마렉병 바이러스의 분자적 병리기전과 증가하는 병원성에 대한 제어 방안

장형관^{1,*} · 박영명¹ · 차세연¹ · 권정택²

¹전북대학교 수의과대학 전염병학 · 조류질병학연구실, ²(주)하림 제1본부 증계사업부

Recent Molecular Studies of Marek's Disease Virus and Control Approaches for Increasing Virulence

H. K. Jang^{1,*}, Y. M. Park¹, S. Y. Cha¹ and J. T. Kwon²

¹Department of Infectious Diseases and Avian Diseases, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, 664-14 Duckjin-Dong, Duckjin-Ku, Jeonju 561-756, Korea

²Department of Broiler Breeder, Halim Co. LTD, 740-1 Sinheung-Dong, Iksan-City, Chonbuk, Korea

ABSTRACT Marek's disease (MD) is caused by a ubiquitous, lymphotropic *alphaherpesvirus*, MD virus (MDV). MD has been a major concern in the poultry industry due to the emergence of increasingly virulent strains over the last few decades that were isolated in the face of comprehensive vaccination. MD is characterized by a variety of clinical signs, amongst them neurological symptoms, chronic wasting, and most notably the development of multiple lymphomas that manifest as solid tumors in the viscera and musculature. Much work has been devoted to study MD-induced oncogenesis and genes involved in this process. Among the many genes encoded by MDV, a number have recently been shown to affect the development of tumors in chickens, one protein directly causing transformation of cells (Meq) and another being involved in maintaining transformed cells (vTR). Other MDV gene products modulate and are involved in early lytic *in vivo* replication, thereby increasing the chance of transformation occurring. In this review, specific genes encoded by MDV that are involved in the initiation and/or maintenance of transformation were briefly summarized, and limits of current vaccination and new control strategies against MD, particularly how modern molecular biological methods may be used to improve strategies to combat the disease in the future, were discussed.

(Key words: Marek's disease virus, herpesvirus, oncogenesis, oncogenes, vaccine)

머리말

마렉병(Marek's disease; MD)은 국내를 비롯해 세계 각지에 널리 존재하고 있는 닭의 림프 친화성 알파-헤르페스바이러스(lymphotropic α -herpesvirus)인 마렉병 바이러스(Marek's disease virus; MDV)에 의해 발생하는 질병이다. MD는 지난 약 30여 년간에 걸쳐 적절한 MD 예방 백신을 접종했음에도 불구하고 병원성이 증가한 변이주의 계속되는 출현에 따라 양계 산업에 있어서 주요 관심사의 하나로 부각되었다. MD는 면역 억제, 신경 장애, 그리고 빠르게는 감염 2주 후부터 내장 기관에 종양성 T세포 림프종(lymphoma)을 유발하는 특징이 있다(Fig. 1).

따라서 MDV로 인해 유도되는 종양 형성 등의 병리기전에 관여하는 유전자 및 이들 유전자 산물에 대한 많은 연구가 다각도로 수행되고 있다. MDV의 게놈(genome)을 구성하는 많은 유전자 중, 최근까지 닭에 종양을 형성하는데 직접적으로 영향을 미치는 몇몇 유전자 및 이들 유전자 산물이 밝혀지게 되었으며, 대표적으로 세포의 형질 전환을 직접적으로 일으키는데 관여하는 Meq라는 단백질과 형질 전환 세포의 유지(지속)에 관여하는 vTR을 들 수 있다. 이외의 다른 MDV 유전자 산물은 감염 초기 생체 내에서 MDV의 세포융해성 복제 · 증식을 조절하여 결과적으로 형질 전환이 발생할 수 있는 기회를 증가시키는 데에 관여하는 것으로 알려져 있다.

* To whom correspondence should be addressed : hkjang@chonbuk.ac.kr

본고에서는 MDV의 병리기전 중, MDV 감염에 따른 형질 전환의 초기(시발)에 관여하거나 혹은 이후 형질 전환을 유지(지속)하는데 관여하는 MDV 특이적인 유전자 및 이들 유전자 산물에 대한 최근까지의 연구 동향에 대하여 고찰하고자 한다. 그리고 국내를 비롯해 전 세계적으로 병원성이 증강된 MDV 변이주의 계속되는 출현에 따른 현행 MD 예방 백신의 문제점(한계성) 및 이들 MDV 변이주에 효과적으로 대처할 MD 제어 전략, 특히 최근 분자 생물학적 첨단 기법이 미래의 MD 제어 전략에 어떻게 활용될 수 있는 지에 대해 그 가능성을 고찰하고자 한다.

마렉병(MD)의 감염기전

MD는 *Mardivirus* 속(genus)에 속하는 림프 친화성 α -herpesvirus인 MDV에 의해 야기되는 닭의 종양성 질병이다. 모든

종양원성 야의 분리주는 *Gallid herpesvirus 2*(GaHV-2; MDV-1)로 분류되며, 반면 닭에 감염은 일으키나 비종양원성인 야의 분리주는 *Gallid herpesvirus 3*(GaHV-3; MDV-2)로 분류된다. 이외에 칠면조에 감염하는 비종양원성 야의 분리주는 *Meleagrid herpesvirus 1*로 분류되며, HVT(herpesvirus of turkey; MDV-3)로 명명된다. 이와 같은 분류는 종양원성 유무의 분류와도 일치하며, 항원적으로 근연인 비종양원성인 MDV-2 및 HVT가 종양원성인 MDV-1에 의한 종양 형성을 저지할 수 있다는 보고이래, MD는 백신 면역에 의해 제어할 수 있는 유일한 종양원성 질병으로 주목을 받게 되었다. 닭을 자연 숙주로 하는 MDV-1과 MDV-2는 닭 간의 수평 전파가 이루어지지만, 칠면조를 자연 숙주로 하는 HVT는 닭과 닭 상호간의 수평 전파는 거의 이루어지지 않는다. 현재 양계 현장에서 종양원성인 MDV-1을 예방하기 위한 백신주로는 CVI 988(Rispens), SB-1 및 FC126 등이 단독 또는 혼합된 형태로 널리 상용되고 있다(Table 1).

Fig. 1. The electronic microscopy of virion particles, and SPF chickens and their organs experimentally infected with vv+ MDV-1. A, Thin section of a cultured duck embryo fibroblast cell infected with vv+ MDV-1. Detail of the nucleus showing unenveloped particles in nuclear vesicles; B, Chickens infected with the field isolate at 4 weeks post-infection showing MD clinical signs (limb paralysis and depression); C, Enlargement and bleeding of thymus in the field isolate-infected chickens; D, Enlargement (left) or atrophy (right) of spleen in the field isolate-infected chickens compared with normal spleen (middle) in an uninfected chicken.

Table 1. Serotypes and pathotypes of the MDV group

Serotypes	Virus	Natural host	Pathotypes	Strain	Horizontal spread
1	MDV	Chicken	Very virulent plus (vv+)	Md11, KOMD-IC	+
			Very virulent (vv)	RB1B, Md5	+
			Virulent (v)	GA, JM, HPRS16	+
			Mild (m)	HPRS17, Conn-A	+
			Low or less (L)	CVI988, Cu-2	+
2	MDV	Chicken	Non-oncogenicity	SB-1, HPRS24	+
3	HVT	Turkey	Non-oncogenicity	FC126, HPRS26	+/-

MD에 이환된 닭은 다양한 임상 증상을 보이게 된다. 특히 다리나 날개, 경부 등의 신경 마비 증상을 비롯해 만성 소모성 및 면역 억제 상태로 일생을 지속하게 되며, 다양한 내

장 기관이며 피부 근육 등에 불치성 종양으로 전이한 다발성 림프종을 특징적으로 형성하게 된다(Figs. 2 & 3).

닭에서 MD의 병리기전은 매우 복잡하다(Calnek, 2001).

Fig. 2. The diverse neurological signs caused by MDV-1 infection. A, Limb paralysis; B, Cervical paralysis; C, Pterygoid paralysis; Enlarged nerves affected with MDV-1 in sciatic (D), cervical (E), and brachial (F) plexuses, respectively.

Fig. 3. The diverse and multicentric nodular lymphomas in the different organs and tissues caused by MDV-1 infection. A, Depigmentation of iris (gray eye); B, Cutaneous neoplastic nodules; C, Cutaneous inflammatory nodules; D, Ovarian nodules; E, Cardiac nodules; F, Pulmonary nodules; G, Hepatoma; H, Renal nodules.

서로 다른 다양한 면역계 세포가 연계하고 있으며, 많은 내장기관, 주로 림프계 조직과 내부 실질 장기가 표적이 되고 있다. 최근까지의 연구 결과로부터 밝혀진 MDV의 생체 내 자연 감염에 따른 전형적인 MD 병리기전을 병태의 진행 단계별(4단계)로 나누어 볼 수 있다(Fig. 4). 요약하면, MDV 감염성 virion 입자가 호흡기를 통해 생체 내로 유입되면, 이들 바이러스 입자는 폐에 유주하는 매크로파지(macrophages; MΦ)에 의해 탐식되어 흡수, 비장, F낭 등의 면역 장기로 운반되고, 최초의 표적인 B세포(B lymphocyte)에 감염이 이루어지게 된다. 이는 감염 후 3~6일 사이에 일어나는 첫 번째 감

염 단계로 알려져 있다. 계속되는 두 번째 감염 단계로서, MDV 감염 B세포는 주로 세포 용해성 감염(cytolytic infection; cell death, apoptosis)의 형태로 진행되며, vIL-8 등과 같은 MDV 특이 항원(MDV antigens) 등의 작용에 의하여 $CD4^+$ T세포(T lymphocyte)와 접촉을 통한 감염 전이가 이루어지게 되면서 IL-2와 같은 사이토카인(cytokine) 산생과 더불어 MDV에 감수성을 가지는 활성화 T세포(activated T cells)로 된다. 이때 MDV 감염 활성화 $CD4^+$ T세포에서의 바이러스 복제는 통상 감소하고, 잠복 감염(latent infection)은 감염 후 5~10일 사이에 성립하게 된다. 세 번째 감염 단계는 감염 후 10~14일 사

Fig. 4. Diagram of pathological mechanism by infection with MDV. Natural *in vivo* infection with MDV can typically be divided into four phases. It is believed that macrophages within the lung transfer virus to B cells, which are the primary target cells that are infected between 3~6 days of post-infection (dpi) in the first phase, followed by attraction, and subsequently infection of activated $CD4^+$ T cells in the second phase. During the second phase, viral replication normally decreases and a latent infection is established between 5 and 10 dpi in activated $CD4^+$ T lymphocytes. The third phase is characterized by reactivation of MDV replication between 10~14 dpi, and lymphomas may develop in the fourth phase depending on the genetic susceptibility of the chickens and the virulence of the virus strain after 14 days. Also in the fourth phase, virus replicates within the feather follicle epithelium cells and virus is shed in the chicken's dander as keratin encased virus. Susceptible chickens can then be infected with shed virus by inhalation of the dander of infected chickens and the cycle is repeated.

