

제 51차 KIST-KITA 협동공개강좌

진보된 안전성 평가와 환경호르몬 검출기법

2000. 5.

주최 한국과학기술연구원
 한국산업기술진흥협회

Mouse Lymphoma Thymidine Kinase ($TK^{+/-}$)
Gene Assay

류재천 · 김정란

한국과학기술연구원

독성연구팀

Tel) 958-5070, 5080

Fax) 958-5059

E-mail) 류재천 : ryujc@kist.re.kr

김정란 : roothobbang@kist.re.kr

I. 서 론

Mouse lymphoma Thymidine Kinase (TK) gene assay(MOLY)는 mouse lymphoma 세포주를 이용한 *in vitro* mutagenicity를 연구하는 시험법으로써 그 유용성이 Clive등에 의해 1972년 처음으로 소개되었고, 그후 세포주의 개발과 시험법의 보완 등을 거쳐 민감도가 뛰어난 유전독성시험법으로 대두되고 있으며, 현재 ICH를 중심으로 *in vitro* 염색체이상시험을 대체할 강력한 tool로서 International Harmonization 되고 있는 연구방법이다 (Clive *et al.*, 1987).

MOLY는 mouse lymphoma L5178Y TK⁺-3.7.2C cell line을 이용하며, 11번 염색체 내에 heterozygote로 존재하는 thymidine kinase gene(TK⁺)의 TK⁻ homozygote로의 mutation을 인식할 수 있는 시험체계를 지닌다.

MOLY법의 원리는 thymidine kinase의 역할에 있다. Thymidine kinase는 DNA의 생합성시 전구체로 필요한 thymidine monophosphate(TMP)를 만들기 위한 thymidine의 인산화에 관여하는 효소이다. 세포 내에서 TMP를 합성하는 과정은 Fig. 1 에서 보여지는 바와 같이 *de novo* synthesis와 salvage pathways에 의한 두가지 경로에 의해 합성될 수 있다. MOLY는 *de novo* synthesis에 의해서만 TMP를 합성하여 생존할 수 있는 TK^{-/-} mutant 세포를 정상적 두 pathway를 통하여 TMP를 합성할 수 있는 TK^{+/-} 세포로부터 detection하는 시험체계를 지닌다. 따라서 어떤 시험물질의 mutagenicity를 평가하기 위한 본실험을 시작하기 전에 L5178Y cell에 *de novo* synthesis를 저해하도록 methotrexate (MTX)를 처리해줌으로써 자연돌연변이에 의해 형성될 수 있는 TK^{-/-}의 homozygotes는 생존할 수 없도록 하여 TK^{+/-}의 heterozygote만을 선택한후 본실험을 실시한다. L5178Y TK^{+/-} 세포주에 시험물질을 처리함으로써 TK^{-/-} homozygotes로 돌연변이가 유도된 세포는 trifluorothymidine(TFT)를 배양액에 처리함으로써 선택되어진다. 세포내에서 TFT는 TK에 대한 기질로 사용되어 인산화되어 TFT-monophosphate(TFTMP)를 생성하게되고 이 산물은 세포의 생존을 방해하고 치사하게 한다

(Fig. 2). 따라서 돌연변이가 유도되지않은 TK+/- heterozygotes들은 생존하지 못하고, thymidine kinase를 합성할 수 없는 TK-/- homozygotes는 de novo synthesis에 의해 TMP를 합성하며 생존하게된다.

MOLY는 TK gene내의 또는 TK gene을 포함하는 11번 chromosome내에서 발생하는 넓은 범위의 유전적 변화를 인식할 수 있다는 장점을 지니며, 또한 TK mutants는 hprt mutants에 비해 발현시간이 짧다(Fig. 3). MOLY는 TK gene내부의 point mutation, TK gene 전체의 deletion, 11번 염색체 전체의 deletion, 또한 TK gene을 포함하는 유전자 재조합 등에 의해서 유도된 TK-/- cells을 인식할 수 있는 훌륭한 실험방법으로 대두되고 있다.

기존의 변이원성시험으로 널리 이용되어오고있는 박테리아 복귀돌연변이 시험법인 Ames test가 point mutation, frameshift mutation 등의 하나 또는 수개의 base 정도의 작은 유전적변이만을 인식할 수 있고, 포유동물세포를 이용한 염색체 이상시험이 염색체 수준에서의 large scale의 구조적, 수적 이상만을 인식할 수 있다는 데 반해, MOLY는 두가지 모두를 인식할 수 있음으로 인해 두시험법을 동시에 보완할 수 있다는 것이다 (Gorelick, 1995; Toyokuni et.al., 1995). Table 1은 Ames test와 chromosome aberration assay의 결과에 대한 MOLY의 역할을 나타내고 있다.

