

사람 암세포에서의 O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase의 발현과 알킬화 항암제에 대한 감수성

오혜영 · 정해관 · 한의식 · 정성철 · 허옥순 · 손수정 · 김영미 · 홍성렬 · 이향우¹ · 하광원
국립보건안전연구원 독성부 유전독성과, ¹성균관대학교

Expression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and Sensitivity to Anticancer Alkylating Agents in Human Cancer Cells

Hye Young OH, Hae Kwan JUNG, Eui Sik HAN, Sung Chul JUNG, Ok Soon HEO, Soo Jung SOHN, Young Mi KIM, Sung Youl HONG, Hwang Woo LEE¹ and Kwang Won HA

Department of Toxicology, National Institute of Safety Research, Seoul 122-020, Korea, ¹Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

(Received March 21, 1995; accepted May 26, 1995)

Abstract—Five human cancer cell lines (HeLa S3, Hep 3B, KATO III, Hs 683, HeLa MR) and one human normal cell line (WI-38) were examined cell viability, northern blot analysis, western blot analysis, and *in situ* hybridization for the expression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), which can repair O⁶-methylguanine produced in DNA by alkylating agents. In cell viability test, the lethal sensitivities of each strain against anti-tumor drug N,N-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea (BCNU) were counted, and both BCNU treated and untreated cell extracts were examined for their MGMT inducibility by RNA dot blot analysis. Cell lines did not show MGMT induction by BCNU pretreatment. The MGMT activity was assayed by measuring the ³H radioactivity transferred from the substrate DNA containing [methyl-³H]-O⁶-methylguanine to acceptor molecules in the cell extracts. Extracts from the majority of tumor strains and normal cells contained substantial MGMT activity of varying degree, while the known Mer⁻ cell (lacked or severely depleted in MGMT activity) HeLa MR, and Hs 683 (proved to be Mer⁻) were much more sensitive to BCNU than the rest of tumor strains, as measured by cell viability test. Overall results above, KATO III showed the highest expression level of MGMT among the strains examined. Furthermore, with all the tumor and normal strains tested, a good correlation was observed between MGMT expression and cellular resistance to BCNU. The varying levels of expression of MGMT in human cancer cells found in this study should provide a molecular basis for MGMT expression among tumor strains from different tissue origin, the information of antitumor agents selection for chemotherapy of cancers.

Keywords □ O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity, human cancer cells, MGMT expression, BCNU sensitivity, *in situ* hybridization

손상된 DNA를 수복하는 중요한 효소의 하나인 O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT: EC 2.1.1.63)는 박테리아로부터 고등생물에 이르기까지 널리 존재하는 효소로서 다양한 종류의 알킬화에 의한 발암원 (e.g., N-alkylnitrosamine) 과 알킬화항암제에 의

한 DNA의 손상을 수복한다. 이 효소는 *E. coli*에서 최초로 발견되었으며(Olsson 등, 1980), 주로 guanine염기의 ring nitrogen 또는 exocyclic oxygen 위치의 알킬기를 효소자신의 cysteine기로 옮겨옴으로서 DNA를 원상으로 회복하는데 이때 효소자신은 일회적 반응으로 불활성화된다(Foote 등, 1980). 손상된 염기에서 메틸기를 떼어내는 작용 외에도 *E. coli*에서는 적응현상에 관련된 여타

* To whom correspondence should be addressed.

유전자인 *ada*, *alkA*, *alkB* 및 *aidB*의 발현을 조절하는 역할도 하고 있는 것으로 추측하고 있다(Lindahl 등, 1988). 즉 *ada* 유전자의 발현이 결여된 *ada*⁻ 돌연변이 세포를 분리하여 그 특성을 조사해 본 결과 *ada*⁻ 돌연변이 세포는 MGMT 효소 활성 뿐만 아니라 3-methyladenine-DNA glycosylase II 효소의 활성도 보이지 못함을 알게되었다. 이는 MGMT가 위의 유전자 발현에 관여하는 조절유전자임을 말하는 것이다. 이와같이 현재까지 대부분의 MGMT 관련연구는 *E. coli* (Ada protein)에서 연구가 많이 진행되어 있는 것과 달리 포유류의 MGMT의 특성에 관하여는 접근상의 어려움으로 인해 상대적으로 많이 연구되어 있지 않다. 1990년 K. Tano 등에 의하여 사람의 MGMT cDNA clone이 분리되어, MGMT 유전자의 발현에 관한 연구를 할 수 있는 기회를 부여하였다(Tano 등, 1990). 사람의 MGMT cDNA의 아미노산배열로부터 추정된 분자량은 21.7 kDa이지만 실제 전기영동결과 ~25 kDa로 확인되었다(von Wronski 등, 1991). 포유동물에서 MGMT 활성은 모든 조직에서 나타나지만 그 활성의 크기는 조직의 종류에 따라 다르며, 정상인 사람세포의 경우는 뇌세포에서 가장 낮은 활성을 나타내었다(D'Incalci 등, 1988; Myrnes 등, 1984; Wiestler 등, 1984). Day 등의 보고에 의하면 사람의 암세포는 DNA 수복형태에 따라 두가지로 분류할 수 있는데 몇몇 암세포유래의 배양세포주에서 MGMT activity가 전혀 나타나지 않음이 관찰되었으며 이들 세포는 알킬화제인 MNNG에 높은 치사율을 보였다. 그와는 대조적으로 몇몇 drug-resistant tumor xenografts 및 세포주는 MGMT의 활성이 그들의 progenitor에 비하여 매우 높게 나타남을 볼 수 있으며 (Mer⁺) 상대적으로 MNNG에 대한 치사율이 낮은 것이 확인되었다(Day 등, 1980; Sklar 등, 1981; von Wronski 등, 1989). 이러한 보고들은 세포내에서 O⁶-methylguanine을 수복하는 정도가 세포독성이나 변이, 발암과 밀접한 관련을 가지고 있다는 보고를 부연설명해준다. 사람세포에 대한 MGMT의 연구는 인과구세포, 각종암세포, 생검조직, 태반조직 등을 이용한 MGMT효소의 활성측정이 대부분이었다(Strauss, 1990, Pegg 등, 1982). Tsujimura 등은 40종의 일본사람암세포를 배양하여 MGMT의 활성을 측정할 결과 암세포의 15% 정도가 Mer⁻ 표현형을 보였음을 보고하였고(Tsujimura 등, 1987), Wani 등의 실험에서는 사체부검으로부터 얻은 사람 성인과 태아의 정상간세포조직으로부터 세포특이적인 MGMT의 발현이 되고 있음을 보고하였다(Wani 등, 1993). 또한 사람골수암세포를 암의 진행단계별로 채취하여 MGMT의 활성을 조사하여 암발생초기에는 Mer⁺ 표현형을 보였으나, 말기에는 Mer⁻ 표현형을 나타냄을 보고하였다(He 등, 1992). 이러한 여러가지 실험에 의하여 포유동물세포에서의 조직특이적인 수복능력이 있음이 알려졌으나, 유전자 수준에서의 발현조절이나, 박테리아에서 나타나고 있는

