

## 림프절외 NK/T세포 림프종에서 p73 메틸화 양상

이화여자대학교 의과대학 병리학교실

조 민 선

= Abstract =

### p73 Methylation in Extranodal NK/T Cell Lymphoma

Min-Sun Cho

Department of Pathology, College of Medicine, Ewha Womans University

**Objectives :** DNA methylation of promoter-associated CpG islands is an epigenetic modification of DNA associated with gene silencing. p73 is a member of the p53 family which is a tumor suppressor gene producing apoptosis and cell cycle arrest. We investigated the methylation pattern of p73 on the cases diagnosed at Ewha university hospital between 1993 and 2002.

**Material and Methods :** Sixteen cases of NK/T cell lymphomas and 7 cases of normal controls, which were 2 cases of peripheral blood mononuclear cells and 5 cases of nasal mucosal tissue were studied. Methylation-specific PCR for p73 were done.

**Results :** All cases of NK/T cell lymphomas except one(93.8%) showed hypermethylation of p73. Six cases among 7 normal control cases(14.2%) revealed unmethylated p73.

**Conclusion :** This results suggested that inactivation of p73 could be associated with tumorigenesis of NK cells.

**KEY WORDS :** p73 · NK/T cell lymphoma · Extranodal.

## 서 론

유전자의 발현을 조절하는 촉진자의 메틸화는 유전자 발현을 억제하는 중요한 epigenetic mechanism의 하나이다<sup>1)</sup>. 촉진자의 CpG island의 비정상적인 메틸화는 종양에서 흔히 일어나며 세포의 악성화 과정과 연관되어 있다. p73은 p53과 구조 및 기능에 있어서 상당한 공통점을 갖고 있는 단백질의 하나로서 둘 다 세포자멸사를 유도하고 세포 주기의 정지를 유발한다<sup>2,3)</sup>. p73의 비정상적인 메틸화는 급성 림프구성 백혈병을 포함한 백혈병과 림프종에서 종종 보고되어 있다<sup>4-6)</sup>. Siu 등<sup>7)</sup>은 자연살해 세포 림프종의 94%이상에서 p73의 메틸화가

있어 종양발생과 연관되어 있다고 보고한 바 있다.

림프절외 NK/T 세포 림프종은 서구보다 한국, 일본, 중국을 포함한 남동 아시아와 멕시코 및 페루에서 흔한 림프종으로 한국에서 림프절외 NK/T세포 림프종의 발생률은 전체 림프종 중에 8.7%로 비특이형 말초T세포 림프종이 9.4%인 것과 비교해 상대적으로 흔하다<sup>8)</sup>. 이 질환은 임상 및 조직학적으로 코, 부비동에 호발하고, 조직학적으로 자연살해세포 및 세포독성 T 세포 계열의 중앙 세포가 혈관 중심으로 증식하고 괴사가 심하다는 특징을 가진다. 또한 EBV가 이 림프종의 발생 기전에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>9-12)</sup>.

자연살해세포 림프종에서 p73의 메틸화 양상에 대한 연구가 이루어지고 있는 바, 이화여대부속병원에서 림프

절외 NK/T세포 림프종으로 진단된 16예에 대해 이에 대해 알아보았다.

## 대상 및 방법

### 1. 대 상

이화학대부속 동대문 및 목동 병원에서 1993년부터 2003년까지 10년간 림프절외 NK/T세포 림프종으로 진단된 16예를 대상으로 하였다. H-E염색 슬라이드를 관찰하고, 각 예의 파라핀 포매 조직을 이용하여 CD3, CD56, CD20에 대한 면역염색과 EBV에 대해 EBER in situ hybridization을 시행하여 NK/T세포 림프종으로 확진된 예를 이용하였다. 분류는 2002년에 발표된 WHO 분류를 따랐다. 성별은 남자 8명, 여자 8명이었고 연령 분포는 22세에서 82세(평균 45.3세)였다.

### 2. 파라핀 포매 조직에서 DNA의 추출

파라핀 포매 조직을 블록의 크기가 작은 경우는 8 $\mu$ m의 두께로 5~6장, 블록의 크기가 큰 경우는 7 $\mu$ m 두께로 3~4장 박절하여 1.5ml 튜브에 담았다. xylene으로 파라핀을 제거한 후 proteinase K 400 $\mu$ g/ml이 섞인 용액을 가하고 55 $^{\circ}$ C에 모든 조직이 거의 녹을 때까지(대부분 24~48시간) 둔 후, SV PCR clean up system (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 DNA 정제 후 PCR에 이용하였다.

### 3. Bisulfate conversion of DNA samples

최대 2 $\mu$ g의 DNA를 통상적인 방법에 따라 bisulfite로 처리하여 unmethylated cytosine을 uracil로 전환시켰다<sup>13)</sup>. Bisulfite로 처리한 DNA를 SV PCR clean up system (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 정제한 후 에탄올로 침전시켰다.