이에 일어나며, 바이러스가 재활성화(reactivation) 되면서 B 세포 감염 → 활성화 $CD4^+$ T 세포 감염 → 활성화 $CD4^+$ T 세포 잠복 감염 → 바이러스 재활성화를 반복하게 되고, 감염된 닭은 현저한 면역 억제 상태에 빠지게 된다. 네 번째 감염 단계의 림프종(transformed $CD4^+$ T cells) 형성 및 내장 기관의 다발성 종양(tumors)은 닭의 유전적 감수성이나 감염 바이러스의 병원성 등에 의존적으로 감염 14일 이후에 유발된다. 또한 네 번째 감염 단계에서는 바이러스가 우포 상피 세포(feather follicle epithelium cell; FFE) 내에서 복제·증식하여 케라틴(keratin)에 둘러싸인 형태의 닭 비듬을 통해 체외로 방출·전파된다. 따라서 MDV에 감수성이 있는 닭은 MDV에 감염된 닭의 비듬을 흡입하여 감염 전파되며, 이와 같은 일련의 감염 과정(infection cycle)을 반복하게 된다.

MDV는 생물학적으로 세포 수반성(cell-associated) 속성이 매우 강한 바이러스로서 실험적으로 조류 세포에만 감염한다. MDV는 조직 배양 세포에서 계대를 거듭하게 되면 비병원성 상태로 순화될 수 있다(Fig. 5). 순화 바이러스주는 순화되지 않은 바이러스주와 비하여 2 가지의 주된 특징을 보인다. 첫 번째는 계태아 섬유아세포(chicken embryo fibroblast cell; CEF), 닭 신장 배양 세포(chicken kidney cell; CKC) 혹은 오리 태아 섬유아세포(duck embryo fibroblast cell; DEF)에서 특징적으로 바이러스 증식 플라크(plaque)의 크기가 더 크고 바이러스의 역가도 더욱 높아지는 등 배양 세포(*in vitro*)에서의 바이러스 복제·증식이 증가하게 된다. 그리고 순화 바이러스주는 생체내(*in vivo*)에서는 복제 능력이 감소하여 감염 능력이나 또는 림프구에서의 복제 및 계속되는 질병과 종양을 일으키는 효율이 감소하게 된다.

지난 10여년 동안, MDV의 병원성과 순화기전에 관여하는 특이 유전자 영역을 동정하기 위하여 현대 분자 생물학적인 다양한 기법이 MDV 계놈 상에 존재하는 특이 유전자 또는 영역을 결손시키는데 이용되어 왔다(Cui et al., 2005; Gimeno et al., 2005; Jarosinski et al., 2005; Kamil et al., 2005). 이후 최근에는 BAC 시스템(bacterial artificial chromosome)(Petherbridge et al., 2003, 2004; Schumacher et al., 2000) 또한 중첩 코스미드 클론 시스템(overlapping cosmid clones)(Reddy et al., 2002)을 이용하여 MDV 전체 계놈의 클로닝이 가능하게 되어서, 바이러스의 복제, 잠복 감염, 또는 형질 전환에 관여하는 MDV 특이 유전자와 관련 영역의 기능을 보다 구체적으로 규명할 수 있게 되었다.

MDV와 MDV Genome

MDV는 주로 $CD4^+CD8^-$ T 세포(Schat et al., 1991) 종양을 유발하나 $CD4^-CD8^+$ 와 $CD4^-CD8^-$ T 세포 림프종도 유발하는 것으로 알려져 있다(Okada et al., 1997; Schat et al., 1991). 종양 발생은 빠르게 진행되며 감염 초기인 14일 정도 후면 발생되는데, 이는 형질 전환 과정에 바이러스 유전자나 또는 유전자 산물이 직접적으로 관여하고 있음이 밝혀졌다. 최근에 대표적인 MDV-1 GA주(Lee et al., 2000)와 Md5주(Tulman et al., 2000), MDV-2 HPRS24주(Izumiya et al., 2001), HVT FC126주(Afonso et al., 2001; Kingham et al., 2001)에 대한 계놈 전체의 염기 서열이 분석되었다(Table 2).

Fig. 6에 MDV 혈청형 간의 상대적인 계놈 구조를 보인 바

Fig. 5. Characteristics of MDV in cell cultures. A, Thin section of a cultured duck embryo fibroblast (DEF) with vv+ MDV-1. Detail of the nucleus showing unenveloped particles in a nuclear vesicle; B, DEF cultures infected with the field isolate. Primary isolation and quantification of infected cells derived from chicken is best done using either chick kidney cells or DEF. In both cell systems, infection results in a CPE in the form of characteristic plaques which can be used for quantitative assays; C, Primary chicken embryo fibroblast (CEF) cultures infected with a vaccine strain of CVI988. Vaccine or attenuated virus generally grows to higher titers and produces larger plaques in cell culture than its parent.

Table 2. Summary of the MDV genomes fully analyzed up-to-date

Virus	Serotypes	Length (bp)	G+C (%)	Genes
Md5		177,874	44.1	128
TR _L		14,028	49.5	18
U _L		113,563	41.7	69
IR _L	1	13,943	49.5	18
IR _S		12,264	49.9	6
U _S		10,847	40.6	11
TR _S		13,229	50.3	6
GA		174,040	43.9	126
TR _L		12,585	48.8	18
U _L		113,476	41.7	72
IR _L	1	12,579	48.8	18
IR _S		12,120	50.5	4
U _S		11,160	40.9	10
TR _S		12,120	50.5	4
HPRS24		164,720	53.6	102
TR _L		11,825	62.2	9
U _L		109,933	50.3	68
IR _L	2	11,825	62.2	9
IR _S		9,098	65.3	2
U _S		12,109	49.2	12
TR _S		9,481	64.7	2
FC126		159,160	47.6	98
TR _L		5,909	52.6	4
U _L		111,868	45.3	67
IR _L	3	5,659	52.6	4
IR _S		13,553	52.8	7
U _S		8,617	43.5	9
TR _S		13,554	55.7	7

와 같이 각각의 MDV 계통은 긴 영역(unique long, U_L)과 짧은 영역(unique short, U_S)의 특이적인 두 개의 염기서열을 둘러싸고 있는 반복적인 내부 긴 배열 영역(inverted internal long, IR_L)과 내부 짧은 배열 영역(inverted internal short, IR_S), 그리고 말단 끝부분의 긴 영역(terminal long, TR_L)과 짧은 영

역(terminal short, TR_S)으로 구성되어 있다(Silva et al., 2001). 현재 MDV에 의한 형질 전환의 개시 및 유지에 관여하는 바이러스 유전자, 증식 조절 인자 및 RNA 구조 등을 동정하기 위한 다양한 연구적인 시도가 이루어지고 있다. 현재까지의 연구 결과에 의하면, 형질 전환 과정에 직접적인 역할을 하고 있는 대부분의 유전자 및 구조는 반복 배열 영역, 특히 TR_L과 IR_L에 위치하고 있다. 여러 해에 걸쳐 다양한 종류의 유전자가 형질 전환에 관여하고 있음이 제시되어 왔고, MDV에 의한 종양은 다양한 유전자 산물, 증식 조절 인자 및 RNA 구조 등과의 복합적인 상호 작용을 통해 형성되고 있음이 점차 명백해지고 있다. 특히 본고에서는 종양 발현의 관여 및 역할을 규명하기 위해 대상이 되고 있는 관련 유전자에 초점을 두고 그 주요 내용을 요약·고찰하고자 한다.

현재까지 동정된 종양 형성에 관여하는 유전자 중(Fig. 7), 가장 주목을 끈 것은 MDV-1만이 가지고 있는 특이적인 종양 유전자 Meq(MDV EcoRI-Q)이다. 그리고 간접적으로나마 종양 형성에 관여하고 있는 것으로는 인산화 단백 38(phosphoprotein 38, pp38), 인터루킨-8(interleukin-8)과 상동성을 보이는 바이러스 유래의 IL-8(viral interleukin-8, vIL-8), 바이러스 리파제(viral lipase, vLIP), 그리고 RLORF4 유전자의 생산물 등을 들 수 있다. 이외의 종양 형성과 관련이 있는 다른 유전자 또는 요소로는 1.8-kb RNA군(Bradley et al., 1989a,b)과 ICP4 유전자(Xie et al., 1996)를 들 수 있으나, 종양원성에 관여하고 있음을 보여주는 구체적인 연구 결과는 아직 없는 상태이다. 최근에 동정된 바이러스 텔로미어라제 RNA(viral telomerase RNA; vTR)(Fragnet et al., 2003)는 MDV 계통 내에 암호화하고 있는 핵내 단백 복합체의 일부로서 특히 종양 형성 및 전이와 관련한 기능이 있다(Trapp et al., 2006).

이들 각 유전자에 직접적인 돌연변이를 유발시킨 결과, 바이러스의 복제, 병원성 및 종양 형성에 대한 그들의 역할을 파악할 수 있는 중요한 정보를 얻을 수 있었으며, 새로운 백신을 합리적으로 개발할 수 있는 가능성을 보여 주었다. 이들 유전자 중, 단지 Meq만이 직접적인 형질 전환 능력을 가지고 있었고, vTR은 형질 전환과 종양원성에 보조적인 역할을 수행하고 있으며, 이 외의 다른 유전자는 여전히 닭에서 세포 용해성 복제에 관여하여 간접적으로 종양 형성에 영향을 미치는 것으로만 알려져 있다.

MDV의 종양단백 - Meq

MDV-1의 TR_L과 IR_L 사이에 위치하는 종양 단백 Meq는

Fig. 6. The genome structures of the three serotypes of MDV. The genome is organized into the unique long (U_L) and short (U_S), internal repeat long (IR_L) and short (IR_S), and terminal repeat long (TR_L) and short (TR_S) regions. The relative genome size of the three serotypes of MDV is indicated below, approximately 178 kb of Md5, 174 kb of GA, 164 kb of HPRS24, and 159 kb of FC126 in size.

Fig. 7. Location of the identified genes related to oncogenesis followed by MDV infection. The approximate length and orientation of the identified genes are indicated by open arrows. The individual gene is indicated by numbers from 5' to 3' orientation, and the complementary gene is marked by asterisks, respectively.

