

다양한 환경변이원의 분자독성학적 메커니즘 연구에 있어서 항종양 인자 p53의 중요성 고찰

정 화 진, 류 재 천¹, 서 영 록*

경희대학교 의과대학 약리학 교실 및 MRC 센터
¹한국과학기술연구원 독성학실험실

The Overview of the Importances of Tumor Suppressor p53 for Investigating Molecular Toxicological Mechanisms of Various Environmental Mutagens

Hwa Jin Jung, Jae-Chun Ryu¹ and Young Rok Seo*

Department of Pharmacology & Medical Research Center (MRC), Kyung Hee University,
Seoul 130-701, Korea; ¹Toxicology Laboratory, Korea Institute of Science & Technology,
P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

ABSTRACT

The study of p53 tumor suppressor protein is one of most important subjects in an environmental toxicology as well as in cancer biology. Generally, p53 has been known to involve the cell cycle regulation and apoptosis by the activation of its target genes such as p21 and bax in a number of cellular stress responses. In addition, associations of p53 with cellular proteins presumably reflect the involvement of p53 in critical cellular processes such as DNA repair. The complex formation of p53 and exogenous proteins such as viral or cellular proteins has been shown in many cases to play important roles in carcinogenic processes against environmental mutagen. Recently, the disruption of p53 protein by oxidative stress has been also reported to have relevance to carcinogenesis. These findings suggested that the maintaining of stability and functional activity of p53 protein was also important aspect to play as a tumor suppressor protein. Therefore, the detection of functional status of p53 proteins might be an effective biomarker for the cancer and human diseases under the environmental toxicologic carcinogen.

Key words : p53 tumor suppressor, environmental mutagen, functional activity of p53 protein, biomarker

항종양 인자 p53의 구조와 기능, 그리고 활성화 기전

p53 유전자는 11개의 exon으로 구성되어 396 amino acids, 53kDa phosphoprotein을 암호화 한다 (Fig. 1). 이렇게 발현된 p53 단백질은 transcription

factor로서의 기능을 갖고 있어 특정 DNA sequence에 결합하여 target 유전자의 발현을 조절한다. 일반적으로 p53 단백질은 5개의 기능성 domain을 갖고 있는데, N-terminal 지역 (amino acids 1-93)에 속하는 acidic transcriptional activation domain과 proline-rich domain, core DNA-binding 지역 (amino acids 102-292)에 속하는 sequence-specific DNA binding domain, 그리고 C-terminal 지역에

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-2-961-0674, E-mail: dream21@khu.ac.kr

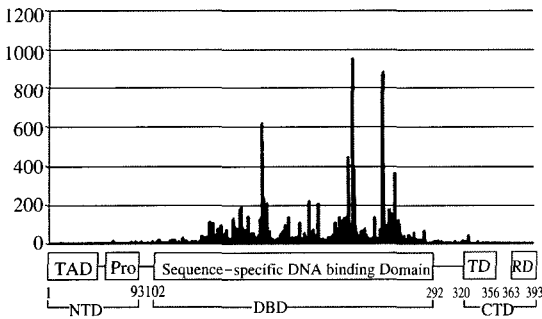


Fig. 1. Schematic representatives of p53 structure. The p53 tumor suppressor gene is generally divided into five functional domains [N-terminal transcriptional activation domain (TAD), proline-rich domain (Pro), DNA binding domain (DBD), tetramerization domain (TD), and C-terminal regulatory domain (RD)]. Over 95% of tumors is reportedly associated with p53 somatic mutations in sequence-specific DNA binding domain. Several mutational hotspots have been identified in this domain. The majority of these mutations is point mutation that results in single amino acid substitution. Somatic mutations of p53 data used in graph have been compiled by International Agency for Research on Cancer (IARC), <http://www.iarc.fr/p53/index.html> (Olivier *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 2002).

속하는 tetramerization domain (amino acids 320-360)과 regulatory domain (amino acids 363-393)으로 구성되어 있다 (Bell *et al.*, 2002). 이 중 regulatory domain은 sequence-specific manner에서 p53의 DNA binding activity에 영향을 줄 수 있다 (Levine *et al.*, 1997). 95% 이상의 종양에서 보이는 p53 돌연변이는 core DNA-binding 지역에서 유도되는 것으로 sequence-specific DNA binding domain이 p53 단백질의 기능에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다 (Fig. 1).

