

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

探討肺癌組織中突變的 p53 蛋白對雙微染色體(MDM2)基因表現調控

## Effects of p53 mutants derived from lung carcinomas on the promoter of the MDM2 gene

計畫編號：NSC 88-2314-B-040-045

執行期限：87年9月1日至88年7月31日

主持人：柯俊良 中山醫學院毒理所

### 一、中文摘要

雙微染色體基因(mdm2)已知是抑癌基因 p53 產物的下游轉錄調控的基因之一。當 mdm2 的基因被轉錄活化時，即代表是具有活性的 p53 抑癌功能所轉錄調控。本研究主要將已知三個具有 p53 突變的肺癌患者組織，其 p53 基因自組織 cDNA 以聚合增幅 (T-Y234N 及 T-L194R) 或以定點突變 (V143A) 方式選殖入 pCDNA-3 表現載體中及另一對照組自 p53 基因的起始密碼區至終止密碼區全長為 1182 bp 的 (p53S) 基因，另外構築 mdm2 promoter (1076bp) 以接合於螢光報告(Luc)基因載體上。二者共同轉染至 p53 缺失的肺癌 (H1299) 細胞株中。以西方吸漬法證實自肺癌組織所增幅的 p53 基因只有 T-Y234N 無表現，其餘皆有 p53 蛋白表現。但是以螢光活性分析其促進基因轉錄表現量則非常低，表示此三種 p53 突變皆無法轉錄活化 mdm2 基因。證實肺癌患者 p53 的蛋白功能喪失。

**關鍵詞：**p53 抑癌基因、雙微染色體、螢光報告基因、西方吸漬法

### Abstract

MDM2 is an oncoprotein that inhibits p53 tumour suppressor protein. MDM2 gene is one of the downstream target genes for transcriptional activation by the product of p53 tumor suppressor gene. Transactivation of MDM2 gene expression is represented by the presence of a functional p53 protein. To understand biological function of the mt p53 for tumorigenesis. In the study, we construct

three of p53 mutants from lung carcinomas tissues (T-Y234N and T-L194R) or site directed mutagenesis (V143A). Mdm2 promoter (1076 bp) was ligated into pGL-3 luciferase reporter gene. Another recombinant plasmid containing only the coding regions of 1182 bp for p53(p53S) has been constructed. We study their transactivation properties of p53 mutants by co-transfecting them with a reported plasmid carrying the promoter of MDM2 gene into the p53 null non small cell lung carcinoma cell line(NSCLC) H1299. We observed these mutant p53 protein expression by Western blot. We determine the transactivation activity by observing the luciferase activity. We find that all three mutants of p53 proteins (T-Y234N, V143A and T-L194R) loss transactivation activity.

**Keywords:** p53 , mutant, mdm2, luciferase, Western blot

### 二、緣由與目的

雙微染色體(mdm2) 致癌基因最早是自 3T3 DM 的細胞株中選殖得來，此基因轉譯出 489 個胺基酸，包含 p53 結合區位 酸性區位及 3 個 Zinc 結合區位(Schlott, *et al.*, 1997), NIH 3T3 細胞的 mdm2 基因過量表現促進細胞產生腫瘤能力 (Fakharzadeh, *et al.*, 1991), 又 mdm2 基因可使兔子胚胎纖維細胞變成不死，且與活化的 RAS 致癌基因共促進細胞轉型 (transformed)(Finlay, 1993), 而因此 mdm2 被視為致癌基因。在一些惡性腫瘤中發現 mdm2 基因大量增幅，且其蛋白質過量表

