악성 림프종에서

DNA Dependent Protein Kinase

(DNA-PK)의 발현

연세대학교 대학원
의과학사업단
노 태 웅

악성 림프종에서

DNA Dependent Protein Kinase

(DNA-PK)의 발현

지도교수 양 우 익

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2001년 6월 일

연세대학교 대학원
의과학사업단
노 태 웅

노태웅의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2001년 6월 일

감사의 말씀

본 논문이 완성되기까지 세심한 지도와 아낌없는 노고를 베풀어 주신 연세대학교 의과대학 병리학교실 양우익 선생님, 조남훈 선생님, 피부과학 교실 이민걸 선생님께 진심으로 감사 드립니다. 힘들어 할때 격려를 아끼지 않으신 정우희, 정현주 선생님께도 감사를 드립니다. 슬라이드 제작에 도움을 주신 영동세브란스 병원 정형재 선생님, 조민영 선생님께도 깊은 감사를 드립니다. 통계처리에 도움을 주신 예방의학교실 이상규 선생님, 어려움이 있을 때 도움을 주신 김세훈, 강혜윤, 김성은 선생님께도 감사드립니다.

그리고 자식들만을 위해서 항상 모든 것을 희생하시는 부모님께 보답해 드리지 못해 죄송한 마음과 은혜에 감사 드립니다. 언제나 힘이 되어준 아내 박계영선생, 귀여운 문수를 보느라 고생하시는 장인, 장모님께 감사를 드리고 제가 항상 올바른 길로 가도록 이끌어 주시는 능인 스님, 두연 스님, 황간 법사님, 정구행 보살님, 용정화 보살님, 그리고 천연 보살님께 감사의 뜻을 전합니다.

저자 씀

목차

그림차례

표차례

국문요약

악성 림프종에서
DNA dependent Protein Kinase의 발현

DNA dependent protein kinase (DNA-PK)는 Ku70과 Ku80의 두 조절인자와 DNA-PKcs의 실행인자(효과인자; effector)로 구성되었으며, DNA 손상부위의 일차성 복구에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. DNA-PK는 이러한 DNA 손상 복구 이외에도 생리학적으로 림프구의 생성과 분화에 필요한 V(D)J 재결합에도 관여한다. 따라서 이들 인자들이 결핍된 경우 림프구의 생성억제로 인한 면역결핍은 물론 DNA 손상 복구의 결함으로 인한 악성종양, 특히 T세포 림프종의 발생이 가능하며 이는 중증복합면역결핍(SCID : severe combined immune deficiency disease)이 있는 백서를 이용한 연구에서 T세포 림프종이 정상대조군에 비하여 자주 발생하고 특히 Ku70이 결핍된 백서에서는 T세포 림프종 생성이 더 빨리 발생하는 것이 보고되었다. 그러나 인체에서의 림프종에 대하여 Ku70 이나 DNA-PK의 발현을 분석한 보고는 아직 없다.

본 연구는 1993년부터 1999년까지 세브란스병원에서 진단 받은 악성림프종 85예를 대상으로 하였으며, B세포 기원 림프종 42예와 T세포 기원 림프종 43예와 양성대조군으로 선정한 반응성병변인 편도선 9예, 림프절 2예와 비교하여 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백발현 양상을 면역조직화학염색을 통하여 비교하여 보았다.

B세포 기원 림프종, T세포 기원 림프종 모두 양성대조군에 비하여 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백발현이 통계학적으로 유의하게 감소되었다. 특히 T세포기

원 림프종의 경우 B세포 기원의 림프종에 비하여 양성대조군 보다 월등히 낮은 발현을 보여 Ku70, Ku80, DNA-PKcs이 T세포 림프종과 더 밀접한 관련이 있음을 알았다. 각 기원세포별 림프종들의 WHO 분류에 따른 아형별로 나누어서 세 단백의 발현을 비교하였을 때 T세포 기원의 아형들은 모두 양성대조군에 비하여 통계학적으로 의미있는 차이를 보였으나 B세포 기원의 아형들중 여포형이나 외투세포 또는 저등급 림프절외 변연부 B세포 림프종은 양성대조군에 비하여 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백발현이 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 그러나 고등급인 미만성 대형 B세포 림프종과 림프절외 변연부 B세포 림프종(고등급)에서는 통계학적으로 유의한 차이를 보였다.

이러한 결과에서 면역조직화학염색에 의한 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백발현을 이들의 단일 항체로 검색하는 것이 이것들의 활성을 반영하다고 여겨졌으며 악성 림프종에서 Ku70, Ku80, DNA-PKcs이 림프종, 특히 T세포 기원의 림프종과 고등급의 B세포 기원의 림프종의 발생의 원인으로 작용할 것으로 생각하였다.

핵심되는말 : DNA-PK(DNA dependent protein kinase), Ku70, Ku80, PKcs(Protein kinase catalytic subunit),악성 림프종, T세포, B세포

악성 림프종에서

DNA-Protein Kinase (DNA-PK)의 발현

<지도교수 양우익>

연세대학교 대학원 의과학사업단

노 태 웅

Ⅰ.서론

Ku단백은 70KDa과 80KDa의 두가지 subunit으로 구성된 DNA-end-binding protein으로 scleroderma-polymyositis overlap syndrome, 전신성 홍반성 낭창 그리고 이들과 연관된 질환의 환자혈청에서 추출한 자가항원으로 규명되기 시작하였다.[1,2,3]

Ku항원은 높은 분자량(300,000 daltons)의 acidic nuclear protein으로, 혈청을 제공한 환자의 이름 첫 두 글자를 따서 명명되었는데, 이 항원은 trypsin 처리, 가벼운 가열 또는 pH의 변화(10이상 혹은 5 이하)에 의하여 파괴되지만 ribonuclease나 deoxyribonuclease에 의하여 항원성은 변하지 않으며 Mimori 등[1]은 Ku 항원이 임상적으로 polymyositis와 scleroderma에서 좋은 예후를 나타내는 인자(marker)로 쓰일 수 있다고 보고하였다.

Ku 항원은 DNA-PK (DNA dependent protein kinase)와 깊은 연관이 있다.

DNA-PK에는 두 부위가 있는데 그 하나가 Ku항원을 포함하는 부위이고, 나머지 하나가 p350을 함유하는 부위이다. Ku70, Ku80은 조절인자로써 실행인자(효과인자; effector)인 DNA-PKcs와 함께 DNA-PK를 이루고 이들은 DNA-PK 의 활성에 중요한 역할을 한다. 즉 DNA-PK는 Ku를 통하여 DNA에 부착하게 되고, p350은 Ku가 DNA에 안정되게 부착되도록 도와주는 역할을 한다고 추측된다. 그리고 DNA-PK가 DNA에 부착되면 구조적인 변화가 일어나면서 catalytic domain이 외부로 노출된다. 분자량이 다른 두 subunit인 Ku70, Ku80항원은 protein-kinase catalytic subunit (PKcs)와 유사성을 보이지 않아 아마도 p350이 DNA-PK의 catalytic subunit로 작용하리라 추측된다.[3]

