

Changes of Telomerase Activity and Proliferation by Inhibition of Reverse Transcriptase Activity in Human Cancer Cell

Hyun-Jung Ji^{1,3}, Kyu-Hyun Park, Ph.D.¹, Tae-Soo Kim¹, Sun-Young Rha, M.D., Ph.D.^{1,3}, Nae-Choon Yoo, M.D.^{1,2}, Jun-Myung Kim, M.D., Ph.D.², Jun-Suk Kim, M.D., Ph.D.⁴, Jae-Kyoung Roh, M.D., Ph.D.^{1,2,3}, Woo-Ick Jang, M.D., Ph.D.⁵ and Hyun-Cheol Chung, M.D., Ph.D.^{1,2,3}

¹Cancer Metastasis Research Center, ²Department of Internal Medicine, ³Brain Korea 21 Project for Medicine Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul; ⁴Department of Hemato-oncology, Korea University College of Medicine, Seoul; ⁵Lilly Korea, Ltd., Seoul, Korea

Purpose: Activation of telomerase is proposed to be an essential step in cancer cell immortalization and cancer progression. 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT), a reverse transcriptase inhibitor, was reported to be incorporated in telomeric sequences of immortalized cells in culture and to suppress the activity of telomerase and the cell proliferation. In this study, after induction of cancer cell senescence with long-term treatment of AZT, we investigated the dynamics of telomerase subunits (hTERT, hTR, TEP), transcription factors (c-Myc, Mad1), telomerase activity, and finally, telomere length in a human breast cancer cell line.

Materials and Methods: Human breast cancer cell (MDA-MB-231) was treated with AZT. Senescence was measured by senescence-associated β -gal staining and apoptosis was counted by dTd enzyme assay. Telomerase activity (by TRAP assay), expression of telomerase subunit genes (by RT-PCR and real-time PCR) and

telomere length (by Southern blot analysis) were measured after the AZT treatment.

Results: We found evidences of senescence, apoptosis and growth delay after AZT treatment. In addition, AZT-treated cancer cells showed inhibition of telomerase activity and shortening of telomere length in a dose- and duration-dependent way. Among the telomerase subunits, hTERT and c-Myc were the first factors to change after AZT treatment, subsequently, followed by the changes of hTR, Mad1 and TEP.

Conclusion: The suppression of hTERT and c-Myc by AZT treatment was the initial genetic phenomenon, subsequently followed by the changes of hTR, Mad1 and TEP. (*Cancer Research and Treatment 2002;34:223-233*)

Key Words: Telomerase, Senescence, Reverse transcriptase inhibitor, hTERT, c-Myc

서 론

세포는 무한정 분열하지 않고 어느 적당한 시간이 되면 분열이 멈추는 노화(senescence) 단계에 다다르게 된다. 이는 telomere의 소실로 인한 현상으로써 telomere는 세포가 노화로 이르게 되는 것을 조절해 준다(1). 이와 같이 'mitotic clock'으로 작용하는 telomere는 염색체 말단의 단순 반복된 DNA 절편으로써 인간에서는 염기서열이(TTAGGG)_n로 이루어져 있다(2). Telomere의 기능은 핵 안에서 염색체를 보

호하면서 다른 염색체와의 비정상적인 결합을 방지하고 DNA복제를 도와주는 역할을 하면서, 세포 분열 시에는 염색체 분리를 돕는다(3). DNA polymerase의 'end-replication problem'에 의하여 염색체가 한 번 분열 시 telomere에서 보통 50~200 nucleotide가 제거된다(4). 따라서 지속적인 telomere 감소는 결국 세포 주기를 지연시키고, 세포노화를 유발하여 세포가 죽게 된다(5).

Telomere는 telomerase라는 효소에 의해 길이가 유지되는데 telomerase는 리보핵단백질(6)로 자체의 RNA 주형을 가지고 역전사를 하여 telomere에 TTAGGG의 반복서열을 붙여줌으로써 telomere의 길이를 유지시켜준다. Telomerase의 구조는 telomere의 상보적인 서열을 가지는 RNA (TR)와 catalytic 기능을 가진 TERT와의 복합체로 이루어져 있다. hTR은 telomere와 상보적인 결합을 하는 부분이며(7) telomerase를 구성하고 활성을 조절하는 단백질에는 hTR과 결합하는 단백질인 telomerase associated protein 1 (TEP1)과 역

Correspondence: Hyun Cheol Chung, Cancer Metastasis Research Center, Yonsei University College of Medicine, 134 Sinchondong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea. (Fax) 02-393-3652, (E-mail) unchung8@yumc.yonsei.ac.kr

Received December 7, 2001, Accepted May 7, 2002

This work was supported by Yonsei University Research Fund of 1999.

전사 효소의 활성을 가지는 단백질인 hTERT가 있다(8). hTERT는 hTERT에서만 특징적으로 나타나는 T-motif와 모든 역전사 효소에서 일반적으로 나타나는 6개의 motif로 구성되어 telomerase의 활성화에 직접적인 관련이 있다. hTERT의 발현조절은 hTERT의 promoter 부분에 전사조절인자의 결합으로 인한 전사 조절 작용과 alternative splicing, 또한 전사후 조절작용으로 hTERT 단백질의 인산화 현상이 알려졌다(9,10). 대표적으로 전사조절인자에는 hTERT의 발현을 증가시키는 c-Myc(11)과 반대작용을 하는 Mad(12)가 알려져 있다.

계속된 세포분열로 인하여 telomere가 짧아지게 되면 'Hayflick limit'이라는 상태에 이르러 세포는 수명이 다하여 죽게 되지만, 일부 세포는 이때 어떤 요인에 의해 세포노화를 극복하게 되는 형질전환이 일어난다. 이후 형질 전환된 세포 중에서 대부분은 telomerase가 활성화 되지 않기 때문에 crisis에 도달하여 죽게 되지만 telomerase가 활성화된 일부 세포는 불멸화된다. 불멸화 되는 과정에는 telomerase의 활성화에 의해서, 또는 telomere의 길이를 유지시킬 수 있는 다른 대체적인 기전이 작용하기도 한다(13).

Telomerase는 대부분의 정상세포에서는 발현되지 않고 줄기 세포나 생식 세포에서 활성화되어 있다. 특징적으로 암세포에서 높은 활성을 나타내며 진행된 암일수록 그 활성도가 높다(14). 그러므로 telomerase의 활성을 억제한다면 암의 증식도 억제할 수가 있어 실제로 telomerase를 억제하여 암의 증식을 억제하려는 연구가 많이 행해지고 있다. 예를 들어, hTR을 억제하기 위해 hTR에 대한 anti-sense nucleotide를 처리하거나(15), hammerhead ribozyme을 제작하거나, catalytic component인 hTERT를 억제하기 위한 연구들이 그것들이다.

Telomerase는 RNA 성분들과 복합체를 이루어 존재하는 역전사 효소(reverse transcriptase: RT)이므로 hTERT에 대한 억제제를 사용하여 telomerase의 활성을 억제시킬 수가 있다. 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT)와 같은 역전사 효소 억제제가 이러한 개념으로 연구되고 있고 AZT는 처음 ADIS의 치료에 사용되었는데 그 작용기전은 AZT가 세포 내에서 thymidine kinase에 의해 AZT-MP로, thymidylate kinase에 의해 AZT-DP로, 그리고 nucleoside diphosphate kinase에 의해 AZT-TP로 인산화되며, AZT-TP는 바이러스 역전사 효소 활성을 저해할 뿐 아니라 바이러스 DNA의 thymidine 자리에 대신 들어가서 DNA 합성을 막는다(16,17). AZT-MP는 바이러스 DNA로 삽입되어 바이러스 DNA의 복제를 종결시키고 template와 primer의 결합을 불활성화시킨다(18). 그러나 AZT의 치료법은 골수세포의 증식을 억제하고 빈혈과 호중구 감소증을 유발하는 등 여러 가지 부작용을 초래하

였고, 또한 세포 배양시 세포에 독성을 주었으며, 동물모델에서 AZT의 투여는 암을 유발하기도 하였다(19,20). 동물모델에서는 AZT의 독성이 너무 강하여 직접적인 항암제로 사용되는 것은 힘들지만, AZT는 telomeric DNA에 결합하여 telomerase의 활성화와 telomere를 감소시키므로 *in vitro* 모델에서 AZT에 의한 telomerase의 활성을 연구하기에는 좋은 약제이다.

