

소의 초기 배 발생단계별 Telomeric DNA 함량 및 Telomerase Activity 분석

진주산업대학교 동물생명과학과¹, 국립축산과학원 가축유전자원시험장²,
경상대학교 응용생명과학부³, 엘르메디산부인과⁴

정예화^{1,4} · 이수희¹ · 조상래² · 공일근³ · 조재동⁴ · 손시환^{1*}

Telomeric Dynamics and Telomerase Activity in Early Bovine Embryos

Yei Hwa Jung^{1,4}, Soo Hee Lee¹, Sang-Rae Cho², Il Keun Kong³,
Jae Dong Cho⁴, Sea Hwan Sohn^{1*}

¹Department of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University, ²Animal Genetic Resources Station,
National Institute of Animal Science, ³Division of Applied Life Science (BK21 Program),
Gyeongsang National University, ⁴Ellemedi Obstetrics and Gynecology

Objective: This study was carried out to analyze the amount of telomeric DNA and telomerase activity in early bovine embryos.

Methods: The amount of telomeric DNA in early bovine embryos at the 8 cell, morula and blastocyst stages was analyzed by Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization (Q-FISH) technique using a bovine telomeric DNA probe. Telomerase activity was analyzed by Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP assay).

Results: The relative amount of telomeric DNA in early bovine embryos was gradually increased from 8 cell to blastocyst stage. It was not significantly associated with the grade of embryo quality. While telomerase activity was detected in the early bovine embryos at these stages, it significantly increased at morula stage and showed maximum activity at the blastocyst stage.

Conclusion: The amount of telomeric DNA and the telomerase activity of bovine embryos increase during the progression of early embryogenesis, suggesting a positive correlation between telomeric DNA and telomerase activity. The telomerase activity seems to increase to maintain the levels of telomeric DNA through embryo development which are required for extensive cell division.

[Korean. J. Reprod. Med. 2009; 36(2): 101-109.]

Key Words: Telomere, Telomerase, Q-FISH, TRAP, Bovine embryo

텔로미어 (telomere)는 nucleoprotein 복합체로 진핵생물 염색체의 말단부에 존재하는 TTAGGG의 임의반복염기서열 (tandem repeated DNA sequence)과 이와 결합되어 있는 단백질들로 구성되어 있으며 염색체를 보호하는 capping 구조로 알려져 있

다.¹⁻³ 진핵생물의 텔로미어는 선형구조와 복제 시 DNA polymerase의 단향성 (5'-3')으로 인해 말단 부분의 복제 문제점 (end replication problem)을 가지고 있다.⁴ 그러므로 세포분열을 거듭할수록 텔로미어 길이는 짧아지게 되고 어떤 한계점 (crisis)에 도달하게 되면 세포는 분열을 멈추고 세포사멸 (apoptosis)이 일어나 정상적인 기능을 잃게 되며 노화가 진행되는 것으로 알려져 있다.^{5,6} 이런 말단 부분의 복제 문제점을 극복하는 역할을 하는 것이 텔로머레

주관책임자: 손시환, 우) 660-758 경남 진주시 칠암동 150번지,
진주산업대학교 동물생명과학과
Tel: (055) 751-3264, Fax: (055) 761-8308
e-mail: shsohn@jinju.ac.kr

*이 논문은 2009년도 진주산업대학교 기성회 연구비 지원에 의하여 연구되었음. 이에 감사드립니다.

이스 (telomerase)이다. 텔로머레이스는 ribonucleo-protein으로 주형 RNA 성분과 catalytic 기능을 가진 단백질 복합체로 구성되어 있으며, 텔로미어 길이를 유지하기 위한 직접적인 효소로 염색체의 3' 말단에 telomeric DNA를 부가시키는 역할을 한다.⁴ 사람에서 텔로머레이스의 구성은 telomerase RNA (hTR or TERC)와 telomerase reverse transcriptase (TERT) 및 dyskerin으로 구성되어 있다.⁷ 일반적으로 대부분의 사람의 체세포에서는 출생 후 텔로머레이스 활성도가 없으므로 텔로미어 길이가 줄어들게 되어 제한적인 복제 수명 (limited replicative life)을 가지며 노화가 진행되게 된다.⁸ 그러나 분열이 왕성한 세포인 생식세포, 줄기세포, 불멸화 세포, 암세포에서는 일정한 텔로미어 길이를 유지하기 위해 텔로머레이스 활성도가 나타나는 것으로 알려져 있으며, 텔로머레이스의 부적절한 활성화에 따른 세포의 통제 불능 증식은 사람에게서 나타나는 전체 암의 90% 정도에서 관찰되는 것으로 알려져 있다.^{6,9} 따라서 텔로미어와 텔로머레이스는 세포의 노화, 증식, 분화 및 암세포 등과 관련한 연구들에 주요 표적이 되고 있으며 사람을 포함한 다양한 동물모델의 세포들에서 이들의 존재와 역할에 관한 많은 연구들이 수행되고 있다.