### 4. Methylation-specific polymerase chain reaction

Nested PCR과 single step PCR을 모두 시행하였다. Primer sequences는 Table 1에 있다. 우선 nested PCR을 위해서 external primer set를 가지고 1차 PCR을

시행하였다. 총 량은 25 $\mu$ l 이었는데, 250 $\mu$ M dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 각 0.4 $\mu$ M 시발체, 1.25unit Hot-star Taq polymerase(Takara), bisulfite 처리 DNA 1 $\mu$ l를 넣었다. 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 후 94 $^{\circ}$ C 30 초, 60 $^{\circ}$ C 30 초, 72 $^{\circ}$ C 30초로 25회 반응시키고 72 $^{\circ}$ C에서 5분 연장하였다. 2차 PCR은 같은 조건의 용액에 100배 희석한 1차 PCR 생산물을 1 $\mu$ l를 넣어 같은 조건으로 PCR하였다. 1차 PCR 생산물의 크기는 158염기쌍이고 2차 PCR 생산물의 크기는 60염기쌍 이었다. 따라서 2% agarose gel과 12% polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하여 양성 띠를 확인하였다. 또한 1차 PCR 과정 없이 internal methyl 및 unmethyl 시발체를 이용하여 PCR 반응 횟수를 35회로 증가시켜 single step PCR도 시행하였다.

### 5. 유전자 서열 분석

PCR 산물을 SV PCR clean up system(Promega)로 정제 후 제노텍(대전, 대한민국)에 의뢰하여 염기서열 분석을 통해 p73 유전자가 증폭된 것을 확인하였다.

## 결 과

정상대조군으로 사용한 정상인의 말초혈액단핵구와 정상 비점막의 경우에는 unmethylated p73에 해당하는 띠만이 관찰되었다. 전체 16예의 NK/T 세포 림프종 모두 unmethylated p73에 해당하는 띠를 보여주었고 이

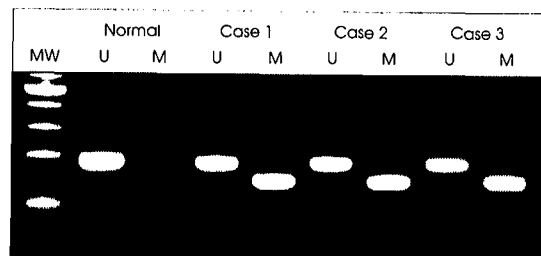


Fig. 1. Methylation specific PCR results of the p73 gene performed on busulfite treated DNAs from extranasal NK/T cell lymphomas. MW : molecular weight marker, U : unmethylated alleles, M : methylated alleles.

Table 1. Primer sets for methylation-specific PCR of p73

	5' primer	3' primer
External	GGGYGGGTAGITYGTTTIGTTTT	CRACCCTAAACCTCCTACCTACAACC
Internal-methyl	GGACGTAGCGAAATCGGGGTTTC	ACCCCGAACATCGACGTCCG
Internal-unmethyl	AGGGGATGTAGTAAATGGGGTTT	ATCACAACCCCAACATCAACATCCA

중 15에는 methylated p73에 해당하는 띠도 함께 보여주었다(Fig. 1).

## 고 찰

p73은 p63과 함께 p53과 염기서열이나 단백질 구조, 세포내 역할 등이 매우 유사하여 종양억제유전자의 하나로 여겨지고 있다. 염색체 1p36.2~3에 위치하며, 두 개의 촉진자를 가져 이로부터 두 종류의 p73 단백질, 즉 TP73단백과 delta Np73을 만들어 내며 이 두 단백질은 서로 역할이 상반되는 것으로 알려져 있다. 종양과 p73과의 연관성에 대해 연구가 진행되어 있는데 신경모세포종, 대장암, 흑색종 및 유방암 등의 여러 종양에서 p73 유전자가 종종 결손되어 있었고<sup>14)</sup> p73단백의 발현 소실과 방광암의 진행과 연관이 있었다<sup>15)</sup>. 그러나 오히려 간세포암, B 세포 만성 림프구성 백혈병 등에서는 p73단백이 과발현될수록 예후가 나쁘다는 보고도 있어 p73과 종양과의 관계는 더 밝혀져야 할 부분이 남아 있겠다고 할 수 있다<sup>16)17)</sup>.

자연살해세포 림프종의 유전자이상에 대해 밝혀진 바는 많지 않다. Comparative genomic hybridization이나 LOH 분석을 통해 염색체 6q, 11q, 13q, 17p 등의 결손이나 점돌연변이가 이 종양의 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>18)19)</sup>. 최근에 유전자 촉진자의 CpG island의 hypermethylation에 의한 종양억제 유전자의 발현 억제가 종양 형성에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다<sup>20)</sup>. 림프질의 NK/T 세포 림프종에서 p73의 메틸화에 대한 연구를 보면, Siu 등은 p73, hMLH1, p16, p15, RARb 등에 대한 메틸화 양상을 분석했는데 22예 중 20예에서 p73의 hypermethylation을 관찰하였다<sup>7)</sup>. 그러나 Kawamata 등은 5예의 림프질의 NK/T 세포 림프종 중 1예에서만 p73 hypermethylation을 보고하였다<sup>21)</sup>. 본 연구자는 16예의 림프질의 NK/T 세포 림프종 중 15예는 p73 유전자의 메틸화(hypermethylation)을 관찰할 수 있어 p73이 종양 형성에 역할을 할 것으로 생각하였다.

