

cDNA microarray를 이용한 HPV-16 E6와 연관된 유전자의 발현 분석

가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실, 연세대학교 암전이연구센터*,
세종대학교 생명과학과†
명진·라선영*·이명진·엄수종†·남궁성은·박종섭

=ABSTRACT=

Analysis of HPV-16 E6-related gene expression using cDNA microarray

Jin Myeong, B.S., Sun Young Rha, M.D.* , Myoung Jin Lee, B.S.,
Soo Jong Um, Ph.D.†, Sung Eun Namkoong, M.D., Jong Sup Park, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Catholic University Medical College

Cancer Metastasis Research Center*, Yonsei University

Department of Life Science†, Sejong University

Objective : To examine the effect of HPV-16 E6 expression on the transcription of cellular genes, we used cDNA microarray in HPV-16 E6 transfected stable cancer cell lines.

Methods : Using cDNA microarray consisting of 1,024 genes, we have performed a systematic characterization of gene expression in A549E6 human lung adenocarcinoma and RC10.1 human colon adenocarcinoma cell lines stably expressing HPV-16 E6 gene. The up-regulated and down-regulated genes were classified into the different functional categories; oncogenes, apoptosis, cell cycle, signal transduction, gene regulation, immune response, cell adhesion, protein transport, metabolism, redox control and angiogenesis.

Results : Among 1,024 known genes and ESTs (expressed sequence tags) tested, we found 27 up-regulated and 43 down-regulated genes in A549E6 (HPV-16 E6) compared to A549. The major up-regulated genes were as follows. GTPase-activating protein Rho 4, transcription factor D2, IKAROS, integrin-α 6, cadherin 11, ephrin-β 2, RAN binding protein 2, branched-chain amino transferase 2. The major down-regulated genes were as follows. K-ras 2, CDC (cell division cycle) 37, CDC16, CDC7L1, IRF3, interferon-γ-inducible protein 30, cadherin 6, desmoglein 1, desmocollin 2, endothelin 2. Also, we found 48 up-regulated and 34 down-regulated genes in RC10.1 (HPV-16 E6) compared to RKO. The major up-regulated genes were as follows. Colon cancer familial nonpolyposis type 1 (COCA 1), Bcl 2, jagged 1, MAP2K6, E2F1, ephrin receptor-β 2, ephrin-β 2, desmoglein 1, transforming growth factor-β 3. The major down-regulated genes were as follows. KIT, Rad51C, Bcl 2 antagonist killer 1, STAT 4, epidermal growth factor receptor, high mobility group protein 2, cadherin 11, cadherin 12, cadherin 3, integrin-α 1, intergrin-α 8, chromosome segregation 1-like.

Conclusion : Various expression patterns of cellular genes by HPV-16 E6 could be wholly grasped and classified into different functional groups using both cell line system stably expressed HPV-16 E6 and cDNA microarray analysis. These analysis methods must be helpful to understand multiple effects of a specific gene on cellular genes in a short period.

Key Words : Human papillomavirus, cDNA microarray, Cellular genes, HPV-16 E6

접수일 : 2002. 7. 30.
주관책임자 : 박종섭

* 본 연구는 과학기술부 중점국가연구개발사업의 생명현상 및 기능연구사업단 과제로 이루어진 것임. (KISTEP 2000-BTF-14)

인유두종 바이러스 (human papillomavirus, HPV) 감염이 주된 발생 원인으로 알려져 있는 자궁경부암은 한국 여성에서 흔한 암이며,¹ 자궁경부암의 90% 이상에서 HPV DNA가 발견되고 있다.^{2,4} 자궁경부암 발생과 HPV 와의 관계는 많은 학자들에 의해 연구되어, HPV-16과 HPV-18은 자궁경부암을 유발시킬 수 있는 생화학적 특성을 갖고 있는 고위험군 바이러스이며 특정 부분에서 발현된 E6, E7 단백질이 종양억제인자를 불활성화 시킨 결과로 암화 변형이 일어난다고 하였다.^{5,6}

자궁경부암 발생에 있어서 고위험군 HPV의 발암유전자인 E6, E7의 주요 작용기전에 대한 연구는 많이 밝혀졌으나,⁷⁻¹⁰ 아직까지 분자생물학 수준과 세포 수준에서 전반적인 발암 기전에 대해서 밝혀져야 할 내용은 매우 많다.

HPV-16 E6 단백질은 151개의 아미노산으로 구성되어 있고, 두 개의 zinc-finger domain을 갖고 있다.⁹ E6 단백질은 종양억제인자인 p53을 ubiquitin 의존성 단백질 분해경로 (ubiquitin-dependent proteolytic degradation)을 통해 불활성화 시키며, p300과 상호 작용하여 세포 내 유전자들의 전사를 조절하고, telomerase의 활성을 증가시켜 세포 수명을 늘리는 작용을 하여 감염된 세포의 환경을 변화시킨다.^{7,9,11} p53은 세포 주기 정지, 세포 자연사 관련 유전자의 발현을 조절하는 전사조절인자로서, 자궁경부암화기전에서 HPV E6에 의해서 분해되거나 또는 E6와 결합되어 전위(translocation)가 저해되는 기전을 갖는다.^{9,11} 자궁경부암의 발생과정에서 E6는 세포의 증식, 세포 자연사 저해, 유전자 전사 변화, 타 단백질과의 결합을 통해 암화를 유도한다고 알려져 있다.^{9,10} 상기한 대로 HPV E6에 의한 암화 과정은 p53을 분해하는 p53 의존적 기전과 p53 이외의 세포 내 단백질에 영향을 주는 p53 비의존적 기전이 있다.

