

Chinese Hamster Ovary 세포에 있어 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine에 의한 DNA 복제억제와 이의 회복경로

김종숙, 이천복*, 이형호, 박상대[†]

* 서울대학교 자연과학대학 동물학과

* 경성대학교 이과대학 생물학과

(1989. 6. 7 접수)

본 연구는 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)를 처리한 CHO-K1세포에서 DNA 복제억제와 그 회복과정의 분자론적 기작을 규명할 목적으로 방사선 이종표지에 의한 DNA합성율의 측정, 알칼리 자당농도구배 초원심분리법에 의한 DNA분자량과 후복제 회복율을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

DNA 합성율은 $2\mu\text{M}$ 이하의 낮은 농도의 MNNG 처리군에서는 급격히 감소하였으나, $5\mu\text{M}$ 이상의 농도에서는 그 감소양상이 둔화되었다. 억제되었던 DNA 합성율은 시간경과에 따라 회복되어 처리 후 4시간 쯤에는 대조군 수준 또는 그 이상으로 회복되었다. MNNG 처리 후 DNA 분자 크기의 분포와 새로 합성된 DNA 분자의 성장양상을 알칼리 자당농도구배 초원심분리법으로 조사한 결과 MNNG 처리 후 시간 경과에 따라 새로 합성된 DNA 분자들의 크기분포는 1×10^7 달톤 이하의 DNA 분자들의 합성양이 특이하게 증가하였다가 감소를 보였다. 또한 알킬화제 처리군에서의 DNA 합성율은 처리 후 4시간에 대조군 수준 또는 그 이상으로 회복되었으나, 새로 합성된 DNA의 중량 평균분자량(weight average molecular weight : Mw)은 대조군에 비해 훨씬 작았다. 한편 알킬화제 처리 직후 새로 합성된 DNA를 순간 표지하고 이들 DNA의 성장을 시간별로 추적한 결과 주형 DNA 상에 상해가 존재하는 상태에서도 지속적인 신장이 일어남을 발견하였다.

이와 같은 결과를 종합해 볼 때 DNA 합성율이 회복되는 것은 상해로 인해 복제포크의 진행이 억제되었던 부위에서 새로 합성이 시작됨, 작은 크기 DNA 분자들의 합성양이 증가하여 나타난 결과로 짐작된다. 또한 이 새롭게 합성된 작은 크기의 DNA 분자와 순간표지되어 있던 DNA 분자가 결합하여 DNA 분자의 신장이 일어나는 것으로 생각된다. 따라서 DNA 복제는 알킬화된 상해에 의해 억제되며, 이의 회복은 상해의 제거와 새로운 복제기점의 사용으로 인해 이루어진다고 생각된다.

서론

포유동물 세포에서 DNA 복제는 DNA 상해에 의해 여러 형태로 억제된다. 그러나 DNA 복제는 수많은 작은 레플리콘에서 합성되기 때문에 복제포크(replication fork)에서 DNA 복제억제 기작을 밝히는 데는 많은 애로가 있다.(Friedberg, 1985). Cleaver 등(1933)은 DNA 상해에 의한 복제억제가 회복되는 속도는 세포의 레플리콘 크기와 절제회복 능력과의 함수로 표시될 수 있다고 주장하였다. 즉, 절제회복 능력이 높은 세포가 절제회복 능력이 낮은 세포에 비하여 DNA 합성억제로부터 회복이 빠르며 상대적으로 작은 크기의 레플리콘을 가진 세포가 큰 크기의 레플리콘을 가진 세포보다 단위 크기의 DNA당 레플리콘 개시부위가 많아 회복이 빨리 일어난다는 것이다. 그러나 다른 한편으로 합

*본 연구는 문교부 학술연구조성비 및 과학재단 복지기초 연구비에 의해 이루어진 것임.

성율의 회복은 새로운 복제기점(replication orgin)의 사용에 기인한다는 가설이 Meneghini 와 Mello Filho(1983)에 의하여 제기되었다. 이 모델에 의하면 DNA합성이 억제되는 현상은 복제포크가 상해 부위에서 일시적으로 정지하였기 때문에 일어나는 것이며 그 후 회복은 새로운 복제기점의 사용으로 인하여 이루어진다는 것이다.

