

초기발달 단계의 생쥐 난소에서 발현하는 유전자에 관한 연구

전은현 · 윤세진¹ · 차광렬¹ · 김남형² · 이경아^{1†}

포천중문 의과대학교 생명과학전문대학원, ¹차병원 여성의학연구소, ²충북대학교 농과대학

Analysis of Genes Expressed in Mouse Ovaries of Early Developmental Stages

Eun-Hyun Jeon, Se-Jin Yoon¹, Kwang-Yul Cha¹, Nam-Hyung Kim² and Kyung-Ah Lee^{1†}

Graduate School of Life Science and Biotechnology, Pochon CHA University College of Medicine

¹Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Seoul 135-081, Korea

²Department of Animal Science, College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

ABSTRACT : The present study was conducted to investigate gene expression profile of mouse ovaries during the primordial-primary follicle transition. We isolated total RNA from mouse ovaries at day1(contains only primordial follicles) and day5(contains both primordial and primary follicles) and synthesized cDNA using annealing control primers(ACP, Seegene, Inc., Seoul, Korea). Using 80 different ACPs for PCR, we cloned, sequenced, and analyzed identities of 41 differentially expressed genes(DEGs). According to BLAST analysis, sequences of 33 clones significantly matched database entries, 4 clones were novel, and 4 clones were ESTs. We selected 8 DEGs with interesting functions, Anx11 and Pepp2-pending highly expressed in day1 ovary, while Apg3/Aut1p-like, BPOZ, Ches1, Kcmf1, NHE3, Nid2, Ninj1, SENP3, Sui1-rs1, and TIAP/m-survivin highly expressed in day5 ovary, and confirmed their different expression between day1 ovaries and day5 ovaries using semi-quantitative RT-PCR. There was no false positive result. Using *in situ* hybridization, we found that almost all of genes studied were expressed in the oocyte from primordial follicle stage but expression decreased from primary follicle stage. Meanwhile their expression was increased in cuboidal granulosa cells. Different expression of BPOZ and TIAP/m-survivin between primordial and primary follicles was confirmed by using laser capture microdissection followed by real-time PCR. BPOZ and TIAP/m-survivin expressed 4.5 and 3.4 fold higher in primary than primordial follicles, respectively. List of genes obtained from the present study will provide insights for the study of mechanism regulating primordial-primary follicle transition.

Key words : Annealing control primers, Differential gene expression, Folliculogenesis, Laser capture microdissection, Mouse, Real-time PCR.

요약 : 본 연구에서는 이러한 초기 난포 발달 과정 중 원시난포-1차 난포 변화과정 시기에 발현하는 유전자를 알아보고자 수행하였다. 원시난포로만 이루어져 있는 생쥐의 생후 1일자 난소와 원시난포 및 1차 난포로만 이루어져 있는 5일자 난소의 RNA와 총 80개의 annealing control primer(ACP) primer를 사용하여 PCR을 수행하여 서로 다르게 발현하는 유전자(differentially expressed genes; DEG) 41개를 찾아내었다. 이들 중 33개는 BLAST에 등록되어 있는 유전자와 일치하였고 4개는 novel sequence였으며 나머지 4개의 유전자는 EST이었다. 실험결과, 1일자 난소에서 더 많이 발현되는 유전자를 9개, 5일자 난소에서 더 많이 발현되는 유전자 31개, 5일자 난소에서만 특이적으로 발현하는 유전자를 1개를 얻었다. 1일자 난소에서 높게 발현하는 Anx11과 Pepp2-pending, 반면에 5일자 난소는 Apg3/Aut1p-like, BPOZ, Ches1, Kcmf1, NHE3, Nid2, Ninj1, SENP3, Sui1-rs1, TIAP/m-survivin 등의 유전자를 선택하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행하여 이들 중에는 false positive 없음을 확인하였다. *In situ* hybridization을 수행하여 대부분의 유전자가 원시난포의 난자에서 발현하다가 1차 난포 이상의 발달단계에서는 난자 내 발현이 사라지면서 오히려 과립세포에서 높게 발현됨을 확인하였다. 또한 laser capture microdissection을 이용하여 원시난포와 1차 난포를 각각 오려내고, real-time PCR을 이용하여 실제로 BPOZ와 TIAP/m-survivin의 발현이 1차 난포에서 각각 4.5배, 3.4배 높은 것을 다시 확인하였다. 본 연구결과로 얻어진 유전자 목록은 앞으로 초기 난포발달, 특히 원시난포-1차 난포 변화과정에 관여하고 있는 분자생물학적 기전을 연구하는데 기여하게 될 것이다.

서론

†교신저자: 서울시 강남구 역삼동 606-5, 차병원 여성의학연구소, 포천중문 의과대학교 생명과학전문대학원. (우) 135-081, (전) 02-3468-3440, (팩) 02-501-8704, E-mail: leeka@muri.net

포유류의 난소에서 일어나는 난포발달과정(folliculogenesis)은 여러 가지의 호르몬과 성장 인자들이 난자와 과립세포

(granulosa cells), 그리고 협막 세포(theca cells) 등의 성장과 분화를 조절하는 매우 복잡한 과정이다. 후기 난포발달 과정, 즉 강소 형성 난포(antral follicle)의 발달과 분화에 관한 연구는 많은 반면 초기 난포발달 과정에 대한 연구는 상대적으로 미약하다(Fortune et al., 2000; Fortune, 2003). 포유류는 일정한 숫자의 원시난포를 가지고 태어나는데 대부분이 성장을 멈추고 있다가 특정시기를 지나면서부터 원시난포 중 일부만이 선택적으로 1차 난포로 자라기 시작한다. 난포의 성장은 난자와 난자 주위를 둘러싸고 있는 과립세포와 협막 세포에 의해 좌우되는데, 처음 성장이 정지된 상태인 원시난포의 경우는 몇 개의 편평 과립세포(flattened granulosa cells)가 난자를 둘러싸고 있으며 난포의 성장이 시작되면 과립세포는 입방형(cuboidal granulosa cells)으로 변화하며, 난자의 성장도 시작된다(Hirshfield, 1991). 난포발달 후기에는 성선자극 호르몬에 영향을 받는 반면 난포의 초기 발달과정, 특히 성장의 개시는 성선자극 호르몬에 의존하지 않고 난소 내의 성장인자와 같은 국소 조절인자(paracrine factor)에 영향을 받는 것으로 추측되고 있으나 그 기전이 알려져 있지 않다(Kol & Adashi, 1995).