분자생물학의 발달과 인간 유전체 사업 (human genome project)의 완성으로 많은 종류의 유전자가 밝혀져 있지만, 각각 유전자의 기능적 및 생물학적 역할에 대해서는 아직 정확히 밝혀져 있지 않다.¹² 최근 개발된 cDNA microarray 기술은 여러 가지 환경 및 서로 다른

종류의 세포에서 유전자들의 상호 발현 차이를 빠른 시간에 동시에 연구할 수 있게 하였다.^{13,14}

본 연구에서는 기존에 알려진 E6 단백질의 역할 이외에 세포 내에서의 새로운 작용을 밝히기 위하여 HPV-16 E6 발암유전자가 지속적으로 발현되는 stable cell lines 와 cDNA microarray를 이용한 high throughput screening system을 실시하여 세포 내에서 발현 양상이 변화하는 유전자들을 기능적인 측면에서 분류하고자 한다.

연구 대상 및 방법

1. 세포주 배양

HPV-16 E6의 cDNA를 neomycin marker를 가지고 있는 LXSN과 pCMVneo에 각각 cloning하여, wild-type p53이 정상적으로 발현되는 human lung adenocarcinoma cell line (A549)과 human colon adenocarcinoma cell line (RKO)에 transfection하여 HPV-16 E6 유전자가 안정적으로 표현되고 있는 A549E6와 RC10.1 cell line을 미국 Mark Groudine 박사와 Kathleen Cho 박사에게 분양받았다.^{15,16} A549, A549E6, RKO, RC10.1 cell들을 10% fetal bovine serum이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, A549E6와 RC10.1에는 지속적으로 neomycin (A.G. scientific Inc.)을 첨가하였다.

2. 역전사 중합반응 (Reverse transcription-polymerase chain reaction)

A549E6와 RC10.1 세포주 내에서 HPV-16 E6의 안정적 발현을 확인하기 위하여 각각 세포주를 배양하였고, RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Germany)을 사용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Titan™ One Tube RT-PCR system (Roche Diagnostics, Germany)을 이용하여 HPV-16 E6 specific primers로 RT-PCR을 시행하여 HPV-16 E6 유전자가 발현됨을 확인하였다 (Fig. 1). 본 실험에 사용한 primers는 Table 1과 같다.

Table 1. Oligonucleotide primers used for RT-PCR analysis

| Primer | Sequences (5' to 3') | Orientation |
|---------------|---|-------------|
| A549/A549E6-T | GGC TCG AGG CCA CCA TGT TTC AGG ACC CAC AGG | sense |
| A549/A549E6-B | GGT CAT TAA TCT GCA ACA AGA CAT ACA | antisense |
| RKO/RC10.1-T | GGC TCG AGG CCA CCA TGT TTC AGG ACC CAC AGG | sense |
| RKO/RC10.1-B | GGG CTA GCT CAT TAC AGC CTG GGT TTC TCT AC | antisense |

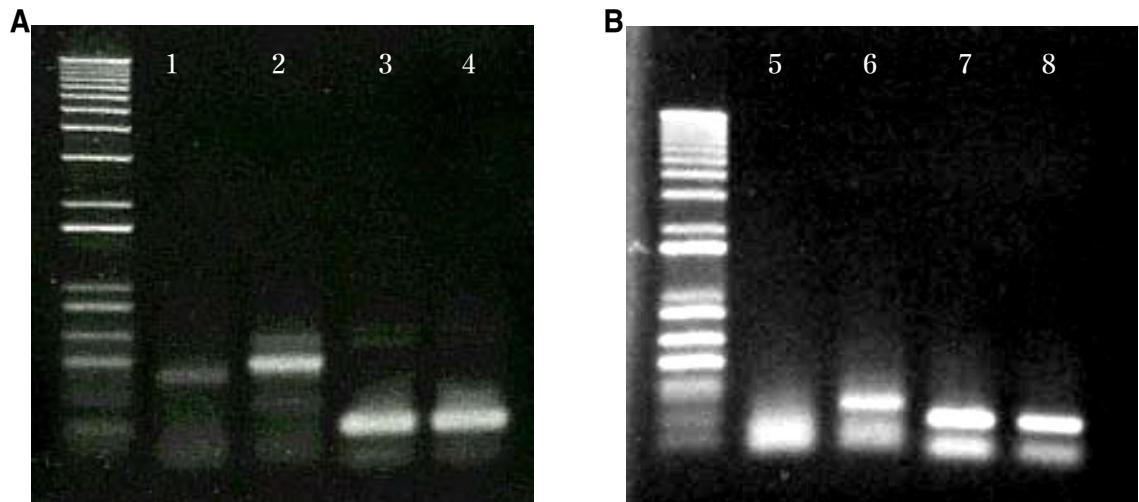


Fig. 1. RT-PCR analysis of HPV-16 E6 gene expression in stable cell lines. (A) Comparison between lung adenocarcinoma cell line A549 and HPV-16 E6 transfected lung adenocarcinoma cell line A549E6. Lane 1: HPV-16 E6 in A549, lane 2: HPV-16 E6 in A549E6, lane 3: GAPDH in A549, lane 4: GAPDH in A549E6. (B) Comparison between colon adenocarcinoma cell line RKO and HPV-16 E6 transfected colon adenocarcinoma cell line RC10.1. Lane 5: HPV-16 E6 in RKO, lane 6: HPV-16 E6 in RC10.1, lane 7: GAPDH in RKO, lane 8: GAPDH in RC10.1.