MGMT의 유도발현에 관하여는 명확히 밝혀져 있지 않다. 본연구에서는 사람의 주요장기 유래의 암조직으로부터 확립된 5종의 암세포 및 1종의 정상세포를 배양하여 각 암세포 및 정상세포의 MGMT활성을 측정하고, 알킬화 항암제로서 임상에서 뇌종양 및 임파종에 많이 사용되고 있는 BCNU에 대한 감수성을 비교연구하였으며, 분자수준에서는 이들의 세포내 mRNA발현량과 BCNU 처리시의 mRNA량을 분석하여, 이 효소의 알려지지 않은 조직특이성 및 발현의 조절 기구에 관하여 밝히고자 하였으며, MGMT유전자의 발현과 세포내 단백질 합성과의 관련성을 MGMT단백질의 polyclonal antibody를 사용한 western blot analysis로서 알아보고자 하였고 암의 조직화학적 연구로서 최근 많이 쓰이고 있는 *in situ* hybridization방법을 이용하여 MGMT mRNA의 발현정도를 비교 연구하였다. 세포 내 MGMT의 결핍은 DNA에 생긴 손상인 O⁶-methylguanine을 수복하지 못함으로써 이러한 손상에 의한 DNA복제과정의 오류에 의하여 돌연변이 더 나아가서 발암의 원인이 된다. 그러나 모든 암세포가 Mer⁻ 표현형을 보이지 않고 있으며, 또한 정상세포들 간에도 MGMT의 활성치가 상당히 나고 있음이 알려져 있다. 본 연구에서는 유전자수준 및 단백질 수준에서 MGMT발현에 관하여 연구하므로써 알킬화항암제를 치료목적으로 임상에서 사용하고자 할 때 선택기준으로서 이러한 일련의 실험들을 활용할 수 있을지의 가능성에 대해서도 타진해 보고자 하였다.

재료 및 방법

세포주 및 배양

본 실험에 사용된 세포주는 Mer⁺대조군으로서 HeLa S3, Mer⁻대조군으로서 HeLa MR을 사용하였고, 이 외 아직까지 MGMT활성이 밝혀지지 않은 암세포인 KATO III, Hs 683, Hep 3B 및 정상세포인 WI-38 등 6가지 세포주를 사용하였다. 이들은 서울대학교 암연구소를 통하여 미국 ATCC(American type culture collection)에서 분양받아 사용하였다. 세포의 배양은 포화습도하에서 5% CO₂를 공급하는 배양기에서 37°C로 유지 배양하였으며, 0.25% Trypsin-EDTA용액을 사용하여 계대 유지하였다. 사용된 세포주의 특성 및 배지는 Table I과 같다.

MGMT활성

75 cm² culture flask에서 배양된 세포를 0.25% Trypsin-EDTA(Gibco)를 사용하여 수거한 후 10~15 ml의 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glycerol(buffer A)에 현탁하여, 초음파를 이용하여 파쇄하였다. 세포 파쇄물을 초원심분리기로 4°C에서 35000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상등액을 실험에 사용하였다. 효소활성도 측정(Coligan 등, 1991)은 O⁶-[³H]-methylguanine calf thymus DNA를 기질로 하여서 동

Table I. Origin, growth characteristics and culture media of cell lines in this study

Cell line	Origin	Morphology	Culture media
HeLa S3 (Mer ⁺)	squamous cell carcinoma, cervix, human	epithelial	RPMI 1640+10% FBS
HeLa MR (Mer ⁻)	squamous cell carcinoma cervix, human	epithelial	DMEM+10%FBS
KATO III	adenocarcinoma, stomach, human	spherical	RPMI 1640+10% FBS
Hs 683	glioma, brain, human	fibroblast	DMEM+10%FBS
Hep 3B	hepatocellular carcinoma, human	epithelial	EMEM+10%FBS
WI-38	normal fibroblast, lung, human	fibroblast	EMEM+10%FBS

위원소로 표지된 methyl기를 가진 DNA기질로 부터 회복효소가 methyl기를 가져오면, 단백질이 방사선허성 (radioactivity)를 갖게됨을 이용하여 회복효소와 기질을 1:5(v/v)로 하여 40 μ l의 반응용액을 만들어 37°C에서 30 분간 반응시킨 다음 반응물을 proteinase K로 처리하여 단백질을 용해시키고, DNA를 침전으로 제거한 상등액 (표지화된 methyl기를 함유하는 단백질 용해액)의 cpm 값을 측정함으로써 효소의 활성을 계산하였다. O⁶-[³H]-methylguanine calf thymus DNA는 Boulden(1987)의 방법을 수정하여 직접 제조하여 사용하였으며, 단백질의 양은 Protein assay kit (Bio-Rad)를 이용하여 bovine gamma globulin을 standard protein으로 하여 측정하였다.

알킬화제에 대한 세포의 감수성

각 세포주에 대하여 alkylating anticancer drug인 BCNU(carmustine, 보령제약)를 처리하였을 때의 생존도를 계산하여 감수성을 알아보았다. 100 mm petri-dish (Corning, γ -ray irradiated) 4개에 각각 5×10^5 개의 세포를 파종하여 24시간 배양 후 각 petri-dish에 BCNU농도가 0 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M이 되도록 1시간 동안 처리하고, 이를 각 농도 당 3개의 60 mm petri-dish에 나누어 파종하였다. 3일 간 배양한 후 이들 세포를 수거하여 trypan blue로 염색한 후 생존한 세포를 계수하였으며, 각 농도별 생존 세포수를 BCNU가 처리되지 않은 plate의 세포수와 비교하여 생존율을 상대적 백분율로 나타내었다.

RNA추출

BCNU를 처리하지 않은 세포주와 BCNU를 처리한 세포주로부터 mRNA purification kit(Pharmacia)를 이용하여, guanidine thiocyanate방법에 의하여 total RNA를 추출하고 oligo-dT cellulose를 사용하여 poly(A)⁺ mRNA를 추출하였다. 추출된 RNA의 양은 UV spectrophotometer로 A₂₆₀을 측정하여 계산하였다.

