

Human Herpes Virus 6(HHV-6)의 변형유전자의 특성과 위치*

창녕 왕생병원 일반외과** 및 계명대학교 의과대학 해부학교실

최동호** · 이인환 · 김홍태 · 최인장 · 장성의

서 론

Herpesviridae계에서는 herpes simplex types-1과 -2(HSV-1과 HSV-2), varicella zoster(VZV), Epstein Barr virus(EBV), human cytomegalovirus (HCMV), human B lymphotropic virus (HBLV) 및, human herpesvirus type 등이 여기에 속한다. 1981년 virus 명명의 국제회의(International Committee on the Taxonomy of Viruses)에서 herpes virus를 아라비아 숫자로 표기하게 되어 HBLV를 HHV-6로 칭하게 되었다(Roizman et al., 1981). 분리된 HHV-6는 효소에 의한 절단양상과 세포배양에서 성장양상으로 두 subgroup(A와 B)으로 나누어진다(Schurmer et al., 1991). Subgroup A strain(strain GS와 U 1102)은 임파구 증식증과 유관하며 subgroup B strain(strain Z-29)은 일반인에서 높은 빈도로 검출되며 exanthem subitum의 인자로 알려져 있다(Black et al., 1974; Yamanishi et al., 1988). 이중 subgroup A strain은 AIDS의 진행의 보조인자(co-factor)로 여겨지며 HHV-6와 HIV-1을 CD₄⁺ 사람 T세포에 같이 감염시켰을 경우 HIV-1 virus의 표현을 조장시키며 세포괴사를 유발시킨다(Lusso et al., 1989). 암에 관해서는 HIV 바이러스 양성환자에서 HHV-6가 HIV LTR을 transactivation 시킴으로서 AIDS 증상을 가속시키며 AIDS에 관련된 Kaposi's sarcoma의 중요한 요인으로 생각되고 있다(Ablash et al., 1988; Brady and Khoury, 1983; Giraldo et al., 1972).

그러나 암 발현에서는 이 바이러스 역할이 분명치 않다. 암화과정에서 역할을 규명하기 위하여 *in vitro* model에서 gene transfer technique으로 의심되는 유전자를 세포내에 도입시켜 포유동물세포를 변형(transformation) 시킬 수 있는 DNA 분절(fragment)

gment)을 찾아내고 이 분절을 특성화(characterization) 함으로써 특이 기전(specific mechanism)을 찾을 수 있을 것으로 생각된다(Tazzaque, 1990).

이를 위하여 HHV-6 strain 중 AIDS 진행의 보조인자로 여겨지는 U1102에서 Sall 효소로 절단하여 변형능력(transforming activity)이 높은 Sall-L 부위에서의 변형분절(transforming fragment)의 특정 위치를 규명하는데 목적이 있다. 또한 HIV(Human Immunodeficiency Virus)와 높은 빈도에서 동시감염이 일어나므로 HIV-LTR 혹은 Tat 유전자를 동시에 transfection으로 세포내 도입하여 상호간의 transactivation 관계를 찾고 상호 상승효과의 유무를 확인하고자 한다(Roizman et al., 1981). 또 한편으로는 single clone된 HHV-6의 subfragment를 암원인 진단의 목적으로 생검된 암조직 DNA에 probe로 사용할 수 있을것이며 나아가서 그 DNA의 ORF(Open Reading Frame)로 표현되는 단백질의 항체를 만들어 면역 반응으로 진단등에 이용하고자 본 연구를 시행하게 되었다.

재료 및 방법

1. 조직배양

A. NIH 3T3 세포: P1 또는 P2의 NIH 3T3 세포를 DMEM의 배지(5% BCS, 100 units/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin, 2mM L-glutamine 포함)로 37°C, 6.5% CO₂의 배양기에서 배양한다. 계대배양(subculture)은 60~70% confluence에서 1:6으로 하고 1주일에 두번 배지를 교환하였다.

B. CV-1 세포: A와 같은 배지에 10% BCS를 첨가하였다.

C. HUVE(Human Umbilical Vein Endothelium) 세포: 1.5% gelatin으로 coating 된 flask에 RPMI 1640배지(15% FBS, endothelial cell supplement 포함)

* 이 논문은 1993년도 동산의료원 특수과제 연구비, 조사 연구비 및 계명대학교 을종 연구비로 이루어졌음

로 배양하였다.

2. Plasmid DNA 분리

Large scale plasmid DNA 분리는 alkaline lysis 방법으로 CsCl gradient 원심분리(55,000 rpm, 16시간)를 두번 병행하는 double banded 방법으로 하여 순수 분리(purification) 하였다(Chen and Okayama, 1987).

3. 포유동물 세포내 유전자 도입

A. Calcium Phosphate법: 0.5M CaCl₂ 용액 0.5ml의 plasmid DNA를 10μg/0.5ml H₂O 되게하여 polypropylene tube에서 섞어 HNP 용액(70mM NaH₂PO₄; Hepes NaCl=1:39, Hepes=50mM, NaCl=280mM) 1ml를 air bubbling 하면서 점적하여 미세한 침전을 얻었다. 총량 2ml이 된 것을 30분간 무균 장치내(hood)에 방치한 후 NIH 3T3 배양 dish에 고르게 뿌렸다. 4시간후 PBS로 씻어내고 25% glycerol을 2분간 처리한 후 배양하고 다음날 배지를 바꾼다.

