

Clontech™ Ab Microarray 500를 이용한 Mantle Cell Lymphoma(MCL)의 프로테옴 분석

Irene M. Ghobrial^{1,2} M.D., Daniel J. McCormick, Ph.D., Scott H. Kaufmann, M.D., Alexey A. Leontovich, Ph.D., David A. Loegering, Nga T. Dai, M.D., Kelly L. Krajnik, Mary J. Stenson, Mona F. Melhem, M.D., Anne J. Novak, Ph.D., Stephen M. Ansell, M.D., and Thomas E. Witzig, M.D.

1 Division of Hematology, Department of Internal Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN.

2 Irene M. Ghobrial's current address: University of Pittsburgh, Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, PA

Clontech™ Ab Microarray 500를 이용하여 정상적인 편도선 조직과, 조직학적 분석을 통해 non-Hodgkin's lymphoma의 한 유형인 Mantle Cell Lymphoma(MCL)로 진단된 일곱 명에서 확보한 lymphocytes의 단백질 발현패턴을 분석 비교하였다. 67%의 정상적인 B lymphocytes와 비교하여 최소 두배 이상의 단백질 발현양 증가 양상이 관찰되었다. 발현증가를 보인 전체 polypeptide 중 13종류만 Immunoblotting과 immunohistochemistry를 이용하여 발현양 변화를 확인할 수 있었다는 점은, 보다 정확한 분석방법 선택의 중요성을 증명한다. 본 연구에서는 Mantle Cell Lymphoma(MCL)에서 단백질 발현에 영향을 받는 유전자를 밝히는 새로운 기술을 소개하고 있다.

개요

단백질을 정량적으로 분석하기 위하여 1차원 또는 2차원적인 전기영동방법, Immunoblotting, ELISA, 방사성동위원소를 이용한 면역분석방법(RIAs: Radioimmunoassays) 등의 방법이 일반적으로 사용되었다. 2D gel을 이용한 방법은 시간과 비용면에서 비효율적이며 재현성이 낮은 단점이 있고(1), 세포에서 단백질을 추출하여 분석하는 대부분의 방법들은 그다지 효과적이지 못하다. 최근에는 단백질 발현변화 분석을 위한 바이오칩 방식의 연구방법들이 개발되어 큰 진보를 가져왔고, 이는 최소량의 시료를 통해 보다 적은 비용과 짧은 시간을 들여 포괄적인 proteomic 분석을 가능하게 한다(2). Clontech™ Ab Microarray 500과 같이 항체를 이용한 방식의 protein microarray는 사람의 다양한 단백질에 대한 monoclonal antibody가 spotting 되어 있는 slide glass 위에 세포에서 추출한 단백질을 처리하여 polypeptide의 차이를 직접적으로 구별하여 감지한다(3). 세포에서 추출한 단백질에는 형광물질이 결합되어 있어서 쉽게 분석할 수 있다.

Clontech™ Ab Microarray 500를 이용하여 정상인 경우와 Mantle Cell Lymphoma(MCL) 환자에서 단백질 발현 양상의 차이를 조사하였다. Array를 이용하여 발견한 단백질의 발현양이 증가한 13종류 단백질은 다시 immunoblotting과 immunohistochemistry를 통해 검증하였다. 비정상적인 발현양상을 보이는 이 단백질들은 앞으로 MCL의 치료물질 개발을 위한 target으로 주목할 수 있으며, 이 연구에 대한 보다 자세한 자료는 다음의 자료를 참조하기 바란다(4).

잠재적인 MCL 치료제 타겟물질의 선정

분석에 이용된 7종류의 MCL 시료 중에서, 여섯 개가 유사한 형태의 단백질 발현 패턴을 나타내는 것을 확인하였다(그림 1). 이런 비슷한 발현양상에 근거하여, 정상조직에 비하여 2배 이상의 발현을 나타내거나 오히려 감소하는 단백질을 Ab Microarray 500를 이용하여 분석하였고, 이 종류 시료 중 4 종류(67%)에서 동일한 양상을 보이면서 두 배 이상 발현이 증가된 13개의 polypeptide를 선별할 수 있었다. 이 13종의 polypeptide는 MCL 세포에서 정상 편도선의 B lymphocytes와 비교하여 모두 발현양이 증가하고 있었는데, 여기에는 MDM2과 RCC1와 같은 세포주기 조절인자, Hsp10 나 Hsp90와 같은 chaperone 계열 단백질, 그리고 AKAP149, PP5, Inhibitor 2, 또는 CR1K 등을 포함하는 phosphatase/kinase 조절인자 등이 포함되어 있다.

