

## HPV(Human papilloma virus)유래 바이러스 벡터(Adenovirus, Adeno associated virus)를 이용한 암 억제유전자치료법과 자연산물에서의 암 억제 효과

†천 병 수 · <sup>1</sup>노 민 석 · <sup>2</sup>유 종 수 · 김 준 명  
연세대학교 의과대학, <sup>1</sup>서울대학교 의과대학 암센터, <sup>2</sup>한국 해양대학교 해양과학기술연구소  
(접수 : 2001. 11. 9., 게재승인 : 2001. 12. 17.)

### Tumor Suppressor Gene Therapy, and Natural Product with Vectors(Adenovirus, Adeno associated virus) in Human Papilloma virus

Byeung Soo Cheun†, Min Suk Rho<sup>1</sup>, Jong Su Yoo<sup>2</sup>, and Jun Myung Kim  
Yonsei University, College of Medicine, Medical Research Center Shin Chon-dong 134 Seodaemun-Gu, Seoul, Korea  
<sup>1</sup>Research Institute of Cancer, Seoul National University College Medicine  
<sup>2</sup>Research Institute of Marine Science and Technology, Korea Maritime University, Pusan 606-791, Korea  
(Received : 2001. 11. 9., Accepted : 2001. 12. 17.)

The cell growth inhibitor effect of cervical cancer cells was investigated by liposome mediated transfection (pRcCMVp53/lipofectin) and by transfection using adenovirus (AdCMVp53). The papilloma virus cancer cell lines we used in this study were HPV16 positive, having inhibitor gene, wild p53 gene, CaSki, SiHa, HPV18 positive HeLa, HeLaS3 and HPV negative C33A, HT3. LacZ gene of *E.coli* was used as the marker gene for the transfection efficiency. The effect on the inhibition of tumor cell growth was measured by cell count and cell viability though ELISA analysis and MTT assay. The inhibition of tumor cell growth was confirmed by measuring each assay for six days, comparing with the normal control cell growth. The cell growth of cervical cancer cells by transfection was significantly reduced and showed little differences among the cell lines. To eliminate the potential problem of Ad(adenovirus) contamination during rAAV production, rAAV can be produced by a triple transfection of vector plasmid, packaging plasmid, and adenovirus helper plasmid. To examine the helper functions of Ad plasmids on the production of rAAV vector, we carried out cotransfection of three plasmids, AAV vector, packaging construct, and Ad helper plasmids. The optimized transfection condition for calcium phosphate method is 25 µg of total DNA per 10-cm-diameter plate of 293 cell. We found that rAAV yields peaked at 48hr after Ad infection. The titer of rAAV was measured by the dot blot analysis to measure the number of particles/ml based on the quantification of viral DNA. Recently, Kombucha(fungi) was identified as a very potent antileukemic agent. In the present study, effect of natural toxin(plankton) and Kombucha is PSP(GTX1-3, neoSTX), on various MTT assay cervical cancer cell line. Toxin(GTX 1-3, neoSTX) also inhibited the proliferation in primary cervical cancer cells in a dose-dependent toxin concentration. These results showed that toxin was very potent in inhibiting the proliferation of cervical cancer cells in vitro. Toxins and Kombucha exhibited a dose dependent inhibition of cellular proliferation in cancer cell line.

**Key Words** : Adenovirus, AAVCMVp53, cotransfection, papilloma virus human cervical cancer, gene therapy, cancer

#### 서 론

지금까지 인두유종 바이러스(HPV)는 서로 다른 subtype이 약 85종류가 밝혀져 있으며 이외에도 120종 이상의 noble

type이 알려져 있다. 특히 모든 인두유종 바이러스가 상피에 만 국한하여 성장하고 있으며 경우에 따라서는 피부나 항문 주위 혹은 구강 및 인후부에서도 자란다고 알려져 왔다. 또한 gastric, ileojejinal 혹은 colon mucosa에서는 자라지 않는다. 왜 이렇게 많은 subtype과 external 피부에 감염되는지는 잘 모르나 피부의 viral DNA 복제와 피부, 성기, 구강의 점막등은 면역학적인 영향이 적은 부위이므로 바이러스가 성장을 할것으로 예상된다. 이들 바이러스는 subtype에 따라 서로 다른 특성을 가지고 있고 성기주위에 감염되는 type은 40종류 밖에 없다. 이들은 주로 high risk 16, 18, 31, 33, 39, 45,

†Corresponding Author : Yonsei University, College of Medicine, Medical Research Center Shin Chon-dong 134 Seodaemun-Gu, Seoul, Korea  
Tel : +82-2-361-8348(8367)  
E-mail : bscheun@yumc.yonsei.ac.kr

52, 58과 69이다. 그러나 6, 11은 주로 condyloma에서만 detect되며 low risk로 알려져 있다.

바이러스종양 단백질과 세포단백의 연관성에 대해서는 인두유종 바이러스의 계층은 6개의 early와 2개의 late 단백질로 구성이 된다. 각각의 바이러스성 단백질은 그 특성구조가 이미 밝혀져 있다.

인두유종 바이러스(HPV)의 암화과정은 다음과 같이 6가지 점에서 증명이 될수 있다.

1) 종양의 생검조직에서 HPV DNA의 존재 2) 종양내에서 E6와 E7과 같은 viral oncogene의 expression 3) 이와 같은 gene들의 transforming property 4) 자궁경부암 세포주들에서 이들이 악성화를 유지하기 위하여서는 E6, E7의 지속적인 요구가 필요하며 5) 숙주세포의 단백질 성장을 조절하는 요인과 viral oncogene과의 관계 6) 역학조사에서 이와같은 인두유종 바이러스의 감염이 자궁경부암을 일으키는 주요한 원인이며 viral oncoprotein과 host cell 요인에 의해 조절되는 viral oncogene의 기능에 대하여 숙주세포의 변형 즉, 성장 세포내에서는 인두유종 바이러스는 gene expression을 조절한다고 한다.

국내의 자궁경부암 발생률이 전세계 국가 중에서 상위권이 고, 매년 10 만 명의 여성 중 25명 정도의 새로운 자궁암 환자가 발생된다고 추정되고 있다. 이러한 숫자는 일본, 미국 등 선진국에 비해 대단히 높은 암 발생률이므로 이의 치료에 있어서도 고식적인 치료방법 외에 새로운 치료 방법 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

정상세포를 암세포로 변환시키는 발암 유전자가 하나 돌씩 밝혀지면서 암 발생의 원인이 유전자의 변이임이 밝혀지고 있다(1). 따라서 암의 원인을 제거하는 근본적인 치료방법은 잘못된 유전자를 바로 잡는 치료법일 것으로 사료되고 있다. 유전자 치료방법은 변이를 일으킨 유전자를 교정(correction) 하는 방법과 치환(replacement)하는 방법이 있으며, 유전자 교정이 가장 이상적이나 실제적으로는 실현가능이 희박하며 유전자 첨가(addition) 만이 가능할 뿐이다. 억제 유전자중 p53의 변이는 인간의 암세포에서 일어나는 변이 중 가장 흔히 관찰되는 것이며, 정상적인 p53 단백질의 존재는 정상세포가 암세포로 진행하지 않도록 하는데 필수적이라고 알려져 있다. 그러므로 p53 유전자의 변이를 바로잡아 암세포의 형질을 정상세포로 되돌리려는 연구가 상당히 진행되어 왔으며, 이미 동물실험에서도 기대할 만한 성과를 거두고 있는 상황이다(2). p53 유전자를 가지고 자궁경부암 유전자치료를 위한 암세포내 도입 방법으로 주로 아데노 바이러스를 이용하여 시도하고있는 실정이다(3).

유전자치료 즉, 환자의 특정한 세포에 유전자 혹은 유전물질을 유입시켜 인간의 질병을 치료할때는 치료효과를 기대하는 유전자와 이의 세포내 유입이 절대적으로 필요하다. 현 시점에서는 이론적인 수준에 머물고 있는 유전자치료 방법이나 유전자첨가 방법이 쓰이고 있다. 한편유전자이입 방법에는 직접 유전자 이입과 유전자 이입을 이용한 간접적 이입법의 두가지로 대별할 수 있다. 또 자궁경부암의 새로운 치료기법의 하나로서, 종양 세포에 항암 유전자를 이입시켜 종양 세포가 직접 유전자 산물을 생성하게 되면 암 치료 효과가 극대화 될 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 자궁경부암의

유전자 치료법의 개발에 있어서 우선적으로 고려하여야 할 점은 유전자의 선정과 선정된 유전자의 이입 방법이다. 현재 특정유전자를 세포 내로 이입하기 위하여 레트로 바이러스 벡터(4), 아데노 바이러스 벡터(5), 아데노 연관바이러스벡터를 이용하고 있으며, 세포주에 DNA를 이입시키는 방법으로는 리포솜 등이 이용되고 있다(6). 1992년에 cationic liposome의 일종인 DC-Chol을 이용한 임상시험이 FDA의 승인을 얻은 이후로 이에 대한 연구가 이루어지고 있으며, 이런 리포솜과 같은 non viral vector는 모든 형태의 세포주기에 DNA를 이입시키는 간편한 방법으로 보고가 되고 있다(7). 암 억제 단백질 중 하나인 p53 단백질은 핵 내 phosphoprotein중의 하나이고 393개의 아미노산으로 구성되었고 54 kD이며, 인간 염색체의 17p13.1에 위치하고 있다(8). p53 단백질은 2개 또는 4개가 결합한 형태로 DNA의 특정부위에 결합하여 전사인자로서 작용하고 또한 몇 개의 유전자의 전사과정을 조절하기도 하는데 이렇게 p53의 지배를 받는 것으로 알려진 유전자는 p53유전자의 되먹임 억제 기전에 관여하는 mdm-2, 손상된 DNA의 복구기능을하는 GADD45, 세포주기조절의 중간물질인 p21WAF1/CIP1 그리고 Bcl2에 결합하여 apoptosis를 유도하게 하는 Bax 등이 있다(8,9). p53 단백질의 주 기능은 세포주기의 조절로서 이것은 G1/S 주기의 check point로서 세포가 증식을 해도 되는지에 대한 정보를 종합한뒤 발현이 조절되므로 정상세포가 암세포로 전환되는 것을 막는 중요한 역할을 한다고 알려져있다.(10). 현재 이러한 기능 유전자치료용 벡터로 개발되어 가장 보편적으로 사용되는 벡터중 하나인 아데노바이러스 벡터는 타입 5 아데노바이러스에서 유래한 것으로 이 바이러스는 약 36 kb의 직선형의 유전자를 가지고 있다(11). 아데노바이러스 벡터에 도입되는 치료용 유전자 도입 부위는 아데노바이러스 E1유전자 부위로서 E1유전자 대신에 약 4.5 kb 정도의 치료용 유전자가 도입될 수 있으며 이 유전자는 아데노바이러스 증식에 필수적이므로 E1유전자 산물들이 항상 발현되고 있는 293세포주(12)에서 재조합 아데노바이러스 입자들이 제조되어 사용되고 있다. 자궁경부암 세포주인 CaSki와 SiHa, HeLa와 HeLaS3 세포는 각각 인두유종 바이러스 아형 16 (HPV16)과 인두유종 바이러스 아형 18 (HPV18)에 감염되어 있고 야생형 p53 유전자를 가지고 있다. HPV의 감염시에는 gene product인 E6와 E7 단백질이 항상 발현되며, E6는 p53과 E7는 pRB와 복합체를 형성하여 p53과 pRB 단백질의 분해를 촉진한다고 보고 되었다(12,13). 이러한 이유로 발현은 되지만 발현 후 쉽게 분해되버리는 자체 p53 단백질에 더하여 mutation이나 deletion을 일으킨 경우의 replacement나 correction의 방법보다는 인위적인 유전자 전이에 의한 p53 단백질의 과다발현을 유발하므로써 (gene addition) 자궁경부암 세포주의 세포사를 유도함으로써 자궁경부암 유전자 치료를 위한 연구가 시도되고 있는 실정이다(13,14).

