

위암에서의 고사유발성 Bcl-2 Family의 돌연변이에 관한 연구

가톨릭대학교 의과대학 병리학교실

유남진 · 이종우 · 송영화 · 김홍석 · 박원삼 · 이정용 · 이석형

Mutational Analysis of Proapoptotic Bcl-2 Family Members in Gastric Carcinomas

서 론

Nam Jin Yoo, M.D., Jong Woo Lee, Young Hwa Soung, Hong Sug Kim, Won Sang Park, M.D., Jung Young Lee, M.D. and Sug Hyung Lee, M.D.

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

Purpose: Evidence exists that dysregulation of Bcl-2 family members is involved in the pathogenesis of cancer development. The aim of this study was to explore whether the somatic mutation of proapoptotic Bcl-2 member genes, one of the mechanisms that prolong the survival of cancer cells, is involved in gastric carcinogenesis.

Materials and Methods: In the current study, to detect somatic mutations of the DNA sequences encoding the Bcl-2 homology 3 (BH3) domain of the human *BAD*, *BIM*, *BIK*, and *Bcl-G* genes in 60 advanced gastric adenocarcinomas, we used the polymerase chain reaction (PCR), single strand conformation polymorphism (SSCP), and DNA sequencing.

Results: The SSCP analysis revealed no mutations in the coding regions of the BH3 domain in the cancers.

Conclusion: The data presented here indicate that proapoptotic Bcl-2 member genes, *BAD*, *BIM*, *BIK*, and *Bcl-G*, may not be mutated in human gastric carcinomas and suggest that these genes might be altered by mechanisms other than somatic mutation. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2003;3:84-87)

Key Words: Gastric carcinoma, *BAD*, *BIM*, *BIK*, *Bcl-G*, Apoptosis, Mutation

중심 단어: 위암, *BAD*, *BIM*, *BIK*, *Bcl-G*, 고사, 돌연변이

책임저자 : 이석형, 서울특별시 서초구 반포동 505번지
가톨릭대학교 의과대학 병리학교실, 137-701
Tel: 02-590-1188, Fax: 02-537-6586
E-mail: suhulee@catholic.ac.kr

접수일 : 2003년 2월 11일, 게재승인일 : 2003년 2월 19일
본 연구는 2002년도 과학재단 선도과학자육성 연구지원으로 이루어진 것임(No. R02-2002-000-00050-0).

고사(apoptosis)는 세포사(cell death)의 주된 발생기전으로 조직의 항상성, 세포분화 및 발생에 중요한 역할을 한다.(1, 2) 고사조절의 이상은 사람에서 퇴행성 질환, 종양, 에이즈 등 여러 질병을 유발시킨다.(1,2) 정상세포에 비하여 암세포는 일반적으로 생리적 자극에 대해 고사가 잘 유발되지 않는 특성이 있으며, 이런 특성은 종양발생, 종양의 성장 및 전이에도 중요한 역할을 한다.(3)

고사를 유발하는 여러 경로는 많지만, *intrinsic pathway*와 *extrinsic pathway*로 나누는 것이 가장 흔한 분류이다.(1) *Extrinsic pathway*는 Fas, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 같은 tumor necrosis factor family에 의해서 유발된다. *Intrinsic pathway*는 Bcl-2 family에 의해서 조절되는데, Bcl-2 family는 크게 고사유발성(proapoptotic)과 항고사성(antiapoptotic)으로 나뉜다.(1) 이들 Bcl-2 family 구성원은 서로 결합하여 homodimer 및 heterodimer로서 복잡한 조절 체계를 구성하며, Bcl-2 family 단백질들의 상대적 비율에 따라서 고사의 반응정도가 결정된다.(1) *Intrinsic pathway*는 성장인자의 소실, 저 산소증, 방사선 조사, 항암제 등에 의해서 유발된다.(1)

