

p53이 결여된 SKOV3 난소암 세포주에서 p73유전자의 발현

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 산부인과
황종대 · 박창수 · 최정주 · 김종식 · 배덕수 · 이제호

=Abstract=

Expression of p73 in Null-p53 SKOV3 Ovarian Cancer Cell Line

Jong Dae Whang, Chang Soo Park, Jung Joo Choi, Jong Sik Kim,
Duk Soo Bae, Je Ho Lee

*Department of Obstetrics & Gynecology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University,
School of Medicine, Seoul, Korea*

p73, a first p53 relative, has been identified at chromosome 1p36, a region that is deleted in variety of human cancers. This protein shares strong homology with p53 protein, suggesting functional similarities with p53. Indeed, p73 can activate p53 downstream genes inducing apoptosis or growth arrest in tumor cells lacking p53.

This phenomenon leads us to investigate the function of p73 in ovarian cancer because aberrant p53 was very frequently found in this cancer. We hypothesize that DNA damaging agents trigger p53 dependent apoptotic pathway through p73 instead of p53 in ovarian cancer having aberrant p53.

We selected SKOV3 ovarian cancer cell line having no p53 gene and treated this cell line with cisplatin. After the treatment, we examined the transcriptional level of p73 and p21. Moreover, to identify whether the status of p53 influence to the function of p73, we performed same experiment after inserting adenovirus mediated p53(Avp53) into cell line.

We detected significantly increased transcripts of p73 when treated with cisplatin. But treated with Avp53 or combined treatment with cisplatin, the transcriptional levels were not changed.

These data suggest that overexpression of p73 may be important to trigger apoptotic pathway when the p53 gene is lost, but not so important in cells having normal p53.

Key words: p73, p53, Tumor suppressor gene, Ovarian cancer

I. 서 론

p73은 p53 family중 맨 처음으로 발견된 유전자로서 이는 1번 염색체의 단완 36부위에 존재한다¹⁾. p73유전자가 존재하는 이 부위는 많은 종류의 암에

서 결손이 발견되고 단일상동유전자발현(monoallelic expression)을 한다. p73이 발견된 이래 이 유전자가 p53과 매우 많은 구조적 유사성을 가지고 있어 이것이 p53과 기능적으로도 유사할 것이라는 것을 시사해 왔다. 실제로 p73은 p53으로 인해 발현되는 유전자들을 유도해 내기 때문에 p53이 존재하지 않

*본 연구는 과학기술처에서 주관하는 1994년 우수연구센터사업(97K3-0401-02-01-3), 1998년 특정연구개발사업(08-02-A-11), 1998년 특정기초연구(98-0403-0401-5)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

는 암세포에서는 p73이 종양세포의 apoptosis나 성장억제를 가져오게 된다.^{1,2)} 그러므로 p73유전자는 종양억제유전자로서의 가능성이 있고 더 나아가 p53이 결여되었을 때는 이를 대신해 p73이 종양억제의 기능을 할 수도 있다는 예측을 해 왔다.

일반적으로 DNA에 손상이 일어나게 되면 p53이 동원되어 세포주기의 정지(cell cycle arrest)가 일어나고 정지기간 동안 정상적인 복구가 되면 세포주기가 다시 시작되지만 만일 복구를 해내지 못할 경우 apoptosis로 가게 하는 것이 p53의 중요한 기능이라 할 수 있다. 이러한 관점에서 본 연구는 만일 DNA에 손상을 일으키는 물질을 p53의 기능에 이상이 생긴 난소암 세포에 주입하면 p53의존 apoptosis 경로(p53 dependent apoptotic pathway)를 p53을 대신해 p73이 작용하게끔 할 것이라는 가정으로부터 시작하였다. 그리하여 난소암 세포 중 p53이 결여되었는데도 항암제를 투여하였을 때 apoptosis가 일어나는 경우는 p73이 p53 대신 특정한 기능을 할 수 있는지를 알아보기 위해 실험을 계획하였다.

p53유전자가 결여된 난소암 세포주 SKOV3를 선정하여 cisplatin으로 처리한 후 p73의 전사 수준을 확인하고 p53의존 apoptosis 경로에 관련되어 있는 유전자인 p21의 발현을 함께 보았다. 이와 동시에, p53의 유무가 p73의 기능에 다른 영향을 주는지의 여부를 확인하기 위하여 SKOV3 세포주에 아데노바이러스 매개 p53(adenovirus mediated p53; Avp53)을 주입한 후 cisplatin을 처리하여 p73과 p21 유전자의 발현을 보았다.

