



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

**Liver X Receptor  $\beta$ 의 전사활성 조절인자  
Topoisomerase II $\alpha$ 의  
functional subdomain 분석**

**Analysis of the functional subdomain of topoisomerase II $\alpha$   
as a coactivator of Liver X receptor  $\beta$**

울 산 대 학 교 대 학 원  
의 과 학 과  
류 현 경

**Liver X Receptor  $\beta$  의 전사활성 조절인자  
Topoisomerase II $\alpha$  의 functional subdomain  
분석**

지도교수 김승환

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함  
2024년 7월

울산대학교 대학원  
의과학과  
류현경

류현경의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원	김 영 훈	인
심사위원	김 승 환	인
심사위원	김 소 원	인

울 산 대 학 교 대 학 원

2024 년 7 월

## 초록

Liver X Receptor (LXR)은 핵수용체 중 하나로 생체 내 지질대사를 유전자 발현을 통해 조절하는 역할을 한다. LXR은 역콜레스테롤 수송에 관여하는 ABCA1, ABCG1의 transcription을 조절하기 때문에 동맥경화의 좋은 치료 표적이 되기도 하지만, 지질합성을 조절하는 SREBP-1의 transcription에도 영향을 주고 있기 때문에 지방간 생성을 일으키는 원인이기도 하다. 선행연구에서 Topoisomerase II $\alpha$ 가 LXR의 isoform 중 하나인 LXR $\beta$ 와 interaction을 하여 transcription을 조절하는 전사조절인자 기능을 가지고 있다는 것을 확인하였다. 게다가 Topoisomerase II $\alpha$ 는 LXR $\beta$ 의 전사조절인자로서 ABCA1, ABCG1의 transcription에는 영향을 주지만 SREBP-1c의 transcription에는 영향을 주지 않는다는 것을 확인하였다.

Topoisomerase II는 두 가지 isoform인 Topoisomerase II $\alpha$  (TOP2A)와 Topoisomerase II $\beta$  (TOP2B)를 가지고 있고, 두 isoform은 79%의 homology를 보인다. isoform인 TOP2B도 LXR $\beta$ 의 전사활성에 영향을 주는지 확인하고자 luciferase promoter assay를 진행하였고, 이 때 LXR $\beta$ 의 활성이 TOP2B에 의해서는 증가하지 않음을 확인하였다. 이는 isoform 간의 높은 homology에도 불구하고 TOP2A만이 LXR $\beta$ 의 특이적인 coactivator function을 가지는 것을 의미한다. 또한 본 연구실에서 TOP2A의 248-692 amino acid 부분 (TOP2A-II)만으로도 LXR $\beta$ 의 coactivator로서 기능한다는 것을 확인한 바 있기에, 그 부분과 상응하는 TOP2B의 homology를 비교하여 TOP2B의 269-713 amino acid 부분 (TOP2B-II) fragment를 제작하였다. 두 fragment의 전사조절인자로서 활성을 확인하고자 luciferase promoter assay를 통해 promoter activity를 측정하였다. TOP2A-II 부분과의 91%의 높은 homology에도 불구하고 TOP2B full length와 마찬가지로 TOP2B-II에 의한 증가가 보이지 않았으며, LXR $\beta$ 와의 interaction에

있어서도 TOP2A-II와 차이를 보였다. 매우 비슷한 부분의 fragment에서도 전사조절인자로서의 기능적 차이를 보였기 때문에 두 fragment에서의 차이점을 찾고자, TOP2A-II와 TOP2B-II의 secondary structure을 비교하였다. 그 중 가장 크게 달랐던 부분인 TOP2A의 611-656 amino acid가 functional subdomain 부분 일 것으로 예상하여 그 부분을 TOP2B-II와 상응하는 TOP2B의 632-677 amino acid와 바꾼 mutant를 제작하였고, luciferase promoter assay 및 GST pull down assay를 통해 예상했던 부분이 TOP2A의 coactivator function에 관여하는 부분의 일부분임을 확인했다. TOP2A의 coactivator functional subdomain을 구체화하기 위해, 예상했던 부분 포함한 secondary structure 상  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet 크기에 차이를 보였던 전체 부분을 바꾼 mutant (TOP2A-II mt L, TOP2B-II mt L)를 제작하였고, luciferase promoter assay를 통해 TOP2B-II mt L이 TOP2A의 coactivator function을 획득하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 TOP2A 575-682 amino acid 부분이 LXR $\beta$ 의 전사조절인자로서 기능하는 중요한 부분으로 생각된다.

# 목차

초록	i
목차	iii
그림 목차	iv
서론	1
연구 방법	5
결과	10
고찰	23
참고문헌	27
Abstract	29

## 그림 목차

Figure 1. Activation of LXR $\beta$ -mediated transcription by TOP2A.....	1 2
Figure 2. Coactivator function of TOP2A-II through protein-protein interaction with LXR $\beta$ .....	1 4
Figure 3. The expected subdomain of hTOP2A and its function.....	1 8
Figure 4. The structure and function of the part that was expected to be functional subdomain of hTOP2A.....	2 1

## 서론

Liver X receptor (LXR)은 nuclear receptor family 중 하나이며, 초반에는 natural ligand가 확인되지 않아 orphan nuclear receptor로 분류되었으나, 이후 oxysterol이 LXR의 natural ligand임이 확인되었다 (1). LXR은 type II receptor로 Retinoid X receptor (RXR)와 heterodimer를 형성하여 전사활성을 억제하며, 이때 corepressor와 함께 결합하여 target 유전자의 transcription을 억제한다. LXR의 전사활성은 ligand의 유무에 따라 달라지게 되는데, ligand가 ligand binding domain에 결합하게 되면 conformational change가 일어나게 되어 corepressor가 떨어져 나가게 된다. 그리고 나서 coactivator와 결합하게 되며, 이때 coactivator와 결합함으로써 target 유전자의 transcription을 증가시키게 된다 (2, 3).

모든 세포의 정상적인 기능에는 콜레스테롤이 필수적으로 필요하지만, 그 양이 과도하게 많아지게 되면 세포독성을 띄게 된다. 콜레스테롤이 축적되면 대식세포와 vascular smooth muscle cells (VSMC)에 foam cell을 형성하고 나아가 죽상동맥경화증을 유발한다 (18). 콜레스테롤이 몸에 쌓이는 것을 막고자 역콜레스테롤 수송 (reverse cholesterol transport, RCT)을 통해 세포 내의 콜레스테롤을 간에서 담즙으로 전환하여 배출하게 되는데, 이때 대식세포는 ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1)을 통해 역콜레스테롤 수송과정에 관여한다 (6,7,9,10). ABCA1은 transmembrane protein으로 간과 장, 뇌, 대식세포에서 많이 발현되며 nascent high-density lipoprotein (nHDL) particle을 생성하기 위해 free cholesterol (FC)과 phospholipid를 세포에서 apolipoprotein A-I (apoA-I)으로