1992년에 cationic liposome의 일종인 DC-Chol을 이용한 임상시험이 FDA의 승인을 얻은 이후로 이에 대한 연구가 이루어지고 있으며, 이런 liposome과 같은 non viral vector는 모든 형태의 세포주기에 DNA를 이입시키는 간편한 방법으로 보고가 되고 있다.

최근 종양, 선전성 전환 등은 현재의 기술로는 치료하기

어려운 질환으로만 알려져 오늘날에 이르기까지 많은 연구가 시도되고 있다. 최근에는 유전자 조작 기술의 발달로 유전자를 이용한 질병 치료 (Gene therapy)가 많은 연구 대상으로 주목을 끌고 있다.

미국에서는 1990년대부터 선천성 면역결핍증의 치료를 위해 adenosine deaminase deficiency(ADA)의 유전자 치료를 임상에까지 도입 시켰으며, 미국에서는 유전자 치료 학회 (American society for Gene Therapy) 결성 등 많은 움직임이 있었으며 최근에 들어 유전자 치료법이 생명 과학 분야의 중심을 이루고 있는 실정이다(15). 본 연구에서도 고분자 소재 유전자를 이용한 방법으로 기존에 사용 해왔던 Adeno associated virus vector 생산법을 효율적으로 안전성있게 개량해서 확실한 유전자 치료를 목적으로 감염되지 않는 순수 바이러스 벡터 시스템을 구축하기 위한 cotransfection 방법을 이용했다(16). 이러한 cotransfection 방법은 기존의 어느 방법보다 빠르고 간단하며, 특별한 장비가 필요 없으며, 감염 되어도 생존 능력이 강하며 대부분의 cell type에 감염될 수 있으며, 짧은 시간내에 유전자 발현이 가능하며, 수 시간 내에 분석할 수 있다는 장점을 이용해서 자궁 경부암 유전자 치료에 도입하여 AAV와 CMVp53을 virus에 cotransfection 시켜, 기존의 방법의 vector system을 개량하고자 CsCl gradient를 이용한 AAVCMVp53을 생산하는 새로운 문제점을 제시하고 자궁 경부암 유전자 치료에 도입하여 cell line 실험, in vivo 실험을 목표로 계속해서 연구해 나갈 것이다. 또한 현재 진행되어온 암억제 물질을 자연에서 얻을려는 연구도 진행되고 있는데 여기에서는 독성 플라크톤과 암 억제 능력이 알려져 있는 티벳 버섯의 발효 우유로부터 얻어진 산물을 섭취함으로써 암 괴종의 크기가 현저하게 줄어든다는 전례 구설로부터 이 버섯을 이용해서 암억제 효과가 있음을 보고한다.

## 재료 및 방법

### 세포주 및 세포배양

본 연구에 사용한 자궁경부암 세포주는 야생형 p53 유전자를 가지고 있고 HPV18 양성을 나타내는 HeLa, HeLaS3 세포주와 HPV16 양성을 나타내는 CaSki, SiHa 세포주, 그리고 HPV 음성을 나타내는 C33A, HT3세포주로서 서울대학교 암 연구센터의 세포주은행에서 분양 받았다. 이들 세포주의 세포배양액은 Dulbecco's minimum essential medium(DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone), 0.37% sodium bicarbonate (Sigma), sodium pyruvate(Gibco) 그리고 streptomycin/penicillin (Gibco)을 첨가하여 사용하였다. 이들 세포주는 37°C, CO<sub>2</sub> 항온조에서 배양되었으며 세포가 완전히 자라 세포단층을 이루면 이를 유지하기 위해서 각각의 완전배지를 사용하였다.

### pRcCMVp53와 pRcCMVLacZ 유전자

1.7 kb의 human wild type p53 유전자는 한국과학기술원 생명공학연구소에서 제공받았으며 이것을 발현벡터인 pRcCMV (Invitrogen Co.) 벡터에 제한효소인 *Xba*I로 절단하여 클로닝한다음 사용하였다. p53 negative control DNA로서 pRcCMV 플라스미드가 사용되었다. 표지유전자로 쓰일 -Galactosidase 유전자는 3.2 kb로 CMV promotor와 BGH(bovine growth

hormone) polyA signal이 삽입된 플라스미드로서 서울의대에서 기증받은 것이 사용되었다. 확인된 플라스미드들은 Qiagen midi kit (Qiagen, USA)의 column 방법을 이용하여 준비하였다.

### Production and measurement of titer of rAAV vectors

pAAVp53 vector, pAAVLacZ vector는 cotransfection 방법에 따라 만들어졌다 간단히 요약하면 Transfection 1-2시간 전에 10-cm plate 30장에 배양한 293 cell (70-80%) 각각을 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM;GIBCO BRL)과 10% Fetal Bovin Serum(FBS,GIBCO BRL)을 사용해서 Antibiotic-Antimycotic 없는 배지로 바꾸고 37°C, CO<sub>2</sub> 항온조에서 배양한 후, 3개의 plasmid를 5 µg: 5 µg :15 µg(1:1:3)의 비율이 되도록 1 mL 0.25 M CaCl<sub>2</sub> 과 1 mL의 HEPES-buffer saline을 잘 혼합한 후 cell에 plasmid가 1:1:3이 되도록 각각 조절 하였다. Trasfection 시켜 8-12 시간까지 배양 시킨 후 배지를 버리고 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM;GIBCO BRL)과 10% Fetal Bovin Serum(FBS,GIBCO BRL), 1% Antibiotic-Antimycotic 배지로 다시 바꾸고 37°C, CO<sub>2</sub> 항온조에서 다시 48시간 배양시켰다. Transfection cell 은 10분간 1500 rpm (UNION 32R)으로 원심분리 하였다. 원심 분리한 cell 들은 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl(pH8.5) 용액을 첨가한 후 4회의 free-thaw방법으로 cell을 파괴하고 3000 rpm (UNION 32R)에서 10분 원심분리하여 cell 파편들을 제거했다. 원심 분리한 cell은 파편을 제거한 후 상층액을 pH7.0 cold saturated(NH<sub>2</sub>)SO<sub>4</sub>에 첨가한 후 얼음 바꾸니에 20분 방치했다. 12,000 rpm (Backman) 4°C에서 원심 분리한 후, 상층을 버리고 침전물을 pH7.0, 3 mL의 phosphate-buffered saline(PBS)으로 녹인 후 3 mL 1.5 g/mL CsCl gradient 와 3 mL 1.35 g/mL CsCl gradient의 윗부분에 첨가했다. 그 gradient를 40000 rpm (Backman)으로 48시간 원심분리했다. 원심 분리한 결과 rAAVCMVp53 viruses, rAAVCMVLacZ viruses 밴드가 확인 되었다. rAAVCMVp53 viruses, rAAVCMVLacZ viruses 만을 회수한 다음 PBS로 투석해서 각각 rAAVCMVp53 viruses, rAAVCMVLacZ viruses를 얻었다. rAAVCMVp53 vector, pAAVCMVLacZ vector titer를 dot blot로 확인했다. rAAVCMVLacZ viruses의 titer는 5-bromo-4-chloror-3-indolyl-β-D-galactopyranoside(X-gal) 염색 후 blue cell를 counting하여 infection율을 나타냈다. PCR을 사용해서 rAAVCMVp53 viruses, rAAVCMVLacZ viruses가 만들어짐을 확인했다(17-19).

### lipofectin을 매개로한 유전자 이입

lipofectinTM (Gibco)은 cationic liposome으로서 DOTMA와 DOPE가 1:1 (w/w)의 비율로 혼합되어 형성된 것으로서 음전하를 띠고 있는 DNA와 실온에서 자발적으로 상호작용하여 lipid-DNA복합물을 형성한다. 먼저 각각의 세포주를 12 well plate에 105 cells/well로 접종한 후에 60~70%가 되게끔 confluent하게 배양시켰다. 배양 후 DPBS 1 mL로 2번 정도 세척한 후에 serum과 antibiotics가 없는 기본 배지에 lipofectin 6 mL와 DNA 6 mL를 각각의 tube에서 총부피 250 mL가 되도록 희석하여 상온에서 30분 동안 방치한 다음 두 용액을 섞어서 lipid-DNA복합물이 형성되도록 15분 동안 더 방치한

다. 이후 lipid-DNA solution을 각각의 well에 500  $\mu$ L/well씩 분주하고 세포주를 6시간 정도 배양시킨 후 다시 DPBS로 세척한 후에 각 세포주에 적합한 배지 1 mL을 첨가하여 24시간 배양시켜 다음 실험에 사용하였다.

#### 이입된 $\beta$ -galactosidase 유전자의 확인 및 이입 효율 측정

이입된  $\beta$ -galactosidase 유전자의 발현확인을 위하여 먼저 각각의 세포주가 있는 well을 DPBS로 1회 세척한 다음 0.5% glutaraldehyde solution을 넣고 상온에서 10분간 fix시켰다. 이후 DPBS buffer로 2회 세척하고 0.05% sodium deoxycholate, 0.1% NP-40, 10 mM MgCl<sub>2</sub>가 들어있는 5 $\times$  buffer 2 mL과 0.1 mL 100 $\times$  X-Gal, 0.1 mL 100 $\times$  K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.1 mL 100 $\times$  K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 그리고 7.7 mL의 PBS를 잘 혼합하여 X-Gal staining solution을 제조하였고 이것을 각각의 well에 1 mL씩 넣은 다음 37 $^{\circ}$ C 항온조에서 1~2시간 방치하였고 염색된 세포수를 측정하여 그 이입 효율을 결정하였다.

