약학회지 제 43 권 제 5 호 623~628(1999)
Yakhak Hoeji Vol. 43, No. 5

새로운 항암제 DA-125의 유전자 복제 억제 기작

이상광 · 김도진 · 오유택 · 이상득* · 우은란** · 신차균#
중앙대학교 생명공학과, *동아제약(주) 연구소, **조선대학교 약학대학
(Received August 17, 1999)

Inhibitory Mechanism of a New Antitumor Agent DA125 on DNA Replication

Sang Kwang Lee, Do Jin Kim, You-Take Oh, Sang Deuk Lee*, Eun-Rhan Woo** and Cha-Gyun Shin#
Department of Biotechnology, Chung-Ang University, Ansung, Kyungki 456-756, Korea
**Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co. Ltd, Yongin, Kyungki 449-900, Korea*
*** College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea*

Abstract — DA-125, a new antitumor agent, was compared with adriamycin, a known DNA intercalator, in terms of inhibitory mechanism of DNA replication by using replicating simian virus 40 (SV40) genome *in vivo*. In analyzing the SV40 DNA replication intermediates present in cells treated with DA-125, it was not observed to accumulate B-dimers of SV40 DNA which are prominent in adriamycin-treated cells. However, treatment with DA-125 induced dose-dependent formation of DNA-topoisomerase complex which is characteristic of topoisomerase poisons. In addition, DA-125 showed more efficient in inhibiting SV40 DNA replication than adriamycin. Therefore, on the basis of this observation, we suggest that DA-125, a derivative of adriamycin, inhibits DNA replication by blocking topoisomerase activity as a topoisomerase poison although adriamycin blocks topoisomerase activity as a DNA intercalator.

Keywords □ Topoisomerase, DA-125, adriamycin, SV40 DNA replication, poison.

Adriamycin은 anthracycline계의 대표적인 항암제로써, 전세계적으로 널리 사용되고 있으나, 장기 투약시 높은 심장독성을 나타내기 때문에 사용이 제한되고 있다.[1,2] Anthracycline계의 항암제는 대사과정에서 free radical을 형성시키며 이 free radical은 lipid peroxidation을 일으켜 심근손상을 유발하여 심장독성을 발생시킨다.[3] 최근에 adriamycin을 모체로 하여 개발된 DA-125는 adriamycin의 결점인 심장독성과 조혈기계 독성 등의 부작용이 훨씬 작은 것으로 알려지고 있다.[4] DA-125는 현재까지의 연구에 의하면 adriamycin보다 더욱 우수한 약효를 낼 뿐만 아니라 특징적 부작용이 적으며, 암세포주 및 일부 실험동물 악성종양에 대하여도 현저한 항암작용이 있다.[5] Anthracycline계 약물들의 이러한 항암효과는 약물이 DNA에 작용하여 유전자분열과 그에 따른 핵산합성 억제를 유발함으로써 나타난다. 특히, adriamycin은 유전자복제의 필수적인 topoisomerase의 작용을 방해하여 항암효과를 나타낸다.[6,7]

Topoisomerase는 같은 DNA를 서로 다른 형태로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소로서 type I과 type II로 분류할 수 있다.[8] Type I topoisomerase는 single strand DNA를 절단하고 다른 single strand DNA를 통과시켜 DNA 나선의 이완을 유도하여 DNA의 구조를 변화시킨다. Type II topoisomerase는 double strand DNA를 절단하여 double strand DNA를 통과시켜서 구조를 변화시킨다. Topoisomerase의 이러한 역할은 유전자의 복제 및 전사과정에 꼭 필요하다. 따

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0334-670-3067 (팩스) 0334-675-0409

라서, 거의 모든 세포에서 이 효소의 활성이 발견되며, 특히 종양세포들에서 이 효소의 활성이 높다. 이런 까닭에 topoisomerase를 목표로 하는 많은 항암제들이 개발되어있다.[9-11]

