

P-17 Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor에 의한 생쥐 초기배아 발생 조절 신호전달

계명찬·서혜영

한양대학교 생명과학과

Background & Objectives: Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)는 원래 골수조혈 세포의 분열과 분화에 관여하는 활성화된 T-lymphocytes의 생산물로 알려진 사이토카인이다. 다양한 포유동물의 female reproductive tract에 위치하는 epithelial cells은 oestrogen에 의해 자극에 의해 GM-CSF를 분비하며 초기배아는 GM-CSF 수용체를 발현한다. 선행연구들에서 GM-CSF가 배아의 초기발달 촉진 효과가 있는 것으로 보고되었지만 그 효과발현을 위한 신호전달 기작은 규명되지 않았다. 본 연구에서는 GM-CSF에 의한 초기배아의 형태발생, 세포증식, apoptosis 조절효과를 조사하고, 그 기작으로 mitogen activated protein kinase (MAPK, Erk1/2), ribosomal S6 kinase (S6K)의 활성변화를 추적하고 MAPK, PI3 kinase, mTOR의 억제제 (PD98059, wortmannin, rapamycin)의 효과를 검색하였다.

Method: 생쥐 초기배아에 GM-CSF를 농도별로 처리하여 형태발생을 비교하였다. 포배의 할구수를 핵염색을 통해 계수하여 세포증식을 조사하였다. 포배를 TUNEL법으로 염색하여 apoptosis 조절효과를 분석하였다. 신호전달 기작은 mitogen activated protein kinase (MAPK, Erk1/2)항체를 이용하여 배아의 MAPK를 면역침강하고 myelin basic protein을 기질로 in vitro phosphorylation을 측정하였다. Ribosomal S6 kinase (S6K)의 활성변화는 배아의 whole lysate를 S6 peptide in vitro phosphorylation 활성을 측정하였다. 모든 실험에 MAPK, PI3 kinase, mTOR의 억제제 (PD98059, wortmannin, rapamycin)의 효과를 검색하였다.

Results: 실험결과, GM-CSF 단독처리군은 대조군, 저해제와 GM-CSF 공동처리군, 저해제처리군에 비해 발생률 (10~15%)과 부화율 (14~28%)의 유의한 향상을 보였으며, 퇴화율은 저해제처리군이 다른 군에 비해 15~30% 높아 선행연구들과 일치하였다. 포배 내 TUNEL-positive apoptotic nuclei의 비율은 저해제 처리군이 대조군, GM-CSF 단독처리군 및 저해제와 GM-CSF 공동처리군에 비해 유의하게 높았다. 포배 내 세포 수에 있어서도 GM-CSF 단독처리군은 다른 군에 비해 유의하게 많았다. GM-CSF는 포배에서 MAPK 활성화와 S6K 활성을 유의하게 증가시켰으며 이 효과는 PI3K 억제제인 wortmannin 및 MAPK 억제제인 PD98059에 의해 상쇄되었다. Rapamycin 처리시 S6K 활성이 억제되었다.

Conclusions: 생쥐 초기배아에서 GM-CSF에 의한 발생촉진, apoptosis 억제 효과 기작에는 PI3 kinase, MAPK, mTOR를 경유한 신호전달 과정이 관여하며 다른 종류의 세포주에서 관찰되는 신호전달 과정이 보존되어 있는 것으로 사료된다.

