

DNA chip의 생명과학연구 및 신약개발에의 활용

김동훈, 권호정* /세종대학교 생명공학과

■ 서론

20세기 후반 미국의 주도로 시작된 휴먼 게놈프로젝트는 인간 게놈의 염기서열을 결정하는 연구로부터 시작되었고, 그 결과 2001년 2월에 개최된 국제컨소시엄에서 휴먼게놈프로젝트와 미국 셀레라 제노믹스는 인간의 게놈지도가 99% 완성되었다고 발표하였다. 약 30억개에 해당하는 인간 유전체와 염기서열이 결정됨으로써 인간생명의 실체를 이해하는 기초를 마련하였으며 더불어 질병의 원인분석 및 치료제 개발을 획기적으로 앞당길 수 있는 발판을 확립하게 되었다. 아울러 인간 유전체 지도의 완성은 각 유전자들의 기능분석을 요구하는 functional genomics 시대를 열게 되었다. 그러나 기존의 방식을 이용하여 약 3만개정도로 추정되는 유전자들 각각의 기능을 분석하는 일은 많은 시간과 어려움이 뒤따르기 때문에, 이를 해결하기 위해 새로운 기술과 개념들이 속속 등장하게 되었다. 그 중 하나로 DNA chip은 동시에 많은 유전자의 발현을 확인하는 기술으로써 자동화 시스템과 전자제어기술등의 발전으로 많게는 수 만개의 유전자 발현을 동시에 확인할 수 있게 되었다. 즉, DNA chip은 우리가 밝히고자 하는 검사대상에서 추출한 DNA sample을 반응시켜 그 결과를 컴퓨터로 처리하는 방식으로 기존에 며칠씩 걸리던 검사를 몇 시간 안에 끝낼 수 있는 획기적인 방법인 것이다. 특히, DNA chip은 매우 좁은 공간(수 cm^2)에 수십만개의 DNA를 집약시킨 것으로 기존의 생화학, 분자생물학적 지식과 화학 및 기계, 전자공학, 그리고 생명정보학의 기술이 접목되어 만들어진 산물이다. 이처럼 기존의 방식보다 빠르게, 그리고 한 번에 많은 정보를 얻어낼 수 있는 DNA chip의 장점을 최대한 활용할 수 있는 분야 중 하나로 chemical genomics를 들 수 있다. 즉, 유전자 기능을 알아보기 위해 그 유전자에 대한 특정 돌연변이주를 이용하는 기존의 방법(forward genetics) 대신 유전자의 산물인 단백질과 특이적으로 결합하여 그 기능을 조절하는 chemical 를 이용하여 직접 유전자를 조작하지 않고도 돌연변이를 유발시켰을 때와 같이 유전자의 기능을 연구할 수 있는 효과를 나타낼 수 있다는 것이 chemical genomics의 주요 개념(reverse genetics)이며, 이에 대한 실험적 증명에 DNA chip이 유용하게 활용될 수 있다(Matthew J. Marton et al., 1998). 초기의 DNA chip은 유전자발현 검색을 목적으로 개발되었으나 이전 chemical genomics 뿐만 아니라 다양한 분야로 활용되고 있다. 실제로 최

근 세포상태에 따른 유전자발현 변화를 파악하는 것이 의료, 제약 산업적인 측면에서 크게 부각되고 있는데, 이는 각종 질환의 원인이 되는 유전자의 발현변화가 파악된다면, 질병관련 유전자발굴에 활용할 수 있으며, 그 결과는 진단 및 치료제 개발로 연결될 것이기 때문이다. 이런 동기에 바탕을 두고서 많은 Biotech기업들이 신약개발의 중요 기초연구로 DNA chip 기술의 개발과 응용에 참여하고 있다. 이 글에서는 microarray의 기본원리와 실험과정을 소개하고 이들이 약물의 작용기전해석 및 표적분자발견등에 활용되는 몇 가지 응용을 소개하고자 한다.

■ 본론

1) 기본원리

세포가 나타내는 특성은 결국 그것이 발현하고 있는 유전자들간의 상호작용의 결과라는 것을 생각할 때, 세포의 상태를 가장 정확히 표현하는 방법은 주어진 상태에서 세포가 어떤 유전자들을 어느정도 발현하고 있는가를 총체적으로 표시하는 것이 될 것이다. 인간의 유전자서열이 모두 결정, 발굴된 다음 단계는 단일세포수준에서 발현되고 있는 모든 유전자들을 정량, 정성적으로 파악하고 표시하는 것을 들 수 있다. 지금까지 유전자의 발현 확인은 northern blotting을 통해 mRNA를 측정하는 방법이 사용되었다. 이는 전기영동으로 분리한 mRNA를 nylon 또는 nitrocellulose membrane에 옮긴 후 방사성 표지된 probe를 membrane위의 RNA에 붙인 후 필름에 감광하여 RNA의 양을 확인하는 방법이다. 이보다 고집적, 고효율적으로 유전자의 발현을 동시에 정량, 정성할 수 있는 방법으로 개발된 것이 DNA chip이며, 여기에는 최소한 다섯가지 요소가 필요하다. 즉, 표면을 특수처리한 cDNA chip, chip에 여러 DNA를 spotting할 수 있는 장치, sample DNA와 chip의 DNA를 반응시킬 수 있는 시스템, 반응결과를 읽을 수 있는 기구(laser scanner), 그리고 얻어진 결과를 분석할 수 있는 컴퓨터 프로그램이 그것이다. 기존의 northern blotting과의 차이는 방사성 표지대신 안전한 형광표지를 사용할 수 있으며, 한 번의 실험으로 다양한 유전자의 발현변화를 측정할 수 있다는 것이다. 최종적으로 DNA chip을 통해 확인된 유전자의 발현변화는 개별 유전자별로 RT-PCR 또는 protein analysis등을 통해 검증한다.

