

## 폐암세포에 *p16 (MTS1)* 유전자 주입후 암생성능의 변화 및 세포주기관련 단백질의 변동에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 서울대학교 의학연구원 폐연구소, 단국대학교 의과대학 내과학교실\*

김영환, 김재열, 유철규, 한성구, 심영수, 이계영\*

= Abstract =

The Change of Cell-cycle Related Proteins and Tumor Suppressive Effect in Non-small Cell Lung Cancer Cell Line after Transfection of *p16(MTS1)* Gene

Young Whan Kim, M.D., Jae Yeol Kim, M.D., Chul Gyu Yoo, M.D.,  
Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D. and Kye-Young Lee, M.D.\*

Department of Internal Medicine and Lung Institute, Seoul National University, College of Medicine,  
Seoul, Korea and Department of Internal Medicine, Dankook University, Cheonan, Korea\*

**Background :** It is clear that deregulation of cell cycle progression is a hallmark of neoplastic transformation and genes involved in the G<sub>1</sub>/S transition of the cell cycle are especially frequent targets for mutations in human cancers, including lung cancer. *p16* gene product, one of the G<sub>1</sub> cell-cycle related proteins, that is recently identified plays an important role in the negative regulation of the the kinase activity of the cyclin dependent kinase (cdk) enzymes. Therefore *p16* gene is known to be an important tumor suppressor gene and is also called *MTS1* (multiple tumor suppressor 1). No more oncogenes have been reported to be frequently related to multiple different malignancies than the alterations of *p16* gene. Especially when it comes to non-small cell lung cancer, there was no expression of p16 in more than 70% of cell lines examined. And also it is speculated that *p16* gene could exert a key role in the development of non-small cell lung cancer. This study was designed to evaluate whether *p16* gene could be used as a candidate for gene therapy of non-small cell lung cancer.

**Methods :** After the extraction of total RNA from normal fibroblast cell line and subsequent reverse transcriptase reaction and polymerase chain reaction, the amplified *p16* cDNA was subcloned into eukaryotic expression plasmid vector, pRC-CMV. The constructed pRC-CMV-p16 was transfected into the NCI-H441 NSCLC cell line using lipofectin. The changes of G<sub>1</sub> cell-cycle related proteins were investigated with Western blot analysis and immunoprecipitation after extraction of proteins from cell lysates and tumor suppr-

이 논문은 1995년도 서울대학교병원 신진연구비(05-95-001) 지원에 의해 이루어진 것임

essive effect was observed by clonogenic assay.

**Results :** (1) *p16(-)* NCI-H441 cell line transfected with pRC-CMV-p16 showed the formation of p16 : cdk 4 complex and decreased phosphorylated Rb protein, while control cell line did not. (2) Clonogenic assay demonstrated that the number of colony formation was markedly decreased in *p16(-)* NCI-H441 cell line transfected with pRC-CMV-p16 than the control cell line.

**Conclusion :** It is confirmed that the expression of p16 protein in p16 absent NSCLC cell line with the gene transfection leads to p16 : cdk4 complex formation, subsequent decrease of phosphorylated pRb protein and ultimately tumor suppressive effects. And also it provides the foundation for the application of *p16* gene as a important candidate for the gene therapy of NSCLC.

**Key words :** *p16*, Tumor suppressor gene, Cell cycle, pRb, Cyclin dependent kinase inhibitor, Non-small cell lung cancer

## 서 론

지난 10여년간 폐암의 진단과 치료에 있어서는 주목할만한 발전이 없었으나 같은 기간동안 이루어진 암발생과 진행에 대한 분자생물학적 연구에서는 실로 혁명적이라는 평가를 받을 만큼 중대한 진보를 이루어내었다. 이중에서도 일련의 유전자군이 정상세포의 성장조절에 참여함과 동시에 각종 악성종양에서 발생하는 유전자변이의 목표가 된다는 사실이 밝혀짐으로써, 비록 종양의 조직학적 분류에 따라 그 원인적, 임상적, 생물학적인 차이는 있지만 이들 유전자변이에 의한 활성화 또는 불활성화가 종양발생의 근간을 이루고 있다는 개념이 정립되게 되었다.