최근 생식세포에 대한 텔로미어와 텔로머레이스의 연구도 활발하게 진행되고 있다. 생식세포 형성과정 중 난자형성과정 (oogenesis)과 정자형성과정 (spermatogenesis)에서 텔로미어와 텔로머레이스의 관계에 대한 다양한 연구 결과들이 보고된 바 있는데 쥐의 난자형성과정에서 텔로미어 길이와 텔로머레이스 활성도는 정비례 하는 결과를 보고하였다.^{10,11} 또한 텔로머레이스 유전자를 제거한 mouse (mTR knock out mouse)의 경우 후기세대에 배란되는 난자 수의 감소와 고환 크기 감소, 1차 정모세포 (primary spermatocyte)의 수 감소 및 정자 DNA fragmentation 유발 등 불임이 야기된다는 결과를 발표하였다.¹²⁻¹⁴ 사람의 정상적인 난자의 경우 텔로머레이스 활성도가 없는 것은 텔로미어 길이의 단축과 연관이 되며 이것은 생식력 노화 (reproductive

senescence)와 염색체 이상과 관련이 되므로 텔로미어 길이가 건강한 난자와 배아를 선별하는 표지자 (marker)로 이용될 수 있을 것이라고 보고하였다.¹⁵ 반면 쥐의 정자형성과정에서 텔로미어 길이와 텔로머레이스 활성도간에는 반비례 관계를 보고하여 텔로미어 길이와 텔로머레이스 활성도 간에 꼭 정비례 관계만 성립하는 것이 아님을 증명하였다.¹¹ 사람과 소를 포함한 여러 종에서 수정 후 배아형성과정 (embryogenesis) 중 배아의 텔로미어 길이와 텔로머레이스 활성도에 대한 연구로서는 8 세포기와 상실배기의 배아에 비해 배반포기 배아에서 텔로미어 길이가 길었으며, 텔로머레이스 활성도는 체외수정된 모든 발달단계의 배아에서 나타나고 수정 후 점진적으로 증가하다가 배반포기에서 가장 높다고 하였다.¹⁶⁻¹⁸

이러한 결과들을 종합해 볼 때 수정란 초기 배아의 텔로미어 및 텔로머레이스 활성도 연구는 배아형성과정 중 세포분열양상을 구명할 수 있는 좋은 테마로 사료된다. 또한 난자형성과정과 정자형성과정에서 텔로미어와 텔로머레이스 활성도가 정비례 관계가 있는 것이 아님으로 배아형성과정 동안 이들의 관계와 양적변화 양상도 규명되어야 할 것으로 보인다. 더불어 정상적인 난자에서 텔로머레이스 활성도가 없는 것은 텔로미어 길이 단축의 결과로 나타나며 이것이 건강한 난자와 배아를 선별하는 표지자로 이용될 가능성에 대해서도 적극적인 검토가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 소의 초기 배 발생단계별 체외수정란을 대상으로 telomeric DNA의 함량 분석과 텔로머레이스 활성도를 분석하여 배아형성과정에서 텔로미어 및 텔로머레이스의 변화 양상을 규명하고자 한다. 더불어 telomeric DNA 함량 분석을 통한 배아의 질 (quality)을 선별하는 표지자로서의 이용 가능성을 모색하고, 배아 및 태아와 성체의 telomeric DNA 함량과 텔로머레이스 활성도를 비교함으로써 성장에 따른 이들의 변화 양상도 고찰하고자 한다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물 및 재료

소 수정란에서 유래된 8 세포기, 상실배기 및 배반포기 배아를 대상으로 telomeric DNA의 양적 분석과 텔로머레이스 활성도 분석을 시행하였다. 공시된 배아들은 국립축산과학원 가축유전자원시험장과 경상대학교에서 생산한 배아를 공여 받아 사용하였다.