Northern blot analysis

BCNU를 처리하지 않은 세포주들로부터 추출한 poly(A)⁺ mRNA를 이용한 Northern blot은 2.2 M formaldehyde, 20 mM Mops, 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA(pH 7.0)을 함유한 1.5% Agarose gel에서 전기영동하고, poly(A)⁺ mRNA를 gel에서 nylon membrane filter로 옮겨서 [³²P]가 표식된 DNA probe로 hybridiza-

tion시켰다. Hybridization용액은 6x standard sodium citrate(SSC), 5x Denhardt's solution, 20 mM EDTA, 0.1 M Tris-buffer(pH 8.0), 0.1%(w/v) sodium dodesyl sulfate(SDS), 5 mg/ml salmon sperm DNA를 혼합하여 제조하였고, hybridization은 40°C에서 12시간에 걸쳐 진행하였다. Filter는 0.5%(w/v) SDS가 함유된 6x SSC로 실온에서 30분간 3회, 0.5%(w/v) SDS가 함유된 6x SSC로 40°C에서 15분간 1회, 6x SSC로 40°C에서 15분간 2회에 걸쳐서 세척한 후 -70°C에서 autoradiography를 하였다.

RNA Dot blot analysis

MGMT의 유도성을 알아보기 위하여 BCNU가 처리된 세포주들로부터 추출한 poly(A)⁺ mRNA를 이용하여 Bio-Dot Microfiltration Apparatus로 Dot blot을 시행하였다. Pre-wetting된 nitrocellulose membrane에 poly(A)⁺ mRNA를 고정시키고, 이를 plastic bag에서 50% formamide, 5x SSC, 1x Denhardt's solution, 50 mM NaHPO₄ (pH 6.5), 250 μ g/ml salmon sperm DNA로 구성된 pre-hybridization 용액으로 42°C에서 8~20시간 동안 반응시킨 후 prehybridization 용액을 버리고 10% dextran sulfate가 함유된 hybridization용액을 넣고 denatured DNA probe와 hybridization시켰다. 42°C에서 4~24시간의 hybridization후 2x SSC, 0.1% SDS로 실온에서 5분씩 4회, 0.1x SSC, 0.1% SDS, 1 mM EDTA로 50°C에서 2회 세척한 후 -70°C에서 autoradiography를 하였다.

DNA probe

Northern 및 Dot blot에 사용된 DNA probe는 1990년 Tano 등이 제작한 pUC9 plasmid에 삽입되어 있는 human MGMT cDNA를 사용하였다. Plasmid pUC9을 Gene Pulser(Bio-Rad)로 *E. coli* JM107에 electroporation시키고 이를 ampicillin이 함유된 LB broth에서 배양하여 다량의 plasmid를 얻은 다음, alkali 추출법으로 plasmid를 분리하였다. 분리된 plasmid를 제한효소인 Eco R1으로 처리하여 human MGMT cDNA를 얻고, 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며, α -³²P-ATP로 random priming (Megaprime DNA labelling kit: Amersham)을 하여 probe로 사용하였다.

Cytosol fraction의 제조

각 세포주를 Tissue culture flask(75 cm², Falcon)에

가득 키운 다음(약 1×10^9 개) rinse buffer(20 mM Tris-HCl(pH 9.0), 137 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂)로 세척한 후 lysis buffer (1%(v/v) NP-40, 10%(v/v) glycerol, 1% (v/v) aprotinin, rinse buffer)를 20분간 처리한 다음, 4°C에서 38,000 rpm으로 1시간동안 원심분리한 상정액내의 protein의 양을 UV spectrophotometer (A₅₉₅)로 측정하였다.

Western blot analysis

각 세포주로부터 추출한 protein과 Oh(1993)가 분리한 사람의 MGMT protein을 사용하여 Rabbit anti-MGMT polyclonal antibody를 사용하여 western blot을 시행하였다. 먼저 각 세포주의 cytosol fraction을 단백질질의 분량을 일정하게 하여 Laemmli(1970)의 방법을 변형한 12%-Sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(30% Acrylamide, 1.5 M Tris-HCl(pH 8.0), 20% SDS, 10% APS, TEMED)를 행하였다. 시료를 prestained molecular weight protein standards(Phosphorylase b 130 KDal, BSA 75 KDal, Ovalbumin 50 KDal, Carbonic anhydrase 39 KDal, Soybean trypsin inhibitor 27 KDal, Lysozyme 17 KDal)와 함께 100 volts로 2시간동안 전개시킨후 nylon membrane filter로 옮겨서 primary antibody를 1x TTBS with 3% BSA (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 0.05% Tween 20)로 1:1000으로 희석하여 37°C에서 16~20시간동안 배양하였다. 그후의 발색과정은 Bio-Rad Immunodetection kit의 사용설명서를 따랐다.

Digoxigenin labeled probe를 이용한 *in situ* hybridization

가. DNA probe의 labelling

MGMT cDNA를 Behlinger Manheim의 Digoxigenin labelling kit로서 표지하였다.

나. *In situ* hybridization

0.4% paraformaldehyde로 슬라이드상의 세포를 4°C에서 20분간 고정하였으며, R&D사의 *in situ* workstation과 *in situ* detection kit를 사용하여 hybridization을 행하였다. Suspension 상태로 자라는 KATO III는 collagen(Type 1: from rat tail, Sigma)를 acetic acid에 용해시켜 (4°C, O/N stirring) 100 g로 원심분리한 다음 다시

구경 0.45 μm syringe filter로 여과하여 Hank's balanced salt solution으로 1/150 희석하여 코팅한 슬라이드에 배양하였다.

결 과

MGMT의 활성측정

사람의 각종장기유래의 암세포 및 정상세포에서 MGMT의 활성을 측정한 결과 대조군으로서 사용된 기지의 MGMT활성이 결핍된 Hela MR(Mer⁻)의 경우는 전혀 활성을 나타내지 않았고, 한편 Mer⁺ 표현형을 나타내는 Hela S3는 147 units (1 unit : 100 CPM/mg protein)을 나타내었다. 위암세포인 KATO III는 5종의 세포중 가장 높은 178 units, 간암세포인 Hep 3B는 101 units, 뇌종양세포인 Hs 683은 19 units로서 가장 낮은 활성을 보였으며 사람의 정상세포로서 폐세포인 WI-38은 129 units의 MGMT활성을 나타내었다. 각 암세포와 정상세포의 DNA손상물질에 대한 영향을 보기 위하여 알킬화항암제인 BCNU (carmustine)을 여러농도로 1시간동안 처리하고 세포의 생존율을 조사하였다 (Table II). Mer⁻ 세포인 Hela MR의 경우는 저농도인 100 μM에서의 생존율과 고농도인 300 μM에서의 생존율이 모두 1% 내외로서 BCNU에 민감하게 반응하여 알킬화제에 대한 수복능이 완전히 결여되어 있음을 알 수 있었고, 그와는 대조적으로 Mer⁺ 표현형을 가진 Hela S3의 경우는 고농도에서도 10%정도의 생존율을 나타내었다. 위암세포인 KATO III의 경우는 고농도에서 시험대상세포중 가장 높은 생존율을 나타내었고, 간암세포인 Hep 3B는 투여한 알킬화 항암제의 농도차에 민감한 결과를 보였으며, Hs 683은 저농도에서와 고농도에서의 생존율이 비슷하였다. 정상세포인 WI-38은 알킬화항암제에 대한 민감도가 Mer⁺ 표현형을 가진 Hela S3와 유사한 결과를 보였다.

