

K-562 세포로부터 DNA topoisomerase II의 분리와 c-myc 원암유전자에서 절단위치의 동정

고신대학교 의학부 생화학 교실
정 인 철, 조 무 연

Isolation of DNA topoisomerase II from K-562 cells and identification of cleavage sites on c-myc protooncogene

In Cheol Jeong, Moo Youn Cho

*Department of Biochemistry
Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea*

= Abstract =

DNA topoisomerase II was purified by Sephacryl S-400 gel filtration, DNA cellulose chromatography and glycerol gradient centrifugation from human chronic myelogenous leukemia K-562 cells. Enzyme activity was assayed by measuring the ATP-dependent relaxation of supercoiled pBR322.

The results are summarized as follows.

1. DNA topoisomerase II was purified more than 184-fold as compared to the whole cell homogenate, with 7% yield.
2. Supercoiled pBR322 DNA was completely converted to relaxed form in the concentration of 120ng of purified DNA topoisomerase II.
3. The preferred DNA topoisomerase II cleavage sites generating the most intense bands were located in the upstream of the c-myc exon 1.

Key words : DNA topoisomerase II, K-562 cell, c-myc

서 론

DNA topoisomerase II는 분자량이 170 KD인 2개의 subunit로 구성되어 있으며(4,

9) 특징적으로 DNA 두가닥을 끊고 절단부위를 통해서 다른 DNA double strand를 통과하도록 한 후 재봉합하여 supercoiling state를 조절하는 효소로서 DNA에서 일어

※ 이 논문의 연구비 일부는 기초의학연구비(1993년)로 이루어 졌음.

나는 복제, 전사, 재조합과정에 큰 영향을 미친다(2, 15, 16, 17). 따라서 DNA topoisomerase II는 유전자의 발현에 관하여는 중요한 효소로 여겨져 이에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 DNA topoisomerase II의 정제와 특성에 관하여, Halligan등(5)과 Schomburg와 Grosse (15), 조등(3)은 calf thymus에서, Minford등(11)은 mouse leukemia(L1210) cell에서, Saijo등(14)과 Hong(6)은 mouse C3H/He(FM3A) cell에서 조사하였다. 그러나 아직 정제 방법들이 확립되지 않아 분리과정으로서 다르며, 이에 따라 순도와 활성에 차이를 보이고 있다. 그리고 빠르게 증식하는 이상 조직에는 이 효소가 많은 양이 존재할 것으로 예측하고 있으며, 종양조직에서 이 효소의 활성을 측정할 수 있다면 이 효소의 억제제는 세포독성을 갖고 있기 때문에, 화학요법에 대한 반응을 진단하는데 이용할 수 있을 것이다(7). 사람조직에서의 정제와 활성 측정에 관한 연구는 holden등(7)에 의해 시도된 바 있으나 앞으로는 많은 연구가 있어야 할 것이다.

이와 같은 배경하에 본 연구에서는 사람의 만성 백혈병 K-562 세포에서 DNA topoisomerase II를 정제하여 순도를 측정하고, pBR322와 c-myc의 exon 1을 포함하고 있는 부위를 기질로 사용하여 효소의 활성과 특성을 구명하였다.

실험 재료 및 방법

1. 시약 및 효소

Sephacryl S-400, DNA cellulose는 Sigma 회사로부터, restriction enzyme, T₄-polynucleotide kinase, γ -³²P-ATP, Hyperfilm-MP는 Amersham사 제품을 구입하였다. fetal calf serum, RPMI 1640은 Gibco, calf alkaline phosphatase는 Promega에서, Proteinase K는 Boehringer Mannheim 제품을 구입하였으며, 그 외의 일반적인 시약은 분석용을 구입하여 사용하였

다. pHSR1(human c-myc gene)은 연세의대 유전공학 연구소에서 제공되었다.

2. 세포 배양

사람 만성 백혈병 K-562(ATCC CCL 243) 세포를 사용하여 heat inactivated fetal calf serum을 포함한 RPMI 1640 배지를 사용하여 150cm²의 flask에 ml당 3×10^5 의 세포를 접종시켜 5% CO₂와 37℃를 유지하는 배양기에서 배양하여 세포수가 $4 \times 10^9 - 9 \times 10^9$ cell이 되었을 때 400xg에서 원심하고 차거운 washing buffer(10mM Tris-HCl pH8.1, 1mM EDTA, 0, 14M NaCl)를 넣어 씻어냈다. 모든 과정(harvest procedure)을 4℃에서 진행하였으며 씻어진 세포용액을 한데 모아 원심하여 상층액은 버리고 pellet (세포)은 실험에 사용될때까지 -70℃의 deep freezer에 동결 보관하였다.

