

PIV 및 TFM 측정 기법을 이용한 예쁜꼬마선충의 동적 패턴 가시화 연구

박진성* · 윤병환** · 신현정†

Characterization of Dynamic Behavior of *C. elegans* in Different Physical Environments

Jin-Sung Park, Byoung Hwan Yun, and Jennifer H. Shin

Abstract. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is an undulatory nematode which exhibits two distinct locomotion types of swimming and crawling. Although in its natural habitat *C. elegans* lives in a non-Newtonian fluidic environment, our current understanding has been limited to the behavior of *C. elegans* in a simple Newtonian fluid. Here, we present some experimental results on the penetrating behavior of *C. elegans* at the interface from liquid to solid environment. Once *C. elegans*, which otherwise swims freely in a liquid, makes a contact to the solid gel boundary, it begins to penetrate vertically to the surface by changing its stroke motion characterized by a stiffer body shape and a slow stroke frequency. The particle image velocimetry (PIV) analysis reveals the flow streamlines produced by the stroke of worm. For the worm that crawls on a solid surface, we utilize a technique of traction force microscopy (TFM) to find that the crawling nematode forms localized force islands along the body where makes direct contacts to the gel surface.

Key Words: *Caenorhabditis elegans* (예쁜꼬마선충), swimming locomotion (수영 이동 방식), crawling locomotion (기어 다니는 이동 방식), non-Newtonian fluid (비뉴토니안 유체), particle image velocimetry (PIV 분석), traction force microscopy (TFM 분석).

1. 서론

자연계에 존재하는 수많은 생명체들은 비뉴토니안 유체계(non-Newtonian fluidic system)의 특성을 나타내는 다양한 생태 환경 속에서 각자 저마다의 고유한 이동 방식(locomotion)을 이용해 생존하고 있다¹⁾. 최근, 비뉴토니안 유체 실험계에서 진행된 일련의 실험 결과들에 의하면, 이러한 생명체들은 복잡 유체 물성과의 상호작용을 통해 단순 뉴토니안 유체계에서 예측된 행동 패턴과는 매우 구별되는 특이적 행동 양상을 출현할 수 있음이 보고된 바 있다.

일례로써, 긴 편모(flagellum)의 파동 운동을 이용해 수영하는 정자(sperm)는 물보다 높은 점도(viscosity)를 갖는 점탄성(viscoelastic) 매질에서 효과적으로 수영하기 위해서 자신의 편모 파동 진폭을 더 크게 만든 hyper-active 운

동 양상을 출현한다.²⁾ 또한, 긴 원통형 몸체를 지닌 선충(nematode)의 경우에 정자와는 달리 점탄성 비뉴토니안 유체계에서는 수영 효율이 감소하지만, 이들의 실제 서식 환경인 물기를 함유한 진흙 환경을 모방한 흐르는 유체 알갱이 계에서는 그 이동 속도가 급격히 증가되는 현상이 관찰되었다.^{3, 4)}

이러한 새로운 생명 현상의 발견에 힘입어 최근 비뉴토니안 유체계 물성과의 상관관계 속에서 생명체의 이동 메커니즘을 이해하고자 다양한 시도가 이루어지고 있지만, 비뉴토니안 물성계가 갖고 있는 복잡성으로 인해 그 근본적인 이해에 도달하기까지는 아직까지는 많은 기술적 한계들을 갖고 있다. 본 논문에서는 비뉴토니안 유체계 속에서 이러한 생명체의 거동 현상을 이해하고자 하는 노력의 일환으로써, 다양한 물리적 매질 환경의 변화에 따른 예쁜

† Department of Mechanical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon 305-701, Republic of Korea, j_shin@kaist.ac.kr

* Department of Mechanical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon 305-701, Republic of Korea, jinsungp@kaist.ac.kr

** Department of Mechanical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon 305-701, Republic of Korea

꼬마선충의 이동 패턴 변화 양상을 시각화할 수 있는 실험 기법을 소개하고자 한다.

