

CYTOTOXICITY OF PATULIN AND ITS EFFECT ON THE LAMBDA DNA CLEAVAGE BY RESTRICTION ENDONUCLEASE

Kil-Soo Lee

Department of Biology, Hallym University, Chunchon, Kangwondo, 200-702, Korea

(Received November 12, 1991)

(Accepted November 29, 1991)

ABSTRACT: The effect of patulin, a mycotoxin, on the growth of *Escherichia coli* cell was investigated. *E. coli* cell elongation usually shown in SOS-response for DNA repair was induced by 20 µg of patulin per ml. After staining the *E. coli* chromosome with fluorescence dye(DAPI, 4', 6-diamino-2-phenyl-indole), chromosomal DNA partitioning was not affected by patulin. This observation indicates that patulin acts as a DNA damaging agent which is effective for *E. coli* cell elongation introduced by the inhibition of septum formation. Moreover, patulin inhibits the cleavage reaction of some restriction endonucleases (*StyI*, *AsnI*, *BamHI*, *HindIII*) on lambda phage DNA. The restriction endonucleolytic fragments of lambda phage DNA preincubated with patulin was larger than standard digest product. The lambda DNA recognition site (cleavage site) for *StyI* (C ↓ CAAGG) was very sensitive to patulin, while the site for *AsnI* had a very low reactivity with patulin. It seems like that the cytosine of *StyI* recognition sequence in lambda phage DNA would be a highly possible target nucleotide for patulin.

Key words: Patulin, Cell elongation, DNA damage, Restriction enzyme

서 론

Patulin(4-hydroxy-4H-furo[3,2C]pyran-2[6H]-one)은 몇 종류의 *Penicillium* species로부터 생성되는 lactone 계열의 진균독소로서 무색의 결정체이며, 자외선 UV 276 nm에서 최대흡광도를 가진다 (Betina, 1989). 진균독소로서 patulin의 mouse에 대한 LD₅₀는 10-35 mg/kg이며, HeLa 세포에서는 DNA 절단을 일으키며 (Umeda 등, 1972), rat에서의 carcinogenicity도 보고된 바 있다(Becci, 1981). 이와같이 돌연변이 유발원으로서의 patulin의 영향은 세균에서 돌연변이 유발성 물질의 test로 이용되는 Ames-test에서는 음성 (Wehner, 1978), recombination test인 rec-test에서는 양성 (Ueno 등 1976)의 결과가 보고 되었다. 한편 patulin의 돌연변이 유발원으로서의 가능성에 관한 *E. coli* 세포에서 *in vivo* 실험의 결과, *E. coli* DNA의 strand 절단 또는 DNA 복제의 저해를 나타낸다고 하였으며, DNA 손상물질의 test로 사용되는 lambda phage induction을 유발한다고 하였다. (Lee 등, 1986). 또한 *in vitro* 실험에서도 lambda phage DNA의 strand

절단을 일으킨다고 보고되었다. (Lee 등, 1987). 이와같이 patulin은 *in vivo*, *in vitro*에서 DNA를 손상시키므로서, *E. coli* 세포 내에서 DNA 손상회복작용의 하나인 SOS-response (D'ari 등, 1983)을 야기시킬 것이고, 이어서 *sfIA* gene product (cell division inhibitor)에 의하여 세포분열이 저해될 수 있으므로 이로부터 야기되는 *E. coli* 세포의 형태적 변화, 염색체의 분포와 같은 세포독성을 위상차, 형광현미경으로 관찰하고자 하였다. Patulin은 sulfhydryl기 또는 아미노기와 쉽게 반응하므로서 (Ciegler, 1977; Hofmann 등, 1971), alcohol dehydrogenase (Ashoor 등, 1973), muscle aldolase (Ashoor 등, 1973), ATPase (Phillips 등 1977), urease (Reiss, 1979) 및 RNA polymerase와 RNase H (Tashiro 등, 1979)의 효소활성을 억제한다고 보고되었다. Lambda phage와 *E. coli* DNA 절단은 patulin에 의한 DNA 손상작용에 기인한 것으로, patulin이 DNA와 반응하여 DNA 염기에 직접 결합되거나, glycosidic bond의 불안정때문에 탈염기화 (depurination 또는 depyrimidination)될 수 있을 것이다. 그러므로 DNA의 특정 염기를 인식하여 절단하는 제한효소를 사용하여 patulin의 DNA 염기에 대한 반응성, 제한효소의 DNA 절단 작용에 대한 영향을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