Ku 단백은 ds-DNA breaks (DSB)의 복구와 V(D)J 유전자의 재조합에 관련되어 DNA 손상시 유발되는 신호전달 체계를 유발한다고 보고된 바 있으며 이 두가지 기능이 DNA-PK의 현재까지 알려진 중요한 기능이다.[4,5,19] DSB는 DNA가 방사능 등으로 인한 손상시 발생하는데 손상부위에 DNA-PK가 결합하면 p53에 의한 세포 예정사(apoptosis)를 억제하고 아울러 연결효소(ligase) 등의 여러 DNA 복구인자들이 참여할 때까지는 비동종 재조합(non-homologous recombination)의 기능을 하게된다. 반면 V[D]J 재조합 과정은 정상적인 생체내 나타나는 DSB의 일종인데 이는 B세포의 항체나 T세포의 수용체의 형성에 필수적인 과정이다.[21] 즉 항체와 수용체를 형성하는 과정에서 variable(V), diversity(D), 그리고 joining(J)의 유전자 재조합이 일어나는데 이러한 DSB가 필연적임에도 불구하고 p53의 작용에 의해 세포자연사가 일어날 수 있으므로, V(D)J 재조정 과정중 세포예정사가 발생하지 않기 위해서는 DNA-PK의 작용이 필수적이다[8]. 이렇듯 DNA-PK가 DNA 복구기능과 V(D)J 재조합으로 인한 항체와 T세포 수용체형성에 중요한 역할을 하므로 DNA-PK가 소실되거나 손상받을 경우 심한 면역장애가 발생한다.[11,20] 대표적으로 DNA-PKcs가 소실된 scid 백서나 Ku70 혹은 Ku80의 양측 대립인자가

모두 소실된 백서는 면역기능이 심하게 소실되고 말단 회장부에 Peyer's patch가 감소한 것을 확인하였다[19]. Maarten 등[6]은 Ku단백이 DNA 복제를 조절한다고 하였는데, Mariana 등은 림프구가 PHA로 자극되어 G0 단계에서 S 단계로 될 때, 후기 G1 단계에서 70KDa과 80KDa의 두 subunit를 전사하는 유전자가 활성화 된다고 하였다. DNA-PK의 활성이 G1단계와 초기S단계 그리고 G2단계에서 정점에 달하는데 이것은 이 시기가 DNA가 방사능에 민감하게 손상되는 시기이기 때문이라는 설명도 있다.[20] 이 유전자의 발현은 promyelocytic leukemia 세포주인 HL60을 phorbol ester TPA로 처리시 단핵구로 분화될 때는 감소한다고 보고 하였다. 위에서 모두 Ku단백의 mRNA 수준은 극적으로 차이가 나지만 Ku단백 자체의 차이는 적어서 Ku단백이 매우 안정되게 존재한다는 것을 알게 되었다. 위 사실로 Ku단백의 유전자 발현은 세포의 증식상태와 관련되어 있고 면역형광검사에서 핵 또는 핵소체에 국한되어 Ku단백이 존재하는 것으로 보아 Ku단백의 분포는 세포주기와 연관되어 있음을 알수 있다.[7]

근자에는 Ku항원(p70Ku, p80Ku)과 p350 또는 두 항원 모두 성숙한 말초혈액의 호중구에서는 발현되지 않지만 HL-60이나 말초 혈액 림프구에서는 발현되고, 이것들이 세포의 자연사(apoptosis)시 소실된다고 보고 하였다. 그리고 HL-60 cell 이나 말초혈액림프구에서 Ku항원이나 p350항원이 자연사시 보이지 않는 것으로 보아 Ku항원이 자연사의 조절인자, 특히 억제인자로 작용할 것으로 추측한 저자들도 있다. 자연사하는 말초혈액 림프구에서 Ku항원이 소실되는 것으로 보아 Ku항원의 소실이 최종적인 분화의 표지자이기 보다는 자연사의 표지자로 판단되나 임파구 세포들 중 T 세포, B 세포 혹은 두가지 세포 모두에서 자연사와 연관되어 있는지는 아직 밝혀져 있지 않다[8]. 이외에도 Ku항원의 기능은 다양한 것으로 알려 졌는데, p53 이외에도 SV-40 large T 항원, RNA-polymerase Ⅱ, RP-A, topoisomerase, hsp90과 c-Jun, c-Fos,

oct-1, sp-1, c-Myc, TFIID등 많은 전사인자들을 인산화시킨다고 보고되었다[23]. 그래서 여러 가지 직간접적인 경로를 통하여 DSB 복구, T세포 수용체와 항체의 V(D)J 재조합은 물론 항체의 아이소타입 전환, DNA 복제와 전사의 조절, heat-shock induced response의 조절, 종말체의 말단(telomeric termini) 구조의 조절, 세포주기중 G2와 M단계에서의 기능 등을 수행한다고 하였다[23]. 최근 scid (severe combined immunodeficiency disease) 백서에서 종양발생, 특히 악성 임파종과 관련된 문헌들이 보고되고 있다. 특히 $Ku70^{-/-}$백서에서 $Ku70^{+/-}$백서나 $Ku70^{+/+}$백서에서 와는 달리 T세포 기원의 악성임파종 발생이 증가한다는 보고가 있다. $Ku70^{-/-}$백서에서는 B세포의 발생이 초기 조상세포 단계(progenitor stage)에서 차단되지만 T세포 수용체 유전자의 재조합(TCR gene rearrangement)과 T세포의 발생은 차단되지 않고 Ku70은 knock-out 백서실험에서 B세포 기원의 림프종이나 림프종 이외의 종양발생과는 관련이 없는 것으로 알려져 있다[9]. Ku80은 대립인자가 소실된 백서에서는 성장억제이외에는 다른 두 인자와는 달리 면역억제나 림프종 발생이 관찰되지 않았다. 위와 같은 사실로 DNA 손상복구에 있어서 Ku80에 비해 Ku70과 DNA-PKcs의 기능이 더욱 중요하다는 것을 알수 있다. 한편 DNA-PKcs는 소실되면 B세포와 T세포의 성장을 모두 억제함으로써 전체적인 면역기능의 저하를 가져오는 반면 악성림프종의 발현 빈도는 상대적으로 낮게 된다. 실제 전반적인 면역기능이 저하된 scid 백서 혹은 세포주는 바로 이 DNA-PKcs의 변이형으로 알려져 있고[19], 이들은 악성림프종보다는 소화기, 특히 장점막의 증식성 병변, 이형성병변을 발현하고 변형된 선와 (aberrant crypt focus)를 발생시키는, 장의 종양이 잘 발생한다는 것이 보고되었다[10]. 그러나 일부 저자들은 DNA-PKcs가 T세포 기원의 종양을 억제하는데 관여한다는 것을 보고 하였고 이와 더불어 이 PKcs의 gene이 PrKdc로써 scid gene과 동일하다고 하였다.[11] 근자에 들어서 DNA-PK는 같은 serine/threonine kinase family인 ataxia-telangiectasia

