

마우스 수정란의 초기 배 발생단계별 Telomeric DNA의 양적 분석과 Telomerase 활성도 분석

강민영 · 한명숙 · 이상찬¹ · 김종홍¹ · 손시환[†]

진주산업대학교 동물생명과학과 · 동물생명산업연구센터

초 록

텔로미어란 염색체 말단부에 (TTAGGG)_n의 반복 염기서열이 단백질과 결합된 형태를 말하는데 이의 역할은 염색체의 안정성에 본질적으로 작용하여 세포의 노화, 사멸 및 암의 발생과 관련이 있다고 알려져 있다. 반면 텔로머레이스는 telomeric DNA 합성에 직접 관여하는 ribonucleoprotein이다.

본 연구에서는 마우스 염색체의 텔로미어 분포 양상을 제시하고, 초기 배 발생단계별 수정란의 텔로미어 함량과 이들 수정란의 텔로머레이스 활성도를 분석하고자 하였다. 본 분석에는 마우스의 섬유아세포, 생식세포, 정자, 난자 및 1세포기, 2세포기, 4세포기, 8세포기, 상실배와 배반포배의 각 단계별 수정란을 대상으로 하였다. 텔로미어의 양적 분석은 human telomeric DNA probe를 이용한 Q-FISH 방법을 이용하였고, 텔로머레이스 활성도는 TRAP 방법을 이용하였다. 분석 결과 마우스 염색체의 텔로미어는 성 염색체를 포함한 모든 염색체의 양 말단부에 분포되어 있고, 염색체별 다소의 양적 차이를 보이거나 대부분의 염색체에서 q-arm 말단이 p-arm 말단에 비해 높은 텔로미어의 함량을 나타내었다. Q-FISH를 이용한 마우스 초기 배 발생단계별 수정란의 텔로미어의 양적 분석에서 수정 직후 1세포기에서부터 상실배까지 거의 비슷한 텔로미어 함유율을 나타내고 있으나 배반포기에서 월등히 증가된 양상을 나타내었다. TRAP 분석을 이용한 초기배아의 텔로머레이스 활성도는 초기 배 발생 모든 단계에서 이의 활성도를 나타내었으며, 특히 상실배 및 배반포기에서 점진적으로 강한 활성을 보였다. 이상의 분석 결과로부터 마우스의 초기 배 분열단계의 각 세포들에 있어 텔로미어의 함유율과 텔로머레이스 활성도는 높은 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 따라서 포유동물의 초기 배자에 있어 텔로미어의 함유율과 텔로머레이스 활성도는 배 발생 및 배자의 세포 분화와 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 사료되어 텔로미어의 양적 분석 및 텔로머레이스 활성도 분석은 발생학적 연구를 위한 또 다른 좋은 자료로 생각된다.

(주제어 : Mouse embryo, Telomere, Telomerase activity, FISH, TRAP)

서 론

텔로미어(telomere)는 진핵생물의 염색체 말단부에 TT-AGGG의 반복 염기서열이 특정 단백질과 결합한 형태로써, 염색체 보전에 본질적으로 작용하고 세포내 유전자의 안정성 유지에 주된 역할을 한다(Blackburn, 1991; Greider, 1991; Pathak 등, 2002). 반면, 텔로머레이스(telomerase)는 ribonucleoprotein으로 RNA와 역전사 효소 활성인자들로 구성되어 있으며, 텔로미어의 길이를 유지하는 직접적 효소이다(Greider, 1993; Lingner와 Cech, 1998; Liu, 1999).

진핵 생물들에 있어 텔로미어의 소실은 DNA 복제시 lagging strand의 불연속적 복제에 따른 불가피한 결과로서 일반적으로 정상 세포의 경우 1세포 주기당 telomeric DNA는 50~200 bp 정도 소실되고, 일정길이 이하에 이르

면 분열 중단으로 인한 자연사적 세포의 사망(apoptosis)이 유기된다(Greider 등, 1985; Harley, 1991; Gan 등, 2001). 따라서 최근 세포의 노화 및 암과 관련하여 텔로미어의 길이와 텔로머레이스 활성도에 관한 연구들이 사람과 설치류에서 광범위하게 진행되고 있다(Kim 등, 1994; Holts 등, 1996; Shay와 Bacchetti, 1997; Buys, 2000; Chang, 2004). 사람에 있어서 텔로머레이스의 활성작용은 태아조직에서는 왕성하나 출생 이후 체세포들에서는 거의 작용을 하지 않는 것으로 나타난다. 그러나 생식세포나 줄기세포(stem cell)와 같이 끊임없이 새로이 분열되는 세포나 무한정한 분열을 지속하는 암 세포의 경우 이의 발현이 지속적으로 나타난다(Robinson, 2000; Cottliar와 Slavutsky, 2001; Artandi 등, 2002). 특히, 소의 생식세포 및 수정란에 대한 텔로머레이스 활성의 연구에서는 정소와 난소 등 생식세포와 수정 직후 배자상태에서 이의 함량이 상대적으로 높다가 초기 배 상태에서 다소 낮아지고 이후 포배기 때 다시

* 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업의 지원에 의해 수행된 것임.

