

분자영상연구를 위한 분자생물학 기법 소개

서울대학교 의과대학 핵의학과, 암연구소 분자영상 및 치료연구실
강 주 현

Introduction To Basic Molecular Biologic Techniques For Molecular Imaging Researches

Joo Hyun Kang, Ph.D.

Department of Nuclear Medicine and Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Molecular imaging is a rapidly growing field due to the advances in molecular biology and imaging technologies. With the introduction of imaging reporter genes into the cell, diverse cellular processes can be monitored, quantified and imaged non-invasively in vivo. These processes include the gene expression, protein-protein interactions, signal transduction pathways, and monitoring of cells such as cancer cells, immune cells, and stem cells. In the near future, molecular imaging analysis will allow us to observe the incipience and progression of the disease. These will make us easier to give a diagnosis in the early stage of intractable diseases such as cancer, neuro-degenerative disease, and immunological disorders. Additionally, molecular imaging method will be a valuable tool for the real-time evaluation of cells in molecular biology and the basic biological studies. As newer and more powerful molecular imaging tools become available, it will be necessary to incorporate clinicians, molecular biologists and biochemists for the planning, interpretation, and application of these techniques to their fullest potential. In order for such a multidisciplinary team to be effective, it is essential that a common understanding of basic biochemical and molecular biologic techniques is achieved. Basic molecular techniques for molecular imaging methods are presented in this paper. (Korean J Nucl Med 38(2):115-120, 2004)

Key Words: Cloning, Expression vectors, Gene, Molecular biology, PCR

서 론

분자세포 생물학의 발달과 첨단 영상 기술 발전에 힘입어 분자영상연구가 가능해졌으며 급속히 발전하고 있다. 광의의 분자영상 연구뿐만 아니라 영상 리포터 유전자(imaging reporter gene)를 이용한 분자영상연구에서 분자생물학적 또는 생화학 적 기초 지식 및 실험 기법에 대한 이해는 필수적이다. 본 원고에서 분자영상연구를 위해 필요한 기초적인 분자생물학적 기법 들을 소개하고자 한다.

유전자 클로닝(Gene Cloning)

일반적으로 유전자 클로닝은 외부에서 얻은 유전자를 세균에 도입하여 원래 갖고 있던 유전정보와 다른 유전정보를 갖는 변형세균의 클론을 키우는 과정을 말한다. 1973년에 Stanley Cohen과 Herbert Boyer에 의해 처음으로 클로닝이 이루어졌고¹⁾ 이 작업이 성공하게 된 것은 제한효소(restriction endonuclease)가 있었기 때문에 가능하였다. 제한효소는 1960년대 후반에 Stuart Lynn과 Werner Arber에 의해 발견되었다.²⁾ 제한효소는 대칭인 염기서열을 인지하여 그곳을 정확히 자를 수 있다. 이렇게 제한효소에 의해 잘려서 만들어진 끝은 다른 DNA분자의 끝과 염기결합을 할 수 있고 DNA 연결효소(DNA ligase)를 처리함으로써 두개의 DNA분자를 공유결합으로 연결할 수 있다. Cohen과 Boyer가 클로닝에 사용한 플라스미드는 대장균에서 복제가 가능한 플라스미드였으며 이와 같은 운반자의 역할을 하는 플라스미드를 벡터라고 부른다. 1970년대 이후 다양한 종류의 벡터들이 개발되었는데 주로 플라스미드와 파아지 두 중

• Received: 2004. 4. 6. • Accepted: 2004. 4. 10.
• Address for reprints: Joo Hyun Kang Ph.D., Department of Nuclear Medicine, Seoul National University College of Medicine, 28 Yongon-dong, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea
Tel: 02) 3668-7069, Fax: 02) 3668-7080
E-mail: kang2325@snu.ac.kr

류이고 실험 목적에 따라 선택해서 사용한다. 실험실에서 주로 사용하는 벡터는 대장균에서 복제가 가능한 플라스미드 벡터이고 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 만드는 경우는 파아지 벡터를 사용한다.^{3,4)}

