

Smart Cycler® II system을 이용한 PNA-LNA PCR clamp로 EGFR 변이 검출 시스템 개발

머리말

폐암은 현재 일본인 남성암 사망 원인 중 1위를 차지하고 있으며, 이미 진행된 폐암은 치유가 힘들어, 여러가지 복합적인 치료를 하더라도 대부분의 환자가 1년 만에 사망한다. Gefitinib(Iressa®)은 상피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor: EGFR)인 tyrosine kinase 활성 억제제로, 일부 폐암, 특히 비흡연 여성의 선암(adenocarcinoma)에서 뚜렷한 효과를 나타내는 반면, 약 0.5%의 환자에게선 심각한 간질성 폐렴이 발병한다. 2004년 폐암 세포에서 EGFR 유전자 이상과 Gefitinib 감수성이 거의 완벽하게 일치하는 것으로 보고되었다²⁾. 이는 EGFR 유전자의 이상을 검출하여 Gefitinib 감수성을 예측할 수 있다는 가능성을 나타내며 또한 Gefitinib을 동일한 억제 감수성을 가지는 폐암 환자에게 투여함으로써 부작용이 적고 효율적인 폐암치료를 할 수 있다는 것을 의미한다. 하지만, 현재 폐암 진단에 사용하는 환자 유래의 객담(sputum)이나 기관지 세척액 등의 임상검체는 암세포 이외에 다량의 정상세포를 포함하고 있으며, EGFR 유전자는 10 종류 이상의 다른 형식을 취하고 있어 임상검체 중 EGFR 유전자 이상이 있는 암세포를 검색하기 위해서는 다량의 정상 EGFR 유전자 존재하에 여러 종류의 소량 변이를 검출할 수 있는 고감도, 고특이성 검사계 확립이 필요하다.

이에 환자 검체에서 보다 신속하고 고감도로 EGFR 유전자 이상을 검출하기 위하여 peptide nucleic acid(PNA)와 locked nucleic acid(LNA)를 사용한 PCR clamp법을 Smart Cycler® II system에 적용한 real time PCR 검출 시스템을 개발하였다³⁾. 이 방법은 다량의 정상세포가 동시에 존재해도 암세포에만 특이적으로 존재하는 EGFR 변이를 신속하게 검출할 수 있어, 폐암 진단에 사용되는 객담(sputum), 흉수, 기관지 세척액, 심낭수와 같은 일반 임상검체를 그대로 검사할 수 있다. 그리고 본 시스템에서는 이미 보고된 11개 다른 EGFR 변이를 동시에 검출할 수 있다. 본 시스템을 임상 검체에 응용하면 폐암의 Gefitinib 감수성의 치료전 예측이 가능하여 효과적인 폐암치료가 가능해질 것으로 기대된다.

(I) PNA clamp primer와 LNA mutant probe의 설계

Point mutation과 deletion mutation를 포함하는 변이 EGFR 유전자만을 특이적으로 증폭하기 위해 PCR clamp법을 이용하였다. Clamp primer에는 wild type과 mutant type을 효율적으로 판별하기 위하여 PNA를 사용하였다. PNA는 *Taq* DNA polymerase의 5'→3' exonuclease에 대한 내성을 갖고, PNA의 상보적인 사슬과 강하게 결합할 수 있으며, 하나의 염기라도 일치하지 않으면 Tm이 크게 감소하기 때문에, clamp primer로 적합하다.

이 PNA를 정상 DNA와 상호보완적으로 제작하여 PCR로 정상 DNA 증폭을 억제할 수 있다. 따라서 각 변이부위의 정상 DNA에 대응하는 상호보완적인 서열을 가진 PNA를 사용하여 clamp primer를 설계하였다. 다시 말해 11개의 변이 중 7개가 존재하는 exon 19의 deletion mutation에서 7개, 모든 변이에 공통으로 존재하는 부위의 정상 DNA에 대하여 1개, exon 18의 2개 point mutation에 공통으로 존재하는 부위에 1개, exon 21의 2개 point mutation 각각에 대응하는 부위에 2개, 총 4 종류의 clamp primer를 설계하였다(그림 1A와 표 1).

