

닭 배아 망막에서 단일가닥 DNA 탐색자를 이용한 α B-crystallin mRNA 검출을 통한 성숙 희소돌기아교세포의 표지

김 지 영, 손 현 준, 서 제 훈

충북대학교 의과대학 · 의학전문대학원 해부학교실

(2010년 4월 28일 접수, 2010년 6월 7일 수정접수, 2010년 6월 16일 게재승인)

간추림 : 단일가닥 DNA 탐색자(single-stranded DNA probe)를 이용한 제자리부합법(*in situ* hybridization)은 탐색자 제작에 시간과 비용이 적게 들고 염색의 특이성과 민감도가 높기 때문에 특정세포의 전사물(transcript)을 관찰하는데 좋은 실험방법이다. 본 연구에서는 α B-crystallin(aBC) mRNA에 대한 단일가닥 DNA 탐색자를 제작하여 닭 배아의 발생 중인 망막에서 aBC mRNA 발현세포를 시공간적으로 관찰하였다.

역전사연쇄중합반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)과 두 번의 연쇄중합반응을 통해 aBC mRNA에 대한 단일가닥 탐색자를 제작하여 제자리부합법으로 염색을 시행하였고 음성 대조를 위해 제작한 센스 탐색자(sense probe)와의 비교 염색 및 aBC에 대한 면역조직화학 염색과의 비교를 통하여 단일가닥 DNA 탐색자의 높은 특이성을 확인하였다. 제자리부합법으로 염색한 발생 12일과 14일의 닭 배아 망막에서는 시각신경과 인접한 부위에 존재하는 유두주위아교세포(peripapillary glial cell)에서 aBC mRNA 발현이 관찰되었고, 다른 부위에서는 양성반응이 관찰되지 않았다. 발생 16일에는 망막의 신경섬유층(nerve fiber layer)에서 적은 수의 aBC mRNA 발현세포가 관찰되었다. 발생 18일에는 망막의 신경섬유층과 신경절세포층(ganglion cell layer)에서 aBC mRNA 발현세포가 관찰되었고 발생 20일에는 동일한 부위에서 aBC mRNA 발현세포의 수가 증가한 것을 확인할 수 있었다. 발생 20일의 망막을 대상으로 aBC mRNA와 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)의 표지자인 nkx2.2의 발현 부위를 비교해 본 결과 분포 부위가 완전히 일치하였지만 신경세포의 표지자인 NeuN, 별아교세포의 표지자인 GFAP, 망막부챗살아교세포의 표지자인 vimentin 및 미세아교세포의 표지자인 RCA I과는 분포 형태에서 뚜렷한 차이를 보였다. aBC mRNA의 발현 시기와 세포 표지자와의 비교 염색을 통해 aBC mRNA 발현 세포는 성숙 희소돌기아교세포임을 알 수 있었다.

본 연구는 닭 배아의 발생 중인 망막에서 aBC mRNA 발현세포를 시공간적으로 관찰한 최초의 보고이며, 향후 aBC mRNA에 대한 탐색자를 이용한 제자리부합법은 중추신경계통에서 성숙 희소돌기아교세포의 분포와 분화 연구에 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

찾아보기 낱말 : 제자리부합법, 단일가닥 DNA 탐색자, α B-crystallin, 망막

서 론

제자리부합법(*in situ* hybridization)은 핵산(nucleic acid)에 부합화(hybridization)를 일으키고, 그 결과 특정 염기서열이 있는 핵산분자를 가시화하는 분자세포화학

법이다. 제자리부합법은 염색체에서 특정 유전자의 위치를 찾거나, 바이러스의 감염 여부 및 감염 부위를 찾는 데도 이용되지만, 주로 세포 표본 또는 조직 절편에서 특정한 mRNA를 검출할 목적으로 시행한다. 그 이유는 세포에서 특정 염기서열의 유전자 발현상태를 확인하는 일은 다양한 세포현상의 조절 메커니즘을 규명하는데 있어서 필수적이기 때문이다. 특히 발생기전을 설명하는 발생 연구에서 발생조절인자의 발현 또는 특정 세포의 표지자(marker)를 추적하는 것이 필수적인데, 단

*이 논문은 2008년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

교신저자 : 서제훈(충북대학교 의과대학 · 의학전문대학원 해부학교실)

