

## 기능유전체학(Functional Genomics)과 DNA 마이크로어레이(Microarray)

지노믹트리

안 성 환

정상세포의 기능은 매우 복잡한 분자수준의 메커니즘에 의한 정교한 조절에 의해 유지된다. 그러나 만약 유전자에 변화가 일어날 경우 이러한 조절 기능을 상실하게 되고 결국 통제가 불가능한 세포분열을 불러 일으켜 세포수준의 암 발생이 진전된다고 할 수 있다. 최근까지 이루어진 분자생물학을 근거로 볼 때 대부분의 이러한 암 발생은 네트워크로 형성된 여러 분자들의 상호작용을 이루고 있는 pathway 상에 손상이 일어난 결과로 간주된다. 현재 암 환자의 치료기술로는 외과적 수술, 방사선 치료, 호르몬치료, 약물치료 등을 적절히 사용하고 있으나 미래에는 환자 맞춤형 약(designer drugs)과 유전자 치료제 그리고 백신 등의 개발이 결실을 거둠에 따라 획기적으로 진전된 치료기법이 도입 될 것이다. 이는 특정 pathway에 관여하는 여러 분자들 중에서 고장 난 특정 분자만을 대상으로 정함(tarcking)에 따라 부작용을 줄이고 효과를 높일 수 있어 환자 치료에 보다 나은 결과를 이룩할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 아직까지는 암 발생의 원인이 되는 특정 pathway에 있어서 분자수준의 고장을 구별 할 수 있는 스크린 방법이 미약한 상태이다. 따라서 다른 암들 간의 차이 뿐만 아니라 동일 부위의 암에서도 미묘한 차이를 구별해낼 수 있는 “진단용 분자 지표(diagnostic molecular signature)”를 확보할 수 있는 적절한 tool 개발이 임상외과학자와 생물학자가 함께 풀어야 할 오랜 숙원 사업이었다. 그러나 최근 에 개발된 “마이크로어레이(microarray or DNA chip) 기술”은 획기적인 분석방법을 제시하여 주고 있다. 이는 획기적인 대용량 유전체 분석 시스템으로서 전체 유전자를 대상(genome level)으로 언제, 어디서, 어느 정도로 유전자들이 활동을 나타내는지를 분석할 수 있게 되었다. 따라서 본 발표에서는 전반적인 마이크로어레이 기술에 대한 설명과 의의를 소개하고자 한다.

### 마이크로어레이 소개

#### 1) 기본원리 및 배경

DNA chip 기술은 유리판 위에 집적되어 있는 모든 유전자(현재 4만개 정도 집적 가능)를 대상으로 하여 유전자 활동차이를 한번의 실험으로 조사할 수 있는 대용량 유전자 활동 분석 시스템(gene expression analysis)이라 할 수 있다. 다시 말해 인간 유전자가 4만여개 정도 된다는 설이 사실이라면 일회 실험을 통해 모든 유전자의 활동을 한순간에 포착할 수 있다는 이야기다. 한번 실험을 통해 소수의 유전자활동 변화를 조사할 수 있는 기존방법인 Northern blot, Dot blot, DD-PCR 들과 비교하면 양적인 측면과 분석속도에서 큰 차이를 나타낸다. 현재 DNA 마이크로어레이 기술을 지칭하기 위해 여러 가지 용어 DNA microarray, biochip, DNA-chip, gene-array 등이 사용되고 있

다. 미국의 Affymetrix사는 트레이드마크로서 GeneChip을 등록하여 사용하고 있다. 이것은 oligonucleotide를 고밀도로 유리판에 직접(*in situ*) 합성한 일종의 생화학적 반도체 칩이라 할 수 있다. 그러나 전문잡지 등에서 genechip은 마이크로어레이 기술을 지칭하는 일반적인 용어로 사용되기도 한다.

마이크로어레이(microarray)라 함은 샘플이 뽁뽁이 순서대로 잘 정리된 것을 말하나 실제적으로 DNA-Chip 자체를 일컫기도 한다. DNA 마이크로어레이 실험의 기본적인 원리는 염기결합이다 (DNA의 경우 A-T, G-C; RNA인 경우 A-U, G-C). 이는 염기결합 법칙에 근거하여 마이크로어레이 상의 probe에 알려 지거나 알려지지 않은 유전자 target들을 결합시켜 유전자 발현 정도를 알아내는 매개체로 사용된다. DNA 마이크로어레이는 유리 고형 판에 조밀하게 배열 집적되는 유전자의 특성에 따라 두 가지 형태로 나눌 수 있다. 첫 번째로 cDNA microarray는 유리판위에 각각의 해당 유전자를 대표 수 있는 probe로서 DNA 조각(PCR product)을 집적하여 고정시킨 것으로 이는 전형적인 DNA microarray로서 미국 스탠포드 의과대학에서 개발되었다. 이때 PCR product 대신 oligonucleotide을 합성한 후 집적하는 방법도 최근 이용되고 있다. 두 번째로 oligo-DNA chip은 아주 작은 DNA조각인 oligo-nucleotide (20~25 mers)를 유리판위에서 직접(*in situ*) 합성하는 형태로 해당 유전자 probe 들을 고밀도로 집적해놓는 방법으로 이는 Affymetrix 사에서 개발한 후 GeneChip이라는 이름으로 상품화 되고 있다.