#### Dot bolt analysis

Viral stock 1-10  $\mu$ l를 200  $\mu$ l의 DMEM 배지에 20 U DNase I을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하고 200  $\mu$ l의 2X Proteinase K 용액을 첨가하여 다시 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양했다. Viral nucleic acid를 phenol/chloroform으로 정제한 후 NaOAc/ethanol을 첨가하고 -80 $^{\circ}$ C에서 20분 방치했다. 15,000 rpm (Backman) 에서 30분 원심분리한 후 침전물을 75% ethanol로 세척하고 0.4 M NaOH, 10 mM EDTA 를 첨가하여 100 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 열처리했다. DNA는 Zeta-probe Blotting Membrane(BIO-RAD)을 사용하지만, 이것은 Viral DNA의 양을 측정하는 기준으로써 일반적으로 쓰고있는 방법이기도 하다. Blotting 후 membrane을 prehybridize 30분 60 $^{\circ}$ C로 하여 변성된 labeled probe을 첨가하여 24시간 60 $^{\circ}$ C로 배양한 후 rAAVCMVp53 viruses가 만들어진 여부를 확인했다(20).

#### PCR assay for determining rAAVp53 viruses, rAAVLacZ viruses

rAAVCMVp53 viruses, rAAVCMVLacZ viruses의 생성을 확인하기 위해서 PCR로 분석하였다. PCR primer(5'-AAGCAGTCACACATGACGGAG-3'), (5'-GAGTCTTCCAGTGTGATGATGGT-3')를 사용했다.

#### 이입된 p53 유전자의 단백질발현 확인

이입된 p53 유전자의 발현유무를 확인하기 위하여 western blotting을 시행하였다. 먼저 p53이 이입된 세포를 모아서 PBS로 두 번 세척한 다음 세포 lysis buffer로 처리하고 그 상층액을 모아서 여기에 SDS-PAGE sample buffer를 첨가하여 5분간 끓인 후 상온에서 식힘으로서 단백질 가검물을 준비하였다. 이후 SDS-PAGE로 단백질을 10 mA, 2시간 동안 전기영동한 다음 Hybond-ECL membrane(Amersham)으로 100 Volt, 1시간 30분 blotting하였고 blotting된 membrane을 5% skim milk로 blocking한 다음 primary 항체, mouse anti-human p53 DO7 (Novocastra)와 secondary 항체, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Novocastra)로 반응시켰으며 각 단계마다 세 번씩의 세척과정이 반복됐다. 항

체가 결합된 membrane은 Amersham ECL kit protocol에 따라 현상되었다.

#### 세포수 측정

자궁경부암 세포주들을 12 well plate에 104 cells/well로 접종한후에 10% FBS가 포함된 DMEM으로 24시간 동안 배양시킨후 DPBS 1 mL로 세척하고 Opti-MEM (Gibco) 0.5 mL을 첨가하여 1시간 동안 배양시켰다. 그다음 pRcCMVp53/lipofectin 혼합물을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 항온조에서 5시간 배양시켜 유전자를 세포내로 이입시켰으며 또한 대조군, pRcCMVp53, pRcCMV/lipofectin, lipofectin 만을 각각의 well에 첨가하여 pRcCMVp53/lipofectin이 첨가된 세포들과 비교하였다. 이측정은 6일간 매일 시행되었으며 세포수 측정은 세 번씩 반복되었고 그평균값이 측정에 이용되었다.

#### ELISA assay

자궁경부암 세포주들을 96 well plate에 5 $\times$ 10<sup>3</sup> cells/well로 접종한후에 10% FBS가 포함된 DMEM으로 24시간 동안 배양시킨후 DPBS 0.2 mL로 세척하고 Opti-MEM (Gibco) 0.2 mL을 첨가하여 1시간 동안 배양시켰다. pRcCMVp53, lipofectin, pRcCMV/lipofectin, pRcCMVp53/lipofectin을 첨가한 세포들과 비교하였다. 유전자 이입후 24시간 동안 배양시킨다음 6일 동안 매일 각각의 well을 PBS로 세척하고 완전배지내에 neutral red (Gibco)가 mL당 50  $\mu$ g의 농도로 들어있는 neutral red 용액을 첨가하여 3시간 동안 배양하고 37% formaldehyde와 1% calcium chloride로 구성된 rinse solution으로 1분간 세척한다음 1% glacial acetic acid와 50% ethanol이 들어있는 solubilization fluid로 15분간 solubilization 시키고 ELISA-reader로 540 nm에서 흡광도를 측정했다.

#### MTT assay

자궁경부암 세포주들을 96 well plate에 5 $\times$ 10<sup>3</sup> cells/well로 접종한 후 10% FBS가 포함된 DMEM으로 24시간 동안 배양시킨 후 DPBS 0.2 mL로 세척하고 Opti-MEM (Gibco) 0.2 mL을 첨가하여 1시간 동안 배양시켰다. pRcCMVp53, lipofectin, pRcCMV/lipofectin, pRcCMVp53/lipofectin을 첨가한 세포들과 비교하였다. 혼합물을 첨가하여 p53 유전자를 이입시켰으며 유전자 이입 후 24시간 동안 배양시킨 다음 6일동안 매일 각각의 well에 5 $\times$ MTT(Sigma)를 20  $\mu$ L 첨가하여 3시간 동안 배양하고 이후 Sorenson's glycine buffer(0.1M glycine, 0.1 M NaCl, pH 8.0) 25  $\mu$ L와 DMSO 200  $\mu$ L를 첨가하여 shaker에서 10분간 흔들어준 후 ELISA-reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 아데노 바이러스를 이용한 p53 유전자의 종양조직내로의 이입 및 항 종양효과

CaSki 및 SiHa 세포주들 106/100  $\mu$ L 멸균된 PBS가 되도록 준비하여 29 gauge syringe를 사용하여 nude mouse의 피하로 주사하였고 tumor의 크기가 9-10 mm가 되었을 때 AdCMVp53 및 AdCMVLacZ를 10<sup>10</sup> pfu/100  $\mu$ L 멸균된 PBS가 되도록 준비하여 종양의 가운데로 주사하였다.

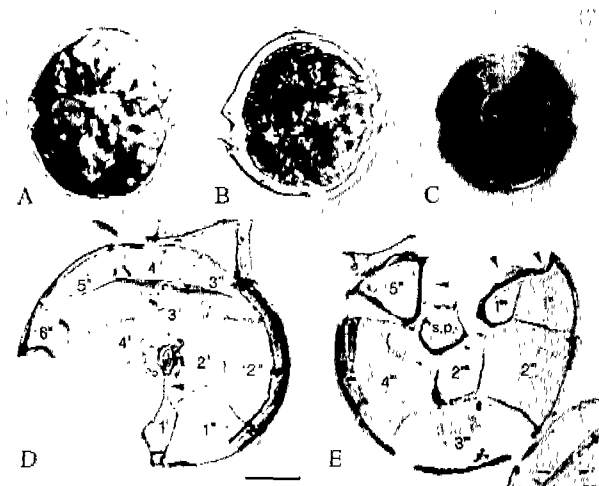


Figure 1. *Alexandrium tamarense*. Ventral view of cell (A-C), Epitheca(D). The thread-like projection on the anterior tip of the first apical plate (arrowhead). Apical pore plate (Po). Hypotheca(E). The first postcingular plate (1''), fifth postcingular plate (5'') and first antapical plate (1'') has a list (arrowheads). Sulcal posterior plate (s.p.). Scale bar=10  $\mu$ m.

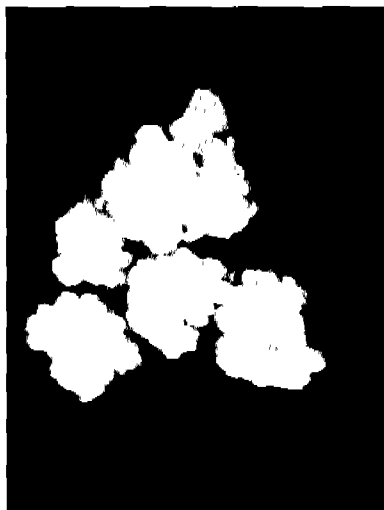


Figure 2. Fluorescence microscope pictures of *Kombucha* (fungi).

**암조직내에서의 AdCMVp53의 Western blot법**

암조직내에 이입된 p53 유전자의 발현 유무를 확인하기 위하여 누드마우스의 암조직을 1, 3, 5, 7, 14, 21로 적출한 후, western blotting을 시행하였다.

**AdCMVp53 Immunohistochemistry법**

조직 절편은 실온에서 30분 반응시키고 PBS로 충분히 washing 한 다음 45℃에서 15분 반응시키고 enhancer로 washing 한다. Chromogen으로 현미경하에서 확인하고 D.W로 washing 하고 Hematoxylin으로 30초 washing 후 200배 및 400배 현미경 하에서 관찰 및 사진촬영 하였고 전체 세포핵 중에서 p53 단백질이 발현된 핵을 측정하였다.

누드생쥐에서 자궁경부암 세포에 아데노바이러스 p53 유전자의 형질 도입이 자궁경부암 종괴의 성장에 미치는 영향 암조직내에 이입된 p53 유전자의 발현 유무를 확인하기 위하여 누드마우스의 암덩어리의 크기를 정기적으로 측정하였다.

**STX, GTX1-3특신의 조절 및 독성 플라크톤 배양 개수와 티벳버섯의 조절**

Saxitoxin(STX), Gyonyoutoxin(GTX)특신은 진주만에서 채취한 폐류에서 HPLC를 이용해서 독을 분리한 것을 한양대 자연대에서 공급받아 실험에 이용하였다.

독성 플라크톤과 티벳버섯을 Figure 1,2에 나타낸다.

