

최 종  
연구보고서

Yeast two-hybrid 시스템을 이용한 웅성 생식세포의  
세포사 제어에 의한 웅성 불임의 극복에 관한 연구  
Study on apoptosis in germ cell to treat of male infertility using  
yeast two-hybrid system

건국대학교

농림수산식품자료실



0015552

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "Yeast two-hybrid 시스템을 이용한 음성 생식세포의 세포사 제어에 의한 음성 불임의 극복에 관한 연구"과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 24일

주관연구기관명 : 건국대학교

총괄연구책임자 : 김 진 회

제1협동연구기관명 : 경상대학교

제1협동연구책임자 : 서 한 극

제2협동연구기관명 : 진주산업대학교

제2협동연구책임자 : 민 계 식

# 요 약 문

## I. 제목

Yeast two-hybrid 시스템을 이용한 음성 생식세포의 세포사 제어에 의한 음성 불임의 극복에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

정소에서 정자를 만드는 과정은 매우 복잡하고 정교한 기전에 의해 이루어지고 있다. 또한 다른 조직에 비해 ROS을 제거 할수 있는 antioxidant enzyme들이 많이 존재하지만, 현실적으로 환경호르몬 등의 chemical에 노출되었을 때 생식세포독성이 나타나고 있다. 이러한 이유로 미성숙된 정자의 발생, 정자수의 급격한 감소, 그리고 무정자증으로 인해 가족에서는 종축의 생산능력의 저하로 인한 생산성의 감소라는 문제가 대두되고 있으며, 사람에서의 남성 불임은 점차 심각한 수준에 도달되고 있어 불임 치료제 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구과제에서는

- ▶ apoptosis을 일으키는 Bax라는 유전자를 이용하여 이것의 anti-dote을 정소 생식세포유래의 cDNA library에서 yeast two-hybrid을 이용하여 광범위하게 스크리닝하고
- ▶ 동정한 유전자의 발현 및 신호전달경로를 해석함으로써 세포수준에서의 유전자의 발현 해석 및 기능을 연구하며,
- ▶ 동정된 유전자에 대한 Transgenic mouse을 작성하여 in vivo에서의 기능연구와 검정을 수행하고자한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

Yeast two-hybrid system을 이용한 ROS억제 유전자의 클로닝 및 신규유전자의 특성 규명

- 유전자의 클로닝

- ◆ Bax 발현 벡터의 작성
- ◆ Yeast two-hybrid system의 구축
- ◆ Yeast two-hybrid cDNA library 구축
- ◆ cDNA Library구축
- ◆ 유전자 클로닝
- ◆ cDNA Microarray
- ◆ BAC genomic library screening
- 유전자산물의 특성규명
  - ◆ Genomic DNA 클로닝
  - ◆ Northern Blot분석에 의한 mRNA의 발현분석
  - ◆ Western Blot분석에 의한 신규유전자 단백질의 발현분석
  - ◆ 신규유전자에 대한 항체제작
  - ◆ Immunohistochemistry
- 유전자의 특성규명
  - ◆ 신규유전자의 구조분석
  - ◆ Promoter 분석용 vector구축
  - ◆ 신규유전자의 in vitro transfection 효율검정 및 조건의 확립

**ROS 억제 유전자의 발현제어 및 유전자산물의 정보전달 경로의 해석에 의한 유전자의  
기능과 특성해석**

- 유전자의 클로닝
  - ◆ 유전자 클로닝
  - ◆ Proteomics를 이용한 정자의 수정능획득에 따른 단백질 변화분석
  - ◆ BAC genomic library screening
  - ◆ 형질전환동물생산을 위한 Vector작성
  - ◆ 형질전환동물생산
- 유전자산물의 기능 및 특성규명
  - ◆ Genomic DNA 클로닝
  - ◆ Northern Blot분석에 의한 신규유전자mRNA의 발현분석
  - ◆ Western Blot분석에 의한 신규유전자 단백질의 발현분석

- ◆ 신규유전자에 대한 항체제작
- ◆ Immunohistochemistry
- ◆ 세포에의 유전자 도입을 위한 유전자 발현 벡터의 작성
- ◆ Stable transfectant의 작성
- ◆ siRNA에 의한 유전자의 발현억제
- ◆ in situ hybridization
  
- 유전자의 기능 및 특성규명
  - ◆ 신규유전자의 구조분석
  - ◆ Promoter 분석용 Reporter Vector구축
  - ◆ Transfection Reporter Assay
  - ◆ In vivo Expression 분석을 위한 조건확립
  - ◆ Trans-acting 조절인자 분석

### Transgenic mouse의 작성 및 모델동물을 이용한 *in vivo* 에서의 신규유전자의 기능연구

- 형질전환동물의 생산 및 정자의 능력평가
  - ◆ 형질전환동물생산 및 분석
  - ◆ 정자의 motility 및 viability에 대한 ROS 억제유전자의 분석: 형질전환동물 유래정자의 동결 및 용해에 따른 정자의운동성 평가 및 Viability를 MTT assay로 비교 분석
  
- 형질전환동물의 분석
  - ◆ Northern Blot분석에 의한 신규유전자 mRNA의 발현분석
  - ◆ Western Blot분석에 의한 신규유전자 단백질의 발현분석
  - ◆ Immunohistochemistry
  - ◆ 형질전환동물 유래정자에 고발현유전자의 siRNA를 in vitro 배양시스템에서 transfection에 의한 유전자의 발현억제에 따른 정자의 운동성 평가분석 및 Viability를 MTT Assay로 비교 분석

# SUMMARY

## I . Title

**Study on apoptosis in germ cell to treat of male infertility using yeast two-hybrid system**

## II . Goals and significance of this research

Spermatozoa are terminally differentiated and specialized cells. Deficient of any major transcriptional or translational activity in sperm is generally known, however a recent published evidence shows that sperm are able to conduct major nuclear gene expressions using 55S mitochondrial ribosomes during their residence in the female reproductive tract until fertilization. Mature sperm cells are released from the testis with tightly supercoiled, transcriptionally inert DNA. In addition, they are unable to exhibit progressive motility, but acquire these abilities during their passage through the epididymis. These processes are referred to as maturation; other maturational changes include completion of nuclear condensation and changes in the expression and distribution of molecules on the cell surface. Therefore, freshly ejaculated sperm cells are incapable of fertilization, and must spend some time in a suitable environment in order to capacitate.

Capacitation in all mammals involves shedding of the sperm plasma membrane, followed by hyperactivity of the tail, attachment to cumulus cells, and adhesion to the zona pellucida for fertilization. These changes must be achieved by modifications of existing proteins, rather than changes in gene expression, and are modulated by signals from the sperm's environment or may occur spontaneously. As in many mammals, sperm capacitation in pigs requires  $Ca^{2+}$  and bicarbonate; the sequence of events for pig sperm capacitation is similar to that of other species. Especially, tyrosine phosphorylation of mouse, human, bull, and hamster sperm proteins is closely associated with capacitation.

We performed a detailed examination of alternations in protein levels in

capacitated sperm cells. Our study had two main aims: (i) To confirm the presence of capacitation-related proteins in pig spermatozoa; and (ii) to investigate the relationship between cytochrome c and the capacitation-promoting signal. We used mature pig sperm cells that had been exposed to capacitating medium (CM), and exhibited characteristics of the capacitation, to identify whether or not phenotypic changes were accompanied by compositional changes in the sperm head cellular compartment and tail hyperactivity. Sperm protein extracts were separated by 2-D gel electrophoresis and analyzed using MALDI-TOF mass spectrometry. Processing of the protein extracts ensured clearly-resolved spots and reproducible analyses.

### **III. Contents and scope of the project**

In this study, we show that transplanted porcine male stem cells efficiently produce spermatocytes that differentiate into haploid cells *in vivo*, but fail to develop into mature sperm cells. We employed adult ICR mice as recipient animals, following busulfan treatment to reduce the endogenous germ-cell numbers. The resulting seminiferous tubules contained only spermatogonia and Sertoli cells in a single cell layer. Therefore, donor cells could easily reach the basement membrane, without the migration through multiple layers of spermatogenic cells, as a first step toward successful colonization. Testes at 1-8 weeks after germ-cell transplantation displayed significant PKH deposits, whereas control testes were rarely stained. In this mouse model of developing germ-cell-depleted testes, grafted porcine donor cells survived at least 150 days following transplantation and were associated closely with or were incorporated into the testis without significantly affecting seminiferous tubule architecture. The cells differentiated primarily into spermatids *in vivo*.

PKH-26 is a lipophilic dye developed by Horan and Slezak. It is the longest-lasting member of a family of cell-surface markers used for multiple purposes, such as *in vivo* tracking of various types of cells. No side effects on cell adhesion or proliferation are evident. In the user manual, the supplier warrants a half-life of elution

from rabbit red blood cells of "greater than 100 days in vivo". Previous studies have indicated that maturation from porcine spermatogonia to mature sperm cells in vivo takes about 60 days. Accordingly, our study design was based on a maximum follow-up of 60 days, which seemed a reasonable period of time for producing mature sperm cells from porcine male stem cells. The possibility remained that PKH brightness might decrease markedly, since dividing cells would share the stained surface of the parent cells. To estimate the number of donor cells and donor-cell-derived progeny cells, we performed slide PCR using porcine-specific primers for upk2. In contrast to the PKH-26 data, slide PCR revealed the presence of differentiated porcine male germ cells, suggesting that a combination of PKH staining and slide PCR is a very reliable tool for the detection of foreign donor cells in the absence of specific antibodies.

Efferent duct transplantations induce widespread distribution of donor stem cells across seminiferous tubules. Mouse Sertoli cells have been shown to support extensive migration and long-term survival of transplanted porcine donor cells, but the donor cells showed no further maturation. In the present study, transplanted cells were widely dispersed across the basement membrane of seminiferous tubules, particularly at longer post-transplantation times, with a tendency to spread out and cover as large an area of the seminiferous tubules as possible. However, global distribution of donor cells across the seminiferous tubules was not always uniform. For instance, some areas of the seminiferous tubules did not contain any transplanted germ cells on the basement layer or within the tubules, whereas large patches of donor cells were present in other areas of the same seminiferous tubules. These data suggest that unequal distribution of grafted donor cells across seminiferous tubules is caused by differences in barrier integrity for the migration of grafted donor cells from the lumen to the basement layer.

The major finding of this study is the formation of porcine spermatocytes in mouse testes, suggesting that the ICR mouse testis does not completely prevent porcine spermatogenesis. For these transplantations, donor male germ cells were isolated from day-5 or day-7 postnatal porcine testes and the germ cells were selected on laminin dishes. Therefore, the donor germ cells may be pro-spermatogonia or authentic spermatogonia stem cells. Despite extensive apoptosis in the recipient testes, some male

stem cells differentiated into spermatocytes. This observation is of interest because a previous report did not find any further maturation in the mouse testis. This result may illustrate the difficulty with relying on individual markers to identify donor cells. It is also possible that this discrepancy may be due to the recipient strain or the donor-cell detection methods used. In our study, we estimated the presence of donor cells and donor cell-derived progeny cells using PKH-26 staining and slide PCR. Collectively, our data illustrate the effectiveness of these methods for the identification of transplanted donor cells.

In the testis, *c-kit* and *prml* mRNAs are expressed in differentiating spermatogonia and round spermatids, respectively. Therefore, *c-kit* and *prml* mRNAs were examined to determine the relationship between the survival of donor cells and donor-cell-derived progeny. In addition, at 2-3 weeks post-transplantation, a marked cell-specific increase in apoptosis was observed in meiotic spermatocytes. Apoptotic cells were not detected in control mice testes at 4 weeks following placebo injection. Our data suggest that, for unknown reasons, most porcine donor cells, with a few exceptions, do not differentiate into post-meiotic spermatids, indicating that mouse Sertoli cells do not produce factors that fully support porcine spermatogenesis and spermiogenesis.

Previous studies demonstrated that donor spermatogonial stem-cell engraftment is enhanced when endogenous germ cells are absent because of genetic mutation or removal by ablative strategies. In addition, GnRH administration following germ-cell transplantation into busulfan-pretreated recipients leads to more effective colonization of donor-derived cells by suppressing endogenous spermatogenic events. The best mouse-recipient model identified to date is the dominant white spotting (W) homozygous mutant male, which is congenitally infertile and lacks endogenous germ cells because of a mutation in the *c-kit* receptor tyrosine kinase. Although GnRH administration to busulfan-pretreated mutant mice could serve as an efficient method for the colonizing of donor spermatogonial stem cells, commercially available W and *jsd* animals are expensive and complex breeding strategies are required to generate homozygous mutants. Furthermore, germ-cell-deficient mutants of other species are not available to serve as

transplantation recipients. Therefore, we tested ICR male mice as recipients. Although they do not fully support spermatogenesis of xenografted porcine spermatogonia in their testes, they may provide a valuable experimental model for developing technologies that can be applied and evaluated in other species.

Although some treatments for specific cancers are more likely to result in subsequent infertility, it is very difficult to predict which children will be affected in later life. Therefore, xenogenic spermatogonial transplantation may be an important method for protecting or restoring fertility at early stages. Although the effectiveness of interspecies spermatogonial transplantation is currently unclear, in the future, xenotransplantation of spermatogonia in clinical settings might be a genuine therapeutic possibility for childhood cancer survivors or endangered animal species at risk for infertility.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Overview of the project</b> .....	14
Section 1. Aims and Necessity of the research and development .....	14
<b>Chapter 2. Status of the technology development in Korea and foreign countries</b> .....	17
Section 1. Status and problem of development of the technique in Korea and other countries .....	17
<b>Chapter 3. Research contents and results</b> .....	18
Section 1. Identification and characterization of ROS-inhibiting genes using yeast two-hybrid screening .....	18
1. Construction of Bax-inducible vector .....	19
2. Construction of cDNA library from mouse testes .....	21
3. Structural analysis of nm23-m5 gene .....	23
4. Contribution of nm23-m5 mRNA and analysis of nm23-m5 gene .....	26
5. Proteomic analysis of protein associated in sperm capacitation .....	28
6. Study on developmental ability of xenotransplantation between pig and mouse germ cell after busulfan treatment .....	44
가. Analysis of immunochemistry .....	44
나. Structural analysis of xenotransplantation between pig and mouse germ cell .....	46
다. Analysis of germ cell in xenotransplantation .....	48
라. Analysis of germ cell induced by apoptosis .....	50
7. Structural and functional analyses of nm23-m5 protein in sperm .....	51
제2절 Production of transgenic mice and functional analysis of noble gene .....	52
1. Methods for analysis of transgenic animals .....	53
2. Design, expression, and analysis of shRNA nm23-m5 gene .....	55
3. Verification of shRNA nm23-m5 function as RNAi .....	60
4. Analysis of transgenic mice having shRNA nm23-m5 using microarray .....	64

<b>Chapter 4. Achievement and contribution to related fields .....</b>	<b>66</b>
section 1. Achievement .....	66
section 2. Contribution to related research fields .....	66
<b>Chapter 5. Application of the results .....</b>	<b>67</b>
Section 1. Application-plan .....	67
Section 2. Applicaton-program .....	67
<b>Chapter 6. References .....</b>	<b>68</b>

# 목 차

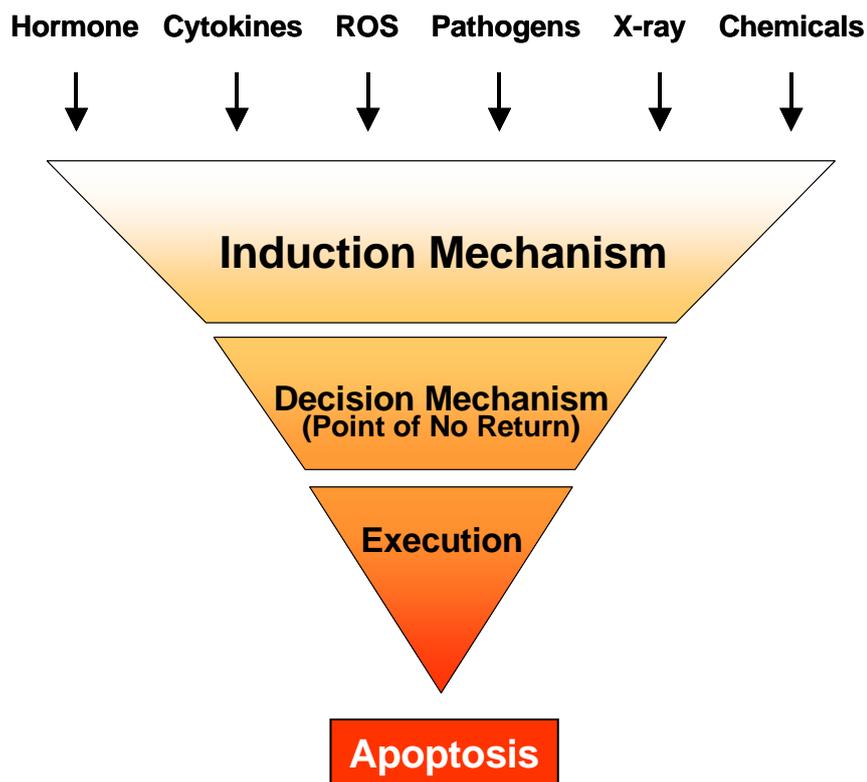
제1장 연구개발 과제의 개요 .....	14
제1절 연구 개발의 목적 및 필요성 .....	14
제2장 국내외 기술개발의 현황 .....	17
제1절 국내·외 관련기술의 현황 및 현재의 연구방향 .....	17
제3장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	18
제1절 Yeast two-hybrid system을 이용한 ROS 억제 유전자의 클로닝 및 신규유전자의 특성 규명 .....	18
1. Bax 발현 벡터의 작성 .....	19
2. cDNA library 및 Yeast two-hybrid system 구축 .....	21
3. Nm23-m5 유전자 구조분석 .....	23
4. Northern Blot분석에 의한 mRNA의 발현분석 및 지놈 구조 분석 .....	26
5. 정자 capacitation에 관련된 단백질의 Proteomics analysis .....	28
6. Busulfan을 활용한 이종간 정원세포 분화능에 대한 연구 .....	44
가. 정소 절편의 형태학적 구조 .....	44
나. 생쥐의 정소에 돼지 정원세포의 이종간 이식후 대리모 정소 절편의 형태학적 구조 .....	46
다. Slide PCR에 의한 대리모 생쥐의 정소에서 돼지 정원세포의 확인 .....	48
라. 대리모 정소에 이식된 정원세포의 사멸 확인 .....	50
7. 정자에서 nm23-m5 단백질의 위치 분석 및 기능적 분석 .....	51
제2절 Transgenic mouse의 작성 및 모델동물을 이용한 in vivo에서의 신규유전자의 기능연구 .....	52
1. 형질전환 동물의 분석을 위한 방법적 접근 .....	53
2. Nm23-m5 유전자에 대한 shRNA 디자인, 발현, 그리고 효율 검증 .....	55
3. RNAi를 활용하여 nm23-m5 발현의 감소로 인한 haploid spermatid의 비정상적인	

발달 .....	60
4. 마이크로어레이 기법을 활용한 정상 생쥐 정소와 nm23-m5 shRNA 형질전환 생쥐 정소간에 유전자 발현 분석 .....	64
<b>제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>66</b>
제1절 기술적 측면 .....	66
제2절 경제 · 산업적 측면 .....	66
<b>제5장 연구개발결과의 활용계획 .....</b>	<b>67</b>
제1절 활용계획 .....	67
제2절 활용방안 .....	67
<b>제6장 참고문헌 .....</b>	<b>68</b>

# 제 1 장 연구 개발과제의 개요

## 제1절 연구개발의 목적 및 필요성

Apoptosis (세포사멸)는 발생과정, 세포의 항상성 유지, 발병 그리고 질병 진행 과정에서 생물학적으로 중요한 역할을 담당하고 있다. 지나치거나 혹은 결함된 apoptosis는 국소 빈혈, 퇴행성 신경 질환, 자가 면역증 그리고 바이러스 감염과 관련된 여러 종류의 발병에 원인이 되며, 종양의 성장과 퇴화에 관련이 있다고 알려져 있다. 세포사멸은 외부로부터 다양한 자극들이 세포 또는 조직에 주어지면 세포는 이를 인식, 결정, 그리고 실행이라는 단계를 거쳐 세포를 사멸 시킬것인지, 아니면 생존시킬것인지를 결정하게 된다.



