

MeDIA-mediated CpG microarray 분석을 이용한 cancer epigenomics 연구

문영호, 안성환 ((주)지노믹트리)

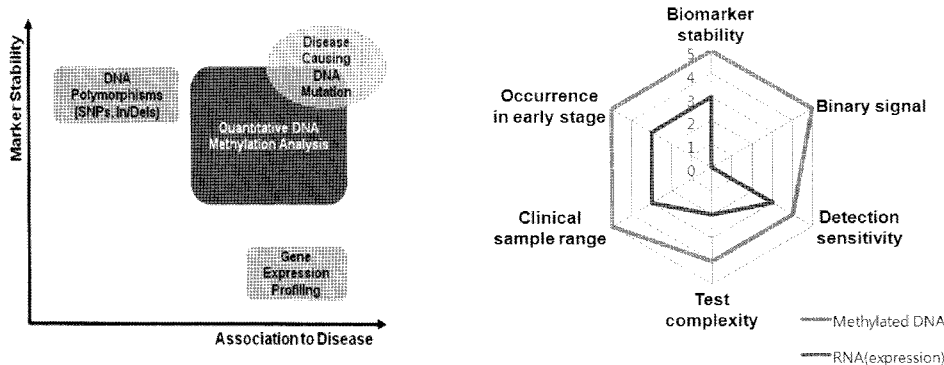
서론

후생유전학(epigenetics)은 DNA 염기서열에는 아무런 변화 없이 유전자 발현에 영향을 주어, 세포주기 조절, 분화, 배 발생 등 주요한 모든 생명현상에 영향을 주는 기전을 연구하는 학문이라고 할 수 있다. 이러한 후생유전학적 기작에 의한 유전자 발현 변화는 DNA 메틸화(DNA methylation)와 히스톤 변화(histone modification)를 통해 이루어지며, 환경 요인에 의한 유전자 발현 변화의 핵심연결고리로서, 유전자 각인, 암, 노화, 면역관련 질환, 심혈관 및 신경정신과적 질환 등의 발생기전에 매우 중요한 요인으로 알려져 있다.

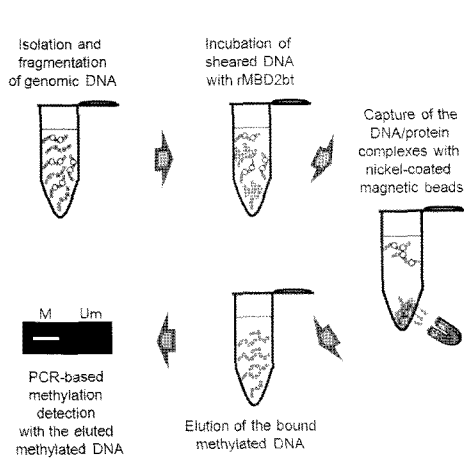
DNA 메틸화는 CpG dinucleotide의 시토신(cytosine)에 DNA 메틸전이효소(DNA methyltransferase)에 의해 메틸화가 되는 현상으로, 유전자의 전사를 억제하는 가장 직접적인 기전 중의 하나이다. 정상적인 세포에서의 DNA 메틸화는 repetitive element 및 transposon 등의 silencing, parental imprinting, X-chromosome inactivation, tissue specific-gene inactivation, differentiation gene들의 발현조절 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히 암의 경우 유전자의 직접적인 변이뿐 만 아니라 후생유전학적 변이에

의해 발생되는데, DNA 과메틸화(hypermethylation)는 종양억제유전자(tumor suppressor gene)의 불활성화를 유도하고, DNA 저메틸화(hypomethylation)는 종양유전자(oncogene)를 활성화시켜 정상세포를 종양세포로 변형시키게 된다. 이러한 DNA 메틸화 변이는 암의 초기단계에서 일어나며 각종 암에서 특이적으로 나타나는 현상으로 알려져 있어, 특정 유전자의 메틸화 상태나 유전체 전반에 걸친 메틸화 패턴의 변화는 특정 암의 분자진단 바이오마커로서의 이용 가능성을 제시해 준다. DNA 메틸화 기반 바이오마커는 안정성, 민감성, 범용성이 탁월한 증거 의학적 분자진단 바이오마커로서, 소변, 객담, 혈액, 조직 등 환자편의적인 방법으로 암의 조기진단 및 치료 예후 예측을 가능하게 하며, 대용량/초고속 미래융합분석 시스템에 적용이 가능한 바이오마커로 미래의 분자진단 시장을 주도할 것으로 예측되고 있다 (그림 1).