항암제로 작용하고 있는 항topoisomerase 약물들은 작용하는 기전에 따라 크게 2가지로 분류한다. 첫째, topoisomerase poison으로 camptothecin, VP16 (etoposide), VM26(teniposide) 등이 이 부류에 속하며, 이들 약물들은 topoisomerase가 DNA에 작용할 때 형성하는 반응의 중간체인 DNA-topoisomerase 복합체를 안정화시켜서 효소작용의 cycling 또는 turnover를 억제하여, 유전자의 복제를 차단한다.[9,11] 둘째, topoisomerase antagonist 또는 DNA intercalator로써 proflavine, 9-aminoacridine, ellipticine, adriamycin등은 DNA의 염기들 사이에 끼어들어 topoisomerase가 DNA에 접근하는 것을 억제하여 효소의 작용을 차단한다.[10,12,13]

본 연구는 DA-125의 항암작용의 기작을 이해하기 위하여, SV40 바이러스 DNA복제 과정에 DA-125와 adriamycin을 각기 투여하여, 이들 약물이 topoisomerase에 작용하여 바이러스 DNA 복제과정을 억제하는 형태를 비교하였다.

실험방법

시약 및 재료 – Camptothecin과 VP-16은 Sigma로부터 구입하였고, adriamycin과 DA-125는 동아제약에서 합성한 것을 사용하였다. Camptothecin, VP-16과 DA-125는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹이고, adriamycin은 증류수에 녹였다. 바이러스 DNA를 표식하기 위한 방사능으로는 [methyl-^{3}H]thymidine을 Amersham Pharmacia Biotech.에서 구입하여 사용하였다. 그외에 실험에 사용한 대부분의 시약들은 Sigma에서 구입하였다.

세포배양 및 바이러스 감염 – 바이러스 감염세포로는 원숭이의 신장세포 (CV-1)을 10% 송아지 혈청을 함유하는 MEM(Minimum Essential Medium) 배지에서 배양하였다. 바이러스 감염을 위한 실험은 먼저 35 mm의 petri dish에 CV-1 세포가 90% 정도 자랐을 때, 배지를 제거한 후, 인산완충용액으로 세척하고, SV40 바이러스(strain 777) 용액을 세포수의 10배 되는 농도(10 m.o.i.)로써, 37°C에서 1시간 동안 감염시킨다. 1시간 후 10% CS-MEM 배지를 넣고 36시간 배양 후 방사능으로 표식하였다.[7]

방사능 Labeling 및 약물처리 – 방사능으로 SV40 바이러스 DNA의 표식은 바이러스의 복제가 최고점에 이르는 감염 후 36시간될 때 실시하였다. 배양배지를 제거하고, 50 μCi/ml 농도의 [methyl-3H]thymidine을 함유하는 200 μl의 MEM 용액을 넣고, 30분간 37°C 배양기에 넣고 배양하여 표식하였다. 약물의 처리는 방사능을 투여한 후, 15분에 고농도의 약물을 10 μl(방사능용액 부피의 5%) 이하의 부피로 직접 방사능 용액에 투여하여 최종농도에서 각 실험에서 표시된 농도가 되도록 하였으며, 약물의 투여는 15분간 실시하였다.

Hirt Extraction 및 고분해능 전기영동 – 방사능용액을 제거하고 0.3 ml의 Hirt 용액(0.6% SDS, 10 mM TrisHCl, 10 mM EDTA, pH 7.5)을 첨가한 후, 실온에서 20분간 방치하며 천천히 흔들어 준다. 세포분해물질들을 소형원심분리용기에 옮긴 후 75 μl의 5 M NaCl을 넣고 잘 섞어주고 4°C에 12시간 방치한다. 12시간 이상 경과 후 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 바이러스 DNA를 포함하고 있는 Hirt 상등액을 새로운 용기에 옮겼다.[14] Hirt 상등액에 단백분해효소 (proteinase K)를 0.1 mg/ml 되게 넣고, 45°C에서 4시간 반응시키고, chloroform-isopropanol 용액으로 추출하였다. 에탄올 침전방법으로 모은 바이러스 DNA를 0.8% agarose gel에서 80 mM TrisHCl (pH 7.5), 5 mM sodium acetate, 1.0 mM sodium EDTA, 0.1% SDS 용액을 이용하여, 1.0 V/cm의 비율로 24~30시간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 20 g/liter의 농도로 2,5-diphenyloxazole(PPO)를 함유하는 초산용액에 10시간 담근 후, 물로 세척하고 건조한 후, X-ray 필름(Kodak X-Omat AR)을 넣고 감광하였다.[15]