**결과 및 고찰**

**자궁경부암 세포 주에서 여러 종류의 리포솜을 이용한 유전자 이입효율의 측정**

여러 종류의 리포솜, Ca Phosphate, Lipofectin, FuGene 6 등을 이용하여, pRcCMVLacZ plasmid의 이입효율을 CaSki, SiHa, HeLa, HeLa S3, C33A 그리고 HT3 등 6종류의 자궁경부암 세포주에서 확인하였다. pRcCMVLacZ 이입효율은 Ca Phosphate를 사용했을 경우, CaSki, SiHa, HeLa, HeLa S3, C33A 그리고 HT3 세포주에서 각각 6.84, 8.37, 8.61, 7.18, 8.51, 6.41%, Lipofectin을 이용했을 경우 15.32, 14.46, 11.94, 11.26, 8.93, 8.87%, 그리고 FuGene 6를 이용했을 경우에는 9.58, 7.99, 33.89, 31.00, 16.21, 30.30%의 이입효율을 나타냈다(Table 1).

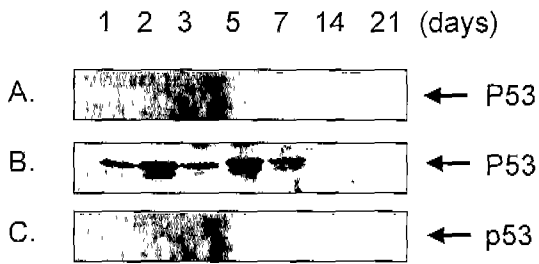
**종양조직에서 아데노 바이러스를 이용한 p53 단백질 발현의 해석**

자궁경부암 세포주, SiHa를 누드 마우스에 주사하여 형성시킨 암 조직 내에, 아데노바이러스를 이용한 종양억제 유전자 p53을 주사한 후, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21일 제에 p53의 발

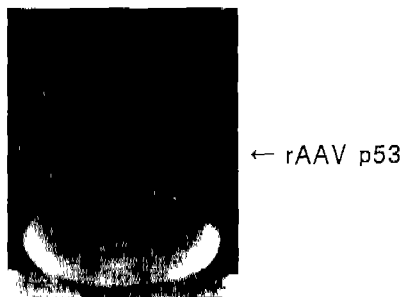
Table 1. Transfection efficiencies of six cervical cancer cell lines

Cell line	pRcCMVp53 Transfection Efficiency(%)			AdCMVp53 Transfection efficiency(%)
	Ca Phosphate	Lipofectin	FuGene 6	
CaSki	6.84 ± 0.54	15.32 ± 0.12 *	9.58 ± 1.28	8.48 ± 1.58
SiHa	8.37 ± 0.32	14.46 ± 0.56 *	7.99 ± 0.10	6.32 ± 0.60
HeLa	8.61 ± 0.36	11.94 ± 5.36	33.89 ± 0.91 *	98.38 ± 0.55 *
HeLa S3	7.18 ± 0.66	11.26 ± 0.13	31.00 ± 3.61 *	6.65 ± 1.95
C33A	8.51 ± 0.32	8.93 ± 3.25	16.21 ± 2.23 *	95.49 ± 1.97 *
HT3	6.41 ± 0.37	8.87 ± 3.77	30.30 ± 0.37 *	8.50 ± 2.42

Transfection efficiency was observed at ×200, (\* P > 0.05 ) 6  $\mu$ g of plasmid DNA was used for each transfection and AdCMVp53 was used to infect the cells at 100 MOIs. The percentages of  $\beta$ -galactosidase-positive cells were determined after scoring all cells each on triplicate pictures.



**Figure 3.** Western blots probed with anti-p53 antibody. Cellular extracts were subjected to SDS-PAGE. The tumor tissue was injected by (A) PBS( $10^5/100 \mu\text{L}$ ), (B) AdCMVp53( $10^{10}$ pfu/ $100 \mu\text{L}$ ), (C) AdCMVLacZ ( $2 \times 10^9$ pfu/ $100 \mu\text{L}$ ) and incubated for 7days. Expression of p53 in tissue showed high level in 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21days after injection of AdCMVp53.



**Figure 4.** Iodixanol step gradient for the purification of rAAV P53. 293 cells were cotransfected with pAAV p53, AAV packaging plasmid, and Ad Helper plasmid. For purification AAV p53 were centrifuged at  $350,000 \times g$  for 1 hr at  $16^\circ\text{C}$ .

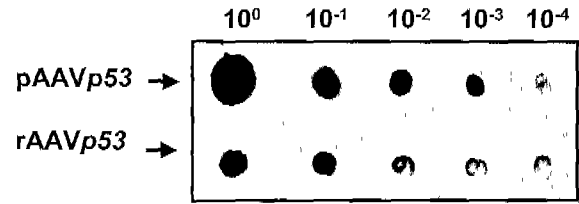
현을 Western 분석법으로 조사하였다. 그 결과 p53은 AdCMVp53 바이러스를 주사후, 1일째부터 발현되었으며, 1, 2, 3, 4, 5, 7일째까지 고농도로 발현하였다 (Figure 3). 한편 AdCMVp53의 대조 군으로써 PBS 완충 용액을 주사한 군과 아데노 바이러스의 세포내 독성을 모니터링 하기 위한 AdCMVLacZ 처리 군에서는 p53의 발현은 전혀 검출되지 않았다.

**rAAV 생산**

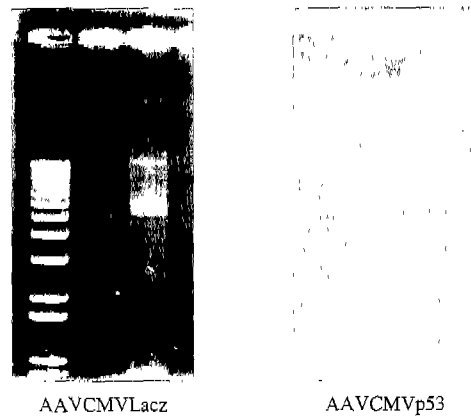
rAAV의 생산 방법은 Samulski et al(1998)의 방법에 준했다. 293cell 이 들어있는 30개의 10-cm plate에 Adenovirus의 오염을 최소화 하기 위해서 vector plasmid, packaging plasmid, adenovirus helper plasmid로 cotransfection 하고 48시간 후 cell 들을 원심분리 하여 iodixanol gradient를 사용하여 순수 분리 하였다. Figure 4에서 나타낸 것과 같이 2층으로 분리 되어있는데 그 밑 부분이 순수 AAVCMVp53 밴드로 추정된다. 밴드 아래 부분을 주사기로 뽑아내 AAVCMVp53 시료로 사용한다.

**rAAV 의 확인**

Dot blot에 의한 viral DNA의 정량화는 rAAVCMVp53의 particles 양으로 측정했다. 원심 분리 후 rAAVCMVp53 CsCl gradient 밴드를 확인하고 주사기로 rAAVCMVp53 만을 회수한 다음 PBS로 투석해서 순수 rAAVCMVp53을 얻었다.



**Figure 5.** Dot hybridization analysis of recombinant AAVCM Vp53 in 293 cell. Recombinant AAVCMVp53 was loaded on a membrane, and hybridized with p53 primer. For analysis ECL method was used, and pAAVp53 was used as control.



**Figure 6.** PCR analysis for determining rAAVCMVlacZ rAAVCMVp53 viruses.

rAAVCMVp53의 생산은 dot blot analysis로 확인했다(Figure 5).

**PCR에 의한 rAAVp53분석**

PCR primer(5'-AAGCAGTTCACATGACGGAG-3'), (5'-GAGTCTTCCAGTGTGATGATGGT-3')를 사용하였으며 rAAVCMVp53 생성을 PCR로 확인하였다(Figure 3). PCR 사진에서 보여진 것과 같이 AAVCMVlacZ는 4kb에서 밴드가 확인되었으며, AAVCMVp53은 200-300 kb 사이에서 밴드가 확인된 것으로 보아 AAVCMVp53이 성공적으로 생산되었다는 것을 알수 있었다(Figure 6).

**X-gal staining method**

6well dish를 사용하여 본 실험에서 얻어진 순수AAVCMVlacZ virus를 6종류의 (Hela, HT3, HelaS3, Caski, C33A, SiHa) cell 에 infection 시켜 24시간 배양한 후, cell 에 infection된 사진 (blue cell)을 촬영해서 종류별로 구분하여 제시한다.

rAAVCMVlacZ viruses의 titer는 5-bromo-4-chloror-3-indolyl-β-D-galactopyranoside(X-gal) 염색 후 rAAVCMVlacZ viruses 가 cell에 infection된 사실은 blue cell를 counting하여 측정 하였다. 이 blue cell를 counting 하여 6종류의 cell에 AAVCMVlacZ virus가 infection 된 비율을 알수 있었는데 그 것을 Table 2 에 나타낸다.

**X-gal staining method**

6well dish에 본 실험에서 얻어진 순수 AAVCMVlacZ virus를 사용하여 6종류의 (Hela, HT3, HelaS3, Caski, C33A,

**Table 2.** Comparison of AAVCMVlacZ titers produced by different six human cervical cancer cell line

Cervical cancer cell	AAVCMVlacZ(t.u/plate(B))	t.u/cell(C)
Hela	$2.1 \times 10^7$	42
HT3	$3.6 \times 10^7$	72
HelaS3	$3.7 \times 10^8$	74
Caski	$2.7 \times 10^8$	54
C33A	$1.5 \times 10^5$	3
SiHa	$0.9 \times 10^5$	1.8

B: Average of experiment obtained from a 10 cm plate of human 293 cells: X-Gal staining, each blue cell was translated into 1t.u C: Obtained by dividing the titers(total t.u) from each 10 cm diameter plate by the total number of 293cells.