(AT)유전자처럼 상위의 p53을 유도하는 기능이 있음이 밝혀지고 있다. 즉 p53의 아미노산 말단부의 Ser15와 Ser37 두 위치에 DNA-PK에 의해 인산화되는 부분이 있어 DNA 손상정보를 DNA-PK로부터 감지하게 된다.[22] 또한 scid mouse에서 p53이 변이가 추가로 있는 경우 림프종의 발생이 더 빠른 기간내에 이루어진다는 보고가 있고[12], 이는 p53이 DSB가 생기면 세포를 자연사 시키는 기능을 하며 이 역할이 변이에 의해 소실되면 세포들이 통제되지 않고 증식하게 되므로 당연한 일이라 할수 있다. Scid 백서와 세포주 실험에서 G1과 G2 억제현상이 정상적으로 일어난다는 결과로 인해 DNA손상시 DNA-PK가 세포자연사를 일으키며 세포주기를 억제하도록 p53을 유도하는데 필수적이지 않다는 사실도 밝혀져 있다.[19] 이상과 같이 DNA-PK의 세가지 요소인 Ku70, Ku80, DNA-PKcs는 결합을 통하여 면역기전과 DNA손상 복구기전에 있어 매우 중요한 기능을 하며, Ku70 소실시 DNA-PKcs와 비의존적으로 T세포 림프종의 발생이 증가하고, DNA-PKcs 소실시 B세포와 T세포 모두 성장억제로 인한 면역 억제가 나타난다는 사실이 실험적으로 입증되었다. 위와 같이 동물실험에서는 Ku단백과 림프종과의 연관성이 어느정도 입증이 되고 있지만 아직 인체내 림프종에서의 Ku 단백의 관련성에 관한 연구는 이루어진 바가 없다.

이에 저자들은 88예의 악성림프종을 대상으로 면역조직화학염색을 통하여 DNA dependent protein kinase (Ku70, Ku80, PKcs)의 발현을 분석하여 실제로 인체의 림프종 발생에 이들 인자가 관여하는지를 알아보고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

연세대학교 의과대학 부속 세브란스 병원에서 1993년부터 1999년까지 진단된 비호치킨 림프종 조직중 85예를 대상으로 하였다. Hematoxylin-eosin염색과 각종 면역표지자에 의한 면역조직화학염색 결과를 종합하여 New World Health Organization Classification of Neoplastic Disease of the Hematopoietic and Lymphoid Tissue에 따라서 아형들을 분류하였으며[18] B세포 기원의 림프종은 42예로 이중 여포형 림프종 12예, 외투세포 림프종 4예, 버킷 림프종 5예, 림프절외 변연부 B세포 림프종 저등급 2예와 고등급 1예, 미만성 대세포 림프종 18예였고, T세포 기원은 43예로 말초 T세포 림프종 비특이형 12예, 림프모구성 림프종 5예, T/NK세포 림프종 10예, 역형성 대세포 림프종 14예, 그리고 혈관면역모구성 림프종 2예였다. 반응성 증식을 보인 9예의 편도선과 2예의 림프절 조직을 대조군으로 이용하였다.

2. 방법

가.병리조직염색

파라핀포매 조직절편을 4㎛ 두께로 절편하여 hematoxylin-eosin염색을 시행하여 종양세포가 많은 부위이면서 진단에 맞는 대표적인 병변부위가 포함된 파라핀포매 조직절편을 선택하였다.

나. 면역조직화학염색

Ku70, Ku80, DNA-PKcs의 면역조직화학염색은 NeoMarkers의 (Fremond, CA, USA)단일 클론항체인 Ku (p70)Ab-4 (Clone N3H10), Ku (p80) Ab-2 (Clone 111), DNA-PKcs Ab-1 (Clone 18-2)을 사용하였다.

양성대조군(positive control)인 수술절제된 편도선 조직 10예와 림프절 2예에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 각항체의 적정희석농도를 결정한 후, 각 아형별 림프종에 대한 면역조직화학염색을 다음과 같이 시행하였다.

파라핀 블록을 4㎛ 두께로 절편하여 poly-L-lysine으로 처리된 유리슬라이드 위에 조직을 부착하여 60℃에서 2시간 건조시켰다. 탈파라핀과 재수화를 시키고 3% 과산화수소에 10분간 전처치하여 내인성 과인산화효소를 억제하였다. 수세후 0.1M citrate buffer(pH6.0)에 담그어 pressure cooker를 이용하여 microwave (750w)에 25분간 가열하였다. 20분간 실온에서 식힌 후 PBS buffer에 5분간 담근 후 1:1000의 비율로 희석시킨 Ku70, Ku80 그리고 1:200으로 희석시킨 DNA-PKcs항체로 실온에서 하룻밤동안 반응시켰다. PBS buffer로 세척후 Dako사(Glostrop, Denmark)의 universial LSAB peroxidase Ⅱ kit와 DAB 발색제를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였으며 면역염색 후 hematoxylin으로 가볍게 핵을 염색한 후 발삼 봉입제로 봉입하였다.

다. 면역조직화학염색 판독

Ku70, Ku80, DNA-PKcs 모두 양성대조군과 종양에서는 세포의 핵에 염색된 경우에만 양성으로 인정하였다. 최소한 5군데에서 400배율로 염색반응을 확인한후 종양세포중 염색된 세포의 수를 비율로 구한값을 백분율로 표시하여 평균치를 구하였다. 전체 종양세포의 1 25%가 양성인 경우를 1점, 26 50%

인 경우를 2점, 51 75%인 경우를 3점 그리고 그 이상인 경우는 4점으로 반정량적으로 판독을 하였다. 발현이 전혀 안된 경우는 0점으로 판독하였다.

라.통계분석

면역조직화학염색에 의한 Ku70, Ku80, DNA-PKcs발현을 먼저 T세포 기원, B 세포 기원 림프종으로 분류하여 비교하였고, 그후에는 WHO 분류에 따라 각 아형별로 나누어 비교하였다. 다시 기원세포별로 B세포 기원 림프종은 pregerminal center 세포 기원 림프종과 postgerminal center 세포 림프종으로, 다시 저등급의 림프종과 고등급의 림프종으로, T세포 기원 림프종은 림프모구성 림프종과 그 외의 아형들로, 그리고 말초 T세포림프종 비특이형, 혈관면역모구성 림프종, T/NK세포 림프종, 역형성 대세포 림프종으로 나누어서 세가지 단백 발현의 차이를 비교하였다. 여기서 결정된 순위형 변수를 통하여 비모수적인 통계방법인 Kruskal-Wallis test를 통하여 비교대상간의 단백질 발현정도의 차이를 살펴보았다. 우선 전체를 양성대조군을 포함하여 B세포 기원, T세포 기원림프종 3집단으로 나누어 세 군 전체내에서의 차이를 보았고, 그 결과를 토대로 각 군 각각에 대하여 Bonferoni 방법에 의하여 다중검정을 실시하였다.

다음으로 위에서 각 B세포 기원, T세포 기원 림프종내의 각 아형별에 대하여 위에서 시행한 같은 방법으로 세 단백 발현의 차이를 비교하였다.

Ⅲ.결과

1. 악성 림프종 연구 대상군의 증례수, 성비, 절제 장기 및 연령분포

환자의 평균 연령은 45.4±18.1세였고 남녀비율은 남자가 48명(56.5%), 여자가 37명(43.5%)이었다. 절제된 조직은 44.4%가 림프절이었고 나머지는 림프절 이외의 장기였으며 그 부위로는 편도선, 위장관, 비인두, 피부, 유방, 난소, 자궁경부, 정소, 혀, 후복강, 비장, 이하선, 종격동, 연구개, 간, 연조직 등이었다.

T세포 기원 림프종중 혈관면역모구성 림프종은 2예로 증례의 수가 너무 적어서 따로 아형별로 비교할 때에는 포함시키지 않았고 크게 기원세포별로 림프종을 분류할 때 T세포 기원 림프종으로 포함시켰다 (표1).