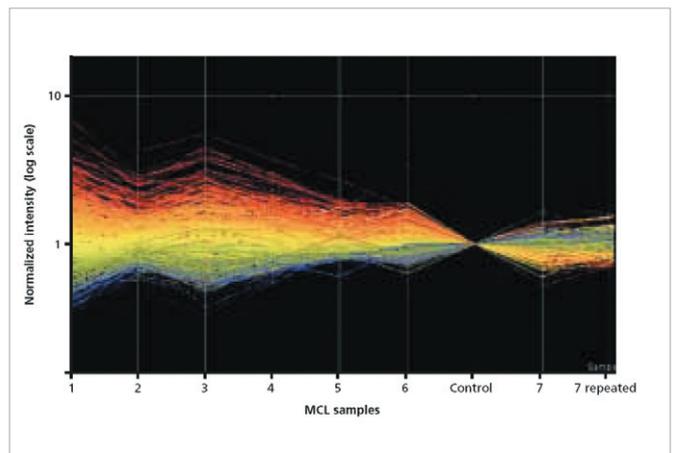


그림 1. Clontech™ Ab Microarray 500를 이용한 발현 단백질의 분석.

Dual-label 되어 있는 정상 또는 종양조직의 B lymphocytes의 단백질을 antibody array와 함께 반응시킨 후에 분석하였다. 분석방법은 Clontech Ab Microarrays User Manual(PT3648-1)에 따라 하였고, 결과는 GeneSpring software(Agilent Technologies, Inc.)를 이용하였다. 세로축은 normalized intensity를 log scale로 표시하였다. Data point의 각각의 색깔은 단백질 발현수준을 나타내는데, 정상 조직의 대조군 발현양과 비교하여 상대적으로 낮은 수준은 파랑색으로, 그리고 높은 수준은 빨간색으로 표시되고 있는데, 13 종류의 단백질의 발현이 대조군에 비하여 두 배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었다.

Clontech™ Ab Microarray 500로 확보한 실험결과의 검증

Clontech Ab Microarray 500를 통해 얻은 단백질 발현양상을 검증하기 위하여 western blot(immunoblotting)과, immunohistochemistry를 이용하여 재현성을 확인하였다. 그 결과, 대부분의 MCL 시료에서 RCC-1, p43/EMAPII precursor, caspase- 7, Inhibitor 2 등 단백질의 발현양이 정상적인 B lymphocytes에 비해 증가하고 있음을 확인할 수 있었고, antibody array 실험결과에서 변화가 없던 Rb2 와 procaspase-8의 발현양은 동일한 것으로 관찰되었다(그림 2).

