

HL-60 사람 백혈병 세포에서 irinotecan이 topoisomerase I과 III의 활성과 발현에 미치는 영향

정인철, 조무연

고신대학교 의과대학 생화학 교실

Effects of irinotecan on the activity and expression of topoisomerase I and III in HL-60 human leukemia cells

In Cheol Jeong, Moo Youn Cho

Department of Biochemistry, Kosin University College of Medicine, Busan 602-702, Korea

Abstract

Background DNA topoisomerases solve the topological problems associated with DNA replication, transcription, recombination, and chromatin remodeling by introducing temporary single- or double-strand breaks in the DNA. DNA topoisomerases have been shown to be the molecular targets of many antimicrobial and anticancer agents. Among topoisomerase-targeting drugs in clinical use at present, most act by trapping the covalent DNA-enzyme intermediates to convert a normal cellular enzyme to a DNA damaging agent.

This studies were designed to elucidate whether pretreatment of HL-60 human leukemia cells with the topoisomerase I - directed drug irinotecan would increase the expression of topoisomerases and to investigate the activity of topoisomerase mediated by irinotecan in nuclear extract from HL-60 human leukemia cells. **Methods** We have conducted experiments on cell cytotoxicity in drug-treated HL-60 cells, topoisomerase purification, topoisomerase assay using gel electrophores and oligo chip microarray analysis, respectively. **Results** Irinotecan inhibited the relaxation activity of topoisomerase in pUC19 DNA at various concentrations (range 0.4-50 μ M). Irinotecan IC(50) values was 1 μ M for HL-60 cells. The levels of the topoisomerase I(type IB) and III(type IA) mRNA remained no significant change from oligo chip microarray analysis. **Conclusion** Our results suggest that topoisomerase I protein is one of the cellular targets of irinotecan but this drug does not coordinate regulation with type I topoisomerase mRNA levels.

Key words : Irinotecan, Topoisomerase activity, Expression, HL-60 cells

서 론

DNA topoisomerase는 DNA 대사 초기단계의 효율성에 영향을 주어 세포내 DNA 가닥의 절단과 재결합을 촉매하여 DNA의 topological problem을 해결하며, 그 촉매 기전에 따라 크게 type I과 II로 분류된다¹⁻⁴⁾. Type I은 DNA

duplex의 한 가닥을 phosphodiester bond에서 끊고, 절단된 한 끝을 상대편 DNA 가닥을 축으로 한 바퀴 회전시킨 후, 끊어졌던 부분을 다시 연결하며, type II는 DNA의 두 가닥을 거의 동시에 끊고, DNA duplex의 다른 부분이 절단된 곳을 통과한 후, 절단 부위를 재 봉합하는데, 촉매과정에서 ATP 가수분해를 필요로 하는 것이 type I과 다른 점이다.⁵⁾ 또한 type I은 양과 음의 supercoiling plasmid에 대한 활성도, DNA상의 결합 방식, Mg^{2+} 의 요구성에 따라 다시 subfamily인 IA와 IB로 나누며, type II는 domain 구조에 따라 IIA와 IIB로 나누어 최근까지 밝

교신저자 : 정 인 철
주소: 602-703, 부산광역시 서구 암남동 34번지
고신대학교 의과대학 생화학교실
TEL. 051-990-6418 FAX. 051-990-3081
E-mail: jpf@ns.kosinmed.or.kr