본 연구에서는 역전사 효소 억제제를 투여하여 세포노화를 유도하는 과정에서 telomerase subunit 변화의 역학 관계와 telomere, telomerase 활성화도의 변화 관계를 조사함으로써 telomerase 활성화의 억제를 위한 중요한 생물학적 자료를 정립하였다.

재료 및 방법

1) 연구 재료

유방암 세포주인 MDA-MB-231 (ATCC HTB 26)을 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 계대배양하면서 실험에 이용하였다. Primer는 GENSET (Singapore Biotech, Singapore)에서 구입하여 사용하였으며, 동위원소는 Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ)에서, 시약은 Sigma (St Louis, MO)에서 구입하여 사용하였다

2) 연구 방법

(1) 세포배양: MDA-MB-231을 minimum essential medium (GIBCO BRL, Grand Island, NY) 배양액에 열로 비활성화시킨 10% 우태아혈청(GIBCO BRL)과 penicillin 100 unit/ml 과 streptomycin 100µg/ml (GIBCO BRL)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 세포는 완전히 증식한 뒤 hemocytometer로 수를 세고 획득한 세포를 5배로 희석하여 새 배양용기에 배양하였다. 0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO BRL)를 사용해 세포를 획득하여 실험에 사용하고 나머지는 -70°C에 냉동 보관하였다. 세포의 population doubling (PD)은 공식에 의하여 구하였다. $2^{PD} = (\text{dilution factor})$, $\log 2^{PD} = \log (\text{dilution factor})$, $PD = \log (\text{dilution factor}) / \log 2 = \log 5 / \log 2 = 2.32$, $PD = 2.32 \times (\text{passage number})$

(2) MTT 실험에 의한 세포 독성도 측정: MTT 검사는 실험에 사용할 약물 농도를 결정하고자 실행하였다. 배양된 MDA-MB-231 세포를 0.25% Trypsin-EDTA를 사용하여 단일 부유된 세포로 만든 후, trypan blue로 염색하여 세포의 수를 계산한 다음, 5×10^3 개에 해당하는 세포를 96-well plate에 분주하였다. 각각의 분주된 세포를 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 16시간 배양한 후 AZT를 농도별로 희석하여 분주하였고, 대조군에는 약제대신 동량의 생리 식염수를

첨가하였다. Plate를 4일간 배양한 후 2 mg/ml MTT 50 μ l를 각 well에 첨가하여 세포배양기에서 4시간 배양하였다. 배양이 끝난 plate를 450 \times g에서 10분간 원심 분리하였다. 바닥의 formazan 결정이 제거되지 않도록 주의하면서 상층액을 제거하고 150 μ l의 DMSO를 첨가하여 37°C에서 10분 동안 formazan 결정을 용해시켰다. ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정 후 실험군의 색소흡수율을 대조군이 색소흡수율과 비교하여 생존율을 구하였다. 구하여진 생존율을 바탕으로 각 세포마다 약제에 대한 inhibitory concentration, 10% (IC₁₀), 20% (IC₂₀)의 농도를 구하여 세포 배양에 사용될 농도로 결정하고 실험 시 배지에 첨가하였다.

(3) 세포 성장을 측정: 약물에 의한 세포 성장을 변화를 측정하기 위하여 5 \times 10⁴개 세포를 culture plate에 배지와 함께 각각 접종하였다. 24시간 간격으로 6일간 매일 세포 수를 hemocytometer를 사용하여 측정하였다. 세포 수의 측정은 3개의 well에서 측정한 값을 평균내어 구하였다. 날짜별로 얻어진 세포 수의 평균 값으로 세포 성장 곡선을 그리고 성장억제율을 측정하였다.

(4) Senescence-associated (SA) β -gal stain: β -galactosidase를 이용하여 세포노화 현상을 측정하였다. 세포를 24-well plate에 5 \times 10⁴개를 분주한 다음 16시간 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하였다. 세포가 plate에서 떨어지지 않도록 phosphate buffered-saline (PBS)로 세척한 다음 2% formaldehyde/ 0.2% glutaraldehyde (또는 3% formaldehyde)로 상온에서 5분간 고정시켰다. PBS로 고정액을 제거한 다음 senescence-associated-galactosidase stain 용액 [40 mM citric acid/sodium phosphate buffer (pH6.0), 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂]에 20 mg/ml X-gal 용액을 mg/ml이 되도록 첨가한 뒤 37°C에서 16시간동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 PBS로 세척한 다음 현미경으로 염색된 부분을 확인하였다. 100배의 배율에서 현미경으로 관찰하면서 같은 부분이 겹치지 않도록 5군데를 세었으며 총 세포 수 중에서 염색된 세포의 수를 측정하여 평균을 내어 세포노화 정도를 측정하였다.

(5) 세포사멸 측정: 약물에 의해 DNA 손상을 받은 세포에서 세포사멸 양상을 알아보기 위하여 Apoptaq Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Intergen company, Purchase, NY)를 사용하여 세포사멸을 측정하였다. 96-well plate에 1 \times 10⁴개의 세포를 분주한 다음 16시간 배양하였다. PBS로 세척한 후 1% paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정시킨 후 ethanol: acetic acid 2 : 1로 5분간 -20°C에서 고정시켰다. Kit 내에 포함된 완충액과 dTd 효소를 사용하여 37°C, 1시간 동안 배양한 후 효소 반응을 정지시켰다. Diaminobenzidine

(DAB, DAKO Corporation, Carpinteria, CA)로 30초 동안 발색시키고 0.5% methyl green을 상온에서 15분간 반응하여 배경 염색을 한 후 현미경으로 염색된 부분을 확인하였다. 100배의 배율에서 현미경으로 관찰하면서 같은 부분이 겹치지 않도록 5군데를 세었으며 총 세포 수 중에서 염색된 세포의 수를 측정하여 평균을 내어 세포사멸 정도를 측정하였다.

(6) TRAP assay에 의한 telomerase 활성도 측정: Telomerase의 활성은 telomeric repeat-amplification protocol (TRAP) assay의 변형된 방법에 의해 측정하였다(22). Telomerase 활성화의 양성 대조군은 telomerase 활성도 양성으로 알려진 293세포(ATCC CRL 1573)의 리보핵 단백질로 하였다. 리보핵단백질 대신 CHAPS lysis buffer을 넣은 검체를 음성 대조군으로 하여 TRAP 반응의 정확성을 부여하였다. 일부 세포에 Taq polymerase 억제제가 포함되어 있기 때문에 PCR을 억제하는 효과를 가져올 수 있으므로 36염기쌍을 만드는 internal control primer 쌍으로 PCR의 적절성을 평가하였다. 세포를 PBS로 세척하고 TRAP 세척 용액[10 mM HEPES-KOH (pH7.5), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM dithiothreitol]을 넣고 10,000 \times g, 4°C에서 1분간 원심 분리하였다. 세포를 가라앉힌 후 차가운 lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM PMSF, 5 mM-mercaptoethanol, 10% glycerol]를 넣은 후 잘 섞어 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응액은 14,000 \times g, 4°C에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하여 리보핵단백질을 분리하고 Bradford method로 단백질을 정량하였다. 0.5 μ g의 리보핵단백질을 0.1 μ g TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'), 0.1 mg BSA, 62.5 M deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)를 포함한 TRAP 용액[20 mM Tris-HCl (pH8.3), 1.5 mM MgCl₂, 63 mM KCl, 0.005% Tween 20, 1 mM EGTA]에 30분간 30°C에서 반응시켰다. 반응액을 PCR용액과 1.5 mM MgCl₂, 40 nM dNTP, 4 ng NT primer (ATCGCTTCTCGGCCTTTT), 3.2 \times 10⁻²¹ M TSNT primer (AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGCCGAGAAGCGAT), 50 ng ACX primer (GCGGCGGCTTACCCTTACCTTACCCTA), 1.25 unit Taq polymerase (GIBCO BRL), 2.5 μ Ci [α -³²P]dCTP (Amersham Pharmacia)를 첨가하여 PCR을 시행하였다. Thermocycle은 94°C에서 3분 동안 가열한 뒤 94°C에서 30초, 60°C에서 30초를 27회 반복하고 PCR 결과물을 12% polyacrylamide gel에 전기영동하고 말린 후 autoradiography하였다. Telomerase 활성도의 정량분석은 R8 control template (R8)을 이용하여 수행하였고 공식에 의하여 total product generated (TPG)를 구하였다. TPG=[(T-B)/CT]/[(R8-B)/CR8] \times 100 (T: total intensity of telomerase-mediated bands from tested extract, B: intensity from the negative control (background), CT: intensity from IC of tested extract, R8:

