대부종콜포회지 제9권 제4호 1998
Vol. 9, No. 4, Dec., 1998

부체형 HPV-16 DNA를 함유한 자궁경부암에서 HPV-16 URR 유전자의 변이에 따른 전사 활성도 증가

가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실, 가톨릭의과학연구원
박종섭 · 엄수종 · 김찬주 · 김은주 · 이해남 · 나종구 · 김승조 · 남궁성은

=Abstract=

Increased transcriptional activity by mutation of HPV-16 URR in cervical cancers carrying episomal HPV-16 DNA

Jong Sup Park, M.D., Soo Jong Um, Ph.D., Chan Joo Kim, M.D.,
Eun Joo Kim, M.S., Hae Nam Lee, M.D., Jong Gu Rha, M.D.,
Seung Jo Kim, M.D., Sung Eun Namkoong, M.D.
Department of Obstetrics and Gynecology, Catholic University Medical College Catholic Research Institute of Medical Science, Seoul, Korea

HPV E2 protein is known to act as a negative regulator of transcription and the disruption of E2 open reading frame by HPV integration can release suppression of E6 and E7 mRNA expression, resulting in uncontrolled cellular growth and malignant transformation by inactivating tumor suppressor gene products (p53, pRb). YY1 mutation of HPV URR has been suggested as one of indicator that explains development of cervical neoplasia by episomal type of HPV. To extend this hypothesis, we examined whether mutation(s) in specific sites of HPV URR is functionally related to the invasiveness of cervical neoplasia and the physical status of HPV DNA.

The URR sequences were obtained by PCR amplification of HPV-16 genome from CIN and invasive cancer patients, cloned into pUC18 for sequencing, and into pBLCAT8+ for functional CAT assay. Our previous data classified HPV-infected patients into three groups: 3 cancer cases carrying episomal HPV DNA; 12 cancer cases carrying integrated HPV DNA; 12 CIN cases carrying episomal HPV DNA. The specific variants in HPV-16 URR were found in Korean women: GA transition at nt 7520 (100%, 27/27), AC transition at nt 7729 (70%; 19/27), and GA transition at nt 7841 (78%; 21/27). Selective mutations were observed at the YY1-binding sites of HPV-16 URR in the 3 patients with invasive cervical cancer, who having the episomal forms of HPV-16 DNA: AC transition at nt 7484 and GA transition at nt 7488 (YY1-binding site 2; from 7481 to 7489). Additionally, CT transition at nt 7785 (YY1-binding site 3; from 7781 to 7790) was found from 2 of 3 patients. No YY1 site mutations were detected in the 12 CIN patients and in the HPV-integrated invasive cancer patients. To determine whether these mutations have effect on the expression of HPV E6/E7 genes driven by URR, the transient transfection assay was employed using URR-CAT reporter plasmid. The

relative activities of three URR mutants from episomal HPV-16 DNA of cervical cancers were 2- to 4-fold higher than that of HPV-16 URR prototype. In contrast, the URRs from integrated HPV-16 DNA in cervical cancer and from episomal HPV-16 DNA in CIN, where no mutation of the YY1-binding site was detected, showed similar levels of promoter activity to that of URR prototype.

Our results support the hypothesis that the mutation at YY1 binding site is functionally related to the development of cervical neoplasia caused by episomal HPV-16 DNA in Korean cervical cancer patient. Thus, mutation in YY1 site of episomal HPV-16 URR may play a role of HPV integration in the progression of cervical cancer.

Keywords: HPV, YY1, URR, cervical cancer, episome, integration

I. 서 론

Human papillomavirus(HPV)는 자궁경부암 조직에서 90% 이상 발견되며, 그 중에서 60% 이상에서 발견되는 HPV-16는 자궁경부암 발생과 진행에 가장 중요한 바이러스임을 짐작할 수 있다[1]. 자궁경부암의 발생 과정은 자궁경부 상피의 전암성 병변인 premalignant dysplastic lesion(cervical intraepithelial neoplasm; CIN)을 경유해 침윤성 자궁경부암으로 진행된다고 생각된다. 일반적으로 HPV-16 DNA는 상피이형증의 초기 단계에서는 부체(episome) 형태로 존재하지만, 중증 상피이형증, 상피내암, 침윤성 자궁경부암에서는 상피세포의 염색체내에 융합되는 경우가 많다[2-4]. HPV DNA가 체세포 염색체에 융합될 때 일반적으로 E2 open reading frame(ORF)의 일부분이 결손되어 E2에 의해 조절되던 E6와 E7 mRNA 표현 억제가 소실되어 진다[5]. 궁극적으로 융합된 형태의 HPV에서는 E6, E7 단백질들이 과다 발현되고, 이는 특정 종양유전자를 활성화시키거나 p53, Rb와 같은 종양억제유전자들에 의한 생성물질들을 비활성화시켜서 세포 성장을 비정상적으로 조절하며, 세포의 악성화 변형과 암화 진행을 일으킬 수 있게 된다[6-9].