3. K-562 세포에서 DNA topoisomerase II의 정제

1) Nuclei 추출

동결 보관한 세포(K-562)를 4℃에서 녹인 후 차거운 nucleus buffer (0.15M NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.1mM dithiothreitol, 10% Glycerol, pH6.5)를 넣어 두번 씻어내고 5ml를 다시 넣어 현탁액을 만들었다. 이 현탁액에 45ml의 0.35% Triton X-100과 0.1mM PMSF(phenylmethylsulfonylfluoride)가 함유된 nucleus buffer를 넣고 4℃에서 서서히 교반하면서 20분간 방치한 후, 10분동안 400xg에서 원심하였다. 상층액은 버리고 침전된 nuclei를 다시 Triton X-100이 포함되어지 않은 nucleus buffer로 녹여 원심하였으며 2번 더 씻어내어 Triton X-100을 제거하였다. 여기서 얻어진 nuclear pellet은 0.35M NaCl이 들어 있는 차거운 nucleus buffer 1ml를 넣어 20분간 서서히 교반하고 10분 동안 900xg에서 원심하였다. 상층액에서 nuclei를 완전히 제거하기 위해 재차 원심시키고 Min-

ford등(11)의 방법을 다소 변경하여 다음 과정을 밟았다.(그림 1 참조)

2) Sephacryl S-400 column chromatography

상기 과정에서 얻어진 추출물을 nucleus buffer에 평형시킨 Sephacryl S-400(Sigma Chemicals Co.) column(2.5×20cm)에 넣고 분당 0.3ml 속도로 nucleus buffer를 흘려 주어 효소활성을 나타내는 분획을 얻었다.

3) DNA-cellulose column chromatography

Sephacryl S-400 column의 분획물을 0.15M NaCl이 함유된 nucleus buffer로 평형된 DNA-cellulose(Sigma Chemicals Co.) column (0.7×10cm)에 넣고 흡착시켰다. 0.15M NaCl이 함유된 nucleus buffer로 A₂₈₀에서 base line이 zero가 될때까지 흘려주고 0.35M NaCl을 사용하여 linear gradient로 전개시켰는데 용출속도는 0.2 ml/min이 되도록 하였다. DNA cellulose column에서 분리된 활성의 분획물을 모아 다음 과정을 통해 더욱 정제하였다.

4) Glycerol gradient centrifugation

0.35M NaCl이 함유된 nucleus buffer에 glycerol을 넣어 15-40%의 glycerol 농도 경사를 만든 원침관 상층에 앞의 시료를 넣고 Kontron SW65 roter를 사용하여 100,000 xg로 4℃에서 68시간 원침시키고 원침관을 24개의 분획으로 나누어 밑에서 부터 시료를 분리하여 각 분획에 대한 효소활성을 측정하였다.

4. DNA topoisomerase II의 relaxation activity

30 μ g/ml의 bovine serum albumin이 포함된 반응 혼합액(50mM Tris-HCl, pH 7.9, 100mM KCl, 10mM MgCl₂, 0.5mM dithiothreitol, 0.5mM EGTA, 1.0mM ATP) 20 μ l에 400ng의 pBR322 DNA와 정제된 K-

562 DNA topoisomerase II를 넣고 37℃에서 30분간 반응 시켰다. 이 반응액에 5 μ l의 5% SDS, 25% Ficoll 400과 0.25mg bromophenolblue/ml의 혼합액을 넣어 반응을 정지시켰으며, 1ml당 0.5mg의 proteinase K를 넣어 42℃에서 1시간 더 반응시켰다. 반응 생성물은 TBE buffer(90mM Tris borate, pH 8.3, 2.5mM EDTA)를 전개용매로 하고 0.8% agarose gel을 사용하여 6 V/cm로 전기영동을 실시하여 분석하였다. DNA topoisomerase II의 활성은 37℃에서 30분내에 1 μ g의 DNA를 완전히 relax시키는 효소의 양을 1unit로 정하였다.

5. 단백질 정량

정제 과정중에 얻어진 단백질의 농도는 Lowry등(10)의 방법에 따라 실시하였으며 표준단백질로 bovine serum albumin을 사용하였다.