2. 반응성 편도선과 림프절에서의 DNA-PK의 발현

정상대조군으로 선정된 반응성 편도선과 림프절 모두에서 Ku70, Ku80, DNA-PKcs이 모두 여포중심이나 부피질 특히 편도선의 경우 구강점막의 편평상피에도 강하게 양성반응을 보였는데 저배율로 보았을 때 부피질 보다는 여포 중심의 세포들이 더 강하게 그리고 더 많은 세포들이 양성반응을 보였다. (표2, 사진1).

3. 악성림프종을 유형별로 나누었을 때 DNA-PK의 발현

악성 림프종을 T세포 기원, B세포 기원으로 나누어 비교 하였을 때 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백의 발현이 반응성병변인 편도선과 림프절에 비해 두 집단 모두에서 통계학적으로 유의하게 감소된 양상을 보였고, Bonferoni 방법

으로 정한 p값(0.017)으로 비교하여 볼 때, T세포 기원의 림프종은 Ku70, Ku80, DNA-PKcs에서 양성대조군과 비교하여 p 값이 모두 0.0001로 보다 현저히 작아 통계학적으로 유의하였으며, B세포 기원 림프종에서는 p값이 Ku70에 대하여서는 0.0016, Ku80에서는 0.0012, DNA-PKcs에서는 0.0023으로 T세포 기원의 림프종 보다는 높은 수치이지만 통계학적으로 유의하다고 분석할수 있었다. 양성대조군을 제외하고 T세포 기원의 림프종과 B세포 기원 림프종을 비교하여 보았을 때 T세포 기원의 림프종에서 세가지 단백의 발현이 상대적으로 현저히 낮았으며 통계학적으로 유의하였다. (Ku70:p=0.0003. Ku80:p=0.0025, DNA-PKcs:p=0.0005). (표2, 사진2 6).

표1. 연구 대상군의 성비와 절제장기 및 연령분포.

		성별 분포		절제 장기		나이
기원세포별	WHO 분류	남자	여자	림프절	림프절외	
양성대조군(n=11)		5	6	2	9	25.0±11.0
B세포기원(n=42)		24	21	20	25	52.6±15.4
	여포형 림프종(n=12)	9	3	8	4	52.6±14.6
	외투세포 림프종(n=4)	2	2	1	3	61.5±4.4
	버킷 림프종(n=5)	2	3	3	2	35.8±27.9
	림프절외 변연부B세포 림프종(n=3)	1	2	0	3	54.0±6.2
	미만성 대형B세포 림프종(n=18)	8	10	6	12	55.8±11.0
T세포 기원(n=43)		26	17	22	21	43.3±17.9
	림프모구성 림프종(n=5)	2	3	2	3	35.2±29.3
	말초T세포 림프종. 비특이형(n=12)	8	4	9	3	43.5±14.1
	혈관면역모구성 림프종(n=2)	1	1	2	0	57.0±11.3
	T/NK세포(n=10)	8	2	0	10	37.8±9.6
	역형성 대형세포 림프종(n=14)	7	7	9	5	48.0±20.6

표 2. 양성대조군, 기원세포별, 아형별 림프종에서의 단백발현 정도

각 단백의 발현정도	Ku70					Ku80					DNA-PKcs				
	4	3	2	1	0	4	3	2	1	0	4	3	2	1	0
양성대조군	11	0	0	0	0	11	0	0	0	0	11	0	0	0	0
B세포기원(n=42)	20	13	7	2	0	19	12	7	2	2	21	11	8	2	0
저등급 림프종(n=18)	12	3	2	1	0	14	0	1	1	2	15	0	2	1	0
여포형 림프종(n=12)	8	3	0	1	0	11	0	0	0	1	11	0	1	0	0
외투세포 림프종(n=4)	4	0	0	0	0	3	0	0	0	1	4	0	0	0	0
림프절외 변연부B세포 림프종(저등급, n=2)	0	0	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
고등급 림프종(n=24)	8	10	5	1	0	5	12	6	1	0	6	11	6	1	0
림프절외 변연부B세포 림프종(고등급, n=1)	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
버킷 림프종(n=5)	2	2	1	0	0	2	1	2	0	0	3	1	1	0	0
미만성 대형B세포 림프종(n=18)	6	8	3	1	0	3	11	3	1	0	3	10	4	1	0
T세포기원(n=43)	5	16	15	6	1	6	14	13	6	4	4	21	9	6	3
림프모구성 림프종(n=5)	1	2	0	2	0	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1
말초T세포 림프종, 비특이형(n=12)	2	7	1	2	0	2	5	3	1	1	1	7	2	1	1
혈관면역모구성 림프종(n=2)	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
T/NK세포 림프종(n=10)	1	3	5	0	1	1	3	4	1	1	0	6	3	0	1
역형성 대형세포 림프종(n=14)	1	3	8	2	0	2	4	5	2	1	2	7	1	4	0

( )안의 숫자는 아형별 총 증례수.

나열된 숫자는 발현정도에 따른 증례수

4. 각아형별 림프종에서의 DNA-PK의 발현

각 아형별로 비교하여 볼 때 정상대조군에 비하여 Ku70, Ku80, DNA-PKcs 단백의 발현이 통계학적으로 유의한 차이를 보이는 아형과 그렇지 않은 아형들로 나뉘었다. T세포 기원의 아형들은 모두 통계학적으로 유의하게 세가지 단백들의 발현이 낮게 나타났다(표2, 사진2 5). 그러나 B세포 기원의 아형들 중, 림프절외 변연부 B세포 림프종, 미만성 대형 B세포 림프종에서는 양성대조군에 비하여 유의한 차이를 보이며 세가지 단백이 감소된 발현 양상을 보였지만,(표2, 사진6) 여포형 림프종, 외투세포 림프종, 버킷 림프종에서는 양성대조군에 비하여 부분적으로는 Ku70, Ku80 및 DNA-PKcs단백의 발현이 감소된 듯 하였으나 통계학적으로 의미가 없었고 대부분의 부위에서 비슷한 정도의 발현을 보였다(표2, 사진7). 역형성 대형세포 림프종에서 세가지 단백의 발현은 종양세포들 뿐 아니라 주변의 이형성이 없는 반응성 림프구들도 세가지 단백 발현의 감소를 보였다(표2, 사진3).

5. pre-/postgerminal center 기원의 악성림프종의 DNA-PK 발현의 차이

Pregerminal center 세포 기원의 림프종으로 본 연구에 포함된 아형은 외투세포 림프종으로 완전한 성숙이 되기 이전, 즉 면역 글로불린의 유전자 재조합이 완성되기 이전의 세포에서 기원한 림프종으로 postgerminal center 세포 림프종보다는 미성숙한 단계의 세포들로 구성되었다고 볼 수 있다. 나머지 여포형 림프종, 버킷 림프종, 미만성 대형B세포 림프종, 림프절외 변연부 B세포 림프종 등이 postgerminal center세포 림프종에 속한다. 이 두가지 집단으로 나누어 비교하여 보았을 때 세가지 단백의 발현은 통계학적으로 유의한 차이

를 보이지는 않았다(Ku70:p=0.14, Ku80:p=0.76, DNA-PKcs:p=0.16).

