

대장암에서 세포자멸사 유발성 bcl-2 Family 유전자의 돌연변이 연구

송영화 · 이종우 · 김수영 · 남석우
박원상 · 이정용 · 유남진 · 이석형

가톨릭대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2005년 2월 14일
게재승인 : 2005년 4월 4일

책임저자 : 이 석 형
우 137-701 서울시 서초구 반포동 505
가톨릭대학교 의과대학 병리학교실
전화: 02-590-1188
Fax: 02-537-6586
E-mail: suhulee@catholic.ac.kr

*이 연구는 2004년도 학술진흥재단 기초과학 연구지원 연구비로 이루어졌음(E00082).

Mutational Analysis of Proapoptotic bcl-2 Family genes in Colon Carcinomas

Young Hwa Soung, Jong Woo Lee, Su Young Kim, Suk Woo Nam, Won Sang Park, Jung Young Lee, Nam Jin Yoo and Sug Hyung Lee

Department of Pathology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Background : Several lines of evidence have indicated that the deregulation of apoptosis is involved in the mechanisms of cancer development, and somatic mutations of the apoptosis-related genes have been reported in human cancers. Members of the bcl-2 family proteins regulate the intrinsic apoptosis pathway mainly in the mitochondria. The aim of this study was to explore whether the somatic mutation of the proapoptotic bcl-2 family genes, one of the mechanisms that prolong the survival of cancer cells, occurred in colorectal carcinomas. **Methods :** In the current study, to detect the somatic mutations in the DNA sequences encoding the bcl-2 homology 3 (BH3) domain of the human *bak*, *bid*, *bik*, *bim*, *PUMA*, *bcl-rambo*, *bcl-G*, and *bmf* genes in 98 colon adenocarcinomas, we used polymerase chain reaction (PCR), single strand conformation polymorphism (SSCP), and DNA sequencing. **Results :** The SSCP analysis detected no evidence of somatic mutations of the genes in the coding regions of the BH3 domain in the cancers. **Conclusions :** The data presented here indicate that the proapoptotic bcl-2 family genes, *bak*, *bid*, *bik*, *bim*, *PUMA*, *bcl-rambo*, *bcl-G* and *bmf* may not be somatically mutated in human colorectal carcinomas, and suggest that the colorectal cancers may not utilize mutational events of these proapoptotic bcl-2 family genes in the mechanisms for evading apoptosis.

Key Words : Colonic neoplasms; Genes; bcl-2; Apoptosis; Mutation

세포자멸사는 세포사의 주된 발생기전으로 조직의 항상성, 세포분화 및 발생에 중요한 역할을 하며, 세포자멸사 조절 이상은 퇴행성 질환, 종양, 에이즈 등 여러 질병을 유발한다.¹⁻³ 정상세포에 비하여 암세포는 일반적으로 생리적 자극에 대해 사멸이 잘 유발되지 않는 특성이 있으며, 이런 특성은 종양의 발생, 종양의 성장 및 전이에도 중요한 역할을 한다.³

세포사를 유발하는 경로는 많지만, 내인성 경로와 외인성 경로로 나누는 것이 가장 흔한 분류법이다.¹ 외인성 경로는 Fas, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 같은 tumor necrosis factor family에 의해서 유발되고, 내인성 경로는 성장인자의 소실, 저산소증, 방사선 조사, 항암제 등에 의해서 유발된다.¹⁻³ 내인성 경로는 bcl-2 family에 의해서 주로 조절되는데, bcl-2 family는 크게 세포자멸사 유발성과 세포자멸사 길항성으로 나뉜다.¹ 이들 bcl-2 family 구성원은 서로 결합하여 homodimer 및 heterodimer로서 복잡한 조절 체계를

구성하며, bcl-2 family 단백질의 상대적 비율은 세포자멸사의 반응정도를 결정하는 중요한 인자다.¹

포유동물의 bcl-2 family 단백질은 약 20종류가 밝혀져 있고, 이들 모두에는 한 종류 이상의 bcl-2 homology (BH) domain이 있다.¹ BH domain 중 BH3 domain은 세포사를 유발하는데 필요 충분한 domain이다. Proapoptotic bcl-2 family 단백질에는 bad, PUMA, Hrk, bcl-G, Noxa, bim, bcl-rambo, bax, bik, bax, bid, bmf 등이 있으며, 이들 모두에는 BH3 domain이 있고 대부분의 경우 세포사 유발은 BH3 domain의 존재에 의존한다.^{1-2,4-9}

