

## Chinese Hamster Ovary 세포에 있어 methyl methanesulfonate에 의한 DNA 복제억제와 이의 회복경로

이천복\*, 이형호, 이치건 · 박상대 #

\* 경성대학교 이과대학 생물학과

# 서울대학교 자연과학대학 동물학과

(1989, 4, 11 접수)

본 연구는 알킬화제를 처리한 CHO-K1 세포에서 DNA 복제억제와 그 회복과정의 분자론적 기작을 규명할 목적으로 방사선 이중 표지에 의한 DNA 합성율의 측정, 알칼리 자당 농도구배 초원심분리법에 의한 DNA 분자량과 후복제 회복율을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

(1) 1mM methyl methanesulfonate (MMS)와 1 $\mu$ M N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) 이하의 낮은 농도의 처리군에서는 DNA 합성율이 급격히 감소하였으나, 2 mM MMS, 2 $\mu$ M MNNG 이상의 농도에서는 그 감소양상이 둔화되었다.

(2) DNA 합성율은 알킬화제의 처리 직후 감소하였다가 시간경과에 따라 회복되어 처리 후 4 시간 쯤에는 대조군 수준 또는 그 이상으로 회복되었다.

(3) 알킬화제 처리 후 새로 합성된 DNA 분자크기의 분포와 새로 합성된 DNA 분자의 성장양상을 알칼리 자당농도구배 초원심분리법으로 조사하였다. 그 결과 알킬화제처리후 시간 경과에 따라 합성된 DNA 분자들의 크기분포는  $1 \times 10^7$ 달톤 이하의 DNA분자들의 합성량이 특이하게 증가하였다가 감소함을 보였다. 또한 알킬화제 처리군에서의 DNA합성율은 처리 후 4 시간에 대조군 수준 또는 그 이상으로 회복되었으나, 새로 합성된 DNA의 중량평균분자량은 대조군의 64%에 불과했다.

그리고 알킬화제 처리 직후 새로 합성된 DNA를 순간표지하고 이들 DNA의 생장을 시간별로 추적한 결과 주형 DNA 상에 상해가 존재하는 상태에서도 계속적인 신장이 일어남을 발견하였다.

이와 같은 결과를 종합해 볼 때 DNA 합성율이 회복되는 것은 상해로 인해 복제포크의 진행이 억제되었던 부위에서 새로 합성이 시작된, 작은 크기 DNA 분자들의 합성량이 증가하여 나타난 결과로 짐작된다. 또한 이 새롭게 합성된 작은 크기의 DNA 분자와 순간표지되어 있던 DNA 분자가 결합하여 DNA분자의 신장이 일어나는 것으로 생각된다.

따라서 알킬화된 상해에 의해 억제된 DNA 복제의 회복은 상해의 제거와 새로운 복제기점에 사용으로 인해 이루어진다고 생각된다.

## 서 론

돌연변이 유발원에 의한 DNA 상해와 이에 연관된 DNA 복제억제와 회복기작 등에 관한 연구들은 지난 20여년 동안 많은 관심의 대상이 되어 왔다.

DNA 상해유발원이 처리된 세포에서의 DNA 합성의 억제는 두가지의 주요한 요인에 의한 것으로 추측되고 있다. 첫째는, 세포당 활성화된 레플리콘의 수에 의한 것으로써, DNA복제개시(initiation)는 세포 내에서 매우 민감한 조절을 받고 있으므로 피리미딘 이량체와 같은 상해에 의하여 쉽게 억제되어 활성화된 레플리콘의 수가 줄어들게 되고 결과적으로 DNA 합성율이 저하된다는 것이다(Painter and Young, 1976; Painter, 1977). 둘째는, DNA상해가 이미 복제가 개시된 복제포크의 진행을 억제하여 DNA 합성율이 저하된다는 것이다. (Edenberg, 1976; Harawalt *et al.*, 1979).

그러나 DNA 상해에 의한 복제포크의 진행이 억제되는 현상이 일시적인지 또는 영구적인지에 대하여는 많은 논쟁이 있어 왔다(Friedberg, 1985). 즉 Buhl 등 (1972)과 Fujiwara (1975), Lehmann (1975) 등은 포유동물 세포를 재료로 실시한 실험에서 피리미딘 이량체 생성부위에서 복제포크의 진행이 정지된다고 주장하였으며, Edenberg (1976)는 HeLa 세포에서 fiber 자기방사법으로 단위시간당  $^3\text{H}$ -티미딘으로 표시된 DNA 조각의 크기를 조사하여 피리미딘 이량체가 생성된 위치에서 복제포크가 정지된다고 보고하였다. 그러나 Doniger(1978)는 Chinese hamster 세포에서 시간의 함수로써 표시된 지역의 길이를 측정하여, 복제포크의 진행이 피리미딘 이량체를 지나 정상적인 속도로 진행된다고 보고하였으며, Dahle 등 (1980)과 Meneghini와 Mello-Filho (1983)는 복제포크의 진행이 피리미딘 이량체 생성위치에서 일정시간 동안만 정지한다고 주장하였다.

한편 DNA 상해유발원을 처리하면 DNA 합성이 저해되나 이러한 저해효과는 시간이 경과함에 따라 감소하여 일정한 시간이 경과하면 DNA 합성율이 대조군 수준에 이르게 된다. Cleaver 등 (1983)은 DNA 복제억제가 회복되는 속도는 세포의 레플리콘 크기와 절제회복능력과 함수로 표시될 수 있다고 주장하였다. 즉 절제회복능력이 높은 세포는 절제회복능력이 낮은 세포에 비하여 DNA의 합성이 억제된 후 빠르게 회복되고, 상대적으로 작은 크기의 레플리콘을 가진 세포가 큰 크기의 레플리콘을 가진 세포보다 단위크기의 DNA 당 복제개시부위가 많아 회복이 신속하게 진행된다고 주장하였다.

