

효모의 재조합 변이주를 이용한 인간 Centromeric Alphoid DNA Repeat의 안정성에 관한 연구

김광섭 · 신영선 · 이상엽 · 안은경 · 도은주 · 박인호 · 임선희* · 선우양일**

동아대학교 자연과학대학 생명과학과

Centromere는 체세포분열과 생식세포분열 등 많은 주요 기능을 담당하는 고도로 분화된 구조이다. Alphoid DNA (α -satellite)는 인간뿐 아니라 모든 영장류의 염색체 내 centromere에서 발견되는 반복서열의 대부분을 차지한다. 인간 인공염색체(Human Artificial Chromosome, HAC)의 개발에서 가장 핵심적인 부분은 centromere의 분리 및 안정적인 유지에 있다. 이 영역은 출아효모에서 alphoid DNA 반복서열을 hook으로 이용하여 Transformation-associated recombination (TAR) cloning법을 사용하여 선택적으로 분리할 수 있다. 이러한 실험방법으로 먼저 repeat array를 rolling-circle amplification (RCA)를 통하여 약 5 kb까지 길이를 연장시킨 후, 효모 내에서 상동성재조합을 이용한 TAR cloning법을 사용하여 분리할 수 있다. 이렇게 분리된 35 kb-50 kb 길이의 4종류의 centromeric DNA repeat arrays (2, 4, 5, 6 mer)를 사용하여, 반복서열의 안정성 유지를 조사하기 위해 상동성재조합 변이주인 *rad51*, *rad52*, *rad54*를 사용하여 비교 분석하였다. 야생주, *rad51*과 *rad54* 변이주를 이용하여 형질전환을 수행한 결과, 반복서열의 크기에 있어서 많은 변화를 나타내었다. 반면, *rad52* 변이주는 야생주와 다르게 형질전환빈도가 매우 낮은 비율로 나타났으나, centromeric DNA repeat array의 안정성은 3배 이상으로 높게 나타났다. 이러한 결과들을 미루어, *rad52* 변이주를 사용하여 centromeric DNA repeat arrays의 형질전환 실험에서 발생하는 많은 변이를 줄일 수 있을 것으로 보인다. 이러한 유전적 방법은 HAC 제작에서 반복서열의 유지에 훨씬 효율적으로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

Key words □ alphoid DNA repeats array, homologous recombination, *Saccharomyces cerevisiae*, TAR cloning

2007년 6월 현재의 기술로는 메울 수 없는 틈새(Gap) 약 400 여개를 남기고 휴먼 게놈 프로젝트의 완성이 발표되었다(by The International Human Genome Sequencing Consortium, 2003). DNA 염기서열 결정에 대한 괄목할만한 기술적인 진전에도 불구하고 게놈 프로젝트의 완성은 euchromatin에 한정된 것으로 heterochromatin 영역은 많은 반복서열들로 구성되어 완성된 염색체의 이해를 어렵게 하고 있다. 인간 염색체 내의 heterochromatin 영역은 전체 염색체 구성을 이해하고, 인간질병의 마지막 해결 열쇠라고도 불리는 인간 인공염색체 구성에 필수적인 telomere와 centromere 영역을 포함하고 있다(2, 11). 이러한 영역에는 각 영역에 특이적인 많은 반복서열을 포함하고 있다(2, 11). 현재까지 완료된 인간의 전체 게놈 연구로 많은 유전자 정보의 사용이 가능하며 다른 고등생물의 유전체 프로젝트에 모델로서 이용되고 있으나, 여전히 고등생물의 염색체 구성을 이해하는 데에는 전체 유전체의 약 45%를 차지하고 있는 반복서열 부분의 해석이 필요하다.

유전체 연구에 있어서 반복서열 영역들은 DNA sequencing 과정의 신장에 있어 기술적 문제를 야기시키고, shot-gun법을 이용한 염기서열 배열조합에 있어 반복서열로 인한 소프트웨어의 문

제 등을 발생시킬 수 있다. 또한 게놈 프로젝트에 사용된 library를 구성한 대장균과 같은 생물체 내에서 반복서열 부분이 불안정한 재배열을 일으키는 생물학적 방법상의 문제도 제기될 수 있다. 특히 long inverted repeats나 AT-rich sequences, 그리고 Z-DNA와 같은 구조를 가진 염기서열의 경우는 대장균 내에서 증폭될 때 매우 불안정하다고 보고되었다(4, 6, 18, 20). 최근 본 실험실에서도 새로운 TAR (Transformation-Associated Recombination) cloning 방법을 이용하여 인간염색체 19번에 남아있는 네 개의 겹을 결정하였다(13). 특히 인간 19번 염색체의 겹에서 *Alu*나 minisatellite와 같은 반복서열들이 겹 부분에 많이 존재함이 밝혀져, 대장균 내에서 증폭되는 library의 경우는 이러한 반복서열의 안정성에 문제가 있을 것이 시사되었다(13). 이러한 연구를 통해 어떤 반복서열들은 대장균 내에서는 매우 불안정하나, 효모 내에서는 안정적이라는 것이 밝혀짐에 따라서 휴먼 게놈 프로젝트에 사용된 BAC library의 문제점이 제기되었다(8, 13). 이러한 반복서열들은 대장균 내에서 증폭되어질 때 부분적 혹은 전체적으로 결실이 일어나는 것이 보고되었다(8, 13).

