

Human c-myc 원암유전자에서 Benzo(a)pyrene 이 DNA Topoisomerase II에 의한 DNA 절단에 미치는 영향

고신대학교 의학부 생화학교실
정인철, 이송재, 조무연

고신대학교 의학부 내과학교실
이 상 욱

Effects of benzo(a)pyrene on the DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage in human c-myc protooncogene

In Cheol Jeong, Song Jae Lee, Moo Youn Cho

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

Sang Uk Lee

Department of Internal Medicine, Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea

= Abstract =

In a previous study, we have found that benzo(a)pyrene(BP) and its metabolites specifically bind to the DNA topoisomerase II fraction of mouse fibroblast C3H/10T1/2 cell cultures. The enzyme was predicted to be a primary target of BP causing malignancy. We therefore investigated, in the present study, changes in DNA cleavage by various concentrations of BP bound to DNA topoisomerase II in the human c-myc protooncogene. DNA topoisomerase II was purified by glycerol gradient centrifugation from murine L1210 leukemia cells. Supercoiled pBR322 DNA was completely reversed to a relaxed form in the presence of 160ng of purified DNA topoisomerase II. In BP-treated HindIII/XbaI cutting c-myc DNA, DNA cleavage was most apparently increased in the upstream of exon 1, the effect being particularly pronounced with 0.1 μ M BP. It is indicated that stimulation of the DNA topoisomerase II induced DNA cleavage sites in the c-myc by BP act on selective region, which increased cleavage at specific sites may induce gene expression of abnormal pattern.

서 론

DNA topoisomerase II는 DNA 이중나선의 가닥을 일시적으로 절단하여 복합나선의 밀도를 조절하는 효소로서 DNA 대사중 전사, 복사, 재조합 및 유사분열의 chromosome 분열이 일어나는 과정에 관여한다.^{5,29)} 따라서 DNA topoisomerase II는 유전자의 발현에 관여하는 중요한 효소로서 이에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 그간의 연구에서 많은 항암제는 포유동물의 DNA topoisomerase II의 재결합 반응을 억제하여 trapped된 단백질 linked-DNA 절단이 증가하는 것으로 알려져 있으며^{6,17,23,26,27)}, Cho 등⁷⁾은 송아지 흉선에서 순수 분리된 효소를 사용하여 Benzo(a)pyrene (BP)이 DNA 보다 DNA topoisomerase II와 상호작용이 있음을 증명한 바 있다.

원암유전자는 점돌연변이, 전위, 재배열 및 삽입에 의해 활성화되며, 이의 대사과정에 관련된 단백질의 증가는 표적세포의 지속적인 성장을 초래함으로써 각종 종양이 발생한다고 알려져 있다. 이들 원암 유전자중 c-myc 유전자는 DNA 복제 및 세포 분열시 G₀ 기에서 G₁ 기로의 진행과 세포분화에도 관여 함이 밝혀졌다¹²⁾. 간장에서 c-myc 유전자의 발현 증가는 재생되는 간세포²⁸⁾와 간암^{8,10,11,25,30)}의 발생 과정, 화학적 발암 물질에 의해 유발된 쥐 간암^{10,16,25)}과 화학물질 혹은 x-ray에 의해 형질 전환된 C3H/10T1/2(cl 8) mouse embryofibroblast²¹⁾에서 관찰된 바 있다. 최근에 Pommier 등²¹⁾은 DNA topoisomerase II가 c-myc의 exon 1 위치에서 절단 및 재결합을 잘 일으키며 chromosomal translocation이 발생하는 부위에 존재 함을 보고하였다. 이러한 연구 결과들은 c-myc coding 부위에서 구조적 돌연변이가 일어나며, 원암유전자 c-myc의 암 유전자로의 전환은 정상적인 단백질의 구조적 변화가 아니라 유전자 발현의 이상으로 초래되고¹³⁾, 구성 성분이 부적당한 상태로 유지되던가 조절할 수

없을 때 c-myc 유전자의 변형으로 새로운 종양이 발생됨을 예측할 수 있다.

본 연구에서는 mouse leukemia L1210에서 DNA topoisomerase II를 순수 분리 정제하여 효소의 활성도를 측정하고, DNA topoisomerase II에 의한 human c-myc DNA의 작용부위에서 발암물질인 BP의 영향을 관찰 하였다.

