위간질종양에서 *c-kit* 유전자 돌연변이에 따른 단백질 과표현 및 활성과 관련된 인자

연세대학교 대학원

의과학사업단

최 연 락

위간질종양에서 *c-kit* 유전자 돌연변이에 따른 단백질 과표현 및 활성과 관련된 인자

지도교수 김 호 근

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2002 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

최 연 락

최연락의 석사학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002 년 6 월 일

감사의 글

아무것도 모르는 제게 많은 기회와 격려를 주시고 과학에 대한 가르침을 주신 김호근 선생님께 진심으로 감사드립니다. 논문이 마치기까지 많은 조언과 격려를 보내주신 정현철 선생님과 이원택 선생님께 감사를 드리며, 학부때 많은 가르침을 주신 곽한식 선생님, 김은희 선생님, 김하근 선생님께 감사드리며, 짧은 시간이었지만 많은 가르침을 주셨던 이창헌 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 가장 오랜 시간 실험하는 데에 많은 조언과 관심으로 대해 준 김남균 선생님과 항상 따스한 맘으로 형처럼 저의 일을 걱정해 준 이용산 선생님, 항상 열정을 가지고 실험에 하던 김현기 선생님, 많은 도움을 주신 김세경 선생님, 이제 막 실험을 시작하는 강현주 선생님께 깊은 감사와 함께 언제나 발전하는 실험실이 되기를 바라는 맘을 전하고 싶습니다. 언제나 따스한 도움이 되어주었던 박강식, 허종호 선생님, 서로 위로와 힘이 되어주던 광조, 오랜시간 함께 했지만 얼굴뵙기 힘들었던 방친구 양재훈 선생님께 감사드립니다. 같이 기쁨과 슬픔을 함께해주던 윤희, 새로 푸르른 꿈을 가지고 시작하는 윤미, 착하기만 한 후배 경미, 양순이, 편하게 아무말 없어도 이해를 해주던 대학친구 미행, 승규, 승희, 희석, 세웅, 봉환, 인서, 광대, 용석이, 가장 오랜시간 마음을 나눈 혁민, 희성, 기채, 힘들때마다 위로를 해주던 재민, 종문이에게 고마운 맘을 전합니다. 그냥 같이 있으면 힘이 되고 언제나 웃음을 주던 동생 경동이, 때론 친구같고 착하기만 한 하나밖에 없는 동생 범락이, 새로이 저희 가족이 되신 제수씨, 만난지 얼마되지 않지만 소중하고 힘이 되어주는 수덕이에게 고맙다는 말과 함께 저의 맘을 전합니다. 이세상 그 누구보다 저를 믿고, 맘속에 버팀목이 되어주시는 부모님께 미흡하나마 이 논문으로 고마움을 전하고 싶고, 오래오래 건강하시길 이 기회를 빌어 기원합니다. 그리고 지금부터가 새로운 시작이라고 생각하며 항상 겸손하고, 따뜻한 맘을 갖는 제가 될 것을 고마우신 선생님들과 소중한 친구들과 사랑하는 가족 앞에 약속드립니다.

저 자 씀

목 차

표 목 차

그 림 목 차

국문요약

위간질종양에서 *c-kit* 유전자 돌연변이에 따른 단백질 과표현 및 활성과 관련된 인자

위간질종양은 비교적 드문 비상피성 종양으로서 조직기원이 불분명하고, 생물학적 특성과 발생의 원인이 밝혀져 있지 않은 종양이다. 최근 위 간질종양은 tyrosine kinase receptor 의 일종인 KIT 이 과표현되며 위장관에 KIT 이 표현되는 Intestinal cell of Cajal 이 기원세포라는 주장이 제시되었다. 악성 종양의 경우에는 *c-kit* 의 돌연변이와 과표현, 활성이 존재한다고 보고되었으며, tyrosine 기의 인산화를 억제하기 위하여 STI571 과 같은 인산화 방해물질을 치료에 이용하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 그러나, 위 간질종양에서 *c-kit* 의 생물학적 기전, 신호전달계 및 관련 인자에 관한 사실은 자세히 밝혀져 있지 않았다.

본 실험에서는 20예의 위간질종양 (양성 4예, 경계 영역성 9예, 악성 7예)에서의 *c-kit*의 돌연변이와 단백표현, 활성 및 *c-kit* 유전자가 활성화되었을 때 진행된다고 생각되어지고 있는 MAPK 신호전달계를 PCR-SSCP법, Immunoprecipitation, Immunoblotting법을 통해 분석하였고, 관련인자를 분석하기위해 2 dimensional electrophoresis(DE)법으로 조사하였다.

위간질종양에서 *c-kit* 돌연변이는 PCR-SSCP를 이용하여 14예 (70%)에서

발견되었으며 이들중 8예는 염기결실이었고 4예는 점돌연변이, 2예는 염기삽입이었다. *c-kit*의 돌연변이가 있는 종양은 전부 KIT 단백의 과표현이 관찰되었으나 정상 점막에서는 거의 이와 같은 소견이 관찰되지 않았다. 위 간질종양에서 활성화된 KIT를 조사한결과, KIT단백의 과표현은 빈번하였지만 활성은 드물었다. ERK 단백의 활성은 *c-kit* 돌연변이나 단백질 과표현과는 무관하게 암조직보다 정상조직에서 높이 나타났다. 2DE를 이용한 단백질 분석상 악성 종양에 특이한 15개 이상 단백의 표현과, *c-kit* 돌연변이에 따른 18개 이상 단백의 표현이 발견되었다.

이상의 결과는 대부분의 위간질종양에서 *c-kit*의 돌연변이가 KIT 단백의 과표현을 유발시키나, 대부분은 비활성화된 형태이며, mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달계로의 신호전달과는 무관한 것임을 시사한다.

핵심되는 말: 위 간질종양, *c-kit*, KIT, MAPK 신호전달계

위간질종양에서 *c-kit* 유전자 돌연변이에 따른 단백질 과표현 및 활성과 관련된 인자

<지도교수 김호근>

연세대학교 대학원 의과학사업단

최 연 락

I. 서 론

위간질종양(gastointestinal stromal tumor, GIST)은 위에 발생하는 간엽성 종양 (mesenchymal tumor)의 대부분을 차지하는 종양이다. 대부분의 종괴가 점막하층 이하에 존재하기 때문에 간혹 내시경적 진단이 어려운 경우가 있으며, 발생빈도 또한 선암종에 비하여 드물기 때문에 이들의 생물학적 특성이 명확하지 않고 조직학적 분류도 확실히 정립되지 않았다. 위간질종양은 조직학적으로 대부분이 미분화된 방추형세포나 상피양세포로 구성되어 있어 조직기원을 가늠할 단서가 없다. 연구자에 따라서는 이들을 간질종

양으로 통합하고 양성 및 악성 방추형세포 및 상피양세포의 4가지 아형으로 분류하는 경우가 있는가 하면,[1] 기존의 근종 및 근육종으로 분류한 경우에 근거하여 양성 방추형세포 간질종양을 세포성 근종 (cellular leiomyoma 또는 cellular spindle cell tumor), 상피양세포 근종 (epithelioid leiomyoma), 상피양세포 근육종 (epithelioid leiomyosarcoma), 미분화 육종 (pleomorphic sarcoma) 으로 분류하는 경우도 있다.[2-3] 따라서 위간질종양의 조직기원을 규명하고 생물학적 특성을 밝히는 것은 이 질환의 정확한 분류와 원인규명을 위하여 필수적인 일이나 현재까지 이들의 유전적 특성 및 변이에 대한 연구결과는 거의 없다.

최근의 암연구에 대한 급속한 발전이 암발생 기전을 세포유전학적 측면과 분자 생물학적 측면에서 이해할 수있게 되었다. 위간질종양의 유전학적 특성은 아직 체계적으로 밝혀져 있지 않으나 최근 나온 연구결과에 의하면 오직 악성종양에서만 exon 11 과 exon 17 에서 주로 *c-kit* 의 돌연변이와 과표현, 자가활성을 유도한다고 밝혀졌다.[4-8] KIT 에 존재하는 receptor tyrosine residue 의 자가인산화는 수용체의 이분자체 형성을 유도하고 Src homology2 (SH2) domain 을 갖는 phospholipase Cγ1, phophoinositol(PI)-3-kinase, Grb2 와 Src kinase 같은 세포내 결합 단백질을 위한 특이적 인식 motif 를 만들어주게 된다.[8-11] 이 SH2 domain 은 대략 100 개정도의 보존된 아미노산으로 phosphotyrosine residue 에 결합하고 세포내 다양한 신호전달물질에서 발견된다. *c-kit* 의 활성화를 초래하는 돌연변이는 비만세포

종양과 위 간질종양에서 서로 틀린 부위에 존재하는 것으로 알려져 있다.[12-16] 비만세포 종양에서는 주로 kinase domain 에 돌연변이가 존재하는 것으로 알려져 있고,[12-16] 위 간질종양에서는 juxtamembrane domain 에 주로 결실, 점 돌연변이, 삽입의 형태로 나타난다.[4,17]

KIT 과 결합하는 물질은 여러 가지로 밝혀지고 있는데, 이중 KIT 의 자가 인산화로 인한 kinase domain 의 활성으로 인해서 신호가 전달되는 물질로 Akt 를 들수 있다.[18-19] 이렇게 전달된 신호전달계는 의견은 분분하지만, MAP kinase 신호전달계 또는 Rb 신호전달계로 신호를 전달하게 되어 세포 증식등에 영향을 미친다는 의견들이 나오고 있다[20-26]. KIT 은 haematopoitic cell 과 melanoblast cell, germ cell 에서 정상적인 발달에 중요한 역할을 하며, stem cell factor(SCF)와 결합한 뒤 receptor dimerization 을 유도하여 자가 인산화를 발생하고, intrinsic tyrosine kinase 활성을 유도한다.[8-10,13,15]

이상과 같이 KIT 의 tyrosine phosphorylation 에 관한 많은 연구들은 세포에 형질전환을 시켰거나, KIT ligand 인 SCF 를 처리하여 세포주에서의 신호전달 및, 암세포의 증식 등을 측정하는 실험들 이였으며,[4,18-26] 조직에서 직접 KIT 의 자가활성을 측정한 결과는 거의 없다. 이에 본 연구에서는 *c-kit* 유전자의 표현이상이 알려진 위 간질종양을 대상으로 직접 조직에서 추출한 DNA 에서 *c-kit* 유전자의 돌연변이를 조사하고, KIT 단백의 과발현 및 인산화를 분석하여, 양성과 악성 종양간의 차이를 규명할 뿐 아니라,

c-kit 유전자의 돌연변이에 따른 신호전달계의 관련 활성인자를 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구재료

연구재료로는 1997 년부터 2000 년까지 연세대학교 의과대학부속 세브란스병원에서 수집한 20 예의 위간질종양의 조직을 사용하였다. 전체 20 예중 여성은 9 예이고, 남성은 11 예 였다. 위 간질종양과 비교하기 위한 종양으로는 4 예의 대장, 3 예의 위 선암종, 3 예의 림프절, 5 예의 림프종, 2 예의 간암을 사용하였다.

