사람 telomerase promoter에 의해 DR4 발현이 조절되는 재조합 adenovirus와 TRAIL 병합 처리에 의한 암세포의 선택적 세포 사멸 유도

연세대학교 대학원

의과학과

최 은 아

사람 telomerase promoter에 의해 DR4 발현이 조절되는 재조합 adenovirus와 TRAIL 병합 처리에 의한 암세포의 선택적 세포 사멸 유도

지도교수 김 건 홍

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2004년 06월

연세대학교 대학원

의과학과

최 은 아

최은아의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004년 06월

감사의 글

학위 과정동안 아낌없는 지도와 세심한 배려로 여기까지 저를 이끌어주신 김건홍 교수님께 깊은 감사를 드리며, 논문을 심사하여 주신 박전한 교수님과 정현철 교수님께도 감사를 표합니다.

생화학 분자생물학교실에서 생활하며 저에게 많은 것을 느끼게 해 주신 안용호 교수님, 김경섭 교수님, 허만욱 교수님께도 감사드립니다.

여기까지 제가 올 수 있도록 늘 같이 지내던 식구들 (순아언니, 우석,현석오빠, 혜연, 화진)과 이웃들 (승순, 상규, 종민오빠, 소연, 사라, 득림언니, 태현, 민영, 현려)에게도 고마움을 표합니다. 같이 졸업하게 되는 졸업동기 승연, 미숙, 선영언니와 성진오빠와 졸업의 즐거움을 함께 나누고 싶습니다. 또한, 실험을 하는데 있어서 항상 도움을 주셨던 박두웅 선생님, 권석철 선생님, 김혜경 선생님께도 감사드립니다.

언제나 곁에서 든든한 버팀목이 되어주는 친구들인 경진, 승수, 한철, 대근, 현승, 현숙, 지영, 진현, 진숙, 지은, 나영, 철홍, 종만이와 진영, 일미, 재임이와 은희에게도 고마움을 표하며 언제나 열심히 생활하는 미정이와 현정이, 그리고 저의 선택을 묵묵히 바라봐 주시는 김영호 교수님과 저에게 조언을 아끼시지 않는 박훤범 교수님, 다정다감하신 주경진 교수님, 정지형 선배께도 감사를 표합니다.

마지막으로 저와 짧은 2개월을 같이 한 친구 bulgan에게도 고마움을 표하며 가족과 비록 언급하진 못한 제 주위 모든 분들께 감사를 표합니다.

2004년 6월

최은아

차 례

국문요약 ····· 1
Ⅰ. 서 론 ····· 3
Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 6
1. 대상 세포주 및 세포 배양 ····· 6
2. TRAP assay ····· 6
3. Human telomerase promoter 부위의 cloning ····· 7
4. hTERT promoter 활성도 측정
1) Luciferase 활성 측정 ····· 7
(가) Transient transfection ····· 7
(나) 세포 추출용액의 준비 ····· 8
(다) β-galactosidase 활성 측정 ····· 8
(라) Luciferase 활성 측정 ····· 8
5. Telomerase promoter와 DR4유전자가 함께 포함된 shuttle 플라즈미드 construct의 제조 및 adenovirus 제작 ····· 9
6. Western blot immunostaining ····· 9
7. Cell death assay ····· 9
Ⅲ. 결 과
1. 암 세포주에서의 telomerase 활성 측정 ····· 12
2. 정상 세포와 암 세포주에서의 hTERT promoter의 활성 측정 ····· 12
3. 재조합 TRAIL 단백질과 Ad-hTERT-DR4에 의한 암세포 사멸 효과 ····· 15
4. Ad-hTERT-DR4와 Ad-ILZ-TRAIL의 병합 처리에 의한 암세포 사멸 효과 ····· 19
5. 정상 자궁 경부 상피 세포에서의 세포 사멸 효과 ····· 19
Ⅳ. 고 찰 ····· 24
Ⅴ. 결 론 ····· 26

참고문헌 ····· 27
Abstract ····· 32

그 림 차 례

그림 1. Death signaling pathways in TRAIL-mediated apoptosis ·· 4
그림 2. pShuttle-hTERT-DR4 adenovirus 생산 ····· 10
그림 3. 여러 암 세포에서의 telomerase 활성 측정 ····· 13
그림 4. hTERT core promoter가 포함된 luciferase construct의 제조 ····· 14
그림 5. 정상 세포와 암 세포주에서의 hTERT promoter 활성 측정 16
그림 6. 재조합 TRAIL 단백질과 Ad-hTERT-DR4 병합 처리에 의한 암세포 사멸 효과 ····· 17
그림 7. Ad-ILZ-TRAIL에서 발현되는 TRAIL에 의한 암세포의 사멸 효과 ····· 20
그림 8. 정상 자궁 경부 상피 세포에서의 세포 사멸 확인 ····· 21

국문요약

사람 telomerase promoter에 의해 DR4 발현이 조절되는 재조합 adenovirus와 TRAIL 병합 처리에 의한 암세포의 선택적 세포 사멸 유도

현재까지 TRAIL을 이용한 유전자 치료는 CMV promoter를 이용한 adenovirus로부터 TRAIL을 과발현하거나 telomerase promoter에 의해 TRAIL 발현이 조절 받는 adenovirus를 제조하여 그 연구가 진행되었으나, 이 경우에는 TRAIL에 민감한 세포에서만 그 효과를 관찰할 수 있었다.

본 연구에서는 암세포에서만 세포 사멸을 유발하는 물질로 알려진 TRAIL에 대한 세포막 수용체 DR4를 사람 telomerase promoter를 이용하여 암세포에서만 선택적으로 발현할 수 있도록 하는 재조합 adenovirus를 제조하고, 재조합 adenovirus 단독 또는 재조합 TRAIL 단백질 또는 TRAIL을 과발현할 수 있는 adenovirus와 함께 처리하여 TRAIL에 대한 내성이 알려진 암세포에 대한 세포 사멸 효과를 검증하여 향후 인간을 대상으로 하는 유전자 치료 기술의 근간을 마련하고자 하였다.

이를 위하여 human genomic DNA로부터 human telomerase promoter 부위를 cloning하고 표적 세포로 사용할 암세포에서의 telomerase 활성도를 luciferase assay를 통해 측정한 결과 자궁 경부암세포인 Caski와 식도 상피 세포암인 HCE4에서 정상 자궁 경부 상피 세포보다 높은 활성을 관찰할 수 있었다. Ubiquitin E3 ligase 활성을 가진 E6AP 단백질과 함께 p53 종양 억제 단백질을 파괴한다고 알려져 있는 HPV 16, 18형으로부터 발현되며 telomerase promoter의 활성을 증가시키는 것으로 알려진 종양 단백질중의 하나인 E6 단백질을 과발현시킨 경우 그렇지 않은 경우보다 telomerase promoter 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 암세포 특이적 활성이 확인된 telomerase promoter와 full length DR4 유전자가 함께 포함된 shuttle plasmid construct를 제조한 뒤, pAd-Easy I system을 이용하여 재조합 adenovirus Ad-hTERT-DR4를 293세포에서 생성 및 증폭하였으며, TRAIL에 내성을 가지는 암세포 CasKi와 HCE4에 감염시켜 DR4를 과발현시키고 TRAIL과 병합 처리 시에 세포 사멸 효과를 western blot immunostaining과 flow cytometry를 통해 세포 배양 모델에서 확인하였다. 그 결

과 단독 처리시 보다는 병합 처리시 세포 사멸의 정도를 보여주는 단백질인 PARP나 pro-caspase 3의 절단이 확인되었고, flow cytometry에서 sub-G1 fraction이 증가하는 것으로 보아 Ad-hTERT-DR4와 Ad-ILZ-TRAIL 또는 재조합 TRAIL 단백질의 병합 처리시 암세포의 성장 억제 및 세포 사멸 효과를 확인할 수 있었다.

TRAIL에 대한 내성을 가진 세포인 HCE4와 HCE7에 Ad-hTERT-DR4와 Ad-ILZ-TRAIL을 각각 infection 시키고 난 후 다시 두 세포를 같이 배양하였을 때 HCE4의 세포 사멸을 확인함으로써 TRAIL과 DR4를 병행 사용 하였을 경우 TRAIL에 내성을 가진 암세포 치료에 유용한 치료법이 될 수 있음을 증명하였다.

이러한 TRAIL과 DR4를 이용한 TRAIL 내성을 가진 암세포 사멸 효과가 암세포 선택적 현상이라는 것을 확인하기 위해 정상 자궁경부 상피 세포에 Ad-GFP, Ad-hTERT-DR4, Ad-ILZ-TRAIL, Ad-E6를 infection 한 후 PARP와 pro-caspase 3의 절단 여부를 확인한 결과 절단 정도가 거의 나타나지 않았으며 sub-G1 fraction도 거의 증가하지 않은 것으로 보아 TRAIL과 hTERT-DR4를 이용한 암세포 사멸은 암세포 선택적인 것으로 확인하였다.

