

# DNA 손상세포에서 RNA Fingerprinting에 의한 이상 발현 유전자 규명

가톨릭대학교 의과대학 병리학교실 및 의과학원 암연구소

이정용 · 신민선 · 동승명 · 나은영 · 김수영 · 이석형 · 박원상 · 유남진

## Identification of Differentially Expressed Genes Using RNA Fingerprinting in Cell after DNA Damage

Jung Young Lee, Min Sun Shin, Seung Myung Dong, Eun Young Na, Su Young Kim,  
Sug Hyung Lee, Won Sang Park, and Nam Jin Yoo

Department of Pathology and Cancer Research Institute, Catholic University  
Medical College, Seoul 137-701, Korea

RNA fingerprinting using on arbitrary primed polymerase chain reaction (RAP-PCR) was carried out to identify differentially expressed genes in HL-60 cell after treatment of methylmethane sulfonate (MMS). Twenty differentially expressed PCR products were cloned and analyzed. We have successfully obtained eight partial cDNA sequences by TA cloning method. Among these, six cDNAs were up-regulated and two cDNAs were down-regulated after the MMS treatment. Of these six up-regulated cDNAs, 3 cDNAs were equivalent to known genes in the GenBank/EMBL databases with 98~100% homology searched by BLAST program: genomic DNA fragment containing CpG island (clone 26h8), Human Rev interacting protein-1 (RIP-1), and human zinc finger protein-4 (HZF4). The sequences of the three remaining cDNA were entirely new genes, but we didn't try to identify a full cDNA sequence. Two clones called KIAA0060 and KIAA0065, were down-regulated in HL-60 cells after the MMS treatment. These findings suggest that the RNA fingerprinting method using RAP-PCR is an effective method which can identify and separate the differentially expressed cDNAs and that the isolated cDNAs might involve in regulation mechanism of apoptosis and/or cell cycle delay, especially a p53-independent pathway, in the cells after DNA damage. But the nature of cDNAs that we have isolated remains to be elucidated. (*Korean J Pathol* 1998; 32: 321~327)

**Key Words:** RNA fingerprinting, DNA damage, HL-60 cell, Apoptosis

### 서 론

살아있는 유기체는 항상 DNA 손상을 받을 수 있는 환경에 노출되어 있다. 이러한 손상은 내적으로는 정상 생리학적인 과정이나 염증반응때 생기는 유리기나 과산화물 등으로 일어날 수 있고 외부요인으로는 수없이

많은 화학적 및 물리적 요인들에 의해 DNA 손상 위험을 받고 있다.<sup>1</sup> 이러한 환경에서 세포가 계속적으로 살아남기 위해서는 생존에 중대한 DNA 손상을 찾아내고 수선할 수 있는 능력이 있어야 한다. DNA에 손상이 가해지면 세포주기가 일시 정지되고 DNA 손상 유도 유전자들 (DNA-damage inducible gene)의 발현이 증가하며 이들 중 많은 유전자들이 정지된 세포주기 동안 DNA 수선에 관여하거나 수리되지 못한 세포는 아포토시스 (apoptosis)로 유도된다.<sup>2</sup>

원핵세포 (prokaryocyte)인 *Escherichia coli*에 증식을 억제하거나 DNA 손상 물질을 가해주면 이에 반응하여 전사가 오히려 활발히 일어나는 유전자가 있으며 이들

접 수: 1997년 12월 20일, 게재승인: 1997년 2월 26일

주 소: 서울시 서초구 반포동 505, 우편번호 137-701

가톨릭대학교 의과대학 병리학교실, 이정용

ISSN : 0379-1149

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비 (기초의학 BM96-012)에 의하여 연구되었음.

대부분은 절제 수리 (excision repair), 재조합 수리 (recombination repair) 또는 유전성 변이유발에 관여하는 유전자로 알려져 있다. 또한 진핵세포 (eukaryocyte)인 *Saccharomyces cerevisiae*에서는 *RNR3* (DNA 복제), *RAD2* (절제 수리), *RAD54* (재조합 수리), *UBI4* (단백질 분해) 및 *CDC9* (DNA 결합효소) 등이 지금까지 알려진 DNA 손상 후 유도되는 유전자로 알려져 있을 뿐이다.<sup>3</sup> 더욱이 포유동물 세포에서는 최근에야 비로소 DNA 손상과 관련된 유전자가 밝혀지기 시작하였다. 대표적인 유전자가 *p53*이다.<sup>4,5</sup> *p53*은 핵 단백질로서 일정한 DNA 염기서열에 결합하여 특정 유전자의 전사를 조절함으로써 세포증식을 억제하는 유전자로 알려져 있으며 *p21*, *p27*, *p57*과 같은 유전자의 발현을 증가시켜 세포주기의 중요한 원동력인 cyclin D-cyclin dependent kinase4/6 복합체와 결합하여<sup>6</sup> 세포주기를 G1기에 머물게 하거나 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)와 결합하여 PCNA 의존성 DNA 복제를 억제하여<sup>7</sup> 세포주기 지연을 유도하거나 아니면 아포토시스와 관련된 *bcl2* 및 *bax* 유전자들의 발현을 조절하여 손상된 DNA를 가진 세포를 아포토시스로 제거한다고 알려져 있다.<sup>8,9</sup> 그러나 *p53* 유전자와 상관없이 DNA 손상 후 발현이 증가하는 유전자도 있다. 이러한 사실은 DNA 손상 후 일어나는 일련의 세포반응에 *p53* 비의존성 경로도 있다는 것을 의미하며 여기에 관여하는 유전자로는 분화와 관련된 *MyD118*, *MyD116* 등과 함께 *gadd* (growth arrest and DNA damage inducible gene) 유전자 군 등이 알려져 있다.<sup>1,10-12</sup> 그러나 아포토시스나 세포주기 조절 및 DNA 수리와 같은 현상을 지금까지 알려진 몇가지 유전자로 전체를 완전하게 설명하기는 어렵다고 생각된다.