B. Lipofection법: Polystyrene tube에서 plasmid DNA 10μg/50μl dH₂O와 lipofectin 30μg/50μl dH₂O를 섞어 10~15분간 두어서 liposome[DNA를 둘러싸길 기다린다. 배양세포를(HUVE) Opti-MEM으로 수세하고 10cm dish에 5ml Opti-MEM 을 남긴후 상기 섞은 용액을 고르게 떨어뜨려 4시간 배양하고 20% FBS가 든 배지를 5ml 첨가하고 다음날 배양액을 교환하였다.

C. Electroporation법: CV-1 세포 1×10⁷개를 PBS로 수세하고 0.25ml에 다시 부유시켜 20μg DNA (10μg의 indicator DNA와 10μg의 HHV-6 subclone plasmid DNA)를 섞고 BRL제 cell-porator electroporation기에 200V/800μF로 전류를 흐르게 한 후 얼음에 10분간 방치한 후 배양하였다.

4. Focal Transformation Assay

A. Focus의 확인: transfection 24 시간후 1:6 으로 계대배양하여 3~4일 마다 배양액 교환을 하며 위상차 현미경에서 다중형성의 세포군집을 조사하였다.

B. Focus의 분리: 단층의 세포를 PBS로 두 번 수세하고 grease로 coating된 cloning cylinder(지름 8mm, 길이 10mm)로 focus를 둘러싸서 trypsin 100μl로 처리, 1분 뒤에 pipetting하여 focus 세포를 6-well dish에 분주하였다.

5. Cloning in Soft Agar

Focus에서 얻은 세포주 혹은 항생제 내성 세포주(NIH 3T3는 hygromycin 125μg/ml, CV-1은 50μg/ml, HUVE는 10μg/ml로 selection)의 dish면에 붙지않고 (anchorage-independent) 자랄수 있는지를 확인하기 위하여 soft agar plate에서 배양하였다(Bouck and DiMayorca, 1979). 45°C, 0.9% agar base에 10% FBS, 20% 2×DMEM 섞어 5cm dish에 5ml씩 분주하여 hood하에서 1시간동안 굳혀 24시간 배양하고 0.36% top agar(20% FBS, 5% 2×DMEM 포함) 2ml에 1×10⁵개의 세포를 섞어 base agar 위에 부어 굳힌 후 배양하였다(37°C, 6.5% CO₂). 2주마다 10% BCS가 든 DMEM을 1.0ml씩 첨가하였다.

6. Cell Aggregation

Soft agar에서와 같은 base agar를 만들고 top agar 대신에 배지 2ml에 1×10⁵개의 세포를 분주하고 1주일에 두 번 상층이 마르지 않을 정도의 배지(0.5ml)를 첨가하였다.

7. Tumorigenesis

Inoculation of Cell Lines: focus에서 cloning한 세포를 nude mice에 주사하여 tumorigenicity를 검사하였다(Clanton et al., 1983). Dish에서 trypsinization으로 세포를 분리하고 PBS로 수세한 후 serum이 없는 DMEM에 10⁷개/ml 농도로 세포를 넣어 나이가 4주된 nude mice에 등의 피하와 대퇴근육에 1ml 씩 주사하였다.

8. Southern Analysis

A. DNA의 Transfer: 효소처리한 DNA를 0.8% agarose gel에 전기영동하여 305 nm 파장의 자외선 transilluminator로 확인하고 gel을 0.2N HCl액에 15분간 수세한 후 물로 두번 세척하고 0.2N NaOH /0.6M NaCl로 30분간 denature 하였다. 이후 다시 물로 씻은후 5×SSC(pH 7.0)으로 20분간 처리한 후 물에 담구었다가 5×SSC에 15분간 담궈두었던 nylon membrane(Genescreen, Dupont)을 gel 위에 두고 Watman 3MM paper 및 흡수지로 파라미드로 만들어 모세관 현상을 이용한 방법으로 DNA를 nylon membrane에 옮겼다(Southern, 1975). 이 membrane를 자외선(254nm)에 5분간 노출시킨후 80°C

에서 1시간 baking 하였다.

B. DNA의 Hybridization: Genescreen filter를 43°C의 prehybridization 용액(50% deionized formamide, 5×SSPE(0.15M sodium chloride, 0.01M sodium phosphate, 1mM EDTA), 5×Denhardt's 용액(0.02% Ficoll, polyvinyl-pyrrolidone, bovine serum albumin), 10% dextran sulfate, 1% SDS, 100 μ g/ml tRNA)에 5시간 prehybridization 한 후 이 용액에 radio-labeled된 DNA를 5×10^6 cpm/ml 양을 denature한 후 첨가하고 43°C에서 16시간 전탕한 후 2×SSC (0.1% SDS 포함)에 상온으로 20분간, 0.1% SDS가 든 0.1×SSC에 상온으로 20분간, 마지막으로 0.1% SDS가 든 0.1×SSC에서 43°C에서 20분간 세척하였다. 이 filter를 plastic wrap으로 싸서 -70°C에서 Kodak XAR-2 필름에 intensifying screen과 함께 노출하였다.

