

## Mutational Analysis of Pro-apoptotic *BAD* Gene in Non-small Cell Lung Cancer

**Purpose:** Evidence exists that deregulation of apoptosis is involved in the mechanisms of cancer development, and the somatic mutations of apoptosis-related genes have been reported in human cancers. Bcl-2/Bcl-2-associated death promoter (BAD), a pro-apoptotic member of Bcl-2 family, plays an important role in the intrinsic apoptosis pathway. **Materials and Methods:** To explore the possibility that the genetic alterations of *BAD* might be involved in the development of human cancers, we analyzed the entire coding region and all splice sites of human *BAD* gene in 100 human non-small cell lung cancers (NSCLC) by polymerase chain reaction (PCR)-based single-strand conformation polymorphism (SSCP). **Results:** The PCR-SSCP analysis detected no mutation in the entire coding regions and all splice sites of human *BAD* gene in the 100 NSCLCs. **Conclusion:** The data presented here suggested that *BAD* gene mutation may not contribute to the pathogenesis of human NSCLCs. (J Lung Cancer 2006;5(1):35-38)

**Key Words:** Non-small cell lung cancer, *BAD*, Apoptosis, Mutation

Jong Woo Lee, M.S.  
Young Hwa Sung, M.S.  
Suk Woo Nam, Ph.D.  
Jung Young Lee, M.D.  
Nam Jin Yoo, M.D. and  
Sug Hyung Lee, M.D.

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

Received: February 4, 2006  
Accepted: March 3, 2006

**Address for correspondence**  
Sug Hyung Lee, M.D.  
Department of Pathology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 505 Bando-dong, Socho-gu, Seoul 137-701, Korea  
Tel: 82-2-590-1188  
Fax: 82-2-537-6586  
E-mail: suhulee@catholic.ac.kr

This work was supported by the funds from KOSEF (R01-2004-000-10463-0).

### 서 론

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

세포사멸을 유발하는 여러 경로는 많지만, intrinsic pathway와 extrinsic pathway로 나누는 것이 가장 흔한 분류법이다(1). Extrinsic pathway는 Fas, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 같은 tumor necrosis factor family에 의해서 유발되고, intrinsic pathway는 성장 인자의 소실, 저산소증, 방사선 조사, 항암제 등에 의해서 유발된다(1~3). Intrinsic pathway는 bcl-2 family에 의해서 주로 조절되는데, bcl-2 family는 크게 세포사멸사 유발성과

세포사멸사 길항성으로 나뉜다(1). 이들 bcl-2 family 구성원은 서로 결합하여 homodimer 및 heterodimer로서 복잡한 조절 체계를 구성하며, bcl-2 family 단백질의 상대적 비율은 세포사멸사의 반응정도를 결정하는 중요한 인자이다(1).

포유동물의 bcl-2 family 단백질은 약 20 종류가 밝혀져 있고, 이들 모두에는 한 종류 이상의 bcl-2 homology (BH) domain이 있다(1). BH domain 중 BH3 domain은 세포사멸을 유발하는 데 필요 충분한 domain이다. proapoptotic bcl-2 family 단백질에는 BAD, PUMA, Hrk, bcl-G, Noxa, BIM, bcl-rambo, BAX, BIK, BAX, BID, BMF 등이 있으며, 이들 모두에는 BH3 domain이 있고 대부분의 경우 세포사멸 유발을 BH3 domain의 존재에 의존한다(4~9). 세포사멸사 기전에 관여하는 물질의 이상이 발암 과정에 중요한 역할을 한다는 증거들이 많이 제시되고 있으며, bcl-2 family member 단백질의 이상 역시 이 과정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(10~12). 세포사멸사 유발성 bcl-2 family 유전자인 BAX, BAK, BID, BAD 유전자의 돌연변이는 각 유전자 산물

의 세포사멸 능력을 소실하게 하여 종양세포의 생존을 증대시킴으로써 암 발생과 연관이 있는 것으로 알려져 있다(12~14).

*BID*와 *BAK*는 위암에서 돌연변이가 발굴되었으며(13, 14), *BAX*, *BAK*와 *BAD* 유전자의 돌연변이는 대장암에서 발견되었다(14~16). 세포자멸사 유발성 *bcl-2* 유전자의 돌연변이가 여러 종양에서 발견된 사실은 세포자멸사 유발성 *bcl-2* family 유전자들의 돌연변이가 비소세포성폐암에서도 일어날 가능성을 제시한다. 이에 저자들은 세포자멸사 유발성 *bcl-2* family 유전자 중 이제까지 비소세포성폐암에서 돌연변이에 대한 연구가 없었던 *BAD* 유전자를 대상으로 돌연변이를 조사하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 연구 대상

1999년 이후 근치적 폐 절제술을 받고 진단된 100명의 비소세포성폐암 환자의 폐조직을 대상으로 하였다. 폐암 환자의 파라핀 포매 조직을 5 $\mu$ m 두께로 박절하여 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시한 후 2명의 진단병리 의사가 독립적으로 WHO 분류에 따라 분류하였으며, 이들은 편평상피암 52예, 선암 43예, 대세포암 5예였다. 남녀의 비율은 7 : 2 : 28이었고, 36~79세의 연령분포를 보였으며 평균연령은 59세였다.

