

HL-60 사람 백혈병 세포에서 camptothecin이 DNA topoisomerase I과 c-myc의 발현에 미치는 영향

정인철* · 정대성 · 류경자¹ · 박장수¹ · 조무연

고신대학교 의학부 생화학교실
¹부산대학교 자연과학대학 화학과

Effects of camptothecin on the expression of DNA topoisomerase I and c-myc in HL-60 human leukemia cells

In-Cheol Jeong*, Dai-Sung Jung, Kyung-Ja Ryu¹, Jang Su Park¹ and Moo-Youn Cho

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

¹Department of Chemistry, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

Camptothecin (CPT) is an antitumor alkaloid that has been isolated from the Chinese tree, *Camptotheca acuminata*. The cytotoxicity of CPT has been correlated to its inhibition of DNA topoisomerase (Topo) I by stabilizing drug-enzyme-DNA "cleavable complex" resulting in DNA single-strand breaks and DNA-protein crosslinks. This studies were designed to elucidate whether CPT regulates Topo I and c-myc gene expression in HL-60 human leukemia cells and to investigate the activity of Topo I mediated by CPT in DNAs containing c-myc protooncogene. We have conducted experiments on Topo I purification, pUC-MYC I cloning and Topo I assay using electrophoresis, quantitative RT-PCR and Northern blotting techniques. CPT inhibited the relaxation activity of Topo I in pUC19 DNA at various concentrations (1-1000 μ M), while it enhanced the cleavage of Topo I in the pUC-MYC I by forming a cleavable complex at relatively high concentrations (100-1000 μ M). In HL-60 cells treated with CPT, the expression of c-myc gene was decreased over that in the control group with no changes in the expression of Topo I mRNA.

Our results suggest that Topo I is the target of CPT cytotoxicity but it does not affect Topo I expression, and the suppression of c-myc mRNA expression by CPT is due to c-myc damage resulted from formation of a cleavable complex with CPT.

Key words – DNA topoisomerase I, camptothecin, c-myc, HL-60 cells

서 론

종양유전자가 내외적 요인에 의해 점 돌연변이, 전위, 재

배열 혹은 삽입 등의 이상을 초래하면 이의 유전자 산물인 단백질의 과다생성으로 표적세포의 무분별한 증식이 일어나고 악성종양 세포로 될 수 있다. 이들 종양세포의 유전자 중 핵 암 유전자 중의 하나인 c-myc 유전자는 DNA복제 및 세포 분열시 G₀기에서 G₁기로의 진행과 세포분화에도 관여

*To whom all correspondence should be addressed
Tel. 051-240-6418, Fax: 051-241-5458, E-mail: jpf@ns.kosinmed.or.kr

함이 밝혀졌으며[10], c-myc RNA의 세포내 농도는 정상세포가 암세포로 변할 때 크게 변하며[11] 여러 종류의 종양에서 그 발현이 증가되어 있는 것이 밝혀졌다[3,8,25]. DNA topoisomerase (Topo)는 DNA 가닥의 절단과 재결합을 촉매하여 DNA의 topological 상태를 조절하는 효소로서 복제, 전사, 재조합과 유사분열 과정 등의 DNA 대사에 관여한다[2,16,20,21]. 또한 DNA와 Topo의 반응은 Topo가 DNA의 phosphodiester bond를 절단하고 Topo의 tyrosine기의 OH와 phosphodiester bond가 형성되어 효소와 DNA 사이에 공유결합한 "cleavable complex"를 이룬 후에 다시 끊어졌던 DNA 부위가 재 결합되는 특징을 가지고 있다. 따라서 Topo 억제제는 세포독성과 함께 DNA cleavable complex를 안정화시킴으로서 항암제의 표적효소일 것이라 하여 임상적으로 그 중요성이 점차 증가되고 있다. 현재까지 발견된 대표적인 Topo II 저해제는 adriamycin, mAMSA, VP-16과 VM-26등의 eukaryotic DNA Topo II 저해제와 novobiocin, nalidixic acid등의 bacterial gyrase 저해제 등이 있다. Topo I은 여러 조직과 세포, 미생물등에서 정제하여 그 정상과 생리적인 작용에 대해서는 구명되었으나 1960년대에 중국의 *Camptotheca acuminata*라는 나무에서 추출한 camptothecin (CPT)이 오로지 Topo I의 저해제로서 항암활성이 알려져 있으며[11] 현재 irinotecan등 CTP 유도체를 이용한 다양한 저해제의 개발과 임상적 응용에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 본 연구에서는 CPT가 c-myc 원암유전자를 가진 pUC-MYC DNA상에서 Topo I의 활성에 미치는 영향을 조사하고, HL-60 사람 백혈병 세포에서 c-myc과 Topo 유전자 발현에 어떻게 작용하는지 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