암에서의 DNA 메틸화 패턴의 변화뿐만 아니라, 각종 다양한 질환의 발생기전에 대한 DNA 메틸화의 중요한 역할에 대한 정보를 얻고자, 유전체 수준에서 DNA 메틸화 패턴 변화를 프로파일할 수 있는 다양한 기법에 대하여 연구가 활발히 진행되고 있다. 유전체 전체를 대상으로 한 DNA methylation profiling 기술은 메틸화 민감 제한효소(methylation

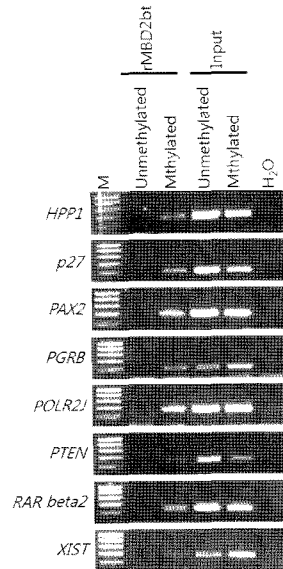


[그림 1] 핵산기반 분자진단 바이오마커로서의 DNA 메틸화 마이크로마커의 장점



【그림 2】 MeDIA-mediated PCR에 의한 DNA 메틸화 검출 방법

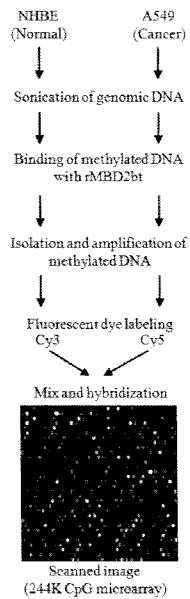
sensitive restriction enzymes) 기반, 염기서열 분석 기반, methylated DNA에 대한 친화력(affinity)을 기반으로 한 분석 방법으로 대별될 수 있다. 제한효소 및 염기서열 분석 기반 방법은 상대적으로 low-resolution, 고비용 등의 문제점을 안고 있어, 현재 microarray 기술과 접목된 affinity-based methylation profiling 기술이 대세를 이루고 있다. Methylated DNA를 선택적으로 분리하기 위하여 5'-methyl cytosine을 특이적으로 인지하는 antibody를 이용하는 방법과, methylated DNA binding protein (MBP)을 이용하는 방법이 affinity-based methylation profiling 기술에 응용되고 있으나, 상대적으로 다량의 시료 DNA가 필요한 antibody 기반 기술과, 2개의 단백질을 이용하는 MIRA (methylated-CpG island recovery assay) 방법의 실험적 번잡성과 단백질 안정성 등에 대한 문제점을 개선하고자, 본 연구팀은 methylated DNA binding protein (MBP)의 특정 domain 즉, methylated CpG DNA에만 특이적으로 결합하는 domain(methylated DNA binding domain, MBD)을 이용하는 방법인 methylated DNA isolation assay (MeDIA) 방법을 개발하였으며, 이를 이용하여 PCR 기반 DNA 검출 기술 및 microarray 기술과 접목된 methylation detection 방법과 genome-wide methylation profiling 방법에 대하여 간단히 소개하고자 한다.



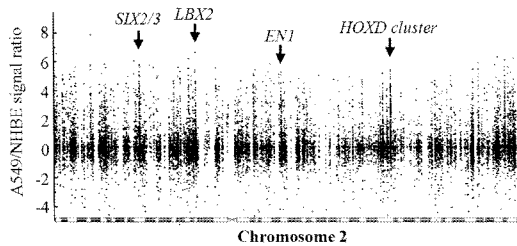
【그림 3】 MeDIA-mediated PCR을 이용한 다양한 유전자의 DNA 메틸화 검출

● MeDIA-mediated PCR을 이용한 DNA methylation detection

MBP 중에서 methylated DNA에 가장 친화력이 높은 MBD2b 단백질의 methylated DNA binding domain (MBD)을 지닌 재조합 단백질 rMBD2bt를 순수분리 정제하여 사용하였다. 그림 2에서 보여 주는 방법에 따라 *in vitro* methylated DNA을 이용하여 정제된 rMBD2bt의 활성을 검증하였으며, 또한 폐암 세포주에서만 메틸화되어 있는 유전자로 알려진 RASSF1A 유전자를 선택하여 활성을 검증하여 rMBD2bt가 methylated DNA에 선택적으로 결합하여 methylated DNA만 선별할 수 있음을 확인하였다. 그리고 *in vitro* methylated gDNA를 이용하여 다양한 유전자에 대하여 MeDIA-mediated PCR로 methylation 여부를 검출한 결과 그림 3에서 보는 바와 같이 모든 유전자에서 DNA 메틸화를 성공적으로 검출할 수 있어, MeDIA-mediated PCR 방법은 기존의 bisulfite 또는 제한효소 의존 메틸화 검출 방법을 대체할 수 있는 새로운 기술로 응용이 가능할 것이며, 대용량/고속 DNA 메틸화 검출 기술에서의 접목도 용이할 것으로 생각된다.