사람 골수성 백혈병 세포주인 HL-60 (human leukemia-60) 세포는 세포주기나 아포토시스 조절에 중추적인 역할을 한다고 알려진 *p53* 유전자가 결여되어 있으나 alkylating agent인 methylmethane sulfonate (MMS)를 처리하였을 때 세포주기가 지연되거나 아포토시스를 유발하는 세포로 잘 알려져 있다.<sup>13</sup>

저자들은 DNA 손상 후 일어나는 일련의 세포반응 즉 아포토시스, 세포주기 지연 또는 DNA 수리에 관여하는 유전자 그 중에서도 특히 *p53* 비의존성 경로에 관여하는 새로운 유전자를 찾아보기 위하여 DNA 손상물질인 MMS를 *p53*이 결여되어 있는 HL-60세포에 투여한 뒤 발현이 증가하거나 감소하는 mRNA를 RNA fingerprinting 방법으로 찾아내어 이를 클로닝하고 염기서열을 분석하여 부분적인 cDNA의 염기서열을 밝히고 동시에 상동성 검색 (homology search)을 통해 새로운 유전자들을 규명하거나 기존에 알려진 유전자라도 DNA 손상과 관련짓지 못한 유전자를 밝혀보고자 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양 및 약제처리

HL-60세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)로 부터 구입하여 10% 우태아혈청이 들어있는 RPMI-1640 배양액에서 배양하였으며 모든 실험은  $2 \times 10^5$  cell/ml의 농도에서 실험하였다. 최종 농도가 100  $\mu$ g/ml의 MMS (Aldrich Chem. Co. Milw, WI, USA)를 처리하고 1시간 후 신선한 배양액으로 갈아주었으며 배양액을 간 시점을 MMS 처리 1시간으로 하여 2시간 3시간째 각각 세포를 수거하였다.

### 2. 세포질 RNA 추출

대조군을 포함한 각 시간대별 수거세포로부터 세포질 RNA를 추출하기 위하여 NP-40 용해용액 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1mM MgCl<sub>2</sub>)을 첨가하여 얼음 위에 5분간 두었다. 4°C 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모은 다음 phenol-chloroform extraction을 실시한 후 에탄올로 RNA를 침전시켰다. 10 U DNase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)를 첨가하여 37°C에서 한시간 배양한 후 다시 phenol-chloroform extraction을 실시하여 에탄올로 침전시키고 Diethyl pyrocarbonate (Sigma, St. Louis, MO, USA) 처리한 물에 녹여 260 nm에서 농도를 측정된 뒤 -20°C에서 다음 실험이 있을 때까지 보관하였다.

### 3. cDNA 합성

대조군과 각각의 시간에 분리한 세포질 RNA 중 2  $\mu$ g씩 취하여 1  $\mu$ l의 olig (dT) primer (1  $\mu$ M)와 1  $\mu$ l의 MMLV reverse transcriptase (Life Technologies, Gaithersburg, MD USA; 200 units/ $\mu$ l)를 이용하여 2  $\mu$ l dNTP 혼합액 (5 mM) 존재 하에서 42°C에서 1시간 반응시켜 single strand cDNA template를 만든 뒤 75°C에서 10분간 두어 반응을 종료시켰다. 이를 새로운 튜브에 옮긴 후 증류수로 10 및 40배로 각각 희석하여 -20°C에 보관하였다.

### 4. PCR fingerprinting 반응

10배 및 40배로 희석한 1  $\mu$ l cDNA를 주형으로 사용하고 primer는 1  $\mu$ l arbitrary primer (20  $\mu$ M)와 1  $\mu$ l oligo (dt) primer (20  $\mu$ M) 또는 arbitrary primer끼리 조합을 하였으며 (Table 1) 여기에 dNTP 혼합액 (최종농도 50  $\mu$ M)와 [*a*-<sup>32</sup>P] dCTP 0.1  $\mu$ l, 그리고 긴 거리 PCR이 용이하게 하기 위하여 16  $\mu$ l의 Stoffel fragment Amplitaq (Perkin Elmer, San Francisco, CA, USA)와 1  $\mu$ l의 Vent<sub>r</sub> (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA)를 섞고 여기에 15  $\mu$ l의 TaqStart Antibody (Clontech Lab. Inc., Palo Alto, CA, USA)를 섞은 후 이중 0.4  $\mu$ l를 넣어주었다. PCR은 첫 3 cycle은 low stringency condition으로 하기 위하여 annealing temperature를 40°C로 하고 그 다음 25 cycle은