· 본 연구는 고신대학교 의과대학 연구비 일부 지원에 의해 이루어짐

혀진 생물들을 포함한 다양한 원핵생물과 진핵생물의 topoisomerase들을 분류하고 있다.⁶⁾ DNA와 topoisomerase의 반응 메카니즘은 이 효소에 의해 DNA의 phosphodiester bond를 절단한 후 topoisomerase의 tyrosine기의 OH와 phosphodiester bond를 형성하여 효소와 DNA 사이에 공유 결합한 “cleavable complex”를 이룬 후에 다시 끊어졌던 DNA 부위가 재 봉합되는 특징을 가지고 있다. 이 효소의 억제제는 세포독성과 함께 DNA cleavable complex를 안정화시킴으로서 항암제의 표적 효소로 널리 알려져 있으며⁷⁾, irinotecan, topotecan 등의 camptothecin 유도체를 이용한 다양한 저해제의 개발과 임상적 응용과 함께 northern blot 기법, RT-PCR에 의한 이들 약물이 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 그리고 새로운 유전공학기술로, 작은 면적의 고체 표면위에 수백에서 수만 종류의 DNA 조각들을 고밀도 배열해 놓은 DNA chip기술의 개발로 생물의 유전 정보가 어떻게 발현되고 있는가를 대규모로 검색할 수 있게 되었다. 그러나 topoisomerase 억제제들이 세포내 효소 생성 유전자의 발현에 미치는 영향에 관하여 발표된 자료는 거의 없는 실정이다¹¹⁻¹³⁾.

이와 같은 연구 배경에 따라 본 실험에서는 topoisomerase I의 억제제인 irinotecan을 투여한 사람 백혈병 HL-60 세포의 독성과 발현에 미치는 영향을 조사하여 topoisomerase I 억제제들의 세포내 작용기전을 밝히기 위한 기초 자료를 얻고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

Irinotecan, ATP, Tris-HCl, formamide, dithiothreitol과 proteinase K는 Sigma회사로부터, bovine serum albumin (BSA)은 Pharmacia LKB사에서, agarose, fetal bovine serum, gentamicin과 RPMI 1640은 Gibco-BRL사에서, pUC19는 USB사에서, HL-60세포는 KCTC에서 분양 받았다. 그리고, total RNA정제용 kit는 Tel-Test사에서 10k oligo chip과 관련 kit 시약들은 마크로젠에서 구입하였으며 그 외의 일반적인 시약은 분석용을 사용하였다.

2. Type I topoisomerase 의 이완 활성화 측정법

Type I topoisomerase의 이완(relaxation) 활성화는 Minford 등¹⁴⁾의 방법으로 측정하였으며, 효소의 활성화는 37 °C에서 30분내에 400 ng의 DNA를 완전히 relax시키는 효소의 양을 1 unit로 정하였다.

3. Cell cytotoxicity 측정법

10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 2×10^4 cell/ml의 농도로 희석한 배지 10 ml에 irinotecan을 농도별 첨가하여 cell doubling time(28시간) 동안 배양하고, 원심분리 후 phosphate buffered saline으로 씻고 56시간(two doubling time)동안 새 배지에 배양한 후 사람 백혈병 HL-60 세포 수를 hemocytometer로 확인하였다.

4. Oligo chip에 의한 microarray hybridization

HL-60 세포를 약물을 처리하지 않은 control group과 irinotecan을 처리한 test group으로부터 각각 total RNA를 분리한 후 각각 Cy3과 Cy5 형광물질로 표지시킨 후 Oligo chip에 대한 microarray hybridization을 실시하였다. 형광물질로 표지된 microarray chip상의 topoisomerase I과 III 유전자를 포함한 10K 유전자 각각에 대한 intensity를 Affymatrix사의 428 Array Scanner로 측정하고 통계 프로그램을 사용하여 분석하였다.

결 과

1. Irinotecan이 topoisomerase I의 활성화에 미치는 영향

pUC19 plasmid를 topoisomerase I의 기질로 사용하여 irinotecan에 의한 topoisomerase I의 이완 활성화 변화를 관찰한 결과는 그림 1과 같다. Irinotecan을 0.4 μ M(lane 3), 2 μ M(lane 4), 10 μ M (lane 5), 50 μ M(lane 6)을 첨가하였을 경우 약물을 첨가하지 않은 2번 lane에 비해 약물의 농도가 증가함에 따라 linear DNA가 현저히 증가하였으며, 10, 50 μ M에서는 이완 활성이 억제되는 양상을 나타내었다.



