# 고빈도 현미부수체 불안정형 대장암 및 위암에서 표적유전자의 동정 및 돌연변이형 유전자 산물의 발현 분석

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 남 균

# 고빈도 현미부수체 불안정형 대장암 및 위암에서 표적유전자의 동정 및 돌연변이형 유전자 산물의 발현 분석

지도교수 김 호 근

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 남 균

# 김남균의 박사학위논문을 인준함

심사위원_____ 인

심사위원_____ 인

심사위원_____ 인

심사위원_____ 인

심사위원_____ 인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

# 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 연구자로서의 정열과 학자로서의 성찰 그리고 스승으로서의 혜안으로 지도해주신 지도 교수 김호근 교수님께 깊은 존경과 감사의 말씀을 드립니다. 부족한 논문을 심사하여 주신 김주항 교수님, 이진성 교수님, 박전한 교수님, 최강열 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 아울러 오늘이 있기까지 많은 격려와 지도를 아끼지 않으신 본과의 박찬일 교수님, 김태승 교수님, 조상호 교수님, 신동환 교수님, 양우익 교수님, 박영년 교수님, 그리고 조남훈 교수님께 감사드립니다.

지금 이 순간 일일이 헤아릴 수 없을 정도로 많은 사람들이 생각이 납니다. 너무나 많은 사람들에게 마음의 빚을 졌기 때문일 겁니다. 항상 여유와 웃음을 잃지 않으며 많은 일들을 도와주신 이용산님, 저의 부족한 면을 많이 발견하고 채워준 김현기님, 기쁨과 슬픔을 함께했던 최연락님, 지금은 졸업해서 각자 자신의 위치에서 충실히 하고 있을 김정진님, 백명진님, 김윤희님, 음으로 양으로 많은 도움 주신 최유정님, 김지은님, 김세경님, 그리고 이제 갓 대학원생이 될 강현주님께 감사의 마음을 전합니다. 오래된 술처럼 좋은 친구 김형관, 멀리 있지만 늘 가까이에 있는 안신태, 새로운 세상에 첫발을 내딛는 김선홍 그리고 자주 보지는 못하지만 항상 염려와 응원을 아끼지 않는 김태현형, 이수진, 서경이, 정종철 친구들에게 그간의 관심과 우정에 대하여 고마움의 뜻을 전합니다.

깊게 패인 주름살만큼 이제껏 헌신적으로 뒷바라지 해주셨던 부모님과 장인, 장모님께 감사드립니다. 아울러, 자주 찾아 뵙지 못했지만 항상 염려해 주시는 친척분들과 형님들, 형수님, 누나, 동생에게 감사드립니다. 가까운 곳에 계시면서 많은 도움을 주신 처형, 동서, 민병에게 감사의 말을 전합니다. 눈에 넣어도 아프지 않다라는 말을 이해하게 해준 우리 아이들 형건, 민수에게 많이 놀아주지 못해 미안하다는 그리고 사랑한다는 말을 전하고 싶습니다. 마지막으로 사고뭉치 두아이의 엄마로, 매일 바쁜 척만 하는 한 남자의 아내로 헌신적으로 희생해준 아내 최연희에게 가슴 깊은 곳에서부터의 존경과 사랑의 마음을 전합니다.

저자씀

# 목 차

국문요약..... 1

I. 서론 ..... 3

II. 재료 및 방법..... 8

1. 암조직 선택 ..... 8

2. 세포주 배양 ..... 8

3. 조직 및 세포주로부터 DNA, RNA 및 단백질 추출 ..... 9

4. 대상 세포주 및 종양조직에서 MSI 판정 ..... 9

5. PCR을 이용한 체이동돌연변이 분석 ..... 10

6. 염기서열 분석 ..... 12

7. 역전사 중합효소 연쇄반응..... 12

8. Western blotting ..... 13

9. cMNR 을 포함하는 유전자의 체계적 동정 ..... 14

III. 결과..... 15

1. MSI-H 대장암과 위암의 임상병리학적 특성..... 15

2. 대장암과 위암에서 MSI 빈도 ..... 15

3. MSI 양성 대장암과 위암에서 *hRad50, BLM, hMSH6, BRCA1, ATM, NBS1* 유전자의 체이동돌연변이 분석 ..... 15

4. 아데노신 단반복염기서열의 길이와 돌연변이율과의 상관관계 ..... 17

5. MSI-H 종양에서 체이동 돌연변이의 증가와
임상병리학적 특성과의 상관관계 ..... 20
6. 사람 유전자 데이터베이스에서 단백질 지령부위내에
단반복 염기서열을 포함하는 유전자의 탐색 ..... 21
7. 단백질 지령부위내에 단반복 염기서열을 포함하는
유전자의 재확인 및 선별 ..... 21
8. cMNR을 포함하는 유전자들의 체이동 돌연변이율..... 24
9. 복제오류교정 결함 세포주에서 표적 유전자의
돌연변이형 전사체 발현 탐색..... 26
10. 복제오류교정 결함 세포주에서 표적 유전자의
돌연변이형 단백질 발현 탐색..... 27
IV. 고찰..... 29
V. 결론..... 33
참고문헌..... 34
영문요약..... 41

# 표 목 차

**Table 1**. Genes encoding enzymes of DNA mismatch repair..... 4
**Table 2.** Target genes for frameshift mutations in MSI - H colorectal carcinomas ..... 7
**Table 3.** Primers used for the detection of coding mononucleotide repeat ..... 11
**Table 4.** Frequency of frameshift mutations of the six genes involved in DNA repair in 75 MSI - H gastrointestinal carcinomas..... 16
**Table 5.** Characteristics and incidence of frameshift mutations of the 12 target genes in the MSI - H colorectal and gastric carcinomas..... 19
**Table 6.** Frameshift mutations of target genes and clinicopathologic features of the MSI - H colorectal and gastric carcinomas..... 20
**Table 7**. List and description of genes analyzed..... 23

# 그 림 목 차

**Figure 1.** Alterations of the coding polydeoxyadenosine mononucleotide repeat numbers of the *hRAD50* gene in the MSI - H colorectal and gastric carcinomas. ..... 17
**Figure 2.** Nucleotide sequence analysis of the representative clones of *hRAD50* from MSI - H gastric carcinomas. ..... 17
**Figure 3.** Alterations of the coding polydeoxyadenosine mononucleotide repeat numbers of *TGF - β RII, hMSH3* and *TCF - 4* genes in colorectal and gastric carcinomas. .... 18
**Figure 4.** Frequency of frameshift mutations of 12 genes in 39 MSI - H colorectal carcinomas and 40 MSI - H gastric carcinomas..... 19
**Figure 5.** Distribution of cMNR candidate sequences from UniGene database. ..... 21

**Figure 6.** Database search for coding sequences with MNR and confirmation and selection of candidate target genes containing cMNR. ..... 22
**Figure 7.** Alterations of the cMNR number of the *MARCKS, FLJ11383* and *TAF1B* genes in MSI - H colorectal carcinomas. .... 24
**Figure 8.** Nucleotide sequence analysis of the representative clones of *MARCKS*, *FLJ11383* and *TAF1B* from MSI - H colorectal carcinomas. ..... 25
**Figure 9.** Frequency of frameshift mutations of 33 genes in 39 MSI - H colorectal carcinomas and 8 MMR - deficient cell lines. ..... 25
**Figure 10.** Analysis of frameshift mutations and expression profiles of *BAX,* and *TCF - 4* in 16 cell lines. ..... 26
**Figure 11.** Frameshift mutation and expression profiles of hRAD50 and hMSH6 in 16 cell lines and stabilization of the mutant mRNA with puromycin. ..... 27
**Figure 12.** Immunoblot analysis of MARCKS protein in colon cell lines. ..... 28
**Figure 13.** Prevention of degradation of MARCKS frameshift mutant protein and cathepsin B cleaved fragment by proteasome inhibitors..... 28
**Figure 14.** Molecular carcinogenesis pathway and major biological reaction processes to abolish the aberrant products resulting from the frameshift mutation of coding sequences of target genes in MSI - H tumors..... 32

국문요약

# 고빈도 현미부수체 불안정형 대장암 및 위암에서 표적유전자의 동정 및 돌연변이형 유전자 산물의 발현 분석

고빈도 현미부수체 불안정형(high microsatellite instability, MSI-H) 종양은 DNA 복제오류 교정 유전자의 결함으로 발생하며, 이로 인해 종양억제유전자, 세포고사관련 유전자 및 DNA 수선 관련 유전자와 같은 종양관련 유전자의 단백질 지령부위내에 존재하는 현미부수체에 체이동 돌연변이가 발생하여, 암진행이 일어나는 유형의 종양이다. MSI-H 종양의 체이동 돌연변이 산물을 진단 및 면역치료에 이용하고자 하는 시도가 진행되고 있으나, 보다 실제적인 응용을 위해서는 단백질 항원으로 이용될 수 있는 다양한 표적유전자를 동정하고, 돌연변이형 유전자 산물의 발현을 분석하는 연구가 필수적이라 할 수 있다. 이를 위하여 DNA 손상에 대한 감지기 역할을 하는 거대복합체로 알려진 BASC (BRCA1-associated genome surveillance complex)의 구성 유전자중 단백질 지령부위내 단반복 염기서열(coding mononucleotid repeat, cMNR)을 포함하는 유전자의 체이동 돌연변이를 조사하여 새로운 표적유전자를 동정하였다. 또한, 사람의 유전체 데이터베이스 탐색을 통해 cMNR을 포함하는 유전자를 발굴한 다음, 이들 유전자들의 MSI-H 대장암에서의 체이동 돌연변이율을 조사하였고, 동정된 표적유전자들의 돌연변이형 전사체 및 단백질의 발현 여부와 퇴화 기전을 조사하였다. 실험결과 BASC 복합체를 형성하는 유전자 중 *hRAD50* (31%), *BLM* (21%), *hMSH6* (21%)에서 빈번한 체이동 돌연변이가 나타났으나, BRCA1, ATM, NBS1에서는 돌연변이가 거의 나타나지 않았다. UniGene 데이터베이스 탐색을 통해 10개이상의 cMNR을 포함하는 33개의 유전자를 선별한 다음, MSI-H 대장암에서의 체이동 돌연변이를 조사하였는데, 가장 높은 돌연변이율을 나타낸 새로운 표적유전자는 *MARCKS* (72%), *FLJ11383* (74%), *TAF1B* (82%)였으며, 이중 *MARCKS*와 *FLJ11383*은 동형(biallelic) 돌연변이 빈도가 각각 36%, 21%로서 높았다.

돌연변이형 전사체의 발현은 *TGF-βRII, BAX, TCF-4* 및 *MARCKS* 등에서 관찰할 수 있었다. *hMSH6, hRad50* 유전자의 돌연변이형 전사체는 전부

또는 일부에서 발견할 수 없었으나, 단백질 합성 억제제인 puromycin을 처리하였을 때 발현하였다. 이는 *hMSH6, hRad50*의 돌연변이형 mRNA가 nonsense mediated mRNA decay (NMD) 기전을 통해 퇴화됨을 나타낸다. *MARCKS* 유전자의 동형 돌연변이를 포함하는 SNU-C4 세포주의 경우 MARCKS 단백질을 발현하지 않았지만, 특정한 프로테아좀 억제제에 의해 돌연변이형 단백질의 분해가 억제됨을 발견하였다.

결론적으로, 본연구를 통해 MSI-H 종양의 새로운 신규 표적유전자를 동정하였으며, 발생한 돌연변이는 RNA 혹은 단백질 수준에서 제거됨을 확인하였다. 발생한 체이동 돌연변이의 유전자 산물이 RNA 혹은 단백질 수준에서 제거되는 것은 암 면역 반응을 회피하는 하나의 기전으로 사료된다.

---

핵심되는 말: DNA 복제오류 교정, 현미부수체 불안정형, 단백질 지령부위내 단반복 염기서열, 체이동 돌연변이, 대장암.

# 고빈도 현미부수체 불안정형 대장암 및 위암에서 표적유전자의 동정 및 돌연변이형 유전자 산물의 발현 분석

<지도교수 **김 호 근**>

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 남 균

## I. 서론

현재까지 수행된 종양의 분자유전학적 연구결과를 종합하면, 암발생은 종양유발유전자의 활성이나 종양억제유전자의 불활성과 같은 유전적 이상이 여러 단계에 걸쳐 발생되고 축적되어 일어나는 일련의 과정으로 요약할 수 있다.[1] 이러한 전통적인 암 발생에 관한 유전적 모델은 대장암의 경우, 선종에서 선암종에 이르는 암 발생과정에서 발생단계마다 비교적 특이한 종양유발유전자의 활성 또는 종양억제유전자의 불활성이 발생하고, 그 결과로 많은 유전변화가 축적된 상태에서 악성 암이 발견된다는 실험적 사실에 근거를 두고 있다.[2] 이상과 같이 종양유발유전자와 종양억제유전자의 변형을 자주 일으키는 유형은 많은 수의 염색체에 이상이 초래되었기 때문에 염색체 불안정형(chromosomal instability, CIN)으로 분류한다.