HPV-16 E6, E7 종양유전자들의 표현은 promoter p97에 의해 매개되며. 이 promoter p97은 upstream regulatory region(URR or long control region: LCR)의 E6-근위부 끝에 위치하며[10], HPV 융합에 의해 E2 ORF가 파괴되어 E2 단백질이 표현 안되면 p97 promoter의 down regulation을 일으킨다고 알려지고 있다[5]. 바이러스 E2 단백질은 URR 근위부에 있는 특정 인식 부위에 부착되어 전사(transcription)의 음성(negative) 조절자로 작용하는 것으로 알려져 있다[11]. 광범위한 연구들에서 nuclear factor for interleukin-6 expression(NF-IL6)[12], octamer-binding factor 1(Oct-1)[13], 전사 조절 단백질 YY1 등[14-17]은 HPV-16 URR에 부착되어 p97 활성도를 down- regulation시킬 수 있다고 밝혀졌다. 이전의 여러 보고서에서 침윤성 자궁경부암들 중 어떤 것은 단지 부체 형태의 HPV-16 DNA만을 포함하고 있다고 하며[2-4], 이것은 HPV의 융합에 의한 전사 기능 조절외에도 다른 방법에 의한 바이러스 종양 단백질들의 전사 조절을 통하여 발암과 진행을 유도하리라는 가능성을 제시하고 있다. 전사 활성화에 관련되어 특이한 기전이 부체형의 HPV-16을 가진 자궁경부암 세포들에게서 밝혀졌는데 그것은 세포의 전사 요소인 YY1의 부착 부위가 결손되거나 변이되어 YY1에 의한 E6/E7 mRNA 합성이 억제되었던 기능이 소실되는 것이다[14,15]. 즉, p97의 활성도는 YY1 부착 부위 변이가 일어난 URR의 조절하에서 4 6배 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 그들의 과거 연구 결과는 제한된 숫자의 사례에서 보고하였으며, 부체 형태로 존재하는 HPV를 함유한 자궁경부암 세포주에서의 HPV-16 URR 유전자의 변이와 발현 정도에 대해만 분석되었다. 자궁경부 세포에서 HPV-16 E6, E7 암유전자들의 과잉 발현은 과발현된 transactivators나 이를 억제하는 인자를 제어하는 상태에서 일어날 수 있으므로 URR내의 변이들은 repressor 부착을 없애거나 activator 부착을 증가시킬 수 있고, 이를 조절하는 HPV URR 부분에 대한 분석을 각종 상황에

따라 검토할 필요가 있다.

이에 본 연구에서는 다양한 형태의 HPV-16 DNA, 즉 부체형 또는 융합형의 HPV-16 DNA를 함유한 자궁경부 상피이형증과 자궁경부암의 임상 조직으로부터 HPV-16 URR를 증폭하여 유전자의 변이와 기능적인 분석을 시도하고자 하며, 한국의 자궁경부암 환자들에 있어서 부체형의 HPV DNA는 자궁경부암의 발달에 있어서 YY1 부착 부위 변이와 연관이 있는지 여부와 기능적으로도 어떠한 관계가 있는지를 검토하고자 하였다.

II. 연구 대상 및 방법

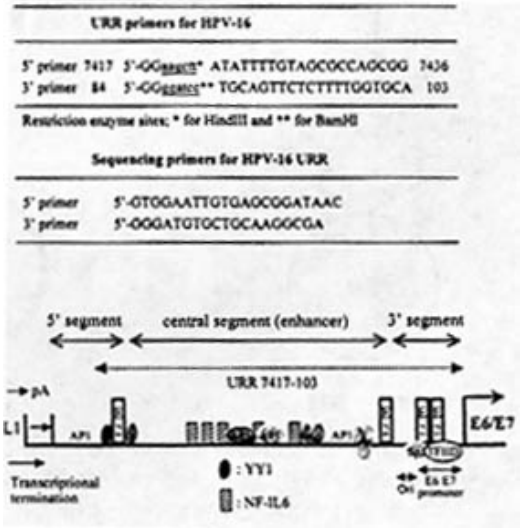
1. HPV 유전자형(genotype)과 HPV-16 DNA의 물리적 상태의 분석

가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실 강남성모병원에서 외래를 방문하여 진단과 치료를 받았던 환잘들에서 HPV-16 E6 primers에 양성으로 나타난 12명의 자궁경부 상피이형증 환자와 15명의 자궁경부암 환자를 대상으로 하였다. HPV의 존재는 E6 PCR로 결정하였고, 상응하는 HPV DNA의 물리적 상태는 여러 종류의 제한 효소를 이용한 Southern blot hybridization과 E2 PCR 방법으로 분석하였고, 과거의 연구 발표에서 분석된 연구 결과와 시료의 일부를 본 연구의 자료로 이용하였다[4].

2. 자궁경부종양 세포들로부터 HPV-16 URR의 sequencing

PCR에 의해 HPV-16 E6 primers가 양성인 12명의 자궁경부 상피이형증 환자들과 15명의 자궁경부암 환자들의 조직에서부터 추출된 DNA로부터 HPV-16 URR을 증폭하였고 복제된 뒤 dideoxynucleotide sequencing 방법에 의해 sequencing하였다[18]. HPV-16 URR의 PCR과 sequencing에 있어 반응 혼합물은 genomic DNA 0.5-1.0 μg, 반응 buffer(10 mM KCl, 100 mM MgCl2, 20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10 mM(NH4)2SO4, 0.1% Triton X-100), HPV-16 URR primers(Table 1.), 잘못된 증폭의 오류를 줄이기 위해 Taq polymerase 대신에 deep vent DNA polymerase(New England BioLabs; Beverly, MA)를 이용하였고, 증폭된 DNA 부분들은 제한효소들인 HindIII와

Table 1. Oligonucleotide Sequence of URR and Sequencing Primers



BamHI들에 의해 절단되고, vector-specific primers를 사용한 DNA sequencing을 위해 pUB18 vector의 같은 자리에서 cloning되어 졌다(Table 1.)(Fig 1.). 모든 조작들은 Dr. Harold zur Hausen(Deusches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany)에 의해 친절하게 제공된 원형(prototype) HPV-16으로부터 증폭된 URR sequence와 병행하여 시행되어졌으며, 증폭 결과로 얻어진 sequence들을 원형HPV-16 URR의 sequence와 비교하였고, 전사 조절 인자들에 대한 예상되는 부착 부위를 간접적으로 분석하였다(Table 1. 및 전사 조절 인자 부착 부위 참조)[19].

