

p53 변이체를 발현하는 종양 선택
적 살상 아데노바이러스의 암세포
살상능 분석

연세대학교 대학원
의 과학과
구태영

p53 변이체를 발현하는 종양 선택
적 살상 아데노바이러스의 암세포
살상능 분석

연세대학교 대학원
의 과 학 과
구 태 영

p53 변이체를 발현하는 종양 선택
적 살상 아데노바이러스의 암세포
살상능 분석

지도교수 윤 채 옥

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2004 년 12 월 일

연세대학교 대학원
의 과 학 과
구 태 영

구태영의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004 년 12 월 일

감사의 글

이 논문을 완성하기까지 저에게 도움을 주신 분들이 너무나도 많아서 그 분들께 감사한 마음이 가득합니다. 아무 것도 모르는 제게 실험을 가르쳐주시고 앞으로 더욱 큰 꿈을 가질 수 있도록 이끌어주신 윤채옥 선생님께 가장 먼저 감사드립니다. 항상 아낌없는 조언과 관심을 보여주신 김주향 선생님께 또한 감사드립니다. 이 두 분 밑에서 배운 것이 저는 행운이라고 생각합니다. 논문 지도를 정성껏 해주시고 관심 가져주시며 웃어주시는 김호근 선생님, 그리고 학문적으로 도움을 많이 주신 서강대 김정호 교수님께도 감사드립니다. 이 논문을 쓰는 기간 동안 저에겐 논문 외에도 얻은 것들이 참 많습니다. 실험실의 소중한 사람들이 생겼기 때문입니다. 실험의 처음부터 하나하나 정성껏 가르쳐주었던 은희 언니, 항상 웃어주며 저의 든든한 후원자인 재성 선배님, 큰언니같이 사소한 고민까지도 함께 고민해주었던 영숙 언니, 물어보면 언제든지 정성껏 가르쳐주시는 대봉 선배님, 애교 많으신 김현희 선생님, 허허 웃으시며 따뜻하게 대해주시는 황 선생님, 너무 편하고 좋아서 얼굴만 봐도 힘이 되는 지영 언니, 포근한 모습의 너무나 따뜻하게 대해주었던 민정 언니, 항상 열심히 하는 모습을 보여주는 경주 언니, 바쁘게도 부탁하면 뭐든지 도와주는 고가이버 동현 오빠, 실험실에서의 나의 정신적 지주 아름 언니, 친오빠처럼 편하고 착한 평환 오빠, 실험실 일이라면 모든 열심히 하며 항상 웃는 내 친구 일규, 열정적으로 실험하는 너무 귀여운 후배 윤아, 백곰같은 너무 귀엽고 착한 오준이, 착하고 귀여워서 동생 삼고 싶은 민주, 졸업했지만 실험하면서 항상 저를 웃게 했던 태영 언니, 착하고 열심히 하면서 선배로서의 모습을 보여준 은아 언니, 실험실의 사무를 보느라 애쓰는 선영이, 박근호 선생님, 박선순 선생님, 환자 진료하면서 열심히 실험하시는 손주혁 선생님. 이 모든 분들께 감사드립니다.

그리고 지금은 세상에 안 계시지만 바르게 사는 방법을 어릴 때부터 가르쳐주시며 사랑해주셨던 외할아버지, 항상 저를 걱정해주시고 사랑해주시는 외할머니, 제가 하는 일이라면 뭐든지 지지해주시고 격려해주시는 아빠, 모든 순간 묵묵히 저를 위해 뒷바라지해주시는 엄마, 그리고 전화만 하면 자다가도 일어나서 데리러 나오는 오빠, 세상에서 제일 소중한고 사랑하는 나의 가족에게 감사드립니다.

또한 제 옆에 어려울때나 기쁠때나 항상 함께 있어주어서 힘이 되었던 소중한 친구들과 항상 저를 믿어주시고 지지해주시는 이기호 목사님, 좋은 말씀으로 힘을 주시는 정규영 목사님과 신촌 교회 청년들에게도 감사드립니다.

마지막으로 저에게 이 모든 것을 허락하시고 지켜주신 하나님께 가장 감사드립니다.

저자 씀.

<차례>

그림 및 표 차례	iii
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	8
1. 대상 세포주 및 세포배양	8
2. p53 변이체 제작	8
3. p53 변이체를 발현하는 복제 불능 아데노바이러스의 제작	8
4. p53 변이체를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 제작	9
5. p53 변이체의 활성 비교 검증	10
6. p53 변이체를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 세포 살상 효과 비교 검증(CPE assay)	11
7. MTT assay를 이용한 재조합 아데노바이러스의 세포 살상 효과 비교 검증	10
8. Immunoblotting 분석	11
9. FACS 분석	12
10. TUNEL assay을 통한 세포고사 관찰	12
11. 생체 내 항종양 효과 실험	13
III. 결과	14
1. p53 변이체의 활성도 검증	14
2. p53 변이체를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 세포 살상 효과 비교 검증	14

3. p53 변이체를 발현하는 아데노바이러스로 감염된 암세포에서의 p53, p21 단백질 발현 양상 비교	21
4. Annexin V/PI 염색과 유세포 분석을 통한 세포 사멸 기전 검증	24
5. TUNEL assay를 통한 세포 사멸 기전 검증	28
6. p53 변이체를 발현하는 복제 가능 아데노바이러스의 생체 내 항종양 효과 비교 검증	30
IV. 고찰	34
V. 결론	38
참고문헌	39
영문요약	43

그림 차례

Figure 1. Effect of wild-type p53, p53 Δ 30, p53-VP or p53 Δ 30-VP on transactivation of the pG13-luciferase reporter vector in C33A cells.	15
Figure 2. Structure of replication-incompetent (A) and replication-competent (B) adenoviral vectors.	6..... 1
Figure 3. The <i>in vitro</i> CPE effects of replication-incompetent adenoviruses.	18
Figure 4. Efficient cancer cell killing effect of replication-incompetent adenoviruses expressing wild-type p53 or p53 variants.	19
Figure 5. The <i>in vitro</i> CPE effects of replication-competent adenoviruses.	22
Figure 6. Efficient cancer cell killing effect of replication-competent adenoviruses expressing wild-type p53 or p53 variants.	23
Figure 7. The expression of p53 in U343 cells	

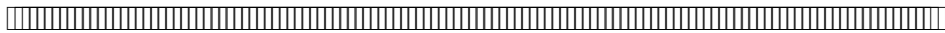
infected with replication-incompetent adenoviruses.	25
Figure 8. The expression of p53, p21 in U343 cells infected with replication-competent adenoviruses expressing p53 variants.	26
Figure 9. Analysis of Annexin-V/PI fluorescence.	2
Figure 10. <i>In vitro</i> TUNEL assay.	1..... 3
Figure 11. Suppression of tumor growth by replication-competent adenoviruses expressing p53 variants in male athymic nude mice	33

국문요약

p53 변이체를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 암세포 살상능 분석

p53 유전자는 17번째 염색체에 위치하고 있는 종양 억제 유전자로써, 폐암, 난소암, 유방암, 직장암, 두경부암 등 인체 종양의 50% 정도에서 유전자 변이가 나타난다. p53 단백질의 전사활성은 암세포에서 세포고사를 유도하는데 결정적인 역할을 하며, 생체 내에서 p53의 활성화도는 mdm2에 의해 음성 피드백(negative feedback) 조절을 받는다. p53 유전자가 정상형으로 밝혀진 종양에서도 mdm2의 과다발현 또는 human papilloma 바이러스에 의한 감염 등으로 p53이 비활성화 되어 있는 경우가 빈번한 것으로 보고되었다. 최근의 연구 결과들에 의하면, DNA 결합 능력이 손상된 p53을 발현하는 암세포에 야생형의 p53 유전자를 형질 도입하면 암세포 증식이 중지되고, 세포고사가 유도되는 현상이 밝혀졌다. 하지만 mdm2의 발현이 높은 암의 경우에는 야생형의 p53을 도입하더라도 암세포 내에 고농도로 존재하고 있는 mdm2에 의해 p53의 분해가 유도되므로 p53에 의한 암세포 살상 효과를 크게 기대하기가 어렵다. 이러한 연구들을 바탕으로, 본 연구에서는 p53의 음성 조절 부위인 N-말단 또는 C-말단을 제거하여 p53의 지속적인 발현을 유도할 수 있는 새로운 구조의 p53 변이체들을 제작하고, 이들을 암세포 특이적 살상 아데노바이러스에 탑재하여 항종양 효과를 유도하고자 하였다. p53의 부조절 기능을 수행하는 C-말단 부위를 제거한 p53 Δ 30, p53의 N-말단 부위를 Herpes simplex virus의 VP16 전사활성 부위로 치환한 p53-VP, 그리고 p53의 N-말단 부위를 VP16 전사활성 부위로 치환하고 동시에 C-말단 부위를 제거한 p53 Δ 30-VP 변이체들을 각각 제작한 뒤 이들의 활성도를 검증

한 결과, p53 Δ 30, p53 Δ 30-VP, p53-VP의 순서대로 활성도가 증가하였으며, 특히 p53 Δ 30와 p53 Δ 30-VP의 활성은 야생형 p53에 비해 약 3~4배로 크게 증가하였다. 또한, 이들 변이체들을 복제 불능 아데노바이러스와 암세포 특이적 살상 아데노바이러스에 도입한 결과, 세포 살상능이 현저하게 증가하였다. 특히, 복제 불능 아데노바이러스에 도입한 경우에는 dl/p53 Δ 30 바이러스의 세포 살상능이 가장 높은 반면, 암세포 특이적 살상 아데노바이러스에 도입한 경우에는 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP 아데노바이러스의 세포 살상능이 가장 높게 나타났다. 또한, p53 단백질의 발현 양상을 비교한 결과에서도, 세포 살상능이 가장 높은 dl/p53 Δ 30와 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP 아데노바이러스에 의한 p53 발현량이 가장 높음을 확인할 수 있었다. 이와 더불어 세포고사 빈도를 확인할 수 있는 TUNEL 분석과 FACS 분석을 시행한 결과에서도, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP에 의해 유도되는 세포고사 빈도가 가장 높게 유도됨을 확인하였다. p53의 활성화는 항암제 또는 방사능을 이용한 효과적인 암치료에 필수적으로, 활성이 증대된 p53 변이체는 항암제 또는 방사능과 함께 병용 투여될 경우에 항암 효과를 현저히 증대시킬 수 있을 것이다. 또한, 활성이 증대된 p53 변이체를 아데노바이러스에 탑재하여 암 유전자 치료에 이용한다면 mdm2가 과발현된 암세포 뿐 아니라 암세포 내에 불활성화 되어 있는 p53의 활성도를 개선시킴으로서 보다 효과적으로 암세포의 세포고사 및 세포성장 억제를 유도할 수 있을 것으로 생각된다.