세포주기는 네가지 시기로 세분되고 있는데 DNA 합성을 준비하는 시기인 G<sub>1</sub>기, DNA 합성시기인 S기, 세포 분열을 준비하는 시기인 G<sub>2</sub>기, 유사분열이 실제로 일어나는 M기 등이 그것이다. 체내에서 세포분열 활동을 하지 않는 세포들은 종말분화된 세포이거나, 세포주기에 재진입하지 못하여 G<sub>0</sub>기에서 일시적으로 정지되어 있는 상태이거나, G<sub>1</sub>/S 또는 G<sub>2</sub>/M checkpoint에 걸려 정지되어 있거나 하는 상태이다. 이러한 세포주기의 분자적 조절장치의 중심이 되는 것이 cdk (cyclin-dependent kinase)라는 효소군으로서 그 이름이 시사하는 바와 같이 cyclin이라는 단백

질과 결합하여 복합체를 형성함으로써 활성화되어 목표분자들을 인산화시킴으로써 세포주기를 진행시킨다. 그런데 이러한 세포주기의 활성화, 그 중에서도 특히 G<sub>1</sub>/S 이행에 관여하는 세포주기관련 단백질들은 암발생에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

G<sub>1</sub> 세포주기 관련 단백질 중의 하나인 cdk4 (cyclin dependent kinase 4)의 억제제로 알려져 있는 *p16* 유전자는 최근에 밝혀진 종양억제유전자중의 하나로서 MTS1 (multiple tumor suppressor 1)이라고도 불린다. 이 유전자는 원래 유전성 악성흑색종의 암억제유전자로 발견된 것인데<sup>1)</sup> 이 유전자가 다른 여러 종류의 암세포주에서도 그 변이가 흔히 관찰된다는 사실이 밝혀져 multiple tumor suppressor 1 (MTS1)이라고 불리게 되었다<sup>2,3)</sup>. 흥미로운 사실은 *p16*이 과거에 이미 발견되어 있던 G<sub>1</sub> 세포주기 활성화에 관여하는 cdk4의 억제단백질인 CDKN2(*p16*<sup>INK4A</sup>)와 동일물질이라는 점이다<sup>4)</sup>.

*p16* 유전자가 폐암 특히 비소세포폐암에서 주목받고 있는 근거로는 우선 기왕의 세포유전학적 연구자료에서 비소세포폐암 세포주의 85%에서 염색체 9p21의 소실이 발견된다는 사실을 밝히면서 이 유전자의 존재를 이미 예기한 바 있으며 염색체 9p21은 바로 *p16* 유전자가 위치하는 곳과 일치한다는 점을 들 수

있겠다<sup>5-8)</sup>. 따라서 *p16* 유전자는 비소세포폐암 발생에 매우 중요한 역할을 하고 있을 가능성이 높다고 판단되며 그 동안 이 점에 대하여 관심이 집중되어져 왔다.

본 연구는 종양발생에 있어서 중요한 역할을 하는  $G_1$  세포주기 관련 단백질 중 *cdk4*를 억제함으로써 암억제효과를 나타낸다고 최근에 알려진 암억제유전자 *p16* (*MTS1*)을 *p16*이 결여된 비소세포폐암 세포주에 유전자이입을 시행하여 암억제효과가 유도되는지 그리고  $G_1$  세포주기관련 단백질들에 어떠한 변동이 초래되는지를 확인함으로써 비소세포폐암에서 *p16*을 이용한 유전자치료의 타당성에 대한 기초자료를 얻기 위하여 다음과 같은 사항들을 연구하고자 하였다.

첫째, *p16*이 결여된 비소세포폐암 세포주에 *p16* 유전자를 이입한 후 *p16* 단백질이 효과적으로 발현되는지를 확인하고자 하였다.

둘째, *p16*이 결여된 비소세포폐암 세포주에 *p16* 유전자를 이입함으로써 *p16*, *pRB* 및 *cdk4*등  $G_1$  세포주기관련 단백질들에 어떠한 상호 변동이 초래되는지를 확인하고자 하였다.

셋째, *p16*이 유전자주입된 비소세포폐암 세포주에서 colony 형성능을 대조 세포주와 비교 관찰함으로써 종양억제효과가 유도되는지를 확인하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포주 및 세포배양

미국 국립암연구소 (NCI)의 Frederic J. Kaye 박사로부터 제공받은 세포주로서 *p16* 단백질을 발현하지 않는 비소세포폐암 세포주인 NCI-H441 세포주와, *p16* 단백질을 발현하는 비소세포폐암 세포주인 NCI-H2009를 사용하였다.

### 2. *p16* expression vector(pRC-CMV-p16)

*p16*을 발현하는 vector로 사용된 pRC-CMV-p16 plasmid vector 는 미국 국립암연구소의 Frederic J. Kaye 박사로부터 제공받아 사용하였다. 대조 vector 로는 pRC-CMV를 사용하였다.

