



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2007년 8월
博士學位論文

Melanoma antigen family A4
(MAGEA4)의 새로운 항암제
내성기전에 관한 연구

조선대학교 대학원
바이오신약개발학과
이 태 범

Melanoma antigen family A4
(MAGEA4)의 새로운 항암제
내성기전에 관한 연구

Novel anticancer drug resistance mechanisms
of melanoma antigen family A4 (MAGEA4)

2007年 8月 日

조선대학교 대학원
바이오신약개발학과
이 태 범

Melanoma antigen family A4
(MAGEA4)의 새로운 항암제
내성기전에 관한 연구

지도교수 최 철 희

이 논문을 이학박사학위 청구논문으로 제출함

2007年 4月 日

조선대학교 대학원
바이오신약개발학과
이 태 범

이태범의 박사학위 논문을 인준함

위원장 경북대학교 교수 김상현 인

위 원 조선대학교 교수 윤지수 인

위 원 조선대학교 교수 조 훈 인

위 원 조선대학교 교수 최홍석 인

위 원 조선대학교 교수 최철희 인

2007年 6月 日

조선대학교 대학원

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS	I
LIST of TABLES.....	III
LIST of FIGURES.....	IV
ABBREVIATIONS.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
I. 서 론.....	1
II. 재료 및 방법.....	5
1. 세포 배양과 항암제 내성세포의 선별.....	5
2. 세포 독성실험.....	6
3. 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR).....	7
4. 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(Real-time RT-PCR).....	8
5. Western blot 분석.....	8
6. DNA chip assay.....	9
7. Construction과 transfection.....	10
8. 유세포 분석술을 이용한 약물축적 실험.....	13
9. Immunoprecipitation (IP).....	13
10. 면역형광 분석.....	14
11. 핵, 세포질 및 세포막의 분리.....	15
12. 형광탐식자를 이용한 반응성 산소종의 측정.....	15
13. 통계처리.....	15

III. 결과	
1. 항암제 내성세포의 선별 및 내성기전의 규명.....	16
2. AML-2/DX100 세포에서 MAGE의 발현.....	16
3. MAGEA4 의 시간별 발현량.....	16
4. MAGEA4의 발현과 항암제 내성과의 관계.....	17
5. MAGEA4의 발현과 약물 배출 효과.....	17
6. MAGEA4의 발현과 Pgp와의 관계.....	18
7. MAGEA4 stable 세포에서 약물 배출 효과.....	18
8. 위암 세포와 악성 흑색종 세포에서 MAGEA4의 발현.....	18
9. MAGEA4 siRNA에 의한 약물 배출 효과.....	19
10. PSC833에 의한 약물 배출 효과.....	19
11. Doxorubicin 내성 세포에서 MAGEA4의 발현.....	19
12. MAGEA4의 세포 내 분포.....	20
13. MAGEA4 deletion mutants의 발현과 세포내 분포.....	20
14. MAGEA4 deletion mutants의 약물 배출 효과.....	21
15. MAGEA4 deletion mutants의 dimer 형성.....	21
16. MAGEA4의 발현과 반응성 산소종과의 관계.....	21
17. AML-2/ WT 세포에서 5AC와 TSA에 의한 MAGEA4의 발현.....	22
IV. 고찰	69
V. 요약문	75
VI. 감사의 말씀	77
VII. 참고문헌	78

LIST OF TABLES

Table 1. Current list of CT genes: 44 CT gene families and 89 individual genes or isoforms.....	23
Table 2. Tumor types expressing <i>MAGE</i> genes.....	25
Table 3. The <i>MAGE</i> family genes.....	26
Table 4. PCR primers	28
Table 5. PCR primers for real-time PCR.....	28
Table 6. PCR conditions.....	29
Table 7. Real-time PCR conditions.....	29
Table 8. PCR primers for pCMV-Tag2AMAGEA4 construction.....	30
Table 9. PCR primers for pcDNA6/FLAGMAGEA4 construction.....	30
Table 10. PCR primers for pcDNA6/MAGEA4Myc construction.....	31
Table 11. Expression profiling of <i>MAGE</i> genes using DNA chip between AML-2/WT and AML2/DX100 cells.....	32

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Chromosomal locations of the human <i>MAGE</i> subfamilies.....	33
Fig. 2. Domain structures of selected <i>MAGE</i> family members.....	34
Fig. 3. Substrate specificity of each <i>MDR</i> gene.....	35
Fig. 4. Maps of vector for transient (A) and stable (B) transfection.....	36
Fig. 5. Resistance of AML-2/DX100 cells to doxorubicin.....	37
Fig. 6. <i>MRP</i> gene expression in AML-2/WT and AML/DX100 cells	38
Fig. 7. <i>MAGEA4</i> gene expression in AML-2/WT and AML-2/DX100 cells	39
Fig. 8. <i>MAGEA4</i> expression as a function of time after transfection in HEK 293T cells.....	40
Fig. 9. Cytotoxic effects of representative three <i>MDR</i> substrates after <i>MAGEA4</i> transfection for 24 hr in HEK 293T cells.....	41
Fig. 10. Cytotoxic effects of two non- <i>MDR</i> substrates after <i>MAGEA4</i> transfection for 24 hr in HEK 293T cells.....	42
Fig. 11. Drug accumulation of <i>MDR</i> substrates after <i>MAGEA4</i> transfection for 48 hr in HEK 293T cells.....	43
Fig. 12. Comparison of drug accumulation by <i>MDR</i> inhibitors after <i>MAGEA4</i> transfection for 48 hr in HEK 293T cells.....	44
Fig. 13. <i>Pgp</i> expression after <i>MAGEA4</i> transfection for 48 hr in HEK 293T cells.....	45
Fig. 14. Interaction between <i>MAGEA4</i> and <i>Pgp</i> after <i>MAGEA4</i> transfection for 48 hr in Caco-2 cells.....	46
Fig. 15. <i>MAGEA4</i> expression (A) and doxorubicin accumulation (B) in stable <i>MAGEA4</i> -overexpressing HT-1080 cells.....	47

Fig. 16. Drug accumulation of MDR substrates in stable MAGEA4-overexpressing HT-1080 cells.....	48
Fig. 17. <i>MAGEA4</i> mRNA expression in gastric cancer and melanoma cells	49
Fig. 18. Effect of MAGEA4 siRNA on expression (A) and accumulation of doxorubicin (B) in MAGEA4-overexpressing AML-2/DX100 cells.....	50
Fig. 19. Effect of MAGEA4 siRNA on expression (A) and accumulation of doxorubicin (B) in MAGEA4-overexpressing SNU-484 cells.....	51
Fig. 20. Effect of MAGEA4 siRNA on cytotoxicity of doxorubicin in MAGEA4-overexpressing SNU-484 cells.....	52
Fig. 21. Effect of MAGEA4 siRNA on expression (A) and accumulation of doxorubicin (B) in MAGEA4-overexpressing DM4 cells.....	53
Fig. 22. Effect of PSC833 on accumulation of doxorubicin in MAGEA4-overexpressing AML-2/DX100 (A), SNU-484 (B) and DM4 (C) cells.....	54
Fig. 23. <i>MAGEA4</i> mRNA expression in doxorubicin resistant-sublines	55
Fig. 24. Correlation of <i>MAGEA4</i> mRNA expression and IC ₅₀ of doxorubicin in gastric cancer cells.....	56
Fig. 25. Localization of MAGEA4 after transfection for 48 hr in HEK 293T cells.....	57
Fig. 26. Proposed prediction structure of MAGEA4.....	58
Fig. 27. Schematic representation of various MAGEA4 deletion mutants	59
Fig. 28. Expression of MAGEA4 deletion mutants after transfection for 48 hr in HEK 293T cells.....	60
Fig. 29. Localization of MAGEA4 deletion mutants after transfection for	

48 hr in HEK 293T cells.....	61
Fig. 30. Subcellular localization of MAGEA4 deletion mutants after transfection for 48 hr in HEK 293T cells.....	62
Fig. 31. Doxorubicin accumulation of MAGEA4 deletion mutants after transfection for 48 hr in HEK 293T cells.....	63
Fig. 32. Dimeric formation of MAGEA4.....	64
Fig. 33. Dimeric formation of MAGEA4 deletion mutants after MAGEA4 and MAGEA4 mutants cotransfection for 48 hr in HEK 293T cells.....	65
Fig. 34. Cytotoxic effects of hydrogen peroxide after MAGEA4 transfection for 24 hr in HEK 293T cells.....	66
Fig. 35. Generation of reactive oxygen species by hydrogen peroxide after MAGEA4 transfection for 48 hr in HEK 293T cells.....	67
Fig. 36. Effects of 5AC and/or TSA on <i>MAGEA4</i> mRNA expression in AML-2/WT cells.....	68

ABBREVIATIONS

5AC	5-aza-2'-deoxycytidine
ABC	ATP-binding cassette
BCRP	breast cancer resistance protein
BSA	bovine serum albumin
CT	cancer/testis
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DCFH-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DX	doxorubicin
ECL	enhanced chemiluminescence
ER	endoplasmic reticulum
FBS	fetal bovine serum
HDAC	histone deacetylase
HEK	human embryonic kidney
HLA	human leukocyte antigen
IB	immunoblot
IP	immunoprecipitation
IRD	interspersed repeat domain
<i>MAGE</i>	melanoma antigen
<i>MAGEA</i>	melanoma antigen, family A
MDR	multidrug resistance
MHD	MAGE homology domain
MRP	multidrug resistance-associated protein
NC	nitrocellulose
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel
PBS	phosphate buffered saline
PBST	Triton X-100/PBS
Pgp	P-glycoprotein
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBST	tris-buffered saline-tween
TMF	3,6,3',4'-tetramethoxyflavone
TSA	trichostatin A
α -MEM	minimum essential medium alpha medium

ABSTRACT

Novel anticancer drug resistance mechanisms of melanoma antigen family A4 (MAGEA4)

Lee, Tae-Bum

Advisor: Prof. Choi, Cheol-Hee, M.D.& Ph.D.

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

The melanoma antigen (*MAGE*) gene family in human consists of 55 members that are classified as type I *MAGE* genes (including *MAGEA*, *MAGEB* and *MAGEC*) and type II *MAGE* genes. Type I *MAGE* genes are highly expressed in various forms of cancer, but not in other normal tissues except for the testes. The doxorubicin-resistant AML-2 cells (AML-2/DX100) have been selected and characterized with respect to drug resistance mechanisms. Interestingly, cDNA microarray, RT-PCR assay and Western blot analysis revealed that AML-2/DX100 cells over-expressed MAGEA4. In this study, to determine whether overexpression of MAGEA4 contributes directly to drug resistance, each MAGEA4 and its mutants were cloned into the mammalian expression vector and then introduced into human embryonic kidney (HEK) 293T and fibrosarcoma HT-1080 cells. MTT assay showed that MAGEA4 transfectants increased resistance to doxorubicin, daunorubicin and hydrogen peroxide, but not to 5-fluorouracil, cisplatin and mitoxantrone. Flow cytometry showed the decreased accumulation of doxorubicin, daunorubicin, rhodamine 123, mi-

toxantrone and calcein-AM, suggesting that MAGEA4 may function as an efflux pump. Also, doxorubicin accumulation was increased by cyanide-induced ATP depletion in MAGEA4 transfectants.

Various P-glycoprotein (Pgp) inhibitors as well as MAGEA4 siRNA in MAGEA4 transfectants and MAGEA4-overexpressing cells increased accumulation of doxorubicin. Immunoprecipitation and Western blot analysis revealed that MAGEA4 neither interacts with Pgp nor alters its expression. Confocal microscopy and subcellular fractionation demonstrated that MAGEA4 was located in plasma membrane, cytosol and nucleus. MAGEA4 protein formed non-disulfide homo- and hetero-dimeric structure. In addition, MAGEA4 had a reactive oxygen species-scavenging activity.

These results suggest that acquisition of drug resistance in cancer cells could be at least in part associated with overexpression of MAGEA4 with membrane transporter and antioxidant activities. It is implicated that MAGEAs can be suitable targets for novel therapeutic strategies of MAGEAs-overexpressing cancer cells.

I . 서 론

종양세포는 정상세포와는 다른 여러 가지 물질을 만들어 내는데 이것들은 인체의 면역계에서 항원으로 인지되기 때문에 통칭하여 종양관련항원 (tumor associated antigen)으로 불린다. 그 중에서 종양세포에서만 특이적으로 발현되는 종양-고환항원(cancer/testis (CT) antigen)이 있다. 현재까지 밝혀진 종양-고환항원은 44개의 family로 구성되어 있고 89개의 항원이 발견되었으며(Table 1, Scanlan 등, 2004) 대표적인 것으로 melanoma antigen (*MAGE*) 를 비롯하여 B melanoma antigen (*BAGE*), G antigen (*GAGE*), preferentially expressed antigen in melanoma (*PRAME*) 및 cancer/testis antigen 1B (*CTAG1B*) 등이 있다(van der Bruggen 등, 1991; Traversari 등, 1992; Gaugler 등, 1994; van der Bruggen 등, 1994, Boel 등, 1995; Herman 등, 1996; Ikeda 등, 1997; Tanaka 등, 1997; Visseren 등, 1997; Jager 등, 1998).

이 중 *MAGE* 유전자는 van der Bruggen 등(1991)에 의해 악성 흑색종 세포에서 처음으로 발견된 종양특이항원으로 흑색종 뿐 아니라 폐암, 두경부암, 방광암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 위암, 간암, 식도암, 일부 백혈병 등 거의 모든 암에서 발현이 되며(Table 2, Bruggen 등, 1991; Van den Eynde 등, 1997; Yoshimatsu 등, 1998; Lee 등, 1999; Tahara 등, 1999; Jungbluth 등, 2000; Chomez 등, 2001; Otte 등, 2001; Zambon 등, 2001), 고환이나 태반 이외의 정상조직에서는 발현되지 않는다(Itoh, 등; Jungbluth 등, 2000). 이러한 *MAGE* 유전자의 우수한 종양 특이성을 이용하여 *MAGE* 유전자의 발현을 암의 진단에 중요한 표지자로서 이용하려는 연구가 진행되고 있다(Park 등, 2002).

인간에서 현재까지 56종의 *MAGE* 유전자가 보고되었으며(Table 3, Xiao와 Chen, 2004), melanoma antigen, family A (*MAGEA*), melanoma antigen, family B (*MAGEB*), melanoma antigen, family C (*MAGEC*), melanoma antigen, family D (*MAGED*), melanoma antigen, family E (*MAGEE*), melanoma antigen, family H (*MAGEH*), melanoma anti-

gen, family I (*MAGEI*), melanoma antigen, family J (*MAGEJ*), melanoma antigen, family K (*MAGEK*), melanoma antigen, family L (*MAGEL*) 등 많은 아형을 가지고 있다. *MAGE* 유전자는 3번, 15번, X 염색체에 존재하며(Fig. 1, Chomez 등, 2001) 크게 I 형과 II 형으로 나뉘는데 I 형은 *MAGEA*, *MAGEB* 및 *MAGEC*이고(Barker와 Salehi, 2002) 나머지는 II 형으로 구분되어진다. I 형은 종양세포에서 발현되고 고환 및 태반이외의 정상 조직에서는 발현하지 않지만, II 형은 정상조직에서도 발현을 한다. I 형은 X 염색체에 존재하며 위치하고 있는 부위에 따라 *MAGEA* (Xq28), *MAGEB* (Xp21) 및 *MAGEC* (Xq26-27)로 나누는데(Chomez 등, 2001), 그 중에서도 *MAGEA*를 이용한 연구가 많이 되고 있으며, 현재까지 약 12개의 subtype이 알려져 있다(de Plaen 등, 1994; Kirkin 등, 1998; Lin 등, 2004). *MAGEA* subtypes 중 1-4번, 6번, 10번, 12번 유전자가 여러 악성종양에서 많이 연구되고 있다(Boon 등, 2000).

MAGE 유전자는 정상세포에서는 promoter 부위가 메틸화되어 있어 전사인자가 결합할 수 없어서 비 활성화된 DNA 상태로 존재하지만, 종양세포에서는 promoter 부위가 비특이적으로 demethylation되면서 활성화 되는 것으로 추정하고 있을 뿐 그 역할에 대해서는 아직까지 알려진 바가 거의 없다(Weber 등, 1994; de Smet 등, 1996). 또한, 악성종양 발생의 어느 단계에서 어떤 신호 전달 체계를 통해서 발현되는지에 대해서는 확실히 밝혀져 있지 않고 있으나, 정상세포의 창상 치유시에 *MAGE*가 나타나고(Becker 등, 1994), 정자형성에 관여하며 세포사멸을 유도하며(Ohman과 Nordqvist, 2001), cell cycle을 조절하는 것으로 추측되고 있다(Barker와 Salehi, 2002).

MAGE 단백질의 domain 구조를 살펴보면 모든 *MAGE* 단백질은 *MAGE* homology domain (MHD)을 모두 가지고 있다. MHD는 *Drosophila*와 *Aspergillus*와 같은 다른 종에서도 흔히 발현하는데 *Caenorhabditis elegans*에서는 적게 발현한다(Barker와 Salehi, 2002). Type I *MAGE*는 MHD만 가지고 있지만 Type II *MAGE*는 MHD 뿐만 아니라 MHD2

또는 interspersed repeat domain (IRD)을 가지고 있는 것도 있다(Fig. 2).

또한, *MAGE* 유전자가 활성화되면서 만들어지는 단백질이 세포막에 발현하게 되면, 특이적인 human leukocyte antigen (HLA) type를 갖는 cytotoxic T lymphocyte (CTL)는 이것을 항원으로 인식하게 되고, 그 결과 종양세포는 CTL에 의해서 용해되기 때문에 악성 흑색종을 포함한 몇몇 종류의 종양을 치료하는데 있어 이들 항원을 이용한 면역치료가 시도되고 있다(Marchand 등, 1995; Nesstle 등, 1998; Kawakami 등, 1998). 현재까지 여러 가지 *MAGE* 유전자의 subtypes가 알려져 있는데 subtypes에 따라서 그것을 인지할 수 있는 CTL의 HLA types가 다르기 때문에 면역요법을 고려할 경우에는 먼저 환자의 HLA types와 종양에서 발현되는 종양특이항원을 알고 있어야 한다(Kirkin 등, 1998). 지금까지 수없이 많은 *MAGE* 유전자의 HLA types가 보고되었다(Novellino 등, 2004). 위와 같이 *MAGE* 유전자는 임상적으로 종양의 진단 및 면역치료에 응용되어 많은 연구가 이루어졌지만(Van den Eynde 등, 1997; Marchand 등, 1999; Park 등, 2002) *MAGE* 유전자의 발현과 항암제 내성에 관한 연구는 드물다.

암환자의 항암화학요법에 있어서 중요한 문제 중 하나는 항암제에 대한 약물내성이라고 할 수 있다. 몇 가지의 종양들(non-small cell 폐암, 대장암)은 처음부터 표준 항암제에 반응하지 않는 일차내성(primary resistance) 또는 자연내성(natural resistance)을 보인다. 반면에 항암제에 처음에는 효과를 나타내다가 나중에는 항암제가 반응하지 않는 획득내성(acquired resistance)을 보이는 경우도 있다. 획득내성 중에서 다약물내성(multidrug resistance, MDR)이 특히 문제가 되고 있다. MDR이란 어떤 한 종류의 항암제를 사용하였을 때, 이 약물과 화학적 구조도 다르고 작용기전도 다른 항암제에 대해서도 내성을 보이는 현상을 말하며 항암화학요법 치료가 실패하는 가장 중요한 요인이 되고 있다. 중요한 MDR 기전은 1) 세포막에서 약물의 uptake을 감소 또는 약물의 배출을 증가시키거나, 2) 표적효소의 질적 양적인 변화, 3) 약물 대사의 변화 4)

핵산수복의 증가, 5) apoptosis의 저항 등으로 나뉘 볼 수 있다. 이 같은 내성기전에는 세포막, 세포질, 핵단백질이 관여하며 종양유전자, 종양억제유전자, transporter, 대사 및 수복효소 등이 있다(Stavrovskaya, 2000). 그러나 이중에서 가장 광범위하게 관련된 기전은 종양세포의 세포막 이동의 변화이기 때문에 이러한 내성 기전을 typical MDR 또는 classical MDR이라고 한다. 이 같은 전형적인 MDR은 주로 암세포내로 들어온 항암제를 암세포 밖으로 내보내는 세포막 배출펌프의 증가 때문인 경우가 많다. 이 중에서 항암제 내성과 관련이 있는 대표적인 세포막 배출펌프로는 P-glycoprotein (Pgp, *MDR1*) (Riordan과 Ling, 1979) multidrug resistance-associated protein (MRP) (Cole 등, 1992), breast cancer resistance protein (BCRP) (Doyle 등 1998; Maliepaard 등, 1999) 등이 있다. 이 3가지 단백질은 ATP-binding cassette (ABC) transporter에 속한다. 이들 내성단백질은 ABC superfamily에 속한다는 것을 제외하고는 유전자의 위치, 아미노산서열, 구조, 기질 등에 있어 상당히 차이가 있다. 이들 단백질의 특이적인 기질의 선택성은 Fig. 3과 같다.

본 연구에서는 항암 화학요법으로 내성기전을 획득한 백혈병 세포에서 *MAGE* 유전자의 발현양상을 조사하여 항암제 내성을 획득한 과정에서의 역할을 살펴보고 나아가 항암제 치료에 내성을 유발하는 기전을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양과 항암제 내성세포의 선별

1) 세포 배양

급성 골수성 백혈병 세포(AML-2), 신장 세포(HEK 293T), 섬유육종 세포 (HT-1080), 대장암 세포(Caco-2), 악성 흑색종 세포(DM4), 위암 세포 (SNU-1, -5, -16, -216, -484, -601, -620, -638, -668, 및 -719)를 37°C, 5% CO₂와 습윤화된 배양기(Sanyo, Osaka, Japan) 내에서 배양하였다. 배양액은 56°C에서 30 분간 열처리된 fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL, Gland Island, NY, USA) 10%와 항생제(antibiotic-anti-mycotic, GibcoBRL)를 함유한 α -MEM (minimum essential medium alpha medium, GibcoBRL) 배지를 AML-2 세포에 사용하였으며, DMEM (dulbecco's modified eagle medium, GibcoBRL) 배지는 HEK 293T, Caco-2 및 DM4 세포에 사용하였고, HT-1080 세포와 위암 세포는 RPMI 1640 (GibcoBRL) 배지를 사용하였다.

매우 낮은 온도(-196°C)에서는 세포내의 모든 대사 작용이 멈추게 되어 세포가 장기간 살아있는 상태로 유지되어 거의 영구적으로 보관이 가능하다 (Grout 등 1990). 그러므로 세포의 변형, 오염, 배양기의 고장 등으로 인하여 세포를 손실하게 되는 경우에 대비해 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, ST. Louis, MO, USA) 10%, FBS 23.5% 및 배양배지 66.5%를 혼합한 세포 동결배지와 함께 액체 질소에 보관해 두었다. 필요한 경우, 액체 질소에 보관되어 있는 동결 용기를 꺼내, 즉시 37°C의 수조에서 충분히 녹인 후 70% 알코올로 동결 용기의 외부를 소독하였다. DMSO는 세포 성장에 방해가 되므로 세포 동결 배지 10배의 배양 배지와 함께 원심분리하여 상층액을 버리고 세포만을 새 배양 배지에 부유하여 배양하였고 6 시간 이후 배지를 교체해 주었다.