**Table 3.** pRcCMVLacZ plasmid and AdCMVp53 transfection efficiency in cervical cancer cell lines

Cell line	pRcCMVLacZ plasmid Transfection Efficiency(%)			AdCMVp53 Transfection efficiency(%)
	Ca Phosphate	Lipofectin	FuGene 6	
CaSki	6.84 ± 0.54	15.32 ± 0.12 *	9.58 ± 1.28	8.48 ± 1.58
SiHa	8.37 ± 0.32	14.46 ± 0.56 *	7.99 ± 0.10	6.32 ± 0.60
Hela	8.61 ± 0.36	11.94 ± 5.36	33.89 ± 0.91 *	98.38 ± 0.55 *
Hela S3	7.18 ± 0.66	11.26 ± 0.13	31.00 ± 3.61 *	6.65 ± 1.95
C33A	8.51 ± 0.32	8.93 ± 3.25	16.21 ± 2.23 *	95.49 ± 1.97 *
HT3	6.41 ± 0.37	8.87 ± 3.77	30.30 ± 0.37 *	8.50 ± 2.42

Transfection efficiency was observed at ×200, (\* P > 0.05 )

**Table 4.** Trasfection efficiency of SiHa tumor tissues

	Transfection efficiency(%) ± S.D.
day 1	20.31 ± 5.36
day 2	24.72 ± 11.69
day 3	74.78 ± 3.98
day 5	45.26 ± 6.43
day 7	6.12 ± 5.72
day 14	8.38 ± 1.99
day 21	6.32 ± 4.07

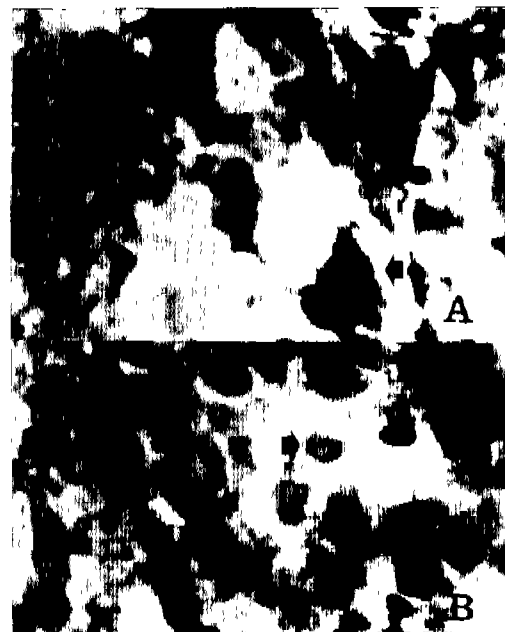
$10^{10}$  pfus of AdCMVp53 were used for injection into each tumor tissue. The percentages of p53-positive cells were determined after scoring of all nuclei on triplicate picture. The tissues were prepared at indicated time points after injection

SiHa) cell line에 infection 시켜 24시간 배양한 후 infection 을 계산했다 이것을 Table 3에 나타낸다.

**종양조직에서 adenovirus에 의한 p53 및 LacZ 유전자의 이입을 분석**

종양조직내 p53 단백질의 발현을 조사하기 위하여 자궁경부암 세포주 SiHa를 피하 주사하고 형성된 약 9-10 mm 크기의 종양 조직에 AdCMVp53을 주사한 후 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21일에 각각 조직을 절편하여, 면역조직화학 분석법으로 조사한 결과 종양조직 내에서 아데노바이러스 유래의 p53은 다량으로 발현되어 있었다. p53 단백질이 발현된 세포 수는 아데노 바이러스를 주사한지 1일째에 전체 세포 수에서 20.31%, 2일째에 24.72%, 3일째에 74.78% 그리고 5일째에 45.16%의 빈도를 나타내었고, 7일 이후는 그 발현 정도가 감소하였다 (Table 4).

**종양조직에서 p53유전자의 immunohistochemistry 해석**  
아데노바이러스 p53의 암 조직내 발현을 조사하기 위하여,



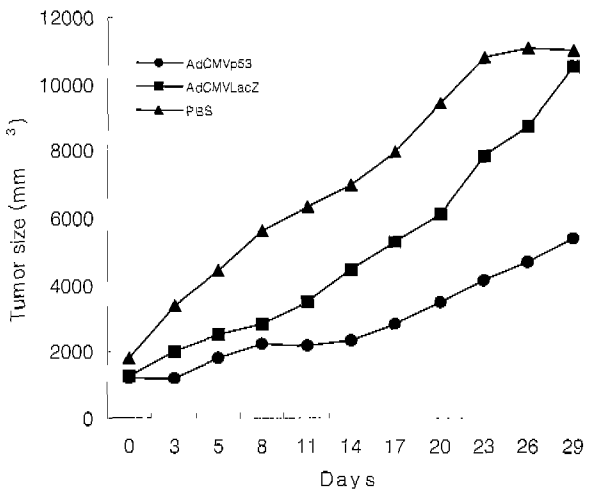
**Figure 7.** A: a positive control, X-gal staining for LacZ infection on a section for tumor tissue (X1000). Blue colored cytoplasm and nuclear was stained by x-gal solution staining. B: a negative controlx-gal staining for LacZ infection on a sectionfor tumor tissue (X1000). No blue colored cytoplasm and nuclear was stained by x-gal solution staining.

자궁경부암 세포주 SiHa를 피하 주사하여, 형성된 약 9-10 mm 크기의 암 조직에 recombinant adenovirus CMVp53 (AdCMVp53)을 주사하고, p53의 발현을 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21일 후, 각각 그 조직을 절편 하여, 면역염색법으로 조사한 결과, 암 조직 내에서 아데노바이러스 유래의 p53은 다량으로 발현되어 있었다 (Figure 7). p53 단백질이 발현된 세포 수는 아데노 바이러스를 주사한지 1일째에 전체 세포 수에서 19.79%, 2일째

**Table 5.** Comparison of transfection efficiency of AdCMVLacZ between SiHa cell and SiHa cell xenografted tumor tissue in nude mouse.

Magnification	Tranfection efficiency(%) + S.D.)	
	× 200	× 400
SiHa cell line	6.33 ± 0.60	15.64 ± 5.56
Tumor tissue		
day 1	61.26 ± 4.66*	88.65 ± 8.65*
day 2	59.63 ± 9.12*	70.85 ± 20.94*
day 3	62.01 ± 14.64	59.68 ± 14.30
day 5	57.76 ± 0.09	88.51 ± 4.76
day 14	28.22 ± 14.33	40.75 ± 25.44
day 21	31.73 ± 22.76	48.21 ± 10.97

\*(P < 0.05) compared to SiHa cell line. Comparison of gene transfection efficiency into cell with tumor tissue was revealed statistically significant increase in tumor tissue than cell line in day 1 and 2 (both 200 and 400 magnification)



**Figure 8.** Effects of treatment with AdCMVp53 on tumor growth of SiHa cells in nude mice. Mice were injected s.c. with 10<sup>7</sup> SiHa cells/mouse. 2 weeks later, 100 μL of AdCMVp53 (10<sup>10</sup>pfus), AdCMVLacZ(10<sup>10</sup>pfus), or PBS alone was injected into tumors of 9-10 mm in diameter. Four mice were used for each treatment group.

에 26.26%, 3일째에 14.77% 그리고 5일째에 15.99%의 빈도를 나타내었고, 7일 이후는 그 발현 정도가 감소하였다.

**AdCMVLacZ에 의한 β-galactosidase 유전자 발현 확인**

아데노 바이러스벡터 유래의 표지 유전자의 암 조직 내 이입을 조사하기 위해, LacZ 리포트 유전자를 아데노 바이러스 벡터의 human cytomegalovirus(CMV) 프로모터를 이용하여 발현된 β-galactosidase를 X-gal 염색법으로 조사한 결과, HPV16 유래의 자궁경부암 세포주 SiHa를 미리 피하 주사하여, 형성된 약 9-10mm 크기의 암 조직에 AdCMVLacZ를 주사하고, 1, 2, 3, 5, 14, 21 일 후, 각각 그 조직을 절편하여, β-galactosidase의 발현을 immunohistochemistry법으로 조사하였다. 그 결과, LacZ 유전자 이입효율은 AdCMVLacZ를 주사 후 1, 2, 3, 5, 14, 21 일째에 각각 200배, 400배로 관찰해서 나타났으며(Table 5), 암조직 절편 내에서 아데노 바이러스 벡터 유래의 β-galactosidase는 다량으로 발현되었다.

**누드 생쥐에서 아데노 바이러스p53 투여가 자궁경부암 종괴의 성장에 미치는 영향**

누드생쥐에서 SiHa 자궁경부암 세포주에 형성된 종괴는 아데노 바이러스p53을 주사한 경우 control로 PBS와 LacZ를 주사 한것에 비해 종괴의 성장이 저하되는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 8).

**HPLC를 이용한 폐독(PSP) 종류별, 농도별 독성치와 Human cervical cancer cell(HT3)에서의 암 억제효과**

HPLC를 이용해서 진주만에서 채취한 폐유에서 독을 추출하여 농도별, 독성별 HT3 cell에서의 암 억제 효과를 측정할 결과 Figure 9에서 나타낸 것과 같이 농도별로 암 억제 효과가 있었으며 독성이 강할수록 암 억제 효과가 큰 것으로 나타났다. 이 결과로부터 인간에게 신경성 마비제로만 알려진 폐독이 암세포에 암 억제 효과가 있음을 시사한다.

**배양한 독성 플라angk톤(A.tamaranse) 세포 개체당, 농도별 암 세포에서의 억제 효과**

Figure 10에서 나타낸 것과 같이 현미경으로 독성 플라angk톤을 개체수당 분리하여 작산 열탕법으로 독을 분리한 다음 암 세포인 SiHa cell에서의 암 억제 효과를 측정한 결과 플라angk톤의 개체수가 증가할수록 암 억제율은 높았으며 농도가 높을수록 암 억제율이 85% 이상임을 알수 있었다. 이 결과로 독성 플라angk톤도 암 세포에 영향을 끼친다는 새로운 결과를 얻게 되었다.

**티벳 버섯에서의 암 억제 효과**

Human cervical cancer cell로 알려진 SiHa cell에 티벳에서 가지고온 버섯을 이용해서 암 억제 효과를 측정하였다. 처음 24 hr, 48 hr 티벳 버섯에 우유를 첨가해 발효된 우유와 티벳 버섯 자체를 열탕법으로 추출한 것은 내상으로 암 억제 효과를 측정한 결과 약 92% 정도의 암 억제 효과를 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 티벳 버섯은 뛰어난 암 억제 효과를 가지고 있으며 매일 복용이 가능하다면 더 큰 효능이 있으리라 생각한다. 이것을 Figure 11에 나타낸다.