포유동물의 Bcl-2 family 단백질은 약 20종류가 밝혀져 있고, 이들 모두는 한 종류 이상의 Bcl-2 homology (BH) domain을 가진다.(1) 이 중 BH3 domain은 고사를 유발하는데 필요 충분한 domain이다. 고사유발성 Bcl-2 family 단백질들은 *BAD*, *PUMA*, *Hrk*, *Bcl-G*, *Noxa*, *BIM*, *Bcl-rambo*, *Bax*, *Bik*, *Bax*, *Bid* 등이 있으며, 이들은 모두 BH3 domain을 가지고 있고 대부분의 경우 고사유발을 BH3 domain에 의존한다.(1,2,4-9)

고사기전에 관여하는 물질의 이상이 발암과정에 중요한 역할을 한다는 증거들이 제시되고 있으며, Bcl-2 family member 단백질의 이상 역시 이 과정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.(10-12) 고사유발성 Bcl-2 family 유전자인 *Bax*, *Bak*의 돌연변이는 이들의 유전자 산물의 고사유발성을 소실하게 하여 종양세포의 생존을 증대시켜서 암 발생과 연관이 있는 것으로 알려지고 있다.(12-14) *Bax*, *Bak*의 돌연변이가 보고된 것은 다른 고사유발성 Bcl-2 family 유전

자신의 돌연변이도 암의 발생과 연관이 있을 수 있다는 것을 제시한다. 본 연구는 고사유발성 Bcl-2 family 유전자 중 이제까지 돌연변이 연구에 대한 보고가 없었던 BAD, BIM, BIK 및 Bcl-G에 대하여 진행성 위암을 대상으로 고사유발성에 중요한 BH3 domain의 돌연변이를 연구하고자 한다.

방 법

1) 연구 대상

1999년 이후 서울에 위치하고 있는 병원에서 근치적 위 절제술을 받은 60명의 진행성 위암 환자들 대상으로 하였다. 위암 환자의 과라린 포배 조직을 5µm 두께로 박절하여 hematoxylin & eosin 염색을 실시한 후 3명의 진단병리의사가 독립적으로 Lauren 분류에 따라 분류하였다. 쌍핑이(intestinal-type) 32예였으며 미란형이(diffuse-type) 28예였다.

2) 돌연변이 조사

Hematoxylin & eosin 염색된 조직에서 미세절제술(microdissection)을 이용하여 암세포 및 정상세포를 각각 분리 수집한 후, proteinase K를 처리하여 DNA를 얻었다. BH3 domain을 포함하는 Bcl-G의 exon 8, BIM의 exon 2, BIK의 exon 3, BAD의 exon 3를 증폭할 수 있는 시발체(primer)를

제작하였다. 방사성 동위원소인(³²P)dCTP를 증합효소연쇄 반응에 포함시켜서 자기방사법(autoradiogram)으로 증합효소연쇄반응 산물을 분석할 수 있게 하였다. 증합효소연쇄 반응은 혼합액을 94°C에서 10분간 변성시킨 후 94°C에서 30초, 53~62°C에서 40초와 72°C에서 40초씩 각각 35회 반복하였으며 72°C에서 5분간 연장반응을 실시하였다. 증합효소연쇄반응 및 single strand conformation polymorphism (SSCP), DNA 열기서열분석에 관한 내용은 이전의 논문에서 재해기 기술되어 있다(15-17)

결 과

미세절제를 통해서 암 및 정상세포를 조사한 60예의 위암조직에서 선택적으로 분리할 수 있었고, 추출된 DNA를 이용하여 BH3 domain을 포함하는 Bcl-G의 exon 8, BIM의 exon 2, BIK의 exon 3, BAD의 exon 3의 돌연변이를 증합효소연쇄반응 및 SSCP로 분석하였다. 모든 증합효소연쇄반응 산물은 SSCP에서 관찰되었는데, 모두 새로운 band의 출현 없이 wild-type의 band로 나타났으며, 이들은 열기서열 분석 결과 돌연변이가 없는 정상 염기서열을 가지고 있었다(Fig. 1). 각각의 정상세포를 SSCP로 분석한 결과도 종양과 동일하게 돌연변이를 관찰할 수 없었다. 이 실험은 미세