세포자멸사 기전에 관여하는 물질의 이상이 발암 과정에 중요한 역할을 한다는 증거들이 많이 제시되고 있으며, bcl-2 family 단백질의 이상 역시 이 과정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.¹⁰⁻¹² 세포자멸사 유발성 bcl-2 family 유전자인 *bax*, *bak*, *bid*, *bad* 유전자의 돌연변이는 각 유전자 산물의 세포사 능력을 소실

하게 하여 종양세포의 생존을 증대시킴으로써 암 발생과 연관이 있는 것으로 알려져 있다.¹²⁻¹⁴

*bid*와 *bak*는 위암에서 돌연변이가 발견되었으며,^{13,14} *bax*, *bak*와 *bad* 유전자의 돌연변이는 대장암에서 발견되었다.¹⁴⁻¹⁶ 세포자멸사 유발성 *bcl-2* 유전자의 돌연변이가 여러 종양에서 발견된 사실과 *bak*, *bad* 및 *bax*의 돌연변이가 대장암에서 발견된 사실은 대장암에서 *bad*, *bak*와 *bax* 이외에 proapoptotic *bcl-2* family 유전자들의 돌연변이가 일어날 가능성을 제시한다.

이에 저자들은 proapoptotic *bcl-2* family 유전자 중 이제까지 대장암에서 일어난 돌연변이에 대한 연구가 없었던 *bid*, *bik*, *bim*, *PUMA*, *bcl-rambo*, *bcl-G*, *bmf* 유전자와 한국인의 대장암에서 돌연변이 연구가 이루어지지 않은 *bak* 유전자에 대하여 세포자멸사 유발에 중요한 BH3 domain의 돌연변이를 연구하였다.

재료와 방법

연구 대상

2001년 이후 대장절제술을 받고 대장암 진단을 받은 98명 환자의 대장암 조직을 대상으로 하였다. 대장암 환자의 파라핀 포매 조직에 헤마톡실린-에오진 염색을 실시한 후 2명의 병리 의사가 독립적으로 진단하였는데, 이들은 모두 샘암종이었고, 모두 점막내근육 이상으로 암세포가 침습한 상태였다. 종양의 해부학적 분포는 막창자 2예, 오름창자 18예, 가로창자 6예, 내림창자 3예, 구불창자 27예, 곧창자 42예였다. 환자의 연령 분포는 37세에서 80세로 평균연령은 57.7세였고, 성별 분포는 남자가 52예(53.1%) 여자가 46예(46.9%)였다. TNM 병기는 I기가 10예(10.2%), II기가 42예(42.8%), III기가 36예(36.7%), IV기가 10

예(10.2%)였다.

돌연변이 조사

헤마톡실린-에오진 염색된 조직에서 미세절제술을 이용하여 암세포 및 정상세포를 각각 분리 수집한 후, proteinase K를 처리하여 DNA를 얻었다. 미세절제술에는 30개이지 주사바늘을 부착한 수동형 미세절제 장비인 SPAM-II (금성과학, 서울)를 사용하였으며, 주사바늘을 고정한 채로 상하, 좌우, 전후 방향으로 현미경의 스테이지를 움직여서 원하는 부위를 미세절제하였다.¹⁷

각 유전자의 BH3 domain 부위를 증폭할 수 있는 시발체(primer)는 *bak*, *bid*, *bik*, *bim*, *PUMA*, *bcl-rambo*, *bcl-G* 및 *bmf*에 대하여 각각 1개씩 제작하였다(Table 1). 방사성 동위원소인 ([γ -³²P]-dCTP)를 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)에 포함시켜서 자기방사선상(autoradiogram)으로 중합효소연쇄반응 산물을 분석할 수 있게 하였다.