암발생의 기전을 설명할 수 있는 새로운 유전모델은 현미부수체 불안정형 (microsatellite instability, MSI) 대장암을 발견하게 됨으로써 가능하게 되었다.[3-5] 대장암의 일부에서 반복된 염기서열에 빈번한 삽입 및 결손이 일어나는 MSI가 발견되었고, 이들은 DNA 복제오류 교정에 관여하는 유전자들의 장애에 의한 것이라는 유전적 기전이 밝혀짐에 따라,[6-9] 이들을 고변이 표현형 종양 또는 고빈도 현미부수체 불안정형 종양(high microsatellite instability, MSI-H)으로 세분하게 되었고, 이러한 유형은 대장암에서 뿐 아니라 위암, 자궁내막암 등에서도 빈번하게 발견됨도 밝혀졌다.[10-11] MSI 대장암은 나쁜 분화도와, 점액성 분화(mucinous

differentiation), 림프구 침윤, 침습성 감소(reduced invasiveness), 양호한 예후, 근위부 발생, 높은 여성 발생율 및 다발성 등과 같은 임상병리학적 특징을 나타낸다.[12]

현재까지 사람에게서 알려진 DNA 복제오류 교정에 관여하는 유전자는 *hMSH2, hMSH3, hMSH6, hMLH1, hMLH3, hPMS1* 및 *hPMS2* 등이며, 이들은 대장균의 복제오류과정에 관여하는 MutHLS 체계와 구조적, 기능적으로 유사하다(Table 1). 대장균의 MutHLS체계는 *mutS, mutL, mutH, mutU* 유전자로 구성되어 있으며, 복제오류가 발생했을 때 비메틸화된 부위를 인식하고 자른 다음, 재합성하는 기능을 한다.[13-15] 사람의 DNA 복제오류 교정 체계는 대장균 체계보다 더 복잡하다. 대장균의 MutS와 관련있는 유전자는 *hMSH2* (human mutS homologue 2), *hMSH6* (GTBP, G/T mismatch binding protein)와 *hMSH3*이며, 대장균의 MutL 유전자와 관련있는 유전자는 *hMLH1* (human mutL homologue 1), *hMLH3*, *hPMS1* (human postmeiotic segregation 1)과 *hPMS2*이다.[16]

**Table 1**. Genes encoding enzymes of DNA mismatch repair

| *E. coli* | *S. cerevisiae* | Human | Functions of eukaryotic proteins |
|---|---|---|---|
| MutS | MSH1 | - | DNA repair in mitochondira |
| " | MSH2 | MSH2 | Single mismatch and small loop repair (with MSH6 to form MutSα); loop repair (with MSH3 to form Muts ) |
| " | MSH3 | MSH3 | Loop repair (with MSH2 to form MutS ) |
| " | MSH4 | MSH4 | Meiosis (with MLH1) |
| " | MSH5 | MSH5 | Meiosis (with MLH1) |
| " | MSH6 | MSH6 | Single mismatch and small loop repair (with MSH6 to form MutS ) |
| MutL | MLH1 | MLH1 | Mismatch repair |
| " | PMS1 | PMS1 | Mismatch repair (with MLH1 to form MutL ) |
| " | MLH2 | MLH2 | Not involved in mismatch repair (yeast); evidence ambiguous (humans). Interacts with MLH1 to form MutL |
| " | MLH3 | MLH3 | Probably involved in loop repair (with MLH1) |
| MutH | - | - | - |
| uvrD | - | - | - |
| - | Exonuclease 1 | Exonuclease 1 | Mismatch repair (5' to 3' polarity) |
| - | RAD27 | Dnase IV FEN-1 | Mismatch repair (Flap endonuclease) |

선천성 비용종성 대장암(hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma, HNPCC) 환자들중 상당수가 DNA 복제오류 교정에 관여하는 유전자에 배선 돌연변이(germline mutation)가 있고, 이들에서 발생한 대부분의 종양에서는 MSI가 발생한다는 것이 알려진 후, 이들에게 발생한 배선 돌연변이의 빈도와 종류에 관한 많은 연구가 있었다.[6-8] 현재까지의 연구결과로는 서구의 경우 HNPCC환자들 중 DNA 복제오류 교정유전자들의 배선돌연변이는 *hMLH1*이 33%, *hMSH2*가 31%, *hPMS2* 및 *hPMS1*이 2%가 발견되었으며, *hMSH6*나 *hMSH3*의 돌연변이는 보고되지 않았다.[17] 우리나라 HNPCC 환자들에서 *hMLH1*의 돌연변이가 32%에서 발견되었으며, *hMSH2*의 돌연변이는 발견되지 않았다.[18]

이에 반하여 대부분의 MSI 양성 특발성 대장암(sporadic colorectal carcinoma)에서의 DNA 복제오류 교정 유전자 불활성화는 HNPCC와는 다른 양상을 나타낸다. *hMLH1* 유전자의 돌연변이는 발견되지 않으며, 대신 프로모터 부위에 발생한 메틸화에 의해 단백질 발현이 억제된다.[19-22] *hMSH3*와 *hMSH6* 유전자는 MSI 때문에 체이동 돌연변이가 발생되며, 후기단계의 MSI 대장암에 주로 나타난다.[23] DNA 복제오류 교정에 관여하는 유전자가 손상된 MSI-H 종양에서 암발생에 중요한 유전자로 알려진 *p53, k-ras, APC* 등과 같은 종양유전자나 종양억제유전자의 변이는 오히려 드물게 발견되고 있으며,[3,4,24-25] 대부분의 돌연변이는 단백질지령부위내 현미부수체를 포함하는 유전자들에서 보고되었다.[26]

현미부수체(microsatellite)는 1개 내지 6개의 염기가 반복적으로 나타나는 염기서열을 일컬으며, 대부분 비단백 부호에 위치하고 있다. 특히 CA/GT 반복은 사람 유전체에서 24개 이상의 반복 염기서열이 100,000개 이상 존재하는 것으로 보고되었다.[28] 현미부수체는 개체에 따른 다형성이 매우 높기 때문에 훌륭한 유전지표로서 사용되고 있다. 유전체에 광범위하게 존재하는 현미부수체는 핵산의 보수와 세포분열시 유전자 재조합에 관여함으로써 유전체 다양성과 안정성을 유지하는 역할을 하지만, DNA 복제과정시 발생하는 작은 부정합 고리형태로 인해 염기의 삽입이나 결손이 나타나는 미끄럼(slippage) 현상이 일어나 현미부수체 불안정형이 발생할

가능성이 높다. 모든 분열세포에서 이러한 현상이 나타나지만, 복제오류 교정계 때문에 현미부수체의 반복 염기서열은 정상적으로 유지된다. 하지만, 복제오류교정 유전자의 결함은 발생한 복제오류를 교정할 수 없기 때문에 MSI를 초래하게 된다. 현미부수체가 비단백부호 이외에도 일부 유전자의 단백질 지령부위에 현미부수체가 존재한다는 것이 밝혀짐으로써 DNA 복제오류교정 유전자의 결함과 MSI, 그리고 발암과정과의 상관관계가 이해될 수 있었다. 유전자의 단백질 지령부위에서 발생한 체이동돌연변이는 필연적으로 정상형에 비해 절단된 단백질을 만들 것으로 추정된다.

현재까지 단백질 지령부위에 위치한 현미부수체의 체이동 돌연변이 연구는 세포내 신호전달(*TGF-βRII, IGFIIR, PTEN*),[29-31] 세포고사(*BAX, Caspase 5*),[32,33] DNA 수선(*hMSH3, hMSH6, MBD4*),[34,35] 전사조절(*TCF-4*),[36] 면역체계감시(*β2M*)[37] 등과 같이 세포의 성장과 생존 조절 기능을 가진 유전자군들을 중심으로 진행되었다(Table 2). 이들 중 체이동 돌연변이의 비율이 높고, 동형(biallelic) 돌연변이가 발생하며 기능적으로 종양억제유전자 역할을 하는 유전자들이 MSI-H 종양의 표적유전자로 제안되었다.[38] 표적유전자의 체이동 돌연변이 빈도는 각 유전자마다 상당한 차이를 나타내는데, 이는 반복염기서열이나 그 주위의 염색질의 구조때문에 체이동 돌연변이의 발생율이 다르게 나타나거나 혹은 종양 진행과정 중에 특정 돌연변이가 선택되기 때문인 것으로 추정하고 있다.[39]

본 연구에서는 MSI 대장암 및 위암의 발암과정에 관여하는 표적유전자를 탐색하기 위하여, DNA 손상 교정 기능을 가진 유전자군내에서 표적유전자들의 탐색과 데이터베이스 탐색을 통해 cMNR을 포함하는 유전자를 확인하고 표적유전자를 탐색하고자 하였다. DNA 손상 교정 유전자의 기능 상실은 또 다른 돌연변이나 유전체 변화를 유발하기 때문에 MSI 종양의 발암기전을 연구하는데 중요한 단서를 제공할 것이다. 최근 DNA 손상 교정 단백질(hMSH2, hMSH6, hMLH1, ATM, BLM), hRad50-hMRE11-NBS1 단백질 복합체, DNA replication factor C와 BRCA1이 결합하여 DNA 손상에 대한 감지기 역할을 하는 거대복합체 (BASC, BRCA1-associated genome surveillance complex)를 형성한다고 보고되었다.[40]

**Table 2.** Target genes for frameshift mutations in MSI-H colorectal carcinomas.

| Gene | Chromosomal location | Function | Type of repeat | Proportion of tumors with mutations | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| *TGF-βRII* | 3p22 | Tumor suppressor | (A)10 | 100/111 (90%) | [41] |
| *Caspase 5* | 11q22.2-q22.3 | Apoptosis | (A)10 | 24/39 (62%) | [33] |
| *ACTRII* | 2q22.2-q23.3 | Serine/threonine kinase | (A)8 | 25/43 (58%) | [42] |
| *BAX* | 19q13.3-q13.4 | Promotes apoptosis | (G)8 | 21/41 (51%) | [32] |
| *SEC63* | 6q21 | Protein folding and translocation | (A)10, (A)9 in exon 16 | 21/43 (49%) | [42] |
| *AIM2* | 1q22 | Tumor suppressor | (A)10 | 20/42 (48%) | [42] |
| *MBD4* | 3q21-q22 | DNA glycosylase, Methyl-CpG binding protein | (A)10 | 10/23 (43%) | [43] |
| *OGT* | Xq13 | O-linked glycosylation | (T)10 | 8/20 (40%) | [44] |
| *hMSH3* | 5q11-q12 | DNA mismatch repair | (A)8 | 16/41 (39%) | [34] |
| *TCF-4* | 18q21.1 | Transcription factor (Wnt signaling) | (A)9 | 19/49 (39%) | [36] |
| *WISP3* | 6q22-q23 | Signal transduction (Wnt signaling) | (A)9 | 11/36 (31%) | [45] |
| *hMSH6* | 2p16 | DNA mismatch repair | (C)8 | 12/40 (30%) | [34] |
| *RIZ* | 1p36 | Tumor suppressor | (A)8, (A)9 in exon 8 | 15/51 (27%) | [46] |
| *AXIN2* | 17q23-q24 | Wnt signaling | (GA)4 | 11/45 (24%) | [47] |
| *PTEN* | 10q23.3 | Tumor suppressor | (A)6 in exon 7, exon8 | 6/32 (19%) | [31] |
| *BLM* | 15q26.1 | DNA helicase | (A)9 | 10/63 (16%) | [48] |
| *IGFIIR* | 6q26 | Tumor suppressor | (G)9 | 3/35 (9%) | [29] |

흥미롭게도 이 BASC 복합체 내에는 단백질 지령 부위내에 단반복염기서열(coding mononucleotide repeat, cMNR)이 나타나는 여러 유전자가 존재하였다. *hRAD50* 유전자와 *BLM* 유전자는 (A)9, *BRCA1* 유전자는 (A)8, *hMSH6* 유전자는 (C)8, *NBS1*은 (A)7, *ATM* 유전자는 (T)7 cMNR을 포함하고 있었다. 이들 중 *hRAD50, ATM, NBS1*은 MSI 종양에서 체이동 돌연변이가 발생하는지에 대한 연구가 진행되지 않았으므로, 이들 중 어떤 유전자가 새로운 표적유전자인지를 확인하였다. 또한, cMNR의 길이와 체이동 돌연변이의 비율 그리고 임상병리학적 특징과의 상관관계를 조사하였다. MSI 종양의 새로운 표적유전자를 탐색하기 위하여 사람 전체 유전자중 cMNR을 포함하는 유전자를 데이터베이스 탐색을 통해 확인한 후, MSI 대장암에서의 체이동 돌연변이를 조사하였다. 아울러 발생한 체이동 돌연변이가 돌연변이형 전사체 및 단백질의 발현 여부와 퇴화 기전을 조사하였다.

## Ⅱ. 재료 및 방법

### 1. 암조직 선택

암조직은 1996년 12월부터 1999년 11월까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스병원에서 채취한 230예의 대장암 조직중 MSI 양성 39예와 MSI 음성 24예를 이용하였으며, 495예의 위암 조직중 MSI 양성 40예를 이용하였다. 39예의 MSI-H 대장암중 15예는 남성이었고 24예는 여성이었으며, 34세에서 80세까지의 나이분포(평균 54±12년)를 나타내었다. 임상병기는 1기가 1예, 2기가 17예, 3기가 10예, 4기가 1예였다. 비장만곡(splenic flexure) 근위부에 위치하고 있는 31예의 MSI-H 대장암은 우측 대장암으로 분류되었으며, 비장만곡 원위부에 위치한 8예의 MSI-H 대장암은 좌측 대장암으로 분류되었다. 40예의 MSI-H 위암중 24예는 남성이었고 16예는 여성이었으며, 36세에서 72세까지의 나이분포 (평균 62±11년)를 나타냈다. 임상병기 1기가 18예, 2기가 6예, 3기가 7예, 4기가 9였다. 1예는 기저부(fundus)에, 7예는 체부(body)에, 그리고 나머지 32예는 유문부(antrum)에 위치하고 있었다.

대조조직으로 각각에 해당되는 장점막조직을 채취하였으며, 사용 전까지 -70℃에서 보관하였다. cryostat fractionation법을 이용하여 선택적으로 암세포를 분리하였고, 분리한 암조직 내에 암세포가 차지하는 비율을 채취조직의 일부를 현미경으로 관찰하여 측정하였다.