Glass Filter Assay 및 통계처리 – SDS 존재하에서도 안정적으로 결합하는 단백질-DNA 복합체의 정량은 다음과 같은 원리에 의하여 실시하였다. 4 M guanidinium(GuHCl)과 같은 높은 농도의 염 용액에서는 단백질과 DNA가 정량적으로 glass filter(GF/C, Whatman)에 결합하나, 0.4 M GuHCl과 같은 낮은 농도의 염 용액에서는 오직 단백질만 glass filter에 결합한다. 이런 특성을 이용하여, 방사능(3H-thymidine)으로 표식된 DNA를 함유하는 Hirt 상등액을 glass filter를 통하여 통과시킬 때에 4 M GuHCl

용액에서는 모든 DNA가 filter에 결합하여 방사능으로 표식된 총 DNA의 양을 알 수 있고, 0.4 M GuHCl 용액에서는 오직 단백질만 결합하므로 단백질과 DNA-단백질 복합체가 filter에 결합하여 나타내는 방사능의 양을 4 M GuHCl을 사용하여 측정한 방사능에 대한 비율로써 표시하여 DNA-단백질 복합체의 양을 측정할 수 있다.[13]

본 연구에서는 Hirt 상등액에 존재하는 DNA-단백질 복합체의 양을 측정하기 위하여, 단백분해효소로 처리되지않은 Hirt 상등액 20 μl를 1 ml의 용액 A(0.4 *M GuHCl, 0.01 Tris pH 8.0, 0.01 M EDTA, 0.01%* sarcosyl, 0.3 M NaCl)에 넣고, 미리 0.4 M GuHCl로 적신 glass filter를 통과 시킨 후 5 ml의 용액 A와 5 ml의 95%의 에탄올로 순차적으로 세척한다. 세척된 fiter는 건조시킨 후, scintillation vial에 넣고, 5 ml의 cocktail(4 g PPO, 0.1 g POPOP, 1 *l* toluene)에 넣어서 liquid scintillation counter (LSC)에서 방사능 양을 측정하였다. 또한, Hirt 상등액에 존재하는 DNA의 양은 같은 Hirt 상등액 20 μl를 1 ml의 용액 B (4 M GuHCl, 0.01 Tris pH 8.0, 0.01 M EDTA, 0.01 % sarcosyl, 0.3 M NaCl)에 넣고, 미리 4 M GuHCl로 적신 glass filter를 통과시키고, 나머지 과정은 위에서와 같은 방법으로 실시하였다. 모든 실험의 결과는 mean±S.E.M.로 표시하였으며, 유의성 검정은 student's t-test에 의하여 $p<0.05$인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

전기영동에 의한 복제 중간체의 비교 – SV40 바이러스는 복제과정에서 포유동물세포의 복제기구를 대부분 사용하며, 바이러스 DNA가 포유세포의 histone에 감겨서 존재하고, 복제하는 까닭에 minichromosome이라 불리우며, 진핵세포의 복제 기작을 연구하는 모델로써 많이 사용되고 있다.[16] SV40 바이러스 DNA복제의 한 주기는 약 15~20분 정도로 30분간 방사능 ^{3}H-thymidine으로 표식할 때 복제되고 있는 바이러스 DNA를 잘 관찰할 수 있다. 특히, topoisomerase 억제제와 같은 약물의 특성을 파악하는 데에 있어서, 별다른 정제된 효소나 기질을 필요로 하지않고, 바이러스가 복제되고 있는 세포에 직접 약물을 투여하여 약물에 의하여 변형된 복제중간체들을 확인할 수 있는 장점이 있다.[15] 본 연구에서 adriamycin과 DA-125가 유전자 복제에 미치는 영향을 비교 조사하기 위하여, 먼저 SV40 바이러스가 복제되고 있는 CV-1세포에 각각의 약물을 처리하여 바이러스 DNA 복제중간체들의 형태를 조사하여 보았다(Fig. 1). 대조군으로 5%의 DMSO가 처리된 lane 1과 2에서는 정상적인 SV40 바이러스 DNA의 복제 형태로써, 복제가 끝난 form I DNA(supercoiled)와 form II(relaxed circle), 복제가 거의 끝나가는 late Cairns(LC) 구조가 선명하게 나타나있고, 복제되고있는 중간체들은 LC구조 밑에서 form *I DNA*까지 *smear*되어있는 형태를 보여주고 있다.[16,17] 또한, 100 μM adriamycin을 처리한 세포에서는 바이러스 DNA의 B-dimer가 상당히 축적되고 있음을 보여준다. 이러한 현상은 기존에 보고된 ellipticine, proflavine 또는 adriamycin을 처리한 경우

