

# IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF BRCA1, BRCA2, AND POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE-1 IN OVARIAN TUMORS

Se-Kyung Choi, MD<sup>1</sup>, Tae-Il Cho, MD<sup>1</sup>, Tae-Jin Lee, MD<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Sungae Hospital; <sup>2</sup>Department of Pathology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

## Objective

BRCA1 and BRCA2 are putative tumor suppressor gene responsible for hereditary ovarian cancer syndrome. Both BRCA1 and BRCA2 are involved in maintaining genome integrity in DNA repair. In the complex DNA repair related proteins such as poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) have been less studied in ovarian cancer. The aim of our work is to analysis the protein expression of BRCA1, BRCA2 and PARP1 in ovarian tumors including benign, borderline, malignant tumors.

## Methods

We selected 10 cases of normal tissue, 24 cases of borderline tumors, 40 cases of benign tumors, and 52 cases of carcinomas in ovary. Immunohistochemistry for BRCA1, BRCA2, and PARP1 was performed on paraffin sections.

## Results

Negative expression of BRCA1 and BRCA2 was found in 12.5% and 22.5% of benign tumors, 25.0% and 33.3% of borderline tumors, and 36.5% and 40.4% of carcinomas, respectively. Expression of PARP1 was detected in 22.5% of benign tumors, 58.3% of borderline tumors, and 69.2% of carcinomas. Negative expression of BRCA1 with BRCA2 correlated with the expression of PARP1.

## Conclusion

Negative expression of BRCA1 with BRCA2 and PARP1 expression may play an important role in the development of ovarian tumor.

**Keywords:** BRCA1; BRCA2; PARP1; Ovarian tumor

난소암은 부인암 중 가장 치명적인 암으로 구미와 마찬가지로 우리나라에서도 발생률이 점차 증가하고 있는 양상을 보이고 있다. 자궁경부암이나 자궁내막암과 같은 주요 부인암은 선별검사에 의하여 조기 발견이 가능해 졌지만 난소암의 경우에는 적절한 선별 방법이 조기진단방법이나 위험인자를 파악할 수 있는 방법을 개발하는 것이 난소암을 예방하거나 생존율을 향상시키는데 중요하다고 할 수 있다.

난소암이 어떤 단계에서 집단적으로 발생한다는 사실이 오래 전부터 관찰되어 난소암과 가족력 간에 밀접한 관계가 있음이 알려져 왔으며 유전성 난소암 중에서도 유방암/난소암 증후군에 관한 연구가 가장 활발히 이루어져 왔고, BRCA 유전자의 발견에 의하여 이러한 연구는 더욱 가속화 되었다[1].

BRCA1과 BRCA2는 종양억제유전자로 유방암의 5% 정도에서 가족성 돌연변이가 관찰되며[2], 비유전성 난소종양에서도 BRCA1과 BRCA2의 이형접합성소실(loss of heterozygosity) [3]과 BRCA1 단백질 발현의 감소가 관찰되었다는 보고[4]가 있으나 연구 결과는 비교적 드

물다. 종양억제유전자로서 BRCA의 역할은 세포분열 동안 염색체의 구조적 혹은 수적 안정성을 유지하는 것으로[5], BRCA1은 단백질 복합

Received: 2011. 5.30. Revised: 2011.10.18. Accepted: 2011.10.20.

Corresponding author: Tae-Jin Lee, MD

Department of Pathology, Chung-Ang University College of Medicine, 224-1 Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

Tel: +82-2-6299-2757 Fax: +82-2-6293-5630

E-mail: taejlee@cau.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2012. Korean Society of Obstetrics and Gynecology

체를 형성함으로써 DNA 이중사슬 절단(double strand breaks)을 감지하고 상동재조합(homologous recombination)에 의하여 파괴를 복구하는 분자를 모으며[6], BRCA2는 상동재조합을 유도하는 반응에 특이한 매개체로서의 역할을 한다[7]. 기능적인 BRCA1과 BRCA2가 없으면 지속적인 돌연변이와 유전체 불안정성(genomic instability)이 발생하게 되는데[8], BRCA와 연관성있는 암의 유전체 불안정성 모델에서 세포주기 검사점(check point)의 소실과 염색체 불안정성이 종양발생과정에서 관찰되었다[9]. 이와 같이 주요 DNA 복구 경로의 하나인 상동재조합 과정 중에서 BRCA1과 BRCA2는 필수적인 요소이며, poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1)에 의하여 유발된 대체 경로의 비정상성 말단 연결은 부적절한 DNA 수복 경로로써 결과적으로 돌연변이를 유발하게 된다[10].

최근 PARP 억제제가 BRCA1과 BRCA2 결함 세포에 세포독성 효과가 있다는 것이 알려지면서 임상적인 활용이 흥미를 끌고 있다[11]. PARP1과 PARP2는 염기 절제 수복 기전에 의하여 DNA 병변의 수복을 증진시키고, BRCA1과 BRCA2 결함 세포에서는 가장 확실한 DNA 이중사슬 절단에 대한 수복 과정인 완전한 상동 재조합 능력이 부족하기 때문에 PARP 억제는 고도의 유전체 불안정성과 세포사를 유발시킨다[12].

유전적 이상이 있는 종양의 치료 약제로서 PARP 억제제의 발전은 BRCA 부족 세포와 같은 DNA 이중사슬 절단 수복 능력이 부족한 세포에 대한 이해에 근거하고 있으며[13], BRCA1과 BRCA2 결함의 경향이 있는 삼중음성 유방암과 유전성 난소암에서 PARP억제제의 사용이 시도되고 있다[14]. 하지만 현재까지 PARP에 대한 종양 조직에서의 발현에 대한 연구는 거의 없는 상황이다.

