현미부수체 불안정성 위암에서
암 관련 유전자의 메틸화

연세대학교 대학원
의과학사업단
김 윤 희

현미부수체 불안정성 위암에서 암 관련 유전자의 메틸화

지도 김 호 근 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원
의과학사업단
김 윤 희

김윤희의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

감사의 글

보일 것 없고 부족하기만 한 저에게 언제나 큰 힘이 되어주시는 하나님께 감사를 드립니다. 짧은 시간이었지만 연구를 하는 데 있어서 새로운 눈을 뜨게 해주시고, 부족했던 제가 지금의 저로서 졸업하기까지 많은 기회와 격려를 해주신 김호근 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 논문을 마치기까지 많은 조언과 격려를 보내주신 박전한 선생님과 이진성 선생님께 감사 드리며, 뒤늦게 시작한 저의 새로운 출발을 함께 기뻐해 주시고 언제나 뒤에서 힘이 되어주신 박상옥 선생님, 이진우 선생님, 그리고 학부 때 교수님이신 김은희 선생님, 김하근 선생님께 감사를 드립니다. 가장 긴 시간을 함께 보내면서, 실험하는 데에 많은 조언과 관심으로 대해 준 김남균 선생님과 항상 미안한 내게 따뜻한 말로 격려해 준 친구 연락이, 배움 만큼이나 소중한 인연을 만난 것에 언제나 고맙고 기뻐할 정진언니, 명진이, 지은이, 그리고 우리 실험실 막내인 승연이에게 깊은 감사와 함께 언제나 발전하는 실험실이 되기를 바라는 맘을 전하고 싶습니다. 함께 시작하고 마치는 것만으로 힘이 되었던 주원이와 승진이, 처음 이곳에 와서 지금에 있기까지 어려울때마다 찾아가도 언제나 따뜻한 도움을 준 김선홍, 박기숙, 이재정, 차지영 선생님께 진심으로 감사드립니다. 힘들때마다 휴식이 되었던 은정언니와 귀여운 동생처럼 웃음을 주었던 은송이, 현정이, 지은이, 바쁘다고 연락없어도 항상 격려해 준 대학친구 은숙이, 윤미, 희정이, 은경이, 수진이, 용석이, 그리고 영미, 화진이, 가장 힘들었을 때 내 마음의 눈물 닦아 준 잊지 못할 윤희언니, 세월만큼이나 소중하고 있는 것만으로 힘이 되어준 가장 오래된 친구인 희정이와 영림이, 그리고 마치기까지 많은 소홀함에도 변함없이 따뜻한 희용이와 지면으로 옮기지 못한 저에게 격려를 해주신 많은 분들께 미흡하나마 이 논문으로 고마움을 전하고 싶습니다. 무엇보다도 공부한다고 잘 해드리지 못하는 하나밖에 없는 딸 언제나 큰 사랑으로 믿어주시는 아빠와 엄마, 같이 살면서 제대로 챙겨주지 못해도 불평 없는 오빠와 우리 집 귀여운 막내 준경이에게 이 세상 무엇보다도 소중하고 사랑한다는 말을 이 기회를 빌어 드리고 싶습니다. 그리고 지금을 시작으로 생각하고 배움에 있어서 언제나 겸손하며 감사할 줄 아는 윤희가 될 것을 고마우신 선생님들과 소중한 친구들과 사랑하는 가족 앞에 다짐하고 싶습니다.

저 자 씀

차 례

그 림 차 례

표 차 례

국문요약

현미부수체 불안정성 위암에서 암 관련 유전자의 메틸화

DNA 메틸화 (methylation)는 후생유전학적 변이 중의 한 과정으로서, 특히 promoter 부위의 CpG island 에 메틸화가 빈번하게 일어날 경우, 유전자의 전사 활성을 억제시키는 기능을 한다. 지금까지 promoter 부위의 DNA 메틸화가 많은 암에서 발견되어 왔으며, 종양억제 유전자의 메틸화에 의한 불활성화가 암 발생과 밀접한 관련이 있음이 제시되었다. DNA 메틸화에 의한 암 발생의 가장 좋은 예로서는 현미부수체 불안정성 (microsatellite instability, MSI)을 보이는 위암 (MSI-양성 위암)의 대부분에서 DNA 복제오류교정 유전자인 *hMLH1* 의 메틸화가 빈번하게 일어나며, 이후 표적 유전자들의 변이가 진행된다는 사실을 들 수 있다.

본 실험은 MSI-양성 위암에서 일어난 *hMLH1* promoter 부위의 메틸화가 선택적 변화인지 아니면 유전체 전반에 동반된 변화인지를 밝히기 위해, MSI-양성 위암의 메틸화를 *hMLH1* 유전자 및 4 개의 종양억제 유전자 (*p16, E-cadherin, Rb, VHL*)에 대하여 methylation-specific PCR (MSP)을 이용하여 DNA 메틸화를 각각 조사하였고, 유전체 전체의 메틸화 분석을 위해 각 예를 CpG island methylator phenotype (CIMP)으로 분류하여 비교 분석하였다.

연구대상으로는 20 예의 MSI-양성 위암과 18 예의 MSI-음성 위암을 선택하였다. MSI-양성 위암에서는 *hMLH1* 유전자의 메틸화 빈도가 월등히 높았고 (80%), *p16* 유전자는 10%의 빈도를 보였으며, 그 외 *E-cadherin, Rb, VHL* 에서

는 메틸화가 관찰되지 않았다. MSI-음성 위암에서는 *hMLH1* 과 *p16* 유전자의 메틸화는 없었으나, *E-cadherin* (11.1%)과 *Rb* (22.2%) 유전자에서 메틸화가 관찰되었다. CIMP 분석을 통해 유전체 전체의 메틸화 양상을 살펴본 결과, 총 위암조직 38 예 중 3 개 이상의 표지자에서 메틸화가 보였던 예 (CIMP+)가 2 예 (5.2%), 2 개의 표지자에만 메틸화가 보였던 예 (CIMP-I)가 7 예 (18.4%), 그리고 1 개 이하의 표지자에서만 메틸화가 있었던 예 (CIMP-)가 29 예 (76.4%) 였으며, 2 예의 CIMP+는 모두 MSI-양성 위암이었다.

이상의 결과는 MSI-양성 위암에서의 DNA 메틸화는 *hMLH1* 유전자에 선택적으로 일어나는 기전임을 시사한다.

핵심되는 말 : 메틸화, *hMLH1*, MSI, CIMP

현미부수체 불안정성 위암에서 암 관련 유전자의 메틸화

<지도교수 김호근 >

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 윤 희

Ⅰ. 서 론

암 발생은 세포 성장과 사멸에 관여하는 유전자들의 변이에 의한 것이라는 것은 잘 알려져 있으며,[1-3] 이러한 유전적 변이는 유전자 자체의 유전학적 변이와 후생유전학적 변이라는 두 가지 기전에 의해 이루어진다.[4-5] DNA 메틸화 (methylation)는 암 발생과 관련이 있는 포유동물세포의 후생유전학적 변형 (epigenetical modification)중의 하나로서, 주로 guanosine의 5'의 cytosine (CpG dinucleotide)에서 일어난다. 이러한 CpG dinucleotide는 종종 유전자의 5' 말단에서 약 0.5 kb-3 kb 길이의 cluster (CpG island)를 형성하고 있으며, 대부분 promoter 부위에 위치하고 있다.[6] 사람의 성숙한 세포에서는 CpG dinucleotide의 약 70%정도가 메틸화되어 있고, 이러한 promoter 부위의 메틸화는 promoter와 전사인자의 결합을 저해하고 methyl-binding protein (MBP)의 결합을 유도함으로써 전사 활성을 억제하는 기능을 하는데, 이러한 유전자 전사 활성 억제는 여성에서 X-염책체의 불활성화,[7] embryonic development,[8] aging,[9] imprinting[10] 에

관여한다.