Table. 1. Mutational data spectrum of MOLY

Ames Test	Chromosome aberration	MoLY
Positive	Positive	Positive (large and small colony)
Positive	Negative	Positive (large colony)
Negative	Positive	Positive (small colony)

Salvage Pathway

De novo Synthesis

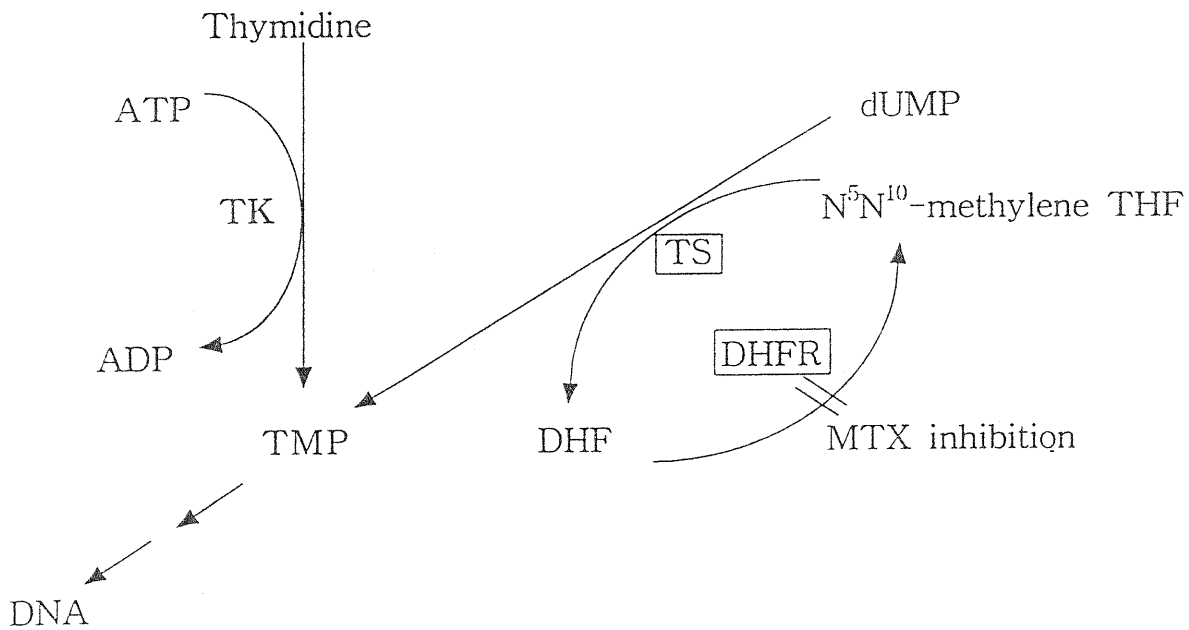


Fig. 1. Biosynthetic pathway of thymidine monophosphate

- @ TK : thymidine kinase, TMP : thymidine monophosphate
- DHFR : dihydrofolate reductase, TS : thymidylate synthase
- dUMP : deoxyuridine monophosphate, DHF : dihydrofolate
- N⁵, N¹⁰-methylene THF : N⁵, N¹⁰-methylenetetrahydrofolate
- MTX : methotrexate

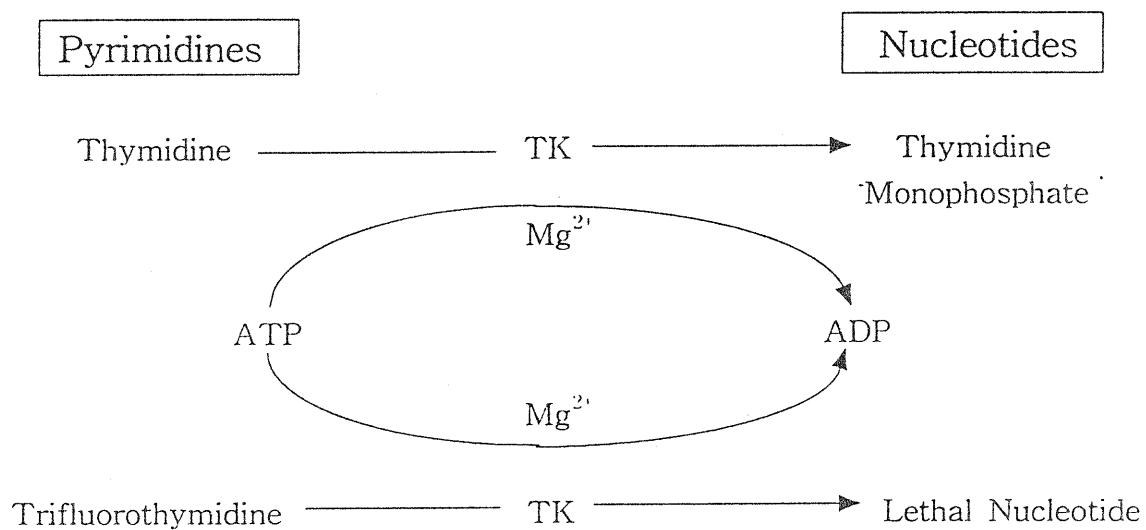


Fig. 2. The enzymatic role of thymidine kinase.