실험 재료 및 방법

1. 시약 및 효소

Benzo(a)pyrene은 Aldrich사 제품을 구입하였고, Sephacryl S-400, DNA cellulose, proteinase K는 Sigma 회사로부터, restriction enzyme, T4-polynucleotide kinase, γ -³²P-ATP, Hyperfilm-MP와 Hybond N⁺는 Amersham사 제품을 구입하였다. fetal calf serum, horse serum, gentamycin과 RPMI 1640은 Gibco, calf alkaline phosphatase는 Promega제품을 구입하였으며, 그 외의 일반적인 시약은 분석용을 구입하여 사용하였다. pHSR1(human c-myc gene)은 연세대학교 의과대학 유전공학 연구소로부터 제공받았다.

2. 세포 배양 및 DNA topoisomerase II의 정제

세포는 mouse leukemia L1210(ATCC, CCL 219) 세포 line으로서 10% horse serum과 gentamycin (30 μ g)이 함유된 Fischer's medium (Gibco Lab.NY) 을 75cm²의 조직 배양 flask에 넣어 5% CO₂가 공급되고, 37°C를 유지하는 배양기에서 배양하여 세포수가 4 $\times$ 10⁹ - 9 $\times$ 10⁹ cell이 되도록 하여 50ml의 원침관에 모아 400 xg에서 원침하고 차거운 washing buffer (10mM Tris-HCl pH8.1, 1mM EDTA, 0, 14M NaCl)를 넣어 씻어냈다. 모든 과정(harvest procedure)을 4°C에서 진행하였으며 씻어진 세포용액을 한데 모아 원침하여 상층액은 버리고 pellet(세포)은 실험에 사용할 때 까지 -70°C deep freezer 에 동결 보관하였다.

L1210 mouse leukemia 세포에서 DNA topoisomerase II의 정제 방법은 Minford등¹⁵⁾의 방법을 다소 변경한 정등¹⁾의 방법에 따라 nuclei를 추출하고 Sephacryl S-400 column chromatography와 DNA-cellulose column chromatography하여 활성의 분획을 모아 15-40%의 Glycerol 농도 경사 침전 과정을 통해 더욱 정제하여 효소 활성을 측정하였다.

3. DNA topoisomerase II의 relaxation activity

30μg/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) 20μl에 400ng의 pBR322 DNA와 정제된 L1210 DNA topoisomerase II를 넣고 37°C에서 30분간 반응 시켰다. 이 반응액에 5μl의 5% SDS, 25% Ficoll 400과 0.25mg/ml의 bromophenol blue의 혼합액을 넣어 반응을 정지 시켰으며, 반응 생성물은 TBE buffer(90mM Tris borate, pH 8.3, 2.5mM EDTA)를 전개용매로 사용하여 0.8% agarose gel상에 4V/cm 속도로 전기영동을 실시하여 supercoiling DNA의 relaxation activity를 측정하였다.

4. DNA를 제한 효소로 자른 절편의 분리과 5'끝에 ³²P로 표지된 DNA 절편 제조

5'end에 ³²P가 표지된 DNA 절편을 얻기 위해 다음과 같은 조작을 실시하였다. c-myc DNA (pHSRI, 그림 1 참조)를 XbaI으로 자른 다음, CIP(calf intestinal alkaline phosphatase)로 phosphate를 제거하고 γ-³²PATP(SA 300Ci/mmol, 10μCi/μl)와 T4 polynucleotide kinase를 작용시켜 5'-끝에 ³²P를 표지하였다¹⁴⁾. 이 과정에서 5'쪽의 한 끝에만 표지된 DNA 절편을 얻기 위해 HindIII를 작용시킨 후 전기영동하고 electroelution을 실시하여 linear한 3.5kb의 DNA 절편을 얻었다.

5. DNA topoisomerase II에 의해 촉진된 DNA

cleavage site 분석

상기의 5'-end에 ³²P가 표지된 DNA 절편(0.5 μg)이 함유된 20μl의 반응 buffer(50mM Tris-HCl; pH 7.5, 10mM MgCl₂, 199mM KCl, 0.5mM EDTA, 30μg/ml BSA, 0.5mM DTT)에 1mM의 ATP와 정제된 DNA topoisomerase II(40ng)를 넣고 30분간 반응시킨 후 5μl의 5% SDS를 넣어 반응을 정지 하고 proteinase K(0.5mg/ml)를 넣어 37°C에서 추가로 60분간 더 반응시켰다. 반응에서 얻어진 산물을 분석하기 위해, 시료에 3μl의 loading buffer(0.3% bromophenol blue, 16% Ficoll, 0.01M Na₂HPO₄)를 가하고 60°C에서 1-2분간 가열하였으며 이를 1.2% agarose gel 상에서 Tris-borate- EDTA buffer를 사용하여 2V/cm의 속도로 15시간 동안 전기영동시켰다. 전계가 끝난 agarose gel은 gel dryer에 넣어 완전히 건조시켜 autoradiography를 실시하였다.

