

염색체 미세절단법을 이용한 표지염색체의 전좌 부위에 대한 DNA Painting Probe 제작

계명대학교 의과대학 해부학교실, 의학유전연구소

박찬상 · 이인환 · 최인장 · 김대광

Construction of DNA Painting Probe for Translocation Region of a Marker Chromosome by Chromosome Microdissection

Chan-Sang Park, M.D., In-Hwan Lee, M.D., In-Jang Choi, Ph.D.
and Dae-Kwang Kim, M.D.

Department of Anatomy and Institute for Medical Genetics, School of Medicine,
Keimyung University, Daegu, Korea

Purpose: Chromosome microdissection has been recommended as a technology to overcome the limited problems of conventional cytogenetic analysis and is a direct approach to isolate DNA from specific interesting region of chromosome. KUMA-1 cell line has a specific reserved chromosome abnormality during process from primary cancer culture to continuous cell line development, der(2)t(2;?)(qter;?). So molecular analysis for translocation region of der(2) may be helpful to understand pathogenesis of this primary cancer. The aim of this study was to develop painting probe for the translocation region for molecular study in future about translocation region of der(2) of KUMA-1 cell line.

Materials and Methods: KUMA-1 cell line was derived from a squamous cell carcinoma of urinary bladder. The translocation breakpoint region of der(2) appeared in KUMA-1 cell line was microdissected and dissected chromosome segments were amplified by PCR reaction. Fluorescent in situ hybridization was conducted on KUMA-1 metaphase cells with the probe generated from PCR product to confirm the construction of painting probe containing the translocation breakpoint of der(2).

Results: Painting probe was hybridized to the metaphase chromosome of KUMA-1 cell line and two fluorescent signals were mapped to the translocation forming chromosomal region of der(2).

Conclusion: It was possible to construct the painting probe for the translocation region of der(2) by chromosome microdissection.

Key Words: Chromosome microdissection, Marker chromosome, Painting probe, Translocation

서 론

염색체 이상은 선천성 기형과 자연 유산의 원인으로 중요하다(1~3). 종양에서도 여러 가지 다양한 염색체 이상이 나타나며 특히, 종양에서 나타나는 특이한 염색체의 결과는 진단과 예후를 판별하는데 매우 중요한 정보를 제공한다(4,5). 염색체 이상 부위에서의 분자생물학적인 연구는 암 발생의 병리기전과 이에 연관된 유전자들의 역할을 규명하는데 매우 유용하다(6). 여러 가지 banding 기법의 개발로 염색체의 구별이 가능하였지만 통상적인 세포유전학적인 염색체의 분석으로는 암세포 특히, 고형 암에서 나타나는 다양한 염색체 이상을 해석할 수 없는 경우가 많다(7).

암세포에서 나타나는 다양한 염색체 변이를 분석하기 위한 여러 가지 분자세포유전학적 기법이 개발되었는데, 그 중 한가지가 염색체 미세절단법(chromosome microdissection)을 이용한 것으로 Bates 등(8)은 사람염색체에 적용하여 2번 염색체의 DNA library를 개발하였다. 염색체 미세절단법으로 얻어진 소량의 염색체 DNA는 중합연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR이라 함)이나 molecular cloning 방법으로 증폭될 수 있으며(9, 10), 또한 증폭된 DNA는 fluorescence in situ hybridization (이하 FISH이라 함) 방법의 probe로 사용할 수 있다(11). 특히 통상적인 세포유전학적인 분석으로 알 수 없는 암세포의 염색체 이상을 지닌 표지염색체(marker chromosome)에 직접 염색체 미세절단으로 얻은 염색체 DNA 절편을 증폭하여 만들어진 probe를 정상 중기 세포 염색체에 적용하면 표지염색체를 형성하는 염색체의 기원을 알 수 있다(12~14). 나아가서 이러한 표지염색체를 형성하는 염색체 부위를 미세절단 후 증폭하여 만든 DNA library는 분자생물학적 연구에 유용하게 사용될 수 있다(15,16).