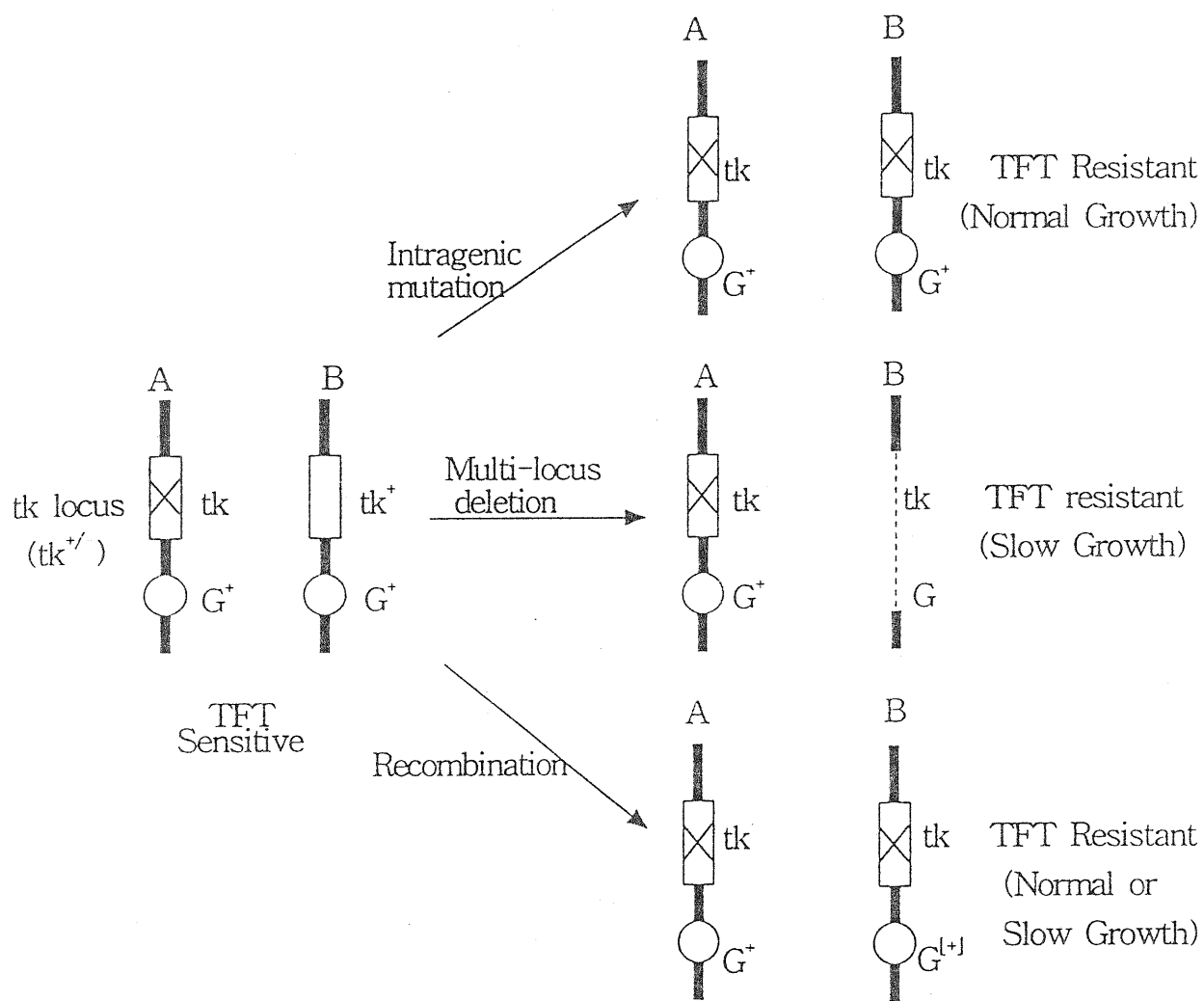


Fig. 3. Genetic mutations in thymidine kinase gene and 11 chromosome, and growth patterns of L5178Y tk +/- cells.

또한 유전적변이의 양상에 따라 L5178Y tk⁻ 세포의 성장에 있어서 두가지 형태의 mutant type을 볼 수 있다. 즉, TK gene 내부의 small scale의 변화에 대해서는 정상적인 성장을 보이는 large colony mutants를 형성하게 되고, TK gene과 함께 염색체 11번 내의 large scale의 손상의 경우에는 성장에도 영향을 미치게되어 slow growth로 인한 small colony mutants를 형성하게 된다 (Applegate *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 1985). 따라서 화학물질에 대한 MOLY의 수행결과에 대한 mutant type을 분석함에 따라 화학물질이 유도하는 mutation의 특성을 예측할 수 있다.

