

Analysis of Telomerase Activity by HPV E6/E7 Expression in SW13

Young-Kwon Kim^{1,†} and Yuk-Pheel Park²

¹Department of Biomedical Laboratory Science, Konyang University, Daejeon 302-718, Korea.

²Laboratory of Cell Biology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

Cervical cancer is one of the most prevalent cancers developed in women worldwide, and human papillomavirus (HPV) type 16 is the most common agent linked to human cervical carcinoma. Viral oncogenes E6 and E7 are selectively retained and expressed in carcinoma cells infected with human papillomavirus type 16 and cooperated with each other in immortalization and transformation of primary keratinocytes. Because of HPV oncogenesis mechanism was not completely solved, the more studies be required thoroughly. In the present study, to investigate the telomere independent role of telomerase in HPV oncogenesis, we constructed the E6 mutant, E7, E6/E7 and hTERT over-expressed stable cells with a telomerase negative cell line, SW13. Expressions of Inserted genes were measured by RT-PCR. E6, E7 and hTERT genes were well expressed in each cell lines comparing with the control groups. By analyzing the cell morphology under the microscope, hTERT clone size was a more smaller than the mock control but oncogene expressed clones were slightly lengthened the marginal region. In addition, hTERT cells has also, a tendency of brief dividing time compared to the mock control. To determine whether telomerase activity associated with a HPV oncogenesis by oncoprotein expression, we performed the PCR based TRAP assay and Northern blot analysis. In TRAP assay data, telomerase activities in hTERT and oncogene clones were more increased than the mock control. In addition, SW13/E6/E7 cells appeared a extremely increased activity than any other clones. Induced TERT mRNA by E6/E7 wasn't, however, detected in Northern blotting. In conclusion, these findings suggest that telomerase activity closely associated the HPV oncogenesis and E6/E7 co-expression is a most important factor of telomerase activity.

Key Words: Human papillomavirus (HPV), Oncogenes, Telomerase activity

서 론

자궁경부암은 전 세계적으로 여성에게서 나타나는 가장 흔한 질병의 하나로서 인유두종 바이러스 (human papilloma virus) 16형의 감염이 가장 중요한 원인으로 알려져 있다. 이 바이러스의 감염에는 E6와 E7의 발암단백질이 감염된 자궁경부암 세포에서 선택적으로 유지되고 발현되어, primary 각질세포의 형질전환 및 불멸화에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Hudson et al., 1990; Hallbert et al., 1992; Woodworth et al., 1992). HPV 바이러스의 감염시, E6와 E7 발암단백질이 종양 억제단백질인 (tumor suppressor) p53과 Rb의 기능을 불활성화시켜 세포주기를 활성화시킴으로써, 발암과정에 관여하는

것으로 알려져 있으며 (Rapp and Chen, 1998; Thomas et al., 1999; Zwerschke et al., 2000; Kubbutat et al., 2000), E7 단백질의 경우, pRb와 결합하여 Rb 단백질의 종양억제 기능을 억제하고 (Dyson et al., 1989; Munger et al., 1989), E6 단백질은 ubiquitin E3 ligase인 E6AP와 결합하여 p53을 ubiquitin 의존적인 단백질 파괴기작으로 p53을 파괴시키는 것으로 보고되고 있다 (Scheffner et al., 1990; Werness et al., 1990; Scheffner et al., 1993).

최근 10년간의 연구결과들에서는 HPV 바이러스의 E6 발암단백질이 hTERT의 전사를 증가시키고 telomerase의 활성을 증가시킨다는 결과들이 많이 도출되어 왔다. Telomerase는 정상세포에서는 불활성화상태이나 다양한 암세포, 불멸화된 세포들에게서 90% 이상의 활성을 보여 암화과정에 밀접한 관련이 있는 단백질로 많이 주목을 받아왔다. HPV 발암단백질이 primary 세포들을 불멸화시키는 과정에 있어서, *in vitro* 상의 HCK (human cervical keratinocyte), HFK (human foreskin keratinocyte), HMEC (human mammary epithelial cells) 등의 다양한 세포들에 발암단백질이 과발현되면, 세포가 노화과정

