

HL-60 사람 백혈병 세포로부터 topoisomerase type IB의 동정

정인철, 광충근, 조무연

고신대학교 의과대학 생화학 교실

Identification of type IB topoisomerase from HL - 60 human leukemia cells

In Cheol Jeong, Choong Keun Kwak, Moo Youn Cho

Department of Biochemistry, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background DNA topoisomerases fall into two categories - type I and type II. For the type I enzymes, the DNA strands are transiently broken one at a time; for the type II enzymes, by contrast, a pair of strands in a DNA double helix are transiently broken in concert by a dimeric enzyme molecule. The two types can be further divided into four subfamilies: IA, IB, IIA and IIB. 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. Camptothecin is an antitumor alkaloid that has been isolated from the Chinese tree, *Camptotheca acuminata*. We have developed a procedure for the simultaneous purification of type I and II topoisomerase from HL-60 human leukemia cells, and identified type IB topoisomerase. **Methods** DNA topoisomerase was purified from HL-60 human leukemia cells by a simple and fast four-step procedure : selective ammonium sulfate precipitation, chromatography on Ultrogel A6 and DNA-cellulose, followed by ultracentrifugation on a glycerol gradient. Enzyme activity, and molecular weight were assayed by measuring the relaxation of supercoiled pUC19 DNA using agarose gel electrophoresis and sodium dodecyl sulfate denaturing gel electrophoresis, respectively. Results Type I and II topoisomerases were isolated from extracted nucleoprotein complexes by glycerol gradient centrifugation, respectively. Human type IB topoisomerase was purified 8.6-fold as compared to the whole cell homogenate, with 12% yield. The purified type I topoisomerase has a molecular weight of 100 kDa as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme relaxes supercoiled DNA in the absence of ATP or Mg²⁺. Camptothecin inhibited the relaxation activity of type I topoisomerase in pUC19 DNA by forming a cleavable complex at various concentrations (0.4-50 μ M). **Conclusion** The results showed that a type IB topoisomerase has been purified to near homogeneity from HL-60 human leukemia cells, and partial purification of type IIA from small samples was achieved by isolation of cell nuclei. Thus, the potential antitumor activity of a type I and II topoisomerase-targeted drug might be easily screened by testing the drug's ability to cause DNA cleavage in the presence of enzymes.

Key words : Identification, Type IB topoisomerase, HL-60 cells

서론

교신저자 : 정인철
TEL : 051-990-6418 FAX : 051-990-3081
E-mail : jpf@kosin.ac.kr

* 본 연구는 고신대학교 의과대학 연구비(2001) 일부 지원에 의하여 이루어진 것임

DNA topoisomerase는 세포내 DNA 가닥의 절단과 재결합을 촉매하여 DNA의 supercoiling 상태를 조절하고 복제, 전사, 재조합과 유사분열 과정 등의 DNA 대사 초기 단계의 효율성에 영향을 주어, 이러한 과정에서 발생하는 DNA의 topological problem을 해결해 주며,¹⁻⁴⁾ 그 촉매 기전에 따라 크게 type I과 type II로 분류한다. 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 밝혀진 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. 또한 topoisomerase는 DNA 초기 대사 과정에 중요한 역할을 담당하기 때문에 그 억제제는 세포 독성과 함께 DNA cleavable complex를 안정화시킴으로서 항암제의 표적 효소일 것이라 하여 임상적으로 그 중요성이 점차 증가되고 있다.⁷⁾ 이와 같은 연구 배경에 따라 본 실험에서는 사람 백혈병 HL-60 세포로부터 topoisomerase를 분리하여 그 순도를 측정하고 type I을 동정함으로써, 이 효소의 억제제들을 검색하는데 필요한 type I topoisomerase의 분리 방법을 확립하기 위한 기초자료를 얻고자 본 연구를 수행하였다.

연구재료와 방법

1. 시약 및 재료

Camptothecin은 Aldrich사에서, Triton X-100, phenylmethanesulfonylfluoride(PMSF), ATP, DNA cellulose, acrylamide, coomassie blue, bromophenol blue, EDTA, EGTA, Tris-HCl, sodium dodecyl sulfate, Ficoll 400, phenol, dithiothreitol과 proteinase K는 Sigma회사로부터, Ultrogel A6, bovine serum albumin(BSA)은 Pharmacia LKB사에서, 단백질 size marker는 Bio-Rad사

에서, agarose, fetal bovine serum, gentamicin과 RPMI 1640은 Gibco-BRL사에서, HL-60세포는 KCTC에서 분양 받았고 그 외의 일반적인 시약은 분석용을 사용하였다.