Patulin의 분리

Penicillium patulum NRRL5259 균주를 Potato-dextrose 액체 배양 배지에 접종하여 28°C에서 8일간 진탕배양한 후 ethylacetate와 ethylether를 사용하여 patulin을 정제하였다 (Norstadt, 1969). Patulin의 순도는 표준시료 patulin (Sigma)과 비교하였다.

E. coli 성장에 대한 영향

Escherichia coli MRE 600 (RNase)을 LB Broth(Miller, 1972)에 접종한 후 37°C에서 배양하여 O.D. 600 nm 0.10에서 여러 농도의 patulin을 처리한 후, 배양을 계속하여 후기 exponential phase에 도달한 후 원심분리로 세포를 수거하였다. 수거된 세포를 0.84% saline에 suspend 시킨 다음 5~10 μ l slide glass에 도말, 건조시켰다. 세포의 염색체 DNA의 형광염색은 Hiraga의 방법에 따라서 DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole)로 염색하여 형광현미경 (Olympus reflected light fluorescence microscope, Model BH 2-RFL)을 사용하여, Kodak color film (ISO 400)으로 사진 촬영하였다.

Bacteriophage lambda DNA의 분리

Escherichia coli CSH44 lambda lysogen으로부터 phage DNA를 분리하였고 (Miller, 1972), DNA의 정성은 0.8% agarose gel 전기영동으로 수행하였다. 정량은 분광 광도계를 사용하여 O.D. 260 nm를 측정하므로서 결정하였고 (O.D. 260 nm 1.0 = 50 μ g/ml of dsDNA, Maniatis, 1982). 순도는 O.D. 260 nm/O.D. 280 nm의 값으로 측정하였다. (pure DNA, O.D. 260 nm/O.D. 280 nm = 1.8).

제한효소의 DNA Cleavage에 대한 영향

Bacteriophage lambda DNA 0.17 μ g과 0.1 μ g에서 150 μ g까지의 patulin을 각각 0.01 M citrate phosphate buffer (pH 6.0)에서 농도별로 37°C, 2시간 동안 preincubation 시킨 후, Boehringer 제한효소 Bam HI, Asn I, Hind III, Sty I 1 unit씩을 각각 처리하고 incubation buffer (Maniatis, 1982)와 H₂O로 total reaction volume이 10 μ l되게 하여 1시간 동안 37°C에서 incubation 하였다. Incubation 후 6배로 농축된 loading buffer 2 μ l를 첨가하고, 0.7% agarose gel의 각 well에 loading하여 DNA 전기영동 submarine chamber에 넣고, 100 V/50 mA에서 2시간 전기영동 하였다. DNA band의 염색은 ethidiumbromide (0.5 μ g/ml TAE buffer, Maniatis, 1982)에서 1시간 하였고, 3시간 동안 증류수로 gel background를 탈색하였다. Gel은 U.V. transilluminator위에서 polaroid camera (Photodyne)로 polaroid film 667을 사용하여 F. 4.5, 1/2 sec로 촬영하였다.