전자우편 : seojh@chungbuk.ac.kr

백질 수준보다는 mRNA 수준에서 관찰할 경우, 검출 시기가 앞당겨져 발생조절인자나 특정세포에 대한 표지자의 발현 시점에 대한 새로운 결과를 간접적으로 증명할 수 있다는 점에서 중요하다. 그러나 제자리부합법에 사용하는 RNA 탐색자(probe)는 제작과정이 복잡하고, RNA분해효소(RNase)의 오염에 의한 분해 가능성이 높은 단점이 있다. 이에 이중가닥 DNA(double-stranded DNA) 또는 올리고핵산(oligonucleotide)을 탐색자로 사용한 다양한 제자리부합법이 소개되었지만, 잡종(hybrid)의 결합력 부족과 시그널의 약화로 크게 주목받지는 못하였다(Wilkinson 1998). 이런 DNA 탐색자의 단점을 보완한 방법이 단일가닥 DNA(single-stranded DNA) 탐색자를 이용한 제자리부합법이다(Kitazawa 등 1999). 단일가닥 DNA 탐색자는 두 번의 연쇄중합반응(polymerase chain reaction)으로 손쉽게 만들 수 있기 때문에 RNA 탐색자에 비해 제작과정이 간단하고, 올리고핵산 탐색자에 비해 시그널이 강하며, 불필요한 DNA 가닥이 생성되지 않기 때문에 이중가닥 DNA 탐색자에 비해 특이성도 높다(Kitazawa 등 1999).

Alpha-crystallin은 수정체의 주된 구조단백질(structural protein)이다. Alpha-crystallin의 한 종류인 α B-crystallin(aBC)은 수정체 뿐만 아니라 심장, 허파, 척수, 피부, 근육, 뇌, 콩팥, 망막과 같은 수정체 이외의 조직에서도 발현하는 특징이 있다(Bhat와 Nagineni 1989, Dubin 등 1989, Iwaki 등 1989). 또한 뇌경색증(cerebral infarction), 알렉산더병(Alexander disease) 또는 크로이츠펠트-야콥병(Cruetzfeldt-Jakob disease)이 있는 뇌에서 aBC의 발현이 증가하는 것으로 보고되었다(Iwaki 등 1989, Renkewek 등 1992, Minami 등 2003). 그러나 뇌와 망막의 정상 발생 과정에서 aBC 단백질 또는 mRNA의 발현을 관찰한 보고는 아직 없다. 발생학적으로 중추신경계통에 속하는 망막은 신경세포인 신경절세포(ganglion cell), 두극세포(bipolar cell), 수평세포(horizontal cell) 및 무축삭세포(amacrine cell)와 신경아교세포인 망막부챗살아교세포(Müller cell)로 되어 있는 점에서 중추신경계통과 유사하다. 또한 조류의 망막은 발생 기전이나 빛 자극의 전달 경로에서 포유류의 망막과 동일하다(Weidman과 Kuwabara 1969, Cowan 1971, LaVail과 Cowan 1971, Turner와 Cepko 1987). 따라서 조류 망막은 신경계통의 발생 기전을 밝히는데 흔히 사용된다(Vanselow 등 1989, Zhang과 Yang 2001, Wang 등 2002). 본 연구에서는 RNA 탐색자와 유사한 민감도와 특이성을 보일 뿐만 아니라 손쉽고 빠르게 제작할 수 있는 단일가닥 DNA 탐색자를 이용한 제자리부합법으로 발생 중인 조류의 망

막에서 aBC mRNA의 발현을 시공간적으로 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 발생 8일에서 20일령의 닭 배아(chick embryo)를 사용하였다. 적당한 일령의 배아를 얻기 위하여 유정란을 38°C의 다습한 부화기에서 배양하였다. 실험에는 Hamburger-Hamilton 단계(Hamburger와 Hamilton, 1992)를 참고하여 일령별로 정상적인 발육상태를 보이는 배아만을 선별하여 사용하였다. 본 연구의 동물 실험은 충북대학교 동물실험윤리위원회의 사전 승인을 얻어 동물실험윤리규정을 준수하며 수행하였다(승인번호: CBNUA-092-0906-01).

2. 역전사연쇄중합반응(RT-PCR)

aBC mRNA가 발생 중인 망막에서 발현하는지 확인하기 위해 발생 8일부터 18일 사이의 닭 배아 망막에서 RNA를 추출하여 역전사연쇄중합반응을 시행하였다. 역전사는 kit(Accupower RT premix, Bioneer, Korea)를 이용하여 통상적인 방법으로 시행하였으며, 역전사된 DNA를 증폭시키기 위한 길잡이(primer)는 19~26개의 서열을 가진 올리고핵산(Bioneer, Korea)을 제작하여 사용하였다(Table 1). 연쇄중합반응의 조건은 94°C에서 30초간 변성(denaturation), 56°C에서 30초간 불임(annealing), 72°C에서 30초간 연장(elongation)하였으며 이 과정을 35회 반복하였다.

