

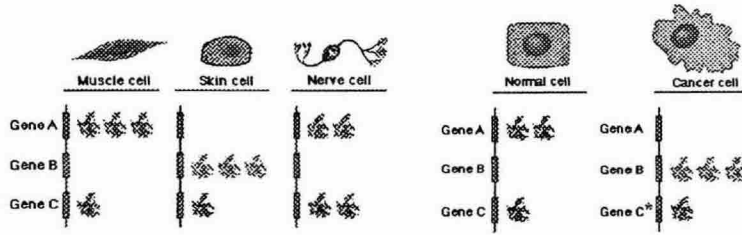
Biomedical research에서의 cDNA Microarray의 적용

이 용 성

한양대학교 의과대학 생화학교실

1. 대규모 유전자 발현 검색시스템의 필요성

사람의 유전체는 3×10^9 개의 염기쌍으로 이루어져 있으며, 최근에 발표된 Human Genome Project 연구결과에 따르면 대략 3만 6천여개의 유전자를 가지고 있는 것으로 추측되고 있다. 이 중 하나의 세포에서 발현되는 유전자, 즉 단백질을 만들어내는 기능성 염기서열의 개수는 대략 10,000개 정도일 것으로 추정된다. 즉 30,000 여개의 유전자 중에서 자기의 특성을 나타내기 위한 약 10,000개의 단백질을 선택적으로 만들어내고 있으며, 어떤 단백질을 만들어내느냐에 따라 그 세포의 기능적 특성이 결정된다는 것이다. 이러한 세포간의 단백질 발현양상의 차이는 하나의 모세포로부터 다양한 세포로 발생하는 과정 중에 단계적으로 나타나는 유전자 발현 변화들이 누적됨으로써 야기된다. 마찬가지로 질병이라는 특정한 phenotype은 한 종류의 단백질에 의해 나타나기 보다는 어떤 특정 변화를 기점으로 시작되는 여러 가지 단백질들의 발현 변화가 총체적으로 모여 나타난다고 하는 것이 보다 정확한 개념이 될 것이다.

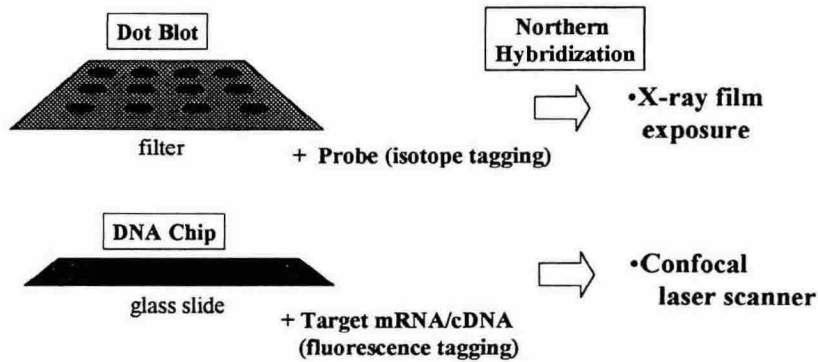


종래의 생명과학은 이러한 유전자 발현의 변화를 일대일의 관계로부터 찾는 것이 관례였다. 즉 A 단백질의 발현 변화는 B 단백질의 발현 변화를 초래하고 이는 또 다시 C 단백질의 발현 변화를 유도한다는 것을 가정하고 이를 증명함으로써 (hypothesis-driven) 유전자 발현 경로와 병리기전을 찾아내는 것이다. 그러나 특정 단백질의 작용이 하나의 단백질에 국한 되는 것만은 아니며 다양한 단백질의 발현에 관여한다고 생각할 때 이러한 접근은 매우 제한적일 수 밖에 없다. 이러한 이유에서 최근에는 수천 개 ~ 수만 개의 유전자 발현을 일시에 검증하고 그 결과를 토대로 생물학적 의미를 찾아내는 (discovery-driven) 효율적인 유전자 발현 검색 시스템이 개발되었으며, 이 중 가장 보편적인 것이 SAGE (serial analysis of gene expression) 나 cDNA microarray 이다.