특히 생식기관중 정소는 난소에 비해 ROS(reactive oxygen species)에 매우 민감하며, 정자 형성과정에서 과도한 ROS에 대한 노출과 부족한 antioxidant enzyme에 기

인하여 정자의 운동성이 둔해지고 또한 미성숙된 정자의 발생율이 증가하게 된다. 점차 산업화가 진행되면서 환경호르몬과 여러 화학물질에의 노출빈도가 증가함으로써 남성의 정액 1 ml에 포함 된 정자수는 50년전 평균 1억 6,000만 마리에서 최근에는 6,600만 마리로 급감되었다고 보도 되었고, 이러한 원인들이 최근 심각하게 대두되고 있는 남성 불임의 주된 원인으로 추정되고 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 정소에서 정자의 형성과정중 ROS를 제거할수 있는 정소 특이적인 antioxidant enzymes과 ROS 억제 관련 인자들을 동정하고 그것들의 기능과 특성을 규명함으로써 spermatogenesis를 분자레벨에서 밝혀내고 이해함으로써 기술적인 측면에서는 Yeast Two-Hybrid 시스템을 이용하여 새로운 인자를 동정할 수 있는 기술력의 확보와 인재를 양성하고, 경제·산업적으로는 Yeast Two-Hybrid 시스템을 이용하여 확보한 인자를 이용하여 정자의 운동성 향상 및 미성숙된 정자의 발생율을 감소시킴으로서 농업 (축산)의 생산성향상에 기여하며, 나아가 사회·문화적으로는 위에서 확보한 기술력과 동정된 인자의 특성과 기능을 규명하여 남성불임 치료제를 개발하는데 목적이 있다.

정소에서 정자를 만드는 과정은 매우 복잡하고 정교한 기전에 의해 이루어지고 있다. 또한 다른 조직에 비해 ROS을 제거 할수 있는 antioxidant enzyme들이 많이 존재하지만, 현실적으로 환경호르몬 등의 chemical에 노출되었을 때 생식세포독성이 나타나고 있다. 이러한 이유로 미성숙된 정자의 발생, 정자수의 급격한 감소, 그리고 무정자증으로 인해 가축에서는 종축의 생산능력의 저하로 인한 생산성의 감소라는 문제가 대두되고 있으며, 사람에서의 남성 불임은 점차 심각한 수준에 도달되고 있어 불임 치료제 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구과제에서는

- ▶ apoptosis을 일으키는 Bax라는 유전자를 이용하여 이것의 anti-dote을 정소 생식세포의 cDNA library에서 yeast two-hybrid을 이용하여 광범위하게 스크리닝하고,
- ▶ 동정한 유전자의 발현 및 신호전달경로를 해석함으로써 세포레벨에서의 유전자의 발현 해석 및 기능을 연구하며,
- ▶ 동정된 유전자에 대한 Transgenic mouse을 작성하여 in vivo에서의 기능연구와 검정을 수행하고자한다.

연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	결 과
Yeast two-hybrid system을 이용한 ROS제거 antioxidant 단백질 및 ROS억제 유전자의 클로닝	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Bax 발현 벡터의 작성</li> <li>◆ yeast two-hybrid system의 구축</li> <li>◆ Yeast two-hybrid cDNA library 작성</li> <li>◆ 유전자 클로닝</li> </ul>	유전자의 클로닝
ROS 억제 유전자의 발현제어 및 유전자산물의 정보전달 경로의 해석에 의한 유전자의 기능 및 특성해석	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 세포에의 유전자 도입에 의한 해석</li> <li>◆ Promotor assay</li> <li>◆ 유전자 발현 벡터의 작성</li> <li>◆ northern and western blot에 의한 해석</li> <li>◆ Stable transfectant의 작성</li> <li>◆ siRNA에 의한 유전자의 발현억제</li> <li>◆ in situ hybridization</li> <li>◆ immunohistochemistry</li> </ul>	유전자의 기능 및 특성파악
Transgenic mouse의 작성 및 모델동물을 이용한 <i>in vivo</i> 에서의 기능연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ transgenic mouse의 작성</li> <li>◆ 특이 유전자 발현제어 약물의 탐색</li> <li>◆ 분자생물학적, 생화학적 분석</li> <li>◆ 병리학적 해석</li> </ul>	<i>in vivo</i> 해석에 의한 유전자의 실용화

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내·외 관련기술의 현황 및 현재의 연구방향

- 기존에 밝혀진 antioxdant enzyme (catalase, superoxide dismutase 그리고 glutathione)들이 ROS에 대한 정자의 운동성 저하를 얼마나 향상 시키는가에 대한 연구. Pasqualotto FF et al. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. Fertil Steril. 73, 459-464, 2000.
- 정자 형성과정중 ROS에 대한 각각의 세포 분화단계에서의 독성 민감도 차이에 대한 연구 등이 이루어지고 있다. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Curr Med Chem. 8, 851-862, 2001.

## 제3장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 Yeast two-hybrid system을 이용한 ROS 억제 유전자의 클로닝 및 신규유전자의 특성 규명

정소에서 정자를 만드는 과정은 매우 복잡하고 정교한 기전에 의해 이루어지고 있다. 또한 다른 조직에 비해 ROS를 제거 할수 있는 antioxidant enzyme들이 많이 존재하지만, 현실적으로 환경호르몬 등의 chemical에 노출되었을 때 생식세포독성이 나타나고 있다. 이러한 이유로 미성숙된 정자의 발생, 정자수의 급격한 감소, 그리고 무정자증으로 인해 가족에서는 종축의 생산능력의 저하로 인한 생산성의 감소라는 문제가 대두되고 있으며, 사람에서의 남성 불임은 점차 심각한 수준에 도달되고 있어 불임 치료제 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 따라서 apoptosis을 일으키는 Bax라는 유전자를 이용하여 정소 생식세포 유래의 cDNA library에서 yeast two-hybrid을 이용하여 광범위하게 스크리닝하고, 동정된 유전자의 발현 및 신호전달경로를 해석함으로써 세포레벨에서의 유전자의 발현 해석 및 기능을 연구하며, 동정된 유전자에 대한 Transgenic mouse을 작성하여 in vivo에서의 기능연구와 검정을 수행하고자한다. Yeast two-hybrid system을 이용한 ROS억제 유전자의 클로닝 및 신규유전자의 특성 규명하기 위해 첫째, Bax에 저항하는 유전자 탐색을 위한 Yeast two-hybrid system의 구축하고자 Bax 발현 벡터의 작성과 Yeast two-hybrid cDNA library을 구축하여 Yeast에서 bax을 이용한 신규유전자클로닝에 대한 시스템을 구축하였다. 둘째, 위에서 구축한 시스템으로부터 클로닝한 신규 유전자의 특성을 파악하고자 신규유전자의 구조분석을 위한 cDNA library제작 및 cDNA의 클로닝, 그리고 신규 유전자의 발현분석을 위하여 genomic DNA을 클로닝하여 Promoter 분석용 vector구축하여 in vitro transfection 효율검정 및 조건을 확립하였다. 셋째, 신규 유전자 산물의 특성을 규명하고 기능을 파악하고자 Northern Blot분석에 의한 mRNA의 각조직에서의 발현양상 western blot 및 immunohistochemistry에 의한 protein의 발현분석을 위한 항체를 제작하였다. 넷째, 본 연구의 최종목표인 세포사멸억제 유전자의 제어기술확보에 의한 웅성정자의 생산능력향상에의 응용에 적합한 연구를 하기 위하여 한편으로 정소에서 세포사멸을 억제하는 유전자를 Yeast two-hybrid에 의해 확보하여 각각의 유전자를 제어할 수 있는 기술을 확보하고, 다른 한편으로는 실질적인 정자의 수정능력에 관련된 기전인 정자의 capacitation시 변화하는 유전자의 스크리닝을 목표로 하였으나, 주지의 사실처럼 정자는 mRNA가 그리 많지 않기 때문에 cDNA microarray에 의한 분석에는 적합하지 않은 것으로 판단되어 부득이

Proteomics기법을 이용하는 실험으로 대체하기로 결정하였다. 따라서, 본 실험에서는 돼지 정자를 회수하여 capacitation을 유발한 정자와 그렇지 않은 정자를 단백질 level에서 비교분석하여 정자의 capacitation에 따른 단백질의 변화를 분석하였다.

### 1. Bax 발현 벡터의 작성

Yeast system에서 bax에 의해 매개 되어지는 apoptosis를 suppression할수 있는 유전자를 screening하기 위해 Bax cDNA를 벡터인 pGilda의 GAL1 프로모터 다음의 Eco RI 부위에 삽입하여 bax의 inducible vector를 구축하기 위하여 먼저 pGilda vector 1  $\mu$ g를 Eco RI 250 U을 넣어 final volume을 50  $\mu$ l로 만들어 overnight으로 반응시켰다. 반응액을 1 % agarose gel에서 전기영동에 의해 완전하게 잘라진 pGilda vector를 분획한다. 분획된 DNA band를 DNA fragment elution kit을 사용하여 agarose gel로부터 정제한 다음 subcloning에 사용하였다. 한편, Bax cDNA의 준비를 위하여 미리 준비한 total RNA 1  $\mu$ g를 사용하여 reverse transcriptase 10 U과 dNTPs, ATP을 넣은 반응액중에서 50분간 반응시켜 first strand cDNA를 합성하고, 이 반응액의 1/10 volume을 사용하여 다음과 같은 primer set를 이용하여 PCR을 수행하였다. RT-PCR product를 pGEM vector에 cloning, Eco RI으로 잘라 위에서 준비한 pGilda vector 2  $\mu$ l, RT-PCR product 5  $\mu$ l, 그리고 ligase 10 U을 사용하여 final volume 10  $\mu$ l 용액을 16°C에서 14시간 반응하여 Amp/LB plate에 plating하여 positive clone을 selection함으로써 Bax cDNA가 삽입된 pGilda Vector를 작성하였다.

Murine 세포주인 RAW 264.7로부터 Trizol을 사용하여 추출한 total RNA 1  $\mu$ g를 사용하여 reverse transcriptase 10 U과 dNTPs, ATP을 넣은 반응액중에서 50분간 반응시켜 first strand cDNA를 합성하고, 이 반응액의 1/10 volume을 사용하여 아래와 같은 조건으로 PCR을 수행하여 Bax cDNA를 증폭하였다(Forward primer: ggaatctgatccgtaattggcc, Reverse primer: aattccatggtacatcatgcatc).

PCR reaction mixture

RT-PCR solution	2 $\mu$ l	
Primer 1 & 2	각각 10 p mol	
dNTPs	5 $\mu$ l	
Taq polymerase	1 $\mu$ l	final 50 $\mu$ l

PCR reaction

94°C	30 sec	
58°C	45 sec	
72°C	45 sec	total 35 cycles

RT-PCR product을 pGEM vector에 cloning하여 Eco RI으로 잘라준비한 cDNA단편 5  $\mu$ l와 pGilda vector을 Eco RI으로 지른 pGilda vector 2  $\mu$ l, 그리고 ligase 10 U을 사용하여 final volume 10  $\mu$ l 용액을 16°C에서 14시간 반응하여 Amp/LB plate에 plating하여 positive clone을 selection함으로써 Bax cDNA가 삽입된 pGilda Vector을 작성하였다 (그림 1).

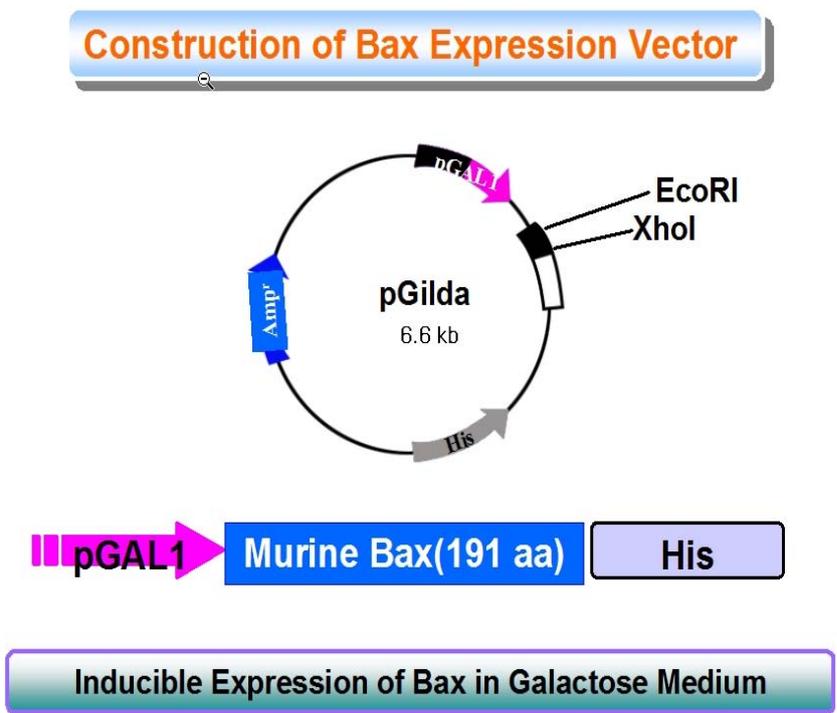


Figure 1. Construction of inducible vector for bax expression in galactose medium

## 2. cDNA library 및 Yeast two-hybrid system 구축

정소조직으로부터 mRNA을 trisol을 사용하여 추출한다음, ADH promotor를 활용하여 cDNA library을 구축하였다. cDNA library구축에는 Invitrogen의 Yeast two-hybrid library packing kit을 사용하여 제조사의 protocol에 따라 titer가 높은 cDNA library을 구축하였다. cDNA library의 제작에는 Stratagene회사의 ZAP-cDNA synthesis kit를 사용하였다. 즉, mRNA template에 poly dT sequence를 지닌 primer를 murine myeloblastic leukemia virus 역전사효소로 처리하여 first strand cDNA를 합성했다. Second strand cDNA는 DNA polymerase I을 이용하여 합성하였다. 다시 T4 DNA polymerase, T4 polynucleotide kinase 및 Xho I 제한효소로 처리하여 양 끝에 EcoR I과 Xho I cohesive end를 지닌 cDNA를 합성하였다. 그 후 Sephacryl S-400 spin column을 이용하여 0.5 kb이상의 크기를 지닌 cDNA fragment를 모은 다음 Uni-ZAP XR vector에 ligation시키고 Gigapack II Gold packaging extract에 package시켰다. 이 cDNA library를 NZY plate내의 SURE 세포에서 배양하여 Uni-ZAP XR library를 제작하였다.

Yeast two-hybrid cDNA library와 Bax발현 벡터를 동시에 yeast에 tranasformation시켜, glucose 배지하에서 배양하면 Bax가 발현되지 않기 때문에 모든 유전자를 가진 yeast가 생존하지만, galactose배지하에서 배양하면 는 Bax가 발현됨으로 Bax에 저항하는 유전자를 가진 yeast만이 생존하고, 저항성이 없는 yeast 는 사멸하는 원리(그림 2)를 이용함으로써 생식 세포의 세포사멸억제 관련유전자를 선발하기 위한 시스템을 구축하였다.

cDNA library는 Stratagene사의 ZAP-cDNA synthesis kit를 사용한다. 즉, 돼지 정소에서 추출하여 정제한 mRNA와 poly dT sequence를 지닌 primer를 murine myeloblastic leukemia virus 역전사효소로 처리하여 first strand cDNA를 합성하고 Second strand cDNA는 DNA polymerase I을 이용하여 합성 중합하였다. 다시 T4 DNA polymerase, T4 polynucleotide kinase 및 Xho I 제한효소로 처리하여 양 끝에 EcoR I과 Xho I blunt-end를 지닌 cDNA를 합성하였다. 그 후 Sephacryl S-400 spin column을 이용하여 0.5 kb이상의 크기를 지닌 cDNA fragment를 모아 Uni-ZAP XR vector에 ligation시키고 Gigapack II Gold packaging extract에 package시켜 NZY plate내의 SURE 세포에서 배양하여 Uni-ZAP XR library를 제작하였다.

돼지정소조직으로부터 total RNA을 Trizol을 사용하여 추출한다음 mRNA만을 분리하여 ADH promotor를 활용하여 cDNA library을 구축하였다. cDNA library구축에는

Invitrogen의 Yeast two-hybrid library packing kit을 사용하여 제조사의 protocol에 따라 약  $1 \times 10^9$  cfu/ml의 titer을 가진 cDNA library을 구축하였다 (그림 3).

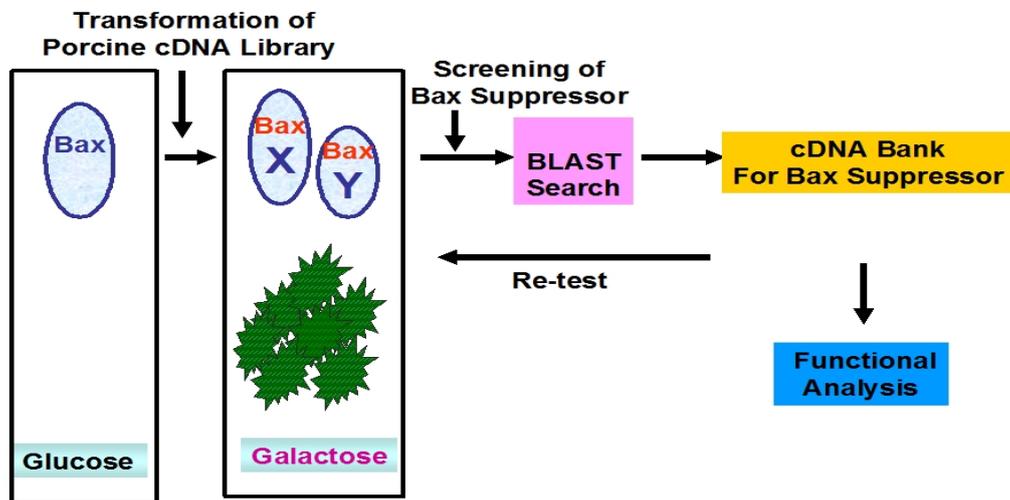


Figure 2. Flowchart for screening of bax-suppressed genes using yeast two-hybrid

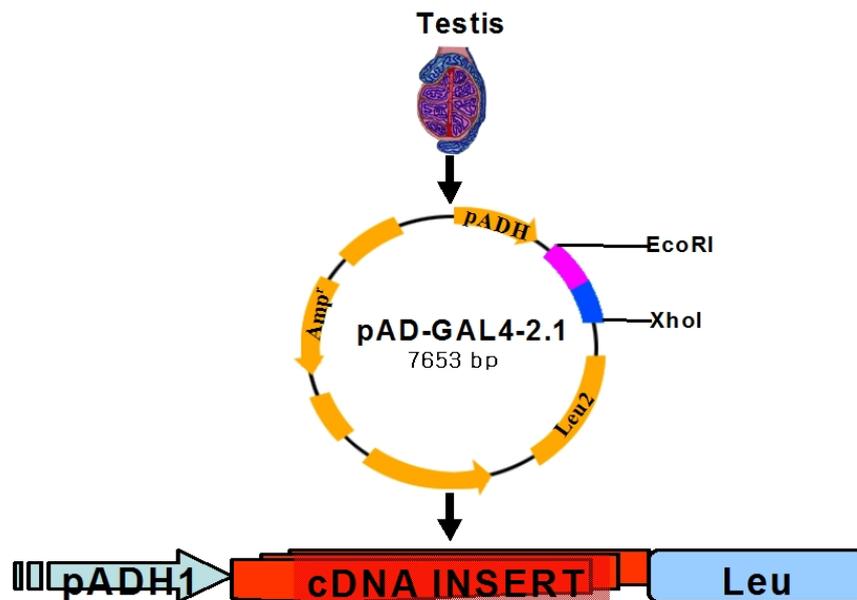


Figure 3. Construction of cDNA library for yeast two-hybrid

위에서 구축한 yeast two-hybrid 시스템을 이용하여 Bax가 발현유도 되어도 살아남는 colony를 스크리닝하기 위하여 먼저, pGilda/Bax vector 1 $\mu$ g과 Phagemid 500  $\mu$ g을 W303 yeast strain에 Litumn Acetate방법으로 Transformation하여 Glucose가 함유된 최소배지하에서 30°C, 3일간 배양하였다. 생성된 colony을 멸균수에 현탁하여 회수한다음 Galactose가 함유된 최소배지에서 1-2일간 배양하여 생성된 colony을 최종적으로 선별하였다. 각각의 colony로부터 DNA을 추출하여 DH5a에 transformation하여 sequencing에 의해 DNA의 염기배열을 결정한다음 database을 사용하여 각각의 유전자에 대한 정보를 획득하였다. 현재까지 동정된 유전자는 단백질합성 및 수식, 해독작용, 산화환원, Ubiquitination등에 관련된 유전자가 59개 동정되었다 (표 1).

