

텔로머라제 음성인 ALT 세포주에서
염색질 구조가 텔로미어 길이 조절에
미치는 영향

연세대학교 대학원

의 과학과

정 아 라

텔로머라제 음성인 ALT 세포주에서
염색질 구조가 텔로미어 길이 조절에
미치는 영향

지도교수 라 선 영

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2009년 12월

연세대학교 대학원

의 과 학 과

정 아 라

정아라의 석사학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2009 년 12월

감사의 글

길 것만 같았던 2년이라는 시간이 지나고 어느덧 졸업을 앞두고 되었습니다. 여전히 많이 부족하지만 2년이라는 시간 동안 이곳에서 인내하고 노력하는 법을 배우며 성숙할 수 있었습니다. 제가 이렇게 졸업을 할 수 있기까지 많은 분들이 도움이 있었습니다.

가장 먼저, 항상 바쁜 와중에도 제가 과학자로서 사고할 수 있게 지도해주시고 따뜻한 관심과 격려를 해주셨던 라선영 교수님, 저의 실험뿐만 아니라 제 마음까지 배려 해 주시며 격려해 주시던 오봉경 교수님, 바쁘신 와중에도 심사에 와주셔서 격려해 주시던 박영년 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 항상 제가 하는 실험에 관심 가져 주시고 조언과 격려를 잊지 않으시던 정희철 교수님, 바쁘신 와중에도 저의 귀찮은 부탁도 흔쾌히 들어 주시는 김태수 선생님, 항상 밝은 웃음으로 저를 대해주시던 박규현 선성님, 그리고 저의 이런저런 투정도 들어 주시며 항상 다독여 주시던 장향란 선생님께도 감사 드립니다.

실험실에 가장 선배로 조언을 아끼지 않았던 찬희 오빠, 내가 질문할 때마다 이해 할 때까지 열심히 설명 해주던 재준오빠, 실험실에 처음 들어와 어리버리한 나에게 온 나에게 많은 것들을 가르쳐 준 우선언니, 매일 아침마다 재미있는 이야기 들려 주면서 항상 즐겁게 해주는 내 짝꿍 귀연언니, 가끔씩 연구동에 가면 반갑게 맞아 주면서 나랑 수다 떨어주는 주혜언니, 아기가 들인데도 아직도 귀여운 선정언니, 507호에 와서 잘 지낼 수 있도록 많은 배려와 이해를 해주고 실험에 대해서도 많은 조언을 해준 명은언니, 선배지만 동갑내기 친구로 나를 이해해 주고 도와준 원석이, 나보다 입학이 한학기 늦은 막내로 실험실에 많은 일들을 하느라 항상 고생 많은 정민오빠, 나보다 한 살 어린데도 언니처럼 든든한 보람이, 내 건너편 옆자리에 앉아서 나를 즐겁게 해주는 혜령언니, 가끔 버스정류장에서 만나는 날씬한 시은선생님, 센터에 있을 때부터 항상 나와 즐겁게 이야기 해주고 격려해 주던 유근오빠, 항상 바쁘신 와중에도 기꺼이 도와 주시던 순천언니, 지금은 실험실에 없지만 항상 사소하게 잘 챙겨 주었던 매너남 태수오빠와 나의 사소한 실수들을 웃어 넘겨 주며 따뜻하게 대해준 귀여운 은정언니, 지금 내 자리의 전 주인으로 507호 막내인 나에게 신경 써주던 동혁오빠 그리고 같이 텔로미어를 공부하며 항상 조언과 격려를 잊지 않았던 병리학 교실 유정은 선생님에게도 감사의 말씀 전합니다.

또한 저에게는 항상 힘이 되어준 친구들이 있습니다. 고등학교 3학년 때부터 단짝이 되어 이제는 사소한 감정들까지도 너무 잘 알고 같이 고민해 주는 친구 현욱이, 대학교 때 같이 실험실에서 고생하며 친구가 되어 지금까지 나에게 큰 위안이 되는 친구 윤지, 편입공부 하며 만나 지금은 서로에게 좋은 친구가 된 지연이, 형민오빠, 환진오빠, 학부 실험실생활 할 때부터 어리고 철없던 나를 감싸주고 열심히 공부 시켜준 미경언니, 항상 내 고민 들어 주며 위로해 주고 즐겁게 같이 수다 떨어 주는 화진이, 유진언니, 도빈이, 완주, 창호오빠, 내가 제일 바쁘다며 나보러 항상 신촌까지 와주는 미혜와 은하, 그리고 대학교에 들어 가서 가장 즐거운 시간을 보내게 해주고 지금도 나에게 힘이 되어 주는 동아리 YOUTH HOSTEL의 선배들과 항상 기수모임은 내 맘대로 신촌으로 정해놓고 불려도 불평 없이 오는 내 동기들(진한이, 효수, 덕형이, 지희, 종대, 환희, 한별이, 미현이, 도현이, 태웅이) 모두 감사합니다.

마지막으로 저를 지금까지 키워주시고 항상 사랑으로 돌봐주신 부모님과 오빠처럼 날 돌봐주는 동생 종혁이, 대학원 다닌다고 정말 좋아 하시던 할머니, 할아버지와 우리 가족들, 그리고 사소한 일들까지 항상 신경써주고 기운내서 열심히 할 수 있게끔 나에게 힘이 되어준 진희오빠에게도 감사 인사 전합니다.

지금껏 저를 도와준 많은 분들이 있었기에 부족하나마 논문을 완성할 수 있게 되었습니다. 대학원 2년 동안의 소중한 경험들과 고마움을 잊지 않고 앞으로 더 노력하며 발전하는 사람이 되도록 하겠습니다.

정아라 드림.

차 례

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	7
1. 세포배양	7
2. Trichostatin A (TSA) 처리	7
3. Western Blot	8
4. FISH-면역형광염색법	9
5. CO-FISH	11
6. 텔로미어 FISH	13
III. 결과	17
1. TSA 처리에 따른 염색질의 구조변이 확인	17
2. 염색질 구조변이에 따른 APB 패턴의 변화	19
3. 염색질 구조 변이에 따른 T-SCE 빈도의 변화	24
4. 염색질 구조 변이에 따른 텔로미어 길이의 변화	26
IV. 고찰	29
V. 결론	32
참고문헌	33
영문요약	38

그림 차례

Figure 1. Cell senescence and activation of telomere maintenance mechanisms with decrease of telomere length	5
Figure 2. Study Scheme	16
Figure 3. Up-regulation of Histone acetylation upon TSA treatment in ALT cells	18
Figure 4. APBs pattern changes upon TSA treatment in GM 847	21
Figure 5. APBs pattern changes upon TSA treatment in WI38-VA13 . . .	23
Figure 6. Change of T-SCE frequency upon TSA treatment in GM 847 . .	25
Figure 7. Telomere length change upon TSA treatment in GM 847 . . .	28

<국문요약>

텔로머라제 음성인 ALT 세포주에서 염색질 구조가
텔로미어 길이 조절에 미치는 영향

텔로미어 (Telomere)는 진핵생물 염색체 끝부분의 DNA 와 단백질 복합체로서 TTAGGG 의 반복 서열을 가지며 염색체가 손상되는 것을 막아 줌으로써 유전체의 안정성에 기여를 한다. 대부분의 불멸화된 세포는 텔로머라제 (Telomerase)를 활성화 시킴으로써 텔로미어 길이의 안정화를 유도하지만 소수의 세포에서는 텔로머라제와 무관하게 텔로미어 길이를 유지하게 된다. 후자의 경우 Alternative lengthening of telomere (ALT)라 불리는 기작에 의해 텔로미어 길이 조절이 이루어진다. 텔로미어 길이조절은 여러 요소들에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 최근에는 텔로미어 염색질 구조와 텔로미어 길이가 밀접한 관계가 있음이 밝혀졌다. 텔로미어 유지는 발암과정에 있어서 중요한 요소이며 중요한 항종양 표적이 될 수 있어 텔로미어 길이 조절에 관한 기작 이해가 필요하다. 하지만 ALT 세포에서 텔로미어 염색질의 구조 변이가 텔로미어 길이 변화에 어떤 영향을 미치는지에 관한 연구는 전무한 상태이다.

본 연구에서는 ALT세포주에 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제 (histone deacetylase inhibitor) 인 Trichostatin A (TSA)를 처리하여 염색질의 구조 변이를 유도하고 그 변이에 따른 텔로미어 길이, APBs (ALT associated PML bodies) 형성, T-SCE (Telomere Sister Chromatid Exchange) 빈도를 측정하여 대조군과 비교 분석하였다. 이때 APBs형성을 측정하기 위하여 FISH combined IF

(Fluorescence in situ Hybridization-Immunofluorescence staining, FISH-면역형광염색법)를 수행하였고, T-SCE 를 측정하기 위해 CO-FISH (Chromosome Orientation FISH)를 수행하였으며 텔로미어의 길이를 측정하기 위하여 텔로미어 FISH를 수행하여 TSA 처리하지 않은 대조군과 비교함으로써 ALT 세포주의 염색질 구조가 텔로미어 길이 조절에 미치는 영향을 보고자 하였다

1. ALT 세포주인 GM 847과 WI38-VA13의 APBs를 측정하기 위하여 FISH-면역형광염색법을 수행하였다. GM 847 경우 TSA를 처리하였을 때 APBs 양성 세포수는 100개 중 63개로 TSA를 처리 하지 않았을 때의 100개중에 30개 보다 증가하였다 ($p<0.001$). 또 다른 ALT 세포인 WI38-VA13에서도 유사한 결과가 나타났다. WI38-VA13에 TSA를 처리하였을 때 APBs 양성 세포수는 100개중 38로 TSA를 처리 하지 않았을 때의 100개중에 18개보다 증가하였다 ($p<0.001$).

2. GM 847의 T-SCE 빈도를 측정하기 위하여 CO-FISH를 수행하였다. TSA를 처리하였을 때 T-SCE 빈도는 1026개 염색체 중에 262개 (25.5%)로 TSA를 처리하지 않았을 때의 1026개중에 215개 (20.9%) 보다 증가 하였다 ($p<0.001$).

3. GM 847의 텔로미어 길이를 측정하기 위하여 텔로미어 FISH를 수행하였다. TSA를 처리하였을 때 텔로미어 평균 길이를 나타내는 형광 평균 세기는 25.11%로 TSA를 처리하지 않았을 때의 29.8.% 보다 감소하였다 ($p<0.001$).

