

## 아데노비루스 5형 초기발현유전자영역(E1B)에서의 선택적잘라잇기에 대한 연구

문광철, 한경애, 김인철

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《의학과학부문에서는 심장혈관계통질병과 암성질병을 비롯한 병걸린률과 사망률이 높은 질병을 막으며 고려의학을 과학화하고 고려의학과 신의학을 옹계 배합하며 공해를 미리막으며 의약품과 의료기구의 가지수를 늘이고 그 질을 높이기 위한 연구사업에 힘을 넣으면서 비루스학과 유전의학을 비롯한 기초의학을 발전시키기 위한 연구사업을 전망성있게 하여야 하겠습니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 81페이지)

비루스학과 같은 기초의학을 발전시키는것은 사람을 가장 귀중히 여기는 우리 나라 사회주의제도의 본성적요구에 맞게 인민들의 건강을 보호증진시키는데서 중요한 자리를 차지한다. 우리는 사람들속에서 여러가지 발병의 원인으로 되고 암을 비롯한 불치의 질병치료를 위한 수단으로서도 연구가치가 있는 아데노비루스의 선택적잘라잇기에 대한 연구를 하였다.

아데노비루스의 초기유전자발현영역인 E1B는 그 배열내에 2개의 잘라잇기제공체(splice donor: SD; SD2, SD3)와 3개의 잘라잇기접수체(splice acceptor: SA; SA1, SA2, SA3)들을 가지고있다.[1] 이러한 여러가지 SD와 SA들의 호상작용결과에 이 영역에서는 구조와 기능이 서로 다른 여러가지 단백질들이 합성되고있다.

최근 이 영역에서 새로운 SD1이 발견되였는데 이 SD1은 E1B영역의 모든 SA들과 호상작용한다. SA3과의 호상작용에 의해 생겨나는 전사물(pF)은 3'-말단에 아데노비루스표면단백질 pIX을 열린읽기틀로서 포함하고있다.[2] 이것은 아데노비루스표면단백질 pIX가 pF의 한 부분으로 혹은 개별적단백질로서 아데노비루스감염의 초기단계에 발현될수 있다는 것을 보여준다.

우리는 아데노비루스표면단백질 pIX의 발현과 새로운 SD의 역할과의 호상관계를 밝혀내고 아데노비루스초기유전자발현영역(E1B)에서 일어나는 모든 잘라잇기과정들의 발현양상을 연구하였다.

### 재료 및 방법

#### 1) 재료

플라즈미드 세포내단백질발현을 위한 플라즈미드운반체인 p3XFLAG-CMVTM-14(p3X), 그것으로부터 유도된 pIX발현운반체들인 p3X-IX와 p3X-F들을 리용하였다. 또한 아데노비루스재조합을 위한 플라즈미드로서 pShuttle-RA(Km<sup>r</sup>)와 pTG3602(Km<sup>r</sup>)를 리용하였다.

균주 플라즈미드의 다량증폭을 위하여 *Escherichia coli* Top10을 리용하였다.

또한 재조합반응을 위해 *Escherichia coli* BJ5183을 리용[3]하였다.

세포계열 사람의 자궁암세포인 헬라세포계열, 911세포계열을 리용하였다.

프라이머배열 E1B영역의 잘라내기과정을 연구하기 위한 프라이머배열은 표 1, 2와 같다.