성장이 억제되어 있는 원시 난포의 성장에 관여할 것으로 알려진 몇 가지 대표적인 인자로는 kit ligand(KL; Parrott & Skinner, 1999; Driancourt et al., 2000), basic fibroblast growth factor(bFGF; Nilsson & Skinner, 2001a, b), leukemia inhibitory factor(LIF; Nilsson et al., 2002), 그리고 insulin(Kezele et al., 2002) 등이 있으나 원시 난포가 어떻게 성장이 억제되어 있는지 또 어떻게 성장이 활성화되는 지에 관한 자세한 기작은 아직까지 확실하지 않다. 원시난포가 활성화되어 다시 성장하기 시작하는 과정을 이해함으로써 여성의 생식능력이 시작되는 시기를 조절하거나 혹은 폐경이 시작되는 시기를 뒤로 미룰 수 있는 등 궁극적으로는 여러 가지 조절이 인위적으로 가능하게 될 것이다. 또한 배란이 되지 않거나 조기 폐경 등 난포발달과 관련된 여성의 난소질병에 대한 기전 연구 및 그 치료도 가능할 것이다. 이러한 궁극적인 목표를 염두에 두고 초기 난포발달 과정에 관여하는 유전자를 찾고자 본 연구를 계획하였다.

두 가지 시료간의 유전자의 발현의 차이를 연구하는 방법으로 differential display PCR(DD-PCR), suppression subtractive hybridization(SSH) 등을 예로 들 수 있는데, 본 연구에서는 비교하고자 하는 시료에서 서로 다르게 발현되는 유전자(DEG; differentially expressed genes)를 탐색한다는 점에서 앞의 두 가지 방법과 같은 의미를 갖지만, false positive가 없고 효율성 면에서 더 좋다고 알려진 annealing control primer

technology(ACP; Seegene, Seoul, Korea)를 이용하였다. ACP는 template에 annealing temperature specific 하게 결합함으로써 두 시료 간에 서로 다르게 발현하는 유전자를 알아내는 새로운 방법이다(Hwang et al., 2003).

Primer를 원하는 자리에만 결합할 수 있게 하는 특이성은 PCR 반응이 성공적으로 이루어지기 위해서 필요한 가장 중요한 항목이라고 할 수 있다. 이 특이성은 annealing 온도와 밀접한 관계를 가지고 있으며, 일반적으로 높은 annealing 온도에서 특이성을 가져오지만 primer 디자인에 있어 많은 제약을 준다. ACP 기술은 높은 annealing 온도에서도 primer가 template의 specific한 자리에만 annealing할 수 있게 하며, 특히 primer의 annealing 부위를 조절할 수 있다. ACP 기술의 원리는 독특한 3차 구조 및 각각의 고유 기능에서 찾을 수 있다. ACP는 3'-말단 target sequence와 5'-말단 universal(non-target) sequence, 그리고 두 sequence를 연결 및 조절 역할을 하는 regulator sequence 등 3개의 기능적 부위로 이루어져 있으며, 이 3개의 부위는 두 가지 단계의 PCR 반응에서 각기 고유의 기능을 발휘하여 primer의 특이성을 극대화시킨다. 이러한 특징을 가지는 ACP를 이용하여 특정 PCR 산물을 생성하기 위한 1단계 PCR, 1단계 PCR 산물의 증폭을 위한 2단계 PCR을 수행하였을 때 false positive 없이 원하는 생성물을 얻을 수 있다(Hwang et al., 2003).

본 연구의 목적은 성장이 정지되어 있는 원시난포와 성장이 개시된 1차 난포 사이에서 다르게 발현하는 유전자를 찾고자 하는 것이다. 그러나 원시난포 및 1차 난포의 크기가 매우 작아서 각 발달 단계별 난포를 충분히 확보하는 것이 쉽지 않기 때문에 대신, 본 연구에서는 대부분이 원시난포로 구성되어 있는 생쥐의 1일자 난소와 주로 원시난포와 1차 난포로 구성되어 있는 5일자 난소를 사용하여 ACP Technology를 통해 두 그룹 간에 서로 다르게 발현하는 유전자들을 발굴하였고, 이렇게 발굴된 유전자들의 발현의 차이 및 난소 내 발현양상을 분석하였다.

재료 및 방법

1. GeneFishing: ACP를 이용한 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

생후 1일, 5일 된 ICR 생쥐 암컷으로부터 얻은 난소에 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA) 용액을 넣고 균질화 시킨 후 상온에서 5분간 두었다가 여기에 전체 부피의 1/5에 해당하는 chloroform을 넣고 다시 상온에서 15분 후 4°C에서 12,000g로 20분간 원심분리한 뒤, RNA를 포함하는 무색의 상층액을 새

로운 튜브로 옮겼다. 여기에 동일한 양의 isopropanol과 15ug/ul의 glycobluе(Ambion, Austin, TX) 1ul 첨가하여 상온에서 10분간 두었다가 4°C에서 12,000g로 15분간 원심 분리하여 RNA를 침전 시켰다. 상층액을 따라 버린 후 75% ethanol을 넣고 4°C에서 10분간 8,000g로 원심 분리하여, RNA 침전물을 공기 중에서 건조시킨 후 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리된 증류수로 용해시켜 사용 전까지 -70°C에 보관하였다.