CPT는 Aldrich사에서, Sephacryl S-400, phenylmethane-sulfonyl fluoride (PMSF), Tris-HCl, formamide, dithiothreitol과 proteinase K는 Sigma회사로부터, DEAE-TrisAcryl, bovine serum albumin은 Pharmacia LKB사에서, α -³²P-dCTP, restriction enzyme, Hyperfilm-MP, Hybond N+와 Rediprime labeling kit는 Amersham사 제품을, agarose, fetal bovine serum, gentamicin과 RPMI 1640은 Gibco-BRL사에서 구입하였다. eukaryotic DNA와 plasmid DNA의 정제용 kit는 Promega에서, total RNA정제용 kit와 Taq DNA polymerase는 Bioneer (KOREA) 제품을, pUC19은 USB사에서, pHSRI은 연세의대에서 제공받았다. HL-60세포는 KCTC (KOREA)에서, K562 세포는 ATCC에서 분양 받았으며, 그 외의 일반적인 시약은 분석용을 구입하여 사용하였다.

pUC-MYC I DNA의 제조

pUC-MYC I DNA는 HL-60세포로부터 Eukaryotic DNA isolation kit를 사용하여 DNA를 정제하고 c-myc exon 1 sense primer (Table 1)와 polymerase chain reaction (PCR) premix-top (Bioneer 사)을 사용하여 PCR을 실시하였다. 반응온도는 1 단계는 95°C에서 5분간 변성시키고, 51°C에서 1분간 annealing한 후, 72°C 1분간 중합시키고, 2 단계에서는 95°C 1분, 51°C 1분, 72°C 1분씩 연속 60회 반응시켰고 3단계는 95°C 1분, 51°C 1분, 72°C 10분간 실시하여 c-myc exon I이 포함된 965bp의 DNA 절편을 합성하였다.

Table 1. The sequences of primer pair used in this study

name	primer set	sequences (5'→3')	product size
c-myc (exon 1)	sense	GTGAATTCATGCGGCTCT	965 bp
	antisense	CCAAGCTTGACAAGTCAC	
c-myc (exon 2)	sense	AAGAGGCGAACACACAACGT	218 bp
	antisense	AACIGTICTCGTTCGTTCCG	
topo I	sense	AAGCAGAGGAAGTAGCTACG	206 bp
	antisense	GTCATCTGTTCCGAGCTT	
β -actin	sense	GTGGGGCGCCCCAGGCACCAGGGC	540 bp
	antisense	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	

이 DNA와 pUC19 DNA를 각각 *EcoRI*과 *HindIII*를 처리한 후 DNA ligase로 pUC19 DNA에 합성한 DNA 절편을 삽입하여 만든 pUC-MYC I DNA를(Fig. 1) Sambrook등[15]의 방법에 따라 HB101세포에 넣어 증폭시켜 plasmid DNA 정제용 kit를 사용하여 정제한 후 다음 실험에 사용하였다.

K-562 세포에서 Topo I의 정제

10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640배지를 사용하여 배양한 사람 만성 백혈병 K-562 (ATCC CCL243) 세포를 Minford등[12]의 방법으로 핵 추출물을 얻은 후 40%-80%의 ammonium sulfate를 사용하여 분별 침전시키고 하룻밤 dialysis하여 탈염과 함께 nucleus 완충액으로 평형시킨 후 Sephacryl S-400 column chromatography와 DEAE- trisacryl column chromatography, glycerol gradient centrifugation하여 효소를 정제하였으며, Topo I의 이완(relaxation) 활성은 30 µg/ml의 bovine serum albumin이 포함된 반응 혼합액 (50 mM Tris-HCl: pH7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM EGTA) 20 µl에 400 ng의 pUC19 DNA와 정제한 K-562 Topo I 용액 (또는 효소 분획)을 2 µl 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액에 5 µl의 5% SDS, 25% Ficoll 400과 0.25 mg bromophenol blue/ml의 혼합액을 넣어 반응을 정지시켰으며, 반응생성물은 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.

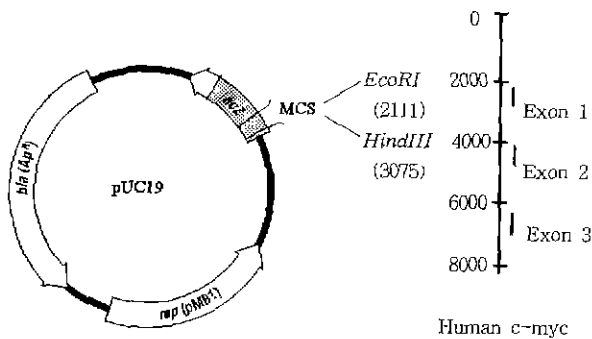


Fig. 1. Construction of a recombinant c-myc vector, pUC-MYC I. c-myc DNA was inserted into multicloning site (*EcoRI*-*HindIII*) of pUC19 plasmid.

