



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](#)

의과학석사 학위논문

Topoisomerase II α 와 상호작용하는

Liver X Receptor β subdomain

확인 및 기능 분석

Identification and functional analyses of Liver X

Receptor β subdomain that interacts with

topoisomerase II α

울 산 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

김 동 섭

**Topoisomerase II α 와 상호작용하는
Liver X Receptor β subdomain**

확인 및 기능 분석

지도교수 김승환

이 논문을 의과학석사 학위 논문으로 제출함

2022년 7월

울산대학교 대학원

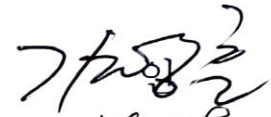
의과학과

김동섭

김동섭의 의과학석사 학위 논문을 인준함

심사위원

김 영 훈



심사위원

이 혜 경



심사위원

김 승 환



울 산 대 학 교 대 학 원

2022년 7월

초록

핵수용체 Liver X Receptor (LXR)의 두 isoform인 LXR α (NR1H3)와 LXR β (NR1H2)는 높은 homology를 가지고 있으나, knockout mouse의 표현형에 있어 분명한 차이를 가지고 있다. 그러나, 전사인자로서의 LXR α 와 LXR β 의 활성화에 있어서 이 둘 간의 차이점에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 흥미롭게도, 선행연구에서 human DNA topoisomerase II α (hTOP2A)가 LXR α 와 interaction하지 않고, LXR β 와는 specific한 protein-protein interaction을 통해 LXR β 의 coactivator로 작용하는 것을 밝혀냈다. 본 연구에서는 높은 homology를 보이는 두 isoform 중 LXR β 만 TOP2A와 interaction을 할 수 있는 능력을 부여하는 LXR β 부위를 규명함으로써, TOP2A의 LXR β -specific activation mechanism을 설명하고자 하였다. 먼저, LXR 전체를 DNA binding domain (LXR β -DBD), hinge-Ligand binding domain (LXR β -hinge-LBD), Helix 12 (H12)가 제거된 나머지 부분(LXR β - Δ H12)의 세 부분으로 나누어 GST-fusion 단백질을 제작하였다. 제작한 단백질을 이용해 GST pull down assay를 시행하여 TOP2A가 LXR β hinge-LBD와 interaction이 가장 강하게 나타나는 것을 확인했다. LXR β hinge-LBD의 TOP2A interaction domain을 구체적으로 mapping하기 위해 secondary structure를 기준으로 LXR β hinge-LBD를 다시 7개의 작은 fragment construct로 제작하였다. 이를 이용하여 TOP2A와 GST pull down assay를 진행한 결과, LXR β 의 hinge domain 부분이 포함된 fragment에서 가장 강한 interaction을 보였고, 이것을 근거로 LXR β 의 hinge부분에 주목하였다. 이 LXR β hinge domain이 TOP2A와의 interaction에 있어 실제 기능을 가지고 있는지 확인하기 위해, LXR β 의 hinge를 LXR α hinge로 바꾼 hybrid construct인 LXR β _ α H를 제작하였다. 이 LXR β _ α H를 이용하여 각각 ABCA1, ABCG1, SREBP1c promoter에서 전사활성에 미치는 TOP2A의 영향을 luciferase assay를 통해 비교 분석하였다. 그 결과 LXR β _ α H에서도 LXR β 와 같이 TOP2A의 coactivator function이

여전히 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 LXR β hinge domain은 LXR β 와 TOP2A의 protein-protein interaction에 중요한 역할을 하지만, TOP2A의 LXR β specific activation을 단독으로 결정하는 부분은 아닌 것으로 생각된다.

목차

초록	i
목차	iii
그림 목차	iv
서론	1
연구 방법	7
결과	1 1
고찰	2 0
참고문헌	2 3
Abstract	2 6

그림 목차

Figure 1. Introduction of liver X receptor.....	6
Figure 2. LXR β hinge-LBD showed the strongest interaction with TOP2A.....	1 2
Figure 3. TOP2A II interacted with LXR β but not with LXR β LBD.	1 5
Figure 4. LXR β fragment I showed the strongest interaction with TOP2A.....	1 7
Figure 5. LXR β _ α H still cooperated with TOP2A as much as wild type LXR β	1 9

서론

Liver X Receptor (LXR)는 핵수용체 superfamily에 속하는 전사인자로 처음에 natural ligand가 알려지지 않아 orphan nuclear receptor로 분류되었지만, 이후 생체 내 ligand가 밝혀지면서 'adopted' orphan nuclear receptor로 재분류되었다(1).

LXR의 구조는 크게 activation function 1 (AF1), DNA binding domain (DBD), hinge domain, Ligand binding domain (LBD), activation function 2 (AF2)로 구성되어 있다 (Figure 1 A)(2). AF1은 ligand와 상관없이 전사를 조절하는 기능이고, AF2는 ligand 의존적으로 전사를 조절하는 부분이다. DBD는 2개의 zinc finger 구조를 통해 DNA에 직접 결합할 수 있고, LBD는 ligand가 결합할 수 있으며 dimer 형성에 중요한 역할을 한다(3). 또한 LBD 중에서 Helix 12 (H12)는 ligand가 결합했을 때 coactivator가 결합할 수 있도록 conformational change를 하는 것으로 알려져 있다(4). 마지막으로 DBD와 LBD사이를 연결하는 부분인 hinge는 nuclear receptor의 구조에 있어서 유연함을 부여하는 도메인이다. 이 Hinge는 nuclear receptor들이 공통적으로 가지고 있는 nuclear localization signal이 포함되어 있음에도 불구하고 중간 염기서열의 보존성이 매우 낮고 특정한 구조를 가지고 있지 않다(5). 이 때문에 Hinge에 대한 연구는 DBD와 LBD같은 다른 도메인에 비해 잘 되어있지 않다.

LXR의 전사활성 기전에 있어서 LXR은 Retinoid X receptor (RXR)와 heterodimer를 형성하여 작용한다 (Figure 1 B)(1, 2). 이때 Ligand의 유무에 따라 달리 작용하는데, ligand가 존재하지 않으면 corepressor와 interaction을 하여 표적 유전자의 전사를 억제한다(4). 반면에 Ligand가 존재하여 LBD와 결합하면 conformational change가 일어나 coactivator와 interaction하게 되는데, 이 coactivator의 interaction이 표적 유전자의 발현을 증가시킨다(4).

LXR의 대표적인 표적 유전자로는, ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1), apolipoprotein E (ApoE), cholesterylester transfer protein (CETP), fatty acid synthase (FAS), sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c 등이 있다(6-8). LXR의 합성 agonist로 잘 알려진 T0901317을 투여한 동물실험에서, 대식세포의 ABCA1, ABCG1 발현 증가에 의한 reverse cholesterol transporter (RCT) 증가, NF- κ B signaling 억제를 통한 염증반응 억제, 항동맥경화 효과가 보고된 바 있다(6, 9, 10). 하지만 LXR의 합성 agonist를 투여한 경우 SREBP-1c의 발현 또한 증가하기 때문에 지방간 (steatosis)이 발생한다는 보고가 있다(11, 12). SREBP는 생체 내 지질합성에 중요한 전사조절인자로 basic helix-loop-helix leucine zipper superfamily에 속하는 전사인자이다(11). SREBP는 3개의 isoform, SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2가 있으며(12), 이 중 SREBP-1c는 지방산 및 중성지방의 합성과 관련된 유전자의 발현을 조절한다(12). SREBP-1c의 대표적인 표적유전자는 acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), stearoyl-CoA desaturase 1(SCD1) 등이 있다(13).