3. cDNA microarray 실험

1) cDNA microarray에 이용될 RNA 분리

HPV-16 E6 유전자가 발현되는 A549E6와 RC10.1 실험군 세포주와 A549, RKO 대조군 세포주를 배양하고, RNeasy® Midi kit (Qiagen, Germany)을 사용하여 RNA를 분리하였다. 1.2% formaldehyde agarose gel electrophoresis 와 260 nm absorbance를 측정하여 RNA 농도와 순도를 확인했다.

2) 형광 표지 cDNA의 준비

각각 시료에서 추출한 RNA ($2 \mu\text{g}$)에 oligo-dT primer ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 첨가하여 65°C 에서 10분간 annealing 반응을 실시하였다. pre-reaction mixture (5X first-strand buffer, 0.1 M DTT, unlabeled dNTPs)를 Cy3-dUTP (대조군), Cy5-dUTP (실험군)가 들어 있는 각각의 reaction tube에 Superscript II (Gibco-BRL) enzyme과 함께 넣어 역전사하여 형광 표지 cDNA를 제조하였다.

3) 교접 반응

제조된 형광 표지 cDNA를 QIAquick® PCR purification kit (Qiagen)을 이용하여 정제하고 섞은 다음 human Cot1 DNA, poly-A RNA, yeast tRNA 등과 혼합하여 교접용액을 만들었다. Microcon-30 tube (Millipore, France)에 넣고, 원심 분리한 후에 $20\times\text{SSC}$ 와 10% SDS를 첨가하였다. 100°C 에서 2분 가열하여 변성 반응을시키고, GT Hybridization Chamber™ (Genomic Tree,

Korea) well에 3×SSC를 넣고 그 위에 반응할 Human Cancer Chip 305 (Genomic Tree)를 옮려놓은 후, 표지된 DNA probe를 잘 섞어서 cover slip 바깥쪽에 대고 조심스럽게 넣었다. 뚜껑을 덮고 GT Chamber Station™ (Genomic Tree) 내에서 65°C 8-16시간 교접 반응을 실시하였다. Human Cancer Chip 305는 housekeeping gene과 plant DNA를 이용하여 internal control 실험을 수행하였다.

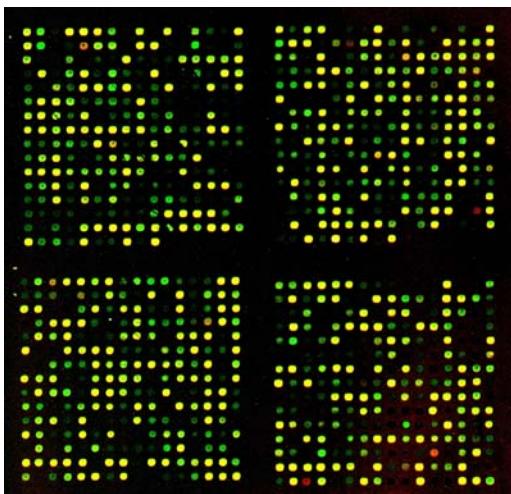
4) 세척 및 유전자 발현 측정

Chamber를 열고 array를 꺼내어서 GT Wash Rack™ (Genomic Tree)에 넣은 후, 세척 용액 I ($2\times\text{SSC}$) · II ($0.1\times\text{SSC}$, 0.1% SDS) · III ($0.1\times\text{SSC}$) · IV ($0.1\times\text{SSC}$)으로 각각의 반응 시간에 맞춰 씻어낸 후, 600 rpm에서 5분 원심 분리하여 건조시켰다. 건조된 array를 GenePix 4000B (Axon Instruments, Union, CA, USA)로 측정한 후 자료화된 유전자 발현 결과를 GenePix Pro 4.0 (Axon Instruments), NCBI Unigene과 Online Mendelian Inheritance in Man™ 등을 이용하여 기능적으로 분류하였다.

결 과

두 종류의 세포주로부터 각각 HPV-16 E6에 의한 유전자 발현 양상을 cDNA microarray로 실험한 결과 다양한 유전자 발현 양상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

A



B

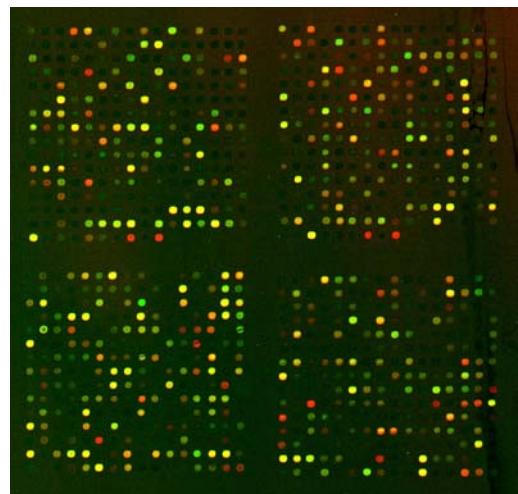


Fig. 2. The expression patterns in HPV-16 E6 stable cell lines. (A) Lung adenocarcinoma cell line A549 (Cy3) and HPV-16 E6 transfected lung adenocarcinoma cell line A549E6 (Cy5). (B) Colon adenocarcinoma cell line RKO (Cy3) and HPV-16 E6 transfected colon adenocarcinoma cell line RC10.1 (Cy5).

