

# Analysis of the global gene expression profiles in genomic instability-induced cervical cancer cells

Jung-Min Oh\*

Department of Oral Biochemistry, Dental and Life Science Institute, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan 50612, Republic of Korea

Preserving intact genetic material and delivering it to the next generation are the most significant tasks of living organisms. The integrity of DNA sequences is under constant threat from endogenous and exogenous factors. The accumulation of damaged or incompletely-repaired DNA can cause serious problems in cells, including cell death or cancer development. Various DNA damage detection systems and repair mechanisms have evolved at the cellular level. Although the mechanisms of these responses have been extensively studied, the global RNA expression profiles associated with genomic instability are not well-known. To detect global gene expression changes under different DNA damage and hypoxic conditions, we performed RNA-seq after treating human cervical cancer cells with ionizing radiation (IR), hydroxyurea, mitomycin C (MMC), or 1% O<sub>2</sub> (hypoxia). Results showed that the expression of 184–1037 genes was altered by each stimulus. We found that the expression of 51 genes changed under IR, MMC, and hypoxia. These findings revealed damage-specific genes that varied differently according to each stimulus and common genes that are universally altered in genetic instability.


**Keywords:** Genomic instability, DNA damage, Hypoxia, Uterine cervical neoplasms

## Introduction

살아있는 생명체는 세포 안에 유전물질인 DNA를 가지고 있고, 이 DNA가 온전하게 유지되는 것은 생명체의 유지 및 증식에 매우 중요하다. 유전체총체성(genome integrity)은 다양한 자극에 의해서 손상받을 수 있고, 손상이 일어난 DNA는 적절한 방법으로 빠른 시일 내에 복구되어야 한다. 만일 손상된 DNA가 제대로 복구되지 못할 경우에는 DNA mutation이 누적되고 이로 인해 세포 기능에 문제가 생기게 된다. 이 손상이 심한 경우 정상 세포는 암세포가 되거나, 생존이 불가능한 경우는 세포사멸을 일으키게 된다. 이렇게 유전체총체성이 유지되지 않음으로써 발생하는 유전체불안정성(genome instability)은 유전병이나 암세포의 진행과정에서 발생하게 되고, 이에 대한 많은 연구가 활발히 이루어지고 있다[1-4].

유전체총체성은 유전적 요인이나 비유전적 요인으로 인해 위협받게 되는데, 유전적 요인은 대부분 DNA 복제나 상해복구에 관련된 단백질들의 유전자 이상에서 야기된다. 그리고 비유전적 상해자극으로는, 활성산소, 전리방사선(ionizing radiation, IR), 자외선(ultraviolet, UV), 여러 유해 화학물질들을 들 수 있다. 그래서 생명체는 이러한 DNA 상해 요인들로부터 DNA를 보호하기 위해서, DNA 상해를 치료하는 여러 복구 메커니즘을 가지고 있다[5,6]. 먼저 손상된 DNA를 인식하는 여러 DNA 상해복구 단백질이 상해 부위로 와서 DNA 상해복구 신호를 생성하게 되고, DNA 상해 종류에 따라 서로 다른 종류의 단백질이 와서 복구 과정에 참여하게 된다. 대표적인 DNA 상해복구 기전에는 염기절제 복구(base excision repair), 뉴클레오티드절제복구(nucleotide excision repair), 틀린 짝 복구(mismatch repair), DNA 이중나선절단복구(DNA double strand break repair) 등이 있고, 각 상해복구 과정과

Received May 19, 2022; Revised May 26, 2022; Accepted May 30, 2022

\*Correspondence to: Jung-Min Oh, E-mail: [jminoh@pusan.ac.kr](mailto:jminoh@pusan.ac.kr)  <https://orcid.org/0000-0003-0385-7168>

Copyright © The Korean Academy of Oral Biology

© This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

기능을 하는 단백질들이 여러 연구들에 의해서 잘 알려져 있다[7-10]. 여러 DNA 손상 중에서 DNA 이중나선절단은 가장 심각한 손상으로 알려져 있는데, 이는 절단된 이중나선이 수리가 되지 않을 경우 세포사멸을 일으킬 수 있고, 제대로 복구가 되지 않으면 암을 발생시킬 수 있는 염색체 전좌(chromosomal translocation)를 일으킬 수 있기 때문이다 [2,4].

DNA 이중나선절단을 일으키는 많은 자극들이 있는데, 먼저 IR은 물 분자를 이온화시켜서, 이것이 DNA를 공격하는 hydroxyl radical을 생성하여 DNA를 손상시킴으로써, 다양한 형태의 DNA 절단을 유도한다 [11]. Hydroxyurea (HU)의 경우는 리보뉴클레오티드 환원효소 억제제(ribonucleotide diphosphate reductase inhibitor)인데, 리보뉴클레오티드(ribonucleotide)를 환원시켜 DNA를 만드는 디옥시리보뉴클레오티드(deoxyribonucleotide)를 만드는 효소가 바로 리보뉴클레오티드 환원효소이다. HU는 이 리보뉴클레오티드 환원효소를 억제하여 DNA 합성을 억제하고, 이것은 결국 DNA 복제 스트레스로 작용하여 DNA 이중나선절단을 일으키게 된다[12]. Mytomycin C (MMC)는 아데닌(adenine)과 구아닌(guanine)에서 교차결합(cross-link)을 형성하고, 이는 DNA 합성 및 복제를 억제하는 기작으로 DNA 손상을 일으키게 된다[13]. 저산소자극(hypoxia)의 경우는 직접적으로 DNA 상해를 일으키는 것이 아니지만, DNA 상해복구 기전을 억제함으로써 세포의 유전체불안정성을 증가시키게 된다. 여러 영향들이 알려져 있는데 DNA 상해복구 기전 중에서 DNA 이중나선절단복구, 염기절제복구, 틀린 짝 복구 등을 저하시켜서 유전체불안정성을 증가시키고, 이것이 결국 암의 진행에 영향을 주는 것이 알려져 있다[14].

