

Molecular Mechanisms of 5-Azacytidine-Induced Trifluorothymidine-Resistance In Chinese Hamster V79 Cells

Kyong-Suk Jin and Yong-Woo Lee[†]

Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

A potent demethylating agent, 5-Azacytidine (5-AzaC) has been widely used as in many studies on DNA methylation, regulation of gene expression, and cancer biology. The mechanisms of the demethylating activity were known to be formation of complex between DNA and DNA methyltransferase (MTase), which depletes cellular MTase activity. However, 5-AzaC can also induce hypermethylation of a transgene in a transgenic cell line, G12 cells and it was explained as a result of defense mechanisms to inactivate foreign gene(s) somehow. This finding evoked the question that whether the phenomenon of hypermethylation induced by 5-AzaC is limited to the transgene or it can be occurred in endogenous gene(s). In order to answer the question, mutagenicity test of 5-AzaC and molecular characterization of mutants obtained from the test were performed using an endogenous gene, *thymidine kinase (tk)* in Chinese hamster V79 cells. When V79 and V79-J3 subclone cells were treated with 1, 2.5, 5, 10 μM of 5-AzaC for 48 hours, their maximum mutant frequencies were revealed as 6×10^{-3} at 5 μM (350-fold induction over background) and 8×10^{-3} at 2.5 μM (1,800-fold induction over background) respectively. Since the induction rates were too high to be induced by true mutations, many trifluorothymidine (TFT)-resistant (TFT^R) cells were subjected to Northern blot analysis to check the presence of *tk* transcripts. Surprisingly, all clones tested possessed the transcripts in a similar level, that implicates the TFT^R phenotype induced by 5-AzaC has not given rise to hypermethylation of the gene in spite of unusually high mutation frequency. In addition, it has shown that the TK activity in the pool of 5-AzaC-induced TFT^R cells has about a half of that in spontaneously-induced TFT^R cells or in non-selected parental V79-J3 cells. This result suggests that the mechanism(s) underlying the TFT-resistance between spontaneously occurred and 5-AzaC-induced cells may be different. These findings have shown that the TFT^R phenotype induced by 5-AzaC has not given rise to hypermethylation of the *tk* gene, and 5-AzaC may be induced by one or combined pathways among many drug resistance mechanisms. The exact mechanisms for the 5-AzaC-induced TFT^R phenotype remain to elucidate.

Key Words: 5-Azacytidine (5-AzaC), Mutagenicity, V79, *Thymidine kinase (tk)*, Trifluorothymidine (TFT), Resistance, Methylation

서 론

5-Azacytidine (이하 5-AzaC로 표기)은 피리미딘환의 5번째 탄소가 질소로 대체되어 있는 뉴클레오시드 유사체로서, 급성 골수성 백혈병 환자의 화학요법제로서 사용이 시도되었으나, 심한 독성으로 인하여 임상적 사용이 중단된 바 있다 (Von Hoff et al., 1976). 그러나 최근에는 이 제제의 강력한

DNA demethylation 작용에 힘입어 DNA methylation이 관여 되는 유전자 발현이나 세포분화 또는 종양발생 등의 기전연구에 널리 사용되고 있다 (Jones 1990; Zingg and Jones, 1997). 5-AzaC에 의한 세포독성은 DNA 복제 시 DNA에 cytosine 대신 5%만 incorporation 되어도 genomic DNA의 85~90%가 demethylation 되는 것으로 믿어진다 (Haaf T, 1995). 이는 5-AzaC의 유사체인 5-aza-2'-deoxycytidine (이하 5-AzadC)가 genomic DNA에 끼워들어 있을 때 DNA methyltransferase (이하 MTase로 표기)와의 공유결합체를 형성함으로써 공간적으로 DNA 복제, 전사, 그리고 DNA 회복을 방해하여 나타나는 것으로 알려졌는데 (Juttermann et al., 1994), 5-AzaC의 경우도 유사할 것으로 믿어진다. 이러한 기전으로 세포내 MTase 활성이 급격히 저하됨으로써 DNA 복제 후 genomic

*논문 접수: 2005년 5월 23일

수정재접수: 2005년 6월 13일

[†]교신저자: 이용우, (우) 621-749 경남 김해시 어방동 607번지, 인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과

Tel: 055-320-3307, Fax: 055-334-3426

e-mail: mlsywllee@inje.ac.kr

DNA의 hypomethylation을 유발하게 되어 각종 세포와 동물 실험에서 세포독성을 나타낼 뿐만 아니라, 염색체 손상, 돌연변이 유발, 세포분화와 세포형질전환, 그리고 발암성까지 보이는 것으로 보고되고 있다 (Haaf T, 1995). 특히 5-AzaC의 강력한 demethylating 활성으로 인해 세포분화와 발암유전자의 활성화 등이 예측되고 또한 알려지지 않은 기전에 의해 항암유전자의 불활성으로 실험동물에서의 종양을 발생 시킬 가능성이 제시 되었다 (Robertson and Jones, 2000).

5-AzaC은 *Escherichia coli* (Freidman, 1979), *Salmonella typhimurium* (Podger, 1983; Call et al., 1986), *Saccharomyces cerevisiae* (Zimmermann and Scheel, 1984) 등의 미생물에서 뿐만 아니라, 포유동물 세포주에서도 돌연변이를 일으킬 수 있음이 알려져 왔으나 (Call et al., 1986; Amacher and Turner, 1987; McGregor et al., 1989), 그 정도가 크지 않았다. 그러나 최근에 보고된 연구에서 transgenic *gpt*⁺ Chinese hamster cell line (G12)을 이용한 5-AzaC의 돌연변이성 실험에서 지금까지 잘 알려진 mutagen이 최대 30배 수준임에 비해 5-AzaC에 대해 매우 높은 돌연변이율을 보였다. 이들 돌연변이체의 분자생물학적 분석결과 대부분이 예상과는 정반대로 hypermethylation에 의해 guanine phosphoribosyl transferase (*gpt*) gene이 불활성화된 것으로 나타나 demethylating 제제로 잘 알려진 5-AzaC이 transgene에 hypermethylation을 일으킬 수도 있음을 보여주었다 (Broday et al., 1999). 또한 여기서 얻어진 variant의 genomic DNA에서의 methylation 수준의 평가에서 parental cell의 수준보다 낮은 값을 보여 5-AzaC이 예상대로 유전체 수준에서는 hypomethylation을 유도함을 보여주었다 (Broday, et al., 1999). 이러한 결과는 대부분의 cancer cell이 보여주는 global hypomethylation과 local hypermethylation 현상과 매우 유사하여 5-AzaC이 tumor suppressor gene과 같은 특정 endogenous gene에 hypermethylation으로 불활성화를 유도하고 다른 전체 유전자에서는 hypomethylation으로 활성화 시킴으로써 종양발생에 기여할 가능성을 암시하였다.