MOLY는 soft agar 배지상에서 mutant cell이 clone되는 방법(agar assay)이 이용되어왔으나, Cole(1986) 등에 의해 96-microwell을 이용한 cloning 법(microtiter assay)이 개발되어 소개되어(Clements, 1990) 활용 중에 있다.

MOLY의 결과처리는 UKEMS (United Kingdom Environmental Mutagen Society)에서 Guideline (Robinson *et al.*, 1990)을 제시하고 있는데, microtiter assay에 있어서 UKEMS Guideline을 바탕으로 한 통계처리 software package가 영국의 Hazleton 社에서 개발된 'Mutant' program으로 제공되어 유용하게 이용되고 있어 앞으로 화학물질의 검색 및 통계처리에 유용하게 제공될 수 있으리라 사료된다.

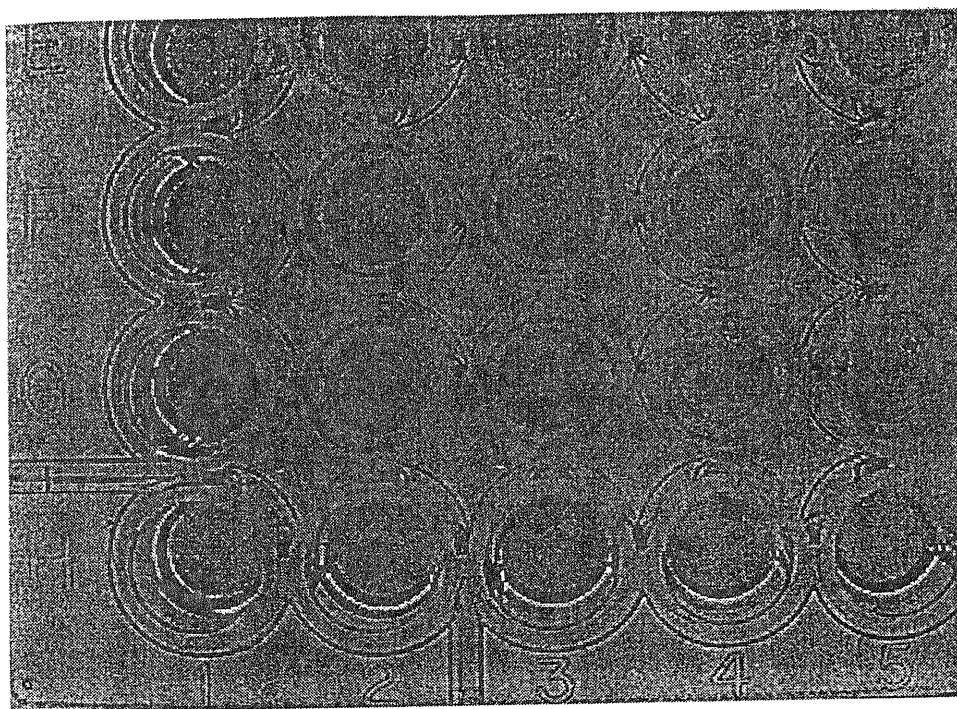


Fig. 4. Typical small and large colony mutants growing in microwells
: viewed on a light box