* 논문 접수: 2006년 11월 2일

수정재접수: 2006년 12월 8일

† 교신저자: 김영권, (우) 302-718 대전광역시 서구 가수원동 685, 건양대학교

Tel: 042-600-6371, Fax: 042-600-6314

e-mail: ykkim3245@konyang.ac.kr

을 극복하여 죽지 않는 불멸화 세포가 형성됨을 보여주었다 (Klingelutz et al., 1996; Kiyono et al., 1998; Sprague et al., 2002; Baegle et al., 2002). 또한 이 primary 세포들이 불멸화되는 과정에서 세포의 노화에 직접 관련된 telomerase의 활성이 증가되어 telomere를 지속적으로 합성하게 되고, 따라서 죽지 않는 세포가 형성되는 것이다. 또한 hTERT promoter 연구에서도, HPV E6 단백질이 c-myc 비-의존적인 상태로도 hTERT의 전사를 증가시킬 수 있음이 보고되었다 (Gewin et al., 2001). 결론적으로 기존 연구들의 결과에서, telomerase가 HPV 발암기전에 관련이 있다는 것을 시사하고 있으나 기존 연구들에서 나타난 문제점은, telomerase의 효과가 각 연구팀에서 이루어진 시스템과 세포에 따라 다른 경향을 보이고 있다. 따라서 본 연구에서는 telomere 비의존적인 TERT subunit 자체의 기능을 분석하기 위한 것으로, HPV 발암기전에서의 E6, E7 발암단백질들과 catalytic subunit (TERT)의 상호작용 및 telomerase의 기능을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 발현벡터 제작

Telomerase negative 세포주, SW13은 ATCC에서 구입하였으며, L-15 Leiboviz (Sigma, St Louis, MO)배지에 10% FBS (Hyclone, Logan, Utah)을 넣어서 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. hTERT, HPV E6m, HPV E7, HPV E6/E7 발현벡터를 형질전환시켜 만들어진 SW13 세포주들은 DMEM (Sigma, St Louis, MO)에 10% FBS를 첨가한 배양액을 이용하였다. 각 유전자의 발현벡터는 성균관대의 이한웅 박사팀에서 얻은 hTERT full length/pcDNA3과 pTARGET/E6m, pTARGET/E7, pTARGET/E6E7을 사용하였다.

2. 형질전환 및 세포주 확립

SW13 세포를 5×10⁶ cells/100 mm dish의 분주한 후, 다음날 형질전환시켰다. 각각의 플라스미드 5 mg에 무혈청배지 (serum free media)를 첨가하여 500 ml가 되도록 하고, Lipofectamine (GIBCO, Grand Island, NY) 30 ml에 475 ml의 무혈청 배지를 첨가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 15분 후 DNA를 첨가한 배지와 Lipofectamine을 첨가한 배지를 혼합하여 상온에서 30분간 반응시키고, 이 때 준비된 세포는 무혈청 배지로 2회 세척 후, 반응이 끝난 DNA-Lipofectamine 혼합물에 5 ml의 배지를 첨가하여 총 6 ml을 잘 혼합한 후 세척한 세포에 도말하였다. 37°C 5% CO₂ 배양기에서 6시간 반응시킨 후 일반배지로 교체하였으며, 24시간 이후부터는 0.8 mg/ml의 G418 (Sigma, St Louis, MO)로 약 2주 동안 형질전환된 세포들을 선별한 뒤, 확보된 세포들을 96 well plate의 각 well당 0.5~1개의 세포를 분주하여 단일클론으로 선

별하였다.