2) 항암제 내성세포의 선별

Doxorubicin (Sigma)의 IC₅₀농도(세포의 성장을 50% 억제하는 농도)인

22.4 ng/ml를 함유한 배양액에서 백혈병 세포 AML-2 세포를 배양하였다. 한 농도에서 약물을 3 일간 투여 후 약물을 제거하여 며칠 또는 몇 주 배양한 후 confluent해지면 약물의 농도를 50%씩 증가시키는 방법으로 선별하여 IC₅₀농도의 10배 이상 되는 약물이 존재하는 배지에서도 잘 자라는 내성 아세포 AML-2/DX100을 수립하였다(Choi 등, 1999). 내성 세포를 수립한 후 안정될 때까지 일주일에 두 번씩 최소 6 개월 이상 계대 배양 후 실험에 사용하였다.

2. 세포 독성실험

Cytotoxicity 실험은 살아있는 세포의 미토콘드리아에 존재하는 succinic dehydrogenase라는 효소가 MTT [3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma]를 환원시켜 formazan을 형성시킬 수 있음을 근거로 formazan의 농도를 측정함으로써 생존한 세포수를 측정하는 MTT 방법을 이용하였다(Pieters 등 1988). 대사과정이 정상적인 암세포는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띄는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영한다.

96 well microplate (Nunc, Rochester, NY, USA)에 세포를 적절한 농도로 희석시키고 세포 부유액 90 μ l씩을 각각 넣었다. 그리고 12 시간 후에 측정하고자 하는 약물을 10 μ l씩 넣고 이때 약물대신 phosphate buffered saline (PBS)를 넣어 세포의 대조군으로 삼고, 세포 대신 배양액만을 넣어 blank로 삼았다. 잘 흔든 후 CO₂ 배양기에서 2일 또는 3일 동안 배양한 후 모든 well에 5 mg/ml의 MTT 용액 10 μ l를 가해주고 다시 37°C, 5% CO₂에서 4-5 시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 4-5 시간 후 각 well에 생성된 formazan 결정을 suspension 세포인 경우에는 0.04 N HCl-isopropanol 용액 100 μ l, monolayer 세포인 경우 상층액 80 μ l씩 버린 다음 150 μ l의 DMSO를 넣고 10 분 동안 shaking해서 생성된 formazan 결정

을 잘 녹여서 microplate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{세포 독성 작용 \%} = \frac{\text{항암제를 처리한 well의 흡광도}}{\text{항암제를 처리하지 않은 well의 흡광도}} \times 100\%$$

3. 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)

1) 총 RNA의 추출 및 역전사(RT)

TRIZol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 총 RNA를 분리 추출하였다. Polypropylene tube에 5×10^5 개의 세포를 침전시킨 후 TRIZol 1 ml을 넣고 5 분 동안 15-30°C에서 반응시킨다. 200 μ l chloroform을 넣고 15 초 동안 손으로 가볍게 섞어주고 2-3 분 동안 15-30°C에서 반응시킨다. 4°C에서 13,200 rpm으로 15 분간 원심분리 한 후 상층 액을 tube에 옮긴다. 500 μ l isopropyl alcohol을 넣고 잘 섞어준 다음 10 분 동안 15-30°C에서 반응시킨다. 4°C에서 13,200 rpm으로 15 분 동안 원심분리 하고 상층 액을 버리고 75% EtOH를 RNA pellet에 넣고 vortexing하고 4°C에서 13,200 rpm으로 5 분간 원심분리 한다. 다음 실온에서 pellet를 건조 시킨 후 0.1% DEPC water에 다시 녹였다. RNA 농도 (1 OD = A_{260} unit of single-stranded RNA = 40 μ g/ml)는 260 nm에서 측정하였고(DU^R 650 spectrophotometer, Beckman, Fullerton, CA, USA), RNA 순도는 A_{260} (260 nm 에서의 흡광도)/ A_{280} (280 nm 에서의 흡광도) 비로, RNA 보존도는 5 μ g RNA을 전기 영동하여 확인하였다. 이상에서 사용된 모든 용액은 제조한 후 하룻밤 동안 37°C에서 방치 후 121°C에서 20 분간 고압 증기 멸균한 0.1% DEPC water를 가지고 만들었다. First strand cDNA를 1 U/ μ l RNasin (Promega, Madison, WI, USA), oligo(dT) 450 ng, 40 mM Tris-HCl (pH 8.4), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM each dNTP, 10 mM DTT (GibcoBRL) 및 M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) 200 U가 함유된 20 μ l의 용액에서 총 RNA 1 μ g으로부터 합성하였다.

2) 중합효소 연쇄반응(PCR)

PCR은 1X PCR 완충액(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1 mM

MgCl₂, 100 µg/ml gelatin 및 0.05% Triton X-100)에 25 ng의 RNA로부터 합성된 cDNA, 각각 10 pM primers, 50 µM dNTP 및 2.5 unit taq DNA polymerase (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)가 함유된 25 µl의 반응액에서 시행하였다. 정량을 위하여 3.33 µCi [α-³²P] dCTP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 반응 혼합물에 첨가하였다. PCR 반응에 사용한 primer와 PCR조건은 Table 4 및 6과 같다. PCR 기계는 GeneAmp PCR system 2400 (PE Applied Biosystems, Boston, MA, USA)을 사용하였다. PCR 산물을 7% 비 변성 polyacrylamide gel 상에서 100 V에서 2 시간 동안 전기 영동하였다. 전기영동 후 1 시간 30 분 동안 80°C에서 건조한 후 X-ray 필름에 노출시켜 autoradiography를 시행하였다.

4. 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(Real-time RT-PCR)

TRIzol 시약 (Invitrogen)을 이용하여 총 RNA를 분리 추출한 후 유전자의 발현을 Light cycler 2.0 (Roche)을 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하여 정량화하였다. RNA로부터 제조된 4 µl의 cDNA에 SYBR Green I, Tag polymerase, dNTPs 및 MgCl₂ 등이 포함된 10X master mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)와 각 유전자에 대한 primer (Table 5 및 7)를 혼합한 다음, 20 µl로 실시간 정량적 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 실험적 오차를 줄이기 위해 동일 시료로 실시간 정량적 중합효소연쇄반응을 반복 시행하였으며 평균값을 구하여 각각의 mRNA 발현량을 정량화하였다.

5. Western blot 분석

세포를 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.1 M DTT 및 10 µg/ml leupeptin을 함유한 추출완충액 [1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate 및 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)를 함유한 PBS용액]으로 용해시킨 후 sonication해서 DNA를 조각냈다. 단백질의 정량은 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 이용해서 protein assay kit (Bio-rad,

Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정했다. Western blot 방법은 Towbin 등(1979)에 의해 처음 기술된 방법을 이용했다. 세포 총 단백질을 50 μg 을 0.1% SDS를 함유한 7% (w/v) polyacrylamide gel (PAGE)에서 전기영동한 후 gel에 존재하는 단백질을 electroblotting 방법으로 nitrocellulose (NC) filter에 옮겼다. 비 특이적인 결합을 차단하기 위하여 NC filter를 5% 탈지분유를 함유한 tris-buffered saline-tween (TBST) 용액에 넣고 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% TBST 용액으로 10 분간 1회, 15 분간 1회 세척한 후 다시 새로운 TBST 용액에서 5 분간 2회 세척했다. Filter를 1 차 항체(MRP (Signet, Dedham, MA, USA), 1:1000; FLAG (Sigma), 1:1000; MAGEA4 (Abgent, San Diego, CA, USA), 1:500)를 함유한 TBST 용액에 넣고 실온에서 1 시간 동안 방치한 후 위와 같은 방법으로 세척하였다. 세척한 후 peroxidase표지된 goat anti-rabbit IgG (1:2000)를 함유한 TBST 완충용액에 filter를 넣고 실온에서 각각 1 시간 동안 방치한 후 TBST 완충용액으로 15 분간 1회, 5 분간 4회 세척했다. Enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Amersham)를 이용하여 band들을 가시화했다.

6. DNA chip assay

1) Probe 제작

TRIzol 시약 (Invitrogen)을 이용하여 총 RNA를 분리 추출한 후 RNA의 cDNA 역전사 반응과 Cy labeling 과정의 시약들은 DNA-chip hybridization kit (Digital Genomics, Seoul, Korea)를 사용하였다. 제작사의 지시에 따랐으며, 이를 간략히 기술하면 50 μg total RNA에 1.5 μg oligo (dT) primer를 넣고 70°C에서 5 분간 변성시킨 후 얼음에 정치하였고, 역전사 표지 반응은 1 mM dNTP, 0.4 mM DTT 및 0.15 mM Cy^3 -, Cy^5 -dUTP를 첨가하고 50 unit AMV reverse transcriptase (Promega)를 사용하여 총 20 μl 반응액으로 cDNA를 labeling 하였다. 역전사 반응 후 Sephacryl S-100으로 labeling 된 cDNA를 정제하였으며 정제된 cDNA는 EtOH 침전으로 농축하고 sample 및 control 각 17.5 μl hybridization buffer (6X SSC,

0.2% SDS, 5X Denhardt Solution 및 0.1 mg/ml salmon sperm DNA)에 녹인 후 합하여 probe로 사용하였다.

3) Hybridization

cDNA chip은 TwinChip Human-8K (Digital Genomics, Seoul, Korea)를 사용하였다. Prehybridization buffer (6X SSC, 0.2% SDS, 5X Denhardt solution 및 1 mg/ml salmon sperm DNA) 30 μ l를 cDNA chip에 넣고 cover glass로 덮은 후 밀봉하여 상온에서 2 시간동안 반응하였다. 2 X SSC와 0.2X SSC로 cDNA chip을 세척한 다음 원심분리기를 이용하여 건조시켰다. Labeling된 probe 35 μ l을 95°C에서 2 분간 정치하여 변성시킨 후 DNA chip위에 떨어뜨리고 cover glass로 덮었다. DNA chip을 100% 습도를 유지시킨 chamber안에 넣어 62°C에서 16 시간 동안 hybridization하였다. Hybridization 후 60°C에서 세척용액(2X SSC 및 0.2X SDS)으로 각각 30 분씩 2회 세척하였고 상온에서 0.05X SSC에 5 분간 세척한 후 원심분리로 건조시켰다.

4) Microarray 분석

cDNA chip의 판독과 해석은 ScanArray Lite (Perkin-Elmer Life Sciences, MA, USA)와 Genepix 3.0 software (Axon instruments, Union City, CA, USA)를 이용하였다. Cy³와 Cy⁵의 비율이 1이 되도록 프로그램으로 조절하고, 이를 중앙값 비를 기준으로 발현 증가와 감소를 분석하였다.

7. Construction과 transfection

1) Plasmid

실험에 사용한 vector는 pCMV-Tag 2A, pcDNA6/FLAG 및 pcDN-A6/Myc-His A vector를 사용하였으며(Fig. 4), construction을 만들기 위해 사용한 primer는 Table 8, 9 및 10과 같다.

2) PCR product의 gel extraction

전기영동된 agarose gel에서 원하는 band를 자른 후 QG buffer (Quiagen, Hilden, Germany)를 100 mg당 300 μ l를 넣은 후 50°C incubator에서 10 분 동안 방치한 후 100 μ l의 isopropanol을 가하여 잘 섞어준다. QIAquick spin column에 옮긴 후 원심분리하여 상층액을 제거한 후 PE buffer 750 μ l를 넣은 후 잘 섞어준 후 원심분리하여 상층액을 제거한다. Elution buffer 10 μ l를 넣은 후 DNA를 elution시킨다.

3) 제한효소로 절단

Gel extraction 한 후 얻은 DNA를 *Bam*H I/*Xho* I 또는 *Hind* III/*Xho* I 제한효소를 이용하여 절단하였다. DNA 10 μ l, 10X buffer 1 μ l, *Bam*H I 또는 *Hind* III 1 μ l, *Xho* I 1 μ l 및 3차 증류수 8 μ l를 넣은 후 37°C에서 overnight 하였다.

3) Ligation

Vector 1 μ l, 2X ligation buffer 5 μ l, T4 DNA ligase (Takara Biotechnology, Tokyo, Japan) 1 μ l 및 PCR product 3 μ l를 넣은 후 25°C에서 2 시간 반응시켰다.

4) *E. coli* transformation

Ligation된 plasmid DNA를 2-mercaptoethanol로 전 처리한 DH5 alpha competent cell (Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 transformation 하였다. Competent cell 45 μ l에 ligation된 plasmid DNA 4 μ l를 넣은 후 얼음에 30 분 방치하고 42°C에서 30 초간 heat shock을 하여 plasmic DNA가 competent cell 안으로 들어가게 하였다. 그런 다음 얼음에 2 분간 방치한 후 SOC broth 255 μ l를 가하여 37°C shaking incubator에서 1 시간 배양한 후 kanamycin 또는 ampicillin이 들어있는 LB agar plate에 streaking 한 후 37°C incubator에서 overnight한 후 나타난 각각의 colony를 LB broth 4 ml에 배양하였다.

5) Plasmid DNA purification

Plasmid extraction kit (Quiagen)를 이용하여 plasmid를 정제하였다. 배양된 세포를 원심분리하여 상층액을 제거한 후 pellet에 solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl 및 10 mM EDTA pH 8.0)을 250 μ l를 넣어 잘 섞어준 후 solution II (0.2 N NaOH 및 1% SDS) 250 μ l를 넣어준 후 잘 섞어준다. 그런 다음 실온에서 2 분간 방치한 후 solution III (5 M potassium acetate 및 glacial acetic acid) 350 μ l를 가하여 잘 섞어준 후 얼음에 약 2 분간 방치시킨다. 12,000 g, 4°C에서 15 분간 원심분리 한 후 상층액을 spin column 에 옮긴다. Washing buffer I [Phenol/chloroform/isoamyl alcohol이 25:24:1 (v/v/v)] 350 μ l 및 washing buffer II (ethanol) 350 μ l를 가하여 씻어준 후 TE buffer (pH 8.0) 50 μ l에 녹인다.

6) 제한 효소에 의한 확인

원하는 DNA가 들어갔는지 확인하기 위하여 제한효소를 처리하여 확인 하였다. DNA 2 μ l, 10X buffer 1 μ l, *Bam*H I 또는 *Hind* III 0.5 μ l, *Xho* I 0.5 μ l, 3차 증류수 6 μ l를 넣은 후 37 °C에서 1 시간 반응하였다.

7) Sequencing

T3와 T7 forward primers를 사용하였고, automated DNA analyzer system (ABI PRISM 3100, PE Applied Biosystems, Boston, MA, USA)을 이용하여 염기서열을 분석하였다. Sequencing kit는 ddNTP에 형광물질을 lable하는 Big dye terminator cycle sequencing 방식을 이용하였다. Sequencing reaction을 위한 PCR reaction은 96°C 10 초, 50°C 5 초, 60°C 4 분 30 cycles을 시행하였다. PCR product은 PCR purification kit (Solgent, Seoul, Korea)을 사용하여 정제하였다.

8) Transient 및 stable transfectant 세포 수립

Plasmid transfection 하루 전 세포를 trypsin처리하고 세포수를 계

산해 당일 50-90% 포화 상태에 도달하게 하였다. 무혈청 배지 300 μ l에 plasmid DNA 2 μ g과 lipofectamine plus reagent (Invitrogen) 15 μ l를 혼합한 용액과 무혈청 배지 300 μ l에 lipofectamine (Invitrogen) 7.5 μ l에 넣은 용액을 실온에서 15 분간 배양하였다. 희석된 lipofectamine reagent와 DNA용액을 섞은 후 실온에서 15 분간 배양하였다. 세포의 배양액을 transfection media로 교체 후 세포에 DNA-lipofectamine 복합체를 첨가해 37°C, 5% CO₂에 6 시간 배양한 후 2X complete media를 첨가해 준 후 48 시간동안 배양하였다. Stable한 transfectant를 얻기 위하여 transient transfection을 한 후 blasticidin S (Invitrogen)로 selection하여 내성 세포 클론을 얻었다.

8. 유세포 분석술을 이용한 약물축적 실험

배양한 세포를 차가운 PBS (pH 7.4)용액으로 세 번 세척한 후 10⁵/ml가 되도록 PBS 용액에 부유한 후 형광물질을 넣어 37°C에서 1 시간동안 방치한 후 유세포 분석기(FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 분석을 하였다. 이때 laminar sheath flow의 세포내의 형광물질을 argon ion laser (488 nm)로 여기시켜 rhodamine과 calcinein-AM은 585 nm, doxorubicin과 daunorubicin은 585 nm, mitoxantrone은 650 nm에서 방출되는 빛을 측정하였다.

9. Immunoprecipitation (IP)

세포를 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml pepstatin A 및 10 μ g/ml aprotin 함유한 추출완충액 (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol 및 1% Triton X-100)으로 용해시킨 단백질을 4°C에서 2 시간동안 반응시킨 1차 항체가 함유된 protein G agarose bead (Invitrogen) 또는 anti-FLAG M2 agarose bead (Sigma)에 넣어 overnight 한 후 추출 완충액으로 4회 세척한 후 2X sample loading buffer 35 μ l를 넣고 95°C에서 5 분간 끓인 후 원심분리한 후 상층액을 SDS-PAGE에 전기영동 한 후, gel에 존재하는 단백질을

electroblotting 방법으로 NC filter에 옮겼다. 비 특이적인 결합을 차단하기 위하여 NC filter를 5% 탈지분유를 함유한 TBST 용액에 넣고 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% TBST 용액으로 10 분간 1회, 15 분간 1회 세척한 후 다시 새로운 TBST 용액에서 5 분간 2회 세척했다. Filter를 Pgp (1:1000, Santa Cruz), FLAG (1:1000, Sigma) 또는 Myc (1:1000, Sigma) 1차 항체를 함유한 TBST 용액에 넣고 실온에서 1 시간 동안 방치한 후 위와 같은 방법으로 세척하였다. 세척한 후 peroxidase가 표지된 goat anti-rabbit IgG (1:2000)를 함유한 TBST 완충용액에 filter를 넣고 실온에서 각각 1 시간 동안 방치한 후 TBST 완충용액으로 15 분간 1회, 5 분간 4회 세척했다. ECL kit (Amersham)를 이용하여 band들을 가시화했다.

10. 면역형광 분석

5×10^4 개의 세포를 cytospin (Cell spin, Hanil, Seoul, Korea)을 이용하여 혈청 알부민으로 코팅한 슬라이드 글라스에 붙여 건조하였다. 슬라이드를 3.7% paraformaldehyde/PBS로 15 분간 고정한 후 1X PBS로 10 분간 세척하였다. 항체의 투과력을 증가시키기 위해 0.2% Triton X-100/PBS (PBST)로 10 분간 반응시켰다. 1X PBS로 10 분간 세척하고, 항체의 비특이적인 결합을 억제하기 위해 3% BSA/0.1% PBST로 1 시간 동안 blocking하였다. blocking 용액을 제거한 후 동일한 blocking 용액에 100배 희석 시킨 anti-FLAG (Sigma) 일차 항체를 처리한 뒤 1 시간 동안 반응시켰다. 0.1% PBST로 5 분간 3회 세척하고, 2차 항체는 anti-rabbit IgG rhodamine conjugate (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 blocking용액에 320배 희석하여 실온에서 1 시간 동안 반응시킨 후 PBST로 5 분간 3회 세척하였다. 2차 항체 처리시 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Hoechst 33342를 함께 처리하였다. Aqua mount로 mount시킨 후 confocal laser scanning microscope (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

11. 핵, 세포질 및 세포막의 분리

세포의 핵, 세포질 및 세포막의 분리는 Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 분리하였다. 세포를 PBS로 2회 세척한 후 extraction buffer I 200 μ l와 protease inhibitor cocktail 1 μ l를 넣은 후 4°C에서 10 분간 반응시킨 후 1,000 g로 10 분 동안 원심분리 한 후 세포질이 들어있는 상층액을 분리한 후 남아 있는 pellet에 extraction buffer II 200 μ l와 protease inhibitor cocktail 1 μ l를 넣은 후 4°C에서 30 분간 반응시킨 후 6,000 g로 10 분 동안 원심분리 한 후 세포막이 들어있는 상층액을 분리하였다. 남아 있는 pellet에 extraction buffer III 100 μ l에 protease inhibitor cocktail 1 μ l와 benzonase nuclease 0.3 μ l를 첨가한 후 4°C에서 10 분간 반응시킨 후 6,800 g로 10 분 동안 원심분리 한 후 핵이 들어있는 상층액을 분리하였다.

12. 형광탐식자를 이용한 반응성 산소종의 측정

반응성 산소종 생성은 형광탐식자인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate (DCFH-DA)를 이용하였다. DCFH-DA는 세포막을 쉽게 통과할 수 있으며 세포내의 esterase에 의해 비형광인 DCFH로 전환되며 반응성 산소종의 존재시 산화되어 형광인 DCF로 전환되는 원리를 이용하여 반응성 산소종의 생성을 측정한다(LeBel 등, 1992). 1×10^5 개의 세포를 함유한 200 μ l의 PBS를 96 well plate에 넣고 DCFH-DA가 1 μ M이 되도록 시료와 함께 넣고 혼합하여 37°C에서 4 시간 동안 반응시킨 후 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 530 nm에서 형광분석기(LS-55, Perkin-Elmer, CT, USA) 에서 형광 강도를 측정하였다.

13. 통계처리

실험 결과는 평균±표준편차 형태로 나타내며 두 그룹간의 통계적인 분석은 Student's *t*-test 방법을 이용하였다. $P < 0.05$ 인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

III. 결 과

1. 항암제 내성세포의 선별 및 내성기전의 규명

급성 골수성 백혈병 세포인 AML-2 세포에 doxorubicin IC₅₀농도(22.4 ng/ml)를 투여하여 단계적으로 농도를 증가시켜 100 ng/ml가 된 후 6개월 간 계대 배양하여 doxorubicin 내성세포인 AML-2/DX100 세포를 얻었다. 3일 MTT assay를 시행하여 항암제에 대한 감수성 검사한 결과 AML-2/DX100 세포는 항암제 doxorubicin에 대한 IC₅₀농도가 419.2 ng/ml로 약물감수성 세포인 AML-2/WT 세포의 IC₅₀농도인 22.8 ng/ml와 비교시 18.4배의 내성을 보였다(Fig. 5).

내성기전을 규명하기 위해서 다른 항암제에 대한 교차내성을 측정한 결과 다약물 내성 표현형을 보였으며(자료 미제시), RT-PCR과 Western blot 방법을 이용하여 mRNA와 단백질의 발현을 각각 측정한 결과 AML-2/DX100 세포는 MRP가 과발현되어 있었다(Fig. 6).