6. 제한효소로 자른 DNA 절편의 분리와 DNA의 5' 끝에 ³²P의 표지 제조

사람 c-myc DNA를 제한효소로 잘라 5' 끝에 ³²P를 표지한 DNA 절편을 얻기 위해 다음과 같은 조작을 실시하였다. DNA는 pBR322에 human c-myc이 포함된 pHSR1을 사용하여, 제한 효소인 Hind III와 Xba I으로 작용시킨후 전기영동하여 약 3.7 Kb의 c-myc/Hind III, Xba I 절편을 electroelution으로 회수하였다. 이 DNA fragment를 CIP(calf intestinal alkaline phosphatase)로 phosphate를 제거하고 γ -³²P-ATP(300Ci/mmole, 10 μ Ci/ μ l)와 T4 polynucleotide kinase를 작용시켜 5' 끝에 ³²P를 표지하였다. 이 과정에서 5'쪽의 한끝에만 표지된 DNA 절편을 얻기 위해 같은 시료에 Sac I 제한 효소를 작용시켜 한쪽 끝을 제거하였으며, phenol/chloroform 추출과 ethanol로 침전시켜 Hind III쪽만 ³²P가 표지된 linear DNA를 분리하였다.

7. linear DNA에 대한 DNA topoisomerase

II의 활성도 측정

상기와 같은 방법으로 ^{32}P 를 표지한 DNA 절편($0.5\mu\text{g}$)이 함유된 $20\mu\text{l}$ 의 reaction buffer(100mM Tris-HCl ; pH 7.5, 5mM MgCl_2 , 50mM KCl, 0.1mM EDTA, $30\mu\text{g/ml}$ BSA)에 1mM 의 ATP와 정제된 DNA topoisomerase II를 넣고 37°C 에서 30분간 반응시킨후 $2\mu\text{l}$ 의 10% SDS를 넣어 반응을 정지시켰으며 proteinase K(0.5mg/ml)를 넣어 42°C 에서 60분간 더 반응시켰다. 반응에서 얻어진 산물을 분석하기 위해, 시료에 $2\mu\text{l}$ 의 loading buffer(0.3% bromophenol blue, 16% Ficoll 400, 0.01M Na_2HPO_4)를 가하고 60°C 에서 1-2분간 가열하였으며 이를 1.2% agarose gel에 TBE buffer를 사용하여 2V/cm 의 속도로 전기영동시켰다. 전가가 끝난 agarose gel을 oven에 넣어 완전히 건조시켜 Hyperfilm-MP를 사용하여 autoradiography를 실시한 후, DNA topoisomerase II의 절단위치에 대한 activity를 비교 분석하기 위해 Autoradiograph film을 Shimadzu UV-265 spectrophotometer의 590nm 에서 scan하여 평가하였다.

연구결과

1. K-562 세포에서 분리한 DNA topoisomerase II의 정제 및 활성

배양한 K-562 세포를 상기 실험방법에 따라 nuclear extract를 얻어 column chromatography를 실시하였다. 그림 2에서 보는 바와 같이 Sephacryl S-400 gel filtration의 분획물을 pBR322를 기질로 사용하여 DNA topoisomerase II의 활성을 측정하였는데 분획 28번 부터 42번 사이의 넓은 범위에서 용출되었으며, 특히 32번에서 36번 분획에서 높은 활성을 나타내었다. 이 효소활성을 나타내는 분획물을 더 정제하기 위하여 DNA-cellulose column에 흡착시키고, 0.15M NaCl nucleus buffer를 base line이 0이 될때까지 흘린 다음, $0.15-0.35\text{M}$ NaCl

용액으로 linear gradient를 만들어 용출시킨 결과 $0.2\text{M}-0.3\text{M}$ 의 NaCl 농도에서 DNA topoisomerase II가 분리되었으며 분획 64번에서 68번 분획 근처에서 가장 높은 활성을 나타내었다(그림 3). 이 활성의 분획물에 15-40% glycerol 농도 경사 원침법을 실시하여 8-12와 20-24의 분획에서 DNA topoisomerase의 활성을 관찰할 수 있었다(그림 4). 가장 높은 활성을 나타내는 12와 22번 분획중 DNA topoisomerase II를 동정하기 위한 ATP(0.5mM)의 영향을 조사한 실험(그림 4)에서 분획 22에서는 12와는 달리 ATP 첨가와 무관한 DNA topoisomerase I으로 여겨지는 효소가 존재하였다. 또한 12번 분획은 ATP hydrolysis를 필요로 하는 점으로 보아 DNA topoisomerase II로 확인되어 이 분획을 회수하여 다음 실험에 사용하였으며, 이상의 과정을 통하여 K-562 세포에서의 DNA topoisomerase II는 표 1에서 보는 바와 같이 효소 활성도가 세포 균등액에서 $486\text{ units/mg of protein}$ 이며, 최종 분리단계인 glycerol 농도경사에서는 $89,474\text{ units/mg of protein}$ 으로 184배 정제되었으며 약 7%의 수율을 나타내었다.