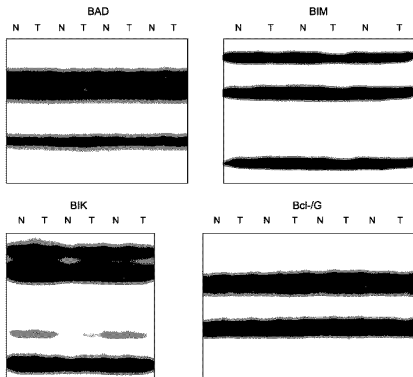


Fig. 1. Absence of somatic mutation of BAD, BIM, BIK and Bcl-G within the BH3 domain in gastric carcinomas. Exon 3 of BAD gene, exon 2 of BIM gene, exon 3 of BIK and exon 8 of Bcl-G were amplified by PCR using primer sets. The PCR products from the representative cases of gastric adenocarcinomas (T) and their corresponding normal tissues (N) were visualized on SSCP. The DNAs from both the tumors and normal tissues show wild-type bands without any additional aberrant bands.

질제, 중합효소연쇄반응, SSCP 및 염기서열분석을 2회 반복하였으며, 결과는 2회 모두 일치하였다.

고 찰

본 연구의 목적은 고사조절유발에 중요한 역할을 하는 BAD, BIM, BIK 및 Bcl-G의 BH3 domain이 위암에서 돌연변이를 가지고 있는지, 또 돌연변이가 있다면 그것이 이 들 단백질의 불활성화를 유도하여 위암의 발생 및 진행에 영향을 줄 수 있는지를 알아보고자 한 것이었다. 저자들은 이 유전자들의 BH3 domain이 60예의 위암조직에서 돌연변이가 되지 않았다는 것을 확인하였고, 이를 통해서 위암의 발생 이전에 이 부위의 돌연변이가 작용하지 않으리라는 것을 예측할 수 있었다.

이제까지 밝혀진 바에 의하면, 고사에 연관된 유전자의 돌연변이는 해당 유전자의 가장 중요한 고사유발 부위에 집중적으로 나타나는 것이 흔하다. Death receptor인 Fas의 돌연변이는 death domain에 집중된 것이 림프종, 다발성 골수종, 흑색종, 폐암, 방광암, 위암 등에서, 다른 death receptor인 TRAIL-receptor2의 돌연변이가 역시 death domain에 집중된 것이 폐암, 림프종, 위암, 유방암에서 보고된 것이 그 예이다.(16,18) 고사의 최종 수행자인 caspase의 일종인 caspase-10은 protease subunit에 돌연변이가 나타나 기능을 소실시킨다.(17) 그러나, Bcl-2 family 유전자인 Bak의 경우, 돌연변이는 모두 BH3 domain 이외의 부위에서 발견되었는데,(14) 이는 Bcl-2 family 유전자의 돌연변이는 한 부위에 국한되어서 나타나지 않을 가능성이 있는 것을 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 고사를 방해하는 기전은 여러 가지가 있는데, 돌연변이는 이 중 한가지 기전이다. DNA methylation, 단백질의 세포 내 위치 변경, 단백질 발현 감소, 길항물질의 생성 증가, 인산화 등이 그 예이다.(1,2) BIM은 세포 골격기관인 microtubule과 결합하면 불활성화 되고,(9) BAD는 인산화되면 기능을 소실한다.(4) 또한, Bcl-2의 발현 증가는 암세포의 고사를 항암제 등의 고사유발기전으로부터 보호한다.(1,19) 위암은 Bcl-2를 과 발현하는 종양 중의 하나이다.(19) 이는 상당 수의 위암이 고사에 대한 저항을 Bcl-2의 과 발현을 통해서 나타낼 가능성이 있음을 제시하는 연구 결과이다. 본 연구 결과 BAD, BIM, BIK 및 Bcl-G의 BH3 domain이 위암에서 돌연변이를 가지고 있지 않다는 사실은 위암에서 이들 유전자의 불활성화가 위에 기술한 것과 유사한 기전으로 이루어질 가능성도 있는 것을 시사한다.