이상의 연구 결과는 ALT세포에서 염색질 구조가 텔로미어 재조합과

밀접한 관계가 있음을 보여주고 있다. 또한 이러한 결과는 텔로머라제 음성 세포주에서 텔로미어 길이 조절 메커니즘을 이해하는데 도움을 줄 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : ALT 세포주, 염색질 구조, 텔로미어

텔로머라제 음성세포주인 ALT 세포주에서 염색질 구조가

텔로미어 길이 조절에 미치는 영향

<지도교수 라 선 영>

연세대학교 대학원 의과학과

정아라

I. 서론

텔로미어 (Telomere)는 선형의 진핵생물 염색체 끝부분의 DNA 와 단백질 복합체로서 TTAGGG 의 반복서열을 가지며 염색체가 손상되는 것을 막아 줌으로써 유전체의 안정성에 기여를 한다¹⁴. 대부분 사람의 체세포에서 텔로미어는 세포 분열을 할 때마다 50 에서 100 염기 정도가 짧아진다. 텔로미어의 길이가 어느 정도 이하로 짧아지게 되면 세포는 성장을 멈추고 노화가 시작된다. 이 단계에서 세포는 살아 있지만 더 이상 분열하지 않는다. 그러나 Ras 와 같은 암유전자 (Oncogene)을 발현 시키거나 p53 이나 Rb 와 같은 종양 억제 유전자 (tumor suppressor gene)을 불활성화 시킨 세포의 경우 이러한 단계를 지나 몇몇 세포가 살아남아 계속해서 증식하게 되는데 이런 세포의 텔로미어는 짧지만 안정한 상태로 유지된다. 이와 같이 불멸화된 세포는 대부분이 텔로머라제 (Telomerase)를 활성화 시킴으로써

텔로미어 길이의 안정화를 유도하지만 소수의 세포에서는 텔로머라제와 무관하게 텔로미어 길이를 유지하게 된다⁵. 후자의 경우 Alternative lengthening of telomere (ALT)라 불리는 기작에 의해 텔로미어 길이 조절이 이루어진다 (Fig. 1)⁶⁻¹⁰.

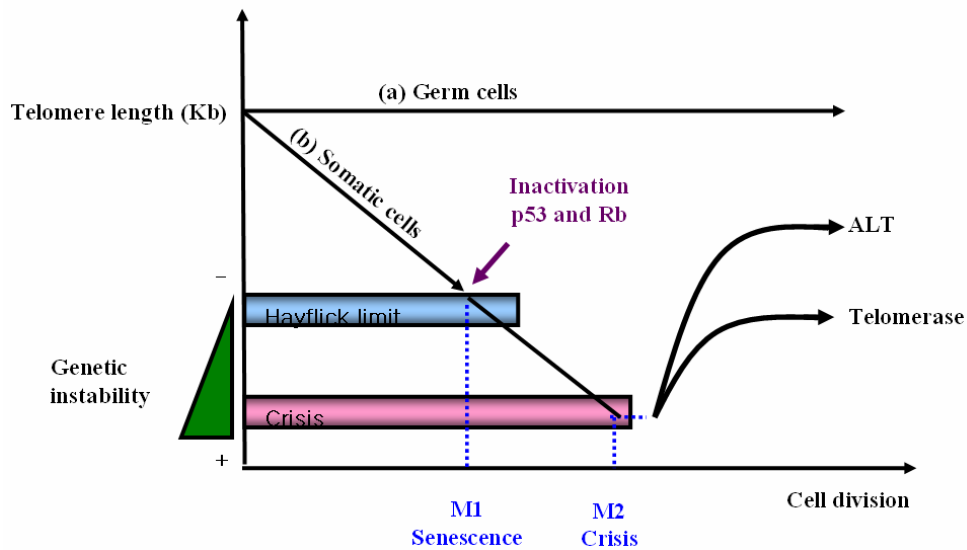


Figure 1. Cell senescence and activation of telomere maintenance mechanisms with decrease of telomere length (Stewart SA et al., 2008 modified).

텔로미어 길이조절은 여러 요소들에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 그 중 하나인 텔로미어 결합 단백질들인 ‘shelterin’ 복합체는 텔로미어 길이 조절에 매우 중요한 요소이며, 최근에는 텔로미어 염색질 구조와 텔로미어 길이가 밀접한 관계가 있음이 밝혀졌다¹¹. 텔로머라제 양성 암세포에서 메틸화를 감소시켜 주어 염색질의 구조를 느슨하게 하여 주었을 때 텔로미어의 길이가 길어졌다¹². 또한 히스톤 메틸기 전달효소 (Histone Methyl Transferase)를 제거한 세포는 염색질의 구조가 느슨하게 변하고 그와 관련하여 텔로미어의 길이가 길어짐을 보고하였다. 동시에 ALT 세포의 특징으로서 핵 안에서 세포의 노화와 세포자멸사 (Apoptosis)

유도, 세포증식 억제, 유전체의 안정성과 항바이러스성 반응의 유지 등 세포의 다양한 기능을 조절하는 PML bodies (Promyelocytic Leukemia bodies)에 텔로미어가 위치하는 APBs (ALT associated PML bodies)의 형성이 증가함을 관찰 하였다¹³⁻¹⁸. 또한 DNA 메틸기 전달효소(DNA methyl transferase)가 제거된 세포에서도 텔로미어의 염색질 구조가 느슨하게 변하고 텔로미어 길이가 길어지고 APBs 형성이 증가하였다¹⁹. 이러한 결과들을 보았을 때 염색질의 구조변이는 텔로미어의 길이 조절과 밀접한 관계가 있음을 시사한다.

반면, 텔로머라제 음성인 ALT 세포의 경우 텔로미어 재조합 (telomere recombination)에 의해 텔로미어 길이가 유지된다고 보고되어있으며, 특징으로는 매우 다양한 텔로미어 길이⁹, APBs 형성, 그리고 재조합과정에서 생길 수 있는 T-SCE가 나타난다²⁰. 텔로미어 유지는 발암과정에 있어서 중요한 요소이며 중요한 항종양 표적이 될 수 있어 텔로미어 길이 조절에 관한 기초 이해가 필요하다. 최근의 보고는 텔로미어 염색질 구조의 느슨함이 텔로미어 재조합 증가를 유도한다고 제시하고 있다^{12,18,19}. 하지만 ALT 세포에서 텔로미어 염색질의 구조변이가 텔로미어 길이 변화에 어떤 영향을 미치는 지에 관한 연구는 전무하다.

본 연구에서는 ALT 세포주의 염색질 구조가 텔로미어 길이 변화에 미치는 영향을 보기 위하여 ALT 세포에 염색질의 구조 변이를 유도한 다음 텔로미어 길이, APBs 형성, T-SCE 정도를 TSA 처리하지 않은 대조군과 비교 분석하여 텔로머라제 음성인 ALT 세포주에서 염색질의 구조변이가 미치는 영향을 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양

본 실험에서는 2 개의 텔로머라제 음성세포주인 ALT 세포주를 사용하였다. 폐 섬유아세포 WI38-VA13 는 한국세포주은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받았고, 피부 섬유아세포는 CORIELL (Camden, NJ, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 세포 증식 및 유지를 위한 기본 배양액으로 WI38-VA13 은 RPMI 1640 (LONZA, Basel, Switzerland) 배양액에 56 °C에서 30 분간 비활성화시킨 10% 우태아혈청 (FBS, PAA, Pasching, Austria)과 1% penicillin/ streptomycin (PAA, Pasching, Austria)을 첨가하여 배양하였고, 피부 섬유아세포 GM 847 은 최소필수배양액 (MEM, LONZA, Basel, Switzerland) 에 56 °C에서 30 분간 비활성화시킨 10% 우태아혈청과 50ug/ml gentamycin (10mg/mL, Sigma, Saint Louis, MO, USA)을 첨가하여 배양하였다. 모든 세포주는 10cm dish 를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였으며 세포 계대 배양을 위하여 세포를 10cm dish 에서 떼어낼 때에는 Trysin/EDTA (GIBCO, Grand, NY, USA)를 사용하였다.

2. Trichostatin A (TSA) 처리

모든 실험의 TSA (Sigma, Saint Louis, MO, USA)처리는 아래와 같은 방법으로 처리하였다. 세포를 37 °C에서 24 시간 동안 배양 하여 50%정도 자랐을 때, WI38-VA13은 200nM의 TSA를, GM 847은 100nM의 TSA가 포함된 신선한 배양액으로 12시간 마다 교체해 주면서 48시간 동안 처리하였다.

3. Western Blot

세포에 TSA를 처리한 후 염색질의 구조변이를 확인하기 위하여 Western Blot을 수행하였다. 48시간 동안 TSA처리 한 세포의 배양액을 제거한 다음 차가운 PBS로 2번 세척한 후 1200rpm에서 4분간 원심분리하여 세포를 얻었다. 세포의 양에 따라 적정량의 SDS-용해 완충액 (SDS-Lysis buffer: 50mM Tris-Cl, pH7.5/1% SDS/10%glycerol) 을 넣고 초음파분해 (sonication)하여 세포를 용해시킨 후 13000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액만을 얻었다. 추출한 단백질은 DC-단백질 정량 키트 (DC-protein assay kit, Bio-rad, Hercules, USA)를 이용하여 정량 하였다²¹. 단백질은 2X loading dye: 50mM Tris-Cl pH6.8/2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol, 5% mercaptoethanol)과 섞어서 5분간 끓인 후 SDS 가 포함되지 않은 12.5% 젤 (gel)에 lane당 10ug의 단백질을 loading하였으며 150V에서 한 시간 반 동안 분리하였다. 단백질 분리 후 semi-dry transfer (Bio-rad, Hercules, USA)를 이용하여 20V에서 45분간 PVDF 막 (PVDF membrane, GE healthcare, Easton Turnpike Fairfield, CT, USA)으로 옮겨주었다. 5% 스킴밀크 (skim milk, Becton Dickinson and Company, MD, USA)를 이용하여 4℃에서 하루 동안 Blocking하였다. Blocking 끝난 후 TBS-T (Tris Buffered saline: 0.05% Tween 20)로 세척한 뒤 1차 항체 [아세틸 히스톤 H3K9 (Acetyl Histone H3K9, Millipore, Billerica, MA, USA)는 TBS-T에 1:500으로 희석, 아세틸 히스톤 H4K8 (Acetyl Histone H4K8, Cell signaling, Danvers, MA, USA)은 TBS-T에 1:1000으로 희석] 를 넣고 교반기 (Shaker) 위에서 약하게 흔들면서 상온에서 3시간 동안 반응시켜 주었다. 1차 항체 반응이 끝난 후 교반기 위해서 강하게 흔들면서 TBS-T로 10분씩 5번 세척하였다. 2차 항체로 TBS-T 에 1:5000으로 희석한 ECL anti-rabbit IgG (GE healthcare, Easton Turnpike Fairfield, CT, USA)를 넣고 교반기 위에서 약하게 흔들면서 상온에서 1시간 동안 반응시켜 주었다. 2차 항체 반응이 끝난 다음 교반기 위해서 강하게 흔들면서 TBS-T로 10분씩 3번 세척하였다. 동량의 단백질이 로딩된 것을 확인하기 위하여 GAPDH (Abcam, Cambridge, MA, USA)로 확인하였다. GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)는 당을 분해 하는

해당과정 (Glycolysis)의 6번째 단계에 관여하는 효소로서 세포에서 발현양이 일정하므로 동량의 단백질이 로딩양을 확인하기 위한 대조군으로 사용하였다²². 1차 항체 GAPDH (1:20000)와 2차 항체 ECL anti-mouse IgG (GE healthcare, Easton Turnpike Fairfield, CT, USA, 1:5000)는 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 항체 반응이 끝난 PVDF 막에 ECL PLUS (GE healthcare, Easton Turnpike Fairfield, CT, USA)를 뿌려 준 후 필름에 노출시켜 단백질의 발현을 확인하였다.