목적하는 유전자를 새로이 분리하여 클로닝하는 하는 여러

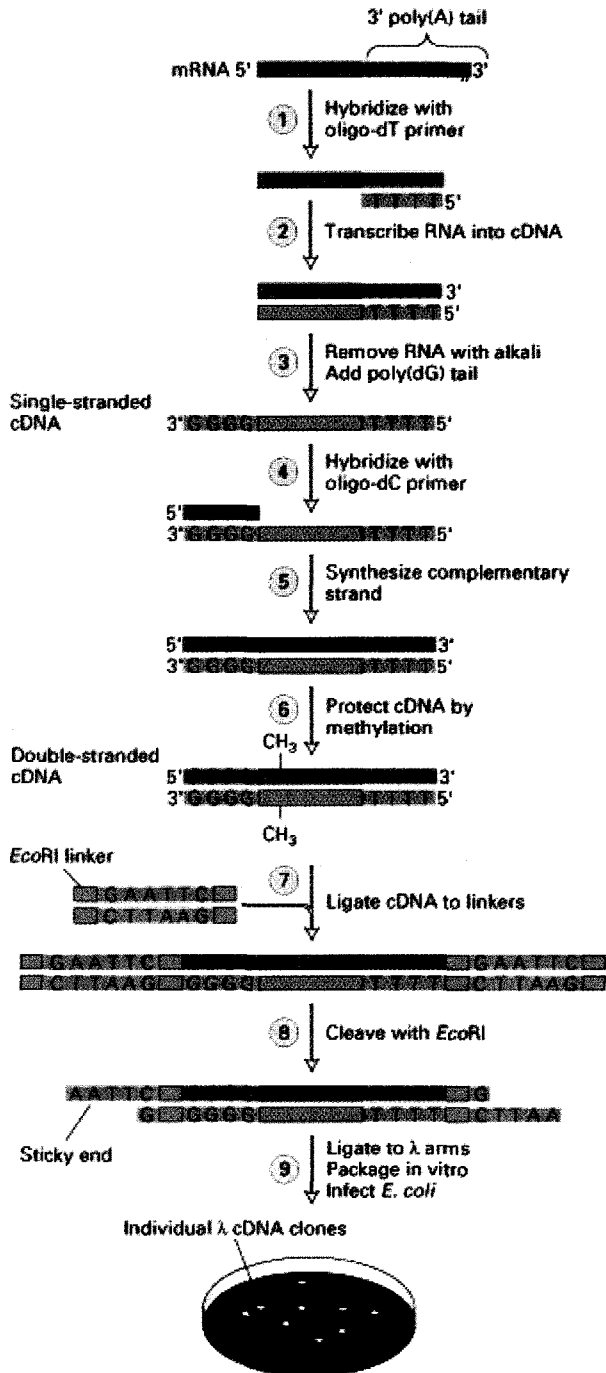


Fig. 1. Preparation of cDNA library in a bacteriophage λ ⁵⁾.

가지 방법들이 개발되었다. 그중에서도 진핵세포의 유전자 게놈 DNA를 클로닝하기 위해서는 코스미드나 람다 파아지에 게놈 라이브러리를 만들어서 목적유전자의 일부 조각을 방사성동위원소(³²P)등으로 표지한 탐침을 이용해 스크리닝하여 클로닝한다. 그리고 목적 유전자의 cDNA를 클로닝하기 위하여 목적 유전자가 발현되는 세포나 세포주로부터 total RNA를 분리하고 올리고(dT) 컬럼을 이용하여 messenger RNA(mRNA)을 정제한다⁵⁾(Fig. 1). 정제된 mRNA를 주형으로 올리고(dT) 프라이머와 역전사효소(reverse transcriptase)로 단일 가닥의 cDNA를 만든다. 그리고 RNase H로 mRNA를 제거하면서 DNA 중합효소 I으로 두 번째 가닥을 만듦으로써 cDNA의 합성이 끝난다. 이렇게 만들어진 cDNA를 이용하여 람다파아지에 cDNA 라이브러리를 만들고 방사성 동위원소로 표지된 탐침으로 스크리닝한다. 하지만 새로이 유전자를 클로닝하는 경우가 아니라면 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 Genbank에서 목적유전자의 염기서열을 찾고 그에 대한 5'과 3'쪽 특이한 올리고뉴클레오티드를 합성하여 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)로 클로닝한다. 예를 들어 본 연구실에서 핵의학 리포터 유전자로 사용하는 사람의 sodium iodide symporter (NIS)의 cDNA 염기 서열의 Genbank number는 NM_000453이다.