### 3. 유전자 이입(transfection)

*p16* 단백질을 발현하지 않는 비소세포폐암 세포주인 NCI-H441 세포주와 *p16* 단백질을 발현하는 비소세포폐암 세포주인 NCI-H2009에 lipofectin (Gibco-BRL)을 이용하여 pRC-CMV-p16 plasmid 또는 pRC-CMV를 유전자 이입하였다.

우선 각 세포주를 70% 정도의 confluency를 유지할 정도로 배양한 후 serum reduced media인 OptiMEM (=2% serum : Gibco-BRL)으로 2회 반복 세척한 후 세포배양접시 (100mm)당 5ml씩 첨가하여 유전자 이입을 위한 세포주를 준비하였다. Polypropylene tube에 lipofectin 50  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)와 OptiMEM 50  $\mu$ l를 혼합하여 100  $\mu$ l lipofectin 용액을 준비하고 다른 tube에 pRC-CMV-p16 plasmid DNA 용액 2  $\mu$ l (5  $\mu$ g/ $\mu$ l)와 OptiMEM 98  $\mu$ l를 혼합하여 100  $\mu$ l의 DNA 용액을 준비하여 두 용액을 혼합하여 잘 섞은 후, 미리 준비된 각 세포주 배양접시에 한방울씩 떨어뜨린 후 균일하게 혼합되도록 하였다. 이 때 pRC-CMV plasmid DNA 용액 2  $\mu$ l (5  $\mu$ g/ $\mu$ l)와 OptiMEM 98  $\mu$ l를 혼합하여 만든 100  $\mu$ l의 DNA 용액을 다른 tube에 준비하여 같은 방법으로 진행하여 유전자 이입에 대한 negative control로 사용하였다. 이후 각 세포주를 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 밤새 배양하고, OptiMEM과 lipofectin 용액을 제거한 후 원 세포배양액 (RPMI-1640+10% fetal bovine serum+ 페니실린 100단위/ml, 스

트렘토마이신 100  $\mu\text{g/ml}$ 로 교환해준 뒤 48시간을 추가 배양하였다.

#### 4. p16과 pRb에 대한 Western blot

p16 단백질을 발현하지 않는 비소세포폐암 세포주인 NCI-H441과 p16 단백질을 발현하는 비소세포폐암 세포주인 NCI-H2009에서 wild type의 p16 단백질을 발현여부를 확인하기 위하여, 그리고 *p16(-)*인 NCI-H441 세포주에 *p16*이 유전자 주입된 NCI-H441-p16 세포주에서 p16 단백질과 Rb 단백질이 발현되는지를 확인하기 위하여 polyclonal rabbit anti-human p16 (Pharmigen)과 monoclonal mouse anti-human Rb (Pharmigen)을 1차 항체로 이용하여 Western blot analysis를 시행하였다.

#### 5. 면역침전에 의한 p16 : cdk4 복합체 형성 확인

*p16(-)*인 NCI-H441 세포주에 *p16* 유전자 이입을 시행한 뒤에 초래되는 p16 : cdk4 단백질 복합체의 변동을 확인하기 위하여 anti-cdk4 특이항체와 protein A-Sepharose bead로서 면역침전시켜 각 복합체를 분리한 후 polyclonal rabbit anti-human p16을 이용하여 Western blot analysis를 시행함으로써 각 복합체의 존재여부를 확인하였다.

#### 6. Clonogenic assay

*p16(-)*인 NIH-H441 세포주에 위에 기술한 바와 같이 lipofectin을 이용해 *p16* 유전자 또는 대조유전자 이입을 시행한 후 이에 의한 암억제 효과를 관찰하기 위하여 G418을 이용하여 선택배양함으로써 형성되는 colony를 염색하여 계수하였다.

*p16(-)*인 NIH-H441 세포주에 위에 기술한 바와 같이 *p16* 유전자 또는 대조유전자 이입 후 72시간이 경과하면 각군의 세포주 배양접시를 두 개씩 준비한 후 G418을 150  $\mu\text{g/ml}$  농도로 첨가한 후 약 2주 이

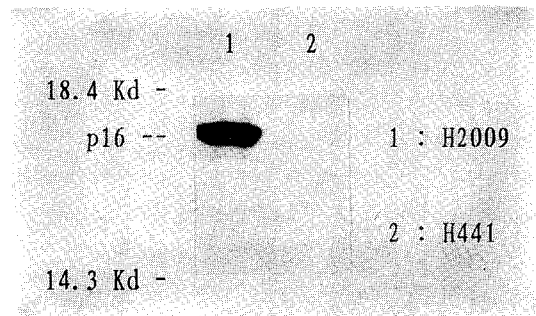
상 배양하면서 단일 colony가 육안적으로 관찰되면 각각의 plate를 methanol fixation한 후 crystal violet staining하여 colony수를 계수하여 대조 비교하였다.