**Table 1. Yeat two-hybrid 스크리닝에 의해 동정된 유전자**

유전자그룹	동정된 유전자 수
Ubiquitin	6개 (UBE1, UBE2N etc.)
Protein synthesis	6개 (RPL21, PPS2,RPS3A, RPS15 etc.)
Detoxification	3개 (GSTA2 etc)
Redox/Oxidation	5개 (COX1, COX2, NADH3 etc)
Protein Modification	6개 (Glycosyltransferase etc)
Processing Gene	21개
Unknown gene	12개

### 3. Nm23-m5 유전자 구조분석

스크리닝된 유전자 단편의 염기서열결정에 따라 Data base을 검색하여 이미 알려진 유전자 염기서열과 비교분석을 통해 open reading frame을 확인하고 유전자의 5'-end cDNA의 약 200 bp을 이용하여 mouse cDNA Library에서 Screen을 수행하였다. Screen과정은 150 mm plate당 3만개의 phage plaque가 나타나도록 plating하여 1차, 2차 screening에서 확인된 clone을 pBluescript/SK(+) plasmid로 subcloninig하여 그것의 염기서열을 결정하였다.

ROS억제력을 가진 nm23-N5의 cDNA을 클로닝하여 그것의 염기서열을 결정하였

다 (그림 4). 이 유전자는 open reading frame이 633 bp로 211아미노산을 code하는 것으로 예상된 분자량이 24 kDa, pI가 5.88인 염기성 protein을 code하는 것으로, Nucleotide homology search를 통하여 이 유전자는 Nucleoside diphosphate kinase (NDPK) 활성을 가지고 있는 단백질의 하나인 것을 확인하였다. nm23-N5와 같은 NDPK 활성을 지닌 다른 단백질들과의 homology검색에서는 NDPK 활성에 중요한 부위가 잘 보존되어 있는 것을 확인할 수 있었으며 (바탕색을 칠한 sequences), NDPK consensus motif인 NXXHG(A)SD (밑줄친 sequence) 또한 잘 보존되어 있는 것을 확인할 수 있었다 (그림 5).

```

1
AACACCTGAACAGAGCTGATTTTGGGACCAGGACTCCTGTCGTTGCTGTGGATAACTGGTTAGGAGATTT
71
GAAAATTGTACCGGAAAACGCCAGAAATGGTGGTATCAATGCCCTGCCTCAGATATATGTAGAAAAAAC
141
CTAGCCCTTATCAAGCCAGATGTTGTTGACAAAGAAGAGGAGATACAGGATATTATTCTGGGATCTGGAT
211
TCACCATTATTCAGAGACGGAAACTACACCTGAGCCCCGAGCACTGTAGTAACTTTTATGTGGAGCAGTA
281
TGGGAAAATGTTTTTCCCAAACCTTAACAGCTTATATGAGCTCTGGACCTCTTGTTGCTATGATATTAGCT
351
AGACATAAGGCCATCTCCTACTGGAAAGAACTTATGGGACCAAGTAACAGTTTAGTAGCCAAGGAGACAC
421
ACCCGGACAGCTTAAGGGCGATATACGGTACAGACGAGCTCAGGAACGCACCTTCATGGGAGCAATGACTT
491
CGCTGCCTCAGAGCGAGAGATCAGGTTTATGTTTCCAGCCGTGATTATTGAACCCATTCCAATTGGACAA
561
GCCGCTAAGGACTACATAAACTTGTACGTAGCGCCAACCCTACTTCAAGGACTCACAGAGCTTTGTAAGG
631
AAAAGCCACCAGACCCTTACCTCTGGCTCGCTGATTGGCTGATGAAAAATAATCCCAACAAACCTAAACT
701
TTGTCATTTCCAGTGACAGAAGAGCCTTAGATTGCTCCTCAGAGCGAGAGCCAAGTTACCTTACTGTAA
771
GAAGCCGCTCCCCATGTTCTTTACATTAAAAGCATATATGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figure 4. Nucleotide sequence of nm23-m5

```

nm23-M5  MVVSMPLPQIYV E K T L A L I K P D V V D K . . . E E E I Q D I I L G S G F T I I Q R R K L H L S P E H C S N F 57
nm23-M1  ANS . . . . . E R T F I A I K P D G V Q R G . _ V G E I I K R F E Q K G F R L V G L K F L Q A S E D L L K E H 50
nm23-M2  ANL . . . . . E R T F I A I K P D G V Q R G . _ V G E I I K R F E Q K G F R L V A M K F L R A S E E H L K Q H 50
nm23-M3  ANL F P S A Y S G V N E R T F L A V K P D G V Q R R . _ V G E I V R R F E R K G F K L V A L K L V Q A S E E L L R E H 59
nm23-M4  V R P S S G G P P W P Q E R T L V A V K P D G V Q R R . _ V G T V I Q R F E R R G F K L V G M K M L Q A P E S I L A E H 59
nm23-M6  - M T S I L R S P Q A L Q L T L A L I K P D A V A H P L I L E A V H Q Q I L S N K F L I V R T R E L Q W K L E D C R R F 59
Pigeon   ANC . . . . . E R T F I A I K P D G V Q R G . _ V G E I I K R F E Q K G F R L V G M K F V H A S E E L L K Q H 50
A. thaliana . . . . . M I K P D G V S G N . Y T E E I K T I V V E A G F N I V K E M L T Q L D K E T A S A F 42
Drosophila . . . . . M E I T L A L I K P H V L R N T Y A M Q Q I R . A L I S Q N F T I L D Q K E V C I T K E L S E R F 48
E. coli   . . . . . M A I E R T F S I I K P N A V A K N . V I G N I F A R F E A A G F K I V G T K M L H L T V E Q A R G F 50

nm23-M5  Y V E D Y G K M F F P N L T A Y M S G P L V A M I L A R H K A I S Y W K E L M G P S N S L V A K E T H P D S L R A I Y 117
nm23-M1  Y T D L K D R P F F T G L V K Y M F S G P V V A M V W E G L N V V K T G R V M L G E T N P A D S . . . K P G T I R G D F 107
nm23-M2  Y I D L K D R P F F P G L V K Y M S G P V V A M V W E G L N V V K T G R V M L G E T N P A D S . . . K P G T I R G D F 107
nm23-M3  Y V E L R E K P F Y S R L V K Y M S G P V V A M V W Q W L D V V H A S R A L I G A T D P G D A . . . M P G T I R G D F 116
nm23-M4  Y R D L Q R K P F Y P A L I S Y M S G P V V A M V W E G P N V V H I S R A M I G H T D S T E A . . . A P G T I R G D F 116
nm23-M6  Y R E H E G R F F Y Q R L V E F M T S G P I R A Y I L A H K D A I Q L W R T L M G P T R V F R A R Y I A P D S I R G S L 119
Pigeon   Y I D L K D R P F Y P G L V K Y M S G P I V A M V W E G L N V V K T G R V M L G E T N P A D S . . . K P G T I R G D F 107
A. thaliana Y E E H S S R S F F P H L V T Y M T S G P V L V M V L E K R N A V S D W R D L I G P T D A E K A K I S H P H S I R A L C 102
Drosophila Y A E H K G K F F Y H R L T S F M M S G P S Y A L I L Q S E T C I Q K W R S L L G P T K V F R A V Y S D P N C I R A L Y 108
E. coli   Y A E H D G K P F F D G L V E F M T S G P I V V S V L E G E N A V Q R H R D L L G A T N P A N A . . . L A G T L R A D Y 107

nm23-M5  G T D E L R N A L H G S N D F A A S E R E I R F M F P A V I I E P I P I G Q A A K D Y I N L Y V A P T L L Q G L T E L C 177
nm23-M1  C I Q V G R N I I H G S D S V K S A E K E I S L W F Q P E E L V E . . . . . Y 141
nm23-M2  C I Q V G R N I I H G S D S V E S A E K E I H L W F K P E E L I D . . . . . Y 141
nm23-M3  C N E V G K N V I H G S D S V E S A H R E I A L W F R E A E L L C . . . . . W 150
nm23-M4  S V H I S R N V I H A S D S V D G A Q R E I E L W F Q S S E L L N . . . . . W 150
nm23-M6  G L T D T R N T T H G S D S V V S A S R E I A A F F P D F S E Q R W Y E . . . . . E E E P Q L R C G P V 166
Pigeon   C I Q V G R N I I H G S D S V E S A Q K E I N L W F K P A E L I D . . . . . F 141
A. thaliana G K N S Q K N C V H G S D S T S S A E R E I K F F F K . . D V V S G . . . . . L 135
Drosophila G I S D T R N A C H G S D S E A S A L R E I S I L F P E F . D A A . . . . . V G S R 144
E. coli   A D S L T E N G T H G S D S V E S A A R E I A Y F F G E G E V C P R T R I R A . . . L F G T D G V R N A A H G P D T F 163