역전사(reverse transcription) 반응에는 분리된 total RNA 3ug과 GeneFishing DEG Kit(Seegene, Seoul, Korea)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. 최종 cDNA 합성물이 20ul이 되도록, DNase I(Invitrogen) 1U/ul 처리된 total RNA 3ug에 10uM dT-ACP1 2ul을 첨가하여 80°C에서 3분간 수행하고, MMLV reverse transcriptase(Promega, Madison, WI) 200U/ul(1ul), RNase inhibitor(Promega) 40U/ul(1ul), 5X RT buffer(4ul), 10mM dNTP(1ul) 첨가하여 42°C에서 90분, 94°C에서 2분간 수행하여 cDNA를 합성한 뒤 5배 희석하여 사용하였다. PCR은 총 25ul로 25mM MgCl₂(2.5ul), 5uM arbitrary ACP(1ul), 10uM dT-ACP2(0.5ul), 10mM dNTP(0.5ul), BioTherm DNA Polymerase (GeneCraft, Munster, Germany) 5U/ul(0.25ul), 10X buffer(2.5ul)를 사용하였다. GeneFishing PCR은 기존의 PCR 조건과는 달리 2단계로 PCR이 진행되는데, PCR 조건은 94°C에서 5분, 50°C에서 3분, 72°C에서 1분간 첫 번째 단계의 PCR을 1회 수행한 후 94°C에서 40초, 65°C에서 40초, 72°C에서 40초의 조건으로 40회 반복 수행하고 마지막으로 72°C에서 5분간 수행하여 두 번째 단계의 PCR을 마쳤다. 이를 통해서 얻어진 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동하여 생후 1일자와 5일자 간에 뚜렷한 차이를 보이는 DEG를 선택하여 gel extraction kit(QIAGEN, Santa Clara, USA)을 사용하여 정제하였다. 정제된 DNA 단편을 TOPO vector(Invitrogen)에 ligation하여 cloning 한 후, 얻어진 plasmid는 miniprep kit(QIAGEN)으로 추출하였다.

2. Differentially Expressed Gene(DEG)의 Cloning 및 Sequencing

Cloning 여부를 확인하기 위해서 TOPO vector 상의 제한효소 인식부위 중에 PCR 생성물 삽입 시에 양쪽에 존재하게 되는 EcoRI과 HindIII를 처리하여 insert 존재여부를 확인하고자 하였다. plasmid DNA 5ul에 20U/ul EcoRI 또는 20U/ul HindIII 제한효소를 37°C에서 3시간동안 처리한 뒤 1.5% agarose gel상에서 전기영동 하여 insert를 확인하였다. 제한효소 처리를 통해서 insert 크기를 확인한 sample은 1ug의 농도로 염기서열 분석(Macrogen Co., Ltd. Seoul, Korea)을 의뢰하

였고, 그 결과를 BLAST 프로그램을 통하여 분석하였다. 확인된 유전자는 GeneSpring(Silicon Genetics, Redwood, CA) 프로그램으로 생물학적 기작 및 기능, 그리고 세포 내에서의 위치에 대한 분석을 하였다.

3. Semi-Quantitative RT-PCR

BLAST를 통하여 얻은 결과 중에서 모두 12개의 유전자를 선택하여 RT-PCR 방법으로 생후 1일자와 5일자 난소간의 발현 차이를 다시 확인하였다. 선택한 유전자에 대한 primer sequence에 대한 정보는 Table 1에 정리하였다. 전체 반응 용액이 25ul이 되도록 DNase I(Invitrogen) 1U/ul 처리된 total RNA 2ug에 oligo(dT)₂₀(1ul)를 첨가하여 70°C에서 10분간 수행하고, MMLV reverse transcriptase(Promega) 200U/ul(1ul), 5X RT buffer(5ul), 10mM dNTP(1.25ul), DEPC-treated water(2.75ul)를 첨가하여 42°C에서 1시간, 94°C에서 2분간 반응하여 역전사 반응을 수행하였다. PCR은 cDNA 1ul에 각 유전자의 20pmol forward/reverse primer(1ul), 25mM MgCl₂(2.5ul), 10X buffer(2.5ul), 10mM dNTP(0.5ul), 5U/ul Taq DNA polymerase (Promega)(0.25ul), 그리고 멸균된 3차 증류수로 전체 반응용액을 25ul로 맞추어 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분, 94°C에서 40초, 각 annealing 온도에서 40초, 72°C에서 1분, 70°C에서 10분간 수행하였다. PCR 수행 후 최종산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 하여 각 유전자들의 생후 1일자와 5일자 난소에서의 발현을 관찰하였다. 상대적인 유전자 발현의 차이는 glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase(G3PDH) 발현으로 normalization 한 후 다시 대조군과 비교하여 분석하였다. 결과는 mean±SEM으로 나타내었고 실험은 3번 반복 수행하였다.

4. In Situ Hybridization

생쥐의 난소조직을 4% paraformaldehyde에서 하루 동안 고정시킨 후 파라핀 블록을 제작하였으며, 파라핀 침투조직은 5um 두께의 연속절편을 슬라이드(ProbeOn Plus, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)에 부착하여 사용 전까지 4°C에서 보관하였다. RNA probe는 *in vitro* transcription kit(Promega)을 이용하여 제작하였다. 이때 1ug/ul DNA template(1ul), 5X Trans buffer(4ul), RNasin(2ul), T7 또는 SP6 RNA polymerase(2ul), DIG RNA labeling mix(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN; 2ul), 100mM threo-1,4-dimercapto-2,3-butandiol(DTT)(2ul) 및 DEPC-treated water를 전체 20ul가 되도록 첨가하여 37°C에서 6시간 합성한 후, RNase-free DNase I(Invitrogen)를 처리하였다. 합성된 RNA probe의 효율을 확인하기 위하여 반응물 1ul

Table 1. Primer sequences and RT-PCR conditions for DEGs

Expression	Genes	GI No.	Primer sequences	Annealing Temp(°C)	Size(bp)
Day1>Day5	Anx11	1815638	5"GAGTATAAGCGGATGTACGG 3"GAGTCTTAGCCACAAGCAAC	58	404
	Pepp2-pending	26449159	5' GCTATTTGAGTTCAGAGCGT 3' TGCTGTACACATCTATCCCA	58	456
Day5>Day1	Apg3p/Aut1p-like	14789860	5' ACTGGAAGCAAGGACAGTA 3' ACTGAACACATAGGAGGTGG	55	402
	BPOZ	14149109	5' ATACAGTGCCATTGAAGAGG 3' TTCAAGCTTTATTGCCACAC	58	398
	Ches1	28522188	5' GTTCACTCCTGCACTTAGCA 3' GGTTTAGCCACAGTTTCTG	58	475
	Kcmf1	9789926	5' AATAAAGGAAATGAGCCTCC 3' GGCAGACATTATCAAAGC	60	577
	NHE3	12860553	5' CTATGAGCAACGTCTTCCAG 3' GTTCTTGACCACTGCTAACC	54	275
	Nid2	18535662	5' TCAGTGCAGTGAGACTCAAG 3' TTTACCCGGAGTACTTTTGA	58	404
	Ninj1	3077900	5' ACTGGACAGCTCCATAGAAA 3' AGCTTTATTGTCGTTCCCTGA	54	426
	SENP3	11245812	5' TATGATGGGGTAAAGAGGTG 3' TCACACAGTGAGTTTGCAGT	58	414
	Sui1-rs1	14789790	5' AGGAAAAGGAATCGTATCGT 3' TAGTCCAAGTTAAAAGCGGA	55	499
	TIAP/m-survivin	3135206	5' AAAGACTACCCGTCAGTCAA 3' CACAATCAGAACCAAGACCT	58	337
	G3PDH	20828350	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3' ACCACAGTCCATGCCATCAC	60	451