Table 1. Primers for RNA fingerprinting using arbitrary primed PCR

Arbitrary primers		Oligo(dT) primers	
P1	5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGA-3'	T1	5'-CATTATGCTGAGTGATACTTTTTTTTTTAA-3'
P2	5'-ATTAACCCTCACTAAATGCRGGAGG-3'	T2	5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAC-3'
P3	5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGRRGG-3'	T3	5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAG-3'
P4	5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG-3'	T4	5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCA-3'
P5	5'-ATTAACCCTCACTAAAGATCTGACTG-3'	T5	5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCC-3'
P6	5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG-3'	T6	5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCG-3'
P7	5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG-3'	T7	5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGA-3'
P8	5'-ATTAACCCTCACTAAATGGAGCTGG-3'	T8	5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGC-3'
P9	5'-ATTAACCCTCACTAAATGTGGCAGG-3'	T9	5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGG-3'
P10	5'-ATTAACCCTCACTAAAGCACCGTCC-3'		

With 10 arbitrary "P" primers and 9 oligo(dT) primers, it has 90 possible combinations of upstream and downstream primers.

annealing temperature를 60°C로 해 주었다. 위에서 얻은 각 반응산물 2  $\mu$ l에 2  $\mu$ l formamide-dye mixture를 섞은 후 94°C에 2분간 변성하여 6% polyacrylamide sequencing gel에서 4시간 동안 전기영동하며 Whatman paper에 gel을 건조시킨 후 X-ray film에 노출시켰다.

### 5. 클로닝

클로닝은 TA cloning kit (Invitrogen, San Diego, CA, USA)를 사용하였다. 서로 달리 증폭된 산물을 말린 gel에서 분리하여 이를 50  $\mu$ l의 10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA에서 100°C 5분간 처치 후 PCR fingerprinting 반응과 같은 primer로 annealing temperature 60°C, 30초로 증폭시켰다. PCR 마지막 단계에서 10분간의 연장시간을 주어 Taq polymerase의 nontemplate-dependent activity에 의해 PCR 산물의 3' end에 하나의 deoxyadenosine이 추가 되도록 하였다. Vector는 *lac* promoter와 *lacZ $\alpha$*  fragment 사이에 PCR product가 삽입되게 하고 양쪽에 *EcoR* I site를 갖는 pCR<sup>TM</sup>II vector를 사용하였다. 즉 1  $\mu$ l의 신선한 PCR 산물을 2  $\mu$ l의 선상의 pCR<sup>TM</sup>II vector (25 mg/ $\mu$ l)와 1  $\mu$ l T4 DNA ligase (4.0 Weiss unit)로 14°C에서 12시간 결합반응 시켰다. 50  $\mu$ l의 One Shot<sup>TM</sup> INV $\alpha$ F' competent cell에 2  $\mu$ l의 0.5 M  $\beta$ -mercaptoethanol을 넣어 준 후 2  $\mu$ l의 결합반응 혼합물을 넣어 준 다음 얼음에 30분간 방치한 뒤 42°C에서 30초간 열성자극을 주어 변형 (transformation) 시킨 후 다시 2분 동안 얼음에 두고 이어서 450  $\mu$ l의 SOC 미디어를 넣어 37°C, 225 rpm의 rotary shaker에 1시간 방치하였다. 50 또는 200  $\mu$ l의 변형 박테리아를 ampicillin (50  $\mu$ g/ml)과 X-gal을 함유한 LB agar plate에 접종 시킨 후 37°C에 최소 18시간 배양하고 다시 2~3시간 동안 4°C에서 발색시켰다. 이중 흰색 집락을 각각 6개씩 따서 kanamycin (50  $\mu$ g/ml)을 함유한 3 ml LB broth에서 37°C rotary shaker에 밤새 배양하고 이중 일부는 100°C에서 10분간 처치 후 처음 사용하였던 arbitrary primer를 이용한 PCR을 하여 삽입 여부

를 확인하였다.

### 6. 염기서열 분석

삽입이 확인된 plasmid에서 M-13의 양쪽 primer와 Sequenase reagent Kit (United State Biochemical, Cleveland, OH, USA) 및 deoxyadenosine 5'-[ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]thio triphosphate (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 핵산 염기서열의 상동성 검색은 인터넷을 통하여 NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 검색하였다.

### 7. antisense RNA probe 제작

*in vitro* 전사는 Ambion Maxiscript (Ambion, Austin, TX, USA)를 이용하였다. 박테리아로 부터 순수 분리한 plasmid를 Hind III (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA)로 절단한 후 phenol-chloroform extraction을 실시하고, 에탄올로 침전시킨 후, TE 완충용액으로 1  $\mu$ g/ml의 농도가 되게 하였다. 1  $\mu$ l 증류수 7.9  $\mu$ l 10X transcription buffer, 10 mM ATP 1  $\mu$ l, 10 mM CTP 10 mM GTP 1  $\mu$ l, 10  $\mu$ M UTP 0.1  $\mu$ l, [ $\alpha$ -P<sup>33</sup>]ATP 4  $\mu$ l, T7 RNA polymerase 2  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 *in vitro* transcription을 실시하였다. 주형 DNA를 제거하기 위하여 2 U DNase를 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 6% denaturing gel 상에서 합성된 RNA를 확인한 후 밴드를 절단하여 추출하였다.

