

Mutational Analysis of the Tumor Suppressor WTX Gene in Non-small Cell Lung Cancer

Purpose: In a recent study of Wilms' tumors, a new X chromosome gene, Wilms' tumor gene on the X chromosome (WTX), was discovered that was found to harbor small deletions and point mutations. The WTX protein negatively regulates Wnt/ β -catenin signaling, and is considered to be a tumor suppressor gene. One of the questions about the WTX gene is whether the genetic alterations of the WTX gene are specific only to Wilms' tumors. The aim of this study was to explore whether the WTX gene mutation is a characteristic of human non-small cell lung cancer (NSCLC). **Materials and Methods:** In the current study, we analyzed the part of the WTX gene encoding the N-terminal of WTX, where most of the WTX point mutations have been detected in Wilms' tumors. Forty-eight NSCLC tissues were analyzed by a single-strand conformation polymorphism assay and DNA sequencing. **Results:** SSCP analysis revealed no evidence of somatic mutations in the DNA sequences encoding the N-terminal of the WTX gene in the 48 NSCLC tissues. **Conclusion:** The data presented here indicate that the WTX gene may not be somatically-mutated in human NSCLCs, and suggest that NSCLCs may not utilize mutational events of the WTX gene in the process of pathogenesis. (*J Lung Cancer* 2008;7(1):22-24)

Key Words: Non-small cell lung cancer, WTX, Wnt, Mutation

Seok Whan Moon, M.D.¹
Yeun Jun Chung, M.D.²
Nam Jin Yoo, M.D.³
Min Sung Kim, B.S.³ and
Sug Hyung Lee, M.D.³

Departments of ¹Thoracic Surgery, ²Microbiology and ³Pathology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Received: March 23, 2008

Accepted: May 30, 2008

Address for correspondence

Sug Hyung Lee, M.D.
Department of Pathology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 505, Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea
Tel: 82-2-590-1188
Fax: 82-2-537-6586
E-mail: suhulee@catholic.ac.kr

This work was supported by Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (01-PJ3-PG6-01GN07-0004).

서 론

Rivera 등은 신장의 윌름즈종양에 대한 유전학적 조사를 통해 X 염색체에 존재하는 새로운 유전자인 Wilms' tumor gene on the X chromosome (WTX) 유전자를 발견하였다(1). 같은 연구에서 WTX 유전자의 결손과 점 돌연변이가 각각 13.4%와 8.5%의 윌름즈종양에서 발견되었다(1). WTX 유전자의 결손과 점 돌연변이는 남성과 여성의 윌름즈종양에서 비슷한 비율로 발생하며, 여성의 경우 WTX의 이형접합성 결손이 활성 X 염색체를 표적하는 것으로 나타났다(1). 윌름즈종양의 WTX 유전자 이상은 'one-hit inactivation'에 의해서 종양을 발생시키는 것을 알 수 있다(1). WTX 유전자의 세포내 주입은 콜로니 형성을 억제하며 세포사멸을 촉진시킨다(1). WTX 단백질은 β -catenin, AXIN1, β -TrCP2, APC와 결합하여 β -catenin의 소멸을 촉진시킨다(2). 이런

자료를 종합하면 WTX가 종양억제 유전자이고 WTX의 점 돌연변이는 윌름즈종양에서 WTX의 종양억제 기능을 소실시킨다는 것을 제시한다. Rivera 등은 82개의 윌름즈종양에서 6종류의 점 돌연변이를 발견했는데, 이들은 2개의 non-sense, 3개의 frameshift, 1개의 missense 돌연변이로 구성되었다(1).

WNT/ β -catenin 신호전달계의 비정상적 활성화는 윌름즈종양뿐 아니라(3,4) 대장암 등 다른 종양의 발생에도 중요한 것이 알려져 있다(5~7). 비소세포폐암에서도 WNT/ β -catenin 신호전달계는 활성화가 자주 나타나는데(7), 대장암과는 달리 APC 및 β -catenin 돌연변이가 발견되지 않아 다른 기전이 중요할 것으로 생각되지만, 정확한 기전은 대부분 알려져 있지 않다. WTX가 중요한 WNT/ β -catenin 신호전달계의 종양억제 유전자이므로 이 유전자의 불활성 돌연변이가 비소세포폐암의 WNT/ β -catenin 활성화에 관여할 가

능성이 있을 것으로 가정할 수 있다. 그러나, 현재까지 비소세포폐암의 WTX 유전자의 돌연변이에 관한 연구는 보고된 바 없다. 이에 저자들은 본 연구에서 WTX 유전자의 돌연변이가 비소세포성폐암의 병발기전에 관여하는지를 알아보기 위해, 비소세포성폐암 조직을 대상으로 WTX 유전자의 돌연변이 조사를 시행하였다.