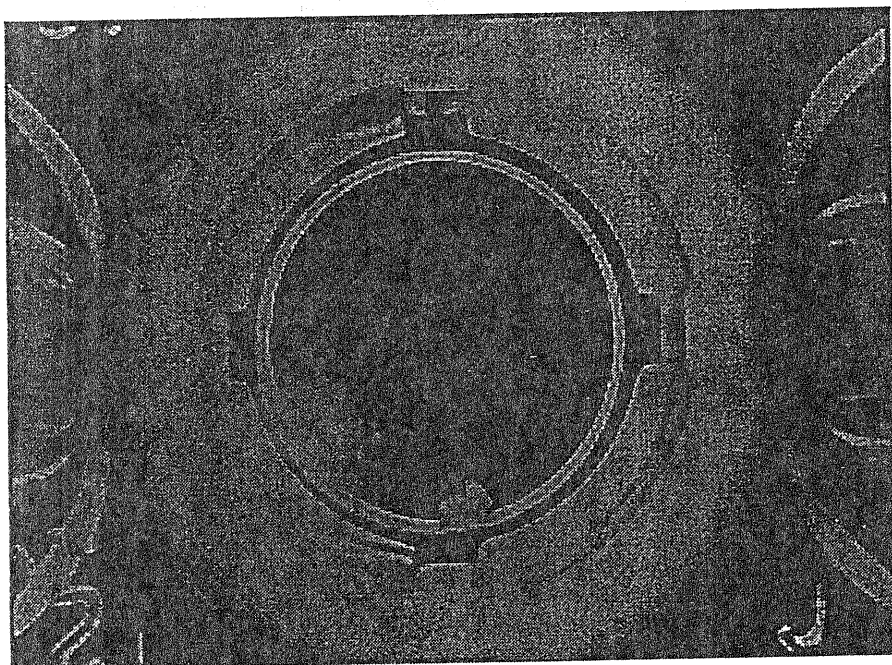
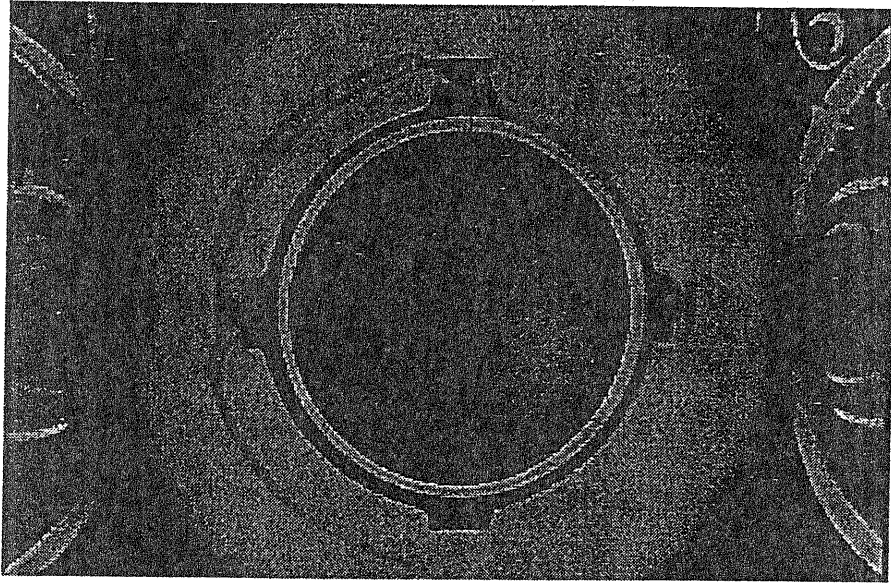


Fig. 5. A large and small colony mutants in microwell

A



B

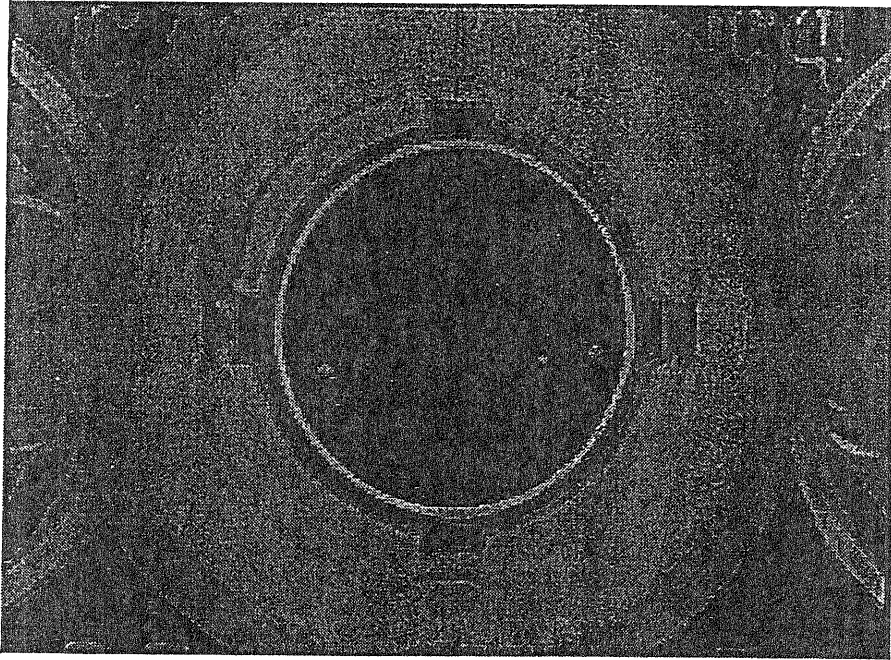


Fig. 6. A. Large colony mutant
B. very small colony mutant

II. 실험 재료 및 방법

실험방법은 Clements(1990)에 의해 소개된 microtiter protocol을 약간 변형하여 본 연구실에 맞게 정립하였다.

MOLY는 *in vitro* system이기 때문에 metabolic activation system의 부재하와 존재하에서 모두 실시하게 된다.

1. 세포 및 세포 배양액

본연구에 사용되는 세포주는 mouse lymphoma유래의 L5178Y(TK^{+/} 3.7.2c)로서 11번 chromosome에 존재하는 thymidine kinase(tk) gene을 TK^{+/}로 heterogeneous하게 지니는 세포주 (L5178Y cell에 *de novo* synthesis를 저해하도록 methotrexate (MTX)를 처리해줌으로써 자연돌연변이에 의해 형성될 수 있는 TK^{/'}의 homozygotes는 생존할 수 없도록 하여 TK^{+/}의 heterozygote만을 선택함 - 이를 Cleansing 이라 한다.) 를 사용하고 있다.