메틸화가 암 진행에 미치는 영향을 살펴보기 위해, 종양세포와 정상 세포간의 메틸화의 차이에 관한 연구가 진행되어 왔고, 많은 종양 세포의 유전자에서 정상세포에서는 비메틸화 (unmethylation)되어 있는 promoter의 CpG island에 메틸화가 빈번하게 일어나고 있음을 발견하였다[11-13]. 전술한 종양세포에서 메틸화가 특히 종양억제 유전자 (tumor suppressor gene)의 promoter 부위에 일어나는 경우에는 이 유전자들의 발현을 억제시키고, 또 다른 유전자의 손실 또는 돌연변이와 같은 과정을 거쳐 세포가 과다 증식하는 데 주요한 영향을 미칠 것으로 생각되었다.[13] 메틸화가 암 진행에 직접적인 작용을 할 것인가에 대한 논쟁이 있었지만, 최근 연구들을 살펴볼 때, *Rb (retinoblastoma)*유전자와 *VHL* (*von Hippel Lindau)*유전자의 promotor 부위의 메틸화가 망막세포암과[14] 가족성 신장암에서[15] 각각 발견되었고, MSI-양성 (microsatellite instability-positive)인 특발성 대장암 (sporadic colorectal carcinoma)은 *hMLH1*의 promoter 부위에 빈번히 메틸화되어 있었으며, 대장암 세포주에서 메틸화 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine을 처리하면 hMLH1 단백질이 재발현 됨이 보고되었다.[16-20] 또한, 일부 종양에서 종양억제 유전자의 불활성화는 두 대립형질 (allele)이 모두 메틸화되어 있거나, 혹은 하나의 대립형질은 정상이나 단지 메틸화가 되어 있고, 반면 또 다른 대립형질은 돌연변이나 유전자 손실로 인해 불활성화됨이 발견되었다.[21] 그 예로 대장암에서 $p16^{INK4A}$의 불활성화가 오로지 promoter의 메틸화에 의해 일어나며, 이로 인해 $p16^{INK4A}$의 기능에 장애가 초래되었고,[21-23] *BRAC1*의 경우, 가족성 유방암과 자궁암에서 대부분이 돌연변이가 되어 있으나 특발성 유방암과

자궁암에서는 돌연변이가 전혀 없는 대신, *BRAC1*의 promoter 메틸화와 관련된 불활성화가 매우 유사한 빈도를 보였던 것으로 제시되었다.[24-27] 따라서, DNA 메틸화는 돌연변이와 같은 유전적 변형뿐만 아니라, 암 진행 과정에서 유전자 불활성화를 일으키는 또 다른 주 요인으로 작용한다는 사실을 뒷받침해 주고 있다.

DNA 메틸화에 의한 종양억제 유전자의 불활성 외에도 일부 암에서 DNA 복제오류교정 유전자 (mismatch repair gene)가 DNA 메틸화에 의해 불활성화 되어 암 발생의 원인이 되는 것이 밝혀져 있다.[12-13] DNA 복제오류교정 유전자의 불활성화는 필연적으로 DNA 염기서열 중 단순염기구조 (microsatellite)의 변이를 유도하여 MSI-양성 암이 발생하게 된다.[13] MSI-양성 위암은 다른 암에서 흔히 보이는 *p53, K-ras, APC*와 같은 종양억제 또는 종양유발 유전자의 돌연변이 또는 불활성화 기전은 비교적 드물고, 높은 빈도의 *hMLH1, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS2* 등의 DNA 복제오류교정 유전자와 *transforming growth factor β1 receptor type II (TGF-βRII), insulin-like growth factor type II receptor (IGF-RII), BAX* 유전자의 돌연변이를 보이고 있다.[28-30] MSI-양성의 HNPCC (hereditary nonpolyposis colorectal carcinomas)의 70%가 *hMLH1, hMSH2*에서 배선돌연변이 (germ line mutation)가 있는 반면, 특발성 대장암, 자궁상피내암 또는 위암에서는 *hMLH1*이나 그 밖의 다른 DNA 복제오류교정 유전자의 돌연변이는 거의 드물며, 오히려 이들의 70-80% 경우가 promoter 부위에 비정상적으로 메틸화를 보였고, 그로 인해 *hMLH1*의 단백질 발현이 결여됨이 알려져 있다.[16-20] 그러나 그 외 다른 DNA 복제오류교정 유전자에는 메틸화의 빈도가 매우 낮거나 발견되지 않았으며,

다른 유전자들의 메틸화 빈도는 밝혀져 있지 않다.

기존의 연구들이 위암발생에 관련된 유전자의 염기서열변화에 초점을 맞추었다면, 본 연구는 위암 발생에 관련된 유전자의 후생유전학적 변화, 즉, promoter CpG island의 메틸화에 의한 유전자 불활성화에 대해 연구하고자 하였다. 따라서, MSI-양성 위암을 대상으로 MSI-음성 위암 및 정상 조직 대조군과 비교하여, MSI-양성 암에서 일어나는 메틸화가 암 발생에서 DNA 복제오류교정 유전자 또는 종양억제 유전자와 같은 특정 부류의 유전자와는 상관없이 산발적으로 일어나는 기전인지, 혹은 특정 부류의 유전자를 불활성화시키는 기전인지를 밝히고자 하였다. 이를 위하여 MSI-양성 위암을 메틸화가 호발적으로 일어나는 군 (CpG island methylator phenotype-positive; CIMP+)과 그렇지 않은 군 (CIMP-intermediate; CIMP-I, CIMP-negative; CIMP-)으로 구분하고,[31-33] CIMP+에서 종양억제 유전자, DNA 복제오류 유전자들에 대해 각각 메틸화를 살펴봄으로써, CIMP+군이 CIMP-I 또는 CIMP-군과 달리 특정 유전자의 불활성화에 관여하는지를 밝히고 여기에는 어떤 유전적 상관관계가 있는가를 밝히고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 연구재료

연구재료로는 1996 년 9 월에서 1999 년 12 월까지 연세대학교 의과대학 병리학교실에서 수집한 210 예의 위암 환자에서 시술 된 조직을 대상으로 하여 이들의 유전적 유형을 검색한 다음, 그림 1 의 모식도와 같이 연구를 진행하였다.

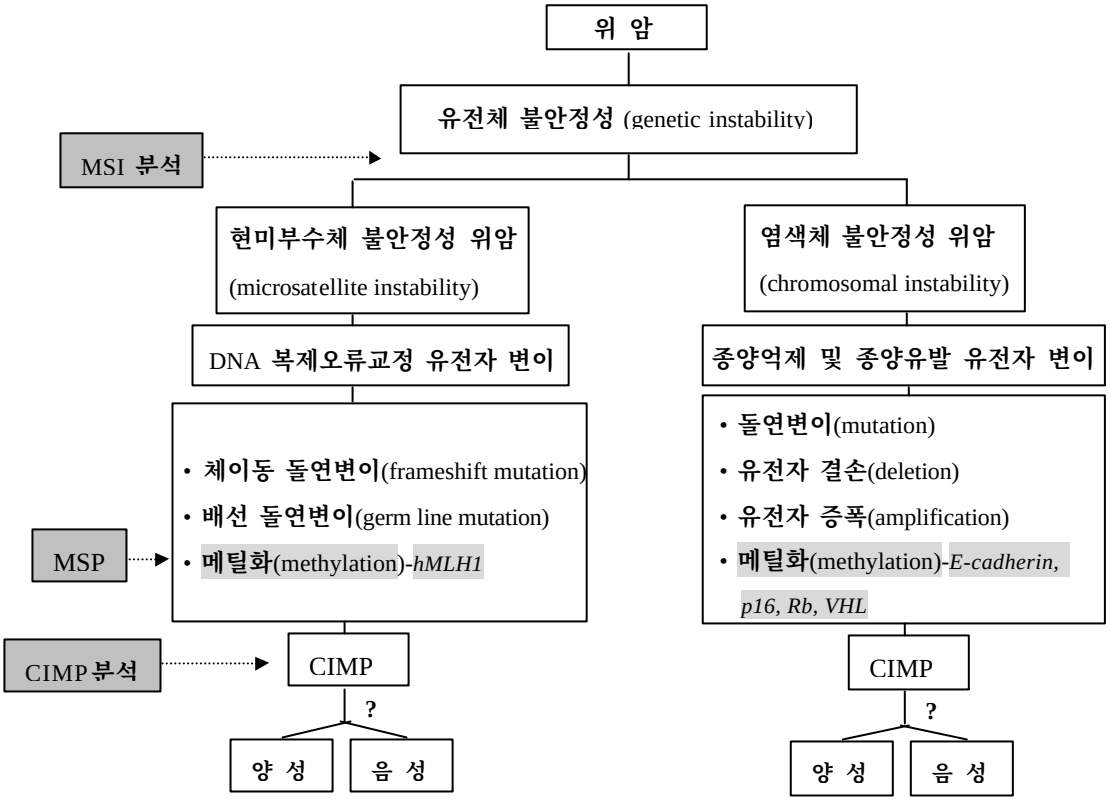

그림 1. 위암의 암 발생 기전과 연구계획 모식도

모든 조직은 절제 후 신속한 육안 표본검사와 함께 종양조직을 채취하였으며, 정상 위점막을 대조조직으로 채취하여 사용 전까지 –70℃에서 보관하였다.

