Immune Network Vol. 1, No. 2, 2001

한국인의 대장암 세포주에서 p53 돌연변이의 발견과 발현에 관한 연구

전남대학교 자연과학대학 생명과학부

정 지 연 · 오 상 진

Study on the expression and detection of the p53 mutation in Korean colon cancer cell lines

Ji-Yeon Jung, Sang-Jin Oh

Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chonnam National University, Kwang-ju, Korea

Background: Inactivation in p53 tumor suppressor gene through a point mutation and deletion is one of the most frequent genetic changes found in human cancer, with 50% of an incidence. This high rate of mutation mostly suggests that the gene plays a central role in the development of cancer and the mutations detected so far were found in exons 5 to 8. Mutation of p53 locus produced accumulation of abnormal p53 protein, and negative regulation of cell proliferation and transcriptional activation as a suppressor of transformation were lost. In addition, inhibition of its normal cellular function of wild-type by mutant is an important step in tumorigenesis. **Method:** 4 colon cancer cell lines (SNU C1, C2A, C4, C5) were examined for mutation in exons 5 to 8 of the p53 tumor suppressor gene by PCR-SSCP analysis and expression pattern by western blotting and immunoprecipitation. p53-mediated transactivation ability were examined by CAT assay and base substitution of p53 in SNU C2A cell were detected by DNA sequencing. **Results:** 1) SNU C2A cell and SNU C5 cell were detected mobility shifts each in exon 5 and exon 7 of p53 gene by the PCR-SSCP method, implicating being of p53 mutation. 2) 3 colon cancer cell lines (SNU C1, SNU C2A, SNU C5) expressed wild type and mutant type p53 protein. 3) In northern blot experiment, SNU C2A and SNU C5 cell expressed high level of p53 mRNA. 4) Results of p53-mediated transactivation in colon cancer cell lines by CAT assay represented only SNU C2A cell has transcriptional activity. 5) DNA sequencing in SNU C2A cell showed missense mutation in codon 179 of one allele, histidine to arginine and wild type p53 in the other allele. **Conclusion:** Colon cancer cell lines showed correlation with mutation in p53 gene and accumulation of abnormal p53 protein. Colon cancer cell SNU C2A retained p53-mediated transactivation as heterozygous p53 with one mutant allele in 179 codon and the other wild-type allele.

Key Words: Tumor suppressor gene, p53 mutation, colon cancer cell line, PCR-SSCP, SNU C2A cell

서 론

인간의 암은 세포생장의 조절에 있어 중요한 역할을 하는 유전자 변이와 관련된 다단계 과정에 의해 일어난다. 분자생물학적으로, 암의 발생은 원발암유전자(oncogene)의 활성화와 세포증식을 억제하는 기능을 지닌 정

책임저자 : 정지연, 전남대학교 자연과학대학 생명과학부
500-757, 광주광역시 북구 용봉동 300
Tel: 062-530-3413, Fax: 062-530-3409
E-mail: breadjj@hanmail.net

상유전자, 즉 종양억제 유전자의 불활성화에 의해 일어나는 것으로 설명되고 있다(1). 종양억제 유전자로 많이 알려져 있는 것은 retinoblastoma 유전자(Rb)와 p53 유전자가 있다(2, 3). 이들은 하이브리드 세포(hybrid cell), 가족성 암, 이형접합성 소실(loss of heterozygosity) 등의 연구를 통해 세포증식에 대해 억제작용을 한다는 것이 알려지게 되었다(4). p53 유전자의 변이는 여러 종류의 인간의 암에서 가장 흔히 발견되는 유전적 특징으로 종양생성에 있어 중요한 단계로 인식되어지고 있다(5).

인체의 정상세포에서 p53 유전자는 염색체 17p13.1에 위치하여 11개의 exon으로 이루어진 20Kb의 DNA이며, mRNA의 크기는 2.8Kb이고 그 산출물은 핵에 미량 존재하는 인단백질로 크기가 53kDa으로 알려져 있다(6). p53 단백질은 simian virus 40 (SV40)으로 형질전환된 세포에서 SV40 large T antigen과 단백질복합체를 형성함으로써 처음 발견되었다(7).

정상인 p53 유전자의 생성물인 p53 단백질의 기능은 다음의 몇 가지로 설명되고 있다. 첫째로 세포주기의 G1기에서 S기로의 전이(transition)를 조절하는 점검점(check point)의 조절인자로서 기능을 하며, 형질전환된 세포의 증식 및 암유전자(oncogene)에 의한 cell transformation을 억제하는 기능을 한다. 또한 세포분화(differentiation)와 계획된 세포사멸(apoptosis)을 통한 세포죽음(cell death)을 결정하는 기능을 지닌다(8, 9). 이러한 세포생장에 있어서의 조절기능은 p53 단백질과 특정 DNA sequence (GAAD45, MDM2 및 WAF1/ cip1)와의 상호작용에 의해 매개된다(10-12). 이러한 기능을 하는 p53 유전자에 손상이 발생하면 세포의 성장 및 분화과정의 조절에 이상이 발생하며 종양억제 기능이 상실되고 종양의 발생위험성이 높아지게 된다. 정상적인 p53 단백질은 유전자 활성에 있어 특정 유전자의 전사촉진인자(transcriptional activator)로서 중요하게 작용하지만 돌연변이된 p53은 p53이 인지하는 DNA sequence들과의 결합이 불가능하고(13, 14), 유전자 전사(gene transcription)를 유도하지 못하며, 돌연변이형 p53 단백질이 정상의 p53 단백질과 결합하여 정상의 p53 단백질의 기능을 억제시킨다(15, 16). 따라서, 야생형 p53의 기능은 종양의 생성억제에 매우 중요하며, 돌연변이형 p53의 발생이 암의 생성과 밀접한 관련이 있다고 본다.

p53 유전자의 돌연변이는 폐암, 대장암, 유방암, 위암 등 여러 종류의 종양에서 관찰됨이 보고되고 있다(3, 17-19). 여러 가지 다른 조직과 세포형으로부터 유래한 인간의 암으로부터 p53 유전자에 있어서의 돌연변이 분포를 종합해 보면, 대부분의 돌연변이가 missense mutation으로 일어나며(20), 그 위치가 종간에 잘 보존된 부위(conserved region), 아미노산 130-290 사이 안에서, 특히 residue 117-142, 171-181, 234-258 과 270-286 등 네 부분에서 많은 돌연변이가 나타난다(21). 그 중에서도 아미노산 175, 248, 273은 hot spot이 존재하는 부분으로 p53의 구조와 기능유지에 필수적인 부위로 생각된다.