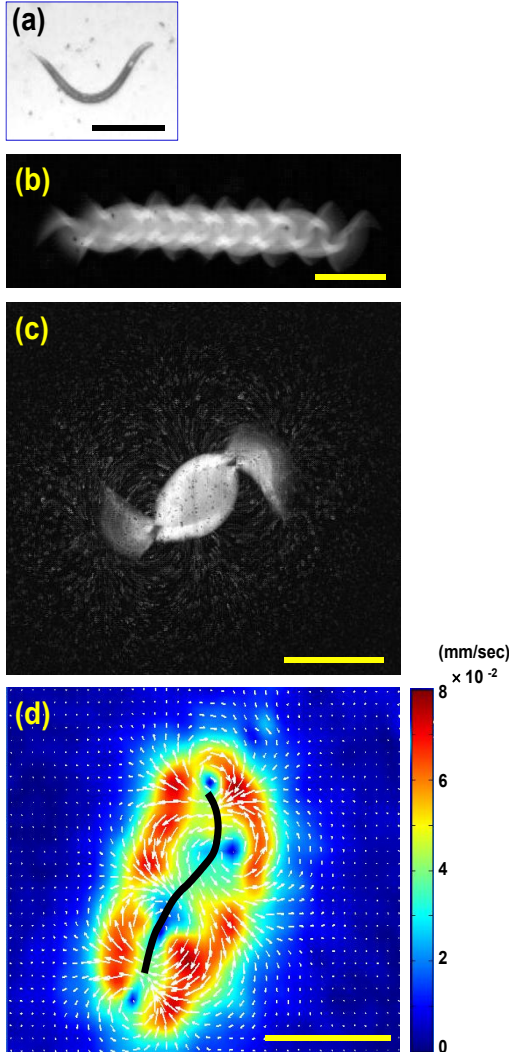


Fig. 1. A typical swimming behavior of a nematode and a reconstruction of flow field produced by its stroke motion: (a) a snapshot image of a swimming nematode in 0.4% MC solution, (b) overlapping image showing the moving displacement of a swimming nematode for 2.4 sec. (c) Streamlines of flow revealed by tracking the particles and (d) one representative image of the velocity vector components. Here, the body skeleton of a nematode is indicated by black line in (d) and all scale bars are 500 μm .

Particle image velocimetry (PIV) 측정 기법은 유체의 흐름을 반영하는 수많은 작은 알갱이들의 시간에 대한 위치 변화 양상을 추적해서 유체의 흐름 패턴을 재구성하는 대표적인 유체 공학적 분석 기법이다. 본 연구에서는 전통적인 PIV 분석 기법을 응용하여, 유체 속에서 수영하는 예쁜꼬마선충의 파동 운동에 의해 형성되는 주변 유체의 유선(flow streamline)에 대한 공간적 속도 벡터장의 구현을 시도하였다. 유체 속에서 자유롭게 수영하던 예쁜꼬마선충이 젤 (gel) 경계면에 도달하게 되면, 젤 내부로 파고들고자 하는 과정에서 강한 추진력을 얻기 위해 자신의 몸통의 구부러짐 강도(bending stiffness)를 증가시킬 뿐 아니라 파동 패턴에 변화를 주는 현상을 실험적으로 관찰하였다. 또한, PIV 분석 기법에 기반을 둔 traction force microscopy (TFM) 측정 기법을 이용하여 확인한 젤 표면 위에서 기어다니는 예쁜꼬마선충에 의해 형성하는 견인력(traction) 패턴 양상 분석을 통해, 견인력의 분포가 선충의 머리 주변과 몸통 하단부의 수직 방향으로 집중되어 있는 특성을 확인하였다.

2. 실험 방법

본 실험에 사용된 예쁜꼬마선충(N2, wild type)은 Caenorhabditis Genetics Center (CGC, Univ. of Minnesota, USA)로부터 구입하였으며, 몸통 길이가 약 1 mm 정도까지 자란 성체(몸통 두께 $\sim 60 \mu\text{m}$)를 이용하였다. 예쁜꼬마선충의 이차원적 수영 운동성은 두 장의 얇은 현미경용 커버 글라스(dimension: $22 \times 60 \text{ cm}^2$, Fisher Scientific)를 이용해 만든 높이 약 $120 \mu\text{m}$ 의 챔버 내부에서 관찰하였다. 이때, 예쁜꼬마선충이 수영하는 챔버 내부 용액으로 4% methylcellulose (MC) 고분자 용액을 사용하였는데, 이 용액은 예쁜꼬마선충의 파동 운동에 의해 매질에 전달되는 100 s^{-1} 이하의 전단율 (shear rate) 범위 내에서 일정한 점도값($\eta_s \sim 20 \text{ mPaS}$)을 갖는 점탄성 매질이다.

