



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

Apoptosis 억제가 viral hemorrhagic
septicemia virus (VHSV) 증식에
미치는 영향



2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생명의학과

이 지 애

이 학 석 사 학 위 논 문

Apoptosis 억제가 viral hemorrhagic
septicemia virus(VHSV) 증식에
미치는 영향

지도교수 김 기 홍

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생명의학과

이 지 애

이지애의 이학석사 학위논문을 인준함.

2015년 2월 27일



위원장	이학박사	김도형 (인)
위원	이학박사	정현도 (인)
위원	이학박사	김기홍 (인)

목 차

AbstractIV

List of TablesV

List of FiguresVI

I. 서 론1

II. 재료 및 방법5

1. 세포 및 바이러스5

2. Inhibitors6

3. 시간에 따른 DNA fragmentation 정도 확인6

4. Inhibitor를 이용하여 EPC cell의 apoptosis 억제7

가. cell culture7

나. The concentration of inhibitors8

다. Inhibitor 처리8

라. Virus 접종9

마. DNA fragmentation laddering9

바. 시간별 titer 측정10

5. Inhibitor의 지속효과와 titer 확인13

가. Inhibitor 처리와 virus 접종13

나. Titer 측정13

6. EPC cell의 p53과 MDM2 유전자 Complete ORF 확인14

가. EPC cell의 p53과 MDM2의 partial cDNA14

나. RACE PCR15

7. VHSV감 염시 p53과 MDM2의 발현확인15

III. 결 과	19
1. VHSV 감염에 의한 DNA fragmentation 양상.....	19
2. The concentration of drugs	21
3. VHSV와 rVHSV- Δ NV-eGFP 의한 apoptosis에 inhibitor가 미치는 영향 가. CPE상에서 변화.....	23
나. Genomic DNA상의 변화.....	31
다. Inhibitor 처리 시 시간별 viral titer의 변화	39
4. Inhibitor의 지속효과와 titer 확인.....	42
5. EPC cell의 p53유전자와 MDM2유전자의 Complete ORF 확인.....	45
6. VHSV감염과 Pifithrin- α 처리시 p53유전자와 MDM2유전자의 발현 확인.....	48
IV. 고 찰	50
요 약	55
감사의 글.....	56
참고문헌	58

Effect of apoptosis inhibition on replication of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)

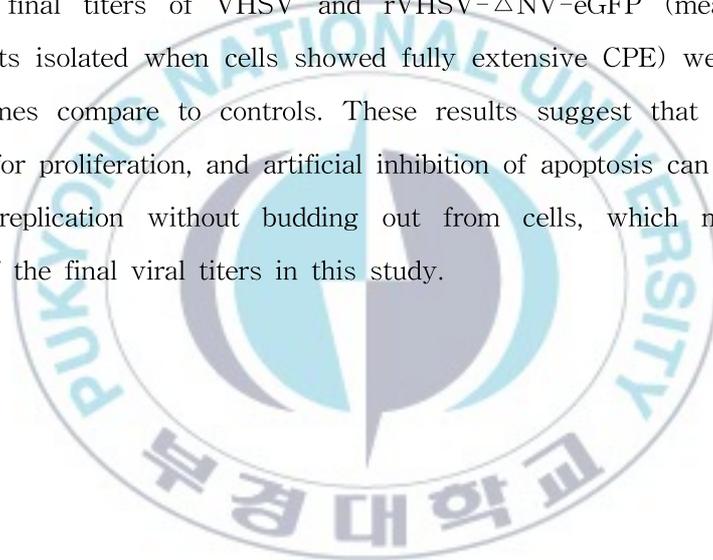
Ji Ae Lee

Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate School,
Pukyong National University

It has been demonstrated that viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection induces apoptosis. Apoptosis occurs through intrinsic and extrinsic pathways, and many viruses exploit apoptosis to facilitate viral proliferation. Although VHSV infection leads to mass mortality of cultured olive flounder, a little information is available on pathway of apoptosis induced by VHSV infection. In this study, we analyzed the effect of apoptosis suppression on the VHSV replication and explored possible pathway of apoptosis caused by VHSV infection in *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cells. Previously, the role of NV protein of *novirhabdoviruses* in inhibition of apoptosis was reported. Thus, in this study, the effect of apoptosis inhibitors (a p53 inhibitor Pifithrin- α or pan-caspase inhibitor Z-VAD(OMe)-FMK) on the replication was analyzed not only in wild-type VHSV but also in NV gene knock-out recombinant VHSV (rVHSV- Δ NV-eGFP).

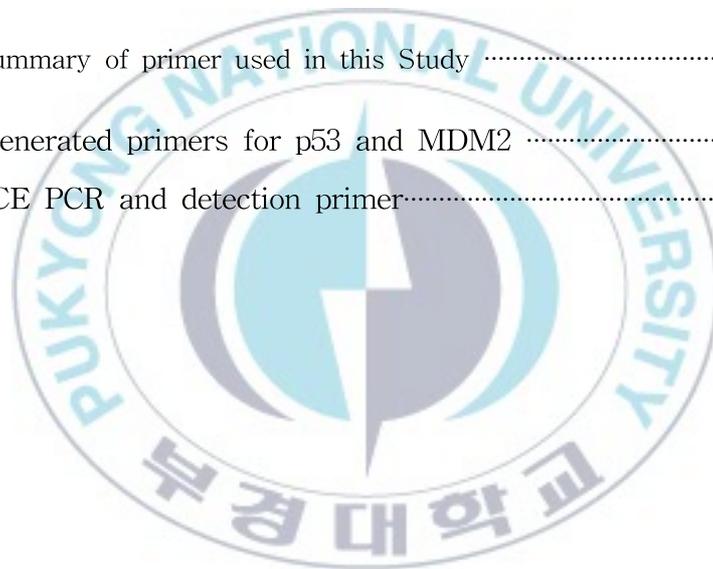
EPC cells were treated with pifithrin- α or Z-VAD(OMe)-FMK for 2 hours, then, inoculated with either VHSV or rVHSV- Δ NV-eGFP. At 24, 36, 48, 60, and 72 h post-infection, cytopathic effect (CPE) was observed, and genomic DNA was isolated for DNA fragmentation analysis. The results showed that both inhibitors dose-dependently delayed CPE and apoptosis by VHSV or

rVHSV- Δ NV-eGFP infection, suggesting that VHSV can induce apoptosis through p53 mediated-pathway and NV gene deletion may not greatly influence on the apoptosis pattern. However, in the semiquantitative RT-PCR analysis, expression of MDM2 that binds to p53 protein for degradation was reduced by VHSV infection. Therefore, further studies are needed to elucidate the involvement of p53 in the apoptosis induced by VHSV infection. Although suppression of apoptosis decreased viral titers of early period (to 3 d post-infection) compared to control groups that were not exposed to apoptosis inhibitors, final titers of VHSV and rVHSV- Δ NV-eGFP (measured from supernatants isolated when cells showed fully extensive CPE) were increased 2 or 3 times compare to controls. These results suggest that VHSV uses apoptosis for proliferation, and artificial inhibition of apoptosis can extend time for viral replication without budding out from cells, which may lead to increase of the final viral titers in this study.



List of Tables

Table 1. Summary of primer used in this Study	17
1-1. Degenerated primers for p53 and MDM2	17
1-2. RACE PCR and detection primer	18



List of Figures

Figure 1. Inhibitors of pre - treatment and virus inoculation.	11
Figure 2. Treatment procedure.....	12
Figure 3. Time course of DNA fragmentation by VHSV in EPC cells.....	20
Figure 4. Confirmation of adequate the concentration of Z-VAD(OMe)-FMK and Pifithrin- α	22
Figure 5-1,2,3. The cytophatic effect(CPE) induced VHSV of <i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (EPC)cell with Z-VAD(OMe)-FMK or Pifithrin- α after 24hs/48hs/72hs post-infection.....	25-27
Figure 6-1,2,3. The cytophatic effect(CPE) induced rVHSV- Δ NV-eGFP of <i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (EPC)cell with Z-VAD(OMe)-FMK or Pifithrin- α after 24hs/48hs/72hs post-infection.....	28-30
Figure 7-1. Analysis of DNA fragmentation from EPC cells at various time after VHSV infection.....	33-35
Figure 7-2. Analysis of DNA fragmentation from EPC cells at various time	

after rVHSV- Δ NV-eGFP infection.....	36-38
Figure 8-1. Effect of apoptosis inhibition on final titer of VHSV.....	40
Figure 8-2. Effect of apoptosis inhibition on final titer of rVHSV- Δ NV-eGFP.	41
Figure 9-1. Final titer of VHSV depending on inhibition of apoptosis through Pifithrin- α or Z-VAD(OMe)-FMK treatment.	43
Figure 9-2. Final titer of rVHSV- Δ NV-eGFP depending on inhibition of apoptosis through Pifithrin- α or Z-VAD(OMe)-FMK treatment.	44
Figure 10-1. Nucleotide sequence of p53 in EPC cell and deduced amino acid sequence.....	46
Figure 10-2. Nucleotide sequence of MDM2 in EPC cell and deduced amino acid sequence.....	47
Figure 11. P53 and MDM2 expression during either VHSV infection or Pifithrin- α . treatment.....	49

I. 서론

VHSV(viral hemorrhagic septicemia virus) 는 *Rhabdoviridae*과, *Novirhabdovirus*속 에 속하는 바이러스로 single-stranded RNA virus이다. 크기는 180x70nm 정도이며 외막을 가진 탄환형의 virus이다. 11-12Kb의 nucleotide로 이루어져 있으며, 4 개의 구조단백질과 하나의 virion-associated polymerase 및 감염 세포에서만 발현 되는 non-virion protein으로 이루어져 있다(Lenoir & de Kinkelin, 1975; Walker et al., 2000; Tordo et al., 2005). VHSV의 genome은 nucleoprotein (N), polymerase-associated phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G), RNA-dependent RNA polymerase (L)과 non-virion protein인 NV로 이루어져있으며 3'-N-P-M-G-NV-L-5'의 순서로 배열되어 있다.(Schutze et al., 1996, 1999; Estepa et al., 1999; Tordo et al., 2005).

VHSV는 담수 연어과 어류뿐만 아니라 유럽과 북미 지역의 다양한 해산 어류에서 분리되고 있으며, 특히 넙치 양식이 많은 우리나라에서는 저수온기가 되면 VHSV에 의한 피해가 급증하고 있다. Viral hemorrhagic septicemia disease (VHSD)를 야기하는 VHSV는 양식어류는 물론 야생어류의 대량 폐사를 일으키는 주요 원인 중 하나로 알려져 있으며 저수온기에 넙치 치어뿐 아니라 성어에서도 높은 폐사를 일으킨다(Schlotfeldt & Ahne, 1988; Schlotfeldt et al., 1991; Mortensen et al., 1999; Isshiki et al., 2003; Skall et al., 2005).

Apoptosis(programmed cell death)는 손상된 세포를 제거함으로써 조직

의 분화와 기관의 발달에 중요한 역할을 한다(Jones, 2001; Grutter M.G., 2000). Apoptosis는 cell shrinkage, apoptotic body 형성과 chromatin의 condensation등의 형태학적인 특징을 지니고 있으며, (Duvall and Wyllie, 1986) DNA의 분절화가 발생하는 특징이 있다(Wyllie, 1981 Duvall and Wyllie, 1986 Arends et al., 1990). Apoptosis를 일으키는 pathway는 the extrinsic(death receptor) pathway 와 the intrinsic(mitochondrial) pathway 두 가지 경로가 존재한다(Igney and Krammer, 2002). Apoptosis의 과정에는 p53과 Caspase라는 효소가 중요한 위치를 차지하는데 p53(tumor suppressor protein)은 stress signal에 대해 세포의 성장을 정지시키거나 apoptosis를 유발하는 역할을 통하여 손상되거나 추후 다른 세포에 위험을 줄 가능성이 있는 세포를 제거하는 역할을 한다(Gottlieb TM, and Oren M.,1996). Caspase는 apoptosis의 두 경로 모두에서 중요한 역할을 하며, apoptosis의 초기, 수행 그리고 조절까지 하는 중요한 요소이다(Earnshaw, W. C., et al, 1999; Huang H, Joazeiro CA, Bonfoco E, et al., 2000; Yasuyuki S. 2001).

Apoptosis는 virus감염에 대한 숙주 세포의 방어기작이며, 세포는 apoptosis를 통하여 virus의 infection cycle을 억제하고 주위 세포로 virus가 전파되는 것을 막는다(Haichen Song, 2003). 이전의 연구에서 bovine herpes virus (Hanon et al., 1998a) measles virus (MV) (Esolen et al., 1995), influenza virus (Mori et al., 1995), feline panleukopenia virus (Ikeda et al., 1998), bovine viral diarrhoea virus (Zhang et al.,1996), infectious bursal disease virus (Vasconcelos and Lam, 1994), African swine fever virus (Oura et al.,1998), human immunodeficiency virus type 1 (Herbein et al., 1998)C등이 apoptosis를 유발 한다고 보고되어 있다. 일반적으로 virus에 감염된 세포는 Type 1 interferon 활성화와

apoptosis를 유도하여 세포내의 viral replication을 억제하거나 innate immunity가 일어나게 되지만 몇몇 virus들은 virus의 replication이 충분히 일어날 때 까지 apoptosis를 지연시키거나 억제하도록 하여 virus에 대한 숙주의 방어기작인 apoptosis를 virus에게 유리하게 이용하기도 한다 (Roulston A., 1999). Human papillomavirus, Hepatitis B virus, Baculovirus, Poxvirus, Adenovirus는 apoptosis를 조절하는 단백질을 encoding하여 apoptosis를 virus에게 유리하도록 이용한다.(Benedict, C. A.,2002 ;Hay, B. A. ,2000; Deveraux, Q. L., Reed, J. C.,1999; Beidler, D. R., Te et al, 1995; Windheim, M., et al., 2004; Tollefson, A. E.et al., 1998; Shisler, J., Yang. et al., 1997; Stewart, A. R. et al., 1995).

어류에 감염되는 *Rhabdoviridae*과의 spring viremia of carp virus (SVCV)와 VHSV또한 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다 (BjoÈrklund, H. V, 1997). *Novirhabdoviruses*과에 존재하는 NV단백질은 초기 apoptosis와 숙주의 IFN system을 억제하는 기능을 가지며 (Ammayappan, A et al., 2011; Choi, M.K. et al., 2011),이를 통하여 숙주의 방어기작을 극복하는 것으로 보인다. 하지만 어류에 감염성을 가진 VHSV induced apoptosis에 대해서는 연구가 많이 되어있지 않으므로 연구가 필요하다.

과거에는 어류의 바이러스 질병을 예방하기 위한 백신으로 불활화 백신, 약독화 백신 , 재조합 단백질 백신 등 DNA백신들이 사용되어 왔다 (Gomez-Casado E, 2011). 최근에는 유전자를 조작하여 생산하는 recombinant vaccine이 많이 만들어지고 있는 추세이며, 어류에서는 reverse genetics system을 이용하여 재조합 VHSV, Snakehead rhabdovirus (SHRV), Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)를 제작하고 이를 백신으로 사용하기 위한 연구 논문들이 발표되어 있다

(Johnson et al., 2000; Biacchesi et al., 2000, 2002, 2010; Ammayappan et al., 2010a,b). 본 연구실에서도 reverse genetics system을 기본으로 하는 T7 RNAP 발현 시스템을 이용하여 VHSV의 NV 유전자가 knockout된 NV 유전자가 knock-out된 재조합 VHSV를 제작하여 그 특성과 생약독화 백신으로서의 효과를 확인한 바 있으며, 이 recombinant virus(rVHSV- Δ NV-eGFP)는 초기 apoptosis를 억제하는 역할을 하는 NV 유전자 대신 enhanced green fluorescent protein(eGFP) gene를 가지고 있다(Kim et al., 2011; Kim & kim, 2011). 그러나 최근에 제작되고 있는 reverse genetics system을 이용한 virus vaccine의 경우, 이전의 백신들에 비하여 면역원성의 오랜 지속과 숙주에게 해가 없다는 장점이 있지만(Christopher C. et al, 2014) titer가 낮아 효율적인 생산과 실용성에 문제가 있다. 본 실험실에서 제작한 rVHSV- Δ NV-eGFP 또한 EPC cell에서의 replication 효율이 wild type VHSV보다 낮음이 확인되었다(Kim et al., 2011). 그러므로 adjuvant나 다른 방법을 통하여 이러한 문제점을 해결하는 것이 중요하다.

본 실험에서는 전반적인 Caspase에 작용하는 inhibitor인 Z-VAD (OMe)-FMK와 p53-mediated apoptosis와 p53-dependent gene transcription을 가역적으로 억제하는 Pifithrin- α 를 이용하여, 숙주세포의 apoptosis억제를 통하여 최근에 많이 만들어지고 있는 reverse genetics system을 통하여 생산된 recombinant virus 백신의 titer를 높일 수 있는 가능성을 확인해보고자 한다. 또한 인위적인 apoptosis의 억제가 VHSV와 rVHSV- Δ NV-eGFP의 replication에 대해 미치는 영향과 VHSV가 유도하는 apoptosis에 대한 연구가 많이 이루어져 있지 않으므로, 이번실험을 통하여 VHSV가 p53 mediated apoptosis를 유발하는지 알아보려고 한다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 및 바이러스

실험에 사용된 세포인 *Epithelioma papulosum cyprini*(EPC) cell은 MycoZap™ Antibiotics(Lonza)(200 μ l/100ml)와 10% fetal Bovine Serum (FBS, BI)이 첨가된 Leibovitz medium (L-15, Sigma)을 이용하여 28℃에서 배양하였다.

실험에 사용한 바이러스인 *viral hemorrhagic septicemia virus*(VHSV)는 2008년 VHS 질병이 발병한 경남 소재 넙치 양식장에서 병든 넙치로부터 분리한 VHSV KJ2008 strain을 사용하였다.

실험에 사용된 rVHSV- Δ NV-eGFP는 이미 본 실험실에서 만들어져 있는 stock을 사용하였으며, 이 rVHSV- Δ NV-eGFP는 VHSV의 NV gene 대신에 eGFP(Enhanced Green fluorescent protein)을 삽입하여 만든 recombinant virus이다. 이 바이러스의 sequence는 recombinant virus를 만들기 위하여 인위적으로 만들어준 enzyme site 몇 부분의 nucleotide만 다르며, 전체의 sequence는 VHSV KJ2008 strain(wild type)과 동일하다.

이들 바이러스는 각각 15℃에서 2% FBS와 penicillin (100U/ml), streptomycin (100 μ g/ml)가 첨가된 L-15배지를 첨가한 EPC cell에 접종하였으며, 접종 후 광범위하게 cytopathic effect (CPE)가 나타났을 때 4℃에서 10분간 4000 g로 원심분리 한 후, 상층액을 모아 -80℃에 보관하였으며 추후 실험에 사용하였다.

