

## DNA Chip 기술과 미래의학

서정선

서울대 유전자이식연구소 소장

1988년부터 미국의 국립보건원과 에너지성이 주축이 되어 30억개로 추정되는 인간의 전체 DNA 염기서열에 대한 정보를 해독하기 위한 작업을 준비하여 마침내 인체 유전체 분석계획(human genome project)을 시작하게 되었다. Craig Venter박사가 주축이 되어 설립한 Celera라는 생명 공학회사는 올해 초 90%이상의 인체 유전자들의 염기서열을 분석하는데 성공하였고 나머지들도 곧 완성할 것이라고 발표하였다. 이들은 인체 유전체중에서 단백질을 합성하는데 필요한 mRNA를 분석하였는데, 각종 분석에 의하면 인체 유전자는 약 15만여종에 이를 것으로 추정되고 있다. 실제 각 조직 또는 세포에서 중요한 역할을 하는 유전자는 5천여종에 이를 것으로 보인다. 이제까지 알려진 인체 유전자는 7천여종에 이르나 각각의 유전자들에 대한 생체내의 기능은 아직 완전히 분석하지 못하고 있다. 따라서 앞으로 15만여개의 유전자에 대한 분석을 위해서는 얼마나 많은 시간이 소요될 지 예측하기도 힘들다.

이제까지의 분자생물학 연구의 목표는 유전자와 인체 질환의 관계를 규명하기 위한 노력들이라고 할 수 있다. 인체 질환에 관여하는 유전자를 발굴하고 이를 이용하여 진단과 치료방법을 모색하는 것이 최근의 연구 방향이었다. 그럼에도 불구하고 유전질환과 암 등을 제외한 대부분의 인체 질환에서는 질환관련 원인 유전자 탐색이 성공하지 못하였다. 이는 생물학적으로 생체가 갖는 여러 안전 장치들이 존재하기 때문이라고 할 수 있다. 인체에는 진화를 통하여 습득한 다양성과 과잉성(diversity and redundancy)에 의해 외부 환경의 자극에 대처하여 다세포개체(multicellular organism)를 유지할 수 있는 것이다. 따라서 하나의 유전자가 잘못됨으로써 생명현상에 치명적인 영향을 준다고 생각하기 어렵다.

최근에 인체 유전체계획(Human Genome Project)에 의해 2003년이면 인체 유전체 전체의 염기서열 정보가 알려지게 될 것이고 당장 올해에는 인체 유전자 15만개에 대한 정보가 상업적으로 유용하게 될 것이다. 그러면 이제까지 염기서열이 알려진 유전자들보다 20배 가까운 수에 이르는 정보를 어떻게 활용하여야 하는가? 이 문제를 해결하려면 대량의 유전자를 동시에 검색할 수 있는 방법이 필요하다.

Ed Southern이 개발하고 이제는 기본적인 실험방법이 되어버린 Southern blot방법으로부터 target과 probe가 바뀐 DNA array법은 유전자 대량검색의 문제를 해결해 줄 수 있다. 각각의 클로닝된 cDNA가 glass plate위에 놓인 DNA chip에 형광표지된 probe로 hybridization하면 형광현미경 또는 microarray scanner라고 불리는 기기를 이용하여 결과를 분석할 수 있다. 이때 어떤 종류의 cDNA와 얼마나 많은 유전자를 이용할 것인가, 그리고 어떤 probe를 사용할 것인가에 따라 의미 있는 결과를 얻을 수 있다.

## 1. DNA chip 기술이란 무엇인가?

최근 몇 년간에 걸쳐 DNA chip 또는 microarray technology라 불리는 작은 혁명이 과학과 의학 분야에서 일어나고 있다. 현재 그 응용이 가장 활발한 분야는 많은 유전자의 발현 양상을 동시에 검색하는 정도이나, 이 기법이 가진 다양한 응용 분야와 유용성을 감안할 때 그 영향이 최근 생물학 및 의학 발전에 큰 영향을 준 polymerase chain reaction (PCR), DNA sequencing 보다도 클 것으로 예상된다.

