

## 한국 재래닭의 주령별 각 조직의 텔로미어 함량과 텔로머레이스 활성도 분석

정길선<sup>1</sup> · 조은정<sup>1</sup> · 최덕순<sup>1</sup> · 이민정<sup>1</sup> · 박철<sup>1,2</sup> · 전익수<sup>2</sup> · 손시환<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>진주산업대학교 동물생명과학과, <sup>2</sup>축산연구소 응용생명공학과

### Analysis of Telomere Length and Telomerase Activity of Tissues in Korean Native Chicken

G. S. Jung<sup>1</sup>, E. J. Cho<sup>1</sup>, D. S. Choi<sup>1</sup>, M. J. Lee<sup>1</sup>, C. Park<sup>1,2</sup>, I. S. Jeon<sup>2</sup> and S. H. Sohn<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

<sup>2</sup>Division of Animal Biotechnology, National Livestock Research Institute, Suwon 441-350, Korea

**ABSTRACT** Telomeres are essential for chromosome stability and are related with cell senescence, apoptosis and cancer. Even though telomere length and telomerase activity have been studied extensively, very little is known to analyze the telomere dynamics in chicken cells. This study was carried out to analyze the telomere distribution and telomerase activity of Korean Native Chicken cells along with aging. The cells were collected from brain, heart, liver, kidney and germinal tissues during physiological stages. Telomere distribution was analyzed by Quantitative-Fluorescence *in situ* Hybridization (Q-FISH) techniques using the chicken telomeric DNA probe. Telomerase activity was performed by Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) assay. In results, the telomeres of chicken were found at the ends of all chromosomes with the interstitial telomeres on chromosomes 1, 2 and 3. The amount of telomeres on chicken cells was decreased along with aging in most tissues. Furthermore, the telomere quantity was significantly different among tissues. The relative amount of telomeres in proliferous cells such as testis cells had much more than those of liver, brain, heart, blood and kidney cells. The telomerase activity was down-regulated in cells of brain, heart and liver tissues. Whereas gonadal cells showed a constitutive activity of telomerase during all stage of life. In conclusions, the telomere quantity and telomerase activity in chicken are closely relate to cell proliferation and tissue specificity during developmental stages and aging. There is also closely correlated between the amounts of telomeric DNA and telomerase activity in chicken tissues.

(Key words : chicken tissues, telomere, telomerase, FISH, TRAP)

## 서 론

텔로미어(telomere)는 진핵 생물 염색체 말단부의 DNA-단백질 복합체로 TTAGGG의 단순 반복 염기 서열로 이루어져 있다. 텔로미어는 핵 내에서 염색체를 보호하고 염색체의 비정상적인 결합을 방지하며 세포의 노화, 암의 발생과 직접적 관련이 있다고 알려져 있으며, 세포 분열시마다 짧아져 더 이상 세포 분열을 할 수 없을 만큼 짧아지면 자연사적인 사망이 유기된다(Greider와 Blackburn, 1985; Robinson, 2000; Ahmed와 Tollefsbol, 2001; Cottliar와 Slavutsky, 2001; Pathak 등, 2002 Sohn 등, 2002). 반면, 텔로머레이스(telomerase)는 텔로미어의 길이를 유지하는 직접적인 효소로 RNA와 여러 개의 단백질로 구성되어 있다. 특히 RNA 분자는 telomeric DNA

합성을 위한 주형 역할을 하여 텔로미어 길이를 신장시킨다고 알려져 있다(Greider와 Blackburn, 1985; Killan 등, 1998).

최근 세포의 노화, 증식, 분화 및 암세포 등과 관련하여 텔로미어 및 텔로머레이스의 연구들이 활발히 진행되고 있으며 다양한 세포들에 대한 이들의 존재와 역할들이 밝혀지고 있다. 텔로미어 길이나 텔로머레이스 활성도에 대한 연구는 인체, 실험 동물에서 널리 진행되어왔지만 조류에서는 연구가 미흡한 실정이다. 조류는 세포의 분화와 노화에 관련하여 매우 좋은 체계를 가진 동물로서 다른 실험 동물들에 비해 세포의 수명이 엄격히 제한 조절되어 있다. 특히 닭은 포유류와 다른 척추동물의 모델로서 텔로미어와 텔로머레이스의 연구에 좋은 재료로 제공될 수 있으나, 이들의 관계가 명확히 규명되어 있지 않을 뿐만 아니라 조직에 따라 이들