¹ 세화병원 (SaeWha Hospital)

[†] Corresponding author : S. H. Sohn, Dept. of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea. TEL: +82-55-751-3264, E-mail:shsohn@jinju.ac.kr

증가되는 양상을 보고함으로써 발생과정 중의 텔로머레이스의 변화 양상을 제시하였다(Betts와 King, 1999; Xu와 Yang, 2000).

한편, 사람의 텔로미어는 대체적으로 15~25 kb 정도로 분석된 반면, 마우스의 경우는 이보다 훨씬 긴 100 kb 이상으로 보고되고 있다(Kipling와 Cooke, 1990; Starling 등, 1990; Zijlmans 등, 1997; Weng과 Hodes, 2000). 뿐만 아니라 정상적 인체내 대부분의 기관에서는 연령이 증가함에 따라 텔로미어와 텔로머레이스의 유의적 감소(down regulation) 양상을 보이지만 설치류는 사람과 달리 출생 후에도 텔로머레이스 활성도는 지속되나 텔로미어의 감소를 나타내어 이들의 관계가 독립적인 또 다른 생물학적 기작을 제시하고 있다(Kipling, 1997; Dolci 등, 2002; Blasco, 2003). 따라서 마우스는 텔로미어 및 텔로머레이스 생물학 연구에 또 다른 모델로서 이의 역할과 작용에 대한 새로운 정보들을 제공하고 있다(Cheong 등, 2003). 최근 텔로머레이스 결핍 마우스를 이용한 텔로미어의 기능과 역할에 대한 연구에서 이의 결핍시 증식성 기관이나 조직의 점진적 결함을 나타내고 또한 수정율의 감소를 초래하여 궁극적으로 불임을 유발하게 된다. 또한 수정된 수정란의 경우에서도 비정상적 분열과 발생을 초래하여 생식세포에 있어 텔로미어의 역할과 기능의 중요성을 시사한 바 있다(Liu 등, 2002). 그러므로 마우스의 초기 배자에 있어 텔로미어 분포 양상과 텔로머레이스 활성도의 분석은 이들의 배 발생 기작과 배자의 세포적 특성을 구명하는데 매우 중요한 과제라 사료된다.

따라서 본 연구에서는 우선 마우스 염색체의 텔로미어 분포 양상을 제시하고, 양적 형광접합보인법(quantitative fluorescence *in situ* hybridization; Q-FISH)을 이용하여 이들의 생식세포 및 초기 배 발생 단계별 수정란의 telomeric DNA 함유량을 분석하며, telomeric repeat amplification protocol(TRAP) 방법으로서 발생 단계별 배자들의 텔로머레이스 활성도를 구명하고자 한다.

재료 및 방법

공시동물 및 수정란 회수

본 연구에 이용된 공시동물은 진주산업대학교 실험동물 사육장에서 사육중인 ICR 계통의 마우스로써 암컷은 생후 4~6주령, 수컷은 9~15주령 개체들을 이용하였다. 마우스는 온도와 명암이 조절되는 곳에서 실험에 사용될 때까지 사육하였으며, 명암의 주기는 14시간:10시간으로 조절하였고, 사료와 물을 무제한으로 급여하였다. 과배란을 유도하기 위하여 암컷 마우스에 5IU의 PMSG(Folligon®, Intervet, Netherland)와 hCG(Chorulon®, Intervet, Netherland)를 48시간 간격으로 복강 주사한 후 수컷과 동숙시켰다. 다음날 질전이 확인된 것을 수정이 되었다고 판단하여 경추 탈구법으로 도살한 다음, 1-세포기, 2-세포기, 4-세포기 및 8-세포기는 수정 후 각 1, 2, 3일째 난관 관류에 의해 수정란을 회수하였으며, 상실배(morula)와 배반포(blastocyst)는 수정 후 4일째 자궁관류에 의해 수정란을 회수하였다.

수정란 표본 제작

수정란을 이용한 표본제작 과정은 손 등(1996) 및 Han 등(2004)이 제시한 방법을 기본으로 다음과 같이 실시하였다. 각 발생 단계별로 채취한 수정란은 D-PBS(Gibco, Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA)에서 한 번 세척하고, 0.9% sodium citrate에서 1분간 저장처리를 하였다. 이후 0.05% tween 20(Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA)이 함유된 0.01N HCl에서 투명대가 완전히 녹아 내릴 때까지 약 20초~1분간 처리 후 수정란을 슬라이드 중앙으로 옮겼다. 현미경 하에서 수정란을 관찰하며 methanol 3: acetic acid 1로 조성된 고정액으로 활구를 분리시켰다. 이를 다시 2차 고정처리액으로 20분간 침지한 후 건조시켜 위상차 현미경을 이용하여 세포의 유무를 확인한 후 실험에 공시하였다.