출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 상동성재조합 기작이 잘 알려져 있으며, 이러한 기작을 이용한 TAR cloning 기술이 개발되었다(9). TAR cloning 기술은 유전체 내에서 분리하고자 하는 유전자 영역에 존재하는 양쪽 말단 DNA 염기서열에 대한 정보를 이용하여 상동성재조합에 필요한 표적 부분에 해당하는 DNA

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-51-200-5639, Fax: 82-51-200-7269
E-mail: shleem@dau.ac.kr, yisunwoo@dau.ac.kr

단편을 제작한다. 즉 cloning 용 vector에 목적으로 하는 유전자 혹은 특정 염색체 부위의 끝 부분에 해당하는 염기배열을 multi-cloning site에 삽입하여 TAR vector를 제작한다(9). 이렇게 TAR vector에 삽입된 염기배열 부분을 hook (Targeting sequence: 표적배열)이라 하며, 이 부분은 효모의 형질전환과 더불어 일어나는 상동성재조합에 사용된다. 이러한 표적배열로서 특정 유전자 말단에 존재하는 unique hook을 제작하는 것과 반복서열 등의 유전체 내에 광범위하게 존재하는 반복서열을 이용한 universal hook이 사용 가능하다. 이 방법을 응용하여, 최근 Ebersole 등(3)은 이러한 hook를 centromere 내의 반복서열인 alphoid DNA repeats array를 사용하여 인간 염색체로부터 기능을 지니는 centromere 영역의 분리에 성공하였다. 인간인공염색체(Human Artificial Chromosome, HAC) 구성의 가장 핵심적인 영역인 centromere 영역에 대한 인간을 비롯한 여러 생물 종에서 게놈 프로젝트의 진행으로 많은 DNA 정보가 밝혀졌지만 여전히 다양한 생물 종에서 이 영역의 규명이란 어려운 일이다.

Centromeric DNA repeat arrays 영역(Fig. 1)의 분리는 출아효모에서 Alphoid DNA의 반복서열을 hook으로 이용하여 Transformation-associated recombination (TAR) cloning법을 사용하여 선택적으로 분리하였다. 방법적으로 centromere DNA repeat arrays를 먼저 rolling-circle amplification (RCA)를 통하여 약 5 kb까지 길이를 연장시킨 후, 효모 내에서 상동성재조합을 이용한 TAR cloning법으로 분리할 수 있다. 본 연구에서는 이렇게 분리된 35 kb~50 kb 길이의 4종류의 centromeric DNA repeat arrays (2 mer, 4 mer, 5 mer, 6 mer)를 사용하여, 인간인공염색체(Human Artificial Chromosome, HAC)의 개발에서 가장 핵심적인 부분인 centromeric DNA repeat arrays 안정적인 유지에 필요한 유전적인 해결을 위하여 출아효모의 상동성재조합 변이주를 이용하여 비교 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmid DNA

본 실험에 사용된 출아효모 *Saccharomyces cerevisiae* 균주는 미국국립암센터(NCI)의 Dr. Vladimir Larionov로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 야생주로 VL6-48 균주(*Mat α his3-Δ200 trp1-Δ1 ura3-52 ade2-101 met14*)를 사용하였고(9, 12), 상동성재조합 결손주로 *rad51* 변이주(VL6-48-Δ51; *Mat α his3-Δ200 trp1-Δ1 ura3-52 ade2-101 met14 rad51-Δ1::HIS3*), *rad52* 변이주(VL6-48-Δ52; *Mat α his3-Δ200 trp1-Δ1 ura3-52 ade2-101 met14 rad52-Δ1::HIS3*), *rad54* 변이주(VL6-48-Δ51; *Mat α his3-Δ200 trp1-Δ1 ura3-52 ade2-101 met14 rad54-Δ1::HIS3*)를 사용하였다. 또한 plasmid DNA (pVC604)와 centromere DNA repeat arrays (2 mer, 4 mer, 5 mer, 6 mer) 증폭에 사용된 대장균의 균주는 DH10B [*F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZDM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galKλ rpsL nupG*]를 사용하였다.

본 실험에 사용된 pVC604 vector에(22) alphoid DNA를 hook

으로 삽입하여 pVC604+alphoid DNA vector를 제작하였다(Fig. 2). Alphoid DNA hook 서열을 만들기 위해 먼저 Forward primer (atcgatgcatcgataagagtggtttcaaaactgct)와 Reverse primer (atcgatgctcgcgacattctcagaaactctttgtgaagttgc)를 사용하여 5'-atcgatcgataagagtggtttcaaaactgctctatcaaaaggaatgttcaacgcgtgagtggaatgcaaacctcacaagaagttctgagaatgctcgcgaggcatgcat-3' 염기서열을 합성하였다. Primer 부분의 굵은 글씨로 밑줄 친 부분이 각각 vector의 multi-cloning site에 삽입될 *Clal* (atcgat)과 *XhoI* (ctcgcg) 제한효소 자리를 나타낸다. 이렇게 삽입된 서열은 TA cloning을 수행할때는 가운데 대문자로 표시된 *MluI* (acgct) site를 잘라 양쪽 끝이 homologous recombination에 이용될 linear vector를 만들어 사용하였다.

