

## Application of the cDNA array system for screening anti-atherogenic agents

이원하\*, 박정의\*, 김재화, 오구택

\*삼성생명과학연구소, 생명공학연구소

전 세계적으로 인간유전체사업(Human genome project)이 시작된지 10년이 지나면서 예상보다 훨씬 빠른 속도로 유전체의 물리적인지도 작성 및 염기서열의 결정이 완성되어 감에 따라 이와 관련된 유전체의 기능연구로 그 방향이 전환되고 있다. 이러한 조류에 편승하여 "Functional Genomics"라는 신조어가 자연과학의 세계에 등장하게 되었으며, 그 의미의 광대함과 다양한 해석에도 불구하고 유전체 구조와 결부하여 생물학적 메커니즘을 이해하려는 새로운 아이디어와 접근방법들을 도출하려는 움직임이 활발히 일어나고 있다. 본 연구는 전 세계에서 치열한 경쟁의 소용돌이에 휘감기고 있는 "Functional Genomics", 즉 "기능 발현"이라는 엄청난 과제의 궁극적인 목적이라고 할 수 있는 약리유전체학(Pharmacogenomics)의 기본 개념을 이용한 동맥경화치료제의 개발에 대한 연구진행의 결과이다. 인간유전체프로젝트를 통하여 개발된 신기술은 유전학을 일신시켰고, 그 고도의 기술과 약물유전학을 결합시킨 약리유전체학을 창조하였다. 생화학에 기반을 둔 약물유전학(pharmacogenetics)에 비하여서 약리유전체학은 고성능 DNA 염기서열 결정, 유전자 지도, 생물정보학(bioinformatics) 등을 이용한다. 신기술의 발달로 인해 새로운 유전자들을 찾아낼 능력이 비약적으로 향상되었는데, 그 중에는 신체속성, 질병이환률, 혹은 의약품에 대한 반응을 결정하는 여러 유전자들이 포함되어 있다.

본 연구에서는 동맥경화 모델동물로 이용되는 유전자적중동물(knock-out)을 이용하여 동맥경화 치료제를 찾아내고, 효능이 있는 물질을 이용하여 치료 기전을 연구하였다. 치료기전 및 발병기전에 대한 연구를 토대로 동맥경화의 발병 및 치료에 관련된 유전자들의 정보를 확보하여 이들을 cDNA array를 만드는 기초 자료로 사용하였다. 또한 현재 대표적인 동맥경화 모델동물인 low density lipoprotein receptor 유전자적중동물에서 고지질혈증을 실시할 경우 서로 다르게 발현되는 유전자를 DDRT-PCR기법으로 선별하였으며, 흡연시 발현이 조절되는 유전자들을 cDNA array chip을 이용하여 선별중에 있다

### 1. 유전자 적중 동물을 이용한 발병 및 치료 기전 연구

유전자의 기능을 생쥐라는 동물 모델에서 살펴보기 위해 가장 많이 사용되었던 방법은 유전자를 과발현시키거나 (Gain of Function), 결손시키는(Loss of Function)형질 전환 생쥐를 만드는 것인데, 지질대사에 관련된 유전자가 과발현되거나 "knockout"된 생쥐들은 그 유전자들의 발현 양상과 동맥경화의 발생 사이의 연관관계를 설명하기 위한 동물 모델로서 이용되어 왔다. 이러한 소위 "제1세대" 모델을 통하여 동맥경화의 발생에

있어서 특정 유전자의 역할을 살펴볼 수 있었고, 더 나아가서 개별 형질전환 생쥐모델의 교배를 통한 두 종류 이상의 유전자가 변형된 생쥐모델을 통하여 동맥경화의 발생에 있어 어떻게 각각의 유전자가 상호작용 하는지에 대한 기전을 알 수 있게 되었다.