Jun과 Wilm's tumor-1(WT-1) 암 억제 유전자(Qian et al., 1995)와 유사한 전사인자를 암호화하는 유전자 산물이다. Meq에 대한 많은 기능들이 분자생물학적 수준에서 뿐만 아니라 *in vivo* 실험을 통해서도 규명되어 MDV의 주요 종양 단백질로 알려지게 되었다. Meq 단백질은 339개의 아미노산으로 구성되어 있으며 N-말단에는 bZIP(basic-leucine Zipper) 영역과 C-말단에는 프롤린을 다수 함유한 전사 활성(proline-rich trans-activation)을 가진 영역이 존재한다(Fig. 8).

Meq의 전사 활성화에 대해서는 광범위한 연구가 수행되어 왔다(Liu et al., 1999, 2000; Qian et al., 1996). Meq는 세포의 전사 활성 인자인 c-Jun, c-Myc 및 C-말단 결합단백(C-terminal binding protein; CtBP) 등과 이들 세포 전사인자 내에 존재하는 bZIP을 매개로 2량체(dimer)를 형성하여 세포와 바이러스 유전자 모두의 발현을 조절한다(Fig. 9). 형질 전환에 대한 Meq의 역할은 Meq 결손 및 특이적인 변이를 유도한 *in vitro* 형질 전환 모델뿐만 아니라(Levy et al., 2005; Liu et al., 1998),

in vivo 형질 전환 모델에서 직접적으로 증명되어 왔다(Brown et al., 2006; Lupiani et al., 2004).

형질 전환에 대한 Meq의 가능성은 Rat의 섬유아세포주(Rat-2)를 이용한 *in vitro* 실험을 통해 처음으로 보고되었다. Meq를 과다 발현(over-expression)시킨 Rat-2 세포주는 혈청 성분에 비의존적으로 증식이 유도되었으며, G1기도 짧아졌고, 세포사멸(apoptosis)에도 저항성을 보였다(Liu et al., 1998). 이후 이와 같은 연구 결과를 확장하기 위하여 닭의 섬유아세포주(DF-1)를 이용한 연구가 시도되어 유사한 결과가 보고되었다(Lee et al., 2000). 더욱이 Meq를 발현하는 이들 세포주에 대한 microarray와 RT-PCR 분석 결과, retrovirus v-Jun에 의한 형질 전환 관련 유전자의 전사가 활성화(up-regulation)된 것과 마찬가지로 Meq에 의해서도 동일한 전사가 활성화(up-regulation)되었으며, 이는 Meq의 형질 전환 능력이 Jun pathway와 같은 기전에 의해서 일어나고 있음을 보여주고 있다. 또한 Meq 발현에 의해 세포 사멸 유전자인(apoptotic

Fig. 8. Structure and major functional domains of the Meq protein. Numbers represent the position of the amino acid residuals at the boundaries of each functional domain or motif. Meq protein consists of N-terminal proline-rich domain, a basic region, a leucine zipper, and a *trans*-activation domain with two and a half proline-rich repeats. The N-terminal 25 amino acids have *trans*-repression activity, whereas the C-terminal 33 amino acids are essential but not sufficient for *trans*-activation. Amino acids 54~127 are required for Meq-p53 interaction (Kung et al., 2001).

Fig. 9. Dimerization of Meq with cellular *trans*-activation factor. Meq dimerizes with cellular *trans*-activation factors such as c-Jun, c-Myc, and the C-terminal binding protein via the bZIP domain present in these cellular transcription factors, thereby altering the expression of both cellular and viral genes. The affinity of dimerization was affected by the nature of the charged amino acids residues in the surface of α -helix which forming the area of contact between the two polypeptides of dimer (Kung et al., 2001).

gene) FAS와 DAP5의 전사 활성이 저하되었으며(down-regulation), 이와 같은 사실은 Meq가 세포 사멸을 억제하는 항세포 사멸(anti-apoptosis)의 기능도 가지고 있음을 보여주고 있다.

한편, 일련의 중첩 코스미드 클론(overlapping cosmid clones) 시스템을 이용해 Meq 유전자 전체를 결손시켜 재구성한 MDV-1 Md5주(vv)(Lupiani et al., 2004), 또는 BAC(bacterial artificial chromosome) 시스템을 이용해 Meq 유전자의 CtBP 결합 부위(CtBP-interaction domain)만을 남기고 결손시켜 재구성한 MDV-1 RB-1B주(vv)(Brown et al., 2006)를 이용한 각각의 *in vivo* 실험을 통해 Meq는 종양 형성에 절대적으로 필요하다는 사실이 증명되었다. 다른 한편, BAC 시스템을 이용해 Meq 유

전자의 CtBP 결합 부위만을 결손시켜 재구성한 MDV-1 RB-1B주(vv)를 이용한 예비적인 백신 면역 실험 결과, 현행 백신주로 널리 사용되고 있는 CVI988과 유사한 수준의 방어능이 동일 유전형질의 닭에서 인정되었다(Brown et al., 2006). 이후 본 병원성을 약화시킨 재조합 바이러스의 안전성 및 백신 효능을 검증하기 위해 다른 유전형질의 다양한 닭과 보다 많은 수의 닭을 공시한 부수적인 비교 실험 결과가 기대된다.

형질 전환 세포의 안정화 및 전이 - vTR

종양화에는 세포의 형질 전환 과정뿐만 아니라 세포 노화와 세포 사멸의 결여가 동반된다. 세포 생존에 필요한 효소 중 하나는 텔로미어라제(telomerase)로서, 2종의 핵심 성분으로 구성되어 있다. 이 중 하나의 구성 단백질로서 텔로미어라제 역전사 효소(telomerase reverse transcriptase; TERT)라 불리고, 다른 하나는 RNA 구조체로서 텔로미어라제 RNA(telomerase RNA; TR)라 불리며 TERT의 지주체 역할을 한다. 하나의 세포가 매번 분열을 할 때마다 각 염색체(chromosome)의 끝은 차츰 짧아지게 된다. 왜냐하면, DNA 중합효소(DNA polymerase)는 새로이 합성되는 각 DNA 상보사의 끝을 복제하는 능력이 없어 telomerase의 작용이 없으면 반복 서열(telomeric repeat sequence)이 신장되지 않기 때문이며, 이를 소위 ‘말단 복제 결여(end replication problem)’라 부른다. 따라서 하나의 세포가 형질 전환에 의해 죽지 않는 상태로 전환되어도 telomerase의 작용이 없게 되면 염색체의 불안정과 계획된 세포 사멸(programmed cell death = apoptosis)이 일어나

게 되어 죽게 된다. 그러나 telomerase가 지속적으로 작용하게 되면 정상적인 세포 분열과 사멸의 기능을 상실한 비정상적인 불멸의 세포, 즉 종양 세포 또는 암세포로 형질이 전환될 수 있으며, 이러한 현상을 'telomerase의 매개에 의한 정상 세포의 위기(telomere-based crisis)'라 부른다. Telomerase는 일정하게 반복되는 염기(telomeric repeat sequence; TTAGGG, TAACCC, TGACCC 등)를 염색체 끝에 부가하며 염색체가 짧아지는 것을 지연시키고, 비정상적인 염색체의 융합(fusion) 혹은 전이(translocation)를 방지한다.

대부분의 정상적인 체세포에서는 Telomerase의 활성은 세포가 분열함에 따라 대부분의 정상적인 체세포에서는 자연적으로 점차 감소하지만, 일반적으로 형질 전환되거나 또는 종양화 된 세포에서는 telomerase의 전사가 활성화(up-regulated) 되어 있다(Kim et al., 1994; Shay et al., 1997). Telomerase의 활성과 상응해서 발현하고 있는 TERT와는 다르게, TR은 체세포에서는 균일하게 발현되고 있으나 일반적으로 암세포에서는 높은 수준으로 발현되고 있다(Feng et al., 1995). 이러한 사실로부터 telomere의 유지는 무제한적인 암세포의 증식에 필요할 것으로 추측되어 왔으며, 최근의 연구 결과에서 telomerase는 telomere 신장(elongation)과는 독립적으로 세포 주기나 증식과 관련한 세포 유전자의 전사를 조절해 종양화를 촉진할 수 있는 것으로 알려졌다(Blasco, 2002; Smith et al., 2003; Stewart et al., 2002).

최근 MDV는 자체의 게놈 내에 바이러스 유래의 telomerase RNA(vTR)가 2 copy(Fragnet et al., 2003) 보존되어(TR_L과 IR_L) 있음이 밝혀졌으며(Table 3), 그중 하나는 telomerase 복합체를 형성한다. 흥미롭게도 MDV의 vTR은 닭의 telomerase RNA(chTR)와 88%의 상동성을 가지고 있어, MDV의 vTR은 닭의 염색체로부터 유래했을 것으로 여겨지고 있다. 또한 MDV의 vTR은 닭의 세포내 chTR보다 더욱 효율적으로 TERT와 작용하며, 이것은 바이러스 게놈 내 보존하고 있는 vTR 내의 점변이(point mutation) 때문인 것으로 여겨지고 있다(Fragnet et al., 2003, 2005). 그러나 바이러스주에 따라서는 특이 점변이의 결과 vTR과 TERT의 상호 작용은 감소하기도 하며, 흥미로운 사실은 CVI988 백신주의 vTR H-box 영역 내의 단일 점변이(single point mutation)의 결과가 이에 해당되며, 이는 CVI988주가 닭에 감염하여도 형질 전환을 거의 유발하지 않는 것과 관계가 있을 것으로 여겨지고 있다(Kim et al., 1994; Fragnet et al., 2003, 2005).

최근에 BAC 시스템을 이용해 vTR의 기능을 완전히 제거한 MDV-1 RB-1B주(vv)는 *in vitro*와 *in vivo* 모두에서 세포 융해성 바이러스 복제가 가능함이 보고되었다(Trapp et al.,

2006). 또한 vTR을 결손시킨 재조합 rRB-1B를 닭에 접종하면 종양의 크기는 물론 종양의 발생 빈도나 전이도 현저히 감소되었다. 이와 같은 실험적 근거로부터 vTR 또는 telomerase가 T세포 림프종 형성과 전이에 직접적인 역할을 하고 있음이 알려지게 되었다. 더욱이 최근에는 MDV-1 vv+ 분리주의 vTR 내 TERT 결합 부위를 염기 치환해준 결과(5'-CTAACCTAA-3'를 5-TATATATATA-3'로 치환), 고병원성 MDV의 림프종 형성을 완전히 제거할 수 있게 되었음이 보고되었다. 그러나 아직은 해결해야 할 문제점을 안고 있다. 즉 비록 바이러스 접종 세포에서의 복제는 잘 이루어지지만, 바이러스 복제가 보다 효율적으로 이루어지지 못하고 있다는 문제점이 지적되어 있다. 따라서 현재까지 이루어진 연구 결과로부터 vTR 내 TERT 결합 부위에 변이를 가하면 결과적으로 변이 telomere 반복 배열이 세포의 염색체 끝에 부가되며, 이와 같이 변이 telomere 반복 배열을 가지고 있는 세포는 세포 사멸을 초래하게 된다는 사실을 알게 되었다(Lin et al., 2004).

