

(국책) 분자 및 세포기능 디스커버리 사업

Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase 돌연변이  
바이러스를 활용한 바이러스 잠복감염으로부터의  
재활성기전 연구

Studies on the mechanisms of reactivation from latent infection  
using thymidine kinase mutants of herpes simplex virus type 1

한국화학연구원

과학기술부

## 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase 돌연변이 바이러스를 활용한 바이러스 잠복감염으로부터의 재활성기전 연구”의 보고서로 제출합니다.

2004. 12.

주관연구기관명 : 한국화학연구원

주관연구책임자 : 이 종 교

연 구 원 : 김 해 수

배 판 기

남 주 령

이 명 진

김 지 현

김 도 완

## 보고서 초록

과제관리번호	MI-0106-00-0102	해당단계 연구기간	2001.8.1~ 2004.5.31	단계 구분	1/1	
연구사업명	중 사업명	국책연구개발사업				
	세부사업명	분자및세포기능디스커버리사업(분자의과학사업 이관)				
연구과제명	중 과제명					
	세부(단위)과제명	Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase 돌연변이 바이러스를 활용한 바이러스 잠복감염으로부터의 재활성기전 연구				
연구책임자	이종교	해당단계 참여연구원수	총 : 5 명 내부 : 2 명 외부 : 3 명	해당단계 연구비	정부: 240,000 천원 기업: 0 천원 계: 240,000 천원	
연구기관명 및 소속부서명	한국화학연구원 약리활성연구팀		참여기업명			
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :				
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :				
요약					보고서 면수	117
<p>HSV-1 thymidine kinase (TK)-deficient 돌연변이주와 세포배양체계를 이용하여 바이러스 잠복감염으로부터 재활성기전에 TK의 필수성 및 각 돌연변이 TK의 효소학적 시험결과는 다음과 같음.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 9 종의 바이러스 TK유전자의 대장균내 발현체계를 확립하고 분리된 단백질로 효소활성을 조사하여, 돌연변이주들을 활성이 조금 남아 있는 TK-partial과 전혀 없는 TK-negative군으로 분류.</li> <li>- TK-negative주는 thymidylate kinase 활성도 없음을 확인.</li> <li>- 마우스 일차 배양 신경세포와 PC-12세포에서 바이러스 잠복감염 유도 체계 확립.</li> <li>- 잠복감염으로부터 재활성 유도시험결과 Vero세포와의 coculture법이 가장 적합함을 확인.</li> <li>- 마우스 일차신경세포에서는 wild type의 재활성효율이 매우 낮으며 (&lt;20%), TK-negative주는 더 낮음.</li> <li>- PC-12에서는 100% 재활성이 일어났으며, 모든 돌연변이주의 재활성관찰.</li> <li>- HSV-1의 TK단백질은 감염 2 시간 후부터 감지되어, 세포가 죽을 때까지 세포핵에 다량 존재.</li> <li>- TK는 바이러스 증식과 무관하게 세포내 핵산 및 핵산유도체의 uptake를 크게 증가시킴</li> <li>- 각 돌연변이주의 TK localization 시험결과 단백질이 소량 발현되는 TK 유전자의 mRNA 생성량은 정상임을 확인하여, nuclear transport signal주위의 돌연변이와 관련될 것을 추정.</li> <li>- 바이러스로 감염된 세포추출물의 2D 전기영동 및 분석체계 구축</li> <li>- LAT유전자의 클로닝과 염기서열을 결정.</li> <li>- 잠복감염된 마우스삼차신경의 DNA와 RNA에서 LAT확인</li> <li>- 마우스 감염모델에서 TK-negative바이러스의 조직 바이러스 역가가 낮음 확인</li> </ul> <p>결론으로, HSV-1 TK돌연변이주들의 TK의 효소학적 특성에 TMPK활성여부를 첨가할 수 있었음. PC-12에서 모든 돌연변이주의 재활성이 관찰되었으나, PC-12세포가 마우스 일차 배양 신경세포와는 달리 cellular TK를 발현함을 확인하였기에 바이러스 TK가 재활성에 필수적이지 않다라는 결론은 내릴 수가 없었음. 대신에 바이러스 동물감염에서 TK가 병원성에 큰 영향을 끼침을 발견. 이는 동물 감염직후 선천면역을 회피기전 또는 세포내 바이러스 증식저해 기능회피기능 때문일 것으로 추측. 즉 TK활성의 결여로 바이러스가 초기에 제거되거나 세포내에서 증식을 못하기 때문일 것임.</p>						
색인어 (각 5개 이상)	한글	허피스 심플렉스 바이러스, 티미딘 인산화효소, 잠복감염, 재활성, 티밀레이트 인산화 효소, 항바이러스 활성, 마우스 감염모델, 프로테오믹스				
	영어	herpes simplex virus, thymidine kinase, latency, reactivation, thymidylate kinase, antiviral activity, mouse infection model, proteomics				

## 요 약 문

### I. 제 목

Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase 돌연변이 바이러스를 활용한 바이러스 잠복감염으로부터의 재활성기전 연구

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

피곤할 때 입가에 흔히 생기는 물집은 감염되었던 herpes simplex virus (HSV)가 특정 신경세포에 잠복하고 있다가 일부가 재활성되어 처음의 감염장소로 이동하여 다시 증식하는 표시이다. Episome 상태로 잠복되어 있으며, 피곤함, 스트레스, 자외선 노출 등에 의해 재활성이 이루어진다는 사실은 알지만, 어떤 기전으로 잠복상태로 되는지, 어떻게 재활성이 되는지는 거의 알려져 있지 않다. 재활성에의 필요여부에 대해 오랜 논란을 일으킨 HSV-1 thymidine kinase (TK)의 여러 돌연변이주들을 이용한 시험관, 세포, 동물체계 연구를 통하여, TK의 특성규명과 재활성에서의 TK의 필요성여부를 결정하며, 잠복감염 및 재활성기전연구의 종합적인 연구기반을 구축함이 연구목적이었다.

HSV의 TK는 중요 허피스치료제의 활성화와 내성기전에 관여하기에, 허피스 치료제 개발을 위한 약효평가에서 TK의 기능결여 돌연변이주 확보는 필수적이었고, 항바이러스효과를 나타내는 시료들에 대한 동물체계 약효평가와 작용기전 및 약제내성 기전연구 체계 구축 또한 필요하였다. 이를 위해 acyclovir로 약제내성을 유도하여 돌연변이주를 유도·분리하고 이들에 대한 동정과 약제내성기전 연구를 통하여 바이러스주의 자체확보와 기술축적 시도를 시작했다. 그 후 다양한 약물로 약제내성주 (모두 TK-기능결여)를 분리하였지만, 처음에 분리한 9 개의 내성주 (AR1 - AR9)에 대한 연구가 유전자 분석, 효소활성, 세포 및 동물 체계 약효, 마우스에서의 병원성 및 재활성 등의 측면에서 가장 많이 이루어졌다. 세포배양시 TK기능 결여주들의 증식은 wild type (WT)과 차이가 없기에, 생체내에서의 TK의 역할 규명에 대한 연구 또한 전 세계적으로 많이 이루어져왔다. TK-결여를 이용한 시험결과로 TK가 생체감염시 병원성, 잠복감염, 재활성기전에 관여할 수 있다는 보고들이 있으나 서로 상반된 결과들로 인하여 명백한 결론은 없는 편이다. 잠복감염과 재활성 저해를 위한 치료제 개발의 어려움은 외국에도 적용되기에, 시험관과 세포와 동물체계에서 종합적으로 동정이 이루어져온 AR돌연변이주를 활용한 잠복감염과 재활성 연구는 경쟁력

이 충분하다고 판단하여 이 연구를 수행키로했다. 연구모델이 잘 갖추어진 HSV-1은 DNA 바이러스연구의 선두를 차지하는 바이러스이기에 타 바이러스 연구에의 활용성도 함께 고려되었다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

세포배양체계 잠복감염과 재활성 유도 및 확인체계를 구축하여, 돌연변이주들의 특성을 wild type과 비교하여 TK의 재활성에서의 필요성 여부를 결정하고, 세포나 생체내 잠복감염을 확인하거나 TK와 반응 또는 영향을 받는 세포물질을 분석할 수 있는 기술을 구축하여 활용하며, 돌연변이 TK의 효소학적 특성 규명, 특히 thymidylate kinase (TMPK) 측면에서의 활성 조사와 그 밖의 TK의 기능에 대한 연구가 주요 내용이다. 이를 위해 일차 신경세포 배양법을 확립하여 HSV의 잠복감염과 재활성 유도체계를 구축하며, 세포 및 동물내 잠복감염 확인을 위한 분석체계를 구축하고 바이러스에 적용하여 재활성에서의 TK의 필요성을 규명하며, 2D 전기영동을 활용한 세포 단백질 발현 분석, 각 HSV 돌연변이 TK 유전자의 대장균내 발현체계 확립 및 분리정제 후 효소 활성 측정 및 TK 저해제 탐색수행이 연구내용이었다.

### IV. 연구개발결과

HSV-1 thymidine kinase (TK)-deficient 돌연변이주와 세포배양체계를 이용하여 바이러스 잠복감염으로부터 재활성기전에 TK의 필수성 및 각 돌연변이 TK의 효소학적 시험 및 기타 시험관, 세포, 동물체계를 이용한 시험 결과는 다음과 같다.

- 9종의 바이러스 TK유전자의 대장균내 발현체계를 확립하고 분리된 단백질로 효소활성을 조사하여, 돌연변이 주들을 활성이 조금 있는 TK-partial과 전혀 없는 TK-negative군으로 분류하였다.
- TK-negative주는 TMPK활성도 없음을 확인하였다.
- 마우스 일차 배양 신경세포와 PC-12세포에서 바이러스 잠복감염 유도 체계를 수립하였다.
- 잠복감염으로부터 재활성 유도시험결과 Vero세포와의 coculture법이 가장 적합함을 확인하였다.
- 마우스 일차신경세포에서는 wild type의 재활성효율이 매우 낮으며 (<20%), TK-negative주는 더 낮음을 발견하였다.
- PC-12에서는 100% 재활성이 일어났으며, 모든 돌연변이주의 재활성도 관찰하였다.

- HSV-1의 TK단백질은 감염 2 시간 후부터 감지되어, 세포가 죽을 때까지 세포핵에 다량 존재함을 발견하였다.
- TK는 바이러스 증식과 무관하게 세포내 핵산 및 핵산유도체의 uptake를 크게 증가시킴을 발견하였다.
- 각 돌연변이주의 TK localization 시험결과 단백질이 소량 발현되는 TK 유전자의 mRNA 생성량은 정상임을 확인하여, nuclear transport signal주위의 돌연변이와 관련될 것을 추정하였다.
- 바이러스로 감염된 세포추출물의 2D 전기영동 및 분석체계 구축하였다.
- LAT유전자의 클로닝과 염기서열을 결정하였다.
- 잠복감염된 마우스삼차신경의 DNA와 RNA에서 LAT 유전자를 확인하였다.
- 마우스 감염모델에서 TK-negative바이러스의 조직 바이러스 역가가 낮음 확인하였다.

결론적으로, HSV-1 TK돌연변이주들의 TK의 효소학적 특성에 TMPK활성여부를 첨가할 수 있었다. PC-12에서 모든 돌연변이주의 재활성이 관찰되었으나, PC-12세포가 마우스 일차 배양 신경세포와 달리 cellular TK를 발현함을 확인하였기에 바이러스 TK가 재활성에 필수적이지 않다라는 결론은 내릴 수가 없었다. 대신에 바이러스 동물감염에서 TK가 병원성에 큰 영향을 끼침을 발견하였고, 이는 동물 감염직후 선천면역을 회피기전 또는 세포내 바이러스 증식저해 기능회피기능 때문일 것으로 추측된다. 즉 TK활성의 결여로 바이러스가 초기에 제거되거나 감염세포내에서 증식을 못하기 때문일 것으로 사료된다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

HSV-1 TK의 기능 중의 하나가 감염된 바이러스의 생체내 확산 수단이라는 점은 HSV 치료제 개발을 위한 새로운 작용점이라 하겠다. 본 연구를 통해 분리한 HSV-1 reccombinant TK단백질을 활용하여 TK 저해제 탐색을 수행할 예정이며, 잠복감염과 재활성기전 연구를 계속 수행할 예정이다. HSV감염에 의한 질병은 생체내 면역체계와 긴밀한 관계가 있기에 면역병리학적 측면에서의 연구를 수행하여, HSV-1 TK감염에 대한 선천면역과 후천면역 영향을 조사하며, HSV-1 TK 돌연변이주를 면역반응을 유도할 수 있는 도구로 삼는 가능성을 조사할 예정이다. HSV의 증식기전, 잠복감염, 재활성, 병원성 기전 등에 대한 이해 확대와 확보한 시험기술과 시험재료는 다른 바이러스나 다른 연구분야에도 활용할 수 있을 것이다. 성병을 주로 유발하여 많은 사회적 문제를 야기하는 HSV-2 연구에도 활용하여, 현재 치료제나 백신이 전혀 없는 herpes 잠복감염이나 재활성 저해제를 개발할 수 있는 연구기반을 지속적으로 조성할 예정이다.

# S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

## I. Subject

Studies on the mechanisms of reactivation from latent infection using thymidine kinase mutants of herpes simplex virus type 1

## II. Objectives and Significance

Studying viral latency and reactivation from the latent infection is important to eradicate virus in an virus-infected person or to develop new antiviral agents or vaccine. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a DNA virus, one of the most interesting virus with very good experimental models for latency and reactivation studies. HSV-1 thymidine kinase (TK) plays important role in antiviral drug resistance and chemogene therapy and pathogenesis in in vivo infection. The possible role of the viral TK in reactivation has been suggested from the results mostly obtained with TK-deficient mutants of HSV-1. We would like to confirm that possibility by using our various TK-deficient mutants and cell-based latency and reactivation models because and also to investigate the enzymatic properties of the TK proteins.

## III. The scope of the study

This 3 year project of "studies on drug-resistant mechanisms of antiviral and anticancer" has been conducted with the following scope:

1. In vitro studies on enzymatic aspects of the TK and LAT gene of HSV-1
  - Cloning of the viral TK gene of various TK mutants for gene expression in E. coli
  - Isolation and purification of recombinant TK (recTK) proteins from E. coli
  - Enzymatic analysis of the purified recTK proteins
  - Cloning of the LAT gene and its DNA sequence analysis
  
2. Cell-based studies on the functions of the TK
  - Establishment of primary mouse neuronal cell cultures
  - Establishment of cell-based latent infection of various mutant strains
  - Establishment of induction method for synchronous reactivation from the latent infection
  - Comparison of reactivation from latency with the mutant strains

- Establishment of 2D-analysis method
- Determination of dNTP pools in virus-infected cells

### 3. Cell-based studies on the functions of the TK

- Establishment of primary mouse neuronal ce

## IV. Results

We cloned the TK gene of 9 TK-deficient mutant strains of HSV-1 strain F and isolated expressed TK proteins in *E. coli*. With these recombinant TK proteins TK and thymidylate kinase activity was measured. We could classifiend the TK-deficiency into TK-partial and TK-negative groups. All of the TJ-negative strains had no TMPK activity. Primary neuronal cells isolated from adult mice were cultivated and infected with the virus to bring the latent stage by using anti-herpetic drugs. All the viral strains showed latent infection but reactivation was not properly induced. Co-culture with indicator cells gave the highest reactivation rate (<20%), but still to low to bring the induction sychronously. An established cell line, PC-12 cell was used also. All the mutants showed reactivation, i.e. without viral TK activity reactivation could occur. But unlike mouse primary neuronal cells PC-12 cells had cellular TK activity, we could not rouled out that cellular TK could also support the reactivation. We establish 2-dimensional gel electrophoresis for further investigation of interaction of the TK with cellular factors. Neuronal cells in vivo have little dNTP pools. The influence of the TK on the intracellular uptake of thymidine and also TK-dependent antiviral agents such as acyclovir, penciclovir and ganciclovir was investigated. The TK increased the uptake of such compounds regardless of viral DNA replication. We could confirm the TK proteins localized mainly in the cell nucleus throughout the viral replication cycle from 2 h postinfection.

## V. Recommendation

HSV-1 TK can be used as a marker of virus suceptibility to host cells. The experiences and information from this study can be used for development of new drugs and for basic reseach directly or indirectly, especially for the investigation of HSV type 2 and other viruses.



# C O N T E N T S

(영 문 목 차)

<b>Chapter 1. Summary</b> .....	1
Section 1. Objectives of the studies .....	1
Section 2. Necessity of the studies .....	1
Section 3. The scope of the studies .....	2
<b>Chapter 2. States of Technical Developments</b> .....	4
<b>Chapter 3. Contents and Results of the Studies</b> .....	10
Section 1. Contents of the studies .....	10
1. Studies in test tube .....	10
A. Enzymatic studies on HSV-1 TK .....	10
(1) Cloning of the HSV-1 TK genes for gene expression .....	10
(2) Isolation and purification of the recTK protein .....	10
(3) TMPK activity .....	10
(4) Search for TK inhibitors .....	10
B. Cloning and sequence analysis of the LAT gene .....	10
2. Cell-based studies .....	10
A. Establishment of latency and reactivation model of HSV-1 in cell culture system .....	11
(1) Mouse primary neuronal cell culture .....	11
(2) PC-12 cell culture .....	11
(3) Induction and confirmation of viral latency in neuronal cell culture .....	11
(4) Induction and reactivation of reaction from latently infected neuronal cells .....	11
B. Interaction of TK with cellular materials .....	11
(1) Expression of the TK gene in HSV-1-infected cells .....	12
(2) 2D gel electrophoresis of cell lysates .....	12
(3) Quantification of thymidine and its metabolites in cells .....	12
(4) Cell tropism of HSV-1 .....	12
3. Animal study .....	12
Section 2. Materials and Methods .....	12
1. Materials .....	12
A. Cells .....	12
B. Viruses .....	12

C. Bacteria .....	12
D. Animals .....	13
E. plasmid DNAs .....	13
F. Test reagents .....	13
2. Methods .....	13
A. Culture of cell lines .....	13
B. Primary culture of mouse neuronal cells .....	14
C. Virus amplification .....	14
D. Virus titration .....	14
E. Antiviral evaluation .....	14
F. Cytotoxicity assay .....	15
G. MTT assay .....	15
H. Protein assay .....	16
I. SDS/polyacrylamide gel electrophoresis .....	16
J. Protein staining .....	16
K. Western analysis .....	17
L. Expression of the TK gene in E. coli and purification of the TK proteins...	17
M. Assay for TK activity .....	18
N. Assay for TMPK activity .....	19
O. Gene manipulation .....	19
P. Isolation of the viral DNAs .....	19
Q. PCR amplification of DNAs .....	20
R. Analysis of DNA sequences .....	20
S. Cloning of the HSV-1 viral genes .....	20
T. Detection of the viral genes in tissues from the virus-infected mice .....	20
U. 2D gel electrophoresis .....	22
V. Radiolabeling of proteins in the virus-infected cells .....	23
W. TK의 intracellular localization .....	23
X. Mouse cutaneous infection model for HSV-1 .....	24
Y. Mouse intranasal infection model for HSV-1 .....	24
Z. Mouse intracerebral infection model for HSV-1 .....	24
Section 3. Results .....	25
1. Studies in test tube .....	25
A. Enzymatic studies on HSV-1 TK .....	25
(A) Cloning of the HSV-1 TK genes for gene expression .....	25
(B) Isolation and purification of the recTK protein .....	25
(C) TMPK activity .....	28

(D) Search for TK inhibitors .....	30
B. Cloning and sequence analysis of the LAT gene .....	36
2. Cell-based studies .....	47
A. Establishment of latency and reactivation model of HSV-1 in cell culture system .....	47
(A) Mouse primary neuronal cell culture .....	47
(B) PC-12 cell culture .....	47
(C) Induction and confirmation of viral latency in neuronal cell culture .....	47
(D) Induction and reactivation of reaction from latently infected neuronal cells .....	55
B. Interaction of TK with cellular materials .....	60
(A) Localization of the TK proteins in HSV-1 infected cells .....	60
(B) Expression of the TK gene in HSV-1-infected cells .....	60
(C) 2D gel electrophoresis of cell lysates .....	60
(D) Quantification of thymidine and its metabolites in cells .....	65
3. Animal study .....	74
A. Virus titers of the tissues of HSV-1 infected mice .....	74
<b>Chapter 4. Achievement and contribution .....</b>	<b>82</b>
Section 1. Achievement .....	82
Section 2. Contribution .....	82
<b>Chapter 5. Future plans .....</b>	<b>86</b>
<b>Chapter 6. Foreign information in science and technology received through the studies ....</b>	<b>87</b>
<b>Chapter 7. References .....</b>	<b>88</b>

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	1
제 1 절 연구개발의 목적 .....	1
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	1
제 3 절 연구개발의 범위 .....	2
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	4
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	10
제 1 절 연구내용 .....	10
1. 시험관체계 연구 .....	10
가. HSV-1 TK의 효소학적 연구 .....	10
(1) TK 유전자 발현을 위한 HSV-1 돌연변이 TK 유전자의 클로닝 .....	10
(2) recTK 단백질의 분리 .....	10
(3) 돌연변이 TK의 TMPK활성 .....	10
(4) TK저해제 탐색 .....	10
나. LAT 유전자의 클로닝 및 염기서열 결정 .....	10
2. 세포체계 연구 .....	10
가. 세포체계 잠복감염과 재활성 모델구축 및 활용 .....	11
(1) 마우스 신경세포 일차 배양 .....	11
(2) PC-12 세포 배양 .....	11
(3) 신경세포의 바이러스 잠복감염 유도 및 확인 .....	11
(4) 잠복감염된 신경세포로부터 재활성 유도 및 확인 .....	11
나. TK와 세포내 물질의 상호작용 연구 .....	11
(1) HSV감염 후 세포내 TK의 발현조사 .....	12
(2) 세포 추출물의 2D 전기영동 .....	12
(3) 세포내 thymidine 정량 및 유도체 분석 .....	12
(4) HSV-1의 cell tropism .....	12
3. 동물체계 연구 .....	12
제 2 절 실험재료 및 방법 .....	12
1. 실험재료 .....	12
가. 세포 .....	12

나. 바이러스	12
다. 박테리아	12
라. 시험동물	13
마. plasmid DNAs	13
바. 시험약물	13
2. 실험방법	13
가. 세포주배양	13
나. 마우스 신경세포의 일차배양	14
다. 바이러스의 증식	14
라. 바이러스 역가측정	14
마. 항바이러스약효검색	14
바. 세포독성검색	15
사. MTT검색법	15
아. 단백질정량	16
자. SDS/polyacrylamide 전기영동	16
차. 단백질 염색	16
카. TK 단백질의 Western 분석	17
타. 대장균내 TK유전자 발현과 TK단백질 분리 정제	17
파. Thymidine kinase 활성측정	18
하. TMP kinase 활성측정	19
가. 유전자 조작	19
나. 바이러스 DNA분리	19
다. 유전자의 PCR 증폭	20
라. DNA 염기서열 결정	20
마. Herpes simplex virus의 DNA 클로닝	20
바. 마우스 조직내 바이러스 유전자 검출	20
샤. 세포추출물의 2D 전기영동	22
야. 바이러스 감염세포내 단백질의 radio-labeling	23
자. TK의 intracellular localization	23
차. Herpes simplex virus의 동물 피부감염모델	24
카. Herpes simplex virus의 mouse비강감염모델	24
타. 마우스의 대뇌감염	24
제 3 절 연구결과	25
1. 시험관체계 연구	25
가. HSV-1 TK의 효소학적 연구	25
(1) TK 유전자 발현을 위한 HSV-1 돌연변이 TK 유전자의 클로닝	25
(2) recTK 단백질의 분리	25
(3) recTK의 TMPK활성	28
(4) TK저해제 탐색	30

나. LAT 유전자의 클로닝 및 염기서열 결정 .....	36
2. 세포체계 연구 .....	47
가. 세포체계 잠복감염과 재활성 모델구축 및 활용 .....	47
(1) 마우스 신경세포 일차 배양 .....	47
(2) PC-12 세포 배양 .....	47
(3) 신경세포의 바이러스 잠복감염 유도 및 확인 .....	47
(4) 잠복감염된 신경세포로부터 재활성 유도 및 확인 .....	55
나. TK와 세포내 물질의 상호작용 연구 .....	60
(1) HSV TK 단백질의 세포내 존재 위치 .....	60
(2) HSV감염 후 세포내 TK의 발현조사 .....	60
(3) 세포 추출물의 2D 전기영동 .....	60
(4) 세포내 thymidine 정량 및 유도체 분석 .....	65
3. 동물체계 연구 .....	74
가. 마우스 감염조직의 바이러스 역가 .....	74
4. 결론 .....	79
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>82</b>
제 1 절 연구개발목표의 달성도 .....	82
제 2 절 관련분야의 기술발전에의 기여도 .....	82
<b>제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....</b>	<b>86</b>
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....</b>	<b>87</b>
<b>제 7 장 참고문헌 .....</b>	<b>88</b>

ACV	Acyclovir
APS	Ammonium persulfate
ATP	Adenosine triphosphate
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BSA	Bovine serum albumin
bp	Base pairs
CC <sub>50</sub>	50% cytotoxic (cytotoxic) concentration
CMV	Cytomegalovirus
CPE	Cytopathic effect
cTK	cellular TK
CTP	Cytidine 5'-triphosphate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	50% effective concentration
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
F	HSV-1 strain F
FBS	Fetal bovine serum
FCV	Famciclovir
GCV	Ganciclovir
HS	Horse serum
HSV	Herpes simplex virus
HSV TK	Herpes simplex virus thymidine kinase
IEF	Isoelectric focusing

IPTG	Isopropyl-beta-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton
kb	Kilobase
M.O.I.	Multiplicity of infection
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NBT	Nitro blue tetrazolium
NCR	Noncoding region
ORF	Open reading frame
PAA	Phosphonoacetic acid
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PCV	Penciclovir
PFA	Phosphonoformic acid.3Na, foscarnet
PFU	Plaque forming unit
p.i.	Postinfection
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TDP	Thymidine diphosphate
TEMED	N'N'N'N' Tetramethylethylenediamine
TK	Thymidine kinase
TMP	Thymidine monophosphate
TMPK	Thymidylate kinase; Thymidine monophosphate kinase
TTP	Thymidine triphosphate
vTK	Viral TK
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

피곤할 때 입가에 흔히 생기는 물집은 감염되었던 herpes simplex virus (HSV)가 특정 신경세포에 잠복하고 있다가 일부가 재활성되어 처음의 감염장소로 이동하여 다시 증식하는 표시이다. Episome 상태로 잠복되어 있으며, 피곤함, 스트레스, 자외선 노출 등에 의해 재활성이 이루어진다는 사실은 알지만, 어떤 기전으로 잠복상태로 되는지, 어떻게 재활성이 되는지는 거의 알려져 있지 않다. 재활성의 필요여부에 대해 오랜 논란을 일으킨 HSV-1 thymidine kinase (TK)의 여러 돌연변이주들을 이용한 시험관, 세포, 동물체계 연구를 통하여, TK의 효소학적 특성규명과 재활성에서의 TK의 필요성 여부를 결정하며, 잠복감염 및 재활성기전연구의 종합적인 연구기반을 구축함이 연구목적이었다.

## 제 2 절. 연구개발의 필요성

바이러스 질환치료제 개발에 있어서 가장 어려운 점은 바이러스의 잠복감염을 막거나 이미 잠복된 것을 소멸시키거나 잠복감염으로부터 재활성을 통한 병의 재발을 막는 것이다. 이제까지 공인된 어떠한 약물도 이 문제를 해결하지는 못하고 있으며, 이에 대한 실현가능성도 매우 어려울 것으로 최근까지 기대했었다. Herpes simplex virus (HSV) 중 type 1 (HSV-1)은 성인의 90% 이상이 감염되어 있으며, 생명에 지장이 없는 단순포진부터 각막염 및 치명적인 뇌염 등 다양한 질병을 유발한다. 성병을 주로 일으키는 HSV type 2 (HSV-2)는 전세계적으로 감염자 수가 급증하고 있으며, 미국의 경우 성인의 20 ~ 25%인 4,600만 명의 감염자가 있는 것으로 추정된다. HSV는 HIV와 함께 전세계적으로 가장 많이 연구되고 있는 바이러스중의 하나이다. HSV-1은 HSV-2, cytomegalo, varicella-zoster, Epstein-Barr virus들과 같은 다른 human herpesvirus들과 같이 잠복감염과 재활성을 큰 특징으로 지니고 있으며, 치료제 개발시의 시장성 때문에 바이러스치료제 개발의 중요 목표바이러스가 되고 있다. 또한, 세포배양체계 및 감염동물을 이용한 연구방법이 잘 확립되어 있어 바이러스연구의 초석이 되고 있다. HSV-1이 세포에 감염하면 두 종류의 감염경로 중 하나를 밟는다: 바이러스가 증식하여 최종적으로 만들어진 바이러스 입자 (virion)가 세포 밖으로 나오면서 감염된 세포를 죽이는 lytic infection과 증식없이 바이러스 유전자만 잠복하고 있는 latent infection (잠복감염). 사람의 경우에는 삼차신경과 sensory neuron이 잠복감염 장소로 알려져 있다.

vTK의 바이러스 증식과정 중의 역할에 대해서는 많은 논란이 있어왔다. 이는 TK-deficient (TK<sup>d</sup>) mutant의 증식이 세포배양체계에서는 WT과 비교하여 큰 차이가 없기 때문이다. 따라서 인체 감염시 병원성에 관한 역할 규명에 많은 노력이 집중되어 왔다. vTK가 바이러스의 생체 내 잠복감염에 관여할 것이라는 추정도 있었으나, 현재는 잠복감염된 바이러스의 재활성화에 관여할 가능성이 인정되고 있다. 병원성에 대하여는 TK<sup>d</sup> 바

이러스주의 병원성이 약하다는 보고가 많지만 병원성에서 wild type (WT)과 유사하다는 상반되는 보고들도 있다. 본 연구팀은 자체 개발하여 오랫동안 특성연구가 이루어진 다양한 TK-돌연변이주들을 보유하고 있다. 특히 HSV-1 strain F를 WT으로 하는 TK-deficient 한 9 개의 mutant (AR1 - AR9)들을 오랫동안 자세히 동정해왔는데, TK활성, 유전자 염기서열의 변화 위치확인, vTK단백질 발현, 약제 내성 및 감염동물모델에서의 병원성 및 약제 내성을 조사하였고 약제 내성은 DNA polymerase에도 돌연변이가 생긴 것으로 추정되는 AR6를 제외하고는 vTK활성결여에 의함을 본 연구팀에서 개발한 vTK발현세포주를 이용하여 확인하였으며 병원성도 vTK유전자의 돌연변이 위치에 따라 매우 강한 것부터 매우 약한 것 등 다양함을 확인하였다. HSV의 잠복감염으로부터 재활성기전을 돌연변이 바이러스주를 이용하여 분자 수준에서 여러 체계에서 연구함은 매우 중요하다 하겠다. 이와 같은 연구를 통하여 바이러스연구에 필요한 제반 기술들이 확립될 뿐만 아니라 HSV의 병원성 기전 규명과 논란이 지속되고 있는 HSV-1의 TK의 역할 규명 및 바이러스 증식기전 이해에 큰 역할을 하게 될 것이며, 바이러스 치료제 개발의 최종 목표인 잠복감염 저해제와 재활성 저해제 개발에 직·간접적인 역할을 하게 될 것이다.

#### 가. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

##### ○ 기술적 측면

본 연구는 분자생물학, 생화학, 세포병리학, 동물병리학 등의 많은 방법이 동원되므로 항바이러스제 약효검색 및 바이러스 기초연구에 필요한 많은 방법들을 확립할 기회가 되어, 연구기술 단계를 향상시킬 수 있다. 습득된 기술들은 언제든지 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 특히 바이러스 병원성에 큰 영향을 주는 잠복감염과 재활성화 연구에 대한 여러 기반기술들이 확립되어 이 분야의 연구에 선도적인 역할을 할 수 있을 것이다.

##### ○ 경제·산업적 측면

본 연구를 통하여 자체 확보되는 실험기술과 병원성, 잠복감염 및 재활성 기전 연구로 이용가치가 확인된 플라스미드, 세포주 및 바이러스들은 약효검색 및 바이러스 증식기전 연구에 직접적인 재료로서 이용될 수 있으며, 제공된 정보가 약물구조설계에 도움이 되어 새로운 치료제가 개발될 경우 경제적이거나 산업적으로 큰 이익을 제공할 것으로 사료된다.

##### ○ 사회·문화적 측면

본 연구를 통하여, HSV의 증식기전에 대한 이해가 증가하게 되며, 항바이러스제 개발연구과제 중 가장 첨단인 잠복감염 및 재활성화 문제를 해결하려는 세계적인 경향에 동참하게 되고, 약제내성문제 해결과 치료효과가 좋은 약제가 개발되어 수 많은 환자들에게 큰 도움이 될 것이다.

### 제 3 절 연구개발의 범위

세포배양체계 잠복감염과 재활성 유도 및 확인체계를 구축하여, 돌연변이주들의 특성을 WT과 비교하여 TK의 재활성에서의 필요성 여부를 결정하고, 세포나 생체내 잠복감염을 확인하거나 TK와 반응 또는 영향을 받는 세포물질을 분석할 수 있는 기술을 구축하여 활용하며, 돌연변이 TK의 효소학적 특성규명, 특히 thymidylate kinase 측면에서의 활성 조사와 그 밖의 TK의 기능에 대한 연구가 주요 내용이다. 이를 위해 일차 신경세포 배양법을 확립하여 HSV의 잠복감염과 재활성 유도체계를 구축하며, 세포 및 동물내 잠복감염 확인을 위한 분석체계를 구축하고 바이러스에 적용하여 재활성에서의 TK의 필요성을 규명하며, 2D 전기영동을 활용한 세포 단백질 발현 분석, 각 HSV 돌연변이 TK 유전자의 대장균내 발현체계 확립 및 분리정제 후 효소 활성 측정 및 TK 저해제 탐색수행이 연구내용이었다 (다음 표 참조).

	연구목표	연구개발 내용 및 범위
시험관 체계	<ul style="list-style-type: none"> <li>TK의 효소학적연구</li> <li>LAT gene cloning</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>각 바이러스주의 TK gene의 대장균 발현체계로의 cloning</li> <li>유전자 발현 후 TK 단백질 분리</li> <li>TK와 TMPK 활성 조사</li> <li>TK 저해제 탐색</li> <li>LAT유전자 클로닝</li> <li>LAT유전자 염기서열 결정</li> </ul>
세포 체계	<ul style="list-style-type: none"> <li>세포체계 잠복감염과 재활성유도 및 확인</li> <li>세포체계 TK특성연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>마우스 일차 신경세포 배양 체계 확립</li> <li>신경세포에서의 바이러스 잠복감염 유도 및 확인체계 수립</li> <li>재활성유도 및 확인체계 수립</li> <li>2D 전기영동을 통한 세포 및 바이러스 단백질 발현 분석</li> <li>Mutant의 host cell tropism 비교</li> <li>세포내 dNTP pool 비교</li> </ul>
동물 체계	<ul style="list-style-type: none"> <li>동물체계 TK돌연변이 주의 특성연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>마우스 감염조직내 바이러스 역가 측정</li> <li>마우스의 잠복감염 조직에서의 바이러스 유전자 탐지</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

HSV에 감염자 중 아주 드물게 뇌염환자가 발생한다. 일차 감염에 의한 경우도 있지만 많은 경우 잠복감염 후의 재활성화에 의한 것으로 조사되었는데 어떤 기전이 이를 가능케 하는지는 알려져 있지 않다. Cullen은 잠복감염을 “증식가능한 바이러스가 가역적으로 증식하고 있지 않는 감염”이라고 정의했다. 거의 모든 herpesvirus들이 평생토록 잠복 감염이 가능한 것으로 간주된다 (Whitley, 1996). 잠복감염을 위해서는 바이러스가 다음과 같은 특성을 가져야 한다: 1) 숙주의 면역반응을 통과; 2) 바이러스의 유전자가 세포 속으로 통과; 3) 세포 속으로 유입된 유전자가 계속 존재. Alphaherpesvirus군에 속하는 HSV-1, HSV-2와 VZV는 신경세포에 감염력이 있으며 신경세포 끝에 감염하여 retrograde axonal flow로 신경세포의 핵으로 들어간 다음 그 곳에서 잠복감염한다 (Cohen and Straus, 1996; Roizman and Sears, 1996). HCMV와 HHV-6와 HHV-7와 같은 betaherpesvirus군의 잠복감염은 monocyte나 T lymphocyte에, EBV와 HHV-8같은 gammaherpesvirus군은 B lymphocyte에 잠복감염되어있는 것으로 여겨진다. HSV의 잠복감염 (latency)는 바이러스 유전자가 episome 상태로 세포 핵 속에 있는데, 사람의 경우에는 trigeminal neurectomy와 sensory neuron이 잠복감염 장소로 알려져 있다. 잠복감염은 다음의 세가지 단계로 구분되어진다: establishment (수립), maintenance (유지), reactivation(재활성화). 재활성에 의하여 질병이 재발하는 것을 recurrency로 표시한다. 각 단계의 특징을 다음 Table 1에 표시하였다. 바이러스가 잠복감염 중임을 latency-associated transcripts (LAT) 발현여부로 확인할 수 있는데, LAT가 잠복감염을 유발하지는 않는 것으로 알려져 있다. LAT gene과 관련된 유전자 지도를 다음의 Fig. 1에 표시하였다. HSV-1의 잠복감염 동물모델로 마우스와 토끼를 이용한 감염모델이 많이 이용된다. 마우스 발바닥에 바이러스를 감염시킬 경우, 감염 21 후에는 삼차신경이나 dorsal root ganglia에서 바이러스가 감지되지 않으나, 적출한 조직을 같이 표지세포와 함께 배양할 경우 90~100% 바이러스의 증식이 감지된다 (Stevens and Cook, 1971). 1바이러스 DNA는 1.9 ~ 24%의 신경세포에서 감지되며, 이는 시간이 지나도 변하지 않아 잠복감염이 영구적으로 일어날 수 있음을 알려준다 (Sedarati et al, 1993; Sawtell, 1997). 마우스와 비슷한 시험결과가 사람의 신경세포에서도 관찰되었다 (Cai et al, 2002). LAT-deficient 돌연변이주가 잠복감염은 일으키지만 재활성 능력이 떨어짐이 보고된바 있다 (Sawtell and Thompson, 1992; Devi-Rao et al, 1994). 안구감염된 토끼의 경우 잠복감염 양상이 마우스나 사람과 유사하다. 자연적인 재활성 (Nesburn et al, 1967)과 adrenergic induction model (Hill et al, 1986)과 같이 재활성이 유도될 수 있는데, 감염력 있는 바이러스가 첫 감염장소에서 나타난다. LAT 유전자의 대단위 결손이 있을 경우를 제외하고는 (Perng et al, 2000) LAT돌연변이주의 잠복감염율이 조금 떨어지는 마우스와 달리 토끼에서는 차이가 없다 (Bloom et al, 1994). LAT promotr mutant나 600 to 1500 bp 정도 결여시에는 토끼나 마우스에서의 재활성 감소가 관찰되었고, 5'exond서의 소규모 결여가 있을 경우 토끼에서만 관찰되었다 (Bloom et al, 1996; Perng et al, 1996; Loutsch et al, 1999).