그러나 다른 한편으로는 DNA 합성율의 회복은 새로운 복제기점(replication origin)의 사용에 기인한다는 가설이 Meneghini와 Mello-Filho (1983)에 의하여 제기되었다. 이 모델에 의하면 DNA 합성이 억제되는 현상은 복제포크가 상해부위에서 일시적으로 정지하였기 때문에 일어나는 것이며 그 후 회복은 새로운 복제원점의 사용으로 인하여 이루어진다는 것이다.

따라서 본 연구에서는 MMS에 의하여 유발된 복제포크의 진행이 억제되는 현상이 일시적인지 영구적인지에 대하여 알아보고 DNA 합성율의 회복에 관여하는 요인에 대하여 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 세포배양

모든 실험에는 Chinese hamster ovary (CHO-K1) 세포를 사용하였다. 배양액은 Eagle's minimum essential medium (GIBCO: Grand Island Biological Co., Grand Island, N. Y.)에 10% 소의 혈청(GIBCO)과 항생물질인 페니실린-G(100units/ml)와 스트렙토마이신 (100  $\mu\text{l}$ )을 첨가하여 사용하였다. 배양액은 10mM의 HEPES buffer (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri)와 7.5% 중탄산 나트륨으로 완충시켜 pH를 7.2-7.4로 유지시켰다. 세포는 5% 탄산가스가 공급되는 37°C 항온기에서 세포를 단층배양하였고, 0.05% trypsin-EDTA (disodium ethylene diamine tetra acetate: Sigma)용액으로 2-3일 마다 계대배양하였다.

## 2. MMS의 처리

methyl methanesulfonate (MMS : Eastman Kodak Ltd.)는 인산 완충 식염수 (phosphate buffered saline : PBS)로 희석하여 원액 (1M)을 만든 후 세포에 처리하기 직전에 필요한 농도로, 혈청이 들어있지 않은 배양액으로 희석하여 1시간 동안 처리하였다.

## 3. DNA 합성율의 측정

세포를 1ml당 0.01 $\mu$ Ci의  $^{14}$ C-티미딘 (specific activity, 50-60mCi/ml Amersham International Ltd., Amersham, U. K.)이 들어있는 배양액에서 2-3일간 배양한 후 MMS를 처리하고 1ml당 5 $\mu$ Ci의  $^3$ H-티미딘이 포함된 배양액에서 30분간 배양하였다. 이들 세포를 방사능으로 표지되어 있지 않은 티미딘 (100 $\mu$ B/ml)이 들어있는 인산 완충 식염수로 3번 세척한 후 SSC (0.15M sodium chloride, 0.015M sodium citrate) 용액을 사용하여 수거하였다. 수거한 세포를 0.5M 수산화 나트륨 용액으로 30분간 용해시킨 후, 4 $^{\circ}$ C로 냉각시킨 4% Trichloroacetic acid (TCA) 용액에 하룻밤 동안 처리하였다. DNA는 Whatman GF/A glass filter (W&R Balston Ltd., England)를 사용하여 수거하였고, DNA가 부착된 여과지를 건조시킨 후 Scintillation cocktail (PPO 4g, POPOP 0.1g, Toluene 1L)을 8ml씩 넣은 scintillation 병에 넣고 liquid scintillation spectrometer (Packard Instrument Co.)를 이용하여 여과지 위에 남아 있는  $^3$ H/ $^{14}$ C 방사능양의 비를 측정하여 DNA 합성율을 계산하였다.

## 4. 알칼리 자당농도구배 초원심분리

## 1). 표본의 준비

DNA 복제억제에 미치는 MMS의 영향을 측정하기 위하여 두 가지 방법을 사용하였다. 첫째, DNA 합성율과 일정한 시간 경과 후 새롭게 합성되는 DNA의 분자량을 측정하기 위하여 chase-pulse 방법 (Buhl *et al.*, 1973; Edenberg, 1976)을 사용하였다. 즉 세포를 ml당 0.01 $\mu$ Ci의  $^{14}$ C-티미딘으로 2-3일간 표지시킨 후 MMS를 처리하고 정상 배양액에서 원하는 시간 동안 배양한 후 1ml당 10 $\mu$ Ci의  $^3$ H-티미딘으로 10분간 표지하였다. 둘째, MMS에 의한 DNA 복제억제기간 중에 새로이 만들어진 DNA의 변화를 조사하기 위하여,  $^3$ H-티미딘 표지를 이용한 pulse-chase 방법을 사용하였다. 즉 세포를 2-3일간  $^{14}$ C-티미딘으로 미리 표지하고 MMS를 처리한 직후  $^3$ H-티미딘으로 표지한 뒤 방사능이 없는 티미딘 (50 $\mu$ M)과 데옥시시티딘 (10 $\mu$ M)이 들어 있는 배양액으로 원하는 시간동안 배양하였다. (Rupp and Howard-Flanders, 1968; Park and Cleaver, 1979). 이상의 방법으로 모든 처리가 끝난 세포들을 4 $^{\circ}$ C로 냉각시킨 SSC 용액으로 3번 세척한 후 수거하였고, 1,200 rpm으로 10분간 원심분리하여 SSC 용액을 제거한 뒤 0.5ml의 PBS로 세포현탁액을 만들었다.