연구 결과

1. Mouse leukemia L1210 세포에서 분리한 DNA topoisomerase II의 활성

Mouse leukemia L1210 세포에서 핵을 분리하여 nuclear extract를 얻고 Sephacryl S-400 column chromatography와 DNA-cellulose column chromatography를 실행하고, 여기서 얻어진 효소 활성을 가진 분획물을 15-40% glycerol 농도 경사 원침을 실시하여 12-14와 21, 22의 분획에서 효소 활성의 수율이 높은 분획을 얻을 수 있었다(그림 2-A). 또한 ATP(0.5mM)의 영향을 조사한 결과 분획 21 및 22에서는 12-14와는 달리 ATP 첨가와 무관하게 효소의 활성이 나타났는데, 이는 아마 DNA topoisomerase I으로 여겨졌다(그림 2-B).

2. 순수 정제된 DNA topoisomerase II의 농도에 따른 활성

Human c-myc 유전자에서 DNA를 절단할 때

가장 알맞는 실험 조건을 찾기위해 L1210 세포에서 정제한 DNA topoisomerase II의 농도 (0,20,40,80,160ng)를 달리하여 ATP 존재하에 30분간 반응시켰을 때 효소가 적은 농도에서는 부분적으로 pBR322 DNA가 초나선형(supercoiled form)에서 이완형(relaxed form)으로 되었다가 효소농도가 160ng일때 완전히 이완형으로 전환되었다(그림 3).

3. Human c-myc 유전자에서 BP가 DNA topoisomerase II에 의한 DNA 절단에 미치는 영향

DNA topoisomerase II의 농도는 앞의 실험에서 50% 정도의 효소 활성을 보이는 40ng으로 고정하고, human c-myc유전자를 제한 효소인 XbaI로 잘라(그림 1,참조) γ -³²P-ATP로 5'-end에 표지하고 HindIII로 절단한 약 3.5kb의 DNA 절편에 BP의 농도(0.01,0.05,0.1,0.5 μ M)를 달리하여 주었을 때, DNA 절단이 0.5 μ M 농도에서는 억제되었으나(lane 6) 0.1 μ M까지 BP의 농도에 비례하여 증가하였고 특히 1.7kb근처에서 강한 절단 부위가 형성되었다.

고 찰

DNA topoisomerase II는 DNA의 절단 및 재결합에 관여하는 효소로서^{9,29)} 몇가지 항암제의 표적소로 작용하는 것으로 알려졌다. m-AMSA와 VM-26과 같은 항암제에 노출되면 효소와 DNA가 공유 결합을 이루어 안정화된다. 또 doxorubicin, m-AMSA, ellipticin과 mitoxantrone은 DNA intercalator로 알려져 있으며, VP-16, VM-26과 같은 epipodophyllotoxin은 nonintercalative 약물로서 DNA topoisomerase II의 재결합을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이들 약물에 의해 DNA topoisomerase II-DNA 복합체(DNA가 절단된 상태)^{3,6,15,26,27)}가 형성되어 안정화되는 것은 아마도 VP-16¹⁸⁾이나 m-AMSA^{17,22)}의 경우와 같이 DNA topoisomerase II에 의한 DNA 재결합이 방해되기 때문인 것으로 사료된다. 조 등⁷⁾은 발암물질인 BP가 DNA topoisomerase II에 특이하게 결합하는 사실을 밝혀내고 DNA topoisomerase II가 일차적 표적소가 될 것이라 하였다.