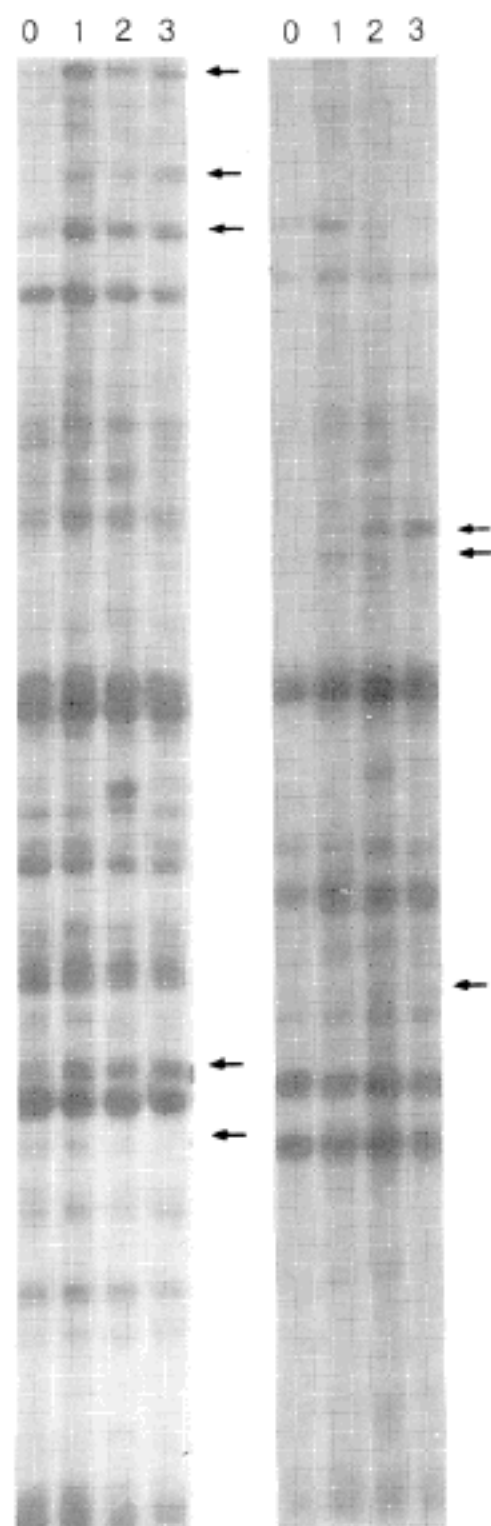
### 8. RNase protection assay (RPA)

RPA는 RPAII Kit (Ambion, Austin, TX, USA)를 이용하여 실시하였다. MMS를 시간대 별로 처리한 세포로부터 추출한 세포질 RNA 30  $\mu$ g과 방사능으로 표지된 antisense RNA probe 1 ng을 함께 에탄올로 침전시켜, 교잡용액 20  $\mu$ l에 녹였다. 200  $\mu$ l의 희석한 RNase 용액을 첨가하여 37°C에서 30분간 둔 후 에탄올이 함유된 Dx 용액 300  $\mu$ l를 넣어 -20°C에서 20분간 두었다. 4°C,

14,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전시킨다음, gel loading buffer 8  $\mu$ l로 녹였다. 90°C에서 3분간 변성시켜 denaturing gel에서 확인하였다.