2. DNA topoisomerase II의 농도에 따른 변화

DNA topoisomerase II의 활성도를 확인하기 위하여 pBR322 DNA(400ng)에 K-562 cell에서 정제한 DNA topoisomerase II의 농도($0, 20, 40, 80, 120, 160\text{ng}$)를 달리하여 ATP 존재하에 30분간 반응시켰을 때 pBR322 DNA가 supercoil된 form에서 relax form으로의 전환은, 효소농도가 20ng 일때 약 50%의 활성을 나타내었으며 120ng 이상일때 완전히 전환되었다(그림 5).

3. 제한 효소로 자른 linear DNA에서의 DNA topoisomerase II의 활성

human c-myc이 삽입된 pHSR1 DNA를 Hind III와 Xba I으로 절단하여 electroelution으로 약 3.7Kb의 fragment를 얻은 다음 ^{32}P 로 5'끝에 표지한 후 Sac I으로 다시 잘라 한쪽 끝이 ^{32}P 로 표지된 exon I을 포함하는 약 3.2Kb의 linear DNA에 topoisomerase II를 작용시켜 시료를 전기영동하고 gel을 말린후 autoradiography한 결과, 그림 6에서 보는 바와 같이 DNA topoisomerase II에 의해 double strand의 linear DNA가 여러 개의 절편으로 절단된 것을 관찰하였고, 절편의 밀도를 확인하기 위하여 autoradiograph film을 spectrophotometer로 scan한 결과 1.58Kb 근처에서 가장 강한 활성을 나타내었으며, 1.87, 1.20, 0.70, 0.55Kb 지점에서도 뚜렷한 활성을 보였다. 이러한 절단 지점들을 c-myc locus의 map으로 나타낸 결과(그림 7) 대부분이 DNA topoisomerase II에 의해 exon 1의 upstream쪽을 절단하였다.

고 찰

DNA topoisomerase II는 세포의 증식 상태에 따라 효소의 양과 활성에 차이가 있으며, 정지기(stationary phase)에 비해 대수 증식기(log phase)에서 높은 활성을 나타낸다. 또한 빠르게 증식하는 이상조직에서는 이 효소가 많은 양이 존재하며, 이 효소의 억제제인 Amsacrine, Adriamycin, Ellipticine, VP-16, VM-26 등은 세포 독성을 가지고 있어 항생, 항암제로 사용하고 있기 때문에, 임상적으로 사람의 이상조직에 대한 DNA topoisomerase II의 간편한 분리방법과 활성의 측정이 화학요법에 대한 반응을 진단하는데 필요할 것으로 기대된다. (13) 따라서 본 실험에서는 사람의 만성 백혈병 세포(K-562)를 사용하여, 몇가지 정제과정을 통하여 DNA topoisomerase II의 분리를 시도하였다.

DNA topoisomerase는 그 촉매기작에 따라 두 형태로 분류되는데 topoisomerase I은 DNA duplex의 한가닥을 끊고, 절단된 한 끝을 상대편 DNA 가닥을 축으로 한바퀴 회전시킨후 끊어졌던 부분을 다시 연결하는데(1), topoisomerase II는 DNA의 두가닥을 거의 동시에 끊고 DNA duplex의 다른 부분이 절단된 곳을 통과한 후 절단된 부위를 다시 연결하는 효소로서 촉매과정에서 ATP hydrolysis를 필요로 하는 것이 topoisomerase I과 다른 점이다.(8)