를 1% agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다. Probe 반응물을 G-50 column(Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Piscataway, NJ)으로 정제한 후 농도가 100ug/ml이 되도록 Hybe buffer(50% formamide, 5X SSC, 1mg/ml Torula yeast RNA, 100ug/ml heparin, 1X Denhardt's solution, 0.1% Tween-20, 0.1%(CHAPS, 0.5mM EDTA)로 희석하였다. 파라핀 절편 슬라이드를 Xylene에 처리하여 파라핀을 제거하고, 알코올 처리과정과 D-PBS 용액에 세척한 후, 4% paraformaldehyde 용액으로 실온에서 10분간 재고정하였다. 그리고 0.1M triethanolamine (TEA) 용액으로 5분간 반응시키고, 0.25% acetic acid가 포함된 0.1M TEA 용액으로 실온에서 10분간 처리하였다. 알코올 처리과정을 거쳐 탈수시킨 후 Hybe buffer에 RNA probe를 100배 희석하여 조직위에 처리하였다. 조직이 마르지 않도록

파라핀을 덮어서 65°C humid chamber에서 하루 동안 처리하였다. 이후 65°C로 예열된 2X SSC-50% formamide 용액으로 30분간 처리한 후 blocking reagent(20% sheep serum, 2% BMB; Boehringer Mannheim Blocking buffer)가 들어있는 MAB(100mM maleic acid in 150mM NaCl, pH 7.5) 용액으로 실온에서 1시간 반응시켰다. 여분의 용액을 제거하고 anti-DIG alkaline phosphatase-conjugated Fab antibody fragments (anti-DIG-AP, Roche, Indianapolis, IN, 1:1000)를 blocking reagent가 포함된 MAB 용액으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. MAB 용액으로 10분씩 4회 수세하고 BCIP-NBT(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)로 실온에서 1시간 발색시켰다. 발색 후 PBS로 수세하고, Nuclear Fast Red로 대조염색 후 수용성 봉입제(DAKO, Carpinteria, CA)로 봉입하였다.

Laser Capture Microdissection(LCM) 과정과 Real-Time PCR

PixCell II™ system(Arcturus Engineering, Inc., Mountain View, USA)을 이용하여 원시난포와 1차 난포를 순수하게 분리하였다. LCM을 위한 조직의 준비과정, LCM 과정 및 포획한 난포세포로부터의 total RNA를 추출은 박 등(2002)의 방법을 사용하였다. Semi-quantitative RT-PCR 방법으로 난소간의 발현차이를 우선 확인하고, *in situ* hybridization을 통해서 mRNA 발현 위치를 확인한 10개의 유전자 중 BPOZ와 TIAP/m-survivin을 선택하여 real-time PCR을 이용하여 실제로 원시난포와 1차 난포간 발현의 양적인 차이를 확인하였다. Real-Time PCR은 MyiQ single-color real-time PCR detection system(Bio-Rad, Hercules, CA)을 사용하여 수행하였다. 450개의 LCM 난포로부터 얻은 cDNA 2ul에 각 유전자의 20pmol forward/reverse primer(1ul), 2X iQ SYBR green supermix 10ul(100mM KCl, 40mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4mM each dNTP, 50U/ml iTaq DNA polymerase, 6mM MgCl₂, SYBR Green I, 20nM fluorescein, stabilizers, Bio-Rad), 그리고 멸균된 3차 증류수로 전체 반응용액을 20ul 으로 맞추어 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 3분을 수행한 뒤, 95°C에서 40초, 60°C에서 40초, 72°C에서 40초 40번 반복하고 95°C에서 1분을 수행한 뒤, PCR 생성물의 melting curve를 분석하고자 55°C부터 95°C까지 0.5°C씩 10초간 온도를 높여가면서 형광발현을 관찰 분석하였다. 사용한 시료간의 유전자 발현 증폭에 관한 정량분석은 Hettinger 등(2001)이 사용한 계산법을 참고하여 semi-log amplification plot의 기하학적 범위 내에서 검출된 형광을 바탕으로 하여 형광이 두드러지게 증가하는 시점의 cycle 수인 threshold cycle(CT)로 분석하였다. 상대적인 유전자 발현의 차이는 G3PDH 발현으로 normalization 한 후 다시 대조군과 비교하여 분석하였다. 결과는 mean±SEM으로 나타내었고 실험은 3번 반복 수행하였다.

5. 통계분석

결과의 통계분석은 *t*-test를 사용하여 검증하였으며 유의차에 대한 수준은 *p*값이 0.05보다 작은 경우에 유의성이 있다고 분석하였다.

결 과

1. ACP를 통한 DEG 발굴 결과

성장이 정지된 원시난포와 그 원시난포의 성장이 개시되어 1차 난포가 되는 과정에 관여할 것으로 생각되어지는 유

전자를 찾기 위해 생쥐의 1일자와 5일자 난소에서 얻은 동량의 cDNA로 ACP를 이용하여 PCR을 수행하였다. 총 80개의 ACP를 사용하여 41개의 DEG를 얻었다. Fig. 1은 ACP를 이용한 PCR 결과, 1일자와 5일자 난소 간에 서로 다른 유전자 발현 양상을 보이는 전형적인 gel 사진을 보여주고 있다. 사용한 ACP의 개수에 비하여 적은 수의 DEG를 얻은 것은, 각각의 ACP에 대한 발현 유전자의 수는 훨씬 많았음에도 불구하고 두 그룹간의 발현 차가 확실하게 나는 유전자는 매우 적었으며, 그렇게 선택된 유전자 중에서도 클로닝, 염기서열 분석, 그리고 BLAST 검색과정까지 마친 유전자만을 포함시켰기 때문이다. 41개의 DEG 중에서 33개의 clone은 BLAST에 등록되어 있는 유전자와 일치하였고 4개의 clone은 아직 밝혀지지 않은 유전자였으며 나머지 4개는 expressed sequence tag(EST)이었다. 이렇게 얻은 41개의 DEG의 이름을 Table 2에 정리하였다. 실험결과, 1일자 난소에서 특이적으로 발현하는 유전자는 찾을 수 없었으나 1일자 난소에서 더 많이 발현되는 유전자를 9개, 5일자 난소에서 더 많이 발현되는 유전자를 31개, 5일자 난소에서만 특이적으로 발현하는 유전자 1개를 얻었다. 1일자 난소에서 더 많이 발현되는 9개의 유전자는 세포간의 정보교환, 물질대사, RNA processing에 관여하는 유전자였으며, 5일자 난소의 32개 유전자는 세포와 기질간의 결합, 유전자 및 단백질 발현, 세포주기 저해, 세포 성장 조절, 전자의 이동, 단백질 가수분해, 세포사멸 저해 등에 관여하는 유전자였다(Table 3).