## 결 과

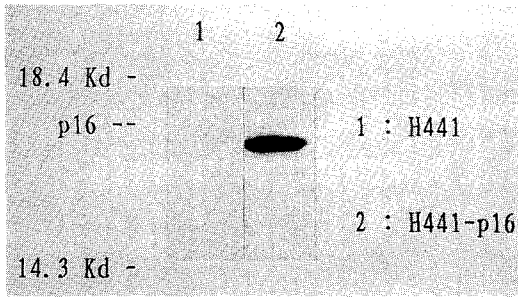
### 1. 유전자 이입에 의한 p16 단백질의 발현

본 실험을 위해서 크게 두가지 종류의 비소세포폐암 세포주를 사용하였다. 하나는 p16 단백질을 발현하지 않는 비소세포폐암 세포주인 NCI-H441 세포주이고 다른 하나는 p16 단백질을 발현하는 비소세포폐암 세포주인 NCI-H2009이다. 이들 각 세포주에서 wild type의 p16 단백질을 발현하는지를 확인하기 위하여 polyclonal rabbit anti-human p16 (Pharmigen)을 사용하여 Western blot analysis를 시행한 결과, NCI-H2009 세포주에서는 positive signal이 관찰되었지만 NCI-H441 세포주에서는 negative result가 나와 세포주 선택에 이상이 없었음을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

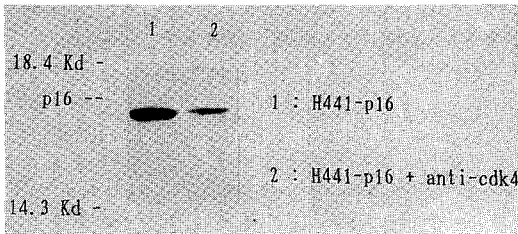
*p16*이 결여된 NCI-H441 세포주에 유전자 이입을 통해 p16 단백질을 발현시키기 위해 CMV promoter를 이용한 expression vector인 pRC-CMV에



**Fig. 1** Western blot analysis of the expressed p16 protein in NCI-H2009 and NCI-H441 NSCLC cell lines

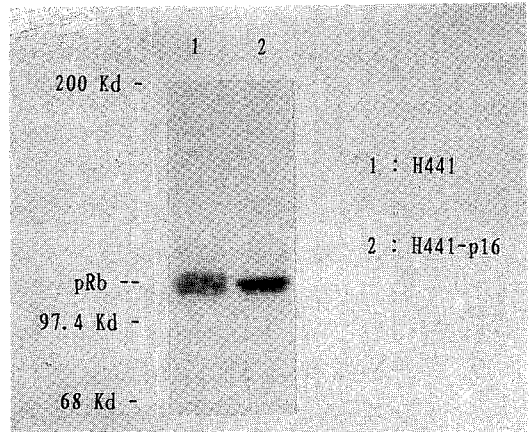


**Fig. 2.** Western blot analysis of the expressed p16 protein in *p16(-)* NCI-H441 NSCLC cell line and NCI-H441-p16 NSCLC cell line transfected with pRC-CMV-p16



**Fig. 3.** Identification of p16 : cdk4 complex formation in vivo in *p16(-)* NCI-H441 cell line after transfection with pRC-CMV-p16

*p16* cDNA를 subcloning한 pRC-CMV-p16을 lipofectin방법으로 NCI-H441 세포주에 유전자 이입을 시행하였다. *p16*이 유전자 이입된 NCI-H441-p16 세포주에서 p16 단백질이 적절히 발현되는지를 확인하기 위하여 polyclonal rabbit anti-human p16 (Pharmigen)을 사용하여 Western blot analysis를 시행한 결과, NCI-H441 세포주에서는 negative result가 나왔으나 NCI-H441-p16 세포주에서는 positive signal이 관찰되어 *p16(-)*인 NCI-H441 세포주에 *p16* 유전자가 정확히 이입되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).



