

구강종양에서 p53 종양억제 유전자의 돌연변이에 관한 연구

주성채 · 표성운*

필치과의원, 가톨릭대학교 성가병원 구강악안면외과*

Abstract

A STUDY ON MUTATIONS OF P53 TUMOR SUPPRESSOR GENE IN ORAL TUMORS

Seong-chai Joo, Sung-woon Pyo*

Phil Private Dental Clinic,

*Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, Holy Family Hospital, The Catholic University**

Nowadays, there are a lot of evidence that mutation of the p53 tumor suppressor gene is one of the most common genetic abnormalities in neoplastic progression. In this study, we analyzed 20 specimens of oral tumors(squamous cell carcinoma 14 cases, ameloblastoma 3 cases, adenoid cystic carcinoma 2 cases, malignant schwannoma 1 case)using polymerase chain reaction and direct sequencing which used an automated DNA sequencer and software for detection of mutations. Polymerase chain reactions were performed with 4 sets of primers encompassing exon 5, 6, 7, 8, and direct sequencing method was employed.

The results were as followings.

1. We detected 10 point mutations out of 20 specimens (50%).
2. The genetic alterations included 7 mis-sense mutations resulting in single amino acid substitutions, 2 silent mutations, 1 non-sense mutations encoding a stop codon.
3. Mutations were mostly in exon 7(7 out of 10 mutations, 70%) and involved codons 225, 234, 235, 236, 238, 247.
4. These were 4 cases of T→A transversion, 2 cases of C→A transversion, A→G transition, 1 case of C→G, T→G transversion respectively.
5. We could find out point mutations more conveniently using PCR - Automated Direct Sequencing method.

key words: Oral tumor, p53 gene, Point mutation, Polymerase chain reaction, Automatic direct sequencing method

I. 서 론

구강 및 두경부 부위에 발생하는 편평세포암은 전 세계적으로 발병율이 높고 5년 생존율이 낮은 종양으로 지난 20여년 동안 생존율의 증가가 거의 없었으며 흡연과 음주가 유발인자로 작용하고 있는 것으로 알려져 있으며, 최근 분자 생물학적인 측면에서의 병태 생리에 대해서는 현재 연구가 활발히 진행되고 있다^{1,2}. 최근에 정상세포를 암세포로 변화시키는 기전으로서 바이러스나 방사능 혹은 각종 화학물질과 같은 발암물질에 노출된 후 순차적으로 여러 단계를 거치는 다단계 암화과정(multistage carcinogenesis)의 개념이³⁰ 제시되고 있고 발암유전자가 하나 둘씩

밝혀지면서 암발생의 근본적인 원인이 유전자의 변이임이 밝혀지고 있고 폐암, 유방암, 대장암, 식도암 및 피부암 등 성인에서 발생하는 암에 있어 가장 빈번한 유전적 이상으로 p53 종양억제 유전자(tumor suppressor gene)의 돌연변이가 알려져 있다⁴⁹. p53 단백질은 핵내에 존재하는 인단백질(phosphoprotein)로서 simian virus(SV 40)의 거대 T항원(large T antigen)과 함께 발견되어 종양항원(tumor antigen)으로 생각되었으나 후에 종양 억제 유전자와 관계 있는 것으로 밝혀졌다^{10,13}. p53 유전자는 17번 염색체의 단완 17p13.1에 존재하고 20kb의 크기를 가지며 393개의 아미노산으로 구성된 53KDa의 p53단백질을 합성한다^{14,18}. 정상형의 p53 단백질은 성장억제 유전자의 전사(transcription)를 활성화시키며 p53단백질이 세포내에 축적됨에 따라 세포 증식이 억제되어 손상된 DNA를 복구할 시간적 여유를 가지게 되어 세포의 성장과 분열을 역조절(negative regulation)하는 종양 억제 기능을 갖는다^{21,25}. 암조직에서 p53 종양 억제 유전자에 결실(deletion) 또는 점 돌연변이(point mutation)에 의한 변화가 일어나면 종양 억제 기능이 상실되어 암세포의 증식이 일어나게 된다. 이러한 암조직에서 발견된 p53유전자의 변화는 대부분 codon 110-307에 분포

표 성 운

420-717, 경기도 부천시 원미구 소사동 2 중동우체국 사서함 29호
가톨릭대학교 성가병원 치과.구강악안면외과

Sung-woon Pyo.

Dept. of OMFS Holy Family Hospital, The Catholic University
2 Sosa-Dong, Wonmi-Ku, Puchon, Chungdong P.O.Box #29, Kyoungki-do, 420-717 Korea
Tel:(032) 340- 2130, 4 Fax:(032) 340- 2133

하고 있으며 이는 exon 5-8에 해당하는 부분으로 진화과정에서 종(species)간에 잘 보존된 부위에 속한다^{31,35}. p53 유전자의 변이를 찾기 위해 흔히 사용되는 중합효소 연쇄반응-단선 다형형상법(polymerase chain reaction - single strand conformation polymorphism)은 PCR 법으로 목표 염기서열을 증폭하고 방사성동위원소를 첨가(labeling)한 후 단선(single-stranded) 상태로 polyacrylamide gel에서 전기영동하여 변이에 따른 형태변화가 있을 때 전기영동의 이동상(mobility)에 차이가 있다는 원리를 이용한 것으로서 동위원소를 사용한다는 것, 작은 gel내에서 전기영동을 해야하기 때문에 분석해야 할 유전자가 큰 경우 용이하게 변이를 검출하지 못하는 단점이 있었다. 이 연구의 목적은 구강중양 조직에서 PCR과 자동화된 직접 염기서열 분석법(automatic direct sequencing)을 통하여 효과적으로 p53 종양 억제 유전자의 변이를 검출하는 실험법을 확립하고자 함이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구 재료

1995년 1월부터 1995년 12월까지 서울대학교병원 치과진료부에서 구강 편평세포암종 및 선낭포양 암종, 법랑아 세포종, 육종으로 진단된 20예를 대상으로 하였으며 임상병리학적 소견은 아래와 같다(Table 1).