핵심되는 말: 복제 가능 아데노바이러스 p53, TERT 프로모터

p53 변이체를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의
암세포 살상능 분석

<지도교수 윤채욱>

연세대학교 대학원 의과학과

구 태 영

I. 서론

p53 유전자는 체내 시스템이 이상을 일으켜 암으로 발전될 수 있는 가능성을 인지해내는 모니터적인 특성을 지니고 있는 종양억제 유전자로서, 23개의 인간 염색체쌍 중 17번째 염색체에 위치하고 있다. 인간 p53 단백질은 총 393개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 야생형 p53은 인간뿐만 아니라 다른 많은 종류의 포유동물에서도 발견되며, 그 아미노산 서열은 종간에 잘 보존되어 있다¹. p53은 동종 사량체를 이루는 서열 특이적인 DNA 결합 단백질로서, 구조적으로 크게 다섯 부위로 나뉘어 진다^{2,3}. N-말단에는 특정 유전자의 전사와 관련이 있는 전사 활성화 도메인이 존재하고 단백질-단백질 상호작용에 관여하는 프로린-리치 도메인은 전사 활성화 도메인 다음에 위치한다. 그리고 DNA에 특이적으로 결합할 수 있는 도메인은 p53 단백질의 중간 부위에 존재한다. 또한 C-말단 부위에는 p53 단백질이 서로 결합해 네 개의 동종 사량체를 만드는데 관여하는 도메인이 있고, 최

말단 부위에는 p53 기능이 역으로 조절되는 부조절 도메인이 존재한다⁴⁵. N-말단 부위의 18~26 번째 아미노산 영역은 α -helix를 형성하고 있으며, 이곳에 mdm2 단백질이 결합하게 되면 p53의 분해가 촉진된다. 또한, 이 부위는 스트레스에 의하여 인산화되면 mdm2가 p53으로부터 분리되어 p53을 안정화 또는 활성화시킬 뿐 아니라 p53 단백질이 세포핵으로부터 빠져나가 세포질로 이동하는 것을 억제해 세포핵 속에 p53 단백질을 축적시켜 세포고사를 일으키게 된다⁶. 그러나 p53 종양 억제 유전자에 돌연변이가 발생하지 않았어도 p53의 안정화를 조절하는 mdm2 유전자의 발현이 이상적으로 높은 경우에는 mdm2가 p53 단백질의 전사활성 부위인 N-말단의 TAD(transactivation domain) 부위에 결합해 p53 단백질의 분해를 촉진하여 암 발생을 유도할 수 있다⁷. 한편 N-말단 부위의 11~27 아미노산에는 아데노바이러스의 E1B 55kDa 단백질이 결합하는 부위가 존재하며, 이 부위에 E1B 55kDa 단백질이 결합하게 되면 p53의 불활성화를 유도한다⁸. 따라서 아데노바이러스를 매개하여 p53을 생체 내에 전달하고자 할 경우에는 E1B 55kDa의 발현으로 p53의 활성화가 크게 감소할 수 있다. p53의 C-말단은 동종 사량체의 형성에 관여하며, 그 최말단 부위인 염기성 부위는 p53의 기능을 역으로 조절할 수 있는 부조절 도메인이 존재한다⁹.

p53은 세포고사를 유도하거나 세포의 성장을 억제하는 기능을 하며, 정상적인 체내 시스템 내에서는 음성 피드백 작용에 의해 낮은 수준의 농도로 유지된다⁴. 그러나 외부로부터 DNA 손상을 유도하는 신호 전달 체계가 활성화되면 곧 체내에서 높은 농도의 p53 발현이 유도되고 활성화된다. 암이 진행되는 경우에는 p53 유전자의 돌연변이가 동반되거나 비활성화된 경우가 많아 이러한 p53 유전자의 기능이 억제되는 경향을 보이게 된다. 최근까지의 연구 결과들에 의해 p53의 기능적 결합이 52종류 이상의 대부분의 암 발생에 직접 또는

간접적인 원인으로 작용한다고 밝혀졌다³⁻⁴. p53은 폐암, 난소암, 유방암, 직장암, 두경부암 등 약 50% 이상의 인체 종양 세포에서 유전자 변이가 나타나고, p53 유전자가 정상형으로 밝혀진 종양에서도 mdm2의 과다발현 또는 human papilloma 바이러스에 의한 감염 등으로 p53이 비활성화되어 있는 경우가 빈번한 것으로 보고되었다. 특히, p53의 분해를 유도하는 mdm2 유전자의 발현이 이상적으로 높은 경우, mdm2가 p53 단백질의 전사활성 부위인 N-말단의 TAD(transactivation domain) 부위에 결합해 p53 단백질의 분해를 촉진시켜 육종, 신경아종, 뇌암, 유방암 등의 암을 유발한다고 보고되었다^{7,10-12}. 따라서 mdm2의 발현이 높은 암의 경우에는 야생형의 p53을 도입하더라도 암세포 내에 고농도로 존재하고 있는 mdm2에 의해 p53의 분해가 유도되므로 p53에 의한 암세포 살상 효과를 크게 기대하기가 어렵다. Liu 연구팀은 두경부암 세포주에 야생형 p53을 아데노바이러스를 이용하여 전달하여 세포고사를 유도할 수 있음을 보고하였으며¹³, 또한 cisplatin이나 paclitaxel과 같은 항암제를 이용하여 p53의 발현을 유도하여 암세포 살상 효과를 증대시키려는 시도도 이루어지고 있다¹⁴. 한편, p53 유전자를 변이시킴으로써 활성을 증가시키려는 연구도 활발히 진행 중이다. 미국 미시간 대학의 Tang 연구팀은 p53의 주요 음성 조절 유전자인 mdm2가 결합하는 부위인 p53의 N-말단 부위의 14, 19번째 아미노산을 치환시키거나 22, 23번째 아미노산을 치환시켜 mdm2에 의한 p53의 분해를 억제하고 그 결과 sarcoma 세포에서의 세포고사가 증가됨을 보고하였다¹⁵.

p53을 도입하여 항종양 효과를 유도하고자 하는 초기의 암 유전자 치료에는, 아데노바이러스의 복제에 필수적인 E1 유전자 대신에 야생형 p53 유전자를 삽입한 복제 불능 아데노바이러스를 주로 이용하였다¹⁶. 현재 p53 유전자를 탑재한 복제 불능 아데노바이러스를 이용한 암 유전자 치료는 미국 MD Anderson Medical Center에서 제 3

상 임상으로 진행되고 있으며 암세포 억제와 인체 내 무독성이 검증되었다¹⁷. 하지만, 복제 불능 아데노바이러스는 1차 감염세포 또는 그 주변의 제한된 세포들에서만 항종양 효과를 유도하여 임상적인 실용성 면에서 많은 제약이 있음이 밝혀졌다. 이를 극복할 수 있는 한 방안으로, 암세포에서만 선택적으로 증식하여 살상하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 대한 연구가 활발히 이루어졌다. 암세포 선택적 살상을 유도할 수 있는 종양 선택적 살상 아데노바이러스는 일차 감염세포에서만 치료효과를 유도할 뿐 아니라 바이러스의 지속적인 증식으로 주변의 암세포들도 이차적으로 감염하여 치료효과가 도미노 현상과 같이 계속 퍼져 나갈 수 있어 암치료 효능을 현저히 증대시킬 수 있다. 또한, 주변의 정상세포는 감염되더라도 바이러스의 증식이 억제되어 독성과 부작용이 현격히 감소되는 이점도 있다.

본 연구실에서는 아데노바이러스의 초기 유전자인 E1B 19kDa이 소실되어 암세포 살상능이 증대되고, 동시에 바이러스의 증식이 암세포 선택적으로 활성화되는 telomerase reverse transcriptase (TERT) 프로모터에 의해서 조절되는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad/m Δ 19의 우수한 생체 내·외 항종양 효과를 보고한 바 있다¹⁸. 아데노바이러스의 E1B 19kDa 유전자는 강력한 세포고사 억제제인 Bcl-2와 구조적, 기능적으로 유사하며, 아데노바이러스의 초기 발현 유전자인 E1A에 의해 유도되는 세포고사를 억제한다고 알려져 있다. 본 연구실에서도 E1B 19kDa 유전자가 소실된 아데노바이러스의 암세포 살상능이 세포고사의 활발한 유도와 더불어 크게 증가하였음을 보고하였다¹⁹. 또한, p53의 발현에 의한 세포 살상은 주로 세포고사에 의해 이루어지며 이들에 의한 항암효과는 암세포의 세포고사 기능이 정상적일 때 더욱 효과적이다. 따라서 E1B 19kDa 유전자가 결손된 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 유전자 전달체로 이용하여 p53을 체내에 도입한다면, 아데노바이러스의 증식에 따른 암세포의 괴사 뿐 아니라 아데노

바이러스 또는 p53의 발현에 의해 유도되는 세포고사를 함께 활발하게 유도할 수 있어 항종양 효과를 크게 개선시킬 수 있을 것이다. 또한, TERT 프로모터는 암 진행 전단계인 전암 조직과 암세포주 및 암조직에서 활성이 선택적으로 증가한다고 알려져 있는 대표적 암세포 선택적 활성 프로모터로서²⁰⁻²⁴, 아데노바이러스의 증식이 TERT 프로모터에 의해서 조절되는 Ad/m Δ 19 아데노바이러스는 암세포 선택적으로 증식하고, 그 결과 암세포 선택적 세포 살상을 유도할 뿐만 아니라 p53의 발현도 암세포 내에서만 지속적으로 발현시킬 수 있는 장점도 있다.

이러한 연구들을 바탕으로, 본 연구에서는 화학물질 및 방사선 조사 방법만을 이용해 p53의 발현을 유도해내려는 기존의 시도와는 달리 p53의 기능을 강화시킬 수 있는 새로운 구조의 p53 변이체들을 만들어 암치료에 이용하였다. 또한, 세포고사 유도에 더욱 효과적인 p53의 구조를 탐색하여 암세포 내에서 불활성화 되어있는 p53을 유전자 치료 요법으로 보다 강하게 활성화시키고, 세포고사의 유도 및 암세포 성장 억제를 통해 암세포의 선택적 사멸을 유도하고자 하였다. 이를 위하여, 암세포 선택적으로 증식할 수 있는 Ad/m Δ 19 아데노바이러스에 활성이 증가된 p53 변이체를 도입하여 암세포 내에서 p53 변이체를 높은 효율로 발현시키고 이에 따른 세포고사 유도 및 암세포 살상을 함께 유도하여 항종양 효과의 개선여부를 검증하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 세포배양

실험에 사용된 세포주들은 간암 세포주(SK-Hep1, HepG2), 뇌암 세포주(U251N, U343, U373MG, U87MG, U118MG, SNU-201), 폐암 세포주(A549), 자궁 경부암 세포주(C33A)와 같은 인체 암세포주들과 인체 정상세포주(IMR90, BJ, Chang, MRC5)들이며, 모두 American Type Culture Collection(ATCC; Rockville, MD)에서 구입하였다. 모든 세포주들은 10%의 우태아혈청(GIBCO BRL, Grand island, NY)이 함유된 DMEM 배지(GIBCO BRL, Grand island, NY)를 배양액으로 항생제 penicillin/streptomycin(GIBCO BRL, Grand island, NY)을 첨가하여 5% CO₂의 존재 하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다.

2. p53 변이체 제작

p53의 C-말단 부위를 제거한 p53 Δ 30, p53의 N-말단 부위를 Herpes simplex virus의 VP16 전사활성 부위로 치환한 p53-VP, 그리고 p53의 N-말단 부위를 VP16 전사활성 부위로 치환하고 동시에 C-말단 부위를 제거한 p53 Δ 30-VP 변이체들을 제작하였다.

3. p53 변이체를 발현하는 복제 불능 아데노바이러스의 제작

야생형 p53과 함께 3종류의 변이체 p53들을 각각 아데노바이러스의 E1 서플렉터인 pCA14(Microbix, Ontario, Canada)에 *XhoI/EcoRV* 제한효소를 이용하여 클로닝하여 pCA14-p53 Δ 30, pCA14-p53-VP, pCA14-p53 Δ 30-VP, 그리고 pCA14-p53을 제작하였

다. 제작된 4종류의 E1 셔틀벡터를 아데노바이러스 토탈벡터인 dl324*BstBI*과 함께 대장균 BJ5183에서 상동 재조합시켜 dl/p53, dl/p53 Δ 30, dl/p53-VP, 또는 dl/p53 Δ 30-VP 아데노바이러스를 제작하였다. 제작된 모든 바이러스들은 *PacI* 제한효소로 절단하여 선형화시킨 후, 아데노바이러스 생산세포주인 HEK293에 lipofectamin(GIBCO BRL, Carlsbad, CA)을 이용하여 형질 전환하여 바이러스를 생산하였다. 생산된 아데노바이러스들은 HEK293 세포주에 재감염시켜 아데노바이러스를 증식시켜 limiting dilution assay와 plaque assay로 아데노바이러스의 역가를 결정하였다. 동물실험을 위해서 CsCl gradient 방법으로 아데노바이러스를 농축하여 순수 분리하였다.