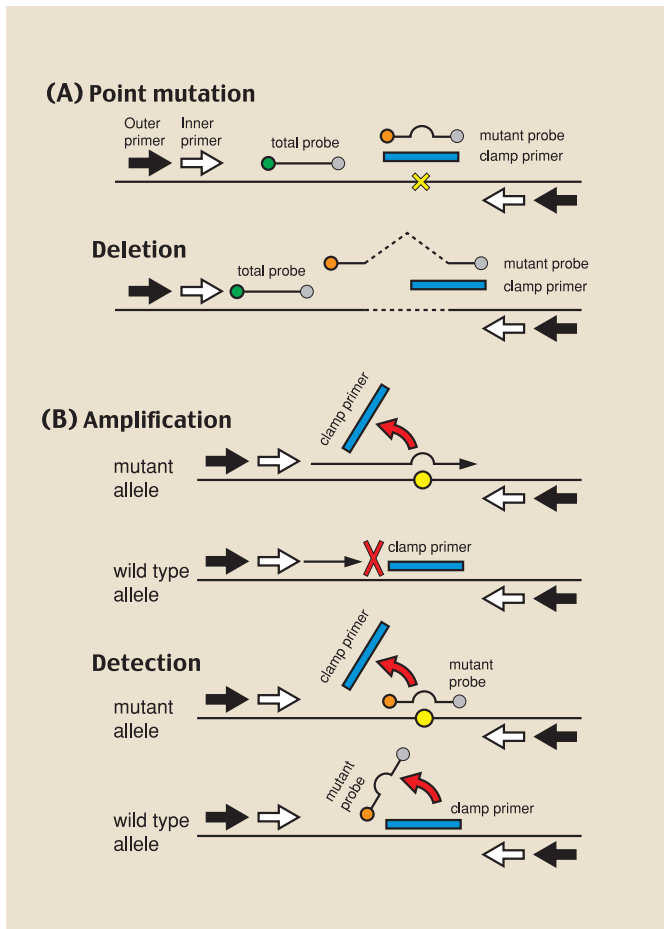


그림 1 PNA-LNA PCR clamp법을 이용한 변이검출 원리

그리고 mutant type을 검출하기 위해 이미 보고된 11 종류의 변이에 대응하는 fluorogenic probe로 mutant probe를 설계하였다. Mutant probe는 wild type과 mutant type을 엄격하게 구별하기 위해 변이 부위에 대응하는 부위의 LNA를 사용하였다. LNA는 일반적인 핵산 염기에 비해 하나의 염기라도 일치하지 않으면 Tm이 크게 감소하기 때문에 probe로 적합하다. 또한 wild type과 mutant type을 동시에 증폭하는 internal control로 변이영역 외에 total probe를 작성하였다. 형광색소는 Smart Cycler® II system의 중요한 특징 중 하나인 4파장 동시검출 방법을 활용하였다. 복수의 유전자 변이를 단일 반응으로 검출하기 위하여 각각의 probe를 FAM®, TET®, Texas Red®, Cy5(=total probe) 중 하나로 표식하고 한 반응당 최대 4 종류의 probe를 동시에 사용할 수 있도록 설계하였다. 이 시스템에서는 clamp primer와 probe 위치의 상관 관계로 background signal을 최소화 하였다. 즉, mutant probe보다 강력하게 wild type allele와 결합할 수 있는 clamp primer가 과잉으로 존재함으로써 mutant probe와 wild type allele이 일치하지 않으면 결합이 억제되기 때문이다(표 1).

(2) PNA-LNA PCR clamp법으로 EGFR 변이 유전자의 검출방법(그림 1B)

Exon 18, 19, 21의 point mutation와 deletion mutation를 사이에 둔 각 부위에 일반 PCR primer를 설계한다. 그리고 감도를 향상시키기 위해 양쪽에