2. 연구방법

가. DNA 추출

냉동 보관된 위암환자에서 적출한 암조직과 정상조직을 멸균된 칼로 잘게 저민 후, 500 μl lysis buffer (100 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% SDS, 200 μg/ml proteinase K, 50 mM EDTA)를 첨가하여, 50℃에서 10 시간 이상 녹였다. 그 후, 동일한 부피의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)을 첨가하여 잘 섞은 뒤, 13,000 rpm 에서 5 분간 원심분리한 후 상층액만을 조심스럽게 새 시험관에 옮겨 동일한 부피의 isopropanol과 0.2 배 부피의 10 M ammonium acetate를 첨가하여 실온에서 30 분간 방치하였다. 13,000 rpm 에서 5 분간 원심분리하여 DNA 를 침전시켰고, 침전된 DNA 를 TE buffer, pH 8.0 에서 완전히 녹인 후, 분광광도계를 이용하여 농도를 측정하였다. 추출된 DNA 는 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

나. MSI 분석

MSI-양성 위암을 식별하기 위해서 1997 년 NCI (National Cancer Institute)의 Concensus Meeting 23 에서 정한 5 개의 표지자 (BAT26, BAT25, D2S123,

D5S346, D17S250)[34] 를 사용하여 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다 (표 1).

표 1. MSI 분석을 위해 사용된 5 개의 표지자 [34]

Locus	Primer sequence	Chromosome	Repeat
BAT 26	F: 5'-ACTACTTTTGACTTCAGCC-3' R: 5'-AACCATTCAACATTTTTAACCC-3'	2p16-2p16	$(A)_{26}$
BAT 25	F: 5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3' R: 5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'	4q11-13	$(A)_{25}$
D2S123	F: 5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3' R: 5'-GGACTTTCCACCTATGGGAC-3'	2p16-21	$(CA)_{14}$
D17S250	F: 5'-GGAAGAATCAAATAGACAAT-3' R: 5'-GCTGGCCATATATATATTTAAACC-3'	17q11.2-q12	$(CA)_{24}$
D5S346	F: 5'-ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG-3' R: 5'-CAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3'	5q21	$(CA)_{26}$

F: forward primer

R: reverse primer

PCR 은 최종부피 20 μl 가 되도록 50 ng 주형 DNA, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 pmol/μl 의 sense 와 antisense primer, 1 μCi [α-P^{32}]dCTP (3000 Ci/mmol; NEN DuPont, Boston, MA, USA), 1 unit *Taq* polymerase (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA), 10 X PCR buffer 를 모두 혼합하였다. 이를 thermocycler (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)를 이용하여 95°C에서 2 분간 변성, 55~58°C에서 30 초 동안 재결합, 72°C에서 15 초 동안 신장과정을 25 회 반복하였고, 마지막으로

72℃에서 5분 동안 1회 신장시켰다. PCR 산물은 6% polyacrylamide gel에서 50 W로 2시간 동안 전기영동시켰고, 전기영동이 끝나면 gel dryer에서 gel을 말린 후, X-ray film에 노출시켰다.

실험결과는 정상조직의 대립형질과 비교하였을 때, 종양조직에서 정상조직과 다른 대립형질이 관찰된 경우를 MSI-양성으로 판독하였으며, NCI에서 제시한 기준에 따라 2개 이상의 표지자에서 양성을 보이는 경우를 MSI-H (MSI-high), 1개의 표지자에서 양성을 보이는 경우를 MSI-L (MSI-low), 양성을 보이지 않는 경우를 MSS (Microsatellite stable)로 구분한 다음,[34] MSI-H 예를 MSI-양성으로, MSI-L 와 MSS 예를 MSI-음성 위암으로 분류하였다.

다. Sodium bisulfite modification 및 DNA 정제

CIMP 분석과 MSP 을 위한 주형 DNA로 사용하기 위해, MSI-양성, MSI-음성 위암조직 및 정상조직의 DNA 를 sodium bisulfite modification 을 실시한 후, 정제하였다. Sodium bisulfite modification 은 DNA 1 μg 을 취하여 최종부피가 50 μl 가 되도록 증류수로 채우고, 5.6 μl 의 5 N NaOH 를 첨가한 후, 37℃ 항온수조에서 15 분간 방치하였다. 각 시험관에 30 μl 의 10 mM hydroquinone, 520 μl 의 4 M sodium bisulfite, pH 5.0 를 첨가하여 부드럽게 섞어주었다.[16] Mineral oil 을 한 방울씩 떨어뜨리고, 55℃에서 16 시간동안 반응시켰다. Sodium bisulfite 로 처리한 DNA 는 Wizard DNA purification resin (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 정제하였다. 최종적으로 50 μl 의 증류수로 정제된 DNA 를 추출한 후, 5.6 μl 의 5 N NaOH 용액을 첨가하여 37℃에서 15 분간 반응시켰다. 반응이 끝나면,

5.5 μl의 10 M ammonium acetate와 125 μl의 ethanol을 첨가하여 -20℃에서 30 분간 방치하였다. 이 후 13,000 rpm, 4℃에서 15 분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 DNA 침전을 실온에서 완전히 말렸다. 마지막으로 증류수 20 μl 를 넣고 혼합한 후, 즉시 -20℃에서 보관하였다.[16]

라. CIMP 분석

위암에서 메틸화가 발견된 5 개의 새로운 clone (MINT 1, 2, 12, 25, 31)에 대해 Toyota 등 [33] 이 고안한 방법에 따라 Bisulfite-PCR 과 제한효소를 이용하여 (그림 2) 3 개 이상의 clone 에서 양성을 보이는 예를 CIMP+, 2 개에서 양성을 보이는 예를 CIMP-I, 1 개 이하에서 양성을 보이는 예를 CIMP-로 구분하였다.

위암에서 CIMP 유형을 구별하기 위해 메틸화된 대립형질과 비메틸화된 대립형질을 동시에 모두 증폭할 수 있는 primer 를 이용하여 5 개의 MINT clone 을 모두 증폭시켰다. MINT clone 에 대한 염기서열의 정보는 http://www.mdanderson.org/leukemia/methylation을 이용하였다 (표 2). Sodium bisulfite 로 처리한 후 정제된 DNA 를 주형으로 하고, 최종부피가 20 μl 가 되도록 100 ng 주형 DNA, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 pmol/μl primer set, 1 unit *Taq* polymerase (GIBCO-BRL), 10 X PCR buffer 를 혼합하여 PCR 을 하였다.

실험 결과는 증폭된 각 clone 마다 메틸화된 대립형질만을 선택적으로 구별할 수 있는 제한효소 (표 2)로 절단함으로써 정상조직에 비해 종양조직에서 달리 나타나는 절단 산물이 있는 경우를 양성으로 판단하였다.[33]