그러나 지금까지 5-AzaC 유사체인 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)이 사람의 T-lymphoblastoid 세포주에서 thymidine kinase (*tk*) 유전자의 hypermethylation을 유도할 수 있다는 보고 (Lucarelli et al., 1996)가 있었지만, 5-AzaC이 transgene에서 보여준 hypermethylation 현상이 endogenous gene에서도 hypermethylation을 유도할 수 있다는 직접적인 관찰의 보고가 없어, 본 연구에서는 돌연변이성 연구 대상 포유동물 세포계로서 가장 안정적이고 널리 사용되어온 세포주의 하나인 Chinese hamster V79 cell의 subclone인 V79-J3 cell을 이용하여 *tk* gene을 target으로 한 5-AzaC의 돌연변이성을 조사하고 여기서 유도된 TFT^R cell을 획득하여 각 clone의 trifluorothymidine (이하 TFT) 저항성의 분자적 특성을 알아봄으로써 그 답을 얻고자 하였다.

재료 및 방법

1. V79 세포 배양과 subclone V79-J3 획득

Chinese hamster lung fibroblast V79 세포주를 10% fetal bovine serum (GIBCO), 1% penicillin-streptomycin (GIBCO), 200 mM L-glutamine (GIBCO)이 첨가된 F12 medium (GIBCO)을 배지로 하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 돌연변이성 시험 전에 세포주 내의 자연발생적 돌연변이체를 제거하기 위해 CHAT (10 μM deoxycytidine, 200 μM hypoxanthine, 0.2 μM aminopterin, 17.5 μM thymidine, Sigma)가 첨가된 F12의 선택 배지 (이하 CHAT 배지로 표기)에서 일정 기간 배양하였고 (Call, 1986), 시험 2일 전 정상 배지에서 배양하여 회복할 수 있는 기간을 두었다. 그리고 single cell 유래의 subclone은 희석클로닝법 (Freshney, 1994)에 따라 수행하여 세포증식율이 가장 좋은 11개의 clone (V79-J1~J11)을 획득하였고, 그 중 자연발생적 돌연변이성이 낮고 5-AzaC에 민감하게 반응하는 V79-J3 subclone을 선정하여 다음 실험을 수행하였다.

2. 세포독성과 돌연변이성 측정

V79 세포주와 subclone V79-J3을 이용하여 *tk* locus를 target gene으로 한 5-AzaC의 세포독성과 돌연변이율을 Broday 등이 사용한 방법을 약간 수정하여 다음과 같이 측정하였다. 5×10⁴ cell을 100 mm tissue culture plate에 seeding하고 6시간의 cell attachment 시간을 둔 후 0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 μM의 5-AzaC를 2일간 처리하였다. 이후 정상 F12 배지로 3일간의 표현기간을 두었다. 돌연변이성 측정을 위하여 0, 1.0 μM 농도 군은 2×10⁶과 2.5, 5.0, 10.0 μM 농도 군은 4×10⁴ 수의 mutagenized cell을 100 mm dish 당 4×10⁵ 또는 필요시 1×10⁴ 세포 농도로 replating하여 10 μg/ml TFT를 함유한 선택 배지에서 3일에 한번씩 교환하면서 총 12일간 배양하였다. 이 때 clonability를 측정하기 위해서는 각 dose 당 60 mm dish 3개씩을 사용해 plate 당 300 cell을 분주하여 정상 F12 배지로 6~7일간 배양한 후 0.5% crystal violet 염색액으로 생성된 colony를 염색하였다. 돌연변이율은 clonable cell 10⁶ 당 생성된 colony 수로 계산하였다. 세포독성시험도 돌연변이성 측정과 동시에 다음과 같이 수행하였다. 60 mm dish에 5-AzaC 0, 1.0, 2.5 μM 농도에서는 300 cell을, 5.0 μM에서는 600 cell을 10.0 μM에서는 1,200 cell을 각 dose 당 3 plate에 seeding하여 6시간의 세포부착 시간을 둔 후 주어진 농도의 5-AzaC을 2일간 처리하였다. 이 후 정상 F12 배지를 공급하여 6~7일 후 0.5% crystal violet 염색액을 이용하여 염색된 colony 수를 구한 다음 대조군의 colony 수를 100%로 하여 각 dose 당 상대적인 값을 clonal survival로 하였다.

3. TFT^R cell의 cloning

돌연변이성 측정 시 얻어지는 TFT^R cell의 분자적 특성 연구를 위하여 colony의 염색 전에 ring cloning법 (Freshney, 1994)으로 plate 당 1개의 colony를 클로닝하여 독립적인 TFT^R clone을 획득하였다. 이 후 TFT 선택배지로 24 well plate에서 배양하여 cell 수를 증식시키다가 최종적으로 100 mm dish에 배양한 후 냉동시켜 이 후의 분자적 약물저항성 기전 연구를 위해서 보관하였다.

4. Northern blot 분석

5-AzaC에 의해 유도된 TFT^R cell의 분자적 특성을 알아보기 위해 각 clone의 RNA를 RNAwizTM (Ambion)를 사용하여 제조사의 manual에 따라 추출하여 formaldehyde-agarose gel에 전기영동한 후 blotting하고 Northern blot analysis를 수행하였다. 이 때 human *tk* gene의 cDNA probe로는 pTK11 (ATCC 79802)을, mouse β -actin cDNA probe는 Dr. Kitahara (Kitasato University, Japan)가 제공한 것을 사용하였으며, 방사능 표지 probe는 Random Priming Labelling Kit (TAKARA)을 사용하여 제조사의 manual에 따라 표지 후 사용하였다.

