

동소보합결합법에 의한 고환내 nur77 유전자의 발현

아주대학교 의과대학 비뇨기과학교실, Scott Department of Urology,
Baylor College of Medicine*

김세중 · 정도영 · 김영수 · Niederberger CS* · Lamb DJ*

=Abstract=

Localization of Nur77 mRNA in Mouse Testes by in Situ Hybridization

Se Joong Kim, Do Young Chung, Young Soo Kim, Craig S. Niederberger* and Dolores J. Lamb*

From the Department of Urology, Ajou University College of Medicine, Seoul, Korea and Scott
Department of Urology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA

By identifying the mRNA products of stage-and cell-specific gene expression directly in histologic specimens, in situ hybridization provides a powerful tool to demonstrate the cellular mechanisms regulating spermatogenesis. Nur77 is a member of the growth factor-inducible "immediate early" genes and is highly homologous to sequences of members of the steroid/thyroid hormone receptor gene superfamily. We investigated a putative role for nur77 during spermatogenesis by probing for its expression using in situ hybridization in mouse testes. Expression of the nur77 gene was restricted to the round spermatids in stages IV through VI. The identification of nur77 as a discretely, temporally expressed gene during germ cell differentiation indicates its pivotal function in spermatogenesis. Its abnormal expression may be important in defining a specific cause of unexplained testicular failure in some patients.

Key Words: Genes, Regulator-Spermatids-Spermatogenesis.

서 론

정자형성과정은 정조세포의 유사분열, 정모세포의 감수분열 그리고 정자세포의 형태전환 등의 여러단계를 포함하는 과정이다¹⁾. 또한 고환내에는 정자발생세포외에도 Sertoli세포, Leydig세포, 세정관주위 근모양세포, 대식세포 등이 존재하며, 이들은 직접 혹은 간접적으로 정자형성 과정에 관여한다²⁾. 최근에 정자형성과정을 조절하는 세포학적 기전을 이해하고자 이들 과정에 관여하는 유전자를 규명하려는 노력들이 이루어지고 있다. 유전자를 규명하는 방법으로는 blotting 기법이 많이 시행되어 왔으나 이는 유전자가 발현되는 세포를 정확히 규명하지 못하는 단점이 있다. 반면에 동소보합결합 (in situ hybridization)

기법은 정자형성단계의 각 분화기 및 세포종류에 따라 조직표본에서 직접적으로 유전자 발현을 확인할 수 있으므로, 정자형성에 관여하는 세포학적 기전을 규명하는데 많은 정보를 얻을 수 있다³⁾.

저자들은 정자형성과정과 고환내 유전자 발현의 관계를 알아보려 immediate early gene의 일종인 nur77 유전자의 발현을 조사하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

고환조직은 Zamboni고정액으로 고정하여 절편한 마우스 조직을 이용하였다 (Novagen, Madison, WI, USA). 인체 nur77 cDNA는 pBluescript II SK-에 삽입되어 있는 2,473bp의 유전자를

이용하였다 (Dr. Harris SE제공, The University of Texas, Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, USA). 마우스 *nur77* cDNA는 pGEM-2에 삽입되어 있는 2,456bp의 유전자를 이용하였다 (Dr. Lau LF제공, The University of Illinois at Chicago, Chicago, IL, USA). ³⁵S-UTP는 Amersham사 제품을 이용하였고, 그외의 효소 및 시약들은 Promega사, 5 Prime→3 Prime사 및 Sigma사 제품을 이용하였다.

2. 실험방법

1) Riboprobe 생성

적절한 제한효소를 처리하여 직선으로 만든 DNA template와 5x transcription buffer, 100mM DTT, RNasin, 10mM ATP, GTP, CTP, ³⁵S-UTP, RNA polymerase를 혼합하여 37°C에서 1시간동안 유지시킨 후, 다시 RNasin과 DNase를 가하여 37°C에서 15분간 유지 시켰다. PCI(phenol-chloroform-isoamy1 alcohol) 및 CI(chloroform-isoamy1 alcohol) extraction을 시행하고 spin column을 통과시켜 antisense 및 sense riboprobe를 생성한 후 -20°C에 보관하였다. 생성된 sense riboprobe는 음

성 대조군으로 이용하였다.