본 실험의 효소 정제과정에서 최종 단계인 glycerol 농도경사 원침법을 실시하여 분류액에서 DNA topoisomerase II를 확인하였는데 또 하나의 type인 ATP independent 형이 존재하였다. 이는 DNA topoisomerase I으로 여겨지며 Minford등(11)이 mouse leukemia(L1210) 세포에서 분리 정제한 효소의 결과와 일치하였다. 그리고 nuclear extract, Sephacryl S-400, DNA cellulose column chromatography와 glycerol 농도경사 원침법의 정제과정을 통하여 184배의 purity와 7%의 yield를 얻었는데 이러한 결과는, Halligan등(5)과 Schomburg와 Grosse(15)가 calf thymus에서 정제한 topoisomerase II의 purity가 각각 1300배, 6300배로 K-562에서의 결과에 비해 높은 순도로 얻어졌으며, Saijo등(14)의 mouse FM 3A cell에서의 결과와는 비슷하였다. 이상의 결과로 보아 분리원에 따라 다소 차이가 있겠으나 정제방법상에 많은 검토가 있어야 될 것이며 임상검사를 위한 신속하고 간편한 방법을 개발하여야 할 것이다.

c-myc locus상의 DNA topoisomerase II의 cleavage site를 autoradiograph 방법과 spectrophotometer로 측정한 결과 exon I의 upstream쪽을 강하게 절단하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Riou등(12)이 calf thymus에서 분리한 DNA topoisomerase II가 기질로 사용한 human c-myc상의 결과와 유사하였는데 앞으로 항암제로 사용되

는 각종 억제제에 의해 유도된 human c-myc상의 절단위치와 비교검토하여 항암제의 작용기전을 밝히는데 기초 자료로 사용하고자 한다.

결 론

사람의 만성 백혈병 K-562 세포로부터 DNA topoisomerase II를 정제하여 효소 활성을 agarose gel electrophoresis에 의해 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DNA topoisomerase II는 nuclear extract로부터 Sephacryl S-400, DNA cellulose column chromatography, glycerol gradient centrifugation 과정을 통하여 184배 정제되었으며 수율은 약 7% 얻어졌다.
2. pBR322 DNA(400ng)에 대한 정제된 DNA topoisomerase II의 activity는 120 ng이상 첨가하였을 때 supercoil된 form에서 relax form으로 완전히 전환시켰다.
3. Hind III, Xba I/Sac I으로 자른 human c-myc DNA fragment에 대한 topoisomerase II의 activity를 측정한 결과 c-myc DNA의 exon I의 upstream쪽에 높은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Champoux JJ : DNA topology and its biological effects. Cold Spring Harbor Laboratory, 1990, 217-242
2. Christman MF, Dietrich FS and Frink GR : Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerase I and II : *Cell* 55 : 413-25, 1988
3. Cho MY, Jeong IC, Lee SJ, Jung IK and Rho J : DNA topoisomerase II as primary target of benzo(a)pyrene compounds : *Korean J Biochem* 24 : 27-37, 1992.
4. Gellert M : DNA topoisomerases : *Ann Rev Biochem* 50 : 879-910, 1981
5. Halligan BD, Edwards KA and Liu LF : Purification and characterization of a type II DNA topoisomerase from bovine calf thymus : *J Biol Chem* 260 : 2475-82, 1985
6. Hong JH : DNA topoisomerase : the mechanism of resistance to DNA topoisomerase II inhibitor VP-16, *Hiroshima J Med Sci* 38 : 4, 197-207, 1989
7. Holden JA, Rolfsen DH and Wittwer CT : Human DNA topoisomerase II : evaluation of enzyme activity in normal and neoplastic tissues : *Biochemistry* 29 : 2127-34, 1990
8. Hsieh T : DNA topology and its biological effects. Cold Spring Harbor Laboratory, 1990, 217-242
9. Liu LF : DNA topoisomerases-enzymes that catalyze the breaking and rejoining of DNA : *CRC Crit Rev Biochem* 15 : 1-24, 1983
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent : *J Biol Chem* 193 : 265-75, 1951
11. Minford J, Pommier y, Filipinski J, Kohn KW, Kerrigan D, Mattern M, Micheals S, Schwarys, R and Zwelliing LA : Isolation intercalator dependent protein linked DNA strand cleavage activity from cell nuclei and identification as topoisomerase II : *Biochemistry* 25 : 9-16, 1986
12. Riou JF, Vilarem MJ, Larsen CJ and Riou G : Characterization of the topoisomerase II-induced cleavage si-