DNA 손상 복구 메커니즘은 활발히 연구되고 있는데 비해서, 유전체 총제성이 유지되지 않고 있는 상황에서의 전체적인 RNA transcriptome이 어떻게 변화되는지에 대한 연구는 부족한 실정이다. 이전 연구에서는 DNA 토포아이스오머라아제 억제제(topoisomerase inhibitor)를 사용하게 되면 RNA 전사가 빨리 끝나게 되는 것이 알려져 있고[15], UV 처리 시 small non-coding RNA가 증가하는 등의 비정상적인 유전자 발현이 보고되어 있다[16].

여기에서는 다양한 DNA damage 자극과(IR, HU, MMC), 저산소자극을 사용하여 세포의 유전체불안정성을 유도하고서 이때, 전체 transcriptome에 어떤 변화가 있는지 살펴보기 위해 RNA-seq을 수행하기로 하였다. 자궁경부암 세포주인 HeLa를 사용하여 서로 다른 자극에서 어떤 RNA에 변화가 있는지 살펴보고, 전체적인 유전자 발현을 분석해 보았다. 그리고 서로 다른 자극에 의해서 변화된 유전자에 어떤 공통점과 차이점이 있는지 살펴보고 유전체불안정성에서 특화된 공통된 유전자 발현이 있는지 살펴보았다.

## Materials and Methods

### 1. 세포 배양 및 DNA 상해반응

자궁경부암 세포주인 HeLa를 실험에 사용하였다. HeLa는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/high glucose (HyClone,

Logan, UT, USA) 배지에 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, Millipore, Burlington, MA, USA)과 1% penicillin과 streptomycin (Invitrogen, Waltham, MA USA)을 섞어서 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. DNA 상해반응을 일으키기 위해서 여러 자극들을 사용하였는데, 이는 다음과 같다. IR 2 Gray, 10 mM HU (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2시간 처리, 500 nM MMC (Sigma-Aldrich) 16시간 처리를 하였고, 저산소자극을 주기 위해서 세포를 1% O<sub>2</sub> 저산소 배양기에서 24시간을 키웠다.

### 2. 4-thiouridine 처리와 RNA 정제 및 total RNA 라이브러리 구축

세포에 서로 다른 상해를 일으키고, 이로 인해 변화가 일어나는 유전자를 찾아내기 위해서, HeLa 세포에 각각의 상해 처리를 한 이후, DMEM 배지에 4-thiouridine (4-shU, Sigma-Aldrich)을 2시간 동안 넣어주었다. 방사선 처리의 경우는 2 Gray 방사선 조사 후에 250 μM 4-shU를 DMEM 배지에 넣고, 2시간 동안 이산화탄소 배양기에 넣고 배양하였다. 대조군의 경우는 세포에서 RNA를 추출하기 전 2시간 동안 4-shU를 처리하고 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 10 mM HU는 HU와 250 μM 4-shU를 같이 넣고 2시간 동안 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 500 nM MMC 16시간 처리의 경우는 14시간 MMC 처리 후에 4-shU를 배지에 넣어주고 다시 2시간 동안 배양하였다. 저산소 조건의 경우는 저산소 배양기에서 산소의 농도를 1%로 맞추고 세포를 24시간 동안 배양하는데 마지막 2시간 배양 시간 동안 250 μM 4-shU를 넣어서 같이 키우도록 한다.

2시간 4-shU 처리가 끝난 HeLa 세포는 trizol (Invitrogen)을 이용하여 용해하고 전체 RNA를 추출하였다. 새롭게 전사되는 RNA들은 모두 RNA에 4-shU이 들어가 있어서, biotin-streptavidin 정제 방법으로 전체 RNA 중 4-shU가 들어가 있는 RNA들만 다시 정제하였다 [17,18].

### 3. Total RNA 라이브러리 구축 및 RNA-seq data 분석

정제된 4-shU labeled RNA는 total RNA-seq을 위해서 디엔에이 리핑크로 보냈고, Truseq Stranded Total RNA H/M/R prep kit (illumina, San Diego, CA, USA)를 이용하여 ribosomal RNA를 제거한 total RNA 라이브러리를 제작하였다. 만들어진 라이브러리는 NovaSeq 6000 (illumina)으로 시퀀싱하였다. 시퀀싱 결과는 Human hg19에 Tophat v 2.0.13 [19]을 이용하여 맵핑하고, differentially expressed gene (DEG) 분석을 위하여 cuffdiff v.2.2.0 [19]을 이용하였다. 유의성 검정은 fold change > 2 또는 fold change < -2를 만족하고,  $p < 0.05$ 인 경우에서 유의한 것으로 간주하였다.

4. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway 분석 및 gene ontology (GO) 분석

변화가 일어난 유전자의 기능 및 경로를 분석하기 위해서 DAVID functional annotation bioinformatics microarray analysis (<http://david.ncicrf.gov>)를 이용하였다[20,21]. 유의성 검정은  $p < 0.05$ 인 경우에 유의한 것으로 간주하고, 비슷한 유전자 기능을 요약하기 위해서 REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>)를 이용하여 정리하였다[22].