목적유전자의 발현 벡터에 서브클로닝

목적 유전자를 얻었으면 세포내에서의 유전자기능을 알아보기 위해 유전자가 발현되어 나타나는 표현형을 연구한다. 주로 세포내에 유전자의 발현을 통해 유전자의 기능을 알아보지만, 때로는 원래 세포내에서 발현되고 있는 유전자의 발현을 antisense RNA⁶⁾ 또는 si RNA 방법⁷⁾을 이용하여 억제해서 목적 유전자의 기능을 연구하기도 한다. 세포내에 목적 유전자를 발현시키기 위해서 먼저 적당한 발현벡터를 선택한다. 발현벡터는 목적유전자가 발현되는 숙주 세포에 의해 분류할 수 있다. 우선 빠르고 쉽게 발현 시키는 시스템으로 대장균 발현 시스템⁸⁾을 들 수 있으며 그 외 효모^{9,10)} 곤충세포^{11,12)}에서 발현시키는 방법이 있다. 그리고 mammalian 발현 시스템¹³⁾에서는 당화(glycosylation) 또는 인산화(phosphorylation)등과 같은 번역후 변형(posttranscriptional modification)이 일어나서 세포내에서 발현되는 구조의 단백질로 만들어지고 또한 세포내 소기관으로의 translocation이 이루어진다. 여러 외국의 생명공학회사들이 다양한 발현 벡터들을 개발하여 수요자들의 구미에 맞는 벡터를

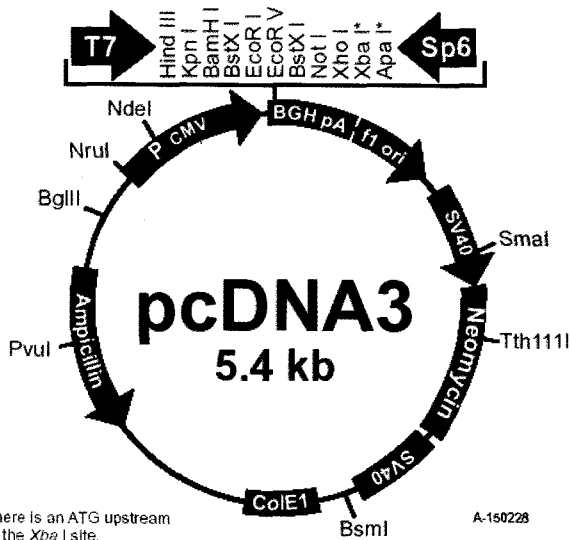
Table 1. Mammalian expression vectors (from Invitrogen)

Promoter*	Vector	Selection Marker†				Fusion Tag‡		
		Neo	Bsd	Zeo	Hygro	V5	6xHis	Xpress™
CMV	pcDNA3.1 (+)							
	pcDNA3.1/Hygro						✓	✓
	pcDNA4/His	✓	✓	✓	✓		✓	✓
	pcDNA6/His							
EF-1 α	pEF1/His						✓	✓
	pEF4/V5-His	✓	✓	✓		✓	✓	✓
	pEF6/His							
UbC	pUB6/V5-His		✓			✓	✓	

*CMV :Cytomegalovirus, EF-1 α :human Elongation Factor-1 α , UbC: human ubiquitin C promoter

†Neo : Neomycin, Bsd: Blastidicin, Zeo :Zeocin, Hygro :Hygromycin resistance gene

‡V5 :V5 epitope, 6XHis :polyhistidine tag, Xpress :Xpress epitope



* There is an ATG upstream of the Xba I site.

A-150228

Fig. 2. Molecular map of expression vector pcDNA3.1 from Invitrogen. PCMV: CMV promoter, T7 and SP6: T7 and SP6 promoter/priming site, BGH pA :bovine growth hormone polyadenylation sequence, SV40: SV40 early promoter and origin, Neomycin: Neomycin resistance gene, ColE1: pUC replication origin, Ampicillin: Ampicillin resistance gene

선택해 사용할 수 있도록 판매하고 있다(Table 1).

