

## 삼투압 배양 조건에 따른 돼지 체세포 복제 배반포에서 Repeats 영역의 DNA 메틸화 변화

고응규<sup>1,†</sup> · 임기순<sup>2</sup> · 박미령<sup>2</sup> · 우제석<sup>2</sup> · 양병철<sup>2</sup> · 황성수<sup>2</sup> · 이휘철<sup>2</sup> · 이풍연<sup>1</sup> · 조창연<sup>1</sup> · 최순호<sup>1</sup> · 유용희<sup>1</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오효공학과

## DNA Methylation Change of Repeats Sequences in Pig SCNT Embryos Produced under Different Osmolarity Culture Conditions

Yeoung-Gyu Ko<sup>1,†</sup>, Gi-Sun Im<sup>2</sup>, Mi-Rung Park<sup>2</sup>, Jae-Seok Woo<sup>2</sup>, Byoung-Chul Yang<sup>2</sup>, Seongsoo Hwang<sup>2</sup>, Hwi-Cheul Lee<sup>2</sup>, Poongyeon Lee<sup>1</sup>, Changyeon Cho<sup>1</sup>, Sun-Ho Choi<sup>1</sup> and Young-Hee Yoo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

<sup>2</sup>Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

### ABSTRACT

Osmolarity of culture media is one of the most important factors affecting *in vitro* development. This study was conducted to investigate the DNA methylation status of Pre-1 and satellite sequence in pig nuclear transfer (pNT) embryos produced under different osmolarity culture conditions. Control group of pNT embryos was cultured in PZM-3 for six days. Other two treatment groups of pNT embryos were cultured in modified PZM-3 with 138 mM NaCl or 0.05M sucrose (mPZM-3, 320 mOsmol) for two days, and then cultured in PZM-3 (270 mOsmol) for four days. Previous our studies have reported that pNT embryos cultured in both hypertonic media showed significantly higher blastocyst formation rate than that of control. The DNA methylation status of the satellite sequences in blastocyst was characterized using bisulfite-sequencing technology. The satellite region had a similar methylation pattern of *in vivo* blastocyst among two culture groups excepting the control group. Each level of methylation is that the satellite DNA moderately methylated (43.10% of PZM-3; 56.12% of NaCl; 55.06% of sucrose; 60.00% of *in vivo* embryos). As a result of the sequence of PRE-1, CpG methylation pattern was similar to three groups, including *in vivo* group. In case of the satellite DNA region, the osmolarity conditions were affected CpG DNA methylation status while PRE-1 sequence was not affected CpG DNA methylation in pNT blastocyst stage. These results indicate that the modification of osmolarity in a culture media may influence to spatially change of DNA methylation of repetitive sequence for pNT embryo development.

(Key words : NT blastocyst, Methylation, Satellite, PRE-1, Osmolarity)

### 서론

개체를 형성하는 최소의 생명 단위인 세포는 epigenetic 제어 기구를 가지고 있으며, 그 변화는 genome과 chromatin maker로써 기억된다. Epigenetic 정보의 하나로 DNA 메틸화는 유전자의 silencing, X염색체 불활성화, imprinting, chromatin의 remodeling과 같은 다양한 유전자의 기능 조절을 통한 포유동물 발달에 관여하고 있다. 포유류의 몸을 구성하는 다양한 조직과 세포는 각각 고유의 DNA 메틸화 패턴을 형성하고 있으며, 개체 발생 및 세포의 분화에 DNA 메틸화가 중요한 역할을 하고 있

다(Shiota 등, 2002). 배우자 형성과 초기 배발달 과정에 genome-wide DNA 메틸화 reprogramming이 일어난다 (Reik 등, 2001; Ko 등, 2005). 복제동물은 epigenetic 관점에서 세포의 분화나 genome 유전자 발현조절 기구를 명확히 할 수 있는 중요한 생물이라고 할 수 있다. 그러나 복제동물은 복제시 DNA 메틸화에 따른 epigenetic reprogramming에 이상이 있고(Ohgane 등, 2001; Kremenskoy 등, 2006), 이들 불완전한 reprogramming은 배반포 형성 및 임신 실패의 원인이 된다(Shi 등, 2002). 어쨌든 이들 reprogramming은 특정 genome 영역에서 다양한 메커니즘에 의해 독립적으로 일어나고(Kim 등, 2004), DNA 메틸화는 초기 배발달 과정의 정상적인 발달과 프로그램된

본 논문은 농촌진흥청 아젠다사업(과제번호 200901FHT010305535)에서 연구비를 지원 받았습니다.