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed : shsohn@jinju.ac.kr

의 활성도와 길이에 대해서도 많은 이견이 있다. 닭의 텔로미어 길이에 관한 연구는 Bloom 등(1993)이 Telomere Restriction Fragment(TRF)법에 의하여 이의 길이가 250 kb에서 2.2 Mb라고 밝힌 이래, Lejnine 등(1995)이 3~100 kb, Venkatesan과 Price(1998)가 사람과 유사한 8~20 kb 정도임을 보고하였다. 한편 Delany 등(2000)은 닭의 텔로미어를 크게 3개의 군으로 분리하고 각각 0.5~10 kb, 10~40 kb 및 40~2 Mb로 구성되어 있음을 분석하였고 척추 동물의 genome상 텔로미어 함유율이 2~4%인 반면 닭은 3~4% 정도임을 보고하였다. 이는 사람의 이배체내 함유율 0.3%에 비해 10배 이상 높은 분포 양상이다(Delany 등, 2003). 닭의 텔로머레이스 활성도에 관한 이론은 마우스와 같이 생후 지속적 활성을 나타낸다고 보고하기도 하고(Venkatesan과 Price, 1998), 기관 형성 시까지 거의 지속적인 활성을 나타내다가 기관 형성 이후 신생 개체에서부터는 활성이 점진적으로 낮아진다는 연구 보고도 있다(Taylor와 Delany, 2000; Swanberg와 Delany, 2003). 최근에는 닭의 telomerase RNA 유전자에 대한 유전자 지도가 작성되고, telomere-binding protein인 TRF 2의 유전자가 cloning되었으며, 이의 발현이 배아 상태에서 매우 높게 나타남을 밝힌 바 있다(Swanberg와 Delany, 2005). 이러한 결과들은 텔로미어와 텔로머레이스의 분석이 생명 현상의 기작을 밝히는데 매우 중요한 자료라 사료되어지며 특히 세포의 분화, 노화 등에 대한 중요한 정보를 제공해 줄 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 아직까지 닭의 성장 단계별 각 조직의 텔로미어 분포 양상이나 텔로머레이스의 활성도에 대한 연구는 매우 제한적이며 부분적 연구만이 이루어지고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 닭의 세포 분화 및 세포 활성의 특이성과 개체의 발육, 성장 및 노화의 생물학적 특성을 구명하고자 한국 재래닭을 대상으로 발생에서부터 생산수명에 이르기까지 주령별 각 조직에 대한 세포들의 텔로미어의 함량을 Quantitative Fluorescence *in situ* Hybridization(Q-FISH) 방법으로 분석하고, 텔로머레이스의 활성도를 telomeric repeat amplification protocol(TRAP) 방법으로 분석 제시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시 동물

닭의 성장, 발육 및 노화 단계별 텔로미어 양적 분석과 텔로머레이스 활성도 분석을 위하여 진주산업대학교 종합농장에서 사육중인 한국 재래계 황갈색 계통 암수 100수를 이

용하였다.

### 2. FISH를 위한 조직 및 혈액 표본 제작

개체의 각 조직들로부터 세포 표본을 제작하기 위하여 발생시, 10주령, 30주령, 60주령 및 120주령 각 10수씩 도살하여 간, 뇌, 심장, 신장 및 정소조직을 채취하였다. 채취한 조직은 D-PBS(Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA)로 여러 번 세척한 후 세절하고 원심 분리하였다. 이 후 0.9% sodium citrate(Sigma Chem, St Louis, MO, USA)로 저장처리하고, methanol과 acetic acid를 3:1로 섞은 고정액으로 3회 이상 반복 고정을 실시하였다. 고정된 세포는 냉장 보관된 슬라이드에 3~4 방울 떨어뜨려 표본을 제작하고 slide warmer에서 3~4시간 건조 후 곧 바로 FISH에 공시하였다.

백혈구 세포 표본의 제작은 개체의 날개 정맥으로부터 약 5 mL의 혈액을 채취하여 백혈구만 순수 분리하여 이용하였다. 순수 백혈구의 분리는 손과 류(1999)가 제시한 Ficoll(Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)을 이용한 분리방법으로 시행하였고, 분리된 세포는 0.06M KCl(Sigma Chem, St Louis, MO, USA)을 이용하여 실온에서 15분간 저장 처리하였다. 저장처리가 끝나면 methanol과 acetic acid가 3:1로 혼합된 고정액을 10 방울 정도 첨가한 후 원심분리하고 이후 동일 고정액으로서 3회 정도 반복 처리한 후 슬라이드 표본을 제작하였다.

### 3. Q-FISH

#### 1) Telomeric DNA probe 제작

FISH용 probe 제작을 위하여(CCCTAA)<sub>n</sub>으로 구성된 42mers 단일 oligomers를 primer로 이용하여 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 수행하고 이의 증폭된 산물을 PCR-DIG Probe Synthesis Kit(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로서 digoxigenin labeling을 하였다.