LXR은 LXR α 와 LXR β 두 가지 isoform이 있으며(14), 이들의 아미노산 서열은 약 70% 정도의 높은 유사성을 가진다 (Figure 1 C, D). LXR α 의 경우 간, 비장, 장, 신장, 폐 등에서 주로 발현되고 있으며, 반면에 LXR β 의 경우 모든 조직에서 발현되고 있다(15). 그러나 LXR의 전사활성 측면에서는 이들 두 isoform 간의 차이는 거의 알려져 있지 않다. 한편 Quinet E. M. 등의 *in vivo* 연구에 따르면, LXR α -/- (LXR α knockout) 쥐와 LXR β -/- (LXR β knockout) 쥐는 서로 다른 phenotype을 보였는데(16, 17), 이는 LXR α 와 LXR β 의 기능적 차이가 있음을 보여준다(16). 또한 각각의 쥐에 LXR α/β dual agonist를 처리했을 때 LXR β null 쥐에서는 ABCA1과 SREBP1c의 mRNA 발현이 모두 증가하였고, 결과적으로 liver에서 lipogenesis가 동반되어 hepatic triglyceride (TG)가 증가하였다(16). 하지만

LXR α null 쥐에서는 ABCA1과 SREBP1c발현이 비슷하게 증가하였으나 hypertriglyceridemia가 발생하지 않았다(16). 따라서 LXR β specific activation은 hepatic LXR α -dominated lipogenesis를 피해서 ABCA1의 발현을 증가시켜 reverse cholesterol transporter (RCT)를 촉진할 수 있어 atherosclerosis의 therapeutic target으로 작용할 수 있다(16).

한편 본 연구실에서 LXR α 와 interaction하지 않으면서 LXR β 와는 specific한 interaction을 하는 coactivator로서 Topoisomerase II α (TOP2A)가 처음으로 규명되었다. Topoisomerase II (TOP2)는 진핵세포에서 DNA의 topological state를 조절하는 필수적인 효소이다(18, 19). 이는 DNA 이중 가닥의 일시적인 절제를 통해 온전한 이중나선을 통과시켜 DNA 가닥의 매듭과 엉킴을 해결한다(18, 19). TOP2는 DNA의 복제(replication), 전사(transcription), 유전자재조합(recombination) 등 세포 내에서 많은 DNA process에 관여하는 것으로 알려져 있다(20). TOP2는 효모나 초파리와 같은 하위 진핵생물은 단일 종류의 topoisomerase II 효소만 발현하는 반면, 척추동물과 같은 상위 진핵생물은 두 가지 분리된 형태인 Topoisomerase II α (TOP2A)와 Topoisomerase II β (TOP2B)가 있다(19, 20). 이들의 아미노산 서열은 약 70% 정도의 높은 유사성을 갖지만, 단백질 크기가 TOP2A는 170kDa, TOP2B는 180kDa으로 다르고, 서로 다른 유전자에서 발현된다(19, 21). 또한 이들은 발현과 생리적 기능이 뚜렷하게 다른 패턴을 가지고 있다(19, 22). TOP2A는 TOP2B와 다르게 왕성하게 성장하는 세포의 생존에 필수적이며 세포증식 기간동안 발현이 매우 증가한다(22).

위와 같이 알려진 TOP2A의 기능과 다르게, 본 연구실에서는 TOP2A가 대식세포에서 LXR activation의 대표적인 표적유전자들 중 SREBP-1c의 발현에는 관여하지 않으면서 ABCA1, ABCG1의 발현을 증가시키고, ApoA-1과 HDL 의존적인 콜레스테롤 배출을 증가시키는 것을 확인했다. 따라서 coactivator를 통한 LXR의 further activation 효과 중에

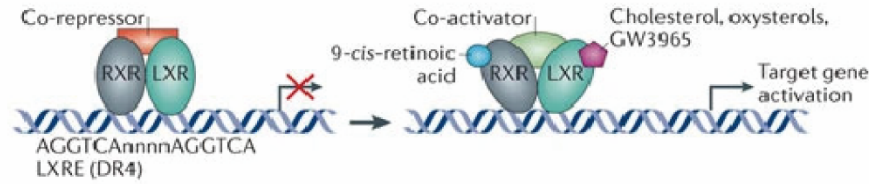
SREBP-1c의 발현증가 없이 reverse cholesterol transport (RCT)의 촉진에 의한 항동맥경화 효과를 가져올 수 있다(10, 16). 또한 LXR α 와 구별되어지는 LXR β 의 specific activation이기 때문에 hepatic LXR α -dominated lipogenesis를 피할 수 있다(16).

그럼에도 불구하고 ABCA1, ABCG1 promoter에서의 TOP2A-LXR β specific interaction mechanism에 대해서는 아직 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 LXR α 와 구별되어지는 LXR β 의 TOP2A interaction domain을 규명하고, TOP2A의 coactivator activity에 있어 이 domain의 역할을 확인하고자 하였다.

A



B



C

	Length	% Identity	% Similarity	% Gaps	Score
hLXRα	447	61.4%	71.7%	9.9%	1410.0
hLXRβ	460				

D

hLXRβ	1	MSSPTTSSLDTPLPGNGPP-----QPGAP-----SSSPTVKEEGP	35
hLXRα	1	----MSLWLGAPVP-DIPDSAVELWKPGAQDASSQAQGGSSCILREEAR	45
hLXRβ	36	EPWPGGPDVPDPTDEASSACSTDWVIP--DPEEERKRKKKGPAPKMLG	83
hLXRα	46	MPHSAGGTAGV-GLEAAEPTALLTRAEPPEPTEIRPQKRKKKGPAPKMLG	94
hLXRβ	84	HELCRVCGDKASGFHYNVLSCEGCKGFFRRSVVRRGGARRYACRGGGTQCM	133
hLXRα	95	NELCSVCGDKASGFHYNVLSCEGCKGFFRRSVIKGA--HYICHSGGHCPM	142
hLXRβ	134	DAFMRRKQCQRLRKCKEAGMREQCVLSEEQIRKKKIRKQQESQSQSQS	183
hLXRα	143	DTYMRKQCQRLRKCRQAGMREECVLSEEQIRLKKLKRQEEEAHATSL	192
hLXRβ	184	PVGPQGSSSSASGPGASPGGSEAGSQSGEGEGVQLTAAQELMIQQLVAA	233
hLXRα	193	P--PRASSP----PQILP-----QLSPEQLGMIKLVAA	220
hLXRβ	234	QLQCNKRSFSDQPKVTPWPLGADPQSRDARQQRF AHFTELAIISVQEI VD	283
hLXRα	221	QQQCNRRSFDRLRVTPWPMAPDPSREARQQRF AHFTELAIISVQEI VD	270
hLXRβ	284	FAKQVPGFLQLGREDQIALLKASTIEIMLLETARRYNHETECITFLKDFT	333
hLXRα	271	FAKQLPGFLQLSREDQIALLKTSATIEVMLLETARRYNPGESEITFLKDFS	320
hLXRβ	334	YSKDDFHRAGLQVEFINPIFEFSRAMRRLGLDDAEYALLIATNIFSDARP	383
hLXRα	321	YNREDFAKAGLQVEFINPIFEFSRAMNELQLNDAEFALLIATNIFSDARP	370
hLXRβ	384	NVQEPGRVEALQQPYVEALLSYTRIKRPQDQLRFPRMLMKLVSLRTLSSV	433
hLXRα	371	NVQDQLQVERLQHTYVEALHAYVSIHHPHDLRMFPRMLMKLVSLRTLSSV	420
hLXRβ	434	HSEQVFALRLQDKKLPPLLSEIWDVHE	460
hLXRα	421	HSEQVFALRLQDKKLPPLLSEIWDVHE	447

Figure 1. Introduction of liver X receptor

(A) General domain structure of nuclear receptors. (B) Activation mechanism of LXR/RXR heterodimer by ligand binding. These figures were modified from Figure 1. in Calkin A. and Tontonoz P.'s review (23). (C, D) Homology analysis between LXR α and LXR β by using Blast 2 sequences. Lines indicate identical amino acid, one dot indicates different amino acid and two dots for similar amino acids.