4. FISH-면역형광염색법

세포에 TSA 를 처리하여 염색질의 구조변이 시킨 후 APBs 패턴에 차이를 확인하기 위하여 FISH-면역형광염색법을 수행하였다. 실험을 수행하기 위하여 6 well plate 에 알코올로 소독한 커버슬라이드를 깔아 주고 Poly-D-Lysine (Sigma, Saint Louis, MO, USA)을 well 당 2mL 넣어 5분 동안 코팅 후 하루 동안 클린 벤치 (clean bench)에서 UV 쬐이면서 건조하였다. 코팅된 커버슬라이드가 놓인 6 well plate 에 세포를 깔아 37 °C에서 TSA 를 48 시간 동안 처리한 후 배양액을 제거하고 차가운 PBS 로 2 번 세척하였다. Triton X-100 완충액 (triton X-100 Buffer: 0.5% Triton X-100/ 50 mM NaCl/ 3 mM MgCl₂/ 300mM Sucrose)를 넣어 준 후 10 분 동안 상온에서 반응시킨 후 차가운 PBS 로 2 번 세척하였다. 세척한 세포에 4% 포르말데하이드/PBS (4% Formaldehyde/PBS)를 넣어 준 뒤 30 분 동안 상온에서 세포를 고정시킨 후 차가운 PBS 를 이용하여 2 번 세척하였다. 다시 triton X-100 완충액을 넣어 10 분 동안 상온에서 반응시킨 후 차가운 PBS 를 이용하여 2 번 세척하였다. 미리 만들어 -20°C에 보관해 두었던 차가운 70% 에탄올을 넣어 준 뒤 4°C 에서 두 시간 이상 세포를 탈수화 한 다음 2X Sodium Chloride/Sodium Citrate (SSC)/ 50% Formamide (2X SSC/ 50% Formamide)넣고 교반기 위에서 약하게 흔들면서 10 분 동안 세척하였다.

세포가 붙어 있는 커버 글라스 하나당 0.1M Tris(pH 7.4) 1 μ l/ Formamide (Sigma, Saint Louis, MO, USA) 2 μ l/ blocking buffer (Roche, Mannheim, Germany) 2 μ l/ MgCl₂ buffer (82mM NaH₂PO₄, 9mM Citric acid, 20mM MgCl₂, pH 7.4) 1 μ l/ 증류수 1 μ l 그리고 Cy3-PNA (Peptide nucleic acid)-CCCTAACCCCTAACCCCTAA 텔로미어 탐침 (telomere probe, 100 μ g/ml, PANAGEN, Korea) 1 μ l이 들어 있는 혼합액 20 μ l를 올린 뒤 슬라이드 위에 올려 주었다. 슬라이드는 80°C에서 5분간 변성시킨 다음 37°C에서 2시간 동안 교배 (hybridization) 시켜 주었다. 교배가 끝난 다음 2X SSC/ 50% Formamide 로 15분씩 2번 세척하고 차가운 PBS 로 10분씩 2번 세척하였다. 차가운 5% BSA/PBS 에 1차 항체인 PML (Abcam, Cambridge, MA, USA)을 1:500으로 희석하여 커버 슬라이드 위에 100 μ l 올려 주고 4°C에서 하루 동안 1차 항체를 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 차가운 5% BSA/PBS 로 5분씩 3번 세척하였다. 2차 항체 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)는 5% BSA/PBS 에 1:400으로 희석하여 커버슬라이드 위에 올려 주고 상온에서 한 시간 동안 반응 시켰다. 2차 항체와 반응이 끝나면 5% BSA/PBS 로 5분 동안 3번 세척하고 차가운 PBS 로 10분 동안 2번 세척하였다. 70% 에탄올로 소독한 슬라이드 위에 수용성 봉입제 (mounting solution, prolong gold antifade reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 200 μ l 팁으로 찍어서 올려 놓고 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 1mg/mL, Sigma, Saint Louis, MO, USA)를 2 μ l를 올려 준 다음 커버슬라이드를 거꾸로 덮어 마무리하였다. 어두운 곳에서 봉입제를 1시간 이상 말린 후 메니큐어를 이용해 가장자리를 붙여 준 다음 -20°C에서 보관하였다.

공초점 현미경 (Confocal microscopy, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 1260 배로 확대하여 사진을 찍었으며 총 3번의 실험을 통해 100여개 세포의 사진을 찍어 분석하였다. Image-pro plus 6.3 (Media cybernetics, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 빨간색의 텔로미어와 초록색의 PML bodies 가 겹쳐져서 노란색으로 보이는 점들의

개수를 측정하였다. 이 때 배경색에 가까운 노란색들은 배제하기 위하여 APBs 넓이가 $0.1 \mu\text{m}^3$ 이상만 되는 APBs 의 개수와 크기를 측정하였다. 총 APBs 수의 유의성 검증을 위한 통계처리는 SPSS 13.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 t-test 와 Chi-square test 를 수행하였으며, p 값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

5. CO-FISH

세포에 TSA 를 처리하여 염색질의 구조변이 시킨 후 T-SCE 빈도수를 측정하기 위하여 CO-FISH 를 수행하였다. 6 well plate 에 알코올로 소독한 커버슬라이드를 깔아 주고 Poly-D-Lysine 을 well 당 2 ml 넣어 준 후 5 분 동안 코팅한 후 하루 동안 클린 벤치에서 UV 쬐이면서 건조하였다. 코팅된 커버슬라이드가 놓인 6 well plate 에 세포를 깔아 37 °에서 100nM TSA 를 48 시간, 10uM BrdU (16.3mM, Sigma, Saint Louis, MO, USA)를 24 시간 그리고 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ colcemid (1mg/mL, Sigma, Saint Louis, MO, USA)를 8 시간 동안 처리하였다. 배양액을 제거하고 PBS 로 2 번 세척 후 37°C 에서 warm-up 한 75mM KCl (KCl buffer, 12.3mM HEPES/ 0.53mM EGTA pH8.0/ 64.4mM KCl) 완충액을 첨가하여 25 분 동안 37°C 에서 반응하였다. 75mM KCl 완충액을 제거한 다음 methanol/acetic acid 를 3:1 로 섞어준 고정액을 상온에서 15분씩 2 번 처리하였다. 그 다음 커버슬라이드를 하루 동안 건조시켰다. 건조된 커버슬라이드는 PBS 에 15 분 이상 담귀 세포를 다시 수화시켰다. 세포를 0.5 mg/ml RNase (10mg/mL, Amresco, Cochran road solon, OH, USA)를 커버슬라이드당 100 μl 씩 올려 준 후 OHP film 을 올려서 RNase 가 커버슬라이드에 퍼지도록 한다. RNase 를 37°C 에서 10 분간 반응시킨 다음 PBS 로 두 번 세척하였다. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33258 (10 mg/ml, Sigma, Saint Louis, MO, USA) 을 2X SSC 에 희석하여 상온에서 10 분간 염색한 후 2X SSC 와

PBS로 각각 세척하였다. 커버슬라이드를 PBS에 담겨 클린 벤치 안에서 30분간 UV 쬐여 주었다. $3\text{U}/\mu\text{l}$ Exonuclease III ($200\text{U}/\mu\text{l}$, Promega, Madison, USA)를 커버슬라이드에 $100\ \mu\text{l}$ 씩 올려 준 후 OHP file을 덮어 커버 슬라이드 위에 퍼지도록 한 다음 37°C 에서 10분간 처리하였다. 세포를 PBS로 15분간 세척 후 4% 포르말데하이드/PBS를 이용하여 2분 동안 고정하고 PBS로 3번 세척하였다. 세척 후 펩신 (Pepsin, Sigma, Saint Louis, MO, USA) 용액 ($1\ \text{mg}/\text{ml}$ 0.01N HCl, pH 2.0)을 넣어 37°C 에서 7.5분간 처리한 후 PBS로 2분씩 2번 세척하였다. 4% 포르말데하이드/PBS로 2분 동안 고정한 다음 PBS로 3번 세척하였다. 세척 후 70, 90, 100% 에탄올에서 각각 2분씩 넣어 줌으로써 세포를 탈수화하고 건조시켰다. 세포가 붙어 있는 커버슬라이드 하나당 0.1M Tris (pH 7.4) $1\ \mu\text{l}$ / Formamide $2\ \mu\text{l}$ / blocking buffer (Roche) $2\ \mu\text{l}$ / MgCl_2 완충액 $1\ \mu\text{l}$ / 증류수 $1\ \mu\text{l}$ 그리고 Cy3-PNA-(CCCTAA)₃ 텔로미어 탐침($10\ \mu\text{g}/\text{ml}$) $1\ \mu\text{l}$ 이 들어 있는 혼합액을 $20\ \mu\text{l}$ 를 알코올로 소독한 커버슬라이드에 올린 뒤 슬라이드를 거꾸로 덮어준다. 커버슬라이드는 상온에서 1시간 동안 교배시켜 준다. 교배가 끝난 다음 슬라이드를 세척액 I (10mM Tris-Cl, pH7.4/ 70% formamide/ 0.1% BSA, pH7.4)으로 10분씩 2번 세척하였다. 다음 세척액 II (0.1M Tris-Cl, pH7.4/ 0.15M NaCl/ 0.1% Tween 20)로 5분씩 2번 세척하였다. DAPI를 PBS에 $6\ \mu\text{l}/\text{ml}$ 로 희석하여 세포를 10분간 염색한 후 교반기 위에서 약하게 흔들면서 PBS로 5분 동안 세척하였다. 그 다음 70, 90, 100% 에탄올에 각각 2분씩 넣어 줌으로써 세포를 탈수화한 후 어두운 곳에서 건조하였다. 70% 에탄올로 소독한 슬라이드글라스 위에 수용성 봉입제를 $200\ \mu\text{l}$ 텡으로 찍어서 올려 놓고 커버슬라이드 위에 거꾸로 덮어 마무리하였다. 어두운 곳에서 봉입제를 1시간 이상 말린 후 메니큐어를 이용해 가장자리를 붙여 준 다음 -20°C 에서 보관하였다^{19,23-27}.