3. HPV-16 URR의 기능적 활성도의 평가

증폭된 HPV-16 URRs의 sequence들의 기능적 활성도를 평가하기 위해 똑같은 자리에서 pBLCAT8+ vector에 reclone되었다(Fig 1.). 세포들의 transfection은 calcium phosphate-base method에 의해 수행되어졌다[20]. 10% FBS로 보충된 DMEM 내에 유지된 C33A 세포들(4×105)을 transfection 5시간 전에 6-well plate에 배양했다. 3 μg의 pBLCAT-URR 운반 plasmid와 1 μg의 SV40-deriven β-gal 내부 조절 plasmid가 각각의 transfection을 위해 사용되었다. calcium phosphate-DNA복합체들을 하룻밤동안 transfection한 후에 세포들을 세척하고 완전배양기로 영양공급 후 24 시간 동안 배양되었다. 세포들을 얼음

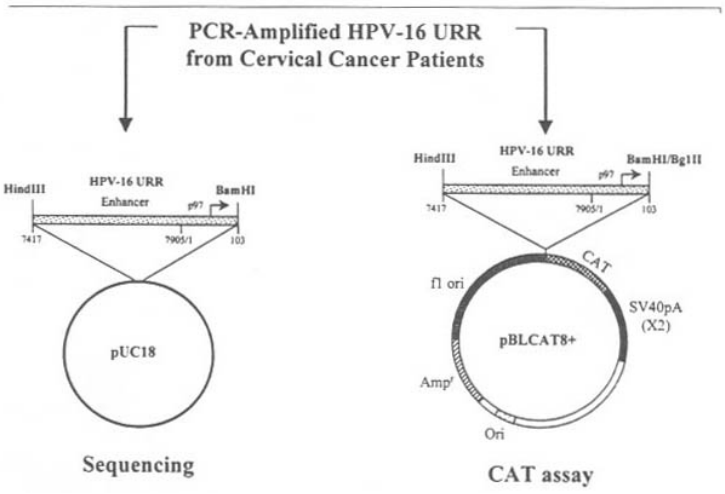


Fig 1. Illustration of constructs used for sequencing and CAT assay of amplified HPV-16 URRs from genomic DNA of cervical neoplastic tissues. The amplified sequences of HPV-16 URRs by deep vent polymerase were cut by restriction enzymes, HindIII and BamHI, and then cloned into pUC18 vector at the same sites for DNA sequencing by a standard dideoxynucleotide method using vector-specific primers. The amplified sequences of HPV-16 URRs were recloned into the pBLCAT8+ vector at the same restriction enzyme sites for evaluation of the functional activity.

으로 차게 한 PBS로 두 번 세척한 후 모으고 0.25 M Tris-HCl 100 μl(pH 7.6)에 다시 띄우고 3 회 해동시킨다. 표본들은 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4 ℃)로 정제되었고 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 분석 색소 시약으로 결정되어졌다. β-galactosidase는 반응들이 96-well plates에서 일어났다는 점을 제외하고 표준 과정에 따라 분석되었다[20]. Boehringer Mannheim 회사의 protocol에 따라 30-70 μl의 clear lysates가 CAT ELISA에서 CAT 농도를 위해 측정되었다(Boehringer Mannheim, Germany). 각 표본의 CAT 농도는 β-gal활성도에 따라 표준화되었다. 여기에 나타낸 모든 자료값들은 적어도 3번의 독립적으로 시행한 transfection의 평균값을 나타낸다. 자궁경부 상피이형증과 자궁경부암 조직으로부터 증폭하여, 재클론한 HPV-16 URR에서 전사조절 부위에서의 변이와 이들의 기능적 활성도는 HPV-16 DNA의 부체형과 융합형의 물리적인 상태와 자궁경부 종양의 침윤성(invasiveness) 여부에 따라 비교되었다.

Ⅲ. 결 과

1. 자궁경부 종양 조직에서 HPV-16 URR 유전자의 변이 검색

이전의 연구 결과로서 자궁경부 종양 조직에서 추출한 DNA로서 HPV-16 E2 PCR과 Southern blot hybridization 분석으로 부체형의 HPV-16 유전자와 융합형의 HPV-16 DNA를 구별할 수 있었으며[4], 그중에서 순수하게 부체형의 HPV-16 DNA만을 함유한 3명의 자궁경부암 환자들을 선택하여 부체형의 HPV-16 DNA를 갖고 있는 12명의 자궁경부 상피이형증 환자들로부터 증폭시킨 HPV-16 URR 유전자의 구조적 차이점을 비교하였다. 또한, 융합형 HPV-16 DNA를 함유한 12명의 자궁경부암 환자들의 HPV-16 URR 유전자에서 변이도 관찰 비교하였다. PCR 방법으로 증폭하여 얻어진 HPV-16 URR 유전자는 DNA sequencing에 의해 분석되었으며, 원형(prototype)의 HPV-16 URR 유전자와 비교하였을 때 한국 여성들에서 특이하게 나타나는 유전자 변이(variation)를 관찰할 수 있었다(Table 2.). HPV-16 URR에서 특이하게 관찰되는 유전자 변이들은 nt 7520 (100%; 27/27)에서 G→A 치환과 nt 7729(70%; 19/27)에서 A→C 치환이었다. 이 변이가 나타난 부위들은 이미 알려져 있는 전사 요소들이 붙는 조절 부위에 위치하지 않았고, 기능적인 차이점도 구별할 수 없어서 이러한 변이들이 한국 여성들에서 존재하는 정상 변종(normal variant)이라는 것을 짐작할 수 있다. 또한, 대부분에서 nt 7841(YY1 부착 부위 6)에서도 G→A 치환이 발견되었다(78%; 21/27). 비록, 이 위치는 YY1 부착 부위 6에 위치하지만 기능적인 분석 결과 차이점을 발견할 수 있어서 한국 여성들에게서 나타나는 정상 변종이라고 생각되고 있다. 부체형의 HPV-16 DNA를 함유한 3명의 자궁경부암에

Table 2. Summary of Mutation Sites in URR Derived from Korean Patients with Cervical Neoplasia