intensity from R8 control, CR8: intensity from IC of R8).

(7) RT-PCR에 의한 telomerase subunits (hTERT, hTR)의 발현 정도 측정: TRIzol-reagent (GIBCO BRL)를 이용하여 RNA를 분리한 후 정량하였다. cDNA 합성과정은 First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)를 사용하였다. 방법은 1.6µg의 RNA에 1 mM dNTPs, 0.2µg random hexamer primer, 20 units ribonuclease inhibitor, 40 units M-MLV reverse transcriptase가 포함된 반응 용액 [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT]을 섞어 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 70°C에서 10분간 가열해 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 1.5µCi [α -³²P]dCTP, 5 mM dNTP, 1.5 units Taq polymerase를 넣어 PCR을 시행하였으며 hTERT의 PCR 반응은 5 pM primer TERT 1784S (CGGAAGAGTGCTCTGG AGCAA), TERT 1928A (GGATGAAGCGGAGTCTGGA)와 정량적인 측정을 위하여 β -actin primer 774 (GGGAATTCAAAGT GGAACGGTGAAGG), 775 (GGAAGCTTATCAAAGTCTT CGGCCACA)를 2.5 pM씩 섞어 PCR 증폭반응을 시행하였다. 처음 94°C에서 3분간 변성반응을 시킨 후 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초 동안 30회 반복하였으며 hTR의 PCR은 2.5 pM primer TR-46S (CTAACCTAACTGAGAAGG GCGTAG), TR-148A (GAAGGCGGCAGGCCGAGGCTTTT CC)와 5 pM β -actin internal control primer 5899 (CAGGT CATCACCATTGGCAATGAGC), 5900 (CGGATGTCCACGT CAACTTCATGA)을 같이 첨가한 후 94°C에서 3분간 변성 반응을 시킨 후 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초 동안 22회 반복하여 PCR반응을 수행하였다. PCR 반응물은 5% polyacrylamide gel에 전기영동하여 말린 후 autoradiography하였다. 정량분석은 각각 sample의 β -actin internal control에 대한 PCR결과 생성된 band의 intensity를 수치화하여 비교하였다.

(8) Real-Time PCR을 이용한 TEP, c-Myc, Mad1의 발현 정도 측정: 위의 방법으로 합성한 cDNA를 사용하여 telomerase subunits와 중요한 전사조절인자로 알려진 유전자에 대해 realtime PCR을 수행하여 그 발현정도를 비교하였다. 발현도를 비교하고자 한 유전자는 hTERT, hTR, c-Myc, Mad1, TEP이며 β -actin을 사용하여 정량분석을 시행하였고 사용한 primer 염기서열은 다음과 같다. c-Myc-S (5'-AAG TCCTGCGCCTCGCAA-3'), c-Myc-AS (5'-GCCTGTGGCCT CCAGCAGA-3'), Mad1-S (5'-TTCAGACTTGGACTGTGTC A-3'), Mad1-AS (5'-ACGCTGAGAGATGAAGTTGT-3'), TEP-S (5'-TCAAGCCAAACCTGAATCTGAG-3'), TEP-AS (5'-CCC GAGTGAATCTTTCTACGC-3'). 합성된 cDNA에 QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, Santa Clarita, CA)를 사용하였다. Kit 내 포함된 HotstarTaq DNA polymerase, QuantiTect

SYBR Green PCR buffer, dNTP mix including dUTP, SYBR Green I, ROX (passive reference dye), 5 mM MgCl₂가 포함된 반응용액에 QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix를 첨가하였으며 각각 PCR 과정마다 비교하고자 하는 primer 0.5µM를 첨가하여 최종 20µl로 PCR을 수행하였다. Rotor-Gene 2072D (Corbett Research, Australia)를 사용하여 처음 95°C에서 15분간 반응시킨 후 94°C에서 15초, 60°C에서 20초, 72°C에서 20초씩 45회 반복하여 PCR 과정을 실시하였다. 실험은 3회 반복하여 평균값을 구하였다

(9) Southern blot hybridization에 의한 terminal restriction fragment (TRF) 측정: 세포를 300µg/ml Proteinase K와 50µg/ml RNase A가 포함된 DNA lysis buffer로 분해한 후, phenol/chloroform 추출법과 ethanol 침전법으로 DNA를 추출하여 정량하였다. 10µg의 DNA를 제한효소 Hinf (Promega, Madison, WI) 15 unit으로 DNA를 절단한 후, 0.8% agarose gel에 전기영동하였다. Gel을 증류수로 세척한 후 변성용액(0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)으로 상온에서 30분 동안 흔들어 주는 변성과정을 2번 반복하였고, 증류수로 gel을 세척한 다음 중화용액(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-Cl, pH 8.0)으로 상온에서 30분 동안 흔들어 주면서 중화시켰다. DNA를 Hybond-N membrane (Amersham Pharmacia)으로 transfer시키기 위한 capillary transfer 장치를 준비하고 10X SSC 용액(1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate)으로 16시간 동안 DNA transfer 과정을 수행하였다. Transfer가 끝난 후에 UV cross linking을 실시한 후 membrane은 42°C에서 1시간 동안 pre-hybridization시켰다. [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mM)로 lable된 5'-[TTAGGG]₆-3'를 첨가하여 42°C에서 16시간 동안 hybridization시켰다. Pre-hybridization 용액은 Rapid-Hyb buffer (Amersham Pharmacia)을 사용하였으며 hybridization도 역시 같은 용액으로 실시하였다. 사용된 probe는 30 pM [TTAGGG]₆에 50 pM [γ -³²P]

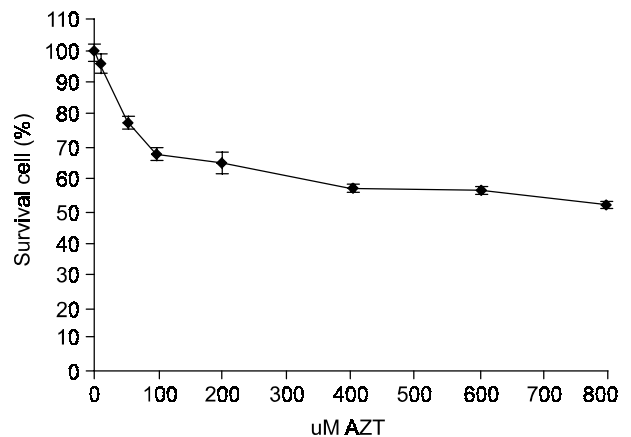


Fig. 1. Dosage determinant of MDA-MB-231 by MTT assay

ATP를 넣고 20 unit의 T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, Beverly, MA)를 사용하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 0.1 mM EDTA (pH 8.0)으로 반응을 중단시킨 후 MicroSpin™ G-25 column (Amersham Pharmacia)을

