방광이행상피세포암 형성에서의 Human v-erbA related EAR-3 gene의 분석

연세대학교 대학원

의 학 과

함 원 식

방광이행상피세포암 형성에서의 Human v-erbA related EAR-3 gene의 분석

지도 최 영 득 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2006년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

함 원 식

함원식의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2006년 6월 일

감사의 글

이 논문을 완성하기까지 아낌없는 지도와 배려를 주신 최영득 교수님께 깊은 감사를 드리며, 많은 조언을 주신 홍성준 교수님, 김종선 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 또한 많은 관심과 배려를 해주신 비뇨기과 의국원들, 외래 직원들, 그리고 언제나 존경하는 부모님과 사랑하는 아내에게 감사드립니다.

저자 씀

<차례>

그림 및 표 차례 ---------- ii

국문 요약 ---------- iii

I. 서론 ---------- 1

II. 재료 및 방법 ---------- 3

1. 연구대상 ---------- 3

2. 연구방법 ---------- 5

III. 결과 ---------- 7

1. ACP-based GeneFishing™ PCR 결과 ---------- 7

2. RT-PCR 결과 ---------- 7

IV. 고찰 ---------- 10

V. 결론 ---------- 16

참고문헌 ---------- 17

영문요약 ---------- 23

그림 차례

그림 1. RT-PCR product analysis by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide ---------- 8

표 차례

표 1. Patient dermographics ---------- 4

표 2. EAR-3 mRNA-positive case numbers and sensitivity results between superficial and invasive tumor types ---------- 9

국문요약

방광이행상피세포암 형성에서의
Human v-erbA related EAR-3 gene의 분석

목적: 방광암은 비뇨생식기계 악성종양들중 가장 흔한 질환으로 그 예후는 종양의 세포분화도 및 병기와 연관되어 있다. 분자학적인 변화가 이러한 병리적인 변화들과 임상적인 발현을 선행하기 때문에 새로운 분자학적인 표지자는 조기 진단에 도움이 된다. 새로운 표지자의 대상으로는 정상조직과 종양조직간에 다르게 발현되는 유전자들이나 그로 인한 단백질산물이 될 수 있다. 저자들은 정상조직과 종양조직간에 다르게 발현되는 새로운 유전자를 찾아 방광암의 발생에 관여하는 새로운 인자를 분석하고자 하였다.
재료 및 방법: 2002년 이후 방광암으로 진단받은 39명의 환자들을 대상으로 경요도방광종양절제술을 시행하여 술중 방광암조직과 정상요로상피에 대한 조직생검을 통해 정상방광조직을 얻었다. 정상방광조직과 방광암조직을 대상으로 annealing control primer (ACP)-based Genefishing™ PCR를 이용하여 정상방광조직과 방광암조직간에 확실히 다르게 발현되는 mRNA의 양상을 선택하여 유전자를 인식하였으며, 선택된 유전자의 결과를 확인하기위해 방광암 환자들을 대상으로 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 시행하여 결과를 임상병리적인 변수들과 비교하였다.
결과: ACP-based Genefishing™ PCR를 시행한 결과 정상방광조직과 방광암조직간에 다르게 발현되는 유전자들 중의 하나로 EAR-3 (v-erbA related protein 3) gene이 발견되었고, 이 유전자는 정상방광조직표본에서는 발현되나, 방광암조직에서는 발현되지 않았다. 이러한 EAR-3 gene에 대한 RT-PCR를 39명의 환자들을 대상으로 시행한 결과 모든 환자들에서 임상병리적인 변수들에 상관없이 정상방광조직에서는 발현되는 EAR-3 gene이 방광암조직에서는 발현이 소실됨이 확인되었다.
결론: EAR-3 gene이 정상방광조직에서만 발현되고 방광이행상피세포암조직에서는 발현되지 않는다는 것을 발견하였다. 이를 통해 저자들은 EAR-3 gene이 방광이행상피세포암의 발생과정에 역할을 할 수도

있다는 것을 제시하였고 이러한 방광암조직들은 retinoids에 대한 저항성을 나타낼 것으로 추측할 수 있었다.

핵심되는 말 : 방광암, ACP-based GeneFishing™ PCR, RT-PCR, EAR-3 gene

방광이행상피세포암 형성에서의
Human v-erbA related EAR-3 gene의 분석

<지도교수 최 영 득>

연세대학교 대학원 의학과

함 원 식

Ⅰ. 서론

방광암은 전 세계적으로 9번째로 흔한 악성종양으로 모든 방광암의 95%는 이행상피세포암으로 보고되고 있다. 방광암으로 진단받은 환자의 70%는 진단 당시 표재성 (Ta 또는 T1)으로 발견되어 경요도방광종양절제술로 치료받는다. 그러나 술후 70%의 환자에서 재발하기 때문에 집중적인 추적 관찰이 요구되며, 더욱이 표재성 방광암의 15%는 침윤성의 좀더 공격적인 질환으로 진행하기 때문에 이러한 표재성 방광암환자들에서 조기 진단과 함께 질환의 진행에 대한 정확한 예측이 가능하다면 완치가 가능한 상태에서 적절한 치료를 할 수 있을 것이다.[1-3]