중합효소연쇄반응은 혼합액을 94°C에서 10분간 변성시킨 후 94°C에서 30초, 53-62°C에서 40초와 72°C에서 40초씩 각각 35회 반응시켰으며 72°C에서 5분간 연장반응을 실시하였다. Single strand conformation polymorphism (SSCP) 분석을 위해 중합효소 연쇄반응 산물을 비변성 겔에 전개한 후 겔을 건조하고 관찰하였다. 그리하여, 정상 DNA에서 관찰되는 야생형 띠 이외의 띠가 나타난 경우, 2회 이상 SSCP 결과를 반복하여 확인하고, cyclic sequencing kit (Perkin-Elmer, CA, USA)으로 DNA 염기서열을 분석하였다. SSCP, DNA 염기서열분석에 관한 내용은 이전 논문에서 자세하게 기술한 바 있다.¹⁷

결 과

미세절제를 통해서 암세포와 정상세포를 대장암 조직에서 선택적으로 분리할 수 있었다. 그리고, 추출된 DNA를 이용하여 *bak*, *bid*, *bik*, *bim*, *PUMA*, *bcl-rambo*, *bcl-G* 및 *bmf* 유전자의 BH3 domain을 코딩하는 DNA 부위의 돌연변이를 중합효소 연쇄반응 후 SSCP로 분석하였다. 중합효소 연쇄반응 산물은 모든 98개 샘플의 SSCP에서 잘 관찰되어서, 미세절제를 통한 DNA의 획득 및 중합효소 연쇄반응에 이상이 없음을 알 수 있었다(Fig. 1A-H). SSCP를 분석한 결과 중합효소 연쇄반응의 결과물은 정상조직의 DNA와 같이 야생형 띠로만 나타났으며, 돌연변이에서 보이는 이상 띠는 관찰할 수 없었다(Fig. 1A-H). 또한 이들은 염기서열 분석 결과, 돌연변이가 없는 정상 염기서열을 가지고 있었다(Fig. 1I-J). 이 실험은 미세절제, 중합효소 연쇄반응, SSCP 및 염기서열분석을 2회 반복하였으며, 결과는 2회 모두 일치하였다.

Table 1. Primers sequences of *bcl-2* family in BH3 domain

Gene	Sequence	Annealing temperature (°C)	Size (bp)
<i>bak</i>	F 5'-CTGCCTGGTACTGGCTCACC-3' R 5'-AGGAGTGACTGGAGCTGGCAG-3'	56	223
<i>bid</i>	F 5'-TCTGAGTCTGCTCTGTCTGCCC-3' R 5'-CTTGGCTCACTGGCCGCC-3'	58	210
<i>bik</i>	F 5'-CTCCACGGCACAGCCACAC-3' R 5'-CCCAGGTGTAGAGGCATAGGGC-3'	56	180
<i>bim</i>	F 5'-CCCAGCGATCTGTGGACCAC-3' R 5'-GGGTGTGAGCAGAAAAGCGG-3'	53	193
<i>PUMA</i>	F 5'-GGCGGAGCAGCACCTGGAGTCG-3' R 5'-TCCCACCTGCCGTCTACCCACC-3'	67	204
<i>bmf</i>	F 5'-ATGCTGGCTATCGGCTTCCTCTC-3' R 5'-CCCAGCAGACTCAACCCTCCTC-3'	63	299
<i>bcl-G</i>	F 5'-CTGGAATTTTCCCCGACAGATG-3' R 5'-AGGGAATAAGTTGCAACCTGG-3'	58	184
<i>bcl-rambo</i>	F 5'-ACAGGCTTTGACCGTCACAC-3' R 5'-CACAGGAGCATTTGCAATGC-3'	59	142

