

## 위암에서 발견된 돌연변이형 Fas 단백질의 기능적 결함

가톨릭대학교 의과대학 병리학교실 및 <sup>1</sup>외과학교실

박원상 · 조용구 · 김창재 · 박조현<sup>1</sup> · 김영실 · 김수영 · 남석우 · 이석형 · 유남진 · 이정용

### Functional Defect of the Fas Mutants Detected in Gastric Cancers

Won Sang Park, M.D., Young Gu Cho, M.S., Chang Jae Kim, M.S., Cho Hyun Park, M.D.,<sup>1</sup> Young Sil Kim, M.D., Su Young Kim, M.D., Suk Woo Nam, Ph.D., Sug Hyung Lee, M.D., Nam Jin Yoo, M.D. and Jung Young Lee, M.D.

Departments of Pathology and <sup>1</sup>Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea

**Purpose:** The balance between cell proliferation and apoptosis is crucial for homeostatic maintenance in a cell population. Decreased apoptosis or uncontrolled proliferation can lead to cancer. The Fas receptor signal through a cytoplasmic death domain is very important in the apoptotic pathway. To identify the effect of the death domain of the Fas gene in the development and/or progression of gastric cancer, we examined the apoptotic potential of five known Fas mutants detected in gastric cancers.

**Materials and Methods:** A wild-type Fas gene was cloned with cDNA from normal liver tissue and full length Fas was sequenced. Mutants of the gene were generated with site-directed mutagenesis by using the wild-type gene and specific primers. Wild- and mutant-type genes were transfected to HEK293 cells. Forty-eight hours after transfection the cells were stained with DAPI and cell death was counted under fluorescent microscopy.

**Results:** In wild-type Fas-transfected cells, the percentage of apoptotic cells was  $85.9 \pm 3.6\%$ , and significant cell death and classic morphologic signs of apoptosis were observed. However, the percentages of apoptotic cells transfected with N239D, E240G, D244V, and F263H of tumor-derived mutant Fas were  $29.5 \pm 2.08\%$ ,  $28.5 \pm 3.34\%$ ,  $25.225 \pm 2.06\%$ , and  $36.625 \pm 4.49\%$ , respectively.

**Conclusion:** These results suggest that inactivation of Fas caused by mutations in the death domain of the Fas gene may be one of the possible escape mechanisms against Fas-mediated apoptosis and that inactivating mutation of the Fas may contribute to the development or progression of gastric cancers. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2003;3: 186-190)

**Key Words:** Apoptosis, Cell death, Fas, Death receptor, Mutation

**중심 단어:** 세포자멸사, 세포사멸, Fas, 사멸수용체, 돌연변이

## 서 론

세포자멸사(apoptosis)는 괴사(necrosis)와 함께 세포사멸(cell death)에 관여하는 중요한 신호 전달 체계로서 세포 손상에 의한 괴사와는 달리 유전자 유도에 의한 계획된 자기 파괴성 세포 사멸이라고 할 수 있다. 세포자멸사는 인체의 발생, 분화 및 항상성의 유지에 중요한 역할을 하고 있으며 이의 이상은 신체 발달이상, 퇴행성 질환, 종양 및 면역계 질환에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.(1,2) 한 예로, 인체 내의 세포군에서는 각 세포의 증식과 사멸이 균형을 유지하고 있는데 세포가 과도히 증식하거나 세포 사멸이 억제될 경우 종양이 발생한다고 할 수 있다.

세포자멸사는 주로 두 경로를 통해 이루어 지고 있다. 그 중 하나는 Fas (CD95)와 TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor) 수용체 등과 같은 TNF (tumor necrosis factor)군에 속하는 세포사멸 수용체를 통한 세포자멸사 경로로 이들 수용체에는 세포외 영역(extracellular domain)에 cysteine이 풍부한 부분과 세포자멸사 유도 작용에 중요한 역할을 하며 약 80개의 아미노산으로 구성된 세포질내 사멸 영역(intracytoplasmic death domain)이 존재한다.(3) Fas 리간드(ligand)가 Fas 수용체에 결합하면, FADD (Fas associated death domain) 단백을 포함하는 세포사멸 유도 신호 복합체 (death inducing signal complex)를 형성하고 caspase 8과 effector caspase 들인 caspase-3, 6, 7을 활

책임저자 : 이정용, 서울시 서초구 반포동 505번지  
가톨릭대학교 의과대학 병리학교실, 137-701  
Tel: 02-590-1190, Fax: 02-537-6586  
E-mail: stingray@catholic.ac.kr

접수일 : 2003년 9월 16일, 게재승인일 : 2003년 9월 22일  
이 연구는 한국과학재단 기초과학연구센터사업지원으로 이루어진 것임(R13-2002-005-01004-0).