모든 예는 절제후 신속한 육안표본 검사와 함께 종양조직의 채취를 하였으며 정상 위점막과 근육층을 재조조직으로 채취하였으며 사용전까지 –70℃ 에서 보관하였다.

2. 병리학적 분석

연구대상에 포함된 20 예의 위간질종양을 분자생물학적 특성은 모르는 상태에서 병리학적 특성(종양크기, 분화정도 등)들을 분석하였다. 종양의 악성도를 Lewin 등 (1992)의 분류 기준에 따라 분석한 결과 총 20 예들 중 양성이 4 예, 경계영역성이 9 예, 악성이 7 예였다(Table 1).

위간질종양의 악성도 판정을 위한 관련 인자는 2 개의 명확한 악성판정요소 (metastasis, invasion of adjacent organs)와 5 개의 고위험 요소 (크기, 분화, 괴사정도, 핵의 다형성, 조직학적 유형)로 나뉘며, 악성도 판정기준은 고위험 요소

가 없는 한 개도 없는 경우를 양성, 단 1 개의 고위험 요소를 갖는 예를 경계 영역성, 1 개의 명확한 요소나 2 개 이상의 고위험 요소를 갖고 있는 예를 악성으로 하였다.

Table 1. Clinicopathological features of gastrointestinal stromal tumors

Sample	Tumor size (cm)	Tumor type	Cell type	Anatomic site	Sex	Age
1	1	Benign	Spindle	Body	F	38
2	2.5	Benign	Spindle	Body	M	64
3	4	Benign	Spindle	Body	F	36
4	7	Borderline	Spindle	Body	M	52
5	5	Borderline	Epitheloid	Antrum	F	47
6	4	Borderline	Spindle	Fundus	M	79
7	8	Borderline	Spindle	Fundus	F	76
8	9	Borderline	Spindle	Body	M	45
9	5.5	Borderline	Epithelioid	Fundus	F	52
10	17	Borderline	Spindle	Fundus	F	64
11	5	Borderline	Spindle	Body	F	56
12	12	Malignant	Spindle	Body	F	57
13	10	Malignant	Epithelioid	Body	M	35
14	17	Malignant	Epithelioid	Body	M	78
15	22	Malignant	Spindle	Antrum	M	64
16	3.7	Malignant	Spindle	Fundus	M	44
17	5.5	Malignant	Spindle	Body	F	68
18	6	Malignant	Spindle	Body	M	58
19	13	Borderline	Spindle	Body	M	49
20	4	Benign	Spindle	Body	M	45

3. DNA 추출

채취한 조직에 lysis buffer (100mM Tris buffer(pH 7.5-8.0), 50mM EDTA, 150mM Nacl, 0.5% SDS, 200μg/ml protein kinase) 500μl 를 첨가하여 50°C 에서 조직이 완전히 녹을 때까지 12~24 시간 이상 반응시켰다. 그 후 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)을 첨가하여 잘 섞은 뒤, 13,000 rpm 에서 4 분간 원심분리하여 상층액만을 조심스럽게 시험관에 택하였다. 같은 양의 isopropanol 과 0.2 배 양의 NH_4OAc 를 첨가하여 실온에서 5 분간 방치하였다. 이 후에 DNA 를 육안으로 확인 하였으며 이를 tip 으로 조심스럽게 취하여 70% ethanol 에 세척한 뒤 실온에서 말렸다.

이 후 DNA 는 TE (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA) buffer 에 완전히 녹인 다음 분광 광도계를 이용하여 260nm 파장에서 농도를 측정하였고 실험 전까지 -20°C 에 보관하였다.

4. 단백질 추출

절제된 종양조직과 주변 정상 위 점막조직을 액체질소를 이용하여 동결 분쇄하여 미세한 가루상태로 만든 뒤 세포 lysis buffer [8.5% sucrose, 50mM NaCl, protease inhibitors (10μg /ml aprotonin, 1μg /ml leupeptin, 1μg /ml pepstatin, 1μg /ml chmostatin), 1mM PMSF]를 함유한 25mM Tris-HCl (pH 7.4) 에 부유시켰다. Phosphatase inhibitor 인 sodium vanadate 를 buffer 에 최종 1mM 의 농도로

첨가하였다. 이후 sonicator 를 사용하여 25% 세포 균질액을 만들었다. 단백질 정량은 protein assay kit(Bio-Rad, Hercules, California, USA)을 이용하였으며 실험전까지 –70°C 에 보관 하였다.

5. 세포주 배양

실험에 사용한 사람 SCLC 세포주(NCI-H69, NCI-H209)는 한국세포주은행에서(KCLB, Korean Cell Line Bank; http://cellbank.snu.ac.kr), NIH-3T3 세포주는 연세의대 미생물학교실에서, 위간질종양 세포주인 GIST882 는 Jonathan A. Fletcher (Brigham and Women's Hospital) 로부터 기증받았다. 세포주들은 10% 우태아혈청(Life technologies, Grand Island, NY, USA)과 100U/mL 의 penicillin, 100ug/mL 의 streptomycin 이 첨가된 RPMI 1640(Life technologies, Grand Island, NY, USA) 배지에서 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

6. PCR–SSCP 를 통한 *c-kit* 유전자 돌연변이 분석 및 Sequencing Analysis

추출된 genomic DNA 를 주형으로 하여 소화기 간질종양에서 *c-kit* 유전자 중 흔한 돌연변이를 보이는 exon 11 과 exon 17 에 해당하는 부위를 증폭시키기 위하여 기존의 방법에 따라 시발체를 설계하였다.[7] 이 부위는 *c-kit* 을 구성하는 immunoglobin-like loops, transmembrane domain, cytoplasmic domain 및 adenosine triphosphate (ATP)-binding domain 과 kinase domain 내의 cytoplasmic

domain 으로 이루어진 juxtamembrane region 에 해당한다. 사용된 시발체의 염기서열은 exon 11s; 5'-CCA GAG TGC TCT AAT GAC TG-3', exon 11a:5'-ACT CAG CCT GTT TCT GGG AAA CTC-3'이며 exon 17s: 5'-TTC ACT CTT TAC AAG TTA AAA TG-3', exon 17a:5'-GGA CTG TCA AGC AGA GAA TG-3'이었다.

PCR 반응을 위해서 50ng 의 genomic DNA 에 총 20μl 가 되도록 1.5mM $MgCl_2$, 각 20 pmol 시발체, 0.2mM dATP, dGTP, dTTP, 5μM dCTP, 1μCi [α-^{32}P] dCTP (3000 Ci/mmol; NEN DuPont, Boston, MA), 1X PCR buffer 와 1.25U Taq polymerase (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA)를 첨가하였다. 반응 조건은 94°C 에서 5 분간 가열하여 변성 (denaturation) 시키고, 80°C 에서 10 분간 Taq polymerase 를 첨가한 후, 변성을 94°C 에서 30 초간, 56°C 에서 재결합 (annealing)과정을 30 초간, 72°C 에서 15 초간 신장 (extending)하는 과정을 30 회 반복 시행한 후, 마지막으로 신장 (extending)과정을 72°C 에서 5 분간 진행하였다

이상과 같이 합성된 PCR 산물은 같은 부피의 loading buffer (95% formamide, 20mM EDTA, 0.05% xylene cyanol FF and 0.05% bromophenol blue)에 섞어 95°C 에서 10 분간 가열한 다음 즉시 얼음에 넣고 그 중 3μl 만을 6% non-denaturing polyacrylamide gel 에 loading 하여 3W 로 12-16 시간 동안 전기영동 시켰다. 전기영동이 끝난 gel 을 gel dryer 에서 1 시간 동안 말린 후 Kodak XAR-5 film (Kodak, Rochester, NY, USA)에 현상하여 PCR-SSCP 결과를 판독하였다.

PCR-SSCP 에 의해 band shift 가 관찰된 14 예에서 염기서열 분석을 통한 돌연변이의 종류를 확인하였다. 염기서열 분석은 Sanger 의 dideoxy chain termination method 로 Sequence version 2.0 sequencing kit (Amersham Life Science, Arlington Heights, Illinois, USA)을 사용하였으며 double strand sequencing 은 T7 forward 시발체를 이용하여 클로닝된 internal standard 단편의 전체 염기서열을 확인 하였다. 일부 예에서는 direct sequencing 을 하였는데 이 때는 PCR-SSCP 에 사용한 시발체 중 anti-sense primer 를 이용하였다.

7. Immunoprecipitation & Immunoblotting

세포는 재조합 SCF 를 처리하기 전에 미리 24 시간전에 non-FBS RPMI-1640 media 로 배양한후 원심분리하여 세포를 1 ㎖로 수거한후 50ng/ml 의 SCF 를 37℃, 7.5 분 처리하였다. 시간이 지난후 바로 4℃ PBS 로 세척한후 lysis buffer 로 용해시켰다. 이 lysate 를 4℃에서 30 분간 배양한후 4℃, 13000rpm 으로 15 분간 원심분리하였다. Immunoprecipitation 은 rabbit polyclonal anti-human *c-kit* antibody 와 Agarose-protein A 를 가한 뒤 16 시간동안 반응시켰다. 두 번 4℃ lysis buffer 를 이용 세척해준뒤 다시 lysis buffer 를 가하였다.