이용한 spin column chromatography 방법을 이용하였다. Hybridization이 끝난 membrane을 1차 세척용액 (2X SSC, 0.2% SDS)로 15분 동안 상온에서 가볍게 흔들어 주면서 2번 세척하고 2차 세척용액(0.1X SSC, 0.1% SDS)로 42°C에

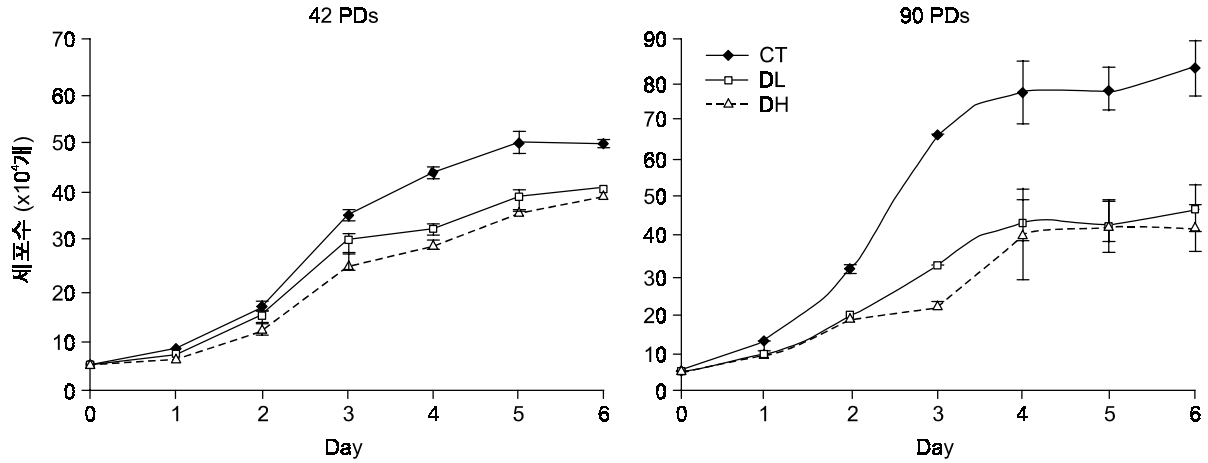


Fig. 2. Growth curve of MDA-MB-231. CT (◆): control, DL (□): low dose, DH (△): high dose, PDs: population doublings.

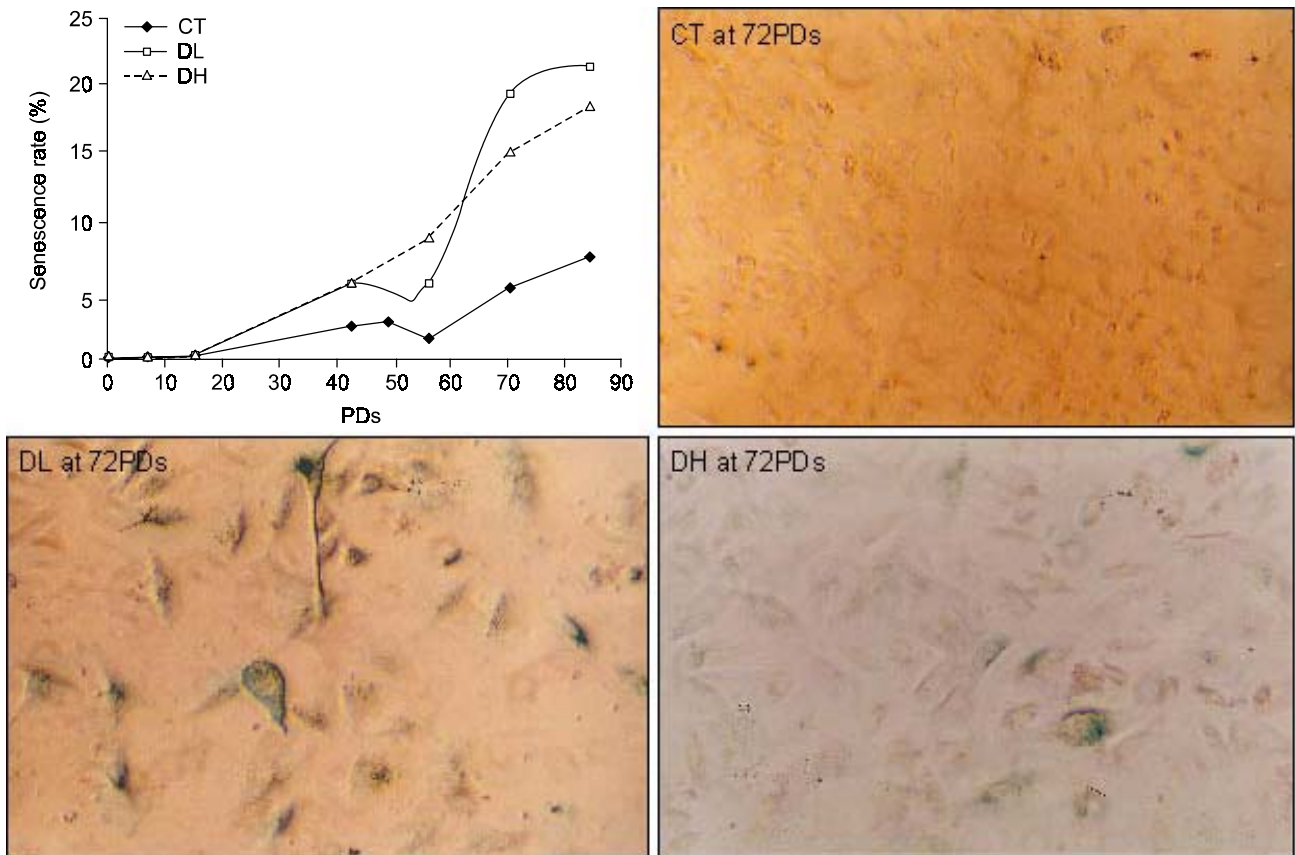


Fig. 3. Expression of senescence by SA β -gal stain in MDA-MB-231. CT (◆): control, DL (□): low dose, DH (△): high dose, PDs: population doublings.

서 10분간 세척한 후 0.1X SSC로 씻고 난 뒤 autoradiography를 실시하였다. TRF의 평균값은 다음의 공식에 의하여 계산하였다(4). $TRF(\text{mean}) = \frac{\sum (OD_i \times L_i)}{\sum (OD_i)}$, OD_i : signal intensity over interval i , L_i : kilobase size at the middle of interval i .

결 과

1) MTT assay를 이용한 AZT의 농도 결정

AZT를 처리하였을 때 10% 세포성장 억제농도(10% growth inhibitory concentration, IC_{10})와 20% 억제농도(IC_{20})를 구하였다. 낮은 농도의 AZT (low dose; DL)는 25 μ M로 결정하였고 높은 농도의 AZT (high dose; DH)는 50 μ M로 결정하였다(Fig. 1). 또한 약제를 처리하지 않고 같은 방법으로 대조군(CT)의 세포를 이용하여 실험을 수행하였다.

2) 세포 성장 곡선으로 측정한 세포의 성장률

약제 투여 초기에는 대조군 세포와 약을 처리한 세포에서 성장률의 차이가 없었으나 42 PD부터 성장이 지연되어 성

장 억제율이 low dose (25%)와 high dose (33%)이던 것이 90 PD에서는 각각 50%, 66%에 이르렀다. 두 세포주 모두에서 PD와 AZT의 농도에 유의하게 성장율이 감소하였다 (Fig. 2).