일반적으로 진핵세포에서 발현할 수 있는 발현벡터들에는 발현을 극대화하기 위한 몇 가지 공통점이 있다. 먼저 발현벡터를 대장균에서 증폭하여 쓸 수 있도록 ColE1과 같은 복제기점(replication origin)이 있으며 beta-lactamase (엠페실린 저항유전자)와 같은 항생제 저항 유전자가 있다(Fig. 2). 그리고 진핵세포에서 복제가 일어나게 하는 SV40 복제기점과 같은 복제기점이 있으며 안정적 발현세포주(stable transfectant)를 선별하기 위해서 neomycin 저항 유전자와 같은 항생제 저항유전자가

있다. 그리고 여러 개의 제한효소 인식 서열인 다중클로닝 부위(multicloning site, MCS)가 있어 목적유전자의 서브클로닝이 용이하게 된다. 목적유전자를 서브클로닝하는 MCS의 upstream 쪽에 강력한 프로모터인 cytomegalovirus 프로모터가 있어서 목적하는 유전자의 발현이 극대화된다. 그리고 그의 downstream 쪽에는 관심유전자의 mRNA의 안정성을 높여서 발현을 극대화를 시키기 위한 bovine growth hormone의 polyadenylation signal이 위치한다. 따라서 연구자들은 목적 유전자를 PCR등으로 증폭하여 선택한 발현 벡터의 MSC에 서브클로닝 하면 목적유전자의 발현벡터 제조가 완성된다.

세포내 발현 시스템 - 리포솜

목적유전자를 적당한 발현 벡터에 서브클로닝한 후, 그의 기능을 알아보기 위하여 발현 벡터를 목적유전자가 발현되지 않는 세포에 도입하는 실험을 한다. 대부분의 동물세포에 발현 벡터를 도입하기 위해서 양이온의 리포솜(cationic liposome)을 이용하여 발현 벡터를 리포솜으로 썬 후, 세포와 융합을 시킴으로써 발현 벡터가 세포내로 들어가도록 한다(Fig. 3). 실험실에서 DNA를 세포내로 도입하기 위해 리포솜을 생명공학회사의 제품을 구입하는데 대표적인 경우가 Invitrogen사에서 제조해서 판매하는 Lipofectamine이다. 세포에 발현벡터를 도입한 후, 계속 세포 배양을 하면 세포분열을 하면서 도입되어 있던 발현벡터를 잃어버리게 된다. 따라서 세포배양을 계속 하면서 목적유전자를 발현시키고자하면 안정적 발현세포주를 얻으면 된다. 세포에 DNA를 도입하게 되면 아주 적은 수의 세포내에서 플라스미드 DNA가 염색체내로 유전자재조합이 일어나게 된다. 이렇게 되면 그 세포는 플라스미드 DNA에 있던 모든 표현형을