방광경검사는 방광내 악성 병변을 발견하는데 기본이 되는 검사방법이나, 침습적이며, 노동집약적이고, 또한 상피내암종 (carcinoma in situ)같은 작거나 편평한 병변들은 발견하지 못하는 단점이 있다.[1] 요세포검사는 비침습적이며, 방광경검사를 보완하기 위해 흔히 임상에서 사용하는 고도의 특이적 검사방법으로 상피내암종같은 높은 세포분화도의 병변 발견에는 신뢰성이 있으나, 판독의의 주관적인 판단에 따라 진단이 달라지고 상대적으로 낮은 감수성 때문에 진단적인 가치는 제한되어 있는 상황이다.[4,5]

현재까지 방광암환자의 추적관찰계획과 치료과정에 대한 중요 결정요인은 종양의 병기와 세포분화도이다. 그러나 병리적인 판단에 의존한 종양의 병기 및 세포분화도의 결정은 판독에 따라 달라지는 경향이 있고, 이러한 변수들은 아직까지 질환의 진행경로를 충분히 정확히 예측하지 못하는 상황이다.[6,7] 분자학적 변화들이 이러한 병리적인

변화들과 임상적인 진행을 선행하기 때문에, 이러한 분자학적 변화들을 파악할 수 있다면 예후에 관한 정보들을 조기에 얻을 수 있을 것이다. DNA ploidy와 같은 분자의 거대한 변화들과 여러 염색체들의 변화들이 방광암의 침윤성 병변으로의 진행과 연관있다고 밝혀졌다.[8,9] DNA의 변화들 외에도 p53과 RB gene과 같은 경우에서와 같이 mRNA 발현정도의 차이가 방광암의 진행과 연관이 있다고 보고되고 있다. Human chorionic gonadotropin, keratinocyte growth factor receptor, epidermal growth factor receptor, hTERT, E-cadherin 그리고 clusterin의 예들이 그런 경우에 해당한다.[10-16] 그러나 이런 각각의 표지자들의 감수성은 아직까지 너무 낮아 임상적용이 어려우며, 방광암의 임상적인 진행경로를 정확히 예측하지 못하는 상황이기 때문에 새로운 표지자들에 대한 필요성은 계속되고 있는 상황이다.

새로운 분자학적 표지자의 대상으로는 정상조직과 종양조직사이에 다르게 발현되는 유전자들 (differentially expressed genes, DEGs) 또는 그로 인한 단백질산물들이 될 수 있다. 이에 같은 환자의 방광암조직과 정상방광조직을 구별한 후, ACP-based Genefishing™ PCR를 이용하여 두 조직에서의 mRNA의 발현차이를 보이는 유전자들을 탐색하였다. 1개의 특정 유전자 (EAR-3 gene)가 정상조직에서만 발현되고 종양조직에서는 발현되지 않아, 이러한 발현양상을 RT-PCR를 통해 확인하여 방광이행상피세포암의 형성에 관여하는 새로운 인자를 분석하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 연구대상

2002년 6월에서 2004년 11월까지 본원에서 방광암으로 진단되어 경요도방광종양절제술를 시행받은 환자 중 방광암조직과 정상방광조직이 동시에 존재하는 39명의 환자를 대상으로 하였다. 방광암 환자에서 경요도방광종양절제술을 시행 후 생리식염수로 방광 내부를 충분히 세척후 방광암 부위의 3cm 이상 먼 방광암 의심 병변이 없는 부위에서 정상요로상피에 대한 조직을 얻었다. 모든 조직표본들은 -80℃로 동결 보관하여 일률적으로 사용하였다.

표재성 방광암환자 (n=26)의 경우 경요도방광종양절제술후 22명에서 추가적인 방광내 관류요법으로 치료받았다. 침윤성 방광암환자 (n=13)중 경요도방광종양절제술후 9명에서 근치적 방광적출술을 시행받았으며, 4명은 술후 항암화학요법를 시행받았다 (표 1).

방광암의 병리학적 소견은 모두 이행상피세포암이었으며, 정상방광조직은 병리의사에 의해 정상방광조직 생검표본내에 종양세포가 없음을 확인하였다. 방광암의 세포분화도결정을 위해 WHO와 ISUP 기준을 사용하였고,[17] 병기결정을 위해 TNM 분류기준을 사용하여 임상병리적인 변수들을 평가하였다.[18] RNA 추출전에 모든 방광암조직표본들에서의 종양세포의 비율을 병리의사가 평가하였다.

표 1. Patient dermographics.

	Patients analyzed for mRNA expression via RT-PCR (n= 39)
Age (yr)	
Mean	61
Range	23-80
Sex	
Male	30
Female	9
Pathologic tumor stage	
Ta	2
T1	24
T2	9
T4	4
Total no. superficial tumors (Ta + T1)	26
Total no. invasive tumors (T2 + T4)	13
Grade	
low	17
high	22

2. 연구방법

종양조직과 정상조직에서 총 RNA를 추출하였다. 모든 조직표본들은 무균의 막자 (sterile pestle)를 이용하여 1ml의 Ultraspec II (Biotecx Lab., Houston, TX, USA)에 넣어 분쇄하였다. 제조사의 포로토콜을 따른 통상의 처리과정을 거쳐, 추출한 RNA를 260^{nm} 흡광도에서 정량하고, 일부는 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 'Lab On a Chip' (developed by Agilent Technologies, Waldbronn, Germany, in co-operation with Caliper Technologies, Mountain View, California, USA)법으로 정량분석하여 RNA비율이 1이상인 mRNA만을 취하여 사용하였다.