대상 및 방법

1) 연구 대상

1999년 이후 근치적 폐 절제술을 받고 진단된 48명의 비소세포성폐암 환자의 폐조직을 대상으로 하였다. 폐조직은 메타칸에 고정되고 파라핀에 포매되었다. 폐암 환자의 파라핀 포매 조직을 5 μm 두께로 박절하여 hematoxylin & eosin 염색을 실시한 후 2명의 진단병리 의사가 독립적으로 WHO 분류에 따라 분류하였으며, 이들은 편평상피암 25예, 선암 23예였다. 36~79세의 연령분포를 보였으며 평균연령은 57세였다.

2) 돌연변이 조사

Hematoxylin & eosin 염색된 조직에서 미세절제술(microdissection)을 이용하여 암세포 및 정상세포를 각각 분리 수집한 후, proteinase K를 처리하여 DNA를 얻었다. WTX 유전자를 이루고 있는 cDNA는 3,405개의 염기로 이루어져 있지만, 이제까지 밝혀진 모든 돌연변이는 N-말단부(cDNA nucleotide positions 439, 876, 1000, 1070, 1072, 1649)에 위치한다(1). 본 연구는 이 중 한 개의 돌연변이를 제외한 모든 돌연변이가 발생했던 352-1143 염기서열의 돌연변이를 조사하였다. 이를 위해 이 부위를 증폭할 수 있는 시발체(primer) 5쌍을 제작하였다(Table 1). 방사성 동위원소인 (³²P]dCTP)를 중합효소연쇄반응에 포함시켜서 자기방사법

(autoradiogram)으로 중합효소연쇄반응 산물을 분석할 수 있게 하였다. 중합효소연쇄반응은 혼합액을 94°C에서 10분간 변성시킨 후 94°C에서 30초, 53~62°C에서 40초와 72°C에서 40초씩 각각 35회 반복하였으며 72°C에서 5분간 연장반응을 실시하였다. 중합효소연쇄반응 산물을 single-strand conformation polymorphism (SSCP) 분석을 위해 non-denaturing gel에 running 후 gel을 건조하고 관찰하여, 정상 DNA에서 관찰되는 wild-type band 이외의 band가 나타난 경우, 2회 이상 반복하여 확인하고, aberrant band를 잘라서 cyclic sequencing으로 DNA 염기서열을 분석하였다. SSCP, DNA 염기서열 분석에 관한 내용은 이전의 논문에서 자세히 기술되어 있다(8~14).

결 과

미세절제를 통해서 암 및 정상세포를 비소세포성폐암 조직에서 선택적으로 분리할 수 있었고, 추출된 DNA를 이용하여 5쌍의 시발체로 증폭하고 SSCP로 분석하였다. 중합효소연쇄반응 산물은 SSCP에서 잘 관찰되어서, 미세절제를 통한 DNA의 획득 및 중합효소연쇄반응에 이상이 없음을 알 수 있었다(Fig. 1). SSCP를 분석한 결과 중합효소연쇄반응의 결과물은 정상조직의 DNA와 같이 wild-type의 band로만 나타났으며, 돌연변이에서 보이는 abnormal band는 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 이들은 염기서열 분석 결과 돌연변이가 없는 정상 염기서열을 가지고 있었다(data not shown). SSCP 결과는 해당 WTX 유전자의 돌연변이가 분석한 48예의 폐암에서 나타나지 않음을 의미했다. 이 실험은 미세절

WTX exon 2 in NSCLCs

N T N T N T N T N T

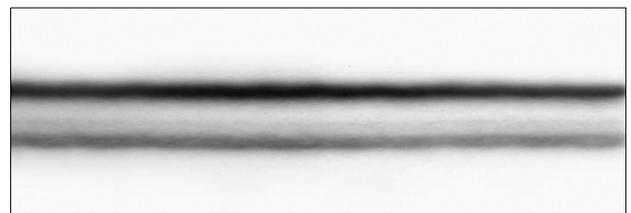


Fig. 1. Representative SSCP of the WTX gene in non-small cell lung cancers. A part of exon 2 of the WTX gene was amplified by PCR using a specific primer set. The PCR products from the representative cases of non-small cell lung cancers were visualized on SSCP. SSCP of DNA from the non-small cell lung cancers (T) show no aberrant bands as compared to SSCP from normal tissues (N). SSCP: single-strand conformation polymorphism.

Table 1. Primer Sequences of WTX Gene Used in This Study

Gene	Sequences	Size (bp)
WTX Exon 2-1	F: 5'-CTGCCT TTGCCTGAGT TACC-3' R: 5'-CCCCAGTGACCTTGCTCTT-3'	208
WTX Exon 2-2	F: 5'-TTAGCAGTATCCGCCGTAC-3' R: 5'-GGCATCTTGGGGGTTAGC-3'	185
WTX Exon 2-3	F: 5'-CCTTCCAAG CCCCTAGAAAG-3' R: 5'-GGGCTATGGGGCTCCTC-3'	202
WTX Exon 2-4	F: 5'-AAGCCAGTAGCCTAGAGG AG-3' R: 5'-GCCATGCTGTCTGCATAC-3'	205
WTX Exon 2-5	F: 5'-TGTGACATCCCTGAAAAGC-3' R: 5'-CTCCTCGTCATCATCTG-3'	199

제, 중합효소연쇄반응, SSCP 및 염기서열분석을 2회 반복하였으며, 결과는 2회 모두 일치하였다.