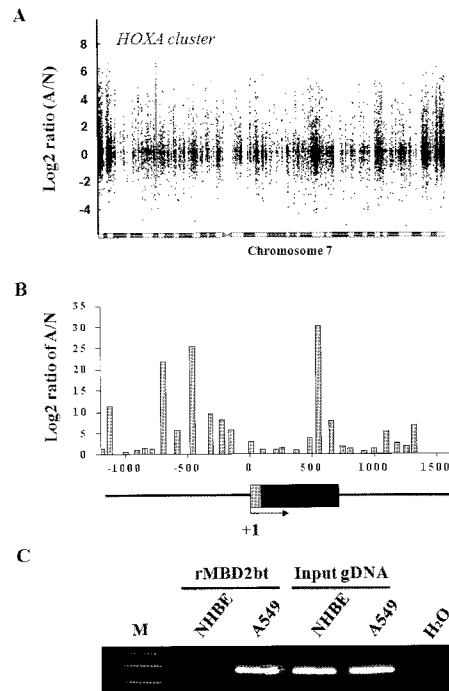
[그림 4] MeDIA-mediated CpG microarray 분석을 통한 이용한 DNA 메틸화 profiling 방법



[그림 5] Chromosome 2의 DNA methylation profile, 각 점들은 A549 세포주에서 DNA 메틸화에 이상이 있는 probe 들의 fold difference를 나타낸다.

● MeDIA-mediated CpG microarray를 통한 genome-wide methylation profiling

Methylated DNA에 선택적으로 binding하는 활성을 지닌 rMBD2bt를 이용하여 genome-wide DNA methylation analysis를 수행하기 위하여 인간 CpG island 내에 존재하는 CpG site에 대한 probe를 지닌 Agilent 사의 244K CpG microarray를 사용하여 MeDIA-mediated CpG microarray 분석을 실시하였다. 먼저 폐암 세포주 A549와 폐 정상세포주 NHBE로부터 genomic DNA를 분리하고, 약 300bp 정도의 DNA 절편이 생성되도록 sonication하였



[그림 6] MeDIA-CpG microarray와 MeDIA-PCR을 이용한 HOXA9 유전자의 DNA methylation pattern 분석

다. DNA 절편을 rMBD2bt 단백질과 반응시킨 후 형성된 DNA-protein complex를 magnetic agarose bead를 사용하여 각 세포주로부터 methylated DNA 절편만을 선택적으로 분리하였다. 분리된 methylated DNA를 whole genome amplification kit를 사용하여 증폭하고, 각 증폭된 산물을 A549 유래 methylated DNA는 Cy-5, NHBE는 Cy-3로 labeling하고 혼합한 후 244K CpG island microarray (Agilent 사)에 혼성화 반응을 수행하였다. Raw data의 preprocessing과 normalization은 GeneSpring 7.3.1 software (Agilent 사)를 이용하였으며, 각 유전자의 promoter 내에 존재하는 CpG island를 대표하는 probe 중 5개의 연결한 probe에서 각 세포주간의 signal이 4배 이상 차이를 보이는 유전자를 methylation-positive 유전자로 판단하였다. MeDIA-CpG microarray 분석의 재현성은 Pearson's correlation coefficient가 0.82로서 높은 것으로 나타났다. Chromosome 2의 methylation pattern을 Rauch 등에 의해 MBD2b와 MBD3L1 2개의 단백질을 이용한 MIRA-assisted

microarray 방법을 이용하여 이미 보고된 분석 결과와 비교해 본 결과, 모든 gene cluster에서 매우 유사한 패턴을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (그림 5). 그리고 HOXA gene cluster에 존재하는 많은 유전자들이 NHBE에 비해 A549에서 비교적 높게 메틸화 되어 있는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 6A). 특히 HOXA9과 HOXA6는 이미 A549 세포주에서 과메틸화되어 있는 것으로 알려져 있는데, MeDIA-CpG microarray 분석에서도 이들 유전자의 메틸화 패턴이 동일하게 나타났다 (그림 6B). HOXA9에 대한 MeDIA-CpG microarray 분석 데이터를 검증하기 위하여 MeDIA-PCR을 수행한 결과, A549에서 DNA 메틸화가 검출된 반면, NHBE에서는 검출되지 않았다 (그림 6C). 따라서 rMBD2bt를 이용한 MeDIA-CpG microarray 분석으로 도출된 결과가 각 세포주의 methylation status를 잘 반영하는 것으로 보여진다.