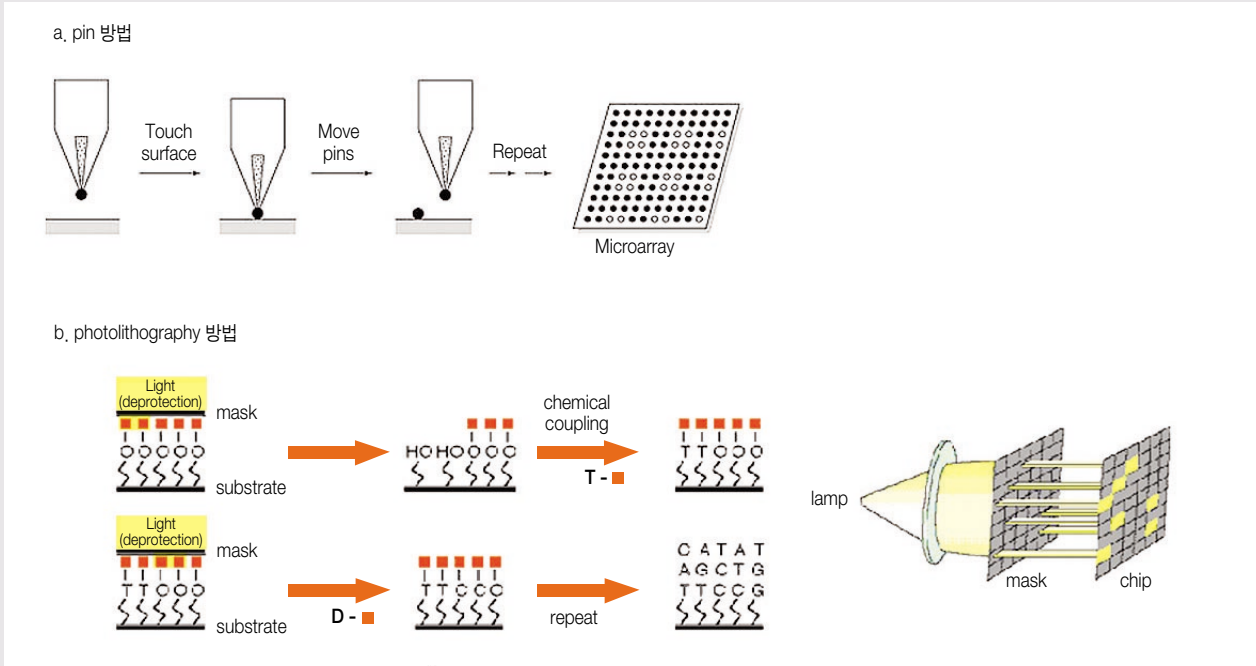


그림 1 DNA chip의 제작방법

A, pin 방법: 염기서열이 밝혀진 genome으로부터 모든 유전자의 open reading frame의 위치를 파악한 여기에 결합하는 primer를 만든다. PCR을 통해 증폭된 유전자들은 자동화 시스템(robotic print head)을 이용해 poly L-lysine으로 처리된 슬라이드 유리판 위에 spotting한다.

B, photolithographic chip : 빛에 민감한 화학물질로 덮여있는 판(plate) 위에 작고 많은 구멍이 뚫린 photomask를 씌우고 빛을 쬐이면 구멍을 통해 빛이 투과되는 plate의 특정 부분에만 화학물질이 활성화된다. 활성화된 plate표면에 빛에 민감한 화학물질이 결합된 첫 번째 염기를 붙인 후 chip을 씻어 여분의 염기를 제거한다. 다시 빛을 쬐어 첫 번째 염기에 붙은 화학물질을 활성화시킨 후 두 번째 염기를 붙인다. 이 과정을 반복하여 20개 내외의 oligonucleotide를 합성한다.

2) DNA chip technology

① DNA chip 제작(그림 1)

DNA chip은 1995년 미국 stanford 대학의 생화학과에서 약 2-3천개의 유전자를 1cm² 넓이 안에 집약시킨 형태로 처음 개발되었다. 초기엔 유전자의 발현변화측정을 목적으로 cDNA chip을 만들었지만 이후에 돌연변이를 검색할 수 있는 chip(oligonucleotide chip)도 개발되었다. DNA chip은 길이 500bp이상의 유전자를 붙여 대량의 유전자발현 확인을 목적으로 하는 cDNA chip과 20개 내외의 염기들을 붙여 돌연변이진단등 주로 DNA 분석을 목적으로 하는 oligonucleotides chip으로 분류된다. 현재까지 기술의 진보를 통해 슬라이드 유리판 위에 spotting할 수 있는 핵산의 수는 cDNA일 경우 1만, oligonucleic acid일 경우 10만으로 늘어났고, 100-300μm²에 5-15ng의 sample을 spotting할 수 있게 되었다. 대표적인 chip의 제작방법은 아래와 같다.

· pin 방법: 염기서열이 밝혀진 genome으로부터 모든 유전자의 open reading frame의 위치를 파악한 후 이들 유전자의 시작과 끝부분에 결합하는 primer를 만든다. PCR을 통해 증폭된 유전자들은 자동화 시스템(robotic print head)을 이용해 poly L-lysine으로 처리된 슬라이드 유리판위에 spotting된다.

· photolithograph chip : 빛에 민감한 화학물질로 덮여있는 plate 위에 작고 많은 구멍이 뚫린 photomask를 씌우고 빛을 쬐이면 구멍을 통해 빛이 투과되는 plate의 특정부분에만 화학물질이 활성화된다. 활성화된 plate표면에 빛에 민감한 화학물질이 결합된 첫 번째 염기를 붙인 후

chip을 씻어 여분의 염기를 제거한다. 다시 빛을 쬐어 첫 번째 염기에 붙은 화학물질을 활성화시킨 후 두 번째 염기를 붙인다. 이 과정을 반복하여 20개 내외의 oligonucleotide를 합성한다.

위 두 가지 방법외에 inkjet의 원리를 이용한 방법과 전기를 이용한 방법이 있다.

② Sample(cDNA) 준비와 표지(그림 2)

DNA chip는 특정상태에서 발현된 RNA로부터 cDNA를 합성한 후 유리판에 spotting된 DNA와 반응시켜 유전자의 발현정도를 측정한다. 이 때, total RNA나 mRNA 모두 사용할 수 있으며 성공적인 결과를 얻기 위해서 고순도의 RNA를 얻는 것이 좋다. 다양한 RNA 분리방법이 있지만 개인별 선호하는 방법을 택하여 RNA를 얻은 다음, agarose gel 전기영동과 흡광계를 이용하여 RNA의 양과 순도를 확인한다. Microarray는 다른 실험에 비해 매우 많은 양의 RNA가 필요하기 때문에 동물세포나 조직에서 얻은 RNA를 PCR방법을 이용하여 증폭하게 된다. 이 때, 분리된 RNA는 형광(Cy-3, -5 dNTP) 또는 방사성(³²P dNTP)표지를 넣어준 상태에서 cDNA로 역전사시킨다. 형광표지를 이용하는 경우 대조군 RNA에는 Cy-3 dNTP(붉은색), sample RNA에는 Cy-5 dNTP(녹색)를 넣어준다. 역전사시킨 cDNA로부터 염(salt), primer, detergents, PCR에 쓰인 단백질(효소), RNA 주형등을 제거한 후 정제된 cDNA를 적정온도(대략 60℃ 내외)에서 chip에 spotting된 DNA와 반응(hybridization)시킨 후 비특이적으로 결합한 cDNA들을 제거하고 공기중에서 말린다. DNA chip에

