

기관고유연구사업 최종보고서

편집순서 1 : 결표지 (앞면)

(과제번호 : 0910020)

간암의 발생에서 ELF 단백질의 역할에 관한 연구

The studies on the regulation of ELF
in hepatocellular carcinogenesis

과제책임자 : 김상수

국립암센터

편집순서 1 : 결표지 (측면, 뒷면)

(뒷면)

(측면)

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.

(14 pont, 고딕체)

↑
6cm ↓

↑
5cm ↓

간암의 발생에서 ELF 단백질의 역할에 관한 연구 국립암센터

↑
3cm ↓

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “간암의 발생에서 ELF 단백질의 역할에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012. 01. 26

국립암센터

과제책임자 : 김상수

목 차

< 요약문 >

(한글)

(영문)

1. 연구의 최종목표
2. 연구의 내용 및 결과
3. 연구결과 고찰 및 결론
4. 연구성과 및 목표달성도
5. 연구결과의 활용계획
6. 참고문헌
7. 첨부서류

< 요약 문 >

연구분야(코드)				과제번호	0910020
과제명	간암의 발생에서 ELF 단백질의 역할에 관한 연구				
연구기간/연구비 (천원)	합계	2009년 1월 1일 ~ 2011년 12월 31일	390,000		
	1차년도	2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일	130,000		
	2차년도	2010년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일	130,000		
	3차년도	2011년 1월 1일 ~ 2011년 12월 31일	130,000		
과제책임자	성명	김상수	소속	방사선의학연구과	
	전화번호	031-920-2491	전자우편	sangsookim@ncc.re.kr	
색인단어	국문	간암, ELF, CDK4, caspase-3, 줄기세포			
	영문	liver cancer, ELF, CDK4, caspase-3, stem cell			
<p>◆ 연구목표</p> <p><최종목표></p> <ul style="list-style-type: none"> ● ELF 단백질의 돌연변이로 유발된 간암의 발생기전에서 ELF와 CDK4의 생화학적 상호작용에 대해 규명하고 발생된 간암이 CDK4의 발현저해를 통해 암이 억제되는 과정을 분석하고, TGF-β에 의한 ELF단백질의 cleavage에 관한 생화학적 동정 및 cleavage의 역할 규명. 또한 ELF 단백질과 interaction하는 단백질의 스크리닝과 이들의 상관관계를 통한 TGF-β의 신호에 의한 세포내의 cytoskeletal remodeling에서의 역할 규명. ● 암 억제 유전자인 ELF의 돌연변이 혹은 발현저하에 의해 생성되는 암의 발생기전을 분석하여 이를 통해 얻어진 연구 성과로 항암치료에서 지표로 사용하여 치료효율을 높임으로써 암억제유전자의 돌연변이 암의 새로운 치료제 및 저해제의 개발에 기여하고자 하는 것. 또한 본 연구는 이의 작용기전을 밝혀내는 과정에서 knockout mice와 이에서 유래된 세포나 조직을 사용함으로써 보다 믿음만한 결론을 이끌어 낼 수 있어서 상대적으로 우수한 논문을 생산할 수 있는 가능성을 가지고 있으며 이를 통해 만들어진 마우스 모델은 각각의 genetic alteration에 적합한 암을 target으로 하는 치료제 개발의 최적의 모델로 이용 가능. <p><당해년도 목표></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ELF의 발현에 따른 TGF-β pathway의 영향의 분석. 2. 다양한 형태의 ELF의 발현에 의한 세포의 영향에 대한 분석. 3. ELF의 발현에 따른 세포 구조 분석하여 ELF의 역할 규명. 4. ELF의 모델 시스템의 확립과 이용. 5. ELF 돌연변이의 영향조건의 분석과 ELF돌연변이에 의한 embryonic lethality의 원인분석 <p>◆ 연구내용 및 방법</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ELF의 결실 혹은 과발현이 TGF-β pathway에 미치는 영향을 알아보기 위해 이와 연관된 조절 단백질의 발현과 활성화 정도를 측정하고 이에 의한 유전자의 발현 양상을 luciferase reporter system을 세포에 주입하여 이의 활성을 측정 하여 알아보고자 함. 2. 세포내에서 ELF의 과발현 혹은 결실외에 다양한 processing 통해 생성될 수 있는 다양한 형태의 ELF의 영향을 세포의 세포주기조절, 성장, 각 pathway의 활성을 분석하여 각 processing이 ELF를 통해 세포에 미치는 영향을 분석하여 각 조절기전의 타겟으로서의 가능성 확인. 3. ELF는 spectrin의 한 가지 isoform이므로 이의 발현이 세포구조에 영향을 주리라 생각되며 ELF의 발현정도에 따른 세포의 형태에 변화를 주는지 분석. 이를 ELF가 knockout된 mouse 세포 혹은 knockdown된 human cancer cell line과 정상 수준의 ELF를 발현하는 세포와 형태적 비교를 시행하며 					

아울러 ELF의 결합단백질의 발현을 조절하여 구조 분석. 또한 FLAG/V5-His-tagged ELF단백질을 사용하여 ELF의 결합단백질을 동정하고 이의 결합이 TGF- β 에 의해 변화되는지 관찰. 그리고 TGF- β 에 의해 결합력에 변화가 생긴 단백질과 ELF를 면역항체를 통해 염색하여 이들의 위치 변화를 추적함으로써 세포구조의 변화 관찰.

4. ELF의 다양한 활용을 위해 *in vitro*와 *in vivo* 모델 시스템의 필요성이 대두. 이를 위해 현재 결실에 사용된 GFP로 knockdown이 표시되는 세포 모델을 이용하여 ELF의 활성을 알아봄. 현재 ELF의 KO mice모델의 경우 homozygous mice의 경우 embryonic lethality가 생겨 heterozygous mice를 사용하고 있으나 mice의 전반적인 발육이 좋지 않으며, 간암의 발생에 오랜 기간이 필요해 암억제제의 투여와 같은 경우 적합한 모델로 이용하기 어려움. 이를 위해 ELF의 조직 특이적인 결실을 유도 할 수 있는 간 특이적 conditional knockout mice모델을 제조하여 이를 통해 보다 폭 넓은 실험이 가능하여 많은 데이터의 축적이 가능하리라 예상됨.
5. ELF의 발현은 다양한 조직에서 나타나므로 ELF의 발현이 나타나는 조직이 ELF의 돌연변이에 의해 영향을 받으리라 가정하고 ELF의 발현을 mouse를 이용하여 embryo부터 성체까지 조직 수준에서 염색하여 발생의 정도를 조사하고 이를 통해 ELF돌연변이에 의해 생기는 embryonic lethality의 원인을 조직수준에서 분석. 또한 이를 통해 주목할 만한 발현이 나타나는 조직에 특이적으로 ELF를 knockout 시켜 이를 통해 어떠한 현상이 발생하는 지를 관찰하고 원인을 분석.

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수	4/6	67
IF 합	25.523/36	71
기타 성과		

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

1. 본 과제는 각각의 암 억제 유전자의 돌연변이에 의해 생성되는 암의 발생과정에서 다른 조절단백질과의 상호작용을 분석하고 이를 통해 암 발생의 기전을 분석함으로써 본 연구를 통해 얻어진 연구성과는 항암치료에서 지표로 사용하여 치료효율을 높이며 이를 통해 각각의 돌연변이 암의 새로운 치료제 및 억제제의 개발에 기여하고자 하는 것.
2. 또한 본 연구는 이의 작용기전을 밝혀내는 과정에서 knockout mice와 이에서 유래된 세포나 조직을 사용함으로써 보다 믿음만한 결론을 이끌어 낼 수 있어서 상대적으로 우수한 논문을 생산할 수 있는 가능성을 가지고 있으며 이를 통해 만들어진 xenograft 나 knockout 마우스 모델은 각각의 genetic alteration에 적합한 암을 target으로 하는 치료제 개발의 최적의 모델로 이용 가능.

◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)

성	명	김상수, 백혜정, 임정아, 장문선, 추동환
---	---	-------------------------

Project Summary

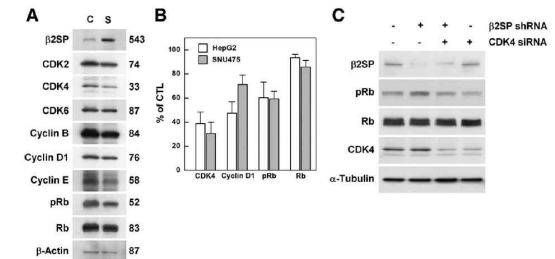
Title of Project	The studies on the regulation of ELF in hepatocellular carcinogenesis
Key Words	liver cancer, ELF, CDK4, caspase-3, stem cell
Project Leader	Sang Soo Kim
Associated Company	
<p>A. Research Purpose</p> <p>Alteration of ELF which is responsible for TGF-β signaling induces the cancer in liver and stomach. However, the detailed regulation of ELF is not established yet. Based on our preliminary result on phosphorylation and identification of interaction protein, we will study the role of ELF in cell regulation. We hope our study provide the informations for how alteration of ELF leads the tumorigenesis and what is the characteristic of ELF-altered tumor. Then it will be also helpful for developing the treatment for ELF-altered cancer.</p> <p>B. Contents</p> <p>1. The role of CDK4 in cell cycle deregulation due to loss of ELF: Our previous studies showed that loss or downregulation of ELF leads G1/S transition and upregulation of cyclin D1 and CDK4. To elucidate the activation of G1/S transition due to loss of ELF, we will investigate this signaling pathway in biochemical and molecular biological approach. Then, we will also examine that downregulation of CDK4 can prevent the abnormalities caused by loss of ELF. This study will provide the information whether CDK4 is suitable target for cancer due to loss of ELF.</p> <p>2. Functional role of ELF cleavage by caspase: Recently, we identified that cleavage of ELF was arisen by treatment of TGF-β. We have investigated what kind of protease is responsible for this cleavage and what kind of cleavage products were generated by this process. We will pursuit what is functional role of this cleavage in cell cycle regulation, apoptosis, and localization. Then, we also investigate the relation between cleavage of ELF and carcinogenesis by using tumor cell lines and primary tumors. We expect that elucidation of this process will provide the information of regular life cycle of ELF and its contribution to carcinogenesis.</p> <p>C. Expected Contributions</p> <p>We will investigate the biochemical and genetic interaction of ELF and interaction proteins in liver carcinogenesis. We are especially interested in phosphorylational regulation and communication with interaction protein. We believe that product of this study may be used for marker and tumor status and contributed to tailored cancer therapy for ELF-altered cancer. And model system of this study can be also applied for development of anti-cancer drug.</p>	

1. 연구의 최종목표

- ELF 단백질의 돌연변이로 유발된 간암의 발생기전에서 ELF와 CDK4의 생화학적 상호작용에 대해 규명하고, ELF의 돌연변이로 부터 발생된 간암이 CDK4의 발현저해를 통해 암이 억제되는 과정에 대해 분석. 또한 TGF- β 에 의해 ELF단백질을 cleavage하는 효소에 대한 생화학적 동정 및 cleavage의 역할 규명. 그리고 ELF 단백질과 interaction하는 단백질을 스크리닝하고 이 단백질들과의 상관관계를 통해 TGF- β 의 신호에 의한 세포내의 cytoskeletal remodeling에서 ELF의 역할 규명.
- 본 과제는 암억제 유전자인 ELF의 돌연변이 혹은 발현저하에 의해 생성되는 암의 발생을 분석하여 본 연구를 통해 얻어진 연구성과를 항암치료에서 지표로 사용함으로써 치료효율을 높이며 이를 통해 각각의 돌연변이 암의 새로운 치료제 및 저해제의 개발에 기여하고자 하는 것. 또한 본 연구는 이의 작용기전을 밝혀내는 과정에서 knockout mice와 이에서 유래된 세포나 조직을 사용함으로써 보다 믿음직한 결론을 이끌어 낼 수 있어서 상대적으로 우수한 논문을 생산할 수 있는 가능성을 가지고 있으며 이를 통해 만들어진 마우스 모델은 각각의 genetic alteration에 적합한 암을 target으로 하는 치료제 개발의 최적의 모델로 이용 가능.

2. 연구의 내용 및 결과

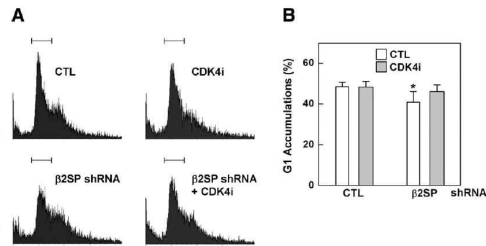
가. b2SP의 결실에 CDK4의 역할에 관한 연구



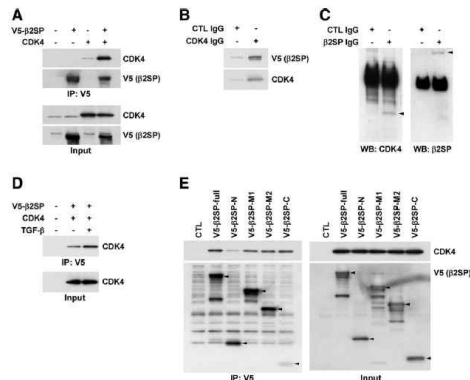
- **b2SP의 발현억제에서의 세포주기조절 타겟 발굴 및 검증:** b2SP의 결실에 의해 암이 발생하는 과정에서 b2SP의 결실이 세포주기의 이상 현상을 유발하는 현상이 관찰되었고 b2SP의 이상에 의한 암 발생의 과정에 관여하는 세포주기를 조절하는 물질이 무엇인지 알아내고, 이 물질의 타겟으로서의 가능성을 조사해 보고자 하였음. 이를 알아보기 위해 간암세포주인 SNU475세포에 b2SP를 과발현하여 이에 가장 특이적으로 변화되는 단백질의 동정을 시도. 대상으로 세포주기의 조절에 관여하는 CDK2, CDK4, CDK6, cyclin B, cyclin A1, cyclin D1, cyclin E와 이들의 기질인 Rb, phospho-Rb를 western blot을 사용하여 이들 단백질의 발현 수준을 조사해 보았을 때 여러 단백질의 감소가 관찰되었지만 그중 CDK4의 감소가 가장 두드러지게 나타났고 이의 기질인 phospho-Rb의 감소도 이에 비례하여 나타나는 것이 관찰 (아래그림 A와 B). CDK4가 b2SP의 발현저하 혹은 결실에 의해 활성화되는 타겟인지를 검증하기 위해 과발현과는 반대로 발현억제를 사용하여 재확인. SNU475세포에 b2SP shRNA를 infection시킨 결과 CDK4의 활성을 나타내는 phospho-Rb의 증가가 나타나고 여기에 CDK4

를 억제시키기 위해 CDK4 siRNA를 transfection시키면 증가된 phospho-Rb가 정상 수준으로 환원되는 것으로 b2SP의 결실에 의한 phospho-Rb의 증가가 CDK4의 활성 증가에 의한 것임을 알 수 있었음 (아래그림 C).