<sup>†</sup>Corresponding author : Phone: +82-63-620-3535, E-mail: kog4556@korea.kr

유전자 발현에 중요하다.

Genome 전체적인 DNA 메틸화의 상세한 해석은 초기 배발달 과정을 이해하는데 필요하다. 그러나 착상 전 초기 배발달 과정의 genome 전체적인 DNA 메틸화 패턴의 조사는 5-methyl cytosine 항체를 이용한 면역 염색이 주로 이용되었고(Dean 등, 2001; Santos 등, 2002), 최근에는 조직과 세포 내 메틸화 가변 영역(tissue-dependent and differentially methylated region, T-DMR)의 genome-wide DNA 메틸화 분석은 D-REAM 방법이 마우스와 human에서 개발되어 이용되고 있다(Yagi 등, 2008). 어젯든 가축인 소, 돼지에서 genome-wide DNA 메틸화 분석의 한계가 있기에 부분적으로 genome 내 repetitive 영역의 DNA 메틸화 해석을 하고 있다. 다수의 결과들이 착상 전 체외수정란 및 체세포 복제란 초기 배발달 동안에 satellite, PRE-1 등 genome 내 반복 영역의 메틸화 변화를 보고하고 있다(Kang 등, 2001, 2005; Wee 등, 2007).

최적 체외배양 시스템은 초기 배발달 메커니즘을 이해하는데 중요한 전략의 하나로 배양 조건에 있어 삼투압 또한 중요한 착상 전 초기 배발달에 영향을 미치는 중요한 요인의 하나이다. 최근 우리는 고 삼투압 배양 조건이 돼지 체세포 복제와 체외 수정란(IVF)의 배반포 발달율을 증가와 세포사를 감소를 보고하였다(Im 등, 2005; Hwang 등, 2007). 본 연구에서는 이러한 고 삼투압 체외배양 조건에서 생산된 돼지 복제 배반포에 있어 genome 내 반복 영역인 Pre-1과 satellite 영역의 DNA 메틸화 양상을 bisulfite sequencing 방법으로 조사하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 난자의 회수와 체외성숙

별도의 표기가 없는 한 본 실험에 사용된 시약은 Sigma사(St. Louis, Mo, USA) 제품을 사용하였고, 실험에 사용된 동물 관리 및 절차는 국립축산과학원 동물복지위원회(Suwon, Korea)의 승인을 얻었다. 난자는 도축장에서 도축된 돼지의 난소에서 10 ml 주사기에 18G 주사침을 이용하여 직경 3~6 mm 난포로부터 채취하였다. 채취된 난자는 실험현미경 하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균일한 것만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다. 체외성숙에 사용된 배양액은 0.1%(w/v) polyvinyl alcohol(PVA), 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM cysteine, 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 40시간 동안 체외성숙을 실시하였다.

### Donor Cell의 준비

핵이식에 사용된 체세포는 8개월령 돼지(Immerge Bio Therapeutics Inc. Cambridge, MA, USA)의 귀에서 생체 조직 절편으로부터 채취되었고, 15%(v/v) FBS와 75 ug/ml antibiotics가 함유된 DMEM(Gibo-BRL, Grand Island, NY, USA)으로 배양하였다. 세포는 3~4회 계대배양 후 10% dimethylsulfoxide가 함유된 DMEM에 동결보존 후 용해 공여세포로 핵 이식에 사용하였다.

### 체세포 복제란의 생산

성숙된 난자는 4분간 0.1%(w/v) PVA와 0.1%(w/v) hya-

luronidase가 포함된 PBS에서 교반에 의해 준비되었다. 색조가 균일하고 제 1극체가 확인된 난자만을 선별하여 제 1극체와 주변의 세포질을 약 1/3 정도 흡입하여 제 2 감수분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 탈핵을 시도하였다. 모든 micromanipulation 과정은 3 mg/ml BSA and 5 ug/ml cytochalasin B가 포함된 TCM-199에서 실시하였다. 난자들은 39°C에서 15분 동안 10 ug/ml의 Hoechst33342의 염색으로 제핵이 확인되었다. 제핵 후 난자들은 donor cell의 핵이식까지 3 mg/ml BSA가 포함된 TCM-199에서 실시되었다. 전기 자극을 통하여 균형적인 세포융합을 위해 핵이식 난자들은 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM HEPES가 포함된 0.3 M mannitol 용액과 함께 fusion chamber의 0.2 mm 직경 와이어 전극(간격 1 mm) 사이에서 BTX Electro Cell Manipulator 2001(BTX, San Diego, CA, USA) 이용 2DC 전류 1.2 kV/cm를 30  $\mu$ /sec 동안 유도하여 융합시켰다. 융합된 난자들은 6일 동안 PZM-3에서 배양되었다. Genomic DNA 추출용 배반포들은 PBS로 4회 이상 세척 후 처리구당 10개를 회수 사용 전까지 -80°C에 보관하였다.