MDV의 복제 및 종양원성 - vIL-8, vLIP, RLORF4, pp38

몇몇 MDV 유전자의 결손 혹은 돌연변이는 Meq와 같이 형질 전환에 직접적으로 영향을 미치고 있는 유전자와 관계없이 종양 형성이 감소되는 결과를 가져올 수 있다. 이와 관련한 MDV 유전자 중 하나는 소위 'vIL-8'이라 불리는 유전자로서 intron을 포함하고 있으며(Fig. 10), 세포 유래의 CX chemokine인 IL-8과 GRO- α (Parcells et al., 2001)와 높은 상동성을 공유하고 있다. 이와 같은 성상에 부합되게 baculovirus를 이용해 발현시킨 vIL-8은 닭의 말초혈단핵구(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)에 대해 chemoattractant로서 기능을 한다. 이에 반해 닭 유래의 chIL-8은 닭의 호중구(neutrophil)와 같은 heterophil의 attractant로 작용하고 있음이 보고되었다(Martins-Green, 2001; Parcells et al., 2001). 이와 같은 세포 특이성의 차이는 heterophil을 끌어들이는 chIL-8에 존재하는 "ELR motif"가 vIL-8에는 "DKR motif"로 치환되어 있어, 결과적으로 바이러스 유래 단백질인 vIL-8에 PBMC를 끌어들이는 능력이 부여된 것으로 여겨지고 있다.

실제로 곤충 세포에서 발현시켜 정제한 vIL-8은 선택적으로 닭의 B 림프구와 결합할 뿐만 아니라 CD4⁺ T세포와도 결합한다. 더욱이 vIL-8의 기능을 규명하기 위하여 MDV-1 RB-

Table 3. The telomere repeat sequences identified in the representative MDV genomes

Virus	Serotypes	Telomere repeat sequences		Types
Md5	1	1 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 4
		5 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 8
		9 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 12
		13 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 16
		17 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 20
		21 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 24
		25 -	TAACCC TAACCC TAACCC TGACCC	- 28
		29 -	TGACCC TAACGGCC TAAGGCC TAACCC	- 32
		33 -	TAACCC TAACCC TAACCC TGACCC	- 36
		37 -	TGACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 40
		41 -	TAACCC TGACCC TGACCC TAACCC	- 44
		45 -	GACCC TGACCC TGACCC TGACCC	- 48
		49 -	TGACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 52
		53 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 56
		57 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 60
		61 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 64
		65 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 68
		69 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 72
		73 -	TAACCC TAACCC TAACCC	- 75
HPRS24	2	1 -	TAACCC TAACCC TAAAGGCC TAACCC	- 4
		5 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 8
		9 -	TAACCC TGACCC TAACCC TAACCC	- 12
		13 -	TAACCC TAACCC TGACCC TAACCC	- 16
		17 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 20
		21 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 24
		25 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAAAGGCC	- 28
		29 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 32
		33 -	TAACCC TGACCC TAACCC TAAAGGCC	- 36
		37 -	TAACCC TAACCC TAAAGGCC TAACCC	- 40
		41 -	TAACCC TAACCC TAACCC TGACCC	- 44
		45 -	TAACCC TAACGGCC TAACCC TAACCC	- 48
		49 -	TAACCC TAACCC TAAAGGCC TAACCC	- 52
		53 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 56
		57 -	TAACCC TAACCC TAACCC	- 59
FC126	3	1 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 4
		5 -	TAACCC TAACCC TAAGGCC TAACCC	- 8
		9 -	TGACCC TGACCC TGACCC TGACCC	- 12
		13 -	TAACCC TAACCC TGACCC TAACGGCC	- 16
		17 -	TAACGGCC TAACCC TGACCC TAACCC	- 20
		21 -	TGACCC TAACCC TGACCC TGACCC	- 24
		25 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAAGGCC	- 28
		29 -	TAACCC TGACCC TAACCC TAACCC	- 32
		33 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 36
		37 -	TAACCC TAACCC TAACCC TAACCC	- 40

Fig. 10. Schematic diagram of the MDV genome and the location of vIL-8 gene. The gene of vIL-8 consists of three exons which map to the *BamHI-L* fragment. The exon I encode N-terminal 21 amino acids. Exon II and III constitute the secreted portion of vIL-8. Two kind of transcripts made by alternative splicing from three exons. First, the bZIP domain of Meq fused with exon II and III. Another, the 0.7-kb transcript consists of three exons (Parcells et al., 2001).

1B주의 vIL-8 유전자 전체를 가용성 형광 단백질(soluble-modified green fluorescent protein; smGFP)로 대체시킨 BAC 클론 재조합 바이러스(Parcells et al., 2001) 및 cosmid 유래의 MDV-1 Md5주에 vIL-8 유전자를 결손시킨 재조합 바이러스(Cui et al., 2004)가 구축되었다. 이 뿐만 아니라 Meq-vIL-8 융합단백(Liu et al., 1999; Parcells et al., 2001)과 같이 복합적인 영역에서 발현되는 다른 유전자에 미치는 영향을 배제하기 위하여 pRB-1B BAC 클론에 vIL-8의 exon I만을 결손시킨 재조합 바이러스도 구축되었다. 상기의 모든 재조합 바이러스는 vIL-8을 결손시킨 유전자의 크기(3개의 exon 모두 또는 exon I 하나)와 관계없이 바이러스의 복제가 현저히 감소된다는 사실을 알게 되었다. 또한 닭에서의 종양은 형성하지만, 종양의 발현빈도도 감소되었다. 이와 같은 현상은 세포 용해성 감염 세포의 수가 줄어들게 되므로 결과적으로 감염 세포에서 발생하는 형질 전환의 기회도 줄어들기 때문인 것으로 여겨지고 있다(Cortes et al., 2004; Cui et al., 2004; Jarosinski et al., 2006; Parcells et al., 2001).

또한 MDV는 바이러스의 복제에 필수적이지는 않지만 닭의 종양 형성에 영향을 미칠 것으로 예상되는 소위 ‘바이러스 유래 리파제(viral lipase; vLIP)’로 불리는 유전자도 보유하고 있다. 원래 LORF2로 명명된 vLIP는 3종의 MDV 혈청형 바이러스 계통 모두에 보존되어 있다(Izumiyama et al., 2001; Kingham et al., 2001; Lee et al., 2000; Tulman et al., 2000). vLIP 단백질은 756잔기의 아미노산으로 구성되어 있으며, 특히 229~369잔기(Kamil et al., 2005) 사이에 위치한 영역은 췌장 유래의 리파제(lipase)와 높은 상동성을 가지고 있다(Fig. 11). 비록 정확한 기능은 알려져 있지 않지만, vLIP는 생체내

Fig. 11. Location of vLIP relative to pp24 in the MDV genome. The complete vLIP ORF is 756 amino acids in length, and significant homology to pancreatic lipases is found in a stretch of approximately 141 amino acids that span positions 229 to 369. This 141-amino-acid region of vLIP shows 42% similarity to a rodent pancreatic lipase (*Myocastor coypus*). This region indicated by a double-stranded arrow in diagram (Jeremy et al., 2005).

세포 용해성 바이러스 복제에 중요한 역할을 하고 있다. 왜냐하면 vLIP 유전자를 결손시키면 감염 초기 말초 혈액의 바이러스 역가가 감소하게 되며, 나아가 종양 형성의 빈도도 감소하기 때문이다(Kamil et al., 2005). Baculovirus를 이용한 발현 vLIP의 단백질 결합 분석(protein-protein binding assay) 결과로부터 닭의 T세포, 주로 CD4⁺ T세포가 효과적인 표적 세포임이 증명되었다. 이와 같은 결과는 vLIP가 chemoattractant의 기능을 가지고 있을 가능성을 암시하고 있다.

MDV 순화 바이러스주와 순화하지 않은 바이러스주 간의 염기 서열을 비교 분석한 결과, 이전에 RLORF4로 불리던 잠정적인 ORF가 조사한 6종의 순화주 중 4종의 순화주에는 TR_L/IR_L 영역 내에 위치하며 결손되어 있음이 발견되었다(Jarosinski et al., 2003). RACE법(3' to 5' rapid amplification of cDNA ends assay)을 이용해 RLORF4 전체 크기의 mRNA 전사산물이 동정되었으며, 최근에는 MDV 감염 CEF 배양 세포의 질량 분석(mass spectrometry)을 통해 RLORF4 단백질이 동정되었다(Liu et al., 2006). 또한 병원성 pRB-1B BAC 클론의 RLORF4를 결손시키면 배양 세포에서 복제 증식과 plaque 크기가 증가하고, 생체내에서는 복제 증식과 종양 형성이 감소한 순화주(attenuated phenotype)로 유도되었다(Jarosinski et al., 2005). 유전자 RLORF4의 결손 변이주를 20마리의 닭에 감염시킨 결과 이중 2마리에서만 감염되어 13주후에 매우 작은 종양을 형성하였고, 그 이외에서는 어떠한 MD 임상 증상을 보인 개체는 없었다. 이와 같은 실험 결과는 RLORF4가 형질 전환에 반드시 필수적이지는 않으나 생체내에서 바이러스 복제에 영향을 미쳐 바이러스의 종양 형성을 현저히 감소시키고 있음을 보여주고 있다.

그동안 많은 연구자들이 인산화 단백질 pp38 또한 형질 전

환에 관계가 있을 것으로 추정해 왔지만, 이것이 형질 전환에 있어서 직접적으로 또는 보조적으로 역할을 수행하고 있다는 결정적인 연구 결과는 보고되지 않았다. pp38을 결손시킨 cosmid 유래 Md5 바이러스는 결과적으로 종양 형성이 현저히 감소하며, 이것은 세포 용해성 바이러스 복제가 감소했기 때문에 일어난 것으로 생각되고 있다(Gimeno et al., 2005; Reddy et al., 2002). 이와 같은 연구 결과와 마찬가지로 또 다른 pp38 결손 바이러스는 B세포 감염 능력은 감소했지만, 반면에 우포 상피 세포에서는 정상적인 수준으로 바이러스가 복제되었다(Gimeno et al., 2005).