두 종류 세포주에서 발현 양상의 차이를 나타내는 유전자들을 기능적으로 11가지의 범주로 분류하고 차이점을 비교할 수 있었다 (Table 2-5). 두 종류의 세포주에서 동일하게 증가된 발현 양상을 보이는 유전자는 전사 인자에서 transcription factor D2 (TFD2), 신호 전달계에서 GTPase-activating protein, Rho 4 (ARHGAP4), 단백질 수

송계에서 RAN binding protein 2 (RANBP2) 대사계에서 branched-chain amino transferase 2 (BCAT)가 있었다. 동일하게 감소된 발현 양상을 보이는 유전자는 endothelin 2 (EDN2), 세포 주기계에서 inhibitor of DNA binding 2 (ID2), 신호 전달계에서 regulator of G protein signaling 4 (RGS4)가 있었다.

Table 2. Genes down-regulated in A549E6 by HPV-16 E6 gene transfection

| | |
|---------------------------|--|
| Oncogenes | ARHGEF5 (Oncogene TIM), KRAS2 |
| DNA repair / Apoptosis | CRADD (CASP2 and RIPK1 domain-containing adaptor with death domain), TP53BP1, LTB (Lymphotoxin-beta), LTBR |
| Cell cycle | CDC37 (Cell division cycle 37), CENPF (Centromeric protein F), CDC16, CDC7L1, ID2 (Inhibitor of DNA binding 2) |
| Signal transduction | NFkBIA (Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells inhibitor, alpha), PRKCL1 (protein kinase C-like 1), FLT4 (FMS-like tyrosine kinase 4), GABBR1 (GABA-B receptor 1), PAK1 (p21/CDC42/RAC-activated kinase 1), RGS4, ARHA (Ras homolog gene family, member A) |
| Gene regulation | RBBP5 (Retinoblastoma-binding protein 5) |
| Immune response | ISG20 (Interferon-stimulated gene, 20-kD), IRF3 (Interferon regulatory factor 3), TAPBP, IL7, MST1 (Macrophage stimulating 1), Interferon-gamma-inducible protein 30 |
| Adhesion | CDH6 (Cadherin 6), COL4A3, TUBG1, LAMC1 (Laminin, gamma-1), CELSR2 (Cadherin EGF LAG seven-pass G type receptor 2), Desmoglein 1, Desmocollin 2, COL18A1, CDH5, Desmocollin 1, L1CAM (L1 cell adhesion molecule) |
| Translation | EIF5, GARS (Glycyl-tRNA synthetase), PRKR (Protein kinase, Interferon-inducible double stranded RNA activated) |
| Biosynthesis / metabolism | CRAT (Cartinine acetyltransferase) |
| Redox controlling | Thioredoxin reductase 1, GSTA2 (Glutathione S-transferase, alpha-2) |
| Other proteins | Endothelin 2 |

Table 3. Genes up-regulated in A549E6 by HPV-16 E6 gene transfection

| | |
|---------------------------|---|
| Oncogenes | YES1 (v-yes-1 yamaguchi sarcoma viral oncogene), APC (Adenomatous polyposis of the colon) |
| Cell cycle | CDC10 |
| Signal transduction | EPS15 (Epidermal growth factor receptor pathway substrate-15), CLK1 (CDC-like kinase 1), Suppressor of cytokine signaling 3, ARHGAP4 (GTPase-activating protein, Rho, 4), KDR (Kinase insert domain receptor), PLAUR (Plasminogen activator receptor, urokinase-type), FKB8 |
| Gene regulation | TFDP2 (transcription factor D2), IKAROS |
| Immune response | NFATC1 (Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, 1), NFIL3 (Nuclear factor, Interleukin 3-regulated), IL18BP |
| Adhesion | ITGA6, CDH11, EFNB1, Fibrillin 1, Keratin 13 |
| Angiogenesis | PCOLN3 (Procollagen, type 3, N-endopeptidase), MMP2 |
| Protein transportation | RANBP2 (RAN binding protein 2) |
| Translation | PTBP1 (Polypyrimidine tract-binding protein 1), EEF2 (Eukaryotic translation elongation factor 2) |
| Biosynthesis / Metabolism | BCAT (Branched-chain amino transferase 2) |
| Redox controlling | GSTT1 (Glutathione S-transferase, theta-1) |
| Other proteins | SPARC (Secreted protein, acidic, cysteine-rich), BLMH (Bleomycin hydrolase) |