2) 보합결합전처리

Zamboni고정액으로 고정되어 있는 마우스 고환조직을 xylene으로 탈락시키고, 100%에서 30%까지의 알코올로 단계적으로 처리한 후 PBS(phosphate-buffered saline)로 합수시켰다. 0.001% proteinase K를 15분간 처리한 후 0.1M TEA(trietanolamine)에 10분간 수세하였다. Acetic anhydride를 상온에서 10분간 가하고 2x SSC(saline-sodium citrate)에 수세하였다. 알코올로 탈수시킨 후 상온에서 최소 1시간동안 건조제와 함께 저장하였다.

3) 보합결합 반응

rRNA, 1M DTT, riboprobe를 혼합하여 probe mixture를 만들고, formamide, 50% dextran sulfate, 5M NaCl, Denhardt's solution, 1M Tris, 0.5M EDTA를 혼합하여 완충액을 만들었다. Probe mixture와 완충액을 혼합해서 보합결합 용액을 생성하여 고환조직에 가하였다. 덮개유리로 고환조직을 덮고 가장자리를 DPX mountant로 봉합한 후, 56-59°C에서 22시간동안 유지시켰다.

4) 보합결합후처리

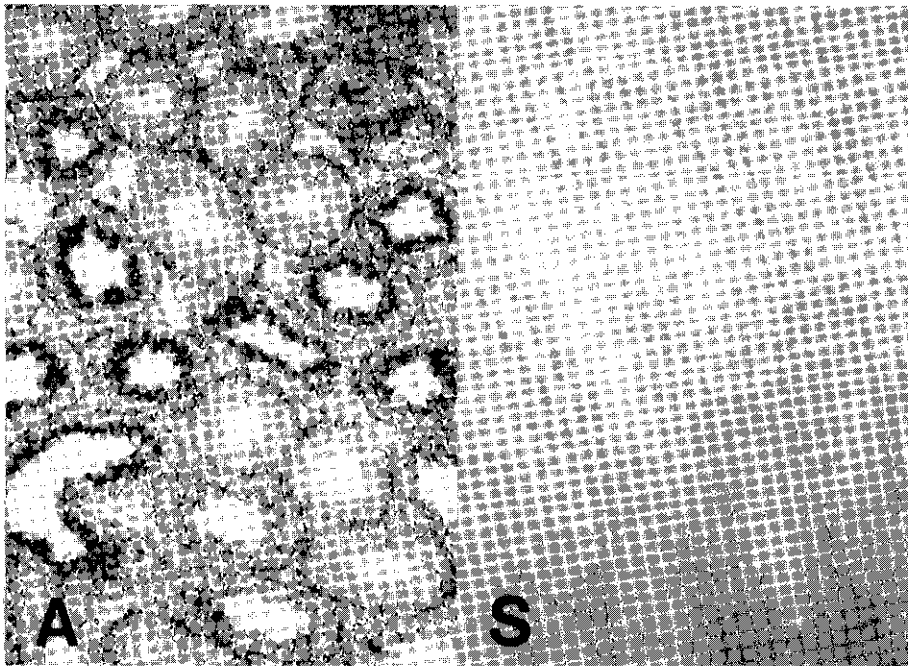


Fig. 1. In situ localization of human *nur77* mRNA in mouse testis. (A) In situ hybridization with antisense-transcribed probe. Signal indicative of human *nur77* mRNA expression was restricted to the round spermatids in stage IV-VI during mouse spermatogenesis. (S) In situ hybridization with sense-transcribed probe revealed no signal in the seminiferous tubules.