이상의 내용을 요약해 보면, vIL-8, vLIP, RLORF4와 pp38은 형질 전환 과정에 직접적으로 관여하지는 않으나, 생체내 바이러스의 세포 감염 및 복제 능력을 감소시켜 종양 형성 능력에 영향을 미치고 있는 것으로 파악되고 있다. 그 이유는 왕성한 세포 용해성 바이러스 복제가 성공적인 형질 전환과 궁극적으로 림프종을 형성하는 선결 조건이기 때문이다.

백신 면역과 증가하는 병원성

1960년대 말~1970년대 초에 MD에 대한 백신을 도입하기 이전에 MD는 가금 산업에 심각한 타격을 입혔으며, 미국의 경우 1967년에 집계된 경제적 손실은 매년 약 1.5억 달러에 이르렀다. 1970년도까지 육계와 채란 산업의 MD에 의한 폐사율은 30~60%에 육박할 정도로 매우 높았다(Abbassi et al., 1999). HVT 백신의 도입으로 종양 등으로 인한 도계체의 불량판정이 급격히 감소했으며, 수 년 만에 MD는 야외에서 제거가 가능해졌다(Fig. 12).

그러나 백신을 도입한 초창기부터 백신 면역은 종양형성을 줄이거나 지연시킬 수는 있었으나, 백신주 또는 종양원성 MDV의 감염이나 전파를 막아내지는 못한다는 사실은 분명했다. 따라서 이와 같은 불완전한 백신 면역은 야외 바이러스가 계속적으로 진화하도록 백신압력(vaccine pressure)을 가하는 환경으로 작용하여 접종한 백신 면역에 적응하여 궁극적으로는 백신 면역으로부터 도피할 수 있게 되었다고 생각할 수 있다. 결과적으로 1970년대 말부터 새로운 MDV 주가 HVT로 면역한 백신 방어능을 교란하기 시작하였다. 그 후 혈청학적으로 관련이 있는 MDV-2 SB-1과 HVT를 혼합한 2가 백신이 도입된 이래 두 번째의 병원성 증가가 1980년대와 1990년대에 걸쳐 관찰되었다. 2가 백신은 병원성이 높아진 바이러스에 대해 방어할 수 있었으나(Calnek et al., 1983; Witter et al., 1984), 1990년대 초부터는 더욱 높은 병원성 MDV 야

외주가 출현하기 시작하여 2가 백신에 의한 방어능을 극복하기 시작했다. 따라서 야외주와 보다 혈청학적으로 근연인 자연순화주 CVI988(Rispens주)을 포함한 3종의 백신주가 2가(CVI988+HVT) 혹은 3가(CVI988+SB-1+HVT) 백신의 형태로 최근까지 밀집 사육 지역 및 위험성이 높은 농장에 적용되고 있다(Fig. 13).

백신을 도입한 이래 지난 몇 십 년을 통해 나타난 분리주의 성상을 기초로 MDV 분리주는 백신 방어능을 극복하는 능력에 따라 몇몇 병원형(pathotype)으로 분류되었다(Witter, 1997). 병원성에 따른 이들 병원형은 일반적으로 1960~1970년대에 분리된 고전적인 MDV는 virulent(v) 바이러스로, 이

Fig. 12. Forty years of MD control in the United States measured by condemnation of young broiler chickens. Disease incidence varies between different states, and has been markedly reduced through a succession of increasingly effective vaccines as showed by arrow (Witter, 2001).

Fig. 13. Usage patterns of MD vaccines in the United States and other countries. The HPRS16 (attn) strain was used mainly in Europe until the mid-1970s. Also, strain CVI988 (also called Rispens) was used in Europe in the early 1970s. This strain was gained favor in many other countries and has been used extensively in the United States since the mid-1990s (Witter, 2001).

후 병원성이 더욱 증가한 분리주는 very virulent(vv) 바이러스로, 더욱이 최근에 분리되는 바이러스는 very virulent plus (vv+) 주로 분류되었다. 현재까지 매년 세계적으로 채란계 약 42억수, 종계 5억수 그리고 170억 수의 육계가 백신 면역에 의해 MD가 제어·관리되고 있다(Baigent et al., 2006). 따라서 이와 동시에 MDV의 병원성도 더욱 증가하는 방향으로 진화되고 있음에 지속적으로 주시해야만 한다(Fig. 14).

최근 MDV의 병원성이 증가하고 있는 것에 대하여 논리적인 해석이 제안된 바 있다. 즉 MDV의 병원성이 증가하고 있다는 의미는 종양 형성 가능성이 증가하고 있음을 의미하는 것이 아니고, 백신을 접종한 닭에서 감염 초기에 보다 빠르게 초기 세포 용해성 바이러스 복제가 이루어지고 있음을 의미한다(Witter, 2005). 이와 같은 사실을 뒷받침하고 있는 최근의 연구 결과(Jarosinski et al., 2005)를 소개하면 다음과 같다. 즉 서로 다른 두 품종의 닭에 RK-1주(vv+)와 RB-1B주(vv), GA-5주(v), CU-2주(m)를 각각 접종하고, 세포 용해성 바이러스 전사생산물(vIL-8 gene transcripts)과 DNA 복제를 실시간으로(real-time quantitative) RT-PCR과 PCR을 이용하여 바이러스의 복제 수준을 비교한 결과, vv+주가 다른 병원성주보다 높은 바이러스 복제 수준을 보여주고 있음이 확인되었다(Fig. 15). 따라서 새로운 병원성주가 끊임없이 출현하고, 이에 대한 효과적인 백신을 사용할 수 없게 되면, 현행 백신 프로그램은 붕괴될 것이며, 경제적으로 뿐만 아니라 공중보건 상에 심각한 위협에 직면하게 될 것이다. 그리고 개발 도상국이나 인구가 많은 국가에 주된 단백질 공급이 붕괴될 가능성도 배제할 수 없을 것이다.

Fig. 14. The stepwise evolution of MDV virulence due to vaccination pressure. The introduction of HVT in the 1970's, the use of bivalent vaccines containing HVT and the non-oncogenic MDV-2 SB-1 strain in the 1980's and 1990's, and now the trivalent use of HVT, SB-1, and attenuated MDV-1 Rispens vaccine will ultimately lead to even more virulent strains in the future forenamed, very virulent plus plus (vv++)(Witter, 1998).

현행 백신 전략과 미래 백신 개발

현재의 MD 백신은 부화 직후 1일령 병아리 또는 18일령 계태아에 SPF 종란을 이용한 CEF 초대 배양을 통해 증식한 cell-associated 바이러스를 접종하고 있다. 이용 가능한 백신 중에서 유일하게 HVT 백신만이 cell-free 백신으로도 사용할 수 있으나 야외 대부분의 닭은 모계군의 백신 접종으로 인한 모체 이행 항체를 보유하고 있어 cell-free 백신은 cell-associated 백신에 비해 백신 효능이 떨어지기 때문에 거의 이용되지 않고 있다(Witter et al., 1979). Cell-associated 백신을 사용하는데 있어 주요 장애 요소로는, (1) 높은 역가의 백신을 생산하기 위해 많은 양의 종란과 세포 배양이 요구된다는 점과 (2) 백신을 액체 질소에 보관해야만 한다는 점을 들 수 있다. 또한, (3) 세포 배양에 사용되는 종란 유래의 알려지지 않은 바이러스 병원체에 의한 백신 오염 및 (4) 일련의 계대 배양을 통해 현행 백신에 생물학적으로 잘 규명되지 않은 변이 백신 바이러스를 포함하고 있을 수 있다는 점 등이다.

백신 바이러스를 생산하기 위해서는 많은 수의 종란이 조직 배양을 위해 사용되는데, 이는 가금 산업이 더 큰 성장을 지속하는데 있어 첫 번째 장애 요인으로 작용할 수 있다. 왜냐하면 비록 닭의 세포를 이용하여 생산된 백신의 효과가 우수하지만, SPF 계군을 유지해야 하는 등의 여러 가지 이유

Fig. 15. Quantitative (q) RT-PCR analysis of vIL-8 mRNA expression in chickens infected with m, v, vv or vv+ MDV. Total RNA was collected from splenocytes obtained from 5 to 7 N2a chickens infected with CU-2/p17 (m), GA-5/p14 (v), RB-1B/p13 (vv), or RK-1/p19 (vv+) MDV strains at 4, 7 and 10 days of post-infection. vIL-8 mRNA transcripts were quantified using qRT-PCR assays. The result was that more virulent strains exhibited significantly higher levels of vIL-8 mRNA than less virulent strains. It was indicated that increased virulent (Jarosinski et al., 2003).

로 백신을 생산하는 비용이 매우 높아지기 때문이다. 따라서 그동안 여러 연구 기관에서 대체 방법을 이용해 높은 역가의 백신 바이러스를 생산하기 위한 보다 나은 방법을 모색해 오고 있다. 현재까지는 지금까지 MDV 백신 생산을 위해 사용되고 있는 CEF 배양 세포보다 동일한 수준 또는 그 이상으로 MDV의 증식이 가능한 세포주 개발이 되어 있지 않아서 특정 세포주를 이용한 MDV 백신 생산은 불가능한 상태이다. 일부 연구그룹에서는 메추라기 근육 세포주(QM7)에 MDV gE 유전자를 지속적으로 발현하는 소위 'SOgE 세포주'를 개발하여 MDV 병원성 바이러스 및 백신 바이러스의 증식을 CEF 배양 세포와 비교한 결과 서로 상응할만한 정도의 증식성을 나타내었다고 보고한 바 있다(Schumacher et al., 2002). MDV의 gE 유전자는 배양 세포에서 바이러스 증식에 필수적인 유전자(Schumacher et al., 2001)로서 CVI988 백신주의 증식성이 SOgE 세포주에서 MDV gE를 발현하지 않는 QM7 세포주에서보다 3,000배 이상 증가되었다(Schumacher et al., 2002). 또 다른 몇몇 세포주, 즉 MDV 잠복 세포주(Yamaguchi et al., 2000) 또는 다른 내재성 바이러스를 가진 QT35와 같은 메추라기 유래 세포주 등을 이용한 MDV 백신 바이러스를 생산하기 위한 세포주 개발에 주의를 기울여야만 한다. 결론적으로 일단 내재성 바이러스가 백신에 부재함을 보일 수만 있다면, 세포주를 유지하는 비용이 절감되므로 MDV 백신을 생산하는 비용도 현저히 절감할 수 있게 될 것이다.