### 2) 돌연변이 조사

Hematoxylin & Eosin 염색된 조직에서 미세절제술(microdissection)을 이용하여 암세포 및 정상세포를 각각 분리

수집한 후, proteinase K를 처리하여 DNA를 얻었다. *BAD* 유전자를 이루고 있는 3개 exon을 증폭할 수 있는 6개의 시발체(primer)를 제작하였다(Table 1). 방사성 동위원소인 ( $^{32}$ P) dCTP를 중합효소연쇄반응에 포함시켜서 자기방사법(auto-radiogram)으로 중합효소연쇄반응 산물을 분석할 수 있게 하였다. 중합효소연쇄반응은 혼합액을 94°C에서 10분간 변성시킨 후 94°C에서 30초, 53~62°C에서 40초와 72°C에서 40초씩 각각 35회 반복하였으며 72°C에서 5분간 연장반응을 실시하였다. 중합효소연쇄반응 산물을 single-strand conformation polymorphism (SSCP) 분석을 위해 non-denaturing gel에 running 후 gel을 건조하고 관찰하여, 정상 DNA에서 관찰되는 wild-type band 외의 band가 나타난 경우, 2회 이상 반복하여 확인하고, aberrant band를 잘라서 cyclic sequencing으로 DNA 염기서열을 분석하였다. SSCP, DNA 염기서열분석에 관한 내용은 이전의 논문에서 자세히 기술되어 있다(14,16).

## 결 과

미세절제를 통해서 암 및 정상세포를 비소세포성폐암 조직에서 선택적으로 분리할 수 있었고, 추출된 DNA를 이용하여 *BAD* 유전자의 모든 exon을 증폭하여 SSCP로 분석하였다. 모든 중합효소연쇄반응 산물은 SSCP에서 잘 관찰되어서, 미세절제를 통한 DNA의 획득 및 중합효소연쇄반응에 이상이 없음을 알 수 있었다(Fig. 1). SSCP를 분석한 결과 중합효소연쇄반응의 결과물은 정상조직의 DNA와 같이 wild-type의 band로만 나타났으며, 돌연변이에서 보이는 abnormal band는 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 또한 이들은 염기서열 분석 결과 돌연변이가 없는 정상 염기서열을 가지고

Table 1. Sequence of SSCP Primer Sets for *BAD*

Primers	Exon	Sequence	Annealing Tm (°C)	Size (bp)
1A	1	F 5'-GCCCCAGCTGTGCCTTGACTACG-3' R 5'-GGCCTGGCGATGTGCTTGC-3'	58	172
1B	1	F 5'-CAGCTCTGCAGAGAGGGGCCTGG-3' R 5'-CAGTGGGCTGGGGGTGAGGTGTC-3'	66	195
2A	2	F 5'-GAGGAGCTGAGATTAACGTCGCC-3' R 5'-CTGTGCTGCCAGAGGTTGG-3'	56	187
2B	2	F 5'-GGAGGACGACGAAGGGATGG-3' R 5'-CGGCCTGGTACTTCAGGTCC-3'	56	187
3A	3	F 5'-AGCTGCCATGGTAATCTAACTCA-3' R 5'-GATGTGGAGCGAAGGTCACT-3'	58	191
3B	3	F 5'-CTCCAGCTGGACGCGAGTCT-3' R 5'-CTCTTTTGCATAGGCC-3'	62	175

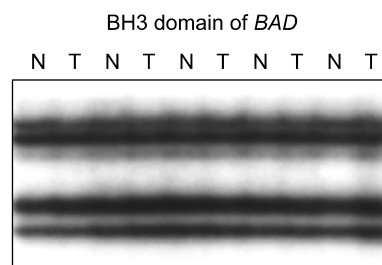


Fig. 1. Representative SSCP of *BAD* gene in the non-small cell lung cancers. The exon 2 of the *BAD* gene were amplified by PCR using a specific primer set. The PCR products from the representative cases of non-small cell lung cancers were visualized on SSCP. SSCP of DNA from the non-small cell lung cancers (T) shows no aberrant bands as compared to SSCPs from the normal tissues (N).

있었다(data not shown). 이 실험은 미세절제, 중합효소연쇄 반응, SSCP 및 염기서열분석을 2회 반복하였으며, 결과는 2회 모두 일치하였다.

## 고안 및 결론

본 연구의 목적은 세포사멸 유발에 중요한 역할을 하는 BAD 유전자의 coding region이 비소세포성폐암에서 돌연변이를 가지고 있는지, 또 돌연변이가 있다면 그것이 이들 단백질의 불활성화를 유도하여 폐암의 발생 및 진행에 영향을 줄 수 있는지를 알아보고자 한 것이었다. 저자들은 이 유전자들이 100예의 비소세포성폐암 조직에서 BAD 유전자가 돌연변이가 되지 않았다는 것을 확인하였고, 이를 통해서 비소세포성폐암의 발생기전에 이 유전자의 돌연변이가 작용하지 않으리라는 것을 예측할 수 있었다.