고안 및 결론

종양억제 유전자에 흔히 돌연변이가 발생하고 기능적으로 압 발생을 저하시키는 경우가 흔하다는 선행연구를 (5,6,15) 따라 본 연구는 WNT/ β -catenin 신호전달계의 종양억제 유전자로 밝혀진 WTX 유전자의 돌연변이 연구를 비소세포폐암을 대상으로 시행하였다. 요약하면, 본 연구의 목적은 두 가지였다. 첫째는 WTX 유전자가 비소세포폐암 조직에서 돌연변이가 되는지 여부를 판명하는 것이었고, 둘째는 돌연변이가 있다면 WNT/ β -catenin 신호전달계의 비정상적 활성화와 관련된 기능적 변화를 암발생과 연관시키는 것이었다. 그러나 WTX 유전자가 48명의 비소세포폐암 조직에서 돌연변이가 되지 않았다는 것을 확인하였고, 이를 통해서 비소세포폐암의 병발생 기전에서 이 유전자의 돌연변이가 작용하지 않으리라는 것을 알 수 있었다.

비소세포폐암에서 WNT/ β -catenin 신호전달계의 이상에 대한 현재까지의 연구결과는 세가지 기전으로 요약할 수 있다(16). 즉, Dvl 같은 Wnt effector의 과발현, JNK를 포함하는 non-canonical Wnt 신호전달계의 활성화, WIF-1과 같은 Wnt 길항물질의 억제 등이다. 본 연구의 결과를 통해 저자들은 WTX 유전자의 돌연변이가 비소세포폐암에 없으며 WNT/ β -catenin 신호전달계의 이상에도 관여하지 않는 것을 확인하였다. 종양유전자의 불활성화를 유발하는 기전은 여러 가지가 있으며, 돌연변이는 이 중 한가지 기전이다. 돌연변이 이외에 DNA 메틸화, 단백질 발현 감소, 길항물질의 생성 증가 등이 제시된다(15,16). 본 연구 결과는 WTX 유전자가 비소세포폐암에서 돌연변이가 되지 않는다는 사실을 제시하며, 비소세포폐암에서 WTX 유전자의 불활성화가 돌연변이 이외에 다른 어떤 방법으로 일어나는지를 규명할 필요가 있다고 생각한다. 비소세포폐암에서 WTX의 발현에 대한 연구가 알려진 바가 없다. 우선 WTX에 대한 발현 연구를 시행하여 발현 여부를 확인하고, 발현 감소가 관찰되면 상응하는 기전이 메틸화를 통해서 나타나는지를 확인하는 것이 우선 이루어져야 할 것이다.

이제까지 윌름즈종양에서 발견된 WTX 유전자의 돌연변이는 모두 N-말단부에서 나타났으며(1), 기능적으로도 N-말단의 돌연변이가 WNT/ β -catenin 경로를 활성화하는 것이 확인되었다(2). 이에 따라 본 연구도 돌연변이 조사를 N-말단에 한정하였다. 그러나, 종양의 종류에 따라서 돌연변이

의 종류가 달라질 가능성이 있으므로, 윌름즈종양과는 달리 비소세포폐암이 C-말단에 WTX의 돌연변이를 가질 가능성도 있다. 향후의 연구를 통해 비소세포폐암에서 WTX의 C-말단에 대한 돌연변이 분석이 필요할 것이다.

REFERENCES

- Rivera MN, Kim WJ, Wells J, et al. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science* 2007;315:642-645.
- Major MB, Camp ND, Berndt JD, et al. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* 2007;316:1043-1046.
- Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, et al. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res* 1999;59:3880-3882.
- Koesters R, Niggli F, von Knebel Doeberitz M, Stallmach T. Nuclear accumulation of beta-catenin protein in Wilms' tumours. *J Pathol* 2003;199:68-76.
- Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006;127:469-480.
- Van der Flier LG, Sabates-Bellver J, Oving I, et al. The intestinal Wnt/TCF signature. *Gastroenterology* 2007;132:628-632.
- Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Jablons DM. Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett* 2005;222:1-10.
- Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Hum Genet* 2004;115:112-115.
- Lee SH, Shin MS, Park WS, et al. Alterations of *Fas (Apo-1/CD95)* gene in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1999;18:3754-3760.
- Lee SH, Shin MS, Kim HS, et al. Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 1999;59:5683-5686.
- Shin MS, Kim HS, Lee SH, et al. Alterations of Fas-pathway genes associated with nodal metastasis in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2002;21:4129-4136.
- Lee JW, Soung YH, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Mutational analysis of pro-apoptotic BAD gene in non-small cell lung cancer. *J Lung Cancer* 2006;5:35-38.
- Soung YH, Lee UW, Moon SW, et al. Mutational analysis of caspase-7 and 8 genes in non-small cell lung cancer. *J Lung Cancer* 2005;4:38-41.
- Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. Mutational analysis of pro-apoptotic caspase-9 gene in common human carcinomas. *APMIS* 2006;114:292-297.
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.