2. 연구 방법

1) DNA의 추출 및 정제

종양 조직은 채취후 DNA를 분리 할때까지 액체 질소에 보관하였다. 그후 검체를 잘게 분쇄하여 10mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.1M EDTA(pH 8.0) 및 0.5% SDS(sodium dodecyl sulfate)를 포함한 digestion buffer 5ml를 넣고 37°C에서 1시간 반응 시킨 후 proteinase K를 10ug/ml 농도로 넣고 50°C에서 36시간 반응시켰다.

이후 PCI(tris-saturated phenol, pH 8.0 /chloroform / isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1) 용액을 동량 넣고 잘 섞은 후 12,000g에서 원심 분리하였고 그후 상층액을 분리하여 동량의 PCI 용액을 넣고 12000g에서 2회 더 반복하였다. 이렇게 분리한 상층액에 1/10배 용량의 3M sodium acetate와 2배 용량의 ethanol을 첨가하여 -20°C에 2시간 방치한 후 12000g로 원심분리 하여 상층액을 버렸다. 남은 DNA 침전물을 70% ethanol로 1회 세척한 후 vacuum dryer로 건조 시키고 400ul의 TE buffer(10mM Tris-HCl, 0.1M EDTA, pH 8.0)를 넣고 실온에서 18시간 방치하여 DNA를 완전히 용해시켰다. 용해된 DNA는 광분석기(spectrophotometer)를 이용하여 260nm와 280nm에서 흡광도를 측정하고 비교하여 순도를 확인한 후 DNA시료를 정량하였다.

2) primer의 합성

p53 primer의 합성은 Buchman²⁰ 등이 보고한 염기서열을 인용하였으며 변이가 흔히 일어나는 부위라고 알려진 exon 5, exon 6, exon 7, exon 8 부위를 분석하기 위해 주위 intron을 포함하여

Table 1. Clinicopathologic Features of Patients

Pt.	Age/sex	Site	TNM stage	Diff.	Alcohol/Smoking	Type
1	62/M	Mn. mucosa	T4NoMx	Well	+/+	SCC
2	72/M	Mx. sinus	T4NoMx	Well	+/+	SCC
3	49/F	Tongue	T2NoMx	Well	-/-	SCC
4	68/F	Mn. mucosa	T4NoMx	Well	-/-	SCC
5	52/F	Tongue	T4N2cMx	Well	+/+	SCC
6	52/M	Maxilla	T4NoMx	Less	+/+	SCC
7	85/M	Maxilla	T4NoMx	Less	+/+	SCC
8	49/M	Maxilla	T4NoMx	Less	+/+	SCC
9	64/M	Maxilla	T4N2Mx	Well	+/+	SCC
10	52/M	Maxilla	T4NoMx	Less	+/+	SCC
11	39/F	Tongue	T2NoMx	Well	-/-	SCC
12	42/M	Tongue	T4NoM0	Well	+/+	SCC
13	56/F	Mn. mucosa	T2NoMx	Well	-/-	SCC
14	66/M	Tongue	T4N1Mx	Mod	+/+	SCC
15	32/M	Submn. gland			+/-	ACC
16	23/F	Maxilla			+/+	ACC
17	12/M	Mn.			Ameloblastoma (Plexiform)	
18	9/M	Mn.			Ameloblastoma (Plexiform)	
19	43/M	Mn.			Ameloblastoma (Plexiform)	
20	16/F	Mn. symphysis			Malignant Schwannoma	

Mn: mandibleMx: maxilla SCC: squamous cell carcinoma Submn: submandible ACC: adenoid cystic carcinoma

Table 2. p53 Oligonucleotide Primers Used for PCR Amplification

Exon	Primer sequence 5' to 3'	PCR product size(bp)
5	sense TTCCTCTTCCTGCAGTACTC	325
	antisense GCAAATTTCCCTCCACTCGG	
6	sense ACCATGAGCGCTGCTCAGAT	236
	antisense AGTTGCAAACCAGACCTCAG	
7	sense GTGTTGTCTCCTAGGTTGGC	139
	antisense CAAGTGGCTCCTGACCTGGA	
8	sense CCTATCCTGAGTAGTGTTAA	330
	antisense CCAAGACTTAGTACCTGAAG	

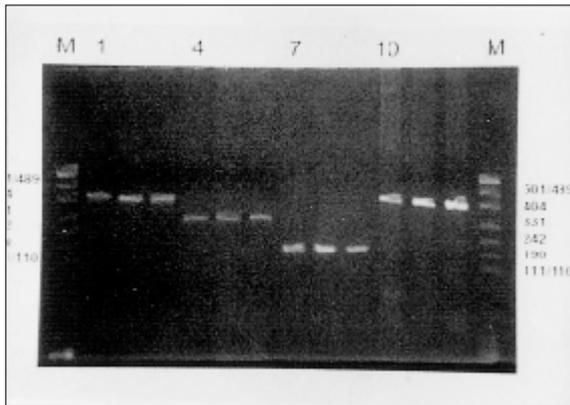


Fig. 1. Photographs showing PCR products electrophoresed in 2% agarose gel.

M : Size marker.
 Lane 1-3, 325bp PCR products encompassing exon 5, Lane 4-6, 236bp exon 6,
 Lane 7-10, 139bp, exon 7, Lane 11-13, 330BP, exon 8.

20bp 크기로 primer 4쌍을 한국생공 (Bioneer[®])에서 제작하였으며 증폭된 primer의 염기서열(sequence)은 아래와 같다(Table 2).