형광현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 1000 배에서 빨간색의 텔로미어와 염색체 모양을 사진 찍었다. 찍은 사진은 DP manager (Olympus, Tokyo, Japan)를 이용하여 하나의 사진으로 만들었다. Image-pro 6.3 를 이용하여 사진을 불러온 뒤 염색체의 모양을 구분 할 수 있어서 분석이 가능한 염색체들을 선별하여 영역을 지정한다. 파란색에 가려진 빨간색의 텔로미어 점들을 보기 위하여 빨간색을 따로 추출하였다. 염색체 모양과 빨간색 텔로미어 점의 위치를 고려하여 T-SCE 가 일어난 염색체와 일어나지 않은 염색체의 개수를 측정 한다. 측정된 T-SCE 빈도의 유의성 검증을 위한 통계처리는 SPSS 13.0 software 프로그램을 이용하여 Chi-square test 를 수행하였으며, p 값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

6. 텔로미어 FISH

세포에 TSA 를 처리하여 염색질의 구조변이 시킨 후 텔로미어의 길이 변화를 관찰하기 위하여 텔로미어-FISH를 수행하였다. 세포를 10cm dish에 깔아 37 °C에서 하루 배양 후 100nM TSA 를 48 시간, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ colcemid 를 8 시간 동안 처리하였다. 배양액을 제거 한 다음 따뜻한 PBS 로 세척하여 준 뒤 Trypsin/ EDTA 를 이용하여 떼어내고 1200rpm 에서 4 분간 원심분리 하여 세포를 얻었다. 37°C에서 warm-up 한 75mM KCl 완충액을 적정량 첨가하여 37°C 에서 25 분 동안 처리하였다. 1200rpm 에서 4 분간 원심분리 한 다음 methanol/acetic acid 를 3:1 로 섞어준 고정액을 넣고 상온에서 15 분 정도 반응시켰다. 그 다음 1200rpm 에서 4 분간 원심분리하고 이 과정을 총 3 번 반복하였다. 양이온이 코팅된 슬라이드 (Superfrost plus, Menzel, Bielefeld, Germany)에 세포를 떨어뜨린 다음 하루 동안 건조시킨 후 슬라이드를 PBS 에 20 분 이상 담궈 세포를 다시 수화시켰다. 4% 포름알데하이드/ PBS 에

슬라이드를 넣고 2 분 동안 고정된 다음 PBS 로 5 분씩 3 번 세척하였다. 슬라이드를 펩신 용액에 넣어 준 뒤 37℃에서 10 분간 처리하였다. PBS 로 2 분씩 2 번 세척 하고 4% 포름알데하이드 / PBS 에 슬라이드를 넣어 2 분 동안 고정하고 세척하였다. 세척 후 70, 90, 100% 에탄올에서 각각 2 분씩 넣어 줌으로써 세포를 탈수화하고 건조시켰다. 세포가 붙어 있는 슬라이드글라스 하나당 0.1M Tris (pH 7.4) 1 μ l / Formamide 2 μ l / blocking buffer (Roche) 2 μ l / MgCl₂ 완충액 1 μ l / FAM-PNA-OOATTCGTTGGAAACGGGA 동원체 탐침 (Centromere probe, 10 μ g/ml, PANAGEN, Korea) 1 μ l 그리고 Cy3-PNA-(CCCTAA)₃ 텔로미어 탐침 (10 μ g/ml) 1 μ l 가 들어 있는 혼합액 20 μ l 를 알코올로 소독한 커버슬라이드에 올린 뒤 슬라이드를 거꾸로 덮어준다. 슬라이드는 80℃에서 3 분간 변성한 다음 상온에서 2 시간 교배시켜 주었다. 교배가 끝난 다음 슬라이드를 세척액 I 으로 15 분씩 2 번 세척하였다. 다음 세척액 II 로 5 분씩 3 번 세척하였다. 앞과 동일한 방법으로 DAPI 염색과 탈수한 후 수용성 봉입제를 이용하여 마무리 하였다²⁸.

형광현미경을 이용하여 1000 배에서 동원체는 노출 시간을 20 초로 고정하고 텔로미어는 노출시간을 10 초로 고정하여 세포 사진을 찍었다. 찍은 사진은 DP manager 를 이용하여 하나의 사진으로 만들었다. Image-pro plus 6.3 을 이용하여 사진을 불러온 뒤 염색체의 모양을 구분 할 수 있는 분석이 가능한 염색체들을 선별하여 영역을 지정하였다. 그리고 빨간색 텔로미어와 초록색 동원체의 형광세기를 측정하기 위하여 따로 색깔을 뽑아낸 다음 선별된 염색체에 해당하는 텔로미어와 동원체 점들의 영역을 지정하였다. 동원체의 형광 세기는 해당 영역안에 점들이 배경색이 포함되지 않는 점들로 인식될 수 있는 형광 세기의 범위를 정한 뒤 자동으로 모든 점들의 형광 세기를 측정한 후 사진별로 평균값을 구하였다. 그리고 텔로미어의 형광 세기는 해당 영역 안에 있으면서 염색체 끝부분에 있는 점들을 일정 크기 원을 이용하여 수동으로 모두 찍어 줌으로써

형광의 세기를 측정하였다. 이렇게 측정한 텔로미어 형광의 세기는 각 사진에 해당하는 동원체 형광 세기의 평균값으로 나눠주어 보정(normalization)한 값에 100 을 곱하여 상대적인 형광세기의 값을 구하였다.

$$\frac{\text{Telomere Intensity}}{\text{Centromere Intensity mean}} \times 100 = \text{Relative Telomere Intensity (\%)}$$

텔로미어 형광 세기의 유의성 검증을 위한 통계처리는 SPSS 13.0 software 프로그램을 이용하여 t-test 와 chi-square test 를 수행하였으며, p 값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

다음은 본 연구의 Study Scheme이다 (Fig. 2).

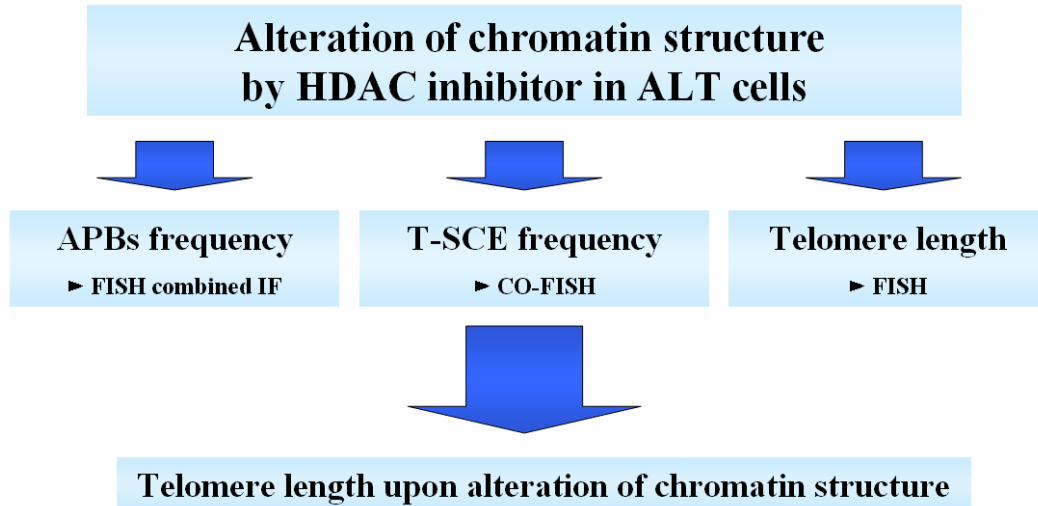


Figure 2. Study Scheme.

III. 결과

1. TSA 처리에 따른 염색질의 구조변이 확인

TSA는 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제의 하나로 히스톤 탈아세틸화 효소 I 과 II를 방해하여 히스톤의 아세틸화가 증가 함으로써 염색질의 구조가 느슨하게 된다²⁹.

ALT인 GM 847에 100nM의 TSA를, WI38-VA13 200nM의 TSA를 48시간 동안 처리한 후 히스톤의 아세틸화 정도를 웨스턴 블로팅 확인하였다. 히스톤의 아세틸화는 히스톤 3의 9번 위치의 라이신기와 히스톤4의 8번째 위치의 라이신기의 아세틸화를 인지하는 항체를 이용하여 검출하였다.

ALT 세포주인 GM 847에 TSA를 처리 하였을 때 GAPDH의 양은 비슷한 반면 아세틸 히스톤 H3K9와 아세틸 히스톤 H4K8의 아세틸화된 히스톤의 양이 증가하였다. 또한 아세틸 히스톤 H3K9과 아세틸 히스톤 H4K8의 증가된 아세틸화된 히스톤 양은 TSA를 처리한 48시간 동안 증가된 상태를 유지 하고 있었다 (Fig. 3a).

또 다른 ALT 세포주인 WI38-VA13에서도 GM 847과 마찬가지로 TSA를 처리 하였을 때 GAPDH의 양은 비슷한 반면 아세틸 히스톤 H3K9와 아세틸 히스톤 H4K8의 발현이 증가하였다. 또한 아세틸 히스톤 H3K9과 아세틸 히스톤 H4K8의 발현은 TSA를 처리한 48시간 동안 발현이 증가된 상태를 유지 하고 있었다 (Fig. 3b).