연구 방법

재료

세포 배양에 사용한 DMEM (12800-017) 배지는 Gibco (Grand island, NY), fetal bovine serum (SH30396.03)은 Hyclone (South Logan, Utah)에서 구입하였다. Transfection시 사용한 lipofectamine 2000 (11668-027)은 Invitrogen (Grand Island, New York)에서 구입하였고 Opti-MEM (22600-050)은 Gibco (Grand island, NY)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (D8418)와 T0901317 (T2320)는 Sigma (St. Louis, MO), 9 cis-retinoic acid (GR-101-0025)는 Biomol (Plymouth Meeting, PA)에서 구입하였다. Luciferase reporter assay시 사용한 luciferin (E-1602)는 구입하였고, β -galactosidase assay에 사용한 ONPG (N1127)는 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하였다. Construct 제작 시 사용한 제한효소 *Xho* I, *Kpn* I, *Bam*H I, *Xba* I, *Apa* I, *Bgl* I 은 모두 NEB (Beverly, MA)에서 구입하였고, T4 ligase (M0202S)는 NEB (Beverly, MA), Prime STAR HS DNA polymerase (R044A)는 Takara (Shuzo, Japan)에서 각각 구입하였다. Transfection 시 사용한 lipofectamine2000 (11668-027)은 Invitrogen (Grand island, NY)에서 구입하였고, opti-MEM (22600-050)은 Gibco (Grand island, NY)에서 구입하였다. Luciferase reporter assay시 사용한 luciferin (E-1602)는 Promega (Madison, WI)에서 구입하였다. luciferase activity를 측정할 때 Berthold (Oak Ridge, US)사의 luminometer centro LB960 기기를 사용하였다. β -galactosidase assay시 사용한 ONPG (N1127), β -mercaptoethanol (M7522)은 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하였고, 흡광도 측정은 BioTEK (Santa Clara, CA)사의 epoch microplate reader기기를 사용하였다. Dimethyl sulfoxide (D8418)와 T0901317 (T2320)는 Sigma (St. Louis, MO), 9 cis-retinoic acid (GR-101-0025)는 Biomol (Plymouth Meeting, PA)에서 구입하였다.

Construct 제작

GST pull down에 필요한 단백질의 construct를 제작하기 위해 pGEX-4T-1 vector에 DNA binding domain (LXR β -DBD), hinge-Ligand binding domain (LXR β -hinge-LBD), helix 12 (H12)가 제거된 나머지 부분(LXR β - Δ H12)과 LXR β fragment I~VII을 각각 cloning 하였다. pcDNA3.1-hLXR α 와 hLXR β 를 각각 template로 하여 restriction enzyme site를 첨가하여 PCR 하였다. Vector와 PCR product는 각각의 restriction enzyme site로 20시간 이상 37 $^{\circ}$ C에서 반응시키고 T4 ligase를 이용하여 16 $^{\circ}$ C에서 20시간 ligation하였다. Heat shock 방법을 이용하여 transformation한 후 100 μ g/ml ampicillin을 함유한 LB배지에서 colony를 선별하여, insert가 포함된 clone을 제한효소를 이용하여 확인하고, 이 후 선별된 plasmid DNA를 sequencing하였다. Sequencing 결과 모든 construct에 mutation이 없는 것을 확인하고 이후 실험에 사용하였다.

GST fusion protein expression 및 purification

앞서 제작한 pGEX-4T-1 plasmid construct들을 BL21 gold competent 세포에 transformation시켰다. 박테리아는 LB broth (BD, 244620)배지에 37 $^{\circ}$ C shaking incubator에서 600nm에서 O.D (optical density)값이 0.1이 될 때까지 배양하였다. 그 다음 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Bioneer, C8001-1)를 첨가하여 16 $^{\circ}$ C에서 18시간동안 배양하였다. 18시간 뒤에 박테리아를 GST protein extraction buffer (0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.3 mM PMSF, protease inhibitor cocktail (Roche, 11697498001))에 harvest하여 30분간 얼음위에서 lysis하였다. Lysis이후 lysate를 sonication해주었고, 원심분리기를 이용해 13,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 돌려 cell debris를 분리하였다. 분리한 상층액은 사용하기 전까지 deep freezer에 보관되었다. GST fusion protein의 발현을 확인하기 위해 glutathione magnetic bead (Thermo Scientific, 78602)를 이용해 protein purification을 하였다. Purified

protein 샘플은 SDS-PAGE를 진행하여 coomassie blue 염색을 통하여 확인하였다.

GST pull down

GST fusion protein은 conformational change를 유도하기 위해 5 μ M T0901317가 포함된 binding buffer(0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.3 mM PMSF, protease inhibitor cocktail (Roche, 11697498001))에서 incubation했다. GST pull down에 앞서 ³⁵S-labeled hTOP2A를 제작하기 위해 *in vitro* transcription-translation을 TNT T7 kit (Promega, L1170)를 이용해 제작사의 protocol에 준하여 실행하였다. 그리고 incubated GST융합단백질과 ³⁵S-labeled hTOP2A를 20시간 동안 반응시켰다. 이 후 버퍼를 이용해 세번의 washing단계를 거쳤고 이 샘플을 SDS-PAGE를 통해 분리하였다. 로딩된 젤을 건조시켜 X-ray 필름에 3일간 노출 후 현상하였다.

Mammalian two hybrid

Mammalian two hybrid system은 HeLa 세포를 이용하여 확인하였다. HeLa 세포를 well당 80% confluency로 48well plate에 DMEM(10% charcoal stripped FBS, antibiotics 제외)배지로 plating하였다. DNA의 조합은 Gal4-TK-Luc와 actin β -Gal을 well 당 25ng, 12.5ng을 공통으로 넣고 Gal4-hLXR α LBD와 VP16-hLBP5 또는 Gal4-hLBP5와 VP16-hLXR α LBD조합으로 각각 10ng씩 넣어 주었다. Transfection reagent로는 Transfection은 lipofectamine 2000을 well당 0.5 μ l 사용하였고, 제조사의 protocol에 따라 실시하였다. 다음날 DMSO와 1 μ M T0901317 단독 또는 1 μ M T0901317/1 μ M 9-cis retinoic acid를 같이 처리하여 18시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 18시간 후 배지를 제거하고 lysis buffer 200 μ l에 lysis하여 그 중 10 μ l를 luciferase reporter assay에 사용하고, 50 μ l를 β -galactosidase assay에 사용하였다. Luciferase reporter assay는 luciferase assay buffer를

100 μ l를 첨가하면서 1초 동안 값을 luminometer를 이용하여 측정하였고, β -gal assay는 2X β -gal buffer와 mix하여 37 $^{\circ}$ C에서 반응하여 420nm에서 multiplate reader로 값을 측정하였다. Luciferase 활성을 β -gal 값으로 나누어 normalization하였다.