한편 DNA 상해에 의한 복제포크의 진행이 억제되는 현상이 일시적인지 또는 영구적인지에 대하여는 많은 논쟁이 있어 왔다(Friedberg, 1985). 즉, Buhl 등(1972)과 Fajwara (1975), Lehmann (1975) 등은 포유동물세포를 재료로 한 실험에서 피리미딘 이량체 생성부위에서 복제포크가 정지된다고 주장하였으며, Edenberg (1976)는 HeLa 세포에서 fiber 자기 방사법으로 단위시간당의 ^3H -티미딘으로 표시된 DNA조각의 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)은 복제포크의 진행이 피리미딘 이량체 생성위치에서 일정시간 동안만 정지한다고 주장하였다.

따라서 본 연구에서는 DNA 합성율의 회복에 관여하는 요인에 대하여 알아보고 MNNG 에 의하여 유발된 복제포크 진행의 억제가 일시적인지 또는 영구적인지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 세포배양

본 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 (100 units/ml) 와 스트렙토마이신 (100 μg /ml)을 첨가하여 사용하였고, 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 $^{\circ}\text{C}$ 항온기에서 세포를 단층 배양하였고, 0.05% trypsin-EDTA (ethylene diamine tetraacetate ; Sigma) 용액으로 2~3일 마다 계대배양하였다.

MNNG의 처리

MNNG는 dimethyl sulfoxide (DMSO ;Merck)에 용해시킨 후 인산완충 식염수 (phosphate buffered saline :PBS)로 희석하여 원액 (0.1M)을 만들었고, 처리하기 직전에 필요한 농도로, 혈청이 들어있지 않은 배양액으로 희석하여 30분 동안 처리하였다.

DNA 합성율 측정 실험

세포를 1ml 당 0.01 μCi 의 ^{14}C -티미딘 (specific activity, 50~60mCi/ml Amersham International Ltd., Amersham, U.K.)이 들어있는 배양액에서 2~3일간 배양한 후 MNNG를 처리하고 1ml 당 5 μCi 의 ^3H -티미딘이 포함된 배양액에서 30분간 배양하였다. 이들 세포를 방사능으로 표지되어 있지 않은 티미딘 (100 μg /ml)이 들어있는 인산완충 식염수로 3번 세척한 후 SSC (0.15M sodium chloride, 0.015M sodium citrate) 용액을 사용하여 수확하였다. 수확한 세포를 0.5M 수산화나트륨 용액으로 30분간 lysis 시킨 후, 4 $^{\circ}\text{C}$ 로 냉각시킨 4% trichloroacetic acid (TCA) 용액에 하룻밤 동안 처리하였다. DNA는 Whatman GF/A glass fiber

filter (W & R Balston Ltd., England)를 사용하여 수확하였고, DNA가 부착된 여과지를 건조시킨 후, 4°C scintillation cocktail (PPO 4g, POPOP 0.1g / Toluene 1L)을 8ml 씩 넣은 scintillation 병에 넣고 Liquid scintillation spectrometer (Packard Instrument Co.)를 이용하여 여과지 위에 남아있는 ^3H / ^{14}C 방사능 양의 비를 측정하여 DNA 합성율을 계산하였다.

알카리 자당농도구배 초원심분리

알카리 자당농도구배 초원심분리 실험은 Cleaver (1974)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 5~20% 자당농도구배 위에 세포현탁액을 넣고 알카리 용해용액 (0.5 M NaOH, 0.02 M Na_2EDTA)으로 4시간동안 용해시킨 후 SW28 rotor를 사용하여 25,000rpm에서 4시간 동안 원심분리하여 DNA를 침강시켜 자당구배에 따른 분획을 얻었다. 이들 분획에 들어 있는 ^3H 과 ^{14}C 로 표지되어 있는 DNA들은 Whatman glass fiber filter (GF/A)를 사용하여 수거하였고, liquid scintillation spectrometer를 사용하여 여과지에 남아 있는 ^3H 와 ^{14}C 의 방사능을 측정하였다. DNA의 중량평균분자량 (weight average molecular weight : Mw)은 Park and Cleaver (1977)의 수식에 의거하여 계산하였다.