자궁경부암의 유전자 치료는 아데노 바이러스와 같은 viral vector의 개발로 급진전을 보이기 시작했다. 아데노 바이러스



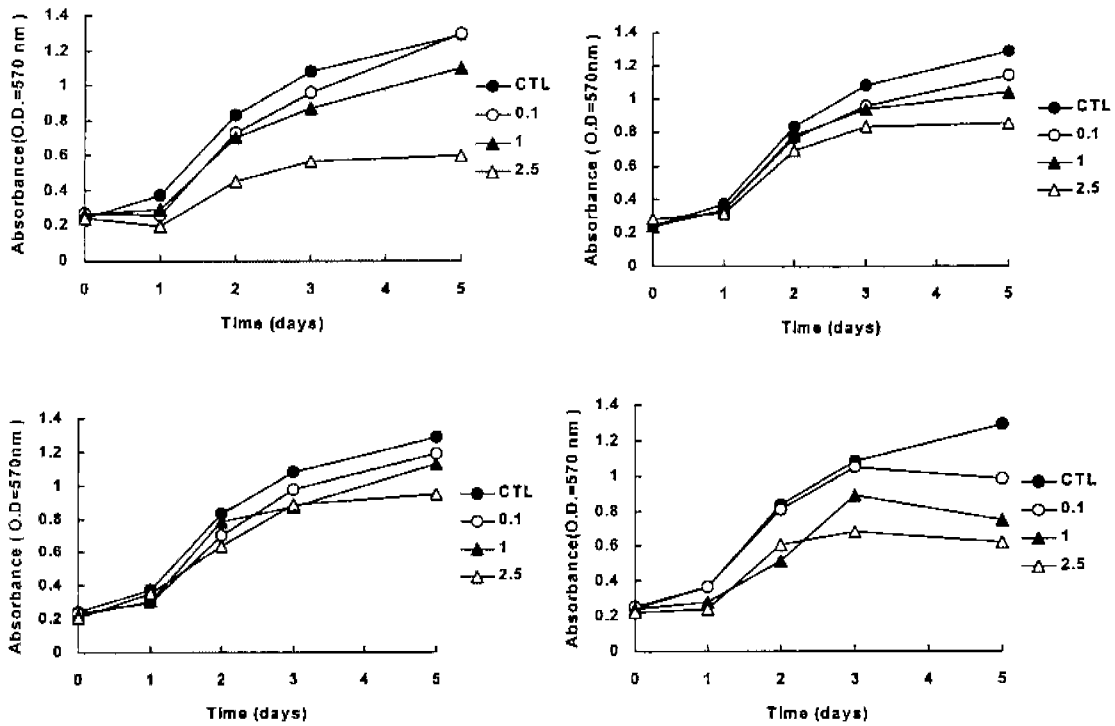


Figure 9. Effect of toxin(GTX1-3, neoSTX) on growth inhibition of human cervical cancer HT3 cell line. 18 f mole/cell ( $4.97\text{MU}/10^6$ ) (A), 43.9 f mole/cell (B), 70.95 f mole/cell (C), 80.96 f mole/cell (D)

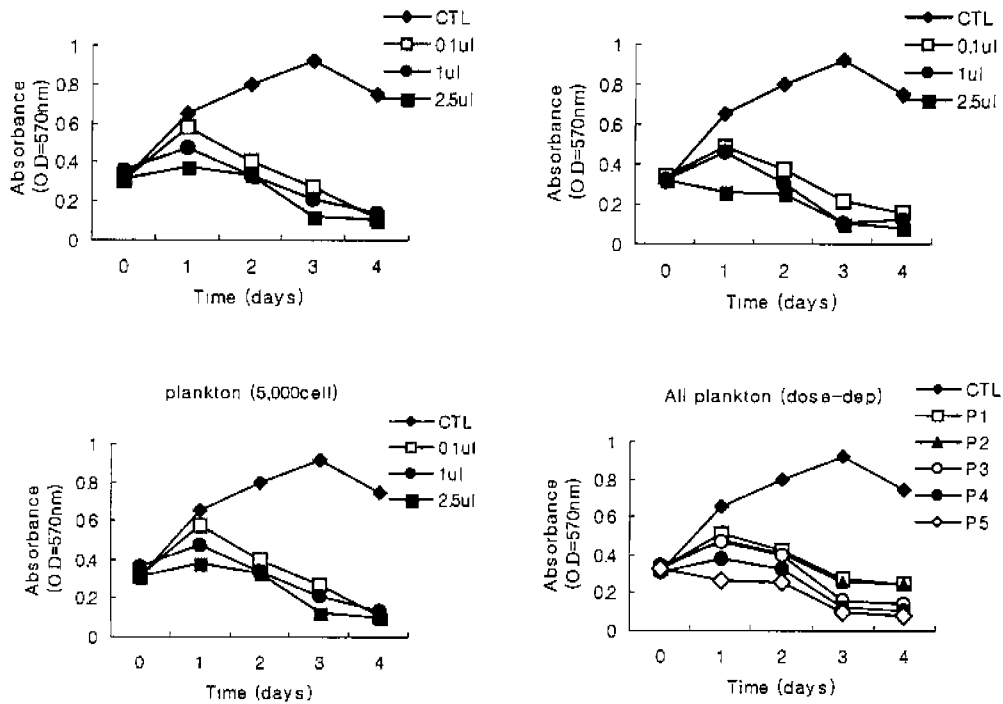


Figure 10. Effect of plankton (*A. tamarensis*) on growth inhibition of human cervical cancer SiHa cell line.

는 표피의 상피에 친화성이 있어 상피 접근이 매우 용이하다. 또한 아데노 바이러스는 고농도(21,22)의 바이러스를 얻을 수 있으며, 바이러스 복제에 중요한 역할을 하는 E1A 혹은 E1B 부위에 목적 유전자가 삽입된 바이러스를 유전자 치

료에 이용할 때에는 E1 유전자를 보충해줄 수 있는 293 세포주 등에서 성장을 시킬 수 있다는 장점이 있다. 또한 아데노 바이러스는 *in vivo*, *in vitro* 실험에서 모두 높은 이입율을 나타내는 장점을 가지고 있어, 유전자치료를 위해 많은 연구

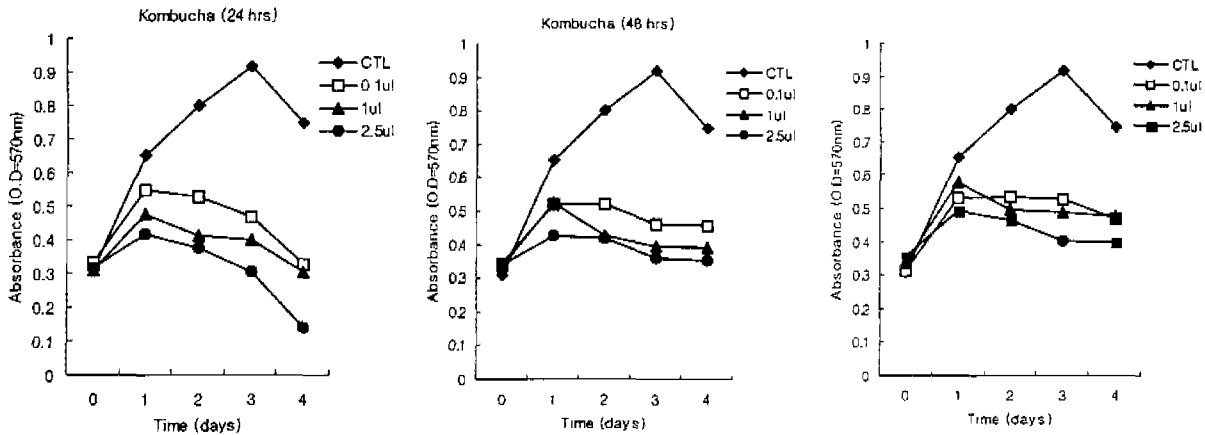


Figure 11. Effect of *Kombucha*(fungi) on growth inhibition of human cervical cancer SiHa cell line.

가 진행되고 있다. 대부분의 자궁경부암의 경우 p53 유전자는 wild type으로 존재하나, p53 단백질은 E6-activated-ubiquitin dependent protease digestion에 의해 빠르게 분해되므로 거의 발견할 수가 없다(23). 이런 의미에서 wild type p53이 삽입된 아데노 바이러스 벡터를 자궁경부암에 도입하는 유전자 치료법의 개발은 매우 흥미로운 연구가 아닐 수 없다.

Ad5CMVp53투여 후 E6의 mRNA의 발현을 비교해본 결과 투여전후에 상당량의 E6 발현의 변동이 나타났다. 즉 Ad5CMVp53 투여후 이입이 된 p53로 인하여 HPV 감염후 나타난 E6의 mRNA양이 조절됨으로써 향후 E6의 양적 측정은 유전자치료 전후의 효과 판정에 유익한 자료로 생각되어지며 p53에 의한 치료효과의 판정뿐만 아니라 어떤 약제에 의한 HPV 감염회복의 판정에도 사용될 수 있는 가능성을 제시했다고 사료된다.

전반적으로 HPV의 감염과 p53의 상태에 관계없이 외부에서 투여된 p53에 의해 모두 세포의 성장이 억제되는 것을 관찰하였다. 플라스미드 이입법인 경우 (pRcCMVp53/lipofectin) 59.1~91.3%, ELISA인 경우는 65~94%, MTT의 경우에는 28~88%의 성장억제를 나타내었다. 또한 간접이입법인 경우 (AdCMVp53) 세포수 검사인 경우 87.4~99.7%, ELISA인 경우는 33~85%, MTT의 경우에는 51~94%의 성장억제를 나타내었다. 이것은 HPV의 감염과 p53의 조건에 관계없이 외부에서 이입된 p53가 자궁경부암세포성장을 억제한다고 해석할 수 있겠다. HPV감염이 없고 mutant type의 p53을 가지고 있는 C33A와 HT3세포에서도 pRcCMVp53/lipofectin과 Ad5CMVp53를 이입한 경우 HPV 16, HPV 18양성세포군과 비슷한 양상으로 모두 세포성장이 유의하게 억제되었다.(p 0.05) 그러나 두 세포에서 pRcCMVp53/lipofectin과 Ad5CMVp53에서의 세포성장억제에는 차이가 없었다. MTT assay에서 세포 성장억제는 CaSki인 경우 pRcCMVp53/lipofectin과 Ad5CMVp53를 투여한 경우 다른군에 비해 세포성장의 현저한 차이를 나타냈으며 이때 pRcCMVp53/lipofectin를 투여했을 때보다 Ad5CMVp53를 투여했을 때가 훨씬 효과가 좋았다(p<0.05). 그러나 SiHa인 경우 세포성장억제는 이루어졌으나 pRcCMVp53/lipofectin과 Ad5CMVp53를 투여한 군에서 서로간에 별로 차이가 없었다. SiHa인 경우에는 pRcCMVp53와 pRcCMVp53/lipofectin을 투

여한 경우 다른군에 비해 현저한 성장 억제를 나타내었으나, 이 경우 리포솜의 유무에는 무관하였다.