세포 추출액을 6-12%의 polyacrylamide gel (polyacrylamide: bis-acrylamide =29:1)을 사용하여 120V 에서 1 시간 30 분~2 시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 Western Blotter (Bio-Rad, Hercules, California, USA)로 2 시간 동안 330mA 의 전류를 흘려 단백질들을 gel 로부터 PVDF membrane 으

로 옮긴 다음 5%의 무지방 우유를 함유한 1X TBST [100mM Tris(pH 7.5), 1.5M Nacl, 0.1% Tween-20] 용액으로 blocking 한 뒤 1X TBST 를 사용하여 5 분 간격으로 3 회간 실온에서 흔들어주며 세척하였다. 세척한 PVDF membrane 을 일차항체를 함유한 TBST (1% skim milk 함유)로써 실온에서 2 시간 동안, 혹은 4°C 에서 밤새도록 천천히 흔들면서 반응시켰다. 일차항체 반응 후 PVDF membrane 을 5 분 간격으로 1X TBST 로써 흔들며 3 회 씻어낸 뒤 1% 의 무지방 우유를 함유하는 같은 용액으로 적당히 희석시킨 이차항체를 사용하여 실온에서 한 시간동안 반응시켰다. Secondary antibody 에 의한 반응이 끝나면 1X TBST 를 사용하여 membrane 을 5 분 간격으로 5 회 흔들면서 씻어내었다. 이 후 signal detection 을 ECL plus kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA)을 사용하여 발광을 유도한뒤 ECL hyper film (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) 에 노출시켰다.

Western blotting 에 사용한 일차항체는 c-Kit(Santa Cruz Biotechnology, Santa cruz, California, USA), p-MEK (New England BioLabs, Beverly, England), p-ERK (Santa Cruz Biotechnology, Santa cruz, California, USA), ERK (New England BioLabs, Beverly, England), p-Tyr (Upstate biotechnology, Lake placid, NY, USA), Akt (Santa Cruz Biotechnology, Santa cruz, California, USA), p-Akt (Santa Cruz Biotechnology, Santa cruz, California, USA), p-Stat3 (Cellsignalling, Beverly, England)을 사용하였다.

Western blotting 을 통해 얻은 결과를 TINA program (raytest Isotopenmess-

geraete GmbH, Straubenhardt, Germany)을 이용하여 같은 부피당 정상 대조 조직의 강도에 대한 암조직의 강도 비를 계산하였으며 돌연변이가 없는 양성 종양을 기준으로 상대적 값을 판독하였다.

8. 2 Dimensional Electrophoresis 분석

절제된 종양조직과 주변 정상 위 점막조직을 sample buffer [40mM Tris, 7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 100mM 1,4-dithioerythritol and protease inhibitor cocktail (Complete; Roche, Mannheim, Germany)]에 부유시켰다. 이후 30 초동안 sonicator 를 이용하여 세포균질액을 만든뒤, 100,000g 에서 45 분동안 침전시켰다. 단백농도를 Protein Assay kit(Bio-Rad, Hercules, California, USA)을 이용하여 정량했다. 총 단백양은 1mg 을 사용하였으며, 모든 단백은 immobilized pH 3 에서 10 의 nonlinear gradient strip (Amersham, Uppsala, Sweden)을 사용했다. 2DE 는 9-16% linear gradient polyacrylamide gels (18cm * 20cm * 1.5mm)에 gel 당 40mA 의 일정한 전류를 이용해서 dye 가 바닥에 다 내려갈때까지 거의 5 시간가량 전기영동했다. 12 시간동안 고정액 [40% 메탄올, 5% phosphoric acid]에 반응시킨뒤, 24 시간동안 Coomassie blue G250 에서 염색하였다. Gel 은 증류수로 씻어준뒤 Bio-Rad (Richmond, CA, USA) G710 densitometer 에서 촬영한 뒤, *Melanie III* 컴퓨터 프로그램 (GenBio, Geneva, Switzerland)로 분석하였다.

분석된 단백들은 mass spectrometry fingerprinting 을 위해서 gel 에서 바로 잘라낸뒤, 50% acetonitrile , 25mM ammonium bicarbonate 용액으로 염색을 제거한

뒤 건조시켰다. 건조된 단백을 25mM ammonium bicarbonate (pH 8.0), 50ng trypsin 에 37℃ 16 시간 반응시켰다. 상등액만 취한뒤 이 단백혼합물에 50% acetonitrile, 5% trifluoroacetic acid 를 첨가한후 건조시켰다. 펩타이드 혼합물에 50% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid 4 ㎕를 넣고 완전히 녹였다. 준비된 disk 에 1 ㎕을 올리고 공기중 건조시킨뒤, matrix 로는 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid 를 사용하였다. Spectra 는 Voyager DE PRO MALDI-TOF spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA)를 사용하였고, 단백 자료검색은 MS-Fit (http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.4/msfit.htm)을 이용 monoisotopic peak 를 분석하였다. [27]

III. 결 과

c-kit 유전자 돌연변이 관찰 및 염기서열 분석

위 간질종양 20 예에서 *c-kit* 유전자 exon 11 과 exon 17 에서의 돌연변이를 관찰한 결과 *c-kit* 유전자 exon 11 에서 70% (14/20)의 돌연변이가 발견되었다 (Table 2 및 Figure 1). 위 간질종양 악성도의 등급에 따른 *c-kit* 유전자 돌연변이 빈도는 양성에서 75% (3/4), 경계영역성에서 67% (6/9), 악성에서는 71% (5/7)로서 악성도 등급에 따른 차이는 없었으며(Figure 1), 발견한 돌연변이를 종류별로 보면 점 돌연변이가 4 예, 염기결실이 8 예였고, 염기삽입이 2 예로, 모든 돌연변이는 KIT 단백의 한 개 또는 수개의 아미노산에 영향을 주는 돌연변이였다. (Table 3).

KIT 단백질 표현 관찰

위간질종양에서 KIT 단백표현을 *c-kit* 유전자가 정상인 위간질종양 (검체번호 2 종양)과 비교한 결과 검색한 20 예중 14 예의 종양에서 KIT 단백표현이 정상 대조군보다 2.77 배이상 증가한 것이 관찰되었다(Figure 2). KIT 단백표현이 증가된 14 예는 전부 *c-kit* 유전자 exon 11 에 돌연변이가 있는 예들로 KIT 의 과표현과 돌연변이의 존재가 밀접한 관계가 있었다 (14/14, 100% versus 0/6, 0%; $p<0.001$) (Table 4 및 5, Figure 1, 2, 3, 및 4). 이에 반하여 대조

실험으로 수행한 4 예의 대장, 3 예의 위 선암종, 3 예의 림프절, 5 예의 림프종, 2 예의 간암 모두에서는 KIT 단백이 거의 표현되지 않았다 (Table 5, Figure 6).

Table 2. *c-kit* mutation of gastrointestinal stromal tumors

Sample number	Tumor type	Sex	Age	KIT expression Comparative ratio [a]	Mutation Type
1	Benign	F	38	3.45	Deletion
2	Benign	M	64	1.00	No mutation
3	Benign	F	36	4.80	Deletion
4	Borderline	M	52	3.02	Point mutation
5	Borderline	F	47	0.71	No mutation
6	Borderline	M	79	4.75	Deletion
7	Borderline	F	76	4.76	Deletion
8	Borderline	M	45	4.04	Insertion
9	Borderline	F	52	0.38	No mutation
10	Borderline	F	64	4.44	Deletion
11	Borderline	F	56	0.21	No mutation
12	Malignant	F	57	4.38	Point mutation
13	Malignant	M	35	0.28	No mutation
14	Malignant	M	78	0.16	No mutation
15	Malignant	M	64	4.15	Deletion
16	Malignant	M	44	3.43	Deletion
17	Malignant	F	68	3.34	Point mutation
18	Malignant	M	58	2.88	Deletion
19	Borderline	M	49	3.18	Insertion
20	Benign	M	45	2.77	Point mutation

[a] data represent ratio between tumor and sample number 2 tumor (no *c-kit* mutation) (tumor/2 tumor)

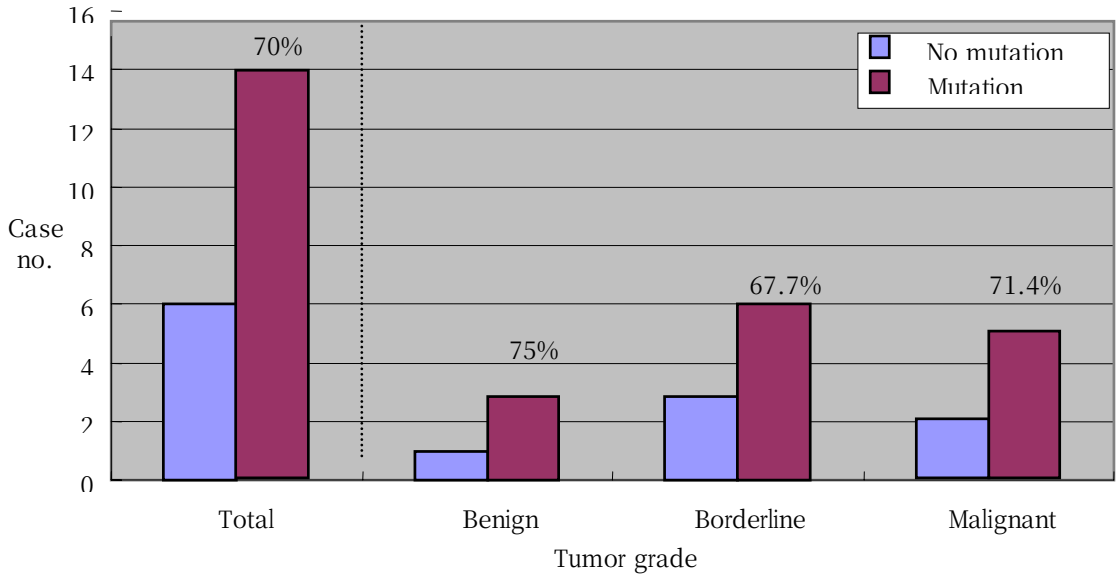

Figure 1. *c-kit* mutation of GISTs according to the tumor grade. Total 20 GISTs were analysised. Total(14/20, 70%), Benign(3/4, 75%), Borderline(6/9, 67.7%), Malignant(5/7, 71.4%)