본 연구에서 mouse leukemia L1210에서 순수 정제한 DNA topoisomerase II를 사용하여 human c-myc DNA에 대한 이 효소의 작용이 BP에 의해 어떻게 변화 되는지를 연구 하였는데, c-myc 유전자를 제한효소 (HindIII/XbaI)로 잘랐을 때 BP의 농도가 0.1 μ M 이하에서는 절단 띠가 증가하나 그이상의 농도에서는 오히려 줄어드는 것을 볼 수 있었으며, 1.7Kb의 위치에서 절단이 가장 잘 일어났다(그림 4). 이와 같이 높은 농도의 BP에서 DNA topoisomerase II와 DNA의 결합이 억제되는 것은 BP와 DNA topoisomerase II의 상호작용으로 효소 자체에 영향을 주어 DNA와의 결합 친화성이 감소되는 것으로 보여진다. 이와 같은 결과는 anthracycline에 의해 유발된 cellular DNA 절단⁴⁾ 또는 acridine유도체^{19, 20, 24)}에 의한 DNA의 절단과 유사하였다. 또한 BP에 의해 1.7Kb의 위치에서 정상군에서 볼 수 없는 DNA 절단이 많이 일어났다. 이는 1.7kb의 위치가 BP 영향에서는 DNA topoisomerase II가 가장 예민하게 작용하는 부위임을 암시하며 몇가지 약물 연구에서 보고한 DNA 재결합의 억제만이 아니라 어떤 선택된 자리에서 DNA topoisomerase II-DNA의 강한 결합이 일어난다는 사실을 알수 있었다. 이 결합이 일어나는 부위는 exon I의 upstream에 위치한 P1 promoter 부위와 일치하는 것으로 판단되며, 약물에 따라 DNA topoisomerase II에 의한 DNA 절단 위치가 특수한 위치로 결정지어 지는 것으로 사료된다.

결 론

Mouse fibroblast C3H/10T1/2 세포 배양중에 BP를 투여한 후 분리한 DNA topoisomerase II

분획에서 고농도의 BP와 그의 대사산물이 특이한 결합으로 상호작용이 일어난다는 사실을 밝혀내고 이것이 BP에 의한 암을 일으키는 일차적인 표적소가 될 것이라고 최근에 본교실에서 예시한 바 있다. 본 연구에서는 단백질과 DNA의 cross linking이 비교적 쉽게 형성하는 mouse leukemia L1210 세포에서 DNA topoisomerase II를 정제하여 사람의 c-myc 원암유전자에서 BP에 의한 DNA topoisomerase II의 작용에 미치는 최적 조건에서의 유전자 변화를 관찰하였다. L1210 세포에서 정제한 DNA topoisomerase II의 농도가 160ng/ml 때 기질인 pBR322 DNA가 초나선형(supercoiled form)에서 이완형(relaxed form)으로 완전히 전환되었다. c-myc DNA를 여러 농도의 BP로 처리하였을 때 0.1 μ M의 BP 처리군에서 DNA 절단이 DNA topoisomerase II 단독 처리군에 비하여 훨씬 증가하였으며, 특히 exon 1의 upstream인 1.7kb 위치에서의 DNA 절단이 현저히 증가하였다.

이상의 결과는 BP가 DNA topoisomerase II에 의해 유도되는 DNA 절단을 선택된 자리에서 촉진시키며, 이와같이 어떤 특수한 위치에서의 DNA 절단의 증가가 비정상적인 유전자 발현을 유발시키는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 정인철, 조무연 : K-562 세포로부터 DNA topoisomerase II의 분리와 c-myc 원암유전자에서 절단위치의 동정. 고신대학교 의학부 논문집 9(2):1-11, 1993
2. Billings PC, Shuin T, Lillehang J, Miura T, Roy-Burman P & Landolph JR: Enhanced expression and state of the c-myc oncogene in chemically and x-ray transformed C3H/10T1/2 Cl 8 mouse embryo fibroblasts. Cancer Res 47:3643, 1987
3. Capranico G, Dasdia T & Zunino F: Comparison of doxorubicin-induced DNA damage in doxorubicin-sensitive and -resistance P388 murine leukemia cells. Int J Cancer 37:227, 1986
4. Capranico G, Zunino F, Kohn KW & Pommier Y: Sequence-selective topoisomerase II inhibition by anthracycline derivatives in SV40DNA: relationship with DNA binding affinity and cytotoxicity. Biochemistry 29: 562, 1990
5. Christman MF, Dietrich FS & 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, 1988
6. Chen GL, Yang L, Rowe TC, Holligan BD, Tewey KM & Liu LF: Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. J Biol Chem 259:13560, 1984
7. Cho MY, Jeong IC, Lee SJ, Jung IK & Rho J: DNA topoisomerase II as primary target of benzo(a)pyrene compounds. Kor J Biochem 24:27, 1992
8. Cote GJ, Lastra BA., Cook JR, Huang DP & Chin JF: Oncogene expression in rat hepatomas and during hepatocarcinogenesis. Cancer Lett 26:121, 1985
9. Gellert M: DNA topoisomerases. Ann Rev Biochem 50:879, 1981.
10. Hayashi K, Makino R, Sugimura T: Amplification and overexpression of the c-myc gene in morris hepatomas. Gann 75:475, 1984
11. Huber BE & Thorgeirsson SS: Analysis of c-myc expression in a human hepatoma cell line. Cancer Res 47:3414, 1987
12. Kelly K & Siebenlist U: The role of c-myc in the proliferation of normal and neoplastic