L5178Y cell을 이용한 MOLY시험에는 다음과 같이 RPMI1640 (Gibco-BRL, cat.no. 31800-022)을 기본으로 하는 세가지, 즉 RPMI 0, 10, 20의 배지조성이 필요하다.

	RPMI 0	RPMI 10	RPMI 20
horse serum	0	100 ml	200 ml
peniciline streptomycin	10 ml	10 ml	10 ml
sodium bicarbonate	2 g	2 g	2 g
sodium pyruvate	200 mg	200 mg	200 mg
pluronic F68	5 ml	5 ml	0

2. 농도 결정을 위한 예비세포독성시험 (range-finding cytotoxicity experiment)

시험물질의 최고농도를 $5000 \mu\text{g/ml}$ 로 하여 공비 2로 최소 6농도에 대해 실시하며 그 결과 RS0 (relative survival at 0 day) 값이 10 - 20 %를 나타내는 범위의 농도를 최고 농도로 하여 본 실험을 실시하게 된다.

농도결정을 위한 예비시험의 96-well plate의 제작은 시험물질을 처리한 후 3시간동안 37°C 에서 배양하였다. 시험물질을 3시간동안 처리한 후 원심분리로 상등액을 제거하고 세포수를 1.6 cells/well이 되도록 각 농도당 96개의 wells에 seeding한다. 각 plate를 10일 동안 배양한 후 형성된 colony의 수를 계수한다.

3. 본실험

Fig. 7은 MOLY의 실험방법의 개략적인 flowchart를 나타내고 있다.

양성대조군

양성 대조물질로서는 대사활성계 부재하에서는 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 methylmethanesulfonate(MMS) 등이 이용되며, 대사활성존재하에서는 $3 \mu\text{g/ml}$ 의 cyclophosphamide (CP)를 사용한다.

0 day : RPMI 10 배지에서 배양된 L5178Y tk⁺/3.7.2c 세포를 5×10^5 으로 농도 조절하고 sample의 양만큼 cell 현탁액을 제조, 그 현탁액의 5%에 해당하는 S9 mixture 첨가한다. S9 mixture의 조성은 다음과 같다.