9. CAT Assay

A. 단백질 추출: transfection 48시간 후 배지를 제거하고 calcium이 없는 PBS로 수세한 후 1ml의 harvesting buffer(0.04M Tris-Cl(pH 7.4), 1mM EDTA, 0.15M NaCl)를 상온에서 2분간 작용시킨 후 scraper로 세포를 긁어모으고 원침하여 100 μ l의 0.25M Tris-Cl(pH 7.8)에 세포 냉여리를 풀고 sonicator를 40% duty cycle에 조정하고 15초씩 2회 sonication하여 세포를 부수었다. 이것을 원침하여 세포찌꺼기를 버리고 상충부를 모아 sample로 사용하였다.

B. Assay: sample을 protein assay하여 1 μ g의 protein에 0.125 μ Ci 14 C-chloramphenicol, 2mM acetyl co-enzyme A에 0.25M Tris-Cl(pH 7.5)로 100 μ l를 만든 후 37°C에서 3시간 반응시키고 0.25M Tris-Cl 용액으로 작용을 정지시켰다. 다시 500 μ l의 ethyl acetate로 섞어 vortex로 전탕하고 원침하여 상충부의 organic phase를 모아서 진공에서 말린 후 20 μ l ethyl acetate를 가하여 다시 녹였다. 이를 silica gel plate에 점적하여 말리고 이것을 chloroform:methanol(95:5) 용액으로 포화된 tank에서 thin layer chromatography(TLC)한다. 용액의 진행이 2/3을 넘어서면 들어내어 말리고 Kodak XAR-2 필름으로 상온에서 16시간 노출시킨다. 필름의 dot 양태에 따라 원 TLC를 오려서 Beckman scintillation counter로 acetylation의 비율을 측정하였다.

결 과

1. Sal 1-L Fragment의 Subclone: HHV-6 strain U1102 DNA를 효소처리 하여 분절을 얻었다. 이중 transforming activity가 의심되는 L, C, H, I, Q를 plasmid Blue Script(이하 pBS)에 삽입하여 NIH 3T3 세포에 transfection하고 focal assay하여 표 1과 같은 결과를 얻었다.

Table 1. Transforming activity of Sal 1-L in NIH 3T3 cells

| Plasmid | Insert | Foci |
|--------------|---------|------|
| pBS 1022 | Sal 1-L | 120 |
| pBS 1023 | Sal 1-C | 36 |
| pBS 1021 | Sal 1-H | 28 |
| pBS 1019 | Sal 1-I | 20 |
| pBS 1018 | Sal 1-Q | 28 |
| pBlue Script | | 24 |

즉 pBS만 transfection 한 대조군에서 관찰된 24개의 focus수에 비해서 Sal 1-L fragment에서 120개의 focus를 얻었으며 이것을 cylinder cloning 방법으로 cloning하여 세포주 Sal 1-L-1, Sal 1-L-2, Sal 1-L-3로 만들어 soft agar에서 anchorage independent growth를 확인하고 이것을 nude mice에 주사하여 표 2를 얻었다.

Table 2. Phenotypic properties of Sal 1-L induced cell lines.

| Cell line | Anchorage | | Tumorigenicity | |
|-----------|-------------|--------|----------------|---------|
| | Independent | Growth | Incidence | Latency |
| Sal 1-L-1 | + | | 6/6 | 8 days |
| Sal 1-L-2 | + | | 6/6 | 8 days |
| Sal 1-L-3 | + | | 6/6 | 13 days |
| NIH 3T3 | - | | 0/6 | |

즉 focal assay에서 얻은 세포주는 모두 soft agar에서 성장하였으며 tumorigenesis는 모든 경우에 발견되었으며 빠른 경우 8일, 늦은 경우 13일에 종괴를 확인할 수 있었다. 즉 tumorigenicity가 있다고 확신이 되는 Sal 1-L fragment를 DNA sequencing(미국 NCI의 Zvi Berman과 Robert C. Gallo의 data)에 의한 ORF(Open Reading Frame) 7개를 찾고 이

DNA를 다시 XbaI, BamHI, Hind III, Nhe, BstX1로 잘라 그림 2와 같이 Sal 1-L-SB(1.0kb), Sal 1-L-SH(1.9kb), Sal 1-L-BN(1.5kb), Sal 1-L-BS(3.0kb), Sal 1-L-HS(2.1kb), Sal 1-L-NS(1.6kb)로 6개의 subclone을 얻었다. 이것을 pBS에 삽입시켜 plasmid DNA를 만들었다(그림 1).