3. 단일가닥 DNA 탐색자 제작

aBC mRNA 발현세포를 관찰하기 위해 Kitazawa 등(1999)의 방법을 일부 변형하여 단일가닥 DNA 탐색자를 제작하였다. 제작 방법은 앞서 기술한 역전사연쇄중합반응으로 얻은 357 bp의 전사물을 주형(template)으로 하여 다시 한번 연쇄중합반응을 시행하였다. 두 번째 연쇄중합반응은 첫 번째와 유사한 조건으로 시행하였으나 UTP에 digoxigenin(DIG)이 표지된 DIG DNA labeling mixture(Roche, Germany)를 사용한 것과 안티센스 길잡이(antisense primer)만 넣어 40회 반복한 것이 다른 조건이었다. 최종적으로 증폭된 단일가닥 DNA 탐색자는 Quickspin Column Sephadex-G50(Roche, Germany)으로 정제하여 탐색자로 사용하였다. 음성 대조군을 위해 센스 탐색자도 제작하여 안티센스 탐색자와 함께 제자리

Table 1. Primer sequences for RT-PCR

Name	S/A*	Sequence	Product size (bp)
αB-crystallin	S	5'-TCCTTATCACCCGTGAAGA-3'	357
	A	5'-AAATGAAGTTACACCAGCA-3'	
β-actin	S	5'-TCATGAAGGTGACGTTGACATCCGT-3'	285
	A	5'-CCTAGAAGCATTTCGGTGCACGATG-3'	

* S: sense, A: antisense

부합법을 시행하였다.

4. 조직 준비

적당한 일령의 닭 배아에서 안구를 적출한 후, 각막을 포함한 안구의 앞부분을 제거하고 4% paraformaldehyde (PFA) 고정액으로 4°C에서 3시간 동안 고정하였다. 동결손상을 방지하기 위해 20% 또는 30% sucrose 용액에 6시간 동안 침적시킨 후, 냉동포매제 (OCT compound, Leica, Germany)에 냉동포매하였다. 그 후, 냉동박절기 (CM3050, Leica, Germany)를 이용하여 10~16µm 두께의 망막 절편을 제작하였다.

5. 제자리부합법

망막 조직 절편을 phosphate-buffered saline (PBS)으로 씻은 후, 10µg/mL proteinase K (Sigma, USA)로 10분간 반응시켰으며 4% PFA에서 10분간 재고정하였다. 그 후 0.25% acetic anhydride (Sigma, USA)가 포함된 0.1 M triethanolamine (Sigma, USA)에서 15분간 조직을 아세틸화시켰다. 망막 조직을 PBS로 씻은 후, 안티센스 탐색자가 포함된 60% Hybrisol (Serologicals Corporation, USA)로 45°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 음성 대조를 위해 센스 탐색자도 동일한 조건으로 반응시켰다. 잡종형성반응을 마친 슬라이드는 50% formamide가 포함된 2 × SSC와 2 × SSC, 0.2 × SSC에서 순차적으로 각각 10분씩 세척하였으며, 10 U/mL의 S1 nuclease (Promega, USA)를 37°C에서 15분간 반응하여 비특이적 반응을 보인 탐색자를 모두 제거하였다. 반응을 마친 슬라이드는 tris-HCl buffered saline (TBS)으로 5분간 세척한 후, 상온에서 알칼리인산분해효소 (alkaline phosphatase)가 표지된 anti-DIG antibody (1 : 200, Roche, Germany)와 2시간 동안 반응시켰다. 이 후 TBS로 10분간 3회 세척하고 NBT/BCIP 용액에서 4시간 이상 발색 반응시켰다. 발색을 마친 슬라이드는 1 mM EDTA가 포함된 10 mM Tris-HCl (pH 8)에서 반응을 종료시키고 Crystalmount (Biomed, USA)로 봉입한 후, 디지털카메라 (Macrofire, Optronics,

USA)가 설치된 광학현미경 (DMLB, Leica, Germany)으로 염색시료를 관찰하고 사진 촬영하였다.

6. 면역조직화학염색

망막 조직 절편은 염색에 앞서 조직 내의 내인성 과산화소 (peroxidase)를 제거하기 위해 0.3% 과산화수소가 함유된 메탄올에서 20분간 반응시켰고, 비특이적 반응을 방지하기 위하여 1% normal chicken serum을 첨가한 PBS로 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 후 streptavidin-biotin-peroxidase법을 이용한 면역조직화학염색을 수행하였다. 1차 항체는 anti-aBC (1 : 500, Stressgen, USA)와 희소돌기아교세포, 별아교세포, 망막부챗살아교세포 (Müller cell) 및 신경절세포 (ganglion cell)를 표지하기 위한 anti-nkx2.2 (1 : 100, DSHB, USA), anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP, 1 : 100, Biogenex, USA), anti-vimentin (H5, 1 : 500, DSHB, USA) 및 anti-NeuN (1 : 200, Chemicon, USA)을 사용하였으며, 미세아교세포의 표지를 위해서는 lectin의 한 종류인 *Ricinus Communis* agglutinin I (RCA I, 1 : 2000, Vector, USA)을 사용하여 망막 조직과 4°C에서 14~18시간 동안 반응시켰다. 2차 항체는 biotin 이 표지된 anti-mouse IgG (1 : 400, Vector, USA)를 사용하여 실온에서 90분간 반응시켰다. 이어서 horseradish peroxidase가 표지된 streptavidin (1 : 200, Vector, USA)을 실온에서 1시간 반응시켰으며, 0.03% 과산화수소가 함유된 diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB) 용액으로 발색시켰다. 각 단계의 사이에는 PBS로 10분씩 3회 세척하였고, 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입한 후 현미경으로 관찰하였다.