**Fig. 4.** Western blot analysis of the expressed pRb protein in NCI-H441 cell line and NCI-H441-p16 cell line transfected with pRC-CMV-p16

## 2. *p16* 유전자 이입 후의 G<sub>1</sub> 세포주기 관련 단백질 변동

### 2-1. p16 : cdk4 복합체 형성

p16과 cdk4가 in vivo에서 복합체를 형성하는가에 대한 확인은 polyclonal rabbit anti-human cdk4 특이항체와 protein A-sepharose beads를 이용해 면역침전시키고 SDS-PAGE로 분획화한 후 polyclonal rabbit anti-human p16을 1차항체로 하여 Western blot 분석을 시행하였다. 그 결과, p16 : cdk4 복합체를 형성하고 있음을 확인할 수 있었고 (Fig. 3) 이로써 cdk4 : cyclin D1 복합체가 Rb를 인산화시키며 불활성화시키는 경로에 p16이 cdk4와 결합함으로써 작용하고 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

### 2-2. pRb 단백질 발현의 변화

*p16*이 유전자 이입된 NCI-H441-p16 세포주에서

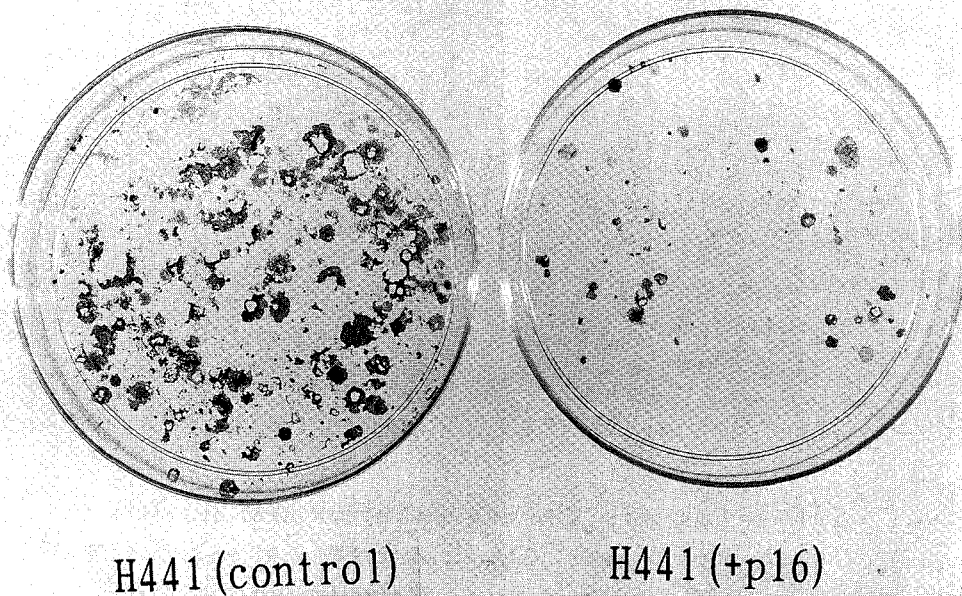


Fig. 5. Clonogenic assay of NCI-H441 transfected with pRC-CMV and pRC-CMV-*p16*

pRb 단백질 발현에 어떤 변화가 초래되는지를 확인하기 위하여 monoclonal mouse anti-human pRb (Pharmigen)을 사용하여 Western blot analysis를 시행한 결과, 대조 세포주인 NCI-H441 세포주에서보다 NCI-H441-p16 세포주에서 signal band의 두께가 감소하였는데(Fig. 4) 이는 phosphorylated Rb가 감소하였음을 나타내는 사실이다. 이로서 외부에서 이입된 *p16*에 의해서도 분자적 작용기전이 Rb 인산화를 억제함으로써 작용한다는 사실을 확인할 수 있었다.

### 3. *p16* 유전자 이입에 의한 암억제 효과

*p16* 유전자 이입에 의한 암억제 효과를 확인하기 위하여 *p16*(-)인 NCI-H441 세포주에 *p16* 유전자 또는 대조유전자를 이입한 후 clonogenic assay를 시행하였다. 각 세포주마다 두 개의 배양접시를 준비하여 G418 존재하에 2주 이상 배양하여 형성된 colo-

ny 수를 계수하여 비교하였는데 그 결과 대조세포주는 colony 수가 각각 163개와 145개가 형성된 반면, NCI-H441-p16 세포주에서는 colony 수가 각각 51개와 23개로써 NCI-H441-p16 세포주에서 대조 세포주에 비해 현저한 colony 형성능의 저하가 관찰되었다(Fig. 5). 이러한 결과에서 *p16*(-)인 비소세포폐암 세포주에 *p16* 유전자 이입으로 현저한 암억제 효과가 유도됨을 확인할 수 있었다.