MGMT mRNA의 발현

poly(A)⁺RNA를 사람의 5종의 암세포와 1종의 정상세포로 부터 분리하여, [³²P]로 표지화된 클론화된 사람의 MGMT cDNA full-length를 사용하여 northern blot분석한 것을 Fig. 1에 나타내었다. MGMT활성이 있는 암세포인 KATO III, Hs 683, Hep 3B, WI-38 모두에서

Table II. Cell viability (%) of strains to antitumor alkylating agent (BCNU)

Dose* (μM)	Strains					
	Hela S3	Hela MR	KATO III	Hs 683	Hep 3B	WI-38
0	81.5± 2.1	92.2± 1.0	76.8± 3.0	82.8± 0.8	82.6± 0.6	73.4± 2.4
100	60.5± 4.7	1.2± 0.2	14.9± 1.0	18.5± 0.9	33.0± 4.3	72.5± 3.7
200	37.6± 3.1	1.1± 0.3	17.6± 1.0	13.1± 1.5	16.0± 3.0	35.5± 2.5
300	10.6± 0.7	0.8± 0.1	26.8± 5.1	9.2± 1.0	2.4± 0.9	4.6± 0.5

*Each 5×10^5 cells were cultured for 24 hours and treated with BCNU (carmustine) for 1 hour, then harvested and reseeded aliquot to three plate for further 3 days incubation to assume viability.

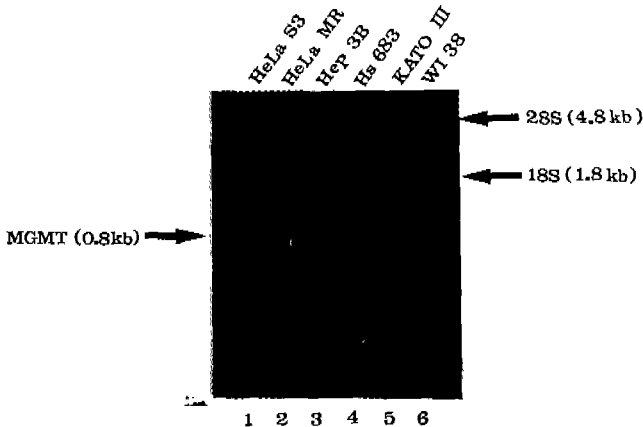


Fig. 1. Northern blot analysis of MGMT mRNA expression in human cancer cells and normal cell on 1.2% agarose/formaldehyde gel electrophoresis, equal amount of poly(A)⁺RNA of each cancer cell lines (lane 1, HeLa S3; lane 2, HeLa MR; lane 3, Hep 3B; lane 4, Hs 683; Lane 5, KATO III; lane 6, WI-38) were size-separated and hybridized with α -³²P-labeled human MGMTcDNA prove.

1.0 Kilobases 정도의 MGMT transcript가 확인되었다. MGMT mRNA 발현은 Mer⁺ strains에서는 모두 확인되었고 그 발현량의 차이는 HeLa S3 발현량의 30%~50% 정도였다. MGMT 발현량의 차이는 각 세포의 MGMT 활성 (units/mg protein)의 차이와 비슷한 양상을 보였다. 이러한 결과는 사람의 암세포 및 정상세포에서 MGMT mRNA level과 MGMT 활성간의 관련성을 입증해 주었다. 기지의 Mer⁻ 세포인 HeLa MR에서는 MGMT mRNA가 확인되지 않았다.

알킬화 항암제가 MGMT mRNA의 발현에 미치는 영향

DNA에 손상을 일으키는 알킬화 항암제로서 BCNU (carmustine)을 일정농도로 각 세포에 처리하였을때 각 세포내의 MGMT mRNA 발현량의 변화를 dot blot 분석한 것을 Fig. 2에 나타내었다. *Escherichia coli*의 모델에 의하면 *ada* 유전자의 transcription은 알킬화제인 MNNG에 의해 유도발현된다(Oh, 1993). 많은 연구진들에 의해 포유동물에서 DNA손상물질에 의하여 MGMT가 유도되는지에 관한 연구가 진행되고 있다. 그중 명확히 두가지 경우에서 MGMT가 약간 증가 하였음이 보고되어 있는데 그 하나는 마우스의 간에서 dimethylnitrosamine 투여, X-ray조사, 또는 간부분절제술후의 경우와 마우스 간암세포주인 H4세포주에서 MNNG 1회 투여에 의하여 MGMT활성이 투여전의 3배로 증가한 것이 그것이다(Laemmli, 1970, Burnette, 1981). BCNU를 1시간 처리한 각세포에서의 MGMT mRNA 발현량은 무처리군과 비교하여 큰차이가 없었으며, 각 세포간에도 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다.

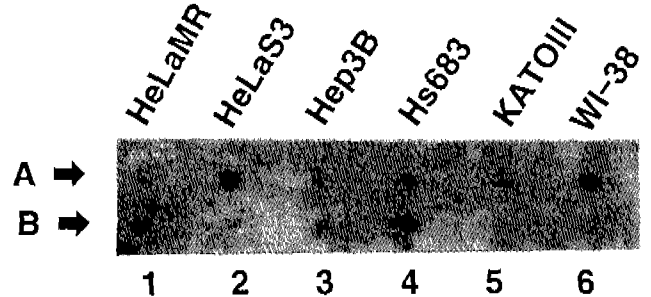


Fig. 2. Dot blot analysis of MGMT mRNA induction before (A) and after(B) BCNU treatment in human cancer cells and normal cell. Equal amount of poly(A)⁺RNA of each cancer cell lines (lane 1, HeLa MR; lane 2, HeLa S3; lane 3, Hep 3B; lane 4, Hs 683; Lane 5, KATO III; lane 6, WI-38) were hybridized with α -³²P-labeled human MGMT cDNA prove. HeLa S3 HeLa MR Hs 683 Hep 3B Debrisoquine

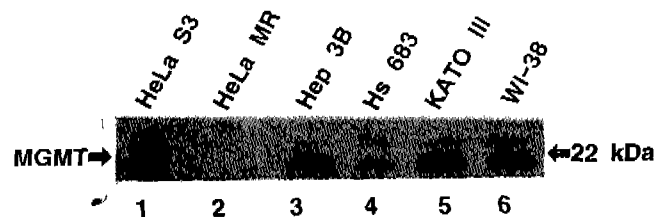


Fig. 3. Western blot analysis of protein extract from five human cancer cell lines and one normal cell line. Lane 1, HeLa S3; Lane 2, HeLa MR; Lane 3, Hep 3B; Lane 4, Hs 683; Lane 5, KATO III; Lane 6, WI-38. The filter was proved with a cocktail of Rabbit anti-MGMT polyclonal antibodies. The immunostained bands of each cell lines at 22 KDal correspond to the transferase. Immunoreactive protein is present in the Mer⁺ lines (HeLa S3), Hep 3B, KATO III, WI-38 but not in the Mer⁻ lines (HeLa MR) and Hs 683.