Luciferase reporter assay

Promoter activity 측정을 위하여 luciferase reporter assay를 하였다. reporter로는 pGL3-mABCA1 (-781/+130), pGL3-hABCG1 (-530/+37), pGL3-mSREBP1c (-550/+42), 3가지를 사용하였다. 96well에 HEK293T 세포를 well 당 80% confluency로 DMEM (10% charcoal stripped FBS, antibiotics 제외)배지를 이용하여 plating하였다. Lipofectamine 2000 (11668-027, Invitrogen)을 사용하여 제조사의 protocol에 따라 transfection하였다. Transfection 18시간 후 DMSO 혹은 T0901317와 9 cis-retinoic acid를 각각 1 μ M로 처리하였다. 18시간 후 배지를 제거하고 lysis buffer 100 μ l에 lysis하여 그 중 10 μ l를 luciferase reporter assay에 사용하고, 50 μ l를 β -galactosidase assay에 사용하였다. Luciferase reporter assay는 luciferase assay buffer를 100 μ l를 첨가하면서 1초 동안 값을 luminometer를 이용하여 측정하였고, β -gal assay는 2X β -gal buffer와 mix하여 37 $^{\circ}$ C에서 반응하여 420nm에서 multiplate reader로 값을 측정하였다.

결과

GST-LXR β Fragments 제작 및 GST pull down assay 를 통한 Interaction 비교

LXR β 의 TOP2A interaction domain을 규명하기 위해 먼저 LXR β 를 크게 세부분으로 잘라 DNA binding domain (LXR β -DBD), hinge-Ligand binding domain (LXR β -hinge-LBD), helix 12 (H12)가 제거된 나머지 부분(LXR β - Δ H12)을 GST tagged vector인 pGEX-4T-1에 cloning하였다 (Figure 2 A). 그리고 BL21gold 균주에 transformation시켜 단백질을 얻어냈다. 얻어낸 GST 재조합 단백질을 GSH magnetic bead를 이용하여 purify한 다음, LXR의 agonist인 T0901317 10 μ M이 들어간 buffer에서 18시간 incubation하여 conformational change가 일어나도록 유도하였다. 18시간 뒤에 *invitro*-transcription-translation system을 이용하여 제작한 ³⁵S-Met (Methionine) labeled TOP2A를 추가하여 20시간동안 반응시켜주었다. 이 샘플을 세차례 washing해주고 SDS buffer와 함께 boiling해 5.5% tris-tricine gel로 running하였다. 이 gel을 80 $^{\circ}$ C에서 충분히 건조한 뒤 x-ray film에 4일 노출시킨 후 현상하였다. 그 결과 선행 연구에서 밝혀진 것과 같이 LXR β full length에서 TOP2A와 interaction이 확인되었다 (Figure 2 B). 또한 모든 fragment에서 interaction이 확인되었는데, 그 중에서 LXR β -hinge-LBD가 가장 강한 interaction을 보였으며 심지어 LXR β full length보다 더 강한 signal이었다. 이 band signal을 relative quantification 그래프로 그렸을 때에도 확인할 수 있었다 (Figure 2 C). 이를 통해 TOP2A와 interaction에 있어서 LXR β -hinge-LBD가 가장 중요하다고 보고, TOP2A의 coactivator function도 작동하는지 확인하기 위해 Mammalian two hybrid assay를 진행하였다.

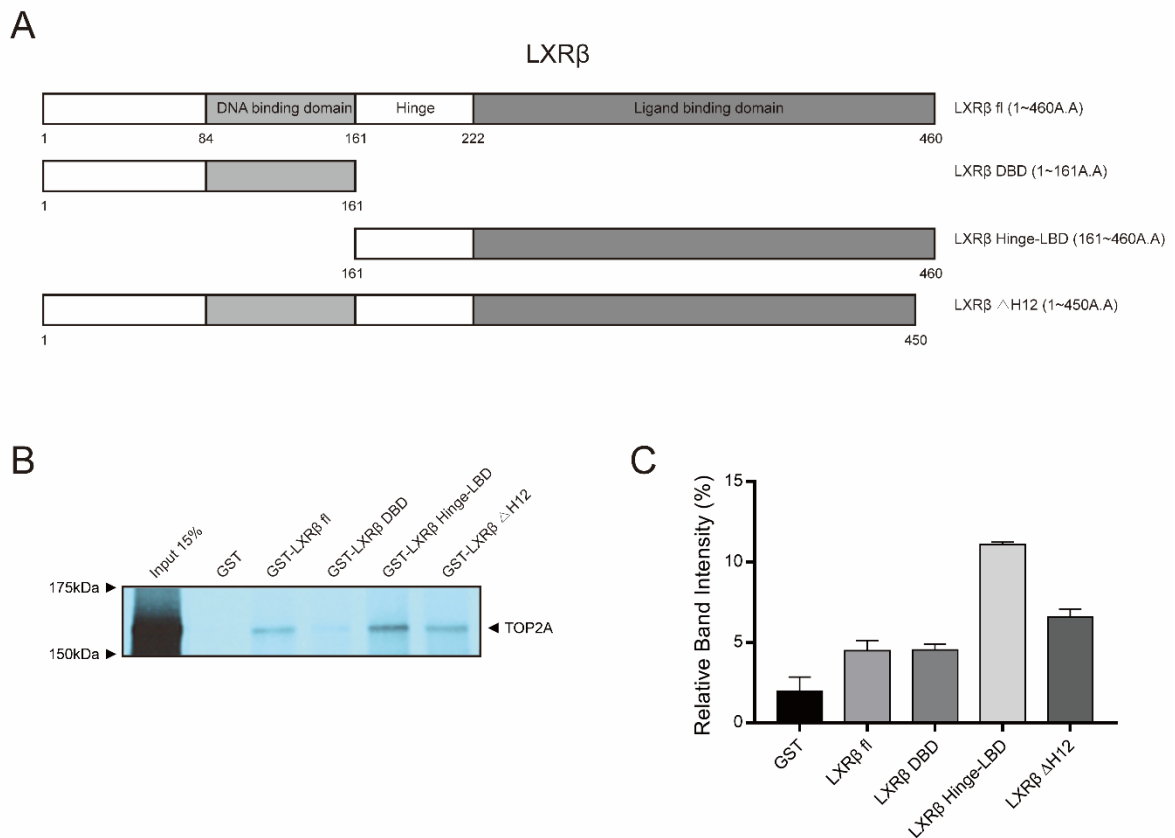


Figure 2. LXR β hinge-LBD showed the strongest interaction with TOP2A

(A) Schematic representation of LXR β fragments. (B) GST pull down assay with GST, GST-LXR β full length, GST-LXR β DBD, GST-LXR β hinge-LBD and GST-LXR β - Δ H12. (C) Data from GST pull down analysis were quantified relative to input. Data are presented as the mean \pm SEM (n = 3).