## 고 찰

*p16* 유전자가 세포주기 조절을 통해 종양억제유전자로서의 기능을 발휘한다는 분명한 근거는 여러 연구결과에서 확인할 수 있다. 첫째로, *p16* 유전자는 염색체상 9p21q에 위치하는데, 9p21q는 폐, 신장, 난소, 췌장, 유방, 방광, 두경부, 식도 등의 암종 (carcinoma)과 신경교종, 악성 흑색종, 백혈병, 골육종 등 여러 다양한 종양에서 잦은 빈도로 결손되는 부위라는

점이고<sup>2,3,9-11)</sup>, 둘째로는, 이러한 여러 종양에서 얻어진 세포주들에서 *p16* 유전자의 동형 결손 (homogygous deletion)과 *p16* 자체의 돌연변이가 흔히 관찰된다는 점이며<sup>12,13)</sup>, 셋째로는, 가족형 악성 흑색종 및 레에서 *p16* 유전자의 돌연변이가 확인되었다는 점이며<sup>10,13,14)</sup>, 넷째로는, *p16* 단백질이 in vitro 에서 *cdk4* : cyclin D 복합체의 활성을 억제하여 세포증식의 음성 조절인자로 작용한다는 점이다<sup>15,16)</sup>. 반면 이러한 근거에 반하여 의문을 제시하는 의견도 있는데, 여러 종양의 배양 세포주에서는 *p16* 유전자의 변이가 흔히 발견되기는 하지만 배양되지 않은 1차 종양에서는 결손이나 돌연변이와 같은 유전자 변이의 빈도가 훨씬 낮다는 점이다<sup>11-13,17,18)</sup>. 따라서 비소세포폐암에서 *p16*에 의한 종양억제효과를 확인하여 *p16* 유전자요법의 타당성에 대한 기초 자료를 얻기 위해서는 *p16*이 결손된 비소세포폐암 세포주에 *p16* 유전자 이입을 시행하여 발현시킨 후 종양형성능에 어떠한 변화가 초래되는지를 확인하는 것이 가장 중요하기 때문에 본 연구를 시행하였다. 본 연구에서는 plasmid vector를 이용하여 *p16(-)*인 NCI-H441 세포주 세포주에 lipofectin을 이용하여 *p16* 유전자 이입을 시행한 후 colony 형성능으로서 종양억제효과를 관찰하였는데 유전자 이입을 시행하지 않은 세포주에 비해 현저한 colony 형성능의 감소가 관찰되어, 이러한 결과들로 볼 때 적어도 비소세포폐암 세포주에서는 *p16* 유전자 이입에 의해 종양억제효과가 분명히 유도된다는 사실을 확인할 수 있었다.

*p16* 유전자 이입에 의한 종양억제효과를 관찰한 다른 연구 결과들을 살펴보면, Okamoto등<sup>19)</sup>은 식도상피암 세포주에 pRC/CMV plasmid vector를 이용하여 *p16* 유전자를 이입한 결과 colony 형성능이 감소함을 확인하였고, Arap 등<sup>20)</sup>도 *p16*이 결손된 신경교종 세포주에 calcium phosphate법으로 *p16* 유전자를 이입하여 종양억제효과를 관찰한 결과 뚜렷한 신경교종 세포주의 성장억제 효과를 확인할 수 있었다. 반면 Arap 등이 시행한 같은 연구에서 *p16* 양성으로 wild-type의 *p16* 단백질을 발현하는 신경교종 세

포주에 *p16* 유전자 이입을 시행한 경우는 세포증식 억제 효과를 관찰할 수 없었다. 그 기전으로서는 확실치는 않지만 *p16* 자율조절에 의한 항상성 유지를 위해 *p16*의 목표물인 CDK4나 cyclin D등이 증폭 또는 과발현되거나<sup>21,22)</sup> G<sub>1</sub>/S 세포주기 이행에 관여하는 또다른 유전자적 경로 이른바 *p53-p21<sup>WAF1</sup>* 등이 불활성화되거나 과발현되어 나타나는 결과가 아닌가라고 추측된다. 이러한 사실은 종양억제유전자를 이용한 유전자 요법을 현실화하는데 시사하는 바가 크다고 생각되며 단일 종양억제유전자만의 유전자 이입으로는 다른 유전자적 기전에 의한 세포주기 활성화를 차단할 수 없어 종양억제유전자에 의한 유전자 요법을 일반화시키기 위해서는 *p53*과 *p16*의 조합과 같이 병합 유전자 이입이 필요할 수도 있을 것이라 추측된다. 본 연구에서는 wild-type의 *p16* 단백질이 발현되는 세포주에서는 *p16* 유전자 이입에 의한 종양억제효과를 관찰하지 못하였는데 이에대해서는 향후 보완 연구가 필요하다고 생각된다. 본 연구를 수행하는데 있어서 내포하고 있는 가장 큰 방법론적인 난점은 유전자 이입에 의해 *p16*을 지속적으로 발현하는 세포주를 얻을 수 없다는데 있다. 즉 종양억제유전자인 *p16*이 유전자이입되어 과발현되면 바로 세포사멸로 이어지기 때문에 flow cytometry를 이용한 통상적인 세포주기 분석이나 계량적인 세포독성검사를 수행할 수 없는 난점이 있다. 이러한 stable transfection의 난점은 *p16* 뿐만 아니라 종양억제유전자를 유전자이입하여 수행하는 실험들이 갖는 공통적인 방법상의 난점으로 이를 극복하기 위해서는 vector cloning시 inducible promotor를 함께 cloning하여 유전자이입함으로써 필요시점에서 특정 유도물질에 의해 유전자발현시키는 것이 대안이 될 수 있을 것이라 생각된다.