운반하는 역할을 한다 (18,19). 이를 통해 대식세포 내의 cholesterol 축적을 막는 역할을 한다. 또한 ABCG1은 주로 대식세포에서 발현되며 nHDL를 HDL로 형성하기 위해 지속적인 FC efflux를 촉진한다 (18,19,20). 이를 통해 최종적으로 ABCA1과 ABCG1은 콜레스테롤을 간으로 이동시켜 콜레스테롤을 담즙으로 전환하여 배출하는데 중요한 역할을 한다 (18,19,20). 이때 ABCA1, ABCG1의 transcription을 조절하는 것이 LXR이다. LXR은 세포 내 콜레스테롤 농도 증가에 반응하는 콜레스테롤 센서 역할을 하며, 콜레스테롤 과부하로부터 세포를 보호하기 위해 콜레스테롤 흡수, 운반, 유출, 배설 및 담즙산으로의 전환과 관련된 유전자 transcription을 유도한다 (4,5). LXR에 의한 ABCA1, ABCG1의 발현 증가를 통해 RCT 과정이 진행되면 혈관 내 콜레스테롤이 제거되며 (7), 이것은 동맥경화의 좋은 치료 전략으로 여겨지고 있다 (8). 그러나 LXR은 지질합성을 촉진시키는 유전인자 Sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1의 transcription에도 영향을 주고 있다 (11,12). SREBP는 콜레스테롤과 지방산 합성을 위한 지질합성 전사인자로 알려져 있으며, basic helix-loop-helix leucine zipper superfamily에 속한다. 이러한 SREBP의 isoform 중 하나인 SREBP-1c는 중성지방 합성 및 지방산과 관련된 유전자를 조절하는 역할을 한다 (15). LXR이 활성화되면 SREBP-1c의 발현 또한 증가하기 때문에 지방간 (steatosis)이 발생한다는 보고가 있다 (11,13,14). 따라서, LXR의 활성화는 역콜레스테롤 수송을 활성화시킬 뿐만 아니라 지질합성을 촉진시켜 지방간 생성을 유도하기 때문에 LXR의 activation은 동맥경화의 target이 되기도 하지만, 지방간 생성을 일으키는 원인이 되기도 한다.

본 연구실의 선행연구에서 topoisomerase II $\alpha$  (TOP2A)가 DNA의 topology 고유의 기능 외에도 LXR $\beta$ 에 특이적인 coactivator function을 가지는 것을

발견하게 되었다. 게다가 TOP2A가 역콜레스테롤 수송에 관여하는 ABCA1, ABCG1의 expression은 증가시키고, 지질합성을 촉진하는 SREBP1c의 expression에는 영향을 주지 않는 것과 TOP2A의 특정한 domain 부분 (TOP2A 258-692A.A, TOP2A-II)만으로도 TOP2A 전체 domain과 같은 function을 가지고 있는 것을 확인했다 (16).

Topoisomerase는 진핵세포 내에서 DNA topology 단계를 조절하는 중요한 효소다. Topoisomerase에는 작용 기전에 따라 type I, type 2로 나뉘는데, Topoisomerase I은 DNA 이중 가닥 중 한 가닥을, Topoisomerase II (TOP2)는 DNA 이중 가닥 모두를 절단한 후 ATP를 사용하여 다시 절단 부위를 결합한다는 특징이 있다. 이러한 Topoisomerase는 DNA 복제, 전사, 유전자 재조합과 같은 DNA 합성 과정에서 많은 관여를 한다 (17). 이러한 특징을 가진 TOP2의 isoform인 TOP2A가 기존의 DNA topology를 조절하는 역할이 아닌 LXR $\beta$ 의 coactivator로서 작용한다는 것이 선행연구에서 확인되었다 (16).

Nuclear receptor가 여러 유전자들을 조절할 때, coactivator는 nuclear receptor가 특정 유전자를 발현하는 데 도움을 주는 역할을 한다 (21). Nuclear receptor가 agonist에 의해 activation 되면 발현시키고자 하는 유전자 뿐만 아니라 nuclear receptor가 조절하는 모든 유전자가 발현되기 때문에, nuclear receptor만을 표적으로 하는 치료는 다른 질병을 초래할 수도 있다. 그렇기 때문에 nuclear receptor의 이점을 최대화하려면 coactivator에 통하여 target 하는 유전자를 조절하거나, 발현시키고자 하는 유전자를 제외한 다른 유전자를 억제하는 것이 필요하다 (22). 앞서 말했듯이 LXR의 activation은 동맥경화를 치료할 수 있지만, 동시에 지방간을 생성하기 때문에 LXR이 ABCA1, ABCG1의 transcription에만 영향을 줄 수 있게 하여 동맥경화 치료의 방법으로 활용하는

것이 중요하다.

또한 선행연구에서 TOP2A의 domain 중 특정 부분이 LXR $\beta$ 의 specific 한 coactivator로 기능한다는 것을 확인하였다. 그러나 아직까지 TOP2A의 coactivator function이 TOP2B와의 어떠한 구조적 차이에 기인한 것인지에 대해 확인된 바가 없다. 게다가 선행연구에서는 human TOP2B가 아닌 rat TOP2B와 비교했기 때문에, 같은 species에서 TOP2A만이 coactivator로 function을 하는지에 대해서도 확인되지 않았다. 따라서, 같은 species에서 TOP2A와 TOP2B의 functional domain을 비교 분석 및 coactivator function을 확인함으로써 최종적으로 두 isoform 간의 구조적, 기능적 차이를 규명하고자 하였다.

## 연구 방법

### 재료

세포 배양에 사용한 DMEM (12800-017)배지와 Transfection시 사용한 Opti-MEM (22600-050)는 Gibco (Crand island, NY)제품을 사용하였다. Transfection시 사용한 lipofectamine 2000 (11668-027), lipofectamine 3000 (L3000001)은 Invitrogen (Grand Island, NY)제품을 사용하였다. Dimethyl sulfoxide, DMSO (D8418)과 T0901317 (T2320)은 Sigma (St. Louis, MO)제품을 사용하였고, 9 cis-retinoic acid (GR-101-0025)는 Biomol (Plymouth Meeting, PA)제품을 사용하였다. DNA construct 제작 시 사용한 제한효소 *Apa* I , *Bam*H I , *Eco*R V는 NEB (Beverly, MA)제품을 사용하였다. 그리고 luciferase reporter assay시 사용한 luciferin (E-1602)는 Promega (Madison, WI USA)제품을 사용하였다.  $\beta$ -galactosidase assay에 사용한 ONPG (N1127)는 sigma (St. Louis, MO)제품을 사용하였다. 그리고 luciferase reporter assay 시 luciferase activity를 측정할 때 사용한 기기는 luminometer cetro LB960이며, Berthold (Oak Ridge, US)사의 제품이다. 또한  $\beta$ -galactosidase assay 시 흡광도 측정할 때 사용한 기기는 Microplate spectrophotometer (Epoch)이며 BioTek (Winooski, VT)사 제품이다.

### TOP2A와 TOP2B homology 비교

National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록된 human TOP2A와 human TOP2B 단백질의 1차 구조 정보를 가지고, NCBI에서 제공하는 Basic Local Alignment Search Tool

(BLAST) 프로그램을 이용하여 두 isoform 간의 homology를 비교하였다.

### **Secondary structure 비교**

Protein Data Base sum (PDBsum, <https://www.ebi.ac.uk>)에 등록되어 있는 human TOP2A와 human TOP2B의 데이터 기준으로 제작된 Sequence Annotated by Structure (SAS) 데이터를 이용하여 두 isoform의 secondary structure를 확인하였다. 이후 두 isoform 간의 homology를 비교할 때 사용하였던 NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 두 isoform의 상응하는 위치를 확인하였고, 이것을 기준으로 secondary structure를 나열하여 비교 분석하였다.

### **Cell culture**

TOP2B full length DNA를 확보하기 위해서 ad293 cell을 사용하였고, luciferase assay 실험을 진행하기 위해 293T cell을 사용하였다. 모든 cell은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidity를 유지하며 배양하였다. 그리고 DMEM (10% FBS, 1% Penicillin-streptomycin) 배지에 배양하였다. 모든 cell은 80% confluency를 유지하였으며, 이틀 혹은 삼일 후 80% confluency가 되었을 때 새로운 cell plate로 seeding하여 배양하였다.