#### 2) FISH

본 연구에서 수행한 FISH 방법은 조 등(2005)이 제시한 닭의 초기 배자 및 발생 조직에 대한 telomeric DNA 분석을 위한 FISH 법과 동일하게 실시하였다. 이를 간단하게 소개하면 슬라이드 표본을 RNase(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로 RNA를 제거한 후 초자수로 세척하고 에탄올로 탈수 건조시켰다. 이후 Hybridization 용액(13  $\mu$ L formamide, 5  $\mu$ L hybridization buffer, 2  $\mu$ L(100 ng/  $\mu$ L) chicken telomeric DNA probe)을 떨어뜨린 후 밀봉하고 85°C에서 5분

간 변성(denaturation)시킨 후 38.5°C에서 12시간 이상 접합(hybridization)시켰다. 접합 후 슬라이드를 2×SSC로서 72°C에서 5분간 처리하고 실온의 PN buffer(0.1% sodium phosphate, 0.1% Nonidet P-40)로 세척하였다. 형광 접합 탐지를 위하여 anti-digoxigenin-fluorescein(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)을 처리하고 커버글라스로 덮은 후 38.5°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 슬라이드는 PN buffer로 세척하고 암소에서 건조시켰다. 배경 염색은 propidium iodide solution(Sigma Chem, St Louis, MO, USA)을 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮고 암소에서 건조시킨 후 검경하였다. 형광 접합 발현 양상은 523 nm 파장대의 필터(WIB filter)를 부착한 형광 현미경(Model AX-70, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하였다.

### 3) Telomeric DNA 함량 분석

처리된 슬라이드를 형광 현미경으로 관찰한 후 100배의 대물렌즈 하에서 평균 5개의 간기 상을 한 프레임으로 하여 디지털 카메라(Model DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)로 촬영하고 이를 컴퓨터에 저장하였다. 저장된 상은 이미지 분석 프로그램(Image analyzer program, MetaMorph, UIC, Pennsylvania, USA)을 이용하여 핵 대비 telomeric DNA 분포량을 분석하였다. 분석 방법은 RGB의 intensity를 이용하여 PI의 적색(red) 대비 FITC의 녹색(green)의 상대적 비를 계산하는 것이다. 즉, 배경 염색에 이용된 PI는 핵 물질 전체를 나타내고, 핵 내 FITC의 형광 signal은 telomeric DNA의 접합 양상을 나타내는 것으로 이들의 상대적 비로 텔로미어의 함량을 간접적으로 분석하는 것이다.

### 4. TRAP

텔로머레이스 활성도의 분석은 Kim과 Wu(1997)가 제시한 TRAP 방법을 이용하였다. TRAP의 수행은 Telomerase Detection Kit(Intergen Company, Purchase, NY, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 다음과 같이 실시하였다. 채취한 각 조직들은 3-cholamidopropyl dimethylammonio-1-propane-sulfonate(CHAPS) lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리하고 정량하였다(Bradford, 1976). 분리된 ribonucleoprotein을 대상으로 PCR을 수행하였고 이의 조건은 30°C에서 30분간 TS-telomerase product를 신장시킨 다음 94°C 30초, 59°C 30초 및 72°C에서 30초간 3단계로 35 사이클을 실시하였다. 증폭된 텔로머레이스는 15% polyacrylamide 겔(Promega, Madison, WI, USA) 전기영동을 통해 75V에 이어 100V에서 2시간 동안 실시하고 ethidium bromide(EtBr, Sigma Chem, St Louis, MO, USA)로 염색한 후 ladder를 확인하였다.

### 5. 통계 분석

닭의 조직간 및 성장 주령 간 세포내 telomeric DNA 함량을 비교 분석하기 위하여 SAS 통계 패키지(SAS, 2000)를 이용하여 ANOVA/Turkey법으로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 닭의 주령별 각 조직의 텔로미어 함량 분석

닭 염색체의 telomeric DNA 분포 양상을 분석하고자 telomeric DNA probe를 이용하여 FISH를 수행한 바 이의 양상은 Fig. 1과 같다. 한국 재래닭 염색체의 텔로미어의 분포 양상은 모든 염색체 양 말단부에 이의 분포가 확인되었고, 1번, 2번 및 3번 염색체에는 양 말단뿐만 아니라 interstitial telomeres가 존재함을 확인하였다. 본 연구 결과에서 나타난 한국 재래계 염색체의 텔로미어의 분포 양상은 Nanda 등(2002)이 제시한 닭의 염색체상 텔로미어 분포 양상과 거의 일치하였으며, 닭에 있어 interstitial telomeric DNA의 존재 양상은 Nanda와 Schmid(1994) 및 Nanda 등(2002)이 보고한 바 있다.