First strand cDNA 합성을 위해 역전사는 3μg 정제된 total RNA, 4μl 5 X reaction buffer (Promega, Madison, WI, USA), 5μl dNTPs (각각 2mM), 2μl 10μM cDNA 합성 primer dT-ACP1 (5'-CGTGAATGCTGCGACTACGATIIIII$(T)_{18}$-3'), 0.5μl RNasin RNase Inhibitor (40U/μl; Promega), 그리고 1μl Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (200U/μl; Promega, Madison, WI, USA)를 초기 용량 20μl로 42℃에서 1.5시간동안 시행하였다. 역전사후 first strand cDNAs는 GeneFishing™ PCR용 ultra-purified water 80μl로 희석하고 사용시까지 -20℃에 보관하였다.

Second strand cDNA 합성과 일련의 PCR 반응은 단일 튜브내에서 시행되었다. Second strand cDNA 합성은 50℃에서 3-5μl (약 50ng) 희석된 first strand cDNA, 10μl 2 X Master Mix (Seegene, Seoul, Korea), 1μl 10μM dT-ACP2, 1μl 10μM 임의의 ACP를 25μl의 용량으로 반응하였다. PCR 반응은 94℃에서 1분, 50℃에서 3분, 그리고 72℃에서 1분간 진행된 후 40회의 증폭 cycles이 시행되었다. 각각의 cycle은 94℃에서 40초간의 denaturation 과정, 65℃에서 40초간의 annealing 과정, 그리고 72℃에서 40초간의 extension 과정을 거친 후, 72℃에서의 5분간의 최종 extension 과정을 통해 PCR 반응을 완료하였다. PCR 산물들은 2% agarose gels에 분리한 후 ethidium bromide로 염색하였다.

Gel위에 전기영동하여 발현차이가 있는 cDNA bands를 잘라내어 재증폭한 후 TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 클로닝하고, ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 automatic sequencing을 수행하고 National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank의 BLASTX 탐색프로그램을 이용하여 분석하였다.

ACP-based Genefishing^{TM} PCR의 결과를 입증하기 위해 RT-PCR를 39명의 환자들의 두 조직들에 대해 시행하였다. First strand cDNA는 human β-actin gene으로 정상화하고, 정상화된 cDNA를 template로 사용하였다. PCR반응은 2-4μl (약 50ng) 희석된 first strand cDNA, 10μl 2 X Master Mix (Seegene, Seoul, Korea), 1μl 10 μM primer 5', 1μl 10μM primer 3'의 25μl로 하였다. PCR 반응은 94℃에서 3분간 처음 시행 후 25회의 증폭 cycles이 이루어졌다. 각각의 cycle은 94℃에서 40초간의 denaturation 과정, 60℃에서 40초간의 annealing 과정, 그리고 72℃에서 40초간의 extension 과정으로 거친 후 72℃에서의 5분간의 최종 extension 과정을 통해 완결되었다. PCR 산물들은 2% agarose gels위에 전기영동되어 ethidium bromide로 염색되었다.

3. 자료분석

39명의 환자들에게 시행한 RT-PCR의 결과에 대해 χ^2 test를 시행하여 두 조직간에 다르게 발현된 유전자와 임상병리적 변수들 간의 상관관계를 비교하였다. SAS (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) computer software를 이용하여 통계분석을 시행하였고, $p<0.05$인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결과

1. ACP-based GeneFishing™ PCR 결과

방광이행상피세포암조직과 정상방광조직이 함께 동결 보관된 39명의 환자들을 대상으로, 두 조직에서의 mRNA의 발현차이를 보이는 유전자들 (DEGs)을 탐색하기 위해 정상조직 및 종양조직에서 추출된 mRNA를 ACP-based Genefishing™ PCR kit (See-Gene, Seoul, Korea)의 120개의 임의의 primers (forward primer)와 2개의 anchored oligo(dT) primers (reverse primer)를 이용하여 ACP-based GeneFishing™ PCR을 시행하였다. agarose gel위에 전기영동하여 발현의 차이가 있는 mRNA band를 잘라내어 재증폭한 후 TA cloning vector를 이용하여 cloning하고, ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer로 automatic sequencing을 수행하고 NCBI GenBank의 BLASTX 검색프로그램을 이용하여 DEGs를 파악하였다. 정상조직과 암조직에서 유전자 발현의 차이를 보이는 인자중 EAR-3 gene이 정상방광조직에서만 발현되고 종양조직에서는 발현되지 않았다.

2. RT-PCR 결과

방광암 환자 39명에서 정상조직과 종양조직에 대해 EAR-3 gene의 상태를 RT-PCR로 확인하였다. ACP-based GeneFishing™ PCR의 결과와 같이 RT-PCR에서도 39명의 환자 모두에서 정상조직에서만 EAR-3 gene이 발현되고 종양조직에서는 발현되지 않았다 (그림 1).

이러한 EAR-3 gene은 방광암의 병기와 세포분화도 차이에 따른 통계적인 유의성없이 모든 종양조직에서 음성으로 나타났다 ($p > 0.05$) (표 2).

그림 1. RT-PCR product analysis by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide. it shows EAR-3 gene in bladder cancer tissue (C) and normal bladder tissue (N) for each patients with intensity rate; the second line represents internal control β-actin loading.