이에 본 연구에서는 난소의 정상 조직과 양성, 경계성 및 악성 종양에서 BRCA1과 BRCA2 및 PARP1의 단백질 발현을 면역조직화학적으로 관찰하고 이들 단백질 발현의 연관성도 동시에 관찰해 보고자 한다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

중앙대학교병원에서 수술받은 환자 중 장액암종 39예, 점액암종 13예, 경계성 점액성 종양 12예, 경계성 장액성 종양 12예, 점액낭샘종 20예, 장액낭샘종 20예와 대조군으로 종양이 없는 난소 조직 20예를 대상으로, 이들 환자의 파라핀 포매 조직을 이용하였다.

### 2. 연구방법

파라핀 포매 조직을 4 μm 두께로 박절하고 자일렌으로 탈 파라핀 과정을 거친 후(5분간 3회) 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시켰다. 그 후 내인성 과산화 효소의 활성을 억제하기 위해 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척한 다음 50 mM Tris 완충용액(tris-buffered saline, TBS, pH 7.5)으로 수세 후 비특이성 반응을 제거하기 위해 30

분간 염소혈청으로 처리하고, 여분의 용액을 제거한 다음 일차항체인 BRCA1 (Bioworld Technology, Louis Park, MN, USA)과 BRCA2 (Bioworld Technology)는 1:50, PARP1 (Epitomics, Burlingame, CA, USA)은 1:25로 희석하여 실온에서 2시간 작용시켰다. 일차항체 반응 후 TBS로 5분간 3회 수세한 다음 biotin이 부착된 이차항체(Lab Vision, Fremont, CA, USA)에 20분간 작용 후, 통상적인 avidin-biotin complex법으로 염색하였다. 발색제는 3-amino-9-ethylcarbazole를 사용하고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색 하였다.

BRCA1과 BRCA2 염색의 판독은 핵에 염색된 정도가 정상 난소표피 상피나 간질세포와 유사한 염색 강도를 보이는 세포를 양성 세포로 간주하였고, 양성 세포가 전체 종양세포의 10% 미만이면 음성, 10-30%이면 +, 30-50%면 ++, 50% 이상이면 +++로 판독하였다. PARP1은 전체 종양 세포의 10% 이상에서 핵에 진한 갈색으로 염색이 되면 양성으로 판정하였다.

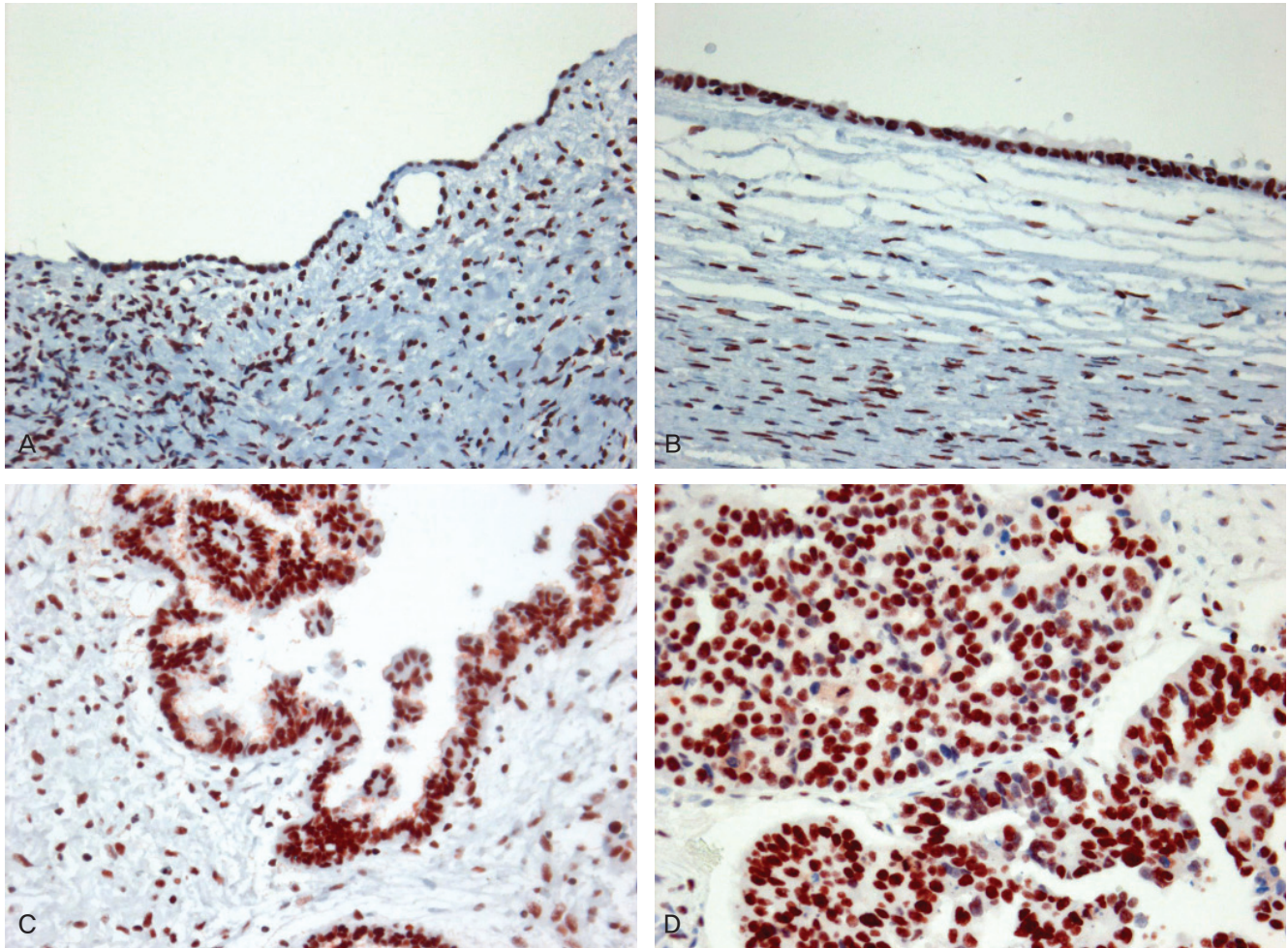
Window용 SPSS ver. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 Pearson chi-square test와 correlation test를 실시하여, P값이 0.05 이하일 때를 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 하였다.