primer를 설계하고 필요하면 nested PCR을 한다(표 1). Mutant type과 wild type이 섞여있는 시료의 경우, 증폭 시에 wild type allele이 clamp primer에 의해 증폭이 억제된다. 반면 mutant type allele에는 clamp primer가 결합할 수 없기 때문에 증폭이 억제되지 않고, mutant type과 우선적으로 증폭 된다. 검출시에 mutant probe는 mutant type allele와 결합할 수 있지만, wild type allele과 일치하지 않는 서열 또는 clamp primer와 길항작용으로 결합이 저해되어, 실제로는 증폭과 검출이 동시에 진행될 수 있다. DNA가 PCR에 적합한 것이고 해당 부위가 적절하게 증폭되어 있는지는 total probe(Cy5 표식)로 확인할 수 있다. 즉, 어느 하나의 mutant probe에서 signal이 존재하는가를 확인한 후, signal이 확인되면 mutant type이 있는 것으로 판정한다. Mutant probe에서 mutant type이 확인되지 않을 경우, total probe의 signal을 확인한다. Total probe로 강한 signal이 있는 경우는 11 종류 변이 이외 다른 변이가 존재할 가능성이 높다. 이러한 경우는 PNA-LNA PCR clamp의 증폭 단편을 직접 sequencing해야 한다. Total probe로 약한 signal이 나타날 경우는 wild type DNA가 증폭되었을 가능성이 높다. 이는 정상적인 human DNA를 통하여 background를 확인하고 판정한다. 시료가 wild type 서열만 포함할 경우, total probe signal은 cycle 수를 많이 하였을 때 검출되거나, 전혀 검출되지 않을 수도 있다.

표 1 사용한 primer와 probe

	oligo name	oligo sequence 5'→3'	final conc.(nM)
Reaction 1(G719C, G719S)			
PCR primer	ex18o-F	TCCAAATGAGCTGGCAAGTG	200
	ex18o-B	TCCCAAACACTCAGTGAACAAA	200
Mutation probe	G719Cp	6-FAM/accggagcAcagcactt/BHQ1	100
	G719Sp	TET/accggagcTcagcactt/BHQ1	100
Total probe	Ex18t	Cy5/ccaagctctctggaggtcttg/BHQ2	100
PNA clamp primer	G179cl	NH2-GAGCCCAGCACTTT-CONH2	5000
Reaction 2(E746-A750del type 1, E746-A750del type 2, L747-A750del T751S)			
PCR primer	ex19o-F	GTGCATCGCTGGTAAACATCC	200
	ex19o-B	TGAGGTTTCAAGCCATGGAC	200
Mutation probe	E746-A750del-1p	6-FAM/ctatcaaAaCatctccgaaagc/BHQ1	100
	E746-A750del-2p	TET/cgctatcaaGacatctccg/BHQ1	100
	L747-A750del T751Sp	Texas red/ctatCaagGaaTCatctcc/BHQ2	100
Total probe	Ex19t	Cy5/ttaaCtTTCTCaCct/BHQ2	100
PNA clamp primer	Delcl	NH2-AGATGTTGCTTCTCTTAA-CONH2	5000
Reaction 3(L747-S752del P753S, L747-E740del A750P, L747-S752del E746V, S752-I759del)			
PCR primers, Total probe and PNA clamp primer is the same as in Reaction 2			
Mutation probe	L747-S752del P753Sp	6-FAM/ctatcaaggaatCgaaagcca/BHQ1	100
	L747-E740del A750Pp	TET/atcaaggaCcaacatctcc/BHQ1	100
	L747-S752del E746Vp	Texas red/tatcaaggttCgaaagcca/BHQ2	100
	S752-I759delp	6-FAM/agagaagCaaCactcgat/BHQ1	100
Reaction 4(L858R)			
PCR primer	ex21o-F	GCATGAACACTTGGAGGAC	200
	ex21o-B	ACCTAAAGCCACCTCCTTAC	200
Mutation Probe	L858Rp	6-FAM/tttggccCgcccga/BHQ1	100
Total probe	Ex21t	Cy5/ccaGgaaCgtaCtg/BHQ2	100
PNA clamp primer	L858cl	NH2-CAGTTTGGCCAGCCCA-CONH2	5000
Reaction 5(L861Q)			
PCR primers and Total Probe are the same as in Reaction 4			
Mutation Probe	L861Qp	TET/accagcTgtttGg/BHQ1	100
Clamp primer	L861cl	NH2-ACCCAGCAGTTTGGC-CONH2	5000
Inner primers for nested PCR			
Reaction 1(exon 18)	ex18i-F	CTTACACCCAGTGGAGAAGC	200
	ex18i-B	GGACCTTACCTTATACACCG	200
Reaction 2 and 3(exon 19)	ex19i-F	TGTCATAGGGACTCTGGATCC	200
	ex19i-B	AGCAGAACTCACATCGAG	200
Reaction 4 and 5(exon 21)	ex21i-F	CTTGGAGGACCGTCGCTTG	200
	ex21i-B	CCACTCCTTACTTTGCCTC	200

(3) Smart Cycler® II system을 이용한 real time PCR로 변이 검출

간단히 조절할 수 있는 *Premix Ex Taq*® (perfect real time)을 사용한다. 11개의 변이를 검출하기 위해 5개의 반응으로 분류하여 측정한다(표 1).