			Enhancer (7466-7875)																	
			YY1 site #2 (7481-7489)												YY1 sites #3 (7781-7790)		#6 (7836-7844)			
Serial No.	HPV-status	Multiplicity	7484 A-c	7488 G-a	7520 G-a	7525 A-c	7624 G-a	7698 C-t	7698 C-a	7728 A-c	7729 A-c	7742 T-g	7761 T-c	7763 C-t	7780 T-c	7785 C-t	7796 A-c	7841 G-a	7885 C-g	24 C-t
1	epi. CA		O	O	O			O	O	O		O		O		O			O	
2	epi. CA		O	O	O						O							O		O
3	epi. CA		O	O	O			O	O	O		O		O		O		O		O
4,5,6	int. CA	X 3			O						O				O			O		O
7	int. CA				O						O							O		O
8	int. CA				O					O			O		O			O		O
9	int. CA				O					O					O		O	O		
10	int. CA				O		O				O							O		O
11	int. CA				O						O							O		O
12	int. CA				O						O				O		O	O		O
13	int. CA				O	O														
14,15	int. CA	X 2			O						O							O		O
16-20	epi.CIN	X 5			O						O				O			O		O
21,22	epi.CIN	X 2			O															
23,24	epi.CIN	X 2			O						O							O		O
25	epi.CIN				O						O				O		O	O		O
26	epi.CIN				O													O		
27	epi.CIN				O						O							O		

서 특별하게 선택적으로 나타나는 변이들이 HPV-16 URR의 YY1 부착 부위들에서 관찰되었다(Table 2.). 이 환자들은 nt 7484에서 A→C 치환과 nt 7488에서 G→A 치환을 동시에 가지고 있었다(YY1 부착 부위 2; 7481에서 7489까지)(Fig 2). 또한, nt 7785 (YY1 부착 부위 3; 7781에서 7790까지)에서 C→T 치환이 3명 중 2명의 환자에서 발견되었다. 그러나 대부분의 부체형의 HPV-16을 함유한 자궁경부 상피이형증 환자들에서는 특이한 변이가 HPV-16 URR의 YY1 부착 부위 2와 부위 3에서 발견되지 않았다. 또한 12명의 융합형 HPV-16을 가진 자궁경부암 환자에서도 YY1 부착 부위 2와 부위 3에서 변이를 발견할 수 없었다. 그외에 다른 부위에서 점 변이(point mutation)들이 이들 자궁경부암 환자들에서 증폭된 HPV-16 URR의 enhancer 부위내 4 곳에서 발견 되었으나 이 부위들은 기존에 알려진 전사 요소들을 위한 부착 부위들이 아니었다.

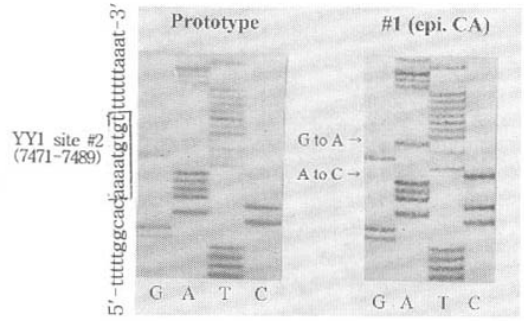


Fig 2. Sequencing gel illustrating the prototype HPV-16 URR and the point mutated URR from cervical cancer carrying episomal form of HPV-16 DNA (case #1). Point mutations were noted at YY1-binding site 2(from nt 7481 to nt 7489) of URR from cervical cancer carrying episomal form of HPV-16 DNA; A→C transition at nt 7484 and G→A transition at nt 7488(arrows).

2. HPV-16 URR 변이의 기능적 분석

HPV-16 E6/E7 표현에 관여하는 전사 활동에 대한 URR 변이의 영향을 실험하기 위해 부체형 HPV-16을 갖는 자궁경부 상피이형증 1예(case #16), 부체형의 HPV-16 DNA를 갖는 자궁경부암 3예(case #1 3), 융합형 HPV-16 DNA를 갖는 자궁경부암 1예(case #8)를 대표적으로 선택하여 각 예에서 변이된 HPV-16 URR과 원형 HPV-16 URR의 전사 활성도를 서로 비교하였다. 이를 위해 pBLCAT8+ vector에 있는 tk promoter를 제거하고 환자로부터 얻은 HPV-16 URR들을 각각 삽입하고, 재조합하여

pBLCAT-URR reporter plasmid를 만들었다. HPV를 함유하고 있지 않는 자궁경부암 세포주(C33A)에서 URR promoter의 활성도를 결정하기 위해 transient transfection과 CAT ELISA를 시행하였다. Fig 3에서 보여진 것처럼 부체형의 HPV-16 DNA를 가지는 3명의 자궁경부암 환자들에서 유래한 HPV-16 URR 변이체 들의 CAT-활성도는 원형의 HPV-16 URR보다 2 4배 더 높게 나타났으며, 이들은 HPV-16 URR의 YY1 부착 부위 2와 부위 3에서 선택적인 점변이들을 보였다. 이와는 반대로 상기의 YY1 부착 부위에 변이가 발견되지 않았던 자궁경부암에서의 융합형 HPV-16 DNA와 자궁경부 상피이형증의 부체형 HPV-16 DNA에서 유래한 HPV-16 URR은 원형 URR의 전사 활성도와 유사한 수준을 나타냈다. nt 7841(YY1 부착 부위 6)에서 G→A로 치환변이한 URR은 기능상 중요한 차이점을 관찰할 수 없었으므로 한국 여성들에서 특별한 나타나는 정상 변종인 것처럼 보이며, YY1 부착 부위 6은 YY1 부착 부위 2 또는 부위 3에 비해 기능적이지 못하다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 부체형의 HPV DNA에 의한 자궁경부 종양의 발생은 HPV E6, E7 발암유전자들의 전사 조절에 관여하는 URR sequence에 있는 YY1 부착 부위의 변이에 의해서도 유발될 수 있다는 것을 기능적으로 분석하여 증명한 것이다.