Results

1. 유전자 발현 패턴 프로파일 분석

세포에 유전체불안정성이 높은 상황을 만들어 주고, 이때 RNA에 생길 수 있는 여러 변화를 관찰하기 위하여 total RNA-seq을 계획하고 자궁경부암 세포주인 HeLa를 사용하여 실험하였다. 유전체불안정성이 높은 상황을 만들기 위해서 다양한 DNA damage 자극과 저산소 자극을 주기로 하였다. DNA damage 자극으로는 DNA 이중나선절단을 일으킬 수 있는 방사선 자극(IR), 그리고 DNA 복제 스트레스 자극(HU, MMC)을 주는 것으로 선택하였고, 저산소 자극을 주기 위해서는 세포를 1% O<sub>2</sub> 상황에서 키우는 것으로 하였다. 특히 각각의 자극 이후에 변화되는 RNA 패턴을 분석하기 위해서 RNA analogue인 4-shU을 이용하여 새롭게 합성된 RNA만을 labeling하고 4-shU labeled RNA을 따로 정제하는 방법을 사용하였다[17]. 방사선 자극을 줄 세포는, X-ray ionizing radiation 기계로 2 Gray의 방사선을 조사하고, 그 이후 세포 배양기에서 2시간 동안 배양하게 되는데, 그 시간 동안 세포 배양액에 4-shU을 처리하여, 방사선 자극 이후에 발현되는 RNA의 변화를 측정할 수 있게 하였다. HU, MMC의 경우는 10 mM HU 2시간, 500 nM MMC 16시간 동안 처리하는데 이때도 RNA를 추출하기 전 마지막

세포를 배양하는 2시간 동안에는, 세포 배양액에 4-shU을 처리하였다. 저산소 자극은 세포를 1% O<sub>2</sub> 조건으로 조절한 저산소 배양기(hypoxia chamber)에서 24시간 동안 키웠는데, 이때 마지막 배양 2시간 동안에(22-24시간) 4-shU을 처리하였다. 대조군으로 사용한 HeLa cells의 경우는 4-shU을 세포배양액에 넣고, 2시간 동안 세포 배양기에서 키운 후에 RNA를 추출하였다. 4-shU이 들어간 RNA는 정제과정을 거쳐서[17], library 제작 후 RNA-seq을 수행하였고, 그 결과를 분석하였다. 각 샘플에서 61M-80M의 sequencing reads를 얻었고, 약 87-91%의 reads가 hg19 genome에 mapping되는 것을 확인하였다(Table 1). RNA의 다양한 변화를 확인하기 위해서 UCSC genome browser에서 각각의 유전자들의 3'UTR length change, alternative splicing, premature cleavage and polyadenylation 등의 변화를 관찰하였지만 대조군과 비교하였을 때, 각각의 유전자 발현 차이 외에 다른 큰 변화는 관찰되지 않았다. 그래서 가장 차이를 나타낸 유전자 발현에 집중하여 분석을 진행하였다.

HeLa control 대조군과 비교하여 각 자극 이후에 2배 이상 증가하거나 감소하는 유전자 중에  $p$ -value  $< 0.05$ 를 만족하는 유전자만을 추

Table 1. Mapping statistics

Sample	Total reads	Mapped reads	Mapping rates (%)
HeLa control	80,042,916	70,697,565	88.3
Hypoxia	61,114,308	53,709,833	87.9
HU	80,990,370	72,823,657	89.9
MMC	71,209,784	65,211,853	91.6
IR	61,124,930	55,565,278	90.9

Total reads, mapped reads, and the mapping rates for each RNA-seq sample are presented.

IR, ionizing radiation; HU, hydroxyurea; MMC, Mytomycin C.