이상의 결과로 암세포에서만 선택적으로 TRAIL의 수용체인 DR4의 발현을 유도하고 TRAIL을 병합 처리하여 TRAIL에 대한 내성을 가진 암세포의 세포 사멸을 유도하는 것은 암세포 선택적인 것이며 향후 암의 치료에 있어 이용 가능할 것으로 생각된다.

핵심 되는 말 : telomerase promoter, DR4, 세포 사멸, TRAIL

사람 telomerase promoter에 의해 DR4 발현이 조절되는 재조합 adenovirus와 TRAIL 병합 처리에 의한 암세포의 선택적 세포 사멸 유도

<지도교수 김건홍>

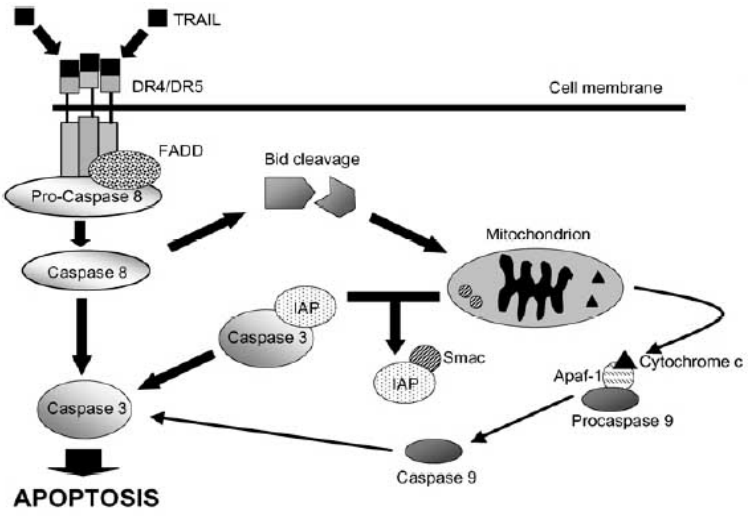
연세대학교 대학원 의과학과

최 은 아

Ⅰ. 서론

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)는 세포 표면의 death receptor 에 결합하여 암세포에서 특이적인 세포 사멸을 유도하는 물질로 알려져 있다.[1,2,3]

TRAIL-mediated apoptosis는 ligand인 TRAIL이 세포 표면에 존재하는 수용체 즉, death receptor에 결합함으로써 프로그램화된 죽음에 관한 일련의 세포 반응이 시작되며, TRAIL에 대한 pro-apoptotic 수용체로서 DR4와 KILLER/DR5가 알려져 있으며[4,7], 세포 외부에 ligand binding site, 막을 관통하는 trans-membrane domain, 세포 외부 죽음 신호를 내부로 전달하는 역할을 해주는 death domain (DD)로 구성되어 있다. Trimer 형태의 TRAIL이 death receptor에 결합하면 receptor trimerization이 유도되고 death domain과 adaptor molecule인 FADD의 death effector domain (DED)사이의 단백질-단백질 결합을 통하여 adaptor 물질이 수용체에 결합하고 FADD의 DED와 pro-caspase 8에 존재하는 DED사이의 단백질 결합을 통하여 pro-caspase 8이 수용체에 recruit되어 하나의 복합체 (Death Inducing Signalling Complex, DISC)를 형성하게 되면 불활성형의 pro-caspase 8은 induced proximity에 의해서 processing되어 활성형의 caspase 8 으로 변형되면서 세포 사멸 신호를 유발하게 된다 (그



Apoptosis · Vol 8 · No 2 · 2003

그림 1. Death signaling pathways in TRAIL-mediated apoptosis

림 1).

TRAIL이 암세포 특이적으로 세포 사멸을 유도하지만 여러 암 종에서 TRAIL에 대한 내성이 보고되어 TRAIL에 대한 내성을 나타내는 암 종에 대한 combination chemotherapy (TRAIL + anti cancer drugs)를 통해 상승적인 암세포 사멸 효과를 유발하거나[8,10], radiation therapy + TRAIL 병합 처치를 통해 *in vivo*에서 암 종의 세포 사멸의 상승적인 효과를 유발하는 방법이 보고되었으나[12], 기존 항암 화학요법이나 방사선 치료 요법으로 인한 정상 세포에 대한 세포 독성은 여전히 많은 문제점을 유발하고 있다.

Telomere는 'TTAGGG'의 반복 염기 서열로 구성되어 있으며 telomerase는 세포 분열시 짧아지는 telomere 길이를 복원시키는 역할을 함으로써 세포 분열의 무한성을 지속시킨다[13,14]. 암세포는 정상 세포와는 달리 telomerase를 활성화시킴으로써 telomere가 짧아지는 것을 방지하는 기재를 갖추고 있으며, 암세포의 90%이상에서 telomerase의 활성화가 보고되어 있고[13,14], ubiquitin E3 ligase 활성을 가진 E6AP 단백질과 함께 p53 종양 억제 단백질을 파괴한다고 알려져 있는 HPV type 16이나 18형으로부터 발현되는 종양 단백질중의

하나인 E6 단백질은 telomerase promoter의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다[11,15].

이러한 연구결과들을 근거로 하여 telomerase의 promoter를 이용하여 정상 세포에 대한 세포 독성을 배제하며 암세포 특이적으로 효과 유전자를 발현하려는 많은 시도가 연구되고 있다[9].

본 연구는 암세포에서만 세포 사멸을 유발하는 물질인 TRAIL에 대한 세포막 수용체 (DR4)를 사람 telomerase promoter를 이용하여 암세포에서만 선택적으로 발현할 수 있도록 하는 재조합 adenovirus를 제조하고 재조합 adenovirus 단독 또는 재조합 TRAIL 단백질 또는 TRAIL을 과 발현할 수 있는 adenovirus와 함께 처리하여 TRAIL에 대한 내성이 알려진 암세포에 대한 세포 사멸 효과를 검증하여 향후 인간을 대상으로 하는 유전자 치료 기술의 근간을 확립하고자 하였다. Human telomerase promoter 부위를 cloning하여 표적세포로 사용할 암세포에서의 telomerase 활성도를 측정하여 보았을 때 암세포 선택적인 활성이 확인되었으며, telomerase promoter와 DR4 유전자가 함께 포함된 재조합 adenovirus를 제조하여 Ad-ILZ-TRAIL 또는 재조합 TRAIL 단백질의 병용처리에 의한 TRAIL 내성을 가진 암세포 HCE4와 CasKi의 세포 사멸 효과를 PARP와 pro-caspase 3 항체를 사용한 Western blotting immunostaining 또는 PI 염색을 통한 sub-G1 분획을 통하여 그 정도를 확인할 수 있었다. 또한 이러한 세포 사멸 효과는 암세포 선택적인 것으로 정상세포에서는 관찰되지 않았다.

이상의 연구 결과를 종합하여 볼 때, 암세포 선택적인 telomerse의 활성을 이용한 Ad-hTERT-DR4와 TRAIL의 병합 처리는 TRAIL 대한 내성을 가진 암세포의 효과적인 세포 사멸을 유도할 수 있음을 확인하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 세포배양

실험에 사용된 세포주들은 자궁 경부암 세포 (CasKi), 유방암 세포 (MCF7), 식도암 세포 (TE9, HCE4), 대장암 세포 (HCT116), 신장세포 (293)을 사용하였고, 모든 세포들은 10%의 우태아 혈청 (U.S. BIO-TECHNOLOGIS Inc, Parkerpord, PA, USA)과 항생제 penicillin/streptomycin를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's media (GIBCOBRL, Auckland, NY, USA)으로 5% CO_2의 존재 하에 37℃ 항온 배양기에서 배양하였다.

2. TRAP assay

실험에 사용되어지는 암 세포주의 telomerase 활성도에 대한 정보를 얻기 위해 Kim등[32]에 의해 개발된 TRAP assay 방법으로 telomerase 활성도를 측정하였다.

Telomerase 활성의 양성 대조군은 293 세포주의 핵단백질을 사용하였다. 음성 대조군으로는 telomerase 활성이 없는 BRN 세포주의 핵단백질을 사용하였다. 일부 세포에 존재하는 Taq polymerase 억제제가 PCR을 억제하여 위 음성 결과를 가져올 수 있으므로 36 염기쌍을 만드는 internal control primer를 사용하여 PCR의 적절성을 평가하였다. 6 ㎕의 핵단백질을 0.2 ㎕ TS primer, 2.5 ㎕ BSA, 1.25 mM dNTP를 포함한 4 x TRAP 용액 (20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 63 mM KCl, 0.005% Tween 20, 1 mM EGTA)에 첨가하여 최종 20 ㎕가 되도록 한 후 30℃에서 30분간 반응시켰다. 10 ㎕의 반응액을 PCR용액과 2.5 mM dNTP, 5 ng NT primer, 0.1 pg TSNT primer, 0.1 ㎍ ACX primer, 2.5 unit Taq polymerase (Promega, Midison, WI, USA), 2.5 μCi [α-^{32}P]dCTP (Amersham

Pharmacia, NJ, USA)를 첨가하여 PCR을 시행하였으며, PCR은 37℃에서 10분간 반응시킨 후, 94℃에서 30초, 60℃에서 30초를 27회 반복하여 실시하였다. PCR 결과물을 7% polyacrylamide gel에 전기 영동하고 Gel dryer (Bio-rad, Hercules, CA, USA)에서 말린 다음 X-ray 필름 (Fuji, Tokyo, Japan)에 감광 후 현상하였다. Telomerase 활성도의 정량 분석은 gel densitometer (Vilber Lourmat, Marne La Vallee Cedex, France)를 사용하였다.