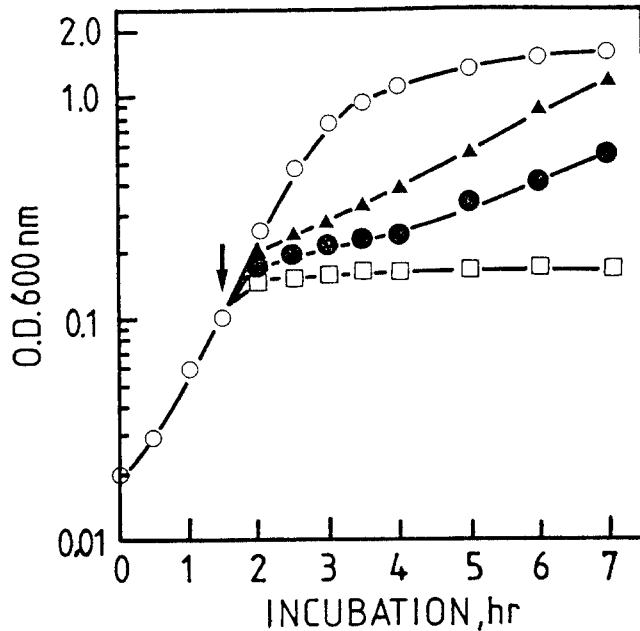


Fig. 1. Growth inhibition of *Escherichia coli* MRE600 by patulin. Arrow indicates the time for patulin addition into culture medium. (○); control, (▲); 10 µg/ml patulin, (●); 20 µg/ml patulin, (□); 50 µg/ml patulin.

결과 및 고찰

E. coli MRE 600 (*RNase*) 균주에 대한 patulin의 세포독성은 세포의 성장을 면에서 배양시간에 따른 세포의 밀도를 측정하였으며, patulin을 각 농도별로 초기 exponential phase에 처리하고 성장을 관찰하였다 (Fig. 1). Patulin의 농도 10 µg/ml에서는 초기에는 성장의 저해가 보였으나, 4-5시간 후에는 patulin을 처리하지 않은 control과 같은 정도로 성장하였다. 그러나 세포의 성장률은 control에 비하여 현저히 저하하였다. Patulin 50 µg/ml에서는 세포의 성장은 거의 중지 되었으나, patulin의 독성에 의한 cell lysis는 일어나지 않았다. 20 µg/ml patulin의 농도에서는 성장의 저해는 현저하였고, 성장률도 매우 낮았다. *E. coli* MRE 600 균주는 patulin의 농도에 의존적으로 patulin에 의하여 성장이 저해되었다. Patulin 처리 4시간 후 즉, 후기 exponential phase에서 세포를 수거하여 세포의 형태와 그의 염색체를 형광염색하여 위상차 현미경과 형광현미경으로 관찰하였다 (Fig. 2). Control에서는 *E. coli* 세포의 전형적인 성장과 균형태가 보였으나, 20 µg/ml patulin을 처리한 *E. coli* 세포는 모두 elongation (long form) 되었음을 볼 수 있었다. 10 µg/ml 및 50 µg/ml patulin 농도에서는 세포의 elongation은 일어나지 않았으며, 10 µg/ml에서는 세포의 성장이 완전히 정지되었다. *E. coli*의 cell elongation은 일반적으로 자외선이나 novobiocin, nalidixic acid 등에 의하여 SOS-response가 야기되어, 이로부터 RecA protein이 합성되고, 이 RecA protein은 protease 활성을 가지므로서 LexA protein을 절단하여 불활성화 시킨다. LexA protein에 의하여 repression되며 세포분열 inhibitor로서 작용하는 *sfiA* gene product (Bachmann, 1990)의 repression은 LexA Protein의 불활성 때문에 derepression 되므로써 (Dari, 1983), SfiA protein이 세포내에 축적되게 되므로 *E. coli* 세포는 체적 성장은 계속되지만 septum 형성이 저해되어 elongation 된다. Patulin 50 µg/ml의 농도는 *E. coli* 세포의 SOS-response를 야기시킬 수 있는 DNA 손상유발 이상의 농도이므로 거의 모든 세포의 기능이 상실되므로서 세포의 성장이 중지된 것으로 생각되며, 10 µg/ml patulin에서는 DNA 손상 이하의 농도이므로 세포의 성장은 계속되었고, 세포분열도 정상적인 것으로 관찰되었다. Patulin은 *in vivo*에서 *E. coli*의 DNA 복제 저해와 lambda phage induction 또는 *in vitro*에서 phage DNA strand 절단을 야기시키므로서 (Lee 등, 1986, 1987), 이러한 DNA 손상의 결과로서 나타나는 세포의