3. 역전사효소-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

다양한 세포들에게서 RNazolB를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA로부터 cDNA를 합성하기 위하여 MMLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI)를 사용하였다. Total RNA로부터 Poly(A+) mRNA를 분리하기 위하여 oligo dT 0.125 mM을 사용하였으며, 얻어진 5 µg의 mRNA, 5 µl RT buffer, 1 mM dNTP, 200 unit 역전사 효소를 혼합하여 37°C에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 마지막으로 95°C에서 5분간 가열하여 역전사 효소들을 불활성화 시킴으로써 cDNA를 얻어내었다. 확보한 cDNA 2 ml과 각각 1 pmol의 특이적 primer, 1 ml의 dNTP 혼합물 및 Taq polymerase (iNtRON Biotech, Sungnam, Kyungki-Do, Korea)를 첨가하여 연쇄반응을 하였으며, 각 유전자의 특이적 primer는 다음과 같다. hTERT sense primer (5'-ATG AAG TTC CTG CAC TGG CTG AT-3'), antisense primer (5'-AGT TGA GCA CGC TGA ACA GT-3'), E6 sense primer (5'-GAA GAT CTC TAT GTT TCA GGA CCA CAG-3'), E6 antisense primer (5'-TTA CAG CTG GGT TTT CTC T-3'), E7 sense primer (5'-GGA GAT CTC ATG CAT GGA GAT ACA CCT-3'), antisense primer (5'-GGG TCG ACG ATT ATG GTT TCT GAG AAC A-3'). PCR이 끝난 산물을 agarose gel에서 전기영동한 후 EtBr 염색을 통해 확인하였다.

4. Northern hybridization

다양한 세포 (5×10⁶ cell)를 Trypsin-EDTA를 사용하여 모두 수확한 후, guanidinium 방법을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 260 nm에서 정량한 후, 8 mg의 RNA를 1% formaldehyde gel에 running하였다. RNA gel을 nylon membrane에 transfer한 후, UV에서 cross-linking하였다. 이 blot을 이용하여 hTERT mRNA 발현을 확인하였다. 이 때 사용한 probe는 hTERT 1950/3210 bp이며 sequencing을 통하여 specificity를 검증하였다.

5. TRAP (Telomerase Repeats Amplification Protocol) assay

Telomerase의 활성을 측정하기 위하여 Intergen사의 TRAPeze kit를 사용하였다. SW-13/Mock 세포를 비롯한 확보된 세포주들을 수확하여 1X PBS로 1회 수세한 후, 새 microfuge tube에 옮겼다. 1X CHAPS lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM benzamidine, 5 mM b-mercaptoethanol, 0.5% CHAPS, 10% glycerol) 200 µl를 첨가하여 ice에서 30분 동안 반응시킨 후, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 용출한 cell extracts를 정량한 후, TRAP reaction에 사용하였다. TS primer (Substrate oligonucleotide, in

TRAPeze Detection Kit)의 동위원소 end-labeling은 10 mCi/ml $g\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$, TS primer, 10X kinase buffer, T4 polynucleotide kinase를 37°C에서 20분 동안 반응시킨 후 85°C에서 5분간 효소를 불활성화시켜 사용하였다. 10X TRAP reaction buffer, 50X dNTP mix, $^{32}\text{P}\text{-TS}$ primer, TRAP primer mix, Taq polymerase를 혼합한 Master mix를 준비하고 RNase-free PCR tube에 분주하였으며 0.5~1 mg 농도의 cell extracts를 첨가하였다. PCR tube를 30°C에서 30분간 반응시킨 후, 94°C에서 30초, 59°C 30초 반응을 27~40회 반복하였다. 반응된 각 혼합물은 15% neutral-polyacrylamide gel에서 전기영동하고 autoradiography를 통해 감광하였다.