## 방 법

### 1) 마이크로어레이 제작

구조 유전체학의 결과로 얻어진 모든 유전자들을 대표하는 DNA 조각(PCR product 또는 oligo-DNA)을 준비하여 최종적으로 수용액 상태로 녹여 각각의 유전자를 384 well plate에 담아 준비한다. 여러 개 핀이 달려있는 자동화된 제작기를 사용하여 광학 현미경용 슬라이드 유리판에 DNA 들을 고밀도로 집적시킨다. 이때 유리판은 화학적인 코팅을 하여 DNA가 잘 붙을 수 있도록 되어 있다. 핀의 끝부분은 펜촉과 같은 형태로 갈라져 있으며 이로 인해 모세관 현상으로 수용액으로 된 DNA를 머금게 된다. 그런 후 핀들은 자동화 시스템에 의해 유리판으로 다가가 바둑판 모양으로 질서정렬하게 DNA들을 심게 된다. 이후 일련의 프로세싱과정을 거쳐 DNA 마이크로어레이(생화학적인 DNA 칩)가 완성된다.

### 2) 샘플과 반응(Hybridization)

준비된 마이크로어레이에는 해당 유전자를 나타내는 DNA 조각이 probe 역할을 담당하고 있고 이들과 상보적으로 결합할 수 있는 세포속의 타겟 유전자들을 효과적으로 염색을 하여 반응을 시킨다.

즉 세포로부터 분리된 mRNA들은 모두 형광 염색으로 착색을 시킨다. 이때 표준 비교대상인 세포(reference)에서 분리한 mRNA는 초록색 염색을 하고 반면 테스트(test) 샘플 세포로부터 분리한 mRNA는 빨간색으로 염색을 한다. 염색을 하는 방법은 기술적 편리함 때문에 oligo-dT primer와 역전사 효소(reverse transcriptase)를 이용하여 해당 mRNA를 상보적인 single strand cDNA로 전환시키는 반응과정(reverse transcription, RT)을 그치게 되는데 이때 각각의 반응 액에 첨가적으로 초록색을 발하는 Cy3-dUTP와 빨간색을 발하는 Cy5-dUTP를 따로 넣어주어 결과적으로 reference와 test 세포 안의 모든 mRNA들은 Cy3와 Cy5가 각각 혼합되어 cDNA 타겟으로 전환 되어진다. 이렇게 얻어진

형광염색된 cDNA 타겟을 동일 량으로 함께 섞은 후 준비된 마이크로어레이(DNA칩)에 hybridization 반응을 통해 상보적으로 결합시킨다. 따라서 유리판에 심겨져 있는 해당목표 유전자(probe)를 대상으로 두 색깔로 염색된 해당 타겟 유전자가 경쟁적으로 반응을 보이게 되며 결과적으로 이와 같은 동일조건에서의 경쟁반응에서는 타겟 유전자의 량에 의해 반응정도의 우위가 결정된다. 반응이 끝난 후 상보적으로 결합하지 못한 다른 것들은 적절한 세척과정을 통해 제거하고 스캐너를 통해 이미지화 작업을 거친다. 이때 형광을 발하는 Cy3와 Cy5는 고유의 파장에서 각각 초록과 빨간색으로 나타나게 된다. 만약 비교하는 샘플 간에 서로 발현차이가 나타나지 않는 유전자들은 서로 유사한 량으로 존재하고 있으므로 이들은 서로 같은 비율로 탐침 유전자(probe)에 반응을 하게 된다. 이는 초록색과 빨간색이 같은 비율로 섞여 색상이 나타남으로 결국 노란색으로 보이게 된다. 한편 테스트 세포에서 특정유전자 발현이 증가(up-regulation) 되면 빨간색으로 염색된 해당 유전자 정보가 상대적으로 더 많이 탐침 유전자와 반응을 나타냄으로 이는 빨간색 쪽으로 색상이 기울게 된다. 그리고 초록색을 나타내는 반응은 이와 반대적 현상이다.