항종양 인자로서의 p53 기능은 수많은 연구 보고에서 증명되었다. Homozygous와 heterozygous p53 knockout mice가 초기 종양 형성에 민감성을 보이는 사실 (Donehower *et al.*, 1992) 외에도 희귀한 유전적 암으로 알려진 Li-Fraumeni syndrome 역시 종양 억제자로서의 p53의 기능을 잘 설명해 준다 (Malkin, 1994). 일반인의 1%가 암에 걸릴 가능성을 가지는 반면, germ-line p53 mutation을 가진 Li-Fraumeni syndrome 가족 구성원은 그 중 50%

가 30세까지 암이 발병할 가능성이 있다고 알려져 있다 (Malkin, 1994). 또한 animal model을 이용한 연구에서 inducible p53 vector를 주입한 경우, apoptosis에 의한 tumor xenografts의 regression을 유도한다고 보고 되었다 (Shaw *et al.*, 1992).

세포 내에서 p53 단백질은 여러 가지 독특한 분자 생물학적인 특징을 갖는다. p53 단백질은 다양한 환경 스트레스에 의해서 acetylation과 phosphorylation 같은 post-translational modification (Ryan *et al.*, 2001) 작용 기전을 통해 활성화되어 핵 내에 축적된다. 가장 잘 알려져 있는 p53의 핵 내 축적을 유도하는 자극은 DNA 손상이다. 예를 들어, 세포가 UV나 IR에 노출되면, dose-dependent하게 p53의 핵 내 농도가 증가하게 된다 (Kastan *et al.*, 1991). 게다가, 광범위하게 사용되고 있는 chemotherapeutic agent (mitomycin C, cisplatin, doxorubicin, etoposide, 5-FU)들은 DNA를 손상시키고 p53 단백질 축적을 유도한다고 알려져 있다 (Fritsche *et al.*, 1993). 그러나 최근에는 DNA에 직접적인 손상을 주지 않는 다른 형태의 스트레스인 hypoxia, heat shock, nucleotide depletion 역시 p53 축적을 유도할 수 있다고 보고 되고 있다 (Graeber *et al.*, 1994; Yin *et al.*, 1998).

활성화된 항종양 인자 p53에 의해 유도되는 세포반응 메커니즘: cell cycle arrest, apoptosis, 그리고 DNA repair

Wild-type p53을 가진 세포에서는 DNA 손상이 일어난 후 cell cycle arrest가 유도 된다 (Kastan *et al.*, 1991). 이에 반해 mutant p53이나 p53이 소실되어 있는 세포는 DNA 손상 후에 cell cycle arrest가 현저히 약화되기 때문에 DNA 손상에 따른 유전자의 안정성이 크게 떨어지게 된다. p53-mediated cell cycle arrest의 작용기전으로는 cyclin-dependent kinase inhibitor 역할을 하는 세포 내 유전자인 p21^{waf/cip1/sdi1}의 transactivation을 통해 cell cycle을 조절하는 메커니즘이 잘 알려져 있다 (el-Deiry *et al.*, 1993).

한편 p53 단백질은 여러 가지 메커니즘을 통해 apoptosis를 유도하기도 하는데 그 중 caspase를 activation시키는 mitochondrial pathway를 활성화시켜 apoptosis를 유도할 수 있다. Wild-type p53

단백질은 mitochondria로부터 cytochrome c의 방출, procaspase-9의 processing, caspase-3의 cleavage를 유도하여 effector caspase를 활성화 시킨다 (Schuler *et al.*, 2000). 그 외에도 death receptor-mediated caspase activation pathway를 통해 apoptosis를 유도하기도 하는데 (Sheikh *et al.*, 2000), 그 예로 Fas와 DR5와 같은 death receptor를 transcriptional activation시켜 apoptosis에 관여하게 한다. p53 단백질은 Fas와 DR5 뿐만 아니라, Bax, Noxa, p53 AIP1과 같은 apoptosis에 직접적으로 관여하는 target gene들을 transactivation 시킴으로써 apoptosis를 유도하기도 한다.