도축 한우 암소의 난소를 운반한 후 난소를 식염수로 3회 이상 세척하고 18G 주사침을 이용하여 3~6 mm 크기의 난포로부터 난포액을 흡인하여 난구세포가 부착된 난포란을 채취하였다. 난구세포가 충분히 부착되어 있고 세포질이 균질한 난자를 선별한 후 HEPES (Sigma Chem, St Louis, MO, USA)로 3회 세척하고 TCM199 (Sigma Chem)를 기본 배양액으로 0.1% PVA (Sigma Chem) 또는 0.1 mM L-cysteine (Sigma Chem)을 첨가하여 5% CO₂, 96~98% 습도, 39°C 배양기에서 22~24시간 동안 체외 성숙을 유도하였다. 체외 성숙된 난포란의 체외수정은 동결 한우 정액을 10 mM caffeine (Sigma Chem)이 든 BO-¹⁹ 배양액으로 2회 이상 세정하여, 체외수정능 획득을 유도하였고, 5 mM caffeine + 1 µg/ml heparin이 포함된 BO+ 배양액으로 체외수정을 실시하였다. 수정 18~24시간 후 방사관 세포가 부착된 상태까지 난구세포를 피펫으로 제거하여 수정 확인을 하였다. 체외 배양은 CR1aa를 기본 배양액으로 5% FBS (Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA), 또는 0.1 mM L-cysteine + 0.3% BSA (Sigma Chem)를 함유한 배양액에서 2~6일간 체외 배양을 실시하여 발생단계별 배아를 수집하였다.²⁰

2. 수정란 표본제작

형광보인분석 (Fluorescence in situ Hybridization; FISH)을 위한 수정란의 표본제작과정은 손 등²¹ 및 Han 등²²이 제시한 방법을 다소 변형하여 실시하였다. 각 발생단계별로 수집한 수정란은 D-PBS

(Gibco)에서 한번 세척하고 투명대를 연화시키기 위하여 0.1% Protease에 20초~1분간 처리한 후 다시 세척하고 1.93% Sodium citrate (Sigma Chem)용액과 0.56% KCl (Sigma Chem)에서 8 세포기 배아는 10~15분, 상실배기와 배반포기 배아는 20~30분간 저장처리를 하였다. 처리한 배아는 슬라이드 중앙으로 옮긴 후 Methanol, 3: Acetic acid, 1로 조성된 고정액으로 할구를 분리시켰다. 이를 다시 2차 고정처리액으로 20분간 침지한 후 건조시켜 위상차 현미경을 이용하여 핵의 유무를 확인한 후 실험에 공시하였다.

3. Telomeric DNA probe의 제작 및 양적형광보인 분석

소 수정란의 텔로미어 함량 분석을 위하여 양적형광보인법 (Quantitative-fluorescence in situ Hybridization; Q-FISH)으로 손 등²³이 제시한 방법을 일부 수정하여 실시하였다. 슬라이드 표본을 1 µg의 RNase A (Sigma-Aldrich)가 함유된 2 × SSC 용액에 넣고 37°C의 항온 수조에서 30분간 처리하였다. 이후 초자수로 세척하고 80%, 90%, 100% 에탄올로 탈수시켰다. Q-FISH를 위한 소의 telomeric DNA probe의 제작은 (CCCTAA)_n으로 구성된 42 mers 단일 oligomers를 primer로 이용하여 PCR을 수행하고 이의 증폭된 산물을 PCR-DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany)로서 digoxigenin labeling을 하였다. Hybridization 용액은 13 µl formamide와 5 µl의 4 × hybridization solution (8 × SSC, dextran sulphate 40%, DNA MBB grade 4 mg/ml; Roche) 및 telomeric DNA probe 2 µl (100 ng/µl)를 함유한 총 20 µl로 제조하였다. Hybridization 용액을 표본 슬라이드의 가장자리에 떨어뜨리고 커버글라스 (22 × 22 mm)로 덮은 후 rubber cement로 밀봉하였다. 이를 72°C에서 10분간 처리하여 probe와 표본 DNA를 변성시키고 다시 38.5°C에서 12시간 이상 접합시킨 후 2 × SSC, PN buffer (7 mM sodium phosphate, pH 8.0, containing 0.1% Nonidet 40; Roche)로 세척하였다. 접합 탐지를 위하여 anti-dig-fluorescein

Table 1. FISH efficiency on *in vitro* fertilized bovine embryos at early embryonic stage

	8 cell	Morula	Blastocyst	Total
No. of embryos	44	57	66	167
No. of embryos analyzed by FISH	34	28	48	110
FISH efficiency (%) [*]	77.3	49.1	72.7	65.9

* Values are the percentages of the number of embryos analyzed by FISH to the total number of embryos used for the experiment

Yei Hwa Jung. *Telomeric Dynamics and Telomerase Activity in Early Bovine Embryos*. *Korean J Reprod Med* 2009.

isothiocyanate (FITC) conjugate (10 ng/mL in PN buffer containing 5% non-fat dry milk; Roche)를 떨어뜨리고 38.5°C에서 30분간 배양하였다. 배경염색으로는 propidium iodide solution (PI)을 이용하였다. 형광접합 발현 양상은 PI와 FITC 파장대의 검용 필터를 부착한 형광현미경 (Model AX-70, Olympus, Tokyo, Japan)으로 검경하고 probe의 접합 양상을 분석하였다. 관찰된 할구의 상을 디지털 카메라 (Model PM-70, Olympus)를 이용하여 획득하고 저장된 상은 이미지 분석 프로그램 (MetaMorph, UIC, Pennsylvania, USA)을 이용하여 배경염색된 PI의 붉은색 핵의 면적 대비 핵 내 telomeric DNA와 접합된 녹색의 FITC의 분포비율을 분석하는 방법으로 핵 대비 telomeric DNA의 상대적 함량을 계산하였다.