총 41개의 DEG 중에서 1일자 난소에서 더 많이 발현한 9개의 유전자 중에서 일차적으로 Anx11 및 Pepp2-pending에 대한 specific primer(Table 1)를 제작하여 난소 전체를 이용한 semi-quantitative RT-PCR을 수행한 결과, ACP를 통해서 얻은

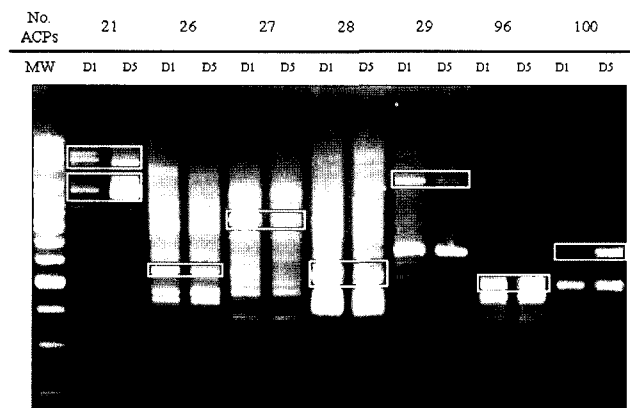


Fig. 1. Typical expression pattern of DEGs after GeneFishing ACP-PCR on day1 and day5 mouse ovaries. RNA samples from day1 and day5 ovaries were analyzed by using ACPs.

Table 2. List of differentially expressed genes on the day1 and day5 mouse ovaries

Expression	Gene Name	GI Number
Day1	Annexin XI	MMU65986
>Day5	Cytochrome c oxidase assembly protein	BC018301
	Hypothetical protein	AK017523
	Jagged 2	BC009082
	Melanoma antigen, family D, 2	NM_030700
	Nfib gene for nuclear factor I/B	AL773518
	Phosphoinositol 3-phosphate-binding protein-2	NM_144920
	Poly(vC) binding protein 2	NM_011042
	Ribosomal protein L4	AK088279
Day1	Acidic ribosomal phosphoprotein P0	X15267
<Day5	Acidic ribosomal phosphoprotein P1	U29402
	Adenine nucleotide translocase-2	U27316
	Adhesion molecule ninjurin	U91513
	Autophagy Apg3p/Aut1p-like	BC010791
	BPOZ	AB053477
	Checkpoint suppressor 1	XM_127089
	Cytochrome c oxidase, subunit VIb	NM_025628
	Dip3 beta	NM_145220
	EST	AC122232
	EST	AC121957
	EST	AK003315
	EST	AK009839
	Hypothetical protein	NM_146184
	Hypothetical protein	XM_130011
	Hypothetical protein ^a	NM_177703
	Insulin-like growth factor binding protein 7	NM_008048
	Microfibrillar-associated protein 2	NM_008546
	Mitochondrial genome	V00711
	Newborn ovary homeodomain protein	AY061761
	Nidogen 2 protein	AY074820
	PHF5A	AF479288
	Potassium channel modulatory factor 1	NM_019715
	Prolidase	U51014
	Ribosomal protein L5 containing protein	AK011800
	Ribosomal protein L23	AF287271
	Ribosomal protein L28	NM_009081
	Sentrin/SUMO-specific protease	AY008764
	Serine hydrolase-like	BC055431
	Sodium/hydrogen exchanger	AK020083
	Suppressor of initiator codon mutations, related sequence 1	BC010791
	TIAP/m-survivin	AB013819

^a, A gene expressed only in day5 ovary.

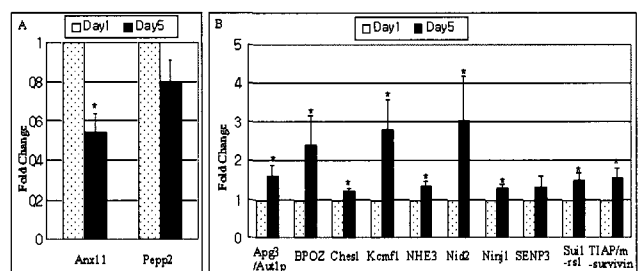
Table 3. Classification of differentially expressed genes according to their functions

Function	Day1>Day5 (9 genes)	Day1<Day5 (32 genes)
Cell cycle/ Apoptosis	1	3
Cell adhesion	-	2
Metabolism	3	8
Etc. ^a	2	3
Unknown Function	3	16

^a, functions other than the above listings such as cell communication, RNA processing, mitochondrial electron transport, regulation of transcription

발현양상과 동일한 양상을 얻어 이 두 유전자가 5일자 난소에서 보다 1일자 난소에서 높게 발현하고 있음을 확인하였다 (Fig. 2A).

총 41개의 DEG 중에서 5일자 난소에서만 특이적으로 발현한 유전자는 hypothetical protein 1개, 1일자보다는 5일자 난소에서 더 많이 발현한 유전자는 Apg3/Aut1p-like 등 31개였다. 5일자 난소에서 더 많이 발현한 유전자 중에서 Apg3/Aut1p-like, BPOZ, Ches1, Kcmf1, NHE3, Nid2, Ninj1, SENP3, Sui1-rs1, TIAP/m-survivin 등 그 기능이 알려져 있는 유전자 중에서 중요하다고 생각되는 10개 유전자를 택하여 마찬가지로

**Fig. 2. Differential gene expression of day1 and day5 mouse ovaries**

by semi-quantitative RT-PCR. RNA samples from day1 and day5 ovaries were amplified with specific primer sets shown in Table 1. Level of gene expression was normalized by that of G3PDH first, then compared between day1 and day5 ovaries. Data were expressed as mean±SEM from 3~4 replicates. A, Highly expressed DEGs in day1 ovaries (Anx11, Pepp2-pending); B, Highly expressed DEGs in day5 ovaries (Apg3/Aut1p, BPOZ, Ches1, Kcmf1, NHE3, Nid2, Ninj1, SENP3, Sui1-rs1, TIAP/m-survivin). Asterisks represent statistically significant values compared to day1 (p<0.05).