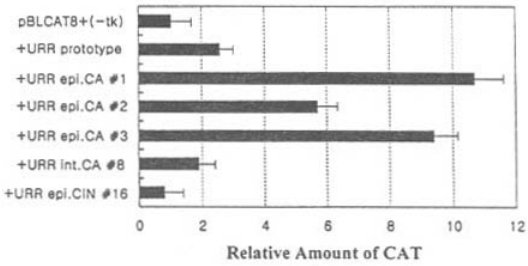


Fig 3. Expression of CAT under the control of the prototype(+URR prototype) and mutated HPV-16 URRs from tissue samples in C33A cells. CAT reporteer plasmids without tk promoter, pBLCAT8+(-tk), and with HPV-16 URR prototype were used as a negative and positive controls, respectively. Mutant URRs from episomal HPV-16 DNA in cervical cancers(+URR epi. CA #1, #2, and #3), URR from HPV-integrated cancer patient (case #8), and URR from HPV-episomal CIN patient(case #16) were analyzed for their activities by CAT assays. Relative amount of CAT was calculated by dividing the amount of URR-driven CAT by that of pBLCAT8+(-tk)-driven CAT.

Ⅳ. 고 찰

자궁경부암의 발생 과정은 자궁경부 상피의 전암성 병변을 경유해 침윤성 자궁경부암으로 진행된다고 생각되며, 일반적으로 HPV-16 DNA는 상피이형증의 초기 단계에서는 부체형으로 존재하지만, 중증 상피이형증, 상피내암, 자궁경부암에서는 상피세포의 염색체내에 융합되는 경우가 많다[2-4]. 과거 본 교실의 연구 결과에서 HPV DNA의 융합 현상은 자궁경부암의 고위험 집단, 예를 들면 임상기가 진행된 말기암 환자, 병리조직학적으로 선암(adenocarcinoma)인 환자, HPV-18 DNA를 가진 환자들에게서 더 많았음을 알 수 있었다[4]. HPV E2 단백질은 바이러스의 전사와 증식을 조절해서 바이러스의 생활주기에 핵심적인 역할을 한다고 알려져 있다[11,21]. BPV E2 단백질처럼 HPV E2는 특정한 표적 유전자들의 전사를 활성화시킬 수도 있지만, 대부분의 연구들에서는 HPV E2가 HPV E6와 E7 유전자 promoter의 활성도를 억제하는 것으로 나타난다[22]. HPV genome의 URR에는 4개의 E2 부착 부위들이 있으며, 이들 중 promoter의 근위부에 위치한 두 개의 부착 부위가 SP1 부착 부위와 HPV-16의 경우에 p97로 불리는 E6/E7 promoter의 TATA box 사이에 존재한다고 알려져 있다. 이들 부위에 E2 단백질이 붙어 전사 조절 인자들의 부착을 방해해서 기본적인 promoter의 활성을 억제한다[23,24]. HPV DNA가 융합될 때 대개 E2 ORF의 부분의 일부에서 결손이 발생하게 되고, 이로 인해 E2 단백질에 의해 억제되었던 바이러스 E6, E7 종양 유전자들의 표현이 증가되고 부체형의 HPV-16 DNA를 가지는 세포들보다 선택적으로 더 많은 성장을 보인다고 한다. 상피 세포의 염색체에 HPV DNA의 융합이 전암 병변에서 자궁경부암로 진행되는 과정에서 중요한 유전자 변화라는 것은 자궁경부암 환자들의 임상 조직에서 HPV DNA의 물리학적 연구로서 잘 알려져 있다[2-4]. 그러나 자궁경부암으로 진행된 세포내에서 지속적으로 존재하고 있는 부체형의 HPV DNA에서의 유

전적 변화들과 자궁경부암으로 진행되는 과정에 있어서 이들의 역할들에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. HPV-16을 포함하는 자궁경부암 환자의 약 1/3에서는 단지 부체형의 HPV-16 DNA를 가진 것으로 알려져 있다. HPV DNA가 부체형으로 있는 초기 상태의 자궁경부 상피이형증에서는 E1, E2 단백질들은 바이러스의 전사와 복제를 조절하며, E6, E7 유전자의 발현 억제에 관여한다[11,25]. 그 외에 HPV E6, E7 유전자들의 전사 조절에 영향을 미치는 다른 경로들로는 HPV URR 내의 전사 조절 유전자에서 변이가 나타나는 경우가 밝혀졌다. 잘 알려진 부위들의 하나는 YY1 억제인자가 붙어 HPV E6, E7 유전자들의 표현에 관여하는 URR의 활성도를 억제하는 YY1 부착 부위에서 변이가 일어난 것이다. YY1 부착 부위의 변이는 부체형으로 존재하는 HPV-16 DNA를 포함하는 자궁경부암 혹은 구강암에서 YY1에 의한 URR 기능의 억제를 완화시키는 것으로 제시되고 있다[14-17]. 그러므로 YY1 부착 부위의 점 변이나 소실은 HPV 발암 유전자들의 과잉 발현에 중요한 역할을 한다고 생각되며, 이러한 부분에서 유전자의 변이나 소실은 keratinocyte-specific enhancer의 promoter 근위부와 전사 활성화 암단백질인 AP-1의 부착 부위에도 영향을 미치는 것으로 밝혀지고 있다. 융합형 HPV를 가진 자궁경부암의 HPV-16 DNA에서는 YY1 부착 부위에서 어떠한 변이가 없고, YY1 부착 부위의 변이는 단지 부체형의 HPV DNA를 갖는 자궁경부암의 발생에 있어서만 선택적으로 일어날 수 있는 것으로 발암 기전으로 생각된다. 본 연구 결과에서는 부체형의 HPV DNA를 갖는 자궁경부암의 HPV-16 URR에서는 YY1 부착 부위들의 유전자 소실이 관찰되지 않았지만 부체형의 HPV DNA를 갖는 3명의 자궁경부암 환자들에서 모두 YY1 부착 부위 2와 부위 3에서 점 변이들이 나타난 것을 관찰할 수 있었다. 이 부분에서 나타난 URR 변이체들을 원형의 HPV-16 URR의 활성도와 비교했을 때 2 4배 증가된 promoter 활성도를 보였다. YY1 부착 부위 3에서 발견되는 하나의 점 변이만으로도 promoter의 활성도를 충분히 증가시켰다는 이전 보고[14]는 본 연구에서 발견된 YY1 부착 부위 2와 부위 3에서 변이가 나타나서 활성도를 저하시켰던 결과와 밀접한 관계가 있다. 부체형의 HPV-16을 갖는 12명의 자궁경부 상피이형증 환자들과 융합형 HPV-16 DNA를 갖는 12명의 자궁경부암 환자들의 URR 유전자에서는 YY1 부착 부위 2와 3에서 어떠한 변이도 관찰되지 않았으며, 이들의 URR 전사 활성도는 원형 URR의 전사 활성도에 비교하여 거의 차이가 없었다. YY1 부위 이외의 다른 부위에서도 변이들을 발견할 수 있었지만 유전자 지도를 검토하고, 변이체의 기능적인 분석을 통하여 비교한 결과 별 다른 의미는 없는 부분으로 생각되었다.