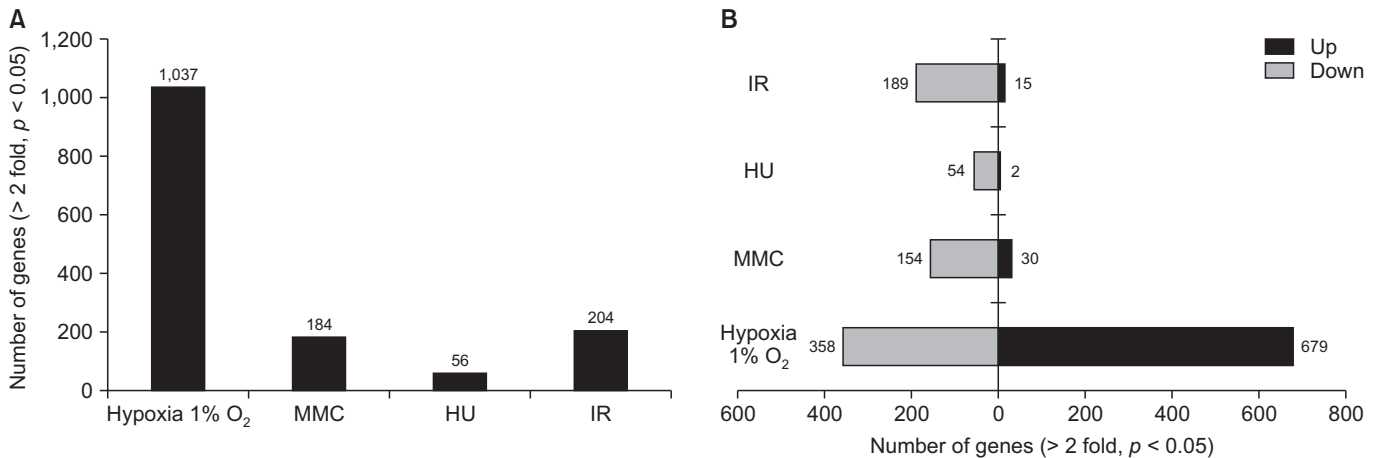
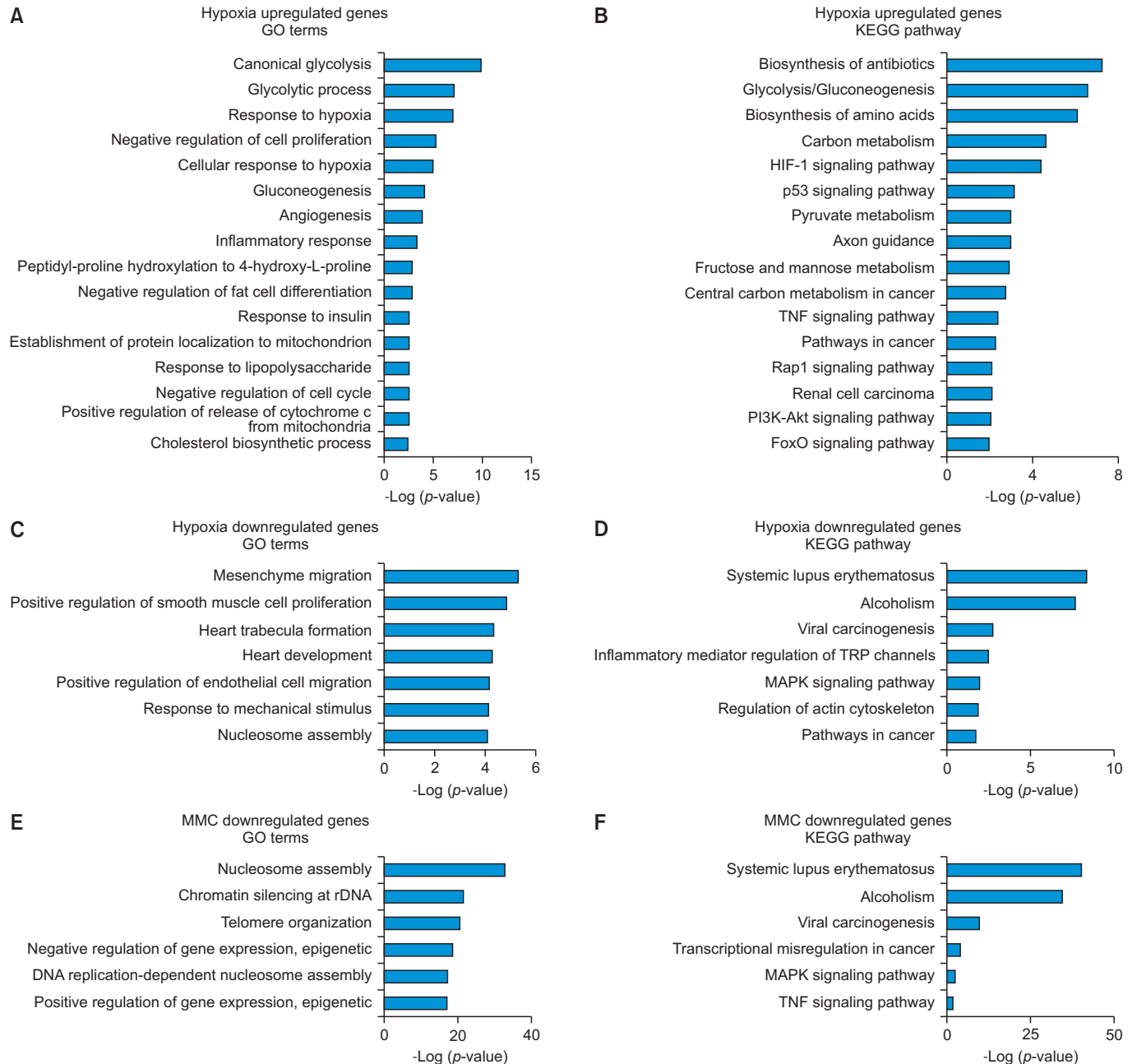


Fig. 1. Summary of RNA-seq data. (A) The numbers of genes are affected at each condition are presented. (B) Black bar and grey bar represent upregulated genes and downregulated gene, respectively. Up and downregulated genes were analyzed by cuffdiff v2.2.0 with following cutoffs: fold change > 2-fold and  $p$ -value  $< 0.05$ .

IR, ionizing radiation; HU, hydroxyurea; MMC, Mytomycin C.

출하였다. 전체적인 유전자 변화와 증가 또는 감소하는 유전자들의 수를 Fig. 1에 나타내었다. 저산소 조건인 1% O<sub>2</sub>에서 24시간 배양한 결과에서 가장 많은 수의 유전자가 변화하는 것을 확인할 수 있었다. 총 1,037개의 유전자 발현이 변화하였고, 다시 세부적으로 나누면 679개의 유전자가 2배 이상 증가, 그리고 358개의 유전자가 2배 이상 감소하였다. 그 다음으로 큰 변화를 나타낸 것은 방사선 조사였는데 총 204개

의 유전자가 변화하였고, 그 중에서 15개의 유전자 증가, 189개의 유전자는 감소하였다. MMC와 HU 처리 시에 유전자 변화는, 앞의 두 개의 자극에 비해 변화하는 숫자가 좀 더 적었다. MMC 처리의 경우 184개의 유전자가 변화하였고 이중 30개 증가, 154개 유전자가 감소하였다. HU 처리 시에 가장 적은 수의 유전자 변화를 보였다. 56개의 유전자가 변화하였고 2개 증가, 54개가 감소하였다. 저산소자극을 제외한



**Fig. 2.** Analysis of gene ontology (GO) terms and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) pathway of affected genes in genomic instability induced cervical cancer cells. GO term and KEGG pathway analyses were performed and the results are displayed as a histogram ( $p < 0.05$ ). (A–D) Genes affected by hypoxia. GO terms of (A) up- and (C) down-regulated genes. KEGG pathway of (B) up- and (D) down-regulated genes. Genes downregulated by MMC (E, F), HU (G, H), and IR (I, J) were analyzed. IR, ionizing radiation; HU, hydroxyurea; MMC, Mytomycin C.