2. Inhibitors

실험에 사용한 시약은 p53 inhibitor인 Pifithrin- α (CAS 63208-82-2, PFT- α ; 1-(4-Methylphenyl)-2-(4,5,6,7-tetrahydro-2-imino-3(2H)-benzothiazolyl)ethanone hydrobromide, Santa Cruz)과 Pan-Capase inhibitor인 Z-VAD(OMe)-FMK (CAS 187389-52-2, Methyl 5-fluoro-3-[2-[[[3-methyl-2-(phenylmethoxycarbonylamino) butanoyl]amino]propanoylamino]-4-oxopentanoate, Santa Cruz)을 Santa Cruz에서 구입하여 사용하였다. 각각의 시약은 DMSO에 녹여 20mM의 stock solution을 만든 후, -20°C 에 보관하며 실험에 사용하였다. Pifithrin- α , Z-VAD(OMe)-FMK는 20mM의 stock solution을 L-15배지로 희석하여 EPC cell에 각각의 농도로 처리하였다.

3. 시간에 따른 DNA fragmentation의 정도 확인

VHSV에 감염된 EPC cell의 시간에 따른 DNA fragmentation의 변화를 알기위하여 실험을 하였다.

EPC cell을 35dish에 1×10^6 cells을 10% fetal Bovine Serum (FBS, BZ)이 첨가된 Leibovitz medium (L-15, Sigma)를 이용하여 28°C 에서 배양한 후, 다음 날, 20°C 로 옮기고, 그 다음날, 15°C 로 옮겨주어 순차적으로 EPC cell의 온도를 순차시키며 낮추어 주었다. 15°C 로 옮긴 EPC cell은 실험하기 직전, PBS로 한번 washing 하여, 2% FBS와 MycoZap™ Antibiotics(Lonza)($2\mu\text{l}$

/ml)가 첨가된 L-15배지로 바꾸어 주었다. 그리고 wild-type VHSV MOI 0.1로 접종하여 15°C에 배양한다. 배지와 virus 희석액의 총 량이 2ml이 되도록 하여 접종하였다. Virus를 접종한 후, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 42시간, 48시간, 54시간, 60시간, 66시간, 72시간째에 상층액에 떠있는 cell과 아직 35dish에 붙어있는 cell을 모아 PBS로 2번 washing 하고 genomic DNA를 분리 하였다. Genomic DNA 분리에는 geneall clinic kit를 이용하여 분리하였고, 각각 cell들의 genomic DNA양을 측정하고 일정한 양으로 1.5% agarose gel에 50v로 로딩 하였다.

4. Inhibitor를 이용하여 EPC cell의 apoptosis 억제

가. cell culture

6-well plate에 EPC cell, 1×10^6 cells을 MycoZap™ Antibiotics(Lonza)(2 μ l/ml)와 10% fetal Bovine Serum (FBS, BZ)이 첨가된 Leibovitz medium (L-15, Sigma)를 이용하여 28°C에서 하루 동안 monolayer로 배양한 후, 다음 날, 20°C, 15°C로 옮겨주어 순차적으로 EPC cell의 온도를 순차시키며 낮추어 주었다. EPC cell은 실험하기 직전에, PBS로 한번 washing 하여, 2% FBS와 MycoZap™ Antibiotics(Lonza)(200 μ l/100ml)가 첨가된 L-15배지로 바꾸어 주었다.

나. The concentration of drugs

EPC cell에 적절한 시약의 농도를 알아내기 위하여, Pifithrin- α 는 well 당 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M의 농도를 사용하였고, Z-VAD(OMe)-FMK는 well당 5 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 50 μ M의 농도를 사용하였다. 위의 방법대로 배양한 EPC cell을 15 $^{\circ}$ C까지 온도를 순차 시킨 후, Pifithrin- α 와 Z-VAD(OMe)-FMK를 well당 각각의 농도로 접종하고 2시간동안 incubation 한 후, wild-type VHSV을 MOI 0.1로 접종 하였다. 15 $^{\circ}$ C에서 배양하며, 1일, 2일, 3일까지 CPE를 관찰하고, 3일째 genomic DNA를 분리 하여, PBS로 2번 washing 한 후, genomic DNA분리(geneall clinic kit) 하였다. 각각 cell들의 genomic DNA양을 측정하여 일정한 양으로 1.5% agarose gel에 50v로 두 시간 동안 로딩 하였다.

다. Inhibitor 처리

앞의 실험에서 Pifithrin- α , Z-VAD(OMe)-FMK의 농도 실험을 토대로, 각각의 시약은 DMSO를 이용하여 희석 한 20mM stock을 사용하였다. 2% FBS와 MycoZapTM Antibiotics(Lonza)(2 μ l/ml)가 첨가된 L-15배지로 각각 희석한 후 well 당 10 μ M, 30 μ M, 50 μ M을 최종농도가 되도록 well에 접종 한 후 15 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 incubation 시켰다. 시약을 희석한 DMSO의 well당 최고 농도는 1%가 넘지 않게 설정하였다. 그리고 시약을 희석한 최고농도인 1% DMSO를 처리한 EPC cell과 시약과 DMSO 아무것도 처리 하지 않은 EPC cell을 각각 control group으로 설정하였다. (figure.1, figure.2)

라. Virus 접종

Pifithrin- α 와 Z-VAD(OMe)-FMK 을 농도별로 처리한 후, 15°C에서 2시간 동안 incubation 시킨다. 배지는 따로 갈아주지 않고, inhibitor가 처리된 상태의 cell에 wild-type VHSV와 Δ NV-eGFP recombinant VHSV을 각각 MOI 0.1(100 μ l)로 접종한다. virus를 접종한 EPC cell은 다시 15°C에서 배양한다.

마. DNA fragmentation laddering

Inhibitor처리후 wild-type VHSV와 Δ NV-eGFP recombinant VHSV을 각각 접종하고, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간 후에 EPC cell의 CPE를 관찰한다.

그리고 well의 상층액을 모아 4000rpm, 10분 원심분리 한 후, 상층액에 떠 있는 cell과 상층액을 분리 하였다. 상층액은 -80°C에 보관하여 추후 titer를 확인하기 위한 실험에 사용하였다. 그리고 아직 well에 붙어있는 cell은 trypsin-EDTA(gibco)으로 cell을 떼어내어 상층액에 있던 cell과 함께 모아 PBS로 2번 washing 하였다. genomic DNA 분리에는 ExgeneTM clinic SV kit (Geneall)를 이용하여 분리하였고, cell들의 genomic DNA양을 측정하여 일정한 양으로 1.5% agarose gel에 50v로 로딩 하였다.

바. 시간별 titer 측정

시간별로 분리하여 -80°C에 보관해 둔 상층액을 이용하여 plaque assay

를 수행하였다. Virus stock을 2% FBS와 MycoZap™ Antibiotics (Lonza)(200 μ l/100ml)가 첨가된 L-15배지로 10^{-3} 에서 10^{-6} 까지 단계 희석하여 15 $^{\circ}$ C까지 온도를 순차한 EPC cell (1.5×10^6 cells)에 접종하였다. 15 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 incubation 한 후, 배지를 제거하고 0.7% agarose, 10% FBS와 1%의 Antibiotics가 들어간 L-15배지로 갈아 주고 15 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 7일 후, 세포를 10% formalin을 이용하여 고정한 후, 세포 위의 plaque medium을 제거하고 10% crystalviolet으로 2시간동안 실온에서 염색하였다. 염색액을 제거하고 증류수로 세포를 수세한 후, plaque-forming units (PFU)를 산출하였다.



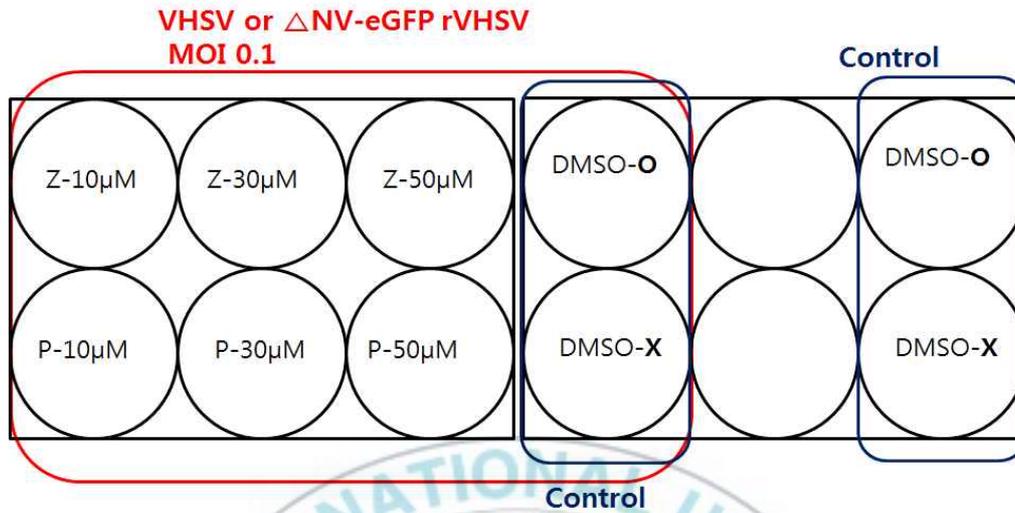


Figure 1. Inhibitors treatment and virus inoculation.

This figure showed how to treat inhibitors and inoculation of each virus. rVHSV- Δ NV-eGFP and VHSV was inoculated into each cell which was pre-treated each concentration Pifithrin- α or Z-VAD(OMe)-FMK. DMSO treated or not used control of inhibitors.

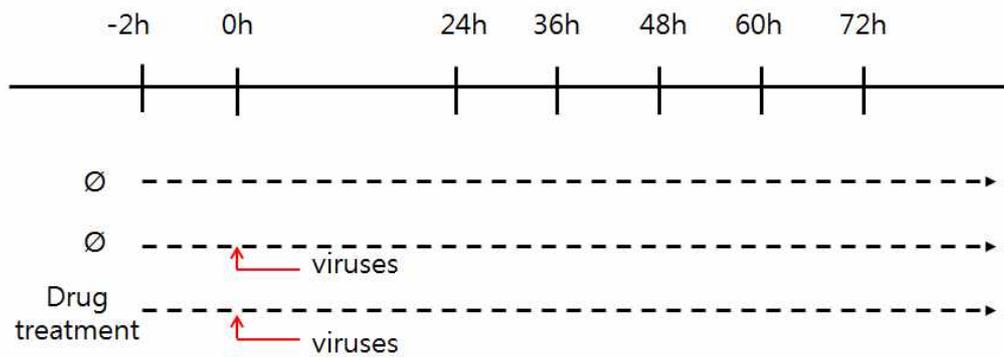
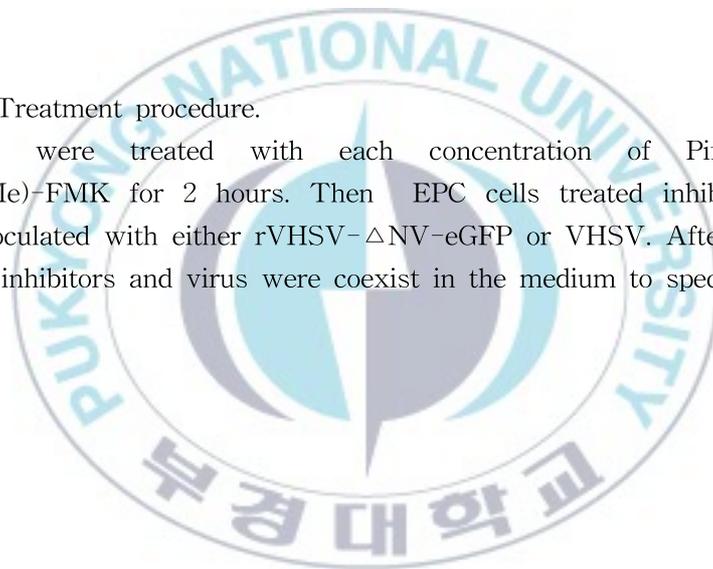


Figure 2. Treatment procedure.

CPE cells were treated with each concentration of Pifithrin- α or Z-VAD(OMe)-FMK for 2 hours. Then EPC cells treated inhibitors except controls inoculated with either rVHSV- Δ NV-eGFP or VHSV. After inoculation of viruses, inhibitors and virus were coexist in the medium to specific time.



5. Inhibitor의 지속효과와 최종 titer 확인

가. Inhibitor 처리와 virus 접종

EPC cell을 (4-가)의 방법으로 배양 하고, Pifithrin- α 와 Z-VAD(OMe)-FMK을 각각 $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ 을 최종농도가 되도록 well에 처리한 후 15°C 에서 2시간동안 incubation 시키고 (4-라)의 방법으로 wild-type VHSV와 $\Delta\text{NV-eGFP}$ recombinant VHSV을 각각 MOI 0.1로 접종하여 15°C 에 배양하였으며, 3개의 반복구를 두어 실험 하였다. 주기적으로 cell을 관찰하고, 농도별로 CPE가 완전히 나타났을 때, 바이러스 상층액을 모아 4000rpm, 10분 원심분리를 한 후, 상층액은 -80°C 에 보관 하였다.

나. titer 측정

CPE가 완전히 나타났을 때, 분리하여 보관해 둔 상층액을 이용하여 plaque assay를 수행하였다. Virus stock을 2% FBS와 MycoZap™ Antibiotics (Lonza)($2\mu\text{l}/\text{ml}$)가 첨가된 L-15배지로 10^{-4} 에서 10^{-6} 까지 단계 희석하여 EPC cell(1.5×10^6 cells)에 접종하고 (4-바)의 방법으로 titer 측정 하였다.

6. EPC cell의 p53과 MDM2 유전자 Complete ORF 확인

가. EPC cell의 p53과 MDM2의 partial cDNA

EPC cell의 p53유전자와 MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) 유전자의 sequence를 확인하기 위해서 EPC cell에서 RNeasy Plus kit(Qiagen)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. 분리한 total RNA 1 μ g과 0.5 μ l Random hexamer (0.5 μ g/ml, Promega)을 80 $^{\circ}$ C 5분간 반응한 후 다시 10mM dNTP 2 μ l (Takara), M-MLV reverse transcriptase 0.5 μ l(Promega), RNase inhibitor 0.25 μ l(Promega)를 포함하여 42 $^{\circ}$ C에서 60분, 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하여 최종적으로 10 μ l의 cDNA를 합성하였다.

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 의 GenBank에 등록되어 있는 *Gobiocypris rarus* (KC477763.1) partial, *Danio rerio*(U60804.1), *Salmo salar* (BT058777.1)의 cDNA sequence를 서로 비교하여 p53 degenerated primer를 제작하였고, *Danio rerio* (AF010255.1), *Callorhinchus milii* (JN794076.1), *Gobiocypris rarus* (TF KC477761.1)의 cDNA sequence를 서로 비교하여 MDM2 degenerated primer를 제작하였다. (Table 1-1)

10배 희석한 cDNA를 template로 사용하고, p53과 MDM2의 degenerated primer를 이용하여 RT-PCR를 수행하였다. 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 1cycle, 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초씩 35cycle 한 후 72 $^{\circ}$ C에서 7분 annealing의 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 Nucleic acid stain (Korealabtech)이 포함된 1% agarose gel에 전기영동하

였다. Gel Purification kit (GeneAll)를 사용하여 DNA를 분리한 후, DNA를 pGEM-T easy vector (Promega)에 cloning하여 ABI PRISM 3730XL Analyzer (Applied Biosystems)을 이용해 sequence를 분석하였다.

나. RACE PCR

p53 과 MDM2의 전체 sequence를 알기위하여 RACE PCR을 수행하였다. PCR을 통하여 확인한 EPC cell의 일부 p53 sequence와 MDM2 sequence를 이용하여 5'과 3' RACE primer를 제작하였다(Tabel 1-2).

EPC cell에서 분리한 Total RNA 1 μ g을 SMART RACE cDNA Amplication kit(Clontech)을 이용하여 RACE 용 5' 과 3' cDNA를 제작하여 RACE-PCR를 수행하였다. RACE-PCR를 한 PCR product는 Nucleic acid stain (Korealabtech)이 포함된 1% agarose gel에 전기영동 하였다. Gel Purification kit (GeneAll)를 사용하여 DNA를 분리한 후, DNA를 pGEM-T easy vector (Promega)에 cloning하여 ABI PRISM 3730XL Analyzer (Applied Biosystems)을 이용해 sequence를 분석하였다.

7. VHSV 감염과 Pifithrin- α 처리시 p53과 MDM2의 발현 확인

Pifithrin- α 처리시 MDM2의 발현감소 확인과 VHSV 감염시 p53과 MDM2의 발현 정도를 비교하기 위한 실험을 수행하였다.

35dish에 EPC cell(1×10^6 cells)을 하루 동안 28°C에서 monolayer로 배양한 후, 15°C까지 EPC cell의 온도를 순차시키며 낮추어 주었다. EPC cell은 실험하기 직전에, PBS로 한번 washing 하여, 2% FBS와 MycoZap™ Antibiotics (Lonza)($200 \mu\text{l}/100\text{ml}$)가 첨가된 L-15배지로 바꾸어 주었다.

Pifithrin- α 의 처리와 VHSV 감염을 시키지 않은 EPC cell을 control로 사용하였다. 또한 EPC cell VHSV MOI 0.1을 감염시킨 cell과 Pifithrin- α 를 처리한 cell을 실험 구로 사용하였다. Pifithrin- α 가 VHSV 감염시에도 p53 관련 유전자를 억제하는지 알아보기 위하여 Pifithrin- α 를 처리하고 2시간 후에 VHSV를 접종하고 15°C에서 배양 하였다. 감염 12시간, 24시간 후에 RNeasy Plus kit(Qiagen)를 사용하여 EPC cell의 total RNA를 분리 하였다.

(5-가)와 같은 방법으로 합성한 cDNA를 template로 하여 RT-PCR를 수행하고 p53과 MDM2의 발현을 확인하였다. PCR 조건은 95°C에서 3분간 1 cycle, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 24 cycles (β -actin) 또는 26 cycles (p53 gene), 27cycles(MDM2 gene) 한 후 72°C에서 7분간 annealing을 하였다. PCR 산물은 Nucleic acid stain (Korealabtech)을 포함한 1% agarose gel에 전기영동으로 확인하였다.