몇몇 세포내 전사 조절인자들, AP-1, NFI, TEF-1, KRF-1, GR은 URR의 양성 조절 기능과 관련이 있다고 하며[26], 바이러스 E2[23,24], 세포성 NF-IL6[12] Oct-1[13], YY1[14-17,27,28]은 HPV-16이나 HPV-18를 갖고 있는 세포들에서 URR 유전자의 음성 기능으로 억제 조절로서 작용한다. 또한, 세포핵의 retinoic acid 수용체들은 HPV-18 URR의 발현을 억제시킬 수도 있다고 한다[29]. 그러므로 양성 인자들이 과잉 활성화되거나 음성 인자들에 의해 조절 억제 상태에 있을 때 URR 활성도를 상승 조절시킬 수 있다. 본 연구에서는 부체형의 HPV에 의한 자궁경부암 발생 기전을 규명하고자 하였으나 YY1 부착 부위 이외의 특정한 다른 부위들에서는 변이를 발견 못하였고, YY1 부착 부위에서만 기능적으로 차이가 있는 변이를 발견했다. 부체형의 HPV 유전자를 갖고 있는 자궁경부암에서 이와 같은 YY1 부착 부위에서 자연적으로 발생하는 유전자 변이나 소실은 전사 활성도를 증가시키고, 이로 인한 결과 암이 발생할 수 있다. 자궁경부 종양의 임상 조직으로부터 본 연구 결과는 이전 연구 발표들[14,15]과 유사한 HPV-16 URR의 유전자 변이 양상과 기능적인 활성도를 보여 주었다. 그러므로 YY1은 HPV 전사 수준을 낮게 유지시킬 수 있지만, 전사 환경에 변화가 생기거나 YY1 부착 부위에서 변이가 발생하면 HPV 발암 유전자의 발현 수준이 높아진다.

HPV-16의 변종들은 안정화되어 있어 동일 지역의 서로 다른 개개인에서 동일한 변종들이 발견되고 있다. HPV-16에 대해 다섯 개의 다른 계통발생적인 갈래들이 보고 되었고 이들 갈래들은 European, Asian, Asian-American, African-1, African-2로 구분되었다[30,31]. 한 지역에서의 게놈 누클레오타이드 변화는 같은 계보내의 다른 지역들에서 발견되는 변화들의 표시자들로서 사용될 수 있다. 변종에

대한 연구들에서 HPV-16 L2 ORF는 다른 유전자 부분보다 변이가 많아 URR 만큼이나 다양한 반면 L1 ORF는 가장 잘 보존된 부위인 것으로 나타났다[32]. 한국 여성들의 자궁경부 종양 조직들의 HPV-16 DNA 내의 URR 유전자 구조는 몇몇 부위들에서 원형 HPV-16 DNA와 비교할 떠 특정 부분에서 차이가 나타나는 부분이 있었다. 한국 여성에서 흔하게 나타나는 HPV-16 URR 내의 특이한 변종(variation)들은 nt 7520(100%, 27/27)에서 G→A 치환, nt 7729(70%;19/27)에서 A→C 치환이다. 이들은 안정된 치환 부위들로서 이미 알려져 있는 전사 조절 부위들과는 일치하지 않았으며, 원형 HPV-16 URR와 비교해도 기능적으로 차이가 없다는 것을 밝힐 수 있었다. 흥미롭게도 nt 7841(YY1 부착 부위 6)에서 G→A 치환은 자궁경부 종양에서 높은 빈도에서 관찰되었는데(78%; 21/27), 이 부위는 변이가 상대적으로 안정화되어 있었고, URR promoter 활성도에 어떤 중요한 영향을 미치지 않았기 때문에 한국인에서 나타나는 특이한 변종인 것으로 보여진다.

본 연구 결과를 정리하면 부체형의 HPV-16 DNA를 가지는 자궁경부암 환자들은 HPV-16 URR의 YY1 부착 부위들에서 선택적인 점 변이들을 나타냈으며, YY1-부착 부위 2와 부위 3에서 점 변이를 가진 HPV-16 URR 유전자는 원형 HPV-16 URR과 비교해 2 4배 증가된 promoter 활성도를 나타냈다. 이러한 결과는 부체형의 HPV-16 DNA를 가진 자궁경부 전암 병변이 자궁경부암으로 진행되는 과정에서 HPV 유전자의 융합에 의한 주된 기전 외에 부가적인 기전으로 설명할 수 있었으며, YY1 부착 부위에서 나타난 변이들은 YY1에 의한 전사 억제를 경감시키고, 이로 인해 부체형의 HPV-16를 갖는 자궁경부 전암 병변에서도 자궁경부암이 발생할 수 있다는 가설을 한국 여성에서도 재확인할 수 있었다. 또한, HPV-16 URR 유전자내에 nt 7520에서 G→A 치환, nt 7729에서 A→C 치환과 nt 7841(YY1 부착 부위 6)에서 G→A 치환이 있는 한국형 정상 변종을 발견할 수 있었다.