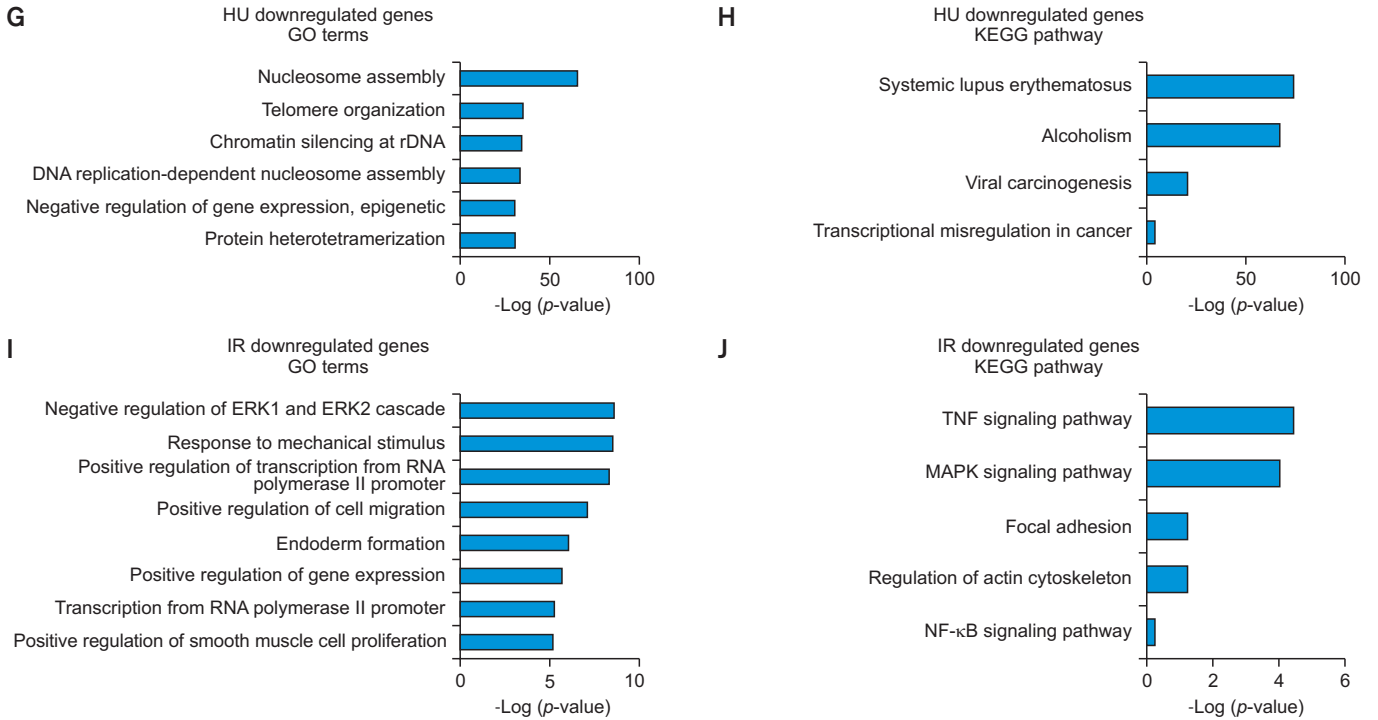


Fig. 2. Continued.

다른 자극에서는 증가하는 유전자들보다는 감소하는 유전자가 더 많음을 알 수 있었다. 이 결과들은 유전체불안정성으로 인해 여러 유전자들의 RNA 발현 변화가 있음을 나타내고, 유전자 발현 감소가 더 많이 나타나는 것을 알 수 있었다.

## 2. GO term과 KEGG 경로 분석

각각의 조건에서 발현이 변화한 184-1,037개의 유전자들의 특성을 알아보기 위해서 GO term과 KEGG 경로 분석을 시행하였다. 그중 대표적인 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

저산소자극에서 증가하는 유전자들은 기존에 알려진 바 있는 response to hypoxia, canonical glycolysis, angiogenesis, negative regulation of cell proliferation 등이 있었고, 감소하는 유전자들은 이와는 다른, mesenchyme migration, response to mechanical stimulus 등에 속하는 유전자들이 있었다. MMC와 HU를 처리한 경우는 nucleosome assembly, chromatin silencing at rDNA, telomere organization에 연관된 유전자들이 감소하는 경향이 동일하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. IR 처리 후에 감소하는 유전자들은 tumor necrosis factor (TNF) signaling, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling, Focal adhesion, regulation of actin cytoskeleton에 관련된 유전자들이 통계적으로 유의하게 나타나는 것을 확인하였다.