잠복감염 동물모델은 이용에 어려운 점이 많기에 세포배양을 이용한 모델이 사용 중이다. 두 종류의 모델이 주로 이용되는데, 하나는 nerve growth factor (NGF)로 분화된 rat PC-12 pheochromocytoma 세포를 HSV (50 to 100 p.f.u./cell)로 시키는 법이다 (Danaher et al, 1999; Su et al, 1999). 살아남은 PC-12세포에는 circular form의 HSV DNA가 감지된다. 다른 한 방법은 rat나 마우스 dorsal root ganglionic neurons을 HSV로 감염시키고 acyclovir와 NGF를 첨가하여 잠복감염을 유도하고 유지하는 것이다 (Wilcox and Johnson, 1988). 이 경우 세포내에 LAT의 축적이 관찰되며, 재활성은 NGF를 제거하거나 cAMP 유도체인 forskolin이나 histone deacetylases 저해제인 trichostatin A를 처리하여 유도한다 (Arthur et al, 2001). NGF제거하거나 forskolin첨가시 핵에서 LAT intron이 사라짐 (Colgin et al, 2001)을 관찰할 수 있는데, 이는 재활성을 촉진하기 위해서는 LAT발현이 없어야 하는 것을 추측할 수 있으나, 잠복감염되었어도 LAT발현없는 신경세포가 2/3 정도 있는 것을 고려하면, 실제 동물에서 어떤 영향을 끼치는지는 아직 불분명하다.

HSV-1의 thymidine kinase (vTK)는 376 개의 아미노산으로 구성된 40.9 kDa의 subunit 2 개로 구성되어 있으며, ATP binding site와 nucleoside binding site와 thymidine binding site의 세가지 active center가 알려져 있다. TK는 이화작용으로부터 thymidine을 구하는 pyrimidine salvage의 핵심 효소이다 (Chen and Prusoff, 1978; Kit et al., 1974; Maga et al., 1994). 세포가 지닌 TK (cTK)와 달리 효소기질 이용범위가 크기 때문에 cTK가 이용 못하는 여러 핵산유도체를 monophosphate (MP)화하며 thymidine monophosphate (TMP)를 diphosphate화 하는 TMP kinase (TMPK) 활성도 지니고 있다. 바이러스 TMPK활성은 vTK활성보다는 덜 특이적이지만 bromovinyluridine (BVdU)의 경우 BVdU-MP에서 BVdU-DP가 되는데 HSV-1 TK에 의존한다. vTK에 대한 연구는 항바이러스제의 활성화 및 약제내성 (Bacon et al., 2003; Chibo et al, 2004; Gilbert et al., 2002; Sarisky et al., 2003), in vivo virulency, 잠복감염으로부터의 재활성화, suicide gene therapy (Balzarini et al., 1993; Degre'Ve et al., 2000a; Fillat et al., 2003), 효소 자체 특성측면 등 다양한 목적에 집중되고 있다.

외국의 경우 다양한 바이러스들에 대한 항바이러스제 후보물질들의 in vitro 및 in vivo 내성 유도 및 관련 유전자 검색을 통한 내성기전연구가 이루어지고 있다. 사람에게서 HSV의 ACV 내성균주출현 빈도와 관련 유전자를 분석하기 위한 "International task force on HSV resistance"팀이 Glaxo-Wellcome사에 의하여 최근에 구성되고, 미국의 CDC (Centers for Disease Control)와 ViroMed사가 공동참여하여 HIV감염자와 STD (sexually transmitted disease) 환자들을 2 년간 조사한 결과가 발표되었다 (Snowden, 1998). 이는 ACV를 의사처방이 필요없는 OTC (over the counter)시판을 1995 년부터 시도하였지만 미국의 FDA가 약물의 남용으로 인한 내성균주출현가능성과 그 폐해 가능성 때문에 허락치 않고 있기 때문이었다. 3,193 명으로부터 lesion을 swab culture하여 HSV 분리 여부, HSV type결정 및 ACV에 대한 감수성을 조사하였는데, 분석이 끝난 1,736 명 중 986 명에서 HSV가 발견되었으며, 887 명은 HSV-2 (51.2%), 99 명은 HSV-1 (5.7%)이었다. EC<sub>50</sub>가 2 ug/ml이상일 경우 ACV내성으로 간주하였는데 126 명의 HIV감염자에서

는 7 명 (5.6%)이 860 명의 STD환자에게서는 1 명 (0.1%)가 내성을 나타냈으며 평균  $EC_{50}$ 는 13.6 ug/ml이었다. 보고되는 ACV내성균주들이 대부분 TK-deficient이기 때문에 내성기작연구 측면에 광범위 조사가 수행되었다 (Chibo et al., 2004). Genital lesion에서 검취한 시료를 primary rabbit kidney세포에서 배양하고 Vero세포에서 ACV감수성을 조사하였다. 2,334 검체 중 1,338 (57.3%)에서 HSV가 검출되었다. 그중 1,194 (89.2%)는 ACV-sensitive HSV-2, 134 (10%)는 ACV-sensitive HSV-1, 10 (0.7%)는 ACV-resistant HSV-2였다. 내성균주 9 개가 실험실에서 동정되었는데, 9 개 모두 penciclovir에 대해 내성을, 6 개가 ganciclovir에 대한 교차내성을 나타냈지만, cidofovir나 foscarnet에 대해서는 모두 감수성을 나타냈다. Mouse 대뇌감염모델에서 neurovirulence감소가 8 개에서 관찰되었으며. 유전자 염기서열분석이 끝난 7 개중 4 개가 TK ORF상의 stop codon을 유발하는 돌연변이를 나타냈다. ACV와 유사하게 PCV내성 임상바이러스주에 대해서도 연구가 이루어졌다 (Sarisky et al., 2003). 대한 약제내최근에는 HSV TK를 이용한 항암제 유전자요법에 이용하려는 목적으로 HSV의 TK에 대한 연구가 활발해지고 있는데, 이는 vTK가 cTK보다 광범위 기질을 이용하기 때문이다 (예, ganciclovir). HSV 잠복감염에 대한 연구에 큰 진전이 있어 잠복감염으로부터의 재활성에 관여하는 TK의 역할 규명에도 많은 관심이 집중되고 있다.

외국의 경우 다양한 바이러스들에 대한 항바이러스제 개발을 위한 큰 제약회사에서는 후보물질들의 in vitro 및 in vivo 약효검색 및 내성 유도 및 관련 유전자 검색을 통한 기전연구가 이루어지고 있지만, 본 연구팀과 같이 in vitro와 in vivo가 연계된 실험을 하는 곳이 그다지 많지는 않다. 우리나라에서는 감염성이 있는 바이러스를 직접 취급하는 실험실이 많지 않으며, 특히 HSV에 대한 연구의 경우는 더 적다. 본 연구팀은 HSV-1의 다양한 TK돌연변이바이러스들에 대한 연구를 수행해왔는데, 이들은 TK-negative와 TK-partial 두 군으로 분리됨을 확인했고, 2 군의 바이러스들이 동물감염에서의 병원성과 재활성 등에 큰 차이가 있음을 확인했다. TK<sup>-</sup>바이러스주는 ex vivo 재활성실험에서 재활성을 거의 나타내지 않는다. 즉, AR8 (182 아미노산)을 제외하고는 TK-negative 바이러스는 적출된 신경조직으로부터 바이러스가 재활성되지 않으나 TK-partial 돌연변이주는 재활성됨이 다양한 mouse 감염모델에서 확인되었다. 최근에는 penciclovir로 약제내성이 유도된 후 분리된 5 개의 TK-돌연변이주 (PR1 ~ PR5)를 확보하였는데, 이들 중 PR1 (119 아미노산), PR2 (103아미노산)와 PR4 (272 아미노산)은 단백질의 C-terminal이 끊긴 구조이며, PR3는 N-terminal에 stop codon이 도입되어 TK유전자의 2 번째 시작 codon에서 단백질 합성이 시작되어 보유 바이러스중 유일한 N-terminal mutant로서 효용가치가 높다. 실제로 활성은 TK<sup>p</sup>이지만 TK의 발현은 적게 되는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구팀은 다양한 감염경로로 HSV로 접종된 마우스의 조직 역가를 측정하였는데, 시간과 조직에 따라 바이러스 증식이 확인되는 wild type 바이러스와 달리 TK<sup>-</sup>바이러스 주의 경우 초기 감염 조직 외에는 바이러스 증식이 확인되지 않는 점과, AR8과 PR mutant들 중 일부가 마우스 감염시 재활성되는 점으로 보아, TK가 재활성에 필요한 것이 아니라 재활성 장소까지 바이러스가 이동을 못하여, 잠복감염이 일어나지 않았기 때문에 재활성이 결과

적으로 일어나지 않을 가능성을 생각하게 되었다. 개체차이에 의한 차이점이 큰 동물감염 모델과 달리, 재활성기전에서 TK의 역할을 확인할 수 있는 비교적 명확한 방법은 세포를 이용하는 것이다. HSV-1의 잠복감염은 신경세포이기에 신경세포에 TK-돌연변이주를 잠복감염시키고, 잠복감염된 것을 확인한 다음 재활성이 일어난다면, TK가 재활성에 필수적이지 않다는 증거가 될 것이다. 세포체계를 이용한 잠복감염과 재활성확인 연구는 이 과제의 매우 중요한 부분을 차지한다. 이를 위해 시험에 사용된 돌연변이주의 TK활성에 따른 분류는 다음과 같다.

Classification	Induced with acyclovir	Induced with penciclovir
TK-negative mutants	AR1, AR3, AR7, AR8	PR1, PR2, PR4, PR5
TK-partial mutants	AR2, AR4, AR5, AR6, AR9	PR3
DNA polymerase-altered mutant	AR6	-

Table 1. Major steps during the latency-reactivation cycle

---

<b>Establishment of latency</b>
. Entry of viral genome into ganglionic neurons
. Abundant viral gene expression and DNA replication (acute infection)
. Extinction of viral gene expression
. Abundant LAT expression

---

<b>Maintenance of latency</b>
. Expression of LAT
. No detection of abundant lytic viral gene expression
. No detection of abundant viral DNA replication

---

<b>Reactivation from latency</b>
. External stimulus (stress and immunosuppression for example)
. Productive infection (extensive viral gene expression, DNA replication, and infectious virus)
. Survival of latently infected cell?
. LAT expression

---



Map of the HSV-1 genome region expressing the LATs

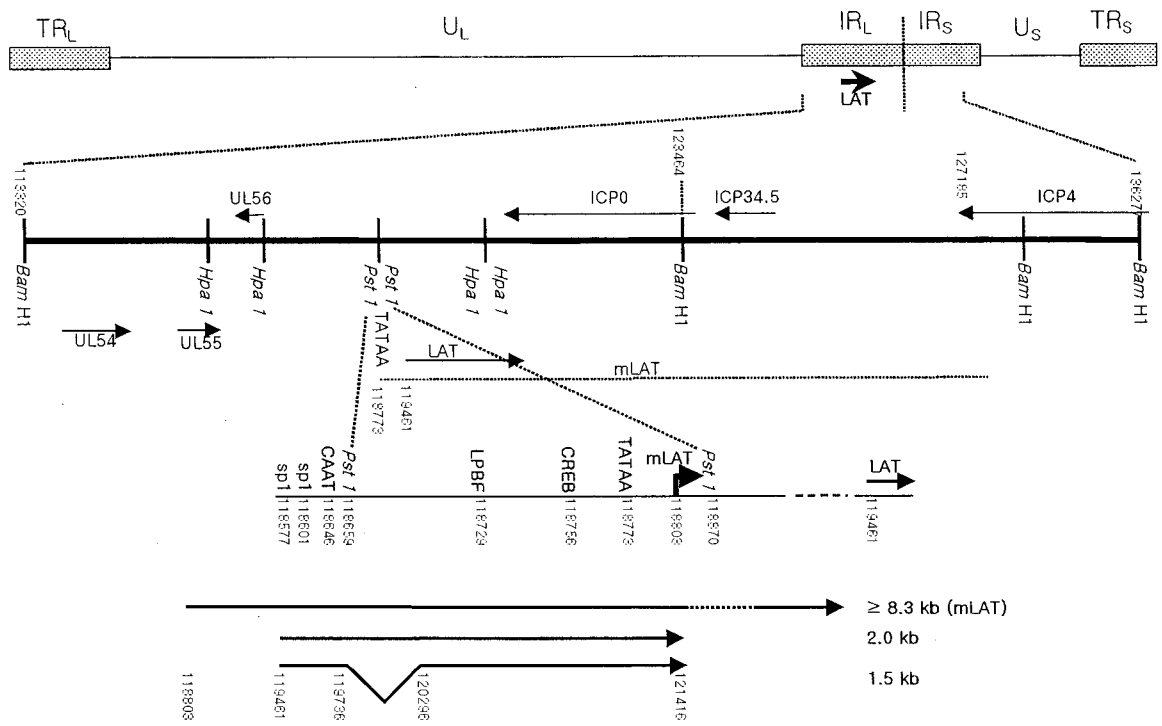


Fig. 1. Map of the HSV-1 genome region expressing the LATs

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구내용

#### 1. 시험관체계 연구

##### 가. HSV-1 TK의 효소학적 연구

HSV-1 TK의 특징은 cTK와 달리, 여러 가지 기질들을 활용할 수 있다는 점이다. TK 활성으로 여러 가지 nucleoside들을 인산화 시킬 뿐 아니라 TMP와 BVDU-monophate에 인산기를 추가하는 TMP kinase (TMP) 활성도 지니고 있다. 선행과제를 통하여 본 연구에 활용되는 돌연변이주의 TK 활성은 알 수 있었으나, TMPK활성여부는 알 수 없었기에 이를 조사하기로 하였다. 방사성 동위원소로 표시된 TK가 TMP로 될 경우, 첨가된 인산기의 음이온 성질이 TMP를 음이온화시킨다. 이를 양이온 물질에 결합시킨 후 결합되지 않은 TK는 제거하고 TMPK의 방사성활성을 측정하면, 비교적 손쉽게 TK 활성을 정량분석 할 수 있다. TMPK활성 측정은 기질인 TMP와 생성물인 TDP 모두 인산기를 보유하기에 TLC나 HPLC 분석을 이용해야하는 어려움이 있다. 또, vTK와 cTK의 반응조건이 달라 각자의 활성을 분리하여 측정할 수 있는데, vTMPK의 경우 그럴 수 없으며, 모든 세포에 cTMPK가 존재하기에 세포 추출물로 TMPK활성을 측정할 수 없다. 따라서 분리정제된 vTK가 필요하여 모든 돌연변이주의 vTK유전자를 대장균내 발현을 위해 클로닝하기로 하였다. 이들 TK단백질을 분리하여 효소학적 특성을 조사하여 각 돌연변이주의 세포 및 동물체계에서의 특성과 연관지어봄이 목적으로 다음과 같은 연구내용이 수행되었다:

- (1) TK 유전자 발현을 위한 HSV-1 돌연변이 TK 유전자의 클로닝
- (2) recTK 단백질의 분리
- (3) 돌연변이 TK의 TMPK활성
- (4) TK저해제 탐색

##### 나. LAT 유전자의 클로닝 및 염기서열 결정

바이러스가 잠복감염 중 유일하게 뚜렷이 감지되는 것은 LAT gene의 RNA이다. 따라서, 잠복감염을 유도한 다음 잠복감염수립을 확인하는 한 방법이 LAT의 detection이다. 이를 위하여 HSV-1 F의 LAT gene을 클로닝하고 염기서열을 결정하였다.

#### 2. 세포체계 연구

## 가. 세포체계 잠복감염 및 재활성 모델

HSV-1 TK가 잠복감염으로부터 재활성에 필수적인가가 본 연구의 가장 중요한 질문이었다. 선행한 마우스 감염실험에서 마우스의 삼차신경이나 dorsal root sensory ganglia를 적출하여 Vero 세포와 coculture한 재활성 실험결과에서는 TK<sup>+</sup> (F)와 TK<sup>P</sup> (AR2, AR4, AR5, AR6, AR9)의 경우 재활성이 거의 모두 일어났으며, TK의 경우 AR8의 경우를 제외하고는 재활성이 일어나지 않았다. 재활성된 AR8 유래 바이러스를 감염시킨 Vero세포 추출물을 이용한 TK 단백질에 대한 Western 분석 결과는 AR8과 같은 유형의 작은 TK 단백질이 감지되었다. 동물의 경우 개체간의 실험결과 차이가 크며, 잠복감염 장소인 신경세포 중 몇 %가 바이러스에 감염되어있는지를 확인할 수 없다. 따라서 TK 바이러스주에 감염된 마우스 신경조직에서 바이러스 재활성이 일어나지 않는 이유로 1) TK활성이 재활성에 필수적이어서 그 활성이 결여될 경우, 또는 2) 잠복감염된 바이러스 양이 상대적으로 적거나 없기에 재활성이 관찰되지 않을 수도 있다. 이를 규명하기 위하여 감염된 마우스의 바이러스 잠복감염장소인 신경조직을 적출하여 일차 배양시키고, 배양된 세포에 바이러스를 감염시킨 후 잠복감염을 유도하고, 잠복감염을 확인한 다음, 재활성을 유도하여 확인하는 방법을 수립하여, TK 돌연변이주들에 대한 시험을 수행하여 TK활성이 재활성에 필요한지를 조사하기로 결정하였다. 마우스 일차신경세포의 취급의 까다로움, 긴 배양시간 등의 문제점을 고려하여 잠복감염연구에 많이 이용되고 있는 PC-12 (rat pheochromocytoma from adrenal gland) 세포주도 시험에 함께 이용하기로 결정하였다. 잠복감염을 유도하기 위해서는 바이러스 DNA합성 저해제인 ACV를 첨가하여 바이러스 증식을 억제하였다. Plaque검사를 이용한 세포배양액의 바이러스 역가 측정, PCR을 이용한 바이러스 DNA확인, RT-PCR을 이용한 LAT transcripts존재를 확인하여, 잠복감염이 되었는지를 확인하였다. 즉, 세포배양액에서 바이러스가 감지되지 않고 세포내에 바이러스 특이 유전자가 감지되면 잠복감염되었다고 판단하였다. 바이러스가 잠복감염된 모든 세포에서 동시에 재활성 유도는 필수적이다. 이를 위하여 NGF-제거, UV조사, 고온 처리, 약물처리법과 indicator세포와의 coculture법을 이용하였으며, 재활성의 확인은 바이러스 plaque검사법을 이용하였다. 다음과 같은 연구를 수행하였다:

- (1) 마우스 일차 신경세포 배양
- (2) 신경세포의 바이러스 잠복감염 유도 및 확인
- (3) 잠복감염된 신경세포로부터 재활성 유도 및 확인
- (4) 돌연변이주들의 잠복감염력 및 재활성력 비교

## 나. TK와 세포내 물질의 상호작용 연구

TK유전자 발현이나 TK단백질 그 자체나 활성화에 영향을 주거나 받는 세포 현상 또는 특정물질을 찾아내기 위하여 바이러스와 mock 감염세포의 단백질발현차이를 2D전기영동법을 이용하여 조사하여 보고, TK<sup>+</sup>와 TK<sup>P</sup> 바이러스주에 감염된 세포추출물을 2D전기영동등으로 분류하는 연구를 수행하였다. TK가 세포내 dNTP pool을 증가시킨다는 점을 고려

하여 바이러스감염세포내 Thd와 그 유도체들을 분석하였다. 또한 TK활성에 따라 세포감수성의 차이가 있는 점을 조사하였으며, 바이러스 감염세포내 TK의 localization을 수행하였다. 연구내용을 다음과 같이 기록하였다:

- (1) 세포 추출물의 2D 전기영동
- (2) 세포내 thymidine 및 유도체 분석
- (3) HSV-1의 cell tropism
- (4) HSV 감염세포의 TK 단백질의 localization

### 3. 동물체계 연구

TK가 생체감염 후의 병원성과 잠복감염 및 재활성에 필수적인가 또는 어떤 역할을 하는가를 연구하기 위하여 마우스를 TK-와 TK+ 또는 TKp 바이러스주로 감염시킨 다음 임상 소견, 감염조직내 바이러스 역가와 바이러스 유전자의 존재 유무를 조사하였다. 특히, 잠복감염장소인 삼차신경에서 LAT 유전자 발현을 조사하였다.

## 제 2 절 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 가. 세포

이용한 세포들 중 Vero세포 (African green monkey kidney cell) (ATCC CCL 81)와 143B 세포(human osteosarcoma, TK) (ATCC CRL-8303), 143 PML BK TK (143TK) (143B containing HSV TK plasmid hybrid) (ATCC CRL-8304)와 PC-12 (rat pheochromocytoma from adrenal gland) (ATCC CRL-1271)는 American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 구입하였다. 바이러스 TK유전자 발현 진핵세포주인 FTK143B (FTK세포) (143B expressing the TK gene of HSV-1 strain F)는 본 연구팀이 다음과 같이 제작하였다: 진핵세포내 유전자 발현 vector인 pcDNA3.1/HisA plasmid (Invitrogen사)에 HSV-1 strain F의 TK ORF를 삽입시키고 (pFTK1), cTK인 143B세포를 전이시키고, 600 ug/ml G418과 HAT존재하에 생존가능성이 selection marker로 활용되었다.

#### 나. 바이러스

시험에 사용된 바이러스들은 Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) strain F (ATCC VR-733)와 그로부터 유도, 분리된 ACV 내성균주인 HSV-1 strain AR1 ~ AR9과 PCV 내성바이러스주인 PR1 - PR5였다.

#### 다. 박테리아

Escherichia coli (E. coli) 균주들로 HB101, 71-18, DH5 $\alpha$ , BL21, AD494 등이 이용되었다.

#### 라. 시험동물

한국화학연구소 실험동물실, 한국의 대한바이오링크나 일본 Charles River사로 부터 SPF (specific pathogen free) 4 주령의 BALB/c 마우스 암컷을 구입하여, 군당 5 - 6 마리씩 분류하고 일주일간 항온·항습 사육실에서 일주일간 적응시킨 다음 실험에 이용했다.

#### 마. plasmid DNA

HSV-1 TK유전자 클로닝을 위하여 pBR322, Bluescript + [BS(+)] (Stratagene), T vector (Promega)이 이용되었으며, 대정균내 유전자 발현을 위해서는 pET28과 pET32a (Novagen)과 pGEX ( )들이 이용되었다.

#### 바. 시험약물

항herpes약물로서 ACV는 삼천리제약으로부터, (s)-1-(3-hydroxy-2-phosphonyl methoxy propyl) -cytosine (HPMPC)는 Gilead사로부터 기증받았다. Phosphonoacetic acid (PAA)는 Sigma로부터 구입하였으며, PAA는 증류수에 나머지는 100% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 20 mg/ml로 녹여 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 가. 세포주 배양

Vero세포의 계대배양에는 지름 10 cm petri dish에 5%의 열처리된 fetal bovine serum (FBS) (Gibco)과 4 ug/ml gentamycin (Gm)(Sigma)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle (DME) 배지 (Gibco) (DME/5% FBS)에서 세포단층이 형성될 때까지 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 증식시켰다. 세포를 3 - 4 일 간격으로 trypsin처리를 하여 계대하였다. 바이러스 증식에는 2% FBS가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle (DME)배지를 이용했다. 143B 세포는 15 ug/ml의 5'-bromodoxyuridine (BrdUrd)가, 143TK세포는 HAT (0.1 mM sodium hypoxanthine, 0.4 uM aminopterin, 0.016 mM thymidine) 이, 본 연구결과 만들어진 FTK세포는 (Kim et al, 2002) HAT와 600 ug/ml의 G418 (Gibco)가 첨가된 DME/10% FBS 배양액에 계대배양했다. PC-12 세포는 RMP1640에 5% FBS와 10% 말 혈청(Gibco) 배지에 4 - 5 일 간격으로 계대 배양 하였으며, 세포분화를 위해서는 50 ng/ml 2.5s nerve growth factor (2.5s NGF) (BD Biosciences)을 첨가하였다. 마우스의 일차배양 신경세포에는 10% FBS가 첨가된 Minimum Essential 배양액에 10 ng/ml 2.5s mouse NGF를 첨가하였다.

#### 나. 마우스 신경세포의 일차 배양

마우스 삼차신경, dorsal root ganglia, optical nerve를 적출하여, 해부용 가위로 잘게 잘라서 1 mg/ml collagenase로 37°C, 1 시간동안 배양하였다. Pipetting을 여러 번 하여 조직을 완전히 해리시키고, 200 ~ 300 x g에서 5 분 정도 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 배양액을 첨가하여 다시 세포를 부유시키고 원심분리하여 세척하였다. 완전히 해리된 신경세포를 hemacytometer로 세포 수를 측정하고, rat-tail collagen-coated culture dish에 일정하게 신경세포를 배양하였다. 신경세포 배양은 10%의 열처리된 FBS, 4 ug/ml Gm, 그리고 10 ng/ml 2.5S NGF가 첨가된 DME배지 (유지용 배지)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 증식시켰다. 삼 일 배양 후 유지용 배지에 20 uM fluorodeoxyuridine과 20 uM uridine이 첨가된 antimitotic medium을 넣어 배양기에서 2 일정도 배양하였다. 이는 non-neuronal cell population을 감소시키는 역할을 한다. 이와 같이 유지용 배지와 antimitotic medium으로 번갈아 가며 신경세포를 12 일 이상 배양기에서 배양하였다.

#### 다. 바이러스의 증식

모든 바이러스를 Vero세포에서 증식시켰다. 즉, T75-flask (배양면적 75 cm<sup>2</sup>)에 세포 단층이 형성되면 배양액을 제거하고 바이러스를 DME/2% FBS에 희석하여 1.5 ml 바이러스 희석액에 세포 한 개당 0.1 M.O.I (multiplicity of infection)이 되도록 접종하였다. 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 1 시간 동안 흡착시킨 다음 배양액을 제거하므로써 세포에 흡착되지 못한 바이러스들을 제거하였다. DME/2% FBS를 6 ml 첨가한 후 70%의 세포가 CPE를 나타낼 때까지 계속 배양한 다음 세포와 배양액을 회수하여 시험관에 넣었다. 영하 70°C에서 얼리고 37°C에서 녹이는 작업을 세 번 시행한 후 4°C, 2,000 rpm으로 10 분간 원심분리하였다. 상등액을 소량씩 용기에 분주한 다음 -70°C 또는 액체질소통에 바이러스 종균액으로서 보관하였고, 실험직전에 바이러스를 37°C에서 신속히 녹여 사용하였으며, 남은 액은 폐기하였다.

#### 라. 바이러스 역가측정

바이러스 종균액의 역가를 알기위해서 plaque검색법과 cytopathic effect (CPE)검색법을 이용하여 조사했다. 96-well 또는 48-well plate에 confluent하게 배양된 Vero세포 단층에 DMEM/2% FBS에 1:10으로 연속희석된 바이러스를 well당 100 ul씩 접종하고 한 시간 후 흡착되지 못한 바이러스액을 제거한 다음 100 ul 또는 200 ul의 배양액을 새로이 첨가하였다. 3 일 간 배양한 다음 48 well plate는 crystal violet로 염색하여 plaque수를 세었고, 96 well plate는 MTT검색법을 이용한 CPE검색법으로 조사했다. 바이러스역가는 각각 PFU (plaque forming unit)/ml 또는 CCID<sub>50</sub> (50% cell culture inhibitory dose)/ml로 표시했다.

#### 마. 항바이러스 약효검색

약효검사는 virus-induced CPE 저해법을 이용하였으며, 바이러스 흡착이 끝난 후에 약물이 첨가 되었다. 즉, 96-well plate에 Vero세포를 증식시킨 다음 DME/2% FBS 배양액으로 희석된 바이러스를 각 well에 접종량이 100 CCID<sub>50</sub>가 되도록 100 ul씩 접종하고 1 시간 동안 37°C에서 흡착시켰다. 배양액을 제거함으로써 흡착이 되지 못한 바이러스들을 제거하였다. 각 농도로 희석된 약물들을 duplicate로 각 well에 100 ul씩 첨가하고 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 3 일 배양한 다음 MTT검색법으로 50%의 세포를 살아남도록 한 약물의 농도를 EC<sub>50</sub> (50% effective concentration)로 결정하였다. 약물의 독성이 약효에 끼치는 영향을 알 수 있도록 바이러스 접종시 바이러스가 첨가되지 않은 배양액을 세포에 더해진 다음 (mock-infected) 바이러스로 접종된 세포와 같은 방법으로 처리되었다. 즉, 한시간 배양 후 배지가 제거되었고 배양액에 희석된 약물이 duplicate로 첨가되었다. 3 일 배양 후 MTT검색법으로 약물이 첨가된 각 well의 살아남은 세포수를 약물이 첨가되지 않은 세포 control well과 비교하여 50%의 세포를 죽도록 한 약물의 농도를 CC<sub>50</sub> (50% cytotoxic concentration)으로 결정하였다.

#### 바. 세포독성검색

약물의 cytostatic효과를 알기 위하여 96-well plate에 2.5 x 10<sup>5</sup> cells/ml로 희석된 Vero세포를 각각 100 ul를 넣고 1 일간 배양한 다음, 배양액에 각 농도로 희석된 시료를 첨가하고 3 일간 더 배양한 다음 MTT검색법을 이용하여 CC<sub>50</sub>를 결정하여 약물의 독성을 조사하였다. Cytocidal 효과관찰을 위해서는 동량의 세포를 넣고 3 일간 배양하여 완벽한 세포단층을 이루게 한 다음 약물을 첨가하고 3 일간 더 배양하여 이미 성장이 멈춘 세포에 주는 CPE정도를 조사했다.

#### 사. MTT검색법

이 검색법은 살아남은 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 노란색을 띤 MTT를 보라색을 지닌 formazan으로 환원시키고, 이 생성물을 유기용매로 녹여 흡광도를 측정하여 살아있는 세포와 죽은 세포의 수를 상대적으로 비교하는 것이다 (Scudiero, et, al, 1988). 배양이 끝난 Vero세포의 배양액을 제거하고 DME/2% FBS에 3 mg/ml로 희석된 MTT (Sigma)액을 96-well plate의 well당 50 ul씩 넣어준 후 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 두 시간 동안 배양하였다. 산성화된 isopropanol/6% triton X-100액을 100 ul 씩 각 well에 넣어준 후 교반기를 이용하여서 formazan결정들이 완전히 녹도록 하였다. Microplate reader (Vmax, Molecular Devices)를 이용하여 540 nm와 690 nm에서의 흡광도를 읽었다. A<sub>540</sub>과 A<sub>690</sub>의 흡광편차에서 blank값을 빼 다음 cell control과 virus control과 비교하였다.

즉, 항바이러스효과는

$$\frac{(A_T)_{\text{HSV}} - (A_C)_{\text{HSV}}}{(A_C)_{\text{mock}} - (A_C)_{\text{HSV}}} \times 100 (\%) \text{로서}$$

세포독성은

$$\frac{1 - (A_T)_{\text{mock}}}{(A_C)_{\text{mock}}} \times 100 (\%) \text{로서}$$

$(A_T)_{\text{HSV}}$ : 바이러스와 약물이 첨가된 well의 흡광도

$(A_C)_{\text{HSV}}$ : 바이러스만 첨가된 well의 흡광도 (virus control)

$(A_C)_{\text{mock}}$ : 배양액만이 약물이 첨가된 well의 흡광도 (cell control)

$(A_T)_{\text{mock}}$ : 약물이 첨가된 well의 흡광도

항HSV값으로 부터  $EC_{50}$ 와 세포독성 값으로 부터  $CC_{50}$ 를 구한 후 selectivity index (SI) ( $CC_{50}/EC_{50}$ ) 를 구하였다.

#### 아. 단백질정량

Bradford검색법을 이용한 (Detergent Compatible) protein assay kit (Bio-Rad)를 이용하였다. 이차증류수와 시료를 포함한 0.2 ml에 50 ul의 단백질 정량액을 넣고 섞은 다음 5 분 후 microplate reader를 이용하여 595 nm에서의 흡광도를 읽었다. 각 crude extract의 양을 변화시켜서 흡광도를 측정하고 각 농도별 bovine serum albumine (BSA)의 흡광도를 이용한 표준곡선을 그려 단백질 농도를 산출하였다.

#### 자. SDS/polyacrylamide 전기영동

바이러스를 접종한 세포에서의 TK 발현양상이나 *E. coli*에서 발현이 유도되어 정제된 단백질을 크기별로 분리하여 확인하기 위하여 사용하였다. SDS-PAGE gel은 12.5%를 사용하였다. SDS-PAGE용 gel은 seperating gel과 stacking gel로 나누어지는데 seperating gel 10 ml를 만들기 위하여 dH<sub>2</sub>O 3.3 ml, 30% acrylamide/bisacrylamide 혼합액 4 ml, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 2.5 ml, 10% SDS 0.1 ml, 10% ammonium persulfate 0.1 ml, TEMED 0.004 ml을 섞은 것을 10 cm gel 판에 거품이 나지 않게 조심해서 붓고 40 분 동안 중합반응을 시켰다. 여기에 5% stacking gel 3 ml (dH<sub>2</sub>O 2.1 ml, 30% acrylamide/bisacrylamide 혼합액 0.5 ml, 1 M Tris-HCl (pH 6.8) 0.38 ml, 10% SDS 0.03 ml, 10% ammonium persulfate 0.03 ml, TEMED 0.003 ml)를 만들어 굳은 seperating gel 위에 부어서 comb를 꽂고 상온에서 굳을 때까지 두었다. 시료는 cell lysate나 정제된 단백질 일정량을 SDS gel loading buffer (50mM Tis-HCl pH 6.8, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)와 섞은 후 100°C 끓는 물에서 5 분간 열을 가하여 단백질을 변성시키고 이 시료를 얼음에서 급속히 식혀서 짧게 원심분리하였다. 일정량의 상등액을 12.5% SDS-PAGE gel에 넣고 전기영동을 하였다.

#### 차. 단백질염색

전기 영동을 마친 SDS/PAG gel의 silver staining은 Sigma사의 kit를 구입하여 설명서대로 수행했으며, comassie brilliant blue staining은 다음과 같이 수행하였다. 전



기영동된 gel을 염색액 (0.25% comassie brilliant blue/45% 메탄올/10% acetic acid)에 넣고 4 시간동안 실온에서 서서히 교반시키며 염색시켰다. 탈색액 (45% 메탄올/ 10% acetic acid)을 3 - 4 번 교환하며 4 - 8 시간 동안 탈색시킨 다음 단백질 밴드들을 확인하였다.

#### 카. TK 단백질의 Western 분석

Western blot은 여러 종류의 샘플을 주로 12.5% SDS-PAGE에 전기영동한 후에 semi-dry blotter를 이용하여 nitrocellulose막으로 단백질을 3 시간동안 이동시켰다. 단백질이 옮겨진 막은 3% BSA가 첨가된 1 x TBS buffer (10 mM Tris · HCl, pH 8.0, 0.15 N NaCl)로 4°C에서 밤새 blocking시킨 다음, 1 x TBST buffer (0.05% tween-20 in TBS)로 상온에서 가볍게 흔들어 주면서 5 분간 2 회 세척하였다. 토끼에서 면역화시켜 얻은 TK에 대한 항혈청을 1xTBST/1% BSA buffer에 1:1,000으로 희석한 용액으로 상온에서 1 시간동안 반응시킨 다음 1 x TBST로 2 회 세척하였다. 이차항체는 1 x TBST buffer/1% BSA로 1:10,000으로 희석한 alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit혈청을 사용하여 상온에서 1 시간 동안 배양하였으며 1 x TBST로 2 회 세척한 후 BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium) 용액의 기질과 반응시켜 발색시켰다.

#### 타. 대장균내 TK유전자 발현과 TK단백질 분리 정제

GST-fusion 단백질을 생성토록 형질전환된 *E. coli*는 Ampicillin (50 ug/ml)과 chloramphenicol (34 ug/ml)의 항생제가 들어있는 Luria-Bertani 배양액(1 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl)에 접종하였다. OD<sub>600</sub> 0.6이 될 때까지 37°C에서 배양한 후 0.1 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 첨가하여 23°C에서 200 rpm으로 진탕하면서 15 시간동안 효소의 생성을 유도하였다. 박테리아 배양액을 4°C에서 5,000 x g로 10 분간 원심분리하여 얻은 침전물을 lysis buffer I (50mM Tris pH 7.5, 1 .M DTT, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 0.1 mM PMSF, 150 μg/ml lysozyme)에 현탁시킨 후, pulse on 10 초, pulse off 30 초, 10 회 반복으로 얼음 속에서 sonication시켰다. 용해성의 vTK protein을 획득하기 위해서 12,000 rpm에서 20 분 동안 원심분리시켜 상등액만을 획득하였다. 이 상등액에서 GST-vTK fusion protein만을 정제해 내기 위하여 Glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) column을 이용하였다. 사용하기 전 GST column을 PBS(-)로 12 시간가량 흘려보내고 lysis buffer II (lysis buffer I 에 lysozyme과 PMSF가 첨가되지 않은 것)를 평형화시킨 후 column 두 배 부피의 sonication시킨 상등액을 column에 통과시켰다. column을 lysis buffer II로 세정한 후, elution buffer (5 mM Glutathione, 0.1% Triton X-100 in 20 mM Tris-HCl)로 fusion protein을 분리해 내었다. 이런 GST column purification 전 과정은 4°C 저온실에서 수행되었다.