결과 및 고찰

1. HPV16 E6/E7 유전자 및 hTERT 유전자를 과발현하는 SW13 세포주 확립

본 연구에서는 HPV 바이러스 oncogenesis 기작에서의 telomerase의 기능을 분석하고자 다음의 세포주들을 확립하

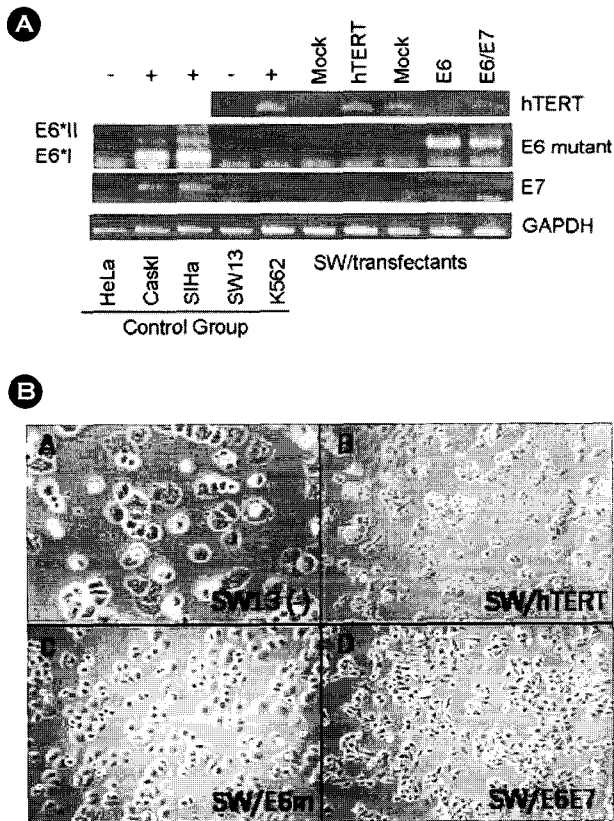


Fig. 1. Construction of HPV oncogenes and hTERT overexpressed SW13 clones. (A) The identification of E6, E7 and hTERT expression in stable clones of SW13. E6 mutants, E7 and E6/E7 oncogenes and hTERT expression were detected by RT-PCR. (B) Representative photographs show the cell phenotype in SW/transfectants.

였다. 먼저 telomerase subunit인 pcDNA3-hTERT 유전자와 pTARGET-E6mutants, pTARGET-E6/E7 유전자의 벡터를 이용하여 telomerase negative 세포, SW-13에 liposome을 이용한 transfection을 하였다. 약 2주 동안 G418에 내성을 지니는 세포들을 확보한 후 클로닝하여 SW/hTERT #31, SW/E6m #29, SW/E6E7 #30의 단일클론들을 확보하였다. 확보된 세포들의 total RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 각각의 세포가 insert gene인 HPV oncogene, E6m, E7, E6/E7과 hTERT 유전자를 발현하고 있음을 확인하였다. 또한 이때 HeLa, Caski, SiHa, SW13 모세포주, K562 세포들은 각각의 음성 및 양성대조군으로 사용되었다. 본 연구에 사용된 HPV 유전자는 16형 타입이므로 HPV oncogene E6, E7이 양성대조군인 Caski, SiHa에서도 나타났으며 HPV 18형 타입인 HeLa에서는 나타나지 않았다. 또한 K562 세포는 hTERT의 발현이 높은 양성대조군으로 사용되어 역시 hTERT의 발현을 나