## 2). 알칼리 자당농도구배 초원심분리

알칼리 자당농도구배 초원심분리 실험은 Cleaver (1974)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 미리 준비한 36 ml의 5~20% 자당농도구배 위에 세포들을 넣고 DNA사의 풀림을 촉진시키기 위하여 알칼리 용해용액 (0.5M NaOH, 0.02M Na<sub>2</sub>EDTA)을 0.5ml를 넣어 4시간 동안 용해시킨 후 SW28 rotor를 사용 25,000rpm으로 4시간동안 원심분리하여 DNA를 침강시켰다. 이후 원심분리관의 바닥에 구멍을 뚫어 자당구배에 따른 분획을 얻었다. 이들 분획에 들어 있는  $^3$ H과  $^{14}$ C로 표지되어 있는 DNA들은 Whatman GF/A glass filter를 사용하여 수거하였고, liquid scintillation spectrometer를 사용하여 여과지에 남아 있는  $^3$ H와  $^{14}$ C의 방사능을 측정하였다. DNA의 중량 평균분자량과 수평균분자량은 다음 수식에 의거하여 계산하였다.

$$M_w = \sum C_i \times M_i / \sum C_i, \quad M_n = \sum C_i / \sum (C_i / M_i)$$

$C_i$  :  $i$ 번째 분획의 방사능량

$M_i$  :  $i$ 번째 분획의 분자량

$M_w$  : 중량 평균분자량 (weight average molecular weight)

$M_n$  : 수 평균분자량 (number average molecular weight)

또한 특정 구배 분획의 DNA 분자량은 Studier (1965)의 방정식,

$$S_i = 0.0523 \times M_i^{0.4}$$

을 사용하여 계산하였다.

## 결 과

CHO-K1세포에서의 MMS에 의한 DNA 합성율의 억제양상과 DAN 복제 양상을 알칼리 자당농도구배 초원심분리법으로 분석하기 위하여 MMS를 여러 농도로 처리한 후 DNA 합성율을 조사하였다. DNA 합성율은 표지된  $^{14}\text{C}$ -티미딘 전체량에 대한 알킬화제 처리 후 표지된  $^3\text{H}$ -티미딘의 비율로 계산하였다.

Fig. 1은 MMS (0.1-5mM)를 처리하였을 경우의 DNA 합성율을 나타낸 것이다. DNA 합성율은 MMS를 1mM 이하로 처리하였을 경우에는 농도에 따라 급격히 감소하는 양상을 보이고 있는 반

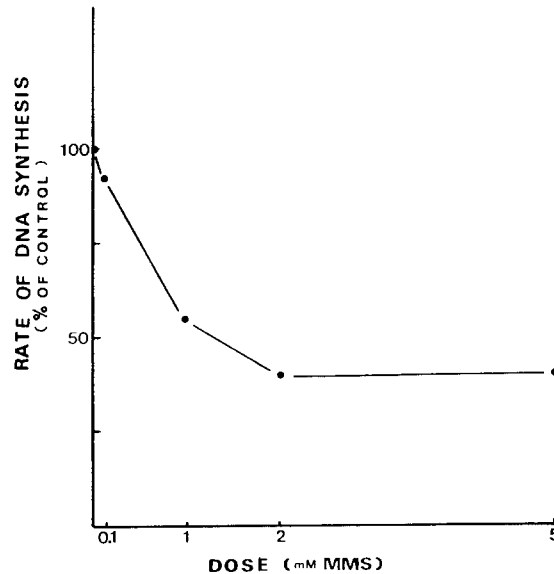


Fig. 1. The rate of DNA synthesis in CHO-K1 cells treated with various concentrations of MMS. Each point represents the mean of four determinants in two experiments. The rate of DNA synthesis is the amount of incorporated  $^3\text{H}$ -thymidine relative to the total amount of  $^{14}\text{C}$ -thymidine.

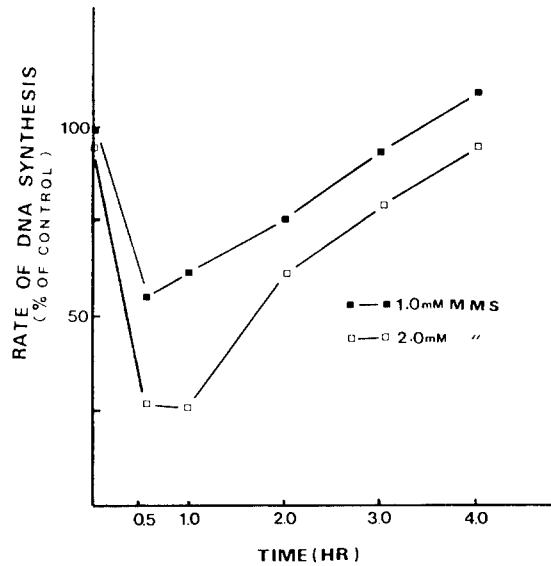


Fig. 2. The change of DNA synthesis rate with the lapses of time after treatment of MMS.