5. TK 효소활성 측정

V79-J3 세포와 TFT^R 세포 pool에서의 TK 효소활성 측정은 Voeller 등이 보고한 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 단백질 용액을 준비하기 위하여 우선 100 mm tissue culture 당 2×10^6 세포를 분주하여 2일간 배양한 후 trypsin을 사용하여 15 ml tube에 옮겼다. 세포 부유액을 1X PBS로 200 μ g, 10분간 4°C에서 원침하며 2번 세척한 다음 200 μ l의 추출완충액 (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 5 mM β -mercaptoethanol)에 재부유하여 냉동-해동을 반복하여 추출액을 준비하였다. 이 세포 추출액을 12,000 \times g, 30분간 4°C에서 원침 분리한 후 상층액을 옮겨 효소활성 측정에 사용하였다. TK 효소활성의 측정은 150 μ g의 단백질을 효소반응완충액 (50 mM Tris, 10 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM 비표지 dThd, 10 mM Sodium fluoride, 5×10^5 dpm [³H]dThd)에 가하여 37°C에서 30분간 반응 시킨다. 2분간 끓여 반응을 중지시킨 다음 얼음에서 식히고 간단히 원침하여 상층액 50 μ l을 DE-81 filter에 적하하여 공기 중에서 15분간 건조시켰다. 건조된 filter를 10 ml의 완충액으로 vacuum filterator (Manifold Milipore model 1225)를 이용하여 3~4회 세척한 후 1 ml의 0.2 N HCl/0.4 M KCl 용액이 든 scintillation vial에 넣어 60°C에서 1시간 용출했다. 여기에 scintillation cocktail을 넣고 5분간 잘 흔들어 준 다음 liquid scintillation counter (Packard)를 이용하여 측정하였다. 모세포주인 V79-J3 세포의 효소활성을 1로 하여 자연발생적 TFT^R 세포 pool이나 5-AzaC에 의

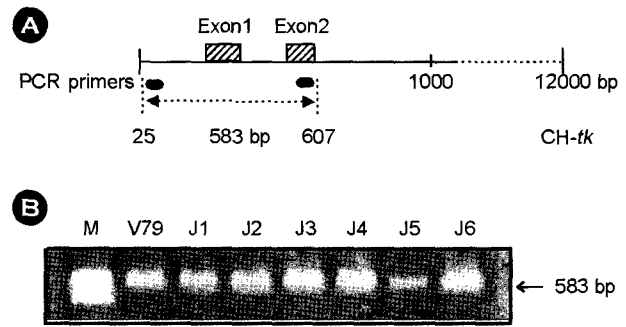


Fig. 1. PCR analysis of 5' region of the *tk* gene in Chinese hamster V79 and subclones. (A) PCR-amplified region of the *tk* gene in the Chinese hamster V79 cell line (B) PCR products amplified from the V79 and V79 subclones (J1~J6). M, molecular weight marker DNA of pBR322 digested with Hae III.

해 유도된 TFT^R 세포 pool의 효소활성을 상대적인 비율로 나타내어 비교하였다.

결 과

1. V79-J3 subclone의 특성

V79 배양 세포를 희석하여 96-well microplate에 분주한 후 하나의 cell만 들어 있는 well을 현미경으로 선별하여 CHAT media에서 cell을 계속 증식시켰다. 이와 같은 방법으로 세포 성장이 좋은 11개의 clone을 획득하여 그 중 가장 안정되게 배양되고 빠른 세포증식을 보인 6개의 subclone (V79-J1~J6)에 대한 세포 배양적 및 유전적 특성을 조사하였다. 먼저 parental cell line V79와 subclone들의 *tk* gene 구조를 확인하기 위해 유전자 발현의 조절부위의 존재를 5' region에 대한 PCR을 실시하여 알아보았다. 그 결과 V79 세포주와 6개의 subclone 모두에서 예상된 583 bp 크기의 PCR 생성물이 나타나 V79 cell과 6개의 subclone들의 *tk* gene 구조 중 5' region의 결손이 없음을 확인하였다 (Fig. 1).

그리고 이 6개 subclone에 대한 세포독성과 돌연변이성의 민감도를 알아보기 위하여 5 μ M 농도의 5-AzaC을 2일간 처리하였을 때의 세포독성시험에서는 각 subclone의 세포 생존율은 비 처리군 대비 최소 45%에서 최대 63%로 나타나 5-AzaC에 대한 세포독성이 각 subclone 마다 조금씩 차이를 보여주었으며, 그 중 J3 subclone이 가장 세포독성에 민감하였다 (Fig. 2A).

각 subclone의 자연발생적 돌연변이성은 10 μ g/ml TFT로 선택하였을 때 최소 1.9×10^{-6} 에서 최대 3.5×10^{-6} 범위를 보였는데 이는 parental cell line인 V79 세포주가 같은 조건에서 보여준 17×10^{-6} 보다 5~9배 낮아 모두가 돌연변이성 측정에 적당한 subclone인 것으로 판단되었으며, 그 중에서도 J3와 J5 subclone이 가장 낮은 값을 보였다 (Fig. 2A, inset).