염색체 표본 제작

마우스의 염색체 표본 제작을 위하여 섬유아세포(fibroblast) 배양을 실시하였다. 섬유아세포는 신장조직으로부터 분리하고 세절된 세포 조직들을 Medium-199을 기본 배양액으로 하여 10% FBS, 1% Penicillin-streptomycin(10,000 U/ml~10,000 µg/ml)(이상 Gibco, Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA)이 첨가된 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하였다. 세포들이 배양 용기의 바닥면 전체에 monolayer를 형성하게 되면 0.25% trypsin-EDTA(Gibco, Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA)를 이용하여 세포들을 분리하고 일정량을 분주하여 3회 계대배양하였다. 증기상 유도를 위하여 배양 종료 1시간 전에 colcemid 0.2 µg/ml(Gibco, Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA)를 주입하고 배양 종료 후 scraper를 이용하여 세포만을 회수하였다. 분리된 세포에 0.4% sodium citrate 용액과 0.4% KCl(이상 Sigma Chem., St. Louis, MO, USA)용액을 1:1로 희석한 저장액으로 6분간 저장처리 하였다. 고정처리는 acetic acid와 methanol(1:3, v/v)로서 3회 반복처리하고, 고정된 세포액 3~4방울을 슬라이드에 떨어뜨려 표본 제작하였다.

FISH 분석

형광접합보인법(Fluorescence *in situ* Hybridization; FISH)은 Kobayashi 등(1998)이 수행한 방법을 다소 변형하여 시행하였다. 준비된 슬라이드 표본을 50µl RNase A (100mg/ml)가 함유된 2×SSC 용액에 넣고 37°C의 항온 수조에서 30분간 처리하여 RNA를 제거한 후 초자수로 세척하고 80%, 90%, 100% 에탄올로 탈수시켜 상온에서 건조시켰다. 이 후 본 실험실에서 제작한 Dig-labelled human telomeric DNA probe를 이용하여 hybridization 용액(13µl formamide, 5 µl 4×hybridization solution 및 telomeric DNA probe 2 µl(400 ng/µl), 이상 Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA)을 만든 후 슬라이드에 떨어뜨리고 coverslip으로 덮은 후 고무풀로 밀봉하였다. 이를 85°C에서 5분간 처리하여 프로브(probe)와 표본을 변성시키고, 다시 38.5°C에서 1시간 동안 접합시킨 후 2×SSC 및 PN buffer(0.1% sodium phosphate, 0.1% Nonidet P40)로서 세척하였다. 접합 탐지를 위하여 슬라이드에 20 µl의 anti-digoxigenin-fluorescein(Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA)을 떨어뜨리고 coverslip을 덮은 후 38.5°C에서 10분간 배양하였다. 배경 염색으로는 propidium io-

dide solution을 이용하였으며, 형광접합 발현양상은 523nm 파장대의 필터를 부착한 형광현미경(Olympus AX-70, Tokyo, Japan)으로 검경하고, 분석 표본당 최소 50여개의 상을 디지털 이미지로 획득하였다(Olympus DP-70 digital camera, Tokyo, Japan). 저장된 각각의 상은 화상분석프로그램(MetaMorph Imaging System, Universal Imaging Co, PA, USA)을 이용하여 텔로미어의 양을 정량 분석하였다.

TRAP 분석

텔로머레이스 활성도 분석은 Kim과 Wu(1997)가 제시한 telomeric repeat amplification protocol(TRAP) 방법으로 상업용 telomerase detection kit(TRAP^{EZE}, Intergen Co., Purchase, NY, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 다음과 같이 실시하였다. 분석할 조직들은 3-cholamidopropyl dimethylammonio-1-propane-sulfonate(CHAPS) lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리하고, 30분 동안 얼음 위에 정치시켰다. 이후 4°C에서 12,000×g로 20분간 원심분리하고 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 단백질 정량을 시행하였고, 정량된 추출물은 급속 냉동시킨 후 -70°C에 보관하였다. Polymerase chain reaction(PCR)을 위해 10×TRAP reaction buffer 5 μ l, 50×dNTP mix 1 μ l, TS primer 1 μ l, TRAP primer mix 1 μ l, Taq polymerase(2.5units/ μ l) 1 μ l를 섞은 PCR 혼합물을 준비하고 각 튜브에 혼합물을 9 μ l씩 분주하여 여기에 초자수 40.5 μ l와 세포 및 조직 추출물 0.5 μ l(1mg/ μ l)를 섞어 총량이 50 μ l이 되게 하였다. PCR은 30°C에서 30분간 TS-telomerase product를 확장시킨 다음 94°C 30초, 59°C 30초, 72°C에서 30초간 3단계로 35 사이클을 시행하였다. 증폭된 텔로머레이스는 15% polyacrylamide 겔 전기영동을 통해 75V에 이어 100V에서 2시간 동안 실시하고 ethidium bromide로 염색한 후 결과를 관찰하였다.