지로 semi-quantitative RT-PCR을 수행하여 이들 유전자 역시 모두 1일자 난소에서보다 5일자 난소에서 높게 발현함을 확인하였다(Fig. 2B). 모두 12개의 유전자에 대한 semi-quantitative RT-PCR 결과 중 2개의 유전자(Pepp2, SENP3)는 통계적으로 유의성을 보이지는 않았으나 경향은 보였다.

2. In Situ Hybridization 결과

RT-PCR로 발현양상을 확인한 유전자 가운데 Anx11, Pepp2-pending, BPOZ, Ches1, Kcmf1, Ninj1, SENP, TIAP/m-survivin 등을 선택하여 난소 내에서의 mRNA 발현 위치를 알아보려고 *in situ* hybridization을 수행하였다. 이때 난포 발달 단계에 따른 변화를 살펴보고자 5일자 난소와 4주령의 난소에서 실험하여 각 발달단계별 난포 내 난자와 과립세포, 그리고 협막 세포에서의 발현을 관찰하였다. 그 결과, 어느 특정 세포에서만 발현하는 유전자는 찾을 수 없었고, 거의 모든 유전자가 난자 또는 과립 세포를 비롯한 난소 내 모든 부분에서 발현하였다. 관찰한 모든 유전자에서 공통적으로 특이하게 발견되는 발현양상은 모든 유전자가 원시난포의 난자에서는 발현되던 것이 1차 난포만 되어도 난자에서의 발현이 급격히 감소하였고(Fig. 3, 4), 그 이상의 발달단계에 있는 강소 형성 난포(antral follicle)에서는 난자에서 거의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 3, 4). 그러나 모든 유전자가 과립 세포에서는 지속적으로 높게 발현하였다.

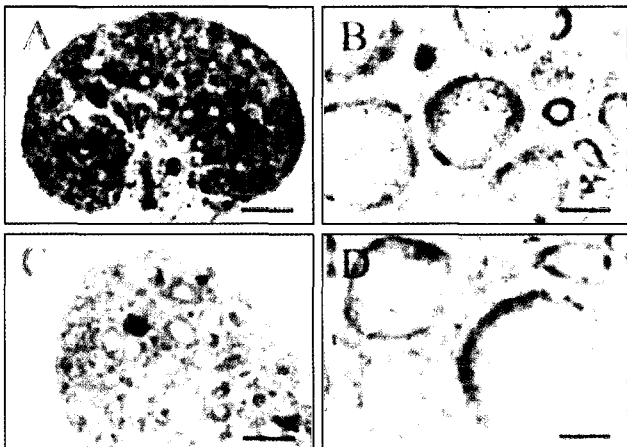


Fig. 3. Localization of DEGs(Day1>Day5) in day5 and in 4 week-old ovaries. A and B, Anx11; C and D, Pepp2-pending; A and C, Expression in day5 ovary; B and D, Expression in 4-week old ovary. Scale bars represent 100um. Both genes expressed in oocyte at primordial follicle stage(A, C), but disappeared from the oocyte at primary follicle stage and thereafter(B, D). Their expression in the granulosa cells increased in the developing follicles.

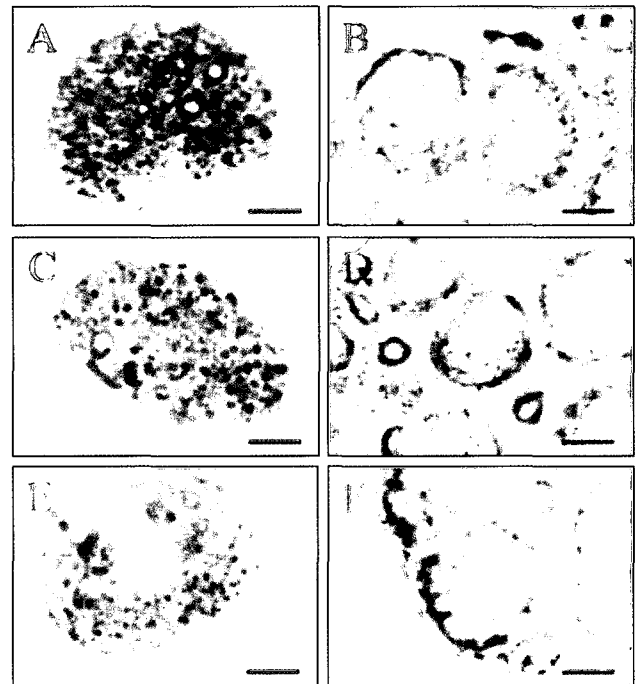


Fig. 4. Localization of DEG(Day1<Day5) in day5 as well as in 4 week-old ovary. A and B, BPOZ; C and D, SENP3; E and F, TIAP/m-survivin; A, C and E, Expression in day5 ovary; B, D and F, Expression in 4-week old ovary. Scale bars represent 100um.

3. Real-Time PCR 분석

BPOZ와 TIAP/m-survivin의 발현이 원시난포와 1차 난포에서 얼마나 다르게 발현하는지를 정량분석을 위하여 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과, CT값의 차이로 우선 각 유전자의 발현양의 차이가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 이들 유전자의 양을 각각의 G3PDH 양으로 먼저 환산한 후에, 원시난포에 대한 1차 난포의 발현 양을 조사한 결과, BPOZ는 원시난포에서보다 1차 난포에서 약 4.5배, 그리고 TIAP/m-survivin은 3.4배 높게 발현하고 있음을 알 수 있었고 이들 모두 통계적으로 유의성이 있었다(Fig. 5B). 이것으로 BPOZ와 TIAP/m-survivin 두 유전자 모두 난소에서 뿐만 아니라 난포 간에서도 차이 나게 발현함을 확인하였다.