성화시켜 세포자멸사를 유도하는 것으로 알려져 있다.(4,5) 이와는 달리 혈청 결핍, 자외선, v-irradiation, 활성 산소 (oxygen radical) 등에 의한 세포자멸사는 세포 내 미토콘드리아에서 cytochrome *c*가 유리되어 APAF-1과 결합하여 caspase 9을 활성화시키고 effector caspase 들의 활성화로 일어난다.(6-9)

Fas 유전자는 염색체 10q23~24에 위치하고 있으며 335 개의 아미노산으로 구성되어 있는 세포사멸 수용체이다. 이 단백질은 활성화된 T 세포와 간세포 등을 포함하는 인체의 여러 정상 조직이나 종양 세포들에서 발견되고 있으나,(10,11) 암세포에서는 Fas 단백질이 발견된다 하더라도 세포자멸사가 일어나지 않아 암세포에는 Fas 유도성 세포자멸사 억제 기전이 있을 것을 생각되어 이에 대한 많은 연구들이 진행되었다. 현재까지 밝혀진 기전을 살펴보면, 암세포에서는 transmembrane 영역이 없는 soluble Fas 를 분비하여 Fas 리간드에 의한 세포 공격을 방해하거나,(12) FAP-1 (Fas-associated phosphatase-1), FLICE-inhibitory protein, 그리고 Bcl-2와 같은 세포사멸 신호전달경로의 억제 단백을 과발현하여 Fas에 의한 세포자멸사를 방해하는 것으로 밝혀졌다.(13-15) 이러한 기전들 외에도 Fas 유전자의 돌연변이는 위암을 비롯한 여러 악성 종양에서 발견되어 암세포가 세포자멸사를 피해가는 중요한 기전으로 대두되었다.(16-18)

암세포에 방사선 조사하면 Fas 단백질 발현 증가와 함께 Fas 유도성 세포자멸사가 증가하며,(19) 최근 Fas agonist 등을 이용한 새로운 암 치료법이 시도되고 있다.(20-22) 그러나 암 조직에서는 Fas 유전자 돌연변이들이 사멸영역에서 발견되고 있고 이러한 돌연변이로 Fas가 FADD와 결합하지 못하거나 caspase의 활성을 저하시킨다는 사실은 세포자멸사에 있어서 Fas 단백질의 사멸영역이 암의 이해와 함께 암 환자의 새로운 치료법 개발에 매우 중요한 의미를 지닌다고 할 수 있다.

이에 연구자들은 위암 조직에서 발견된 Fas 유전자의 사멸영역에 존재하는 돌연변이들을 대상으로 site-directed mutagenesis 방법으로 각 돌연변이형을 제작한 다음, HEK293 세포주에서 과발현시켜 세포자멸사에 미치는 영향을 조사하였다.

## 방 법

### 1) Fas 유전자의 돌연변이

이 연구에 사용된 Fas 유전자의 돌연변이들은 연구자들이 한국인의 장형 위암에서 발견한 missense 돌연변이들로 모두 Fas 유전자의 사멸영역에 위치하고 있다(Table 1). Fas 유전자의 크로닝에는 Natoli 등(23)이 이용한 방법을 사용하였다. 간단히 기술하면, 간조직에서 추출한 mRNA를 이용하여 random hexamer와 Murine Reverse Transcriptase로 cDNA를 제작한 후 5'-GGGAATTCATGCTGGGCATCTGGACC-3

**Table 1.** The Fas gene mutations detected in Korean gastric cancers

Case No.	Age/gender	Fas mutations	
		Sequence	Effects
15	53/M	AAT → GAT	N239D
27	59/F	AAT → GAT	N239D
35	61/M	CGT → CAT	R263H
36	62/M	GAT → GTT	D244V
40	64/M	GAA → GGA	E240G