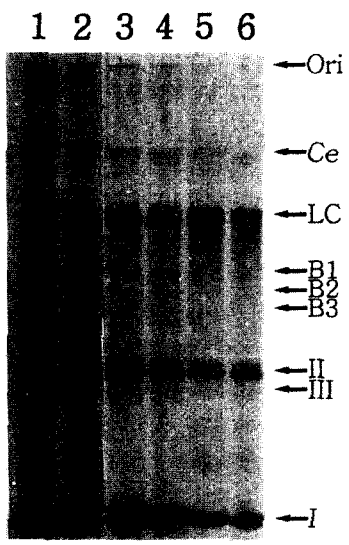

Fig. 1 – SV40 DNA replication intermediates after exposure of infected cells to adriamycin or DA-125. At 36 hr postinfection, infected cells were labeled with 50 μCi/ml [methyl-^{3}H]thymidine for 30 min. Drugs described below were added 15 min after the start of labeling, and then the viral DNA was extracted by the Hirt lysis method. Lanes: 1 and 2, control (5% DMSO); 3 and 4, 100 μM adriamycin; 5 and 6, 100 μM DA-125. Abbreviations: Ori, origin of electrophoresis; Ce, cellular DNA (mitochondrial DNA); LC, late Cairns structures; B1-B3, catenated dimers with one member of each dimer relaxed and the other super-helical; I, form I (superhelical) SV40 DNA monomer; II, form II (relaxed circle) SV40 DNA monomer; III, form III (linear) SV40 DNA monomer.

의 결과와 잘 일치하고 있다(lanes 3 and 4).[7,12] 그러나, adraimycin의 유도체로써 제작된 DA-125는 B-dimer를 거의 축적하지않고, 바이러스 DNA의 복제를 전반적으로 억제하고 있다(lanes 5 and 6). DA-125에 의하여 유도된 바이러스DNA 복제의 이러한 형태는 DA-125의 DNA 복제억제 기작은 모체인 adriamycin의 DNA 복제억제 기작과 다를 수 있음을 제시한다.

Topoisomerase가 DNA에 결합할 때에 다음과 같이 2단계로 결합한다.

$$\text{효소} + \text{DNA} \leftrightarrow \text{효소} \cdot \text{DNA}_{\text{noncov.}} \leftrightarrow \text{효소} \cdot \text{DNA}_{\text{cov.}}$$

Topoisomerase는 DNA에 일차적으로 비공유결합적으로 결합한다.[8,9] 이단계에서는 효소와 DNA는 주변의 조건에 따라서 쉽게 다시 떨어질 수 있다. Adriamycin, ellipticine, proflavine, acridine등의 DNA intercalator로 작용하는 많은 topoismerase 억제제들은 이반응에서 효소와 DNA가 떨어지는 쪽으로 평형을 이동시켜 topoi-somerase의 작용을 억제한다.[12,13] 비공유결합적으로 결합한 효소와 DNA의 복합체는 효소의 촉매작용의 일환으로 순간적으로 DNA 나선을 끊고 효소와 DNA사이에 공유결합으로 연결하고, 다른 DNA나선을 통과시켜 효소작용을 수행하고 다시 효소와 DNA가 분리된다.[8] 이과정에서 topoisomerase poison으로 알려진 VP16, VM26, camptothecin 등과 같은 약물들은 효소와 DNA의 공유결합 중간체의 존속시간을 길게함으로써 정상적인 효소의 작용을 방해한다.[11,18,19] 또한, m-AMSA와 같은 일부의 억제제들은 두가지 성격을 공유하여 두가지 방법으로 효소의 작용을 억제한다. 한편, topoisomerase poison에 의하여 많이 형성되는 효소와 DNA의 공유결합 중간체들은 다양한 방법에 의하여 정량할 수 있다.[9,13]