KUMA-1 세포주는 방광의 편평상피세포암에서 유래된 세포주로 초기배양에서는 염색체 배수가 과이배수성(hyperdiploid) 양상을 보이지만 세포주

로 되면서 저사배수성(hypotetraploid) 양상을 지닌 세포주이다(17). 이 세포주에서 나타나는 유도염색체 2번[derivative chromosome 2, der(2)t(2;?)(qter,?)]은 초기 배양부터 나타나서 지속적인 세포배양 과정에도 유지되는 염색체 이상으로, 이 염색체 이상은 세포배양 이전에 이미 존재하는 원발성 방광암의 한 특성으로 암의 병리기전에 관련될 것으로 추정된다.

이 연구에서는 유도염색체 2번의 전좌 부위를 미세절단한 다음 PCR 증폭을 실시하여, 이 실험에서 제작된 painting probe를 이용하여 미확인된 유도염색체 2번의 염색체 기원에 대한 조사와 이 painting probe에서 만들어진 DNA library를 이용하여 진보된 분자생물학적 연구를 수행하여 이 방광암의 세포주에 대한 암화과정을 이해하기 위하여 유도염색체 2번의 전좌 부위에 대한 painting probe를 제작하고자 본 실험을 하였다.

재료 및 방법

1) 실험재료

10% 소태아혈청을 함유한 F12 배지에 세포배양을 실시한 방광의 편평상피암에서 유래된 세포주 KUMA-1을 실험재료로 사용하였다.

2) 염색체 표본 준비

세포를 수확하기 전에 colcemid ($0.1 \mu\text{g/ml}$)로 20분간 처리한 후 trypsin-EDTA를 사용해서 세포를 배양용기에서 탈락시켰다. 유리된 세포를 0.075 M KCl 저장액으로 37°C 수조에서 20분간 처리한 다음 메탄올과 초산이 3:1로 배합된 고정액으로 고정시켰다. 24×50 mm coverglass에 염색체를 퍼지게 한 후 56°C 에서 6시간 방치하였다. 속성된 염색체를 0.05% trypsin으로 G-banding을 실시하였다.

3) 염색체의 미세절단과 Topoisomerase I 전처리

0.1~0.4 μm 의 크기로 만들어진 미세 유리 바

늘을 미세조작기(micromanipulator, Narishige, Tokyo, Japan)에 부착한 다음 1,000배의 역상현미경 하에서 유도염색체 2번의 전좌 부위를 미세절단하였다. 10개의 미세절단된 염색체 조각을 Topoisomerase I을 함유한 5 μ l 용액[40 mM Tris HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 200 μ M dNTP, 1 unit topoisomerase (Promega, Madison, Wisconsin), 5 pM universal primer (sequence, CCGACTC-GAGNNNNNNATGTGG)]에 넣어 37°C에서 30분간 처리한 후, 96°C에서 10분간 처리하여 topoisomerase I의 활성을 중지시켰다.

4) 미세절단된 염색체 DNA의 증폭

Topoisomerase I으로 처리된 5 μ l 용액을 94°C에서 변성시킨 후 4°C에 두었다가, 30°C 1분, 37°C 3분, 94°C 1분의 주기로 6주기를 실시하였다. 이 때 매주기의 37°C의 전단계에서 T7 polymerase (USB, Cleveland, Ohio, sequenase Version 2.0)을 0.2 단위를 주입하였다. 이후 50 μ l의 PCR 혼합물 [50 pM universal primer, 200 μ M dNTP, 2 mM MgCl₂, 1.25 unit AmpliTaq Gold™ DNA polymerase와 완충액(Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster, California)]을 조성하여 95°C에서 10분간 활성화 단계를 거친 후 94°C 30초, 56°C 30초, 72°C 30초의 주기를 35회 실시하고, 72°C에서 10분간 연장반응으로 미세절단된 염색체 DNA 절편을 PCR 증폭하였다. 증폭된 DNA를 확인하기 위하여 PCR 증폭물의 5 μ l를 취해 1%의 agarose gel에 전기영동하였다. 1차 PCR 산물의 전기영동에서 더 선명하게 확인하기 위해 1차 PCR 산물의 2 μ l를 같은 방법으로 PCR하여 전기영동을 실시하였다.