nm23-M5  K E K P P D P Y L W L A D W L M K M N P N K P K L C H F P V T E E P 211
nm23-M1  K S C A Q N . w I Y E . . . . . 151
nm23-M2  K S C A H D . w V Y E . . . . . 151
nm23-M3  E D S A G H . w L Y E . . . . . 160
nm23-M4  A D G G H H S S C Y P A . . . . . 162
nm23-M6  H Y S P E E G I H C A A E T G G H K Q P N K T . . . . . 189
Pigeon   K S C A H D . w I Y E . . . . . 151
A. thaliana F S S P P I L L L K L L P L S S I C V L S V M T Y D H . . . . . 162
Drosophila Q A K R E E A . . . . . 151
E. coli   A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T N C T C C I I K 197

```

Figure 5. Alignment between nm23-m5 and other NDPK family

#### 4. Northern Blot분석에 의한 mRNA의 발현분석 및 지놈 구조 분석

Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 방법을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 먼저 Acid guanidinium thiocyanate solution 750  $\mu$ l을 사용하여 조직을 완전히 용해시킨 다음 phenol 750  $\mu$ l과 2 M sodium 용액을 넣고 반응시킨 후, chloroform 150  $\mu$ l을 첨가하여 vortex에 의해 완전히 섞어 on ice에서 15분간 방치하였다. 12000 rpm에서 15분간의 원심분리에 의해 aqueous fraction을 단리한 후, 2-fold volume의 100 % Ethanol을 첨가하여 실온에서 3분간 반응시켜 total RNA를 침전시켰다. 다시 12000rpm에서 10분간 원심분리를 통해 total RNA를 침전시킨 후 소량의 amide 용액에 녹여 260 nm에서 RNA의 양을 정량하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 필요시까지 보관하였다. Northern blotting을 위하여 1% agarose-formamide gel 전기영동으로 RNA를 분획한 다음, 10 x SSC 용액의 모세관 작용을 이용하여 Hybond N+ Membrane에 RNA를 overnight동안 transfer 시킨 후 UV 조사에 의해 RNA를 Membrane에 고정시켰다. 이렇게 고정된 Membrane을 Quick hybridization 용액에서  $68^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 목적으로 하는 gene의 일부분을 RT-PCR에 의해 증폭한 cDNA을 TAKARA Labeling Kit을 사용하여  $^{32}\text{P}$ -dCTP로 labeling한 probe와 반응시킨 후, 0.1 % SDS을 포함하는 2 x SSC용액을 사용하여 실온에서 30분간 1번,  $55^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 2번 washing하여 membrane을 세척한 후, Autoradiography로 bands를 확인하였다.

생쥐 각조직에서의 nm23-N5 mRNA의 발현양상을 검토하기 생쥐의 조직들로부터 total RNA을 Guanidium thiocyanate법으로 분리하여 Northern blot에 의해 분석하였다. nm23-N5 mRNA는 주로 정소조직 특이적으로 발현되고 있으며, 다른조직의 발현은 상당히 제한적인 것으로 나타났다 (그림 6). 한편, 생쥐 조직을 이용한 northern blot분석에서 nm23-N5의 transcript가 2개 존재하는 것으로 확인하였다.

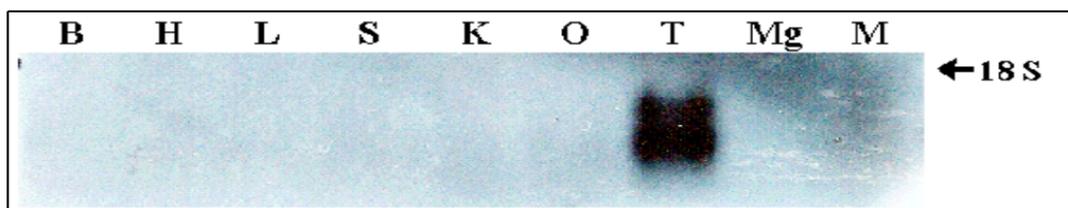


Figure 6. Analysis of nm23-m5 mRNA expression using northern blot

지금까지 동정된 Bax 저항 유전자중 가장 현저한 저항성을 보여주는 유전자인 nm23-N5의 유전자구조를 밝히기 위하여 mouse BAC genomic library에서 nm23-N5에 대한 genomic DNA을 스크리닝하여 이 유전자 구조를 결정하였다 (그림 7). nm23-N5는 6개의 exon과 5개의 intron으로 구성된 총 17 kbp의 유전자로 구성되어 있으며 (그림 7A), Exon/intron boundary에서 consensus splice donor/acceptor site (at/gt)가 잘 보존된 유전자로 밝혀졌다 (그림 7B).

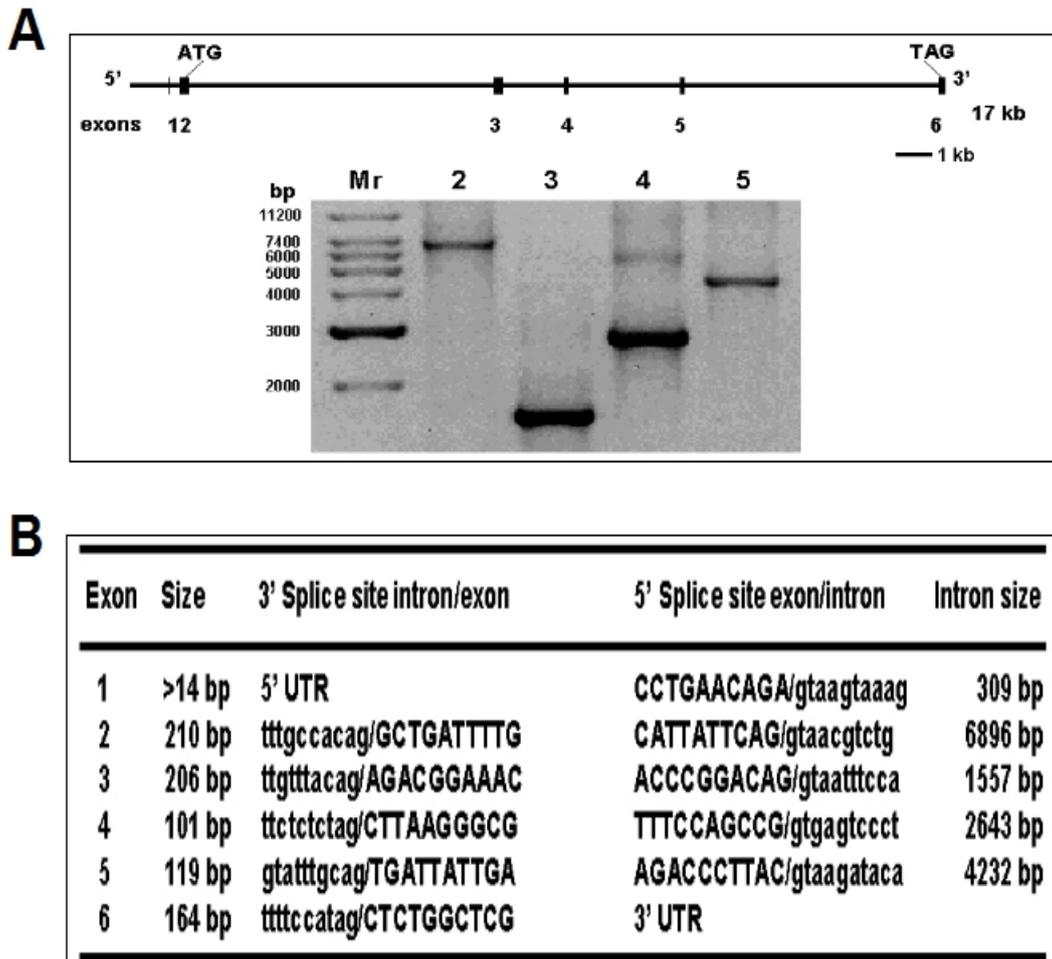
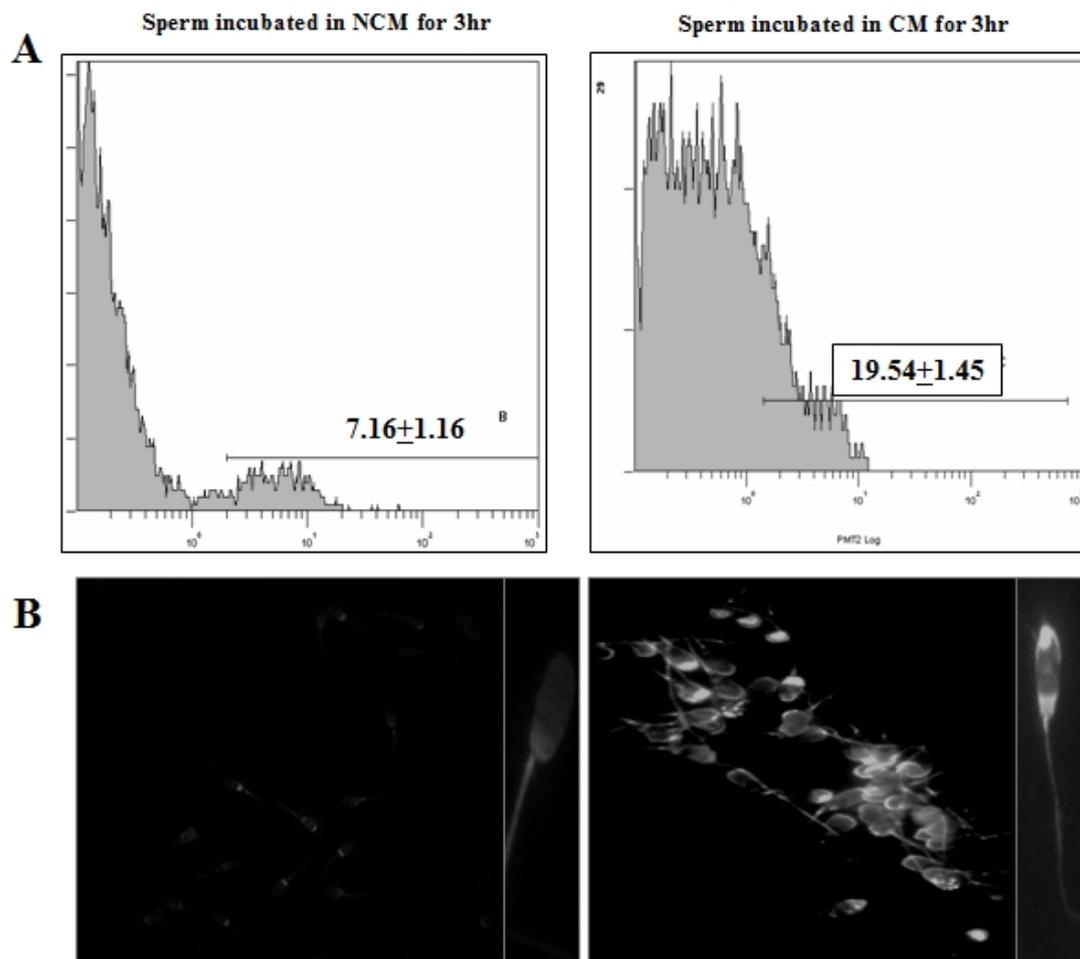


Figure 7. Genomic structure of nm23-m5 gene. A) nm23-m5 gene structure B) Exon/intron boundaries of nm23-m5 gene.

## 5. 정자 capacitation에 관련된 단백질의 Proteomics analysis

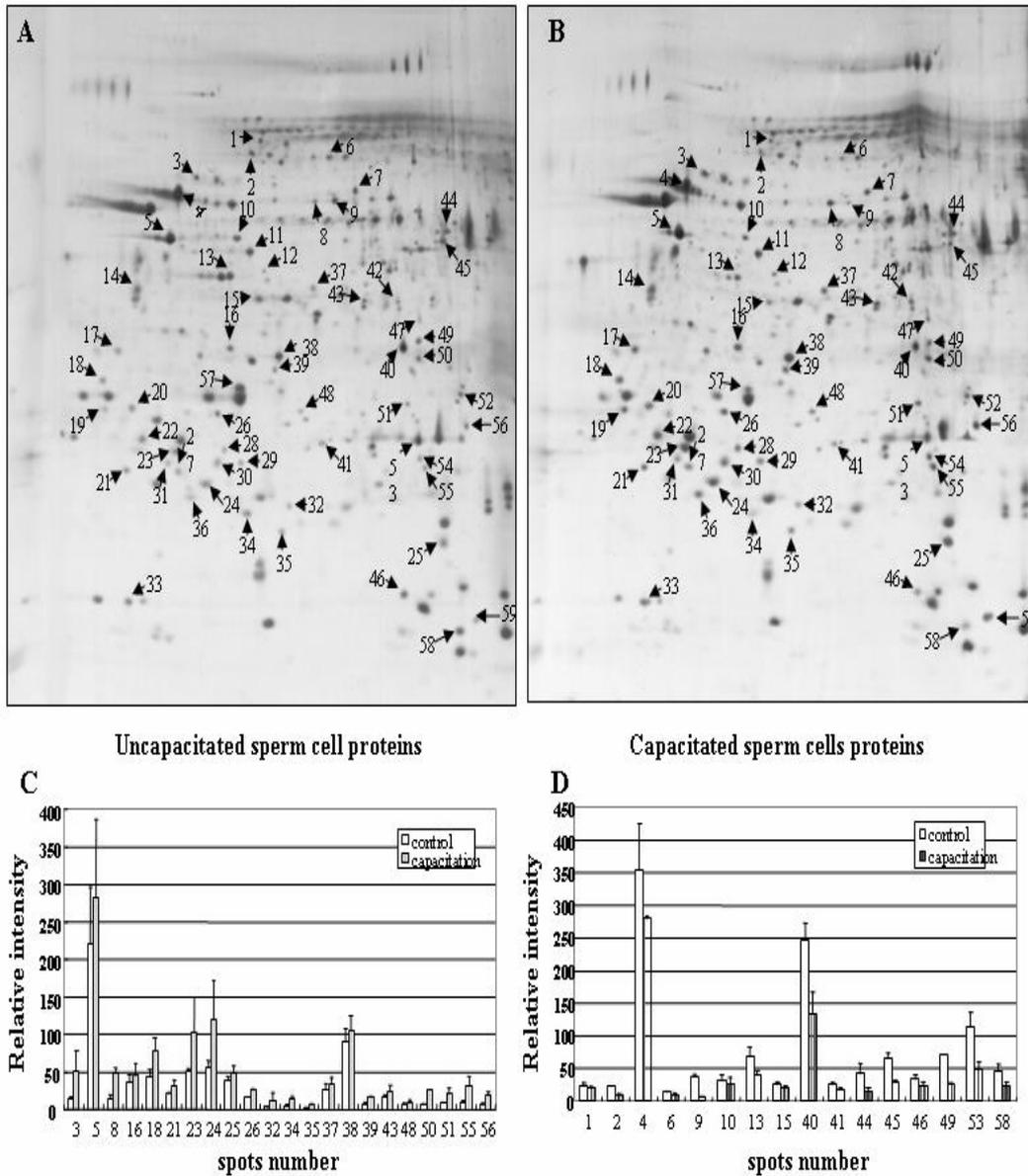
nm23-N5 단백질의 발현을 분석하기 위하여 현재 nm23-N5에 대한 항체를 작성할 목적으로, nm23-N5-GST fusion protein 발현용 vectro인 pGEX에 클로닝하여 DH5a에 transformation을 수행한후, transformant을 얻었다. 이렇게 얻은 transformant을 24시간 LB 배지에서 배양한 후, IPTG에 의해 fusion protein의 발현을 유도하여 glutathione sepharose 4B을 이용한 Affinity column chromatography로 nm23-N5-GST fusion protein을 정제하여 항체작성을 위한 항원으로 사용하였다. 돼지 정자의 capacitation에 따른 단백질의 발현변화를 분석하고자 2-D 전기영동을 수행하여 단백질 spots의 차이를 비교 분석하였다.

본 연구의 최종목표인 세포사멸억제 유전자의 제어기술확보에 의한 음성정자의 생산능력향상에의 응용에 적합한 연구를 하기 위하여 한편으로 정소에서 세포사멸을 억제하는 유전자를 Yeast two-hybrid에 의해 확보하여 각각의 유전자를 제어할 수 있는 기술을 확보하고, 다른 한편으로는 실질적인 정자의 수정능력에 관련된 기전인 정자의 capacitation시 변화하는 유전자의 스크리닝을 목표로 하였으나, 주지의 사실처럼 정자는 mRNA를 생성하지 않는 세포로 cDNA microarray에 의한 분석에는 적합하지 않은 것으로 판단되어, Proteomics기법을 이용하여 분석하였다. 따라서, 본 실험에서는 돼지 정자를 회수하여 capacitation을 유발한 정자와 그렇지 않은 정자를 단백질 level에서 비교분석하여 정자의 capacitation에 따른 단백질의 변화를 분석하였다. 수정 가능한 수태지유래 정자세포를 수정능획득 유도를 위한 CM 처리군 또는 수정능획득이 되지 않는 NCM 대조군을 나누었다. CM 배양 3시간 후 약 20%의 정자세포가 항-CD46 항체와 강한 반응을 나타낸 반면, NCM에서 배양된 초기의 정자세포는 7%만이 약한 반응을 나타내었다 (그림 8A). 이는 CM에서 25mM bicarbonate와 함께 3시간 동안 배양함으로써 일어나는 자발적 첨체반응 (acrosome reaction)은 수정능획득을 거치고 있음을 의미한다.



**Figure 8. Capacitation analysis of pig sperm cells with anti-CD46 antibody using flow cytometry and indirect immunolocalization by immunohistochemistry.** Non-capacitated spermatozoa were incubated in NCM, and capacitated spermatozoa were incubated in CM for 3 hours, then fixed in permeabilizing conditions. A) Flow cytometry analysis. Uncapacitated (left) and capacitated (right) spermatozoa reacted with anti-CD46 polyclonal antibody. B) Indirect immunolocalization of CD46 in non-capacitated (left), and capacitated (right), pig sperm cells. Localization of CD46 was determined using a polyclonal primary antibody, and a secondary goat anti-rabbit IgG conjugated to fluorescein, and visualized using UV illumination. Magnification was x 400.

그림 9에서 보는 것처럼 수정능을 획득하지 않은 정자 (control)와 수정능획득정자 (capacitation)세포에 대한 two-dimensional 전기영동을 실시한 다음 capacitation에 따라 발현이 증가하는 단백질 spot들과 발현이 감소하는 spot들을 확인하여 이들의 control에 대한 상대적 발현 양을 보여주고 있다. Coomassie brilliant blue 염색의 재현성을 평가하기 위하여, 수정능획득(capacitation) 유도이전과 이후에서 돼지의 정자 단백질을 추출한 다음 각 시료를 독립된 2-dimensional 겔 상에서 전기영동 분리하였다. 그 결과 2-D 겔 상의 4-7의 등전점 부위에서 약 680여종의 단백질이 모든 시료에서 일관성 있게 나타났다. 이들 단백질 중 56 spot 부위에서 수정능획득이 유도되지 않은 대조군 정자세포와 수정능획득이 유도된 정자세포(spermatozoa) 사이에 발현된 단백질 양의 변화를 관찰할 수 있었다. 56개의 다른 단백질 spot의 확인된 위치와 상대적 발현강도를 나타내고 있다. 이러한 spot들은 모든 겔 상에서 공통적으로 나타났으며, 발현강도는 수정능획득을 유도하는 조건에서 배양된 정자세포에서 증가하거나 수정능획득이 일어나지 않은 정자세포에서 과발현되었다. 가장 높은 단백질 범위는 spot 1과 4에서 나타났으며 (50%), spot 34에 대한 G1/S-specific cyclin D3는 11% 범위를 보이며 4가지 펩티드와 일치하였다. 한편, 3개의 단백질 spot (7, 11, 52)은 수정능획득이 일어나지 않은 정자세포와 수정능획득 정자세포사이에 유사한 발현양상을 나타내어 2-D 겔 영동에서의 변이성을 극복하기 위한 내부 대조군으로 사용될 수 있음을 의미한다.



**Figure 9. Two-D gel electrophoresis of non-capacitated and capacitated sperm cells.** Total protein was separated by isoelectric focusing in the first dimension, followed by SDS-PAGE gel. A) The numbers indicate protein spots that changed in abundance after capacitation induction. B) Comparing the differences of level of each spot expression. Upper panel shows the spots that are up-regulated, and lower panel shows the spots that are down-regulated, after capacitation induction. All experimental data are presented as means  $\pm$  SD. Each experiment was performed at least three times and subjected to statistical analysis. All increased expression was statistically significant ( $P < 0.05$ ).

전기영동 상에서 capacitation에 따라 발현 양의 차이를 나타내고 있는 spots에 대해서는 in situ trypsin digestion에 의한 protein fragment인 tryptic peptides들의 MALDI-TOF에 의한 질량분석으로 spots을 동정하였다 (표 2). 분석결과, 돼지의 정자세포에 있어서 수정능획득(capacitation) 중 차별적으로 조절되는 것으로 보이는 56개 단백질을 확인하였으며 이들을 이전의 기능적 연구결과에 기초하여 주요한 기능적 특성별로 8 그룹으로 나누어 분석하여 표 2에 나타내었다. : 1) 다른 종의 침체반응(acrosome reaction)에 관여하는 것으로 알려진 단백질 군 [arylsulfatase A (As-A), lactadherin P47, acrosomal protein SP-10 precursor, prohibitin, and DJ-1], 2) 스트레스-연관 단백질 군 [tubulin alpha-2 chain, T-complex protein (CCT 또는 TCP)1-alpha, T-complex protein 1-epsilon, actin, F-actin capping protein, 3) 구연산회로 관련 단백질 군 [vacuolar ATP synthase catalytic subunit A, ATP synthase beta subunit, pyruvate dehydrogenase E1 component, isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase], 4) 항산화 관련 단백질 군 [ferritin heavy chain, glutathione s-transferase Mu5, peroxiredoxin 6, superoxide dismutase Cu/Zn, 5) 프로테아좀 isoform 단백질 군 [proteasome subunit beta type 6 precursor, alpha type 3, alpha type 1, alpha type 6], 6) 인산화 관련 단백질 군 [heat shock protein 70, cAMP-dependent protein kinase, ubiquinol-cytochrome c reductase complex core protein, inositol-1 or 4-monophosphatase, glutathione s-transferase Mu5, pyruvate dehydrogenase E1 component, F-actin capping protein, 7) 세포주기 관련 단백질 군 [G1/S specific cyclin D3, G1/S specific cyclin E1], 8) 기타 단백질 군 [serum albumin precursor, tetratricopeptide repeat protein 14]. 수정능획득이 일어나지 않은 정자세포 대조군과 비교하여 수정능획득 조건에서 배양된 정자세포에서 38개의 단백질 발현이 높은 spot과 18개의 낮은 발현 spot이 나타났다.

Table 2. MALDI-TOF analysis of sperm polypeptides identified by 2-D gel

Spot No.	Protein (Mr)	% co.	Position of the amino acids of the tryptic peptides in the protein sequence
Proteins involved in acrosome reaction in other species			
3	<b>Arylsulfatase A precursor (53776.5)</b>	16	58-72, 114-122, 123-142, 206-213, 302-310
23	<b>Acrosomal protein SP-10 precursor (28156.7)</b>	33	205-220, 221-227, 251-257, 258-264
24	<b>Acrosomal protein SP-10 precursor (28156.7)</b>	31	205-220, 221-227, 251-257, 258-264, 258-265
25	<b>Acrosomal protein SP-10 precursor (28156.7)</b>	29	205-220, 221-227, 251-257, 258-265
45	<b>Lactadherin(45725)</b>	44	132-145, 146-155, 203-214, 215-228, 229-236, 242-259, 267-275, 320-330, 321-330, 331-342, 343-356, <b>378-387</b> , 391-399
48	<b>Prohibitin (29804.2)</b>	43	12-35, 36-41, 84-93, 94-105, 106-117, 118-128, 134-143, 187-195, 220-239, 240-253