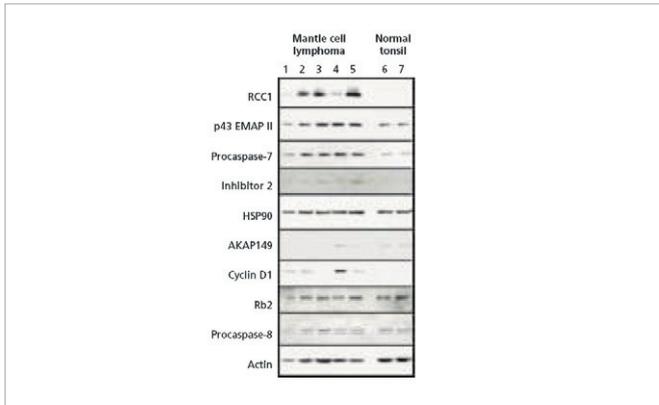


그림 2. Western blotting 을 이용한 Clontech™ Ab Microarray 500 결과의 검증
정상적인 갑상선의 B lymphocytes 단백질은 6, 7 lane에 전기영동하였고, MCL 단백질은 1-5 lane에 나타내었다. Blotting한 단백질은 각 monoclonal Ab와 결합시켰고 (anti-RCC1, p43/EMAPII precursor, procaspase-7, Inhibitor 2, Hsp90, AKAP149, cyclin D1, Rb2, 그리고 procaspase-8), actin의 발현양으로 동량의 단백질이 전기영동 되었음을 확인하였다. 정상조직과 비교하여 확연한 차이를 나타내는 나머지 lymphocytes 단백질의 발현양상과는 대조적으로, Hsp90과 AKAP149는 western blot으로는 발현양의 차이를 나타내지 않는다는 점을 확인하였다.

Array를 이용한 실험결과들은 대부분 다른 실험을 통해 검증하지만, Hsp90나 AKAP149의 경우와 같이 Array 방법만을 이용하여 단백질 발현양의 차이를 확인하는 것은 정확하지 않을 수 있으므로 다른 확인실험이 필수적이다. Immunohistochemistry를 통한 검증에서도 알 수 있듯이(그림 3), Array 방법에서 발현양이 두 배 가량 증가한 것으로 확인되었던 단백질들 중, paraffin-embedded tissue에서 CRİK와 MDM2의 발현증가는 재현되었으나, Hsp90는 확인되지 않았다. 한편, Bcl-xL, paxillin, Rb-2와 KU-80의 발현패턴의 변화는 두 가지 방법 모두에서 관찰되지 않았다.

결론

본 고에서는 정상세포와 비정상적인 상태의 세포의 차이를 분석할 수 있는 매우 유용한 실험방법인 Clontech™ Ab Microarray 500를 소개하였다. 연구결과와 같이 immunoblotting 또는 immunohistochemistry 등의 다른 검증실험을 통해 확인하는 작업은 필요하며, 본 연구에서는 MCL에서 발현증가 양상을 보이는 RCC1(세포주기 조절 인자), MDM2(p53 조절인자), Inhibitor 2(phosphatase 조절인자), 그리고 CRİK 등과 같은 다양한 단백질을 확인할 수 있었다. MDM2와는 다르게, 다른 나머지 단백질들과 MCL의 연관성은 아직 알려진 바가 없으며, 이러한 연구결과들이 임상적인 치료효과를 얻는 데까지 이어지기 위해서는 앞으로도 많은 연구들이 진행되어야 할 것이다.

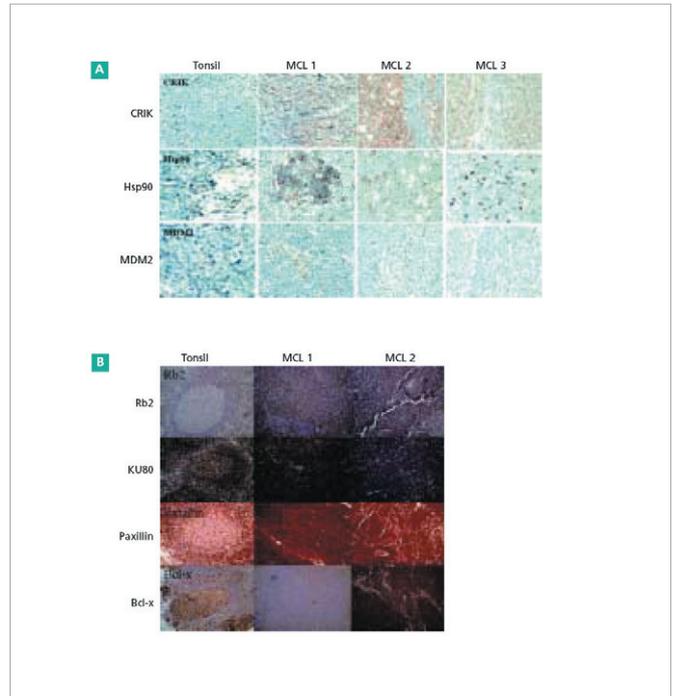


그림 3 Immunohistochemistry를 통한 Clontech™ Ab Microarray 500 analysis 결과의 검증.