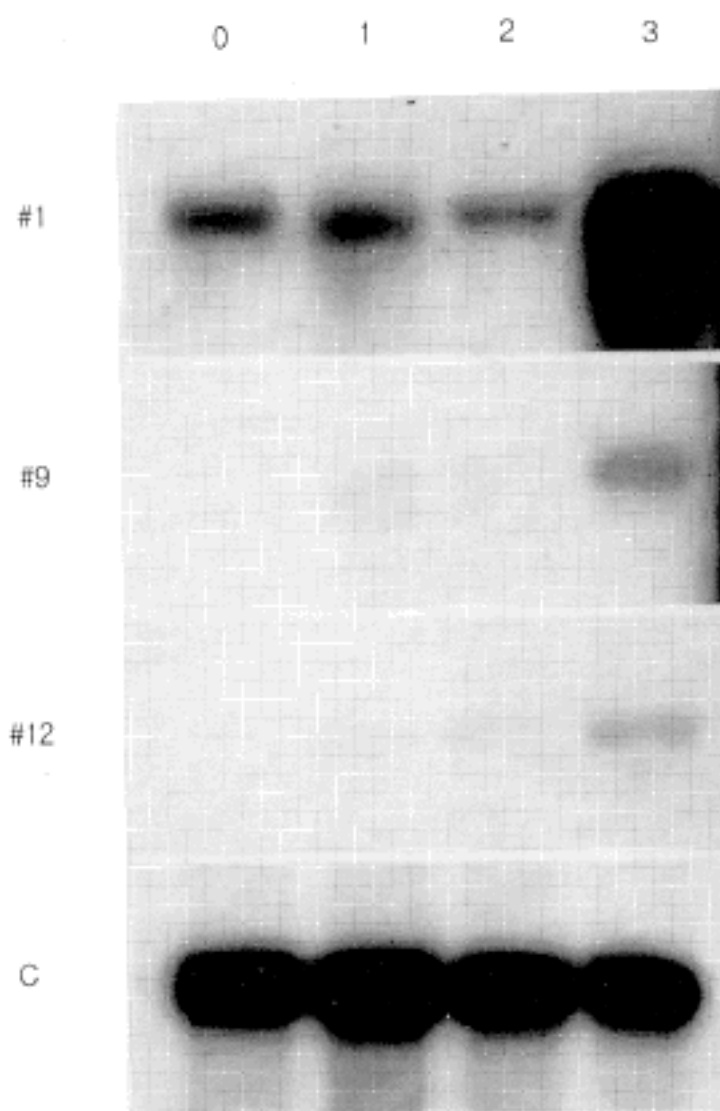
### 성 적

10개의 arbitray P primer와 9개의 oligo (dT) T primer를 이용하여 90개의 조합이 가능하였다. 이 primer 조합을 이용한 RNA fingerprinting 방법을 시행해 본 결과 약 40여개의 밴드들이 대조군보다 발현이 증가해 있거나



**Fig. 1.** The differentially expressed transcripts demonstrated by RNA fingerprinting using RNA arbitrary primed PCR(RAP-PCR). HL-60 cells were harvested at 0, 1, 2, and 3 hours after treatment with 100  $\mu$ g/ml of MMS (0. control; 1, one hour; 2, two hours; 3, three hours). Two autoradiograms indicating RAP-PCR products displayed on 6% polyacrylamide sequencing gels. Arrows indicate abnormally up- or down-regulated bands after MMS treatment.

또는 감소해 있었다. Fig. 1은 RNA fingerprinting시 발현이 증가 또는 감소하는 예들을 보여 주고 있다. 이들 중에서 같은 primer로 실험을 반복하거나 회색시킨 cDNA에서도 계속적으로 같은 발현의 변화를 보여 신빙성을 주는 밴드 20개를 선정하였다. LB agar plate에서 자란 competent cell은 20~30개의 집락을 형성하였으며 이중 절반정도에서 백색 집락을 보였으며 나머지는 옅은 청색 집락이거나 가장자리에만 청색을 띄었다. 이 중 백색 집락에서만 약 6개씩을 채취하여 LB broth에서 증식 시켰다. 삽입이 확인된 15개의 plasmid vector는 이어 염기서열을 분석하였고 상동성 검색을 실시하였으며 이 중 리보솜 RNA나 Alu sequence 등이 의심되는 7개의 클론은 폐기하고 최종적으로 8개의 클론만 남겨 놓았다. 이들 8개의 클론은 크기가 150에서 200 bp 정도 였으며 이 중 5종류의 클론은 GenBank에 보고되어 있는 알려진 유전자와 96% 이상 상동성을 보이는 partial cDNA 였으며 나머지 3종류의 클론은 기존에 알려진 유전자와 거의 homology를 보이지 않는 새로운



**Fig. 2.** Gene expressions of 26h8 (# 1), RIP-1 (# 9), and HZF4 (# 12) were examined by RNase protection assay. Cytosolic RNA (30  $\mu$ g) isolated from MMS treated HL-60 cells at indicated time (0, 1, 2, and 3 hours) were hybridized with [<sup>32</sup>P]-labeled antisense RNA probes specific for each corresponding cDNA, and digested with RNases. The protected fragments were fractionated by electrophoresis on a 6% polyacrylamide sequencing gel and standardized with reference to the level of GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA(C).

Table 2. Differentially expressed genes identified by RNA fingerprinting in HL-60 cell after MMS treatment

Clone	Expression pattern	Homology	Known gene
1	increased	98%	26h8, DNA containing CpG island (Ref 15)
2	decreased	96%	KIAA0060, human mRNA (Ref 27)
7	increased	none	none
8	decreased	97%	KIAA0065, human mRNA (Ref 27)
9	increased	100%	RIP-1, human Rev interacting protein-1(Ref 18~21)
10	increased	none	none
11	increased	none	none
12	increased	100%	HZF4, human zinc finger protein-1 (Ref 24~26)

cDNA 염기서열임을 알 수 있었다 (Table 2). 기존에 알려진 유전자 중 MMS 처리 후 발현이 증가하는 3클론을 RPA로 다시 확인해 본 결과 모두에서 RNA fingerprinting에서와 같이 발현이 증가함을 확인하였다 (Fig. 2).

## 고 찰

어떤 새로운 유전자를 찾기 위한 방법으로 subtractive hybridization이나 plus/minus screening 등과 같은 고식적인 방법이 사용되어 왔으나 최근 mRNA differential display나 arbitrary primer를 이용한 RNA fingerprinting 방법이 소개되고 있다.<sup>14</sup> 그러나 mRNA differential display 방법보다도 primer 및 PCR 조건의 개선 등으로 훨씬 사용이 용이한 In vitro 회사 RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction (RAP-PCR)의 사용이 점점 증가하고 있는 추세이다. RAP-PCR에 의한 RNA fingerprinting 방법은 2개 이상의 세포 집단간에 달리 표현되는 유전자를 용이하게 찾아낼 수 있는 방법으로서 arbitrary primer와 T primer의 조합이 90개 이상 가능하며 또한 각 primer set 마다 40~80개의 band를 보여 줄 수 있어서 적게는 3,600개로부터 많게는 7,200개의 RNA 변동을 집단으로 검색할 수 있는 좋은 방법이다. 따라서 본 연구에서와 같이 DNA 손상물질을 투여한 뒤 달리 발현되는 밴드를 클로닝하고 그 염기서열을 밝혀 이것이 기존에 알려진 유전자인지 아직 알려져 있지 않은 새로운 유전자인지를 상동성 검색을 통해서 알 수가 있을 뿐만 아니라 기존에 알려진 유전자라 하더라도 DNA 손상과 관련을 짓지 못한 유전자도 새로이 밝혀 수가 있는 것이다.

