

D119

반응성 산소종이 사람 정자의 DNA 안정성에 미치는 영향

강희규¹, 김동훈¹, 한성원¹, 김요경¹, 권혁찬², 이호준¹, 김문규³울지병원 의과학연구소¹, 울지대학교 의과대학 산부인과², 한양대학교 자연과학대학 생명과학과³

최근 들어 반응성 산소종의 발생 원인들과 과다 생성으로 인한 수정과정의 필수적인 단계에서의 정자의 기능에 미치는 영향에 대한 병리 생리학적인 분석이 주목받고 있다. 이에 본 연구에서는 반응성 산소종이 사람 정자의 DNA 안정성에 미치는 영향을 알아보고자 반응성 산소종으로 superoxide anion은 xanthine (X) -xanthine oxidase (XO) system을 X (100mM), XO (50 mIU ~ 400mIU) 처리하였고, hydroperoxide는 H₂O₂를 125mM ~ 1mM까지 처리하였으며, nitric oxide는 NO donor인 sodium nitroprusside를 0.1mM ~ 100mM처리하였다. 또한 남성불임요인의 하나로 알려진 leukocytospermia에 대한 영향을 알아보기 위해 lymphocyte를 농도별로 1 x 10⁶/ml ~ 4 x 10⁶/ ml 까지 처리하였다. 또한 일반적인 배양기내 산소농도인 20% O₂농도를 생체내 농도와 유사한 5% O₂농도로 낮추어서 배양한 후 결과를 분석하였다. 정액은 울지병원 산부인과를 불임률 주소로 내원한 환자에게서 동의를 받고 정액검사 후 남은 정액을 냉동보관한 뒤 해빙하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 정자는 정자를 각각의 실험군에 분주한 후 5% CO₂, 37°C의 배양기 또는 5% O₂, 5% CO₂, 37°C chamber에 넣어 0, 30분, 1시간, 3시간, 6시간동안 배양한 후 single cell gel electrophoresis (comet assay)와 flowcytometer를 이용한 SCSA를 시행하였다. COMET assay는 Nikon E600 형광현미경에서 515 - 560nm 필터를 이용하여 관찰하였고, 대조군의 염색양상을 기준으로 하여 slide당 200개의 정자를 계수하였다. 또한, SCSA는 각각의 실험군들은 6W Ar ion laser가 장착되어진 FACS Vantage (Becton Dickinson, San Jose, USA)를 이용하여 488nm에서 분석하였다. 실험군을 FACS에 삽입하여 DNA가 double strand인 것들은 녹색형광 (530±30nm)으로,

single strand인 것은 적색형광 (>630nm)으로 발광되어지는 것을 검출하였다. 아무런 처리도 하지 않은 대조군을 scattergram 분석하여 산출되어진 histogram에서 평균적으로 (4회 반복시행) 방출되어지는 적색형광 증가분 (M2)을 FACS Vantage내 장착되어진 프로그램으로 산출하였다. 모든 실험군은 초당 1000개의 정자를 분석하여 총 100,000개의 정자를 분석하였다. 통계적 유의성은 Chi-square test를 사용하였으며, 유의수준을 5%로 하여 p값이 0.05보다 낮은 경우를 유의하다고 정의하였다. 반응성 산소종에 의한 DNA 안정성에 대한 결과는 DNA single strand breakage율(9.0±1.0% ~ 46.0±4.6%)과 DNA 절편화율 (7.5±1.0% ~ 29.5±4.6%)에 있어서 산소종의 종류 및 처리시간에 대한 결과들이 거의 같은 양상을 보여 주고 있었으며, 모든 반응성 산소종들이 DNA에 상해를 줄 수 있음을 확인했다. 한편, 저산소 상태 (5%, 14.0±1.7% ~ 26.7±5.1%)에서의 DNA 상해정도가 대기중 산소농도(20%, 8.0±1.0% ~ 11.7±4.7%)를 사용한 경우에 비해 낮은 DNA 상해율을 얻었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, DNA상해 및 염색질 안정성에 관해서는 모든 반응성 산소종이 짧은 노출시간에도 악영향을 끼치는 것으로 알 수 있었다. 또한 반응성 산소종의 정자의 기능에 대한 주된 악영향은 고농도 또는 오랜 노출로 운동성 감소 및 침체반응 유기 저해를 통한 수정률이 저하되는 것 보다 DNA 불안정성의 유발에 있다고 사료된다.