### **Construct 제작**

Luciferase assay 및 GST-pull down assay에 필요한 DNA construct를 제작하기 위해 pcDNA3.0 vector에 human TOP2B fragment II (TOP2B-II), human TOP2A

fragment II mutant (TOP2A-II mt), human TOP2B fragment II mutant (TOP2B-II mt), human TOP2A fragment II mutant long form (TOP2A-II mt L), human TOP2B fragment II mutant long form (TOP2B-II mt L)을 cloning 하였다. TOP2B-II는 human TOP2B를 template로 이용하기 위해, 먼저 ad293 cell에서 cDNA를 합성하여 TOP2B full length를 확보하였다. pcDNA3.0-hTOP2B를 제작 후 Xenotech (Daejeon, KR)사의 shotgun sequencing 방법을 통해 Topoisomerase II $\alpha$  sequence에 mutation이 없는 것을 확인하였고, 그리고 나서 promoter assay와 GST-pull down assay 실험에 사용하였다. 이 후 TOP2B full length construct를 가지고 TOP2B-II fragment를 제작하였다. 마찬가지로 TOP2B-II도 mutation이 없는 것을 shotgun sequencing 방법을 통해 확인 후 promoter assay 및 GST pull down assay 실험에 사용하였다. TOP2A-II mt, TOP2B-II mt, TOP2A-II mt L, TOP2B-II mt L는 pcDNA3.0-hTOP2A-II, pcDNA3.0-hTOP2B-II를 template로 하여 mutant를 주고자 하는 sequence을 기준으로 앞쪽 fragment, mutant 줄 부분 fragment, 뒤쪽 fragment, 총 3개의 fragment를 제작하였다. 그리고 나서 TOP2A와 TOP2B에 상응하는 mutant 줄 부분을 서로 바꿔서 construct를 제작하였고, 이후 앞선 방법들과 동일한 방법으로 sequence 확인을 통해 원하는 mutant가 만들어진 것을 확인한 후 promoter assay와 GST pull down assay 실험에 사용하였다.

### **Luciferase reporter assay 및 $\beta$ -galactosidase assay**

LXRE, ABCA1, ABCG1 promoter activity를 측정하기 위해 각각의 promoter 유전자에 luciferase 유전자를 부착시킨 DNA construct를 이용하여 luciferase promoter assay를 진행하였다. Reporter로는 pGL3-mABCA1 (-781/+130), pGL3-hABCG1 (-530/+37), pGL3-3xLXRE, 3가지를 사용하였다. 또한 DMEM (10%

charcoal stripped FBS, antibiotics 제외) 배지를 이용하여 세포를 96well에 plating 하였고, well당 80% confluency일 때 실험을 진행하였다. Lipofectamine 2000 (11668-027) 또는 lipofectamine 3000을 이용하여 제조사에서 제공하는 protocol에 따라 transfection을 진행하였다. Transfection 18시간 후 기존의 배지에 DMSO 혹은 T0901317, 9cis-retinoic acid를 각각 1 $\mu$ M로 처리하였다. 18시간 후에 기존의 배지를 제거하고 lysis buffer 100 $\mu$ l에 lysis 하였다. 그 중 10 $\mu$ l는 luciferase assay에 사용하였고, 50 $\mu$ l는  $\beta$ -galactosidase assay에 사용하였다. Luciferase reporter assay는 luciferase assay buffer 100 $\mu$ l를 첨가한 후 1초 동안의 값을 luminometer로 측정하였고,  $\beta$ -galactosidase assay는 2x  $\beta$ -galactosidase buffer와 mix 한 후 37°C에서 5min동안 반응시킨 후, 420nm에서 multiplate reader로 측정하였다. Luciferase의 활성을  $\beta$ -galactosidase assay 값으로 나누어 normalization하였다. 최소 3회 반복한 데이터를 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Version 25) 통계 프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석 (One-Way ANOVA)으로 통계 처리하였다.

### **GST-pull down assay**

LXR $\beta$ 와 TOP2A, TOP2B의 직접적인 interaction을 확인하기 위해 GST가 tagging된 hLXR $\beta$  protein을 사용하여 GST-pull down assay를 진행하였다. 먼저 GST fusion protein의 conformational change를 유도하기 위해 binding buffer (0.2mM EDTA, 1mM DTT, 0.3mM PMSF, protease inhibitor cocktail 1x (Roche, ii697498001)에 10 $\mu$ M T0901317를 함께 넣고 4°C에서 incubation하였다. 그리고 in vitro transcription-translation (IVT)을 TNT T7 kit (Promega, L1170)를 이용해

제작사의 protocol에 따라 IVT를 진행하였다. 그리고 나서 conformational change된 GST-hLXR $\beta$  protein에 IVT로 제작된 TOP2A-II, TOP2B-II, TOP2A-II mt protein 각각을 넣어주어 binding 하였다. 이 후 기존의 buffer를 제거한 뒤 2xSDS sample loading buffer를 넣고, 98°C에서 boiling 하였다. 그리고 나서 SDS-PAGE를 통하여 분리하였고, gel을 건조하여 X-ray 필름에 3일간 노출시킨 후 현상하였다. IVT 진행했을 때 발현된 protein을 기준으로 LXR $\beta$ 와의 interaction을 확인하고자 input을 기준으로 비교하기 위해 3회 진행한 데이터 모두 Image J (<https://imagej.net>) 프로그램을 통하여 정량 하고자 하는 밴드를 수치화 하여 측정하였다. 이후 SPSS 프로그램을 통해 통계처리 하였다.

## 통계분석

GST-pull down assay 실험은 독립적으로 3회 반복하였고, promoter assay 실험은 최소 3회에서 최대 8회 반복하였다. 모든 실험 결과에 대한 오차막대는 표준오차로 표시하였다. 통계적 유의성은 t-test 또는 one-way ANOVA를 사용하여 평가하였고 사후분석은 LSD (Fisher's Least significant difference)로 진행하였다. 또한  $p < 0.05$  값의 차이는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## 결과

### hTOP2A와 hTOP2B의 LXR $\beta$ 의 coactivator로서의 function 비교

LXR $\beta$ 의 coactivator인 hTOP2A와 isoform인 hTOP2B의 homology를 비교하기 위해 protein BLAST를 진행하였다 (Figure 1A). 그 결과 hTOP2A full length와 hTOP2B full length의 protein primary structure에서 79%의 homology를 보였다. 이후 hTOP2A의 LXR $\beta$ 의 coactivator로서의 function이 hTOP2B에서도 보이는지 확인하기 위해 luciferase reporter assay를 진행하였다.