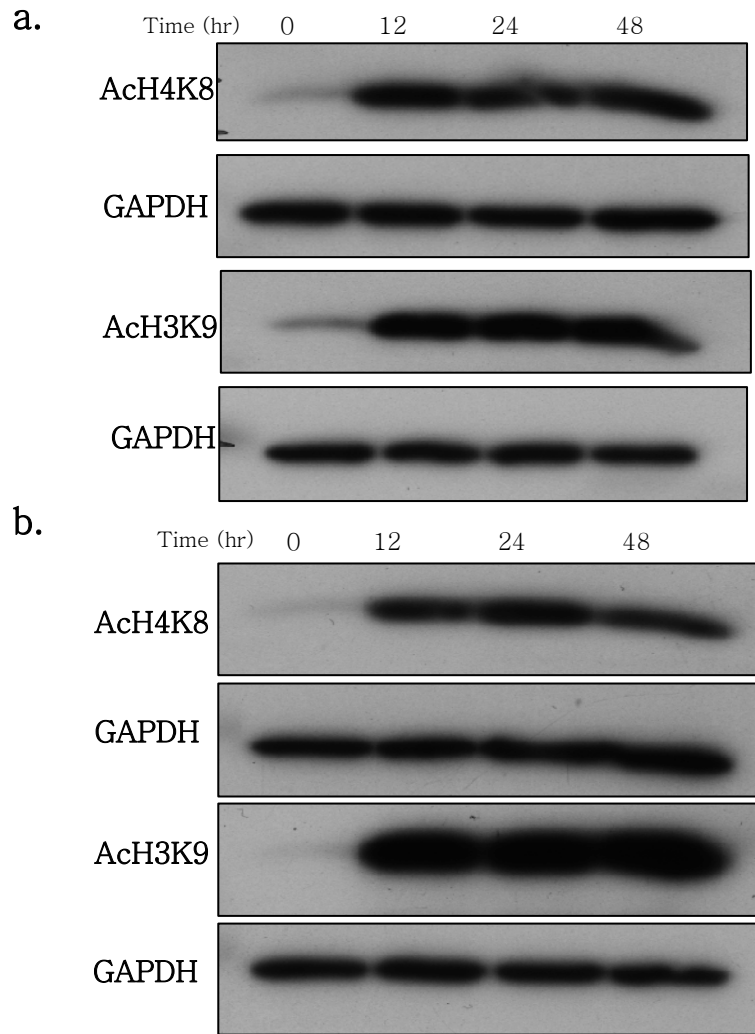


Figure 3. Up-regulation of Histone acetylation upon TSA treatment in ALT cells. ALT cells were treated with TSA for 0h, 12h, 24h, 48h. Western blot analysis of acetylated H3K9 and H4K8 at 0h, 12h, 24h, 48h after TSA treatment. The 10 μ g of total cell lysate was loaded on each lane. GAPDH is loading control. a, GM 847. b, WI38-VA13.

2. 염색질 구조변이에 따른 APB 패턴의 변화

ALT 세포주에 TSA를 처리하여 염색질의 구조변이 시킨 후 APBs 패턴에 차이를 확인하기 위하여 FISH-면역형광염색법을 수행하였다. 실험은 3번의 실험을 통하여 총 100개의 세포를 분석하였으며 배경색에 가까운 APBs들은 제거하기 위하여 APBs 크기가 $0.1\mu\text{m}^3$ 이상인 것만은 측정하였다.

Fig 4a는 공초점 현미경을 통해 찍은 TSA 처리하지 않은 GM 847 세포와 처리한 GM 847 세포의 대표적인 사진을 나타내고 있다. 빨간색 점은 텔로미어로 세포마다 많은 수의 텔로미어 점들이 위치하고 있었다. 또한 ALT세포주의 특징 중 하나가 다양한 텔로미어의 길이인데 현미경을 통해 찍은 사진을 보면 다양한 텔로미어의 크기를 볼 수 있었고 이것은 다양한 텔로미어의 길이를 나타내고 있었다. 초록색 점은 PML bodies로서 세포 내에서 다양한 크기로 나타나고 있었다. 노란색 점은 APBs로 텔로미어와 PML bodies가 같은 곳에 위치 함으로써 노란색으로 나타난다. 이러한 노란색 점의 개수를 측정함으로써 APBs 패턴의 변화를 확인하였다. TSA를 처리 하지 않았을 때보다 TSA를 처리하였을 때 APBs의 크기와 개수가 증가하는 것을 볼 수 있었다.

GM 847에 TSA를 처리한 후 크기가 $0.1\mu\text{m}^3$ 이상인 APB를 가진 APBs 양성 세포 수, 세포당 APBs 수, 총 APBs 수를 대조군과 비교하였다 (Fig. 4b). TSA를 처리 하지 않은 대조군에서는 APBs 양성 세포수가 100개중에 30개로 30%였으나 TSA를 처리하였을 때에는 100개중에 63개인 63%로 증가하였다 ($p < 0.001$). 또한 세포당 APBs의 개수를 살펴 보기 위하여 5개 이하의 APBs를 가진 세포수와 6개 이상의 APBs를 가진 세포수를 나누어 분석하였다. 5개 이하의 APBs를 가진 세포수는 TSA를 처리하지 않았을 때에는 각각 100개중에 30개 (30%)였으나 TSA를 처리하였을 때에는 각각 100개중에 56개 (56%)로 증가하였다 ($p < 0.001$). 또한 6개

이상의 APBs를 가진 세포수는 TSA를 처리하지 않았을 때에는 100개중에 0개 (0%)였으나 TSA를 처리 하였을 때에는 100개중에 7개 (7%)로 증가하였다 ($p<0.05$). TSA 처리에 따른 APBs 크기를 비교하였을 때 대조군의 APBs 크기는 대부분 $0.4\mu\text{m}^3$ 이하에 위치하고 있으나 TSA를 처리하였을 때에는 APBs가 크기가 $0.4\mu\text{m}^3$ 이하에서 뿐만 아니라 그 이상의 큰 크기에서도 많이 분포하고 있었다 ($p<0.001$, Fig. 4c).

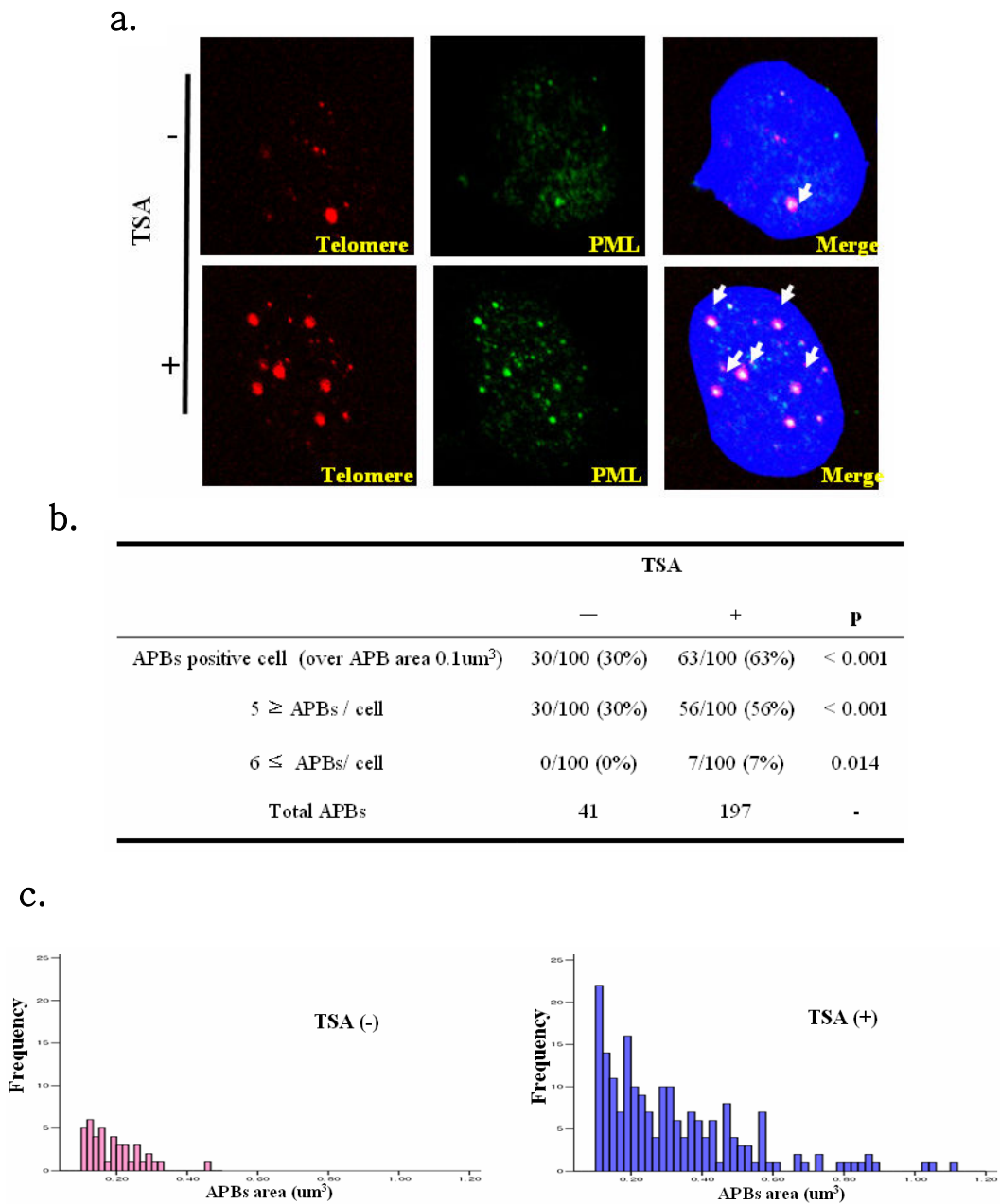


Figure 4. APBs pattern changes upon TSA treatment in GM 847. GM 847 was treated with 100nM TSA. Cells were permeabilized, fixed, dehydrated and hybridized with Cy3-PNA-(CCCTAA)₃ telomere probe. Cells were immunofluorescence-stained with PML antibodies. a, representative figure of APBs formation on GM 847 with TSA or without TSA. APBs (yellow) were analyzed by examining of telomere (red) and PML (green) in nucleus (blue). b, Quantitation of APBs formation. c, APBs area changes upon TSA treatment ($p < 0.001$ by t-test).

이러한 결과가 다른 ALT 세포에서도 발견되는지 확인하기 위하여 또 다른 ALT 세포인 WI38-VA13을 이용하여 같은 실험을 수행하였다. Fig 5a는 공초점 현미경을 통해 찍은 TSA 처리하지 않은 WI38-VA13 세포와 처리한 WI38-VA13 세포의 대표적인 사진을 나타내고 있다. WI38-VA13 의 경우 GM 847에 비하여 텔로미어 점들이 작은 경향을 나타내고 있었다.

WI38-VA13 에 TSA를 처리한 후 크기가 $0.1\mu\text{m}^3$ 이상인 APB를 가진 APBs 양성 세포 수, 세포당 APBs 수, 총 APBs 수를 대조군과 비교하였다 (Fig. 5b). WI38-VA13의 경우 TSA를 처리 하지 않았을 때에는 APBs 양성 세포수가 100개중에 18개로 18%였으나 TSA를 처리하였을 때에는 100개중에 38개인 38%로 증가하였다 ($p < 0.001$). 또한 세포당 APBs의 개수를 살펴 보기 위하여 5개 이하의 APB를 가진 세포수와 6개 이상의 APB를 가진 세포수를 나누어 분석하였다. 5개 이하의 APB를 가진 세포수는 TSA를 처리하지 않았을 때에는 각각 100개중에 17개 (17%)였으나 TSA를 처리하였을 때에는 각각 100개중에 31개 (31%)로 증가하였다 ($p < 0.05$). 또한 6개 이상의 APBs를 가진 세포수는 TSA를 처리하지 않았을 때에는 100개중에 1개 (1%)였으나 TSA를 처리 하였을 때에는 100개중에 7개 (7%)로 증가하는 경향을 보였다 ($p = 0.065$). TSA 처리에 따른 APBs 크기를 비교하였을 때 대조군의 APBs 크기는 대부분 $0.3\mu\text{m}^3$ 이하에 위치하고 있으나 TSA를 처리하였을 때에는 APBs가 크기가 $0.3\mu\text{m}^3$ 이하에서 뿐만 아니라 그 이상의 큰 크기에서도 많이 분포하고 있었다 ($p = 0.275$, Fig. 5c).