- **CDK4의 siRNA에 의한 b2SP의 shRNA로 기인한 세포주기 조절이상의 회복 측정:** 이전의 선행연구를 통해 b2SP의 발현이 G1/S transition에 연관되어 있음을 밝힌바 있음. 이에 b2SP의 발현억제가 G1/S transition를 촉진하는지와 촉진한다면 이것이 CDK4의존성을 보이는지 알아봄. 이를 알아보기 위해 SNU475세포에 b2SP shRNA를 infection한 후 FACS분석을 하여보니 통계적으로 유의한 G1 arrested population의 감소가 관찰. 이 G1/S transition이 b2SP의 발현억제에 따른 CDK4의 활성화에 의한 것인지 알아보기 위해 CDK4의 억제제를 처리한 경우 b2SP억제에 의한 G1 arrested population의 회복이 관찰 (아래 그림). 따라서 이를 토대로 b2SP의 결실 혹은 발현감소에 의해 발생되는 G1/S transition의 이상이 CDK4의 활성화에 의한 것임을 알 수 있었음.

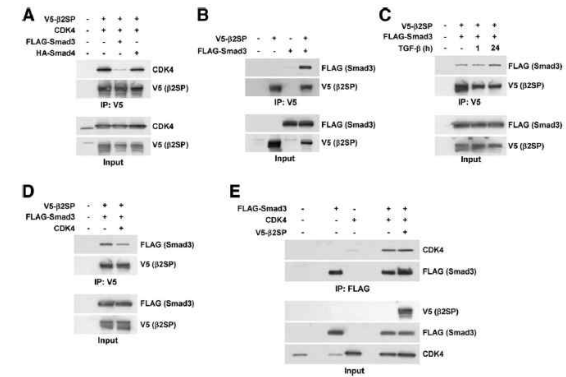


- **b2SP와 CDK4의 결합여부 측정과 이에 대한 TGF- β 의 효과 분석:** b2SP의 발현억제가 CDK4의 활성화를 유도하는 특성에 의해 b2SP와 CDK4가 생화학적 반응을 하리라 가정하고 b2SP가 CDK4의 기질이 될 수 있는지 알아보기 위해 순수 정제된 b2SP가 CDK4-cyclin D1 complex에 의해 인산화 되는지 ^{32}P -gamma-ATP를 사용하여 확인해 본 결과 인산화 되지 않았음. 다음으로 이 두 단백질이 결합하는지를 확인해 보기위해 293T 세포에 V5 epitope 표지가 tagged된 b2SP와 CDK4를 transfection을 통해 과발현시킨 후 세포를 lysis시킨 후 V5-agarose를 사용하여 b2SP를 immunoprecipitation 하고, CDK4에 특이적인 항체를 사용하여 결합여부를 확인. 아래 그림에서 보이듯이 b2SP가 CDK4와 결합하는 것을 관찰 할 수 있었고 이 결합은 293T세포뿐 아니라 SNU475세포에서도 일

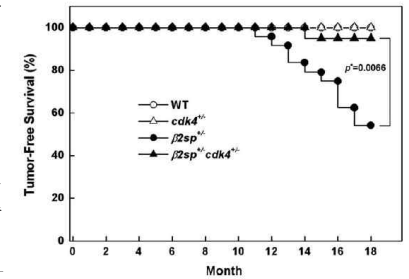


어남을 보았음 (왼쪽 그림). 이 결합의 세기가 TGF- β 에 의해 조절되는지 알아보기 위해 TGF- β 를 처리한 후 immunoprecipitation을 통해 결합 정도를 측정해보니 TGF- β 는 b2SP와 CDK4의 발현에는 차이를 만들지 않으나 결합을 증가.

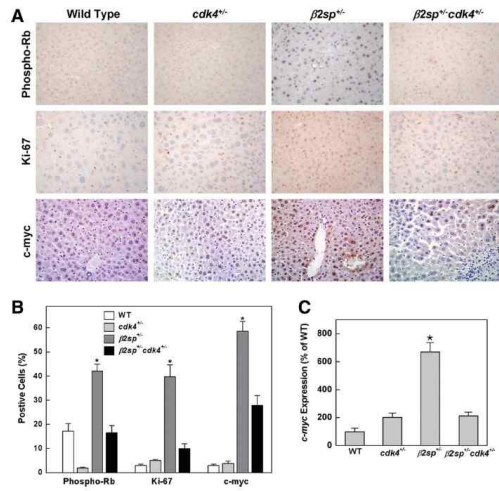
- **b2SP와 CDK4의 결합에 TGF- β /Smad단백질들의 영향 분석:** b2SP와 CDK4의 결합이 TGF- β /Smad단백질들에 의해 영향을 받는지 알아보니 b2SP와 CDK4의 결합은 smad3에 의해 저해되고 CDK4의 경우 오히려 b2SP에서 분리되어 smad3과 결합하는 것으로 밝혀짐. 이러한 가능성은 b2SP가 CDK4/Smad와 결합함으로써 이 두 단백질의 결합을 촉진하는 매개체로 역할을 함으로써 TGF- β 의 신호를 전달하는 역할을 담당하리라 생각됨 (아래 그림).



- **b2SP와 CDK4의 돌연변이취와 교잡취에서 발생된 암의 IHC를 통한 마커 분석:** b2SP의 돌연변이에 의한 간암발생이 CDK4의 발현감소에 의해 억제되는지 알아보기 위해 b2SP 돌연변이 마우스에 *cdk4* 돌연변이 쥐를 교배하여 서로 다른 유전형 (Wild type, *cdk4*^{-/-}, *b2SP*^{-/-}, *b2SP*^{-/-}*cdk4*^{-/-})으로 grouping하여 18개월 동안 사육하며 간암 발생빈도를 조사. *b2SP*^{-/-} 쥐의 경우 이전과 유사하게 18개월 동안에 24개체 중에서 11개체 (46%)에서 간암이 관찰되었던 반면 *cdk4*의 발현이 절반으로 줄어든 *b2SP*^{-/-}*cdk4*^{-/-} 쥐의 경우 20개체 중에서 1개의 개체 (5%)에게서만 간암이 관찰 (우측 그림). 반면에 *cdk4*^{-/-} 쥐의 경우 간암의 발생은 20개체에서 한 개도 관찰되지 않음. 이러한 *cdk4*의 발현억제에 의해 생장억제가 일어났는지 알아보기 위해 위 유전형의 쥐들에게서 간조직을 적출하여 조직적 수준에서 어떠한 변화가 있는지 조사. 세포의 생장에 대한 마커로 Ki-67의 수준을 측정해 보니 *b2SP*^{-/-} 쥐의 경우 정상 쥐에 비해 두배 이상의 hepatocyte에서 Ki-67양성이 관찰되었던 반면 *cdk4*의 발현이 절반으로 줄어든 *b2SP*^{-/-}*cdk4*^{-/-}의 경우 Ki-67의 양성이 정상수준으로 회복되는 것이

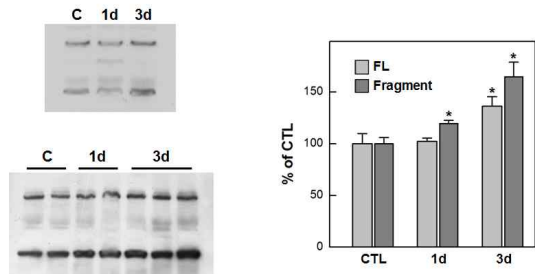


관찰 되었고 이러한 조직학적 특성은 c-myc 암유전자의 발현에서도 같은 양상을 보임 (아래 그림).