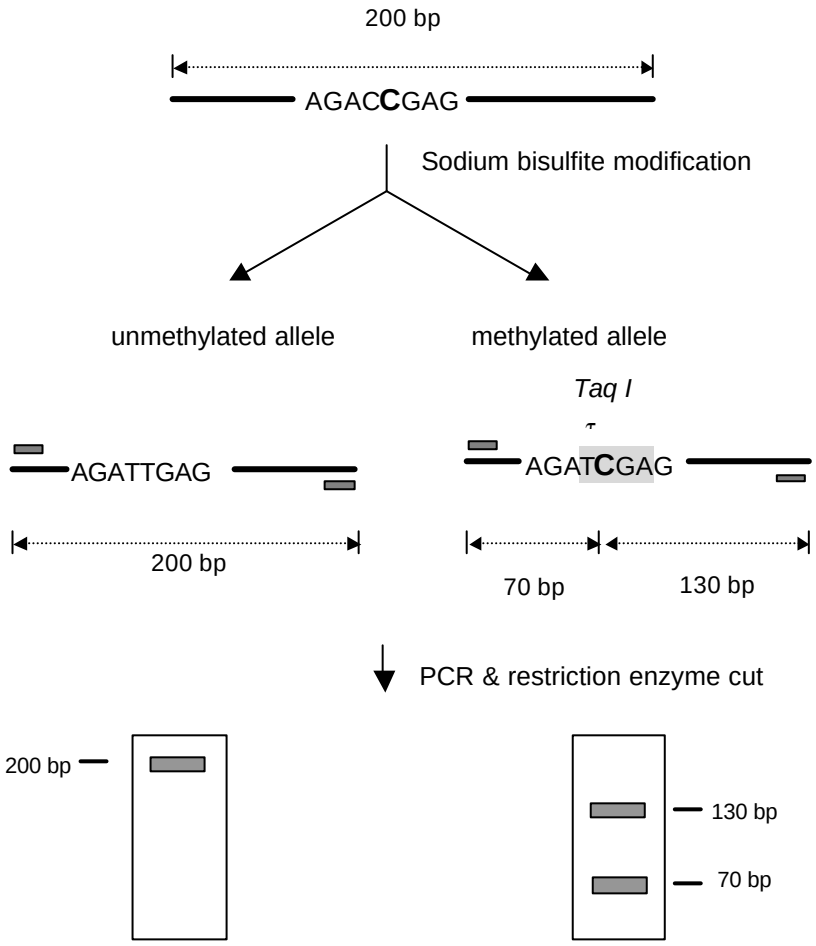

그림 2. CIMP **분석 원리**. Sodium bisulfite **로 처리한** DNA **는 대립형질간에 서로 구별된 염기서열을 가지게 되며**, **이때 메틸화된 대립형질에서만 나타나는 제한효소로 절단시킴으로써 메틸화된 대립형질만을 선택적으로 확인할 수 있다**.

표 2. Bisulfite-PCR 을 위한 primer sequence 및 사용된 제한효소

Clone	Number of CpG	Primer set	제한효소
MINT 1	25	F: 5'-GGGTTGGAGAGTAGGGGAGTT-3' R: 5'-CCATCTAAAATTACCTCRATAACTTA-3'	*Taq* I
MINT 2	26	F: 5'-YGTTATGATTTTTTTGTTTAGTTAAT-3' R: 5'-TACACCAACTACCCAACTACCTC-3'	*Taq* I *BstU* I
MINT 12	19	F: 5'-YGGGTTATGTTTTATTTTTTGTGTTT-3' R: 5'-CTCAAAAAAATCAAACAACCAACCAA-3'	*Mae* II
MINT 25	37	F: 5'-TYGGTGTTTGTAAAGGGTTGGAAT-3' R: 5'-CCCRAACTAAAAACTAACTCRTAA-3'	*Rsa* I
MINT 31	52	F: 5'-GAYGGYGTAGTAGTTATTTTGTT-3' R: 5'-CATCACCACCCCTCACTTTAC-3'	*Mae* II *BstU* I

F: forward primer

R: reverse primer

MINT : methylated in tumors

마. MSP

Sodium bisulfite 를 처리한 후 정제된 DNA 를 주형으로 하고, *hMLH1, p16, E-cadherin, Rb* 및 *VHL* 에 대한 메틸화 또는 비메틸화를 판별할 수 있는 각각의 primer (표 3)를 이용하여 PCR 을 수행함으로써, 메틸화를 관찰하였다 (그림 3).

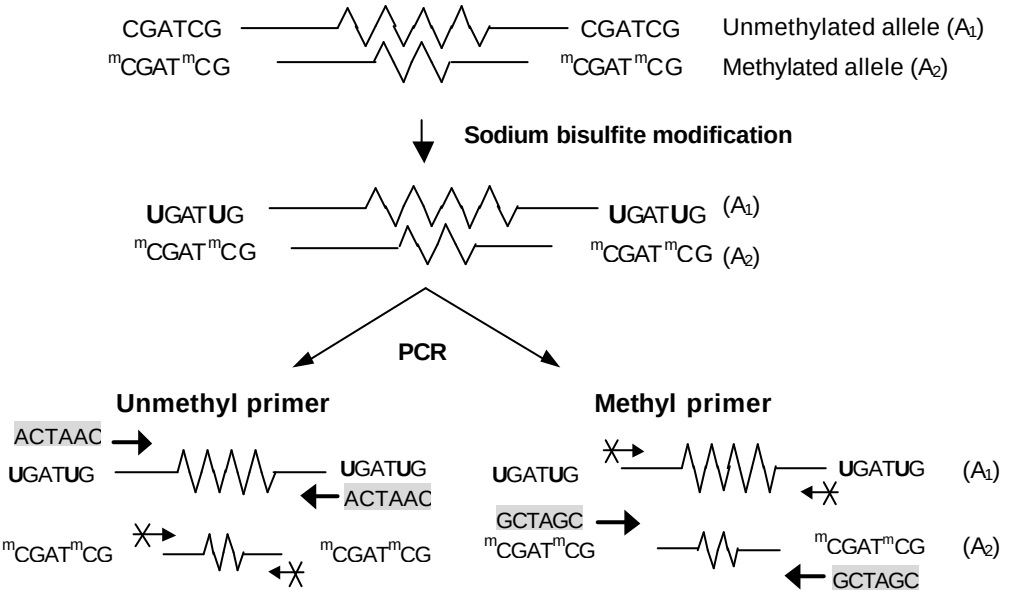

그림 3. MSP **분석 원리**. DNA **를** sodium bisulfite **로 처리하면**, **비메틸화된** cytosine **은** uracil **로 치환되는 반면**, **메틸화된** cytosine **은 치환되지 않으므로 서로 구별된 염기서열을 갖게 된다. 서로 다른 염기서열의 차이를 이용하여 메틸화 및 비메틸화 대립형질을 증폭시킬 수 있는 각각의** primer set **로** PCR **을 수행함으로써 메틸화 여부를 확인할 수 있다.**[35]

PCR **은 최종부피가** 20 μl **가 되도록** 100 ng **의 주형** DNA, 1.5 mM $MgCl_2$, 20 pmol primer set, 1 unit *Taq* polymerase (GIBCO-BRL), 10 X PCR buffer **를 혼합하여 수행하였으며**, **반응이 끝나면**, 2% agarose gel **에서** 120 V **전압으로** 30 **분간 전기영동하였다**.

표 3. MSP **를 위한** primer sequence

Gene			Primer set	Annealing Temp (℃)	Genomic position
hMLH1[17]	U	F	5'-AGTTGAAGGAAGAATGTGAGTAT-3'	61	-711
		R	5'-CAAATAACCCCTACCACAAACA-3'		
	M	F	5'-GAATAACCCCTACCACGAACG-3'	63	-711
		R	5'-GAATAACCCCTACCACGAACG-3'		
p16[35]	U	F	5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'	60	+ 167
		R	5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3'		
	M	F	5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'	65	+167
		R	5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'		
E-cadherin[35]	U	F	5'-TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT-3'	53	- 210
		R	5'-CACAACCAATCAACAACACA-3'		
	M	F	5'-TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT-3'	57	- 205
		R	5'-CACAACCAATCAACAACACA-3'		
Rb[36]	U	F	5'-GGGAGTTTTGTGGATGTGAT-3'	55	-141
		R	5'-ACATCAAAACACACCCCA-3'		
	M	F	5'-GGGAGTTTCGCGGACGTGAC-3'	55	-141
		R	5'-ACGTCGAAACACGCCCCG-3'		
VHL[35]	U	F	5'-GTTGGAGGATTTTTTTGTGTATGT-3'	60	-118
		R	5'-CCCAAACCAAACACCACAAA-3'		
	M	F	5'-TGGAGGATTTTTTTGCGTACGC-3'	60	-116
		R	5'-GAACCGAACGCCGCGAA-3'		

U: unmethylated-specific primer M: methylated-specific primer

F: forward primer R: reverse primer

III. 결 과

1. MSI-양성 위암의 판별

위암환자의 종양조직 210 예에서 5 개의 표지자를 이용하여 분석한 결과, 20 예 (9.5%)에서 MSI-양성 위암이 관찰되었다 (그림 4).