표 1. SD와 SA가 변이된 비루스생성을 위한 프라이머배열

변이부위	구분	방향성	배열
SD1	원본배열	정방향	GAAGAGCTTTTGAAATCCTGTGGTGAGCTGTTTGATTCTTTGAATC
	변이배열	정방향	GAAGAGCTTTTGAAATC <u>A</u> TG <u>C</u> GGC <u>G</u> A <u>A</u> CTGTTTGATTCTTTGAATC
		역방향	GATTCAAAGAATCAAACAGT <u>T</u> TC <u>G</u> CCG <u>C</u> ATGATTTCAAAAGCTCTTC
SD3	원본배열	정방향	GAAGATACAGATTGAGGTACTGAAATGTGTGGGC
	변이배열	정방향	GAAGATACAGATTGAG <u>AA</u> ACTGAAATGTGTGGGC
		역방향	GCCACACATTTTCAGT <u>T</u> TCTCAATCTGTATCTTC
SA3	원본배열	정방향	GTTTTGTATCTGTTTTGCAGCAGCCGCCGCCGCATG
	변이배열	정방향	GTTTTGTATCTGTTTT <u>A</u> CA <u>A</u> CA <u>A</u> CCGCCGCCGCCATG
		역방향	CATGGCGGCGGCGGT <u>T</u> GT <u>T</u> GT <u>T</u> AAAACAGATACAAAAC

표에서 밑줄 및 강조체로 표시한것이 변이된 염기임

표 2. E1B영역의 잘라내기과정들의 발현양상검사를 위한 정량PCR프라이머배열

잘라내기 결과물	방향성	배열
SD1-SA1	정방향	GTAACCTGCTGGAACAGAGC
	역방향	CCCCCTCCACAGGATTTTC
SD1-SA2	정방향	GTAACCTGCTGGAACAGAGC
	역방향	CTCTCGGGCACAGGATTTTC
SD1-SA3	정방향	GTAACCTGCTGGAACAGAGC
	역방향	GGCGGCTGCACAGGATTTTC
SD2-SA1	정방향	GAGGAGCAGCAGCAGCAG
	역방향	CCCCCTCCTGTACAACATTC
SD2-SA2	정방향	GAGGAGCAGCAGCAGCAG
	역방향	GCTCTCGGGCTGTACAACATTC
SD2-SA3	정방향	GAGGAGCAGCAGCAGCAG
	역방향	GGCGGCTGCTGTACAACATTC
SD3-SA3	정방향	CGGTAAACATATTAGGAACCAG
	역방향	GGCGGCTGCTCAATCTGTATC

## 2) 연구방법

아데노비루스재조합 아데노비루스의 재조합은 표 1에 있는 프라이머를 리용하여 pShuttle-RA 플라스미드에 점변이를 일으킨 다음 그것을 플라스미드 pTG3602와 함께 *Escherichia coli* BJ5183에 형질전환시켜 목적하는 변이가 정확히 재조합된 균주들을 항생제내성과 배렬결정을 통하여 선발하는 방법으로 진행하였다. 재조합된 비루스들에서 잘라내기과정이 억제되는가를 표 2에 있는 프라이머를 리용하여 검사한 결과 SD1이 변이된 비루스에서는 목적한 잘라내기과정이 억제되었으나 SD3과 SA3이 변이된 비루스들은 목적하는 변이가 정확히 도입되었음에도 불구하고 해당한 잘라내기과정이 억제되지 않았으므로 다음실험에서는 SD1이 변이된 비루스만을 리용하였다.

비루스의 립자개수측정 분리된 비루스의 핵산량을 측정하는 방식으로 하였다.

먼저 분리된 비루스에 RIPA완충액을 작용시켜 비루스캡시드를 분해한 다음 용액속에 들어있는 핵산의 농도를 핵산농측정장치(《Nanodrop ND1000》)를 리용하여 측정하고 그에 기초하여 비루스의 립자개수를 환산하였다.

RNA분리 세포시료로부터 RNA의 분리는 트리졸(Trizol<sup>®</sup>)용액을 리용하여 진행하였다.

우선 세포배양한 샤페로부터 배양액을 제거하고 린산완충액으로 1회 세척한다. 다음 분홍색빛을 띠는 1mL의 트리졸용액을 매 샤페에 넣어 세포를 파괴하고 그 용액을 새 에펜도프관에 넣는다. 매 시험관에 0.2mL의 클로로포름을 넣고 잘 흔들어준 다음 10min동안 원심분리한다. 상청액을 새로운 시험관에 넣고 같은 체적의 이소프로판올로 처리한 다음 방온도에서 15min동안 방치한다. 다시 원심분리하여 상청을 버리고 3배 체적의 70% 에타놀(4℃)을 넣고 세척한다. 세척이 끝나면 시험관을 상온에서 10min간 말린 다음 50  $\mu$ L의 증류수를 넣고 시료를 용해시킨다.

cDNA합성 우연프라이머를 리용하여 분리한 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 효소는 역전사효소(《SuperScript II》)를 리용하였다. 0.5g의 RNA시료를 주형으로 하였으며 반응체적은 20  $\mu$ L로 하였다.