한편 *p16* 음성인 세포주에 *p16*을 유전자 이입하여 과발현시켜 이와 관련된 세포주기 단백질의 변화를 관찰한 연구결과는 아직 보고된 바 없는데, 본 연구에서 *p16*이 *cdk4*와 in vivo complex를 형성하고 있음을 확인할 수 있었으며 동시에 인산화 Rb의 감소가 관찰되어 이로 인해 colony 형성능이 감소되어 종양억제

효과가 관찰되었다고 판단된다. 본 연구에 사용된 *p16(-)* NIH-H441 비소세포폐암 세포주는 wild-type의 Rb 양성인 세포주로 알려져 있으므로 위에서 기술한 바와 같이 Rb 양성세포주에서 *p16*이 *cdk4*와 결합하여 *cdk4*의 활성화를 억제함으로써 종양억제 효과가 있음을 입증한 것은 본 연구의 목적인 바와 같이 *p16*을 이용한 유전자요법의 타당성 가능성을 제시하는 사실이라고 생각된다.

## 요 약

### 연구배경 :

세포주기의 활성화, 그 중에서도 특히 G<sub>1</sub>/S 이행에 관여하는 세포주기관련 단백질들은 암발생에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. G<sub>1</sub> 세포주기 관련 단백질 중의 하나인 *cdk4* (cyclin dependent kinase 4)의 억제제로 알려져 있는 *p16* 유전자는 최근에 밝혀진 종양억제유전자중의 하나로서 MTS1 (multiple tumor suppressor 1)이라고도 불린다. *p16* 유전자는 지금까지 알려진 어느 종양관련 유전자보다도 유전자변이의 빈도가 높은 암억제유전자인데, 특히 비소세포폐암인 경우는 70% 이상의 세포주에서 *p16* 단백질의 발현이 없는 것으로 밝혀져 있어 *p16* 유전자는 비소세포폐암 발생에 매우 중요한 역할을 할 것이라고 알려져 있다. 본 연구에서는 비소세포폐암에서 *p16*을 이용한 유전자치료의 타당성을 입증하기 위하여 다음과 같은 연구를 시행하였다.

### 방 법 :

*p16*이 결여된 비소세포폐암 세포주 (NCI-H441)에, 정상섬유아세포에서 총 RNA를 추출하여 역전사효소 및 DNA 중합효소반응으로 증폭된 *p16* cDNA를 유핵세포 발현 vector인 pRC-CMV plasmid에 subcloning하여 구축된 pRC-CMV-*p16* plasmid vector를 lipofectin을 이용하여 유전자 이입한 후, 단백질을 추출하여 Western blot 분석과 면역침전법으로 G<sub>1</sub> 세포주기관련 단백질의 변동을 관찰하고, colony 형성능을 비교함으로써 암억제효과를 확인하

였다.

### 결 과 :

*p16*이 유전자주입된 NCI-H441 세포주에서 *p16*과 *cdk4*가 복합체를 형성하고 있고 인산화 Rb가 대조 세포주에 비해 감소되어 있음을 확인할 수 있어, *p16*이 *cdk4*와 결합함으로써 *cdk4*에 의한 Rb의 인산화를 방해하고 이에 따른 G<sub>1</sub> 세포주기 정체에 의해 종양억제효과가 나타난다는 설명을 뒷받침할 수 있었다. Clonogenic assay 결과는 *p16* 유전자주입된 NCI-H441 세포주의 colony 형성능이 대조 세포주에 비하여 현저히 감소함을 관찰하였다.