pUC19과 pUC-MYC I DNA에 CPT를 투여했을 때 Topo I 활성도

앞의 Topo I 활성도 측정용 반응혼합액에 CPT를 1, 10, 100, 1000 µM의 농도로 각각 넣고 이완 활성 측정 방법에 따라 분석하였는데 agarose gel상에 우선 EtBr를 첨가한 경우와 전기영동 후 EtBr 염색을 한 경우를 비교 확인하였으며 선형(linear) DNA에 대한 Topo I의 절단효과를 확인하기 위하여 pUC-MYC DNA를 *HindIII*로 절단한 선형 DNA를 기질로 하여 앞의 효소 반응 혼합액에 CPT를 농도별 가한 후 이완 활성측정 방법에 따라 반응시키고 5 µl의 5% SDS를 넣어 반응을 정지하고 proteinase K (0.5 mg/ml)를 첨가하여 37°C에서 추가로 60분간 더 반응시켰다. 반응 후 phenol/chloroform을 동량 가하여 섞은 후 12,000xg에서 원심 분리하여 흰 중간층의 단백질이 포함되지 않게 상층액을 회수하여 여기에 1/10 부피의 3 M sodium acetate (pH 5.2)를 넣고 보조 침전제(pellet paint; Novagen사) 2 µl와 2.5x의 ethanol을 가하여 잘 섞고 -70°C에서 30분간 방치한 후 원심분리 (12,000xg)하여 상층액을 버리고 침전물을 건조시켜 증류수 18 µl씩 각각 가하여 녹이고 1 µl는 PCR 분석에 사용하고 나머지는 10x Nuclease S1 완충액 2 µl와 Nuclease S1 1 µl (2units)씩 가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 시료에 3 µl의 전개 완충액 (0.3% bromophenol blue, 16% Ficoll, 0.01M Na₂HPO₄)을 가하여 이를 1.2% agarose gel상에서 전기영동하고 절단 형태를 비교하였다. 그리고 nuclease S1을 처리하지 않은 시료 1 µl에 c-myc exon 1 sense primer를 가하여 앞의 PCR 조건에 따라 증폭한 후 위의 nuclease S1 반응액과 함께 1.2% agarose gel상에 전기영동 (2 V/cm)하여 절단 형태를 비교 분석하였다.

CPT를 투여한 HL-60세포의 핵 추출물에서 ATP에 의한 Topo I 활성의 변화

세포에서 CPT가 Topo I 활성에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 HL-60세포에 CPT를 세군 (0, 0.05 µM, 0.4 µM)으로 나누어 투여하고 48시간 후에 앞의 방법에 따라 핵 추출물을 얻어 ATP 첨가군과 첨가하지 않은 군에서 Topo I 활성을 측정하였다. 또한 세포에 들어간 약물의 유무를 확인하기 위하여 각 군의 핵 추출물을 370 nm의 excitation 파장으로 고정하고 emission파장에서 scan하였다.

RT-PCR법에 의한 c-myc과 Topo I의 mRNA 정량 total RNA purification kit를 사용하여 CPT를 투여한 HL-60세포로부터 RNA를 정제하고 MLV reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 합성한 후 Wong등[22]의 primer-dropping 방법을 이용하여 cDNA와 c-myc exon 2 또는 Topo I primer 1조 (Table 1 참조)를 첨가하여 PCR을 7 cycle 진행한 후 β -actin primer 1조 (Table 1 참조)를 추가하여 17 cycle 진행시켰다. PCR 반응온도는 1 단계는 95 °C에서 5분간 변성시키고, 57°C에서 1분간 annealing한 후, 72 °C 1분간 중합시키고, 2 단계에서는 95°C 1분, 57°C 1분, 72 °C 1분 씩 c-myc과 Topo I은 23 cycle, β -actin은 17 cycle씩 반응시킨 후 1.2% agarose gel상에 4 V/cm로 전기 영동하여 c-myc과 Topo I의 mRNA양을 비교 분석하였다.

Northern blot hybridization에 의한 Topo I 유전자 발현 분석

HL-60세포에서 CPT 투여에 의해 Topo I과 c-myc 유전자의 발현이 조절되는지 확인하기 위하여 세포로부터 정제한 총 RNA 20 μ g을 1% formaldehyde-agarose gel상에 4 V/cm로 전기영동하고 TransVac (Hoefer Co.)에서 20X SSC 용액을 사용하여 nylon membrane (Hybond N+)에 이동시켰으며, nylon membrane을 실온에서 충분히 말린 후 80°C에서 고정하여 hybridization을 실시하였다. hybridization에 필요한 probe는 Topo I primer 또는 c-myc exon 2 primer 1조(Table 1 참조)를 사용하여 각각 HL-60 세포에서 정제한 DNA와 pHSRI DNA를 기질로 하여 Topo I과 c-myc 유전자 절편을 PCR법으로 합성하였다. 반응온도는 1 단계는 95°C에서 5분간 변성시키고, 57°C에서 1분간 annealing한 후, 72°C 1분간 중합시키고, 2 단계에서는 95 °C 1분, 57°C 1분, 72°C 1분 씩 연속 30회 반응시켰고 3 단계는 95°C 1분, 57°C 1분, 72°C 10분간 실시하여 증폭한 후 전기영동하여 PCR 산물을 전기용출 방법으로 분리하였고 α -³²P-dCTP를 Rediprime labeling kit (Amersham Co.)로 표지시켜 probe로 사용하였다. hybridization은 42 °C에서 2시간 hybridization 용액 (50% formamide, 0.5% SDS, 6xSSC, 0.05xBLOTTO)으로 prehybridization한 후 probe를 포함한 hybridization 용액에 넣어 24시간 동안 42 °C에서 hybridize하였고 Hyperfilm MP (Amersham)를 사용하여 autoradiography하였다.