P-18 생쥐 정소 및 정자에서 C-terminal Src Kinase (Csk) 발현

계명찬·강현희¹·김영수²

한양대학교 생명과학과¹, 아주대학교 비뇨기과²

Background & Objectives: Protein tyrosine kinases는 표적단백질의 tyrosine 잔기를 인산화하는 효소

로서 다양한 종류의 성장인자, peptide 호르몬, cytokine 수용체 하위의 세포 내 신호전달에 관여한다. Non-receptor tyrosine kinase의 일종인 c-Src는 세포막에서 발생한 ligand-receptor 상호작용 하위의 신호 전달에서 중요한 역할을 하며 C-terminal Src kinase (Csk)는 Src의 C-terminal tyrosine 잔기를 인산화시켜 kinase 활성을 저해한다. 이러한 Src-Csk loop를 통한 세포 내 신호전달과정은 세포의 증식과 분화, 사멸 조절에 중요한 기능을 갖는다. 본 연구는 정소의 발생과 분화 과정 및 정자에서 Src-Csk loop의 발현 및 기능을 규명하기 위해 생쥐 정소에서 출생 후 성적 성숙과정에서 Csk의 발현과 Src kinase 활성의 변동을 조사하였으며, 정자 내 CSK의 발현 및 침체반응 전후로 CSK의 변동을 조사하였다.

Method: 생 후 1, 2, 4, 8주령의 생쥐 정소에서 Csk mRNA 발현은 RT-PCR법으로 조사하였다. Csk 항체를 이용하여 Western blot으로 단백질 발현을 조사하였다. c-Src 항체를 이용하여 정소 균질액을 면역침강한 후 Src peptide의 in vitro phosphorylation을 측정하여 Src kinase 활성을 조사하였다. 면역조직화학을 이용하여 성체 세정관 조직의 Csk 발현양상을 세정관 상피주기에 따라 구분하였다. 미성숙 정소로부터 Sertoli cell을 분리하여 primary culture를 시도하여 testosterone을 처리한 후 Csk mRNA의 발현을 RT-PCR법으로 추적하였다. 한편 부정소에서 채취한 정자를 제외배양하면서 Calcium ionophore인 A23197을 처리하여 침체반응을 유도한 후 정자에서 CSK 항원의 발현량 및 발현부위의 변화 조사하였다.

Results: Csk mRNA 발현은 생 후 2주령 이하의 미성숙 정소에서 다량으로 발현되었고 사춘기 정소 이후에는 오히려 감소하였다. Csk 단백질의 발현 양상은 mRNA 발현양상과 일치하였다. c-Src kinase 활성은 생 후 2주에 급격히 증가하고 이 후 4주령에서 감소하다가 성체 (8주령)에서 다시 증가하여 가장 높았다. 성체 조직의 Csk 단백질 현존량이 미성숙 개체보다 적은 반면 Src kinase 활성은 가장 높아 Csk 발현의 감소는 Src kinase 활성을 증가시키는 것으로 사료된다. 면역조직화학방법으로 정소 조직 내 Csk의 발현양상을 조사한 결과 Leydig cell, Sertoli cell, germ cell 등 도처에서 발현되었으며 Sertoli cell에서의 발현은 세정관 상피의 구성에 따른 차이가 확인되었다. 성체의 세정관 내에서는 감수 분열 이후의 정세포 (spermatid)를 감싸고 있는 Sertoli cell의 강소 측에서 강한 Csk 활성이 검출되어 생식세포의 분화과정 동안 세정관 상피의 조직재구성에 관여하는 것으로 사료된다. Leydig cell에서의 발현은 생후 1주령까지는 미미하였으나 이후 2주령 이후에는 다량으로 발현되므로 adult type Leydig cell에서 진행되는 steroidogenesis와의 관련성을 추측할 수 있다. 미성숙 정소로부터 분리한 Sertoli cell-enriched culture에 200 nM testosterone을 처리하였을 때 Csk mRNA의 발현의 증가되므로 androgen에 의한 Sertoli cell의 분화과정에 Csk가 관여하고 있음을 추측할 수 있다. 정자의 두부 침체부위에서 다량 존재하였고 미부에도 많은 양이 검출되었다. Calcium ionophore인 A23197을 처리하여 침체반응을 유도한 정자에서 CSK 항원의 감소를 확인하였다.

Conclusions: 결론적으로 성적 성숙에 따른 정소 내 CSK 발현의 변화는 간충조직과 세정관 상피의 증식 및 기능적 분화과정을 매개하는 생리적 활성분자 수용체 하위의 신호전달 과정에 관여하며, 정자의 수정능력획득과 침체반응 과정에 Src-Csk loop에 의한 조절기작이 관여하는 것으로 사료된다.