

## Pro-apoptotic Cytochrome c Gene Mutation is Rare in Non-small Cell Lung Cancers

**Purpose:** Several lines of evidence have indicated that the deregulation of apoptosis is involved in the mechanisms of cancer development, and somatic mutations of the apoptosis-related genes have been reported in human cancers. In addition to its role in oxidative phosphorylation, release of cytochrome c from the mitochondrial intermembrane space results in nuclear apoptosis. The aim of this study was to explore whether alteration of cytochrome c gene mutation is a characteristic of human non-small cell lung cancers (NSCLC). **Materials and Methods:** In the current study, to detect the somatic mutations in the DNA sequences encoding cytochrome c in 48 NSCLCs, we used polymerase chain reaction (PCR), single-strand conformation polymorphism (SSCP), and DNA sequencing. **Results:** The SSCP analysis revealed no mutation in the entire coding regions and all splice sites of human cytochrome c gene in the 48 NSCLCs. **Conclusion:** The data presented here indicate that the pro-apoptotic cytochrome c may not be somatically mutated in human NSCLCs, and suggest that NSCLCs may not utilize mutational events of cytochrome c gene in the mechanisms for evading apoptosis. (*J Lung Cancer* 2006;5(2):111-113)

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

Young Hwa Soun, Ph.D. and  
Sug Hyung Lee, M.D.

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

Received: December 3, 2006

Accepted: December 11, 2006

### Address for correspondence

Sug Hyung Lee, M.D.  
Department of Pathology, College of  
Medicine, The Catholic University of  
Korea, 505, Banpo-dong, Seocho-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 세포사멸(cell death)의 주된 발생기전으로 조직의 항상성, 세포분화 및 발생에 중요한 역할을 하며, 세포자멸사 조절 이상은 퇴행성 질환, 종양, 에이즈 등 여러 질병을 유발한다(1~3). 정상세포에 비하여 암세포는 일반적으로 생리적 자극에 대해 사멸이 잘 유발되지 않는 특성이 있으며, 이런 특성은 종양의 발생, 종양의 성장 및 전이에도 중요한 역할을 한다(3).

세포사멸을 유발하는 경로는 많지만, 내인성 경로와 외인성 경로로 나누는 것이 가장 흔한 분류법이다(1). 외인성 경로는 Fas, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 같은 death receptor family에 의해서 유발되고, 내인성 경로는 성장인자의 소실, 저산소증, 방사선 조사, 항암제 등에 의해서 유발된다(1~3). 내인성 경로는 미토콘드리아를 중심으로 일어나며 bcl-2 family에 의해서 주로 조절된다(1).

Cytochrome c는 미토콘드리아에 존재하며 전자전달계에 산화성 인산화의 기능을 담당한다. 이와 같은 기능과는 별도로 cytochrome c는 미토콘드리아의 intermembrane space

에 존재하다가 내인성 세포사멸 자극이 오면 미토콘드리아 밖으로 배출된다(4). 세포질 내로 배출된 cytochrome c는 APAF1과 dATP와 결합하여 caspase-9를 활성화시킨다. 활성화된 caspase-9는 순차적으로 caspase-3, 6, 7 등의 effector caspase를 활성화하게 되며 세포는 죽게 된다(4).

세포사멸 기전에 관여하는 유전자의 이상이 발암과정에 중요한 역할을 한다는 증거들이 제시되고 있다. 예를 들면 caspase-3, Fas 등의 돌연변이가 비소세포폐암을 비롯한 여러 암에서 보고된 바 있다(5~11). Cytochrome c가 세포사멸에서 중요한 기능을 담당하지만, 현재까지 이 유전자의 돌연변이에 관한 연구는 보고된 바 없다. 이에 저자들은 본 연구에서 cytochrome c 유전자의 돌연변이가 비소세포성폐암의 세포사멸 이상에 관여하는지를 알아보기 위해, 비소세포성폐암 조직을 대상으로 돌연변이 발굴연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 연구 대상

1999년 이후 근치적 폐 절제술을 받은 48명의 비소세포

성폐암 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 25예, 선암 23예였다. 36~79세의 연령분포를 보였으며 평균연령은 57세였다.