Fig. 1. Effect of irinotecan(CPT-11) on the relaxation activity of topoisomerase I. The relaxation activity was analyzed by the agarose gel assay described in "Materials and Methods". The gel mobilities for the different DNA forms are indicated for each gel, where form S is supercoiled, form R is relaxed circular, form L is linear DNA. Each lane was used 500 ng of pUC19 DNA. Lane 1; pUC19 DNA only, lane 2; lane 1 + topoisomerase I(80 ng), lane 3, 4, 5, 6 ; lane 2 + 0.4, 2, 10, 50 μ M CPT-11, respectively.

2. HL-60 사람 백혈병 세포에서 irinotecan에 의한 세포 독성 검사

DNA topoisomerase의 활성화와 topoisomerase 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 irinotecan 투여시 세포의 생육에 미치는 영향을 조사하였다. 실험에 사용한 HL-60세포의 doubling time은 28시간이었으며 ml당 2×10^4 세포를 10 ml의 배양액에 분주한 25 cm²의 culture flask에 irinotecan을 0, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8 μ M을 각각 투여한지 28시간 후 정상 배지로 갈아주고 다시 56시간(two doubling time) 배양하여 세포의 생육정도를 비교한 결과(그림 2) 0.2, 0.5, 1 μ M에서 각각 80%, 70%, 50%의 생육도를 나타내었다.

3. Irinotecan이 topoisomerase I, III 유전자의 발현에 미치는 영향

약물을 투여하지 않은 정상 HL-60 세포와 0.5 μ M의 irinotecan을 투여한 세포에서 각각 total RNA를 추출하고 RT-PCR한 후 각각 Cy3, Cy5로 형광 표식 시료를 혼