5) FISH 탐식자를 위한 미세절단된 PCR 산물의 표지(labeling)

2 μ l의 1차 PCR 증폭 산물을 취해 50 μ l의 PCR 반응 혼합물을 1차 PCR과 같은 방법으로 만들고 다만 dTTP의 농도는 160 μ M으로 하고 표지물질인 biotin 16-dUTP는 40 μ M으로 사용하였다. PCR 실행은 1차 PCR 방법과 같으나 연속 주기는 20회

실시하였다. PCR 산물은 알코올로 침전하여 정제하였고 biotin의 표지 여부는 Blue Gene kit (nonradioactive nucleic acid detection system, GIBCO BRL, Gaithersburg, Maryland)로 검출하였다.

6) FISH 분석

KUMA-1의 염색체 슬라이드를 70% formamide, 2X SSC 용액으로 72°C에서 2~5분간 변성한 후 70%, 90%, 그리고 100%의 알코올로 각각 5분, 3분, 그리고 2분간 탈수한 후 공기 건조시켰다. 20 μ l의 hybridization 혼합물(200 ng 탐식자, 50% formamide, 10% dextrane sulfate, 1X SSC, 3 μ g cot1 DNA, 5 μ g salmon sperm DNA)을 75°C에서 8분간 변성시킨 후 37°C에서 2시간 preannealing을 실시하였다. 염색체 표본에 hybridization 혼합물을 놓고 coverglass를 덮은 후 매니큐어로 밀봉하고 37°C에서 16시간 동안 2X SSC로 젖힌 상자 안에서 hybridization을 실시했다. 세척단계는 50% formamide, 2X SSC로 42°C에서 3분간 3회 실시하고, PN완충액(0.1 M NaH₂PO₄, 0.1 M Na₂HPO₄, pH 8.0, 0.1% Nonidet P-40)으로 45°C에서 15분 그리고 실온에서 2분간 수세하였다. PMN완충액(PN완충액, 5% 탈지분유, 0.02% sodium azide)에 FITC-avidin (2.5 mg/ml)를 400배 회석한 100 μ l를 슬라이드 위에 놓고 실온에서 20분간 방치한 다음 PN완충액으로 2분간 2회 세척하였다. Biotinylated anti-avidin (0.5 mg/ml)를 100배 회석한 100 μ l를 20분간 처리하고 세척한 후 한번 더 FITC-avidin으로 반응시켰다. 10 μ l의 DABCO용액[90% glycerol, 10% PBS, DABCO (Sigma, St. Louis, Missouri, 0.125 gm/ml), pH 8.8]에 propidium iodide (최종농도 0.2 μ g/ml)를 넣어 잘 혼합한 후 coverglass을 덮고 10분 후 공초점레이저주사현미경으로 염색체를 관찰하고 사진 촬영하였다.

결 과

1) 염색체 미세절단

KUMA-1 세포주를 일반적인 세포 수확법으로

Fig. 1. A karyotype of KUMA-1 cell line. Arrow indicates the translocation region between a long arm terminal portion of chromosome 2 and an unidentified chromosome segment which is microdissected under the control of a micromanipulator.

염색체 표본을 준비하여 G-banding을 실시한 후 (Fig. 1), 유도염색체 2번의 전좌 부위를 미세절단하였다.

2) 미세절단된 염색체 DNA의 증폭

Supercoil된 염색체 구조를 이완시키기 위한 topoisomerase I의 사용과 Taq polymerase에 의한 PCR 증폭의 효율을 높이기 위한 T7 polymerase의 전처리 증폭으로 painting probe를 얻기 위한 PCR 증폭 산물을 얻을 수 있었다(Fig. 2, 3).