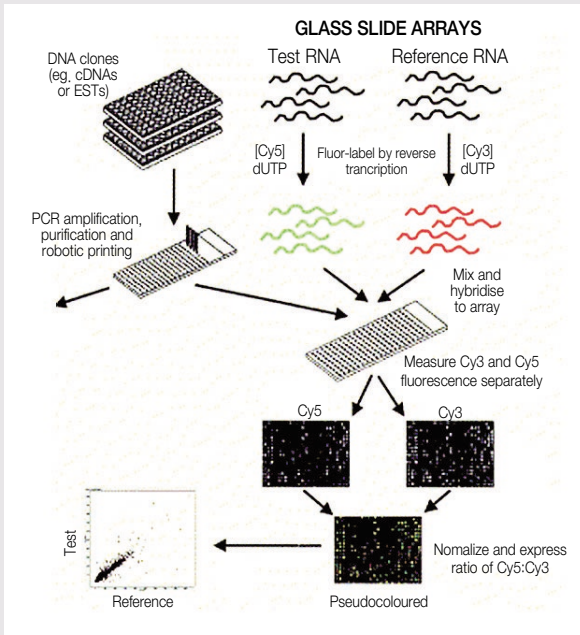


그림 2 DNA chip 기술

세포에서 얻은 DNA clone을 PCR로 증폭한 뒤 정제한다. 정제된 PCR products를 자동화기기를 이용하여 유리판에 spotting한다. oligonucleotides DNA chip을 만드는 경우 PCR product 대신 oligonucleotides를 직접 유리판 위에 합성한다. 각각 Cy3, Cy5로 표지된 대조군 DNA와 test DNA를 같은 유리판에 반응시킨 후 유리판을 씻어 여분의 DNA를 제거한다. 적절한 파장에서 형광을 측정하고 이에 대한 영상을 컴퓨터 프로그램으로 수치화 하여 test sample과 대조군 sample간의 유전자 발현정도를 비교한다.

spotting된 DNA와의 비특이적 결합을 줄이기 위해 일반적으로 SDS, sonicated salmon sperm DNA, tRNA, COT1 DNA등을 처리한다.

③ Image의 획득과 정량화

Laser scanner를 이용하면 각 유전자에 결합하는 cDNA들의 신호가 spot들의 집합형태로 나타난다. 형광표지를 이용하는 경우, 먼저 Cy-3에 의한 형광을 측정하여 대조군 cDNA에 대한 영상(image)을 얻고 Cy-5(green)의 형광을 측정하여 sample의 영상을 나중에 얻는다. 영상을 얻은 후 먼저 각 spot에 대한 유전자를 확인(identity)하고 soft program을 통해 각 유전자에 대한 spot의 밝기(signal intensity)를 수치화한다. 이 때, 너무 낮은 값이나 오염에 의한 값, 또는 spot보다 바탕이 높은 값들은 배제한다. sample 수치와 대조군 수치의 비율을 구하여 유전자 발현의 증감을 알아낸다.

④ Normalization

실험과정에서 생기는 오차는 결과분석에 중대한 영향을 끼치기 때문에 이 값을 최소화해야 한다. Normalization은 실험오차를 줄이기 위해 일정한 기준에 맞추어 수치들을 조정하는 것으로 대조군의 결과와 test sample의 결과를 비교하거나 같은 조건에서 실시한 다른 실험결과를 비교하기 위해 필요한 과정이다. Normalization에는 몇 가지 방법이 있다. 첫째, 발현변화가 없는 actin이나 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 같은 "house keeping" 유전자의 발현정도를 기준으로 삼아 나머지 유전자의 발현수치들을 조정하는 방법과, 발현변화가 없는 유전자그

룹을 기준으로 삼는 것이다. 대부분의 DNA chip 결과를 보면, 대다수의 유전자는 발현변화가 없는데 반해, 소수의 유전자에만 발현변화가 있을 것이다. 그러므로 발현변화가 없는 유전자들을 기준(발현증감 0)으로 하여 다른 유전자의 발현수치를 조정한다.

⑤ Data 분석

Normalization을 통해 data set이 만들어지면 의미있는 정보를 얻기 위해 data set을 분석한다. 먼저 대조군에 비해 발현정도가 최소 2배이상 차이나는 유전자들의 목록을 만든다. 그러나 이것만으로는 의미있는 결론을 얻을 수 없기 때문에 다른 조건, 예를들면 처리한 약물의 농도 또는 시간이 다른 sample에서 얻은 array 결과와 비교하여 특정상태에서 발현변화를 보이는 유전자들을 찾아낸다. 또한 발현패턴이 유사한 유전자들을 묶어 data를 재구성하는 방법을 이용하면 또다른 정보를 얻을 수 있다. 생물학적 기능은 여러 요소들의 복잡한 상호작용에 의해서 일어나기 때문에 이를 설명하기 위해서는 몇몇 특정유전자의 발현변화보다 특정상태에서 유사한 발현패턴을 보이는 유전자를 찾는 것이 도움이 될 것이다. 이같은 유전자의 경우 promoter의 조절요소(regulatory element)가 동일하거나 단백질로 발현되었을 때 복합체(complex)를 이루어 기능할 것이라 생각할 수 있고, 이러한 예측은 질병의 진단이나 약제의 개발등에 유용하게 이용된다.

3) 신약개발에의 활용

① DNA chip를 이용한 항암기전의 해석

증식신호이상이나 세포분열같은 활동이 정상적 통제를 벗어나면 세포는 암이 되며, 이런 변화는 세포의 성장과 사멸에 관여하는 유전자의 발현변화 때문에 일어나는 것으로 알려져 있다. 비정상적인 세포활동에 관여하는 특정 유전자의 발현변화를 확인하는 일은 약물의 표적분자를 결정하고 아울러, 약효를 증대시키는데 필수적이다. 암으로의 변형(transformation)에는 여러 유전자들이 관여하기 때문에 세포 전체에 걸친 유전자의 발현을 확인하는 것이 중요하게 인식되고 있으며, 이는 DNA chip를 이용하면 보다 빠르게 해결할 수 있다.