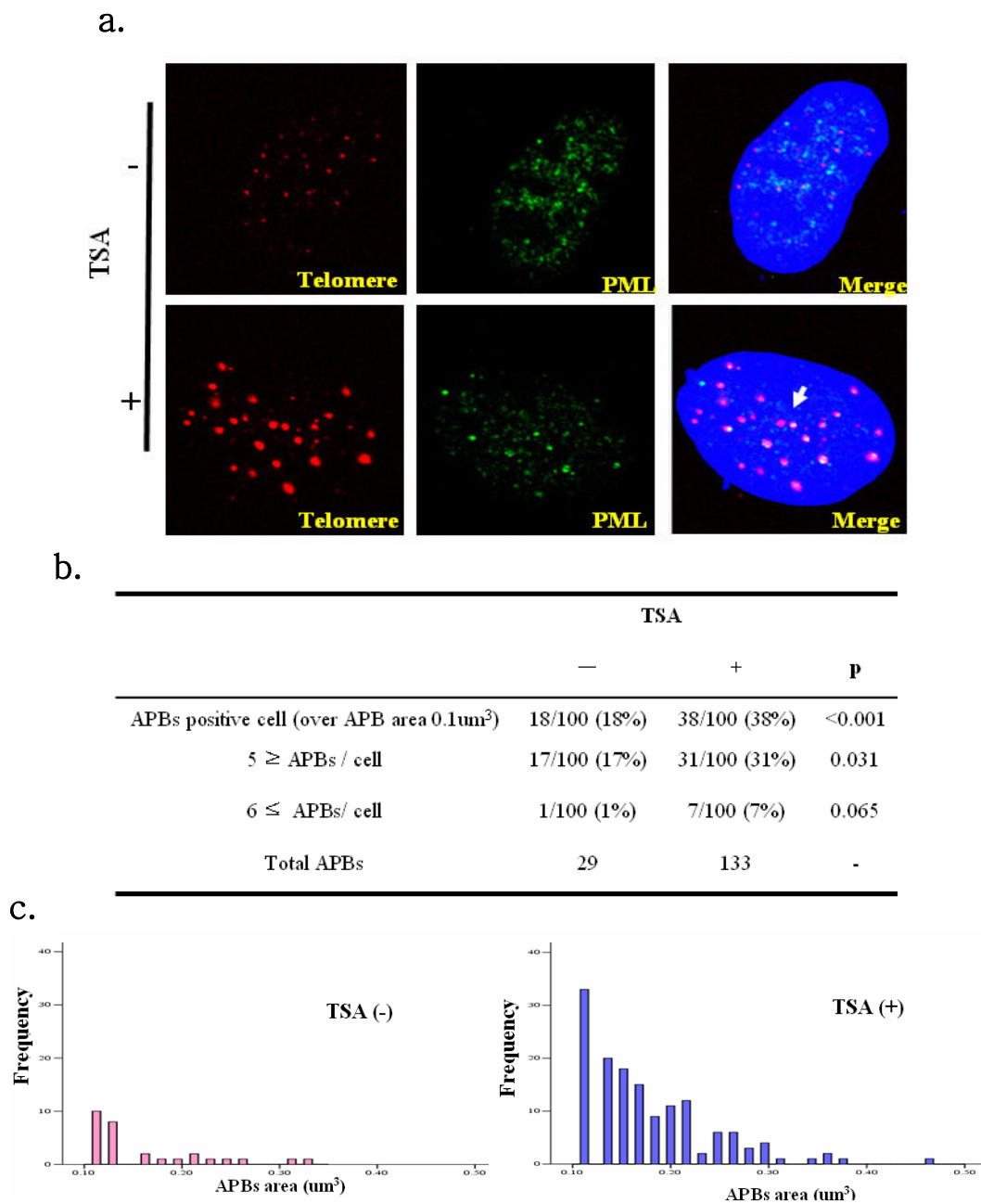


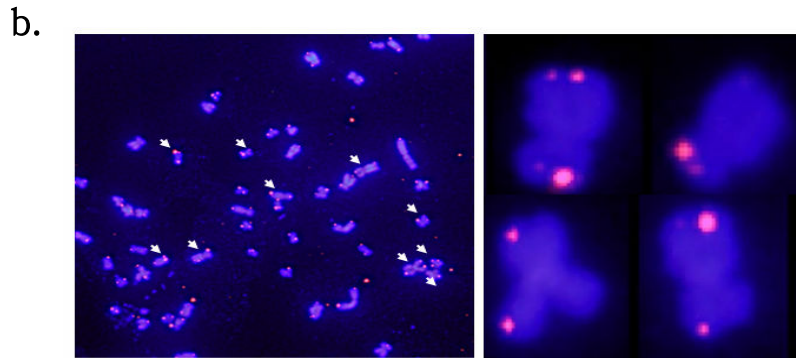
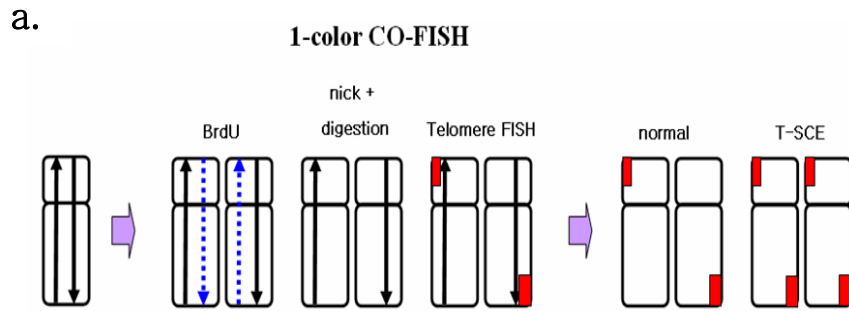
Figure 5. APBs changes upon TSA treatment in WI38-VA13. WI38-VA13 was treated with 100nM TSA. Cells were permeabilized, fixed, dehydrated and hybridized with Cy3-PNA-(CCCTAA)₃ telomere probe. Cells were immunofluorescence-stained with PML antibodies. a, representative figure of APBs formation on WI38-VA13 with TSA or without TSA. APBs (yellow) were analyzed by examining of telomere (red) and PML (green) in nucleus (blue). b, Quantitation of APBs formation. c, APBs area changes upon TSA treatment ($p=0.275$ by t-test).

3. 염색질 구조 변이에 따른 T-SCE 빈도의 변화

ALT 세포주인 GM 847에 TSA를 48시간 동안 처리한 후 T-SCE 빈도의 변화를 보기 위하여 CO-FISH를 수행하였다. 총 3번의 실험을 수행하였으며 TSA처리 안 한 세포와 처리한 세포 각각 1026개 염색체의 T-SCE 빈도를 측정하였다.

Fig 6a는 CO-FISH 방법의 원리로, BrdU를 배양액에 넣어 준 후 하루 동안 세포를 배양하면 새롭게 만들어지는 DNA 가닥 (Strand)에는 BrdU를 포함하게 된다. UV를 쬐여주게 되면 BrdU가 들어가 있는 DNA가닥은 틈 (nick)을 형성하게 되고 Exonuclease III을 처리하게 되면 틈이 있는 가닥만이 분해 (degradation) 된다. 처음 한 가닥만을 텔로미어 탐침을 이용하여 교배한다. 정상적인 염색체는 대각선으로 빨간색 점을 보이게 되지만 텔로미어 간에 재조합이 일어난 염색체는 대각선뿐만 아니라 염색체의 모든 부분에서 빨간색 점이 나타날 수 있다. 이러한 염색체를 측정함으로써 텔로미어 재조합의 빈도를 확인하였다. Fig 6b는 CO-FISH를 수행 후 형광 현미경을 이용하여 찍은 GM 847 세포의 대표적인 염색체를 나타냈다. DAPI로 염색한 염색체 사진과 텔로미어 사진을 합쳐준 사진이다. 염색체 끝부분에 빨간색 텔로미어를 확인 할 수 있었다. 그 중에서 하얀색 화살표가 가리키는 염색체는 텔로미어의 재조합이 일어난 염색체를 의미한다. 텔로미어의 재조합이 일어난 염색체 모습을 나타내고 있다. 텔로미어의 재조합이 일어나지 않을 경우 대각선으로 텔로미어가 나타나지만 재조합이 일어나면서 4가지의 형태로 텔로미어가 나타난다 (Fig. 6b).

TSA 처리 하지 않은 세포와 처리하지 않은 염색체의 T-SCE 빈도를 비교하였을 때, 대조군에서는 1026개 중에 215개 (20.9%)의 염색체에서 텔로미어 재조합이 일어났으나 TSA를 처리 하였을 때에는 1026개 중에 262개 (25.5%)로 TSA를 처리하였을 때 T-SCE 빈도가 5% 증가하였다 ($p=0.014$, Fig 6c, d).



c.

		TSA	
		-	+
T-SCE frequency	1 st	56/233 (24.0%)	113/402 (28.1%)
	2 nd	120/484 (24.8%)	71/187 (38.0%)
	3 rd	39/309 (12.6%)	78/437 (17.8%)
	total	215/1026 (20.9%)	262/1026 (25.5%)

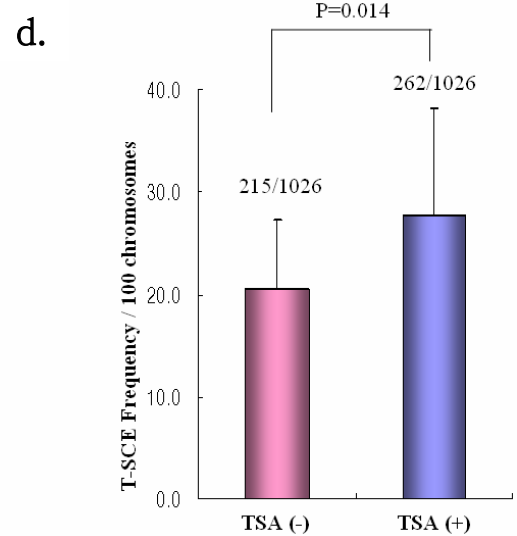


Figure 6. Change of T-SCE frequency upon TSA treatment in GM 847. GM 847 was treated with 100nM TSA for 48h, 10uM BrdU for 24h and 2 μ g/ml colcemid for 8h. Cell was hypotonic treatment, fixed, UV irradiation, digestion, dehydrated and hybridized with Cy3-PNA-(CCCTAA)₃ telomere a, Principle of 1-color CO-FISH. BrdU incorporated newly synthesized strand. UV irradiation made nick and Exo III degraded nicked strand. Chromatid was hybridized with telomere probe. b, Representative figure of chromosomes. blue-DAPI, red-telomere. c, Quantitation of T-SCE frequency in total 1026 chromosomes from three separate experiments. d, T-SCE frequency per 100 chromosomes (p=0.014 by chi-square test).