### In Vivo 배반포의 회수

In vivo 배반포 회수를 위하여 7~11개월령 Landrace 처녀돈을 이용, 과배란처리를 회수하였다. hCG 주사 후 24~36시간에 인공수정시켰고 hCG 주사 후(배란 후 약 120시간) 168시간에 도축 후 생식기를 회수하였다. PBS를 이용 자궁 관류하여 회수된 수정란은 30분 내에 37°C의 0.1%(w/v) PVA를 첨가한 Tyrode's lactate-HEPES를 이용하여 세척 Genomic DNA 추출 전까지 -80°C에 보관하였다.

### Bisulfite Sequencing에 의한 DNA 메틸화 해석

우선 Genomic DNA 추출은 Ko 등(2005)의 방법에 준하여 추출하였고, sodium bisulfite genomic sequencing은 Clark 등(1994)의 방법에 따라 수행하였다. 간략히 bisulfite genomic sequencing 방법을 설명하면 EcoRI 처리된 약 2  $\mu$ g의 genomic DNA가 0.33 M NaOH에서 37°C에서 15분 동안 denature시켰고, pH 5의 2M의 sodium metabisulfite와 0.5 mM의 hydroquinone 농도로 55°C에서 12시간 빛을 차단하여 반응시켰다. Bisulfite 처리된 샘플은 Wizard DNA clean-Up system(Promega, Madison, WI)을 이용하여 정제하였다. Bisulfite 처리된 DNA는 AmpliTaq Gold(Applied Biosystems)을 이용하여 PRE-1과 satellite 영역을 Table 1의 primer set을 이용하여 증폭시켰다. PCR 증폭 조건은 94°C에서 10분간 pre-denaturation 반응 후, 94°C에서 30초, annealing 온도는 56°C에서 30초, 72°C에서 1분간 43회 반응시켰고, 72°C에서 10분간 신장시켜 증폭 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel 전기영동 하여 증폭 여부를 확인한 후 증폭된 PCR 산물의 염기 서열은 pGEM T-easy vector system(Promega, USA)을 이용하여 PCR 산물을 클로닝한 후, Bigdye terminator와 ABI 377 자동 염기 서열 분석 장치(PE Applied Biosystems, U.S.A.)를 이용하여 염기 서열을 결정하였다. 결정된 염기 서열은 BLAST를 이용하여 상동성을 검색하였고, DNA Sequence Navigator(PE Applied Biosystems, USA) program을 사용하여 분석하였다.

결 과

배양 조건에 따른 Satellite 영역의 DNA 메틸화 변화

우리는 최근에 고 삼투압 배양 조건이 돼지 체세포 복제(pNT)와 체외수정란(IVF)의 배반포 발달율을 증가시키고 세포사를 감소 결과를 발표하였다(Hwang 등, 2007). 다양한 삼투압 체외배양 조건에 따른 satellite 영역의 DNA 메틸화 변화를 genomic DNA의 bisulfite 처리와 sequencing법에 의하여 분석하였다. Satellite 영역은 229 bp의 길이로 총 12개의 CpG site가 있다. *In vivo* 배반포의 satellite 영역의 DNA 메틸화는 65개 CpG중 39개가 메틸화 되어 60.00%가 메틸화 되었다(Fig. 1). PZM-3(270 mOsmol)만으로 배양한 체세포 복제 배반포의 메틸화는 43.10%(50/116)에 비하여 NaCl과 sucrose(PZM-3, 320 mOsmol)의 처리구에서는 각각 56.12%(78/139), 55.06%(49/89)로 PZM-3에서만 배양한 배반포에 비하여 약간의 고 메틸화를 나타냈다. 이들 결과는 고 삼투압에서 배양 된 복제배반포의 메틸화는 *in vivo* 배반포에 가까운 유사한 고 메틸화 경향을 보이고 있다.