His-tagged 단백질 분리를 위해서는 Ampicillin (50 ug/ml), kanamycin (15 ug/ml), chloramphenicol (34 ug/ml)의 항생제가 들어있는 1 l의 2xTY 배양액 1 l에 TK발현 plasmid로 전이된 E. coli를 접종하고 OD<sub>600</sub> 0.6이 될 때까지 37°C에서 배양한 후 1 mM IPTG를 첨가하여 30°C에서 200 rpm으로 진탕하면서 3 시간동안 효소의 생성을 유도하였다. 박테리아 배양액을 4°C에서 5,000 x g로 10 분간 원심분리하여 얻은 침전을 lysozyme이 포함된 10 ml의 1 x binding buffer (0.2 mg/ml lysozyme, 10 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris · HCl, pH 7.9)에 현탁하여 -70°C에서 동결시켰다. 동결된 균 현탁액에 4종류의 protease inhibitor들 (100 ug/ml leupeptin, 100 ug/ml pepstatin, 1 mM PMSF, 1% aprotinin)을 첨가하여 녹인 후 4°C에서 20,000 x g로 30 분간 원심분리하여 상등액을 취하여 멸균필터를 통과시켜 조효소액으로 사용하였다. Ni<sup>++</sup>-affinity chromatography를 통한 정제 과정은 Novagen의 His·Tag purification법을 따랐다. Ni<sup>++</sup>을 고정시킨 His·Bind metal chelation resin을 이용하여 pH 7.9의 조건에서 5 mM, 60 mM, 100 mM로 imidazole의 농도를 증가시키면서 순차적으로 세척한 후 1 M imidazole이 포함된 완충액으로 용출하여 분리하였다. 용출된 효소액은 Stirred cell (Amicon)을 이용하여 농축하였고 Econo-Pac 10DG (Bio-Rad) column을 통과시켜 염을 제거하고 20 mM Tris · HCl, pH 8.0의 완충액으로 교환하였다. Anion exchange chromatography를 수행하기 위해 Resouce-Q (Pharmacia Biotech) column 을 이용하여 flow rate는 1 ml/min로 30 분 사이에 NaCl의 농도가 0.8 M로 증가되도록 linear gradient를 이용하여 정제하였다. TK 활성이 검출된 fraction을 모아 농축하고 탈염조작을 수행하였고 고순도의 정제된 효소를 얻기 위해서 gel-filtration으로 다시 한번 정제를 수행하였다. Gel-filtration을 위해서는 Sephacryl s-300 (Pharmacia Biotech) column 을 이용하여 단일 완충액으로 (50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.15 N NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1 mM DTT) column을 통과시켜 분리하였다. GST제거를 위해서는 thrombin cleavage 반응을 이용했다. 즉, Fusion protein 1 mg에 ≤10 units의 비율로 thrombin를 첨가한 후, 15 시간 상온에서 반응시켰다. Cleavage가 완벽하게 끝난 반응물을 다시 Glutathione Sepharose 4B column에 통과시킴으로서 GST는 제거되고 원하는 TK protein만을 정제할 수 있었다.

#### 파. Thymidine kinase 활성측정

Wild type HSV-1 F와 wild type으로부터 유래된 약제내성 바이러스의 TK/TMP kinase 활성을 측정하기 위해 대장균으로부터 분리된 후 부분 정제된 TK 단백질을 이용하였다. 반응액은 reaction mixture [20 mM 인산 완충액, pH 7.5 (0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP, 10 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA]에 5 uM [<sup>3</sup>H]-thymidine (specific activity: 83 mCi/mmol), 5 uM thymidine을 넣어서 이용하였고 여기에 정제된 fusion protein과 dH<sub>2</sub>O를 첨가하여 50 ul를 만들었다. 이를 37°C에서 30 분간 반응시킨 다음 Whatman DE81 filter에 반응물질을 여과시켰다. 차가운 4 mM ammonium formate로 두 번, 에탄올에 두 번 씻어준 후 filter를 건조시켜 방사선 동위

원소 측정기 (Packard)를 이용하여 방사능 역가를 DPM (disintegration per minute)로 측정하였다. 바이러스에 감염된 세포 추출물을 효소활성에 측정할 경우에는 다음과 같이 준비하였다: Vero세포에 바이러스를 5 M.O.I./cell로 접종하고 배양한 다음 50%의 세포가 CPE를 나타냈을 때 세포만을 회수하고 두 번 PBS(-)로 씻어준 다음, PBS(-)/3 mM DTT에 부유시킨 후 -70 °C에 보관하였다; 37°C에서 신속히 녹인 다음, Nonidet P-40를 0.1%가 되도록 첨가한 후 얼음에 5 분간 방치하였다; 원심분리를 2 분간 하여 분리한 상등액을 -70°C에 보관하였다.

#### 하. TMP kinase 활성측정

HPLC analysis를 통해 TMP kinase 활성을 측정하였다. HPLC 분석은 SCL-10A *vp* system controller (Shimadzu)에 의해 수행되어졌다. TMP kinase 활성을 측정하기 위하여 reaction mixture [20 mM 인산 완충액, pH 7.5 (0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 40 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA]을 준비한 후, 여기에 50 mM TMP (thymidine 5'-monophosphate), 정제된 fusion protein과 dH<sub>2</sub>O를 첨가하여 90 ul를 만들었다. 이를 37°C에서 시간대별 (1 시간, 3시간, 15시간)로 반응시킨 다음, 반응 중지를 위해 10% Trifluoroacetic acid 10 ul을 반응시킨 시료에 분주한다. 준비된 반응물 40 ul를 HPLC column에 주입시킨 후, 260 nm에서 Nucleotide 들은 buffer A; pH 3.5 (20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM tetrabutylammonium bromide)와 buffer B; pH 3.5 (20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM tetrabutylammonium bromide, 60% acetonitrile)에 의해 column (250\*84.6 mm, particle size 5 um, Termo)상에서 분리되어졌다. 분석시 buffer 조건은 1 ml/분의 속도로 time flow(분), buf. B value (%): 0 분, 6%, 10분, 8%, 11 분, 10%, 38 분, 12% 가 최적이었다.

#### 가. 유전자 조작

Plasmid DNA transformation, 소량 및 대량 분리, agarose gel 전기영동, 제한효소로의 절단, DNA fragment의 agarose gel로부터의 순수분리등은 Maniatis et al.<sup>(45)</sup>에서 설명한 방법들을 이용하였다.

#### 나. 바이러스 DNA분리

Vero 세포에 바이러스를 5 M.O.I./cell로 접종하고 배양한 다음 80%의 세포가 CPE를 나타냈을 때 세포와 배양액을 회수한 다음 3 번 얼렸다 녹여 세포를 깨뜨린 후 원심분리하였다. 상등액만을 회수하여 다시 12,000 rpm으로 2 시간 원심분리하여 침전된 바이러스를 500 ul의 lysis buffer (0.5% SDS, 9 mM EDTA, 10 mM Tris · HCl, pH 7.5)에 부유시켰다. 37°C에서 한 시간 배양한 다음, 한 번 phenol로, 두 번 phenol/chloroform으로, 한번 chloroform으로 DNA를 추출한 후 에탄올 침전법으로 DNA를 회수하였다. DNA를 50 ul의 TE (10 mM Tris · HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA)액에 부유 시킨 후 4°C에 보관하였다.

#### 다. 유전자의 PCR 증폭

PCR은 DeltaCyclerI™ system (Ericomp사)을 사용하였다. HSV-1 strain F와 9 개의 ACV 내성 바이러스들의 DNA을 분리하여 *BamH I*으로 절단 후 *rTth* polymerase(Perkin Elmer)를 이용하여 PCR을 수행하였다. pFTK와 pAR1b의 PCR증폭에는 *Ultma* polymerase (Perkin Elmer)를 이용하였다. pET28a(+)에 클로닝하기 위해 이용된 expression primer에는 양쪽에 *BamH I*, *Hind III*에 의해 절단될 수 있는 부위를 첨가하였고, pcDNA3.1(+)에 이용되는 primer 양쪽에는 *BamH I*, *Not I*에 의해 절단될 수 있는 부위를 첨가하여 vector 삽입과정과 삽입 후 확인과정에 용이하도록 하였다.

#### 라. DNA 염기서열 결정

HSV-1 strain CL101을 template로 한 sequencing primer를 이용하여 Plasmid DNA BS(+)나 T vector에 클로닝 되어있는 HSV-1 (F)와 내성균주들의 TK유전자의 염기서열을 결정하였는데, 전기영동은 6% urea/PAG를 이용하였다. 염기서열 재확인을 위하여 dideoxy method (Sanger 방법)에 의한 DNA염기서열자동분석기를 보유하고 있는 기초과학지원센터에 분석을 의뢰하였다.

#### 마. Herpes simplex virus의 DNA 클로닝

Strain F로부터 HSV-1의 DNA를 분리한 다음 제한효소 *BamH I*으로 절단하고, TK 유전자를 포함하고 있는 3.4 Kb절편을 동일한 제한효소로 절단된 plasmid DNA BS(+) vector에 클로닝하여 DNA염기서열 결정에 이용하였다. HSV-1의 strain F와 ACV 내성바이러스들인 AR1~AR9의 TK 주위 DNA를 증폭시키기 위해 PCR (DeltaCyclerI™ system, Ericomp사)를 수행하였다. 이때 *rTth* polymerase(Perkin Elmer)를 이용하였으며, 1.9 Kb PCR product를 T vector (pGEM-T vector; Promega, 3.0 Kb)에 삽입시키고 TK절편의 삽입방향을 제한효소 *Bgl II*와 *Hinc II*를 이용하여 결정하였다.

#### 바. 마우스 조직내 바이러스 유전자 검출

바이러스에 감염된 마우스 조직에서의 바이러스 유전자 검출은 Intron사의 RNA 추출 kit로 RNA를 분리하고, RT-PCR로 증폭시킨 다음 1.5% agarose 전기영동으로 확인하였다. 즉, 마우스로부터 적출된 삼차신경 등의 조직을 가위로 잘게 자른 다음, easy blue (RNA extraction 용액)를 1ml 첨가하였다. 이 때, 100mg 기준, 조직의 양이 easy blue 용액의 10%를 초과하지 않도록 하였다. 조직속의 세포가 잘 깨지도록 pipetting하고, 0.2ml chloroform을 첨가한 후 살짝 vortex한 다음 온에 3 분 정도 방치하였다. 4℃, 12000 rpm에서 15 분간 원심분리 수행한 후 상등액을 새로운 tube 로 옮겼다. 0.5ml isopropanol 첨가한 후 2 - 3 차례 섞어주고 다시 상온에서 10 분간 방치하였다. 원심분리를 12,000 rpm, 4℃에서 15 분간 수행하고 침전물을 75% 에탄올로 세척한 다음 diethylpyrocarbonate가 첨가된 물에 녹였다. 이 중 일정량(100 ng 이상, 추출한

양의 반 정도)를 RT-PCR에 사용하였다. RT-PCR은 Intron사의 one step RT-PCR premix를 사용하였으며, 45°C에서 1 시간, 94°C에서 5 분, 94°C에서 1 분, 58°C에서 1 분, 72°C에서 1 분, 72°C에서 5 분, 30 cycles 을 수행하였다. HSV-1의 TK, LAT, ribonucleotide reductase (RR) 유전자와 마우스  $\beta$ -actin 유전자 확인을 위한 primer 는 다음과 같았다:

TK1: 5'-CTGCAAATACCGCTCCGTATT-3'

TK2 : 5'-CATCTTCGACCGCCATCCCAT-3'

LAT1 : 5'-GACAGCAAAAATCCCCTGAG-3'

LAT2 : 5'-ACGAGGGAAAACAATAAGGG-3'

RR-1 : 5'-ATGCCAGACCTGTTTTTCAA-3'

RR-2 : 5'-GTCTTTGAACATGACGAAGG-3'

mouse  $\beta$ -actin 1 : 5'- GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3'

mouse  $\beta$ -actin 2 : 5'- CTCITTTGATGTCACGCACGTTTC-3'

위의 primer중 antisense primer는 200 pmole씩 사용하였으며, 그 외 sense primer는 100 pmole 씩 사용하였으며 RNA inhibitor 0.5 ul 첨가하였다.

RT-PCT은 RNA 7.5 ul, primer TK2, RR2, LAT2, mouse  $\beta$ -actin2가 각각 100 pmole 씩 전체가 13.5 ul되도록 각 용액을 넣은 다음 70°C에서 10 분, 4°C에서 1 분이 상 방치하였다. 위의 RNA mixture에 one step RT-preMix 16 ul (total volume 40 ul 당 16 ul 사용)와 RNase inhibitor 0.5 ul, primer TK1,TK2, RR1, RR2, LAT1, LAT2, mouse  $\beta$ -actin1, mouse  $\beta$ -actin2를 각각 100 pmole 씩 첨가하고 DEPC처리된 물을 첨가하여 총 반응액이 40 ul이 되도록 하였다. PCR조건은 다음과 같았다: 45°C에서 1 시간, 94°C에서 5 분 반응후 94°C에서 1 분, 58°C에서 1 분, 72°C에서 1 분 30 번 반복 하고 끝으로 72°C에서 5 분 반응시켰다. 생성물의 확인은 1.5% agarose 전기영동을 이용하였다.

조직으로부터 DNA추출은 적출된 조직에서 처음부터 DNA를 추출하거나, RNA를 추출하고 남은 찌꺼기로부터 DNA를 추출하는 방법을 이용하였다. 직접 추출의 경우 적출된 조직에 0.8ml lysing buffer (0.6% SDS, 10mM EDTA/pH 7.4)에 넣고 분쇄한 후 5M NaCl 0.2 ml 을 첨가하여 4°C에서 24 시간 방치한 다음 원심분리하고 phenol extraction으로 분리된 DNA를 PCR에 사용하였다. RNA를 추출 후의 DNA 분리는 RNA추출 후 남은 phenol 용액에 100% EtOH 300 ul를 첨가 후 실온에서 3 분간 방치 후 12000 rpm, 4°C, 5 분 동안 원심분리하였다; 상등액을 모두 제거 후 pellet을 0.1M sodium citrate (1 ml)로 2번 세척했다; 실온에서 30 분간 중간 중간 흔들어주면서 방치 후 2000 rpm, 4°C, 5 분 원심분리하였다. 75% EtOH로 2 번 세척 후 RT에서 10 분간 중간중간 흔들어주면서 방치 후 12000 rpm, 4°C, 5 분간 원심분리하였다; PCR을 위하여 8mM NaOH에 DNA pellet을 부유시키고, 1 M HEPES를 사용하여 pH 8.4로 맞추는 후 PCR 수행하였다. DNA의 PCR은 앞에 설명한 RT-PCR과 비슷한 조건으로 수행하였다: 45°C에서 1 시간, 94°C에서 5 분 반응후 94°C에서 1 분, 58°C에서 1 분, 72°C에서 1

분 30 번 반복하고 끝으로 72°C에서 5 분 반응시켰다.

#### 샤. 세포추출물의 이차원 전기영동

2D 전기영동을 위한 시료의 준비는 보통 물리적 분쇄법 (freeze-thaw, homogenizer, sonicator 혹은 glass bead)와 화학적 파괴법(detergent, 효소 이용)을 이용하는데, 본 연구에서는 두 가지 방법을 병용하여 포집한 세포를 3 번 냉해동시킨 후 sonication시켜 세포내용물이 추출되도록 하였다. 즉, Freeze-thaw - sonication - protein extraction - precipitation - resolubilize 순서로 진행하였다. 바이러스에 감염되었거나 비감염된 세포를 rubber policeman으로 긁어내어 PBS(-)로 두 번 세척하고 2,700rpm에서 5 분간 원심분리한 다음 세포 침전물을 모았다. 세포용해 완충액 (0.25% SDS/0.5% NP40/4% CHAPS/8 - 9 M urea/1 mM PMSF/1 mM EDTA/50 mM DTT)를 첨가한 후 -70°C에서 얼렸다 녹이고 여기에 lysis액을 넣고 3 초 씩 5 번 초음파처리로 세포를 추가로 깎 다음 20 분 동안 얼음에 놓아두었다. Microfuge로 4°C, 5 분간 원심분리시키고 불용해성 단백질을 제거하고 상층액을 회수하였다. 10% TCA을 사용하여 얼음에서 10 분경과 후 3 분간 원심분리하여 salt들이나 계면활성제들을 제거하였다. 침전물을 sample buffer로 다시 녹이고, 녹지 않는 단백질은 원심분리하여 제거한 다음 Bio-rad사의 Bradford법으로 단백질을 정량하고, 단백질 용액을 적당량씩 분주하여 -70°C냉동고에 보관하며 필요시 사용하였다. 일차 분리는 18cm IPG strip을 이용한 isoelectric focusing (IEF)하였고, 2차 분리는 18 cm의 12.5% SDS/PAGE를 이용하였다.

#### (1) 일차 분리: IEF

IPGphor Isoelectric Focusing system (Amersham)을 사용하여 1D를 수행하였다 (총 18 시간: rehydration 12 시간, 500 V에서 1 시간, 1,000 V에서 1 시간, 8000 V에서 4 시간). 먼저 기기를 작동시켜 strip holder가 놓이는 표면의 온도를 20C 정도 유지 되도록 하였다. 사용직전에 7 mg DTT/2.5 ml와 05% IPG buffer가 첨가된 rehydration solution (8 M Urea, 2% CHAPS, bromphenol blue)에 IPG strip을 담귀 rehydration시켰다. 즉, sample과 rehydration solution을 strip holder에 기포가 생기지 않도록 loading한후 IPG strip의 gel 표면에 붙어 있는 비닐을 벗겨내고 gel이 있는 표면을 아래쪽으로 행하게 하고 조심스럽게 holder에 올려놓았다. Running하는 동안 젤이 건조되는 것을 방지하기 위하여 cover fluid를 채우고 덮개를 닫았다. IPGphor의 평판위에 양극 (+)쪽에 Holder의 위쪽을, 음극(-)쪽에 아래쪽이 오도록 하고 덮개를 덮은 다음 전기영동시켰다. IEF가 끝난후 2차 분리를 즉시 시행하거나 -70°C에 보관하였다.

#### (2) 이차 분리: SDS/PAG

이차원 분리를 위한 SDS/PAGE 는 다음 4가지 과정으로 나뉘어졌다: SDS/PAG의 제조 - strip gel의 SDS Buffer에서 평형화 - 평형화시킨 IPG strip의 gel에 고정 - 전기영동. 즉, IEF용 strip을 10 ml SDS equilibration solution (6 M Urea, 30% Glycerol,

2% SDS, 10 mg/ml DTT, bromophenol blue)에 15 분간 담그어 평형화 시켰다. 준비된 18 cm X 18 cm 12.5% SDS-PAGE gel 위에 평형화된 IPG strip을 SDS gel 위에 조심스럽게 끼운 다음 0.5% agarose 로 sealing을 하였다. 20mA에서 15 시간 정도 전기영동 시킨 다음 곧바로 염색 또는 blotting을 하거나 storage solution에 담가서 보관하였다.

### (3) 2-D gel 분석

염색이 끝난 2D gel의 이미지 분석은 Nonlinear사의 phoretix software (Ver 6.01)를 사용하여 다음과 같은 순서로 분석하였다 - 1) gel scanning, 2) image 의 최적화, 3) Filtering image, 4) spot 의 detection과 editing, 즉, silver staining한 gel을 AGFA사의 ARCUS 1200에서 8bit gray scale TIF format으로 scan하였다. 스캔받은 이미지를 contrast, 밝기를 적절히 조정하며, matchset의 모든 이미지를 같은 크기와 모양으로 최적화 시켰다. 이미지상의 noise제거를 위하여 spot으로 생각되지 않는 것들을 제거하고 background subtraction을 수행하였다. 자동적으로 detection parameter을 조정하여 가장 근사한 spot을 detect하고 빠진 spot은 수작업으로 편집하여 주었다. Reference gel을 정해주고 이것과 비교할 이미지를 matching하여 주고, match하고자 하는 gel의 서로 같다고 생각되는 주된 spot의 위치를 맞추어 주고, 이 점들을 기준으로 하여 다른 점들을 matching시켜 gel상의 spot을 전체적으로 보정하여 주었다.

#### 야. 바이러스 감염세포내 단백질의 radio-labeling

완전히 성장한 Vero세포를 접종량 5 MOI (multiplicity of infection) 이상의 바이러스로 감염시키고 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 1 시간 흡착시킨 다음 제거하고, 15 ml의 배양액 (5% DMEM/ 5% dialyzed FBS)을 넣고 다시 배양하였다. 일정 시간 (3 시간 또는 8 시간) 배양 후 methionine이 결여된 DMEM배지로 5 번 세척한 다음, [<sup>35</sup>S]-methionine 14 ul (1,000 Ci/mmol 17 uCi/ul, Amersham)가 첨가된 5% methionine-free DMEM/5% dialyzed FBS를 첨가하고 6 시간 또는 13 시간 동안 label하였다. 세포를 PBS(-)로 5 회 세척하여 배양액에 잔존하는 <sup>35</sup>S-methionine을 제거하고, 세포를 회수한 다음 세포추출물을 준비하였다.

#### 자. TK의 intracellular localization

Chamber slide (Nunc)나 6well plate에 세포를 준비한 다음, phosphate-buffered 4% paraformaldehyde로 고정시킨 다음 100% MeOH을 사용하여 permeabilization시켰다. 위의 세포에 0.4% BSA를 10 분간 처리하여 blocking시키고 1:1000으로 희석된 자체제작 rabbit anti-TK 혈청을 30 분간 처리하였다. PBS(-)로 5 분씩 세 차례 세척한 다음 이차항체로서 1:10,000 희석된 FITC-conjugated anti-rabbit IgG 항체(Sigma)를 처리했다. PBS(-)로 5 분씩 3 차례 세척 후 mounting 액 (SlowFade Light Antifade Kit)으로

고정시킨 다음 confocal 형광현미경으로 관찰했다.

차. Herpes simplex virus의 동물 피부감염모델 B (Blyth et al, 1984; Simmonds and Nash, 1984)

사육실에서 일주일간 적응된 주령 5 - 6 주의 BALB/c 암컷 mice의 털을 깎아주고, 척추의 가운데에서 약간 왼쪽에 자극을 주었다. DME/2% FBS로 희석된 바이러스 10 ul를 접종하였다 (mouse당  $5 \times 10^5$  PFU). 각 바이러스 농도 당 5 마리의 mouse를 사용하였고 체중, 감염부위와 이차감염으로 형성되는 세로로 띠모양의 포진 형성, 치사율 등을 최고 한 달까지 관찰하였다.

카. Herpes simplex virus의 mouse비강감염모델 (De Clercq and Luczac, 1976; Gold et al, 1992)

사육실에서 일주일간 적응된 주령 5 - 6 주의 BALB/c 암컷 mice를 에테르로 마취시킨 다음 DME/2% FBS로 희석된 바이러스 20 - 50 ul를 비강에 접종하였다 (mouse당  $1 \times 10^6$  PFU). 각 바이러스 농도 당 5 마리의 mouse를 사용하였고 감염 후 치사율, 체중감소, CNS, 각막염 증상 등을 최고 한 달까지 관찰하였다.

타. 마우스의 대뇌감염 (Collins and Oliver, 1985; Lee and Kim, 1998)

사육실에서 일주일간 적응된 5 주령의 BALB/c 암컷의 대뇌에 DME/2% FBS로 희석된 바이러스액 50 ul를 직접 주사했다. 각 실험군은 5 - 6 마리로 이루어졌는데 바이러스대신 DME/2% FBS가 접종된 mock-감염군도 포함되어 있었다. 접종직전부터 약 한 달동안 매일 마우스의 체중을 측정하고 감염증세를 관찰했다. 감염증세는 사망, 안질환, 뇌염증세 등이었다.



### 제 3. 절 연구결과

#### 1. 시험관체계 연구

##### 가. HSV-1 TK의 효소학적 연구

###### (1) TK 유전자 발현을 위한 HSV-1 돌연변이 TK 유전자의 클로닝

HSV-1의 strain F와 ACV 내성 바이러스들인 AR1 ~ AR9의 vTK 단백질을 *E. coli*에서 발현을 위해 2 종류의 발현 벡터를 이용하였다: pGEX (GST-fused)와 pET (His-tagged). HSV-1의 strain F와 내성 바이러스 TK 유전자가 클로닝되어 있는 pGEM-T vector에서 vTK 유전자를 획득하여 pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia, 4,950 bp) vector에 다시 클로닝하였다. pGEM-T (Promega) vector에서 1.2 kb의 vTK DNA만을 얻기 위해서 PCR (DeltaCyclerI™ system, Ericomp사)를 수행하였다. HSV-1 strain CL101를 template으로 하여 양쪽 부근에 *Bam*H I과 *Eco*R I 제한 효소 site를 가지는 primer로 sense (TK ex-1) 5'-GCGGATCC CGTATGGCTTCGTACCCCTGC-3'와 antisense (TK 3-1) 5'-CGGAATTCCGTC AGTTAGCCTCCCCATC-3'를 제작하여 PCR에 활용하였다. pGEX-4T-1과 vTK PCR product를 제한 효소 *Bam*H I과 *Eco*R I (Promega)로 잘라낸 다음, 0.8% agarose gel 전기영동시키고, 약 4.9 kb의 pGEX-4T-1과 1.2 kb의 vTK DNA를 gel에서 분리하였다. 획득된 pGEX-4T-1과 vTK DNA를 16°C에서 16시간동안 반응시켰으며, 반응액은 *E.coli* BL21(DE3) pLys에 형질전환시켰다. F와 AR1 ~ AR9 모든 TK유전자의 발현 plasmid를 제조하였다 (Fig. 2).

His-tagged TK단백질 발현을 위해서는 PCR을 이용하여 1.1 kb의 HSV-1 TK ORF 왼쪽에 *Bam*H I과 오른쪽에 *Hind* III restriction site를 도입시킨 후 pET28a (Novagen) 발현벡터에 삽입시키고, *E.coli* BL21(DE3) pLys를 형질변환시켰다. F와 AR1과 AR2의 TK유전자를 클로닝하였다. 각 돌연변이 바이러스의 TK유전자의 염기서열의 분석이 이루어졌는데, 발현벡터에 클로닝된 각 돌연변이 TK유전자의 염기서열을 재분석하였다 (Table 2)

###### (2) recTK 단백질의 분리

실험방법에 기술된 바와 같이 pGEX유래 플라스미드 DNA로 형질전환된 *E. coli*는 ampicilline (AM) (50 ug/ml)과 chloramphenicol (CM) (34 ug/ml)이 들어있는 LB배양액에 배양하며, IPTG로 TK유전자 발현을 유도한 다음 27 °C에서 15 시간 동안 발현시켰다. 원심분리로 침전된 균들을 lysis액에 부유시키고 초음파분쇄기로 분쇄한 다음 원심분리시켜 상등액을 glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) column을 통과 시켜 일차 정제시켰다. 컬럼 통과물을 효소원으로 효소반응에 이용하였다. 정제된 fusion 단백질의 확인은 12% acrylamide gel에 전기영동한 후 comassie brilliant blue 염색법을 통해서 수행하였다. 정제된 단백질의 전체 농도는 DC (Detergent Compatible) Protein Assay (Bio-rad)를 이용하여 측정하고 각 농도별로 bovine serum albumin (BSA) 표준곡

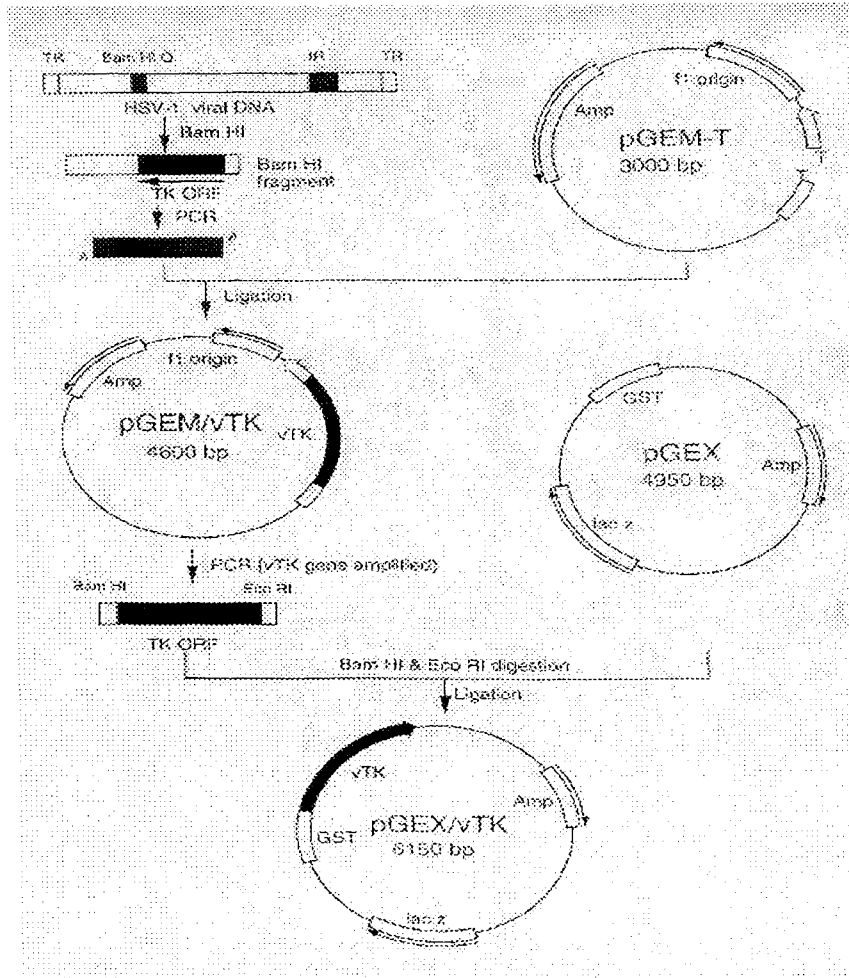


Fig. 2. Construction of prokaryotic expression plasmids for the vTK genes of HSV-1

Table 2. Genotypic analyses of thymidine kinase-deficient isolates

Group	Strains	Mutations in the TK gene <sup>a</sup>		Length of authentic TK sequence (aa)	Total length of polypeptide (aa)
		Nucleotide	Amino acid		
TK-positive	F	No mutations		376	376
	CL101	A427G	I 143 V	376	376
		C766T	R 256 W		
TK-negative	AR1	C246G	silent mutation	376	376
		T965A	M 322 K		
	AR3	C533- <sup>b</sup>	Q 185 R	184	407
	AR7	G247T	E 83 K	376	376
	AR8	G346A	D 116 N	154	181
		C460- <sup>c</sup>	P 155 R		
TK-partial	AR2	C566T	A 189 V	376	376
	AR4	C566T	A 189 V	376	376
		T1043C	V 348 A		
	AR5	C646T	R 216 C	376	376
	AR6 <sup>d</sup>	G488A	R 163 H	376	376
	AR9	G488A	R 163 H	376	376
		T592C	silent mutation		
	Mock <sup>e</sup>	-		-	

<sup>a</sup> 'C246G' represents the nucleotide substitution of cytosine (C) for guanosine (G) at position 246 of the ORF region. 'M322K' represents the amino acid substitution of Met for Lys at position 322<sup>b</sup> Frames

선을 그려 정제된 단백질의 농도를 산출하였다. 분리된 TK 단백질의 SDS/PAGE와 Western 사진은 다음의 그림과 같다 (Fig. 3). 필요시 thrombin cleavage 반응을 이용하여 GST가 제거된 TK단백질을 효소 반응에 이용하기도 하였다.

pET28에 클로닝한 TK유전자발현을 위하여 15 ug/ml의 kanamycin이 첨가된 LB 배양액에 0.1 mM IPTG를 첨가하여 27 °C에서 15 시간 동안 발현시키고, GST-TK와 마찬가지로 초음파로 대장균을 파괴하였다. Inclusion body에서 대부분의 단백질이 검출되었다. 효소를 가용화시키기 위해 단계적으로 urea를 제거하면서  $\beta$ -ME 또는 DTT같은 SH-compound로 처리를 해 주어도 가용화되지 않고 응고되어 많은 양을 배양해도 가용화된 효소의 수율이 지극히 낮았다 (시험결과 미제시). 한편으로는 thioredoxin(TRX)이 fusion되어 있는 pET32a plasmid로 subcloning하여 E. coli Ad494를 형질변화시켜 유전자발현시켰는데, 이러한 TRX-fusion vector를 이용하여 발현시킴으로 인해 가용화된 효소를 효율성 있게 얻을 수 있었다. TRX-fusion vector를 이용하여 발현시킬 때도 sonication으로 균체를 파괴하거나 또는 37°C에서 효소의 생성을 유도할 경우 대부분의 TK가 inclusion body에서 검출되었다. 이에 30°C에서 효소의 생성을 유도하고 균체를 lysozyme으로 처리하여 freeze-thawing함으로 인해 대부분의 효소를 가용화된 형태로 추출할 수 있었다 (시험결과 미제시). 그러나 His-tagged TK단백질의 분리량이 매우 낮았으며, wash buffer의 imidazol 농도를 낮추면, elution된 단백질의 정제도가 떨어지기에, TMPK 활성비교를 위한 mutant TK 유전자의 발현은 pGEX를 이용하기로 결정하였다.

### (3) recTK의 TMPK 활성

HSV 바이러스 TK 단백질은 TK 활성뿐 아니라 TMPK 활성도 가지고 있다. Wild type HSV-1 F와 TK-wild type으로부터 유래된 약제내성 바이러스의 TK/TMPK활성을 측정하기 위해 vTK 유전자가 클로닝되어 있는 pGEX-4T-1/vTK에 IPTG를 첨가하여 TK 단백질을 과발현시킨 후 GST column을 통과시켜 GST fusion 단백질만을 순수 분리하였다. 이렇게 분리된 fusion 단백질에 thrombin protease (Amersham pharmacia)를 처리하여 순수한 TK 단백질만을 분리할 수는 있지만 과정이 복잡하고 효소 활성이 GST-TK fusion 단백질과 큰 차이가 없어서(결과보고안함) fusion 단백질로 부분 정제하여 TK와 TMPK활성 측정 및 TK 저해제 탐색 연구에 활용하기로 결정하였다. 활성측정을 할 때마다 농도를 DC protein assay를 이용하여 측정하고 BSA 표준곡선을 그려서 단백질의 농도를 산출하였다 (Chen, S-H. *et. al.* 1998) (Durham, J. P., and D. H. Ives. 1970). TK활성 측정용 반응액은 RX1 mixture [(20 mM 인산 완충액, pH 7.5 (0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.5M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM ATP, 10 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA)]에 5 uM [ $^3\text{H}$ ]-thymidine (specific activity: 83 mCi/mmol), 5 uM thymidine을 넣어서 이용하였고 여기에 정제된 fusion protein과  $\text{dH}_2\text{O}$ 를 첨가하여 50 ul를 만들었다. 이를 37°C에서 30 분간 반응시킨 다음 Whatman DE81 filter에 반응물질을 여과시켰다. 차가운 4 mM ammonium formate로 두 번, 에탄

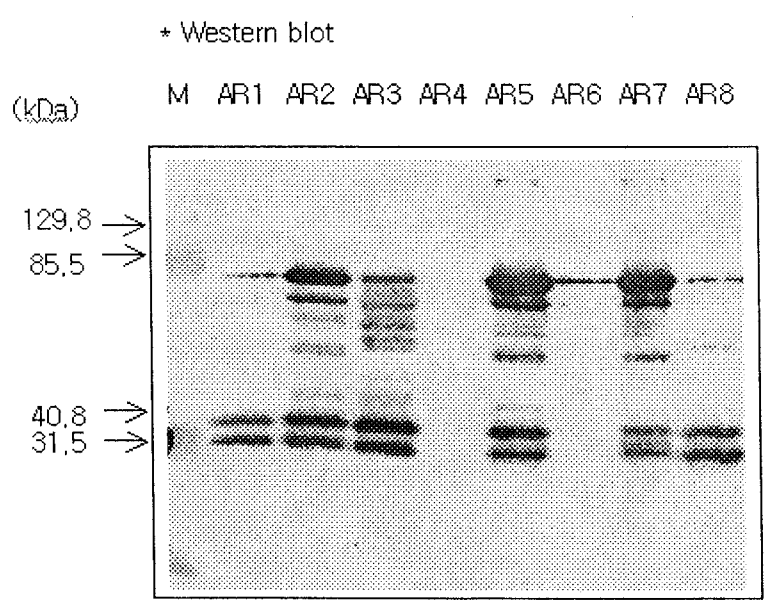
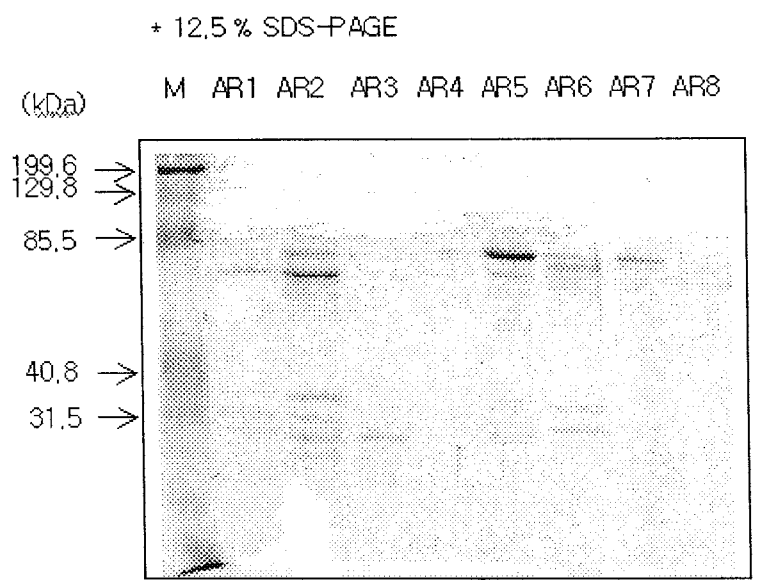


Fig. 3. The GST-TK fusion proteins expressed in *E. coli* and one-step purified

올에 두 번 씻어준 후 filter를 건조시켜 방사선 동위원소 측정기 (Packard)를 이용하여 방사능 역가를 DPM (disintegration per minute)로 측정하였다. Fig. 4는 바이러스에 감염된 Vero 세포추출물을 이용한 TK활성과 GST-TK fusion protein의 recTK활성을 측정한 것으로 (Fig. 5) 바이러스에 감염된 세포추출물을 시험한 결과와 마찬가지로 AR1, AR3, AR7와 AR8은 TK<sup>-</sup>이며 AR2, AR4, AR5과 AR9는 TK<sup>+</sup>임을 확인할 수 있었다.