결과 및 고찰

마우스 염색체의 텔로미어 분포양상

마우스 염색체의 텔로미어 분포양상을 제시하기 위하여 마우스의 섬유아세포로부터 중기상 염색체를 획득하고 이에 telomeric DNA probe를 이용한 FISH를 수행하였다. Fig. 1에 제시한 바와 같이 마우스는 상 염색체와 성 염색체의 양 말단부 모든 염색체에 공히 텔로미어가 분포되어 있음을 알 수 있고, 염색체의 양 말단부에 분포된 텔로미어의 함량은 염색체별 다소 차이를 보였으며, 일부 염색체에 있어서는 상동 염색체간에도 함유량의 변이를 나타내었다. Y 염색체를 제외한 거의 대부분의 염색체에서 p-arm 말단보다 q-arm 말단에서 텔로미어 함유량의 분포가 높게 나타나고 있는데, 특히 8번, 12번, 13번과 15번에서 이의 함유량이 상대적으로 많음을 보였다.

마우스 염색체의 텔로미어 분포 양상에 대한 연구로서는 Zijlmans 등(1997)이 여러 종의 마우스 염색체를 대상으로 Q-FISH 의한 텔로미어의 길이를 분석 제시하였다. 이들은 BALB/c, C57BL/6, C3H, 129 및 DBA/2 inbred line을 이용하여 골수 및 피부 섬유아세포 배양으로 염색체를 분리하고 개개 염색체의 텔로미어 길이를 분석하였다. Q-

FISH 분석 결과 각 종간 텔로미어 길이의 다형성이 나타났고, 개개 염색체간에도 p-arm 말단부와 q-arm 말단부 간 텔로미어 함유량의 차이를 보였으나, 개체 및 분리 세포와 상관없이 거의 대부분의 염색체에서 q-arm 말단부의 분포량이 많음을 보고하였다. 특히 특정 염색체에서의 텔로미어 길이는 섬유아세포와 골수세포에서 공히 동일한 양상을 보여 동일 개체 내 체세포간에는 텔로미어의 분포량이 유사함을 제시하였다. 본 연구는 신장조직으로부터 섬유아세포를 배양하여 염색체를 분리하고 이들에 대한 Q-FISH를 수행한 것으로 분석 결과 개체간 텔로미어 함유량의 다형성이나 개체내 세포간 유사성 등은 상기 보고와 거의 동일한 결과이다. 그러나 마우스 염색체상 텔로미어의 분포에 있어 interstitial telomeric DNA의 존재는 연구자들 간에 다소의 이견이 있다. 본 분석의 경우 8번 염색체에서 q-arm 말단 인접 부위에 interstitial telomeric DNA가 존재하는 것으로 보여지나 Zijlmans 등(1997)은 이의 존재를 부인하고 있으며, Yen 등(1996, 1997)은 8번 및 13번 염색체에서 이의 존재를 제시하고 있어 마우스에서 interstitial telomeric DNA의 존재는 구명되어야 할 또 다른 연구 과제라 사료된다.

마우스 초기 배 발생단계별 Telomeric DNA 함량

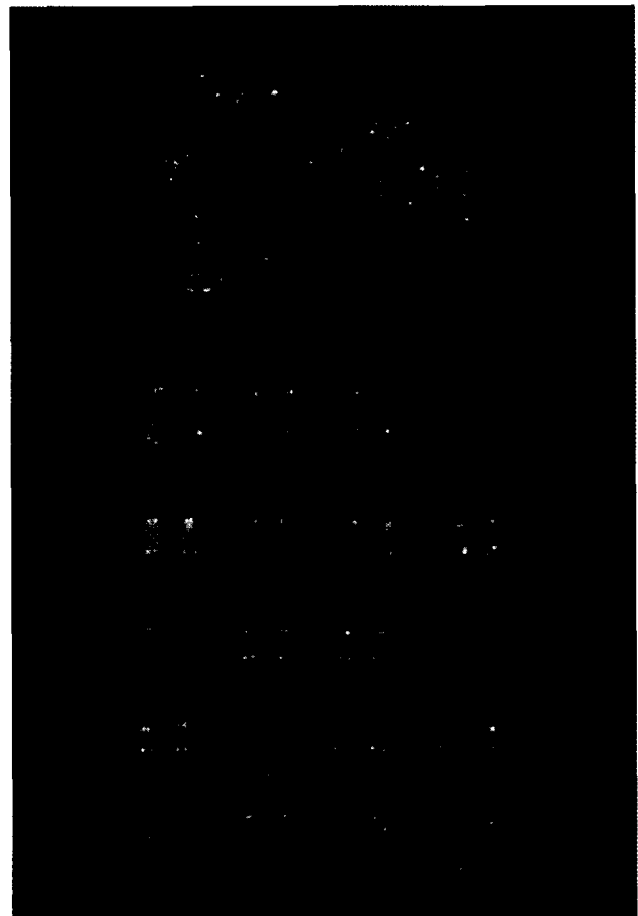


Fig. 1. Metaphase spread and karyotype of mouse chromosomes after FISH using human telomeric DNA probe.