## 2) 돌연변이 조사

Hematoxylin & eosin 염색된 조직에서 미세절제술(microdissection)을 이용하여 암세포 및 정상세포를 각각 분리 수집한 후, proteinase K를 처리하여 DNA를 얻었다. Cytochrome c 유전자를 이루고 있는 2개 exon 모두와 splice site를 증폭할 수 있는 4개의 시발체(primer)를 제작하였다(Table 1). 방사성 동위원소인 [ $^{32}$ P]dCTP를 중합효소연쇄반응에 포함시켜서 자기방사법(autoradiogram)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 이외의 band가 나타난 경우, 2회 이상 반복하여 확인하고, aberrant band를 잘라서 cyclic sequencing으로 DNA 염기서열을 분석하였다. SSCP, DNA 염기서열분석에 관한 내용은 이전의 논문에 자세히 기술되어 있다(5~11).

## 결 과

미세절제를 통해 암 및 정상세포를 비소세포성폐암 조직

에서 선택적으로 분리할 수 있었고, 추출된 DNA를 이용하여 cytochrome c 유전자를 coding하는 모든 exon을 증폭하여 SSCP로 분석하였다. 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 있었다(data not shown). 따라서, SSCP 결과는 cytochrome c 유전자의 돌연변이가 분석한 48예의 폐암에서 나타나지 않음을 의미했다. 이 실험은 미세절제, 중합효소연쇄반응, SSCP 및 염기서열분석을 2회 반복하였으며, 결과는 2회 모두 일치하였다.

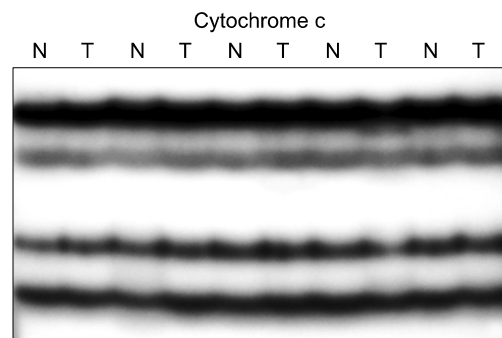


Fig. 1. Representative SSCP of cytochrome c gene in the non-small cell lung cancers. The exon 2 of the cytochrome c gene was amplified by PCR using a specific primer set. The PCR products from the representative cases of non-small cell lung cancers were visualized on SSCP. SSCP of DNA from the non-small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

Table 1. Sequences of PCR Primer Sets for Cytochrome c Gene Amplification

Primers	Exon	Sequence	Annealing Tm (°C)	Size (bp)
1A	1	F 5'-GTTGAAGCTTTCGTTTTAG-3' R 5'-GGCTGTGTAAGAGTATCCAG-3'	58	172
1B	1	F 5'-GCCACACCGTTGAAAAG-3' R 5'-CTCCTGATAGTTTGCCACAT-3'	66	195
2A	2	F 5'-GCAAACATCAGGAGTGTG-3' R 5'-ATTAAGTCTGCCCTTCTTC-3'	56	187
2B	2	F 5'-GTTTAGGCATCATCTGG-3' R 5'-TGTAATAATAAGGCAGTGG-3'	56	187

## 고안 및 결론

본 연구의 목적은 두 가지였다. 첫째는 세포사멸 조절에 중요한 역할을 하는 cytochrome c가 비소세포폐암 조직에서 돌연변이가 되는지 여부를 판명하는 것이었고, 둘째는 돌연변이가 있다면 그 기능적 변화를 암 발생과 연관시키는 것이었다. 하지만 cytochrome c 유전자가 48개의 비소세포폐암 조직에서 돌연변이가 되지 않았다는 것을 확인하였고, 이를 통해서 비소세포폐암의 병발생 기전에서 이 유전자의 돌연변이가 작용하지 않으리라는 것을 예측할 수 있었다.