본 연구 결과, SKOV3 세포주를 cisplatin으로 처리하면 p73의 전사는 유의하게 증가하고 이와 함께 p21이 동원됨을 알 수 있었다. 그러나 p53의 상태에 따른 p73의 기능을 확인하려고 SKOV3 세포주에 Avp53을 주입한 후에 측정된 p73의 전사는 cisplatin 처리 전후에 변화가 없었다.

이상에서 p73은 p53이 결여되었을 경우에는 p53을 대신하여 apoptosis를 가져오게 할 수 있지만 만일 p53이 제대로 기능하고 있는 경우에는 그 기능이 p53에 비해 미약할 것이라는 추정을 하였다. 하지만 p73이 난소암에서 진정한 종양억제유전자로서 작용하는지의 여부에 대한 정확한 규명을 위해서는 여러 상태의 p53유전자를 가진 다양한 세포주 각각에서 p73유전자의 기능을 확인하여야 할 것이다.

II. 연구 방법

1. p73유전자의 탐식자(probe) 제작

상피세포 난소암 환자의 암세포에서 총 RNA를 추출한 후 RNAExpand™ Reverse Transcriptase(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)로 역전사(reverse transcription)시켜 cDNA를 합성하였으며 Bioneer (Korea)사에 의뢰하여 만든 소식자(primer)인 SW73 (sense: 5'-CCTGTTTACAAGAAAGCGGA-3')과 p73 A2(antisense: 5'-CCTCAGTGGATCTCGGCCTCCGTG-3')를 가지고 Taq DNA polymerase(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)를 넣어 중합효소연쇄반응기(9600 PCR thermal cycler; Perkin-Elmer, U.S.A.)로 1차 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. 이를 다시 nested primer인 SE7 p73(sense: 5'-GGGACGGAATTCACCACCATC-3')과 AE9p73(antisense: 5'-AAGGTAGTACGTGTCCTCGTC-3')으로 2차 중합효소연쇄반응을 수행하여 336 base pair(bp)의 분절을 얻었다. 이것을 pCR®2.1-TOPO vector(Invitrogen, U.S.A.)에 클로닝(cloning)한 후 자동염기서열분석기(automatic sequencer; Perkin-Elmer, U.S.A.)를 통해 증폭된 p73분절이 돌연변이가 일어나지 않은 정상 서열을 가지고 있음을 확인하였다.

2. SKOV3 세포주의 배양 및 p53 단백질의 cisplatin으로의 처리

SKOV3(American Type Culture Collection, U.S.A.) 세포주를 DMEM®(Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 4.5 G/L Glucose & L-Glutamine; Biowhittaker, U.S.A.)배지가 들어 있는 4개의 60mm dish에서 각각 배양시켰는데, 이 중 2개의 dish에는 adenovirus-mediated p53(Avp53)을 처리하였다. Avp53은 SKOV3 세포 하나당 50의 비율(1:50)로 들어가게 하기 위하여 2X10⁶의 Avp53을 주입하여 24시간 배양하였다. Avp53을 주입 후 24시간을 기다린 이유는 Avp53을 감염시킬 때, 24시간이 경과하게 되면 p53이 세포에 충분히 들어갈 수 있었다는 우리의 실험 결과에 의한 것이었다.