2. Subclone에 대한 Focal Assay: NIH 3T3(P1), CV-1(P1), HUVE(P1) 세포에 subclone 6개와 Sal 1-L fragment 전체 positive control로는 방광암에서 추출한 ras 암유전자인 T24 DNA를 세포내 도입하였다(그림 2). 전 실험에서 NIH 3T3의 경우는 calcium phosphate법이 적절하였고 CV-1인 경우 electroporation, HUVE 인 경우 lipofection법으로 DNA를 세포내 도입하였다. 그림 3과 같은 focus를 Sal 1-L과 Sal 1-L-SH을 NIH 3T3, CV-1에 transfection 했을 경우 얻을 수 있었다. NIH 3T3 세포를 confluence 될 때까지 배양하면 그림 3A 같고 cell aggregation과 soft agar에서 약간의 background가 보인다. 그림 3B는 Sal 1-L-fragment를 세포내 도입한 것이며 cell aggregation(그림 3E)과 soft agar(그림 3H)에서 성장한 세포군집(colony)을 볼 수 있었다. Sal 1-L-SH fragment를 NIH 3T3 세포에 도입한 경우 그 배양양태(그림 3C), cell aggregation(그림 3F), soft agar(그림 3I)의 성장 모양이 Sal 1-L의 경우와 유사하였다. 이를 도식화하여 요약하면 그림 4와 같다. CV-1세포에서도 대동 소이한 결과(그림 5)를 얻었으며 HUVE 세포의 경우 6개월

배양으로도 transformed focus를 얻을 수 없었다.

3. Sal 1-L-SH의 tumorigenicity: CV-1과 NIH 3T3에 이 DNA를 transfection하여 focus 형성 및 nude mice의 tumor 형성등이 Sal 1-L fragment와 유사한 성격을 얻었다. Tumor 조직에서 DNA를 추출하여 Sal I 과 Hind III로 자르고 0.8% gel에 전기 영동하여 Southern analysis 하여 transfer한 DNA를 확인할 수 있었다.

4. CAT assay: tumorigenicity가 있다고 판단되는 Sal 1-L-SH DNA가 HIV virus의 표현에 영향을 미치는지 알기 위하여 NIH 3T3 세포에 CAT assay 하였다. 이 세포의 경우 CMV IE promoter를 가진 pCHC 6 CAT에서 acetylation이 더 잘 일어나서(표 3) pCHC 6 CAT DNA와 cotransfection하였다.

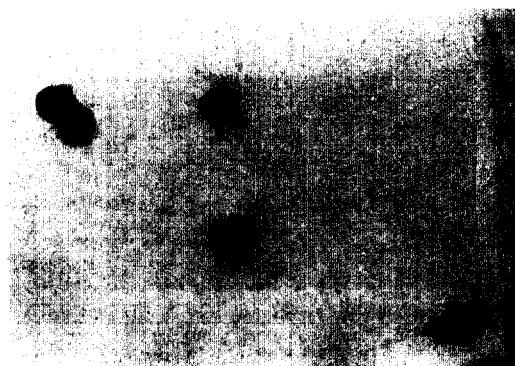


Fig. 2. Transformed phenotype of NIH 3T3 cells induced by T24. (X 100)

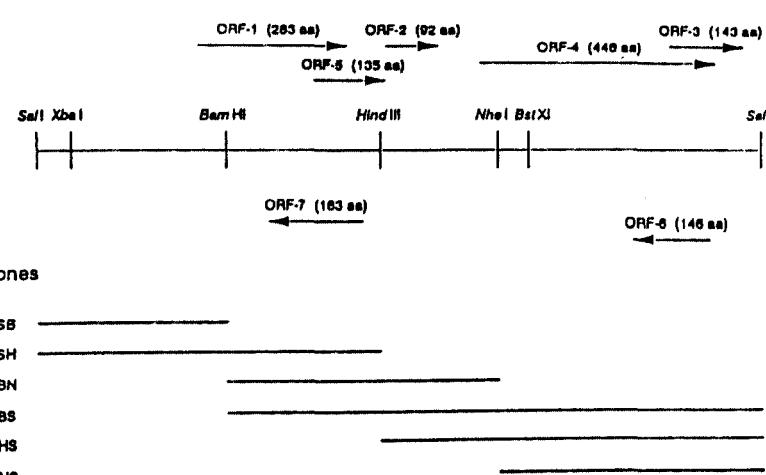


Fig. 1. Subclones of Sal 1-L. Schematic representation of the Sal 1-L subclones and the restriction enzymes used to generate these subfragments.