비소세포폐암에서 세포사멸 관련 유전자의 돌연변이 연구는 이미 많은 유전자를 대상으로 이루어졌다. Death receptor인 Fas의 돌연변이는 7.7%의 비소세포폐암에서 나타났으며, 이중 대부분은 세포사멸에 중요한 death domain에서 발견되었다(6). 또한, 다른 death receptor인 TRAIL receptor1 및 2의 돌연변이는 6.8%의 비소세포폐암에서 나타났다(7). Death receptor를 기시부로 하는 외인성 세포사멸 경로상의 유전자들을 검색한 결과 Fas, FADD, caspase-10의 돌연변이가 13.8%라는 높은 빈도로 나타났고, 림프절로 전이한 폐암의 경우는 그 돌연변이 정도가 전이하지 않은 폐암에 비해 의미 있게 높은 것이 관찰되었다(8). 내인성 세포사멸경로를 이루는 Bcl-2계열의 돌연변이는 BAD 등을 검색하였으나 발견할 수 없었다(9). Caspase는 caspase-3, 7, 8, 9, 10에 대해서 돌연변이 연구가 이루어졌으며, caspase-10과 caspase-3만이 돌연변이가 발견되었다(5,8,10,11). 하지만, 이 경우도 caspase-3는 2.2%, caspase-10은 5%로 나타나서 caspase-10을 제외한 대부분의 caspase-유전자는 돌연변이로 인해 세포사멸 기능을 폐암에서 소실하지는 않는다는 것을 알 수 있었다(5,8). 정리하면 비소세포폐암에서 세포사멸 관련 유전자의 돌연변이는 주로 death receptor 경로상의 유전자에 집중적으로 나타나는 것을 알 수 있으며, 본 연구의 결과로 cytochrome c의 돌연변이가 비소세포폐암에서 발견되지 않았던 것도 이에 상응하는 결과라고 생각한다.

암세포의 사멸을 방해하는 기전은 여러 가지가 있으며, 돌연변이는 이중 한가지 기전이다(1~3). 돌연변이 이외에 DNA 메틸화, 단백질의 세포 내 위치 변경, 단백질 발현 감소, 길항물질의 생성 증가, 인산화 등이 세포사멸을 유도하는 단백질의 기능을 불활성화시키는 방법이다(1~3). Bim 단백질은 세포 골격기관인 미세관과 결합하면 불활성화되고, BAD 단백질은 인산화되면 기능을 소실한다(1). 또한, bcl-2 단백질의 발현 증가는 암세포의 고사를 항암제 등의

고사유발기전으로부터 보호한다(1). 본 연구 결과는 cytochrome c 유전자가 비소세포폐암에서 돌연변이 되지 않는다는 사실을 제시하며, 비소세포폐암에서 암세포의 세포사멸 억제기전의 이해를 위해서는 cytochrome c 유전자의 불활성화가 돌연변이 이외에 다른 어떤 방법으로 일어나는지를 규명할 필요가 있다고 생각한다.

많은 연구가 비소세포폐암을 대상으로 시행되었지만 많은 비소세포폐암 환자들이 매년 사망하고 있다. 따라서 비소세포폐암의 조기 발견 및 진행을 예측하는 방법의 개발이 절실하다. 최근, 치료적 관점에서 세포사멸 유발성 단백질을 소형분자약제와 결합시켜서 종양의 세포사멸사를 유도하는 방법도 연구되고 있다(12). 이와 같은 임상연구를 위해서는 진단 및 치료타겟 발굴연구가 환자의 암조직을 이용해서 이루어져야 한다고 생각되며, 앞으로도 이를 위해 많은 세포사멸 관련 유전자 및 산물의 이상에 관한 연구가 이루어져야 한다고 생각된다.

## 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. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-157.
5. Soung YH, Lee JW, Kim HS, et al. Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Hum Genet* 2004;115:112-115.
6. 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.
7. 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.
8. Shin MS, Kim HS, Lee SH, et al. Alterations of Fas-pathway genes associated with nodal metastasis in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2002;21:4129-4136.
9. Lee JW, Soung YH, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Mutational analysis of pro-apoptotic BAD gene in non-small cell lung cancer. *J Lung Cancer* 2006;5:35-38.
10. Soung YH, Lee UW, Moon SW, et al. Mutational analysis of caspase-7 and 8 genes in non-small cell lung cancer. *J Lung Cancer* 2005;4:38-41.
11. Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. Mutational analysis of pro-apoptotic caspase-9 gene in common human carcinomas. *APMIS* 2006;114:292-297.
12. Reed JC. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell* 2003;3:17-22.