3. Human telomerase promoter 부위의 cloning

Human genomic DNA를 주형으로 하여 5'-GAA-GAT-CTG-GAG-AG-CTG-CGC-TGT-3′ (sense primer)과 5'-GAA-GAT-CTA-AGC-TTG-CCA-GGG-CTT-3′ (antisense primer)의 염기서열을 가지는 primer set를 사용하여 PCR을 수행하여 얻은 human telomerase core promoter (301 bp)를 pGL3-basic vector (Promega)의 BglⅡ부위 (밑줄 친 부분)를 사용하여 cloning 하였다.

4. hTERT promoter 활성도 측정

1) Luciferase 활성 측정

(가) Transient transfection

HCE4, CasKi, HCT116-neo, HCT116-E6, 일차 정상 자궁 경부 상피세포를 5 x 10^5 cells/ 35-mm dish의 density로 plating 하고 다음 날 transfection을 실시하였다. 35-mm dish 1 well당 100 ㎕의 혈청과 항생제를 포함하지 않는 DMEM과 Plus reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 4 ㎕를 1 ㎍의 plasmid (pGL3-basic, pGL3-control, pGL3-hTERT)와 섞었다. 이 혼합물을 상온에서 15분간 방치하였다. 이 때 전날 미리 plating해 놓은 세포는 배지를 제거한 후 PBS 완충용액 2 ㎖로 1회 세척하고 800 ㎕의 혈청과 항생제를 포함하지 않는 DMEM 배지를 넣어 놓았다. 이 세

포에 위의 혼합물 200 ㎕를 분주하고 5% CO_2의 존재 하에 37℃ 항온 배양기에서 24시간 배양시켰다. 24시간 후에 Ad-GFP나 Ad-E6를 infection하거나 하지 않은 모든 실험군을 새 배양액으로 갈아주고, 24시간 배양하였다.

(나) 세포 추출 용액의 준비

Plate에서 배양액을 제거하고 2 ㎖의 PBS로 2회 세척하였다. 각 plate에 200 ㎕의 reporter lysis buffer (Promega)를 가한 후, 세포를 긁어 1.5 ㎖ tube에 옮겨 놓았다. 5분간 4℃에서 vortex하여 완전히 세포를 용해시킨 후에 4℃에서 13,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상층액을 회수하여 세포 추출 용액을 얻었다. 세포 추출 용액 20 ㎕는 β-galactosidase 활성 측정에 사용하였고, 5 ㎕는 luciferase 활성 측정에 사용하였다.

(다) β-galactosidase 활성 측정

β-galactosidase 활성 측정은 세포 추출 용액 20 ㎕에 4 ㎎의 O-nitrophenyl-β-D-galatopytanoside (ONPG)와 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.8, 1 ㎖)를 섞은 용액 44 ㎕와 2 ㎕의 100 x Mg용액 (0.1 M $MgCl_2$, 4.5 M β-mercaptoethanol), 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.8) 134 ㎕를 넣고 37℃, 420 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

(라) Luciferase 활성 측정

Luciferase 활성은 Luciferase Assay System (Promega)을 이용하여 측정하였다. 세포 추출 용액 5 ㎕에 50 ㎕의 luciferase assay substrate를 넣고 luminometer에서 luciferase에 의한 substrate 분해 정도를 측정하였다.

5. Telomerase promoter와 DR4 유전자가 함께 포함된 shuttle 플라즈미드 construct의 제조 및 adenovirus 제작

PCR을 통해 얻은 human telomerase (hTERT) core promoter와 DR4를 각각 KpnI, NotI 부위와 XhoI, XbaI 부위를 이용하여 pShuttle에 cloning 하였다. 만들어진 pShuttle-hTERT-DR4를 PmeI으로 절단한 뒤, pAd-Easy I과 함께 대장균 BJ5183에 형질전환시켜 상동 재조합 (homologous recombination)을 유도하여 바이러스 벡터를 제조하였다. 제작된 바이러스 벡터를 대장균 DH5α에 다시 형질전환시켜 DNA를 증폭한 뒤 293 세포에 transfection시켜 24시간 후에 western blot immunostaining을 통해 DR4의 발현 여부를 확인하였다. 상동재조합된 DNA는 PacI으로 절단한 뒤 293 세포에 transfection하고 아데노바이러스를 생산하였다.

6. Western blot immunostaining

세포 추출 용액을 12% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel (acrylamide: bis-acrylamide; 29: 1)에서 전기영동한 후 PVDF 막에 transfer하고 anti-PARP Ab (Cell Signaling Technology Co. Beverly, MA, USA; 1:1,000), anti pro-caspase3 Ab (SantaCruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA; 1:1,000), anti-DR4 Ab (BD Biosciences Pharmingen, SanDiego, CA, USA; 1:1,000)를 사용하여 표적 단백질의 존재 및 발현 정도의 변화를 확인하였다. 이차 항체는 horse radish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-rabbit IgG (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA; 1:5,000)또는 HRP conjugated goat anti-mouse IgG (Pierce Biotechnology Inc.; 1:5,000)를 각각 사용하였다.

7. Cell death assay

세포를 수확하기 위해 배지를 15 ㎖ tube에 옮긴 후 plate의 세포

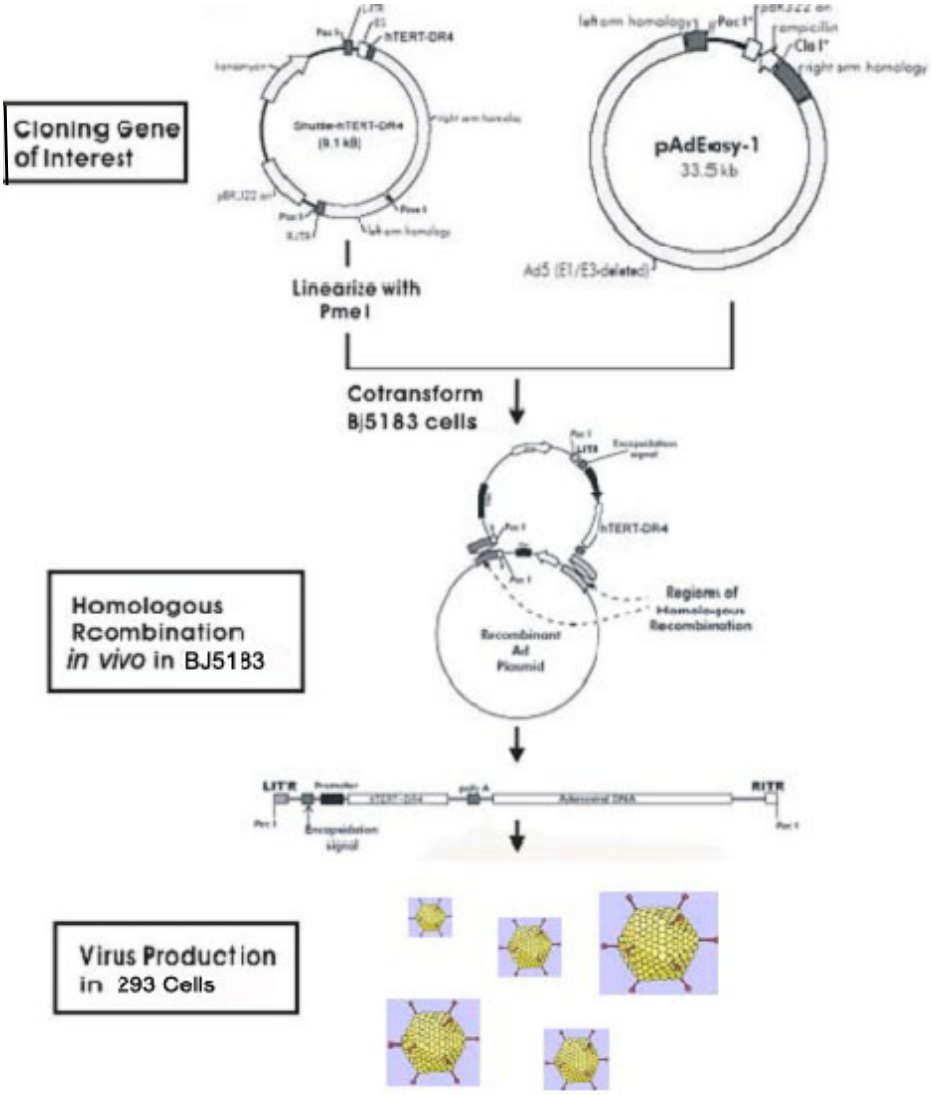


그림 2. pShuttle-hTERT-DR4 adenovirus 생산

는 trypsin-EDTA를 1 ㎖ 넣고 37℃에서 1-2분 동안 반응시켰다.

