

심혈관계 질환 진단용 DNA 컴퓨팅 시스템 모듈로서의 C-반응 단백질-결합 앵타머 개발

김수동², 류재송³, 김성천³, 장병탁^{1,2}

¹ 서울대학교 컴퓨터공학부, ² 서울대학교 대학원 인지과학 협동과정, ³ 제노프라 (주)

sdkim@bi.snu.ac.kr; ryu137@hanmail.net; kimsc1026@yahoo.co.kr; btzhang@bi.snu.ac.kr

Construction of C-Reactive Protein-Binding Aptamer As A Module of the DNA Computing System for Diagnosing Cardiovascular Diseases

Su Dong Kim², Jae Song Ryu³, Sung-Chun Kim³ and Byoung-Tak Zhang^{1,2}

¹School of Computer Science & Engineering, Seoul National University

²Interdisciplinary Program in Cognitive Science, Seoul National University

³GenoProt Co., Ltd.

요약

급성 심근경색 진단용 DNA 컴퓨팅 시스템 모듈로서, 트로포닌 I (troponin I, TnI), 트로포닌 T (troponin T, TnT), 미오글로빈 (myoglobin), C-반응 단백질 (C-reactive protein, CRP) 과 각각 결합할 수 있는 네 가지 종류의 앵타머를 선정하고, 이의 개발을 시도하여, 그 중 첫 번째로 C-반응 단백질-결합 앵타머를 SELEX 기법을 이용하여 선별해내었다. 또한, 선별된 앵타머 염기서열에 기초하여 각각 10-mer 길이의 FDNA 와 QDNA 를 제작하고, 표적 단백질 (CRP) 과 혼합시켜 형광발현 변화의 추이를 살펴보았다. 앵타머 및 FDNA, QDNA 가 결합할 경우에는 형광감쇄효과가 발생하므로, 형광감쇄효과가 일어나지 않은 경우에 비하여 현저하게 형광측정값이 저조하게 나타나는 현상을 확인할 수 있었다. 향후 연구로, 나머지 세 가지 종류의 앵타머를 SELEX 기법을 이용하여 선별해내고, 기확보된 C-반응 단백질-결합 앵타머 모듈과 함께 논리회로를 구성하는 DNA 컴퓨팅 칩을 제작할 예정이다.

1 서론

의약학이 발전함에 따라 예방책과 치료법이 진보되고 있음에도 불구하고, 심혈관계 질환 (cardiovascular disease, CVD) 은 세계적으로 사망자 또는 장애인 발생의 주요한 원인으로 남아 있으며 [1], 발전도상국에서는 생활양식이 서구화 (westernization) 됨에 따라, 심장 질환의 발병이 증가세를 보이고 있다 [2]. 본 고에서는 여러 가지 심혈관계 질환 중에서, 병원 응급실에서 행할 수 있도록 신속한 진단 방법이 요구되고 있는 급성 심근경색 (acute myocardial infarction, AMI) 에 관하여 중점적으로 논의하기로 한다.

세계보건기구 (World Health Organization, WHO) 의 정의에 따르면, 다음 세 가지 중 두 가지만 충족되어도 급성 심근경색으로 판정한다. 첫째, 현저한 흉통 (chest pain) 이 20 분 이상 지속되는 경우이거나, 둘째, 심전도 (electrocardiogram, ECG) 의 변화가 진단된 경우, 셋째, 심장 표지자 (cardiac marker) 의 양이 치솟았다가 뒤이어 줄어드는 일련의 변화 양상이 나타나는 경우이다 [3]. 세계보건기구 (WHO) 에 따르면, 생화학적 표지자의 일종인 심장 표지자를 활용할 경우, 급성 심근경색에 대하여 조기 진단을 내리는 데 도움을 얻을 수 있다. 생화학적 표지자 (biochemical marker) 는, 낮은 수준 또는 중간 수준의 발병 위험도를 지닌 환자군을 진단하는 데 있어서 특히 초석 역할을 담당해 왔다 [3].