Table 1. Summary of primer used in this Study

1-1. Degenerated primers for p53 and MDM2

Name of primer		Sequence (5' to 3')
EPC p53 gene	F	CCCCTCACCTGCAGSGTA
	R	GAACAGCCTCAGCCRTCCAC
EPC MDM2 gene	F	AARCTGGTRAGACCRAAGGT
	R	GCASACYGGRCACARYTTGTTCC

1-2. RACE PCR and detection primer

Name of primer		Sequence (5' to 3')
EPC p53 3' RACE	F	ATGTGACGTAGACAAGTACCGGCAGAAAATC
	R	CATCACTGCTGGCGCTCAGCTTTGCCTTC
EPC p53 5' RACE	F	CCCCACCGACCTCCACTGTCCCAATTGCCAC
	R	CATGGTCGCCAGGATAATCGGTGGCAATTG
EPC MDM2 3' RACE	F	GAGCTCACCAGCATCACCACAACAACCATCT
	R	CAAGTGTAACACGCCATAAAGG
EPC MDM2 5' RACE	F	GGCTGTTAGAGGATGCAGGTGCAG
	R	TCACTCCAAGAACAGCACCAAGAGCATCCTC
EPC p53 detection (471-983)	F	TCATCTGATCCGAGTGGAAGGA
	R	ACGACGTCGGAGAGTTCTAAC
EPC MDM2 detection (780-1355)	F	GAAGACTCGTTTGTGAGGATACT
	R	CAAGTGTAACACGCCATAAAGGTG
EPC β -actin	F	AAGGAGAAGCTCTGCTATGTGGCT
	R	AAGGTGGTCTCATGGATACCGCAA

Ⅲ. 결 과

1. VHSV 감염에 의한 DNA fragmentation 양상

EPC cell이 wild type VHSV에 감염된 후, DNA fragmentation의 변화를 관찰하였다. EPC cell에 wild type VHSV MOI 0.1로 감염 시킨 후, 시간대 별로 genomic DNA를 분리하여 1.5% agarose gel에 50v로 두 시간 동안 로딩 하였다. Virus 감염 후, 24시간 이내에는 아무런 변화도 확인할 수 없었지만 30시간 이후부터 연하게 DNA fragmentation의 양상이 나타나기 시작하였으며 시간에 따라 세포내의 DNA가 잘려 분절화 되어 나타나는 200bp 정도의 작은 밴드가 점점 많아지는 것을 확인 할 수 있다. 시간에 따라 fragmentation된 DNA양이 많아지면서 laddering의 패턴은 진해지고 제일 위쪽에서 나타나는 genomic DNA의 양이 상대적으로 감소하는 것을 알 수 있다. (Figure 3.)



Figure 3. Time course of DNA fragmentation by VHSV in EPC cells as assessed by agarose gel electrophoresis. **Lane 1-13:** DNA of EPC cell 0, 6, 12, 18, 24, 36, 42, 48, 54, 60, 66 and 72 hours post-infection, **M:** DNA marker (Geneall, 1Kb)

2. The concentration of inhibitors

Inhibitor 실험에서 사용될 농도구를 정하기 위하여 p53 inhibitor인 Pifithrin- α 와 pan- caspase inhibitor인 Z-VAD(OMe)-FMK를 각각 농도 별로 전처리하고 VHSV MOI 0.1로 감염시켜 72시간 후에 genomic DNA 를 분리하여 비교하였다.

Z-VAD(OMe)-FMK와 Pifithrin- α 를 처리한 group 모두 inhibitor를 처리하지 않고 VHSV만 접종한 control 그룹에 비해서 DNA fragmentation 의 양상이 상대적으로 적게 나타났으며, inhibitor의 농도가 높아질수록 laddering의 양상이 더 적은 것을 알 수 있다. 이를 통하여, pan- caspase inhibitor인 Z-VAD(OMe)-FMK의 농도구는 10 μ M, 30 μ M, 50 μ M로 정하였고, p53 inhibitor인 Pifithrin- α 는 10 μ M, 30 μ M, 50 μ M의 농도구를 사용하였다. (Figure 4.)

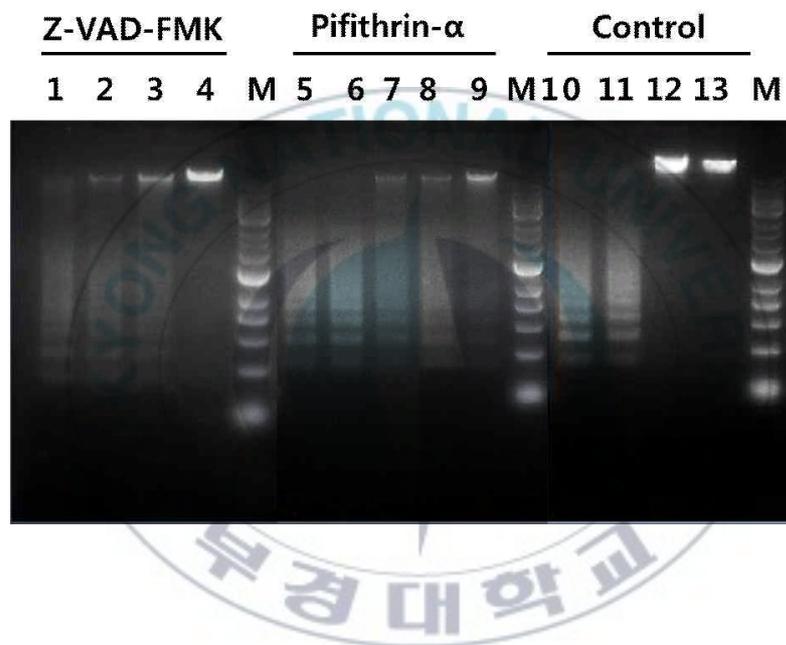


Figure 4. Confirmation of adequate concentration of Z-VAD(OMe)-FMK and Pifithrin- α .

EPC cells were treated with various concentrations of Pifithrin- α or Z-VAD(OMe)-FMK for 2 hours. Then EPC cell except controls inoculated with VHSV for 72h. genomic DNA was isolated from cell and analyzed in 1.5% agarose gel. **lane1-4:** VHSV infection with 5, 10, 30, 50 μ M of Z-VAD (OMe) -FMK treatment, **lane5-9:** VHSV infection with 3, 10, 30, 50, 100 μ M of Pifithrin- α treatment, **lane10:** VHSV infection with DMSO, **lane11:** VHSV infection , **lane12:** EPC cell with DMSO, **lane13:** EPC cell

3. Apoptosis 억제제 VHSV와 rVHSV- Δ NV-eGFP replication에 미치는 영향

가. CPE상에서 변화

Z-VAD(OMe)-FMK와 Pifithrin- α 가 각각 처리된 EPC cell에 VHSV와 rVHSV- Δ NV-eGFP를 각각 MOI 0.1로 감염시키고, 시간별로 genomic DNA를 분리하기 직전에 CPE를 확인하였다.

24시간 후, VHSV를 접종한 group은 virus를 접종하지 않은 group과 차이점이 나타나지 않았다. 36시간 이후부터 VHSV만 접종한 control cell은 점차 CPE를 관찰 할 수 있었고, Z-VAD(OMe)-FMK와 Pifithrin- α 가 각각 처리된 EPC cell에 VHSV를 감염시킨 group에서는 VHSV만 감염시킨 group에 비하여 CPE가 적게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 두 inhibitor의 농도가 낮아짐에 따라 CPE가 더 많이 나타났으며, 72시간째는 virus만 접종한 group은 90% 이상의 CPE가 나타난 반면, 두 inhibitor를 처리한 cell에서는 CPE가 inhibitor 농도에 따라 80-40% 정도로 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 inhibitor만 처리하여 둔 EPC cell에서는 virus와 inhibitor 아무것도 처리하지 않은 cell과 동일한 상태를 보였다. 같은 농도로 inhibitor처리 시 Z-VAD(OMe)-FMK를 처리하고 VHSV 감염시킨 cell이 Pifithrin- α 를 처리하고 VHSV를 감염시킨 cell보다 CPE가 적게 나타났다.

rVHSV- Δ NV-eGFP에 의한 CPE는 VHSV를 접종한 경우와 유사한 결과를 나타내었다. rVHSV- Δ NV-eGFP만 접종한 control group은

VHSV보다 CPE가 빨리 나타나는 것을 관찰하였으며, Z-VAD(OMe)-FMK, Pifithrin- α 을 처리한 cell의 CPE는 rVHSV- Δ NV-eGFP만 접종한 control cell에 비해 CPE가 느리게 나타남을 확인하였다. 또한 같은 농도로 inhibitor처리 시 Z-VAD(OMe)-FMK를 처리하고 VHSV감염시킨 cell이 Pifithrin- α 를 처리하고 VHSV를 감염시킨 cell보다 CPE가 적게 나타났다.



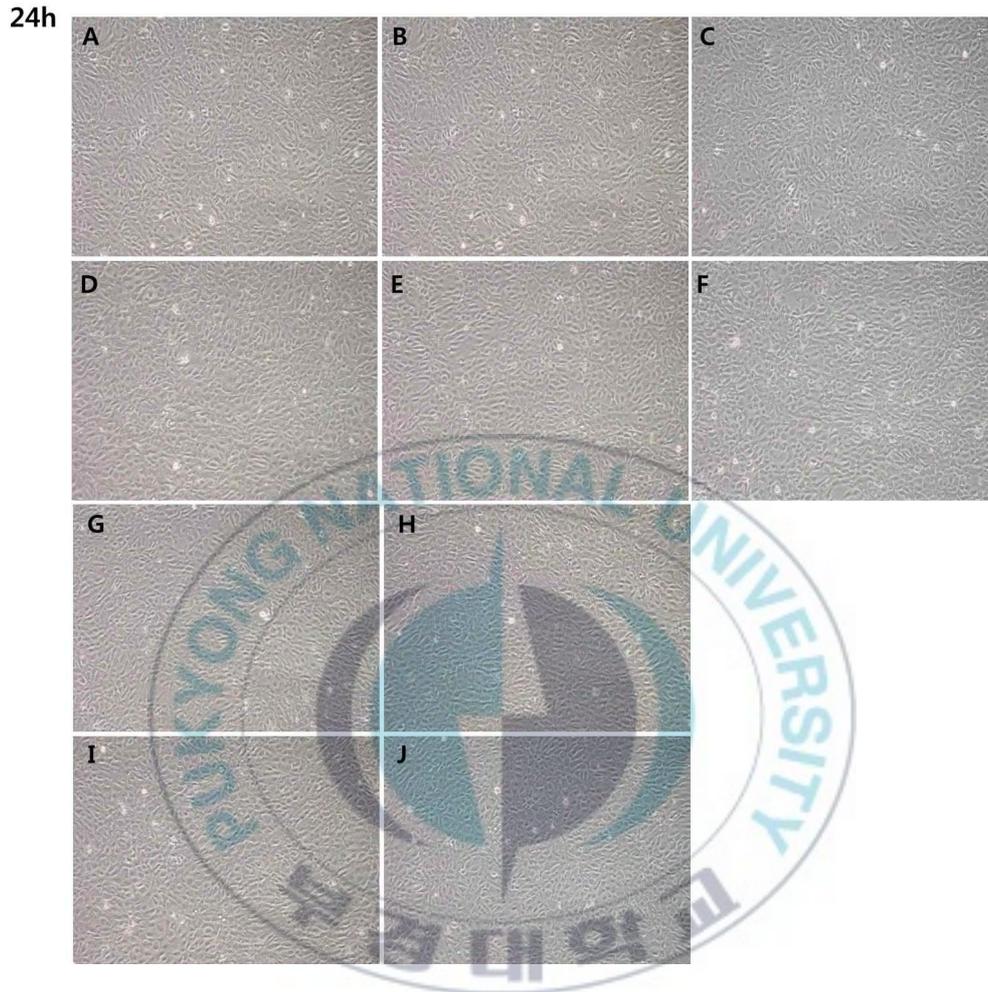


Figure 5-1. Cytopathic effect(CPE) induced by VHSV in *Epithelioma papulosum cyprini*(EPC)cells at various concentrations of inhibitor at 24hs post-infection.

A-C: VHSV infection with 10, 30 and 50 μM of Z-VAD(OMe)-FMK treatment, **D-F:** VHSV infection with 10, 30 and 50 μM of Pifithrin- α treatment, **G:** VHSV infection with DMSO, **H:** VHSV infection , **I:** EPC cell with DMSO, **J:** EPC cell

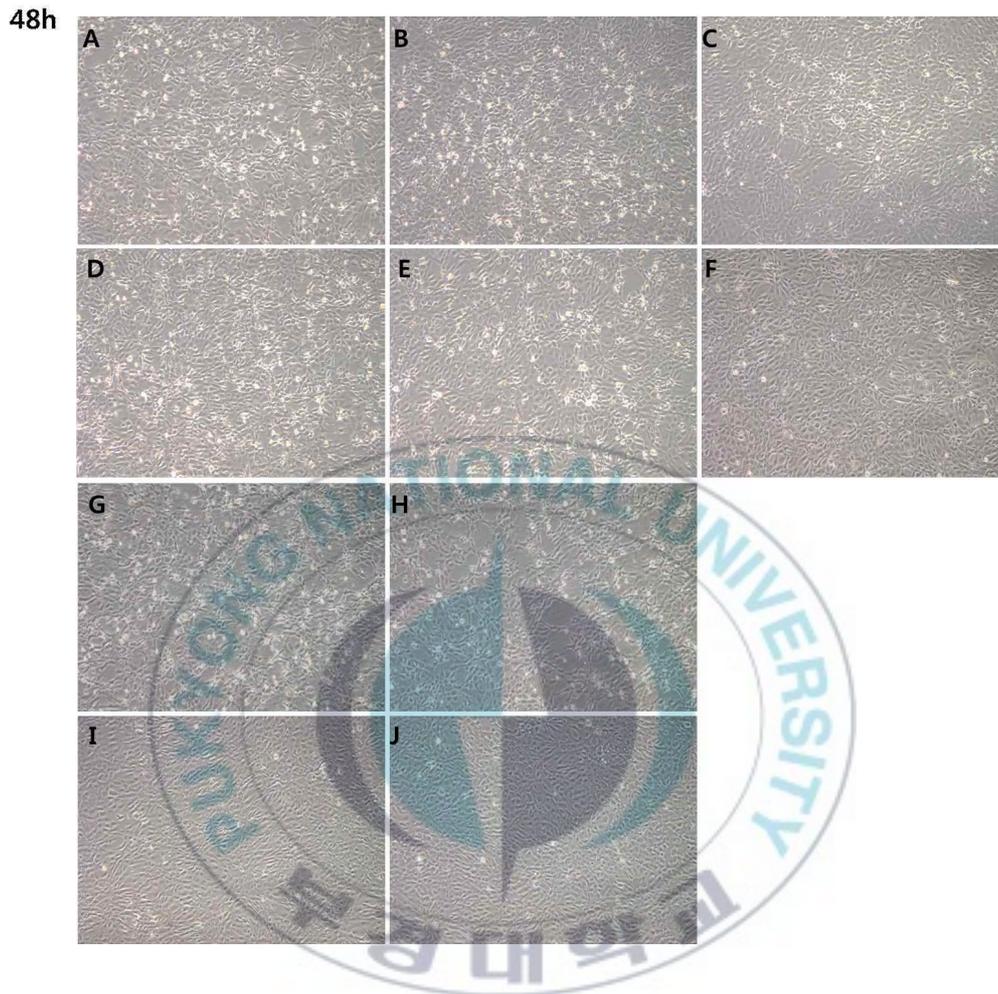


Figure 5-2. Cytopathic effect(CPE) induced by VHSV in *Epithelioma papulosum cyprini*(EPC)cells at various concentrations of inhibitor at 48hs post-infection.

A-C: VHSV infection with 10, 30 and 50 μ M of Z-VAD(OMe)-FMK treatment, **D-F:** VHSV infection with 10, 30 and 50 μ M of Pifithrin- α treatment, **G:** VHSV infection with DMSO, **H:** VHSV infection , **I:** EPC cell with DMSO, **J:** EPC cell

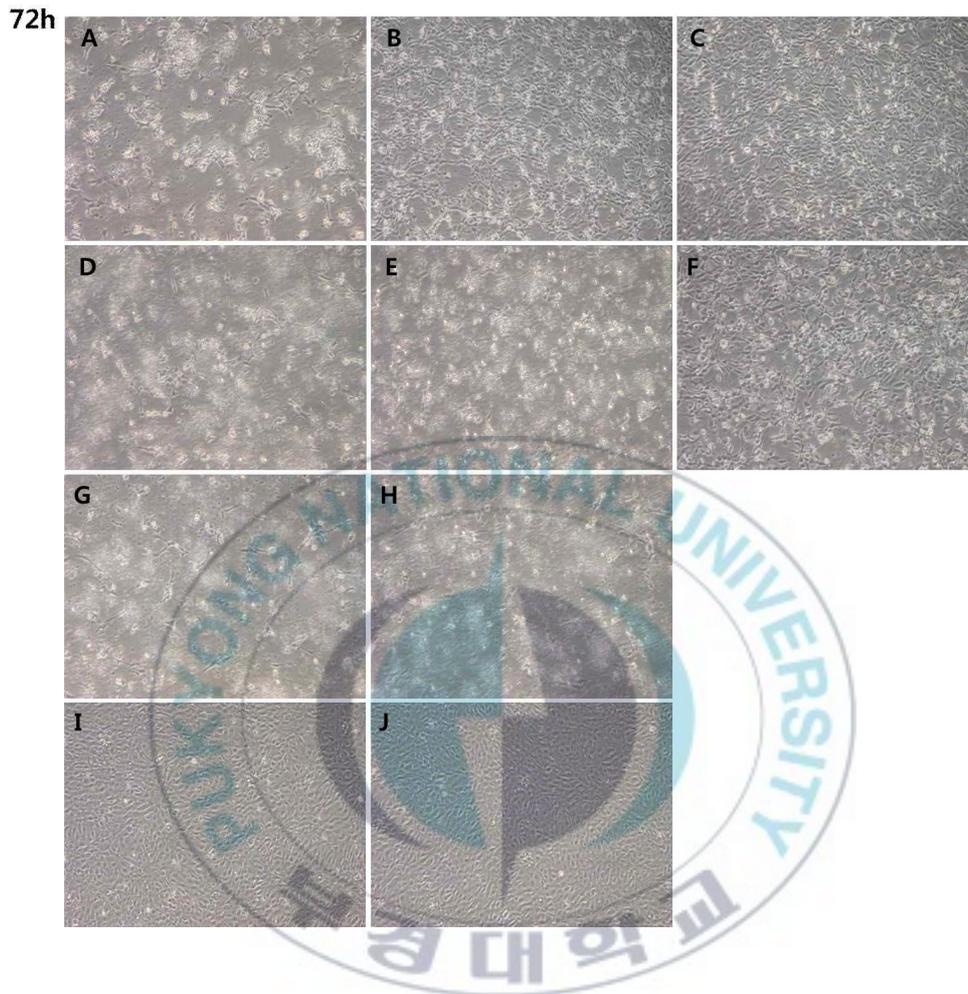


Figure 5-3. Cytopathic effect(CPE) induced by VHSV in *Epithelioma papulosum cyprini*(EPC)cells at various concentrations of inhibitor at 72hs post-infection.