p53 활성화는 cell cycle arrest와 apoptosis를 일으키는데 중요한 역할을 하기도 하지만, 최근 연구에 따르면 DNA repair의 기능 증진에 기여함으로써 유전적 돌연변이를 억제하는데도 관여한다고 알려져 있다 (Kastan *et al.*, 1992; Ford *et al.*, 1997). 특히 UV-induced DNA damage, bulky carcinogen adducts 및 cisplatin과 같은 항암 치료제에 의해 야기된 DNA 손상에 대한 수복 경로인 nucleotide excision repair (NER)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Smith *et al.*, 2000). 종양 세포에서 흔히 나타나는 p53 단백질 기능의 결여는 이런 형태의 손상에 대한 DNA 수복 현상을 감소시키고, 이로 인해 DNA 손상을 야기하는 물질들에 대한 민감성을 증가시키기도 한다 (Cistulli *et al.*, 1998). 최근에는 base-damaging agent인 methyl methane-sulfonate (MMS)에 의한 DNA 손상을 수복하는 base excision repair (BER) pathway에 p53이 관여한다는 사실이 연구되고 있다 (Seo *et al.*, 2002). 이것은 p53 단백질이 환경 발암원에 의한 DNA 손상의 주요한 수복 과정인 NER과 BER을 조절함을 의미하고 유전자의 항상성을 유지하기 위한 보호 기작의 일환으로도 p53의 기능이 중요하다는 사실을 말해준다. 이와 같이 p53 단백질은 다양한 세포 반응을 유도할 수 있음을 알 수 있다 (Fig. 2).

환경독성학 연구에 있어서 항종양 인자 p53의 중요성

p53은 다양한 환경변이원에 의해 유발되는 종양 형성을 억제하는 항종양 인자 (tumor suppression factor)로 알려져 있다. 정상 세포가 DNA 손상을

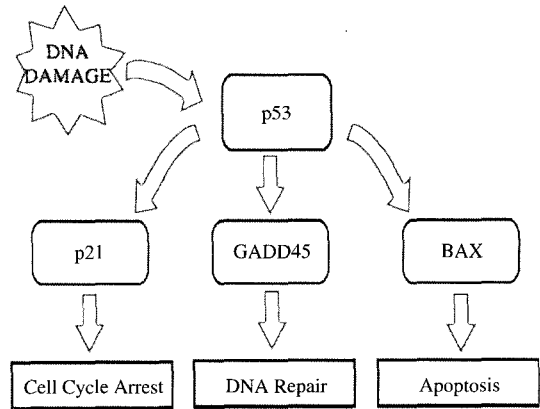


Fig. 2. Various roles of p53 tumor suppressor under genotoxic stresses. Activated p53 induced by DNA damage plays as a transcription factor for activating several target genes such as p21, BAX, and GADD45. p21 induced by p53 protein leads to cell cycle arrest. p53 also induces apoptosis by upregulating the expression of proapoptotic gene, Bax. In addition, GADD45 enhances DNA repair as protective response.

일게 되면 wild-type p53 단백질이 활성화되어 p21, bax, gadd45와 같은 자신의 target gene을 발현 시킴으로써 cell cycle arrest 및 apoptosis와 DNA repair에 관련된 기능을 한다 (Kastan *et al.*, 1992; Appella and Anderson, 2000; Seo *et al.*, 2002). 일반적으로 정상 세포의 wild-type p53 단백질은 짧은 반감기 때문에 낮은 농도로 핵 내에 축적되어 있는 반면 (Starzynska, 1999), 대부분의 종양이나 형질 전환된 비정상적인 세포에서 mutant p53 단백질은 비정상적인 단백질 안정성을 보이고, 높은 비율로 축적되는 특징을 가진다 (Rodrigues *et al.*, 1990).

이와 같은 p53의 복잡한 특성으로 인해 지금까지 종양과 같은 질환의 biomarker로서 p53 유전자의 돌연변이를 검출하기 위한 연구는 중요한 이슈가 되어 왔다. 그러나 정상 p53 유전자를 가진 경우에도 다양한 종양 바이러스성 단백질과 p53이 복합체를 형성함으로써 wild type p53 단백질의 정상적인 기능을 불활성화시켜 자궁경부암, 간암 등을 유발하는 기전이 잘 알려져 있다 (Fig. 3) (Bartek *et al.*, 1992). 최근에는 wild type p53이라 할지라도 세포 내 대사 과정에서 생성되는 활성 산소와 같은 산화적 스트레스 (oxidative stress)에 의해 단백