4. 텔로머레이스 활성도 분석

텔로머레이스 활성도 분석은 Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) 방법을 이용하였다.²⁴ TRAP의 수행은 Telomerase Detection Kit (Intergen Company, Purchase, NY, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 실시하였다. 채취한 각 조직들은 3-cholamidopropyl dimethylammonio-1-propane-sulfonate lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리하여 정량하고,²⁵ 분리된 ribonucleoprotein을 대상으로 PCR을 수행하였다. 본 PCR의 조건은 30°C에서 30분간 TS-telomerase product를 신장시킨 다음 94°C 30초, 59°C 30초 및 72°C에서 30초간 3단계로 35 사이클을 실시하였다. 증폭된 텔로머레이스는 15% polyacrylamide gel (Promega, Madison, WI, USA) 전기영

동을 통해 300V에서 3시간 30분 정도 실시하고 ethidium bromide (Sigma-Aldrich)로 염색한 후 발현된 층 (ladder)을 확인하였다.

5. 통계 분석

소 수정란의 초기 배 발생단계별 telomeric DNA의 함유율 비교는 SAS package (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)를 이용해서 ANOVA/Tukey 검정으로 평균 값간 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 소 수정란 발생단계별 telomeric DNA 함량 분석

소 수정란의 초기 배 발생단계별 telomeric DNA의 함량 분석을 위하여 각 단계별 8 세포기배, 상실배, 배반포배 29~46개의 수정란으로부터 할구를 분리하여 표본을 제작하고 이들에 대하여 telomeric DNA probe를 이용하여 FISH를 수행하였다. 8 세포기배는 모든 할구들을, 상실배와 배반포배의 경우는 배아 당 최대 20개 이상씩의 할구를 대상으로 각각의 상을 획득하고 Image analysis program (MetaMorph[®])을 이용하여 핵 대비 telomeric DNA의 함량을 분석하였다. Table 1은 이러한 방법을 이용하여 발생단계별 배아에 대한 분석 방법의 효율성을 검증한 결과이다. 8 세포기 배아의 경우 44개의 배아 중 34개가 분석 가능하여 77%의 효율성을 나타내었고, 상실배의 경우 이보다 훨씬 낮은 49%, 배반포배는 73% 정도로 공시된 전체 배아의 66%

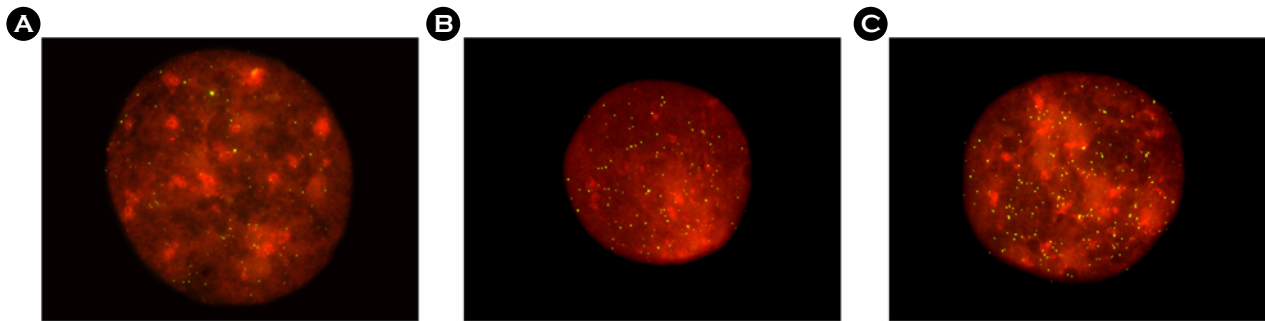


Figure 1. Telomeric DNA distribution on the nuclei of bovine blastomeres after FISH using a telomeric DNA probe. Nuclei from blastomeres of 8 cell (A), morula (B), and blastocyst embryo (C) are shown, respectively (Obj. ×100).

Yei Hwa Jung, Telomeric Dynamics and Telomerase Activity in Early Bovine Embryos. Korean J Reprod Med 2009.