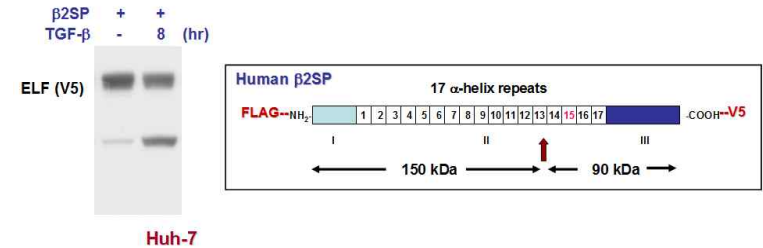
나 b2SP에 의한 세포생장과 세포사의 조절기전에 관한 연구

● b2SP의 발현저하가 간암의 발생을 증가시키는 이전의 연구를 통해 b2SP가 간의 항상성에 중요한 역할을 하리라 가정하고 간손상을 유도하였을 때 b2SP의 변화를 추적. 개체에서 간손상을 유도하기 위해 간손상을 일으키는 것으로 알려진 acetaminphen을 복강을 통해 쥐에게 주입하고 b2SP의 변화를 관찰. 간손상이 유도된 경우 b2SP의 발현이 증가하고 이보다 빨리 SDS-PAGE에서 작은 분자량의 b2SP 유도체가 증가함이 관찰되며 이 증가는 통계적으로 유의성이 나타남 (아래 그림).

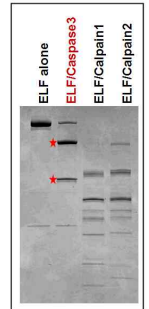


● 이 작은 분자량의 b2SP가 간손상에 의해 유도되는지 확인하기 위해 간손상에 촉진되는 TGF-β의 처리가 작은 분자량의 b2SP를 증가시키는지 huh7세포를 사용하여 확인하여 보니

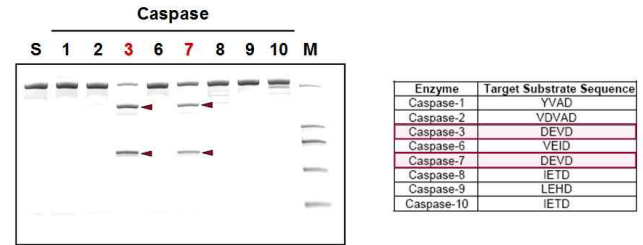
TGF-β가 이를 증가시키며 이를 N-말단과 C-말단에 다른 표지를 사용하여 확인하여보니 Full-length 작은 b2SP의 repeat region에서 절단이 생겨 150 Kda과 90 Kda의 두 개의 fragment로 나뉘어짐이 밝혀짐 (아래 그림).



● 다음으로 이러한 cleavage가 TGF-β에 의해 유도될 때 어떠한 cleavage protease에 의해 일어나는지를 동정하기 위해 순수정제한 b2SP 단백질을 calpain과 caspase-3와 반응시켜본 결과 TGF-β에 의한 절단패턴은 caspase-3에 의한 것이라 추정됨. 이를 재확인하기 위해 세포에서 TGF-β를 처리하여 cleavage를 유도하고 caspase-3의 저해제를 처리하였으나 cleaved fragment가 관찰됨. 반면에 모든 caspase를 저해하는 저해제인 경우 cleaved fragment의 발생을 효과적으로 저해하는 것으로 보아 TGF-β에 의해 유도되는 b2SP 단백질의 cleavage는 caspase-3이외에 다른 caspase에 의해서도 유도되는 것으로 추정됨 (우측 그림).



● Caspase-3 이외의 다른 b2SP의 절단효소를 동정하기 위해 위와 같이 순수 정제한 b2SP를 기질로 하여 다른 여러 가지 caspase와 반응시켜본 결과 caspase-7이 caspase-3와 같은 절단을 일으키며 동일한 패턴을 만드는 것으로 밝혀짐 (아래 그림).

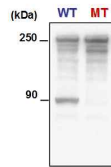


● Caspase-3/7의 경우 단백질의 1차구조에서 1454-1457번째 아미노산에서 이 염기서열이 존재하고 이 염기서열은 mouse와 chicken에서도 유전적으로 보존되어 있음. 직접적으로 이 염기서열이 b2SP의 일어나는 위치인지를 알아보기 위해 1457번째의 Aspartate (D)를 alanine (A)으로 site-directed mutagenesis를 사용하여 돌연변이 시킨 결과 돌연변이의 경우 절단이 나

타나지 않으므로 이 위치에서의 절단이 일어날 것으로 추정되며 이 위치에서 절단이 일어나는 경우 그 부산물은 관찰되는 fragment의 크기를 나타냄 (아래 그림).

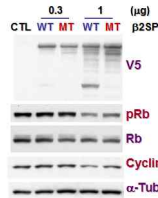
Identification of Cleavage Site of β 2SP

	1441	1457	1470
Human	SQAQALSQEG	KSTDEVD SKR	LTVQTKFMEL
Mouse	SQAQALSQEG	KSTDEVD SKR	LTVQTKFMEL
Gallus	SQARALSQEG	KSTDEVD GKR	LTVKKFLEL

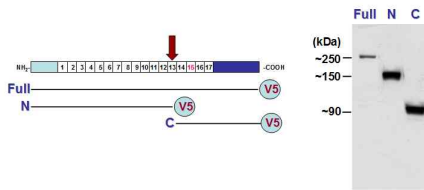


- Point mutation of Caspase3 cleavage site : DEVD¹⁴⁶⁷SKRL (DEVD→DEVA)
- 5X10⁵ cells (Huh7)
- Transfection of ELF 1 mg (V5 tag)

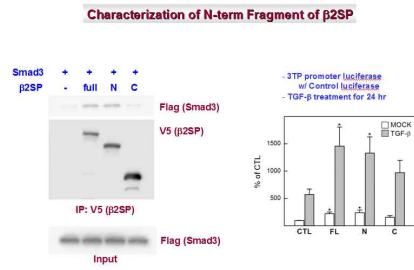
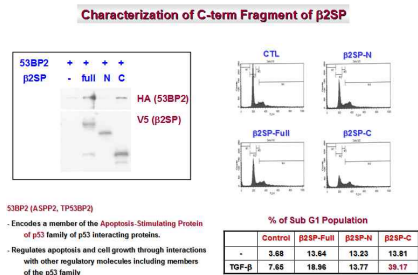
- 이 절단이 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 정상 b2SP와 절단이 일어나지 않는 돌연변이 b2SP를 세포에 transfection시킨 후 세포조절 단백질질을 조사해보니 돌연변이는 정상단백질에 비해 Rb의 인산화 억제와 cyclin D1의 발현억제 능력이 정상 단백질에 비해 떨어지는 것이 관찰 됨. 이는 b2SP의 이러한 효능이 절단을 통해서 조절됨을 시사 함 (우측 그림).



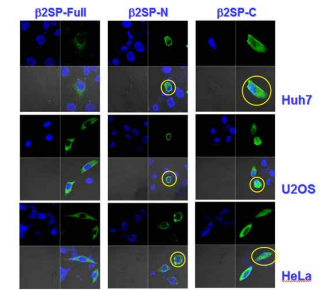
- 절단이 신호전달의 매개체로 작용한다고 가정하고 절단되어 나온 각 fragment를 각각 cloning하여 발현시켜 작용을 연구. 또한 이 경우에 발현을 쉽게 모니터링 할 수 있도록 하기 위해 C-말단에 V5를 tagging시켜 발현토록 함 (아래 그림).



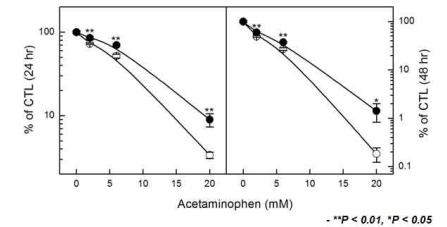
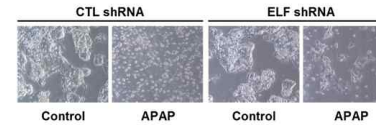
- 이렇게 만들어진 fragment의 역할을 알아보니 C-말단의 경우 b2SP의 결합단백질인 53BP2에 특이적으로 결합하며 TGF- β 의존적 apoptosis를 촉진하는 것으로 나타남. 반면에 N-말단의 경우 Smad3에 특이적으로 결합하여 TGF- β 의존적 발현조절에 영향이 있음 (아래 그림).