3) 중합효소 연쇄 반응 (Polymerase Chain Reaction)

위에서 추출한 DNA 500ng, dNTP 200uM, primer 10pmol, Taq(Perkin-Elmer U.S.A.)중합효소 0.5U, Taq 효소 Buffer 5ul, MgCl2 1.5mM과 증류수로서 전체 반응부피를 50ul로 하였다. 중합효소 연쇄 반응의 조건은 94°C 10분간 열변성(denaturation)후 94°C 1분 denature, 65°C 1분 annealing, 72°C(exon 7, 8은 58°C) 1분 extension 과정을 총 35회 반복하였으며 최종 annealing은 10분간 하였다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 80 볼트의 전압으로 30분간 전기영동하여 분리하였으며 그 크기는 각각 325, 236, 139, 330bp 이였고(Fig. 1) Gene clean kit(Bioart[®])를 이용하여 정제하였다.

4) 자동화 직접 염기서열 분석방법(Automated Direct sequencing)

정제한 PCR산물은 Sanger(dideoxy sequencing)법을 참조하였으며 Dye Terminator Sequencing Reaction Kit[®] (Perkin-Elmer)을 이용하여 다음과 같이 반응시켰다. 분리한 PCR 산물 1ug, antisense primer 2pmol, terminator premix(dye-labeled dideoxy nucleotides

Table 3. Result of Molecular Analysis

Case No.	Diagnosis	codon(exon)	nucleotide change	amino-acid substitution
1	SCC	234(7)	TAC → AAC (T:A)	Tyr → Asn
3	SCC	273(8)	CGT → AGT (C:A)	Arg → Ser
5	SCC	247(7)	AAC → GAC (A:G)	Asn → Asp
6	SCC	238(7)	TGT → TGA (T:A)	Cys → stop codon
7	SCC	146(5)	TGG → AGG (T:A)	Trp → Arg
9	SCC	140(5)	ACC → ACA (C:A)	Thr (silent mutation)
14	SCC	235(7)	AAC → GAG (A:G, C:G)	Asn → Glu
		236(7)	TAC → GAC (T:G)	Tyr → Asp
20	MS	225(7)	GTT → GTA (T:A)	Val (silent mutation)

SCC: squamous cell carcinoma
 MS: malignant schwannoma
 Asn: Asparagine
 Asp: Aspartic acid
 Tyr: Tyrosine
 Tyr: Tyrosine
 Trp: Tryptophan
 Glu: Glutamic acid
 Cys: Cysteine
 Arg: Arginine
 Ser: Serine
 Val: Valine
 Thr: Threonine

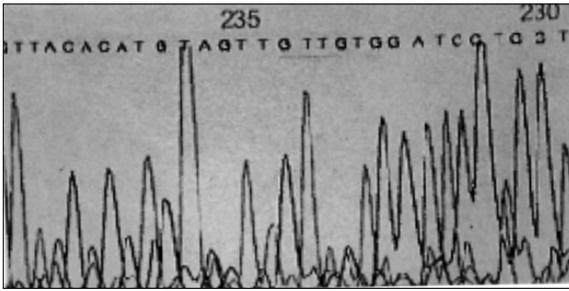


Fig. 2. Case No. 1, exon 7, codon 234(GTA→GTT: TAC→AAC) Tyr→Asn

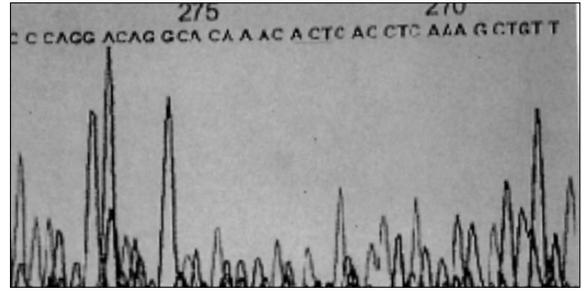


Fig. 3. Case No. 3, exon 8, codon 273(ACG→ACT: CGT→AGT) Arg→Ser

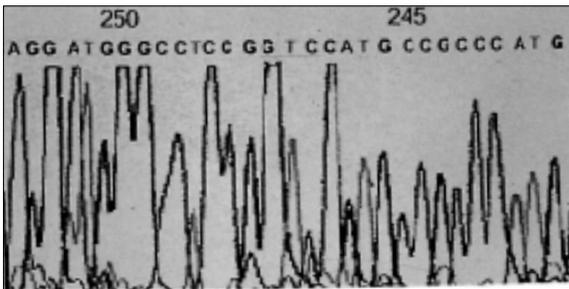


Fig. 4 Case No. 5, exon 7, codon 247(GTT→GTC: AAC→GAC) Asn→Asp

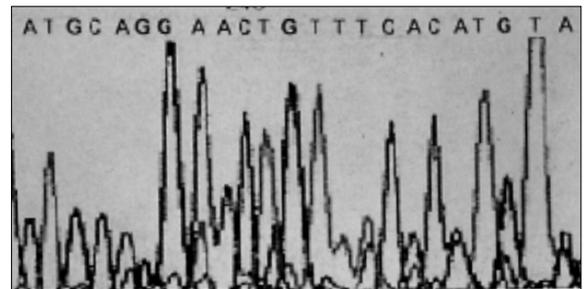


Fig. 5. Case No. 6, exon 7, codon 238(ACA→TCA: TGT→TGA) Cys→Stop codon

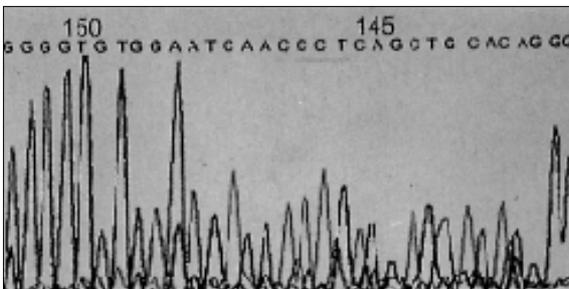


Fig. 6. Case No. 7, exon 5, codon 146(CCA→CCT: TGG→AGG) Trp→Arg

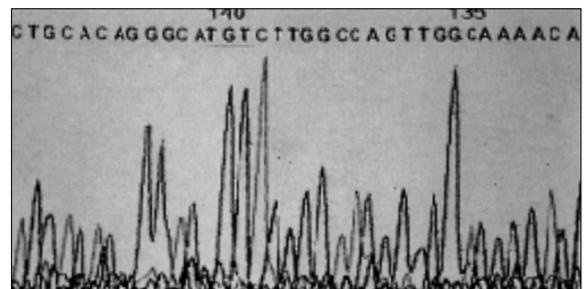


Fig. 7. Case No. 9, exon 5, codon 140(GGT→TGT: ACC→ACA) Thr(silent mutation)