3) 세포노화 측정

초기에는 세포노화에 이른 세포가 거의 관찰되지 않았으며 42 PD에서 대조군이 2%인데 반하여 low dose (5.4%), high dose (5.8%)에서 2.5배 이상 증가하였다. 56 PD에서는 10배 이상 증가하였으며 PD가 증가할수록 세포노화도 계속 증가하였다. 형태학적으로 세포노화의 염색 정도는 핵 주변의 세포질 부분에 푸르게 염색되는 것이 관찰되며 또한 모양이 비정상적으로 커진 세포의 수가 증가되었다 (Fig. 3).

4) 세포사멸 측정

초기 PD에서는 세포사멸 정도에 변화가, 50 PD 이후부터 low dose, high dose에서 세포사멸이 급격히 증가하였다. 49 PD에서 대조군(0.8%)에 비해 low dose (2.6%), high dose

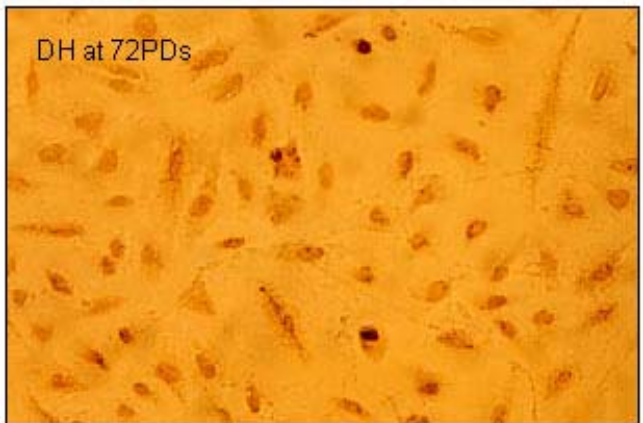
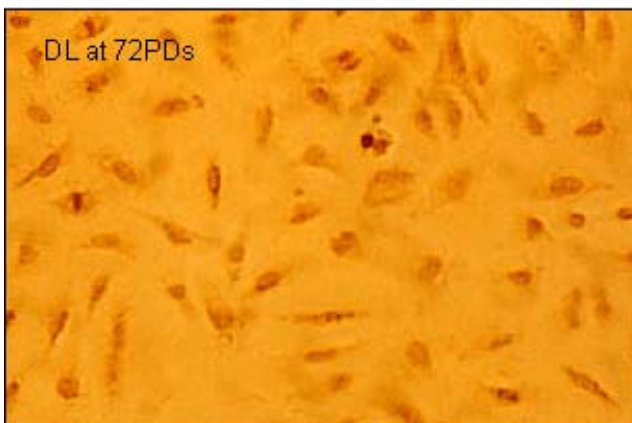
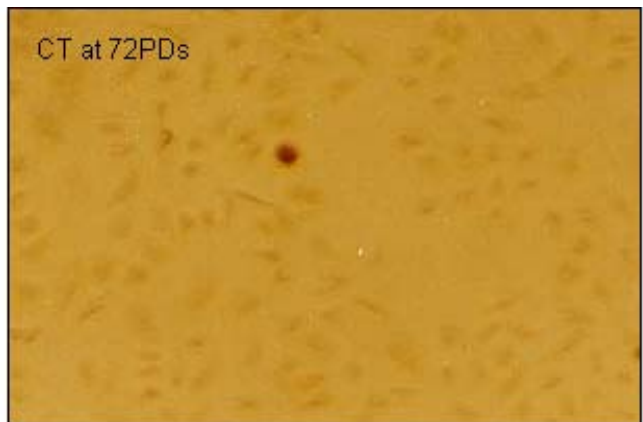
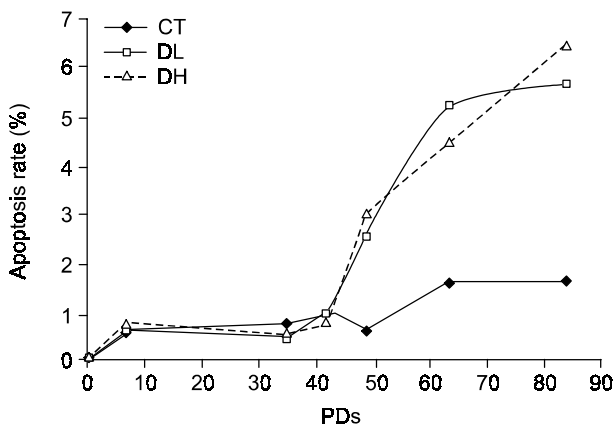


Fig. 4. Apoptosis detection by TUNEL assay in MDA-MB-231. CT (◆): control, DL (□): low dose, DH (△): high dose, PDs: population doublings.

(2.9%) 모두에서 3배 이상 증가하기 시작하였고, PD가 증가할수록 세포사멸정도도 계속하여 급격히 증가하였다(Fig. 4).

5) TRAP assay로 telomerase 활성도 비교

Telomerase의 활성 측정은 변형된 TRAP assay법에 의해 시행하였다. 먼저 양성 대조군인 293 세포의 핵단백질에서는 telomerase 활성이 관찰되었고, 핵단백질 대신 lysis buffer 만 넣은 음성대조군에서는 PCR 결과 TRAP band는 나타나지 않고 IC band만 나타난 것으로 quality control을 시행하였다. TRAP assay 결과, 대조군은 PD가 증가하더라도 telomerase가 지속적으로 활성화되었으나, AZT를 처리한 세포

에서는 telomerase의 활성이 감소하였다. 대조군과 약처리한 세포 모두 telomerase가 상당히 활성화된 상태였기에 그들간의 차이를 구별하기가 쉽지 않았으나 signal을 분석하여 보면 약하긴 하여도 대조군과 dose 세포간의 차이가 나타났다. Low dose 세포는 42 PD 이후부터 유의하게 감소하기 시작하였고 PD에 비례하여 감소하였다. High dose는 초기에 telomerase 활성이 감소하여 PD가 증가하여도 감소된 정도를 유지하였다. 결론적으로 대조군에 비해 low dose, high dose에서 42 PD에서 근소하게나마 감소하였다(Fig. 5).

6) RT-PCR을 이용한 telomerase subunits의 발현 정도 비교

Telomerase의 주 구성 성분인 hTERT와 hTR의 발현 여부를 RT-PCR을 통하여 관찰하였으며, 각각 PCR 과정에서 β -actin primer를 동시에 반응시켜 정량적으로 분석하였다. 먼저 telomerase의 효소활성의 주된 기능을 수행하는 것으로 알려진 hTERT 발현도가 hTR보다 먼저 AZT에 의해 저해되었다. hTERT의 발현도는 low dose에서 20 PD 이후부터

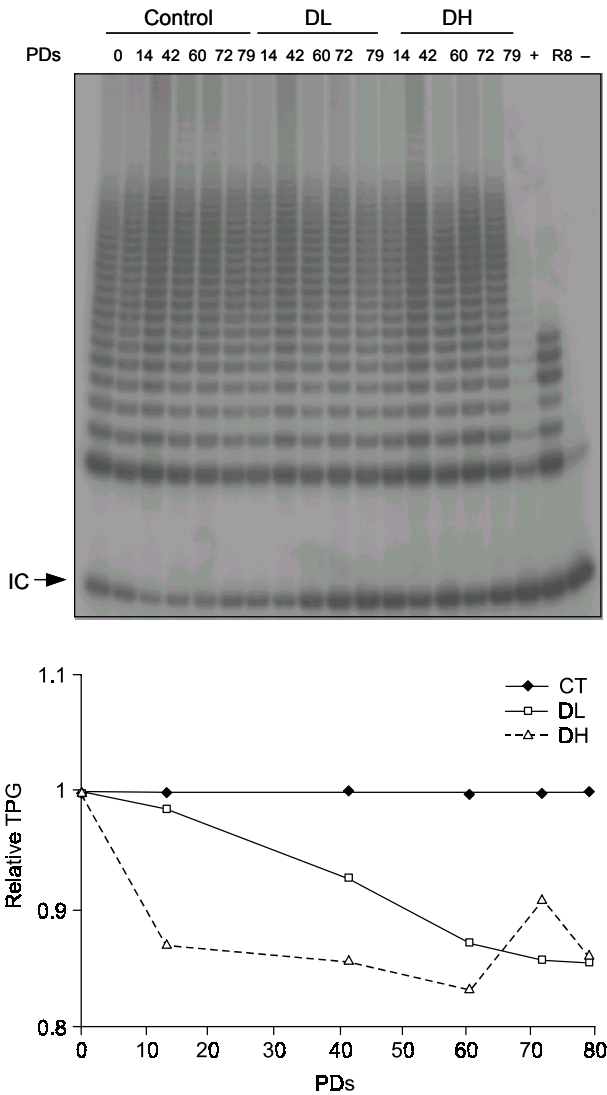


Fig. 5. Telomerase activity of MDA-MB-231 by TRAP assay. IC: internal control, R8: R8 control template, +: 293 cell, -: lysis buffer, CT (◆): control, DL (□): low dose, DH (△): high dose.