Table 2. The relative amount of telomeric DNA on *in vitro* fertilized bovine embryos at early embryonic stage by Q-FISH

	8 cell	Morula	Blastocyst
No. of embryos	33	29	46
No. of blastomeres	160	544	915
Relative amount of telomeric DNA (%) [*]	2.465±0.035 ^c	2.726±0.018 ^b	2.989±0.018 ^a

^{*}The relative amount of telomeric DNA is the percentage of telomeric DNA to total genomic DNA in each cell.
^{abc} Values are mean ± SE. The values with different superscripts show statistical significance (p<0.001)

Yei Hwa Jung, Telomeric Dynamics and Telomerase Activity in Early Bovine Embryos. Korean J Reprod Med 2009.

Table 3. The relative amount of telomeric DNA of bovine blastocyst according to the grades of embryo quality

	Grade 1 [*]	Grade 2	Grade 3
No. of blastocyst	7	27	12
Relative amount of telomeric DNA(%) [†]	3.035±0.045	3.000±0.022	2.922±0.038

^{*} Grades were determined according to the guidelines provided by Gardner et al (2004) and Dokras et al (1993)

[†] Values are mean ± SE. There is no statistical significance between values

Yei Hwa Jung, Telomeric Dynamics and Telomerase Activity in Early Bovine Embryos. Korean J Reprod Med 2009.

정도가 분석이 가능하였다.

Figure 1은 FISH 방법에 의한 소 수정란의 초기 배아의 telomeric DNA의 분포 양상을 나타낸 것이다. 핵 내 전체 genomic DNA는 PI에 의해 붉게 염색되고 telomeric DNA는 FITC로 탐지되어 녹색 spot의 형태를 띠며 일정한 분포 양상이 없이 핵 내 산재되어 있는 것을 확인할 수 있다.

Q-FISH 방법에 의한 소의 8 세포기배, 상실배 및 배반포배로부터 분석된 telomeric DNA의 상대

적 함량 값을 Table 2에 제시하였다. 소의 배 발생 단계별 각 세포들의 평균 telomeric DNA의 함유율은 8 세포기배가 2.47%, 상실배가 2.73%, 배반포배가 2.99%로 발생과정이 진행됨에 따라 유의적인 양적 증가를 나타내었다 (p<0.001).

2. 수정란 질에 따른 telomeric DNA 함량 분석

Table 3은 소의 초기 수정란 중 배반포배의 질 (quality)에 따른 telomeric DNA 함량을 나타낸 것

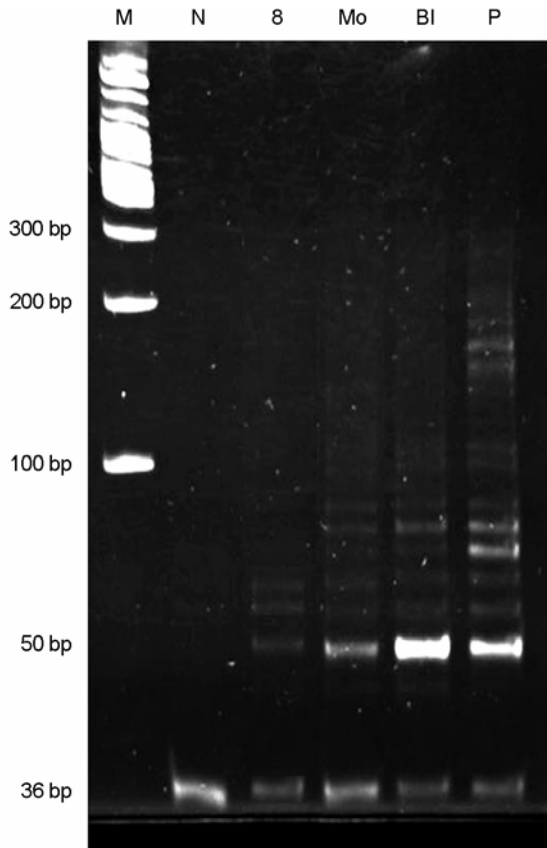


Figure 2. Telomerase activity of *in vitro* fertilized bovine embryos by TRAP assay. M, 100 bp size marker; N, negative control; 8, 8 cell embryos; Mo, morula embryos; BI, blastocyst embryos; P, positive control (TSR 8).

Yei Hwa Jung. *Telomeric Dynamics and Telomerase Activity in Early Bovine Embryos.* Korean J Reprod Med 2009.