병리기전을 연구하기 위하여, LDLr<sup>-/-</sup> 마우스의 지방 선조 (Fatty streak) 병변을 관찰한 결과, 8주간 고지방 식이 후, 모든 투여군 및 대조군에서 흉대동맥의 내강에 동맥경화의 특징적인 지방선조 병변이 형성됨을 알 수 있었으며, 지방선조 병변을 면역화학법으로 염색하여 관찰한 결과, 혈관내피하 (Subendothelial space)에 다수의 지방구를 탐식한 대식구 및 림프구의 침윤으로 두터워져 있는 것을 관찰할 수 있었으며, iNOS가 다량 발현됨을 알 수 있었다. 약리효과에 대한 작용 기전을 연구하기 위하여, RAW264.7 대식세포주에 각각 50, 100, 200  $\mu$ M hematein을 첨가하여 배양시키고 LPS로 활성화시킨 결과, 농도가 증가함에 따라 NF- $\kappa$ B의 활성이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 활성화된 NF- $\kappa$ B에 의해 조절되는 iNOS 역시 hematein에 의해 NF- $\kappa$ B와 비슷한 양상으로 억제되는 것을 볼 수 있었다. Human umbilical vein endothelial cells에 각각 50, 100, 200  $\mu$ M hematein을 첨가하여 배양시키고 TBG-beta로 활성화시킨 결과, 농도가 증가함에 따라 NF- $\kappa$ B의 활성이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 결론적으로 동맥경화의 발병 및 치료 기전에는 염증과 관련된 세포기능 조절 물질들이 매우 밀접하게 관련이 됨을 알 수 있었으며, 이러한 염증관련 유전자들에 대한 array를 작성하여 screening에 이용하는 것이 유용함을 알 수 있었다 (그림 1).

## 2. DDRT-PCR

현대인들의 식습관 변화에 따른 고지방, 고칼로리 식이, 운동 및 활동량의 부족 등의 원인으로 국내에서도 동맥경화증의 발병률이 급격히 증가하고 있다. 따라서 본 연구팀은 인체와 가장유사한 형태의 동맥경화병변을 유발하는 LDLr<sup>-/-</sup>에서 고콜레스테롤 식이시 발현변화를 보이는 유전자들을 DDRT-PCR 기법으로 종합적으로 탐색하여 330여종의 후보유전자들을 1 차 확보하였으며, 이들을 2차적으로 dot-hybridization을 실시하여 60여종의 유전자를 선별하여 특징을 규명하기 위하여 노력하고 있다. 본 연구에서는 동맥경화병변에 관여하는 신규유전자의 획득, 그 특성을 규명함으로써 동맥경화증의 발병기전과 이들간의 상관관계를 밝히고, 더 나아가 신규 유전자를 이용한 발현조절모델의 개발 및 새로운 혈중 지질 강하제의 효능 검사 시스템의 개발, 동맥경화진단 DNA chip의 개발과 같은 응용분야로 연구의 폭을 넓히기 위하여 실시 하였다.

## 3. DNA microarray chip

본 연구에서는 DNA chip을 이용하여 산화저밀도지단백 및 최종당화산물등에 의해 혈관내피 세포에서 발현되는 유전자들의 발현양상을 분석하고 이를 바탕으로 새로운 유전

자를 선정하여 동맥경화의 병인에 미치는 영향을 분석하고자 실시하였다. 현재까지 연구방법으로는 한가지 유전자의 발현의 차이를 분석하는 것으로 일정 세포의 반응성을 볼 수 밖에 없었으나 DNA chip의 개발은 수만가지의 유전자의 발현변화를 한번의 분석으로도 가능하게 한다. 본 연구에서는 흡연시 산화적 손상의 결과로 생성되는 산화저밀도 지단백 및 최종당화산물을 혈관내피세포에 처리 하였을 때 발현되는 유전자들의 변화를 DNA chip으로 분석하여 기존의 연구와는 다른 차원의 연구결과를 얻고자 한 것이다 (그림 2). 또한 연구의 결과로 지금까지 예견치 못했던 새로운 유전자의 관련성을 밝히고 이 유전자가 동맥경화의 발병에 미치는 영향을 분석할 수 있을 것으로 예상된다.