2. cDNA Microarray의 기본 개념

Array에는 크게 3가지 종류가 있는데 filter array, oligonucleotide array 및 cDNA microarray가 그것이다. 이중 filter array는 filter를 사용한다는 점 외에는 다른 것들과 원리적인 면에서 차이가 없으며 oligonucleotide array는 DNA sequence의 탐지를 기본 원리로 하고 있어 cDNA microarray와는 기본 개념에서 많은 차이가 있다. 본 강의에서는 mRNA의 양을 감지하여 유전자 발현의 변화를 주 타겟으로 하는 cDNA microarray 만을 다루고자 한다. cDNA Microarray는 분자생물학적 기법으로 볼 때 Northern blot의 역실험이라 할 수 있다 (Reverse Northern). 즉 filter 위에 mRNA를 고정시키고 특정 유전자 probe를 가하는

Northern 실험 대신 유전자 probe를 먼저 고정시키고 조직에서 얻은 mRNA를 가하여 발현 양상을 조사하는 것과도 같다. 이러한 방법의 이점은 Northern과 달리 수많은 유전자 probe를 동시에 사용할 수 있다는 점인데, 이를 위해서는 먼저 몇 가지 트릭에 대한 기본적인 이해가 필요하다.

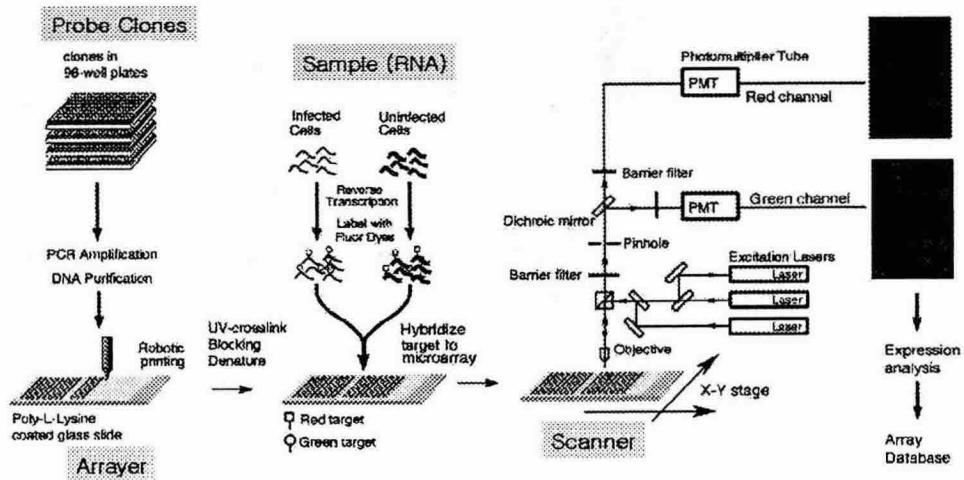


첫째, 수많은 probe 유전자를 고정시키기 위해 filter paper 대신에 특별히 코팅된 유리 슬라이드를 사용한다는 점이다. 왜냐하면 filter paper에서는 용액이 번지게 되므로 고정시킬 수 있는 유전자의 개수가 제한되기 때문이다. 이때 유전자를 유리 슬라이드 위에 찍는 기술은 반도체 생산에 사용되는 미세기술을 사용하며, 고정시키려는 유전자 간격을 마이크로미터 단위까지도 조절할 수 있다.

둘째, 유전자 probe가 mRNA와 결합했는지 여부를 알기 위해서 Northern blot에서는 probe 유전자를 방사성 동위원소로 labeling 하게 되는데, cDNA microarray에서도 마찬가지로 mRNA를 labeling 하는 절차가 필요하다. 그러나 방사성 동위원소는 신호가 예민한 대신, 신호가 강할 경우 인접한 유전자 영역까지 침범하게 되므로, 유전자가 고집적된 cDNA microarray에서는 일반적으로 형광물질을 사용하여 labeling 하게 된다. 형광물질은 Cy3와 Cy5나 Alexa dye 등을 일반적으로 사용하는데, 방사성 동위원소에 비하여 신호가 상대적으로 약하기 때문에 end labeling 대신에 Cy3-dUTP, Cy5-dUTP를 사용한 reverse