TMP kinase 측정 (Rechlin, T. M. *et. al.* 1995)을 위하여 RX2 mixture (140 mM phosphate buffer, pH 7.5, 70 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM ATP, 5 mM DTT, 2 mg/ml BSA)에 thymidine 대신 12 mM thymidine 5'-monophosphate를 사용하고 여기에 purified fusion protein을 넣어 37°C에서 30 분 ~ overnight 동안 반응시켰다. Whatman DE81 filter를 이용할 경우 MP, DP에 상관없이 다 결합해 버리기 때문에 thymidine 5'-monophosphate (TMP)와 thymidine 5'-diphosphate (TDP) 분리해서 확인할 수가 없다. 따라서 각각의 반응물을 TLS 또는 HPLC로 분석하였다. TLC분석을 위해서는, Brinkmann Polygram CEL 300 PEI thin-layer chromatography (TLC) plate에 spotting하였다. 그런 후 100% methanol로 먼저 plate의 꼭대기까지 올리고 신속하게 건조한 다음 Solvent I (44% methanol, 1.1 M Lithium chloride, 0.37 M sodium formate, pH 3.4)을 꼭대기 바로 직전까지 올렸다. 이 과정을 통하여 thymidine 5'-monophosphate와 thymidine 5'-diphosphate를 분리할 수 있었다 (Fig. 6). 좀 더 정밀한 분석을 위하여 HPLC로 분석하였는데, 반응물을 측정하기 위해 mobile phase로 buffer A (20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 5 mM tetrabutylammonium bromide in dH<sub>2</sub>O, pH 3.5)와 buffer B (20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 5 mM tetrabutylammonium bromide in 60 % acetonitrile, pH 3.5)를 사용하였다. 각각의 반응물은 40 µl씩 주입하였으며, 분석은 SHIMADZU SCL-10A *vp* system controller 기기와 Thermo 250\*84.6 mm, particle size (µ) 5 column에 의해 이루어졌다. Flow rate는 1 ml/min였으며, 감지파장은 260 nm였다. Time flow와 buffer B의 %값과의 관계는 다음과 같다: 0 min/6%, 10 min/8%, 11 min/10%, 38 min/12%. TMPK 활성을 측정하는 TLC사진을 Fig. 6에 표시했는데, TDP가 생성물이며 이 반응을 위해 ATP가 ADP로 변한다. TLC상의 spot강도와 크기를 분석하여 계산한 TMP활성도는 Fig. 7에 표시했다. 정제된 FTK 단백질의 경우 TDP가 명확하게 생성된 것을 볼 수가 있지만 AR1 TK 단백질을 반응시킨 것에서는 TDP생성을 확인할 수 없었다. AR2 에서의 TK 활성은 200 µg/ml 이상에서 F와 비슷하게 나타났지만 TMPK 활성은 떨어짐을 확인할 수 있었다. AR7의 TMPK 활성은 TK 활성과 마찬가지로 생성된 TDP가 확인되지 않았다. 이와 같은 시험결과로 각 돌연변이주의 TK와 TMPK 활성을 Table 3에 요약하였다.

#### 4) TK저해제 탐색

TK저해제 탐색을 위해서 [<sup>3</sup>H]-thymidine을 기질로서 HSV-1 (F)의 recGST-TK을 효소

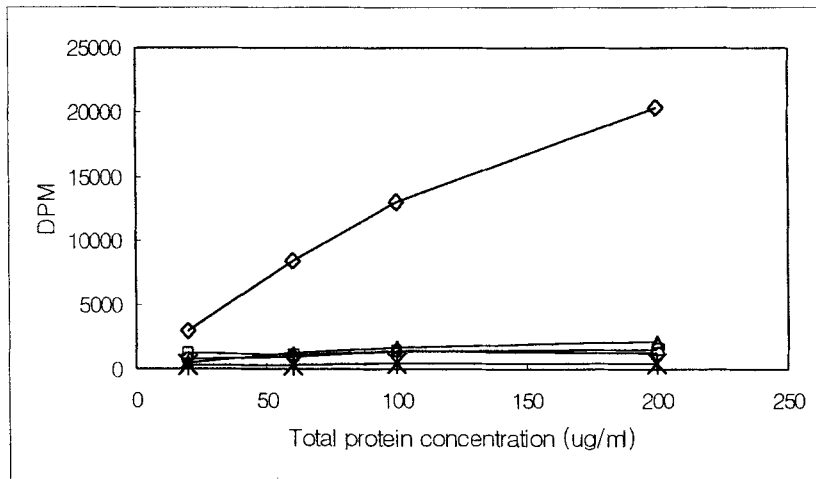
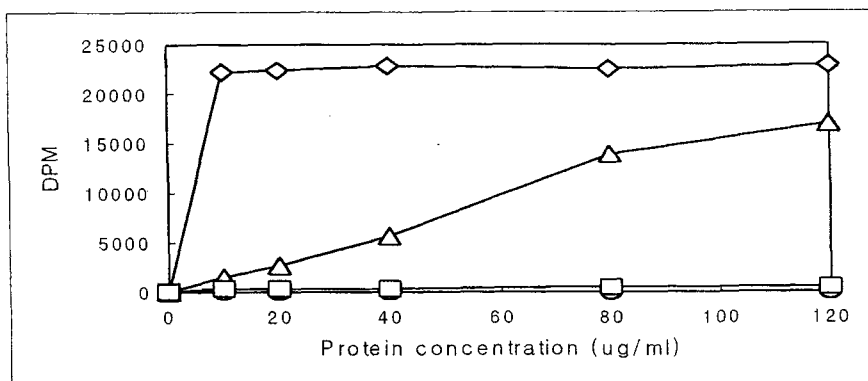


Fig. 4. TK activity of the crude Vero cell lysates infected with viruses.  
 Mock (-x-), F/Vero(-◇-), AR1/Vero(-○-), AR2/Vero(-△-), AR7/Vero(-□-)

A) TK activity



B) % Ratio of TK activity of each mutant to that of F

Protein (ug/ml)	Protein amount (ug/ml)				
	10	20	40	80	120
recFTK	100	100	100	100	100
recAR1TK	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
recAR2TK	7.0	12.1	25.1	61.5	73.9
recAR7TK	1.3	1.6	1.7	2.1	2.2

Fig. 5. Analysis of TK activity of the purified recombinant TK (recTK) proteins. Recombinant(rec) FTK(-◇-), recAR1TK(-□-), recAR2TK(-△-), recAR7TK(-○-). [<sup>3</sup>H]-thymidine was used as substrate.



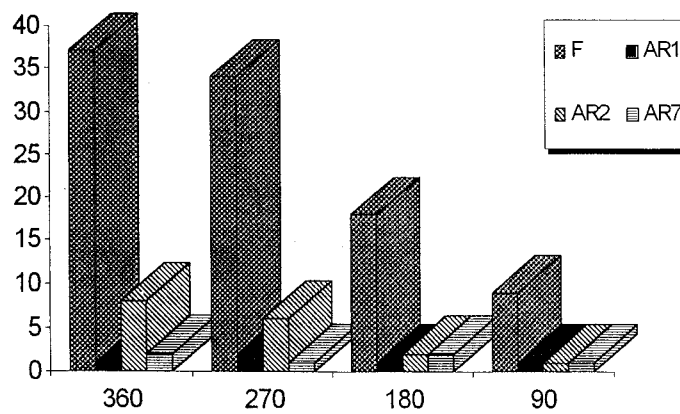
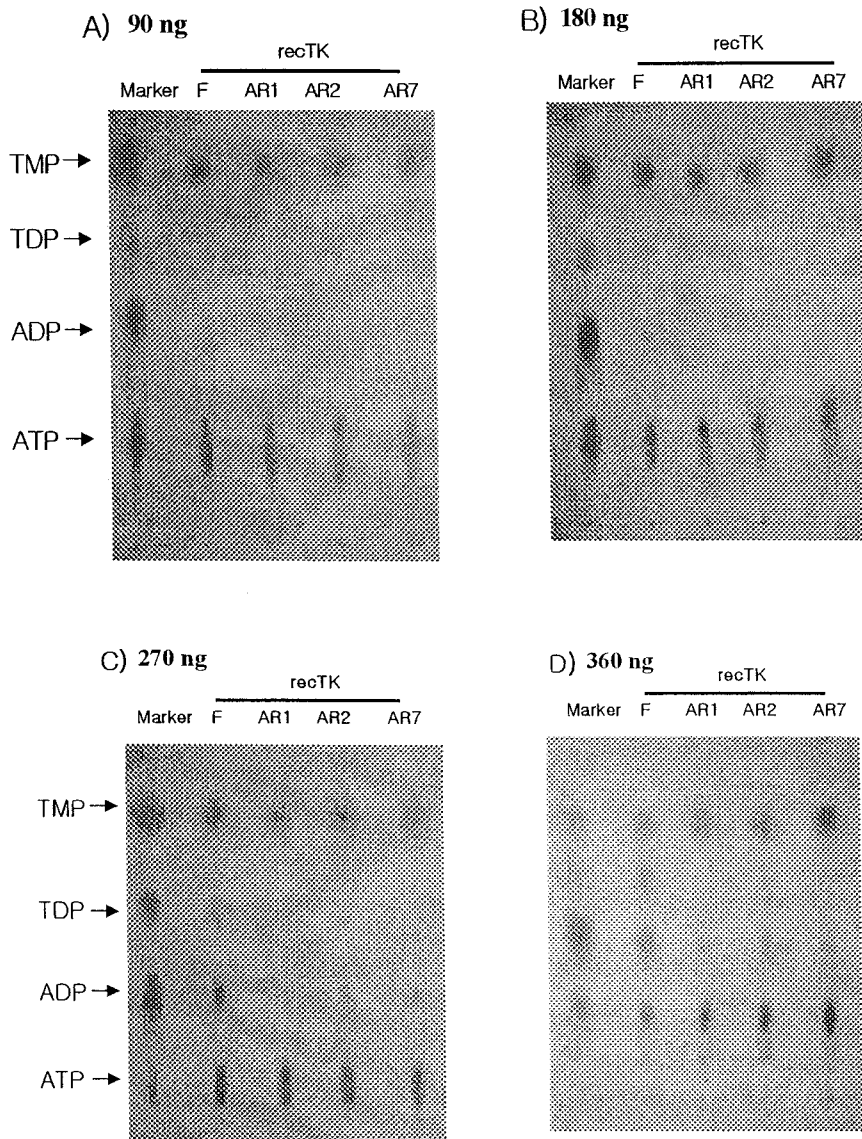
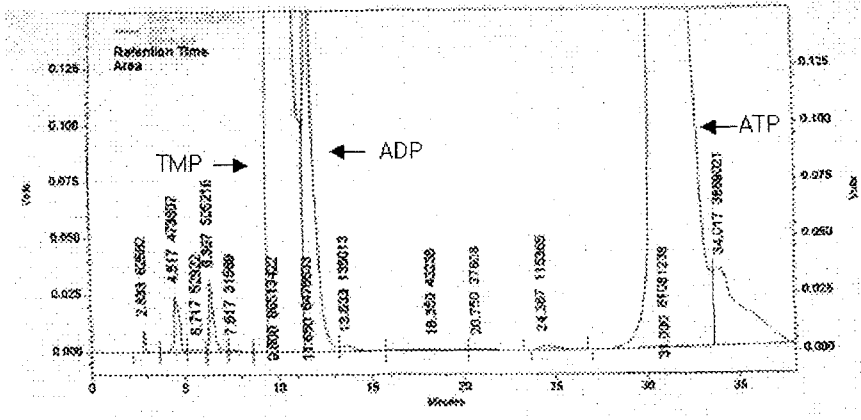
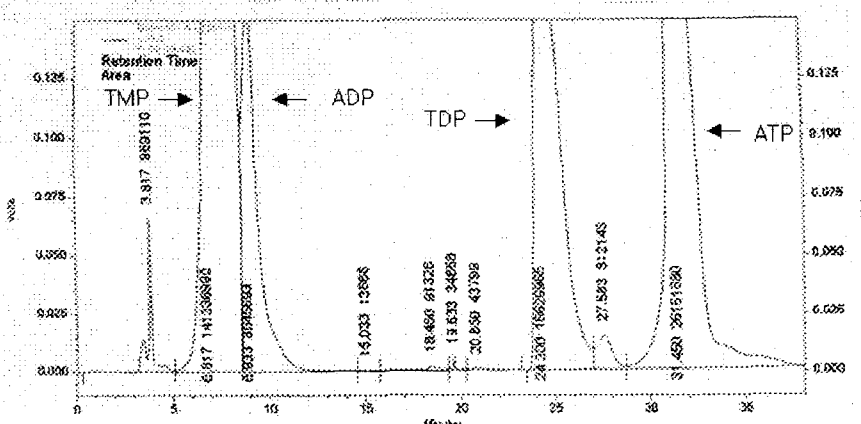


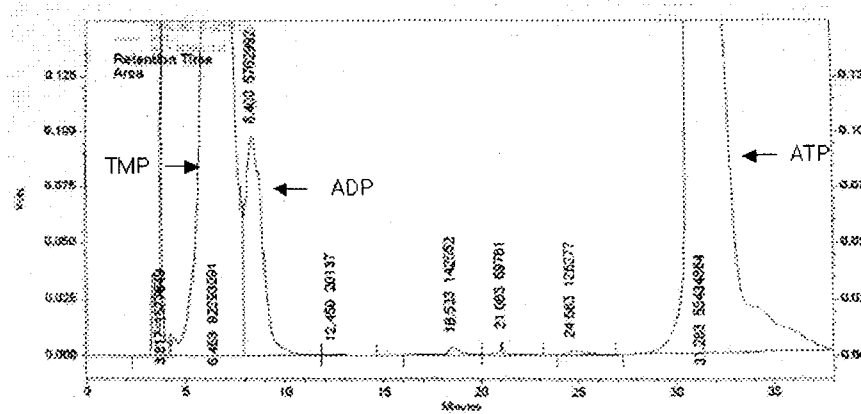
Fig. 6. TMPK activity of the purified recTK proteins in TLC analysis



Blank



F



AR1

Fig. 7. TMP kinase activity of the purified recTK proteins in HPLC analysis

Table 3. Summary of enzymatic activity of the TK proteins of various TK-deficient mutants

Enzyme activity	Enzyme sources	F	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5	AR6	AR7	AR8	AR9
	Vero lysates	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TK	Recombinant	+	-	p	-	p	p	p	-	-	p
	Plaque autoradiogram	+	-	p	-	p	p	p	-	-	p
TMPK	Recombinant	+	-	p	-	P	-	-	-	-	-

+, positive; p, partial; -, negative

원으로 이용하였다. 구매가 가능한 핵산유도체 화합물의 효소저해력은 다양한 농도로 먼저 조사하였으며, 표준약물들의 TK에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 다음과 같다 (단위, ug/ml): ACV, >1,000; BrdCyd, 74.3; BrdUrd, <10; BrUrd, 39.2; BVdUrd, 26.0; EdUrd, 1.0; FEAU, 14.6 ; FIAC, 350; FIAU, 233; FMAU, 149; FUrd, 244; GCV, 140; IdUrd, <10; PCV, 21.2; TFT, 1.6. ACV, GCA, PCV, EdUrd와 TFT,의 농도에 따른 효소저해력을 다음 Fig. 8에 표시했다. 본 연구팀에 시험의뢰가 들어왔던 핵산유도체들에 대해서는 1,000 ug/ml과 100 ug/ml의 두 농도로 시험하였다. 시료에 대한 탐색시 표준 약물로 EdUrd와 TFT를 이용하였는데, 200 여개의 시료를 조사했는데, 뚜렷한 저해력을 나타내는 것은 없었다 (결과 제시 안함).

#### 나. LAT 유전자의 클로닝 및 염기서열 결정

잠복감염시 발견되는 LAT gene transcript의 확인을 위한 probe제작을 위해 HSV-1 F의 LAT 유전자를 Fig. 8과 같이 클로닝하였다. 바이러스 DNA를 BamH I으로 자른 다음 10,139 bp의 BamH I B fragment (HSV유전자의 113,323 ~ 123,461 위치)와 8,913 bp의 BamH I E fragment를 플라스미드 pBR322에 삽입시키고 E.coli DH5alpha를 형질전환시켰다. 플라스미드 DNA의 염기서열 결정을 기초과학연구소에 의뢰하였는데, 발견되는 transcript 중 2 kb와 1.5 kb LAT 주위의 4.86 kb의 염기서열을 결정하여 염기서열이 알려진 HSV-1 CL101 strain과 비교하였다 (Table 4, Fig. 9).

## Thymidine kinase inhibition curves

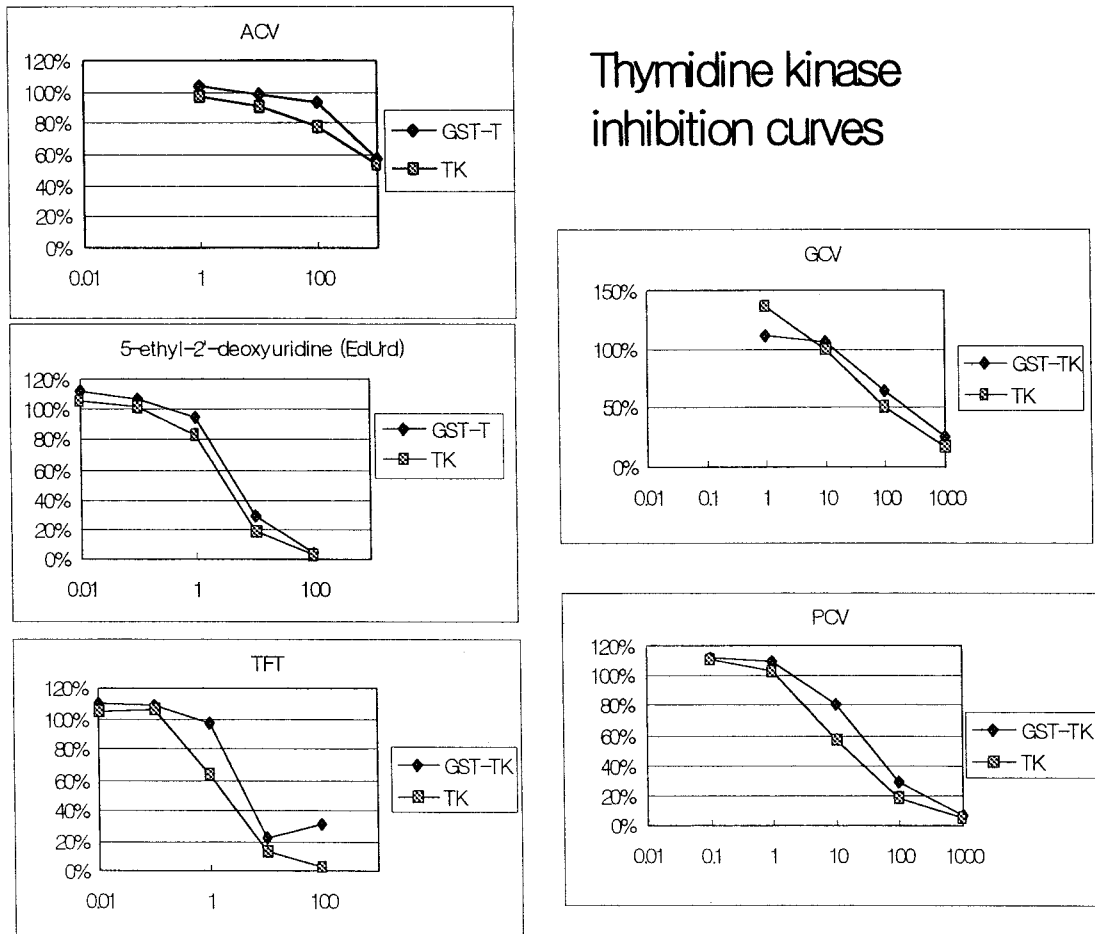


Fig. 8. Dose-responsed TK activity of the recombinant TK proteins of HSV-1 strain F in the presence of various TK inhibitors.

GST-TK: GST-fused TK; TK, GST-removed TK

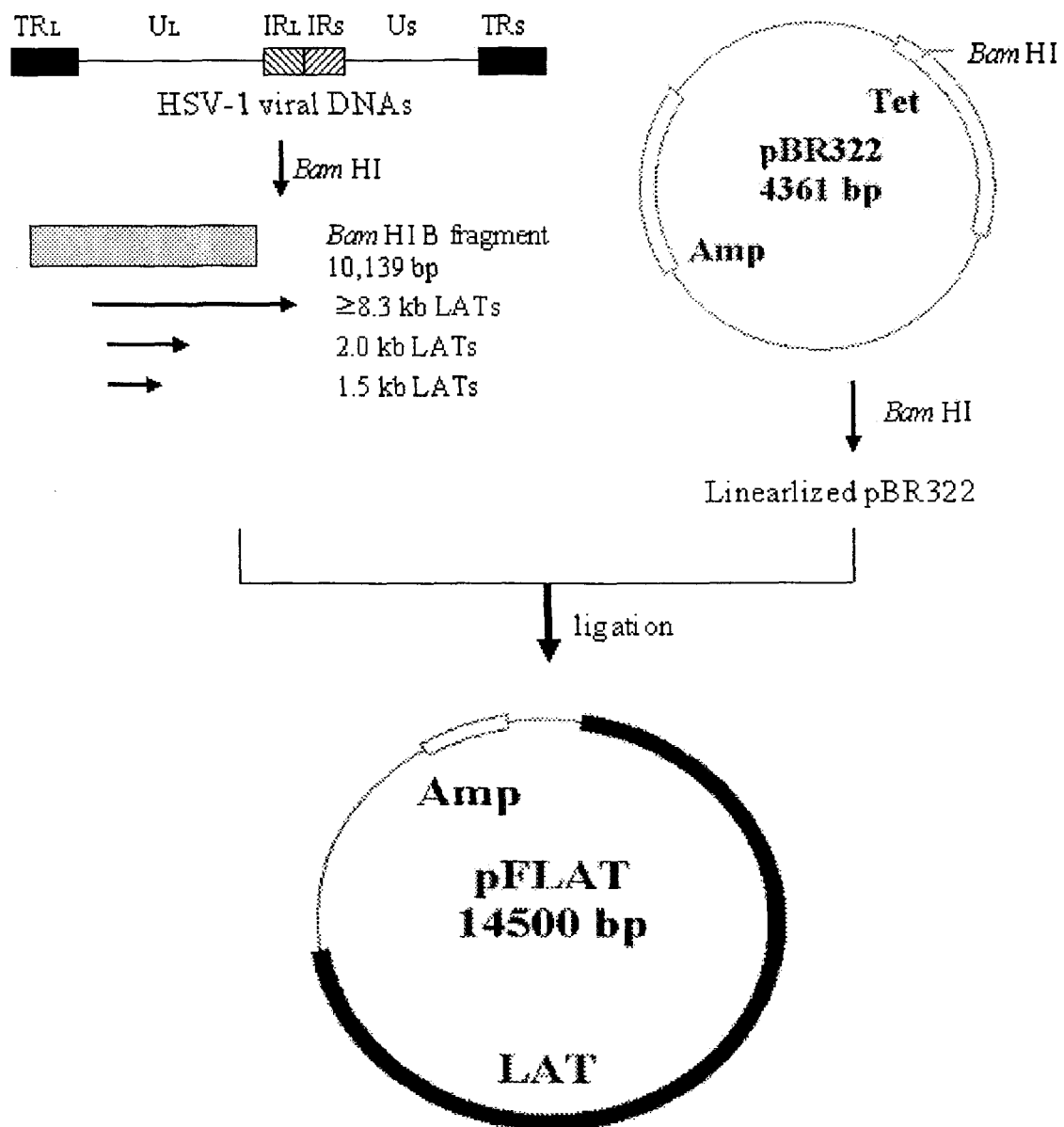



Fig. 9. Construction of a recombinant plasmid harboring the LAT gene of HSV-1 strain F

Table 4. DNA sequence analysis of the LAT gene of HSV-1 strain F and CL101

CL101	10	20	30	40	50
F	GCCCGCGAGA	TATCAATCCG	TTAAGTGCTC	TGCAGACAGG	GGCACCGCGC
	GCCCGCGAGA	TATCAATCCG	TTAAGTGCTC	TGCAGACAGG	GGCACCGCGC
CL101	60	70	80	90	100
F	CCGGAAATCC	ATTAGGCCGC	AGACGAGGAA	AATAAAATTA	CATCACCTAC
	CCGGAAATCC	ATTAGGCCGC	AGACGAGGAA	AATAAAATTA	CATCACCTAC
CL101	110	120	130	140	150
F	CCACGTGGTG	CTGTGGCCTG	TTTTTGCTGC	GTCATCTAG	CCTTTATAAA
	CCACGTGGTG	CTGTGGCCTG	TTTTTGCTGC	GTCATCTAG	CCTTTATAAA
				8.3 kb mLAT start point	
CL101	160	170	180	190	200
F	AGCGGGGGCG	CGGCCGTGCC	GATCGCGGGT	GGTGCGAAAG	ACTTTCCGGG
	AGCGGGGGCG	CGGCCGTGCC	GATCGCGGGT	GGTGCGAAAG	ACTTTCCGGG
CL101	210	220	230	240	250
F	CGCGTCCGGG	TGCCGCGGCT	CTCCGGGCC	CCCTGCAGCC	GGGGCGGCCA
	CGCGTCCGGG	TGCCGCGGCT	CTCCGGGCC	CCCTGCAGCC	GGGGCGGCCA
CL101	260	270	280	290	300
F	AGGGGCGTCC	GCGACATCCT	CCCCCTAAGC	GCCGGCCGGC	CGCTGGTCTG
	AGGGGCGTCC	GCGACATCCT	CCCCCTAAGC	GCCGGCCGGC	CGCTGGTCTG
CL101	310	320	330	340	350
F	TTTTTTGTT	TTCCCCGTTT	CGGGGGTGG	GGGGGTTGCG	GTTTCTGTTT
	TTTTTTGTT	TTCCCCGTTT	CGGGGGTGG	GGGGGTTGCG	GTTTCTGTTT
CL101	360	370	380	390	400
F	CTTTAACCCG	TCTGGGGTGT	TTTTTCGTTCC	GTCGCCGAA	TGTTTCGTTT
	CTTTAACCCG	TCTGGGGTGT	TTTTTCGTTCC	GTCGCCGAA	TGTTTCGTTT
CL101	410	420	430	440	450
F	GTCTGTCCCC	TCACGGGGCG	AAGGCCGCGT	ACGGCCCGGG	ACGAGGGGGC
	GTCTGTCCCC	TCACGGGGCG	AAGGCCGCGT	ACGGCCCGGG	ACGAGGGGGC
CL101	460	470	480	490	500
F	CCCCGACCGC	GGCGGTCCGG	GCCCCGTCCG	GCCCCGCTCG	CCGGCACGCG
	CCCCGACCGC	GGCGGTCCGG	GCCCCGTCCG	GCCCCGCTCG	CCGGCACGCG
CL101	510	520	530	540	550
F	ACGCGAAAAA	GGCCCCCGG	AGGCTTTTCC	GGGTCCCAG	CCCGGGGCCT
	ACGCGAAAAA	GGCCCCCGG	AGGCTTTTCC	GGGTCCCAG	CCCGGGGCCT
CL101	560	570	580	590	600
F	GAGATAACA	TCGGGGTTA	CCGCCAACGG	CCGGCCCCCG	TGGCGGCCCG
	GAGATAACA	TCGGGGTTA	CCGCCAACGG	CCGGCCCCCG	TGGCGGCCCG
CL101	610	620	630	640	650
F	GCCCGGGGCC	CCGGCGGACC	CAAGGGGCC	CGGCCCGGGG	CCCCACAACG
	GCCCGGGGCC	CCGGCGGACC	CAAGGGGCC	CGGCCCGGGG	CCCCACAACG
CL101	660	670	680	690	700
F	GCCCGGCGCA	TGCGCTGTGG	TTTTTTTTTC	TCGGTGTT	TGCGGGGCTC
	GCCCGGCGCA	TGCGCTGTGG	TTTTTTTTTC	TCGGTGTT	TGCGGGGCTC
CL101	710	720	730	740	750
F	CATCGCCTTT	CCTGTTCTCG	CTTCTCCC	CCCCCCTTC	TTCACCCCA
	CATCGCCTTT	CCTGTTCTCG	CTTCTCCC	CCCCCCTTC	TTCACCCCA
CL101	760	770	780	790	800
F	GTACCCTCCT	CCCTCCCTTC	CTCCCCGTT	ATCCCACTCG	TCGAGGGCGC
	GTACCCTCCT	CCCTCCCTTC	CTCCCCGTT	ATCCCACTCG	TCGAGGGCGC


Continued

2 ( or 1.5) kb LAT start point

	810	820	830	840	850
CL101	CCCGGTGTCG	TTCAACAAAG	ACGCCGCGTT	TCCAGGTTAGG	TTAGACACCT
F	CCCGGTGTCG	TTCAACAAAG	ACGCCGCGTT	TCCAGGTTAGG	TTAGACACCT
	860	870	880	890	900
CL101	GCTTCTCCCC	AATAGAGGGG	GGGGACCCAA	ACGACAGGGG	GCGCCCCAGA
F	GCTTCTCCCC	AATAGAGGGG	GGGGACCCAA	ACGACAGGGG	GCGCCCCAGA
	910	920	930	940	950
CL101	GGCTAAGGTC	GGCCACGCCA	CTCGCGGGTG	GGCTCGTGTT	ACAGCACACC
F	GGCTAAGGTC	GGCCACGCCA	CTCGCGGGTG	GGCTCGTGTT	ACAGCACACC
	960	970	980	990	1000
CL101	AGCCCGTTCT	TTTCCCCCCC	TCCCACCCTT	AGTCAGACTC	TGTTACTTAC
F	AGCCCGTTCT	TTTCCCCCCC	TCCCACCCTT	AGTCAGACTC	TGTTACTTAC
	1010	1020	1030	1040	1050
CL101	CCGTCCGACC	ACCAACTGCC	CCCTTATCTA	AGGGCCGGCT	GGAAGACCGC
F	CCGTCCGACC	ACCAACTGCC	CCCTTATCTA	AGGGCCGGCT	GGAAGACCGC
	1060	1070	1080	1090	1100
CL101	CAGGGGGTTCG	GCCGGTGTTCG	CTGTAACCCC	CCACGCCAAT	GACCCACGTA
F	CAGGGGGTTCG	GCCGGTGTTCG	CTGTAACCCC	CCACGCCAAT	GACCCACGTA
	1110	1120	1130	1140	1150
CL101	CTCCAAGAAG	GCATGTGTCC	CACCCCGCCT	GTGTTTTTGT	GCCTGGCTCT
F	CTCCAAGAAG	GCATGTGTCC	CACCCCGCCT	GTGTTTTTGT	GCCTGGCTCT
	1160	1170	1180	1190	1200
CL101	CTATGCTTGG	GTCTTACTGC	CGGGGGAGTG	CGGGGGAGGG	CGGGGGAGGG
F	CTATGCTTGG	GTCTTACTGC	CGGGGGAGTG	CGGGGGAGGG	CGGGGGAGGG
	1210	1220	1230	1240	1250
CL101	GGGGTGTGGA	AGGAAATGCA	CGGCGCGTGT	GTACCCCCC	TAAAGTTGTT
F	GGGGTGTGGA	AGGAAATGCA	CGGCGCGTGT	GTACCCCCC	TAAAGTTGTT
	1260	1270	1280	1290	1300
CL101	CCTAAAGCGA	GGATACGGAG	GAGTGGCGGG	TGCCGGGGGA	CCGGGGTGAT
F	CCTAAAGCGA	GGATACGGAG	GAGTGGCGGG	TGCCGGGGGA	CCGGGGTGAT
	1310	1320	1330	1340	1350
CL101	CTCTGGCACG	CGGGGGTGGG	AAGGGTCGGG	GGAGGGGGGG	ATGGAGTACC
F	CTCTGGCACG	CGGGGGTGGG	AAGGGTCGGG	GGAGGGGGGG	ATGGAGTACC
	1360	1370	1380	1390	1400
CL101	GGCCCACCTG	GCCGCGCGGG	TGCGCGTGCC	TTTGACACCC	AACCCCACGT
F	GGCCCACCTG	GCCGCGCGGG	TGCGCGTGCC	TTTGACACCC	AACCCCACGT
	1410	1420	1430	1440	1450
CL101	CCCCGGGCGG	TCTCTAAGAA	GCACCGCCCC	CCCTCCTTCA	TACCACCGAG
F	CCCCGGGCGG	TCTCTAAGAA	GCACCGCCCC	CCCTCCTTCA	TACCACCGAG
	1460	1470	1480	1490	1500
CL101	CATGCCTGGG	TGTGGGTGG	TAACCAACAC	GCCCATCCCC	TCGTCTCCTG
F	CATGCCTGGG	TGTGGGTGG	TAACCAACAC	GCCCATCCCC	TCGTCTCCTG
	1510	1520	1530	1540	1550
CL101	TGATTCTCTG	GCTGCACCGC	ATTCTTGTTT	TCTAACTATG	TTCTGTTTTC
F	TGATTCTCTG	GCTGCACCGC	ATTCTTGTTT	TCTAACTATG	TTCTGTTTTC
	1560	1570	1580	1590	1600
CL101	TGTCTCCCCC	CCCACCC	CTCCGCCCA	CCCCCAACA	CCCACGTCTG
F	TGTCTCCCCC	CCCACCC	CTCCGCCCA	CCCCCAACA	CCCACGTCTG



Continued

	1610	1620	1630	1640	1650
CL101	TGGTGTGGCC	GACCCCCTTT	TGGGCGCCCC	GTCCCGCCCC	GCCACCCCTC
F	TGGTGTGGCC	GACCCCCTTT	TGGGCGCCCC	GTCCCGCCCC	GCCACCCCTC
	1.5 kb splicing end point 				
	1660	1670	1680	1690	1700
CL101	CC■TCCTTTG	TTGCCCTATA	GTGT■AGTT■A	CCCCCCCCGC	CCTTTGTGGC
F	CC■TCCTTTG	TTGCCCTATA	GTGT■AGTT■A	CCCCCCCCGC	CCTTTGTGGC
	1710	1720	1730	1740	1750
CL101	GGCCAGAGGC	CAGGTCAGTC	CGGGCGGGCA	GGCGCTCGCG	GAAACTTAAC
F	GGCCAGAGGC	CAGGTCAGTC	CGGGCGGGCA	GGCGCTCGCG	GAAACTTAAC
	1760	1770	1780	1790	1800
CL101	ACCCACACCC	AACCCACTGT	GGTTCTGGCT	CCATGCCAGT	GGCAGGATGC
F	ACCCACACCC	AACCCACTGT	GGTTCTGGCT	CCATGCCAGT	GGCAGGATGC
	1810	1820	1830	1840	1850
CL101	TTTCGGGGAT	CGGTGGTCAG	GCAGCCC GGG	CCG■GGCTCT	GTGGTAAACA
F	TTTCGGGGAT	CGGTGGTCAG	GCAGCCC GGG	CCG■GGCTCT	GTGGTAAACA
	1860	1870	1880	1890	1900
CL101	CCAGAGCCTG	CCCAACATGG	CACCCCCACT	CCCACGCACC	CCCACTCCCA
F	CCAGAGCCTG	CCCAACATGG	CACCCCCACT	CCCACGCACC	CCCACTCCCA
	1910	1920	1930	1940	1950
CL101	CGCACCCCCA	CTCCCACGCA	CCCCCACTCC	CACGCACCCC	CACTCCCACG
F	CGCACCCCCA	CTCCCACGCA	CCCCCACTCC	CACGCACCCC	CACTCCCACG
	1960	1970	1980	1990	2000
CL101	CACCCCCACT	CCCACGCACC	CCCACTCCCA	CGCACCCCCA	CTCCCACGCA
F	CACCCCCACT	CCCACGCACC	CCCACTCCCA	CGCACCCCCA	CTCCCACGCA
	2010	2020	2030	2040	2050
CL101	CCCCCACTCC	CACGCA■CCC	CG■GAT■CAT	CCAACACAGA	CAGGGAAAAG
F	CCCCCACTCC	CACGCA■CCC	CG■GAT■CAT	CCAACACAGA	CAGGGAAAAG
	2060	2070	2080	2090	2100
CL101	ATACAAAAGT	AAACCTTTAT	TTCCCAA■AG	ACAGCAAAAA	TCCCCTGAGT
F	ATACAAAAGT	AAACCTTTAT	TTCCCAA■AG	ACAGCAAAAA	TCCCCTGAGT
	2110	2120	2130	2140	2150
CL101	TTTTT■AT	TAGGGCCAAC	AC■AAAGACC	CGCTGGTGTG	TGGTGCCCGT
F	TTTTT■AT	TAGGGCCAAC	AC■AAAGACC	CGCTGGTGTG	TGGTGCCCGT
	2160	2170	2180	2190	2200
CL101	GTCTTTCACT	TTTCCCCTCC	CCGACACGGA	TTGGCTGGTG	TAGTGGGCGC
F	GTCTTTCACT	TTTCCCCTCC	CCGACACGGA	TTGGCTGGTG	TAGTGGGCGC
	2210	2220	2230	2240	2250
CL101	GGCCAGAGAC	CACCCAGCGC	CCGACCCCCC	CCTCCCCACA	AACACGGGGG
F	GGCCAGAGAC	CACCCAGCGC	CCGACCCCCC	CCTCCCCACA	AACACGGGGG
	2260	2270	2280	2290	2300
CL101	GCGTCCCTTA	TTGTTTTCCC	TCGTCCC GGG	TCGACGCCCC	CTGCTCCCCG
F	GCGTCCCTTA	TTGTTTTCCC	TCGTCCC GGG	TCGACGCCCC	CTGCTCCCCG
	2310	2320	2330	2340	2350
CL101	GACCACGGGT	GCCGAGACCG	CAGGCTGCGG	AAGTCCAGGG	CGCCCACTAG
F	GACCACGGGT	GCCGAGACCG	CAGGCTGCGG	AAGTCCAGGG	CGCCCACTAG
	2360	2370	2380	2390	2400
CL101	GGTGCCCTGG	TCGAACAGCA	TGTTCCCCAC	GGGGGTCATC	CAGAGGCTGT
F	GGTGCCCTGG	TCGAACAGCA	TGTTCCCCAC	GGGGGTCATC	CAGAGGCTGT