2. HL-60 세포에서 topoisomerase의 정제

10 % fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640배지를 사용하여 배양한 사람 백혈병 HL-60 세포를 Minford등⁸⁾의 방법으로 핵 추출물을 얻은 후 40 % - 80 %의 ammonium sulfate를 사용하여 분별 침전시키고 하룻밤 dialysis하여 탈염과 함께 nucleus 완충액으로 평형시킨 후 Ultrogel A-6 column chromatography와 DNA cellulose column chromatography, glycerol gradient centrifugation하여 효소를 정제하였다.

3. 단백질 정량법

정제 과정 중에 얻어진 단백질의 농도는 Lowry등⁹⁾의 방법에 따라 분석하였으며 표준 단백질로 bovine serum albumin을 사용하였다.

4. Topoisomerase의 이완 활성 측정법

Type I topoisomerase의 이완(relaxation) 활성은 30 μ g/ml의 bovine serum albumin이 포함된 반응 혼합액 (50 mM Tris-HCl: pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM EGTA) 20 μ l에 400 ng의 pUC19 DNA와 정제한 HL-60 type I topoisomerase 용액 (또는 효소 분획)을 2 μ l씩 넣고 37 °C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액에 5 μ l의 5 % SDS를 넣고 반응을 정지하고 proteinase K(0.5 mg/ml)를 넣어 42 °C에서 추가로 60분간 더 반응시킨 후 25 % Ficoll 400과 0.25 mg bromophenol blue/ml의 혼합액을 넣어 반응을 정지시켰으며, 반응 생성물은 TBE buffer (90 mM Tris borate, pH 8.3, 2.5 mM EDTA)를 전개용매로 하고 0.8 % agarose gel을 사용하여 4 V/cm로 전기영동을 실시하여 분석하였다. 그리고 type II topoisomerase의 이완 활성은 위의 반응 혼합액에 1 mM ATP를 첨가하여 위의 실험 방법과 같은 방법으로 측정하였다. Topoisomerase의 활성은 37 °C에서 30분내에 400 ng의 DNA를 완전히 relax시키는 효소의 양을 1 unit로 정하였다.

5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 방법

HL-60 세포에서 정제한 topoisomerase의 순도와 분자량을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 Laemmli의 방법¹⁰⁾에 따라 시료를 7.5 % acrylamide gel에서 200 V, 100-60 mA의 조건으로 전기 영동한 후 coomassie blue로 염색하여 단백질 띠를 확인하였다.