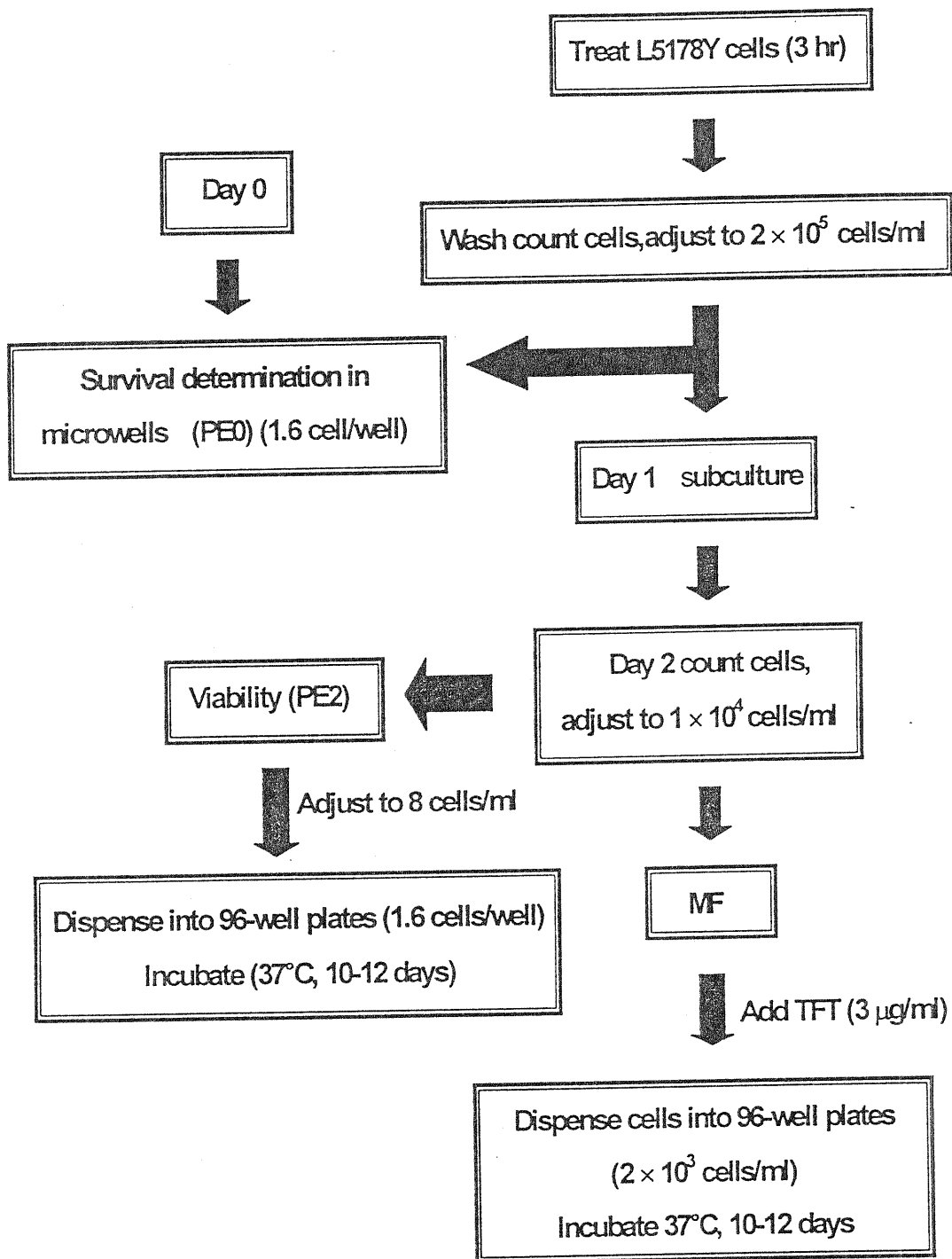


Fig. 7. Flowchat of mouse lymphoma TK gene assay

@ S9 mixture의 조성

Glucose-6-phosphate (180 mg/ml)	1	총 현탁액의 5% 에 해당하는 ml량 을 5로 나누어 옆 의 숫자 비율에 맞는 값을 첨가
NADP (25 mg/ml)	1	
KCl (150 mM)	1	
S9 fraction	2	

예비세포독성시험에서 결정된 시험물질의 3가지 농도를 L5178Y cells에 처리한 후 3시간동안 37°C에서 배양한다.

3시간 동안 시험물질을 처리한 후 원심분리로 상등액을 제거하고 세포를 2×10^5 /ml로 조절한다. 이중 일부를 취하여 96 well-microplate에 1.6 cells/well 이 되도록 세포를 분주하고 survival study를 위한 plate를 준비하여(PE0) 10-12일 후 각 well에 형성된 colony 수를 계수한다.

2×10^5 /ml로 맞춘 세포는 37°C에서 24시간동안 배양한다.

1st day : 배양된 세포를 계수하여 다시 2×10^5 /ml로 맞추어 24시간 더 배양한다.

2nd day : 세포를 계수하여 viability를 위한 96-microplate (PE2)에 1.6 cells/ml로 심고, 유전자 돌연변이빈도 검출을 위한 plate (MF, mutation frequency)에는 TFT(tetrafluorothymidine)를 $3 \mu\text{g/ml}$ 이 되게 처리한 배지에 2000 cells/well이 되도록 세포를 분주한다.

PE2 plate는 10-12일 후 형성된 colony를 계수하고, MF plate는 12일 후에 형성된 mutant colony를 large colony와 small colony로 구분하여 계수한다.

본시험은 대사활성계 부재와 존재하에서 2회 반복 실시하며, PE0, PE2, MF의 각 plate는 duplicate로 한다.

4. 관찰 및 결과분석

MF plate에 형성된 TFT-resistant mutant colony는 large colony와 small colony로 구분하여 계수한다. Large colony mutants는 well 직경의 1/4 이상의 크기인 것으로 하고, small colony mutants는 그이하인 것으로 한다.

Probable number of clones/well인 P 값은 clone을 지니지 않는 well 수 (EW, empty well)와 총 well 수 (TW, total wells)로 부터 구한다.

$$P = -\ln (EW/TW)$$

이값으로 부터 plating efficiency(PE) 값을 구할 수 있다.

$$PE = P/\text{no. of cells plated per well}$$

Survival과 viability plates에서 well당 심어진 세포는 1.6이므로

$$PE = P/1.6 \text{ 이다.}$$

Relative survival의 percentage는 다음과 같다.

$$\% RS = [PE(\text{test})/PE(\text{control})] \times 100$$

Mutant frequency(MF)는 "mutant/ 10^6 viable cells"로 표현한다. 이 값은 동일한 배양에서 mutant와 viable cells사이의 plating efficiency로 부터 구할 수 있다.

$$\begin{aligned} MF &= [PE(\text{mutant})/PE(\text{viable})] \times 10^6 \\ &= [P(\text{mutant})/2 \times 10^3]/[P(\text{viable})/1.6] \times 10^{-6} \\ &= \{-\ln[EW/TW(\text{mutant})]/-\ln[EW/TW(\text{viable})]\} \times 800 \end{aligned}$$

위와 같은 결과의 분석은 영국의 Hazleton 社에서 제공되는 Mutant program을 통하여, 관찰된 수치만을 대입함으로써 손쉽게 처리할 수 있게 되고, 현재 본 연구실에서 확보하여 운영중에 있다.