A-C: VHSV infection with 10, 30 and 50 μ M of Z-VAD(OMe)-FMK treatment, **D-F:** VHSV infection with 10, 30 and 50 μ M of Pifithrin- α treatment, **G:** VHSV infection with DMSO, **H:** VHSV infection , **I:** EPC cell with DMSO, **J:** EPC cell

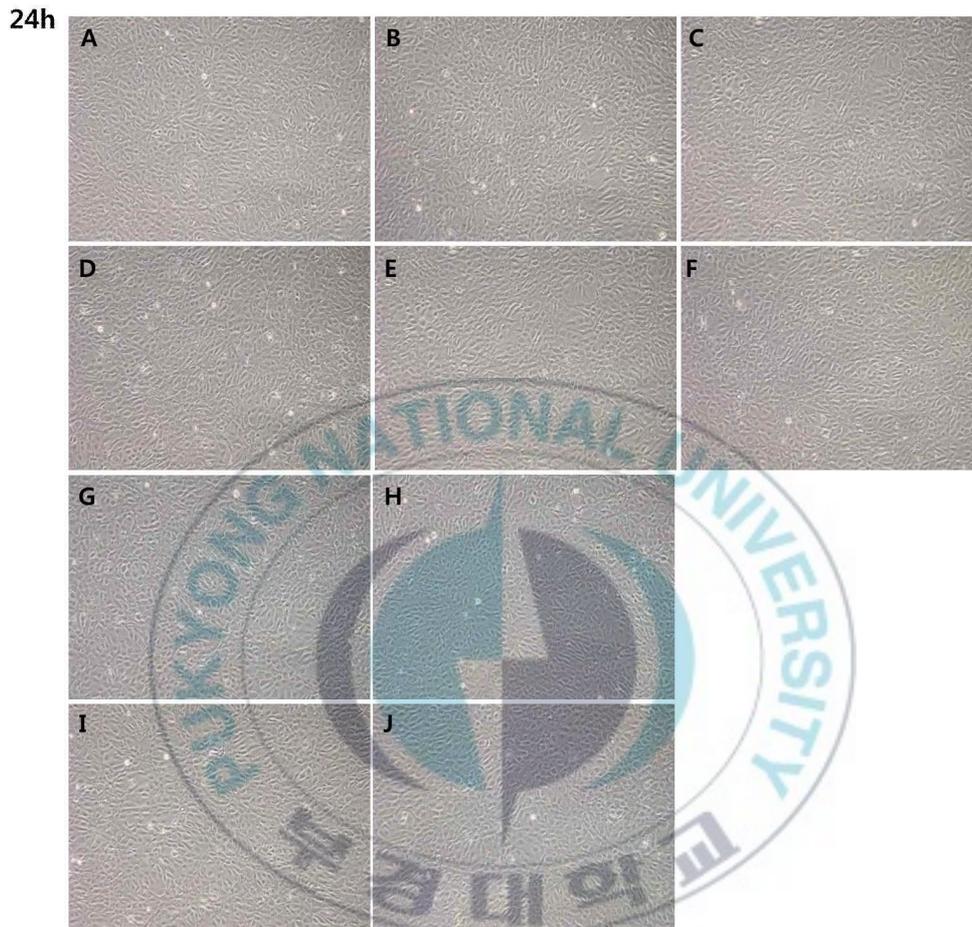


Figure 6-1. Cytopathic effect(CPE) induced by rVHSV- Δ NV-eGFP in *Epithelioma papulosum cyprini*(EPC)cells at various concentrations of inhibitor at 24hs post-infection.

A-C: rVHSV- Δ NV-eGFP infection with 10, 30 and 50 μ M of Z-VAD(OMe)-FMK treatment, **D-F:** rVHSV- Δ NV-eGFP infection with 10, 30 and 50 μ M of Pifithrin- α treatment, **G:** rVHSV- Δ NV-eGFP infection with DMSO, **H:** rVHSV- Δ NV-eGFP infection , **I:** EPC cell with DMSO, **J:** EPC cell

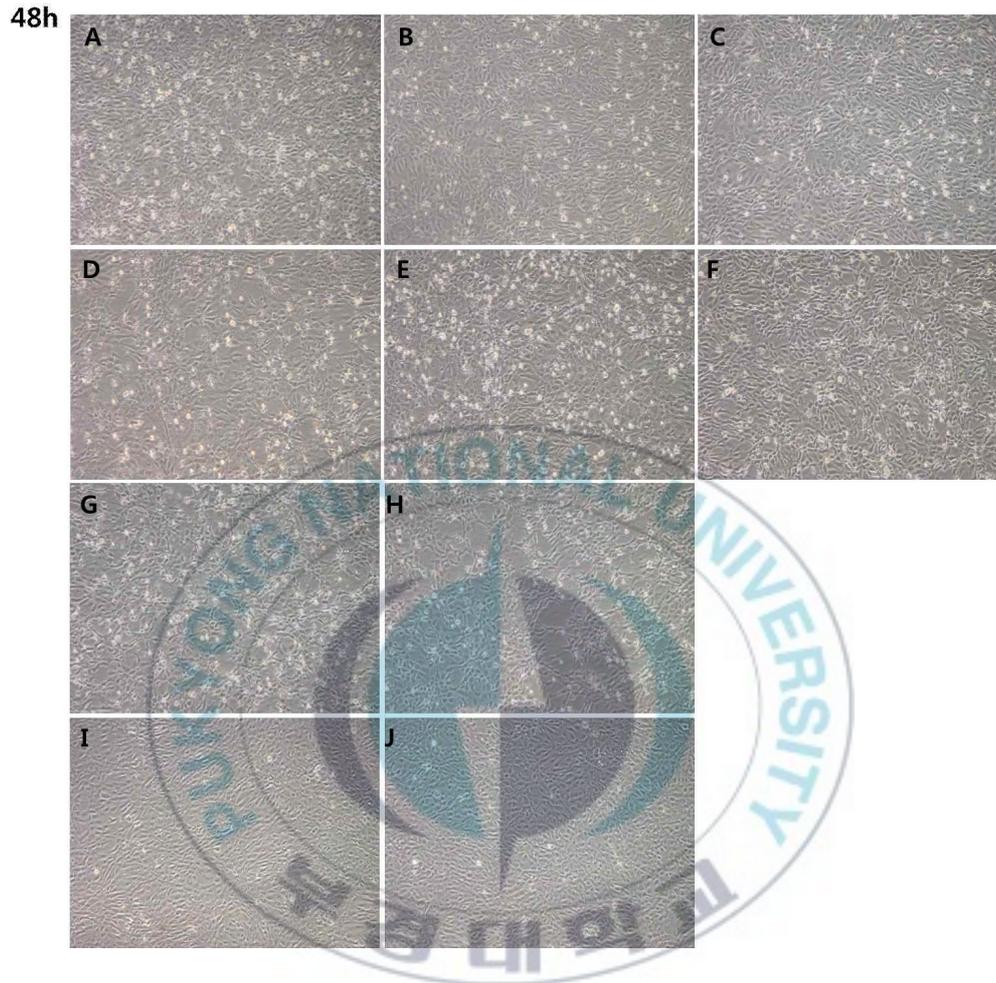


Figure 6-2. Cytopathic effect(CPE) induced by rVHSV- Δ NV-eGFP in *Epithelioma papulosum cyprini*(EPC)cells at various concentrations of inhibitor at 48hs post-infection.

A-C: rVHSV- Δ NV-eGFP infection with 10, 30 and 50 μ M of Z-VAD(OMe)-FMK treatment, **D-F:** rVHSV- Δ NV-eGFP infection with 10, 30 and 50 μ M of Pifithrin- α treatment, **G:** rVHSV- Δ NV-eGFP infection with DMSO, **H:** rVHSV- Δ NV-eGFP infection, **I:** EPC cell with DMSO, **J:** EPC cell

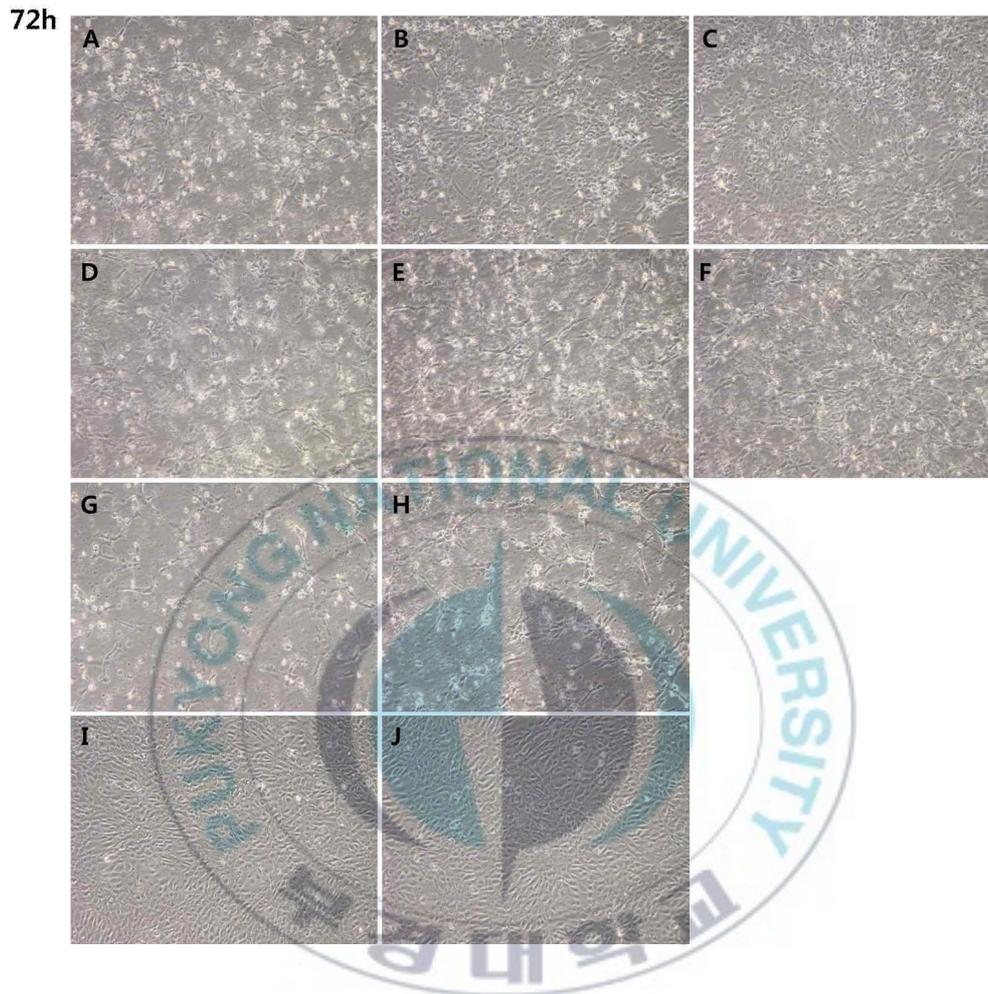


Figure 6-3. Cytopathic effect(CPE) induced by rVHSV- Δ NV-eGFP in *Epithelioma papulosum cyprini*(EPC)cells at various concentrations of inhibitor at 72hs post-infection.

A-C: rVHSV- Δ NV-eGFP infection with 10, 30 and 50 μ M of Z-VAD(OMe)-FMK treatment, **D-F:** rVHSV- Δ NV-eGFP infection with 10, 30 and 50 μ M of Pifithrin- α treatment,**G:** rVHSV- Δ NV-eGFP infection with DMSO, **H:** rVHSV- Δ NV-eGFP infection , **I:** EPC cell with DMSO, **J:** EPC cell

나. Genomic DNA상의 변화

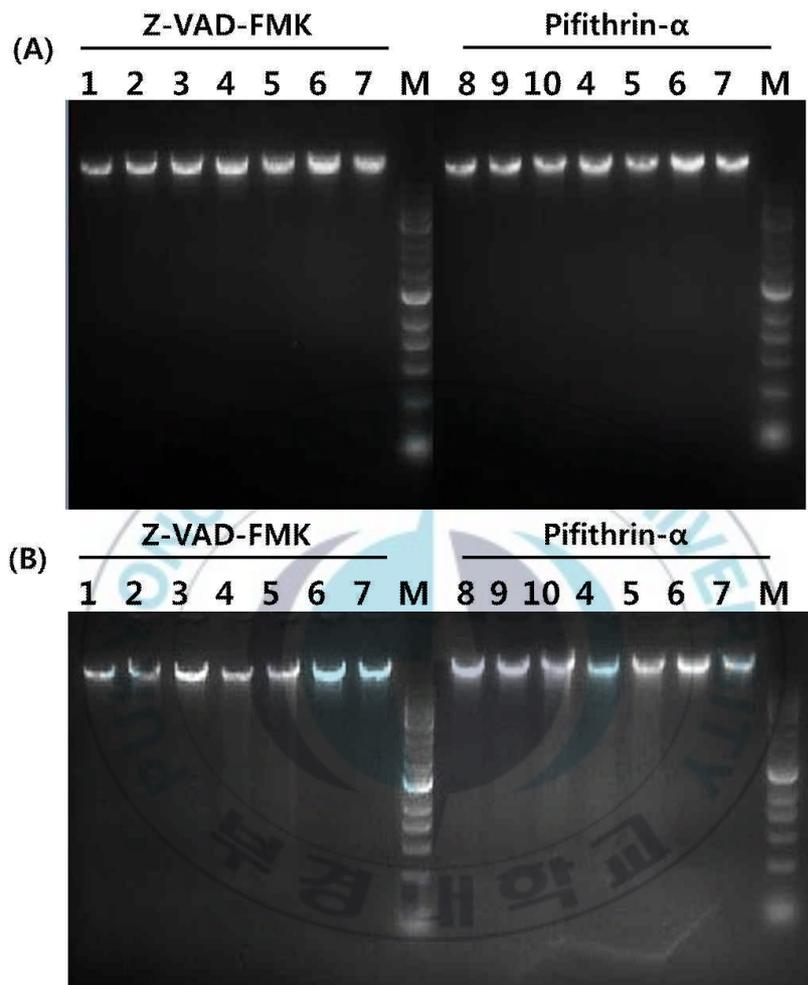
Z-VAD(OMe)-FMK와 Pifithrin- α 가 각각 처리된 EPC cell에 rVHSV- Δ NV-eGFP와 VHSV를 감염시키고 시간별로 DNA fragmentation의 패턴을 확인하였다.

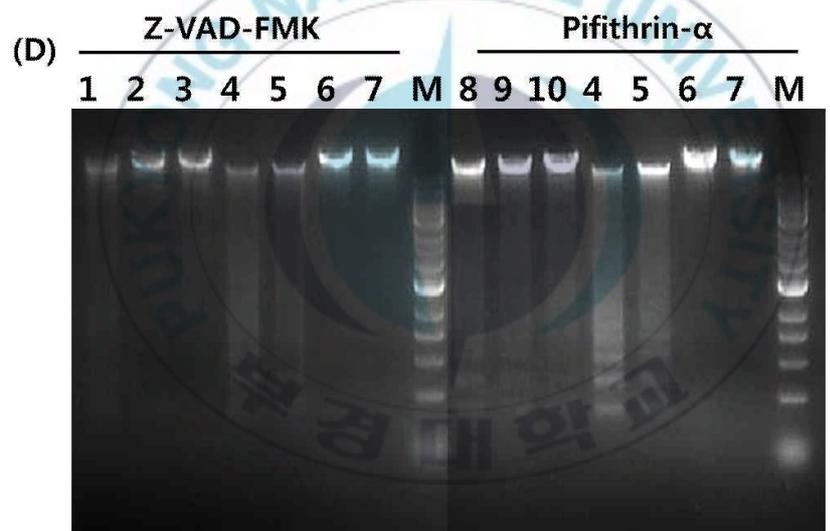
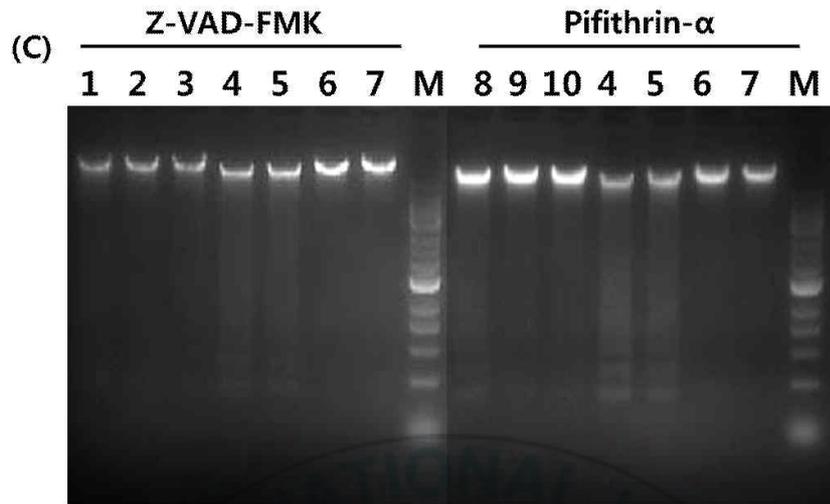
rVHSV- Δ NV-eGFP와 VHSV 모두 감염 24시간 후에는 genomic DNA상에서 아무런 변화를 관찰 할 수 없었다. 그러나 36시간 후에는 virus만 접종한 cell의 genomic DNA의 laddering 현상이 나타나기 시작하였다. Inhibitor를 처리한 cell의 genomic DNA의 경우 virus만 접종한 cell보다 분절화 현상이 더 적게 나타났다. 또한 두 종류의 inhibitor 모두 농도가 높아질수록 laddering 양상이 적게 나타났으며, 60시간, 72시간에서는 control cell의 DNA fragmentation의 패턴이 더 많이 나타남으로써 control과의 차이가 확연하게 나타났다. Z-VAD(OMe)-FMK와 Pifithrin- α 10 μ M을 처리하고 virus를 감염시킨 후 72째에 분리한 genomic DNA는 virus만 감염시킨 cell의 과 거의 비슷하게 나타났으며, 50 μ M을 처리한 group에서 제일 적은 DNA fragmentation을 관찰 할 수 있었다.