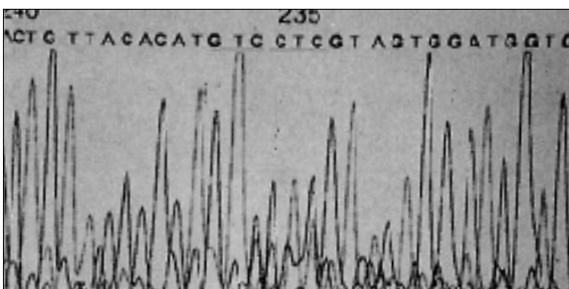


Fig. 8. Case No. 14, exon 7, codon 235(GTT→CTC: AAG→GAG) Asn→Glu

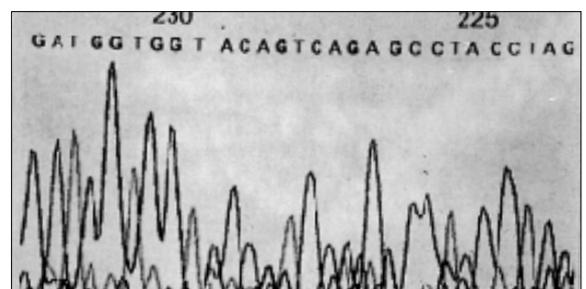


Fig. 9. Case No. 20, exon 7, codon 225(AAC→TAC: GTT→GTA) Val (Silent Mutation)

G, A, T, C, Taq polymerase, dNTP) 8ul와 증류수 5ul를 혼합하여 전체 부피가 20ul가 되게 하였다. Thermal cycler를 96°C로 예열시킨 후 96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분의 조건으로 25cycle 반응시키고 즉시 4°C에서 유지하였다. 반응산물에 80ul의 증류수와 100ul의 phenol : H₂O : chloroform (68 : 18 : 14)을 넣고 vortexing한 후 12,000g에서 원심분리하여 아래층의 유기용매층을 제거하였다. 다시 100ul의 phenol : H₂O : chloroform 용액을 넣고 vortexing한 후 12,000g에서 원심분리하여 상층의 수용액을 새 tube에 옮긴다. 여기에 2M sodium acetate 15ul와 100% ethanol 300ul를 첨가하여 잘 섞고 실온에서 12,000g로 15분간 원심분리하여 상층을 버리고 나서 70% ethanol로 세척한 후 공기중에서 말렸다. Acrylamide, bisacrylamide, Urea, TEMED를 이용하여 4.85% acrylamide sequencing gel을 만들었다. 5ul deionized formamide와 1ul 50mM EDTA 혼합액 4ul를 먼저 준비한 반응산물에 첨가하여 녹이고 90°C에서 2분간 열변성시킨 후 얼음에 즉시 넣어 변성상태를 유지시켰다. 이중 2ul를 미리 준비한 sequencing gel에 loading 하였으며 Automatic Sequencer 377[®](Perkin-Elmer Co. U.S.A.)를 이용하여 염기서열 분석하였다.

III. 연구 결과

상기한 방법에 의하여 p53 유전자의 exon 5, 6, 7, 8에 해당하는 부위를 증폭할 수 있었으며 PCR 산물의 크기는 각각 325, 236, 139, 330 bp 였다.

자동화 직접 염기서열 분석법에 의한 점 돌연변이는 Fig. 2에서와 같이 발견되었다. 20개의 검체중 8건, 10개(한 검체에서 3개의 돌연변이 발생)의 점 돌연변이를 보였으며 exon 7에서 7개, exon 5에서 2개, exon 8에서 1 개의 돌연변이를 나타내었다(Table 3).

편평상피암종 14건중 7건(50%) 9개의 점 돌연변이를 보였으며 malignant schwannoma 1례에서도 침묵변이(silent mutation)를 관찰할 수 있었으나 ameloblastoma와 adenoic cystic carcinoma에서는 돌연변이를 관찰할 수 없었다. 점 돌연변이중 7례에서는 오인변이(mis-sense mutation)에 의한 아미노산의 치환을 가져왔으며, 1례에서는 불인식변이(non-sense mutation)에 의한 stop codon을 형성하였으며 2례에서는 아미노산의 변화를 초래하지 않는 침묵변이(silent mutation)를 보였다.

IV. 총괄 및 고찰

구강 및 두경부 부위에 발생하는 편평세포암은 전 세계적으로 발생률에 있어 10위내를 차지하고 있으며 5년 생존율이 가장 낮은 종양중의 하나이고, 지난 20여년간 생존율의 증가가 거의 없었던 악성종양으로 흡연과 음주, 바이러스 감염, 영양결핍, 식생활 습관 등이 유발인자로 작용하고 있는 것으로 알려져 있으며 분자 생물학적인 측면에서의 병태 생리에 대해서 현재 연구가 활발히 진행중에 있다¹³⁾. 암발생에 관여하는 유전인자에는 종양 유전자(on-cogene)와 종양억제 유전자(tumor suppressor gene)가 있다.