2. AML-2/DX100 세포에서 MAGE의 발현

cDNA microarray를 이용하여 *MAGE* 유전자 발현을 조사한 결과 AML-2/DX100 세포는 AML-2/WT 세포와 비교시 melanoma antigen인 *MAGEA4* 유전자가 221배, *MAGEA2* 123배, *MAGEA6* 18배, *MAGEA9* 11배, *MAGEB2* 7배, *MAGEA1* 3.8배 및 *MAGEA12* 1.2배 순으로 증가하였다(Table 11). 가장 많이 증가한 *MAGEA4* 유전자를 RT-PCR, real-time RT-PCR 및 Western blot 방법을 이용하여 재확인한 결과 AML-2/WT에 비해 현저히 증가되어 있었다(Fig. 7).

3. MAGEA4 의 시간별 발현량

MAGEA4가 발현된 세포를 만들기 위해 HEK 293T 세포에 MAGEA4를 transfection 시킨 후 24 시간에서 96 시간까지 24시간 간격으로 MAGEA4의 발현량을 조사하였는데 48 시간에서 최대의 발현을 보였으며 48 시간 이후에는 발현이 감소되다가 96 시간에는 거의 발현을 하지 않았다(Fig. 8).

4. MAGEA4의 발현과 항암제 내성과의 관계

MAGEA4의 발현이 항암제 내성과 관계가 있는지를 조사하기 위하여 HEK 293T 세포에 MAGEA4를 transfection 시킨 후 24시간 후에 MDR 기질인 doxorubicin, daunorubicin 및 mitoxantrone을 처치하고, non-MDR 기질인 5-FU와 cisplatin을 2일 동안 처치한 후 MTT 방법을 이용하여 세포독성을 조사하였다. MDR 기질인 doxorubicin과 daunorubicin을 처치하였을 때는 IC₅₀농도를 기준으로 각각 1.5 배, 2.3배의 내성을 보였으나 mitoxantrone에는 내성을 보이지 않았다(Fig. 9). Non-MDR 기질인 5-FU와 cisplatin에는 내성을 보이지 않았다(Fig. 10)

5. MAGEA4의 발현과 약물 배출 효과

MAGEA4가 약물 배출 기능이 있는지 알아보기 위하여 HEK 293T 세포에 MAGEA4를 transfection 시킨 후 48시간 후에 형광물질이면서 MDR 기질인 doxorubicin, daunorubicin, rhodamine123, mitoxantrone 및 calcein-AM을 처치한 후 1시간 후 유세포 분석술을 이용하여 각각의 형광량을 조사하였다. 그 결과 MAGEA4가 doxorubicin, daunorubicin 및 rhodamine123의 형광량을 각각 23%, 17% 및 21% 감소시켰고, mitoxantrone은 7%정도의 형광량을 감소시켰으나 통계적 의의는 없었다. 그러나 calcein-AM은 오히려 형광량이 증가하였다(Fig. 11). MAGEA4의 발현이 여러 MDR 기질들을 배출한다는 것이 관찰되었는데 대표적인 세포막 배출펌프로 알려진 Pgp, MRP, BCRP와 관련이 있는지 알아보기 위하여 Pgp inhibitors인 PSC833과 flavonoid (3,6,3',4'-tetramethoxyflavone, TMF), MRP inhibitor인 probenecid, BCRP inhibitor인 novobiocin 및 adenosine triphosphate (ATP)를 고갈시키는 약물인 cyanide를 doxorubicin을 함께 처치한 후 1 시간 후 유세포 분석술을 이용하여 doxorubicin 형광량을 관찰하였다. PSC833과 TMF를 처치한 군과 cyanide를 처치한 군에서 doxorubicin 형광량이 증가하였고 probenecid와 novobiocin을 처치한 군에서는 형광량의 변화가 없었다(Fig. 12).

6. MAGEA4의 발현과 Pgp와의 관계

Pgp inhibitor를 처치한 군에서만 doxorubicin 형광량이 증가하여 MAGEA4가 Pgp의 발현을 조절하는지 살펴보기 위하여 HEK 293T 세포에 MAGEA4를 transfection 시킨 후 48시간 후에 IP를 이용하여 Pgp의 발현량을 조사하였는데 MAGEA4가 Pgp의 발현에는 영향을 주지 않았다(Fig. 14). 또한, MAGEA4가 Pgp와 결합하는지를 조사하기 위하여 Pgp를 발현하고 있다는 알려져 있는 Caco-2 세포에 MAGEA4를 48 시간동안 transfection 한 후 Pgp와의 결합을 조사하였는데 MAGEA4와 Pgp는 결합하지 않았다(Fig. 14).

7. MAGEA4 stable 세포에서 약물 배출 효과

HT-1080 세포에 MAGEA4를 과발현하는 2개의 stable 세포(HT-1080/MAGEA4C1 및 /MAGEA4C2)를 만든 다음 MAGEA4의 발현과 약물 배출 효과를 조사하였다. 2개의 stable 세포에서 MAGEA4가 과발현 되어 있었으며, 이들 세포에 doxorubicin을 처치한 후 유세포 분석술을 이용하여 doxorubicin 형광량을 측정하였을 때 HT-1080/MAGEA4C1와 HT-1080/MAGEA4C2에서 각각 24% 및 37% 감소하였다(Fig. 15).

HT-1080/MAGEA4C2 stable 세포에서 약물 배출 효과를 알아보기 위하여 MDR 기질인 doxorubicin, daunorubicin, rhodamine123, mitoxantrone, 및 calcein-AM을 처치한 후 1시간 후에 유세포 분석술을 이용하여 각각의 형광량을 조사하였다. 이 세포에서 doxorubicin, daunorubicin, rhodamine123, mitoxantrone 및 calcein-AM의 형광량이 각각 24%, 15%, 22%, 22% 및 8% 감소하였다(Fig. 16).

8. 위암 세포와 악성 흑색종 세포에서 MAGEA4의 발현

10종의 위암 세포(SNU-1, -5, -16, -216, -484, -601, -620, -638, -668 및 -719)와 2종의 악성 흑색종 세포(DX3 및 DM4)에서 *MAGEA4* mRNA의 발현을 조사하였을 때 위암 세포에서는 SNU-216과 SNU-484세포를 제외한 다른 세포에서는 *MAGEA4*가 발현하지 않았으

나, 2종의 악성 흑색종 세포에서는 *MAGEA4*가 과발현 되어 있었다(Fig. 17).

9. MAGEA4 siRNA에 의한 약물 배출 효과

MAGEA4를 과발현하고 있는 AML-2/DX100, SNU-484 및 DM4 세포에 MAGEA4 siRNA를 transfection 한 후 MAGEA4 발현량과 약물 배출 효과를 조사하였다. *MAGEA4* mRNA의 발현량은 AML-2/DX100 세포는 20 nM, SNU-484와 DM4 세포는 각각 100 nM의 siRNA 농도에서 최대의 감소효과를 보였으며, 최대 감소 효과를 보인 농도에서 MAGEA4 단백질은 거의 발현하지 않았다(Fig. 18, 19, 21).

MAGEA4 siRNA를 transfection 시킨 후 doxorubicin을 1시간 동안 처치한 후 유세포 분석술을 이용하여 doxorubicin 형광량을 측정하였다. siRNA를 transfection 한 AML-2/DX100, SNU-484 및 DM4 세포에서 doxorubicin 형광량이 각각 14%, 26% 및 29% 증가하였다(Fig. 18, 19, 21). 또한, SNU-484세포에 MAGEA4 siRNA를 24시간 동안 transfection 시킨 후 doxorubicin을 2일 동안 처치한 후 MTT 방법을 이용하여 세포독성을 조사하였을 때 IC_{50} 농도를 기준으로 1.3 배의 감수성을 보였다(Fig. 20).

10. PSC833에 의한 약물 배출 효과

AML-2/DX100, SNU-484 및 DM4 세포에 Pgp inhibitor인 PSC833을 doxorubicin과 함께 1시간 동안 처치한 후 유세포 분석술을 이용하여 doxorubicin 형광량을 측정하였다. PSC833을 doxorubicin과 함께 처치한 군의 doxorubicin 형광량을 PSC833을 처리하지 않았을 때와 비교하였을 때 AML-2/DX100, SNU-484 및 DM4 세포에서 각각 58%, 72% 및 43% 증가하였다(Fig. 22).

11. Doxorubicin 내성 세포에서 MAGEA4의 발현

백혈병 내성세포인 AML-2/DX100 세포에서 MAGEA4가 과발현 되

어 있었는데 doxorubicin으로 내성이 길러진 다른 백혈병 내성세포 (AML-2/DX250, /DX500, /DX1000 및 HL-60/ADR) 및 폐암세포 (SKMES-1/DX1000)에서 *MAGEA4* mRNA의 발현을 조사하였는데 다른 모든 doxorubin 내성세포들에서 *MAGEA4*의 발현이 증가하지는 않았다 (Fig. 23). 그리고 10종의 위암 세포에서 *MAGEA4* mRNA 발현량과 doxorubicin에 대한 IC₅₀농도와의 상관성은 보이지 않았다(Fig. 24).

12. *MAGEA4*의 세포 내 분포

*MAGEA4*의 세포내에서의 분포를 알아보기 위해서 HEK 293T 세포에 *MAGEA4*를 transfection 시킨 후 48시간 후에 면역형광염색법을 이용하여 *MAGEA4*의 세포내 분포를 조사하였을 때 주로 세포막에 위치하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 25). 세포막에 존재하는 *MAGEA4*가 transporter로 작용할 수 있는지 알아보기 위하여 단백질 구조를 예측하는 사이트(<http://www.predictprotein.org/>)에서 *MAGEA4*의 단백질 구조를 살펴본 결과 transmembrane 구조를 가질 수 있음을 확인하였다(Fig. 26).

13. *MAGEA4* deletion mutants의 발현과 세포내 분포

*MAGEA4*의 아미노산 서열 중 어느 위치가 MDR 기질을 배출하는 효과가 있는지 알아보기 위하여 Fig. 27과 같이 deletion mutants를 디자인하였다. ΔC 는 C-terminal deletion을 의미하며 ΔN 는 N-terminal deletion을 의미한다. HEK 293T 세포에 deletion mutants를 transfection 시킨 후 48시간 후에 발현과 세포내 분포를 조사하였다. $\Delta N1-232$ 를 제외한 나머지 1-317, $\Delta C233-317$, $\Delta C110-317$ 및 $\Delta N1-109$ mutants는 발현을 하였다(Fig. 28). 면역형광 염색법을 이용하여 deletion mutants의 세포내 분포를 살펴보았는데 $\Delta N1-232$ 를 제외한 나머지 1-317, $\Delta C233-317$, $\Delta C110-317$ 및 $\Delta N1-109$ mutants가 세포막에 위치하고 있었다(Fig. 29). 또한, deletion mutants를 transfection 시킨 후 48시간 후에 핵, 세포질 및 세포막을 분리하여 세포내 발현을 조사하였다. 1-317은 핵, 세포질 및 세포막 모두에 존재하고 있었으며 나머지 mutants인 $\Delta C233-317$, Δ

C110-317 및 Δ N1-109는 세포질과 세포막에 존재하였으나 Δ N1-232는 발현하지 않았다(Fig. 30).

14. MAGEA4 deletion mutants의 약물 배출 효과

MAGEA4 deletion mutants의 약물 배출 기능을 살펴보기 위하여 각 mutants를 HEK 293T 세포에 transfection 시킨 후 48시간 후에 doxorubicin을 1 시간 동안 처치한 후 유세포 분석술을 이용하여 doxorubicin 형광량을 조사하였다. 1-317, Δ C233-317, Δ C110-317 및 Δ N1-109 mutants가 doxorubicin 형광을 각각 29%, 17%, 22% 및 19% 감소시켰으나, 발현되지 않는 Δ N1-232 mutant에서는 형광의 변화가 없었다(Fig. 31).

15. MAGEA4 deletion mutants의 dimer 형성

MAGEA4가 세포내에서 oligomer 구조를 형성하는지 알아보기 위하여, HEK 293T 세포에 MAGEA4를 transfection 시킨 후 48시간 후에 DTT를 포함하고 있는 앓는 추출 완충액으로 추출한 단백질을 DTT를 처치한 후 상온에서 30 분 동안 반응시킨 후 전기영동하여 DTT를 처치하지 않은 단백질과의 밴드 패턴을 비교하였다. DTT를 처치한 곳에서는 MAGEA4 단백질의 monomer만 존재하였지만 처치하지 않은 곳에서는 monomer와 dimer가 동시에 존재하였다(Fig. 32). 그리고 MAGEA4 아미노산 서열 중 어느 위치가 dimer 구조를 이루는지 알아보기 위하여 FLAG로 tagging 된 MAGEA4와 Myc으로 tagging 된 MAGEA4 deletion mutants를 HEK 293T 세포에 cotransfection 시킨 후 48시간 후에 IP를 이용하여 조사하였다. Deletion mutant 1-317, Δ C233-317, Δ C110-317 및 Δ N1-109는 MAGEA4와 dimer를 이뤘지만 Δ N1-232는 밴드가 보이지 않았다(Fig. 33).

16. MAGEA4의 발현과 반응성 산소종과의 관계

MAGEA4의 발현이 반응성 산소종과의 관계를 조사하기 위하여 HEK 293T 세포에 transfection 시킨 후 24시간 후에 hydrogen peroxide를 2일 동안 처치한 후 MTT 방법을 이용하여 세포독성을 조사하였는데 IC₅₀농도를

기준으로 1.3 배의 내성을 보였다(Fig. 34). 또한, HEK 293T 세포에 MAGEA4를 transfection 시킨 후 48시간 후에 oxidative stress를 유발하는 hydrogen peroxide를 처치한 후 DCFH-DA를 이용하여 반응성 산소종을 측정하였는데 MAGEA4가 반응성 산소종 생성을 억제하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 35).

17. AML-2/ WT 세포에서 5AC와 TSA에 의한 MAGEA4의 발현

AML-2/DX100 세포에서 *MAGEA4*의 발현이 DNA methylation과 histone deacetylation에 의한 것인지를 조사하기 위하여 DNA methyltransferase (DNMT) inhibitor인 5-aza-2'-deoxycytidine (5AC)와 histone deacetylase (HDAC) inhibitor인 trichostatin A (TSA)을 각각 또는 동시에 처치한 후 *MAGEA4*의 변화를 관찰하였다. 그 결과 5AC에 의해 *MAGEA4*의 발현이 증가되었으며, TSA에 의해서는 변화가 없었고, 동시 투여시에도 TSA가 5AC의 효과에 변화를 초래하지 않았다(Fig. 36).

Table 1. Current list of CT genes: 44 CT gene families and 89 individual genes or isoforms

Transcript/ Transcript family	CT Identifier	Family Members/CT Identifier
MAGEA	CT1	MAGEA1/CT1.1, MAGEA2/CT1.2, MAGEA3/CT1.3, MAGEA4/CT1.4, MAGEA5/CT1.5, MAGEA6/CT1.6, MAGEA7/CT1.7, MAGEA8/CT1.8, MAGEA9/CT1.9, MAGEA10/CT1.10, MAGEA11/CT1.11, MAGEA12/CT1.12
BAGE	CT2	BAGE/CT2.1, BAGE2/CT2.2, BAGE3/CT3.3, BAGE4/CT2.4, BAGE5/CT2.5
MAGEB	CT3	MAGEB1/CT3.1, MAGEB2/CT3.2, MAGEB5/CT3.3, MAGEB6/CT3.4
GAGE1	CT4	GAGE1/CT4.1, GAGE2/CT4.2, GAGE3/CT4.3, GAGE4/CT4.4, GAGE5/CT4.5, GAGE6/CT4.6, GAGE7/CT4.7, GAGE8/CT4.8
SSX	CT5	SSX1/CT5.1, SSX2/CT5.2a, SSX2/CT5.2b, SSX3/CT5.3, SSX4/CT5.4
NY-ESO-1	CT6	NY-ESO-1/CT6.1, LAGE-1a/CT6.2a, LAGE-1b/CT6.2b
MAGEC1	CT7	MAGEC1/CT7.1, MAGEC3/CT7.2
SYCP1	CT8	SYCP1/CT8
BRDT	CT9	BRDT/CT9
MAGEE1	CT10	MAGEE1/CT10
CTp11/SPANX	CT11	SPANXA1/CT11.1, SPANXB1/CT11.2, SPANXC/CT11.3, SPANXD/CT11.4
XAGE-1/GAGED	CT12	XAGE-1a/CT12.1a, XAGE-1b/CT12.1b, XAGE-1c/CT12.1c, XAGE-1d/CT12.1d, XAGE-2/CT12.2, XAGE-3a/CT12.3a, XAGE-3b/CT12.3b, XAGE-4/CT12.4
HAGE	CT13	HAGE/CT13
SAGE	CT14	SAGE/CT14
ADAM2	CT15	ADAM2/CT15
PAGE-5	CT16	PAGE-5/CT16.1, CT16.2
LIP1	CT17	LIP1/CT17
NA88	CT18	NA88/CT12
IL13TA1	CT19	IL13RA1/CT19
TSP50	CT20	TSP50/CT20
CTAGE-1	CT21	CTAGE-1/CT21.1, CTAGE-2/CT21.2
SPA17	CT22	SPA17/CT22
OY- TES-1	CT23	OY- TES-1/CT23
CSAGE	CT24	CSAGE/CT24.1, TRAG3/CT24.2
MMA1/DSCR8	CT25	MMA-1a/CT25.1a, MMA-1b/CT25.1b
CAGE	CT26	CAGE/CT26
BORIS	CT27	BORIS/CT27
HOM- TES-85	CT28	HOM- TES-85/CT28

AF15q14/D40	CT29	D40/CT29
E2F-like/hca661	CT30	HCA661/CT30
PLU-1	CT31	PLU-1/CT31
LDHC	CT32	LDHC/CT32
MORC	CT33	MORC/CT33
SGY-1	CT34	SGY-1/CT34
SPO11	CT35	SPO11/CT35
TPX1	CT36	TPX-1/CT36
NY-SAR-35	CT37	NY-SAR35/CT37
FTHL17	CT38	FTHL17/CT38
NXF2	CT39	NXF2/CT39
TAF7L	CT40	TAF7L/CT40
TDRD1	CT41	TDRD1/CT41.1, NY-CO-45/CT41.2
TEX15	CT42	TEX15/CT42
FATE	CT43	FATE/CT43
TPTE	CT44	TPTE/CT44

Table 2. Tumor types expressing *MAGE* genes

Tumor type	No. of specimens	No. of specimens expressing gene (percentage)						Reference
		M1	M2	M3	M4	M6	M12	
Bladder	57	12(21)	17(30)	20(35)	19(33)	-	-	Patard 등, 1995
Breast	28	3(11)	1(4)	1(4)	0(0)	-	-	Russo 등, 1995
Breast	49	15(31)	-	12(24)	-	-	-	Fujie 등, 1997
Colorectal	54	16(30)	15(28)	11(20)	-	-	-	Mori 등, 1996
Gastric	68	28(41)	21(31)	26(38)	-	-	-	Inoue 등, 1995
Gastric	38	11(29)	-	-	-	-	-	Katano 등, 1997
Glioma	21	8(38)	-	7(33)	-	-	-	Chi 등, 1997
Glioma	14	12(86)	-	-	5(36)	-	-	Kuramoto, 1997
Non-glioma	14	3(21)	-	-	1(7)	-	-	
Head and neck-squamous	83	27(33)	34(41)	36(43)	22(27)	35(42)	-	Eura 등, 1995
Head and neck-non-squamous	12	3(25)	5(42)	4(33)	1(8)	4(33)	-	Lee 등, 1996
Hepatocellular	20	16(86)	-	-	-	-	-	Yamashita 등, 1996
Leukaemia								Shichijo 등, 1995a
T	21	12(57)	-	*	*	*	-	*non-specific primers amplified M1,M3,M4 or M6
B	8	1(13)	-	*	*	*	-	
Myelomonocytic	16	0(0)	-	*	*	*	-	
Lung	53	6(11)	7(13)	20(38)	7(13)	-	-	Shichijo 등, 1995
Lung	46	16(35)	-	-	-	-	-	Weynants 등, 1994
Lung	53	6(11)	-	5(9)	6(11)	4(13)	-	Sakata 등, 1996
Maxillary	18	9(50)	8(44)	9(50)	-	-	-	Eura 등, 1995
Melanoma-primary	100	16(16)	41(41)	36(36)	11(11)	-	-	Brasseur 등, 1995
-metastasis	145	70(48)	102(70)	110(76)	32(22)	-	-	
Ocular Melanoma-primary	27	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	-	-	Mulcahy 등, 1996
metastasis	26	1(4)	0(0)	0(0)	0(0)	-	-	
Neuroblastoma	73	13(18)	-	41(73)	-	-	-	Corrias 등, 1996
Oesolhagus-primary	65	12(18)	17(26)	1(2)	5(8)	-	-	Toh 등, 1995
-metastasis	11	5(45)	2(18)	0	0	-	-	
Oesophagus	42	26(62)	18(43)	24(57)	-	-	-	Inoue 등, 1995
Oesophagus	49	26(53)	24(49)	23(47)	35(49)	-	-	Quillien 등, 1997
Osteosarcoma	8	5(63)	6(75)	5(63)	1(13)	5(63)	-	Sudo 등, 1997
Ovary	58	12(21)	5(9)	11(19)	4(7)	-	-	Yamada 등, 1995
Ovary -normal	16	1(6)	0(0)	1(6)	0(0)	-	-	Gillespie 등, 1998
-benign	25	21(44)	1(4)	0(0)	0(0)	-	-	
-malignant	27	15(56)	1(4)	0(0)	1(4)	-	-	
-metastases	6	2(33)	0(0)	0(0)	0(0)	-	-	

Table 3. The *MAGE* family genes

Subtype	Gene name	Access number	Expression status	Length of amino acids
<i>MAGEA</i>	<i>MAGEA1</i>	JC2358	T	280
	<i>MAGEA2</i>	AAH13098	T	314
	<i>MAGEA3</i>	AAH00340	T	314
	<i>MAGEA4</i>	BAA06841	T	317
	<i>MAGEA5</i>	NP_064402	T	320
	<i>MAGEA6</i>	AAA68875	T	314
	<i>MAGEA7</i>	NP_064677	P	80
	<i>MAGEA8</i>	AAH02455	T	318
	<i>MAGEA9</i>	P43362	T	315
	<i>MAGEA10</i>	AAA68869	T	369
	<i>MAGEA11</i>	P43364	T	319
	<i>MAGEA12</i>	AAF44789	T	314
	<i>MAGEA13</i>	U71148	P	-
	<i>MAGEA14</i>	NT_011534.1	P	-
	<i>MAGEA15</i>	NT_025309.1	P	-
<i>MAGEB</i>	<i>MAGEB1</i>	AAC23616	T	347
	<i>MAGEB2</i>	AAC23617	T	319
	<i>MAGEB3</i>	AAC23618	T	346
	<i>MAGEB4</i>	AAC23619	T	346
	<i>MAGEB5</i>	Q9BZ81	T	111
	<i>MAGEB6</i>	Q8N7X4	T	407
	<i>MAGEB7</i>	AC005297.1	P	-
	<i>MAGEB8</i>	AC005297.1	P	-
	<i>MAGEB9</i>	AC005297.1	P	-
	<i>MAGEB10</i>	AC011693.5	T	348
	<i>MAGEB11</i>	AC011693.5	P	-
	<i>MAGEB12</i>	AC011693.5	P	-
	<i>MAGEB13</i>	AC011693.5	P	-
	<i>MAGEB14</i>	NT_025279.3	P	-
	<i>MAGEB15</i>	NT_011752.1	P	-
	<i>MAGEB16</i>	NT_025279.3	T	320
	<i>MAGEB17</i>	NT_011766.3	T	203
<i>MAGEC</i>	<i>MAGEC1</i>	NP_005453	T	1142
	<i>MAGEC2</i>	NP_057333	T	373
	<i>MAGEC3</i>	AAK00358	T	346
	<i>MAGEC4</i>	AL023279.1	T	115
	<i>MAGEC5</i>	NT_025337.2	P	-
	<i>MAGEC6</i>	NT_025337.2	P	-
	<i>MAGEC7</i>	NT_025337.2	P	-

<i>MAGED</i>	<i>MAGED1</i>	AAG09704	N	778
	<i>MAGED2</i>	CAB10841	N	606
	<i>MAGED3</i>	Q12816	N	1387
	<i>MAGED4</i>	Q96JG8	N	741
<i>MAGEE</i>	<i>MAGEE1</i>	Q96JG8	N	741
	<i>MAGEE2</i>	-	N	-
	<i>MAGEE3</i>	NP_032879	N	424
<i>MAGEF</i>	<i>MAGEF1</i>	NP_071432	N	307
<i>MAGEG</i>	<i>MAGEG1</i>	AAG38607	N	100
<i>MAGEH</i>	<i>MAGEH1</i>	AAG38608	N	219
<i>MAGEI</i>	<i>MAGEI1</i>	NT_011638.3	P	-
	<i>MAGEI2</i>	NT_011638.3	P	-
<i>MAGEJ</i>	<i>MAGEJ1</i>	NT_011577	P	-
<i>MAGEK</i>	<i>MAGEK1</i>	Z81311	P	-
<i>MAGEL2</i>	<i>MAGEL2</i>	NP_061939	N	529
<i>Necdin</i>	<i>Necdin</i>	XM_007686	N	321
<i>Restin</i>	<i>Restin (Apr-1)</i>	NP_054780	N	219

T: Only expressed in tumor cells or germ cells. P: Pseudogene; N: Expressed in normal cells. -: Unknown.