결론적으로 본 연구에서 추구하고자 하는 바는 여러 가지 원인으로 발생할 수 있는 동맥경화의 원인 유전자들을 발굴하고, 이들 유전자들에 의해 발현이 조절되는 유전자들 까지 발굴하여 이를 array system 으로 만들어 동맥경화 치료제의 검색제로 사용하고 자 한다. 또한 이들 유전자를 이용하여 새로운 생쥐모델의 구상하고 이들 모델의 표현형을 분류하여 인간의 질병에 대한 모델로서 생쥐의 동맥경화를 밝히기 위한 생쥐 연구의 유용성을 향상시키고, 치료 약물 등의 자료수집과 데이터 베이스 작성하여 동맥경화의 치료 및 연구에 기여하고자 한다.

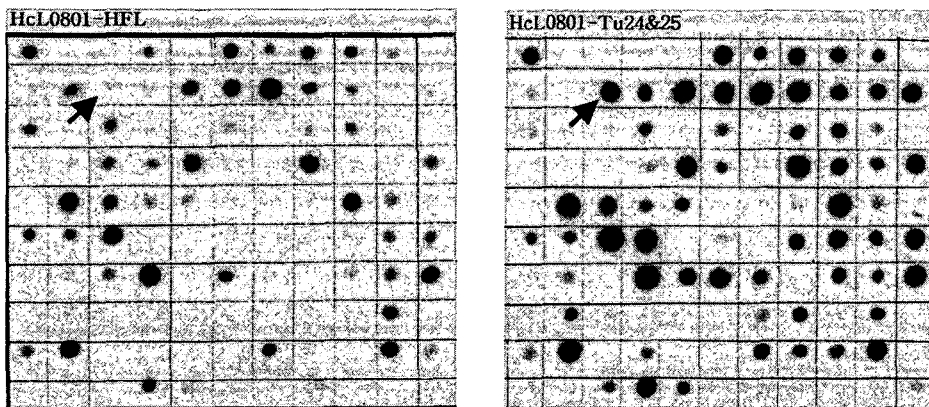


그림 1. LDLr <sup>-/-</sup> 마우스에 고지질식을 실시할 경우 흉대동맥에서 발현이 변하는 유전자의 검색

왼쪽: 정상식을 실시한 마우스의 흉대동맥에서 분리한 mRNA의 cDNA를 probe로사용, 오른쪽: 고지질식을 4주간 실시 한 LDLr <sup>-/-</sup> 마우스

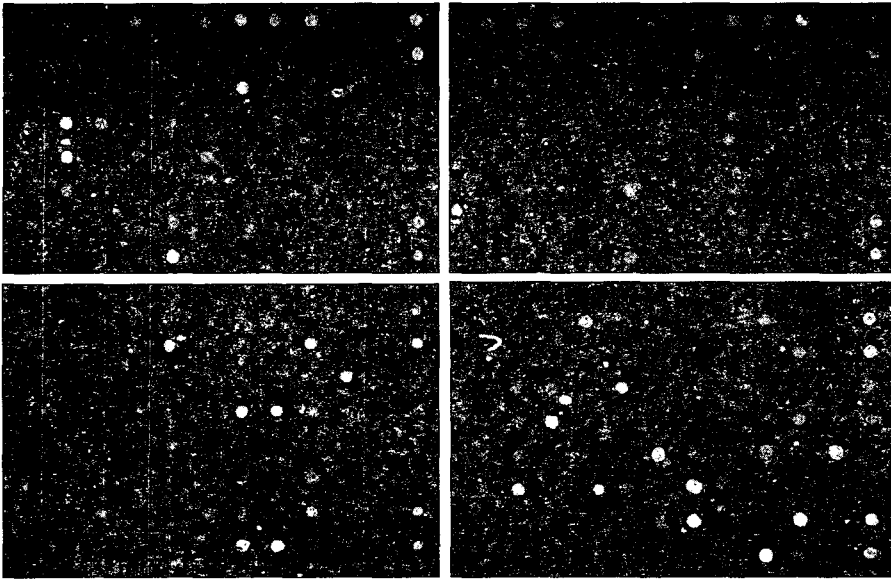


그림 2. 흡연 농축액을 처리한 THP-1 세포의 total RNA (녹색 형광) 및 대조군 RNA (적색형광)를 co-hybriduczation 하여 얻은 DNA chip 분석결과. 세포주기, 신호전달, 면역학관련 유전자등 400여종의 유전자의 발현 변화를 분석하여 약 20여종의 유전자의 발현이 변화함을 관찰하였음.