p53 단백질은 정상세포나 조직에서는 짧은 반감기를 가져 미량으로 존재하나, p53 유전자에 돌연변이가 일어나게 되면 p53 단백질이 안정화되어 세포 내에 과량의 단백질이 축적하게 된다(16). 또한, 단백질의 3차 구조에 변화가 초래되며, 야생형과 돌연변이형의 구조변화는 단일클론 항체(monoclonal antibody)들을 이용하여 구분할 수 있다(22).

p53 유전자의 변이는 그 형태가 종양마다 다르고 심지어는 인종, 지역적인 요소에 따라 다양하게 특성지워짐으로 인해 변이형태에 대한 연구는 종양발생에 기여하는 또 다른 인자들을 확인할 수 있게 하는 역학적인 연구의 수단으로도 유용하게 사용할 수 있다(23). 그러나, 우리나라에서는 암환자들을 대상으로 한 p53 유전자의 변이와 관련한 연구는 아직 미진하여 암발생간의 관련성을 추정할 뿐 암의 진단이나 치료적인 목적으로 이용하기 위해서는 더 많은 연구를 필요로 한다. 대장암에서의 p53 유전자변이는 주로 약 75%가 allele를 소실하는 형태를 나타내며, 변이를 지닌 것의 90% 이상이 점돌연변이를 지니고 있는 것으로 보고된다(24). 그러나 이러한 결과는 모두 외국의 경우에서 밝혀진 것이므로, 우리나라에서 나타나는 대장암의 p53 유전자의 변이형태와 발현양상에 대한 특이성을 찾아내고자 먼저 기초연구로써 한국인의 대장암조직에서 분리된 세포주들을 대상으로 p53의 변이양상과 발현을 조사하는 본 실험을 계획하였다.

이에 p53 유전자의 돌연변이와 p53 단백질의 축적간에 긴밀한 상관관계가 있으며, p53의 비활성화가 암의 전이와 연관이 있음을 전제로, 본 연구에서는 한국인의 대장암에서 분리한 대장암 세포주에서 소량의 유전적 변이까지 확인할 수 있는 단일쇄 형태 변환 다형성(single strand conformation polymorphism)법을 이용하여 p53 유전자 변이의 빈도와 변이위치를 알아보고, 단일클론 항체를 이용한 면역블롯과 면역침강법으로 대장암

세포주 내의 p53 단백질의 발현정도와 변이형을 관찰함으로 한국인의 대장암 세포주에서 p53 유전자 변이의 특징을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포주와 세포배양

한국인의 암세포주들 (SNU C1, SNU C2A, SNU C4, SNU C5: 대장암, MCF 7: 유방암)은 한국 세포주 은행(KCLB)으로부터 구입하였다. 세포배양은 가열 비활성화된 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco)이 포함된 RPMI 1640(Gibco, BRL)을 기본배양액으로 하여 37℃, 6%의 CO_2하에서 증식시켜 3 4일 간격으로 계대배양하였다. SaOS2(human osteosarcoma, p53-/-), U2OS (human osteosarcoma, p53+/+), SV80(human fibroblast) 세포는 Dulbeccos modified Eagle's midium (DMEM)에 10% FBS를 포함하여 37℃, 6% CO_2에서 증식시켰다. DLD-1 세포(대장암: p53 -/-)는 RPMI 1640 배지에서, LoVo 세포(대장암: p53 +/+)는 Ham's F-12 배지에서 10% 우태아혈청을 포함하여 3 4일 간격으로 계대배양하였다.

2. DNA 추출과 PCR-SSCP

세포주로부터의 DNA 추출은 T80 flask 용기에 1×10^8 cell을 배양하여 proteinase K를 포함한 lysis buffer [10mM Tris (pH 8.0), 10mM EDTA(pH 8.0), 5mM NaCl, 0.1mg/ml proteinase K, 0.5% SDS]를 넣고 하룻밤 반응시킨 후 phenol 및 chloroform 추출을 시행하고 ethanol 침전을 하여 정제하였다. DNA 농도는 260nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. p53 유전자를 구성하는 11개의 exon 중 변이의 대부분이 발생한다고 알려져 있는 exon 5-8 (아미노산 126-306)을 중합효소연쇄반응을 통해 증폭시켰다. Sambrook(25) 법에 의해 추출한 DNA에 대한 비동위원소성 PCR-SSCP 분석법은 Oh 등(26)에 보고된 방법에 따라 수행하였다.

3. 면역블롯 및 면역침강

면역블롯(Immuno blot)을 위해 약 1×10^7개의 세포를 배양한 뒤 lysis buffer [50mM Tris pH 8.0, 5mM EDTA, 150mM Nacl, 0.5%NP40, 1mM PMSF]에 의해 단백질을 추출하여 Bradford 법(Bio-Rad)에 의해 단백질을 정량하였다. 200μg의 단백질 추출물을 10% SDS-PAGE 전기영동으로 분리한 후 전이완충용액(20mM Tris, 150mM glycine, 20% methanol, pH 8.3)을 사용하여 Immobilon-P membrane (Millipore)으로 cold room안에서 150mA로 3시간 동안 electrotransfer하였다. 이것을 4℃에서, blocking buffer(5% dry milk/PBS-T (0.1% Tween 20)) 용액에 하룻밤 두었다. membrane을 PBS-T로 잘 세척한 후, PBS-T에 5:1 희석시킨 일차항체(PAb421)에 2시간동안 orbital shaker 위에서 반응시켰다. 다시 세척한 후 1000:1 희석시킨 이차항체인 horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG를 이용하여 1시간 동안 배양시켰다. PBS-T로 3번 세척한 후 enhanced chemiluminescence(ECL, Amersham)방법에 의해 signal을 관찰하였다.