결 과

pUC19 plasmid vector에 삽입한 c-myc 유전자의 동정

Topo I의 기질로 사용할 c-myc exon 1 유전자 (2111-3075)가 포함된 c-myc DNA 절편은 HL-60세포에서 분리한 DNA를 주형으로 하여 PCR기법으로 합성하였고, pUC19 plasmid vector에 삽입시켜 만든 pUC-MYC I DNA의 동정 결과는 Fig. 2와 같다. pUC-MYC I DNA를 *EcoRI*과 *HindIII*로 처리하였을때 pUC19 DNA와 PCR product의 DNA 크기가 일치하였고 c-myc 유전자가 삽입된 vector가 제조되었다.

CPT가 Topo I의 활성에 미치는 영향

pUC19 DNA를 기질로 사용하여 CPT에 의한 Topo I의 활성 변화를 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 반응 후 eth-

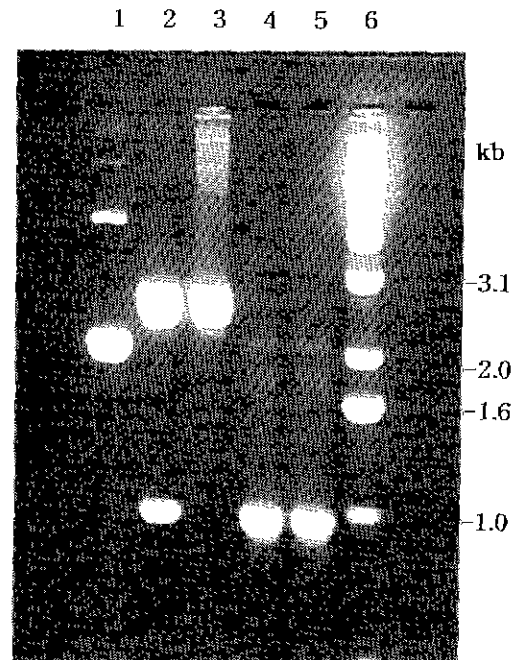


Fig. 2. Identification of pUC-MYC I DNA.

The experiments were performed as described in "Materials and Methods". Lane 1: pUC-MYC I plasmid DNA, lane 2: lane 1 with *EcoRI* and *HindIII* treatment, lane 3: pUC19 DNA with *EcoRI* treatment, lane 4: PCR product (c-myc from HL-60), lane 5: PCR product (c-myc from pHSRI), lane 6: 1kb DNA ladder

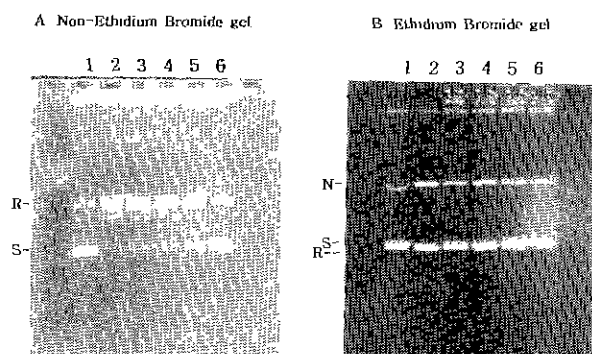


Fig. 3. Effect of CPT on the relaxation activity of Topo I. The relaxation activity was analyzed by the agarose gel assay described in "Materials and Methods". The gel mobilities for the different DNA forms are indicated for each gel, where form S is supercoiled, form R is relaxed circular, form N is nicked circles. Each lane was used 500ng of pUC19 DNA. Lane 1: pUC19 DNA only, lane 2: lane 1+Topo I (80 ng), lane 3, 4, 5, 6: lane 2+1,10,100,1000 μ M CPT, respectively

idium bromide가 포함되어 있지 않은 gel (A)과 ethidium bromide가 들어있는 gel (B)상에서의 전기영동 양상을 조사하였는데 CPT의 농도(1, 10, 100, 1000 μ M)에 따라 이완(relaxation) 활성이 억제되었으며(3A) 이때 CPT에 의해 절단(nick)이 일어남을 확인할 수 있었다(3B). 또한 합성한 pUC-MYC I DNA를 *HindIII*로 절단한 DNA 절편을 기질로 사용하여 Topo I의 절단에 CPT의 작용 효과를 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 효소반응 후에 각각 SDS와 proteinase K를 처리하고 nuclease S1 반응으로 nick된 DNA를 절단시켜 전기영동을 실시하였는데 역시 CPT 농도(1, 10, 100, 1000 μ M)에 따라 Topo I 단독 처리시보다 cleavage를 증가시켰다(4A). 반응후의 생성물 미량(1 μ l)을 sense primer (c-myc exon 1)를 첨가하여 PCR기법을 실시한 결과는 CPT에 의해 DNA cleavable complex를 형성한 band가 뚜렷하게 나타났다(4B).