- cells. *J Clin Immunol*,5:65,1985
13. Land H, Parada LF & Weinberg RA: Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*. 304:596,1983
14. Maniatis T, Fritsch EF.& Sambrook J: Molecular cloning.Cold Spring Harbor, NY. 1982
15. Minford J, Pommier Y, Filipski J, Kohn KW, Kerrigan D, Mattern M, Micheals S, Schwarys R & Zwelliing LA: Isolation intercalator dependent protein linked DNA strand cleavage activity from cell nuclei and identification as topoisomerase II. *Biochemistry* 25;9,1986
16. Multon E, Riou JF, Lefevre D et al: Topoisomerase II-mediated DNA cleavage activity induced by ellipticines on the human tumor cell line N417. *Biochem Phar.* 38:2077,1989
17. Nelson EM, Tewey KM, Liu LF: Mechanism antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 9-acridiryl-amino)methanesulfonamaniside. *Proc.Natl.Sci.USA*, 81:1361, 1984
18. Osheroff N: Effect of antineoplastic agents onthe DNA cleavage/ religation reaction of the eukaryotic topoisomerase II:inhibition of DNA religation by etoposide. *Biochemistry*,28;6157,1989
19. Pommier Y, Covey JM, Kerrigan D, Mattes W, Markovits J & Khon KW: Role of DNA intercalation in the inhibition of purified mouse leukemia (L1210) DNA topoisomerase II by 9-aminoacridines. *Biochem Pharmacol* 36;3477,1987a
20. Pommier Y, Covey JM, Kerrigan D, Markovits J and Pham R: DNA unwinding and inhibition of mouse leukemia L1210 DNA topoisomerase I by intercalators. *Nucleic Acids Res* 15;6713,1987b
21. Pommier Y, Cockerill PN, Kohn KW : Identification within the simian virus 40 genome of a chromosomal loop attachment site that contains topoisomerase II cleavage sites. *J Virol* 64:419,1990
22. Robinson MJ,and Osheroff N: Stabilization of the topoisomerase II-DNA cleavage complex by antineoplastic drugs:inhibition of enzyme mediated DNA religation by 4'-(9-acridinylamino)methansulfon - m - aniside. *Biochemistry*. 29;2511,1990
23. Ross W, Rowe T, Glisson B, Yalowich J, Liu LF: Role of topoisomerase II in mediating epipodophyllotoxin induced DNA cleavage. *Cancer Res* 44:5857,1984
24. Rowe TC, Chen GL, Hsiang YH and Liu LF: DNA damage by antitumor acridines mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res* 44;2021,1986
25. Tashiro F, Morimura S, Hayashi K, Makino R, Kawamura H, Horikoshi N, Nemoto K, Ohtsubo K, Sugimura T & Ueno Y: Expression of the c-Ha-ras and c-myc genes in aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 138; 858,1986
26. Tewey KM, Chen GL, Nelson EM & Liu LF: Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 259;9182,1984
27. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD & Liu LF: Adriamycin induced DNA damage mediated by mammalian topoisomerase II. *Science (Wash.DC)* 226;466,1984
28. Thompson NL, Mead JE, Braun L, Goyette M, Shank PR & Fausto N: Sequential pro-

tooncogene expression during rat liver re-generation. Cancer Res.46;3111,1984

29. Wang JC: DNA topoisomerases. Ann Rev Biochem.54;665,1985

30. Zhang XK, Huang DP, Chiu DK & Chiu JF: The expression of oncogenes in human developing liver and hepatomas. Biochem. Biophys Res Commun. 142;932,1987

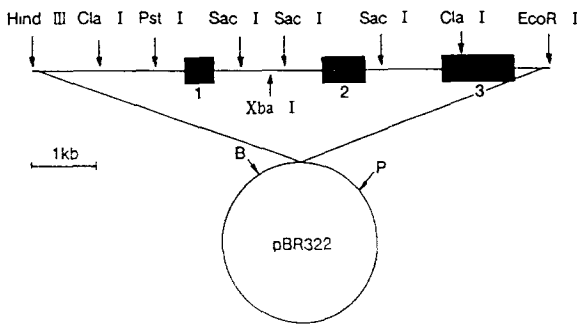


Fig. 1 Schematic representation of the restriction map of the human c-myc protooncogene(pHSRI)