급성 심근경색 진단용 생화학적 표지자로서는 1954 년, AST (aspartate aminotransferase) 가 사용된 것이 효시이다. 1960 년대 후반에는 CK (creatin phosphokinase) 가 AST 를 대체하였고, 1970 년대에 들어서는 LDH (lactate dehydrogenase) 및 그 동질효소들 (isoenzymes) 이 사용되기 시작하였다. 1980 년대 초반에는 보다 특이적인 CK 동질효소인 CK-MB 가 널리 사용되면서, 급성 심근경색 진단물질로서 황금을 (gold standard) 의 지위를 누렸다 [4]. 그리고 최근 몇 년 사이에, 전기영동법을 통해 CK-MB 를 두 가지 isoform 으로 분리해냄으로써, CK-MB, 미오글로빈 (myoglobin) 및 트로포닌 (troponin) 을 검출하기 위한 단일클론 항체 (monoclonal antibody) 를 이용하는 자동화 효소면역측정법 (automated enzyme immunoassay) 이 개발되었다 [5]. 지방산-결합 단백질, 글리코겐 인산화효소, 세포질 산화효소, C-반응 단백질 (C-reactive protein, CRP) 및 인터루킨-6 (interleukin-6) 등은 트로포닌 I (troponin I) 과 달리, 아직 FDA (Food and Drug Administration) 승인을 받지 못하였으며 [4], 그 중 일부에 대해서는 응용이 연구되고 있는 중이다.

어떤 염증 또는 울혈 표지자 (inflammatory or hemostatic markers) 는 실제로 심혈관계 위험인자 (cardiovascular risk factor) 로서 작용한다. 이러한 맥락에서 C-반응 단백질은 주목 받을 만한 가치가 충분하지만, 생리학적 역할이 아직 명확히 밝혀지지 않은 상태이다. *In vitro* 에서, C-반응 단백질은 항염

증 효과 및 염증 효과를 모두 나타낸다. 이때 염증 효과는 기질에 결합된 C-반응 단백질이 보체 (complement) 체제를 활성화시키는 능력을 포함한다. 따라서 C-반응 단백질은 심혈관계 위험인자로 간주하는 편이 타당해 보인다 [6].

2003 년, 인간의 심장 근육에 존재하는 과량의 Ca^{2+} 이온과 결합하고 있는 트로포닌 (troponin) 핵심 부위의 고해상도 결정 구조가 규명되었다 [7]. 트로포닌은 Ca^{2+} 이온 결합단위체인 TnC, 억제단위체인 TnI 및 트로포미오신 (tropomyosin) 결합단위체인 TnT 등 3 가지 단위체로 구성되어 있으며, 트로포미오신과 함께 액틴 (actin) 의 중심인 가는 필라멘트 (thin filament) 에 존재한다 [7]. 트로포닌 수치가 상승하면 심장발작 위험은 증가한다. TnI 와 TnT 의 수치 증가에 따른 환자의 상대적 위험도는 각각 3.2, 1.7 이다 [2].

트로포닌 (troponin) 은 특이성 (specificity) 이 매우 높지만 조기 표지자 (early marker) 가 아니므로, 현재까지 가장 최선의 조기 표지자로 널리 쓰이는 미오글로빈 (myoglobin) 과 함께 조합하여, 급성 심근경색 진단에 이용한다 [8]. C-반응 단백질 (CRP) 은 기타 임상 표지자 및 생화학적 표지자와는 독립적으로 쓰일 수 있는, 위험 인자이다 [2].

이상의 내용에 기초하여 저자들은 급성 심근경색 진단용 DNA 컴퓨팅 시스템 모듈로서, 트로포닌 I (troponin I, TnI), 트로포닌 T (troponin T, TnT), 미오글로빈 (myoglobin), C-반응 단백질 (C-reactive protein, CRP) 과 각각 결합할 수 있는 네 가지 종류의 앵타머를 선정하고, 이의 개발을 모색하였다. (각 모듈의 동작원리는 기본적으로 동일하며, 앵타머를 이용한 DNA 컴퓨팅 동작원리에 관한 내용은 저자의 2003 년 줄고 [9] 를 참조.)