CPT를 투여한 HL-60세포의 Topo I 활성에 미치는 영향 세포 (HL60)에서 약물에 의한 Topo의 활성 변화를 보기 위해서 CPT를 투여한 세포의 핵 추출물을 얻어 pUC19 DNA를 기질로 사용하여 효소활성을 측정하였다. Fig. 5의 lane 2-4는 ATP를 첨가하였고 lane 5-7은 ATP를 넣지 않고 반응시켜 전기 영동한 결과, lane 5-7 ATP 첨가하지 않

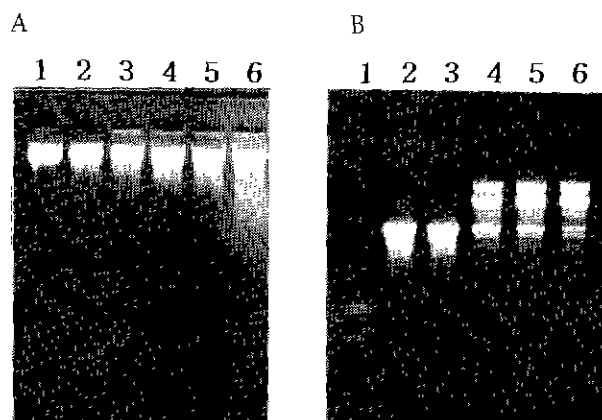


Fig. 4. Comparison of linear pUC-MYC I DNA cleavage pattern induced by CPT.

In panel A, Topo I mediated DNA cleavage assay in combination with S1 nuclease digestion was done under the conditions. Lane 1: pUC-MYC I/*HindIII* alone, lane 2: lane 1+Topo I/S1 nuclease, lane 3-6: lane 2+1,10,100,1000 μ M CPT, respectively. They were analyzed by 1.2% agarose gel electrophoresis followed by Et-Br staining. In panel B, analysis of CPT-induced cleavage sites aligned by PCR reactions (60 cycle) using the specific sense primer after Topo I/proteinase K reaction. Lane 1: DNA ladder marker, lane 2: PCR product for pUC-MYC I/*HindIII*+Topo I/proteinase K reaction, lane 3-5: PCR product of pUC-MYC/*HindIII*+Topo I+CPT (10, 100, 1000 μ M, respectively) proteinase K reaction.

은 군이 lane 2-4의 ATP 첨가군에 비해 Topo의 활성이 더욱 억제되어 CPT 투여에 따라 Topo I의 활성이 억제됨을 확인할 수 있었다. 또한 효소 활성 측정에 사용한 핵 추출물내의 CPT 존재 유무를 확인하기 위해 약물 투여한 HL-60세포의 핵 추출물을 분석한 결과, 투여된 CPT 농도에 비례하여 증가된 전형적인 CPT 띠(Em. 435 nm)를 형광 spectrophotometer로 확인하였다(Fig. 6).

CPT가 Topo I 유전자와 c-myc 유전자 발현에 미치는 영향

CPT를 HL-60세포에 투여시 Topo I을 생성하는 유전자와 c-myc 유전자의 발현에 어떻게 작용하는지 관찰하기 위하여 RT-PCR기법으로 Topo I과 c-myc mRNA 농도를 비교 분석한 결과(Fig. 7), Topo I mRNA의 발현에는 변화가 없었다(lane5-7). 그러나 c-myc mRNA 발현에는 차이가 있었다(lane1-3). 같은 방법으로 총 RNA를 분리하여 전기 영동한 후 nylon지에 옮겨 32 P로 표지한 probe를 사용하여

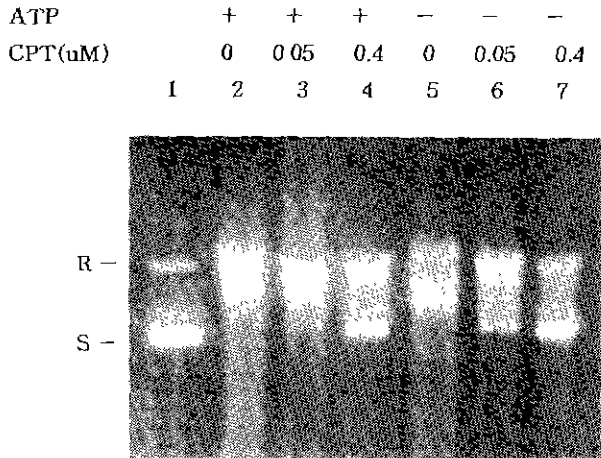


Fig. 5. Topo activity of nuclear extract from HL-60 cells treated with CPT. Lane 1: pUC19 DNA (400 ng) only, lane 2: lane 1+topo II reaction buffer (with 1 mM ATP)+nuclear extract, lane 3, 4: lane 2+0.05, 0.4 μ M CPT, respectively, lane 5: lane 1+topo I reaction buffer (without ATP), lane 6, 7: lane 5+0.05, 0.4 μ M CPT, respectively. Extraction of nuclear extract was performed as described in "Materials and Methods". After 30 min incubation at 37°C, the reaction mixture was subjected to 0.8% agarose gel electrophoresis followed by Et-Br staining.