효모 배지, 배양조건 및 transformation

효모 및 대장균을 이용한 일반적인 유전학적 방법은 Sambrook 등(19) 및 Sherman 등(21)의 방법을 사용하였다. 대장균 DH10B의 증식용 배지로 LB (Luria-Bertani) broth (0.5% yeast extract, 1% bacto-trypton, 0.5% NaCl, 50 μg/ml ampicillin)를 사용하여 37°C에서 배양하였다. 효모의 배양에는 YPD (1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% glucose) 액체배지와 여기에 2% Bacto-Agar를 첨가한 YPD 고체배지를 사용하였다.

대장균의 형질전환은 Electrophorater (BioRad, CA, USA)를 사용하였고, 효모의 형질전환법으로서 Spheroplasts transformation 법을 사용하였다. 이 실험법에 사용되는 Sorbitol-Ura 배지와 Spheroplasts 제작방법은 본 연구실에서 보고된 실험법에 따랐다(7, 9, 13). 본 실험에 사용된 균주들의 형질전환빈도의 비교분석은 0.1 μg의 4 mer centromeric DNA repeat arrays를 사용하여 spheroplasts transformation으로 조사하였다.

Centromeric DNA repeat arrays의 신장

본 실험에 사용한 centromeric DNA repeat arrays는 인간염색체 21번에 존재하는 centromere 영역에서 분리된 것으로(3), 이 중 centromere로서의 기능성으로 밝혀진 α21-I 영역에 존재하는 alphoid DNA 11 mer를 이용하여 증폭하였다(Fig. 1). 이러한 alphoid DNA 11 mer는 제한효소 *EcoRI*의 처리로 3영역인 5 mer, 2 mer, 4 mer로 나눌 수 있으며 제한효소의 partial treatment로 2 mer와 4 mer가 연결된 6 mer의 분리도 가능하다(Fig. 1). 이러한 4종류의 alphoid DNA를 이용하여 4종류의 centromeric DNA repeat arrays의 신장을 수행하였다. Figure 2에서 보여주는 것과 같이 이 과정은 크게 두 과정으로 나눌 수 있다(3). Figure 1에서 보여주는 것과 같이 먼저 네 종류의 array를 각각 ligation하여 연결한 후, 각 repeat 내에서 가장 많이 존재하는 8개의 염기서열을 primer로 하여(3) Amersham TempliPhi kit (GE healthcare, USA)를 이용하여 RCA를 수행하였다. 약 5 kb 정도의 신장이 이루어지면 이 repeats DNA를 넣고, 효모 내에서 linearized pVC604+alphoid DNA vector와 함께 spheroplast 형질전환법으로 TAR cloning을 수행하였다. 이 방법으로 4종류의 repeats에 대해 각각 35 kb~50 kb의 centromeric DNA repeat arrays를 분리하였다.

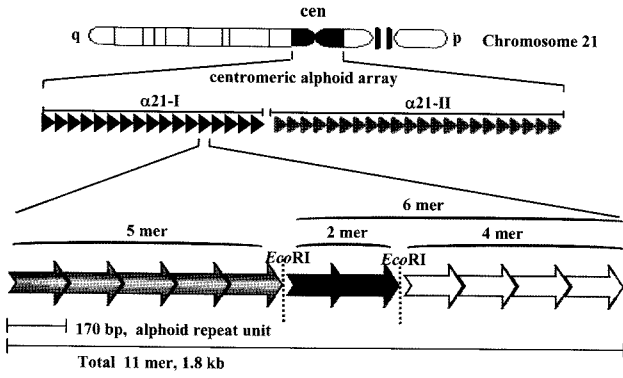


Fig. 1. The alphoid DNAs at the human chromosome 21. The structure of centromeric alphoid array at chromosome 21. Alphoid arrays at human centromere extend to several Mega bases. Type I arrays ($\alpha 21$ -I) are highly homogeneous higher-order repeats of the 170 bp monomer. Alphoid arrays with monomers containing the 17 bp CENP-B box have been shown to form artificial chromosome in cultured cells, but Type II arrays ($\alpha 21$ -II) have proven to be inefficient. The 2 mer, 4 mer, 5 mer and 6 mer in the 11 mer of human alphoid DNAs were obtained by an *EcoRI* digestion.

효모 및 대장균 내에서 centromeric DNA repeat arrays 크기 확인

효모에서 TAR cloning법으로 분리된 centromeric DNA repeat arrays의 크기를 조사하기 위하여, 무작위로 30개의 형질전환체를 5 ml의 SD-His 배지에 하룻밤 30°C에서 배양하였다. 이러한 효모의 형질전환체로부터 YAC DNA를 분리하여(12), 그 중 1/5의 양을 *NotI* 효소로 처리한 후 CHEF (Clamped homogeneous electric field) gel electrophoresis (BioRad)를 수행하였다. 각 클론에 삽입된 centromeric DNA repeat arrays의 크기는 alphoid DNA를 probe로 사용하여 Southern blotting (19)하여 확인하였다. 또한 안정성 실험을 위해서는 크기가 확인된 alphoid DNA를 효모 내로 다시 형질전환 시킨 후, 다시 30개의 형질전환체를 배양하여 DNA 크기를 조사하였다.