## 결과

BRCA1은 정상 대조군인 난소표피상피(ovarian surface epithelium)와 간질세포의 핵에서 단백질 발현이 관찰되었으며, 양성 종양 40예 중 5예인 12.5%에서 단백질 발현 음성이 관찰되었다. 조직학적 유형별로 각각 20예의 장액낭샘종과 점액낭샘종 중 3예(15.0%)와 2예(10.0%)에서 단백질 발현 음성이 관찰되었고, 각각 12예의 장액과 점액 경계성 종양 중 장액성의 4예(33.3%)와 점액성의 2예(16.7%)에서 단백질 발현 음성이 관찰되었다. 암종의 경우는 총 52예 중 19예인 36.5%에서 단백질 발현 음성이 관찰되었는데, 조직학적 유형별로 장액암 39예 중 15예인 38.5%와 점액암 13예 중 4예인 30.8%에서 단백질 발현 음성이 관찰되었다(Table 1, Fig. 1).

BRCA2도 BRCA1과 동일하게 정상 난소표피상피와 간질세포에서 발현이 관찰되었으며, 양성 종양 40예 중 22.5%에서 단백질 발현 음성이 관찰되었고, 조직학적 유형별로 보면 장액낭샘종의 5예(25%)와 점액낭샘종의 4예(20%)에서 단백질 발현 음성이 관찰되었다. 각각 12예씩의 경계성 종양의 경우는 장액종양의 5예(41.7%), 점액종양의 3예(25.0%)에서 단백질 발현 음성이 관찰되어 총 24예의 경계성 종양 중 8예인 33.3%에서 단백질 발현 음성이 관찰되었다. 암종의 경우는 장액암 39예 중 16예인 41.0%에서, 점액암 13예 중 5예인 38.5%에서 단백질 발현 음성이 관찰되어 암종 52예 중 21예인 40.4%에서 단백질 발현 음성이 관찰되었다(Table 1, Fig. 2). BRCA1과 BRCA2는 양성 종양, 경계성 종양, 악성 종양으로 병변이 진행함에 따라 통계학적으로 의미있게 단백질 발현 음성의 빈도가 증가하는 소견을 나타냈다( $P=0.001$ ,  $P=0.006$ ) (Table 1). 또한 조직학적 유형별로 관찰하였을 때 BRCA1과 BRCA2는 양성과 경계성 및 악성 종양 모두에서 점액성에 비하여 장액성 종양에서 단백질 발





**Fig. 1.** Immunohistochemistry for BRCA1 in ovary (A) positive cells in normal ovarian surface epithelium and stromal cells, (B) positive cells in serous adenoma, (C) positive cells in serous borderline tumor, and (D) positive cells in serous carcinoma ( $\times 400$ ).

현 음성의 빈도가 높았다.

PARP1은 정상 난소표피상피와 간질세포에서는 발현이 관찰되지 않았고, 양성 종양 40예 중 9예인 22.5%에서 단백질 발현이 관찰되었으며 조직학적 유형별로 보면 장액낭샘종의 20.0%와 점액낭샘종의 25.0%에서 발현이 관찰되었다. 경계성 종양에서는 총 24예 중 14예인 58.3%에서 단백질 발현이 관찰되었고, 장액 경계성 종양의 50.0%, 점액 경계성 종양의 66.7%에서 발현이 관찰되었다. 암종에서는 총 52예 중 36예인 69.2%에서 단백질 발현이 관찰되었고 조직학적 유형별로 관찰해 보면 장액암의 74.4%, 점액암의 53.8%에서 단백질 발현이 관찰되었다 (Fig. 3). PARP1의 경우는 병변이 악성 종양으로 진행하면서 통계학적으로 유의하게 발현 빈도가 증가하는 양상을 보였다( $P=0.001$ ) (Table 1).

BRCA1과 BRCA2 및 PARP1 단백질 발현의 상호 연관성을 분석하여 보았을 때 BRCA1 단백질 발현이 음성인 30예 중에서 BRCA2도 동시에 단백질 발현 음성을 보인 예가 22예인 73.3%였으며, BRCA1 단백질 발현 양성인 96예 중 BRCA2 단백질 발현 양성으로 관찰되는 예가 80예인 83.3%였다. BRCA1과 BRCA2가 각각 단백질 발현 음성을 보이는 경우에

PARP1은 각각 93.3%와 92.1%에서 단백질 발현이 양성으로 관찰되었으며 통계학적인 유의성이 있었다( $P<0.05$ ) (Table 2).

## 고찰

난소의 종양화에 관여하는 유전자 중에서 염색체 17q12-21과 13q12-13에 위치하는 BRCA1과 BRCA2 유전자의 배선돌연변이는 가족성 난소/유방암의 90%에서 관찰되는 가장 중요한 요인으로 알려져 있다[15]. 인간의 BRCA1 유전자는 1863 아미노산(220 Kda)의 핵단백을 암호화하고 있는 반면 BRCA2 단백질은 3418 아미노산으로 구성되어 있으며, 두 단백질은 DNA 손상에 대한 세포 반응과 유전자 안정성을 유지하는 데 중요한 역할을 한다[16]. BRCA1 조절유전자 생성물은 세포주기조절과 DNA 수복에 직간접적으로 작용하며, 특히 종양 억제 유전자로서 BRCA1 관련 종양화에 대한 연구가 계속 진행되어 왔다. 이들 연구에서 BRCA1은 DNA 손상 수복, G2-M 세포주기 검사항, 중심