Table 4. Genes down-regulated in RC10.1 by HPV-16 E6 gene transfection

| | |
|---------------------------|--|
| Oncogenes | KIT, MYCN (v-myc avian myelocytomatosis viral-related, neuroblastoma-derived oncogene), MPL (Myeloproliferative leukemia virus oncogene) |
| DNA repair / Apoptosis | ERCC3, RAD51C, BAK1 (Bcl2 antagonist killer 1), Harakiri |
| Cell cycle | PLK (polo-like kinase), MKI67 (Proliferation-related ki-67 antigen), ID2 (Inhibitor of DNA binding 2) |
| Signal transduction | STAT4, RGS4 (Regulator of G protein signaling 4), MAPK11, ARHGDIB (Rho GDP-dissociation inhibitor beta), RGS3, EGFR (Epidermal growth factor receptor), TNFRSF12 (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12) |
| Gene regulation | HMG2 (High mobility group protein 2), COPEB (Core promoter element-binding protein) |
| Immune response | LIF (Leukemia-inhibitory factor), BTK (Bruton agamma-globulinemia tyrosine kinase) |
| Adhesion | CDH11 (Cadherin 11), CDH12, CDH3, COL8A1 (Collagen type 8 alpha 1), ITGA (Integrin alpha 1), ITGA8, EFNB1 (Ephrin B1) |
| Translation | PPKR (Protein kinase, Interferon-inducible double stranded RNA activated), PTBP1 (polypyrimidine tract-binding protein 1) |
| Protein transportation | CSE1L (Chromosome segregation 1-like) |
| Biosynthesis / Metabolism | CTSL (Cathepsin L), GAPD (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) |
| Redox controlling | AKR1C2 (Aldo-keto reductase family, member 2) |
| Other proteins | EDN2 (Endothelin 2) |

Table 5. Genes up-regulated in RC10.1 by HPV-16 E6 gene transfection

| | |
|----------------------------|---|
| Oncogenes | BRAF, PKD (Polycystic kidney disease 1), COCA1 (Colon cancer familial nonpolyposis, type 1), ELK1, Bcl2 |
| DNA repair / Apoptosis | DDB2 (DNA-damage binding protein 2) |
| Cell cycle | CHAF1A (Chromatin assembly factor 1 subunit A), STK12 (Serine/Threonine protein kinase 12), CCND2 (cyclin D2), E2F5 |
| Signal transduction | JAG1 (Jagged 1), ARHGAP4 (GTPase-activating protein, Rho, 4), TRAF6 (TNF-receptor associated factor 6), ILK (Integrin linked kinase), MAP2K6, EPS15 (Epidermal growth factor receptor pathway substrate-15) TNFRSF1B (Tumor necrosis factor receptor subfamily, member, 1B), TNFRSF1A |
| Gene regulation | TFDP2 (transcription factor D2), RB1, NSEP1 (Nuclease-sensitive element-binding protein 1), E2F1 |
| Immune response | IL10RB (Interleukin 10 receptor, beta), IL1A, IL11 |
| Adhesion | Vitronectin, ITGB3, Tubulin alpha 2, LAMC1 (Laminin, gamma-1), TBCC (Tubulin specific chaperone C), EPHB2 (Ephrin receptor EphB2), COL16A1 (Collagen type 16 alpha 1), EFNB2, Desmoglein 1 |
| Cell growth / Angiogenesis | TGFB3, CYR61 (Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61), MMP1, TEK (Tek tyrosine kinase, endothelial), TIMP2, TIAM1 (T cell lymphoma invasion and metastasis 1) |
| Protein transportation | PSCD2 (Pleckstrin homology, Sec7, and Coiled coil domains protein 2), RANBP2 (RAN binding protein 2) |
| Biosynthesis / Metabolism | CRAT (Cartinine acetyltransferase), LDHA (Lactate dehydrogenase-A), PPBP (Pro-platelet basic protein), BCAT (Branched-chain amino transferase 2) |
| Redox controlling | GSTP1, GSR (Glutathione reductase) |

두 종류 세포에서 모두 신호 전달계와 세포-세포 신호 전달 인자에서 많은 유전자들의 발현 변화를 볼 수 있었다. 신호 전달계에서 tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, GTPase 관련 신호전달 유전자들이, cell adhesion molecule로는 cadherin, ephrin receptor family, integrin의 변화를 관찰하였다. 세포 주기계에서는 cell division cycle (CDC) 관련 유전자들이 중점적으로 변화 하였으며, 발암유전자에서 K-ras 2, KIT 등은 감소된 유전자 발현을 보인 반면, ELK 2, Bcl 2, COCA 1 유전자는 증가된 발현 양상을 보였다. 면역 반응계에서는 interleukin과 interferon 관련 유전자들이 감소된 발현 양상을 보였다. 대사계와 산화·환원 조절인자에서는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase와 branched-chain amino transferase 2, glutathione reductase는 증가된 반면, glutathione S-transferase α, aldo-keto reductase는 감소된 양상이 관찰되었다.

고 칠

현재까지 알려진 암화 과정은 다발적인 요인에 의해 다양한 단계를 거치면서 발생된다고 알려져 있다.^{17,18} 본 연구진은 근래에 새롭게 개발된 cDNA microarray 기술

을 바탕으로 HPV-16 E6 발암 단백질의 세포내 발현에 따른 유전자의 변화를 암유전자, 세포 자연사 관련 유전자, 세포 주기 관련 유전자, 신호 전달계 관련 유전자, 전사 조절인자, cell adhesion molecule, 면역 관련 유전자, 단백질 수송 관련 유전자, 대사, 산화·환원관련 및 암전이 관련 유전자로 분류하여 분석하였다.