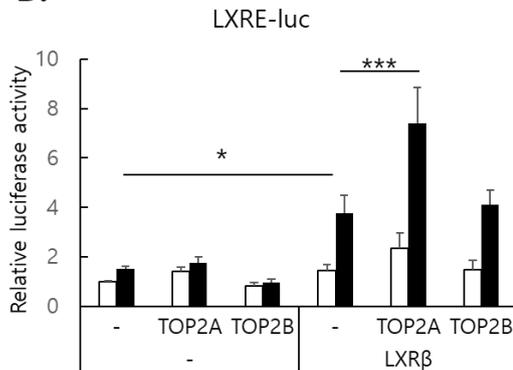
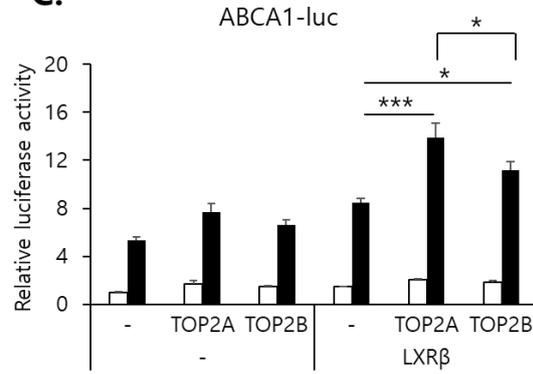
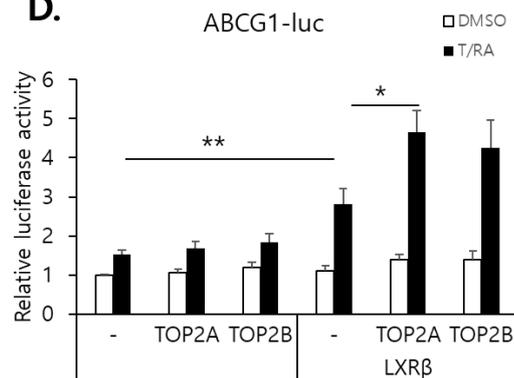
먼저 hTOP2A 또는 hTOP2B를 HEK 293T 세포 내에서 과발현시키기 위해서는 hTOP2B full length를 가진 plasmid가 필요했기 때문에 hTOP2B의 cDNA를 ad293 cell에서 합성하여, pcDNA3.0-HA-hTOP2B를 제작하였다. pcDNA3.0-HA-hTOP2A는 선행연구에서 사용한 plasmid DNA를 사용하였다 (16). HEK 293T 세포에 LXRE (LXR binding element)가 있는 promoter인 LXRE, mABCA1, hABCG을 pcDNA3.0-hLXR $\beta$ 와 pcDNA3.0-HA-hTOP2A 또는 pcDNA3.0-HA-hTOP2B를 함께 transfection 하였고, 이후 hLXR $\beta$ 를 활성화시키기 위해 1 $\mu$ M T1317 ligand를 처리하였다. 그리고 18 시간 후에 HEK 293T 세포를 lysis 하여 luciferase activity를 측정하였다 (Figure 1B, C, D). 그 결과 LXR $\beta$ 가 활성화되지 않았을 때에는 promoter activity에 아무런 변화가 없었다. 또한 T0901317에 의해 LXR $\beta$ 가 활성화되었을 때 LXR $\beta$ 가 단독으로 transfection된 조건에서 promoter activity가 증가한 것을 통해 각각의 promoter들이 LXR $\beta$ 가 조절하는 transcription 유전자인 것을 확인하였다. 또한 LXR $\beta$ 와 hTOP2A가 함께 transfection 되었을 때,

hTOP2A에 의해 further activity를 보였다. 그에 반해 hTOP2B에서는 유의미한 증가가 보이지 않거나 TOP2A의 activity와는 차이를 보였다. 이것은 선행연구에서 rTOP2B를 가지고 luciferase reporter assay를 진행했을 때와 유사한 패턴을 보인다. hTOP2A와 같은 human species를 가진 TOP2B에서 비교해 봐도 TOP2B는 LXR $\beta$ 의 coactivator function을 보이지 않거나 차이가 있었다.

**A.**

hTOP2A and hTOP2B full length

Score	Method	Identities	Positives	Gaps
2112 bits(5472)	Compositional matrix adjust.	1082/1577(69%)	1247/1577(79%)	87/1577(5%)

**B.****C.****D.****Figure 1. Activation of LXRβ-mediated transcription by TOP2A.**

(A) Homology analysis between hTOP2A and hTOP2B by using protein BLAST in NCBI. HEK 293T cells were transfected with luciferase reporter containing synthetic promoter LXRE (B), natural promoter ABCA1 (C) and ABCG1 (D). T0901317 was used to activate LXRβ. Luciferase activities were normalized by β-galactosidase activities. Luciferase activities were represented as fold compared to the value of mock DMSO. Data are presented as the mean ± SEM (n=3). \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001 by one-way ANOVA, followed by LSD post-hoc test.

## hTOP2A-II와 hTOP2B-II의 LXR $\beta$ 의 coactivator로서의 function 비교

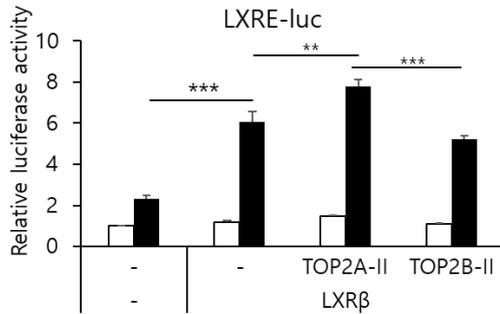
본 연구실의 선행연구에서 hTOP2A-II만으로도 hTOP2A 전체 domain과 같은 function을 보이는 것을 확인하였다. 그래서 본 실험에서는 hTOP2A-II에 상응하는 hTOP2B-II 부분에서의 차이가 있는지 알아보기 위해, 먼저 hTOP2A-II와 hTOP2B-II의 homology를 비교하였다 (Figure 2A). 그 결과 91%로 full length보다 더 높은 homology를 보이는 것을 확인하였다. 그렇다면 더 높은 homology를 보이는 hTOP2B-II에서는 LXR $\beta$ 의 coactivator function을 가지는지 확인하기 위해 HEK 293T 세포에서 luciferase reporter assay를 진행하였다 (Figure 2B, C, D). 그 결과 앞선 full length 데이터와 마찬가지로 hTOP2A-II만이 further activity를 보였다. 이를 통해 hTOP2B-II가 hTOP2A-II와 높은 유사성에도 불구하고 LXR $\beta$ 의 function을 보이지 않는 것을 알 수 있다. 그리고 hTOP2A-II의 coactivator function이 LXR $\beta$ 와 직접적인 interaction에 의해 나타나는 것인지 확인하기 위해 GST-pull down assay를 진행하였다 (Figure 2E). GST가 달린 GST-hLXR $\beta$  protein과 <sup>35</sup>S-Met-labeled TOP2A-II, TOP2B-II protein을 가지고 실험하였고, 이를 통해 LXR $\beta$ 와 TOP2A-II, TOP2B-II 간의 interaction이 있는지 확인하였다. 그 결과, LXR $\beta$ 와의 interaction에 있어서 차이를 보였다. 이를 통해 hTOP2A-II의 coactivator function은 LXR $\beta$ 와의 직접적인 interaction을 통해 일어나는 것임을 알 수 있으며, 그것이 hTOP2A-II가 hTOP2B-II와 다른 9%의 domain에서 연관된 것임을 짐작할 수 있다.