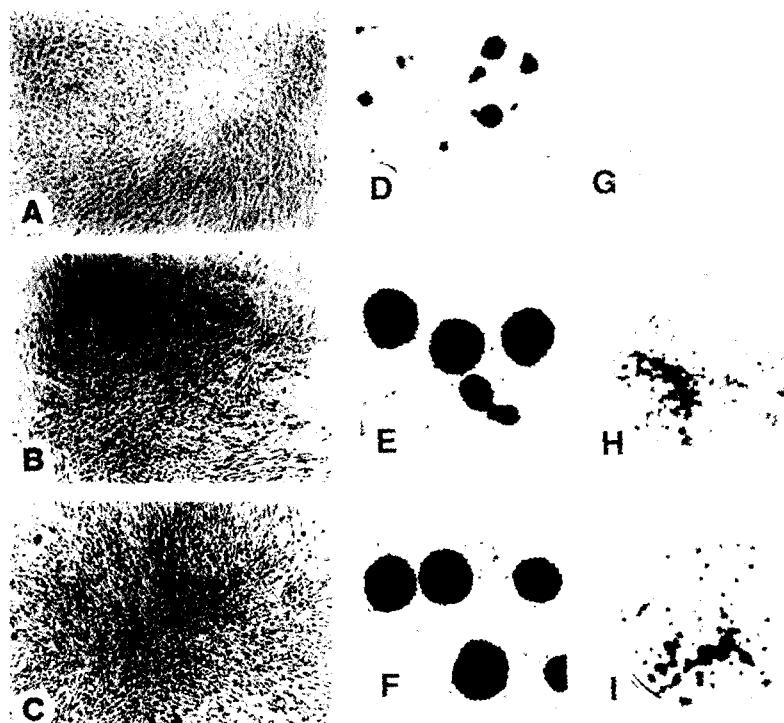


Fig. 3. Phenotype of NIH 3T3 cells on culture dish(A, B, C), cell aggregation (D, E, F) and soft agar (G, H, I).

A, D and G: control, B, E and H: Sal 1-L transfection, C, F and I: Sal 1-L-SH transfection

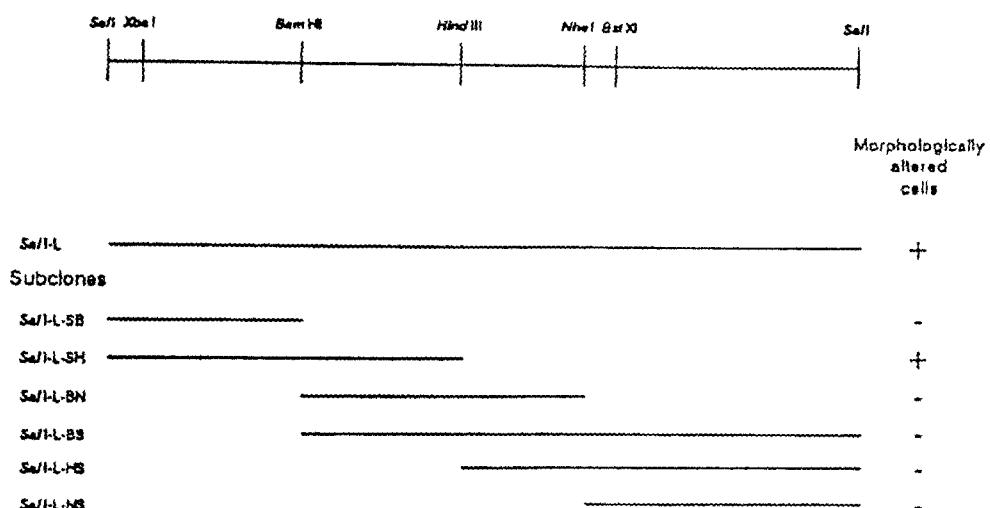


Fig. 4. Transforming activity of Sal 1-L-SH

그림 6에서와 같이 lane 1을 Jurkat 세포주(T-임파구)에 HIV-LTR pCHC6, HIV-TAT을 같이 넣어서 positive control로 사용하였으며 lane 2, 3, 4에는 NIH 3T3, CV-1 HUVE 세포에 HIV TAT 대신에

Sal 1-L-SH를 transfection 하였으며 lane 5는 negative control 이었다. 즉 Sal 1-L-SH fragment는 세 가지 세포에서 공히 HIV-LTR을 transactivation하였다.

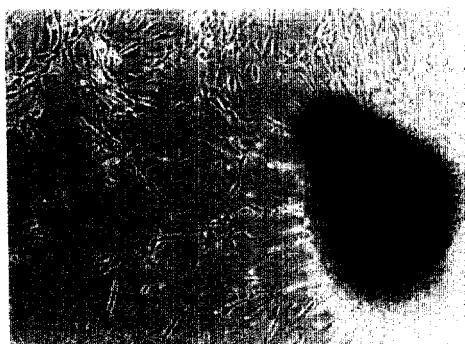


Fig. 5. Transformed phenotype of CV-1 cells induced by Sal 1-L-SH fragment.(X 200)

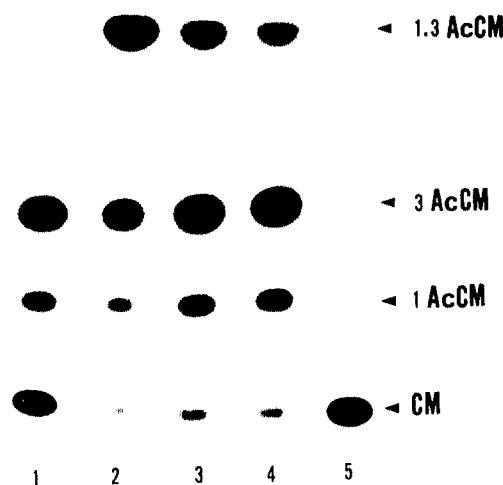


Fig. 6. Autoradiogram of silica gel.
CM: chloramphenicol
AcCM: acetylated chloramphenicol

Table 3. Comparison of promoter strength between the SV 40 early and the CMV IE promoters

| Plasmid | Promoter | % Acetylation |
|------------|-------------|---------------|
| pSV 2 CAT | SV 40 early | 13% |
| pCHC 6 CAT | CMV IE | 40% |

* NIH 3T3 cells were transfected with 15 μ g plasmid DNA and cell extracts prepared after 48 hour.