DNA-topoisomerase 복합체의 정량 – SV40 바이러스가 복제하고 있는 세포를 SDS로 용해시키면, 순간적으로 존재하고 있던 DNA-topoisomerase 공유결합 복합체는 효소와 DNA가 연결된 상태로 Hirt 용액속에 존재하게되고, 이복합체의 양은 filter assay[13]나 K-SDS precipitation 방법[9]으로 측정할 수 있다. SV40 바이러스 DNA 복제중간체 조사에서 모체인 adriamycin과 다른 결과를 보인 DA-125가 topoisomerase poison으로써 작용하는 지를 조사하기 위하여 filter assay를 통하여 DNA-topoisomerase 복합체의

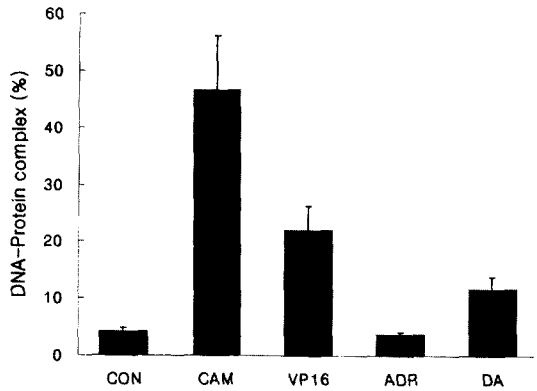

Fig. 2 – Filter binding assay for DNA-protein complexes induced by topoisomerase inhibitors. Infected cells were labeled for 30 min and treated with drugs indicated for 15 min before extraction. A 20 μl of Hirt extract supernatant was added to 1 ml of solution A or solution B, respectively, and then filtered through a GF/C glass filter. Labeled DNA retained on the filter was quantitated in LSC. Amounts of DNA-protein complexes are estimated as a ratio of amount of radioactivity measured in solution A to amount of radioactivity measured in solution B. CON, control (5% DMSO); CAM, 100 μM camptothecin; VP16, 250 μM VP16; ADR, 500 μM adriamycin; DA, 500 μM DA-125.

양을 측정하였다(Fig. 2). 대조군으로 5% DMSO가 처리된 바이러스 감염세포의 Hirt 상등액에서는 복제하고 있는 총 DNA중에 3.0%가 단백질에 결합된 DNA로 나타났고, 100 μM camptothecin, 250 μM VP16, 500 μM adriamycin로 각기 처리된 실험군에서는 46.3, 21.7, 3.4%로 각각 나타났다. 이결과는 topoisomerase poison인 camptothecin과 VP16을 처리한 세포에서는 복제하고있는 바이러스 DNA의 상당량이 topoisomerase와 연결되어 있음을 보여준다. 그러나, DNA intercalator로 알려진 adriamycin이 처리된 세포에서는 대조군과 같은 정도의 DNA-단백질 복합체가 측정되어, adriamycin은 DNA-topoisomerase 복합체를 잘 형성시키지 못함을 알 수 있다. 이러한 결과들은 기존에 발표된 결과[13]와 잘 일치하여 본 연구에 사용된 SV40 바이러스 복제 시스템과 DNA-단백질 복합체 정량을 위하여 사용된 filter assay가 잘 작용하고 있음을 보여준다. 또한, 500 μM DA-125가 처리된 경우에는 11.3%의 DNA-단백질 복합체가 측정되어 DA-125는 DNA intercalator로 작용하는 adriamycin과는 달리, 중간정도 세기의 topoisomerase

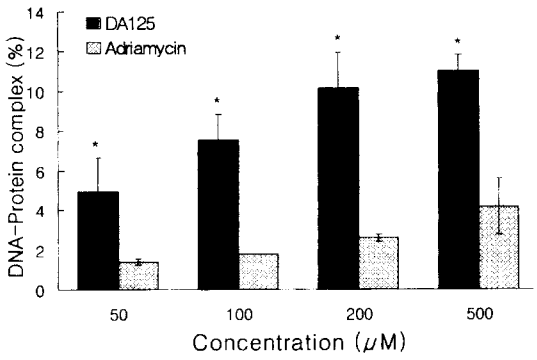

Fig. 3. – Dose-dependent formation of DNA-protein complexes induced by DA-125. Infected cells were treated with adriamycin or DA-125 at the concentrations indicated above. DNA-protein complexes were measured as described in Fig. 2. * Significantly different from adriamycin-treated group ($p<0.05$).