결 과

역전사연쇄중합반응으로 발생 8일부터 18일까지의 닭 배아 망막에서 aBC mRNA의 발현을 관찰하였다. 발생 8일의 망막에서는 aBC mRNA의 발현이 매우 적었다. 발생 15일에는 발현이 증가하여 전기영동에서 뚜렷한 띠

(band)가 관찰되었다. 발생 18일에는 aBC mRNA의 발현이 증가하여 전기영동에서 짙은 띠로 관찰되었다 (Fig. 1).

제자리부합법을 시행하기 위해 안티센스 탐색자를 제

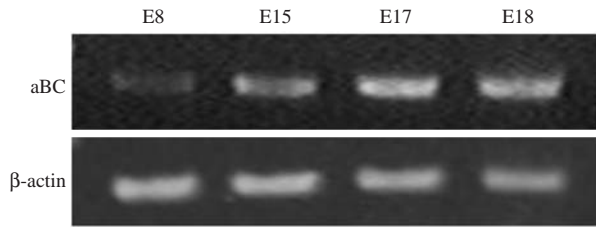


Fig. 1. Expression of aBC transcripts in the chick embryos. The aBC cDNAs were amplified after reverse transcription of total RNA extracted from E8 to E18 retinas (lanes E8, E15, E17, E18).

작하였으며 탐색자의 특이성 (specificity)을 검사하기 위해 센스 탐색자를 함께 제작하여 비교 염색을 시행하였다. 전기영동 결과 첫 번째 연쇄증합반응에서 만들어진 전사물은 357 bp 높이에서 뚜렷한 띠로 나타났다 (Fig. 2A, lane 1). 첫 번째 연쇄증합반응에서 얻은 전사물을 주형으로 하여 두 번째 연쇄증합반응을 시행하여 얻은 안티센스 탐색자와 센스 탐색자도 주형으로 사용한 첫 번째 연쇄증합반응의 전사물과 동일한 높이에서 뚜렷한 띠를 형성하였다 (Fig. 2A, lane 2, 3). 안티센스 탐색자가 특이적으로 잡종을 형성하는지 확인하기 위해 발생 18일의 망막 조직에 안티센스와 센스 탐색자를 이용해 각각 부합화를 시행한 결과, 안티센스 탐색자를 적용한 경우에는 망막 특정세포의 세포질에서 뚜렷한 양성반응이 관찰되었다 (Fig. 2B). 그러나 센스 탐색자를 적용한 경우