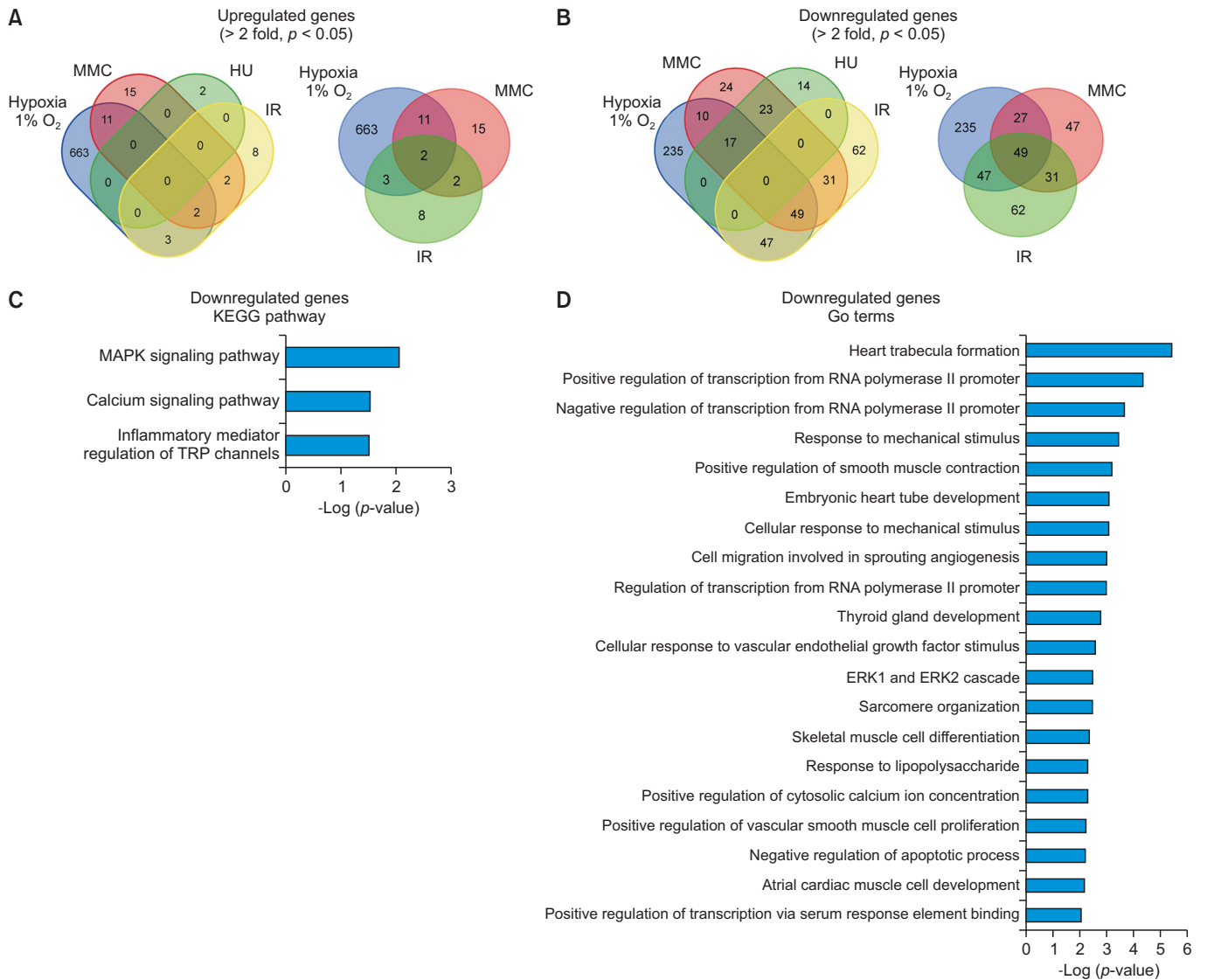
## 3. 자극에 공통적으로 변화하는 유전자

마지막으로 각 조건에서 동일하게 변화한 유전자들이 있는지 찾아보았는데, Fig. 3A와 3B의 벤 다이어그램을 살펴보면 1% O<sub>2</sub>, IR, MMC, HU 4가지 모든 처리 조건에서 공통적으로 2배 이상 증가하거나, 2배 이상 감소하는 유전자는 없었다. 이것은 세포들이 모두 다른 자극을 받아서 유전체불안정성이 야기되었기에, 변화되는 유전자의 종류가 다르다는 것을 나타낸다. HU에서 변화된 유전자가 적어서 이후 분석에서는 제외하고, 1% O<sub>2</sub>, IR, MMC 조건을 이용하여 공통적으로 변화하는 유전자들을 찾아보았다(Fig. 3A and 3B). 3개의 조건에서 모두 증가하는 유전자는 2개가 있었고, 49개의 유전자가 공통적으로 감소하였다(Table 2). 공통적으로 감소하는 유전자들의 KEGG pathway와 GO term 분석 결과는 Fig. 3C와 3D에 나타내었다.

## Discussion

세포에 DNA 손상자극이 주어지면 세포는 DNA 상해를 인식하고, 복구하는 반응이 일어나게 되는데, 제대로 상해복구가 되지 않을 경우 유전체불안정성이 야기된다. 유전적으로 상해복구 유전자에 이상이 있거나 환경적으로 상해복구 유전자의 발현이 감소하게 되는 경우에도 세포의 유전체불안정성이 증가하게 된다. 이번 연구는 세포의 유전체불안정성이 증가하는 상황에서 일어나는 RNA 전사(transcription) 과정 중에 어떤 변화가 나타나는지 살펴보기 위해서, 서로 다른 DNA 손상자극과 DNA 상해복구 기전을 억제하는 것으로 알려진 저산소자극에 의해서





