

미토콘드리아의 D-고리의 다형성과 복제수와의 관계

이재호¹, 김대광²

¹계명대학교 의과대학 해부학교실, ²계명대학교 의과대학 의학유전학교실

(2014년 6월 10일 접수, 2014년 7월 18일 수정접수, 2014년 9월 5일 게재승인, Published Online 30 September 2014)

간추림 : 종양의 미토콘드리아에는 유전자 돌연변이나 다형성과 같은 유전적 불안정성이 높게 나타나며, 특히 D-고리에서 흔히 발견되는데 이는 암의 예후와 연관이 있다고 한다. 또한 D-고리의 유전자변이는 미토콘드리아의 복제수의 변화와 연관이 있다고 한다. 본 연구에서는 미토콘드리아 DNA의 D-고리에서 자주 나타나는 다형성인 D310과 D514의 빈도를 108명의 정상인 말초혈액 DNA에서 살펴보고 이에 따른 미토콘드리아 복제수의 변화를 조사하였다. D310의 다형성은 C7은 40명(37.7%), C8은 34명(32.1%) 그리고 C9는 32명(30.2%)에서 각각 나타났다. D514의 다형성은 (CA)5와 (CA)4에서 각각 62명(61.4%)과 39명(38.6%)에서 나타났다. 미토콘드리아 복제수는 44명(40.7%)에서 증가되어 있었고, 64명(59.3%)에서 감소가 관찰되었다. D310과 D514의 다형성과 복제수의 변화의 증가와 감소와의 상관관계는 없었다. 정상인에서 미토콘드리아 D-고리의 다형성과 복제수와의 연관성은 없었으나, 이를 바탕으로 다양한 질환에서 이들 미토콘드리아 표지자들의 변화를 조사할 필요가 있을 것이다.

찾아보기 낱말 : 미토콘드리아 다형성, 미토콘드리아 복제수, D-고리

서 론

미토콘드리아의 주 기능은 유기물질을 이용하여 세포가 사용할 수 있는 에너지 형태인 ATP로 전환시키는 것이다. 사람의 미토콘드리아 유전체는 15,569 염기쌍으로 이루어진 두 가닥의 원형 DNA로, 13종의 인산화산화효소와 단백질 합성에 필요한 22종의 tRNA 및 2종의 rRNA를 위한 모두 37개의 유전자로 구성되어 있다 [1]. 미토콘드리아의 유전체는 핵 속에 존재하는 DNA보다 유전적 불안정을 보이는데 그 이유는 핵 DNA에 존재하는 히스톤과 같은 방어 물질이 없고, DNA가 손상되는 경우에 이를 복구할 수 있는 유전자가 미토콘드리아에는 존재하지 않기 때문에 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 손상을 극복할 능력이 한정되어 있기 때문이다 [2-5]. 그리고 활성산소를 지속적으로 생성하는 전자 전달사슬이 미토콘드리아 유전체에 인접하여 위치하기

때문에 핵 유전체보다 돌연변이 물질에 의한 돌연변이 확률이 수십 배 더 많이 나타나기 때문에 최근 mtDNA의 유전적 변화가 중요시 되고 있다 [6,7].

미토콘드리아의 복제와 전사는 D-고리(D-loop)에서 일어나며 [8], 또한 이 부위는 유전적 다형성이 흔하게 나타나서 이 부위의 염기서열을 분석하여 생물학적 특성이나 법의학적 이용뿐만 아니라 인류학적 연구에도 활용되고 있다 [9]. 특히 다형성이 흔히 나타나는 D310과 D514는 암의 생존율을 비롯하여 다양한 질환의 임상양상과 깊은 연관성을 보였다 [5,7,9]. 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 함유량은 복제수(copy number)로도 표현하는데 이는 세포가 정상적인 생리적 기능을 보존하는 데 필요한 에너지 요구에 맞게 상대적으로 안전한 범위에서 유지된다. 미토콘드리아는 포유동물에서 세포 당 수백에서 수천 복제수(copy number)가 존재하고, 세포 또는 조직의 기원에 따라 복제수가 다양하게 나타난다 [10].

종양에서 나타나는 D-고리 부위의 유전자 변이는 미토콘드리아의 복제수(mitochondrial copy number, mtCN)의 변화와 연관이 있다는 보고도 있다 [11-18]. 더욱 중요한 사실은 난소암, 유방암 그리고 간암의 경우에는 mtCN의 변화는 신생물의 형질변환, 암의 진행 그리고 전이와 같은 임상적 결과와 연관이 있는 것으로 나타났

*이 연구는 2013년 (재)동일문화재단 학술연구비지원에 의해 수행되었음.

