

## Mutational Analysis of JAK1 Exons 10 and 13 in Non-small Cell Lung Cancers

**Purpose:** JAK kinases play important roles not only in normal cellular processes, but they are also important in tumor development. A recent study identified two somatic mutations of JAK1 in leukemia cells that were detected in exon 10 (p.T478S) and exon 13 (p.V623A). The aim of this study was to see whether the JAK1 mutations in these exons occur in non-small cell lung cancers (NSCLC). **Materials and Methods:** We analyzed the exons 10 and 13 of JAK1 for detecting somatic mutations in NSCLC by performing polymerase chain reaction (PCR) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) assay. **Results:** The SSCP analysis revealed no evidence of somatic mutation in the DNA sequences of JAK1 exon 10 and exon 13 in the 47 NSCLCs. **Conclusion:** The data presented here indicate that the JAK1 exons 10 and 13 may not be somatically mutated in human NSCLCs, and this suggests that the JAK1 mutation in exons 10 and 13 may not play an important role in the tumorigenesis of NSCLCs. (*J Lung Cancer* 2008;7(2):71 – 74)

**Key Words:** Non-small cell lung cancer, JAK1, Mutation

Ji Eun Oh, B.S.<sup>1</sup>  
Hyung Kyu Yoon, M.D.<sup>2</sup>  
In Sook Woo, M.D.<sup>2</sup>  
Seung Joon Kim, M.D.<sup>2</sup>  
Nam Jin Yoo, M.D.<sup>1</sup> and  
Sug Hyung Lee, M.D.<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Pathology and <sup>2</sup>Internal Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Received: August 23, 2008  
Accepted: October 1, 2008

**Address for correspondence**

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

This study was supported by a grant of the National Cancer Control R&D Program 2008, Ministry for Health, Welfare and Family Affairs (0820080).

### 서 론

포유류에는 JAK1, JAK2, JAK3, TYK2 네 가지로 이루어진 Janus kinase (JAK) 단백질군이 존재하며, 각각의 단백질은 유사한 구조와 기능을 나타낸다(1,2). 사이토카인과 이들의 수용체 결합은 세포질의 JAK 단백질들을 결합하고 순차적으로 signal transducers and activators of transcription (STATs)이 활성화된다. STAT은 핵으로 이동하고 DNA에 결합하여 Bcl-2 family 단백질, cyclin D1, IL-2 수용체, c-Myc 등의 표적 유전자의 전사를 활성화 한다(3). JAK-STAT 신호전달계는 세포증식, 분화, 세포사멸 등의 다양한 과정을 정상 및 암세포에서 조절한다(2).

JAK 유전자의 이상이 암발생 과정에 관여한다는 다양한 증거들이 제시되고 있다(2). 염색체 전위 t (9;12)는 JAK2와

TEL 유전자를 결합시켜 TEL-JAK2 융합 단백질을 급성백혈병에서 만들어 낸다(4). JAK2 p.V617F 돌연변이는 만성 골수증식성 질환에서 보고된 바 있다(5,6). 이 돌연변이는 70% 정도의 polycythemia vera와 약 1/3의 essential thrombocythemia와 myeloid metaplasia with myelofibrosis에서 나타난다. JAK2 p.V617F 돌연변이 단백질은 JAK2의 인산화 기능을 항상 활성화하여 백혈병 세포에 세포성장인자-비의존성 증식기능을 부여한다(5,6). JAK2의 이상에 의한 종양 발생 기전이 비교적 잘 연구된 반면, JAK1에 대한 연구는 미비한 형편이다. 최근, Xiang 등(7)은 JAK1의 체성 돌연변이 두 가지(p.T478S, p.V623A)를 급성 골수성 백혈병 환자의 골수에서 보고한 바 있다. 기능적으로 이 두 가지 JAK1 돌연변이는 type I 인터페론에 대한 STAT의 활성화를 촉진하였다.

JAK-STAT 신호경로의 활성화는 백혈병 세포뿐 아니라

비소세포성 폐암을 포함한 다양한 고형암에서 나타난다(2,8). 따라서, 이런 활성화가 JAK1 유전자의 활성화 돌연변이에 의한 것인지를 규명하는 것이 필요하다. 하지만, 현재까지 이 유전자의 돌연변이가 비소세포성 폐암에서 보고된 바 없다. 이에 저자들은 본 연구에서 JAK1 유전자의 돌연변이가 비소세포성 폐암의 발암과정에 관여하는지를 알아보기 위해, 비소세포성 폐암 조직을 대상으로 돌연변이 발굴 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 연구 대상

1999년 이후 근치적 폐 절제술을 받고 진단된 47명의 비소세포성 폐암 환자의 폐조직을 대상으로 하였다. 폐암 환자의 파란된 포매 조직을 5  $\mu$ m 두께로 박절하여 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시한 후 2명의 진단병리 의사가 독립적으로 WHO 분류에 따라 분류하였으며, 이들은 편평상피암 24예, 선암 23예였다. 36~79세의 연령분포를 보였으며 평균연령은 57세였다.