종양유전자는 과발현에 의해 그 작용을 나타내며 현재 ras, c-myc 등 여러 바이러스 종양 유전자와 유사한 유전자가 정상세포에서 발견되었고 이들은 세포의 증식 및 성장을 조절하는 기능을 가지고 있다¹⁴⁾. 항 종양유전자(Anti-oncogene)로 불리는 종양억제 유전자는 정상세포의 성장에 있어 역조절(negative regulator) 작용을 하여 종양발생을 억제한다고 알려져 있다¹⁵⁾. 종양억제 유전자의 돌연변이는 유전자 산물의 기능 소실을 초래하고 이에 따른 세포의 증식 및 성장을 억제하는 기능이 상실되어 악성변형(malignant transformation)으로 진행된다고 한다. 현재까지 가장 널리 알려진 종양억제 유전자로는 p53, Rb-1 (retinoblastoma gene)이 있다. 망막아세포종의 Rb-1은 최초로 알려진 종양억제 유전자로서 염색체 13q14에 존재하는 한 쌍의 Rb-1유전자가 모두 불활성되어 발생한다고 하여 Knudson은 "two hit theory"를 제시하였다¹⁶⁾. p53은 1979년에 발견된 핵내에 존재하는 인단백질로서 Simian virus 40(SV 40) 거대 T 항원(large T antigen)과 결합된 숙주단백(host protein)으로 발견되었으며, 종양 조직에서 과발현을 보여 종양유전자로 생각되었으나 정상형의 p53은 악성변이를 유발하기 보다는 억제하고 변이형 p53은 단백질의 변이를 나타내고 이 변이 산물이 세포성장 억제에 효과가 없다는 사실이 밝혀졌다⁸⁻¹³⁾. 또한 32°C에서 정상형태로서 세포성장 억제를 보이지만 변이형태를 보이는 39°C에서는 오히려 증식을 야기하는 온도에 민감한 p53변종 실험을 통하여 p53은 우성으로 작용하는 종양억제 유전자로 밝혀졌다^{37,38)}.

p53 불활성화 기전은 몇 가지로 분류할 수 있는데 첫째로 바이러스 조각이 p53 유전자에 유입되는 경우이다. Abelson murine leukemia virus(Ab-MuLV) - trans formed pre-B cell과 Friend leukemic cell line은 p53을 생성하지 않는 첫번째 세포주로서 바이러스 조각이 p53 유전자에 유입되어 그 기능이 상실된다. Ab-MuLV 세포주에서 L12, Moloney 바이러스 조각이 p53의 첫째 intron에 유입되어 유전자를 불활성 시키는데 변형체 mRNA가 발현되어 p53 단백질이 검출되지 않는다. Friend leukemia 세포주에서는 바이러스 조각이 4번째 intron에 유입되어 짧은 p53 산물을 발현시키고 또한 다른 변형된 형태의 p53도 발견되고 있다³⁹⁻⁴¹⁾. 이상의 예들은 바이러스가 유도하는 leukemic cell line에서 독특하게 나타난 것으로 아직까지 인간의 원발성 종양에서는 발견되고 있지 않다. p53 유전자의 불활성의 또다른 기전으로 p53 유전자의 결실(deletion) 및 재배열(rearrangement)이 있다. HL-60 promyelocytic leukemic cell line은 인간의 세포주에서 첫 번째로 p53 단백질을 생성하지 않은 경우로서 염색체 17번 중의 하나가 소실되거나 p53이 염색체 지도상의 단완에서 중대한 결실을 나타낸다^{14,42,43)}. 세번째 기전으로서 단백질간의 상호작용에 의해 p53의 기능이 불활성화 된다. p53이 처음 관찰된 SV-40 변형세포에서 발견된 p53 단백질은 성질상 정상형이라고 오늘날 받아들여지고 있다¹⁰⁻¹³⁾. 그러나 이 단백질의 종양억제 능력은 바이러스에 의해 발현되는 거대 T 항원(large T antigen)과의 복합물 형성에 의해 소실되는데, 정상형 p53의 작용에 중요한 구조적 형태는 다른 단백질과 복합물 형성에 의해 쉽게 변형될 수 있다. 정상형 p53은 Adenovirus의 Elb 또는 EBV의 EBNA 항원과 같은 단백질과

복합물을 형성하는 것이 보였다. Papillomavirus의 경우 p53은 E6 바이러스에 의해 생성되는 단백질에 의해 분해되어 불활성화 되는 것으로 여겨진다^{44,46}. 네번째 기전으로서 정상형 p53이 불활성화 되는 가장 빈번한 기전은 점돌연변이 이다^{1,31,47}. 비록 처음에는 돌연변이가 p53 유전자의 일정한 지역에 집중되어 발생하는 것으로 여겨졌으나 오늘날에는 유전자 전체에 걸쳐 발생하는 것으로 받아들여지고 있다^{31,32,48}. 변환(transversion), 전환(transition), 결실(deletion), 삽입(insertion), 구조이동(frame-shift)에 의해서 다양한 오인(mis-sense), 불인식(non-sense)변이가 다양한 종양에서 발견되고 있다. p53 유전자는 17번 염색체 단완(17p13.1)에 존재하고 있으며 유전자 크기(genomic size)는 20kb이며 11개의 exon으로 구성되어 있고³¹ 첫번째 noncoding exon은 10kb의 intron에 의해 10개의 exon군으로 부터 분리되어 있다⁴⁹. p53 유전자는 2.6kb의 mRNA를 생성하는데 mRNA의 전사기시부위를 분석해 보면 2개의 AUG codon이 있음을 보여 주는데 변이 p53 단백질의 빈번한 발생에 비추어 대부분의 p53은 첫번째 AUG codon을 이용하여 p53이 형성되며 5'-end의 결손이나 돌연변이 등에 의해 첫번째 AUG가 소실되면 두번째 AUG가 전사에 이용된다⁴⁸. 인간의 p53 유전자는 적어도 2개의 promoters에 의해 제어받게 되는데 P1은 첫번째 exon의 5'에 위치하고 P2는 첫번째 intron 5' 끝에 위치한다⁵⁰. p53 단백질이 세포의 성장을 조절하는 기전은 다음과 같다.