각 암세포에서의 MGMT유전자의 발현에 의한 세포내 단백질의 합성

각 암세포 및 정상세포의 배양물로부터 추출한 세포내 단백질과 사람의 MGMT cDNA를 함유하는 High level expression vector로부터 순수분리정제한 사람의 MGMT 단백질에 대한 토끼의 항혈청 (Rabbit anti-MGMT polyclonal antibody)으로 western blot을 시행하였다. Immunostained bands는 항체의 농도 45 pmole이하에서 확인할 수 있었다. 5종의 암세포 및 1종의 정상세포에서 MGMT의 분자량에 해당하는 immunostained bands를 확인 하였으며 그 결과는 Fig. 3과 같았다. 기지의 Mer⁺ 세포인 HeLa S3를 비롯하여 간암세포인 Hep 3B, 위암 세포인 KATO III, 정상의 폐섬유세포인 WI-38에서는 각각 염색의 강도차이는 있었으나 명확한 양성으로 확인되었으며 그 중 KATO III와 WI-38은 Mer⁺ 세포인 HeLa S3보다 약 2배 정도의 단백질량을 나타내었다. 뇌종양세포인 Hs 683은 Mer⁻ 대조군으로 실험한 HeLa



Fig. 4. *In situ* hybridization of MGMT gene expression in the HeLa S3 cells. A) HeLa S3 cells after hybridization without probe. B) HeLa S3 cells after hybridization with a digoxigenin-labeled MGMT cDNA. C) HeLa S3 cells after hybridization with a digoxigenin-labeled poly d(T) probe. Microscopic magnification was 400x.

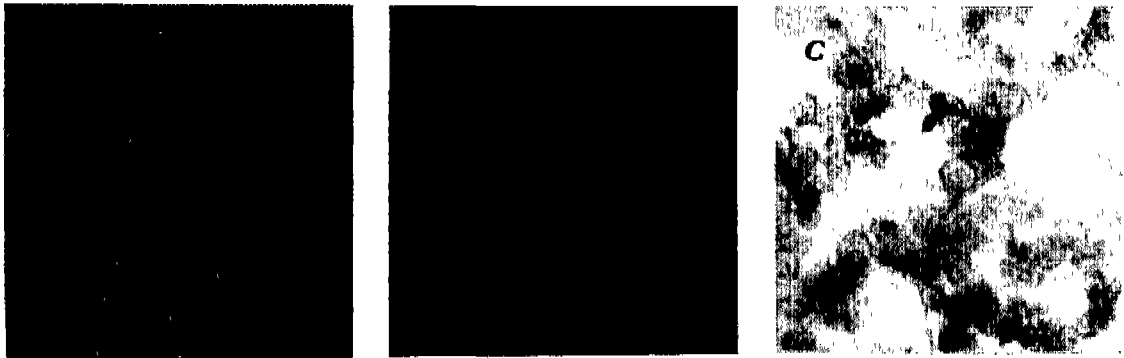


Fig. 5. *In situ* hybridization of MGMT gene expression in the HeLa MR cells. A) HeLa MR cells after hybridization without probe. B) HeLa MR cells after hybridization with a digoxigenin-labeled MGMT cDNA. C) HeLa MR cells after hybridization with a digoxigenin-labeled poly d(T) probe. Microscopic magnification was 400x.

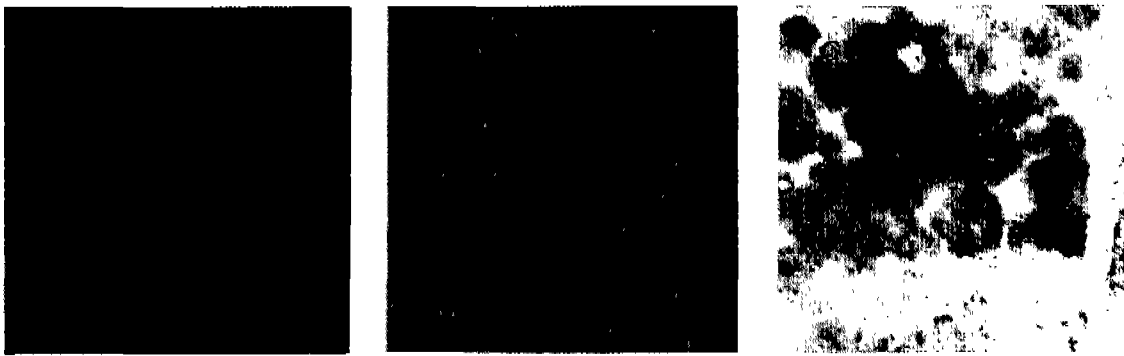


Fig. 6. *In situ* hybridization of MGMT gene expression in the Hep 3B cells. A) Hep 3B cells after hybridization without probe. B) Hep 3B cells after hybridization with a digoxigenin-labeled MGMT cDNA. C) Hep 3B cells after hybridization with a digoxigenin-labeled poly d(T) probe. Microscopic magnification was 400x.

MR이 전혀 나타나지 않은 것에 비하여 희미한 band를 나타내었으나 음성으로 판단되었다.

Digoxigenin-labeled MGMT cDNA probe를 사용한 *in situ* hybridization

양성대조군인 poly d(T) probe 및 probe를 사용하지 않은 음성대조군의 결과와 비교하여 각 세포의 특성에

따라 MGMT의 발현의 정도를 확인할 수 있었으며, 그 결과를 Fig. 4~Fig. 9에 나타내었다. 기지의 HeLa S3 세포는 비교적 강한 염색상을 나타내었고, 위암 세포인 KATO III의 경우는 실험한 세포중 가장 강하게 염색됨을 알 수 있었다. Mer⁺로 확인된세포에서 염색은 핵의 주위로부터 세포질 쪽으로 확산되어 가는 경향을 보였으나