4. p53 변이체를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 제작

p53의 C-말단 부위를 제거한 p53 Δ 30, p53의 N-말단 부위를 Herpes simplex virus의 VP16 전사활성 부위로 치환한 p53-VP, 그리고 p53의 N-말단 부위를 VP16 전사활성 부위로 치환하고 동시에 C-말단 부위를 제거한 p53 Δ 30-VP 변이체들을 야생형 p53과 함께 각각 아데노바이러스의 E3 셔틀벡터인 pSP72 Δ E3의 *BamHI* 부위에 삽입하여 pSP72 Δ E3-p53 Δ 30, pSP72 Δ E3-p53 Δ 30-VP, 그리고 pSP72 Δ E3-p53을 제작하였다. 제작된 3종류의 E3 셔틀벡터를 각각 *XmnI* 제한효소를 처리하여 단일가닥으로 만든 다음 *Spe I* 제한효소를 처리하여 단일가닥이 된 종양 선택적 살상 아데노바이러스 토탈벡터인 Ad/m Δ 19와 함께 대장균 BJ5183에서 상동 재조합시켜 Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP 아데노바이러스를 각각 제작하였다. 제작된 모든 바이러스들은 *PacI* 제한효소로 절단하여 선형화시킨 후, HEK293에 lipofectamin(GIBCO BRL, Carlsbad, CA)을 이용하여 형질 전환하여 바이러스를 생산하였다.

5. p53 변이체의 활성 비교 검증

제작된 각 p53 변이체의 세포 내에서의 활성 정도를 비교하기 위해, polyoma virus minimal promoter의 ribosomal gene cluster upstream으로부터 유래된 13 copy의 p53 결합부위가 luciferase 유전자 앞에 위치한 pG13-luciferase 벡터(Johns Hopkins 대학에 있는 Vogelstein 박사)를 이용하여 luciferase assay를 시행하였다. 자궁 경부암 세포주 C33A에 각각의 p53 변이체 또는 야생형 p53 유전자를 pG13-luciferase 또는 음성대조군 벡터인 MG15-luciferase와 함께 형질 전환한 뒤 48시간 이후에 세포를 해리하였다. 해리된 세포용액을 원심분리한 후, 상층액만을 모아 firefly luciferase와 renilla luciferase를 일정량 반응시킨 뒤 luciferase의 발광량을 측정해 p53의 활성 정도를 정량화하였다.

6. p53 변이체를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 세포 살상 효과 검증(CPE assay)

p53 변이체를 발현하는 복제 불능 또는 중양 선택적 살상 아데노바이러스의 암세포 살상능을 검증하기 위해, 인체 간암 세포주(SK-Hep1, HepG2), 뇌암 세포주(U251N, U343, U373MG, U87MG, U118MG, SNU-201), 폐암 세포주(A549), 자궁 경부암 세포주(C33A)와 같은 인체 암세포주들과 인체 정상세포주(IMR90, BJ, Chang, MRC5)를 여러 역가의 아데노바이러스로 감염시킨 후 세포의 사멸 정도를 관찰하였다. 세포 살상의 정도는 0.5% crystal violet(in 50% methanol) 용액으로 염색하여 비교 분석하였다.

7. MTT assay를 이용한 재조합 아데노바이러스의 세포 살

상 효과 비교 검증

아데노바이러스 감염에 의한 세포 살상 정도를 보다 정량화하기 위해, 여러 종류의 암세포들과 정상세포주들을 24-well plate에 분주하고 24시간 후 여러 역가의 아데노바이러스를 감염시켰다. 바이러스 감염 후 2, 4, 6, 8일째에 세포의 생존율을 측정하기 위해 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 2 mg/ml) 용액을 각 well 당 250 μ l씩 넣고 37°C 항온 배양기에서 4시간동안 배양 후 1 ml의 DMSO(dimethyl sulphoxide)를 첨가하고 37°C에서 10분간 방치한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 측정된 흡광도 값을 이용하여 다음의 수식으로 산출하였다.

$$\text{생존률(\%)} = \frac{\text{실험군의 평균 색소 흡수률} - \text{기준 색소 흡수률}}{\text{대조군의 평균 색소 흡수률} - \text{기준 색소 흡수률}} \times 100$$

8. Immunoblotting 분석

복제 불능 또는 복제 가능 아데노바이러스에 의해 발현되는 3 종류의 p53 변이체와 야생형 p53의 단백질을 확인하기 위해 293 세포주에 dl/p53, dl/p53 Δ 30, dl/p53-VP, dl/p53 Δ 30-VP 아데노바이러스 또는 Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP를 각각 2 MOI로 감염시키고 2일 뒤에, lysis buffer(50mM HEPES, 0.15M NaCl, 0.5% NP-40, protease inhibitor: PMSF, TLCK, TPCK)로 세포들을 용해시켜 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 gel에 있는 단백질을 PVDF(polyvinylidene fluoride) membrane에 electro-transfer한 뒤 p53 또는 p21 단백질을 특이적으로 인지하는

항체(pAb 240, 6A7; BD Biosciences., San Jose, CA)와 β -actin(Sigma, St. Louis, MO)을 일차 항체로 hybridization시키고 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 goat anti-mouse IgG(Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA)로 다시 hybridization시킨 후 ECL(enhanced chemiluminescence: sc-2048; SantaCruz Biotech., Santa Cruz, CA)을 이용해 p53 또는 p21 단백질의 발현 양상을 검증하였다.

9. FACS 분석

p53에 의해 유도되는 세포사를 flow cytometry analysis cell sorting(FACS) 분석을 통해 검증하였다. U343, U373MG, A549, U251N 세포주(1×10^6 개)를 25T flask에 분주한 다음 Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP 아데노바이러스 또는 양성 대조군으로 1μ M camptothecin(CPT)-11을 처리한 후 48시간 뒤에 감염된 세포들을 회수하여 1x binding buffer로 씻어낸 후 ApoAlert Annexin V-FITC apoptosis kit(CLONTECH, Polo Alto, CA)를 이용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 Annexin V/PI 이중 염색(double staining)하여 유세포 분석을 시행하였다.

10. TUNEL assay를 통한 세포고사 관찰

p53 유전자가 세포사에 미치는 영향을 알아보기 위해 TUNEL assay를 실시하였다. U343, U373MG, A549, 그리고 U251N을 5×10^4 개로 chamber slide에 분주하고 각각의 바이러스를 3 MOI로 감염시키고 24시간 후에 배지를 제거한 뒤 ApoTag Kit(Intergen, Purchase, NY)을 이용해 제조회사가 제시한 방법에 따라 terminal

deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) assay를 시행하였다. 발색여부를 확인하기 위해 peroxidase와 결합된 avidin을 사용하여 3,3'diaminobenzine(DAB; Dako, Carpinteria, CA)와 반응시킨 후 세포들이 갈색으로 변하는 것이 육안으로 확인되면 증류수로 3회 씻어내고 0.5% methyl green으로 10분간 염색하였다. 다시 증류수로 3회 씻어 낸 후 cover glass로 고정시켜 현미경으로 관찰하여 현미경 상에서 네 곳 이상의 부위를 무작위로 정하여 전체 세포들 중 염색된 세포의 비율을 계산하였다.

11. 생체 내 항종양 효과 검증

생후 6~8주 정도 경과된 누드마우스에 1×10^7 개의 인체 뇌암 세포주 U343을 마우스의 복벽 피하에 주사하였다. 종양의 크기가 약 50~80 mm³ 정도 성장하였을 때 5×10^7 plaque forming unit(PFU)/50 μ l 용량으로 야생형 p53 또는 3 종류의 p53 변이체를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 음성 대조군인 PBS를 종양 내에 직접 1, 3, 5일째에 투여하고 종양의 성장을 관찰하였다. 종양의 크기는 caliper를 이용하여 종양의 장축과 단축을 측정하고, 다음과 같은 공식으로 산출하였다. Tumor size(mm³) = 장축 mm \times (단축 mm)² \times 0.523. 종양의 용적 비교는 Mann-Whitney test를 이용하여 통계학적으로 분석하였다.

III. 결 과

1. p53 변이체의 활성화도 검증

제작된 각 p53 변이체의 세포 내에서의 활성화 정도를 비교하기 위해, 13 copy의 p53 유전자 결합부위가 luciferase gene 앞에 삽입된 pG13-luciferase 벡터에 p53 변이체가 결합하는 양을 측정하였다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이, p53의 C-말단 부위를 제거한 p53 Δ 30, p53의 N-말단 부위를 Herpes simplex virus의 VP16 전사활성 부위로 치환한 p53-VP, 그리고 p53의 N-말단 부위를 VP16 전사활성 부위로 치환하고 동시에 C-말단 부위를 제거한 p53 Δ 30-VP 변이체들의 활성화도가 야생형 p53보다 모두 증가하였다. 또한 활성화도 정도는 p53 Δ 30, p53 Δ 30-VP, p53-VP의 순서대로 증가하였으며, 특히 p53 Δ 30와 p53 Δ 30-VP의 활성화는 야생형 p53에 비해 약 3~4배로 크게 증가하였다. 그러나 음성 대조군인 p53의 결합 부위가 변이되어 있는 MG15-luciferase 벡터를 이용한 경우에는 야생형 p53과 p53 변이체의 활성화도는 거의 측정되지 않았다.

2. p53 변이체를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 제작 및 세포 살상 효과 비교 검증

아데노바이러스의 세포고사 유도능을 증가시키기 위해 복제 불능 아데노바이러스인 dl/Z의 E1 부위에 p53 유전자를 삽입한 아데노바이러스들을 제작한 후(Fig. 2), 세포 살상 효과를 비교 검증하였다. dl/p53, dl/p53 Δ 30, dl/p53-VP, dl/p53 Δ 30-VP 아데노바이러스와 대조군으로서 복제 불능 아데노바이러스인 dl/Z를 여러 종류의 종양 세포주와 정상세포주에 여러 역가로 각각 감염시킨 뒤 세포 살상 정

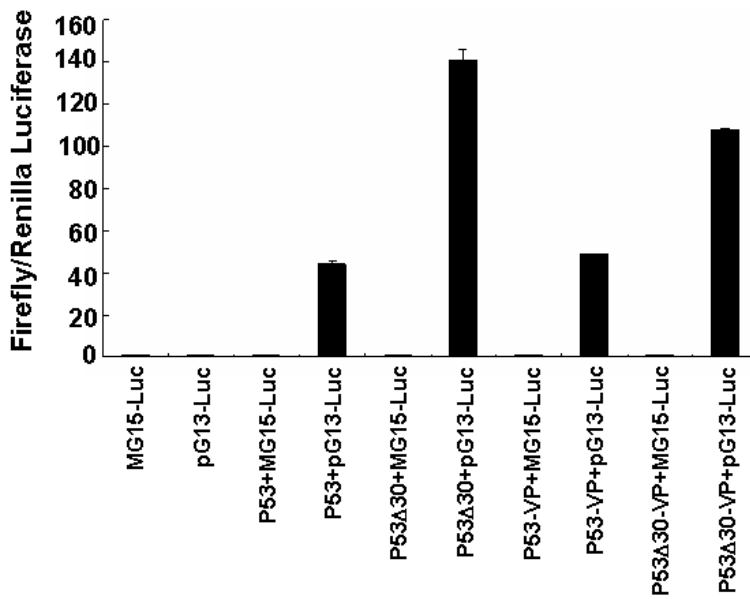


Figure 1. Effect of wild-type p53, p53 Δ 30, p53-VP, or p53 Δ 30-VP on transactivation of the pG13-luciferase reporter vector in C33A cells. The p53 activity was determined by the Luciferase assay. C33A cells were co-transfected with pG13-luc, which carries the luciferase gene driven by a promoter consists of 13 copies of p53-binding elements derived from the ribosomal gene cluster upstream of a polyoma virus minimal promoter sequence, and pCEP4 expressing either wild-type p53 or one of the mutant p53s: p53 Δ 30, p53-VP, p53 Δ 30-VP. Negative control construct, MG15-luc, which carries mutated p53-binding elements, was co-transfected with wild-type or mutant p53s. The luciferase activity of pG13-Luc or MG15-Luc was considered as 0 with the luciferase activity of each plasmid normalized to this. All data represent the means and standard deviations (SD) of quadruplicate experiments.