Continued

CL101	2410	2420	2430	2440	2450
F	TCCACTCCGA	CGCGGGGGCC	GTCGGGTACT	CGGGGGGCAT	CACGTGGTTA
	TCCACTCCGA	CGCGGGGGCC	GTCGGGTACT	CGGGGGGCAT	CACGTGGTTA
CL101	2460	2470	2480	2490	2500
F	CCCGCGGTCT	CGGGGAGCAG	GGTGCGGCGG	CTCCAGCCGG	GGACCCGCGC
	CCCGCGGTCT	CGGGGAGCAG	GGTGCGGCGG	CTCCAGCCGG	GGACCCGCGC
CL101	2510	2520	2530	2540	2550
F	CCGCAGCCGG	GTCGCCATGT	TTCCCGTCTG	GTCCACCAGG	ACCACGTACG
	CCGCAGCCGG	GTCGCCATGT	TTCCCGTCTG	GTCCACCAGG	ACCACGTACG
CL101	2560	2570	2580	2590	2600
F	CCCCGATGTT	CCCCGTCTCC	ATGTCCAGGA	TGGGCAGGCA	GTCCCCCGTG
	CCCCGATGTT	CCCCGTCTCC	ATGTCCAGGA	TGGGCAGGCA	GTCCCCCGTG
CL101	2610	2620	2630	2640	2650
F	ATGTCTTGT	TCACGTAAGG	CGACAGGGCG	ACCACGCTAG	AGACCCCCGA
	ATGTCTTGT	TCACGTAAGG	CGACAGGGCG	ACCACGCTAG	AGACCCCCGA
CL101	2660	2670	2680	2690	2700
F	GATGGGCAGG	TAGCGCGTGA	GGCCGCCCGC	GGGGCGGCC	CCGGAAGTCT
	GATGGGCAGG	TAGCGCGTGA	GGCCGCCCGC	GGGGCGGCC	CCGGAAGTCT
CL101	2710	2720	2730	2740	2750
F	CCGCGTGGCG	CGTCTTCCGG	GCACACTTCC	TGGCCCCCG	CGGCCAGAA
	CCGCGTGGCG	CGTCTTCCGG	GCACACTTCC	TGGCCCCCG	CGGCCAGAA
			2 ( or 1.5) kb LAT end point		
CL101	2760	2770	2780	2790	2800
F	GCAGCGCGGG	GGCCGAGGGA	GGTTTCCTCT	TGTCTCCCTC	CCAGGGCACC
	GCAGCGCGGG	GGCCGAGGGA	GGTTTCCTCT	TGTCTCCCTC	CCAGGGCACC
CL101	2810	2820	2830	2840	2850
F	GACGGCCCCG	CCCGAGGAGG	CGGAAGCGGA	GGAGGACGCG	GCCCCGGCGG
	GACGGCCCCG	CCCGAGGAGG	CGGAAGCGGA	GGAGGACGCG	GCCCCGGCGG
CL101	2860	2870	2880	2890	2900
F	CGGAAGAGGC	GGCCCCCGCG	GGGTCGGGG	CCGAGGAGGA	AGAGGCAGAG
	CGGAAGAGGC	GGCCCCCGCG	GGGTCGGGG	CCGAGGAGGA	AGAGGCAGAG
CL101	2910	2920	2930	2940	2950
F	GAGGAAGAGG	CGGAGGCCGC	CGAGGACGTC	AGGGGGGTCC	CGGGCCACC
	GAGGAAGAGG	CGGAGGCCGC	CGAGGACGTC	AGGGGGGTCC	CGGGCCACC
CL101	2960	2970	2980	2990	3000
F	CTGGCCGCGC	CCCCCGGCC	CTGAGTCGGA	GGGGGGGTGC	GTCGCCGCC
	CTGGCCGCGC	CCCCCGGCC	CTGAGTCGGA	GGGGGGGTGC	GTCGCCGCC
CL101	3010	3020	3030	3040	3050
F	TCTTGGCCCC	TGCCGGCGCG	AGGGGGGGAC	GCGTGGACTG	GGGGGAGGGG
	TCTTGGCCCC	TGCCGGCGCG	AGGGGGGGAC	GCGTGGACTG	GGGGGAGGGG
CL101	3060	3070	3080	3090	3100
F	TTTTCTGGC	CCGACCCGCG	CCTCTTCCCTC	GGACGCACCG	CCGCTCCTG
	TTTTCTGGC	CCGACCCGCG	CCTCTTCCCTC	GGACGCACCG	CCGCTCCTG
CL101	3110	3120	3130	3140	3150
F	CTCGACAGAG	GCGGCGGAGG	GGAGCGGGG	GGCGCCGAG	GGGGCGGCGC
	CTCGACAGAG	GCGGCGGAGG	GGAGCGGGG	GGCGCCGAG	GGGGCGGCGC
CL101	3160	3170	3180	3190	3200
F	CGCGGGAGGG	CCCGTGCCA	CCCTCCACGC	CCGGCCCCC	CGAGCCGCGC
	CGCGGGAGGG	CCCGTGCCA	CCCTCCACGC	CCGGCCCCC	CGAGCCGCGC

Continued

	3210	3220	3230	3240	3250
CL101	GCCACCGTCG	CACGCGCCCG	GCACAGACTC	TGTTCTTGGT	TCGCGGCCTG
F	GCCACCGTCG	CACGCGCCCG	GCACAGACTC	TGTTCTTGGT	TCGCGGCCTG
	3260	3270	3280	3290	3300
CL101	AGCCAGGGAC	GAGTGC GACT	GGGGCACACG	GCGCGCGTCC	GCGGGG
F	AGCCAGGGAC	GAGTGC GACT	GGGGCACACG	GCGCGCGTCC	GCGGGG
	3310	3320	3330	3340	3350
CL101			GCCGGGGCGC	GGGGGCCGGG	CCCCGGAGGC
F			GCCGGGGCGC	GGGGGCCGGG	CCCCGGAGGC
	3360	3370	3380	3390	3400
CL101	GGCGCTCGCA	CGCACGGGGC	CACGGCCGCG	CGGGGGCGCG	CGGGTCCC GA
F	GGCGCTCGCA	CGCACGGGGC	CACGGCCGCG	CGGGGGCGCG	CGGGTCCC GA
	3410	3420	3430	3440	3450
CL101	CGCGGCCCG	GACGCGGG	GCCC GGGGCG	GGGGGCGGAG	CCTGGCATGG
F	CGCGGCCCG	GACGCGGG	GCCC GGGGCG	GGGGGCGGAG	CCTGGCATGG
	3460	3470	3480	3490	3500
CL101	GCGCCGCGGG	GGGCTGTGG	GGAGAGGCCG	GGGGGAGTC	GCTGATCACT
F	GCGCCGCGGG	GGGCTGTGG	GGAGAGGCCG	GGGGGAGTC	GCTGATCACT
	3510	3520	3530	3540	3550
CL101	ATGGGGTCTC	TGTTGTTTGC	AAGGGGGGCG	GGTCTGTTGA	CAAGGGGGCC
F	ATGGGGTCTC	TGTTGTTTGC	AAGGGGGGCG	GGTCTGTTGA	CAAGGGGGCC
	3560	3570	3580	3590	3600
CL101	CGTCCGGCCC	CTCGGCCGCC	CCGCCTCCGC	TTCAACAACC	CCAACCCCAA
F	CGTCCGGCCC	CTCGGCCGCC	CCGCCTCCGC	TTCAACAACC	CCAACCCCAA
	3610	3620	3630	3640	3650
CL101	CCCCAACCCC	CCCGGAGGGG	CCAGACGCCC	CCCGCGGGCG	CGCGGCTCGC
F	CCCCAACCCC	CCCGGAGGGG	CCAGACGCCC	CCCGCGGGCG	CGCGGCTCGC
	3660	3670	3680	3690	3700
CL101	GACTGGCGGG	A	GCCGCC	GCCGCCGCTG	CTGTTGGTGG
F	GACTGGCGGG	A	GCCGCC	GCCGCCGCTG	CTGTTGGTGG
	3710	3720	3730	3740	3750
CL101	GTTACTGCTG	CCGTGTGGCC	CGATGGGCGC	CGAGGGGGGC	GCTGTCCGAG
F	GTTACTGCTG	CCGTGTGGCC	CGATGGGCGC	CGAGGGGGGC	GCTGTCCGAG
	3760	3770	3780	3790	3800
CL101	CCGCGGCCCG	CTGGGGGGCT	GCGTGAGACG	CCCCGCCCGT	CACGGGGGGC
F	CCGCGGCCCG	CTGGGGGGCT	GCGTGAGACG	CCCCGCCCGT	CACGGGGGGC
	3810	3820	3830	3840	3850
CL101	GCGGCGGCGC	CTCTGCGTGG	GGGGGCGCGG	GGCGTCCGGC	GGGGGGCGGG
F	GCGGCGGCGC	CTCTGCGTGG	GGGGGCGCGG	GGCGTCCGGC	GGGGGGCGGG
	3860	3870	3880	3890	3900
CL101	CGGTACGTAG	TCTGCTGCAA	GAGACAACGG	GGGGCGCGAT	CAGGTTACGC
F	CGGTACGTAG	TCTGCTGCAA	GAGACAACGG	GGGGCGCGAT	CAGGTTACGC
	3910	3920	3930	3940	3950
CL101	CCCCTCCC		G	GCCCG	CCCTTTCCTC
F	CCCCTCCC		G	GCCCG	CCCTTTCCTC
	3960	3970	3980	3990	4000
CL101	CCGCCTATTC	CTCCCTCCCC	CC	TCCTC	CTCCTCCTCC
F	CCGCCTATTC	CTCCCTCCCC	CC	TCCTC	CTCCTCCTCC

Continued

CL101		4010	4020	4030	4040	4050
F	T	GCCGCCC	CCCGCCTCAC	CGTCGTCCAG	GTCGTTCGTCA	TCCTCGTCCG
	T	GCCGCCC	CCCGCCTCAC	CGTCGTCCAG	GTCGTTCGTCA	TCCTCGTCCG
CL101		4060	4070	4080	4090	4100
F	TGGTGGGCTC	GGGTGGGTG	GGCGACAGGG	CCCTCACCGT	GTGCCCCCCC	
	TGGTGGGCTC	GGGTGGGTG	GGCGACAGGG	CCCTCACCGT	GTGCCCCCCC	
CL101		4110	4120	4130	4140	4150
F	AGGGTCAGGT	ACCGCGGGGC	GAACCGCTGA	TTGCCCCTCC	AGATAAAGTC	
	AGGGTCAGGT	ACCGCGGGGC	GAACCGCTGA	TTGCCCCTCC	AGATAAAGTC	
CL101		4160	4170	4180	4190	4200
F	CACGGCCGTG	CCCGCCCTGA	CGGCCTCCTC	GGCCTCCATG	CGGGTCTGGG	
	CACGGCCGTG	CCCGCCCTGA	CGGCCTCCTC	GGCCTCCATG	CGGGTCTGGG	
CL101		4210	4220	4230	4240	4250
F	GGTCGTTTAC	GATCGGGATG	GTGCTGAACG	ACCCGCTGGG	CGTCACGCCC	
	GGTCGTTTAC	GATCGGGATG	GTGCTGAACG	ACCCGCTGGG	CGTCACGCCC	
CL101		4260	4270	4280	4290	4300
F	ACTATCAGGT	ACACCAGCTT	GGCGTTGCAC	AGCGGGCAGG	TGTTGCGCAA	
	ACTATCAGGT	ACACCAGCTT	GGCGTTGCAC	AGCGGGCAGG	TGTTGCGCAA	
CL101		4310	4320	4330	4340	4350
F	TTGCATCCAG	GTTTTTCATGC	ACGGGATGCA	GAAGCGGTGC	ATGCACGGGA	
	TTGCATCCAG	GTTTTTCATGC	ACGGGATGCA	GAAGCGGTGC	ATGCACGGGA	
CL101		4360	4370	4380	4390	4400
F	AGGTGTCGCA	GCGCAGGTGG	GGCGCGATCT	CATCCGTGCA	CACGGCGCAC	
	AGGTGTCGCA	GCGCAGGTGG	GGCGCGATCT	CATCCGTGCA	CACGGCGCAC	
CL101		4410	4420	4430	4440	4450
F	ACGTCGCCCT	CGTCGCTCCC	CCCGTCCTCT	CGAGGGGGGG	CGCCCCCGCA	
	ACGTCGCCCT	CGTCGCTCCC	CCCGTCCTCT	CGAGGGGGGG	CGCCCCCGCA	
CL101		4460	4470	4480	4490	4500
F	ACTGCCGGGG	TCTTCCTCGC	GGGGGGGGCT	CCCCCCCAG	ACCGCCCCC	
	ACTGCCGGGG	TCTTCCTCGC	GGGGGGGGCT	CCCCCCCAG	ACCGCCCCC	
CL101		4510	4520	4530	4540	4550
F	CATCCACGCC	CTGCGGCCCC	AGCAGCCCCG	TCTCGAACAG	TCCCGTGTCC	
	CATCCACGCC	CTGCGGCCCC	AGCAGCCCCG	TCTCGAACAG	TCCCGTGTCC	
CL101		4560	4570	4580	4590	4600
F	GTGCTGTCCG	CCTCGGAGGC	GGAGTCGTCT	TCATGGTGGT	CGGCGTCCCC	
	GTGCTGTCCG	CCTCGGAGGC	GGAGTCGTCT	TCATGGTGGT	CGGCGTCCCC	
CL101		4610	4620	4630	4640	4650
F	CCGCCCCCCC	ACTTCGGTCT	CCGCCTCAGA	GTCGCTGCTG	TCCGGCAGGT	
	CCGCCCCCCC	ACTTCGGTCT	CCGCCTCAGA	GTCGCTGCTG	TCCGGCAGGT	
CL101		4660	4670	4680	4690	4700
F	CTCGGTCGCA	GGGAAACACC	CAGACATCCG	GGGCGGGCTA	AGGGGAAAAA	
	CTCGGTCGCA	GGGAAACACC	CAGACATCCG	GGGCGGGCTA	AGGGGAAAAA	
CL101		4710	4720	4730	4740	4750
F	A	GGGGGGCG	GGTAAGAATG	GGGGG	ATT	TCCCGCGTCA
	A	GGGGGGCG	GGTAAGAATG	GGGGG	ATT	TCCCGCGTCA
CL101		4760	4770	4780	4790	4800
F	ACGAGTTCCC	CCTCTCCCC	CCCCGCCTCA	CAAAGTCTTG	CCCCCCTGCT	
	ACGAGTTCCC	CCTCTCCCC	CCCCGCCTCA	CAAAGTCTTG	CCCCCCTGCT	

Continued

CL101	4810	4820	4830	4840	4850
F	GGCCTCGAA	GAGGGGGAG	AAAGGGTCT	GCAACCAAAG	GTGGTCTGGG
	GGCCTCGAA	GAGGGGGAG	AAAGGGTCT	GCAACCAAAG	GTGGTCTGGG
F		4861			
CL101	TCCGTCCTTT	G			
	TCCGTCCTTT	G			

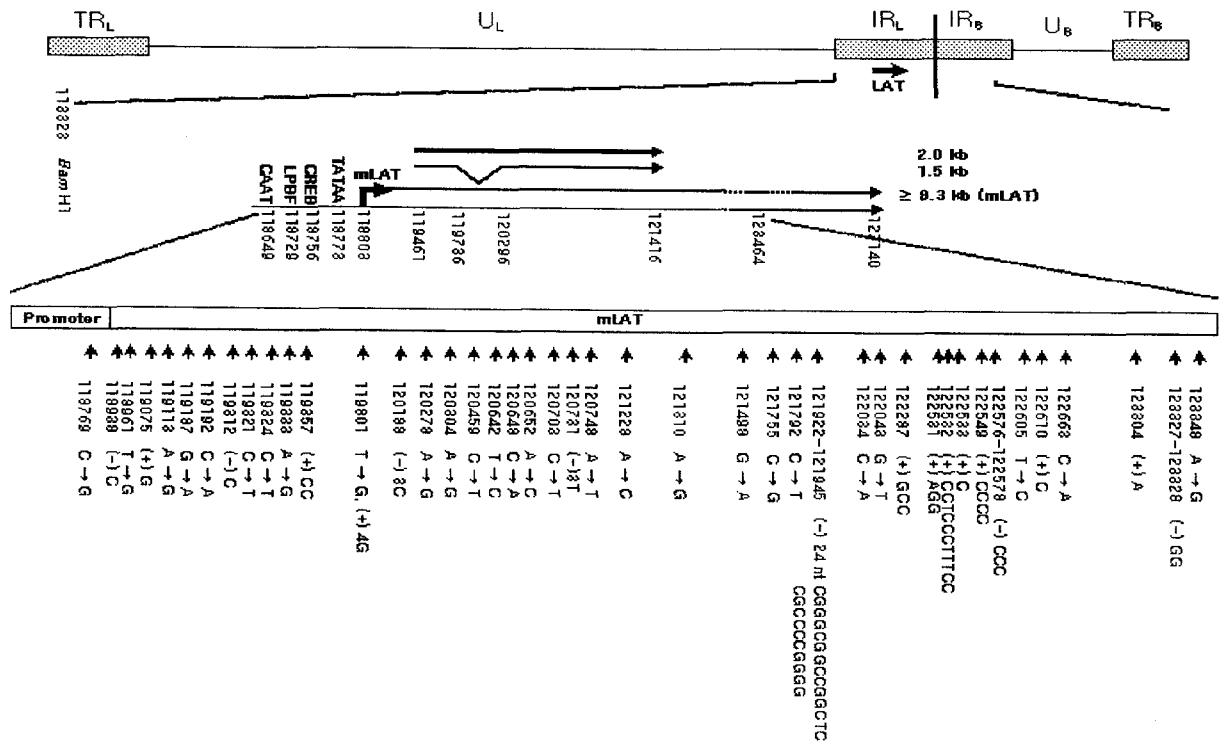


Figure 10. The summary of LAT sequence

## 2. 세포체계 연구

### 가. 세포체계 잠복감염과 재활성 모델구축 및 활용

#### (1) 마우스 일차 신경세포 배양

5 주령 ICR마우스로부터 삼차신경을 적출하여 실험방법에 명시된 바와 같이 일차 배양시켰다. 마우스 삼차신경, dorsal root ganglia, optocal nerve를 적출하여, 해부용 가위로 잘게 잘라서 1 mg/ml collagenase로 37°C, 1 시간동안 배양하였다. Pipetting을 여러 번 하여 조직을 완전히 해리시키고, 200 ~ 300 x g에서 5 분 정도 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 배양액을 첨가하여 다시 세포를 부유시키고 원심 분리하여 세척하였다. 완전히 해리된 신경세포를 hemacytometer로 세포 수를 측정하고, rat-tail collagen-coated culture dish에 일정하게 신경세포를 배양하였다. 신경세포 배양은 10%의 열처리된 FBS, 4 ug/ml Gm, 그리고 10 ng/ml 2.5s nerve growth factor (2.5S NGF) (BD science)가 첨가된 Minimum Essential 배지 (유지용 배지)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 증식시켰다. 삼 일 배양 후 유지용 배지에 20 uM fluorodeoxyuridine 과 20 uM uridine이 첨가된 antimitotic medium을 넣어 배양기에서 2 일정도 배양하였다. 이는 non-neuronal cell population을 감소시키는 역할을 한다. 이와 같이 유지용 배지와 antimitotic medium으로 번갈아 가며 신경세포를 12 일 이상 배양기에서 배양하였다. Fig. 11에 마우스 일차신경세포를 이용한 시험과정을 정리하였다.

#### (2) PC-12 세포 배양

PC-12 세포는 계대 배양이 가능한 cell line으로 rat-tail collagen-coated culture dish에 배양하였으며, 계대 배양만을 할 경우에는 NGF불포함 RPMI/5% FBS/10% HS를 이용하였으며, 바이러스 감염이나 재활성 실험을 위해서는 50 ng/ml 2.5s NGF를 첨가하여 신경세포형태로의 분화를 유도하였다.

#### (3) 신경세포의 바이러스 잠복감염 유도 및 확인

세포에 감염된 바이러스가 lytic cycle로 가서 성숙된 바이러스를 배출하면, 세포가 죽게되어 잠복감염을 유발시킬 수 없다. 따라서 48-well plate에 배양된 마우스 일차 배양 삼차신경세포 또는 NGF처리된 PC-12세포에 바이러스를 감염시킨 후 HSV 치료제로 이용되는 ACV 50 mM을 첨가하여 바이러스 증식을 억제하였다. 2 - 3 일 간격으로 15 일 까지 배양액을 회수하여, Vero에서의 plaque형성 여부를 측정하여 바이러스의 증식여부를 확인하였다.

#### (가) 마우스 일차 배양 삼차신경세포

마우스에서 삼차신경세포를 적출하여 rat-tail collagen-coated 48-well plate에  $5 \times 10^4$  세포를 분주하고, 적정농도의 2.5s NGF를 처리하여 세포가 완전히 분화가 되어 질 때까지 배양하였다. 바이러스 감염하기 12 시간 전에 잠복 감염을 유도하기 위해 HSV 치료제를 첨가하고

1 M.O.I.가 되게 F와 약재내성바이러스를 감염시켰다. HSV 치료제 없이 바이러스 감염 시, 바이러스들은 잠복 감염되어 지지 않고 lytic cycle로 가서 성숙된 바이러스가 배출되어 세포가 죽게 된다 (Fig. 12). 따라서, 약재내성바이러스의 잠복감염을 유도하기 위해 여러 가지 HSV 치료제를 가지고 잠복감염 유무와 바이러스 역가를 조사하여 wild type과 비교하였다. Table 5와 같이 F에 감염시, ACV, ACV와 PAA, 또는 ACV와 HPMPC를 사용했을 때 잠복감염되는 정도와 바이러스역가는 별 차이가 없었다. 그리고, 감염 7 일 만에 모든 culture에서 잠복 감염되었다. ACV 내성 바이러스인 AR1의 경우에는 ACV만 사용했을 경우 잠복감염이 현저히 떨어지고 바이러스 역가가 높음을 알 수 있었다. 20 일 째에 모든 well에서 잠복감염되었지만, 이는 대부분의 삼차신경세포가 바이러스에 의해 죽게 되어 극소수의 세포만 살았기 때문이었다. 하지만, ACV와 PAA, 또는 ACV와 HPMPC를 동시에 사용했을 경우, ACV만 사용하였을 때와는 달리 F와 마찬가지로 감염 7 일 만에 모든 culture에서 잠복 감염 되어졌고, AR1의 복제를 저해하여 잠복감염되는 정도와 바이러스 역가가 F와 유사함을 알 수 있었다. 따라서 마우스 삼차신경세포의 잠복감염 유도에는 ACV와 HPMPC를 바이러스 감염하기 12 시간 전에 처리하여 잠복감염을 유도하였다. 바이러스 감염 세포를 회수하여 DNA와 RNA를 추출한 다음, viral DNA polymerase의 primer를 이용한 PCR로 vDNA를, LAT의 primer를 이용한 RT-PCR로 LAT transcripts를 각각 존재함을 확인하였다 (Fig. 13).

#### (나) PC-12 세포

PC-12세포는 랫트의 크롬친화성세포종 (pheochromocytoma)에서 유래되었으며, 이들은 NGF에 대한 높은 친화성을 가지는 수용체를 가지고 있다. 계대 배양하기 위해서는 NGF를 필요로 하지 않지만, 바이러스 잠복 감염과 재활성화 실험을 위해서는 마우스 NGF를 첨가하여야 신경세포의 특성을 가지게 된다. PC-12 세포와 NGF의 반응에 의하여 세포의 분열은 중단되고, 신경돌기가 생성되고 신경세포의 특징적인 활동전위가 나타나며, HSV 감염 시 바이러스의 productive cycle을 제한하는 특징을 가지고 있다. 따라서, 본 연구에서는 마우스 일차 배양 삼차신경세포와 함께 PC-12세포를 바이러스 잠복 감염 유도 연구에 이용하였다. Collagen-coated 48 well plate에  $5 \times 10^4$  세포를 분주하고, 2.5s NGF를 처리하여 세포가 완전히 분화가 되어 질 때까지 배양한다. 분화 되지 않은 세포를 제거하고, 바이러스 감염하기 24 시간 전에 HSV 치료제 (ACV)를 처리한 것과 처리하지 않은 세포의 바이러스 역가를 측정하여 바이러스의 잠복 감염 유무를 조사하였다. Table 에서와 같이 ACV를 처리하지 않은 세포에서는 바이러스 감염 3 주 후에도 대부분의 바이러스들이 50%미만의 잠복감염율을 나타냈다. 하지만, 바이러스 감염하기전에 ACV를 처리한 세포에서는 2주 후부터 거의 모든 culture에서 높은 잠복 감염율을 나타냈다. 그리고 잠복 감염 되어진 바이러스 감염 세포를 회수하여 바이러스 유전자와 LAT transcripts를 PCR과 RT-PCR을 통하여 조사하였고, 바이러스 유전자와 LAT transcripts를 확인하였다 (Table 6).



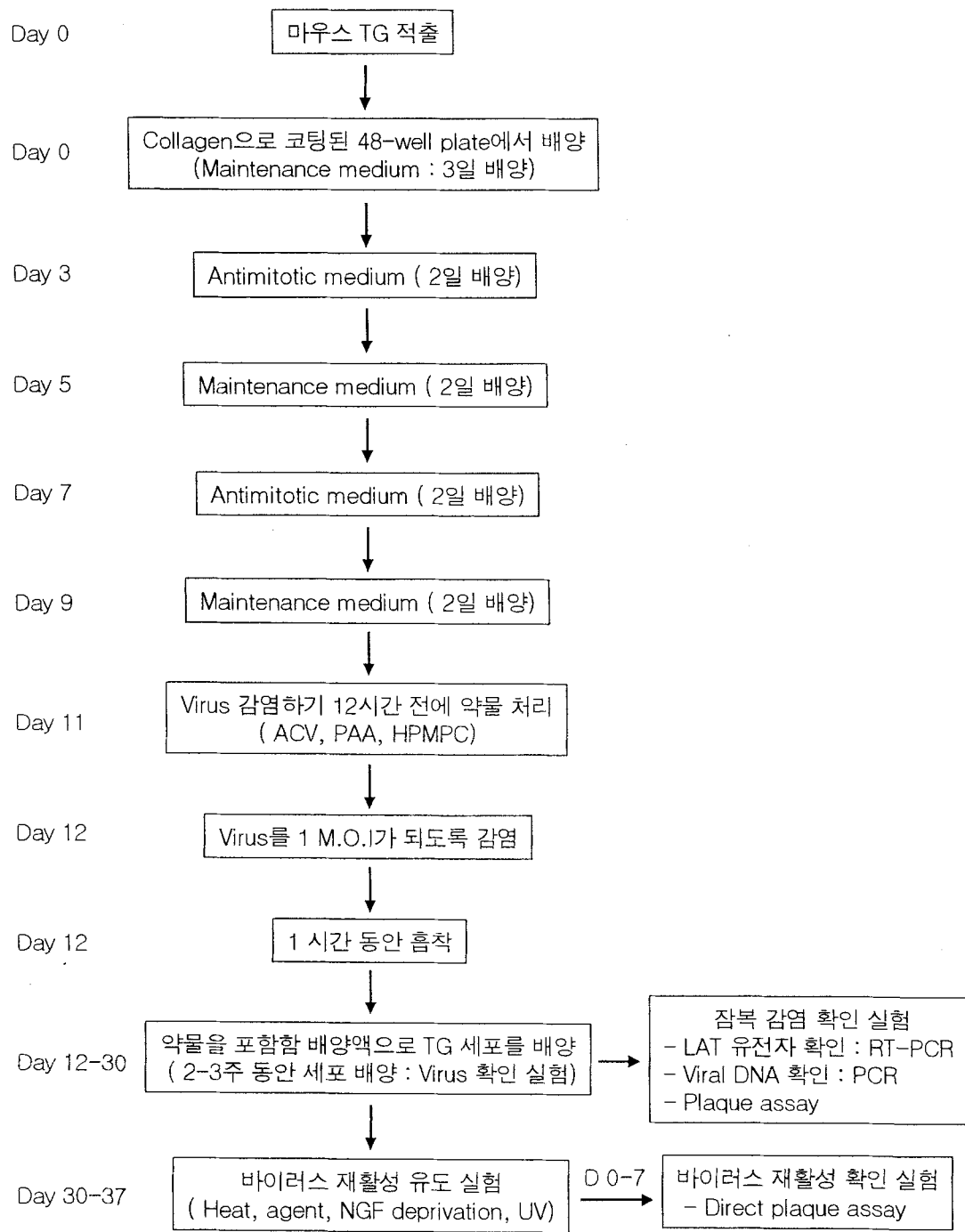


Fig. 11. General scheme of latency and reactivation of HSV01 model with primary mouse neuronal cells

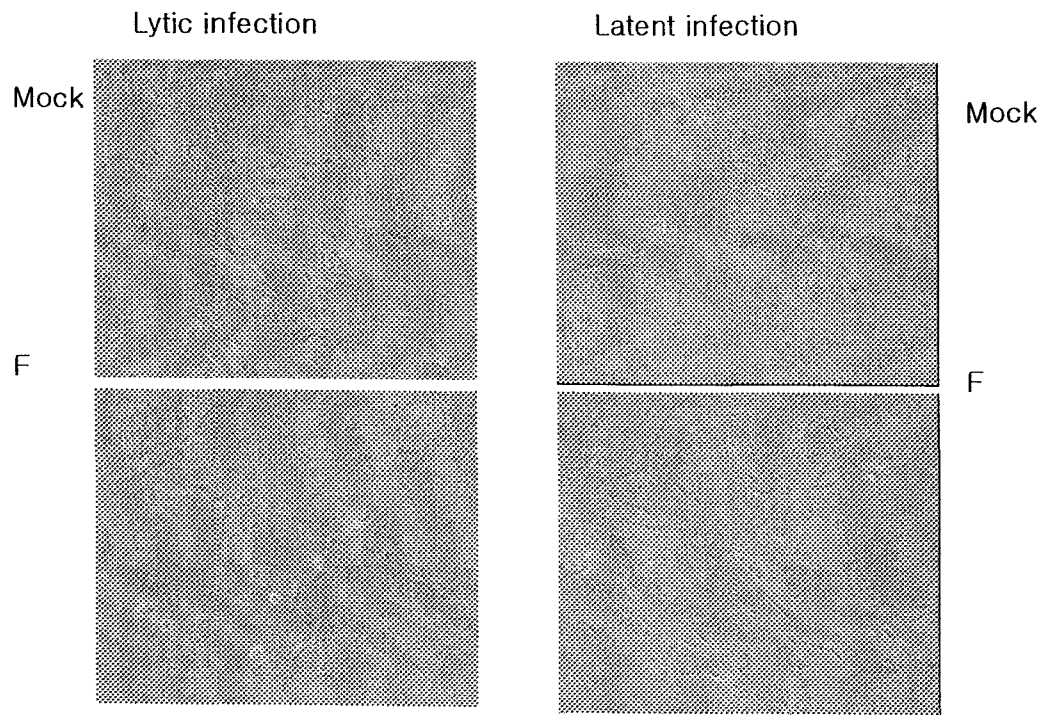


Fig. 12. Cell morphology of virus-infected primary mouse neuronal cells

Table 5. Establishment of latency in primary mouse trigeminal nerve cells infected with HSV-1 (F) or HSV-1 (AR1) and treated with acyclovir alone or together with other anti-HSV-1 compounds

HSV-1(F)						
Day	ACV		ACV/PAA		ACV/HPMPC	
	% latency	titer	% latency	titer	% latency	titer
1	0(0/20)*	6.69 X 10 <sup>2†</sup>	0(0/20)	3.91 X 10 <sup>2</sup>	0(0/20)	2.24 X 10 <sup>2</sup>
4	40(8/20)	7.95 X 10 <sup>1</sup>	60(12/20)	9.20 X 10 <sup>1</sup>	35(7/20)	4.62 X 10 <sup>1</sup>
7	100(20/20)	0	100(20/20)	0	100(20/20)	0
10	100(20/20)	0	100(20/20)	0	100(20/20)	0

HSV-1 (AR1)						
Day	ACV		ACV/PAA		ACV/HPMPC	
	% latency	titer	% latency	titer	% latency	titer
1	0(0/20)	5.12 X 10 <sup>4</sup>	0(0/20)	7.96 X 10 <sup>2</sup>	20(4/20)	8.61 X 10 <sup>1</sup>
4	0(0/20)	7.74 X 10 <sup>3</sup>	30(6/20)	5.06 X 10 <sup>1</sup>	95(19/20)	2.73 X 10 <sup>1</sup>
7	55(11/20)	2.32 X 10 <sup>1</sup>	100(20/20)	0	100(20/20)	0
10	100(20/20)	0	100(20/20)	0	100(20/20)	0

\* % (no. of virus-negative cultures/no. of total tested cultures)

† Lorenz and Bogel calculation of plaque-forming units (PFU)

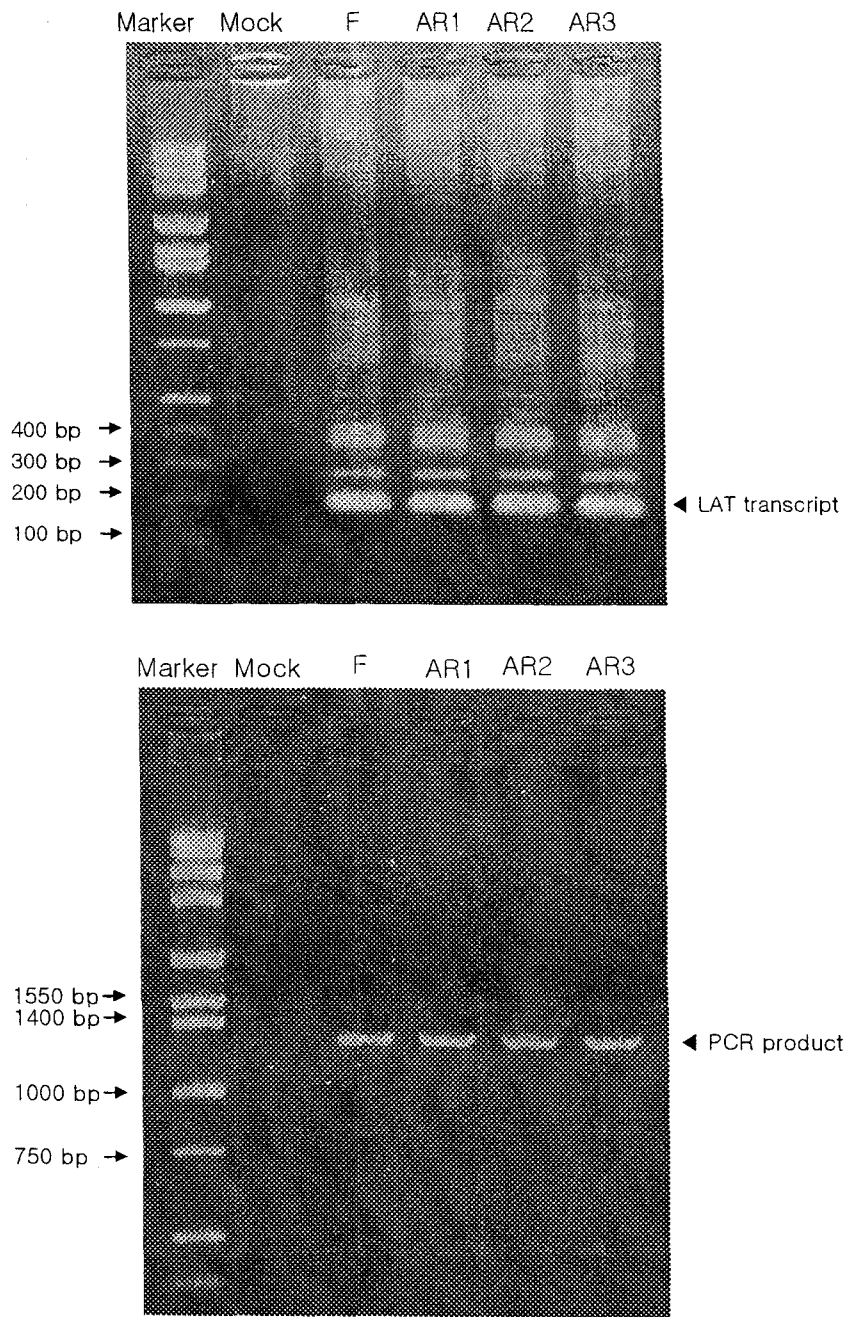


Fig. 13. Confirmation of latent infection of HSV-1 in primary mouse trigeminal nerve cells by RT-PCR for LAT transcripts or the DNA polymerase gene

Table 6. Establishment of latency in PC-12 cells infected with various strains of HSV-1 and treated with or without acyclovir

% Latency (without acyclovir)										
Day	F	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5	AR6	AR7	AR8	AR9
1	0(0/16)*	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)
2	0(0/16)	6(1/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)
5	0(0/16)	31(5/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)
10	0(0/16)	56(9/16)	0(0/16)	6(1/16)	0(0/16)	6(1/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)
23	38(6/16)	56(9/16)	100(16/16)	63(10/16)	13(2/16)	50(8/16)	31(5/16)	25(4/16)	75(12/16)	31(5/16)
% Latency (with acyclovir)										
Day	F	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5	AR6	AR7	AR8	AR9
1	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)
2	38(6/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)
5	100(16/16)	75(12/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	13(2/16)	0(0/16)	0(0/16)	0(0/16)	13(2/16)
10	100(16/16)	88(14/16)	44(7/16)	56(9/16)	31(5/16)	81(13/16)	38(6/16)	38(6/16)	50(8/16)	94(15/16)
23	100(16/16)	100(16/16)	100(16/16)	88(14/16)	75(12/16)	81(13/16)	87.5(14/16)	93.8(15/16)	100(16/16)	100(16/16)

\* % (no. of virus-negative cultures/no. of total tested cultures)

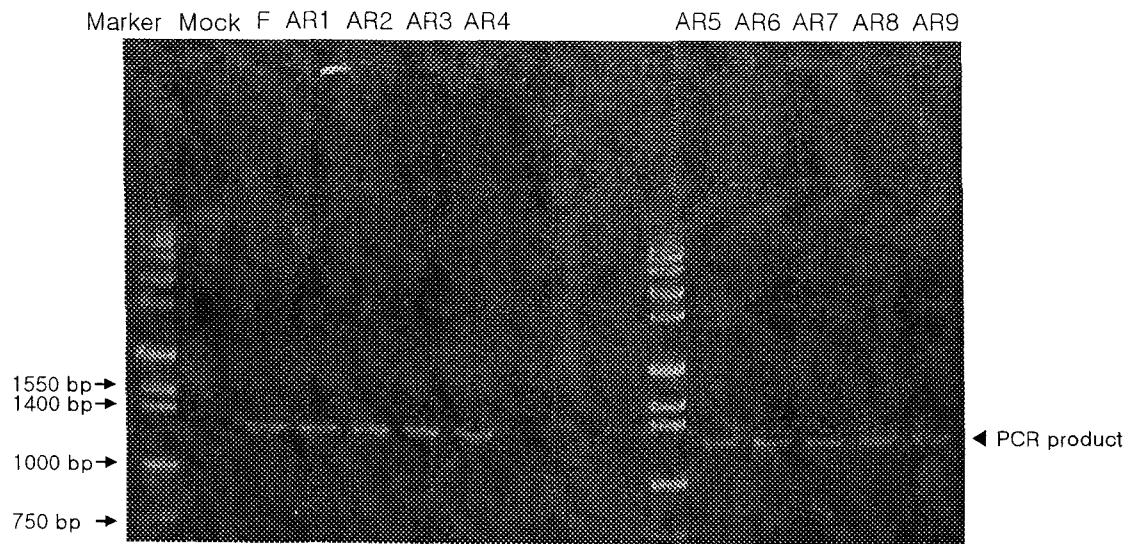
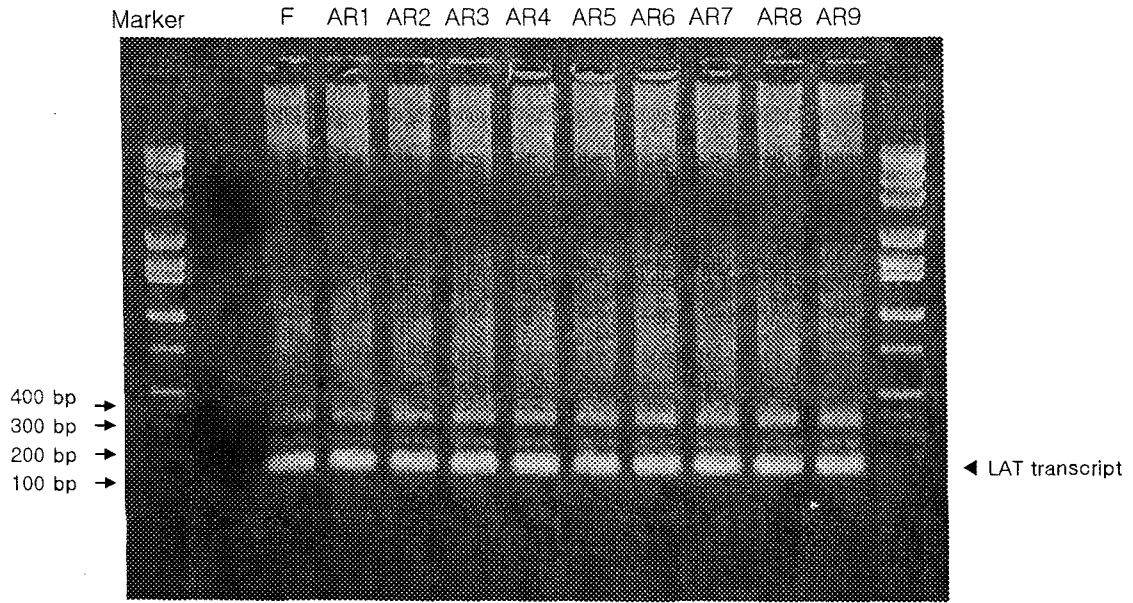


Fig. 14. Confirmation of latent infection of HSV-1 in primary mouse trigeminal nerve cells by RT-PCR for LAT transcripts or the DNA polymerase gene.