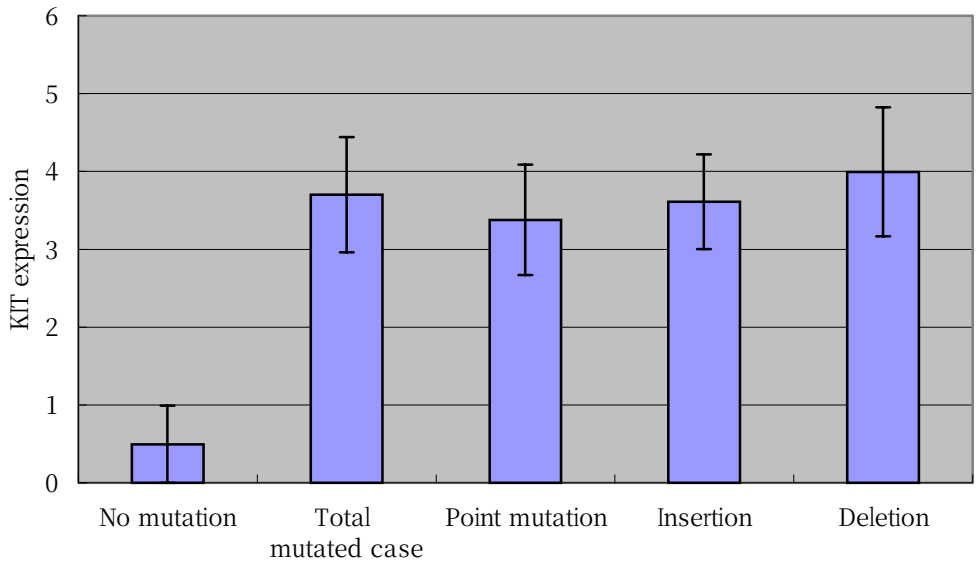

Figure 2. KIT expression according to mutation types.

Table 3. *c-kit* mutation profiles in 20 GISTs

	Tumor	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570
	Grade	**Q**	**K**	**P**	**M**	**Y**	**E**	**V**	**Q**	**W**	**K**	**V**	**V**	**E**	**E**	**I**	**N**	**G**	**N**	**N**	**Y**	**V**	**Y**
1	Benign	Q	K	-	-	-	-	-	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y
3	Benign	Q	K	P	-	-	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y
20	Benign	Q	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	***D***	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y
4	Borderline	Q	K	P	M	Y	E	V	Q	***R***	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y
6	Borderline	Q	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y
7	Borderline	Q	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	-	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y
8	Borderline	Q	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y
10	Borderline	Q	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y
19	Borderline	Q	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y
12	Malignant	Q	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	***A***	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y
15	Malignant	Q	K	P	M	Y	E	V	Q	-	-	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y
16	Malignant	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y
17	Malignant	Q	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	***D***	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y
18	Malignant	Q	K	P	M	-	-	-	-	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y

	Tumor	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590
	Grade	**I**	**D**	**P**	**T**	**Q**	**L**	**P**	**Y**	**D**	**H**	**K**	**W**	**E**	**F**	**P**	**R**	**N**	**P**	**L**	**S**
1	Benign	I	D	P	T	Q	L	P	Y	D	H	K	W	E	F	P	R	N	P	L	S
3	Benign	I	D	P	T	Q	L	P	Y	D	H	K	W	E	F	P	R	N	P	L	S
20	Benign	I	D	P	T	Q	L	P	Y	D	H	K	W	E	F	P	R	N	P	L	S
4	Borderline	I	D	P	T	Q	L	P	Y	D	H	K	W	E	F	P	R	N	P	L	S
6	Borderline	I	D	P	T	Q	L	P	Y	-	H	K	W	E	F	P	R	N	P	L	S
7	Borderline	I	D	P	T	Q	L	P	Y	D	H	K	W	E	F	P	R	N	P	L	S
8	Borderline	I	D	P	***T***	***Q***	***L***	***P***	***Y***	***D***	***H***	***K***	***W***	***E***	***F***	***P***	***R***	N	P	L	S
				T	***Q***	***L***	***P***	***Y***	***D***	***H***	***K***	***W***	***E***	***F***	***P***	***R***					
10	Borderline	I	D	P	T	Q	L	P	Y	-	H	K	W	E	F	P	R	N	P	L	S
19	Borderline	I	D	P	T	Q	***L***	***P***	***Y***	***D***	***H***	***K***	***W***	***E***	***F***	***P***	***R***	N	P	L	S
						L	***P***	***Y***	***D***	***H***	***K***	***W***	***E***	***F***	***P***	***R***					
12	Malignant	I	D	P	T	Q	L	P	Y	D	H	K	W	E	F	P	R	N	P	L	S
15	Malignant	I	D	P	T	Q	L	P	Y	D	H	K	W	E	F	P	R	N	P	L	S
16	Malignant	I	D	P	T	Q	L	P	Y	D	H	K	W	E	F	P	R	N	P	L	S
17	Malignant	I	D	P	T	Q	L	P	Y	D	H	K	W	E	F	P	R	N	P	L	S
18	Malignant	I	D	P	T	Q	L	P	Y	D	H	K	W	E	F	P	R	N	P	L	S

Gray : new c-kit mutations, - : deletion, Bold : amino acid substitution

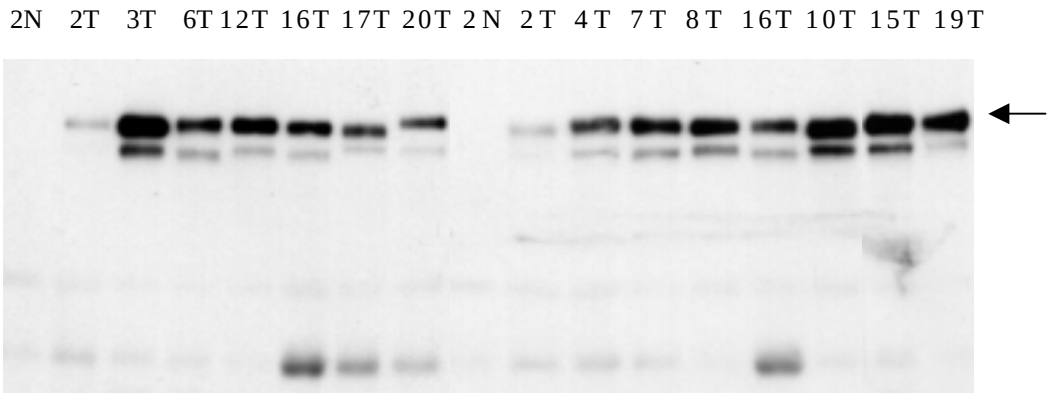

Figure 3. **KIT** expression in GISTs. N: normal mucosa, T: gastrointestinal stromal tumor. KIT overexpression : 3T, 6T, 12T, 16T, 17T, 20T, 4T, 7T, 8T, 16T, 10T, 15T, 19T.

Table 4. KIT expression according to tumor grade, mutation type

Tumor grade	Mutation	Mutation type	Case No.	KIT expression Mean	± SD	KIT expression Mean	± SD
Benign	No mutation	No mutation	1	1.00	± 0.00	1.00	± 0.00
	Mutation	Deletion	2	4.13	± 0.95	3.67	± 1.03
		Point mutation	1	2.77	± 0.00		
Borderline	No mutation	No mutation	3	0.36	± 0.30	0.36	± 0.30
	Mutation	Point mutation	1	3.02	± 0.00	4.03	+ 0.83
		Insertion	2	3.61	± 0.61		
		Deletion	3	4.65	± 0.01		
Malignant	No mutation	No mutation	2	0.22	± 0.09	0.22	± 0.09
	Mutation	Point mutation	2	3.86	± 0.74	3.64	± 0.62
		Deletion	3	3.49	± 0.64		

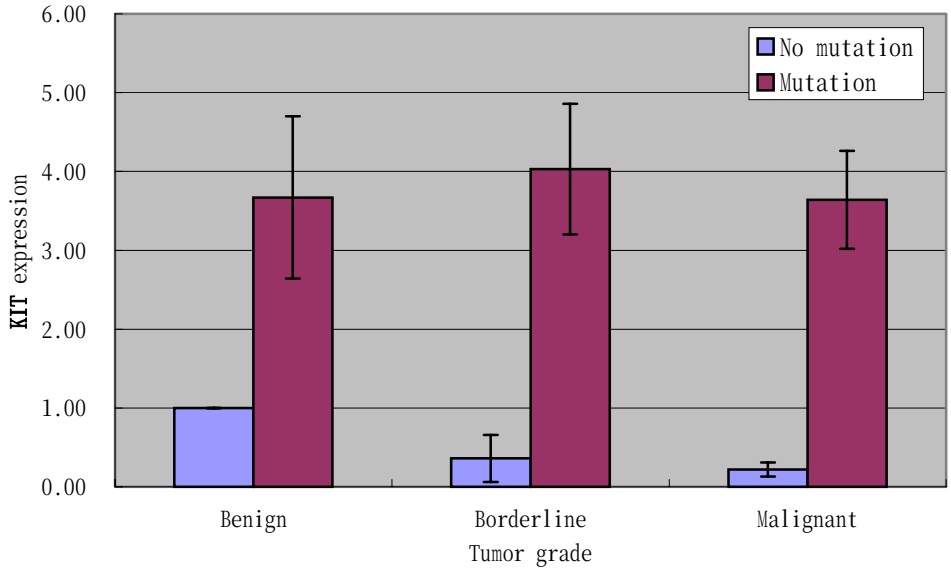

Figure 4. **KIT** expressions according to *c-kit* mutation. All GISTs with *c-kit* mutation showed high overexpression, however GISTs with no mutation showed low expression.