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

교신저자 : 김대광(계명대학교 의과대학 의학유전학교실)

전자우편 : dkkimmd@kmu.ac.kr

다[12,16,17]. 하지만 아직까지 미토콘드리아의 다형성과 복제수의 관계는 암세포뿐 아니라 정상 세포에서도 연구가 되어 있지 않아서, 이들 관계의 질환에서의 의의를 비교해볼 수 있는 대조군이 없는 현실이다.

이 연구에서는 정상인 한국인의 말초혈액 DNA에서 미토콘드리아 유전체의 다형성이 가장 많이 나타나는 D310과 D514를 조사하고 이들 다형성과 mtCN의 연관성을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

이 연구는 1996년 제공받은 108명의 건강한 30대 성인 남녀의 혈액으로부터 DNA를 추출하여 실험을 하였다. 제공받은 혈액으로부터 DNA를 DNA extraction Kit (Absolute™ DNA extraction Kit, BioSewoom, Korea)를 이용하여 추출하였다. 추출한 DNA의 양과 순도는 ND-1000 (Nanodrop, USA)으로 측정된 후 -20°C 에 보관하였다.

미토콘드리아의 유전자 다형성을 알아보기 위해 Table 1의 primer를 이용하여 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 시행하였다. PCR 반응을 위해 반응액은 template DNA 1 μL , 각 10 pM primer 0.2 μL , MgCl_2 free 10 \times PCR buffer 3 μL , 25 mM MgCl_2 3 μL , 2.5 mM dNTP 3 μL , Taq DNA polymerase (5U) (Promega, USA) 0.5 μL 를 첨가하고 멸균증류수를 첨가하여 총 30 μL 로 조정하였다. PCR 수행은 94°C 에서 5분간 pre-denaturation 후 $94^{\circ}\text{C}/30$ 초, $56^{\circ}\text{C}/30$ 초, $72^{\circ}\text{C}/1$ 분씩 3단계로 35 cycles 수행한 후 마지막으로 72°C 에서 5분간 extension을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물을 1.5% agarose gel에서 확인하였다. 이 결과를 Bionics Inc. (Seoul, Korea)에 의뢰하여 ABI 3730 DNA sequencer를 이용하여 직접 염기서열분석을 시행하여 결과를 분석하여 D310과 D514의 다형성을 확인하였다.

미토콘드리아의 복제수는 real-time PCR의 방법으로 β -actin을 이용하여 input DNA의 양을 표준화하여 측정하였다[13,17]. Table 1의 primer를 이용하여 LightCycler

480 II system (Roche Diagnostics, Germany)으로 실험 분석하였다. 매 실험마다 DNA를 5배 연속 희석하여 다양한 농도의 DNA주형을 함께 분석하였다. Real-time PCR 반응액은 template DNA 1 μL (50 ng/ μL), SYBR Green Master MIX 2 μL (Takara, Japan), and 10 pM primer 0.1 μL 를 첨가하고 멸균증류수를 첨가하여 총 20 μL 로 조정하였다. PCR 수행은 94°C 에서 1분간 pre-denaturation 후 $94^{\circ}\text{C}/15$ 초, $60^{\circ}\text{C}/30$ 초, $72^{\circ}\text{C}/30$ 초씩 3단계로 40 cycles 수행하였다. 각 검체에서 용해곡선 (melting curve)을 확인하고 참고 유전자 (reference gene)로 이용한 β -actin값으로 나누어 상대적인 미토콘드리아의 복제수를 측정하였다[17].

실험에서 얻어진 결과는 SPSS 20.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였다. 미토콘드리아 다형성과 성별은 Fisher's exact test 혹은 Pearson's Chi square test을 이용하여 검정하였다. 각 군 내에서의 측정치는 t-test 혹은 One-way ANOVA를 이용하였고 $P < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의하다고 하였다.

결 과

미토콘드리아의 유전자의 D310과 D514의 다형성과 미토콘드리아 발현양을 108명에서 관찰하였다. 미토콘드리아의 이형세포질성 (heteroplasmy)에 의해 다형성에 대한 정확한 판독이 불가능한 표본은 제외하여 106명에서 미토콘드리아의 다형성을 확인하였다. D310의 다형성은 C7 (40명, 37.7%)이 가장 많이 나타났고, 그 다음으로 C8 (34명, 32.1%)과 C9 (32명, 30.2%)가 나타났다 (Fig. 1). D514의 다형성은 (CA)5와 (CA)4에서 각각 62명 (61.4%)과 39명 (38.6%)에서 나타났다. 이들 다형성은 서로 상관 없이 성별에 따라 차이가 없었다.