3) Painting 탐식자의 표지와 FISH 분석

유도염색체의 전좌 부위에 대한 painting probe를 만들기 위해 증폭된 미세절단한 염색체 PCR 산물을 biotin 16-dUTP로 PCR 방법으로 표지하였고, 표지여부는 nonradioactive nucleic acid detection법으로 painting 탐식자의 biotin 표지를 확인할 수 있었다. 표지된 painting probe를 KUMA-1 세포 주 염색체에 FISH를 실시한 결과 유도염색체 2번에서 전좌 부위의 양쪽 염색분체에 형광신호를 검출할 수 있어 적절한 painting probe가 제작되었음을 확인하였다(Fig. 4).

Fig. 2. Electrophoresis of PCR products from microdissection on 1% agarose gel. Lane M, size marker; lane 1, 5 μ l of the PCR product, a smear is quite faint ranging from 200~800 base pairs; lane 2, 5 μ l of second PCR product showing a bulk smear approximately 300~500 base pairs in size.

Fig. 3. Ethidium bromide stained gel electrophoresis of 5 μ l PCR products resulting from second PCR from other microdissections. Lane M, size marker; Lane 1~4, second PCR product.

고 찰

KUMA-1 세포주는 방광의 편평상피세포암에서 유래된 것으로 세포배양 초기에서는 염색체의 배수성이 과이배수성으로 나타나서 세포배양이 진행되면서 염색체 수가 증가되어 세포주에서는 저사배수성을 나타내는 세포주인데, KUMA-1 세포주에 나타나는 특이적인 클론성 염색체 구조적 이상 중 der(2)t(2;?)(qter;?), del(3)(p21), i(13q), i(15q) 등은 원발성 암의 세포배양 때부터 나타나서 지속적으로 유지되는 염색체 이상들이다(17). 염색체 2qter 부위에서 나타나는 클론성 염색체 구조적 이상과 관련 있는 종양으로 포상횡문근육종(18,19)과 자궁의 평활근종(20)이 있으나 그 예는 드문 상태이고 또한 방광암에서의 보고는 없는 상태이다.

통상적인 세포유전학적 방법으로 염색체 분석이 불가능한 암세포에서 나타나는 복잡한 염색체의 재배열은 분자·세포유전학적 기술로 가능하게 되었는데, 그 중 한 가지 기술이 염색체 미세절단법을 이용하는 것이다. 사람 세포유전학 분야에서 염색체 미세절단법은 Bates등(8)에 의해 처

Fig. 4. FISH finding with painting probe generated from microdissecting the translocation region of the derivative chromosome 2 of KUMA-1 cell line. Arrow indicates fluorescent signals on both chromatids of long arm of the derivative chromosome 2.

음 도입되어 banding과 염색이 안된 2번 염색체 절편들을 절단하여 염색체 2번의 library를 제작하였고, Ludecke등(9)은 미세절단된 염색체 절편을 PCR 방법으로 증폭하여 microdissection-microcloning법을 개발하였으며, GTG banding된 염색체에서의 미세절단은 Senger등(10)에 의해 성공적으로 실시되었다.

염색체 미세절단법으로 생기는 염색체 DNA 절편을 PCR로 증폭한 후 biotin이나 digoxigenin으로 표지시켜 만든 painting probe를 이용하여 FISH를 실시하는 것을 Micro-FISH라 하며(11), 이 방법으로 암에서 나타나는 염색체 이상 부분을 미세절단하여 만든 painting probe를 정상 염색체에 결합시키면 통상적인 세포유전학적 방법으로 알 수 없는 염색체의 구조적 이상이나 표지염색체의 기원을 알 수 있다(12~14,21,22). 한편 미세절단된 염색체 DNA 절편들은 직접적으로 microcloning하거나 PCR 방법을 이용하여 재조합 DNA library를 만들 수 있는데, 이것을 이용해서 세포유전학적으로 유전자의 증폭을 나타내는 double minutes (DM)나 homogeneously staining region (HSR) 부분에 대

한 염색체 미세절단으로 얻은 microclone library를 이용하면 어떠한 유전자가 증폭되었는지를 알 수 있다(14). 암세포에서 흔히 나타나는 염색체 결손(deletion) 부위에 대한 microclone library가 구축되면 특정 암세포에서 나타나는 염색체 결손 부위에 대한 물리적 지도작성(physical mapping)을 할 수 있으며(23), 염색체 전좌 부위에 대한 microclone library를 이용하여 전좌 부위를 형성하는 절단점을 클로닝할 수 있어(15) 염색체 미세절단법으로 만든 library clone은 암세포의 염색체에서 일어나는 구조적 변화와 생물학적 문제를 해결할 수 있어 암의 병리 기전을 이해하는데 좋은 재료가 된다.