6. 저등급, 고등급 B세포 림프종에서 DNA-PK발현의 차이

저등급의 림프종으로는 여포형 림프종과 외투세포 림프종, 림프절외 변연부 B세포 림프종(저등급)이 있고, 고등급의 림프종으로는 버킷 림프종, 림프절외 변연부 B세포 림프종(고등급), 미만성 대세포 림프종 등이 있는데 이들 두 집단간의 세 단백의 발현의 차이는 통계학적인 의미가 있었다(Ku70:p=0.001, Ku80:p=0.001, DNA-PKcs:p=0.0001).

7. T세포 림프모구성 림프종과 그 외의 아형들에서 DNA-PK 발현의 차이

림프모구성 림프종과 그 외의 림프종 (말초T세포, 혈관면역모구성, T/NK세포 및역형성 대형세포 림프종)으로 나누어 비교하였을때 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백 발현의 차이는 통계학적인 의미는 없었다(Ku70:p=0.97, Ku80:p=0.41, DNA-PKcs:p=0.21).

8. T세포 기원의 림프종의 아형들간의 Ku70, Ku80, DNA-PKcs 단백 발현의 차이.

T세포 기원 림프종 아형들간의 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백의 발현에 있어서 통계학적으로 유의한 차이를 보이는 군은 없었다(Ku70:p=0.41, Ku80:p=0.76, DNA-PKcs:p=0.62).

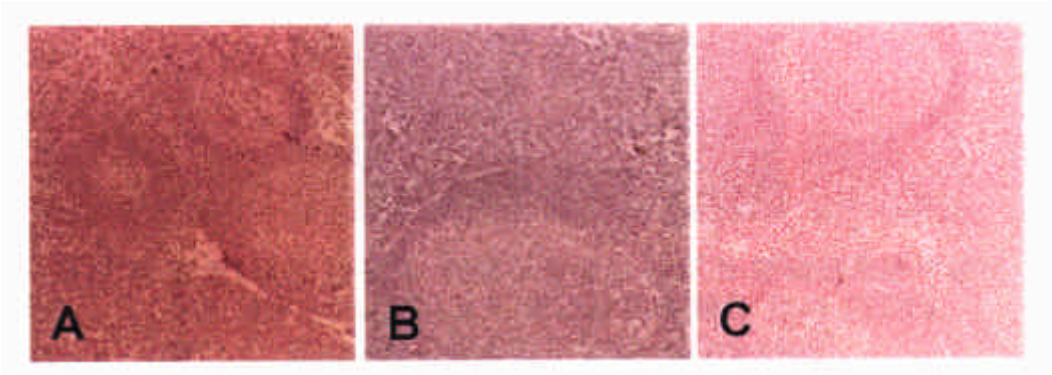

사진 1. 정상편도에서 면역조직화학염색 소견. 75%이상(4도)에서 세포의 핵에 염색 되었다.
(A:Ku70, B:Ku80, C:DNA-PKcs, x100)

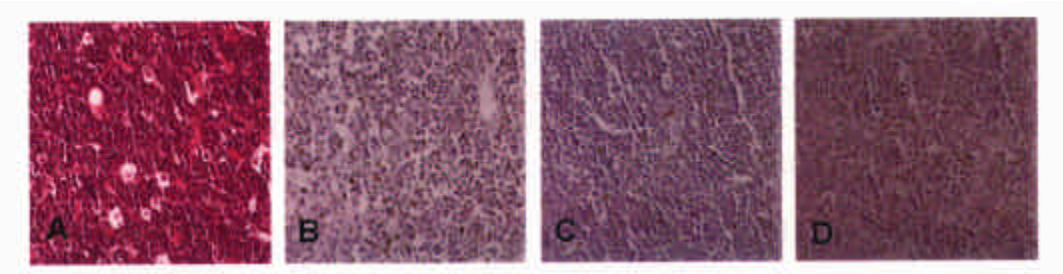

사진 2. T세포 림프모구성 림프종에서 H-E와 면역조직화학염색 소견. 25%이하(1도)에서 종양세포의 핵에 염색 되었다.
(A:H-E, B:Ku70, C:Ku80, D:DNA-PKcs x400)

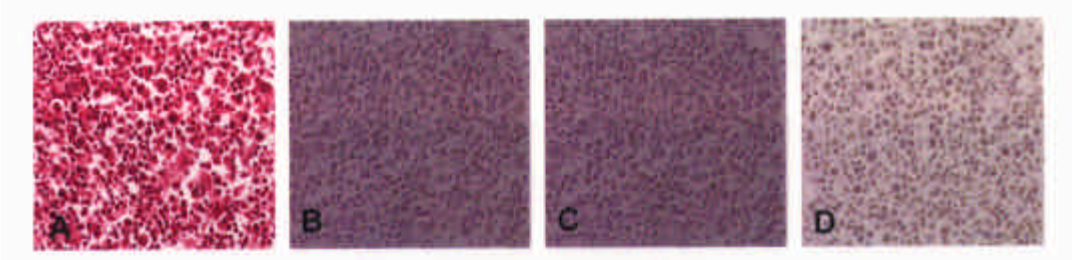

사진 3. 역형성 대형세포 림프종에서 H-E와 면역조직화학염색 소견. Ku70, Ku80에 대해서는 25~50%(1도)에서, DNA-PKcs에 대해서는 50~70%(3도)에서 종양세포의 핵에 염색 되었다.
(A:H-E, B:Ku70, C:Ku80, D:DNA-PKcs x400)

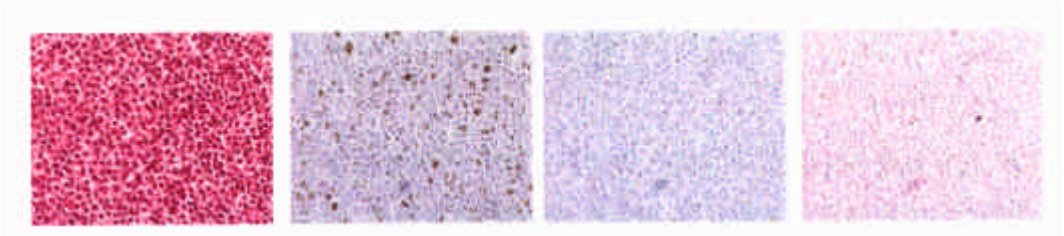

사진 4. 말초T세포 림프종, 비특이형에서 H-E와 면역조직화학염색 소견. 25~50%(2도)에서 종양세포의 핵에 염색 되었다.
(A:H-E, B:Ku70, C:Ku80, D:DNA-PKcs x400)

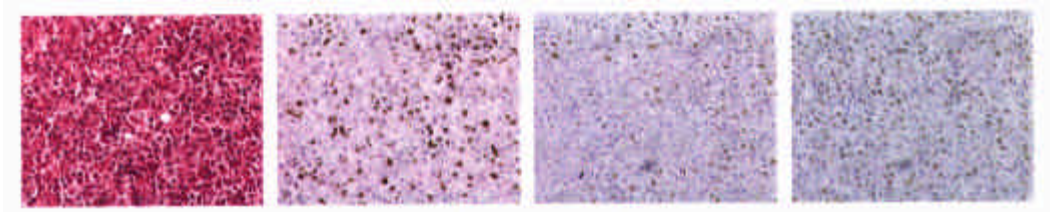

사진 5. T/NK세포 림프종에서 H-E와 면역조직화학염색 소견. Ku70, Ku80에 대해서는 25~50%(2도)에서, DNA-PKcs에 대해서는 50~75%(3도)에서 종양세포의 핵에 염색 되었다.
(A:H-E, B:Ku70, C:Ku80, D:DNA-PKcs x400)

