding to DNA by chromium, cadmium, mercury, zinc, and arsenite *in vitro:* evidence of a thiol mechanism. *Arch Biochem Biophys 349: 356-362, 1998*

Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M: The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron 7: 337-347, 1991*

Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, Haegeman, G:

p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem 273: 3285-3290, 1998*

Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr: TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-κB. *Science 274: 784-787, 1996*

Xu J, Wu Y, He L, Yang Y, Moore SA, Hsu CY: Regulation of cytokine-induced iNOS expression by a hairpin oligonucleotide in murine cerebral endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun 235: 394-397, 1997*

Zeng J, Heuchel R, Schaffner W, Kägi JHR: Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1. *FEBS Lett 279: 310-312, 1991a*

Zeng J, Vallee BL, Kägi JHR: Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters. *Proc Natl Acad Sci USA 88: 9984-9988, 1991b*

Abstract

Effect of metallothionein expression on NF-κB activity

Chul Hoon Kim

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Young Soo Ahn)

Metallothionein (MT), a small protein molecule which can bind or release metal ions, is involved in the regulation of cellular metal homeostasis. Recently, metal ions have been suggested as important regulators of nuclear factor kappa B (NF-κB) activity. In bovine cerebral endothelial cells, zinc has been reported to be a potent negative regulator of NF-κB activity. Thus, it might be speculated that metal-binding protein, MT, would be an important regulator of NF-κB. In this study, the effect of expression of MT on the inhibitory effect of zinc on NF-κB activity was investigated. In Tet-On HeLa cells, $ZnSO_4$ inhibited NF-κB activity dose-dependently. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) revealed that pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) and pyrithione inhibited NF-κB activity. Cu-EDTA blocked the effect of PDTC on NF-κB activity but Zn-EDTA did not. PDTC increased the zinc-specific fluorescence signal of intracellular mag-fura-2. Both $CdCl_2$ and dexamethasone increased the expression of MT-IIA transcripts in 16 h. After pretreatment of $CdCl_2$ or dexamethasone, PDTC did not efficiently inhibit the NF-κB activity. When MT-IIA was transfected in Tet-On HeLa cell using doxycycline-inducible gene expression system, over-expression of MT-IIA by treatment of doxycycline reduced the effect of PDTC on NF-κB activity, which was measured by both EMSA and luciferase assay. These data suggest that metallothionein can modulate NF-κB activity through regulating the zinc homeostasis.

Key Words: metallothionein, nuclear factor kappa B (NF-κB), zinc, Tet-On HeLa cell