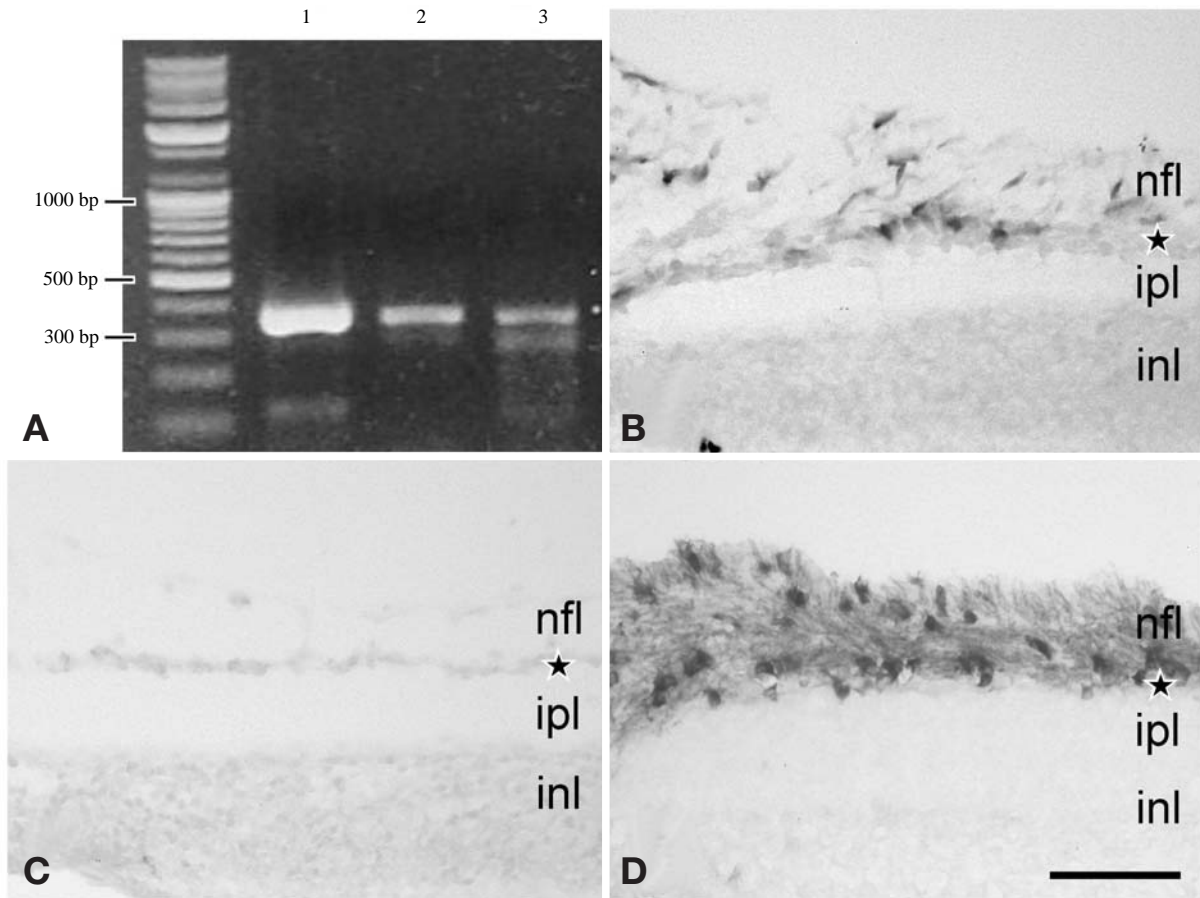


Fig. 2. Preparation of aBC probes using the E18 retina. A: Products from the first PCR (lane 1), antisense (lane 2) and sense probes (lane 3). They were detected at the level of 357bp. B: *In situ* hybridization using antisense probe. Considerable number of aBC mRNA-expressed cells were stained in the retina. C: Negative control using sense probe. There is no signal in the negative control using sense probe. D: Immunohistochemistry for aBC. A number of aBC immunoreactive cells were detected in the retina. Note that the localization of aBC immunoreactive cells was accorded with that of aBC mRNA-expressed cells. nfl: nerve fiber layer, ipl: inner plexiform layer, inl: inner nuclear layer, asterisks: ganglion cell layer. Scale bar: 30 μ m.