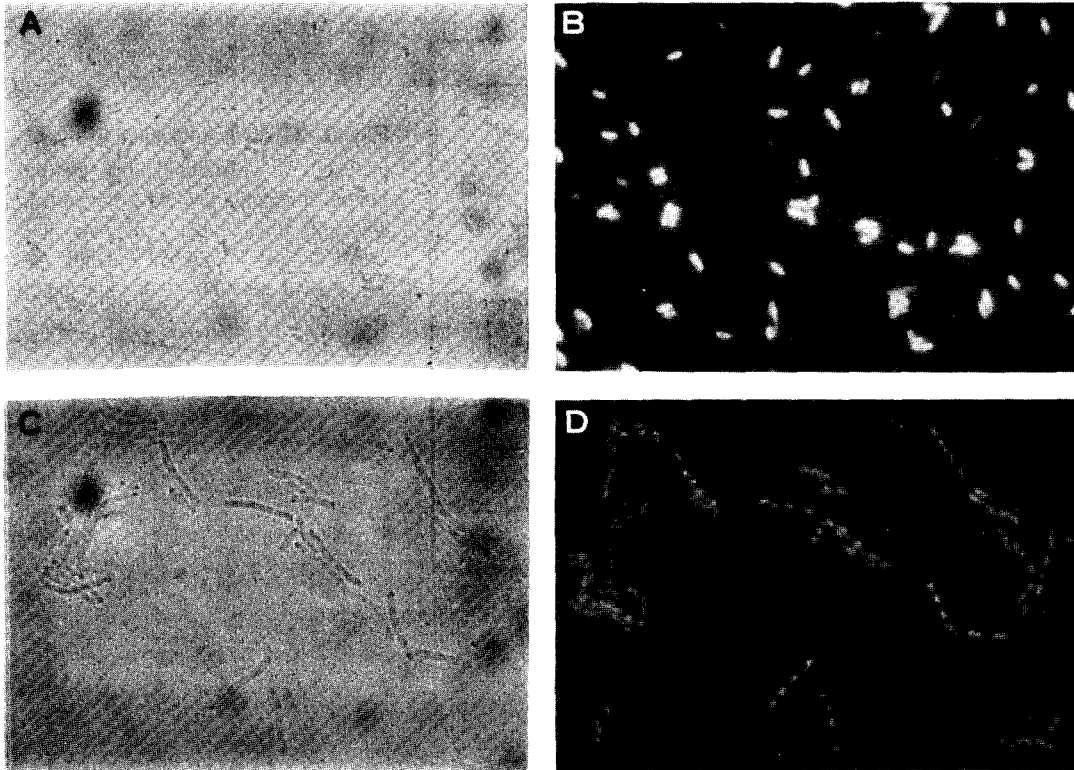


Fig. 2. Cell elongation of *Escherichia coli* MRE600 by patulin (20 $\mu\text{g/ml}$). Panel A and B are *E. coli* control cell, C and D are *E. coli* cell treated with patulin (20 $\mu\text{g/ml}$). Panel B and D are *E. coli* cells stained with fluorescence dye(DAPI) to observe cell shape and chromosome.

elongation은 patulin 20 $\mu\text{g/ml}$ 처리에 의하여 유발되는 DNA 손상에 의한 세포독성 때문일 것이다.