## 요 약

### 목 적 :

유전자 촉진자의 CpG island의 메틸화는 종양억제유

전자의 발현을 억제하는 기전의 하나이다. p73은 p53과 매우 유사한 유전자의 하나로서 마찬가지로 종양억제유전자로서 세포자멸사와 세포주기의 정지를 유발한다. 여러 종양에서 p73의 유전자 돌연변이 및 메틸화가 종양발생과의 연관성에 대해 연구되어 있는 바, 림프질의 NK/T 세포 림프종에서 이에 대해 알아보고자 하였다.

### 대상과 방법 :

본원에서 진단된 림프질의 NK/T세포 림프종 16예를 대상으로 methylation-specific PCR을 통해 p73의 메틸화 양상을 관찰하였다.

### 결 과 :

16예 중 15예에서 p73의 hypermethylation을 관찰할 수 있었다.

### 결 론 :

p73의 hypermethylation을 통한 불활성화가 림프질의 NK/T세포 림프종의 발생에 있어 역할을 할 것으로 생각한다.

**중심 단어 :** p73 · NK/T세포 림프종 · 림프질의.

## References

- 1) Robertson KD, Wolffe AP : *DNA methylation in health and disease. Nat Rev Genet* 2000 ; 1 : 11-19
- 2) Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, et al : *Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. Cell* 1997 ; 90 : 809-819
- 3) Soengas MS, Lowe SW : *p53 and p73 : seeing double? Nat Genet* 2000 ; 26 : 391-392
- 4) Garcia-Manero G, Daniel J, Smith TL, Kornblau SM, Lee MS, Kantarjian HM, et al : *DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. Clin Cancer Res* 2002 ; 8 : 2217-2224
- 5) Garcia-Manero G, Jeha S, Daniel J, Williamson J, Albitar M, Kantarjian HM, et al : *Aberrant DNA methylation in pediatric patients with acute lymphocytic leukemia. Cancer* 2003 ; 97 : 695-702
- 6) Gutierrez MI, Siraj AK, Bhargava M, Ozbek U, Banavali S, Chaudhary MA, et al : *Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL : Correlation with phenotype and molecular subgroup. Leukemia* 2003 ; 17 : 1845-1850

- 7) Siu, LL, Chan JK, Wong KF, Kwong YL : *Specific patterns of gene methylation in natural killer cell lymphomas : p73 is consistently involved. Am J Pathol 2002 ; 160 : 59-66*
- 8) Ko YH, Kim CW, Park CS, Jang HK, Lee SS, Kim SH, et al : *REAL classification of malignant lymphoma in Republic of Korea : Incidence of recently recognized entities and changes in clinicopathologic features. Cancer 1998 ; 83 : 806-812*
- 9) Chiang AK, Chan AC, Srivastava G, Ho FC : *Nasal T/natural killer (NK)-cell lymphomas are derived from Epstein-Barr virus-infected cytotoxic lymphocytes of both NK- and T-cell lineage. Int J Cancer 1997 ; 73 : 332-338*
- 10) Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al : *A revised European-American classification of lymphoid neoplasms : a proposal from International Lymphoma Study Group. Blood 1994 ; 84 : 1361-1392*
- 11) Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW : *Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France, IARC, 2001 : 204-207*
- 12) Arber DA, Weiss LM, Albuja PF, Chen YY, Jaffe ES : *Nasal lymphomas in Peru : High incidence of T-cell immunophenotype and Epstein-Barr virus infection. Am J Surg Pathol 1993 ; 17 : 659-665*
- 13) Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB : *Methylation-specific PCR : a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci USA 1996 ; 93 : 9821-9826*
- 14) Schwab M, Praml C, Amler LC : *Genomic instability in 1p and human malignancies. Genes Chromosomes Cancer 1996 ; 16 : 211-2919. Siu LL, Wong KF, Chan JKC, Kwong YL : Comparative genomic hybridization analysis of natural killer cell lymphoma/leukemia. Recognition of consistent patterns of genetic alterations. Am J Pathol 1999 ; 155 : 1419-1425*
- 15) Baylin, SB, Herman JG : *DNA hypermethylation in tumorigenesis : epigenetics joins genetics. Trends Genet 2000 ; 16 : 168-174*
- 16) Kawamata N, Inagaki N, Mizumura S, Sugimoto K, Sakajiri S, Ohyanagi-Hara M, et al : *Methylation status analysis of cell cycle regulatory genes (p16INK4A, p15INK4B, p21Waf1/Cip1, p27Kip1 and p73) in natural killer cell disorders. Eur J Haematol-2005 ; 74 : 424-429*