▶ 흉막세포(mesothelial cell)의 흉막암(mesothelioma)으로의 변형

비정상적 mesothelial 세포(mesothelioma)는 약물에 대한 저항성, 세포 이동, 거대분자(macromolecule)의 안정성, 세포분열, 세포의 부착력등에 관련된 유전자의 발현이 정상세포와는 많은 차이를 보인다. Mesothelioma 세포로의 변형은 이들 유전자 발현의 차이에 기인하는 것으로 인식되고 있다. DNA chip을 이용하여 유전자 발현을 조사했을 때 mesothelioma 세포에서 iodothyronine deiodinase의 mRNA가 과량으로 발현되어 있음이 보고됐다(Huang S.A. et al, 2000). 이 단백질은 selenium을 포함하는 것으로 알려져 있으며 또한, mesothelioma와 유사한 세포형을 나타내는 hemagioma 환자에서도 과량으로 발현되는 것으로 보고된 바 있다. 이 같은 결과는 iodothyronine deiodinase가 세포의 상태, 즉 특정조직의 정상세포가 암으로 변할 때 중요한 역할을 담당하고 있음을 알려주는 중요한 분자적 표지(marker)일 뿐 아니라, 유사한 세포형태(phenotype)을 나타내는 두 가지 암(mesothelioma, hemagioma)의 생리학적 특징을 결정하는데 중요한 인자임을 시사한다(Curcio C. et al, 2001).

▶ 암 발전 단계별 유전자의 변화

최근 질병의 단계별로 나타나는 특정 유전자의 발현이나, 질병에 걸린 환

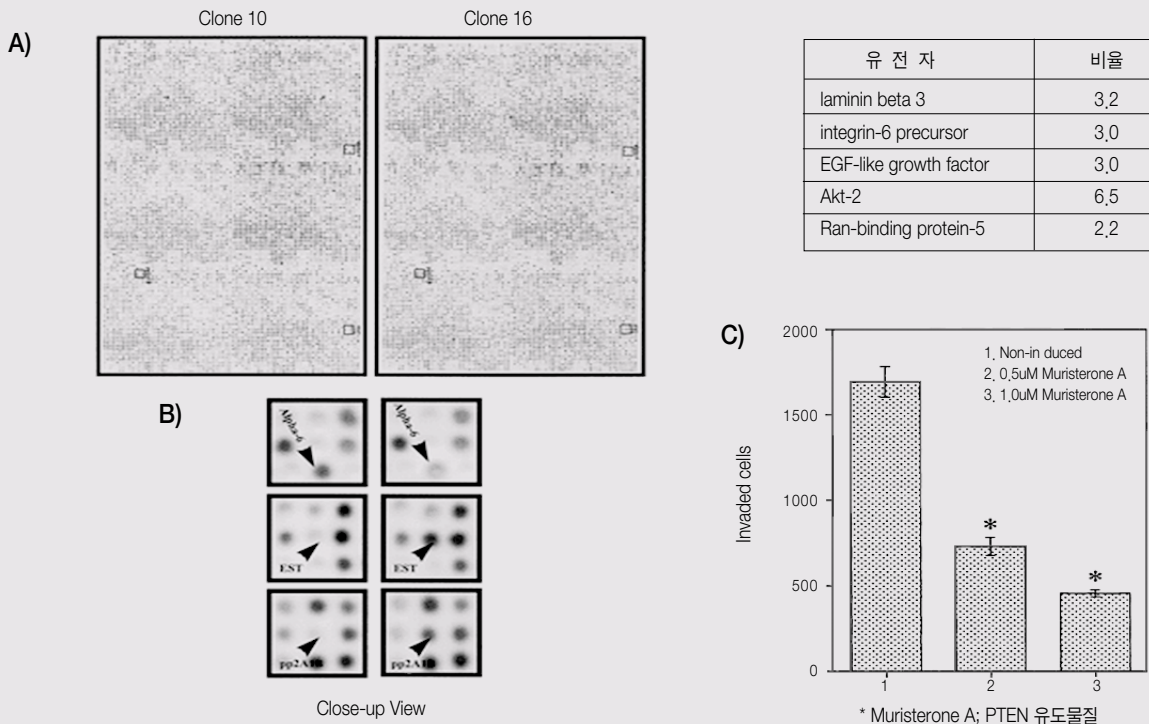


그림 3 PTEN 과다발현에 따른 전체 유전자발현패턴과 암세포 침윤억제 효과

- A. DNA chip을 이용하여 PTEN 과다발현 clone(clone 16)과 대조군(clone 10)의 유전자발현(9,600 DNA clone)을 조사하였다. 각각 5 μg의 mRNA를 추출하여 biotin-16-dUTP로 표지하고 DNA chip과 반응시킨 후 drum scanner를 통해 영상을 얻었다. 표는 PTEN에 의해 발현이 억제된 유전자들은 나열하였다.
- B. 확대한 그림
- C. PTEN이 과다발현 되도록 만들어진 세포에 PTEN발현 유도물질인 Muristerone A를 처리하였을 때, 세포의 침윤능력은 현저히 떨어진다.

자의 생존율과 밀접한 관계를 보이는 유전자의 존재가 제안되고 있다. 실제로 DNA chip을 활용한 연구로부터 인간 B세포의 만성적 lymphocytic leukemia 질병을 발병초기부터 전이형성 단계까지 살펴볼 때, 후기 단계에서 interleukin-1 beta와 early growth response protein-1 (EGR-1)의 발현이 감소되고, L-selectin, integrin beta-2, interleukin-1 beta, interleukin-8, EGR-1등의 발현감소와 동시에 성숙한 면역세포의 비정상화에 관여하는 oncogene인 TCL1 유전자의 과다발현이 환자의 생존율을 저하시킨다는 것이 보고되었다(Stratowa C. et al, 2001). 이런 표지(유전자)들은 환자의 질병상태 결정과 질병의 초기 발병유무를 진단하는데 효과적으로 이용될 수 있다.

▶ 이차적 표지(marker)의 발굴

특정 암관련 유전자를 과다발현 시켰을 때 변화되는 세포 유전자의 발현패턴을 DNA chip을 통해 확인하면, 이용하여 암과 관련된 이차적 표지(downstream marker)를 찾아내는데도 유용하게 쓰인다. 암억제 유전자인 phosphatase and tensin homology deleted on chromosome 10 (PTEN)의 과다발현은 세포의 기저막에 대한 부착과 인식에 관여하는 integrin alpha-6와 laminin beta-3의 발현을 억제하여 암세포의 침윤(invasion)능력을 감소시키는 것으로 보고되었다(Hong T.M. et al, 2000)(그림 3). 이같은 이차표지의 발굴은 환자에 대한 치료방법과 투여할 약제의 다양화를 꾀할 수 있을 뿐 아니라, 약제에 대한 독성과 부작용을 줄일 수 있다.