- b2SP의 절단이 위치의 조절에 영향을 주는지 알아보기 위해 b2SP와 fragment들을 Huh7, U2OS, HeLa에 과발현시키고 tag으로 사용된 V5에 대하여 염색해본 결과 세포질에 넓게 분포하는 Full-length와 달리 N-말단은 핵막 주위에 높게 분포하고 C-말단은 세포질에 넓게 분포되어 보임. 이는 절단이 세포내에서 b2SP의 위치 조절을 통해 활성을 일으킬 가능성을 보여줌 (우측 그림).

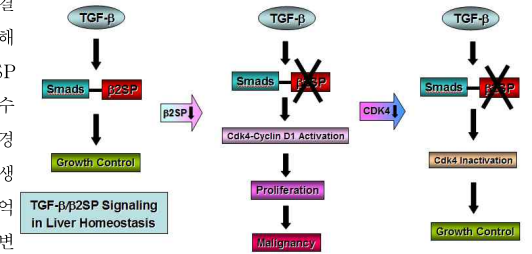


- 그리고 이러한 역할을 하는 b2SP의 결실이 간손상반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 HepG2 세포에 b2SP 단백질을 shRNA를 통해 발현억제를 시키고 간손상을 준 경우 정상세포에 비해 APAP에 의해 유도되는 간손상에 통계적으로 유의한 저항성을 보임. 이는 b2SP가 결실되거나 발현억제되는 경우 TGF- β 에 의한 apoptosis나 transcriptional regulation에 이상이 생겨 간손상 반응이 적절히 일어나지 않아 손상된 간세포의 제거가 완벽히 일어나지 않으므로 이를 통한 genetic instability의 축적을 통해 암발생이 촉진되리라 추정 (아래 그림).



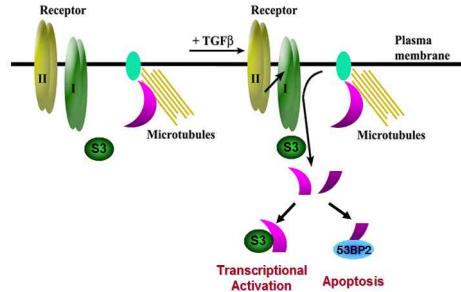
3. 연구결과 고찰 및 결론

- 본 연구결과는 b2SP의 결실에 의해 발생하는 간암의 생성기전을 연구함으로써 b2SP가 결실된 암의 타겟을 밝히고자 하는 연구로 본 연구를 통해 b2SP의 결실에 의한 세포의 세포주기 이상현상과 과다생장의 원인을 밝히고자 함. 본 연구는 이에 대한 타겟으로 CDK4에 대한 가능성을 검증. 또한 CDK4와 b2SP의 연관성을 알아보기 위해 생화학적 방법을 통해 알아본 결과 CDK4와 b2SP의 생화학적 결합이 밝혀졌으며 이를 통해 CDK4/TGF- β 의 상호조절에 b2SP가 관여함을 보임. 그리고 개체 수준에서 CDK4의 발현을 억제한 경우 b2SP의 발현저하를 통해 발생하는 간암의 생성을 효과적으로 억제함으로써 CDK4가 b2SP 돌연변이



이 간암의 적절한 타겟이 될 수 있음을 증명.

- 이와 더불어 아직 잘 알려지지 않은 b2SP의 조절기전을 알아보고 이를 통해 b2SP가 TGF- β 에 의해 절단이 촉진되며 이를 통해 생성된 fragment들에 의해 apoptosis와 transcriptional regulation이 독립적으로 일어나며 이는 간손상과 같은 간의 항상성조절에 관여하며 b2SP의 발현저하 혹은 결실은 이러한 조절기전의 이상을 통해 간암의 형성에 촉진 할 것이라 추정됨.



4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	지널명 (IF.)	Year; Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
Pretreatment Carbohydrate Antigen 19-9 Level Indicates Tumor Response, Early Distant Metastasis, Overall Survival and Therapeutic Selection in Localized and Unresectable Pancreatic Cancer	김상수 (공동)	Int J Radiat Oncol Biol Phys (4.592)	Epub ahead of print	국외 SCI	없음
Transforming growth factor- β adaptor, b2-spectrin modulates Cyclin dependent kinase 4 to reduce development of hepatocellular cancer.	김상수 (교신)	Hepatology (10.840)	2011; 53: 1676-1684	국외 SCI	0910020
The Effect of a Contrast Agent on Proton Beam Range in Radiotherapy Planning Using Computed Tomography for Patients With Locoregionally Advanced Lung Cancer	김상수 (공동)	Int J Radiat Oncol Biol Phys (4.592)	Epub ahead of print	국외 SCI	없음
Role of Adjuvant Chemoradiotherapy for Resected Extrahepatic Biliary Tract Cancer.	김상수 (공동)	Int J Radiat Oncol Biol Phys (4.592)	Epub ahead of print	국외 SCI	없음
In vivo Radiobiological Characterization of Proton Beam at the National Cancer Center in Korea: The Effect of the CHK2 Mutation.	김상수 (교신)	Int J Radiat Oncol Biol Phys (4.592)	2011; 79: 559-562	국외 SCI	0910020
The effect of external beam radiotherapy volume on locoregional control in patients with locoregionally advanced or recurrent nonanaplastic thyroid cancer.	김상수 (공동)	Radiat Oncol	2010; 5: 69-76	국외 SCI	없음
Impaired skin and mammary gland development and increased g-irradiation-induced tumorigenesis in mice carrying a mutation of S1152-ATM phosphorylation site in Brca1.	김상수 (교신)	Cancer Research (7.543)	2009; 69: 9291-9300	국외 SCI	0910020
ATM is required for rapid degradation of cyclinD1 in response to gamma-irradiation.	김상수 (교신)	Biochem Biophys Res Commun (2.548)	2009; 378: 847-850	국외 SCI	0910020

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종 목표	연차별 목표	달성내용		달성도(%)		
		연차	내용	연차	최종	
간암의 발생에서 ELF 단백질의 역할	1차년도	1	ELF/CDK4의 생화학적 interaction 분석	생화학적 결합 확인	100	33
		2	CDK4에 의한 ELF 인산화 연구	인산화되지 않음		
		3	TGF- β 처리에 의한 ELF/CDK4의 위치이동 분석	절단촉진을 통한 이동변화 관찰		
		4	CDK4억제에 따른 ELF의 생화학적 표지 분석	pRb와 G1 accumulation 조절		
		5	ELF와 ELF/CDK4 돌연변이 쥐의 조직 분석	Ki67, pRb, c-myc발현의 감소		
관련 연구	2차년도	1	ELF 단백질 분해 assay system 확립	분해 assay system 확립	100	33
		2	ELF 단백질의 순수 정제	순수 정제 완료		
		3	ELF 단백질 분해 효소 동정	Caspase-3/7 동정		
		4	ELF 단백질 분해 위치 분석	1454-1457번째 DEVD서열		
		5	ELF의 분해에 의한 단백질 위치변화 분석	핵막과 핵으로 분포		
3차년도	3차년도	1	분해 억제 ELF 단백질의 생산과 분해 역할 분석	pRb와 cyclin D1 축적에 영향	90	30
		2	ELF의 발현에 따른 세포 구조 분석	stress fiber 형성		
		3	정상세포와 ELF KO 세포의 세포 구조 분석	ELF의 발현을 통한 편평도 조절		
		4	ELF의 결합단백질 스크리닝	53BP2가 C-말단에 결합		
		5	분해 억제 ELF 단백질의 구조 변화 역할 분석	변화 없음, KO 세포 이용 필요		
6	ELF의 상위 구조 단백질의 위치 변화 분석	actin fiber network의 조절				