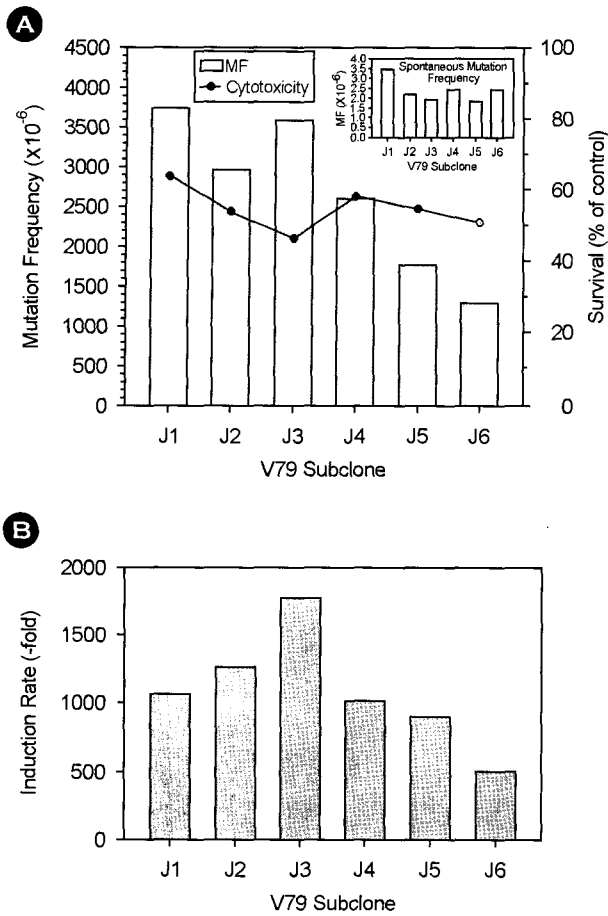


Fig. 2. Mutational responses of V79 subclones to 5-azacytidine. Subclone cells were treated with 5-AzaC (5 μ M for 2 days). (A) The cytotoxicity and mutation frequency of 5-AzaC in each subclone were measured by the method described in materials and methods. Inlet is showing spontaneous mutation frequency of each subclone. (B) Mutational sensitivity of each V79 subclone was calculated as ratio of 5-AzaC-induced mutation frequency to the spontaneous one.

5-AzaC에 대한 돌연변이성 시험에서는 최소 $1,223 \times 10^{-6}$ 에서 최대 $3,723 \times 10^{-6}$ 으로 나와 V79 세포주보다 1.4 내지 4배 낮았지만, 자연발생적 돌연변이율 대비 유도율은 500~1,773 배로 나와 V79의 약 350배에 비해 더욱 민감한 세포주임을 보여주었으며, 이 중 J1과 J3 subclone이 가장 높았다 (Fig. 2A). 자연발생적 돌연변이성 대비 돌연변이 유도율을 고려할 때는 subclone V79-J3이 비교적 낮은 자연발생적 돌연변이율 (2×10^{-6})과 5-AzaC에 의해 유도된 높은 돌연변이율 ($3,545 \times 10^{-6}$), 그리고 자연발생적 돌연변이율에 비해 약 1,800배에 이르는 가장 높은 돌연변이 유도율을 보여 (Fig. 2B), 이 연구 목적적인 5-AzaC이 endogenous gene에서도 methylation을 일으킬 수 있는지를 알아보는 대상 세포로서 가장 적합한 것으로 판단하여 이 후 본 연구에 중점적으로 사용하였다.

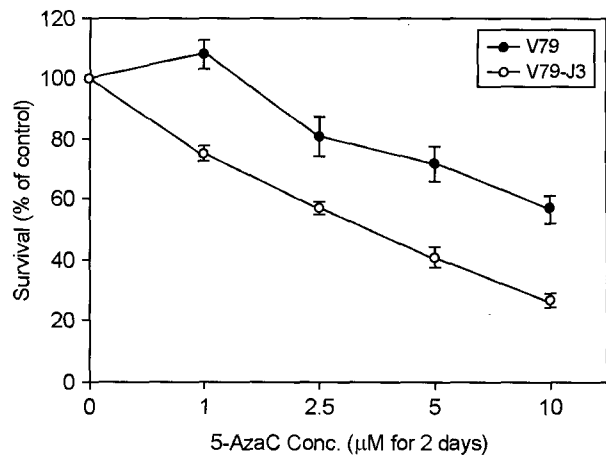


Fig. 3. Cytotoxicity of 5-azacytidine in V79 and V79-J3 subclone cells. Following treatment with indicated doses of 5-AzaC for 2 days, the survival rates were scored as the relative survivals over control without treatment, and expressed as mean \pm SD obtained from the results in three independent experiments.

2. 5-Azacytidine의 세포독성과 돌연변이성 측정

Colony forming assay 법으로 알아본 5-AzaC의 세포독성은 먼저 V79 세포주의 경우, 비 처리 대조군의 집락수를 100%로 하였을 때 1 μ M 5-AzaC 처리 세포에서 약간 증가하였으나, 이후 5-AzaC의 농도가 높아질수록 세포독성이 증가되어 세포 생존율 (survival rate)이 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). 반면에 V79-J3 subclone에 대한 5-AzaC의 세포독성을 나타내는 세포 생존율은 V79 cell에서 보여준 것과 달리 낮은 농도의 5-AzaC에서부터 농도가 높아질수록 세포 생존율이 낮아지는 것을 관찰할 수 있었고 전반적으로 V79-J3 subclone이 5-AzaC의 세포독성에 대해 매우 민감함을 보여주었다 (Fig. 3).

5-AzaC의 V79 세포에 대한 돌연변이성 연구의 결과로는 자연발생적 돌연변이율이 17×10^{-6} 으로 나타났으며 subclone J3에서보다 약 4배 높은 빈도를 보였으며, 5-AzaC 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 μ M에서 각각 84×10^{-6} , $3,486 \times 10^{-6}$, $5,918 \times 10^{-6}$, $5,084 \times 10^{-6}$ 의 돌연변이율을 보여 5.0 μ M에서 가장 높은 돌연변이율을 보이는 것으로 나타났다 (Fig. 4A). 이는 자연발생적 돌연변이율에 대비 각각 5, 210, 350, 300배로서 2.5 μ M에서 급격히 상승하여 5.0 μ M에서 가장 높은 돌연변이 유도율을 나타냈다 (Fig. 4B). V79-J3에 대한 돌연변이율은 자연발생적 돌연변이 빈도가 4.4×10^{-6} 으로 나타났으며 이는 V79 세포주에서 관찰된 비율의 약 0.26배에 해당하며, 각각 5-AzaC 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 μ M에서 282×10^{-6} , $7,748 \times 10^{-6}$, $3,306 \times 10^{-6}$, $1,554 \times 10^{-6}$ 의 돌연변이 빈도를 나타내었다 (Fig. 4A). 또한 자연발생적 돌연변이율 대비 돌연변이 유도율은 각각 64배, 1,760배, 751배, 353배로 나타나, V79에서와는 달리 2.5