많은 연구가 위암을 대상으로 시행되었지만, 위암은 이 적도 한국에서 가장 높은 빈도의 암이고 많은 위암 환자들

이 매년 사망한다. 그러므로, 위암의 조기 발견 및 진행을 예측하는 방법의 개발은 중요하다. Bcl-2 family에 대한 발현 정도와 유전자 이상을 임상에 적용하려는 연구가 시도되고 있다.(1) 또한, 치료적 관점에서 Bcl-2 family member를 small molecule drug과 결합시켜서 종양의 고사를 유도하는 방법도 연구되고 있다.(20) 이런 관점에서 본 연구는 비록 Bcl-2 family member의 돌연변이를 찾지 못하였지만, 향후의 Bcl-2 family 단백질들을 대상으로 하는 연구에 중요한 정보를 제공하리라 생각된다.

결 론

고사유발성 Bcl-2 family 유전자 중 이제 까지 돌연변이 연구에 대한 보고가 없었던 BAD, BIM, BIK 및 Bcl-G에 대하여 진행성 위암 60예를 대상으로 돌연변이 조사를 중합효소연쇄반응 및 SSCP로 분석하였다. 위암조직에서 선택적으로 분리된 위암세포 및 정상세포 모두 이들 유전자의 BH3 domain에서 돌연변이를 관찰 할 수 없었다. 이 결과를 통하여 저자들은 진행성 위암에서의 BAD, BIM, BIK 및 Bcl-G의 BH3 domain 돌연변이는 없거나 있다 하여도 발생 빈도가 극히 낮을 것이라는 것을 알 수 있었고, 또한 위암에서 이들 유전자의 불활성화는 대부분 돌연변이가 아닌 다른 기전에 의해서 이루어질 가능성이 높은 것을 예측할 수 있었다.

REFERENCES

1. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;39:1415-1430.
2. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
4. Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME. 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, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 1998;17:384-395.
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;16:1686-1694.
7. Guo B, Godzik A, Reed JC. Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 2001;276:2780-2785.
8. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-

- induced apoptosis. *Science* 2000;288:1053-1058.
9. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 1998;17:384-395.
 10. Chang J, Clark GM, Allred DC, Mohsin S, Chamness G, Elledge RM. Survival of patients with metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2003;97:545-553.
 11. Krajewska M, Zapata JM, Meinhold-Heerlein I, Hedayat H, Monks A, Bettendorf H, Shabaik A, Bubendorf L, Kallioniemi OP, Kim H, Reifemberger G, Reed JC, Krajewski S. Expression of Bcl-2 family member Bid in normal and malignant tissues. *Neoplasia* 2002;4:129-140.
 12. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989;57:79-88.
 13. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997;275:967-969.
 14. Kondo S, Shinomura Y, Miyazaki Y, Kiyohara T, Tsutsui S, Kitamura S, Nagasawa Y, Nakahara M, Kanayama S, Matsuzawa Y. Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res* 2000;60:4328-4330.
 15. 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;433:305-309.
 16. Shin MS, Park WS, Kim SY, Kim HS, Kang SJ, Song KY, Park JY, Dong SM, Pi JH, Oh RR, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Alterations of *Fas (Apo-1/CD95)* gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* 1999;154:1785-1791.
 17. Shin MS, Kim HS, Kang CS, Park WS, Kim SY, Lee SN, Lee JH, Park JY, Jang JJ, Kim CW, Kim SH, Lee JY, Lee SH. Inactivating mutations of *CASP10* gene in non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2002;99:4094-4099.
 18. Shin MS, Kim HS, Lee SH, Park WS, Kim SY, Park JY, Lee JH, Lee SK, Lee SN, Jung SS, Han JY, Kim H, Lee JY, Yoo NJ. 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;61:4942-4946.
 19. Krajewska M, Fenoglio-Preiser CM, Krajewski S, Song K, Macdonald JS, Stemmerman G, Reed JC. Immunohistochemical analysis of Bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach. *Am J Pathol* 1996;149:1449-1457.
 20. Reed JC. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell* 2003;3:17-22.
-