Table 4. PCR primers

Gene	S&AS ^a	Nucleotide sequences	Sequences region	Length of PCR products	References ^b
<i>MRP</i>	S	5'-GACGGGAGCTGGGAAGTC-3'	4180-4197	389 bp	Cole 등, 1992
	AS	5'-CCGTGGCCTCATCCAACA-3'	4551-4568		
<i>MAGEA4</i>	S	5'-AAGGACTCTGCGTCAGGC-3'	89-106	446 bp	Tajima 등, 2003
	AS	5'-GAGCAGACAGGCCAACCG-3'	517-534		
<i>β-actin</i>	S	5'-GACTATGACTTAGTTGCGTTA-3'	1912-1932	501 bp	Nakajimali- jima 등, 1985
	AS	5'-GTTGAACTCTCTACATACTCCG-3'	2392-2412		

MRP, multidrug resistance-associated protein

MAGEA4, melanoma antigen, family A 4

β-actin, PCR control (house keeping gene).

^aSense and antisense.

^bReferences for gene sequences

Table 5. PCR primers for real-time PCR

Gene	S&AS	Nucleotide sequences	Sequences region	Length of PCR products	References
<i>MAGEA4</i>	S	5'-AAGGACTCTGCGTCAGGC-3'	89-106	446 bp	Tajima 등, 2003
	AS	5'-GAGCAGACAGGCCAACCG-3'	517-534		
<i>β-actin</i>	S	5'-GACTATGACTTAGTTGCGTTA-3'	1912-1932	501 bp	Nakajimaliji- ma 등, 1985
	AS	5'-GTTGAACTCTCTACATACTCCG-3'	2392-2412		

Table 6. PCR conditions

Gene	Cycles	Hot start	Denaturation	Annealing	Extension
<i>MRP</i>	22			53°C, 30 sec	
<i>MAGEA4</i>	22	94°C, 12 min	94°C, 30 sec	70°C, 30 sec	72°C, 1 min
<i>β-actin</i>	18			53°C, 30 sec	

Table 7. Real-time PCR conditions

Gene	Cycles	Hot start	Denaturation	Annealing	Extension	Melting
<i>MAGEA4</i>	45	95°C, 10 min	95°C, 15 sec	57°C, 5 sec	72°C, 8 sec	65°C, 15 sec
<i>β-actin</i>	40			55°C, 5 sec	72°C, 18 sec	

Table 8. PCR primers for pCMV-Tag2AMAGEA4 construction

Construction S&AS	Nucleotide sequences
1-317	S 5'-CGGGCGGATCCCATGTCTTCTGAGCAGAAGAGTC-3'
	AS 5'-CCCCCTCGAGGTTTCAGACTCCCTCTTCCTCCTC-3'
ΔC233-317	S 5'-CTGGGTGTGATGGGGGTGTATTGAGATGGGAGGGAGCACACTGTC-3'
	AS 5'-GACAGTGTGCTCCCTCCCATCTCAATACACCCCATCACACCCAG-3'
ΔC110-317	S 5'-GAGTCCTTGTTCCGAGAAGCATGACTCAGTAACAAGGTGGATGAG-3'
	AS 5'-CTCATCCACCTTGTTACTGAGTCATGCTTCTCGGAACAAGGACTC-3'
ΔN1-109	S 5'-CGGGCGGATCCCCTCAGTAACAAGGTGGATGAG-3'
	AS 5'-CCCCCTCGAGGTTTCAGACTCCCTCTTCCTCCTC-3'
ΔN1-232	S 5'-CGGGCGGATCCCGATGGGAGGGAGCACACTGTC-3'
	AS 5'-CCCCCTCGAGGTTTCAGACTCCCTCTTCCTCCTC-3'

Table 9. PCR primers for pcDNA6/FLAGMAGEA4 construction

Construction S&AS	Nucleotide sequences
1-317	S 5'-GCTAGTTAAGCTTGGGCCACCATGGATTACAAGGATG-3'
	AS 5'-5'-CCCCCTCGAGGTTTCAGACTCCCTCTTCCTCCTC-3'-3'

Table 10. PCR primers for pcDNA6/MAGEA4Myc construction

Construction S&AS	Nucleotide sequences
1-317	S 5'-AGCTAGTTAAGCTTGGGCCACCATGTCTTCTGAGCAGAAGAGTCAG-3'
	AS 5'-TCTAGACTCGAGGACTCCCTCTTCCTCCTCTAA-3'
Δ C233-317	S 5'-AGCTAGTTAAGCTTGGGCCACCATGTCTTCTGAGCAGAAGAGTCAG-3'
	AS 5'-TCTAGACTCGAGATACACCCCATCACACCCAGCTC-3'
Δ C110-317	S 5'-AGCTAGTTAAGCTTGGGCCACCATGTCTTCTGAGCAGAAGAGTCAG-3'
	AS 5'-TCTAGACTCGAGTGCTTCTCGGAACAAGGACTCTGC-3'
Δ N1-109	S 5'-AGCTAGTTAAGCTTGGGCCACCATGCTCAGTAACAAGGTGGATGAGTTG-3'
	AS 5'-TCTAGACTCGAGGACTCCCTCTTCCTCCTCTAA-3'
Δ N1-232	S 5'-AGCTAGTTAAGCTTGGGCCACCATGCTCAGTAACAAGGTGGATGAGTTG-3'
	AS 5'-TCTAGACTCGAGGACTCCCTCTTCCTCCTCTAA-3'

Table 11. Expression profiling of *MAGE* genes using DNA chip between AML-2/WT and AML2/DX100 cells

Gene	Description of genes	Fold change vs. control
<i>MAGEA1</i>	Melanoma antigen, family A1	+ 3.80
<i>MAGEA2</i>	Melanoma antigen, family A2	+ 123.32
<i>MAGEA4</i>	Melanoma antigen, family A4	+ 221.58
<i>MAGEA6</i>	Melanoma antigen, family A6	+ 18.09
<i>MAGEA9</i>	Melanoma antigen, family A9	+ 11.25
<i>MAGEA12</i>	Melanoma antigen, family A12	+ 1.22
<i>MAGEB2</i>	Melanoma antigen, family B2	+ 7.04

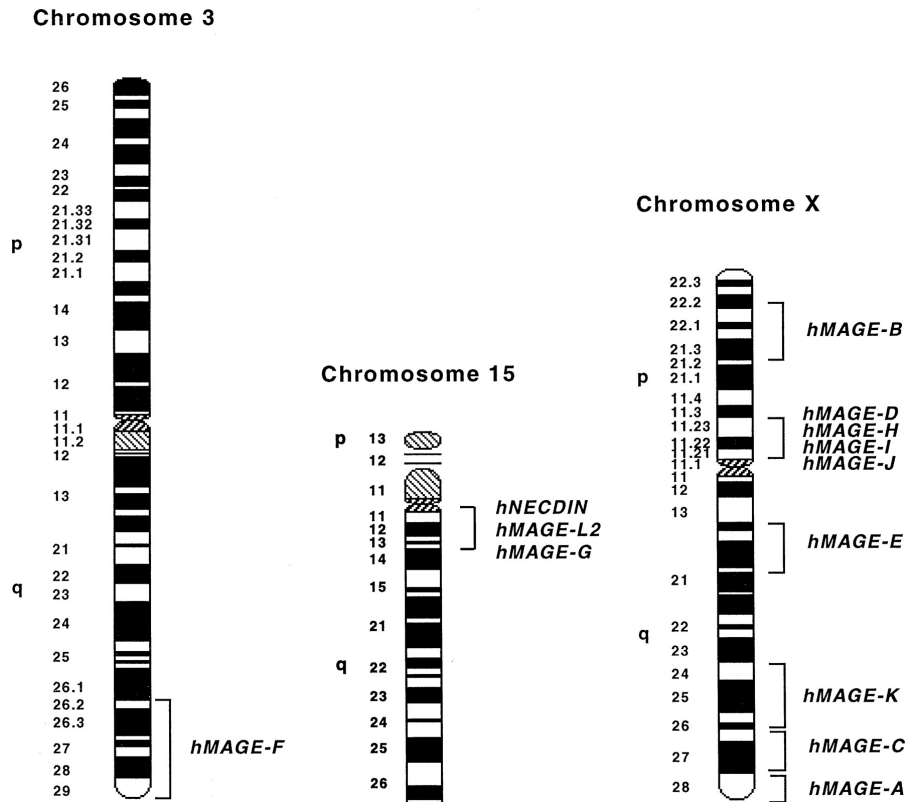


Fig. 1. Chromosomal locations of the human *MAGE* subfamilies.

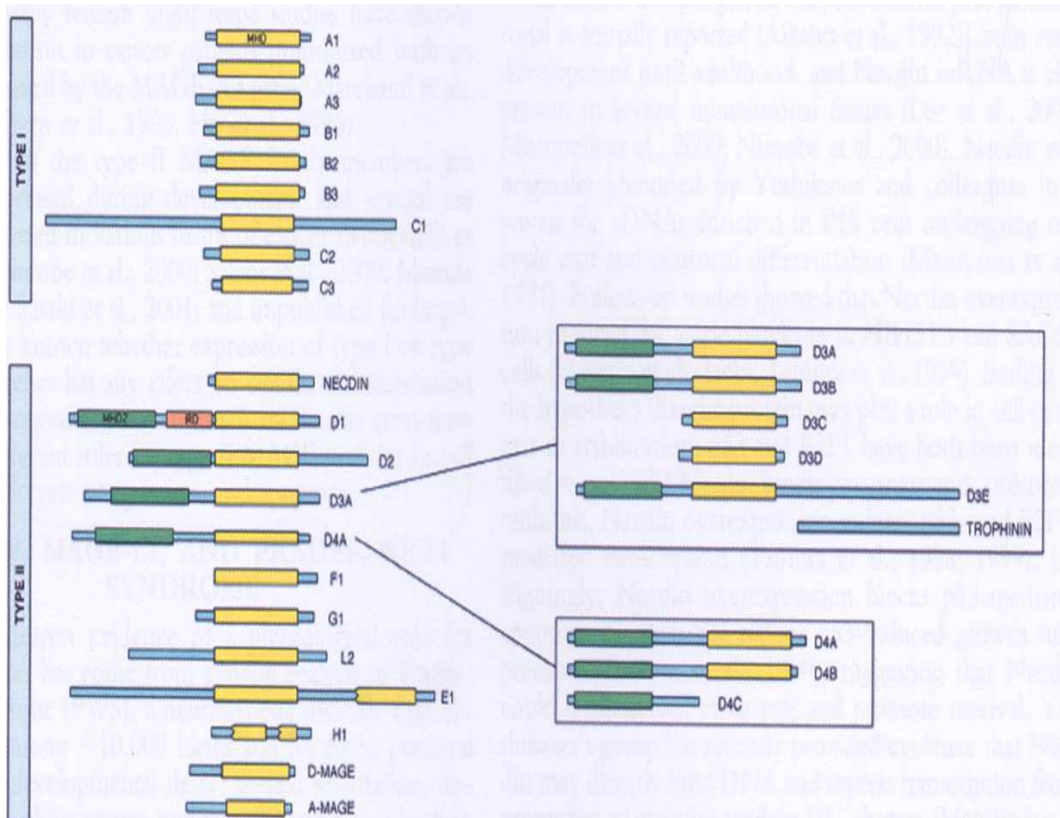


Fig. 2. Domain structures of selected MAGE family members. The MHD indicated in yellow, MHD2 in green, and IRD in orange.

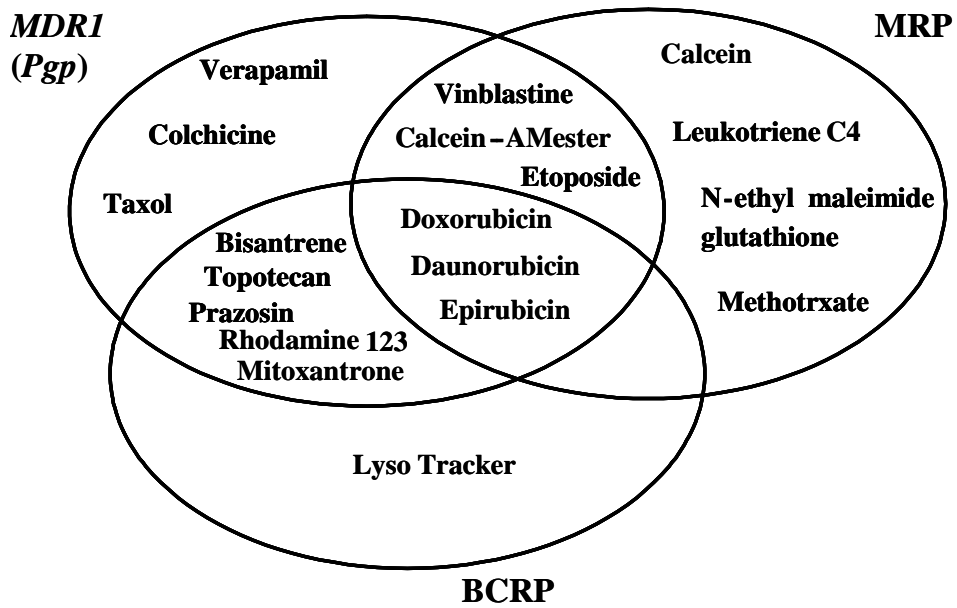
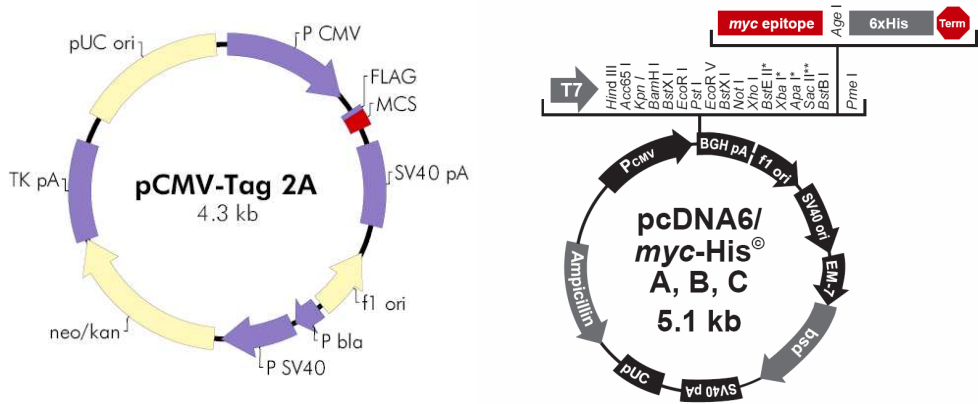


Fig. 3. Substrate specificity of each MDR gene.

(A)



(B)

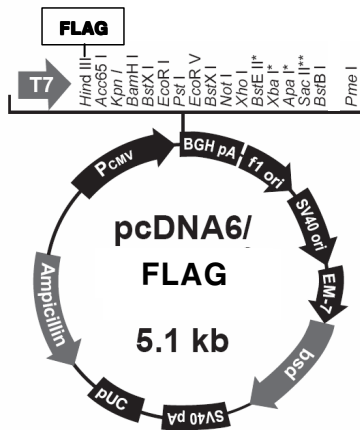


Fig. 4. Maps of vector for transient (A) and stable (B) transfection.

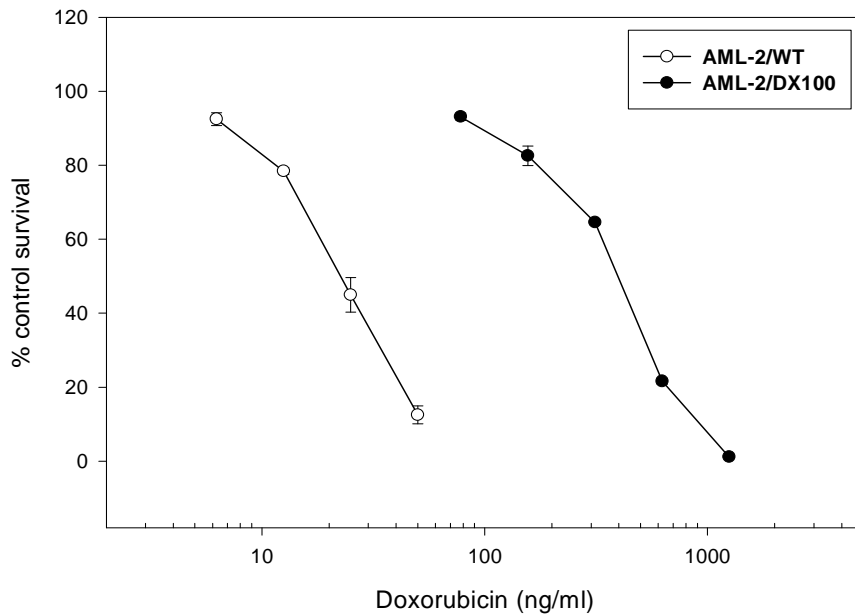


Fig. 5. Resistance of AML-2/DX100 cells to doxorubicin. Cytotoxicity was determined by the MTT assay. The MTT assay was performed for 3 days after treatment of drug.

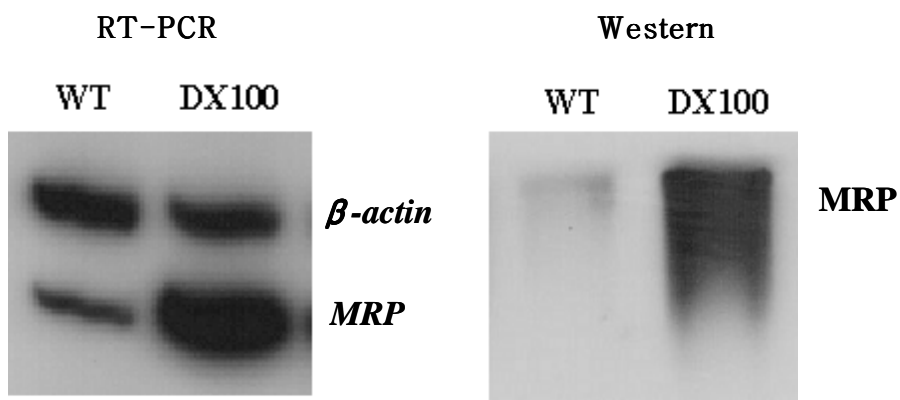
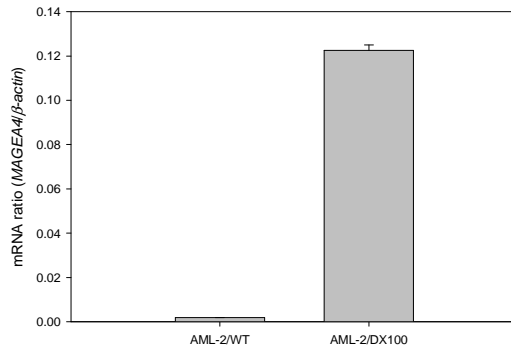
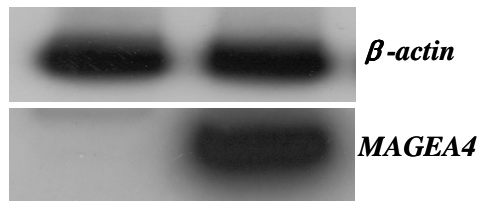


Fig. 6. *MRP* gene expression in AML-2/WT and AML/DX100 cells. Expression was determined by the RT-PCR and Western blot analyses. The cDNA reverse-transcribed from mRNA was separately amplified with each primer pair for *MRP* and *β -actin* genes. Aliquotes of each PCR reaction mixture were separated on 7% PAGE. The gel was dried and exposed on X-ray film overnight. The protein samples were extracted from cells and then 50 μ g of total cellular protein were separated on 7% SDS/PAGE.

Real-time RT-PCR



RT-PCR



Western blot



Fig. 7. *MAGEA4* gene expression in AML-2/WT and AML-2/DX100 cells. Experiments are described in Materials and methods.

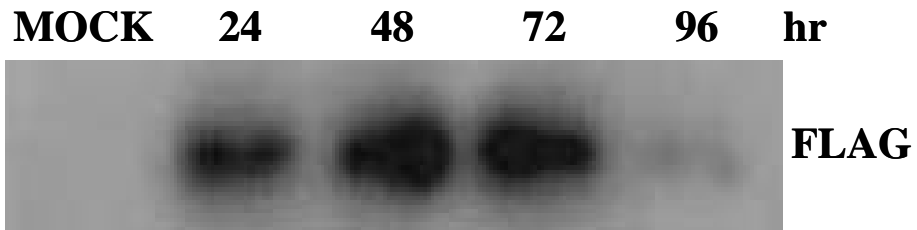


Fig. 8. MAGEA4 expression as a function of time after transfection in HEK 293T cells. MAGEA4 expression was shown as expression of its fused FLAG using Western blot assays as described in Materials and methods.