24시간이 경과하면 4개의 dish중 Avp53을 처리하

지 않은 세포주 하나와 처리한 세포주 하나에 cisplatin을 각각 10 μ g/ml의 농도로 하여 주입하였고 이를 다시 24시간 동안 배양시켰다. 그리하여 control 세포주와 cisplatin 10 μ g/ml을 24시간동안 처리한 세포주, 그리고 Avp53을 1:50 의 비율로 처리한 세포주와 Avp53 처리 후 cisplatin 10 μ g/ml을 24시간동안 추가로 처리한 세포주 등 총 4개의 세포주를 실험에 사용하였다.

3. 세포주에서의 RNA채취

dish에 배양된 4개의 SKOV3 세포주에서 DMEM[®] 배지를 제거한 후 TRIZOL[®] reagent(Gibco-BRL, U.S.A.)을 사용하여 각각의 총 RNA를 추출해 내었다. 추출한 RNA에 대하여 각각 흡광도를 측정하여 용량을 재었으며 이를 다시 1 μ g씩 전기영동(electrophoresis)하여 RNA의 정합성과 농도를 재확인하였다.

4. 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

추출한 총 RNA 4 μ g씩을 사용, RNAExpand[™] Reverse Transcriptase로 역전사 시켜 cDNA를 얻었으며 p73, p53, p21에 대해 Table 1의 소식자와 조건으로 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 각각의 유전자에 대한 중합효소연쇄반응의 결합온도(annealing temperature)와 시간은 Table 1과 같고 모든 과정에서 변성 온도(denaturing temperature)와 시간은 95 $^{\circ}$ C /1min 이었다. 중합 온도(extension temperature)는 모

두 72 $^{\circ}$ C를 사용하였는데, p73에서의 시간은 1분, p53의 경우는 1차 중합효소연쇄반응에서 2분(10cycles), 1분(20cycles), 2차 중합효소연쇄반응에서 1분(10cycles), 0.5분(20cycles)이었으며, p21의 경우는 2차례의 중합효소연쇄반응에서 모두 2분의 중합 시간을 갖게 하였다.

5. 서던 블롯팅(Southern blotting)

p73의 경우에는 RT-PCR로 얻어진 PCR 분질의 발현 정도를 비교하기에는 서로간의 차이가 미세해 보였기 때문에 실험1에서 얻어진 탐식자(probe)에 무작위 표지(random labelling) 방법으로 [α -³²PdC TP](Amersham, U.S.A.)를 표지하여 1차 중합효소연쇄반응 산물이 흡착된 질소막(Nitrogen membrane; Amersham, U.S.A.)에 보합결합(hybridization)하는 southern blotting을 시행하였다.

III. 결 과

SKOV3 난소암 세포주에 Avp53를 투여한 후 p53의 발현 여부를 역전사 중합효소연쇄반응으로 확인하였다(Fig 1). 그림에서 보면 A lane과 B lane은 각각 control 세포주와 cisplatin 10 μ g/ml을 24시간동안 투여한 후의 세포주로서 p53에 대한 두 차례의 중합효소연쇄반응 후에도 이에 대한 산물이 전혀 나타나지 않았음을 보이고 있다. 이는 본 연구에서 사용한 난소암 세포주인 SKOV3 세포주에는 p53이 결여

Table 1. Primers and conditions of PCR and expected sizes of products.

	Primary PCR		Secondary PCR		Expected size(bp)
	Primer	annealing temperature	Primer	annealing temperature	
p73	sense : p73S1 5'-CCTGTTTACAAGAAAGCGGA-3'	60 $^{\circ}$ C/1m (40cycles)	sense : p73S1 5'-CCTGTTTACAAGAAAGCGGA-3'	60 $^{\circ}$ C/1m (25cycles)	195
	antisense : p73AS1 5'-GTGATGATGATGAGGATGGG-3'		antisense : p73AS2 5'-GGCTGGGTCGGCGTGGTA-3'		
p53	sense : p53-ATG-F 5'-ATGGAGGAGCCGACAGTAG-3'	55 $^{\circ}$ C/1m (10cycles)	sense : p53-5F 5'-CTACAAGCAGTCACAGC-3'	55 $^{\circ}$ C/1m (10cycles)	579
	antisense : p53-TGA-R 5'-GTCTGATCAGGCCCTTCTG-3'	55 $^{\circ}$ C/0.5m (20cycles)	antisense : p53-10R 5'-GCCTGGGCATCCTTGAG-3'	55 $^{\circ}$ C/0.5m (20cycles)	
p21	sense : p21-F 5'-CCGGGAATTCGCATGTCAGAACCGCTGGG-3'	59 $^{\circ}$ C/2m (30cycles)	sense : p21-F 5'-CCGGGAATTCGCATGTCAGAACCGCTGGG-3'	60 $^{\circ}$ C/2m (25cycles)	563
	antisense : p21-R 5'-CCCCCGGATCCTTAGGGCTTCCTCTTGG-3'		antisense : p21-R 5'-CCCCCGGATCCTTAGGGCTTCCTCTTGG-3'		