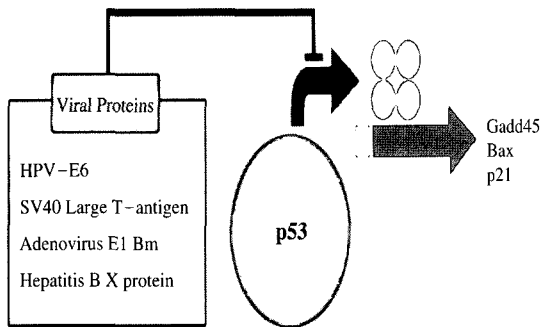


Fig. 3. Active form of p53 protein as a tetramer is able to be interfered by interacting with the variety of viral proteins, such as HPV-E6, SV40 Large T-antigen, adenovirus E1Bm, and hepatitis BX protein (Bell *et al.*, 2002; Yin and Dong, 2003).

결론

“guardian of the genome”으로 불리는 (Lane, 1992) 항종양인자 p53 단백질은 DNA 손상에 의해 핵 내에 축적되고 세포에 DNA 손상을 복구할 시간을 주기 위해서 일시적인 cell cycle arrest를 유도하게 된다. 만약 손상이 심각하여 DNA repair가 성공적으로 이루어질 수 없다면, p53은 apoptosis를 유도할 수 있다고 추정되며, 이러한 일련의 과정에서 p53은 genome의 integrity를 유지하고, 종양이 될 가능성을 가지는 deleterious mutations의 축적을 억제 한다 (Holstein *et al.*, 1994). 만약, p53이 돌연변이 되거나 단백질 활성을 잃어 DNA 손상에 반응할 수 없다면, 다른 유전자의 mutation을 막을 수 없기 때문에 이런 세포들은 더 쉽게 transformation 된다. 이와 같이 p53이 항종양 인자로서 광범위하게 역할을 하고 있음을 알 수 있고 유전자 수준에서 뿐만 아니라 단백질의 안정성과 기능적 활성을 유지하는 것이 그 역할을 수행하는데 필수적임을 확인할 수 있다.

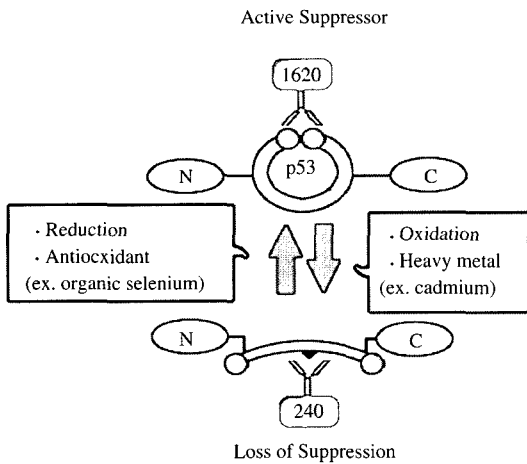


Fig. 4. Effects of oxidation-reduction (REDOX) in the control of p53 conformation. This model proposes that metal binding and oxidation of cysteines modulate the conformation of the DNA binding domain of p53. Factors that affect this metal and redox-dependent equilibrium are indicated (Meplan *et al.*, 2000).

질의 안정성과 활성을 잃어버려 (Fig. 4) 항종양 인자로서 기능을 상실하는 경우 또한 발암의 위험성을 높이는 것으로 보고 되고 있다 (Marshall *et al.*, 2000). Oxidative stress를 주었을 경우, 활성형의 wild type p53을 인식하는 antibody인 PAb1620이 p53을 detection하지 못하는 연구 결과로도 p53 단

지금까지 연구들은 p53의 유전자 수준에서의 표지뿐만 아니라 mutant p53 단백질 검출도 가능하게 만들었다. 그러나 종양 또는 다양한 병원성 질환에서의 p53은 돌연변이에 의한 이상뿐만 아니라 wild-type p53 단백질의 기능적 불활성과 비정상적인 바이러스성 인자 또는 세포 내 단백질과의 상호 작용도 중요한 요인으로 알려지면서 wild-type p53 단백질 기능 자체의 문제가 새로운 이슈로 떠오르고 있다. 이와 같은 항종양인자 p53 단백질의 연구를 통해 최근 중요한 연구 주제로 주목받고 있는 환경 변이원성 물질에 의해 유도되는 세포