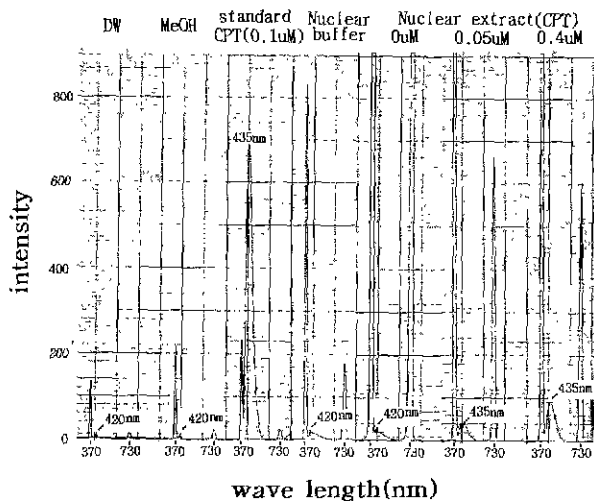


Fig. 6. Fluorescence emission spectra of nuclear extract from HL-60 cells treated with CPT. The position of the excitation is 370 nm. The experiments were performed as described in "Materials and Methods".

hybridize한 경우, Topo I 유전자의 발현에는 약물의 농도

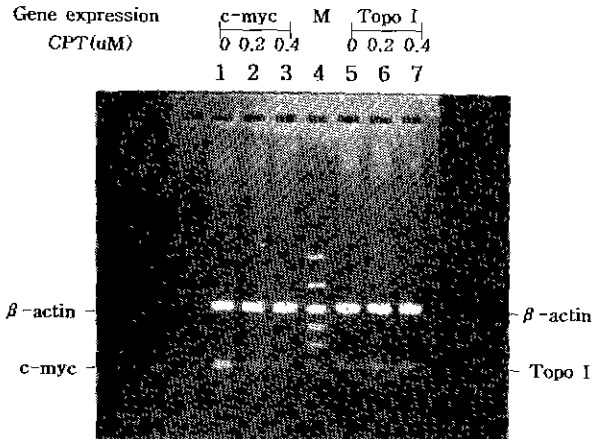


Fig. 7. Quantitation of the c-myc and Topo I mRNA by RT-PCR in HL-60 cells treated with CPT. The mRNA is extracted from the cells using mRNA isolation kit. Determination of mRNA expression by polymerase chain reactions by the primer-dropping method described in "Materials and Methods". Ethidium bromide staining of PCR products separated in 1.2% agarose gel. Lane 1: control, lane 2,3: effects on c-myc expression of treatment with 0.2 μ M, 0.4 μ M CPT, respectively, lane 4: DNA ladder MW marker, lane 5: control, lane 6,7: effects on Topo I expression of treatment with 0.2 μ M, 0.4 μ M CPT, respectively.

에 상관없이 일정하였으나 반면, c-myc 유전자 발현에서는 CPT의 농도에 따라 감소 현상을 나타내었다(Fig. 8).

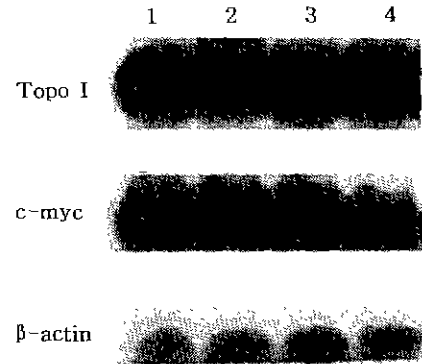


Fig. 8. Northern blot analysis of Topo I and c-myc RNA in HL-60 cells treated with CPT. 20 μ g of total RNAs were electrophoresed in denaturing agarose gel, transfer to nitrocellulose membrane, hybridized to 32 P-labeled probe. Northern blot analysis was performed as described in "Materials and Methods". Lane 1: control RNA, lane 2: CPT (0.1 μ M), lane 3: CPT (0.2 μ M), lane 4: CPT (0.4 μ M).