결 과

1. HL-60 사람 백혈병 세포로부터 type I topoisomerase의 정제

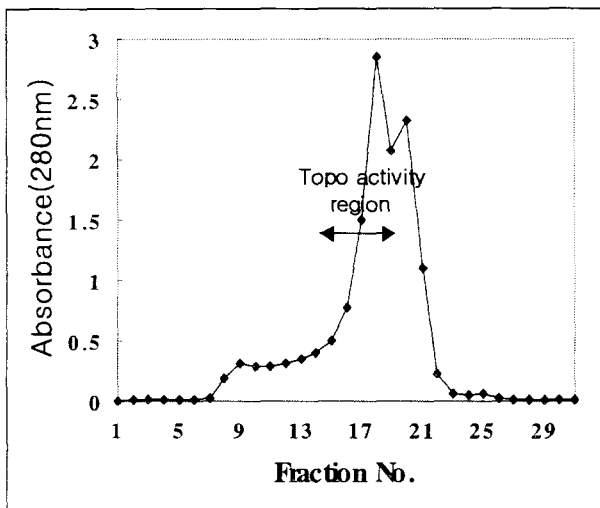


Fig. 1. Elution profile of topoisomerase on Ultrogel A6 gel filtration

배양한 HL-60 세포를 상기 실험 방법에 따라 nuclear extract를 얻어 column chromatography를 실시하였다. 그림 1에서 보는 바와 같이 Ultrogel A6 gel filtration의 분획물을 pUC19을 기질로 사용하여 topoisomerase의 활성을 측정하였는데 분획 14번부터 18번 사이의 범위에서 효소 활성을 나타내었으며 특히 16번, 17번 분획에서 높은 활성을 나타내었다. 이 효소 활성을 나타내는 분획물을 더 정제하기 위하여 DNA cellulose column에 흡착시키고, 0.15 M NaCl nucleus buffer를 base line이 0이 될 때까지 흘린 다음, 0.15 M, 0.25 M, 0.35 M의 NaCl 용액으로 단계적으로 농도 경사를 만들어 용출시킨 결과 0.25 M의 NaCl 농도에서 topoisomerase가 분리되었으며

분획 17번에서 22번 분획 사이에서 효소 활성을 나타내었다(그림 2). 이 활성을 나타내는 분획물에 15-40 % glycerol 농도 경사 원침법을 실시하여 5-7과 9,10의 분획에서 topoisomerase의 활성을 관찰할 수 있었다(그림 3).

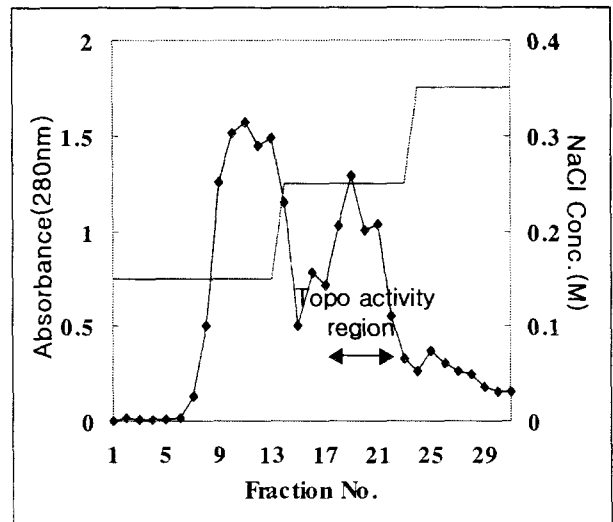


Fig. 2. DNA cellulose column chromatography of topoisomerase eluted from Ultrogel A6 gel filtration

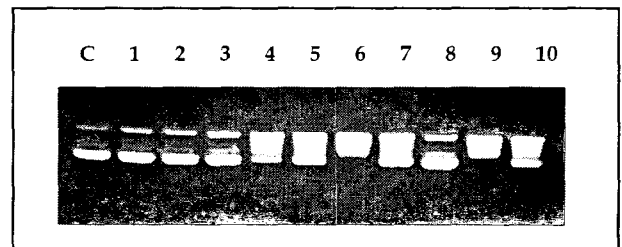


Fig. 3. Separation of topoisomerase by glycerol gradient centrifugation

The material purified by DNA cellulose column was centrifuged with 15-40 % glycerol gradient in nucleous buffer containing 0.35 M NaCl at 100,000 xg for 68 hr at 4 °C

2. 정제한 topoisomerase 분획의 ATP와 Mg²⁺에 의한 영향

가장 높은 활성을 나타내는 6번과 9번 분획에 대한 ATP와 Mg²⁺의 영향을 조사한 결과(그림 4, 5) 9번 분획은 ATP와 Mg²⁺ 첨가와 무관한 type IB topoisomerase로 여겨지는 효소가 존재하였다. 또한 6번 분획은 효소 활성에 ATP와 Mg²⁺을 요구하는 점으로 보아 전형적인 type IIA topoisomerase로 확인되었다.

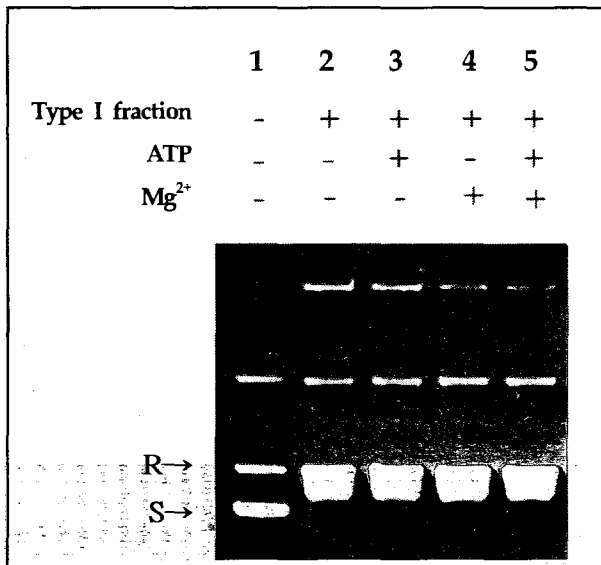


Fig. 4. Effects of ATP and Mg²⁺ on the relaxation activity of type I topoisomerase fraction by glycerol gradient centrifugation