### 2) 돌연변이 조사

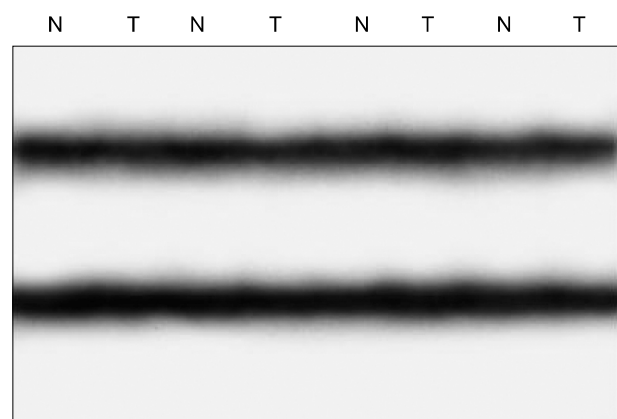
Hematoxylin 및 Eosin 염색된 조직에서 미세절제술(microdissection)을 이용하여 암세포 및 정상세포를 각각 분리 수집한 후, proteinase K를 처리하여 DNA를 얻었다. JAK1 유전자를 이루고 있는 exon 중 활성화에 중요한 역할을 한다고 알려진 부위를 코딩하는 exon 10과 exon 13을 증폭할 수 있는 시발체(primer) 2쌍을 제작하였다. 시발체의 DNA sequence는 exon 10 (5'-ctcccttgctactctcc-3' 및 5'-acacctcatggctgtatgg-3') exon 13 (5'-accagcctctgctcttc-3 및 5'-gggagggaggaggttcag-3)였다. 방사성 동위원소인( $^{32}$ P)dCTP)을 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 논문에서 자세히 기술되어 있다(9~15).

## 결 과

미세절제를 통해서 암 및 정상세포를 비소세포성 폐암 조직에서 선택적으로 분리할 수 있었고, 추출된 DNA를 이용하여 JAK1 exon 10과 exon 13을 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 BNIP3 유전자의 돌연변이가 분석한 47예의 비소세포성 폐암에서 나타나지 않음을 의미했다. 이 실험은 미세절제, 중합효소연쇄반응, SSCP 및 염기서열분석을 2회 반복하였으며, 결과는 2회 모두 일치하였다.

## 고안 및 결론

인산화 단백질을 코딩하는 유전자에 흔히 암 돌연변이가 발생하고 기능적으로 세포증식 및 세포생존을 저하시키는 경우가 흔하다는 기존연구(16,17)를 따라, 급성 백혈병에서 돌연변이가 발굴된 바 있고 기능적으로 암세포의 증식 기



**Fig. 1.** Representative SSCP of the JAK1 gene in the non-small cell lung cancers. The exon 10 of the JAK1 gene was amplified by PCR with using a specific primer set. The PCR products from the representative cases of non-small cell lung cancers were visualized on SSCP. The SSCP of the DNA from the non-small cell lung cancers (T) shows no aberrant bands as compared to that of the SSCPs from the normal tissues (N).

능이 확인된 JAK1 유전자의 돌연변이 연구를 비소세포성 폐암을 대상으로 시행하였다. 따라서, 본 연구의 목적은 두 가지였다. 첫째는 세포증식 조절에 중요한 역할을 하는 JAK1 exon 10 및 exon 13 돌연변이가 비소세포성 폐암 조직에서 돌연변이 되는 것을 판명하는 것이었고, 둘째는 돌연변이가 있다면 그 기능적 변화를 암발생과 연관시키는 것이었다. 하지만 JAK1 유전자의 exon 10 및 exon 13이 47예의 비소세포성 폐암 조직에서 돌연변이가 되지 않았다는 것을 확인하였고, 이를 통해서 비소세포성 폐암의 발생기전에서 이 유전자의 돌연변이가 중요한 역할을 하지 않으리라는 것을 예측할 수 있었다.

비소세포성 폐암에서 인산화 효소 유전자의 돌연변이 연구는 이미 많은 유전자를 대상으로 이루어졌고, 이 중 일부는 진단 및 치료의 바이오마커로 활용되고 있다. Receptor tyrosine kinase인 epidermal growth factor receptor (EGFR)의 exon 19 및 exon 21 돌연변이는 비소세포성 폐암 중 샘암의 약 30% (아시아인 기준)에서 발견되며 EGFR의 세포 내 인산화 억제제인 gefitinib에 반응하는 치료 예측성 바이오 마커이다(18,19). EGFR과 마찬가지로 JAK1 역시 암세포의 증식에 중요한 단백질이므로 JAK1의 활성화 돌연변이는 이를 대상으로 하는 표적항암제의 개발 대상이 될 수 있다. 하지만, 본 연구의 결과로 JAK1 exon 10과 13의 돌연변이가 비소세포성 폐암에서 치료 표적이 될 수 없음이 밝혀졌다.