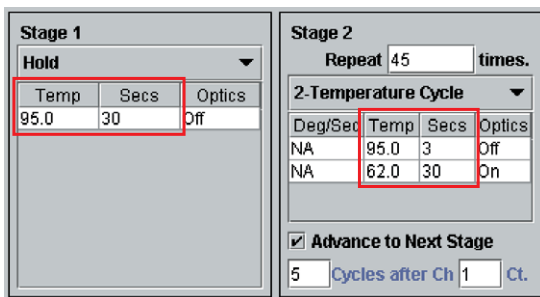
【반응액 조성】

<i>Premix Ex Taq</i> ® (2×)	12.5 μ l
Basic mixture	7.5 μ l
Forward primer	(200 nmol/L)
Reverse primer	(200 nmol/L)
PNA clamp primer	(5 μ mol/L)
Fluorogenic LNA probes	(100 nmol/L)
Template DNA	5.0 μ l
Total	25 μ l

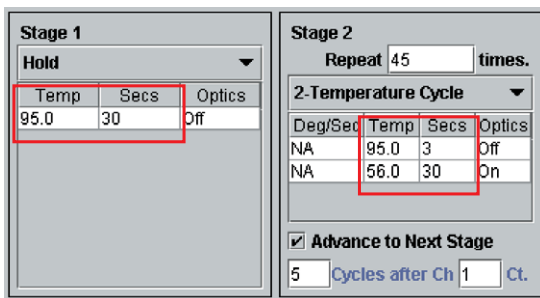
【반응온도 조건】

Real time PCR 기기는 Smart Cycler® II system을 이용하고, 반응 조건은 다음과 같다.

Exon 18



Exon 19,21



실험결과

Site directed mutagenesis에서 보고된 EGFR 유전자 4종류의 point mutation과 7종류의 deletion mutation을 모두 작성하여 plasmid에 cloning 한 후, 염기서열을 확인하였다. 이 EGFR positive control을 human chromosome DNA(정상 혈액 유래) 2 copy당 1, 0.1, 0.01, 0.001 copy가 되도록 정상적인 human chromosome DNA와 혼합하여 template로 사용하였다. 이것은 각각 정상세포 1, 10, 100, 1000개당 1개의 암세포가 존재하는 모델이다. 이 template 중에 포함된 변이 plasmid의 검출 감도 조사 결과를 그림 2에 나타내고 있다. Point mutation인 G719S 검출은 그림 2의 좌측, deletion mutation인 E746-A750 del 검출은 그림 2의 우측에 나타내었

다. 그림 2A와 2B와 같이 PNA clamp primer가 존재할 때, 100~1,000 배 감도로 검출할 수 있었다.

그림 2B의 증폭곡선을 2차 미분한 plot을 그림 2C에 나타내었다. 이 plot이 나타내는 바와 같이 최대값에서 PCR cycle 수가 1/10 희석할 때마다 약 3 cycle씩 우측으로 이동하였다. 다시 말해 변이 plasmid 존재 비를 2차 미분 최대값에 의해 반정량적으로 검출할 수 있다. 또한 PCR 반응액을 10° 배로 희석한 후, 1 μ l를 template로 nested PCR을 한 결과를 그림 2D에 나타내었다. Base line에 가까운 1,000배 희석한 변이 plasmid 존재도 쉽게 판별할 수 있었다.

나머지 9개의 변이에 대해서도 마찬가지로 정상세포 100개당 암세포 1(100:1)개 이상의 감도로 변이를 검출할 수 있었다.