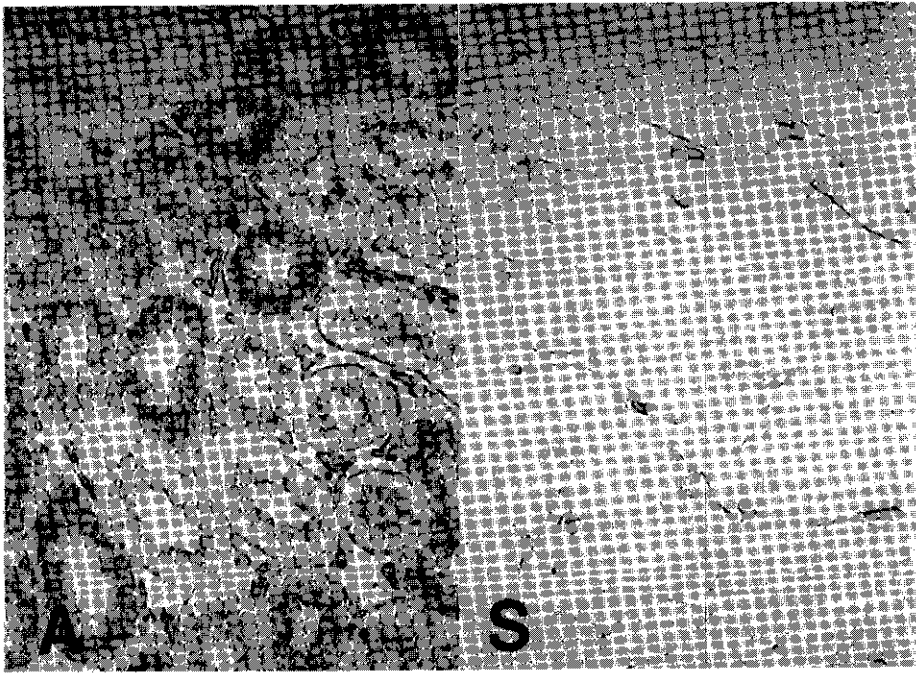


Fig. 2 In situ localization of mouse nur77 mRNA in mouse testis (pre-staining). (A) In situ hybridization with antisense-transcribed probe. Signal indicative of mouse nur77 mRNA expression was strong, weak or absent in different tubules, which means stage specific expression of the signal. (S) In situ hybridization with sense-transcribed probe revealed no signal in the seminiferous tubules.

건조된 DPX mountant를 제거하고 4x SSC에 30분간 수세시킨 후, 덮개유리를 제거하고 다시 4x SSC에 수세시켰다. RNase를 37°C에서 30분간 가한 후 2x SSC에서 0.5x SSC까지 단계적으로 SSC를 가하여 순차적으로 제염시켰다. 60°C에서 30분간 0.1x SSC에 수세한후 알코올로 탈수시키고, 상온에서 30분간 진공건조시켰다.

5) Signal 검출

슬라이드를 XAR5 필름에 상온에서 22시간동안 노출시킨 후 NTB-2 emulsion을 가하고 건조제와 함께 빛이 차단된 상자에 넣어 4°C에서 4-10주일간 저장하였다. 슬라이드에 Dektol과 정착제를 가한 후 5분간 증류수로 수세하였다. 슬라이드를 상온에서 건조시킨 후 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다.

결 과

인체 nur77 mRNA의 발현은 antisense strand의 경우에는 마우스 정자형성 분화기 4-6의 전기 정자세포에서만 특이하게 발현되었고 (Fig.1A), sense strand의 경우에는 유전자 발현이 관찰되지

않았다 (Fig.1S).

마우스 nur77 mRNA의 발현은 antisense strand의 경우에는 세정관에 따라 강하게 발현되는 곳과 약하게 발현되는 곳 그리고 전혀 발현이 되지 않는 곳이 관찰되었다 (Fig.2A). Hematoxylin-eosin염색을 시행한 결과 마우스 정자형성 분화기 4-6의 전기 정자세포에서 가장 signal이 강하게 발현되었고, 분화기 2,3,7,8에서는 약하게 발현되었으며, 그외의 분화기에서는 전혀 발현되지 않았다. Sense strand의 경우에는 유전자 발현이 관찰되지 않았다 (Fig.2S).

고 안

Nur77 cDNA는 immediate early gene의 일종으로서, 스테로이드 및 갑상선호르몬 수용체 유전자 상과와 유사한 배열순서를 가진다^{4,6)}. Immediate early gene은 세포주기의 휴식기(G0)로부터 증식기(G1)로의 이행에 관여하는 유전자를 검색하는 과정에서 발견된 유전자로 nur 77, c-fos, c-jun 등이 이에 해당된다^{7,9)}. 이들 유전자들은 성장인자 투여시 급속히 일시적으로 활성화 되어

다른 유전자들의 발현을 조절한다⁴⁹). 따라서 정조세포로부터 후기 정자세포로 이행되기까지 여러 단계의 세포들이 관여하는 정자형성과정에 nur77 유전자가 관여하리라 추측할 수 있다.