와 5'-CTTCTGCAGCTAGACCAAGCTTTG-3'의 시발체를 이용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 실시하여 크로닝하였다. 위암에서 발견된 돌연변이 5예 중 2예에서는 239 코돈에서 같은 형태의 돌연변이를 보이고 있어 기능적 연구는 모두 4가지 형태의 돌연변이형을 제작하여 사용하였다. 돌연변이형의 클론 제작은 각 변이에 대한 특이 시발체를 제작한 다음 site directed mutagenesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하였으며 각각의 클론은 염기서열 분석으로 돌연변이형을 확인하였다.

### 2) 야생형과 돌연변이형의 클론들 이입(transfection) 및 세포자멸사 분석

Fas 유전자의 이입에는 염기서열이 확인된 각각의 클론들에 myc과 형광단백인 Green fluorescence protein (GFP)이 부착된 plasmid pEGFP (CLONETECT, Palo Alto, CA) 벡터와 Superfect transfection reagent (Qiagen, Valencia, CA)을 이용하여 사람의 배아신장세포주인 HEK293 세포주에 이입하였다. 이입된 유전자들의 단백질 발현 양상은 형광현미경하에서 관찰하였으며 또한 anti-myc 항체를 이용하여 Western blotting으로 확인하였다. 각각의 클론들이 이입된 후 48시간째에 세포들을 10% methanol에 15분 간 고정하고 0.1 ug/ml의 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 로 15분 간 염색하였다. 각각의 클론들을 대상으로 형광현미경하에서 세포자멸사를 5군데에서 헤아려 야생형과 돌연변이형의 Fas 유전자가 세포자멸사에 미치는 영향을 비교 조사하였다.

## 결 과

Fas 유전자의 야생형과 site-directed mutagenesis 방법으로 제작한 4가지의 돌연변이형들은 염기서열을 분석한 결과, 돌연변이형들은 위암에서 발견된 코돈에서 정확한 돌연변이들을 보여주고 있었으며 다른 부위에서의 돌연변이는 관찰할 수 없었다(Fig. 1).

HEK293 세포주에 Fas 유전자의 야생형과 돌연변이형을 이입한 후 24시간째에 세포용해질(cell lysate)을 추출하고

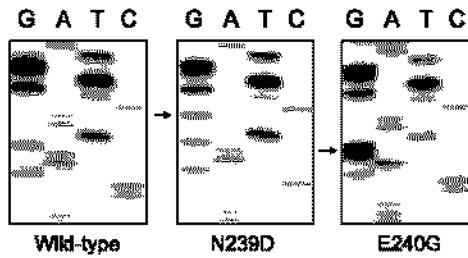


Fig. 1. *Fas* wild- and mutant-types of N239D and E240G. Cyclic sequencing analysis of mutant-types revealed A to G transition at codon 239 and 240 in exon 9 of the *Fas* gene.

anti-myc 항체를 이용하여 Western blotting을 실시한 결과 각 단백질은 발현이 양호하였고 그 정도는 모든 클론들에서 큰 차이가 없었다(data not shown). HEK293 세포주에 각 클론을 이입한 후 형광현미경하에서 GFP의 발현은 약 70% 이상의 세포에서 관찰되어 *Fas* 유전자의 이입이 약 70% 이상이라고 생각하였다(Fig. 2A). *Fas* 유전자 야생형의 클론이 이입된 세포주에서는 이입 후 약 24시간 후 부터 세포자멸사를 관찰할 수 있었으며 48시간에 조사한 세포자멸사는 85.9±3.6%로 벡터만 이입한 15.125±0.85% 보다 현저히 높았다(Fig. 2B). 또한 *Fas* 유전자 돌연변이형의 4가지 클론들, 즉 N239D, E240G, D244V, 그리고 R263H를 이입한 세포주에서는 각각 29.5±2.08%, 28.5±3.34%, 25.225±2.06%, 그