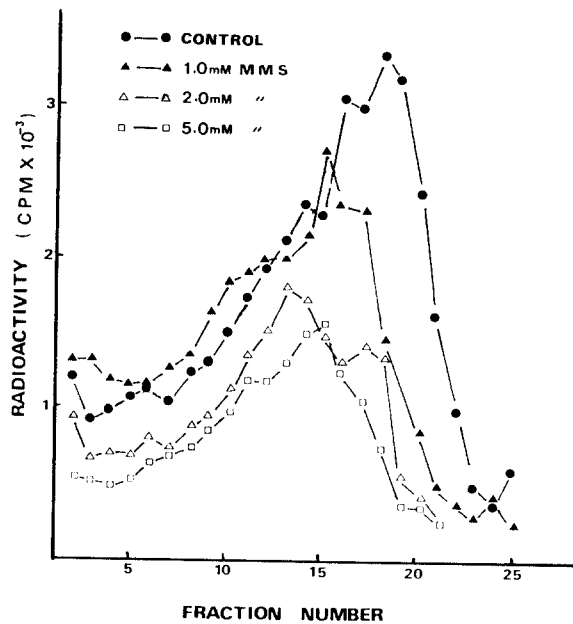


Fig. 3. Steady-state distribution of nascent DNA molecules in CHO-K1 cells pulse-labeled with <sup>3</sup>H-thymidine after treatment with various concentrations of MMS. The direction of sedimentation is from left to right. Data were normalized to a constant number of cells applied to gradients.

면, 2mM 이상의 농도로 처리하였을 경우에는 낮은 농도 처리시에 비하여 훨씬 둔화된 감소 양상을 보이고 있다. 이러한 양상은 다른 종류의 DNA 상해유발원인 자외선이나 X-선을 조사하고 DNA 합성율을 측정한 결과들 (Painter and Young, 1976; Cleaver *et al.*, 1983; Young and Painter, 1988) 과도 일치한다. 또 이결과로부터 낮은 농도로는 1mM 이하가, 높은 농도로는 각각 2mM 이상이 적당하다고 판단하였다.

Fig. 2는 알킬화제를 처리한 후 시간에 따른 DNA 합성율의 회복 양상을 나타낸 것으로 낮은 농도 처리군이 높은 농도 처리군에 비하여 빨리 회복되는 양상을 보였다. 또한 MMS 처리 후 30분에서 1시간 사이에서 가장 낮은 DNA 합성율을 나타내었고 이후 DNA 합성율은 점차 회복되어 2-4시간 후에는 대조군 이르렀다.

여러 농도의 MMS를 처리한 세포에서 새로이 합성된 DNA 분자의 크기 분포를 조사한 결과는 Fig. 3에 나타나 있다. 1mM 이하의 MMS 처리군에서는  $5 \times 10^7$  달톤 이상 크기의 DNA 분자들도 감소하였다. 이러한 결과들은 낮은 농도의 MMS를 처리할 경우 순간표지(pulse label)하는 동안, 또는 그 직전에 DNA 합성을 시작할 예정이던 레플리콘에로의  $^3\text{H}$ -티미딘의 유입이 선별적으로 억제되었거나 (즉 DNA 복제개시가 억제되었거나), 각각의 레플리콘 내에서 진행 중이던 DNA 합성이 상해부위에서 억제되어 복제포크의 진행이 억제된 결과로 추측된다. 또한 높은 농도 처리시  $5 \times 10^7$  달톤 이상의 커다란 분자들의 양이 감소하는 것은 농도 증가에 따라 DNA 상해부위가 증가하게 되어 복제가 이루어지지 못하는 부위가 많아짐에 따라 여러 레플리콘에서 합성된 DNA분자들끼리의 연결이 저해되었기 때문으로 생각된다.

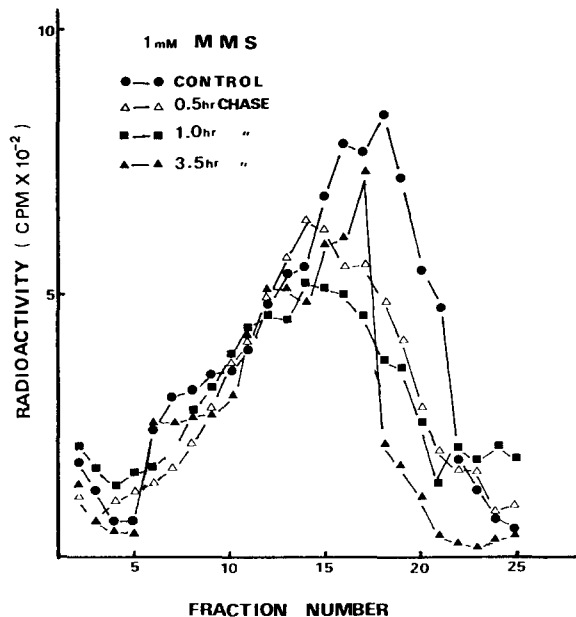


Fig. 4. Changes of steady-state distribution of nascent DNA in CHO-K1 cells pulse-labeled various times after treatment of 1mM MMS.