한편 HeLa는 위와 같이 모두 세포성장억제를 나타내는 반면에 HeLaS3에서는 lipofectin단독 혹은 pRcCMVp53 그룹보다 유의한 성장 억제가 일어났으나(p 0.05)대조군과 p53 단독 투여 및 pRcCMVp53와 lipofectin을 투여한 그룹에서는 서로간의 유의한 차이가 없었다. HPV 감염 음성인 경우, C33A인 경우 lipofectin, pRcCMVp53와 lipofectin 혹은 lipofectin이 없는 경우가 대조군이나 p53를 투여한 경우보다 성장 억제가 일어났으나(p 0.05) lipofectin의 유무에는 서로간에 무관하였다. HT3세포인 경우 pRcCMVp53와 pRcCMVp53와 lipofectin을 혼합한 경우가 나머지 경우보다 유의하게 성장 억제를 일으켰으나 (p 0.05), 두 군사이에서는 서로 간에 무관하였다. 한편 pRcCMVp53가 들어있는 경우가 Ad5CMVp53를 투여한 경우보다 현저한 감소를 나타내었다. ELISA assay를 시행한 경우 CaSki세포는 pRcCMVp53/lipofectin과 Ad5CMVp53를 투여한 경우 대조군이나 VGFP를 이입한 경우보다 세포의 성장을 억제하였으나 pRcCMVp53/lipofectin과 Ad5CMVp53인 경우 Ad5CMVp53이 더 유의하게 cell viability의 변화를 나타낸 것으로 보인다(p<0.05). 그러나 lipofectin, pRcCMVp53, pRcCMVp53/lipofectin군에는 서로 유의한 차이의 세포성장억제는 나타내지 않았다. 여기에서 우리는 자궁경부암 세포주에 의한 아데노 바이러스 p53과 pRcCMVp53을 투여한 후 E6 단백질의 변화를 보았다. 자궁경부암의 유전자 치료에 있어서는 아데노 바이러스와 같은 Viral Vector의 개발로 급진적인 발달을 보였으며 아데노 바이러스는 특히 표피 상피에 매우 친화성이 강하므로 유전자 치료의 전략으로 상피에 접근시키는 유전자 치료가 생각된다. 아데노 바이러스는 고농도 (24-27)까지 만들어지고 293cell을 이용한 cotransfection을 이용해서 in vivo, in vitro 실험에서 높은 이입율을 보였다. 야생형 p53 유전자는 플라스미드 이입율 50% 이상이라는 보고에서와 같이 자궁경부암 세포주에서도 응용이 되어왔다.

자궁경부암 세포주 CaSki, SiHa, HeLa, HeLaS3, C33A, HT3 등을 이용한 본 실험에서 아데노 바이러스 벡터와 리포펙틴 등의 리포솜을 이용한 유전자 이입효율을  $\beta$ -galactosidase assay방법으로 측정된 결과, 아데노 바이러스는 90-99%의 유전자 전이 효율을 나타내었으며, 리포솜은 10-30%의 효율을

나타냈다. 또한 누드마우스에 미리 자궁경부암 세포주(SiHa)를 주사하여 형성된 암 조직에 대한 AdCMVlacZ의 발현을 면역화학요법에 의한 X-gal 염색법으로 조사한 결과에서도 아데노 바이러스 유래의  $\beta$ -galactosidase 표적단백질은 80-90%의 발현율을 나타내어, 이는 바이러스를 이용한 치료유전자가 세포주에서 뿐만 아니라 조직내에서도 표적 암세포로의 전달이 유사함을 시사하고 있다. 한편, 누드마우스의 암조직 절편의 단백질 추출물에 대한 western blot을 통하여 본 결과, AdCMVp53을 투여한 경우 AdCMVlacZ, PBS완충용액을 주사한 대조군에 비하여, p53 단백질의 발현이 현격히 증가함을 볼 수 있었다. p53 단백질 발현은 감염 후 2, 5일째에 최고치에 이르며 7일째까지 단백질 발현측정이 가능하였다. 이것은 외부에서 투여한 p53 유전자가 충분히 발현되었다는 것을 의미하며, 이것은 폐암에서 실험한 내용과 유사한 결과를 나타내었다(21,25). 종양 억제 유전자인 p53을 발현하는데 이용한 아데노 바이러스 벡터는 CMV promotor와 wild type p53 유전자를 포함하고 있으며, p53 유전자가 이입되지 않은 경우, 다른 실험과 마찬가지로 p53 단백질이 거의 검출되지 않았다. 이는 형성된 암 조직 내에는 누드마우스 유래의 항암 인자인 p53 단백질이 존재하지 않거나, 혹은 검출감도 이하로 존재하고 있음을 시사하는 것으로, 면역능력이 상실된 누드마우스에 형성된 암 조직은 어떠한 저해도 없이 증식할 것으로 추정되며, 이러한 추정은 외부에서 도입한 AdCMVp53이 암 조직 내에서 발현하여 강력한 항암작용을 나타내는 본 실험의 결과에서 확인되었다. 종양조직에서의 p53 면역 화학 염색에 의한 양성 염색은 본 실험에서는 세포질과 핵내에서 모두 발현이 나타났다. 확실히 양성반응을 나타내는 염색은 핵내에서만 발현되는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 현상은 핵막을 통과하는 p53내지는 p53 이입으로 세포질에 남아 있는 p53의 염색일 것으로 추정되고 있다. 종양조직에서 리포트 유전자인 LacZ 유전자는 X-gal 염색에 의해 청색으로 세포질과 핵내에 선명히 염색된 것으로 나타났다. X-gal 염색을 하기 위한 고정액에서 포르말린 고정된 표본에서는 염색이 안 되었는데, 차후에 신선한 조직에 X-gal 염색을 위한 고정액을 주입하여 고정시키니 염색이 되는 것으로 보아 LacZ 유전자에 의한 X-gal 용액의 반응은 조직절편의 최초의 고정용액에 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 이입된 유전자에 의해 DNA에 변형을 가져와, 단백질을 생산하는 과정에서 최초 노출시간과 단백질 생성 시간이 세포주기에 따라 다르기 때문으로 생각되며, 유전자를 투여하는 양과 노출되는 시간에 따라 원하고자 하는 높은 효과를 기대할 수 있으리라 생각한다. 한편 누드마우스를 이용한 *in vivo* 실험에서 아데노 바이러스를 이용하여 종양 조직 내로 p53 유전자를 이입한 결과, 외부에서 이입된 유전자 p53의 산물에 의해 종양조직의 크기가 AdCMVlacZ, PBS완충용액을 주사한 대조군에 비하여 현저하게 감소됨을 확인함으로써, 암 조직 내에서 재조합 아데노바이러스 유래의 p53 단백질 발현이 증가한 western 분석결과와 일치하는 것을 확인할 수 있으리라 생각한다. 누드 생쥐에서 아데노바이러스 p53 투여가 자궁경부암 종괴의 성장에 미치는 영향으로 누드생쥐에서 SiHa 자궁경부암 세포주에 형성된 종괴는 아데노바이러스 p53을 주사한 경우 control로 PBS와 Lacz를 주사 한것에 비해 종괴의

성장이 저하되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 western blot을 통하여 pRcCMVp53와 lipofectin에서와, AdCMVp53를 투여했던 경우 p53 단백질의 현격한 증가 현상을 볼 수 있었다. 자궁경부암 세포주와 누드마우스에 아데노 바이러스 p53과 pRcCMVp53을 투여한 후 성장 억제효과와 항종양 효과를 본 것으로 대부분의 자궁경부암 세포주들은 인유두종 바이러스의 존재유무와 관계없이 성장이 억제됨을 알 수 있었다. E6 단백질의 변화로 RT-PCR에 의한 E6 유전자의 발현을 조합 아데노 바이러스 p53과 pRcCMVp53 유전자의 외부이입 후 E6 발현양을 보았는데 p53과 E6의 발현은 서로 반대되는 현상이 나타났으며, 단백질 발현량 검출에서는 p53 직접이입 후 Hela, SiHa cell에서 전사 단계의 발현양 변화와 동일하게 E6 발현 양이 감소되는 것으로 보아 자궁경부암 세포주에 있어서 adenovirus p53, pRcCMVp53 E6 단백질의 변화가 있는 것으로 사료된다. 이러한 점으로 볼 때 자궁경부암에 있어서도 p53 유전자 변이가 상호 관계가 있다고 사료되는 연구 결과로 본다. 억제유전자 치료 후 치료전후의 E6 level의 정량분석을 통하여 유전자 치료의 효과를 판정할 수 있으며 한편 예후 인자로의 정의를 확실히 할 수 있으며 자궁경부암 세포는 functional genotype equivalent를 가지고 E6 단백질과 p53 단백질이 결합하므로써 불활성화되는 특성을 가지고 있다는 것을 알았다. 또한 누드 마우스의 종괴에 pRcCMVp53와 리포펙틴 혹은 AdCMVp53와 바이러스 벡터를 투여하여 종괴의 변화를 보았는데 종괴가 줄어드는 현상을 나타냈다.

또한 Adeno-associated virus (AAV)는 약 4.7 nucleotides의 genome을 가지고 있는 single-stranded DNA viruses 이다(28). Nonstructural protein (Rep78, Rep68, Rep52, Rep40) 등은 3개의 promoters로부터 발현되는 structural protein (VP1, VP2, VP3)과 genome 끝에 두개의 동일한 inverted terminal repeats (ITR)가 존재한다. 이것들은 parvoviridae 집단에 속하며, adenovirus, herpesvirus, human papillomavirus와 같은 helper virus의 coinfection이 요구되며, cellular genotoxic stress 등에 의존하여 복제 된다(29). AAV virus는 아직까지 인간의 어떤 질병과도 연관성이 없으며 viral gene과 immune response을 일으키지 않는다. 이러한 Adeno-associated virus (AAV)의 특성을 이용하여 recombinant AAV를 유전자 전달 vector로 이용한 유전자의 특성 때문에 치료에 관심이 집중되고 있는 실정이다(30-34).

본 연구에서는 아데노 바이러스의 오염을 최소로 억제할 수 있는 triple transfection 방법으로 vector plasmid, packaging plasmid, adenovirus helper plasmid등을 사용한 cotransfection을 이용했다(35-37). 이 방법은 아데노 바이러스의 오염을 최소화하는 triple transfection 방법으로 vector plasmid, packaging plasmid, adenovirus helper plasmid를 cotransfection 시켜 cesium chloride gradient를 사용하여 rAAV의 순수 분리에 성공했다. 이런 결과를 토대로 triple transfection 방법이(38-38) 기존의 방법보다는 아데노 바이러스 오염을 최소화할 수 있으며 triple transfection 방법이 유용 할 것으로 생각해서 본 연구에서는 gradient를 사용한 순수 분리 방법(39)을 이용하여, 장래 자궁경부암 gene therapy법의 새로운 도약의 가능성을 제시했다고 사료된다.