Z-VAD(OMe)-FMK와 Pifithrin- α 가 농도에 의한 차이는 있지만 모두 VHSV에 의한 초기 apoptosis를 지연시켜 주는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 같은 시간대에서 Z-VAD(OMe)-FMK와 Pifithrin- α 가 처리된 cell의 genomic DNA를 비교시 Caspase inhibitor인 Z-VAD (OMe)-FMK가 p53 inhibitor를 처리한 cell의 genomic DNA보다 laddering의 패턴이 더 적게 나타났다. DNA fragmentation상에서 Pifithrin- α 는 36시간째부터 laddering 현상이 나타나기 시작하는 반면, Z-VAD(OMe)-FMK는 48시간째부터 나타나며, 시간이 지날수록 Pifithrin- α 가 처리된 cell의 DNA fragmentation의 밴드가 Z-VAD(OMe)-FMK가 처리된 cell의 밴드보다 더

진하게 나타남을 확인 하였다. 그리고 inhibitor만 처리한 EPC cell에서는 72시간 까지 genomic DNA상의 아무런 변화가 없었으며 DMSO만 처리한 control group의 genomic DNA에서도 72시간 까지 아무런 변화도 관찰 하지 못하였다.(Figure 7-1).







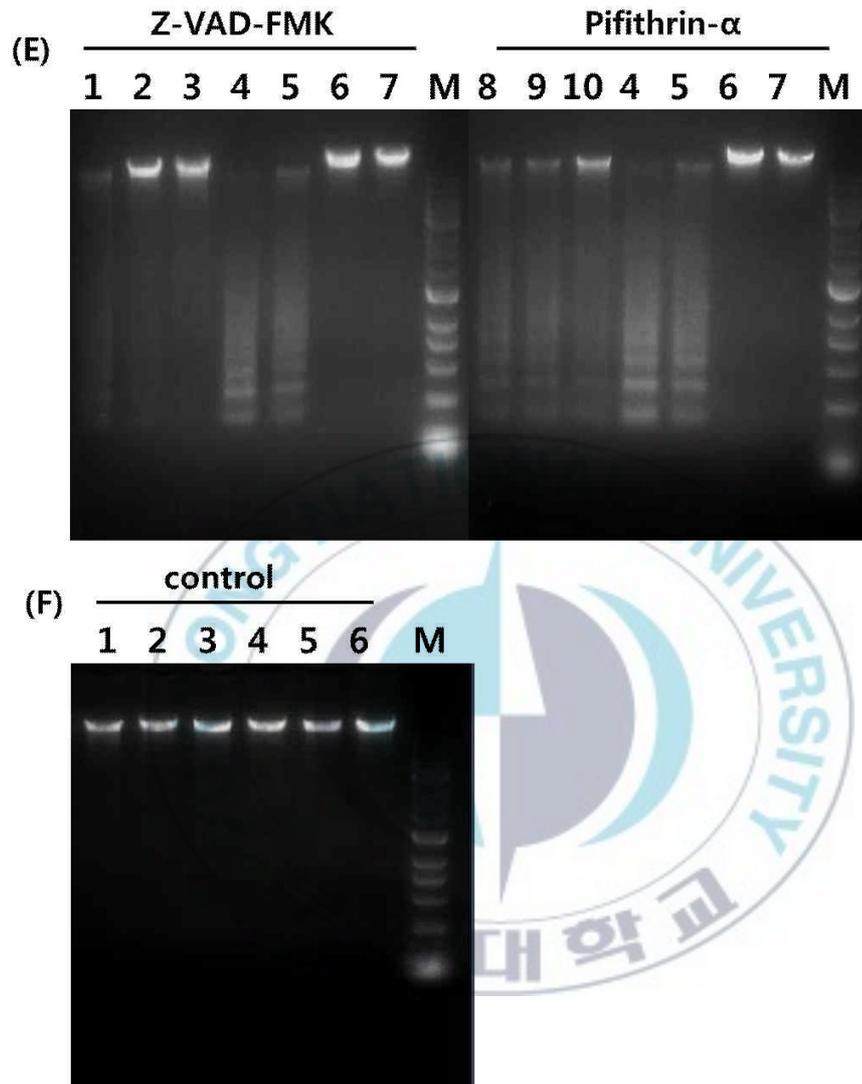
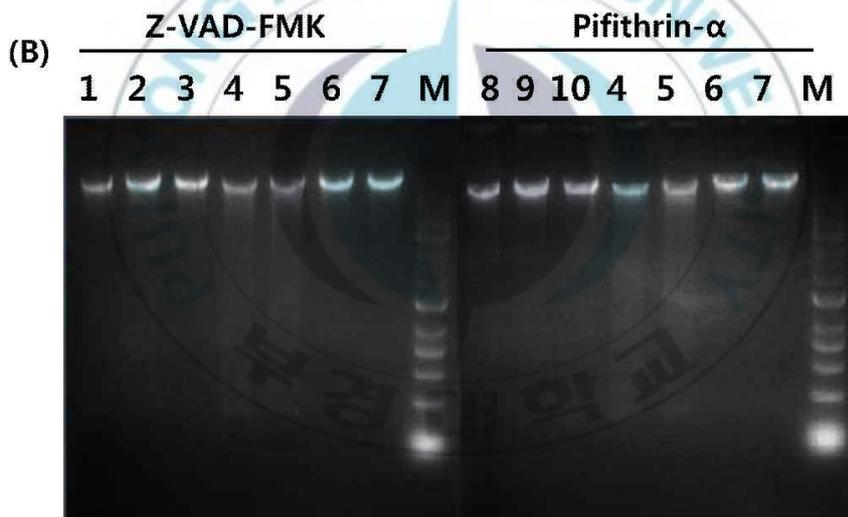
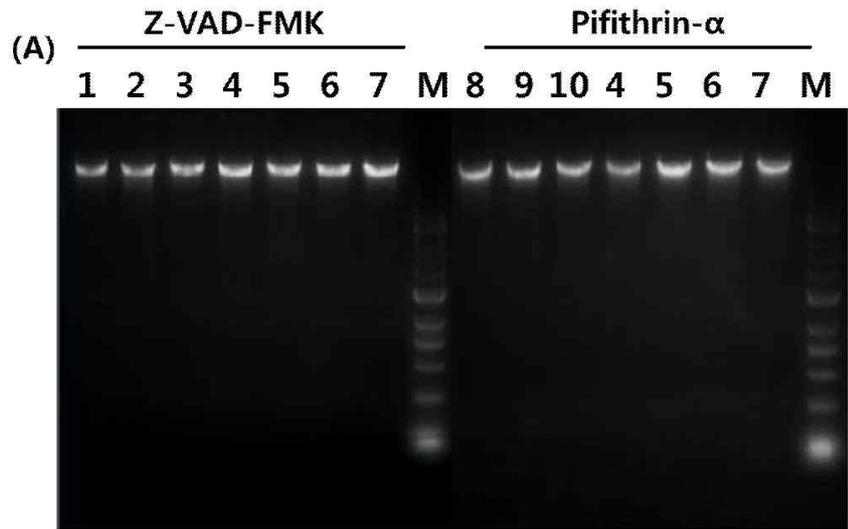
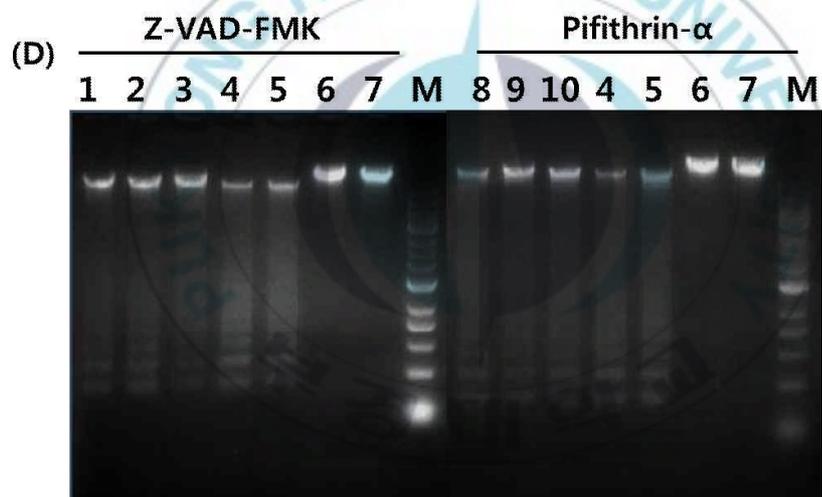
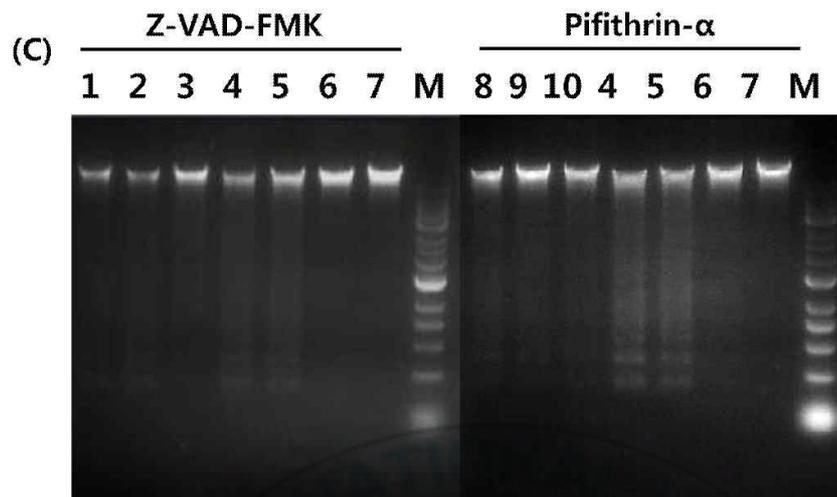


Figure 7-1. Analysis of DNA fragmentation from EPC cells at various time after VHSV infection. **(A-E: 24,36,48,60 and 72hs)** lane1-3: VHSV infected cell treated with Z-VAD(OMe)-FMK at 10, 30 and 50 μ M. lane8-10: VHSV infected cell treated with Pifithrin- α at 10, 30 and 50 μ M. lane4: VHSV infected cell treated with DMSO, lane5: VHSV infected cell , lane6: EPC cell treated with DMSO, lane7: EPC cell .**(F)** lane1-3: EPC cell treated with Z-VAD(OMe)-FMK at 10, 30 and 50 μ M, lane4-6: EPC cell treated with Pifithrin- α at 10, 30 and 50 μ M.





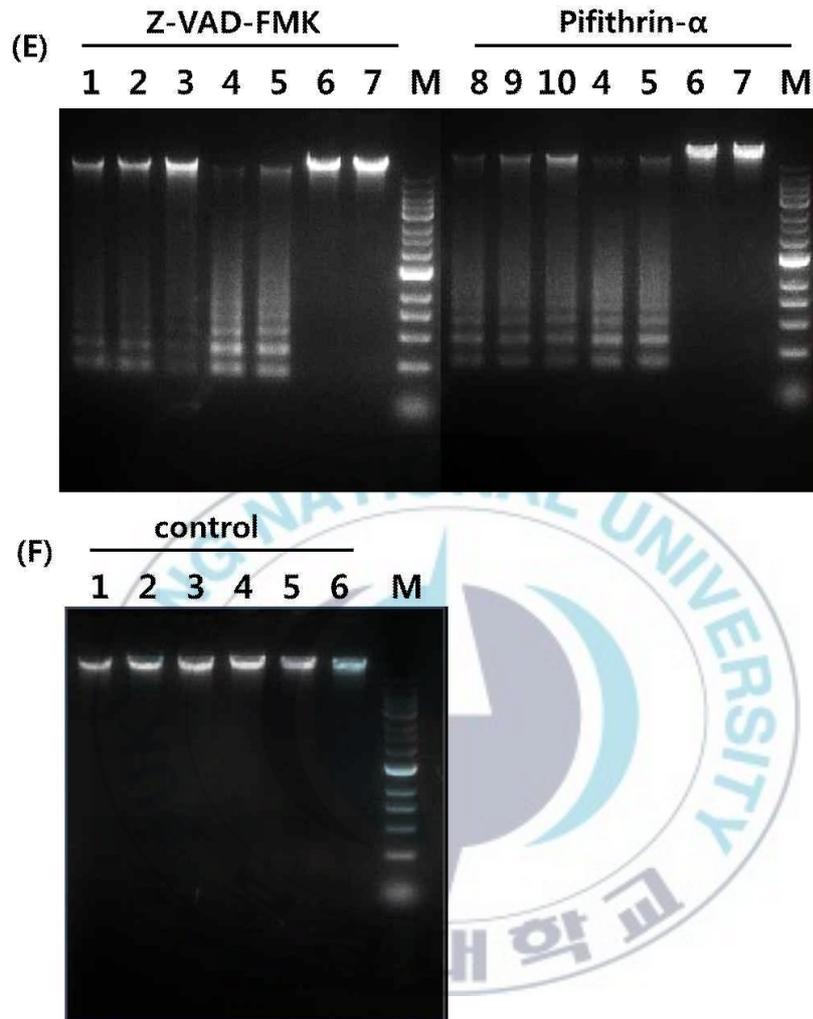


Figure 7-2. Analysis of DNA fragmentation from EPC cells at various time after rVHSV- Δ NV-eGFP infection. (A-E: 24,36,48,60 and 72hs) lane1-3: rVHSV- Δ NV-eGFP infected cell treated with Z-VAD(OMe)-FMK at 10, 30 and 50 μ M. lane8-10: rVHSV- Δ NV-eGFP infected cell treated with Pifithrin- α at 10, 30 and 50 μ M. lane4: VHSV infected cell treated with DMSO, lane5: rVHSV- Δ NV-eGFP infected cell, lane6: EPC cell treated with DMSO, lane7: EPC cell. (F) lane1-3: EPC cell treated with Z-VAD(OMe)-FMK at 10, 30 and 50 μ M, lane4-6: EPC cell treated with Pifithrin- α at 10, 30 and 50 μ M.

다. Inhibitor 처리 시 시간별 viral titer의 변화

Z-VAD(OMe)-FMK와 Pifithrin- α 를 처리하고 rVHSV- Δ NV-eGFP와 VHSV를 MOI 0.1 접종한 후, 시간별로 상층액을 분리하여, plaque assay를 수행하였다.

두 virus 모두 control 그룹인 DMSO를 처리하고 virus를 접종한 그룹과 DMSO를 처리하지 않고 virus만 접종한 그룹의 titer가 매 시간마다 제일 높게 나타났으며, 두 그룹의 titer는 비슷하거나 DMSO를 처리하고 virus를 접종한 그룹이 약간 더 높은 경향을 나타냈다.

Z-VAD(OMe)-FMK와 Pifithrin- α 에 의한 VHSV의 titer는 control group보다 매시간 낮게 나타났으며, 60시간 이후에는 titer가 비슷해지는 양상을 보였다. Z-VAD(OMe)-FMK 50 μ M과 Pifithrin- α 50 μ M을 처리한 group이 titer가 가장 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 같은 시점에서 두 inhibitor에 의한 titer는 Z-VAD(OMe)-FMK을 처리한 group이 Pifithrin- α 을 처리한 group의 titer보다 전반적으로 낮음을 확인하였다. Z-VAD(OMe)-FMK와 Pifithrin- α 에 의한 rVHSV- Δ NV-eGFP의 titer는 48시간 이전까지는 control group보다 낮았지만 48시간 이후에는 10 μ M과 30 μ M은 control group과 비슷하거나 조금 더 높아졌다. rVHSV- Δ NV-eGFP의 growth curve는 초기 24, 36시간째에 titer증가 후 titer의 증가 폭이 작았지만 VHSV의 growth curve는 시간이 지나도 titer가 점차 증가하였다. Inhibitor를 처리하고 rVHSV- Δ NV-eGFP를 감염시킨 group의 titer증가는 VHSV의 titer증가양상과 비슷함을 알 수 있다. 또한, rVHSV- Δ NV-eGFP와 VHSV모두 24시간째, Pifithrin- α 을 처리한 cell의 상층액에서 수집한 virus의 titer Z-VAD(OMe)-FMK을 처리한 cell의 상층액에서 수집한 virus의 titer보다 상대적으로 높게 나타났다.(Figure 8-1,2)

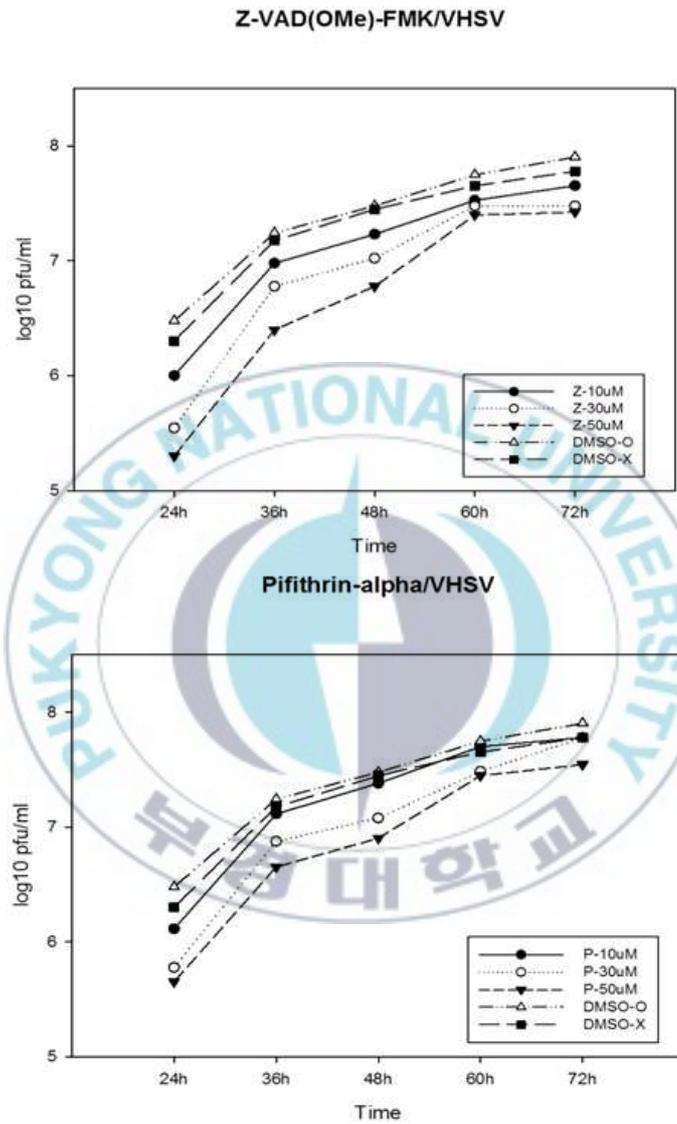


Figure 8-1. Effect of apoptosis inhibition on final titer of VHSV

VHSV was inoculated into EPC cells treated at various concentration of either Pifithrin- α or Z-VAD(OMe)-FMK. DMSO treated or not were used as control of experiment.