한국 재래닭의 발육, 성장, 노화 단계의 각 조직에 대한 텔로미어의 양적 분포 양상을 분석하기 위하여 발생시, 10주령, 30주령, 60주령 및 120주령 개체들의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소 및 혈액 세포에 대한 Q-FISH를 수행하였다. 분석 결과 주령별 각 조직의 세포들에 대한 평균 telomeric DNA의 함유율은 Table 1에 제시된 바와 같고 이의 변화 양상을 Fig 2에 제시하였다.

한국 재래계의 세포내 telomeric DNA의 함유율은 계능 당 1.3~2.8% 정도로 분석되었으나 동일 개체 내 조직 간 및 성

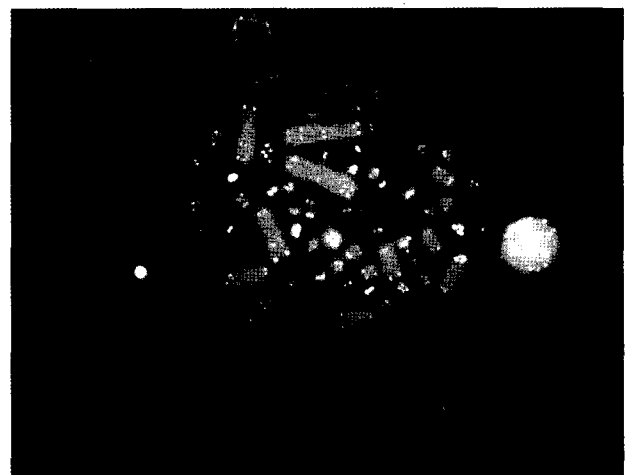


Fig. 1. Telomere distribution on Korean Native Chicken chromosomes by FISH using telomeric DNA probe.

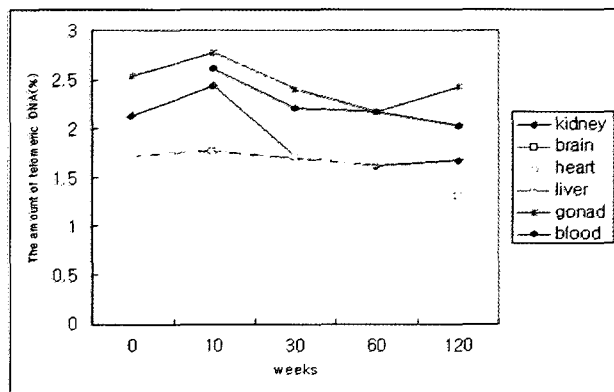
**Table 1.** The relative amount of telomeric DNA in each cell from several tissues along with aging in Korean Native Chicken

	Number of analyzed cells	Post-natal tissues						Total
		Kidney	Brain	Heart	Liver	Gonad	Blood	
Hatched	250	2.13±0.12 <sup>b</sup>	1.72±0.12 <sup>a</sup>	1.83±0.10 <sup>a</sup>	1.78±0.11 <sup>a</sup>	2.54±0.14 <sup>ab</sup>	N/A	2.00±0.12 <sup>a</sup>
10 Wks	1,000	2.44±0.08 <sup>a</sup>	1.78±0.06 <sup>a</sup>	1.75±0.05 <sup>a</sup>	1.69±0.05 <sup>a</sup>	2.78±0.11 <sup>a</sup>	2.61±0.05 <sup>a</sup>	2.13±0.08 <sup>a</sup>
30 Wks	1,000	1.71±0.05 <sup>c</sup>	1.71±0.06 <sup>a</sup>	1.67±0.05 <sup>a</sup>	1.69±0.05 <sup>a</sup>	2.41±0.11 <sup>bc</sup>	2.20±0.03 <sup>b</sup>	1.85±0.06 <sup>b</sup>
60 Wks	1,000	1.62±0.04 <sup>d</sup>	1.63±0.04 <sup>a</sup>	1.68±0.05 <sup>a</sup>	1.63±0.05 <sup>a</sup>	2.17±0.09 <sup>c</sup>	2.17±0.03 <sup>b</sup>	1.82±0.05 <sup>b</sup>
120 Wks	1,000	1.67±0.04 <sup>c</sup>	1.31±0.03 <sup>b</sup>	1.47±0.05 <sup>b</sup>	1.29±0.04 <sup>b</sup>	2.43±0.08 <sup>bc</sup>	2.02±0.06 <sup>c</sup>	1.65±0.05 <sup>c</sup>
Total		1.88±0.07 <sup>3</sup>	1.61±0.06 <sup>4</sup>	1.65±0.06 <sup>4</sup>	1.59±0.06 <sup>4</sup>	2.46±0.11 <sup>1</sup>	2.23±0.04 <sup>2</sup>	

The values are means ± standard errors.