정상형 p53 단백질은 393개의 아미노산으로 이루어진 인단백으로 G1-phase 동안 세포질내에 축적되고 초기 S-phase에서 핵내로 들어가서 머무르게 되는데⁵⁰ 2개 또는 4개가 결합하여 존재하며 DNA의 특정부위에 결합하여 전사인자(transcription factor)로서 작용한다^{53,55}. 정상형 p53만이 핵내에 위치하며 변이형은 세포질에 위치한다²⁹. p53 단백질의 지배를 받는 것으로 알려진 유전자는 mdm-2, GADD 45, waf-1/ Cip-1 등으로 대부분은 TATA-box를 갖는 promotor로서 조절되는 유전자들로서 p53은 TATA 결합 단백질(TBP)이나 다른 전사 요인과 결합하여 TATA로 조절되는 유전자의 발현을 억제한다. 또한 Rb의 promotor에 위치하는 CGAAGTGA cis-acting 요소에 작용하여 Rb 유전자의 발현을 억제한다²⁰. 정상형 p53 단백질은 세포가 G1 주기에서 S phase로 진행하여 세포가 분열하는 것을 막거나 세포의 고사(apoptosis)를 유발한다. 그 기전은 p53이 세포주기 단백질인 waf-1/p21을 직접 활성화 시키는데 활성화된 waf-1/p21은 G1-phase에서 작용하는 CDK2 kinase 활성을 억제하여 세포가 G1 phase에서 S phase로의 진행을 막게 된다. p53 단백질의 세포내 축적은 아마도 손상된 DNA가 회복될 때 까지 cell cycle을 억제하기 때문이며 세포의 회복이 이루어 지지 않을 경우 cell death 기전을 활성화 시키게 된다^{59,61}. 정상형 p53 단백질은 반감기가 6~20분 정도로 매우 짧으며 변이된 p53 단백질은 안정되어 반감기가 6시간 정도로 연장되며 종양세포내에서 높은 농도로 축적된다. 대부분의 변이 p53 단백질은 핵 염색을 나타내는 특이 항체로서 염색되며 따라서 p53의 과발현은 일반적으로 종양세포에 대한 특이 표식자로서 사용될 수 있다⁶²⁻⁶⁴. 그러나 어떤 예의 종양에서는 현재까지 기전이 밝혀지지 않았지만 정상형 p53의 과발현을 보이는 것도 있

었다⁶⁵. 원발종양에서 p53이 과발현 되는 것 외에도 p53에 대해 면역반응을 나타내는 것이 발견되었다. 초기의 연구에서 종양을 가진 생쥐 혈청에서 p53에 대한 항체를 형성하는 것을 보여주었고 암종환자 혈청내에서도 유사하게 p53에 대한 항체가 높게 나타났다^{66,67}. 따라서 암종 환자의 혈청에서 p53에 대한 항체 검출은 암종의 조기 진단과 잔존질병의 추적조사에 유용한 수단이 될 수 있다. Hollstein등은 280종의 p53 돌연변이를 조사하여 본 결과 98%가 codon 110-307(exon 4-9)에 집중적으로 분포한다고 보고하였으며³⁰ 특히 codon 238-248 부위에 hot spot을 이루는 것으로 보고되고 있으나 지역에 따라 차이가 있다고 알려져 있다. 미국의 경우 exon 7, 일본의 경우 exon 5, 8, 영국의 경우 exon 4에서 주로 일어나는 것으로 보고되고 있다^{1,28,29}. 본 연구에서는 exon 5에서 exon 8 까지 분석하였으며 정상의 염기서열과 비교하여 발견된 10개의 변이중에서 exon 5 (codon 140, 146)에 2개, exon 7번(codon 225, 234, 235, 236, 238, 247)에 7개, exon 8번(codon 273)에 1개가 발견되어 exon 7에 집중적으로 분포하고 있음을 관찰할 수 있었으며 미국의 경우와 유사하였다. p53 돌연변이의 염기 치환 양상을 보면 미국의 경우 구강 및 두경부 암의 63%에서 G→T 변환(transversion)이 있고 일본의 경우 50%에서 G↔A 전환(transition)이 발견된다고 한다³⁰. G→T 변환은 흡연이 중요한 인자로 작용하는 폐암에서 가장 흔한 돌연변이이며 담배의 주 발암물질인 benzo-pyrene이 G→T 변환을 일으킨다고 알려져 있어 두경부 암에 있어 p53의 G→T 변환이 담배의 발암물질에 의한 것이라는 추측도 가능하다²⁷. 본 실험에서는 T→A 변환이 4례로 가장 많았으며, C→A 변환 2례, A→G 전환 2례, C→G 전환 1례, T→G 변환 1례였고 흡연과 연관성이 있는 G→T 변환은 4례를 수 없었다.

p53 유전자의 변이를 찾기 위해 지금까지 흔히 사용되는 PCR-SSCP 방법은 PCR 법으로 목표 염기서열을 증폭하고 방사성 동위원소를 labelling한 후 단선(single-stranded) 상태로 polyacrylamide gel에서 전기영동하여 변이에 따른 형태변화가 있을 때 전기영동의 이동상에 차이(mobility shift)가 있다는 원리를 이용한 것으로서 김 등¹⁹은 9건의 두경부 암중에서 2례의 이동상의 차이를 관찰하였고, Kiyonori 등³⁵은 63건의 암중에서 18례의(28.5%) 돌연변이를 발견하였으며 Adel 등³⁰은 35-75%의 돌연변이를 보고하였다. 본 연구에서는 Perkin-Elmer사의 Automated Direct Sequencer 377을 이용하여 20건의 종양중 효과적으로 8건(40%), 10례(50%)의 점 돌연변이와, 14건의 편평상피암에서 7건(50%) 9례(64%)의 점 돌연변이를 발견할 수 있었고, 방사성 동위원소를 사용하지 않아도 형광염색제에 의해 유전자 서열을 용이하게 분석할 수 있었으며 수동의 전통적인 gel 전기영동법에서 이용하는 4개의 lane 대신에 1개의 lane만을 이용할 수 있고 특히 분석해야할 유전자의 크기가 큰 경우에는 PCR-Automated Direct Sequencing 방법이 기존의 PCR-SSCP 후 Gel 상에서 수동으로 하는 염기서열 분석 방법보다 간편하고 더욱 효과적 검출법으로 사료된다.