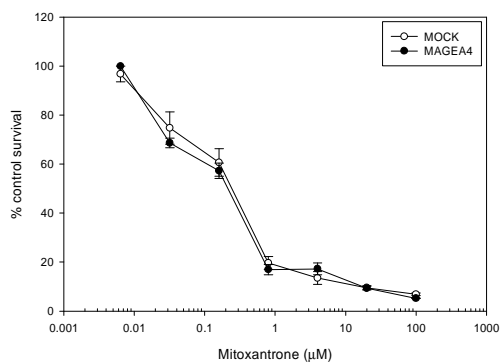
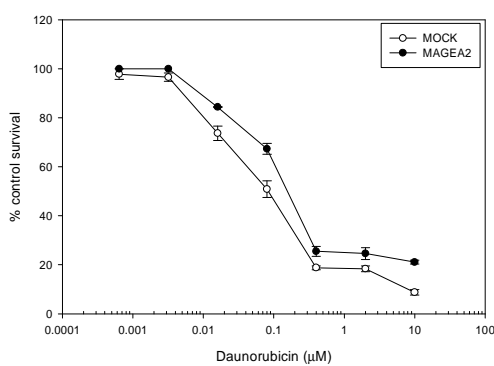
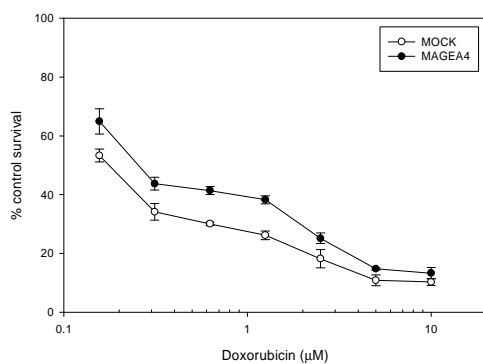


Fig. 9. Cytotoxic effects of representative three MDR substrates after MAGEA4 transfection for 24 hr in HEK 293T cells. Cytotoxicity of doxorubicin, daunorubicin and mitoxantrone was determined using the MTT assay. The MTT assay was performed for 2 days after treatment of drugs.

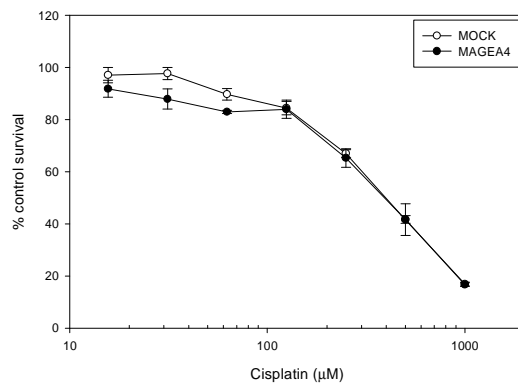
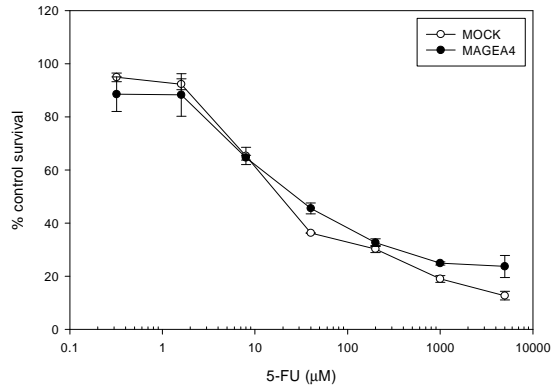


Fig. 10. Cytotoxic effects of two non-MDR substrates after MAGEA4 transfection for 24 hr in HEK 293T cells. Cytotoxicity of 5-FU and cisplatin was determined using the MTT assay. The MTT assay was performed for 2 days after treatment of drug.

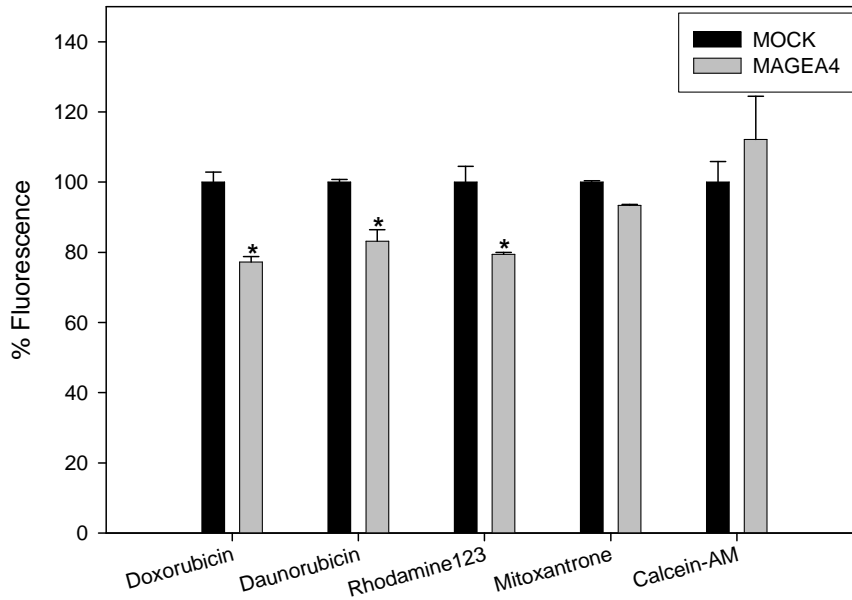


Fig. 11. Drug accumulation of MDR substrates after MAGEA4 transfection for 48 hr in HEK 293T cells. Fluorescent compounds for the functional detection of transporters; 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxorubicin, 5 μM daunorubicin and 1 μM rhodamine 123 for Pgp, 50 nM calcein-AM for MRP and 20 μM mitoxantrone for BCRP. The level of fluorescence was determined by flow cytometry. Mean \pm SEM of triplicate determination is given. *, statistically significant at $P < 0.05$ from the control values by a Student's t -test.

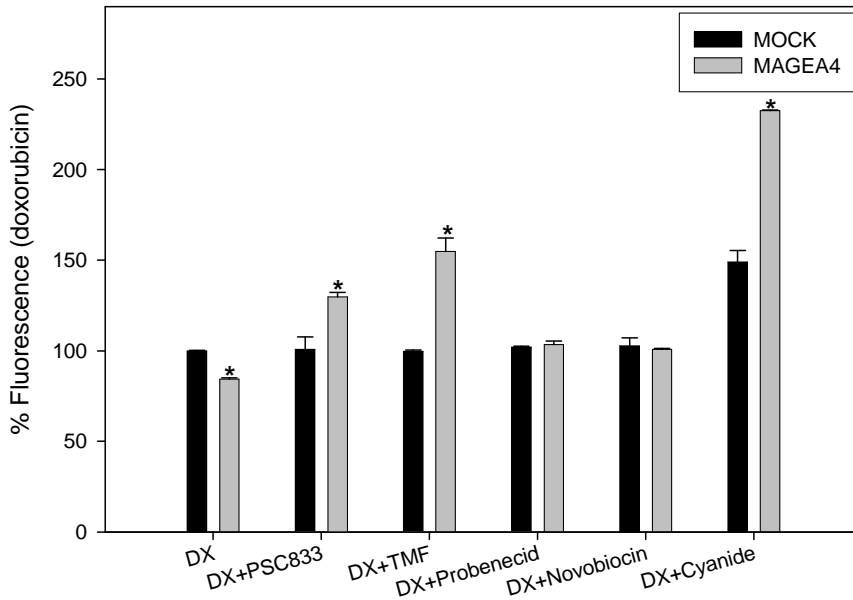
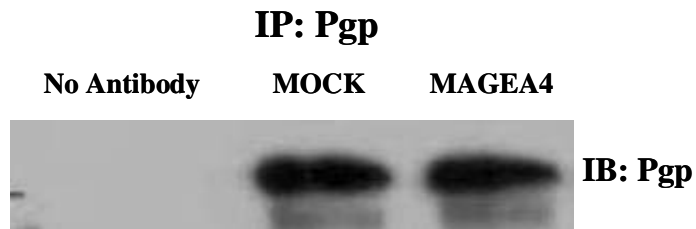


Fig. 12. Comparison of drug accumulation by MDR inhibitors after MAGEA4 transfection for 48 hr in HEK 293T cells. The fluorescence level of 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxorubicin was determined by flow cytometry in the presence of various compounds such as 5 μM PSC833 and 100 μM TMF for Pgp inhibition, 5 mM probenecid for MRP inhibition and 100 μM novobiocin for BCRP inhibition, 2 mM cyanide for ATP depletion. Mean \pm SEM of triplicate determination is given. *, statistically significant (at $P < 0.05$). DX, doxorubicin.

(A)



(B)

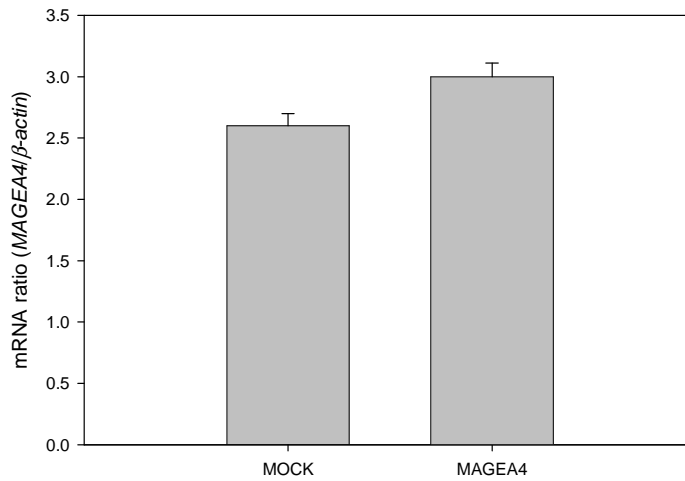


Fig. 13. Pgp expression after MAGEA4 transfection for 48 hr in HEK 293T cells. IP and Western blot analysis (A) and real-time RT-PCR assay (B) were performed as described in Materials and methods. IB, immunoblot.

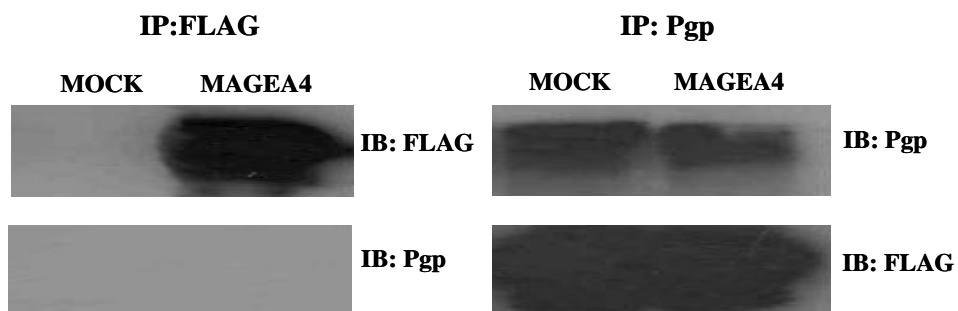
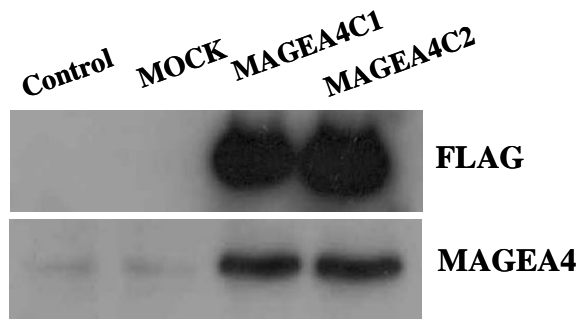


Fig. 14. Interaction between MAGEA4 and Pgp after MAGEA4 transfection for 48 hr in Caco-2 cells. IP and Western blot analysis were performed as described in Materials and methods.

(A)



(B)

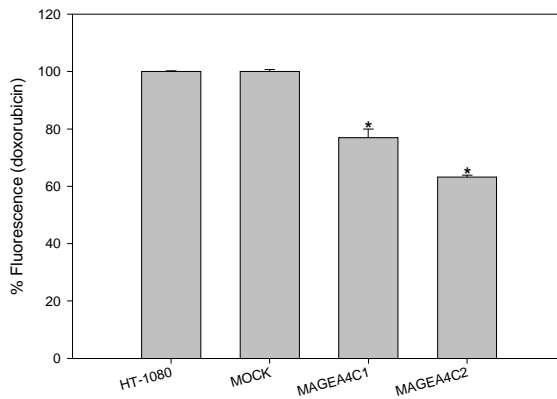


Fig. 15. MAGEA4 expression (A) and doxorubicin accumulation (B) in stable MAGEA4-overexpressing HT-1080 cells. Expression of MAGEA4 was determined by the Western blot analysis. The intracellular fluorescence was determined by flow cytometry using 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxorubicin. Mean \pm SEM of triplicate determination is given. *, statistically significant (at $P < 0.05$).

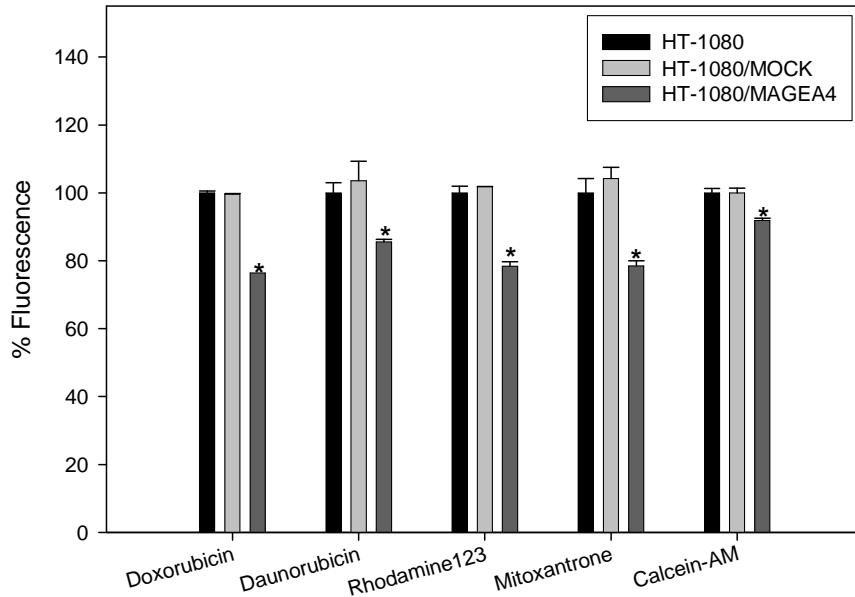


Fig. 16. Drug accumulation of MDR substrates in stable MAGEA4-overexpressing HT-1080 cells. The intracellular fluorescence was determined by flow cytometry. Mean \pm SEM of triplicate determination is given. *, statistically significant (at $P < 0.05$).

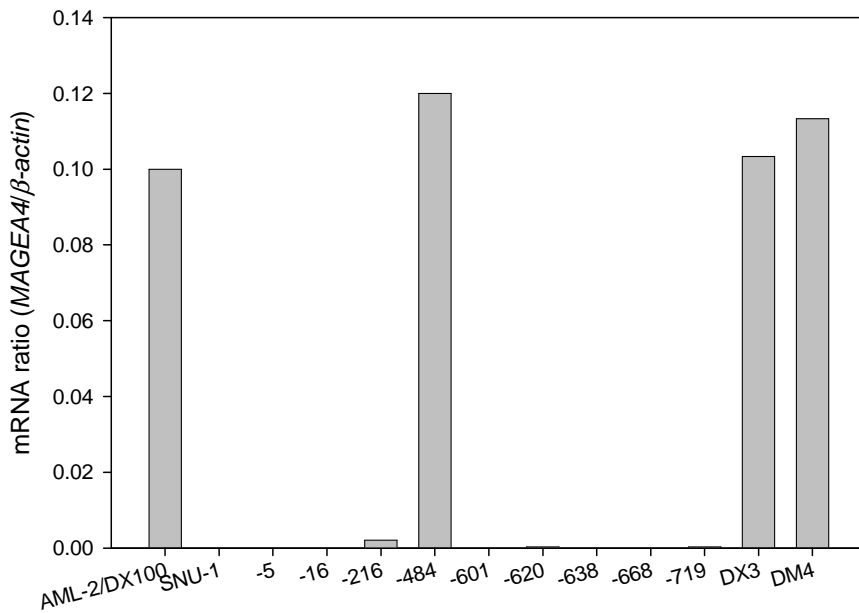
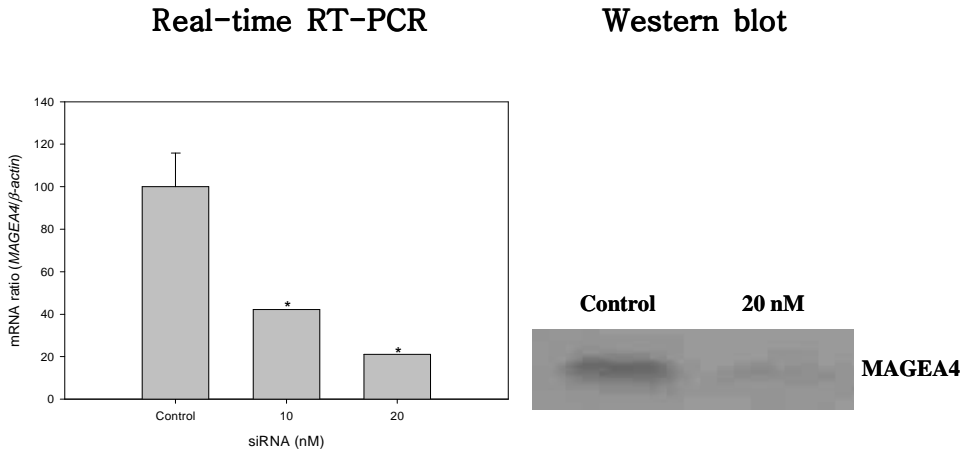


Fig. 17. *MAGEA4* mRNA expression in gastric cancer and melanoma cells. mRNA expression was determined by the real-time RT-PCR assay as described Materials and methods.

(A)



(B)

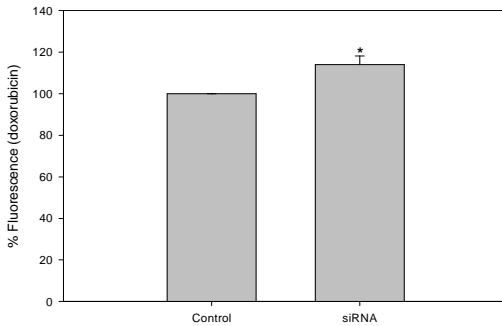
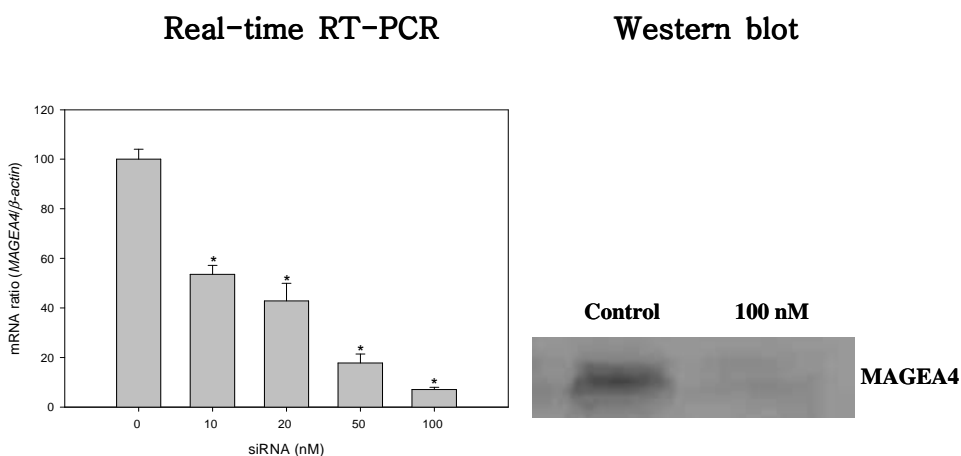


Fig. 18. Effect of MAGEA4 siRNA on expression (A) and accumulation of doxorubicin (B) in MAGEA4-overexpressing AML-2/DX100 cells. Expression and accumulation were observed after 24 hr of MAGEA4 siRNA transfection. Expression was determined by the real-time RT-PCR and Western blot analyses as described Materials and methods. The intracellular fluorescence was determined by flow cytometry using 6 $\mu\text{g/ml}$ doxorubicin. Mean \pm SEM of triplicate determinations is given. *, statistically significant (at $P < 0.05$).

(A)



(B)

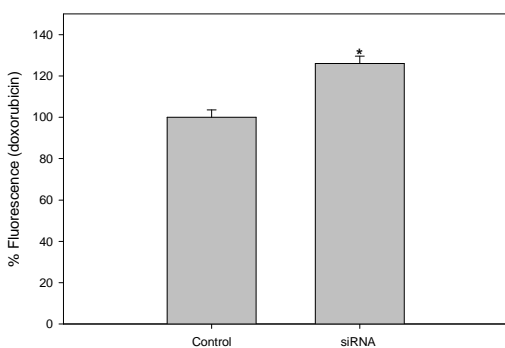


Fig. 19. Effect of MAGEA4 siRNA on expression (A) and accumulation of doxorubicin (B) in MAGEA4-overexpressing SNU-484 cells. Expression and accumulation were observed after 24 and 48 hr of MAGEA4 siRNA transfection, respectively. Expression was determined by the real-time RT-PCR and Western blot analyses as described Materials and methods. The intracellular fluorescence was determined by flow cytometry using 6 μ g/ml doxorubicin. Mean \pm SEM of triplicate determinations is given. *, statistically significant (at $P < 0.05$).