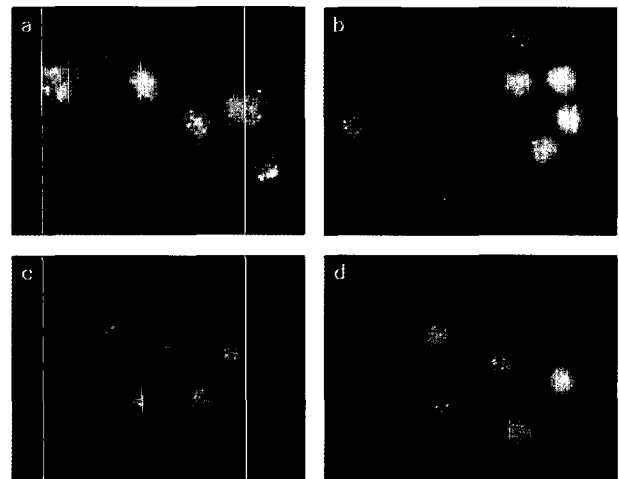
<sup>a-d</sup> Means with different superscripts in same column significantly differ at  $p < 0.01$ .

<sup>1-4</sup> Means with different superscripts in same row significantly differ at  $p < 0.01$ .



**Fig. 2.** The changes of telomeric DNA in several tissues along with aging in Korean Native Chicken.

장 주령 간 함유율에서 매우 큰 차이를 나타내고 있다. 닭이 발육, 성장하여 노화에 이르기까지 대부분의 조직에서 텔로미어 함유율은 유의적으로 감소되는 양상을 보였다. 특히 발육, 성장이 완료되는 30주령 단계와 노화 단계라고 할 수 있는 120 주령시 텔로미어의 함유율은 이전 단계에 비해 급진적 감소됨을 나타내고 있다. 한편 조직 간 telomeric DNA 함유율에 있어서도 많은 차이를 보이는 바 특히 정소와 백혈구세포 내의 텔로미어 함유율은 모든 주령에서 다른 조직내 세포에 비하여 상대적으로 높은 수준의 함유율을 나타내었다. Fig. 3은 동일 주령 내 조직 간 및 동일 조직 내 주령 간 텔로미어의 분포 양상을 비교 제시한 그림으로서 60주령 개체의 정소 세포와 간 세포 및 10주령과 120주령의 백혈구 세포의 대표적 FISH 양상이다. 본 그림의 백혈구 세포에서 나타난 바와 같이 연령이 증가함에 따라 telomeric DNA의 분포



**Fig. 3.** The representative telomere distribution patterns of inter-phase nuclei in Korean Native Chicken by FISH using telomeric DNA probe; (a) testis cells from 60 wks chicken, (b) liver cells from 60 wks chicken, (c) lymphocytes from 10 wks chicken, (d) lymphocytes from 120 wks chicken.

양상은 극단적으로 감소됨을 확인할 수 있었고, 동일 연령에서 정소 세포와 간 세포의 비교에서 정소 조직 내 세포들의 텔로미어 함유율이 간 세포에 비해 월등히 높은 분포 비율을 나타내고 있음을 알 수 있다.

이러한 결과는 조 등(2005)이 닭의 발생 과정 중 기관 형성 이후 발육 단계가 진행됨에 따라 조직 내 텔로미어의 함유율은 감소되는 양상을 나타내었다는 보고와 더불어 부화 후 개체의 성장, 노화 단계에서도 모든 세포내 텔로미어의 감소 양상을 나타내고 있는 것이다. 또한 조 등(2005)이 초기

배자 세포 내 평균 telomeric DNA 함유율을 2.56%로 제시한 것을 참고로 본 연구에서 발생 직후 개체의 함유율이 2.0%, 30주령시 1.85%, 120주령시 1.65%로 분석됨에 따라 닭은 배자 발생에서부터 출생 후 연령의 증가에 따른 지속적인 텔로미어의 감소를 의미하는 것이다. 닭의 연령 증가에 따른 telomeric DNA의 감소는 모든 조직 내 세포들에서 공통적으로 나타나는 양상이며 특히 노화 단계라 할 수 있는 120주령시 이의 감소율이 급격히 높아짐을 나타내었다. 이는 텔로미어가 노화와 밀접한 관련을 지닌다는 여러 보고들을 재 입증하는 것으로 닭에 있어서도 생리적 연령에 따른 세포내 텔로미어의 감소를 재 확인하는 것이다(Harley, 1991; Counter, 1996; Engelhardt와 Martens, 1998; Cottliar와 Slavutsky, 2001; Sohn 등, 2002; Shay와 Wright, 2005). 또한 본 연구에서 제시한 닭의 주령별 각 조직의 텔로미어 함량 분석 결과는 Delany 등(2003)이 분석한 닭의 이배체내 텔로미어 함유율 3~4%보다는 다소 낮은 수치이기는 하나 이는 분석 방법의 차이인 것으로 생각되며, 사람이나 포유류에 비해서는 월등히 높은 함유율을 나타낸다는 보고와는 일치된 결과이다. 한편 동일 연령에서 조직 간에도 텔로미어 함유율의 유의적인 차이를 보이고 있는데 증식성 세포인 정소내의 함유율이 비증식성 세포들에 비해 월등히 높은 분포율을 나타내었다. 이는 정소 조직의 경우 이를 구성하는 세포들이 증식성 분열 세포들이기 때문에 지속적인 텔로머레이스의 영향을 받고, 연령이 증가하더라도 세포 증식성은 유지하기 때문이다. 이러한 결과는 사람을 포함한 포유동물에서도 동일 양상이 확인된 바 있으며(Bekaert 등, 2004) Taylor와 Delany(2000)가 텔로미어 제한 단편 길이 측정법(TRF)으로 닭 발생 시 조직별 분석에서 텔로미어의 길이가 생식선 조직이 체세포 조직에 비해 평균 0.4 kb가 길고, 심장 세포보다는 무려 1.1 kb가 길었다는 보고를 재 입증하는 결과라 할 수 있겠다. 따라서 증식성 세포로 알려진 정소 조직과 비 증식성 세포인 간, 뇌, 심장 조직의 telomeric DNA의 분포율을 분석함으로써 조직별 세포의 분화 및 증식 특이성과 텔로미어 함량간의 밀접한 상관성을 확인하였다.