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자체평가
달성 여부	달성

5. 연구결과와의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구분	건수	비고
학술지 논문 게재	2편 (IF: 12점)	Cancer Research, Oncogene

(2) 연구성과의 활용계획

- 현 기관고유사업에서 본 연구진의 연구에 사용된 돌연변이 마우스가 미국에서 사육되어 조직의 사용이 제한되어 실험이 전반적으로 세포수준에서 중점적으로 연구되고 연구의 성격이 기술적으로 진행되어 b2SP의 역할이 조직이나 개체 수준에서 심도있게 진행되지 못 하였음.
- 이에 본 연구진은 최근에 영국의 Wellcome Trust Institute에서 도입한 b2SP에 대해 특이적인 돌연변이 마우스를 이용하여 heterozygote, homozygote의 b2SP의 돌연변이를 가진 마우스의 배아와 성체를 사용하여 조직과 개체수준에서 심도있는 연구의 진행이 가능해짐.

Transforming Growth Factor- β Adaptor, β 2-Spectrin, Modulates Cyclin Dependent Kinase 4 to Reduce Development of Hepatocellular Cancer

Hye Jung Baek,^{1,*} Michael J. Pishvaian,^{2*} Yi Tang,² Tae Hyun Kim,¹ Shaoxian Yang,² Majed El Zouhairi,² Jon Mendelson,² Kirti Shetty,² Bhaskar Kallakury,² Deborah L. Berry,² Kyung Hwan Shin,¹ Bibhuti Mishra,³ E. Premkumar Reddy,⁴ Sang Soo Kim,¹ and Lopa Mishra³

Transforming growth factor beta (TGF- β) is an important regulator of cell growth, and loss of TGF- β signaling is a hallmark of carcinogenesis. The Smad3/4 adaptor protein β 2-spectrin (β 2SP) is emerging as a potent regulator of tumorigenesis through its ability to modulate the tumor suppressor function of TGF- β . However, to date the role of the TGF- β signaling pathway at specific stages of the development of hepatocellular carcinoma (HCC), particularly in relation to the activation of other oncogenic pathways, remains poorly delineated. Here we identify a mechanism by which β 2SP, a crucial Smad3 adaptor, modulates cyclin dependent kinase 4 (CDK4), cell cycle progression, and suppression of HCC. Increased expression of β 2SP inhibits phosphorylation of the retinoblastoma gene product (Rb) and markedly reduces CDK4 expression to a far greater extent than other CDKs and cyclins. Furthermore, suppression of CDK4 by β 2SP efficiently restores Rb hypophosphorylation and cell cycle arrest in G₁. We further demonstrate that β 2SP interacts with CDK4 and Smad3 in a competitive and TGF- β -dependent manner. In addition, haploinsufficiency of *cdk4* in β 2sp^{+/-} mice results in a dramatic decline in HCC formation compared to that observed in β 2sp^{+/-} mice. **Conclusion:** β 2SP deficiency leads to CDK4 activation and contributes to dysregulation of the cell cycle, cellular proliferation, oncogene overexpression, and the formation of HCCs. Our data highlight CDK4 as an attractive target for the pharmacologic inhibition of HCC and demonstrate the importance of β 2sp^{+/-} mice as a model of preclinical efficacy in the treatment of HCC. (HEPATOLOGY 2011;53:1676-1684)

The transforming growth factor β (TGF- β) signaling pathway is involved in multiple cellular processes, including cell growth, differentiation, adhesion, migration, and apoptosis. TGF- β is particularly active as an antimitogenic cytokine, functioning as a profound tumor suppressor by inhibiting cell cycle progression and arresting cells in early G₁ phase. TGF- β signaling is mediated by type I and type II transmembrane serine/threonine kinase receptors (T β RI and T β RII) and such intracellular mediators as the

- 또한 성체로 습득할 수 있는 heterozygote 돌연변이를 가진 β 2SP의 돌연변이 마우스의 경우 관심을 가지는 간의외의 다른 여러 조직에서 다양한 이상을 가지고 있어서 간조직에 대해서 특이적인 연구모델로 적합하지 않아 이를 극복하기 위해 β 2SP의 conditional knockout 마우스를 제조하고 이를 간 특이적 결실을 유도하는 albumin-cre를 가진 마우스와 교배를 통해 간특이적 β 2SP의 결실을 유도하여 β 2SP의 간암의 억제에 미치는 영향에 대해 연구하기를 기대하고 있음.
- 이렇게 만들어진 β 2SP의 간조직에 대해서 특이적인 conditional knockout 마우스는 whole body에서 heterozygote의 상태로 돌연변이된 knockout 마우스와 달리 homozygote 상태의 돌연변이를 유도함으로써 보다 동물모델로 사용하기 적합한 특성을 가지고 있음.
- 따라서 이러한 동물모델의 확립이 이루어진 후 다양한 간손상을 개체수준에서 β 2SP의 간암의 억제에 미치는 영향에 대해 연구함과 동시에 동물모델로의 유용성을 확인해 보고자 함.

6. 첨부서류

- (1) 연구과제와 관련된 과제책임자의 대표적 논문 4편의 초록페이지 사본

Abbreviations: β 2SP, β 2-spectrin; CDK4, cyclin dependent kinase 4; HCC, hepatocellular cancer; TGF- β , transforming growth factor- β .

From the ¹Radiation Medicine Branch, National Cancer Center, Goyang, Korea; ²Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University, Washington DC; ³Department of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX; and ⁴Department of Oncological Science, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY.

Received September 7, 2010; accepted December 6, 2010.

Supported by National Institutes of Health, RO1-CA106614 (to L.M.), RO1-CA042857 (to L.M.), RO1-DK58637 (to B.M.), PO1-CA130821 (to L.M.), RC2-AA019392, VA Merit Award (to L.M.), R. Robert and Sally D. Funderburg Research Scholar (to L.M.), Ben Orr Award (to L.M.), National Cancer Center, Korea, NCC-0910020 (to S.S.K.), Korea Healthcare Technology R&D Project, A0900095 (to S.S.K.), and National Research Foundation, Korea, 2010-0021822 (to S.S.K.).

*These authors contributed equally to this work.

Address reprint requests to Sang Soo Kim, Radiation Medicine Branch, National Cancer Center, Goyang, 410-769, Korea. E-mail: sangsookim@ncc.n.kr; fax: 8231-920-2494; or Lopa Mishra, M.D., Department of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Boulevard, Unit 1466, Houston, TX, 77030. E-mail: lmishra@mdanderson.org; fax: 202-687-0992.

Copyright © 2010 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at www.liverjournal.com.