맺음말

이번에 필자는 point mutation, deletion mutation를 신속하고 고감도로 검출할 수 있는 PNA-LNA PCR clamp법을 개발한 후, 이를 이용하여 EGFR의 고감도 신속검출 시스템을 구축하였다. 본 시스템으로 정상세포 100~1,000개당 1개 정도의 이상 세포까지 검출할 수 있으며, 또한 정량성도 확인하였다. Smart Cycler® II system의 16개 독립적인 I-CORE™ module을 활용하여 PNA-LNA PCR clamp법으로 exon 18, 19와 21의 변이를 5개의 반응으로 나누어 동시에 함으로써 약 1 시간 정도의 PCR 반응으로 11 종류의 변이를 동시에 검출할 수 있었다. 또한 PNA-LNA PCR clamp법을 이용하여 일본인 유래의 폐암 cell line에서 EGFR 변이 유무를 스크리닝한 결과, 30 종류의 cell line 중, 11개의 cell line에서 변이가 나타났으며 6 종류의 변이를 확인할 수 있었다(표 2). 또한 동일한 방법으로 cell line에 EGFR 변이의 subpopulation이 존재하는 것도 확인하였다³⁾.

일본인 EGFR 변이의 약 95 %가 이번에 주목한 11 종류의 변이에 포함된다⁴⁾. 본 시스템을 이용하여 변이 유무를 검출하면 Gefitinib 감수성을 예측하고 치료에 EGFR 변이 정보를 이용할 수 있게 된다. 다시 말해 객담, 흉수, 기관지 세척액, 기관지 찰과액과 같은 검체를 사용하여 양성 환자에 대해 Gefitinib 치료를 하면 좋은 결과를 기대할 수 있다.

검사하는 검체도 병리 진단에 사용하는 검체 일부를 나누어 사용하면 가능하기 때문에 특별한 검사 방법을 구축할 필요가 없다. 이와 같이 본 시스템은 검체 채취에서도 환자에게 부담이 적고, 소량의 검체로 신속하고 고감도로 검출할 수 있어, 유전자 정보를 직접 임상치료에 활용하는 첨단의료의 중요한 방법이 될 것으로 기대한다.

【참고문헌】

- Lynch, T. J., *et al.* : Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to Gefitinib.(2004) *NEJM*, **350**, 2129-2139.
- Paez, J. G., Janne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F. J., Lindeman, N., Boggon, T. J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M. J., Sellers, W. R., Johnson, B. E., Myerson M. : EGFR mutations in lung cancer : Correlation with clinical response to Gefitinib therapy.(2004) *Science*, **204**, 1497-1500.