면역침강법(Immunoprecipitation)은 2×10^7개의 세포를 배양시킨 후 cytoplasmic lysis buffer [10mM Tris (pH 7.4), 250mM Sucrose, 160mM KCl, 50mM ε-amino caproic acid, 0.5% NP40, 3mM β-mercaptoethanol]에 protease inhibitor (10mM PMSF, 10μg/ml leupeptin 1μg/ml aprotinin, 10μg/ml E-64, 1μg/ml pepstatin)를 넣고 세포를 lysis시켜 Bradford법(Bio-Rad)에 의해 단백질을 정량하였다. 동량의(400μg)단백질 추출물은 p53 단일 클론 항체(PAb421, Ab5, Ab3)들과 4℃에서 하룻밤 두고, 50% w/w protein A-sepharose bead (Pharmacia Biotech)를 첨가하여, 4℃의 Rocker (Hoefer Scientific Instrument, USA)에서 8시간동안 반응시켰다. 면역복합체는 10% polyacrylamide gel에서 분리한 후 면역블롯과 같은 방법을 실시하여 signal을 확인하였다.

4. p53에 대한 단일클론 항체

PAb5(Ab1620) (CALBIOCHEM)은 구조적으로 야생형을 인지하는 human p53 단백질(residues 371-380)에 대한 단일클론 항체이다. PAb3(Ab240)은 non-denature 상태하에서는 돌연변이와 변성으로 생긴 epitope (residues 212-207)를 인식하나 면역블롯에서와 같은 변성조건에서는 돌연변이형과 야생형 p53 단백질 모두를 인식한다. PAb421은 pan-specific p53(residues 371-378)을 인식하여 변성조건에서도 돌연변이형과 야생형 p53 epitope와 반응한다(27).

5. Northern blot

대장암 세포주로 부터 total RNA를 rapid guanidinium

isothiocyanate 방법(28)으로 추출하여 formamide (0.26 %)/ formaldehyde (0.2%)/sample buffer (0.13%)에 65℃, 15분간 반응하여 RNA를 변성시킨 후 foraldehyde (5%)/ agarose (1%) gel에 전기영동 하였다. 이를 Mytran membrane에 capillary transfer시킨 후 1200E, 90초간 UV crosslinking (Hoeffer UVC 1000, UV crosslinker)하여 RNA를 고정하였다. Membrane은 hybridization oven에서 68℃, 2시간 동안 prehybridization 한 후 P^{32}-labeling된 p53 probe를 100℃에서 10분간 denature하여 가하였다. probe는 ml당 2×10^6cpm으로 가하며 65℃에서 하룻밤동안 배양하였다. 세척은 실온에서 2xSSC, 0.1% SDS로 15분간 3회, 65℃에서 0.5xSSC, 0.1% SDS로 1시간 세척한 후 Kodak XAR 필름에 노출하여 현상하였다.

6. CAT (Chloramphenicol acetyl transferase) 활성측정

대장암 세포주들의 p53의 전사활성능력을 측정하기 위한 CAT assay를 위해 calcium phosphate mammalian cell transfection kit (5 prime → 3 prime, Inc.)를 이용하였다. 6개의 human colorectal carcinoma 세포주들은 1×10^6씩 10cm dish에 배양하여 5㎍의 Cosx1 CAT reporter plasmid를 $CaPO_4$ 방법으로 transfection시킨 후 CAT 활성측정을 위해 48시간이 지나면 세포를 phosphate buffer saline(PBS)으로 2번 씻은 다음 STE buffer (40mM Tris, pH 7.4, 150mM Nacl, 1mM EDTA) 1ml를 넣고 rubber policeman으로 세포를 모아 수집하였다. 3000rpm에서 1분 동안 원심분리하여 수집한 세포는 0.25M Tris-hydrocholride (pH7.5) 용액에 녹였다. 세포 내 protein extract를 얻기 위해 5분 간격으로 freezing (-75℃)과 thawing (37℃)을 반복함으로 세포를 lysis시켰다. 4℃, 12000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 새 tube에 옮기고 Bradford assay (Bio-Rad)법으로 단백질의 농도를 측정하였다. 100㎍의 단백질 추출액(protein extract)에 4㎕의 〔^{14}C〕-chloramphenicol (56.0mci/mmol, Amersham), 30㎕의 2mM acetyl-CoA, 70㎕의 0.25M Tris (pH 8.0)를 넣고 총량 154㎕가 되도록 멸균증류수를 첨가했다. 37℃에서 약 1시간 동안 반응시키고 1ml의 ethyl acetate를 넣고 혼합하여 원심분리 시킨 뒤 상층액만 새 tube에 옮겨 하루동안 말렸다. 25㎕의 ethyl acetate로 chloramphenicol을 추출하여 thin-layer chromatography plates (Merck)에 spot한 다음 chloroform-methanol (95:5)이 들어있는 용기에서 전개시킨 후 건조하여, Fuji film이나 phosphoimager에 24 48시간 노출시킨 뒤 radioactivity를 분석하였다.

7. 염기서열결정법

PCR-SSCP 분석법에 의해 운동성 변이가 관찰된 SNU C2A 세포의 exon 5의 nucleotide sequence를 대상으로 염기서열 분석법을 실시했다. PCR로 증폭시킨 DNA를 TA cloning vector(Invitrogen)에 삽입하여 *E. coli* DH5α에 형질전환한 다음, ampicillin이 함유된 LB 배지에서 형질전환체를 선별했다. 염기서열 결정을 위한 플라스미드 DNA 추출은 "Geneclean II" kit를 사용하여 깨끗하게 정제하였다. DNA 염기서열 결정은 dideoxy-chain termination 방법으로 수행했으며 Sequi-Therm cycle sequencing kit (Epicentre technologies, USA)를 이용하여 양방향으로 실시했다. 염기서열 분석에 사용된 개시 primer는 T_7 promoter primer, 5'-d (TATACGACT CACTATAGGG)-3'; T_3 promoter primer, 5'-d (ATTA ACCCTCACTAAAGGGA)-3' (Promega, USA)이다.

결 과

1. 대장암 세포주들에서 PCR-SSCP법에 의한 p53 돌연변이 분석

4개의 대장암 세포주(SNU C1, SNU C2A, SNU C4, SNU C5)를 대상으로 p53 유전자를 구성하고 있는 11개의 exon 중 변이의 대부분이 발생한다고 알려져 있는 exon 5(codons 126-186), 6(codons 187-224), 7(codons 225-261)과 8(codons 262-306)에서의 구조적 변화를 분석하였다. p53 유전자의 exon 5, 6, 7, 8(amino acids 126-306)을 포함하고 있는 DNA 부위는 각각의 4종류의 primer를 사용하여 증폭하였다. PCR에 의해 증폭된 DNA를 열변성 시킨 후 4% 비변성의 polyacrylamide gel에서 전기영동을 하게 되면 single strand DNA가 되어 이들이 부분적으로 자체의 염기서열에 의해 2차적인 구조를 형성하여 돌연변이가 1개라도 일어났을 시 그 구조가 바뀌어 정상의 DNA와 다른 운동성(mobility)을 가지게 된다. 4개의 대장암 세포주에서의 exon 5, 6, 7, 8에 대한 각각의 SSCP의 결과 SNU C2A와 SNU C5 세포에서 각각 exon 5와 exon 7 위치에서 정상 DNA와 운동성이 다른 band가 관찰되었다(Table 1, Fig. 1B).