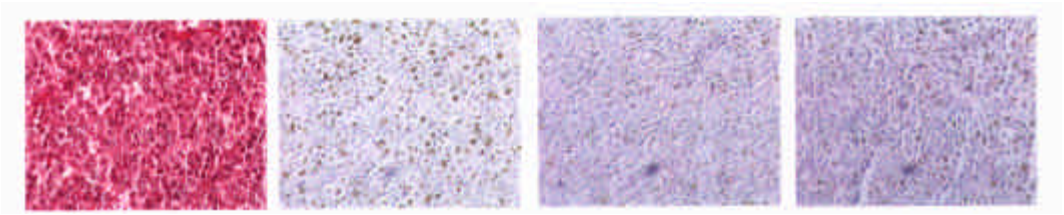

사진 6. 미만성 대형B세포 림프종에서 H-E와 면역조직화학염색 소견. 25~50%(2도)에서 종양세포의 핵에 염색 되었다.
(A:H-E,B:Ku70, C:Ku80, D:DNA-PKcs x400)

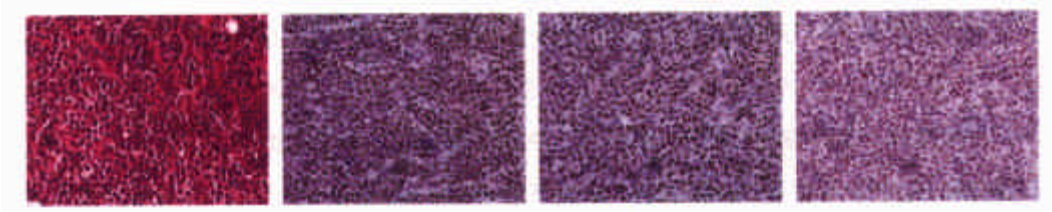

사진 7. 외투세포 림프종에서 H-E와 면역조직화학염색 소견. 90%이상(2도)에서 종양세포의 핵에 염색 되었다.
(A:H-E,B:Ku70, C:Ku80, D:DNA-PKcs x400)

Ⅳ.고찰

본 연구에서는 악성림프종에서 DNA-PK의 발현의 손실이 있을 수 있다는 가정하에 파라핀 포매된 조직에서 Ku70, Ku80 및 DNA-PKcs단백에 대한 면역조직화학염색을 실시하여 이들의 발현이 반응성 증식을 보이는 편도선과 림프절에 비하여 차이를 보이는가와 악성림프종 아형에 따라 차이가 있는지를 조사 하였다.

그 결과 각각의 아형들과 양성대조군 사이에 Ku70, Ku80, DNA-PKcs의 발현이 통계학적으로 유의하게 차이를 보였다. 기원세포별로 분류하여 보았을 때 B세포 기원과 T세포 기원의 림프종, 모두에서 통계학적으로 세가지 단백에 대한 발현의 유의한 차이를 보여 Ku70, Ku80, DNA-PKcs 단백이 이들 림프종과 관련이 있음을 알수 있었다. 기원세포별로 나누어 양성대조군과 보이는 차이의 정도를 비교하여 보았을 때, T세포 기원 림프종에서 B세포 기원 림프종보다 더 큰 차이를 보이며 세가지 단백의 발현이 감소된 것을 알수 있었고, B세포 기원 림프종과 T세포 기원 림프종간의 세가지 단백발현의 차이도 통계학적으로 유의함이 밝혀졌다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 Ku70, Ku80, DNA-PKcs가 아마도 B세포 기원의 림프종보다는 T세포 기원의 림프종에서 더 깊은 연관이 있지 않을까 추측할 수 있었고 이전에 연구된 백서실험에서 $Ku70^{-/-}$이 B세포 림프종의 발생과는 무관하지만 T세포 림프종의 발생을 촉진한다는 결과와 어느정도 일치한다고 생각할 수 있었다[9]. 그러나 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백 각각의 발현의 차이에 대한 비교에서는 통계학적인 의의는 없어서 중증면역결핍 백서의 연구에서 밝혀진 Ku70 과 T세포 림프종과의 관련성은[9] 인체내에서의 림프종과는 다른 양상을 보이는 것을 알 수 있었다. 아형별로 나누었을 때 양성대조군에 비하여 세가지 단백의 발현이 차이를 보이지 않는 아형들은 B세포 기원 림프종중 저등급의 아형들이어서 아마도 B

세포 기원의 림프종중 Ku70, Ku80, DNA-PKcs과 관련이 되는 아형들은 고등급의 림프종들인 것을 알 수 있었다. T세포 기원 림프종들은 아형별로 나누어서 비교하여도 모두 양성대조군에 비하여 세가지 단백의 발현이 통계학적으로 유의한 차이를 보이면 감소했을 뿐만 아니라 아형들간의 세가지 단백 발현의 차이에 있어서 그정도의 차이는 미미하여 T세포기원의 림프종은 모두가 Ku70, Ku80, DNA-PKcs와 밀접한 관계가 있다는 것을 알 수 있었지만, 이 세가지 단백질 간의 발현의 차이는 통계학적 의미가 없어서 역시 백서연구와는 사뭇 다른 결론을 얻었다[9]. 백서를 대상으로 한 연구에서는 림프종의 아형별로 나누어 비교한 연구가 아니고 기원세포에 따라서만 나눈 결과여서 이번의 결과와 정확한 비교는 불가능 하였다. 그리고 B세포 기원의 림프종중 미만성 대세포 림프종은 양성대조군과 세가지 단백의 발현이 의미있는 차이를 보여 이전의 백서를 이용한 연구의 결과와 같이 B세포 기원의 림프종은 세 가지 단백과 무관하다는 결론을 내릴 수는 없었다. 즉 Ku70, Ku80 DNA-PKcs 모두가 비슷한 정도로 T세포 기원 림프종과 연관되어 있고, 백서의 연구결과와 같이 Ku70과 DNA-PKcs가 Ku80보다 더 깊이 관련되어 있다는 결론은 얻지 못하였다. 역형성 대형세포 림프종은 다른 림프종에 비해 면역화학적으로 매우 이질적이고 종양세포들의 모양도 다른 아형들보다 더욱 미분화하여 Kiel 분류에서는 'anaplastic'이라고 규정하였다. 역형성 대형세포 림프종에서는 Ku70, Ku80 및 DNA-PKcs단백의 발현정도가 양성대조군에 비하여 현저히 낮았고 이러한 결과로 이 림프종이 다른 아형들보다 세포학적으로 미분화 형태를 보이는 점과 관련지어 Ku70, Ku80 및 DNA-PKcs가 이러한 역형성 대형세포 림프종의 특성을 반영한다고 생각하였다. 아마도 이러한 미분화 모양을 보이는 것도 다른 아형들보다 세포유전학적으로 더 많은 변화가 있다고 생각해 볼 수 있었다.