전사 조절인자로서 동일하게 증가된 발현 양상을 보인 transcription factor DP2 (TFDP2)는 E2F의 dimerization partner로서 밝혀졌는데,²⁰ E2F1과 기능적 이종결합체를 형성하여, 세포주기 S기의 progression에 필요한 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.²¹ RC10.1 세포주에서는 E2F1의 발현도 증가되었다. TFDP2와 E2F1의 발현 증가는 세포 주기를 S기에서 활성화시키는 유전자들을 작동하여 세포 증식을 자극하는 암화 과정에 기여할 것으로 예상할 수 있다.

단백질 수송에 관여하는 RAN binding protein 2는 nuclear pore complex에 위치하면서, nuclear import에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.²² 또한, SUMO1 (Small Ubiquitin-related Modifier 1) E3-like activity를 갖고 있어서 E2 enzyme Ubc9으로부터 SUMO1을 transfer할 수 있다고 보고되었다.²³ Nuclear import와 sumoylation이 연결되어 있다면, 핵 내로 유입되려는 세포 내 단백질들의 nuclear import에 HPV-16 E6 유전자가 영향을 줄 가능성

이 있으며, 다양한 유전자들의 전사 조절 양상을 변화시키는데 작용할 것이라고 생각할 수 있었다.

E6에 의해 발현이 감소된 cell adhesion molecules 가운데 cell surface glycoprotein인 cadherin은 Ca^{2+} -의존적 세포-세포 연접과 관련되어 있으며,²⁴ 악성 종양의 침윤 및 전이와 연관되어 있다.²⁵ Desmocollins와 desmogleins의 두 가지 family가 존재하며,^{26,27} intercellular junction desmosome에서 발견된다.²⁸ HPV-16 E6에 의한 세포 내 cadherin의 발현 감소는 세포-세포 연접에 의한 세포 유지 작용에 대한 저해 효과로 연관지어 생각할 수 있다.

HPV E6에 의해서 전사가 조절된다고 알려진 유전자들로서 hTERT, c-fos, c-jun, EGFR은 발현이 증가하며,²⁹⁻³² transforming growth factor β 2, c-Ha-ras는 발현이 감소된다고 보고된 바 있다.^{30,33} 상기 유전자들에 대한 발현 양상을 본 실험 결과와 비교하였더니 RC10.1 세포주에서 EGFR은 감소된 발현 양상을 TGF β 3는 증가된 발현 양상을 보이는 상이한 결과를 보였다.

최근, HPV에 의해서 interferon-inducible genes, stat-1, interferon에 반응하는 유전자 표현이 감소하며 세포 종식 관련 유전자와 NF- κ B에 반응하는 유전자들의 발현이 증가된다는 연구 결과가 보고된 바 있다.³⁴ 본 연구에서는 interferon-stimulated gene, 20-KD (ISG20), interferon regulatory factor-3 (IRF-3), interferon- γ -inducible protein 30, interferon-inducible stranded RNA activated protein kinase (PPKR) 유전자들의 발현이 감소되는 유사한 결과를 관찰할 수 있었다. IRF3의 경우, E6와 결합하는 단백질로 밝혀진 바 있다. 본 연구진은 interferon regulatory factor-1 (IRF-1)이 HPV E7 단백질과 결합함을 발견하여, HPV-16/18 E7 암유발 단백질의 기능을 억제하는 종양 억제 인자로서 IRF-1의 가능성을 탐색하고, 분자 생물학적으로 HPV E7에 의하여 IRF-1을 통한 pRb 비의존적 기전을 새롭게 밝힌 바 있다.³⁵ 종합적으로, HPV 감염·암화 기전에 interferon 관련 유전자들에 의한 발암 억제 기전이 작용하고 있음을 연구 결과를 통해 예상할 수 있었다.

신호 전달계에서 증가된 발현을 보이는 tumor necrosis factor receptor (TNFR) family는 TNF에 의한 신호를 TNF receptor-associated factor (TRAF)를 통하여 NF- κ B를 활성화하여 cytokine, cell adhesion molecules, immunoreceptors, transcription factors 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.³⁶

GTPase-activating protein Rho 4 (ARHGAP4)는 SH3 domain과 GAP homologous region을 포함하고 있으며 원형 질 막 아래 세포 질 지역에 위치하여 small GTP-binding proteins를 조절하는 신호 전달 단백질이다.³⁷ HPV-16 E6 유전자에 의한 ARHGAP4의 과발현은 세포 외부로부터 오는 신호에 대한 세포의 반응 양상을 변화

시켜 세포 내부로의 신호 전달을 증폭하여 HPV에 의한 암화 기전을 촉진시킬 것으로 보여진다.

감소된 발현 양상을 보인 cell division cycle 유전자들은 대부분 G1/S 진행에 관련된 유전자들로서 cyclin-dependent kinase regulation에 관여하는 것으로 보여지며, HPV-16 E6 유전자에 의한 발현 감소에 대해서는 연구해보아야 할 것이다.