2. 대장암 세포주 내에서 p53 단백질의 발현 양상 조사

p53 유전자에 돌연변이가 일어나게 되면 정상세포의 짧은 반감기의 p53 단백질이 안정화되어 세포 내 과량의 단백질이 축적되게 된다(27). 대장암 세포주 내에서의 p53 유전자 돌연변이와 연관지어 세포 내 p53 단백질의 발현정도와 구조적 변화를 알아보았다.

야생형과 돌연변이형 p53 단백질 모두를 인지하는 항체인 PAb421을 이용한 면역블롯을 통해 p53 단백질의

Table 1. Properties of p53 in colon cancer cell lines

Cell lines	Immuno blot	Northern blot	Immunoprecipitation		Mutation by PCR-SSCP
	Ab421[a)]		Ab3[b)]	Ab5[c)]	
SV80	+++	ND	ND	ND	ND
SaOS2	−	−	ND	ND	p53(-/-)
U2OS	+	++	ND	ND	p53(+/+)
MCF 7	+	++	−	+	p53(+/+)
SNU C1	+	++	+	+	−
SNU C2A	+++	+++	+	+	exon 5
SNU C4	±	+	−	+	−
SNU C5	++	++	+	+	exon 7

Abbreviations and symbols: (+) Epitope present, (-) Epitope absent, ND, not determined. [a)]PAb421 detects both mutant and wild-type p53 protein from many species. [b)]p53(Ab-3) recognizes many mutants p53 protein but not the wild type protein. [c)]p53(Ab-5) recognizes wild type p53 protein.

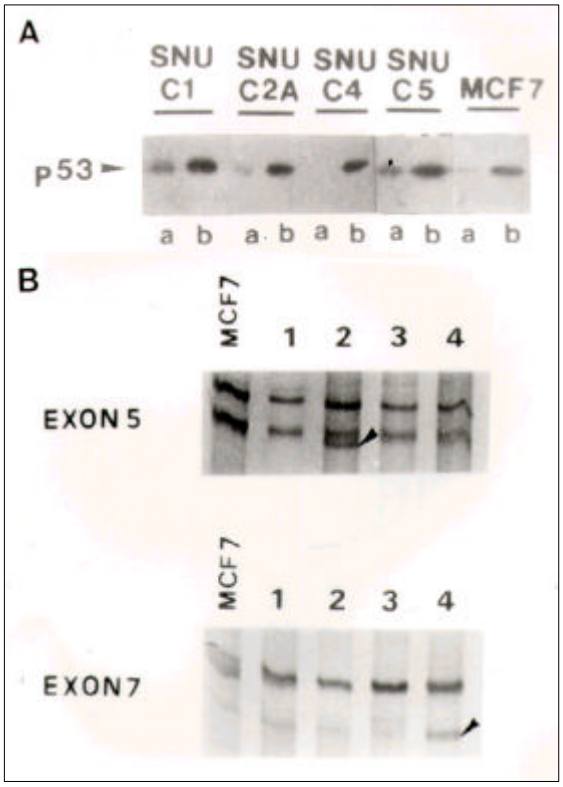

Fig. 1. PCR-SSCP analysis for p53 mutation and immunoprecipitation of p53 in colon cancer cell lines. (A) Immunoprecipitation of p53. Protein extract (400μg) from the various cancer cell lines was immunoprecipitated with anti p53 monoclonal Ab-3 and Ab-5. The resulting immunoprecipitates were immunoblotted with PAb421 as described under materials and methods, Lane a : immunoprecipitated with p53 (Ab-3) ; Lane b : immunoprecipitated with p53 (Ab-5). (B) PCR-SSCP analysis. PCR-SSCP analysis of DNA from cancer cell lines was performed as described in the text. Aberrantly immigrated DNA fragments were indicated by arrows. MCF 7 cell is normal control. The numbers above each lane correspond to specific small cell carcinoma (1:SNU C1, 2:SNU C2A, 3:SNU C4, 4:SNU C5).

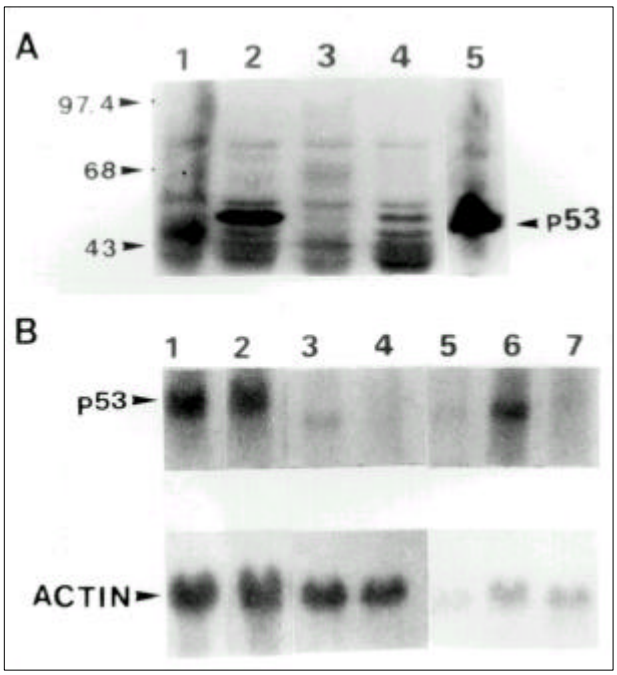

Fig. 2. Expression level of p53 in colon cancer cell lines. (A) Western blot using anti p53 monoclonal antibody(PAb421). Immunoblot was performed with PAb421 as described under "Materials and Methods". SV80 cell(lane 5) is positive control for high level p53 expression. The numbers above each lane correspond to specific small cell carcinoma(1:SNU C1, 2:SNU C2A, 3:SNU C4, 4:SNU C5). (B) Northern analysis of p53 mRNA expression. Control hybridization was done with a probe for the β-actin gene. U2OS(lane 4) and MCF7(lane 1) cell is positive control and SaOS2(lane5) cell is negative control for p53 expression. The numbers above each lane correspond to specific small cell carcinoma(2:SNU C5, 3:SNU C4, 6:SNU C2A, 7:SNU C1).