Fig. 4와 Fig. 5는 각각 1mM과 2mM의 MMS를 처리하고 일정시간 경과 후 순간표지하여 새로이 합성된 DNA 분자의 분포 양상을 알칼리 자당농도구배 초원심분리법으로 조사한 결과이다. 1mM MMS 처리군의 경우 레플리콘 크기 ( $4.33 \times 10^7$ 달톤) 이하의 작은 DNA 분자들의 합성은 3.5시간 경과 후에도 억제되는 양상을 보이고 있으나 레플리콘 크기보다 큰 DNA 분자들의 합성량은 0.5시간 경과 후나 3.5시간 경과 후에도 큰 변화가 없었다. 한편 21번째 이후의 분획에서 나타나는  $1.1 \times 10^7$  달톤보다도 작은 DNA 분자들이 시간이 경과됨에 따라 점차 감소하는 것으로 보아 이들 분자들이 복제를 계속하여 보다 큰 DNA 분자로 전환되었음을 알 수 있다. 만일 MMS의 처리로 DNA 복제개시가 장기간에 걸쳐 완전히 억제된다면  $5 \times 10^7$  달톤 이상의 커다란 DNA분자들이 시간 경과에도 불구하고 계속 존재하는 것을 설명할 수 없게 된다. (Fig. 4). 따라서 이 결과는 DNA의 복제개시가 MMS 처리에 의하여 장기간에 걸쳐 완전히 억제된 것이 아니라 곧 바로 재개된 결과라고 해석될 수 있다. 한편 2mM MMS 처리군의 경우 (Fig. 5),  $5 \times 10^7$  달톤 이상 크기의 DNA 분자들의 양이 MMS 처리 후 4시간까지도 억제되었다. 또한  $1.1 \times 10^7$  달톤 크기 이하의 작은 DNA 분자들의 양이 30분 경과 후 급격히 증가하였다가 시간이 경과함에 따라 감소하였고  $5 \times 10^7$  달톤 정도 크기의 DNA 분자들이 증가하였다. 이는 아마도 상해받은 세포의 경우 본래의 복제기점 (replication origin) 이외의 곳에서도 복제가 시작되었기 때문이 아닌가 생각된다.

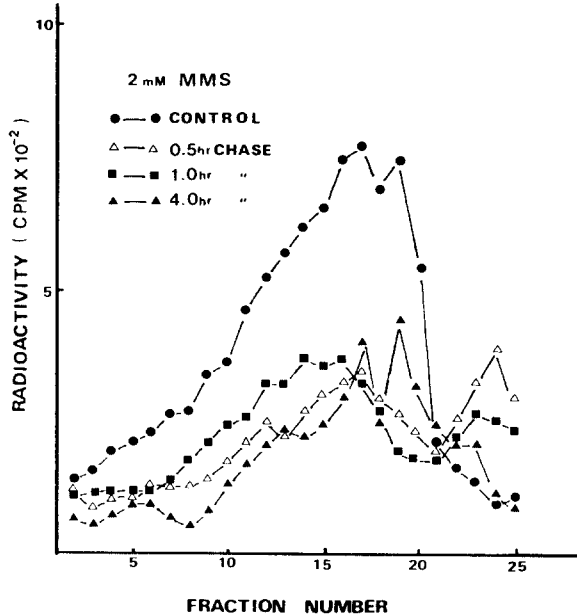


Fig. 5. Changes of steady-state distribution of nascent DNA in CHO-K1 cells pulse-labeled various times after treatment of 2mM MMS.

Table 1은 MMS를 1mM과 2mM을 처리한 후 시간경과에 따른 DNA 합성율과  $5 \times 10^7$  달톤 이상의 DNA 분자들에서 일어난 상대적 DNA 합성율을 나타내고 있다. 이 Table에서 DNA 합성율이 시간이 지남에 따라 점차 회복됨을 알 수 있으며,  $5 \times 10^7$  달톤 이상의 DNA 분자들에서의 상대적인 DNA 합성율이 1mM MMS 처리군에서는 점차 증가되나 2mM MMS 처리군에서는 오히려 감소됨을 알 수 있다. 이 결과는 높은 농도인 2mM의 MMS를 처리한 경우 4시간 경과 후 거의 대조군 수준으로 DNA 합성율이 회복되는 것은 대부분  $5 \times 10^7$  달톤 이하의 DNA 분자들의 합성양 증가에 기인된 것임을 시사한다.

MMS를 처리한 직후에 새로이 합성된 DNA 분자의 변화를 알아보기 위하여 pulse-chase 방법을 사용하였다. 즉 MMS를 처리하고  $^3\text{H}$ -티미딘으로 10분간 순간표지한 후 정상 배양액에서 여러 시간 간격으로 배양하여 표지된 DNA 분자의 성장 양상을 알카리 자당농도구배 초원심분리법으로 분석하였다.

Fig. 6과 Fig. 7은 MMS를 각각 1mM과 2mM로 처리하였을 경우의 결과이다. MMS를 처리한 순간 표지방법으로 표지된 DNA 분자의 크기는 시간이 경과함에 따라 점차 신장하여  $^{14}\text{C}$ -티미딘으로 표지된 모(parental) DNA 크기와 같게 되었다.

Table 2는 Fig. 6과 Fig. 7의 결과에서 계산된 값으로 시간경과가 따른 DNA 분자의 중량 평균 분자량의 변화를 나타내었다. 이 Table에서 보는 바와 같이 순간표지된 DNA 분자의 성장속도는 1mM MMS를 처리한 군에서는 대조군과 거의 비슷하였으나, 2mM MMS를 처리한 경우에는 대조군에 비하여 조금 늦은 것으로 나타났다. 이상의 결과는 MMS에 의해 유발된 상해를 모 DNA에 가지고 있는 세포에서도 새로이 합성되는 DNA 분자의 성장은 낮은 농도로 처리할 경우 거의 정상적으로 일어나며, 높은 농도로 처리할 경우에서도 약간 지연되기는 하나 거의 정상적으로 일어난다는 것

**Table 1. The rate of DNA synthesis in CHO-K1 cells treated with MMS.**

Dose(mM)	Time(hr)	Specific activity*	Relative activity**
1.0	0.0	100.0	60.6
	0.5	55.3	65.7
	1.0	62.3	77.3
	2.5	87.1	76.7
	3.5	101.3	80.9
2.0	0.0	100.0	61.7
	0.5	39.0	61.7
	1.0	37.0	53.2
	2.0	63.0	51.5
	4.0	96.1	46.3

\* The rate of DNA synthesis is expressed as specific activity.

$$\text{Specific activity} = \frac{\sum^3 \text{H-cpm}}{\sum^{14} \text{C-cpm}}$$

\*\* Relative activity indicates a partial rate of DNA synthesis occurred in nascent DNA molecules, particularly, larger than  $5 \times 10^7$  daltons.