고 찰

본 연구는 대부분이 원시난포로 구성되어 있는 생후 1일 된 생쥐의 난소와, 주로 원시난포와 1차 난포로 구성되어 있는 생후 5일된 생쥐의 난소를 사용하여 ACP를 이용한 PCR 방법으로 각각의 난소에서 높게 발현하는 유전자들의 목록을 확보하였고, 기술적으로 분리가 어려운 이들 원시난포와

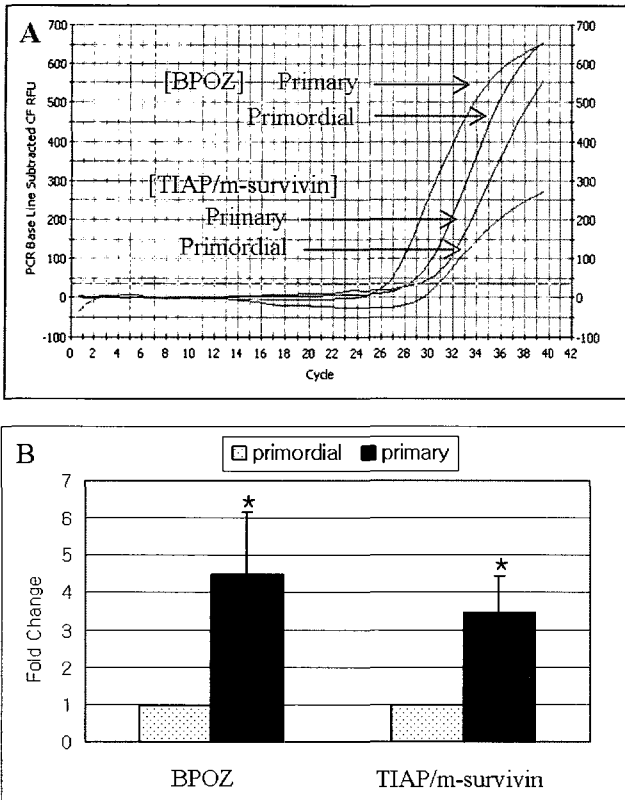


Fig. 5. Confirmation of the differential gene expression by real-time PCR. A. Differential expression was analyzed by real-time PCR using RNAs from 450 microdissected primordial and primary follicles by LCM. B. Bar graphs depict the fold change of gene expression between primordial and primary follicles calculated from CT values according to the method by Hettinger et al.(2001).

1차 난포 간 유전자 발현을 LCM과 real-time PCR 방법을 사용하여 비교분석하였다.

ACP 기술은 높은 annealing 온도에서도 primer가 template의 specific한 자리에만 annealing할 수 있게 하며, 특히 primer의 annealing하는 부위를 조절할 수 있다. ACP 기술의 원리는 primer 자체의 독특한 3차 구조 및 각각의 고유 기능에서 찾을 수 있다. ACP는 3'-말단 target sequence부위와 5'-말단 universal(non-target) sequence부위, 그리고 두 부위를 연결 및 조절 역할을 하는 조절(regulator)부위 등 3개의 기능적 부위로 이루어져 있으며, 이 3개의 부위는 두 가지 단계의 PCR 반응에서 각기 고유의 기능을 발휘하여 primer의 특이성을 극대화시킨다. 이러한 특이성으로 3'-말단 target과 5'-말단 universal sequence 부위를 연결하는 조절부위는 1단계 PCR 동안 3'-말단 target sequence 부위만이 template와 결합하게 하여 primer의 annealing이 일어나게 하며 5'-말단 universal sequence 부위가 template에 비 특이적으로 결합하는 것을 막아주기 때

문에 비 특이적 산물의 형성을 근본적으로 배제시켜 준다. 덧붙여, 2가지 또는 그 이상의 시료 사이에서 서로 다르게 발현되는 유전자를 탐색하고자 사용하는 DD-PCR, suppression subtractive hybridization 방법들에 비해 ACP 기술은 앞서 설명한 특이성으로 false positive에 대한 우려 없이 실험을 할 수 있다는 강점이 있다.

원시난포로만 구성되어 있는 생후 1일자 난소에서 더 높게 발현한 유전자는 세포간의 정보교환, 물질대사, RNA processing에 관여하는 것이었으며, 5일자 난소의 32개 유전자는 세포와 기질간의 결합, 유전자 및 단백질 발현, 세포주기 저해, 세포 성장 조절, 전자의 이동, 단백질 가수분해, 세포사멸 저해 등에 관여하는 것이었다.

1일자 난소에서 Anx11과 Pepp2-pending을 선택하여 이들 모두 1일자 난소에서 더 높게 발현하는 것을 확인하고 mRNA 발현 위치를 확인한 결과, 원시난포와 1차 난포에서 난자와 과립세포 모두 발현하다가 강소 형성 난포(antral follicle)에서는 난자는 발현하지 않고 과립세포에서만 발현하는 것을 관찰하였다. 원시난포에서는 난자가 편평한 과립세포보다 강한 발현을 보이다가 1차 난포에서는 입방형으로 성장한 과립세포에서 난자보다 더 강한 발현을 보이고, 강소 형성 난포에 이르러는 과립세포에서만 발현하였는데, 성장이 저해되어 있는 원시난포의 편평한 과립세포가 1차 난포로 성장이 개시되면서 입방형으로 과립세포가 성장을 하게 되는데 이 두 유전자가 어떠한 영향을 미칠 것으로 사료된다. 특히 Anx11의 경우, Ca²⁺ 존재 하에 S100 단백질인 calyccin (S100Ab)과 결합한다고 보고되어 있다(Tohshiki & Hiroyoshi, 1998). Calyccin은 Ca²⁺ 존재 하에, 난포 성장에 관여한다고 보고되어 있는 insulin 분비를 촉진하며(Okazaki et al., 1994; Satoshi I et al., 2000), 사람에서는 세포주기 특히, G1기의 진행에 관여한다고 보고되어져 있어(Calabretta et al., 1985), 본 연구를 통해 1차 난포에서 입방형 과립세포에서의 mRNA 발현이 관찰된 Anx11과 calyccin과의 상관관계에 대하여 연구할 가치가 높을 것으로 생각된다.