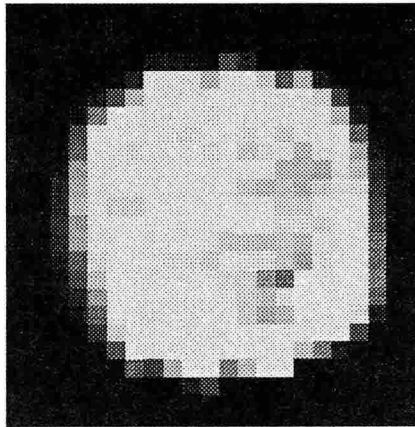
transcription을 통해 cDNA를 합성하는 과정을 통하여 labeling을 실시한다.

셋째, 슬라이드 위에 고정된 유전자 probe는 서로 농도와 DNA 크기 등을 일률적으로 조절하는 것이 불가능하고 reverse transcription 과정 중에 생성된 cDNA의 길이가 모두 같지 않기 때문에 hybridization에 의해 부착된 형광 신호로 절대적인 부착량을 계산할 수 없다. 따라서 cDNA microarray에서는 일종의 competitive hybridization 개념을 도입하게 된다. 즉, 대조군과 실험군 2가지의 mRNA를 각기 Cy3 (녹색 형광)와 Cy5 (붉은색 형광)로 별도로 labeling 한 후에, 동시에 하나의 DNA chip에 대하여 동량을 혼합하여 hybridization을 실시하며 결과적으로 녹색과 붉은 색의 상대적인 비교치를 얻게 된다. 이는 실험군에서 대조군에 비하여 유전자 발현이 몇 배 증가하였다 또는 몇 분의 일로 감소하였다 하는 양상으로 실험 결과를 제시한다는 뜻이다.



3. cDNA microarray data의 출력 양식

cDNA microarray 실험에는 Cy-3와 Cy-5 두 가지 형광이 동시에 붙게 되므로 이를 감지하기 위한 scanning도 570nm (Cy-3)와 670nm(Cy-5) 파장에서 2회를 실시하여 2개의 이미지 파일을 얻고 양쪽의 형광 강도를 비교하여 최종 결과를 얻는다. 이미지 파일은 tiff 파일 형식으로 되어 있는데 대개 5마이크론 또는 10 마이크로 단위의 pixel로 구성되어 있으며 각각의 형광 강도에 따라 65500까지의 수치로 표시될 수 있다. 하나 하나의 유전자는 일반적으로 수백개의 pixel로 구성되는 그림과 같은 형태를 지니고 있으며 각 pixel의 강도를 평균하여 유전자 고유의 형광강도, 즉 hybridization 에 의하여 부착된 mRNA의 양을 추정한다.



4. cDNA microarray data의 신뢰성과 실험 오류

cDNA microarray의 가장 큰 약점은 data의 신뢰성으로 실험 기법상의 제약으로 인하여 아직까지 종래 유전자 발현 검증을 위한 Northern hybridization에 비하여 신뢰성이 떨어진다고 보는 것이 일반적인 견해이다.

Limit of detection: 똑 같은 RNA를 사용하여 실험하였을 경우에도 cDNA microarray 실험은 반드시 Cy-3, Cy-5의 상대적인 비율이 꼭 1:1로 수렴되지는 않으며 대략 1.7배 - 0.6 배 사이에서 변화한다. 따라서 cDNA microarray 실험에서는 2배 이상 발현이 증가하였거나 1/2 이하 감소한 경우를 의미 있게 해석하는 경우가 보통이다.