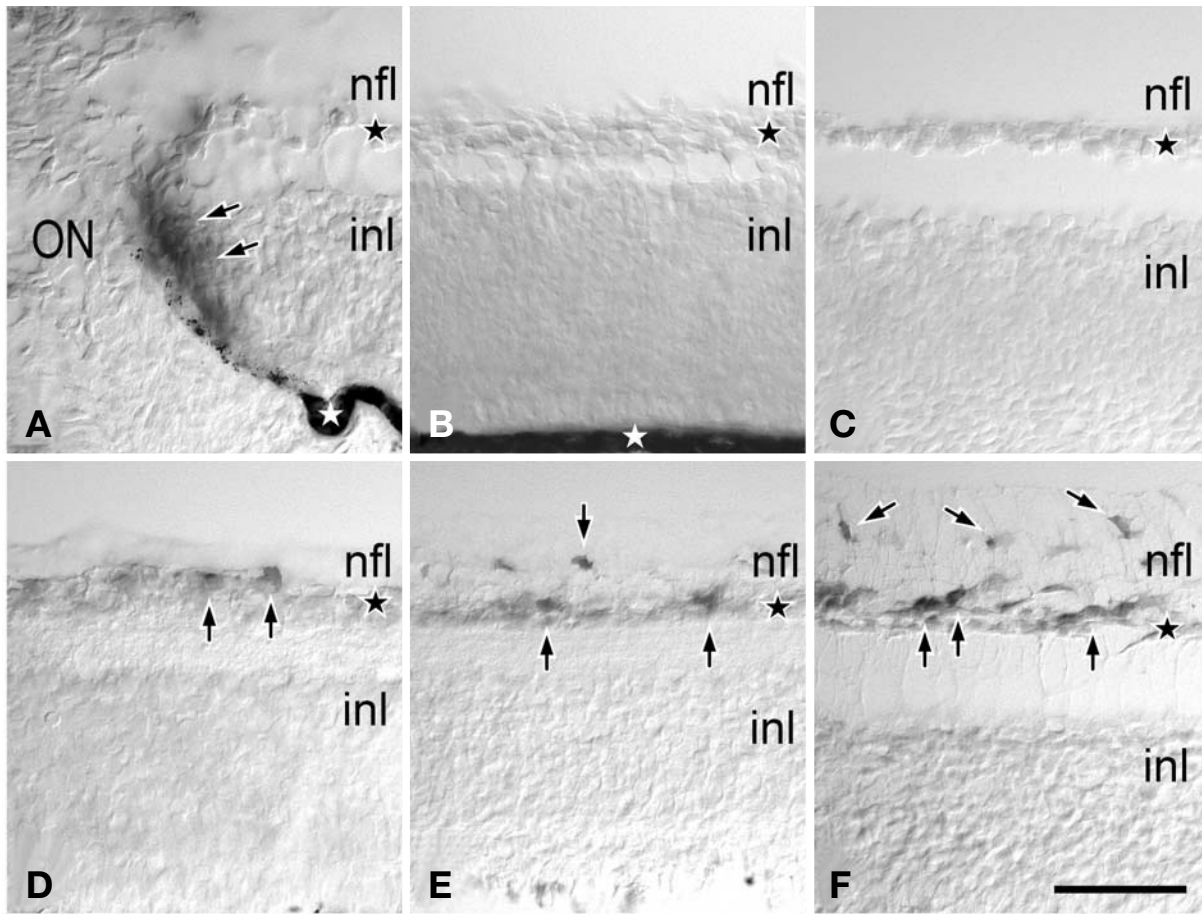


Fig. 3. *In situ* hybridization of aBC mRNA in the E12 to E20 retinas. At E12 (A, B) and E14 (C), aBC+ signals were not detected in the retina except for the region adjacent to the optic nerve (arrows in A). aBC+ cells first appeared in the retina at E16 (arrows in D). The number of aBC+ cells was increased in the retinas at E18 (arrows in E) and E20 (arrows in F). ON: optic nerve, nfl: nerve fiber layer, inl: inner nuclear layer, white asterisks: pigment epithelium, black asterisks: ganglion cell layer. Scale bar: 20 μm.

에는 양성반응을 보이는 세포를 관찰할 수 없었다(Fig. 2C). 안티센스 탐색자를 적용한 제자리부합법에서 나타난 양성반응이 의미 있는 것인지 확인하기 위하여 면역조직화학 염색을 시행하여 aBC 양성세포와 비교해 본 결과, 안티센스 탐색자를 이용한 제자리부합법에서 나타난 양성반응과 동일한 위치였다(Fig. 2D). 따라서 aBC mRNA의 안티센스 탐색자가 높은 특이성을 갖고 있음을 알 수 있었다. 흥미로운 점은 면역조직화학 염색에서 양성반응은 세포의 세포질 뿐만 아니라 말미집(myelin)에서도 관찰되었지만, 제자리부합법에서는 mRNA의 특성상 세포의 세포질에서만 양성반응이 관찰되었다(Fig. 2B, D).

제자리부합법으로 발생 12일부터 20일까지의 닭 배아 망막에서 aBC mRNA의 발현을 관찰하였다. 발생 12일에는 aBC mRNA가 시각신경과 인접한 망막 부위에서

만 양성반응이 관찰되었다(Fig. 3A). 시각신경과 인접한 망막 부위라는 위치의 특성에 비추어 볼 때 발생 12일에 관찰된 aBC mRNA 양성반응은 조류 망막에서 관찰할 수 있는 망막부챗살아교세포(Müller cell)의 일종인 유두주위아교세포(peripapillary glial cell)로 판단되었다(Schuck 등 2000, Quesada 등 2004). 유두주위아교세포를 제외한 망막의 나머지 부위에서는 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 3B). 발생 14일의 망막에서도 발생 12일과 동일한 발현 양상을 보였다(Fig. 3C). 발생 16일의 망막에서 처음으로 aBC mRNA 발현세포가 망막의 신경섬유층(nerve fiber layer)에서 적은 수가 관찰되기 시작하였다(Fig. 3D). 발생 18일에는 aBC mRNA 발현세포가 신경섬유층 뿐만 아니라 신경절세포층(ganglion cell layer)에서도 관찰되었다(Fig. 3E). 발생 20일에는 aBC mRNA 발현세포가 망막의 신경섬유층과 신경절세

포층에서 이전 시기보다 더 많아진 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3F).

aBC mRNA 발현세포의 특성을 확인하기 위해 발생 20일의 망막 조직을 대상으로 희소돌기아교세포의 표지자인 nkx2.2에 대한 면역조직화학 염색을 시행하여 비