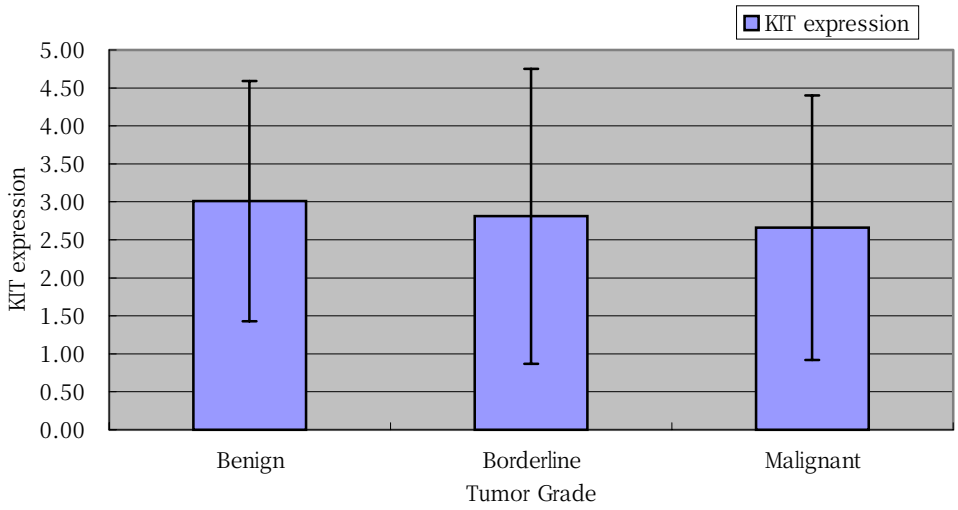

Figure 5. **KIT** expressions according to the GISTs grade. The levels of KIT expression were similar in all of the tumor tissues regardless of tumor grade.

Table 5. **KIT** expression level in various tumors

Tumor type, grade		Case No.	KIT expression (Mean ± SD)	*c-kit* mutation (%) exon 11	exon 17
Lymph Node		3	(0.14 ± 0.08)	0	0
Lymphoma		5	(0.10 ± 0.08)	0	0
Cololectal Carcinoma		4	(0.10 ± 0.08)	0	0
Hepatocellular Carcinoma		2	(0.20 ± 0.08)	0	0
Gastric Carcinoma		3	(0.13 ± 0.02)	0	0
Stromal Tumor	Total	20	(2.85 ± 1.72)	70	0
	Benign	4	(3.01 ± 1.58)	75	0
	Borderline	9	(2.81 ± 1.94)	68	0
	Malignant	7	(2.66 ± 1.74)	71	0

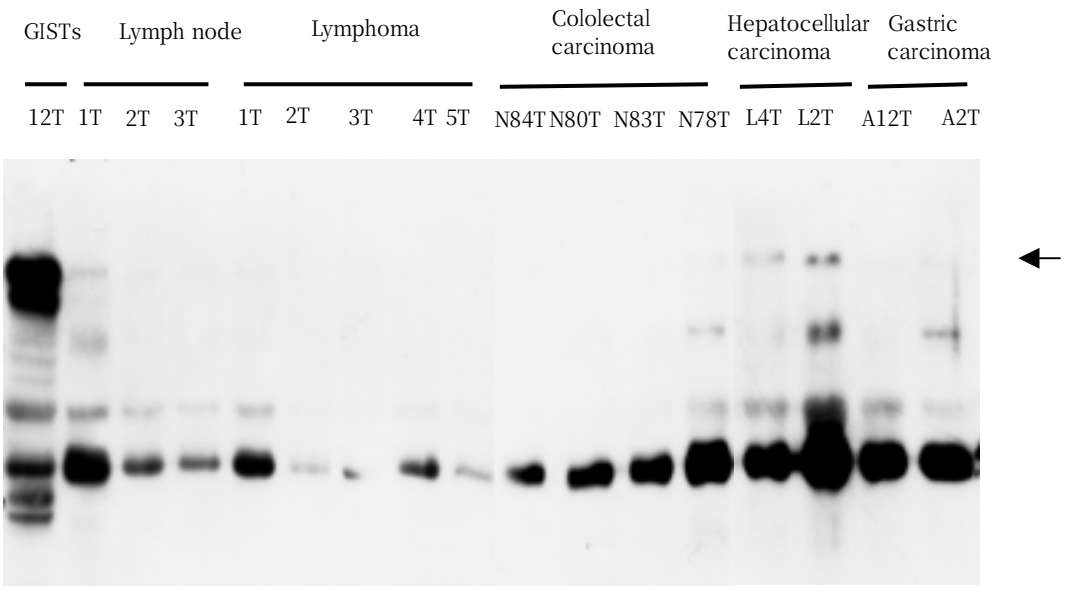

Figure 6. Comparison of KIT expression in GISTs and other tissues. Most of the tissues showed low expression or no expression of KIT protein.

활성화된 KIT 단백 측정

KIT 의 활성을 측정하기 위하여 20 예의 위간질종양의 KIT 단백 표현량을 측정한뒤 (Figure 3), 같은 양의 KIT 단백을 Immunoprecipitation 방법과 Immunoblotting 을 통해 KIT 단백의 활성을 측정한 결과, 위간질종양 20 예중 1 예에서 *c-kit* 유전자 정상 예 (GIST 2)보다 높은 활성을 나타냈다(Figure 7).

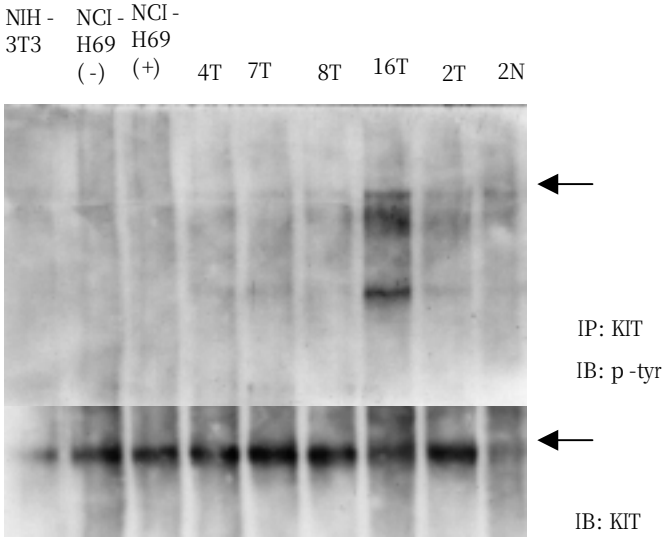

Figure 7. **KIT** activation in GISTs. GISTs proteins were immunoprecipitated with rabbit polyclonal anti-human c-kit antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa cruz, California, USA) and agarose-protein A. Then membrane was immunoblotted with p-Tyr antibody (Upstate biotechnology, Lake placid, NY, USA) and re-immunoblotting c-kit antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa cruz, California, USA). Only 16T GIST was activated.

MAPK 신호전달계에 관여하는 유전자들의 활성도 관찰

위 간질종양에서 일어난 *c-kit* 돌연변이가 MAPK 신호전달계에 미치는 영향을 규명하기 위하여, 연구대상인 20 예의 위 간질종양에서 ERK 단백 표현과 활성화 ERK 의 단백표현을 조사하였다. 17 예중 16 예 (94%)의 위 간질종양에서 활성화된 ERK 가 정상 대조군인 위점막에서보다 감소된 것을 확인하였다 (Table 6, Figure 8). 또한, 유의할 수준은 아니나 양성 및 경계 영역성에서보다 악성에서 활성화된 ERK 의 표현이 증가하였고 (1 versus 1.4, $p>0.05$), 이 차이는 *c-kit* 돌연변이가 있는 예들만을 비교하였을 경우 보다 높아졌다 (0.8 versus 1.2, $p>0.05$). 그러나 전체 예들을 *c-kit* 돌연변이 유무에 따라 비교한 결과 활성화된 ERK 의 표현과 *c-kit* 돌연변이와는 무관한 결과를 보였다. 이러한 단백질의 활성도 변화를 대장암, 위 선암종, 림프절, 림프종, 간암을 비교한 결과 대장암, 위 선암종, 림프절, 간암에서는 종양조직에서 정상조직보다 활성화된 ERK 가 감소되는 현상을 보였으나, 림프종에서는 다른 암이나 위 간질종양과는 달리 정상조직보다 종양조직에서 활성화된 ERK (1.73 ± 0.31)가 증가되었다 (Table. 6). 그리고 일부 림프절에서 정상조직보다 강한 표현을 보이기도 했지만, 전체로는 결과는 활성이 감소(0.78 ± 0.82)하는 결과를 보였다 (Table 6, Figure 8).