## 분 석

### 1) 유전자 발현양상에 따른 유전자 그룹화 단계(Gene Expression Clustering)

마이크로어레이 실험은 유리판에 붙어 있는 해당유전자 probe 에 경쟁적으로 서로결합 반응한 타겟 유전자량의 차이에 따라 나타나는 색상 변화에 의해 테스트 세포안의 순간의 유전자들의 발현 상태(up or down-regulation)를 알 수 있다. 그러나 수천 수 만개의 유전자를 대상으로 그리고 여러 번의 다른 실험결과를 대상으로 원활한 데이터 분석을 위해서는 색상변화로 나타낸 유전자 발현 양상을 수치화로 전환시켜 데이터베이스화한다. 입력된 데이터를 이용하여 전체 실험상에서 유전자 발현(gene expression pattern)의 유사한 정도(similarity)에 따라 유전자들을 그룹화하여 표현 할 수 있다. 이때 이용되는 방법은 주로 스탠다드 알고리즘을 응용한 clustering 방법을 사용하고 있다. Clustering 분석방법의 가장 중요한 목적은 실험간 또는 각 유전자들 간의 유사한 정도를 알아 보는 것이다. 다시 말해 모든 샘플 또는 모든 유전자들을 통해 발현 ratio가 각각 있다면 이들을 유사한 샘플 또는 유사한 유전자들로 함께 묶어 나뉘지 않는 형태의 덴드로그램으로 표현할 수 있다. 예로서 발현양상이 유사한 유전자는 서로 가깝게 위치하고 반면에 활동양상이 다를수록 멀리 떨어진 그룹에 놓이게 된다. 이는 전체 유전자의 활동을 나타내고 이해하는데 매우 편리하다.

## 마이크로어레이 실험 의의

### 1) Biologically processed-oriented database

살아있는 세포의 생물학적인 움직임은 그 순간의 유전자들의 활동에 의해 결정되는데 이는 소수의 특정 유전자나 단백질에 의한 것이 아니라 수많은 유전자들과 이의 산물인 단백질들 간에 이루어지는 상호작용에 의한 네트워크에 의해 유지된다고 말할 수 있다. 인간 세포유전자는 대략 4만개에서 7만개 정도로 구성 되어있다고 추정한다. 그러나 배 발생을 통해 분화된 각각의 조직들은 각 조직별로 고유의 활동 유전자(전체 유전자 수의 약 10% 정도로 추정)들을 포함하는 복잡성을 가지며, 마이크로어레이 기술을 이용하면 모든 네트워크에 관여하는 유전자의 활동양상(gene expression pattern) 을 순간 포착(a snap shot)할 수가 있다. 단 한번의 마이크로어레이 실험을 통해

얻어진 유전자 발현 양상(expression pattern)을 단순히 하나의 데이터 실체로 해석하여 이용할 수도 있다. 그러나 여러 번의 체계적인 일련의 실험을 통해 생물학적인 진행과정(biological process)을 통한 변화되는 특정유전자들을 시간별로 또는 여러 가지 샘플을 대상으로 조사하여 유전자발현의 전체적인 윤곽(gene expression profile)을 프로파일 하여 보는 것이 보다 큰 의미가 있다고 본다. 일례로서 위암 특이 유전자군 들을 알아 내기위해선 수많은 위암 조직 샘플을 정상조직과 비교하여 체계적인 일련의 마이크로어레이 실험 수행을 하여 데이터베이스화할 수 있다. 그리고 결과분석을 위해 바이오인포메틱스를 활용하여 위암 조직에서 활동(up or down-regulation in gene expression)하는 모든 유전자의 발현 양상을 프로파일링(profiling of gene expression pattern)함에 따라 전체 유전자 활동 상태를 파악할 수 있다. 이와 같은 대용량 유전자 분석을 통해 위암조직에서 공통적인 활동 양상을 보이는 유전자군들을 보다 손쉽게 추려낼 수가 있고 이렇게 얻어진 유전자군들은 일차적인 바이오마크로 이용된다.

결론적으로 마이크로어레이 기술개발은 구조 유전체 학에 해당하는 인간유전체 연구 프로젝트 성과의 결과로 얻어진 대량의 유전자 정보를 바탕으로 체계적인 기능 유전체 학(functional genomics)을 수행할 수 있는 전환점을 이루었다. 종전까지는 “내가 좋아하는 유전자(my favorite gene)”를 중심으로 한 제한적인 실험 접근 방법에서 이제는 전체 유전자 움직임을 미리 파악하고 가장 합리적인 실험 접근방법을 선택하여 수행할 수 있게 되었다. 이는 종전과 비교하여 볼 때 과히 혁신적으로 신속하고 정확하게 그리고 경제적으로 질환관련 유전자(바이오마크)들을 찾아낼 수 있게 되었다. 특정 암들 간의 구별뿐만 아니라 특정 암을 대표하여 나타낼 수 있는 “분자수준의 지표(molecular signature)”로서 역할을 담당할 수 있는 유전자군(biomarker) 들을 확보할 수 있는 것은 중요한 의미를 지닌다. 이러한 바이오마크 정보는 질병을 정확히 조기진단 하고, 수술 후 경과에 대한 예후를 정확히 할 수 있는 지표로 사용될 수 있다. 더욱이 이들은 신약개발의 목표 유전자로 선정되어 유전체 학을 근간으로 한 보다 효과적인 신약개발의 가능성을 더욱 높여 줄 수 있게 되었다. 이와 같은 일련의 모든 과정을 체계적으로 수행하고 얻어지는 성공적인 업적은 우리에게 보다 질 높은 환자 관리의 성과를 기대할 수 있게끔 해줄 것이다.