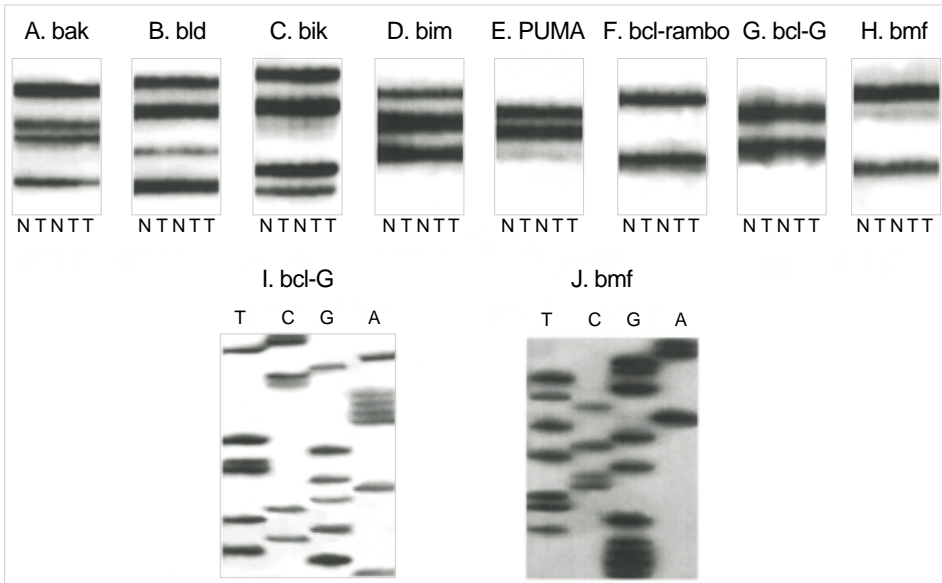


Fig. 1. SSCP analysis and DNA sequencing of *bak*, *bid*, *bik*, *bim*, *PUMA*, *bcl-rambo*, *bcl-G* and *bmf* in colon carcinomas. BH3 region of *bak*, *bid*, *bik*, *bim*, *PUMA*, *bcl-rambo*, *bcl-G* and *bmf* genes were amplified by PCR using the specific primer sets. The PCR products from the representative cases of *bak* (A), *bid* (B), *bik* (C), *bim* (D), *PUMA* (E), *bcl-rambo* (F), *bcl-G* (G) and *bmf* (H) genes were visualized on SSCP (A and C). Both DNAs from the

tumor tissues (T) and the corresponding normal tissues (N) show wild-type bands without any additional aberrant bands. From the representative bands of the SSCP, DNA sequences of *bcl-G* (I) and *bmf* (J) genes were analyzed. The DNA sequences were the same as the wild-type DNA sequences in the GenBank.

고찰

본 연구의 목적은 세포자멸사 유발에 중요한 역할을 하는 *bak*, *bid*, *bik*, *bim*, *PUMA*, *bcl-rambo*, *bcl-G* 및 *bmf* 유전자의 BH3 domain을 코딩하는 부위가 대장암에서 돌연변이를 가지고 있는지, 또 돌연변이가 있다면 그것이 이들 단백질의 불활성화를 유도하여 대장암의 발생 및 진행에 영향을 줄 수 있는지를 알아보고자 한 것이었다. 저자들은 이 유전자들의 BH3 domain이 98 예의 대장암조직에서 돌연변이가 되지 않았다는 것을 확인하였고, 이를 통해서 대장암의 발생기전에 이 부위의 돌연변이가 작용하지 않으리라는 것을 예측할 수 있었다.

이제까지 밝혀진 바에 의하면, 세포사에 연관된 유전자의 돌연변이는 해당 유전자의 가장 중요한 세포사 유발 부위에 집중적으로 나타나는 것이 흔하다. 세포사수용체인 *Fas*의 돌연변이는 사멸 영역에 집중된 것이 폐암 등에서, 다른 세포사수용체인 *TRAIL-receptor2*의 돌연변이가 역시 사멸영역에 집중된 것이 유방암 등에서 보고된 것이 그 예이다.^{18,19} 세포사멸의 최종 수행자인 caspase의 일종인 *caspase-10*은 protease subunit에 주로 돌연변이가 나타나 기능을 소실시킨다.²⁰ 그러나, *bcl-2* family 유전자의 돌연변이는, *bad*처럼 세포사에 가장 중요한 부위인 BH3 domain에 나타나기도 하지만, *bak*, *bax*, *bid*의 경우처럼 BH3 domain 이외의 부위에서 발견되는 경우가 많았다.¹³⁻¹⁶ 이는 *bcl-2* family 유전자의 돌연변이는 한 부위에 국한되어있지 않을 가능성을 제시한다고 하겠다. 본 연구는 돌연변이 검색 부위를 BH3 domain 인근 부위에 국한했기 때문에 다른 부위에 돌연변이가 존재할 가능성이 있으므로, 향후의 연구에는 BH3 이외의 부위를 돌연변이 검색에 포함시켜야 할 것으로 생각된다.