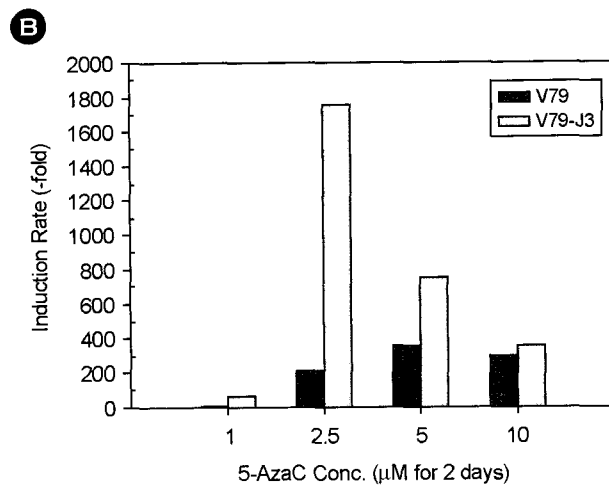
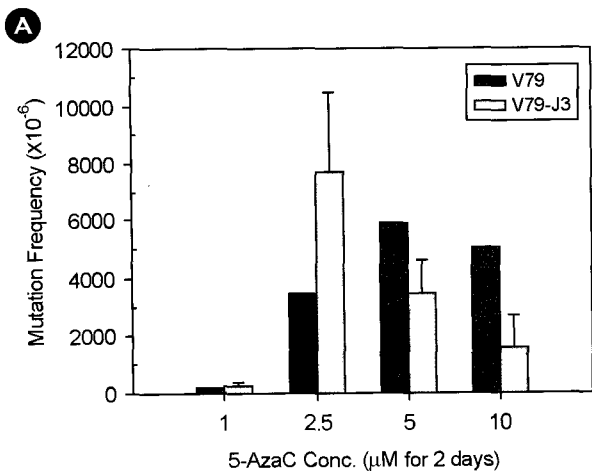


Fig. 4. Mutagenicity of 5-azacytidine in V79 and V79-J3 cells. (A) Mutational frequency was measured from one or three independent experiment(s) using V79 or V79-J3 cells, and spontaneous mutation frequencies of both cells were 17×10^{-6} and 4.4×10^{-6} , respectively. (B) Mutational response of V79 or V79-J3 cells to 5-AzaC was expressed as ratio of 5-AzaC-induced mutation frequency to spontaneously-induced one at each concentration of the treatment.

μM 에서 최대의 돌연변이율 유도율을 보였다 (Fig. 4B). 이는 5-AzaC에 대한 세포독성에서 유사한 결과를 보여 돌연변이율의 측정 방식이 세포독성과 무관하지 않았음을 보여 주었다. 그리고 최대 약 1,800배의 돌연변이율은 잘 알려진 mutagen의 돌연변이율과는 매우 다르며, 이는 Broday 등의 보고에서 transgene에 대하여 5-AzaC이 보여준 돌연변이 빈도와 돌연변이 유도율에 유사한 수준을 보였다.

3. TFT^R cells의 TK 유전자 발현의 변화

돌연변이성 측정 시 colony를 ring cloning 법에 의해 독립적으로 획득한 27개의 TFT 저항성 (TFT^R) 클론 세포를 대상으로 TFT 저항성의 직접적 target gene인 thymidine kinase

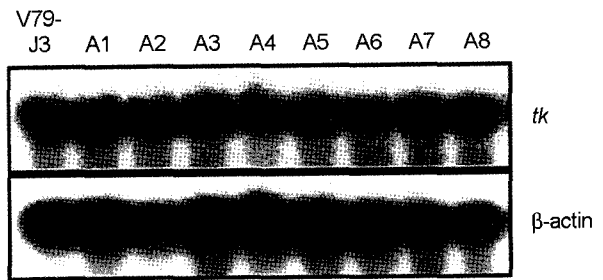


Fig. 5. A representative result of Northern blot analysis of thymidine kinase (*tk*) gene expression in TFT^R clones. The clones were derived from V79-J3 cells after treatment with 5-AzaC. Lane 1, V79-J3 cell; lane 2~9, TFT^R clones (A1~A8 induced by 2.5 μM of 5-AzaC). β -actin was used as loading control. Additional 19 TFT^R clones (A9~A27) were also analyzed, and showed similar results.

(*tk*) gene의 mRNA 발현 정도를 알아보기 위하여 human *tk* cDNA를 probe로 하여 Northern blot 분석을 수행하였다. 이 결과, 예상된 크기인 약 5 kb의 *tk* transcript를 관찰할 수 있었으며, 그 발현 정도는 각 클론마다 조금씩 차이를 보였으나, 전체적으로는 모세포주인 V79-J3 세포에서의 *tk* 유전자 발현도와 비교하여 그 transcript의 발현에 약간의 변화, 주로 약한 감소를 보였다 (Fig. 5). 이와 같은 방법으로 시험된 총 27개의 TFT^R 클론에서 약간씩의 발현도 차이와 함께, 모두에서 *tk* transcript가 발현되고 있음을 보여 주었다.