이다. 수정란의 질은 Gardner²⁶와 Dokras²⁷의 기준에 의해 가장 우수한 등급부터 1등급, 2등급, 3등급으로 분류를 하였다. 1등급은 포배강이 중앙에 위치하며 내세포괴 (inner cell mass)와 영양세포괴 (trophectoderm)의 구별이 뚜렷하며 모두 많은 수의 세포들이 조밀하게 결합되어 있는 배아, 2등급은 하나 이상의 액포 (vacuole)가 존재하며 내세포괴와 영양세포괴의 구별이 뚜렷하지 않고 세포의 수가 많지 않으며 느슨하게 결합되어 있는 배아, 3등급은 내세포괴와 영양세포괴의 구별이 모호하며 내세포괴에 퇴화되어 있는 부분이 있으며 세포의 수가 적은 배아들로 분류하였다. 본 분석 결과 수정란의 등급에 따른 telomeric DNA의 함량 차이는 없

는 것으로 나타났다.

3. 소 수정란의 발생단계별 텔로머레이스 활성도 분석

소 수정란의 초기 배 발생단계별 텔로머레이스 활성도를 분석하는 방법으로 PCR에 기초를 둔 TRAP assay 기법²⁴을 이용하였다.

Figure 2는 소 수정란의 발생단계별 배아들의 텔로머레이스 활성도 양상이다. 본 그림의 가장 아래 band는 primer-dimer (TS primer와 reverse primer)로 36 bp (S-IC; substrate internal control)이며, 그 윗 band부터 telomerase product로 telomeric repeats가 2번 반복된 14 bp (5'-AG(TTAGGG)₂-3')가 증폭되어 50 bp에서 band가 나타나고 계속적으로 telomeric repeat인 TTAGGG가 6 bp씩 증폭되어 ladder가 형성된 것을 볼 수 있다. 이러한 ladder의 반복 발현 양상으로 텔로머레이스 활성 정도를 나타낸다.

분석 결과 소 수정란의 초기 배 발생단계인 8 세포배, 상실배 및 배반포배의 모든 배아에서 텔로머레이스 활성도를 나타내며 상실배에서 증가하여 배반포배에서 가장 강한 활성을 보였다.

고 찰

소 수정란 유래 초기 배 발생단계별 telomeric DNA의 함량 분석을 위하여 Q-FISH를 수행하였다. 본 분석 방법의 효율성을 검증한 결과 각 배아 발달단계별 다소의 차이를 보이나 공시된 전체 배아에서 66% 정도의 양호한 분석 효율성을 나타내었다 (Table 1). 발달단계 중 상실배기의 특히 낮은 효율성은 할구의 조밀성으로 인해 고정처리하는 과정에서 핵의 손실과 손상에 기인된 것으로 사료된다.

Q-FISH 방법으로 분석한 소의 초기 수정란의 배 발생단계에서 각 할구들의 telomeric DNA 함유율은 발생과정이 진행됨에 따라 유의적인 양적 증가를 나타내었다 ($p < 0.001$). 이와 같이 소의 배아형성 과정 중 발달단계가 진행됨에 따라 telomeric DNA

함량이 증가되는 양상은 TRF 방법으로 텔로미어 길이를 분석한 결과 상실배에 비해 배반포배의 길이가 유의적으로 길었다는 보고 (15.8 ± 3.1 kb vs. 28.7 ± 7.4 kb)¹⁷와도 잘 일치되는 결과이다. 또한 마우스 배 발달단계별 Q-FISH에 의한 telomeric DNA 함량 분석에서 2~4 세포기, 8 세포기 및 상실배기의 배아간에는 함량의 차이가 없었으나 배반포배에서는 유의적으로 증가하였다고 하였다.²⁸

한편, 사람의 정상적인 난자의 경우 텔로미어스 활성도가 없는 것은 텔로미어 길이의 단축과 연관이 되어 생식력 감소, 염색체 이상을 유발함으로써 이것은 난자를 선별하는 marker로 이용될 수 있을 뿐 아니라 배아를 선별하는 marker로 이용될 수 있다고 보고하였다.¹⁵ 그러나 본 연구의 소 배반포배의 등급에 따른 수정란의 질 (quality)과 telomeric DNA 함량간의 분석에서 수정란 등급에 따른 텔로미어 함량의 차이는 없는 것으로 나타났다. 수정란의 등급에 따른 질과 이들의 텔로미어 함량간의 관계에 대해서는 수정란의 등급 분류에 대한 인위적 기준이나 공시된 표본의 수 등이 결과에 많은 영향을 미침으로 본 연구에서 분석된 제한된 표본 수로서 이에 대한 명확한 결론을 제시하기에는 다소 어려움이 있는 것으로 사료된다.