58	<b>DJ-1 Protein (19891.2)</b>	20	<b>6-12</b> , 13-27, 49-63, 123-130, 149-156

Stress-related proteins			
4	<b>Tubulin alpha-2 chain (49959.8)</b>	50	65-79, 85-96, 97-105, 106-112, 113-121, 216-229, 230-243, 265-280, <b>312-320</b> , 340-352, 353-370, 394-401
7	<b>T-complex protein 1, alpha (60340.9)</b>	15	19-33, 112-122, 248-264, 434-444, 469-480, 516-526
8	<b>T-complex protein 1, epsilon (59671.4)</b>	22	133-142, 324-340, 382-388, 401-410
9	<b>T-complex protein 1, epsilon (59671.4)</b>	48	90-96, 133-142, 177-183, 233-241, 248-261, 324-340, 382-388, 393-400, 401-410, <b>440-449</b> , 484-496, 503-513, 514-525
13	<b>Actin (41737.0)</b>	43	19-28, 29-39, <b>40-50</b> , 96-113, 197-206, 239-254, 292-312, 313-326
39	<b>F-actin capping protein (33741.5)</b>	41	<b>1-14</b> , 15-23, 58-66, <b>79-92</b> , 95-108, 96-108, 182-195, 226-235, 238-244
40	<b>F-actin capping protein (33741.5)</b>	36	44-52, 87-95, 108-121, 124-137, 125-137, 175-188, <b>198-210</b> , 211-224, 245-254, 255-264, 289-297

Citric acid cycle-related proteins			
2	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (68268.4)	35	45-56, 121-129, 203-212, 221-232, 266-280, 309-323, 354-359, 365-381, 382-388, 514-530, 517-530, 572-580
5	ATP synthase beta chain (56283.8)	41	95-109, 144-155, 213-225, 226-239, 242-259, 265-279, 282-294, 311-324, 325-345, 407-422, 463-480
38	Pyruvate dehydrogenase E1 component (39219.6)	26	37-49, 37-52, 53-68, 309-324, 325-336
43	Isocitrate dehydrogenase (39592.0)	24	101-115, 179-188, 300-316, 317-326, 317-336
50	Malate dehydrogenase (36454.4)	28	67-79, 80-92, 150-157, 221-230, 249-255, 299-310
Antioxidant-related proteins			
32	Ferritin heavy chain (21044.8)	25	11-23(pyroGlu), 55-64, 81-87
35	Glutathione S-transferase Mu 5 (26635.1)	25	5-14, 22-34, 36-46, 73-81, 87-97, 100-111, 140-147, 156-171
41	Peroxiredoxin 6 (24818.7)	14	25-41, 42-53, 54-63, 145-155
46	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (15760.6)	25	10-23, 27-35, 79-90, 115-127

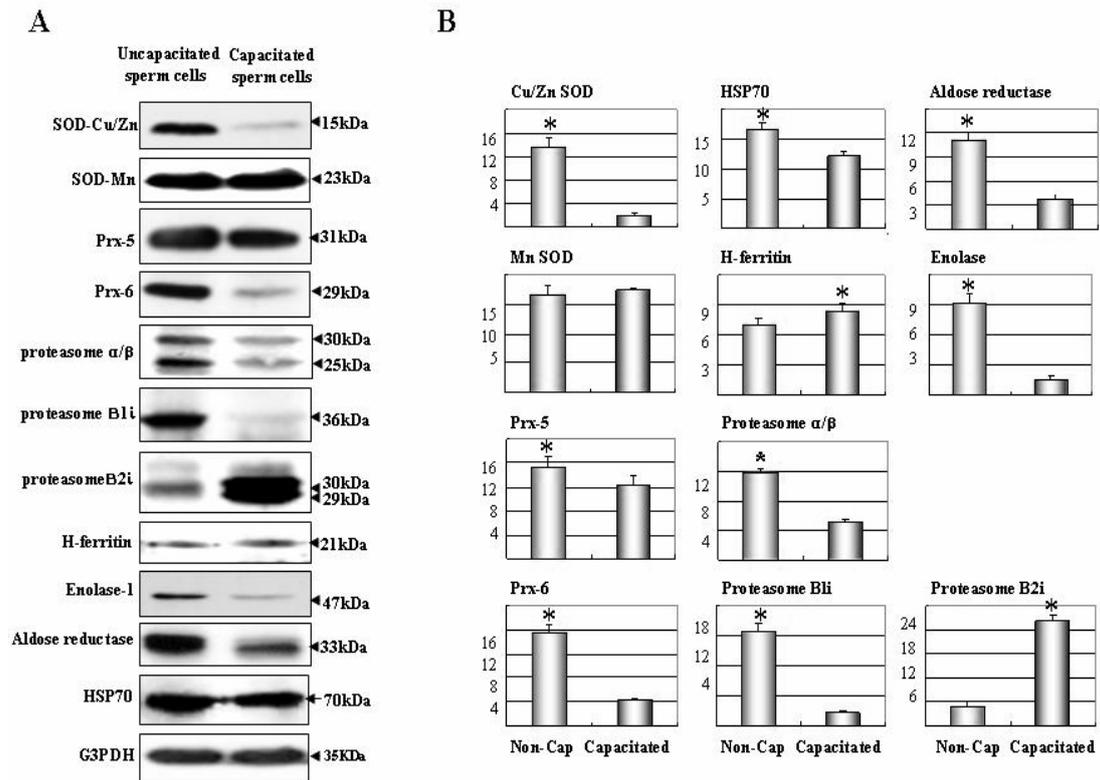
Proteasome isoform proteins			
21	Proteasome subunit beta type 6 precursor (25357.9)	23	54-63, 68-74, 75-79, 119-123, 210-220, 221-230
26	Proteasome subunit alpha type 3 (28405.4)	52	1-20, 21-29, 30-41, 42-52, 58-66, 73-86, 101-110, 197-206, 197-208, 223-230, 231-238
52	Proteasome subunit alpha type 1(29546.7)	35	4-18, 52-61, 63-82, 83-89, 97-107, 175-189
56	Proteasome subunit alpha type 6 (27399.6)	22	12-21, 22-30, 31-43, 72-88, 105-116

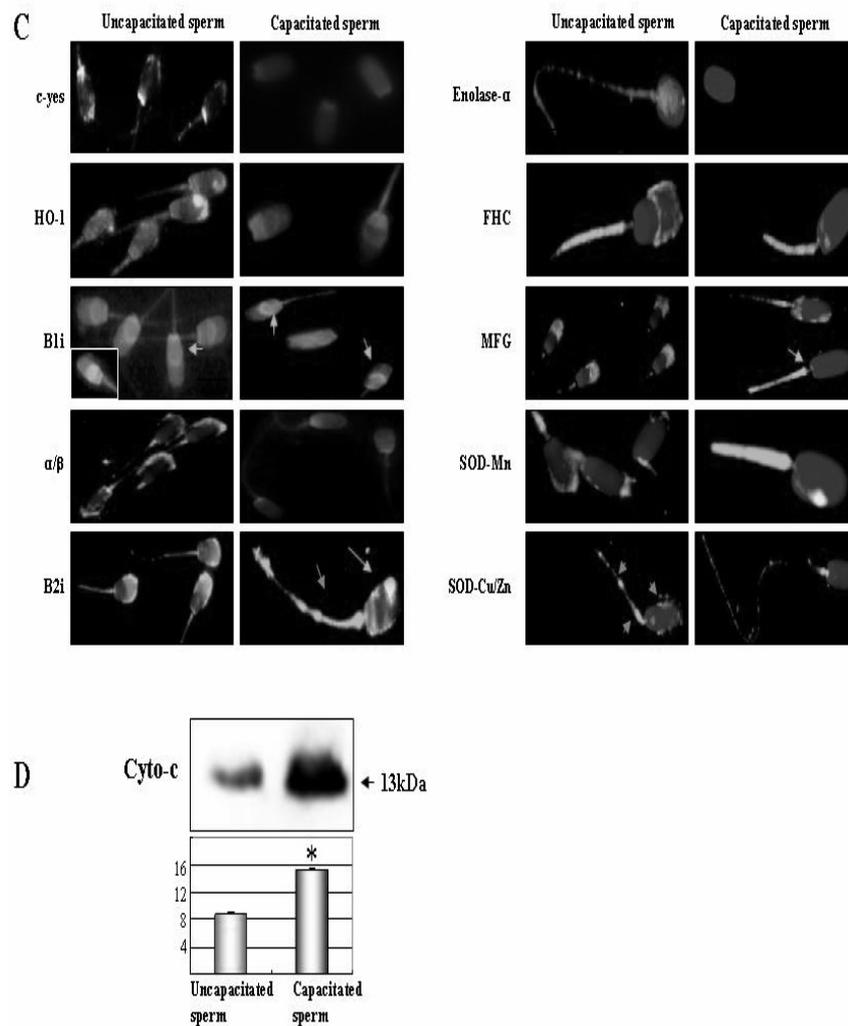
Cell cycle-regulated proteins			
34	G1/S-specific cyclin D3 (32434.0)	11	42-50, 73-87, 168-179, 270-293
37	G1/S-specific cyclin E1(45586.9)	16	83-99, 88-99, 116-129, 162-17

Phosphorylation-related protein			
1	Stress-70 protein (73528.7)	50	127-135, 147-159, 188-202, 207-218, 266-284, 378-391, 395-405, 499-513, 568-574, <b>635-653</b>
10	cAMP-dependent protein kinase (42981.9)	18	74-91, 97-114, 134-145, <b>232-240</b> , 252-263, 264-280
11	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein (52619.1)	28	103-111, <b>112-126</b> , 127-134, 270-276, 416-422, 423-432, 424-432, 471-479, 473-479
18	Inositol-1(or 4)-monophosphatase (30055.8)	19	60-78, 117-129, 182-191, 249-256, 265-273
35	Glutathione S-transferase Mu 5 (26635.1)	25	5-14, 22-34, 36-46, 73-81, <b>87-97</b> , 100-111, 140-147, 156-171
38	Pyruvate dehydrogenase E1 component (39219.6)	26	<b>37-49</b> , 37-52, 53-68, <b>309-324</b> , <b>325-336</b>
39	F-actin capping protein (33741.5)	41	1-14, 15-23, 58-66, <b>79-92</b> , 95-108, 96-108, 182-195, 226-235, 238-244
40	F-actin capping protein (33741.5)	36	44-52, 87-95, 108-121, 124-137, 125-137, 175-188, <b>198-210</b> , 211-224, 245-254, 255-264, 289-297

Others			
6	Serum albumin precursor (69293.9)	48	35-44, 161-167, 168-183, 267-280, 360-371, 421-433, 437-451, 469-482, 508-523, 529-544, 581-597
15	Tetratricopeptide repeat protein 14 (49771.0)	16	23-32, 125-131, 322-331, 427-435

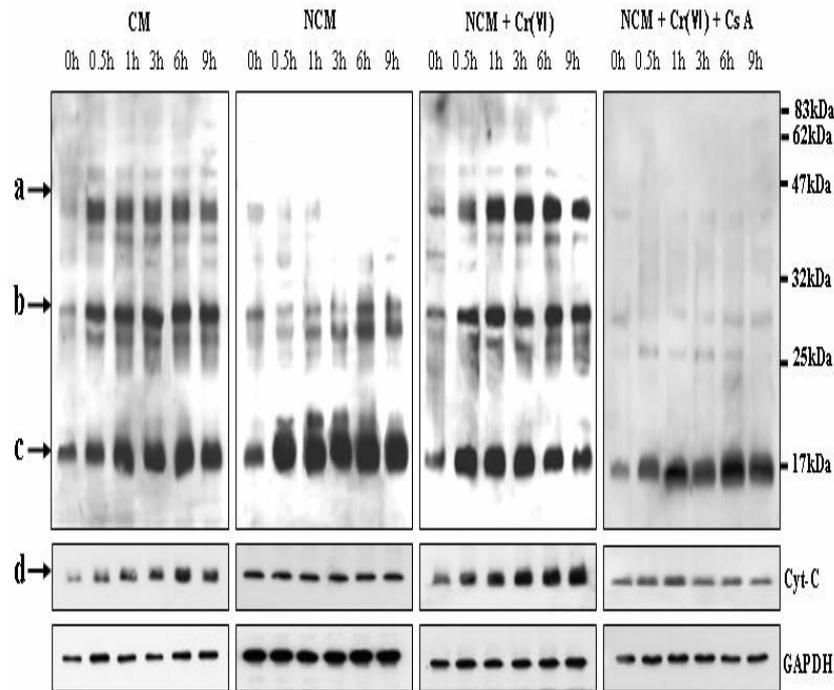
수정능이 획득되지 않은 정자세포와 수정능획득된 정자세포에서 차별적으로 발현되는 단백질을 확인하였다. 수정능획득을 유도기 전과 후 (CM에서 3시간) 차별적으로 조절되는 단백질을 규명하기 위하여 2-D gel 전기영동으로부터 나온 단백질 bands를 잘라낸 다음 trypsin으로 분해하였다. 분자량은 MALDI-TOF-MS에 의해 측정하여 나온 spectrum 결과들을 MS database와 비교분석하여 대표적인 자료들을 표2에 나타내었다. 또한 2-D gel과 western blot 분석법을 사용하여 단백질 수준을 비교분석함으로써 proteasome alpha, beta-type subunit을 제외하고는 유사한 양상을 나타냄을 확인하였다. 수정능이 획득되지 않은 세포에서는 proteasome alpha, beta-type subunits (25-30 kda), betali subunit (36kda), enolase, aldose reductase, Cu/Zn SOD, HSP 70, 및 peroxiredoxin-6 등은 현저하게 감소하였으며, 수정능획득을 유도한 조건에서 배양된 정자세포에서는 proteasome beta2i subunit (29와 30 kda)과 H-ferritin (30 kda)이 수정능을 획득하지 않은 대조군에 비해 현저하게 증가함을 나타내었다 (그림 10).





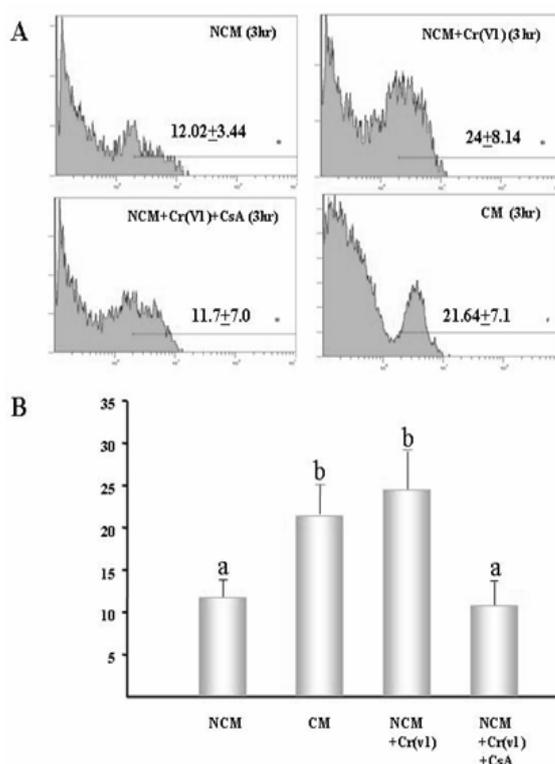
**Figure 10. Western blot and immunohistochemical analysis of proteins in non-capacitated and capacitated sperm cells.** A) Protein expression patterns in non-capacitated and capacitated sperm cells were compared using Western blot analysis. Proteasome  $\alpha/\beta$ -type subunits (25 and 27 kDa) and the  $\beta$ -1i-subunit (36 kDa), enolase, aldose reductase, and HSP70 were significantly decreased, following incubation in CM. However, the 29 and 30 kDa subunits of proteasome  $\beta$ -2i and H-ferritin were increased significantly in CM. B) Comparison data were extracted by western blot intensity using personal densitometry. All experimental data are presented as means  $\pm$  SD C) Localization of subjected proteins for western blot analysis in sperm incubated under non-capacitating or capacitating conditions. D) Western blot analysis of cytochrome c expression. Each experiment was performed at least three times and data subjected to statistical analysis.

CM에서 배양된 정자세포는 단백질 tyrosine phosphorylation과 cytochrome c 발현에 있어서 시간에 따른 증가를 나타내었다 (그림 11). 따라서 이러한 결과는 수정능획득이 일어나는 동안 정자세포가 세포사멸보다는 첨체반응(acrosome reaction)을 일으키고 있을 가능성을 시사한다. Cytochrome C의 방출이 첨체반응에 미치는 영향을 평가하기 위하여 1-50 uM 농도의 Cr(VI)을 NCM에 첨가하였다. Cr(VI)에 의한 cytochrome C의 시간 의존적 유도가 일어났으며 이는 첨체반응 신호전달에 필요한 tyrosine phosphorylation을 증가시켰다 (그림 11A, B). NCM에 Cr(VI)을 첨가한 직후 32 kda과 45 kda의 tyrosine phosphorylation이 현저하게 증가되었으며 첨체반응 또한 상당히 증가함을 나타내었다. NCM에서 0hr 동안 배양된 정자세포에서는 자발적 첨체반응이 거의 일어나지 않는다. 그러나 세포기질로의 cytochrome C 방출을 방지하는 cyclosporin A의 첨가는 정자 단백질의 tyrosine phosphorylation을 억제하였으며 이는 cytochrome C가 이러한 반응을 매개함을 의미한다. 또한 cytochrome C의 발현 변화와 상관없이 NCM과 CM에서 배양된 정자세포에서는 18 kda의 phosphorylation이 증가하였다.



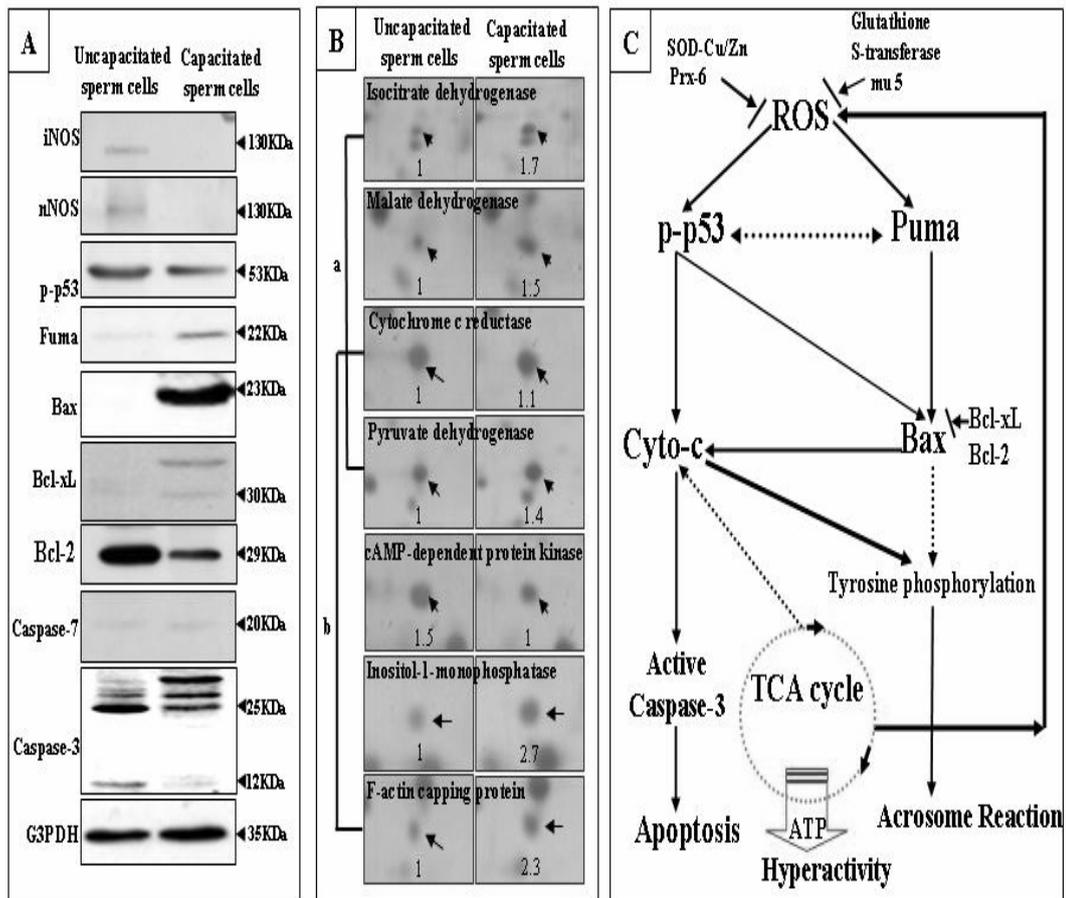
**Figure 11. Time course (0 to 9 h) expression of capacitation-dependent cytochrome c, and tyrosine-phosphorylated protein levels.** A) Alteration of protein tyrosine phosphorylation and cytochrome c expression in sperm cells, following incubation in CM, NCM, NCM supplemented with Cr(VI), and NCM supplemented with both Cr(VI) and CsA. Three major sets of tyrosine-phosphorylated proteins were detected; (a) is 47 kDa, (b) is 28kDa, (c) is 18 kDa phosphorylated proteins, and (d) is cytochrome c expression level in different conditions. Sperm cells incubated in NCM supplemented with Cr(VI), like those of sperm cells cultured in CM, demonstrated a dose- and time-dependent up-regulation of cytochrome c, which led to up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. Supplementation with CsA inhibited tyrosine phosphorylation of sperm proteins and of cytochrome c expression. Note that in pig sperm cells cultured in both NCM and CM, tyrosine phosphorylation of an approximately 18 kDa protein is increased (c). Sperm cells incubated in CM or in NCM, and supplemented with Cr(VI), demonstrated a higher level of cytochrome c expression throughout the incubation time course, whereas control and/or sperm cells incubated in NCM supplemented with both Cr(VI) and CsA, demonstrated a constant level of expression.

침체반응과의 상관관계를 조사하기 위해 처리되지 않은 대조군과 4가지 처리군 [NCM, CM, NCM+Cr(VI), NCM+Cr(VI)+CsA]에 해당하는 5 표본의 wash된 정자세포 부유액을 채취하여 각 처리별 배양 3시간 후 전체 세포군에 대한 상대적 침체반응을 일으킨 정자세포를 조사하였다 (그림 12). FITC-CD48에 의해 탐지된 침체반응을 일으킨 세포의 상대적 양은 NCM과 NCM+Cr(VI)+CsA 처리군에 비교하여 CM과 NCM+Cr(VI) 처리군에서 현저히 높게 나타났다. 이러한 결과와 일치하게 Cr(VI)를 첨가한 NCM에서 배양된 정자세포의 침체반응은 CM에서의 증가된 침체반응과 일치하는 방식으로 증가되었다. 이러한 결과는 미토콘드리아로부터 세포질로 방출된 cytochrome C가 세포사멸의 유도보다는 정자의 수정능 획득을 위한 신호전달기전에 관여하고 있음을 보여준다 (그림 12).



**Figure 12. Flow cytometry analysis with anti-CD46 antibody as a capacitation indicator.** A) Capacitation levels of pig sperm cells incubated for 3h in CM, NCM, NCM supplemented with Cr(VI), and NCM supplemented with Cr(VI) and CsA, were analyzed by flow cytometry, respectively. B) Data were normalized with statistical analysis. All experimental data are presented as means  $\pm$  SDEach experiment was performed at least three times.

정자세포에서 세포사멸 또는 침체반응을 조사하기 위하여 p53, Puma, Bax, cytochrome C, 및 caspase-3를 포함한 세포사멸 단백질 marker의 발현을 western blot에 의해 조사하였다. 수정능획득 조건에서 3시간 동안 배양 후 Puma와 Bax의 발현은 p53의 인산화에 의해 유도되었으나 세포사멸 실행 단백질분해효소인 caspase-3의 발현은 나타나지 않았다 (그림 13). CM에서 배양된 정자세포는 시간경과에 따른 단백질 tyrosine phosphorylation과 cytochrome C의 발현이 증가되었다. 따라서 이러한 결과는 수정능획득 과정에서 정자세포는 세포사멸보다는 침체반응을 일으킬 가능성을 시사한다.