### 2. 세포주 배양

실험에 사용한 사람 위암 세포주 SNU-1, SNU-16, SNU-601, SNU-638, SNU-719와 사람 대장암 세포주 LS174T, HCT-8, NCI-H747, NCI-H508, SNU-C2A, SNU-C4, DLD-1, HCT116, LOVO, SW480, HT-29는 연세의대 미생물학교실, ATCC (American Type Culture Collection; http://www.atcc.org)와 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank;

http://cellbank.snu.ac.kr)에서 분양받아 사용하였다. 세포주들은 10% 우태아혈청 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)과 100 U/mL의 penicillin, 100 μg/mL의 streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 (Life Technologies) 배지에서 5% $CO_2$를 포함하는 37℃ 배양기에서 배양하였다. 단백질합성 억제제인 puromycin (Sigma, St. Louis, MO, USA)은 30 μg/mL의 농도로 6시간동안 처리하였다.

## 3. 조직 및 세포주로부터 DNA, RNA 및 단백질 추출

Cryostat fractionation된 냉동 보관 조직은 멸균된 칼로 잘게 저민 후, 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 10시간 이상 녹였다. 그후 phenol/chloroform extraction 법으로 DNA를 순수분리하였고 분광광도계를 이용하여 농도를 측정하였다. RNA는 RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 분리하였다.

조직에서의 단백질 추출은 조직을 액체질소와 막자사발을 이용하여 동결 분쇄하여 미세한 가루상태로 만든 뒤, 단백질분해효소억제제 (1 μg/mL aprotonin, 1 μg/mL leupeptin, 1 μg/mL pepstatin, 1 μg/mL chemostatin, 1 mM PMSF) 및 탈인산화효소억제제 (1 mM sodium vanadate, 1mM sodium fluoride)를 함유한 RIPA 완충액(10 mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA)에 부유시킨 다음 원심분리하여 추출하였다. 배양된 세포는 배지를 제거한 후 차가운 PBS로 2회 세척한 다음 RIPA 완충액을 사용하여 용해시킨 뒤 원심분리하여 세포 추출액을 준비하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하였다.

## 4. 대상 세포주 및 종양조직에서 MSI 판정

MSI 종양을 식별하기 위하여 1997년 NCI meeting 에서 정한 5개의 표지자(*BAT26, BAT25, D2S123, D5S346, D17S250*)를 사용하여

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다.[38] 이 중 2개의 표지자 이상에서 양성인 종양을 MSI-H, 1개의 표지자에서 양성인 종양을 MSI-L로 세분하여 해당 유전자 및 관련 유전자의 변화를 분석하였으며, 세포주에서는 *BAT26*과 *BAT25* 표지자로 분석하였다. PCR 반응은 50 ng의 genomic DNA에 총 20 ㎕가 되도록 1.5 mM $MgCl_2$, 20 pmol 프라이머, 0.2 mM dATP, dGTP, dTTP, 5 ㎛M dCTP, 1 ㎛Ci [α-$^{32}$P] dCTP (3,000 Ci/mmol; NEN DuPont, Boston, MA, USA), 1 X PCR buffer와 1.25 U *Taq* polymerase (Life Technologies)를 첨가하였다. DNA 변성(denaturation)을 위하여 95℃에서 5분간 가열하였고 80℃에서 10분간 반응을 멈추는 동안 *Taq* polymerase를 첨가하였으며, 이후 95℃에서 30초간의 변성과정, 55℃~60℃에서 30초간의 재결합(annealing)과정, 그리고 72℃에서 15초간의 신장(extension) 과정 등 3과정을 20회에서 30회 반복 시행하였고, 마지막으로 추가 신장과정을 72℃에서 5분간 진행하였다. 이상과 같이 합성된 PCR 산물을 같은 부피의 loading buffer (95% formamide, 20 mM E`DTA, 0.05% xylene cyanol FF, 0.05% bromophenol blue)에 섞어 95℃에서 10분간 가열한 다음 즉시 얼음에 넣고, 그 중 5 ㎕만을 7.5 M의 urea를 포함하는 6% 변성 폴리아크릴아마이드 젤에 loading하여 60 W로 1시간 30분에서 2시간 동안 전기영동시켰다. 전기영동이 끝난 젤을 젤건조기에서 1시간 동안 말린 후 Kodak XAR-5 film (Kodak, Rochester, NY, USA)에 현상하여 합성물을 판독하였다. 이때 현미부수체의 삽입이나 결손이 있으면 정상 대조군의 조직에서 합성된 DNA의 띠와는 다른 크기의 합성 DNA가 종양조직에 나타나는데 이를 체이동돌연변이로 판정하였다.

## 5. PCR을 이용한 체이동돌연변이 분석

각 유전자의 체이동 돌연변이 분석은 상기에서 기술한 MSI 분석과 동일한 방식으로 진행하였다. PCR에 이용된 프라이머는 Table 3에 기술되어 있다.

**Table 3.** Primers used for the detection of coding mononucleotide repeat length

| Gene name | Forward primer | Reverse primer | PCR product length |
|---|---|---|---|
| *TGF-β RII* | 5'-CTTTATTCTGGAAGATGCTGC | 5'-GAAGAAAGTCTCACCAGG | 73 |
| *TAF1B* | 5'-CCAAATAAAAGCCCTCAACC | 5'-TGTCCTGACATCATGAAGGTG | 115 |
| *FLJ11383* | 5'-GGAAAATTATGAACAGCCACAA | 5'-GCAGCCAAATGCTTGTTATG | 121 |
| *MARCKS* | 5'-CCGCCTCCTCGACTTCTT | 5'-AGCCGCTCAGCTTGAAAGAC | 120 |
| *AIM2* | 5'-CCACTCATCGACTGCATCTC | 5'-TGGCTTGAATTGGTCCTTTT | 102 |
| *FLJ11186* | 5'-GCAAGAACAGCCATCAAGAA | 5'-GGAATGATTTGTTGTTTTCCTT | 143 |
| *SEC63* | 5'-AGTAAAGGACCCAAGAAAACTGC | 5'-TGCTTTTGTTTCTGTTGCTTTG | 104 |
| *Caspase 5* | 5'-CAGAGTTATGTCTTAGGTGAAGG | 5'-ACCATGAAGAACATCTTTGCCCAG | 141 |
| *TCF6L1* | 5'-TTGGAAAAAGAAATCATGGACA | 5'-AATCTCAATTCTTTACCATAAGAAAA | 104 |
| *KIAA1470* | 5'-GCATTTGTTCTGGAAGCTCGT | 5'-GTGATGAGAAACCGGAGAGAA | 143 |
| *OGT* | 5'-TCACTTTTGGCTGGTCAGAG | 5'-GGGAGGGAAAGGAGGTAAAG | 116 |
| *UVRAG* | 5'-TTTATTTTTAAACATTGTGAGTATG | 5'-TTTTTAACTGCAGGCATTCAC | 116 |
| *KIAA1052* | 5'-GTCAACTTCTGGGGCCATTA | 5'-GAGGCATCCACTGACTCACC | 104 |
| *SPINK5* | 5'-TGAGGCGTTTGTTCACTTTG | 5'-TGCTCCTGTCTTCATCCTCTT | 99 |
| *FLJ20139* | 5'-GCCAACACAAAGTGTCTCCTC | 5'-GACTGTTGGATGGATGATGC | 89 |
| *ATR* | 5'-GCTTCTGTCTGCAAGCCATT | 5'-TGAAAGCAAGTTTTACTGGACTAGG | 70 |
| *FLJ11222* | 5'-GCTGCAGAAGACAAACGAAAC | 5'-GCAGCTGCTCATAAGCTTCC | 106 |
| *FLJ13615* | 5'-GTTGATTATTTTCTTGGCTGAAC | 5'-GCACTTCTTTTTCCTCTTTCTTGA | 136 |
| *MBD4* | 5'-5'-TGACCAGTGAAGAAACAGC | 5'-GTTGTGTTCTGAGTCTTTGG | 138 |
| *SYCP1* | 5'-CCCCTTCATCTCTAACAACCC | 5'-CACTGATTCTCTGAAATTAAACAAATAAC | 153 |
| *ABCF1* | 5'-CCTGGGCTTCATTTTCTCAC | 5'-CCTGCCTTTTCGGGTATCTC | 73 |
| *PRKWNK1* | 5'-AGTTGGTACGGGAGGAGCA | 5'-CTGGGAAGCACTGGATTGTT | 83 |
| *KIAA1268* | 5'-GTTTCCTCTGTTTTGCAGGA | 5'-GACAGCCAGAGGCTACGAAC | 90 |
| *RFC3* | 5'-TTTTCTTTGTCCACAGACTCCA | 5'-AAGGTGGTAGTTACTTGCAATGG | 70 |
| *GART* | 5'-AGTGTTGAAGAATGGCTCCC | 5'-TGTTCCAGATATTAAGACAGCCAC | 82 |
| *FLJ20333* | 5'-GGCAAGGCAGCAAATTTAGA | 5'-GCATCTAAGGCACTATTCCAGA | 124 |
| *DKFZp564C2478* | 5'-GGAGAGATGCCAAGGTGAAA | 5'-GCCTTGGGTTAGGATGACAG | 143 |
| *PRKDC* | 5'-GACTCATGGATGAATTTAAAATTGG | 5'-TTTGAAAATAACATGTAAATGCATCTC | 113 |
| *FLJ11712* | 5'-GGCTAAAGTTGACAAGAGTGGAA | 5'-GTCAGGAAGGACAAACTGAAACA | 147 |
| *CHD2* | 5'-CTATCCCTGTGGACCCTGAA | 5'-ACGGTACGACCATCTAAGCA | 71 |
| *KIAA1096* | 5'-GGCAAATGAAGAATGGGAAA | 5'-GGAGGTAGAACATTCTCTCCAA | 129 |
| *MAC30* | 5'-TGTTGCGGAGCCCCTAC | 5'-AACCACCCTGTAGGCATCTC | 93 |
| *HMG2L1* | 5'-CTCCACACAGATGGGCATAG | 5'-CCCCCACCACACTTAAAAGA | 103 |
| *hRAD50* | 5'-AACTGCGACTTGCTCCAGAT | 5'-CAAGTCCCAGCATTTCATCA | 87 |
| *hMSH6* | 5'-GGGTGATGGTCCTATGTGTC | 5'-CGTAATGCAAGGATGGCGT | 94 |
| *ATM* | 5'-CATGCTGTTACCAAAGGATGC | 5'-TCGCACACTGAATAGCCTTG | 89 |
| *BLM* | 5'-CTCTGCCACCAGGAAGAATC | 5'-ACAGCAGTGCTTGTGAGAAC | 153 |
| *NBS1* | 5'-AGCAGACCAACTCCATCAGA | 5'-CAGAGACATGAGAGAAGTTATC | 81 |

## 6. 염기서열 분석

체이동 돌연변이로 판정된 PCR 산물을 변성 폴리아크릴아마이드 젤에서 잘라낸 다음, 100 μℓ의 증류수에 넣고 5분간 끓인 후, 이중 2 μℓ 만을 이용하여 PCR을 다시 실시하였다. 반응 산물을 TOPO 벡터 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 ligation시킨 후 Top 10F 세포에 transformation시킨 다음, 각각 5예의 콜로니를 5 mL의 LB배지로 옮겨 배양한 후 minispin kit (Qiagen)를 이용하여 PCR 산물이 포함된 플라스미드 DNA를 순수분리하였다. 염기서열 분석은 Sanger의 dideoxy chain termination method로 수행하였고, 염기서열 분석은 T7 DNA sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA)를 사용하고 기본적으로 제작사의 추천된 방법에 따라 PCR에 이용된 프라이머를 이용하여 체이동 돌연변이된 염기서열을 확인하였다.

## 7. 역전사 중합효소 연쇄반응

1 μg의 총RNA에 1 μg의 random hexamer (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 1 μℓ의 10mM dNTP, MMLV reverse transcriptase (Life Technologies) 200 U를 첨가한 다음, 42℃에서 1시간, 37℃에서 1시간동안 반응시킨 뒤, 65℃에서 10분동안 반응하여 반응을 중지시켰다. 제조된 cDNA를 주형으로 하여 총 30 μℓ가 되도록 1.5 mM $MgCl_2$와 각각의 primer에 합당한 primer 조합을 넣고 0.2 mM dATP, dGTP, dTTP, 5 μM dCTP, 1 μCi [α-$^{32}$P] dCTP (3000 Ci/mmol; NEN DuPont), 1 X PCR buffer와 1.25 U *Taq* polymerase (Life Technologies)를 첨가하여 PCR 반응을 실시하였다. PCR 산물을 7.5 M urea를 포함하는 6% 변성 폴리아크릴아마이드 젤에 전개한 후, X-ray 필름에 감광시키고 자동현상기를 이용하여 필름을 현상하였다.

PCR을 위해 95℃에서 5분간 가열하였고, 80℃에서 10분간 반응을 멈추는 동안 *Taq* polymerase를 첨가하였으며, 이후 95℃에서 2분, 55℃에서 30초,

72℃에서 15초의 과정을 3회 반복한 다음, 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 15초의 과정을 22회 반복 시행하였고 추가 신장 과정을 72℃에서 5분간 진행하였다. RT-PCR primer로는 *BAX* 유전자는 BAX-F 5'-TGC TTC AGG GTT TCA TCC, BAX-R 5'-ACT CGC TCA GCT TCT TGG TG; *hMSH6* 유전자는 hMSH6-F 5'-ATC GCA GTG TTG GAT GTT TT, hMSH6-R 5'-CGT AAT GCA AGG ATG GCG T; *hRad50* 유전자는 hRad50-F 5'-AAC TGC GAC TTG CTC CAG AT, hRad50-F 5'-AAT CAA TTA TGC TTT GCC TCA; *TCF-4* 유전자는 TCF-4-F 5'-GG GAC AAG CAG CCG GGA G, TCF-4-R 5'-CAC CTT GTA TGT AGC GAA CGC을 이용하였다.