**Table 1.** Protein expression of BRCA1, BRCA2, and poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) in ovarian tumours

Variables	n	BRCA1				BRCA2				PARP1	
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+
Normal	20	0 (0)	2 (10.0)	3 (15.0)	15 (75.0)	0 (0)	3 (15.0)	3 (15.0)	14 (70.0)	10 (100)	0 (0)
				20 (100)				20 (100)			
Benign cystadenomas <sup>a</sup>	40	5 (12.5)	3 (7.5)	4 (10.0)	28 (70.0)	9 (22.5)	2 (5.0)	3 (7.5)	26 (6.5)	31 (77.5)	9 (22.5)
				35 (87.5)				31 (77.5)			
Serous	20	3 (15.0)	1 (5.0)	2 (10.0)	14 (70.0)	5 (25.0)	1 (5.0)	1 (5.0)	13 (65.0)	16 (80.0)	4 (20.0)
				17 (87.5)				15 (75.0)			
Mucinous	20	2 (10.0)	2 (10.0)	2 (10.0)	14 (70.0)	4 (20.0)	1 (5.0)	2 (10.0)	13 (65.0)	15 (75.0)	5 (25.0)
				18 (90.0)				16 (80.0)			
Borderline tumors <sup>a</sup>	24	6 (25.0)	4 (16.7)	6 (25.0)	8 (33.3)	8 (33.3)	3 (12.5)	5 (20.8)	8 (33.3)	10 (41.7)	14 (58.3)
				18 (75.0)				16 (66.7)			
Serous	12	4 (33.3)	3 (25.0)	3 (25.0)	2 (16.7)	5 (41.7)	3 (25.0)	2 (16.7)	2 (16.7)	6 (50.0)	6 (50.0)
				8 (66.7)				7 (58.3)			
Mucinous	12	2 (16.7)	1 (8.3)	3 (25.0)	6 (50.0)	3 (25.0)	0 (0)	3 (25.0)	6 (50.0)	4 (33.3)	8 (66.7)
				10 (83.3)				9 (75.0)			
Carcinomas <sup>a</sup>	52	19 (36.5)	17 (32.7)	11 (21.2)	5 (9.6)	21 (40.4)	17 (32.7)	10 (19.2)	4 (7.7)	16 (30.8)	36 (69.2)
				33 (63.5)				31 (59.6)			
Serous	39	15 (38.5)	13 (33.3)	8 (20.5)	3 (7.7)	16 (41.0)	12 (30.7)	8 (20.5)	3 (7.7)	10 (25.6)	29 (74.4)
				24 (61.5)				23 (59.0)			
Mucinous	13	4 (30.8)	4 (30.8)	3 (23.0)	2 (15.4)	5 (38.5)	5 (38.5)	2 (15.4)	1 (7.7)	6 (46.2)	7 (53.8)
				9 (69.2)				8 (61.5)			
P-value <sup>a</sup>			0.001				0.006			0.001	

<sup>a</sup>Correlation with protein expressions of benign cystadenomas, borderline tumors, and carcinomas excluding histologic type such as serous or mucinous.

**Table 2.** Correlation of protein expression of BRCA1, BRCA2, and poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) in ovary

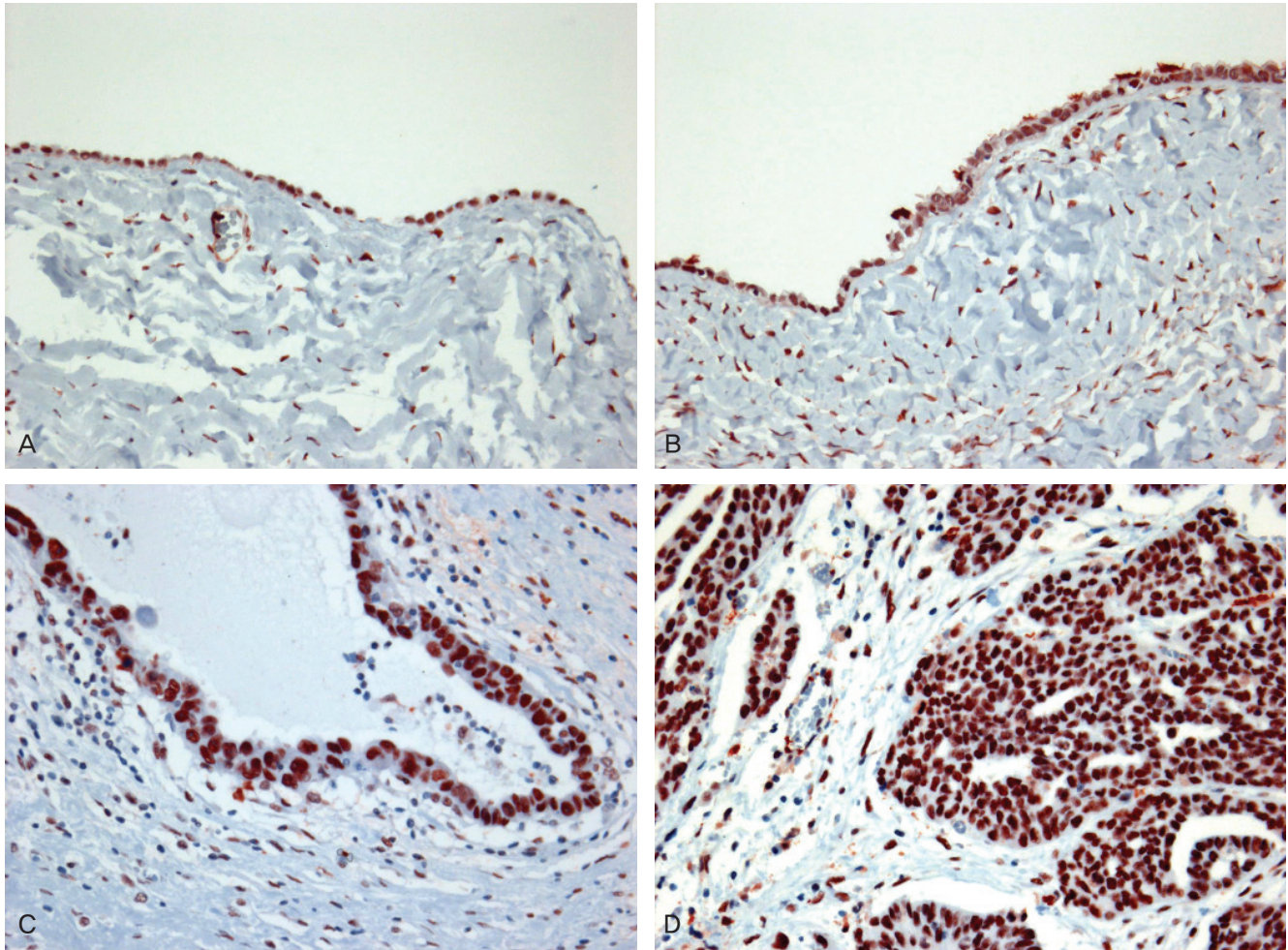
Variables	n	BRCA1		BRCA2		PARP1	
		-	+	-	+	-	+
BRCA1	-	30	-	22 (73.3)	8 (26.7)	2 (6.7)	28 (93.3)
	+	96	-	16 (16.7)	80 (83.3)	65 (67.7)	31 (32.3)
P-value				0.0001		0.0001	
BRCA2	-	38	22 (57.9)	16 (42.1)	-	3 (7.9)	35 (92.1)
	+	88	8 (9.1)	80 (90.9)	-	64 (72.7)	24 (27.3)
P-value			0.0001			0.0001	