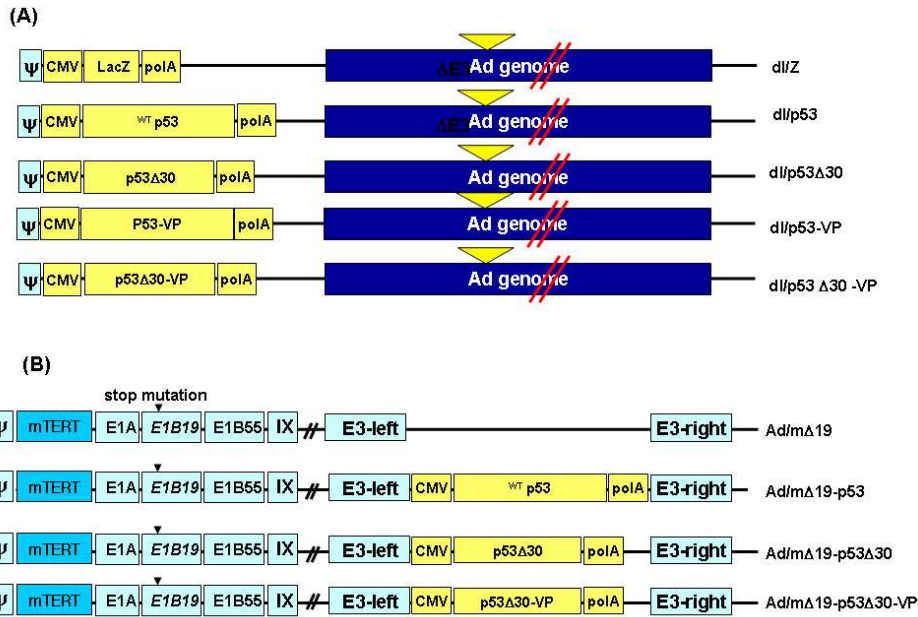


Figure 2. Structure of replication-incompetent (A) and replication-competent (B) adenoviral vectors. dl/Z has the whole E1 region deleted and comprises the β -gal gene inserted into the E1 region; dl/p53, dl/p53 Δ 30, dl/p53-VP, and dl/p53 Δ 30-VP comprised of the wild-type p53, p53 Δ 30, p53-VP, and p53 Δ 30-VP genes inserted into the E1 region of dl/Z, respectively; Ad/m Δ 19 contains the normal E1A and E1B 55kDa, but is E1B 19kDa translation initiation codon mutated, and the E1A expression was controlled by mTERT promoter; Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, and Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP comprised of the wild-type p53, p53 Δ 30, p53-VP, and p53 Δ 30-VP genes inserted into the E3 region of Ad/m Δ 19, respectively.

도를 비교 관찰하였다. Fig. 3에서 보듯이 음성대조군인 dl/Z로 감염된 암세포들(A549, HepG2, C33A, U251N, U343, U373MG, SNU-201)에서는 바이러스의 증식에 의한 세포 살상 효과가 관찰되지 않았으나, 야생형 p53과 p53 변이체를 발현하는 아데노바이러스의 경우, p53을 발현하지 않는 대조군 바이러스인 dl/Z에 비해 모두 증가된 높은 암세포 살상을 보였다. 또한, p53 변이체들에 의한 세포 살상능을 비교해 본 결과 C-말단부위가 소실된 p53 Δ 30을 발현하는 dl/p53 Δ 30 복제 불능 아데노바이러스의 세포 살상능이 가장 높았다. 특히, 인체 폐암 세포주인 A549와 뇌암 세포주인 U343, U373MG, U251N에서는 dl/p53에 비해 약 50배 정도 높은 암세포 살상 효과를 나타내어 p53 변이체의 발현으로 인한 현저히 증가된 암세포 살상능을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

p53 변이체 발현에 따른 암세포 살상능 상승효과를 보다 정량화하기 위해서, 바이러스를 처리한 후 살아있는 세포의 생존률을 측정할 수 있는 MTT 분석을 시행하였다. A549, U373MG, U251N 세포주는 50 MOI 역가로, 그리고 U343 세포주는 100 MOI 역가로 dl/p53, dl/p53 Δ 30, dl/p53-VP, dl/p53 Δ 30-VP 복제 불능 아데노바이러스바이러스로 각각 감염시킨 뒤 A549, U373MG, U343N 세포주는 6일, 그리고 U251N 세포주는 8일 후에 살아남은 세포의 생존률을 측정하였다. 그 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 본 실험에 이용된 모든 암세포주들에서 야생형 p53과 p53 변이체 발현에 의한 암세포 살상능이 음성대조군인 dl/Z에 비해 크게 증가되었으며, 특히 dl/p53 Δ 30 아데노바이러스로 감염시킨 경우에는, 약 60~80%(U343, U251N, A549, U373MG)의 높은 세포 살상을 유도하였다.

p53 변이체 발현에 따른 세포고사 유도를 암세포 특이적으로 유도하기 위하여, 암세포에서만 선택적으로 증식할 수 있는 암세포

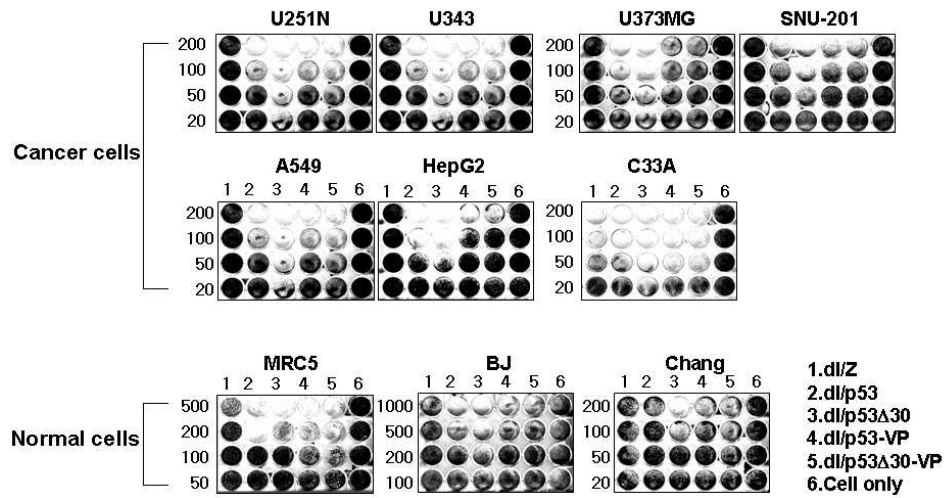


Figure 3. The *in vitro* CPE effects of replication-incompetent adenoviruses. Monolayers of cells in 24-well plate were infected with dl/Z, dl/p53, dl/p53 Δ 30, dl/p53-VP, or dl/p53 Δ 30-VP at MOIs of 20 - 500. dl/Z served as a negative control. At the moment in which cells infected with any one of the viruses at low MOIs exhibited complete cell lysis, the remaining cell layer was fixed and stained with crystal violet. Representative results are shown.

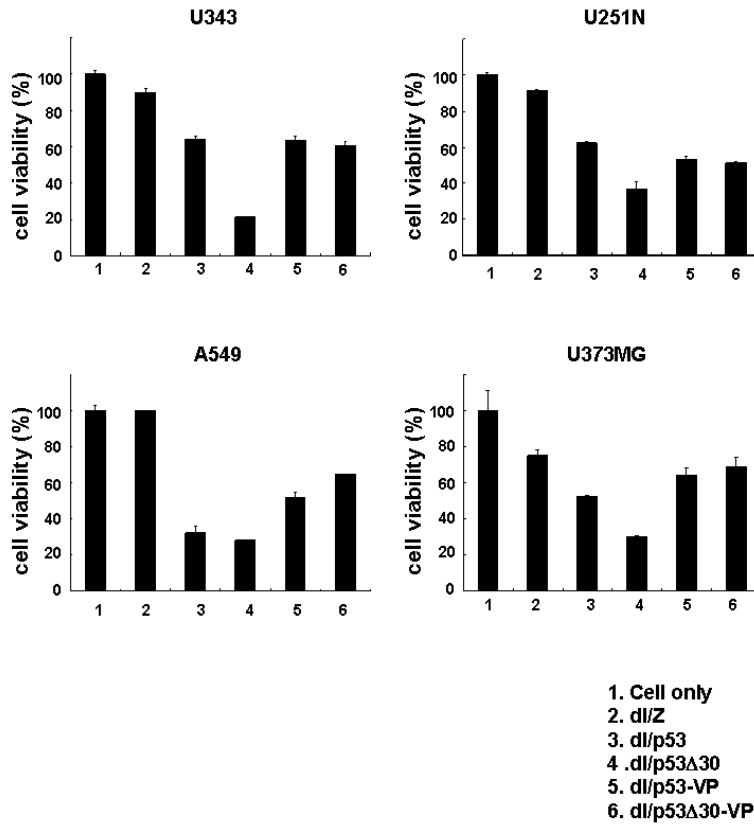


Figure 4. Efficient cancer cell killing effect of replication-incompetent adenoviruses expressing wild-type p53 or p53 variants. Monolayers of cancer cells were treated with an MOI of 50 or 150 of dl/Z, dl/p53, dl/p53 Δ 30, dl/p53-VP, or dl/p53 Δ 30-VP adenovirus. MTT assay was then performed to totally viable cells, and results are the mean of triplicate experiments.

특이적 살상 아데노바이러스인 Ad/m Δ 19의 E3 부위에 야생형 p53과 3종류의 p53 변이체를 각각 삽입하여 Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP 아데노바이러스를 제작하였다(Fig. 2). 이들 제작된 아데노바이러스들의 세포 살상 효과를 비교 검증하기 위해, 여러 종류의 암세포주와 정상세포주에 각각 감염시킨 뒤 세포살상 정도를 비교 관찰하였다. Fig. 5에서 보듯이 음성 대조군인 dl/Z로 감염된 암세포들(U87MG, U343, C33A, SK-Hep1, SNU-201, U118MG, U87MG)에서는 바이러스의 증식에 의한 세포 살상 효과가 관찰되지 않았으나, 복제 가능 아데노바이러스들인 Ad/m Δ 19, Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP로 감염시킨 경우에는 투여한 바이러스의 역가에 비례하여 세포 살상능이 증가됨을 확인하였다. 특히, p53의 N-말단 부위를 VP16 전사활성 부위로 치환하고 동시에 C-말단 부위를 제거한 p53을 발현하는 아데노바이러스인 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP로 감염된 경우에는, 대조군 바이러스인 Ad/m Δ 19와 다른 종류의 p53 변이체를 발현하는 Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30에 비해 훨씬 증가된 암세포 살상 효과를 유도하였다. U87MG 세포주의 경우, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP의 세포 살상능이 야생형 p53을 발현하는 Ad/m Δ 19-p53에 비해 약 10배 정도, 그리고 U343과 SNU-201, U118MG 세포주의 경우에는 약 4~5배 정도 증가하였다. 이상의 결과들을 통해 p53 변이체 유전자, 특히 p53 Δ 30-VP를 삽입한 경우에 암세포 특이적 살상 아데노바이러스의 암세포 살상 효과가 현저히 증가됨을 확인하였다. 이와는 대조적으로, MRC5와 IMR90과 같은 정상세포주들에서는 야생형 p53과 p53 변이체 발현에 의한 암세포 살상능이 크게 증대되지 않아, 활성이 증대된 p53 변이체의 고발현에 따른 정상세포에서의 부작용이 거의 없음을 확인하였다.