#### (4) 잠복감염된 신경세포로부터 재활성 유도 및 확인

바이러스 재활성화 기전이 현재 정확히 밝혀 지지 않았지만, 재활성화 되어질 때 신경 세포 핵에 존재하는 바이러스 유전자의  $\alpha$  유전자가 발현되면서 연쇄적으로 바이러스 유전자가 발현되어 바이러스가 합성된다. 합성되어진 바이러스는 anterograde transport에 의해 sensory nerve를 따라 주위 상피 세포로 이동하여 바이러스 복제를 하게 된다. 신경세포 안에 잠복 감염된 바이러스는 외부로부터의 여러 자극에 의해 재활성화 되어진다. 예를 들어, UV 조사, 고온 처리, 세포내 전위 차 등에 의해 재활성화가 일어나고, 또한 어떤 자극없이 자발적으로도 바이러스이 재활성화가 일어나기도 한다. 본 연구에서는 고온처리, 약물처리, UV 조사, NGF 제거, 그리고 indicator 세포와의 coculture에 의한 바이러스 재활성화 정도를 조사하였다.

- ① 고온처리 : 잠복 감염된 세포를 42°C에서 3 시간동안 배양하여 고온에 의한 잠복 감염된 바이러스를 재활성화 시켰다.
- ② 약물처리 : 재활성화를 위한 약물로는 100  $\mu$ M forskolin 또는 100  $\mu$ M thymidine을 이용하였다. 잠복 감염 세포의 배양액을 제거 한 후 약물을 첨가한 배양액으로 일정시간 동안 배양기에서 배양하여 잠복 감염된 바이러스를 재활성화 시켰다.
- ③ NGF 제거 : 세포 배양액에서 NGF를 완전히 제거 하기 위해 NGF를 제거한 배양액으로 5번 세척 한 후 1% anti-mouse NGF serum을 첨가 한 배양액을 잠복 감염된 세포에 넣어 준다. 이를 세포 배양기에서 1 시간 동안 배양하여 잠복 감염된 바이러스를 재활성화시켰다.
- ④ UV 조사 : UV handle lamp를 이용하여 22.5  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ 로 잠복 감염된 세포에 UV를 조사하여 바이러스를 재활성화 시켰다.
- ⑤ Indicator 세포와의 coculture : Indicator 세포를 이용한 잠복 감염 바이러스의 재활성화 실험에는 Vero 세포를 이용하였다. 잠복 감염된 세포에 Vero 세포를 충분히 넣어주어 바이러스의 재활성화를 조사하였다.

#### (가) 마우스 일차 배양 삼차신경세포

잠복 감염된 마우스 삼차 신경세포를 여러 가지 자극을 주어 바이러스 재활성화 실험을 하였다. Table 7에서와 같이 F에 잠복 감염된 삼차신경세포 중에 3% 정도가 아무런 자극없이 자발적으로 재활성화되었지만, 약재내성 바이러스에 잠복 감염된 삼차신경 세포에서는 재활성화가 일어나지 않았다. F에 잠복 감염된 세포는 고온처리, forskolin 처리, NGF 제거, Vero 세포와의 coculture하여 재활성화가 약간 일어남을 알 수 있다. 하지만 약재내성바이러스에 잠복 감염된 세포는 NGF 제거와 vero 세포와의 coculture에서만 1-2 culture에서만 재활성화가 일어났고 AR3의 경우에는 전혀 재활성화가 일어나지 않았다. 재활성화가 일어난 culture의 경우에는 자극을 준지 2 - 3 일 안에 대부분 일어났다.

Table 7. Reactivation from latent stage of various strains of HSV-1 in primary mouse trigemianl nerve cells by various reactivation-inducing methods

Model	% Reactivation (no. of virus-negative cultures/no. of total tested cultures)			
	F	AR1	AR2	AR3
Spontaneous reactivation	3(2/72)	0(0/72)	0(0/50)	0(0/50)
Heat stress	20(3/15)	0(0/15)	0(0/10)	0(0/10)
UV irradiation	0(0/15)	0(0/15)	0(0/10)	0(0/10)
Forskolin (50 uM)	14(2/14)	0(0/15)	0(0/10)	0(0/10)
Thymidine (100 uM)	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)
NGF deprivation	7(1/14)	7(1/15)	10(1/10)	0(0/10)
Coculture (with Vero)	14(2/14)	14(2/14)	20(2/10)	0(0/10)



(나) PC-12 세포

PC-12세포에 바이러스를 감염시켜 잠복감염을 유도한 후 마우스 삼차신경세포와 마찬가지로 여러 가지 자극을 주어 바이러스의 재활성화를 유도하였다. 또한, 바이러스 재활성화에 HSV 치료제인 ACV가 영향을 미치는 지를 조사하였다. 먼저, F와 AR1-AR9을 잠복 감염 시킨 후 vero 세포와 coculture시 ACV가 있는 경우 보다 ACV가 없는 경우가 2 배 이상 높은 재활성화율을 나타냈다. 이는 ACV가 바이러스 유전자의 합성에 영향을 미치기 때문인 것으로 추정된다. 그리고, 바이러스의 종류에 따른 재활성화율에는 큰 차이는 보이지 않았고 2 - 3 일부터 재활성화가 시작되었고, 대부분의 culture에서 재활성화가 진행되었다. Vero 세포와의 coculture 경우와는 달리, 고온 처리 했을 경우에는 20% 미만의 재활성화율을 보였지만, UV 조사, NGF 제거, 약물 처리(forskolin or thymidine)의 자극을 주었을 경우에는 잠복감염된 바이러스의 재활성을 관찰할 수 없었다 (Table 8, Fig. 15).

Table 8. Reactivation from latent stage of various strains of HSV-1 in PC-12 cells by coculture method

		% reactivation (coculture with Vero cells)									
		F	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5	AR6	AR7	AR8	AR9
w/o ACV		100(6/6)*	56(5/9)	88(14/16)	73(8/11)	100(3/3)	86(6/7)	80(4/5)	100(5/5)	92(11/12)	80(4/5)
with ACV		50(6/12)	33(4/12)	67(8/12)	64(7/11)	44(4/9)	56(5/9)	70(7/10)	64(7/11)	58(7/12)	64(7/11)

\* % (no. of virus-positive cultures/no. of total tested cultures)

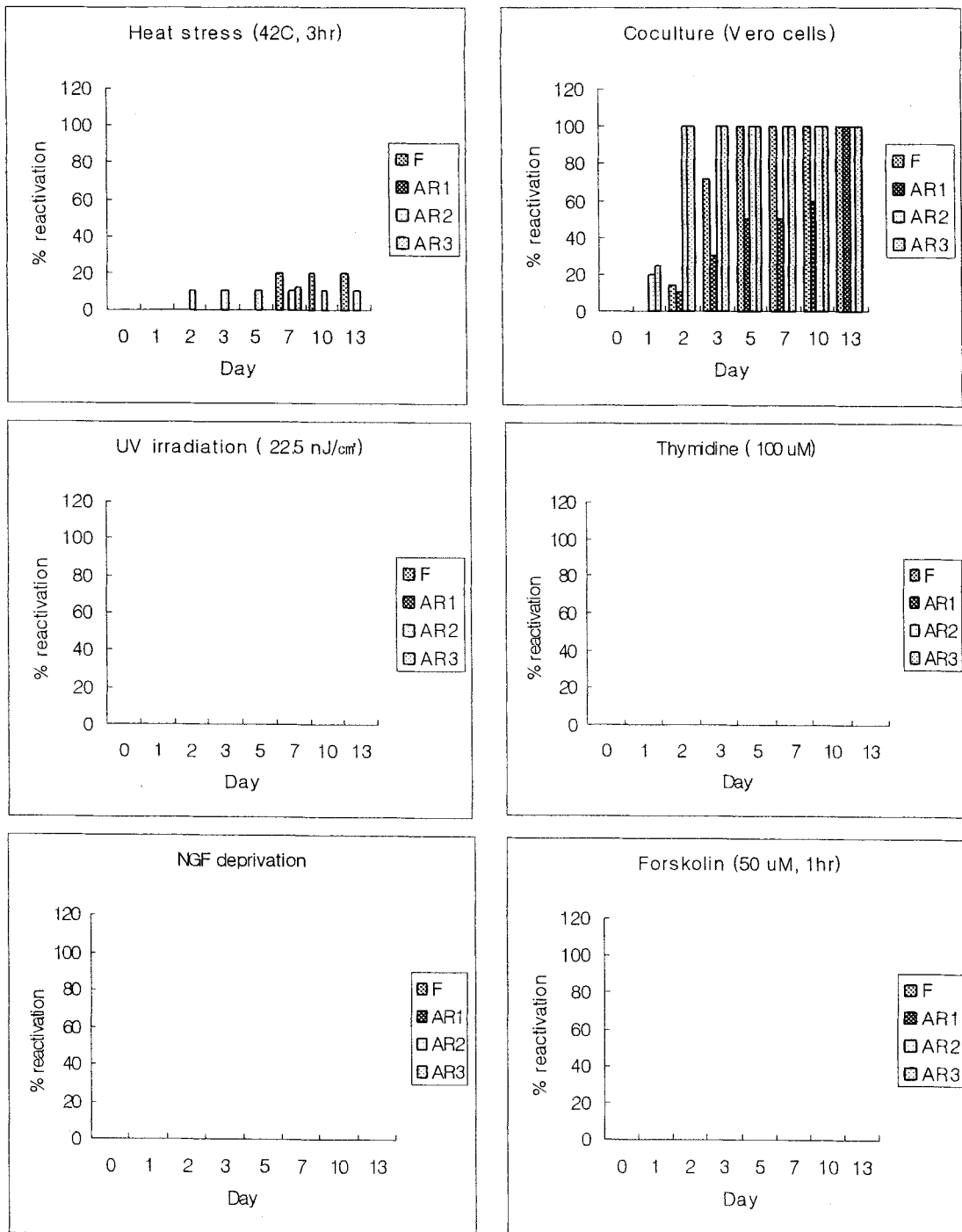


Fig. 15. Reactivation from latent stage of various strains of HSV-1 in PC-12 cells by various reactivation-inducing methods

## 나. TK와 세포내 물질의 상호작용 연구

### (1) HSV TK 단백질의 세포내 존재 위치

다음의 그림은 rabbit polyclonal anti-HSV-1 TK항체로 세포내 TK 단백질 위치를 confocal 현미경으로 확인한 사진이다. HSV-1의 TK단백질은 감염세포의 핵에 주로 존재하며, 여러 종류의 일차 신경세포에서도 마찬가지로 다음의 Fig. 16에서 알 수 있었다. 이는 TK가 주로 세포질에 존재한다는 보고와 상반되는 결과이다. TK-돌연변이주의 TK localization을 수행하였는데, nuclear transport signal (Degre've et al, 1998) 주변의 돌연변이와 관련있는 것 같았다 (Fig. 17).

### (2) HSV 감염 후 세포내 TK의 발현조사

HSV-1 (F)의 배양시간에 따른 증식도와 TK 발현 양상을 알기 위하여 48 well plate에 duplicate로 완전하게 자란 Vero세포에 과량의 바이러스 (2 MOI/cell)를 첨가하여 1 시간 동안 충분히 감염 시킨 후 흡착되지 않은 바이러스는 제거하고 감염 후 한 시간부터 21 시간까지 trypsin을 처리하여 바이러스가 흡착된 세포만을 획득하였다. 획득한 시료를 -70°C에서 얼렸다가 녹인 후 lysate buffer를 첨가하고 원심분리 후 상등액만을 획득하고 일정농도의 단백질을 이용하여 Western과 ELISA 분석을 하였다 (Fig. 18). TK의 발현이 3 시간 PI부터 나타나기 시작하는 것을 알 수 있으며 7 시간 PI부터 21 시간 PI까지는 비슷한 양상을 보임을 나타내고 있다. Fig. 18 에서와 마찬가지로 흡광도A450에서 측정한 값이 3 시간 PI부터 지속적으로 상승됨을 알 수 있다. 하지만 21 시간 PI에서 값이 떨어졌는데 이는 바이러스가 복제 후 세포 밖으로 유리되어 나가서 그런 것으로 생각되어진다. TK RNA에 대한 RT-PCR결과는 이들 단백질이 TK유전자의 지속적인 발현에 의할 것임을 추측케한다. 이로서 HSV-1 (F)의 복제 주기가 18 시간 PI에서 22 시간 PI 사이에서 이루어진다는 것과 TK의 발현이 7 시간 PI 이후부터 18시간 PI 사이에서 가장 많이 이루어짐을 알 수 있었다. TK localization 시험 결과도 TK단백질이 세포가 죽을 때까지 다량 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 19).

### (3) 세포 추출물의 2D 전기영동

TK 돌연변이주들은 세포내에서 TK활성을 나타내지 않는다. 바이러스 감염 후 TK활성이나 TK 단백질과 관련되는 세포내 물질을 찾아내기 위한 2D 전기영동 기술을 확립하고, HSV에 감염된 Vero세포의 추출물을 2D 전기영동을 통하여 발견함이 연구의 목적이었다. 처음에 Vero세포를 F와 mock으로 감염시켜 다음, 회수된 Vero 추출물을 일차로 IEF로 2 차로 SDS/PAGE (18 cm x 18 cm)로 분리시킨 다음 silver stain 또는 방사성동위원소의 autoradiogram으로 나타난 spot들을 분석하였다. Cell lysate를 원심분리한 다음 상등액을 soluble 단백질로, 세포찌꺼기인 침전물을 SDS가 포함된 gel loading sample buffer로 다시 녹인 후 원심분리하여 얻은 상등액을 insoluble 단백질로 표시하였다. 바이러스에 감염된 143B 세포의 soluble 단백질의 2D gel 전기영동 후 silver염색한 사진이 Fig. 20에 표시되었다. 바이러스에 감염된 Vero 세포의 insoluble 분석 사진 용해성 단백질의 silver염색 사진과 [<sup>35</sup>S]-methionine으로 labeling하여 얻은 autoradiogram

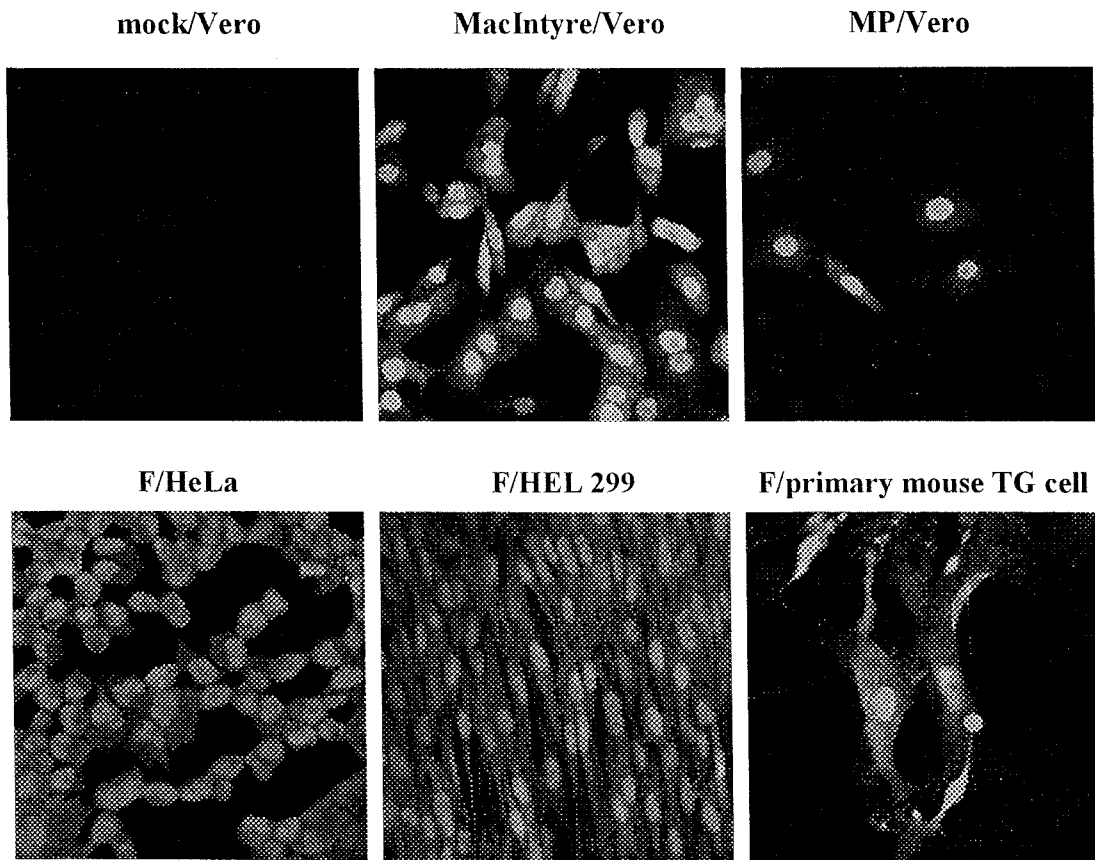


Fig. 16. Localization of the TK proteins of various HSV-1 strains in different cell lines

HSV-1 TK localization in Vero cells (12 h p.i.)

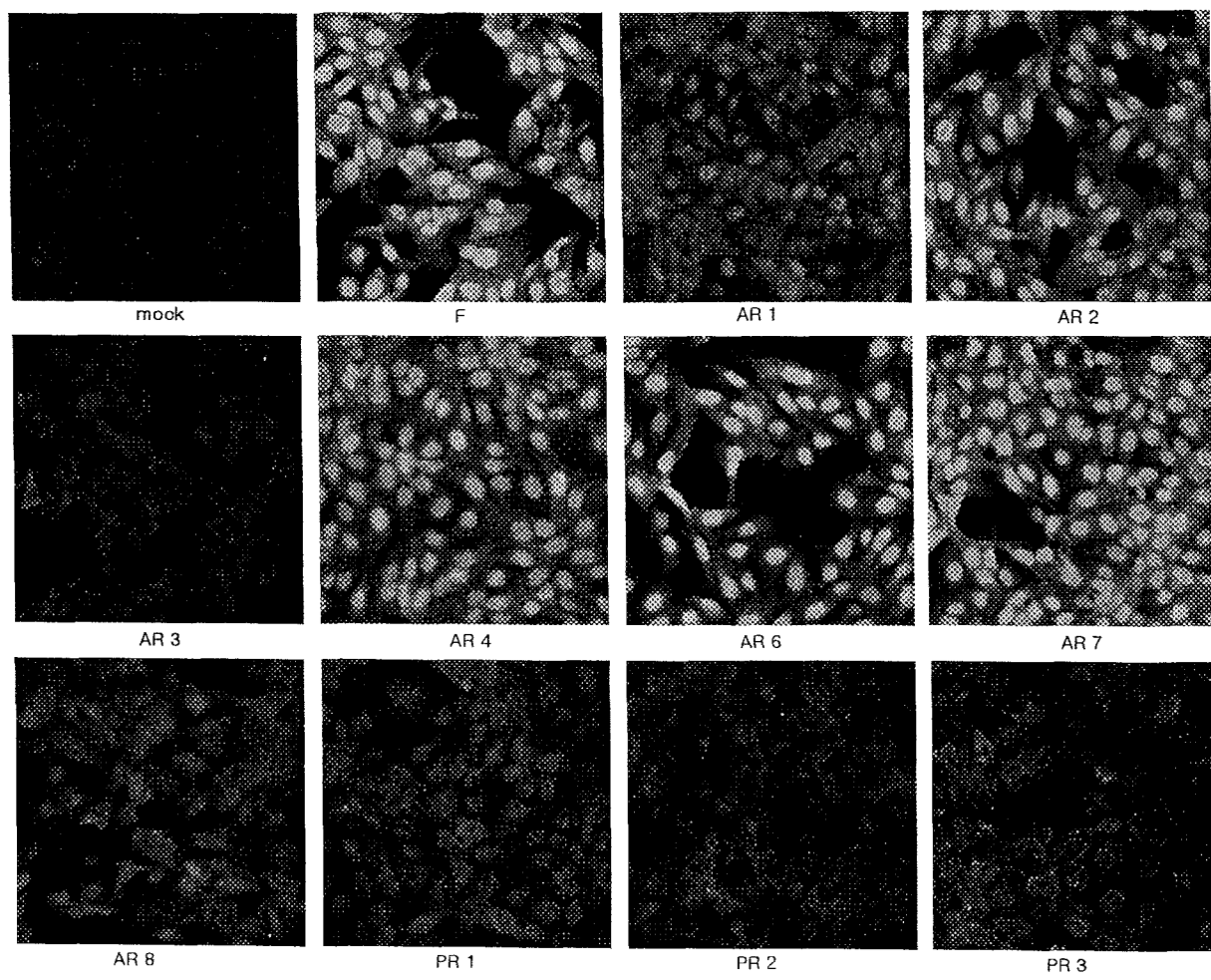
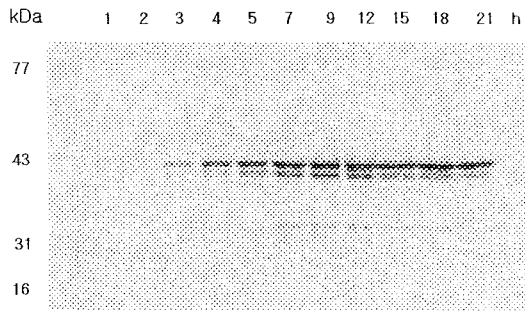
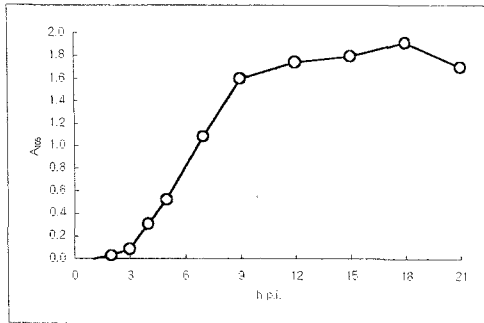


Fig.17. Localization of the TK proteins of various HSV-1 strains in Vero cells

**Western**



**ELISA**



**RT-PCR of the viral TK gene**

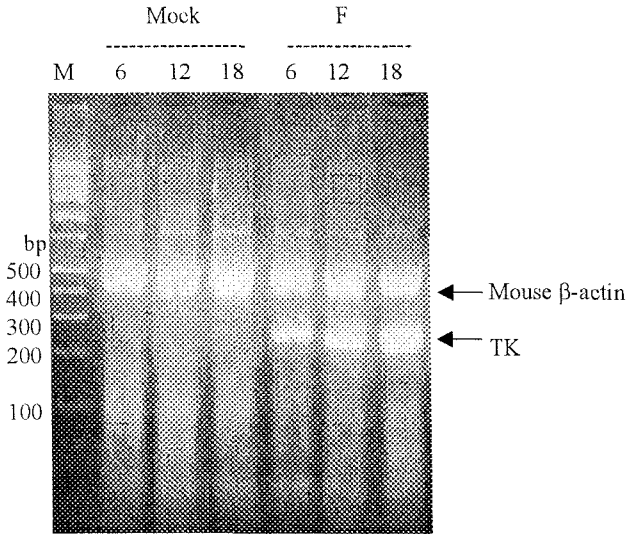


Fig. 18. Western, ELISA and RT-PCR profiles of the TK of HSV-1 strain F during one-step growth in Vero cells

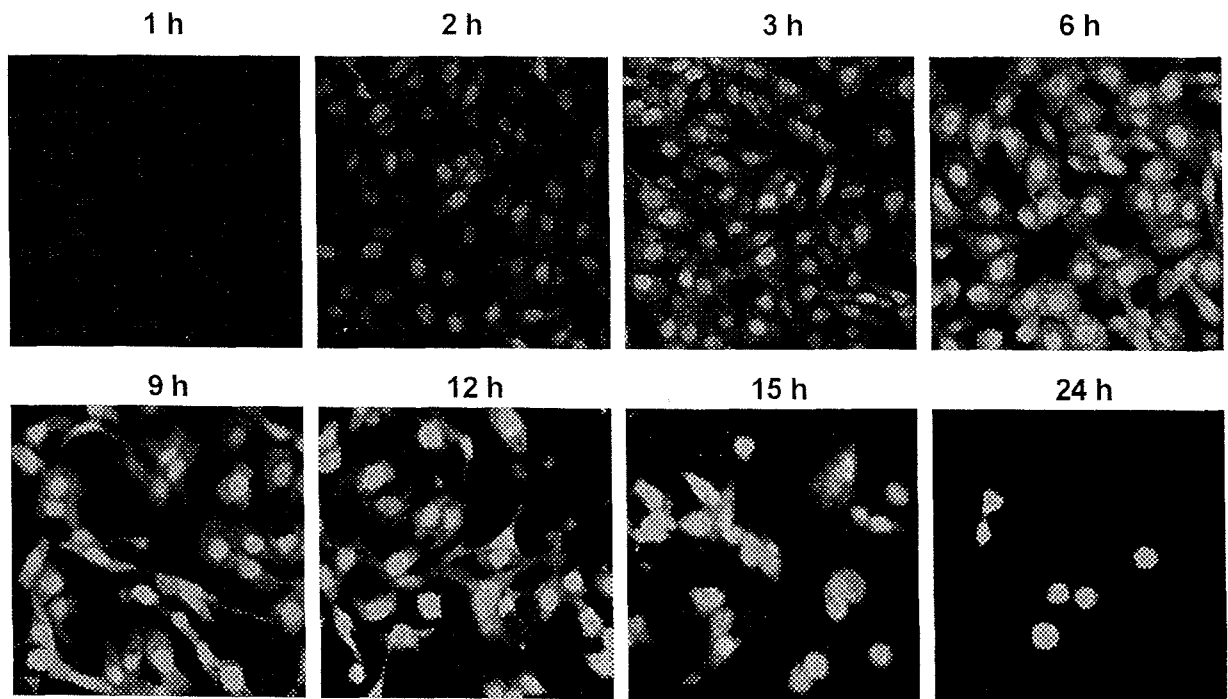


Fig. 19. Intracellular localization of TK of HSV-1 strain F during one-step growth in Vero cells



사진을 Fig. 21 ~24에 표시하였다. TK활성이 있는 바이러스와 없는 바이러스가 감염되었을 때 세포에서의 단백질 발현의 차이점을 알고 관여하는 단백질을 분석함이 목적이었으나, 분석에 어려움이 많아 2D 전기영동 및 분석 기술을 확립한 것에 만족하기로 하였다.

#### 4) 세포내 thymidine 및 유도체 분석

다양한 HSV 돌연변이주를 Vero세포에 감염시킨 후 [3H]-Thd를 첨가한 다음, 세포내로 유입된 Thd양의 지표로서 감염 12 시간 후 세포추출물의 방사성활성을 측정하였다. Fig. 25와 같이 F의 Thd 유입이 가장 높았고, TK-partial인 AR2, AR4, AR5, AR6, AR9은 바이러스주에 따라 차이는 있지만 Thd의 유입이 관찰되었다, TK-negative인 AR1, AR3, AR7, AR8은 mock와 같이 Thd 유입이 거의 관찰되지 않았다. TK-partial의 대표주로서 AR2를, TK-negative의 대표로서 AR1을 F와 함께 다양한 세포에 감염시키고, TK-dependent한 약물인 ACV와 GCV와 PCV의 유입정도를 측정하였다 (Table 9). PCV와 GCV의 유입이 TK활성에 의해 가장 큰 영향을 받았으며 ACV는 가장 낮았다. 바이러스 TK 유전자를 발현하는 FTK143B세포와 cellular TK-deficient한 143B세포에서 결과를 비교하였는데, FTK세포에서 시험 약물들의 유입이 급증하였다. 이로서 바이러스 TK가 기질로 이용되는 물질들의 세포내 유입에 큰 영향을 끼치는 것을 알 수 있었다. HSV-1 TK는 HSV의 DNA 증식과 무관하게 세포내 핵산 및 핵산유도체의 uptake를 크게 증가시킴을 다음의 Fig. 26에서 알 수 있다. 즉, 고농도의 ACV 때문에 바이러스 유전자의 증식이 억제 (thymidine의 DNA incorporation이 일어나지 않음)되어도 uptake는 증가함을 알 수 있었다.

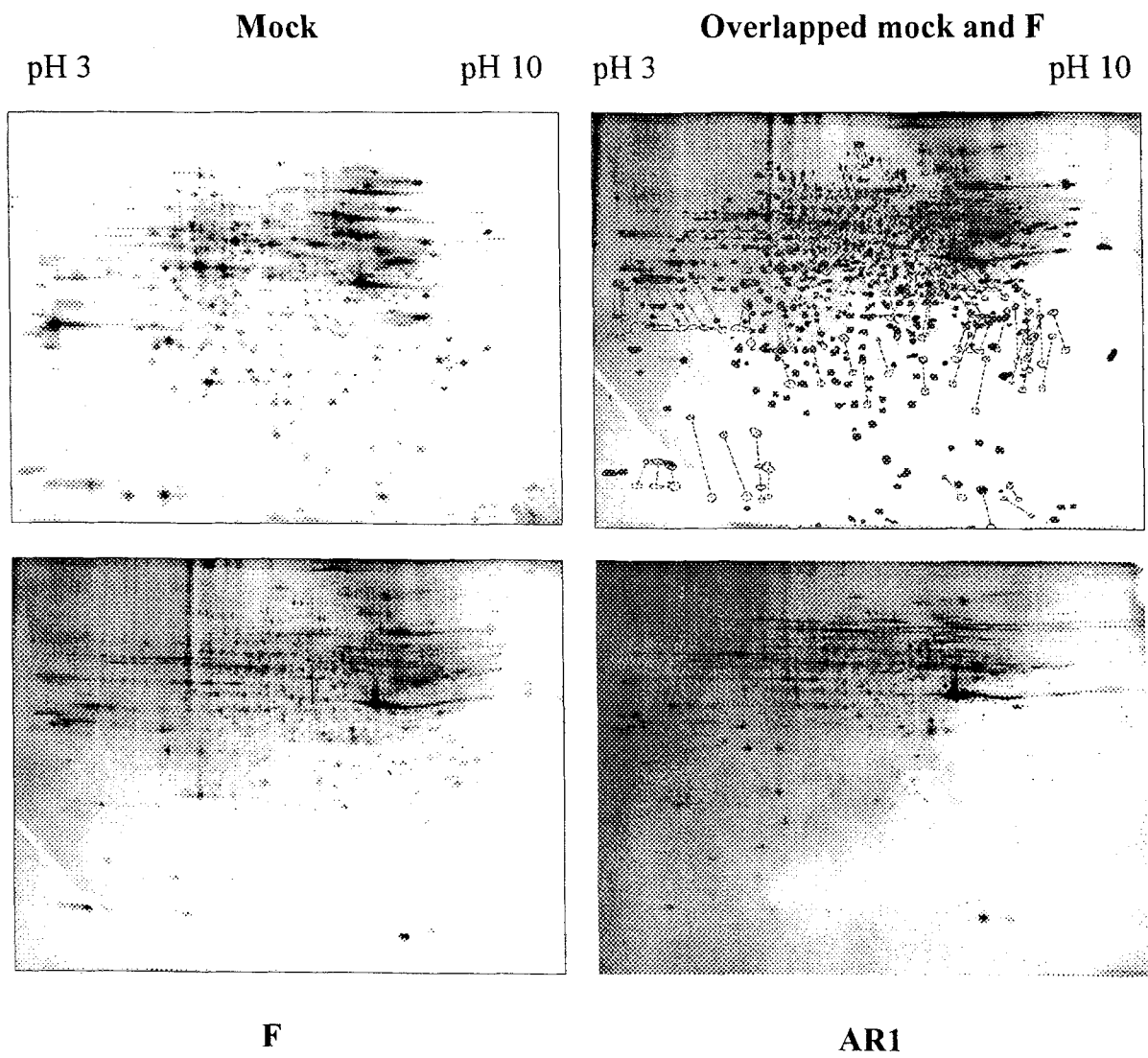


Fig. 20. 2D analysis of silver stained soluble proteins of virus-infected 143B cell lysates

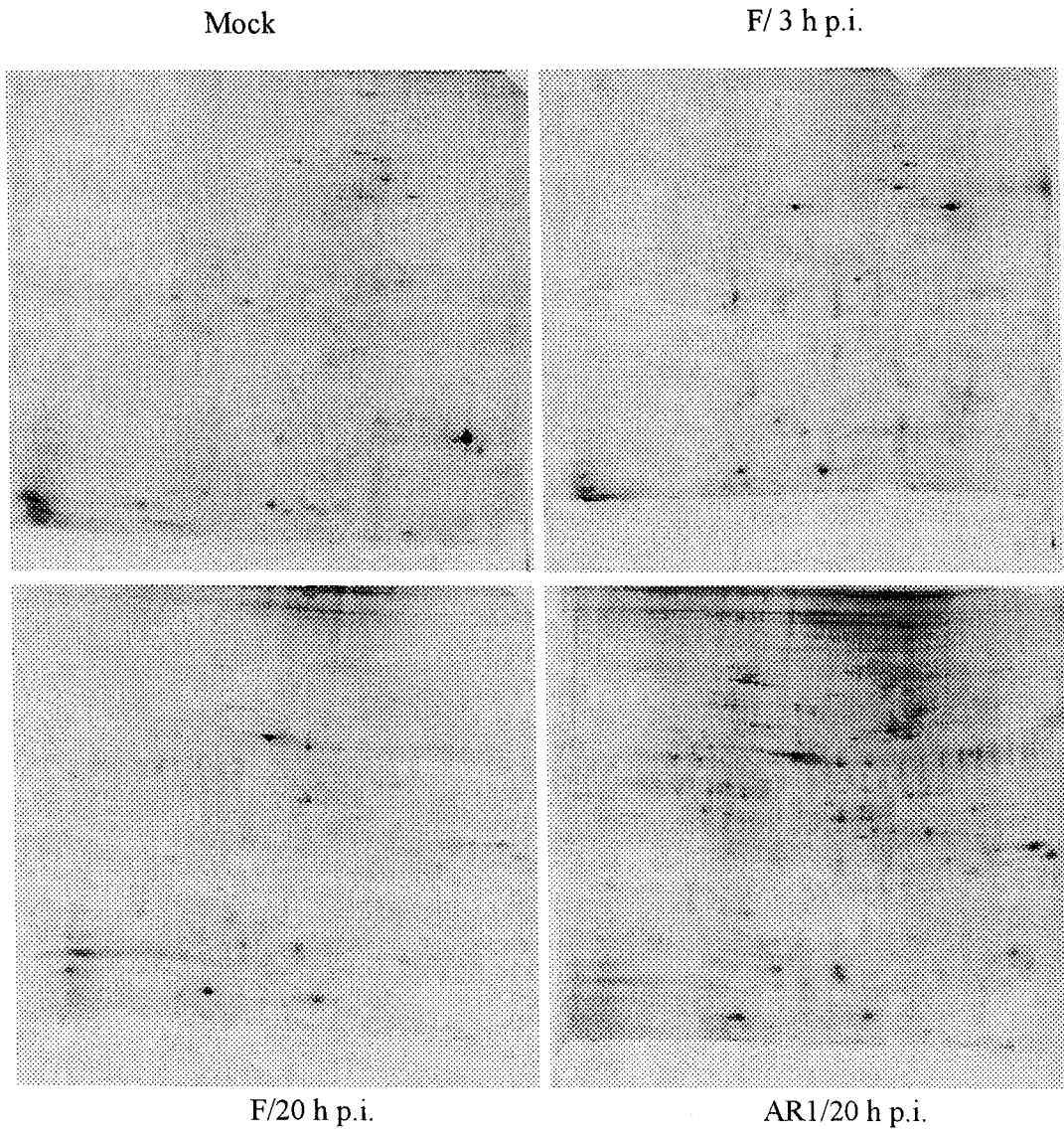


Fig. 21. 2D analysis of silver stained soluble proteins of virus-infected Vero cell lysates

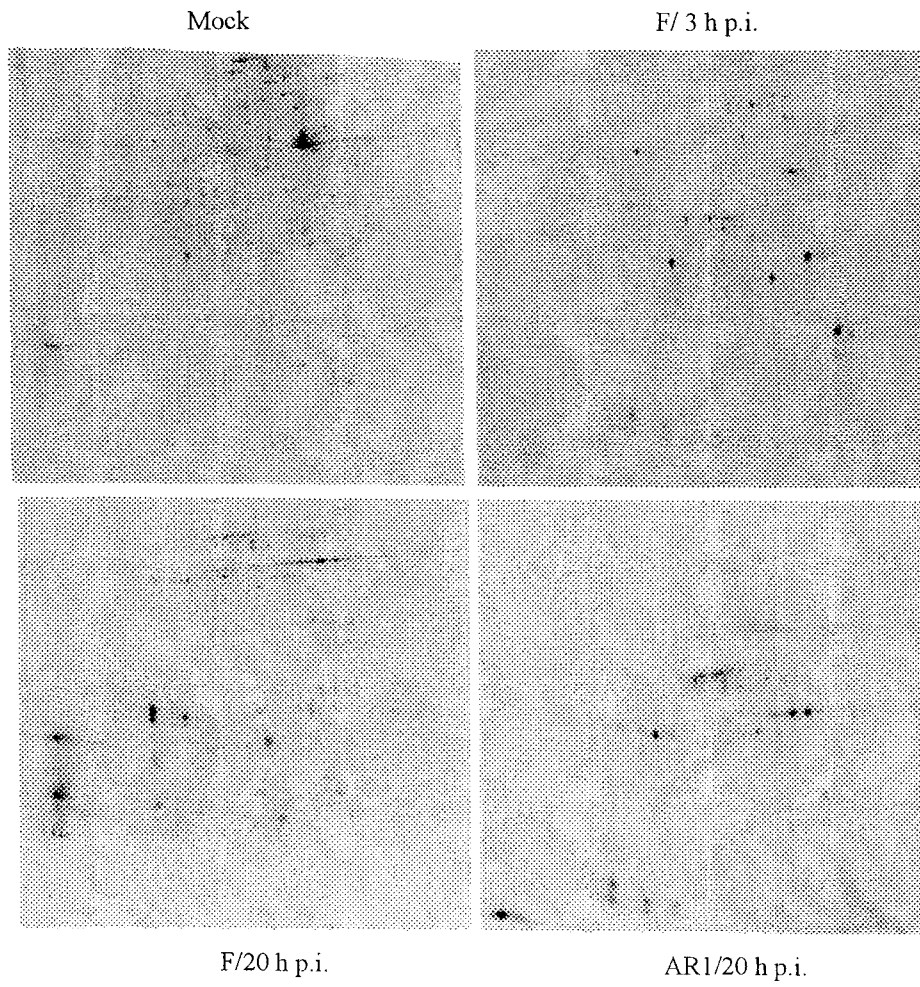


Fig. 22. 2D analysis of autoradiographed [<sup>35</sup>S]-labeled soluble proteins isolated from virus-infected Vero cell lysates.