결론적으로 자궁경부암의 발생, 침윤, 진행에 관계하는 HPV-16 URR 특정 부분의 변이 유전자를 기능적으로 평가하여 자궁경부의 초기 병소인 HPV 감염 상태나 초기 상피이형증에서 HPV 유전자의 진단을 이용하여 예후의 평가에 필요한 지표를 설정할 수 있는 자료를 제시하였다는 임상적인 의미가 있다. 또한, 한국형 변종을 발견한 것은 자궁경부암의 발생 원인인 HPV 감염을 분자생물학적인 방법으로 역학 조사에 응용될 수 있을 것이며, 한국 여성에서 HPV 감염 경로를 추적하는데에 단서를 제공할 수 있으며, 지리학적인 차이에 따라 다르게 나타나는 HPV 감염의 분포도와 자궁경부암의 발병율을 규명하는데에도 중요한 자료로서 이용될 수 있을 것이다.

V. 결 론

자궁경부의 HPV 감염이나 초기 상피이형증의 경우에 존재하는 HPV-16 DNA는 대부분에서 부체 상태로 존재하나 중증 상피이형증이나 자궁경부암으로 진행되면서 체세포의 염색체내로 융합되는 것으로 알려지며, 발암과 진행 과정에서 HPV-16 유전자의 융합 현상이 연관이 있다고 알려지고 있다. 간혹, 자궁경부암에서 발견되는 부체 상태의 HPV-16은 HPV 암유전자의 발현을 조절하는 부위인 URR 특정 부위의 변이가 자궁경부암 발생 기전을 설명하는 가설로서 제기되고 있다. 본 연구에서는 이러한 가설을 입증하기 위해 HPV-16 URR의 특정 부위의 변이가 HPV-16 DNA의 물리적 상태에 따른 차이를 규명하고, 자궁경부암의 침윤, 진행 과정에서 변이된 HPV-16 URR 유전자의 역할을 기능적으로 분석하고자 하였다.

HPV-16 URR 유전자는 자궁경부 상피이형증과 자궁경부암 환자들로부터 얻은 HPV-16 유전자에서 PCR 반응으로 증폭한 후, 유전자 재조합을 통하여 pUB18 vector에서 DNA sequencing으로 HPV-16 URR의 변이를 찾았으며, 유전자 재조합를 통하여 pBLCAT8+ vector에서 CAT assay로 변이된 HPV-16 URR 유전자의 기능적 분석을 하였다.

자궁경부 종양 환자의 실험 대상의 분류는1) 부체 상태의 HPV-16 DNA를 갖는 3명의 자궁경부암 2) 융합된 HPV-16 DNA를 갖는 12명의 자궁경부암 3) 부체상태의 HPV-16 DNA를 갖는 12명의 자궁경부 상피이형증 환자으로 하였다. 자궁경부 상피이형증과 자궁경부암 환자들의 자궁경부 병소 세포에서 채취한 DNA에서 PCR 반응으로 HPV-16 URR 유

전자를 증폭한 후, DNA sequencing으로 HPV-16 URR의 변이를 찾은 결과, HPV-16 URR의 특징적인 한국형 변종들(variants)으로 생각되는 유전자 변이를 발견할 수 있었다. 그 부위는 nt 7520에서 G→A 치환(100%; 27/27), nt 7729에서 A→C 치환(70%; 19/27), nt 7841에서 G→A 치환(78%; 21/27)된 것으로 많은 빈도에서 나타나는 것을 관찰할 수 있었으나, 이들의 기능적 분석을 통한 차이점은 발견할 수 없었다. 또한, 선별적인 변이가 부체 형태의 HPV-16 DNA를 가지는 3명의 침윤성 자궁경부암 환자의 HPV-16 URR의 YY1 부착 부위에서 관찰되었으며, nt 7484에서 A→C 치환과 nt 7488에서 G→A 치환(YY1 부착 부위 2; 7481에서 7489)으로 동시에 나타난 것이 3명 모두 발견되었고, nt 7785(YY1 부착 부위 3; 7781에서 7789)에서 C→T 치환된 경우는 3명 중 2명에게서 발견할 수 있었다. 각각 12명의 부체형의 HPV-16을 가진 자궁경부 상피내종양 환자들과 융합형 HPV-16을 가진 자궁경부암 환자들에서는 위와 같은 YY1 부착 부위 2와 부위 3에서 변이가 관찰되지 않았다. HPV-16 URR에 의해 조절되는 HPV-16 E6/E7 유전자 표현이 이러한 특정한 URR 부위에서 변이가 나타난 것이 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 HPV-16 URR-CAT reporter plasmid를 사용해 transient transfection assay를 시행하였다. YY1 부착 부위 2와 부위 3에서 변이가 관찰되는 부체형의 HPV-16 DNA를 갖는 3명의 자궁경부암 환자의 URR 변이체들의 상대적인 활성도는 원형 HPV-16 URR의 활성도보다 2 4배 더 높게 나타났다. 융합형 HPV-16 DNA를 가진 자궁경부암과 부의 HPV-16 URR의 YY1 부착 부위 2와 부위 3에서 변이가 발견되지 않았으며, 그들의 HPV-16 URR 활성도 수준은 원형 HPV-16 URR과 유사하게 나타났다.

결론적으로 본 연구 결과 HPV-16 URR의 특징적인 변종(variant)으로 생각되는 유전자 변이를 한국 여성들에서 발견할 수 있었으며, 이들에서의 기능적인 차이점은 발견할 수 입었다. 부체형의 HPV-16 DNA를 갖고 있는 한국 여성의 자궁경부암 환자에서는 HPV-16 YY1 부착 부위 2 와 부위 3에서 특이한 변이가 발견되었으며, 이러한 특정한 부위의 변이는 원형 HPV-16 URR의 활성도보다 2 4배 더 높게 나타났고, 융합형 HPV-16 DNA를 가진 자궁경부암과 부체형의 HPV-16 DNA를 가진 자궁경부 상피이형증의 HPV-16 URR에 비해서도 활성도가 높은 것을 알 수 있었다.