여러 암유전자들은 암세포에서 특이하게 나타나는 전좌와 연관이 있기 때문에 염색체 변이에 대한 분자학적 분석을 하기 위해서는 각 유전자의 위치 파악은 필수적이다. 전좌 부위의 절단점을 클로닝하면 성장조절유전자들의 구조적이나 기능적 변화를 분자생물학적 기전으로 설명이 가능해진다(24,25). 염색체 전좌로 인해 암유전자의 활성화나 새로운 암유전자성 키메라 유전자가 형성된다. 이를 암유전자나 키메라유전자의 단백질 산물을 종종 전사요인으로 사용하며 이들의 변이는 암 발생에 매우 중요하며 암의 원인과 연관이 있으며 또한 융합단백질(fusion protein)은 암항원으로 암치료의 표적으로 이용 가능성이 크다(25).

KUMA-1에서 나타나는 der(2)t(2;?)(qter;?)는 원발성 암과 세포주에서 동시에 나타나는 클론성 염색체 전좌로서 이 변이는 세포주가 성립되기 전에 이미 일어나 오랫동안 *in vitro*에서 배양되더라도 원래 기원한 암의 특성을 보존하는 것으로, 암의 발생과 진행에 관여하는 염색체 재배열이며, 방광암에서 이와 같은 염색체 변이는 보고되어 있지 않다. 그러므로 유도염색체를 형성하는 기원을 알 수 없는 염색체의 확인과 유도염색체의 전좌를 형성하는 부위에 대한 분자생물학적 연구는 매우 중요할 것이다.

이 연구에서는 위와 같은 실험을 하기 위한 초기 단계로 유도염색체 2번의 전좌 부위를 미세절

단한 다음 PCR 증폭을 실시하여 생성된 PCR 산물을 probe로 사용하여 KUMA-1 세포주 염색체에 FISH를 실시한 결과 유도염색체 2번의 전좌 부위의 양쪽 염색분체에 형광신호를 검출할 수 있었어 2번 유도염색체 전좌 부위에 대한 적절한 painting probe가 제작되었음을 확인할 수 있었다. 앞으로 이 실험에서 제작된 painting probe를 이용하여 정상 중기 염색체에 FISH를 실시하여 유도염색체를 형성하는 미확인된 염색체 기원을 조사할 것이다. 그리고 이 painting probe에서 만들어진 DNA library를 이용하여 유도염색체 2번의 전좌 부위의 절단점을 클로닝하여 문자생물학적 연구를 수행하면 원발성 방광암 세포와 세포주에 대한 암화과정을 이해하는데 도움이 될 것이다.

결 롬

유도염색체 2번의 전좌 절단 부위를 미세절단하고 절단된 염색체 DNA 절편을 증폭하여 KUMA-1 중기세포에 hybridization을 실시한 결과 der(2)의 전좌 절단 부위에 두 개의 형광 신호를 검출할 수 있었어 염색체 미세절단법으로 der(2)의 전좌 부위에 대한 DNA painting probe를 제작할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane JA, Jacobs PA. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. Ann Hum Genet 1980;44:151-178.
- Cohen MM, Rosenblum-Vos LS, Prabhakar G. Human cytogenetics. A current overview. Am J Dis Child 1993;147:1159-1166.
- Jacobs PA, Hassold TJ. The origin of numerical chromosome abnormalities. Adv Genet 1995;33:101-133.
- Heim S, Mitelman F. Cancer cytogenetics. New York, Alan R Liss, Inc., 1987.
- Sandberg AA. The chromosome in human cancer and leukemia. 2nd ed, New York, Elsevier Science Publishing Co., 1990.
- Nowell PC, Croce CM. Philip Levin award lecture. Chromosome translocations and oncogenes in human