4. TFT^R cells의 TK 효소활성의 변화

Table 1에 표시된 바와 같이 포유동물의 *tk* 유전자에 대한 많은 돌연변이성 연구 결과는 자연발생적 돌연변이율 대비 최대 약 30배의 돌연변이 유도성인데 반해, 본 연구에서는 같은 유전자에 대해 5-AzaC이 최대 약 1,800배의 높은 돌연변이 유도율을 보여 두 가지 유형의 연구 결과에 극심한 차이를 보였다. 이러한 차이가 TFT 약물 저항체의 분자적 기전을 조사를 위하여 시험하는 클론의 수에 따라 큰 편차를 보일 수 있기 때문에, TFT 저항성을 가지는 세포들의 pool에 대한 TK 효소활성 측정이 필요하였다. 이에 따라 5 μM 의 5-AzaC에 의해 유도된 TFT^R cells의 pool을 대상으로 수정된 Voeller 등의 방법으로 TK 효소활성을 비교해 보았다. 이 결과 자연발생적으로 얻은 TFT^R 세포 pool에서의 TK 효소활성이 모세포인 V79-J3의 효소활성에 비해 약간 높으나 큰 차이를 보이지 않았지만, 5-AzaC에 의해 유도된 TFT^R 세포 pool의 효소활성은 약 0.6배 이하로 감소됨을 보였다 (Fig. 6). 이 결과는 자연발생적으로 만들어지는 TFT 저항세포들과 5-AzaC에 의해 유도되는 TFT 저항체간에 약물 저항성 생성 기전이 다를 수 있음을 암시하였다.

Table 1. Comparative mutagenesis of 5-AzaC in many cell lines

Cell line	Agent (Conc., time)	Selection agent (target gene)	Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$)	Fold Induction over background	Ref.
10T $\frac{1}{2}$	5-AzaC (20 μ M, 48 h)	Oua (Na ⁺ /ATPase)	14	7	Landolph & Jones, 1982
	5-AzadC (1 μ M, 48 h)		32	10	
	MNNG (6.7 μ M, 48 h)		72	8	
V79	5-AzaC (40 μ M, 48 h)	Azg (<i>aprt</i>)	260	4	Landolph & Jones, 1982
	5-AzadC (10 μ M, 48 h)		330	5	
	MNNG (6.7 μ M, 48 h)		950	14	
AS52	5-AzaC (12 μ M, 5 h)	6-TG (<i>gpt</i>)	626	18	Spenser et al., 1996
G10	5-AzaC (5 μ M, 48 h)	6-TG (<i>gpt</i>)	45,400	454	Broday et al., 1999
G12	5-AzaC (5 μ M, 48 h)	6-TG (<i>gpt</i>)	16,240	541	Broday et al., 1999
L5178Y	5-AzaC (1.2 μ g/ml, 3 h)	TFT (<i>tk</i>)	550	20	Amacher & Turner, 1987
	AraC (4.86 μ g/ml), 3 h)		714	26	
	EMS (621 μ g/ml, 3 h)		715	26	
	5-AzaC (1 μ g/ml, 4 h)	TFT (<i>tk</i>)	400	8	McGregor et al., 1989
	5-AzadC (0.1 μ g/ml, 4 h)		150	7.5	
	5-FCdR (0.1 μ g/ml, 4 h)		150	7.5	
	dH-AZA-CR (45 μ g/ml, 4 h)		75	9	
AraC (5 μ g/ml, 4 h)	700	18			
TK6	5-AzaC (1 μ M, 24 h)	TFT (<i>tk</i>)	80	27	Call et al., 1986
		6-TG (<i>hprt</i>)	10	3	

Abbreviations: AraC, 1- β -D-arabinofuranosylcytosine; 5-AzaC, 5-azacytidine; 5-AzadC, 5-aza-2'-deoxycytidine; dH-AZA-CR, 5,6-dihydro-5-azacytidine; 5-FCdR, 5-fluoro-2'-deoxycytidine; EMS, ethyl methanesulfonate; MNNG, *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine

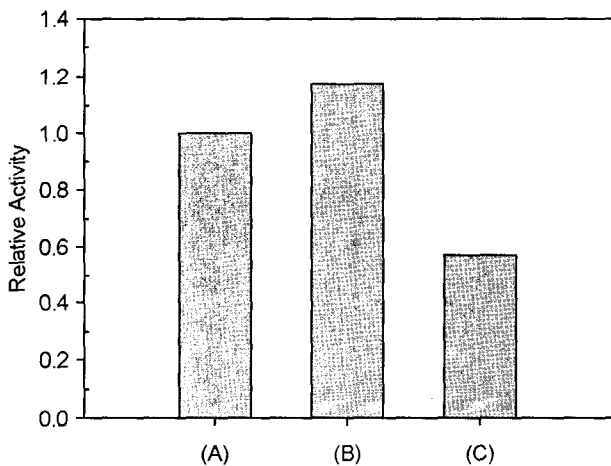


Fig. 6. Effect of 5-azacytidine on TK enzyme activity in the pools of the TFT-resistant cells. Protein extracts were obtained from the parental V79-J3 cells (A), their pools of spontaneously occurred- (B) or 5-AzaC-induced TFT resistant cells (C).

고 찰

종래 demethylation 제제로 널리 사용되어온 5-AzaC이 최

근의 연구 결과에 의하면 오히려 transgene에 대해서는 hypermethylation을 유도할 수 있음이 밝혀졌다 (Broday et al., 1999). 그 작용 기전으로서 비돌연변이성 발암물질인 니켈화합물의 연구에서 보여준 세포내 MTase의 직접 혹은 간접적 불활성화가 genomic DNA의 methylation 수준의 일시적 저하를 유도하고 후에 특정한 부위의 유전자가 hypermethylation 되는 과정을 거친다는 사실을 제시한 바 있으며 (Lee et al., 1995; Lee et al., 1998), 5-AzaC의 유사체인 5-aza-2'-deoxycytidine (이하 5-AzadC)의 경우 DNA 복제 시 삽입되어 세포내 MTase와의 공유결합에 의한 adduct가 생성되어 세포내 MTase 활성 저하로 세포독성을 나타낼 뿐만 아니라 (Juettermann and Jaenisch, 1994), 실험동물에서는 hypomethylation이 돌연변이 생성을 촉진시키는 것으로 나타났다 (Chen et al., 1998; Jackson-Grusby et al., 1997). 이러한 5-AzaC과 유사체의 작용 기전으로 돌연변이에 의한 oncogene의 활성화 뿐 만 아니라, tumor suppressor gene의 methylation에 의한 불활성화를 유도하여 실험동물에서의 발암성에 기여할 가능성을 보여 준바 있다. 또한 다른 염기유사체이며 항 HIV 제제로 사용되는 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)이 사람의 T-lymphoblastoid 세포주에서 thymidine kinase (*tk*) 유전자의 hyperme-

thylation을 유도할 수 있다는 보고가 있다 (Lucarelli et al., 1996). 그러나 5-AzaC의 이러한 hypermethylation 기전이 실제로 endogenous gene에서 일어날 수 있는지에 대해서는 알려지지 않았다. 따라서 본 연구는 가장 안정적으로 돌연변이성 연구 대상 포유동물 세포계로서 널리 사용되어온 V79 세포주를 이용하여 5-AzaC이 특정 endogenous gene인 *tk* 유전자를 target으로 한 돌연변이성 시험과 분자적 특성의 분석을 통하여 그 답을 얻고자 수행되었다.