결론

재조합 rMBD2bt 단백질을 기반으로 하는 MeDIA 방법은 현재 알려진 가장 높은 친화력으로 methylated DNA만 선

택적으로 결합하는 MBD2b 단백질의 methylated DNA binding domain 만을 이용하는 것으로서, methylated DNA의 염기서열 인식부위에 대한 선택성을 지닌 MeCP2와 MBD2b의 binding partner인 MBD3L1을 사용하는 기존의 방법과 달리, 상대적으로 염기서열 비의존적이며 보다 용이하게 methylated DNA만을 선택적으로 분리할 수 있는 방법이다. 또한 rMBD2bt 단백질은 저온에서 적어도 6개월 이상 보관하며 사용하여도 활성을 잃지 않아 안정성이 매우 높을 뿐만 아니라 동결건조가 가능하여 운반성에서도 탁월하다. 따라서 MeDIA 기반으로 한 methylation detection 방법과 microarray 기술을 접목한 유전체 수준에서의 methylation profiling 방법은 특정 유전자의 메틸화를 용이하게 검출할 수 있어 후생유전학 기반 바이오마커의 분자진단 기술에 응용이 가능하며, 유전체 전체 수준에서의 DNA 메틸화 패턴 분석을 통하여 DNA 메틸화가 다양한 질병의 발생에 미치는 영향과 분화, 배 발생 등 모든 생명현상에 대한 영향을 연구하는데 유용한 도구로 이용될 것으로 생각되며, 아울러 MeDIA 방법은 single-base resolution으로 DNA 메틸화 변이를 분석할 수 있는 next generation sequencing 기술과의 접목도 가능하리라 예측된다.

[참고 문헌]

- [1] Herman JG and Baylin SB (2003) Mechanisms of Disease: Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N Eng J Med* 349: 2042-2054
- [2] Singer-Sam J, Grant M, LeBon JM, Okuyama K, Chapman V, Monk M, Riggs AD (1990) Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the Pcg-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. *Mol Cell Biol.* 10:4987-4989
- [3] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996) Methylation -specific PCR: a novel PCR assay for methyl- ation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9821-9826
- [4] Gebhard C, Schwarzfischer L, Pham TH, Andreesen R, Mackensen A, Rehli M (2006) Rapid and sensitive detection of CpG-methylation using methyl-binding (MB)-PCR. *Nucleic Acids Res* 34:e82
- [5] Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijnenberg MP, Herman JG, Baylin SB (2002) A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature Genet* 31: 141-149
- [6] Brena, RM, Huang, TH and Plass, C (2006) Quantitative assessment of DNA methylation: potential applications for disease diagnosis, classification, and prognosis in clinical settings. *J Mol Med* 84: 365-377
- [7] Callinan, PA and Feinberg, AP (2006) The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet* 15: R95-R101
- [8] Foltz G, Ryu GY, Yoon JG, Nelson T, Fahey J, Frakes A, Lee H, Field L, Zander K, Sibenthaler Z, Ryken TC, Vibhakar R, Hood L, Madan A (2006) Genome-Wide Analysis of Epigenetic Silencing Identifies BEX1 and BEX2 as Candidate Tumor Suppressor Genes in Malignant Glioma. *Cancer Res* 66: 6665-6674
- [9] Khulan B, Thompson RF, Ye K, Fazzari MJ, Suzuki M, Stasiek E, Figueroa ME, Glass JL, Chen Q, Montagna C, Hatchwell E, Selzer RR, Richmond TA, Green RD, Melnick A, Grealley JM (2006) Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay. *Genome Res* 16: 1046-1055
- [10] Schumacher A, Kapranov P, Kaminsky Z, Flanagan J, Assadzadeh A, Yau P, Virtanen C, Winegarden N, Cheng J, Gingeras T, Petronis A (2006) Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. *Nucleic Acids Res* 34: 528-542
- [11] Esteller M (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone -modification maps. *Nat Rev Genet* 8(4): 286-98
- [12] Rauch T, Pfeifer GP (2005) Methylated-CpG island recovery assay: a new technique for the rapid detection of methylated-CpG islands in cancer. *Lab Invest* 85(9): 1172-80
- [13] Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE, Ecker JR. (2006) Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in Arabidopsis. *Cell* 126: 1189-1201
- [14] Fraga MF, Ballestar E, Montoya G, Taysavang P, Wade PA, Esteller M (2003) The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic Acids Res* 31(6): 1765-74
- [15] Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP (2000) Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumor suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 25(3): 315-9
- [16] Rauch T, Wang Z, Zhang X, Zhong X, Wu X, Lau SK, Kernstine KH, Riggs AD, Pfeifer GP (2007) Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(13): 5527-32