Q-FISH에 의한 소의 연령별 백혈구 세포내 telomeric DNA의 함량은 0~12개월이 2.31%, 12~48개월이 1.95%, 48개월 이상이 1.49%로 연령이 증가할수록 텔로미어의 함량이 유의적으로 감소한다는 결과를 제시한 바 있다.²⁹ 그러나 소의 초기 배아형성과정 동안 telomeric DNA 함량은 배아 발달이 진행 될수록 증가하는 양상을 보이고 있어 생후 개체들의 연령 증가에 따른 텔로미어의 감소 양상과는 다른 양상을 보인다. 배아형성과정 동안 텔로미어의 양적 증가는 세포분열이 왕성해지면서 세포수의 증가시점, 분화시점과 밀접한 관련이 있으며 텔로미어스의 활성도와도 관련이 있는 것으로 생각된다.

소 수정란의 초기 배 발생단계별 텔로미어스 활성도를 TRAP assay 기법을 이용하여 분석한 결

과 8 세포기, 상실배기 및 배반포기의 모든 배아에서 텔로미어스 활성도를 나타내었고 상실배에서 증가하여 배반포배에서 가장 강한 활성을 보였다. 이와 같은 상실배 이후부터 텔로미어스 활성도의 급격한 증가는 상실배와 배반포배 사이에서 전체 세포수가 증가하고, 또한 배 발생단계가 진행 될수록 telomeric DNA의 함량 증가를 유지하기 위해서도 필수적인 것으로 사료된다. 이러한 결과는 포유동물의 초기 수정란에서는 비교적 강한 텔로미어스 활성도를 보이고 조직의 분화가 개시된 후부터 조직적 특이성에 따라 활성도의 차이를 보인다는 보고와 유사한 결과이다.⁶ 또한 소의 생식 세포와 수정란에서 텔로미어스 활성도를 분석한 결과 미성숙 난자에서 활성도가 높다가 성숙한 난자에서 활성도가 떨어지고 수정된 후 다시 활성도가 점차 증가하여 배반포기 때 가장 높은 활성도를 나타낸다는 연구 결과¹⁸와도 거의 일치하는 결과이다. 텔로미어스 활성도가 낮은 성숙한 난자와 활성도가 거의 없는 정자가 수정된 후 배 발생이 진행 될수록 활성도가 증가하는데 있어 Calcium oscillation이 관련이 있다는 보고가 있으나 수정 후 활성도가 증가하는 원인에 대해서는 보다 더 심층적 연구가 이루어져야 할 것으로 보인다.³⁰ 한편 마우스 배 발달단계별 텔로미어스 활성도에 있어서도 상실배에서 증가하여 배반포배에서 가장 높은 텔로미어스 활성을 보인다고 하여²⁸ 포유동물의 배 발생과정 중 텔로미어스의 활성 기전은 모든 종에서 거의 유사한 것으로 사료된다. 배 발생 이후 텔로미어스 활성도는 태아 경우 거의 모든 조직에서 활성도가 보이나 성체 (18개월령)는 정소조직을 제외하고는 활성도가 거의 없거나 현저히 떨어짐을 보고하였다.²⁹ 따라서 소의 경우 배아형성과정에서 텔로미어스 활성도가 높게 나타나다가 태아 상태일 때 어느 정도의 수준이 유지되고 출생 후 성체가 되면서 조직에 따라 활성도가 거의 없거나 낮아지는 양상이다. 한편, 소 수정란의 초기 배 발생단계별 telomeric DNA의 증가와 더불어 텔로미어스 활성도도 비례적으로 강해지

는 양상을 보이는데 이는 텔로미어의 함량을 유지하기 위해 텔로머레이스 활성도가 증가되는 것으로 생각되며, 성체에 있어서도 이러한 양상은 거의 동일하게 나타나고 있다.