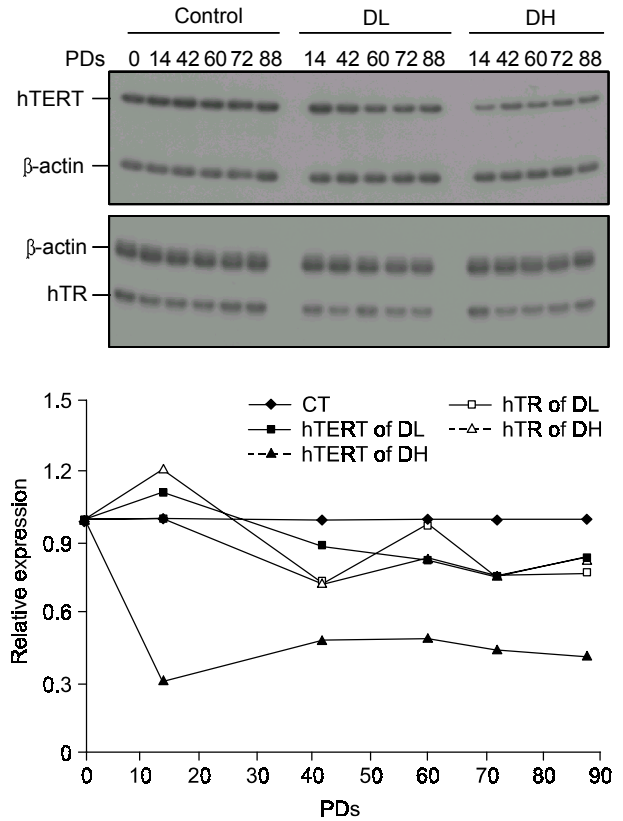


Fig. 6. Expression of hTERT and hTR mRNA of MDA-MB-231 by RT-PCR. CT (◆): control, DL (■□): low dose, DH (▲△): high dose.

대조군에 비해 발현도가 감소되기 시작하였고 PD가 증가할수록 조금씩 더 감소되었다. High dose에서는 초기 PD부터 hTERT의 발현이 대조군보다 감소되어 PD가 계속되는 동안 감소된 수준을 유지하였다. hTR의 발현율은 대조군과 비교시에 low dose와 high dose 모두에서 42 PD 이후부터 hTR의 발현이 감소되어 나타났다(Fig. 6).

7) Real-Time PCR을 이용한 TEP, c-Myc, Mad1의 발현정도 비교

Real-time PCR을 통하여 telomerase RNA와 관련된 전사조절인자의 발현정도를 비교하였다. 먼저 RT-PCR을 통하여 분석한 hTERT, hTR의 발현도 비교는 Real-time PCR의 결과와 RT-PCR 결과가 비슷한 경향을 보였다. Real-time PCR의 경우 RT-PCR 보다 검사 방법이 민감하다고 알려져 있는 대로 본 실험에서도 발현정도가 RT-PCR로 측정된 값보다 증폭되어 나타나는 것을 확인하였다. Low dose에서 hTERT의 발현이 가장 먼저 감소하였으며, 그 후 세포분열이 진행되는 동안 hTERT의 발현저해가 지속적으로 나타났다. hTR은 20 PD 이후부터 감소하기 시작하였고, PD가 증가하는 동안 발현이 저해된 상태를 유지하였다. c-Myc의 경우 hTERT 발현 변화 후 즉시 감소되기 시작하였으며, 발현 경향은 hTERT의 변화와 유사하였다. Mad1은 발현변화가 없었으나 대체로 30 PD이후부터 변화하여 감소된 상태를 유지하였으며, TEP는 초기 PD에서는 발현이 저해되었으나 후기 PD에서는 비교적 안정하게 발현되었다. High dose에서도 각 인자의 발현은 low dose와 비슷한 양상으로 나타났다. hTERT가 초기 PD에서부터 가장 먼저 발현이 저해되면서 변하기 시작하였고, hTR와 c-Myc, Mad1은 10 PD부터 감소하기 시작하였으며 TEP는 가장 나중인 42 PD 이후부터 감

소하기 시작하였다. 또한 c-Myc의 경우 hTERT와 같은 양상으로 변하는 것을 관찰하였다. 이러한 변화는 PD이 증가할수록 그 변화폭이 다양하였으며, high dose에서 더 심하여, 약제투여 후 PD이 증가함에 유전자의 발현 폭의 변화가 보다 다양하여 나타난 결과로 추정하였다. 지금까지의 결과를 종합하면 MDA-MB-231에서는 hTERT가 가장 먼저 발현 변화가 나타났으며, 이후 다른 여러 인자가 비슷한 시점에

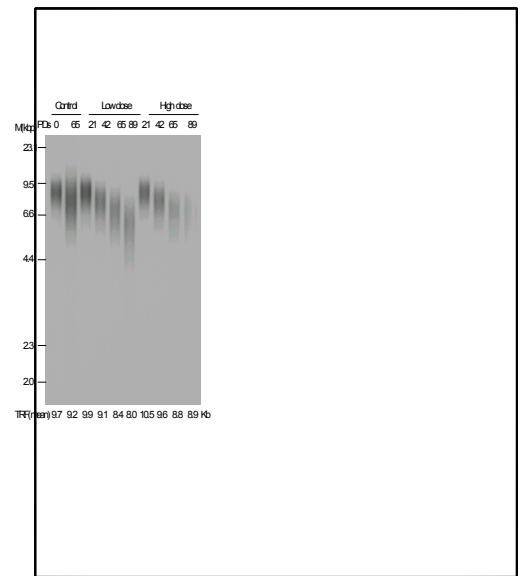


Fig. 8. Length of terminal restriction fragments (TRFs) of MDA-MB-231 by Southern blot hybridization. CT: control, DL: low dose, DH: high dose, M: DNA size marker.

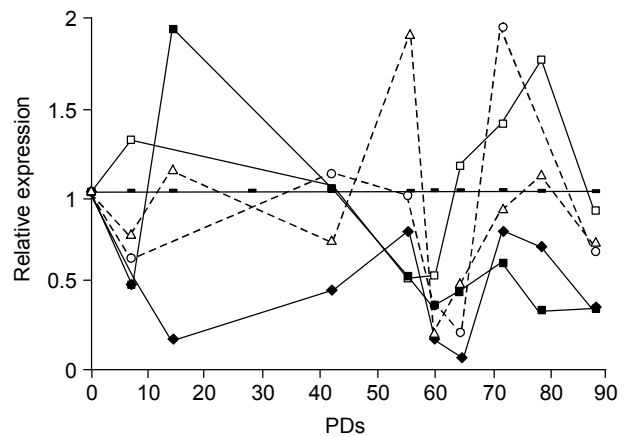
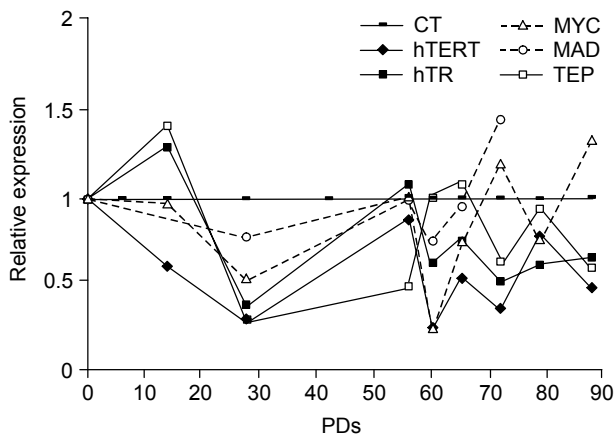


Fig. 7. Expression of telomerase subunits mRNA of MDA-MB-231 by real-time PCR. PDs: population doublings, ? : control, ◆: hTERT, ■: hTR, △: c-Myc, ○: Mad1, □: hTEP.