결 과

Fig. 1A는 MNNG에 의한 DNA 합성율의 억제양상과 DNA 복제 양상을 알카리 자당농도구배 초원심분리법으로 분석하기 위하여 MNNG를 여러 농도로 처리한 후 DNA 합성율을 조사한 결과로서, DNA 합성율은 표지된 ^{14}C -티미딘 전체량에 대한 MNNG 처리 후 표지된 ^3H -티미딘의 비율로 계산

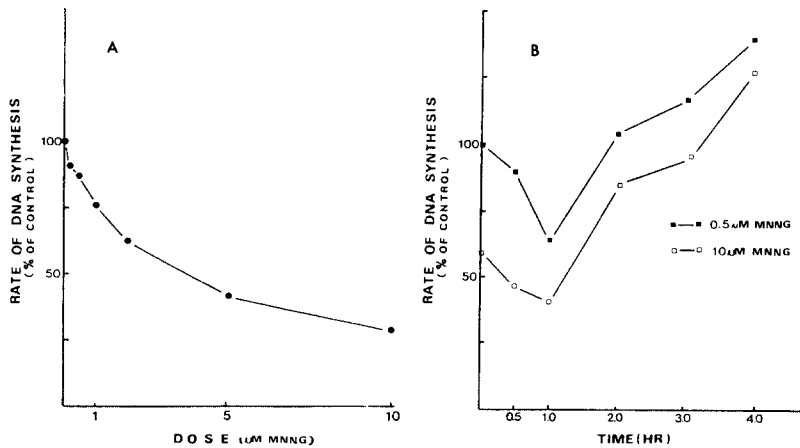


Fig. 1. (A) Rates of DNA synthesis in CHO-K1 cells treated with various doses of MNNG. Each point represents the mean of five or more determinants from at least three different experiments. (B) Changes of DNA synthesis rate in CHO-K1 cells treated with MNNG. Cells were pre-labeled with ^{14}C -thymidine and incubated for an appropriated period of time after treatment of MNNG and pulse-labeled with ^3H -thymidine.

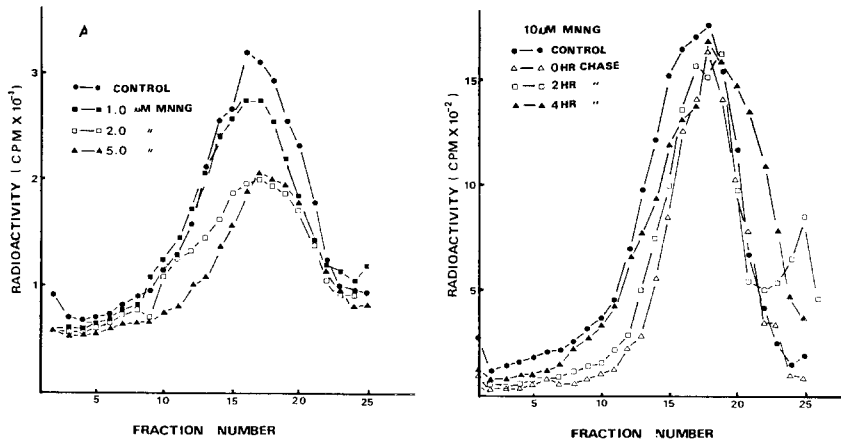


Fig. 2. (A) Steady-state distribution of nascent DNA molecules in CHO-K1 cells pulse-labeled with $10\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -thymidine after treatment of various concentrations of MNNG for 30min and incubation in growth medium for 1 hour. (B) Changes of steady-state distribution of nascent DNA molecules in CHO-K1 cells pulse-labeled at various times after treatment with $10\mu\text{M}$ MNNG.

하였다. DNA 합성율은 MNNG를 $2\mu\text{M}$ 이하로 처리하였을 경우에는 농도에 따라 급격히 감소하는 양상을 보이고 있는 반면 $5\mu\text{M}$ 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)과 일치한다. 또 이 결과로부터 낮은 농도로는 $2\mu\text{M}$ 이하가, 높은 농도로는 $5\mu\text{M}$ 이상이 적당하다고 판단하였다.