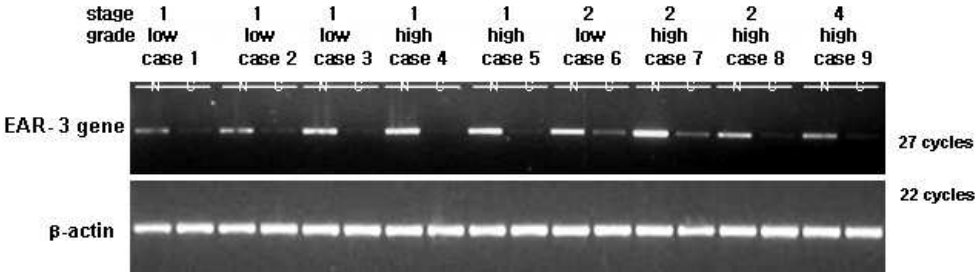

표 2. EAR-3 mRNA-positive case numbers and sensitivity results between superficial and invasive tumor types

Variable	Patients	Positive EAR-3 PCR
Stage		
pTa	2	0 (0%)
pT1	24	0 (0%)
pT2	9	0 (0%)
pT4	4	0 (0%)
Grade		
low	17	0 (0%)
high	22	0 (0%)
NL tissue	39	39 (100%)

Numbers in parentheses are percentages. These percentages indicate the sensitivity of the RT-PCR method for EAR-3.

Ⅳ. 고찰

종양형성은 많은 종양유전자들과 종양억제물질들이 관여되어 이루어지는 복잡한 다단계의 과정으로 인간에게 발생하는 다양한 종양들에 대해 그 형성에 관여하는 인자들에 대한 연구는 지금까지 계속되고 있으나, 현재까지 종양형성에 관여하는 인자들은 제한적으로만 밝혀진 상태이다. 요로생식기계 악성 종양중 가장 치명적인 질환들 중의 하나로 최근 부각되고 있는 방광암의 경우도 형성, 진행, 재발 및 예후척도에 대해 많은 인자들이 보고되고 있으나, 현재까지 임상에 적용할 만큼 효과적인 인자는 아직 없는 상태로 질환의 조기 진단을 위한 새로운 분자학적 표지자에 대한 연구는 계속되고 있다.

새로운 분자학적 표지자의 대상으로는 정상조직과 종양조직사이에 다르게 발현되는 유전자들 또는 그로 인한 단백질산물들이 될 수 있다. 이에 저자들은 같은 환자의 방광암조직과 정상방광조직을 구별하여 두 조직에서의 mRNA의 발현차이를 보이는 유전자를 탐색한 후 이를 RT-PCR을 통해 확인하였다. 즉, 방광이행상피세포암조직과 정상방광조직을 대상으로 두 조직에서의 mRNA의 발현차이를 보이는 유전자를 탐색하기위해 Hwang 등[19-22]의 연구에 의해 유용하다고 밝혀진 ACP-based GeneFishing™ PCR를 시행하여 우선 두 조직간에 다르게 발현된 유전자들을 파악하였다. 그 결과 정상조직에서는 발현되는 mRNA band 1개가 종양조직에서는 발현되지 않는 것으로 나타나, 그 특정 mRNA band를 상기 과정에 기술한 대로의 처리과정을 거쳐 논문 검색을 한 결과 EAR-3 gene으로 밝혀졌다.

이러한 EAR-3 gene이 실제 다른 환자들에서도 정상조직에서만 발현되고 종양조직에서는 발현되지 않는지 확인하기 위해 39명의 환자들을 대상으로 EAR-3 gene에 대한 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 39명의 환자 모두에서 정상조직에서만 EAR-3 gene이 발현하는 것으로 나타났고, 방광이행상피세포암조직에서는 발현하지 않는 것으로 나타났다. 종양조직에서 EAR-3 gene이 발현되지 않는 것은 종양의 병기, 세포분화도와는 상관없이 모든 종양조직에서 동일하게 관찰되었다.

저자들의 연구에서 정상방광조직에서만 존재하고 방광이행상피세포암조직에서는 존재하지 않는 것으로 나타난 EAR-3 gene은 1988년 Miyajima 등[23]에 의한 cDNA cloning을 통한 분석에 의해 밝혀진

human v-erbA related genes중의 하나로, 이 독립적인 연구와는 별도로 처음에는 chicken ovalbumin promoter내의 direct repeat regulatory element에 결합하는 homodimer로 발견되어 이에 chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI)로 명칭되었고, 이후에 이어 COUP-TFII가 발견되어 그것 또한 다른 연구진들에 의해 apolipoprotein regulating protein 1 (ARP-1)으로 독립적으로 clone되어 밝혀져 그동안 연구되었다.[24-28] 이처럼 같은 region에 대해 여러 명칭들이 존재하는 것은 특히 발견의 순간에 그들의 기능에 의해 묘사될 수 없는 orphan receptors의 경우 급한 문제를 야기하여 중복된 region에 대한 명칭들의 과잉으로 인해 혼란이 점점 증가하고 새로운 지식을 획득하는데 장애물로 작용하게 되었다. 이에 nuclear receptor superfamily에 대한 통일된 명칭체계를 사용하자는 주장이 제시되어 현재 EAR-3/COUP-TFI는 NR2F1으로 분류되고 있고, ARP-1/COUP-TFII는 NR2F2로 분류되어 표기되고 있다.[29]