2. 닭의 주령별 각 조직의 텔로머레이스 활성도 분석

한국 재래닭의 발육, 성장, 노화 단계별 각 조직에 대한 텔로머레이스 활성도를 비교 분석하기 위하여 발생시, 10주령, 30주령, 60주령 및 120주령 각 개체의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소 조직을 대상으로 TRAP을 시행하였다. TRAP 방법은 3' 말단 substrate oligonucleotide에 telomeric repeat가 반복되고, TS와 RP primer를 이용하여 PCR로 확장된 산물이 증폭되는

원리를 이용한 것이다.

Fig. 4는 닭의 성장 주령별 개체의 간, 뇌, 심장, 신장, 정소 조직에 대한 TRAP 분석 결과이다. 본 그림에서 가장 아래의 층은 primer-dimer이고, 그 위 층은 36 bp 위치의 substrate internal control(S-IC)을 나타내며, 이후 50 bp부터 텔로머레이스 활성도가 증가할 때마다 6 bp씩 telomeric DNA의 band가 부가하여 나타난다. 분석 결과, 발생 이전 모든 조직의 세포들에서 텔로머레이스의 활성도를 나타내고 있으나 발생 이후 성장 단계가 진행됨에 따라 이의 활성도가 서서히 약해지면서 10주령시 정소 조직을 제외하고는 모든 조직에서 미약한 텔로머레이스 활성을 보였다. 그러나 성 성숙 이후 노

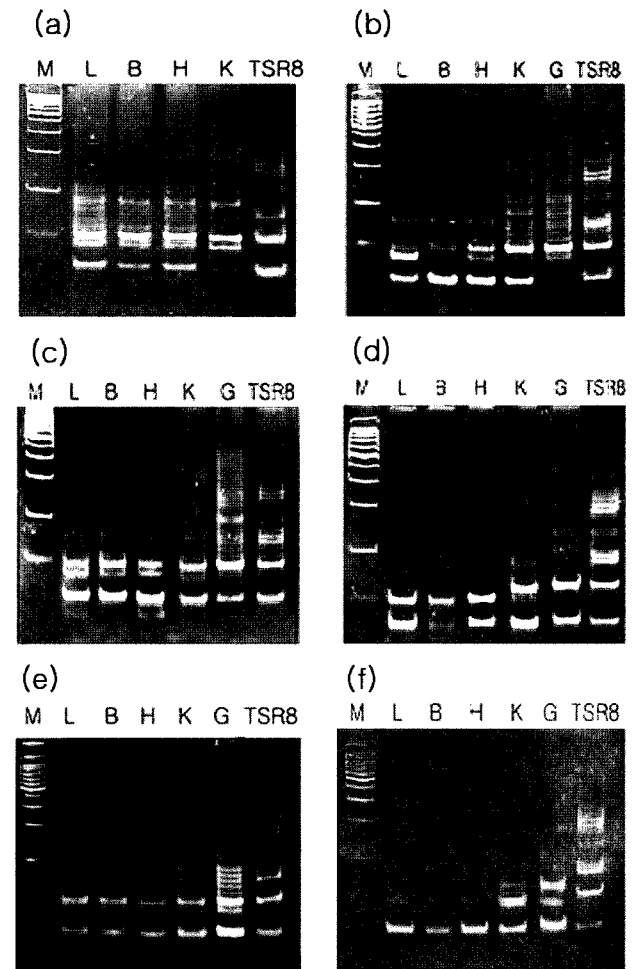


Fig. 4. TRAP assay with liver, brain, heart, kidney and testis cells along with age in Korean Native Chicken; Samples from 7-days fetus (a), hatching (b), 10 wks chicken (c), 30 wks chicken (d), 60 wks chicken (e) and 120 wks chicken (f), M: 100bp size marker, N: negative control, L: liver, B: brain, H: heart, K: kidney, G: testis, TSR8: positive control.