Fig. 1B는 MNNG를 처리한 후 시간에 따른 DNA 합성율의 회복 양상을 나타낸 것으로 MMS와 MNNG 모두에서 낮은 농도 처리군이 높은 농도 처리군에 비하여 빨리 회복되는 양상을 보였으며, 처리 후 1시간에서 가장 낮은 DNA 합성율을 나타내었다. 이후 DNA 합성율은 점차 회복되어 2~3시간 후에는 대조군 수준에 이르렀고, 처리 4시간 후부터는 대조군에 비하여 오히려 높은 DNA 합성율을 보였다. Fig. 2A는 여러 농도의 MNNG를 처리한 세포에서 새로이 합성된 DNA분자의 크기를 조사한 결과로, $1\mu\text{M}$ 이하의 MNNG 처리군에서는 5×10^7 달톤 이하 크기의 분자들이 감소하였으며 그 이상의 농도 처리군에서는 5×10^7 달톤 이상 크기의 DNA 분자들도 감소하였다. 이러한 결과들은 낮은 농도의 알킬화제를 처리할 경우 DNA 복제개시가 억제되었거나, 각각의 레플리콘 내에서 진행 중이던 DNA 합성이 상해부위에서 억제되어 복제포크의 진행이 억제된 결과로 추측된다. 또한 높은 농도 처리시 5×10^7 달톤 이상의 커다란 분자들의 양이 감소하는 것은 농도 증가에 따라 DNA 상해부위가 증가하게 되어 복제가 이루어지지 못하는 부위가 많아짐에 따라 여러 레플리콘에서 합성된 DNA 분자들끼리의 연결이 저해되었기 때문으로 생각된다.

Fig. 3A는 MNNG를 여러 농도로 처리하여 얻어진 DNA 합성율과 중량평균분자량(Mw)을 나타낸 것으로 MNNG의 농도가 증가함에 따라 새로 합성된 DNA의 중량 평균분자량이 감소해 감을 알

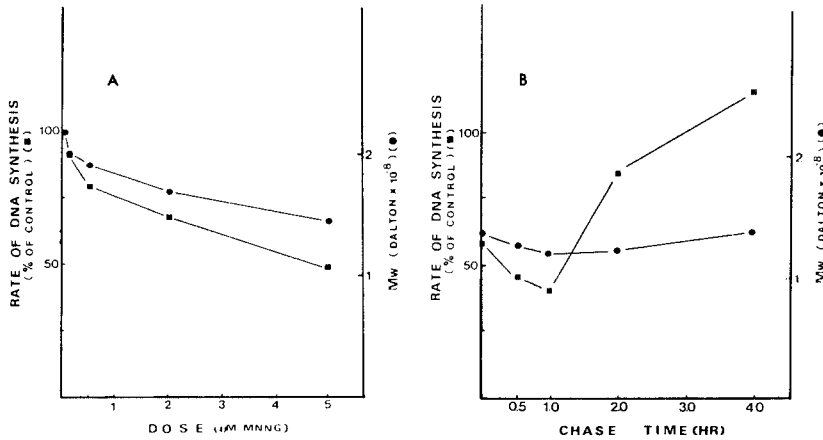


Fig. 3. (A) Changes of Mw and DNA synthesis in CHO-K1 cells treated with various concentrations of MNNG. Mw was calculated from the results described in Fig. 2A by using the sedimentation of phage DNA ($M_w = 1.65 \times 10^7$ dalton) labeled with ^{14}C -thymidine according to Studier's equation. (B) Changes of Mw and DNA synthesis with lapses of time after treatment of $10\mu\text{M}$ MNNG. These data were calculated from results described in Fig. 2B.