DNA chip의 실제 사용은 세 단계를 거치게 된다. 첫 번째 단계는 sample로부터 RNA를 추출하는 단계로 cell line으로부터의 추출은 비교적 간단하다. 인간의 조직으로부터 RNA를 추출하는 경우에는 DNA chip의 탐식자로 사용되는 cDNA 제조에 필요한 현재의 형광물질을 이용한 RNA labeling 방법은 비교적 많은 양의 RNA를 요구하기 때문에 순수하게 질병상태의 세포만을 분리하였을 경우 RNA가 소량 분리되어 DNA chip기술을 이용할 수 없다. 이를 극복하기 위한 PCR을 이용한 total cDNA의 증폭, 또는 방사선 동위원소를 이용한 표지법의 개발 등의 전략이 필요하다. 제 2단계는 DNA chip의 제작과 그 활용에 관한 것이다. 이는 DNA chip을 위한 cDNA를 확보하고 PCR 증폭하는 과정이 필요하다. 인체 유전자 전체를 사용할 것인가, 아니면 특정 유전자군을 사용할 것인가에 따라 다양한 활용이 가능하다. 세 번째 단계는 data 분석의 문제이다. 한 번의 실험으로 수 천가지 유전자의 정보를 분석해야 하며 이를 효과적으로 분석하고 그 결과를 공유하고 저장하는 것이 중요한 요소가 된다. 현재 이러한 프로그램의 개발이 다양하게 이루어지고 있으며 그 결과들이 많은 database들과 연계되어 체계화 되어가고 있다.

### 1.1 DNA Spotting

실제 DNA chip의 개발에 가장 중요한 요소는 고밀도로 DNA를 심는 방식의 개발이다. 이는 정밀한 robot (arrayer)의 개발과 더불어 glass slide를 사용함으로써 가능해졌다. 기존의 nylon과 같은 membrane의 장점들과 더불어 glass slide는 유리표면에 적당한 처리를 통하여 DNA sample을 covalent 하게 결합시킬 수 있으며, 유리자체의 특성으로 인하여 높은 온도와 washing 시의 높은 ionic strength에 견딜 수 있다. 유리의 non-porous 구조는 hybridization volume을 최소화 할 수 있게 하며, probe와 target의 결합 속도를 높일 수 있다. 그 외에도 유리의 low fluorescence한 성질에 의하여 background noise를 획기적으로 줄일 수 있으며, 동시에 두 가지 형광물질로 표지된 sample을 hybridization시킬 수 있다.

DNA chip은 제작하는 방법에 따라 크게 pin microarray, Inkjet, Photolithography, Electronic array 방법의 4가지로 나눌 수 있다.

#### - Pin microarray chip의 제작

Pin microarray chip은 1995년 미국 Stanford 대학의 생화학과에서 처음 개발되었으며 약 2~3천 개의 유전자를 약 1cm<sup>2</sup> 안에 붙일 수 있다 (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/>). 처음에는 유전자 발현 측정을 목적으로 cDNA를 붙여놓은 chip을 만들었기 때문에 cDNA microarray chip이라고 불렸지만 지금은 돌연변이를 검색할 수 있도록 oligonucleotide를 같은 방법으로 붙인 chip도 개발되었다. DNA microarray는 크게 세 부분으로 나눌 수 있다. 첫 번

째가 수십개의 glass slide들을 놓는 곳이고 두 번째가 PCR 된 유전자를 담고 있는 96well plate를 놓는 곳이다. 마지막으로 DNA를 glass slide에 옮겨 주는 역할을 하는 pin이 붙어 있는 robotic print head이다. 이 pin이 DNA를 96well plate로부터 담아서 glass slide로 computer가 지정한 똑같은 장소에 심는 것이다. 이와 같은 연속적인 반복 동작을 통해서 수 백개 이상의 유전자를 가진 cDNA microarray chip이 만들어진다.