배양 조건에 따른 PRE-1 영역의 DNA 메틸화 변화

다음으로 다른 삼투압 처리 배양 조건에 따른 PRE-1 영역의 CpG DNA 메틸화 변화를 분석하였다. PRE-1 영

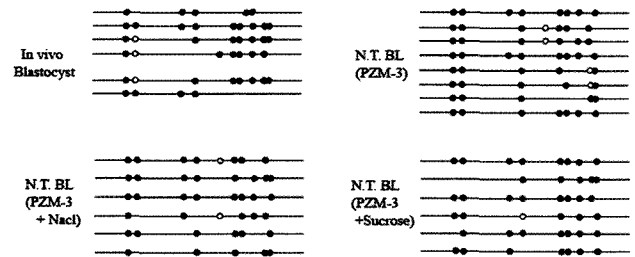


Fig. 2. Methylation profiles of the s PRE-1 sequence of pig embryos produced *in vivo* or SCNTs. Each string indicates a 148 bp fragment of PRE-1 sequences amplified by PCR from bisulfite-converted genomic DNA and has 8 CpG sites. Blank and filled circles indicate unmethylated and methylated CpGs, respectively.

역은 148 bp로 8개의 CpG site를 포함하며, 다수의 polymorphism이 존재하고 있다. *In vivo* 배반포의 PRE-1 영역의 CpG DNA 메틸화는 92.68%로 고 메틸화 되었다(Fig. 2). 또한, PZM-3, NaCl 그리고 sucrose 처리구의 메틸화는 각각 92.73%, 96.76%, 97.5%로 처리구 간의 변화 없이 고 메틸화를 나타냈다. 이들 결과는 PRE-1 영역 DNA 메틸화 상태는 삼투압 변화를 준 체세포 배양 조건에 변화없이 안정적으로 메틸화에 감수성이 낮고 체세포 복제에 따른 DNA 메틸화에 의한 epigenetic 변화가 없음을 의미하고 있다.

Table 1. Primer sequences for bi-sulfite PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	Fragment size (bp)
PRE-1	F:TTAACAAATCCAACATAAAAAACCATA R:GTTGGTTTATMTAGAGTTATAGTAA	148
Satellite region	F:AAAATCTAAACTACCTCTAACTC R:TITGTAGAATGTAGTTTTTGAAG	229

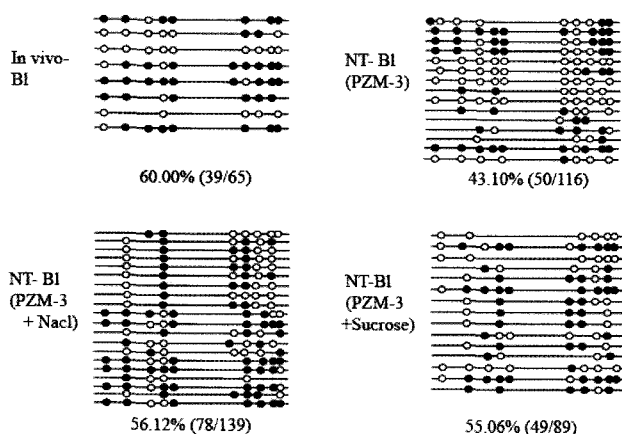


Fig. 1. Methylation profiles of the satellite DNA sequence of pig embryos produced *in vivo* or SCNTs. Each string indicates a 229bp fragment of satellite sequences amplified by PCR from bisulfite-converted genomic DNA and has 12 CpG sites. Blank and filled circles indicate unmethylated and methylated CpGs, respectively. Percent methylation (mean) is the proportion of methylated CpG sites relative to the whole CpG sites.

고 찰

본 실험은 고 삼투압 체외배양 조건에 따른 genome 내 반복 영역 중 heterochromatic satellite 영역과 euchromatic PRE-1 영역의 DNA 메틸화의 변화를 분석하고자 실시하였다. 착상 전 초기배발달 과정은 급격한 탈메틸화에 의한 genome-wide DNA 메틸화 reprogramming이 일어나는 시기이다(Reik 등, 2001; Ko 등, 2005). Satellite 영역에 있어서 우리의 실험 결과, 고 삼투압(320mOsmol) 배양 조건의 복제(50.31%과 52.92%)와 *In vivo* 배반포(56.96%)에서 비교적 고 메틸화 되었고(Fig. 1), PRE-1 영역에 있어서 *in vivo* 배반포와 체세포 복제 배반포의 고 삼투압 배양 조건인 NaCl 그리고 sucrose 처리구는 각각 92.68%, 96.76%, 97.5%로 satellite 영역보다 훨씬 고 메틸화 되어 있었다(Fig. 2). 이들 결과는 돼지 satellite 영역에서 *in vivo*와 복제 배반포의 1.4%와 3% 저 메틸화와 PRE-1 영역의 저 메틸화 결과를 나타낸 보고와 마우스 satellite 영역의 저 메틸화와 결과와는 다른 경향을 보였다(Kang 등, 2001; Kim 등, 2004). 이들 결과는 이전의 보고와 달리 착상 전 초기 배반포에서 satellite 반복 영역이 genome-wide한 탈메틸화 범주에 포함되지 않는 genome 영역 특이적인 안정된 영역임을 시사하고 있다. Imprinting 유전자들의 특이적인 site들 또한 초기 embryogenesis 동안에 메틸화 상태를 유지하고 급격한 탈메틸화에 저항한다(Kafri 등, 1993).