現，而這些異常現象，可能是經由透過 P53 抑癌蛋白功能受抑制，而與其形成腫瘤的過程中扮演重要角色。P53 基因座落在染色體 17P13.1 位置，共轉譯出 393 個胺基酸，它是一種核內的磷酸化蛋白質。P53 蛋白質區分為三部位，一、N 端前 42 個胺基酸具有活化基因轉錄功能。二、120 至 290 的胺基酸區域是特異 DNA 結合區位，促進基因轉錄。三、310 至 393 胺基酸區域是核位訊息(nuclear localization signal)及形成寡合體(tetramer)的區域。P53 蛋白會專一結合在某些 DNA 序列，其核酸序列為二段 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GpyPyPy-3' 中間間隔 13 個核 酸，此 p53 所結合的序列稱 PRE(p53 response element)，進而促進一些基因表現。如：一、p21 結合到 cdks 而抑制 cyclin-dependent kinase (El-Deiry, et al., 1993)；二、GADD45，它會促進 DNA 破壞，結合到 PCNA，使細胞週期進行停止，直接與 DNA excision 修補有關(Kastan., et al., 1992)；三、Bax，抑制細胞死亡(Apoptosis)蛋白質 BCl-2 的拮抗蛋白(Miyashita, T., 1995)；四、MDM2，與 p53 互相形成調控(Zauberman, A., et al., 1995)，抑制 MDM2 表現及 DNA 的破壞會協力性的促進 p53 活化(Chen, et al., 1998)。p53 在轉錄層次上可以活化 mdm2 表現(Barak, et al., 1993, Reinke, et al., 1997)，但 mdm2 會再結合到 p53，將 p53 分解而抑制其轉錄活性(Kubbutat, et al., 1997)。而許多常見的 p53 突變目前對於肺癌的分子異常順序調控仍尚未十分清楚，肺癌的生物特性也正積極研究中(Carbon, 1997)，而肺癌組織中突變的 p53 基因的生理功能尚不清楚。所以本研究擬自肺癌組織中以 PCR 增幅出突變的 p53 的基因，並探討其基因產物與 mdm2 中 promoter 區位的 PRE 結合並探討其活化調控的情況。所以將採取構築 p53 的基因，接於 PECE 載體內，另一方面構築 mdm2 promoter 接於載體 pGL-3 basic(Promega)。然後共同轉染至 H1299 肺癌細胞株(p53 缺失株)，測定其 luciferase 表現。

### 三、材料與方法

取 0.5 微克的 cDNA 或自李文華院士的 pC53-SN clone(含 p53 基因的表現質體)，加入 5 微升 10 X PCR 緩衝液(100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 25 mM 氯化鎂, 500 mM 氯化鉀, 0.1 % gelatin)，2 微升的 10 mM dNTPs，和各 10 pmole 的具有限制 切位 p53 引子(primer)，其引子序列見表一，最後加二次蒸餾水至 50 微升，上層加 50 微升的輕礦物油，加熱 95 °C，5 分鐘，最後加入 0.5 微升的 *Taq* DNA polymerase(5 單位/微升)。反應條件：94 °C，1 分鐘，60 °C，1 分鐘，72 °C，2.5 分鐘，上述條件進行 35 cycles，72 °C 反應 10 分鐘作用完畢後取 20 微升進行 1.5 % Agarose gel 電泳分析。P53 PCR 的產物經 agarose gel 回收後，經限制 反應使這片段末端成 cohesive end 再和 pECE vector (經 *EcoRI* 及 *XbaI* digestion)作接合反應。而 MDM2 promoter PCR 的產物亦經 agarose gel 回收後，經限制 反應(*NheI* 及 *HindIII*)使這片段末端成 cohesive end 再和 pGL-3 vector (經 *NheI* 及 *HindIII* digestion)作接合反應。取 DNA:Vector 3:1 的量，加入 4 微升 5X ligation 緩衝液(150 mM Tris-HCl pH 7.8，50 mM 氯化鎂 50 mM DTT，5 mM ATP，25 % pEG)，和 1 微升 T4 DNA ligase (1 單位/微升)加二次蒸餾水至 20 微升，16 反應 12 小時後進行轉形作用(transformation)。

### 四、結果與討論

本研究所構築出 mdm2 接合於 luc 報告基因的質體 (*p mdm2-luc*) 全長為 5862 bp，包括 mdm2 promoter 的長度為 1076 bp(圖一)。內含二段 p53 response element，可受 p53 wild type 基因調控而轉錄活化。在 Higashiyama 研究報告非小細胞肺癌若沒有 p53 蛋白累積，而通常 wt p53 其蛋白並不會累積，有些 mdm2 基因會大量表現，所以說明在組織中正常 p53 功能也是具有轉錄活化 mdm2 功能(Higashiyama, 1997)。

自肺癌組織得來的 cDNA 所增幅出 p53 基因突變株包括 T-Y234N 及 T-L194R 的點突變或以 site direct mutagenesis 方式變換的 V143A p53 表現載體與構築完成的 p mdm2 luc 其送入 H1299 細胞中,42 小時後以西方吸漬法分析其細胞萃取液 p53 蛋白表現(圖二),發現從組織中 p53 蛋白 Y234N 的突變株並無表現,而 V143A 及 L194R 中其 p53 蛋白皆表現,但 V143A 的 p53 蛋白表現量較低,但不論如何即使 p53(L194R) 蛋白表現量不亞於 Wt p53 但其轉錄活性仍相當低,約只有 0.16%, 0.44%(T-Y234N) 及 0.31% (V143A)(圖三)。又只表現譯碼區(coding region)的 p53 基因長度 1182 bp 譯出 53 kDa 蛋白其轉錄活性就較 p53(1.8 kbp)弱,約降為 63.7%。而 p53 基因的異常與預後非常有關,通常在 stage I p53 突變預後通常不佳(Tomizawa, et al., 1999)。本研究室之前台灣肺癌患者的 p53 突變不高(20%),但多以 deletion mutation, 而 point mutation 發生不多(Wang, 1998)。所以台灣肺癌癌症發生機轉,p53 所扮演的角色仍有待釐清。所以證實肺癌病人組織患者的 p53 基因的確喪失功能,特別是由本研究所建立的系統 mdm2 promoter-Luc 的報告基因方式可用以偵測 p53 的蛋白是否具有功能。