체 복제 등에 관여함으로써 유전자 안정성의 유지에 필수적인 유전자로 알려졌다[5]. BRCA 배선돌연변이와 연관성있는 난소암은 비유전적 암보다 증식능이 의미있게 높다고 하며[17], 이들 유전자의 체세포 돌연변이도 난소암의 발생에 관여한다고 알려져 있다[18]. 유전성 난소암과 비유전성 난소암 사이에 BRCA1과 BRCA2의 유전자 발현 측면에서는 유사하며[19], 적어도 진단 초기에는 난소암의 생존율에 BRCA 배선 돌연변이가 영향을 미친다고 한다[20]. 비유전성 난소암에서 BRCA 유전자의 역할은 적은 것으로 알려져 있으며 난소 상피세포 종양에서

이형접합성소실은 BRCA1이 23-44%, BRCA2가 25-40% 정도로 보고되었고[21], BRCA1/2 유전자의 체세포돌연변이는 매우 드물지만 체세포 불활성은 흔한 것으로 보고되고 있다[3].

본 연구에서 BRCA1과 BRCA2는 정상 대조군인 난소표피상피와 간질세포의 핵에서 단백질 발현이 모두 관찰되었다. BRCA1의 경우는 장액낭샘종과 점액낭샘종을 포함한 양성 종양 40예 중 5예인 12.5%에서 단백질 발현 음성이 관찰되었고, 경계성 종양 24예 중 6예인 25.0%에서 단백질 발현 음성이 관찰되었으며, 암종 52예 중 36.5%에서 단백질 발





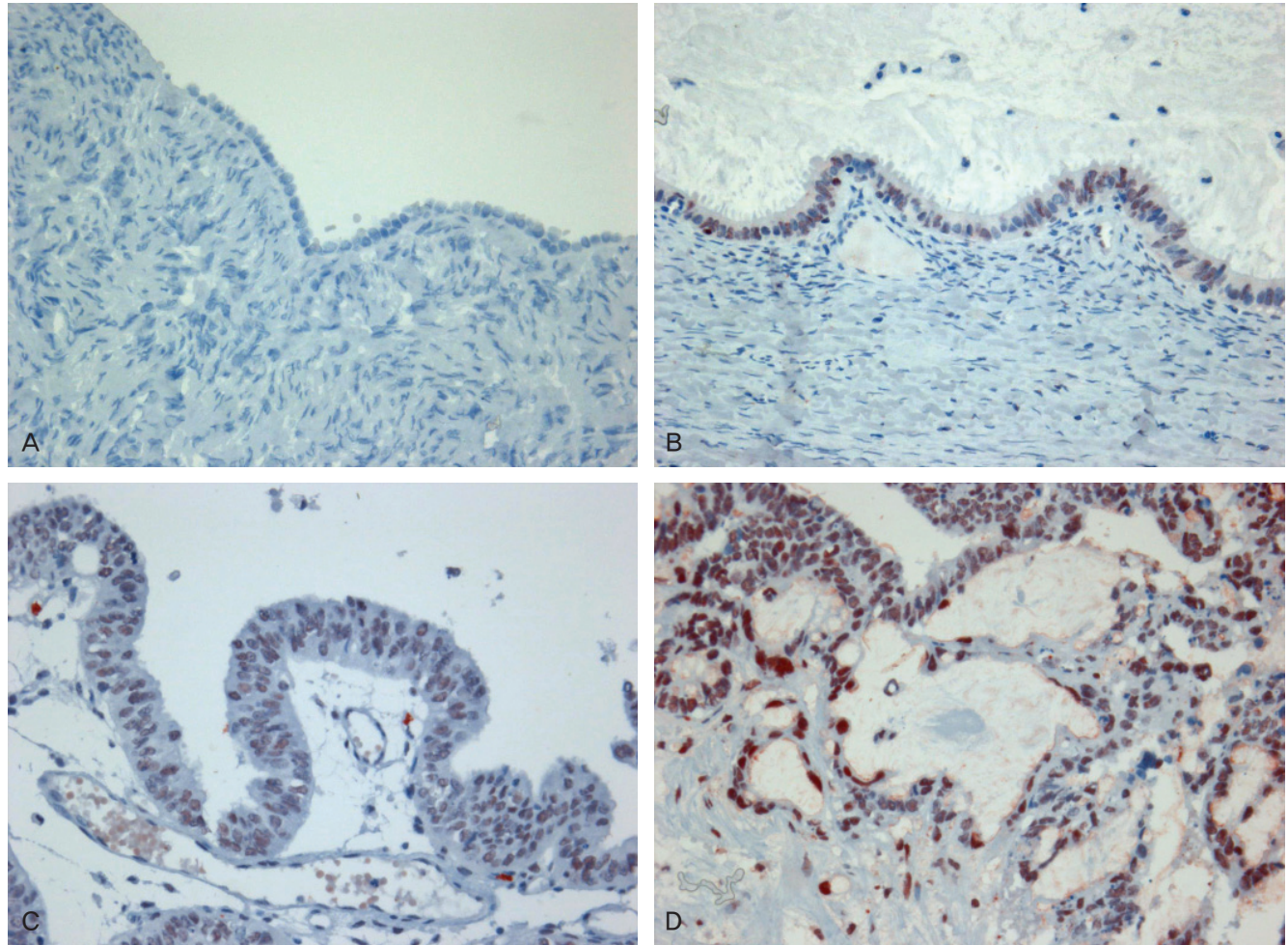
**Fig. 2.** Immunohistochemistry for BRCA2 in ovary (A) positive cells in normal ovarian surface epithelium and stromal cells, (B) positive cells in serous adenoma, (C) positive cells in serous borderline tumor, and (D) positive cells in serous carcinoma (×400).