시험의 acceptance criteria : 본 MOLY 연구기법의 객관성과 정확성을 기하고자 하는 노력에 따라, Mutant Program에서의 통계처리는 물론 다음과 같은 시험결과의 acceptance criteria를 설정해 놓고있고 이 조건을 만족해야 시험이 유효한 것으로 판정하고 있다.

- 음성대조군의 MF가 historical mean value의 3배 미만이어야한다.
- 양성대조군의 최소 한농도에서 MF가 분명한 증가를 보여야한다(양성대조군과 음성대조군의 MF 값의 차이가 historical mean value의 1/2이 넘어야한다).

평가기준 : 또한 시험결과의 판정에 따른 변이원성 물질과 비 변이원성물질에 대한 설정 및 평가 기준은 다음과 같고 이상을 충족해야 변이원성물질로서 고려될 수 있다.

- 시험이 acceptance criteria를 만족하며 유효해야한다.
- 한 dose이상에서 MF가 음성대조군에 비해 유의성있게 증가해야한다.
- Linear trend analysis에 의해 유의성있는 용량의존성을 나타내어야한다.
- 시험의 재현성이 있어야한다.

III. 참고문헌

- Applegate, M. L., M. M. Moore, C. B. Broder, A. Burrell, G. Juhn, K. L. Kasweck, P. F. Lin, A. Wadhams, and J. C. Hozier, (1990) Molecular dissection of mutations at the heterozygous thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 51-55.
- Clements, J., (1990) Gene mutation assays in mammalian cells, In S. O'Hare and C. K. Atterwill (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol.43: *in vitro* Toxicity Testing Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ., pp. 277-286.
- Clive, D., G. Bolcsfoldi, J. Clements, J. Cole, M. Honma, J. Majeska, M. Moore, L. Muller, B. Myhr, T. Oberly, M.-C. Oudelhkim, C. Rudd, H. Shimada, T. Sofuni, V. thybaud, and P. Wilcox, (1995) Consensus agreement regarding protocol issues discussed during the mouse lymphoma workshop:Portland, Oregon, May 7, 1994. *Environ. Mol. Mutagen.*, 25, 165-168.
- Clive, D., W. G. Flamm, M. R. Machesco, and N. J. Bernheim (1972) A mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells, *Mutation Res.*, 16, 77-87.
- Clive, D. , W. Caspary, P. E. Kirkby, R. Krehl, M. Moore, J. Mayo, and T. J. Oberly, (1987) Guide for performing the mouse lymphoma assay for mammalian cell mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, 145-156.
- Cole, J., W. J. Muriel, and B. A. Bridges, (1986) The mutagenicity of

- sodium fluoride to L5178Y(wild-type and TK+/- 3.7.2c) mouse lymphoma cells, *Mutagenesis*, 1, 157-167.
- Cole, J., Harrington-Brock, k. and Moore, M. M. (1999) The mouse lymphoma assay in the wake of ICH4--where are we now? *Mutagenesis*, 14, 265-270
- Gorelick N. J., (1995) Genotoxicity of trans-anethole *in vitro*, *Mutation Res.*, 326:199-209
- Honma, M., Hayashi, M., Shimada, H., Tanaka, N., Wakuri, S., Awogi, T., Yamamoto, K., Kodani, N.-U., Nishi, Y., Nakadate, M., and Sofuni, T. (1999) Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration test. *Mutagenesis*, 14, 5-22
- Moore, M. M., D. Clive, J. C. Hozier, B. E. Howard, A. Gail Batson, N. T. Turner, and J. Sawyer, (1985) Analysis of TFFr mutants of L5178Y/TK⁺ mouse lymphoma cells, *Mutation Res.* 151, 161-174.
- Moore, M. M., Collard, D. C. and Harrington-Brock, K. (1999) Failure to adequately use positive control data leads to poor quality mouse lymphoma data assessments. *Mutagenesis*, 14, 261-263
- Putman, D., H.C.San Richard, C. A. Bigger, B. S. Levine, and D. Jacobson-Kram, (1996) Genetic toxicology assessment of HI-6 dichloride, *Environ. Mol. Mutagen.*, 27, 152-161.
- Robinson, W. D., M. H. L. Green, J. Cole, R. C. Garner, M. J. Healy, and D. Gatehouse, (1990) Statistical evaluation of bacterial/mammalian

fluctuation tests, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data* (Kirkland, D. J., ed.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 102-140.

Sofuni, T., M. Honma, M. Hayashi, H. Shimada, N. Tanaka, S. Wakuri, T. Awogi, K. I. Yamamoto, Y. Nishi, and M. Nakdate, (1996) Detection of *in vitro* clastogens and spindle poisons by the mouse lymphoma assay using the microwell method: interim report of an international collaborative study, *Mutagenesis*, 11(4) 349-355.

Toyokuni, S., J. L. Sagripanti, V. M. Hitchins, (1995) Cytotoxic and mutagenic effects of ferric nitrilotriacetate on L5178Y mouse lymphoma cells, *Cancer Research*, 88, 157-162