생후 5일자 난소에서 선택한 이 8개의 유전자 모두 원시난포에서는 난자가 편평한 과립세포보다 강한 발현을 보이다가 1차 난포에서는 입방형으로 성장한 과립세포에서 난자보다 더 강한 발현을 보이고, 강소 형성 난포에 이르러는 과립세포에서만 발현하였다. 이 중 BPOZ, Ches1, TIAP/m-survivin 등은 세포주기에 관련이 있는 유전자들이며 real-time PCR 수행결과, BPOZ의 경우에는 원시난포에서보다 1차 난포에서 약 4.5배 더 높은 발현율을 보였는데, 이 유전자는 tumor suppressor 인 PTEN 신호 전달 기작에서 BPOZ가 과발현되었

을 때 세포주기 과정의 G1기에서 S기로의 진행을 저해하여 암세포의 성장 억제에 영향을 미친다고 보고되어 있다(Unoki & Nakamura, 2001). Ches1과 TIAP/m-survivin은 세포주기 과정의 G2기에 영향을 미치며 특히, real-time PCR 결과에서 원시난포에서보다 1차 난포에서 약 3.4배 더 높은 발현을 보인 TIAP/m-survivin은 세포사멸을 억제하는 그룹의 일원으로 세포주기의 G2와 M기에서 특별히 발현하여 세포주기를 조절하며, 세포증식에도 관여한다고 보고되어 있다(Kobayashi et al., 1999; Otaki M et al, 2000). 또한, TIAP/msurvivin과 같은 그룹인 XIAP과 HIAP-2가 성장한 쥐의 난소의 난포발달과 난포폐쇄과정의 과립세포에서 발현하고 있음이 보고되어 있다(Li J et al., 1998). TIAP/m-survivin이 닭의 난소의 과립세포에서 유사분열의 G2와 M기에서 특별히 발현한다는 보고가 있으며(Johnson AL et al., 2002), TIAP/msurvivin의 p34^{xxs2} 인산화에 의해 세포 분열에서의 세포사멸을 조절한다는 보고가 있어(O'Connor et al., 2000), 본 연구를 통해 관찰된 1차 난포의 성장이 개시된 입방형 과립세포에서의 TIAP/m-survivin과 세포주기에 관련된 cell-cycle machinery, 특히 cdc2, cyclinB1 등과의 상관관계를 연구하는데 의의가 있을 것으로 사료된다.

모든 포유류는 난소 안에 일정한 수의 원시난포를 갖고 태어나는데, 원시난포가 성장을 개시하여 발달하거나 혹은 세포사멸로 죽어 가는 과정을 통해 원시난포의 수가 감소하게 된다. 따라서 생후 5일자 난소에서 세포주기를 저해하고 세포사멸에 관한 인자들의 높은 발현은 매우 흥미로운 결과로서, 이들 유전자에 대한 연구를 통하여 앞으로 원시난포에서 성장이 정지되었다가 1차 난포로 성장이 개시되는 분자생물학적 기전을 밝히는데 한 걸음 더 다가갈 수 있을 것으로 기대한다.

인용문헌

- Calabretta B, Kaczmarek L, Mars W, Ochoa D, Gibson C, Hirschhorn R, Baserga R (1985) Cell-cycle-specific genes differentially expressed in human leukemias. *Proc Natl Acad Sci* 82:4463-4467.
- Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J (2000) Roles of KIT and KIT ligand in ovarian function. *Rev Reprod* 5:143-152.
- Fortune JE, Cushman RA, Kito WS (2000) The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 163:53-60.
- Fortune JE (2003) The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 78:135-63.
- Hettinger AM, Allen MR, Zhang BR, Goad DW, Malayer JR, Geisert RD (2001) Presence of the acute phase protein, bikunin, in the endometrium of gilts during estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 65:507-513.
- Hirshfield AN (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124:43-101.
- Hwang IT, Kim YJ, Kim SH, Kwak CI, Gu YY, Chun JY (2003) Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *Biotechniques* 35:1180-1184.
- Johnson AL, Langer JS, Bridgham JT (2002) Survivin as a cell cycle-related and antiapoptotic protein in granulosa cells. *Endocrinol* 143:3405-3413.
- Kezele PR, Nilsson EE, Skinner MK (2002) Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 192:37-43.
- Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawarra T, Tokuhisa T (1999) Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci* 96:1457-1462.
- Kol S, Adashi EY (1995) Intraovarian factors regulating ovarian function. *Curr Opin Obstet Gynecol* 7:209-213.
- Li J, Kim JM, Liston P, Li M, Miyazaki T, Mackenzie AE, Korneluk RG, Tsang BK (1998) Expression of inhibitor of apoptosis proteins(IAPs) in rat granulosa cells during ovarian follicular development and atresia. *Endocrinol* 139:1321-1328.
- Nilsson E, Kezele P, Skinner MK (2002) Leukemia inhibitory factor(LIF) induces the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 188:65-75.
- Nilsson E, Skinner MK (2001a) Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 175:123-130.
- Nilsson E, Skinner MK (2001b) Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J Soc Gynecol Invest* 8:S17-S20.
- O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (2000) Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci* 97:13103-13107.
- Okazaki K, Niki I, Iino S, Kobayashi S, Hidaka H (1994) A role

- of calcyclin, a Ca^{2+} -binding protein, on the Ca^{2+} -dependent insulin release from the pancreatic beta cell. *J Biol Chem* 269:6149-6152.
- Otaki M, Hatano M, Kobayashi K, Ogasawara T, Kuriyama T, Tokuhiisa T (2000) Cell cycle-dependent regulation of TIAP/m-survivin expression. *Biochim Biophys Acta* 1493:188-194.
- Park CE, Ko JJ, Lee SH, Cha KY, Kim K, Lee KA (2002). Analysis of the gene expression by laser capture microdissection(II): Differential gene expression between primordial and primary follicles. *Dev Reprod* 6:89-96.
- Parrott JA, Skinner MK (1999) Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinol* 140:4262-4271.
- Satoshi I, Toshiki S, Tae N, Tatsuya F, Hiroyoshi H, Ichiro N (2000) Annexin XI may be involved in Ca^{2+} - or GTP- γ S-induced insulin secretion in the pancreatic β -cell. *FEBS Letters* 479:46-50.
- Toshiki S, Hiroyoshi H (1998) Regulation of calcyclin(S100A6) binding by alternative splicing in the N-terminal regulatory domain of annexin XI isoforms. *J Biol Chem* 273:6351-6357.
- Unoki M, Nakamura Y (2001) Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* 20:4457-4465.