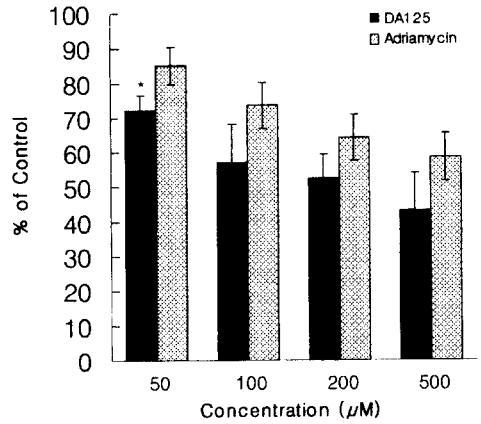

Fig. 4. – Inhibition of DNA replication by DA-125. Infected cells were labeded for 30 min and treated with adriamycin or DA-125. Amount of total replicating SV40 DNA was measured by filter assay using solution B. Amounts of total SV40 DNA replicating in the presence of drug were represented as a percentage of control group. * Significantly different from adriamycin-treated group ($p<0.05$).

poison으로 작용하고 있음을 보여준다. DA-125의 이러한 topoisomerase poison의 성격은 adriamycin과 DA-125를 각각의 여러 농도에서 DNA-단백질 복합체의 양을 비교 조사하여 보았을 때 더욱 더 명확하였다(Fig. 3). 50, 100, 200, 500 μM의 adriamycin으로 처리된 실험군에서는 DNA-단백질 복합체의 양이 약물의 농도에 따라 크게 증가하지 않았으나, 같은 농도의 DA-125가 처리된 실험군에서는 약물농도에 비례하여 크게 증가하는 양상을 보여주고 있다. 이런 결과는 DA-125가 일차적으로는 topoisomerase poison으로 작용하여 topoisomerase를 억제하고 있음을 보여준다. 그러나, 본 실험의 결과는 DA-125가 부분적으로 DNA intercalator로도 작용하여 topoisomerase를 억제할 수 있는 가능성을 전혀 배제하지는 못한다. 기존의 알려진 topoisomerase 억제제들도 약물의 성격에 따라 순수한 topoisomerase poison이나 DNA intercalator로 작용하는 약물들도 있으나, m-AMSA 와 같이 많은 약물이 두가지의 성격을 공유하여 topoisomerase를 억제하는 것으로 알려져 있다.[18] 따라서, DA-125의 이러한 가능성을 밝히기 위하여는 더 정밀한 연구를 필요로 한다.

DNA 복제의 억제 – 대부분의 암세포들은 DNA의 복제가 왕성하다. 이런 까닭에 기존에 개발된 많은 항암제들이 DNA 복제를 효과적으로 차단하는 약물들이다. Topoisomerase의 작용을 차단하는 것도 DNA의 복제를 억제하는 효과적인 방법의 하나이다. 이러한 측면에서 DA-125가 adriamycin에 비하여 어느정도로 DNA의 복제를 억제할 수 있는가를 복제하고있는 SV40 DNA 양을 측정하여 비교하여 보았다(Fig. 4). 각각의 약물을 50, 100, 200, 500 μM 되게 처리한 실험군들의 복제되고 있는 바이러스 DNA의 총량을 5% DMSO가 처리된 대조군에서의 바이러스 DNA의 총량의 비로써 비교하여 보았을 때, adriamycin의 경우, 84.9, 73.6, 64.2, 58.5%로 나타났고, DA-125는 각 농도에서 72.0, 56.9, 52.6, 43.1%로 각각 나타나, 같은 농도에서 DA-125가 adriamycin보다 12~17% 정도 더 DNA 복제 억제효과가 있음을 보여주고 있다. 이런 결과는 DA-125가 adriamycin보다 더 효과적으로 항암효과를 보이는 것에 대한 부분적인 설명이 될 수 있을 것이다.