**Transcription Factors AP-1 and NFκB and Novel Inhibitor Pcd4 as Potential Molecular Targets for Cancer Prevention** Colburn N, Young M, Suzukawa K, Hsu TC, Yang HS, and Cmarik, J. NCI Frederick; colburn@ncifcrf.gov

Studies with the mouse JB6 model of transformation sensitive and resistant variants have revealed differential expression of several genes and molecular responses. Among the differential responses that have proven to be required for tumor promoter induced transformation are activation of MAP kinase Erks 1/2 (4) and activation of transcription factors AP-1 and NFκB (1,2,3,8). Additional events also implicated in the transformation response are activation of PI3 kinase, of ornithine decarboxylase (ODC), of superoxide anion generation, and of osteopontin synthesis and phosphorylation (8). More recently the requirement for AP-1 activation has been demonstrated to apply to mouse skin tumor promotion (6). Expression of dominant negative jun (TAM 67) in the basal keratinocytes of the epidermis dramatically inhibited induction of AP-1-driven luciferase and papillomagenesis (tumor promotion) without inhibiting induced hyperplasia (6). The requirement for AP-1 and for NFκB activation has been found to extend to progression to tumor phenotype in HPV E6/E7 immortalized human keratinocytes (5). Microarray expression profiling of TAM67-expressing mouse JB6 cells, human keratinocytes, and mouse epidermis is expected to reveal a new generation of potential molecular target genes whose expression is AP-1 or NFκB dependent and is required for tumorigenesis. A differential display of mRNA comparison of JB6 transformation resistant (P-) and sensitive (P+) cells made possible the cloning of a novel gene Pcd4 whose expression is 10-fold higher in P- than in P+ cells (7). Expression of antisense and sense pcd4 constructs respectively rendered P-cells transformation sensitive and P+ cells resistant, thus establishing Pcd4 as an inhibitor of tumor promotion in vitro (7,9). Inquiries into the mechanism of action of Pcd4 have shown that expression of Pcd4 inhibits AP-1 activation but not activation of NFκB or ODC or Erk 1/2 (9). Yeast two-hybrid analysis is expected to identify functionally significant binding partners of Pcd4. In summary, transcription factors AP-1 and NFκB and inhibitor Pcd4 appear to constitute valuable molecular targets for cancer prevention that can be targeted rather specifically.

1. Bernstein LR and Colburn NH. *Science* 244: 566-569, 1989.
2. Dong Z, Birrer M, Watts R, Matrisian L, and Colburn NH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 609-613, 1994.
3. Li JJ, Westergaard C, Ghosh P and Colburn NH. *Cancer Res.* 57: 3569-3576, 1997.
4. Huang C, Ma W-Y, Young MR, Colburn, NH and Dong Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 156-161, 1998.
5. Li JJ, Rhim JS, Schlegel R, Vousden KH and Colburn NH. *Oncogene* 16: 2711-2721, 1998.
6. Young MR, Li JJ, Rincon M, Flavell RA, Sathyanarayana BK, Hunziker R and Colburn NH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9827-9832, 1999.
7. Cmarik JL, Min H, Hegamyer G, Zhan S, Matsushashi S, Yoshinaga H and Colburn NH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14037-14042, 1999.
8. Hsu T-C, Young MR, Cmarik J and Colburn NH, *FORUM Free Radical Biology and Medicine* 28: 1338-1348, 2000.

9. Yang H-S, Jansen AP, Nair R, Shibahara K, Verma AK, Cmarik JL, and Colburn NH  
Oncogene, in press 2000.