한편 patulin에 의한 DNA 복제 저해, lambda phage DNA의 절단 및 induction은 DNA의 직접적인 손상의 결과로 생각되므로 patulin이 aflatoxin B1 (Essigmann, 1977)과 같이 DNA 염기와 직접 반응한다면 반응 생성물실로서 결합 복합체인 DNA-patulin adduct를 형성하던지 또는 patulin이 염기와 결합하므로써 DNA의 N-glycosidic bond의 불안정 때문에 탈염기화 (depurination, depyrimidination)될 수 있을 것이다. 그러나 아직까지 DNA-patulin adduct의 분리에 관하여는 보고된 바 없을 뿐 아니라, patulin의 DNA 염기에 대한 반응성도 밝혀진 바 없다. 그러므로 특정 염기를 인식하여 DNA를 절단하는 제한 효소 4종을 사용하여 이들 효소의 lambda phage DNA 절단 효과에 대한 patulin의 영향을 관찰하였다. (Fig. 3). 실험에서 사용된 효소는 모두 lambda phage DNA의 hexanucleotide target을 가지는 제한 효소로서 Fig. 3의 A에서는 최초의 절단 저해를 일으키는 patulin의 농도는 StyI (C \downarrow CAAGG)의 경우에 1.0 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ (lane 5)로서 그 이상의 농도 (lane 6)에서는 StyI에 의하여 인식되어 절단되는 부위가 patulin에 의하여 절단이 저해되어 비교적 큰 DNA fragment가 관찰되었다. 이것은 cytosine의 아미노기와 patulin의 반응 가능성 때문에 StyI의 cleavage site 인식 또는 cleavage 반응이 저해될 것이라고 생각된다. AsnI(AT \downarrow TAAT)의 경우 (lane 10-12)에는 매우 높은 농도 (150 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$)에서 DNA 절단이 저해 되었음을 볼 수 있었다. AsnI에 의한 lambda DNA의 절단부위는 17개로서 사용된 다른 제한효소보다 훨씬 많은 DNA의 인식 부위를 가지므로 보다 높은 patulin의 농도가 요구될 것이며 AsnI cleavage site에 있는 thymine은 cytosine과 달리 아미노기가 없으므로 patulin과의 반응 가능성은 매우 희박할 것으로 추측된다. 그러므로 patulin이 DNA에 반응하므로써 제한효소의 target nucleotide의 화학적 modification 또는 DNA인식 부위의 국부적인 구조