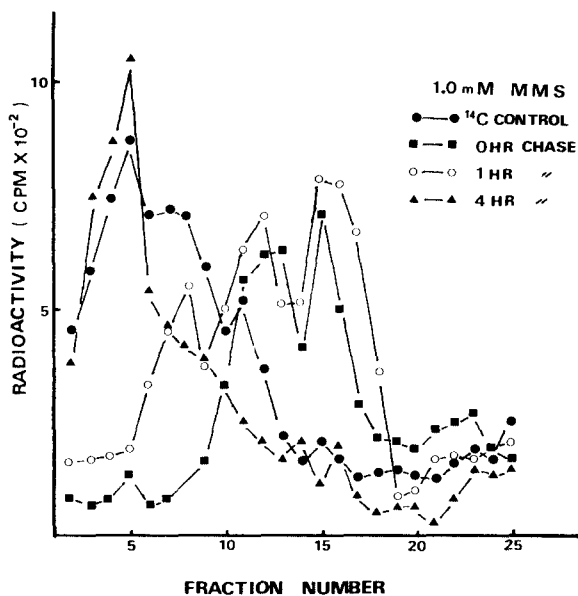


Fig. 6. The growth patterns of nascent DNA in CHO-K1 cells incubated in fresh medium after treatment of 1mM MMS followed by pulse-labeling. <sup>14</sup>C control indicates the distribution of parental DNA of control group in this and other figures.

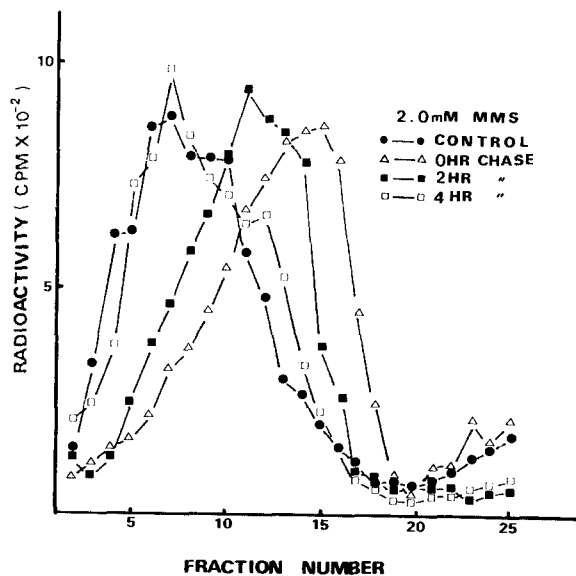


Fig. 7. The growth patterns of nascent DNA in CHO-K1 cells incubated in fresh medium after treatment of 2mM MMS followed by pulse-labeling.

**Table 2. Changes of Mw in CHO-K1 cells treated with MMS and subsequently allowed to grow in fresh medium after pulse-labeling with  $^3\text{H-TdR}$ .**

Dose(mM)	Time(hr)	Mw( $\times 10^5$ d)	% of control
0 (control)*	0.0	2.17	100
0	0.0	1.10	51.2
0	0.16	1.19	54.8
0	0.5	1.41	65.0
0	1.0	1.49	68.7
0	2.0	1.82	83.9
1.0	0.0	0.74	34.1
1.0	0.5	1.11	51.2
1.0	1.0	1.66	76.5
1.0	2.0	2.00	92.2
1.0	4.0	2.15	99.1
2.0	0.0	1.06	48.8
2.0	0.5	1.08	49.8
2.0	1.0	1.24	57.1
2.0	2.0	1.71	78.8
2.0	4.0	1.82	83.9

\* Weight average molecular weight(Mw) of control group was calculated from the radioactivity of  $^{14}\text{C-TdR}$  with which parental DNA strands were fully pre-labeled for 24-48 hrs.

을 보여주고 있다. 즉 후복제 회복기작이 존재함을 보여주고 있으며, 이는 다른 연구자들의 결과와 일치하였다. (Lehmann, 1972; Park and Clebver, 1979).

## 논 의

포유동물 세포에서 DNA 복제는 DNA 상해에 의해 여러형태로 억제된다. 그러나 DNA 복제는 수많은 작은 레플리콘에서 일어나기 때문에 복제포크(replication fork)에서 DNA 상해에 의한 DNA복제억제기작과 이의 회복기작을 밝히는 데는 많은 애로가 있다(Friedberg, 1985).

Cleaver 등 (1983)은 절제회복능과 레플리콘 크기를 DNA의 복제억제 및 회복과 연관시켜 일반적인 결론을 추론하였다. 즉 자외선을 조사한 후 1시간 동안에서의 DNA 복제 억제는 레플리콘당 평균 상해수와 상관이 있어, 레플리콘당 상해 수가 적을 경우에는 DNA의 복제 개시가 주로 억제되고 상해 수가 많을 경우에는 DNA사의 성장도 억제되며, 또한 DNA사의 성장을 억제하는 정도의 선량을 세포에 조사하였을 경우 DNA사 생장의 억제가 회복되는 속도는 절제회복 능력이 높은 세포가 절제회복 능력이 낮은 세포에 비하여 빠르게 회복되고 상대적으로 작은 크기의 레플리콘을 가진 세포가 큰 크기의 레플리콘을 가진 세포보다 단위크기의 DNA당 레플리콘 개시부위가 많아 회복이 신속하게 진행된다고 추측하였다.