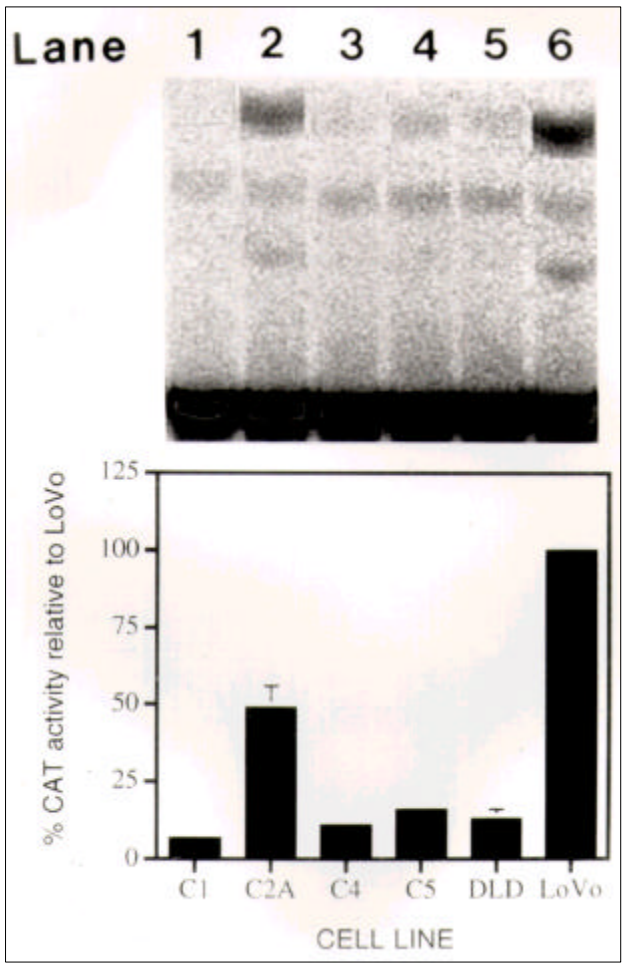

Fig. 3. Transcriptional activation of the p53-responsive reporter plasmid Cosxl CAT in human colorectal carcinoma cell lines. Human colorectal carcinoma cell lines were transfected with 5μg of Cosx1 CAT reporter, using the calcium phosphate precipitation method. Cells were harvested and analyzed for CAT activity as described in materials and methods. DLD-1 cell (lane 5) is negative control and LoVo(lane 6) cell is positive control for transcriptional ability of p53. Graphic data representated transcriptional activation of the p53-responsive reporter plasmid Cosxl CAT in human colorectal carcinoma cell lines. The data were normalized to the value (100%) obtained with LoVo cell. The numbers above each lane correspond to specific small cell carcinoma (1:SNU C1, 2:SNU C2A, 3:SNU C4, 4:SNU C5).

과발현도를 조사한 결과, 4개의 대장암 세포주 중 3개(SNU C1, SNU C2A, SNU C5)의 세포에서 p53 단백질의 발현을 관찰할 수 있었으며(Fig. 2A), 그 중 PCR-SSCP 분석에 의해 변이가 확인된 SNU C1, SNU C5 세포에서 다른 세포보다 상대적으로 높은 발현을 하는 것을 관찰할 수 있었다(Table 1).

돌연변이형 p53 단백질만을 인지하는 항체 p53(Ab-3)을 이용한 면역침강법에 의해 4개 세포주중 3개(75%)의 세포주(SNU C1, SNU C2A, SNU C5)에서 돌연변이형 단백질을 발현하는 것을 확인하였고, SNU C4 세포에서는 돌연변이형의 단백질이 관찰되지 않았다. 또한 4개의 세포 모두에서 야생형 p53 단백질이 발견되었다(Fig. 1A).

4개의 대장암 세포주에서 guanidinium thiocyanate법(28)에 의해 RNA를 추출하여 Northern blot을 실시하여 p53 유전자의 발현정도를 확인하였다. 그 결과 β-actin band의 세기를 기준으로 했을 때 PCR-SSCP법에 의해

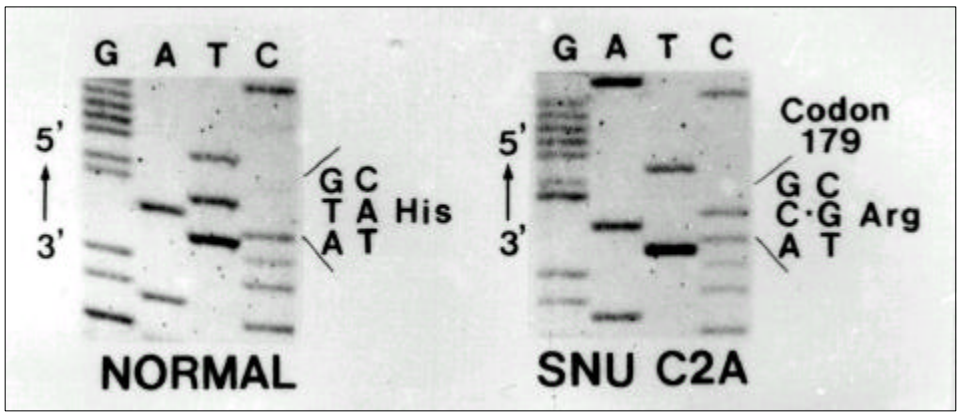

Fig. 4. Sequence analysis of p53 mutations in SNU C2A cell. The sequencing ladders of mutated DNA samples were shown together with those of normal control DNAs. SUN C2A cell showed a CAT to CGT (histidine to arginine) mutation at codon 179 in exon 5.

변이가 확인된 SNU C2A, SNU C5 세포에서 높은 p53 mRNA의 발현을 나타내었다. 이러한 결과는 단백질 발현양성과도 비슷하였다. 그러나, 야생형을 발현하는 대조군 세포주 MCF 7은 높은 mRNA의 발현을 보였으나, Immuno blot의 결과는 세포내의 단백질 양은 적은 것으로 나타났다. 한편, 돌연변이형 단백질과 함께 p53 단백질의 과발현을 보였지만 변이 확인이 되지 않았던 SNU C1 세포에서는 mRNA 발현이 낮게 나타났다(Fig. 2B).