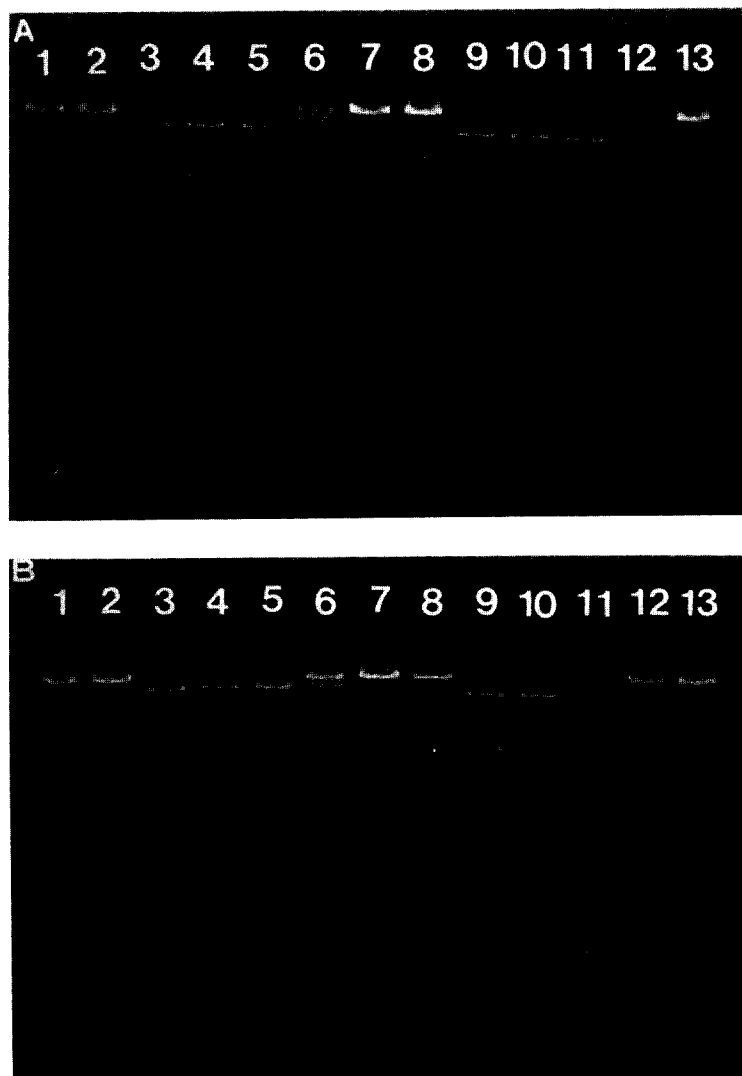


Fig. 3. Effect of patulin on the cleavage of lambda phage DNA by restriction endonucleases. Reaction mixture contained 0.17 μg lambda DNA preincubated with patulin. Total reaction volume was adjusted to 10 μl .

A: lane 1, 7 and 13: control containing only λ DNA, lane 2: 50 μg of patulin, lane 3: Styl digest of λ DNA, lane 4: 0.1 μg , lane 5: 1.0 μg , lane 6: 50 μg of patulin, lane 8: 150 μg of patulin, lane 9: AsnI digest of λ DNA, lane 10: 10 μg , lane 11: 50 μg , lane 12: 150 μg of patulin. B: lane 1, 7 and 13: control containing only λ DNA, lane 2: 100 μg of patulin, lane 3: HindIII digest of λ DNA, lane 4: 5 μg , lane 5: 25 μg , lane 6: 100 μg of patulin, lane 8: 150 μg of patulin, lane 9: BamHI digest of λ DNA, lane 10: 10 μg , lane 11: 50 μg , lane 12: 150 μg of patulin.

변화가 생길것이고 따라서 제한효소에 의한 DNA절단이 저해되므로 standard digest보다 더 큰 DNA fragment가 생긴 것이라고 생각된다. Fig. 3의 B는 A \downarrow AGCTT를 절단하는 효소인 Hind III의 절단 저해를 실험한 결과이며, patulin 25 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ 에서 Hind III에 의한 DNA 절단이 저해 되었으며 (lane 5), lane 11에서는 Bam HI(G \downarrow GATCC)에 의한 실험으로서 patulin 농도 50 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ 에서 현저한 DNA절단 저해가

관찰되었다. Hind III와 Bam HI은 lambda DNA에 대하여 각각 6개, 5개의 절단 부위를 가지므로서, 절단 저해를 위한 patulin의 농도는 거의 비슷한 것으로 나타났다.

Patulin은 sulfhydryl기와의 반응성 때문에 몇가지 효소의 활성을 저해한다고 (Tashiro 등 1979)보고 되었으나, 본 실험에서는 DNA와 patulin의 preincubation 후 반응을 하지 않은 free patulin은 제한효소 활성을 위한 반응 buffer내의 dithiothreitol(DTT)에 의하여 모두 불활성화 되기 때문에 patulin에 의한 제한효소 자체의 활성 저하는 없을 것이므로 patulin에 의한 제한효소의 DNA 절단 저해에는 patulin이 DNA에만 반응하였을 것이고, 제한효소에는 영향을 미치지 않았을 것이다. 그러므로 제한효소의 DNA 절단에 대한 patulin의 저해는 patulin과 DNA 염기사이의 반응에 의한 것으로 생각되며, 이상의 실험 결과로 보아 StyI의 recognition site (C↓CAAGG)가 patulin에 가장 sensitive 하였으며 AsnI cleavage site(AT↓TAAT)와 patulin과의 반응성은 매우 낮았다. 따라서 patulin의 DNA염기에 대한 반응성은 StyI의 recognition site가 가장 높을 것으로 생각된다. 그러나, patulin의 DNA와의 반응에서 생성될 수 있는 DNA-patulin adduct의 분리, 구조에 관한 연구, 또는 DNA염기에 반응하므로서 야기될 수 있는 depurination이나 depyrimidination의 결과로서의 DNA의 구조적 변화를 규명하기 위하여 앞으로 분자 수준에서 연구가 계속되어야 할 것이라고 본다.