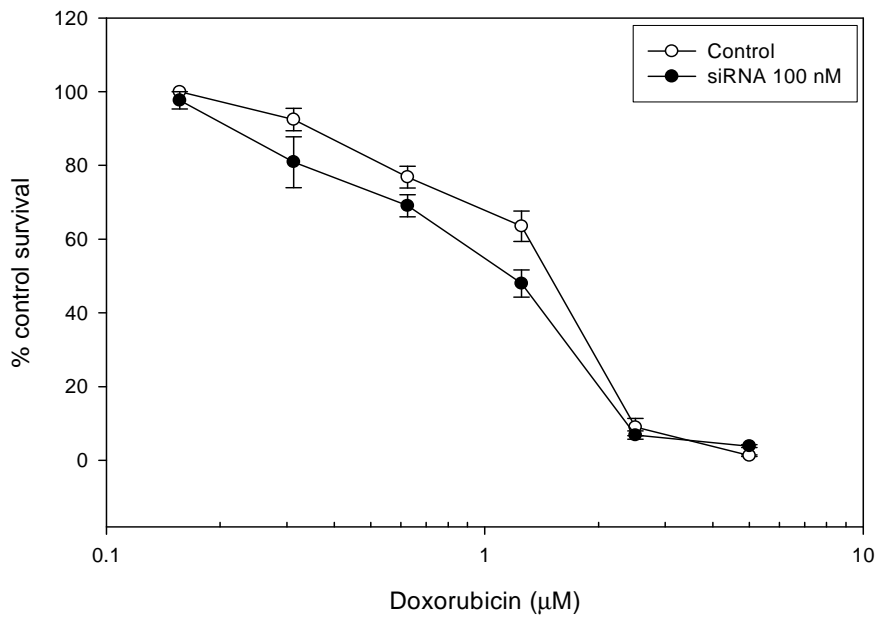
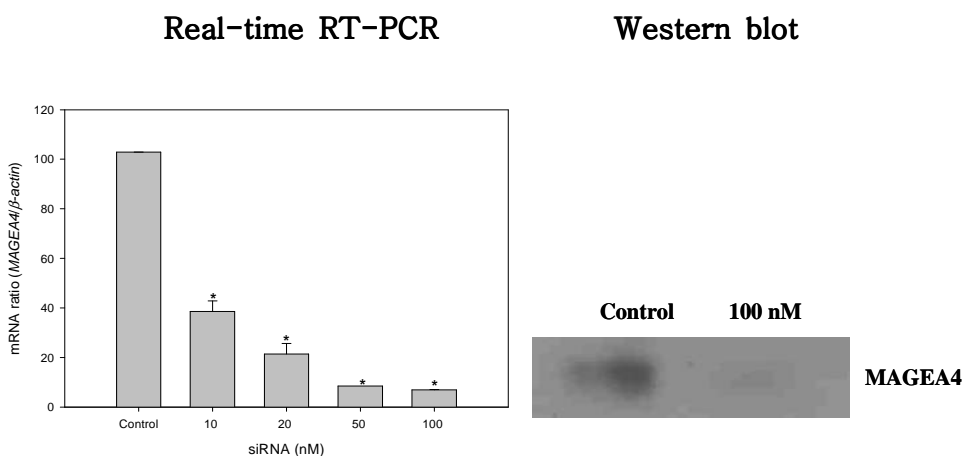


Fig. 20. Effect of MAGEA4 siRNA on cytotoxicity of doxorubicin in MAGEA4-overexpressing SNU-484 cells. 100 nM MAGEA4 siRNA was transfected for 24 hr. Cytotoxicity was determined by the MTT assay. The MTT assay was performed for 2 days after treatment of drug.

(A)



(B)

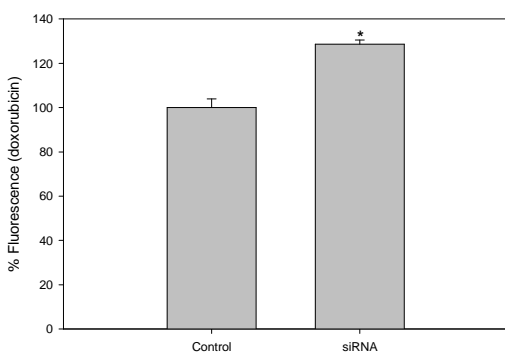
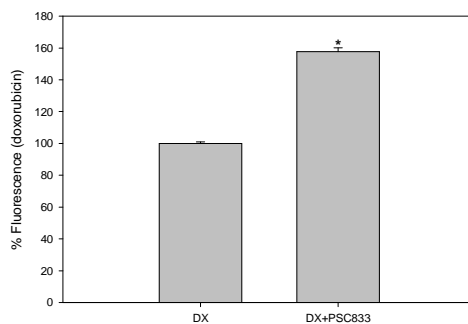
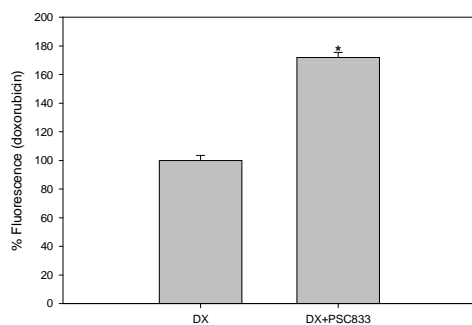


Fig. 21. Effect of MAGEA4 siRNA on expression (A) and accumulation of doxorubicin (B) in MAGEA4-overexpressing DM4 cells. Expression and accumulation were observed after 24 and 48 hr of MAGEA4 siRNA transfection, respectively. Expression was determined by the real-time RT-PCR and Western blot analyses as described Materials and methods. The intracellular fluorescence was determined by flow cytometry using 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxorubicin. Mean \pm SEM of triplicate determinations is given. *, statistically significant (at $P < 0.05$).

(A)



(B)



(C)

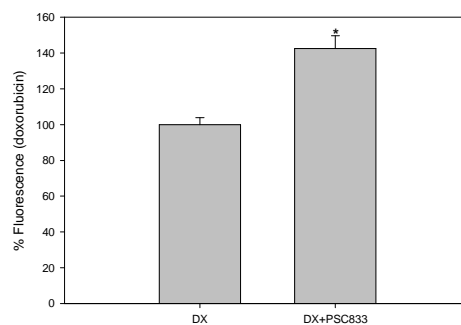


Fig. 22. Effect of PSC833 on accumulation of doxorubicin in MAGEA4-overexpressing AML-2/DX100 (A), SNU-484 (B) and DM4 (C) cells. The intracellular fluorescence was determined by flow cytometry using 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxorubicin in the presence of 10 μM PSC833 for Pgp inhibition. Mean \pm SEM of triplicate determinations is given. *, statistically significant (at $P < 0.05$).

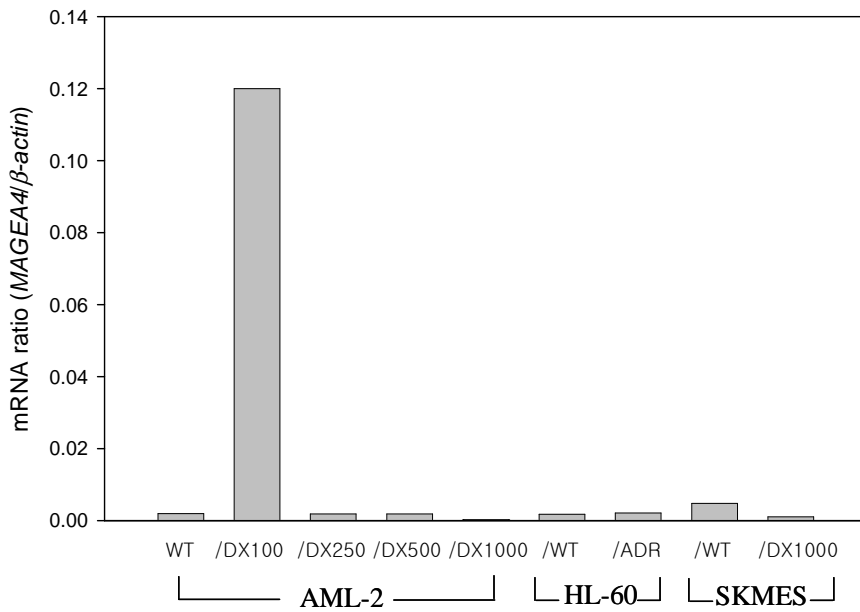


Fig. 23. *MAGEA4* mRNA expression in doxorubicin resistant-sublines. mRNA expression was determined by the real-time RT-PCR assay as described Materials and methods.

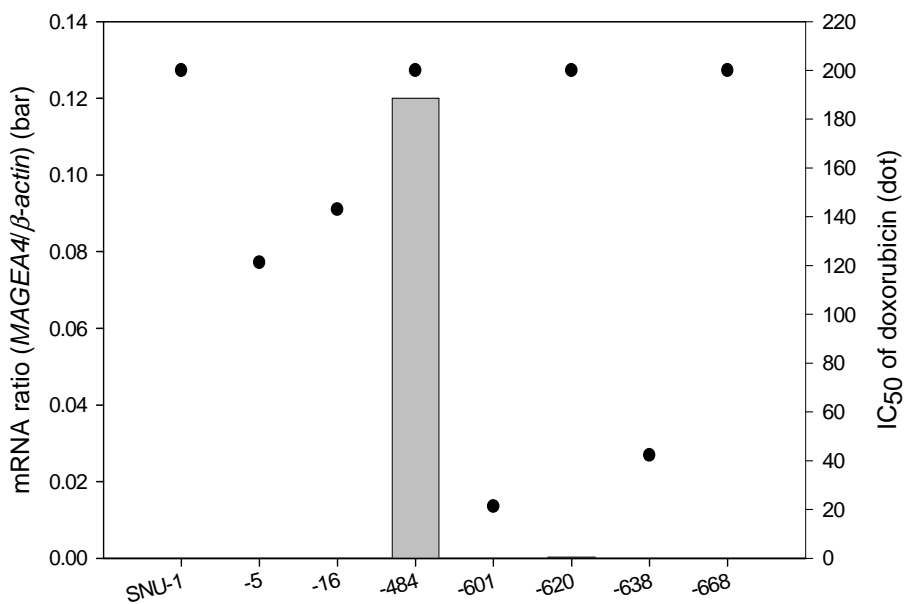


Fig. 24. Correlation of *MAGEA4* mRNA expression and IC₅₀ of doxorubicin in gastric cancer cells. mRNA expression was determined by the real-time RT-PCR assay as described Materials and methods.

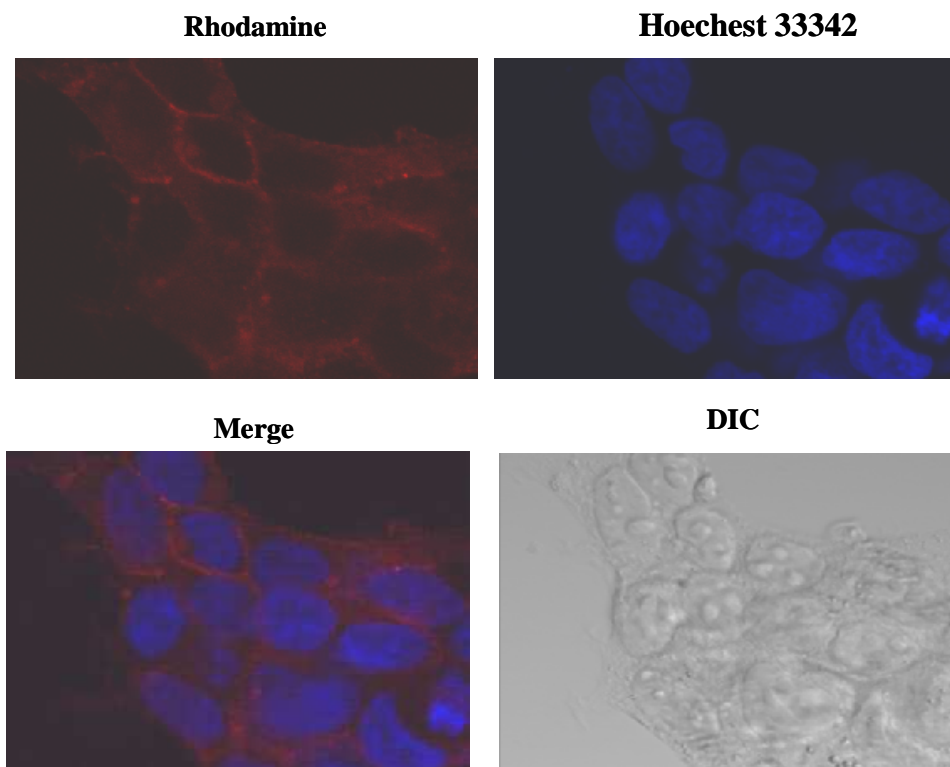


Fig. 25. Localization of MAGEA4 after transfection for 48 hr in HEK 293T cells. Localization of MAGEA4 was visualized by immunofluorescence assay as described in Materials and methods. The cells were stained with a rhodamine-conjugated anti-rabbit secondary antibody and counter-stained with Hoechst 33342. DIC; Differential interference contrast.

```

      . . . . .
SEQ MSSEQKRSQHCKPEEGVEAQEEALGLVGAQAPTTEEQEAAVSSSSPLVPQT 5
NORS NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
SEC
COILS
HTM
ACC
      . . . . .
SEQ LEEVPAAESAGPFPQSPQASALPTTISFTCWRQPNEGSSSQEEEGPSTSE 10
NORS NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
SEC
COILS
HTM
ACC
      . . . . .
SEQ DAESLFREALSNKVDELAHFLLRKYRAKELVTKAEMLERVIKNYKRCFPV 15
NORS NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
SEC HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
COILS
HTM
ACC
      . . . . .
SEQ IFGKASESLKMIIFGIDVKEVDFASNTYTLVTCGLGLSYDGLLGNQIFFPT 20
NORS NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
SEC HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
COILS
HTM MMM
ACC
      . . . . .
SEQ GLLIIVLGTIAMEGDSASEEEIWEELGVMGVYDGREHTVYGEFPRKLLTQD 25
NORS NNNNNNNNNNNHHHHEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
SEC
COILS
HTM MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM
ACC
      . . . . .
SEQ WVQENYLEYRQVPGSNPARVEFLWSPRALAETSIVKVLHVVVRVNRVRI 30
NORS NNNNNNNNNNNHHHHHEE EEEEEEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
SEC
COILS
HTM
ACC
      . . . . .
SEQ AYPSLREAALLEEEEGV 35
NORS
SEC HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
COILS
HTM
ACC e eee ee eeeeeee
//

```

Fig. 26. Proposed prediction structure of MAGEA4. NORS, non-regular secondary structure; H, helix; E, strand; M, transmembrane helix; e, exposed.

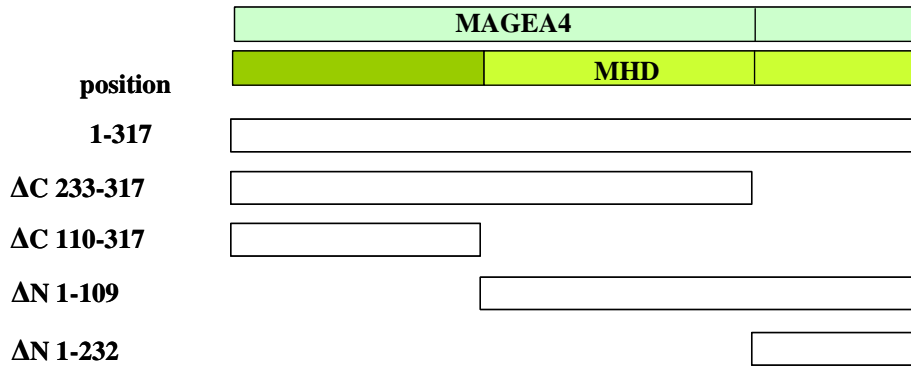


Fig. 27. Schematic representation of various MAGEA4 deletion mutants.

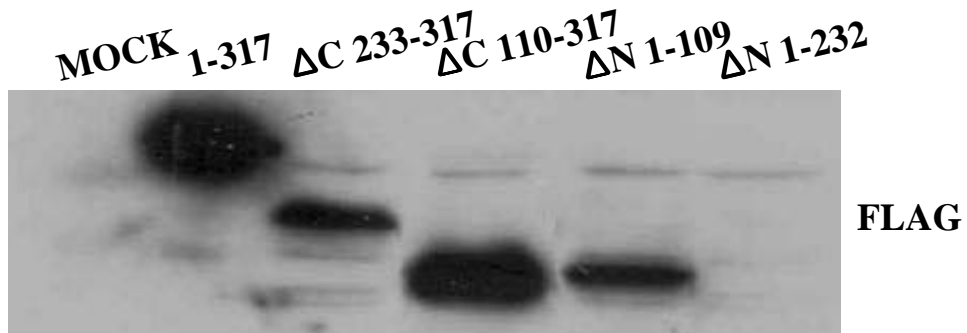


Fig. 28. Expression of MAGEA4 deletion mutants after transfection for 48 hr in HEK 293T cells. Expression of MAGEA4 deletion mutants was determined by the Western blot assay as described in Materials and methods. The protein samples were extracted from cells and then 1 μ g and 50 μ g of total cellular protein of 1-317 mutant and the other mutants were separated respectively on 10% SDS/PAGE.

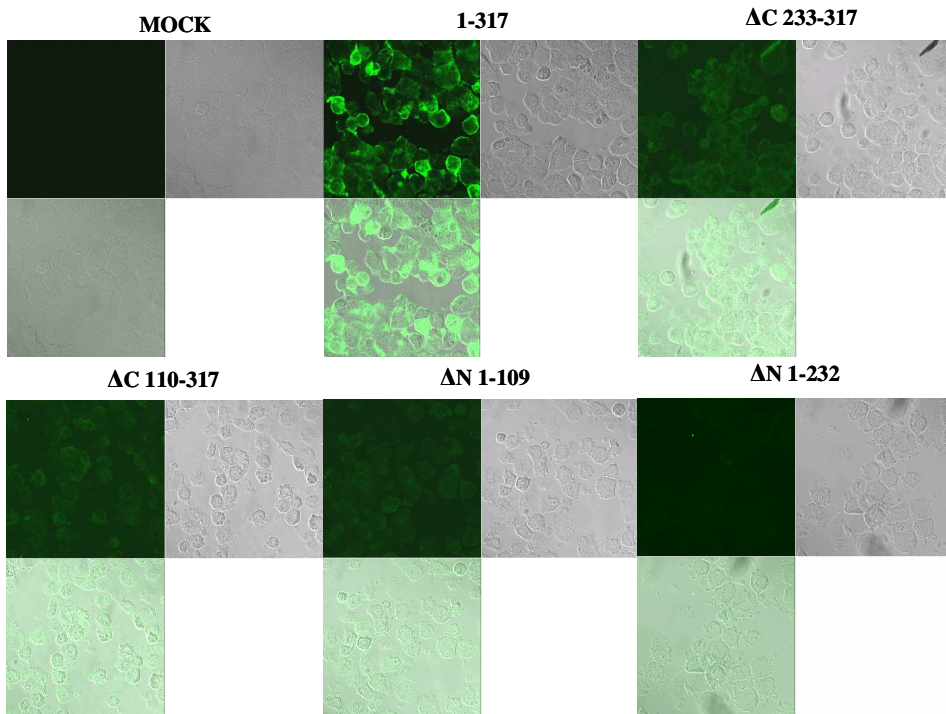


Fig. 29. Localization of MAGEA4 deletion mutants after transfection for 48 hr in HEK 293T cells. Localization of MAGEA4 deletion mutants was visualized by confocal microscopy using immunofluorescence assay as described in Materials and methods.

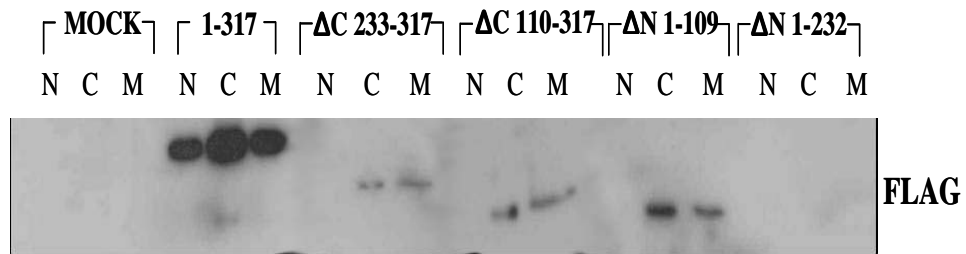


Fig. 30. Subcellular localization of MAGEA4 deletion mutants after transfection for 48 hr in HEK 293T cells. Expression of MAGEA4 deletion mutants was determined by Western blot assay as described in Materials and methods. N, Nuclear; C, Cytosol; M, Membrane.

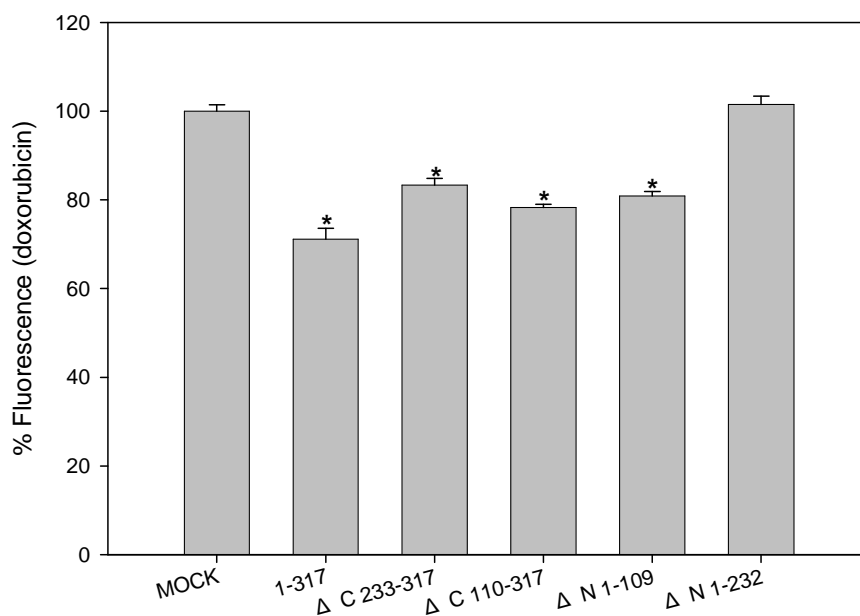


Fig. 31. Doxorubicin accumulation of MAGEA4 deletion mutants after transfection for 48 hr in HEK 293T cells. The intracellular fluorescence was determined by flow cytometry using 6 $\mu\text{g/ml}$ doxorubicin. Mean \pm SEM of triplicate determinations is given. *, statistically significant (at $P < 0.05$).

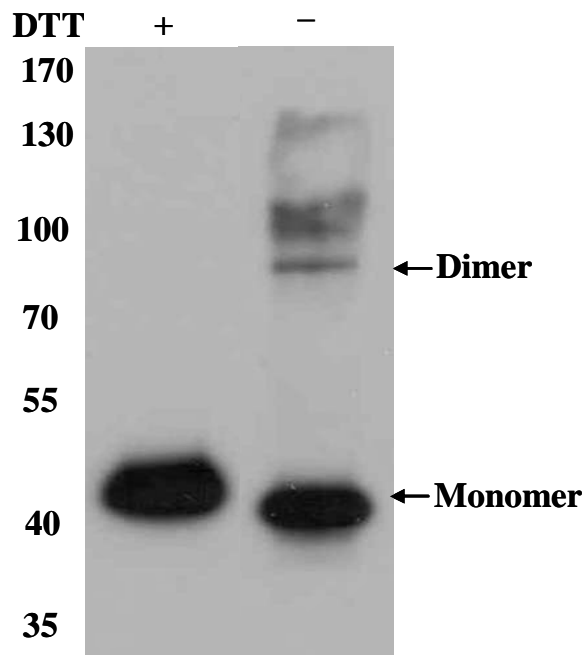


Fig. 32. Dimeric formation of MAGEA4. The protein samples were solubilized in SDS sample buffer with (+) or without (-) 100 mM DTT and then total cellular proteins were separated respectively on 8% SDS/PAGE.