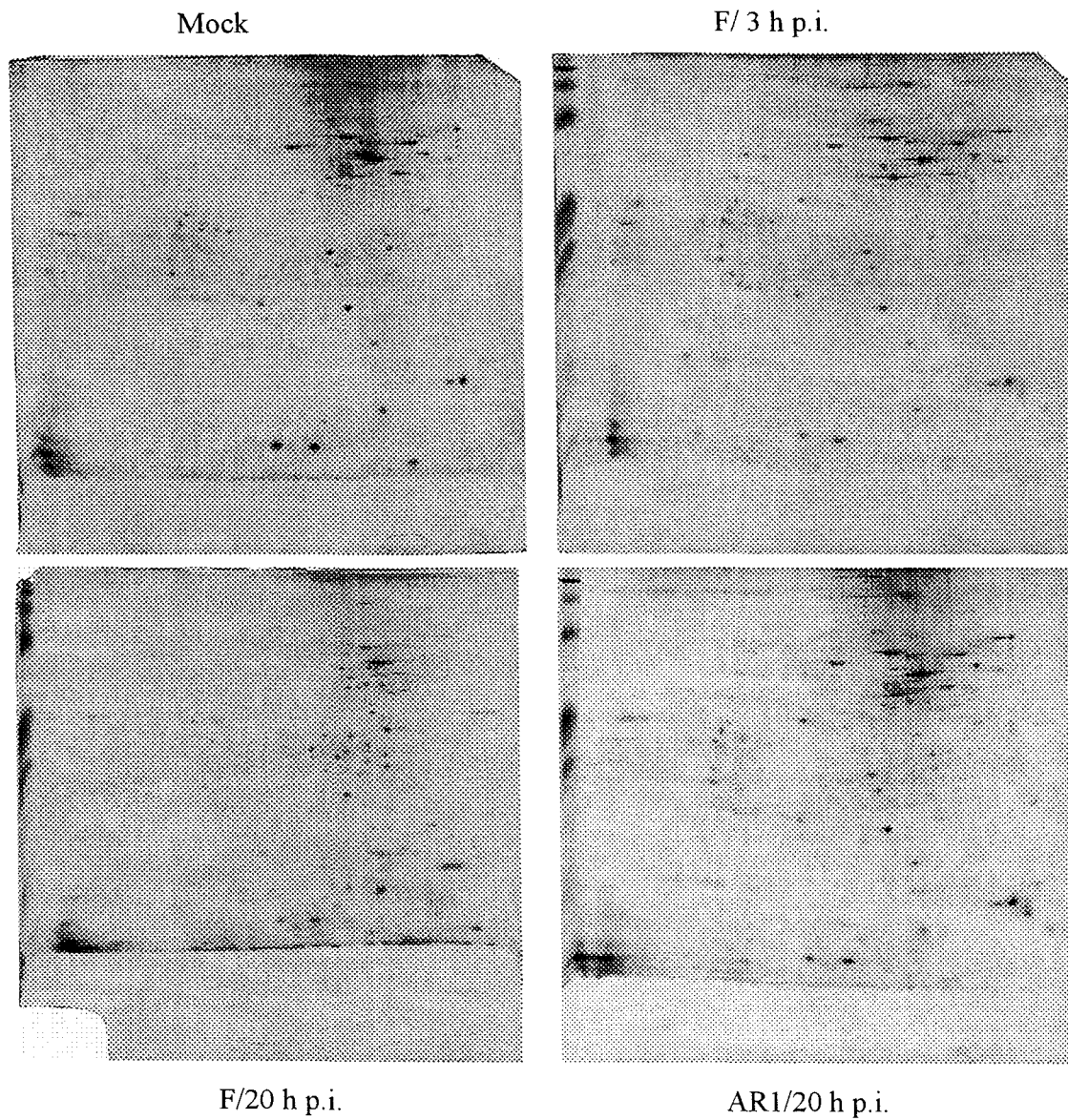


Fig. 23. 2D analysis of silver stained insoluble proteins of virus-infected Vero cell lysates

Insoluble protein means the proteins of cell debris precipitated after centrifugation of cell lysates and dissolved with SDS.

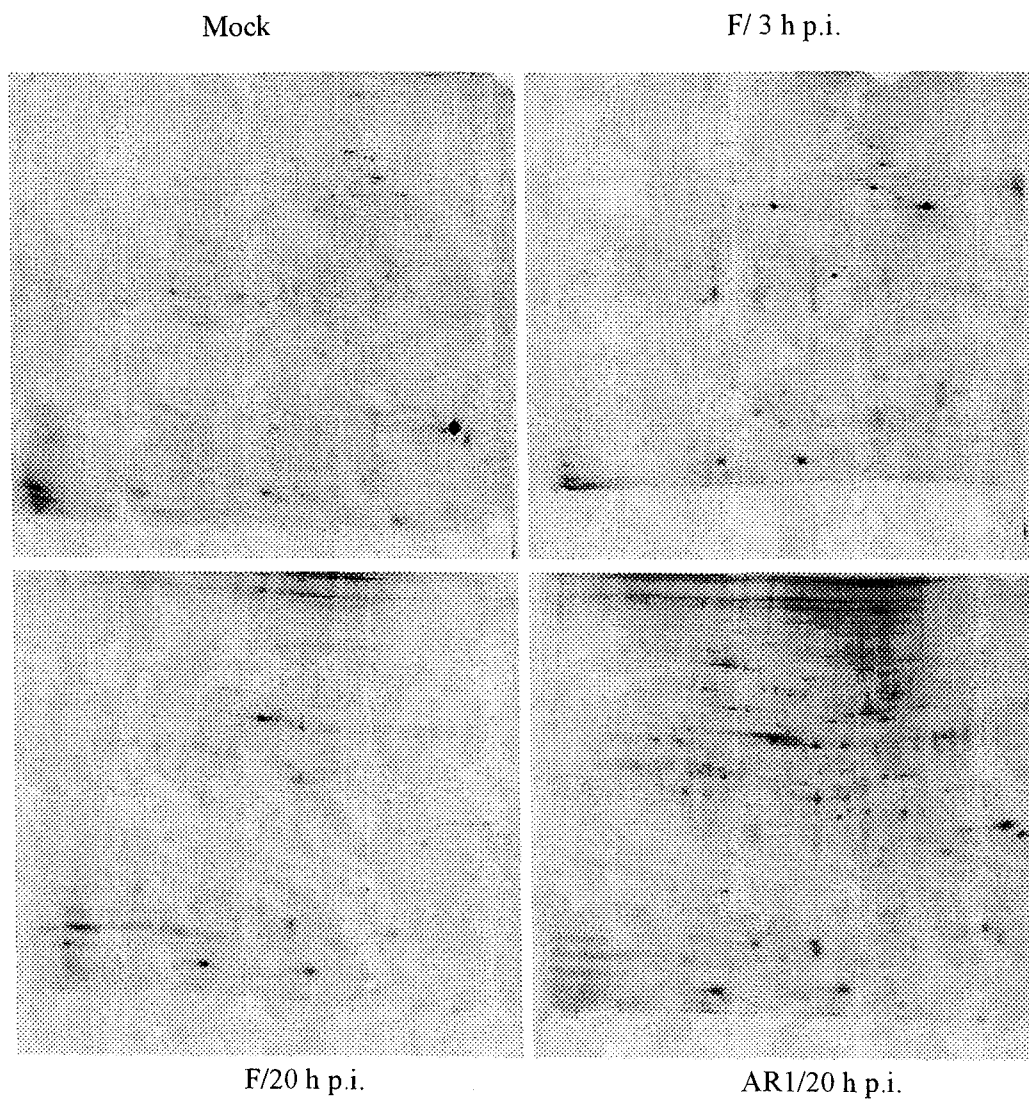


Fig. 24. 2D analysis of autoradiographed [<sup>35</sup>S]-labeled insoluble proteins isolated from virus-infected cell lysates.

Insoluble protein means the proteins of cell debris precipitated after centrifugation of cell lysates and dissolved with SDS.

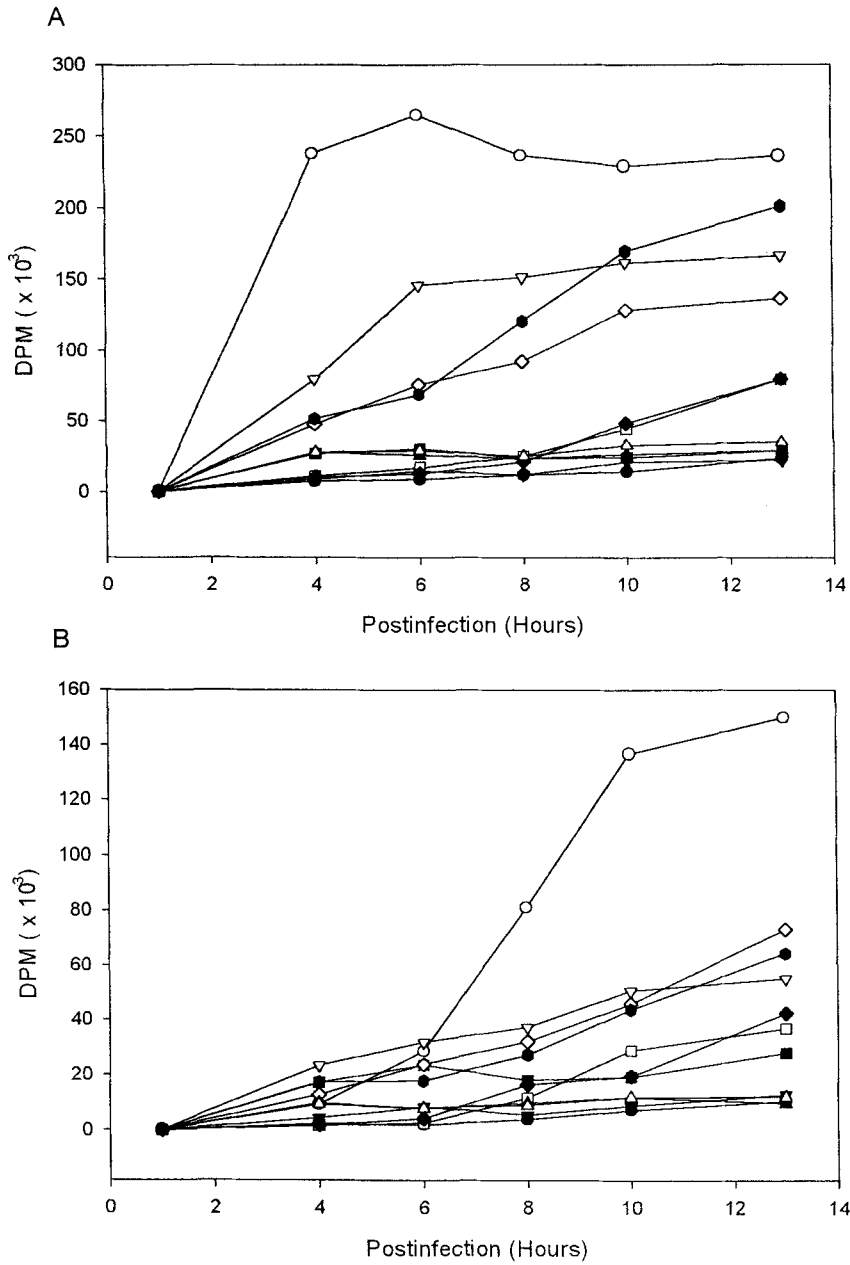


Fig. 25. (A) Intracellular uptake of [3H]thymidine and (B) incorporation into DNA in Vero cells infected with various strains of HSV-1.

HSV-1: mock (●), F (○), AR1 (▼), AR2 (▽), AR3 (■), AR4 (□), AR5 (◆), AR6 (◇), AR7 (▲), AR8 (△), and AR9 (◊) strains. Other experimental details are given in Materials and Methods.

Table 9. Influx of thymidine, acyclovir, ganciclovir and penciclovir: influx relative to 143B cells and mock-infected cells

Compounds	Cell lines	Influx relative				
		to 143B	to mock-infected cells			
		Mock	Mock	F	AR1	AR2
Thymidine	Vero	4.1	1.0	52.2	1.2	3.2
	143B	1.0	1.0	116.0	1.7	3.7
	FTK143B	3.3	1.0	5.1	2.0	3.1
Acyclovir	Vero	2.7	1.0	2.6	1.0	0.7
	143B	1.0	1.0	9.1	1.6	2.1
	FTK143B	7.5	1.0	3.3	0.5	0.7
Ganciclovir	Vero	0.7	1.0	79.2	4.7	29.0
	143B	1.0	1.0	541.1	2.6	17.9
	FTK143B	201.8	1.0	3.3	0.8	1.5
Penciclovir	Vero	0.1	1.0	263.8	3.7	57.8
	143B	1.0	1.0	213.2	1.2	28.7
	FTK143B	98.2	1.0	1.8	0.9	1.4



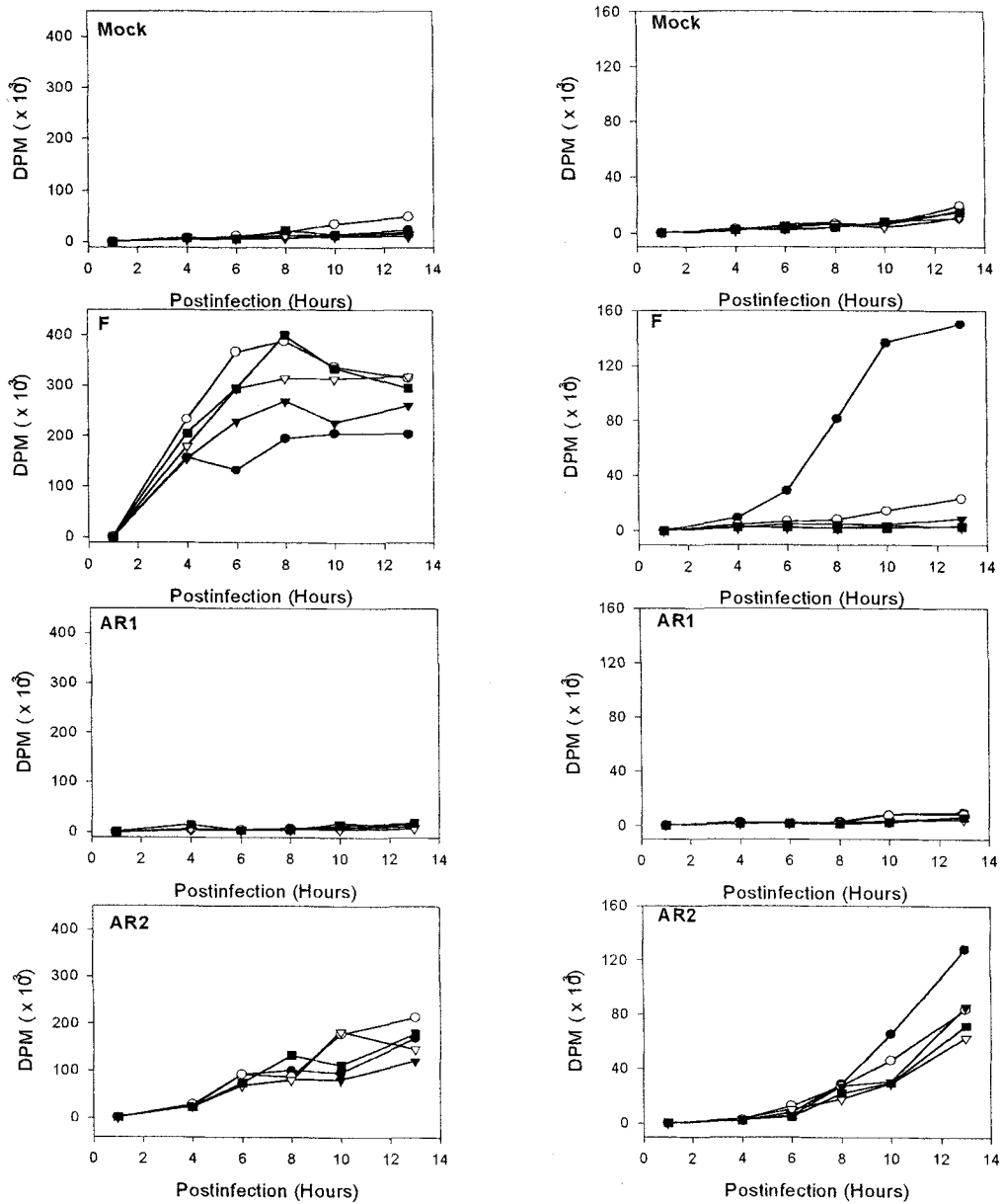


Fig. 26. Influence of acyclovir on (A) intracellular uptake of thymidine and (B) its incorporation into DNA in Vero cells infected with various virus strains. Acyclovir was added after 1 h-virus adsorption.

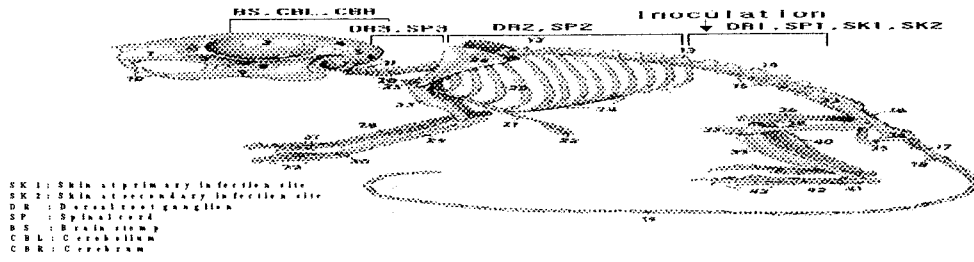
ACV: 0 mg/ml (●), 1 mg/ml (○), 2 mg/ml (▼), 5 mg/ml (▽), 10 mg/ml (■)

### 3. 동물체계 연구

#### 가. 마우스 감염조직의 바이러스 역가

생체에 감염된 HSV-1는 일차감염된 장소에서 이동을 하며, 이동 중에 감수성이 있는 조직에서 바이러스 증식을 하지만, 바이러스가 소멸되는 시간이 조직에 따라 다르다. 이는 피부감염을 이용한 zosteriform model의 마우스 사진 (Fig. 27)과 매일 2 마리에서 적출된 각 조직의 바이러스역가에서 알 수 있다. 포진이 있는 곳이 처음 감염장소인데 감염바이러스가 며칠 후 뇌에서 감소되는 것을 다음 Fig. 28와 29에서 알 수 있었다. AR1의 경우 바이러스가 거의 모든 조직에서 감지되지 않았다 (결과 제시안함)

HSV-1의 mouse감염모델 중 비강감염모델을 이용하기 위하여 WT바이러스로 방법을 확립한 다음 내성바이러스들의 병원성을 WT과 비교하였다. 일주일간 사육실에서 적응된 평균 무게 약 20 g의 5 주령의 암컷 BALB/c 또는 ICR mouse를 에테르로 마취시킨 다음, 군당 5 마리 씩 HSV-1 (F) 50 ul를 코로 흡입시키고 체중 및 증세를 최고 한 달간 관찰했다. 바이러스접종량  $10^6$  PFU/mouse에서 F는 100% 사망률 (평균생존일 5일)을 나타냈다. 감염증세는 체중감소, 안질환, 뇌염으로 인한 사망이었다. 바이러스에 감염된 mouse가 특이 증세를 나타내지 않을 때가 많으므로 체중감소는 질병진행의 중요 지표로 이용될 수 있다. 실험시작일 체중을 기준으로 1 g 이상 감소한 경우 체중감소로 판단하였고 2 g 이상의 경우 심한 감소로 판정하였었다. 체중감소의 멈춤이 감염으로부터의 회복 징후였으며, 회복기간에 간혹 각막염 증세가 관찰되었다. Fig. 30은 F 또는 AR1으로 비강감염된 마우스 조직들의 바이러스 역가변화와 viral DNA를 PCR을 이용하여 비교한 것이다. 다른 감염모델에서 비슷한 양상을 보이는 것을 고려하면, TK의 경우 감염 초기에 증식을 못하고 다른 조직으로 이동을 못하는 것 같았다. 비강감염후 30 일이 지난 마우스의 삼차신경을 적출하여 LAT과 TK유전자에 대한 RT-PCR을 수행하여 바이러스의 잠복감염 여부를 조사하였다 (Fig. 30). F에서는 LAT이 검출되었으나 AR1에서는 검출되지 않았다.



T i s s u e s   i s o l a t e d

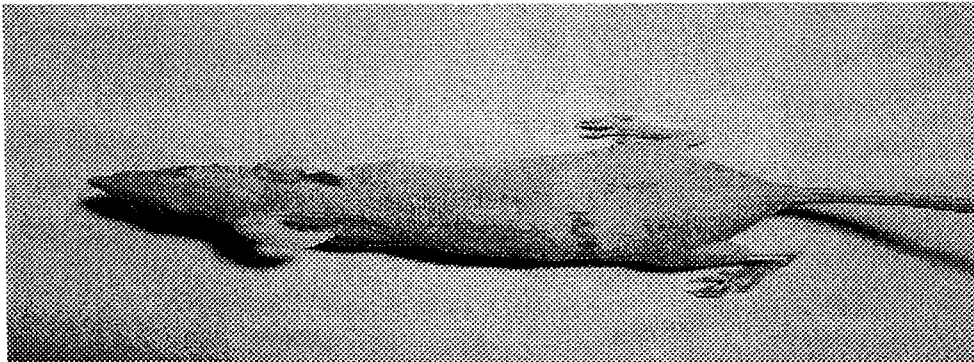
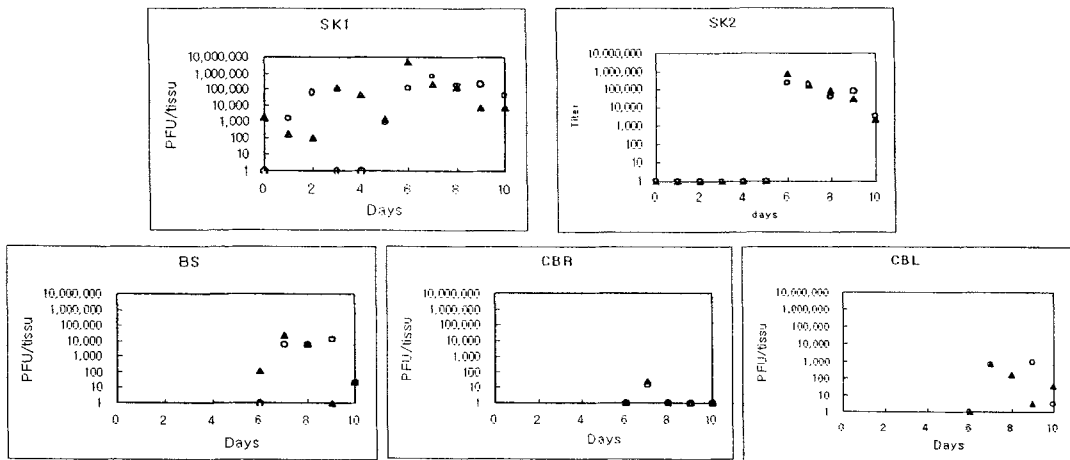


Fig. 27. Mouse zosteriform model

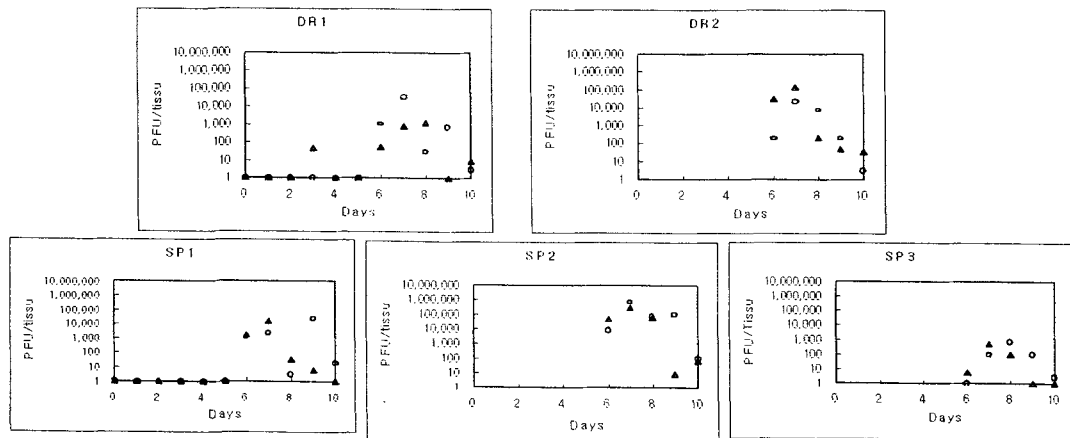
Upper, Tissues from which viruses isolated; Lower, a hairless mouse showing zosteriform after percutaneous infection with HSV-1 strain F



Virus titers of the tissues isolated from the mice infected cutaneously with HSV-1 (F)

○: Mice in group1, ▲: Mice in group 2

SK1, skin at primary infection; SK2, skin at secondary infection; BS, Brain stem; CBR, cerebrum; CBL, cerebellum



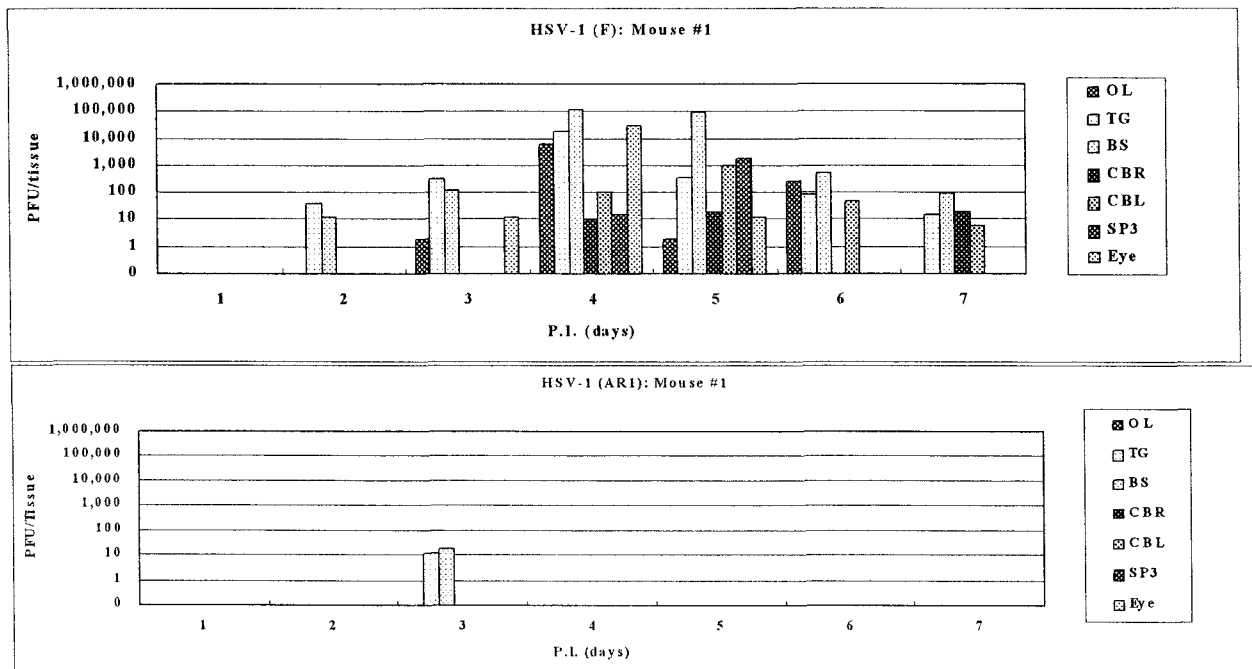
Virus titers of the tissues isolated from the mice infected cutaneously with HSV-1 (F)

○: Mice in group1, ▲: Mice in group 2

DR1 & SP1, dorsal root ganglia and spinal cord at pelvic & lumbar curvature; DR2 & SP2, dorsal root ganglia and spinal cord t thoracic curvature; SP3, spinal cord at cervical curvature

Fig. 28. Virus titers of the tissues isolated from the mice infected cutaneously with HSV-1

Upper, group 1; lower, group 2



Virus titers of the tissues isolated from the mouse #1 groups infected with F or AR1  
 Fig. 29. Virus titers of the tissues isolated from the mice infected cutaneously with HSV-1  
 (Experiment 2)

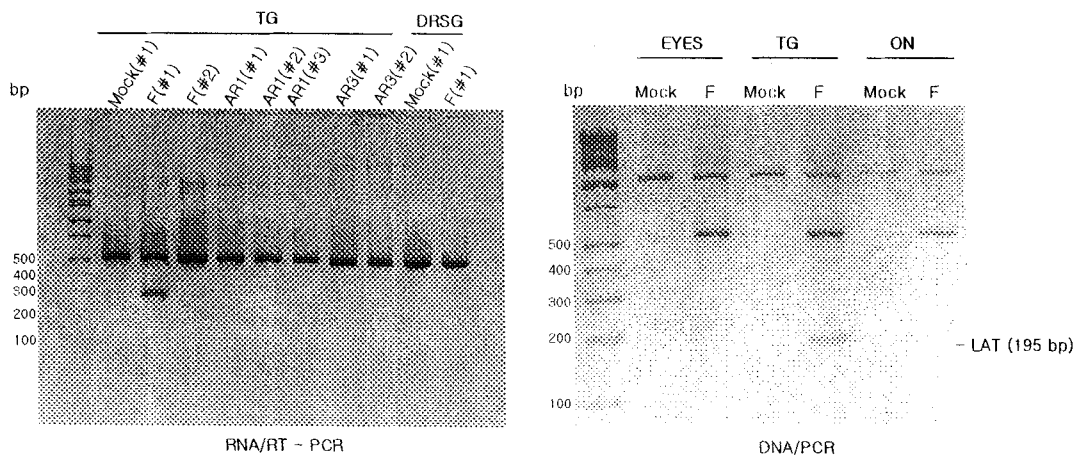


Fig. 30. PCR-detection of LAT gene from RNA or DNA extracted from tissues such as trigeminal nerves (TG), dorsal root sensory ganglia (DRSG), olfactory nerves (ON) or eyes isolated from mice infected with HSV-1 intranasally

HSV-1 LAT products: 195 bp

mouse  $\beta$ -actin RNA: 539 bp

HSV-1 TK gene: 273 bp

#### 4. 결론

이 번 연구의 가장 중요한 질문인 HSV-1 TK가 재활성에서 필수적인가라는 질문에 대해, 필수적이지 않다라는 답이 나왔다. 마우스 일차신경세포와 PC-12세포에서 잠복감염은 잘 일어나지만 재활성을 효율적으로 일으키는 방법을 마우스 일차신경세포에서는 찾을 수가 없었다. PC-12세포에서는 모든 TK-negative 바이러스도 재활성을 일으켰지만, PC-12세포는 cellular TK활성이 큼을 확인하였기에 세포의 TK가 재활성을 일으키는데 도움이 되었을 가능성을 배제할 수 없다. 동물실험을 통하여 TK-바이러스는 TK-positive나 partial에 비하여 병원성이 낮으며, 감염초기에 바이러스가 소실됨을 알 수 있었기에 감염초기에, 선천면역에 의해 바이러스가 효율적으로 제거되기 때문인지 아니면 바이러스가 숙주세포에 감염 또는 증식을 잘 못하기 때문인지에 대한 정밀한 연구가 필요하다.

TK의 효소학적 측면에서 TK-mutant들을 조사한 결과 TK주는 모두 TMPK활성도 결여되었음을 확인할 수 있었다. TK<sup>P</sup> 주의 경우 TMPK<sup>P</sup>인 것도 있고 TMPK인 경우도 있었는데, TMPK라고 결론짓기 위해서는 좀 더 많은 시험이 이루어져야 할 것이다. 이는 TK활성에 비해 TMPK 활성이 훨씬 비효율적이기에, 시험에 이용된 TK 단백질의 농도 등을 더 높혀 확인할 필요가 있겠다.

이 번 연구를 통하여 새로이 알게 되었거나 HSV나 TK와 관련하여 좀 더 명확해진 사항은 다음과 같다.

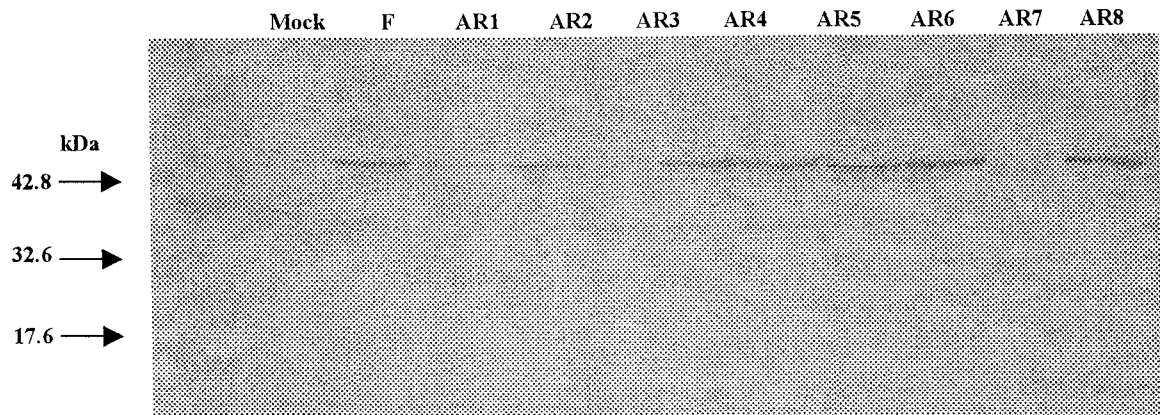
1. HSV-1 TK-deficient 돌연변이주 중 활성이 조금 남아있는 TK-partial (TK<sup>P</sup>)과 전혀 관찰되지 않는 TK-negative (TK)의 두 종류로 구분할 수 있다. TK는 약제내성, 병원성, 재활성 등에서 공통적인 특성을 나타내지만, TK<sup>P</sup>의 경우 개체마다 큰 차이가 있다.
2. HSV-1 TK는 HSV의 DNA 증식과 무관하게 세포내 핵산 및 핵산유도체의 uptake를 크게 증가시킨다.
3. HSV-1의 TK단백질은 세포질에 주로 존재한다고 알려진 것과 달리 감염세포의 핵에 주로 존재하며, 여러 종류의 일차 신경세포에서도 마찬가지이다.
4.  $\beta$ -유전자로 알려진 HSV-1 TK는 바이러스감염 2 시간 후부터 세포에 발현되는 것이 관찰되었고 바이러스 감염이 끝난 후까지 제거되지 않고 세포에 남았음을 확인할 수 있었다.
5. 보유하고 있는 HSV-1 TK 돌연변이주 중 Western 분석에서 낮은 TK 유전자 발현을 나타내는 것은 cell localization 시험에서도 적게 발현되는 것을 확인하였다. 그러나, mRNA 수준에서는 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다.
6. Recombinant TK 단백질의 세포내 발현으로 TK에 세 곳의 nuclear localization signal (25RRRTALRPRR33, R236-R237, K317-R318)이 있을 것으로 추정한다는 보고가 있었는데, TK단백질 발현이 적게 일어나는 돌연변이주의 경우 그 주변에 변화가 있는 것이 확인되었다.
7. HSV-2 TK는 세포질에 주로 존재하는 것으로 알려졌는데, 본 연구팀의 연구결과에서도 HSV-1과 달리 세포질에서 나타났다. 이는 nuclear localization signal 부위의 결여때문일 것으로 추정되기도 하지만, 시험에 사용한 항체가 HSV-1 TK에 특이적이기 때문에 HSV-2에 대해서는 상대적으로 낮은 감도를 나타내었을 가능성도 배제하지 못한다.