파라핀 포매된 조직의 절편은 각각의 단백질에 대한 항체와 반응시킨 후 Olympus IX70 inverted microscope(20 x/0.40 에서60 x/0.70까지 가능한 objective lense 장착)를 이용하여 관찰하였다. 관찰된 이미지는 MagnaFire digital camera(Model No. 599806)와 MagnaFire software(version 4.1)를 이용하여 확인하였다. Array에서 결과와 마찬가지로, CRİK와 MDM2의 발현양은 증가하였고, Hsp90의 발현 변화는 관찰되지 않았다.

[관련제품]

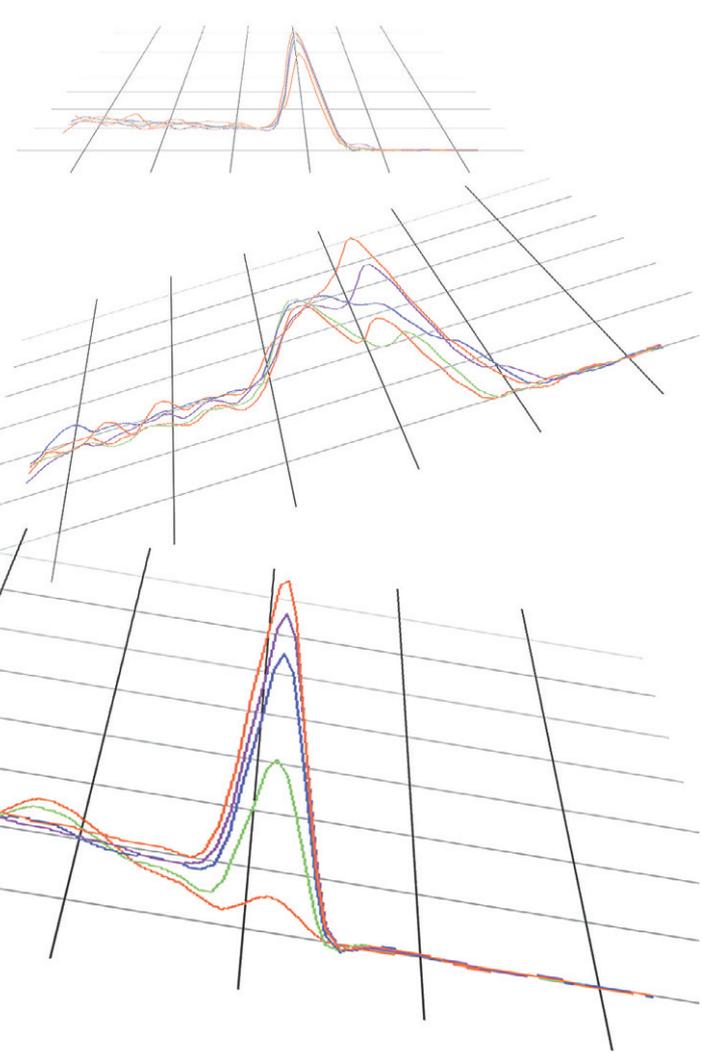
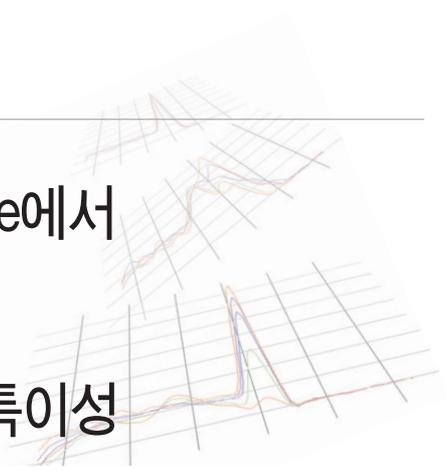
제품명	Size	Code
Clontech Ab Microarray 500	2 매	631790
Clontech Ab Microarray Buffer Kit	1 개	631791

[참고문헌]

- Hamdan, M. & Righetti, P. G. (2003) *Mass Spectrom. Rev.* 22(4):272-284.
- Zhu, H. & Snyder, M. (2003) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7(1):55-63
- Clontech Bioinformatics Ab-Array info 1.0, <http://bioinfo.clontech.com/abinfo>
- Ghobrial, I. M., et al. (2005) *Blood* 1;105(9):3722-3730.