화 단계에서는 정소 조직을 제외한 다른 조직들에서는 거의 텔로머레이스 활성이 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 이론적인 닭의 성장 과정과 매우 밀접한 관련성이 있는 결과로 보여지는데 닭의 성장과정을 살펴보면, 0~20주령까지는 발육이 가장 왕성한 시기이며, 20주령에 들어서면 성 성숙이 이루어지고, 30주령이 되면 신체적 성 성숙이 완료되고 지방이 증가되기 시작하며 근육이 발달되어진다고 알려져 있다. 따라서 성장 시기에 따른 조직별 세포 분화와 증식성 특이성을 텔로머레이스 활성도에서 잘 보여주고 있는 결과라 할 수 있겠다. 생식선 조직은 증식성 세포들로서 분열능력이 높고 많은 세포들이 미분화 단계임에 따라 텔로머레이스의 지속적인 활성을 나타내고, 간, 뇌, 심장 조직의 경우 거의 비 증식성 세포들로 구성되어 있으므로 분화가 완료되는 시점에서부터 텔로머레이스의 활성도가 떨어지는 것으로 보인다. 사람의 경우에도 발생 단계에서 조직의 분화가 일어난 후 곧바로 대부분의 조직에서 텔로머레이스의 활성도가 감소되는데 심장, 뇌, 간, 폐, 근육, 신장의 순으로 활성 양상이 없어지며, 신생아 및 성체에서 생식선이나 골수를 제외한 거의 모든 조직에서 텔로머레이스 활성도는 나타나지 않는다고 알려져 있다 (Ulaner 등, 1998, 2001; Wright 등, 1996, 2001). 닭에 있어서도 기관 형성 이후 신생 개체의 체세포는 증식성이 강한 세포 및 생식세포를 제외하고는 출생 후 텔로머레이스 활성이 나타나지 않는다는 보고가 있다(Taylor와 Delany, 2000).

이상의 결과를 종합하면, 닭의 발육, 성장, 노화 단계별 텔로머레이스 활성도는 주령 및 조직에 따라 각기 다른 활성 양상을 보이며, 증식성 세포는 지속적인 활성(constitutive activity)을 나타내었고, 비 증식성 세포는 성장이 진행됨에 따라 텔로머레이스 활성도가 떨어지는 down-regulation 양상을 보였다. 따라서 닭의 조직별 세포의 분화 및 증식성 특이성과 텔로머레이스 활성도 간에는 매우 밀접한 관련이 있으며, 더불어 텔로미어의 양적 분포와도 매우 높은 상관관계가 있는 것으로 사료된다.

## 적 요

텔로미어는 염색체를 보호하고 세포 분열의 안정성에 주된 작용을 하며 세포의 사멸, 노화 및 암의 발생과 직접적 관련이 있다고 알려져 있다. 최근 텔로미어의 길이와 텔로머레이스의 활성에 대한 많은 연구들은 광범위하게 진행되어 왔지만 닭에서는 매우 제한적으로 연구되어왔다. 따라서 본 연구에서는 한국 재래닭에서 발육, 성장 및 노화 단계별 간,

뇌, 심장, 신장, 정소 및 백혈구 세포에 대한 텔로미어의 양적 분포와 텔로머레이스 활성도를 분석 고찰하고자 하였다. 텔로미어의 함량 분석은 telomeric DNA probe를 이용하여 Q-FISH 법으로 수행하였고, 텔로머레이스 활성도 분석은 TRAP 방법을 이용하였다. 분석 결과, 닭 염색체상 텔로미어는 모든 염색체 양 말단부에 나타나며 특히 1, 2 및 3번 염색체에서는 양 말단 외 interstitial telomeric DNA가 존재하였다. 닭의 조직별 세포들의 telomeric DNA 함량을 분석한 결과 성장 및 노화가 진행됨에 따라 대부분의 세포들에서 텔로미어 함유율이 유의적으로 감소하였고, 조직 간 텔로미어 함유율에서도 많은 차이를 보였는데 특히 증식성 세포인 정소 내 세포들이 다른 비 증식성 세포들에 비해 월등히 높게 나타났다. 텔로머레이스 활성도는 간, 뇌, 심장 등 대부분의 조직에서 성장 및 노화가 진행됨에 따라 활성이 감소되거나 없거나 생식선 조직인 정소세포는 연령과 무관하게 지속적으로 높은 활성을 나타내었다. 이상의 결과로부터 닭의 조직별 세포 분화 및 증식성 특이성과 텔로미어의 함량 및 텔로머레이스 활성도 간에는 매우 밀접한 관련이 있으며, 텔로머레이스 활성도와 텔로미어 함유율 간에 매우 높은 상관성이 있었다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업비 지원에 의해 수행되었습니다.