Cell-associated 백신을 사용하는데 있어 두 번째 장애 요소는 백신의 보관과 접종이 용이하지 않다는 사실이다. 일단 백신주를 조직 배양에서 높은 역가로 생산하게 되면 세포는 일반적으로 dimethyl sulfoxide(DMSO)와 같은 동결 보존액을 섞어 서서히 얼려야만 하며 -196°C 의 액체 질소에 보관해야 한다. 즉 백신은 무기한으로 액체 질소에 보관할 수 있으나, 백신 바이러스의 역가 감소를 피하기 위해서는 백신은 반드시 빠르게 녹여야만 하며 엄격한 사용 지침에 따라 곧바로 사용되어야 한다. 적절치 못한 냉동, 해동, 희석 및 접종 지연 등은 백신의 효율성을 감소시킬 수 있으며, 백신의 방어능을 저하시키는 요인으로 작용할 수 있다.

하지만 장래에는 백신의 저장과 접종이 DNA 백신을 사용함으로써 좀 더 용이해질 수 있을 것으로 전망하고 있다. DNA는 살아있는 cell-associated 바이러스에 비해 훨씬 안정적이고 보다 용이하게 닭에 접종할 수 있다는 장점을 지니고 있다. 비록 아직은 기술적으로 완벽하지 못하고 가장 이상적인 접종법이 정립된 상태는 아니나, MDV 백신 바이러스의 감염성 클론(infectious clone)을 이용한 DNA 백신은 현

행 MDV 백신 체계의 고착한 문제점으로부터 벗어날 수 있는 하나의 방법이 될 수 있음을 몇몇 연구 결과에서 보여주고 있다. 한 연구 그룹(Tischer et al., 2002)에서는 비병원성 584Ap80C 바이러스로부터 유래한 BAC20 클론을 여러 형태의 백신 면역과 공격 접종 실험 연구에 사용하였다. 비록 BAC20 DNA 백신의 방어 수준이 현행 CVI988 cell-associated 백신의 방어 수준에 미치지 못하는 못하지만, 상당한 정도의 방어 수준이 유도된다는 사실은 확인되었다(Petherbridge et al., 2003). 또한 CVI988에서 유래한 BAC 클론을 DNA 백신으로 접종해도 방어능은 보이지만, 현행 cell-associated CVI988과 같은 수준의 방어능에는 미치지 못하는 것으로 나타났다. 이처럼 아직은 DNA 백신에 대한 접근 방법과 백신 조성 등을 정립하기 위해 더 많은 연구가 필요하지만, DNA 백신은 생산, 저장 및 접종에 있어 보다 손쉬운 방법을 이끌어 낼 수 있을 것으로 기대되고 있다. 그리고 닭에서의 바이러스의 복제가 백신 효과를 결정하는 가장 중요한 하나의 요소로 작용함이 확인되었는데, 이는 백신 접종 후 수 주 동안까지도 검출 가능한 복제하는 백신 바이러스를 가지고 있어야 닭이 방어력을 갖기 때문이다.

Cell-associated 백신의 세 번째 주된 장애 요소는, 특히 조류 백혈병 바이러스(avian leukosis virus; ALV)와 같이 암을 유발하는 retrovirus 등이 외인성으로 오염될 가능성이 있다(Zavala et al., 2006). 물론 백신 생산을 위하여 SPF 종란을 사용하며 생산된 백신도 품질 관리가 철저히 이루어지지만, 백신 로트(lot)에 따라서는 ALV가 검출된 경우도 있었기 때문이다. 오염 문제는 가금용 백신에서 뿐만 아니라 인플루엔자, 홍역, 이하 선염 백신과 같이 닭 유래 세포로 생산하고 있는 사람용 백신에 있어서조차도 그동안 주요 관심사가 되어 왔다(Hauptli et al., 1997; Hussain et al., 2003; Monath et al., 1983; Shahabuddin et al., 2001; Tsang et al., 1999).

현행 백신의 특징 중의 하나인 백신 바이러스의 닭과 닭 상호간 수평 전파가 종종 문제시 되고 있다. 백신 바이러스가 계사 내에 순환하고 있는 병원성 바이러스와 닭의 일생 동안을 통해 섞일 수 있는 가능성은 충분히 있고, 순환하는 야외주가 진화하여 더욱 병원성이 증가하는 형질주의 출현도 가능할 것이다. 이론적으로 백신 바이러스가 수평 전파될 수 있다는 것은 접종 누락된 닭이나 방어력이 약화된 닭에 방어력을 제공할 수 있다는 측면에서 이점이 될 수도 있으나, 반면에 수평 전파됨으로써 병원성 바이러스를 더욱 출현하게 조장하는 경우로도 작용할 수 있을 것이다. 즉 병원성주에 완벽한 방어력이 형성되지 않은 닭에서 수평 전파의 가능성은 병원성주가 좀 더 병원성이 크고 복제 능력

이 증가할 수 있는 충분한 백신 압력으로 작용하여 병원성이 증가한 바이러스를 출현하게 할 수 있다. 아직은 이러한 가설을 뒷받침할 실험적인 근거는 없지만, 새로이 개발되는 백신의 특성 및 백신 처방전에는 개체별 백신 접종이 이루어져야 하며, 이상적으로 백신 바이러스의 닭 간 수평 전파가 이루어지지 않아야 한다는 조건이 포함되어야 한다. 한 가지 예로서 흥미로운 보고를 소개하면, pRB-1B BAC 클론을 접종한 닭에서 재구성된 바이러스의 경우는 감염되지 않은 대조군과 접촉해도 수평 전파가 이루어지지 않았다. 감염성 클론을 구축하는 과정 중에 mini-F vector 염기서열을 RB-1B 게놈에 삽입하고자 했을 때, 결과적으로 재조합된 감염성 클론에는 Us2 유전자의 결손이 발생하였다(Petherbridge et al., 2004). 이것은 닭 간 바이러스의 전파에 Us2 유전자 산물이 중요하게 작용하고 있을 가능성을 내포하고 있다. 비록 Us2 단백질이 *in vivo*나 *in vitro* 상에서 바이러스의 복제에 필수적이지는 않지만(Jarosinski et al., 2005; Parcells et al., 1994), 바이러스의 발아 및 전파에 중요할 것으로 추측되고 있다. 추가실험에서 Us2 유전자를 복원한 rRB-1B BAC 클론을 접종한 닭에서 재구성된 바이러스의 감염은 우포 상피세포에서 검출되었지만, 대조군과 접촉해도 여전히 수평 전파는 효과적으로 이루어지지 않았다.

앞서 언급했듯이 현행 백신의 또 다른 문제는 기본적으로 잘 규명되지 않은 다양한 유전 형질의 바이러스가 조직 배양 세포를 통해 산생된다는 점이다. 계대 배양이 거듭됨에 따라 MDV의 게놈 구성이 변한다는 것은 잘 알려진 사실이며, 이것은 조직 배양을 진행하는 과정에서 다양한 변이가 발생하여 *in vitro* 증식능에 영향을 미치고 있다. 예를 들면, JM-16주의 계대 배양으로 RLORF4 결손주가 개발되었는데, 이는 16번 계대 배양까지는 완벽한 전체 길이의 copy만을 보이지만 43번째 계대 배양에서는 전체 길이를 가진 것과 잘려진 것이 혼재된 copy가 모두 나타났으며 71번째 계대 배양에서는 잘려진 copy만이 나타났다(Jarosinski et al., 2003). 따라서 백신을 생산할 때에는 변이가 자연적으로 발생하게 되며, 이와 같이 본래 잘 규명되지 않은 바이러스 혼합물이 실제로 현행 백신을 통해 닭에 접종되고 있다. 혼합된 상태의 백신 바이러스로 닭에 접종하게 되면 이것 또한 병원성 바이러스의 병원성을 더욱 증가시키는 원인으로 작용할 수 있다. 그러나 감염성 BAC 클론의 형태와 같은 DNA 백신을 사용하게 되면 단일 상태로 더욱이 염기 서열 등 게놈의 특성이 잘 규명되고 균일한 상태로 접종할 수 있게 되므로 이상적인 생물학적 성상을 가진 백신 바이러스를 *in vivo*에서 재구성 할 수 있게 된다.

전문가 주석

감염성 MDV 게놈의 특이적인 조작을 가능하게 하는 DNA 재조합 기법은 개량 백신을 개발하는데 매우 중요하게 활용될 수 있다(Fig. 16). 질병을 일으키는 주요 유전자의 결손 혹은 단순 돌연변이 혹은 면역 방어를 증강시킬 수 있는 유전자를 추가하는 등 기존의 기법과는 달리 손쉽게 조작이 가능하다. 다른 기대되는 특성으로는 배양 세포에서 동질성 바이러스의 생산이 가능하며, 또한 뉴캐슬병 바이러스(NDV), 전염성 기관지염 바이러스(IBV), 전염성 F낭병 바이러스(IBDV), 조류 인플루엔자 바이러스(AIV) 등과 같은 다른 병원체에 대한 복합 백신 형태로도 백신을 디자인할 수 있다. 현재 본 연구 그룹에서도 우리나라 MDV 야외주에 대한 BAC 클론을 제작하여 백신 면역을 증강시키고자 다양한 시도를 수행해 오고 있으며, 궁극적으로 야외 현장에서 문제가 되고 있는 vv+ MDV에 대한 최적의 방어능을 보이는 백신개발에 박차를 가하고 있다.

한편, MDV gC는 높은 수준으로 발현되어 발현 단백질의 약 95%가 감염세포로부터 분비되기 때문에 'A 항원'으로 불리며(Isfort et al., 1986), UL44 유전자에 암호화되어 있다. MDV gC의 특이한 특성 중의 하나는 통상 높은 수준으로 발현되거나 배양 세포에서 계대 배양이 진행됨에 따라 급격한 발현 감소를 보인다는 점이다. 이와 같은 결과는 gC의 발현과 바이러스의 병원성과의 상관성이 있음을 반영하고 있으나, gC의 발현 유무가 실제로 병원성과 연계하고 있다는 납득할만한 증거는 없다. BAC20 클론은 vv+583A 바이러스를 계대 배양한 584Ap80C로부터 유래했기 때문에 gC의 발현량은 매우 적거나 거의 없는 상태이다(Schumacher et al., 2000). 따라서 몇몇 gC 돌연변이 바이러스에 gC 유전자를 복귀시키는 조작을 가하자 *in vitro* 배양에서 gC를 높은 수준으로 발현하게 되었고, 이에 따라 순화되지 않은 야외주와 같이 바이러스의 복제능이 감소되었다(Tischer et al., 2005). 이와 같은 실험 결과로부터 gC의 발현이 높은 수준으로 유지될수록 공격적 접종에 대한 방어 수준도 높을 것으로 가설을 세울 수 있었으나, 실제로는 gC를 과다 발현하는 바이러스가 야외주나 gC를 발현하지 않는 바이러스보다 덜 효과적인 방어 수준을 보이고 있음을 알 수 있었다(Fig. 17). 이러한 gC의 연구 결과는 MDV 백신에 변화를 가하고자 특정 유전자를 결정할 때에는 세심한 주의를 기울여야 한다는 사실을 시사해 주고 있다. 어떠한 유전자는 *in vitro* 나아가 *in vivo* 실험 결과에 입각해 결손 혹은 순화에 적합할 수도 있으나, 그렇지 않을 수도 있음을 염두에 두어야 한다.