8. HSV TK발현 확인은 HSV의 감염여부나 감염율을 확인하는데 요긴한 도구로 이용될 수 있다.
9. HSV-1 TK 단백질은 virion에 포함되어있으며, TK단백질의 발현율과 비례하여 virion에 존재한다.
10. 생체에 감염된 HSV-1은 처음 감염된 장소에서 이동을 하며, 이동 중에 감수성이 있는 조직에서 바이러스 증식을 하지만, 바이러스가 소멸되는 시간이 조직에 따라 다르다. 생체내 면역체계가 중요한 영향을 끼칠 것이다.
11. HSV-1의 마우스 감염모델은 종류마다 특징이 있다. 즉, 본 연구팀에서 주로 이용하는 모델인 mouse 비강, 대뇌감염, 피부감염을 이용한 zosteriform은 각 모델마다 바이러스의 이동방향이나 조직 역가와 잠복감염세포가 다르다. 즉, 비강과 대뇌감염의 경우 삼차신경에서 피부감염에서는 dorsal root ganglion이 잠복감염 장소이다.
12. TK의 경우 감염 초기에 증식을 못하고 타조직으로 이동을 못하는 것 같다.
13. 신경세포 배양을 이용한 실험결과 HSV-1 TK활성이 결여되어도 잠복감염은 일어난다.
14. 신경세포 배양을 이용한 실험결과 HSV-1 TK가 결여되어도 재활성은 일어난다.

잘 동정되어진 바이러스주의 보유는 다른 여러 종류의 시험에 이용될 수 있을 것이며, AR1 - AR9의 특성을 Fig. 31에 표시하였다.



TK western



Summary

	F	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5	AR6	AR7	AR8	AR9
TK activity	+	-	p	-	p	p	p	-	-	p
TMPK activity	+	-	p	-	p	-	-	-	-	-
TK protein	+++	+	+++	+	+++	+++	+++	+++	+	+++
TK mRNA	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
In vitro ACV (Vero*FTK)	S*S	R*S	R*S	R*S	R*S	R*S	RR*S	R*S	R*S	R*S
GCV, PCV	S	R	M	R	M	M	M	R	R	M
BVdUrd	S	R	M	R	R	R	R	R	R	R
BrdUrd, IdUrd	S	R	S	R	M	M	S	R	R	M
Ara-A, Ara-C	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S
PFA	M	M	M	M	M	M	R	M	M	M
In vivo Virulence	H	vL	H	L	M	H	M	L	M	H
LD <sub>50</sub> (IC)(PFU/m)	1,200	>2,575,000	<195	12,000	198,000	42,000	228,000	22,000	20,000	125
2nd infection(PC)	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
2nd infection(IN,IC)	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
ACV resistance	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Reactivation(explan	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
Express Protein	normal	weak	normal	weak	normal	normal	normal	normal	weak?	normal
RNA	normal	Normal	nt	Normal	nt	nt	nt	nt	nt	nt

Fig. 31. Various characterization of TK-deficient mutants of HSV-1

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### (1) 연구개발의 최종목표

HSV-1의 인체내 잠복감염으로부터의 재활성기전과 vTK의 역할을 규명하기 위하여, 다양한 vTK-deficient HSV-1 mutant들을 활용하여 분자수준에서 연구하여 인체 생리 및 질병의 기전을 밝히고, 질병의 예방 및 치료를 위한 기반 지식을 확보하여 국민 보건 향상에 기여하며, 고부가가치 산업육성 기반을 확립함이 최종 목표였다. 이를 위해 시험관, 세포 배양 및 동물체계에서의 재활성 기전과 병원성에 대한 vTK역할 및 특성을 TK-negative mutant들과 WT인 strain F와 비교실험하고 TK 유전자의 변화 위치를 연관시켜 functional domain을 결정하고 in vitro와 in vivo 결과를 연결하는 종합적인 연구와 관련 기술을 개발 확립하려하였다. 이를 통해 바이러스 증식기전을 이해하며, 세계적인 항바이러스제 개발 동향에 선도적으로 동참함과 아울러 약제내성문제 해결을 시도하며, 약물구조설계에 도움이 되는 정보제공을 목표로 하였다.

- HSV-1 TK mutant 9 종을 이용하여 잠복감염으로부터의 재활성 기전에서의 TK 역할 규명
- 대장균으로부터 정제된 9 종 mutant의 TK의 효소학적 연구와 TK 저해제 탐색
- 일차 신경세포배양체계에서의 잠복감염 및 재활성유도체계 확립후 TK mutant 활용 조사
- 2 종류 이상의 TK mutant에 감염된 TK 비발현 또는 HSV TK발현세포주의 세포내 발현단백질 비교
- 비강 감염 마우스 조직내 HSV-1 잠복감염 확인체계 수립 후 TK mutant의 잠복감염조사

### (2) 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2001)	<p>oHSV-1 WT과 mutant AR1과 AR2 바이러스의 TK 유전자의 대장균내 발현체계 확립 및 분리정제된 vTK 단백질의 TK 및 TMPK 활성 확인 및 효소저해제 탐색</p> <p>o마우스 일차 신경세포배양체계에서의 잠복감염 체계 확립 및 분석</p> <p>oMock, F, AR1 또는 AR7에 각각 감염된 cTK<sup>-</sup> 143B 세포의 단백질발현분석 체계 확립 및 분석</p> <p>oHSV 비강감염 mouse의 조직에서 PCR을 활용한 vTK유전자 확인</p>	<p>wild type과 2종의 mutant vTK유전자의 대장균내 발현체계 구축 및 단백질 분리 정제 (FTK, AR1TK, AR2TK/pGX plasmid 제조 및 각 vTK 단백질 분리정제)</p> <p>분리정제된 vTK의 TK/TMPK 활성 측정 (TK 및 TMPK 활성의 완전한 deficiency 여부 확인)</p> <p>분리정제된 vTK를 활용한 TK 저해제 탐색 및 antiviral assay (보존중인 50 개 이상의 핵산유도체 시료 검정)</p> <p>마우스 일차 신경세포 배양 체계 확립 (trigeminal nerves)</p> <p>신경세포에서의 wild type 바이러스의 lytic cycle 이 아닌 잠복감염 유도체계 확립</p> <p>2D 전기영동을 통한 세포 및 바이러스 단백질 발현 분석 (mock, F, AR1 또는 AR7에 각각 감염된 cTK<sup>-</sup> 143B 세포)</p> <p>Mutant의 host cell tropism 비교 (세포 3종류 이상에서 각 mutant들의 역가 측정)</p> <p>마우스 비강 감염후 조직에서 감염성있는 바이러스가 확인되는 시기와 확인되지않는 시기에서의 PCR을 이용한 바이러스 유전자 확인체계 확립</p>
2차 년도 (2002)	<p>o HSV-1 TK-mutant TK 유전자 대장균내 발현 및 분리정제된 vTK 특성연구</p> <p>o 세포배양체계에서의 잠복감염 및 재활성 분석</p> <p>o HSV-1에 감염된 세포의 단백질 발현분석</p> <p>o HSV감염 mouse의 조직에서 LAT유전자 확인</p>	<p>- mutant vTK유전자의 발현체계 구축(AR7, AR4, AR5/pGX체계)</p> <p>- 발현된 단백질의 분리 정제</p> <p>- vTK를 이용한 BVdU-MP생성</p> <p>- BVdU-MP를 이용한 vTK의 TMPK 활성측정</p> <p>- 필요시 분리정제된 일부 vTK의 crystal structure 분석의뢰 (F, AR1의 TK)</p> <p>- vTK inhibitor 탐색 및 antiviral assay (50 개 이상)</p> <p>- Neuronal 세포에서의 HSV mutant 잠복감염 확인 (AR1, AR2)</p> <p>- WT의 재활성 유도 및 확인체계 확립</p> <p>- 세포내 thymidine 및 유도체의 정량분석 (Thd, TMP, TDP, TTP)</p> <p>- Mutant에 감염된 cTK<sup>-</sup>-143B세포의 단백질 분리 (WT, AR1 또는 AR7, mock)</p> <p>- Mutant에 감염된 cTK<sup>-</sup>/vTK<sup>+</sup>-FTK143B세포의 단백질 분리 (WT, AR1 또는 AR7, mock)</p> <p>- 2D 전기영동을 통한 세포 및 바이러스 단백질 발현 분석</p> <p>- Mutant의 host cell tropism 비교 (세포 3종류 이상)</p> <p>- 특히 단백질이 발견될 경우 아미노산서열 분석 의뢰</p> <p>- mutant에 감염된 mouse 조직에서 바이러스 및 LAT gene 확인: 비강 모델 (WT, AR1)</p>

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2003)	0 HSV-1 TK-mutant TK 유전자 대장균내 발현 및 분리정제된 vTK 특성연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 필요시 분리정제된 일부 vTK의 crystal structure 분석의뢰 (AR2, AR7의 TK)</li> <li>- vTK inhibitor 탐색 및 antiviral assay (50 개 이상)</li> <li>- vTK돌연변이 위치와 효소활성 특성 정리</li> <li>- vTK저해제 발견시 효소저해력 확인</li> </ul>
	0 세포배양체계에서의 잠복감염 및 재활성 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neuronal 세포에서의 잠복감염확인체계 확립: 면역화학적 확인</li> <li>- Mutant의 재활성 유도 및 확인 (AR1 - AR9)</li> <li>- 세포내 thymidine 및 유도체의 정량분석</li> <li>- vTK돌연변이 위치와 재활성 특성 정리</li> <li>- vTK저해제 발견시 잠복감염 및 재활성 저해력 확인</li> </ul>
	0 HSV-1에 감염된 세포의 단백질 발현 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mutant에 감염된 cTK<sup>-</sup>-143B세포의 단백질 분리</li> <li>- Mutant에 감염된 cTK<sup>-</sup>/vTK<sup>+</sup>-FTK143B세포의 단백질 분리 (WT, AR2, AR9)</li> <li>- 2D 전기영동을 통한 세포 및 바이러스 단백질 발현 분석</li> </ul>
	0 HSV감염 mouse의 조직에서 vTK유전자 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mutant의 host cell tropism 비교 (세포 3종류 이상)</li> <li>- 특이 단백질이 발견될 경우 아미노산서열 분석의뢰</li> <li>- mutant에 감염된 mouse 조직의 면역화학적 확인</li> <li>- mutant에 감염된 mouse 조직에서 바이러스 및 LAT gene 확인: 비강감염 모델 (AR2, AR7, AR3, AR8 등)</li> </ul>

(3) 계획대비 달성도

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	HSV-1 TK-mutant TK 유전자의 대장균내 발현체계 확립 및 분리정제된 vTK 특성연구	1) 종류의 HSV TK gene의 대장균내 발현체계 구축 및 단백질 분리 2) TMPK활성확인 3) TK돌연변이 위치와 TK특성관계 결정	100% 100% 100%
2	세포배양체계에서의 잠복감염체계 확립 및 분석	1) 마우스 일차 신경세포와 신경세포주 PC-12 배양 (삼차신경과 dorsal root 신경세포) 2) 신경 세포에 HSV 잠복감염 유도 및 잠복감염확인체계 확립 (vDNA, LAT transcript 확인) 3) HSV LAT gene cloning 4) WT의 재활성 유도 및 확인 5) 세포내 thymidine 및 유도체의 정량분석 6) Mutant의 재활성 유도 및 확인	100% 100% 100% 100% 100%
3	HSV-1에 감염된 세포의 단백질 발현 분석체계 확립 및 분석	계획에 없었음.	100%
4	HSV감염 mouse의 조직에서 vTK유전자 확인	1) WT에 비강 감염된 mouse 조직으로부터 PCR을 이용한 바이러스확인체계 확립 2) mutant에 감염된 mouse 조직의 면역화학적 확인 (vTK) - mutant에 감염된 mouse 조직에서 바이러스 및 LAT gene 확인: 비강 모델 (4종 이상)	100% 100% 100%

연차	변경 전 (선정연도 연구계획서)			변경 후			비고
	연구목표	연구내용	연구범위	연구목표	연구내용	연구범위	
1							
2							
3							

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

HSV-1 TK의 기능 중의 하나가 감염된 바이러스의 생체내 확산 수단이라는 점은 HSV 치료제 개발을 위한 새로운 작용점이다. 본 연구를 통해 분리한 HSV-1 recTK단백질을 활용하여 TK 저해제 탐색을 수행할 예정이며, 잠복감염과 재활성기전연구를 계속 수행할 예정이다. HSV감염에 의한 질병은 생체내 면역체계와 긴밀한 관계가 있기에 면역병리학적 측면에서의 연구를 수행하여, HSV-1 TK감염에 대한 선천면역과 후천면역 영향을 조사하며, HSV-1 TK 돌연변이주를 면역반응을 유도할 수 있는 도구로 삼는 가능성을 조사할 예정이다. HSV의 증식기전, 잠복감염, 재활성, 병원성 기전 등에 대한 이해 확대와 확보한 시험기술과 시험재료는 다른 바이러스나 다른 연구분야에도 활용할 수 있을 것이다.

HSV-1 TK의 기능 중의 하나가 감염된 바이러스의 생체내 확산 수단이라는 점은 HSV 치료제 개발을 위한 새로운 작용점이다. 본 연구를 통해 분리한 HSV-1 recTK단백질을 활용하여 TK 저해제 탐색을 수행할 예정이며, 잠복감염과 재활성기전연구를 계속 수행할 예정이다. HSV감염에 의한 질병은 생체내 면역체계와 긴밀한 관계가 있기에 면역병리학적 측면에서의 연구를 수행하여, HSV-1 TK감염에 대한 선천면역과 후천면역 영향을 조사하며, HSV-1 TK 돌연변이주를 면역반응을 유도할 수 있는 도구로 삼는 가능성을 조사할 예정이다. HSV의 증식기전, 잠복감염, 재활성, 병원성 기전 등에 대한 이해 확대와 확보한 시험기술과 시험재료는 다른 바이러스나 다른 연구분야에도 활용할 수 있을 것이다.

HSV-2는 재발성 성병을 주로 일으키는데, 미국의 경우 1980년대부터 매년 약 30%의 감염증가율을 보여, 1997년도 미국의 16세 이상 인구의 약 22% (남자 18%, 여자 25%)가 감염되었음이 보고되었다. HSV-2는 HSV-1과 유전자의 약 50% 동등성을 가지고 있으며, 성기감염시 HSV-1보다 재활성율이 2배 이상 높으며, HSV-1보다 더 neurovirulent한 것으로 보고된다. HSV-1이 뇌염을 잘 일으키는데 비해 HSV-2는 수막염을 많이 일으키는데, 이는 HSV-1은 신경세포를 통해 뇌로 확산하는데 비해 HSV-2는 혈액으로 수막으로 확산하기 때문이다. 많은 사회적 문제를 야기하는 HSV-2 연구에도 활용하여, 현재 치료제나 백신이 전혀 없는 herpes 잠복감염이나 재활성 저해제를 개발할 수 있는 연구기반을 지속적으로 조성할 예정이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

현재 herpes치료제로 이용되고 있는 acyclovir에 소염제인 hydrocortisone을 첨가한 연고제가 마우스감염모델에서 재활성 저해력이 월등 (R1)한 것이 확인되어 임상시험 중이다 (Medivir사의 B Oberg).

## 제 7 장 참고문헌

- Arthur, J.L., Scarpini, C.G., Connor, V., Lachmann, R.H., Tolkovsky, A.M. and Efstathiou, S. (2001). Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro. *J Virol*, 75, 3885-3895.
- Bacon, T.H., Levin, M.J., Leary, J.J., Sarisky, R.T., Sutton, D. (2003). Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 114-128.
- Balzarini, J., Bohman, C., De Clercq, E., 1993. Differential mechanism of cytostatic effect of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine, 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)-guanine, and other antiherpetic drugs on tumor cells transfected by the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1 or type 2. *J. Biol. Chem.* 268, 6332-6337.
- Bloom, D.C., Devi-Rao, G.B., Hill, J.M., Stevens, J.G. and Wagner, E.K.(1994). Molecular analysis of herpes simplex virus type 1 during epinephrine-induced reactivation of latently infected rabbits in vivo. *J Virol*, 68, 1283-1292.
- Bloom, D.C., Hill, J.M., Devi-Rao, G., Wagner, E.K., Feldman, L.T. and Stevens, J.G.(1996). A 348-base-pair region in the latency-associated transcript facilitates herpes simplex virus type 1 reactivation. *J Virol*, 70, 2449-2459.
- Blyth WA, Harbour DA, Hill TJ. Pathogenesis of zosteriform spread of HSV in the mouse. *J Gen Virol* 65: 1477-1468, 1984
- Cai, G.Y., Pizer, L.I. and Levin, M.J. (2002). Fractionation of neurons and satellite cells from human sensory ganglia in order to study herpesvirus latency. *J. Virol. Methods*, 104, 21-32.
- Chen, M.S., Prusoff, W.H., 1978. Association of thymidylate kinase activity with pyrimidine deoxyribonucleoside kinase induced by herpes simplex virus. *J. Biol. Chem.* 253, 1325-1327.
- Chibo, D., Druce, J., Sasadeusz, J., Birch, C., 2004. Molecular analysis of clinical isolates of acyclovir resistant herpes simplex virus. *Antiviral Res.* 61, 83-91.
- Colgin, M.A., Smith, R.L. and Wilcox, C.L. (2001). Inducible cyclic AMP early repressor produces reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in neurons in vitro. *J Virol*, 75, 2912-2920.
- Collins P, Oliver NM. Comparison of the in vitro and in vivo antiherpesvirus activities of the acyclic nucleosides, acyclovir and BWB759U. *Antiviral Res* 5: 145-156, 1985



- Danaher, R.J., Jacob, R.J. and Miller, C.S. (1999). Establishment of a quiescent herpes simplex virus type 1 infection in neurally-differentiated PC12 cells. *J NeuroVirol*, 5, 258-267.
- De Clercq E, Luczac M. Intranasal challenge of mice with herpes simplex virus: an experimental model for the evaluation of efficacy of antiviral drugs. *J Infect Dis* 133: A226-A236, 1976
- Degre've, B., De Clercq, E., Balzarini, J., 2000a. Selection of HSV-1 TK gene-transfected murine mammary carcinoma cells resistant to (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine(BVDU) and ganciclovir (GCV). *Gene Ther.* 7, 1543-1552.
- Degre've, B., Johansson, M., De Clercq, E., Karlsson, A. and Balzarini, J.(1998). Differential intracellular compartmentalization of herpetic thymidine kinase (TKs) in TK gene-transfected tumor cells: molecular characterization of the nuclear localization signal of HSV1 TK. *J Virol.* 72, 9535-43.
- Devi-Rao, G.B., Bloom, D.C., Stevens, J.G. and Wagner, E.K. (1994). Herpes simplex virus type 1 DNA replication and gene expression during explant induced reactivation of latently infected murine sensory ganglia. *J.Virol*, 68, 1271-1282.
- Fillat, C., Carrio, M., Cascante, A., Sangro, B., 2003. Suicide gene therapy mediated by the herpes simplex virus thymidine kinase gene/ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr. Gene. Ther.* 3, 13-26.
- Gilbert, C., Bestman-Smith, J., Boivin, G., 2002. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist. Updat.* 5, 88-114.
- Gold SE, Boyd MR, Field HJ. Effects of penciclovir and famciclovir in a murine model of encephalitis induced by intranasal inoculation of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Chem Chemother* 3: 37-47, 1992
- Hill, J.M., Dudley, J.B., Shimomura, Y. and Kaufman, H.E. (1986). Quantitation and kinetics of induced HSV-1 ocular shedding. *Curr Eye Res*, 5, 241-246.
- Kim, J.H., Park, J.B., Bae, P.K., Kim, H.S., Kim, D.W., Ahn, J.K. and Lee, C.-K. (2002). Establishment and use of a cell line expressing HSV-1 thymidine kinase to characterize viral thymidine kinase-dependent drug-resistance. *Antiviral Research*, 54, 163-174.
- Kit, S., Leung, W.C., Jorgensen, G.N., Dubbs, D.R., 1974. Distinctive properties of thymidine kinase isozymes induced by human and avian herpesviruses. *Int. J. Cancer* 14, 598-610.
- Loutsch, J.M., Perng, G.C., Hill, J.M., Zheng, X., Marguart, M.E., Block, T.M., Nesburn, A.B. and Wechsler, S.L. (1999). Identical 371-base-pair deletion mutations in the LAT genes of herpes simplex virus type 1 McKrae and 17syn+ results in different in vivo reactivation phenotypes. *J Virol*, 73, 767-771.
- Lee C-K, Kim HS. Evaluaton of anti-herpes simplex virus type 1 activity of acyclovir by using mouse intracerebral infection model. *J Kor Soc Virol* 28 (1): 63-69, 1998

- Maga, G., Focher, F., Wright, G.E., Capobianco, M., Garbesi, A., Bendiscoli, A., Spadari, S., 1994. Kinetic studies with N2-phenylguanines and with L-thymidine indicate that herpes simplex virus type-1 thymidine kinase and thymidylate kinase share a common active site. *Biochem. J.* 302, 279-282.
- Nesburn, A.B., Elliot, J.H. and Leibowitz, H.M. (1967). Spontaneous reactivation of experimental herpes simplex keratitis in rabbits. *Arch Ophthalmol*, 78, 523-529.
- Perng, G.C., Maguen, B., Jin, L., Mott, K.R., Kurylo, J., BenMohamed, L., Yukht, A., Osorio, N., Nesburn, A.B. Henderson, G., Inman, M., Jones, C. and Wechsler, S.L. (2002). A novel herpes simplex virus type 1 transcript (AL-RNA) antisense to the 5' end of the latency associated transcript produces a protein in infected rabbits. *J Virol*, 76, 8003-8010.
- Perng, G.C., Slanina, S.M., Yukht, A., Ghiasi, H., Nesburn, A.B. and Wechsler, S.L.(2000a). The latency-associated transcript gene enhances establishment of herpes simplex virus type 1 latency in rabbits. *J Virol*, 74, 1885-1891.
- Sarisky, R.T., Bacon, T.H., Boon, R.J., Duffy, K.E., Esser, K.M., Leary, J., Locke, L.A., Nguyen, T.T., Quail, M.R., Saltzman, R., 2003. Profiling penciclovir susceptibility and prevalence of resistance of herpes simplex virus isolates across eleven clinical trials. *Arch. Virol.* 148, 1757-1769.
- Sawtell, N.M. (1997). Comprehensive quantification of herpes simplex virus latency at the single-cell level. *J Virol*, 71, 5423-5431.
- Sawtell, N.M. and Thompson, R.L. (1992). Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J. Virol*, 66, 2150-2156.
- Sedarati, F., Margolis, T.P. and Stevens, J.G. (1993). Latent infection can be established with drastically restricted transcription and replication of the HSV-1 genome. *Virology*, 192, 687-691.
- Simmonds A, Nash AA. Zosteriform spread of herpes simplex virus and its use to investigate the role of immune cells in prevention of recurrent disease. *J Virol* 52: 816-821, 1984
- Snowden W, W Harris, P Collin, M Sowa, R Fenton and G Darby. Phenotypic and genotypic characterization of clinical isolates of herpes simplex virus resistant to acyclovir. In: 11th International Conference on Antiviral Research, San Diego, USA, 1998
- Stevens, J.G. and Cook, M.L. (1971). Latent herpes simplex virus in spinal ganglia. *Science*, 173, 843.
- Stevens, J.G., Wagner, E.K., Devi-Rao, G.B., Cook, M.L. and Feldman, L.T. (1987). RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science*, 235, 1056-1059.

Su, Y.H., Meegalla, R.L., Chowhan, R., Cubitt, C., Oakes, J.E., Lausch, R.N., Fraser, N.W. and Block, T.M.(1999). Human corneal cells and other fibroblasts can stimulate the appearance of herpes simplex virus from quiescently infected PC12 cells. *J Virol*, 73, 4171-4180.

## 특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	국책연구개발사업		
	세부사업명	분자및세포기능디스커버리사업(분자의과학사업 이관)		
과제명	Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase 돌연변이 바이러스를 활용한 바이러스 잠복감염으로부터의 재활성기전 연구			
연구기관	한국화학연구원	연구책임자	이종교	
총연구기간	2001 년 8 월 1 일 ~ 2004 년 5 월 31 일 (34 개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	240,000	0	240,000	
기술분야	생명공학기술 (유전공학핵심기술)			
참여기업				
공동연구기관				
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ( )	2. 기술이전( )	3. 후속연구추진( )	4. 타사업에 활용( )
	5. 선행 및 기초연구(√)	6. 기타목적활용(교육, 연구)( )	7. 활용중단(미활용)( )	8. 기타( )
<p>특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p>				
<p>첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부. 2. 기술요약서 1부</p>				
<p>2004 년 12 월 일</p>				
<p>연구책임자 : 이 종 교 </p> <p>연구기관장 : 김 충 섭 </p>				
<p>과학기술부장관 귀하</p>				

## [첨부1]

# 연구결과 활용계획서

### 1. 연구목표 및 내용

HSV-1 thymidine kinase (TK)-deficient 돌연변이주와 세포배양체계를 이용하여 바이러스 잠복감염으로부터 재활성기전에 TK의 필수성 및 각 돌연변이 TK의 효소학적 특성 규명이 연구목표였다. 이를 위하여 1) 돌연변이 TK 유전자를 클로닝하고 대장균에서 발현시켜 분리된 단백질로 효소학적 특성을 규명하며, 2) 잠복감염의 주요 지표인 LAT유전자를 클로닝하고 염기서열을 결정지으며, 3) 세포체계 잠복감염과 재활성모델확립을 위하여 마우스 신경세포의 일차배양을 수행하고 바이러스 잠복감염과 재활성 유도기술을 수립한 다음 돌연변이주의 특성비교, 4) dNTP pool이 없는 신경세포의 특성을 고려하여 세포내 thymidine 및 유도체 분석, 5) 세포와 반응하는 물질탐색을 위한 2D 전기영동체계 수립, 6) 마우스 감염동물모델을 이용하여 바이러스 잠복감염 확인과 병원성 연구 등이 연구내용이었다.

### 2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

#### 가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허광고번호 출원(등록)번호	광고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고

#### 나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

#### 다. 노하우 내역

HSV-1과 관련한 다음의 내용들 말고도, 신경세포 일차 배양기술, 세포체계 잠복감염 및 재활성 유도기술, proteomics 연구기술, 분자생물학을 이용한 진단기술 등의 다양한 기술 이외에 TK 발현 vector 등의 다양한 시험재료 확보도 중요한 의미가 있다.

1. HSV-1 TK-deficient 돌연변이주 중 활성이 조금 남아있는 TK-partial (TK<sup>p</sup>)과 전혀 관찰되지 않는 TK-negative (TK)의 두 종류로 구분할 수 있다. TK는 억제내성, 병원성, 재활성 등에서 공통적인 특성을 나타내지만, TK<sup>p</sup>의 경우 개체마다 큰 차이가 있다.
2. HSV-1 TK는 HSV의 DNA 증식과 무관하게 세포내 핵산 및 핵산유도체의 uptake를 크게 증가시킨다.
3. HSV-1의 TK단백질은 세포질에 주로 존재한다고 알려진 것과 달리 감염세포의 핵에 주로 존재하며, 여러 종류의 일차 신경세포에서도 마찬가지이다.
4. β-유전자로 알려진 HSV-1 TK는 바이러스감염 2 시간 후부터 세포에 발현되는 것이 관찰되었고 바이러스 감염이 끝난 후까지 제거되지 않고 세포에 남아있음을 확인할 수 있었다.
5. 보유하고 있는 HSV-1 TK 돌연변이주 중 Western 분석에서 낮은 TK 유전자 발현을 나타내는 것은 cell localization 시험에서도 적게 발현되는 것을 확인하였다. 그러나, mRNA 수준에서는 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다.
6. Recombinant TK 단백질의 세포내 발현으로 TK에 세 곳의 nuclear localization signal (25RRRTALRPRR33, R236-R237, K317-R318)이 있을 것으로 추정한다는 보고가 있었는데, TK단백질 발현이 적게 일어나는 돌연변이주의 경우 그 주변에 변화가 있는 것이 확인되었다.
7. HSV-2 TK는 세포질에 주로 존재하는 것으로 알려졌는데, 본 연구팀의 연구결과에서도 HSV-1과 달리 세포질에서 나타났다. 이는 nuclear localization signal 부위의 결여때문일 것으로 추정되기도 하지만, 시험에 사용한 항체가 HSV-1 TK에 특이적이기 때문에 HSV-2에 대해서는 상대적으로 낮은 감도를 나타내었을 가능성도 배제하지 못한다.
8. HSV TK발현 확인은 HSV의 감염여부나 감염율을 확인하는데 요긴한 도구로 이용될 수 있다.
9. HSV-1 TK 단백질은 virion에 포함되어있으며, TK단백질의 발현율과 비례하여 virion에 존재한다.
10. 생체에 감염된 HSV-1은 처음 감염된 장소에서 이동을 하며, 이동 중에 감수성이 있는 조직에서 바이러스 증식을 하지만, 바이러스가 소멸되는 시간이 조직에 따라 다르다. 생체내 면역체계가 중요한 영향을 끼칠 것이다.
11. HSV-1의 마우스 감염모델은 종류마다 특징이 있다. 즉, 본 연구팀에서 주로 이용하는 모델인 mouse 비강, 대뇌감염, 피부감염을 이용한 zosteriform은 각 모델마다 바이러스의 이동방향이나 조직 역가와 잠복감염세포가 다르다. 즉, 비강과 대뇌감염의 경우 삼차신경에서 피부감염에서는 dorsal root ganglion이 잠복감염 장소이다.
12. TK의 경우 감염 초기에 증식을 못하고 타조직으로 이동을 못하는 것 같다.
13. 신경세포 배양을 이용한 실험결과 HSV-1 TK활성이 결여되어도 잠복감염은 일어난다.
14. 신경세포 배양을 이용한 실험결과 HSV-1 TK가 결여되어도 재활성은 일어난다.

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재 연월 일	호	발행 기관	국 명	SCI게재 여부
Antiviral Research	Establishment and use of a cell line expressing HSV-1 thymidine kinase to characterize viral thymidine kinase-dependent drug-resistance.	2002년 일	54: 129-142	Elsevir	네덜란드	○
계: 1 건수						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행 기관	국 명
한국분자세포생물학회 추계학술대회	Thymidine kinase and thymidylate kinase activity of the recombinant thymidine kinase proteins of drug-resistant herpes simplex virus type 1	2001년 10월 11일			한국
한국분자세포생물학회 추계학술대회	Study of thymidine kinase using penciclovir-resistant mutants in herpes simplex virus type 1	2001년 10월 11일			한국
International Conference on Antiviral Research	The virus replication in the brain tissues of the mice infected intranasally with several TK-negative drug-resistant mutants of HSV-1	2002년 3월 19일			체코
International Conference on Antiviral Research	Intracellular metabolism of acyclovir and deoxythymidine in cell culture system using HSV-1 and its acyclovir-resistant mutant strains	2003년 4월 28일			미국
2004 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	Herpes simplex virus and immunity.	2004년 5월 13일			한국
계: 5 건수					

3. 연구성과

- 1) HSV TK가 마우스감염 초기의 생존에 중요하며, 이는 TK가 선천면역에 대한 방어기능을 가질 수 있고, 이는 TK를 새로운 신약 개발 target으로 삼을 수 있음.

- 2) HSV-1 TK단백질은 virion안에 존재함.
- 3) HSV-1 TK단백질은 세포핵에 주로 존재함을 확인.
- 4) HSV-1 TK는 HSV-1의 세포내 감염을 확인할 수 있는 중요한 도구로 이용될 수 있음.
- 5) TK단백질이 소량 발현되는 HSV-1 TK돌연변이주의 경우, mRNA는 정상적으로 만들어지나, nuclear localization signal 부위의 이상에 의한 것일 수 있음.
- 6) HSV-1 TK는 핵산 유도체의 uptake를 급증시키며, 이는 바이러스 증식이 일어나지 않아도 단백질은 세포에 계속 존재하며 기능도 수행함 등.

#### 4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

##### 가. 당해연도 활용계획

HSV TK의 innate immunity에 대한 연구 TK가 혹시 지닐 다른 효소활성특정 및 SCID mouse를 활용한 TK- 바이러스주에 대한 실험을 벨기에 Rega연구소의 Jan Balzarini와 공동 연구를 수행할 계획이다.

##### 나. 활용방법

본 연구를 통해 확립한 일차 신경세포 배양기술, 잠복감염 및 재활성 유도기술, proteomics 연구기술, 바이러스 진단 기술 등은 앞으로의 바이러스 연구에도 계속 활용할 예정이다. HSV-1 TK가 HSV 치료제 개발을 위한 새로운 target이기에 본 연구를 통해 분리한 HSV-1 TK단백질을 활용하여 TK 저해제 탐색을 계속할 예정이다. TK돌연변이주를 활용하여 HSV감염의 면역병리학적 연구를 수행하여, HSV-1 TK감염에 대한 선천면역과 후천면역 영향을 조사하며, HSV-1 TK 돌연변이주를 면역반응을 유도할 수 있는 도구로 삼는 가능성을 조사할 예정이다.

##### 다. 차년도이후 활용계획

HSV-1 TK가 HSV 치료제 개발을 위한 새로운 target이기에 본 연구를 통해 분리한 HSV-1 TK단백질을 활용하여 TK 저해제 탐색을 계속할 예정이다. TK돌연변이주를 활용한 잠복감염과 재활성기전연구를 계속 수행하며, HSV감염의 면역병리학적 연구를 수행하여, HSV-1 TK감염에 대한 선천면역과 후천면역 영향을 조사하며, HSV-1 TK 돌연변이주를 면역반응을 유도할 수 있는 도구로 삼는 가능성을 조사할 예정이다.

#### 5. 기대효과

본 연구를 통한 인프라 구축효과 바이러스감염시험과 그에 대한 복합적 분석체계 수립과 앞으로의 Herpesvirus 및 타 바이러스연구 선도에 이바지 할 수 있다. 바이러스감염초기 생체내 확산 제어측면에서 TK에 대한 연구는 다른 바이러스의 질병제어에도 큰 영향을 끼칠 것이며, 동정이 잘 되어 있는 바이러스주의 확보는 국가 연구능력 및 잠재력을 향상시킬 것이다.



# 기술 요약서

## ■ 기술의 명칭

※기술이란? 과제 수행결과 확보된 신기술, 산업재산권, 기술적 노하우 등 개발된 성과중 수요자에게 공급할 수 있는 형태의 기술을 의미함

## ■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	M1-0106-00-0102			
과제명	Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase 돌연변이 바이러스를 활용한 바이러스 잠복감염으로부터의 재활성기전 연구			
사업명	국책연구개발사업			
세부사업명	분자및세포기능디스커버리사업(분자의과학사업 이관)			
연구기관	한국화학연구원	기관유형	정부 출연연구원	
참여기관(기업)				
총연구기간	2001 년 8 월 1 일 ~ 2004 년 5 월 31 일 (34 개월)			
총연구비	정부( 240,000)천원	민간( 0)천원	합계( 240,000)천원	
연구책임자 1	성명	이 종 교	주민번호	550206-xxxxxxx
	근무기관 부서	약리활성연구팀	E-mail	ckyolee@krikt.re.kr
	직위/직급	책임연구원	전화번호	042-860-7412
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	이 종 교	소속/부서	약리활성연구팀
	직위/직급	책임연구원	E-mail	ckyolee@krikt.re.kr
	전화번호	책임연구원	FAX	042-861-4246
	주소	(305-600) 대전시 유성구 장동 100 한국화학연구원 약리활성연구팀		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

<기술적 특징>

(1)

(2)

(3)

[용도 · 이용분야]

(1)

(2)

(3)



## ■ 기술이전 조건

이전형태	<input type="checkbox"/> 유상 <input type="checkbox"/> 무상	최저기술료	천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 협의결정	<input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 기타( )	<input type="checkbox"/> 통상실시권
이전 소요기간	년      개월	실용화예상시기	년도
기술이전시 선행요건			

\* 기술이전시 선행요건 : 기술이전을 위한 사전준비사항(필수 설비 및 장비, 전문가 확보 등)을 기술

\* 실용화예상시기 : 기술을 활용한 대표적인 제품이 최초로 생산이 시작되는 시기를 기재

## ■ 기술의 개발단계 및 수준

[기술의 완성도] (1개씩 선택(✓로 표시)하여 주십시오)

v	① 기초, 탐색연구단계 : 특정용도를 위해 필요한 신 지식을 얻거나 기술적 가능성을 탐색하는 단계
	② 응용연구단계 : 기술적 가능성의 실증, 잠재적 실용화 가능성의 입증 등 실험실적 확인 단계
	③ 개발연구단계 : Prototype의 제작, Pilot Plant Test 등을 행하는 단계
	④ 기업화 준비단계 : 기업화에 필요한 양산화 기술 및 주변 기술까지도 확보하는 단계
	⑤ 상품화 완료단계

[기술의 수명주기] (1개씩 선택(✓로 표시)하여 주십시오)

v	① 기술개념 정립기 : 기술의 잠재적 가능성만 있는 단계
	② 기술실험기 : 기술개발에 성공했으나 아직 실용성, 경제성 등이 확실치 않은 단계
	③ 기술적용 시작기 : 최초의 기술개발국에서만 활용되고 있는 단계
	④ 기술적용 성장기 : 기술개발국 및 일부 선진국에서 활용되고 있는 단계
	⑤ 기술적용 성숙기 : 선진국사이에서 활발한 기술이전이 일어나며, 기술의 표준화가 되어가는 단계
	⑥ 기술적용 쇠퇴기 : 선진국에서 개도국으로 기술이전이 활발하게 일어나고, 선진국에서는 기술의 가치가 저하되나, 개도국에서는 아직 시장의 가치가 높은 기술

[기술발전 과정상의 기술수준] (1개씩 선택(✓로 표시)하여 주십시오)

	① 외국기술의 모방단계 : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
v	② 외국기술의 소화·흡수단계 : 국내시장구조나 특성에 적합하게 적응시킴
	③ 외국기술의 개선·개량단계 : 성능이나 기능을 개선시킴
	④ 신기술의 혁신·발명단계 : 국내 최초로 개발

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[ 기술개요 ]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[ 기술을 도출한 과제현황 ]

과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	합계 : (            )백만원 - 정부 : (            )백만원    민간 : (            )백만원		
연구책임자	소속		성명
	전화번호		E-mail
연구개발 주요내용			