우리의 이전 결과에서는 고 삼투압의 배양 조건에 따른 세포사의 감소와 높은 배반포 발달 결과를 보였고(Hwang 등, 2007; Park 등, 2008), imprinting 유전자인 H19 T-DMR 영역의 *in vivo* 배반포와 유사한 메틸화 경

향을 나타냈다(Park 등, 2008). 이러한 결과는 이질염색질인 heterochromatin 염색질이 매우 응축되어 있어 유전자 발현이 억제되는 영역인 satellite 반복 영역과 euchromatic PRE-1 영역의 체외배양 조건의 변화와 체세포 복제에 따른 genomic DNA 메틸화 저항성을 가진 reprogramming 변화없이 안정적인 genome 영역임을 시사하고 있다.

Genome-wide DNA 메틸화 프로파일의 적절한 형성은 정상적인 분화와 발달 연구의 기초 자료가 되기 때문에 복제 동물의 발달을 평가하는데 이용될 수 있을 것이다. 또한, 복제 기술이 급후 생물학의 발전과 재생 의학에서 응용, 축산 자원의 확보, 개량 등 많은 분야에서 인류에 공헌할 기술이란 것은 의심의 여지가 없기에 복제에서 나타나는 여러 가지 이상 중 특히 초기 배발달 과정의 상세한 epigenetic 메커니즘을 이해하는 것이 중요할 것이다.

### 인용문헌

- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994): High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22:2990-2997.
- Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W (2001): Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13734-13738.
- Hwang IS, Park MR, Moon HJ, Shim JH, Kim DH, Yang BC, Ko YG, Yang BS, Cheong HT, Im GS (2007): Osmolarity at early culture stage affects development and expression of apoptosis related genes (Bax- $\alpha$  and Bcl-xl) in preimplantation porcine NT embryos. *Mol Reprod Dev* 75:464-471.
- Im GS, Yang BS, Lai L, Liu Z, Hao Y, Prather RS (2005): Fragmentation and development of preimplantation porcine embryos derived by parthenogenetic activation and nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 71:159-165.
- Kafri T, Gao X, Razin A (1993): Mechanistic aspects of genome-wide demethylation in the preimplantation mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10558-10562.
- Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Kim HN, Chang WK, Lee KK, Han YM (2001): Typical demethylation events in cloned pig embryos. *J Biol Chem* 276:39980-39984.
- Kim SH, Kang YK, Koo DB, Kang MJ, Moon SJ, Lee KK, Han YM (2004): Differential DNA methylation reprogramming of various repetitive sequences in mouse preimplantation embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324:58-63.
- Ko YG, Nishino K, Hattori N, Arai Y, Tanaka S, Shiota K (2005): Stage-by-stage change in DNA methylation status of *Dnmt1* locus during mouse early development. *J Biol Chem* 280:9627-9634.
- Kremensky M, Kremenska Y, Suzuki M, Imai K, Takahashi S, Hashizume K, Yagi S, Shiota K (2006): Epigenetic characterization of the CpG islands of bovine *Leptin* and *POU5F1* genes in cloned bovine fetuses. *J Reprod Dev* 52:277-285.
- Ohgane J, Wakayama T, Kogo Y, Senda S, Hattori N, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K (2001): DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* 30:45-50.
- Park MR, Hwang IS, Shim JH, Moon HJ, Kim DH, Ko YK, Seong HH, Im GS (2008): Effect of osmolarity of culture medium on imprinting and apoptotic gene expression in miniature pig nuclear transfer embryos. *Reprod Dev Biol* 32(3):183-191.
- Reik W, Dean W, Walter J (2001): Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293:1089-1093.
- Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W (2002): Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 241:172-182.
- Shiota K, Kogo Y, Ohgane J, Imamura T, Urano A, Nishino K, Tanaka S, Hattori N (2002): Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells* 7:961-969.
- Shi W, Haaf T (2002): Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 63:329-334.
- Yagi S, Hirabayashi K, Sato S, Li W, Takahashi Y, Hirakawa T, Wu G, Hattori N, Hattori N, Ohgane J (2008) DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) in mouse promoter regions demonstrating tissue-specific gene expression. *Genome Res* 18:1969-1978.

(접수일자: 2010. 8. 30 / 채택일자: 2010. 9. 15)