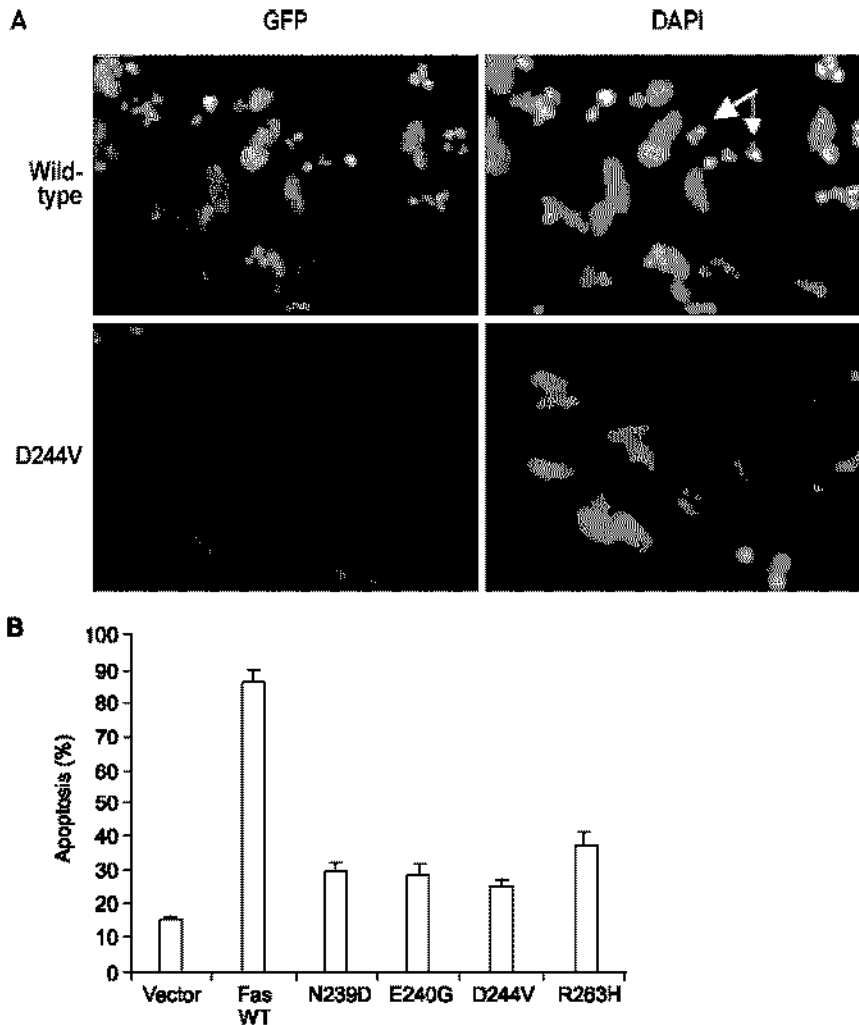


Fig. 2. Loss of function of *Fas* mutant in HEK293 cells. (A) Representative results showing the effects of *Fas* mutants. Forty-eight hours after transfection, cells were fixed in 10% methanol for 15 minutes and stained with 1  $\mu$ g/ml 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 15 minutes, and the nuclei were examined by fluorescence microscopy. Many round apoptotic cells were shown in wild-type *Fas*-transfected cells (upper panel, arrows), as compared with more numerous, healthy nonapoptotic cells transfected the mutant *Fas* (lower panel). (B) The percentage of apoptosis was presented as the mean±SD of five independent experiments.

리고 36.625+4.49% 정도의 세포자멸사가 관찰되어(Fig. 2), Fas 유전자의 사멸영역에 존재하는 돌연변이는 세포자멸사를 현저히 억제시킨다는 것을 알 수 있었다.

## 고 찰

세포 증식과 사멸의 불균형은 종양을 비롯한 여러 질환을 유발할 수 있는데 이 중 종양은 세포 증식이 과도하거나 세포사멸이 억제되어 발생한다고 할 수 있다. 특히 종양세포에서는 종양의 발생 및 진행 과정에서 세포 스스로 세포자멸사를 피할 수 있는 능력을 획득하게 되어 다양한 세포자멸사 자극으로부터 자신을 보호하고 있다.(24) 이로 인해 종양세포의 생명 연장과 함께 다른 유전자들이 손상을 받아 돌연변이가 발생할 기회가 많아진다고 할 수 있다. 세포자멸사에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Fas 수용체의 신호전달계는 암세포에서 흔히 돌연변이들이 발견되었으며 현재까지 Fas, caspase-8, -10 유전자 등에서 돌연변이들이 보고되어 있다.(16,25-27) 이 외에도 Fas 세포자멸사 경로를 억제하는 기전으로는, Fas 단백질의 발현 감소, soluble Fas의 생성, FLICE-like inhibitory protein (FLIP)과 Bcl-2와 같은 세포자멸사 억제물질의 생성 등이 있다.(14,27)