Nuclear receptors는 ligand-activated transcription factors로 이에 속하는 steroid/thyroid hormone receptor (TR) superfamily는 세포발달, 분화, 항상성 유지에 관여하는 중요한 기능을 한다.[30] ligand가 없는 경우 nuclear receptor는 nuclear corepressor (NCoR), silencing mediator of retinoid and thyroid receptors (SMRT), SUN-CoR, Alien 등과 같은 여러 corepressors와 결합함으로서 다양한 histone deacetylase complexes를 동원하여 결과적으로 promoter region 주위의 chromatin내의 histones의 deacetylation을 가져와 대상 gene의 발현억제효과를 나타낸다.[31-34] 기원이 같은 (cognate) ligand와 결합하는 경우 수용체의 ligand-binding domain (LBD)에 중심된 입체형태적인 변화가 발생하여, corepressors와 분리되고, coactivators와 histone acetyltransferases를 동원하게 되어 promoter region의 결과적인 histone acetylation과 대상 gene의 발현을 가져오게 된다.[35]

Orphan receptor는 ligands가 아직까지 밝혀지지 않은 nuclear receptor를 의미하는 것으로 COUP-TFs는 그동안 가장 많은 연구가 이루어져 온 orphan receptors중의 하나로, sequence를 분석한 결과 steroid/TR superfamily의 member에 속하는 것으로 밝혀졌다. 기존의 많은 연구들에 의하면 EAR-3/COUP-TFI과 ARP-1/COUP-TFII는 여러 기관들에서 발현되는 서로 밀접히 연관된 transcription factors

로 신경발생, 기관발생, 세포의 운명결정, 대사적 항상성유지와 같은 여러 중요한 생물학적 과정들의 조절에 관여한다. 두 genes는 특별한 homology와 서로 겹치는 발현양상들을 보여 중복된 기능들을 나타낼 수 있을 것으로 제시되고 있으나, 각각의 인자는 발생도중 서로 구별되는 고유의 발현특징을 보인다고 한다.[36-38]

COUP-TFs는 homodimer를 형성하거나 retinoid X receptor (RXR)와 몇몇의 다른 nuclear receptors과 heterodimer를 형성하여 다양한 spacings의 불완전한 AGGTCA direct 또는 inverted repeats를 포함한 다양한 response elements에 결합한다.[39,40] 연구 초기에는 chicken ovalbumin gene의 transcriptional activator로 밝혀졌지만,[25] 일반적으로는 retinoid acid receptor (RAR), TR, vitamin D receptor (VDR), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) 등과 같은 다른 nuclear hormone receptors에 대한 transcriptional repressors로 알려지고 있다.[40-42] COUP-TFs의 억제효과를 설명하는 4가지 기전은 현재까지 다음과 같다. 첫 번째 기전은 결합부위 선점에 대한 경쟁으로, COUP-TFs는 PPAR, VDR, TR, RAR에 의한 대상 gene의 hormonal induction을 이용가능한 결합부위에 대한 수용체들과의 직접적인 경쟁을 통해 억제한다. 이러한 억제는 RAR의 발현증가에 의해 해소되는데 이는 대상 수용체의 retinoid response element 결합에 대해 경쟁함으로서 retinoid response를 음성적으로 조절할 수 있다는 것을 제시하는 것으로 다른 수용체들과도 비슷한 기전으로 억제하는 것으로 밝혀지고 있다. 두 번째 기전은 RXR과의 경쟁으로 RAR, TR, VDR, PPAR, 그리고 다른 orphan receptors과 일반적인 heterodimeric partner로 작용하는 RXR과 DNA-binding heterodimers를 형성하여, 결과적으로 RXR를 격리하는 효과를 가져와 RXR의 이용가능한 농도를 감소시킨다. RXR의 감소는 간접적으로 TR, VDR, RAR, PPAR의 DNA 결합 친화력을 감소시켜 이러한 수용체들이 대상 genes를 활성화시키는 잠재능력을 방해하게 된다. 세 번째 기전은 적극적인 억제 (active repression)로 COUP-TFs가 TR, RAR의 경우와 비슷한 추정의 LBD의 c-terminus 내에 적극적인 silencing domain을 가지고 있다는 것이다. 다양한 집단의 transactivators를 억제할 수 있다는 것은 TR, RAR subfamily의 members에 흔한 corepressors를 이용하여 체내에서 억제물질로 작용

할 수 있다는 것으로, 특정 ligands가 없을 경우 histone deacetylases와 연관되는 RAR/RXR, TR/RXR의 경우와 비슷한 기전으로 전사를 억제할 수 있다고 생각되어진다. 네 번째 기전은 transrepression으로 nuclear hormone receptors의 LBD에 직접 결합함으로서 전사를 억제하는 것으로 그들의 cognate response elements없이 LBD-LBD 상호관계를 통해 DNA에 구속될 수 있는 것을 의미한다.