#### - Inkjet

Inkjet 원리를 이용하여 DNA chip을 만드는 방법은 위에서 설명한 microarray chip과 거의 비슷하다. 다만 pin 대신에 computer inkjet printer에서 쓰이는 것과 같은 원리의 cartridge를 사용한다는 것이 다르다 (<http://www.biodot.com/>). 각각의 cartridge 안에는 유전자가 들어 있어서 전기적인 힘으로서 유전자를 고형체 위에 뿌리게 되는 것이다. 지금까지 뿌리는 방법에 따라서 thermal, solenoid 그리고 piezoelectric의 3가지 방법이 있다. 이 기술들의 장점은 유전자를 전기적으로 chip 표면에 닿지 않고 뿌릴 수 있기 때문에 정량의 유전자가 붙어 있는 많은 수의 chip을 생산할 수 있다는 것이다. 하지만 아직까지는 많은 종류의 다른 유전자를 가진 DNA chip을 생산하기 위해서 필요한 cartridge안의 유전물질 교환과 같은 기술적인 문제가 조금 있다.

#### - Photolithography

미국의 Affymetrix라는 회사는 computer chip을 만들기 위해서 쓰는 photo-lithography라는 기술을 사용하여 수만개의 다른 염기 (nucleotide)들을 하나의 유리위에 직접 합성하는데 성공하였다 (<http://www.affymetrix.com/>). Affymetrix는 이 기술을 사용하여 초기에 1.28 cm<sup>2</sup> 안에 65,000개의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 만들었고 지금은 400,000개의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 만들 수 있게 되었다. 각각의 oligonucleotide들은 15 ~ 25개의 염기로 이루어져 있다. Oligonucleotide가 합성되는 유리의 표면은 각각의 염기들이 합성할 수 있게 보조체가 붙어 있다. 하지만 이들 보조체는 평소엔 빛에 민감한 화학 물질로 덮여 있어 염기들이 합성될 수 없다. 이러한 성질을 이용하여 특별히 설계된 photomask를 위에 놓고 빛을 쏘이면 구멍이 나있는 곳으로 빛이 들어가 그곳에 있는 보조체의 화학물질들을 제거한다. 이렇게 화학물질이 제거된 보조체들을 가진 chip을 한가지 염기가 있는 곳에 넣으면 모든 활성화된 보조체들에 염기가 가서 합성된다. 물론 각각의 염기들도 빛에 민감한 화학물질로 덮여 있어 한 개씩밖에 합성이 안된다. 이러한 chip을 씻은 다음 다시 다르게 설계된 photomask를 이용하여 빛을 쏘여 주면 그곳에 있는 보조체나 염기들이 활성화되어 다음 염기들과 합성할 수 있게 되는 것이다. 이와 같은 반복적인 과정을 통하여 65,000개의 다른 25mer (25개의 염기를 가진 oligonucleotide)를 약 100 cycle 안에 합성할 수 있다. 앞에서 설명한 cDNA microarray chip과 이 oligonucleotide chip의 다른 점은 chip에 완전한 유전자 (full-length ORF) 대신에 25mer를 심은 것이다. 이 oligonucleotide chip도 cDNA microarray chip과 마찬가지로 한 환경에만 발현하는 유전자를 찾을 수 있을 뿐만 아니라 발현 정도까지도 알 수 있다. 또한 Affymetrix oligonucleotide chip은 하나의 염기서열만 틀려도 결합을 하지 않는 성질을 이용하여 한 염기에 생긴 돌연 변이 (point mutation)까지도 찾아낼 수 있다. 많은 암이나 유전병들이 특정 유전자에 생긴 작은 돌연변이에 의해서 유발되기 때문에, 이것을 이용하여 지금까지 밝혀진 암 관련 유전자를 가진 DNA chip을 만든다면 한번의 실

힘으로 아주 쉽게 돌연변이를 찾을 수 있다. 지금 Affymetrix 회사에서는 앞에서 설명한 유전자 발현 검색용 chip 뿐만 아니라 암 관련 유전자인 p53와 BRCA1을 가진 chip, AIDS의 원인인 HIV의 종류도 알 수 있는 chip, 그리고 SNP (single nucleotide polymorphism) 측정용 chip등을 생산하고 있다.

