

정상, 낭종 및 법랑아세포종 세포에서의 유전자 발현 차이 분석

양철희 · 김재곤 · 백병주 · 양연미

전북대학교 치과대학 소아치과학교실 및 구강생체과학연구소

국문초록

법랑아세포종은 1868년에 처음 보고된 이래 명칭, 발생기전, 분류 그리고 치료 방법 등에 관하여 수 많은 논란이 있어 왔는데 이는 법랑아세포종이 양성종양임에도 불구하고 종양자체의 진행이 파괴적이고, 외과적 처치를 한 후에도 재발이 잘되며, 흔하지는 않지만 악성종양과 유사하게 전이를 보이는 등 독특한 특성을 지니고 있기 때문이다.

정상세포와 암 세포 간에 차이를 보이는 유전자 혹은 정상세포에서 변형이 일어날 때 특이적으로 발현하는 유전자의 분리 및 분석하는 것은 암세포의 생성과정을 이해하는데 있어서 중요한 열쇠를 제공할 수 있다.

이에 본연구는 RNA differential display 방법 중 재연성과 반복성이 개선된 Ordered differential display(ODD) RT-PCR과 보다 개선된 GeneFishing™ 기술을 이용하여 악성과 양성종양 사이의 유전자 발현의 차이를 조사하고, 특이 유전자의 profile을 확보하고자 하였다.

GeneFishing™ 기술과 RT-PCR을 수행한 결과 nasopharyngeal carcinoma gene을 제외한 9개의 유전자는 악성에서 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다. 따라서 GeneFishing™을 이용하면 각 시료간의 mRNA 상에서 발현차이를 보이는 DEG를 비교 분석하면 암관련 유전자, 항생제 내성 유전자, 그리고 분화 관련 유전자들에 대한 연구가 용이하게 수행할 수 있을 것으로 생각된다.

주요어 : 법랑아세포종, ODD RT-PCR, GeneFishing™

I. 서 론

법랑아세포종은 악골에서 발생 빈도가 가장 높은 외배엽성 치계종양으로 구강악안면 영역에 발생하는 모든 종양의 11%~18%를 차지한다¹⁻³⁾.

법랑아세포종은 1868년 Broca⁴⁾에 의해 처음 보고된 이래 명칭, 발생기전, 분류 그리고 치료 방법 등에 관하여 수 많은 논란이 있어 왔는데 이는 법랑아세포종이 양성종양임에도 불구하고 종양자체의 진행이 파괴적이고, 외과적 처치를 한 후에도 재발이 잘되며, 흔하지는 않지만 악성종양과 유사하게 전이를 보이는 등 독특한 특성을 지니고 있기 때문이다⁵⁾.

현재까지의 법랑아세포종과 함치성낭종에 대한 연구는 두 가지 관점에서 이루어져 왔다. 첫째는 발생치배, 치성낭종 및 법랑아세포종을 정상조직과 병리조직간의 상호 비교함으로써, 치아 형성과정의 다양성과 잠재적으로 종양화에 관여하는 성장 및 분화인자를 검출하고, 기원세포를 규명하여 보다 확실한 진단방법을 개발하는 것이다. 둘째는 growth factor인 EGF, TGF-β, HGF와 matrix metalloproteinase을 이용하여 종양의 invasion과 전이의 과정을 구강 편평상피종양과 같은 악성종양과 비교 연구하는 것이다. 그러나 현재까지 발생치배, 치성낭종 및 치성종양, 특히 법랑아세포종의 발생기전 및 병태에 관한 명확한 이해가 이루어지지 않고 있다.

정상세포와 암 세포 간에 차이를 보이는 유전자 혹은 정상세포에서 변형이 일어날 때 특이적으로 발현하는 유전자의 분리 및 분석하는 것은 암세포의 생성과정을 이해하는데 있어 중요한 열쇠를 제공할 수 있다.

이에 RNA differential display 방법 중 재연성과 반복성이 개선된 Ordered differential display(ODD) RT-PCR과 보다

교신저자 : 김재곤

전북 전주시 덕진구 금암동 634-18

전북대학교 치과대학 소아치과학교실

Tel : 063-250-2128, 2121 Fax : 063-250-2131

E-mail : pedodent@chonbuk.ac.kr

개선된 GeneFishing™ 기술을 이용하여 악성과 양성종양 사이의 유전자 발현의 차이를 조사하고, 특이 유전자의 profile을 확보하고자 본 연구를 시행하였다.

본 연구를 통하여 기존의 유전자들과 염기서열 분석을 통한 유연관계 분석을 수행하여 각각의 특이 유전자의 기능을 유추하고, 법랑아세포종의 진행단계에 따른 발병기전 및 병리현상을 이해와 함께 효과적인 진단 및 치료법의 모색을 위한 기초연구로서 활용될 것이다.

II. 재료 및 방법

A. ODD RT-PCR 방법을 이용한 유전자 연구 (Fig. 1)

Isolation of total RNA

정상, 양성 및 악성 조직으로부터 total RNA를 변형된 Chomczynski의 방법에 따라 추출하였다⁶⁾. 즉 각각의 조직에 용해 완충제 1 mL을 첨가한 후 조직 파쇄기로 조직을 완전히

파쇄한 후, chloroform을 첨가하여 DNA와 단백질을 제거하였다. 원심분리로 수용액 층을 얻은 후 여기에 동량의 iso-propanol을 첨가하여 RNA를 침전시키고 침전된 RNA에 80%의 ethanol을 처리하여 깨끗이 하였다. Ethanol을 완전히 제거한 뒤 RNA pellet을 DEPC treated water에 녹인 후 1 μl을 취하여 1% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 RNA가 제대로 추출되었는지 확인하였고, UV-visible spectrophotometer를 이용하여 wavelength 260과 280 nm에서 정량을 수행하였다.

Synthesis of First strand cDNA

종양 조직으로부터 분리한 약 1.5 μl의 total RNA를 cDNA Synthesis Kit(Takara, Japan)를 사용하여 합성하였다. 즉 RNase inhibitor의 존재 하에서 total RNA에 synthetic oligo dT를 primer로 하여 70℃에서 10분간 전 처리한 후, 1 mM dNTP(Takara, Japan), 200 unit Moloney murine leukemia virus(MMLV) 역전사 효소(Promega, USA)와