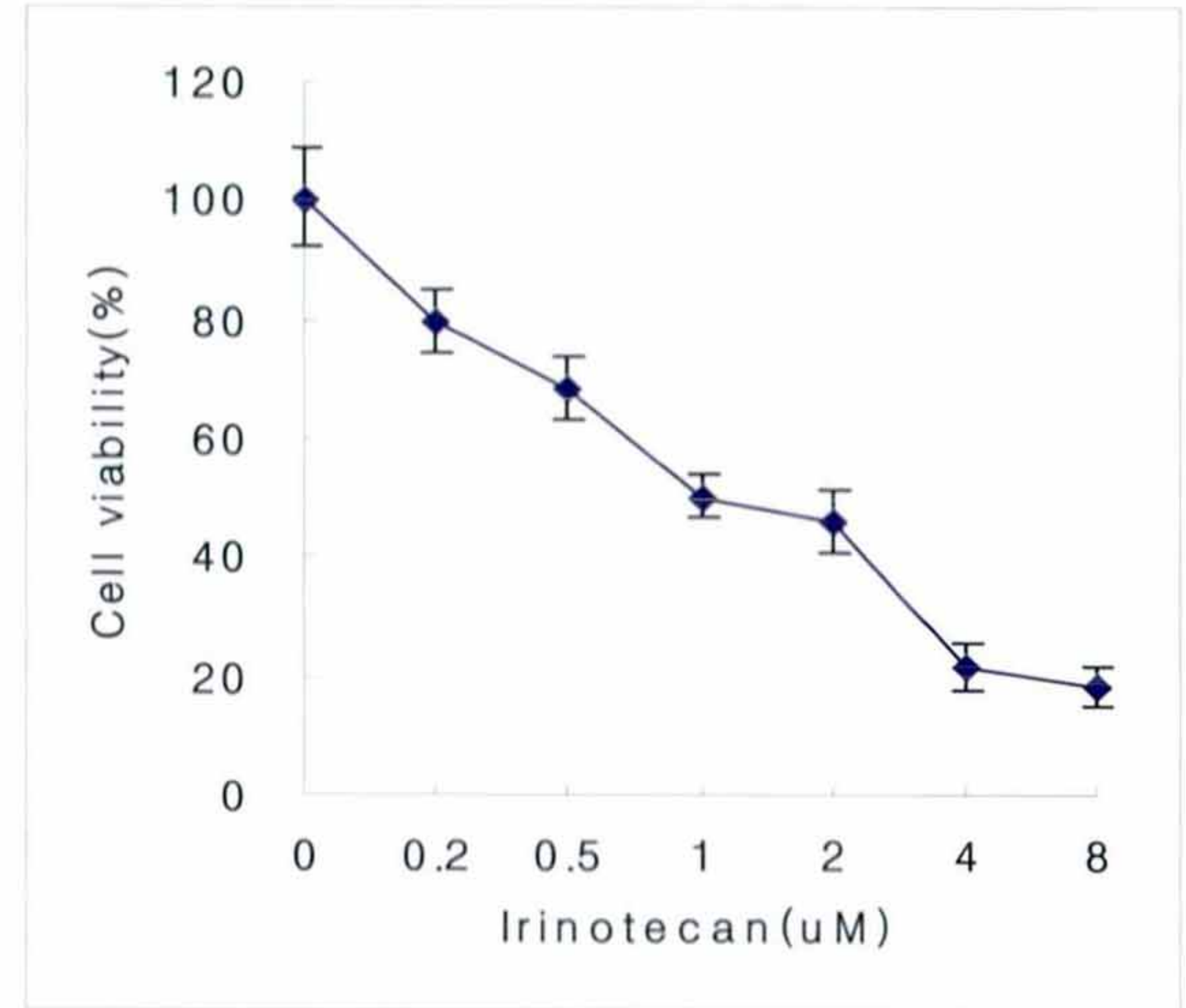


Fig. 2. The growth effects of various concentrations of Irinotecan on HL-60 cell lines. Cells were suspended in RPMI 1640 medium at a level of 2×10^4 cells/ml. They were treated 2 days later with increasing concentrations of Irinotecan for one cell doubling time(28 hr). After washing with phosphate buffered saline, the cells were further grown for two doubling times(56 hr) in normal medium, counted in a hemocytometer. Each point are representatives of six independent experiments; points given represents the mean, bars show $\pm$ SD

합하여 10K oligo chip상에 하룻밤 hybridization하고 세정한 후 Affymatrix사의 428 Array Scanner로 scan하여 Cy3와 Cy5의 감도 값과, house keeping gene의 감도 값, 외부 유전자의 감도 값을 가지고 보정한 후 Scatter plot (그림 3)하여 자료를 분석하였다.