또한, U343, U373MG, A549 세포주는 3 MOI 역가로, 그리고

U251N 세포주는 1 MOI 역가로 Ad/m Δ 19, Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, 또는 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP로 각각 감염시킨 뒤, U343, U373MG, A549 세포주는 5일 뒤, 그리고 U251N 세포주는 8일 후에 살아남은 세포의 생존률을 측정하였다. 그 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이, 본 실험에 이용된 모든 세포주들에서 종양 선택적 살상 아데노바이러스(Ad/m Δ 19, Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP)의 세포 살상능이 복제 불능 아데노바이러스인 dl/Z에 비해 크게 증대되었다. 또한, 야생형 p53과 p53 변이체를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 세포 살상능은 U343 세포주를 제외한 다른 세포주들에서 대조군 바이러스인 Ad/m Δ 19에 비해 세포 살상능이 증가하였으며, 특히, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP의 세포 살상능이 가장 우수하였다.

3. p53 변이체를 발현하는 아데노바이러스로 감염된 암세포에서의 p53, p21 단백질 발현 양상 비교

야생형 p53 및 변이체 p53을 발현하는 아데노바이러스에 의해 유도되는 p53의 발현 양상을 비교 검증하기 위해, U343 세포주를 dl/p53, dl/p53 Δ 30, dl/p53-VP, 또는 dl/p53 Δ 30-VP 복제 불능 아데노바이러스로 각각 감염시킨 뒤 48시간 경에 세포를 회수하여 야생형 및 변이체 p53을 모두 검출할 수 있는 항체를 이용하여 Western blotting을 시행하였다. Fig. 7에서 볼 수 있듯이, 음성 대조군인 dl/Z 바이러스로 감염된 경우에는 p53이 매우 약하게 검출된 반면, p53을 발현하는 모든 종류의 바이러스로 감염된 세포들에서는 p53이 보다 강하게 검출되었다. 특히, p53의 부조절 기능만이 상실된 dl/p53 Δ 30 바이러스에 의한 p53 발현이 가장 크게 증대되었으며, dl/p53-VP와 dl/p53 Δ 30-VP 바이러스에 의한 p53 발현도 크게 증대되었다. 이러한 p53의 발현 정도는 앞서 진행된 p53 활성 정도와 세포 살상능 검증하

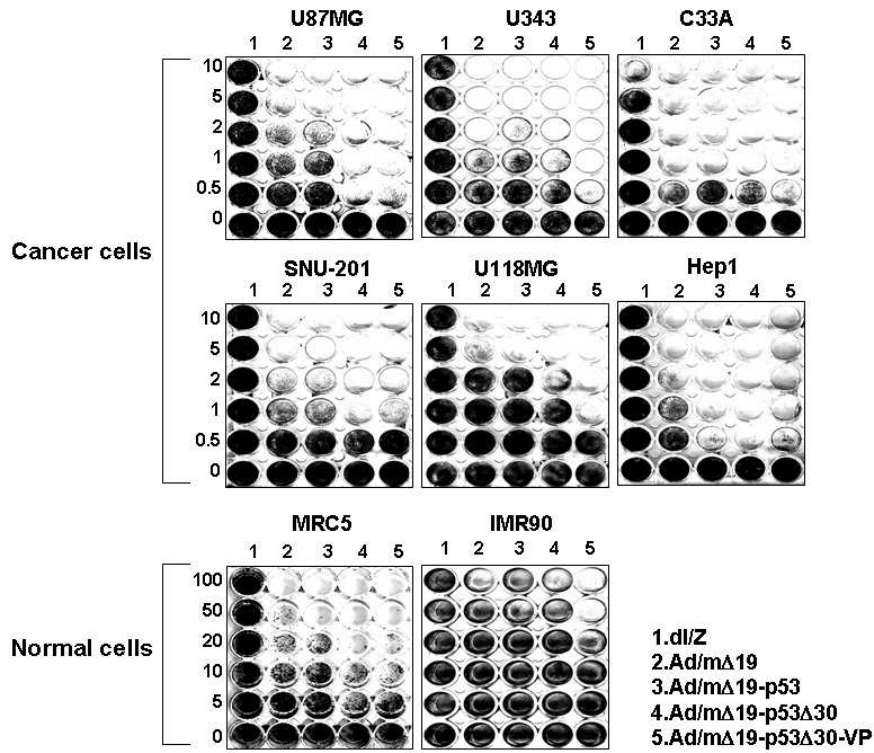


Figure 5. The *in vitro* CPE effects of replication-competent adenoviruses. Monolayers of cells in 24-well plate were infected with dl/Z, Ad/m Δ 19, Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, or Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP at MOIs of 0.5 - 100. replication-incompetent adenovirus, dl/Z, served as a negative control. At the moment in which cells infected with any one of the viruses at low MOIs exhibited complete cell lysis, the remaining cell layer was fixed and stained with crystal violet. Representative results are shown.

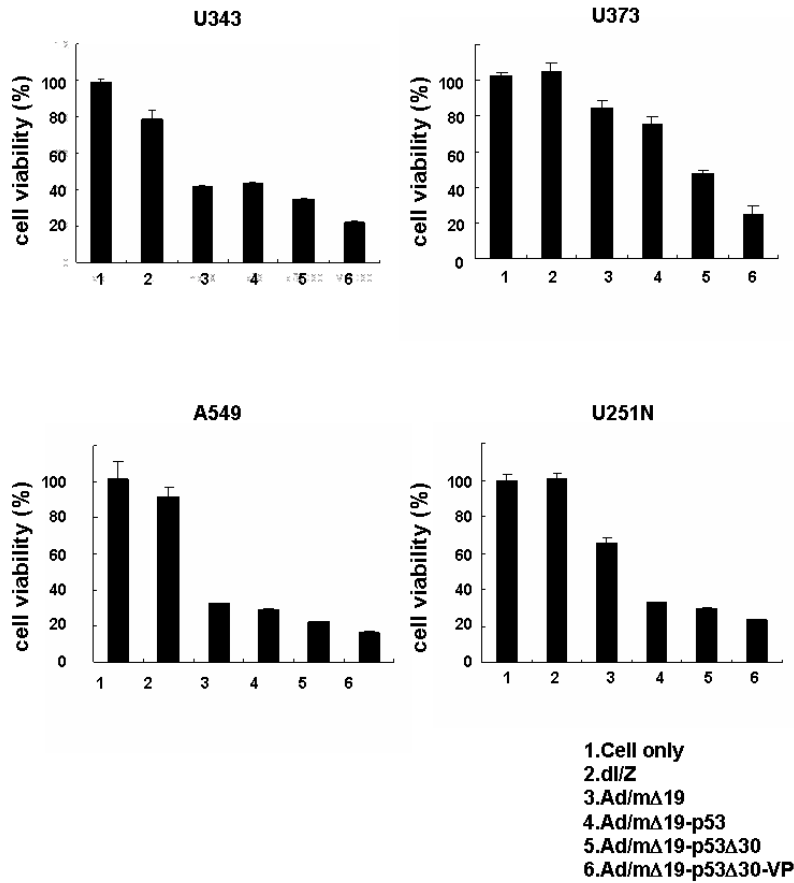


Figure 6. Efficient cancer cell killing effect of replication-competent adenoviruses expressing wild-type p53 or p53 variants. Monolayers of cancer cells were treated with an MOI of 1 or 3 of dl/Z, Ad/mΔ19, Ad/mΔ19-p53, Ad/mΔ19-p53Δ30, or Ad/mΔ19-p53Δ30-VP adenovirus. MTT assay was then performed to tally viable cells, and results are the mean of triplicate experiments.

는 실험 결과를 뒷받침하는 결과이다. 또한, 야생형 및 변이체 p53을 발현하는 암세포 특이적 살상 아데노바이러스들인 Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP와 대조군 바이러스인 Ad/m Δ 19로 U343 세포주를 각각 감염시킨 뒤, p53과 p21의 발현양상을 검증하였다. p53의 C-말단 부위가 제거된 2종류의 변이체 p53을 발현하는 아데노바이러스(Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP)로 감염된 세포주에서의 p53 발현이 Ad/m Δ 19-p53 아데노바이러스로 감염된 경우에 비해 현저히 증가되었으며, 특히 C-말단 부위가 제거되고 동시에 N-말단 부위가 VP16 전사활성 부위로 치환된 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP에 의한 p53 발현량이 가장 크게 증가되었다. 이와 같은 결과들로, E1B 55kDa 유전자가 내재하는 암세포 특이적 살상 아데노바이러스를 이용하여 야생형 및 변이체 p53을 발현하는 경우에는, 부조절 기능이 상실되고 동시에 N-말단이 VP16 전사 활성 부위로 치환되어 E1B 55kDa의 결합에 의한 p53의 불활성화를 우회할 수 있는 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP에 의한 p53 발현이 가장 높음을 확인하였다. 또한 p21의 발현 양상을 검증해본 결과, 음성 대조군인 Ad/m Δ 19 바이러스로 감염시킨 경우에 비해 야생형 및 변이체 p53을 발현하는 모든 종류의 아데노바이러스로 감염시킨 경우에 p21의 발현이 크게 증가하였다. 이들 결과를 통해, 활성이 증대된 p53 변이체를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스들에 의해 p53 발현량이 크게 증대되고, 또한 p53의 발현 증대로 인해 p21의 발현도 증가함을 알 수 있었다.

4. Annexin V/PI 염색과 유세포 분석을 통한 세포 사멸 기전 검증

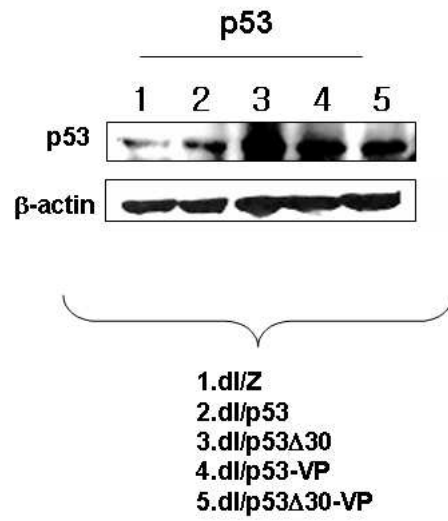


Figure 7. The expression of p53 in U343 cells infected with replication-incompetent adenoviruses expressing p53 variants. Cells on 6-well plates were infected with dl/Z, dl/p53, dl/p53 Δ 30, dl/p53-VP, or dl/p53 Δ 30-VP adenovirus at an MOI of 50. At 48 hr after infection, cell lysates were subject to immunoblot analysis with an antibody recognizing p53 or β -actin.

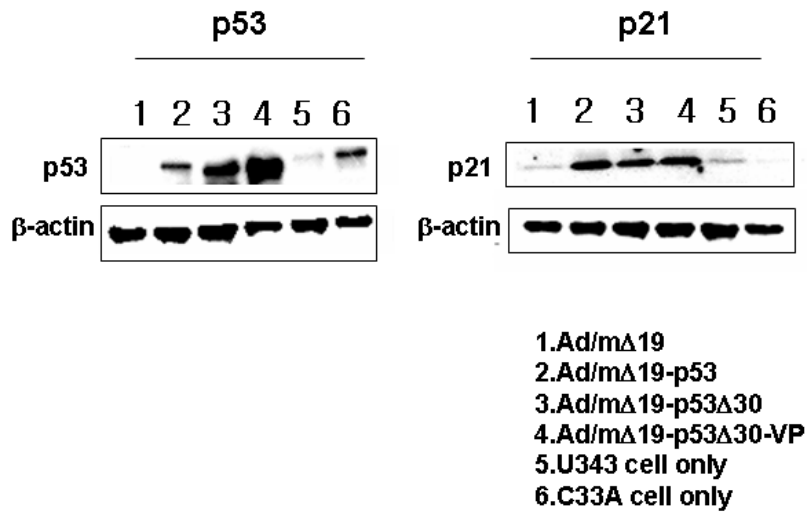


Figure 8. The expression of p53, p21 in U343 cells infected with replication-competent adenoviruses expressing p53 variants. Cells on 6-well plates were infected with Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53-VP, or Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP adenovirus at an MOI of 5. At 48 hr after infection, cell lysates were subject to immunoblot analysis with an antibody recognizing p53, p21, or β -actin.