되어 있음을 확인해주는 소견이라 할 수 있다. C lane과 D lane은 Avp53를 넣어준 세포주에서의 p53에 대한 역전사 증합효소연쇄반응 결과로 본 실험에서 사용한 소식자로 증폭시 얻어질 것으로 예상되는 579 bp의 영역에 p53의 증합효소연쇄반응 산물이 발현됨을 보이고 있다. 이는 본 실험에서의 방법으로 Avp53가 SKOV3 세포주에 제대로 들어가서 p53이 정상적으로 기능을 하게 한다는 것을 나타내는 것이다.

이어서 p73의 발현 여부를 알아보기 위해 역전사 증합효소연쇄반응과 southern blotting을 시행하였다 (Fig 2). SKOV3 세포주에 cisplatin을 투여한 후 p73의 발현을 두 차례의 역전사 증합효소연쇄반응으로 알아본 결과, 상층 사진의 B lane에서 control에 비해 p73의 발현 변화가 195 bp 영역에서 미세하게 증가되고 Avp53이 주입된 상태인 C lane과 D lane에서는 그 영역에 발현이 나타나기는 하나 B lane에 비해 다소 감소하는 것이 관찰되었다. 하지만 각각의 lane에서 그 차이가 미세하였으므로 이를 보다 더 확실히 비교하기 위하여 실험 1에서 제작한 p73의

탐식자를 1차 증합효소연쇄반응 산물에 보합결합(hybridization)시켜 southern blotting 하였다. Southern blotting에서는 중층 사진의 B lane에서 보이듯이(*로 표시함) 역전사 증합효소연쇄반응에서 미세한 차이를 보였던 세포주에서의 p73 발현 증가는 유의한 것이었음을 보이고 있다. 반면에 Avp53을 처리한 후의 southern blotting인 C lane에서는 p73의 발현이 다시 감소함이 관찰되었고 이의 발현 정도는 아무런 처리를 하지 않았던 control에 비해서도 미약했음이 나타났다. 또한 정상 p53을 갖게 한 후 cisplatin을 처리한 D lane이 경우에는 다른 모든 lane과 비교하였을 때 p73의 발현이 가장 적게 나타남을 보이고 있다.

Fig 2에서의 결과는 SKOV3 세포주에서 p73은 p53이 존재하지 않을 경우에 어느 정도의 기능을 하

Fig 1. RT-PCR products corresponding to p53 from cell lines showing null p53 in SKOV3(A, B). After the treatment with Avp53, p53 expressions were identified in the cell lines(C, D). (Top: RT-PCR of p53, Bottom: GAPDH, Marker; 1kb DNA ladder, A: control, B: cisplatin 10g/ml, C: Avp53 1:50, D: Avp53 1:50 + cisplatin 10 g/ml)

Fig. 2. RT-PCR products and results of southern blotting corresponding to p73. Increased transcription of p73 after the treatment with cisplatin was not significant from the results of RT-PCR. But after the southern blotting, the level significantly increased(indicated by asterisk). (Top: RT-PCR of p73, Center: southern blotting of p73, Bottom: GAPDH, Marker; 1kb DNA ladder, A: control, B: cisplatin 10g/ml, C: Avp53 1:50, D: Avp53 1:50 + cisplatin 10 g/ml)