세포가 떨어진 것을 확인하고 배지를 모아두었던 15 ㎖ tube에 옮겼다. 2 ㎖의 PBS로 plate에 있는 세포를 모두 헹구어 내어 15 ㎖ tube에 담고 1,100 rpm에서 5분간 원침시켰다.

상층액을 제거한 후 2 ㎖의 1 x PBS/ 1% FBS를 넣고 재부유 시킨 후 다시 1,100 rpm에서 5분간 원침하고 상층액을 제거하였다. 1 x PBS를 1 ㎖ 넣고 1,100 rpm, 5분간 세포를 원침시키고 상층액을 제거하는 과정을 반복한 뒤, 4℃ 냉장고에 미리 보관 중 이었던 에탄올 9 ㎖를 약하게 vortexing을 하면서 첨가하였다.

Tube를 aluminum foil에 싼 후 4℃에서 24시간동안 방치한 후 1,100 rpm에서 5분간 세포를 원침하고 상층액을 제거한 후 4 ㎖ 1 x PBS/ 1% FBS로 재부유하였다. 다시 한번 4℃ 1,100 rpm에서 5분간 원침한 후, 0.5 ㎖ phosphate-citric acid buffer (192 ㎖ 0.2 M Na_2HPO_4 + 8 ㎖ 0.1 M citric acid)를 첨가 하였다. 상온에서 5분간 방치한 세포를 다시 원침하고 300 ㎕의 PBS/ FBS/ Propium Iodide (PI)/ RNase solusion (300 ㎕ 1 x PBS/ 1% FBS + 30 ㎕ 0.5 mg/ ㎖ PI + 5.5 ㎕ USB RNase)에 resuspension하였고 37℃에서 15분간 반응시켰다. 5 ㎖ polystyrene round-bottom tube (FALCON, Franklin Lakes, NJ, USA)로 옮긴 뒤 flow cytometry (BD FACsCalibur; Becton Dickinson, Boston, USA)를 시행하였고, 그 결과는 winMDI 2.8로 분석하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 암 세포주에서의 telomerase 활성 측정

HCE4, TE2, CasKi 및 MCF7에서 양성 대조군인 293보다도 높은 telomerase 활성이 관찰되었으며 (그림 3), TE9과 HeLa는 293에 비해 낮은 활성을 관찰할 수 있었다.

2. 정상 세포와 암 세포주에서의 hTERT promoter의 활성 측정

정상 세포와 암 세포주에서의 hTERT promoter의 활성을 측정하기 위하여 human genomic DNA를 주형으로 PCR을 통해 hTERT core promoter 부위를 증폭한 후 그림 4와 같은 reporter constructs를 제조하였다.

Luciferase 활성을 확인한 결과, 정상 자궁 경부 상피세포에서는 hTERT promoter의 활성이 음성 대조군으로 쓰인 pGL3-basic과 대등한 반면 식도암 세포주 HCE4, 자궁경부암 세포주 CasKi, 대장암 세포주 HCT116에서는 음성 대조군 보다 월등히 높은 hTERT-promoter 활성을 관찰할 수 있었다 (그림 5).

또한 Ad-E6 infection을 통해 E6 단백질을 과발현시킨 경우 암 세포주에서 hTERT promoter의 활성이 Ad-GFP infection시 보다 현저히 증가됨을 알 수 있었다 (그림 5A, B, C).

E6 단백질에 의한 hTERT promoter의 활성 증가는 HCT116-E6와 같은 stable transfectant를 이용한 실험에서도 재확인 할 수 있었다 (그림 5D). 이상의 결과 hTERT promoter 활성은 암세포에서만 증가된 것을 확인할 수 있었으며, E6단백질 존재 시 그 활성이 더욱 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 위 결과들을 근거로 하여 본 실험에서는 hTERT promoter에 의해 DR4의 발현이 조절되는 재조합 adenovirus를 제작하였다.

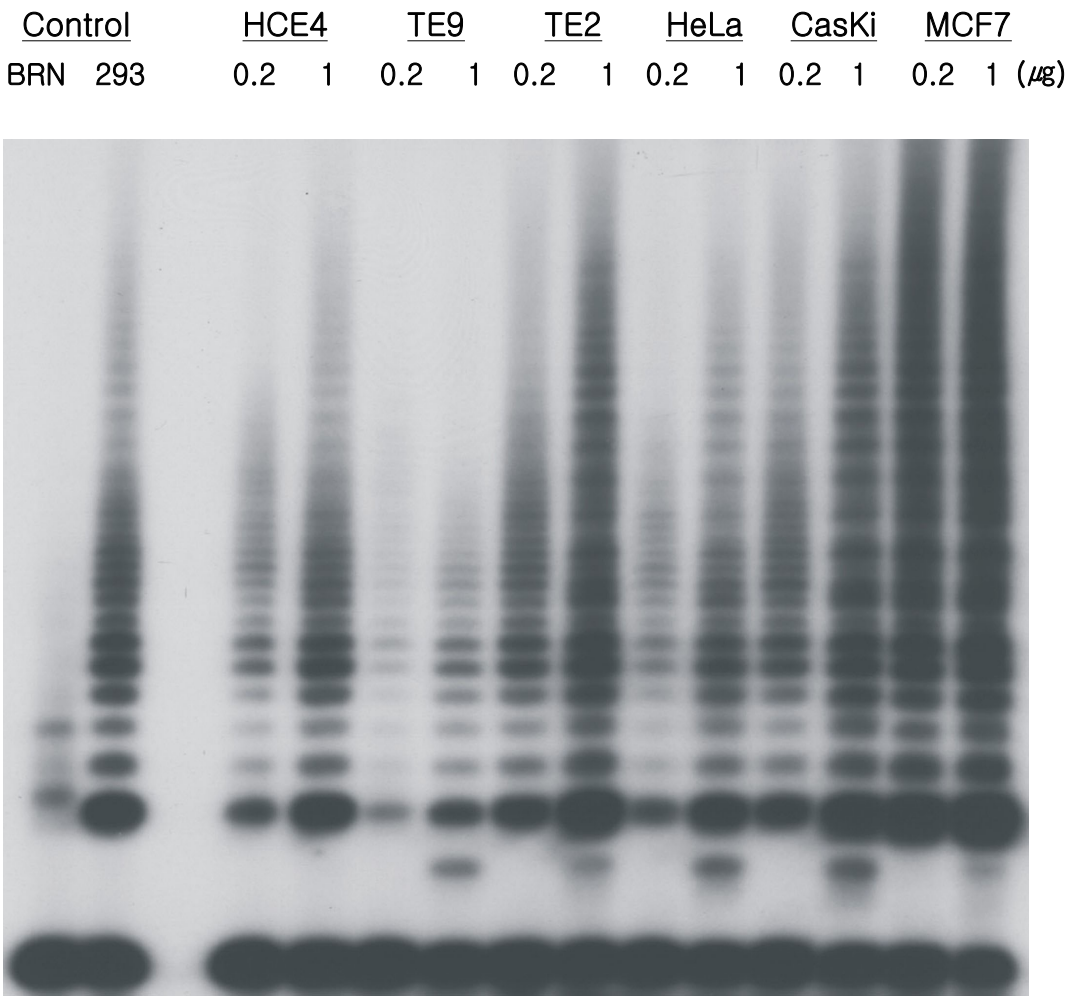


그림 3. 여러 암세포에서의 telomerase 활성 측정. Telomerase 활성의 양성 대조군은 293 세포주의 핵단백질을 사용하였고, 음성 대조군으로는 telomerase 활성이 없는 BRN 세포주의 핵단백질을 사용하였다. 다양한 암세포주의 telomerase 활성을 Kim등[32]에 의해 개발된 TRAP assay 방법으로 측정하였다.

A.

```
-320   GGAGCAGCTG CGCTGTCGGG GCCAGGCCGG GCTCCCAGTG GATTCGCGGG CACAGACGCC

-260   CAGGACCGCG CTTCGCACGT GGCGGAGGGA CTGGGGACCC GGGCACCCGT CCTGCCCCTT
                          E Box                  Ap2
-200   CACCTTCCAG CTCCGCCTCC TCCGCGCGGA CCCCGCCCCG TCCCGACCCC TCCCGGGTCC
         Ap2    Ap2     Sp1                Ap2       Sp1                    Ap2
-140   CCGGCCCAGC CCCCTCCGGG CCCTCCCAGC CCCTCCCCTT CCTTTCCGCG GCCCCGCCCT
                Sp1       Ap2              Sp1       Ap2                      Sp1
 -80   CTCCTCGCGG CGCGAGTTTC AGGCAGCGCT GCGTCCTGCT GCGCACGTGG GAAGCCCTGG
                                                          E Box
 -20   CCCCGGCCAC CCCCGCGATG
```

B.