3. 대장암 세포주들의 p53이 매개하는 전사촉진 활성 조사

야생형 p53이 종양억제유전자로서 역할을 하는데 갖는 중요한 특징이 특정 유전자의 전사를 조절하는 능력이다 (30). 세포 내에서 발현되는 p53 단백질의 양상에 따라 나타나는 전사촉진활성의 특징을 관찰하여 p53 기능상의 변화를 알아보고자 인간의 대장암 세포주들 (SNU C1, SNU C2A, SNU C4, SNU C5, DLD-1, LOVO)을 대상으로 CAT assay를 실시하였다. p53과 결합하여 전사 조절을 받는 Cosx1 CAT reporter plasmid를 $CaPO_4$ 방법에 의해 각각 6개의 대장암 세포주에 도입시켜 CAT 활성도를 측정하였다. 야생형 p53을 발현하는 LOVO 세포의 CAT 활성도를 100%로 했을 때 SNU C2A 세포에서 높은 활성(60%)을 나타냈고, 나머지 SNU C1, SNU C4와 SNU C5 세포에서는 매우 낮은 활성을 보였다. p53을 발현하지 않는 DLD-1 세포가 negative control로 이용되었다(Fig. 3).

4. 염기서열분석에 의한 SNU C2A 세포내 p53의 돌연변이 분석

PCR-SSCP 분석법에 의해 exon 5 위치에서 돌연변이가 확인되었고, p53 단백질의 과발현과 변이형 단백의 관찰에 의해 돌연변이형 p53을 확실하게 포함할 것으로 보인 SNU C2A 대장암 세포주를 대상으로 염기서열분석을 실시하였다. 염기서열분석을 위하여 PCR로 증폭시킨 exon 5를 TA cloning vector에 삽입하여 콜로니를 선별하여 염기서열분석을 한 결과, 반수의 콜로니에서 야생형과 동일한 p53 서열이 확인되었고, 나머지 반에서 CAT가 CGT로 변화된 염기를 지닌 것을 확인하였다. 이러한 결과로 SNU C2A 세포가 가지는 p53 유전자 중 하나는 야생형이고, 나머지 하나는 돌연변이형을 가진 이형대립유전자형태임을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

고 찰

최근 종양의 발생에 대한 견해는 세포 증식의 조절에 영향을 주는 여러 가지 변화의 총합이라는 것이 일반적인 견해이다(30). 분자생물학의 발달로 이러한 종양의 발생과정을 점차로 밝히게 되었다. 현재 밝혀진 종양의 진행에 관여하는 유전자들 중에는 첫째, 종양 억제 유전자로 대표적인 것으로 *ras*, Rb와 p53을 들 수 있으며, 둘째, 작동유전자로 알려진 주조직 적합성 유전자(MHC gene)가 있는데, 특히 변이의 빈도가 높으면서 크게 주목받고 있는 유전자가 p53 유전자이다 (31). p53은 정상

세포에서 세포생장과 증식의 음성적인 조절인자로 작용하며 동시에 종양세포로의 전환을 억제하는 인자로 작용한다고 알려져 있다(32).

여러 종류의 인간의 암에서 50%이상 p53 돌연변이가 확인되었으며, 이러한 변이율은 p53 유전자가 암 발생에 중요한 역할을 함을 제시하고 있다(5). 발견된 p53 유전자의 돌연변이는 일부 염기가 다른 염기로 치환되어 p53의 일부 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되는 missense mutation이 있는 경우가 대부분이고(17), 많은 종양에서 양쪽 대립인자의 불활성화가 알려져 있는데, 하나는 점 돌연변이를 통하여 이루어지고, 나머지 하나는 대립인자의 소실을 통해 이루어진다. p53 유전자는 구조적으로 11개의 exon들로 구성되어 있는데 p53의 변이가 집중되어 관찰되는 곳이 exon 5 9이고 이 부위는 생성되는 단백질의 입체적 구조에 유연성을 부가하는 중심부분을 암호하고 있어서 exon 5 9에서 일어나는 변이에 의해 생성되는 단백질에 구조적 변화를 초래하게 된다(33). 따라서, 암조직에서 발견된 p53 돌연변이는 조직에 축적되는 돌연변이형 p53 단백질의 발현을 통해 관찰할 수 있게 된다. 이러한 내용을 근거로 하여 암에서 발견되는 p53 유전자의 변이 연구는 크게 DNA측면에서 접근하는 방법과 단백질 측면에서 접근하는 방법으로 구분할 수 있다.

DNA 측면에서 접근하는 방법의 하나인 DNA sequencing은 염기서열의 분석을 통해 정확한 유전자의 돌연변이 여부를 파악할 수 있으나 경제적 부담을 가지는 단점이 있다. 본 연구에 사용된 비동위원소성 방법의 PCR-SSCP 분석법은 유전자 돌연변이분석을 위한 가장 간편하고 민감한 방법으로 알려져 있다(34, 35). 이 방법은 표본 내에서 독특한 점변이 형태로 유전적 변화가 존재하더라도 변이를 감지해 낼 수 있다. PCR -SSCP 분석법은 PCR로 증폭된 DNA fragment를 단일가닥(single strand)으로 변성시키고, 비변성의 겔 상에 전기영동시켰을 때 각 가닥(strand)이 독특한 입체적 구조를 이루게 되어 nucleotide 내에 단 하나의 염기치환이 일어나더라도, 2차원 구조 및 전기영동적 운동력의 변화로 유전자 변이 확인이 가능해진다. 이 방법은 대립유전자 소실 및 점돌연변이 검색에 가장 좋은 방법이며, 경제적인 장점을 지녀 대량의 표본의 돌연변이 검색에 효과적이다. SSCP 분석법은 400bp이하의 DNA fragment인 경우에 효과적으로 변이를 확인할 수 있으므로 본 연구에서는 4예의 대장암 세포주로부터 DNA를 추출하여 각 exon별로 PCR 증폭을 시행하여 SSCP법을 실시하였다.