## 8. Western blotting

조직 및 세포로부터 추출된 단백질 20 μg을 SDS-PAGE로 전개한 후 Bio-Rad Western Blotter로 2시간동안 30 mA의 전류를 흘려 단백질들을 젤로부터 PVDF membrane으로 옮겼다. PVDF membrane을 5%의 무지방 우유를 함유한 TBST (10 mM Tris [pH 7.6], 120 mM NaCl, 0.1% Tween 20) 용액으로 1시간동안 교반한 뒤, TBST를 사용하여 5분 간격으로 3회간 실온에서 흔들어 주며 세척하였다. 세척한 membrane을 0.5%의 무지방 우유를 함유한 TBST에 1차 항체를 넣고 실온에서 2시간 동안, 혹은 4℃에서 밤새도록 천천히 흔들면서 반응시켰다. 일차항체 배양후 membrane을 15분 간격으로 TBST로써 흔들며 3회 씻어낸 뒤, 0.5%의 무지방 우유를 함유하는 TBST에 적당히 희석시킨 AP-conjugated anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotech.)와 1시간 반응시킨 후 TBST 를 사용하여 상기한 방법으로 세척한 다음, ECL plus Kit (Amersham Pharmacia) 을 사용하여 발광을 유도하고 X-Ray 필름에 노출시켰다.

## 9. cMNR 을 포함하는 유전자의 체계적 동정

유전체 내에 분포한 cMNR을 동정하기 위하여 NCBI의 사람 UniGene 데이터베이스(ftp://ncbi.nlm.nih.gov/repository/UniGene) 중 각 유전자에서 대표 염기서열만을 취합한 Hs.seq.uniq 파일을 분석에 이용하였다. cMNR을 포함하는 유전자의 선발은 본 연구를 위해 개발된 Exact Tandem Repeat Finder 프로그램을 이용하였다. 암호화 서열이라고 명기되어있는 염기서열은 NCBI 홈페이지내의 LocusLink (http://ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink), UCSC Human Genome Project Working Draft 웹사이트(http://genome.ucsc.edu)를 이용하여 유전자의 구조 및 기능을 분석하였다. 최초로 선택한 cMNR 포함 유전자가 타 데이터 베이스에서 비암호화 서열부위로 지칭되거나, 엑손-엑손 결합부위에 cMNR이 나타난 경우, pseudogene으로 등록된 유전자의 경우는 본 연구에서 제외하였다. 여러 차례에 걸친 체계적인 분석을 통해 최종적으로 10개 이상의 cMNR을 포함하는 유전자를 이용하여 돌연변이를 조사하였다.

# Ⅲ. 결과

## 1. MSI-H 대장암과 위암의 임상병리학적 특성

MSI-H 대장암의 경우 우측 대장암이 대부분이었는데, 39예중 31예가 splenic flexure의 근저부위에 위치하고 있었다. MSI-H 위암은 주로 유문부에 위치하였다(32/40). 조직병리학적으로 MSI-H 대장암은 MSI-H 위암에 비해 나쁜 분화도(22/39 vs. 15/40 p=0.15)와 점액형(19/39 vs. 8/40, p=0.11) 특성을 나타내었다. 종양인접부위 림파구의 침윤은 MSI-H 대장암과 위암에서 모두 높았다(18/39 vs. 23/40, p=0.43).

## 2. 대장암과 위암에서 MSI 빈도

조사된 5개의 표지자중 2개 이상의 표지자에서 양성반응을 나타났을 때 MSI-H이라고 정의하였다. MSI-H 종양의 빈도는 위암에 비해 대장암에서 약간 높게 나타나, 대장암에서는 230예 중 39예(17%)가 양성이었으며, 위암에서는 495예중 40예(8%)가 양성이었다(P=0.002 $\chi^2$-test).

## 3. MSI 양성 대장암과 위암에서 *hRad50, BLM, hMSH6, BRCA1, ATM, NBS1* 유전자의 체이동돌연변이 분석

BASC를 구성하는 유전자중 cMNR을 포함하는 유전자들의 체이동 돌연변이를 분석하였는데, 이중 *hRAD50*과 *BLM*은 (A)9을, *BRCA1* 유전자는 (A)8, *hMSH6* 유전자는 (C)8, *NBS1*은 (A)7, *ATM* 유전자는 (T)7 단반복 염기서열을 단백질 지령부위내에 포함하고 있었다(Table 4).

**Table 4.** Frequency of frameshift mutations of the six genes involved in DNA repair in 75 MSI-H gastrointestinal carcinomas

| Gene | Type of nucleotide repeat | Incidence of frameshift mutation | |
|---|---|---|---|
| | | Colon cancer [N=39] no. (%) | Stomach cancer [N=36] no. (%) |
| *hRAD50* | $(A)_9$ | 13 (33) | 10 (28) |
| *BLM* | $(A)_9$ | 7 (18) | 9 (25) |
| *hMSH6* | $(C)_8$ | 9 (23) | 7 (19) |
| *BRCA1* | $(A)_8$ | 1 (3) | 0 |
| *ATM* | $(T)_7$ | 1 (3) | 2 (6) |
| *NBS1* | $(A)_7$ | 0 | 0 |

*hRAD50* 유전자의 돌연변이는 13예의 MSI-H 대장암(33%)과 10예의 MSI-H 위암(28%)에서 발견되었다. *hRAD50* 유전자의 돌연변이는 (A)9 반복부위에서 1개나 혹은 2개의 염기의 결실이나 1개의 염기 삽입으로 발생하였으며 (Figure 1), 염기서열 분석을 통해 단반복 염기서열의 삽입과 결실을 확인하였다(Figure 2). *BLM* 유전자의 체이동 돌연변이는 7예의 MSI-H 대장암(18%)과 9예의 MSI-H 위암(25%)에서 발견되었다. 모든 *BLM* 유전자의 체이동 돌연변이는 1개의 염기서열 결실을 통해 나타남을 염기서열 분석을 통해 확인하였다. *hMSH6* 유전자의 체이동 돌연변이는 9예의 MSI-H 대장암(23%)과 7예의 MSI-H 위암(19%)에서 발견되었다. 이에 반해 *BRCA1, ATM, NBS1* 유전자의 체이동 돌연변이는 거의 발생하지 않았다. *BRCA1* 유전자의 체이동 돌연변이는 MSI-H 대장암 1예(3%)에서만 발견되었고, *ATM* 유전자의 체이동 돌연변이는 1예의 MSI-H 대장암(3%)과 2예의 MSI-H 위암(6%)에서만 발견되었다. *NBS1* 유전자의 체이동 돌연변이는 MSI-H 대장암과 위암에서 발견되지 않았다.

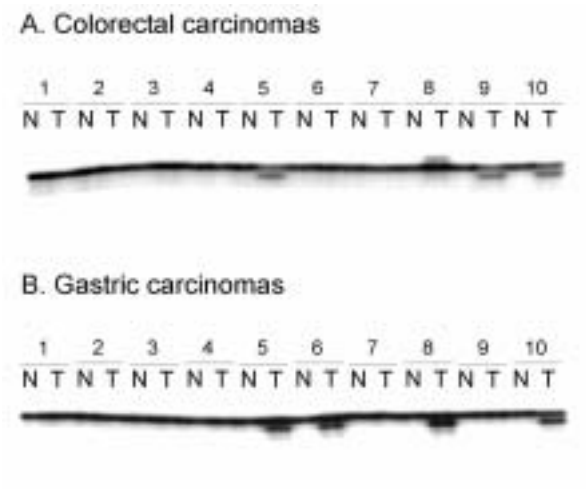


**Figure 1.** Alterations of the coding polydeoxyadenosine mononucleotide repeat numbers of the *hRAD50* gene in the MSI-H colorectal (A) and gastric carcinomas (B). N denotes DNA from normal tissue, T denotes DNA from carcinoma tissue.

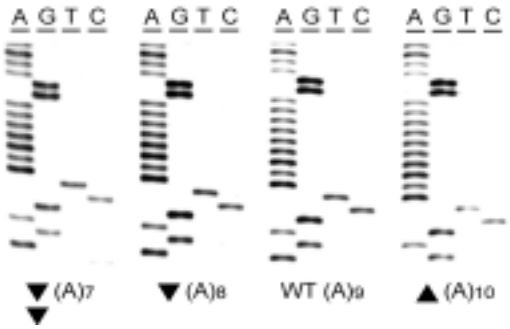


**Figure 2.** Nucleotide sequence analysis of the representative clones of *hRAD50* from MSI-H gastric carcinomas. Arrowheads pointing up or down indicate insertion or deletion of one nucleotide in the polydeoxyadenosine mononucleotide repeats, respectively.

## 4. 아데노신 단반복염기서열의 길이와 돌연변이율과의 상관관계

단반복 염기서열의 길이와 돌연변이율과의 상관관계를 조사하기 위하여 암호화 서열내에 아데노신 반복 염기서열을 포함하고 있는 12개 유전자의 체이동 돌연변이를 MSI-H 대장암과 위암에서 조사하였다(Figure 3). *TGF-βRII, Caspase 5, ATR, MBD4* 유전자는 10개의, *hRad50, TCF-4, BLM,*

*RECQL* 유전자는 9개의, *hMSH3, PMS2, BRCA1, BRCA2*는 8개의 아데노신 반복 염기서열을 포함하고 있다. *TCF-4*를 제외한 11개 유전자의 체이동 돌연변이율은 MSI-H 대장암과 MSI-H 위암간에 큰 차이는 없었다. *TCF-4* 유전자의 체이동 돌연변이율은 MSI-H 대장암이 MSI-H 위암에 비해 훨씬 높았다(26/39 vs. 6/40, $p<0.001$) (Table 5).

체이동 돌연변이율은 아데노신 반복염기서열의 수가 많을수록 높았다($p<0.001$). MSI-H 대장암과 위암에서 평균 돌연변이율은 (A)10 반복이 각각 2.03과 1.95였고, (A)9 반복은 1.23과 0.73, (A)8 반복은 0.61과 0.48이었다. 동일한 반복 염기서열을 가진 유전자간이라고 할지라도 돌연변이율은 서로 상당히 차이가 났다. (A)10 반복에서는 *TGF-βRII* 유전자가, (A)9 반복에서는 *TCF-4* 유전자가, (A)8 반복에서는 *hMSH3* 유전자가 가장 높은 돌연변이율을 나타냈다(Figure 4).

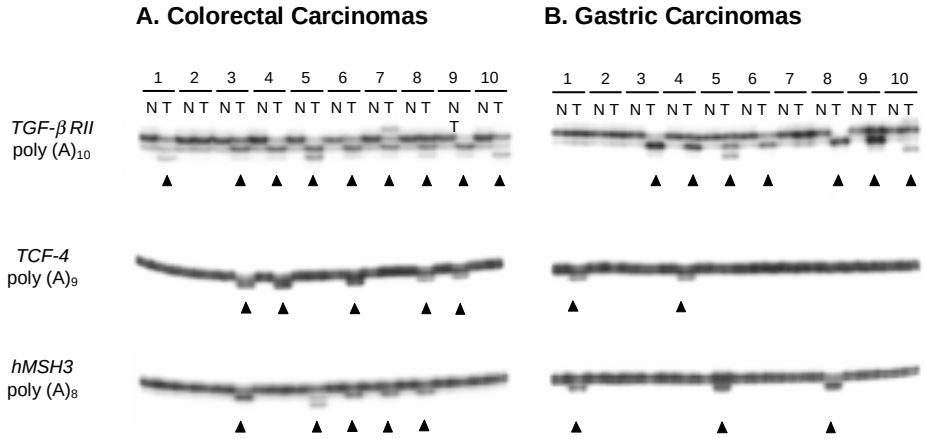


**Figure 3.** Alterations of the coding polydeoxyadenosine mononucleotide repeat numbers of *TGF-βRII, hMSH3* and *TCF-4* genes in colorectal (A) and gastric carcinomas (B). In each case, the carcinoma (T) and corresponding normal mucosa tissue (N) are shown. Abnormal bands with base insertion and deletions are indicated (arrowhead).