고 있다가 DNA손상물질에 의해 반응하여 그 발현이 증가되지만 p53이 기능을 제대로 하게 된다면 발현이 감소되고 이러한 경우에는 DNA손상물질을 주입하더라도 발현이 되지 않음을 보이는 것이다.

p53의존 apoptosis 경로에 관여하는 유전자중 하나인 p21은 두 차례의 역전사 증합효소연쇄반응 결과, B, C, D 모든 lane에서 control에 비해 발현이 563 bp 영역에서 증가됨을 보였다(Fig 3). 이 경우에는 C lane에서와 같이 Avp53을 처리하였을 때 cisplatin만을 처리한 B lane보다 그 발현이 현저히 증가하지만 D lane에서와 같이 Avp53을 주입한 후 추가적으로 cisplatin을 처리하게 되면 p21의 발현이 다시 감소됨을 보이고 있다.

IV. 고 찰

p53은 사람에게 발생하는 암에서 가장 흔하게 변이가 발견되는 종양억제유전자라고 할 수 있다³⁾. 이는 특정한 DNA서열에 결합하여 그에 해당하는 유전자를 활성화시켜서 세포주기의 정지를 가져오게 하고 그로 인해 세포의 성장을 억제하는 역할을 한다.⁴⁾ 하지만 그 동안 p53과 같은 기능을 하는 유사 유전자는 발견되지 않아서 p53은 자기와 비슷한 family의 다른 유전자를 가지고 있지는 않다고 생각해 왔다.

그러나 1997년 Kaghad 등은¹⁾ 종양과는 상관없는 다른 실험을 하다가 자신들이 우연히 발견하게된 p73유전자가 p53과 매우 많은 유사성을 가지고 있다고 보고하였다. p73은 1번 염색체의 단완 36부위에 존재하고 이것이 p53과 구조적인 측면뿐만 아니라 기능적인 면에서도 매우 많은 유사성을 가지고 있기 때문에 p73이 p53을 대신할 수 있으리라는 예측 하에 그간 많은 연구자들에게 호기심의 대상이 되어 왔다. 1번 염색체의 단완 36부위는 신경아세포종(Neuroblastoma)을 포함하여 흑색종(melanoma), 유방암, 대장암 등 여러 가지 종양에서 소실이 발견되어서 이 부분에 중요한 종양억제유전자가 존재하리라는 예측을 해 온 터라 p73의 종양억제유전자로서의 가능성은 더욱 크다고 할 수 있다. 실제로 p73은 과발현이 되었을 경우, p53에 반응하는 유전자의 전사를 활성화시키고 p53과 같은 방법으로 apoptosis

Fig.3. RT-PCR products corresponding to p21.

Induction of p21 was identified in the cell line after the treatment with cisplatin(B). The amount was more significant in cell line with normal p53 (C). But the level decreased after the combined treatment with cisplatin(D). (Top: RT-PCR of p21, Bottom: GAPDH, Marker; 1kb DNA ladder, A; control, B; cisplatin 10g/ml, C; Avp53 1:50, D; Avp53 1:50 + cisplatin 10 g/ml)

에 의해 세포의 성장을 억제시키며 인위적으로 p73 단백질에 돌연변이를 시킨 실험에서 정상 p73에서 나타나던 세포성장의 억제 기능이 소실됨이 보고되었다.²⁾

p53의 경우는 여러 가지 다양한 종양에서 돌연변이가 발견되고 이러한 돌연변이가 일어나서 기능을 제대로 못하게 되는 것이 암화 과정에 중요한 역할을 하는 반면, p73의 발견 이후 지금까지 해 온 여러 연구에서 상동유전자소실(Loss of heterozygosity; LOH)이 많지 않고 LOH가 일어난 경우에도 돌연변이는 거의 발견되지 않고 있다^{6,13)}. 이는 p73의 경우는 돌연변이가 p73의 기능을 못하게 하는 기전이 아니라는 사실을 시사하며 p53과 비교하였을 때 조절 기전에 차이가 있음을 의미하는 것이다.⁹⁾