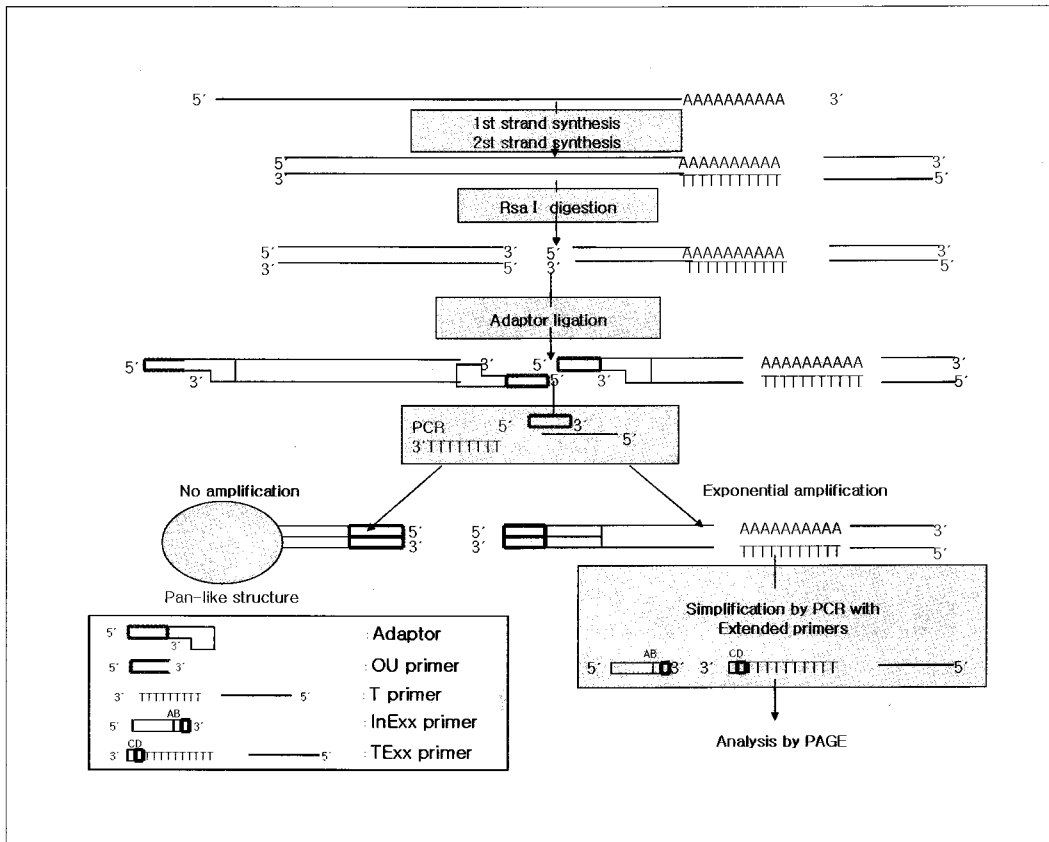


Fig. 1. Scheme of the Ordered differential display protocol. Double-stranded cDNA was synthesized with T-primer using cDNA Synthesis Kit(Takara Shuzo Co., Ltd.). The cDNA samples were further digested by Rsa I. Then the cDNA was taken for ligation with adaptor-L and adaptor-S(1:1 mixture, 20pM/μl). Ligation was performed overnight at 16°C in a 10μl volume with 2μl adaptor mixture. Then 1μl of 1/5 dilution of the ligation mixture was used for PCR with OU and T primer. One microliter of 1/20 dilution in distilled water of the PCR product served as initial material for amplifying simplified subsets.

1X 완충액을 최종 25 μ l가 되도록하고, 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 역전사 효소의 활성을 제거하기 위해 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 열 변성시켰다.

Isolation, generation and amplification of cDNA fragments

얻어진 double strand cDNA에 제한 효소인 Rsa I 을 37 $^{\circ}$ C에서 한 시간 반 동안 처리한 후, adaptor-L, adaptor-S와 ligation하였다. Ligation mixture의 1/5, OU primer, T-primer(Table 1)들을 사용하여 유전자들을 증폭한 후, A-tail fragment pool을 제작했다.

Display of discrete patterns of cDNA fragments

A-tail pools을 주형으로 하여 TExx-primer와 γ - 32 P로 labelling된 InExx-primer(Table 1)를 이용하여 유전자들을 증폭한 후, 6% polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 수행하였다. 이 때 특이적으로 발현되는 유전자 band들을 elution하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다⁷⁾.

Reamplifying, cloning and sequencing

ODD를 통해 특이적으로 발현되는 유전자 band들을 주형으로 하여 Inp, Tp primer와 re-PCR을 수행하였다. 이를 1%에 전기 영동하여 크기를 확인 후 elution하여 pGEM-T vector(Promega, USA)에 cloning하였다. 이들 유전자들의 염기 서열을 확인하기 위하여 sequencing을 수행하였으며; GeneBank에 등록된 유전자들과 비교 조사하였다.

Reverse hybridization

악성종양 조직에서 얻은 유전자인 Human mRNA for Epstein-Barr virus small RNAs-associated protein(EAP)를 대상으로 ODD RT-PCR이 정상적으로 수행되었는지 알아보기 위하여 Northern blot을 수행하였다. RNase inhibitor의 존재 하에서 각 조직에서 분리한 total RNA를 formaldehyde 방법으로 reaction mixture을 만들어 65 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 denaturation한 후, 13860 ng 씩 전기 영동 하였다. Band가 약

8 cm정도 이동했을 때 위치 확인을 위하여 UV하에서 자를 대고 사진을 찍은 다음, Nitrocellulose filter로 transfer하였다. Transfer가 끝난 후 NC filter을 분리하여, 이를 glassware 통에 넣고 church buffer (1% BSA, 1 mM EDTA, 0.5M phosphate buffer, 7% SDS)를 넣어 55 $^{\circ}$ C에서 한 두 시간 정도 pre-hybridization하였다. 그 동안 random primer extension방법으로 probe을 제작하였다. 즉 pGEM-T vector (Promega, USA)에 cloning되어 있는 EAP를 enzyme으로 잘라 분리하고, hexamer primer (20 ng)과 섞어 65 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 boiling한 후 얼음에서 식혔다. 여기에 BSA (10 mg/ml), 10X labelling buffer, dNTP mixture (-dCTP), Klenow fragment, 32 P-dCTP을 첨가하여 한 시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후, stop solution(0.5M EDTA, DW) 을 넣어 반응을 정지시켰다. 이를 hybridization solution에 첨가시키고, 55 $^{\circ}$ C에서 16시간 이상 hybridization 한 후, hybridization solution을 버리고 washing solution A(2X SSC, 0.1% SDS), B(2X SSC, 1% SDS), C(0.1X SSC, 0.1% SDS)로 각각 15분씩 두 번 washing하였다. 그 다음 membrane을 꺼내 RT에서 air dry하고, X-ray film에 exposure후, develop 하였다⁸⁾.

B. GeneFishingTM technology을 이용한 유전자 연구 (Fig. 2)

Synthesis of first strand cDNA

약 3 μ l의 total RNA(Seegene, Korea)를 dT-ACP 1 primer (Table 2)를 사용하여 위와 같은 방법으로 cDNA를 합성하였다.

First-stage PCR for second-strand cDNA synthesis

GeneFishingTMPCR 반응의 첫 번째 단계에서는 annealing Tm=50 $^{\circ}$ C에서 1 cycle만 수행하여 second-strand cDNA을 합성한다. 이때 dT-ACP 1(Table 2)은 상대적으로 낮은 Tm 값을 가지므로 first-strand cDNA에 결합하지 못하며, arbitrary ACP(1~20)만이 first-strand cDNA의 상보적인 부위

Table 1. ODD-PCR Primer sets

Primer Name	Primer Sequence
Adaptor-L	5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT-3' (43 mers)
Adaptor-S	5'-ACCGCCCTCCGC-3' (12 mers)
OU	5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAA-3' (21 mers)
T	5'-CGCAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTT-3' (25 mers)
In	5'-AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT-3' (22 mers)
TP	5'-AACTGCAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTT-3' (28 mers)
InP	5'-AACTGCAGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT-3' (28 mers)
InExx	5'-AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGTCCxx-3' (26 mers)
TExx	5'-CGCAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTTxx-3' (27 mers)