lane 1, pUC19 DNA only; lane 2, lane 1 + reaction buffer (without ATP and without MgCl₂) + type I fraction; lane 3, lane 1 + reaction buffer (with ATP and without MgCl₂) + type I fraction; lane 4, lane 1 + reaction buffer (with MgCl₂ and without ATP) + type I fraction; lane 5, lane 1 + reaction buffer (with ATP and with MgCl₂) + type I fraction

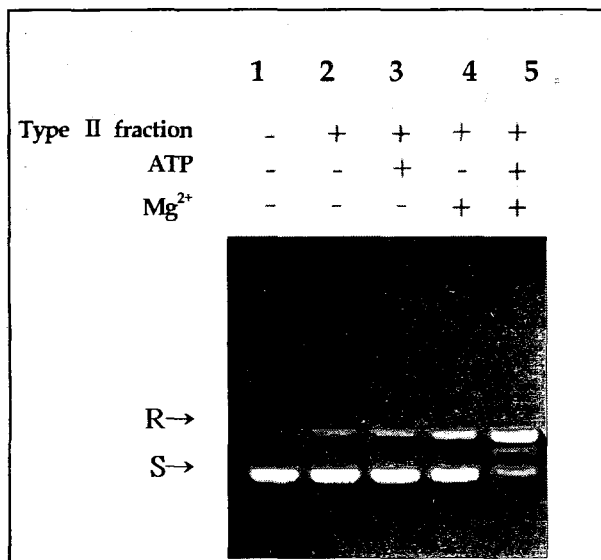


Fig. 5. Effects of ATP and Mg²⁺ on the relaxation activity of type II topoisomerase fraction by glycerol gradient centrifugation

lane 1, pUC19 DNA only; lane 2, lane 1 + reaction buffer (without ATP and without MgCl₂) + type II fraction; lane 3,

lane 1 + reaction buffer (with ATP and without MgCl₂) + type II fraction; lane 4, lane 1 + reaction buffer (with MgCl₂ and without ATP) + type II fraction; lane 5, lane 1 + reaction buffer (with ATP and with MgCl₂) + type II fraction

3. HL-60 세포에서 분리한 type I topoisomerase 분획의 정제 수율 및 효소의 분자량

이상의 과정을 통하여 HL-60 세포에서의 type I topoisomerase는 효소 활성도가 핵 균질액에서 1011 units/mg of protein이며, 최종 분리 단계인 glycerol 농도 경사에서는 8,662 units/mg of protein으로 8.6배 정제되었으며 약 12 %의 수율을 나타내었고(표 1), 정제된 type I topoisomerase의 분자량은 약 100. kDa이었다(그림 6).

Table 1. Purification of type I topoisomerase from HL-60 cells

Purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Nuclear extract	89,946	89	1011	100
Ammonium sulfate(40 -80%)	69,158	52	1330	77
Ultrogei A6	48,870	28	1745	54
DNA cellulose	23,586	6.9	3418	26
Glycerol gradient	10,394	1.2	8662	12