또한 p73의 경우, p53과는 달리 DNA손상을 가져오는 물질에 의해서는 발현되지 않기 때문에 p53과 그 구조와 기능적인 유사성은 생각할 수 있지만 p53과는 다른 경로로 조절되지 않을까 하는 예측을 하고 있다.^{1,5)}

돌연변이가 많이 일어나지 않는다는 것은 p73이 위치한 부분이 monoallelic expression된다는 사실로 p53과 기능은 다르지만 종양억제유전자로서의 가능성은 있다고 할 수 있지만 DNA손상에 의해 발현이 증가되지 않는다는 것에서는 아직 그 기전을 정확히 이해하고 있지 못하고 있다.

더 나아가 p53은 자궁경부암에서 인유두종바이러스(human papillomavirus)에 의해 불활성화되어 그 기능을 수행하지 못하는데 반하여 p73은 인유두종바이러스에 상관없이 작용하여 종양억제를 일으킨다는 점은¹⁴⁾ p73이 유전자치료에서 p53을 대신할 수 있다는 근거가 되고 이의 발현 기전을 규명하는 것이 매우 중요한 일이라는 것을 뒷받침하고 있다.

이에 본 연구에서는 p73의 기능을 재평가하고 이에 대한 조절 경로를 알아보기 위하여 p53의 변이가 가장 많이 발견되는 암 중의 하나인 난소암을 모델로 하였고 p73의 역할을 알아보았다. 본 연구에서 채택한 난소암 세포주는 SKOV3로서 이 세포주는 특징적으로 p53이 결여되어 있는 상피세포 난소암의 모델이다. p53이 결여된 SKOV3 세포주에 대표적인 DNA 손상 제제인 cisplatin을 처리하여 p73과 p21의 전사 정도를 평가하여 p73의 기능을 알아보았다. 또한 p53을 아데노바이러스를 벡터로 하여 본 세포주에 주입한 후, 다시 cisplatin을 처리하여 정상 p53을 가지고 있게 만든 상태에서의 p73 기능을 재평가하였다.

이와 같은 방법으로 실험을 한 이유는 현재까지 p73은 p53과 여러 가지 유사성을 가지고 있지만 p53과는 달리 DNA손상 물질에 반응하여 발현하지 않는다고 보고되어 있는데¹⁾ 이는 p53을 정상적으로 가지고 있는 상태의 세포주에서 시행한 것이었고 p73이 그 구조적인 특징상 오징어와 같은 하류 동물의 p53과 구조가 비슷함을 고려하였을 때 p53이 정상적으로 기능을 하고 있다면 p73이 기능을 할 필요성이 없을 것이라는 가정을 하였기 때문이다. 또한 SKOV3세포주를 선택하고 이 세포주에 p53 처리를 한 이유는 p53을 정상적으로 가지고 있는 세포주와 비정상적으로 가지고 있는 서로 다른 세포주 각각을 비교하면 세포주 나름의 특징으로 인해 결과 해석에 혼란이 있을 가능성이 있고 이를 배제하는 방법이 p53이 없는 상태와 인위적으로 p53을 가지게 한 상태를 비교해 보는 것이라 생각했기 때문이었

다.

본 연구에서 p73은 cisplatin에 의해 세포주가 성장을 정지하고 사멸을 시작하는 시기인 24시간이 경과하면 그 발현이 증가하였고 p53을 주입한 후에는 세포주가 사멸을 하더라도 발현 변화가 없었음을 보여주고 있다. 이는 p73이 DNA손상 물질에 의해 발현되지 않을 것이라는 그간의 연구에 대해 반대되는 결론이고 본 저자들은 이것이 SKOV3라는 난소암 세포주에서의 특징이라 할 수도 있지만 그 보다는 p53을 가지고 있지 않은 암세포에서 일어나는 일반적인 현상이라고 생각하고 있다. 즉, 위에서 설명한 바와 같이 거의 모든 세포에 미량으로 존재하는 p73은 p53의 정상 기능 여하에 따라 발현에 있어 차이가 나서 p53이 정상으로 있을 때는 특별한 역할을 맡고 지내다가 p53에 이상이 생겼을 때 비로소 기능을 시작한다고 추론하게 되었다. 그러므로 p73은 p53이 어떠한 이유에서 기능을 하지 못하거나 p53을 통한 유전자치료가 실패하였을 경우, 이차적으로 유전자치료를 가능하게 할 수 있는 유전자라고 생각하고 있다.