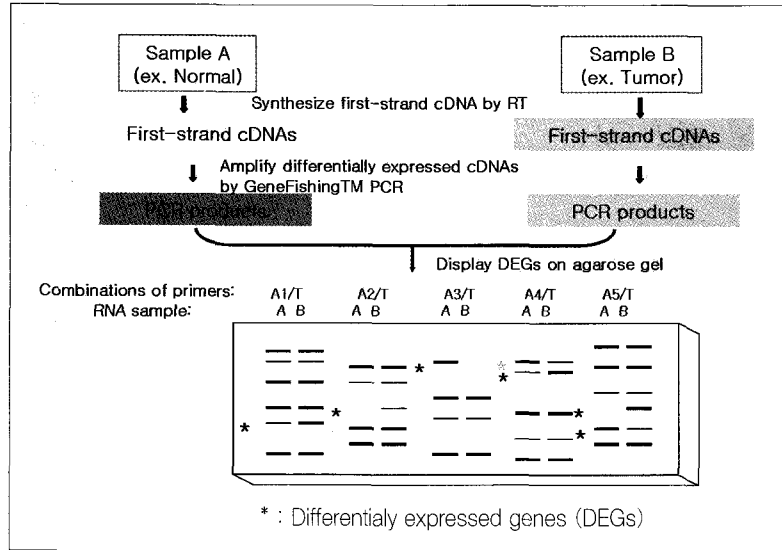


Fig. 2. Overview of GeneFishing™

Step 1. First-strand cDNA synthesis

Step 2. First-stage PCR for second-strand cDNA synthesis

Step 3. Second-stage PCR for amplifying the second-strand cDNA

Table 2. GeneFishing Primer sets

Primer Name	Primer Sequence
dT-ACP1	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T)18-3'
dT-ACP2	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T)15-3'
ACP1	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCCATCGACC-3'
ACP2	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXAGGCGATGCC-3'
ACP3	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXC CGGAGGATG-3'
ACP4	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCTGCTCGCG-3'
ACP5	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXAGTGCGCTCG-3'
ACP6	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGGCCACATCG-3'
ACP7	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTGCGGATCG-3'
ACP8	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGGTCACGGAG-3'
ACP9	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGATGCCGCTG-3'
ACP10	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXTGGTCGTGCC-3'
ACP11	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTGCAGGACC-3'
ACP12	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXACCGTGGACG-3'
ACP13	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCTTCACCGC-3'
ACP14	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCAAGTCGGC-3'
ACP15	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCCACCGTGTG-3'
ACP16	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGTCGACGGTG-3'
ACP17	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCAAGCCCACG-3'
ACP18	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCGGAGCATCC-3'
ACP19	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTCTGCGAGC-3'
ACP20	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGACGTTGGCG-3'

와 결합하여 second-strand cDNAs를 합성한다. 또한 일반적인 PCR 반응과는 달리 1 cycle 만 수행하며, dT-ACP 1 를 사용함으로써 기존의 oligo d(T) primer에 의해 발생하는 비 특이적인 결합을 배제함으로써 non-specific product를 근본적으로 제거할 수가 있다⁹⁾.

Second-stage PCR for amplifying the second-strand cDNA

두 번째 단계의 PCR 반응에서는 높은 stringency 조건 하에 첫 번째 단계에서 합성된 arbitrary-primed second-strand cDNA만이 증폭된다. 즉 Annealing Tm=65°C에서 dT-ACP 2(Table 2)와 arbitrary ACP는 second-strand cDNA의

Table 3. Oligonucleotic primer used in this study and product size of the amplified RT-PCR

Gene	RT-PCR primer Sequence	Product/annealing temperature
GAPDH housekeeping	S-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	452bp/59
	AS-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	
RAS	S-ATG GCT GCG CAG GGA GAG CC	650bp/50
	AS-TCA CAG GTC ATC ATC CTC AT	
TIMP	S-ATG GCC CCC TTT GAG CCC CT	623bp/55
	AS-TCA GGC TAT CTG GGA CCG CA	
HCA	S-ATG TCT GAC ACA AGC GAG AG	1820bp/50
	AS-TCA CTT GTA GGA GAA ACC AC	
OPA	S-ATG CGG GCT GCC TGG CTC AT	968bp/50
	AS-AGA GTT GCT GAA GTC AGA GC	
SIAT8C	S-ATG AGA AAC TGC AAA ATG GC	1142bp/50
	AS-TTA GGC ACA GTG TGA CAG AG	
HDL	S-GCC ATC GAC CAC ATC CTC AA	440bp/50
	AS-TTA TCG TTT GGG GCC CCA AG	
HMT	S-ATG GCG GCC TCA TGC TTG GT	1394bp/50
	AS-TTA TGT GTC CAT AAC CAA AG	
Biglycan	S-ATG TGG CCC CTG TGG CGC CT	1106bp/50
	AS-CTA CTT TTT GTA GTT GCC AA	
CPE	S-ATG AGC CTG GTG AGC CTG AA	338bp/50
	AS-CAA CAG ATG ATT ATT TGG AC	
NC	S-AAG TAC AGT GGA AGG TGG AT	412bp/50
	AS-ACA GGT GCA AAG ATT CAC TTT A	

3'-말단과 5'-말단의 상보적인 부위에 annealing을 할 수 있으나, 반면에 dT-ACP 2와 arbitrary ACP는 first-strand cDNA에 결합하지 못함으로 second-strand cDNA만이 증폭된다⁹⁾.

Cloning and sequencing

증폭된 second-strand cDNA을 2% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 size 확인한 다음 elution하여, pCR4-TOPO vector(Invitrogen, USA)에 cloning하였다. 이들 유전자들의 염기서열을 sequencing을 수행하여 확인하였으며, GeneBank™에 등록된 유전자들과 비교 분석하였다.

RT-PCR

확보된 DEGs를 RT-PCR 법을 이용하여 재확인하였다. 즉, DNA polymerase, dNTP, 각 조직으로부터 얻은 cDNA, 그리고 각 DEGs에 특이적인 primer들을 첨가하여 최종 반응액의 부피가 50 µl가 되게 조절하여 반응시켰다. 반응조건은 각각의 annealing Tm 값에 따라 실시하였다(Table 3). RT-PCR을 위한 denature는 95℃에서 5분동안, annealing은 30초 동안, extension은 72℃에서 30초간 실시하였고, cycle 수는 35회로 하였다. 반응이 끝난 후 target sequence의 증폭여부를 1.5% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 확인하였다. 이때 internal control로 GAPDH housekeeping(Table 3) 유전자를 사용하였다.

III. 결 과

A. ODD-RT PCR 방법을 이용한 유전자 연구

각각의 조직을 대상으로 agarose gel에서 전기영동을 수행한 결과 28S rRNA와 18S rRNA의 존재를 확인할 수 있었고 (Fig. 3A), 추출된 RNA를 이용하여 A-tail pool을 제작한 후, agarose gel에서 전기영동을 수행한 결과, 500bp 내외의 cDNA smear 또한 관찰되었다(Fig. 3B). A-tail pool을 주형으로 하여 유전자를 증폭한 후, PAGE를 수행하였을 때 나타나는 band를 비교함으로써 특이적으로 발현되는 유전자들을 볼 수 있었다(Fig. 4).

ODD-RT-PCR로 확인된 특이 유전자들은 re-PCR을 수행하여 pGEM-T vector에 cloning한 후, 유전자의 염기서열을 확인한 다음 이들 유전자들을 Genbank (NCBI)에 등록된 유전자들과의 동일성과 유사성을 조사하여 profile을 확보하였다 (Table 4).

Northern blot을 시행한 결과 X-ray film에 정상조직과 양성종양에서는 볼 수 없었던 band가 악성종양 조직에서만 특이적으로 관찰되었다(Fig. 5A). Gel에 로딩된 RNA양이 같았는지를 확인하기 위하여, gel을 염색하여 본 결과 정상조직의 RNA양이 많이 나타났었다(Fig. 5B). 그 결과 정상과 양성에서는 볼 수 없는 band가 악성에서는 관찰됨으로써, probe로 사용한 EAP가 악성에서만 특이적으로 발현되는 유전자임을 확인할 수 있었다.

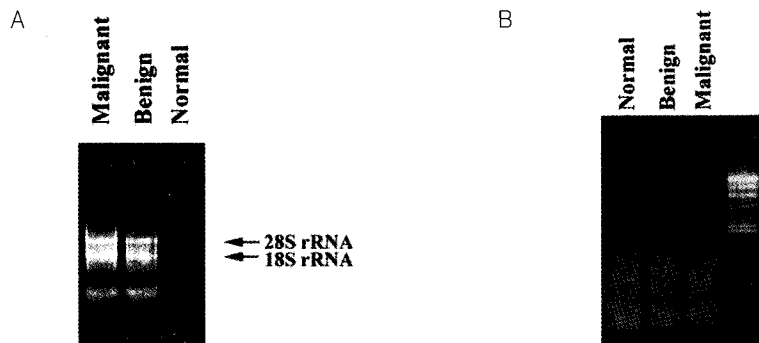


Fig. 3. (A) Isolated total RNA from the studied tissues. Integrity of the isolated total RNA was confirmed by the presence of 28S and 18S rRNA bands. (B) After A-tail pool production, confirmation of relative amount and integrity of each sample by agarose gel-electrophoresis.