지금까지의 연구는 주로 암종을 대상으로 한 것으로서 Malignant Schwannoma와 같은 육종에서도 유전자의 변이를 보여 주었고, Ameloblastoma에서는 비록 변이를 발견하지 못했으

나 양성 종양에서도 염색체의 수적 이상 등이 보고되고 있는바 앞으로는 종양발생에 대한 유전자의 변이 연구가 전 종양 모두에 걸쳐 이루어져야 한다고 사료된다.

V. 결 론

최근 종양 발생에 대한 유전자의 변이에 대한 분자생물학 연구가 활발히 진행되고 있고 본 연구에서는 구강종양 20건에서 p53 유전자의 axon 5, 6, 7, 8의 핵산염기서열을 중합효소 연쇄 반응과 자동화 직접 염기서열 분석법으로 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 20건의 종양중 8건 10례에서 유전자의 점 돌연변이를 관찰하였다.
2. 유전자의 변이에 의해 아미노산 치환을 보이는 7례의 오인(missense)변이와 2례의 침묵(silent)변이, 정지 codon을 만드는 1례의 불인식(nonsense)변이가 있었다.
3. 변이는 주로 exon 7(10례중 7례, 70%)에서 발생하였다.
4. T→A 변환이 4례, C→A 변환, A→G 전환이 각각 2례였으며 T→G, C→G 변환은 각각 1례였다.
5. 중합효소 연쇄반응-자동화된 직접 염기서열 분석법은 점 돌연변이 등 유전자의 변이를 더욱 용이하게 발견할 수 있었다.

참고문헌

1. Kenneth DS, Martha EL, Leonard SI, et al.: Frequent p53 Mutations in Head and Neck Cancer. *Cancer Research* 52: 5997-6000, 1992.
2. Jonathan CI, Alan B.: *Oncogenes in Head and Neck Cancer*. *Laryngoscope* 103: 42-53, 1993.
3. Dong MS, Jhngook K, Jae YR, Jason H, Jack AR, Waun KH, Walter NH: Activation of p53 Gene Expressing in Premalignant Lesions during Head and Neck Tumorigenesis. *Cancer Research* 54: 321-326, 1994.
4. 임석원, 장석균 : 인체 대장 직장암에서 p53단백질의 발현 유무와 ras 21 단백질 발현 p53 암억제유전자의 점변이 및 17p 대립유전자 결손. *가톨릭대학 의학부 논문집*. 47: 1613- 1626, 1994.
5. 조원일, 주상용 : 인체 대장 직장암 및 근접 조직에서 염색체 대립 유전자 결손과 K-ras점 돌연변이. *가톨릭대학 의학부 논문집*. 46: 547-558, 1993.
6. Karin N, Roger S, Gans G, Bjorn Z, Goran R: p53 Expression and Cell Proliferation in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Cancer* 75: 87-93, 1995.
7. Matthias Nees: Expression of Mutated p53 Occurs in Tumor-distant Epithelia of Head and Neck Cancer Patients: A Possible Molecular Basis for the Development of Multiple Tumors. *Cancer Research* 53: 4189- 4196, 1993.
8. Finley CA, Hinds PW, Levine AJ: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083, 1989.
9. Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimiho O, Oren M: Wild type p53 can inhibit oncogene mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 8763, 1989.
10. Lane DP, Crawford L: T antigen is bound to a host protein in SV 40 transformed cells. *Nature* 278: 261, 1979.
11. Linzer DIH, Levine AJ: Characterization of a 54 K-dalton cellular SV 40 tumor antigen present in SV 40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43, 1979.
12. Sarnow P, Ho YSH, Williams J, Levine AJ: Adenovirus E1b-58 Kd tumor antigen and SV 40 large tumor antigen are physically associ-

- ated with the same 54-Kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28: 387, 1982.
13. Montenarh M, Quaiser A: Two different protein-protein interactions in oligomeric complexes of SV40 large T antigen with the cellular oncoprotein p53. *Oncogene* 4: 379, 1989.
14. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, et al.: Chromosomal 17 deletions and p53 mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217, 1989.
15. Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV: Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 7: 961, 1987.
16. Carbone D, Chiba I, Mitsudomi T: Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene* 6: 1691, 1991.
17. Pennica D, Goeddel DV, Hayflick JS, Reich NC, Anderson CW, Levine AJ: The amino acid sequence of murine p53 determined from a cDNA clone. *Virology* 134: 77, 1984.
18. Harris N, Brill E, Shohat O, Prokocimer M, Wolf D, Arain N, Rotter V: The molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol Cell Biol* 6: 4650, 1986.
19. 김갑무, 우훈영, 조윤희, 김봉윤 : 두경부 암에서 p53 종양 억제 유전자의 변이. *한이인지*. 38: 258, 1995.
20. 백정환 등 : 두경부 편평세포암에서 p53의 표현양상에 관한 면역조직화학적 연구. *한이인지*. 38: 407, 1995.
21. Shio Y, Yamamoto T, Yamaguchi N: Negative regulation of Rb expression by the p53 gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5206, 1992.
22. Unger T, Mietz JA, Scheffner M, Yee CL, Howley PM: Functional domains of wild type p53 and mutant p53 proteins involved in transcriptional regulation, transdominant inhibition, and transformation suppression. *Mol Cell Biol* 13: 5186, 1993.
23. Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, Shay JW: A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol* 12: 2866, 1992.
24. O'Rourke RW, Miller CW, Kato GJ, Simon KJ, Chen DL, et al.: A potential transcriptional activation element in the p53 protein. *Oncogene* 5: 1829, 1990.
25. Raycroft L, Wu H, Lozano G: Transcriptional activation by wild type but not transforming mutants of the p53 antioncogene. *Science* 249: 1049, 1990.
26. Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP, Georgiev GP: A variation in the structure of the protein-coding regions of the human p53 gene. *Gene* 70: 245, 1988.
27. Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP: p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res*. 52: 1695, 1992.
28. Sakai E, Tsachida N: Most common squamous cell carcinoma in the oral cavity contain mutated p53 tumor suppressor genes. *Oncogene* 7: 927, 1992.
29. Weinberg RA: Tumor suppressor gene. *Science* 254: 1138, 1991.
30. Weinberg RA: Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 222: 771, 1983.
31. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49, 1991.
32. Levine AJ, Momand J, Finlay CA: The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351: 453, 1991.
33. Mercer WE, Shields MT, Amin M, et al.: Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild type p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6166, 1990.
34. EL-Naggar AK, Lai S, Luna MA, Zhou XD, Batsakis JG: Sequential p53 Mutation Analysis of Pre-invasive and Invasive Head and Neck Squamous Carcinoma. *Int J. Cancer* 64: 196, 1995.
35. Katsuragi K, Chiba W, Matsubar Y et al.: A Sensitive and High-Resolution Method for the Detection of Mutations in the p53 Gene Using Fluorescence-Based PCR-SSCP. *Biomedical Research* 16: 273, 1995.
36. Soussi T, Caron De Fromentel C, May P: Structural aspects of the p53 protein in relation to Oncogene evolution. *Oncogene* 4: 945, 1990.
37. Ginsberg D, Michalovitz D, Dorit Oren M: Induction of growth