**Fig. 3.** Common genes affected in genetic instability. Venn diagrams of upregulated genes (A) and downregulated genes (B) under hypoxia, IR, MMC, and HU (fold change > 2-fold and  $p$ -value < 0.05). (C) KEGG pathway of downregulated genes ( $p < 0.05$ ). (D) GO terms of downregulated genes ( $p < 0.05$ ). IR, ionizing radiation; HU, hydroxyurea; MMC, Mytomycin C; GO, gene ontology; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

**Table 2.** Common gene list

	Number of genes	Genes
Genes are upregulated in all IR, MMC, and hypoxia conditions	2	RAB3A, PRAME
Genes are downregulated in all IR, MMC, and hypoxia conditions	49	TAGLN, EDN1, VCAN, STK38L, CNN2, LINC00152, NKX2-5, TUFT1, EGR2, SYNPO2, LMOD1, FHL2, SOWAHC, SPHK1, GADD45A, ADAMTS1, NUA2, NPAS4, DLX2, SNX18, FOSB, GBP2, RASGEF1B, MYLK, CD83, FBLIM1, LOC221946, NR4A1, FOXC1, ANKRD1, BDKRB1, DUSP5, ID1, NCOA7, DUSP2, BDKRB2, DOK7, NR4A3, CRISPLD2, MIR143HG, GATM, PCSK7, TNFRSF12A, EGR3, DCUN1D3, CRB1, SRF, LONRF2, PTGER4

Common genes affected by IR, MMC, and hypoxia.

IR, ionizing radiation; MMC, Mytomycin C.

전체 transcriptome에 어떤 변화가 있는지 비교해 보았다.

여기서는 유전자 발현의 변화 뿐만 아니라 다양한 transcriptome의 변화를 관찰하기 위해서 oligo-dT RNA-seq이 아닌 total RNA-seq을 수행하고 RNA 프로파일을 비교해 보았다. 기존 연구들에서 DNA 상해 물질을 처리할 경우 RNA의 길이가 짧아지는 경우가 보고되기도 하고[15], 또는 UV 처리가 RNA 합성속도를 조절하여 small non-coding RNA의 증가와 이것이 transcription recovery를 촉진한다는 보고들이 있어서[16], 그 실험들과의 비교를 하기 위해 여기서는 다른 종류의 자극들을 선택하여 RNA의 변화를 살펴보았다.

이번 실험에서는 위의 보고처럼 극단적인 RNA transcriptome의 변화는 살펴볼 수 없었고, 가장 눈에 띄는 변화는 여러 유전자의 발현 변화였다. 이것은 이 실험에서 사용한 DNA 상해 조건들이 큰 변화를 일으키기에는 다소 약한 조건이었기 때문으로 생각된다. 이 조건을 좀 더 다양하게 변화시킨다면 변화하는 유전자들 종류와 전체 RNA 전사 경향 역시 달라질 것으로 생각된다.

각 조건에 따라 변화하는 유전자의 개수와 종류가 모두 다른 것을 확인할 수 있었는데, 특히 이 연구에서는 1% O<sub>2</sub>의 저산소자극이 가장 많은 유전자의 변화를 보여주었다. 이는 저산소자극의 경우, 24시간 동안 저산소 배양기에서 세포를 배양하여 다른 DNA 상해 자극보다 오랜 시간 자극을 주었기 때문에(MMC - 16시간, IR - 2시간, HU - 2시간) 변화된 유전자들이 더 많았을 가능성이 있다. 각각의 자극은 선행연구를 통해서 DNA 상해는 일으키지만, 세포사멸에는 영향을 주지 않는 조건으로 선택하였는데, 자극을 주는 시간도 다르지만 모두 다른 형태로 자극을 주는 만큼, 변화하는 유전자들도 많이 다르다는 것을 알 수 있었다. 각각의 자극을 주었을 때, 나타나는 유전자의 변화의 신뢰성을 확인하기 위해서 각각의 처리에 의해서 변화하는 것으로 알려져 있는 유전자들이 이 실험에서도 변화했는지 살펴보았다. 예를 들어, 저산소자극의 경우 기존의 논문에서도 glycolysis에 관련된 유전자들과 response to hypoxia, angiogenesis 관련 유전자들이 증가한다고 잘 알려져 있는데[23,24], 이번 실험에서도 발현이 증가하는 것으로 나타나 실험의 신뢰성이 높다고 할 수 있겠다. 선행된 연구에서는 다양한 세포주를 사용하였는데(mouse embryonic fibroblasts 및 여러 human cancer cell lines), 이 실험에서 사용한 HeLa 세포주와 비슷한 결과들이 나오는 것을 확인할 수 있었다. 이는 저산소자극이 세포 특이적인 변화를 일

으키기 보다는 전반적으로 동일한 반응을 일으키는 것을 알 수 있었다.

그리고 MMC와 HU는 비슷한 형태의 DNA 상해 자극인데, 이들의 처리에 의해서 감소하는 유전자들이 비슷한 것을 확인할 수 있었다. HU 처리에서 나타나는 54개의 감소 유전자 중에서 40개의 유전자도 MMC 처리에서도 감소함으로써, 변화하는 유전자의 74%가 공통적인 것을 확인할 수 있는데, 이는 비슷한 형태의 DNA 상해 자극에서는 비슷한 종류의 유전자들이 변화하는 것을 확인할 수 있었다.

이 연구에서는 유전체불안정성이 증가한 상황에서 공통적으로 발현이 변화하는 51개의 유전자들을 찾아낼 수 있었는데, 이 중 대부분인 49개의 유전자는 공통적으로 발현이 감소하는 것으로 나타났다. 이것들의 KEGG 경로를 분석해보면 결과, MAPK signaling pathway, calcium signaling pathway, inflammatory mediator regulation of transient receptor potential (TRP) channels에 관련된 유전자들인 것을 알 수 있었다. 이런 신호전달경로들은 DNA 상해나 스트레스 상황에서 활성화된다고 알려져 있는데[25-27], 이런 신호전달경로의 유전자들이 감소한다는 것은 상해에 의해서 과도하게 활성화되는 신호전달 경로를 막기 위해 negative feedback으로 인해서 감소했을 가능성도 있다.