1) 실험상의 오류

cDNA microarray는 가치성이 큰 대신 많은 오류 요인을 가지고 있다. cDNA microarray 제작 상의 오류, 실험절차에서의 오류, 이미지 분석의 오류 외에도 각 실험 개체가 가지고 있는 유전적 다양성으로 인한 유전자 발현의 차이점, 환경이나 실험 조건의 변화에 의한 유전자 발현의 차이점 등이 실험 결과 해석에 오류를 가져올 수 있다. 이를 해결하기 위해서는 크게 2가지 방안이 있을 수 있는데, 하나는 cDNA microarray로 얻어진 결과를 다른 실험 방법을 통하여 재검증하는 방식이며 다른 하나는 cDNA microarray 실험 결과 자체의 신뢰성을 높이는 방식이다. 실험결과의 재검증이란 예를 들어 cDNA microarray 실험으로 얻어진 결과 중에서 본인이 흥미 있는 유전자를 선택하여 Northern hybridization 등의 방법으로 다시 확인하는 것이다. 이런 방식은 자칫하면 cDNA microarray 실험은 소용 없다는 인식을 낳을 수 있으나, 어떤 유전자의 발현을 조사할 것인지 그 대상을 압축하여 제공한다는 점에서 실제 매우 powerful 한 것이다. cDNA microarray 실험결과의 신뢰성 향상이란 cDNA microarray 실험을 반복하고 통계적인 방법을 통하여 신뢰성 있는 data로 재창출하는 방식이다. 이러한 방식은 매우 효율적이거나 실험의 규모가 커지고 비용이 커지므로 어떤 방식이 본인의 실험 여건에 적합한지 신중히 고려하여야 한다.

5. cDNA microarray의 의학적 적용

cDNA microarray의 적용은 매우 광범위한데 약물의 독성 검증 (toxicogenomics)이나 환경위해 생물체의 검증 등에 이미 많은 적용이 이루어지고 있다. 그러나 생명과학자에게 가장 흥미가 있는 것은 무엇보다도 대단위 유전자발현 검색을 통한 질병과 생리현상의 규명에 있다고 할 것이다.

1) cDNA microarray를 이용한 molecular marker와 druggable target의 개발

질병의 진단에 있어 세포의 형태학적 소견이 중요한 근거이나, 실제 세포의 형태학

적 변화에 앞서 이를 결정짓는 유전자 발현의 변화가 선행된다. 따라서 cDNA microarray를 이용하여 유전자 발현을 효율적으로 검증할 경우, 질환의 발생에 선행되어 발현이 변화되는 특정유전자, 또는 환자의 예후와 치료 효과를 판정할 수 있는 유전자를 발굴할 수 있다. 또한 cDNA microarray 실험결과를 통하여 특정 유전자 발현 경로가 임상적으로 중요한 의미를 지니고 있는 것으로 판단될 경우, 이를 target으로 하는 새로운 약물의 개발이나 평가가 이루어질 수 있다.

2) cDNA microarray를 이용한 질병의 새로운 분류와 병리기전 규명

최근 cDNA microarray를 이용한 실험의 중요한 이정표 중의 하나가 diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)의 유전자 발현 양상이다. DLBCL은 non-Hodgkin's lymphoma의 가장 흔한 형태로서 지금까지 한 질환으로 분류되어 왔던 DLBCL이 서로 다른 유전자 발현 양상을 나타내는 2가지 이상의 환자군으로 분류될 수 있음이 보고되었으며, 이들의 생존 예후에 서로 큰 차이가 있음이 밝혀졌다. 이러한 접근은 기존에 하나의 질환으로 알려진 많은 질환에 대하여 새로운 평가가 필요하다는 점을 시사한다.

3) 진단용 tool로서의 cDNA microarray 사용 가능성

임상분야에서의 가장 큰 관심사는 cDNA microarray가 진단용 tool로서 사용될 수 있는가 여부이다. cDNA microarray가 진단용으로 사용되기 위해서는 몇 가지 넘어야 할 고비가 있다. 우선 진단용으로 사용될 수 있는 molecular marker가 개발되어야 하며, 개발된 molecular marker가 병리적 소견에 의한 진단보다 정확해야 한다는 점이다. 즉 기존의 병리적 소견으로 알아내지 못하는 새로운 소견을 신뢰성있게 임상 의사에게 줄 수 있어야 하는데 아직까지 이 단계에 들어서지는 못했으며 최소 몇 년의 시간이 지나야 가능할 것으로 판단된다. 진단용 tool로서 사용하기 위한 또 다른 문제는 cDNA microarray 실험에 충분한 RNA를 추출할 수 있는 생체 조직을 얻을 수 있어야 한다는 점인데, 최근에는 소량의 RNA로서 실험이 가능한 protocol이 여러 종류 개발되어 유용하게 사용할 수 있다.