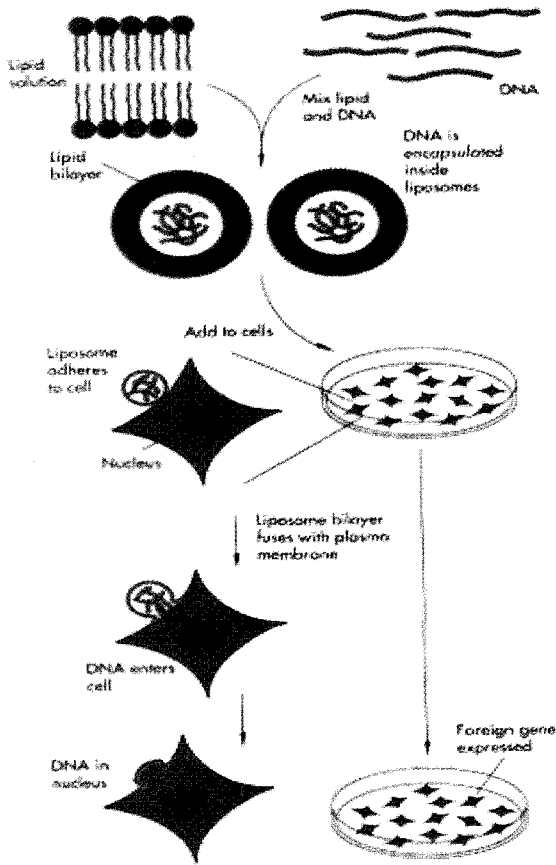


Fig. 3. Liposome-mediated gene transfer (lipofection).³⁾

갖게 된다. 따라서 대부분의 발현 벡터에는 안정적 발현세포주를 골라내기 위하여 항생제에 대한 저항성을 나타내는 유전자가 포함되어있다(예를 들어 Neomycin 저항 유전자). 그러므로 세포내로 유전자 도입 후 항생제로 일정기간 처리하게 되면 유전자 재조합이 일어난 세포들만이 살아남아 안정적 발현세포주를 얻을 수 있게 된다. 유전자 도입 세포를 얻은 후 그의 표현형이 제대로 발현되고 있는지는 RNA를 정제한 후 RT-PCR로 확인하거나 그의 기능을 분석하여 정량하거나 또는 그 단백질에 대한 특이한 항체가 있다면 Western blot 등을 통해 확인 할 수 있다.

세포내 발현 시스템- 바이러스 수송체

세포에서 목적유전자를 발현하기 위하여 앞에 서술한 리포좀을 주로 많이 사용한다. 하지만 발현 양을 정량적으로 조절해야할 경우나 in vivo에서 발현시키고자 할 경우에는 유전자 전달 효율이 높은 바이러스 수송체를 이용한다. 유전자의 구조에

따라 RNA 바이러스와 DNA 바이러스 수송체로 구분되고 adenovirus, adeno-associated virus (AAV)와 herpes simplex virus (HSV)는 DNA 바이러스에, retrovirus와 lentivirus는 RNA 바이러스에 속한다.¹⁴⁾ 연구자들은 바이러스 수송체에 실을 유전자의 크기나 발현시킬 숙주세포의 특성들을 고려해서 선택한다.

1. Adenovirus

Double-stranded DNA virus인 adenovirus는 세포의 분열상태와 관계없이 다양한 종류의 세포에서 높은 유전자 전달 효율을 나타내며 간단한 조작으로 retrovirus보다 높은 역가를 나타낸다.¹⁵⁾ 최근에는 conditionally replicative adenovirus (CRAd)인 oncolytic adenovirus를 이용하여 정상세포에서는 영향을 미치지 않고 종양세포만을 선택적으로 사멸시킬 수 있는 종양 유전자치료법 연구가 활발히 진행되고 있다.^{16,17)} 하지만 유전자 발현기간이 상대적으로 짧으며 면역반응을 일으키므로 이미 처치된 환자에 다시 투여될 수 없다는 단점이 있다. 따라서 adenovirus는 목적유전자의 발현기간이 짧지만 발현 정도가 높아야 하는 경우와 면역체계에 쉽게 드러나지 않는 중추신경계 등이 목적장기로 적당하다.¹⁸⁾

2. Adeno-associated Virus (AAV)

Small, linear single-stranded DNA virus인 AAV는 게놈의 대부분이 치료유전자에 의해서 대체될 수 있으므로 면역반응이 일어날 가능성이 낮다. AAV는 adenovirus처럼 조혈세포뿐 아니라 분열, 비분열세포 모두를 감염시킬 수 있다. 목적 유전자의 발현기간이 adenovirus에 비해 긴 장점이 있으나 게놈 대부분이 제거되었으므로 adenovirus와 같은 helper virus이 필요하고 이 과정에서 helper virus에 의한 오염이 자주 일어난다.

3. Retrovirus

Retrovirus 수송체를 이용하면 목적유전자가 숙주세포의 염색체 내로 비가역적으로 삽입되는 특성이 있어 목적유전자의 발현이 장시간 안정적으로 일어나 오랜 기간 유전자의 발현이 필요한 질환의 유전자 치료에 널리 이용되고 있다. 또한 retrovirus는 높은 유전자 전달효율 때문에 ex vivo 방법에 의한 유전자 치료에 사용될 수 있다. 그러나 세포가 분열할 경우에만 유전자의 염색체내로 삽입이 이루어지며 따라서 비분열세포는 숙주세포로 사용할 수 없다는 단점이 있다.¹⁹⁾ 그리고 삽입할 수 있는 유전자의 크기가 8 kb로 한정되어 있으며 대규모의 생산이 어렵다는 문제점이 있다.