두 종류의 세포주에서 공통적으로 감소된 발현 양상을 보이는 endothelin 2는 혈관 수축 능력이 높은 단백질로서,³⁸ E6의 작동에서는 암 전이와 연관될 가능성이 있는 E6의 역할을 규명할 연구가 필요하다고 생각한다.

HPV E6 유전자의 발현만으로는 primary human foreskin keratinocyte (HFK)를 immortalization할 수 없으며 E7과 함께 발현되어지면 가능하다는 연구 결과는,⁹ HPV 감염에 의한 자궁경부 암화기전 과정에서 E6와 E7의 상호 작용이 있음을 증명하였다. 따라서, E6 유전자 발현에 의한 영향만을 관찰한 본 연구 결과로는 인유두종 바이러스의 감염에 따른 암화 기전을 생리학적으로 해석하기에 한계가 있었다. 또한, 본 실험에서 사용된 세포주가 adenocarcinoma cell line에 HPV-16 E6 유전자를 전이하여 제조한 stable cell line이므로, cDNA microarray 실험 결과를 acute phase에서 E6 유전자만의 영향으로 보기 힘들었고, 범위와 양상이 복잡·다양하여 해석하기 어려웠다. 빈번하게 유발되는 두 종류의 암에서 기인한 lung adenocarcinoma cell line과 colon adenocarcinoma cell line을 사용함으로 서로 다른 발암기전에서 작용되는 유전자들과 고위험군 HPV E6와의 상관관계를 규명하려 하였으나, 유전자 발현 양상의 차이가 조직특이성에 기인한 것으로 생각할 수 있으므로 직접적인 비교·분석은 불가능하였다. 따라서, 상기 나열된 문제점을 해결하기 위해 HPV-16 E6 inducible cell line을 제작하고 있다. 위의 여러 가지 문제점에도 불구하고 현재까지 자궁경부 암을 모델로 high throughput screening system을 적용한 연구 발표가 적었고, 본 연구의 결과가 기존에 HPV-16 E6에 의해 조절된다고 밝혀진 유전자들과 비교하여 유사한 발현 양상을 보였으며, HPV-16 E6에 의한 세포 내 전반적인 유전자 발현 양상을 관찰했다는데 그 의의를 두었다.

특정 질환에 대한 분석 방법이 과거에는 질환 특이적 단일 유전자의 탐색 및 기능분석에 국한되었다고 하면, postgenome 시대의 현재에는 인간 유전체 사업의 분자생물학적 발전에 힘입어 다양한 유전자들에 대한 탐색 및 기능을 대규모·고속으로 분석할 수 있게 되었다. cDNA microarray를 이용하여 HPV-16 E6에 의한 세포 내 다양한 유전자들의 발현 조절 양상을 기능적으로 분류함으로써 HPV-16 E6의 새로운 기능을 탐색하고, 자궁경부암 발암 기전에 관련된 유전자들의 새로운 기능을 규명하

며, 유전자들의 상호작용에 대한 기전을 분석할 수 있는 기초 자료로 활용될 수 있을 것이며 총괄적인 새로운 시각을 제공하리라고 기대한다.