Perfect Real Time 시리즈 !

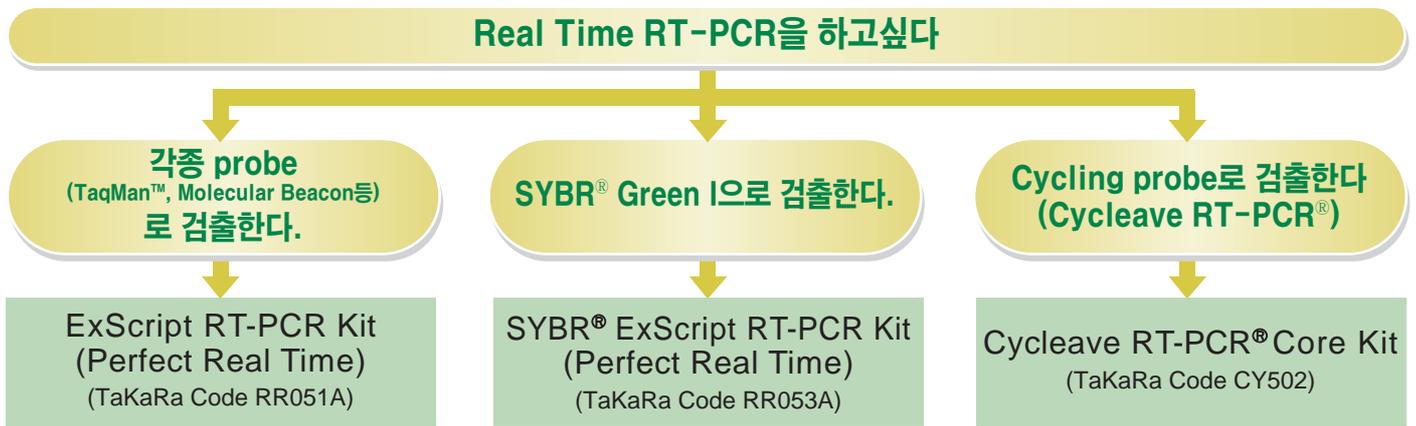
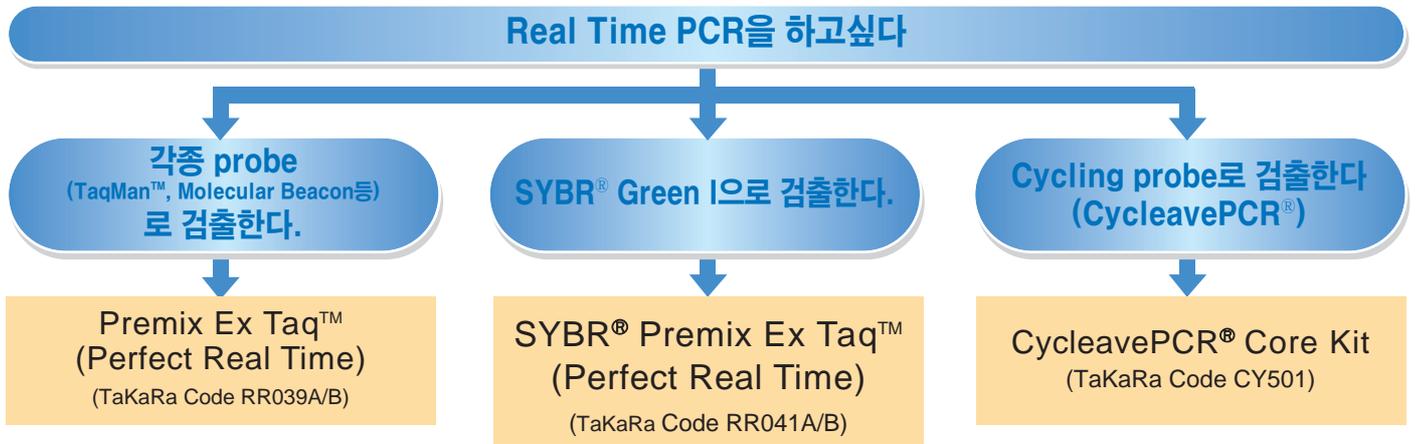
- 모든 회사의 Real Time PCR Machine에서
고도의 특이성 발휘
- *TaKaRa Ex Taq HS*를 이용한 높은 특이성
- 간단하고 편리한 Premix type