PIV 분석을 위해 polymethyl methacrylate (PMMA) 알갱이($5 \mu\text{m}$ diameter, volume fraction(ϕ) ~ 0.1 %)들을 MC 용액에 섞어 사용하였으며, 실체 현미경 (SMZ 800, Nikon) (AxioCam MRm, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 1 Hz의 속도로 촬영하였다. TFM 측정을 위해 최근 Tseng에 의해 개발된 ImageJ의 plugin을 이용하여 분석하였다.⁶⁾

3. 실험 결과

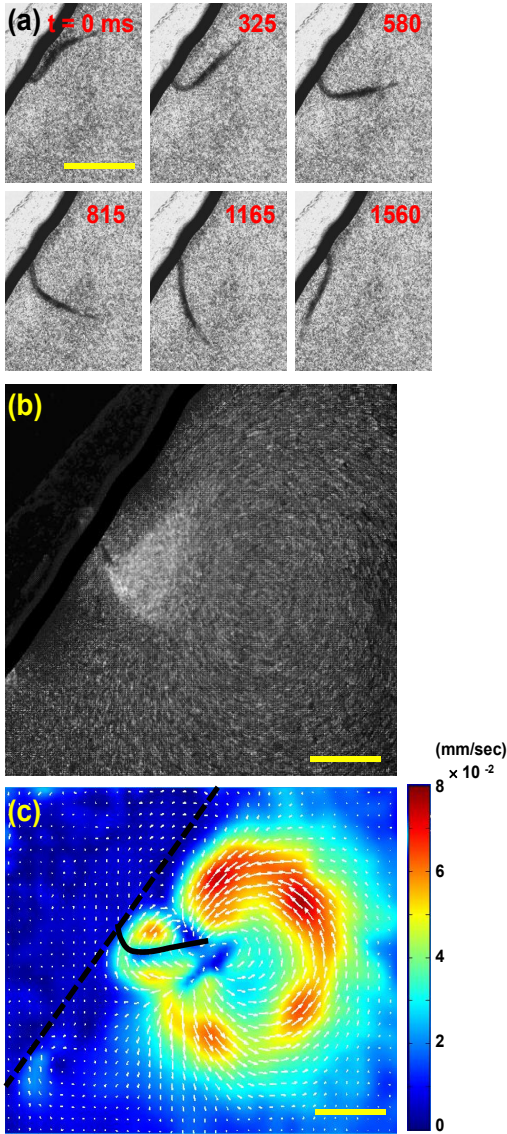


Fig. 2. Penetration dynamics of *C.elegans* at soft gel boundary: (a) Sequential images of *C. elegans* penetrating into the gel boundary, (b) processed image showing flow streamlines, and (c) its reconstructed image for the velocity vector components from (b). Here, the gel boundary and the body skeleton of a nematode are each drawn in dotted and solid line in (c), respectively. All scale bars are 500 μ m.