현 음성이 관찰되었다. BRCA2도 BRCA1과 유사한 양상으로 관찰되었는데 양성 종양의 22.5%, 경계성 종양의 33.3%, 암종의 40.4%에서 단백질 발현 음성이 관찰되었다. 이전 연구자에서 Wang 등[4]은 BRCA1 단백질 발현의 감소가 양성 종양의 16%, 경계성 종양의 38%, 악성 종양의 72%에서 관찰되었다고 보고하였으며, 악성 종양의 경우 장액암종의 70%, 점액암종의 50%, 자궁내막유사암종의 68%, 투명세포암종의 89%에서 단백질 발현의 감소가 관찰되었다고 하였고, BRCA1의 발현과 암종의 조직학적 등급과 병기와는 연관성이 없어서 예후인자라기 보다는 종양의 발생과 진행에 관여하는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 악성 종양에서 BRCA1 단백질 음성이 36.5%로 이전 연구자에 비해 다소 낮은 비율을 보여 암종에서 BRCA1에 대한 단백질 발현의 검출율이 높게 관찰되었는데 이는 비교적 적은 수의 검체를 대상으로 한 점과 항체나 면역조직화학염색 방법상의 문제도 있을 것으로 판단된다. 비유전성 난소암에서 BRCA1에 대한 mRNA 발현과 메틸화의 이상 소견은 58.2%와 56.3% 정도로 보고된 연구 결과도 있고[18], 36.4%의 이형 접합성소실의 빈도에도 불구하고 유전자 발현의 감소는 6.7% 정도로

고 보고한 연구 결과도 있어서[3] BRCA1 발현 감소 빈도에 대한 연구는 좀 더 이루어져야 한다고 생각된다. 본 연구와 이전 연구자들의 결과를 종합하여 빈도의 차이는 있지만 BRCA1과 BRCA2의 단백질 발현은 양성 종양과 경계성 종양 및 암종으로 병변이 진행함에 따라 의미있게 감소하는 양상을 나타낸다고 할 수 있고 이러한 소견으로 난소암의 발생과 진행 과정에서도 BRCA1과 BRCA2가 관여하며 체세포 돌연변이나 유전적 변이의 의하여 단백질 발현의 감소가 종양화에 관여할 것으로 추정 할 수 있다.

PARP1은 정상적으로 DNA 복구와 유전자보전에 관련된 세포핵 내 단백질로 DNA 손상을 신호화하고 염기 절제 복구에 관여한다[22]. DNA 손상을 복구하는 특별하고 복잡한 체계 중에서 가장 즉각적이고 강력한 생화학적 반응이 핵단백의 PARP이며 이 반응은 PARP1에 의하여 매개된다. DNA 손상인자에 의해 손상된 DNA로부터 생성된 DNA 사슬 절단은 PARP1을 활성화시키고, 이로 인한 poly (ADP-ribose)ylation은 DNA 복제, DNA 손상 복구, 유전자 발현 및 세포자멸사 등의 각종 생리적 병태생리적 변화를 유발한다[23]. 그러나 심한 DNA 손





**Fig. 3.** Immunohistochemistry for poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) in ovary (A) positive cells in normal ovarian surface epithelium, (B) positive cells in serous adenoma, (C) positive cells in serous borderline tumor, and (D) positive cells in serous carcinoma (×400).