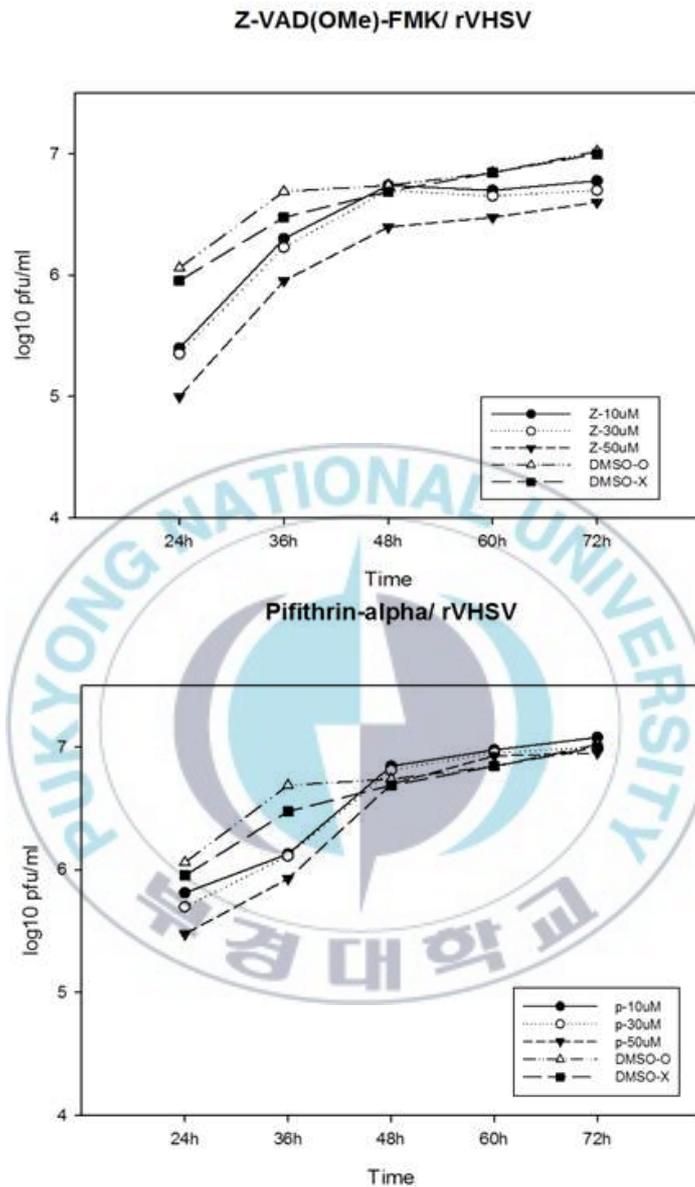


Figure 8-2. Effect of apoptosis inhibition on final titer of **rVHSV-ΔNV-eGFP**

rVHSV-ΔNV-eGFP was inoculated into EPC cells treated at various concentrations of either Pifithrin-α or Z-VAD(OMe)-FMK. DMSO treated or not were used as control of experiment.

4. Inhibitor의 지속효과와 titer 확인

Z-VAD(OMe)-FMK, Pifithrin- α 두 inhibitor의 지속효과와 inhibitor처리 시 virus의 최종 titer의 변화를 알아보기 위한 실험을 하였다. Z-VAD(OMe)-FMK와 Pifithrin- α 를 처리후 rVHSV- Δ NV-eGFP와 VHSV를 감염시키고, 완전히 CPE를 나타낼 때 상층액을 수집하여 titer를 측정하였다. Pifithrin- α 을 처리한 group은 virus를 접종한지 4-5일째에 CPE가 완전히 나타나 상층액을 수집할 수 있었고, Z-VAD(OMe)-FMK의 경우 5-6일째에 상층액을 수집할 수 있었다. Virus만 접종한 group에서는 모두 3일째에 CPE가 완전히 나타나 상층액을 수집할 수 있었다. 상층액을 모아 titer를 측정한 결과 rVHSV- Δ NV-eGFP와 VHSV 모두 control의 titer보다 inhibitor를 처리한 cell에서 수집된 virus의 titer가 더 높아졌으며, 두 virus 모두 Z-VAD(OMe)-FMK 50 μ M 처리한 group에서 titer가 3배정도 높아졌으며($P < 0.05$), Pifithrin- α 처리에 의해서 titer가 약 2배 높아졌다. Pifithrin- α 30 μ M, 50 μ M를 처리한 후 rVHSV- Δ NV-eGFP를 감염시킨 group과 Pifithrin- α 50 μ M를 처리한 후 VHSV를 감염시킨 group이 control과 비교하여 유의적으로 titer가 높아짐을 확인하였다($P < 0.05$).

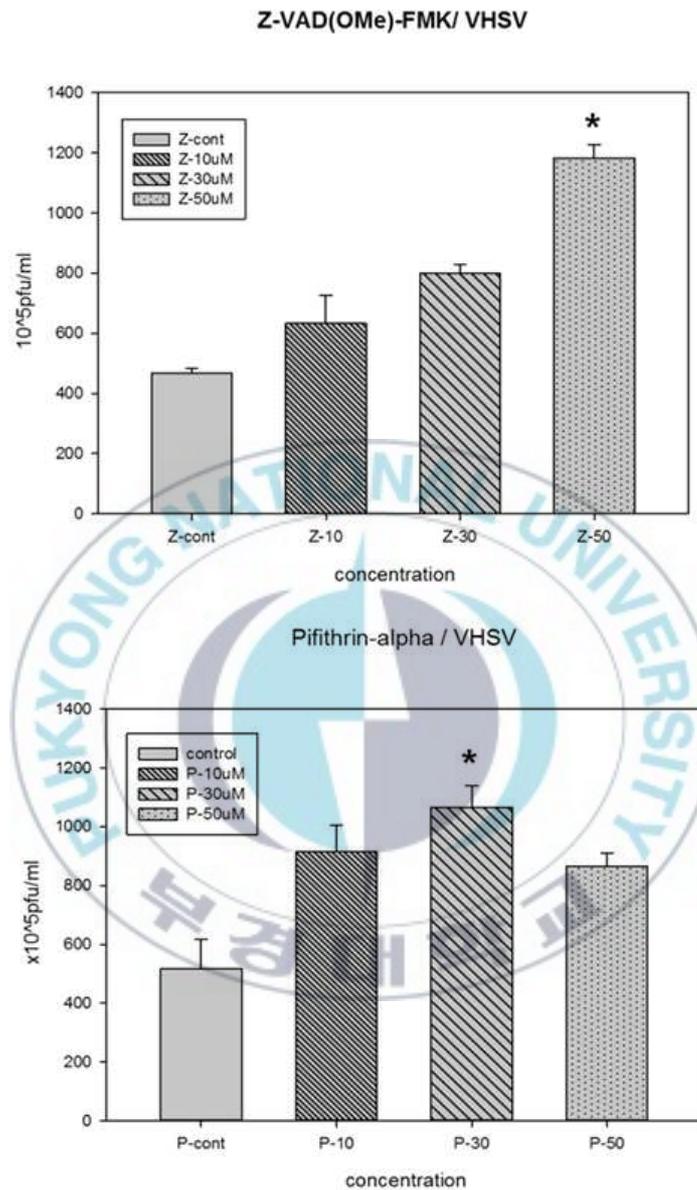


Figure 9-1. Final titer of **VHSV** depending on inhibition of apoptosis through Pifithrin- α or Z-VAD(OMe)-FMK treatment. VHSV were inoculated into EPC cells with MOI 0.1 after treating Pifithrin- α or Z-VAD(OMe)-FMK. The supernatant were isolated at the point of entirely appeared CPE. Significant differences were analyzed using Duncan's methods. The asterisk on the bar represents a significant difference at $P < 0.05$.

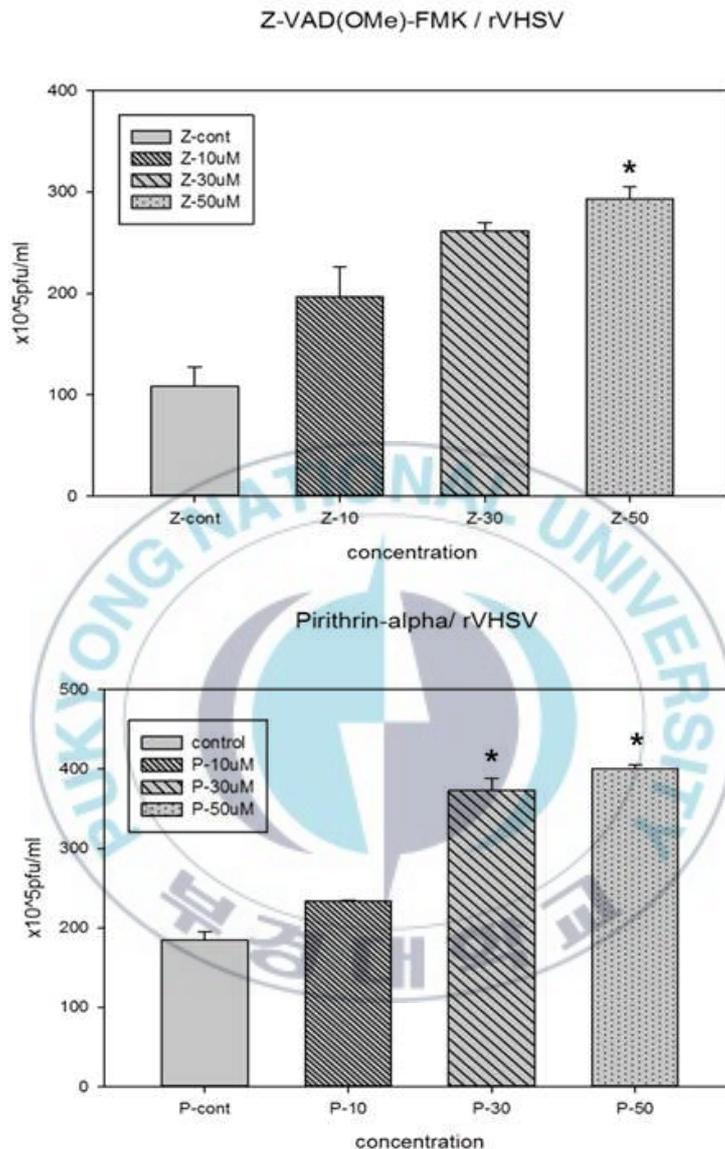


Figure 9-2. Final titer of **rVHSV-ΔNV-eGFP** depending on inhibition of apoptosis through Pirithrin- α or Z-VAD(OMe)-FMK treatment. rVHSV- Δ NV-eGFP were inoculated into EPC cells with MOI 0.1 after treating Pirithrin- α or Z-VAD(OMe)-FMK. The supernatant were isolated at the point of entirely appeared CPE. Significant differences were analyzed using Duncan's methods. The asterisk on the bar represents a significant difference at $P < 0.05$.

5. EPC cell의 p53유전자와 MDM2유전자의 Complete ORF 확인

EPC cell에서 total RNA를 분리하여 합성한 cDNA에서 NCBI의 GenBank에 등록된 *Gobiocypris rarus* (KC477763.1) partial, *Danio rerio*(U60804.1), *Salmo salar* (BT058777.1)의 cDNA sequence conserved한 부분을 찾아 conserved한 부분을 찾아 p53 degenerated primer를 제작하여 RT-PCR를 한 결과 779bp의 sequence를 얻었으며, *Danio rerio* (AF010255.1), *Callorhinchus milii* (JN794076.1), *Gobiocypris rarus* (TF KC477761.1)의 cDNA sequence를 서로 비교하여 MDM2 degenerated primer를 제작하여 RT-PCR를 한 결과 1344bp의 sequence를 얻을 수 있었다.

이후, RACE PCR을 통하여 1855bp의 p53 유전자를 얻었다. ORF fragment는 총 1113bp로 371 amino acids로 구성되어 있었으며, *Barbus barbus*의 Tumor suppressor p53과 79%의 identity를 나타내었고, *Danio rerio*의 Tumor protein p53과 74%의 identity를 나타내었다. MDM2 유전자는 RACE PCR을 통하여 2129bp의 MDM2 유전자를 얻었다. ORF fragment는 총 1440bp로 480 amino acids로 구성되어 있었으며, *Danio rerio*의 E3 ubiquitin-protein ligase MDM2 와 87%의 identity를 나타내었고, *Astyanax mexicanus*의 ubiquitin-protein ligase MDM2-like isoform X1과 72%의 identity를 나타내었다.

```

ACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGTGTTGTTTTGGCCGTTGGGGTGAGTCACTCGAAACATCAACGC 70
AGCAAGAGCAACGAGATAACCGTTTTGGGAGAAGAGGTCAGCAAAGTGAATTGTCGCAAGTTTTGCGAAT 140
CTGAAACAGGACATGGCAGAAAAATCCCGAGAGTCAAGAGTTTGCTGACCTCTGGGAGCGGAACCTCATT 210
      M A E N P E S Q E F A D L W E R N L I
CAGCTCCAGAAGGTGGCCCTTGTGGGACCTCAGTGATGAGTATCTTACAAGTTCGCTCGACCCAAGTTT 280
S A P E G G P C W D L S D E Y L T S S L D P S F
TTTTAGCTTGCTGACTGAACCGCCTCAGCCGTCCACTTCCCCACCGACCTCCACTGTCCCAATTGCCACC 350
F S L L T E P P Q P S T S P P T S T V P I A T
GATTATCCTGGCGACCATGGGTTAAACTCCAGTTCGCCGAGTCAGGCACAGCCAAGTCTGTCCACTGCA 420
D Y P G D H G F K L Q F P Q S G T A K S V T C
CGTACTCCCCAGAGCTGAACAAGCTCTTTGCCAGTTGGCAAAAACGTCAGTTCAGATGGTGGTGGA 490
T Y S P E L N K L F C Q L A K T C P V Q M V V D
TGTTGCCCTCCTCAAGGGTCGTTGCTCAGAGCCACAGCCATTATAAAAAGTCTGAGCATGTGGGTGAT 560
V A P P Q G S L L R A T A I Y K K S E H V A D
GTGGTCCGGCGTGGCCCAACCAGAGAGCACTTGATACTGATGGATTGGCTCCTCCTGCTCATCTGA 630
V V R R C P H H E R R L D T D G L A P P A H L
TCCGAGTGGAAAGGAACTTGCAGCTAATTACAGGAAGATGACATCACCTCCAGGCACAGTGTAGTGGT 700
I R V E G N L R A N Y K E D D I T S R H S V V V
GCCCTATGAATCTCCTCAGCTGGGAGCAGAGTTTCATCACAATTCGTATAATTACATGTGCAATAGTAGC 770
P Y E S P Q L G A E F I T I L Y N Y M C N S S
TGCATGGTGGCATGAATCGCCGGCCCATCCTCACAATCATCACTCTGGAGACTCAAGACGGTCAGATAC 840
C M G G M N R R P I L T I I T L E T Q D G Q I
TGGGCCGAGATCCTTCGAGGTGCGAGTCTGTGCGTCCCGAGCAGAGCAGGAAAACCTGAAGAGCAAA 910
L G R R S F E V R V C A C P G R D R K T E E S N
CTTCAGGAAAGACCAGGAGACAAAACCGTGAAGCAAGACCCCTTACCACCAAAACGAAGTTTGATGAAA 980
F R K D Q E T K T V S K T P S T T K R S L M K
GAATCCTCTTCTACATCTCGGCCTGAAGCAGTAAGAAGGCAAAGCTGAGCGCCAGCAGTGTATGAAG 1050
E S S S S T S R P E G S K K A K L S A S S D E
AAATCTATACTCTGCAGGTGAGGGGTAAGGAGAGATTTGAAATGTTAAGAAGATTAACGATGGGTTAGA 1120
E I Y T L Q V R G K E R F E M L K K I N D G L E
ACTCTCCGACCTCGTGCCTCCATGTGACGTAGACAAGTACCGGCAGAAAATCCTGTCCAAAACCAAGAAA 1190
L S D V V P P C D V D K Y R Q K I L S K T K K
GAAAAAGATGGCAAAACACCTGAGCCCAAAAGAGGAAAAAACTGATGGTAAAGGATGAAAAGAGCGATT 1260
E K D G Q T P E P K R G K K L M V K D E K S D
TTGATTAGGATGGTGGGATGCTGAAATAAAAAGAAAGGAGAGTTTTGGGGGTTTTTGCCTTTTGTAA 1330
F D
GCCTTTATTTGACAAAAACAGCTCGTTCATAGAGGGAGCATTTGTTGAATTGCAGACCCACGTGATCCCTC 1400
AGTCCCTGATGTCATATTTTCATCTTTGTTACTCCACGGGGACATGTGTTAGTAAGCTGATCCAGAGAAGT 1470
TCTGTATGAGTAAGGCTAGTATCAGCTGGGTACTGTAGGGTGTGTTGTGCTCTATCAGCATTAGAGAAGC 1540
AATACGGCCCATCATTTCGAGACCTGATAAATGAATGTCAGCAATGAGGCTTAACATGTGTAGGAT 1610
TTTTTCTCTGTTGTGGGCCAGTGCAGGTCACTTGCCTCCTAACTCATAGTTTTTGAATCGGGTTGAAA 1680
GGGAGTTGTTTTGAAATGCTAGATGGCCAAATGAGTTATACCAGTATTTTGTGACTTGTGATTTT 1750
GTAACCACTTTTTTAAAGAACAGAGGTATGAATAATAGATGATATGAGCAGTGTGTTACAAGCCAAA 1820
ATTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGT 1855