▶ 약물의 개발과 약물의 표적분자 확인

좋은 약물은 강한 효능과 표적분자에 대한 선택성을 가져야 하며, 따라서 약물이 표적분자의 기능을 억제함과 동시에 불필요한 이차효과를 발휘하는지 유무를 확인하는 것이 새로운 약물 개발시 필수적인 사항이다. DNA chip의 등장으로 약물처리시에 세포내 수많은 유전자발현을 단시간에 확인할 수 있게 되었고 또 생화학적 경로에 대한 정보가 없더라도 정상상태와 질병상태를 비교함으로써 다수의 조절 가능한 후보표적분자를 확인할 수 있게 되었다.

이같은 개념의 활용으로 최근 약학분야에유전체학(genomics)을 접목시키려는 움직임이 일고 있다. 약리유전체학(pharmacogenetics)이 그것인데 약물학과 신기술인 유전체학을 결합하여 개인의 유전성향이 여러 의약품에 대한 신체에 어떤 영향을 미칠 것인가를 연구하는데 초점을 맞추고 있다. 개개인 유전성향의 차이에 의해 약물의 대사와 반응이 각기 다르기 때문에 어떤 약이 더 효과적인지 또 부작용의 위험이 있는지를 알려주는 요인들을 이해하면 각 개인의 유전적 조성에 적합한 약물을 투여할 수 있을 것이다. 아울러, DNA chip을 통해 약물의 이차적 표적분자와의 결합으로 나타나는 부작용 또한 예측할 수 있다.

② Chemical genomics에의 응용

Chemical genomics는 유전자의 기능을 알아내기 위해 유전자를 돌연변이시켜 그 기능을 파악하는 기존의 방법 대신 작은 화학분자로 유전자의 산물인 단백질의 기능을 저해할 때 나타나는 세포의 특징들을 관찰함으로써 세포내 유전자의 기능을 알아내는 새로운 해석방법이다. 이를 위해서는

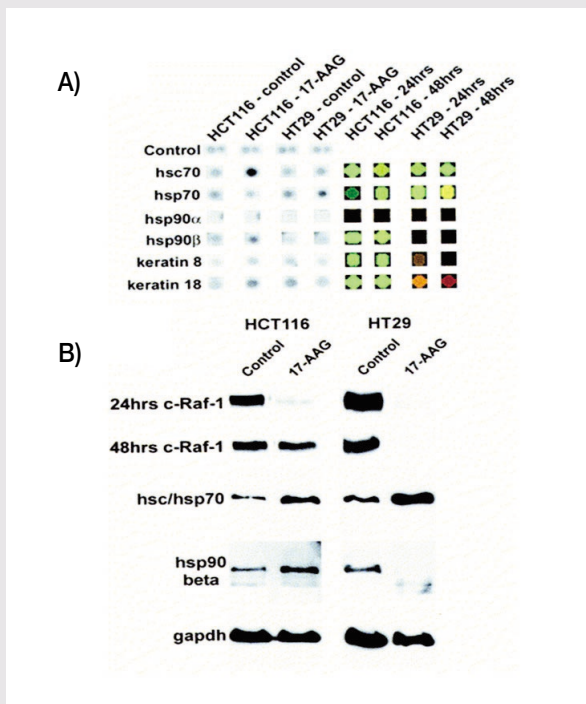


그림 4 약물처리 세포내 여러 유전자의 발현정도 확인
인간의 두 가지 대장암 세포에서 17AAG가 나타내는 생물학적 효과, 즉 RNA와 단백질의 세포내 발현에서 차이를 나타내고 있다.

A. 인간 대장암 세포주인 HT29, HT116에 0.5, 1M 17AAG를 72시간동안 처리하여 microarray를 실시하였다. 왼쪽의 결과(phosphorimage data)는 17AAG 처리 24시간에 얻은 것이고, 오른쪽의 결과는 시간별로 대조군에 대한 test sample의 발현정도(비율)를 나타낸 것이다. 녹색은 17AAG에 의한 발현 증가를, 노란색은 변화 없음을, 적색은 감소를 나타내며, 갈색이나 검정은 측정할 수 없음을 나타낸다.

B. 17AAG를 처리한 후 c-raf-1, hsc/hsp70, hsp90, 그리고 GAPDH의 발현을 western blotting을 이용하여 단백질수준에서 조사하였다. HCT116에서 c-raf-1은 24시간 후 발현이 억제되었지만, 48시간 후 다시 회복되었다. HT29에서 c-raf-1은 약물처리 24시간, 48시간 후 모두 감소되었다. 또한 Hsc/hsp70의 경우 두 세포주 모두에서 발현이 유도되었고, hsp90은 HCT116에서 발현 유도된 반면, HT29에서는 발현이 억제되었다.

먼저 화학분자가 특이적으로 결합하여 그 기능을 저해하는 표적분자(단백질)를 찾아야 한다. DNA chip를 이용하면 화학분자를 세포에 처리했을 때 나타나는 유전자의 발현패턴을 조사하여 화학분자의 표적을 효율적으로 예측할 수 있고, 표적분자를 저해했을 때 나타나는 세포표현형을 빠르고 보다 손쉽게 조사할 수 있다.

▶ 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG)에 의한 Hsp90의 저해효과 (그림 4, 5).

Hsp90의 저해제로 알려진 17AAG는 Hsp90와 관련된 주요 oncogene의 세포내 양을 감소시키는 효과를 나타내기 때문에 현재 항암제로서 임상에 시험되고 있다. 유전자나 단백질의 발현측면에서 볼 때, 약물에 대한 여러 가지 대장암 세포주의 반응이 서로 차이가 있는데, 이는 항암제에 대한 반응에 있어 세포내 단백질간의 연계(network)가 중요함을 알려준다. 흥미롭게도, 17AAG에 대한 내성이 있는 세포주에서는 Hsp90이 많이 발현되어 있는 반면, 매우 민감한 세포주의 경우 Hsp90가 적게 발현되어 있는

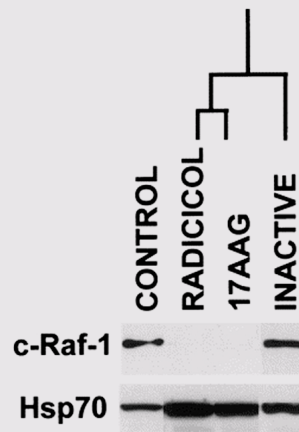


그림 5 표적분자의 효과검증(target validation)