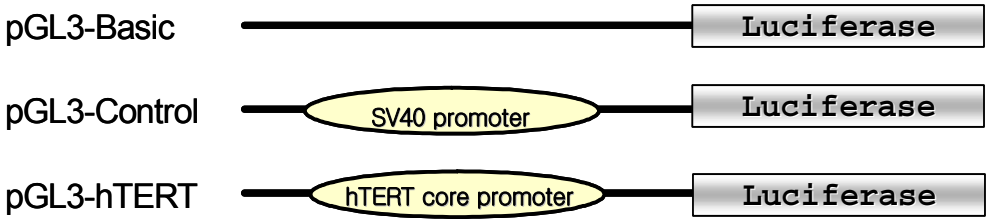


그림 4. hTERT core promoter가 포함된 luciferase construct의 제조.
A. hTERT core promoter의 염기 서열 및 PCR primer의 위치 (밑줄 친 부분). B. 음성 대조군 pGL3-basic과 양성 대조군인 pGL3-control (Promega). PCR을 통해 얻은 hTERT core promoter (A)를 BglⅡ부위를 사용하여 cloning한 pGL3-hTERT의 구조를 모식화하였다.

3. 재조합 TRAIL과 Ad-hTERT-DR4에 의한 암세포 사멸효과

표적 암세포에 Ad-hTERT-DR4를 감염시킨 후 재조합 TRAIL을 처리하였을 때, synergistic cell killing effect가 있는 지 여부를 western blot immunostaining과 flow cytometry를 이용하여 sub-G1 분획을 확인한 결과, TRAIL에 내성을 나타내는 HCE4의 경우 Ad-hTERT-DR4나 재조합 TRAIL 단백질 단독으로 처리한 경우, 현미경 관찰시 세포 사멸이 거의 관찰되지 않았다 (그림 6A; 왼쪽). 또한 pro-caspase 3와 PARP의 절단이 관찰되지 않았으며 (그림 6B), Ad-hTERT-DR4를 infection시킨 후 재조합 TRAIL을 처리한 경우에서는 세포 사멸이 매우 효과적으로 유발됨을 확인할 수 있었다 (그림 6A; 왼쪽). 배지를 제거한 후 coomassie brilliant blue로 염색하였을 때에도 단독 처리 보다는 병합 처리하였을 경우 세포 사멸의 정도가 컸다 (그림 6B; 오른쪽).

HCE4 세포의 경우 병합 처리 하였을 시 세포 사멸의 최종 단계에서 작용하는 pro-caspase 3가 활성형의 상태로 되어 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, PARP의 절단이 명확하게 관찰되었다 (그림 6B; HCE4).

CasKi 세포에서도 Ad-hTERT-DR4 infection 후에 재조합 TRAIL 단백질을 처리 하였을 경우 현저한 세포 사멸을 확인할 수 있었다 (그림 6B; CasKi).

PI 염색 후 FACs를 이용하여 세포의 sub-G1 분획을 확인한 결과에서도 Ad-hTERT-DR4나 재조합 TRAIL 단백질 단독으로 처리한 경우 sub-G1 분획이 거의 존재하지 않았다. 반면 Ad-hTERT-DR4과 재조합 TRAIL 단백질을 동시에 처리한 경우에는 sub-G1 분획이 증가함을 볼 수 있었다 (그림 6C).

이상의 결과를 통해 재조합 TRAIL 단백질과 Ad-hTERT-DR4의 병합 처리시 TRAIL에 내성을 가지는 암 세포주에서 세포 사멸이 효과적으로 유발될 수 있음을 확인하였다.

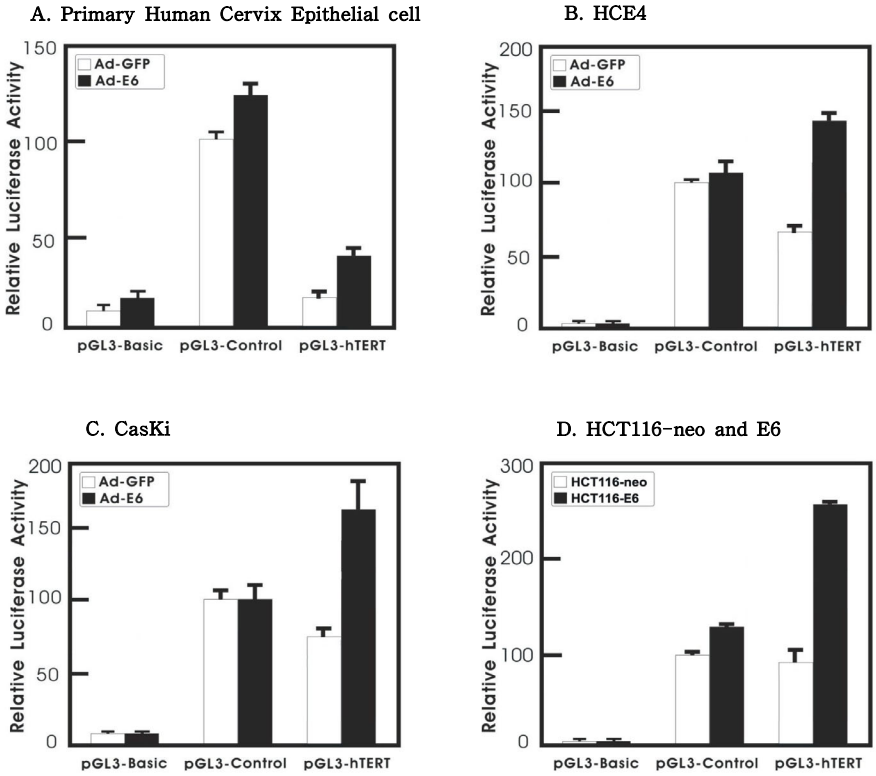


그림 5. 정상 세포와 암 세포주에서의 hTERT promoter 활성 측정.

A. Primary Human Cervix Epithelial cell, B. HCE4, C. CasKi, D. HCT116-neo and E6. pGL3-basic, pGL3-control, pGL3-hTERT을 각각 1 μg씩 5 x 10^5세포에 transfection 시킨 후 24시간 후에 Ad-GFP, Ad-E6를 infection 시켰다. Infection 시킨 후 24시간 후에 luciferase assay를 시행하였다.

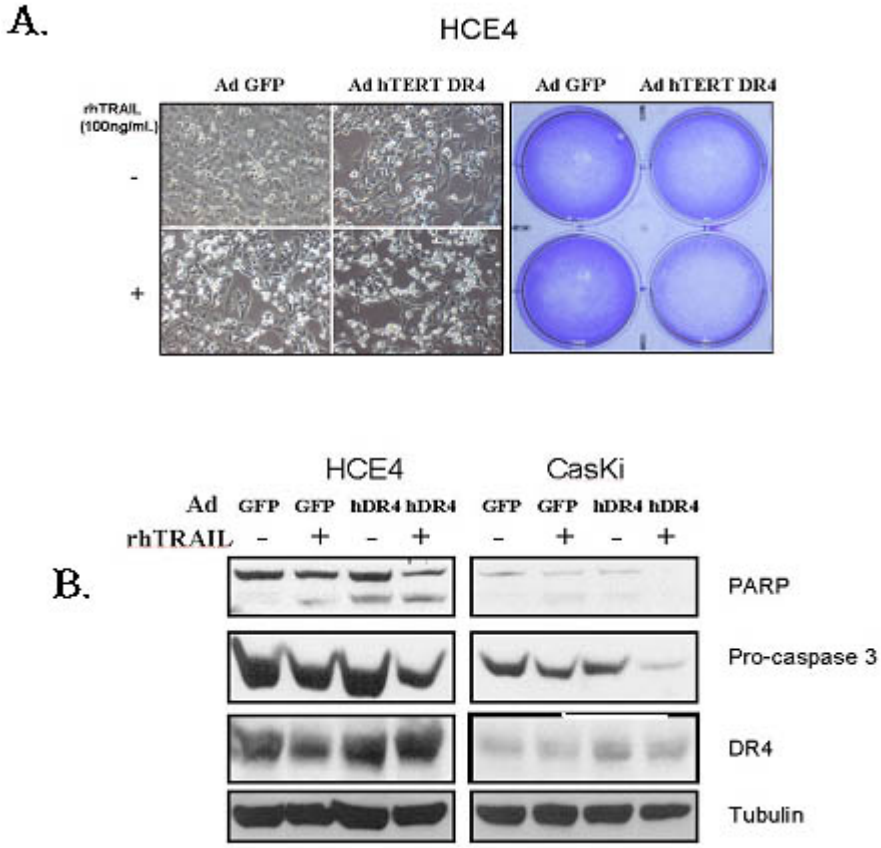


그림 6. 재조합 TRAIL 단백질과 Ad-hTERT-DR4 병합 처리에 의한 암세포 사멸효과

A. 재조합 TRAIL과 Ad-hTERT-DR4를 단독 또는 병합 처리시 세포의 형태를 현미경으로 관찰하였다 (왼쪽). 배지를 제거한후 coomassie brilliant blue로 staining [staining sol; coomassie 0.1%, methanol 45% (w/v), glacial acetic acid 10% (w/v), destaining sol. methanol 10% (w/v), glacial acetic acid 10% (w/v)]하였다 (오른쪽).