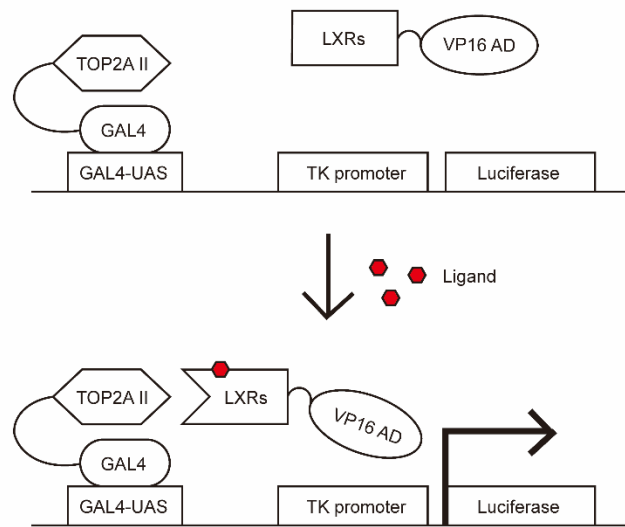
Mammalian two hybrid system 을 이용한 LXRs 에서 TOP2A II 의 coactivator function 확인 및 비교

LXR α fl, LXR α LBD, LXR β fl, LXR β -LBD 와 TOP2A II (248-692A.A) 간의 interaction 과 coactivator 활성을 확인하기 위해 Mammalian two hybrid system 을 이용하였다. Mammalian two hybrid system 은 DNA 에 binding 할 수 있는 Gal4 DNA binding domain 에 bait 단백질을 붙이고, transcription 활성을 증가시킬 수 있는 VP16 activation domain 에 bait 와 interaction 을 확인할 단백질을 붙여 두 단백질이 interaction 할 경우, reporter gene 의 발현 증가를 통해 이것을 확인할 수 있는 system 이다. pCMX-GAL4 vector 에 TOP2A II (TOP2A fragment II)를 cloning 하였고, pcDNA3.1(+)-neo-VP16 vector 에 각각 LXR α , LXR α LBD, LXR β , LXR β -LBD 를 cloning 하였다. 이때 TOP2A full length 가 아닌 TOP2A II 를 사용했는데 그 이유는 선행 연구에서 TOP2A II 단독으로도 full length 와 거의 유사한 coactivator function 을 보여 주었고, transfection 시에 5.6kb 로 사이즈가 매우 큰 TOP2A 보다 TOP2A II 가 유리하기 때문에 사용하였다.

HeLa 세포에 GAL4 DNA, VP16 DNA 와 reporter gene 을 lipofectamine 2000 을 이용해 co-transfection 시킨뒤 하루 배양한 다음 DMSO 혹은 1 μ M T0901317, 1 μ M T0901317/1 μ M 9 cis-RA 을 각각 처리하였다. 그 다음날 배지를 제거하고 lysis buffer 를 이용해 lysis 하고, 이 lysate 를 가지고 luciferase reporter assay 와 β -galactosidase assay 를 진행했다. 이때 luciferase activity 값을 β -gal 값으로 나누어 normalization 하였고 이를 DMSO 처리군과 비교하였다. 그 결과 LXR β full length 에서 선행연구와 동일하게 TOP2A II 의 coactivator function 에 의한 luciferase 의 유의미한 further activation 을 확인할 수 있었다 (Figure 3 B). 반면에 LXR α fl 와 LXR α LBD 에서는 이러한 luciferase 의 발현증가가 나타나지 않았다. 한편 LXR β -LBD 에서는 이러한 further activation 이 보이지 않았다. 이것은 GST pull down 에서 보여 주었던 결과와 다른 점인데, 이것은 이후

실험에서 알아낸 가장 큰 interaction 을 보이는 hinge domain 이 포함되어 있지 않기 때문에 interaction 을 하지 않는 것으로 해석할 수 있다. 무엇보다 LXR β -hinge-LBD 부분이 GST pull down 이라는 protein-protein direct interaction 을 확인할 수 있는 실험에서 확인이 되었기 때문에, LXR β -hinge-LBD 부분에서 구체적인 TOP2A interaction subdomain 을 확인하기로 했다.

A



B

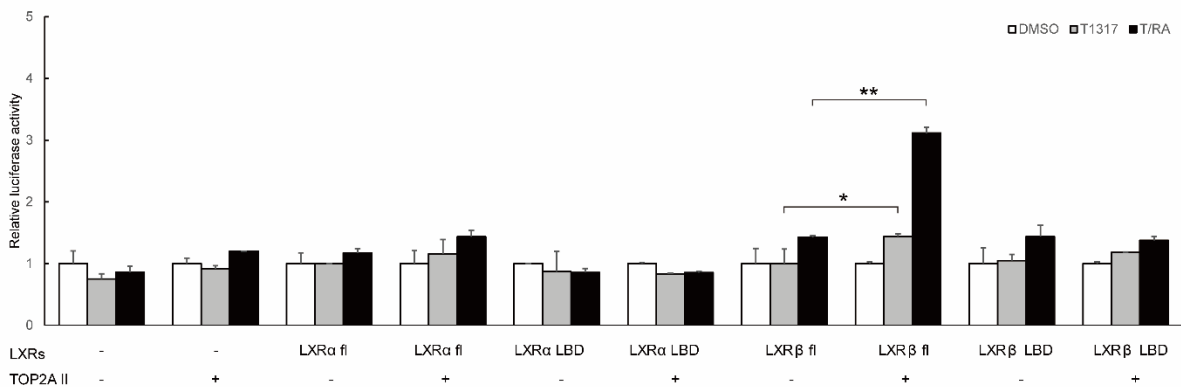


Figure 3. TOP2A II interacted with LXRβ but not with LXRβ LBD.

(A) Schematic diagram of mammalian two hybrid system. (B) Ligand-dependent interaction between GAL4-TOP2A II and VP16-LXRβ full length. GAL4-TOP2A II, VP16-LXRα, GAL4-tk-luc and actin β-gal were co-transfected into HeLa cells. The cells were treated with 1μM DMSO or 1μM T0901317 or 1μM T0901317/1μM 9 cis-RA. Luciferase activities were measured and normalized by β-galactosidase activities. Luciferase activities are shown as relative folds. The data are representative of at three independent experiments (n = 3). Data are presented as the mean ± SEM. * p<0.05; ** p<0.01 by one-way ANOVA.

GST-LXR β LBD Fragments 제작 및 GST pull down assay 를 통한 Interaction 비교

LXR β hinge-LBD가 TOP2A와 interaction하는 것을 확인했지만, 더 구체적인 subdomain을 mapping하기 위해서 LXR β hinge-LBD의 amino acid sequence를 secondary structure를 기준으로 7개의 LXR β LBD fragments를 제작했다 (Figure 4 A). 얻어낸 단백질을 앞선 실험과 동일한 실험방법으로 GST pull down assay를 진행했다. 그 결과 LXR β LBD fragments 중에서 LXR β fragment I이 TOP2A와 가장 큰 interaction을 보이는 것을 확인했다 (Figure 4 B). 또한 LXR β fragment VII에서도 약한 interaction이 확인됐다. 이것은 정량그래프를 통해서도 확인할 수 있다 (Figure 4 C). LXR β fragment I에서 가장 높은 intensity를 보였지만, 일부분이 겹치는 LXR β fragment II의 intensity는 거의 확인되지 않았다. 이를 통해 두 fragment가 겹치는 부분을 제외한 부분, 즉 LXR β 의 hinge domain이 TOP2A와 interaction하는 가장 중요한 subdomain임을 확인할 수 있다. 이 부분을 검증하기 위해 LXR β 의 hinge domain을 LXR α hinge domain으로 바꾸어 TOP2A와의 interaction 및 coactivation function을 확인하는 실험을 진행하였다.