향후 5년

최근까지 MDV에 대한 백신은 단지 종양을 유발하는 바이러스에 대항하는 백신으로서 주로 MD에 의한 불량 도계

Fig. 16. Schematic diagram of bacterial artificial chromosome (BAC) technology. BAC technology in herpesvirus genetics has made their genomes accessible to the tools of bacterial genetics. Cloning vector of the method based on the replicons of bacterial F plasmids. The BAC-cloned viral genome can be engineered in *E. coli* to introduce a mutation (black cross). Transfection of a BAC containing the mutated viral genome leads directly to mutant viral progeny.

육이 1970년에 1.5%에서 1999년에 0.0121%까지 감소시키는데 크게 기여하여(Witter, 2001), 지난 몇 십 년 동안에 걸쳐 가금 산업에 커다란 이익을 안겨주었으나, 백신 사용으로 인해 동시에 병원성을 증가시키는 결과도 가져오게 되었다. 오늘날 MDV 연구 기관이나 양계 산업 종사자 모두는 출현하는 새로운 병원성주의 세계적인 확산을 막을 수 있을 것이라고 전망하지만, 실제로는 단순한 문제로 해결하기 어려운 당면 과제이기 때문에 닭 생산자나 연구자 모두는 새로운 병원성주에 대한 경계를 늦출 수 없는 상태에 처해 있다. MDV의 병원성 증가는 종양을 유발하는 MDV의 능력이 증가되었음으로 이해하기 보다는 자연 숙주인 닭에서 바이러스의 복제가 보다 빨라지고 더욱 효과적으로 진화하고 있음으로 이해하는 것이 더욱 타당할 것이다. 현재까지의 연구 결과를 종합해 보면, 병원성이 상대적으로 낮은 바이러스와 높은 바이러스를 비교했을 때 병원성이 높은 바이러스는 감염 초기 닭에서 보다 빨리 복제가 이루어지며, 감염 전반에 걸쳐 바이러스의 복제가 높은 수준으로 유지되고 있으며, 또한 바이러스의 복제가 지연적으로 계속되어 통상 잠복기가

Fig. 17. Vaccination with gC-negative or gC over-expressing BAC20 virus and challenge with vvMDV. One-day-old P2a chickens were inoculated with either 1,000 plaque forming units (PFU) of reconstituted BAC20 (v20), gC-negative BAC20 (v20ΔgC), gC-negative BAC20 revertant with gC restored (v20ΔC-R), the start codon of gC mutated (v20ΔMgC), or BAC20 over-expressing gC (v20ExpG) viruses. SOgE cells were used as a negative control since each virus was reconstituted on SOgE cells. At 13 days post-vaccination, chickens were inoculated with 200 PFU of the vv RB-1B strain. Shown is the percent (%) survival of chickens over the course of 60 days post-challenge (Jarosinski et al., 2006).

늦게 이루어지고 있다(Calnek et al., 1998; Jarosinski et al., 2002, 2005).

초기의 백신은 병원성주의 계대 배양을 통해 순화시켜 선별된 MDV를 사용하였다. 이와 같은 방법은 바이러스의 병원성은 감소시킬 수는 있었으나, *in vivo*에서의 복제 능력의 감소도 동반되어 결국에 방어를 위한 강력한 면역 반응을 유도시키기에는 한계를 보이고 있다. 따라서 가장 이로운 특성을 가진 백신을 공급하기 위한 새로운 백신 개발에 DNA 재조합 기법이 주목받고 있으며, 현행 백신이 안고 있는 한계점을 극복한 미래 백신이 갖추어야 할 주요 특성에 주의를 기울여야 한다. 첫 번째로 주목해야 할 특성으로는 종양 뿐만 아니라 다른 형태의 질병도 유발시키지 않아야 한다는 점이다. 두 번째는 백신 바이러스가 병원성주의 복제 수준 이상으로 복제가 잘 이루어져야 하며, 결과적으로 면역계에 가장 최적의 기회를 제공하여 강력하고 지속적인 면역 반응을 형성시켜야 한다. 세 번째는 위에서도 언급했듯이 백신 바이러스는 분자 생물학적으로 잘 규명되어야 하며, 백신을 접종한 개체간의 수평 전파로 인해 발생할 수 있는 잠재적인 문제점을 피하기 위해 백신을 실시한 개체에서만 한정적으로 복제·증식이 이루어져야 한다.

새로운 기법을 이용한 MD 백신개발은 끊임없는 시행 착오를 거듭하면서도 지속되어야 하며, 머지않은 장래에는 가금 현장에서 제공할 수 있어야 한다. 전 세계적으로 가금 생산자나 소비자는 물론 MDV 연구기관에서도 새로이 개발되는 백신으로 병원성이 증가하는 야외 변이주에 대하여 효과적으로 방어하게 되기를 희망하고 있다.

사 사

본 총설은 (주)삼지약품과 인터베트코리아(주)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

인용문헌

- Abbassi H, Coudert F, Cherel Y, Dambrine G, Brugere-Picoux J, Naciri M 1999 Renal cryptosporidiosis (*Cryptosporidium baileyi*) in specific-pathogen-free chickens experimentally coinfectd, with Marek's disease virus. Avian Dis 43:738-744.
- Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Zsak L, Rock DL, Kutish GF 2001 The genome of turkey herpesvirus. J Virol 75:971-978.
- Baigent SJ, Smith LP, Nair VK, Currie RJ 2006 Vaccinal control of Marek's disease: Current challenges, and future strategies to maximize protection. Vet Immunol Immunopathol 112:78-86.
- Blasco MA 2002 Telomerase beyond telomeres. Nat Rev Cancer 2:627-633.
- Bradley G, Hayashi M, Lancz G, Tanaka A, Nonoyama M 1989a Structure of the Marek's disease virus BamHI-H gene family: Genes of putative importance for tumor induction. J Virol 63:2534-2542.
- Bradley G, Lancz G, Tanaka A, Nonoyama M 1989b Loss of Marek's disease virus tumorigenicity is associated with truncation of RNAs transcribed within BamHI-H. J Virol 63:4129-4135.
- Brown AC, Baigent SJ, Smith LP, Chattoo JP, Petherbridge LJ, Hawes P, Allday MJ, Nair V 2006 Interaction of MEQ protein and C-terminal-binding protein is critical for induction of lymphomas by Marek's disease virus. Proc Natl Acad Sci USA 103:1687-1692.
- Calnek BW 2001 Pathogenesis of Marek's disease virus infection. Pages 25-55 In: Marek's disease. Hirai K, (Ed.). Springer, Berlin, Germany.
- Calnek BW, Harris RW, Buscaglia C, Schat KA, Lucio B 1998 Relationship between the immunosuppressive potential and the pathotype of Marek's disease virus isolates. Avian Dis 42:124-132.
- Calnek BW, Schat KA, Peckham MC, Fabricant J 1983 Field trials with a bivalent vaccine (HVT and SB-1) against Marek's disease. Avian Dis 27:844-849.
- Cortes PL, Cardona CJ 2004 Pathogenesis of a Marek's disease virus mutant lacking vIL-8 in resistant and susceptible chickens. Avian Dis 48:50-60.
- Cui X, Lee LF, Hunt HD, Reed WM, Lupiani B, Reddy SM 2005 A Marek's disease virus vIL-8 deletion mutant has attenuated virulence and confers protection against challenge with a very virulent plus strain. Avian Dis 49:199-206.
- Cui X, Lee LF, Reed WM, Kung HJ, Reddy SM 2004 Marek's disease virus-encoded vIL-8 gene is involved in early cytolytic infection but dispensable for establishment of latency. J Virol 78:4753-4760.
- Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J et al 1995 The