마우스 수정란의 초기 배 발생 단계별 telomeric DNA의 함량분석을 위하여 2-세포기에서부터 배반포기까지 초기 배를 대상으로 각 배자의 핵구를 이용하여 핵 내 텔로미어의 함량을 Q-FISH로서 분석하였다. 이를 위하여 우선 각 단계별 26~78개의 수정란으로부터 핵구를 분리하여 표본 제작을 하고, 이들에 대하여 telomeric DNA probe로서 FISH를 수행한 후 각 발생 단계별 FISH 상을 획득하였다. 획득한 개개의 상은 이미지 분석 프로그램을 이용하여 핵 대비 텔로미어의 분포 비를 분석하고 각 발생 단계별 배자들의 평균값으로 이들의 상대적 함량을 제시하였다. 초기 배 발생단계별 각 세포의 telomeric DNA의 상대적 함량비는 Table 1과 같다. 또한 초기 배자의 각 단계별 핵 내 텔로미어의 분포 양상의 대표적 사진을 Fig. 2에 제시하였다. Table 1에 제시된 바와 같이 마우스의 초기 배자 내 텔로미어의 함량은 핵 대비 1.10~2.36%로 배 발생단계에 있어 상실배까지는 일정한 함유량을 보이다가, 배반포기에서 유의적으로 telomeric DNA의 양적 증가를 나타내었다. 이러한 배반포기에서 telomeric DNA의 양적 증가는 본 연구에서 분석된 텔로머레이스의 활성도와 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났는데 마우스 수정란의 2세포기부터 배반포기까지 초기 배 발생 단계별 모든 단계에서 텔로머레이스의 활성도를 보였으며, 특히 상실배에서부터 보다 높은 활성도를 나타내었다. 따라서 상실배기 이후 배반포기에서 telomeric DNA의 유의적 증가는 텔로머레이스의 높은 활성도에 기인된 것으로 생각되고, 이러한 현상은 본 단계에서 조직의 분화와 관련되어 보다 높은 세포의 활성화가 요구되기 때문이 아닌가 사료된다.

최근 텔로머레이스 결핍 마우스를 이용한 텔로미어의 기능과 역할에 대한 연구에서 이의 결핍시 증식성 기관이나 조직의 점진적 결함을 나타내고 또한 수정율의 감소를 초래하여 궁극적으로 불임을 유발하게 되며 수정된 수정란의 경우에서도 비정상적 분열과 발생을 나타내었다(Herrera 등, 1999; Liu 등, 2002). 따라서 세포 내 텔로미어의 양적 분석은 생명 현상의 표지로서 새롭게 인식되고 있으며 이의 분석 방법으로는 텔로미어 제한단편측정법(telomeric restriction fragment; TRF)과 Q-FISH 방법이 알려져 있다. TRF법은 텔로미어의 제한 단편들을 southern blot 방법으로 분석하여 이의 길이를 측정하는 것으로 blotting하는 동안 DNA의 소실이 발생하고, 마우스와 같이 텔로미어 길이가 극단적으로 길 경우 측정하는데 다소의 무리가 있다(Bryant 등, 1997; Oexle, 1998; Gan 등, 2001). 반면, Q-FISH 방법은 peptide nucleic acid(PNA) telomeres oligonucleotides를 probe로 이용하여 형광 표지(signal)된 양을 디지털 화상분석시스템으로 분석하는 방법이다(Lansdorp 등, 1996; Poon 등, 1999; Law와 Lau, 2001; Ferlicot

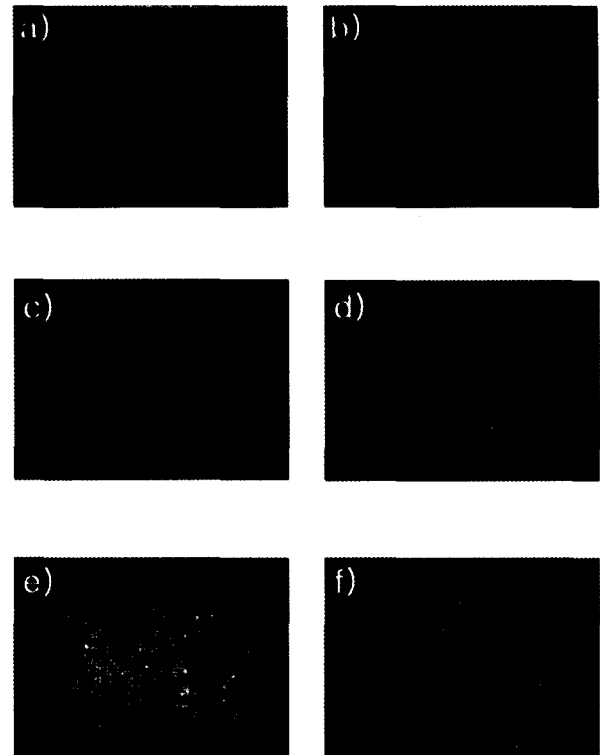


Fig. 2. Mouse interphase nuclei of blastomeres after FISH using human telomeric DNA probe. Nuclei from 2-cell (a), 4-cell (b), 8-cell (c), morula (d), and blastocyst embryos (e)-(f).