효모에서 분리된 4종류의 centromeric DNA repeat arrays를 대장균에 형질전환시킨 후, 완전한 크기로 대장균 내로 전달되는지 조사하기 위하여 무작위로 형질전환체를 선별하여 DNA를 분리하여 제한효소 *NotI*로 처리한 후 CHEF gel electrophoresis를 수행하였다. 또한 삽입된 centromeric DNA repeat arrays의 대장균 내에서 안정하게 유지되는지를 조사하기 위하여, 삽입 크기가 확인된 형질전환체를 평판배지에 streaking하여 single colony를 형성시킨 후, 그 subclone을 배양하여 조사하였다.

결과 및 고찰

효모 내의 *in vivo* homologous recombination을 이용한 신장된 centromeric DNA repeat arrays의 분리

본 실험에 사용된 각 alphoid DNA의 반복단위 2 mer, 4 mer, 5 mer, 6 mer 염기서열은 Fig. 1에서 보여주는 것과 같이 인간 염색체 21번의 centromere에 존재하는 영역으로 그 기능이 증명

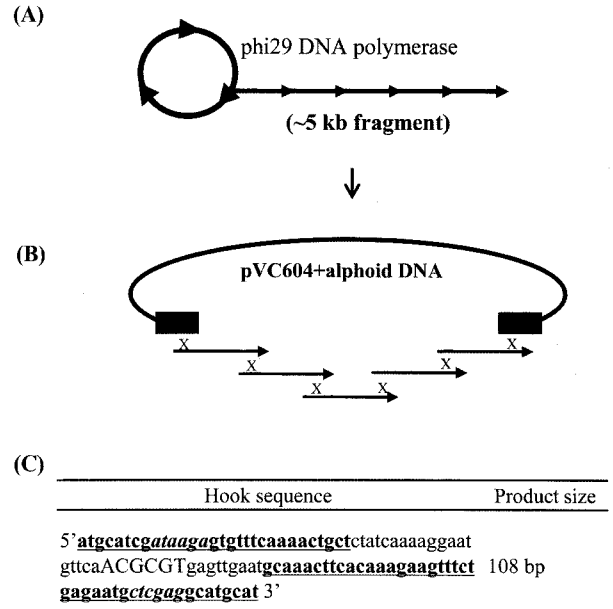


Fig. 2. Construction of synthetic centromeric DNA repeat arrays. (A) Scheme for amplification of multimers by RCA to approximately 5 kb. (B) The isolation of the elongated alphoid DNAs as a circular YACs using TAR vector. The TAR vector contains sequences from 5' promoter region (black box) and from 3' end (black box) of target alphoid DNA (C). Yeast cells were transformed with the RCA-amplified fragments along with a TAR vector containing two target alphoid-specific hooks. Arrows indicate the RCA-amplified fragments and x represents the homologous recombination between the alphoid DNAs. The vector contains an yeast cassette, *HIS3/CEN/ARS* (a selectable marker *HIS3*, a centromere sequence *CEN6* from yeast chromosome VI and yeast origin of replication *ARSH4*) and a BAC replicon that allows the YAC clones to be transformed into *E. coli* cells. (C) The DNA sequence of the alphoid-specific hook.

된 $\alpha 21$ -I 영역에 존재하는 alphoid DNA 11 mer를 이용하여 증폭하였다(Fig. 1). 또한 centromeric DNA repeat arrays를 신장하기 위한 TAR cloning의 target sequence로서 alphoid DNA를 hook으로 사용하였다(Fig. 2C). 각 네 종류의 alphoid DNA 내의 unit 사이에서의 상동성을 비교하면, Table 1에서 보여주는 것과 2 mer는 두 개의 units 간에 75.56% 상동성을 나타내었고, 4 mer는 각각 73.98%~86.08%의 상동성을 나타내었다. 5 mer의 경우는 상동성이 5 mer-2와 5 mer-4가 매우 낮아 blast (1)에 의해서는 상동성이 확인되지 않았으나 다른 unit간에는 75.79~87.5%의 상동성을 나타내었다. Table 1에서 X로 표시된 부분은 상동성이 70% 미만인 부분을 의미한다. 이러한 alphoid DNA 11 mer는 제한효소 *EcoRI* 제한효소의 partial treatment로 2 mer, 4 mer, 5 mer 그리고 2 mer와 4 mer가 연결된 6 mer로 분리하여 ligation으로 원형을 만든 후(Fig. 1), phi DNA polymerase로 약 5 kb까지 신장시킨 후, 이를 다시 효모 내에서 상동성재조합을