교하였다. 망막의 중심부에서 aBC mRNA 발현세포는 신경섬유층과 신경절세포층에서 관찰되었고 (Fig. 4A) 이는 nkx2.2 발현세포와 동일한 분포 양상이었다 (Fig. 4B). 그러나 RCA I 발현세포는 신경섬유층 뿐만 아니라 신경절세포층과 속핵층 (inner nuclear layer)에 인접한 속열기

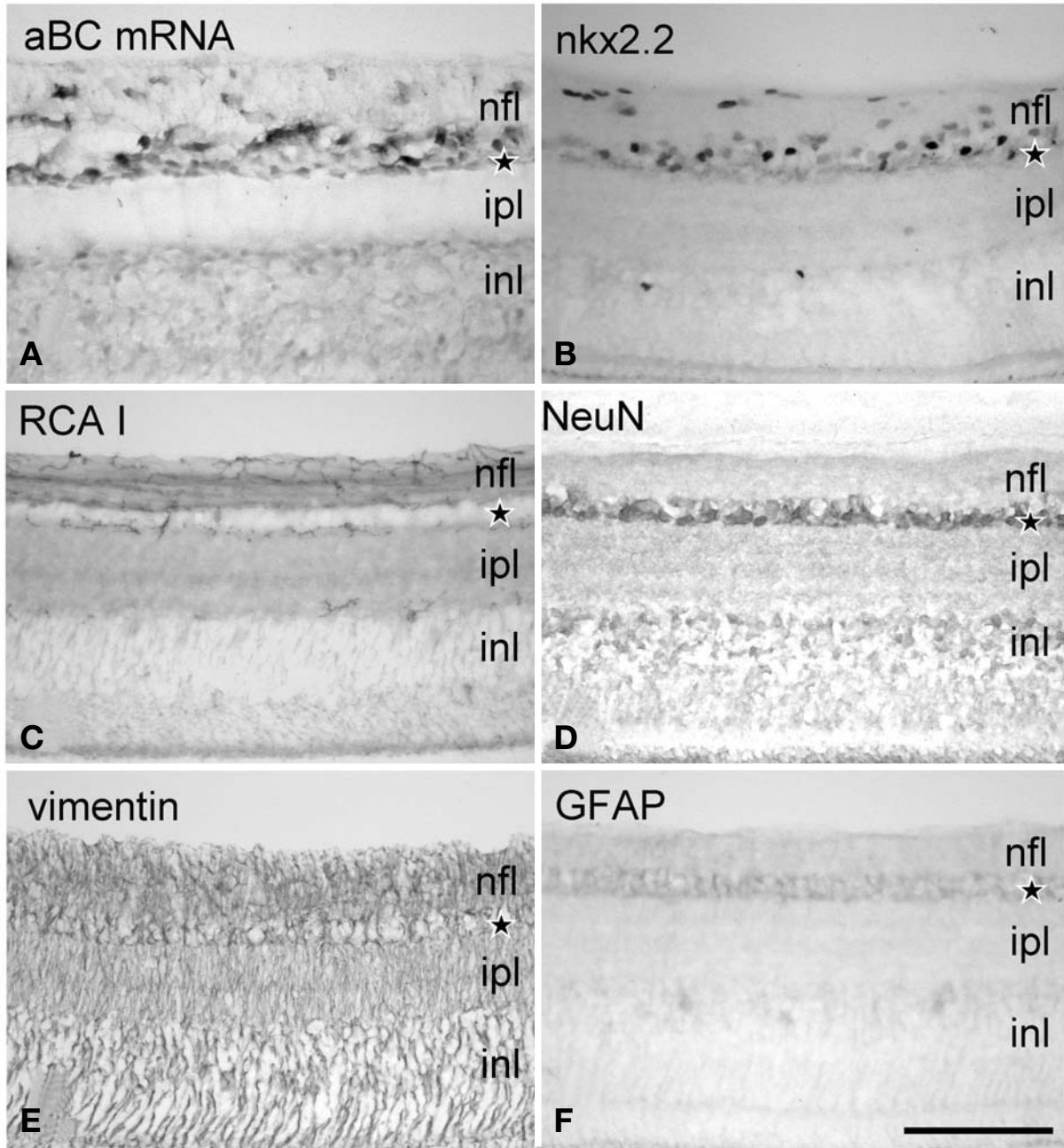


Fig. 4. Expression of aBC mRNA (A) and specific markers for retinal cells (B-F) in the E20 retinas. A: aBC+ cells are observed in the nerve fiber layer and ganglion cell layer. B: Localization of nkx2.2+ oligodendrocytes is in accord with that of aBC+ cells. C: RCA I+ microglia are located in the inner plexiform layer as well as the nerve fiber layer. D, E: Distribution of NeuN+ neurons or vimentin+ Müller cells is different from that of aBC+ cells. F: There is no GFAP immunoreactivity in the chick embryonic retina. nfl: nerve fiber layer, ipl: inner plexiform layer, inl: inner nuclear layer, asterisks: ganglion cell layer. Scale bar: 30 μ m.