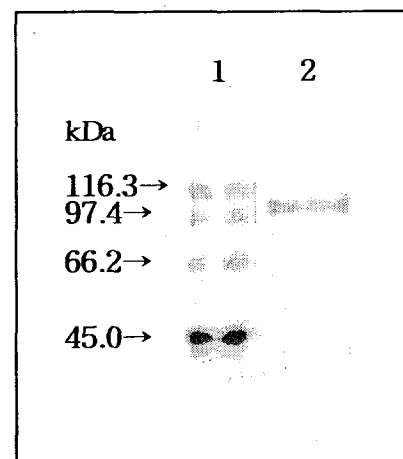


Fig. 6. SDS-PAGE analysis of type I topoisomerase from HL-60 cells

Lane 1, molecular size markers; lane 2, type I fraction

4. Camptothecin이 type I topoisomerase의 활성에 미치는 영향

pUC19 DNA를 type I topoisomerase의 기질로 사용하

여 camptothecin에 의한 topoisomerase의 이완 활성 변화를 관찰한 결과는 그림 7과 같다. Camptothecin을 0.4, 2, 10, 50 μM 을 첨가하였을 경우 약물의 농도가 증가함에 따라 linear DNA가 증가하였으며, 0.4 μM 의 약물을 처리하였을 때 가장 높은 이완 활성을 나타내었으나 농도의 증가함에 따라 이완 활성은 억제되는 양상을 나타내었다.

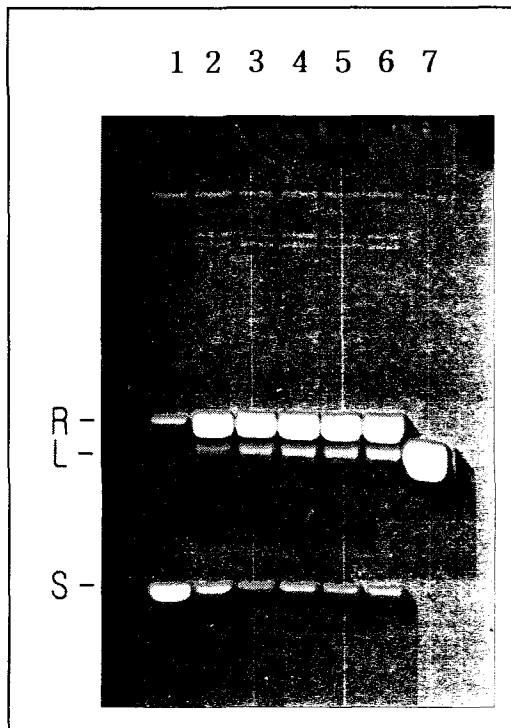


Fig. 7. Effect of camptothecin on the relaxation activity of type I topoisomerase

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 + type I topoisomerase (80 ng), lane 3,4,5,6 ; lane 2 + 0.4, 2, 10, 50 μM CPT, respectively, lane 7; pUC 19/Hind III fragment

고찰

Topoisomerase는 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 절단부위를 봉합한다. 이 때 ATP를 필요로 하며 2개의 linking number가 변화된다. Type IA의 일반적 특징을 살펴보면 *Methanopyrus kandleri*의 reverse gyrase¹¹⁾를 제외한 type IA에 속한 효소들은 모두 monomer이며 DNA의 한쪽 가닥을 절단하여 절단된 DNA 끝과 효소의 활성부위인 tyrosine 사이에 5' phosphodiester bond를 형성한 후 linking number를 1개씩 변화시킨다. 또한 type IA는 대체로 약한 이완 활성을 나타내고, 반응에 Mg^{2+} 를 필요로 하며, positive supercoil된 plasmid에는 작용하지 않기 때문에 negative supercoil된 plasmid만이 이완 활성 측정용 기질이 된다.⁵⁾ 고온 균에서 발견된 reverse gyrase는 ATP 의존성 positive supercoiling을 촉매하기 때문에 type II와 비슷한 점도 있지만 단일 가닥을 절단하고 절단된 가닥의 5'-말단에 결합하는 점에서 type IA로 분류된다.¹²⁾ Reverse gyrase gene은 *Sulfolobus acidocaldarius*로부터 처음 cloning¹³⁾되었으며 다른 type IA 세균들과 c-말단 쪽 절반 가량은 높은 상동성을 나타내며, N-말단쪽은 ATP 결합 부위를 갖고 있다. Type IB에 속하는 효소에는 진핵세포에 있는 topoisomerase I과 poxyvirus topoisomerase 그리고 *Methanopyrus kandleri*에서 분리된 원핵의 topoisomerase V가 있다.^{14,15)} Type IB에 속한 효소들은 아미노산 배열 상으로나 구조적으로 전혀 상동성을 가지고 있지 않다. 또한 type IA와는 달리 양과 음의 supercoiling plasmid에 뚜렷한 이완 활성을 나타내고, 절단된 3'-말단 DNA의 phosphate와 효소의 활성부위인 tyrosine 사이에 공유 결합을 하는 점이 type IA와 뚜렷하게 구분된다. 그리고 금속이온과 결합하는 부위가 없기 때문에 DNA 이완활성에 Mg^{2+} 를 요구하지 않는다.⁶⁾ 사람 DNA topoisomerase I은 type IB에 속하며 91 kDa의 monomer이고 DNA 이완 활성에 ATP와 Mg^{2+} 를 요구하지 않는 반면 사람 DNA topoisomerase II는 type IIA에 속하며 170 kDa와 180 kDa의 isozyme을 가지며 homodimer이고 DNA 이완 활성에 ATP와 Mg^{2+} 를 요구한다. 현재까