실험결과에서 보면 p21의 경우, cisplatin을 처리하게 되면 그 발현이 증가됨을 보이는데 이는 기존에 알고 있듯이 p53에 결합하여 세포주기의 정지를 나타내게 되는 이 유전자의 특징이라고 할 수 있고¹⁵⁾ p53을 주입하기 전에 cisplatin만을 처리하였는데도 p21이 발현되면서 p73의 발현이 함께 증가하는 것은 p53 대신 p73이 기능을 대신 하지 않느냐 하는 조심성 있는 예측을 가져오게 한다. 이것은 그간의 여러 연구에서 p21이 p53 없이 발현될 수 있다¹⁶⁻¹⁸⁾는 기전을 설명할 수 있는 방법이 된다. 그리고 p21이 정상 p53을 주입하였을 때는 그 발현이 더욱 증가하는 것은 p73에 비해 p53이 세포 주기 정지에는 더 확실한 역할을 할 것이라는 생각을 하게 하고 p21이 p53 주입 후 cisplatin을 처리하였을 때는 발현이 다시 감소하는 것은 세포주기의 정지를 벗어나 세포가 사멸이 되기 시작하는 것을 반영하는 것이라 하겠다.

하지만 세포주 나름의 특징을 배제하기 위한 본 연구에서의 계획이 오히려 SKOV3 세포주에서만 나타날 수 있는 현상을 확대 해석할 우려도 있기 때문에 위에서 우리가 내린 결론을 바로 적용하기에는 아직 실험이 부족하다고 생각된다. 그러므로 p53

이 각각 다르게 존재하는 다양한 세포주에서 실험이 진행되었을 때 p73의 진정한 종양억제유전자로서의 결론에 이를 수 있을 것이다.

현재 p73 이외에도 더 많은 p53 유사 유전자가 계속 발견되고 있고^{19,23)} p73 자체도 Kaghad 등이 처음 발표한 $\alpha, \beta 1$ 외에도 최근 γ, δ 의 새로운 변이형 (splice variant)이 발견되었기 때문에²⁴⁾ 이들 각각의 의미와 기능에 대한 연구는 계속되어야 할 것이다.

V. 결 론

p73유전자는 아직도 그 기능에 대하여 종양억제 유전자로서의 결론을 내리지 못하는 상황이다. 이러한 이유는 p73에 대해 여러 암에서 시행한 상동유전자 소실분석(Loss of heterozygosity)에서 대립상동유전자의 소실이 발견되기는 하나 남아있는 대립상동유전자가 대부분 정상 p73을 가지고 있기 때문이라고 할 수 있다. 하지만 이는 paternal imprinting되어 monoallelic expression되는 p73유전자의 특징으로 남은 하나의 대립상동유전자가 기능을 하지 못하기 때문으로 설명할 수 있고 그간 국내외적으로 시행된 in vitro 실험에서 p73이 발현되었을 때 종양의 성장을 억제함을 보였기 때문에 p53과 같은 돌연변이의 면으로 이 유전자의 기능 유무를 해석 할 수는 없는 것으로 생각된다.

그러므로 이 유전자의 발현 기전에 대한 분석이 역할 규명에 중요한 이 시점에서 본 연구에서와 같이 p73도 p53과 같이 DNA손상 물질에 의해 발현되고 p53의 존재 유무에 따라 발현되는 양상이 다르다는 것은 아직 국내외적으로 보고된 바가 없기 때문에 그 시사하는 바가 크다고 하겠고 이를 뒷받침할 수 있는 더 많은 실험이 진행되어야 한다고 생각된다.