이와 같은 결과는 부체형의 HPV는 HPV 암유전자의 발현을 조절하는 URR 특정 부위의 변이가 자궁경부암 발생 기전에 기여할 수 있는 새로운 경로라는 과거의 가설을 다수의 임상적인 종양 조직을 이용한 연구 결과로서 뒷받침할 수 있었고, 자궁경부암의 발생, 침윤, 진행에 관계하는 HPV URR 유전자 특정 부분의 변이 유전자를 기능적으로 평가하여 진단과 예후의 평가에 필요한 임상적인 지표를 설정할 수 있는 자료를 제시하였다는 의미가 있다.

- Reference -

1. zur Hausen H: Human papillomavirus in anogenital cancer as a model to understan- ding the role of viruses in human cancer. Cancer Res 1989;49:4677-81.
2. Matsukura T, Koi S, Sugase M: Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. Virology 1989;172:63-72.
3. Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT: Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasia. J Virol 1991;65:606-12.
4. Park JS, Hwang ES, Park SN, Ahn HK, Um SJ, Kim CJ, Kim SJ, Namkoong SE: Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. Gynecol Oncol 1997;65:121-6.
5. zur Hausen H: Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. Virology 1991;184:9-13.
6. Dyson M, Howley PM, Munger K, Harlow E: The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science 1989;243:934-7.
7. Werness BA, Levine AJ, Howley PM: Association of human papillomavirus type 16 and 18 proteins with p53. Science 1990;248:76-9.
8. DiMaio D: Transforming activity of bovine and human papillomaviruses in cultured cells. Adv Cancer Res 1991;56:133-59.
9. Munger K, Phels WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R: The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. J Virol 1991;63:4417-21.
10. Smotkin D, Prokoph H, Wettstein FO: Oncogenic and non-oncogenic human paillomaviruses generate the E6 and E7 mRNA by different mechanism. J Virol 1989;63:1441-7
11. McBride AA, Romanczuk H, Howley PM: The papillomavirus E2 regulatory gene proteins. J Biol Chem 1991;266:18411-4.

12. Kyo S, Inoue M, Nishio Y, Nakanishi K, Akira S, Inoue H, Yutsudo M, Tanizawa O, Hakura A: NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type 16 through binding to the noncoding region. J Virol 1993;67:1058-6.
13. Hoppe-Seyler F, Butz K, zur Hausen H: Repression of human papillomavirus type-18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. J Virol 1991;65:5613-8.
14. May M, Dong XP, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG, Pfister H: The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV-16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. EMBO J 1994;13:1460-6.
15. Dong XP, Stubenrauch F, Beyer-Finkler E, Pfiester H: Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. Int J Cancer 1994;58:803-8.
16. O'Connor MJ, Tan SH, Tan CH, Bernard HU: YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. J Virol 1996;70:6529-39.
17. Chen Z, Storthz KA, Shillitoe EJ:. Mutations in the long control region of human papillomavirus DNA in oral cancer cells, and their functional consequences. Cancer Res 1997;57:1614-9.
18. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:5463-7.
19. Seedorf K, Kraemmer G, Durst M, Suhai S, Roewekamp WP: Human papillomavirus type 16 sequence. Virology 1985;145:181-5.
20. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
21. McBride AA, Myers G: The E2 proteins. in Myers G, Bernard H-U, Baker C, Halpern A, Delius H, Icenogle J(eds): Human Papillomavuruses 1997. Los Alamos Laboratory, 1997;III 54-73.
22. Kovelman R, Bilter GE, Glezer E, Tsou AY, Barbosa MS: Enhanced transcriptional activation by E2 proteins from the oncogenic human papillomaviruses. J Virol 1996;70:7549-60.
23. Dostatni N, Lambert PF, Sousa R, Ham J, Howley PM, Yaniv M: The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. Genes Dev 1991;5:1657-71.
24. Tan SH, Leong LE, Walker PA, Bernard HU: The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. J Virol 1994;68:6411-20.
25. Lambert PF: Papillomavirus DNA replication. J Virol 1991;65:3417-20.
26. O'Conner MJ, Chan S-Y, Bernard HU: Transcriptional factor binding sites in the long control region of genital HPVs. in Myers G, Bernard H-U, Baker C, Halpern A, Delius H, Icenogle J(eds): Human Papillomaviruses 1995. Los Alamos Laboratory, 1995;III 21-40.
27. Bauknecht T, Jundt F, Herr I, Oehler T, Delius H, Shi Y, Angel P, zur Hausen H: A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. J Virol 1995;69:1-12.
28. Bauknecht T, Angel P, Royer HD, zur Hausen H: Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type-18 promoter: interaction with the transcription repressor YY1. EMBO J 1992;11:4607-17.
29. Bartsch D, Boye B, Baust C, zur Hausen H, Schwarz E: Retinoic acid-mediated repression of human papillomavirus 18 transcription and different ligand regulation of the retinoic acid receptor β gene in non-tumorigenic and tumorigenic HeLa hybrid cells. EMBO J 1992;11:2283-91.
30. Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Durst M, Meulen J ter, Villa L, Luande F, Mgaya HN, Bernard HU: Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. J Virol 1992;66:2057-66.
31. Ho L, Chan S-Y, Burk RD, Das BC, Fujinanga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Naraz P, Labropoulou V, Mitrani-Rosenbaum S, Norrild M, Pillai MR, Stoerker J, Sjrjaenen K, Sjrjaenen S, Tay SK, Villa LL, Wheeler CM, Williamson AL, Bernard HU: The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human ethnic groups. J Virol 1993;67:6413-23.
32. Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Sterwart ACM, Hildersheim A, Jenison SA: Human papillomavirus type 16 variants lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. J Virol 1995;69:7743-53.