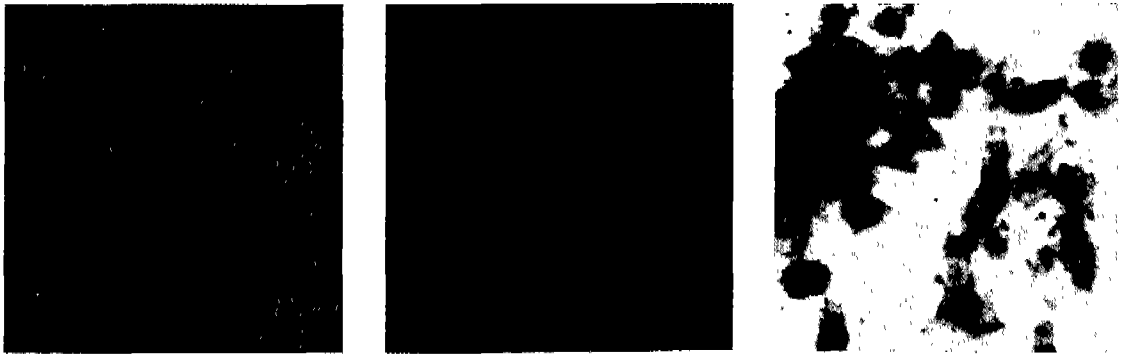


Fig. 7. *In situ* hybridization of MGMT gene expression in the Hs 683 cells. A) Hs 683 cells after hybridization without probe. B) Hs 683 cells after hybridization with a digoxigenin-labeled MGMT cDNA. C) Hs 683 cells after hybridization with a digoxigenin-labeled poly d(T) probe. Microscopic magnification was 400x.

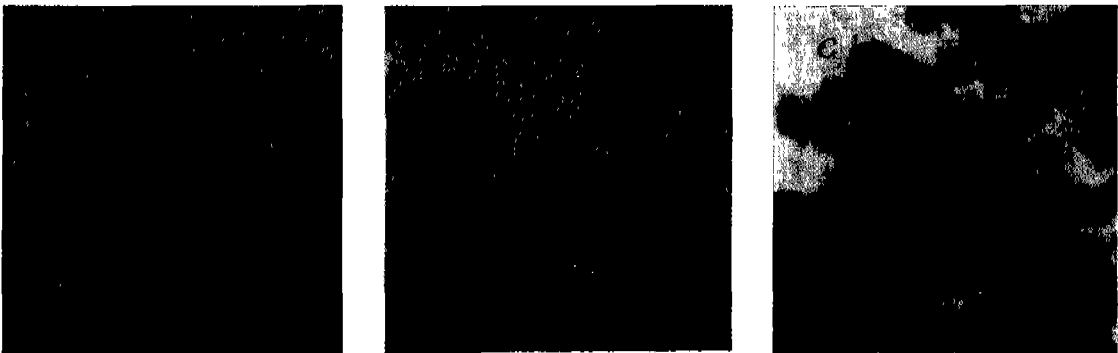


Fig. 8. *In situ* hybridization of MGMT gene expression in the KATO III cells. A) KATO III cells after hybridization without probe. B) KATO III cells after hybridization with a digoxigenin-labeled MGMT cDNA. C) KATO III cells after hybridization with a digoxigenin-labeled poly d(T) probe. Microscopic magnification was 400x.

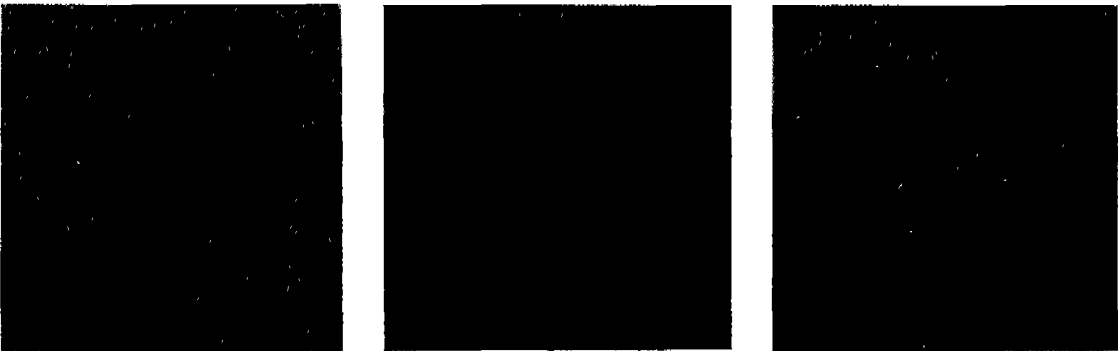


Fig. 9. *In situ* hybridization of MGMT gene expression in the WI-38 cells. A) WI-38 cells after hybridization without probe. B) WI-38 cells after hybridization with a digoxigenin-labeled MGMT cDNA. C) WI-38 cells after hybridization with a digoxigenin-labeled poly d(T) probe. Microscopic magnification was 400x.

명확하게 구별되지는 않았다. Mer⁻ 세포인 HeLa MR에서는 음성대조군 및 digoxigenin-labeled probe hybridization에서 전혀 염색상이 나타나지 않았고, 뇌종양 세포인 Hs 683에서도 같은 결과를 보였다.

고 찰

사람의 암세포 및 정상세포에 있어서의 MGMT의 발현에 관하여 연구하였다. 각 세포의 추출물에서 MGMT의 활성을 methy-[³H]-O⁶-methylguanine을 함유하는 calf thymus DNA를 기질로 하여 측정하였고, 각 세포에서의 MGMT의 발현과 알킬화 항암제에 대한 관련성을 대표적인 알킬화 항암제인 BCNU (carmustine)