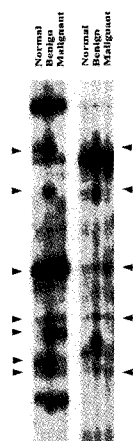


Fig. 4. The three differential cDNA fragments displayed on 6% polyacrylamide gel. The respective combination of extended primers used for subset generation. First, respective InEcc(2pM/ μ l) were γ - 32 P-labelled by T4 polynucleotide kinase. Then 1 μ l of this mixture and non-labelled TE-primer was added to 10 μ l of PCR mixture. PCR was carried out according to the following profile : 95 $^{\circ}$ C for 5min, 95 $^{\circ}$ C for 30s, 65 $^{\circ}$ C for 30s, 72 $^{\circ}$ C for 1min 30s. 28 cycles. Last 72 $^{\circ}$ C for 10min. To discriminate PCR products, 3.5 μ l of each reaction was analyzed on 6% polyacrylamide sequencing gel. After running, the gel was dried at 50 $^{\circ}$ C and exposed to X-ray film for 12h. The bands excised for further analysis are marked with arrowheads.

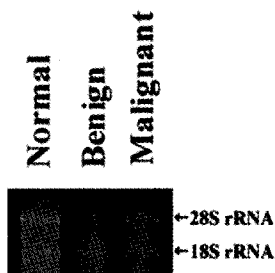


Fig. 6. Isolated total RNA from the studied tissues. Integrity of the isolated total RNA was confirmed by the presence of 28S and 18S rRNA bands.

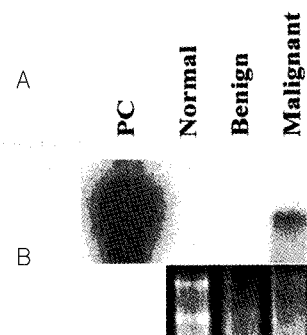


Fig. 5. Northern hybridization analysis. (A) The film was hybridized with the DNA probe obtained from malignant. The EAP gene, which is seemed to be expressed along the malignant tissue, was used to confirm the expression of RNA samples. (B) Gel-electrophoresis on 0.6% agarose gel for position confirmation : normal, benign and malignant, respectively.

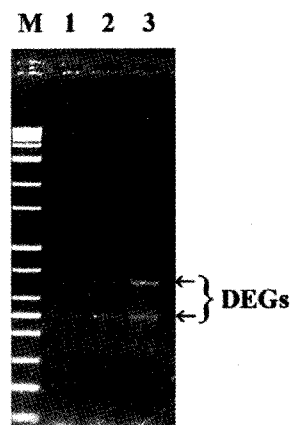


Fig. 7. Amplified cDNA products obtained from different stages of ameloblastoma (normal, lane 1; benign, lane 2; malignant, lane 3) using a set of arbitrary ACP1 and dT-ACP2. M represents 1kb ladder.

Table 4. ODD-RT-PCR : Profiles information retrieved from NCBI database

GenBank id	GenBank Acc	Length nt	Putative identification	E value
927066	L41498.2	250	Homo sapiens longation factor 1-alpha 1 (PTI-1) mRNA	1e-12
927064	L41490.1	250	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1-like 14 (EEF1A1L14) mRNA	1e-12
5138913	AF092132.1	75	Homo sapiens PAK2 mRNA	1e-17
2465720	AF022208.1	75	Homo sapiens palmitoyl-protein thioesterase (PPT) gene	9e-13
8131761	AF144029.1	75	Homo sapiens MDM2 gene	3e-09
2370221	Z96972.1	75	H.sapiens mRNA for immunoglobulin heavy chain variable region	3e-09
14572585	AL139295.6	279	Human chromosome 14 DNA sequence BAC R-61A17 of library RPCI-11 from chromosome 14 of Homo sapiens (Human)	0.059
3885372	AB019569.1	279	Homo sapiens mRNA expressed only in placental villi, clone SMAP84	0.059
3885369	AB019566.1	279	Homo sapiens mRNA expressed only in placental villi, clone SMAP67	0.059
13752361	AF323754.1	250	Homo sapiens ADP-ribosylation factor binding protein GGA2s (GGA2) mRNA	6e-91
5689496	AB029003.1	250	Homo sapiens mRNA for KIAA1080 protein	6e-91
10439189	AK026350.1	250	Homo sapiens cDNA: FLJ22697 fis, clone HSI11994	2e-88
15887320	AC026701.6	613	Homo sapiens chromosome 5 clone CTC-547D20	8e-37
14329055	AC008520.7	613	Homo sapiens chromosome 5 clone CTC-467M3	8e-37
292289	L08895.1	613	Homo sapiens MADS/MEF2-family transcription factor (MEF2C) mRNA	8e-37
17442576	XM_001298.4	541	Homo sapiens hypothetical gene supported by D17652	3e-98
17402905	NM_000983.2	541	Homo sapiens ribosomal protein L22 (RPL22)	3e-98
31061	X59357.1	541	Human mRNA for Epstein-Barr virus small RNAs (EBERs)associated protein (EAP)	3e-98
409069	D1765.1	541	Human mRNA for HBp15/L22	3e-98
400340	L21756.1	541	Homo sapiens acute myeloid leukemia associated protein (AML1/EAP) mRNA	8e-08
17932991	AB061849.1	541	Homo sapiens RPL22 gene for ribosomal protein L22, exons 1, 2 and partial cds	1e-20
14733826	XM_016953.2	154	Homo sapiens similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	6e-16
14733844	XM_042322.1	154	Homo sapiens similar to ELONGATION FACTOR 1-ALPHA 1	6e-16
160147	XM_056957.1	154	Plasmodium falciparum hypothetical cell division cycle ATPase gene, partial ORF	6e-16
31093	X16870.1	154	Human DNA for elongation factor 1-alpha (clone lambda-1)	1e-13
15559738	BC014224.1	154	Homo sapiens, Similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, clone MGC:20826 IMAGE:4335756, mRNA	3e-11
15421128	AY043301.1	154	Homo sapiens elongation factor 1-alpha mRNA	3e-11
15277710	AF397403.1	154	Homo sapiens translation elongation factor 1 alpha 1-like 14 (EEF1A1L14) mRNA	3e-11
181962	J04617.1	154	Human elongation factor EF-1-alpha gene	3e-11
1032495	Z60391.1	154	H.sapiens CpG island DNA genomic MseI fragment, clone 21d8, forward read cpg21d8.ft1a	3e-11
927064	L41490.1	154	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1-like 14 (EEF1A1L14) mRNA	3e-11
7108914	AF174496.1	154	Homo sapiens glucocorticoid receptor AF-1 specific elongation factor mRNA	3e-11
4503470	NM_001402.1	154	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1), mRNA	3e-11
14733826	XM_016953.2	153	Homo sapiens EF1a-like protein mRNA	6e-19
12006048	AF267861.1	153	Homo sapiens EF1a-like protein mRNA	4e-14
31061	X59357	504	Human mRNA for Epstein-Barr virus small RNAs (EBERs)associated protein (EAP)	3e-98
409069	D17652.1	504	Human mRNA for HBp15/L22	3e-98
400340	L21756.1	504	Homo sapiens acute myeloid leukemia associated protein (AML1/EAP) mRNA	8e-80
17932991	AB061849.1	504	Homo sapiens RPL22 gene for ribosomal protein L22, exons 1, 2 and partial cds	1e-20
7706396	NM_106149.1	504	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT protein PIASy (PIASY), mRNA	0.008
7706229	NM_015897.1	504	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT protein PIASy (PIASY), mRNA	0.008
12061188	AY013290	239	Homo sapiens ASC-1 complex subunit P50 mRNA	1e-12
945089	U31059	239	Human Mermaid LINE-1 element mRNA sequence	2e-11
18576721	XM_083848	239	Homo sapiens CGI-18 protein (LOC51008)	1e-12
18555369	XM_011011	198	Homo sapiens glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1 (glycogen branching enzyme, Andersen disease, glycogen storage disease type IV) (GBE1), mRNA	8e-56
3093334	Y17172	183	Homo sapiens mRNA from HIV-associated non-Hodgkin' s lymphoma	8e-04
3327187	AB014587	318	Homo sapiens mRNA for KIAA0687 protein	8e-64
4322935	AF096300	318	Homo sapiens HPK/GCK-like kinase HGK mRNA	8e-64
18553055	XM_038748	318	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP4K4)	8e-64
4758523	NM_004834	318	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP4K4)	8e-64
4185494	AF095891	168	Homo sapiens calpastatin mRNA	3e-06
3093334	Y17172	168	Homo sapiens mRNA from HIV-associated non-Hodgkin' s lymphoma	2e-45
7242877	AB032363	168	Homo sapiens B120ind1 mRNA	3e-44
6453350	Y11107	168	Homo sapiens ITGB4 gene for integrin beta 4 subunit	8e-15