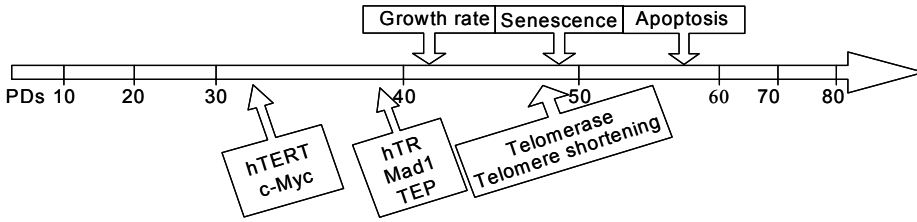


Fig. 9. Time points of initial change of biological and genetic phenotype in MDA-MB-231.

서 발현변화가 나타나, c-Myc의 발현 변화 후에 hTR, Mad, TEP의 발현변화가 관찰되었다(Fig. 7).

8) Southern Blot 방법에 의한 TRF 길이 측정

Telomere의 길이를 측정하기 위하여 Southern Blot 방법을 수행하였다. MDA-MB-231에서 대조군은 telomere 길이가 65 PD가 증가하여도 500 base 정도 감소하였으나 low dose와 high dose에서는 42 PD부터 500~800 base 정도로 감소하기 시작하여 PD가 증가할수록 급속히 감소하였으며 90 PD정도에서는 telomere 길이의 감소율이 초기 PD보다는 감소된 상태를 유지하였다(Fig. 8).

9) AZT 처리 후 세포의 변화와 유전자의 발현 변화 요약

지금까지의 결과를 종합하여 AZT를 처리한 후 나타난 세포수준의 변화(성장율, 세포노화, 세포사멸의 변화)와 유전자수준의 변화(telomerase 활성도, telomerase subunits, telomere 길이 변화)를 발현 변화 시점별로 도표화하였다(Fig. 9).

고찰

본 연구에서는 암세포에 직접적인 독성을 주지 않는 약물농도 내에서 유방암 세포주를 역전사 효소 억제제에 장기간 노출시킴에 따라 역전사 효소의 기능이 상실되고 telomere 길이가 유지되지 못하여 세포노화가 발생하도록 실험을 구성하였다. 그리고 이러한 과정에서 telomerase subunits에는 어떤 변화가 나타나는지 관찰하고자 하였다.

AZT는 ADIS의 치료제로 사용되고 있고 그 주된 작용기전은 역전사 효소 억제에 의한 telomere 연장의 억제이다(18). 그러나 이 약제를 직접적인 항암제로 사용하기에는 인체 내에서의 독성이 너무 강하여 배제되고 있다(19,20). 따라서 본 연구에서는 세포에 직접적인 세포 독성을 주지 않는 IC₁₀, IC₂₀ 범위의 농도에서 AZT에 의한 역전사 효소 억제 현상이 서서히 발생하도록 유도하였다. 먼저 MTT assay를 통하여 세포 독성을 유발하지 않는 범위의 AZT 농도를 결정하였다. 그리고 이 농도에서 유방암 세포주를 AZT에 지속적으로 노출시켰고 노출 기간이 증가함에 따라

세포의 성장이 지연되었고, 세포 성장율도 감소하였다. 세포주를 약제에 노출시키면서 계속하여 세포 모양을 직접적으로 관찰하고 염색법에 의해 조사한 결과, 세포 증식이 억제됨에 따라 세포노화가 증가함을 알 수 있었다. 또한 세포노화가 증가한 시점 이후부터는 AZT를 처리하지 않은 대조군 세포와 비교하여 세포사멸 정도도 증가하는 것을 관찰하였다. 이와 같은 결과에 의하면 AZT에 의해 암세포 성장이 지연된 이유는 AZT의 영향을 받아 세포노화가 유발되고, 그 후 세포 주위의 비정상적인 환경에 의해 세포가 사멸하는 것으로 생각되었다.

AZT가 세포주에 영향을 미치는 기전으로는 두 가지가 있다. 첫째는 역전사 효소 억제작용에 의해 telomere 길이가 세포 내 허용 범위 이상 짧아지게 되면 세포는 더 이상 분열을 하지않고 G₀로 이르는 세포노화가 유도되는 기전이다. 둘째는 AZT가 세포 내에서 대사과정을 거친 후 telomere에 직접 끼어 들어가게 되어 DNA 연장을 억제하는 기전이다. 손상된 세포는 DNA의 이상을 감지하고 이를 회복하기 위해 cell cycle을 잠시 지연시키고 DNA 이상을 회복하기 위한 노력을 한다. 이때 회복이 되지 못할 정도의 DNA가 손상된 경우 세포는 사멸기전을 유도하여 세포 자살을 유발하게 된다. 본 연구 결과 세포성장의 지연이 나타난 시점에서 보아 세포노화의 증가에 뒤이어 나타난 증가된 세포사멸의 순차적 발현은 이러한 가설을 뒷받침하였다.

TRAP assay를 이용하여 telomerase의 활성도 비교한 결과, PD가 증가할수록 AZT에 의해 telomerase의 활성도가 저해됨을 관찰하였고, 또한 AZT 농도가 높을수록 그 저해정도가 증가하였다. AZT가 역전사 효소 억제제로서의 본래 기능에 의해 telomerase의 활성을 억제함을 알 수 있었다.

다음 단계로 telomerase에서 주요한 기능을 수행하는 subunit인 hTERT, hTR, TEP 발현이 telomerase 활성도 변화에 따라 어떻게 변하는지 비교하였다. hTERT의 발현변화는 초기 PD부터 나타나 telomerase의 활성도와 같은 양상으로 변화하였다. Telomerase의 활성도 변화는 hTERT의 발현 감소가 나타난 시점보다 PD가 좀더 진행된 시점에서 시작됨으로 미루어, telomerase 활성도 변화가 hTERT에 의해 직접적으로 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 그러나 telomerase의 활성도 저하 정도는 hTERT의 발현 저하 정도

보다는 낮아, telomerase 활성화에 hTERT의 발현이 직접적인 영향을 미치는는 하지만 hTERT의 발현정도가 정확히 telomerase의 활성도를 대변하지는 않음을 알 수 있었다.

hTERT가 AZT 투여 초기부터 변하기 시작하는데 반하여 hTR의 경우는 hTERT 발현 변화 후에 변하기 시작하였다. 이는 hTR이 AZT로부터 직접적인 영향을 받았다기 보다는 hTERT의 발현 변화에 영향을 받는다고 생각하였다. 아울러 AZT 투여기간이 증가함에 따라 hTR의 발현은 hTERT의 변화에 따라 이차적으로 변화함을 관찰하였다. 일반적으로 hTR은 hTERT보다 다양하게 발현되어 telomerase의 활성이 나타나지 않는 정상조직이나 암 조직에서도 발현된다(7). 또한 hTR의 정량적인 발현변화가 telomerase 활성화에 직접적으로 영향을 미치는는 않지만, 일단 발현됨으로써 telomerase의 활성화에 안정성을 유지시켜준다(23).