2 실험 재료 및 실험 방법

2.1 단백질 발현 재조합 벡터의 제조 및 단백질 발현/정제

단일유전자클론 Hs54668 (pBlueScript-TnI), MGC3889 (pOTB7-TnT), 6712372 (pDNR-LIB-myo), KU012980 (pCNS-D2-CRP) 로부터 플라스미드 DNA 를 정제하여 각각의 단백질을 발현하는 삽입 DNA 를 제한효소로 절단, pET28 계열의 플라스미드 DNA 로 옮겨 재조합 벡터를 제조하였다 [그림 1]. 각각의 단백질 발현 재조합 벡터로부터 단백질을 발현시켜 HPLC 기법으로 정제하였다.

2.2 C-반응 단백질 (CRP)-결합 앵타머 선별

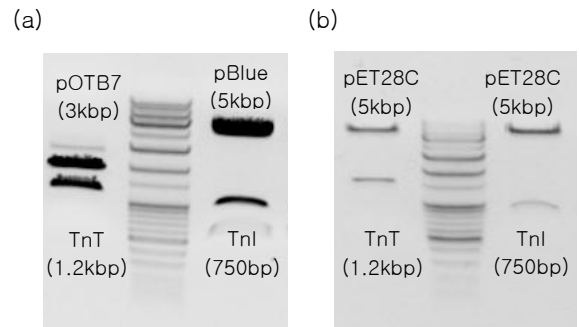
SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 기법을 이용하여 C-반응 단백질-결합 앵타머를 선별하였다 [10]. PCR 을 위한 무작위 서열의 길이는 43-mer 를 택하였으며, *in vitro* RNA 합성에는 DuraScribe T7 Transcription Kit 을 사용하였다. 결합 완충용액 (조성: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM $NaCl_2$, 0.1 % NaN_3) 에 표적 단백질 (CRP), RNA 를 30 분간 혼합한 뒤, 선별된 RNA 로부터 RT-PCR (95°C, 5 분 → [95°C, 1 분 → 55°C, 1 분 → 75°C, 1 분 →: 20 회 반복] → 72°C, 8 분) 을 통해 DNA 를 합성하였다. *in vitro* RNA 합성부터 RT-PCR 까지의 과정을 10 회씩 반복하였으며, 최종 선별된 DNA 조각을 pGEM-T-easy vector 에 클로닝하여, 서열을 확인하였다.

2.3 CRP, 앵타머, FDNA, QDNA 형광 측정

선별된 앵타머 (80 nM) 와 FDNA (5'-Cy3-CACCGACCAC-3': 40 nM), QDNA (5'-CACACTCGCC-Dabcyl-3': 120 nM) 를 결합 완충용액 (1 ml) 에 넣고 90 °C 에서 5 분 보관한 뒤, 실온에서 30 분간 두어 앵타머, FDNA, QDNA 결합체가 생성되도록 한다. 이때 형광을 측정한다. 표적 단백질 (CRP: 200 ng) 을 추가하고, 37 °C 에서 30 분간 잘 섞이도록 한다. 이후 형광을 측정하여 형광의 변화량을 확인하였다 [그림 3].

3 실험 결과

3.1 단백질 발현 재조합 벡터의 제조 및 단백질 발현/정제

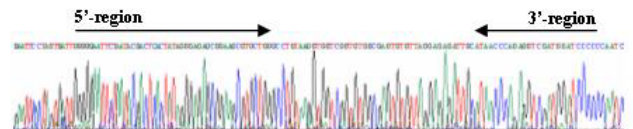


[그림 1] 트로포닌 (TnI, TnT) 발현 재조합 벡터의 제조

(a) pBlueScript-TnI (*EcoRI*, *XhoI* 절단) 및 pOTB7-TnT (*BamHI*, *HindIII* 절단) 전기영동 결과