이러한 억제기능 외에 COUP-TFs는 많은 다른 genes에 대해 양성적인 조절인자들로 작용할 수도 있다. 첫 번째 기전은 DNA response element에 결합함으로서 직접적인 활성화를 일으키는 것이고, 두 번째 기전은 전사 활성화에 대해 보조적인 인자들로 작용함으로서 간접적인 활성화를 일으키는 것이다. 세 번째 기전은 DNA-bound factor에 대해 단백질-단백질 상호작용으로 활성화하는 것이다. 이처럼 COUP-TFs은 gene 발현에 활성화물질, 또는 억제물질로 작용할 수 있으나 아직까지 이러한 기능적인 양면성의 기전에 대해서는 정확히 알려져 있지 않은 상태로 일부 기전은 COUP-TFs와 작용하는 coregulator proteins의 종류에 따라 달라질 수 있고, 또한 대상 genes의 promoter 환경에 따라서도 달라질 수 있다고 추측되어 지고 있다.[43]

최근에는 방광암을 포함한 여러 악성종양들의 치료 및 예방을 위한 약제로 각광받아 많은 연구가 이루어지고 있는 retinoids의 치료효과에 COUP-TFs가 연관되어 있다는 여러 연구들이 보고되고 있다. 이러한 retinoids의 효과는 RAR, RXR의 두 가지 수용체에 의해 주로 매개되는데, 세 개의 다른 genes (α, β, γ)에 의해 암호화되고 주로 RXR/RAR heterodimers의 형태로 체내에서 transcription factors로 작용한다. 이러한 수용체들에 retinoids가 결합하면 수용체의 입체형태적인 변화를 야기하여 RA response elements (RAREs)를 포함하는 genes의 전사를 작동시킨다. retinoid receptors는 RAREs를 포함하는 genes에 대한 양성적인 조절 외에, 그들의 ligands에 반응하여 tumor promoter인 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)와 종양세포 증식에 관여하는 activator protein 1 (AP-1) complex의 구성요소인 원발암유전자 c-Jun과 c-Fos의 transcriptional activity에 의해 유발되는 효과들을 억제할 수 있다. TPA 또는 TPA response elements (TREs)를 통한 c-Jun/c-Fos에 의한 AP-1 responsive genes의 활성

화는 ligand에 의존하는 방식으로 retinoid receptors에 의해 억제되고, 이와 반대로 AP-1은 retinoid receptors의 transactivation을 억제하는 효과를 나타낸다. 이러한 상호적인 antagonism은 세포성장 및 분화조절에 중요한 역할을 하는 것으로 나타나고 있으나, retinoids가 AP-1의 기능을 억제하는 기전은 아직까지 명확하지 않은 상태이다. 기존의 연구들에 따르면 COUP-TFs는 여러 RAREs에 결합하는 높은 친화력 또는 RXR과의 heterodimerization을 통해 retinoid response를 조절할 수 있다고 하였고, 최근 연구들에서는 COUP-TFs가 trans-RA에 의한 종양세포 성장억제에 필요하고, COUP-TFs의 효과가 부분적으로 여러 종양세포들에서 retinoids에 의한 성장억제를 매개하는 RARβ를 유도하기 때문인 것으로 밝혀지기도 하였다. 또한 COUP-TFs 발현과 AP-1 활동성을 억제하는 trans-RA의 능력이 여러 종양세포주 (cancer cell line)들에서 양성적인 연관성이 있음이 보고되었고, COUP-TFs의 발현은 trans-RA 의존적인 또는 비의존적인 방식으로 TPA에 의한 AP-1 transactivation과 c-Jun/c-Fos의 transactivation을 강력히 억제한다고 하였다. trans-RA에 의한 AP-1 antagonism을 항진하는 COUP-TFs의 효과는 RARs의 발현이 있어야 나타났는데 이를 통해 COUP-TFs과 AP-1의 상호작용이 종양세포들에서의 retinoids의 anti-AP-1 활동성을 조절하는데 연관되어 있고, retinoid와 AP-1의 signaling 사이의 cross-talk에 COUP-TFs가 중요한 역할을 할 것이라고 제시되었다. RA에 저항성을 나타내는 종양세포주들의 대부분에서 COUP-TFs가 발현되지 않는 것으로 보아 종양세포들에서 RA 저항성획득에 COUP-TFs의 발현소실이 중요한 기전으로 작용할 것으로 추측되었다. COUP-TFs의 발현이 RARβ의 발현과 RA의 항암작용에 필수적이라는 연구결과는 COUP-TFs 발현의 소실기전을 이해하는 것이 종양세포에서의 retinoid 저항성과 연관된 결손들을 이해하는데 중요할 것이라는 것을 추측할 수 있게 하고, 유방암 발생 조기단계에 RARβ 발현이 소실된다는 것은 COUP-TFs가 종양발생에 역할을 할 수도 있다는 것을 암시하게 한다.[44-48]

본 연구에서 저자들은 EAR-3/COUP-TFI mRNA가 정상방광조직에서는 발현되나 방광이행상피세포암조직에서는 발현되지 않는 것을 확인함으로서 EAR-3/COUP-TFI gene이 방광이행상피세포암의 발생과정에도 역할을 할 수도 있다는 것을 제시하였고, 이러한 방광암조

직들은 retinoids에 대한 저항성을 나타낼 것으로 추측할 수 있었다. 앞서 언급한 연구들에서 제기되었던 것처럼 EAR-3/COUP-TFI이 그들의 ligands에 의해 anti-AP-1 활동성을 조절하는지, 또한 그렇다면 어떠한 기전에 의해 그런 작용을 하는지에 대한 질문이 해결되어야 하는 상황으로 결국 orphan receptor인 EAR-3/COUP-TFI의 기능을 이해하기 위해서는 대상 genes와 ligands 파악을 위한 추가적인 연구가 지속되어야 하며 이를 통해 최종적으로 세포발생과 생존에 필수적인 orphan receptors의 신호전달경로에 대한 해명이 가능하게 되어 전사조절에 대한 새로운 기전을 발견할 수 있을 것이다.