정량PCR 합성된 cDNA와 표 2에 서술된 프라이머들을 리용하여 정량PCR를 진행하였다. 형광시약으로서는 《SYBR Green》를 리용하였다.

비루스복제실험 각이한 농도의 p3X-IX, p3X-F운반체들을 100만개의 헬라세포에 형질도입한 다음 6h동안 탄산가스배양기에서 배양한다. 다음 SD1이 변이된 아데노비루스를 감염시키고 12h동안 배양한다. 배양이 끝나면 배양액을 제거하고 메티오닌과 시스테인이 결핍된 배지를 넣고 2h동안 배양한다. 다음 배양액을 제거하고 세포가 들어있는 매 샤페에 3  $\mu$ L의 <sup>35</sup>S-아미노산용액을 넣는다. 이때 매 샤페에 들어가는 방사선량은 50  $\mu$ Ci 정도 되도록 한다. 다음 4h동안 세포를 배양한다. 다음 RIPA완충액을 리용하여 세포단백질을 분리하고 그 농도를 잰 다음 아데노바이러스 5형캡시드단백질에 대한 항체를 리용하여 웨스턴잡종화를 진행한다. 매 단백질띠에서 방출되는 방사선량을 읽기전용장치를 통하여 검출한다. 얻어진 방사선량의 크기에 기초하여 비루스의 복제정도를 판정한다.

## 결과 및 논의

### 1) 재조합된 비루스들의 활성검사

아데노바이러스 E1B영역의 SD와 SA들중에서 SD1, SD3과 SA3이 변이된 아데노비루스들을 분리하고 그것들의 립자개수와 비루스활성을 검사한 결과는 표 3과 같다.

새로 만들어진 비루스들은 야생형비루스와 그 활성에 있어서 큰 차이가 나타나지 않았다. 변이된 SD와 SA가 참가하는 잘라잇기과정들이 억제되었는가를 PCR를 통하여 검사한 결과 SD1이 변이된 비루스에서는 SD1

표 3. 재조합된 비루스들의 립자개수와 그 활성

구분	비루스립자개수	활성
	/(개·mL <sup>-1</sup> )	/(PFU·mL <sup>-1</sup> )
SD1변이비루스	3.34×10 <sup>11</sup>	2.194×10 <sup>9</sup>
SD3변이비루스	5.30×10 <sup>11</sup>	2.198×10 <sup>9</sup>
SA3변이비루스	3.06×10 <sup>11</sup>	1.748×10 <sup>9</sup>

이 참가하는 잘라잇기과정들이 억제되었으나 SD3과 SA3이 변이된 비루스들에서는 SD3과 SA3이 참가하는 잘라잇기과정들이 억제되지 않았다.

이로부터 SD3과 SA3이 참가하는 잘라잇기과정은 SD와 SA배열의 변이상태에 관계없이 잘라잇기과정이 일어나도록 하는 어떠한 알려지지 않은 반응물립새를 가지고있는것으로 보인다.

## 2) E1B영역의 각이한 잘라잇기과정들의 발현양상

아데노비루스 E1B영역내에 존재하는 여러가지 잘라잇기과정들의 발현수준을 검사한 결과는 그림 1과 같다.