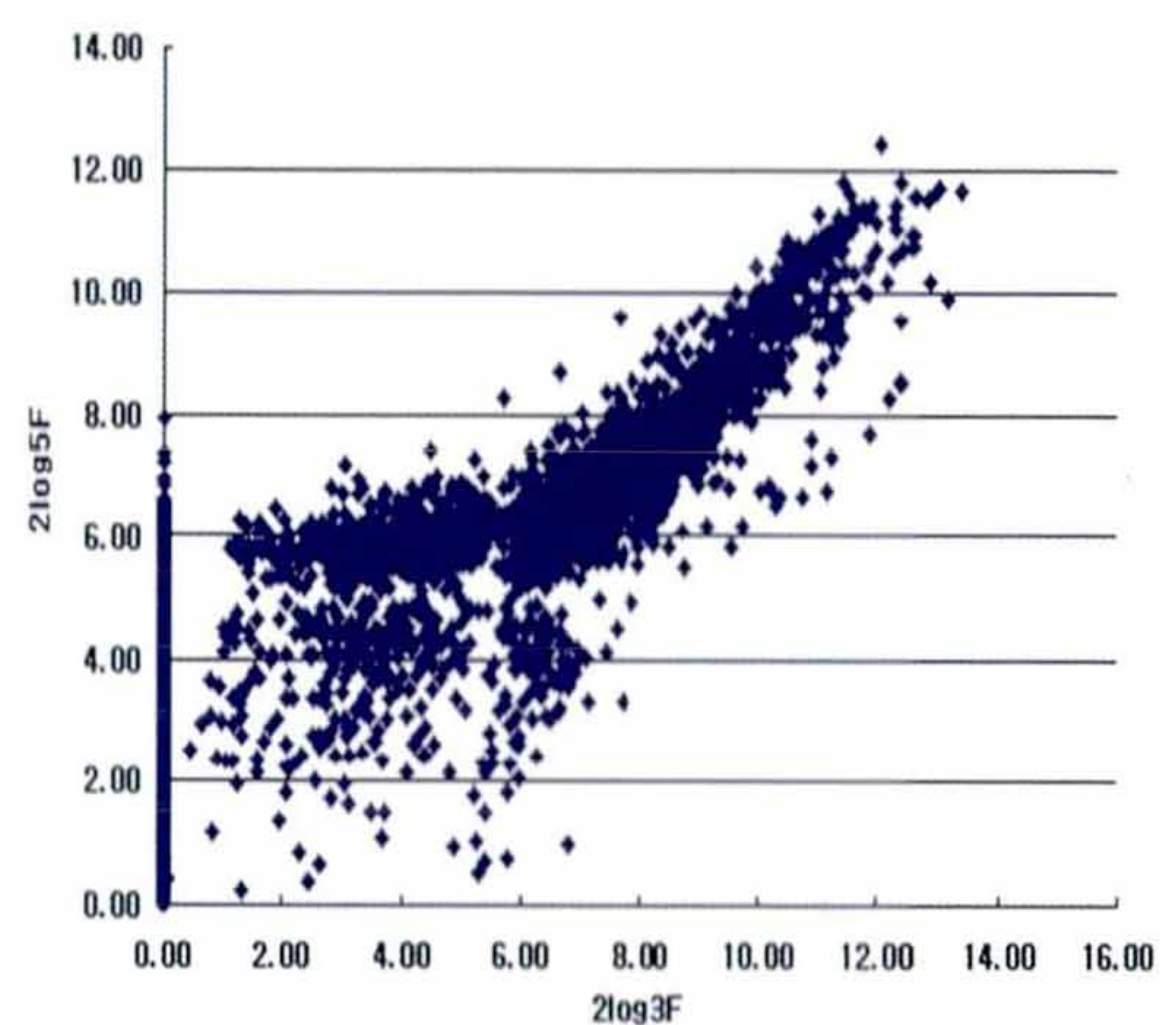


Fig. 3. Scatter plot analysis comparing the expression levels of 10K genes between irinotecan-treated (Cy5) and irinotecan-untreated (Cy3) HL-60 cells.

이 결과를 토대로 topoisomerase I과 III 유전자의 발현을 비교 검토하였다(그림 4). Irinotecan의 투여에 의해 type I(topoisomerase I과 III) 유전자 발현의 변화는 없었다.