**Table 5.** Characteristics and incidence of frameshift mutations of the 12 target genes in the MSI-H colorectal and gastric carcinomas

| Genes | Polyadenosine repeat number | Location | Function of wild-type gene product | % of mutation | | p value |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Colon cancer (n=39) | Gastric cancer (n=40) | |
| *TGF-βRII* | 10 | 125-128 | Tumor suppressor | 87 | 83 | 0.74 |
| *Caspase 5* | 10 | 49-52 | Apoptosis | 54 | 53 | 1 |
| *ATR* | 10 | 771-774 | Checkpoint kinase | 31 | 30 | 1 |
| *MBD4* | 10 | 310-313 | DNA glycosylase, Methyl-CpG binding protein | 31 | 30 | 1 |
| *hRad50* | 9 | 719-722 | Cellular response to double strand breaks | 33 | 28 | 0.75 |
| *TCF-4* | 9 | 459-462 | Transcription factor (Wnt signaling) | 67 | 15 | 0.001 |
| *BLM* | 9 | 512-515 | DNA helicase | 18 | 25 | 0.63 |
| *RECQL* | 9 | 38-40 | DNA helicase | 5 | 5 | 1 |
| *hMSH3* | 8 | 381-383 | DNA mismatch repair | 56 | 48 | 0.57 |
| *PMS2* | 8 | 411-413 | DNA mismatch repair | 0 | 0 | |
| *BRCA1* | 8 | 652-654 | Tumor suppressor | 3 | 0 | 0.99 |
| *BRCA2* | 8 | 1443-1450 | Tumor suppressor | 3 | 0 | 0.99 |

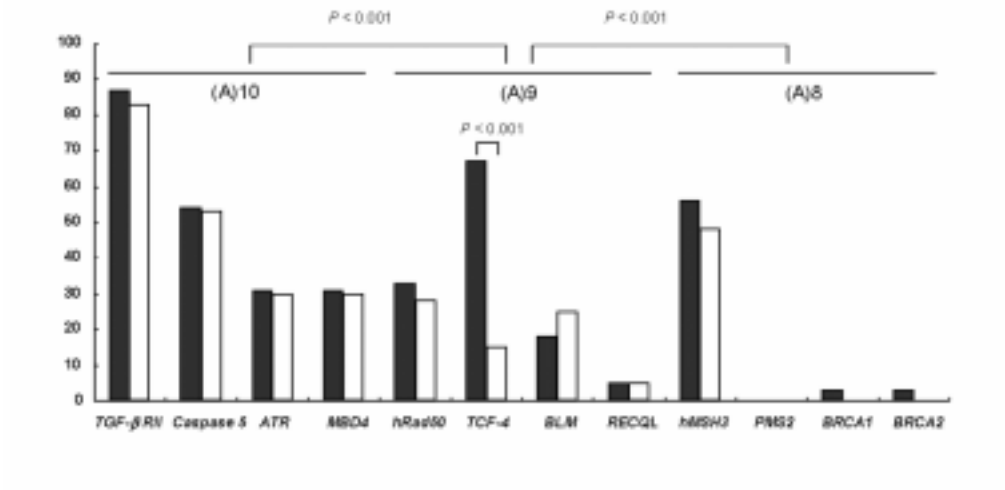


**Figure 4.** Frequency of frameshift mutations of 12 genes in 39 MSI-H colorectal carcinomas (filled bar) and 40 MSI-H gastric carcinomas (empty bar).

## 5. MSI-H 종양에서 체이동 돌연변이의 증가와 임상병리학적 특성과의 상관관계

연구에 포함된 39예의 MSI-H 대장암과 40예의 MSI-H 위암에서 체이동 돌연변이의 빈도와 임상병리학적 특징을 비교한 결과, MSI-H 위암에서는 체이동 돌연변이의 증가가 조직학적으로 미만형(diffuse type) 종양(2.0)보다는 장형(intestinal type) 종양(3.6)과 상관관계가 있었다(p=0.02). 대장암에서는 우측에서 발생한 대장암이 더 많은 체이동 돌연변이를 나타냈다(4.2 vs. 2.8, p=0.1). 종양 시기, 분화도, 점액 분비, 종양 인접부위 림파구 반응은 MSI-H 대장암과 위암 모두에서 돌연변이율과 상관관계를 나타내지 않았다(Table 6).

**Table 6.** Frameshift mutations of target genes and clinicopathologic features of the MSI-H colorectal and gastric carcinomas

| Type of Tumor | Variables | Categories | Number of cases | Number of frameshft mutations* | p value |
|---|---|---|---|---|---|
| Colorectal carcinomas | Site | Right | 31 | 4.16 | 0.1 |
| | | Left | 8 | 2.75 | |
| | Tumor stage | 1 & 2 | 28 | 3.61 | 0.09 |
| | | 3 & 4 | 11 | 4.54 | |
| | Differentiation | Well & Moderate | 17 | 3.35 | 0.1 |
| | | Poor | 22 | 4.27 | |
| | Mucin component | Absent | 20 | 3.85 | 0.94 |
| | | Present | 19 | 3.89 | |
| | Peritumoral lymphoid reaction | Absent | 21 | 3.57 | 0.26 |
| | | Present | 18 | 4.22 | |
| Gastric carcinomas | Site | Proximal | 8 | 2.25 | 0.1 |
| | | Distal | 32 | 3.38 | |
| | Tumor stage | 1 & 2 | 24 | 3 | 0.5 |
| | | 3 & 4 | 22 | 3.38 | |
| | Differentiation | Well & Moderate | 25 | 3.36 | 0.32 |
| | | Poor | 15 | 2.8 | |
| | Mucin component | Absent | 32 | 3.16 | 0.96 |
| | | Present | 8 | 3.13 | |
| | Peritumoral lymphoid reaction | Absent | 17 | 2.76 | 0.22 |
| | | Present | 23 | 3.43 | |
| | Lauren classification | Intestinal | 31 | 3.52 | 0.01 |
| | | Diffuse | 9 | 1.88 | |

* Mean number of frameshift mutations of the 12 examined target genes

## 6. 사람 유전자 데이터베이스에서 단백질 지령부위내에 단반복 염기서열을 포함하는 유전자의 탐색

데이터베이스 탐색을 위한 프로그램을 제작한 후, UniGene 데이터베이스(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene)를 검색한 결과, 단백질 지령부위내에 7개이상의 단반복 염기서열을 포함하는 4071개의 유전자를 동정하였다(A 반복 2248개, T 반복 690개, G 반복 369개, C 반복 764개) (Figure 5). 이중 102개의 유전자는 10개 이상의 단반복 염기서열을 포함하고 있었다(A반복 56개, T반복 38개, G반복 5개, C반복 3개).

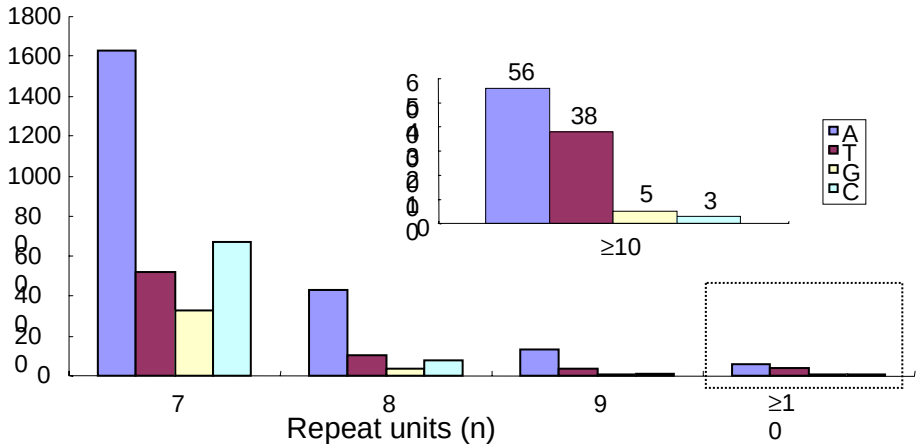


**Figure 5.** Distribution of cMNR candidate sequences from UniGene databases. MNRs are illustrated according to repeat length and nucleotide type; the inset displays an enlarged view of cMNRs with a length of 10 or more nucleotides.

## 7. 단백질 지령부위내에 단반복 염기서열을 포함하는 유전자의 재확인 및 선별

본 연구에서는 탐색된 유전자군들 중에서 유전체 데이터베이스와 EST 데이터베이스 모두에서 단백질 지령부위임이 확인된 유전자와 체이동 돌연변이가 정상 점막 조직, MSS 종양, 복제오류교정 정상 세포주에서는 발생하지 않는 유전자들만을 이용하였다. 돌연변이율은 단반복 염기서열의 길이가 길수록 증가하였기 때문에, 우선 10개이상의 단반복 염기서열을

포함하는 102개의 유전자를 대상으로 하였다. 여러 유전체 염기서열 정보와 EST 염기서열 정보등을 취합하여 최종적으로 33개의 유전자만을 선별하였다(Figure 6).

최종적으로 선별된 33개의 유전자 중에서 5개의 유전자(*TAF1B, MARCKS, FLJ11186, KIAA1052, FLJ13615*) 는 11개의 아데노신 반복, 27개의 유전자는 10개의 아데노신 반복을, 1개의 유전자는 10 개의 싸이미딘 반복을 단백질 지령부위내에 포함하고 있었다. 이중 11개의 유전자는 이전의 연구에서 MSI-H 종양에서의 표적유전자 후보로 알려진 유전자였으나(*TGF-βRII, AIM2, SEC63, Caspase 5, OGT, ATR, MBD4, SYCP1, GART, PRKDC, MAC30*),[30,33,42-44] 나머지 22개의 유전자는 현재까지 연구가 수행된 바 없었다(Table 7).

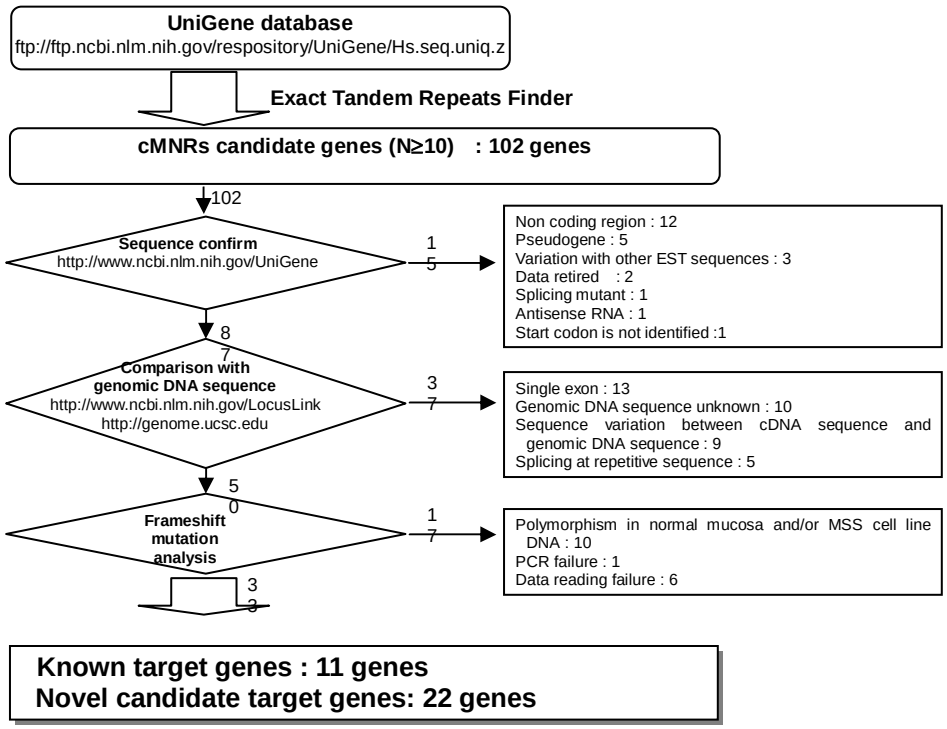


**Figure 6.** Database search for coding sequences with MNR and confirmation and selection of candidate target genes containing cMNR.

**Table 7**. List and description of genes analyzed

| GenBank accession no. | Gene description | Gene name | Type of repeat | Chromosomal location |
|---|---|---|---|---|
| D50683 | Transforming growth factor, beta receptor II | *TGF-βRII* | A(10) | 3p22 |
| L39061 | TATA box binding protein (TBP) - associated factor, RNA polymerase I, B, 63kD | *TAF1B* | A(11) | 2p25 |
| NM_024938 | FLJ11383 | | A(10) | 1 |
| NM_002356 | Myristoylated alanine - rich protein kinase C substrate (MARCKS, 80K - L) | *MARCKS* | A(11) | 6q22.2 |
| NM_004833 | Absent in melanoma 2 | *AIM2* | A(10) | 1q22 |
| NM_018353 | FLJ11186 | | A(11) | 14q13.1 - 14q21.3 |
| NM_007214 | Endoplasmic reticulum translocon component (*S. cerevisiae*) like | *SEC63* | A(10) | 6q16 - 22 |
| NM_004347 | Apoptosis - related cysteine protease | *Caspase 5* | A(10) | 11q22.2 - q22.3 |
| NM_003201 | Transcription factor 6 - like 1 (mitochondrial transcription factor 1 - like) | *TCF6L1* | A(10) | 7pter - cen |
| AB040903 | KIAA1470 | | A(10) | 1 |
| NM_003605 | O - linked N - acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP - N - acetylglucosamine: polypeptide - N - acetylglucosaminyl transferase) | *OGT* | T(10) | X |
| NM_003369 | UV radiation resistance associated gene | *UVRAG* | A(10) | 11q13.5 |
| NM_014956 | KIAA1052 protein | | A(11) | 11 |
| NM_006846 | Serine protease inhibitor Kazal type 5 | *SPINK5* | A(10) | 5q32 |
| NM_017685 | FLJ20139 | | A(10) | 1 |
| NM_001184 | Ataxia telangiectasia and Rad3 related | *ATR* | A(10) | 3q22 - 24 |
| NM_018365 | FLJ11222 | | A(10) | 15q11.2 |
| NM_025114 | FLJ13615 | | A(11) | 12 |
| NM_003925 | Methyl - CpG binding domain protein 4 | *MBD4* | A(10) | 3q21 - 22 |
| NM_003176 | Synaptonemal complex protein 1 | *SYCP1* | A(10) | 1p13 - 12 |
| NM_001090 | ATP - binding cassette, sub - family F (GCN20), member 1 | *ABCF1* | A(10) | 6p21.33 |
| NM_018979 | Protein kinase; lysine deficient 1 | *PRKWNK1* | A(10) | 12p13.3 |
| AB033094 | KIAA1268 | | A(10) | 3 |
| NM_002915 | Replication factor C (activator 1) 3 (38kD) | *RFC3* | A(10) | 13q12.3 - q13 |
| NM_000819 | Phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylaminoimidazole synthetase | *GART* | A(10) | 21q22.11 |
| AB037754 | FLJ20333 (KIAA1333) | | A(10) | 14 |
| AL136680 | DKFZp564C2478 | | A(10) | 1 |
| U47077 | Protein kinase, DNA - activated, catalytic polypeptide | *PRKDC* | A(10) | 8q11 |
| NM_024570 | FLJ11712 | | A(10) | 13 |
| NM_001271 | Chromodomain helicase DNA binding protein 2 | *CHD2* | A(10) | 15q26 |
| AL096857 | KIAA1096 | | A(10) | 1 |
| L19183 | Differentially expressed in neuroblastoma (MAC30) | | A(10) | 17q11.2 |
| AL008635 | High - mobility group protein 2 - like 1 | *HMG2L1* | A(10) | 22q13.1 |