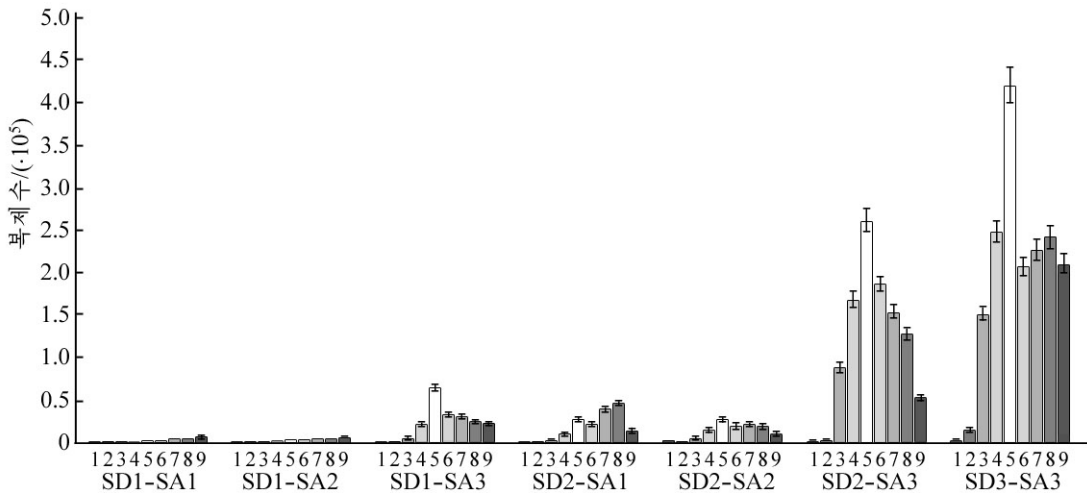


그림 1. 비루스감염후 시간에 따르는 잘라잇기과정들의 발현수준

1-9는 비루스감염후 시간이 각각 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54h일 때; E1B영역에 존재하는 7가지의 잘라잇기과정들의 발현양상을 비루스감염후 일정한 간격으로 측정된 결과를 보여준다.

매 잘라잇기과정의 복제수는 표품DNA를 리용하여 C<sub>T</sub>값을 결정한데 기초하여 측정하였다.

그림 1에서 보는바와 같이 SA3과 관련된 잘라잇기과정들의 발현수준이 다른 SA와 관련된 잘라잇기과정들과 대비해볼 때 가장 높았다.

새로 발견된 SD1이 참가하는 잘라잇기과정들중에서는 SD1과 SA3사이에 일어나는 잘라잇기과정의 발현수준이 제일 높았다.

이로부터 SA3이 E1B영역의 잘라잇기과정들중에서 중요한 역할을 담당하고있다는것을 알수 있다. 이 접수체는 SA3관련잘라잇기과정들을 통하여 E1B전사물을 성숙시키고 또한 그것의 세포질에로의 수송을 돕는 작용을 하는것으로 추정된다.

## 3) 비루스복제실험결과

세포에로의 pIX, pF발현플라즈미드의 형질도입이 야생형비루스와 SD1이 변이된 비루스의 복제에 어떤 영향을 미치는가를 검사하였다.

결과 pIX, pF발현플라즈미드들의 형질도입은 비루스의 복제를 돕는 효과를 나타낸다는것을 알수 있다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 p3X-IX발현플라즈미드는 야생형비루스와 변이된 비루스에 대하여 다같이 복제수준을 증가시키는 효과를 나타냈다.