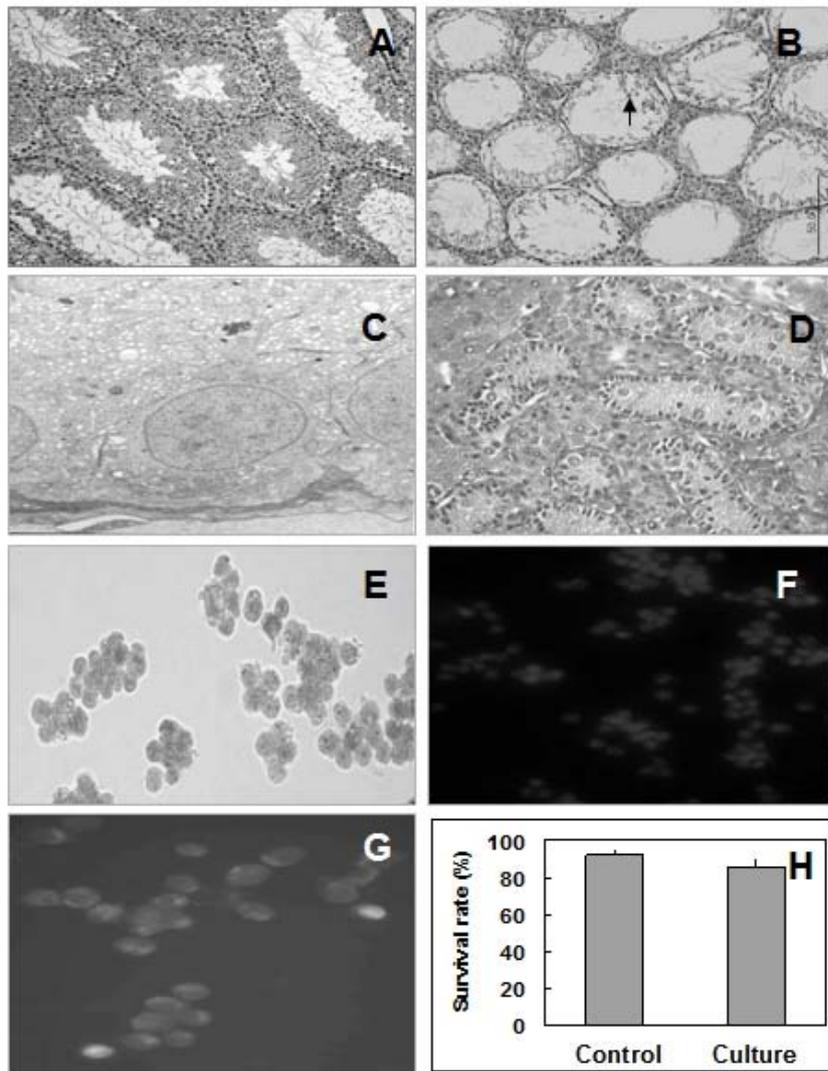
**Figure 13.** A proposed mechanism of capacitation of pig sperm cells. A) Non-capacitated sperm cells demonstrated high level so factivated p53, Bcl-2, and caspase-3 expression; however, Fuma and Bax expression were down-regulated. Note that capacitated sperm cells demonstrated low ered expression of caspase-3, in spite of a higher expression of Fuma and Bax. B) Close-up images of the region on the gels showed the differentially expressed proteins in between non-capacitated and capacitated sperm cells, and each number on the 2-D gel indicates their relative expression. (a) and (b) refer to TCA cycle- and phosphorylation-related proteins, respectively. C) Schematic depicting of the sperm cells fate following capacitation. Three major signaling pathways are operating in sperm cells, namely a Bax/cytochrome c-dependent caspase-3 pathway (cell death), a Bax/cytochrome c-tyrosine phosphorylation pathway (capacitation), and TCA cycle-dependent ATP production (hyperactivity).

## 6. Busulfan을 활용한 이종간 정원세포 분화능에 대한 연구

이종간 정원세포의 이식은 정자형성과정을 조절하는 molecular event와 cellular event를 연구하기 위한 유일한 시스템으로 알려져 왔다. Spermatogonia의 분화와 증식을 조절하는 인자를 알기위하여 약 95%가 분화하고 있는 일반 마우스에 busulfan인 항암제를 투여하였다. Alkylating agent인 busulfan과 같은 cytotoxic agent는 대부분의 분화하고 있는 testicular germ cell 유래 세포들을 죽인다. 그래서 이와 같은 처리를 한 마우스를 대리모로 사용하여 이식실험을 하기 위한 재료로 활용 하였다. 이미 보고된 연구에 의하면 rat spermatogonia를 mouse 정소에 이식했을때 마우스 정소내의 체세포인 sertoli cell이 이식된 rat spermatogonia가 분화되는 것을 도와주는 것으로 알려졌다. 그리고 다양한 종에서 만들어진 embryonic stem cell에서 유래된 testicular stem cell이 남성 불임을 보호하는 새로운 방법임을 확인한 보고가 있었다. 그리고 신생아의 마우스 정소에서 유래된 ES-like cells이 확립이 되었고 이것을 배반포 난자에 주입을 했을때 germline chimera가 형성되는 것을 확인 하였다. 그래서 본 연구에서는 돼지의 spermatogonia를 donor cells로 사용하여 항암제 처리한 마우스에 이식했을때 마우스의 세정관에서 돼지의 spermatogonia가 재 분화가 다시 일어나는지 확인을 하고 돼지의 spermatogonia 특이적인 표지인자가 없는 상황에서 PKH staining, slide PCR과 같은 방법으로 이식된 돼지의 spermatogonia를 확인하고자 하였다.

### 가. 정소 절편의 형태학적 구조

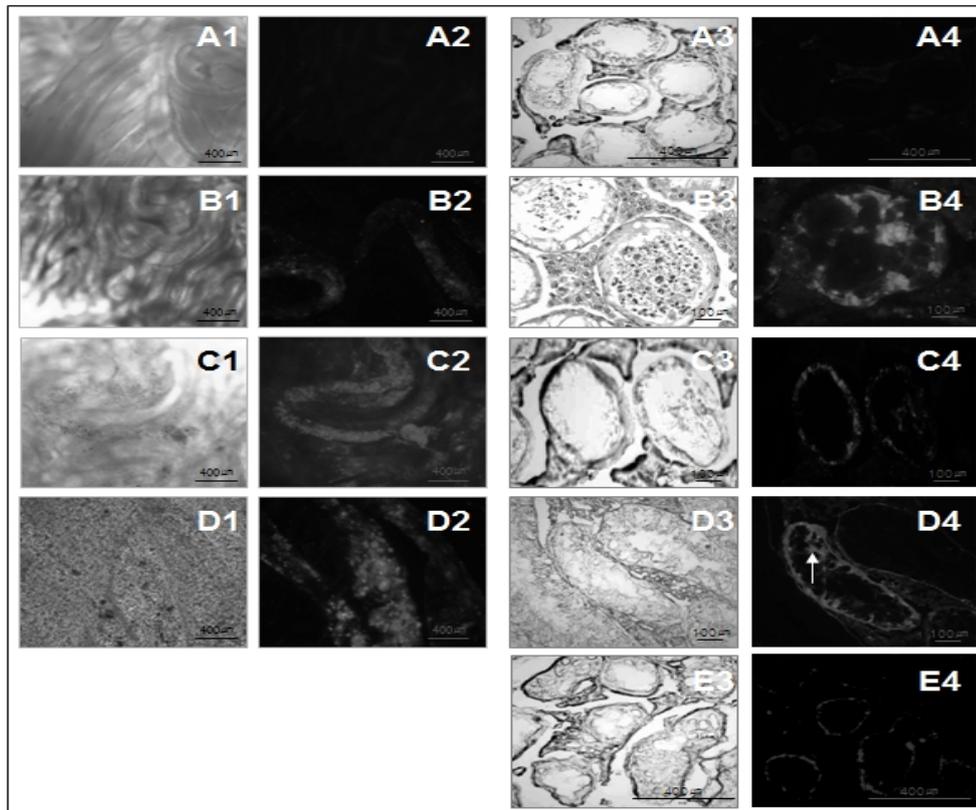
항암제인 busulfan를 투여한 정소와 일반 정소의 조직학적인 현상을 서로 비교 분석하였다. Busulfan을 처리한 후 4주가 지난 마우스의 정소와 정상 마우스의 정소를 비교한 사진으로 busulfan 처리군이 정상군보다 크기가 현저히 감소하였고, 이를 절편 하여 확인 했을 때 정상적으로 발달중인 germ cells이 없는 것을 확인 할 수가 있었다. 그리고 세정관에는 spermatogonia와 약간의 somatic cells만 존재하는 것을 확인 할 수 있었다. 몇몇 분화중인 male germ cells를 나타내고 있다. 생후 7일에서 15일 사이의 돼지 정소에서 germ cells을 전자현미경으로 확인한 그림이고 PKH 26으로 염색한 결과이다. 분리한 세포의 viability를 확인한 결과를 나타내었다. 초록색으로 발색되는 세포는 살아있는 세포를 나타내고 붉은 색으로 발색되는 세포는 죽은 세포를 나타낸다. 이를 수치적으로 계산하기 위해 Flowcytometry로 분석 했을 때 정상세포군과 분리한 세포군에 있어서의 viability는 유의적 차이가 없음을 확인했 (그림 14).



**Figure 14. Photomicrographs of donors and recipients.** Testes at 4 weeks after busulfan treatment (B), compared with those of control mice (A). Four weeks after busulfan treatment, the testes of most busulfan-treated mice are depleted of developing germ cells, although they contain somatic cells and spermatogonia. Arrow in B indicates debris from differentiating male germ cells. Porcine testes assessed by electron microscopy (C) and H & E staining (D), indicating that most spermatogonial stem cells survived. Porcine male germ cells were obtained from 7-15-day-neonate testes (E) and stained with PKH-26 dye (F). The viability of porcine germ cells was examined using a live and dead staining kit. Green fluorescence represents live porcine germ cells and red fluorescence signifies dead porcine germ cells (G). Apoptotic cells in busulfan-treated testes were detected by flow cytometry analysis (H).

## 나. 생쥐의 정소에 돼지 정원세포의 이종간 이식후 대리모 정소 절편의 형태학적 구조

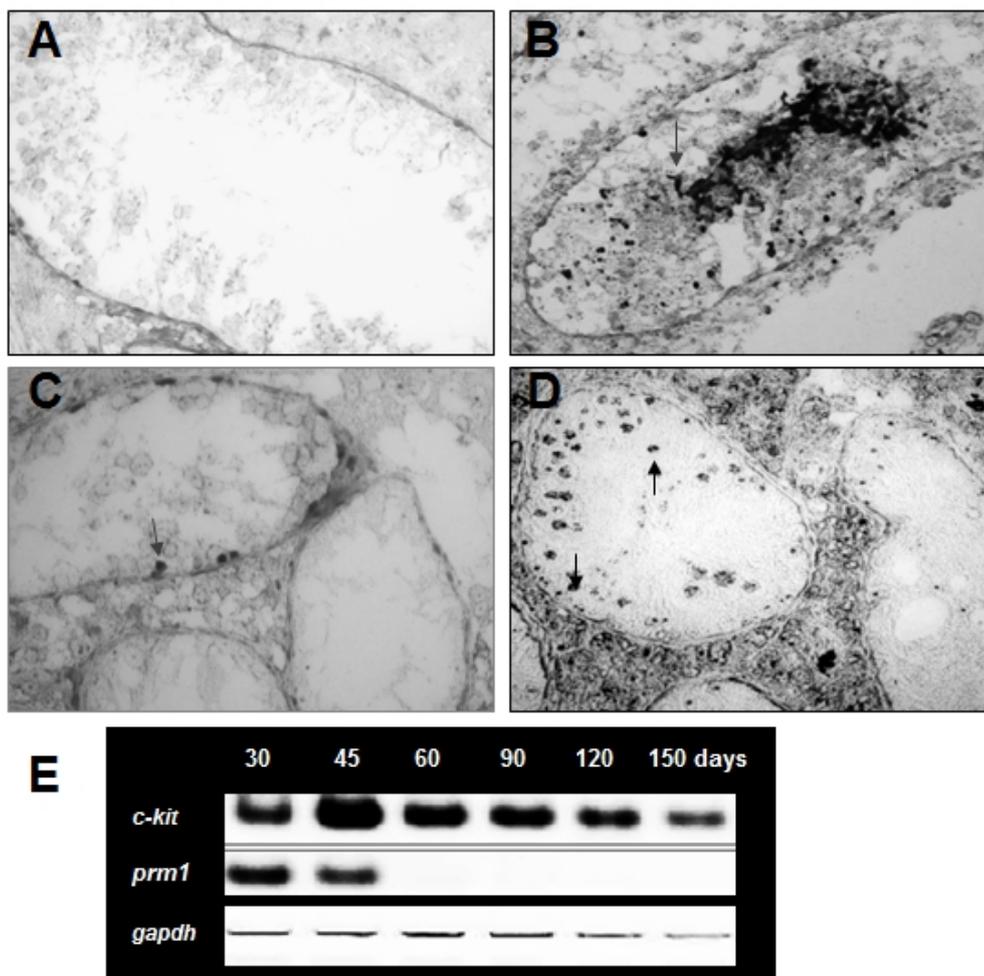
다음은 이식하는 과정과 이식한 후 정소를 절편한 후 외래 세포가 분화해 가는 과정을 나타낸 그림이다. 돼지의 germ cell을 PKH26을 염색한 후 mouse 정소에 이식한 후 각각 광학현미경과 형광현미경으로 관찰한 그림이다. 정상 군, 이식 후 1일, 이식 후 10일, 이식 후 한달 그리고 이식 후 3달은 동결절편으로 관찰을 했다. 이식 후 하루가 지났을때는 대부분의 돼지 donor cell은 세정관의 중간에 위치하다가 이식 후 10일 지나면 세정관의 basement membrane으로 이동을 한다. early meiotic stage 혹은 meiotic stage 로 분화한 spermatogonia로 보여주고 있다. 그리고 이식 후 세달이 되면 각 세정관에서 유래한 spermatocyte를 확인할 수가 있다. 그러나 대부분의 세포는 spermatogonia stage 에서 정지되어 더 이상 분화하지 않는 것을 확인 할 수가 있다 (그림 15).



**Figure 15. Xenotransplantation of porcine germ cells into germ-cell-depleted mouse testes.** Photomicrographs of dispersed seminiferous tubules (A1 - D1) and fluorescent-labeled (PKH-26) cells at 1 day (B1, B2), 10 days (C1, C2), and 1 month (D1, D2) after xenotransplantation of porcine germ cells. A1 and A2 are non-injected control seminiferous tubules. Cross-sections of recipient mouse testes after transplantation of porcine male germ cells assessed by light microscopy (A3-E3) and fluorescence (A4-E4) after 1 day (B3, B4), 10 days (C3, C4), 1 month (D3, D4), and 2 months (E3, E4). A3 and A4 are non-injected controls. At 1 day after transplantation, most porcine donor cells are located at the center of the seminiferous tubules (B4) and translocate to the basement membrane of the seminiferous tubules at 10 days after xenografting (C4). Donor cells from some seminiferous tubules are differentiated into spermatocytes, but most donor cells are arrested at the spermatogonia stage (E4). The arrow in D4 indicates that some porcine spermatogonia are differentiating into early meiotic stages. Figures are in 200X magnification, except A3, A4, E3, and E4 (100X).

#### 다. Slide PCR에 의한 대리모 생쥐의 정소에서 돼지 정원세포의 확인

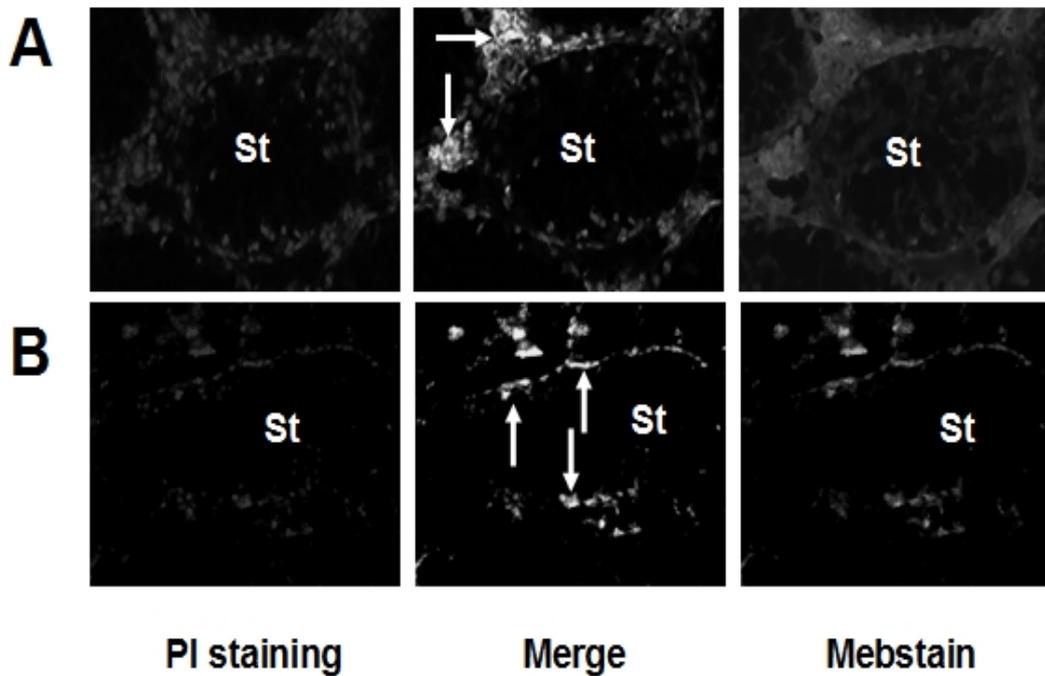
이식된 pig germ cell을 확인할 수 있는 specific marker가 현재는 밝혀진 것이 없다. 그래서 우리는 이식된 pig germ cell을 확인하기 위해서 돼지에 존재하는 유전자를 이용하여 slide PCR을 수행하였다. Recipient 정소를 동결절편하여 각 시기별 유전자 발현 정도를 확인해 보았다. Donor cell을 이식한 후 각각 정상군, 이식 후 1일, 이식 후 10일 그리고 이식 후 한달이 지난 recipient 정소를 사용하였다. 화살표 표시는 이식 후의 pig male germ cell을 나타내고 있다 (그림 16).



**Figure 16.** Detection of porcine germ cells in recipient mouse testes by slide PCR. Evaluation of gene expression in cryosections of recipient testes: control (A) and 1 day (B), 10 days (C), and 1 month (D) after xenotransplantation of donor cells. Porcine gene-expressing cells are located towards the periphery of seminiferous tubules. The arrows in B and C indicate porcine male germ cells near the lumen of seminiferous tubules shortly after transplantation and porcine-derived spermatogonia settled in the mouse testes, respectively. The arrows in D indicate that some porcine-derived male germ cells have differentiated into spermatocytes. E) Analysis of donor cell-specific marker gene expression. Porcine *c-kit* expression patterns were relatively constant, whereas protamine (*prm1*) expression was not observed at 2 months after germ-cell transplantation. *gapdh*, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase.

#### 라. 대리모 정소에 이식된 정원세포의 사멸 확인

이식된 외래세포가 recipient 정소내에서 사멸 여부를 확인하기 위해 다음과 같이 수행하였다. PKH26으로 염색된 pig germ cell을 이식한 후 Annexin V 염색을 통해 apoptotic cell을 확인하였다. donor cell-specific marker 유전자의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR 기법을 활용하여 확인하였다. 돼지 c-kit유전자는 이식후 150일까지도 확인이 되었으나, protamine의 발현은 이식후 2달 이전에 사라지는 것을 확인할 수가 있었다. 그리고 control 유전자로 GAPDH를 사용하였다 (그림 17).



**Figure 17. Monitoring of donor-derived male germ cell apoptosis by the TUNEL assays.** For assay details, see Material and Methods. Male germ cell apoptosis is indicated by brown coloration or green color. Apoptotic cells in busulfan-treated control testes (A) are mainly limited to Leydig cells, whereas xenografted testes (B) include spermatogonia and/or meiotic germ cells, indicating that some pig male germ cells differentiated into spermatocytes despite extensive apoptosis in the recipient testes

## 7. 정자에서 nm23-m5 단백질의 위치 분석 및 기능적 분석

nm23-N5 단백질의 발현을 분석하기 위하여 현재 nm23-N5에 대한 항체를 작성할 목적으로, nm23-N5-GST fusion protein 발현용 vectro인 pGEX에 클로닝하여 DH5a에 transformation을 수행한후, transformant을 얻었다. 이렇게 얻은 transformant을 24시간 LB 배지에서 배양한 후, IPTG에 의해 fusion proetin의 발현을 유도하여 glutathione sepharose 4B을 이용한 Affinity column chromatography로 nm23-N5-GST fusion protein을 정제하여 항체작성을 위한 항원으로 사용하였다.

nm23-m5는 수정능 획득전 (A)에 두부와 중편부를 중심으로 발현되나, 수정능력이 절반정도 획득되면 중편부 (B)에서 완전히 획득되면 (C) 거의 발현을 나타내지 않았다. 이들 결과를 Western blot에 의하여 재확인 한 결과는 D와 E와 같다. 따라서, nm23-m5는 아마도 미토콘드리아의 호흡작용에 관여하는 단백질로서, 수정을 위한 매우 중요한 단백질이라는 결과가 도출되었으나, 정밀한 기전은 더 많은 연구가 필요하다. 또한 동정된 Bax 저항 유전자들의 Reactive Oxygen Species (ROS)에 대한 저항성을 조사한 결과 nm23-m5가 가장 강력한 저항성을 지니고 있음을 확인하였다 (그림 18).

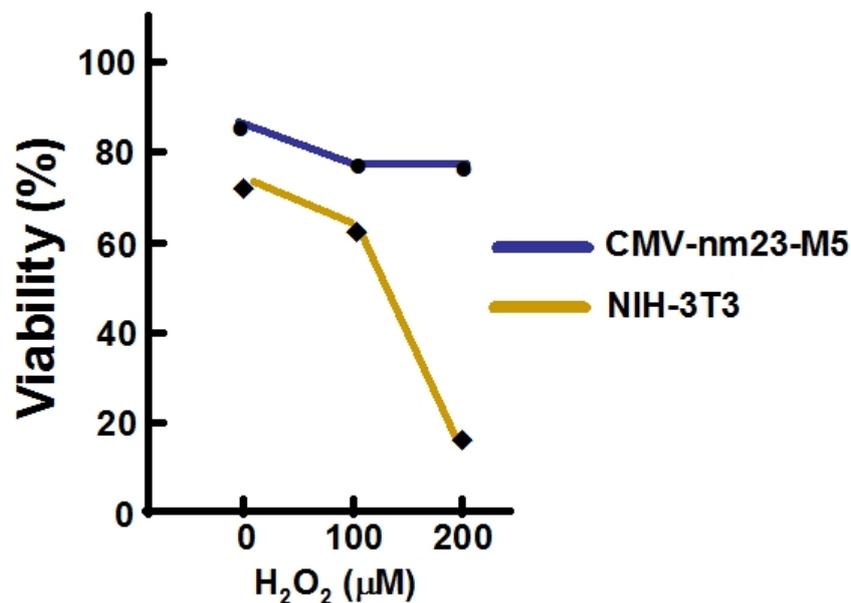


Figure 18. Effect of nm23-m5 in cell-survival rate following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment

## 제2절 Transgenic mouse의 작성 및 모델동물을 이용한 in vivo에서의 신규유전자의 기능연구

nm23은 NDPKs (Nucleoside diphosphate kinases) family의 하나로, 사람의 경우는 H-1으로부터 H-8에 이르는 약 8종류의 isoform들이 알려져 있으며, 이들 유전자들은 주로 tumor metastasis, 세포 증식, transcriptional regulation, development, senescence와 apoptosis에 관여하는 것으로 알려져 있다.

최근 Hwang등은 Human NM23-H5 의 homolog 인 생쥐로 부터 nm23-m5 유전자를 클로닝하여, 이 유전자가 음성생식세포인 반수체 단계에서 주로 발현한다고 보고하였으나, 그 기능은 아직 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 nm23-m5 유전자의 기능을 규명하기 위해, nm23-m5발현을 knock-down 시킬 수 있는 shRNA 방법을 이용한 형질전환 생쥐를 생산하여, 정소에서의 nm23-m5유전자의 기능을 조사하였다. 먼저, nm23-m5 shRNA에 의한 nm23-m5 유전자 발현의 저해 효과를 알아보기 위하여 nm23-m5 유전자를 CHO cell에 transfection 시킨 stable cell line을 수립하였다. 이 세포에 nm23-m5 shRNA를 0, 1, 5, 10nM 농도로 다시 co-transfection 시켰을 경우, nm23-m5 shRNA농도에 따라 nm23-m5 유전자의 발현이 감소하는 것을 northern blot과 western blot을 통해 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 nm23-m5 shRNA는 효과적으로 nm23-m5의 단백질 번역을 저해하는 발현백터로 활용 가능함을 시사하였다. nm23-m5 shRNA 형질전환 생쥐를 생산한 결과, 형질전환 생쥐의 정소는 대조군에 비하여 유의적으로 적은 nm23-m5단백질의 발현을 보였다. 그 결과로서 반수체 단계의 spermatid stage의 세포 수가 정소내에서 현저히 줄어들었음을 조직학적으로 관찰되었다. 이러한 결과는 nm23-m5발현이 음성생식세포의 반수체 단계의 발생에 있어 매우 중요한 역할을 수행함을 시사하였다.

## 1. 형질전환 동물의 분석을 위한 방법적 접근

### - construct design of nm23-m5 expression vector

nm23-m5 cDNA ( genebank AF343565)는 pCXN2 벡터에 EcoR I과 Bgl II사이에 넣어서 pCXN2-nm23-m5 벡터를 구축했다. CHO 세포주에 transfection 하기 위해서 pCXN2-nm23-m5를 PvuII 제한효소로 절단한 후 사용하였다.

### - construct design of nm23-m5 shRNA expression vector

nm23-m5의 256-277의 상보적인 oligonucleotide를 합성한 후, pU6shx 벡터에 구축을 했다. pU6shx -nm23-m5 벡터는 xbaI과 EcoRI 제한효소로 자른, gel extraction kit로 정제한 뒤 세포에 삽입하거나 형질 전환 동물을 생산하는데 사용했다.

### - knock-down test by nm23-m5 shRNA in stable CHO cell line expression nm23-m5 gene

pcxn2-nm23-m5 10ug 을 effectene(Qiagen)을 이용해서 CHO 세포에 transfection 하였다. selection 할때는 G418(700ug/ml)을 30일간 처리하였다. nm23-m5를 가지고 있는 stable cell line은 western blot으로 확인 했다. nm23-m5를 발현하는 stable cell line은 35-mm dish 당  $2 \times 10^5$  밀도로 깔고 10% FBS가 포함된 McCoy's 5A 배양액에서 키웠다. HiPerFect transfection kit(qiagen)을 이용하여 nm23-m5 shRNA 1,1,5,10nM로 transfection 했다. 48시간후, nm23-m5를 발현하는 정도는 northern blot과 western blot으로 확인했다.

### - Northern blot analysis

TRIZOL을 이용해서 다양한 조직에서 total RNA를 분리했다. northern blot 은 앞선 보고에서와 같이 했다. 간단히 요약하면, total RNA를 denaturation 시킨 후, 1.2% agarose/formaldehyde gel에 로딩했다. 그리고 membrane 에 transfer 한 뒤, 3시간 동안 prehybridization 하고 [<sup>32</sup>P]dCTP로 라벨링된 probe로 24시간동안 hybridization 했다. membrane washing은 2x SSC/0.1%SDS, 0.2X SSC/0.1% SDS에서 washing 한후 7일동안 X-ray film에 노출하여 결과를 얻었다. imaging densitometer는 Molecular analyst Software 제품으로 측정했다.

### - Real time RT-PCR analysis

성체 마우스 정소에서 total RNA를 분리한뒤 cDNA로 전향했다. nm23-m5의 발현을 확인하기 위해서 Peltier Thermal Cycler 200(MJ research)를 이용해 확인했다.

이때 사용하나 primer는 forward 5'-ATGGGGGTGCACGAATGTCC-3' reverse 5'TCATCTGTCCCCTGTCCTGC-3'이다.

#### - Western blot analysis

마우스 정소에서 단백질을 분리한 후 Bradford로 정량을 했다. 그리고 30-50ug의 solution protein을 12% polyacrylamide gel에 로딩을 하고 PVDF membrand에 transfer했다. 5% skim milk로 blocking 한 뒤, nm23-m5 polyclonal antibody로 반응시킨 후 세척하고 다시 anti-mouse secondary antibody IgG로 다시 반응시켰다. 단백질의 발현 정도는 최종적으로 ECL로 확인을 했다.

#### - Generation of heterozygotes and homozygotes

microinjection 방법으로 형질전환 생쥐를 만든 후, PCR 을 이용하여 hetro-transgenic mice 를 확인했다. 이때 사용한 primer는 forward 5'-TTTATGCTTCCGGCTCGTAT-3' reverse 5'-CGTAATACGACTCACTATAGG-3'이다.

#### - Immunohistochemical analysis

2시간 동안 동결조직 절편 (8um thickness)을 말렸다. 그리고 실온에서 절편을 4% paraformaldehyde로 15분간 고정시키고 TBS/ 0.1% Saponin으로 slide를 각각 5분씩 washing 했다. TBS/ Saponin으로 1/100으로 희석시킨 goat serum을 20분간 처리하여, non-specific한 binding site를 block하고 Ab로 4도씨에서 overnight incubation했다. 그리고 biotin이 붙은 secondary Ab.로 30분간 slide와 incubation, Avidin-biotin-peroxidase를 첨가한 후, distilled water(증류수, 이하 D.W)에 희석시킨 0.5mg/ml DAB solution으로 slide를 incubation시켰다. TBS로 slide washing 후, Hematoxylin으로 1분간 counterstaining (착색) 후 75% -> 80% -> 100% ethanol 순서로 각각 1분씩 slide를 dehydration, 결과는 Optical microscope로 확인했다.

## 2. Nm23-m5 유전자에 대한 shRNA 디자인, 발현, 그리고 효율 검증

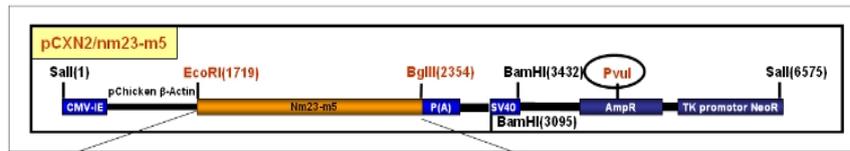
Nm23-m5 발현 벡터를 구축하기 위해 CMV와  $\beta$ -actin 프로모터로 발현량이 월등히 향상된 pCXN2 발현벡터를 활용하여 pCXN2-nm23-m5를 만들었다. 우선 nm23-m5의 cDNA인 632 bp를 pCXN2 발현 벡터의 EcoRI과 BglIII에 삽입하여 pCXN2-nm23-m5 발현 벡터를 구축하였고 PvuI 제한효소를 절단하여 linear DNA를 만들어 pCXN2-nm23-m5의 stable cell line를 확립하기 위해 CHO 세포주에 transfection하여 30일동안 700  $\mu$ g/ml 농도의 G418 항생제에서 선택되어 성장시켰다. pCXN2-nm23-m5의 stable cell line 확립 여부를 확인하기 위해 nm23-m5 항체를 활용하여 western blot 기법으로 단백질의 발현 여부를 확인해 본 결과 대조군에 비해 과량의 nm23-m5 단백질이 발현됨을 확인하였다. (그림. 15).

Nm23-m5는 여러조직 (뇌, 심장, 신장, 간, 폐, 췌장, 난소, 그리고 정소)에서 western blot 기법으로 확인해 본 결과 오로지 정소에서만 발현됨을 확인하였는데 이러한 결과는 앞서 발표 (Hwang et al., 2003)된 northern blot결과와도 일치한다 (그림 16).

Nm23-m5 유전자의 기능적 분석을 위해 RNAi인 shRNA 기법을 활용하였다. Nm23-m5 유전자의 knock-down은 U6 RNA polymerase promotor의 조절하에 이루어진다. 생쥐의 nm23-m5 cDNA 서열중 256-277에 해당하는 서열은 BLAST 조사에 의해 오직 nm23-m5 유전자만 해당하도록 선택되고 디자인되었다. Nm23-m5 cDNA 서열중 256-277의 sense와 anti-sense 서열을 cloning하여 pU6shx-shRNA 발현 벡터 (pU6shx-nm23-m5)를 만들기 위해 XbaI과 EcoRI 제한효소로 절단하여 구축하였다 (그림 17).

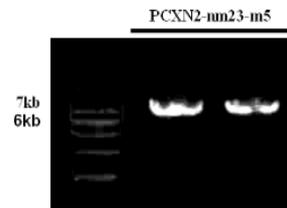
선택된 nm23-m5 서열이 실제로 RNAi로서 기능하는지 확인하기 위해 nm23-m5 shRNA는 각각 다른 농도 (0, 1, 5 그리고 10 nM)로 CHO 세포주에 transfection한후 nm23-m5의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과 10 nM 농도로 처리된 세포주에서는 다른 농도인 0, 1, 그리고 5 nM농도의 세포주보다 현저히 발현 정도가 낮아 졌음을 Northern blot 기법으로 nm23-m5 mRNA의 발현 정도를 확인하였고 Western blot 기법으로 nm23-m5 단백질의 발현정도를 측정하여 분석하였다. 이러한 결과는 nm23-m5 shRNA의 농도에 의존하여 nm23-m5 stable 세포주에서 nm23-m5의 발현을 억제한다는 것을 보여준다 (그림 18).

A



**NM\_080637** Mus musculus expressed in non-metastatic cells 5 (nm23-m5), 632 bp  
 ATGGTGGTATCAATGCCCTGCTCAGATATATGTAGAAAAACCTAGCCCTTATCAAGC  
 CAGATGTTGTTGACAAAGAGAGGAGATACAGGATATTATTCTGGATCTGGATTCCACAT  
 TATTCAGAGACGGAAACTACACCTGAGCCCGAGCACTGTAGTAACITTTATGTGGAGCAG  
 TATGGGAAAATGTTTTTCCAAACTTAACAGCTTATATGAGCTCTGGACCTCTTGTTCAT  
 GATATTAGCTAGACATAAGGCCATCTCTACTGGAAAGAATTATGGGACCAAGTAACAGT  
 TTAGTAGCCAAGGAGACACACCCGGACAGCTTAAGGGCGATATACGGTACAGACGAGCTC  
 AGGAACGCACTTCATGGGAGCAATGACTTCGCTGCCTCAGAGCGAGAGATCAGGTTTCATG  
 TTCCAGCCGTGATTATTGAACCCATTCCAATTGGACAAAGCCGCTAAGGACTACATAAACTT  
 GTACGTAGCGCCAAACCCTACTTCAAGGACTCACAGAGCTTTGTAAGGAAAAGCCACCAGA  
 CCCTTACCTCTGGCTCGCTGATTGGCTGATGAAAAATAATCCCAACAAACCTAAACTTTGTC  
 AITTCAGTGACAGAAGAGCCTTAG

Digestion of 'PvuI' restriction enzyme



B

Transfection with nm23-m5 cDNA into CHO cell



G418 selection during 30 days

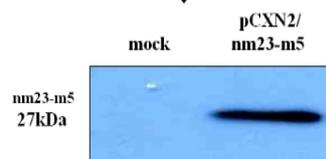
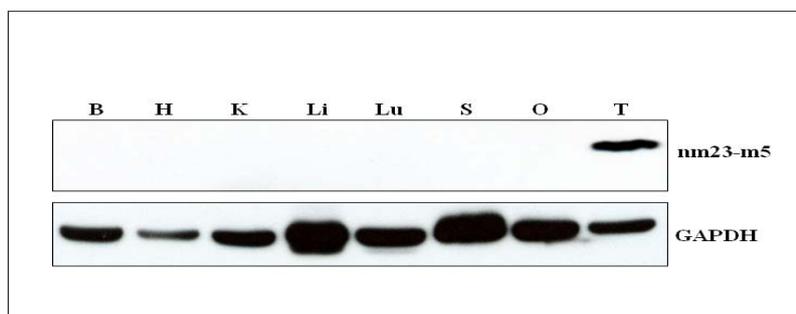


Figure 15. Flow chart of establishment of nm23-m5 stable CHO cell line.



**Figure 16. Expression pattern of nm23-m5 by noncompetitive ELISA.** Analysis of nm23-m5 mRNA expression in various murine tissues. B, brain; H, heart; K, kidney.; Li, liver; Lu, lung; S, spleen; O, ovary; T, testis.

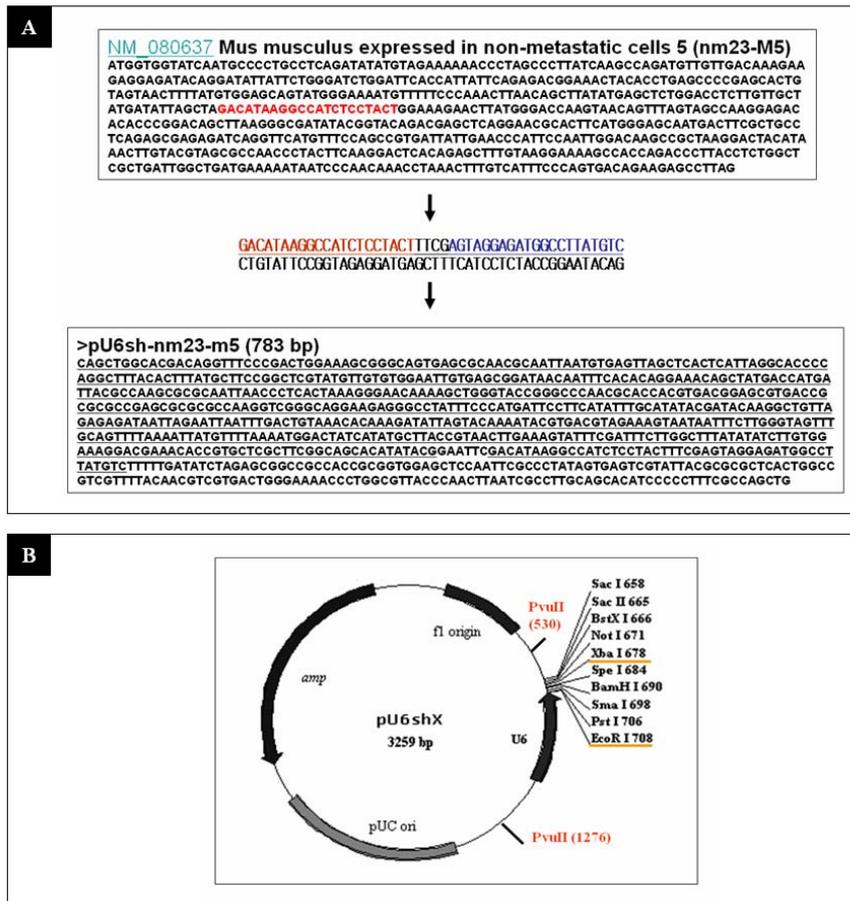
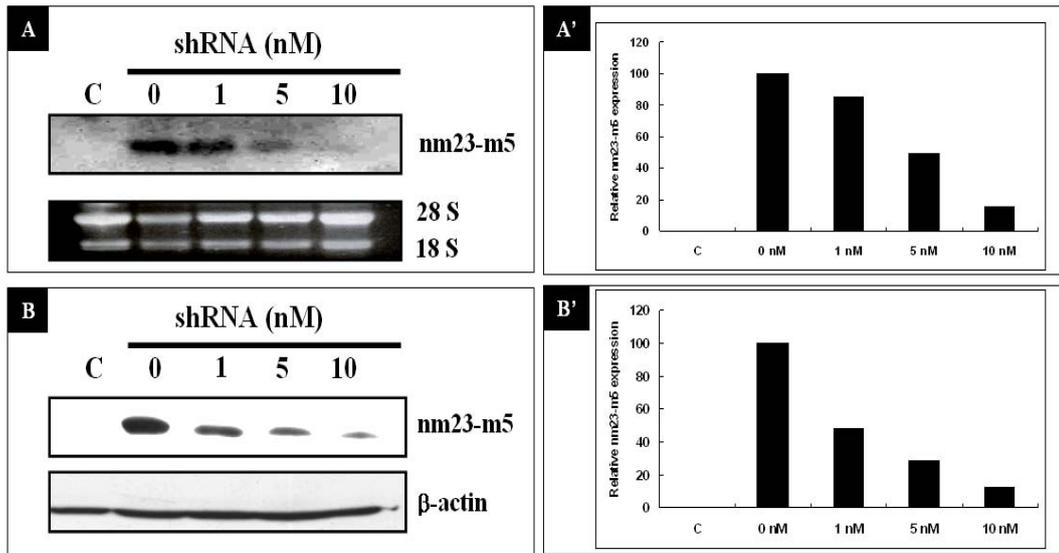


Figure 17. Target sequence of nm23-m5 for shRNA and construction design of nm23-m5 shRNA expression vector for the production of transgenic mice. The nm23-m5 sense and anti-sense was inserted into the XbaI and EcoRI-digested pU6shx-shRNA expression vector (pU6sh--nm23-m5).



**Figure 18.** Down-regulation of nm23-m5 expression by transfection of nm23-m5 shRNA into the CHO cells. A, B) Northern, western blot analysis of the RNA and protein level from cotransfection nm23-m5 and shRNA nm23-m5 in the CHO cell. A', B') The level of gene expression is expressed as relative intensity. Data are shown as means  $\pm$  SD (bars) of triplicate determinations.

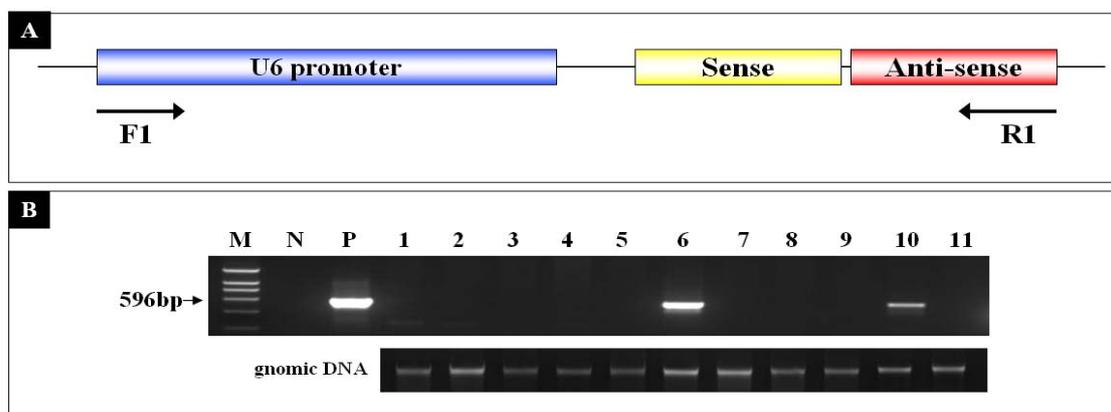
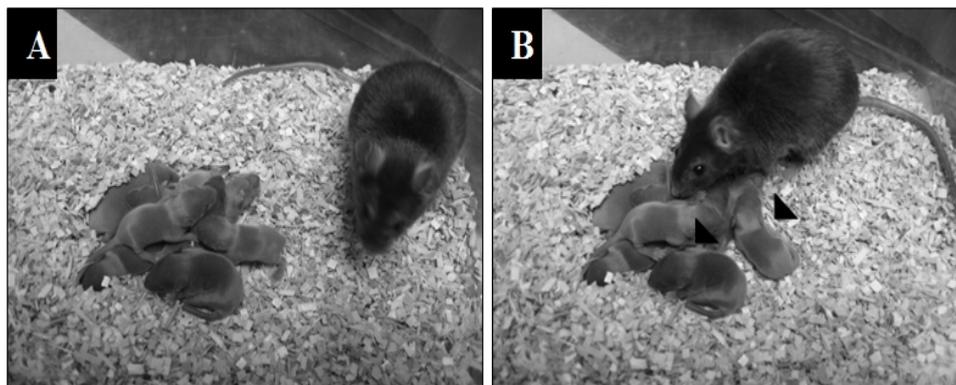
### 3. RNAi를 활용하여 nm23-m5 발현의 감소로 인한 haploid spermatid의 비정상적인 발달

shRNA nm23-m5의 다양한 copy수가 전달된 여러 hetero-transgenic 생쥐들을 microinjection 기법을 활용하여 만들었고 (표 1), shRNA nm23-m5이 전달된 생쥐의 nm23-m5의 발현 정도는 real-time RT-PCR 분석에 의해 확인하였다 (그림 19). 더욱이, shRNA nm23-m5가 전달된 hetero transgenic 생쥐들을 mating함으로써 homo-transgenic 생쥐를 만들 수 있었다. Nm23-m5유전자의 발현을 결정하기 위해, 대조군 (wild-type), hetero, 그리고 homo-transgenic 생쥐에서 RT-PCR과 western blot 분석을 수행하였다. Homo-transgenic 생쥐에서 nm23-m5의 발현 수준은 wild type과 hetero-transgenic 생쥐에서의 발현과 비교하였을 때 상당히 낮은 발현 패턴을 보였다 (그림 20A와 B).

Nm23-m5 shRNA 형질전환 생쥐의 정소 (B)의 조직학적 분석을 위해 HE 염색법에 의해 대조군의 정소 (A)와 비교 분석하였다. 대조군의 정소 절편에서 nm23-m5발현은 haploid 단계의 spermatocyte와 spermatid 단계의 정자에서 주로 관찰되었다. 특히 nm23-m5의 발현은 pachytene단계에 있는 정소의 세포질에서 높게 존재함을 확인하였다 (A 그리고 A'). 그러나 nm23-m5 shRNA로 형질전환된 생쥐의 정소에서는 대조군과 비교하였을 때 비정상적인 정자형성과정을 관찰할수 있었는데 특히 spermatocyte와 spermatid단계의 정자가 급격히 감소됨을 알수 있었다 (B 그리고 B'). 이러한 결과로 미루어 보아, nm23-m5의 발현은 sperminogenesis에서 중요한 역할을 하리라 사료된다 (그림 21).

**Table 3. Efficacy of transgenic mice harboring nm23-m5 shRNA**

Mouse strain	No. of ET embryos	No. of recipients	No. of offspring	No. of transgenic mice (%)