B. 5 x 10^5개의 HCE4 또는 CasKi세포에 재조합 TRAIL 단백질과 Ad-hTERT-DR4 (hDR4)를 단독 또는 병합 처리한 후 DR4의 발현, pro-caspase 3와 PARP 단백질의 절단 정도를 western blot immunostaining을 통해 확인하였다.

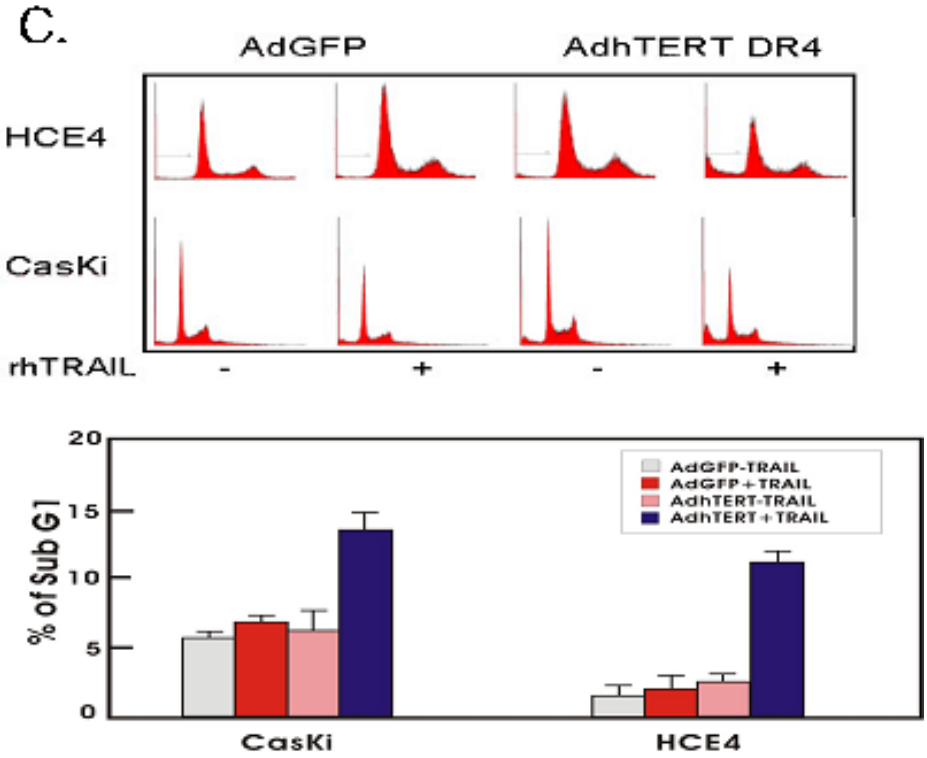


그림 6. 재조합 TRAIL 단백질과 Ad-hTERT-DR4 병합 처리에 의한 암세포 사멸효과

C. 세포 사멸 효과를 정량화하기 위하여 PI 염색을 시행하고, flow cytometry를 이용하여 sub-G1 분획을 측정하였다 (위). Sub-G1 분획의 %로 측정치를 도표화하였다 (아래).

4. Ad-hTERT-DR4와 Ad-ILZ-TRAIL의 병합 처리에 의한 암세포 사멸 효과

재조합 adenovirus에 의해 합성되어 분비된 TRAIL에 의한 암세포 사멸 효과를 관찰하기 위하여 TRAIL에 대한 내성을 나타내는 HCE4와 HCE7를 서로 다른 배양 접시에 배양하고 Ad-hTERT-DR4와 Ad-ILZ-TRAIL을 각각 infection 시킨 뒤 12시간 후 세포를 수확하고 수확한 세포들을 같은 배양접시에 함께 넣어서 배양하였다. 24시간 후 세포를 수확하여 추출액을 만들고 western blot immunostaining을 시행한 결과, HCE4/Ad-hTERT-DR4, HCE7/Ad-ILZ-TRAIL에서 세포 사멸의 정도를 나타내어주는 PARP의 절단이 가장 현저하였으며, pro-caspase 3의 단백질이 소멸했음을 관찰할 수 있었다 (그림 7).

이 결과로 보아 Ad-ILZ-TRAIL이 infection된 세포에서 만들어져 분비된 TRAIL에 의해 Ad-hTERT-DR4가 감염된 암세포의 세포 사멸이 유발되었음을 확인할 수 있었다.

5. 정상 자궁 경부 상피세포에 대한 세포 사멸 효과.

정상 자궁 경부 상피세포에 대한 Ad-hTERT-DR4와 Ad-ILZ-TRAIL 또는 재조합 TRAIL 단백질의 병합 처리 시에 세포 사멸 유발 여부를 확인해 보았다. 한 그룹에는 Ad-hTERT-DR4와 재조합 TRAIL 단백질, Ad-E6를 infection하였고, 다른 나머지 그룹에는 Ad-hTERT-DR4와 Ad-ILZ-TRAIL을 infection 하고 형광 현미경 하에서 GFP의 발현정도를 관찰함으로써 infection정도를 확인하였으며 (그림 8A), pro-caspase 3 및 PARP에 대한 항체를 이용한 western blot immunostaining을 통하여 세포 사멸 정도를 확인하였다. 현미경으로 관찰 시 각각의 그룹에서의 세포 사멸 정도가 대조군과 대등하게 관찰되었으며, TRAIL을 adenovirus 형태로 infection 시키거나 단백질 자체를 처리한 두 그룹 모두에서 PARP의 절단은 관찰되지 않았고, pro-caspase 3의 band 소실도 관찰되지 않았다

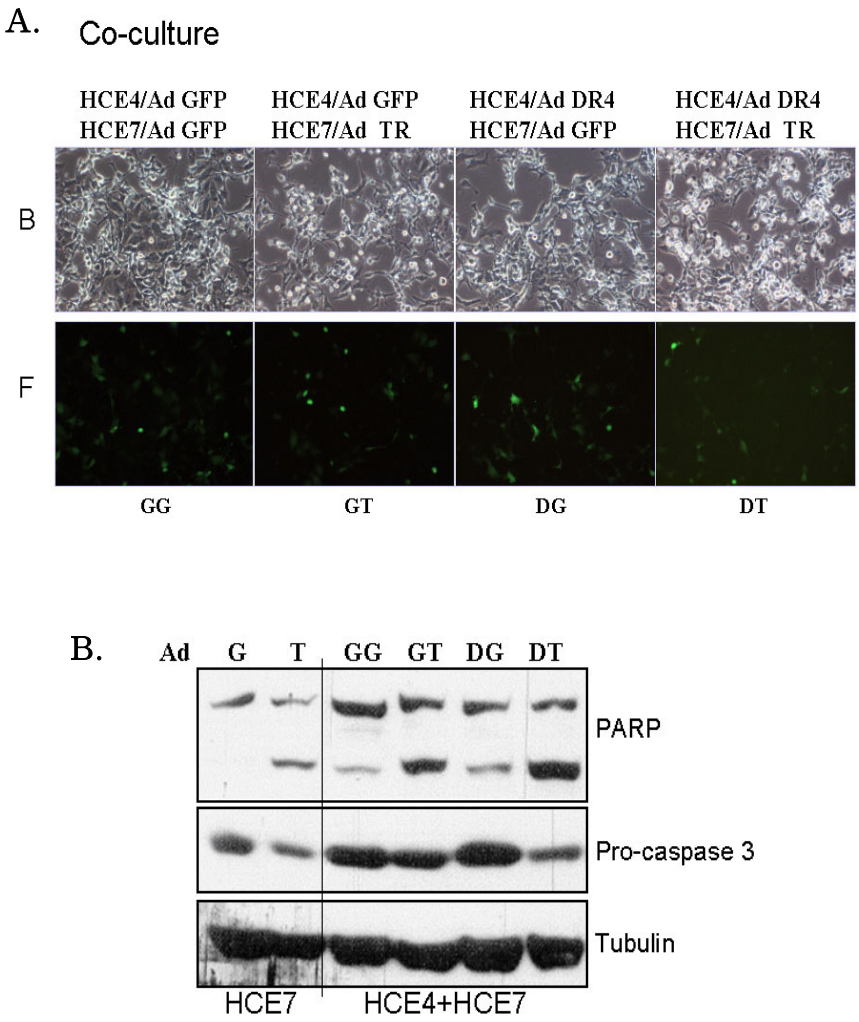
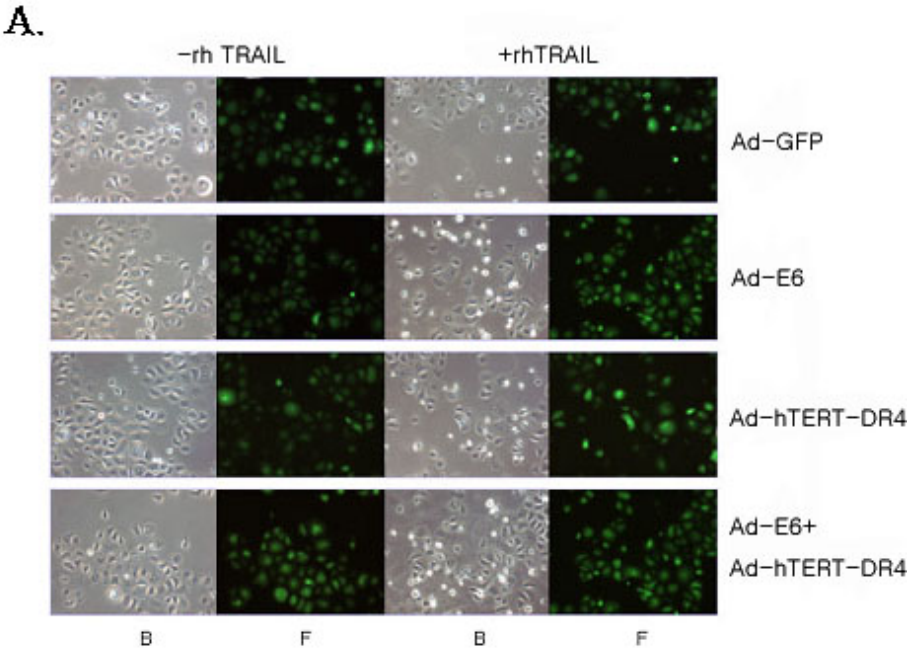
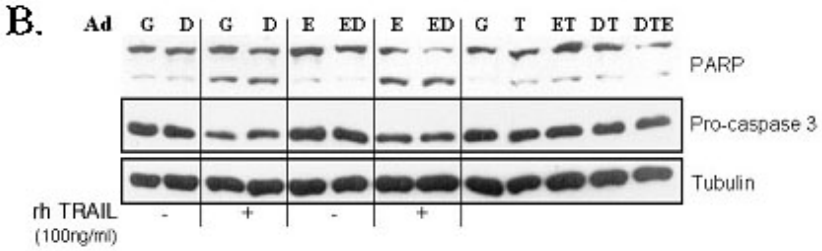