Table 1. Homology among the units of human 11 mer alphoid DNA repeat array

	2mer-1	2mer-2	4mer-1	4mer-2	4mer-3	4mer-4	5mer-1	5mer-2	5mer-3	5mer-4	5mer-5
2mer-1											
2mer-2	75.56										
4mer-1	86.16	76.87									
4mer-2	X	81.55	73.98								
4mer-3	81.41	76.69	86.08	74.07							
4mer-4	76.85	88.02	77.27	84.43	75.7						
5mer-1	86.71	78.36	97.08	73.98	85.31	77.27					
5mer-2	X	80.24	75.79	86.9	X	81.1	75.79				
5mer-3	75.4	85.35	79.03	92.07	80	85	79.03	82.32			
5mer-4	78.52	76.69	83.57	74.05	91.78	72.52	82.86	X	77.69		
5mer-5	77.27	90.97	79.45	85.03	77.86	90.42	79.45	85.8	87.5	76.43	

Blastn, gap x_dropoff :50, penalty for mismatch : -3

이용한 TAR cloning법으로 신장시켰다(Fig. 2).

네 종류의 centromeric DNA repeat arrays를 사용하여 TAR cloning법에 의해 형성된 형질전환체 각각 60개를 분석하여, 여러 크기로 신장된 alphoid DNA를 Southern blotting analysis에 의해 확인되었다(예: 4 mer alphoid DNA의 신장, Fig. 3A). 그 결과, 35 kb의 2 mer array, 45 kb의 4 mer array, 50 kb의 5 mer array와 30 kb의 6 mer array가 가장 긴 길이로 신장된 centromeric DNA repeat arrays로 분리하였다(Table 2A).

본 실험을 통해 얻어진 각 centromeric DNA repeat arrays의 신장된 길이는 30 kb~50 kb로 차이를 나타내었다. 이는 각 반복 unit 내에 존재하는 염기서열의 상동성 차이에 의한 상동성재조합 빈도의 차이나 상동성재조합이 일어난 후 효모 내에서 DNA array 유지에 대한 안정성에 대한 차이를 고려할 수 있다. 먼저 상동성재조합 빈도는 DNA의 말단 서열에 의존한다고 보고되었고(15), 말단의 상동성이 70%에서 100%에 이르기까지 거의 유사한 빈도로 나타남이 밝혀졌다(16). 즉, 각 centromeric DNA repeat arrays의 각 unit간의 상동성의 차이가 있더라도 말단 영역의 상동성이 73.98~76.43%를 나타내므로 이로 인한 빈도의 차이로 고려하기는 어렵다. 반면, 예를 들어 Fig. 3A에서 보여주는 것과 같이 4 mer의 신장된 길이를 Southern blotting을 통해 조사하였을 때, 한 lane 당(한 형질전환체 당) 한 개 이상의 band가 확인되어 재배열의 가능성을 나타내었다. 그러므로 각 centromeric DNA repeat arrays의 신장된 길이의 차이는 상동성재조합이 일어난 후, 효모의 증식과정에서 일어나는 DNA array의 안정성의 차이로 사료되어 centromeric DNA repeat arrays의 안정성에 대한 실험을 수행하였다.

대장균 내에서의 centromeric DNA repeat arrays 안정성

네 종류의 centromeric DNA repeat arrays에서 가장 긴 길이로 선택된 형질전환체를 5 ml의 SD-His배지에 하루밤 배양한 후, 효모 DNA를 분리하여 100 µl의 물에 녹였다. 이 중 2 µl 사용하

Table 2. (A) Accurate transfer of alphoid DNA repeats into *E. coli*

Alphoid DNA	Size	Intact alphoid repeats / total colonies	Stability (%)
2 mer	35 kb	1/84	1.2
4 mer	45 kb	1/56	1.8
5 mer	50 kb	1/28	3.3
6 mer	30 kb	1/84	1.2

To analyze the accuracy of the alphoid DNA arrays into *E. coli*, individual transformants were cultured to isolate the DNA, and were analyzed by CHEF gel electrophoresis.

(B) Stability of alphoid DNA repeats during propagation in *E. coli*

Alphoid DNA	Size	Stable colonies / total colonies	Stability (%)
2 mer	35 kb	10/20	50
4 mer	45 kb	17/20	85
5 mer	50 kb	20/20	100
6 mer	30 kb	0/20	0

To analyze the stability of the alphoid DNA arrays, *E. coli* transformants included the entire repeats size were streaked to single colonies, and individual subclones were analyzed by CHEF gel electrophoresis.

여 Electroporater를 사용하여 대장균 DH10B에 형질전환 시킨 후, 대장균 형질전환체 28~84개로부터 DNA를 분리하였다. 각 DNA를 제한효소로 절제 후, CHEF 전기영동을 통해 크기를 조사하여 효모에서와 같은 크기를 지닌 형질전환체를 선별하였다(Table 2A). 대장균 내로 완전한 크기로 centromeric DNA repeat arrays 유지된 형질전환체의 빈도는 2 mer, 4 mer, 5 mer 그리고 6 mer에서 각각 1.2, 1.8, 3.3, 1.2%로 나타났다(Table 2A).