암세포의 증식을 유발하는 인산화 효소의 기전은 여러 가지가 있으며, 활성화 돌연변이는 이 중 한가지 기전이다(5,6,16~19). 활성화 돌연변이 이외에 단백질 발현 증가 및 인산화 증가가 다른 기전이다(2). ERBB2 단백질은 EGFR family의 인산화 효소로 유방암에서 유전자가 증폭되고 발현이 증가하여 암발생을 촉진시킨다(20). 폐암에서는 EGFR의 증폭, C-MET 유전자의 증폭에 의한 해당 단백질의 발현 증가가 보고된 바 있다(21). 유전자 증폭 이외에 전사조절에 의한 단백질의 발현 또한 암 발생의 기전으로 작용한다. 인산화 효소의 활성화는 돌연변이, 유전자 증폭 등에 의해 서뿐 아니라 해당 단백질의 상위 및 연결 경로의 활성화에 의해 나타날 수 있다. 본 연구 결과는 JAK1 유전자가 비소세포성 폐암에서 돌연변이 되지 않는다는 사실을 제시한다. 따라서, 비소세포성 폐암에서 JAK1 활성화 기전을 규명하고 이를 통한 발암기전의 이해를 위해서는 JAK1 유전자의 돌연변이 이외에 JAK1의 증폭, 발현증가, 또한 관련 유전자(특히, JAK2, JAK3, TYK2)의 이상을 추가로 연구해야 한다고 생각한다.

많은 연구가 비소세포성 폐암을 대상으로 시행되었지만 비소세포성 폐암 환자의 사망률은 감소하지 않고 있다. 따

라서 비소세포성 폐암의 치료를 향상할 수 있는 치료제의 개발이 절실하며, gefitinib의 경우에서 나타난 것처럼(18,19) 표적항암제의 개발은 향후 폐암치료제 개발의 중심이 될 것이다. 표적항암제의 가장 큰 타겟은 인산화 효소의 활성화 돌연변이이다. 따라서, 미국 및 영국의 연구진들이 대규모의 인산화 효소 유전자 돌연변이 연구를 시행하고 있다(16,17). 이들 연구를 통해 높은 빈도로 반복적 발생하는 새로운 돌연변이를 발굴하는 것에 실패했지만 돌연변이가 실제로 존재하지 않는 지에 관한 추가 연구가 필요하다. EGFR 돌연변이의 경우와 같이 서구인과 동양인의 돌연변이 빈도가 현격히 다를 수 있다(18,19). 또한, 서구에서 행해진 대규모의 돌연변이 스크리닝에 사용된 폐암의 개체 수가 적어서 돌연변이의 발굴이 미진했을 가능성도 있다. 따라서, 대규모 유전자의 스크리닝과 함께 가능성 높은 소수의 유전자를 많은 폐암에서 분석하는 것이 필요하리라고 생각된다.

## REFERENCES

1. Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 2000;19:5662-5679.
2. Verma A, Kambhampati S, Parmar S, Platanius LC. Jak family of kinases in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22:423-434.
3. Turkson J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 2000;19:6613-6626.
4. Lacronique V, Boureux A, Valle VD, et al. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 1997;278:1309-1312.
5. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. *Nature* 2005;434:1144-1148.
6. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779-1790.
7. Xiang Z, Zhao Y, Mitaksov V, et al. Identification of somatic JAK1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111:4809-4812.
8. Seki Y, Suzuki N, Imaizumi M, et al. STAT3 and MAPK in human lung cancer tissues and suppression of oncogenic growth by JAB and dominant negative STAT3. *Int J Oncol* 2004;24:931-934.
9. Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Hum Genet* 2004;115:112-115.
10. 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.
11. 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.

12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. Mutational analysis of proapoptotic caspase-9 gene in common human carcinomas. *APMIS* 2006;114:292-297.
16. Bardelli A, Parsons DW, Silliman N, et al. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* 2003;300:949.
17. Davies H, Hunter C, Smith R, et al. Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer. *Cancer Res* 2005;65:7591-7595.
18. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-1500.
19. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-2139.
20. Arteaga CL, Moulder SL, Yakes FM. HER (erbB) tyrosine kinase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Semin Oncol* 2002;29:4-10.
21. McDermott U, Sharma SV, Dowell L, et al. Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19936-19941.