이 연구에서는 위암에서 발견된 4종류의 Fas 유전자 돌연변이를 대상으로 HEK293 세포주를 이용하여 세포자멸사에서의 기능적 결함 여부를 조사하였다. 사용된 돌연변이들은 모두 Fas 유전자의 사멸영역 중 3과 4 helices에 위치하고 있었으며 모두 아미노산이 변하는 missense 돌연변이들이었다(Table 1). Fas 유전자의 야생형과 돌연변이형의 클론들을 각각 site-directed mutagenesis 방법으로 제작하여 세포주에 이입한 후 48시간 췌에 세포자멸사를 조사한 결과, 야생형을 이입한 세포주에서는 85.9%의 세포자멸사를 보였으나 돌연변이형을 이입한 세포주에서는 약 25~38% 정도의 세포자멸사를 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과는 Fas 유전자 내의 사멸영역이 세포자멸사 신호 전달에 매우 중요한 역할을 하는 부분이며 이 부위의 돌연변이는 세포자멸사를 현저히 억제한다는 것을 알 수 있었다. 또한 Fas 유전자의 돌연변이는 위암세포가 세포자멸사를 피해가는 중요한 기전 중의 하나라고 생각되었다.

Fas 유전자 내 사멸영역에서의 돌연변이는 단백질간의 결합이나 상호 작용에 직접적으로 간여하는 것으로 알려져 있다. 한 예로, 이 연구에서 사용되었던 코돈 244의 돌연변이(D244V)는 위암 이외에도 자가면역성 림프구 증식 증후군(autoimmune lymphoproliferative syndrome) 환자와 비호즈킨스 림프종에서 발견되었던 돌연변이로,(28-30) 세포자멸사 자극에도 불구하고 FADD와 caspase-8의 활성이 현저히 떨어짐이 밝혀져 있다.(28,29) 또한, 코돈 240은 Fas의 self-association에 의한 trimerization과 FADD와의 결합에 중요한 부위로, 이 부위의 돌연변이는 세포자멸사 신호 전달을 차

단하는 것으로 밝혀져 있다.(28) 이 연구에서 사용된 코돈 239와 263의 돌연변이는 현재까지 위암을 제외한 인체 종양에서 발견되지 않았지만 코돈 238과 241 그리고 262에서의 돌연변이가 이미 보고되어 있으며 기능적 연구에서 FADD와의 결합능이 떨어져 있음이 알려져 있다.(28,29) 이러한 연구 결과들과 연구자들의 세포자멸사 분석 결과를 종합하여 위암에서 세포사멸 수용체인 Fas 유전자의 돌연변이는 암세포의 세포자멸사를 피해가는 기전으로 위암의 발생 및 진행에 관여하고, Fas 유전자 내 사멸영역은 세포자멸사 신호 전달계에 중요한 역할을 하며 이 부위의 돌연변이는 세포자멸사 신호 전달계로부터 세포를 보호하여 생명을 연장시킬 수 있다고 생각된다.

앞으로 세포자멸사를 이용한 새로운 위암 치료법 개발을 위해서는 위암세포가 어떠한 방법으로 세포 내 혹은 주위로부터의 세포자멸사 신호 전달계를 피해가는 지에 대한 기본적인 기전 연구가 필수적이며 이러한 저항 기전을 극복할 수 있는 방법에 대한 연구가 활발하게 이루어져야 한다고 생각된다. 또한 위암 발생 및 진행의 다단계 모델에서 Fas 유전자의 기능적 결함 등이 어느 단계에서 관여하는 지에 대한 조사는 위암의 발생 및 진행에 대한 이해와 함께 환자의 정확한 진단에 도움이 되리라 판단된다.