를 처리하여 세포의 생존율을 보았으며, 동시에 원핵세포에서 나타나는 MGMT의 유도발현을 진핵세포에서 알아보기 위하여 저농도의 BCNU 처리전후의 세포로부터 total cellular RNA를 분리하여 dot blot hybridization을 실시하였다. 또한 각세포의 유전자발현을 total cellular RNA를 추출하여 northern blot hybridization에 의하여 확인하였다. 1990년 사람의 MGMT유전자가 클론화되어(Tano 등, 1990) MGMT 발현을 연구할 수 있는 기회를 부여하였다. MGMT활성은 세포의 종류에 따라 조금씩 다르며 그에 따른 DNA손상에 대한 수복능도 달라지게 된다. 상대적으로 mRNA의 발현량도 관련이 있을 것 이라는 것이 통념이다. 암세포에서 Mer⁻ 표현형의 세포는 MGMT활성이 결핍되어 있음이 보고 되어 있다(Yarosh 등, 1983). 본 실험에서 사용한 5종의 암세포와 1종의 정상사람세포중에서 기지의 HeLa MR과 HS 683은 Mer⁻ 표현형을 나타내었다. MGMT mRNA의 발현을 northern blot으로 측정할 결과에서도 Helan MR의 경우는 충분한 노출시간을 주었음에도 spot을 볼 수 없었다. 각 세포의 단백질을 추출물과 MGMT의 high-level expression vector로부터 순수분리한 사람의 MGMT 단백질을 사용하여 제조한 rabbit anti-MGMT polyclonal antibody를 사용하여 western blot hybridization을 시행하였고, 암 세포의 oncogene 연구에 최근 많이 이용되고 있는 면역조직화학적 방법인 *in situ* hybridization 방법을 사용하여 단층 배양된 각 세포로부터 세포내 MGMT mRNA의 발현을 조사하였다. 본 연구에 사용된 사람 암세포는 뇌종양세포인 Hs 683을 제외하고 모두 알킬화제에 의한 DNA의 손상중 O⁶-methylguanine을 수복할 수 있는 MGMT 발현이 많이되고 있었다 (Mer⁺). 그에 따른 세포내 MGMT protein의 합성량은 동일한 양상을 보였으며 활성측정에서도 같은 결과를 보였다. 그러나 뇌종양세포인 Hs 683에서는 확인되지 않았다. 암세포는 모두 정상적인 MGMT 유전자를 가지고 있는 것으로 보이며, Hs 683의 경우는 불활화된 MGMT 단백질의 합성이기 보다는 유전자 수준에서의 결실, 재조합에 의하여 발현이 안되는 것으로 보아진다. 이같은 사실은 *in situ* hybridization의 결과에서도 알 수 있듯이, 기지의 Mer⁻세포인 HeLa MR과 Hs 683의 경우는 세포내 MGMT mRNA 발현이 거의 없음을 확인하였다. 비슷한 현상을 보고한 것으로서 Mer⁻ 세포에서 명확히 변형되지 않은 MGMT 유전자를 보유하고 있으나, 전사가 일어나지 않는 경우가 여러 연구팀들에 의해 보고 되어 있다(Rydberg 등, 1990; Piper 등, 1990). 그러나 이와 달리 MGMT의 유전자가 결손된 경우도 보고 되었다(Tano 등, 1990). Mer⁻ 세포에서는 대부분 MGMT 유전자의 전사결핍 또는 억제에 의하여 mRNA가 확인되지 않은 것으로 보인다. 그러나 세포가 Mer⁻ 표현형을 나타내게 되는 명확한 기전은 아직까지 밝혀지지 않았다. 본 연구에서도 얻은 결과가 모두 *in vitro* 조직 배양세

포로부터 얻은 자료임으로, 생검조직으로부터 실험한 결과와 비교 연구되기 전에는 배양세포에서 Mer⁻로 표현되는 것이 세포주화 되는 과정의 전 또는 후의 어느 과정에서 일어난 것인지를 규정지을 수는 없을 것이다. 그러나 본 연구의 또 다른 목적의 하나가 암 세포에서 MGMT의 발현정도와 알킬화 항암제의 내성 혹은 감수성에 관하여 알아보려고 하였으므로, 유전자 발현 연구에서 얻은 일련의 시험결과를 항암제 선택시의 기준으로 활용할 수 있는가 하는 점이기에 때문에 그 방법론적인 문제에서 생각하면 본 연구에서 사용된 암 세포주가 생검조직이 아니고 확립된 세포주라 할지라도 문제가 되지 않을 것으로 보인다. 생검조직에서는 다른 정상세포의 오염으로 인한 검사결과의 오류가 더 문제가 될 것으로 보인다. 그러므로 생검조직에서는 면역조직화학적방법인 *in situ* hybridization에 의한 MGMT 유전자 발현의 측정이 상기 관점에서 요구되는 시험법이다. MGMT의 전사조절에 관한 것이 좀더 완전히 연구되기 위해서는 1990년 Tano 등에 의하여 genomic MGMT gene 이 클론화된 것과 함께 promoter와 regulatory regions까지 모두 밝혀짐으로써 가능하게 될것이다. 분명한 것은 Mer⁻ 표현형에서는 MGMT transcript가 나타나지 않았다는 것이며, MGMT 단백질합성이 안되거나 단백질이 불활성화된 것을 아닌 것으로 보여지며, western blot의 결과를 볼 때도 MGMT mRNA의 결핍과 단백질량의 결핍은 결과가 일치하고 있었다. 미국 암세포의 20% (19/93)정도가 Mer⁻ 표현형을 나타낸다는 보고가 있으며 (Day 등, 1980; Scudiero 등, 1984) 또한 일본암세포의 15%가 (6/40) Mer⁻로 보고 되었다(Tsujimura 등, 1987). Mer⁻ 표현형의 암세포는 MGMT 유전자는 southern blot 분석결과 변형되지 않은 것으로 나타났으며, 조절 영역에 있는 어떤 유전자의 활성화 또는 불활성화에 의하여 transcript가 생성되지 않은 것으로 보여진다. 뇌종양 세포인 Hs 683의 경우 사용된 암세포 중 유일하게 Mer⁻ 표현형을 나타내었는데 실제 임상에서 glioma의 경우 알킬화 항암제인 BCNU를 많이 사용하고 있으며, 이는 적절한 선택으로 보여진다. 암화학요법에서 암세포의 항암제에 대한 내성획득이 가장 문제 되고 있다. 그 이유중 하나는 암세포가 처음부터 내성을 가진 경우이고 (de novo resistance) 둘째는 항암제 반복투여에 의하여 내성을 획득해 가는 것이다 (acquired resistance). 암세포가 내성을 획득하는 기전은 복합적인 요인이 작용하게 되는데 *in vitro* 및 *in vivo* 시험결과 nitrosourea 혹은 procarbazine에 대한 감수성을 나타내는 암의 경우, MGMT 활성이 적은 암세포임이 보고되었다(Schold 등, 1989, Bodell 등, 1988). MGMT 활성이 높은 암세포에 알킬화항암제인 nitrosourea류를 투여하는 것은 치료효과 기대하기 보다 부작용만 초래할 가능성이 크므로 이때는 MGMT에 의하여 해독대사를 받지 않는 nitrogen mustard류의 cyclophosphamide 또는 melphalan을 선택할