B세포 기원림프종의 아형중에서 고등급의 림프종에서와 T세포 기원 림프

종 모두에서 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백의 발현이 양성대조군과 통계학적으로 의미있는 차이를 보이는 것과 일부 저자들에 의해 백서를 이용한 연구 결과로 이미 보고된 Ku70이 주로 T세포 림프종의 발생과 관련 된다는 것을 종합해볼때, B세포 기원의 림프종중 고등급의 아형들과 T세포 기원 림프종에서 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백이 주로 관련된 것으로 종합할 수 있었다[9,10].

이런 사실로 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백이 림프종과 관련이 있음을 알수 있고 특히 분화가 나쁜 아형일수록 이들의 발현이 양성대조군에 비하여 더 많은 차이를 보이는 것을 알수 있었다.

가장 낮은 발현을 보인 림프종 아형은 T세포 기원의 림프모구성 림프종이었고 이중 Ku80과 DNA-PKcs단백이 아주 낮게 발현되었지만, 증례의 수가 너무 적은데다가 편차가 커서 의미있는 해석을 하기 힘들었다.

이번 연구에서 예상과 달랐던 점은 종양세포에서 Ku단백이나 DNA-PKcs의 발현이 감소하고 반응성 림프구들은 그 발현의 감소가 없거나 미미할 것으로 예상을 하였지만, 역형성 대형세포 림프종에서 보면 종양세포나 종양세포 주변의 이형성이 없는 반응성 림프구들이나 모두에서 세가지 단백이 비슷한 정도로 감소된 발현양상을 보였다. 그리고 통계학적으로 의의가 없다고 생각된 아형들을 볼 때 외투세포 림프종은 t(11;14)(q13;q32), 여포형 림프종 t(14;18)을, 버킷 림프종은 80%에서 t(8;14)(q24;32)을 보이고 나머지 20%에서는 t(8;22)(q24;q11)이나 t(2;8)(q13;q24)를 보이는 등 이미 세포유전학적으로 이상이 밝혀진 것들이다[14,15,16,17]. 이런 점으로 미루어 볼 때 중증복합면역결핍 백서를 이용한 연구에서 Ku단백의 손상이나 소실이 DSB 복구와 관련되어 Ku70이 T세포 림프종의 발생에 밀접한 관련이 있다고 보고되었으나 본 실험에서는 T세포 기원의 악성림프종에서 Ku70, Ku80, DNA-PKcs가 림프종생성에 관련된다는 결론을 내릴수는 없었다[4,5,8,9]. 다만 이번 연구를 통하여 Ku70, Ku80 및 DNA-PKcs단백이 반응성 병변보다 통계학적으로 의미있게 적게 발

현되는 림프종 아형들이 있고 이들이 다른 아형들보다 좀더 이형성이 심한것 이어서 아마도 이들 단백의 감소와 림프종의 조직학적 등급에 상관관계가 있을 것이라는 추정을 할수 있었다. DNA-PK가 생리적인 DSB인 면역글로불린의 유전자 재조합에 중요한 역할을 하는 점을 비추어 이들 유전자의 손상과 관련되어 B세포의 분화와 연관지어 germinal center를 거쳐서 이미 성숙된 B세포들에서 기원한 림프종과 거치지 않은 미성숙 B세포에서 기원한 림프종으로 나누어 비교하였을 때 거쳐간 성숙된 B세포 기원의 림프종들이 미성숙 B세포 기원의 림프종보다는 이들 세가지 단백발현이 더 잘 될것으로 예상했지만 결과는 DNA-PK단백 발현의 차이는 없는 것으로 나왔다.

이전의 연구 결과들은 Ku70의 유전자가 소실된 경우 T림프종의 발생이 증가하고 빨라진다는 보고를 통해 이 단백의 림프종생성에서의 역할을 설명하였고 이번 연구에서도 T세포 기원의 림프종에서 Ku70, Ku80, DNA-PKcs의 소실이 대조군에 비해 통계학적으로 의미있는 수준으로 보여서 아마도 사람의 림프종에서도 T세포 기원인 경우는 악성림프종 발생에 DNA-PK가 관계되어 있음을 시사하였다. 그러나 B세포 기원의 림프종에서도 Ku70, Ku80, DNA-PKcs의 발현이 차이를 보이는 아형이 있어 사람의 경우 B세포 기원의 림프종 중 일부에서는 이 세가지 단백이 림프종 생성에 관여하리라는 추측을 할수 있었다. 그러나 이 단백들의 발현이 감소하였다고 이단백들의 유전자가 소실돤 것으로 단정지을 수는 없었다. 그 이유로는 Ku70의 경우 림프종과 양성대조군 사이에 mRNA의 수준은 극적인 차이를 보이지만 단백질의 수준의 거의 차이를 보이지 않는다는 보고가 있었고[7], 이번 연구에서 단백들이 양성대조군에 비해 통계학적으로 의미 있게 가장 낮은 발현을 보인 역형성 대형세포 림프종의 경우 종양세포 뿐 아니라 반응성 림프구들에서도 발현이 동시에 감소 하였기 때문이다.

종양세포의 발생과 관련된 유전자들이 그들의 기능을 보이기 이전에 생산한

단백들이 안정된 상태에 있다가 유전자의 소실이 발생한 뒤 정상세포가 종양세포로 전환된 뒤에도 이 단백들은 안정상태를 유지한다면 염색에서는 양성결과를 보일수 있기 때문이다. 형태학적으로 반응성 림프구들로 생각되는 것들 중에서 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백의 발현이 감소된 것들은 혹시는 종양세포로 완전히 전환되지 않은 예비 종양세포라면 이들 단백의 종양발생에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각할 수 있을 것이다. 이에 대한 검증을 위해서는 이들 단백이 발현되지 않은 반응성 림프구들, 종양세포 그리고 발현이 잘되는 반응성 림프구들을 나누어 세포 유전학검사를 한다면 확실히 알수 있을 것이다.

B세포 기원 림프종중 외투세포 림프종은 예후가 나쁜 것으로 알려져 있지만 세가지 단백의 발현은 양성대조군와 별 차이가 없었다. 이 림프종을 제외한다면 이번 연구에서 포함된 림프종중 종양세포의 이형성이 심하거나 예후가 나쁜 림프종들은 세가지 단백이 모두 의미있게 낮은 발현을 보여 이 세가지 단백이 예후와 이형성과 관련이 된다는 추론을 하였다

결론적으로 본 연구 결과 림프종에서 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백의 발현이 적은 아형일수록 이형성이 심하고 예후가 나쁠것이고, 이 세가지 단백의 발현은 B세포 기원의 림프종중 고등급의 아형들과 T세포 기원의 림프종과 깊은 연관이 있는 것으로 생각되었다.

Ⅴ.결론

본 연구는 85예의 악성림프종에서 Ku70, Ku80, DNA-PKcs의 발현양상을 면역조직화학염색을 통하여 알아 보았다.

그 결과

1. 양성대조군인 반응성 편도선이나 림프절과 비교하여 볼 때 T세포 기원 악성림프종, B세포 기원 악성 림프종 모두에서 Ku70, Ku80, DNA-PKcs 단백의 발현정도가 통계학적으로 유의하게 감소되어 있었다.

2. B세포 기원의 림프종 아형들중 고등급의 림프종과 T세포 림프종의 모든 아형들에서 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백의 발현이 감소를 보인점으로 이들 단백에 대한 유전자가 B세포 기원의 고등급 림프종과 T세포 기원의 림프종 발생에 관련된다고 추측된다 .