그리고 hTERT가 telomerase의 활성화에 영향을 미치는 가장 중요한 요소이지만 매우 다양한 조절 기전에 의하여 변형되기 때문에(9,10) hTERT 발현만으로 telomerase의 활성을 가늠할 수는 없다. hTERT와 마찬가지로 hTR 역시 telomerase의 구성분 중의 하나로서 telomerase의 작용에 영향을 미치므로, hTR도 간접적인 telomerase 활성변화의 표지자로 사용될 수 있다고 생각된다. 즉, AZT에 의해 hTERT가 직접적으로 활성화에 영향을 받은 후 이러한 hTERT의 변화에 의해 hTR 발현이 간접적으로 영향 받기 때문에 hTR의 변화는 hTERT의 변화가 이미 나타내고 있음을 제시한다고 하겠다. 이러한 사실은 telomerase subunits간의 균형이 telomerase 활성화에 영향을 미치는 중요한 요인이 된다는 것을 의미한다. 즉, telomerase 활성화는 hTERT의 발현변화에 영향을 받지만 hTR과 hTERT이 함께 작용되어 그 발현정도에 변화를 나타냄을 확인할 수 있었다.

hTERT와 hTR 외에 다른 telomerase subunit인 TEP와 telomerase 활성화에 영향을 미치는 전사조절인자인 c-Myc, Mad1의 발현변화를 측정하였다. c-Myc의 경우 hTERT와 비슷한 시점에서 발현이 감소하기 시작하였으며, 발현 변화 양상은 hTERT의 변화와 일치하였다. c-Myc은 hTERT의 전사를 조절하는 요소로써 작용하기 때문에(11) AZT가 c-Myc의 발현에 영향을 주고 c-Myc의 변화가 hTERT의 발현에 직접적으로 작용함을 의미하였다. Mad1의 발현양상은 특징적이지는 않지만 AZT 처리에 의해 발현정도가 저해되었으며 그 저하는 hTERT의 발현 이후에 나타나, 직접적으로 hTERT의 발현에 영향을 주는 것은 아니라고 생각되었다.

마지막으로 AZT 작용에 의하여 궁극적으로는 telomere의 길이가 짧아지는지를 입증하기 위하여 telomere 길이를 측정하였다. AZT 투여기간이 증가할수록 telomere 길이가 감소하였다. Telomere가 감소되기 시작하는 시점은 hTERT의

발현변화 후에 telomerase의 활성이 감소하기 시작한 시점과 비슷하게 일치하였다. 즉, 세포 내에서 AZT 작용에 의해 hTERT의 발현 감소가 일어났으며 이는 telomerase의 활성화에 영향을 미치고 그 결과 telomere의 길이가 감소하는 현상이 일어났음을 확인할 수 있었다.

MDA-MB231 세포주는 앞서 언급한 것처럼 42PD로 배양하는 동안 세포는 큰 변화를 보이지는 않았다. 초기 PD에서 AZT를 지속적으로 투여하는 동안에도 telomerase 활성화 변화는 없었으며 세포의 성장 속도에도 변화가 없었다. 이는 세포에서 IC₂₀내의 농도로 AZT를 처리하였으나, 이 농도의 약제가 세포에 장기적으로 영향을 줄 때 그 반응정도가 세포주마다 다를 것으로 판단된다. 이는 MDA-MB-231의 기본 telomerase 활성화도가 높고, telomere 길이도 길었다는 점에 근거할 수 있다. AZT에 의해 telomerase의 활성이 일부 저해되었다더라도 이 현상은 20% 이내의 소수의 세포에서 나타나는 현상일 뿐 나머지 80% 이상인 대부분의 세포에서는 telomerase가 왕성한 활성을 나타냈기에 TRAP assay에서 발현변화 정도를 정확히 관찰할 수 없다고 생각된다. 그리고 AZT에 의해 약간의 손상을 입었다더라도 이를 회복하기 위한 세포회복기전이 충분히 작동하였다면 세포가 충분히 원래의 특성만큼 회복이 가능했을 것으로 생각되었다. 즉, 높은 telomerase 활성화와 긴 telomere 구조에 의하여 세포 분열이 반복되어도 telomere가 허용범위까지 짧아지기까지는 오랜 시간이 필요하다고 생각된다. MDA-MB-231에서는 유전자 수준에서 telomerase subunits의 변화가 나타나고 난 뒤 telomerase 활성화도 변화, telomere 길이 감소 현상이 나타나면서 동시에 세포 수준의 변화인 세포 성장율의 지연과 세포노화의 증가, 세포사멸의 증가가 유도되는 현상이 관찰되었다.

결론

Telomerase 억제제인 AZT는 세포노화와 세포사멸을 유발하며 세포 성장속도를 지연시켰다. Telomerase 유전자의 변화는 먼저 AZT에 의해 hTERT가 직접적으로 억제되고, 이때 c-Myc의 발현이 거의 동시에 변화하였다. 이후 hTR, TEP의 순으로 발현변화가 유도되고 이와 같은 telomerase subunits의 변화 후에 telomerase 활성화도와 telomere의 길이가 순차적으로 변화하는 일련의 반응과정을 확인하였다.

REFERENCES

1. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991;256:271-282.
2. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*

- 1991;350:569-604.
3. Zakian VA. Structure and function of telomeres. *Annu Rev Genet* 1989;23:579-604.
 4. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomere shorten during aging of human fibroblasts. *Nature* 1990;345:458-460.
 5. Faragher RG, Kipling D. How might replicative senescence contribute to human ageing? *Bioessays* 1998;20:985-991.
 6. Blackburn EH. Telomerases. *Annu Rev Biochem* 1992;61:113-129.
 7. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995;269:1236-1241.
 8. Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* 1998;12:1073-1085.
 9. Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, Duncan EL, Reddel RR, Jefferson RA. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 1997;6:2011-2019.
 10. Li h, Zhao LL, Funder JW, Liu JP. Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1997;272:669-677.
 11. Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ. Myc activates telomerase. *Genes Dev* 1998;12:1769-1774.
 12. Oh S, Song YH, Yim J, Kim TK. Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. *Oncogene* 2000;19:1485-1490.
 13. Colgin LM, Reddel RR. Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. *Curr Opin Gen Dev* 1999;9:97-103.
 14. Park KH, Rha SY, Kim TS, Lee BC, Park SH, Chung HC, Lee WY, Kim JH, Roh JK, Lee KS, Min JS, Kim BS. Increment of telomerase activity with breast cancer progression. *J Korean Cancer Assoc* 1997;29:1032-1040.
 15. Kondo Y, Kondo S, Tanaka Y, Haqqi T, Barna BP, Cowell JK. Inhibition of telomerase increases the susceptibility of human malignant glioblastoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* 1998;16:2243-2248.
 16. Strahl C, Blackburn EH. Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol Cell Biol* 1996;16:53-65.
 17. Furman PA, Fyfe JA, St Clair MH, Weinhold K, Rideout JL, Freeman GA, Lehrman SN, Bolognesi DP, Broder S, Mitsuya H, et al. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8333-8337.
 18. Agarwal RP, Mian AM. Thymidine and zidovudine metabolism in chronically zidovudine-exposed cells in vitro. *Biochem Pharmacol* 1991;42:905-911.
 19. Yarchoan R, Mitsuya H, Myers CE, Broder S. Clinical pharmacology of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (zidovudine) and related dideoxynucleosides. *N Engl J Med* 1989;321:726-738.
 20. Sommadossi JP, Carlisle R. Toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine for normal human hematopoietic progenitor cells in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:452-454.
 21. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescence human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9363-9367.
 22. Kim NW, Wu F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res* 1997;25:2595-2597.
 23. Wen J, Cong YS, Bacchetti S. Reconstitution of wild-type or mutant telomerase activity in telomerase-negative immortal human cells. *Hum Mol Genet* 1998;7:1137-1141.
-