암세포주의 SSCP 분석법을 통한 p53 유전자의 변이 검색 결과 4개의 세포주 가운데 2개의 세포주(SNU C2A, SNU C5)에서 정상의 DNA가 나타내는 band와 함께 이들과 운동성이 다른 band가 관찰되었다(Fig. 2B.) 보통 정상의 DNA는 상보성 가닥을 나타내는 2개의 band를 보이는 반면, 돌연변이가 존재하는 DNA sample은 운동성이 다른 두 band를 갖거나 두 개 이상의 band를 나타낸다(37, 38). 따라서 SNU C2A와 SNU C5 세포는 p53 유전자에 2개의 각기 다른 대립인자(allele), 즉 정상인자와 변이된 인자가 동시에 존재함을 제시해 주었다.

단백질 측면의 유전자 변이 연구방법에는 면역조직화학염색법, ELISA, 면역침강, 면역블롯 등의 세포면역화학반응이 있는데 본 연구에서는 면역침강과 면역블롯을 이용하여 p53 단백질의 발현정도와 변이형을 검색하여 p53 유전자의 돌연변이 유무를 알아보았다. PCR-SSCP법에 의해 각각 exon 5와 exon 7에서 변이가 확인된 2개의 세포주 SNU C2A와 SNU C5에서 p53 단백질의 과발현이 관찰되었는데, 이것은 p53 유전자 변이로 인해 안정한 돌연변이형 단백질을 형성하거나 세포 안에서 안정한 단백질-단백질 복합체를 형성함을 시사한다. 두 세포주(SNU C2A, SNU C5)에서 p53의 과발현은 mRNA 수준에서도 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 정상세포의 p53 단백질은 20분 정도의 매우 짧은 반감기를 가지는 반면, 변이된 p53 단백질은 6 8시간의 긴 반감기를 가진다. 변형된 배양세포 및 종양세포에서는 보다 안정한 변이 단백질이 과량 축적하게 된다(27). 따라서 p53 단백질에 대한 단일클론 항체반응은 주로 돌연변이형 단백질에 대한 인지가 높을 것이다(35). 이러한 p53 단백질의 과발현은 유전자에서의 점돌연변이로 인해 다른 아미노산으로 치환되는 missense mutation 경우에서만 일어난다(33).

과발현된 단백질이 돌연변이형인가를 알아보기 위해 돌연변이형 p53 단백질을 인지하는 특이적인 항체를 이용하여 면역침강법을 실시하였다. 돌연변이형 p53 단백질 검색을 위한 p53(Ab-3)에 의해서 3개 세포주(SNU C1, SNU C2A, SNU C5)에서 돌연변이형 단백질이 관찰되었다. 또한 4개의 세포주 모두에서 야생형의 p53 단백질의 발현이 관찰되었다(Fig. 2A). 이 결과에서도 SNU C5과 SNU C2A 세포에서 두 대립유전자 중 한 대립유전자에서 돌연변이가 일어나 두 가지 유형의 단백질이

한 세포 내에 발현되어 함께 존재하는 것으로 해석할 수 있었다.

4개의 대장암을 대상으로 관찰한 PCR-SSCP 분석법에 의한 유전자변이와 면역학적인 방법을 통한 단백질 발현사이의 관계를 살펴보면, 유전자 변이가 있는 것으로 보이는 2개의 세포주 모두에서 돌연변이형 단백질의 발현을 관찰함으로 p53 유전자 변이에 의한 돌연변이형 단백질의 축적사이에 유의있는 연관성을 확인할 수 있었다.

본 연구의 대상 중에 면역침강법에 의해 돌연변이 단백질이 인지되었던 SNU C1 세포는 PCR-SSCP법에 의해서 유전자 변이가 검색되지 않아 유전자 변이와 단백질 발현과의 연관성에 불일치를 나타냈다. Coles 등(34)은 p53 변이여부를 확인하는 방법으로써 DNA 측면과 단백질 측면에서 접근하여 보고되는 결과사이에 심각한 불일치가 있음을 관찰하였고, 통상 단백질 측면에서 확인되는 빈도가 DNA 측면에서 확인되는 변이결과 보다 좀 더 높다고 보고되고 있다. 이것은 돌연변이의 10% 이상이 exon 5-8 이외의 위치에서 일어날 수 있다는 것에 기인할 수 있다. 또한 야생형 p53 단백질이 경우에 따라 변이된 단백질과 면역학적으로 유사한 형태로 표현되어 검출될 수도 있다고 보고하였다(36). Thompson 등(37)은 p53 유전자에 있어서 이종접합성의 상실, 변이, mRNA, 그리고 단백질 표현능 등을 검색해 본 결과 DNA 이상과 단백질 표현사이에 분명한 연관성을 발견할 수 없었다고 하였으나 본 연구에서 유전자 변이와 변이형 단백질 양성과의 연관성을 조사해 본 결과, DNA이상과 단백질 발현사이에서 높은 연관성을 찾을 수 있었다. 본 연구에서는 연구대상의 수가 적어 data를 보편화시키기는 힘들다고 본다. 따라서, 차후의 p53 유전자 돌연변이의 연구에서는 좀더 많은 수의 암세포주를 검색하여 유의있는 공통점의 발견에 접근할 수 있으리라 사료된다. 또한, 유전자변이 검색에 있어 보다 높은 해상도를 지닌 DNA sequencing에 의한 변이검색과 면역조직화학염색법이 보다 확실한 p53 유전자의 이상을 발견하기 위해 필요하리라 여겨진다.

대장암 세포주들에서 p53이 매개하는 전사활성정도를 CAT 활성측정으로 알아보았다. 대장암 세포주인 SNU C2A 세포만이 다른 대장암 세포주와 달리 돌연변이형 단백질의 발현에도 불구하고 전사활성능력을 나타냈다. 많은 돌연변이들은 p53 유전자의 변이로 인해 DNA 결합능력이 상실되어 전사활성을 나타내지 못한다고 보고되고 있다(13,14). SNU C2A 세포는 유전자 변이와 함께 돌연변이형 p53 단백질과 야생형 p53 단백질을 함께 발현 시켰고, 상대적으로 높은 p53 발현을 나타내었다. 염기서열 분석법을 통해 한 쪽 대립유전자는 정상의 p53 유전자를 지니고, 다른 한쪽의 대립유전자의 179번 코돈에서 히스티딘(histidine)이 아르기닌(arginine)으로 치환된 돌연변이가 있음을 확인하였다. 따라서, 돌연변이와 야생형 단백질의 발현이 한 세포 내에서 동시에 이루어지고, 전사활성능력은 야생형의 p53 단백질에 의한 활성으로 사료된다. p53 유전자에 변이가 발생하게 되면 변형된 단백질이 생성되고 이들이 야생형 단백질의 기능을 차단시키거나(33), 야생형 단백질에 결합하여 야생형 단백질의 정상적인 기능을 억제시킨다고 알려져 있다(16). p53 유전자에 변이가 있어 변이형 단백질을 포함하고 있는 SNU C2A 세포에서 나타난 p53이 매개한 전사활성능력은 돌연변이형태보다 야생형이 우세하게 활성을 나타냄을 시사한다. 또한 돌연변이형과 야생형 p53의 발현 비율에 따라서도 세포에서의 p53의 기능수행과 관련성이 있다는 보고(37)를 전제로 야생형의 발현이 돌연변이형보다 높은 것에 기인하여 나타난 야생형의 활성임을 생각할 수 있다. 이러한 세포가 가지는 특징은 야생형 p53을 이용한 유전자 치료에 효과적인 전략을 제시하며(38), 이에 대한 보다 자세한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