DNA에 손상이 가해지면 대부분의 유전자들은 발현이 감소하는데, 일부 유전자들은 오히려 발현이 증가하는 유전자들이 있다. 이렇게 발현이 증가되는 유전자들은 DNA 손상에 대해 적극적으로 대처하고자 하는 세포의 능동적 반응이라 할 수 있다. 그러므로 DNA 손상을 가한 후 발현이 증가되는 유전자들을 찾아낸다면 이들은 유전자 수선, 유전자 보존, 아포토시스, 세포주기 조절 등에 관여할 가능성이 많은 유전자일 것이다. 본

연구에서도 6개의 클론이 MMS 처리 후 발현이 증가하였다. 그 중에서 3개의 클론은 아직까지 보고 되지 않은 유전자였으며 나머지 3개의 클론은 기존에 보고된 유전자로서 상동성이 모두 96% 이상이었다.

본 연구에서 발현이 증가하는 클론 중 26h8은 MacDonald 등 (Humquery@sanger.ac.uk)이 GenBank에 clone 26h8 (HS26H8R)라는 이름으로 직접 등록한 genomic *Mse I* fragment로 CpG island를 가지고 있는 281 bp 크기의 genomic DNA와 100% 상동성을 보였다. *Mse I*는 CpG island 내에는 별로 없는 TTAA 염기서열을 인식하는 제한효소이기 때문에 이 효소로 genomic DNA를 자르면 손상되지 않은 CpG island를 가진 DNA 조각을 얻을 수 있다. 포유동물세포의 지놈 (genome)은 크게 두가지 부류로 나눌 수 있는데 50~100 bp마다 CG 염기서열이 반복되면서 methylation 되어 있는 지놈 (98%)과 대략 10 bp 마다 CG 염기서열이 반복되면서 methylation 되어 있지 않은 지놈 (2%)으로 나눌 수 있다. 그중에서도 methylation되어 있지 않은 소수 지놈들이 특히 중요한데 이들은 60% 이상의 사람 유전자에서 CpG island를 가지고 있으며 이 CpG island내에 그 유전자의 프로모터 염기서열이나 또는 유전자의 5'쪽 첫번째 또는 몇개 이상의 exon이 위치한다. 그러므로 CpG island를 갖는 DNA 조각들에 대한 염기서열 정보들은 많은 경우에 mRNA에서 획득한 cDNA의 5' 부위가 중복되는 경우가 흔하며 이를 통해 고유 유전자의 프로모터 염기서열이나 5' start codon을 밝혀는데 아주 유용하게 사용된다.<sup>15</sup> 본 연구에서 발현이 증가한 26h8 클론은 기존에 알려진 cDNA와 연관이 없는 클론이어서 DNA 손상 후 어떤 역할을 할 것인지에 대해서는 짐작하기가 어려웠으며 26h8과 관련된 cDNA가 다른 연구자에 의해 빨리 밝혀 지기를 기대할 뿐이다.

9번 클론 RIP-1 (human Rev interacting protein)은 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) 바이러스의 Rev 단백질 (retroviral regulatory protein)과 결합하는 단백질이다. Rev 단백질은 핵내에서 HIV 바이러스 구조 단백질을 코딩하고 있는 HIV-1 mRNA의 Rev response element (RRE)인 특이 RNA 염기서열에 결합하여 Rev-RRE