- RNA component of human telomerase. *Science* 269:1236-1241.
- Fragnet L, Blasco MA, Klapper W, Rasschaert D 2003 The RNA subunit of telomerase is encoded by Marek's disease virus. *J Virol* 77:5985-5996.
- Fragnet L, Kut E, Rasschaert D 2005 Comparative functional study of the viral telomerase RNA based on natural mutations. *J Biol Chem* 280:23502-23515.
- Gimeno IM, Witter RL, Hunt HD, Reddy SM, Lee LF, Silva RF 2005 The pp38 gene of Marek's disease virus (MDV) is necessary for cytolytic infection of B cells and maintenance of the transformed state but not for cytolytic infection of the feather follicle epithelium and horizontal spread of MDV. *J Virol* 79:4545-4549.
- Hauptli D, Bruckner L, Ottiger HP 1997 Use of reverse transcriptase polymerase chain reaction for detection of vaccine contamination by avian leukosis virus. *J Virol Methods* 66: 71-81.
- Hussain AI, Johnson JA, Freire MD, Heneine W 2003 Identification and characterization of avian retroviruses in chicken embryo-derived yellow fever vaccines: Investigation of transmission to vaccine recipients. *J Virol* 77:1105-1111.
- Isfort RJ, Stringer RA, Kung HJ, Velicer LF 1986 Synthesis, processing, and secretion of the Marek's disease herpesvirus A antigen glycoprotein. *J Virol* 57:464-474.
- Izumiya Y, Jang HK, Ono M, Mikami T 2001 A complete genomic DNA sequence of Marek's disease virus type 2, strain HPRS24. Pages 191-221 In: Marek's disease. Hirai K, (Ed.) Springer, Berlin, Germany.
- Jarosinski KW, Njaa BL, O'Connell PH, Schat KA 2005 Pro-inflammatory responses in chicken spleen and brain tissues after infection with very virulent plus Marek's disease virus. *Viral Immunol* 18:148-161.
- Jarosinski KW, O'Connell PH, Schat KA 2003 Impact of deletions within the BamHI-L fragment of attenuated Marek's disease virus on vIL-8 expression and the newly identified transcript of open reading frame LORF4. *Virus Genes* 26: 255-269.
- Jarosinski KW, Osterrieder N, Nair VK, Schat KA 2005 Attenuation of Marek's disease virus by deletion of open reading frame RLORF4 but not RLORF5a. *J Virol* 79:11647-11659.
- Jarosinski KW, Schat KA 2006 Multiple alternative splicing to exons II and III of viral interleukin-8 (vIL-8) in the Marek's disease virus genome: The importance of vIL-8 exon I. *Virus Genes* 34:9-22.
- Jarosinski KW, Tischer BK, Trapp S, Osterrieder N. 2006 Marek's disease virus: Lytic replication, oncogenesis, and control. *Expert Rev Vaccines* 5:761-772.
- Jarosinski KW, Yunis R, O'Connell PH, Markowski-Grimsrud CJ, Schat KA 2002 Influence of genetic resistance of the chicken and virulence of Marek's disease virus (MDV) on nitric oxide responses after MDV infection. *Avian Dis* 46: 636-649.
- Kamil JP, Tischer BK, Trapp S, Nair VK, Osterrieder N, Kung HJ 2005 vLIP, a viral lipase homologue, is a virulence factor of Marek's disease virus. *J Virol* 79:6984-6996.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW 1994 Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266:2011-2015.
- Kingham BF, Zelnik V, Kopacek J, Majerciak V, Ney E, Schmidt CJ 2001 The genome of herpesvirus of turkeys: Comparative analysis with Marek's disease viruses. *J Gen Virol* 82:1123-1135.
- Kung HJ, Xia L, Brunovski P, Li, D, Liu JL, Lee LF 2001 Meq: An MDV-specific bZIP transactivator with transforming properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 255:245-260.
- Lee LF, Wu P, Sui D, Ren D, Kamil J, Kung HJ, Witter RL 2000 The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6091-6096.
- Levy AM, Gilad O, Xia L, Izumiya Y, Choi J, Tsalenko A, Yakhini Z, Witter R, Lee L, Cardona CJ, Kung HJ 2005 Marek's disease virus Meq transforms chicken cells via the v-Jun transcriptional cascade: a converging transforming pathway for avian oncoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 14831-14836.
- Liu HC, Soderblom EJ, Goshe MB 2006 A mass spectrometry-based proteomic approach to study Marek's disease virus gene expression. *J Virol Methods* 135:66-75.
- Lin J, Smith DL, Blackburn EH 2004 Mutant telomere sequences lead to impaired chromosome separation and a unique checkpoint response. *Mol Biol Cell* 15:1623-1634.
- Liu JL, Kung HJ 2000 Marek's disease herpesvirus transforming

- protein MEQ: a c-Jun analogue with an alternative life style. *Virus Genes* 21:51-64.
- Liu JL, Lin SF, Xia L, Brunovskis P, Li D, Davidson I, Lee LF, Kung HJ 1999 MEQ and vIL8: Cellular genes in disguise? *Acta Virologica* 43:94-101.
- Liu JL, Ye Y, Lee LF, Kung HJ 1998 Transforming potential of the herpesvirus oncoprotein MEQ: Morphological transformation, serum-independent growth, and inhibition of apoptosis. *J Virol* 72:388-395.
- Lupiani B, Lee LF, Cui X, Gimeno I, Anderson A, Morgan RW, Silva RF, Witter RL, Kung HJ, Reddy SM 2004 Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11815-11820.
- Martins-Green M 2001 The chicken chemotactic and angiogenic factor (oCAF), a CXC chemokine. *Int J Biochem Cell Biol* 33:427-432.
- Monath TP, Kinney RM, Schlesinger JJ, Brandriss MW, Bres P 1983 Ontogeny of yellow fever-17D vaccine - RNA oligonucleotide fingerprint and monoclonal-antibody analyses of vaccines produced world-wide. *J Gen Virol* 64: 627-637.
- Okada K, Tanaka Y, Murakami K, Chiba S, Morimura T, Hattori M, Goryo M, Onuma M 1997 Phenotype analysis of lymphoid cells in Marek's disease of CD4⁺ or CD8⁺ T-cell-deficient chickens: Occurrence of double negative T-cell tumour. *Avian Pathol* 26:525-534.
- Parcells MS, Anderson AS, Cantello JL, Morgan RW 1994 Characterization of Marek's disease virus insertion and deletion mutants that lack US1 (ICP22 homolog), US10, and/or US2 and neighboring short-component open reading frames. *J Virol* 68:8239-8253.
- Parcells MS, Lin SF, Dienglewicz RL, Majerciak V, Robinson DR, Chen HC, Wu Z, Dubyak GR, Brunovskis P, Hunt HD, Lee LF, Kung HJ 2001 Marek's disease virus (MDV) encodes an interleukin-8 homolog (vIL-8): Characterization of the vIL-8 protein and a vIL-8 deletion mutant MDV. *J Virol* 75:5159-5173.
- Petherbridge L, Brown AC, Baigent SJ, Howes K, Sacco MA, Osterrieder N, Nair VK 2004 Oncogenicity of virulent Marek's disease virus cloned as bacterial artificial chromosomes. *J Virol* 78:13376-13380.
- Petherbridge L, Howes K, Baigent SJ, Sacco MA, Evans S, Osterrieder N, Nair V 2003 Replication-competent bacterial artificial chromosomes of Marek's disease virus: Novel tools for generation of molecularly defined herpesvirus vaccines. *J Virol* 77:8712-8718.
- Qian Z, Brunovskis P, Lee L, Vogt PK, Kung HJ 1996 Novel DNA binding specificities of a putative herpesvirus bZIP oncoprotein. *J Virol* 70:7161-7170.
- Qian Z, Brunovskis P, Rauscher F, Lee L, Kung HJ 1995 Transactivation activity of Meq, a Marek's-disease herpesvirus bZIP protein persistently expressed in latently infected transformed T-cells. *J Virol* 69:4037-4044.
- Reddy SM, Lupiani B, Gimeno IM, Silva RF, Lee LF, Witter RL 2002 Rescue of a pathogenic Marek's disease virus with overlapping cosmid DNAs: Use of a pp38 mutant to validate the technology for the study of gene function. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7054-7059.
- Schat KA, Chen CL, Calnek BW, Char D 1991 Transformation of T-lymphocyte subsets by Marek's disease herpesvirus. *J Virol* 65:1408-1413.
- Schumacher D, Tischer BK, Fuchs W, Osterrieder N 2000 Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *J Virol* 74:11088-11098.
- Schumacher D, Tischer BK, Reddy SM, Osterrieder N 2001 Glycoproteins E and I of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. *J Virol* 75: 11307-11318.
- Schumacher D, Tischer BK, Teifke JP, Wink K, Osterrieder N 2002 Generation of a permanent cell line that supports efficient growth of Marek's disease virus (MDV) by constitutive expression of MDV glycoprotein E. *J Gen Virol* 83:1987-1992.
- Shahabuddin M, Sears JF, Khan AS 2001 No evidence of infectious retroviruses in measles virus vaccines produced in chicken embryo cell cultures. *J Clin Microbiol* 39:675-684.
- Shay JW, Bacchetti S 1997 A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33:787-791.
- Silva RF, Lee LF, Kutish GF 2001 The genomic structure of Marek's disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 255: 143-158.
- Smith LL, Collier HA, Roberts JM 2003 Telomerase modulates

- expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol* 5:474-479.
- Stewart SA, Hahn WC, O'Connor BF, Banner EN, Lundberg AS, Modha P, Mizuno H, Brooks MW, Fleming M, Zimonjic DB, Popescu NC, Weinberg RA 2002 Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12606-12611.
- Tischer BK, Schumacher D, Beer M, Beyer J, Teifke JP, Osterrieder K, Wink K, Zelnik V, Fehler F, Osterrieder N 2002 A DNA vaccine containing an infectious Marek's disease virus genome can confer protection against tumorigenic Marek's disease in chickens. *J Gen Virol* 83:2367-2376.
- Tischer BK, Schumacher D, Chabanne-Vautherot D, Zelnik V, Vautherot JF, Osterrieder N et al 2005 High-level expression of Marek's disease virus glycoprotein C is detrimental to virus growth *in vitro*. *J Virol* 79:5889-5899.
- Trapp S, Parcells MS, Kamil JP, Schumacher D, Tischer BK, Kumar PM, Nair VK, Osterrieder N 2006 A virus-encoded telomerase RNA promotes malignant T cell lymphomagenesis. *J Exp Med* 203:1307-1317.
- Tsang SX, Switzer WM, Shanmugam V, Johnson JA, Goldsmith C, Wright A, Fadly A, Thea D, Jaffe H, Folks TM, Heneine W 1999 Evidence of avian leukosis virus subgroup E and endogenous avian virus in measles and mumps vaccines derived from chicken cells: Investigation of transmission to vaccine recipients. *J Virol* 73:5843-5851.
- Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Rock DL, Kutish GF 2000 The genome of a very virulent Marek's disease virus. *J Virol* 74:7980-7988.
- Witter RL 1997 Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Dis* 41:149-163.
- Witter RL 1998 The changing landscape of Marek's disease. *Avian Pathol* 27:S46-S53.
- Witter RL 2001 Protective efficacy of Marek's disease vaccines. Pages 57-90 In: Marek's disease. Hirai K, (Ed.) Springer, Berlin, Germany.
- Witter RL 2005 Marek's disease: The continuing struggle between pathogen and host. *Vet J* 170:149-150.
- Witter RL, Burmester BR 1979 Differential effect of maternal antibodies on efficacy of cellular and cell-free Marek's disease vaccines. *Avian Pathol* 8:145-156.
- Witter RL, Lee LF 1984 Polyvalent Marek's disease vaccines - Safety, efficacy and protective synergism in chickens with maternal antibodies. *Avian Pathol* 13:75-92.
- Xie Q, Anderson AS, Morgan RW 1996 Marek's disease virus (MDV) ICP4, pp38, and meq genes are involved in the maintenance of transformation of MDCC-MSB1 MDV-transformed lymphoblastoid cells. *J Virol* 70:1125-1131.
- Yamaguchi T, Kaplan SL, Wakenell P, Schat KA 2000 Transactivation of latent Marek's disease herpesvirus genes in QT35, a quail fibroblast cell line, by herpesvirus of turkeys. *J Virol* 74:10176-10186.
- Zavala G, Cheng S 2006 Detection and characterization of avian leukosis virus in Marek's disease vaccines. *Avian Dis* 50:209-215.