본 연구에서는 nur77 유전자의 고환내 발현양상을 알아보기 위해 동소보합결합법을 이용하였다. 동소보합결합법은 고환과 같이 여러 종류의 세포가 존재하는 기관에서 유전자를 발현하는 세포를 정확히 판별할 수 있으며, blotting과정에서 요구되는 조직파쇄 및 RNA추출과정이 필요 없으므로 민감도가 우수한 장점이 있다. 또한 본 연구에서 선택한 RNA-RNA의 동소보합결합법은 그 결합상태가 DNA-RNA 혹은 DNA-DNA 결합보다 안정성이 높은 장점이 있다^{3,10}.

동소보합결합에서 좋은 결과를 얻기 위해서는 조직의 보존이 중요하다. 저자들은 고환 조직에서 RNA 발현을 검색하는데 적절한 고정액을 선택하기 위하여 쥐의 Sertoli세포를 배양하여 Zamboni고정액, Bouin고정액, 파라포름알데히드, 글루타알데히드, Canoy고정액 등으로 고정한 후 인체 α -inhibin의 antisense RNA probe로 동소보합결합을 시행하여 보았다. 그 결과 Zamboni고정액을 이용한 경우가 α -inhibin mRNA의 보존이 가장 우수하여^{11,12}, 본 연구에서는 Zamboni고정액을 이용하였다. Zamboni고정액은 피크린산과 파라포름알데히드의 혼합액을 인산염으로 완충시킨 용액이다^{13,14}). 또한 동소보합결합법에서 좋은 결과를 얻기 위해서는 적절한 riboprobe의 길이가 중요하다. 일반적으로 100-1,000bp의 길이인 경우 좋은 결과를 얻을 수 있으며, 200-400bp가 가장 적절하다¹⁰). 그러나 본 연구에서는 riboprobe의 길이가 약 2,500bp로 매우 길었는데도 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 이는 riboprobe이 클 경우 조직내로의 침투가 어려운 단점이 있지만 proteinase K를 충분한 시간동안 처리하고, 적절한 조건을 형성해 준다면 riboprobe이 큰 경우에도 동소보합결합이 잘 일어날 수 있음을 시사한다.

본 연구의 결과 nur77 mRNA는 마우스 정자형성 분화기 4-6의 전기 정자세포에서만 특이하게 발현되었다. 특히 마우스 nur77의 경우에는 정자형성 분화기 2,3,7,8에서는 약하게, 분화기 4-6에서는 강하게 발현되었다. 이는 유전자 발현이 서서히 증가하다가 분화기 4-6에서 강하게 발현된 후 다시 서서히 감소되는 이론적인 발현양상을

실제 실험결과가 뒷받침해 주는 결과라 할 수 있다. Nur77 유전자가 정자형성 분화기 4-6의 전기 정자 세포에서만 발현됨은 nur77 유전자 발현이 spermiogenesis의 초기단계에서 중요한 역할을 함을 나타낸다. Spermiogenesis 4-6기는 cap phase에 해당하므로¹⁵, nur77이 정자 머리의 cap을 형성하는데 관여할 수도 있겠으나 nur77 유전자가 immediate early gene의 일종임을 감안할 때 이 유전자가 발현되어 spermiogenesis에 관여하는 다른 유전자들의 발현을 조절하리라 생각된다.

저자들은 이미 동소보합결합법을 이용하여 원종양유전자(proto-oncogene)인 Wnt-1이 마우스 정자형성 분화기 9,10의 정자세포에서 특이하게 발현되어 정자의 머리를 길게하는데 관여한다는 보고를 한 바 있다¹¹). 또한 c-myc 유전자는 정자형성 분화기 6, 7을 제외한 나머지 분화기의 정조세포에서¹⁶, Gapd-s 유전자는 spermiogenesis 4-15기의 정자세포에서 발현됨이 보고되었다¹⁷). Protamine과 TPI는 정자세포에서, actin은 주로 정조세포와 정모세포에서, α -tubulin은 주로 정자세포에서 발현됨도 보고된 바 있다¹⁸). 향후 정자형성과정의 각 단계마다 발현되는 유전자들이 모두 밝혀져서 정자형성과정과 유전자 발현의 연관성이 규명된다면 남성불임을 초래하게 되는 세포학적 기전을 이해하는데 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

결 론

정자형성과정과 고환내 유전자 발현의 관계를 알아보고자 마우스 고환조직에서 immediate early gene의 일종인 nur77 유전자의 발현을 동소보합결합법을 이용하여 조사하였다.