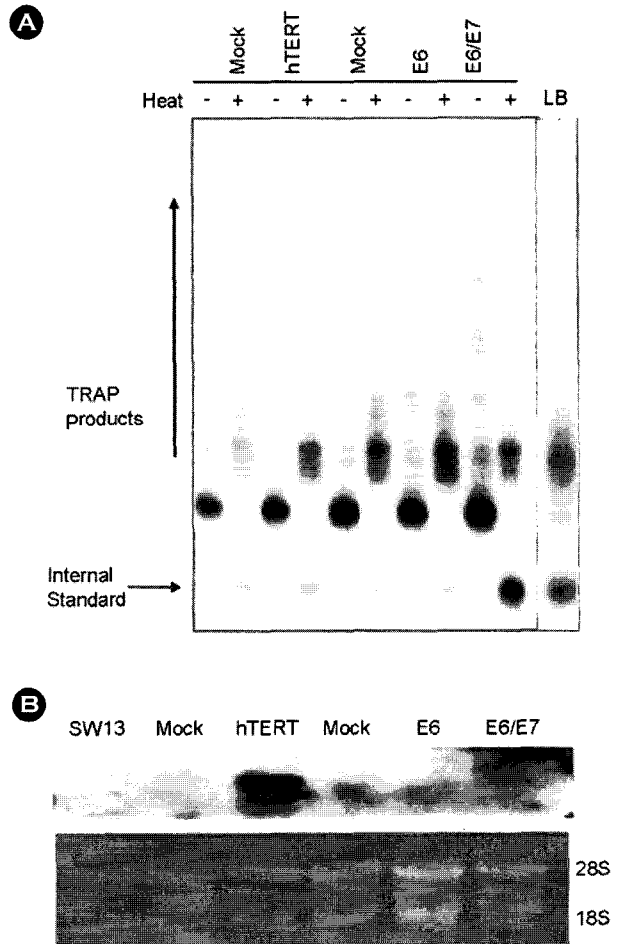


Fig. 2. Telomerase activity is closely related with human papilloma virus oncogenesis. (A) Telomerase activity was measured by TRAPeze detection kit (Intergen). Total cell lysates were extracted with a chaps lysis buffer. And 0.5 mg of cell extracts were used TRAP-PCR based assay. (B) Total RNAs were extracted by guanidinium method in SW13 transfectants. And the Northern blot analysis was performed using the hTERT specific probe.

타내었다 (Fig. 1A).

또한 SW-13/Mock 세포주와 비교하여 확보된 클론들의 세포형태를 현미경을 통해 분석하였다. SW/hTERT 세포의 경우, SW13/Mock 세포와 비교하였을 때, 세포형태의 변화는 거의 없었으나 세포의 크기가 작아졌고, 세포의 분열 시간이 조금 빨라졌다. 반면에 HPV oncogene들이 발현되는 SW13의 경우 세포의 형태가 Mock 세포에 비해 많이 변화하였으며 특히 SW/E6E7의 경우는 세포가 바닥에 부착하는 정도가 심해졌고 세포의 모양이 길쭉하게 변했다. SW13/Mock의 경우도 원래의 SW13 세포에 비해 모양이 낮모양처럼 길쭉하게 변한 세포들이 많이 형성된 특징을 보임을 알 수 있었다 (Fig. 1B).

2. Telomerase의 활성과 HPV oncogenesis의 관련성

확립된 세포주들의 특성분석 및 telomerase의 관련성을 분석하기 위하여 Fig. 2에서 나타난 것처럼 telomerase 활성 및 hTERT의 발현을 TRAP assay와 Northern blot analysis를 이용하여 분석하였다. Fig. 2A와 같이 바이러스 발암단백질 E6/E7을 도입하였을 때, telomerase의 활성이 뚜렷이 증가하였으며, 이는 hTERT 유전자를 발현시킨 클론에서보다도 더 높은 활성을 보였다. Telomerase의 활성에 있어서 HPV oncogene E6/E7 모두의 발현이 크게 영향을 미침을 알 수 있었고, 이 결과는 telomerase가 HPV 바이러스의 oncogenesis 과정에 밀접하게 관련됨을 시사하고 있다. 또한 HPV E6/E7에 의해 hTERT의 발현의 증가도 확인할 수 있는 지 알아보기 위하여 Northern blot analysis를 수행하였다 (Fig. 2B). 그러나 HPV E6/E7에 의해 유도된 hTERT mRNA의 발현은 확인할 수 없었다. 이 결과는 본 연구에서 사용된 세포가 telomerase의 활성 및 TERT 발현이 전혀 없는 negative 세포이므로 그에 따른 현상일 가능성을 지니고 있거나 HPV 발암단백질이 TERT mRNA의 전사물 발현과 관련없이 단백질 수준에서의 조절작용에 관여하여 telomerase의 활성을 증가시켰을 가능성을 내포하고 있다 (Gewin et al., 2001). 따라서 본 연구에서는 mRNA 수준에서의 발현의 증가는 확인할 수 없었으나, 분명한 사실은 E6/E7 발암유전자가 telomerase 활성을 뚜렷이 증가시킨다는 것이며, 이는 HPV oncogenesis에 telomerase가 밀접하게 관여할 것임을 시사하고 있음을 확인하였다.