야생형 및 변이체 p53 발현에 따른 세포고사 증대효과를 알아보기 위해, 초기 세포고사 빈도를 확인할 수 있는 FACS 분석을 시행하였다. U343, U373MG, A549, 그리고 U251N 세포주를 Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP 아데노바이러스로 MOI 10의 역가로 각각 감염시키고 48시간 뒤에 세포를 회수하여, 세포고사 진행정도를 Annexin-V와 propidium iodide(PI)로 이중염색(double staining)하여 확인하였다. Annexin-V는 세포고사 초기에 세포막 밖으로 유출되어 나온 phosphatidylserine(PS)를 검출할 수 있는 반면에, propidium iodide(PI)는 세포사 후기에 세포막의 파괴로 propidium iodide가 세포 내로 들어가 핵 내에 있는 chromatin과 결합할 수 있어 세포괴사(necrosis)의 특징을 확인할 수 있다. 따라서 Annexin-V⁻/PI⁻는 건강한 세포를 의미하며, Annexin-V⁺/PI⁻는 초기 세포고사가 일어난 세포, 그리고 PI⁺ 세포는 세포괴사가 일어난 세포를 의미한다. 세포고사를 유도하는 양성 대조군으로 이용된 1 μ M의 CPT-11을 처리한 U343 세포의 경우에는 약 34.46%(Annexin-V⁺/PI⁺)의 세포들이 세포고사로 진행되었으며, U373MG, A549, U251N 세포에서도 각각 13.11%, 42.82%, 23.88%의 세포들이 세포고사로 진행되었다. Ad/m Δ 19, Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP에 의해 감염된 U343 세포주에서는 각각 3.63%, 3.18%, 7.12%, 12.29%의 세포들에서 세포고사가 유도되었고, U373MG 세포주는 Ad/m Δ 19, Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP 바이러스를 감염시킨 경우, 각각 8.92%, 7.86%, 8.15%, 12.22%의 세포들에서, A549 세포주에서는 각각 25.10%, 25.98%, 25.64%, 28.74%의 세포들에서, 그리고 U251N 세포주에서는 각각 8.01%, 15.96%, 16.32%, 24.03%의 세포들에서 세포고사가 유도되었다(Fig. 9). 이러한 결과들에 의해, U373MG, A549, U251N 세포의 경우에 의해서는 야생형 p53 뿐 아니라 2종류의 변이체 p53을 발현하는 암세포 특이적 살상 아데노바이러스들에 의해 세포고사가 크게 증대됨을 확인할 수 있었으며, 특히

Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP에 의해 감염된 경우에는 실험에 사용된 모든 세포주들에서 가장 효과적인 세포고사가 유도됨을 확인하였다. 또한, 세포고사 및 세포괴사에 의한 총체적인 세포사(Annexin-V⁺ + PI⁺)를 비교해 볼 때도, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP 바이러스 감염에 의한 세포사 비율이 현저히 증가하여, U343과 U373MG, A549, U251N 세포주의 경우에는 각각 38.55%, 50.76%, 68.77%, 47.82%로서 Ad/m Δ 19(31.72%, 24.63%, 53.13%, 38.88%)와 Ad/m Δ 19-p53(23.56%, 27.23%, 61.59%, 44.59%), Ad/m Δ 19-p53 Δ 30(26.54%, 32.1%, 64.39%, 47.93%)에 의한 세포사 비율에 비해 크게 증가하였다.

5. TUNEL assay를 통한 세포 사멸 기전 검증

야생형 및 변이체 p53 발현에 따른 세포고사 증대효과를 알아보기 위한 또 다른 방법으로, 세포고사의 중요한 생화학적 특징 중의 하나인 DNA 절편화를 TUNEL 분석으로 검증하였다. 야생형 및 변이체 p53을 발현하는 암세포 특이적 살상 아데노바이러스인 Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP와 대조군 아데노바이러스로서 Ad/m Δ 19를 3 MOI 역가로 U251N, 인체 뇌암 세포주에 감염시키고 48시간 뒤에 TUNEL 분석을 시행하여 세포 핵 내의 DNA 절편화를 관찰하였다. Fig. 10a에서 볼 수 있듯이, U251N 세포주가 Ad/m Δ 19로 감염된 경우는 약 21.33%의 세포들이 갈색으로 흐리게 염색된 반면, Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, 또는 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP에 의해 감염된 경우에는 현저히 증가된 세포들(30.04%, 39.57%, 72.14%)이 진한 갈색으로 염색되어 높은 빈도로 세포고사가 유도됨을 확인할 수 있었다. 특히, 부조절 기능이 상실된 변이체 p53을 발현하는 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30 또는 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP으로 감염된 경우의 세포고사 빈도가 야생형 p53을 발현하는 Ad/m Δ 19-p53으로 감염된 경우에 비해 크게 증가하였음을 확인하였

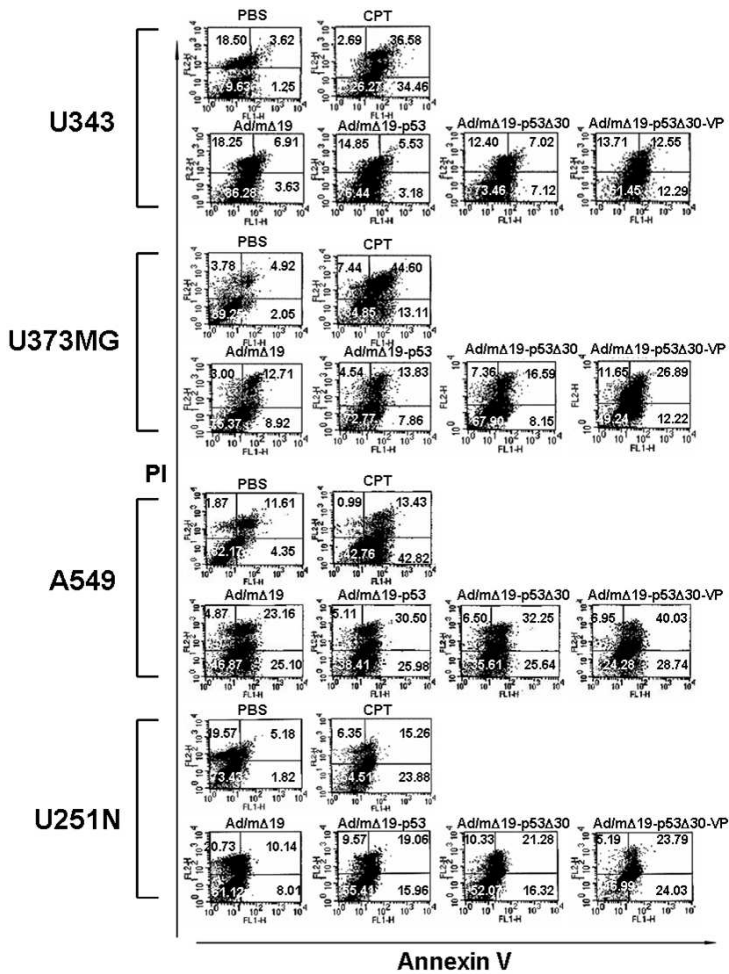
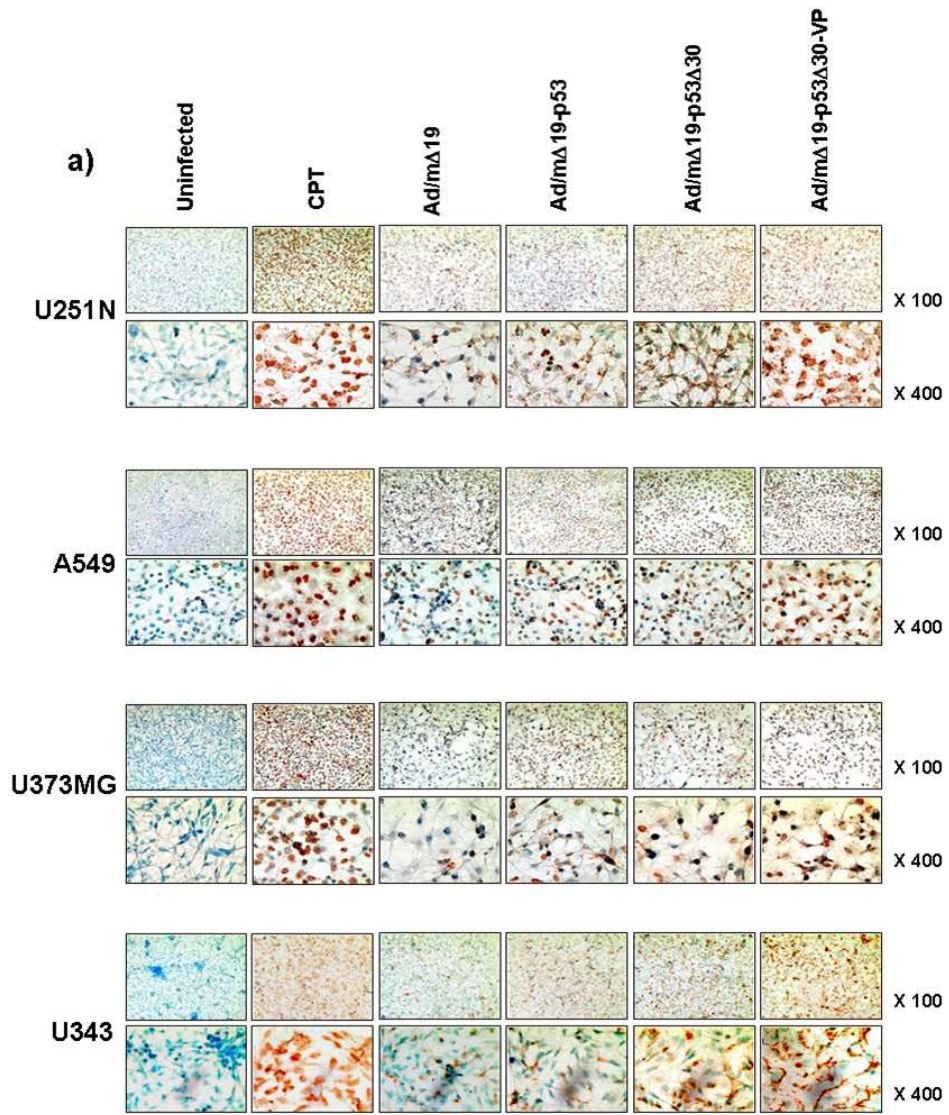


Figure 9. Analysis of Annexin-V/PI fluorescence. Cells were infected with Ad/m Δ 19, Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, or Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP virus, or treated with CPT. Cell pellets were resuspended in 100 μ l binding buffer and then reacted with Annexin-V (3 μ l) and PI (5 μ l) at room temperature. The stained cells were then analyzed in a fluorescence-activated cell sorter. In each scatter plot, the percentage of Annexin-V⁺/PI⁻ (cells in early apoptosis, bottom right quadrant) is bold and italicized.

다. 또한, U343, U373MG, A549 세포주에서도 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP로 감염된 경우에 유도되는 세포고사 빈도가 Ad/m Δ 19, Ad/m Δ 19-p53, 또는 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30으로 감염된 경우보다 훨씬 증가되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 10b).