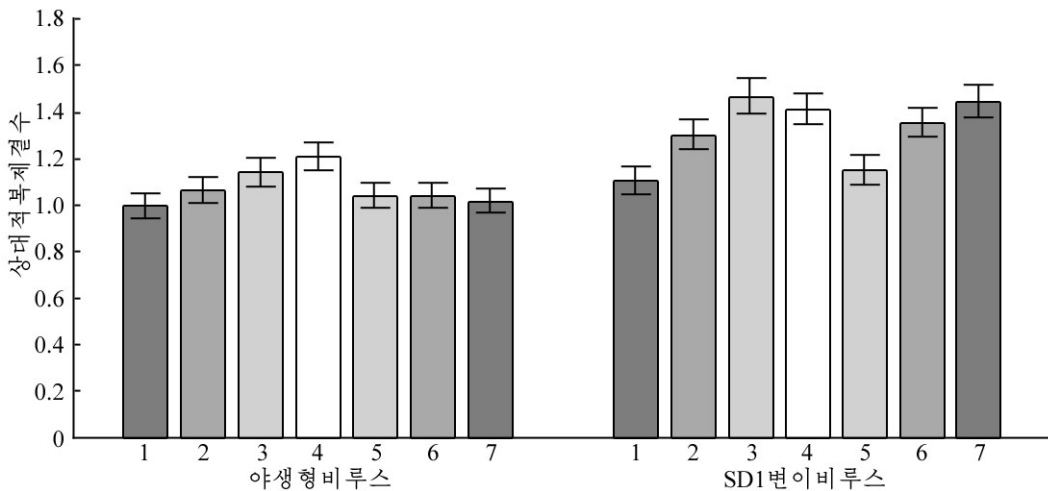


그림 2. 변이된 비루스의 복제실험결과

1-대조, 2-pIX 1X, 3-pIX 5X, 4-pIX 25X, 5-pF 1X, 6-pF 5X, 7-pF 25X;

대조는 p3X플라즈미드를 형질도입한 비루스의 복제수준을 보여주며 1X, 5X,

25X는 형질도입된 플라즈미드의 상대적인 양을 나타낸다. 1X는 5ng의

플라즈미드DNA에 해당된다.

그러나 p3X-F발현플라즈미드는 야생형비루스에 대하여서는 거의나 복제수준증가효과를 나타내지 못했지만 변이비루스에 대해서는 뚜렷한 복제수준증가효과를 나타냈다. p3X-IX발현플라즈미드를 형질도입하였을 때 SD1이 변이된 비루스는 야생형비루스에 비하여 최대 1.5배 정도의 높은 복제수준을 나타냈다.

이로부터 pIX단백질이 아데노바이러스복제에 영향을 준다는것과 새로운 SD가 pIX의 발현에 관여할 가능성이 높다는것을 알수 있다.

## 맺 는 말

1) 새로 발견된 SD1은 아데노바이러스표면단백질 pIX의 발현에 참가할 가능성이 높다. SD1에 의하여 생겨나는 전사물인 pF를 주형으로 하여 아데노바이러스표면단백질인 pIX가 발현될수 있다.

2) 아데노바이러스 E1B영역의 잘라잇기들중에서 그 발현수준이 제일 높은것은 SD3과 SA3사이에 일어나는 잘라잇기이다.

## 참 고 문 헌

- [1] S. Timo et al.; J. Virol., **81**, 95, 2007.
- [2] D. L. Black; Annu. Rev. Biochem., **72**, 291, 2003.
- [3] M. C. Wahl et al.; Cell, **136**, 701, 2009.

## **The Alternative Splicing in the Human Adenovirus Serotype 5 E1B Region**

*Mun Kwang Chol, Han Kyong Ae and Kim In Chol*

Adenovirus serotype 5 E1B region has hitherto been known for having two splice donors (SD2, SD3) and three splice acceptors (SA1, SA2, SA3), which are involved in alternative splicing events. These splicing events are related to the expression of several proteins (19k, 55k, 156R, 93R and 84R and other proteins) in that region.

Within the region, a new splice donor (SD1) was recently discovered. It is located in the upstream region of SD2 and SD3 and interacts with all the three splice acceptors. Remarkably, the splice event that happens between SD1 and SA3 results in the formation of a fusion protein (pF) of a small E1B fragment and pIX, keeping pIX as an open reading frame in 3' end. This provides the possibility for pIX to be expressed as a part of pF or to be expressed by itself via leaky scanning of the starting codon at the early time during adenovirus infection.

In order to determine the functional significance of the new splice donor, we produced 3 mutant adenoviruses and analysed their activity. The new splice donor appears to contribute to the pIX expression and virus replication.

Key words: adenovirus, alternative splicing, E1B, pIX