암세포의 사멸을 방해하는 기전은 여러 가지가 있는데, 돌연변이는 이 중 한가지 기전이다.¹ 그 이외에 DNA 메틸화, 단백질의 세포내 위치 변경, 단백질 발현 감소, 길항물질의 생성 증가, 인산화 등이 세포사멸을 유도하는 단백질의 기능을 불활성화시키는 방법이다.^{1,2} *bim* 단백질은 세포 골격기관인 미세관과 결합하면 불활성화되고,⁹ *bad* 단백질은 인산화되면 기능을 소실한다.⁴ 또한, *bcl-2* 단백질의 발현 증가는 암세포의 고사를 항암제 등의 고사유발기전으로부터 보호한다. 대장암은 *bcl-2*를 과발현하는 종양 중의 하나이다.²¹ 또한, 대장암에서는 *bax* 및 *bad* 유전자의 돌연변이가 암발생 및 진행에 중요한 것으로 이미 보고되어 있다. 본 연구 결과 대장암에서는 *bak*, *bid*, *bik*, *bim*, *PUMA*, *bcl-rambo*, *bcl-G* 및 *bmf*의 BH3 domain에 돌연변이가 발생하지 않을 가능성이 높다는 사실을 제시하며, 대장암에서 암세포의 세포사 억제기전의 이해를 위해서는 *bak*, *bid*, *bik*, *bim*, *PUMA*, *bcl-rambo*, *bcl-G* 및 *bmf* 유전자의 불활성화가 BH3 domain 돌연변이 이외에 다른 어떤 방법으로 일어나는지를 규명할 필요가 있다고 생각한다.

많은 연구가 대장암을 대상으로 시행되었지만, 많은 대장암 환자들이 매년 사망하고 있으며, 따라서 대장암의 조기 발견 및 진행을 예측하는 방법의 개발은 중요하다. 최근, *bcl-2* family에 대한 발현정도와 유전자 이상을 임상에 적용하려는 연구가 시도되고 있다.¹ 또한, 치료 관점에서 *bcl-2* family member를 소형 분자약제와 결합시켜서 종양의 세포자멸사를 유도하는 방법도 연구되고 있다.²² 이런 관점에서 본 연구는 비록 *bcl-2* family member의 돌연변이를 찾지 못하였지만, 향후의 *bcl-2* family를 대상으로 하는 연구에 중요한 정보를 제공하리라고 생각한다.

참고문헌

1. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1415-30.
2. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-65.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
4. Datta SR, Katsov A, Hu L, *et al.* 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 2000; 6: 41-51.
5. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, *et al.* Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 1998; 17: 384-95.
6. Inohara N, Ding L, Chen S, Nunez G. harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X (L). *EMBO J* 1997; 16: 1686-94.
7. Guo B, Godzik A, Reed JC. Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 2001; 276: 2780-5.
8. Oda E, Ohki R, Murasawa H, *et al.* Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288: 1053-8.
9. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001; 7: 683-94.
10. Chang J, Clark GM, Allred DC, Mohsin S, Chamness G, Elledge RM. Survival of patients with metastatic breast carcinoma: importance of prognostic markers of the primary tumor. *Cancer* 2003; 97: 545-53.
11. Krajewska M, Zapata JM, Meinhold-Heerlein I, *et al.* Expression of Bcl-2 family member Bid in normal and malignant tissues. *Neoplasia* 2002; 4: 129-40.
12. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, *et al.* bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989; 57: 79-88.
13. Lee JH, Soung YH, Lee JW, *et al.* Inactivating mutation of the proapoptotic gene BID in gastric cancer. *J Pathol* 2004; 202: 439-45.
14. Kondo S, Shinomura Y, Miyazaki Y, *et al.* Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res* 2000; 60: 4328-30.
15. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, *et al.* Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275: 967-9.
16. Lee JW, Soung YH, Kim SY, *et al.* Inactivating mutations of proapoptotic Bad gene in human colon cancers. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1371-6.
17. Lee JY, Dong SM, Kim SY, Yoo NJ, Lee SH, Park WS. A simple, precise, and economical microdissection technique for analysis of genomic DNA from archival tissue sections. *Virchows Arch* 1998; 433: 305-9.
18. Lee SH, Shin MS, Park WS, *et al.* Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1999; 18: 3754-60.
19. Shin MS, Kim HS, Lee SH, *et al.* Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res* 2001; 61: 4942-6.
20. Shin MS, Kim HS, Kang CS, *et al.* Inactivating mutations of CASP10 gene in non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2002; 99: 4094-9.
21. Sinicrope FA, Hart J, Michelassi F, Lee JJ. Prognostic value of bcl-2 oncoprotein expression in stage II colon carcinoma. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1103-10.
22. Reed JC. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell* 2003; 3: 17-22.