3.1 젤 경계면 근처에서 출현한 예쁜꼬마선충의 특이적 수영 패턴

예쁜꼬마선충은 자신의 긴 몸통을 이용해 주기적인 파동을 형성하면서 이동 추진력을 얻는 대표적인 낮은 레이놀즈 값($Re < 1$) 을 갖는 수영체(swimmer)이다. Fig. 1(a)는 4% MC 고분자 점탄성 매질에서 수영하고 있는 예쁜꼬마선충의 모습을 보여준다. 일반적으로 용액 속에서 수영하는 예쁜꼬마선충은 진행의 수직 방향으로 진동하는 파동 운동의 에너지를 대부분 손실하고, 약 25% 미만의 낮은 운동 효율에서 진행한다. 이러한 운동 에너지 손실은 예쁜꼬마선충의 촬영 영상들을 한꺼번에 겹쳐 놓은 fig. 1(b)에서 나타나는 바와 같이, 예쁜꼬마선충의 이동 궤적이 선명하게 보이질 않고 진행의 수직 방향에서 흐트러져 있음을 통해 확인할 수 있다. 예쁜꼬마선충의 수직 방향에서의 파동 운동에 의해 형성된 주변 유체의 유선 패턴은 절반 진동 주기 동안의 영상들을 겹쳤을 때 보여지는 PMMA 알갱이들의 흐름 경로를 통하여 보여진다 (Fig. 1(c)). 예쁜꼬마선충의 몸통 중심부를 기준으로 서로 반대 방향의 소용돌이가 형성되고 있다. 또한, PMMA 알갱이들의 순간 속도 성분을 계산하는 것에 의해 예쁜꼬마선충의 파동 운동에 의해 주변에 형성된 유속의 벡터장을 그려 볼 수가 있는데, 낮은 레이놀즈 값의 수영체의 특성상 벡터장 형성 영역이 대략 자신의 몸통 길이에 해당하는 공간적 영역 범위 이내에 국한되어 있음을 볼 수 있다 (fig. 1(d)).

MC 고분자 용액 속에서 자유롭게 수영하던 예쁜꼬마선충이 2% 아가 젤로 막혀 있는 챔버 경계 면에 도달하게 되면, 이후 매우 특이적인 행동 패턴을 출현한다 (Fig. 2(a)). 첫째, 젤 경계 면에 닿은 후에, 예쁜꼬마선충은 자신의 머리 부분을 경계면에 수직으로 꽂꽂이 세운 후 파고드는 행동을 출현한다. 둘째, 젤 경계면에 수직으로 박혀 있는 예쁜꼬마선충의 머리 부분을 제외한 나머지 몸통은 몸통의 구부러짐 강도(bending stiffness)가 증가되어, 막대기 처럼 곧게 뻗은 채 노를 젓는 것과 같은 방식으로 운동한다. 셋째, 일반적인 수영 운동시 측정된 예쁜꼬마선충의 파동 주기가 약 2 Hz정도인 반면에, 이와 같이 파고드는 운동성을 출현하는 과정에서 뻗뻗한 몸통을 이용한 파동 진동수는 약 0.3 Hz로 매우 느려졌다.

이와 같은 예쁜꼬마선충의 파동 운동성의 변화에 따른 주변 유선 벡터장 패턴의 형성 영역은 자유로운 수영 이동시에 형성된 벡터장 형성 면적보다 약 2배 이상 넓어져 있음을 확인할 수 있다 (Fig. 2(c)). 이와 같이 유체로부터 젤 매질로 옮겨가는 과정에서 필요한 강한 추진력을 얻기 위하여 예쁜꼬마선충은 자신의 몸통 물성과 파동 패턴의 형

태를 효과적으로 선택할 수 있음을 말해 준다.

3.2 TFM 측정 분석: 젤 위를 기어다니는 예쁜꼬마선충의 비등방적 추진력 패턴 형성

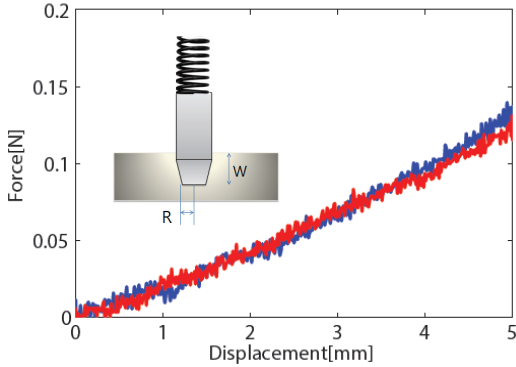


Fig. 3. Measurement of elastic modulus of gelatin gel. This graph shows the loading curves for 3% gelatin gel and inset is a schematic of indenter used in this experiment.