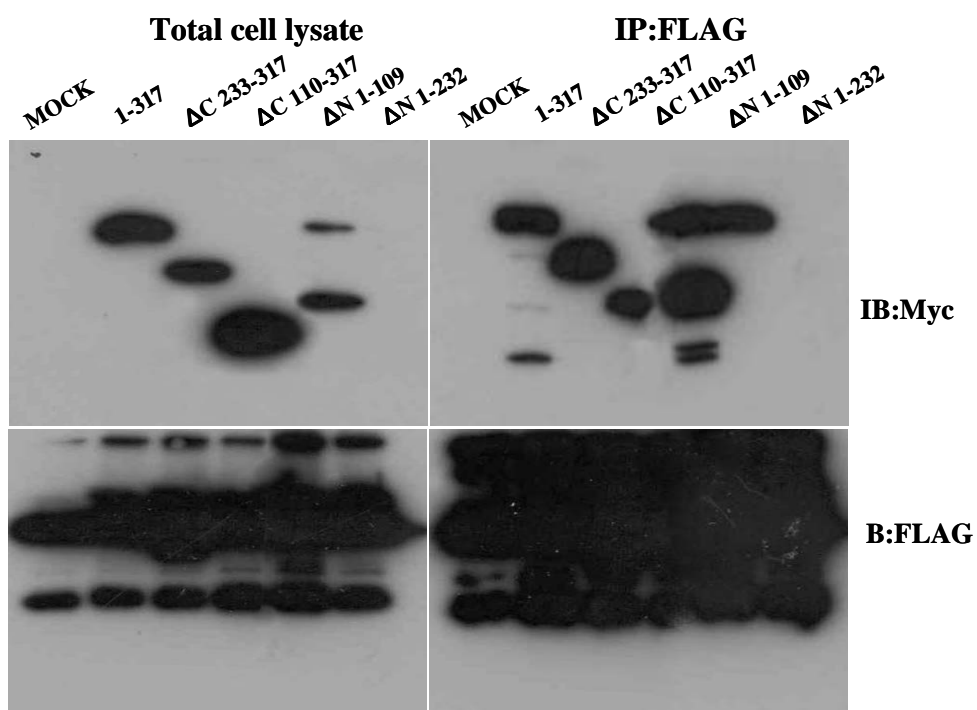


Fig. 33. Dimeric formation of MAGEA4 deletion mutants after MAGEA4 and MAGEA4 mutants cotransfection for 48 hr in HEK 293T cells. IP and Western blot analysis were performed as described in Materials and methods.

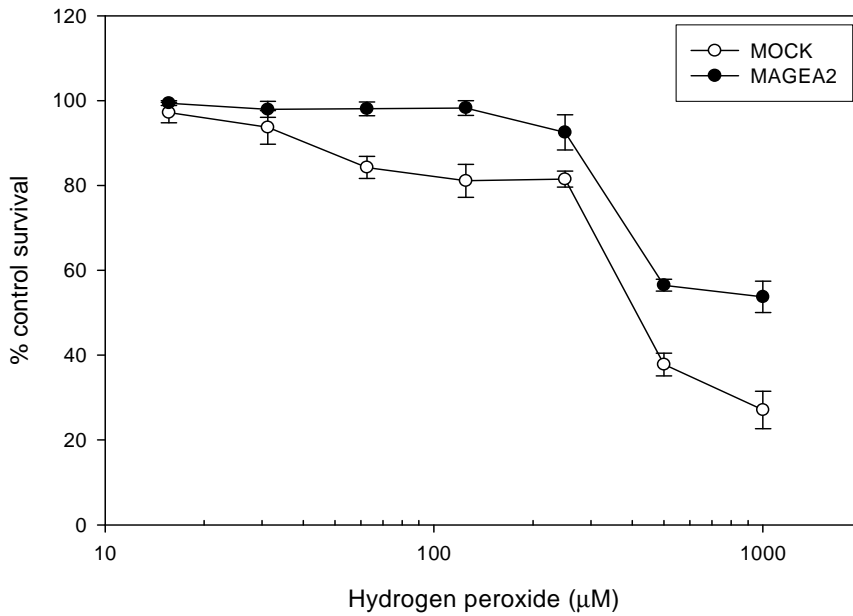


Fig. 34. Cytotoxic effects of hydrogen peroxide after MAGEA4 transfection for 24 hr in HEK 293T cells. Cytotoxicity was determined using the MTT assay. The MTT assay was performed for 2 days after treatment of drug.

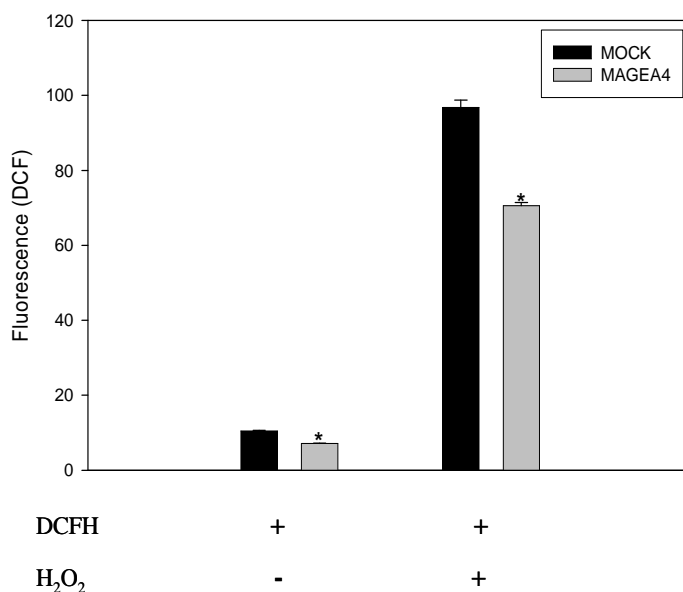


Fig. 35. Generation of reactive oxygen species by hydrogen peroxide after MAGEA4 transfection for 48 hr in HEK 293T cells. PBS containing $1 \times 10^5/\text{ml}$ cells was incubated with $1 \mu\text{M}$ DCFH-DA at 37°C for 4 hr in the presence or absence of 5 mM hydrogen peroxide. After incubation, the DCF fluorescence intensity was determined by using a fluorometer set at a wavelength of 485 nm for excitation and 530 nm for emission. Mean \pm SEM of triplicate determinations is given. *, statistically significant (at $P < 0.05$).

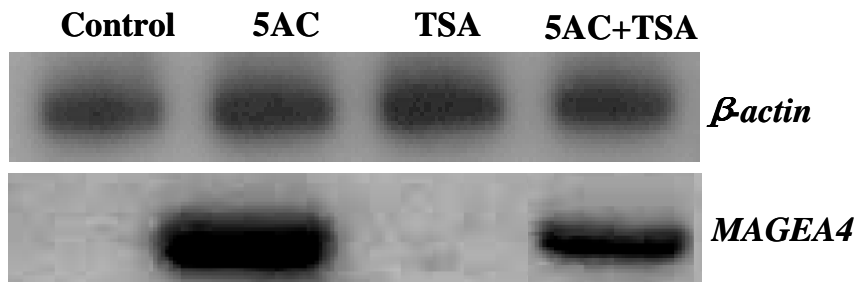


Fig. 36. Effects of 5AC and/or TSA on *MAGEA4* mRNA expression in AML-2/WT cells. Control, no treatment of 5AC or TSA. Expression was determined by the RT-PCR assay. Total RNA was isolated after treatment with 2.5 μ M 5AC for 96 hr and/or 150 ng/ml TSA for 24 hr.

IV. 고찰

본 연구에서는 doxorubicin 내성 백혈병 세포(AML-2/DX100)에서 *MAGE* 유전자의 발현양상과 항암제 내성을 획득한 과정에서의 역할과 내성을 유발하는 기전을 밝히고자 하였다. AML-2/DX100 세포에서 여러 *MAGEA* subtypes 중 *MAGEA4*의 발현이 가장 높았으며 *MAGEA4*가 과발현된 세포에서 여러 MDR 기질에 내성을 보이며 세포막에 존재하여 이러한 기질들을 배출하는 것으로 생각되어진다. 또한 약물을 배출하는 역할 뿐만 아니라 반응성 산소종을 제거하는 기능도 하는 것으로 생각되어진다.

MAGEA 유전자는 임상적으로 종양의 진단 및 면역치료에 응용되어 많은 연구가 이루어졌지만(Van den Eynde 등, 1997; Marchand 등, 1999; Park 등, 2002), 현재까지 *MAGEA*의 기능에 대해서는 확실히 알려진 바가 없다(Monte 등, 2006). *MAGEA*의 발현이 항암제 내성과 관련되어 있다고 보고된 논문은 지금까지 단 2편에 불과하다. Duan 등(2003)은 paclitaxel 내성 난소암 세포(SKOV-3)에서 여러 *MAGEA* 유전자들이 과발현되어 있었으며, 그 중에서 발현량이 높은 *MAGEA2*와 *MAGEA6*를 선택하여 paclitaxel에 sensitive한 난소암 세포(OVCAR8)에 과발현시켰을 때, IC_{50} 농도 값을 기준으로 MDR 기질인 paclitaxel과 doxorubicin에 각각 4 배와 2 배의 내성을 보였으나 non-MDR 기질인 cisplatin이나 topotecan에는 내성을 보이지 않았다고 보고하였다. 이 결과는 *MAGEA*가 항암제 내성에 관여하고 있다는 최초의 보고였다. 또한, 대표적인 세포막 배출펌프인 Pgp와의 관련성을 조사하였는데 *MAGEA2*와 *MAGEA6*의 발현이 Pgp의 발현에는 영향을 미치지 않았다고 하였다. 본 연구에서도 *MAGEA4*의 과발현이 Pgp의 발현에는 영향을 미치지 않았으며, Pgp와 결합하지도 않았다. Monte 등(2006)은 항암제인 etoposide에 대한 내성기전으로 *MAGEA2*가 연관되어 있다고 보고하였다. 내성기전을 살펴보면 *MAGEA2*가 p53과 결합하여 p53을 down-regulation시

키며 HDAC3/p53 complex와 결합하여 p53을 deacetylation 시킴으로써 p53의 발현을 억제하여 etoposide 내성에 관여한다고 보고하였다. MAG-EA1, -A4 및 -A11 등이 SKIP, Miz-1 및 androgen receptor FXXLF motif 등과 같은 transcription factor와 결합하여 전사조절을 한다고 알려져 있다(Laduron 등, 2004; Sakurai 등, 2004; Bai 등, 2005). MAGEA 유전자는 정상세포에서 DNA methylation에 의해 발현하지 않고 있지만, 종양세포가 되면서 Brother of the Regulator of Imprinted Sites (BORIS) 단백질이 MAGEA 유전자의 DNA methylation을 억제하여 MAGEA 단백질을 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Loukinov 등, 2002; Vatolin 등, 2005). 이렇게 활성화된 MAGEA 단백질 (MAGEA1, -A2 및 -A6) 이 p53과 결합하여 p53의 기능을 억제한다고 보고되고 있다(Monte 등, 2006).

뿐만 아니라 MAGEA가 apoptosis를 억제한다는 보고도 있다. Morishima 등(2002)은 murine 세포(C2C12)에서 endoplasmic reticulum (ER) stress (inhibition of glycosylation or ER-specific calcium ATPase)를 받게 되면 caspase-12가 활성화되면 caspase-9과 -3를 거쳐 apoptosis를 일으키는데 MAGEA3가 caspase-12와 결합하여 caspase-12의 활성을 억제하여 apoptosis를 억제한다고 보고하였다. 그러나 human에서 이러한 가능성이 일어날 확률은 적다. 왜냐하면 caspase-12가 부족한 murine에서 단지 12%의 apoptosis 효과를 보였을 뿐만 아니라 human과 murine의 caspase-12의 homology가 거의 없기 때문이다(Nakagawa 등, 2000; Lamkanfi 등, 2004).

반대로 MAGEA가 apoptosis를 유도한다는 보고도 있다. Sakurai 등(2004)은 MAGEA4의 317개의 아미노산 중 C-terminal에 위치하고 있는 211-317 부분이 Miz-1과 binding 하여 cell death를 일으키는 p53으로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 p21의 transcription을 억제시킬 뿐만 아니라, p53의 발현을 증가시킴으로써 p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA)와 같은 pro-apoptotic gene들의 발현시켜 cytochrome C를 방출시키며, anti-apoptotic gene인 Bcl-xL의 발현을 감소시켜 cell death를 유도한다고 보고하였다. Peikert 등(2006)은 non-small

cell lung cancer 환자의 48%에서 MAGEA4가 발현되었으며 caspase-3을 활성화시켜 apoptosis를 유도한다고 보고하였다. 위와 같이 MAGEA 단백질은 drug resistance, survival, cell cycle 및 apoptosis 등과 관련이 있다고 알려져 있다.

앞서 설명한 바와 같이 MAGEA2와 MAGEA6가 paclitaxel과 doxorubicin 내성에 관여하고 있다는 보고는 있지만(Duan 등, 2003), MAGEA4가 항암제 내성과 관련이 있다는 보고는 처음이며 현재까지 MAGEA4가 apoptosis를 유발한다는 보고만 있다(Sakurai 등, 2004; Peikert 등, 2006). Apoptosis를 유도한다는 2편의 보고를 살펴보면 MAGEA4의 기능에 대한 상반된 보고를 하고 있다. 즉 Peikert 등(2006)은 MAGEA4의 open reading frame (ORF) 부위 (아미노산 서열 1-317)가 apoptosis를 유도한다고 보고하였지만, Sakurai 등(2004)은 ORF 부분은 apoptosis를 일으키지 않고 317개의 아미노산 중 C-terminal에 위치하고 있는 211-317 부분만 apoptosis를 유도한다고 보고하였다.

MAGEA4 단백질은 317개의 아미노산으로 구성된 분자량이 34.9 kDa 인 작은 단백질이다. MAGEA4 단백질 구조를 살펴보면 MHD 외에 다른 domain을 가지고 있지 않다. 흔히 알려져 있는 세포막에 존재하는 ABC 배출펌프인 Pgp, MRP, BCRP 등에서처럼 약물의 이동 통로인 trans-membrane domain을 가지고 있지 않으며, ATP가 결합하는 nucleotide binding domain도 가지고 있지 않다. 그럼에도 불구하고 MAGEA4가 약물을 배출하는 역할에 대해 여러 가능성을 생각할 수 있다. 아직까지 MAGEA4가 직접적으로 약물을 배출하는 역할을 하는 것인지 아니면 다른 단백질의 기능을 도와주는 것인지 또는 다른 단백질과 결합하여 기능을 하는 것인지는 확실하지 않다. 단백질 구조를 예측할 수 있는 사이트 (<http://www.predictprotein.org/>)에서 MAGEA4의 MHD 위치가 trans-membrane 구조를 형성할 수 있다는 가능성으로 보아 직접적인 약물배출 역할이 가능할 수도 있다. 다른 단백질을 도와주는 역할을 한다면 여러 가능성을 생각할 수 있는데 세포막의 이온 채널들의 통로를 스위치 하는 역할을 할 수도 있고, 다른 세포막 배출펌프 단백질의 ATP 결합을

도와 줄 수도 있다. 본 연구에서 MAGEA4가 dimer를 형성한다는 것을 확인하였다. 또한 MAGEA4가 MAGEA2와 결합한다는 것을 확인하였다(자료 미제시). 이 같은 결과는, MAGEA4는 homo-dimer 구조를 이루어 약물을 배출하는 펌프로 작용할 수도 있을 뿐 아니라, 다른 MAGEA subtypes와 결합하여 hetero-oligomer을 생성하여 약물 배출을 할 가능성도 있다. MAGEA4의 dimer가 구조가 disulfide bond에 의해 이뤄지는지 알아보기 위하여 MAGEA4의 아미노산 서열(1-317)에 존재하는 4개의 cysteine을 mutation 시켰을 때도 dimer를 형성하였다(자료 미제시). MAGEA4는 disulfide bond가 아닌 α -helix와 β -sheet가 연결되어 dimer 구조를 형성할 가능성이 있다.

MAGEA 단백질은 핵과 세포질 양쪽 모두에 존재한다고 알려져 있다(Ohman과 Nordqvist, 2001). MAGEA 단백질은 세포막에도 존재할 수 있는데 세포막으로 이동하는 메커니즘을 살펴보면 악성종양세포에서 MAGEA 단백질이 세포질에서 단백질분해과정에 의해 제거가 되기도 하며, 소포체로 이동한 후 골지체를 통해 major histocompatibility complex (MHC) 단백질 1 및 2로 세포막에 발현되면 CTL이나 helper T세포에 의해 인식되게 된다(Kirkin 등, 1998). 본 연구결과에서 더욱 더 중요한 의의는 MAGEA4가 주로 세포막에 존재하며 세포막을 통해 약물을 배출할 가능성이 있다는 것이다. 또한 MAGEA4의 단백질 예측 구조를 살펴보면 이 myristoylation 될 가능성이 있는 사이트가 존재하는데 MAGEA4가 세포막으로 이동하는데 myristoylation이 관여할 가능성이 있다. 또한, MAGEA4가 세포막에서 MDR 기질을 배출하는 기능을 한다면 MAGEA4와 결합하는 여러 기질들이 존재하며 약물 배출을 억제하는 억제제도 존재할 것이다. 현재까지 MAGEA4의 기질이나 억제제는 보고된 바는 없다. 본 연구에서 MAGEA4가 doxorubicin, daunorubicin, rhodamine123, mitoxantrone 및 calcein-AM 등과 같은 여러 MDR 기질들을 배출하였으며 MAGEA4가 과발현된 세포에서 Pgp 억제제인 PSC833이나 TMF에 의해 약물 배출 기능이 억제되었다. 아직까지 MAGEA4의 단백질 구조가 밝혀지지 않았기 때문에 단백질 구조를 밝힌다면 MAGEA4

와 결합하는 여러 기질 및 억제제를 찾을 수 있을 것으로 기대된다.

악성 흑색종은 전 세계적으로 발생 빈도가 증가하고 있으며, 특히, 백인에게 많고 자외선의 양이 많은 지역에서 발생률이 높다(Elwood, 1996; Eggermont, 2002). 피부암 중 비교적 드물게 발생하지만 미국의 경우 전체 피부암의 5%를 차지하고, 모든 피부암 사망률의 80%를 차지할 정도로 악성도가 높은 암이다(Elwood, 1996). 악성 흑색종은 다른 암종과 비교하여서도 악성도가 매우 높고 항암제나 면역요법제 또는 방사선치료 등에 잘 반응하지 않는데, 이것은 Bcl-2와 Bcl-xL 등이 악성 흑색종 세포의 apoptosis를 방해하기 때문이다(Tuker 등, 1997; Thompson 등, 2005). 악성 흑색종의 치료에 효과가 있는 약물로는 dacarbazine, nitrosourea, platinum 유사체, vinca alkaloids 및 taxane 등이 있다(Nathan과 Mastrangelo, 1998; Buzaid, 2000). 최근에 미국 국립암연구소에서 악성 흑색종의 치료에 사용하고 있는 30종의 약물을 테스트하였는데 dacarbazine, nitrosourea 단 두 가지 약물만이 response rate (RR)가 10% 이상이라고 보고하고 있으며 dacarbazine이 단일 화학요법 제제로 가장 효과적인 것으로 알려져 있다(Gogas 등, 2004). 악성 흑색종 세포는 거의 모든 *MAGEA* subtypes를 발현하고 있다(Brasseur, 1999). 본 연구결과에 근거하면 *MAGEA4* 뿐만 아니라 다른 *MAGEA* subtypes도 항암제 내성 및 약물 배출 작용에 관여할지도 모른다. 또한, 악성 흑색종의 치료에 항암제가 반응을 하지 않는 이유가 약물 배출 기능을 가진 *MAGEA*의 발현이 원인이 될 수도 있다.

Doxorubicin 내성 백혈병 세포(AML-2/DX100)는 *MAGEA4*의 발현이 높았으나 doxorubicin으로 내성을 획득한 다른 백혈병 세포(AML-2/DX250, /DX500, /DX1000 및 HL-60/ADR)와 폐암 세포(SKMES-1/DX1000)에서는 *MAGEA4*의 발현이 높지 않았다. 이 같은 사실은 doxorubicin을 사용하였을 때 모든 암세포에서 *MAGEA4*가 과발현되는 것은 아니며 세포의 특성에 따라 다르다는 것을 의미한다.

*MAGE*는 유전자의 hypermethylation으로 발현이 안 되고 있는 세포에서 여러 가지 원인으로 demethylation되면 유전자 발현이 되는 것으로

알려져 있다(Weber 등, 1994; de Smet 등, 1996). AML-2/DX100 세포의 특성을 살펴보면 doxorubicin에 대한 내성을 가지고 있지만 항산화효소인 catalase가 감소되어 있어 hydrogen peroxide, t-butyl hydroperoxide 및 paraquat와 같은 pro-oxidants에 오히려 민감성을 보인다(Kim 등, 2001). 이와 같이 AML-2/DX100세포는 선별과정에 doxorubicin과 같은 pro-oxidants에 의해 산화적 스트레스를 더 많이 받아 *MAGEA4* 유전자가 demethylation된 것으로 추측된다. Anthracyclines와 같은 많은 항암제가 산소라디칼을 생성하기 때문에 *MAGEA4*가 항산화 효과를 가지고 있다면 이러한 항암제에 내성을 보일 가능성을 배제하기 위하여 *MAGEA4*의 항산화 효과를 측정하였다. 그 결과 *MAGEA4*가 항산화 효과를 가지고 있는 것을 최초로 확인 할 수 있었으나 어떤 기전으로 항산화 효과를 보이는지는 향후 더 연구되어야 할 과제이다. 그렇지만, heme의 전구물질인 porphyrin을 BCRP가 세포 밖으로 풀어내어 NO 및 산소라디칼의 생성을 억제한다는 사실(Jonker 등, 2007)을 기초로 *MAGEA4*가 라디칼의 생성에 관여하는 내인성 기질 물질을 배출함으로써 항산화 효과를 보일 수 있다는 추론이 가능하다.

AML-2/DX100 세포에서 hydrogen peroxide를 처하였을 때 감수성 세포에 비해 훨씬 많은 산소라디칼을 생성되지만, 내인성 산소라디칼 양은 감수성 세포보다 더 낮으며, 다른 glutathione S-transferase Pi (GSTP1), peroxiredoxin 2 (PRDX2), thioredoxin 2 (TXN2) 및 glutaredoxin (GLRX) 등과 같은 항산화 효소의 발현이 감수성세포에 비해 증가되어 있었다(Oh 등, 2004). AML-2/DX100세포에서 *MAGEA4*가 이러한 내인성 항산화의 증가 기전이 될 가능성이 있다.