TaKaRa

Real Time PCR용 제품선택 Guide

- Perfect Real Time 시리즈의 제품은 각사의 Real Time PCR 장치에 대응이 가능하다 (ROX Reference Dye I, II 첨부).
- Cycling probe를 사용하는 제품은 Smart Cycler® System에 최적화되어 있다.



ExScript RT Reagents (TaKaRa Code RR035A)와 *Premix Ex Taq™* (Perfect Real Time) (TaKaRa Code RR039A), 또는 SYBR® *Premix Ex Taq™* (Perfect Real Time) (TaKaRa Code RR041)을 조합한 Real Time RT-PCR용 Core Kit이다. mRNA의 발현해석을 신속하고 정확하게 수행할 수 있다.



**Real Time PCR/RT-PCR
용의 primer, cycling probe
등의 설계 · 합성 수탁서비스
를 제공하고 있다.**

Real Time PCR 관련 신제품

제품명	TaKaRa Code	용량
Real Time PCR		
SYBR® <i>Premix Ex Taq™</i> (Perfect Real Time)	RR041A	1 ml × 5개 (50 µl 반응 × 200회)
<i>Premix Ex Taq™</i> (Perfect Real Time)	RR041B (A × 2)	1 ml × 10개 (50 µl 반응 × 400회)
	RR039A	1 ml × 5개 (50 µl 반응 × 200회)
	RR039B (A × 2)	1 ml × 10개 (50 µl 반응 × 400회)
Real Time RT-PCR		
SYBR® ExScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)	RR053A	200회
ExScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)	RR051A	200회
One Step SYBR® RT-PCR Kit (Perfect Real Time)	RR046A	100회
One Step RT-PCR Kit (Perfect Real Time)	RR044A	100회

TaKaRa PCR Related products are sold under licensing arrangements with F. Hoffmann-La Roche Ltd., Roche Molecular Systems, Inc. and Applied Biosystems.

Hot Start PCR: Licensed under U.S. Patent 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

Cycleave 관련제품은 Epoch Biosciences, Inc. 보유특허 (US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830)의 license 하에 제조 · 판매하고 있으며, 본 제품과 관련기술에 관한 권리는 상기 특허가 영향을 미치는 범위에서 Epoch Biosciences, Inc.에 속한다. 상업용으로 license는 포함하지 않고 있기 때문에 상업적인 목적으로의 사용에는 Epoch Biosciences, Inc.로부터 별도의 license가 필요하다.

TaKaRa는 Cycling probe법 및 DNA-RNA-DNA chimera형 핵산기술의 license를 ID Biomedical사로부터 받고, Cycling probe 및 Cycling probe를 사용하는 각종 CycleavePCR® Kit를 제조판매하고 있다.

SYBR® Green 관련제품은 Molecular Probes Inc.로부터 SYBR® Green I의 연구용 시약으로서 license를 받아 TaKaRa Bio Inc.가 제조판매하고 있다.

- 기재된 회사명 및 제품명은 특별한 기재가 없어도 TaKaRa 또는 다른 회사의 상표이거나 등록상표입니다.
- 본 카탈로그에 기재된 제품은 모두 연구용 목적으로만 판매하고 있습니다.