대장균에서 분리된 35 kb의 2 mer array, 45 kb의 4 mer array, 50 kb의 5 mer array와 30 kb의 6 mer array를 지닌 대장

균이 증식시키는 동안 그대로 유지되어지는 지를 알아보기 위해 각 형질전환체를 평판배지에 streaking하여 subcolony를 형성시켰다. 이러한 subcolony들을 각 array마다 20개씩 배양하여 DNA를 분리하고 크기를 조사하였다(Table 2B). 그 결과 안정하게 유지된 빈도가 2, 4, 5, 6 mer에서 각각 40, 85, 100, 0%로 각각 나타났다.

이러한 재배열 현상은 각 반복 unit 내에 존재하는 염기서열의 높은 상동성으로 인한 것으로, 앞선 연구에서 진핵세포의 반복서열이 대장균에서 불안정하다는 결과와 일치한다(8, 13). 또한 각 array 간의 안정성 차이는 반복 unit 내에 존재하는 염기서열 간의 상동성의 차이로 사료된다. 이는 앞에서 서술한 각 centromeric DNA repeat arrays의 신장된 길이의 차이와 일치하는 결과로서 상동성재조합이 일어난 후의 세포 내에서의 재배열로 인한 결과로 사료된다.

효모 내에서의 안정성 비교와 상동성재조합 변이주의 이용

TAR cloning법으로 신장된 각 centromeric DNA repeat arrays를 대장균 내로 형질전환 시켰을 때, 수 %의 빈도로 완전한 크기의 DNA 들이 유지되며 다시 증식되는 동안 그 안정성에도 차이를 나타내었다. 이러한 실험에 사용된 대장균은 *recA1*으로서 재조합 빈도가 낮게 나타나는 균주이며, 유전체 연구에서 많이 사용되었다. 반면 효모의 경우는 상동성재조합이 높아 유전체 연구에 있어서 chimera 형성으로 인해 DNA 유지에 적합하지 않은 것으로 알려져 있다(5, 17).

45 kb의 4 mer의 centromeric DNA repeat arrays를 효모 내로 형질전환 시킨 후, 형성된 형질전환체 30개를 배양하여 DNA를 추출한 후, 재료 및 방법에서와 같이 CHEF 전기영동 후, Southern blot analysis를 통하여 그 크기를 조사하였다. 그 결과, Table 3A에서 보여주는 것과 같은 0.1 µg의 alphoid DNA 당 평균 234개의 형질전환체가 확인되었고, 형질전환체 내에 존재하는

완전한 크기의 alphoid DNA는 30개 중 6개가 확인되어 20%의 안정성 빈도를 나타내었다. 효모에서 완전한 크기의 형질전환체의 빈도는 대장균에 비해 매우 높은 빈도를 나타내지만(1.8% vs 20%; Table 2A vs Table 3B), 반복서열을 갖지 않는 일반적인 DNA는 80~95%의 안정성을 나타내므로 상대적으로 낮은 값을 의미한다. 이러한 낮은 안정성 빈도를 높이기 위해 대장균의 *recA1*와 같이 상동성재조합에 관련된 변이주인 *rad51*, *rad52*, *rad54* 균주를 이용하여 안정성에 대해 조사하였다. 먼저 0.1 µg의 4 mer alphoid DNA에 대해 형질전환빈도를 조사한 결과, 야생주에 비해 *rad51*과 *rad54* 균주는 빈도의 차이를 거의 나타내지 않았으나(Table 3A), *rad52* 균주는 현저한 형질전환 빈도의 감소를 나타내었다(4.7%). 이러한 형질전환체 각각 30개를 분리하여 균주 내에 유지된 alphoid array의 길이를 조사하였다. 그 결과, 형질전환빈도가 야생주에 비해 유사하게 나타난 *rad51*과

Table 3 (A) Transformation frequency of mutants by spheroplast methods

Strain	Average number of transformants ^a	Ratio
Wild type	234	1
<i>rad51</i>	251	1.07
<i>rad52</i>	11	0.047
<i>rad54</i>	207	0.88

^a0.1 µg of 5 mer alphoid DNA was used

(B) Stability of 5 mer alphoid DNA repeat array in yeast strains

Strains	Intact size/total colonies	Stability (%)
Wild type	6/30	20.0
<i>rad51</i>	7/30	23.3
<i>rad52</i>	22/30	73.3
<i>rad54</i>	6/30	20.0

To analyze the stability of the alphoid DNA arrays, yeast transformants were analyzed by CHEF gel electrophoresis and southern blot analysis