등, 2003). 이들은 염색체뿐만 아니라 간기 세포 내 텔로미어의 길이 측정이 가능하며, 다양한 세포에 적용하여 보다 빠르고 정밀한 텔로미어의 양적 분석이 가능하다고 알려져 있다(Slijepcevic, 2001). 이와 같이 세포 내 텔로미어의 양적 분석법이 널리 알려져 있음에도 불구하고 수정란이나 발생 조직의 세포 내 텔로미어의 함량은 거의 보고된 바가 없으며, 더욱이 초기 배자 상태의 발생 단계별 배자 내 텔로미어의 함량 분석은 본 연구가 처음인 것으로 사료되어 이에 대한 부가적인 양적 분석에 관한 연구들이 요망된다.

마우스 생식세포 및 초기배아세포의 텔로머레이스 활성도

마우스의 생식세포 및 초기배아세포에 대한 텔로머레이스 활성도를 TRAP 방법으로 분석하였다.

Fig. 3-a는 마우스 성체의 정소와 신장, 혈액세포에 대한 텔로머레이스 활성도를 분석한 결과이다. 본 그림에서 가장 아래의 ladder는 primer-dimer로 36 bp(substrate in-

Table 1. The amount of telomeric DNA in preimplantation mouse embryonic cells

	2-cell	4-cell	8-cell	Mourla	Blastocyst
Number of analyzed embryos	51	48	49	78	26
Percentage of telomeric DNA*	1.10±0.06 ^a	1.16±0.06 ^a	1.30±0.06 ^a	1.29±0.05 ^a	2.36±0.34 ^b

* Data are means±standard error.

^{a,b} Different superscripts significantly differ at $p < 0.01$.

ternal control; S-IC)이며, 그 윗 ladder는 50 bp를 가리키며 텔로머레이스의 활성도가 증가함에 따라 여기서부터 ladder층이 증가하게 되는데 한 ladder가 늘어날 때마다 6 bp씩 telomeric DNA의 증가를 의미한다. 분석 결과 재생 능력이 있는 증식성 세포인 정소에서는 예상했던 바와 같이 텔로머레이스의 활성이 강하게 나타났고, 뿐만 아니라 체세포인 신장과 혈액 세포에서도 강한 텔로머레이스의 활성도를 보였다. 이는 대부분의 포유동물의 체세포에서는 텔로머레이스의 활성이 없는 것으로 보고된 경우와 달리, 마우스의 경우는 특이적으로 체세포에서도 텔로머레이스의 활성이 지속되게 나타난다는 연구 결과와 일치함을 확인하였다(Starling 등, 1990; Kipling, 1997; Zijlmans 등, 1997; Weng과 Hodes, 2000; Dolci 등, 2002).

Fig. 3-b는 마우스의 정자, 난자 및 수정 직후 배아 세포(1세포기)의 텔로머레이스 활성도를 나타낸 것이다. 그림에서 나타난 바와 같이 정자에서는 텔로머레이스의 활성도를 관찰할 수 없었으며, 배란 난자와 수정 직후 수정란에서는 이의 활성도를 나타내었다. 정소 조직 내 세포들의 경우 강한 텔로머레이스의 활성도를 나타내는 반면 정자는 거의 활성도가 없는 것으로 보여지는데 이는 정소 조직의 경우 spermatogonia와 같은 증식성이 높은 세포들로 구성되어 있고 정자의 경우 분열이 완료된 최종산물로써 스스로의 분열 능력을 지니지 않기 때문인 것으로 생각된다. 이러한

양상은 사람(Wright 등, 1996)과 rat(Ravindranath 등, 1997; Eisenhauer 등, 1997)에서도 동일한 결과를 보고하고 있다. 한편, 배란 직후의 난자와 수정란의 경우 분열의 잠재성과 더불어 세포의 활성화가 촉진됨에 따라 텔로머레이스의 활성도가 증가되는 것으로 사료된다. 본 시기의 텔로머레이스의 활성도가 상실배기 이전의 초기 배자에서 보다 더욱 높은 것으로 나타나는데 이러한 결과는 소의 초기 배자에서도 비슷한 양상을 보인다(Betts와 King, 1999; Xu와 Yang, 2000).

Fig. 3-c는 마우스 수정란의 2세포기부터 배반포기까지의 초기 배 발생 단계별 배자의 텔로머레이스 활성도를 나타낸 것이다. 분석 결과 모든 단계에서 텔로머레이스의 활성도를 보였으며, 특히 상실배에서부터 보다 높은 활성도를 나타내었다. 초기배자의 텔로머레이스 활성도는 수정란의 높은 증식성과 관련된 것으로 상실배와 배반포 단계에서 텔로머레이스의 강한 활성은 연이은 조직의 분화와 밀접한 관련이 있는 것으로 사료되며 또한 본 발생 시점에서 전체 세포수가 급격히 증가된 것이 주된 요인으로 생각된다. 한편으로 본 단계에서의 강한 텔로머레이스의 활성이 높은 수준의 텔로미어 함량(Table 1)을 유지한 것으로 여겨진다. 소의 난포세포 및 수정 직후 배자의 텔로머레이스 활성도가 상대적으로 높게 나타나고 이후 초기 분열 단계에서 감소하다가 상실배와 배반포기에서 활성이 다시 높게 나타나는데 이러한 텔로머레이스의 활성 양상과 본 실험에서 분석된 마우스의 배 발생 단계별 텔로머레이스 활성도는 섞 잘 일치되는 것으로 모든 포유류의 배 발생 과정 중 텔로머레이스의 기전은 매우 유사한 것으로 사료된다(Prowse와 Greider, 1995; Wright 등, 1996; Eisenhauer 등, 1997; Betts와 King, 1999; Xu와 Yang, 2000).