고 찰

Topo는 그 측매 방법에 따라 type I Topo와 type II Topo로 크게 두 그룹으로 나뉜다. 전자는 helix DNA의 한 가닥을 절단하고 상대편 DNA가닥을 통과시키고 절단부분을 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. 현재까지 발견된 항암 활성을 나타내는 Topo의 저해제중 Topo II에 대한 저해제는 많이 있으나 Topo I의 저해제로는 *Camptotheca acuminata*에서 추출한 CPT만이 알려져 있으며 그외의 저해제를 발견하기 위하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 본 연구에서는 HL-60 사람 백혈병 세포에서 CPT가 Topo I의 발현과 cleavable complex에 미치는 영향을 구명하기 위하여 Topo I 효소를 K-562세포에서 정제한 후 Topo I에 의한 이완 활성과 선형 pUC-MYC I DNA의 절단에 CPT가 미치는 영향을 nuclease S1 처리와 ethidium bromide를 사용하여 실행하였는데 100 μ M-1000 μ M 첨가시 DNA cleavable complex를 안정화시키는 것을 확인하였으며(Fig. 3B) Yaashita등[23,24]의 실험 결과와 같은 양상을 보여주었다. 그리고 γ -³²P로 DNA 절편의 5' 말단을 표지하여 CPT에 의해 cleavable complex를 안정화하는 것을 확인한 연구 보고가 있는 데[14,6,7] 본 실험에서는 동위원소의 사용을 배제하고 sense primer만 사용한 PCR 기법으로 cleavage site를 확인 할 수 있었다(Fig. 4). CPT를 처리한 HL-60세포에서 분리한 핵 추출물에서 Topo I의 효소 활성을 측정하였을 때 정상군에 비해 현저히 억제되어 있었고 반응액에 ATP를 첨가하지 않은 군이 첨가하였을 경우보다 현저한 억제 현상을 나타내었다(Fig. 5). 또한 핵 추출물을 형광 spectrophotometer로 분석한 결과 CPT 처리군에서 상당량 검출되는 것으로 보아(Fig. 6) 검출된 약물에 의해 Topo I의 활성이 억제된 것으로 추정되며, 1999년 Pu 등[14]이 melphalan (alkylator)을 HL-60세포에 투여하여 내성을 가진 세포주에서 Topo II α 의 활성은 증가한다고 하였으나 Topo II β 와 Topo I의 활성에는 아무 변화가 없는 것을 확인한 바 있는데 CPT의 경우에는 Topo II에는 영향을 미치지 않음을 간접적으로 확인할 수 있었다. RT-PCR기법에

의한 mRNA 분석기법은 1989년 이후부터 여러 편 소개된 바 있는데[5,18,19,22] 본 실험에서도 competitive RT-PCR 법과 Northern blot을 기초로한 정량적 분석법으로 Topo I과 c-myc 유전자의 발현을 확인하였다. HL60 세포에서 Topo I 유전자의 발현은 RT-PCR 그리고 Northern blot후 hybridization 방법 모두 약물의 농도와는 상관없이 같은 양상을 나타내었는데(Fig. 7, 8), Perego등[13]이 여러 type의 사람 세포주에서 CPT에 의한 Topo I 유전자 발현을 조사한 결과와 같았다. 앞의 핵 추출물의 Topo I 활성 실험에서 활성이 약물에 의해 억제되는 점으로 미루어 볼 때 CPT가 Topo I의 기능에는 영향을 나타내지만 효소 발현의 조절에는 아무 영향을 주지 못하는 것으로 여겨진다. 반면 CPT를 처리한 군에서 c-myc 유전자 발현이 억제되었는데 Northern blot 분석에서도 비슷한 양상을 나타내었다. 이와 같은 결과는 Jain등[9]이 MCF-7 사람 유방암 세포에서 c-myc 유전자 발현을 억제한다고 한 것과 일치하였다. 이와 같은 결과로 볼 때 Topo I은 CPT 세포독성의 표적은 되지만 Topo I의 발현은 조절하지 않으며, CPT가 c-myc DNA의 cleavable complex를 유도하여 c-myc 유전자 발현을 억제하는 것으로 여겨지며 Topo I은 특히 선택적 약물에만 작용하여 독특한 특이성을 가지고 cleavable complex를 유도하는 것으로 보이나 이에 대해서는 앞으로 구명하여야 할 과제로 사료된다.

요 약

Camptothecin (CPT)은 중국의 *Camptotheca acuminata*라는 나무에서 추출된 alkaloid로 항암성을 가진다. CPT의 세포독성은 DNA topoisomerase (Topo) I의 억제와 관련되며, 이 효소에 의한 DNA의 한 가닥이 절단되고 DNA-단백질이 crosslink될 때 CPT-효소-DNA "cleavable complex"를 안정화시켜 Topo I을 억제한다. 본 연구에서는 CPT가 c-myc 원암유전자를 가진 pUC-MYC I DNA상에서 Topo I의 활성에 미치는 영향을 관찰하고 CPT가 HL-60 사람 백혈병 세포에서 c-myc 유전자와 Topo I 유전자 발현에 어떻게 관여하는지 구명하고자 본 연구를 실행하였다. 연구 수행 방법은 Topo I의 정제, pUC-MYC I DNA cloning, Topo I assay, electrophoresis, 형광분석, 정량적 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)분석과

Northern blot을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. pUC19 DNA에서 Topo I에 의한 이완 활성(relaxation activity)은 CPT의 다양한 농도(1-1000 μ M)에 비례하여 억제되었으며, 100-1000 μ M 첨가시 Topo I과 DNA의 cleavable complex 형성을 유도하였다.

2. CPT를 처리한 HL-60세포에서 분리한 핵 추출물에서의 Topo I 활성은 정상군에 비하여 강하게 억제되었다.

3. HL-60세포에서 CPT에 의한 c-myc 유전자 발현은 억제되었으나 Topo I 유전자 발현에는 아무런 영향이 없었다.

이상의 결과는 Topo I은 CPT 세포독성의 표적은 되지만 Topo I의 발현은 조절하지 않으며, CPT가 c-myc DNA의 cleavable complex를 유도하여 c-myc 유전자 발현을 억제하는 것으로 여겨진다.