## 인용문헌

- Ahmed A, Tollefsbol T 2001 Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. *J Am Geriatr Soc* 49(8):1105-1109.
- Bekaert S, Derradji H, Baatout S 2004 Telomere biology in mammalian germ cells and during development. *Dev Biol* 274(1):15-30.
- Bloom SE, Delany ME, Muscarella DE 1993 Constant and variable features of avian chromosomes. In *Manipulation of the avian genome* (ed. R.J. Etches and A.M. Verrinder Gibbins), pp. 39-60. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the prin-

- ciple of protein-dye binding. *Anim Biochem* 72:248-254.
- Cotliar AS, Slavutsky IR 2001 Telomeres and telomerase activity: their role in aging and in neoplastic development. *Medicina* 61(3):335-342.
- Counter CM 1996 The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutat Res* 366(1):45-63.
- Delany ME, Daniels LM, Swanberg SE, Taylor HA 2003 Telomeres in the chicken: genome stability and chromosome ends. *Poul Sci* 82:917-926.
- Delany ME, Krupkin AB, Miller MM 2000 Organization of telomere sequences in bird: evidence for arrays of extreme length and for *in vivo* shortening. *Cytogenet Cell Genet* 90:139-145.
- Engelhardt M, Martens UM 1998 The implication of telomerase activity and telomere stability for replicative aging and cellular immortality. *Oncol Rep* 5(5):1043-1052.
- Greider CW, Blackburn EH 1985 Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43:405-413.
- Harley CB 1991 Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 256:271-282.
- Killan A, Heller K, Kleinhofs A 1998 Development patterns of telomerase activity in barley and maize. *Plant Mol Biol* 37(4):621-628.
- Kim NW, Wu F 1997 Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res* 25(13):2595-2597.
- Lejnine S, Makarov VL, Langmore JP 1995 Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2393-2397.
- Nanda I, Schmid M 1994 Localization of the telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequence in chicken (*Gallus domesticus*) chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 65(3):190-193.
- Nanda I, Schrama D, Feichtinger W, Haaf T, Schrtl M, Schmid M 2002. Distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in avian chromosomes. *Chromosoma* 111:215-227.
- Pathak S, Multani AS, Furlong CL, Sohn SH 2002 Telomere dynamics, aneuploidy, stem cells and cancer. *Int J Oncology* 20(3):637-641.
- Robinson MO 2000 Telomere and cancer. *Genet Eng* 22:209-222.
- SAS 2000 SAS user's guide. Statistical Analysis System Institute, Cary, NC, USA.
- Shay JW, Wright WE 2005 Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 26(5):867-874.
- Sohn SH, Multani AS, Gugnani PK, Pathak S 2002 Telomere erosion-induced mitotic catastrophe in continuously grown Chinese hamster Don cells. *Exptl Cell Res* 279(2):271-276.
- Swanberg SE, Delany ME 2003 Dynamics of telomere erosion in transformed and non-transformed avian cells *in vitro*. *Cytogenet Genome Res* 102:318-325.
- Swanberg SE, Delany ME 2005 Differential expression of genes associated with telomere length homeostasis and oncogenesis in an avian model. *Mech Ageing Dev* 126(10):1060-1070.
- Taylor HA, Delany ME 2000 Ontogeny of telomerase in chicken: Impact of downregulation on pre- and postnatal telomere length *in vivo*. *Dev Growth Differ* 42:613-621.
- Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Hoffman AR 1998 Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase(hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res* 58:4168-4172.
- Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Hoffman AR 2001 Tissue-specific alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) influences telomere lengths during human development. *Int J Cancer* 91:644-649.
- Venkatesan R, Price C 1998 Telomerase expression in chickens: Constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14763-14768.
- Wright DL, Jones EL, Mayer JF, Oehninger S, Gibbons WE, Lanzendorf SE 2001 Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod* 7:947-955.
- 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.
- Zakian VA 1995 Telomeres: Beginning to understand the end. *Science* 270:1601-1607.
- 손시환 류은경 1999 Ficoll을 이용한 닭 염색체 분리 기법에 관한 연구. *진주산업대학교 농업기술연구소보* 12:131-140.
- 조은정 최철환 손시환 2005 닭의 발생 단계별 세포내 telomere의 양적 분포양상과 telomerase 활성도 분석. *한국동물자원과학회지* 47(2):187-194.