감사의 말씀

이 논문은 1990년도 문교부지원 한국학술진흥재단의 지방대학육성 학술연구조성에 의하여 연구되었음

참고문헌

- Ashoor, S.H. and Chu, F.S. (1973): Inhibition of alcohol and lactic dehydrogenase by patulin and penicillic acid *in vitro*, *Food Cosmet. Toxicol.*, **11**, 617-624.
- Ashoor, S.H. and Chu, F.S. (1973): Inhibition of muscle aldolase by penicillic acid and patulin *in vitro*, *Food. Cosmet. Toxicol.*, **11**, 995-1000.
- Bachmann, B.J. (1990): Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8, *Microbiological Reviews*, **54**, 130-197.
- Becci, P.J., Hess, F.G., Johnson, W.D., Gallo, M.H., Babisch, J.G., Dailey, R.E. and Perent, R.A. (1981): Long-term carcinogenicity studies of patulin in the rat, *J. Appl. Toxicol.*, **1**, 256-261.
- Betina, V. (1989): *Mycotoxins, Chemical, Biological and Environmental Aspects* (Elsevier, Amsterdam), p. 242-270.
- Ciegler, A. (1977): *Mycotoxin in Human and Animal Health* (Pathotox Publishers, Park Forest South, Ill), p. 609-624.
- Dari, R. and Huisman, O. (1983): Novel mechanism of cell division inhibition associated with the SOS response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **156**, 243-250.
- Essigmann, J.M., Croy, R.G., Nadzan, A.M., Busby, Jr, W.F., Reinhold, V.N., Büchi, G. and Wogan, G.N. (1977): Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B1 *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **74**, 1870-1874.
- Hiraga, S., Niki, H., Ogura, Y., Ichinose, C., Mori, H., Ezaki, B. and Jaffe, A. (1989): Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: Novel mutants producing anucleate cells, *J. Bacteriol.*, **171**, 1496-1505.
- Hofmann, K., Mintzlauff, H.-J., Alperden, I. and Leistner, L. (1971): Untersuchung

- über die Inaktivierung des Mykotoxins Patulin durch Sulfhydrylgruppen, *Fleischwirtschaft*, **10**, 1534-1536.
- Lee, K.S. and Roeschenthaler, R. (1986): DNA-damaging activity of patulin in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 1046-1054.
- Lee, K.S. and Roeschenthaler, R. (1987): Strand scissions of DNA by patulin in the presence of reducing agents and cupric ions, *J. Antibiotics*, **40**, 692-696.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982): *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*(Cold Spring Harbor Lab., Cold spring Harbor), p. 453-468.
- Miller, J.H. (1972): *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor), p. 319-325.
- Norstadt, F.A. and McCalla, T.M. (1969): Patulin production by *P. urticae* Bainer in batch culture, *Appl. Microbiol.*, **17**, 193-196.
- Phillips, T.D. and Hayes, A.W. (1977): Effect of patulin on adenosine triphosphatase activities in the mouse, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **42**, 175-187.
- Reiss, J. (1979): Inhibitory action of the mycotoxins patulin and penicillic acid on urease, *Food. Cosmet. Toxicol.*, **17**, 145-146.
- Tashiro, F.K., Hirai, K. and Ueno, Y. (1979): Inhibitory effects of mycotoxins deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase and ribonuclease H, *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 191-196.
- Ueno, Y. and Kubota, K. (1976): DNA-attacking ability of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant cells of *Bacillus subtilis*, *Cancer Res.*, **36**, 445-451.
- Umeda, M., Yamamoto, T. and Saito, M. (1972): DNA-strand breakage of HeLa cells induced by several mycotoxins, *Japan J. Exp. Med.*, **42**, 527-535.
- Wehner, F.C., Thiel, P.G. Van Rensburg, S.J. and Demasius, I.P.C. (1978): Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxins, *Mutation Res.*, **58**, 193-203.