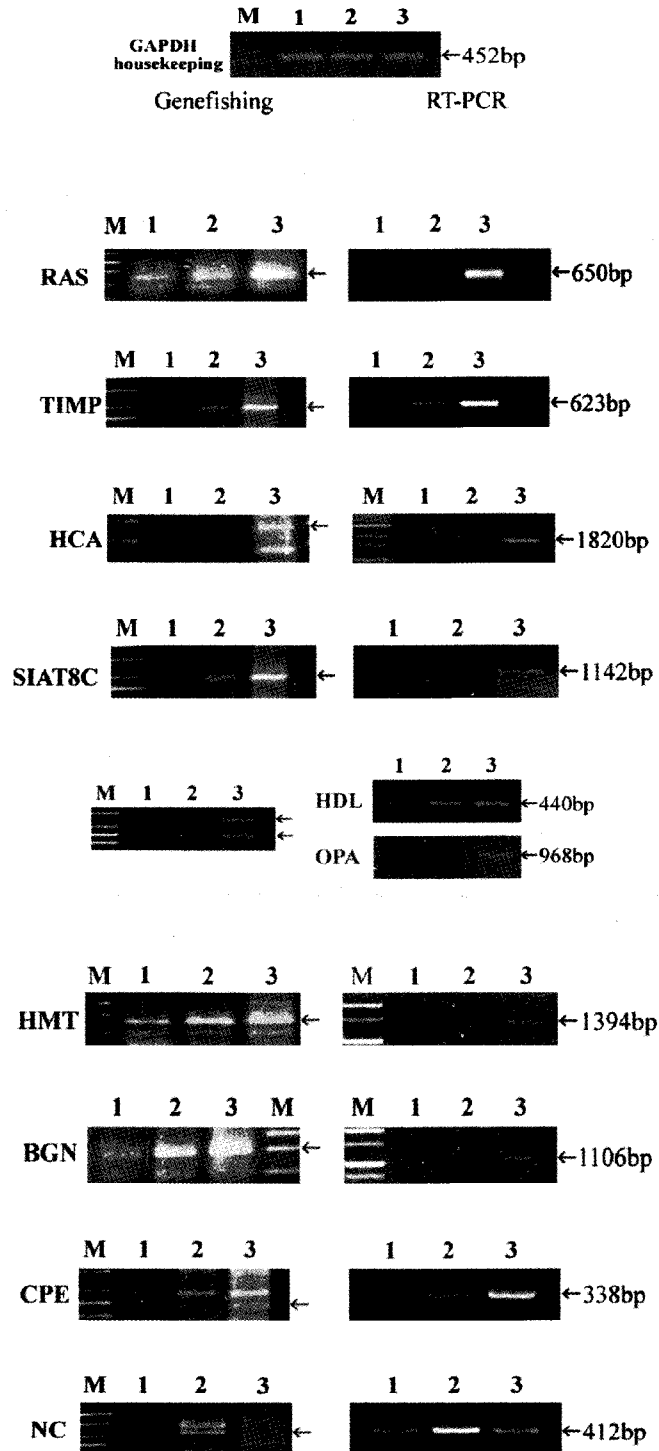


Fig. 8. Amplified cDNA products using each different arbitrary ACPs (left panels; DEGs are marked at the arrows.) and confirmation of each DEGs with RT-PCR products (right panels; Table 3) obtained from different stages of ameloblastoma (normal, lane 1; benign, lane 2; malignant, lane 3). M represents 1kb ladder.

Table 5. Genefishing technology ; Profiles Information retrieved from NCBI database

GenBank id	GenBank- Acc	Length, nt	Putative identification	E value
Malignant up-regulated genes				
12654680	BC001179.1	839	Homo sapiens high density lipoprotein binding protein (vigilin), mRNA	0.0
34534917	AK127833.1	811	Homo sapiens cDNA FLJ45936 fis, clone PLACE7004103	0.0
27657616	AC104841.6	507	Homo sapiens BAC clone RP11-475G3 from 2	e-141
33875393	BC000399.2	783	Homo sapiens acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain, mRNA	0.0
21756933	AK097243.1	783	Homo sapiens cDNA FLJ39924 fis, clone SPLEN2021057, highly similar to ACYL-COA DEHYDROGENASE, VERY-LONG-CHAIN SPECIFIC, MITOCHONDRIAL PRECURSOR	0.0
790446	X86556.1	779	H.sapiens HVLCAD gene	0.0
4827041	NM_005120.1	40	Homo sapiens trinucleotide repeat containing 11 (THR-associated protein, 230kDa subunit) (TNRC11), mRNA	4.0
4530438	AF117755.1	40	Homo sapiens thyroid hormone receptor-associated protein complex component TRAP230 mRNA	4.0
5524202	AF132033.1	40	Homo sapiens OPA-containing protein (HOPA) gene	4.0
21327825	BC032078.1	854	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1, mRNA	0.0
28372776	AC139850.1	359	Homo sapiens BAC clone RP13-25D5 from 2	5e-96
40225623	BC010084.2	517	Homo sapiens hypothetical protein SB153, transcript variant 1, mRNA	e-144
39645179	BC018937.2	509	Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease), mRNA	e-141
21411393	BC031095.1	509	Homo sapiens asparagine-linked glycosylation 1 homolog (yeast, beta-1,4-mannosyltransferase), mRNA	e-141
30985151	AC144862.1	446	Homo sapiens fosmid clone XXFOS-88839D6 from 4	e-122
6970469	AB019038.1	391	Homo sapiens HMT-1 mRNA for beta-1,4 mannosyltransferase	e-106
4503008	NM_001873.1	733	Homo sapiens carboxypeptidase E (CPE), mRNA	0.0
3641620	D85390.1	66	Homo sapiens mRNA for gp180-carboxypeptidase D-like enzyme	1e-07
18042922	BC020169.1	297	Homo sapiens, clone IMAGE:3543815, mRNA	5e-78
14141189	NM_000990.2	295	Homo sapiens ribosomal protein L27a (RPL27A), mRNA	2e-77
13509321	AJ400879.1	289	Homo sapiens ST5 gene for suppression of tumorigenicity 5, L27a gene for ribosomal protein L27a and KIAA0298 gene	1e-75
38044144	AC140139.2	781	Homo sapiens chromosome 5 clone RP11-1417I21	0.0
32891812	AY341030.1	206	Homo sapiens diaphorase (NADH) (cytochrome b-5 reductase) (DIA1) gene	4e-50
21724144	AC112246.4	373	Homo sapiens BAC clone RP11-606M12 from 2	e-100
24497632	NG_000008.5	180	Homo sapiens cytochrome P450, family 2, subfamily A (CYP2A) on chromosome 19	1e-42
4510439	AC007065.5	172	Homo sapiens, clone hRPK.58_A_1	3e-40
24414630	AY165178.1	168	Homo sapiens RAD23 homolog B (S. cerevisiae) (RAD23B) gene	4e-39
16905511	NM_001003.2	628	Homo sapiens ribosomal protein, large, P1 (RPLP1), transcript variant 1	e-177
17932965	AB061836.1	238	Homo sapiens RPP1 gene for ribosomal protein P1	7e-60
33990788	BC002416.2	270	Homo sapiens biglycan, mRNA	1e-69
21328445	NM_005357.2	38	Homo sapiens lipase, hormone-sensitive (LIPE), mRNA	8.5
12654106	BC000866.1	710	Homo sapiens tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor), mRNA	0.0
7705667	NM_015879.1	40	Homo sapiens sialyltransferase 8C (SIAT8C)	5.2
184426	M85289.1	480	Human heparan sulfate proteoglycan (HSPG2) mRNA Homo sapiens ribosomal protein S8 (RPS8)	e-133
4506742	NM_001012.1	698		0.0
29502084	NG_001019.2	603	Homo sapiens immunoglobulin heavy locus (IGH.1@) on chromosome 14	e-169
3095031	AF000145.1	430	Homo sapiens germinal center kinase related protein kinase mRNA	e-117
46242482	AY570526.1	722	Homo sapiens isolate TUVLI mitochondrion	0.0
46242454	AY570524.1	722	Homo sapiens isolate Mansi10512 mitochondrion	0.0
40849819	AY495330.1	722	Homo sapiens isolate V1-25 mitochondrion	0.0
5031748	NM_005517.1	488	Homo sapiens high-mobility group nucleosomal binding domain 2 (HMGN2)	e-135
32328	X13546.1	488	Human HMG-17 gene for non-histone chromosomal protein HMG-17	e-135
18606075	BC022813.1	569	Homo sapiens RAN, member RAS oncogene family, mRNA	e-159
4092053	AF054183.1	569	Homo sapiens GTP binding protein mRNA	e-159
21686608	AF523283.1	373	Homo sapiens clone 1199 MHC class Ib antigen (HLA-E) gene, HLA-E*0101 allele	e-100
14250519	BC008710.1	583	Homo sapiens putative translation initiation factor, mRNA	e-164
5813822	AF083441.1	583	Homo sapiens SUI1 isolog mRNA	e-164
34367154	BX647995.1	186	Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp686P0752	4e-44
33875274	BC000304.2	182	Homo sapiens melanoma antigen, family D, 2, transcript variant 1, mRNA	6e-43
19113672	AF320070.2	182	Homo sapiens hepatocellular carcinoma-associated protein HCA10 mRNA	6e-43
16117792	NM_007209.2	765	Homo sapiens ribosomal protein L35 (RPL35), mRNA	0.0