결론적으로 대장암 세포주에서의 p53 유전자의 높은 변이 빈도와 그에 따른 단백질의 변화를 관찰함으로써, 대장암발생에 있어 p53 유전자의 중요성을 이해하고, 암에 대한 진단과 예후 및 치료에 연관지어 이상의 결과가 향후 암발생의 원인을 규명하는데 중요한 기초 자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC: Mutations in the tumor suppressor gene: clue to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res 53: 4855-4878, 1994
2. Murphree AL, Benedict WF: Retinoblastoma : clues to human oncogenesis. Science 223:1028-1033, 1984
3. Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, Harris CC: Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated

complication. Nucleic Acid Res 24:141-146, 1996

4. Sano T, sujino T, Yoshida K, Nakayama H, Haruma K, Ito H, Nakamura Y, Kajiyama G, Tahara E: Frequent loss of heterozygosity on chromosome 1q, 5q and 17p in human gastric carcinomas. Cancer Res 51:2926-2931, 1991
5. Nigro J, Baker S, Preisinger A, Jessup J, Hostetter R, Cleary K, Bigner S, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins F, Weston A, Modali R, Harris C, Vogelstein B: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. Nature 342:705-708, 1989
6. Oren M: The p53 cellular tumor antigen gene structure, expression and protein properties. Biochemica et Biophysica Acta 823:67-78, 1985
7. Mercer WE, Amin M, Sanve GJ, Appella E, Ullrich SJ, Romano JW: Wild type human p53 is antiproliferate in SV40-transformed hamster cells. Oncogene 5:973-980, 1990
8. Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ: p53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. Cancer Metast Rev 14:3-15, 1995
9. Gottlieb TM, Oren M: p53 and apoptosis. Cancer Biol 8:359-368, 1998
10. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression Cell 75:817-825, 1993
11. Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV Plunkett BS, Vogelstein B, Fomace AJ: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. Cell 71:587-591, 1992
12. Miyashita T, Reed JC: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell 80:293-299, 1995
13. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B: Identification of p53 as a sequence-specific DNA binding protein. Science 252:1708-1711, 1991
14. Kern SE: Mutant p53 proteins bind DNA abnormally in vitro. Oncogene 6. 131-136, 1992
15. Vogelstein B, Kinzler KW: p53 function and dysfunction. Cell 70:523-526, 1992
16. Milner J, Medcalf EA, Cook AC: Tumor suppressor: Analysis of wild-type and mutant p53 complexes. Mol Cell Biol 11:12-19, 1991
17. Takahashi T, Nau M, Chiba M, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD: p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. Science 246:491-494, 1989
18. Kim J, Takahashi T, Chiba I, Park JG, Birrer MJ, Roh JK, Lee H, Kim JP, Minna JD, Gazda AF: Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma tumors and cell lines. J Natl Cancer Inst 83:938-943, 1991
19. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis Cancer Res 53: 4855-4878, 1994
20. Soussi T, Fromental CC, May P: Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. Oncogene 5:945- 952, 1990
21. Hollstein M, Sidrowsky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancer. Science 253:49-53, 1991
22. Gannon JV, Greave R, Iggo R, Lane DP: Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. EMBO J 9:1595-1602, 1990
23. Sommer SS, Cunningham J, McGovern RM, Saitoh S, Schroeder JJ, Wold LE, Kovach JS: Pattern of p53 gene mutations in breast cancers of women of the midwestern United States. J Natl Cancer Inst 84:246, 1992
24. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM: Chromosomal 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. Science 244:217-221, 1989
25. Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF: Molecular cloning, 2nd Ed., Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989
26. Oh SJ, Moon HJ, Yoon JH, Chung SY: Analysis of p53 Gene Alteration in breast cancer in Korea. Korean J BRM 5:75-83, 1995
27. Thor AD, Moore II DH, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihsau E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayhall BH, Smith HS: Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein. J Natl Cancer Inst 84:845-854, 1992
28. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA

isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162:156, 1987

29. Farmer G, Bargonetti J, Zhu H, Fridman P, Prywes R, Prives C: Wild-type p53 activates transcription in vitro. Nature 358:83-86, 1992
30. Leland HH, Michael BK: Cell cycle control and cancer. Science 266:1821-1828, 1994
31. Klein G, Klein E: Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. Nature 315:190-195, 1985
32. Mercer WF, Shields MT, Amin M, Sauve GJ, Appella E, Ullrich SJ, Romano JW: Negative growth regulation in a gliobalastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. Proc Natl Acad Sci USA 87:6166-6170, 1990
33. Yewdell JW, Gannon JV, Lane DP: Monoclonal antibody analysis of p53 in normal and transformal cells. J Virol 59:444-452, 1986
34. Coles C, Condie A, Chetty U, Steel M, Evans HJ, Prosser J: p53 mutations in breast cancer. Cancer Res 52:L5291, 1992
35. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP: A monoclonal antibody specific for the mutant form. EMBO J 9:1595-1602, 1990
36. Lee J, Kim C, Kim D: Treatment of chronic myelogenous leukemia(bone marrow transplantation, interferon, chemotheraphy). Korean J BRM 4:7-16, 1994
37. Thompson AM, Anderson TJ, Condie A, Prosser J, Chetty U, Carter DC, Evans HJ, Steel CM: p53 allele losses, mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinico-pathologiccal parameters. Int J Cancer 50:528, 1992
38. Blandino G, Levine AJ, Oren M: Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. Oncogene 18: 477-485. 1999