## 결 론

한국인 장형 위암 5예에서 발견된 4가지 Fas 유전자의 돌연변이를 대상으로 HEK293 세포주를 이용하여 세포자멸사 신호 전달에 대한 기능적 연구를 실시하였다. 사용된 돌연변이들은 모두 Fas 유전자 내 사멸영역에 위치하고 있는 돌연변이로 각각의 돌연변이형 클론들을 제작한 후 세포주에 이입하고 48시간 췌에 형광현미경하에서 세포자멸사를 조사하여 야생형과 비교하였다.

Fas 유전자의 야생형을 이입한 경우 세포자멸사는 85.9%였으며, Fas 유전자의 돌연변이형을 이입한 세포주에서는 25~38% 정도의 세포자멸사를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로 세포사멸 수용체인 Fas 유전자의 돌연변이는 위암 세포가 세포자멸사를 피해가는 기전 중의 하나이고 Fas 유전자 내 사멸영역은 세포자멸사 신호 전달계에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 암세포에서 세포자멸사 저항 기전 연구와 함께 이를 극복할 수 있는 새로운 치료방법에 대한 연구가 필요할 것이다.

## REFERENCES

1. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. Am J Pathol 2000;39: 1415-1430.
2. Natgata S. Apoptosis by death factor. Cell 1997;88:355-365.
3. Zren N, El-Deiry WS. Cell surface death receptor signaling in

- normal and cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2003;13:135-147.
4. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
  5. Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E, Beyaert R, Vandenaebelle P, Fiers W. Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding. *FEBS Lett* 1997;410:96-106.
  6. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513-519.
  7. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-1312.
  8. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-489.
  9. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-776.
  10. Nagata S, Goldstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449-1456.
  11. Leithuser F, Dhein J, Mechtersheimer G, et al. Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the new growth factor/tumor necrosis receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* 1993;69: 415-429.
  12. Lee SH, Kim SY, Lee JY, et al. Detection of soluble *Fas* mRNA using *in situ* reverse transcription-polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1998;78:453-459.
  13. Sato T, Irie S, Kitada S, Reed JC. FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 1995;268:411-415.
  14. Irmeler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190-195.
  15. Lauwers GY, Scott GV, Hendricks J. Immunohistochemical evidence of aberrant bcl-2 protein expression in gastric epithelial dysplasia. *Cancer* 1994;73:2900-2904.
  16. Park WS, Oh RR, Kim YS, et al. Somatic mutations in the death domain of the *Fas* (*Apo1/CD95*) gene in gastric cancer. *J Pathol* 2001;193:162-168.
  17. Landowsky TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, Dalton WS. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 1997;90:4266-4270.
  18. Maeda T, Yamada Y, Moriuchi R, et al. *Fas* gene mutation in the progression of adult T cell leukemia. *J Exp Med* 1999;189:1063-1071.
  19. Park IC, Woo SH, Park MJ, et al. Ionizing radiation and nitric oxide donor sensitize Fas-induced apoptosis via up-regulation of Fas in human cervical cells. *Oncol Rep* 2003;10:629-633.
  20. French LE, Tschopp J. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ* 2003;10:117-123.
  21. Shinoura N, Hamada H. Gene therapy using an adenovirus vector for apoptosis-related genes is a highly effective therapeutic modality for killing glioma cells. *Curr Gene Ther* 2003;3:147-153.
  22. Nakanishi H, Mazda O, Satoh E, et al. Nonviral genetic transfer of Fas ligand induced significant growth suppression and apoptotic tumor cell death in prostate cancer *in vivo*. *Gene Ther* 2003;10:434-42.
  23. Natoli G, Ianni A, Costanzo A, et al. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human hepatoma cells. *Oncogene* 1995;11: 1157-1164.
  24. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
  25. Park WS, Lee JH, Shin MS, et al. Inactivating mutations of the caspase-10 gene in gastric cancer. *Oncogene* 2002;21: 2919-2925.
  26. 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.
  27. Martin SJ, Green DR. Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1998;10:559-563.
  28. Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows ET, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 1996;384:638-641.
  29. Martin DA, Zheng L, Siegel RM, et al. Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type 1a. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4552-4557.
  30. Gmbk K, Straten PT, Ralfkiaer E, et al. Somatic *Fas* mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 1998;92:3018-3024.