**A.**

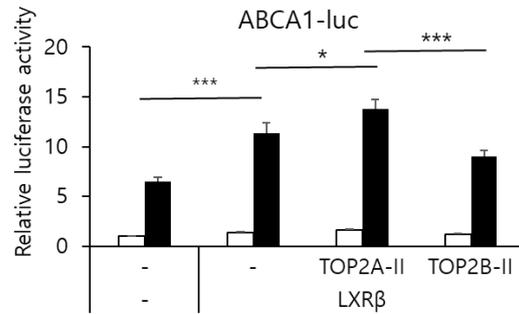
TOP2A and TOP2B fragment II

Score	Method	Identities	Positives	Gaps
790 bits(2040)	Compositional matrix adjust.	367/445(82%)	408/445(91%)	0/445(0%)

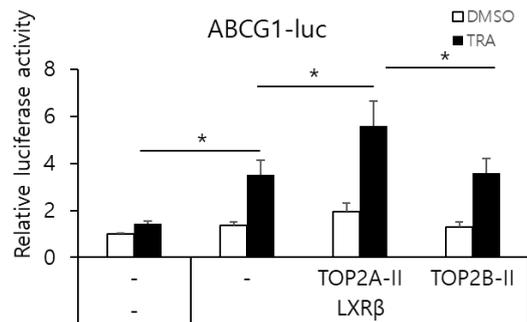
**B.**



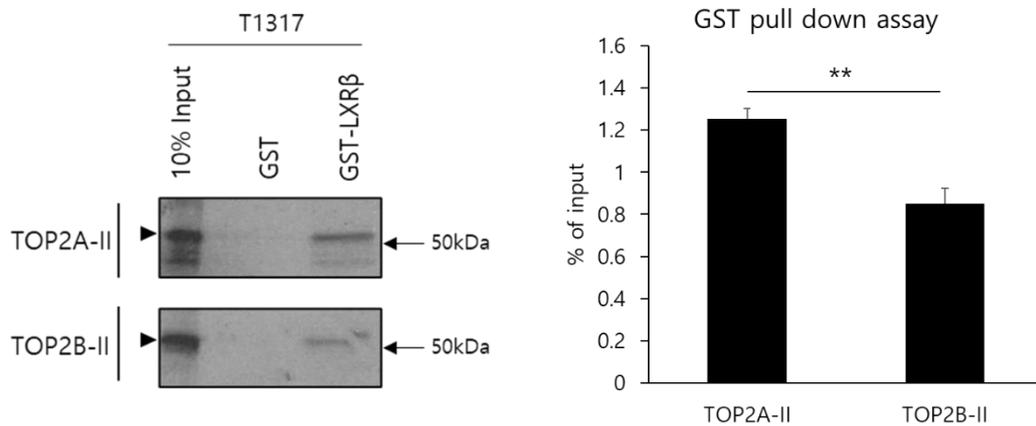
**C.**



**D.**



**E.**



**Figure 2. Coactivator function of TOP2A-II through protein-protein interaction with LXR $\beta$ .**

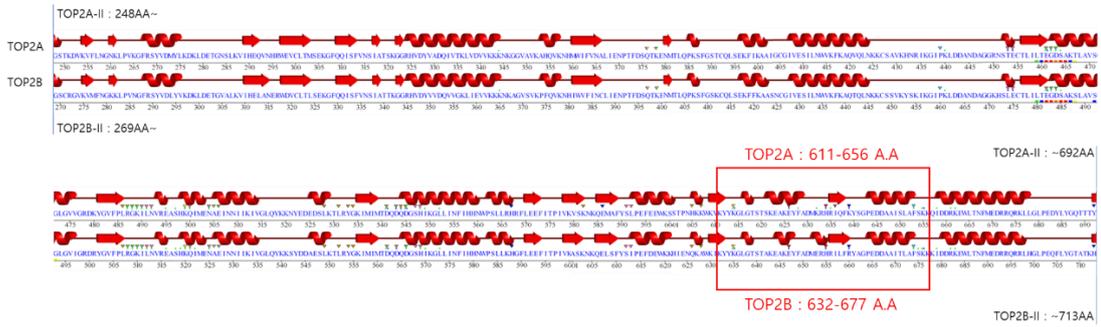
(A) Homology analysis between hTOP2A-II and hTOP2B-II by using protein BLAST in NCBI. HEK 293T cells were transfected with luciferase reporter containing synthetic promoter LXRE (B), natural promoter ABCA1 (C) and ABCG1 (D). T0901317 was used to activate LXR $\beta$ . Luciferase activities were normalized by  $\beta$ -galactosidase activities. Luciferase activities were represented as fold compared to the value of mock DMSO. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n=3). \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001 by one-way ANOVA, followed by LSD post-hoc test. (E) GST-pull down assays were performed using  $^{35}\text{S}$ -Met-labeled TOP2A-II and TOP2B-II and were quantified relative to input. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n=3). \*\*, p < 0.01 by standard t-test.

## hTOP2A-II와 hTOP2B-II mutant 제작 및 LXR $\beta$ 의 coactivator function 확인

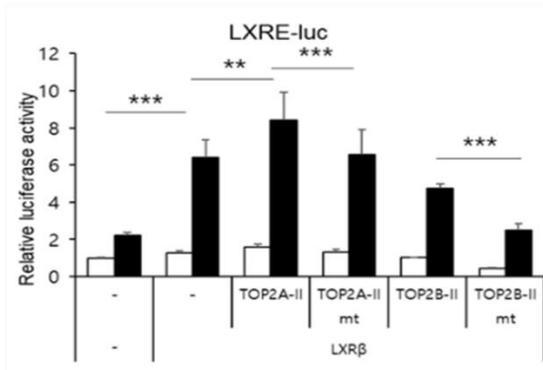
hTOP2A-II가 hTOP2B-II와의 91% 높은 homology에도 불구하고 (Figure 2A), hTOP2A-II만이 LXR $\beta$ 의 coactivation으로 function을 보였기 때문에, 두 fragment 간의 secondary structure에서 구조적으로 다른 부분이 있는지 확인하기 위해 secondary structure를 비교하였다 (Figure 3A). 그 결과 전체적인 부분이 유사하였으나, hTOP2A 611-656 amino acid 부분과 hTOP2B 632-677 amino acid 부분에서  $\alpha$ -helix와  $\beta$ -sheet 길이 및 크기 차이가 있다는 것을 확인하였다 (Figure 3A, red square). 그래서 이 부분에서의 차이가 coactivator function에 영향을 주는 domain 인지 확인하기 위해, 각각의 이 부분을 바꾼 pcDNA3.0-HA-hTOP2A-II mutant (hTOP2A-II mt), pcDNA3.0-HA-hTOP2B-II mutant (hTOP2B-II mt)를 제작하였다. 이후 luciferase reporter assay를 통해 promoter activity를 측정하였다. 그 결과 hTOP2A-II mt는 예상한 대로 hTOP2A-II의 coactivator function이 사라진 걸 확인할 수 있었다. 그러나 hTOP2B-II mt에서는 예상과 달리 hTOP2A-II의 coactivator function을 획득하지 못하였다. LXR $\beta$ 와의 interaction에도 차이가 있는지 확인하기 위해, GST-hLXR $\beta$  protein과  $^{35}\text{S}$ -Met-labeled TOP2A-II, TOP2A-II mt protein를 사용하여 GST-pull down assay를 진행하였다 (Figure 3E). 그 결과 hTOP2A-II mt의 interaction이 hTOP2A-II의 interaction에 비해 감소하는 듯한 trend를 확인하였다. 이는 promoter assay에서의 hTOP2A-II mt의 promoter activity 감소가 hTOP2A-II에서의 특정한 domain이 사라짐으로써 발생하였고, 이것이 protein-protein interaction에서도 차이가 있음을 보여주고 있다. 그러나 hTOP2B-II mt에서 hTOP2A의 coactivator function을 획득하지 못하였다. 이것은

hTOP2A 611-656 amino acid 부분이 coactivator function에 관여하는 domain의 일부이고, 일부만 **change** 되었기 때문에 발생한 결과로 보인다.