Western blot을 이용하여 17AAG의 세포내 효과를 단백질수준에서 확인하였다. 동량의 17AAG, 17AAG의 비활성 유사체, 그리고 hsp90 억제제로 알려진 radicicol을 A2780 ovarian adenocarcinoma 세포에 처리하였을 때, 17AAG와 radicicol에 의해 c-raf-1의 발현이 억제된 반면, hsp70의 발현은 유도되었다. 그러나 17AAG 비활성 유사체의 경우 이러한 효과가 매우 미약하였다. DNA chip을 이용한 microarray 결과를 볼 때, 구조적으로 유사성이 없는 radicicol에 의한 유전자의 발현패턴이 17AAG와 유사한 반면, 17AAG 비활성 유사체의 경우 17AAG에 의한 발현패턴과의 유사성이 떨어졌다. 세 가지 약물에 의한 유전자 발현패턴의 연관성은 그림 위의 dendrogram으로 표시하였다.

것으로 나타났다. 뿐만 아니라 이들 세포주들은 약물처리 신호전달관련 유전자나 세포골격관련 유전자의 발현에도 많은 차이를 보이는 것으로 나타났다(Clarke P.A et al, 2000). 즉, 모든 세포주에서 Hsp70 family의 발현이 유도되는 반면 c-Raf-1의 RNA발현이 감소되었고, 이러한 결과는 western blot을 이용하여 단백질수준에서의 변화도 확인하였다. 그림 5는 Hsp90의 저해제로 알려진 radicicol과 비활성형태의 17AAG를 처리하여 17AAG가 실제로 Hsp90의 기능을 억제하는지를 알아본 결과이다. 17AAG와 radicicol에 의해 Hsp70 발현이 증가되고 c-Raf-1은 감소했으나 비활성형태인 17AAG에서는 그러한 효과가 보이지 않는 것으로 볼 때, 17AAG의 표적분자는 Hsp90임을 추정할 수 있다. 이처럼 DNA chip과 기존의 분자생물학적 연구법을 같이 이용하면 약물의 세포내 표적분자의 확인이 가능하고 약물 저해에 의한 세포의 표현형을 분자수준에서 알 수 있으며, 이러한 정보는 신약개발에 유용하게 활용될 수 있다.

▶ FK506의 표적분자결정

또 한 가지 DNA chip을 chemical genomics연구에 접목시킨 대표적인 예는 면역억제제로 장기이식수술시 면역거부반응완화제로 활용되는 FK506의 표적분자인 calcineurin의 결정을 들 수 있다(Marton M.J. et al, 1998). Calcineurin은 칼슘과 calmodulin에 의해 활성화되는 serine/threonine 단백질 탈인산화효소로서, 세포내 이온 항상성을 유지시키고 세포분열의 시작을 조절하며, T-세포 활성화, apoptosis등에도 관여한다. 면역억제제인 FK506-결합단백질(FKBP)에 의해 calcineurin은 선택적으로 저해되어 면역기능인자의 발현을 조절한다. FK506의 세포활성을 알아보기 위해 FK506을 처리한 정상세포와 calcineurin의 활성부위를 돌연변이화 시킨 세포에서 cDNA를 얻어 유전자 발현패턴을 측정할 결

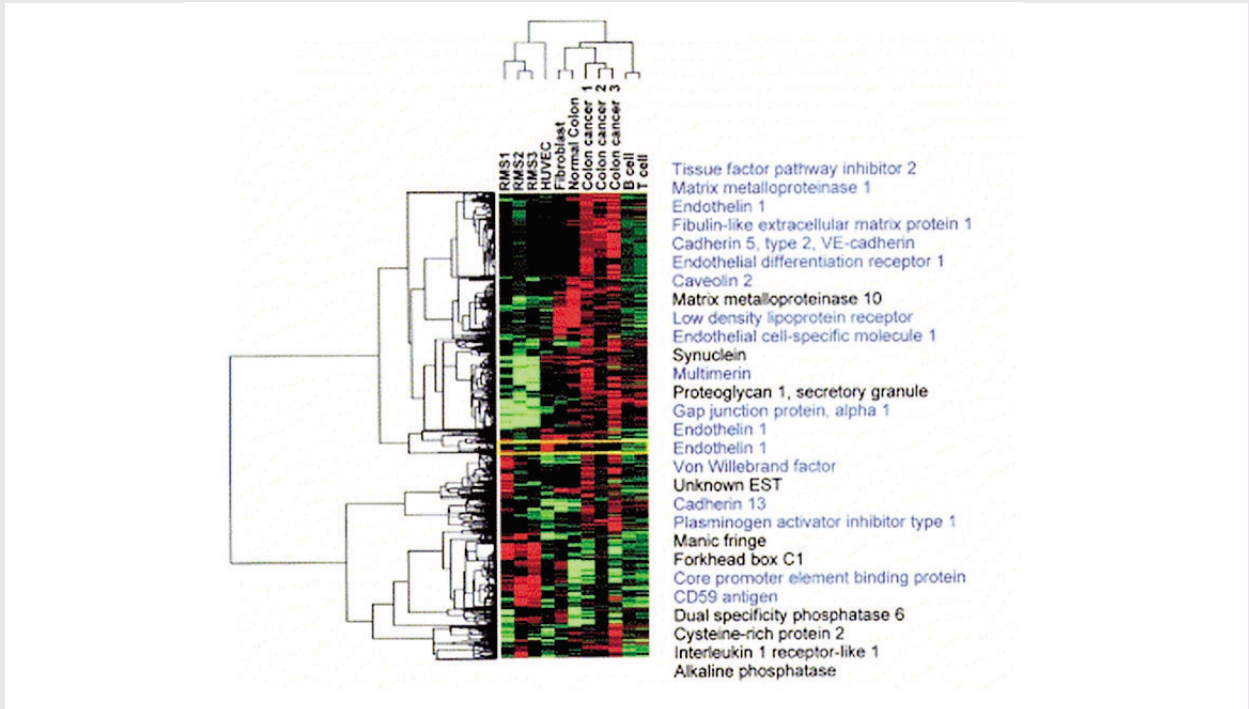


그림 6 Microarray 결과의 그룹화

Human umbelical vein endothelial cells (HUVEC), normal fibroblasts, B cells, T cells, 정상 bowel biopsy, 세 가지 rhabdomyosarcoma 세포, 그리고 세 가지 대장암세포에서 mRNA를 추출하여 4132개 DNA clone에 대한 microarray결과를 얻었고, 모든 세포에 발현되는 유전자를 기준으로 normalization하였다. 모든 수치는 대조군에 대한 비율로 나타내었고 그룹화를 통해 재분석하였다. 그림은 전형적인 그룹화의 결과로 녹색신호는 중간(median)보다 낮은 값을, 적색은 중간보다 높은 값을, 그리고 검정색은 중간과 같은 값을 나타낸다. 그림 옆의 목록은 endothelial 세포에서 발현변화를 보이는 유전자들이며, 청색으로 표시된 목록은 endothelial 세포에서 특징적인 역할을 담당하거나 그 발현이 다른 세포에 비해 endothelial 세포에서 억제되어 있거나 유도되어 있는 유전자들을 나타낸다.