이제까지 밝혀진 바에 의하면, apoptosis에 연관된 유전자의 돌연변이는 해당 유전자의 가장 중요한 apoptosis 유발 부위에 집중적으로 나타났다. Death receptor인 Fas의 돌연변이는 death domain에 집중된 것이 폐암 등에서, 다른 death receptor인 TRAIL-receptor2의 돌연변이 역시 death domain에 집중된 것이 폐암 등에서 보고된 것이 그 예이다(17,18). 카스파제의 경우는 protease subunit에 돌연변이가 가장 흔하게 나타난다(19~22). 그러나, bcl-2 family 유전자의 돌연변이는, BAD처럼 세포사멸에 가장 중요한 부위인 BH3 domain에 나타나기도 하지만, BAK, BAX, BID의 경우처럼 BH3 domain 이외의 부위에서 발견되는 경우가 많았다(13~16). 이는 bcl-2 family 유전자의 돌연변이는 한 부위에 국한되어서 나타나지 않을 가능성이 있는 것을 제시한다고 하겠다. 이에 따라서 본 연구는 부위를 국한시키지 않고 BAD 유전자의 모든 exon을 검색하였지만 돌연변이를 발견하지 못했고, 이는 부위와 관계 없이 비소세포성폐암에서 BAD 유전자가 돌연변이 되지 않음을 보여주는 결과이다. SSCP 방법은 90% 이상에서 돌연변이 detection rate를 보이므로, 일부의 돌연변이가 실험조건에 따라서 발견되지 않았을 가능성이 있다. 따라서, 연구자는 이전에 다른 종양에서 BAD 유전자가 발굴되었던(16) 종양의 DNA를 양성대조군으로 이용하여 비교하였다. 하지만, 양성대조군은 달리 비소세포성폐암에서는 돌연변이를 발견할 수 없었다(data not shown). 이 결과는 비소세포성폐암에서는 대장암과는 달리 BAD 유전자의 돌연변이가 흔히 나타나지 않는 것을 확인해 주었다.

비소세포성폐암은 여러 가지 세포사멸 자극에 대해 저항적이라는 것이 잘 알려져 있다(17). 이제까지 비소세포성폐

암에서 밝혀진 대표적인 세포사멸 기전의 이상은 Fas, TRAIL receptor, 카스파제-3의 돌연변이 등이며(17,18,23), 본 연구를 통하여 BAD 유전자의 돌연변이는 비소세포성폐암의 세포사멸 저항기전에 중요하지 않을 가능성이 높음을 밝혔다. 본 연구는 비록 BAD 유전자의 돌연변이를 발견하지는 못 하였지만, 연구의 결과가 향후 세포사멸 기전을 이용한 비소세포성폐암의 임상개발 연구에 중요한 정보를 제공하리라고 생각한다.

## 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, et al. 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, et al. 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, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000;288:1053-1058.
9. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001;7:683-694.
10. Chang J, Clark GM, Allred DC, Mohsin S, Chamness G, Elledge RM. Survival of patients with metastatic breast carcinoma: importance of prognostic markers of the primary tumor. *Cancer* 2003;97:545-553.
11. Krajewska M, Zapata JM, Meinhold-Heerlein I, et al. Expression of Bcl-2 family member Bid in normal and malignant tissues. *Neoplasia* 2002;4:129-140.
12. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, et al. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989;57:79-88.
13. Lee JH, Soung YH, Lee JW, et al. Inactivating mutation of the pro-apoptotic gene BID in gastric cancer. *J Pathol* 2004;202:439-445.
14. Kondo S, Shinomura Y, Miyazaki Y, et al. Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res* 2000;60:4328-4330.
15. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the micro-

- satellite mutator phenotype. *Science* 1997;275:967-969.
  16. Lee JW, Soung YH, Kim SY, et al. Inactivating mutations of proapoptotic Bad gene in human colon cancers. *Carcinogenesis* 2004;25:1371-1376.
  17. Lee SH, Shin MS, Park WS, et al. Alterations of *Fas* (*Apo-1/CD95*) gene in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1999; 18:3754-3760.
  18. Lee SH, Shin MS, Kim HS, et al. Alterations of the DR5/ TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 1999;59:5683-5686.
  19. Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. Caspase-8 gene is frequently inactivated by the frameshift somatic mutation 1225 1226delTG in hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2005;24: 141-147.
  20. Kim HS, Lee JW, Soung YH, et al. Inactivating mutations of caspase-8 gene in colorectal carcinomas. *Gastroenterology* 2003;125:708-715.
  21. Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. *CASPASE-8* gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. *Cancer Res* 2005;65:815-821.
  22. Soung YH, Lee JW, Kim HS, et al. Inactivating mutations of *CASPASE-7* gene in human cancers. *Oncogene* 2003;22:8048-8052.
  23. Soung YH, Lee JW, Kim HS, et al. Somatic mutations of *CASP3* gene in human cancers. *Hum Genet* 2004;115:112-115.
-