이상의 결과로부터 소 수정란의 초기 배아형성 과정 동안 telomeric DNA와 텔로머레이스의 활성도는 정 (positive)의 상관관계가 있으며, 발생이 진행될수록 telomeric DNA 함량이 증가 하는데 이것을 유지하기 위해 텔로머레이스의 활성은 필수적인 것으로 사료된다. 특히 배반포기 배아에서 높은 텔로미어 함량과 강한 텔로머레이스 활성도는 이 시기가 배 발생 및 분화과정 중 가장 세포적 활성도가 높은 시점임을 의미하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Zakian VA. Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 1995; 270: 1601-7.
- Blackburn EH. Structure and function of telomere. *Nature* 1991; 350: 569-73.
- Shay JW. At the end of the millennium, a view of the end. *Science* 1999; 288: 1377-9.
- Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985; 43: 405-13.
- Faragher RG, Kipling D. How might replicative senescence contribute to human ageing? *Bioassays* 1998; 20: 985-91.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; 18(2): 173-9.
- Scott BC, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* 2007; 315: 1850.
- Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991; 256(2-6): 271-82.
- Deng Y, Chang S. Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Lab Invest* 2007; 87(11): 1071-6.
- Eisenhauer KM, Gerstein RM, Chiu CP, Conti M, Hsueh AJ. Telomerase activity in female and male rat germ cells undergoing meiosis and in early embryos. *Biol Reprod* 1997; 5: 1120-5.
- Achi MV, Ravindranath N, Dym M. Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity. *Biol Reprod* 2000; 63(2): 591-8.
- Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW II, DePinho RA. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 1998; 392: 569-74.
- Liu L, Blasco MA, Trimarchi JR, Keefe DL. An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Dev Biol* 2002; 249: 74-84.
- Rodríguez S, Goyanes V, Segrelles E, Blasco M, Gosálvez J, Fernández JL. Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2005; 84(4): 843-5.
- Cohen J, Scott R, Alikani M, Schimmel T, Munne S, Levron J, et al. Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol Hum Reprod* 1998; 3: 269-80.
- Betts DH, King WA. Telomerase activity and telomere detection during early bovine development. *Dev Genet* 1999; 25: 397-403.
- Schaetzlein S, Lucas-Hahn A, Lemme E, Kues WA, Dorsch M, Manns MP, et al. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(21): 8034-8.
- Xu J, Yang X. Telomerase activity in bovine embryos during early development. *Biol Reprod* 2000; 63: 1124-8.
- Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1975; 12(2): 260-74.
- Rosenkrans CF, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK, First NL. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993; 49: 459-62.
- 손시환, 박충생, 송상현. 염색체 분석 기법에 의한 소 체외수정란의 성 조절. *한국가축번식학회지* 1996; 20(2): 179-90.
- Han MS, Cho EJ, Ha HB, Park HS, Sohn SH. Sex determination of in vitro fertilized bovine embryos by fluorescence in situ hybridization technique. *Reprod Dev Biol* 2004; 28(2): 133-7.
- 손시환, Multani AS, Pathak S. 소, 돼지 염색체의 telomeric DNA 분포 양상. *동물자원과학회지* 2004; 46(4): 547-54.
- Kim NW, Wu F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res* 1997; 25(13):

- 2595-7.
25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Animal Biochem* 1976; 72: 248-54.
26. Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2004; 81: 551-5.
27. Dokras A, Sargent IL, Barlow DH. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum Reprod* 1993; 8(12): 2119-27.
28. 강민영, 한명숙, 이상찬, 김종홍, 손시환. 마우스 수정란의 초기 배 발생단계별 telomeric DNA의 양적 분석과 telomerase 활성도 분석. *Reprod Dev Biol* 2005; 29(1): 1-7.
29. 최덕순, 조창연, 손시환. 소의 생리적 특성에 따른 세포내 텔로미어 함량과 텔로머레이스 활성도 분석. *한국동물자원과학회지* 2008; 50(4): 445-56.
30. Bickenbach JR, Vormwald-Dogan V, Bachor C, Bleuel K, Schnapp G, Boukamp P. Telomerase is not an epidermal stem cell marker and is downregulated by calcium. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 1045-52.

= 국문초록 =

목적: 소 수정란의 telomeric DNA 함량 및 텔로머레이스 활성도 (telomerase activity)를 분석하여 초기 배아형성과정에서 텔로미어의 변화 양상을 규명하고자 하였다.

연구방법: 소의 초기 배 발생단계별 체외수정란을 대상으로 양적형광보인법 (Q-FISH)을 이용한 telomeric DNA의 함량 분석과 Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP)로서 텔로머레이스 활성도를 분석하였다.

결과: 소의 초기 수정란의 telomeric DNA 함유율은 발생과정이 진행됨에 따라 유의적인 양적 증가를 나타내었다. 배반포배의 질 (quality)에 따른 텔로미어의 함량 차이는 나타나지 않았다. 소 수정란의 8 세포기, 상실배기 및 배반포기의 모든 초기 배 단계에서 텔로머레이스 활성도를 보였으며, 상실배에서 증가하여 배반포배에서 가장 강한 활성도를 나타내었다.

결론: 소의 초기 배아형성과정이 진행되면서 텔로미어의 함량 및 텔로머레이스 활성도는 점진적으로 증가하고 이들 간에는 정 (positive)의 상관관계를 가진다. Telomeric DNA 함량의 증가를 유지하기 위하여 텔로머레이스의 활성화는 필수적인 것으로 보여진다. 배반포기 배아에서 높은 텔로미어 함량과 강한 텔로머레이스 활성도는 이 시기가 배 발생 및 분화과정 중 가장 세포적 활성도가 높은 시점임을 의미하는 것으로 사료된다.

중심단어: 텔로미어, 텔로머레이스, 양적형광보인법, TRAP, 소 수정란