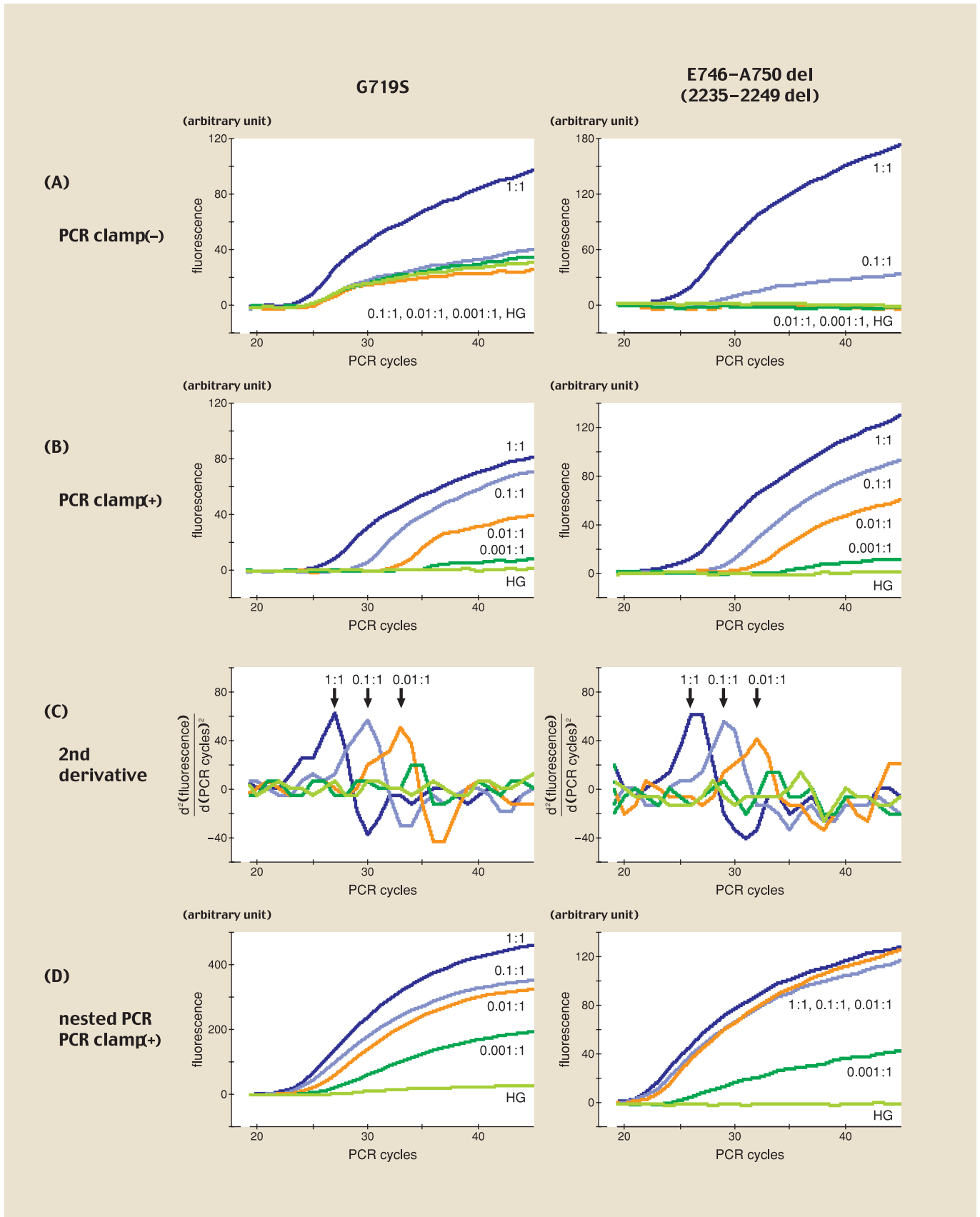


그림 2 Point mutation(G719S)과 deletion mutation(E746-A750 del)의 검출

표 2 폐암 cell line에서 EGFR 변이 유무의 스크리닝(100 % 변이만의 결과)

cell line name	cytology	mutation present in nearly 100% of the cells	
11-18	Ad	L858R(T2573G)	TKG
KTA-7	Ad	L861Q(T2582A)	Kitasato
LC2/Ad	Ad	L858R(T2573G)	Riken Bioresource Center
LCSC#1	Ad	L858R(T2573G)	TKG
PC-3	Ad	L747-E749del, A750P(2239-2247del, G2248C)	Japanese Collection of Research Bioresources
PC-7	Ad	G719S(G2155A)	IBL
PC-9	Ad	E746-A750del type 1(2235-2249del)	IBL
PC-14	Ad	E746-A750del type 1(2235-2249del)	Riken Bioresource Center
RERF-LC-Ad2	Ad	L747-E749del, A750P(2239-2247del, G2248C)	Japanese Collection of Research Bioresources
KTSq-1	Sq	E746-A750del type2(2236-2250del)	Kitasato
RERF-LC-A1	Sq	L858R(T2573G)	Riken Bioresource Center

Ad : 선암(adeno carcinoma), Sq : 편평상피암(squamous cell carcinoma)
TKG : 토호쿠(東北)대학 가레이(加齢)의학연구소 의용(醫用) 세포자원센터, IBL : 주식회사 면역생물연구소

3) Nagai, Y., Miyazawa, H., Huqun, Tanaka, T., Udagawa, K., Kato, M., Fukuyama, S., Yokote, A., Kobayashi, K., Kanazawa, M., and Hagiwara, K. : Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp.(2005) *Cancer Res.*, **65**, 7276-7282.

4) Kosaka, T., Yatabe, Y., Endoh, H., Kuwano, H., Takahashi, T., Mitsudomi, T. : Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer : Biological and clinical implications.(2004) *Cancer Res.*, **64**, 8919-8923.

Smart Cycler[®] II system

- Lamp · Rate (가열, 냉각속도)의 설정
- Advance to Next Stage 기능
- Import STD Curve 기능
- 용해곡선의 smoothing 기능
- Compare Run 기능
- 충실한 보안성
- 그래프의 화상 파일화