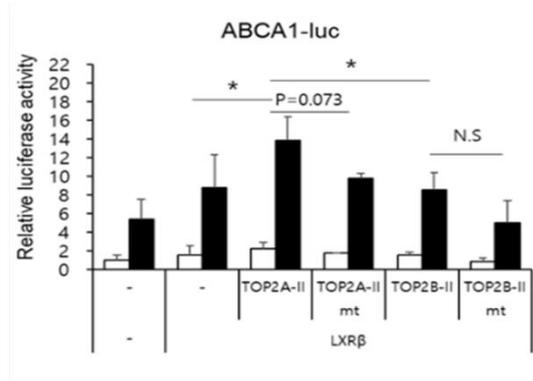
**A.**



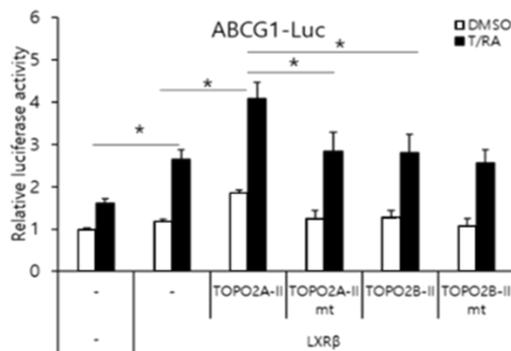
**B.**



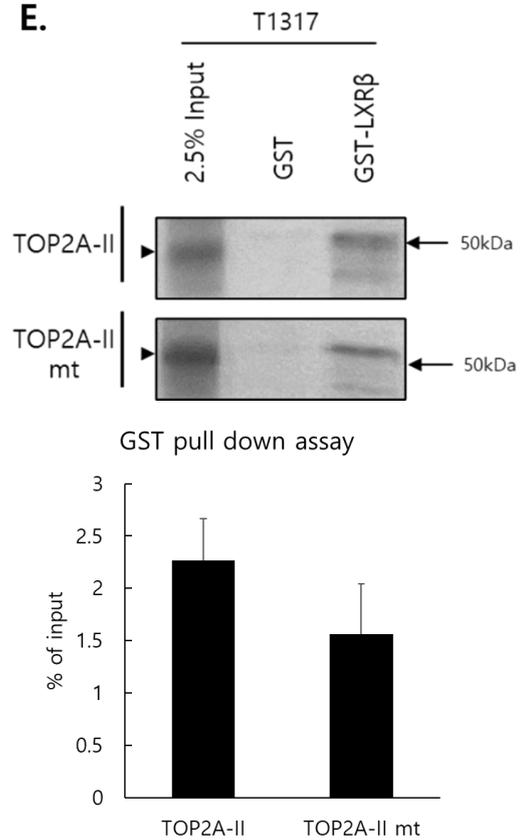
**C.**



**D.**



**E.**



**Figure 3. The expected subdomain of hTOP2A and its function.**

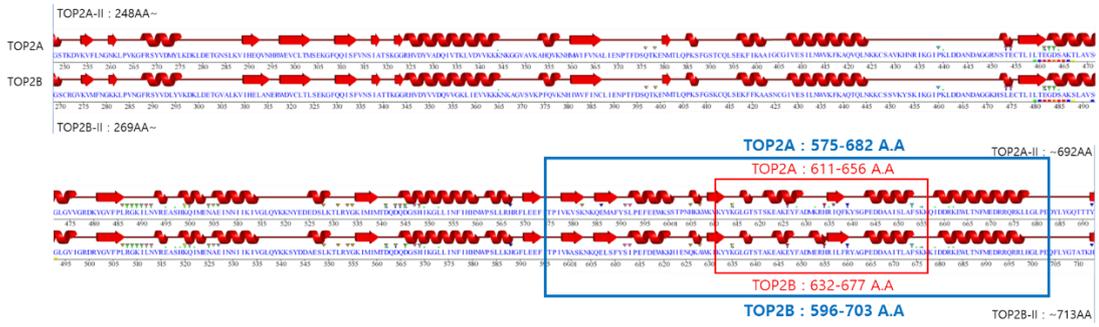
(A) Comparison between TOP2A-II and TOP2B-II secondary structure. The secondary structure of TOP2B, which is the most different from TOP2A, was compared (A, the red square). HEK 293T cells were transfected with luciferase reporter containing synthetic promoter LXRE (B), natural promoter ABCA1 (C) and ABCG1 (D). T0901317 was used to activate LXR $\beta$ . Luciferase activities were normalized by  $\beta$ -galactosidase activities. Luciferase activities were represented as fold compared to the value of mock DMSO. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n=4). \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001 by one-way ANOVA, followed by LSD post-hoc test. (E) GST-pull down assays were performed using <sup>35</sup>S-Met-labeled TOP2A-II and TOP2A-II mt and were quantified relative to input. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n=3).

## hTOP2A-II와 hTOP2B-II mutant long form 제작 및 LXR $\beta$ 의 coactivator function 확인

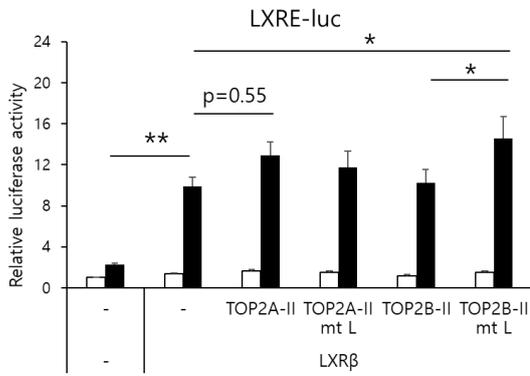
앞선 실험을 통해 hTOP2A-II 611-656 amino acid 부분이 LXR $\beta$ 의 coactivation에 관여하는 domain의 일부분임을 알았다 (Figure 3). 그러나 LXR $\beta$ 의 coactivator function에 관여하는 domain의 전체적인 부분은 확인되지 않았기에 그 부분을 찾고자 하였다. 그래서 기존의 mutant를 포함한 hTOP2A-II에서 hTOP2B-II와의 달랐던 모든 부분을 바꾼 mutant를 제작하였다 (Figure 4A, blue square). 그리고 이는 mutant long form (mt L)이라고 칭하였다.

앞선 실험들과 동일하게 hTOP2A-II mt L과 hTOP2B-II mt L의 coactivator function을 확인하기 위해 luciferase reporter assay를 진행하였다. 그 결과 hTOP2A-II mt L의 promoter activity는 기존의 mutant에서와 동일하게 coactivator function이 사라지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 기존의 hTOP2B mutant에서 coactivator function을 획득하지 못한 것과 달리, hTOP2B-II mt L에서의 promoter activity는 LXRE, ABCG1에서는 hTOP2B-II에 비해 증가하였고, ABCA1에서는 증가하는 trend를 확인할 수 있었다. 이는 hTOP2B-II mt L이 기존의 mutant와 달리 hTOP2A의 coactivator function을 획득한 것으로 보인다. 이를 통해 hTOP2A-II 611-656 amino acid 부분이 LXR $\beta$ 의 coactivator로서 function을 하는데 관여하는 부분임을 알 수 있으며, 611-656 amino acid에서의 일부분으로는 coactivator function을 나타내기 어려우며, 전체 부분이 있어야 coactivator로서의 function을 나타내는 것을 알 수 있다.