본 연구에서는 HPV 발암기전에서의 E6, E7 발암단백질들과 catalytic subunit (TERT)의 상호작용 및 telomerase의 기능을 분석하기 위하여 telomerase negative 세포주인 SW13에 HPV E6, E7 발암유전자 및 hTERT를 과발현시킨 세포주들을 확립하였다. 기존의 hTERT promoter 연구에서, HPV E6 단백질이 c-myc 비-의존적인 상태로도 hTERT의 전사를 증가시킬 수 있음이 보고되어 E6, E7 발암단백질과 TERT의 상호작용이 HPV oncogenesis에 중요할 것으로 사료된다

(Gewin and Galloway, 2001).

본 연구에서는 E6, E6/E7의 두 발암단백질이 결합된 유전자가 각각 telomerase의 활성을 증가시킬 수 있었으며 (Fig. 2A), 특히 E6/E7 유전자는 hTERT 유전자를 과발현시킨 세포주보다도 높은 telomerase 활성을 지니고 있었다. 따라서 E6/E7 발암단백질이 TERT의 발현에도 영향을 미칠 것 (Klingelhutz et al., 1996; Kiyono et al., 1998; Sprague et al., 2002; Baega et al., 2002)으로 사료되어 TERT mRNA를 Northern blot analysis로 확인하였다 (Fig. 2B). 그러나 SW13/E6/E7 세포에서 hTERT mRNA를 확인할 수 없었으며, 이는 telomerase는 일차적으로 전사수준에서 조절되는 단백질이지만, 단백질 수준에서의 조절도 많이 이루어지므로, E6/E7 발암단백질에 의한 TERT 전사발현 이외에도 telomerase의 발현에 영향을 미칠 가능성은 충분한 것으로 사료된다. 결론적으로 E6와 E7 발암단백질을 telomerase negative 세포주에 과발현시켰을 때, telomerase 활성이 증가하는 것으로 보아 telomerase의 발현에 E6, E7 발암단백질이 관여할 것임을 시사하며, 이는 또한 telomerase가 HPV oncogenesis에도 관여할 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Baega AC, Berger A, Schlegel R, Veldman T, Schelegel R. Cervical epithelial cells transduced with the papillomavirus E6/E7 oncogenes maintain stable levels of oncoprotein expression but exhibit progressive, major increases in hTERT gene expression and telomerase activity. *Am J Pathol.* 2002. 160: 1251-1257.
- Dyson N, Howley PM, Munger, K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989. 243: 934-937.
- Gewin L, Galloway DA. E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 dose not require induction of c-myc. *J Virol.* 2001. 75: 7198-7201.
- Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol.* 1992. 66: 2125-2134.
- Hudson JB, Bedell MA, McCance DJ, Laimins LA. Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes *in vitro* by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J Virol.* 1990. 64: 519-526.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 1991. 10: 4129

-4135.

- Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ. Both Rb/p16^{INK4a} inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998. 396: 84-88.
- Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996. 380: 79-82.
- Kubbutat HG, Vousden KH. New HPV E6 binding proteins: Dangerous liaisons? *Trends Microbiol.* 2000. 6: 173-175.
- Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 1989. 8: 4099-4105.
- Rapp L, Chen JJ. The papillomavirus E6 proteins. *Biochem Biophys Acta.* 1998. 1378: 1-19.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein liase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993. 75: 495-505.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990. 63: 1129-1136.
- Sprague DL, Phillips SL, Mitchell CJ, Berger KL, Lacey M, Turek LP, Klingelutz AJ. Telomerase activation in cervical keratinocytes containing stably replicating human papillomavirus type 16 episomes. *Virology* 2002. 301: 247-254.
- Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6 p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 1999. 18: 7690-7700.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990. 248: 76-79.
- Woodworth CD, Cheng S, Simpson S, Hamacher L, Chow LT, Dipaolo JA. Recombinant retroviruses encoding human papillomavirus type 18 E6 and E7 genes stimulate proliferation and delay differentiation of human keratinocytes early after infection. *Oncogene* 1992. 7: 619-626.
- Zwerschke W, Jansen-Durr P. Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: Interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Adv Cancer Res.* 2000. 78: 1-29.