고찰

Sal 1-L의 subclone을 NIH 3T3 와 CV-1에 세포 내 도입한 (Sal 1-L-SH fragment에서) focal assay

에서 focus 형성과 soft agar clone 과 cell aggregation에서 anchorage와 관계없이 성장함을 관찰하였다. 또 nude mice의 tumorigenesis에서 transforming activity가 확인되었다. Sal 1-L-SH subclone에는 3개의 ORF 즉, ORF-1, 5, 7이 존재한다. 그러나 그림 1과 같이 ORF 5와 ORF 7을 포함한 Sal 1-L-BN 및 Sal 1-L-BS에서 transforming activity를 보이지 않아 ORF-1의 283aa 가 transformation 과정에서 transforming peptide로서의 역할을 할 것으로 여겨진다(Jones et al., 1986).

Viral transforming peptide로는 가장 작은 44개 아미노산으로 이루어진 bovine papilloma virus (Schiller et al., 1986)의 것으로부터 HCMV(Galloway et al., 1986), SV 40 antigen(Schmiege and Simmons, 1988), adenovirus E1A protein(Whyte et al., 1988), E1B(Sarnow et al., 1982), HPV E7 protein (Dyson et al., 1989), E6 protein(Scheffner et al., 1990), EBNA-1, 2(Wang et al., 1987), hepadnavirus X(Twu and Schloemer, 1987) 등이 알려져 있다. 이중 44aa의 경우 세포막에서의 이온 이동에 관여하고, SV 40 T antigen은 암 억제유전자인 Rb유전자와 p53 유전자가 상호작용하며, E1A는 Rb와 결합하고, E1B의 경우 p53 단백질과 결합하는 것으로 알려져 있다. 즉 E1A일 경우 primary cell의 immortalization에 관여하고 E1B일 경우 영구세포 주의 변형에 관여한다(Sarnow et al., 1982). 또 E7 단백질은 Rb 단백질과 결합하며(Dyson et al., 1989), E6 단백질은 p53 단백질과 결합하여 p53 단백질을 파괴한다(Werness et al., 1990). 즉, ORF-1 (283aa)의 경우 transformation에 있어서의 세포단백질과 상호관계, 혹은 암억제 인자와의 상호관계 및 역할을 규명하여야 하겠다.

Lawrence et al.(1990)의 보고에 의하면 HHV-6는 HCMV와 많은 homology를 가진다고 하였으나 이 영역은 HHV-6 strain U1102 Sal 1-Q에 해당되며(Smiley et al., 1988) 그림 4에서와 같이 이 fragment는 transforming activity를 보이지 않고 있어 HCMV의 transforming peptide인 79aa와 별 연관성을 발견할 수 없었다. HHV-6가 HIV-1에 영향을 주어 AIDS의 진행에 관여하는가를 알기 위하여 시행한 HIV-LTR CAT과 transforming activity가 있는 Sal 1-L, Sal 1-L-SH을 cotransfection한 후 시행한 CAT assay(그림 6)에서 Sal 1-L과 Sal 1-L-SH fragment가 공히 HIV-LTR을 transactivation

시켜 (Beckman scintillation counter로 15배 증폭한 acetylation) HHV-6는 AIDS 진행에 가속시키는 쪽으로 영향을 줄 것으로 생각된다. Sal 1-L fragment와 다른 HHV-6 DNA fragment의 HIV-1 LTR transactivation의 보고(Geng et al., 1992)에서는 활성도는 낮으나 얼마간의 general transactivation 등을 보였다. 그러나 CV-1 세포에서는 이런 transactivation이 전혀 보이지 않아 HHV-6 Sal 1-L 중 특히 Sal 1-L-SH fragment가 HIV-1 감염의 co-factor로서 직접적 영향을 미치는 것으로 생각된다.

한편 AIDS와 동반해서 빈번히 발생되는 Kaposi 씨 육종의 경우, 많은 학자들 보고로는 (Breakstead et al., 1985; Dorfman and Path, 1984), 혈관 내피세포(vascular endothelial cell)에서 기인한 것으로 알려져 있다. 또 AIDS와 연관된 Kaposi 씨 육종에서는 HIV-1 바이러스와 HHV-6 바이러스의 particle이 동시에 발견된다고 알려져 있다(Lusso et al., 1989). 이 학설에 의거하여 HHV-6에서의 NIH 3T3 와 CV-1 세포에서 확인된 transforming fragment (Sal 1-L, Sal 1-L-SH)를 단독 혹은 HIV-LTR과 동반하여 내피세포에 gene transfer하였으나 transformation 혹은 immortalization을 얻지 못하여 Kaposi 씨 육종의 형성은 HIV-LTR과 HHV-6 외의 다른 인자가 필요하거나 이 종양이 혈관내피에서 기인하지 않는 것으로 여겨진다.