미토콘드리아의 발현양은 참고 유전자에 상대적인 값으로 이것의 평균 (1.12 ± 0.37)을 기준으로 증가 혹은 감소하는 군을 나누었다. 그 결과, 108명 모두에서 미토콘드리아의 발현양을 성공적으로 확인하였고, 증가와

Table 1. Primer sequence

| | Region | Sequence |
|-----------------------|----------------|---|
| D310 (C)n | D loop | F: 5'-TCC ACA CAG ACA TCA TAA CA-3' R: 5'-AAA GTG CAT ACC GCC AAA AG-3' |
| D514 (CA)n | D loop | F: 5'-CCC ATAT CTA CTA ATG TCA TCA A-3' R: 5'-TTT GGT TGG TTC GCC GTA TG-3' |
| Mitochondrial Content | COX | F: 5'-CCC CAC ATT AGG CTT AAA AAC AGA T-3' R: 5'-TAT ACC CCC GGT CGT GTA GC-3' |
| Nucleus Content | β -actin | F: 5'-ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC-3' R: 5'-TTC CAC TGC TGA GCC ATC AC-3' |

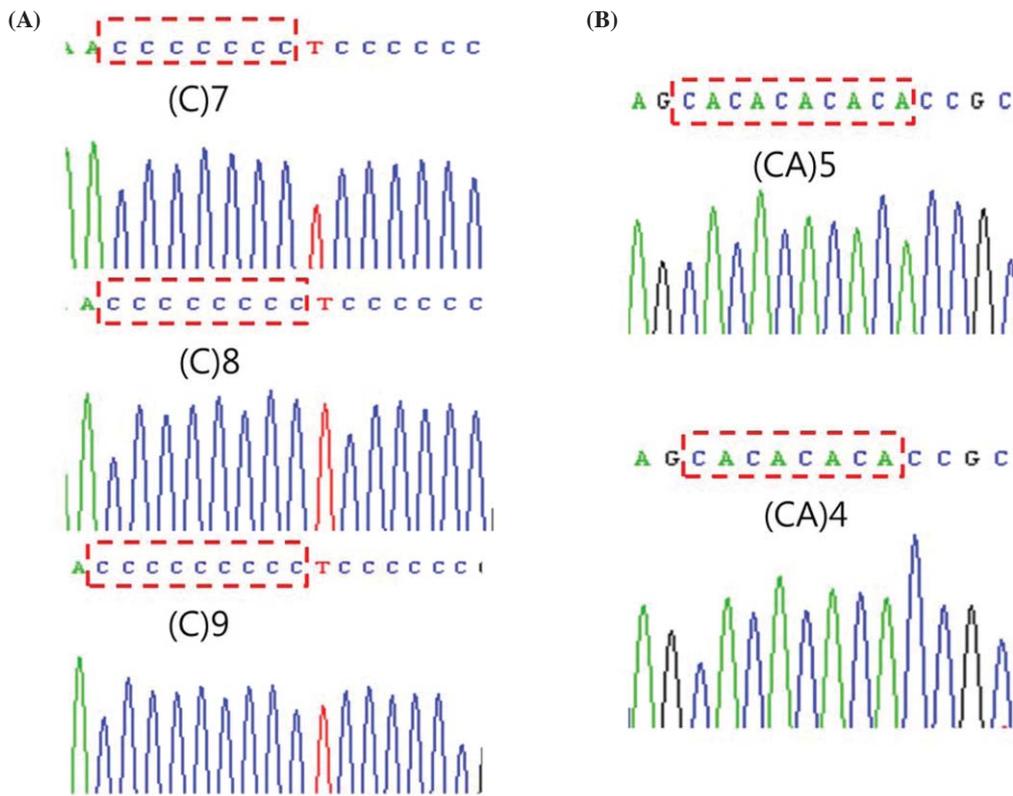


Fig. 1. Mitochondrial polymorphisms in D-loop. (A) D310 polymorphism, (B) D514 polymorphism.