Ⅴ. 결론

방광이행상피세포암의 조기 진단 및 질환의 진행예측을 위한 효과적인 분자학적 표지자는 아직까지 존재하지 않는 상태이다. 정상방광조직과 방광암조직간에 다르게 발현되는 새로운 유전자를 확인함으로서 방광암에 대한 새로운 표지자의 대상을 찾고자 하는 연구를 한 결과 EAR-3/COUP-TFI gene이 정상방광조직에서만 발현되고 방광이행상피세포암조직에서는 발현되지 않는다는 것을 발견하였다. 이를 통해 저자들은 EAR-3/COUP-TFI gene이 방광이행상피세포암의 발생과정에도 역할을 할 수도 있다는 것을 제시하였고, 이러한 방광암조직들은 retinoids에 대한 저항성을 나타낼 것으로 추측할 수 있었다.

참고문헌

1. Scher HI, Shipley WU, Herr HW. Cancer of the bladder. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer: principles and practice of oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p.1300-1322
2. Kroft SH, Oyasu R. Urinary bladder: mechanisms of development and progression. Lab Invest 1994;71:158-174
3. Kiemeney LA, Witjes JA, Verbeek AL, Heijbroek RP, Debruyne FM. The clinical epidermiology of superficial bladder cancer. Dutch South-East Cooperative Urological Group. Br J Cancer 1993;67:806-812
4. Matzkin H, Moinuddin SM, Soloway MS. Value of urine cytology versus bladder washing in bladder cancer. Urology 1992;39:201-203
5. Halachmi S, Linn JF, Amiel GE, Moskovitz B. Nativ O. Urine cytology, tumour markers and bladder cancer. Br J Urol 1998;82:647-654
6. Ooms EC, Anerson WA, Alons CL, Boon ME, Veldhuizen RW. Analysis of the performancer of pathologists in the grading of bladder tumors. Hum Pathol 1983;14:140-143
7. Tosoni I, Wagner U, Sauter G, Egloff M, Knonagel H, Alund G, et al. Clinical significance of interobserver differences in the staging and grading of superficial bladder cancer. BJU Int 2000;85:48-53
8. Dorkin TJ, Robson CN, Neal DE. The molecular pathology of urological malignancies. J Pathol 1997;183:380-387
9. Cordon-Cardo C. Molecular alterations in bladder cancer. Cancer Surv 1998;32:115-131
10. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC. et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. N Engl J Med 1994;331:1259-1264
11. Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA. Loss of heterozygosity at

the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. Oncogene 1991;6:2305-2309
12. Xu HJ, Cairns P, Hu SX, Knowles MA, Benedict WF. Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlated with loss of hererozygosity at the RB locus and tumor progression. Int J Cancer 1993;53:781-784
13. Lazar V, Diez SG, Laurent A, Giovangrandi Y, Radvanyi F, Chopin D, et al. Expression of human chorionic gonadotropin beta subunit genes in superficial and invasive bladder carcinomas. Cancer Res 1995;55:3735-3738
14. Diez de Medina SG, Chopin D, El Marjou A, Delouvee A, LaRochelle WJ, Hoznek A, et al. Decreased expression of keratinocyte growth factor receptor in a subset of human transitional bladder carcinomas. Oncogene 1997;14:323-330
15. Kok JB de, Schalken JA, Aalders TW, Ruers TJ, Willems HL, Swinkels DW. Quantitative measurement of telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in urothelial cell carcinomas. Int J Cancer 2000;87:217-220
16. Miyake H, Gleave M, Kamidono S, Hara I. Overexpression of clusterin in transitional cell carcinoma of the bladder is related to disease progression and recurrence. Urology 2002;59:150-154
17. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. The bladder Consensus Conference Committee. Am J Surg Pathol 1998;22:1435-1448
18. Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer (UICC). Urinary bladder. TNM classification of malignant tumors. 5th ed. New York: John Wiley&Sons, Inc.; 1997
19. Hwang KC, Cui XS, Park SP, Shin MR, Park SY, Kim EY, et al. Identification of diifferentially regulated genes in bovine blastocysts using an annealing control primer system. Mol Reprod Dev 2004;69:43-51

20. Hwang KC, Lee HY, Cui XS, Kim JH, Kim NH. Identification of maternal mRNAs in porcine parthenotes at the 2-cell stage: a comparison with the blastocyst stage. Mol Reprod Dev 2005;70:314-323
21. Hwang IT, Kim YJ, Kim SH, Kwak CI, Gu YY, Chun JY. Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. Biotechniques 2003;35:1180-1184
22. Kim YJ, Kwak CI, Gu YY, Hwang IT, Chun JY. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. Biotechniques 2004;36:424-434
23. Miyajima N, Kadowaki Y, Fukushige SI, Shimizu SI, Semba K, Yamanashi Y, et al. Identification of two novel members fo erbA superfamily by molecular cloning: the gene products of the two are highly related to each other. Nucleic Acids Res 1988;16:11057-11074
24. Pastorcic M, Wang H, Elbrecht A, Tsa SY, Tsai M-J, O'Malley BW. Control of transcription initiation in vitro requires binding of transcription factor to the distal promoter of the ovalbumin gene. Mol Cell Biol 1986;6:2784-2791
25. Sagami I, Tsai SY, Wang H, Tsai M-J, O'Malley BW. Identification of two factors required for transcription of the ovalbumin gene. Mol Cell Biol 1986;6:4259-4267
26. Wang LH, Tsai SY, Cook RG, Beattie WG, Tsai M-J, O'Malley BW. COUP tanscription factor is a member of the steroid receptor superfamily. Nature 1989;340:163-166
27. Wang LH, Ing NH, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai M-J. The COUP-TFs compose a family of functionally related transcription factors. Gene Expr 1991;1:207-216
28. Ladias JA, Karathanasis SK. Regulation of the apolipoprotein AI gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily. Science 1991;251:561-565
29. Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. Cell 1999;97:161-163

30. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 1988;13:889-895
31. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. Nature 1995;377:454-457
32. Horlein AJ, Naar AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. Nature 1995;377:397-404
33. Zamir I, Harding HP, Atkins GB, Horlein A, Glass CK, Rosenfeld MG, et al. A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains. Mol Cell Biol 1996;16:5458-5465
34. Dressel U, Thormeyer D, Altincicek B, Paululat A, Schneider S, Tenbaum S, et al. Alien: a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for nuclear hormone receptors. Mol Cell Biol 1999;19:3383-3394
35. Wolffe AP. Sinful repression. Nature 1997;387:16-17
36. Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. Cell 1995;83:841-850
37. Ritchie HH, Wang LH, Tsai S, O'Malley BW, Tsai M-J. COUP-TF gene: a structure unique for the steroid/thyroid receptor superfamily. Nucleic Acids Res 1990;18:6857-6862
38. Qiu YH, Tsai SY, Tsai M-J. COUP-TF: An orphan member of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily. Trends Endocrinol Metab 1994;5:234-239
39. Tsai SY, Tsai M-J. Chick ovalbumin upstream promoter transcription factors (COUP-TFs): coming of age. Endocr Rev 1997;18:229-240
40. Cooney AJ, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai M-J. Chicken ovalbumin upstream promoter trancription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTCA response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D3, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. Mol Cell Biol

1992;12:4153-4163
41. Ladias JA, Hadzopoulou-Cladaras M, Kardassis D, Cardot P, Cheng J, Zannis V, et al. Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII, and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1,EAR-2, and EAR-3. J Biol Chem 1992;267:15849-15860
42. Leng X, Cooney AJ, Tsai SY, Tsai M-J. Molecular mechanisms of COUP-TF-mediated transcriptional repression: evidence for transcription and active repression. Mol Cell Biol 1996;16:2332-2340
43. Park JI, Tsai SY, Tsai M-J. Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. Keio J Med 2003;52:174-181
44. Wu Q, Li Y, Liu R, Agadir A, Lee MO, Liu Y, et al. Modulation of tetinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization. The EMBO journal 1997;16:1656-1669
45. Lin B, Chen GQ, Xiao D, Kolluri SK, Cao X, Su H, et al. Orphan receptor COUP-TF is required for induction of retinoic acid receptor β, growth inhibition, and apoptosis by retinoic acid in cancer cells. Mol Cell Biol 2000;20:957-970
46. Lin F, Kolluri SK, Chen GQ, Zhang XK. Regulation of retinoic acid-induced inhibition of AP-1 activity by orphan receptor chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor. J Biol Chem 2002;277:21414-21422
47. Widschwendter M, Berger J, Daxenbichler E, Muller-Holzner A, Widschwendter A, Mayr C, et al. Loss of retinoic acid receptor expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. Cancer Res 1997;57:4158-4161
48. Xu XC, Sneige N, Liu X, Nandagiri R, Lee JJ, Lukmanji F, et al. A progressive decrease in nuclear retinoic acid receptor β message RNA levels during breast carcinogenesis. Cancer Res

1997;57:4992-4996

Abstract

Analysis of human v-erbA related EAR-3 gene
in the development of
bladder transitional cell carcinoma

Won Sik Ham

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Young Deuk Choi)

Purpose: Bladder cancer is one of the most common diseases among urogenital cancers and its prognosis is related to tumor grade and stage. Because these pathological changes and clinical manifestations are preceded by molecular alterations, new molecular markers are needed in early diagnosis of the disease. New target molecular biomarkers can be differentially expressed genes (DEGs) or their protein products between normal and cancer tissues. We tried to find a new DEG between normal and cancer tissues and demonstrate that it may be related to the development of the bladder cancer.

Materials and Methods: Bladder cancer tissues were obtained from 39 patients with urothelial cell carcinoma (UCC), treated by transurethral resection of tumor (TURT) since 2002. Biopsies from normal urothelium, obtained from the same patients during TURT were used as normal bladder tissues. We compared the mRNA profiles between normal and cancer tissues using ACP-based Genefishing™ PCR to identify the DEGs in normal and cancer tissues of one same patient. To validate the result of ACP-based GeneFishing™ PCR, RT-PCR was performed on those of 39

patients and those results were correlated to clinicopathologic parameters.
Results: According to the result of ACP-based Genefishing™ PCR, EAR-3 gene which was found as one of DEGs between normal and cancer tissues was cloned only in normal tissues but cancer tissues. The expression pattern that EAR-3 gene was expressed only in normal tissues but cancer tissues irrespective of the clinicopathologic parameters was confirmed by RT-PCR in 39 patients.
Conclusions: EAR-3 gene was expressed only in normal tissues but cancer tissues. Therefore, we suggested that EAR-3 gene may be also play a role in bladder cancer development and retinoid resistance will be observed in these bladder cancer tissues.

Key Words : bladder cancer, ACP-based GeneFishing™ PCR, RT-PCR, EAR-3 gene