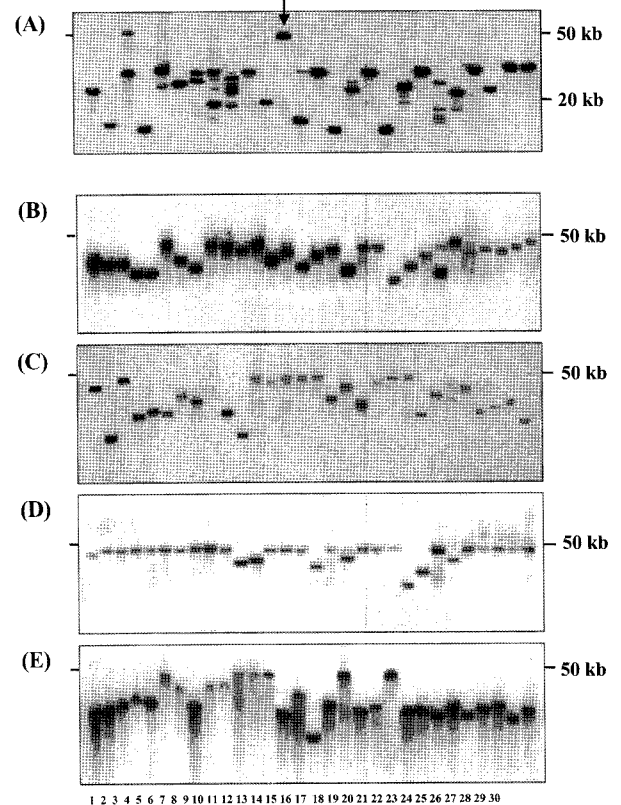


Fig. 3. Stability of synthetic 4 mer based alphoid arrays in recombination-deficient yeast strains. (A) 45 kb alphoid DNA arrays (black arrow) generated from 4 mer was isolated from wild-type yeast strain by TAR cloning. CHEF analysis of the YAC clones showed that approximately half of yeast transformants contained alphoid DNA larger than 20 kb. The transformation yields of intact inserts with 2 mer, 4 mer, 5 mer and 6 mer-based arrays were determined (Table 2 A). (B)~(E) showed the stability of subclones from the recombination-deficient yeast transformants with the 45 kb alphoid arrays; (B) wild-type (C) *rad51* (D) *rad52* (E) *rad54*. To analyze the stability of these alphoid arrays, transformants were streaked to single colonies, and individual subclones were analyzed by Southern blot hybridization.

rad54 균주는 안정성에서도 각각 23.3%와 20%로 유사한 값을 나타내었다(Table 3, Fig. 3B, C, E). 이에 비해 매우 낮은 형질 전환빈도를 나타내었던 *rad52* 균주는 야생주보다 3배 이상 높은 73.3%의 안정성을 나타내었다(Table 3, Fig. 3D).

이러한 결과들은 먼저 TAR cloning에 사용되는 spheroplast transformation법은 상동성재조합과 형질전환빈도가 매우 밀접한 것으로 보이며, 이때의 상동성재조합 기작에는 *RAD52*가 주된 역할을 하는 것으로 사료된다. 또한 세포 내의 상동성재조합에 의한 재배열에도 *RAD52*가 주역할을 수행하는 것으로 사료되어, centromeric DNA repeat arrays와 같이 재배열이 잘 일어나는 불안정한 DNA 서열의 유지에는 *rad52* 균주가 매우 효과적으로 사용될 수 있음이 밝혀졌다. 또한 5 mer centromeric DNA repeat arrays를 이용한 실험에서도 유사한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 효모의 360 kb의 염색체 3번을 *rad52* 균주에 형질 전환시켜 안정성을 높인 결과와 일치한다(10).

본 연구의 결과들을 종합하면 상동성재조합이 높은 효모 내에서 TAR cloning법을 이용하면, 반복서열간의 재조합에 의해 효소를 사용하지 않고 효율적으로 그 길이를 신장할 수 있다. 이러한 상동성재조합 기작은 단지 재배열에만 영향을 주는 것이 아니라 spheroplast transformation의 형질전환 빈도에도 영향을 나타내므로, 야생주에서 반복서열의 신장을 시킨 후 연이어 그 DNA를 *rad52* 균주로 삽입시킨다면 안정성 유지에 도움을 주었으므로 고등생물의 인공염색체 제작에 도움이 될 것으로 사료된다.