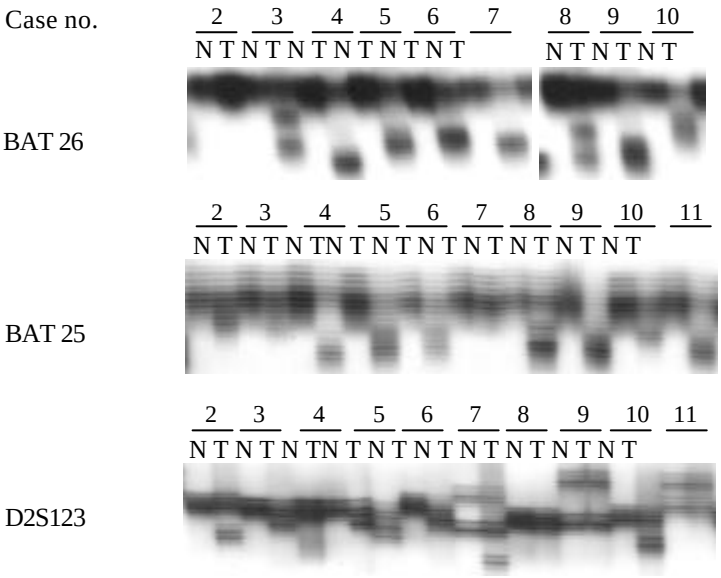

그림 4. 위암조직의 MSI 분석 결과. 각 조직에서 분리한 genomic DNA 를 주형으로 하고, 5 개의 표지자 (BAT26, BAT25, D2S123, D5S346, D17S250)를 사용하여 PCR 을 수행한 후, PCR 산물을 6% polyacrylamide gel 에서 전기영동하였다. 정상조직 (N)과 비교하여 종양조직 (T)에서 서로 다른 대립형질을 보이는 것을 양성으로 판단하였으며, 모든 예는 MSI-양성을 보여주고 있다.

2. 위암에서 MSI 에 따른 암 관련 유전자의 메틸화 분석

위암에서 *hMLH1, p16, E-cadherin, Rb, VHL* 유전자의 메틸화를 살펴보기 위해 각 유전자에 대해 MSP 를 실시하였다.

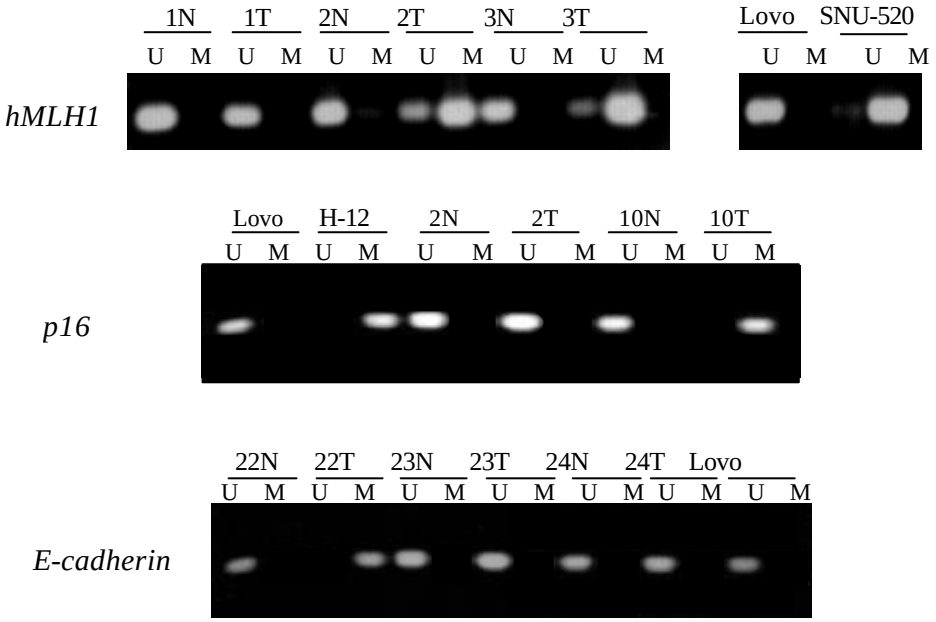

그림 5. MSP 를 이용한 위암에서 암 관련 유전자의 메틸화 분석. Sodium bisulfite 로 처리한 DNA 를 주형으로 비메틸화된 (U; unmethylated) 대립형질과 메틸화된 (M; methylated) 대립형질을 증폭할 수 있는 각각의 primer 를 이용하여 PCR 을 수행한 후, PCR 산물을 2% agaroese gel 에서 전기영동하였다. 대장암 세포주 (LoVo)는 *hMLH1*, *E-cadherin*, *p16* 의 음성 대조군으로, 위암 세포주 (SNU-520)는 *hMLH1* 의 양성 대조군으로 각각 사용되었고, H-12 는 *p16* 의 양성 대조군으로 사용되었다.

위암에서 MSI에 따른 암 관련 유전자의 메틸화를 MSP로 분석한 결과를 살펴보면, MSI-양성 위암의 경우, *hMLH1* 의 메틸화 빈도가 월등히 높았고 (80%, 16/20), *p16* 유전자는 10% (2/20)의 빈도를 보였으며, 그 외 *E-cadherin, Rb, VHL* 에서는 메틸화가 관찰되지 않았다. 반면, MSI-음성 위암에서는 뚜렷이 메틸화를 보이는 유전자는 없었으나, MSI-양성 위암에서는 관찰되지 않은 *E-cadherin* (11.1%, 2/18)과 *Rb* (22.2%, 4/18) 유전자에서 메틸화가 관찰되었다 (그림 5, 표 4). 그 외 *hMLH1* 과 *p16* 유전자에서도 일부의 예에서 메틸화가 있었으며 [*hMLH1* (17%, 3/18), *p16* (5.5%, 1/18)], *VHL* 의 메틸화는 MSI 여부에 관계없이 위암에서 관찰되지 않았다.

3. 위암에서 CIMP에 따른 암 관련 유전자의 메틸화 분석

위암에서 전체적인 메틸화 양상을 살펴보기 위해, MSI-양성으로 분류된 20예와 MSI-음성으로 분류된 18예의 각각에 대하여 PCR과 제한효소를 이용함으로써 5 개의 MINT clone 에 대한 메틸화를 조사하였다. 이러한 분석방법은 DNA를 sodium bisulfite로 처리하면, 메틸화된 cytosine은 다른 염기로 치환되지 않는 반면, 비메틸화 된 cytosine 은 uracil로 치환되는 원리를 이용한 것으로, 메틸화된 대립형질과 비메틸화된 대립형질을 동시에 증폭시킨 후, 메틸화된 대립형질만을 인식하는 제한효소로 절단함으로써 메틸화 여부를 알 수 있다 (그림 2). 따라서, 위암에서는 이미 밝혀진 종양 특이적으로 메틸화된 clone (MINT 1, 2, 12, 25, 31)에 대해 PCR을 시행하여 각각의 제한효소를 처리하였다.

실험 결과, 전체 위암조직 38 예는 2 예 (5.2%)의 CIMP+, 7 예 (18.4%)의

CIMP-I, 그리고 29예 (76.4%)의 CIMP-로 구분되었다 (그림 6, 표 4).

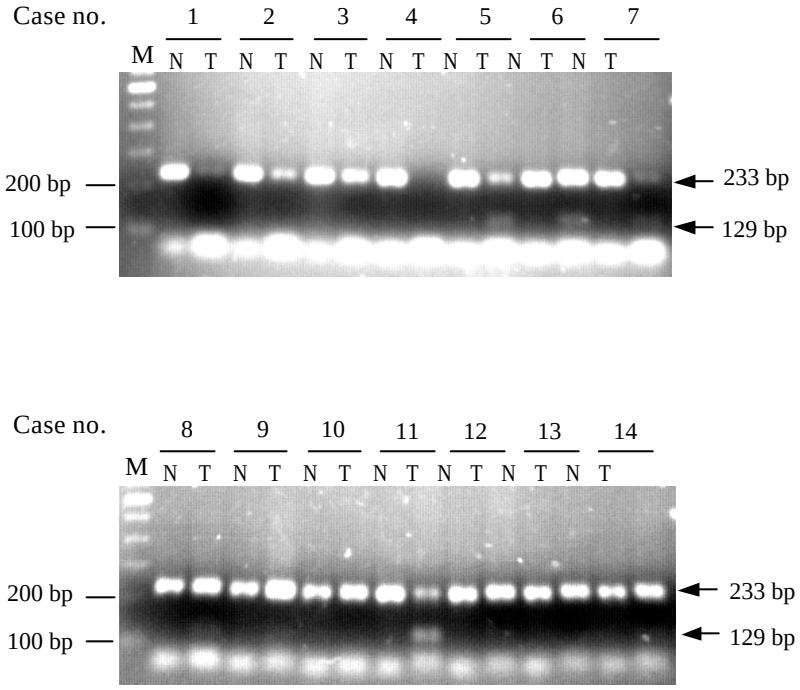

그림 6. 위암조직에서 MINT 25의 Bisulfite-PCR과 제한효소를 이용한 CIMP 분석. Sodium bisulfite로 modification된 정상조직 (N)과 종양조직 (T)의 DNA로부터 Bisulfite-PCR을 실시하여 MINT 25 clone을 증폭한 후, 제한효소, *Rsa* I으로 절단하여 2% agarose gel에서 전기영동하였다. Case no. 5, 6, 7, 8, 11의 종양조직에서만 129 bp의 절단 산물을 볼 수 있으며, 이는 메틸화된 것임을 나타내고 있다.