예쁜꼬마선충은 젤과 같은 고체 표면 위에서 예쁜꼬마선충의 기어 다니는 이동 방식을 사용한다. 현재까지 기어 다님 운동성에 관한 연구는 주로 아가(agar)를 굳혀 만든 젤 표면 위에서 이루어졌는데, 이 위에서 예쁜꼬마선충은 유체 속에서 비교해 볼 때 느린 진동 주기(-0.5 Hz)를 갖지만, 100%에 가까운 높은 운동 효율과 함께 이동하는 것으로 알려져 있다. 이는 아가 젤 표면 위를 덮은 물막에 의해 예쁜꼬마선충이 젤 표면 아래 방향 쪽으로 강한 압력을 받으면서 이동하기 때문인데, 이러한 상황에서 예쁜꼬마선충에 의해 전달된 견인력에 의해 젤 표면에 영구적인 변형이 발생하기 때문에 TFM 측정을 위한 매질로는 적합하지 않다. 따라서, 본 연구에서는 아가 젤 대신에 젤라틴 (gelatin) 젤을 이용하여 예쁜꼬마선충에 의한 견인력 형성 패턴을 분석하고자 시도하였다.

먼저, 실험에 사용된 3% 젤라틴 젤의 탄성계수는 인덴터 (indenter) 장비를 이용하여 측정하였는데(Fig. 3), 이를 위해 사용된 계산식은

$$E = \frac{3}{\pi^2 R} \frac{(n \sum_{i=1}^n W_i F_i - \sum_{i=1}^n W_i \sum_{i=1}^n F_i)}{(n \sum_{i=1}^n W_i^2 - (\sum_{i=1}^n W_i)^2)}$$

과 같으며, 여기서 R 은 인덴터 측정시 사용한 팁(tip)의

반지름, W 는 젤을 수직 방향으로 눌렀을 때 이동한 인덴터 측정자의 z 축 이동 변위, F 는 인덴터에 의해 젤 표면에 가해진 힘, 그리고 n 은 반복 측정 횟수를 의미한다. 실험실 온도 25 °C에서 측정된 3% 젤라틴 젤의 탄성계수 값은 약 4,100 Pa이다.

Fig. 4(a)는 TFM 분석을 위해 젤라틴 젤 표면에 심겨져 있는 형광 자석 알갱이들에 대한 형광 현미경 이미지를 보여 주고 있다. 실험에서 관찰된 젤라틴 젤 표면 위를 기어 다니고 있는 예쁜꼬마선충(Fig. 4(b)에서의 주황색 실선)의 동력학적 특징은 다음과 같다. 첫째, 점탄성 젤라틴 젤 표면 위에서 예쁜꼬마선충은 매우 불규칙적인 과동 패턴을 출현하며, 아가 젤 위에서 측정된 운동성과 비교해 볼 때 매우 낮은 운동 효율로 이동한다. 이는 예쁜꼬마선충에 의해 형성된 견인력에 따른 젤 표면 변형과 이를 원상태로 되돌리고자 하는 젤라틴 젤의 복원력 간의 경쟁에 따른 결과로 이해할 수 있다. 둘째, 예쁜꼬마선충에 의해 형성된 젤 위의 견인력 분포는 몸통 주변으로 균일하게 형성되어 있지 않다. Fig. 4(d)의 TFM 분석 이미지에서 보여지는 것처럼, 진행 방향인 예쁜꼬마선충의 머리 주변에 상대적으로 강한 힘의 분포가 형성되어 있다. 반면에, 예쁜꼬마선충의 꼬리를 포함한 몸통 하단부에서는 몸통의 수직 방향으로 넓게 힘이 분포되어 있는 양상을 확인할 수 있다.

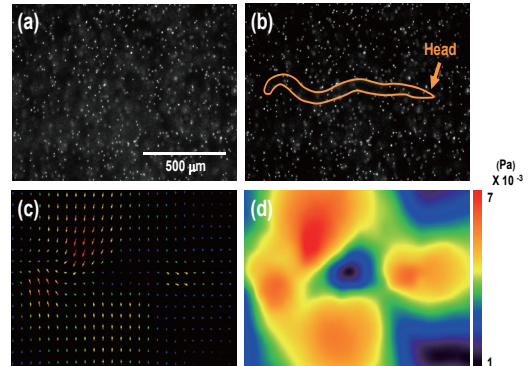


Fig. 4. Measurement of traction force exerted by a crawling *C. elegans*: (a) Reference frame of 3% gelatin substrate with embedded fluorescent microspheres (1µm diameter). (b) Deformation of gel substrate due to force exerted by a crawling *C. elegans* (orange line). (c) Vector fields calculated by comparing the distribution of microspheres between (a) and (b). (d) Field of traction stresses, rendered as a color image after mapping the magnitude of stress.