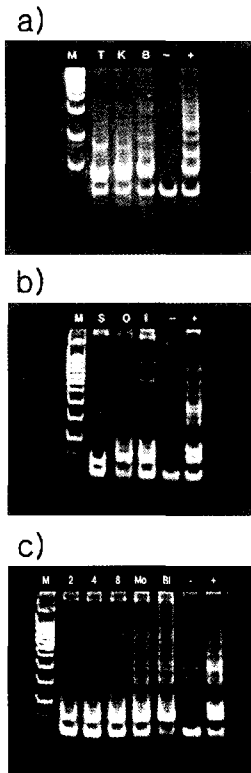


Fig. 3. Telomerase activity in mouse cells. a) extracts of whole testis (T), kidney (K) and whole blood (B) ; b) extracts of sperms (S), mature oocytes (O) and one cell stage of embryos (1) ; c) extracts of 2-cell embryos (2), 4-cell embryos (4), 8-cell embryos (8), morulae (M) and blastocysts (B) ; 100 bp size marker (M) ; negative control (-) ; positive control (+).

Analysis of the Amount of Telomeric DNA and Telomerase Activity on Preimplantation Mouse Embryonic Cells

Kang, M. Y., M. S. Han, S. C. Lee, J. H. Kim and S. H. Sohn

Department of Animal Science and Biotech. & RAIRC, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

ABSTRACT

Telomeres consisting of (TTAGGG)_n tandem repeat DNA sequences and associated proteins are essential for chromosome stability and related with cell senescence, apoptosis and cancer. The telomerase is a ribonucleoprotein which act as a template for the synthesis of telomeric DNA. This study was carried out to identify the distribution of telomeres on mouse chromosomes and also to analyze the amount of telomeres and telomerase activity of mouse embryos at early embryonic stages. Germ cells and early embryos from 1 cell to blastocyst stage were analyzed. The amount of telomeres was analyzed by quantitative fluorescence *in situ* hybridization technique(Q-FISH) using a human telomeric DNA probe, and telomerase activity was measured by telomeric repeat amplification

protocol assay(TRAP). In results, the telomeres on mouse chromosomes were distributed at the ends of all autosomes and sex chromosomes. Although the quantity of telomeres varied among chromosomes, most of chromosomes had higher amount in q-arm telomeres than in p-arm telomeres. The results of Q-FISH indicated that the relative amount of telomeres of mouse embryos in each embryonic stage was approximately the same except the higher amount in blastocysts. Using TRAP assay on mouse embryos, telomerase activity was detected in all preimplantation stages from mature oocytes to blastocysts. Especially the telomerase activity was significantly increased at the morula and blastocyst stage. In conclusion, there may be a close association between the amount of telomeres and telomerase activity in early embryonic stages, and analysis of telomere quantity and telomerase activity on early development will be helpful for the investigation of embryogenesis and embryonic cell differentiation in mice.

(Key words : Mouse embryo, Telomere, Telomerase activity, FISH, TRAP)