2예의 CIMP+ 위암에서 *p16*와 *hMLH*1이 높은 빈도 (50%)로 메틸화를 보

였고, 그 외 다른 유전자에서는 메틸화가 발견되지 않았다 (표 4). CIMP-I 와 CIMP- 위암에서도 *hMLH1* 의 메틸화가 각각 50%와 71.4%를 보여, *hMLH1* 의 메틸화가 CIMP 와 밀접한 관련이 없음을 나타내고 있다.

표 4. 위암의 유전적 유형에 따른 암 관련 유전자의 메틸화 빈도

Tumor Phenotype	Number of positive cases (%)				
	hMLH1	*p16*	*E-Cadherin*	*Rb*	*VHL*
CIMP status					
CIMP + (n=2)	1 (50)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CIMP-I (n=7)	5 (71.4)	1 (14.3)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
CIMP - (n=29)	13 (44.8)	1 (3.4)	2 (6.9)	3 (10.3)	0 (0)
MSI status					
MSI-positive (n=20)	16 (80)	2 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MSI-negative (n=18)	3 (17)	1 (5.5)	2 (11.1)	4 (22.2)	0 (0)

n : number of cases

총 38 예의 위암에서 각 예에 대한 유전자별 메틸화 분석 결과, MSI status 및 CIMP 에 대한 결과는 표 5 와 같다.

표 5. 암 관련 유전자의 메틸화 분석 및 유전적 유형과의 관계

Case no.	*hMLH 1*	*p16*	*E-cadherin*	*Rb*	*VHL*	MSI status	CIMP status
1	μ	l	μ	μ	μ	+	-
2	l	μ	μ	μ	μ	+	-
3	l	μ	μ	μ	μ	+	-
4	μ	μ	μ	μ	μ	+	-
5	μ	μ	μ	μ	μ	+	-
6	l	μ	μ	μ	μ	+	-
7	l	μ	μ	μ	μ	+	-
8	l	μ	μ	μ	μ	+	-
9	l	μ	μ	μ	μ	+	I
10	l	l	μ	μ	μ	+	I
11	l	μ	μ	μ	μ	+	-
12	l	μ	μ	μ	μ	+	+
13	l	μ	μ	μ	μ	+	-
14	l	μ	μ	μ	μ	+	-
15	l	μ	μ	μ	μ	+	I
16	μ	μ	μ	μ	μ	+	+
17	l	μ	μ	μ	μ	+	I
18	l	μ	μ	μ	μ	+	-
19	l	μ	μ	μ	μ	+	-
20	l	μ	μ	μ	μ	+	-
21	μ	μ	μ	l	μ	-	-
22	μ	μ	l	μ	μ	-	-
23	l	μ	μ	μ	μ	-	-
24	μ	μ	μ	l	μ	-	I
25	μ	μ	μ	μ	μ	-	-
26	l	μ	l	μ	μ	-	-
27	μ	μ	μ	l	μ	-	-
28	μ	μ	μ	l	μ	-	-
29	μ	μ	μ	μ	μ	-	-
30	μ	l	μ	μ	μ	-	-
31	μ	μ	μ	μ	μ	-	-
32	l	μ	μ	μ	μ	-	-
33	μ	μ	μ	μ	μ	-	-
34	μ	μ	μ	μ	μ	-	-
35	μ	μ	μ	μ	μ	-	-
36	μ	μ	μ	μ	μ	-	I
37	μ	μ	μ	μ	μ	-	-
38	μ	μ	μ	μ	μ	-	I

○: unmethylated case ●: methylated case I: intermediate case

4. 위암에서 CIMP와 MSI에 따른 MINT clone의 메틸화 분석

위암에서 종양 특이적으로 메틸화되는 것으로 밝혀진 5 개 clone 의 메틸화 빈도를 살펴보면, CIMP+를 보이는 2 예 모두 3 개의 clone 에서 양성을 보였고, CIMP-를 보이는 29 예 중 6 예는 하나의 clone 에서만 양성을 보였으며, 그 외 23 예는 5 개의 clone 모두에서 음성을 나타내었다.

표 6. 위암의 유전적 유형에 따른 5 개의 MINT clone 의 메틸화 빈도

Tumor Phenotype	Number of positive cases (%)				
	MINT 1	MINT 2	MINT 12	MINT 25	MINT 31
CIMP status					
CIMP + (n=2)	2 (100)	2 (100)	1 (50)	1 (50)	0 (0)
CIMP-I (n=7)	5 (71.4)	1 (14.3)	1 (14.3)	4 (57.1)	1 (14.3)
CIMP - (n=29)	3 (10.3)	1 (3.4)	0 (0)	2 (6.9)	1 (3.4)
MSI status					
MSI-positive (n=20)	7 (35)	4 (20)	2 (10)	5 (25)	1 (5)
MSI-negative (n=18)	3 (16.7)	0 (0)	0 (0)	2 (11.1)	1 (5.6)

n : number of cases

각 clone 에 대한 메틸화 정도를 살펴볼 때, 그 빈도는 각각 26.3% (10/38, MINT 1), 10.5% (4/38, MINT 2), 5.3% (2/38, MINT 12), 21.1% (8/38, MINT 25), 그리고 5.3% (2/38, MINT 31)로, MINT 1과 MINT 25 에서 그 빈도가 높게 나타났다 (표 6). 또한, CIMP 와 MSI 의 상관관계를 살펴볼 때, 2 예의 CIMP+가 모두

MSI-양성이었으며, 7예의 CIMP-I 중 5예가 MSI-양성, 2예가 MSI-음성으로서, MSI-양성이 MSI-음성보다 메틸화 정도가 다소 높음을 알 수 있었다.

IV. 고 찰

유전체의 변형 (modification)을 유전적 변형 (genetic modification)과 후생유전학적 변형 (epigenetic modification)으로 크게 나누어 볼 때, 전자는 유전자의 염기서열상의 변화를, 후자는 염기서열상의 변화와는 상관없는 유전자 발현의 변화에 관한 변형이라고 할 수 있다. 따라서, 종양세포나 노화된 세포에서 유전자 발현의 억제가 유전적 변형만으로 그 원인을 모두 설명하기에는 불충분하며, 유전적 변형뿐만 아니라, 후생유전학적 변형이 암 발생 과정 중 또 하나의 기전으로 작용할 수 있음이 제시되고 있다.[2,4,5]

MSI-양성 위암은 전체 위암 중 약 10%를 차지하며, 이는 *p53, ras* 돌연변이와 같은 기전을 통하지 않고, DNA 복제오류교정 유전자들의 돌연변이 및 메틸화로 인한 불활성화가 주요 기전이라는 사실이 밝혀졌다.[37-38] 지금까지 *RB1, p15, p16, BRCA1, VHL, H19, HIC-1, GSTP* 및 *E-cadherin* 과 같은 종양억제 유전자와 DNA 복제오류교정 유전자인 *hMLH1, MGMT* (O6-methyl guanine-DNA methyl transferase), 신혈관 생성억제 유전자인 *THBS1*, 세포성장 조절 유전자인 *ER, PGR* 등에서 메틸화가 보고되어 왔다.[14,15,21-23,36,39-43] 특히 MSI-양성 위암에서 *hMLH1* 의 불활성화가 주 기전으로 밝혀지면서, *hMLH1* 유전자의 불활성화는 연쇄적으로 단백질 지령 부위 내 단순염기구조 (microsatellite)를 가진 일련의 종양억제 유전자들의 변이를 초래함으로써, 암화과정을 촉진하게 된다.[16-20]

이러한 메틸화의 중요성을 생각해 볼 때, MSI-양성 위암에서 메틸화가 다른 종양억제 유전자와 구별된 *hMLH1* 와 같은 특정 유전자에 국한된 것인지, 혹은

유전자 전체의 메틸화 활성의 상승때문인지에 대한 메틸화 기전이 아직 불분명하다. 또한, 암 발생과정에서 일어나는 유전체의 변이를 유전적 변이와 후생유전학적 변이로 크게 나누어 볼 때, MSI-양성 위암은 기존에 밝혀진 암과 구별된 유전적 변이 기전을 통하는 것으로 알려져 있으며,[37-38] 이러한 유전학적 차이와 더불어 후생유전학적 변이 또한 구별된 기전을 통하는지 정확한 언급이 없다. 본 연구에서는 MSI-양성 위암을 선별하여 DNA 복제오류교정 유전자와 종양억제 유전자로 나누어 메틸화 상태를 살펴보았고, 전체적인 메틸화 양상을 비교하기 위해서는 CIMP 로 분류하여 그 상관관계를 분석하였다.