결 론

1. DA-125는 모체인 adriamycin과는 달리 복제하고 있는 SV40 DNA 복제중간체에서 B-dimer의 축적을 유도하지 않으며, 전반적으로 복제중간체의 형성을 억제하고 있다.

2. Adriamycin은 DNA-단백질 복합체를 거의 형성하지 않으나, DA-125는 처리된 약물의농도에 비례하

여 상당량 형성하여, adriamycin이 DNA intercalator로써 topoisomerase를 억제하는 것과는 달리 topoisomerase poison으로 topoisomerase의 작용을 억제하여 DNA 복제를 차단한다.

3. DA-125의 DNA 복제억제 효능은 adriamycin에 비하여 12-17% 정도 더 강력하였다.

감사의 말씀

본연구는 1998학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것으로, 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Donehower, R. C., Meyers, C. E. and Chabner, B. A. : New developments on the mechanisms of action of antineoplastic drugs. *Life Sci.* **25**, 1 (1979).
2) Fantel, A. G., Greenway, J. C. and Juchan, M. R. : The embryotoxicity of adriamycin in rat embroys *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **80**, 155 (1985).
3) Myers, C. E., McGuire, W. P., Liss, R. H., Ifrim, I., Grotzinger, L. and Young, R. C. : Adriamycin; the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* **197**, 165 (1977).
4) Chung, M. G., Lee, S. B., Han, S. S. and Roh, J. K. : Reproductive toxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent: Peri- and postnatal study in rats. *J. Appl. Pharmacol.* **3**, 38 (1995).
5) Baik, N. G., Ahn, B. O., Lee, S. B., Kim, W. B., Yang, J. and Watanabe, T. : A study on car-diotoxicity of DA-125, a new anticancer antibiotic. *J. Appl. Pharmacol.* **1**, 9 (1993).
6) Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. D. and Liu, L. F. : Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* **226**, 466 (1984).
7) Snapka, R. M. : Topoisomerase inihbitors can selectively interfere with different stages of simain virus 40 DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 4221 (1986).
8) Wang, J. C. : DNA topoisomerase. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 351 (1985).
9) Liu, L. F. : DNA Topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 665 (1989).
10) Tewey, K. M., Chen, G. L., Nelson, E. M. and Liu, L. F. : Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* **259**, 9182 (1984).
11) Douc-Rasy, S., Kayser, A. and Riou, G. F. : Inihbition of the reactions catalyzed by a type topoisomerase and a catenating enzyme of *Trypanosoma cruzi* by DNA-intercalating drugs. *EMBO J.* **3**, 11 (1984).
12) Snapka, R. M. Powelson, M. A. and Strayer, J. M. : Swiveling and decatenation of replicating simian virus 40 geneome *in vivo*. *Mol. Cell Biol.* **8**, 515 (1988).
13) Shin, C.-G. Strayer, J. M., Wani, M. A. and Snapka, R. M. : Rapid evaluation of topoisomerase inhibitors: Caffeine inhibition of topoisomerases *in vivo*. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **10**, 41 (1990).
14) Hirt, B. : Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultires. *J. Mol. Biol.* **26**, 365 (1967).
15) Sundin, O. and Varshavsky, A. : Arrest of segregation leads to accumulation of highly interwined catenated dimers: Dissection of the final stages of SV40 DNA replication. *Cell* **21**, 103 (1980).
16) DePamphilis, M. L., Chalifour, L. E., Cherette, M. F., Cusick, M. E., Hay, R. T., Henderson, E. A., Pritchard, C. G., Tack, L. C., Wassarman, P. M., Weaver, D. T., Wirak, D. O. : Papovavirus chromosomes as a model for mammalian DNA replication. *In* Cozzarelli: NR: "Mechanisms of DNA replication and recombination." New York: Alan R. Liss, Inc., pp423-427 (1983).
17) Snapka, R. M., Permana, P. A., Marquit, G. and Shin, C.-G. : Two-dimensional agarose gel analysis of simian virus 40 DNA replication intermediates. Methods: *A companion to methods in enzymology* **3**, 73 (1991).
18) Shin, C.-G. and Snapka, R. M. : Patterns of strongly protein-associated simian virus 40 DNA replication intermediates resulting from exposures to specific topoisomerase poisons. *Biochemistry* **29**, 10934 (1990).
19) Shin, C.-G. and Snapka, R. M. : Exposure to camptothecin breaks leading and lagging strand simian virus 40 DNA replication forks. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**, 135 (1990).