DOI 10.1002/hep.24128

Potential conflict of interest: Dr. Shetty received grants from Novartis and Bristol-Myers Squibb. She is on the speakers' bureau of Gilead and Merck. She is on the speakers' bureau of, and received grants from Salix Pharmaceutical.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Impaired Skin and Mammary Gland Development and Increased γ -Irradiation-Induced Tumorigenesis in Mice Carrying a Mutation of S1152-ATM Phosphorylation Site in Brca1

Sang Soo Kim,^{1,2} Liu Cao,² Hye Jung Baek,¹ Sung-Chul Lim,³ Cuiling Li,² Rui-Hong Wang,² Xiaoling Xu,² Kwan Ho Cho,¹ and Chu-Xia Deng²

¹Radiation Medicine Branch, National Cancer Center, Goyang, Korea; ²Genetics of Development and Disease Branch, National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, NIH, Bethesda, Maryland; and ³Department of Pathology, College of Medicine, Chosun University, Gwangju, Korea

Abstract

The tumor suppressor BRCA1 interacts with many proteins and undergoes multiple modifications on DNA damage. ATM, a key molecule of the DNA damage response, phosphorylates S1189 of BRCA1 after γ -irradiation. S1189 of BRCA1 is known as a unique ATM phosphorylation site in BRCA1 exon 11. To study the functions of ATM-dependent phosphorylation of BRCA1-S1189, we generated a mouse model carrying a mutation of S1152A (S1152 in mouse *Brca1* corresponds to S1189 in human BRCA1) by gene targeting. *Brca1*^{S1152A/S1152A} mice were born at the expected ratio, unlike that seen in previous studies of *Brca1*-null mice. However, 36% of *Brca1*^{S1152A/S1152A} mice exhibited aging-like phenotypes including growth retardation, skin abnormalities, and delay of the mammary gland morphogenesis, with an increase in apoptosis. Mutant mice were hypersensitive to high doses of γ -irradiation, displaying shortened life span and reduction in intestinal villus size, associated with increased apoptosis. Aging-unaffecting 18-month-old *Brca1*^{S1152A/S1152A} female mice also showed mammary gland abnormalities with increased levels of cyclin D1 and phospho-ER α , such as *Brca1*- Δ 11 mutation. On low-dose γ -irradiation, they suffered a marked increase in tumor formation with an abnormal coat pattern. Furthermore, *Brca1*^{S1152A/S1152A} embryonic fibroblasts failed to accumulate p53 on γ -irradiation with delayed phosphorylation of p53-S23. These observations indicate that ATM-mediated phosphorylation of S1189 is required for BRCA1 functions in the modulation of DNA damage response and in the suppression of tumor formation by regulating p53 and apoptosis. [Cancer Res 2009;69(24):9291–300]

Introduction

Ataxia-telangiectasia is a human autosomal recessive disorder characterized by progressive neurodegeneration, immunodeficiency, and cancer predisposition (1). The ataxia-telangiectasia cellular phenotype includes chromosomal instability, radiosensitivity, and

failure to adequately activate cell cycle checkpoints (2). Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM), the gene product defective in ataxia-telangiectasia, is a member of the phosphoinositide 3-kinase family, which is involved in the recognition of damage in DNA (3).

Germ-line mutations in BRCA1 and BRCA2 are responsible for the majority of hereditary breast cancers and cause almost all familial cases involving both breast and ovarian cancers (4, 5). The BRCA1 protein is a tumor suppressor that has a crucial role in the maintenance of genomic integrity. BRCA1 achieves this by integrating important cellular processes such as regulation of genetic stability, DNA damage repair, centrosome duplication, apoptosis, and cell cycle control (6). BRCA1 contains 24 exons that encode proteins of 1,863 and 1,812 amino acids in the human and mouse, respectively (7, 8). Notably, more than 60% of the protein is encoded by an unusually large exon, exon 11, which is 3.4 kb in length. In addition to the full-length BRCA1 protein (BRCA1-FL), a deletion, BRCA1- Δ 11, arises from in-frame splicing between exon 10 and exon 12, but retains the highly conserved NH₂-terminal RING finger and COOH-terminal BRCT domains found in full-length BRCA1 (9–12). To study the functions of BRCA1 and to create animal models for BRCA1-associated breast cancer, mice carrying various mutations in *Brca1* have been generated by gene targeting (reviewed in ref. 13). *Brca1*-null embryos die at embryonic day (E) 6.5 to 8.5 (14–16), whereas embryos that lack *Brca1*-FL due to targeted deletion of exon 11 (*Brca1* ^{Δ 11/ Δ 11}) but still express the *Brca1*- Δ 11 isoform die at E12 to E18.5 (17). In addition, surviving *Brca1* ^{Δ 11/ Δ 11} mice that had lost one or both *p53* alleles exhibited aging phenotypes with tumor formation (17, 18). Moreover, Cre-mediated excision of exon 11 of *Brca1* in mouse mammary epithelial cells caused abnormal ductal development attributable to induction of apoptosis (19). However, *Brca1*^{FL/FL} mutant mice, which lack the *Brca1*- Δ 11 isoform, did not display any developmental defects, and the incidence of tumor formation in such animals was significantly lower than that in *Brca1* ^{Δ 11/ Δ 11} mice, indicating that exon 11 of *Brca1* is essential for proper functioning of *Brca1* in development and tumor suppression (20).

The DNA damage response involves the sensing of DNA damage followed by transduction of the damage signal to a network of cellular pathways, including cell cycle checkpoints, DNA repair, and the apoptotic system (21). It has been shown that BRCA1 undergoes regulation by phosphorylation on DNA damage and cell cycle progression (22). In this network, ATM is also a critical regulator of checkpoint signal cascades: it phosphorylates and activates several molecules including H2AX, p53, and CHK1 to execute the DNA damage response (2, 23). ATM also phosphorylates BRCA1 in response to ionizing radiation *in vivo* and *in vitro* in a region that contains clusters of serine and glutamine residues (24). Analysis



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



ATM is required for rapid degradation of cyclin D1 in response to γ -irradiation

Dong Wan Choo^{a,b}, Hye Jung Baek^a, Noboru Motoyama^c, Kwan Ho Cho^a, Hye Sun Kim^b, Sang Soo Kim^{a,*}

^aRadiation Medicine Branch, National Cancer Center, 809 Madu 1-dong, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do 410-769, South Korea

^bDepartment of Biological Science, Ajou University, Suwon, Gyeonggi, South Korea

^cDepartment of Geriatric Research, National Institute for Longevity Sciences, Morioka, Ibaraki, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 November 2008
Available online 9 December 2008

Keywords:
Cyclin D1
 γ -irradiation
ATM
Degradation
Ubiquitination

ABSTRACT

The cellular response to DNA damage induced by γ -irradiation activates cell-cycle arrest to permit DNA repair and to prevent replication. Cyclin D1 is the key molecule for transition between the G1 and S phases of the cell-cycle, and amplification or overexpression of cyclin D1 plays pivotal roles in the development of several human cancers. To study the regulation of cyclin D1 in the DNA-damaged condition, we analyzed the proteolytic regulation of cyclin D1 expression upon γ -irradiation. Upon γ -irradiation, a rapid reduction in cyclin D1 levels was observed prior to p53 stabilization, indicating that the stability of cyclin D1 is controlled in a p53-independent manner. Further analysis revealed that irradiation facilitated ubiquitination of cyclin D1 and that a proteasome inhibitor blocked cyclin D1 degradation under the same conditions. Interestingly, after mutation of threonine residue 286 of cyclin D1, which is reported to be the GSK-3 β phosphorylation site, the mutant protein showed resistance to irradiation-induced proteolysis although inhibitors of GSK-3 β failed to prevent cyclin D1 degradation. Rather, ATM inhibition markedly prevented cyclin D1 degradation induced by γ -irradiation. Our data indicate that communication between ATM and cyclin D1 may be required for maintenance of genomic integrity achieved by rapid arrest of the cell-cycle, and that disruption of this crosstalk may increase susceptibility to cancer.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

The cellular response to DNA damage caused by γ -irradiation involves the activation of checkpoint pathways that impose a delay on cell-cycle progression and control DNA repair and replication [1,2]. This process is triggered by several tumor suppressors including ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), Chk2, p53, and p21, which are essential for cell-cycle checkpoint activity and genetic stability [3,4]. Thus, alterations in these processes lead to the accumulation of mutations resulting in increased susceptibility to cancer.