본 실험 결과에 따르면, MSI-양성 위암에서는 *hMLH1* 의 메틸화 (80%, 16/20)가 현저히 나타났으며, 그 외 다른 종양관련 유전자에서는 메틸화가 비교적 드물었고, MSI-음성 위암에서는 *hMLH1* 이나 *p16* 유전자의 메틸화는 없었으나, *E-cadherin* (11.1%, 2/18)과 *Rb* (22.2%, 4/18) 유전자에서 메틸화가 관찰되었다. MSI-양성 위암에서 *hMLH1* 메틸화 결과는 기존의 보고된 다른 연구결과 [대장암 (70%),[45] 자궁내막암 (90%),[46] 위암 (80%)[47]]와 비교해 볼 때 일치됨을 보였다. 그 외 MSI-양성 암에서 *E-cadherin*[32,48] 과 *p16*[2,32,49] 의 메틸화가 일부 보고된 바 있으나, 본 실험에서는 *E-cadherin* 의 메틸화는 관찰되지 않았으며, *p16* 은 10%의 빈도를 보여 이는 기존의 보고된 15%[32] 에서 50%[49] 의 빈도보다 다소 낮은 빈도를 보였다. 이러한 결과는 MSI-양성 위암이 *hMLH1* 에 선택적인 메틸화의 영향을 받는다는 것을 입증하고 있다. 최근에는 특정 유전자의 메틸화에 국한되지 않고, 종양에서 특히 빈번하게 메틸화가 일어난 유전자들을 찾아내어 유전체 전체의 메틸화 양상에 따른 암 발생 기전을 밝히고자 하는 연구가 활발히 진행중이다.[31-33] 그 예로서, 대장암에서 특이적으로 CpG island 에

메틸화가 빈번하게 일어난 새로운 6 개의 clone (MINT 1, 2, 12, 17, 27, 31)을 찾아내었고, 6 개 clone 중 3 개 이상에서 메틸화를 보이는 군을 특히 CIMP+, 그 외 2 개 이하의 모든 군을 CIMP-로 분류하였다.[32] 위암에서도 대장암과 달리 종양 특이적으로 메틸화된 5 개의 새로운 clone (MINT 1, 2, 12, 25, 31)을 찾았으며, 대장암의 경우와는 달리 CIMP 를 세 군으로 분류하였으며 (CIMP+, CIMP-I, CIMP-)[33], 특히 대장암에서 두 군간의 *p53* 돌연변이, *K-ras* 돌연변이, *p16* 메틸화의 상관관계를 살펴보았을 때, CIMP 에 따라 특정 유전자의 돌연변이와 메틸화에 차이가 있는 것으로 보아 암 발생 기전이 서로 구별됨을 보였다.[32] 본 실험에서는 메틸화에 초점을 맞추어 CIMP 에 따른 *p16* 메틸화 빈도를 살펴 보았으며, *p16* 메틸화가 50% (CIMP+), 14.3% (CIMP-I), 3.4% (CIMP-)로 나타났고 이는 앞서 보고된 대장암과의 결과와 비교해 볼 때 일치하는 결과로서, CIMP+ 위암 발생과정에서 *p16* 의 메틸화로 인한 유전자 불활성화가 암 발생과정에 주요한 역할을 할 것으로 사료된다. 따라서, 이러한 결과는 메틸화가 기존의 유전자 염기서열 변화에 의존했던 유전적 변형에 의한 암 발생 기전 외에 또 다른 기전으로서 그 중요성을 뒷받침 해주었다.

또한, 전체적으로 38 예 (MSI-양성 20 예, MSI-음성 18 예)의 위암 중, 2 예에서 CIMP+를 보였으며, CIMP 와 MSI 의 상관관계를 살펴볼 때, 2 예의 CIMP+가 모두 MSI-양성이였으며, MSI-양성 위암에서는 *hMLH1* 의 메틸화가 가장 높은 빈도를 보였다 (80%). 그러나 CIMP 와 *hMLH1* 의 메틸화의 상관관계를 볼 때, CIMP 와 상관없이 *hMLH1* 의 메틸화 빈도가 모두 높은 것으로 보아 MSI-양성 위암에서 높은 빈도의 *hMLH1* 의 메틸화는 유전체 전체에 대한 메틸화의 영향보다는 MSI 와 더 밀접한 상관관계가 있다는 것을 의미하고 있다. MSI-양성

위암과 MSI-음성 위암에서 메틸화를 비교해 볼 때, MSI-양성 위암에서는 DNA 복제오류교정 유전자인 *hMLH1* 의 메틸화가 월등히 높은 반면, MSI-음성 위암에서는 DNA 복제오류교정 유전자와 종양억제 유전자에서 모두 메틸화를 보이는 것으로 보아, MSI-양성 위암에서 *hMLH1* 의 메틸화로 인한 불활성화가 MSI-양성 위암 발생과정에서 아주 중요한 기전으로 작용한다는 것을 [16,17,19,20] 뒷받침해 주고 있다. 기존의 보고된 결과와 본 실험결과를 토대로 앞에서 서술된 바와 같이, *hMLH1* 의 메틸화는 종양에 따라 차이는 있으나 70% 이상의 높은 빈도로 나타났고, CIMP 보다는 MSI-양성 위암에서 특이적으로 나타나는 것으로 보고되고 있으나,[32,33] CIMP 와의 연관성에 대해서는 아직 정확한 언급이 없다. 지금까지 유일하게 보고된 두 연구결과를 살펴보면, Ueki 등 [50] 의 연구에서는, MSI-양성의 pancreatic adenocarcinoma 에서 50%의 *hMLH1* 메틸화를 보였고, *hMLH1* 가 메틸화된 MSI-양성의 경우가 모두 CIMP+였으며, *hMLH1* 가 비메틸화된 경우에는 다양한 CIMP 양상을 보였다. 또한, Toyota 등 [32] 의 연구결과는, 5예의 MSI-양성 위암 중 3예에서 *hMLH1* 의 메틸화를 보였고, 3예 모두 CIMP+로 구분 되었으며, 나머지 2 예의 MSI-양성 위암은 CIMP-임을 보고하였다. 이러한 두 연구 결과에 따르면, *hMLH1* 의 메틸화, MSI-양성 그리고 CIMP 사이에 밀접한 연관성이 있다는 것을 추측할 수 있다. 그러나, 본 실험결과에서는 CIMP+양상을 보인 예가 모두 MSI-양성 위암이였기 때문에 서로 연관성이 있을 것으로 사료되나, *hMLH1* 가 메틸화된 MSI-양성 위암과는 CIMP 와 밀접한 관련이 없는 것으로 나타났다.

이상의 결과로, *hMLH1* 의 메틸화가 MSI-양성 위암에서 특이적으로 일어나는 후생유전학적 변이과정으로 판단되고, 이는 유전체 전체적인 메틸화의 영

향보다 유전자의 특이적인 메틸화로 추측되어지나, 이를 CIMP 와 관련 지어 결론을 내리기엔 아직 더 많은 연구가 진행되어야 하며, 향후 이러한 메틸화 현상이 무엇에 의하여 조절받는지, 그 조절 기전에 대해서도 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 이러한 연구는 DNA 복제오류교정 유전자가 불활성화되어 있는 세포가 그렇지 않은 세포와 달리 여러 가지 약제에 대해서 저항성을 보이고, 성장이 빠른 암세포를 선택적으로 죽이는 화학치료제인 알킬화제 (alkylating agent)에 대해 강한 저항성을 보이는 것으로 보고되어,[51] 선택적 항암 화학치료제의 선별에 기여할 것으로 예상된다. 또한 메틸화로 인한 유전자 산물의 불활성화가 demethylating agent 를 처리하면, 그 활성을 되찾는다는 점[52]에서 위암치료에 새로운 장을 열 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

총 38 예의 위암 조직 (20 예의 MSI-양성, 18 예의 MSI-음성)을 대상으로, 종양억제 유전자 및 DNA 복제오류교정 유전자에 대한 promoter 부위의 메틸화를 살펴보았고, CIMP 를 분석함으로써 유전체 전체의 메틸화 정도를 살펴보았다. 이로써, MSI-양성 위암에 메틸화가 끼치는 영향에 대한 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MSI-양성 위암은 전체 위암 중 9.7%의 빈도를 보였다.
2. MSI-양성 위암에서 *hMLH1* 의 메틸화가 매우 빈번하였고 (80%, 16/20), 그 외 종양억제 유전자의 메틸화 빈도는 매우 낮았다.
3. MSI-음성 위암은 특정 유전자의 메틸화와 밀접한 관련이 없었다.
4. MSI-양성 위암이 MSI-음성 위암에 비해 CIMP 가 높았다.
5. MSI-양성 위암에서 빈번하게 일어난 *hMLH1* 의 메틸화는 CIMP 와 밀접한 관련이 없었다.