-참고문헌-

1. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minthy A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D: Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997;90:809-19.

2. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr: p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 1997;389:191-4.
3. Levine AJ, Momad J, Finlay CA: The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-6.
4. Haffner R, Oren M: p53: biochemical properties and biological effects of p53. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1995; 5:84-90.
5. Wiman KG: p53: Emergency brake and target for cancer therapy. *Exp Cell Res* 1997;237:14-8.
6. Nomoto S, Haruki N, Kondo M, Konishi H, Takahashi T, Takahashi T, Takahashi T: Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers. *Cancer Res* 1998;58:1380-3.
7. Takahashi H, Ichimiya S, Nimura Y, Watanabe M, Furusato M, Wakui S, Yatani R, Aizawa S, Nakagawara A: Mutation, allelotyping, and transcription analyses of the p73 gene in prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:2076-7.
8. Mai M, Yokomizo A, Qian C, Yang P, Tindall DJ, Smith DI, Liu W: Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res* 1998;58:2347-9.
9. Sunahara M, Ichimiya S, Nimura Y, Takada N, Sakiyama S, Sato Y, Todo S, Adachi W, Amano J, Nakagawara A: Mutational analysis of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in colorectal carcinomas. *Int J Oncol* 1998;13:319-23.
10. Nimura Y, Mihara M, Ichimiya S, Sakiyama S, Seki N, Ohira M, Nomura N, Fujimori M, Adachi W, Amano J, He M, Ping YM, Nakagawara A: p73, a gene related to p53, is not mutated in esophageal carcinomas. *Int J Cancer* 1998;78:437-40.
11. Kovalev S, Marchenko N, Swendeman S, LaQuaglia M, Moll UM: Expression level, allelic origin, and mutation analysis of the p73 gene in neuroblastoma tumors and cell lines. *Cell Growth Differ* 1998;9:897-903.
12. Tsao H, Zhang X, Majewski P, Haluska FG: Mutational and expression analysis of the p73 gene in melanoma cell lines. *Cancer Res* 1999;59:172-4.
13. Ichimiya S, Nimura Y, Kageyama H, Takada N, Sunahara M, Shishikura T, Nakamura Y, Sakiyama S, Seki N, Ohira M, Kaneko Y, McKeon F, Caput D, Nakagawara A: p73 at chromosome 1p36.3 is lost in advanced stage neuroblastoma but its mutation is infrequent. *Oncogene* 1999;18:1061-6.
14. Prabhu NS, Somasundaram K, Satyamoorthy K, Herlyn M, El-Deiry WS: p73beta, unlike p53, suppresses

- growth and induces apoptosis of human papillomavirus E6-expressing cancer cells. *Int J Oncol* 1998;13:5-9.
15. 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* 1993;75:817-25.
 16. Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D: Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 1994;54:3391-5.
 17. Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradley A, Olson EN, Harper JW, Elledge SJ: p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 1995;267:1024-7.
 18. Zhang W, Grasso L, McClain CD, Gambel AM, Cha Y, Travallo S, Deisseroth AB, Mercer WE: p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation. *Cancer Res* 1995; 55:668-74.
 19. Kaelin WG Jr: Another p53 Doppelganger? *Science* 1998;281:57-8.
 20. Senoo M, Seki N, Ohira M, Sugano S, Watanabe M, Inuzuka S, Okamoto T, Tachibana M, Tanaka T, Shin-kai Y, Kato H: A second p53-related protein, p73L, with high homology to p73. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248:603-7.
 21. Trink B, Okami K, Wu L, Sriuranpong V, Jen J, Sidransky D: A new human p53 homologue. *Nat Med* 1998;4:747-8.
 22. Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I, Ikawa Y, Nimura Y, Nakagawara A, Obinata M, Ikawa S: Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med* 1998 Jul;4:839-43.
 23. Kaelin WG Jr: The emerging p53 gene family. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:594-8.
 24. De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M, Levrero M, Melino G: Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J Exp Med* 1998;188:1763-8.