- 참고문헌 -

1. 한국인 암등록 조사자료 분석보고서. 대한민국 보건복지부, 1997.
2. Gissmann L, Moshart M, Durst M, Ikenberg H, Wagner D, zur Hausen H. Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J Invest Dermatol* 1984; 83: 26-8.
3. de Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989; 63: 4898-903.
4. Lorincz AT, Reid R, Jensen AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: Relative risk association of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 328-37.
5. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The HPV-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 234: 934-7.
6. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 protein with p53. *Science* 1990; 248: 76-9.
7. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. E6 encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1991; 63: 1129-36.
8. zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res* 1989; 49: 4677-81.
9. McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, Mcanee DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Path* 2001; 82: 15-33.
10. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Res* 2000; 92: 690-8.
11. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999; 187: 112-26.
12. Aaronsen JS, Eckman B, Blevis RA, Borkowski JA, Myerson J, Imran S, Elliston KO. Toward the development of a gene index to the human genome: an assessment of the nature of high-throughput EST sequence data. *Genome Res* 1996; 6: 829-45.
13. Shalon D, Smith SJ, Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 1996; 6: 639-45.
14. Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 10614-9.
15. Kenneth JR, Linda WW, William D, Denise AG, Tiep Le, Glenn CR, James AB, Jack WS, Mark G. Preferential radiosensitization of G1 checkpoint-deficient cells by methylxanthines. *Int J Rad Oncol Biophys* 1996; 36: 1099-106.
16. Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, Lorincz AT, Hedrick L, Cho KR. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 3988-92.
17. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
18. Knudson AG. Two genetic hits(more or less) to cancer. *Nature Rev* 2001; 1: 157-62.
19. Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 2150-5.
20. Zhang Y, Chellappan SP. Cloning and characterization of human DP2, a novel dimerization partner of E2F. *Oncogene* 1995; 10: 2085-93.
21. Zhang Y, Venkataj VS, Fischer SG, Warburton D, Chellappan SP. Genomic cloning and chromosomal assignment of the E2F dimerization partner TEDP gene family. *Genomics* 1997; 39: 95-8.
22. Yokoyama N, Hayashi N, Seki T, Pante N, Ohba T, Nishii K, Kuma K, Hayashida T, Miyata T, Abei U, Fukui M, Nishimoto T. A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature* 1995; 376: 184-8.
23. Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, Melchior F. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 2002; 108: 109-20.
24. Tanihara H, Sano K, Heimark RL, St. John T, Suzuki S. Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin. *Cell Adhes Commun* 1994; 2: 15-26.
25. Kremmidiotis G, Baker E, Crawford J, Eyrn HJ, Nahmias J, Callen DF. Localization of human cadherin genes to chromosome regions exhibiting cancer-related loss of heterozygosity. *Genomics* 1998; 49: 467-71.
26. Greenwood MD, Marsden MD, Cowley CME, Sahota VK, Buxton RS. Exon-intron organization of the human type 2 desmocollin gene(DSC2): desmocollin gene structure is closer to 'classical' cadherins than to desmogleins. *Genomics* 1997; 44: 330-5.
27. Buxton RS, Cowin P, Franke WW, Garrod DR, Green KJ, King IA, Koch PJ, Magee AI, Rees DA, Stanley JR, Steinberg MS. Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J Cell Biol* 1993; 121: 481-3.
28. Arremann J, Spurr NK, Wheeler GN, Parker AE, Buxton RS. Chromosomal assignment of the human genes coding for the major proteins of the desmosome junction, desmoglein DSG(DSG), desmocollins DSC II/III(DSC), desmoplakins DPL II(DSP) and plakoglobin DPL III(JUP). *Genomics* 1991; 10: 640-5.
29. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* 2001; 75: 4467-72.
30. Fogel S, Riou G. The early HPV16 proteins can regulate mRNA levels of cell cycle genes in human cervical carcinoma cells by p53-independent mechanisms. *Virology* 1998; 244: 97-107.
31. Sizemore N, Choo CK, Eckert RL, Rorke EA. Transcriptional regulation of the EGF receptor promoter by HPV16 and retinoic acid in human ectocervical epithelial cells. *Exp Cell Res* 1998; 244: 349-56.
32. Hu G, Liu W, Mendelsohn J, Ellis LM, Radinsky R, Andreeff M, Deisseroth AB. Expression of epidermal growth factor receptor and human papillomavirus E6/E7 proteins in cervical carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1271-6.
33. Nees M, Geoghegan JM, Munson P, Prabhu V, Liu Y, Androphy E, Woodworth CD. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes. *Cancer Res* 2000; 60: 4289-98.
34. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 2001; 75: 4283-96.
35. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* 2000; 275: 6764-9.
36. Uwe Senftleben, Michael Karin. The IKK/NF-κB pathway. *Crit Care Med* 2002; 30: S18-26.
37. Demura M, Takeda Y, Yoneda T, Furukawa K, Usukura M, Itoh Y, Mabuchi H. Two novel types of contiguous gene deletion of the AVPR2 and ARHGAP4 genes in unrelated Japanese kindreds with nephrogenic diabetes insipidus. *Hum Mutat* 2002; 19: 23-9.
38. Bloch KD, Hong CC, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2. *Genomics* 1991; 10: 236-42.

=국문초록=

목적 : 이 연구는 자궁경부암의 주요 발암 원인 인자로 알려진 HPV-16 E6의 발현이 세포내 유전자들의 전사조절에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 시행되었다.

연구 방법 : HPV-16 E6를 안정적으로 발현하는 A549E6와 RC10.1 세포주를 실험군으로 사용하여 cDNA microarray 실험을 시행하였다.

결과 : A549E6 세포주에서 HPV-16 E6의 세포내 발현으로 증가된 발현양상을 보인 주요 유전자들로는 GTPase-activating protein Rho 4, transcription factor D2, IKAROS, integrin- α 6, cadherin 11, ephrin- β 2, RAN binding protein 2, branched-chain amino transferase 2 등이 있었으며, 감소된 발현양상을 보인 주요 유전자들로는 K-ras 2, CDC (cell division cycle) 37, CDC16, CDC7L1, IRF3, interferon- γ -inducible protein 30, cadherin 6, desmoglein 1, desmocollin 2, endothelin 2 등이 있었다. RC10.1 세포주에서 증가된 발현양상을 보인 주요 유전자들로는 colon cancer familial nonpolyposis type 1 (COCA 1), Bcl 2, jagged 1, MAP2K6, E2F1, ephrin receptor- β 2, ephrin- β 2, desmoglein 1, transforming growth factor- β 3 등이 있었으며, 감소된 발현양상을 보인 주요유전자들은 KIT, Rad51C, Bcl 2 antagonist killer 1, STAT 4, epidermal growth factor receptor, high mobility group protein 2, cadherin 11, cadherin 12, cadherin 3, integrin- α 1, intergrin- α 8, chromosome segregation 1-like 등이 있었다.

결론 : HPV-16 E6를 안정적으로 발현하는 세포주 시스템과 cDNA microarray 실험을 이용하여 HPV-16 E6 유전자에 의한 세포내 유전자들의 발현 양상을 기능적으로 분류할 수 있었다. 이러한 분석 방법은, 특정 유전자의 세포내 유전자들에 대한 다양한 영향을 단기간 내에 분석할 수 있는데 도움이 되리라 생각된다.

중심단어 : 인유두종바이러스, cDNA microarray, 세포내 유전자, HPV-16 E6