BDF1	213	8	31	2 (6.5%)



**Figure 19. Identification of transgenic mice harboring nm23-m5 shRNA by PCR analysis** (A) The construction design of nm23-m5 shRNA expression vector (B) nm23-m5 gene (596bp size) identification by PCR analysis. (M: size marker, N: negative control, P: positive control, Lane 1-11: numbers of pup)

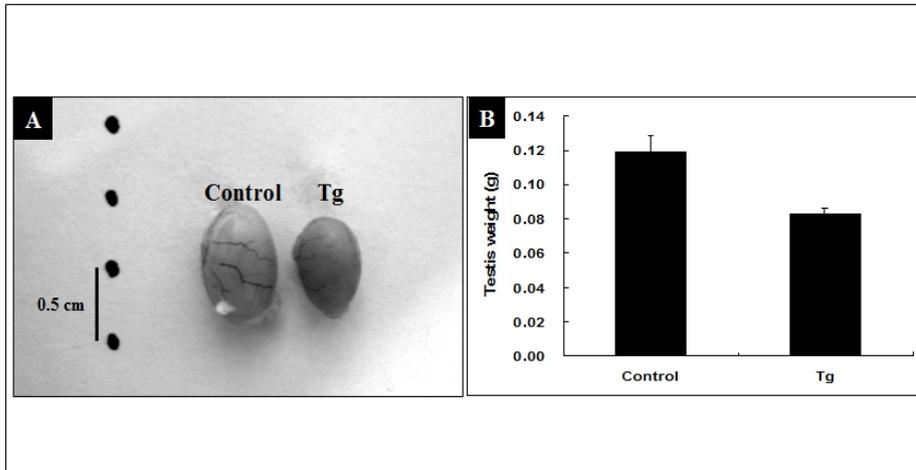
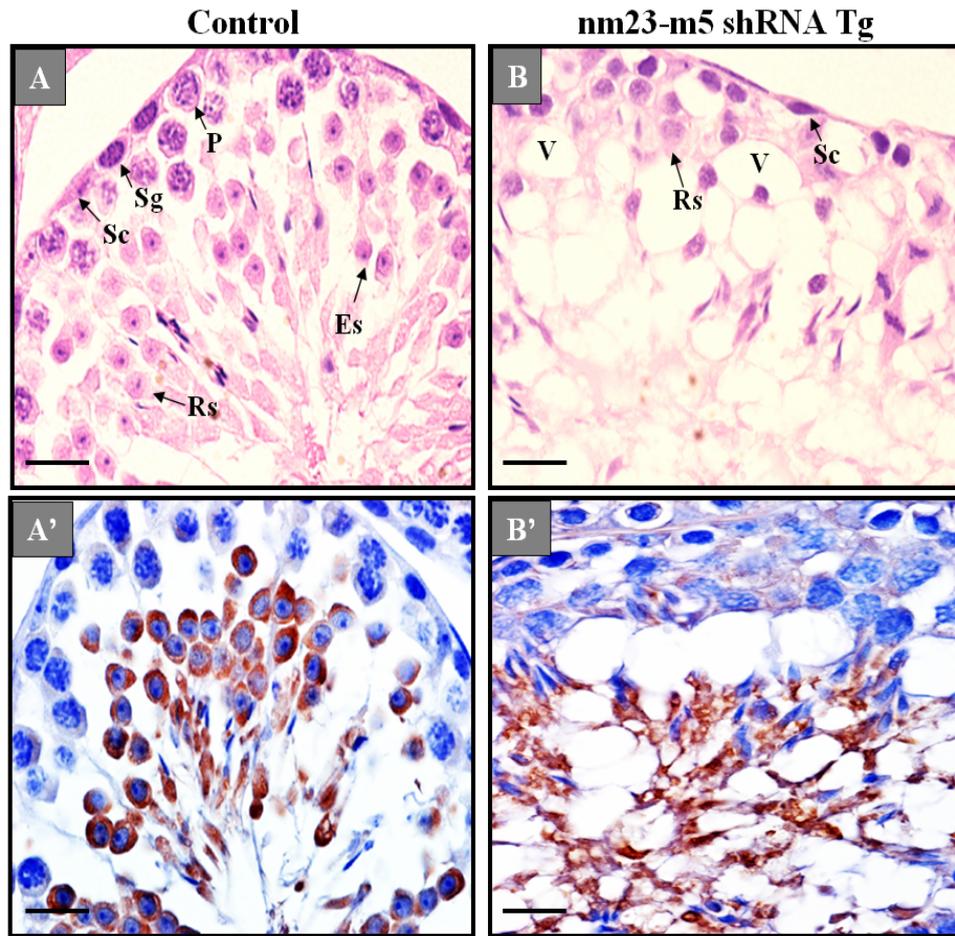


Figure 20. Difference of testis weight between control and nm23-m5 shRNA transgenic mice (control n=6, Tg n=2)



**Figure 21. Abnormal testes phenotype in nm23-m5 shRNA transgenic mice.** The wild-type adult (A) and nm23-m5 shRNA transgenic mouse testis (B) stained by hematoxylin and eosin. In wild type mice, nm23-m5 gene expression was observed in the spermatocytes and spermatids of haploid stage. Especially, nm23-m5 gene was strongly expressed in the cytoplasm of pachytene spermatocytes. The arrow indicate primary spermatocytes, spermatids expressed stage. In the nm23-m5 shRNA transgenic mouse testis, abnormal stage phenotype of spermatogenesis was observed as irregular pattern and the decrease of cell number was detected in spermatocytes and spermatids. Scale bars show 20  $\mu$ m. Es, elongating spermatids; P, pachytene spermatocyte; Rs, round spermatids; Sc, Sertoli cells; Sg, spermatogonium; V, vacuoles. (A, B) The sections were stained with hematoxylin and eosin. (A', B') Immunohistochemical analysis of testes of 8-week-old wild-type (A, A') and nm23-m5 shRNA transgenic mice (B, B') by nm23-m5-antibody.

#### 4. 마이크로어레이 기법을 활용한 정상 생쥐 정소와 nm23-m5 shRNA 형질전환 생쥐 정소간에 유전자 발현 분석

정상 생쥐 정소와 nm23-m5 shRNA 형질전환 생쥐 정소간에 유전자 발현을 분석하기 위해 마이크로어레이 기법을 활용하여 확인하였다. 그 결과 gpx2, gpx5, nm23-m5, Iba1, srf, 그리고 prohibitin 유전자의 발현에 차이를 보였다. 이들의 발현 정도를 정확히 수치화 하기 위해 real-time RT-PCR 기법을 이용하여 해 본 결과 대조군에 비해 hetero와 homo-nm23-m5 shRNA에서 이들 유전자들이 점증적으로 감소함을 확인하였다 (그림 22).

또한 real-time RT-PCR 기법을 활용한 흥미있는 유전자 (c-kit, GLI1, Stra8, Prohibitin, RAD51, GPX2, GPX5, MAK, Iba1, 그리고 nm23-m5)은 분화하는 germ cell 특이적 마커, antioxidant enzyme, 그리고 nm23-m5 유전자로서 대조군인 control에 비해 hetero 혹은 homo nm23-m5 shRNA 형질전환 생쥐의 정소에서 점증적으로 감소함을 확인하였다. (그림 23).

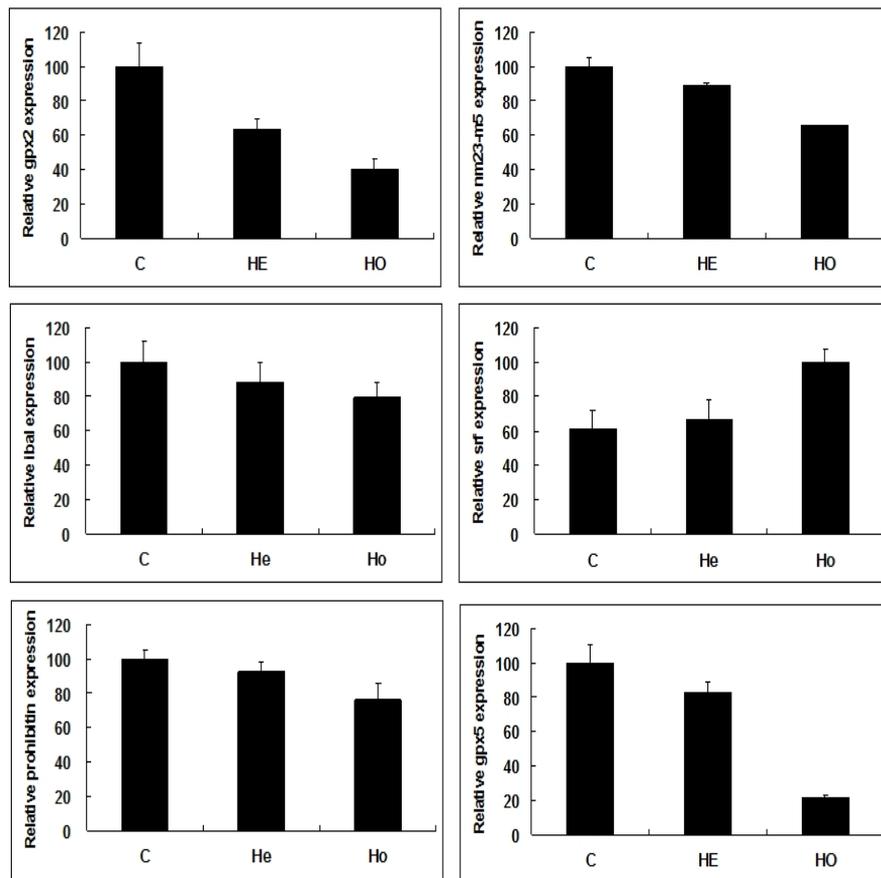


Figure 22. Analysis of gene expression between control testis and nm23-m5 shRNA transgenic mice using qRT-PCR.

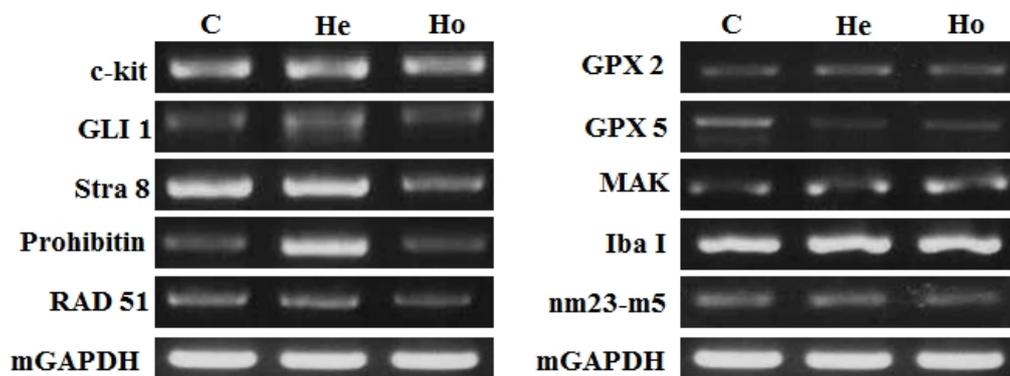


Figure 23. Analysis of interesting gene expression in testes between control, hetero nm23-m5 shRNA, and homo nm23-m5 shRNA transgenic mice. C; control testes, He; hetero nm23-m5 shRNA testes, Ho; homo nm23-m5 shRNA testes.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에 의 기여도

### 제1절 기술적 측면

- ▶ 정소 생식세포의 사멸에 관련된 인자를 yeast two-hybrid system과 Bax을 이용하여 동정함으로써 정자 형성 과정 기전을 이해함으로써 새로운 학문적 개념을 도출한다.
- ▶ 환경호르몬의 영향으로 나타나는 생식세포독성을 억제할 수 있는 유전자를 스크리닝 함으로써 전혀 새로운 환경호르몬 독성치료를 위한 실마리를 제공할 수 있다.
- ▶ 본 연구에 의하여 새로운 인자를 동정하고, 다른 인자들과의 상호작용에 대하여 연구를 수행한다면 세포사멸 분야의 연구 및 불임 치료제 개발에 크게 기여할 수 있으리라 사료된다.
- ▶ 또한, 세포사멸관련 연구분야는 현재 전세계적으로 많은 연구가 진행되고 있는 분야로, 본 연구를 성공적으로 수행하여 새로운 결과를 얻는다면 전세계적인 주목을 받는 것은 물론, 관련분야의 학문연구에 크게 기여할 수 있으리라 생각된다.

### 제2절 경제 · 산업적 측면

- ▶ 종축의 생산능력을 향상시킴으로서 농가의 소득증대 효과를 기대할 수 있다.
- ▶ 환경호르몬의 영향으로 나타나는 생식세포독성을 억제할 수 있는 유전자를 스크리닝하여 새로운 환경호르몬 독성치료를 위한 원천기술을 개발함으로써 배타적인 원천특허를 확보하여 국내 제약산업의 발전을 도모함으로써 지금으로서는 예상할 수 없을 정도의 수입대체효과와 수출에 의한 국가 경제 발전에 크게 기여 할 수 있으리라 사료된다.
- ▶ 본 연구과제의 수행에는 분자생물학 및 생화학적인 기법이 근간을 이루고 있으므로 본 연구에 관여하는 연구자에게 다양한 연구능력을 습득할 수 있는 기회를 부여함으로써 BT산업을 포함한 국가산업에 공헌할 수 있는 연구인력을 양성할 수 있으리라 생각한다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제1절 활용계획

본 연구에서는 세포사멸의 유도인자인 Bax를 이용하여 새로운 survival factor를 찾고자하는 것으로, 전혀 새로운 미지의 인자를 동정해낼 수 있는 충분한 가능성을 가지고 있다고 하겠다. 따라서, 본 연구에 의하여 새로운 인자를 동정하고, 다른 인자들과의 상호작용에 대하여 연구를 수행한다면 다음과 같은 연구 및 관련질환 치료제의 개발에 크게 기여할 수 있으리라 사료된다.

- ▶ 정소 생식세포의 사멸에 관련된 인자를 yeast two-hybrid system과 Bax을 이용하여 동정함으로써 정자 형성 과정 기전에 대한 새로운 연구방법을 제시할 수 있다.
- ▶ 본연구를 통하여 정소 생식 세포의 사멸을 억제하는 유전자를 스크리닝한다면, 새로운 불임 치료제 개발에 대한 실마리를 제공할 수 있다.
- ▶ 본연구는 yeast two-hybrid system을 이용하여 효율적으로 관련 유전자를 대량으로 스크리닝 할 수 있기 때문에 목표달성 가능성이 높다.
- ▶ 또한, 세포사멸관련 연구분야는 현재 전세계적으로 관심이 많은 분야로, 본연구를 성공적으로 수행하여 새로운 결과를 얻는다면 전세계적인 주목을 받을 수 있는 연구라 사료된다.

### 제2절 활용방안

- ▶ 본 연구과제에서 Yeast Two-Hybrid 시스템을 이용하여 정소조직에서 ROS억제 유전자 및 ROS를 제거할수 있는 정소 특이적인 antioxidant enzymes을 대량으로 스크리닝함으로써 생식세포의 손상을 억제할 수 있는 기술을 개발하여 가축에서는 종축의 생산능력의 향상을, 사람에서는 남성불임의 치료분야에 응용하고자 한다.
- ▶ 항암제 및 방사선요법치료시 대량으로 발생하는 ROS가 생식세포에 손상을 야기함으로써 나타나는 불임등의 부작용을 줄일 수 있는 Target 분자를 동정할 수 있는 system의 구축에 활용할 수 있다.
- ▶ 본 연구과제에서 제안한 연구분야는 전세계적으로 초기연구단계로 본 연구를 수행함으로써 세계적인 원천기술을 확보하고 배타적인 지적재산권을 확보하여 궁극적으로 제약산업분야를 비롯한 BT산업체에 기술을 이전할 수 있으리라 생각된다.

## 제 7 장 참고문헌

Brinster, C. J., Ryu, B. Y., Avarbock, M. R., Karagenc, L., Brinster, R. L. and Orwig, K. E. (2003) Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. *Biology of reproduction*, 69, 412-420.

Brinster, R. L. and Avarbock, M. R. (1994) Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 11303-11307.

Choi, Y. J., Ok, D. W., Kwon, D. N., Chung, J. I., Kim, H. C., Yeo, S. M., Kim, T., Seo, H. G. and Kim, J. H. (2004) Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL- and p53-independent manner. *FEBS letters*, 575, 41-51.

Choi, Y. J., Song, H., Kwon, D. N., Cho, S. K., Kang, S. J., Yoe, S. M., Kim, H. C., Lee, H. T., Park, C. and Kim, J. H. (2006) Significant IgG-immunoreactivity of the spermatogonia of the germ cell-depleted testis after busulfan treatment. *Animal reproduction science*, 91, 317-335.

Dobrinski, I., Avarbock, M. R. and Brinster, R. L. (1999) Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biology of reproduction*, 61, 1331-1339.

Dobrinski, I., Avarbock, M. R. and Brinster, R. L. (2000) Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Molecular reproduction and development*, 57, 270-279.

Franca, L. R. and Cardoso, F. M. (1998) Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. *Tissue & cell*, 30, 573-582.

Horan, P. K., Melnicoff, M. J., Jensen, B. D. and Slezak, S. E. (1990) Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking. *Methods in cell biology*, 33, 469-490.

Horan, P. K. and Slezak, S. E. (1989) Stable cell membrane labelling. *Nature*, 340, 167-168.

Johnston, D. S., Russell, L. D. and Griswold, M. D. (2000) Advances in spermatogonial stem cell transplantation. *Reviews of reproduction*, 5, 183-188.

Kim, J. H., Jung-Ha, H. S., Lee, H. T. and Chung, K. S. (1997) Development of a

positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. *Molecular reproduction and development*, 46, 515-526.

Kubota, H., Avarbock, M. R. and Brinster, R. L. (2003) Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 6487-6492.

Kwon, D. N., Seo, H. G. and Kim, J. H. (2002) Cloning, sequencing, and expression analysis of the porcine uroplakin II gene. *Biochemical and biophysical research communications*, 293, 862-869.

Nagano, M., Patrizio, P. and Brinster, R. L. (2002) Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertility and sterility*, 78, 1225-1233.

Oatley, J. M., de Avila, D. M., McLean, D. J., Griswold, M. D. and Reeves, J. J. (2002) Transplantation of bovine germinal cells into mouse testes. *Journal of animal science*, 80, 1925-1931.

Ogawa, T., Dobrinski, I. and Brinster, R. L. (1999) Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat. *Tissue & cell*, 31, 461-472.

Ohta, H. and Wakayama, T. (2004) Full-term development of offspring using round spermatids produced ectopically from fetal male germ cells. *The Journal of reproduction and development*, 50, 429-437.

Olive, V. and Cuzin, F. (2005) The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37, 246-250.

Orwig, K. E. and Schlatt, S. (2005) Cryopreservation and transplantation of spermatogonia and testicular tissue for preservation of male fertility. *Journal of the National Cancer Institute*, 51-56.

Russell, L. D. and Brinster, R. L. (1996) Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *Journal of andrology*, 17, 615-627.

Schlatt, S., Rosiepen, G., Weinbauer, G. F., Rolf, C., Brook, P. F. and Nieschlag, E. (1999) Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Human*

reproduction (Oxford, England), 14, 144-150.

Wistuba, J., Schlatt, S., Cantauw, C., von Schonfeldt, V., Nieschlag, E. and Behr, R. (2002) Transplantation of wild-type spermatogonia leads to complete spermatogenesis in testes of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate response element modulator-deficient mice. *Biology of reproduction*, 67, 1052-1057.

Yoshinaga, K., Nishikawa, S., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., Fujimoto, T. and Nishikawa, S. (1991) Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development* (Cambridge, England), 113, 689-699.