GenBank id	GenBank Acc	Length, nt	Putative identification	E value
5708496	AC006001.2	618	Homo sapiens PAC clone RP4-756H11 from 7	e-174
3135278	AC004695.1	523	Homo sapiens BAC clone CTA-317H1 from 3p13-3p14.2	e-146
27413210	AC116534.7	48	Homo sapiens chromosome 11, clone RP11-265F24	0.011
			Benign up-regulated genes	
34365281	BX640947.1	684	Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp686G11190	0.0
34535743	AK128394.1	684	Homo sapiens cDNA FLJ46537 fis, clone THYMU3037772, highly similar to Ig gamma-1 chain C region	0.0
41351365	BC065820.1	684	Homo sapiens cDNA clone MGC:75197 IMAGE:6178926	0.0
45595686	BC067091.1	676	Homo sapiens immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker), mRNA	0.0
46326409	AY570731.1	644	Homo sapiens Hepatitis B virus receptor binding protein mRNA	0.0
21757077	AK097357.1	789	Homo sapiens cDNA FLJ40038 fis, clone SYNOV2000297, highly similar to Human (hybridoma H210) anti-hepatitis A IgG variable region, constant region, complementarity-determining regions mRNA	0.0
38513	Z17370.1	781	H.sapiens germline immunoglobulin gamma1 chain constant region gene	0.0
19718803	NG_000834.1	741	Homo sapiens immunoglobulin kappa locus, proximal V-cluster and J-C cluster (IGK-proximal) on chromosome 2	0.0
21592476	AF178581.3	741	Homo sapiens nasopharyngeal carcinoma gene sequence	0.0

B. GeneFishing™ technology을 이용한 유전자 연구

각각의 조직을 대상으로 agarose gel에서 전기영동을 수행한 결과 28S rRNA와 18S rRNA의 존재를 확인할 수 있었고 (Fig. 6), first-strand cDNA를 합성한 다음 arbitrary primer로 PCR하여 agarose gel에서 전기영동한 결과 두 band가 각 조직간에 차이가 있음을 알 수 있었다(Fig. 7). 그리고 이들 유전자들의 염기서열을 확인하기 위하여 sequencing을 수행하였으며, GenBank에 등록된 유전자들과 비교 조사하였다(Table 5).

GAPDH primer를 제작하여, RT-PCR을 수행한 결과 band가 유사하게 나타났으며, nasopharyngeal carcinoma gene을 제외한 나머지 9개의 유전자에서 RT-PCR을 수행한 결과 악성조직에서 band가 더 컸다(Fig. 8). 이렇게 확보하게 된 유전자들 중 본 실험에서는 암과의 연관성이 밝혀진 흥미로운 10개의 유전자를 선별하여 RT-PCR 방법을 통해 재확인 하였다(Table 3). 이때 internal control로써 GAPDH house-keeping 유전자를 사용하였다(Fig. 8). 이 중 1개의 유전자만이 양성 조직에서 특히 많이 발현되었고, 나머지 9개의 유전자는 악성조직에서 특이적으로 많이 발현됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 8).

IV. 고 찰

법랑아세포종의 변연부에 존재하는 입방 또는 원주세포는 치배의 법랑아전구세포와 유사하고, 중앙부에 존재하는 세포들은 치배의 성장망과 상당한 유사성을 보이나, 법랑아세포와는 달리 분비기능이 없고 중앙내의 석회화 물질을 형성하지 않는 것

이 일반적이다^{10,11)}.

이러한 형태학적 유사성을 근거로 법랑아세포종의 기원세포로 치아발생시에 출현하는 법랑기세포가 가장 유력하며, 이외에도 치성낭종 특히 함치성낭종의 이장상피, Malassez 상피잔사, 구강상피 등도 법랑아세포종의 기원세포로 고려되어 왔으나 이에 대해서는 보다 확실하고 명료한 연구를 필요로 하고 있다.

최근 분자 생물학적 기법의 발달로 다양한 종양의 발생기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있어 세포주기와 관련되는 단백질들에 대한 항체들이 개발되고, apoptosis에 관한 연구가 진전을 보임에 따라 세포생물학적인 설명이 가능하여졌고, 분자생물학적 연구가 진행되어짐에 따라 치질형성, 치성낭종 및 치계종양의 발생에 중요한 유전물질이 밝혀지고 있다¹²⁻¹⁴⁾.

그러나 이와 같이 대부분의 치성낭종이나 치성종양이 잔존 법랑상피에서 유래됨은 잘 알려져 있으나 어떤 기전에 의하여 잔존 법랑상피가 낭종세포나 종양세포로 변형을 일으키는지에 관하여는 자세히 밝혀지지 않은 상태이다. 법랑아세포종과 여러 가지 상피잔사와의 현미경적 또는 미세구조적 유사성에 근거를 둔 연구가 수행되어져 왔으며, 효소 등을 이용한 조직화학적 연구 등 법랑아세포종의 기원에 관한 연구도 여러 선학들에 의해 이루어져 왔다.

Cutler와 Innes¹⁵⁾는 법랑아세포종에 대한 전자현미경, alkaline phosphatase 및 ATPase를 이용한 세포화학적 연구에서 치배와 비교함으로써 이 종양의 종양전환시기를 예측하고자 하였으며, Thesleff와 Ekblom¹⁶⁾은 법랑아세포종, 편평상피종, 법랑기에 각질과 laminin을, Nadimi와 Toto¹⁷⁾는 법랑아세포종과 단계별로 구분된 법랑기에 laminin, fibronectin, mannosyl, glycosyl 등을 적용하여 기원을 밝히려고 하였다. 근래

에는 단일클론 항체가 개발되어 종양의 발생을 규명하고, 진단 하는데 많이 이용하고 있으며, Ramaekers 등¹¹⁾은 단일클론 항체를 이용하여 치성종양의 기원을 찾고자 하였다.