Table 2. Mitochondrial copy number change according to mitochondrial polymorphism

| | Mitochondrial copy number (N, %) | |
|-------|----------------------------------|-----------|
| | Decreased | Increased |
| D310 | | |
| C7 | 26 (65.0) | 14 (35.0) |
| C8 | 17 (50.0) | 17 (50.0) |
| C9 | 20 (62.5) | 12 (37.5) |
| D514 | | |
| (CA)4 | 23 (59.0) | 16 (41.0) |
| (CA)5 | 38 (61.3) | 24 (38.9) |

감소는 각각 44명 (40.7%)와 64명 (59.3%)에서 관찰되었다. 미토콘드리아의 다형성에 따른 발현양의 분포는 Table 2와 같이 나타났다. D310은 미토콘드리아의 발현양이 감소하였을 때 C7과 C9의 빈도가 더욱 높게 나타나는 경향이 있었으나 통계적으로 유의성이 없었다 ($p=0.31$). D514는 다형성에 상관없이 미토콘드리아의 발현양이 비슷하게 나타났다 ($p=0.82$). 성별로 나누어 보았을 때, D514는 다형성에 따라 발현양의 빈도가 남녀에서 다르게 나타났으나 통계적으로 유의성은 없었다 (Fig. 2).

고찰

미토콘드리아 DNA는 핵 DNA에 보다 외부 자극에 대해 유전체의 불안정성이 높아 돌연변이가 생길 확률이 높으며 [6,7], 특히 미토콘드리아의 D-고리는 미토콘드리아의 전사와 복제에 관여하는 부분이 존재하는 비부호화영역 (non-coding region)으로 이 부분의 염기서열의 변화는 미토콘드리아의 전사와 복제에 영향을 미칠 것으로 추정된다 [8]. D-고리에서의 유전적 다형성은 정상인 그룹 간 및 인종 간에서도 나타나며, 또한 종양과 인접한 정상조직 사이에서도 유전적 다형성이 나타난다 [9,19]. 미토콘드리아 DNA 복제수의 유지는 미토콘드리아의 기능 유지와 세포 성장에 아주 중요한 역할을 한다 [20]. 그러므로 핵 속의 DNA뿐만 아니라 미토콘드리아 DNA의 다형성과 복제수의 변화는 미토콘드리아 유전체의 안정성 유지에 연관이 있을 것으로 추정된다.

D-고리 구간에 해당하는 16183-16193, 303-315, 568-573에 cytosine 단일뉴클레오타드가 반복적으로 다양하게 나타난다. Sanches-Cespeds 등 (2001)은 이 중 303-315서열 (D310)에서 cytosine의 결손과 삽입의 돌연변

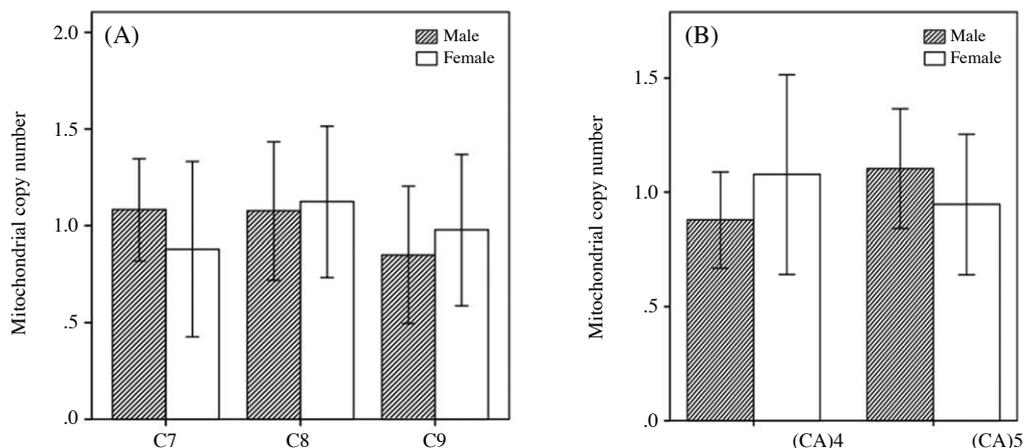


Fig. 2. Association between mitochondrial polymorphisms and copy number according to the gender. (A) D310 and mitochondrial copy number, (B) D514 and mitochondrial copy number.

이가 종양에서 높게 나타나는 것을 보고하였다[19]. CCCCTCCCC와 같이 cytosine이 연속적으로 배열되지만 thymine (T) 앞에 존재하는 cytosine이 7개가 있는 경우를 (C)₇으로 표기할 수 있으며, cytosine의 수는 6~9개로 다양하게 나타난다[21]. 그리고 D 고리의 514-523서열 사이에 (D514) cytosine-adenosine 디뉴클레오티드 (CA)_n이 반복적으로 다양하게 나타나며 반복수는 (CA)₃에서 (CA)₇로 나타난다[22].