```

Figure 10-1. Nucleotide sequence of p53 in EPC cell and deduced amino acid sequence .The stop (TAA) codon is indicated with an asterisk.

```

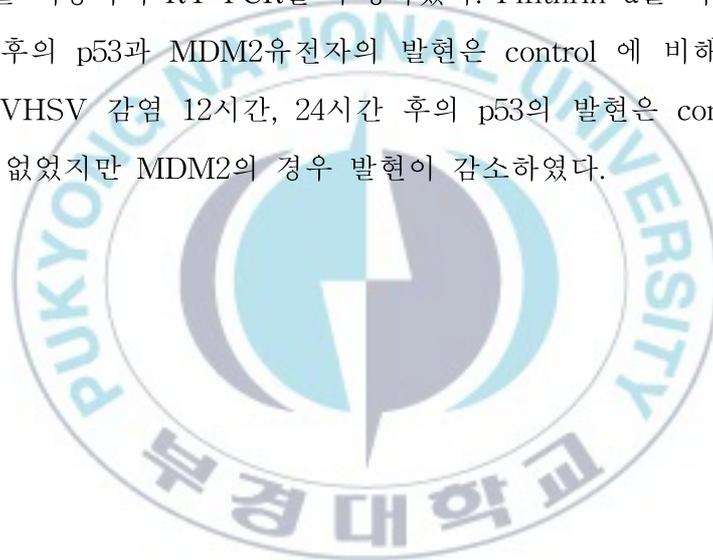
ACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACCATAGACTGGCTCTCAGCCGGCTCCCACTCCTCACTAA 70
CCCAGAGCTCAAGCACTTTATGTACAGCTAGCAGAGTATATTTAGAGGATTTTTAGGTAGAATATCCAAT 140
TTACCTCCATTTGCACAGATCACTACAAATATGGCAACAGAGAGTTGTTAAGCAGTTCTCAGATCAACA 210
M A T E S C L S S S S Q I N
AGGTTGACAAAGAAAACTGGTAAAGCCAAAGTTGCAGTTAAAAAGGCTGTTAGAGGATGCAGGTGCAGA 280
K V D N E K L V R P K L Q L K R L L E D A G A D
TAAAGATGTTTTCACTATGAAGGAGGTTATGTTTTATTTGGGAAGTATATCATGAGCAAGGAGTTATAT 350
K D V F T M K E V M F Y L G K Y I M S K E L Y
GACAAGCAGCACAACACATCGTTCACTGCGGAGAGGATGCTCTTGGTCTGTTCTTGGAGTGAAAAGTT 420
D K Q Q Q H I V H C G E D A L G A V L G V K S
TCTCAGTCAAAGGCCACGAGCTCTCTTTGCAATGATCAATAGAAACCTTGTGACAGTGAAAAATCCAGA 490
F S V K E P R A L F A M I N R N L V T V K N P E
AACTCAGTCTACCTTCTCTGAACCCAGGAGTCAAAGTGAACCAGATCGAGGGCCTGGGGATACAGATCA 560
T Q S T F S E P R S Q S E P D R G P G D T D S
GACTCTCGCTCATCTACCTCACACAGCAGCGCAGGAGGAGGAGCAGTGATCCTGAGAGTTCTTCAG 630
D S R S T S Q Q Q R R R R S S D P E S S S
CCGAAGCAGGCTTAGAGAACCAGGAAAAGCACAAGTCCGACAGCTTCTCCCTGACATTTGATGACAG 700
A E D E P R E R R K R H K S D S F S L T F D D S
CCTGCTTGGTGTGTGATCGGCGCCGTCACCGGGAGAGGAGAACAGCGAGTCTTCAGATGCACACAGC 770
L S W C V I G G L H R E R R N S E S S D A H S
AACTCTGATGTAGGTATCTCTCACAGTGAAGGCAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGA 840
N S D E V F I S H S E G S D E S E D S D S D N F
GTGTGGAGTTCGAGGTGGAGTCCATCAACTCCGATGCCCTACAGTGAGAACGATGAGGATTCGTTGCCGG 910
S V E F E V E S I N S D A Y S E N D E D S L P G
AGAGAACGAGGTGTATGAAGTCAATCATCGCTGAGGATGAAGACTCGTTTGTGAGGATACTGAGATA 980
E N E V F I E V T I I A E D E D S F D E D T E I
ACTGAGGCAGATTACTGGAAGTGTGCTGAATGTGACGTGCTCAACCCCTCCTCTCCACGGCATTGCAAAA 1050
T E A D Y W K C A E C D V L N P P L P R H C K
GCTGCTGGAACGTCGACCCCGTGGCTTCCAGAATCAGACTCCAACAATGAAAACCCCTCCACTAACAC 1120
S C W N V R P W L P E S D S N N E N P S T N T
TCAAACCCAGCTGAGCTCACCAGCATCACCACAACCAATCTTTGCCTCAGGTGACAAAATGTTCCCT 1190
Q T S T E L T S I T T T T I F A S G D K M L P
TCCAAAACCTCAAGCCCTCCTCCAGAAACAGATGAAGGAGTGGACGTACCCGACGGCAAGTGCCTGCAAT 1260
S K P S S P P P E T D E G V D V P D G K C L Q
CTCCCGTCTCCCGCCGCAAAAGAGTAGTCCCTCTTCTGCCACCCCGGCTCCCTGACTGACTCTCAGAC 1330
S P V S A A K E V V P S S A T P G S L T D S Q T
CTCGTATCGCAGCCCTCCACCTCCTCTGTTGGGGGAGCAGCCAGGAAGAGACCCCTGAGCTAGAGCGC 1400
S S S Q P S T S S G G S S Q E E T P E L E R
TTCAACAGCCTGGAGGCTGCCTGCCCATGCTCGAGCCCTGCTCATCTGTCAAAGTCGCCCA 1470
F N S L E A C L P A T C L E E C V I C Q S R P
AGAATGGCTGCATCGTCCACGGAAGGACTGGACACCTTATGGCGTGTACACTTCGCGCTAAGAAATAAA 1540
K N G C I V H G R T G H L M A C Y T C A K K L K
GAACCGAACAAGCTGTGCCCGTGTGCCGAGAGCCCAATCAGTCAAGTGGTATTGACCTACGTGAGCTGA 1610
N R N K L C P V C R E P I Q S V V L T Y V S *
GGCACTGCAGATACCTCCACTCCTCTGCTTTCCTCACATGAAGTCTGGGAGGCTCCTATGTTGCCCTTG 1680
TCTTAGTTCTTGTTCAAATTTCTTAATGATTAATTAATTTTATGACTCAAGCGAGGTTCTCAC 1750
TCTCATGCTGGTTGGAAAATACACATTTATGTTGGTGGTTAAGGGCTTAGAATTTAAACAACATC 1820
TTGTGGACTTGGAGTGTATGTTAAATGCATTATATCATACTAGAAATGTTGTAATTAATTAATTTATGTA 1890
CATGCTGATGATTGGTTCTCCGATTTATGATAATTTGAGTTCTTTGCTGCACTGAAATGAGTTCTGA 1960
GCTCTTGTGACACCCCTTTAAATTTGCTCCTCCTCTTGGGGGAAATACCCCCAGCATTGTTTTCTGCT 2030
GCAAAGACTGGCTTATTTTCTGAGTGGGCTTAATAAATGGATTATTTTTGAGGCTCTTGGCTAAAAA 2100
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGT 2129

```

Figure 10-2. Nucleotide sequence of MDM2 in EPC cell and deduced amino acid sequence. The stop (TAA) codon is indicated with an asterisk.

6. VHSV 감염과 Pifithrin- α 처리시 p53 유전자와 MDM2 유전자의 발현 확인

EPC cell의 cDNA로부터 얻은 p53과 MDM2 sequence를 바탕으로 RT-PCR용 Primer를 제작하였다. Pifithrin- α 의 처리와 VHSV감염 12시간, 24시간 후 RNA를 분리하여 cDNA를 합성하고 p53유전자와 MDM2유전자의 primer를 이용하여 RT PCR을 수행하였다. Pifithrin- α 를 처리하고 12시간, 24시간후의 p53과 MDM2유전자의 발현은 control 에 비해 모두 감소하였으며, VHSV 감염 12시간, 24시간 후의 p53의 발현은 control과의 차이가 거의 없었지만 MDM2의 경우 발현이 감소하였다.



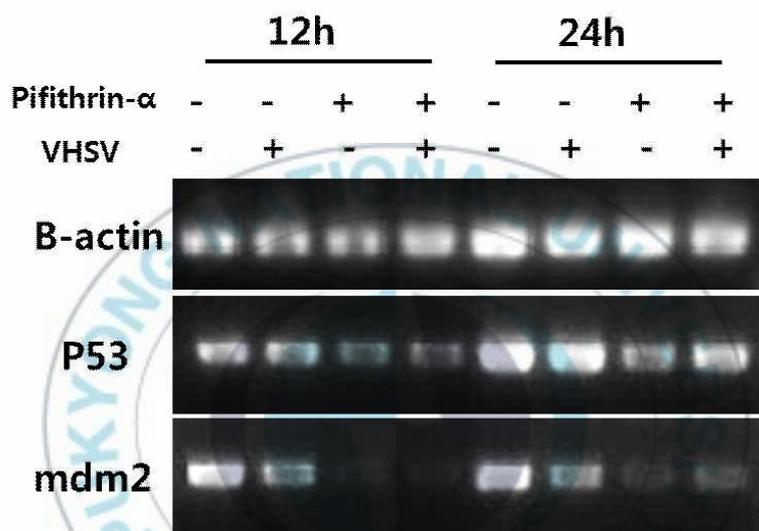


Figure 11. P53 and MDM2 expression during either VHSV infection or Pifithrin- α treatment. VHSV was inoculated into EPC cell treated with Pifithrin- α . EPC cell and EPC cell treated Pifithrin- α are Control. After 12hs and 24hs, RNA was isolated and P53 and MDM2 genes expression was analyzed by semi-quantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR). β -actin gene expression was used as a control.

IV. 고찰

몇몇 virus는 효율적으로 replication을 위하여 숙주세포의 초기 apoptosis를 억제 또는 지연시키거나 감염 후기에 apoptosis를 유도를 하는 mechanism을 가지고 있다. Viral hemorrhagic septicemia virus(VHSV) 또한 감염시 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있으나 apoptosis를 유발하는 정확한 mechanism은 밝혀져 있지 않다. Vero cell에 *Rabdovirus*과인 Vesicular stomatitis virus (VSV) 감염시, caspase 9와 caspase 3이 활성화된다는 결과가 있으며(Patricia Gadaleta et al., 2004; Alicia F. Pearce and Douglas S. Lyles, 2009), Rabies virus 는 caspase-dependent pathway와 caspase-independent pathway를 통하여 apoptosis를 유발한다고 한다(Sarmento, 2006). 본 연구에서는 p53 inhibitor인 Pifithrin- α 와 pan-caspase inhibitor인 Z-VAD(OMe)-FMK를 처리 후 VHSV 감염시, VHSV 만 감염시킨 control group보다 두 inhibitor를 처리 후 virus를 감염시킨 group의 CPE가 느리게 나타났으며, Pifithrin- α 와 Z-VAD(OMe)-FMK가 apoptosis를 완전히 억제시키지는 못하였지만 apoptosis를 지연시킴을 확인하였다.

Z-VAD-FMK 처리시 Sindbis virus(Nava et al., 1998; Zhivotovsky et al., 1995), Rubella virus(Pugachev & Frey, 1998), Sendai virus(Bitzer et al., 1999), Poliovirus(Agol et al., 1998)에 의한 apoptosis의 억제가 보고되어 있으며, virus에 의해 유도되는 apoptosis의 억제는 virus의 성장에

영향을 준다고 밝혀져 있다(Nava et al., 1998). Z-VAD(OMe)-FMK 처리를 통한 apoptosis의 억제는 Bovine herpesvirus 1에 의한 apoptosis의 억제 하였으며, caspase 억제를 통한 apoptosis억제를 통하여 virus particle의 생성은 증가하지만 세포외부로 virus의 방출은 감소하였고(Laxminarayana R. devireddy, 1999) , Maedi - visna virus에 의한 apoptosis 억제는 virus의 replication에는 영향을 미치지 않지만 virus의 방출에는 영향을 주는 것으로 알려져 있다(R. Duval et al., 2002). 또한 Z-VAD(OMe)-FMK 처리를 통한 Caprine herpesvirus 1 (CapHV-1)의 apoptosis의 억제를 통해 virus의 생산이 증가 하였다고 한다. (U. Pagnini et al., 2005). 본 연구에서는 VHSV 감염시 apoptosis의 억제가 virus의 최종 titer에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 Pifithrin- α 와 Z-VAD(OMe)-FMK 처리 후 VHSV감염시키고 CPE가 완전히 나타났을 때 상층액을 모아 titer를 측정하였다. Pifithrin- α 와 Z-VAD(OMe)-FMK을 처리한 group의 titer가 virus만 감염시킨 control group의 titer에 비해 2-3 배 높아졌으며, 이는 VHSV의 감염시 숙주세포의 apoptosis가 virus의 budding과 replication에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

p53 inhibitor인 Pifithrin- α 는 p53-mediated apoptosis와 p53과 관련된 유전자의 전사를 억제하는 inhibitor이다. *Rhabdoviridae*과인 Vesicular stomatitis virus(VSV)는 mitochondrial apoptotic pathway를 통하여 apoptosis를 유발한다고 알려져 있으며, Bcl-2의 과발현시 VSV induced apoptosis가 억제되는 사실이 확인되었다.(Alicia F. Pearce and Douglas S. Lyles, 2009). Apoptosis를 유발하는 미토콘드리아의 활동에는 Bcl-2 계열의 단백질에 의해 조절되며, tumor suppressor protein인 p53 은 Bcl-2의 조절에 중요한 역할을 한다(Cory and Adams, 2002). 이 때문에 the intrinsic pathway의 중요한 인자인 p53의 의해 apoptosis가 조절되는 것으

로 보인다. 본 실험에서 Pifithrin- α 처리는 VHSV에 의한 apoptosis를 지연시켰으며, viral titer가 향상되는 것을 확인 할 수 있었고 p53 억제시 Influenza virus 의 titer가 증가한다는 결과와 일치하였다(Zabeth Turpin et al., 2007). VHSV 감염후 p53과 MDM2의 발현을 비교하였을 때, p53 level은 control group cell과 차이가 없었지만, murine double minute 2 (MDM2)의 발현이 감소함을 확인하였다. MDM2는 p53에 대한 ubiquitin E3 ligase로써, p53의 안정성과 p53의 transcriptional activity 조절하는 negative regulator 이다(Wu X et al.1993; Levine AJ.,1997). 평소에는 MDM2에 의해 p53이 조절되어지고 있으며, MDM2이 감소는 p53의 조절을 정상적으로 하지 못하게 되고 이는 p53의 level을 증가시켜 p53의 활성화를 통해 apoptosis를 유발한다. Human adenovirus와 Human cytomegalovirus에 감염된 세포에서 MDM2가 감소하며 이는 p53의 축적을 유도한다(Heng Yang et al., 2012; Chen Z et al., 2007)는 결과가 있지만 본 실험에서 VHSV 감염시 MDM2의 감소를 통하여 p53의 축적을 유도한다고 결론짓기에는 이르다고 생각된다. 그러나 p53을 inhibitor를 이용하여 인위적으로 억제하였을 때 VHSV의 apoptosis가 지연됨을 확인하였고, 이를 통하여 VHSV는 p53-mediated apoptosis를 관련 된 것으로 추측된다. 그렇지만 자세한 mechanism은 아직 연구가 되어있지 않으므로 VHSV에 의한 apoptosis에 대한 연구가 앞으로 더 필요하다.

Pifithrin- α 와 Z-VAD(OMe)-FMK에 의한 VHSV에 의한 초기 apoptosis가 지연되었을 때, VHSV의 titer가 높아진 결과를 토대로 inhibitor처리 후 rVHSV- Δ NV-eGFP의 최종 titer와 시간대별 titer를 측정하였다. 두 inhibitor에 의한 apoptosis억제를 통하여 rVHSV- Δ NV-eGFP도 VHSV와 마찬가지로 Pifithrin- α 와 Z-VAD(OMe)-FMK을 처리한 group의 titer가 rVHSV- Δ NV-eGFP만 감염시킨 control group의 titer에 비해 2-3배 높아

짐을 확인하였고 이를 통하여 Pifithrin- α 와 Z-VAD(OMe)-FMK의 처리는 rVHSV- Δ NV-eGFP에 의한 apoptosis를 완전히 억제하지는 못하지만 초기 apoptosis를 지연시킴을 확인하였다. 또한 VHSV의 growth curve가 시간이 지나도 titer가 점차 증가하지만 rVHSV- Δ NV-eGFP만 감염시킨 control group의 growth curve는 초기 24, 36시간째에 titer증가 후 titer의 증가폭이 작았는데, 이는 rVHSV- Δ NV-eGFP가 NV유전자를 가지고 있지 않아 초기 apoptosis를 억제하지 못하였기 때문으로 보인다. 그러나 inhibitor를 처리하고 rVHSV- Δ NV-eGFP를 감염시킨 group은 VHSV와 비슷한 양상으로 36시간이후에도 titer가 점차 증가하였다. 이를 통하여, rVHSV- Δ NV-eGFP는 NV유전자는 없지만 인위적으로 apoptosis를 억제하여 주었을 때, VHSV와 같은 replication을 할 수 있는 것으로 생각된다.

p53과 caspase inhibitor인 Pifithrin- α 와 Z-VAD(OMe)-FMK는 VHSV와 rVHSV- Δ NV-eGFP에 의한 apoptosis를 지연시켰으며, apoptosis가 일어나는 시기를 늦추므로 인해서 virus의 titer가 향상되는 것으로 생각된다. 현재 제작되고 있는 recombinant viral vaccine의 효과를 높이기 위해 adjuvant를 사용하거나 효율을 높이기 위한 방법을 찾는 것이 중요한데, apoptosis inhibitor의 사용을 통하여 현재 제작되고 있는 recombinant viral vaccine의 titer를 증가시킴으로써 조금 더 효율적인 백신 생산을 가능하게 할 수 있을 것으로 기대한다.

요 약

Viral hemorrhagic septicemia virus(VHSV)는 replication시 apoptosis를 유발하는 virus중 하나이다. Apoptosis는 the extrinsic or death receptor pathway 와 the intrinsic or mitochondrial pathway 두 가지 경로에 의해 발생한다. 어류 양식 산업에 큰 피해를 주는 VHSV는 숙주세포 내에서 apoptosis를 유도하는 virus로 알려져 있으나 apoptosis를 일으키는 경로에 대한 연구가 많이 이루어져 있지 않다. 본 연구에서는 VHSV가 EPC cell 내에서 p53-mediated apoptosis를 통하여 apoptosis를 유도하는지를 확인하는 실험을 하였다. 본 실험실에서는 reverse genetics system을 이용하여 재조합 VHSV를 제작하였다(VHSV- Δ NV-eGFP). 그러나 이 재조합 virus가 EPC 내에서 wild type VHSV에 비해 titer가 낮음이 확인되었다. Vaccine의 상업화를 위해서는 vaccine 생산의 효율성을 높이는 것이 중요한데, virus의 titer를 높임으로써 효율적인 생산이 가능할 것으로 생각하였다. 본 연구에서는 NV 유전자의 기능과 유사하게 초기 apoptosis를 억제할 수 있는 inhibitor를 처리한 후, VHSV의 replication과 비교하고 최종 titer의 변화를 확인하였다.

EPC cell의 apoptosis를 억제하기 위하여 광범위하게 Caspase에 작용하는 inhibitor인 Z-VAD(OMe)-FMK와 p53-mediated apoptosis 및 p53-dependent gene transcription을 가역적으로 억제하는 Pifithrin- α 를 실험에 2시간 동안 전처리 한 후 wild type VHSV와 rVHSV- Δ NV-eGFP를 각각 접종하였다. virus를 접종한 후, 24, 36, 48, 60, 72시간 췌에 CPE를 관찰하고 genomic DNA를 분리하여 DNA fragmentation의 양상을 관

찰하였으며, plaque assay를 통하여 각 시간별 viral titer를 확인하였다.