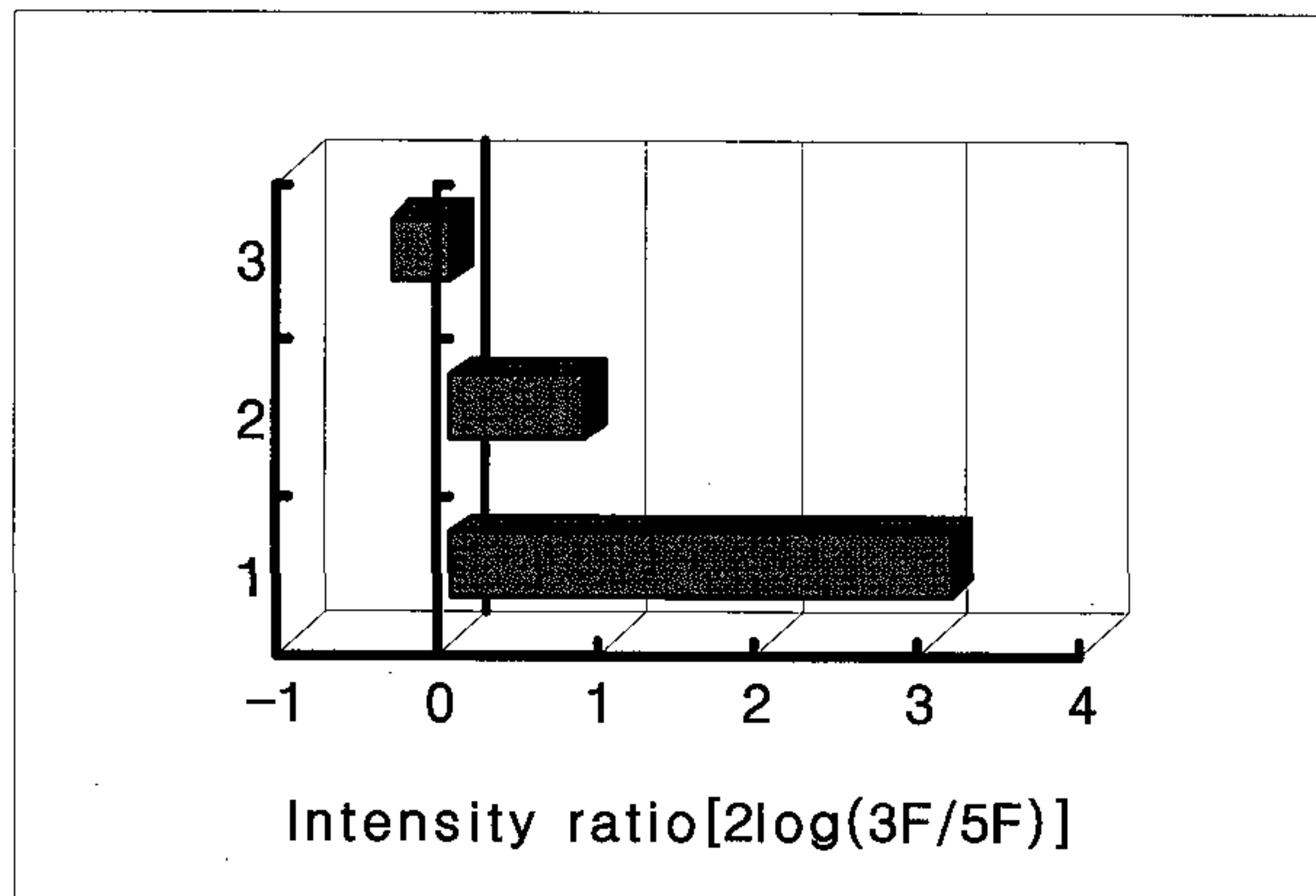


Fig. 4. Comparison of the expression levels of type I topoisomerase genes between irinotecan-treated (Cy5) and irinotecan-untreated (Cy3) HL-60 cells. 1; topoisomerase II α , 2; topoisomerase I 3; topoisomerase III mRNA,

고찰

DNA topoisomerase는 세포내 DNA 가닥의 절단과 재결합을 촉매하여 DNA의 supercoiling 상태를 조절하고 복제, 전사, 재조합과 유사분열 과정 등의 DNA 대사 초기단계의 효율성에 영향을 주며, 그 촉매 방법에 따라 type I topoisomerase와 type II topoisomerase로 크게 두 그룹으로 나눈다. 전자는 helix DNA의 한 가닥을 절단하고 상대편 DNA가닥을 통과시키고 절단 부분을 다시 연결하여 한 개의 DNA linking number를 변화시킨다. 후자의 경우는 supercoiling DNA의 두 가닥을 동시에 끊어 DNA의 다른 부분을 절단된 곳으로 통과시키고 절단 부위를 봉합한다. 이 때 ATP를 필요로 하며 2개의 linking number가 변화된다¹⁻⁴⁾. 본 연구에서는 현재까지 발견된 topoisomerase I의 대표적 저해제로 항암 활성을 나타내는 camptothecin의 유도체인 irinotecan이 type I topoisomerase의 이완 및 절단 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 supercoil된 pUC19 plasmid DNA는 irinotecan의 농도가 증가함에 따라 linear DNA의 생성이 증가하였는데, 이는 이미 밝혀진 대로 topoisomerase 촉매 반응의 전 단계인 phosphodiester bond 절단 과정에는