D310에서 나타나는 cytosine의 결손과 삽입은 인구 집단에서는 다형성으로 나타나거나, 종양에서는 돌연변이로 나타난다. 정상조직에서 D310에서의 cytosine의 다형성은 (C)₆~(C)₉로 나타나고 D514의 (CA)_n 다형성은 (CA)₃~(CA)₇로 나타나는데, 이는 미토콘드리아의 D 고리에서의 다형성은 미토콘드리아의 실제적인 기능적 변이가 아니라 클론의 확장의 의미하는 것으로 추정된다[23-26]. 이 연구에서 D310의 다형성으로 (C)₇이 가장 많이 나타났으며, D514의 다형성으로는 (CA)₅가 가장 많이 나타났다. D-고리에서의 유전적 다형성의 다양성은 종족 간에 비슷하게 나오거나 또는 다르게 나올 수 있어 인류학적 연구에 좋은 자료가 된다[21,27].

미토콘드리아 DNA의 복제수(mitochondrial copy number, mtCN)는 저산소증과 호르몬 자극같은 미세 환경들에 의해 변화된다[28,29]. 활성산소와 같이 미토콘드리아의 기능 장애를 일으키는 경우에는 mtCN는 감소하였으며[30], 실험적으로 mtCN을 유지하는 것은 미토콘드리아의 기능을 보존하고 세포성장에 필수적임을 증명하였다[20]. 종양에서의 mtCN는 두경부암, 난소암 및 식도암에서는 증가하였고[18-20]. 간세포암, 위암, 유방암 및 신세포 암에서는 감소하였다[21-25]. 이는 종양 발생에 있어서 mtCN의 역할은 복잡하게 나타나며 암에

특이적으로 나타나는 것을 시사한다. 신장암, 유방암 그리고 폐암에서 말초혈액에서 나타나는 mtCN의 변화는 이들 종양의 위험도와 예후를 예측할 수 있는 유전적 표지자로 사용될 가능성을 보였다[18,31,32]. D-고리 부위의 유전자 변이와 mtCN와의 연관성은 여러 종양에서 보고가 있어[11-18], 건강한 사람의 말초혈액에서의 연관성을 조사할 필요가 있어서 본 연구를 시행하였다.

그 결과, 미토콘드리아 DNA의 다형성과 mtCN과의 연관성은 젊은 정상인의 말초혈액에서는 없는 것을 확인하였지만, 노화 혹은 질환이 진행되면서 세포 내의 손상이 축적되어 미토콘드리아의 변화를 초래하면서 다형성과 발현양의 변화에 대한 추후 연구가 필요하다. 이에 대한 결과는 암과 같은 노화에 의한 질환에서 예후나 경과를 예측할 수 있는 유전적 표지자로 이용 가능성이 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol.* 1998; 4:289-333.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981; 290:457-65.
- Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem.* 1992; 61:1175-212.
- Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 8739-46.
- Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, Copeland WC. Mito-

- chondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res.* 2001; 488:119-33.
6. Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res.* 2002; 509:127-51.
 7. Lièvre A, Chapusot C, Bouvier AM, Zinzindohoué F, Piard F, Roignot P, et al. Clinical value of mitochondrial mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23:3517-25.
 8. Van Tuyle GC, McPherson ML. A compact form of rat liver mitochondrial DNA stabilized by bound proteins. *J Biol Chem.* 1979; 254:6044-53.
 9. Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet.* 1992; 2:324-9.
 10. Clay Montier LL, Deng JJ, Bai Y. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J Genet Genomics.* 2009; 36:125-31.
 11. Kim MM, Clinger JD, Masayeva BG, Ha PK, Zahurak ML, Westra WH, et al. Mitochondrial DNA quantity increases with histopathologic grade in premalignant and malignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:8512-5.
 12. Wang Y, Liu VW, Xue WC, Cheung AN, Ngan HY. Association of decreased mitochondrial DNA content with ovarian cancer progression. *Br J Cancer.* 2006; 95:1087-91.
 13. Lin CS, Chang SC, Wang LS, Chou TY, Hsu WH, Wu YC, et al. The role of mitochondrial DNA alterations in esophageal squamous cell carcinomas. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010; 139:189-97.
 14. Lee HC, Li SH, Lin JC, Wu CC, Yeh DC, Wei YH. Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Mutat Res.* 2004; 547:71-8.
 15. Wu CW, Yin PH, Hung WY, Li AF, Li SH, Chi CW, et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005; 44:19-28.
 16. Yamada S, Nomoto S, Fujii T, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, et al. Correlation between copy number of mitochondrial DNA and clinico-pathologic parameters of hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2006; 32:303-7.
 17. Yu M, Zhou Y, Shi Y, Ning L, Yang Y, Wei X, et al. Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in Chinese breast cancer patients. *IUBMB Life.* 2007; 59:450-7.
 18. Xing J, Chen M, Wood CG, Lin J, Spitz MR, Ma J, et al. Mitochondrial DNA content: its genetic heritability and association with renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100:1104-12.
 19. Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Nomoto S, Cohen D, Xiao Y, Esteller M, et al. Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors. *Cancer Res.* 2001; 61:7015-9.
 20. Jeng JY, Yeh TS, Lee JW, Lin SH, Fong TH, Hsieh RH. Maintenance of mitochondrial DNA copy number and expression are essential for preservation of mitochondrial function and cell growth. *J Cell Biochem.* 2008; 103:347-57.
 21. Mitomap. A human mitochondrial genome database [Internet]. Available from: <http://www.mitomap.org/>.
 22. Bodenteich A, Mitchell LG, Polymeropoulos MH, Merrill CR. Dinucleotide repeat in the human mitochondrial D-loop. *Hum Mol Genet.* 1992; 1:140.
 23. Lee HC, Yin PH, Lin JC, Wu CC, Chen CY, Wu CW, et al. Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. *Ann NY Acad Sci.* 2005; 1042:109-22.
 24. Schwartz S Jr, Alazzouzi H, Perucho M. Mutational dynamic in human tumors confirms the neutral intrinsic instability of the mitochondrial D-loop polycytidine repeat. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006; 45:770-80.
 25. Kose K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Chayama K. Somatic mutations of mitochondrial DNA in digestive tract cancers. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 20:1679-84.
 26. Chang SC, Lin PC, Yang SH, Wang HS, Liang WY, Lin JK. Mitochondrial D-loop mutation is a common event in colorectal cancers with p53 mutations. *Int J Colorectal Dis.* 2009; 24:623-8.
 27. Szibor R, Michael M, Spitsyn VA, Plate I, Ginter EK, Krause D. Mitochondrial D-loop 3' (CA)_n repeat polymorphism: optimization of analysis and population data. *Electrophoresis.* 1997; 18:2857-60.
 28. Hoppeler H, Vogt M, Weibel ER, Fluck M. Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Exp Physiol.* 2003; 88:109-19.
 29. Weitzel JM, Iwen KA, Seitz HJ. Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp Physiol.* 2003; 88:121-8.
 30. Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, et al. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102:5618-23.
 31. Shen JI, Platek M, Mahasneh A, Ambrosone CB, Zhao H. Mitochondrial copy number and risk of breast cancer: a pilot study. *Mitochondrion.* 2010; 10:62-8.
 32. Hosgood HD 3rd¹, Liu CS, Rothman N, Weinstein SJ, Bonner MR, Shen M, et al. Mitochondrial DNA copy number and lung cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis.* 2010; 31:847-9.

Association between Mitochondrial D-loop Polymorphism and Copy Number

Jae-Ho Lee¹, Dae-Kwang Kim²

¹*Department of Anatomy, School of Medicine, Keimyung University*

²*Department of Medical Genetics, School of Medicine, Keimyung University*

Abstract : Mitochondria in cancer have genetic instability like genetic mutations or polymorphisms, and D-loop is hot spot region and is suggested its association with cancer prognosis. Genetic variations of D-loop were associated with mitochondrial copy number. In present study, mitochondrial polymorphism in D-loop (D310 and D514) was studied in 108 DNAs from health individuals and its association with mitochondrial copy number was also investigated. In D310 polymorphism, C7 was most common (37.7%, 40/108), and C8 and C9 was found in 32.1% and 30.2%, respectively. In D514 polymorphism, (CA)5 and (CA)4 was shown in 61.4% and 38.6%, respectively. Mitochondrial copy number was increased in 40.7% while it was decreased in 59.3%. There was no association between mitochondrial polymorphism and copy number. Follow-up study should be needed to confirm its change in same individuals.

Keywords : Mitochondrial polymorphism, Mitochondrial copy number, D-loop