D120

Cloning and Characterization of p90Rsk in Frog Oocytes

Hyang-Min Byun and Hae Mook Kang
Department of Genetic Engineering, Chongju University, Chongju 360-764

In *Xenopus* eggs, the 90-kDa ribosomal protein S6 kinase (p90^{Rsk}) is directly phosphorylated and activated by MAPK. During oocyte maturation, activation of p90^{Rsk} closely parallels that MAPK, and both enzymes are dephosphorylated when cytosolic factor (CSF) disappears after

fertilization. Thus, Rsk seems to be an essential mediator or itself of CSF. To evaluate it in other frog oocytes, we have cloned and characterized Rsk cDNA in *Rana dybowskii* oocytes. The cloned Rana Rsk cDNA is about 2950 bp of nucleotides, which is consisting of a complete single open-reading frame with ATG codon and polyadenylation signal. The deduced amino acid sequence of Rana Rsk is 733 amino acids with 83 kDa. Rana Rsk shows a high homology (about 90 %) Xenopus Rsk. It also well conserved the two kinase domains with the specific phosphorylation sites, which is essential for activation of Rsk. Interestingly, we have cloned two type of Rsk variants, which may be splicing variants. Northern analysis is exhibited that Rana Rsk mRNA is strongly expressed in ovary tissue but weakly in other tissues. Rana Rsk protein is expressed with pTYB1 vector and purified with IMPACT-CN system. The purified Rana Rsk is cross-reacted with Xenopus p90^{Rsk} antiserum. Therefore, the cloned Rana Rsk will be very useful for study of CSF during meiotic maturation in seasonal breeding animals.

D121

Functional Analysis of Rapsyn in *C. elegans*

Seung Hee Nam* and Junho Lee

Department of Biology, Yonsei University, Seoul

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are clustered at high density in the postsynaptic membrane of neuromuscular junction. Rapsyn (achR Associated protein at SYNapse) is a peripheral membrane protein that is required for the AChR clustering at the neuromuscular junction. Rapsyn is conserved in many species including *C. elegans*. To understand rapsyn-mediated AChR clustering at the neuromuscular junction, we have examined various

constructs of rapsyn fused to the green fluorescent protein in transgenic animals. In wild-type *C. elegans*, rapsyn was expressed specifically in muscle synapses and neurons. When a putative dominant negative mutant rapsyn gene, in which the histidine residue of the zinc finger motif was substituted by the amino acid glutamine, was examined, we found that its expression in muscle cells was altered and that the transgenic animals showed an uncoordinated phenotype, suggesting that the zinc finger motif of rapsyn is essential for AChR clustering. Examination of the transgenic animals bearing either wild type rapsyn or dominant negative mutant rapsyn in the genetic background of *unc-29* (AChR mutant), and *ric-4* (md1088) showed that both functional presynaptic activities and functional postsynaptic receptors are required for normal localization and function of rapsyn. To investigate the function of rapsyn, we analyzed rapsyn deletion mutant. Rapsyn deletion mutant animals grow slowly and their brood size is smaller than that of wild type. In order to investigate the interaction of rapsyn and AChR, we are examining co-localization of AchR and wild-type or mutant rapsyn proteins by using LacZ and GFP reporters. From these various assays, we will be able to elucidate the functions of rapsyn in *C. elegans*.

D122

Biological Functions of Transcriptional Mediators in the Nematode *Caenorhabditis elegans*

Jae Young Kwon* and Junho Lee

Department of Biology, Yonsei University, Seoul

Mediator is required for transcriptional regulation of most genes in yeast. Mammalian Mediator homologs function as transcriptional coactivators in vitro, however, their physiological role in gene-specific