그러나 세포의 절제회복능력이 DNA 합성율의 회복에 영향을 미친다는 보고 (Mavne, 1984; Ventura *et al.*, 1987)에도 불구하고 수종의 사람 세포에서 피리미딘 이량체의 제거는 자외선 조사후 6시간 내에는 거의 일어나지 않았으며 48시간이 경과한 후에도 완전히 제거되지 않았다는 보고 (Ehmann *et al.*, 1978)로 미루어 볼 때 자외선을 포함한 DNA 상해유발원을 처리할 경우 1시간이 경과한 후부터 나타나는 DNA 합성율의 회복양상은 절제회복 만으로는 설명할 수 없다.

최근 이 차이를 설명하기 위하여 DNA 합성율의 회복은 새로운 복제기점 (replication orgtn)의 사용에 기인한다는 가설이 Meneghini와 Mello-Filho (1983)에 의하여 제기되었다. 이들은 상해와 상해 사이에서는 복제포크의 진행이 정상으로 일어나며 자외선을 조사한 후에는 활성 레플리콘의 수가 천천히 증가한다고 가정하여 수식적인 모델을 제시하였다. 이 모델에 의하면 DNA 합성이 억제되는 현상은 복제포크가 상해부위에서 일시적으로 정지하였기 때문에 일어나는 것이며 그 후 회복은 새로운 복제기점의 사용으로 인하여 이루어진다는 것이다.

본 연구에서는 MMS 처리군의 경우 억제되었던 DNA 합성율이 시간경과에 따라 회복되어 대조군 수준으로 회복 증가 되었으나  $5 \times 10^7$  달톤 이상 크기의 DNA 분자들에서의 DNA 합성량을 나타내는 상대적 DNA 합성율은 감소하였다 (Table 1). 또한 MMS 처리 후 시간이 지남에 따라  $1 \times 10^7$  달톤 이하 크기의 DNA 분자들의 합성량이 특이하게 증가하였다가 점차 감소하였고 (Fig. 4 과 Fig. 5). 특히 1mM 정도의 낮은 농도의 MMS를 처리한 경우에 있어서는 시간경과에 관계없이 큰 크기의 DNA 분자들의 양이 감소하지 않은 결과들을 얻을 수 있었다. 이는 MMS 처리에 의하여 억제되었던 DNA 합성율이 시간이 경과함에 따라 회복되는 것은 상대적으로 작은 DNA 분자들의 합성량이 증가된 결과라 생각할 수 있다.

즉, DNA 상해가 주형 DNA상에 존재하는 상태에서 새로운 부위에서 복제가 개시된 결과라 추측되며 이는 새로운 복제기점이 DNA 합성율이 회복에 관여한다는 여러 연구자들의 연구결과와 일치한다. (Meneghini and Mello-Filho, 1983; Taylor, 1984; Ventura and Meneghini, 1984; Griffiths and Ling, 1985, 1987).

MMS를 처리하고  $^3\text{H}$ -티미딘으로 10분간 순간표지한 후 이 표지된 DNA의 성장 양상을 조사한 pulse-chase 실험결과는 MMS에 의하여 유발된 DNA 상해가 DNA상에 존재함에도 불구하고 DNA사의 생장이 계속 일어나나 (Fig. 6, Fig.7 과 Table 2) DNA상에 상해가 있는 경우 대조군에 비해 느린 성장을 하는 것을 보여주고 있다. 이로 미루어 DNA 상해부위에서의 복제포크의 진행이 억제되는 현상은 일시적인 것으로 추측되며 이는 여러 연구자들의 연구결과와 일치한다. (Park and Cleaver, 1979; Meneghini and Mello-Filho, 1983; Taylor, 1984; Ventura and Meneghini, 1984; Griffiths and Ling, 1985, 1987). 또한 이러한 복제포크의 진행억제가 풀리는 현상은 아마도 새로운 복제기점에서 새롭게 합성된 작은 크기의 DNA 분자들과 이미 순간표지되어 있던 DNA 분자들의 결합에 의한 결과로 인한 것이라 생각된다.