6. p53 변이체를 발현하는 복제 가능 아데노바이러스의 생체 내 항종양 효과 검증

야생형 및 변이체 p53을 발현하는 암세포 특이적 살상 아데노바이러스들(Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP)의 생체 내 항종양 효과를 비교 검증하기 위해, U343 인체 뇌암 세포주를 누드마우스에 접종한 후 형성된 종양에 5×10^7 PFU의 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 이틀 간격으로 3번 종양내 투여한 후 종양의 성장을 관찰하였다. 음성 대조군인 PBS를 투여받은 누드마우스의 경우, 바이러스 투여 후 28일에 종양의 크기가 $1,346 \pm 391.2 \text{ mm}^3$ 정도로 종양이 급격히 성장하였으나, 종양 선택적 살상 아데노바이러스들인 Ad/m Δ 19, Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP를 투여 받은 누드마우스의 경우는 종양의 성장이 크게 지연됨을 확인할 수 있었다(Fig. 11). 특히, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30 또는 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP를 투여 받은 누드마우스의 경우에는 바이러스 투여 후 28일 경에 종양의 크기가 각각 $153.7 \pm 103.8 \text{ mm}^3$ 과 $94.2 \pm 36.2 \text{ mm}^3$ 로 뚜렷한 항종양 효과를 유도하였다($p < 0.05$). 하지만, 야생형 p53을 발현하는 Ad/m Δ 19-p53을 투여한 경우($231.3 \pm 63.2 \text{ mm}^3$, 바이러스 투여 후 28일)에는 대조군 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad/m Δ 19를 투여한 경우($209.9 \pm 72.3 \text{ mm}^3$, 바이러스 투여 후 28일)보다 낮은 항종양 효과를 유도하였는데, 이러한 결과는 더 많은 수의 누드마우스를 이용한 후속 실험으로 다시 한번 더 검증받아야 할 것으로 생각된다.



b)

U251N	Uninfected	CPT	Ad/mΔ19	Ad/mΔ19-p53	Ad/mΔ19-p53Δ30	Ad/mΔ19-p53Δ30-VP
Apoptotic Cell ratio (%)	4.12±3.12	85.97±7.21	21.33±4.35	30.04±5.87	39.57±2.56	72.14±8.45

A549	Uninfected	CPT	Ad/mΔ19	Ad/mΔ19-p53	Ad/mΔ19-p53Δ30	Ad/mΔ19-p53Δ30-VP
Apoptotic Cell ratio (%)	5.34±1.97	70.48±3.23	23.27±3.72	28.94±7.82	32.29±5.98	56.32±4.87

U373MG	Uninfected	CPT	Ad/mΔ19	Ad/mΔ19-p53	Ad/mΔ19-p53Δ30	Ad/mΔ19-p53Δ30-VP
Apoptotic Cell ratio (%)	2.21±3.57	75.23±9.32	13.85±8.52	19.89±2.32	25.27±5.32	61.08±3.25

U343	Uninfected	CPT	Ad/mΔ19	Ad/mΔ19-p53	Ad/mΔ19-p53Δ30	Ad/mΔ19-p53Δ30-VP
Apoptotic Cell ratio (%)	3.67±2.61	86.45±8.56	19.55±2.05	15.84±1.41	30.04±1.71	64.14±1.62

Figure 10. *In vitro* TUNEL assay. At 48 hrs after treatment without or with 1 μ M of CPT or infection with Ad/mΔ19, Ad/mΔ19-p53, Ad/mΔ19-p53Δ30, or Ad/mΔ19-p53Δ30-VP, apoptotic cells were detected by labeling with DAB using terminal deoxynucleotidyl transferase (counterstained with methyl green). (A) Brown staining indicates positive staining for DNA strand breakage. Representative fields of three independent experiments are shown. Original magnification: x100 and x400. (B) The mean percentage of apoptotic cells induced by each treatment. The number of brown stained cells per 2000 cells was counted. Each of the indicated values reflects the mean of three independent experiments, and is expressed as the percentage of apoptotic cells.

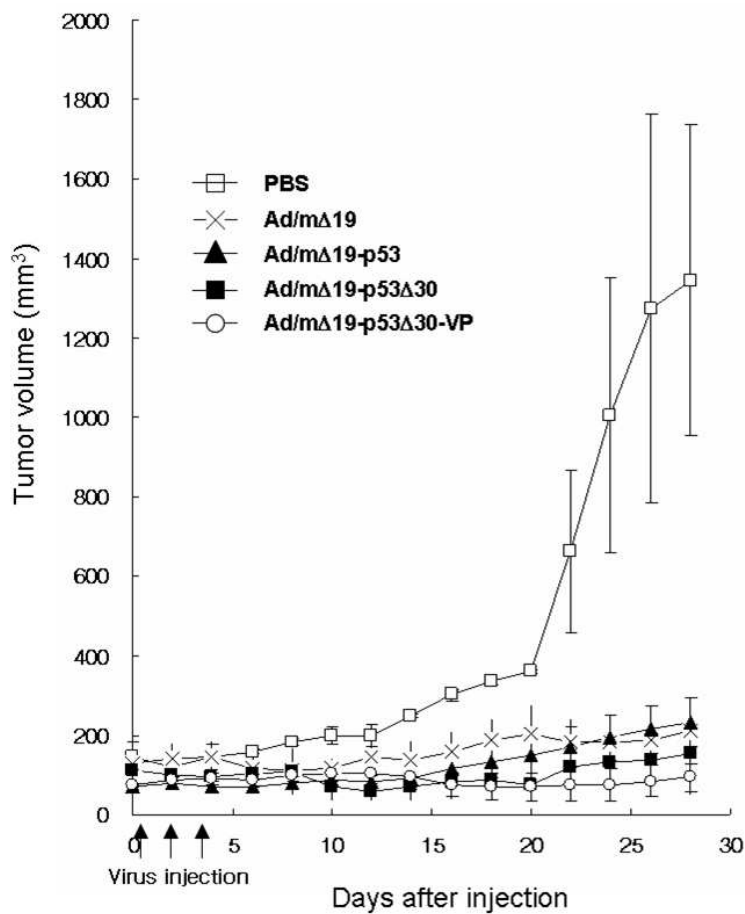


Figure 11. Suppression of tumor growth by replication-competent adenoviruses expressing p53 variants in male athymic nude mice. Subcutaneous tumors derived from U343 cells were treated with Ad/m Δ 19, Ad/m Δ 19-p53, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30, or Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP, along with PBS as a negative control. Tumor volume was monitored over time (days) after treatment with adenovirus. The arrow indicated when treatment was given (5×10^7 PFU/mouse/treatment). Values represent the mean \pm s.e. for six animals per group.

VI. 고찰

현재 p53의 역할 규명과 임상 실험으로 암치료에 획기적인 전기를 마련하고자 많은 연구들이 활발히 진행되고 있으며, 이미 전 세계적으로 5천 2백여 건의 p53 관련 연구 논문이 발표되고 있다. 최근의 연구 결과들에 의하면, DNA 결합 능력이 손상된 p53을 발현하는 암세포에 야생형의 p53 유전자를 형질 도입하면 암세포 증식이 중지되고, 세포고사가 유도되는 현상이 밝혀졌다. 최근 국내에서도 p53을 효과적으로 전달하는 매개 물질과 주입 방법을 새롭게 개발하려는 연구가 계속하여 진행 중이며, 지방과 단백질의 결합체인 지단백질로 특수한 매개 물질을 만들어 정상세포에는 손상을 유도하지 않고 발현율을 높일 수 있는 방법이 시도되고 있다.

p53 유전자를 암세포에 도입하고 발현시켜 항종양 효과를 유도해내려는 기존의 시도와는 달리 본 연구에서는, p53의 기능을 강화시키기 위하여 새로운 구조의 p53 변이체들을 제작하였다. p53의 N-말단부위의 Leu-22와 Trp-23은 아데노바이러스 E1B 55kDa과 mdm2 단백질이 결합하는 부위이고, 또한 Leu-14와 Phe-19 아미노산은 mdm2의 결합부위, 그리고 Trp-23과 Pro-27 아미노산은 아데노바이러스 E1B 55kDa이 결합하는 중요한 부위이다²⁶. 본 연구에서는 p53 N-말단의 80개의 염기서열을 제거하여 E1B 55kDa과 mdm2의 결합능을 소실시키고 동시에 제거된 N-말단부위에 VP16 전사활성인자를 도입함으로써, E1B 55kDa과 mdm2 단백질들에 의한 분해 기전을 우회할 수 있는 p53-VP를 제작하였다. 또한, p53 단백질의 음성 조절 부위인 C-말단 부위를 제거한 p53 Δ 30과 p53-VP의 C-말단 부위를 제거한 p53 Δ 30-VP 변이체를 각각 제작하였다. VP16은 Herpes simplex virus type 1의 IE(immediate early) 유전자의 전사에 관여하는 활성인자로서, 세포 내로 감염된 바이러스 유전자가 전사를 활성

화시키고 복제를 개시하게 함으로서 바이러스의 증식을 유도한다²⁵. 따라서 E1B 55kDa과 mdm2의 결합능을 소실시키기 위해 제거한 p53 N-말단 부위의 전사활성 도메인을 대신하여 전사활성을 유도하기 위하여 VP16을 삽입하여 p53-VP 또는 p53 Δ 30-VP 변이체를 제작하였다. 본 연구에서 제작한 3 종류의 p53 변이체의 활성을 야생형 p53과 비교 검증한 결과, p53-VP의 활성이 야생형 p53보다 약간 증가하여, VP16 전사활성 인자가 p53 단백질에 내재한 전사활성 도메인 못지않게 전사활성을 활발히 유도할 수 있음을 알 수 있다. 그리고 부조절 기능을 한다고 알려진 C-말단 부위를 제거한 p53 Δ 30의 활성은 야생형 p53에 비해 약 3~4배로 크게 증가하였으며, 또한 C-말단 부위의 제거와 함께 N-말단 부위가 VP16 전사활성 부위로 치환된 p53 Δ 30-VP 변이체의 활성도는 야생형 p53에 비해 약 3배 정도 증가하였다(Fig. 1). 이러한 결과들로 볼 때, 음성조절 기능을 제거한 2종류의 p53 변이체의 활성이 매우 증가하였음을 확인할 수 있었다.

야생형 p53에 비해 활성이 증가된 3종류의 p53 변이체를 복제 불능 아데노바이러스에 탑재하여 암세포로 도입하여 세포 살상 효과를 비교 검증한 결과, p53 Δ 30을 발현하는 dl/p53 Δ 30 복제 불능 아데노바이러스의 세포 살상능이 가장 높게 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과는 p53 단백질 발현 양상 실험(Fig. 7)에서 확인된 바와 같이 부조절 기능의 소실에 따라 p53 발현량이 증가하여 세포 살상능이 증대되었을 것으로 생각된다. 그리고 활성이 증대된 p53 변이체들을 암세포 특이적으로, 그리고 좀 더 지속적으로 발현시키기 위하여 암세포 특이적 살상 아데노바이러스인 Ad/m Δ 19에 삽입하여 세포 살상 효과를 비교 검증한 결과, 야생형 및 변이체 p53을 발현하는 아데노바이러스들의 세포 살상능이 대조군 바이러스인 Ad/m Δ 19에 비해 현저히 증가하였다(Fig. 5, 6). 특히, 부조절 기능이 소실되고 동시에 N-말단 부위가 VP16 활성인자로 치환된 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP 아데노바이러

스의 세포 살상능이 가장 높게 나타났는데, 이는 N-말단 부위의 소실로 E1B 55kDa과 mdm2 단백질의 결합에 의한 p53 분해기전이 소실되고, 동시에 부조절 기능이 소실됨으로서, p53 발현량이 증가하였기 때문으로 생각된다. Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP 아데노바이러스 감염에 따른 증가된 p53 발현량은 immunoblotting 실험으로 확인할 수 있었다.(Figure 8).