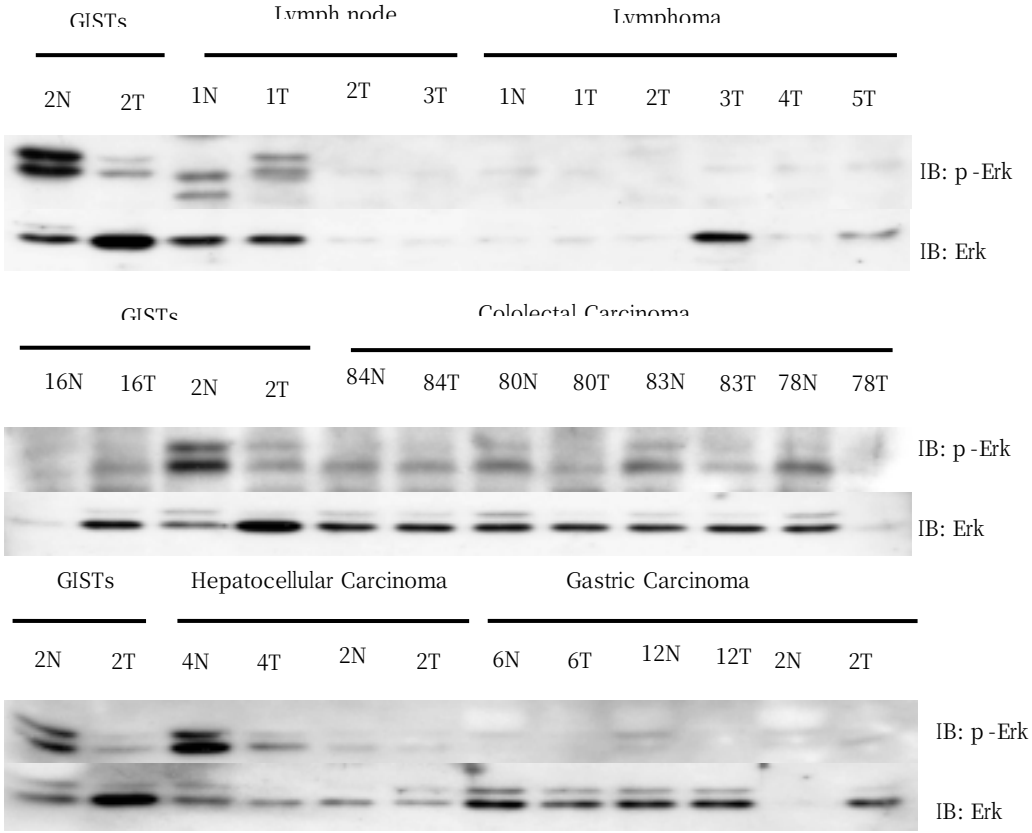

Figure 8. **ERK** expression & activation in various tumors. Almost Erk activation of GISTs were lower than that of normal mucosa, and other tumors showed similar expression.

Table 6. **ERK** activation levels in various tumors

Tumor type, grade		Case No.	**ERK** activation (T/N) [a] (Mean ± SD)
Lymph Node		3	0.78 ± 0.82
Lymphoma		5	1.73 ± 0.31
Cololectal Carcinoma		4	0.54 ± 0.22
Hepatocellular Carcinoma		2	0.56 ± 0.22
Gastric Carcinoma		3	0.65 ± 0.40
Stromal Tumor	Total	17	0.39 ± 0.25
	Benign	3	0.27 ± 0.15
	Borderline	8	0.18 ± 0.12
	Malignant	6	0.55 ± 0.30

[a] data represent ratio between tumor and normal (T/N)

위간질종양의 종양 단계에 따른, *c-kit* 돌연변이에 따른 관련 인자 관찰

위간질종양에서 종양의 단계 또는, *c-kit* 돌연변이에 따른 관련 인자를 규

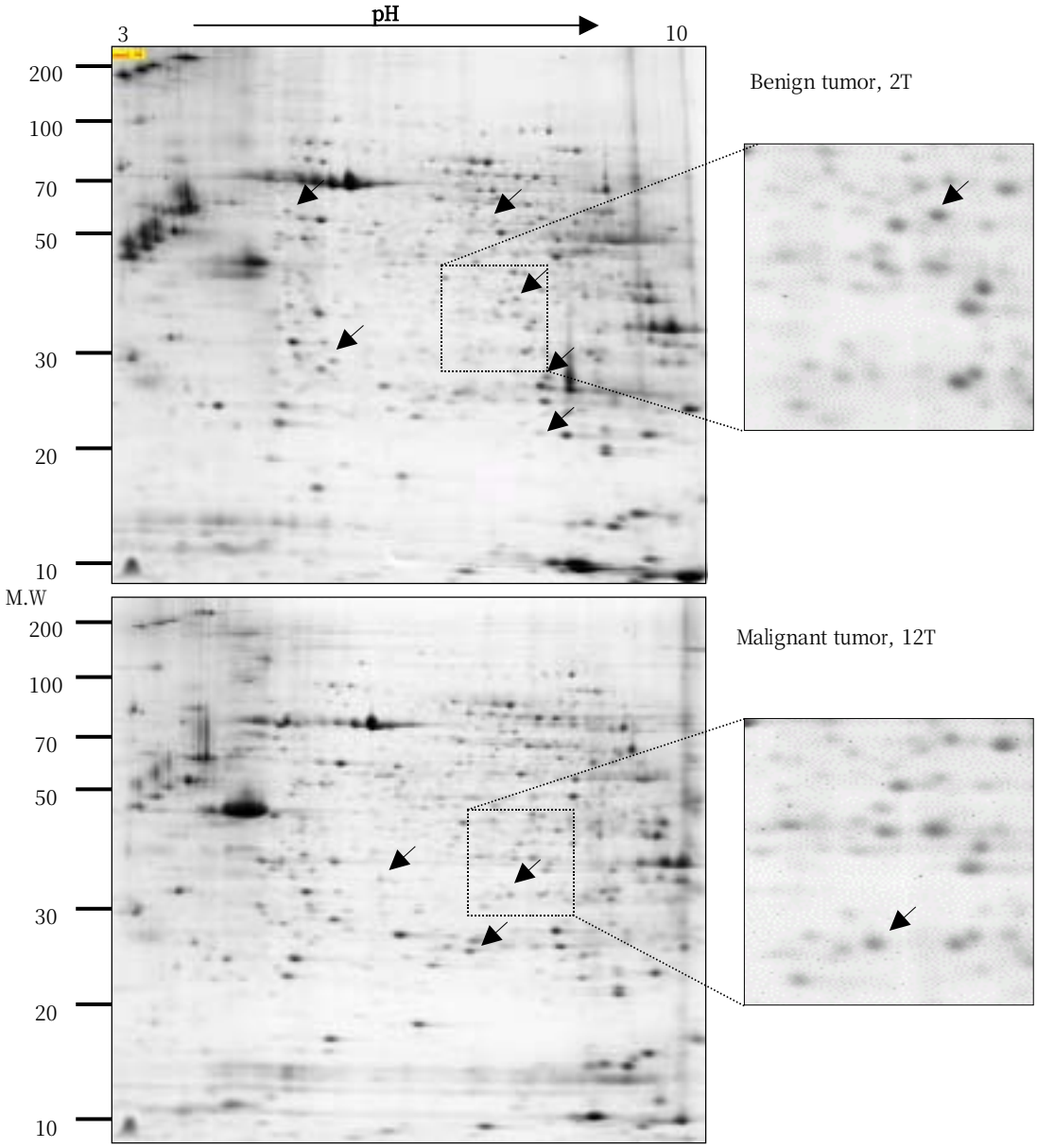

Figure 9. **2DE** analysis of human GIST proteins. arrow : aberrant protein spots.

명하기 위해 양성 2 예, 경계영역성 5 예, 악성 5 예를 분석한 결과 종양 단계에 따른 이상 단백의 표현 중 악성에서 표현이 감소하는 단백 점이 12, 악성에서 증가하는 단백 점이 3 개가 나타났고, *c-kit* 돌연변이에 따른 이상 단백의 표현으로 돌연변이가 있는 종양에서 증가하는 단백 점이 13, 감소하는 단백 점이 5 개가 나타났다 (Figure 9).

IV. 고 찰

본 실험에서는 생물학적 의의가 잘 알려져 있지않은 위 간질 종양에서 *c-kit* 유전자의 돌연변이에 따른 과표현 및 신호전달계를 알아보기 위해서, *c-kit* 유전자의 돌연변이, KIT 및 Erk 단백질의 표현 및 활성조사와 *c-kit* 돌연변이에 따라 변하는 단백질군을 20 예의 GIST 를 사용하여 조사한 결과, *c-kit* 돌연변이는 대부분의 GIST 에서 존재했고, 이는 KIT 단백질 과표현과 관련이 있으나 KIT, Erk 단백질의 활성과는 무관하였다. 또한 *c-kit* 돌연변이에 따라 변화가 일어나는 단백질군을 찾아내었지만, *c-kit* 돌연변이가 MAPK 신호전달계와는 무관하여 다른 단백질과 상호작용이 있을것으로 추정된다.

C-kit proto-oncogene 은 5 개의 immunoglobin-like loops 을 포함하는 extracellular domain 과 transmembrane domain, 그리고 juxtamembrane region 으로 이루어진 cytoplasmic domain, kinase 삽입과 carboxy-terminal tail 에 의해 phosphotransferase subdomains 으로 구분되는 adenosine triphosphate (ATP)-binding domain, kinase domain 을 포함하는 intracellular domain 으로 구성되어 있다.[27-28] KIT 의 염기서열과 domain 구성은 Type III receptor tyrosine kinase subfamily 인 colony-stimulating factor-1 과 platelet-derived growth factor 의 수용기들과 비슷하다.[28-31]

c-kit proto-oncogene 은 사람에서는 염색체 4 번에 위치하고, *c-kit* 의 ligand 인 SCF 는 염색체 12 번에 위치하며 생쥐의 경우 *c-kit* proto-oncogene 는 5 번 염

색체에, SCF 는 염색체 10 번에 위치한다.[32-35] 생쥐에서 KIT/W 와 SCF/SI 위치의 기능이 소실되는 돌연변이의 변화를 KIT 기능과 위치별 역할로 조사한 결과, KIT 와 SCF 의 돌연변이는 hematopoietic stem cells, mast cells, neural crest-derived melanocytes, germ cell 의 증식, 분화, 이동과 생존에 영향을 미친다는 것이 밝혀졌다.[35]

근자에 위 간질종양에서 *c-kit* 유전자산물의 과표현이 있음이 알려진 후, Hirota 등(1998)에 의해 위 간질종양에서 기능의 항진을 초래하는 돌연변이가 발견되는 등 *c-kit* 유전자의 변형에 대한 많은 연구가 이루어졌다.[5-8,36-38] 본 실험에서는 위 간질종양에서의 *c-kit* 유전자의 돌연변이 빈도가 70%로서 이전에 보고된 21%[38], 42%[17] 또는 57%[6] 보다 높게 나타났다. 이러한 차이의 원인은 알 수 없으나, 본 실험에서 사용된 위 간질종양의 판정기준이 이전의 보고보다 엄격했기 때문인 것도 하나의 원인일 것으로 생각된다. 본 연구에서 발견된 돌연변이의 발생 부위는 다른 연구자들의 보고와 같이[5-8,17,36-38] 대부분이 *c-kit* 의 juxtamemebrane domain 인 codons 550-560 에서 나타났고, 이중 codons 552-553 염기결손, codons 573-574 에서의 13 개 아미노산 삽입 및 codons 553-556 의 결손과 codon 557 에의 치환의 세가지 돌연변이는 이전에 보고되지 않은 돌연변이 유형이다. 이전에 보고되었던 돌연변이인 codon 579 에서도 염기 결실도[17] 본 실험에서 확인하였으며, Moskaluk 등 (1999)이 보고한 염기삽입 부위(codons 575-586)와 비슷한 부위 (codons 574-586)에서 염기삽입도 확인되었다.[38] 이러한 돌연변이가 어떤 생물학적 의의가 있는지는 불