참 고 문 헌

- Bailly, C., J. F. Riou, P. Colson, C. Houssier, E. R. Pereira and M. Prudhomme. 1997. DNA cleavage by topoisomerase I in the presence of indolocarbazole derivatives of rebeccamycin. *Biochemistry* **36**, 3917-3929.
- Christman, M. F., F. S. Dietrich and G. R. Frink. 1988. Mitotic recombination in the rRNA of *S.cerevisiae* is suppressed by the combined action of Topo I and II. *Cell* **55**, 413-425.
- Cote, G. J., B. A. Lastra, J. R. Cook, D. P. Huang and J. F. Chin. 1985. Oncogene expression in rat hepatomas and during hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* **26**, 121-127.
- Fujii, N., Y. Yamashita, T. Mizukami and H. Nakano. 1997. Correlation between the formation of cleavable complex with topoisomerase I and growth-inhibitory activity for saintopin-type antibiotics. *Mol. Pharmacol.* **51**, 269-276.
- Gilliland, G., S. Perrin, K. Blanchard and H. F. Bunn. 1990. Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2725-2729.
- Hsiang, Y. H., R. Hertzberg, S. Hecht and L. F. Liu. 1985. Camptothecin induced protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **260**(27), 14873-14878.
- Hsiang, Y. H., L. F. Liu, M. E. Wall, M. C. Wani, A. W. Nicholas, G. Manikumar, S. Kirschenbaum, R. Silber and M. Potmesil. 1989. DNA topoisomerase I-mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogues. *Cancer Res.* **49**, 4385-4389.
- Huber, B. E. and S. S. Thorgeirsson. 1987. Analysis of c-myc expression in a human hepatoma cell line. *Cancer Res.* **47**, 3414-3420.
- Jain, P. T., F. A. Fornari, J. K. Randolph, M. S. Orr and D. A. Gewirtz. 1998. Induction of DNA damage, inhibition of DNA synthesis, and suppression of c-myc expression by the topoisomerase I inhibitor, camptothecin, in MCF-7 human breast tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* **55**(8), 1263-1269.
- Kelly, K. and U. Siebenlist. 1985. The role of c-myc in the proliferation of normal and neoplastic cells. *J. Clin. Immunol.* **5**, 65-77.
- Lehmann, A. R. 1987. The cell cycle, DNA replication, and repair. *International Review of Cytology* **17**, 710.
- Minford, J., Y. Pommier, J. Filipinski, K. W. Kohn, D. Kerrigan, M. Mattern, S. Micheals, R. Schwarzy and L. A. Zwelling. 1986. Isolation intercalator dependent protein linked DNA strand cleavage activity from cell nuclei and identification as topoisomerase II. *Biochemistry* **25**, 9-16.
- Perego, P., G. Capranico, R. Supino and F. Zuino. 1994. Topoisomerase I gene expression and cell sensitivity to camptothecin in human cell lines of different tumor types. *Anti-cancer Drugs* **5**(6), 645-649.
- Pu, Q. Q. and W. R. Bezwoda. 1999. Induction of alkylator (melphalan) resistance in HL-60 cells is accompanied by increased levels of topoisomerase II. *Mol. Pharmacol.* **56**(1), 147-153.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning*. pp. 1.53-1.84, 2nd eds., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schomburg, U. and F. Grosse. 1986. Purification and characterization of DNA topoisomerase II from calf thymus associated with polypeptides of 175 and 150kDa. *Eur. J. Biochem.* **160**, 451-457.
- Wall, M. E., M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail and G. A. Sim. 1966. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor. *J. American Chemical Society* **88**(16), 3888-3890.
- Wang, A. M., M. V. Doyle and D. F. Mark. 1989. Quantitation of mRNA by the polymerase chain

- reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9717-9721.
19. Wang, J., J. Medeiros, D. L. Longo, A. Mansoor, M. Raffeld, P. L. Duffey, E. S. Jaffe and M. S. Stevenson. 1996. Use of the polymerase chain reaction technique to determine c-myc expression in follicular center cell lymphoma. *Diagnostic Mol. Pathol.* **5(1)**, 20-25.
 20. Wang, J. C. 1985. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **54**, 665-697.
 21. Wang, J. C. 1987. Recent studies of DNA topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta* **909**, 1-9.
 22. Wong, H., W. D. Anderson, T. Cheng and K. T. Riabowol. 1994. Monitoring mRNA Expression by polymerase chain reaction: The "primer-dropping" method. *Anal. Biochem.* **223**, 251-258.
 23. Yamashita, Y., N. Fujii, C. Murakata, T. Ashizawa, M. Okabe and H. Nakano. 1992. Induction of mammalian DNA topoisomerase I mediated DNA cleavage by antitumor indolocarbazole derivatives. *Biochemistry* **31**, 12069-12075.
 24. Yamashita, Y., S. Z. Kawada, N. Fujii and H. Nakano. 1991. Induction of mammalian DNA topoisomerase I and II mediated DNA cleavage by saintopin, a new antitumor agent from fungus. *Biochemistry* **30**, 5838-5845.
 25. Zhang, X. K., D. P. Huang, D. K. Chiu and J. F. Chiu. 1987. The expression of oncogenes in human developing liver and hepatomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142(3)**, 932-938.