- arrest by a temperature-sensitive p53 mutant is correlated with increased localization and decreased stability of the protein. *Mol Cell Biol* 11: 582, 1991.
38. Martinez J, Georgoff I, Martinez J, Levine AJ: Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Gene Dev.* 5: 151, 1991.
 39. Wolf D, Rotter V: Inactivation of p53 gene expression by an insertion of Moloney murine leukemia viral-like DNA sequence. *Mol Cell Biol* 4: 1402, 1984.
 40. Wolf D, Admon S, Oren M, Rotter V: Abelson murine leukemia virus transformed cells that lack p53 protein synthesis express aberrant p53 mRNA species. *Mol. Cell Biol* 4: 552, 1983.
 41. Munroe DG, Peacock JW: Inactivation of the cellular p53 gene is a common feature of Friend erythro-leukemia: Relation to dominant transforming alleles. *Mol Cell Biol* 10: 3307, 1990.
 42. Wolf D, Rotter V: Major deletion in the gene encoding the p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 790, 1985.
 43. Kelman Z, Prokocimer M, Peller S, et al.: Rearrangements in the p53 gene in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 74: 2318, 1989.
 44. Szekeley L, Selivanaova G, Magnusson KP, Klein G, Wiman KG: EBNA-5 an Epstein-Barr virus encoded nuclear antigen binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5455, 1993.
 45. Crook T, Tidy JA, Vousden KH : Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequence distance from those required for p53 binding and transactivation. *Cell* 67: 547, 1991.
 46. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129, 1990.
 47. Vogelstein B, Kinzler KW: p53 function and dysfunction. *Cell* 70: 523, 1992.
 48. Harris CC: The p53 tumor suppressor gene: At the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and cancer risk assessment. *Science* 262: 5142, 1993.
 49. Lamb P, Crawford L: Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 6: 1379, 1986.
 50. Soussi T, De Fromental CC, Mechali M, May P, Kress M: Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. *Oncogene* 1: 71, 1987.
 51. Reisman D, Greenberg M, Rotter V: Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second stronger promoter within intron 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5146, 1988.
 52. Shaulsky G, Goldfinger N, Peled A, Rotter V: Involvement of wild type p53 protein in the cell cycle requires nuclear localization. *Cell Growth Differ.* 2: 661, 1991.
 53. Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Zeev A, Rotter V: Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 10: 6565, 1990.
 54. Dang CV, Lee WMF : Nuclear and nucleolar targetting sequences of c-erb, c-myc, N-myc, p53, HSP 70 and HIV tat proteins. *J. Biol Chem* 264: 18019, 1989.
 55. Shaulsky G, Goldfinger N, Tosky MS, Levine AJ: Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene* 6: 2055, 1991.
 56. Momand J, Zambetti GP, Olson D, George D, Levine AJ: The mdm-2 oncogene product forms a complex with the P53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69: 1237, 1992.
 57. Mack DH, Vartikar J, Pipas JM, Laimins L: Specific repression of TATA-mediated but not inhibitor-mediated transcription by wild type p53. *Nature* 363: 282, 1993.
 58. Kastan MB, Zhan Q, El-Deily WS, Carrier F, et al.: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD 45 is defective in ataxia telangiectasia. *Cell* 71: 587, 1992.
 59. El-Deily WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Kinzler KW, Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817, 1993.
 60. Wade-Harper J, Adami G., Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ: The p21 CDK-interacting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinase. *Cell* 75: 805, 1993.
 61. Xiong Y, Hannon GJ Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinase. *Nature* 366: 701, 1993.
 62. Rotter V: p53, a transformation-related cellular encoded protein can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1613, 1983.
 63. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, et al.: p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7555, 1990.
 64. 임창윤, 오현주: 구강 편평세포암종에서 p53의 과발현 및 돌연변이에 관한 연구. 서울치대논문집, 1995.
 65. Moll UM, Riou G, Levine AJ: Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutations and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7262, 1992.
 66. Rotter V, Witte ON, Coffman RB, Altimore D, et al: Abelson murine leukemia virus induced tumors elicit antibodies against a host cell protein p50. *J. Virol.* 36: 547, 1980.
 67. Schlichtholz B, Legros Y, Gillet D, et al.: The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to mutational hot spots. *Cancer Res.* 52: 6380, 1992.