## 五、參考文獻

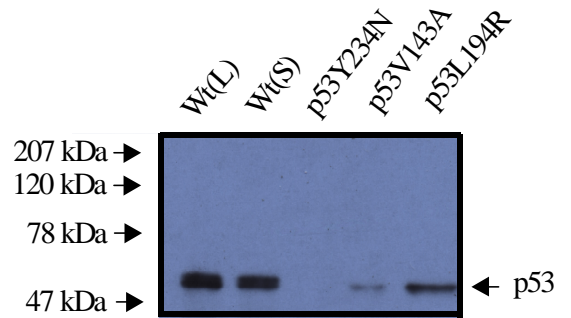
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. (1993) mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. EMBO. J., 12, 461-468.
- Carbone, D. (1997) The biology of lung cancer. Semin. Oncol, 24, 388-401.
- Chen, L., Agrawal, S., Zhou, W., Zhang, R., and Chen, J. (1998) Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage. Proc. Natl. Acad. Sci., 95, 195-200.
- El-Diery, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parson, R., Trent, G. M., Lin, D., Merker, W. E., Kinz, K. W., and Volgenstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell, 75, 817-825.
- Fakharzadeh, S. S., Trusko, S. P., and George, D. L. (1991). Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. EMBO. J., 10:1565-1569.
- Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., Yokouchi, H., Kasugai, T., Ishiguro, S., Takami, K., Nakayama, T., and Nishisho, I. (1997) MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. Br. J. Cancer, 75, 1302-1308.
- Kastan, M. B., Zhan, Q., El-diery W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Volgenstein, B. M., and Fornace, A. J. Jr. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telegiectasis. Cell, 71, 587-597.
- Kubbutat, M. H. G., Jones, S. N., and Vousden, K. H. (1997) Regulation of p53 stability by mdm2. Nature, 387, 299-303.
- Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell, 80, 293-299.
- Reinke, V., and Lozano, G. (1997) The p53 targets mdm2 and Fas are not required as mediators of apoptosis *in vivo*. Oncogene, 15, 1527-1534.
- Schlott, T. Reimer, S., Jahns, A., Ohlenbusch, A., Ruschenburg, I., Nagel, H., and Droese, M.(1997) Point mutations and nucleotide insertions in the MDM2 zinc finger structure of human tumours. J. of Pathol. 182, 54-61.

Tomizawa, Y., Kohno, T., Fujita, T., Kiyama, Saito, R., Noguchi, M., Matsuno, Y., Hirohashi, S., Yamaguchi, N., Nakajima, T., and Yokota, J. (1999) Correlation between the status of the p53 gene and survival in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*, 18; 1007-1014.

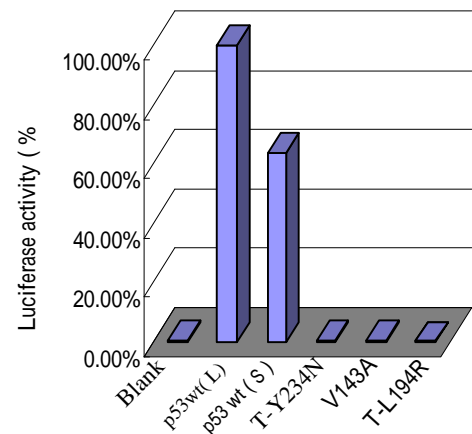
Wang, Y. C., Chen, C. Y., Chen, S. K., Cherng, S. H., Ho, W. L., and Lee, H. (1998) High frequency of deletion mutations in p53 gene from squamous cell lung cancer patients in Taiwan. *Cancer Res.*, 58, 328-333.

Zauberman, A., Flusberg, D., Haupt, Y., Barak, Y., and Oren, M. (1995) A functional p53 responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene. *Nucleic Acid Res.*, 23, 2584-2592.

圖二



圖三



## 六、圖表

表一

Primer	DNA sequence
p53EcoRI start	GGAATTCATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCC
p53XbaI End	AGTCTAGATCAGT CTGAGTCAGGCCCTTCT
MDM2P1NheI	TAGCTAGCCCTGTGTG TCGGAAAGATGGAG
MDM2P3XhoI	GCCTCGAGTCTTGTCCGAAGCTGGAATCT
P53 Y234N	ATCCACACA ACTACATGTGT

圖一