## 8. cMNR을 포함하는 유전자들의 체이동 돌연변이율

39예의 MSI-H 대장암과 8예의 복제오류교정 결함 대장암 세포주를 대상으로 선별된 33개의 유전자들의 체이동 돌연변이를 조사하였다. MSI-H 대장암 환자의 정상 점막조직과, MSS 대장암환자의 정상 및 암조직, 3예의 복제오류교정 정상 세포주를 대조군으로 이용하였다. 39예의 MSI-H 대장암 환자중 1예를 제외한 나머지 예는 1개 이상의 유전자에서 돌연변이를 나타냈지만, MSS 대장암에서는 돌연변이가 발견되지 않았다. 조사된 33개의 유전자 중에서 11개 유전자는 MSI-H 대장암에서 빈번한 체이동 돌연변이(≥40%)를 나타냈다. 이 11개의 유전자 중 5개 유전자는 *TGF-βRII* (85%), *AIM2* (67%), *SEC63* (56%), *Caspase 5* (49%), *OGT* (41%)로, 이전에 MSI-H 대장암에서 높은 돌연변이율을 나타내는 것으로 보고된 것들이다.[30,33,42,44]

나머지 6개의 유전자는 *TAF1B* (82%), *FLJ11383* (74%), *MARCKS* (72%), *FLJ11186* (64%), *TCF6L1* (49%), *KIAA1470* (44%)으로 이전의 연구에서는 밝혀지지 않은 새로운 유전자였다. 복제오류교정 결함 대장암 세포주 8예에서의 돌연변이율은 MSI-H 대장암과 대개 유사하였다. 70%이상의 돌연변이를 나타내는 4개의 유전자중 *TGF-βRII* (52%), *FLJ11383* (21%), *MARCKS* (26%)는 MSI-H 대장암에서 높은 동형 돌연변이를 나타냈지만, *TAF1B* (3%)는 낮은 동형 돌연변이를 나타냈다(Figure 7, 8, 9).


**Figure 7.** Alterations of the cMNR number of the *MARCKS, FLJ11383* and *TAF1B* genes in MSI-H colorectal carcinomas. N, DNA from normal mucosal tissue; T, DNA from carcinoma tissue. Lanes 1-20 represent PCR products derived from paired tissues of MSI-H colorectal carcinomas. Lanes 21-31 represent PCR products derived from cell lines. LS-174T, HCT-8, NCI-H747, SNU-C2A, SNU-C4, DLD-1, HCT-116 and LOVO cell lines are MMR-deficient cell lines and the 3 remainings are MMR-proficient.

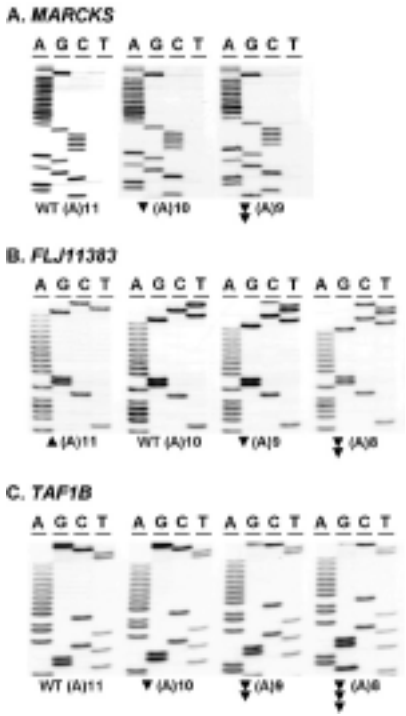


**Figure 8.** Nucleotide sequence analysis of the representative clones of *MARCKS*, *FLJ11383* and *TAF1B* from MSI-H colorectal carcinomas. Arrowheads pointing up or down indicate insertion or deletion of one nucleotide in the polydeoxyadenosine repeats, respectively. WT denotes wild type.

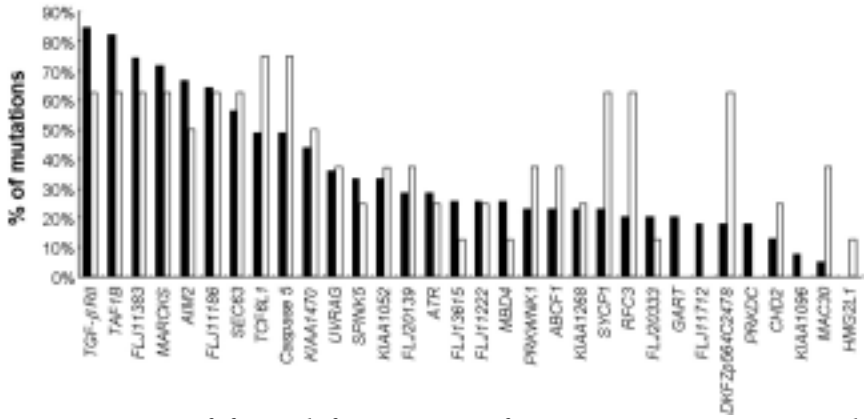


**Figure 9.** Frequency of frameshift mutations of 33 genes in 39 MSI-H colorectal carcinomas (dark bar) and 8 MMR-deficient cell lines (white bar). Four genes, *TGFβ-RII, TAF1B, FLJ11383* and *MARCKS,* showed mutational rates of more than 70% in MSI-H colorectal carcinomas.

## 9. 복제오류교정 결함 세포주에서 표적유전자의 돌연변이형 전사체 발현 탐색

표적유전자의 체이동 돌연변이가 세포내에서 발현하는지를 확인하기 위하여 우선 세포주들의 표적유전자인 *TGF-βRII, BAX, hRad50, hMSH3, hMSH6, TCF-4*의 체이동 돌연변이를 조사한 다음, RT-PCR 연쇄반응을 통해 돌연변이형 전사체의 발현을 조사하였다. 실험에 사용된 사람 위암 세포주중 SNU-1, SNU-638, 사람 대장암 세포주중 LS174T, HCT-8, NCI-H747, SNU-C2A, SNU-C4, DLD-1, HCT116, LOVO는 복제오류교정 유전자에 결함이 있는 세포주이다. 표적유전자의 체이동 돌연변이를 통해 나타나는 돌연변이형 전사체는 *TGF-βRII, BAX, TCF-4*에서 관찰되었다(Figure 10).

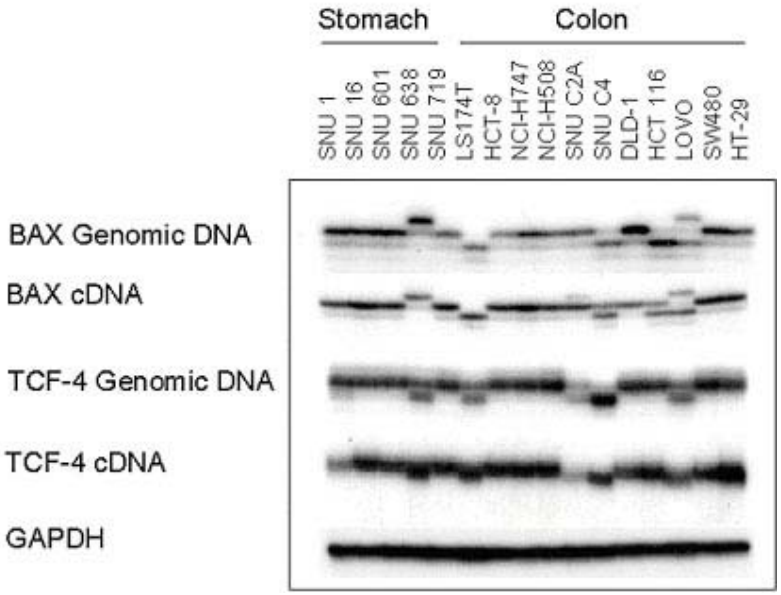


**Figure 10.** Analysis of frameshift mutations and expression profiles of *BAX,* and *TCF-4* in 16 cell lines. SNU-1, SNU-638, LS-174T, HCT-8, NCI-H747, SNU-C2A, SNU-C4, DLD-1, HCT-116 and LOVO cell lines are MMR-deficient cell lines and the remaining 6 are MMR-proficient.

나머지 *hMSH3, hMSH6, hRad50* 유전자의 돌연변이형 전사체는 관찰되지 않거나 극히 적은 양만이 관찰되었다(Figure 11). *hMSH3, hMSH6, hRad50* 유전자의 돌연변이형 전사체의 발현억제가 전사후에 세포질내에서

파괴되었다는 것을 알아보기 위하여, 단백질 번역개시 과정 방해 기전을 통해 NMD 경로를 억제하는 puromycin을 처리한 후, RT-PCR을 실시하였다. 정상적인 상태에서 퇴화되었던 *hMSH3, hMS6, hRad50* 돌연변이형 전사체가 puromycin 처리를 통해 다시 나타남을 확인하였다(Figure 11).

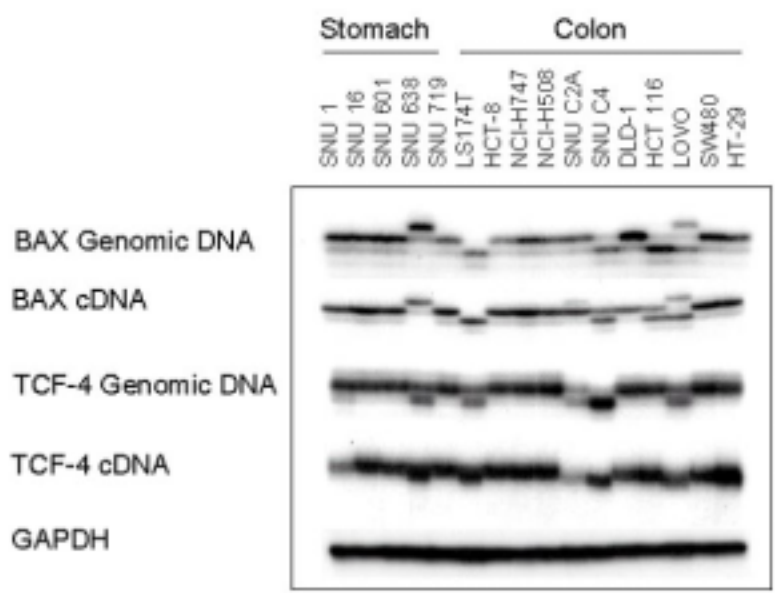


**Figure 11.** Frameshift mutation and expression profiles of hRAD50 and hMSH6 in 16 cell lines and stabilization of the mutant mRNA with puromycin. RT-PCR analysis of total RNA isolated from cell lines before or after treatment with 30 μg/mL puromycin for 3 hours. Arrowheads indicate stabilized mutant transcripts after treatment with puromycin.

## 10. 복제오류교정 결함 세포주에서 표적유전자의 돌연변이형 단백질 발현 탐색

RT-PCR을 통해 NMD경로를 거치지 않는 유전자중 *MARCKS* 유전자의 단백질 발현을 검사하였다. Western blot에 이용한 항체는 *MARCKS* 유전자의 체이동돌연변이의 앞쪽에 위치한 아미노 말단부위를 항원부위로 인식한다. 체이동 돌연변이가 발생한 SNU-C4, LOVO 세포주에서는 MARCKS 단백질의 발현을 확인할 수 없었으며, 체이동 돌연변이를 통해 발생할 것으로 추정되는 65Kd의 단백질 산물은 확인할 수 없었다(Figure 12). MARCKS 유전자의 동형 돌연변이를 가지는 SNU-C4 세포주에

프로테아좀 억제제인 lactacystin과 MG132에 의해 돌연변이형 단백질의 분해가 억제됨을 발견하였다(Figure 13). 정상형 MARCKS 유전자를 가지는 HCT116과 SW480 세포주에서도 SNU-C4와 같은 길이의 단백질이 발현됨을 알 수 있으나, 이는 기존의 보고에 의하면[49] MARCKS 단백질의 활성화 부위내에 존재하는 cathepsin B 절단위치에서 절단된 단백질로 추정하였다.