또한 PCR 사진에서 보여진 것과 같이 Lacz는 4kb에서 벤

드가 확인 되었으며, p53은 200-300kb에서 밴드가 나타난 것으로 보아 AAVCMVp53, AAVCMVLacZ가 성공적으로 생산된 것을 알 수 있었다. 본 실험에서 얻어진 순수 AAVCMVLacZ virus를 6종류의 cell (Hela, HT3, HelaS3, Caski, C33A, SiHa)에 infection 시켜 24시간 배양한 후, cell에 infection된 사진을 촬영하여 종류별로 infection된 cell을 counting하여 각 cell line에서의 titer를 알 수 있었으며, cell의 종류에 따라 infection된 형태가 서로 달랐으며 titer도 달랐다. AAVLacZ viruses의 titer는 5-bromo-4-chloror-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) 염색 후 infection된 blue cell로 측정 하였다.

이러한 결과로부터 자궁경부암 세포주에서도 AAVCMVp53 virus stock을 유전자 치료에 적용 가능할 것으로 생각된다. 최근에는 이러한 항암 억제물질들을 자연 산물에서 찾으려는 노력이 계속되고 있는 실정으로서 또한 인간에게 강독으로 알려진 비소를 이용한 항암 효과의 결과들이 나오고 있으며 현저한 억제 능력을 가지고 있다. 또한 자연산물에서의 아가리쿠스 버섯 등에서의 항암 효과는 이미 많은 연구가 이루어지고 있다. 이러한 연구 결과로부터 필자는 해양생물에서의 강독 물질로 알려진 Saxitoxin(STX), Gyonyotoxin(GTX)을 HPLC로 분리하여 항암 효과능을 측정한 결과 65% 이상의 항암 효과가 있었다. 또 한국 진해만 부근의 적조 현상을 일으킨 플랑크톤을 배양하여 cell 개체당 항암효과를 보았는데 개체수가 많을수록 항암 억제능력이 큰 것으로 나타났으며 90% 이상의 항암 효과를 나타내었다. 이러한 결과로부터 해양생물이 자연 육고라고 불리워지고 있듯이 해양 생물의 특이 물질들이 충분히 항암, 항균, 면역에 뛰어난 물질들이 존재함을 알 수가 있었고 연구의 중요성을 시사한 좋은 예라 생각한다. 또한 자연산 버섯이 항암 능력을 가지고 있다는 것은 말할 여지가 없지만 특히 아가리쿠스 버섯은 항암 효과가 큰 것으로 보고되었다. 이러한 관점에서 저자는 티벳버섯의 항암능력을 실질적으로 측정한 결과 92% 이상의 항암 능력이 있었으며 장기간 티벳 버섯을 복용하면 종괴에 작용하여 항암 능력이 뛰어난 증명을 수가 있었다(40). 지금까지의 유전자 치료법과 자연산물에서의 항암 억제 효과는 앞으로 연구 되어야될 중요한 부분으로 나타났기에 이를 보고한다.

## REFERENCES

- Levine A. J. (1997), p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell* **88**, 323.
- Howley P.M. Scheffner M, and Munger K. (1991), Oncoproteins encoded by the cancer-associated human papillomavirus target the products of the retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes, *Gold spring Harbor Symp.* **56**, 149-155.
- Hamada K Sakaue M. Alemany R. Zhang W. W. Horio Y. Roth J. A Mitchell M. F (1996), Adenovirus-mediated transfer of HPV 16 E6/E7 antisense RNA to human cervical cancer cells. *Gyne Onco* **63**, 219.
- Graham F. L. and Van der eb A. J. (1973), A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, **52**, 456.
- Fujiwara T. Grimm E. A. Mukhopadhyay T. Cai D. W. (1993), Owen-Schaub LB and Roth JA. A retroviral wild-type p53 expression vector penetrate human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis. *Cancer Res*, **53**, 4129-4133.
- Leonard C. J. Canman C. E. and Kastan M. B. (1995), The roll of p53 in cell-cycle control and apoptosis : Implications for cancer. *Important Advances in Oncology*, **33**.
- Shimamura A and Fisher D. E. (1996), p53 in life and death. *Clin Cancer Res*, **2**, 435.
- Graham F. L. and Prevec L. (1991), Manipulation of adenovirus vectors. *Methods in molecular biology*, **7**, 109.
- Rha S. Y Kim T. S Jeong S. J. Ahn J. B. (1998), etc. Effect on malignant phenotypes of gastric cancer cell line after p53 gene transduction.. *J Koean Cancer Assoc*, **30**, 508-522.
- Heck D. V. Yee C. L. Howley P. M. Munger K. (1992), Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 4442.
- Kessiss T. D. Slebos R.J. Nelson W. G. Kastan M. B. Plunkett B. S. Han S. M. Lorincz A. T. Hedrik L. Cho K. R. (1993), Human papillomavirus16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 2988.
- Hamada K. Sakaue M. Alemany R. Zhang W. W. Horio Y. Roth J. A. (1996), Mitchell MF. Adenovirus-mediated transfer of HPV 16 E6/E7 antisense RNA to human cervical cancer cells. *Gyne Onco*, **63**, 219.
- Kim J. H. Moon Y. S. Shin D. H. Song J. J. etc. (1997), A Study of retrovirus mediated p53 gene transduction into human gastric cancer cell lines. *J Korean Cancer Asso*, **29**, 754-764.
- Diller L. Kassel J. Nelson C. E. Gryka M. A. Litwak G. Gebhardt M. Bressac B. Ozturk M. Baker S.J. Vogelstein B. and Friend S. H. (1990), p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol. Cell. Biol*, **10**, 5772-5781.
- Hamada K. Alemany R. Zhang W.W . Hittelman W. N. Lotan R. Roth J. A. Mitchell M. F. (1996), Adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene and induction of apoptosis in cervical cancer. *Cancer Res*, **56**, 3047.
- Brinton, L. A. epidemiology of cervical cancer : overview, In : N Munoz, F. Bosch, K. V. and A. Meheus(eds). (1992), *The Epidemiology of Human Papilloma Virus and Cervical Cancer* pp.3-23. Lyon, France, *IARC Science Publications*, Na119.
- Zhang W. W. Fang X.F. Mazur W. French B. A. Georges R. N. and Roth J. A. (1994), High-efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther*, **1**, 4-15.
- Cho S. D. Hwang S. J. Park H. R. Han Y. J. Ahn W. S. etc. (1999), Development of gene therapy strategy using plasmid and adenovirus in cervical cancer treatment. *Korean J. of dbstetrics and gynecology*, **42**, 2019-2027.
- Scheffner M. Munger K. Byrne J. C. and Howley P. M. (1991), The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5523-5527.
- Kim J. C. Seo S. Y. Shin B. Y. Ahn W. S etc. (1999), Growth inhibitory effect of human cervical cancer cells

- with the direct transfer of liposome complexed recombinant pRcCMVp53. *42*, 821-829.
21. El-Deiry W. S. Harper J. W. O'Connor P. M. Velculescu V. E. Canman C. E. Jackman J. Pietenpol J. A. Burrell M. Hill D. E. Wang Y. Wiman K. G. (1994), Vogelstein B. WAFI/CIPI is induced in p53-mediated G<sub>1</sub> arrest and apoptosis. *Cancer Res*, **53**, 1169-1174.
  22. Gavrieli Y. Sherman Y. and Ben-Sasson S. A. (1992), Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Bio*, **119**, 493-501.
  23. Hamada K. Alemany R. Zhang W. W. Hittelman W. N. Lotan R. Roth J. A. (1996), Adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene and induction of apoptosis in cervical cancer. *Cancer Res*, **56**, 3047.
  24. Dranoff G. E. Jaffee A. Lazenby P. Golumbek H. Levitsky K. Brose V. Jackson H. Hamada D. Pardoll and Mulligan R. C. (1993), Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3539-3543.
  25. Afione S. A. Conrad W. G. Kearns S. Chunduru R. Adams T. C. Reynolds W. B. Guggino G. R. Cutting B. Carter J. Flotte T. R. (1996), In vivo model of adeno-associated virus vector persistence and rescue. *J. Virol*, **70**, 3235-3241.
  26. Bett A. J. Haddara L. and F. L. Graham F.L. (1994), An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8802-8806.
  27. Ferrari F. K. Samulski T. and Samulski R. J. (1996), Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol*, **70**, 3227-3234.
  28. Ferrari F. K. Xiao X. D. and Samulski R. J. (1997), New developments in the generation of Ad-free, high-titer rAAV gene therapy vectors. *Nat. Med*, **3**, 1295-1297.
  29. Fisher K. J. Gao G. P. Weitzman M. D. DeMatteo R. J. Burda J. F. and Wilson J. M. (1996), Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J. Virol*, **70**, 520-532.
  30. Fisher K. J. Jooss K. J. Alston Y. Yang S. E. Haecker K. High R. Pathak S. E. and Wilson J. M. (1997), Recombinant adeno-associated virus for muscle-directed gene therapy. *Nat. Med*, **3**, 306-312.
  31. Flannery J. G. Zolotukhin S. Vaquero M. I. LaVail M. Muzyczka M. N. and Hauswirth W.W. (1997), Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6916-6921.
  32. Flotte T. B. Carter C. Conrad W. Guggino R. Reynolds B. Rosenstein G. Taylor S. and Wetzel R. (1996), A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum. Gene Ther*, **7**, 1145-1159.
  33. Kessler P. D. Podsakoff G. M. Chen X. McQuiston S. A. Colosi P. C. Matelis L. A. Kurtzman G. J. and Byrne B. J. (1996), Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14082-14087.
  34. Jooss K. Yang Y. Fisher K. J. and Wilson J. M. (1998), Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J. Virol*, **72**, 4212-4223.
  35. Koeberl D. D. Alexander I.E. Halbert C. L. Russell D. W. and Miller A. D. (1997), Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1426-1431.
  36. Li J. Samulski R.J. and Xiao X. (1997), Role of highly regulated rep gene expression in adeno-associated virus vector production. *J. Virol*, **71**, 5236-5243.
  37. Pereira D. J. McCarty D. M. and Muzyczka N. (1997), The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J. Virol*, **71**, 1079-1088.
  38. Pereira D. J. and Muzyczka N. (1997), The adeno-associated virus type 2 p40 promoter requires a proximal Sp1 interaction and a p19 CARG-like element to facilitate Rep transactivation. *J. Virol*, **71**, 4300-4309.
  39. Pereira D. J. and Muzyczka N. (1997), The cellular transcription factor SP1 and an unknown cellular protein are required to mediate Rep protein activation of the adeno-associated virus p19 promoter. *J. Virol*, **71**, 1747-1756.