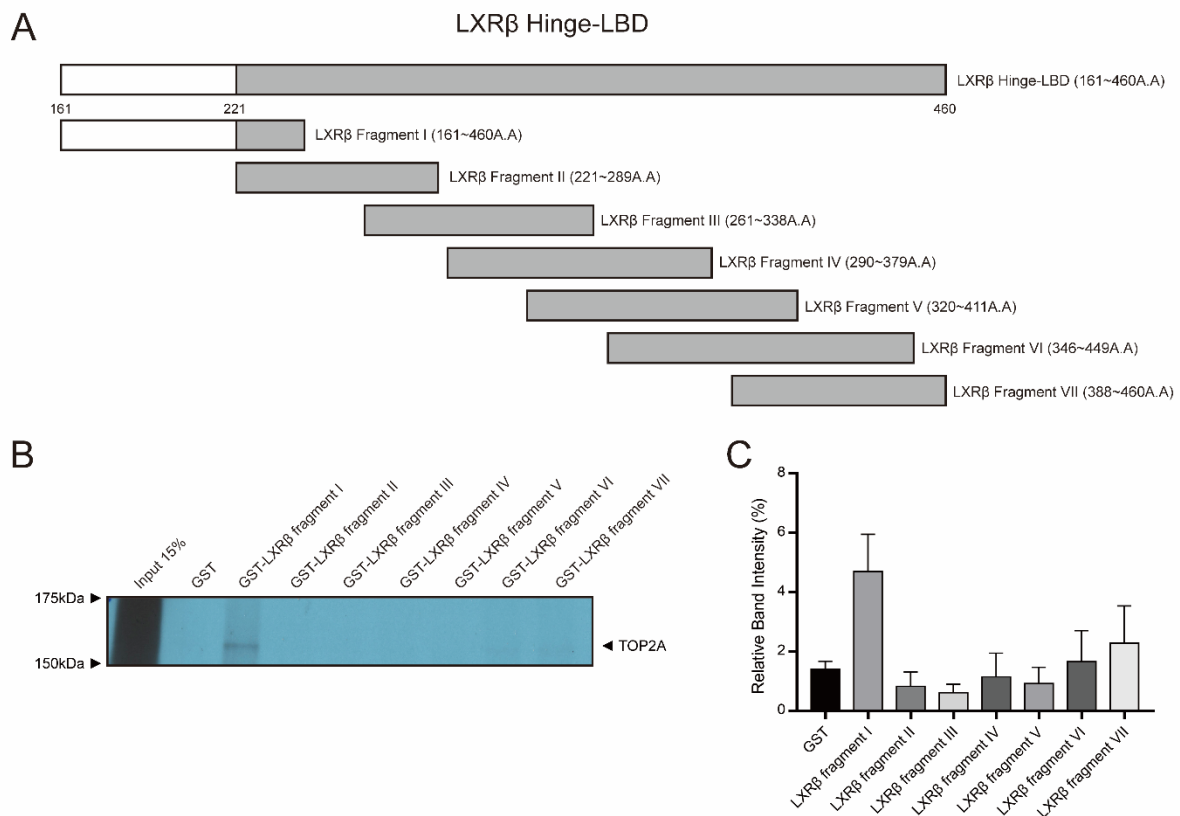


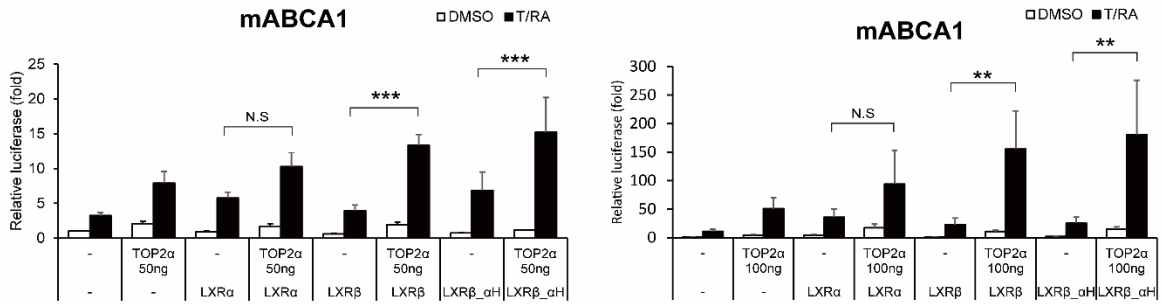
Figure 4. LXR β fragment I showed the strongest interaction with TOP2A.

(A) Schematic representation of LXR β hinge-LBD fragments. (B) *In vitro* GST pull down analysis was performed between TOP2A and GST-LXR β fragment I~VII. (C) Data from GST pull down analysis were quantified relative to input. Data are presented as the mean \pm SEM (n = 3).

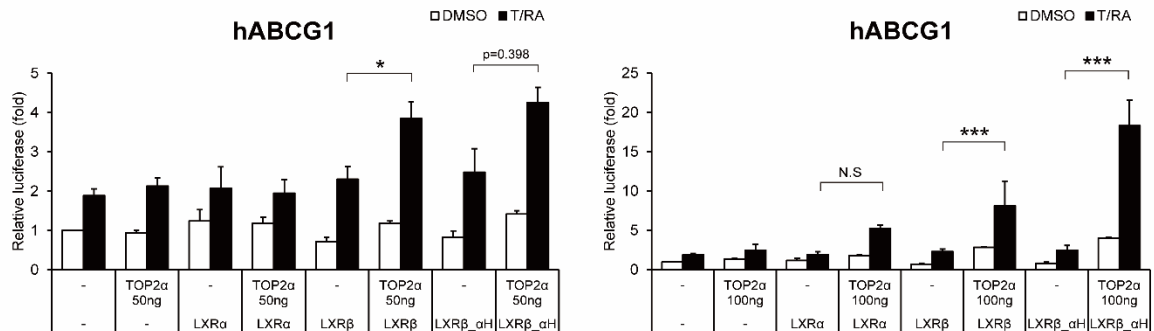
LXR β _ α H 의 TOP2A 와 interaction 확인 및 비교

먼저 LXR β 에서 hinge domain 부분만 LXR α hinge domain 으로 교체한 construct 를 제작하였다. 그 다음 LXRE (LXR binding element)가 존재하는 promoter 인 mABCA1, hABCG1, mSREBP1c 에서 각 LXRs 와 함께 TOP2A 를 co-transfection 시켜 luciferase activity 를 측정하였다 (Figure 5). 그 결과, mABCA1 에서는 TOP2A 가 각각 50ng ,100ng transfection 되었을 때 모두 LXR β 에서 further activation 을 보였고, LXR α 에서는 유의미한 증가를 보이지 않았다 (Figure 5A). 이때 LXR β _ α H 는 LXR β 에서 보인 further activation 이 사라지지 않았다. 또한 hABCG1 에서도 TOP2A 가 100ng transfection 되었을 때 이와 같은 패턴을 보이고 있으며, 50ng transfection 된 경우에는 LXR β 에서만 유의미한 증가를 확인할 수 있었고, LXR β _ α H 에서는 증가하는 듯한 trend 만 확인되었다. 반면에 선행연구와 동일하게 mSREBP1c 에서는 TOP2A 의 coactivator function 을 확인할 수 없었다. 따라서 LXR β 에서 hinge domain 부분만 LXR α hinge domain 으로 교체한 LXR β _ α H 에서 TOP2A 와의 specific interaction 이 없어지지 않은 것을 알 수 있다.