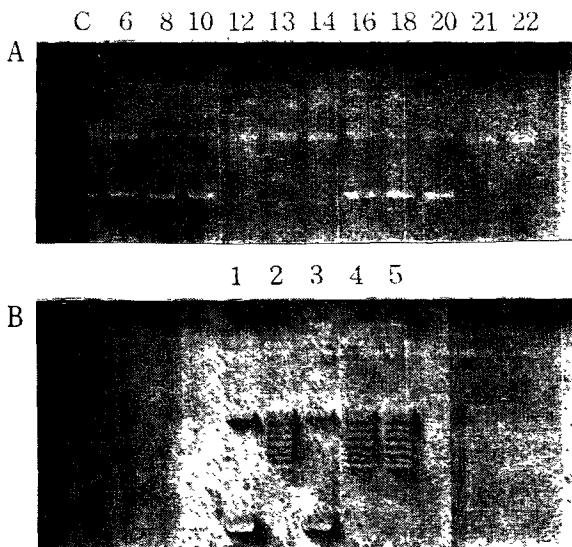


Fig. 2 Separation of DNA topoisomerase II by glycerol gradient centrifugation

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.13; lane 3, without ATP in No. 13; lane 4, with ATP in No. 22; lane 5, without ATP in No.22

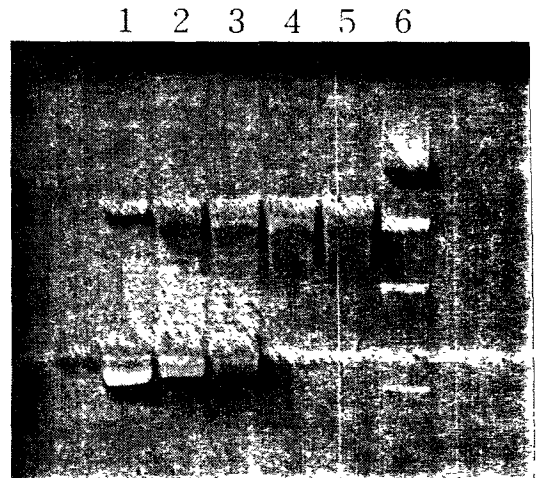


Fig. 3 Effect of various concentrations of DNA topoisomerase II on the relaxation activity

The relaxation activity was analyzed by the agarose gel assay described in "Materials and methods". Lane 1, 400 ng of pBR322 DNA; lane 2-5, lane 1+20ng, 40ng, 80ng or 160ng of DNA topoisomerase II; lane 6, λ DNA/HindIII

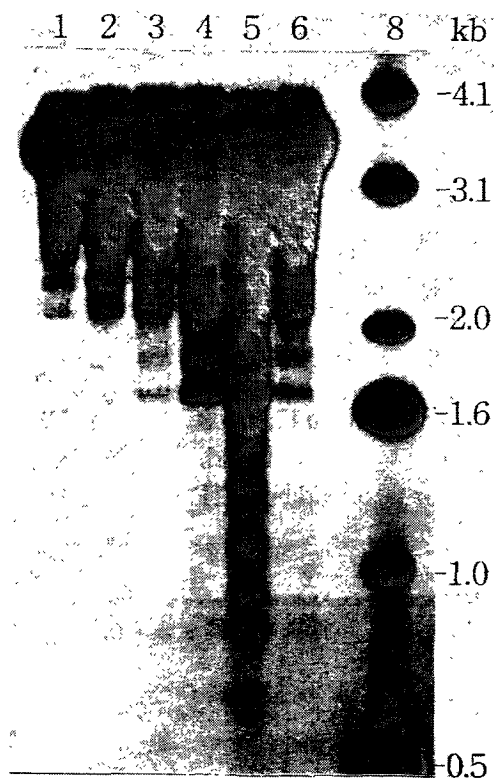


Fig. 4 Effect of various concentrations of BP on DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage

Various concentration of BP were added to the reaction mixture(20μl) containing 0.5μg of human c-myc/XbaI, HindIII DNA fragment and DNA topoisomerase II. XbaI/HindIII DNA fragment uniquely end labeled at the XbaI site was used. Lane 1, human c-myc/XbaI,HindIII fragment;lane 2, lane 1+ topoisomrase II(40ng);lane 3-6, lane 2 +0.01μM, 0.05μM, 0.1μM, or 0.5μM of BP;lane 8, 1kb ladder