수 있다. 또한 streptozocine(Gerson, 1989)이나 O⁶-alkyl-guanine(Dolan 등, 1986) 또는 그 유도체(Chae 등, 1994)를 보조요법제로 투여함으로써 MGMT의 활성을 고갈시켜 알킬화항암제에 감수성을 나타내게 하는 보고도 있다. 본 연구에서 시행한 여러가지 방법들을 암조직에 대하여 MGMT level을 유전자 및 단백질수준에서 확인함으로써, 감수성이 있는 항암제의 선택을 가능케 하리라 여겨지며, MGMT 활성이 높은 암에 대하여 nitrosourea 또는 procarbazine 같은 무효한 약물을 선택하지 않게 하는데 이용될 수 있을 것으로 보인다. 사람의 암세포 및 정상세포에서 MGMT의 발현을 연구함은 임상에서 암화학요법제로서 알킬화항암제를 사용하고자 할 때 선택의 지표가 되며 MGMT와 관련된 약제내성에 관한 문제를 해결하는 데도 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Bae, S.K., Kang, C.M., Park, B.C. and Kim K.W. (1993). The role of fos oncogene protein on the induction of differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *J. of Korean Cancer Associ.* **25**, 47-53.
- Bodell, W., Tokuda, K. and Ludlum, D. (1988). Differences in DNA alkylation products formed in sensitive and resistant human glioma cells treated with N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Cancer Res.* **48**, 4489-4492.
- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting" Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195.
- Chae, M.Y., McDougall, M.G., Dolan, M.E., Swenn, K., Pegg, A.E. and MoSchel, R.C. (1994). Substituted O⁶-Benzylguanine derivatives and their inactivation of human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *J. Med. Chem.* **37**, 342-347.
- Coligan, J.E., Kruisbeek, A., Shevach, E.M. and Strober, W. (1991). Current protocols in immunology. 1,2.1-2.4.
- D'Incalci, M., Citti, L., Taverna, P. and Catapano, C.V. (1988). Importance of the DNA repair enzyme O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase (AT) cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.* **15**, 279-292.
- Day, R.S. III, Ziolkowski, C.H.J., Scudiero, D.A., Meyer, S.A., Lubinecki, A.S., Girardi, A.J., Galloway, S.M. and Bynum, G.D. (1980). Defective repair of alkylated DNA by human tumor and SV40-transformed human cell strains. *Nature(Lond.)* **288**, 724-727.
- Dolan, M., Young, G. and Pegg, A. (1986). Effect of O⁶-alkylguanine pretreatment of the sensitivity of human colon tumor cells to the cytotoxic effects of chloroethylating agents. *Cancer Res.* **46**, 4500-4504.
- Foote, R.S., Mitra, S. and Pal, B.C. (1980). Demethylation of O⁶-methylguanine in a synthetic DNA polymer by an inducible activity in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**, 654-659.
- Gerson, S. (1989). Modulation of human lymphocyte O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase by streptozocin *in vivo*. *Cancer Res.* **49**, 3134-3138.
- Gibson, N., Zlotogorski, C. and Erickson, L. (1985). Specific DNA repair mechanisms may protect some human tumor cells from crosslinking by other anti-tumor alkylating agents. *Carcinogenesis(Lond)* **6**, 445-450.
- He, X., Ostrowski, L.E., von Wronski, M.A., Friedman, H.S., Wikstrand, C.J., Bigner, S.H., Rasheed, A., Batra, S.K., Mitra, S., Brent, T.P. and Bigner, D.D. (1992). Expression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in six human medulloblastoma cell lines. *Cancer Res.* **52**, 1144-1148.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 227-230.
- Lindahl, T., Sedwick, B., Sekiguchi, M. and Nakabeppu, Y. (1988). Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 133-157.
- Myrnes, B., Norstrand, K., Giercksky, K-E., Sjunneskog, C. and Krokan, H. (1984). A simplified assay for O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity and its application to human neoplastic and non-neoplastic tissues. *Carcinogenesis (Lond.)* **5**, 1061-1064.
- Oh, H.Y. (1993). Purification and characterization of O⁶-methylguanine DNA methyl-transferase of mammals and *Escherichia coli*, unpublished.
- Olsson, M. and Lindahl, T. (1980). Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**, 10569-10571.
- Pegg, A.E., Roberfroid, M., Bahr, C.V., Foote, R.S., Mitra, S., Bresil, H., Likhachev, A. and Montesano, R. (1982). Removal of O⁶-methylguanine from DNA by human liver fractions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5162-5165.
- Piper, R., Futscher, B., Dong, Q., Ellis, T. and Erikson, L. (1990). Comparison of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)mRNA levels in Mer⁺ and Mer⁻ human tumor cell lines containing the MGMT gene by the polymerase chain reaction technique. *Cancer Commun.* **2**, 13-20.
- Rydberg, B., Spurr, N. and Karren, P. (1990). cDNA cloning and chromosomal assignment of the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **265**, 9563-9569.
- Schold, S., Brent, T., von Hofe, E., Friedman, H., Mitra, S., Bigner, D., Swenberg, J. and Kleihues, P. (1989). O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase and sensitivity to procarbazine in human brain tumor xenografts. *J. Neurosurg.* **70**, 573-577.
- Scudiero, D.A., Meyer, S.A., Clatterbuck, B.E., Mattern, M.R., Ziolkowski, C.H.J. and Day III, R.S. (1984). Relationship of the DNA repair phenotypes of human fibroblast and tumor strains to killing by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res.* **44**, 961-969.
- Sklar, R. and Strauss, B. (1981). Removal of O⁶-methylguanine from DNA of normal and xeroderma pigmentosum-derived lymphoblastoid lines, *Nature(Lond.)* **289**, 417-420.
- Strauss, B.S. (1990). The control of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferases (MGMT) activity in mammalian cells: a pre-molecular view, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagenesis* **233**, 139-150.
- Tano, K., Shiota, S., Collier, J., Foote, R.S. and Mitra, S. (1990). Isolation and structural characterization of a cDNA

- clone encoding the human DNA repair protein for O⁶-alkyl-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 686-690.
- Towbin, H. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350.
- Tsujimura, T., Zhang, Y-P., Fujio, C., Chang, H-R., Watatani, M., Ishizaki, K., Kitamura, H. and Ikenaga, M. (1987). O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity and sensitivity of Japanese tumor cell strains to 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride. *Jpn. J. Cancer Res.(Gann)* **78**, 1207-1215.
- von Wronski, M. A., Bigner, D. D. and Brent, T. P. (1989). Expression of O⁶-methyl-guanine-DNA methyltransferase in Mer⁻ and Mer⁺ human cell extracts proved with specific monoclonal antibodies. *Cancer Commun.* **1**, 323-327.
- von Wronski, M. A., Shiota, S., Tano, K., Mitra, S., Bigner, D. D. and Brent, T. P. (1991). Structural and immunological comparison of indigenous human O⁶-methylguanine -DNA methyltransferase with that encoded by a cloned cDNA. *J. Biol. Chem.* **266**, 1064-1070.
- Wani, G., Wani, A. A. and D'Ambrpsio, S. M. (1993). Cell typq specific expression of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene in normal human liver tissues as revealed by in situ hybridization. *Carcinogenesis* **14**, 737-741.
- Wiestler, O., Kleihues, P. and Pegg, A. E. (1984). O⁶-methyl-guanine-DNA methyl-transferase activity in human brain and brain tumors. *Carcinogenesis(Lond.)* **5**, 121-124.
- Wilcox, J. N. (1993). Fundamental principles of *in situ* hybridization. *J. Histo. Cyto. Chem.* **41**(12), 1725-1733.
- Yarosh, D., Foote, R., Mitra, S. and Day, R. (1983). Repair of O⁶-methylguanine in DNA by demethylation is lacking in Mer⁻ human tumor cell strains. *Carcinogenesis (Lond)* **4**, 199-205.