A



B



C

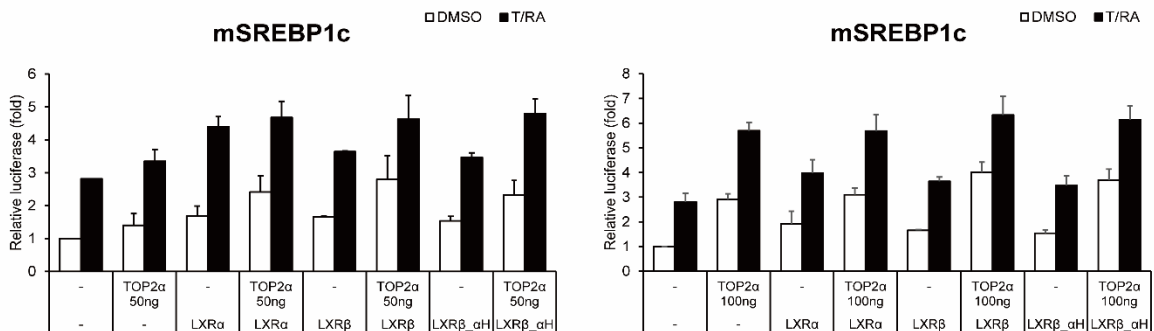


Figure 5. LXRβ_αH still cooperated with TOP2A as much as wild type LXRβ.

HEK 293T cells were transfected with luciferase reporter plasmid under the control of (A) mABCA1 (-781/+130), (B) hABCG1 (-530/+37) or (C) mSREBP-1c (-550/+42) promoters. TOP2A was transfected with 50ng (left) or 100ng (right). 2.5ng of reporter gene (Figure A left) and 5ng of LXR were cotransfected. Luciferase activities were represented as fold compared to the value of mock DMSO. Data are presented as the mean \pm SEM. ***, $p < 0.001$ by one-way ANOVA. $n = 5$ for ABCA1-Luc/TOP2A 50ng; $n = 3$ for ABCA1-Luc/TOP2A 100ng; $n = 4$ for ABCG1-Luc; $n = 3$ for SREBP-1c-Luc.

고찰

LXR이 ligand에 의해 activation되면 대식세포의 ABCA1, ABCG1 발현 증가에 의한 reverse cholesterol transporter (RCT) 증가, NF- κ B signaling 억제를 통한 염증반응 억제, 항동맥경화 효과를 보인다(10). 그러나 그와 더불어 SREBP1c의 발현 증가에 의해 고중성지방혈증 (hypertriglycemia)과 지방간 (steatosis)이 발생한다(10, 16). 하지만 Quinet E. M. 등의 *in vivo* 연구에 따르면, LXR β specific activation이 고중성지방혈증 (hypertriglycemia)을 동반하지 않고 항동맥경화효과를 가져올 수 있다. 따라서 본 연구에서는 TOP2A를 이용해 LXR α 과 LXR β 간의 구조적 차이를 규명하여, LXR β specific activation의 target을 새로 개발하고자 했다.

TOP2A가 LXR β 와 specific interaction한다는 선행연구를 바탕으로, LXR β full length, LXR β -DBD, LXR β -hinge-LBD, LXR β - Δ H12를 GST pull down를 진행했다 (Figure 2 A, B). TOP2A의 LXR β fl와의 interaction은 선행연구의 내용과 일치했고, LXR β -hinge-LBD같은 경우는 오히려 interaction이 더 증가했다. 이것으로 hinge-LBD부분이 주요한 interaction domain을 가지고 있으며 TOP2A와 interaction에 있어서 구조적으로 더 유리하다고 볼 수 있다. 이렇게 확인된 LXR β -LBD를 mammalian two hybrid assay를 이용하여 interaction을 한번 더 확인하고자 했다 (Figure 3 A, B). 이때 T0901317에 의한 반응이 충분하지 않아 LXR과 heterodimer를 이루는 RXR α 의 agonist인 9 cis-RA를 동시에 처리하여 ligand에 의한 반응이 더 커지도록 하였다. 그러나 예상과 달리 LXR β full length에서만 interaction이 확인되었고 LXR β -LBD에서는 TOP2A II에 의한 coactivator function을 확인할 수 없었다. 이것은 TOP2A II 와 LXR β LBD간에는 interaction이 확인되지 않는 것인데, Figure 4에서 확인했듯이 LXR β hinge-LBD중에서 hinge domain이 interaction에 있어서 essential하기 때문에 이것이 존재하지 않는 VP16-LXR β LBD와는 interaction을 보이지 않

는 것으로 해석할 수 있다.

LXR β LBD fragment의 GST pull down 결과를 보았을 때, Fragment I에서 가장 강한 signal을 보였고 Fragment II에서는 signal을 보이지 않은 점을 통해 LXR β hinge 부분을 특정하게 되었다. 하지만 protein expression을 확인하는 실험에서(Data not shown) fragment I이 유독 많이 발현되었는데, hinge부분이 단백질 발현에 영향을 미칠 가능성을 고려하여 단백질 발현을 여러 차례 반복해보았다. 하지만 hinge 부분이 없는 Fragment II와 비슷한 발현정도를 보였을 때에도 Fragment I이 여전히 가장 signal이 강했기 때문에 단백질 발현 정도의 차이에 의한 문제는 고려하지 않았다.

Hinge부분의 function에 대해 확인을 하고자 LXR β 에서 hinge domain부분을 LXR α hinge domain으로 교체한 hybrid construct인 LXR β _ α H를 제작하여 세 promoter, mABCA1, hABCG1, mSREBP1c에 대해 luciferase assay를 진행하였다. 그 결과 LXR β 의 hinge domain을 LXR α 교체하였음에도 불구하고, LXR β 에서 보이던 TOP2A의 coactivator function이 LXR β _ α H에서도 여전히 보였다. 이를 통해 TOP2A의 LXR β specific interaction은 hinge domain을 통해 이루어지지 않는다는 것을 알 수 있다. 또한 Figure 3 데이터를 토대로 보았을 때, LXR β 대신 교체된 LXR α hinge domain이 interaction에 있어서 어느 정도 역할을 하고 있는 것을 알 수 있다. 따라서 LXR β 뿐만 아니라 LXR α 에서 hinge domain은 TOP2A와 interaction 자체에는 매우 중요하지만, 이것이 LXR β specificity를 가지지는 못한다고 정리할 수 있다.

Hinge domain은 일반적으로 두개의 major한 도메인을 연결하는 유연한 연결부위로 특별한 기능이 없는 것으로 알려져 있다. 그러나 Miyamoto T 등 (2001)의 연구에 따르면 thyroid hormone receptors (TR)의 LBD가 VDR (vitamin D) promoter에 결합하는데 있어 hinge부분이 필요하다고 보고된 바 있다(23). 또한 Haelens 등 (2007)에 의하면 androgen receptor (AR)의 hinge에 존재하는 RKLKGLGN motif가 AR DBD가 DNA에 결합

하는데 있어 중요하다고 보고되었다(24). 본 연구를 진행하면서 LXR β 의 hinge 부분을 분석해 앞서 보고된 RKLKGLN motif와 일치하지는 않았지만 비슷한 아미노산 서열을 확인했다. 또한 본 연구에서는 hinge가 LBD와 붙어있는 construct를 제작하였기 때문에 주로 DBD와 함께 기능을 하는 것으로 보인 Haelens 등 (2007)의 연구에서 보였던 hinge의 기능이 잘 나타나지 않았을 가능성도 있다. Hinge domain은 nuclear receptor들이 공통적으로 가지고 있는 nuclear localization signal이 포함되어 있다. 하지만 중간 염기서열의 보존성이 매우 낮고 특정한 구조를 가지고 있지 않기 때문에 hinge domain은 nuclear receptor들마다 각자 고유의 기능을 가질 것이라는 가설도 있다(5). 그렇기 때문에 본 연구에서는 TOP2A의 LXR β interaction domain으로서 초점을 맞추었지만, hinge가 가지는 다른 기능이 있을 가능성도 생각해 볼 수 있다.