## REFERENCES

1. Buhl, S.N., R.B. Setlow, and J.D. Regan, (1972): Steps in DNA chain elongation and joining after ultra-violet irradiation of human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 22: 417-424.
2. Buhl, S.N., R.B. Setlow, and J.D. Regan, (1973): Recovery of the ability to synthesize DNA in segments of normal size at long times after irradiation of human cells. *Biophys. J.* 13: 1265-1275.
3. Cleaver, J.E., (1974): Sedimentation of DNA from human fibroblasts irradiated with ultraviolet light: Possible detection of excision breaks in normal and repair deficient xeroderma pigmentosum cells. *Radiat. Res.* 57: 207-227.
4. Cleaver, J.E., W.K. Kaufman, L.N. Kapp, and S.D. Park, (1983): Replicon size and excision repair as factors in the inhibition and recovery of DNA synthesis from ultra-violet damage. *Biochim. Biophys. Acta.* 739: 207-215.
5. Dahle, D., T.D. Griffiths, and S.G. Carpenter, (1980): Inhibition and recovery of DNA synthesis in UV-irradiated Chinese hamster V-79 cells. *Photochem. Photobiol.* 32: 157-165.
6. Doniger, J., (1978): DNA replication in UV light irradiated Chinese hamster cells: The nature of replicon inhibition and post-replication repair. *J. Mol. Biol.* 120: 433-446.
7. Edenberg, H.J., (1976): Inhibition of DNA replication by ultra-violet light. *Biophys. J.* 16: 849-860.
8. Ehmann, U.K., K.H. Cook, and E.C. Friedberg, (1978): The kinetics of thymidine dimer excision in ultraviolet-irradiated human cells. *Biophys. J.* 22: 249-264.
9. Friedberg, E.C., (1985): DNA damage tolerance in eukaryotic cells. *In: DNA repair.* (E.C. Friedberg, ed). Freeman, N.Y., pp. 459-504.
10. Fujiwara, Y., (1975): Postreplication repair of ultra-violet damage to DNA, DNA chain elongation, and effects of metabolic inhibitors in mouse L cells. *Biophys. J.* 15: 403-415.
11. Griffiths, T.D., and S.Y. Ling, (1985): Effects of ultraviolet light on thymidine incorporation, DNA chain elongation and replicon initiation in wild-type and excision-deficient Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 826: 121-128.
12. Griffiths, T.D., and S.Y. Ling, (1987): Activation of alternative sites of replicon initiation in Chinese hamster cells exposed to ultra violet light. *Mut. Res.* 184: 39-46.
13. Hanawalt, P.C., P.K. Cooper, A.K. Ganesan, and C.A. Smith, (1979): DNA repair in bacteria and mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 783-836.
14. Lehmann, A.R., (1972): Post-replication repair of DNA in ultraviolet irradiated mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 66: 319-337.
15. Lehmann, A.R., (1975): Postreplication repair in UV irradiated mammalian cells. *In: Molecular Mechanisms for repair of DNA.* (P.C. Hanawalt and R.B. Setlow, eds.) Plenum, N.Y., pp. 617-624.
16. Mayne, L.V., (1984): Inhibitors of DNA synthesis (aphidicolin and cytosine arabinoside/hydroxyurea) prevent the recovery of RNA synthesis after UV-irradiation. *Mut. Res.* 131: 187-191.
17. Meneghini, R., and A.C. Mello-Filho, (1983): Rate of DNA synthesis in mammalian cells irradiated with ultraviolet light: A model replication fork, and in the number of active replicons. *J. Theor. Biol.* 100: 359-371.

18. Painter, R.B., (1977a): Inhibition of initiation of HeLa cell replicons by methylmethane sulfonate. *Mut. Res.* 42: 299-303.
19. Painter, R.B., (1977b): Rapid test to detect agents that damage human DNA. *Nature* 265-650-651.
20. Painter, R.B., and B.R. Young, (1976): Formation of nascent DNA molecules during inhibition of replicon initiation in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 418: 146-153.
21. Park, S.D., and J.E. Cleaver, (1979): Post-replication repair: Questions of its definition and possible alteration in xeroderma pigmentosum cell strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3927-3931.
22. Rupp, W.D., and P. Howard-Flanders, (1968): Discontinuities in the DNA synthesized in an excision deficient strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation. *J. Mol. Biol.* 31: 291-304.
23. Studier, F.W. (1965): Sedimentation studies of the size and shape of DNA. *J. Mol. Biol.* 11: 373-390.
24. Taylor, J.H., (1984): Replicon models for organization and control of chromosome reproduction. *In: Genetics: New frontiers* (V.L. Chopra, B.C. Joshi, R.P. Sharma, and H.C. Bansal, eds.). *UNIPUB, N. Y.*, pp. 213-218.
25. Ventura, A.M., and R. Meneghini, (1984): Inhibition and recovery of the rate of DNA synthesis in V79 Chinese hamster cells following ultra violetlight irradiation. *Mut. Res.* 131: 81-88.
26. Ventura, A.M., J.M. Ortega, R.I. Schumacher, and R. Meneghini, (1987): Recovery of DNA synthesis from inhibition by ultraviolet light in mammalian cells. *J. Cell. Sci. (Suppl)* 6: 191-206.
27. Young, B.R., and R.B. Painter, (1988): Radioresistant DNA synthesis and human genetic diseases. *Human Genetics* (in print).

## Replication Inhibition and Its Recovery/Process in Chinese Hamster Ovary Cells Treated with Methyl Methanesulfonate

Lee, Chun-Bok\*, Hyung Ho Lee, Chee Gun Lee and Sang Dai Park#

*\*Department of Biology, Kyungshung University  
Pusan 608-736, Korea*

*#Department of Zoology, Seoul National University  
Seoul 151-742, Korea*

This study aims to elucidate the molecular mechanism of DNA replication inhibition and its recovery process in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells treated with MMS. The distribution and growth pattern of nascent DNA molecules from the CHO-K1 cells treated with MMS were assayed by the alkaline sucrose gradient sedimentation method. 1) When cells were pulse-labeled at various periods after treatment of MMS, DNA molecules smaller than  $1 \times 10^7$  dalton were increased and then decreased with the lapses of time. 2) The rate of DNA synthesis was recovered at 4 hr following treatment of MMS, but the weight average molecular weight (Mw) of nascent DNA molecules was still lower than that of control. 3) The DNA molecules pulse-labeled immediately after MMS treatment were continued to grow in the presence of damaged site on the template DNA strand.

These data indicate that the smaller DNA molecules were newly synthesized using new replication origins, in the sites where progression of replication fork were inhibited and then the rate of DNA synthesis was increased. The pulse-labeled DNA molecules immediately after MMS treatment, also, grew by fusion with the newly synthesized smaller DNA molecules.