그림 7. Ad-ILZ-TRAIL에서 발현되는 TRAIL에 의한 암세포의 사멸 효과

A. TRAIL에 저항성을 가진 HCE4와 HCE7에 Ad-hTERT-DR4와 Ad-ILZ-TRAIL을 각각 infection 시킨 뒤 세포를 수확하여 함께 한 배양접시에 배양한 후 현미경 하에서 관찰하였다 (B: Bright Field, F: Fluorescent field).

B. A에서 얻은 세포 추출물을 이용하여 pro-caspase 3 및 PARP에 대한 항체를 이용하여 western blot immunostaining을 시행하였다 (GG: HCE4에 Ad-GFP, HCE7에 Ad-GFP를 infection한 경우, GT: HCE4에 Ad-GFP, HCE7에 Ad-ILZ-TRAIL을 infection한 경우, DG: HCE4에 Ad-hTERT-DR4, HCE7에 Ad-GFP를 infection 한 경우, DT: HCE4에 Ad-hTERT-DR4, HCE7에 Ad-ILZ-TRAIL을 infection 한 경우).





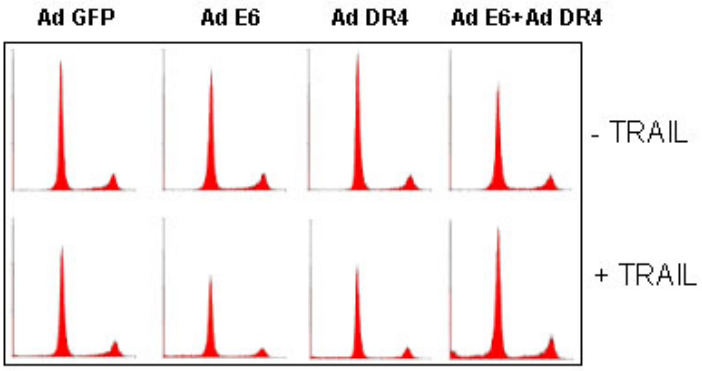
G: Ad-GFP D: AD-hTERT DR4 E:Ad-E6 T:Ad-ILZ-TRAIL

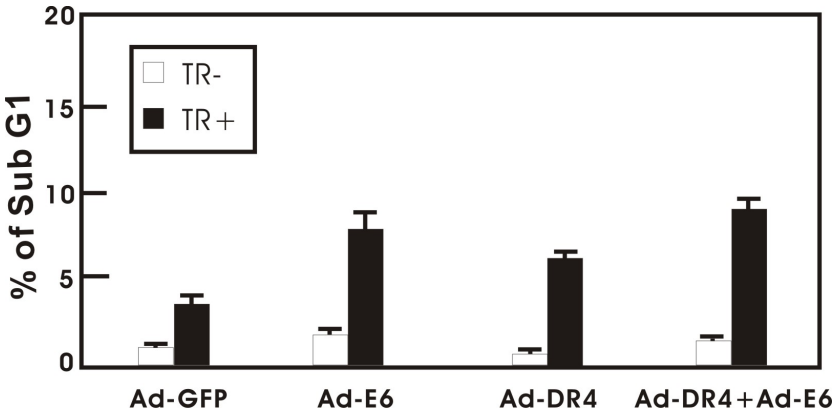
그림 8. 정상 자궁 경부 상피 세포에서의 세포 사멸 확인.

A. 정상 자궁 경부 상피 세포에 그림에 표시된 adenovirus를 이용하여 infection하였다. 광학 현미경 (B)과 형광 현미경 (F)으로 관찰하여 세포 사멸 여부와 감염 정도를 확인하였다.

B. A조건에서 얻어진 추출액을 이용하여 PARP 및 pro-caspase 3에 대한 western blot immunostaining을 시행하였다. ED, ET, DT, DTE는 그림에 표시된 Ad-E6 (E), Ad-ILZ-TRAIL (T), Ad-hTERT-DR4 (D)의 조합을 표시한다.

C.





C. Ad-GFP, Ad-E6, Ad-DR4, Ad-DR4+Ad-E6를 각각 infection 시킨 후 PI 염색을 시행하고, flow cytometry를 이용하여 sub-G1 분획을 측정하였다 (위). Sub-G1 분획의 %로 측정치를 도표화 하였다 (아래). TR : 재조합 TRAIL 단백질

(그림 8B). 세포 사멸 효과를 정량화하기 위하여 PI 염색 후 flow cytometry를 이용하여 세포의 sub-G1 분획을 확인해 본 결과 각각의 그룹에서 TRAIL을 처리하였을 때 sub-G1 분획이 증가되는 것을 관찰할 수 있었으나, 그 정도가 전체 세포의 10% 미만으로 정상 세포에 대한 독성은 그 정도가 매우 미약하였다 (그림 8C).

Ⅳ. 고 찰

암은 인류가 존재하는 한 정복해야 할 중요 질환 중의 하나이다. 최근까지 여러 연구들을 통하여 많은 치료 기술이 발전하여 왔고 새로운 치료법들이 시도되고 있지만, 아직도 많은 문제점과 한계점을 가지고 있다.

TRAIL은 암세포에서만 특이적으로 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있기에 향후 유용한 항암 요법제로서 최근 많은 연구가 진행되고 있다[34]. 하지만 여러 암 종에서 TRAIL에 대한 내성이 관찰되고 있으며, 현재에는 이러한 내성 극복을 위한 여러 가지 방법들이 연구되고 있다[12,18].

암에 대한 유전자 치료에서 가장 큰 문제점 중의 하나는 효과 유전자를 표적 세포에서만 특이적으로 발현할 수 있도록 조절하는 모듈의 가용성 여부이다. 여러 가지 가능한 대상 중에 telomerase 유전자의 발현 조절 기전은 주목할 만하다.

Telomerase는 세포 분열시 짧아지는 telomere의 길이를 복원시키는 역할을 함으로써 세포 분열의 무한성을 지속시키며 정상 체세포에서는 그 활성이 관찰되지 않지만, 암세포 90% 이상에서 활성이 관찰되어 진다고 보고되어 왔다.[11,13] Telomerase의 활성은 암세포 특이적인 현상이므로, 암의 치료에 있어서 암세포만을 선택적으로 치료해 줄 수 있을 것이며, 현재 이러한 모델에 관한 많은 연구가 진행중이다. Jian 등의 보고에 따르면 human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter에 bax를 cloning하여 adenovirus 형태로 제작, 다양한 암세포에 감염시킨 결과, 암세포 선택적으로 bax가 과발현함을 확인하였으며, 정상 세포의 독성 유발없이 암세포의 선택적 세포사멸을 확인할 수 있었으나[33], Bax 과발현 만으로 모든 암세포에서 세포사멸이 유발되지는 않은 것이라고 생각한다.

Thomas 등의 보고에 따르면 암세포 선택적인 세포사멸을 일으킨다고 알려진 TRAIL을 이용하여 Ad-CMV-TRAIL을 제작 한 후 암세포에 처리할 경우 PARP와 caspase 8의 절단을 western blot immunostaining으로 확인 할 수 있었으며[34], *in vivo* 모델에서

tumor size의 감소라는 긍정적 결과를 보여주었으나, 이러한 현상이 TRAIL에 민감한 세포에서만의 제한적인 결과라는 한계점을 보여주었다.