확실하나 *c-kit* juxtamembrane domain 중 codons 552-563 은 receptor 자가인산화를 조절하는 부위로 밝혀진 바 있다.[39-40] 이 보고에 따르면 SCF 와 결합하지 않은 *c-kit* 유전자의 kinase activity 에 대한 억제효과에는 juxtamembrane 부위 중 codons 553, 557, 559 및 560 의 구조가 중요한 작용을 하는 것으로 알려졌다. 이러한 원인으로는 이 부위에서 발견된 염기결실과 점 돌연변이가 구조적 변형을 일으켜 receptor kinase 의 활성화를 초래하는 것으로 추정되며 본 실험에서도 발견한 14 개의 돌연변이중 5 예를 제외하고는 모두 이 부위에 돌연변이가 있어 receptor kinase 의 활성화가 초래되었을 것으로 추정된다. 특히 본 실험에서 처음 발견된 돌연변이는 receptor 자가인산화를 초래하는 codons 552-563 부위에서 일어난 돌연변이로서 receptor kinase 활성과 연관이 있을것으로 추정된다. 본 연구의 결과로는 모든 종류의 *c-kit* 돌연변이와 KIT 단백의 과표현과 밀접한 관계가 있었으나, 과표현이 있었던 14 예중 1 예만이 KIT 단백 활성이 있었다. 이러한 결과는 본실험에서는 사용한 방법이 직접 활성화된 KIT 에 대한 항체는 아니었기 때문에 예민도가 떨어졌을 가능성과 KIT 단백질 과표현과 활성은 무관한 사실일 가능성이 있다. 이러한 가능성중 *c-kit* 유전자의 돌연변이가 악성도 등급과 무관하게 양성종양부터 빈번하였고 KIT 과표현이 MAPK 화성과도 관계가 없다는 점은 GIST 에서 *c-kit* 돌연변이는 KIT 단백질의 활성보다는 종양발생초기에 일어나는 유전적 변화일 가능성이 높다. 그러나 본실험의 결과는 최근에 *c-kit* 유전자의 돌연변이가 위 간질종양의 악성도와 관계 있다는 결과와는[6] 상반된 소견인데,

본 실험 뿐 아니라 이전의 보고에서도 KIT 단백질이 모든 종류의 위 간질종양에서 과표현되었기 때문에 KIT 단백의 과표현은 초기의 변화로 추정된다.

전술한 바와 같이 본 실험결과에 따르면 *c-kit*의 돌연변이에 의한 KIT 단백의 활성이 MAPK 신호전달계의 활성과는 관계가 없었다. ERK는 세포질내의 Ras-MAPK 신호전달계의 말단에서 작동하는 신호전달 단백질로서, 그 활성도는 세포의 성장 분열상태를 예측할 수 있는 중요한 표지가 될 수 있다. 최근의 연구들은 ERK의 과발현이나 활성도의 증가가 다양한 종류의 암 (유방암, 신장암등)에서 발견되었으나[41-42] 앞서 언급했듯이 ERK의 활성도와 암과의 일관성 있는 상호관계는 아직 확실하게 알려지지 않은 상태이다. 연구자들의 최근 결과에 따르면[43] 대장암에서는 ERK의 활성도가 정상조직 보다 낮게 나타남을 밝혔으며, 이는 MAPK 의 활성도 증가가 모든 종류의 암에서 일어나는 일반적인 현상이 아님을 보여주고 있다. 이는 세포주를 이용한 다른 실험결과와도 일치되었는데 이들의 연구결과에 따르면 ERK 신호전달계의 활성화가 생리조건의 변화 혹은 세포주에 따라서는 세포의 성장촉진이 아닌 저해를 유도 할 수도 있다고 보고하고 있다. [44-45] 이와 같은 연구 결과들은 ERK 신호전달계가 세포의 성장기능 뿐만 아니라 세포의 성장저해라는 상반되는 기능들을 동시에 수행할 수 있음을 암시하고 있다. 본 실험에서는 MAPK 신호전달계를 관찰하는 과정중에 KIT 단백의 신호전달계를 알아보기 위하여 Akt, STAT1, STAT3, STAT5, STAT6, FKHR 단백의 활성을 살펴 보았는데 위의 유전자들은 *c-kit* 유전자의 돌연변이나 활성과는 크게 관련이

없는 것으로 나타났다. 이중 Akt 단백은 종양에서 특이적으로 과표현되나 *c-kit* 유전자의 돌연변이와는 무관한 것으로 나타났다. 그리고 STAT1은 전체적인, STAT3 단백의 일부의 활성을 나타냈지만, *c-kit* 돌연변이와의 관계는 확실하지 않았다. 따라서 *c-kit*의 변화에 따른 타 신호전달계의 변화에 관한 연구가 필요한데, *c-kit* 유전자가 활성화 되었을 때 MAPK 신호전달계 외에 janus kinase (JAK) kinase, phospholipase Cγ와 phophoinositol-3-kinase로도 신호가 전달된다고 알려져 있다.[18-26] JAK/signal transducers and activators of transcription (STAT) 신호전달계는 몇 몇 cytokine 수용체에 의해 활성되는 것으로, 이런 수용체는 내인성 kinase 활성을 가지고 있지 않다. 이들은 cytokine과 결합하여 수용체를 dimer로 만들어서 신호와 결합하게 함으로써 STATs 라는 전사인자를 기질로 갖는 tyrosine kinase인 JAK kinase를 활성시킨다. STAT dimer는 핵내로 들어가 다른 단백질과 결합하는데 이 단백질은 전사를 활성 시키는 표적유전자와 결합한다고 알려져 있다.[23-26] 이러한 신호전달을 옮기는 단백질 (signal transducer)은 수많은 기질들을 변형시키는 효소와는 달리 인산화와 같은 촉매작용이 있음에도 불구하고 보통 적은 수의 표적 단백질들에 영향을 주고 기질과 결합한 부분과 촉매 기능을 나누게 된다. 결합부위는 특이적인 조절과 인식 능력을 모두 가지고 있으며, 다른 단백질과 결합하게 변형됨으로써 신호전달계의 경로를 결정한다. 이러한 결합은 지속적으로 유지되는 것이 아니라 일시적으로 모여 신호를 전달하고 전달 후에는 다시 흩어지게 된다. 그러므로, *c-kit* 유전자의 돌연변이와 그에 따른 단백질 과표현의

결과로 진행되어지는 신호전달계의 규명은 위 간질종양에 발생하는 유전변화의 본질을 규명하는데 필요한 절차로서 향후 MAPK 신호전달계 이외에 *c-kit* 활성과 연관된 신호전달계의 활성화에 대한 연구가 수행되어야 한다.

본 연구에서 또한 2DE 단백체 연구를 통해서 *c-kit* 유전자의 돌연변이에 따른 변화되는 단백을 살펴보았다. 일부 단백에서 종양 단계별로, 또는 c-kit 유전자 돌연변이에 따라서 구분되어지는 것을 볼수 있었다. 향후 이 단백의 실체를 밝혀 *c-kit* 돌연변이와 과표현이 관계되는 신호전달계에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

본 연구의 결과를 요약하면, 위 간질종양에서 *c-kit* 유전자의 돌연변이는 흔히 일어나는 현상이며 이것은 KIT 단백질의 과표현과 직접적인 관련이 있음을 확인하였다. 이러한 현상은 위 간질종양의 악성도와 관계없이 나타났고, 이들은 MAPK 신호전달계 단백보다는 다른 단백에 영향을 주는 것으로 해석되며, 향후 위 간질종양의 조기진단 및 기전의 이해에 따른 치료에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

위간질종양 20 예에서 *c-kit* 돌연변이와 이에 따른 단백 과표현 및 활성, 그에 따른 관련인자를 규명하고자 *c-kit, Erk* 의 돌연변이, 단백발현 및 활성화를 조사한 결과, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 위간질종양 일부에서 *c-kit* 유전자 exon11 에 돌연변이가 있었으며, 이 돌연변이들은 모두 한 개 또는 수개의 codon 에만 영향을 미쳤다.
2. 위간질종양에서 *c-kit* 유전자에 돌연변이가 존재할 경우 모두 단백 과발현이 나타났다.
3. KIT 단백의 과발현은 빈번하지만 활성은 드물었다.
4. 위간질종양에서 ERK 단백의 활성은 드물었으며, KIT 단백 과발현과도 관계가 없었다.
5. *c-kit* 돌연변이와 연관되는 2DE 단백체는 18 개가 있었다.
6. 종양 악성도에 따른 연관 2DE 단백체는 15 개가 있었다.

이와 같은 결과들을 종합하면 위간질종양에서 *c-kit* 의 돌연변이 및 그에 따른 단백 과발현은 빈번하지만, MAPK 신호전달계와는 관계없고, 다른 신호전달계와 관련있는 변화라고 생각된다.

참고문헌

1. Lewin KJ: Mesenchymal tumors. In Lewin KJ, Ridell RH, Weinstein WM, eds. Gastrointestinal Pathology. Tokyo, Igaku-Shoin 1992;284-341.
2. Suster S: Gastrointestinal stromal tumors. Semin Diagn Pathol 1996;13: 297-313.
3. Appelman HD: Mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract. In Ming SC, Goldman H, eds. Pathology of the gastrointestinal tract. Baltomore, William and Wilkins, 1998;361-398.
4. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Tunio GM, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y: Gain-of-function mutations of *c-kit* in human gastrointestinal stromal tumors. Science 1998;279: 577-580.
5. Yamaguchi M, Miyaki M, Iijima T, Matsumoto T, Kuzume M, Matsumiya A, Endo Y, Sanada Y, Kumada K: Specific mutation in exon 11 of c-kit proto-oncogene in a malignant gastrointestinal stromal tumor of the rectum. J Gastroenterol 2000;35;779-783.
6. Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, Isozaki K, Ito T, Nomura T, Matsuda H, Kitamura Y: Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. Cancer Res 1999;59(17):4297-300.
7. Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinene M: Mutations in exon 11 of c-*kit* occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. Am J Pathol 1999;154:53-60.

8. Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G, Xiao S, Singer S, Fletcher CD, Fletcher JA: KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. : Am J Pathol 2000;156(3):791-5

9. Lev S, Yarden Y, Givol D: Dimerization and activation of the kit receptor by monovalent and bivalent binding of the stem cell factor. J Biol Chem 1992;267(22):15970-7.

10. Blume-Jensen P, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Zsebo KM, Westermark B, Heldin CH: Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. EMBO J 1991;10(13):4121-8.

11. Blume-Jensen P, Ronnstrand L, Gout I, Water-field MD, Heldin CH. Modulation of Kit/stem cell factor receptor-induced signaling by protein kinase C. J Biol Chem 1994;269:21793-21802.

12. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, Metcalfe DD: Identification of mutations in the coding sequence of the protooncogene *c-kit* in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92: 10560-10564.

13. Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, Ma YS, Langley K, Ding TG, Duffy T, Jacobs P, Tang LH, Modlin I: Somatic *c-kit* activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive astocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. Nat Genet 1996; 12: 312-314.

14. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, Sugahara H,

Butterfield JH, Ashman LK, Kanayama Y, Maysuzawa Y, Kitamura Y, Kanakura Y: Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene *c-kit* in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of *c-kit* product. J Clin Invest 1993;92: 1736-1744.

15. Tsujimura T, Furitsu T, Morimoto M, Isozaki K, Nomura S, Matsuzawa Y, Kitamura Y, Kanakura Y: Ligand-independent activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a murine mastocytoma cell line P-815 generated by a point mutation. Blood 1994;83:2619-2626.
16. Tsujimura T, Furitsu T, Morimoto M, Kanayama Y, Nomura S, Matsuzawa Y, Kitamura Y, Kanakura Y: Substitution of an aspartic acid results in constitutive activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a rat tumor mast cell line RBL-2H3. Int Arch Allergy Immunol 1995;106:377-385.
17. Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Miyagawa J, Hase-Sawada N, Taniguchi M, Nishida T, Kanayama S, Kitamura Y, Shinomura Y, Matsuzawa Y: A novel gain-of-function mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. Gastroenterology 1998;115:1090-1095.
18. Dong F, Larner AC: Activation of Akt kinase by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): evidence for the role of a tyrosine kinase activity distinct from the Janus kinases**.** Blood 2000;95(5):1656-62.
19. Kapur R, Cooper R, Zhang L, Williams DA: Cross-talk between alpha(4)beta(1)/alpha(5)beta(1) and c-Kit results in opposing effect on growth and survival of hematopoietic cells via the activation of focal adhesion kinase, mitogen-

activated protein kinase, and Akt signaling pathways. Blood 2001;97(7):1975-81.

20. Harissions V, Alexandra SW, Dean DM: The protooncogene *c-kit* and *c-kit* ligand in human disease. J Allergy Clin Immunol 1997;100:435-440.

21. Chian R, Young S, Danilkovitch-Miagkova A, Ronnstrand L, Leonard E, Ferrao P, Ashman L, Linnekin D: Phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the transformation of hematopoietic cells by the D816V c-Kit mutant. Blood 2001;98(5):1365-73.

22. Ishizuka T, Chayama K, Takeda K, Hamelmann E, Terada N, Keller GM, Johnson GL, Gelfand EW: Mitogen-activated protein kinase activation through Fc epsilon receptor I and stem cell factor receptor is differentially regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and calcineurin in mouse bone marrow-derived mast cells. J Immunol 1999;162(4):2087-94.

23. Ning ZQ, Li J, McGuinness M, Arceci RJ: STAT3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit induced tumorigenicity. Oncogene 2001;20(33):4528-36.

24. Krystal GW, DeBerry CS, Linnekin D, Litz J: Lck associates with and is activated by Kit in a small cell lung cancer cell line: inhibition of SCF-mediated growth by the Src family kinase inhibitor PP1. Cancer Res 1998;58(20):4660-6.

25. Deberry C, Mou S, Linnekin D: Stat1 associates with c-kit and is activated in response to stem cell factor. Biochem J 1997;327 (Pt 1):73-80.

26. Brizzi MF, Dentelli P, Rosso A, Yarden Y, Pegoraro L: STAT protein recruitment and activation in c-Kit deletion mutants. J Biol Chem 1999;274(24):16965-72

27. Park KS, Cho SY, Kim H, Paik YK: Proteomic alterations of the variants of human

aldehyde dehydrogenase isozymes correlate with hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 2002;97(2):261-5.

28. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Cousens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A: Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tytosine kinase for an unidentifide ligand. EMBO J 1987;6:3341-3351.

29. Qiu FH, Ray P, Brown K, Barker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, Abesmer P: primary structure of *c-kit*: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family-oncogenic activation of v-*kit* involves deletion of extracellular domain C terminus. EMBO J 1988;7:1003-1011.

30. Ullrich A, Schlessinger : Signal transduction by receptors with throsine kinase activity. Cell 1990;61: 203-212.

31. Lev S, Yarden Y, Givol D: Receptor functions and ligand-dependent transforming potential of a chimeric kit proto-oncogene. Mol Cell Biol 1990;10(11):6064-8.

32. Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM: The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine receptor maps to the mouse W locus. Nature (Lond) 1988;335: 88-89.

33. Geissler EN, Ryan ma, Housman DE: The dominant-white spotting(w) locus of the mouses encodes the c-kit proto-oncognen. Cell 1988;55:185-192.

34. Witte O: Steel locus defines new multipotent growth factor. Cell 1990;63:5-6.

35. Reith AD, Bernstein A: Molecular biology of the W and steel locus genome analysis. Vol 3, Genes and phenotype, cold spring habor laboratory press, 1991;105-

133.

36. Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM: Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. Am J Pathol 1998;152: 1259-1269.

37. Nishida T, Hirota S, Taniguchi M, Hashimoto K, Isozaki K, Nakamura H, Kanakura Y, Tanaka T, Takabayashi A, Matsuda H, Kitamura Y: Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene. Nat Genet 1998;19: 323-324.

38. Moskaluk CA, Tian Q, Marshall CR, Rumpel CA, Franquemont DW, Frierson Jr HF: Mutations of c-kit JM domain are found in a minority of human gastrointestinal stromal tumors. Oncogene 18: 1897-1902, 1999

39. Ma Y, Cunningham ME, Wang X, Ghosh I, Regan L, Longley BJ: Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative α-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. J Biol Chem 1999;274: 13399-13402.

40. Ma Y, Longley BJ, Wang X, Blount JL, Langley K, Caughey GH: Clistering of activation mutations in *c-kit*'s juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. J Invest Dermatol 1999;112: 165-170.

41. Oka H, Chatani Y, Hoshino R, Ogawa O, Kakehi Y, Terachi T, Okada Y, Kawaichi M, Kohno M, Yoshida O: Constitutive activation of mitogen-activated protein(MAP) kinase in human renal cell carcinoma. Cancer Res 1995;55:4182-4187.

42. Sivaraman VS, Wang HY, Nuovo GJ, Malbin CC: Hyperexpression of mitogen-

activated protein kinase in human breast cancer. J Clin Invest 1997;99: 1478-1483.

43. Park K-S, Kim N-G, Kim JJ, Kim H, Ahn Y, Choi KY: Differential regulation of MAP kinase cascade in human colorectal tumorigenesis. Br J Cancer 1999;81(7):1116-21.

44. Sewing A, Wiseman B, Lloyd AC, Land H: High intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. Mol Cell Biol 1997;17: 5588-5597.

45. Woods D, Parry D, Cherwinski H, Bosch E, Lees E, McMahon M: Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. Mol Cell Biol 1996;17: 5598-5611.

Abstract

Overexpression and activation of *c-kit* gene mutated products and related factors in gastrointestinal stromal tumors.

Yon Rak Choi

Brain Korea 21 Project for Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Hoguen Kim)

Gastrointestinal stromal tumor (GIST), one of the mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract, is indistinct histogenesis and the biological characteristics are not well characterized. Overexpression of KIT, a kind of receptor tyrosine kinase, have recently reported in GISTs, and have proposed that intestinal cell of cajal is the origin of GISTs. *C-kit* mutation, KIT overexpression and trials of treating with STI571, tyrosine kinase inhibitor, has also been reported in GISTs. However, the biological mechanisms, signal transduction systems and related factors of *c-kit* alteration are not well characterized.

To elucidate the biological role of KIT alteration in GISTs, mutation of *c-kit*,

expression and activation of KIT and proteins and the status of MAPK pathway were analyzed by PCR-SSCP, Western blotting and Immunoprecipitation in 20 cases of GISTs (4 cases of benign tumors, 9 cases of borderline tumors and 7 cases of malignant tumors). Additionally we performed 2-dimensional electrophoresis(DE) method in 12 cases of GISTs in order to identify the related proteins with *c-kit* alteration.

C-kit mutations were found frequently (14/20, 70%) in GISTs. Among the 14 mutations, 8 were deletions, 4 were point mutations and 2 were insertions. Furthermore, all cases with *c-kit* mutation showed KIT overexpression whereas normal mucosa did not. However, the activation of KIT was infrequently. The ERK activities were lower than those of normal mucosas in GISTs regardless of *c-kit* mutations and/or overexpression of KIT. By analyzing 2DE method, we identified 15 protein spots alternated according to tumor grade, and 18 protein spots were alternated according to *c-kit* mutation.

These results suggest that the mutations of *c-kit* were closely related to the KIT overexpression, however were not related to KIT activation and also were not related to the activation status of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway.

Key Words : gastrointestinal stromal tumor, GIST, *c-kit*, KIT, MAPK pathway