V. 요약문

인간에서 현재까지 56종의 Melanoma antigen (*MAGE*) 유전자가 보고되었으며 크게 type I 과 type II형으로 나뉘지는데 I형은 *MAGEA* (melanoma antigen, family A), *MAGEB* (melanoma antigen, family B) 및 *MAGEC* (melanoma antigen, family C)가 있으며 나머지는 II형으로 구분되어진다. Type I형은 종양세포에서 발현되고 고환 및 태반 이외의 정상 조직에서는 발현하지 않지만, II형은 정상조직에서도 발현을 한다. Type I형 중 *MAGEA*에 대한 연구가 가장 많이 되고 있다.

Doxorubicin 내성 백혈병 세포(AML-2/DX100)에서 *MAGE* 유전자의 발현양상과 항암제 내성을 획득한 과정에서의 역할과 내성을 유발하는 기전을 조사하였다. AML-2/DX100 세포에서 여러 *MAGEA* subtypes 중 *MAGEA4*의 발현이 가장 높았으며 *MAGEA4*가 과발현된 세포에서 MDR 기질인 doxorubicin과 daunorubicin에 내성을 보였으며 non-MDR 기질인 5-FU와 cisplatin에는 내성을 보이지 않았다. 또한 doxorubicin, daunorubicin, rhodamine 123, mitoxantrone 및 calcein-AM과 같은 여러 MDR 기질들을 배출하였고 ATP를 고갈시키는 cyanide에 의해 doxorubicin 형광량이 증가하였다. *MAGEA4*가 과발현된 세포에서 P-glycoprotein (Pgp) inhibitor에 의해 doxorubicin 형광량이 증가하였지만 *MAGEA4*의 발현이 Pgp의 발현에는 영향을 미치지 않았으며 *MAGEA4*와 Pgp는 결합하지 않았다. 그리고 *MAGEA4*가 과발현된 세포에서 *MAGEA4* siRNA에 의해서도 doxorubicin 형광량이 증가하였다. *MAGEA4*는 핵, 세포질, 세포막에 존재하였지만 주로 세포막에 존재하고 있었다. 그리고 *MAGEA4*는 homodimer 및 heterodimer를 형성하지만 disulfide 결합이 dimer를 형성하는데 관여하지는 않는다. 또한 *MAGEA4*는 반응성 산소종을 제거하는 능력을 가지고 있다.

이상의 결과에서 *MAGEA4*는 주로 세포막에 존재하며 dimer 구조를 형성하여 여러 MDR 기질에 내성을 보이며 기질들을 배출하는 역할과 반응성 산소종을 제거하는 기능을 하는 것으로 생각되어진다.

새로이 발견된 항암제 내성 관련 유전자인 MAGEA4는 앞으로 내성 기전 연구에 활용될 수 있어 새로운 치료제 개발 타겟을 제공할 것으로 기대되며, 임상에서 항암제 치료 후에 내성출연 여부를 검출할 수 있는데 활용할 수 있어 항암치료를 증진시키는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

VI. 감사의 말씀

처음 학위를 시작하던 때의 봄날의 설레임과 두려움을 기억하며, 뜨거운 여름의 문턱에서 여러분들의 도움 속에 이렇게 작은 성과를 내놓을 수 있게 됨을 몇 줄의 글로 감사의 마음을 올립니다.

먼저 본 논문이 완성되기까지 배움의 방법과 삶的方法을 일깨워주시고 부족한 저를 큰 사랑으로 지켜봐 주신 지도 교수 최 철희 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 많은 관심을 기울여주시고 날카로운 비판과 애정 어린 조언을 아끼지 않으셨던 윤 지수 교수님, 아울러 바쁘신 가운데서도 아낌없는 지도의 시간을 내주시고 유익한 지도편달을 해 주신 김 상현 교수님, 조 훈 교수님, 최 홍석 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 그리고 본 연구를 위하여 실험 과정 중 도움을 주시고 학업에 열중할 수 있도록 많은 노력을 함께 해준 약리학교실의 선후배님 그리고 내성세포연구센터의 여러 식구들에게 그동안의 감사함을 이 지면을 통해 전해드리고 싶습니다.

무엇보다도 중요한 것은 오늘이 있기까지 사랑의 그늘과 희생으로 길러주신 어머니의 사랑에 깊은 감사를 드립니다. 또한 부족한 동생에게 부모님을 대신하여 격려와 성원을 아끼지 않으신 형님, 그리고 누님과 자형을 비롯하여 사랑하는 동생들에게도 진심으로 고마움을 전하며 앞으로도 항상 화목하게 지내도록 열심히 노력하겠습니다. 그리고 끊임없는 학문의 길에서 이 보람에 만족하지 않고 예지를 사랑하는 인간다운 인간이 되도록 힘쓰며 늘 감사하는 마음 잊지 않겠습니다. 끝으로 지금은 하늘에 계시지만 항상 언제나 힘과 용기를 주시고 늘 아들 잘되기를 바라시고 살아 계신다면 누구보다도 기뻐하셨을 아버님 영전에 이 한편의 논문을 바칩니다.

자신이 맡은 분야에서 끊임없는 노력을 통해 최고가 되는 것이 저의 꿈입니다. 저의 꿈을 이루기 위해 욕심 부리지 않고 차근차근, 그러나 끊임없이 노력하겠습니다. 마치 토끼와 거북이의 경주에서 느림보 거북이가 이길 수 있었던 성공비결처럼 말입니다. 때론 간간히 뒤도 돌아보고 주위도 살피면서 그렇게 걸어갈 생각입니다. 어차피 끝이 있는 길이 아니니까요. 삶이란...

2007. 6.

이 태 범

VII. 참고문헌

Bai S, He B, Wilson EM. Melanoma antigen gene protein MAGE-11 regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction. *Mol Cell Biol.* 25(4):1238-57, 2005.

Barker PA, Salehi A. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J Neurosci Res.* 67(6):705-12, 2002.

Becker JC, Gillitzer R, Bröcker EB. A member of the melanoma antigen-encoding gene (MAGE) family is expressed in human skin during wound healing. *Int J Cancer.* 58(3):346-8, 1994.

Boel P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P, Boon T, van der Bruggen P. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity.* 2(2):167-175, 1995.

Boon T, Van den Eynde B. Cancer vaccines: Cancer antigens, shared tumor-specific antigens., In: *Principles and Practice of the Biologic Therapy of Cancer.*, SA Rosenberg ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkin, pp.493-504, 2000.

Brasseur F, Rimoldi D, Liénard D, Lethé B, Carrel S, Arienti F, Suter L, Vanwijck R, Bourlond A, Humblet Y, et al. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer.* 63(3):375-80, 1995.

Brasseur F. Melanoma: Brussels melanoma cell lines. In: Human Cell Culture. Vol. 1. Cancer Cell Lines. Part 1., ed. JRW Masters, B Palsson, Kluwer Academic Publishers, pp.275-82, 1999.

Buzaid AC. Strategies for combining chemotherapy and biotherapy in melanoma. *Cancer Control*. 7(2):185-97, 2000.

Chi DD, Merchant RE, Rand R, Conrad AJ, Garrison D, Turner R, Morton DL, Hoon DS. Molecular detection of tumor-associated antigens shared by human cutaneous melanomas and gliomas. *Am J Pathol*. 150(6):2143-52, 1997.

Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res*. 61(14):5544-51, 2001.

Choi CH, Kim HS, Rha HS, Jeong JH, Park YH, Min YD, Kee KH, Lim DY. Drug concentration-dependent expression of multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein in the doxorubicin-resistant acute myelogenous leukemia sublines. *Mol Cells*. 9(3):314-9, 1999.

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 258(5088):1650-54, 1992.

Corrias MV, Scaruffi P, Occhino M, De Bernardi B, Tonini GP, Pistoia V. Expression of MAGE-1, MAGE-3 and MART-1 genes in neuroblastoma. *Int J Cancer*. 69(5):403-7, 1996.

de Plaen E, Arden K, Travesari C, Gaforio JJ, Szikora JP, de Smet C, Brasseur F, van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C, Brasseur R, Chomez P, de Backer O, Cavenee W, Boon T. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*. 40(5):360-69, 1994.

De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGA-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(14):7149-53, 1996.

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(26):15665-70, 1998.

Duan Z, Duan Y, Lamendola DE, Yusuf RZ, Naeem R, Penson RT, Seiden MV. Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 9(7):2778-85, 2003.

Eggermont AM. European approach to the treatment of malignant melanoma. *Curr Opin Oncol*. 14(2):205-11, 2002.

Elwood JM. Melanoma and sun exposure. *Semin Oncol*. 23(6):650-66, 1996.

Eura M, Ogi K, Chikamatsu K, Lee KD, Nakano K, Masuyama K, Itoh K, Ishikawa T. Expression of the MAGE gene family in human

head-and-neck squamous-cell carcinomas. *Int J Cancer*. 64(5):304-8, 1995.

Eura M, Chikamatsu K, Ogi K, Nakano K, Masuyama K, Ishikawa T. Expression of genes MAGE-1, -2, and -3 by human maxillary carcinoma cells. *Anticancer Res*. 15(1):55-9, 1995.

Fujie T, Mori M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. Expression of MAGE and BAGE genes in Japanese breast cancers. *Ann Oncol*. 8(4):369-72, 1997.

Gaugler B, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen E, Lethé B, Brasseur F, Boon T. Human gene MAGE-3 codes for an antiaigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med*. 179(3):921-30, 1994.

Gillespie AM, Rodgers S, Wilson AP, Tidy J, Rees RC, Coleman RE, Murray AK. MAGE, BAGE and GAGE: tumour antigen expression in benign and malignant ovarian tissue. *Br J Cancer*. 78(6):816-21, 1998.

Gogas H, Bafaloukos D, Bedikian AY. The role of taxanes in the treatment of metastatic melanoma. *Melanoma Res*. 14(5):415-20, 2004.

Herman J, van der Bruggen P, Luescher IF, Mandruzzato S, Romero P, Thonnard J, Fleischhauer K, Boon T, Coulie PG. A peptide encoded by the human MAGE3 gene and presented by HLA-B44 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE3.

Immunogenetics 43(6):377-83, 1996.

Ikeda H, Lethé B, Lehmann F, van Baren N, Baurain JF, de Smet C, Chambost H, Vitale M, Moretta A, Boon T, Coulie PG. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity*. 6(2):199-208, 1997.

Inoue H, Mori M, Li J, Mimori K, Honda M, Nakashima H, Mafune K, Tanaka Y, Akiyoshi T. Human esophageal carcinomas frequently express the tumor-rejection antigens of MAGE genes. *Int J Cancer*. 63(4):523-6, 1995.

Inoue H, Mori M, Honda M, Li J, Shibuta K, Mimori K, Ueo H, Akiyoshi T. The expression of tumor-rejection antigen "MAGE" genes in human gastric carcinoma. *Gastroenterology*. 109(5):1522-5, 1995.

Itoh K, Hayashi A, Nakao M, Hoshino T, Seki N, Shichijo SJ. Human tumor rejection antigens MAGE. *J Biochem. (Tokyo)* 119(3):385-90, 1996.

Jager E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jager D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stockert E, Old LJ, Knuth A. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med*. 187(2):265-70, 1998.

Jonker JW, Musters S, Vlaming ML, Plösch T, Gooijert KE, Hillebrand MJ, Rosing H, Beijnen JH, Verkade HJ, Schinkel AH. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) is expressed in the harderian gland and mediates transport of conjugated protoporphyrin IX. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292(6):C2204-12, 2007.

Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Chen YT, Spagnoli GC, Old LJ. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer.* 85(4):460-5, 2000.

Katano M, Nakamura M, Morisaki T, Fujimoto K. Melanoma antigen-encoding gene-1 expression in invasive gastric carcinoma: correlation with stage of disease. *J Surg Oncol.* 64(3):195-201, 1997.

Kawakami Y, Robbins PF, Wang RF, Parkhurst M, Kang X, Rosenberg SA. The use of melanomal proteins in the immunotherapy of melanoma. *J Immunother.* 21(4):237-46, 1998.

Kim HS, Lee TB, Choi CH. Down-regulation of catalase gene expression in the doxorubicin-resistant AML subline AML-2/DX100. *Biochem Biophys Res Commun.* 281(1):109-14, 2001.

Kirkin AF, Dzhandzugazyan K, Zeuthen J. Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *APMIS.* 106(7):665-79, 1998.

Kuramoto T. Detection of MAGE-1 tumor antigen in brain tumor.

Kurume Med J. 44(1):43-51, 1997.

Laduron S, Deplus R, Zhou S, Kholmanskikh O, Godelaine D, De Smet C, Hayward SD, Fuks F, Boon T, De Plaen E. MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Res.* 32(14):4340-50, 2004.

Lamkanfi M, Kalai M, Vandenabeele P. Caspase-12: an overview. *Cell Death Differ.* 11(4):365-8, 2004.

Lee KD, Eura M, Ogi K, Nakano K, Chikamatsu K, Masuyama K, Ishikawa T. Expression of the MAGE-1, -2, -3, -4, and -6 genes in non-squamous cell carcinoma lesions of the head and neck. *Acta Otolaryngol.* 116(4):633-9, 1996.

Lee KD, Chang HK, Jo YK, Kim BS, Lee BH, Lee YW, Lee HK, Huh MH, Min YG, Spagnoli GC, Yu TH. Expression of the MAGE 3 gene product in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Anticancer Res.* 19(6B):5037-42, 1999.

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 5(2):227-31, 1992.

Lin J, Lin L, Thomas DG, Greenson JK, Giordano TJ, Robinson GS, Barve RA, Weishaar FA, Taylor JM, Orringer MB, Beer DG. Melanoma-associated antigens in esophageal adenocarcinoma: identification of novel MAGE-A10 splice variants. *Clin Cancer Res.* 10(17):5708-16, 2004.

Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I, Mannan P, Larsson E, Kanduri C, Vostrov AA, Cui H, Niemitz EL, Rasko JE, Docquier FM, Kistler M, Breen JJ, Zhuang Z, Quitschke WW, Renkawitz R, Klenova EM, Feinberg AP, Ohlsson R, Morse HC, Lobanenkov VV. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(10):6806-11, 2002.

Maliepaard M, van Gastelen MA, de Jong LA, Pluim D, van Waardenburg RC, Ruevekamp-Helmers MC, Floot BG, Schellens JH. Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res*. 59(18):4559-63, 1999.

Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parminai G, Cascinelli N, Bourlond A, Vanwijck R, Humblet Y. Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int J Cancer*. 63(6):883-5, 1995.

Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y, Bourlond A, Vanwijck R, Lienard D, Beauduin M, Dietrich PY, Russo V, Kerger J, Masucci G, Jager E, De Greve J, Atzpodien J, Brasseur F, Coulie PG, van der Bruggen P, Boon T. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer*. 80(2):219-30, 1999.

Monte M, Simonatto M, Peche LY, Bublik DR, Gobessi S, Pierotti MA, Rodolfo M, Schneider C. MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(30):11160-5, 2006.

Mori M, Inoue H, Mimori K, Shibuta K, Baba K, Nakashima H, Haraguchi M, Tsuji K, Ueo H, Barnard GF, Akiyoshi T. Expression of MAGE genes in human colorectal carcinoma. *Ann Surg*. 224(2):183-8, 1996.

Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem*. 277(37):34287-94, 2002.

Mulcahy KA, Rimoldi D, Brasseur F, Rodgers S, Liénard D, Marchand M, Rennie IG, Murray AK, McIntyre CA, Platts KE, Leyvraz S, Boon T, Rees RC. Infrequent expression of the MAGE gene family in uveal melanomas. *Int J Cancer*. 66(6):738-42, 1996.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 403(6765):98-103, 2000.

Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, Kakunaga T. Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82(18):6133-37, 1985.

Nathan FE, Mastrangelo MJ. Systemic therapy in melanoma. *Semin Surg Oncol.* 14(4):319-27, 1998.

Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 4(3):328-32, 1998.

Novellino L, Castelli C, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother.* 54(3):187-207, 2005.

Oh YK, Lee TB, Choi CH. Anti-oxidant adaptation in the AML cells supersensitive to hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 319(1):41-5, 2004.

Otte M, Zafrakas M, Riethdorf L, Pichlmeier U, Löning T, Jänicke F, Pantel K. MAGE-Agene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res.* 61(18):6682-7, 2001.

Park JW, Kwon TK, Kim IH, Sohn SS, Kim YS, Kim CI, Bae OS, Lee KS, Lee KD, Lee CS, Chang HK, Choe BK, Ahn SY, Jeon CH. A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers. *J Immunol Methods.* 266(1-2):79-86, 2002.

Patard JJ, Brasseur F, Gil-Diez S, Radvanyi F, Marchand M, François P, Abi-Aad A, Van Cangh P, Abbou CC, Chopin D. Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int J Cancer.* 64(1):60-4, 1995.

Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA. Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res.* 66(9):4693-700, 2006.

Pieters R, Huisman DR, Leyva A, Veerman AJ. Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. *Cancer Lett.* 41(3):323-32, 1988.

Quillien V, Raoul JL, Heresbach D, Collet B, Toujas L, Brasseur F. Expression of MAGE genes in esophageal squamous-cell carcinoma. *Anticancer Res.* 17(1A):387-91, 1997.

Riordan JR, Ling V. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J Biol Chem.* 254(24):12701-05, 1979.

Russo V, Traversari C, Verrecchia A, Mottolese M, Natali PG, Bordignon C. Expression of the MAGE gene family in primary and metastatic human breast cancer: implications for tumor antigen-specific immunotherapy. *Int J Cancer.* 64(3):216-21, 1995.

Sakata M. Expression of MAGE gene family in lung cancers. *Kurume Med J.* 43(1):55-61, 1996.

Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, Nagao T, Nonoguchi K, Chiba T, Fujita J. A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells. *J Biol Chem.* 279(15):15505-14, 2004.

Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* 4:1, 2004.

Shichijo S, Tsunosue R, Masuoka K, Natori H, Tamai M, Miyajima J, Sagawa K, Itoh K. Expression of the MAGE gene family in human lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother.* 41(2):90-103, 1995.

Shichijo S, Hayashi A, Takamori S, Tsunosue R, Hoshino T, Sakata M, Kuramoto T, Oizumi K, Itoh K. Detection of MAGE-4 protein in lung cancers. *Int J Cancer.* 64(3):158-65, 1995.

Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc).* 65(1):95-106, 2000.

Sudo T, Kuramoto T, Komiya S, Inoue A, Itoh K. Expression of MAGE genes in osteosarcoma. *J Orthop Res.* 15(1):128-32, 1997.

Tahara K, Mori M, Sadanaga N, Sakamoto Y, Kitano S, Makuuchi M. Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 85(6):1234-40, 1999.

Tajima K, Obata Y, Tamaki H, Yoshida M, Chen YT, Scanlan MJ, Old LJ, Kuwano H, Takahashi T, Takahashi T, Mitsudomi T. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer.* 42(1):23-33, 2003.

Tanaka F, Fujie T, Tahara K, Mori M, Takesako K, Sette A, Celis E, Akiyoshi T. Induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes with a

MAGE-3-encoded synthetic peptide presented by human leukocytes antigen-A24. *Cancer Res.* 57(20):4465-68, 1997.

Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet.* 365(9460):687-701, 2005.

Toh Y, Yamana H, Shichijo S, Fujita H, Tou U, Sakaguchi M, Kakegawa T, Itoh K. Expression of MAGE-1 gene by esophageal carcinomas. *Jpn J Cancer Res.* 86(8):714-7, 1995.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. procedures and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76(9):4350-4, 1979.

Traversari C, van der Bruggen P, Luescher IF, Lurquin C, Chomez P, Van Pel A, De Plaen E, Amar-Costesec A, Boon T. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J Exp Med.* 176:1453-1457, 1992.

Tucker MA, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Elder DE, Sagebiel RW, Guerry D, Clark WH. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA.* 277(18):1439-44, 1997.

Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol.* 9(5):684-93, 1997.

van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E,

Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 254(5038):1643-47, 1991.

van der Bruggen P, Bastin J, Gajewski T, Coulie PG, Boel P, De Smet C, Traversari C, Townsend A, Boon T. A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. *Eur J Immunol*. 24:3038-42, 1994.

van der Bruggen P, Szikora JP, Boel P, Wildmann C, Somville M, Sensi M, Boon T. Autologous cytolytic T lymphocytes recognize a MAGE-1 nonapeptide on melanomas expressing HLA-Cw*1601. *Eur J Immunol*. 24(12):2134-40, 1994.

Vatolin S, Abdullaev Z, Pack SD, Flanagan PT, Custer M, Loukinov DI, Pugacheva E, Hong JA, Morse H, Schrupp DS, Risinger JI, Barrett JC, Lobanenko VV. Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Res*. 65(17):7751-62, 2005.

Visseren MJ, van der Burg SH, van der Voort EI, Brandt RM, Schrier PI, van der Bruggen P, Boon T, Melief CJ, Kast WM. Identification of HLA-A*0201-restricted CTL epitopes encoded by the tumor-specific MAGE-2 gene product. *Int J Cancer*. 73(1):125-30, 1997.

Weber J, Salgaller M, Samid D, Johnson B, Herlyn M, Lassam N,

Treisman J, Rosenberg SA. Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 54(7):1766-71, 1994.

Weynants P, Lethé B, Brasseur F, Marchand M, Boon T. Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer.* 56(6):826-9, 1994.

Xiao J, Chen HS. Biological functions of melanoma-associated antigens. *World J Gastroenterol.* 10(13):1849-53, 2004.

Yamashita N, Ishibashi H, Hayashida K, Kudo J, Takenaka K, Itoh K, Niho Y. High frequency of the MAGE-1 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 24(6):1437-40, 1996.

Yamada A, Kataoka A, Shichijo S, Kamura T, Imai Y, Nishida T, Itoh K. Expression of MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3/-6 and MAGE-4a/-4b genes in ovarian tumors. *Int J Cancer.* 64(6):388-93, 1995.

Yoshimatsu T, Yoshino I, Ohgami A, Takenoyama M, Hanagiri T, Nomoto K, Yasumoto K. Expression of the melanoma antigen-encoding gene in human lung cancer. *J Surg Oncol.* 67(2):126-9, 1998.

Zambon A, Mandruzzato S, Parenti A, Macino B, Dalerba P, Ruol A, Merigliano S, Zaninotto G, Zanovello P. MAGE, BAGE, and GAGE gene expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer.* 91(10):1882-8, 2001.

저작물 이용 허락서

학 과	바이오신약 개발학과	학 번	20057613	과 정	석사, 박사
성 명	한글: 이 태 범 한문: 李 泰 範 영문: Lee Tae Bum				
주 소	광주광역시 북구 임동 101-195				
연락처	E-MAIL : tblee01@hanmail.net				
논문제목	한글 : Melanoma antigen family A4 (MAGEA4)의 새로운 항암제 내성기전에 관한 연구 영문 : Novel anticancer drug resistance mechanisms of melanoma antigen family A4 (MAGEA4)				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함.
다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 조건부 동의() 반대()

2007 년 6 월 30 일

저작자: 이 태 범 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하