본 연구에서 5-AzaC의 돌연변이성 측정을 위하여 사용된 *tk* gene은 autosome에 위치하여 diploid 형태로 존재하기 때문에 mutation assay의 sensitivity가 매우 낮을 것으로 예상되어 hemizygous allele 상태의 cell line을 이용한 주요 실험에서 선택약물 TFT의 농도를 1~2 µg/ml로 하여 mutant를 selection 하였다 (Moor et al., 1985). 그러나 본 연구에서는 diploid 형의 *tk* allele을 대상으로 하였기 때문에 자연발생적 돌연변이율 7×10^{-6} 을 보이는 TFT selection의 농도를 10 µg/ml로 하여 사용하였다. 그러나 selection 농도로 정한 10 µg/ml은 종전의 시험에서 사용된 농도에 비해 매우 높음에도 불구하고 비교적 높은 수치인 7×10^{-6} 을 보여 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 single cell에서 유래한 subclone을 획득하여 그 특성을 조사하였다. 사용된 V79 세포주의 subclone 6개에 대한 PCR 분석을 수행하여 대상 cell line에 존재하는 *tk* gene의 exon 1과 exon 2 위치를 포함한 5' region의 구조가 다르지 않음을 확인하였다 (Fig. 1). 또한 V79 세포주와 본 연구에 중점적으로 사용된 V79-J3 subclone의 *tk* gene 5' region을 중심으로 한 Southern blot 분석은 두 cell line간에 제한효소 지도가 다르지 않아 두 cell line의 *tk* 유전자의 genomic DNA level에서의 구조에 큰 변화는 없는 것으로 확인되었다 (unpublished data).

본 연구에 사용된 V79 세포와 그 subclone V79-J3 세포에 대한 5-AzaC의 세포독성을 조사한 결과 V79 보다 V79-J3 subclone이 5-AzaC에 대해 매우 민감함을 보여주었으며 (Fig. 3), Broday 등의 보고에서 5-AzaC이 오히려 transgene에 hypermethylation을 유도하는 기전이 항암유전자나 세포노화유전자 등의 hypermethylation에 의한 tumorigenicity에 기여할 가능성을 보였다. 이 가능성이 endogenous gene에서도 일어날 수 있는지 알아보기 위해 전보에서 사용된 transgene 대신에 Chinese hamster *tk* 유전자를 선택하여 5-AzaC의 돌연변이성 시험을 한 결과, 모세포주인 V79과 subclone V79-J3에서의 돌연변이성은 세포독성에서의 민감성과 최대 돌연변이성을 나타내는 dose에서 약간의 차이를 보일 뿐 대체로 비슷한 결과를 보였다 (Fig. 4). 즉 V79 세포는 5.0 µM에서 가장 높은 돌연변이율 및 유도율을 보이고, V79-J3 세포의 돌연변이율은 V79 cell에서와는 달리 2.5 µM에서 최대의 값을 보였다. 이는 5-AzaC에 대한 세포독성에서 유사한 결과를

보여 돌연변이율의 측정 방식이 세포독성과 무관하지 않았음을 보여 주었다. 최대 돌연변이 유도율은 V79 cell에서 350배, V79-J3 cell에서는 8×10^{-3} 1,800배로 나타나 Table 1에 요약된 바와 같이 $10T\frac{1}{2}$ 세포에서의 $Na^+/ATPase$ 를 target으로 한 MNNG가 8배, V79의 *aprt*를 target으로 한 MNNG는 약 14배, 그리고 L5178Y mouse lymphoma 세포의 *tk*에 대한 EMS의 돌연변이율이 약 26배로서 일반적으로 잘 알려져 있는 돌연변이원에서 얻을 수 있는 값에 비해 매우 높은 값을 보였다. 이는 Broday 등의 보고에서 transgene에 대하여 5-AzaC이 보여준 돌연변이 빈도와 돌연변이 유도율에 유사한 수준을 보이고 있어 5-AzaC이 endogenous gene인 *tk* gene에 진정 돌연변이체가 아닌 TFT^R variant를 유도할 가능성을 보였다.

그러나 5-AzaC 처리 후 돌연변이성 시험에서 획득한 27개의 TFT^R clone에 대한 *tk* mRNA 발현여부를 Northern blot 분석의 결과 모든 TFT^R clone에서 *tk* transcript를 확인할 수 있었고 그 발현 정도가 parental cell인 V79-J3에서의 수준과 크게 다르지 않았다. 그리고 transgene을 대상으로 한 전보에서 hypermethylation을 수반한 epigenetic mechanism에 의해 유도된 높은 6-TG (6-thioguanine) 저항성을 보인 것과 같이 5-AzaC에 의해 유도된 TFT 저항성이 매우 높았음에도 불구하고, 본 연구의 결과는 5-AzaC이 *tk* 유전자에 대하여 methylation 보다는 다른 기전에 의해 발생되었을 가능성을 시사하였다.