과, 두 sample의 유전자 발현패턴이 유사한 반면, calcineurin이외의 유전자를 돌연변이시킨 세포의 유전자 발현패턴과는 많은 차이를 나타내었다. 이는 FK506가 FKBP와의 결합을 통해 calcineurin의 활성을 억제하여 나타나는 결과로서 화학분자를 이용하여 표적분자의 기능을 억제하는 것이 표적분자의 유전자를 돌연변이시켜 그 기능을 억제하는 것과 같은 효과를 낸다는 것을 증명하는 좋은 예이다.

4) 생명과학연구에의 활용

① 유전자 발현패턴 확인

DNA chip을 이용해서 얻을 수 있는 정보 중 가장 핵심이 되는 것은 특정 유전자의 발현변화를 효율적으로 알 수 있다는 것이다. 즉, 유전자의 발현은 미생물, 식물, 동물별로 다르고 같은 세포라 하더라도 세포의 상태나 외부의 자극에 의해 유전자 발현패턴이 달라진다. DNA chip에서 얻은 결과는 하나의 sample을 다른 sample과 비교하는 정적인(static) 결과와 시간경과에 따른 발현변화를 관찰하는 역동적(dynamic) 결과가 두 가지로 나눌 수 있다. 질병에 걸린 sample과 정상 sample을 비교하는 것이 전자에 속하고 질병의 발전 단계별 또는 세포에 자극을 주는 시간에 따른 결과를 비교하는 것이 후자의 예이다.

여러 실험조건에서 얻을 수 있는 유전자의 발현패턴 결과를 database화하여 개별 실험에서 얻은 유전자의 발현패턴을 비교, 검증하면 병원성 미생물의 검사나 동식물의 품질상태 점검등에도 다양하게 응용할 수 있다. 이

미 많은 미생물의 염기서열이 밝혀지고 있으며 본 연구결과를 이용하여 미생물의 유전자 검색 또한 쉽게 이루어질 수 있을 것이다. 실제로, 모든 게놈 구조가 밝혀진 결핵균은 우리나라뿐만 아니라 미국에서도 AIDS환자사에서 많이 발병하며 또한 항생제의 오용으로 내성을 가진 종이 많아지고 있다. 이러한 요인으로 난치성 결핵환자의 원인균으로 최근 문제가 되고 있는 비결핵 마이코박테리아의 균주를 빠른 시간내에 환자로부터 찾아내고 어떠한 항생제에 내성을 가졌는가를 밝히는 일이 매우 중요하다. 기존의 병원성 세균동정검사는 많은 시간과 경비가 소요되기 때문에 병원성 미생물 검색용 DNA chip을 이용한 microarray의 시장성은 높다고 할 수 있다. 이렇게 개발된 DNAchip은 병원뿐만 아니라 동, 식물 및 식품검역소, 환경오염등에도 쓰여질 수 있을 것이다.

② 유전자 기능의 예측

유사한 발현패턴을 보이는 유전자들은 대개 해당과정같은 생물학적 경로(pathway)에서 기능적으로 관련이 있는 것으로 생각되며 또, 이들은 유전적인(co-regulated) 메카니즘에 의해 조절된다. 동일한 조건에서 여러 번의 실험으로 얻어진 유사한 발현패턴의 유전자를 그룹화함으로써 유전자의 기능을 예측할 수 있다(그림 6).

실례로 DeRisi등은 효모에서 유전자의 발현차이로 혐기적 성질에서 호기적 성질로의 일시적 변환(diauxic shift)을 관찰하였다. 이들은 DNA chip을 통해 일시적으로 발현패턴이 변하는 유전자를 찾아내고 유사한 패턴을

나타내는 유전자들을 그룹화하였다. 그 결과, 호기적 성질로 일시적으로 변환하는 동안 cytochrome-c 관련 유전자, TCA/ glyoxalate cycle 관련 유전자들, 탄화수소 저장에 관련한 유전자들의 발현이 공통적으로 유도됨을 밝혀냈다(DeRisi J.L., et al., 1997).

이같은 방법으로 알려지지 않은 유전자의 발현패턴을 이미 알려진 유전자의 발현패턴과 비교함으로써 세포내 역할이 알려지지 않은 유전자의 기능도 예측할 수 있을 것이다.

③ 돌연변이 및 다형성(polymorphisms)의 진단

인간의 DNA 염기서열은 약 0.1%(핵산 3,000,000개에 해당)정도 개별 다양성을 갖는데, 이를 다형성이라 하며 개개인의 모든 차이를 만드는 원인이 된다. 현재 휴먼게놈프로젝트에서 몇 명의 선택된 사람을 대상으로 한 분석에 따르면, 대략 1,000염기쌍마다 하나씩 변이가 발견되는 것으로 알려져 있지만 사람간 대립유전자(allele)의 차이나 반복수(repeating number)의 차이와 인종간의 차이까지 고려한다면 이보다 더 높은 변이를 가질 것으로 추정하고 있다. 이러한 다형성은 키, 피부와 머리색, 성격뿐 아니라 인간의 질병과도 연관되는데, 개인별 질병에 대한 저항성, 민감도가 다르기 때문에 같은 질병이라 해도 개개인이 나타내는 질병의 징후나 치료 결과에 현격한 차이를 나타낸다. 이는 치료제의 독성을 줄이고 유효농도를 정하는데 도움을 줄 수 있기 때문에 시술자로 하여금 환자 개개인에 맞는 맞춤진료(tailor-therapy)를 실시할 수 있도록 할 것이다.