4. 염색질 구조 변이에 따른 텔로미어 길이의 변화

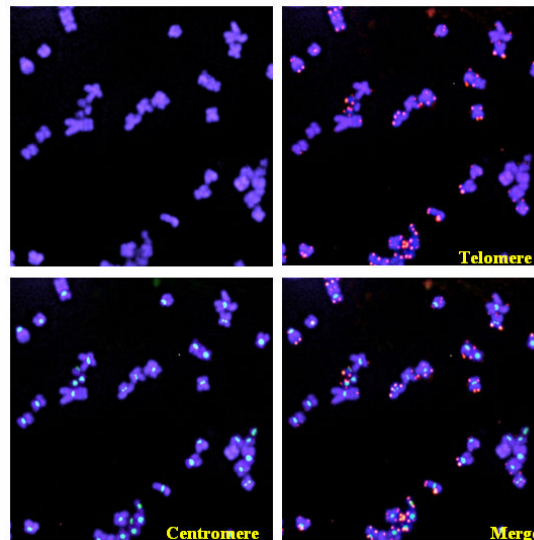
ALT 세포주인 GM 847에 TSA를 48시간 동안 처리한 후 텔로미어 길이의 변화를 보기 위하여 텔로미어 FISH를 수행하였다. TSA 처리 안 한 GM 847의 764개 텔로미어와 TSA를 처리 한 767개 텔로미어의 형광세기를 측정하였다. 측정된 텔로미어의 형광세기는 텔로미어의 길이를 의미하여 TSA처리에 따른 텔로미어 형광 세기를 비교 함으로써 텔로미어 길이 변화를 측정하였다.

Fig 7a는 텔로미어 FISH 수행 후 형광현미경을 이용하여 찍은 GM 847 세포를 나타내었다. DAPI가 염색된 염색체는 다양한 형태와 길이를 가지고 있었다. DAPI가 염색된 염색체와 빨간색의 텔로미어를 합쳐보면 염색체 끝부분에 빨간색의 텔로미어가 위치하는 것을 확인할 수 있었다. 많은 수의 염색체들이 끝부분에 각각 텔로미어를 가지고 있음을 볼 수 있었다. 텔로미어의 크기는 다양하였으며 이것을 텔로미어의 길이가 다양하다는 것을 의미하는 것으로 ALT 세포주의 특징을 보여주고 있다. 동원체는 텔로미어의 형광세기를 보정하기 위하여 텔로미어 탐침과 함께 교배하였다. DAPI로 염색된 염색체와 초록색의 동원체를 합쳐보면 대부분의 염색체가 중간에 초록색의 동원체를 나타내고 있었다. 염색체, 텔로미어 그리고 동원체를 모두 합쳤을 때 대부분의 염색체의 중간에는 초록색의 동원체가 끝부분에는 빨간색의 텔로미어가 위치하고 있었다.

텔로미어와 동원체의 형광세기는 Image-pro 6.3을 이용하여 측정하여, 실험방법에서처럼 각 사진에서 동원체 형광세기의 평균값으로 텔로미어 형광값을 나눠준 후 100을 곱하여 동원체 형광세기로 보정된 텔로미어 형광세기를 구하였다. 이렇게 구한 텔로미어 형광의 세기는 텔로미어의 길이를 의미한다. TSA처리를 하지 않은 GM 847의 텔로미어 형광세기 평균은 29.8%이며 많은 수의 텔로미어 형광세기는 40%이전에 위치하고 있었으며 특히 20%에서 40% 사이에 많이

위치하고 있었다. TSA를 처리한 GM 847의 텔로미어 형광 세기 평균은 25.11%로 TSA를 처리하지 않았을 때 보다 약 4% 감소하였으며 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.001$, Figure 7b). 그 중에서도 TSA처리 안 한 세포에 비하여 TSA 처리 한 GM 847 에서 형광세기가 20%보다 낮은 쪽 빈도수가 유의하게 증가하였다 ($p < 0.001$).

a.



b.

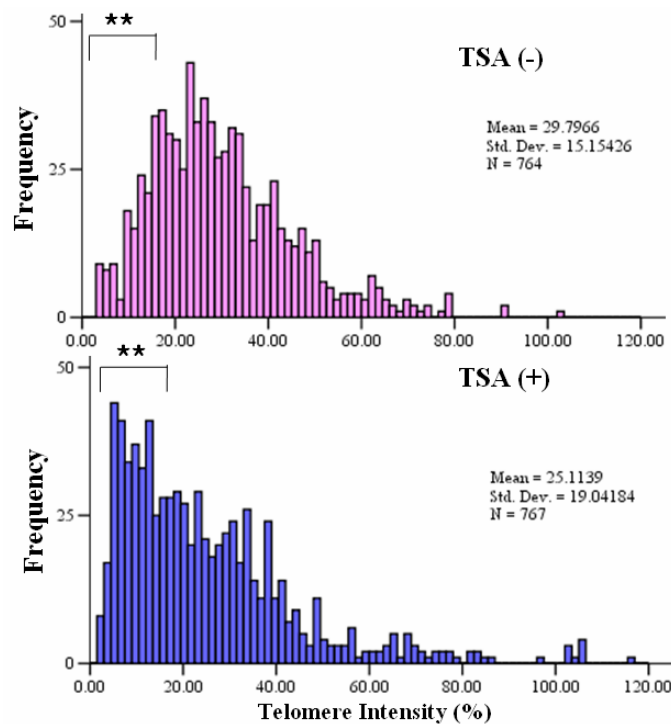


Figure 7. Telomere length change upon TSA treatment in GM 847. GM 847 was treated with 100nM TSA for 48h and 2ug/ml colcemid for 8h. Cell was treated with hypotonic 75mM KCl buffer, fixed, dehydrated and hybridized with Cy3-PNA-(CCCTAA)₃ telomere probe and FAM-PNA-OOATTCGTTGGAAACGGGA centromere probe. a, Representative figure of chromosomes. blue-DAPI, red- telomere, green- centomere. b, Telomere intensity distribution of GM 847 with TSA or without TSA. Telomere intensity was measured by Image pro 6.3. Telomere intensity was normalized by centromere intensity (p<0.001 by t-test).

IV. 고찰

염색체의 말단에 위치한 텔로미어는 염색체의 손상을 방지 하고 있으며 유전체의 안정성에 기여를 한다. 대부분의 불멸화된 세포는 텔로머라제를 활성화 시킴으로써 텔로미어를 유지하지만 소수의 세포에서는 텔로머라제와는 무관하게 텔로미어의 재조합을 통하여 텔로미어를 유지한다. 텔로머라제 양성 암세포에서 메틸화를 감소시켜 주어 염색질의 구조를 느슨하게 하여 주었을 때 텔로미어의 길이가 길어졌으며 히스톤 메틸기 전달효소를 제거한 세포는 염색질의 구조가 느슨하게 변하고 그와 관련하여 텔로미어의 길이가 길어짐을 보고하였다¹²⁻¹⁸. 또한 DNA 메틸기 전달효소가 제거된 세포에서도 텔로미어의 염색질 구조가 느슨하게 변하고 텔로미어 길이가 길어졌다¹⁹. 이러한 결과들을 보았을 때 염색질의 구조변이는 텔로미어의 길이 조절과 밀접한 관계가 있음을 시사한다. 텔로미어 길이 유지는 발암과정에 있어서 중요한 요소이며 중요한 항종양 표적이 될 수 있어 텔로미어 길이 조절에 관한 기초 이해가 필요하다.

따라서 본 논문에서는 ALT 세포주에서 염색질의 구조가 텔로미어의 길이에 미치는 영향을 보고자 하였다. 염색질의 구조를 변화 시키기 위하여 ALT세포주에 TSA를 처리하였다. TSA는 히스톤 탈아세틸화 효소를 억제 함으로써 히스톤의 아세틸화를 증가 시키고 이것은 염색질의 구조를 느슨하게 만든다. 히스톤의 아세틸화 증가를 확인하기 위하여 Western Blot을 수행하였다. GM 847과 WI 38-VA13의 히스톤 아세틸화를 증가시키는 각각의 TSA농도와 48시간 동안 히스톤의 아세틸화를 유지시키는 조건을 확립하였다. 아세틸 H3K9과 아세틸 H4K8을 이용하여 2가지 위치에서 아세틸화 증가를 확인하였다. TSA를 처리 하였을 때 두 가지 세포주에서 모두 로딩 대조군인 GAPDH의 양은 비슷한 반면 아세틸

H3K9과 아세틸 H4K8의 발현을 증가하였으며 이것은 48시간 동안 유지되었다.

GM 847에 TSA를 처리하여 염색질의 구조를 느슨하게 변화 시켜준 후 APBs 를 확인해 보았을 때 APBs의 개수와 크기의 증가를 확인하였다. PML bodies의 경우 TSA처리에 따라서 크기의 큰 변화가 없는 것으로 보여지지만 텔로미어의 경우에는 TSA 처리하였을 때 대조군에 비하여 상대적으로 커지는 것으로 보여졌다. 이러한 텔로미어의 크기 증가가 APBs 크기 증가를 유도하는 것으로 보여지며 텔로미어 크기의 증가는 텔로미어의 길이 증가로 추측해 볼 수 있다. 또 다른 ALT 세포주인 WI38-VA13에서도 유사하게 APBs 개수와 크기가 모두 증가하는 것을 보여주었다. GM 847 세포만큼 유의하게 증가하지는 않았으나 증가하는 경향을 나타내었다. 이것은 TSA에 의하여 증가한 히스톤의 아세틸화가 GM 847 에 비하여 상대적으로 낮았기 때문이라고 추측할 수 있다. 또한 WI38-VA13의 경우 사진 찍을 때 GM 847과 같은 노출 시간으로는 텔로미어가 잘 잡히지 않았고 노출시간을 증가시켜 주었을 때 관찰이 가능하였다. 이러한 차이는 텔로미어 길이가 GM 847에 비하여 상대적으로 짧기 때문이라고 추측할 수 있다. 그러나 WI38-VA13에서도 TSA에 의한 텔로미어의 크기가 커짐을 관찰 할 수 있었다.