그 결과 nur77 mRNA는 마우스 정자형성 분화기 4-6의 전기 정자세포에서만 특이하게 발현되었다. 이는 nur77 유전자 발현이 spermiogenesis의 초기단계에서 중요한 역할을 함을 나타낸다.

REFERENCES

- 1) Fawcett, D.W.: *The mammalian spermatozoon. Dev. Biol.*, 44: 394-436, 1975.
- 2) Skinner, M.K.: *Cell-cell interactions in the testis. Endocr. Rev.*, 12: 45-77, 1991.
- 3) Tecott, L.H., Eberwine, J.H., Barchas, J.D and

- Valentiono, K.L.: *Methodological considerations in the utilization of in situ hybridization*. In: Valentino, K.L., Eberwine, J.H., Barchas, J.D., eds. *In situ hybridization applications to neurobiology*. New York: Oxford University Press, 1987, pp 3-24.
- 4) Hazel, T.G., Nathans, D. and Lau, L.F.: A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8444-8448, 1988.
 - 5) Davis, I.J., Hazel, T.G. and Lau, L.F.: Transcriptional activation by *nur77*, a growth factor-inducible member of the steroid hormone receptor superfamily. *Mol. Endocrinol.*, 5(6): 854-859, 1991.
 - 6) Nakai, A., Kartha, S., Sakurai, A., Toback, F.G. and DeGroot, L.J.: A human early response gene homologous to murine *nur77* and rat *NGFI-B*, and related to the nuclear receptor superfamily. *Mol. Endocrinol.*, 4(10): 1438-1443, 1990
 - 7) Lau, L.F. and Nathans, D.: Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *EMBO J.*, 4(12): 3145-3151, 1985.
 - 8) Lau, L.F. and Nathans, D.: Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: Coordinate regulation with *c-fos* or *c-myc*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 1182-1186, 1987.
 - 9) Herschman, H.R.: Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu. Rev. Biochem.*, 60: 281-319, 1991.
 - 10) Simmons, D.M., Arriza, J.L. and Swanson, L. W.: A complete protocol for in situ hybridization of messenger RNAs in brain and other tissues with radio-labeled single-stranded RNA probes. *J. Histochem.*, 12(3): 169-181, 1989.
 - 11) Niederberger, C.S., Kim, S.J., Maislos, S., Sigman, M., Lipshultz, L.I. and Lamb, D.J.: Stage- and cell-specific gene expression in the testis. *J. Urol.*, 149: 387A (Abstract 699), 1993.
 - 12) Niederberger C.S., Kim, S.J., Lipshultz, L.I. and Lamb, D.J.: The immediate early gene *nur77* is expressed in a cell- and stage-specific manner during spermatogenesis. *J. Urol.*, 151: 411A (Abstract 736), 1994.
 - 13) Zamboni, L. and De Martino, C.: Buffered picric acid-formaldehyde: A new, rapid fixative for electron microscopy. *J. cell Biol.*, 35: 148A, 1967.
 - 14) Stefanini, M., De Martino, C. and Zamboni, L.: Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216: 173-174, 1967.
 - 15) Oakberg, E.F.: A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am. J. Anat.*, 99: 391-414, 1956.
 - 16) Koji, T., Izumi, S., Tanno, M., Moriuchi, T. and Nakane, P.K.: Localization in situ of *c-myc* mRNA and *c-myc* protein in adult mouse testis. *Histochem. J.*, 20: 551-557, 1988.
 - 17) Mori, C., Welch, J.E., Sakai, Y. and Eddy E. M.: In situ localization of spermatogenic cell-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapd-s*) messenger ribonucleic acid in mice. *Biol. Reprod.* 46: 859-868, 1992.
 - 18) Hecht, N.B. and Panshow, J.D.: In situ localization of mRNAs coding for mouse testicular structural genes. *Exp. Cell Res.*, 173(1): 274-281, 1987.