4. Lentivirus

Retrovirus의 일종으로 1990년대 후반부터 개발되기 시작한 수송체로 HIV를 모체로 한다. 기존의 retrovirus와 달리 세포 분열주기에 영향을 받지 않아 분열이 활발한 세포 뿐만 아니라 분열이 활발하지 않은 세포에서도 유전자 발현 효율이 좋다.²⁰⁾ 연구 기간이 짧아 임상시험을 시도하고 있지는 못하지만 HIV를 모체로 한다는 점 때문에 여전히 안전성에 문제점이 있을 것으로 판단한다.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR기술²¹⁾은 목적 유전자의 클로닝이나 서브클로닝 및 전 사조절에 관한 연구 뿐만 아니라 single nucleotide polymorphism (SNP)을 찾아내기 위한 DNA 염기서열 분석²²⁾에까지 광범위하게 응용되고 있다.^{23,24)} PCR에 관련된 기술이 처음 고안되었을 당시 고온에 안정한 DNA 중합효소가 분리되지 않았으므로 매 PCR 과정마다 대장균의 DNA 중합효소를 첨가해주어야 했다. 하지만 고온에서 서식하는 세균으로부터 DNA 중합효소를 분리하면서 PCR기술이 여러 분야로의 적용가능성을 인정받아 더욱 발전하게 되었다. PCR 기법은 DNA 이중나선구조의 열에 의한 변성(denaturation)과정, 목적유전자의 염기서열에 특이한 프라이머와의 결합(annealing)과정 및 DNA 중합효소에 의한 DNA 합성 반응을 반복함으로써 목적 유전자를 다량으로 증폭한다⁵⁾(Fig. 4). 증폭하고자 하는 목적유전자의 길이 및 잘 못 합성된 DNA 염기서열을 교정(proofreading)하는 기능을 갖고 있는지의 여부에 따라 사용하는 DNA 중합효소의 종류를 결정한다. 그리고 프라이머와의 결합과정에서 최적의 결합 온도 조건을 선택하는 것이 PCR반응의 성패를 좌우한다.

맺는 말

분자영상법을 이용하여 세포의 근원적 현상, 생체 기전을 영상화하는데 시간적 정보와 공간적 정보를 함께 평가하는 것이 가능하게 됨으로써 질병에 대한 이해도가 증가하고 뿐만 아니라 종양, 뇌신경질환, 면역질환 등 많은 난치성 질병의 조기 진단, 신약의 개발 및 유전자 치료의 발전에 큰 도움이 될 것으로 기대된다. 그리고 기초생물학 분야에서 분자세포 생물학 분석의 새로운 방법론으로 여러 연구 개발에 응용 가능할 것으로 생각한다. 또한 게놈 프로젝트가 완료되면서 쏟아져 나오는 많은 새로운 사실 뿐만 아니라 생화학분야에서 연구되어 얻어진 발견을 in vivo영상을 통하여 반복적으로 정량적인 개념을 도입하