#### - Electronic array

Electronic array DNA chip은 DNA가 (-) 전하를 띠는 성질을 이용하여 chip의 표면에 있는 특정 위치에 (+) 전기를 넣어서 그 위치에 원하는 유전자를 붙게 만드는 방법이다. 이와 같은 원리를 이용한 chip이 미국의 Nanogen에서 개발되었고 지금은 10,000개의 DNA를 이러한 방법으로 붙일 수 있는 chip이 개발되어 있다 (<http://www.nanogen.com/>). 이 기술의 장점은 이와 같은 electronic addressing 뿐만 아니라 전기를 이용하여 target DNA를 원하는 특정 위치에 끌어들이므로써 결합 시간을 단축할 수 있다는 것이다.

### 1.2 Labeling and Detection

최근 형광물질을 이용한 DNA 또는 RNA의 labeling과 laser를 이용한 검색 기법이 꾸준히 발전하여왔다. 이러한 방법을 이용하여 각각의 sample을 각기 다른 형광으로 표지할 수 있다. 즉 두 개의 다른 환경에서 얻은 세포들로부터 total RNA 또는 mRNA를 추출한 뒤 이들 mRNA를 역전사 (reverse transcription) 시킬 때 각각 다른 색깔의 형광 물질을 띤 염기를 집어넣어 빨간색 (Cy5)이나 녹색 (Cy3)을 띤 cDNA를 합성한다. 합성된 두 개의 cDNA를 똑 같은 양으로 섞어서 하나의 cDNA microarray chip에 결합시킨다. 결합의 기본 원리는 southern 및 northern blot과 동일하다. 결합이 안된 유전자들을 씻어낸 chip은 laser fluorescence scanner에 의하여 읽혀진다. 각각 유전자의 형광 정도는 그 유전자의 발현정도를 알려주는 것으로 이들 정보는 computer에 의하여 분석되어 진다. 가령 정상 세포에서 발현되는 유전자는 녹색 (Cy3)로 표지하고 암세포에서 발현되는 유전자는 빨간색 (Cy5)로 표지한 뒤 이 두가지 색깔을 띤 유전자들을 섞어서 한 chip에 결합시킨 결과 녹색을 띠는 점들은 이 유전자들이 정상세포에서만 발현되는 것임을 보여주고 빨간색을 띠는 점들은 암세포에서만 발현되는 유전자를 나타낸다. 그리고 노란색 점들은 녹색과 빨간색의 보색에 의하여 나타난 것으로 이 유전자들은 두 환경에서 서로 비슷한 양이 발현되는 것을 알 수 있다. 이 방법으로 1:50,000의 빈도로 발현하는 유전자까지 검색할 수 있다.

## 2. DNA chip의 응용

DNA chip을 이용한 인체질환에 대한 연구 및 기타 관련분야에서 그 유용성은 이미 수많은 논문과 세계 유수의 의약품 및 생명공학업체에서 참여하고 있는 것을 보아도 잘 알 수가 있다. 먼저 특정 인체질환에서 유전자 발현양상을 비교함으로써 질환의 발생기전과 함께 문제가 되는 유전자를 찾아 낼 수 있다. 또한 기능이 알려지지 않은 수만 종류의 cDNA중에서 인체질환과 관련하여 발현이 증가하거나 줄어드는 것을 찾을 수도 있을 것이다. 이러한 정보가 축적이 되면 환자의 진단과 예측, 그

리고 치료에 따른 반응을 계속 추적할 수 있는 좋은 시스템을 제공할 것이다. 이 방법은 치료약물 개발에도 적용될 수 있으며 pharmacogenomics라는 새로운 분야가 바로 그 예이다. 아직도 그 응용 분야는 계속 확장되고 있으며 많은 임상 및 인체질환을 연구하는 연구자들의 관심과 노력에 의해 충분히 개발의 여지가 있는 신세계와 같다고 할 수 있다.

## 2.1 인체질환 유전자의 발굴

하나의 유전자와 인체질환의 상관관계를 보는 연구 시스템에 비하여 십 수년 전부터 subtraction library를 이용하는 좀 더 체계적인 인체 질환 유전자 연구가 시작되었다. 이후로는 1988년 개발된 differential display법으로 PCR에 의해 대량으로 유전자 발현의 차이를 보는 방법이 개발되었다. 최근에는 representative difference analysis (RDA)라는 방법을 이용한 PCR이용 subtraction 법이 소개되기도 하였다. 이에 비하여 DNA chip을 활용한 인체 질환 유전자 탐색은 신속하고 민감한 방법으로 수천개 내지 수만개의 유전자를 동시에 비교하는 것이 가능하다.