5-AzaC에 의해 유도되어 clone 된 TFT^R cells에 대한 *tk* 유전자 발현도 분석에 사용된 clone의 수가 그 돌연변이 빈도에 비해 너무 적은 문제를 극복하기 위하여 5-AzaC에 의해 유도되는 TFT^R cells의 pool을 대상으로 TK 효소활성을 비교해 보았다. 이 결과 자연발생적 TFT^R cells이 parental cell인 V79-J3의 활성에 비해 약간 높게 나오나 큰 차이를 보이지 않았지만, 5-AzaC에 의해 유도된 TFT^R cells의 효소활성은 약 0.6배로 감소됨을 보였다 (Fig. 6). 이러한 효소활성의 차이가 TFT에 대한 저항성을 보일 수 있는지는 현재로서는 명확하지 않으며, 이에 대한 연구가 더 필요할 것으로 보인다. 그리고 전보의 보고에서와 같이 5-AzaC에 의한 hypomethylation이 야기한 *tk* 유전자의 돌연변이에 의하여 TFT 저항성이 적어도 모든 변이체에서 생성되지 않음을 시사하였다. 이외에도 Hayes and Wolf가 review한 각종 약물 저항성 기전이나 새로운 형태의 약물저항성 관련 기전에 의해 나왔을 가능성이 존재한다. 다시 말하면 5-AzaC에 의한 TFT의 cell 내 uptake의 직접 또는 간접적인 저해, TFT-efflux의 증대, TFT의 불활성화, *tk* 유전자의 돌연변이에 의한 불활성 또는 활성 저해 등의 가능성을 생각할 수 있다.

본 연구의 결과는 5-AzaC이 endogenous gene에 hypermethylation을 일으킬 수 있는지 확인할 수 없었으나, *tk* 유전자

를 target으로 하는 TFT 저항성의 돌연변이성 측정에 매우 신중을 기할 필요가 있음을 시사하였다. 또한 이러한 시스템에서 5-AzaC이 약물 저항성에 관련된 유전자의 변형이나 잘 알려지지 않은 새로운 기전에 의해 약물 저항성을 나타낼 수도 있음을 보여, 이에 대한 관련 유전자의 연구가 항암제 등의 약물 저항성에 대한 이해와 이를 극복할 수 있는 새로운 방법의 개발에 도움이 될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 인제대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드리는 바입니다.

REFERENCES

- Amacher DE, Turner GN. The mutagenicity of 5-azacytidine and other inhibitors of replicative DNA synthesis in the L5178Y mouse lymphoma cell. *Mutat Res.* 1987. 176: 123-131.
- Brodoy L, Lee YW, Costa M. 5-Azacytidine induces transgene silencing by DNA methylation in Chinese hamster cells. *Mol Cell Biol.* 1999. 19: 3198-3204.
- Call KM, Jensen JC, Liber HL, Thilly WG. Studies of mutagenicity and clastogenicity of 5-azacytidine in human lymphoblasts and *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res.* 1986. 160: 249-257.
- Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 1998. 395: 89-93.
- Freshney IR. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 1994. pp.161-178. Wiley-Liss. NY, USA.
- Friedmann S. The effect of 5-azacytidine on *E. coli* DNA methylase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1979. 89: 1328-1333.
- Haaf T. The effect of 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine on chromosome structure and function: implications for methylation-associated cellular processes. *Pharmac Ther.* 1995. 65: 19-46.
- Hayes JD, Wolf RC. Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochim J.* 1990. 272: 281-295.
- Jackson-Grusby L, Laird PW, Magge SN, Moeller BJ, Jaenisch R. Mutagenicity of 5-aza-2'-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci.* 1997. 94: 4681-4685.
- Jones PA. 5-Azacytidine. (Fisher PB. Ed., Mechanisms of Differentiation: modulation of differentiation by exogenous agents). 1990. Vol II, pp.103-116. CRC Press. Boca Raton, USA.
- Juettermann R, Li E, Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci.* 1994. 91: 11797-11801.
- Landolph JR and Jones PA. Mutagenicity of 5-azacytidine and Related Nucleosides C3H/10T $\frac{1}{2}$ clone 8 and V79 Cells. *Cancer Res.* 1982. 42: 817-823.
- Lee YW, Broday L, Costa M. Effects of nickel on DNA methyltransferase activity and genomic DNA methylation levels. *Mutat Res.* 1998. 415: 213-218.
- Lee YW, Klein CB, Kargacin B, Salnikow K, Kitahara J, Dowjat K, Zhitkovich A, Christie NT, Costa M. Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Mol Cell Biol.* 1995. 15: 2547-2557.
- Liber HL, Yandell DW, Little JB. A comparison of mutation induction at the *tk* and *hprt* loci in human lymphoblastoid cells; quantitative differences are due to an additional class of mutations at the autosomal *tk* locus. *Mutat Res.* 1989. 216: 9-17.
- Liber HL, Thilly WG. Mutational assay at the thymidine kinase locus in diploid human lymphoblasts. *Mutat Res.* 1982. 94: 467-485.
- Lucarelli M, Palitti F, Carotti D, Cianfriglia M, Signoretti C, Bozzi A, Strom R. AZT-induced hypermethylation of human thymidine kinase gene in the absence of total DNA hypermethylation. *FEBS Lett.* 1996. 396: 323-326.
- McGregor DB, Brown AG, Cattanaach P, Shepherd W, Riach C, Daston DS, Caspary WJ. TFT and 6-TG resistance of mouse lymphoma cells to analogs of azacytidine. *Carcinogen* 1989. 10: 2003-2008.
- Moor MM, Clive D, Hozier JC, Howard BE, Batson AG, Turner NT, Sawyer J. Analysis of rifluorothymidine-resistant (TFT^r) mutants of L5178Y/TK mouse lymphoma cells. *Mutat Res.* 1985. 151: 161-174.
- Podger DM. Mutagenicity of 5-azacytidine in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res.* 1983. 121: 1-6.
- Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2000. 21: 461-467.
- Voeller DM, Grem JL, Pommier Y, Paull K, Allegra CJ. Identification and proposed mechanism of action of thymidine kinase inhibition associated with cellular exposure to camptothecin analogs. *Cancer Chemther Pharmacol.* 2000. 45: 409-416.
- Von Hoff D, Slavik M, Muggia F. 5-Azacytidine. A new anticancer drug with effectiveness in acute myelogenous leukemia. *Ann*

Intern Med. 1976. 85: 237-245.

Zimmermann F, Scheel I. Genetic effects of 5-azacytidine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.* 1984. 139: 21-24.

Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997. 18: 869-882.