수 있다. Fig. 2B는 $10\mu\text{M}$ MNNG를 처리하고 일정시간 경과 후 순간 표지하여 새로이 합성된 DNA 분자의 분포 양상을 알카리 자당농도구배 초원심분리법으로 조사한 결과이다. MNNG를 처리한 후 2시간이 경과하면 1.1×10^7 달톤 이하의 DNA 분자들이 대조군에 비하여 급격히 증가하는 양상을 보이며, 4시간 경과 후에는 1×10^7 달톤과 5×10^7 달톤의 중간 정도의 DNA 분자들의 증가가 뚜렷해지는 반면 5×10^7 달톤 이상의 DNA 분자들의 양적 증가는 상대적으로 적게 나타난다. 또한 시간경과에 따른 DNA 합성율과 상대적인 중량 평균분자량(Mw)를 비교해 보면(Fig. 3B), DNA 합성율은 MNNG를 처리한 후 1시간이 경과된 뒤 가장 낮아졌다가 시간이 지남에 따라 증가하여 4시간 이후에는 오히려 대조군보다도 높았으나, 중량 평균분자량은 4시간 경과 후에도 대조군의 60% 정도 수준에 지나지 않았다. 이 결과를 볼 때 DNA 합성율의 회복은 상대적으로 작은 DNA 분자들의 합성양 증가에 기인된 것으로 추측된다. 이는 아마도 상해받은 세포의 경우 본래의 복제기점 이외의 곳에서도 복제가 시작되었기 때문으로 생각된다.

MNNG를 처리한 직후에 새로이 합성된 DNA 분자의 변화를 알아보기 위하여 pulse-chase 방법을 사용하였다. 즉 알킬화제를 처리하고 ^3H -티미딘으로 10분간 순간 표지한 후 정상 배양액에서 여러 시간 간격으로 배양하여 표지된 DNA 분자의 성장 양상을 알카리 자당농도구배 초원심분리법으로 분석하였다. Fig. 4는 $0.1\mu\text{M}$ MNNG를 처리하여 얻은 결과로, MNNG를 처리한 직후 순간표지방법으로 표지된 DNA 분자의 크기는 시간이 경과함에 따라 점차 신장하여 ^{14}C -티미딘으로 표지된 모(parental) DNA 크기와 같게 되었다. 이 결과는 MNNG에 의해 유발된 상해를 모 DNA 사에 가지고 있는 세포에서도 새로이 합성되는 DNA 분자의 성장은 약간 지연되기는 하나 거의 정상적으로 일어난다는 것을 보여주고 있다. 즉 후복제 회복기작이 존재함을 보여주고 있으며, 이는 다른 연구자들의 결과와 일치하였다 (Lehmann, 1972; Park and Cleaver, 1979).

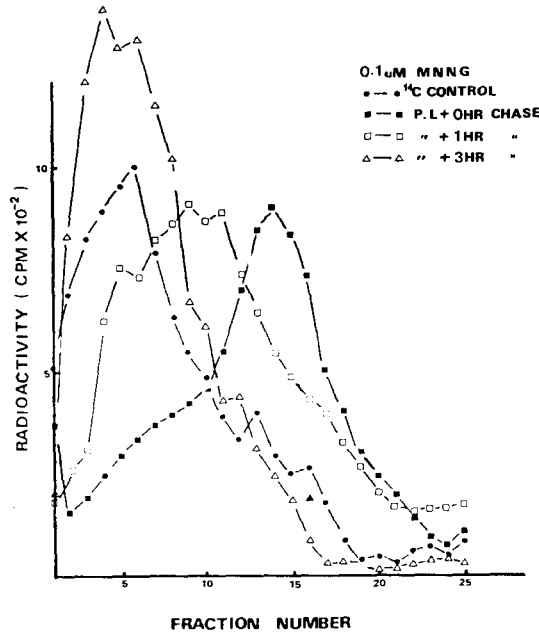


Fig. 4. The growth patterns of nascent DNA in CHO-K1 cells incubated in fresh medium after treatment of $0.1\mu\text{M}$ MNNG followed by pulse-labeling.