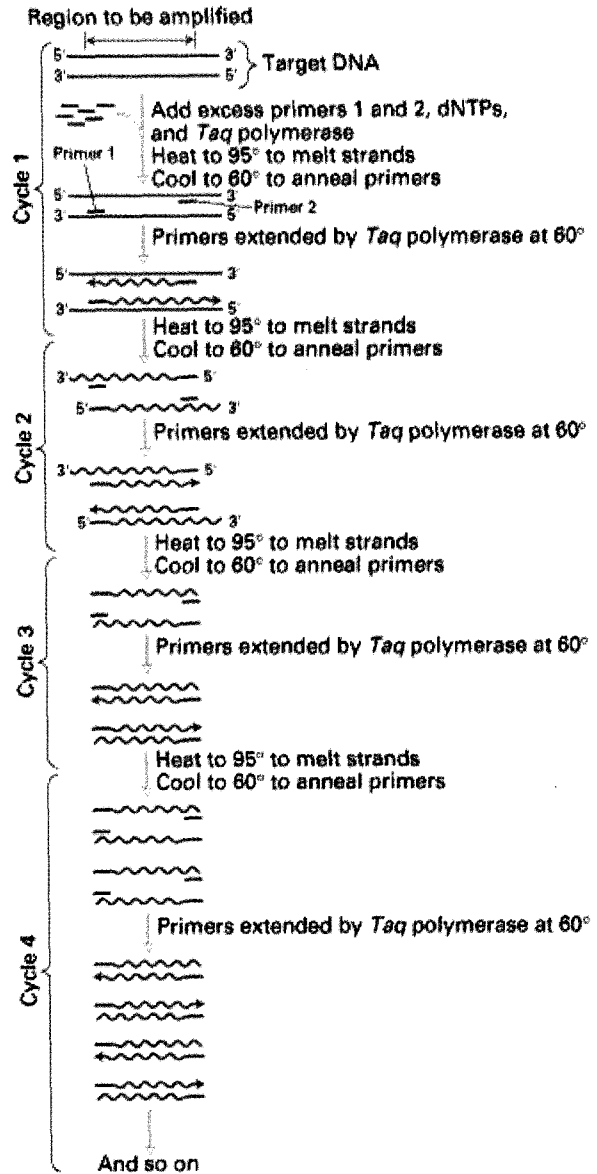


Fig. 4. The polymerase chain reaction.⁵⁾

여 설명해 줄 수 있다면 분자영상법의 적용분야를 넓힐 수 있으며 분자영상의 가치는 무궁무진하다고 할 수 있다. 따라서 분자영상연구야말로 임상의학자들과 분자생물학자 및 생화학자들과의 연계 연구가 절실한 분야라고 할 수 있다.

References

1. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70:3240-4.
2. Kuhnlein U, Linn S, Arber W. Host specificity of DNA produced

- by Escherichia coli. XI. In vitro modification of phage fd replicative form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969;63:556-62.
3. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA. 2nd ed. New York: Scientific American Books: 1992. p79-134.
 4. Weaver RF. Molecular Biology. 2nd ed. New York: Mc Graw Hill: 2002. p60-90.
 5. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. Molecular Cell Biology. 4th ed. New York: WH Freeman and company. 2000. p208-251.
 6. Izants JG, Weintraub H. Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* 1984;36:1007-15.
 7. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.
 8. Goeddel DV, Heyneker HL, Hozumi T, Arentzen R, Itakura K, Yansura DG, et al. Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* 1979;281:544-8.
 9. Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 1982;298:347-50.
 10. Hitzeman RA, Leung DW, Perry LJ, Kohr WJ, Levine HL, Goeddel DV. Secretion of human interferons by yeast. *Science* 1983;219:620-5.
 11. Luckow VA, Summers MD. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *BioTech* 1988;6:47-55.
 12. Medin JA, Hunt L, Gathy K, Evans RK, Coleman MS. Efficient, low-cost protein factories; expression of human adenosine deaminase in baculovirus-infected insect larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2760-4.
 13. Fussenegger M, Bailey JE, Hauser H, Mueller PP. Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells. *Trends Biotechnol* 1999;17:35-42.
 14. Kaplitt MG, Loewy AD. Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications. London: Academic Press: 1995. p173-237.
 15. Graham FL. Adenovirus vectors for high-efficiency gene transfer into mammalian cells. *Immunol Today* 2000;21:426-8.
 16. Nettelbeck DM, Rivera AA, Balague C, Alemany R, Curiel DT. Novel Oncolytic Adenoviruses Targeted to Melanoma: Specific Viral Replication and Cytolysis by Expression of E1A Mutants from the Tyrosinase Enhancer/Promoter. *Cancer Res* 2002;62:4663-70.
 17. Lamfers MLM, Grill J, Dirven CMF, van Beusechem VW, Georger B, van den Berg J. Potential of the Conditionally Replicative Adenovirus Ad5-24RGD in the Treatment of Malignant Gliomas and Its Enhanced Effect with Radiotherapy. *Cancer Res* 2002;62:5736-42.
 18. St George JA. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther* 2003;10:1135-41.
 19. Daly G, Chernajovsky Y. Recent developments in retroviral-mediated gene transduction. *Mol Ther* 2000;2:423-34.
 20. Buchschacher GL, Wong-Staal F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 2000;95:2499-504.
 21. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.
 22. Wong C, Dowling CE, Saiki RK, Higuchi RG, Erlich HA, Kazazian HH Jr. Characterization of beta-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* 1987;330:384-6
 23. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, and White TJ eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic, NY., 1990.
 24. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991;252:1643-51.