상을 동반한 몇몇 병리적 상황에서 과도한 PARP1의 활성은 세포내의 NAD+와 그 전구물질인 ATP를 소실시킴으로써 비가역적인 세포독성과 세포사멸을 초래할 수 있다. 이러한 PARP1의 과활성은 각종 장기의 염증성 재관류와 퇴행성 및 혈관질환에 대한 동물실험들에서 병태생리에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[24]. DNA 이중사슬 절단과 같은 DNA 손상이 유발되었을 때 PARP1의 촉매 활성도가 10–500배 증가하고 결과적으로 긴 분자의 pADPr 사슬이 손상 후 15–30초 안에 만들어지며[25], pADPr의 형성은 DNA를 위한 PARP와 histone의 친화력을 감소시키며 손상받은 DNA로부터 PARP1을 제거하는 기전을 생성하게 된다[26]. 실험적으로 PARP1의 제거는 수복 단백질의 접근을 용이하게 하고 계속적으로 pADPr 합성을 억제한다고 한다[27]. 이와 같이 DNA의 수복과 연관성 있는 PARP1에 대한 이해와 더불어 유전적 병변이 있는 종양의 치료제로서 PARP 억제제가 개발되고 있으며, 이것은 BRCA 결함세포와 같은 DNA 이중사슬 절단의 복구에 장애가 있는 세포를 중심으로 이루어지고 있다. 실험적으로 BRCA1과 BRCA2 불활성화 모델에서 PARP 억제제의 단일 약제 활성이 증명되기도 하였고,

결과적으로 이전에 AZD2281이라고 알려진 PARP 억제제 olaparib는 임상 실험에서 BRCA1과 BRCA2 돌연변이 종양에 대한 단일 약제로서의 가능성이 있는 것으로 평가되었다[28]. 또한, 최근 Fong 등[29]은 Platinum 근거 화학요법에 민감성이 있으며 BRCA1/2 돌연변이가 있는 난소종양에서 PARP 억제제인 olaparib가 항암의 활성을 가진다는 연구보고를 하기도 하였다. 삼중음성(에스트로겐 음성, 프로그스테론 음성, ERBB2 음성) 유방암과 비유전성 난소암은 BRCA1과 BRCA2 결함 세포의 특성을 어느 정도 갖기 때문에 PARP 억제제의 사용에 대한 연구가 진행되고 있다[14,30]. 하지만, PARP 억제제의 활용을 위해서는 PARP 자체의 생물학적 특성에 대한 이해와 해결해야 할 문제가 남아 있다고 지적되고 있는데 그 중 하나가 정상과 종양세포에서 PARP1에 대한 연구가 요구된다는 것이다. 정상세포와 종양세포에서 PARP1 단백질의 수준과 활성도는 거의 연구된 바가 없으며 이러한 연구는 PARP1 억제제를 정상 수복 과정에 있는 세포에 DNA 손상 약제를 병합하여 사용하는 데 있어서 치료의 기준을 어떻게 정할 것인가에 중요한 것으로 판단되었다[31].

본 연구에서 PRAP1은 정상 난소표피상피와 간질세포에서는 발현이 관찰되지 않았고, 양성 종양의 22.5%, 경계성 종양의 58.3%, 암종의 69.2%에서 발현이 관찰되었으며 병변이 악성 종양으로 진행하면서 통계학적으로 유의하게 발현 빈도가 증가하는 양상을 보였다. 이러한 결과로 PARP1의 단백질 발현이 난소암의 발생과 진행에 관여하는 것으로 추정할 수 있다. 현재까지 종양에서 PARP1의 단백질 발현에 대해서는 뇌종양과 체장암을 비롯한 몇몇 종양에서의 연구 결과가 보고되어 있을 뿐 연구 결과는 매우 드물며[32,33], 특히 난소종양에서의 결과는 거의 없다. 최근 Pizem 등[32]은 뇌의 속질모세포종(medulloblastoma)에 대하여 PARP1에 대한 면역조직화학 염색을 실시하여 연구 대상인 65예 모두에서 PARP1의 발현을 관찰하였으며, 이러한 결과로 PARP1을 치료에 적용할 수 있을 것이라고 하였고, Piao 등[33]도 체장암세포를 이용한 연구에서 이와 유사한 주장을 하였다.

또한, 본 연구에서 BRCA1과 BRCA2 및 PARP1 단백질 발현의 상호 연관성을 분석하여 보았을 때 BRCA1 단백질 발현이 감소된 경우에 BRCA2도 동시에 단백질 발현의 감소를 보이는 경우의 빈도가 매우 높아서 BRCA1과 BRCA2는 연관성있게 단백질 발현이 일어남을 알 수 있었고, BRCA1과 BRCA2 단백질 발현이 동시에 음성인 경우에 PARP1은 높은 빈도로 발현이 관찰되어, BRCA1과 BRCA2 단백질 발현이 음성이거나 BRCA1과 BRCA2에 대한 돌연변이가 관찰되는 종양 환자에 대해서 PARP1 억제제가 효과가 있을 것으로 추정된다.

종합하면, 본 연구에서는 난소의 정상 조직과 양성, 경계성 및 악성 종양에서 BRCA1과 BRCA2 및 PARP1의 단백질 발현을 면역조직화학적으로 관찰하고 이들 단백질 발현의 연관성도 동시에 관찰하여, 난소종양이 양성, 경계성, 악성으로 진행함에 따라 BRCA1과 BRCA2 단백질 발현은 음성의 빈도가 증가하고 PARP1 단백질 발현은 양성의 빈도가 증가하는 소견이 관찰되었다. 이러한 결과로 비록 단백질 발현의 현상만을 관찰한 연구 결과 이기는 하지만 난소암의 발생에 있어서 BRCA1과 BRCA2 단백질 발현의 감소와 PARP1 단백질 발현이 관여할 것으로 생각되며 계속적으로 임상적인 연구가 이루어 진다면 난소암의 치료에 PARP 억제제가 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

## References

1. Park CS, Kim JK. Expression of BRCA1 transcripts and protein in sporadic ovarian cancer. *Korean J Obstet Gynecol* 1998;41: 2131-45.
2. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2004;4:665-76.
3. Zikan M, Janatova M, Pavlista D, Pohlreich P. High frequency of BRCA1/2 and p53 somatic inactivation in sporadic ovarian cancer. *J Genet* 2007;86:169-71.
4. Wang C, Horiuchi A, Imai T, Ohira S, Itoh K, Nikaido T, et al. Expression of BRCA1 protein in benign, borderline, and