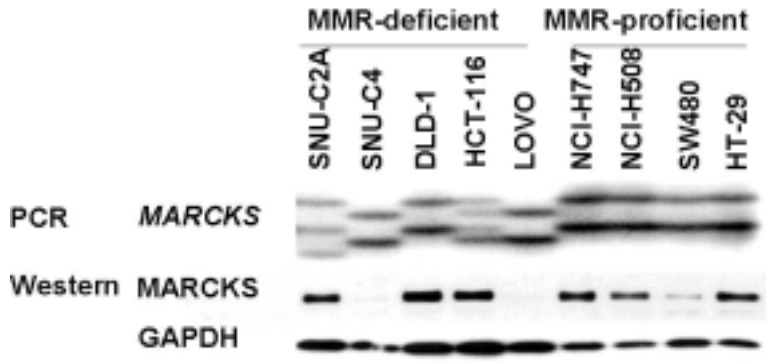


**그림 12.** Immunoblot analysis of MARCKS protein in colon cell lines. Immunoblot analysis showed that SNU-C4 and LOVO cells, which contain no wild-type *MARCKS* alleles, did not express detectable amounts of MARCKS protein

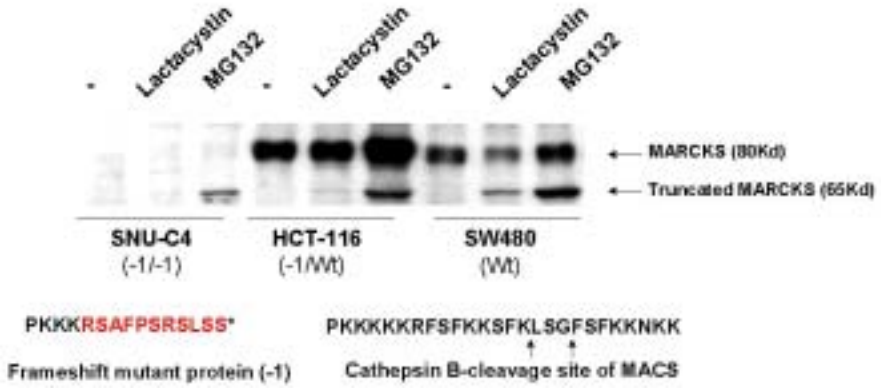


**Figure 13.** Prevention of degradation of MARCKS frameshift mutant protein and cathepsin B cleaved fragment by proteasome inhibitors. SNU-C4, HCT116 and SW480 cells were treated for 24 hours with 10 mM Lactacystin or 50 mM MG132 and immunoblotted with MARCKS. The migration position of MARCKS and a smaller fragment of MARCKS are indicated. After treatment of proteasome inhibitors, frameshift mutant protein of MARCKS, which is similar to the size of cathepsin B-cleaved protein in SW480, was detected in SNU-C4 bearing biallelic frameshift mutation of MARCKS.

# Ⅳ. 고찰

MSI-H 종양은 고변이 표현형 종양으로 복제오류교정 유전자의 결함으로 인해 발생하며, 발암관련 유전자, 종양억제유전자, 세포고사관련 유전자, DNA 수선 관련 유전자와 같은 종양관련 유전자에서 돌연변이가 주로 발생한다고 알려졌다. 가장 독특한 MSI-H 종양의 특징은 림프구 침윤, 침습성 감소, 좋은 예후, MSI 대장암 세포의 주위에 상당히 많은 활성화된 세포 독성 T 림프구의 침윤과 인접한 세포의 고사 발생 등이다.[12,50] 이러한 종양주변의 염증반응과 그에 따른 임상특성은 MSI-H 종양에서 표적유전자의 체이동 돌연변이로 인한 변이형 단백질이 면역항원으로 작용하는 것이 한가지 원인일 것이라는 가설을 제기할 수 있다. 최근, MSI-H 대장암의 특성을 면역치료에 이용하고자 하는 시도가 진행되고 있다.[51] 현재까지, *TGF-βRII*를 비롯해 여러 표적유전자의 변이형 단백질이 T 세포반응을 일으킬 수 있다고 보고되었으나,[52] MSI-H 종양은 상당히 다양한 유전자에서 돌연변이가 발생할 수 있기 때문에, 보다 실제적인 응용을 위해서는 단백질 항원으로 이용될 수 있는 다양한 표적유전자를 동정하는 것이 필수적이라 할 수 있다.

본 연구에서는 새로운 표적유전자들의 동정과 돌연변이의 기능분석을 위하여 특정한 기능군에 속해있는 유전자중 cMNR을 포함하는 유전자의 빈도와 해당 유전자들의 체이동 돌연변이를 조사하여 MSI-H 종양의 표적유전자와 특성을 밝히고자 하였다. DNA 손상에 대한 감지기 역할을 거대복합체로 알려진 BASC의 구성 유전자중 cMNR을 포함하는 유전자는 *hRAD50, BLM, BRCA1, hMSH6, NBS1, ATM*였으며, MSI-H 대장암과 위암에서 체이동 돌연변이율이 가장 높은 유전자는 *hRad50*이었다. hRad50은 coiled-coil 구조를 가지는 ATP 의존형 DNA 결합 단백질이다. hRad50은 체이동 돌연변이 위치의 앞쪽에 있는 752번째 아미노산과 아미노 말단 사이에 BRCA1과 결합하는 부위를 가지고 있다.[53] hRad50은 hMRE11과 NBS1과 복합체를 형성하여 동형 재조합(homologous recombination), 세포주기 검사, 비동형 말단 결합(nonholomogous end joining), 생식세포분열 재조합 (meiotic recombination)과 텔로미어 유지와 같은 기능을 한다.[54,55] DNA 이중 나선의 절단은 동형 재조합과 비동형 말단 결합에 의해 수선되는데 hRad50-hMRE11-NBS1 복합체는 양쪽 기전에 모두

관여한다.[54] hRad50-hMRE11-NBS1 복합체의 결함은 염색체 불안정형과, 이온화 방사선에 대한 민감성, 발암율의 증가와 같은 특성을 지닌 상염색체 열성 유전병인 Nijmegen breakage syndrome을 유발한다.[56] hRad50의 구조적 기능적 특성에 근거하여, MSI-H 종양에서 발생한 hRad50 유전자의 결함은 종양의 생성과 진행에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

단반복 염기서열의 길이와 돌연변이율과의 상관관계를 조사하기 위하여 암호화 서열내에 아데노신 반복 염기서열을 포함하고 있는 12개 유전자의 체이동 돌연변이를 MSI-H 대장암과 위암에서 조사한 결과, *TCF-4*를 제외한 11개 유전자의 체이동 돌연변이율은 MSI-H 대장암과 MSI-H 위암간에 큰 차이는 없었다. *TCF-4* 유전자의 체이동 돌연변이율은 MSI-H 대장암이 MSI-H 위암에 비해 훨씬 높았다. *TCF-4*와 함께 APC/β-catenin/TCF-4경로를 구성하는 APC와 β-cateinin의 변화는 대장암에서만 주로 나타나고, 위암에서는 거의 나타나지 않기 때문에, 이러한 차이는 대장암의 발암과정이 위암의 발암과정과 상이하다는 것을 나타낸다.[57] 체이동 돌연변이율은 아데노신 반복염기서열의 수가 많을수록 높았으나, 동일한 반복 염기서열을 가진 유전자간이라고 할지라도 돌연변이율은 서로 상당히 차이가 났는데, 이는 발암과정에서 특정 유전자의 돌연변이가 선택된다는 것을 의미한다.

단반복 염기서열의 길이가 길수록 평균 돌연변이율은 높아지기 때문에, 본 연구에서는 데이터 베이스 탐색을 통해 확인된 유전자중 10개이상의 단반복염기서열을 포함하는 유전자만의 돌연변이율을 선택하였다. 11개의 단반복 염기서열을 포함하는 5개의 유전자는 10개의 단반복 염기서열을 포함하는 유전자에 비해 높은 돌연변이율을 나타냈다(55% vs. 31%). 이러한 돌연변이율은 기존에 연구된 표적유전자의 돌연변이율에 비해 높게 나타났기 때문에 이들중 일부 유전자는 잠재적으로 중요한 표적유전자임을 의미한다. 확인된 돌연변이중 *MARCKS, FLJ11383, TAF1B*유전자의 돌연변이는 현재까지 MSI-H 종양에서 가장 잘 알려진 중요한 표적유전자인 *TGF-βRII* 유전자와 비슷할 정도로 높은 돌연변이율을 나타내었다. 특히, *TGF-βRII, MARCKS, FLJ11383* 유전자에서 동형 돌연변이가 많이 나타나기 때문에, 이러한 새로운 표적유전자가 종양의 개시와 진행에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

MARCKS (Myristoylated alanine-rich C kinase substrate)는 세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[58] MARCKS는 PKC에 대한 세포내에서 가장 중요한 기질이며, 조사된 거의 모든 종류의 세포에서 광범위하게 발현한다. 최근 MARCKS의 세포 증식 조절기능이 보고되었는데, MARCKS의 농도가 여러 종양 세포주에서 낮아져 있으며, 이러한 MARCKS 발현억제는 PKC 의존적, 비의존적 경로를 통해 나타났다.[59] MARCKS 단백질의 양은 세포가 활동적으로 생장할때는 감소하지만, 분열을 중지하면 급격히 늘어난다.[60] 또한 MARCKS를 과발현시키면 사람의 종양에서 유래된 맹락막 흑색종(choroidal melanoma) 세포의 생장을 억제시키는 역할을 한다.[61] MARCKS 단백질의 PKC 기질로서의 기능과 세포내 위치, 분해는 effector domain에 위치한 세린 152/156 잔기의 인산화를 통해서 발생하는데, 단반복 염기서열은 이 부위의 바로 앞에 존재한다. 따라서 *MARCKS* 유전자의 단반복 염기서열에서 발생한 체이동 돌연변이는 MARCKS 단백질의 기능적, 구조적 결함을 초래할 것이며, 이러한 MARCKS의 불활성화는 암발생과정에 관여할 것으로 추정할 수 있다. *TAF1B*와 *FLJ11383*은 체이동 돌연변이의 빈도가 높기는 하지만, 발생한 돌연변이와 발암과정과의 상관관계가 *MARCKS*처럼 분명하지는 않다. 이것은 아직까지 이들 두 유전자의 발암과정에서의 기능 연구가 진행되지 않았기 때문으로 생각된다. TAF1B (TAFI63)은 리보솜 RNA의 합성에 관여하는 TIF-1B/SL1의 subunit으로 세포의 성장과 발생에 관해서 알려진 바 없다. FLJ11383은 아직까지 기능과 어떠한 연구도 진행되지 않은 상태이다.

표적유전자의 체이동 돌연변이형 전사체의 세포내에서 발현을 조사하였을 때, 조사된 유전자중 *TGF-βRII, BAX, TCF-4* 및 *MARCKS*에서 돌연변이형 전사체를 관찰할 수 있었으나, *hMSH3, hMSH6, hRad50* 등의 유전자에서는 전사체를 관찰하지 못하였다. *hMSH6, hRad50*에서 관찰되지 않은 돌연변이형 전사체가 puromycin 처리 후 관찰된 것은 이들이 세포질내에서 능동적으로 퇴화된 것임을 알 수 있다. 현재까지 알려진 바에 의하면 돌연변이형 mRNA 중 premature stop을 보이는 것은 NMD 기전을 통해 퇴화됨이 밝혀져 있다.[62-64] MSI-H 종양에서 발견되는 대부분의 표적유전자들의 돌연변이는 premature stop을 유발하기 때문에 이들이 NMD 기전으로서 퇴화되는 것으로 사료된다. 그러나, *TGF-βRII, BAX, TCF-4* 및 *MARCKS* 등의

돌연변이형 전사체는 퇴화가 안되고, 나머지 표적유전자들의 돌연변이형만 퇴화가 되는 지는 현재로서는 알 수 없으며 향후 추가적인 연구가 필요하다.

본 연구에서는 돌연변이형 전사체가 표현된 *MARCKS*와 *BAX* 표적유전자의 단백질 발현을 조사하였는데, Western blotting에서 정상형의 단백질만 관찰하였을 뿐 돌연변이형 단백질은 관찰하지 못하였다. 이러한 사실은 돌연변이형 전사체가 퇴화되지 않더라고 단백질 합성이 이루어지지 않거나, 합성된 단백질이 일찍 퇴화될 것이라는 가능성을 제시한다. 퇴화된 BAX 단백질은 매우 작은 크기 이기 때문에 (~6 Kd) 본 연구에서는 MARCKS를 대상으로 프로테아좀 억제 실험을 수행하여 MARCKS의 돌연변이형 단백질을 확인하였다. 따라서 MSI-H 종양의 표적유전자 돌연변이중 일부는 돌연변이형 단백이 합성된다는 증거를 확보하였으며, 이들은 매우 빨리 프로테아좀에 의해 분해된다는 것을 추정할 수 있었다. 이러한 돌연변이형 단백질이 암의 발생과 진행에 어떠한 역할을 하는지는 알 수 없지만, 이들이 분해된 후 새로운 항원으로서 작용할 가능성이 있는 만큼, 향후 MSI-H 종양에서의 종양특이 항원에 대한 연구가 돌연변이형 단백질들을 중심으로 지속되어야 한다고 사료된다(Figure 14).

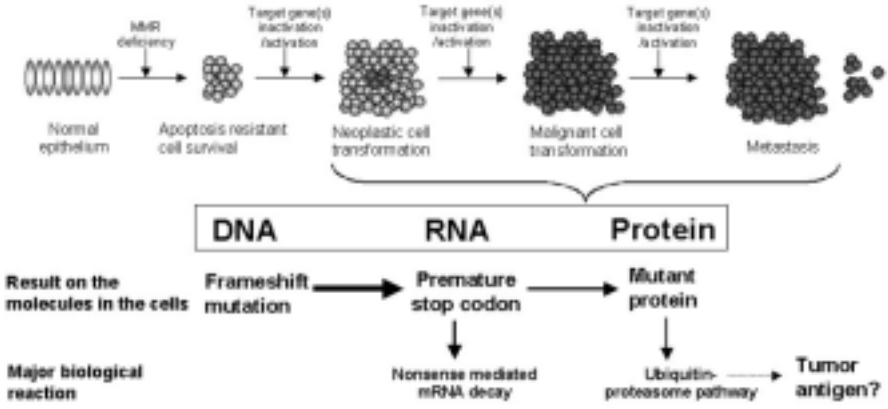


**Figure 14.** Molecular carcinogenesis pathway and major biological reaction processes to abolish the aberrant products resulting from the frameshift mutation of coding sequences of target genes in MSI-H tumors.