이상의 결과는 *hMLH1* 유전자의 promoter 부위의 메틸화는 MSI-양성 위암에서 특이적으로 일어나는 후생유전학적 변이로서 *hMLH1* 유전자의 메틸화로 인한 불활성화가 MSI-양성 위암 발생 과정에 선택적으로 일어나는 중요한 기전으로 생각된다.

참고문헌

1. Todd R, Wong DT. Oncogenes. Anticancer Res 1999;19:4729-46.
2. Devereux TR, Risinger JI, Barrett JC. Mutations and altered expression of the human cancer genes: what they tell us about causes. IARC Sci Publ 1999;146:19-42.
3. Sedlacek Z, Mares J, Goetz P. Tumor suppressor genes. Cas Lek Cesk 1997;136: 11-6.
4. Jones PA, Rideout WM 3d, Shen JC, Spruck CH, Tsai YC. Methylation, mutation and cancer. Bioessays 1992;14:33-6.
5. Laird PW, Jaenisch R. DNA methylation and cancer. Hum Mol Genet. 1994; 3:1487-95.
6. Ng HH, Bird A. DNA methylation and chromatin modification. Curr Opin Genet Dev 1999;9:158-63.
7. Panning B, Jaenisch R. RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. Cell 1998;93:305-8.
8. Li E, Beard C, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell 1992;69:915-26.
9. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa J. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. Cancer Res 1998;8:5489-94.
10. Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. Nature 1993;366:362-5.

11. Jone PA. DNA methylation errors and cancer. Cancer Res 1996;56:2463-67.
12. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JPJ. Alterations in DNA methylation : a fundamental aspect of neoplasia. Adv Cancer Res 1998;72:141-96.
13. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. Nat Genet 1999;21:163-7.
14. Stirzaker C, Millar DS, Paul CL, Warnecke PM, Harrison J, Vincent PC, et al. Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. Cancer Res 1997;57:2229-37.
15. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, et al. Silencing of the tumor suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:9700-4.
16. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa J, et al. Incidence and funtional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1998;98:6870-5.
17. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. Cancer Res 1997;57:808-11.
18. Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, et al. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. Cancer Res 1996;56: 4836-40.
19. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and

functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:6870-5.

20. Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS H, Kim YS. Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. Cancer Res 1999;59:2029-33.
21. Myohanen SK, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation can selectively silence individual p16INK4a alleles in neoplasia. Cancer Res 1998;58:591-3.
22. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. Cancer Res 1995;55:4525-30.
23. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5'CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. Nat Med 1995;1:686-92.
24. Xu CF, Solomon E. Mutations of the BRCA1 gene in human cancer. Semin Cancer Biol 1996;7:33-40.
25. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. J Natl Cancer Inst 2000;92:564-9.
26. Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. Cancer Res 1997;57:3347-50.
27. Catteau A, Harris WH, Xu CF, Solomon E. Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease

characteristics. Oncogene 1999;1:1957-65.

28. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh F, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. Science 1995;268:1336-8.
29. Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abrraham JM, et al. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. Nat Genet 1996;14:255-7.
30. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the *BAX* gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. Science 1997;275:967-9.
31. Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. Cancer Res 1999;59:2307-12.
32. Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:710-5.
33. Toyota M, Ahuja n, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, et al. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. Cancer Res 1999;59:5438-42.
34. Dietmeter W, Wallinger S, Bocker T, Killmann F, Fishel R, Ruschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. Cancer Res 1997;57:4749-56.

35. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:9821-6.

36. Simpson DJ, Hibberts NA, Mcnicol AM, Clayton RN, Farrell WE. Loss of pRb Expression in pituitary adenomas is assiciated with methylation of the RB1 CpG island. Cancer Res 2000;60:1211-6.

37. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. Nat Genet 1995;9:48-66.

38. Moslein G, Tester DJ, Linder NM, Honchel R, Cunningham JM, French AJ, et al. Microsatellite instability and mutation analysis of hMSH2 and hMLH1 in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer. Hum Mol Gent 1996;5: 1245-52.

39. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5'CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. Nat Med 1995; 1:686-92.

40. Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. Cancer Res 1997;57:3347-50.

41. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:9700-4.

42. Li Q, Ahuja N, Burger PC, Issa JP. Methylation and silencing of the

Thrombospondin-1 promoter in human cancer. Oncogene 1999;18:3284-9.

43. Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, Davidson NE. Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. Cancer Res 1994;54:2552-5.
44. Romanov GA, Vanyushin BF. Methylation of eiterated sequences in mammalian DNAs. Effects of the tissue type, age, malignancy and hormonal induction. Biochim Biophys Acta 1981;653:204-18.
45. Wheeler JM, Loukola A, Aaltonen LA, Mortensen NJ, Bodmer WF. The role of hypermethylation of the hMLH1 promoter region in HNPCC versus MSI+ sporadic colorectal cancers. J Med Genet 2000;37:588-92.
46. Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, Iversen OE, Jacobs IJ, Akslen LA, et al. Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas. Clin Cancer Res 2000;6:3607-13.
47. Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. Int J Cancer 2000;87:200-3.
48. Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, et al. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. J Natl Cancer Inst 2000;92:569-73.
49. Shim YH, Kang GH, Ro JY. Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. Lab Invest 2000;80:689-95.
50. Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, et al. Hypermethylation of

multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res 2000;60:1835-9.

51. Nyce J, Leonard S, Canupp D, Schulz S, Wong S. Epigenetic mechanisms of drug resistance: drug-induced DNA hypermethylation and drug resistance. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:2960-4.

52. Jarrard DF, Kinoshita H, Shi Y, Sandefur C, Hoff D, Meisner LF, et al. Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. Cancer Res 1998;58:5310-4.

Abstract

DNA methylation of cancer-related genes in gastric cancer with microsatellite instability

Yun Hee Kim

Brain Korea Project 21

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Associate Professor Hoguen Kim)

DNA methylation is one of the epigenetic modifications, and cancers often exhibit an aberrant methylation of gene promoter regions that is associated with loss of transcriptional activity. Recently aberrant methylation is found in many tumors and can be associated with the inactivation of tumor suppressor gene expression. As an example for the role of DNA methylation in carcinogenesis, studies of sporadic gastric cancer exhibiting microsatellite instability demonstrated a high frequency of promoter region hypermethylation of *hMLH1*, a member of mismatch repair genes. However, it remains to be determined whether this methylation is only gene specific-methylation rather than a global methylation of the genome.

To characterize the mechanism responsible for frequent methylation of *hMLH1*

promoter in gastric cancer exhibiting MSI, we examined the promoter regions coding for *hMLH1* and tumor suppressor genes (*p16, E-cadherin, Rb, VHL*) by methylation - specific PCR (MSP) method. In addition, CpG island methylator phenotype (CIMP) was determined to define the methylation status of the genome in 38 cases of gastric cancers (20 cases of MSI-positive, 18 cases of MSI-negative).

In MSI-positive tumors, most frequent methylation was observed in *hMLH1* (80%) and *p16* (10%) but no methylation was found in *E-cadherin, Rb, VHL.* In MSI-negative tumors, *hMLH1* and *p16* methylation showed rare but frequent methylation was observed in *Rb* (22.2%), *E-cadherin* (11.1%). In addition, of the 38 cases, 2 cases (5.2%) were CIMP+, 7 cases (18.4%) were CIMP-I, and 29 cases (76.4%) were CIMP-, and all of the CIMP+ cases were MSI-positive. In conclusion, these results suggest that *hMLH1* methylation was gene specific event in gastric cancer with MSI.

Key Words : methylation, *hMLH1*, MSI, CIMP