영향을 주지 않으며 그 후속 단계인 phosphodiester bond의 재 봉합을 방해하여 cleavable complex를 유도하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 토대로 topoisomerase I의 억제제로 알려진 irinotecan에 의한 topoisomerase I의 활성 억제 현상은 세포내 효소 유전자 발현에도 영향을 미칠 것으로 추측되므로 topoisomerase 유전자의 발현을 조사하였는데, 이에 대한 연구로는 1999년 Pu 등¹⁵⁾이 melphalan (alkylator)을 HL-60세포에 투여하여 내성을 가진 세포주에서 topoisomerase II α 의 활성은 증가한다고 하였으나 Topo II β 와 Topo I의 활성에는 아무 변화가 없는 것을 확인한 바 있으며, Ramachandran 등¹⁶⁾은 doxorubicin 내성을 가진 사람 melanoma 세포에서 topoisomerase II mRNA의 발현이 증가하며, 정 등¹³⁾은 camptothecin을 투여하였을 때 type I 효소인 topoisomerase III β 의 발현은 현저하게 증가된 반면 II α 와 myc과 관련된 유전자의 발현은 억제되었으며 topoisomerase I의 발현은 약간 증가함을 보고한 바 있다. Microarray 기법을 이용한 topoisomerase와 관련하여 Wang 등¹⁷⁾이 topoisomerase II 억제제인 etoposide 투여에 따른 유전자 발현 양상을 oligonucleotide array 기법으로 분석하였고, Sujuki 등¹⁸⁾은 genistein 처리한 암세포주에서, Guo 등¹¹⁾과 Zhou 등¹²⁾ 그리고 정 등¹³⁾은 camptothecin 처리한 암세포 주에서 oligonucleotide 또는 cDNA microarray 기법으로 일부 유전자에 대하여 분석한 연구 이외에는 거의 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 우선 약물의 적정 투여량을 결정하기 위하여 세포 독성 실험을 통해 약 70%의 생존율을 나타내는 조건에서 약물을 투여한 후 topoisomerase 유전자 발현의 변화를 확인하였다. 즉 0.5 μ M의 irinotecan을 처리한 HL-60 세포와 대조구로 부터 total RNA를 분리하고 DNA chip 기법을 이용한 oligonucleotide microarray 방법으로 type I topoisomerase I과 III 유전자의 발현을 조사하였다. 그 결과 topoisomerase I과 III 유전자 발현은 큰 변화가 없었는데, 이는 앞의 연구 결과들과 비교해 볼 때 약물의 종류와 연구 방법상의 차이는 있으나 대체로 일치한 경향을 나타내었다. 그러나 type II 유전자의 발현에는 현저한 영향을 주었는데 그 이전에 대해서는 앞으로 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서 irinotecan을 투여한 사람 백혈병 HL-60 세포에서 세포 독성과 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, irinotecan은 세포내 topoisomerase I 단백질의 활성은 억제하지만 type I topoisomerase(topoisomerase I 과 III) mRNA 양의 조절에는 관여하지 않는 것으로 여겨진다.