고찰

DNA 손상유발원을 처리하면 DNA 합성이 저해되나 이러한 저해효과는 시간이 경과함에 따라 감소하여 일정한 시간이 경과하면 DNA 합성율이 대조군 수준에 이르게 된다. Cleaver 등(1983)은 절제회복능력과 레플리콘 크기를 DNA의 복제억제 및 회복과 연관시켜 일반적인 결론을 추론하였다. 즉, 자외선을 조사한 후 1시간 동안에서의 DNA 복제억제는 레플리콘당 평균 상해 수와 상관이 있어 레플리콘당 상해 수가 적을 경우에는 DNA의 복제개시가 주로 억제되고, 상해 수가 많을 경우에는 DNA사의 성장도 억제된다고 주장하였다. 또한 DNA사의 성장을 억제하는 정도의 선량을 세포에 조사하였을 경우 DNA사 생장의 억제가 회복되는 속도는 세포의 레플리콘 크기와 절제회복능력의 함수로 표시될 수 있다고 주장하였다. 즉, 절제회복능력이 높은 세포가 절제회복능력이 낮은 세포에 비하여 DNA의 합성이 억제되었다가 빠르게 회복되고, 상대적으로 작은 크기의 레플리콘을 가진 세포가 큰 크기의 레플리콘을 가진 세포보다 단위크기의 DNA당 복제개시 부위가 많아 회복이 신속하게 진행된다고 주장하였다.

그러나 수종의 사람 세포에서 피리미딘 이량체의 제거는 자외선 조사 후 6시간 내에는 거의 일어나지 않았으며 48시간이 경과한 후에도 완전히 제거되지 않았다는 보고(Ehmann *et al.*, 1978)와 알킬화된 염기의 반을 제거하는 데에 10~60시간이 소요된다는 Bodell 등(1979)의 보고로 미루어 볼 때 자외선이나 MNNG와 같은 DNA 손상유발원을 처리할 경우 1시간이 경과한 후부터 나타나는

DNA 합성율의 회복양상은 절제 회복만으로는 설명할 수 없다. 최근 이 차이를 설명하기 위하여 DNA 합성율의 회복은 새로운 복제기점(replication origin)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. 또한 자외선량에 대한 DNA 합성율의 곡선은 상해부위에서 복제포크가 20분 정도 정지했을 때의 이론적 계산치와 일치한다고 주장하였다.

본 연구에서는 MNNG를 처리하고 시간경과에 따른 새로운 DNA 분자의 합성 양상을 조사한 결과, 1×10^7 달톤 이하 크기의 DNA 분자들이 특이하게 증가하였다가 감소하였으며 시간경과에 따라 이들보다 조금 큰 분자들의 합성량이 증가하였고 (Fig. 2B), DNA 합성율은 MNNG 처리 후 1시간 째에 대조군의 42%까지 저하되었다가 4시간 째에 118%로 오히려 대조군 수준 이상으로 증가하였음에도 불구하고 DNA 분자들의 중량 평균분자량(Mw)는 대조군의 60% 정도에 지나지 않았다(Fig. 3B). 이로 보아 MNNG 처리 후 억제되었던 DNA 합성율이 대조군 수준 또는 그 이상으로 회복되는 중요한 요인 중의 하나는 작은 크기의 DNA 분자들의 합성이 상대적으로 증가하여, 이들의 합이 전체적으로 대조군에서의 정상크기의 DNA 분자들의 합성량보다 커지는 것이라 추측된다. 즉, DNA 상해가 주형 DNA 상에 존재하는 상태에서 새로운 부위에서 복제가 개시된 결과라 추측되며 이는 새로운 복제기점이 DNA 합성율의 회복에 관여한다는 여러 연구자들의 연구결과와 일치한다(Meneghini and Mello-Filho, 1983; Taylor, 1984; Ventura and Meneghini, 1984; Griffiths and Ling, 1985, 1987).

한편 MNNG를 처리하고 ^3H -티미딘으로 10분간 순간표지한 후 이 표지된 DNA의 생장 양상을 조사한 pulse-chase 실험결과(Fig. 4)는 MNNG 처리에 의하여 유발된 DNA 상해가 DNA 상에 존재함에도 불구하고 DNA 사의 생장이 계속 일어난다는 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 복제원점에서 새롭게 합성된 작은 크기의 DNA 분자들과 이미 순간 표지되어 있던 DNA 분자들의 결합에 의한 결과로 인한 것이라 생각된다.