이 실험에 사용한 조건으로는 실험 전에 예상하였던 transcriptome의 다양한 변화는 관찰할 수 없었는데, 이 연구를 더 발전시키기 위해서는 세포에 주는 자극을 다양화하고, 자극의 세기를 조절함으로써 세포가 여러 유전체불안정성 환경에서 대응하는 변화들을 더 자세하게 살펴볼 수 있을 것이라 생각한다.

## Acknowledgements

This work was supported by a 2-Year Research Grant of Pusan National University.

## Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## References

1. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009;461:1071-8. doi: 10.1038/nature08467.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
3. Rouse J, Jackson SP. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 2002;297:547-51. doi: 10.1126/science.1074740.
4. Smeenk G, van Attikum H. The chromatin response to DNA breaks: leaving a mark on genome integrity. *Annu Rev Biochem* 2013;82:55-80. doi: 10.1146/annurev-biochem-061809-174504.
5. Ciccio A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 2010;40:179-204. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.019.
6. Friedberg EC, Aguilera A, Gellert M, Hanawalt PC, Hays JB, Lehmann AR, Lindahl T, Lowndes N, Sarasin A, Wood RD. DNA repair: from molecular mechanism to human disease.

- DNA Repair (Amst) 2006;5:986–96. doi: 10.1016/j.dnarep.2006.05.005.
7. Oh JM, Myung K. Crosstalk between different DNA repair pathways for DNA double strand break repairs. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2022;873:503438. doi: 10.1016/j.mrgentox.2021.503438.
  8. Lee JH, Paull TT. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 2007;26:7741–8. doi: 10.1038/sj.onc.1210872.
  9. Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 2009;30:2–10. doi: 10.1093/carcin/bgn250.
  10. Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JH. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:465–81. doi: 10.1038/nrm3822.
  11. Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* 2009;417:639–50. doi: 10.1042/BJ20080413.
  12. Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, Helleday T. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol Cell* 2010;37:492–502. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.021.
  13. Dusre L, Covey JM, Collins C, Sinha BK. DNA damage, cytotoxicity and free radical formation by mitomycin C in human cells. *Chem Biol Interact* 1989;71:63–78. doi: 10.1016/0009-2797(89)90090-2.
  14. Kaplan AR, Glazer PM. Impact of hypoxia on DNA repair and genome integrity. *Mutagenesis* 2020;35:61–8. doi: 10.1093/mutage/gez019.
  15. Venters CC, Oh JM, Di C, So BR, Dreyfuss G. U1 snRNP tele-scripting: suppression of premature transcription termination in introns as a new layer of gene regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2019;11:a032235. doi: 10.1101/cshperspect.a032235.
  16. Williamson L, Saponaro M, Boeing S, East P, Mitter R, Kantidakis T, Kelly GP, Loble A, Walker J, Spencer-Dene B, Howell M, Stewart A, Svejstrup JQ. UV irradiation induces a non-coding RNA that functionally opposes the protein encoded by the same gene. *Cell* 2017;168:843–55.e13. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.019.
  17. Oh JM, Di C, Venters CC, Guo J, Arai C, So BR, Pinto AM, Zhang Z, Wan L, Younis I, Dreyfuss G. U1 snRNP tele-scripting regulates a size-function-stratified human genome. *Nat Struct Mol Biol* 2017;24:993–9. doi: 10.1038/nsmb.3473.
  18. Oh JM, Venters CC, Di C, Pinto AM, Wan L, Younis I, Cai Z, Arai C, So BR, Duan J, Dreyfuss G. U1 snRNP regulates cancer cell migration and invasion in vitro. *Nat Commun* 2020;11:1. doi: 10.1038/s41467-019-13993-7.
  19. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 2012;7:562–78. doi: 10.1038/nprot.2012.016. Erratum in: *Nat Protoc* 2014;9:2513.
  20. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211.
  21. Sherman BT, Hao M, Qiu J, Jiao X, Baseler MW, Lane HC, Imamichi T, Chang W. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res* 2022. doi: 10.1093/nar/gkac194. [Epub ahead of print]
  22. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* 2011;6:e21800. doi: 10.1371/journal.pone.0021800.
  23. Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2001;21:3436–44. doi: 10.1128/MCB.21.10.3436-3444.2001.
  24. Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer* 2011;2:1117–33. doi: 10.1177/1947601911423654.
  25. Rezatabar S, Karimian A, Rameshknia V, Parsian H, Majidinia M, Kopi TA, Bishayee A, Sadeghinia A, Yousefi M, Monirialamdari M, Yousefi B. RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression. *J Cell Physiol* 2019. doi: 10.1002/jcp.28334. [Epub ahead of print]
  26. Wang JQ, Chen Q, Wang X, Wang QC, Wang Y, Cheng HP, Guo C, Sun Q, Chen Q, Tang TS. Dysregulation of mitochondrial calcium signaling and superoxide flashes cause mitochondrial genomic DNA damage in Huntington disease. *J Biol Chem* 2013;288:3070–84. doi: 10.1074/jbc.M112.407726.
  27. Miller BA, Zhang W. TRP channels as mediators of oxidative stress. *Adv Exp Med Biol* 2011;704:531–44. doi: 10.1007/978-94-007-0265-3\_29.