- tes in the c-myc protooncogene : Biochem Pharmacol 35 : 244-249, 1986
13. Ross WE, Sullivan DM and Chow K : Altered function of DNA topoisomerases as a basis for antineoplastic drug action : Important Adv Oncol 4 : 65-81, 1988
 14. Saijo M, Enomoto T, Hanaoka F and 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 : 583-590, 1990
 15. Schomburg U and Grosse F : Purification and characterization of DNA topoisomerase II from calf thymus associated with polypeptides of 175 and 150kDa : Eur J Biochem 160 : 451-457, 1986
 16. Wang JC : DNA topoisomerases : Ann Rev Biochem 54 : 665-97, 1985
 17. Wang JC : Recent studies of DNA topoisomerases : Biochim Biophys Acta 909 : 1-9, 1987

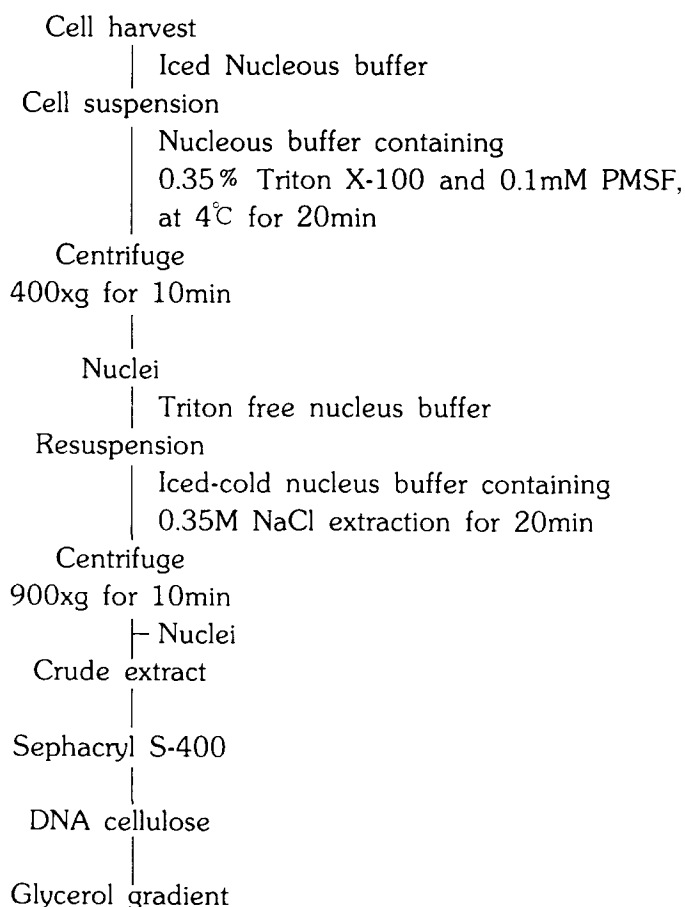


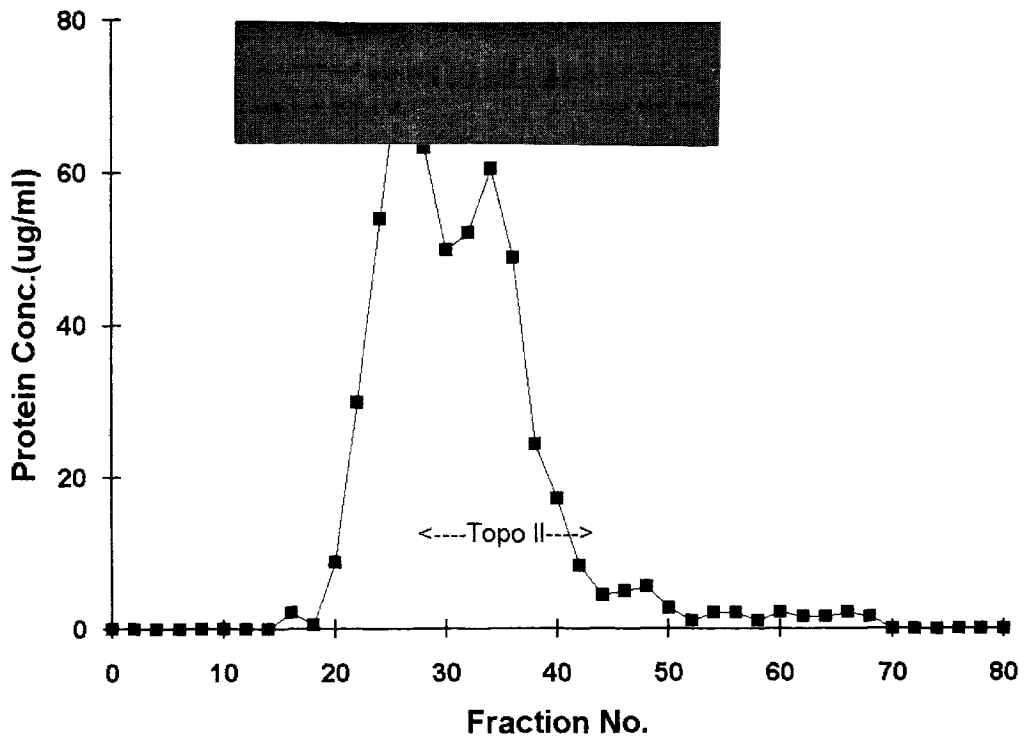
Fig. 1. Purification scheme of K-562 DNA topoisomerase II