인체 질환에 대한 연구를 위해서는 시료의 선택이 중요하다. 첫째로는 정확한 대조군이 필요하며 이 때문에 DNA chip 적용의 한계가 있을 수 있다. 정상 조직이 동일한 환자에서 구할 수 없는 경우가 있으며 이 때에는 많은 수의 시료를 비교하여야 한다. 또는 실험동물을 이용하여 같은 strain의 정상 동물을 사용할 수 있다. 경우에 따라 치료 전후의 시료를 비교할 수 있으며 세포배양계를 이용하는 것은 이 문제를 해결하는 좋은 방법 중에 하나이다.

환자로부터 얻는 시료의 양과 종류는 한계가 있다. 아직 생검조직을 이용한 실험은 성공하지 못하였으며 RNA를 증폭하는 방법을 개발하고 있다. 충분한 양으로 얻을 수 있는 좋은 시료는 환자 혈액으로 WBC 또는 PBMC를 분리하여 사용할 수 있다.

두 실험군간의 차이가 유전자의 발현 양상의 차이로 나오게 되면 이를 유전자의 기능에 따라 인체 질환 또는 환자의 상태를 설명할 수 있는지 분석한다. 이들 중에서 발현양이 충분히 높고, 두 군간에 차이가 있는 유전자를 선택하여 RT-PCR, northern blot, western blot을 비롯한 2차 분석을 시행한다. 또는 동일한 질환을 대상으로 다른 시료를 이용하여 실험을 반복하여 통계적인 의미를 분석할 수도 있다.

## 2.2 인체질환의 분석

- 유전자를 이용한 진단 (prediction) 과 새로운 분류 (classification)

최근에 발표된 MIT대학의 Dr. Lander의 논문에 의하면 acute lymphoblastic leukemia (ALL)와 acute myelocytic leukemia (AML)의 유전자 발현을 DNA chip으로 분석하여 각각의 leukemia에 특징적인 유전자의 발현을 찾을 수 있었다. 이들은 자신의 homepage (<http://www.genome.wi.mit.edu/MPR>) 에 소개된 분석방법을 이용하여 의미가 있는 유전자들을 선정하였고 이들을 이용하여 ALL 및 AML에 대한 예측과 분류를 시도하였다. 즉 기존에 알려진 surface marker와 morphology를 이용한 분류법에 의해서 설명이 되지 않는 항암치료에 대한 세포의 반응의 차이를 해결하였다. 앞으로 이와 같은 유전자 진단과 질환 감수성에 대한 분석을 시도할 수 있을 것이며 이러한 분석을 근거로 증상과 형태학에 근거한 질병의 분류를 다시 해야 할 것이다.

### - 환자의 monitoring

인체질환에 대한 유전자를 분석한 결과를 응용할 수 있는 분야는 진단과 예측이외에도 환자의 상태를 유전자 수준에서 파악하는 분야로도 확장할 수 있다. 질환 상태의 유전자 발현 양상으로부터 치료에 따라 질환 원인이 되거나 증상의 원인이 되는 유전자의 발현을 검색함으로써 치료의 방향과 예후 등을 예견할 수 있는 길이 열릴 수 있을 것이다.

### 2.3. 돌연변이의 탐색

유전질환이 아닌 경우에도 체세포 돌연변이에 의해 인체 질환이 발생할 수 있다. 이 경우에는 cDNA chip을 이용하여 유전자의 발현을 비교하는 것으로 검색되지 않는다. 따라서 일정 염기서열을 가진 oligonucleotide를 이용한 oligo chip을 사용하여 하나의 염기서열에 대한 분석을 하여야 한다. 이를 위해 미국 Affimatrix사에서 개발된 DNA chip을 사용해야 하는데 원하는 유전자에 대해 계획된 chip을 제작해야 한다. p53을 비롯한 각종 유전자에 대한 oligo chip이 있으며 국내에서도 기술개발 중에 있다. 이는 질환관련 유전자의 돌연변이 분석 외에도 population genetics나 법의학, single nucleotide polymorphism 등의 분석에도 유용하게 사용될 수 있다.