④ 세포별 또는 질병에 특이적인 분자적 표지(molecular marker)

세포는 특정한 외부 신호에 따라 유전자를 발현하기 때문에 신호에 따른 유전자의 발현패턴은 세포나 조직의 지문(finger printing)으로 생각될 수 있다. 이러한 분자생물학적 지문은 cell의 대사상태, 질병의 구분, *in vivo* 와 *in vitro*에서의 실험차이를 알아내는데 좋은 도구(tool)로 쓰일 수 있다. 아울러 같은 질병이라든 표현형사이에 큰 차이를 보이는 특정유전자의 발현패턴을 관찰하면 질병을 좀 더 작은 단위로 세분화할 수 있다(Golub T.R. et al. 1999). 예를 들어, non-Hodgkin's lymphomas에 두 가지 형태가 존재한다는 것(Alizadeh A.A. et al. 2000)과, 주로 피부에 생기는(cutaneous) melanoma와 전이가 잘 되는 형태의 melanoma가 있다는 것(Bittner M. et al. 2000), 그리고 상피세포와 유방암 세포의 유전자 발현이 확연히 구분될 수 있음은 모두 DNA chip 결과를 이용하여 밝혀진 사실들이다. (Perou C.M., et al. 1999; Perou C.M. et al. 2000). 이외에도 다양한 sclerosis, Alzheimer's disease, viral hepatitis등의 현상을 확인하는데 이용할 수 있다(Whitney L.W. et al. 1999; Hanzel D. K. et al. 1999; Han J. et al. 2000).

■ 결론

20세기 후반에 접어들면서 생명과학의 발달로 암이나 질병의 원인으로 유전자가 관여한다는 것이 밝혀진지 오래되었고 병원성 세균의 감염여부 및 항생제 내성검사, 신약개발, 유전자의 기능연구, 범죄자확인 및 친자확인 등 많은 부분에 DNA와 유전자감식기술이 이용되고 있다. 지금까지는 이러한 사실을 밝히기 위하여 DNA sequencing, southern blotting등이 이용되었으나 이러한 기술을 사용하여 한 번에 여러 개의 유전자발현변화나 돌연변이를 확인한다는 것은 쉽지 않았다. 하지만 DNA chip을 통한 genome차원에서의 유전자 확인은 유전자발현 청사진을 효율적으로 제공함으로써 과학기술적인 측면뿐만 아니라 인류의 건강과 생명의 신비를 해

석하는데 결정적인 기여를 할 것이다. 처음 게놈연구를 시작할 때 대부분의 사람들은 모든 유전자가 밝혀지더라도 그들의 모든 성질을 밝히는데 최소 100년이 걸릴 것이라고 추측했지만, DNACHIP을 이용한 신기술의 등장으로 이 시간은 많이 단축되리라고 생각되며, 가까운 미래에 우리는 유전정보에 대한 청사진을 가지고 난치병 치료에의 획기적인 전기를 맞이하게 되리라 전망한다.

【참고문헌】

- 1) Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E. et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**:503-511.
- 2) Bittner M., Meltzer P., Chen y. et al. (2000) Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* **406**:536-540.
- 3) Clarke P.A., Hostein I., Bnerji U. et al. (2000) Gene expression profiling of human colon cancer cells following inhibition of signal transduction by 17-allylamino-17- demethoxygeldanamycin, an inhibitor of the Hsp90 molecular chaperone. *Oncogene* **19**:4125-4133.
- 4) Cohen B. The chipping forecast. (1999) *Nat. Genet.* **21**:1-60.
- 5) Curcio C., Baqui M.M., Salvatore D. et al. (2001) The human type 2 iodothyronine deiodinase is a selenoprotein highly expressed in a mesothelial cell line. *J. Biol. Chem.* **276**:30183-30187.
- 6) DeRisi J.L., Iyer V.R., Brown P. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**:680-686.
- 7) Eisen M.B., Brown P.O. (1999) DNA array for analysis of gene expression. *Methods Enzymol.* **303**:179-205.
- 8) Golub T.R., Slonim D.K., Tamayo P. et al. (1999) Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene monitoring. *Science* **286**:531-537.
- 9) Han J., Yoo H.Y., Choi B.H. et al. (2000) High-throughput quantitative histological analysis of Alzheimer's disease pathology using a confocal digital microscanner. *Nat. Biotechnol.* **17**:53-57.
- 10) Harding M. W., Galat A., Uehling D. E., et al. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. (1989) *Nature* **341**: 758-760.
- 11) Hanzel D.K., Trojanowski J.Q., Johnston R.F. et al. (1999) Selective transcriptional regulations in the human liver cell by hepatitis B viral X protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**:525-530.
- 12) Hegde P., Qi R., Abernathy K., Gay C., et al. (2000) A concise guide a cDNA microarray analysis. *Biotechniques* **29**:548-562.
- 13) Hong T.M., Yang P.C., Peck K. et al. (2000) Profiling the downstream genes of tumor suppressor PTEN in lung cancer cells by complementary DNA microarray. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**:355-363.

- 14) Huang S.A., Tu H.M., Harney J.W. *et al.* (2000) Severe hypothyroidism caused by type 3 iodothyronine deiodinase in infantile hemangiomas. *N. Engl. J. Med.* **343**:185-189.
- 15) Hughes T.R., Marton M.J., Jones A.R. *et al.* (2000) Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* **102**:109-126.
- 16) Marton M. J., Derisi J.L., Bennett H. A. *et al.* (1998). Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays.
- 17) Perou C.M., Feffery S.S., van de Rijn M. *et al.* 1999. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**:9212-92117.
- 18) Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**:747-752.
- 19) Pilarsky C.H., Schmitt A. O., Dahl E., Rosenthal A. (1999) Microarrays: changes and challenges *Curr. Opin. Mol. Ther.* **1**:727-736.
- 20) Stratowa C., Loffler G., Lichter P. *et al.* (2001). cDNA microarray gene expression analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia proposes potential new prognostic markers involved in lymphocyte trafficking. *Int. J. Cancer* **91**:474-480.
- 21) Whitney L.W., Becker K.G., Tresser N.J. *et al.* (1999) Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using DNA microarrays. *Ann. Neurol.* **46**:425-428.



권호정 (kwonhj@sejong.ac.kr)

이학박사
세종대학교 생명공학과

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 1980. 3. ~ 1984. 2. | 서울대학교 (학사) |
| 1990. 4. ~ 1992. 3. | 동경대학교 생명공학과 (석사) |
| 1992. 4. ~ 1995. 3. | 동경대학교 생명공학과 (박사) |
| 1995. 4. ~ 1998. 3. | 미국 하버드 대학교 박사연구원 |
| 1999. 9. ~ 현 재 | 세종대학교 생명공학과 부교수/학과장 |