Table 1. Purification of DNA topoisomerase II from K-562 cells

Purification step	Total Protein (mg)	Total Activity (units $\times 10^{-3}$)	Specific Activity (units/mg)	Yield (%)
1. Cell homogenate	1024	498	486	100
2. Nuclear extract	128	318	2484	64
3. Sephacryl S-400	15.1	128.2	8490	26
4. DNA cellulose	4.6	71	15435	14
5. Glycerol gradient	0.38	34	89474	7

Enzyme activity was assayed as described in Materials and Methods.

Protein concentrations were determined by Lowry's method.

**Fig. 2.** Elution profile of DNA topoisomerase II on Sephacryl S-400 column chromatography

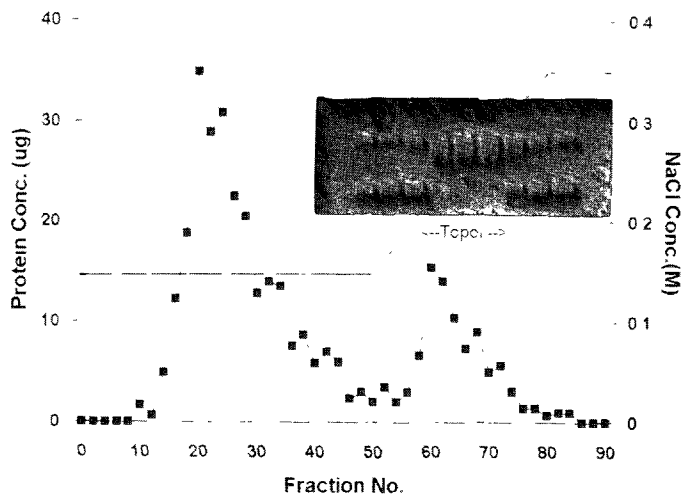


Fig. 3. DNA cellulose column chromatography of DNA topoisomerase II eluted from Sephacryl S-400 column chromatography

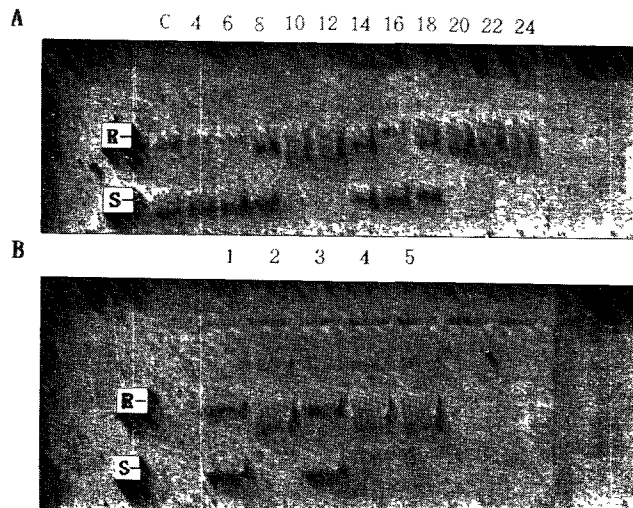


Fig. 4. Separation of DNA topoisomerase II by glycerol gradient centrifugation

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

B) The purified DNA topoisomerase II was incubated with or without ATP in reaction mixture.