최근 치배 발생과정과 합치성낭종, 치성각화낭종 및 범람아 세포종에서 apoptosis와 연관된 단백질의 역할 및 이에 관련된 요인들의 규명을 위해 Bcl-2 family (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak)의 치성상피에서의 발현^{18,19)} 및 laminin, MMP-1, TIMP-1 등의 extracellular matrix protein들의 cell migration 및 cell differentiation^{20,21)}과 inflammatory and osteolytic activity 규명을 위해 IL-1, IL-6, IL-8, tumor necrosis factor 등의 cytokine의 기원에 대한 연구도 활발히 진행되고 있으며, oncogenesis에 대한 연구도 활발히 진행 중이다²²⁻²⁴⁾. 또한, 치계낭종이나 치계종양의 증식도에 관한 연구가 국내외에서 PCNA 및 Ki-67 등 세포주기에 관련되는 항체를 이용한 면역조직화학적 방법으로 행하여지고 있으며²⁵⁻²⁹⁾, ECF, TGF- β , 그리고 치성상피에서만 발현되는 cytokeratin 5, 9의 발현이나 CSF-1등을 이용한 활발한 연구가 진행 중이다³⁰⁻³⁶⁾.

종양을 효과적으로 치료하는데 있어서 가장 큰 장애는 종양 세포와 정상세포의 표현형(phenotype)이 유사하다는 것이다. 정상세포에서 종양세포로의 변환은 정상세포의 기능유지에 필요한 어떤 세포 조절기구의 이상에서 초래된다고 여겨지고 있다. 종양의 발생과 성장은 유전적 요소와 국소적 요인에 의해 조절되는 세포 분화 과정에 달려 있으며, 세포 분화 과정은 유전자의 시간적, 공간적 형질 발현 조절에 기인하고 세포와 세포, 세포와 세포의 기질과의 상호작용의 정도가 세포의 성장, 이동 및 형태적 분화 조절에 관여할 것으로 추측된다³⁶⁾. 이처럼 종양은 종양 세포의 증식이나, 증식을 억제하는 유전자의 변이에 의하여 유발되며, 이 유전자가 생산하는 단백질을 공략하는 새로운 항암제나 유전자 치료들이 개발되고 있다. 예를 들면 minimal residual disease를 추적하는 gene marking, 종양 세포를 환자의 면역체계에 노출시키는 tumor vaccine, 변이된 oncogene이나 tumor suppressor gene의 교정 등이 있다³⁷⁻³⁹⁾.

유전자 발현의 차이를 알아보는 방법으로는 DD-PCR⁴⁰⁾, SSH⁴¹⁾, RDA⁴²⁾, cDNA array 등이 있다. 그러나 이 방법들은 수천 개 이상이 되는 미지의 유전자를 알아내기 위해서는 여러 가지 면에서 적절한 방법이 아니다.

본 연구에서는 먼저 RNA differential display 방법 중에서 재연성과 반복성이 개선된 ODD RT-PCR을 이용하였다. ODD는 두 개의 arbitrary primer 인, anchored T-primer와 adaptor specific primer를 사용하는 효과적인 방법으로⁷⁾, full-length cDNA 없이도 특이 유전자들의 differential display가 가능하며 re-amplification 후 분리된 band들을 바로 sequencing할 수 있고, 이를 probe로써 이용할 수 있다는 장점을 가진 반면에, 많은 노력과 숙달된 기술을 필요로 한다. ODD RT-PCR은 각 조직 간의 유전자 발현 차이를 알아볼 수 있는 효과적인 방법으로 특정 세포나 기관에서 유전자 발현의 양상을 보다 빠르고 효율적으로 분석할 수 있다(Fig. 1)^{7,43)}.

본 연구에서 ODD RT-PCR과 Northern blot을 수행한 결과, 정상과 양성에서는 보이지 않은 band가 악성에서는 관찰됨으로서 probe로 사용한 EAP가 악성에서만 특이적으로 발현되는 유전자임을 확인할 수 있었다. 그러나, ODD RT-PCR 방법으로는 약 50개에서 100개의 band를 PAGE 상에서 볼 수 있는데, false 산물이 섞여있거나, 여러 band가 같은 유전자에 해당하는 하나의 positive clone일 가능성이 높았다. 이러한 이유로 진짜 positive DEG 후보를 찾기 위해 많은 후속 작업이 뒤따라야 하는 문제점이 제기되었다.

따라서 false product 생성을 배제하고 real product 만을 얻기 위하여 Seegene사에서 개발한 APCTM technology(Fig. 2)를 이용하였다. 이 기술의 핵심은 annealing control primer (APC)를 제공한다는 점인데, 이 primer는 크게 3 부분으로 나눌 수 있는데, (a) 3' end arbitrary nucleotide sequence, (b), 5' end non-target universal nucleotide sequence, (c) regulator로서 여기서 regulator는 (a)와 (b) 사이에 bubble 구조를 형성하여 두 영역간의 구분을 확실하게 해준다. 따라서 APC의 annealing portion을 조절하여 primer annealing specificity를 극대화시키는 역할을 한다. Arbitrary ACP (Table 2)는 eukaryotic cDNA database를 분석하여 빈번하게 등장하는 10mer의 염기서열들을 정리한 정보를 참고로 하였고, 실질적으로 human, mouse, plant 등의 개체들에 대해 PCR을 행하여 비교적 고른 PCR product들을 얻는 arbitrary ACP 들로 구성되어있다. 또한 실험군과 대조군에서 PCR을 수행한 후 agarose gel 전기영동 상에서 차이가 보이는 band는 최소 1.5배 이상의 발현 차이가 있음이 확인되었다.

본 연구에서 GeneFishingTM 기술과 RT-PCR을 수행한 결과 nasopharyngeal carcinoma gene을 제외한 9개의 유전자는 악성에서 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다. 따라서 GeneFishingTM을 이용하면 각 시료간의 mRNA 상에서 발현 차이를 보이는 DEG를 비교 분석하면 암 관련 유전자, 항생제 내성 유전자, 그리고 분화 관련 유전자들에 대한 연구가 용이하게 수행할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Bhaskar SN : Oral pathology in the dental office : Survey of 20,575 biopsy specimens. JADA, 76:761, 1968.
2. Regezi JA, Kerr DA, Courtney RM : Odontogenic tumors- Analysis of 706 cases. J Oral Surg, 36:771, 1978.
3. Sirichitra V, Dhiravarangkura R : Intrabony ameloblastoma of the jaws - An analysis of 147 Thai patients. Int J Oral Surg, 13:187, 1984.
4. Vickers RA, Gorlin RJ : Ameloblastoma : Delineation of early histopathologic features of neo-