지 알려진 생물들의 topoisomerase들 사이에는 유전자 염기 배열상 상동성은 거의 없고 새롭게 밝혀진 효소들의 독특한 특징들이 차츰 밝혀지고 있기 때문에 가까운 장래에 새로운 분류체계가 정립될 것으로 생각된다.

Topoisomerase 연구를 위한 진핵세포의 type II 효소의 정제와 관련하여 Halligan 등¹⁶⁾과 Schomburg와 Grosse²⁾는 calf thymus에서, Minford 등⁸⁾은 mouse leukemia 세포에서 Saijo 등¹⁷⁾은 mouse C3H/He(FM3A) 세포에서, Boege 등¹⁸⁾과 Drake 등¹⁹⁾은 사람 백혈병 세포에서, Galande 등²⁰⁾은 쥐의 고환에서 topoisomerase II를 부분 정제하였다. Type I 효소의 정제는 Hyder 등²¹⁾이 유방암 세포에서, Suzuki 등²²⁾이 Raji 세포에서, Florell 등²³⁾이 환자의 지라에서 topoisomerase I을, Goulauic 등²⁴⁾은 사람 topoisomerase III α 를 정제하였으며, Strausfeld와 Richter²⁵⁾는 topoisomerase I과 II를 송아지 흉선으로부터 분리하였다. 그러나 아직 정제 방법들이 확립되지 않아 서로 상이한 원리에 따른 방법으로 분리되었고, 이에 따른 분석 시간, 효소 순도와 활성에 많은 장단점을 갖고 있다. 그리고 빠르게 증식하는 이상 조직에는 이 효소가 많은 양이 존재할 것으로 예측되고 있으며, 종양조직에서 type I과 II의 topoisomerase의 활성을 동시에, 또한 간편하게 측정할 수 있다면, 이 효소의 억제제는 세포독성을 가지고 있기 때문에, 화학 요법에 대한 반응을 진단하는데 이용할 수 있을 것이다. 따라서 사람조직에서의 정제와 활성 측정에 관하여 앞으로 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

본 연구에서는 사람 백혈병 HL-60 세포로부터 type I topoisomerase 효소를 분리하기 위하여 nuclear extract로부터 salting in-out, dialysis, Ultrogel A-6 gel filtration, DNA cellulose column chromatography, glycerol gradient centrifugation 과정을 통하여 효소 반응에 있어 ATP와 Mg^{2+} 비의존성인 type IB topoisomerase를 12%의 수율로 분리하였고, 또한 ATP- Mg^{2+} 의존성 type IIB topoisomerase를 동시에 확인하였다. SDS polyacrylamide gel 전기영동을 통해 분자량을 확인한 결과 단일 띠의 순수한 단백질은 얻지 못하였지만 전형적인 type IB인 topoisomerase (약 100 kDa)를 정제할 수 있었다.

현재까지 발견된 항암 활성을 나타내는 topoisomerase의 저해제중 topoisomerase II에 대한 저해제는 많이 있

나 topoisomerase I의 저해제로는 *Camptotheca acuminata*에서 추출한 camptothecin만이 알려져 있으며 그외의 저해제를 발견하기 위하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 진핵 세포의 topoisomerase I, II의 억제제들은 topoisomerase 촉매 반응의 전 단계인 phosphodiester bond 절단 과정에는 영향을 주지 않으며 그 후속 단계인 phosphodiester bond의 재봉합을 방해하여 "cleavable complex"를 형성하는데 camptothecin은 3'-phosphotyrosyl-공유결합에 의한 중간 산물을 형성하여 DNA 재봉합을 방해하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 HL-60 사람 백혈병 세포에서 topoisomerase I의 저해제인 camptothecin이 topoisomerase의 이완 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 cleavable complex 유도에 의한 억제 효과를 나타내었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 분리된 효소는 전형적인 사람 DNA topoisomerase I(type IB)으로 동정할 수 있었다. 그러나 type I, II 효소를 보다 더 간편하게 동시에 분리하는 방법과 순도 및 수율을 높이며 임상에 적용하기 위해서는 앞으로 더 연구되어야 할 것이다.