lane 1 : pBR322 only, lane 2 : with ATP in No. 12

lane 3 : without ATP in No. 12, lane 4 : with ATP in No. 22, lane

5 : without ATP in No. 22

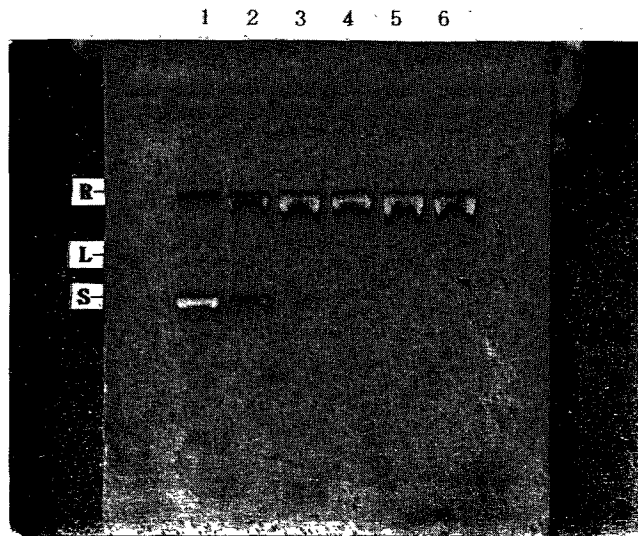


Fig. 5. Effect of various concentrations of DNA topoisomerase II on the relaxation activity

The relaxation activity was analyzed by the agarose gel assay described in "Materials and Methods". Lane 1, 400ng of pBR322 DNA; lane 2-6, lane 1 + 20ng, 40ng, 80ng, 120ng, or 160ng of topoisomerase II

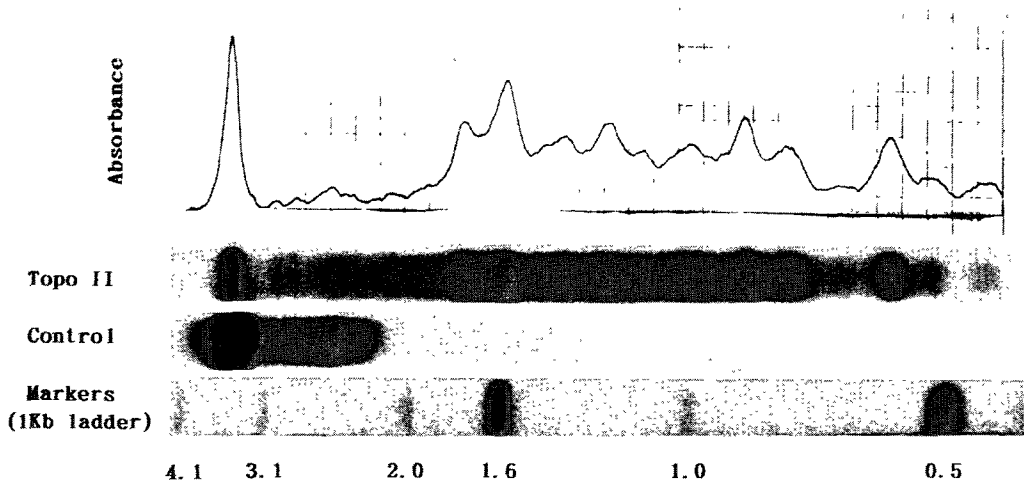


Fig. 6. DNA topoisomerase II cleavage products of the c-myc gene Hind III/Sac I DNA fragments that had been uniquely ^{32}P end labeled at the Hind III site were reacted with DNA topoisomerase II for 30min at 37°C . Samples were run into 1.2% agarose gels, and autoradiography was performed. Autoradiograph was scanned by UV-265 spectrophotometer.

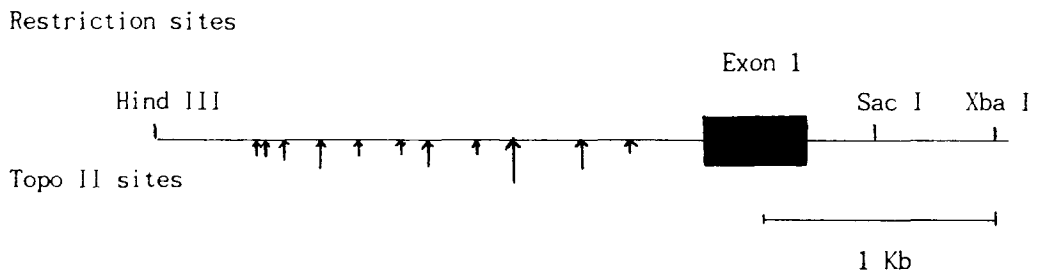


Fig. 7. Map of the DNA topoisomerase II cleavage sites in the c-myc locus
The size of the arrows is indicative of the relative strength of the
cleavage sites.