- plasia. *Cancer*, 26:699, 1970
5. Jang HS : A case report of recurred ameloblastoma. *J Korean Oral Maxillofac Surg*, 22:744, 1996.
 6. Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1):156-9, 1987.
 7. Matz M, Usman N, Shagin D : Ordered differential display : a simple method for systematic comparison of gene expression profiles. *Nucleic Acids Res*, 15:25(12):2541-2, 1997.
 8. Thomas PS : Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 77(9):5201-5, 1980.
 9. Hwang IT, Kim YJ, Kim SH, et al. : Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *BioTechniques*, 35:1180-1184, 2003.
 10. Lane EB : Monoclonal antibodies provide specific intramolecular markers for the study of epithelial monofilament organization. *J Cell Biol*, 92:665, 1982.
 11. Ramaekers FCS, Puts JJG, Moesker O : Antibodies to intermediate filament in the immunohistochemical identification of human tumors - An overview. *Histochem J*, 15:691, 1983.
 12. Merrilees MJ, Sodec J, Aubin JE : Effects of cells of epithelial rests of Malassez and endothelial cells on synthesis of glycosaminoglycans by periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Dev Biol*, 97:146, 1983.
 13. Abiko Y, Saitoh M, Inoue T : Laminin localization and gelatinolytic activity of epithelial rest of Malassez grown on titanium. *Bull Tokyo Dent Coll*, 35:55, 1994.
 14. Peters BH, Peters JM, Kuhn C : Maintenance of cell-type-specific cytoskeletal character in epithelial cells out of epithelial context - cytokeratins and other cytoskeletal proteins in the rests of Malassez of the periodontal ligaments. *Differentiation*, 59:113, 1995.
 15. Cutler LS, Innes DJ Jr : An electronmicroscopic and cytochemical study of follicular ameloblastomas. *J Oral Pathol*, 12:502, 1983.
 16. Thesleff I, Ekblom P : Distribution of keratin and laminin in ameloblastoma. Comparison with developing tooth and epidermoid carcinoma. *J Oral Pathol*, 13:85, 1984.
 17. Nadimi H, Toto PD : Product identification of ameloblastomas and immunohistochemical study. *J Oral Pathol*, 15:439, 1986.
 18. Krajewski S, Hugger A, Krajewska M, et al. : Developmental expression patterns of Bcl-2, Bcl-x, Bax, and Bak in teeth. *Cell Death Differ*, 5:408-415, 1998.
 19. Kumamoto H, Ooya K : Immunohistochemical analysis of bcl-2 family proteins in benign and malignant ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*, 28:343-349, 1999.
 20. Lin F, Zhao L, Wise GE : In vivo and in vitro effects of epidermal growth factor on its receptor gene expression in rat dental follicle cells. *Arch Oral Biol*, 41:485, 1996.
 21. Salo T, Kainulainen T, Parikka M, et al. : Expression of laminin-5 in ameloblastomas and human fetal teeth. *J Oral Pathol Med*, 28:337-342, 1999.
 22. Bando Y, Henderson B, Meghji S, et al. : Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. *J Oral Pathol Med*, 22:221-227, 1993.
 23. Pripatnanont P, Song Y, Harris M, et al. : In situ hybridisation and immunocytochemical localisation of osteolytic cytokines and adhesion molecules in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*, 27:496-500, 1997.
 24. Honma M, Hayakawa Y, Kosugi H, et al. : Localization of mRNA for inflammatory cytokines in radicular cyst tissue by in situ hybridization, and induction of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to radicular cyst contents. *J Oral Pathol Med*, 27:399-404, 1998.
 25. Matthews MB, Bernstein RM, Franza BR, et al. : Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, 303:374, 1984.
 26. Bruno S, Dazynkiewicz Z : Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear antigen detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif*, 25:31, 1992.
 27. Tsuji T, Shrestha P, Yamada K : Proliferating cell nuclear antigen in malignant and pre-malignant lesions of epithelial origin in the oral cavity and the skin : an immunohistochemical study. *Virchows Archiv A Pathol Anat*, 420:377, 1992.
 28. Yang L, Hashimura K, Qin C : Immunoreactivity of

- proliferating cell nuclear antigen in salivary gland tumors: an assessment of growth potential. *Virchows Archiv A Pathol Anat*, 422:481, 1993.
29. Li TJ, Browne RM, Mathews JB : Quantification of PCNA+ cells within odontogenic jaw cyst epithelium. *J Oral Pathol Med*, 23:184, 1994.
 30. Gao Z, Mackenzie IC, Cruchley AT : Cytokeratin expression of the odontogenic epithelia in dental follicles and developmental cysts. *J Oral Pathol Med*, 18:63, 1989.
 31. Wise GE, Lin F, Zhao L : Transcription and translation of CSF-1 in the dental follicle. *J Dent Res*, 74:1551, 1995.
 32. Heikinheimo K, Happonen RP, Miettinen PJ, et al. : Transforming growth factor β 2 in epithelial differentiation of developing teeth and odontogenic tumors. *J Clin Invest*, 91:1019, 1993.
 33. Wise GE, Fan W : Immunolocalization of transforming growth factor beta in rat molars. *J Oral Pathol Med*, 20:74, 1991.
 34. Shroff B, Jeffrey E, Kashner JE : Epidermal growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in the mouth dental follicle during tooth eruption. *Arch Oral Biol*, 41:613, 1996.
 35. Lin SK, Chiang CP, Hong CY, et al. : Immunolocalization of interstitial collagenase(MMP-1) and tissue inhibitor of metallo- proteinases-1(TIMP-1) in radicular cysts. *J Oral Pathol Med*, 26:458-463, 1997.
 36. Christ B, Jacob HJ, Jacob M : Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat Embryol*, 150:170, 1997.
 37. Nienhuis AW, McDonagh KT, Bodine DM : Gene transfer into hematopoietic stem cells. *Cancer*, 15:2700-4, 1991.
 38. James RFL, Edward S, Hui KM, et al. : The effect of class II gene transfection on the tumorigenicity of the H-2k-negative mouse leukemia cell line K36.16. *Immunology*, 72:213-218, 1991.
 39. Mercer WE, Shidlds MT, Lin D, et al. : *Cancer Res*, 51:2897-2901, 1991.
 40. Liang P, Pardee A : Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 14:257(5072):967-271, 1992.
 41. Michiels L, Van Leuven F, Van den Oord JJ, et al. : Representational difference analysis using minute quantities of DNA. *Nucleic Acids Res*, 1:3608-10, 1998.
 42. Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP : Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 11:93(12):6025-30, 1996.
 43. Kang JS, Li RX, Du YC : Ordered differential display. *Chemistry of Life*, 19(6): 282-283, 1999.

Abstract

**ANALYSIS OF DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN NORMAL,
CYST AND AMELOBLASTOMA CELLS**

Cheol-Hee Yang, Jae-Gon Kim, Byeong-Ju Baik, Yeon-Mi Yang

Department of Pediatric Dentistry and Institute of Oral Bioscience, School of Dentistry, Chonbuk National University

Ameloblastoma is the most commonly occurring odontogenic tumor in oral cavity. Although most are benign epithelial neoplasm, they are generally considered to be locally aggressive and destructive, exhibiting a high rate of recurrence. The biological behavior of this neoplasm is a slowly growing, locally invasive tumor without metastasis, therefore malignant neoplasm, changed its histological appearance to carcinoma or showed distant metastasis, is only defined clinically.

In this study, we identified the differentially expressed genes (DEGs) in stages under benign or malignant ameloblastoma compared with normal patient using ordered differential display (ODD) reverse transcription (RT)-PCR and GeneFishing™ technology. ODD RT-PCR is rather effective when the investigation of samples containing very small amounts of total RNA must be accomplished. ODD RT-PCR used the means of amplification with anchored T-primer and adaptor specific primer, bearing definite two bases at their 3' ends and so this method could display differential 3'-expressed sequence tags (ESTs) patterns without using full-length cDNAs. Compared with standard differential display, ODD RT-PCR is more simple and have enough sensitivity to search for molecular markers by comparing gene expression profiles. However, this method required much effort and skill to perform.

GeneFishing™ modified from DD-PCR is an improved method for detecting differentially expressed genes in two or more related samples. This two step RT-PCR method uses a constant reverse primer (anchor ACP-T) to prime the RT reaction and arbitrary primer pairs (annealing control primers, ACPs) during PCR. Because of high annealing specificity of ACPs than ODD RT-PCR, the application of GeneFishing™ to DEG discovery generates reproducible, authentic, and long (100bp to 2kb) PCR products that are detectable on agarose gels.

Consequently, various DEGs observed differential expression levels on agarose gels were isolated from normal, benign, and malignant tissues using these methods. The expression patterns of the some isolated DEGs through ODD RT-PCR and GeneFishing™ were confirmed by Northern blot analysis and RT-PCR. The results showed that these identified DEGs were implicated in ameloblastoma neoplasm processes. Therefore, the identified DEGs will be further studied in order to be applied in candidate selection for marker as an early diagnosis during ameloblastoma neoplasm processes.

Key words : Ameloblastoma, ODD RT-PCR, GeneFishing™