야생형 및 3종류의 변이체 p53 단백질의 세포내 활성 및 발현량 차이에 따른 p21 단백질의 발현 양상을 검증한 결과, 야생형 및 변이체 p53을 발현하는 바이러스들로 감염된 경우에 p21 단백질의 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8). p21은 세포 주기 조절을 위해 cyclin-CDK complex의 활성을 조절하는 대표적 단백질로서, p53에 의해 p21의 발현이 유도되고, 발현된 p21은 S-phase를 유도하는 Cyclin-CDK complex에 결합하여 CDK 4/6/2 kinase의 활성을 저해함으로써 Rb의 인산화를 막아 cell cycle arrest를 유도한다. 따라서 활성이 증대된 p53 변이체의 세포 내 발현에 의해서 p21 단백질이 활발히 유도되어 cell cycle arrest 또는 세포고사로 진행될 수 있음을 확인하였다.

p53 변이체 발현에 의한 세포 살상능 증대가 세포고사 유도에 의해 일어나는지를 알아보기 위해 세포고사 빈도를 확인할 수 있는 TUNEL 분석과 FACS 분석을 시행한 결과, 부조절 기능이 상실된 두 종류의 변이체 p53을 발현하는 암세포 특이적 살상 아데노바이러스들인 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30과 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP에 의해 세포고사가 증대됨을 확인할 수 있었으며, 특히 N-말단 부위가 VP16 전사활성 부위로 치환된 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP에 의해 감염된 경우에 가장 효과적인 세포고사가 유도됨을 확인하였다(Fig. 9, 10). 특히, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP 바이러스에 의한 세포 살상능 증가 효과는 p53 변이

가 일어나 있는 암세포와 야생형 p53이 존재하는 암세포 모두에서 확인되었는데, 이들 세포주들 중 특히 뇌암 세포주들(U343, U251N, U373MG, U87MG, U118MG, SNU-201)에서 가장 뚜렷한 세포 살상 증대 효과를 관찰할 수 있었다. 또한, 뇌암 세포주인 U343 세포에서의 생체 내 항종양 효과를 비교해 본 실험에서도 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP에 의한 뚜렷한 항종양 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 11). 현재 뇌암을 치료하기 위한 목적으로 아데노바이러스 type 5를 이용하여 p53을 전달하고자 하는 실험이 활발하게 진행되고 있으나 치료효과는 아주 제한적으로 일어나고 있다²⁷. 따라서 본 연구에서 제작한 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP를 뇌암 유전자 치료에 이용함으로써, 뇌암의 치료 한계를 극복할 가능성을 제시할 수 있을 것으로 생각된다. p53의 활성화는 항암제 또는 방사능을 이용한 효과적인 암치료를 필수적으로, 활성이 증대된 p53 변이체는 항암제 또는 방사능과 함께 병용투여 할 경우 항암 효과를 현저히 증대시킬 수 있을 것이다. 또한, 활성이 증대된 p53 변이체를 아데노바이러스에 탑재하여 암 유전자 치료에 이용한다면 mdm2가 과발현된 암세포 뿐 아니라 암세포 내에 불활성화 되어있는 p53의 활성도를 개선시킴으로서 보다 효과적으로 암세포의 세포고사 및 세포성장 억제를 유도할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP는 낮은 역가의 바이러스로도 높은 살상 효과를 유도할 수 있고, 바이러스의 암세포 특이적 복제에 따른 p53 단백질의 암세포 내에서의 제한된 발현으로 체내에서의 안전성이 증대되어 더욱 개선된 항종양 효과를 유도할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는, p53의 기능을 강화시키기 위하여 새로운 구조의 p53 변이체들을 제작하고 이들을 암세포 특이적 살상 아데노바이러스에 탑재하여 항종양 효과를 유도하고자 하였다. 제작한 3종류의 p53 변이체의 활성을 야생형 p53과 비교 검증한 결과, p53-VP 변이체의 활성은 야생형 p53보다 약간 증가한 반면, p53 Δ 30와 p53 Δ 30-VP 변이체의 활성은 약 3~4배 높게 증가하였다. 또한, 이들 변이체들을 복제 불능 아데노바이러스와 암세포 특이적 살상 아데노바이러스에 도입한 결과에서도 세포 살상능이 증가하였다. 특히, 복제 불능 아데노바이러스에 도입한 경우에는 dl/p53 Δ 30 바이러스의 세포 살상능이 가장 높은 반면, 암세포 특이적 살상 아데노바이러스에 도입한 경우에는 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP 아데노바이러스의 세포 살상능이 가장 높게 나타났다. 또한, p53 단백질의 발현 양상을 비교한 결과에서도, 세포 살상능이 가장 높은 dl/p53 Δ 30와 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP 아데노바이러스에 의한 p53 발현량이 가장 높음을 확인할 수 있었다. 이와 더불어 세포고사 빈도를 확인할 수 있는 TUNEL 분석과 FACS 분석을 시행한 결과에서도, Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP에 의해 유도되는 세포고사 빈도가 가장 높게 유도됨을 확인하였다. 생체 내에서도 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP에 의한 뚜렷한 항종양 효과를 확인하였다. 따라서 Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP를 암치료에 이용한다면, 정상세포에 대한 독성 감소와 암세포에 대한 살상능의 개선으로 암치료에 필요한 투여량을 감소시켜 바이러스에 의한 생체 내 독성과 면역반응을 크게 줄이면서 효율적인 암치료 효과를 유도할 수 있을 것으로 기대된다.

V.참고 문헌

1. Soussi, T., Caron de Fromental, C. & May, P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 1990;5:945-952.
2. May, P. & May, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999;18: 7621-7636.
3. Harris, C. C. p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 1993;262: 1980-1981.
4. Balint, E. E. & Vousden, K. H. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer* 2001;85:1813-1823.
5. Hupp, T. R., Meek, D. W., Midgley, C. A. & Lane, D. P. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 1992;71: 875-886.
6. Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. & Prives, C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 2000;14:289-300.
7. Reid AH, Tsai MM, Venzon DJ, Wright CF, Lack EE, O'Leary TJ. MDM2 amplification, P53 mutation, and accumulation of the P53 gene product in malignant fibrous histiocytoma. *Diagn Mol Pathol* 1996;5:65-73.
8. Zhao, L. Y. & Liao, D. Sequestration of p53 in the cytoplasm by adenovirus type 12 E1B 55-kilodalton oncoprotein is required for inhibition of p53-mediated apoptosis. *J Virol*

- 2003;77:13171-13181.
9. Bosari, S. & Viale, G. The clinical significance of p53 aberrations in human tumours. *Virchows Arch* 1995;427: 229-241.
 10. Galanis E, Buckner J, Kimmel D, Jenkins R, Alderete B, O'Fallon J, et al. Gene amplification as a prognostic factor in primary and secondary high-grade malignant gliomas. *Int J Oncol* 1998;13:717-724.
 11. Simon R, Struckmann K, Schraml P, Wagner U, Forster T, Moch H, et al. Amplification pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer. *Oncogene* 2002 ;21:2476-2483.
 12. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997;387:296-299.
 13. Liu TJ, el-Naggar AK, McDonnell TJ, Steck KD, Wang M, Taylor DL. et al. Apoptosis induction mediated by wild-type p53 adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1995;55: 3117-3122.
 14. Weinrib, L., Li, J. H., Donovan, J., Huang, D. & Liu, F. F. Cisplatin chemotherapy plus adenoviral p53 gene therapy in EBV-positive and -negative nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2001;8:352-360.
 15. Tang, H. J., Qian, D., Sondak, V. K., Stachura, S. & Lin, J. A modified p53 enhances apoptosis in sarcoma cell lines mediated by doxorubicin. *Br J Cancer* 2004;90:1285-1292.
 16. Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in

- p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996;274:373-376.
17. Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, Arseneau J, Kuhn J, McCarty T, et al. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res* 2000;60:6359-6366.
 18. Eunhee Kim, Joo-Hang Kim, Ha-Youn Shin, Hansaem Lee, Jai Myung Yang, et al. Ad-mTERT-Δ19, a Conditional Replication-Competent Adenovirus Driven by the Human Telomerase Promoter, Selectively Replicates in and Elicits Cytopathic Effect in a Cancer Cell-Specific Manner. *Human Gene Ther* 2003;14:1415-1428
 19. Kim, J., Cho, J. Y., Kim, J. H., Jung, K. C. & Yun, C. O. Evaluation of E1B gene-attenuated replicating adenoviruses for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2002;9:725-736.
 20. Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W. & Shay, J. W. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996;18:173-179.
 21. Cerni, C. Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutat Res* 2000;462:31-47.
 22. Shay, J. W. & Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:787-791.
 23. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J* 1992;11:1921-1929.
 24. 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.
25. Yang CT, Song J, Bu X, Cong YS, Bacchetti S, Rennie P, et al. Herpes simplex virus type-1 infection upregulates cellular promoters and telomerase activity in both tumor and nontumor human cells. *Gene Ther* 2003;10:1494-1502.
 26. Lin J., J.Chen, B. Elenbaas, and A.J. Levine Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev* 1994;8:1235-1246.
 27. Cerrato JA, Khan T, Koul D, Lang FF, Conrad CA, Yung WK Differential activation of the Fas/CD95 pathway by Ad/p53 in human gliomas. *Int J Oncol* 2004 Feb;24(2):409-417.

Abstract

Effect of recombinant adenoviruses expressing p53 variants on tumor cell killing

Taeyoung Koo

*Department of Medical Science
The Graduated School, Yonsei University*

(Directed by professor Chae-Ok Yun)

The tumor suppressor gene, p53, located on chromosome 17q, is mutated or lacking in at least 50% of human cancers, including lung cancer, cervical cancer, breast cancer and head and neck cancer. The p53 gene encodes a transcription factor that plays a critical role in apoptosis in cancer. Mdm2, a major negative regulator of p53, inactivates p53 protein by binding its transcriptional activation domain. Mdm2 overexpression or infection of human papilloma virus is common in cancer, and most of these tumors retain ^{wt}p53, suggesting that tumors with mdm2 overexpression bypass the need to mutate p53. In recent research, transient expression of the p53 gene via adenovirus-mediated gene transfer induces apoptosis in cells expressing mutant p53, while causing cell cycle arrest in cells with ^{wt}p53. However, since many cancer cells overexpress mdm2, and high levels of mdm2 inactivate and cause degradation of p53, the transfer of ^{wt}p53 into cells that overexpress mdm2 is unlikely to be efficacious. To overcome the

inhibition of p53 by mdm2 and increase transcriptional activity of p53, 3 different kinds of p53 variants genes were constructed, generating p53 Δ 30 (deletion of C-terminal region of p53), p53-VP (substitution of N-terminal region of p53 with activation domain of VP16), and p53 Δ 30-VP (deletion of C-terminal region and substitution of N-terminal region of p53 with activation domain of VP16). As assessed using relative luciferase activity, the functional transcriptional activity of all three kinds of p53 variants was greatly enhanced in comparison to ^{wt}p53. In particular, the activity of p53 Δ 30 and p53 Δ 30-VP showed over 3- to 4-fold enhanced transcriptional activity. In addition, we have introduced ^{wt}p53 and the p53 variants at E1 and E3 region of replication-incompetent adenovirus, dl/Z, or oncolytic adenovirus, Ad/m Δ 19, respectively. Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP expressing p53 Δ 30-VP significantly enhanced cytopathic effect and cell-killing activity in all tumor cell lines tested. Moreover, TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) assay and Annexin-V/PI double staining indicate that apoptotic ratio induced by Ad/m Δ 19-p53 Δ 30-VP was superior to those of other adenoviruses expressing ^{wt}p53 or p53 Δ 30. Taken together, these lines of evidence demonstrate that the newly generated adenoviruses expressing p53 variants elicit enhanced cancer cell killing, and suggest their utility and potential in improving the efficacy of adenovirus-mediated cancer gene therapy.

.....
Key Words: replication-competent adenovirus, p53, TERT promoter