이상의 결과들로 볼 때 MNNG 처리 후 억제되었던 DNA 합성율의 회복은 DNA 상해가 주형 DNA 상에 존재하는 상태에서 일어나는 새로운 부위에서의 복제개시와, 상해부위에서 일시적으로 억제되었던 복제포크의 진행이 재개됨에 따른 결과로 생각된다. 그러나 이러한 생각들을 보다 명확하게 증명하기 위해서는 상해부위에서의 복제포크의 진행이 억제되는 현상과 이의 풀림현상에 대한 생화학적 연구가 수행되어야 하리라 생각된다.

REFERENCES

1. Bodell, W.J., B. Singer, G.H. Thomas, and J.E. Cleaver, (1979): Evidence for removal at different rates of O⁶-ethylpyrimidines and ethylphosphotriesters in two human fibroblast cell lines. *Nucleic. Acid Res.* 6: 2819-2829.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Edenberg, H.J., (1976): Inhibition of DNA replication by ultra-violet light. *Biophys. J.* 16: 849-860.
7. Ehmman, U.K., K.H. Cook, E.C. Friedberg, (1978): The kinetics of thymidine dimer excision in ultraviolet-irradiated human cells. *Biophys. J.* 22: 249-264.
8. Friedberg, E.C., (1985): DNA damage: *In*: DNA repair. (E.C. Friedberg, ed). Freeman, N.Y., pp. 1-78.
9. Fujiwara, Y., (1975): Postreplication repair of ultraviolet damage to DNA, DNA chain elongation, and effects of metabolic inhibitors in mouse L cells. *Biophys. J.* 15: 403-415.
10. 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.
11. 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: 38-46.
12. Lehmann, A.R., (1972): Post-replication repair of DNA in ultra-violet irradiated mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 66: 319-337.
13. Lehmann, A.R., (1975): Postreplication repair in UV irradiated mammalian cells. *In*: Molecular Mechanisms for repair of DNA. (Hanawalt, P.C., and R.B. Setlow. eds.) pp. 617-624.
14. Meneghini, R., A.C. Mello Filho, (1983): Rate of DNA synthesis in mammalian cells irradiated with ultra-violet light: A model replication fork, and in the number of active replicons. *J. Theor. Biol.* 100: 359-371.
15. 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.

16. 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.
17. Taylor, J.H., (1984): Replicon models for organization and control of chromosome reproduction. *In: Genetics: New frontiers; vol. I.* (Chopra, V.L., Joshi, B.C., Sharma, R.P., and Bansal, H.C. eds.) UNLPUB. New York.
18. Ventura, A.M., and R. Meheghini, (1984): Inhibition and recovery of the rate of DNA synthesis in V79 chinese hamster cells following ultra-violet light irradiation. *Mut. Res.* 131: 81-88.

Replication Inhibition and Its Recovery Process in Chinese Hamster Ovary Cells Treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

Jong Sook Kim, Chun-Bok Lee*, Hyung Ho Lee and Sang Dai Park

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

**Department of Biology, Kyungsoong University,
Pusan 608-736, Korea*

DNA replication inhibition and its recovery processes were determined in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells treated with MNNG. Rates of DNA synthesis were remarkably inhibited at lower doses ($< 2\mu\text{M}$ MNNG), and this inhibition was recovered as a function of time following MNNG treatment. However, weight average molecular weight (Mw) of nascent DNA molecules analysed by alkaline sucrose gradient sedimentation method was still lower than that of control. When cells were pulse-labeled at various times after treatment of MNNG, DNA molecules smaller than 1×10^7 dalton were initially increased and then decreased with lapses of time. The DNA molecules pulse-labeled immediately after MNNG treatment were continued to grow in the presence of damaged sites on the template DNA strand. These results indicated that the smaller DNA molecules were newly synthesized in the sites where progression of replication fork was inhibited using new replication origins and then the rates of DNA synthesis were increased. The pulse-labeled DNA molecules immediately after MNNG treatment were also grown by linking the newly synthesized smaller DNA molecules.

These results suggested that DNA replication was inhibited by MNNG and its recovery was achieved by the damage removal and by the use of new replication origins.