분자 독성 메커니즘을 이해함으로써 암을 비롯한 다양한 질병에의 접근은 물론 새로운 환경 독성 발암원과 항종양 인자와의 상호 작용을 밝히는데 기여할 것으로 기대하고, 더 나아가 분자수준의 생물지표를 이용한 위해성 평가 연구에 있어서 중요한 biomarker로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Byung Ju Kim, Jee Na Hwang and Se Jin Oh for helping preparation of the manuscript. This work is partially supported by Ministry of Environment as "The Eco-technopia 21 project" (2004-09001-0025-2).

참 고 문 헌

- Appella E and Anderson CW. Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code, *Pathol. Biol.* (Paris) 2000; 48: 227-245.
- Bartek J, Vojtesek B and Lane DP. Diversity of human p53 mutants revealed by complex formation to SV40 T antigen, *Eur. J. Cancer* 1992; 29: 101-107.
- Bell S, Klein C, Muller L, Hansen S and Buchner J. p53 contains large unstructured regions in its native state, *J. Mol. Biol.* 2002; 322: 917-927.
- Cistulli CA and Kaufman WK. p53-dependent signalling sustains DNA replication and enhances clonogenic survival in 254nm ultraviolet-irradiated human fibroblasts, *Cancer Res.* 1998; 58: 1993-2002.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS and Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours, *Nature* 1992; 356: 215-221.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW and Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell* 1993; 75: 817-825.
- Ford JM and Hanawalt PC. Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 92: 8876-8880.
- Fritsche M, Haessler C and Brandner G. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents, *Oncogene* 1993; 8: 307-318.
- Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ Jr and Giaccia AJ. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status, *Mol. Cell Biol.* 1994; 14: 6264-6277.
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Sussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R and Harris CC. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines, *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 3551-3555.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B and Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage, *Cancer Res.* 1991; 51: 6304-6311.
- Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B and Fornace AJ Jr. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia, *Cell* 1992; 71: 587-597.
- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome, *Nature* 1992; 358: 15-16.
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell* 1997; 88: 323-331.
- Malkin D. p53 and the Li-Fraumeni syndrome, *Biochim. Biophys. Acta* 1994; 1198: 197-213.
- Marshall HE, Merchant K and Stamter JS. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression, *FASEB J.* 2000; 14: 1889-1900.
- Meplan C, Richard MJ and Hainaut P. Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway, *Biol. Pharmacol.* 2000; 59: 25-33.
- Oliver M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC and Hainaut P. The IARC TP53 Database: new online mutation analysis and recommendations to users, *Hum Mutat* 2002; 19: 607-614
- Rodrigues NR, Rowan A, Smith MEF, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV and Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 7555-7559.
- Ryan KM, Phillips AC and Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein, *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001; 13: 332-337.
- Schuler M, Bossy-Wetzels E, Goldstein JC, Fitzgerald P and Green DR. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release, *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 7337-7342.

- Seo YR, Fishel ML, Amundson S, Kelley MR and Smith ML. Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence, *Oncogene* 2002; 21: 731–737.
- Seo YR, Kelley MR and Smith ML. Selenomethionine regulation of p53 by a ref1-dependent redox mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 14548–14553.
- Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B and Costa J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line, *Proc. Natl. Sci. USA* 1992; 89: 4495–4499.
- Sheikh MS and Fornace AJ Jr. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis, *Leukemia* 2000; 14: 1509–1513.
- Smith ML, Ford JM, Hollander C, Bortnick RA, Amundson SA, Seo YR, Deng CX, Hanawalt PC and Fornace AJ Jr. p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: Studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes, *Mol. and cellular biol.* 2000; 20: 3705–3714.
- Starzynska T. Protein p53 in gastric carcinoma: clinical use of cancer research on neoplasms, *Pol. Merkuriusz Lek.* 1999; 6: 61–64.
- Yin Y, Terauchi Y, Solomon GG, Aizawa S, Rangarajan PN, Yazaki Y, Kadowaki T and Barrett JC. Involvement of p85 in p53-dependent apoptotic response to oxidative stress, *Nature* 1998; 391: 707–710.
- Yin XM and Dong Z. *Essentials of Apoptosis: A guide for basic and clinical research*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2003; 177–200.