3. 이들 악성 림프종들의 아형들중 Ku70, Ku80, DNA-PKcs단백의 발현이 감소되지 않은 림프종에 비해 발현이 현저히 감소된 림프종들이 형태학적으로 이형성이 심하고 생물학적 행동 양상이 비교적 나빠서 이들 단백 발현의 감소와 림프종에서 세포 형태학적 이형성과 상관관계가 있으며, 예후를 예측하는데 도움이 될 수 있다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, DNA-PK단백이 T세포 림프종과 고등급의 B세포 림프종의 발생에 의미있는 인자로 추정된다.

참고문헌

1. Mimori T, Akizuki M, Yamagata S, Inada S, Yashida S, Homma M. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis scleroderma overlap. J Clin Invest 1981; 68: 611-20.

2. Reeves WH. Use of monoclonal antibodies for the characterization of novel DNA binding protein recognized by human autoimmune sera. J Exp Med. 1985; 161: 18-39.

3. Gottlieb TM, Jackson SP. The DNA dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. Cell 1993; 72: 131-42.

4. Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, Priestley A, Cemengeot J, Mizuta R et al. Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. Science 1994; 265: 1442-5.

5. Rathmell WK, Chu G.. Involvement of the Ku autoantigen in the cellular response to DNA double-strand breaks. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 7623-7.

6. Stuiver MH, Celis JE, van der Vliet PC. Identification of nuclear factor IV/Ku autoantigen in a human 2D-gel protein database. Modification of the large subunit depends on cellular proliferation. FEBS Lett 1991; 282: 189-92.

7. Yaneva M, Jhiang S. Expression of the Ku protein during cell proliferation. Biochem Biophys Acta 1991; 1090: 181-7.

8. Ajamani AK. Satoh M, Reap E, Cohen PL, Reeves WH. Absence of autoantigen Ku in mature human neutrophils and human promyelocytic leukemia line (HL-60) cells and lymphocytes undergoing apoptosis. J Exp Med 1995; 181: 2049-58.

9. Li GC, Ouyang H, Li X, Nagasawa H, Little JB, Chen D. Ku 70 : A candidate tumor suppressor gene for murine T cell lymphoma. Mol Cell 1998; 2: 1-8.

10. Kurimasa A, Ouyang H, Dong LJ, Wang S, Li X, Cordon-Cardo C et. al. Catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase: impact on lymphocyte development and tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96; 1403-8.

11. Jhappan C, Morse HC 3rd, Fleischmann RD, Gottesman MM, Merlino G. DNA-PKcs: a T-cell tumour suppressor encoded at the mouse scid locus. Nat Genet 1997; 17: 483-6.

12. Gurley KE, Vo K, Kemp CJ. DNA double-strand breaks, p53, and apoptosis during lymphomagenesis in scid/scid mice. Cancer Res 1998; 58: 3111-5.

13. Nakamura S, Shiota M, Nakagawa A, Yatabe Y, Kojima M, Motoori T, et al: Anaplastic large cell lymphoma : A distinct molecular pathologic entity: a reappraisal with special reference to p80 (NPM/ALK) expression. Am J Surg Pathol 1997; 21: 1420-32.

14. Jaffe ES, Adam B, Peter MB, Jerome AB, Thomas RC, Jeffrey C et al.: Low-grade B-cell lymphoma not specified in the working formulation: Surgical pathology of the lymph nodes and related organs. Saunders, 1995. p.221-33

15. Yano T, van Krieken V, Magrath IT, Longo OL, Jaffe ES, Raffeld M: Histogenetic correlations between subcategories of small noncleaved cell lymphomas. Blood 1992; 79: 1282-90.

16. Fukuhara S, Rowley JD, Variakojis D, Golomb HM: Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. Cancer Res 1979; 39: 3119-31.

17. Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM, Makenna J, Theologides A, Arnesen M: Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer N Engl J Med 1987; 316 : 79-84.

18. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK,Vardiman J et al. : World Health Organization classification of neoplastic disease of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. Journal of Clinical Oncology 1999; 17: 3835-49.

19. Gurley KE, Kemp CJ : p53 induction, cell cycle checkpoints, and apoptosis in DNA-PK-deficient scid mice. Carcinogenesis 1996; 17: 25337-42.

20. Lee SE, Mitchell RA, Cheng A, Hendrickson EA : Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathway in mammalian cells as a function of the cell cycle. Mol Cell Biol 1997; 17: 1425-33.

21. Jeggo PA, Taccioli GE, Jackson SP : Menage a trios: double strand break repair, V(D)J recombination and DNA-PK. Bioessay. 1995; 17: 949-57.

22. Carol P. Signaling to p53: Breaking the MDM2-p53 circuit. Cell 1998; 95: 5-8.

23. Renu T, Narendra T. Ku autoantigen: A multifunctional DNA-Binding protein. Critical reviews in biochemistry and molecular biology 2000; 35: 1-33.

Abstract

The expression of DNA-PK protein in malignant lymphoma

Tae Woong Noh

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University
(Directed by Associated Professor Woo Ick Yang)

DNA dependent protein kinase (DNA-PK) is composed of two regulators, Ku70 & Ku80, and an effector, DNA-PKcs, and plays an important role in the primary repair of break points of damaged DNA. In addition to the repair of the radiation-induced DNA damage, they are also needed for recombination of the V, D, J genes, which is important in the genesis and differentiation of lymphocytes. Therefore, lack of DNA-PK may lead to not only immunodeficiency but possibly malignant tumors, especially malignant lymphomas. In SCID (severe combined immune deficiency disease) mice, malignant lymphoma of T-cell type develops more frequently than in the normal population, and Ku70 Knock-out mice

demonstrated more accelerated lymphomagenesis. However, the relationship between DNA-PK and human malignant lymphoma has not yet been studied.

We examined the degree of expression of Ku70, Ku80 and DNA-PKcs in 85 cases of different subtypes of malignant lymphoma which were diagnosed at Severance hospital between 1993 and 1999. They included 42 cases of malignant lymphoma of B-cell type and 43 cases of T-cell type. Immunohistochemical stains for DNA-PK subunits, such as Ku70, Ku80 and DNA-PKcs, were performed using formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections. As controls, reactive lymphoid tissue, composed of reactive lymph nodes and tonsils, were used.

Compared with positive controls, the differences in expression of Ku70, Ku80 and DNA-PKcs in the T-cell and B-cell types were statistically significant. Especially in T cell lymphomas, the expression of DNA-PK proteins was decreased in comparison with B cell lymphomas. However, when subtyped according to the different origins by the WHO classification, both T cell lymphomas and high grade subtypes of B cell lymphomas demonstrated significantly lower immunoreactivities to the DNA-PK proteins. However immunoreactivities of T cell lymphoma were comparatively lower expression than those of B cell lymphoma.

From these results, we find that immunohistochemistry for Ku70,

Ku80 and DNA-PKcs can represent the activities of Ku70, Ku80 and DNA-PKcs genes, and that the genes of Ku70, Ku80 and DNA-PKcs proteins act as a factor of lymphomagenesis, especially of T-cell lymphomas and high-grade B cell lymphomas.

Key Words : DNA-PK, Ku70, Ku80, PKcs, Immunohistochemical stain, Malignant lymphoma.