인용문헌

- Artandi SE, Alson S, Tietze MK, Sharpless NE, Ye S, Greenberg RA, Castrillon DH, Horner JW, Weiler SR, Carrasco RD, DePinho RA (2002): Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Genetics* 99:8191-8196.
- Betts DH, King WA (1999): Telomerase activity and telomere detection during early bovine development. *Dev Genet* 25:397-403.
- Blackburn EH (1991): Structure and function of telomeres. *Nature* 350:569-573.
- Blasco MA (2003): Telomerase in cancer and aging: lessons from the mouse. *Cancer Letters* 194:183-184.
- Bryant E, Hutchings KG, Moyzis RK, Griffith JK (1997): Measurement of telomeric DNA content in human tissues. *Biotech* 23:476-478.
- Buys C (2000): Telomeres, telomerase, and cancer. *New England J Med* 342:1282-1283.
- Chang JY (2004): Telomerase: A potential molecular marker and therapeutic target for cancer. *J Sur Oncology* 87:1-3.
- Cheong C, Hong KU, Lee HW (2003): Mouse models for telomere and telomerase biology. *Exp Mol Med* 3:141-153.
- Cottliar AS, Slavutsky IR (2001): Telomeres and telomerase activity: their role in aging and in neoplastic development. *Medicina* 61:335-342.
- Dolci S, Levai L, Pellegrini M, Faraoni L, Graziani G, Carlo AD, Geremia R (2002): Stem cell factor activates telomerase in mouse mitotic spermatogonia and in primordial germ cells. *J Cell Sci* 115:1643-1649.
- Eisenhauer KM, Gerstein RM, Chiu CP, Conti M, Hsueh AJ (1997): Telomerase activity in female and male rat germ cells undergoing meiosis and in early embryos. *Biol Reprod* 56:1120-1125.
- Ferlicot S, Youssef NF, Delhommeau F, Paradis V, Bedossa P (2003): Measurement of telomere length on tissue sections using quantitative fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH). *J Pathology* 200:661-666.
- Gan Y, Engelke KJ, Brown CA, Au JLS (2001): Telomere amount and length assay. *Pharmaceutical Research* 18:1655-1659.
- Greider CW (1991): Telomeres. *Curr. Opin. Cell Biol* 3:444-451.
- Greider CW (1993): Telomerase and telomere-length regulation: lessons from small eukaryotes to mammals [Review]. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 58:719-723.
- Greider CW, Blackburn EH (1985): Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43:405-413.
- Han MS, Cho EJ, Ha HB, Park HS, Sohn SH (2004): Sex determination of *in vitro* fertilized bovine embryos by fluorescence *in situ* hybridization technique. *Reprod Dev Biol* 28:133-137.
- Harley CB (1991): Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? [Review]. *Mutat Res* 256:271-282.
- Herrera E, Samper E, Blasco MA (1999): Telomere shortening in mTR^{-/-} embryos is associated with failure to close the neural tube. *EMBO* 18:1172-1181.
- Holt SE, Shay JW, Wright WE (1996): Refining the telomere-telomerase hypothesis of aging and cancer. *Nat Biotech* 14:836-839.
- Kim NW, Wu F (1997): Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res* 25:2595-2597.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994): Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266:2011-2015.
- Kipling D (1997): Telomerase structure and telomerase expression during mouse development and tumorigenesis. *Eur J Cancer* 33:792-800.
- Kipling D, Cooke HJ (1990): Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347:400-402.
- Kobayashi J, Sekimoto A, Uchida H, Wada T, Sasaki K, Sasada H, Umezumi M, Sato E (1998): Rapid detection of male-specific DNA sequence in bovine embryos using fluorescence *in situ* hybridization. *Mol Reprod Develop* 51:390-394.
- Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK, Tanke HJ (1996): Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 5:685-691.

27. Law HKW, Lau YU (2001): Validation and development of quantitative flow cytometry-based fluorescence *in situ* hybridization for intercenter comparison of telomere length measurement. *Cytometry* 43:150-153.
28. Lingner J, Cech TR (1998): Telomerase and chromosome end maintenance. *Curr Opin Genet Dev* 8:226-232.
29. Liu J (1999): Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB* 13:2091-2104.
30. Liu L, Blasco MA, Trimarchi JR, Keefe DL (2002): An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Dev Biol* 249:74-84.
31. Oxle K (1998): Telomere length distribution and southern blot analysis. *J Theor Biol* 190:369-377.
32. Pathak S, Multani AS, Furlong CL, Sohn SH (2002). Telomere dynamics, aneuploidy, stem cells and cancer. *Int J Oncology* 20:637-641.
33. Poon SS, Martens UM, Ward RK, Lansdorp PM (1999): Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 36:267-278.
34. Prowse KR, Greider CW (1995): Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Cell Biol* 92:4818-4822.
35. Ravindranath N, Dalal R, Solomon B, Djakiew D, Dym M (1997): Loss of telomerase activity during male germ cell differentiation. *Endocrinology* 138:4026-4029.
36. Robinson MO (2000): Telomerase and cancer. *Genet Eng* 22:209-222.
37. Shay JW, Bacchetti S (1997): A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33:787-791.
38. Slijepcevic P (2001): Telomere length measurement by Q-FISH. *Methods in Cell Science* 23:17-22.
39. Starling JA, Maule J, Hastie ND, Allshire RC (1990): Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res* 18:6881-6888.
40. Weng NP, Hodes RJ (2000). The role of telomerase expression and telomere length maintenance in human and mouse. *J Clinical Immunology* 20:257-267.
41. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW (1996): Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18:173-179.
42. Xu J, Yang X (2000): Telomerase activity in bovine embryos during early development. *Biol Reprod* 63:1124-1128.
43. Yen CH, Pazik J, Elliott RW (1996): A polymorphic interstitial telomere array near the center of mouse chromosome 8. *Mamm Genome* 7:218-221.
44. Yen CH, Pazik J, Zhang Y, Elliott RW (1997): An interstitial telomere array proximal to the distal telomere of mouse chromosome 13. *Mamm Genome* 8:411-417.
45. Zijlmans JM, Martens UM, Poon SS, Roap AK, Tanke, HJ, Ward RK, Lansdorp PM (1997): Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94:7423-7428.
46. 손시환, 박충생, 송상현 (1996): 염색체 분석 기법에 의한 소 체외수정란의 성 조절. *한국가축번식학회지* 20:179-190.
(접수일자: 2004. 8. 18. / 채택일자: 2004. 12. 20.)