# Ⅴ. 결론

본 연구에서는 MSI-H 종양에서 새로운 표적유전자의 동정과 돌연변이형 유전자 산물의 발현을 검증하고자 하였다. 우선, DNA 손상에 대한 감지기 역할을 거대복합체로 알려진 BASC의 구성 유전자중 cMNR을 포함하는 유전자의 체이동 돌연변이를 조사하였고, UniGene 데이터베이스를 이용한 cMNR을 포함 유전자군 탐색과 MSI-H 대장암에서의 체이동 돌연변이율 조사를 통해 새로운 표적유전자를 동정하였으며 발굴한 표적유전자들의 돌연변이형 전사체 및 단백질의 발현여부와 퇴화 기전을 조사하였다.

실험결과 BASC 복합체를 형성하는 유전체 중 *hRAD50* (31%), *BLM* (21%), *hMSH6* (21%)에서 빈번한 체이동 돌연변이가 나타났으며, BRCA1, ATM, NBS1에서는 돌연변이가 거의 나타나지 않았다. UniGene 데이터베이스 탐색을 통해 10개이상의 cMNR을 포함하는 33개의 유전자를 선별한 다음, MSI-H 대장암에서의 체이동 돌연변이를 조사하였는데, 가장 높은 돌연변이율을 나타낸 신규 표적유전자는 *MARCKS* (72%), *FLJ11383* (74%), *TAF1B* (82%)였으며, 이중 *MARCKS* (26%)와 *FLJ11383* (21%)은 동형 돌연변이 빈도가 높았다. 돌연변이형 전사체는 *TGF-βRII, BAX, TCF-4* 및 *MARCKS* 에서 관찰할 수 있었으며 *hMSH3, hMSH6, hRad50* 유전자의 돌연변이형 RNA는 세포질내에서 퇴화됨을 확인하였으며, 돌연변이형 전사체가 있는 경우도 생성된 단백질이 프로테아좀에 의해 퇴화되어 표현이 되지 않음을 확인하였다.

이상의 연구결과 본연구를 통해 MSI-H 종양의 신규 표적유전자를 선별하였으며, 발생한 돌연변이는 RNA 혹은 단백질 수준에서 제거됨을 확인하였다. 이러한 결과는 체이동 돌연변이를 통해 발생한 돌연변이의 유전자 산물이 RNA 혹은 단백질 수준에서 제거되는 것은 절단된 펩타이드에 의한 독성 작용을 회피하기위한 세포내 방어기전이 작용한 것임을 시사한다.

# 참고문헌


1. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. Nature 1998;396:643 - 9.
2. Vogelstein B. Cancer. A deadly inheritance. Nature 1990;348:681 - 2.
3. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin J - P, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. Science 1993;260:812 - 6.
4. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature 1993;363:558 - 61.
5. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science 1993;260:816 - 9.
6. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. Cell 1993;75:1027 - 38.
7. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cell 1993;75:1215 - 25.
8. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non - polyposis colon cancer. Nature 1994;368:258 - 61.
9. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. Nature 1994;371:75 - 80.
10. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinomas. Cancer Res 1993;53:5100–3.
11. Perucho M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. J Biol Chem 1996;377:675–84.

12. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. Am J Pathol 1994;145:148 - 56.
13. Kolodner R. Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. Genes Dev 1996;10:1433 - 42.
14. Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. Annu Rev Genet 1991;25:229 - 53.
15. Schaaper RM. Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. J Biol Chem 1993;268:23762 - 5.
16. Fishel R, Kolodner RD. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. Curr Opin Genet Dev 1995;5:382 - 95.
17. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non - polyposis colorectal cancer patients. Nat Med 1996;2:169 - 74.
18. Han HJ, Yuan Y, Ku JL, Oh JH, Won YJ, Kang KJ, et al. Germline mutations of hMLH1 and hMSH2 genes in Korean hereditary nonpolyposis colorectal cancer. J Natl Cancer Inst 1996;88:1317 - 9.
19. 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.
20. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JPJ, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:6870 - 5.
21. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. Proc

Natl Acad Sci USA 1998;95:8698 - 702.
22. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. Cancer Res 1998;58:1713 - 8.
23. Percesepe A, Pedroni M, Sala E, Menigatti M, Borghi F, Losi L, et al. Genomic instability and target gene mutations in colon cancers with different degrees of allelic shifts. Genes Chromosomes Cancer 2000;27:424 - 9.
24. Konishi M, Kikuchi - Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, et al. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. Gastroenterology 1996;111:307 - 17.
25. Breivik J, Lothe RA, Meling GI, Rognum TO, Borresen - Dale AL, Gaudernack G. Different genetic pathways to proximal and distal colorectal cancer influenced by sex - related factors. Int J Cancer 1997;74:664 - 9.
26. Salahshor S, Kressner U, Pahlman L, Glimelius B, Lindmark G, Lindblom A. Colorectal cancer with and without microsatellite instability involves different genes. Genes Chromosomes Cancer 1999;26:247 - 52.
27. Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. Hum Mol Genet 2001;10:735 - 40.
28. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet 1989;44:388 - 96.
29. Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abraham JM, et al. Microsatellite instability in the insulin - like growth factor II receptor gene in gastrointestinal. Nat Genet 1996;14:255 - 7.
30. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, et al. Inactivation of the type II TGF - receptor in colon cancer cells

with microsatellite instability. Science 1995;268:1336 - 8.
31. Guanti G, Resta N, Simone C, Cariola F, Demma I, Fiorente P, et al. Involvement of PTEN mutations in the genetic pathways of colorectal cancerogenesis. Hum Mol Genet 2000;9:283 - 7.
32. 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.
33. Schwartz S Jr, Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J, Perucho M. Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase - 5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. Cancer Res 1999;59:2995 - 3002.
34. Malkhosyan S, Rampino N, Yamamoto H, Perucho M. Frameshift mutator mutations. Nature 1996;382:499 - 500.
35. Riccio A, Aaltonen LA, Godwin AK, Loukola A, Percesepe A, Salovaara R, et al. The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability. Nat Genet 1999;23:266 - 8.
36. Duval A, Gayet J, Zhou XP, Iacopetta B, Thomas G, Hamelin R. Frequent frameshift mutations of the TCF - 4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability. Cancer Res 1999;59:4213 - 5.
37. Bicknell DC, Kaklamanis L, Hampson R, Bodmer WF, Karran P. Selection for 2 - microglobulin mutation in mismatch repair - defective colorectal carcinomas. Curr Biol 1996;6:1695 - 7.
38. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res 1998;58:5248 - 57.
39. Zhang L, Yu J, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B.

Short mononucleotide repeat sequence variability in mismatch repair deficient cancers. Cancer Res 2001;61:3801 - 5.

40. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1 - associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. Genes Dev 2000;14:927 - 39.
41. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW, et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor type II receptor gene in colorectal cancer. Cancer Res 1995;55:5548 - 50.
42. Mori Y, Yin J, Rashid A, Leggett BA, Young J, Simms L, et al. Instabilotyping: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. Cancer Res 2001;61:6046 - 9.
43. Bader S, Walker M, Hendrich B, Bird A, Bird C, Hooper M, et al. Somatic frameshift mutations in the MBD4 gene of sporadic colon cancers with mismatch repair deficiency. Oncogene 1999;18:8044 - 7.
44. Woerner SM, Gebert J, Yuan YP, Sutter C, Ridder R, Bork P, et al. Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in DNA mismatch repair - deficient cancer cells. Int J Cancer 2001;93:12 - 9.
45. Thorstensen L, Diep CB, Meling GI, Aagesen TH, Ahrens CH, Rognum TO, et al. WNT1 inducible signaling pathway protein 3, WISP - 3, a novel target gene in colorectal carcinomas with microsatellite instability. Gastroenterology 2001;121:1275 - 80.
46. Piao Z, Fang W, Malkhosyan S, Kim H, Horii A, Perucho M, et al. Frequent frameshift mutations of RIZ in sporadic gastrointestinal and endometrial carcinomas with microsatellite instability. Cancer Res 2000;60:4701 - 4.
47. Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, et al. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating ß - catenin/TCF signaling. Nature Genet

2000;26:146 - 7.
48. Calin GA, Gafa R, Tibiletti MG, Herlea V, Becheanu G, Cavazzini L, et al. Genetic progression in microsatellite instability high (MSI - H) colon cancers correlates with clinico - pathological parameters: A study of the TGFβRII, BAX, hMSH3, hMSH6, IGFIIR and BLM genes. Int J Cancer 2000;89:230 - 5.
49. Spizz G, Blackshear PJ. Identification and characterization of cathepsin B as the cellular MARCKS cleaving enzyme. J Biol Chem 1997;272:23833 - 42.
50. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, et al. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. Am J Pathol 1999;154:1805 - 13
51. Saeterdal I, Bjorheim J, Lislerud K, Gjertsen MK, Bukholm IK, Olsen OC, et al. Frameshift - mutation - derived peptides as tumor - specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:13255 - 60
52. Linnebacher M, Gebert J, Rudy W, Woerner S, Yuan YP, Bork P, et al. Frameshift peptide - derived T - cell epitopes: a source of novel tumor - specific antigens. Int J Cancer 2001;93:6 - 11
53. Zhong Q, Chen C - F, Li S, Chen Y, Wang C - C, Xiao J, et al. Association of BRCA1 with the hRad50 - hMre11 - p95 complex and the DNA damage response. Science 1999;285:747 - 50.
54. Haber JE. The many interfaces of Mre11. Cell 1998;95:583 - 6.
55. Petrini JHJ. The mammalian Mre11 - Rad50 - Nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA - damage response. Am J Hum Genet 1999;64:1264 - 9.
56. Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR 3rd, et al. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double - strand break repair to the cellular DNA damage response. Cell 1998;93:477 - 86.

57. Duval A, Iacopetta B, Ranzani GN, Lothe RA, Thomas G, Hamelin R. Variable mutation frequencies in coding repeats of TCF - 4 and other target genes in colon, gastric and endometrial carcinoma showing microsatellite instability. Oncogene 1999;18:6806 - 9.
58. Blackshear PJ. The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. J Biol Chem 1993;268:1501 - 4.
59. Brooks SF, Herget T, Broad S, Rozengurt E. The expression of 80K/MARCKS, a major substrate of protein kinase C (PKC), is down - regulated through both PKC - dependent and - independent pathways. J Biol Chem 1992;267:14212 - 8.
60. Herget T, Brooks SF, Broad S, Rozengurt E. Expression of the major protein kinase C substrate, the acidic 80 - kilodalton myristoylated alanine - rich C kinase substrate, increases sharply when Swiss 3T3 cells move out of cycle and enter G0. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:2945 - 9.
61. Manenti S, Malecaze F, Chap H, Darbon JM. Overexpression of the myristoylated alanine - rich C kinase substrate in human choroidal melanoma cells affects cell proliferation. Cancer Res 1998;58:1429 - 34.
62. Culbertson MR. RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. Trends Genet 1999;15:74 - 80.
63. Frischmeyer PA, Dietz HC. Nonsense - mediated mRNA decay in health and disease. Hum Mol Genet 1999;8:1893 - 900.
64. Peter H. Byers. Killing the messenger: new insights into nonsense - mediated mRNA decay. J Clin Invest 2002;109:3 - 6.

Abstract

# Identification of novel target genes in high microsatellite instability colorectal and gastric carcinomas and investigation of mutant gene products expression

Nam - Gyun Kim

*Brain Korea 21 Project for of Medical Science*
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Hoguen Kim)

Tumors with high microsatellite instability (MSI - H) are caused by defects in DNA mismatch repair genes and progress with by accumulating frameshift mutations in coding microsatellite sequences of various cancer - related genes including tumor suppressor genes, apoptosis - related genes and DNA repair genes. The mutant products from frameshift mutations in target genes containing nucleotide repeat sequences can be used for diagnosis or immune therapy in MSI - H tumors. So, it is essential to identify various target genes and validate the expression of mutant gene products in MSI - H tumors. Initially, frameshift mutations of genes which in a large complex named BASC (BRCA1 - associated genome surveillance complex), that serves as a sensor for DNA damage were examined. Furthermore, a number of genes containing cMNR were identified by genome - wide systematic database search and the frameshift mutations in these repetitive sequences in MSI - H colorectal carcinomas are investigated. Expression of mutant transcripts and proteins were also examined.

Frequent mutations in genes forming a BACS complex were found in *hRAD50* (31%), *BLM* (21%), *hMSH6* (21%), however rare mutations in *BRCA1* (1%) and *ATM* (4%), and no mutation in *NBS1* were found. Thirty-three genes which containing cMNR with a length of 10 or more nucleotides were identified by a systematic database search. The most frequently mutated novel genes in MSI-H colorectal carcinomas were *MARCKS* (72%), *FLJ11383* (74%) and *TAF1B* (82%). Biallelic inactivation in *MARCKS* (26%) and *FLJ11383* (21%) was also frequent in the MSI-H colorectal carcinomas.

Expression of mutant transcripts were identified in *TGF-βRII, BAX, TCF-4 and MARCKS* genes. Mutant transcripts of *hMSH3, hMSH6* and *hRad50* genes were nearly undetectable. However, these transcripts were identified in the presence of the translation inhibitor puromycin, implying that mutant hMSH6 and hRad50 mRNAs are degraded, possibly by the mechanism of nonsense mediated mRNA decay. SNU-C4 cell, which contains biallelic mutant MARCKS allele, did not express the detectable amount of MARCKS protein. However, mutant MARCKS protein was protected from proteolysis by adding specific proteasome inhibitors.

In conclusion, we identified several target genes in MSI-H tumors and their mutant products were eliminated in RNA or protein level. Taken together, these data demonstrate the mechanism of evoking intense immune reaction and also explain the immune escape mechanism in a subset of MSI-H tumors.

---

Key Words: DNA mismatch repair, microsatellite instability, coding mononucleotide repeats, frameshift mutation, colorectal carcinoma.