결론

본 연구에서는 사람 백혈병 HL-60 세포로부터 Ultrogel A-6 column chromatography와 DNA cellulose column chromatography, glycerol gradient centrifugation을 통하여 얻은 topoisomerase 분획에 대한 ATP와 Mg의 영향 그리고 topoisomerase I의 억제제인 camptothecin이 topoisomerase 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, type IB와 type IIA topoisomerase를 동시에 정제할 수 있었으므로 앞으로 topoisomerase 억제제의 검색 및 작용 기전을 밝히는데 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

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. 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
9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 15:1-24, 1951
10. Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259):680-685, 1970
11. Krah R, Kozyavkin SA, Slesarev AI, Gellert M : A two-subunit type I DNA topoisomerase (reverse gyrase) from an extreme hyperthermophile. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(1):106-110, 1996
12. Kikuchi A, Asai K : Reverse gyrase - a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA. *Nature* 309(5970):677-681, 1984
13. Confalonieri F, Elie C, Nadal M, de La Tour C, Forterre P, Duguet M : Reverse gyrase: a helicase-like domain and a type I topoisomerase in the same polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(10):4753-4757, 1993
14. Slesarev AI, Lake JA, Stetter KO, Gellert M, Kozyavkin SA. : Purification and characterization of DNA topoisomerase V. An enzyme from the hyperthermophilic prokaryote *Methanopyrus kandleri* that resembles eukaryotic topoisomerase I. *J Biol Chem.* 269(5):3295-3303, 1994
15. Slesarev AI, Stetter KO, Lake JA, Gellert M, Krah R, Kozyavkin SA.: DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. *Nature* 364(6439): 735-737, 1993
16. Halligan BD, Edwards KA, Liu LF. : Purification and characterization of a type II DNA topoisomerase from bovine calf thymus. *J Biol Chem.* 260(4):2475-2482, 1985
17. Saijo M, Enomoto T, Hanaoka F, Ui M. : Purification and characterization of type II DNA topoisomerase from mouse FM3A cells: phosphorylation of topoisomerase II and modification of its activity. *Biochemistry.* 29(2):583-590, 1990
18. Boege F, Gieseler F, Muller M, Biersack H, Meyer P. : Activation of topoisomerase II during partial purification by heparin-Sepharose chromatography. *J Chromatogr.* 625(1): 67-71, 1992
19. Drake FH, Zimmerman JP, McCabe FL, Bartus HF, Per SR, Sullivan DM, Ross WE, Mattern MR, Johnson RK, Crooke ST. : Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme. *J Biol Chem.* 262(34):16739-16747, 1987
20. Galande S, Muniyappa K. : Purification and functional characterization of type II DNA topoisomerase from rat testis and comparison with topoisomerase II from liver. *Biochim Biophys Acta.* 1308(1):58-66, 1996
21. Hyder SM, Baldi A, Crespi M, Wittliff JL. : Rapid purification of topoisomerase I from human breast cancer cells by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 359:433-447, 1986
22. Suzuki M, Takagi E, Kojima K, Izuta S, Yoshida S. : Rapid purification and structural study of DNA topoisomerase I from human Burkitt lymphoma Raji cells. *J Biochem (Tokyo).* 106(5): 742-744, 1989
23. Florell SR, Martinchick JF, Holden JA. : Purification of DNA topoisomerase I from the spleen of a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *Anticancer Res.* 16(6B):3467-3474, 1996
24. Goulaouic H, Roulon T, Flamand O, Grondard L, Lavelle F, Riou JF. : Purification and characterization of human DNA topoisomerase IIIalpha. *Nucleic Acids Res.* 27(12):2443-2450, 1999
25. Strausfeld U, Richter A. : Simultaneous purification of DNA topoisomerase I and II from eukaryotic cells. *Prep Biochem.* 19(1):37-48, 1989