- lymphoid tumors. Am J Clin Pathol 1990;94:229-237.
7. Mitelman F, Kaneko Y, Trent J. Report of the committee on chromosome changes in neoplasia. Cytogenet Cell Genet 1991;58:1053-1079.
 8. Bates GP, Wainwright BJ, Williamson R, Brown SD. Microdissection of microcloning from the short arm of human chromosome 2. Mol Cell Biol 1986;6:3826-3830.
 9. Ludecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B. Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. Nature 1989;338:348-350.
 10. Senger G, Ludecke HJ, Horsthemke B, Claussen U. Microdissection of banded human chromosomes. Hum Genet 1990;84:507-511.
 11. Meltzer PS, Guan XY, Burgess A, Trent JM. Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application 1992;1:24-28.
 12. Deng HX, Yoshiura K, Dirks RW, Harada N, Hirota T, Tsukamoto K, Jinno Y, Niikawa N. Chromosome-band-specific painting: chromosome *in situ* suppression hybridization using PCR products from a microdissected chromosome band as a probe pool. Hum Genet 1992;89:13-17.
 13. Meltzer PS, Guan XY, Trent JM. Telomere capture stabilizes chromosome breakage. Nat Genet 1993;4:252-255.
 14. Zhang J, Trent JM, Meltzer PS. Rapid isolation and characterization of amplified DNA by chromosome microdissection: identification of IGF1R amplification in malignant melanoma. Oncogene 1993;8:2827-2831.
 15. Zhang J, Cui P, Glatfelter AA, Cummings LM, Meltzer PS, Trent JM. Microdissection based cloning of a translocation breakpoint in a human malignant melanoma. Cancer Res 1995;55:4640-4645.
 16. Elkahloun AG, Bitner M, Hoskins K, Gemmill R, Meltzer PS. Molecular cytogenetic characterization and physical mapping of 12q13-15 amplification in human cancers. Genes Chromosomes Cancer 1996;17:205-214.
 17. Kang JS, Sohn SS, Kim DK, Chang SI. Cyto-molecular comparison between primary squamous cell carcinoma and derived cancer cell line from bladder. J Korean Cancer Assoc 1995;27:61-70.
 18. Seidal T, Mark J, Hagmar B, Angervall L. Alveolar rhabdomyosarcoma: a cytogenetic and correlated cytological and histological study. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand[A] 1982;90:345-354.
 19. Turc-Carel C, Lizard-Nacol, Justrab E, Favrot M, Philip T, Tabone E. Consistent chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. Cancer Genet Cytogenet 1986;19:361-362.
 20. Vanni R, Nieddu M, Paoli R, Lecca U. Uterine leiomyoma cytogenetics. I. Rearrangements of chromosome 12. Cancer Genet Cytogenet 1989;37:49-54.
 21. Engelen JJ, Loots WJ, Albrechts JC, Motoh PC, Fryns JP, Hamers AJ, Geraedts JP. Disclosure of five breakpoints in a complex chromosome rearrangement by microdissection and FISH. J Med Genet 1996;33:562-566.
 22. Jonveaux P, Le Coniat M, Derre J, Flexor MA, Daniel MT, Berger R. Chromosome microdissection in leukemia: a powerful tool for the analysis of complex chromosomal rearrangement. Genes Chromosomes Cancer 1996;15:26-33.
 23. Guan XY, Meltzer PS, Cao J, Trent JM. Rapid generation of region-specific genomic clones by chromosome microdissection: isolation of DNA from a region frequently deleted in malignant melanoma. Genomics 1992;14:680-684.
 24. Solomon E, Borrow J, Goddard AD. Chromosome aberrations and cancer. Science 1991;254:1153-1160.
 25. Rabitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. Nature 1994;372:143-149.