최근 이와 매우 유사한 연구 결과가 뱀을 이용한 실험 연구에서 보고된 바 있다. 뱀은 선충과 동일한 방식으로 자신의 몸통을 따라 파동 물결을 만들어 내면서 이동하는데, 이 때 바닥 표면과의 마찰력을 최소화하기 위해 자신의 몸통 일부만 바닥에 접촉시키는 방식으로 강한 견인력을 형성한다는 사실이 확인되었다⁸⁾.

4. 결 론

본 연구에서는 비뉴토니안 유체계에서 출현하는 예쁜꼬마선충의 행동 특이성을 이해하기 위한 한 방편으로 유체 역학 분야에서 광범위하게 사용되고 있는 PIV 분석 기법을 적용해 유체 또는 점탄성 매질의 경계면에서 수영하는 예쁜꼬마선충의 추진력 형성 패턴의 분석을 시도하였다. 예쁜꼬마선충은 자신의 몸통의 물성과 파동 형태를 효과적으로 바꿈으로써 강한 추진력을 얻을 수 있음을 확인하였다. 또한, PIV 분석법을 응용한 TFM 측정은 점탄성 젤 표면 위를 기어다니는 예쁜꼬마선충의 동적 특성을 선명하게 나타내 보여 주었다. 기존에 이론적으로 예측된 것과는 달리, 예쁜꼬마선충은 자신의 몸통의 국부적인 부위에 힘을 집중시키는 방식으로 견인력을 형성하고 있었다.

예쁜꼬마선충은 직진 이동 모드 이외에도 후진 이동이나 “U-turn” 과 같은 방향 전환을 위한 다양한 이동 모드를 출현한다. 향후 본 측정 기법을 이와 같은 예쁜꼬마선충의 이동 모드 방식이 적용함으로써 다양한 비뉴토니안 유체 환경 속에서 출현하는 힘의 패턴의 차이에 대한 가시화를 시도하고자 한다. 이러한 연구는 생명체의 운동 메커니즘과 비뉴토니안 유체계의 물성의 상관 관계를 이해할 수 있는 중요한 단서를 제공해 줄 것으로 기대되는 바이다.

후 기

본 연구는 한국연구재단을 통해 미래창조과학부의 일반연구지원사업(2013R1A1A2012420)과 NRF-2010-00006925의 지원으로 수행됨.

참고문헌

- (1) Fauci, L and Dillon, R. 2006, “Biofluidmechanics of reproduction”, *Annu. Rev. Fluid Mech.*, Vol. 38, pp. 371~394.
- (2) Smith, D. J., Gaffney, E. A., Gadelha, H., Kapur, N. and Kirkman-Brown, J. C. 2009, “Bend propagation in the flagella of migrating human sperm, and its modulation by viscosity”, *Cell Motil. Cytoskeleton*, Vol. 66, pp.220~236.
- (3) Jung, S. 2010, “Caenorhabditis elegans swimming in a saturated particulate system”, *Phys Fluids*, Vol. 22, pp.031903.
- (4) Shen, X. N. and Arratia, P. E. 2011, “Undulatory swimming in viscoelastic fluids”, *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 106, pp.208101.
- (5) Thielicke, W. and Stamhuis, E. J., “PIVlab-time-resolved digital particle image velocimetry tool for matlab”, <http://PIVlab.blogspot.com>
- (6) Tseng, Q. *et al.*, 2012, “Spatial organization of the extracellular matrix regulates cell-cell junction positioning”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 109, pp.1506~1511.
- (7) Munevar, S., Wang, Y., and Dembo, M. 2001, “Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts”, *Biophys. J.*, Vol. 80, pp. 1744~1757.
- (8) Hu, D. L., Nirody, J., Scott, T., and Shelley, M. J. 2009, “The mechanics of slithering locomotion”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 109, pp.10081~10086.
- (9) Kim, D., Park, S., Mahadevan, L., and Shin, J. H. 2011, “The shallow turn of a worm”, *J. Exp. Biol.*, Vol. 214, pp.1554~1559.