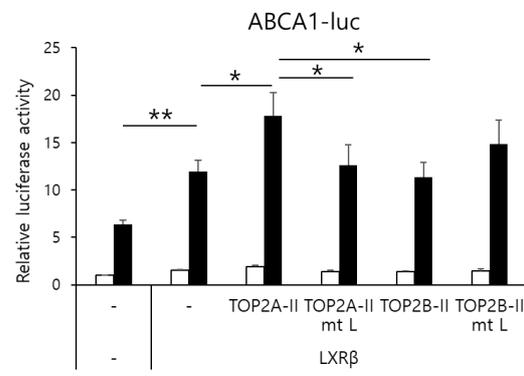
**A.**



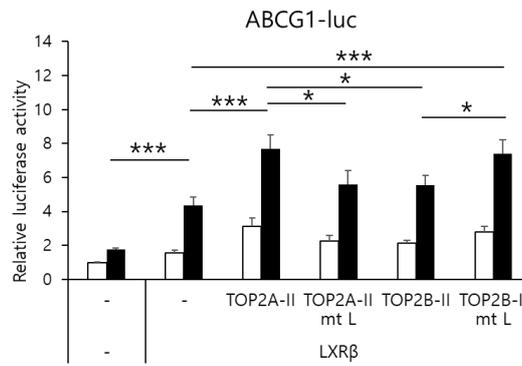
**B.**



**C.**



**D.**



**Figure 4. The structure and function of the part that was expected to be functional subdomain of hTOP2A.**

(A) Comparison between TOP2A-II and TOP2B-II secondary structure. The secondary structure of TOP2B, which is different from TOP2A, was compared (A, The blue square). HEK 293T cells were transfected with luciferase reporter containing synthetic promoter LXRE (B), natural promoter ABCA1 (C) and ABCG1 (D). T0901317 was used to activate LXR $\beta$ . Luciferase activities were normalized by  $\beta$ -galactosidase activities. Luciferase activities were represented as fold compared to the value of mock DMSO. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (LXRE; n=4, ABCA1; n=6, ABCG1; n=8). \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001 by one-way ANOVA, followed by LST post-hoc test.

## 고찰

Nuclear receptor는 전사조절인자 중 하나로 ligand를 통해 표적 유전자의 활성을 조절한다는 특징을 가지고 있으며, ligand를 이용해 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있기 때문에 치료제 개발에 중요한 표적 중 하나다 (26). 그러나 특정한 nuclear receptor를 activation 하게 된다 하여도 nuclear receptor가 발현하는 유전자의 종류는 다양하기 때문에, nuclear receptor가 발현시키는 유전자 중 원하는 유전자만을 발현시키는 방법이 필요하다 (21). Nuclear receptor 중 하나인 LXR도 ligand에 의해 활성화되면 ABCA1, ABCG1 발현이 증가하게 되고, 그로 인한 RCT 증가로 세포 내에 과도한 콜레스테롤을 제거할 수 있으나, LXR은 지질합성과 관련된 SREBP-1c의 발현도 증가시키기 때문에 지방간을 발생시킨다는 문제점이 있다. 그렇기 때문에 LXR에 의해 발현되는 유전자 중 ABCA1, ABCG1 유전자만의 발현을 증가시켜 LXR의 이점을 최대화하기 위해서는 특정한 유전자의 발현에 도움을 주는 coactivator를 이용하여 조절하는 것이 중요하다. 본 연구실의 선행연구에서 ABCA1, ABCG1의 transcription에는 영향을 주면서, SREBP-1c의 transcription에는 영향을 주지 않는 LXR $\beta$ 의 coactivator인 TOP2A를 발견하였다. TOP2는 두 가지 isoform을 가지고 있고, 그 isoform 간의 homology는 79%이다. 그러나 79%의 유사성에도 TOP2A만이 LXR $\beta$ 의 coactivator로서 function을 하였다. 그래서 TOP2A와 TOP2B의 구조적으로 다른 부분이 TOP2A가 coactivator로서 function을 하는데 가장 큰 이유일 것이라고 생각했다. 따라서 본 연구에서는 TOP2A와 그의 isoform인 TOP2B의 구조적, 기능적 차이를 확인하고, TOP2A의 coactivator function에 관여하는 특정 domain을 더욱더 구체화하고자 하였다.

TOP2A가 LXR $\beta$ 의 specific 한 coactivator function을 가지고, TOP2A-II만으로도 coactivator function을 가진다는 선행연구를 바탕으로 TOP2A의 구체적인 functional subdomain을 분석하고자 실험을 진행하였다. 선행연구에는 같은 species에서 비교한 바가 없기에, human TOP2A와 비교하기 위해 human TOP2B를 cloning 하여 실험을 진행하였다. TOP2A에서 coactivator function을 보이는 것이 선행연구와 일치했으나 TOP2B에서는 보이지 않거나 차이가 있었다. 선행연구에서 rat TOP2B와 비교했을 때와 달리 ABCA1, ABCG1 promoter assay에서 TOP2B에 의해서도 activation이 증가하는 것처럼 보였다. 그러나 이후에 coactivator functional domain인 TOP2A-II와 그에 상응하는 TOP2B-II로 promoter assay를 진행했을 때 TOP2B-II에 의한 증가가 보이지 않는 것을 보아, full length를 실험했을 때 TOP2B에 의해 증가하는 것처럼 보였던 것은 실험적 오차 부분에 의해 발생한 것이라고 볼 수 있다. coactivator는 nuclear receptor의 protein-protein interaction을 통해 transcription을 조절하는데, 이를 확인하기 위한 GST pull down assay에서 LXR $\beta$ 와의 interaction에 있어 차이가 있었다. 이를 통해 TOP2A의 특정한 domain 부분이 LXR $\beta$ 와 protein-protein interaction을 통해 coactivator로 function을 하는데 중요한 부분임을 확인하였다. TOP2A-II와 TOP2B-II의 구조적 차이를 비교하여 TOP2A-II의 coactivator functional subdomain을 예측하고자 하였다. 단백질의 일차적인 모양을 결정하는 secondary structure에서 비교하였고, 이때 TOP2A의 611-656 amino acid 부분과 상응하는 TOP2B의 부분의 구조가 가장 크게 달라 그 부분이 TOP2A의 coactivator function에 관여하는 domain 일 것이라고 생각하였다. 이후 그 부분을 서로 바꾼 mutant로 진행한 promoter assay를 보면 TOP2A-II mt에서는 TOP2A의 coactivator function이 사라지는 것을 확인할 수 있었으나, 그에 반해 TOP2B-II

mt에서 coactivator function을 획득하지 못하는 것을 볼 수 있다. 이는 611-656 부분이 coactivator function에 관여되는 일부 sequence이기 때문에 이러한 결과를 가져온 것으로 보인다. 그래서 이후 611-656 amino acid 부분을 포함하는 더 넓은 부분, 575-682 amino acid 부분과 상응하는 TOP2B 부분을 바꾼 mutant (TOP2A-II mt L, TOP2B-II mt L)를 가지고 진행한 promoter assay에서 TOP2B-II mt L가 TOP2A의 coactivator function을 획득하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 TOP2A가 coactivator로서 function을 하기 위해서는 611-656 amino acid 부분뿐만 아니라 더 많은 부분을 포함한 TOP2A의 575-682 amino acid 부분이 필요하며, 이것이 TOP2A의 coactivator function에 관련된 중요한 domain 일 것으로 생각된다.