Cell-cycle progression is tightly regulated, in part by the levels of cyclins and the activities of cyclin-dependent kinases (CDKs). Uncontrolled cell division caused by aberrant regulation of cyclins and CDKs is considered a hallmark of transformation and cancer [5]. Cyclin D1 is the regulatory subunit of a holoenzyme that phosphorylates and inactivates Rb protein, which forms a complex with proteins of the E2F family [6]. Hyperphosphorylated Rb releases E2Fs, which regulate transcription of genes required for DNA replication and promote progression through the G1/S phase of the cell-cycle [7]. Amplification or overexpression of cyclin D1 plays pivotal roles in the development of several human cancers, including parathyroid adenoma, breast cancer, colon cancer, lymphoma, melanoma, and prostate cancer [8].

Expression of cyclin D1 is largely influenced by transcriptional activation induced by several growth factors through the activity of transcription factors including AP-1, STATs, NF- κ B, SP-1, cAMP-response element binding protein, and T-cell factor [9]. In addition to transcriptional regulation, the level of cyclin D1 protein is also regulated by post-translational control involving ubiquitin-dependent proteolysis. Recently, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1B (DYRK1B) have been reported to enhance cyclin D1 degradation by phosphorylating cyclin D1 threonine residues 286 and 288, respectively [10–12]. Interestingly, GSK-3 β and DYRK1B share glycogen synthase as another common substrate (other than cyclin D1), suggesting that cyclin D1 regulation by these kinases may be related to metabolic control [13]. DNA damage also causes rapid degradation of cyclin D1, resulting in immediate cell-cycle arrest at the G1 phase, independent of p53 levels [14]. This process prevents both initiation of the G1/S phase transition and accumulation of mutations, indicating that cyclin D1 degradation is an essential component of the cellular response to DNA damage. However, it is not yet clear how degradation of cyclin D1 is initiated by γ -irradiation.

Here, we show that rapid degradation of cyclin D1 induced by γ -irradiation requires the tumor suppressor ATM, which is rapidly activated by DNA damage. Thus, we show how the DNA damage re-

* Corresponding author. Fax: +82 31 920 2494.
E-mail address: sangsookim@ncc.re.kr (S.S. Kim).

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

S.S. Kim, L. Cao, and H.J. Baek contributed equally to this work.
Requests for reprints: Sang Soo Kim, National Cancer Center, 809 Madu 1-dong, Goyang, Gyeonggi 410-769, Korea. Phone: 82-31-920-2491; Fax: 82-31-920-2494; E-mail: sangsookim@ncc.re.kr or Chu-Xia Deng, Genetics of Development and Disease Branch, National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, NIH, 10/9N105, 10 Center Drive, Bethesda, MD 20892. Phone: 301-402-7225; Fax: 301-480-1135; E-mail: ChxiaD@BDG10.NIDDK.NIH.Gov.

© 2009 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CCR.09-2418



BIOLOGY CONTRIBUTION

IN VIVO RADIOBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PROTON BEAM AT THE NATIONAL CANCER CENTER IN KOREA: EFFECT OF THE *CHK2* MUTATION

SANG SOO KIM, PH.D.,* DONG WAN CHOO, M.S.,* DONGHO SHIN, PH.D.,† HYE JUNG BAEK, PH.D.,*
TAE HYUN KIM, M.D.,† NOBORU MOTOYAMA, PH.D.,‡ BLANCHE M. DE COSTER, B.S.,§
JOHN GUEULETTE, PH.D.,§ YOSHIYA FURUSAWA, PH.D.,|| KOICHI ANDO, PH.D.,¶ AND KWAN HO CHO, M.D.*‡

*Radiation Medicine Branch and †Proton Therapy Center, National Cancer Center, Goyang, Korea; ‡Department of Geriatric Research, National Institute for Longevity Sciences, Morioka, Ibaraki, Japan; †Laboratory of Radiobiology and Radioprotection, Catholic University of Louvain, Belgium; ‡Laboratory of Heavy-ion Radiobiology for Therapy, National Institute of Radiological Science, Chiba, Japan, and §Medicine & Biology Division, Gunma University Heavy Ion Medical Center, Gunma, Japan

Purpose: The relative biological effectiveness (RBE) in the presence or absence of *CHK2* was estimated at the Korean National Cancer Center Proton Therapy Center (NCCPTC).

Methods and Materials: The proton beam was fixed at 210 MeV with 6-cm spread-out Bragg peaks (SOBPs) because this is expected to be the most frequently used clinical setting. X-rays were obtained using a 6-MV conventional linear accelerator. The RBE was estimated from the survival of jejunal crypt in C3H/He and *CHK2*^{−/−} mice.

Results: The estimated RBEs of the NCCPTC at the middle of the SOBP were 1.10 and 1.05 in the presence and absence of *CHK2*, respectively. The doses that reduced the number of regenerated crypt per jejunal circumference to 20 (D_{20}) in C3H/He mice were 14.8 Gy (95% confidence interval [CI], 13.7–15.9) for X-rays and 13.5 Gy (95% CI, 14.5–15.5) for protons. By contrast, the doses of D_{20} in *CHK2*^{−/−} mice were 15.7 Gy (95% CI, 15.0–16.4) and 14.9 Gy (95% CI, 14.0–15.8) for X-rays and protons, respectively.

Conclusions: The RBE of the NCCPTC is clearly within the range of RBEs determined at other facilities and is consistent with the generic RBE value of 1.10 for 150- to 250-MeV beams. The mutation of *CHK2* gave rise to radioresistance but exhibited similar RBE. © 2011 Elsevier Inc.

Proton beam, RBE, Crypt regeneration assay, *CHK2*.

INTRODUCTION

The Korean National Cancer Center Proton Therapy Center (NCCPTC), which opened in March 2007, is the one of newest proton facilities for the clinical use of proton radiotherapy. An important feature of proton beams arises from the physical aspects of their dose distribution. Proton beams can provide highly localized, uniform doses of radiation to tumors, while sparing the surrounding normal tissues, compared with conventional modalities using photons or electrons. Although there are no randomized clinical trials comparing proton beam therapy with conventional X-ray therapy, the superiority of clinical effectiveness of proton beam therapy might result from its previously mentioned physical characteristics (1). This is why proton beam therapy is considered a promising new treatment for malignant tumors, and why the number of proton beam therapy facilities worldwide has increased over the last 10 years.

It has been shown that equal physical doses of different types of radiation do not produce equal biological effects, because of differences in their energy deposition patterns. Thus this difference must be considered in clinical applications that use alternative modalities to photons. This is taken into account by the concept of relative biological effectiveness (RBE): The RBE of a tested radiation "T" (e.g., protons) in comparison with a reference radiation "R" (most often ⁶⁰Co γ -rays or linear accelerator X-rays) is the ratio of the doses D_T/D_R that produce the same biological effect. The RBE is a simple concept; however its clinical application is complex, because the RBE depends on several factors, including particle type, energy, dose, dose per fraction, number of fractions, and cell or tissue type, and differs between the early and late reactions after irradiation. The consideration of RBE ensures that radiation oncologists can benefit from the large clinical experience gained with

Reprint requests to: Kwan Ho Cho, M.D., Radiation Medicine Branch and Proton Therapy Center, National Cancer Center, Goyang, Korea, 410-769. Tel: 82-31-920-1720; Fax: 82-32-920-0149; E-mail: kwancho@ncc.re.kr or sangsookim@ncc.re.kr
S.S. Kim, D.W. Choo, and D.H. Shin contributed equally to this work.

This study was supported by National Cancer Center of Korea (NCC-1010100), the Korea Healthcare Technology R&D Project (A090095), and the National Research Foundation of Korea (2009-0070609 and 2010-0021822).

Conflict of interest: none.

Received Feb 22, 2010, and in revised form July 30, 2010. Accepted for publication Aug 7, 2010.