ribonucleoprotein 복합체를 이루어 바이러스 RNA를 핵내로부터 세포질로 이동시키는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. HIV-1 감염세포에서 세포질로 나온 RNA는 구조단백을 만들어 virion을 만든다.<sup>16</sup> 그러므로 Rev 단백질이 없으면 바이러스 RNA가 세포질내로 나오지 못하고 핵내에서 파괴됨으로 바이러스 증식이 억제된다.<sup>17</sup> Human T-lymphotrophic virus-1의 Rex 단백질도 Rev 단백질과 유사한 기능을 한다고 알려져 있다.<sup>18</sup> 그러나 Rev나 Rex 단백질이 RNA의 핵-세포질 이동에 역할을 하기 위해서는 숙주세포의 어떤 보조단백이 Rev이나 Rex 단백질의 활성화영역 (activation domain)에 결합을 하여야만 된다고 알려져 있다. 여기에 속하는 보조단백으로는 eIF-5A (eukaryotic translation initiation factor), Rab (Rev/Rax activation domain-binding protein), hRIP (human Rev interacting protein) 등이 있으며 본 실험에서 규명한 RIP-1도 여기에 속한다.<sup>19,20</sup> 이 중에서 Rab와 hRIP는 현재 같은 유전자로 알려져 있으며 몇몇의 nucleoporin 단백질과 상동성을 보이고 있다.<sup>21</sup> 진핵세포에서 mRNA의 핵-세포질 이동기전에 대해 거의 알려져 있지 않은 현재 Rev/Rex 단백질과 이들과 결합하는 보조단백의 기능에 대한 연구는 mRNA의 핵-세포질 이동에 중요한 기본 지식을 제공하리라 여겨진다. 최근 retrovirus 감염세포가 아닌 사람세포에서도 Rev 단백질과 유사한 단백질이 밝혀지고 있으므로 진핵세포의 유전자 발현기전에 중요한 단서를 제공하리라 생각된다.<sup>22,23</sup> 본 실험에서 MMS 처치 후 발현이 증가한 RIP-1도 DNA 손상 후 일어나는 아포토시스나 세포주기 지연 및 DNA 수리 등에 관여하는 유전자의 발현 증가에 관련있으리라 예상이 되지만 현재까지 밝혀진 지식으로는 이해하기가 어려우며 앞으로 진핵세포에서 mRNA 핵-세포질 이동기전이 완전히 밝혀지면 DNA가 손상 받은 세포에서 RIP-1이 어떤 역할을 할 것인지 밝혀질 것이다.

어떤 유전자가 발현되기 위해서는 전사조절 물질 (transcription factor)이라고 하는 몇 가지 단백질들이 발현하고자 하는 특정 유전자의 프로모터 부위에 결합을 하여야만 DNA로부터 RNA로 전사가 시작된다. 그러나 어떻게 전사조절 물질이 정확하게 특정한 DNA의 프로모터 부위를 인식하고 결합하는지에 대해 과학자들이 한 동안 궁금하게 생각하였다. 1985년 Miller등이 transcription factor IIIA에서 Zinc finger domain을 밝혀낸 이래로 많은 Zinc finger 단백질들이 밝혀졌으며 이들 대부분이 전사조절 물질로 작용하는 것으로 밝혀졌다.<sup>24</sup> HZF4 (human zinc finger protein 4)는 Abrink등에 의해 사람 단핵구/대식세포 분화연구의 모델로 사용되고 있는 U-937 세포주에서 cDNA를 분리하였으며 Krüppel형의 zinc finger protein으로 8번염색체 장완 8q24.3의 c-MYC 유전자 바로 옆에 위치하고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>25,26</sup> HZF4의 기능에 대한 연구가 아직 완전히 이루어지지 않았으나 이 역시 아포토시스나 DNA 수리에 관련된 유전자의 mRNA나 단백질 생성에 전사조절 물

질로 관여하리라 여겨진다.

본 연구에서 기존에 알려진 유전자이면서 MMS 처치 후 RNA 발현이 감소하는 cDNA로는 KIAA0060과 KIAA0065가 있으며 이들은 모두 사람 미성숙 골수양 세포주인 KG-1세포에서 Nomura등에 의해 cDNA가 밝혀졌다.<sup>27</sup> 그러나 DNA 손상 후 발현이 감소하는 것은 세포가 죽어가면서도 발현이 감소할수 있기 때문에 해석이 어려워 별 의미를 두지 않았다.

기존에 알려지지 않은 유전자이면서 DNA 손상 후 발현이 증가하는 클론 3개 (7번, 10번, 11번)는 새로운 DNA 유전자임에 틀림 없으나 long RACE PCR 방법으로 전체 cDNA를 밝혀려는 시도는 하지 않았으며 다른 연구자에 의해 GenBank 데이터 베이스에 등록될 때까지 주기적인 상동성 검사를 하면서 기다려 보고자 한다.

## 결 론

DNA 손상 후 일어나는 일련의 세포반응은 손상된 DNA가 수리될 때까지 세포주기가 지연되거나 수리될 수 없을 때는 아포토시스로 세포집단에서 제거된다. 이러한 현상은 한 개체의 입장에서 볼 때 유전자 변화로 인한 암 발생을 억제시키는 중요한 생물학적 반응이다. 그러나 아직도 그 기전에 대해 정확히 파악하고 있지 못하다.

본 연구는 DNA 손상 후 일어나는 아포토시스, 세포주기 지연 또는 DNA 수리에 관여 하는 유전자 그 중에서도 특히 p53 비의존성 경로에 관여하는 새로운 유전자를 규명하거나 기존에 알려진 유전자라 하더라도 DNA 손상과 관련 짓지 못한 유전자를 밝혀 보고자 하였다. DNA 손상 물질인 methylmethane sulfonate를 p53이 결여되어 있는 HL-60세포에 투여한 뒤 발현이 증가하거나 감소하는 mRNA를 arbitrary primed PCR을 이용한 RNA fingerprinting 방법으로 알아내어 이를 클로닝하고 염기서열을 분석 및 상동성 검색을 시행하였으며 RNase protection assay를 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

methylmethane sulfonate를 HL-60세포에 처치한 후 발현이 증가하는 6개의 클론과 발현이 감소하는 2개의 클론을 얻었다. 발현이 증가하는 클론 6개 중 3개는 기존에 밝혀진 DNA 염기서열과 98% 이상의 상동성을 보였으며 여기에는 CpG island를 갖는 26h8 genomic DNA, human Rev interacting protein 1, 그리고 human zinc finger protein 4였다. 이들은 모두 RNase protection assay에 의해 methylmethane sulfonate 처치 후 발현이 증가함을 다시 확인할 수 있었다. 나머지 3클론은 기존의 유전자와 상동성을 보이지 않는 새로운 유전자임을 알았다. DNA 손상 후 감소하는 클론은 KIAA0060 및 KIAA0065 human mRNA와 상동성을 보였다.