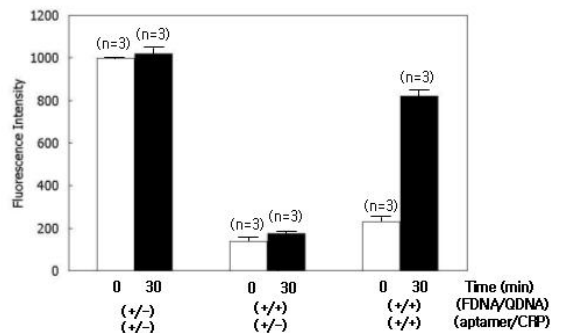
(b) pET28C-TnI (*EcoRI*, *XhoI* 절단) 및 pET28C-TnT (*BamHI*, *HindIII* 절단) 전기영동 결과

3.2 C-반응 단백질-결합 앵타머 선별



[그림 2] C-반응 단백질(CRP)-결합 앵타머 선별

3.3 CRP, 앵타머, FDNA, QDNA 형광 측정



[그림 3] CRP, 앵타머, FDNA, QDNA 형광 측정결과

4 결론 및 고찰

저자들은 급성 심근경색 진단용 DNA 컴퓨팅 시스템 모듈로서, 트로포닌 I (troponin I, TnI), 트로포닌 T (troponin T, TnT), 미오글로빈 (myoglobin), C-반응 단백질 (C-reactive protein, CRP) 과 각각 결합할 수 있는 네 가지 종류의 앵타머를 선정하고, 이의 개발을 시도하여, 그 중 첫 번째로 C-반응 단백질-결합 앵타머 (5'-CCAGTGGTGGTAGAGTGCGGTGATAATGGGATGATGCGTTTCC-3') 를 SELEX 기법을 이용하여 선별해내었다. 또한, 선별된 앵타머 염기서열에 기초하여 각각 10-mer 길이의 FDNA 와 QDNA 를 제작하고, 표적 단백질 (CRP) 과 혼합시켜 형광발현 변화의 추이를 살펴보았다. 앵타머 및 FDNA, QDNA 가 결합할 경우에는 형광감쇄효과가 발생하므로, 형광감쇄효과가 일어나지 않은 경우에 비하여 현저하게 형광측정값이 저조하게 나타나는 현상을 확인할 수 있었다.

향후 연구로, 나머지 세 가지 종류의 앵타머를 SELEX 기법을 이용하여 선별해내고, 기확보된 C-반응 단백질-결합 앵타머 모듈과 함께 논리회로를 구성하는 DNA 컴퓨팅 칩을 제작하여, 급성 심근경색 발병 가능성을 짧은 시간 내에 간편하게 진단해내는 제품을 개발할 예정이다.

감사의 글

본 연구는 NRL, BrainTech, MEC 과제에 의해 지원되었음. 이 연구를 위해 연구장비를 지원하고 공간을 제공한 서울대학교 컴퓨터연구소에 감사드립니다.

참고문헌

- [1] AstraZeneca (2000), Vascular biology: a route to novel cardiovascular drugs, *Nature*, 407, 270.
- [2] M. Plebani (2001), Biochemical markers of cardiac damage: from efficiency to effectiveness, *Clin. Chim. Acta*, 31, 3-7.
- [3] W. W. Chu *et al.* (2002), A review of clinically relevant cardiac biochemical markers, *WJM*, 101(3), 40-48.
- [4] D. W. Mercer (1996), A historical background in cardiac markers, *Medical Laboratory Observer*, July, 45-51.
- [5] J. E. Adams *et al.* (1993), Biochemical markers of myocardial injury: Is MB creatine kinase the choice for the 1990s?, *Circulation*, 88, 750-763.
- [6] W. K. Lagrand *et al.* (1999), C-reactive protein as a cardiovascular risk factor more than an epiphenomenon?, *Circulation*, 100, 96-102.
- [7] S. Takeda *et al.* (2003), Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca²⁺-saturated form, *Nature*, 424, 35-41.
- [8] M. Zaninotto *et al.* (1999), Strategies for the early diagnosis of acute myocardial infarction using biochemical markers, *Am. J. Clin. Pathol.* 111, 399-405.

- [9] 김수동, 장병탁 (2003), DNA 컴퓨팅에서의 앵타머 구조 변환 활용 방안, *제 30 회 한국정보과학회 가을 학술발표논문집(II)*, 30(2), 838-840.
- [10] C. Tuerk *et al.* (1992), RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 89(15), 6988-6992.