본 연구를 통해 TOP2A의 LXR β specific interaction의 mechanism에 있어 LXR β hinge domain이 TOP2A와 interaction하는데 있어 essential한 것을 확인했지만, LXR β hinge domain 만으로는 specificity를 가질 수 없었다. Nuclear receptor의 도메인으로서 DBD와 LBD가 가장 주목받는 것은 사실이지만, 앞서 언급한 연구들을 바탕으로 볼 때 hinge 도메인 또한 transcription factor로서 잠재적인 기능을 가진 부분으로 볼 수 있으며 이를 연구할 가치가 충분하다. 그리고 앞으로의 연구에 있어서, 본 연구에서는 확인하지 못한 LXR α _ β H와 DBD-LXR β hinge construct에 대한 TOP2A의 LXR β specific interaction을 확인하는 것도 LXR의 isoform에 대한 이해에 있어 중요한 부분이 될 것이다.

참고문헌

1. Baranowski M. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59 Suppl 7:31-55.
2. Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Horoszewicz K, 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.
3. Ulven SM, Dalen KT, Gustafsson JA, Nebb HI. LXR is crucial in lipid metabolism. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 2005;73(1):59-63.
4. Komati R, Spadoni D, Zheng S, Sridhar J, Riley KE, Wang G. Ligands of Therapeutic Utility for the Liver X Receptors. *Molecules.* 2017;22(1):88.
5. Miyamoto T, Kakizawa T, Ichikawa K, Nishio S, Takeda T, Suzuki S, et al. The role of hinge domain in heterodimerization and specific DNA recognition by nuclear receptors. *Molecular and cellular endocrinology.* 2001;181(1-2):229-38.
6. Fievet C, Staels B. Liver X receptor modulators: effects on lipid metabolism and potential use in the treatment of atherosclerosis. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(8):1316-27.
7. Loren J, Huang Z, Laffitte BA, Molteni V. Liver X receptor modulators: a review of recently patented compounds (2009 - 2012). *Expert Opin Ther Pat.* 2013;23(10):1317-35.
8. Li X, Yeh V, Molteni V. Liver X receptor modulators: a review of recently patented compounds (2007 - 2009). *Expert Opin Ther Pat.* 2010;20(4):535-62.
9. Terasaka N, Hiroshima A, Koieyama T, Ubukata N, Morikawa Y, Nakai D, et al. T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Lett.* 2003;536(1-3):6-11.
10. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. 2002;99(11):7604-9.
11. Moslehi A, Hamidi-Zad Z. Role of SREBPs in Liver Diseases: A Mini-review. *J Clin*

Transl Hepatol. 2018;6(3):332-8.

12. Shimano H, Sato R. SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology — divergent pathophysiology. *Nature Reviews Endocrinology*. 2017;13(12):710-30.
13. Ferré P, Foufelle F. SREBP-1c Transcription Factor and Lipid Homeostasis: Clinical Perspective. *Hormone Research in Paediatrics*. 2007;68(2):72-82.
14. Korach-André M, Gustafsson J-Å. Liver X receptors as regulators of metabolism %J *Biomolecular Concepts*. 2015;6(3):177-90.
15. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:459-81.
16. Quinet EM, Savio DA, Halpern AR, Chen L, Schuster GU, Gustafsson JA, et al. Liver X receptor (LXR)-beta regulation in LXRalpha-deficient mice: implications for therapeutic targeting. *Mol Pharmacol*. 2006;70(4):1340-9.
17. Gnerre C, Schuster GU, Roth A, Handschin C, Johansson L, Looser R, et al. LXR deficiency and cholesterol feeding affect the expression and phenobarbital-mediated induction of cytochromes P450 in mouse liver. *Journal of lipid research*. 2005;46(8):1633-42.
18. Nielsen CF, Zhang T, Barisic M, Kalitsis P, Hudson DF. Topoisomerase II α is essential for maintenance of mitotic chromosome structure. 2020;117(22):12131-42.
19. Nitiss JL. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9(5):327-37.
20. Bossaert M, Pipier A, Riou J-F, Noirot C, Nguyễn L-T, Serre R-F, et al. Transcription-associated topoisomerase 2 α (TOP2A) activity is a major effector of cytotoxicity induced by G-quadruplex ligands. *eLife*. 2021;10:e65184.
21. Deweese JE, Osheroff N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic acids research*. 2009;37(3):738-48.
22. Cuvier O, Hirano T. A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. *Journal of Cell Biology*. 2003;160(5):645-55.

23. Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(4):213-24.
24. Majumdar R, Dighe RR. The hinge region of human thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor operates as a tunable switch between hormone binding and receptor activation. *PLoS one.* 2012;7(7):e40291.
25. Clinckemalie L, Vanderschueren D, Boonen S, Claessens F. The hinge region in androgen receptor control. *Molecular and cellular endocrinology.* 2012;358(1):1-8.

Abstract

The Liver X Receptor (LXR) is one of the nuclear hormone receptors. Its two isoforms, LXR α and LXR β , show a very high level of homology, but have distinct differences in the metabolic phenotypes demonstrated in LXR knockout mice. However, it has been mostly unknown how transcriptional activities between LXR α and LXR β as a transcription factor are different. Our previous study demonstrated that DNA topoisomerase II α (TOP2A) functions as a transcriptional coactivator specifically regulating LXR β -target gene transcriptional activation. To support the finding and elucidate LXR β -specific regulation mechanism of TOP2A, this study identified a subdomain of LXR β , which is responsible for the specific interaction with TOP2A. Firstly, GST pull down assay was performed using the GST fusion proteins of LXR β DNA binding domain (LXR β -DBD), LXR β hinge-ligand binding domain (LXR β hinge-LBD), and helix 12-deleted LXR β (LXR β - Δ H12). LXR β hinge-LBD showed the most robust interaction with TOP2A. In order to map even smaller part of LXR β , LXR β hinge-LBD was further divided to seven fragments based on the protein secondary structure. The fragment containing LXR β hinge region showed strong interaction with TOP2A. Then, to clarify whether the LXR β hinge is an essential domain for TOP2A coactivation, LXR β hinge domain was replaced with LXR α hinge. Using this hybrid LXR β (LXR β α H), the effects of TOP2A on transcription activities of ABCA1, ABCG1, and SREBP1c promoters were compared by luciferase reporter assay. Unexpectedly, the coactivator function of TOP2A is still observed with LXR β α H hybrid. Taken together, these results suggest that the LXR β hinge domain plays an important role in the protein-protein interaction between LXR β and TOP2A, but it is considered not to be a part that solely determines the LXR β specific activation of TOP2A.