유전자를 도입하는 방법론에 있어서, 물리적인 방법과 생물학적 vector를 사용하는 방법으로 나눌 수 있겠다. 물리적인 방법중에는 transfection, liposome을 이용한 lipofection, microinjection, electroporation, recombination 등이 특정유전자를 세포내 도입함에 효과적이다 하겠다. 그러나 그 효능이 $10^3 \sim 10^7$ 개의 세포당 1개의 세포가 DNA를 받아들이며 그 량도 일정치 않다. 또한 계대배양(subculture)을 함께 따라 도입된 DNA의 소실율도 일정치 않다. 이를 개선하기 위해서 세포마다 최고의 transfer율을 나타내는 방법을 사용하여야 하겠으나 한계가 있다. 결국 DNA 혹은 RNA virus를 vector로 개발함이 효능의 극대화 및 영구적 도입방법으로 생각된다.

요 약

HIV-1 virus와 동반적 감염을 일으키고 AIDS의 진행에 관여하며 다른 AIDS와 관련된 종양형성에 관여할 것으로 의심되는 HHV-6 변형유전자의 위치 및

특성을 알기위하여 변형유전자를 포함한다고 의심되는 DNA분절(Sal 1-L)을 XbaI, BamHI, Hind III, NheI, BstX1의 효소를 절단하여 6가지의 subclone을 얻고 이것을 NIH 3T3 세포, CV-1 세포, HUVE 세포에 도입하여 focal assay, anchorage independency test, nude mice에서 tumorigenicity를 조사하고 HIV-LTR과의 상호관계를 조사한 결과를 요약하면

HHV-6의 Sal 1-L의 subclone인 Sal 1-L-SH(1.9 kb)를 NIH 3T3, CV-1 및 HUVE에 transfection 하였을 경우 NIH 3T3 및 CV-1 세포배양에서 focus 형성을 보았으며 이것을 cylinder를 이용한 focus cloning을 하고 hygromycin으로 plasmid DNA가 transfection만 된 세포들을 모아(selection) soft agar assay 및 cell aggregation으로 anchorage independency를 확인하였다. Nude mice에 접종하여 종양 형성을 관찰하였으며 이 종양 세포에서 DNA를 추출하여 Southern blot hybridization으로 insert DNA(Sal 1-L-SH)에 기인한 종양임을 알았다. 이로써 HHV-6의 Sal 1-L-SH fragment내에 변형유전자가 포함되어 있음이 확인되었다. 그러나 사람의 혈관 내피세포(HUVE)에서는 focus등의 형태학적 변화가 보이지 않았으며 또 HIV-TAT 및 HIV-LTR 등과의 복합적 세포내 도입에서도 세포변형은 얻을수가 없어 Kaposi 씨 육종이 혈관내피세포에서 기인하지 않거나 이 종양형성에 HHV-6 외의 다른 인자가 관여할 것으로 생각된다.

한편 HIV-LTR CAT과 Sal 1-L-SH 유전자를 같이 transfection하여 CAT assay를 하였을 경우 HIV-LTR의 표현 즉 acetylation이 15배나 항진되어 HHV-6의 Sal 1-L-SH fragment AIDS의 진행을 transactivation으로 촉진시킬 것으로 짐작된다. 더욱이 DNA sequence에 의해 이 유전자가 3개의 ORF를 가지고 있으며 이중 ORF-1에 해당되는 283aa의 polypeptide가 transactivation을 유발시키는 중심단백질로 추정된다. 이에 따라 이 단백질에 대한 항체로 종양의 HHV-6 관련유무를 판단할 수 있을것으로 생각되며 이 단백질을 직접 세포내 도입하여 세포의 변형 등을 더 추구하여야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Ablashi DV, Josephs SF, Buchbinder A, et al:
Human B lymphotropic virus(human herpesvirus-6). *J Virol Methods* 1988; 21: 29-48.