VHSV- Δ NV-eGFP와 wild type VHSV는 감염 3일까지는 apoptosis의 억제에 의해 titer가 낮았지만 최종 titer는 inhibitor를 처리한 group이 control group에 비해 2-3배 높아짐을 확인 하였다. 또한 semi-quantitative RT-PCR결과에서 VHSV 감염시 MDM2의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 VHSV에 의한 apoptosis가 p53-mediated pathway를 통하여 발생하는 것이라 추측되지만 VHSV induced apoptosis가 p53을 통하여 발생하는지는 좀 더 연구가 필요한 것으로 보인다. 또한 VHSV는 증식을 위해서 apoptosis를 사용하는 것으로 생각되며, 인위적인 apoptosis 억제를 통하여 virus가 cell안에 머무는 시간을 늘어남으로 인해 viral titer가 증가된 것으로 추측된다. 최근에 생산되고 있는 recombinant virus vaccine이 이전의 vaccine들에 비해 안전성과 생산성에서 이점을 가지지만 여전히 효율적인 생산과 실용성이 과제로 남아 있는데, 이러한 약물의 전처리를 통하여 viral vaccine의 titer를 높여 백신의 효율성과 백신의 효과를 높일 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글

석사과정을 시작하고 실험을 처음 배운 것이 엇그제 같은데 벌써 2년이
라는 시간이 흘러 제가 졸업을 하게 되었습니다.

실험도 할 줄 모르던 저를 받아주시고 2년 동안 모자란 저를 지도해 주
신 김기홍 선생님께 감사드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 제 논문을 심사
해주시고 지도해주신 김도형 교수님과 정현도 교수님께도 감사의 말씀을
드립니다. 처음부터 실험과 여러 다른 것들을 많이 가르쳐주신 승혁 선배,
어려움이 있을 때 마다 도와주신 민선 언니, 지금은 교수님이 되신 예재
선배께 감사의 말씀을 드리고 싶습니다. 저와 비슷한 점이 많은 지선이 언
니, 언니같이 편한 준성이 오빠, 막내지만 항상 엄마처럼 챙겨주는 수진이
가 있어 실험이 힘들 때도 힘을 낼 수 있었습니다. 옆에서 많이 도와준
Najib에게도 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

그리고 옆에서 묵묵히 응원해주고 도와주는 친구들 숨이야, 수지야 말은
못하지만 항상 고맙게 생각하는거 알지? 모두 자기자리에서 열심히 하고
있는 1414(한솔, 효선이, 경화, 주영이, 연정이, 현주, 수빈이, 현숙이, 은정
이, 잔디, 수현) 얼른 다 같이 모이자! 이제는 매일 못 보는 주니어(미주,
서경이, 지희, 선정이) 모두 옆에서 힘들고 지칠 때 힘이 되어줘서 고마
워. 한결같이 6년 동안 옆에 있어준 한솔이 오빠, 그동안 힘들다고 투정부
러서 미안하고, 앞으로 더 잘할게. 마지막으로 항상 저를 걱정해주시고 사
랑해주는 부모님. 어머니, 아버지 이제 진짜 졸업이에요. 얼른 취직해서
효도 할게요 사랑해요. 그리고 힘들 때마다 밀크티 사준 지은아 내가 얼른
취직해서 용돈 줄게. 2년이라는 시간동안 실험실에 있으면서 실험뿐만 아

나라 많은 것을 배웠습니다. 제 인생에서 실험실에서의 시간은 소중하고 값진 순간이었습니다. 2년이라는 긴 시간동안 옆에서 응원해주시고 도움을 주신 모든 분들께 감사한다는 말씀을 드리고 싶습니다. 감사합니다.



참 고 문 헌

Sandstrom, P. A., Pardi, D., Goldsmith, C. S., Chengying, D., Diamond, A. M. & Folks, T. M., (1996). bcl-2 expression facilitates human immunodeficiency virus type-1 mediated cytopathic effects during acute spreading infections. *Journal of Virology*, 70, 4617-4622.

Agol, V. I., Belov, G. A., Bienz, K., Egger, D., Kolesnikova, M. S., Raikhlin, N. T., Romanova, L. I., Smirnova, E. A. & Tolskaya, E. A., (1998). Two types of death of poliovirus-infected cells : caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect. *Virology* 252, 343-353.

Alicia F. Pearce and Douglas S. Lyles,(2009).Vesicular Stomatitis Virus Induces Apoptosis Primarily through Bak Rather than Bax by Inactivating Mcl-1 and Bcl-XL *Journal of Virology*, 83, 9102 - 9112.

Alicia F. Pearce and Douglas S. Lyles., (2009). Vesicular Stomatitis Virus Induces Apoptosis Primarily through Bak Rather than Bax by Inactivating Mcl-1 and Bcl-X. *Journal of Virology*,, 83, 9102 - 9112.

Ammayappan A, Vakharia VN.,(2011). Nonvirion protein of novirhabdovirus suppresses apoptosis at the early stage of virus infection. *J Virol.*, 85, 8393-8402.

Ammayappan A., Kurath G., Thompson T.M., and Vakharia V.N., (2010). A reverse genetics system for the Great Lakes strain of viral hemorrhagic septicemia virus: the NV gene is required for pathogenicity. *Mar Biotechnol.* 13, 672-683.

Ammayappan A., Lapatra S.E., and Vakharia V.N., (2010a). A vaccinia virus-free reverse genetics system for infectious hematopoietic necrosis virus. *J Virol Methods.*, 167, 132-139.

Ammayappan, A.; Vakharia, V.N., (2011). Nonvirion protein of novirhabdovirus suppresses apoptosis at the early stage of virus infection. *J. Virol.*, 85, 8393 - 8402.

Antoni, B. A., Sabbatini, P., Rabson, A. B. & White, E. (1995). Inhibition of apoptosis in human immunodeficiency virus-infected cells enhances virus production and facilitates persistent infection. *Journal of Virology* 69, 2384-2392.

Antoni, B. A., Sabbatini, P., Rabson, A. B. & White, E. (1995). Inhibition of apoptosis in human immunodeficiency virus-infected cells enhances virus production and facilitates persistent infection. *Journal of Virology*, 69, 2384-2392.

Arends, M.J., Morris, R.J., Wyllie, A.H., (1990). Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.*, 136, 593 - 608.

Beidler, D. R., Tewari, M., Friesen, P. D., Poirier, G., Dixit, V. M., (1995). The baculovirus p35 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 270, 16526 - 16528.

Benedict, C. A., Norris, P. S., Ware, C. F., (2002). To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat. Immunol.* 3, 1013 - 1018.

Biacchesi S., Béarzotti M., Bouguyon E., and Brémont M., (2002). Heterologous exchanges of the glycoprotein and the matrix protein in a Novirhabdovirus. *J Virol.*, 79, 2881-2889.

Biacchesi S., Lamoureux A., Mérour E., Bernard J., and Brémont M., (2010). Limited interference at the early stage of the infection between two recombinant Novirhabdovirus: the viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *J Virol.*, 84, 10038-10050.

Biacchesi S., Thoulouze M.I., Bearzotti M., Yu Y.X., and Brémont M., (2000). Recovery of NV knockout infectious hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes. *J Virol.*, 74, 11247-11253.

Bitzer, M., Prinz, F., Bauer, M., Spiegel, M., Neubert, W. J., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K. & Lauer, U. (1999). Sendai virus infection induces apoptosis through activation of caspase-8 (FLICE) and caspase-3 (CPP32). *Journal of Virology* 73, 702-708.

BjoÈrklund, H. V., T. R. Johannson, and A. Rinne, (1997). Rhabdovirus-induced apoptosis in a fish cell line is inhibited by a human endogenous acid cysteine proteinase inhibitor. *J. Virol.*, 71, 5658-5662.

Chen Z, Knutson E, Wang S, Martinez LA, Albrecht T. (2007). Stabilization of p53 in human cytomegalovirus-initiated cells is associated with sequestration of HDM2 and decreased p53

ubiquitination. *J Biol Chem.*, 282,29284–29295.

Chinnaiyan, A. M., Woffendin, C., Dixit, V. M. & Nabel, G. J. (1997). The inhibition of pro-apoptotic ICE-like proteases enhances HIV replication. *Nature Medicine* 3, 333–337.

Choi, M.K.; Moon, C.H.; Ko, M.S.; Lee, U.H.; Cho, W.J.; Cha, S.J.; Do, J.W.; Heo, G.J.; Jeong, S.G.; Hahm, Y.S., (2011). A Nuclear Localization of the Infectious Haematopoietic Necrosis Virus NV Protein Is Necessary for Optimal Viral Growth. *PLoS One.*, 6, e22362.

Christopher C. Stobart 1,2 and Martin L. Moore,(2014). RNA Virus Reverse Genetics and Vaccine Design. *Viruses*, 6, 2531–2550.

Cory S, Adams JM,(2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2, 647 - 656.

Deveraux, Q. L., Reed, J. C., (1999). IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13, 239 - 252.

Duvall, E., Wyllie, A.H., (1986). Death and the cell. *Immunol. Today*, 7, 115 - 119.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M. & Kaufmann, S.H., (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383 - 424.

Esolen, L.M., Park, S.W., Hardwick, J.M., Griffin, D.E., (1995). Apoptosis as a cause of death in measles virus-infected cells. *J. Virol.*, 69, 3955 - 3958.

Estepa A, Fernandez-Alonso M, Coll JM, (1999). Structure, binding and neutralization of VHSV with synthetic peptides. *Virus Res*, 63, 27-34.

Gadaleta PI, Perfetti X, Mersich S, Coulombié F.,(2005). Early activation of the mitochondrial apoptotic pathway in Vesicular Stomatitis Virus-infected cells. *Virus Research*,109, 65-69.

Gomez-Casado E., Estepa A., and Coll J.M., (2011). A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine.*, 29, 2657-2671.

Gottlieb TM, Oren M.,(1996). p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta.*, 1287, 77 - 102.

Grütter, M.G., (2000). Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.*, 10, 649-655.

Hanon, E., Lambot, M., Hoorneart, S., Lyaku, J., Pastoret, P.P., (1998). Bovine herpes virus 1-induced apoptosis: phenotypic characterization of susceptible peripheral blood mononuclear cells. *Arch. Virol.*, 143, 441 - 452.

Hay, B. A., (2000). Understanding IAP function and regulation: a view from *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 7, 1045 - 1056.

Herbein, G., van Lint, C., Lovett, J.L., Verdin, E., (1998). Distinct mechanisms trigger apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-infected and in uninfected bystander lymphocytes. *J. Virol.*, 72, 60 -

70.

Huang H, Joazeiro CA, Bonfoco E, et al., (2000). The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J. Biol. Chem.*, 275, 26661 - 26664.

Igney FH, Krammer PH. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.*,2, 277 - 288.

Ikeda, Y., Shinozuka, J., Miyazawa, T., Kurosawa, K., Izumiya, Y., Nishimura, Y., Nakamura, K., Kai, J., Fujita, K., Doi, K., Mikami, T., (1998). Apoptosis in feline panleukopenia virusinfected lymphocytes. *J. Virol.*, 72, 6932 - 6936.

Isshiki T, Nagano T, Miyazaki T., (2003), Susceptibility of various marine fish species to viral hemorrhagic septicemia virus isolated from Japanese flounder. *Fish Pathol*, 38, 113–115.

Johnson M.C., Simon B.E., Kim C.H., and Leong J.C., (2000). Production of recombinant snakehead rhabdovirus: the NV protein is not required for viral replication. *J Virol.*, 74, 2343-2350.

Jones,A.(2001).Programmedcell death in development and defense. *Plant Physiol.*, 125, 94 - 97.

Kim M.S., and Kim K.H., (2011). Protection of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) by immunization with NV geneknockout recombinant VHSV. *Aquaculture.*, 314, 39-43.

Laxminarayana R. Devireddy and Clinton J. Jones.,(1999). Activation of Caspases and p53 by Bovine Herpesvirus 1 Infection Results in Programmed Cell Death and Efficient Virus Release. *J. Virol.*,73 ,3778-3788

Lenoir G, de Kinkelin P., (1975). Fish rhabdoviruses: comparative study of protein structure. *J Virol*, 16, 259–262.

Levine AJ. (1997)p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* ,88, 323 - 331.

Licata JM1, Harty RN., (2003). Rhabdoviruses and apoptosis. *Int Rev Immunol.*, 22,451-476.

Mori, L., Kamatsu, T., Takeuchi, K., Nakakuki, K., Sudo, M., Kimura, Y., (1995). In vivo induction of apoptosis by influenza virus. *J. Gen. Virol.*, 76, 2869 - 2873.

Mortensen HF, Heuer OE, Lorenzen N, Otte L, Olesen NJ., (1999). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Res.*, 63, 95–106.

Nava, V. E., Rosen, A., Veluona, M. A., Clem, R. J., Levine, B. & Hardwick, J. M., (1998). Sindbis virus induces apoptosis through a caspase- dependent, CrmA-sensitive pathway. *Journal of Virology*, 72,452-459.

Nava, V. E., Rosen, A., Veluona, M. A., Clem, R. J., Levine, B., and

Hardwick, J. M.,(1998). Sindbis virus induces apoptosis through a caspase-dependent, CrmA-sensitive pathway. *J. Virol.* 72, 452-459.

Novirhabdovirus: the viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *J. Virol.*, 84, 10038-10050.

Oura, C.A.L., Powell, P.P., Parkhouse, R.M.E., (1998). African swine fever: a disease characterized by apoptosis. *J. Gen. Virol.*, 79, 1427 - 1438.

Pagnini U, Montagnaro S, Sanfelice di Monteforte E, Pacelli F, De Martino L, Roperto S, Florio S, Iovane G., (2005). Caprine herpesvirus-1 (CapHV-1) induces apoptosis in goat peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 103, 283-93.

Pagnini U, Montagnaro S, Sanfelice di Monteforte E, Pacelli F, De Martino L, Roperto S, Florio S, Iovane G., (2005). Caprine herpesvirus-1 (CapHV-1) induces apoptosis in goat peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 103, 283-93.

Pugachev, K. V. & Frey, T. K., (1998). Rubella virus induces apoptosis in culture cells. *Virology* 250, 359-370.

R. Duval, V. Bellet, S. Delebasse and C. Bosgiraud., (2002). Implication of caspases during maedi - visna virus-induced apoptosis. *Journal of General Virology*, 83, 3153 - 3161.

Roulston A., Marcellus R.C., Branton P.E., (1999). *Annual Reviews of Microbiology*, 53, 577-628.

Sandstrom, P. A., Pardi, D., Goldsmith, C. S., Chengying, D., Diamond, A. M. & Folks, T. M., (1996). bc1-2 expression facilitates human immunodeficiency virus type-1 mediated cytopathic effects during acutespreading infections. *Journal of Virology* 70, 4617-4622.

Sarmiento, L., T. Tseggai, V. Dhingra, and Z. F. Fu. (2006). Rabies virus-induced apoptosis involves caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Virus Res.* 121, 144 - 151.

Schlotfeldt HJ, Ahne W, Vestergård-Jørgensen PE, Glende W (1991) Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) – a natural outbreak. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 11(3):105–107.

Schlotfeldt HJ, Ahne W., (1988). Epizootics in brown trout (*Salmo trutta fario*) caused by VHSV-F1. *J Appl Ichthyol* 4, 147–148.

Schütze H, Enzmann PJ, Mundt E, Mettenleiter TC., (1996). Identification of the non-virion (NV) protein of fish rhabdoviruses viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious haematopoietic necrosis virus. *J Gen Virol*, 77, 1259–1263.

Shisler, J., Yang, C., Walter, B., Ware, C. F., Gooding, L. R., (1997). The adenovirus E3 - 10.4K /14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. *J.Virol.*, 71, 8299 - 8306.

Skall HF, Olesen NJ, Møllergaard S., (2005). Viral hemorrhagic septicemia virus in marine fish and its implications for fish farming – a review. *JFishDis*, 28, 509–529.

Sandstrom, P. A., Pardi, D., Goldsmith, C. S., Chengying, D., Diamond, A. M. & Folks, T. M., (1996). bc1-2 expression facilitates human immunodeficiency virus type-1 mediated cytopathic effects during acutepreading infections. *Journal of Virology* 70, 4617-4622.

Stewart, A. R., Tollefson, A. E., Krajcsi, P., Yei, S. P., Wold, W. S., (1995). The adenovirus E3 10.4K and 14.5K proteins, which function to prevent cytolysis by tumor necrosis factor and to down-regulate the epidermal growth factor receptor, are localized in the plasma membrane. *J. Virol.* 69, 172 - 181.

Tollefson, A. E., Hermiston, T. W., Lichtenstein, D. L., Colle, C. F., Tripp, R. A., Dimitrov, T., Toth, K., Wells, C. E., Doherty, P. C., Wold, W. S., (1998). Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus infected cells. *Nature* 392, 726 - 730.

Tordo N, Benmansour A, Calisher C, Dietzgen RG and others., (2005). Family Rhabdoviridae. *Virus taxonomy*, 623-653.

Turpin E, Luke K, Jones J, Tumpey T, Konan K, Schultz-Cherry S., (2005). Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication. *J Virol.*, 79, 8802-8811.

Turpin E, Luke K, Jones J, Tumpey T, Konan K, Schultz-Cherry S., (2005). Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication. *J Virol.*, 79, 8802-8811.

Vasconcelos, C.A., Lam, K.M., (1994). Apoptosis induced by bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, 75, 1803 - 1806.

Vikram N. Vakharia,. (2003). Functional Studies Of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Proteins And Mechanism Of Virus-Induced Apoptosis.

Walker PJ, Benmansour A, Dietzgen R, Fang RX and others, (2000). Family Rhabdoviridae. Classification and nomenclature of viruses.,563 -583.

Windheim, M., Hilgendorf, A., Burgert, H. G., (2004). Immune evasion by adenovirus E3 proteins: exploitation of intracellular trafficking pathways. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 273, 29 - 85.

Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. Genes Dev,7:1126 - 32.

Wyllie, A.H., (1981). Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. Cell Death in Biology and Pathology., 9 - 34.

Yang H1, Zheng Z, Zhao LY, Li Q, Liao D.(2012). Downregulation of MDM2 and Mdm4 enhances viral gene expression during adenovirus infection. Cell Cycle.11, 582-593.

Yasuyuki Suzuki, Yui Nakabayashi, and Ryosuke Takahashi,(2001). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. Cell Biology.,98, 8662 - 8667.

Zhang, G., Aldridge, S., Clarke, M.C., McCauley, J.W., (1996). Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J. Gen. Virol.*, 77, 1677 - 1681.

Zhivotovsky, B., Gahm, A., Ankarcrona, M., Nicotera, P. & Orrenius, S.,(1995). Multiple proteases are involved in thymocyte apoptosis. *Experimental Cell Research* 221, 404-412.