본 실험에서는 hTERT promoter를 이용하여 DR4를 선택적으로 암세포에서 발현시키고, 암세포 선택적인 세포 사멸 유발물질인 TRAIL을 병합 처리함으로써, 정상세포에 대한 독성을 줄일 수 있으면서 TRAIL 내성을 가진 암세포에서 세포사멸을 유발할 수 있다라는 장점도 가지고 있다고 생각되나, Ad-hTERT-Bax와의 비교실험을 하지 않았기에 어떠한 Ad-hTERT-Bax에 비해 그 우수성을 증명할 수는 없었다.

Ad-ILZ-TRAIL을 암세포에 감염시킬 경우, TRAIL을 과발현 시킬 뿐만 아니라, mouse immunoglobulin Kappa chain signal peptide를 통해 감염된 세포 외부로 TRAIL이 분비 되어지고, 주변의 암세포에 세포 사멸효과를 나타낼 수 있다. 즉, Ad-hTERT-DR4와 Ad-ILZ-TRAIL가 암세포에 모두 감염되지 않더라도 분비되는 TRAIL로 인해 암세포 선택적인 세포 사멸을 유도할 수 있었다.

이상의 모든 결과를 종합하면, Ad-hTERT-DR4와 TRAIL의 병합 처리는 TRAIL을 이용한 암세포 치료의 문제점으로 대두되었던 내성에 관한 문제점과 암세포 선택적인 치료의 문제점을 극복할 수 있는 하나의 대안으로 생각되어지며 향후 암의 치료에 있어 이용 가능한 전략으로 생각된다.

Ⅴ. 결 론

TRAIL은 암세포 선택적 세포고사를 유발하는 물질로 알려져 있다.[1,2,3]. 하지만 현재 TRAIL에 내성을 가진 많은 암세포가 발견되었으며 이를 위한 치료법이 개발되고 있다.

따라서 본 실험에서는 정상 세포 독성을 배제하며, TRIAL 내성을 가진 암세포의 선택적 세포사멸을 유도하고자 하였다.

hTERT promoter가 암세포 특이적인 활성을 가지고 있다라는 사실에 근거하여 hTERT promoter에 의해 DR4의 발현이 조절되는 Ad-hTERT-DR4를 제작하고, TRAIL (Ad-ILZ-TRAIL 또는 재조합 TRAIL 단백질)과 병합 처리시 TRAIL 내성을 가진 암세포주에서 synergistic한 암세포 사멸 효과를 관찰할 수 있었다.

또한 Ad-ILZ-TRIAL을 암세포에 감염시켜 TRAIL을 분비 하도록 하였을 때에는 Ad-hTERT-DR4가 감염된 세포에서의 효과적인 세포 사멸효과를 확인할 수 있었다.

이러한 세포 사멸 효과는 암세포 선택적인 것으로 정상 세포에서는 세포 사멸효과가 매우 미비하였다.

V. 참고문헌

1. Thomas SG, and Elizabeth L. Suppression of Tumor Growth Following Intralesional Therapy with TRAIL Recombinant Adenovirus. Molecular Therapy 2001; 4: 257-266.

2. Tongyu L, Xuefeng H, Jian G, Lidong Z, Jack AR, Momiao X, et al. Long-term tumor-free survival from treatment with the GFP-TRAIL fusion gene expressed from the hTERT promoter in breast cancer cells. Oncogene 2002; 21: 8020- 8028.

3. Ulrike N, Robert W, Jorg BS, Michael W. Adenoviral (Full-Length) Apo2L/TRAIL Gene Transfer is an Ineffective Treatment Strategy. Neuro-oncology 2003; 61: 7-15.

4. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak P, Waugh J. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. EMBO J 1997; 16: 5386-5394.

5. Pan G, Chinnaiyan AM, Gentz, R. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. Science 1997; 276: 111-117.

6. Screaton GR, Mongkolsapaya J, Cowper AE, McMichael AJ and Bell JI. TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. Curr Biol. 1997; 7: 693-698.

7. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptor. Science 1997; 277: 818-827.

8. Motoo N, Guohua P, Jessie JW, Vishva MD, Webster KC. Increased Death Receptor 5 Expression by Chemotherapeutic Agents in Human Gliomas Causes Synergistic Cytotoxicity with Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand in Vitro and in Vivo. Cancer Res 2000; 60: 847-855.

9. Jerry WS and Woodring EW. Telomerase: A target for cancer therapeutics. Cancer Cell 2002; 2: 257-262.

10. Kunhong K, Michael JF, Shi-Qiong Xu and Wafik S. Molecular Determinants of Response to TRAIL in Killing of Normal and Cancer Cells. Clin Cancer Res 2000; 6: 335-340.

11. Aloysius JK, Scott AF & James KM. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. Nature 1996; 380: 79-84.

12. Arul MC, Uttara P, Sunita S, Daniel AH, Murthy S, Thomas LC, et al. Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy PNAS 2000; 97: 1754-1766.

13. Norrback KF and GR. Telomeres and Telomerase in Normal and Malignant Haematopoietic Cells. European Journal of Cancer 1997; 33: 774-780.

14. Peter MS, Christine L, Eckart M and Frank FB. Detection of activity of telomerase in tumor cells using fiber optical biosensors Biosensors and Bioelectronics 2002; 17: 1081-1093.

15. Tim V, Izumi HJ, Carl B and Richard S. Transcriptional

Activation of the Telomerase hTERT Gene by Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein. J. Virol. 2001; 75: 4467-4474.

16. Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. Cell 2000; 102: 1-12.

17. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. Nat. Cell Biol. 2001; 3: 255-267.

18. Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL and its role in cancer therapy. Mol. Cell. Biol. Res. Commun. 2000; 4: 67-74.

19. Blackburn EH. Structure and functions of telomeres. Nature 2000; 266: 569-578.

20. Konig P, Rhodes D. Recognition of telomeric DNA. Trends Biochem. Sci. 1997; 22: 43-51.

21. Chiu CP, Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1997; 214: 99-106.

22. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994; 266: 2011-2015.

23. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life-span by introduction of

telomerase into normal human cells. Science 1998; 279: 349-352.

24. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, et al. The RNA component of human telomerase. Science 1995; 269: 1236-1241.

25. Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R. A mammalian telomerase-associated protein. Science 1997; 275: 973-977.

26. Nakayama J, Saito M, Nakamura H, Matsuura A, Ishikawa F. TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. Cell 1997; 88: 875-884.

27. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. Cell 1997; 90: 785-795.

28. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. Science 1997; 277: 955-959.

29. Motoo N, Guohua P, Jessie JW, Vishva MD, Webster KC and HJ, Su H. Increased Death Receptor 5 Expression by Chemotherapeutic Agents in Human Gliomas Causes Synergistic Cytotoxicity with Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand in Vitro and in Vivo. Cancer Res 2000; 60: 847-853.

30. Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. Nat. Genet., 1997; 17: 498-502.

31. Nakayama J, Tahara H, Tahara E, Saito M, Ito K. Telomerase activation by hTRT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. Nat. Genet. 1998; 8: 65-68.

32. Kim NW, Piatys MA, Prowse KR, Harley CB, West M. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994; 66; 2011-2015.

33. Jian G, Shunsuke K, Masahiro T. Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancer. Cancer Reserch 2000; 60: 5359-5366.

Abstract

Selective induction of apoptosis in cancers by hTERT promoter controlled expression of DR4 and TRAIL

Eunah Choi

Department of Medical Science
the graduate School, Yonsei University

(directed by Professor Kunhong Kim)

Telomerase activity is detected in more than 90% of immortalized and cancer cells but absent in most normal somatic cells and HPV E6 oncoprotein could activate telomerase. In this experiment, we hypothesized that the hTERT promoter can be used for tumor-specific expression of transgenes to induce selective cancer cell death in TRAIL-resisitant or HPV E6 positive cancer cells.

First, we tested whether hTERT core promoter is active only in cancer cells and whether the presence of HPV E6 protein could potentiate the activation of the promoter by using luciferase constructs and we found that hTERT promoter is active only in cancer cells, and the presence of E6 protein could agument hTERT promoter activity. Then, we generated adenoviruses to express TRAIL-death receptor (DR) 4 driven by hTERT promoter to test whether the expression of DR4 is induced by the promoter in cancer cell lines in the presence or absence of E6 oncoprotein and

we found that DR4 expression was induced.

Finally, we tested whether TRAIL treatment and the induction of DR4 could contribute to selective cancer cell death by observing caspase 3 activation and PARP cleavage, and we found that death of Ad-hTERT-DR4 infected cells were increased in the presence of TRAIL. Taken together, our results reveal that the proper use of hTERT promoter could be useful and powerful for inducing selective cancer cell death with effective death inducing transgenes such as DR4.

---

key point: telomerase promoter, death receptor, apoptosis, cancer, TRAIL