참고문헌

1. Christman MF, Dietrich FS, Frink GR : Mitotic recombination in the rRNA of *S.cerevisiae* is suppressed by the combined action of topo I and II. *Cell* 55:413-425, 1988
2. Schomburg U, Grosse F : Purification and characterization of DNA topoisomerase II from calf thymus associated with polypeptides of 175 and 150 kDa. *Eur J Biochem.* 160(3): 451-457, 1986
3. Wang JC : DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem.* 54:665-697, 1985
4. Wang JC : Recent studies of DNA topoisomerases. *Biochim Biophys Acta* 909:1-9, 1987
5. Wang J, Medeiros J, Longo DL, Mansoor A, Raffeld M, Duffey PL, Jaffe ES, Stevenson MS : Use of the polymerase chain reaction technique to determine c-myc expression in follicular center cell lymphoma. *Diagnostic Mol Pathol.* 5(1):20-25, 1996
6. Champoux JJ : DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* 70: 369-413, 2001
7. Liu LF : DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem.* 58:351-375, 1989
8. Nair J, Traganos F, Tse-Dinh YC : Differential effect of camptothecin treatment on topoisomerase II alpha expression in ML-1 and HL-60 leukemia cell lines. *Anticancer Res.* 20(6B):4183-4188, 2000
9. Perego P, Capranico G, Supino R, Zunino F : Topoisomerase I gene expression and cell sensitivity to camptothecin in human cell lines of different tumor types. *Anticancer Drugs* 5(6):645-649, 1994
10. Xu JM, Azzariti A, Tommasi S, Lacalamita R, Colucci G, Johnston PG, Church SW, Paradiso A : Combination of 5-fluorouracil and irinotecan on modulation of thymidylate synthase and topoisomerase I expression and cell cycle regulation in human colon cancer LoVo cells: clinical relevance. *Clin Colorectal Cancer* 2(3):182-188, 2002
11. Guo X, Zhang J, Fu X, Wei Q, Lu Y, Li Y, Yin G, Mao Y, Xie Y, Rui Y, Ying K : Analysis of common gene expression patterns in four human tumor cell lines exposed to camptothecin using cDNA microarray: identification of topoisomerase-mediated DNA damage response pathways. *Front Biosci.* 1(11):1924-1931, 2006
12. Zhou Y, Gwadry FG, Reinhold WC, Miller LD, Smith LI, Scherf U, Liu ET, Kohn KW, Pommier Y, Weinstein JN : Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects. *Cancer Res.* 62(6):1688-1695, 2002
13. Jeong IC, Lee NJ, Lee SU, Lee SJ, Cho MY : Expression profile of topoisomerase, ras and myc genes in HL-60 cells treated with camptothecin. *Kosin Medical J.* 19(1): 271-278, 2004
14. Minford J, Pommier Y, Filipinski J, Kohn KW, Kerrigan D, Mattern M, Michaels S, Schwartz R, Zwelling LA : Isolation of intercalator-dependent protein-linked DNA strand cleavage activity from cell nuclei and identification as topoisomerase II. *Biochemistry* 25(1):9-16, 1986
15. Pu QQ, Bezwoda WR : Induction of alkylator (melphalan) resistance in HL60 cells is accompanied by increased levels of topoisomerase II expression and function. *Mol Pharmacol.* 56(1):147-153, 1999
16. Ramachandran C, Samy TS, Huang XL, Yuan ZK, Krishan A : Doxorubicin-induced DNA breaks, topoisomerase II activity and gene expression in human melanoma cells. *Biochem Pharmacol.* 24:45(6):1367-1371, 1993
17. Wang Y, Rea T, Bian J, Gray S, Sun Y : Identification of the genes responsive to etoposide-induced apoptosis : application of DNA chip technology. *FEBS Lett* 445(2-3):269-273, 1999
18. Suzuki K, Koike H, Matsui H, Ono Y, Iwasumi M, Nakazato H, Okugi H, Sekine Y, Oki K, Ito K, Yamamoto T, Fukabori Y, Kurokawa K, Yamanaka H : Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3. *Int J Cancer.* 99(6):846-852, 2002