### 2.4 Pharmacogenomics

신약의 개발을 위해서 가장 중요하면서도 힘든 단계는 목표 단백질을 설정하는 것이다. 이를 위해 수많은 연구와 투자가 이루어지고 있다. 이후의 단계는 자동화되어 있어 시간에 의해 결정되는 단계라고 할 수 있다. 이 목표 단백질, 또는 유전자의 선정을 위해 DNA chip은 아주 중요한 기술이라고 할 수 있다. 수만개의 유전자들이 수백여종의 질환에 따라 다르게 움직이는 것을 분석함으로써 각각의 질환에 치료목표가 될 수 있는 유전자를 선정하는데 중요한 방법으로 떠오르고 있다. 또한 개발 중인 신약의 효과 및 독성을 검정하기 위한 방법으로 세포 또는 조직의 유전자 발현 변화를 신속히 볼 수 있어 신약의 대량 검색이 가능하다.

또 하나는 약물에 대한 반응이 사람마다 다른 이유를 알 수 있는 방법을 제공할 수 있다. 약물의 목표가 되는 단백질, 또는 이에 해당하는 유전자가 사람마다 서로 다를 수 있다. 따라서 개개인마다 서로 다른 약물반응을 나타내게 되는 것이다. 이를 알아보는 방법으로 oligo chip을 이용하면 차이가 있는 염기서열을 빠르게 분석할 수 있다. 이를 근거로 일정 유전형에 대한 새로운 약물을 개발하는 것이 또 하나의 DNA chip 적용분야라고 할 수 있다.

### 2.5 미생물 동정

수천종의 단백질로 구성된 미생물들은 좋은 모델 시스템이 될 수 있다. 따라서 Cyanobacteria를 비롯한 몇종의 prokaryote의 전체 유전자를 이용한 DNA chip이 개발되어 있다. 또한 효모의 6000여개 유전자를 이용한 DNA chip을 이용하여 대사 상태나 세포분열등에 따른 유전자 발현 분석, 그리고 변이형 효모와의 차이를 보는 실험을 할 수 있게 되었다. 실제로 임상에서 환자에게 문제가 되는 경우는 분리된 미생물의 항생제 내성이나 유전형 분석을 통하여 치료 방법을 결정하는 것이 중요하다. cDNA chip을 사용하여 미생물의 유전자 발현을 보거나 oligo chip을 이용하여 유전형을 분석함으로써 감염된 균주의 특징을 수시간내에 분석할 수 있을 것이다.

### 3. 맺는 말 : 미래의학

궁극적인 유전체 연구 목표는 인체 질환에 대한 정복일 것이다. 이제까지 알려진 당뇨병이나 암, 유전성 질환과 같은 단일 유전자에 의한 질병발생과 달리 대부분의 질환은 복합 유전인자에 의한 현상이라고 할 수 있다. 인체 심장병 발생에는 수백가지 유전자들이 관여할 것으로 추정되며 이제 인체 유전체 전체 정보를 얻게 되면 이들 질환 유전자의 정체가 밝혀지게 될 것이다. 따라서 인체 질환을 증상이나 형태학적으로 분류하던 시대에서 벗어나 생명현상의 원인이 되는 유전자에 대한 분석, 즉 유전자 의학 (genetic medicine) 으로 전환될 것이다. 이는 DNA chip과 같이 유전자 대량분석 시스템과 초고속 염기서열분석을 통해 가능해질 것이다. 질환에 대한 유전체 정보를 얻게 되면 이를 근거로 각 개인의 유전형, 즉 염기서열을 분석하여 개인별로 진단과 치료를 하는 개인별 의학 (personal medicine) 이 가능할 것이다. 이는 개인의 암유전자의 돌연변이나 다형성 (polymorphism) 을 분석하여 암 발생의 가능성을 예측하는 예측의학 (predictive medicine) 의 시대가 도래할 것이다. 바로 이 모든 미래 유전자 의학의 중심에는 인체 유전체에 대한 정보가 있다고 할 수 있다.