### 결 론 :

이상의 결과로 *p16(MTS1)* 유전자를 *p16* 단백질을 발현하지 못하는 비소세포폐암 세포주에 주입할 경우, 주입한 유전자에서 생성되는 *p16* 단백질이 *cdk4*와 결합하여 Rb 단백질의 인산화를 저하시켜 궁극적으로 암억제 효과를 일으킬 수 있음이 확인되었고, 이는 향후 비소세포폐암의 유전자치료에 있어서 *p16* 유전자의 이용 가능성을 확인한 기초자료가 된다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, Hegi MZ, Wiseman RW, Pretty EM, Bale AE : Assignment of a locus for familial melanoma MLM, to chromosome 9p13-221. Science. 258 : 1148, 1992
2. Kamb A, Gruis NA, Weaver FJ, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Stockert, E., Day RS, Johnson BE, and Skolnick MH : A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science. 264 : 436, 1994
3. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K and Carson DA : Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple



- human cancers. *Nature*. **368** : 753, 1994
4. Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, McClure M, Aitken JF, Anderson DE, Bergman W, Frants R, Goldgar DE, Green A, MacLennan R, Martin NG, Meyer LJ, Youl P, Zone JJ, Skolnick MH, and Cannon-Albright LA : Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nature Genet.* **8** : 22, 1994
  5. Coleman A, Fountain JW, Nobori T, Olopade OI, Robertson G, Housman DE, Lugo TG : Distinct deletions of chromosome 9p associated with melanoma versus glioma, lung cancer, and leukemia. *Cancer Res.* **54** : 344, 1994
  6. Lukeis R, Irving L, Garson M, Hasthorpe S : Cytogenetics of non-small cell lung cancer : analysis of consistent non-random abnormalities. *Genes Chromosom Cancer.* **2** : 116, 1990
  7. Mead LJ, Gillespie MT, Irving LB, Campbell LJ : Homozygous and hemizygous deletions of 9p centromeric to the interferon genes in lung cancer. *Cancer Res.* **54** : 640, 1994
  8. Merlo A, Gabrielson E, Askin F, Sidransky D : Frequent loss of chromosome 9 in human primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **54** : 640, 1994
  9. Peter M, and Herskowitz I. Joining the complex : Cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell.* **79** : 181, 1994
  10. Mori T, Miura K, Aoki T, Nishihira T, Mori S, and Nakamura Y : Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK41 (multiple tumor suppressor/cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **54** : 3396, 1994
  11. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, and Kern SE : Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature Genet.* **8** : 27, 1994
  12. Spruck C, Gonzalez ZM, Shibata A, Simoneau AR, Lin MF, Gonzales F, Tsai YC, and Jones PA : p16 gene in uncultured tumors. *Nature.* **370** : 183, 1994
  13. Zhang SY, Klein-Szanto AJP, Sauter ER, Shafarenko M, Mitsunaga S, Nobori T, Carson DA, Ridge JA, and Goodrow TL : Higher frequency of alterations in the p16/CDKN2 gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumors of the head and neck. *Cancer Res.* **54** : 5050, 1994
  14. Ohta M, Nagai H, Shimizu M, Rasio D, Berd D, Mastrangelo M, Singh AD, Shields JA, Shields CL, Croce CM, and Huebner K : Rarity of somatic and germline mutations of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor gene, CDK41, in melanoma. *Cancer Res.* **5** : 5269, 1994
  15. Serrano M, Hannon GJ and Beach D : A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* **366** : 704, 1993
  16. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PAT, Ally DS, Sheahan MD, Clark Jr. WH, Tucker MA, and Dracopli NC : Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature Genet.* **8** : 15, 1994
  17. Cairns P, Mao L, Merlo A, Lee DJ, Schwab D, Eby Y, Tokino K, van der Riet P, Blaugrund JE, and Sidransky D : Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science.* **265** : 415, 1994

18. Xu L, Sgroi D, Sterner CJ, Beauchamp RL, Pinney DM, Keel S, Ueki K, Rutter JL, Buckler AJ, Louis DN, Gusella JF, and Ramesh V : Mutational analysis of CDKN2 (MTS1/P16 INK4) in human breast carcinomas. *Cancer Res.* 54 : 5262, 1994
19. Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennett WP, Forrester K, Gerwin B, Serrano M, Beach DH, and Harris CC : Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91 : 11045, 1994
20. Arap W, Nishikawa R, Furnari FB, Cavenee WK, Huang HS : Replacement of the p16/CDKN2 gene suppression human glioma cell growth. *Cancer Res.* 55 : 1351, 1995
21. Reifenberger G, Feifenberg J, Ichimura K, Meltzer PS, and Collins VP : Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13~14 in human malignant gliomas : preliminary mapping of the amplications shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res.* 54 : 4299, 1994
22. He J, Collins VP, Allalunis-Turner MJ, Godbout R, Day RS, and James CD : CDK4 amplication is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Res.* 54 : 5804, 1994