- malignant epithelial ovarian neoplasms and its relationship to methylation and allelic loss of the BRCA1 gene. *J Pathol* 2004;202:215-23.
5. Xu X, Wagner KU, Larson D, Weaver Z, Li C, Ried T, et al. Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nat Genet* 1999;22:37-43.
6. Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* 1999;4:511-8.
7. Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* 2001;7:263-72.
8. Patel KJ, Joenje H. Fanconi anemia and DNA replication repair. *DNA Repair (Amst)* 2007;6:885-90.
9. Venkitaraman AR. Modifying chromatin architecture during the response to DNA breakage. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010;45:2-13.
10. Shaheen M, Allen C, Nickoloff JA, Hromas R. Synthetic lethality: exploiting the addiction of cancer to DNA repair. *Blood* 2011;117:6074-82.
11. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005;434:913-7.
12. Sugimura K, Takebayashi S, Taguchi H, Takeda S, Okumura K. PARP-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA. *J Cell Biol* 2008;183:1203-12.
13. Saleh-Gohari N, Bryant HE, Schultz N, Parker KM, Cassel TN, Helleday T. Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. *Mol Cell Biol* 2005;25:7158-69.
14. Anders C, Carey LA. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 2008;22:1233-9.
15. Alberg AJ, Helzlsouer KJ. Epidemiology, prevention, and early detection of breast cancer. *Curr Opin Oncol* 1997;9:505-11.
16. Chen J, Silver DP, Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G, et al. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* 1998;2:317-28.
17. Koul A, Malander S, Loman N, Pejovic T, Heim S, Willen R, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in ovarian cancer: Covariation with specific cytogenetic features. *Int J Gynecol Cancer* 2000;10:289-295.
18. Chan KY, Ozcelik H, Cheung AN, Ngan HY, Khoo US. Epigenetic factors controlling the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic

- ovarian cancer. *Cancer Res* 2002;62:4151-6.
19. Hedenfalk IA. Gene expression profiling of hereditary and sporadic ovarian cancers reveals unique BRCA1 and BRCA2 signatures. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:960-1.
  20. Cass I, Baldwin RL, Varkey T, Moslehi R, Narod SA, Karlan BY. Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer* 2003;97:2187-95.
  21. Gras E, Cortes J, Diez O, Alonso C, Matias-Guiu X, Baiget M, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 13q12-q14, BRCA-2 mutations and lack of BRCA-2 promoter hypermethylation in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer* 2001;92:787-95.
  22. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 1999;342:249-68.
  23. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, et al. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis: caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem* 1999;274:22932-40.
  24. Jagtap P, Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:421-40.
  25. Hassa PO, Covic M, Bedford MT, Hottiger MO. Protein arginine methyltransferase 1 coactivates NF-kappaB-dependent gene expression synergistically with CARM1 and PARP1. *J Mol Biol* 2008;377:668-78.
  26. Timinszky G, Till S, Hassa PO, Hothorn M, Kustatscher G, Nijmeijer B, et al. A macrodomain-containing histone rearranges chromatin upon sensing PARP1 activation. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16:923-9.
  27. Zahradka P, Ebisuzaki K. A shuttle mechanism for DNA-protein interactions: the regulation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Eur J Biochem* 1982;127:579-85.
  28. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009;361:123-34.
  29. Fong PC, Yap TA, Boss DS, Carden CP, Mergui-Roelvink M, Gourley C, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol* 2010;28:2512-9.
  30. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 2004;4:814-9.
  31. Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2010;10:293-301.
  32. Pizem J, Popovic M, Cör A. Expression of Gli1 and PARP1 in medulloblastoma: an immunohistochemical study of 65 cases. *J Neurooncol* 2011;103:459-67.
  33. Piao L, Nakagawa H, Ueda K, Chung S, Kashiwaya K, Eguchi H, et al. C12orf48, termed PARP-1 binding protein, enhances poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activity and protects pancreatic cancer cells from DNA damage. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:13-24.



## 난소종양에서 BRCA1과 BRCA2 및 poly (ADP-ribose) polymerase 1의 면역조직화학적 연구

<sup>1</sup>성애병원 산부인과, <sup>2</sup>중앙대학교 의과대학 병리학교실

최세경<sup>1</sup>, 조태일<sup>1</sup>, 이태진<sup>2</sup>

### 목적

BRCA1과 BRCA2는 유전성 난소암 증후군과 연관성이 있는 종양억제유전자이며, DNA 손상 시 수복에 관여하여 유전자의 안정성을 유지하는 데 중요한 역할을 한다. 또한 PARP1과 같은 DNA 수복 관련 단백질은 난소암에서 드물게 연구되었다. 이에 본 연구에서는 양성과 경계성 종양을 포함하여 비유전성 난소암에서 BRCA1과 BRCA2 및 PARP1의 단백질 발현을 관찰하여 보고자 한다.

### 연구방법

10예의 정상 난소, 40예의 양성 종양, 24예의 경계성 종양, 52예의 난소암을 대상으로 이들 예의 파라핀 포매 조직을 이용하여 BRCA1과 BRCA2 및 PARP1에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다.

### 결과

BRCA1과 BRCA2 단백질 발현 양성이 양성 종양의 12.5%와 22.5%, 경계성 종양의 25.0%와 33.3%, 암종의 36.5%와 40.4%에서 관찰되었다. PARP1의 단백질 발현은 양성 종양의 22.5%, 경계성 종양의 58.3%, 암종의 69.2%에서 관찰되었으며, BRCA1과 BRCA2 단백질 발현 양성과 PARP1 단백질 발현 간에는 유의한 상관성이 있었다.

### 결론

난소암의 발생에 BRCA1과 BRCA2 단백질 발현의 양성과 PARP1 단백질 발현이 중요한 역할을 할 것으로 생각한다.

**중심단어:** BRCA1, BRCA2, PARP1, 난소종양