TOP2는 구조는 크게 N-terminal에 ATPase domain과 DNA binding and cleavage domain 그리고 C-terminal tail로 구성되어 있다. TOP2는 DNA cleavage domain에 G segment를 고정하여 절단한 후 T segment를 통과시켜 DNA topological bond를 해소하는 특징을 가지고 있다 (23,25). 선행연구에서 coactivator function이 확인된 TOP2A-II는 DNA binding and cleavage domain 부분에서 TOPoisomerase/PRIMase (TOPRIM)을 포함한 부분이었다. TOPRIM은 TOP2가 DNA cleavage를 진행할 때  $Mg^{2+}$ 와 결합하여 winged-helix domain과 함께 DNA 절단한 후 나머지 DNA 가닥이 통과할 수 있게 만들어주는 역할을 한다 (24). 그러므로 TOPRIM이 coactivator function에 중요한 역할을 하는 부분이 아닐까 생각하였으나 secondary structure를 비교하였을 때, TOPRIM 부분을 제외한 다른 domain에서 구조적 차이가 있었다. 이후 본 실험에서 확인한 functional subdomain, 575-682 amino acid 부분은 TOPRIM과 winged-helix domain 부분의 사이의 domain이었다. 이는 TOP2A의 DNA cleavage function에 관여하는

domain이 아닌 새로운 domain이 coactivator function에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

본 연구를 통해 TOP2A의 coactivator function에 관여하는 domain이 기존의 TOP2A의 DNA cleavage functional domain이 아닌 새로운 domain임을 확인하였다. 그러나 TOP2A functional subdomain 단독으로 coactivator function을 보이는데 대해서는 확인해 본 바가 없다. 그렇기 때문에 TOPRIM 부분을 포함하지 않은 subdomain이 coactivator function에 중요한 부분은 맞으나, TOPRIM을 제외한 subdomain만으로도 coactivator function을 보이는데 대해 확인하는 실험이 추가적으로 필요할 것이라 생각된다.

## 참고 문헌

1. Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Horoszewicz K, and Beltowski J, Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007;61:736-59.
2. Richard Sever, Christopher K Glass, Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(3):a016709.
3. Baranowski M, Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol* 2008;59 Suppl 7:31-55.
4. Mihir Parikh, Kirti Patel, Sachin Soni, Tejal Gandhi, Liver X receptor: a cardinal target for atherosclerosis and beyond. *J Atheroscler Thromb* 2014;21(6):519-31.
5. Bo Wang, Peter Tontonoz, Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 2018;14(8):452-463.
6. Shreya R. Savla, Kedar S Prabhavalkar, Lokesh K Bhatt, Liver X receptor: a potential target in the treatment of atherosclerosis. *Expert Opin Ther Targets* 2022;26(7):645-658.
7. Snehal U Nail et al., Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 2006;113(1):90-7.
8. Barbara Bonamassa, Antonio Moschetta, Atherosclerosis: lesson from LXR and the intestine. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24(3):120-8
9. Tomoyuki Yasuda et al., Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(4):781-6.
10. Ilaria Zanotti et al., The LXR agonist T0901317 promotes the reverse cholesterol transport from macrophages by increasing plasma efflux potential. *J Lipid RES* 2008;49(5):954-60.
11. Ji-Young Cha, Joyce J Repa, The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 2007;282(1):743-51.
12. Hitoshi Shimano, Ryuichiro Sato, SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology – divergent pathophysiology. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13(12):710-730.
13. Na Li, Xiaodan Li et al., SREBP Regulation of Lipid Metabolism in Liver

- Disease, and Therapeutic Strategies. *Biomedicines* 2023;11(12)3280.
14. Azam Moslehi, Zeinab Hamidi-Zad, Role of SREBPs in Liver Diseases: A Mini-review. *J Clin Transl Hepatol* 2018;6(3):332-338.
  15. H Shimano, Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res* 2001;40(6):439-52.
  16. G S Oh, Regulation of lipid metabolism by novel Liver X Receptor coactivators. *PhD thesis in University of Ulsan* 2016.
  17. P W Watt and I D Hickson, Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem J* 1994;303(Pt 3):681-695.
  18. Lei Chen et al., Molecular mechanisms for ABCA1-mediated cholesterol efflux. *Cell cycle* 2022;21(11):1121-1139.
  19. Michinori Mastuo, ABCA1 and ABCG1 as potential therapeutic targets for the prevention of atherosclerosis. *J Pharmacol Sci* 2022;148(2):197-203.
  20. Xiao-Hua Yu, Chao-Ke Tang, ABCA1, ABCG1, and Cholesterol Homeostasis, *Adv Exp Med Biol* 2022;1377:95-107.
  21. A M Naar, B D Lemon, R Tjian, Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem* 2001;70:475-501.
  22. Geun Hyang Kim, Gyun-Sik Oh, Jin Yoon, Gang Gu Lee, Ki-up Lee and Seung-Whan Kim, Hepatic TRAP80 selectively regulates lipogenic activity of liver X receptor. *J Clin Invest* 2015;125(1):183-193.
  23. Liis Uuskula-Reimand, Michael D Wilson, Untangling the roles of TOP2A and TOP2B in transcription and cancer. *Sci Adv* 2022;8(44):eadd4920.
  24. Timothy J. Wendrff et al., The structure of DNA-Bound Human Topoisomerase II Alpha: Conformational Mechanisms for Coordinating Inter-Subunit Interactions with DNA Cleavage. *J Mol Biol* 2012;424(3-4):109-124.
  25. Christian F. Nielsen et al., Topoisomerase II $\alpha$  is essential for maintenance of mitotic chromosome structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117(22):12131-12142.
  26. Taosheng Chen, Nuclear receptor drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 2008;12(4):418-16.

## Abstract

The Liver X receptor(LXR) is one of the nuclear receptors and plays a role in regulating lipid metabolism through gene expression in vivo. LXR is a good therapeutic target for arteriosclerosis because it regulates transcription of ABCA1 and ABCG1, which are involved in reverse cholesterol transport. But it is also a cause of fatty liver production because it also affects transcription of SREBP-1, a master regulator that regulates lipid synthesis. In our previous studies, it was confirmed that Topoisomerase II $\alpha$  has a function of a transcription-regulating factor that regulates transcription by interacting with LXR $\beta$ , affecting the transcription of ABCA1 and ABCG1, but not SREBP-1c. Topoisomerase II has two isoforms, Topoisomerase II $\alpha$  (TOP2A) and Topoisomerase II $\beta$  (TOP2B). To check whether TOP2B also affected the transcriptional activity of LXR $\beta$ , a luciferase promoter assay was performed. It was confirmed that the activity of LXR $\beta$  was not increased by TOP2B. It suggests that only TOP2A has the specific coactivator function of LXR $\beta$  despite the high homology between the isoforms. In addition, as it previously confirmed that only the 248-692 amino acid moiety (TOP2A-II) of TOP2A functions as a coactivator of LXR $\beta$ , a 269-713 amino acid moiety of TOP2B was prepared by comparing the homology of TOP2B corresponding to the moiety of the corresponding part. Despite the high homology of 91% with the TOP2A-II, there was no increase in promoter activity by TOP2B-II like the full length of TOP2B, and there was a difference from TOP2A-II in the interaction with LXR $\beta$ . As these two high homologous fragments have transcriptional difference, their secondary structure was compared. The most different part was TOP2A's 611-656 amino acid. thus it was expected to be a functional subdomain. The mutant was produced in which the part was replaced with TOP2B's 632-677 amino acid corresponding to TOP2B-II. Through the luciferase promoter assay and GST pull

down assay it was confirmed that the expected part is responsible for in the coactivator function of TOP2A. In order to specify the coactivator functional subdomain of TOP2A, the expanded mutant (TOP2A-II mt L, TOP2B-II mt L) was produced, that swapped expanded sequence of the two with a difference in  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet size on the secondary structure including the expected part. It was confirmed that TOP2B-II mt L obtained the coactivator function of TOP2A. Therefore, the Top2a 575-682 amino acid part is considered to be an important part of LXR $\beta$ 's transcriptional regulator.