이상의 결과로 arbitrary primed PCR을 이용한 RNA fingerprinting 방법은 새로운 유전자를 찾기에는 좋은 방법이라는 것을 알 수 있었으나 본 연구를 통해 DNA 손

상과 관련성이 있다고 밝혀진 유전자들에 대한 기존 연구가 아직 미비하여 이들 유전자들이 DNA 손상 후 일어나는 일련의 세포반응에서 어떤 역할을 할 것인가에 대해서 현재로는 규명하기가 어려웠다. 이들 유전자들에 대한 지속적인 추적조사가 요구된다.

### 참 고 문 헌

1. Fornace AJ Jr, Jackman J, Hollander MC, Hoffman-Liebermann B, Libermann DA. Genotoxic-stress-response genes and growth arrest genes: gadd, MyD, and other genes induced by treatments eliciting growth arrest. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 41: 139-53.
2. Chiou SK, Rao L, White E. Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2556-63.
3. Weinert TA, Hartwell LH. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 1988; 241: 317-22.
4. Zahn Q, Carrier F, Fornace AJ Jr. Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agent and growth arrest. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4242-50.
5. Fritsche M, Haessler C, Brandner G. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 1993; 8: 307-18.
6. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 389: 574-8.
7. Sherr CJ. Cancer cell cycle. *Science* 1996; 274: 1672-77.
8. Zahn Q, Bieszczad CK, Bae I, Fornace AJ Jr, Craig RW. Induction of BCL2 family member MCL1 as early response to DNA damage. *Oncogene* 1997; 14: 1031-9.
9. Sheikh MS, Garcia M, Zhan Q, Liu Y, Fornace AJ Jr. Cell cycle-independent regulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and retinoblastoma protein during okadaic acid-induced apoptosis is coupled with induction of bax protein in human breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 1599-607.
10. Zahn Q, Fan S, Bae I, Guillouf C, Lieberman DA, O'Conner PM, Fornace AJ Jr. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 1994; 9: 3743-51.
11. Vairapandi M, Balliet AG, Fornace Jr AJ, Hoffman B, Liberman DA. The differentiation primary response gene MyD118, related to gadd45, encodes for a nuclear protein which interacts with PCNA and p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. *Oncogene* 1996; 12: 2579-63.
12. Jackman J, Alamor I, Fornace AJ Jr. Genotoxic stress confers preferential and coordinate messenger RNA stability on the five gadd genes. *Cancer Res* 1994; 54: 5656-62.
13. 이정용, 이정득, 동승명 등. 유전자손상 물질에 의한 아포토시스와 세포주기 지연에 대한 gadd 및 p53 유전자 역할. *대한병리학회지* 1998; 32: 239-47.
14. McClelland M, Mathieu-Daude F, Welsh J. RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *TIG* 1995; 11: 242-46.
15. Cross SH, Charlton JA, Nan X, Bird AP. Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. *Nat Genet* 1994; 6: 236-44.
16. Cullen BR. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retrovirus. *Microbiol Rev* 1992; 56: 375-94.
17. Emerman M, Vazeux R, Peden K. The rev gene product of human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell* 1989; 57: 1155-65.
18. Bogerd HP, Fridell RA, Madore S, Cullen BR. Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell* 1995; 82: 485-94.
19. Jones T, Sheer D, Bevec D, Kappel B, Hauber J, Steinkasserer A. The human HIV-1 Rev binding protein hRIP/Rab (HRB) maps to chromosome 2q36. *Genomics* 1997; 40: 198-9.
20. Bevec D, Jaksche H, Oft M, et al. Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor elF-5A. *Science* 1996; 271: 1858-60.
21. Fritz CC, Zapp ML, Green MR. A human nucleoprotein-like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature* 1995; 376: 530-3.
22. Huang J, Liang TJ. A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 7476-86.
23. Bray M, Prasad S, Dubay JW, et al. A small element from the Mason-Pfizer Monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1256-60.
24. Miller J, McLachlan AD, Klug J. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J (EMBO J)* 1985; 4: 1609-14.
25. Abrink M, Aveskogh M, Hellman L. Isolation of cDNA clones for 42 different Krüppel-related zinc finger proteins expressed in the human monoblast cell line U-937. *DNA Cell Biol* 1995; 14: 125-36.
26. Kas K, Wlodarska I, Meyen E, Van den Berghe H, Van de Ven WJ. Assignment of the gene encoding human Krüppel-related zinc finger protein 4 (GLI4) to 8q24.3 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 74: 297-8.
27. Nomura N, Nagase T, Miyajima N, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. II. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0041- KIAA0080) deduced by analysis of cDNA from human cell line KG-1. *DNA Res* 1994; 1: 223-9.