Mouse embryonic stem cell의 DNA 메틸화와 히스톤의 메틸화를 감소 시킴으로서 염색질의 구조를 느슨하게 해 주었을 때 APBs의 형성이 증가한 결과와 마찬가지로^{18,19}, 본 실험에서도 TSA에 의해 이미 APBs가 형성되어 있는 ALT 세포주에서도 APBs의 형성의 증가를 보여 주었다. APBs형성은 텔로미어 재조합이 일어남을 보여주는 간접적인 증거로 TSA처리에 따른 APBs형성의 증가는 ALT 세포주에서 일어나는 텔로미어의 재조합이 좀 더 빈번하게 일어났을 수 있으며 이러한 T-SCE의 증가는 텔로미어 길이 연장을 추측하게 한다.

염색질의 구조 변화와 텔로미어 재조합과 직접적인 연관성을 보기 위하여 ALT 세포주인 GM 847에 TSA를 처리하여 텔로미어 재조합을 확인할 수 있는 T-SCE

빈도를 측정하였다. 대조군에 비하여 TSA를 처리하였을 때 T-SCE 빈도가 약 5% 증가 하였다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 mouse embryo stem cell과 텔로머라제 양성 암세포주에서 메틸화 감소에 따른 염색질의 구조 변화로 인하여 T-SCE 빈도의 증가가 일어난 실험 결과와 마찬가지로^{12,18-19}, 본 실험 에서도 TSA처리에 따른 염색질의 구조 변화가 ALT세포주의 T-SCE를 증가시킴을 보여주었다. 이것은 염색질의 구조가 텔로미어의 재조합과 밀접한 관련이 있음을 보여주고 있다.

염색질의 구조 변이에 의한 T-SCE 빈도의 증가가 텔로미어의 길이에 영향을 주었는지 확인하기 위하여 ALT 세포주인 GM 847에 TSA를 처리하여 텔로미어 FISH를 수행하였다. 선행된 실험에서 TSA에 의하여 염색질의 구조가 느슨하게 변하였을 때 APBs와 T-SCE 빈도의 증가가 일어난 결과를 바탕으로 텔로미어의 길이가 증가를 추측하였다. 그러나 본 실험에서는 대조군에 비하여 TSA를 처리하였을 때 텔로미어 길이를 의미하는 텔로미어 형광 세기가 감소 하였다 ($p < 0.001$). 이러한 결과는 mouse embryo stem cell의 메틸화 감소에 따른 T-SCE 빈도와 텔로미어 길이가 증가했다는 보고¹⁸와는 상반되는 결과로 ALT세포주의 염색질의 구조 변이는 T-SCE 빈도는 증가 시켰지만 텔로미어 길이에 는 영향을 미치지 못하고 오히려 텔로미어 길이를 감소시켰음을 보여주었다. 이것은 TSA처리 한 시간이 짧아서 ALT 메커니즘에 의한 텔로미어 길이 연장 시간이 부족하였거나 염색질의 구조 변이로 인하여 ALT 메커니즘에 의한 텔로미어 길이 연장이 한계가 있을 수 있는 가능성을 생각해 볼 수 있다.

현재까지 ALT 세포주에서 염색질의 구조와 텔로미어 길이 조절에 관한 연구는 미비한 실정이었다. 본 연구 결과는 ALT세포에서 염색질 구조가 텔로미어 재조합과 밀접한 관계가 있음을 보여주고 있다. 또한 이러한 결과는 텔로머라제 음성 세포주에서 텔로미어 길이 조절 메커니즘을 이해하는데 도움을 줄 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구는 ALT 세포주의 염색질 구조를 느슨하게 변화했을 때 ALT 세포주의 특징인 APBs 형성의 변화와 그에 따른 텔로미어의 길이를 확인하였으며, 텔로미어 재조합에 차이가 있는지 조사하였다.

연구의 결과를 종합하면

1. 염색질의 구조를 느슨하게 변화 시켜 주었을 때 APBs 양성 세포수, 세포당 APBs 의 개수, 총 APBs 의 수 그리고 APBs 의 크기가 모두 증가하는 것을 확인하였다.
2. 염색질의 구조를 느슨하게 변화 시켜 주었을 때 텔로미어의 재조합이 좀더 빈번하게 일어남을 확인하였다
3. 염색질의 구조를 느슨하게 변화시켜 주었을 때 텔로미어의 길이 감소를 확인하였다.

본 연구 결과는 ALT 세포에서 염색질 구조가 텔로미어 재조합과 밀접한 관계가 있음을 보여주고 있다. 또한 이러한 결과는 텔로머라제 음성 세포주에서 텔로미어 길이 조절 메커니즘을 이해하는데 도움을 줄 것으로 생각된다.

참고문헌

1. De Boeck G, Forsyth RG, Praet M, Hogendoorn PC. Telomere-associated proteins: cross-talk between telomere maintenance and telomere-lengthening mechanisms. *J Pathol* 2009; 217:327-44.
2. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:6622-6
3. Wellinger RJ, Sen D. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer* 1997; 33:735-49.
4. Cesare AJ, Reddel RR. Telomere uncapping and alternative lengthening of telomeres. *Mech Ageing Dev* 2008; 129:99-108.
5. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266:2011-5.
6. Nittis T, Guittat L, Stewart SA. Alternative lengthening of telomeres (ALT) and chromatin: is there a connection?. *Biochimie*. 2008; 90:5-12.

7. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991;350(6319) :569-73.
8. Wei W, Sedivy JM. Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures. *Exp Cell Res* 1999; 253:519-22.
9. Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 2002;21:598-610.
10. Yang Q. Cellular senescence, telomere recombination and maintenance. *Cytogenet Genome Res* 2008; 122:211-8.
11. Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet* 2007; 8:299-309.
12. Vera E, Canela A, Fraga MF, Esteller M, Blasco MA. Epigenetic regulation of telomeres in human cancer. *Oncogene* 2008; 27:6817-33.
13. Johnson FB, Marciniak RA, McVey M, Stewart SA, Hahn WC, Guarente L. The *Saccharomyces cerevisiae* WRN homolog Sgs1p participates in telomere maintenance in cells lacking telomerase. *EMBO J* 2001; 20:905-13.
14. Wu G, Lee WH, Chen PL. NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem* 2000; 275:30618-22.

15. Yankiwski V, Marciniak RA, Guarente L, Neff NF. Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:5214-9.
16. Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res* 1999; 59:4175-9.
17. Zhu XD, Küster B, Mann M, Petrini JH, de Lange T. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* 2000; 25:347-52.
18. Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, Schotta G, Klatt P, Jenuwein T et al. Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. *Cell Biol* 2007; 78:925-36.
19. Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E, Esteller M et al. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 2006; 8:416-24.
20. Ogino H, Nakabayashi K, Suzuki M, Takahashi E, Fujii M, Suzuki T et al. Release of telomeric DNA from chromosomes in immortal human cells lacking telomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248:223-7.

21. Strasák L, Bártoová E, Harnicarová A, Galiová G, Krejčí J, Kozubek S. H3K9 acetylation and radial chromatin positioning. *J Cell Physiol.* 2009 ;220:91-101.
22. Tarze A, Deniaud A, Le Bras M, Maillier E, Molle D, Larochette N et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* 2007; 26 : 2606–2620.
23. Potts PR, Yu H. The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nat Struct Mol Biol* 2007 ; 14:581-90.
24. Bailey SM, Cornforth MN, Kurimasa A, Chen DJ, Goodwin EH. Strand-specific postreplicative processing of mammalian telomeres. *Science.* 2001; 293:2462-5.
25. Al-Wahiby S, Wong HP, Slijepcevic P. Shortened telomeres in murine scid cells expressing mutant hRAD54 coincide with reduction in recombination at telomeres. *Mutat Res.* 2005; 578:134-42.
26. Al-Wahiby S, Slijepcevic P. Chromosomal aberrations involving telomeres in BRCA1 deficient human and mouse cell lines. *Cytogenet Genome Res.* 2005; 109:491-6.
27. Fan Q, Zhang F, Barrett B, Ren K, Andreassen PR. A role for monoubiquitinated FANCD2 at telomeres in ALT cells. *Nucleic Acids Res* 2009; 37:1740-54.

28. Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 1996; 5:685-91.

29. Vanhaecke T, Papeleu P, Elaut G, Rogiers V. Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view. *Curr Med Chem* 2004; 11: 1629–43.

Abstract

The effect of chromatin structure on regulation of telomere length
in telomerase negative ALT cells

A Ra Jung

Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Sun Young Rha)

Telomeres are DNA–protein complexes at the ends of linear eukaryotic chromosomes and composed of tandem repeats of a TTAGGG sequence ending in a 3' single-stranded overhang, or the G-strand overhang. Telomeres confer chromosomal stability protecting chromosome ends. Maintaining telomere length is important process in tumorigenesis and it has been suggested that telomeres are important target for cancer therapy. Most immortalized human cell lines maintain and extend their telomere by activating telomerase, while a small number of cells maintain and extend their telomere lengths without telomerase by homologous recombination of telomeres, which is called as alternative lengthening of telomere (ALT). Recently, it has been known that chromatin structure is closely related to regulation of telomere length. However, in ALT cells the effect of chromatin structure on regulation of telomere length is not understood. Here,

we investigated the effect of chromatin structure on regulation of telomere length in telomerase negative ALT cells. We induced change of chromatin structure by treating Trichostatin A (TSA), Histone deacetylase inhibitor, in ALT cells. Then, we measured APBs (ALT associated PML bodies) patterns by FISH (Fluorescence in situ hybridization) combined IF (Immunofluorescence staining), T-SCE (Telomere Sister Chromatid Exchange) frequency by CO-FISH (Chromosome Orientation-FISH) and telomere lengths by telomere FISH. We compared the number of APBs positive cells in ALT cells with or without TSA. In GM 847 (ALT cell), APBs positive cells were found to be more frequent in GM 847 with TSA (63/100) compared to GM 847 without TSA (30/100) ($p < 0.001$). A similar result was found in other ALT cell line, WI38-VA13. APB positive cells were more frequent in WI38-VA13 with TSA (38/100) compare to WI38-VA13 without TSA (18/100), ($p < 0.001$). Increased T-SCE frequency was found in GM 847 with TSA (262/1026, 25.5%) compared to GM 847 without TSA (215/1026, 20.9%), ($p < 0.001$). however, decreased telomere length was found in GM 847 with TSA (telomere intensity mean 25.11%) compared to GM 847 without TSA (telomere intensity mean 29.8%), ($p < 0.001$). This study demonstrated a close association between chromatin structure and telomere recombination in ALT cells and this result might provide insight into the mechanism of regulation of telomere length in telomerase-negative cells.

Key Words : ALT cells, chromatin structure, telomere