감사의 말

이 논문은 2005학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제) 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E. Meyers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- De Lange, T. 2004. T-loops and the origin of telomeres. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 323-329.
- Ebersole, T., Y. Okamoto, V.N. Noskov, N. Kouprina, J.H. Kim, S.H. Leem, J.C. Barrett, H. Masumoto, and V. Larionov. 2005. Rapid generation of long synthetic tandem repeats and its application for analysis in human artificial chromosome formation. *Nucleic Acids Res.* 33, e130.
- Hagan, C.E. and G.J. Warren. 1982. Lethality of palindromic DNA and its use in selection of recombinant plasmids. *Gene* 19, 147-151.
- Green, E.D., H.C. Reithman, J.E. Dutchik, and M.V. Olson. 1991. Detection and characterization of chimeric yeast artificial chromosome clones. *Genomics* 11, 658-669.
- Kang, H.K. and D.W. Cox. 1996. Tandem repeats 3' of the IGHA genes in the human immunoglobulin heavy chain gene cluster. *Genomics* 35, 189-195.
- Kim, J.H., Y.S. Shin, Y.H. Yoon, H.J. Jang, E.A. Kim, K.S. Kim, C.N. Chung, I.H. Park, S.H. Leem, and Y. Sunwoo. 2003. Effect of GC content on target hook required for gene isolation by transformation-associated recombination cloning. *Kor. J. Microbiol.* 39, 128-134.
- Kouprina, N., S.H. Leem, G. Solomon, A. Ly, M. Koriabine, J. Otstot, E. Pak, A. Dutra, S. Zhao, J.C. Barrett, and V. Larionov. 2003. Segments missing from the draft human genome sequence can be isolated by TAR cloning in yeast. *EMBO Rep.* 4, 257-262.
- Kouprina, N. and V. Larionov. 1999. Selective Isolation of mammalian Genes by TAR cloning. In A.L. Boyle. (ed.), *Current Protocols in Human Genetics*, UNIT 5.17, John Wiley & Sons, Inc. New York, NY, USA.
- Larionov, V., J. Graves, N. Kouprina, and M.A. Resnick. 1994. The role of recombination and *RAD52* in mutation of chromosomal DNA transformed into yeast. *Nucleic Acid Res.* 22, 4234-4241.
- Lee, C., R. Wevrick, R.B. Fisher, M.A. Ferguson-Smith, and C.C. Lin. 1997. Human centromeric DNAs. *Hum. Genet.* 100, 291-304.
- Leem, S.H., V.N. Noskov, J.E. Park, S.I. Kim, V. Larionov, and N. Kouprina. 2003. Optimum conditions for selective isolation of genes from complex genomes by transformation-associated recombination cloning. *Nucleic Acid Res.* 31, e29.
- Leem, S.H., N. Kouprina, J. Grimwood, J.H. Kim, M. Mullokandov, Y.H. Yoon, J.Y. Chae, J. Morgan, S. Lucas, P. Richardson, C. Detter, T. Glavina, E. Rubin, J.C. Barrett, and V. Larionov. 2004. Closing the gaps on human chromosome 19 revealed genes with a high density of repetitive tandemly arrayed elements. *Genome Res.* 14, 239-246.
- Neil, D.L., A. Villasante, R.B. Fisher, D. Vetrie, B. Cox, and C. Tyler-Smith. 1990. Structural instability of human tandemly repeated DNA sequences cloned in yeast artificial chromosome vectors. *Nucleic Acids Res.* 18, 1421-1428.
- Noskov, V.N., M. Koriabine, G. Solomone, M. Randolph, J.C. Barrett, S.H. Leem, L. Stubbs, N. Kouprina, and V. Larionov. 2002. Defining the minimal length of sequence homology required for selective gene isolation by TAR cloning. *Nucleic Acids Res.* 29, e32.
- Noskov, V.N., S.H. Leem, G. Solomone, M. Mullokandov, J.Y. Chae, Y.H. Yoon, Y.S. Shin, N. Kouprina, and V. Larionov. 2003. A novel strategy for analysis of gene homologues and segmental genome duplications. *J. Mol. Evol.* 56, 702-710.
- Petek, E., P.M. Kroisel, and K. Wagner. 1997. Isolation of site-specific insert probes from chimeric YACs. *BioTechniques* 23, 72-77.
- Razin, S.V., E.S. Ioudinkova, E. Trifonov, and K. Scherrer. 2001. Non-clonability correlates with genome instability: A case of unique DNA region. *J. Mol. Biol.* 307, 481-486.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd (ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
- Schroth, G.P. and P.S. Ho. 1995. Occurrence of potential cruciform and H-DNA forming sequences in genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23, 1977-1983.
- Sherman, F., G.R. Fink, and J.B. Hicks. 1986. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
- Sikorski, R. and P. Philip. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.

(Received October 22, 2007/Accepted November 23, 2007)

ABSTRACT: Stability of Human Centromeric Alphoid DNA Repeat during Propagation in Recombination-Deficient Yeast Strains**Kwang-Sup Kim, Young-Sun Shin, Sang-Yeop Lee, Eun-Kyung Ahn, Eun-Ju Do, In-Ho Park, Sun-Hee Leem*, and Yangil Sunwoo**** (Department of Biological Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea)

The centromere is a highly differentiated structure of the chromosome that fulfills a multitude of essential mitotic and meiotic functions. Alphoid DNA (α -satellite) is the most abundant family of repeated DNA found at the centromere of all human chromosomes, and chromosomes of primates in general. The most important parts in the development of Human Artificial Chromosomes (HACs), are the isolation and maintenance of stability of centromeric region. For isolation of this region, we could use the targeting hook with alphoid DNA repeat and cloned by Transformation-Associated Recombination (TAR) cloning technique in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The method includes rolling-circle amplification (RCA) of repeats *in vitro* to 5 kb-length and elongation of the RCA products by homologous recombination in yeast. Four types of 35 kb~50 kb of centromeric DNA repeat arrays (2, 4, 5, 6 mer) are used to examine the stability of repeats in homologous recombination mutant strains (*rad51*, *rad52*, and *rad54*). Following the transformation into wild type, *rad51* and *rad54* mutant strains, there were frequent changes in inserted size. A *rad52* mutant strain showed extremely low transformation frequency, but increased stability of centromeric DNA repeat arrays at least 3 times higher than other strains. Based on these results, the incidence of large mutations could be reduced using a *rad52* mutant strain in maintenance of centromeric DNA repeat arrays. This genetic method may use more general application in the maintenance of tandem repeats in construction of HAC.