- Black FL, Hierholzer WJ, Pinheiro F: Evidence for persistence of infectious agents in isolated human populations. *Am J Epidemiol* 1974; 100: 200.
- Bouck N, DiMayorca G: *Evaluation of chemical carcinogenicity by in vitro neoplastic transformation*, in: Jakoby WB(eds): Methods and Enzymology, New York, Academic press, 1979, pp 296-307.
- Brady J, Khoury G: Stimulation of gene expression by viral transforming proteins. in: Van de woude GF, Levine AJ, Topp WC, Watson JD(eds): "Cancer cells I: The transformed phenotype," New York, Cold Spring Harbor Laboratories, 1983, pp 105-110.
- Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N. Y. 1983: 105-110.
- Breakstead JH, Wood GS, Fletcher V: Evidence of the origin of Kaposi's sarcoma from lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 1985; 119: 294-299.
- Clanton DJ, Jariwalla RJ, Kress C, et al: Neoplastic transformation by a cloned human cytomegalovirus DNA fragment uniquely homologous to one of the transforming regions of herpes simplex virus type 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 3826-3830.
- Chen C, Okayama H: High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2745-2752.
- Dorfman RF, Path RFC: The histogenesis of Kaposi's sarcoma. *Lymphology* 1984; 17: 76-77.
- Dyson N, Howley PM, Munger K, et al: The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243: 934-936.
- Galloway DA, Nelson JA, McDougall JK: Small fragments of herpesvirus DNA with transforming activity contain insertion sequence-like structures. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81: 4734-4740.
- Geng Y, Chandran B, Josephs SF, et al: Identification and characterization of a human herpesvirus 6 gene segment that trans activates the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol* 1992; 66: 1564-1570.
- Giraldo G, Beth E, Haguenau F: Herpes-type virus particles in tissue culture of Kaposi's sarcoma from different geographic regions. *J Natl Cancer Inst* 1972; 49: 1509-1526.
- Iyengar S, Levine PH, Ablashi D, et al: Sero-epidemiological investigations of human herpesvirus 6(HHV-6) infections using a newly developed early antigen assay. *Int J Cancer* 1991; 49: 551-557.
- Jarret RF, Glendhill S, Oureshi F, et al: Identification of human herpesvirus 6 specific DNA sequences in two patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 1988; 2: 496-7859.
- Jones C, Ortiz J, Jariwalla RJ: Localization and comparative nucleotide sequence analysis of the transforming domain in herpes simplex virus DNA containing repetitive genetic elements. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 7855-7859.
- Josephs SF, Buchbinder A, Streicher H, et al: Detection of human B lymphotropic virus(human herpesvirus 6) sequence in B cell lymphoma tissue of three patients. *Leukemia* 1988; 2: 132-135.
- Lawrence GL, Chee M, Craxton MA, et al: Human herpesvirus 6 is closely related to human cytomegalovirus. *J Virol* 1990; 64: 287-299.
- Lusso P, Ensoli B, Markham PD, et al: Productive dual infection on human CD4⁺ T lymphocytes by HIV-1 and HHV-6. *Nature* 1989; 337: 370-373.
- Martin MED, Thomson BJ, Honess RW, et al: The genome of human herpesvirus 6: Maps of unit length and concatemeric genomes for nine restriction endonucleases. *J Gen Virol* 1991; 72: 157-168.
- Razzaque A: Oncogenic potential of human herpesvirus 6 DNA. *Oncogene* 1990; 5: 1365-1370.
- Roizman B, Carmichael LE, Deinhardt F: Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology* 1981; 16: 201-217.
- Roizman B: Herpesviridae: A brief introduction, in Fields BN, Knipe DM(eds): virology, New

- York, Raven press, 1990 pp 1787-1793.
- Sarnow P, Ho VS, Williams J, et al: Adenovirus Elb-58 Kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 Kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 1982; 28: 387-394.
- Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, et al: Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 1986; 234: 596-601.
- Schurmer EC, Wyatt LS, Yamanishi K, et al: Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 5922-5926.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, et al: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-1136.
- Schiller JT, Vass WC, Vousden KH, et al: E5 open reading frame of bovine papillomavirus type I encodes a transforming gene. *J Virol* 1986; 57: 1-6.
- Schmieg FI, Simmons DT: Characterization of the in vitro interaction between SV40 T antigen and P53: Mapping the P53 binding site. *Virology* 1988; 164: 132-140.
- Southeern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-517.
- Twu JRS, Schloemer RS: Transactivation function of hepatitis B virus. *J Virol* 1987; 61: 3448-3453.
- Wang D, Leibowitz D, Kieff E: An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 1985; 43: 831-840.
- Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, et al: Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1a proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; 334: 387-394.
- Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, et al: Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1988; i: 1065-1067.

=Abstract=

Localization and Characterization of Transforming Regions in HHV-6*

Dong Ho Choi, MD**; Ihn Hwan Lee, MD; Hong Tae Kim, MD;
In Jang Choi, PhD; Sung Ik Chang, MD

*Department of General Surgery, Wangsan Hospital, Chang Young** and*

*Department of Anatomy, Keimyung University School of Medicine,
Taegu, Korea*

HHV-6 was isolated in 1986 from patients suffering from lymphoproliferative disorders and AIDS. The antibodies directed against HHV-6 indicate a previous viral infection in 80~90% of the general population. HHV-6 isolates have been divided into two distinct subgroups(subgroup A and B) based on restriction enzyme profiles, prevalence in the population, and their in vitro ability to grow in cultured cells. Subgroup A strain(strains GS and U1102) is correlated with lymphoproliferative disorders.

HHV-6 has been proposed to be a co-factor in the progression of AIDS because HHV-6 and HIV-1 have been demonstrated to co-infect CD4+ human T cells and accelerate HIV-1 expression and cell death.

HHV-6 has also been associated with human several malignancies. The association between HHV-6 and human cancer might be strengthened if other fragments representing different regions of the genome with demonstrated transforming potential were also used for these analyses. These associations have led to the analysis of genomic HHV-6 DNA and cloned restriction fragments(Sal I-L-SB, -SH, -BN, -BS, -HS, -NS) for their ability to transform cells in vitro. A 4.1-kb Sal I-L fragment which exhibited transforming activity was identified. This fragment was retained in focal and tumor-derived cell lines. In addition, the Sal I-L fragment was shown to transactivate the HIV-1 LTR.

Initial experiments have co-localized both the transforming and transactivating activities to a 1.9kb Sal I-L-SH fragment and implicate a 283-aa ORF as the functional element. Moreover, the identification of a transforming and transactivating region in HHV-6 has strengthened the association of HHV-6 as a co-factor in AIDS and AIDS-related malignancies.

Key Words: HHV-6, AIDS, Transformation