층(inner plexiform layer)에서도 다수가 관찰되어 aBC mRNA 발현세포는 미세아교세포의 분포 양상과 차이를 보였다(Fig. 4C). NeuN 및 vimentin 발현세포도 aBC mRNA 발현세포의 분포 양상과는 차이를 보여 aBC mRNA 발현세포가 신경세포나 망막부챗살아교세포가 아님을 확인할 수 있었다(Fig. 4D, E). 별아교세포가 없는 닭 배아 망막에서 GFAP에 대한 면역반응은 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 4F). 이 결과는 aBC mRNA가 nkx2.2와 동일하게 희소돌기아교세포에서 발현함을 의미하는 것으로 판단된다.

고 찰

탐색자(probe)로 사용되는 핵산에는 RNA 탐색자와 이중가닥 DNA, 단일가닥 DNA, 올리고핵산과 같은 DNA 탐색자가 있다. RNA 탐색자는 이중가닥 DNA 주형으로부터 시험관내 전사(*in vitro* transcription)를 통해 단일가닥 RNA 탐색자를 만드는 방법으로 최근 많이 사용되고 있다(Aigner와 Pette 1990, Tsukamoto 등 1991). RNA 탐색자는 특이성과 민감도가 매우 높고, 부합화 후에 리보핵산분해효소(ribonuclease) 처리를 통해 비특이 결합을 제거하기 때문에 배경 염색(background stain)이 적은 장점이 있다. 그러나 RNA 탐색자를 제작하기 위해서는 플라스미드매개체(plasmid vector)를 이용한 클로닝(cloning), 적절한 제한효소의 사용, 시험관내 전사와 같은 복잡한 과정이 필요하며 음성 대조군을 위한 센스 탐색자를 제작하기 위해서도 동일한 과정을 반복해야 하는 번거로움이 있다. 뿐만 아니라 RNA 탐색자는 안정된 구조의 RNA분해효소(RNase)에 의해 분해되기 쉽기 때문에 RNA분해효소에 오염되지 않도록 주의해야 한다. 이를 위해 실험 중에 항상 비닐 또는 고무장갑을 끼고, 실험에 사용되는 모든 용액은 0.05~0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리를 하며, 유리제품은 180°C에서 8시간 이상 멸균시키거나, DEPC 처리한 증류수에 담겼다 꺼낸 후 고압멸균하고, 플라스틱제품은 RNA분해효소가 검출되지 않은 제품을 사용해야 하는 등 실험을 준비하는 과정에 시간과 비용이 많이 든다. 반면, DNA 탐색자는 특이성과 민감도만 높으면 연쇄중합반응으로 비교적 간단히 만들 수 있다는 점에서 장점이 있다. 특히 단일가닥 DNA 탐색자의 경우 이중가닥 DNA 탐색자에 비해 특이성이 높고 센스 탐색자를 손쉽게 제작하여 음성 대조군으로 사용할 수 있다는 것도 장점이다. 본 연구에서도 안티센스 탐색자와 센스

탐색자를 동시에 제작하여 제자리부합법을 시행해 봄으로써 안티센스 탐색자의 특이성이 높음을 확인할 수 있었다. 그 외에도 역전사연쇄중합반응을 통한 결과 값을 짧은 시간 내에 제자리부합법으로 조직 슬라이드에서 다시 확인할 수 있다는 것도 큰 장점이라고 판단된다. 따라서 단일가닥 DNA 탐색자를 이용한 제자리부합법은 향후 RNA 탐색자를 대체할 연구방법이 될 것으로 기대된다.

조류의 망막은 사람을 포함한 포유류의 망막과 동일한 일련의 발생 과정을 거치고, 유사한 세포 분포를 보인다. 다만 신경섬유층을 이루는 신경절세포의 축삭이 말아집신경섬유(myelinated nerve fiber)로 되어 있어 이 부위에 희소돌기아교세포가 존재하는 것이 포유류의 망막과 다른 유일한 차이점이다(Seo 등 2001). 조류 망막에 존재하는 희소돌기아교세포의 발생과 이주에 대한 연구는 희소돌기아교세포의 표지자인 nkx2.2와 O4 항체를 이용한 연구에서 잘 밝혀졌다(Ono 등 1998, Fu와 Qiu 2001). aBC mRNA 발현세포의 특성을 확인하기 위해 본 연구에서 사용한 희소돌기아교세포의 특이표지자인 nkx2.2는 희소돌기아교세포의 여러 발생 단계에서 꾸준히 발현하는 전사인자이다(Qi 등 2001, Soula 등 2001, Fu 등 2002, Watanabe 등 2004, Cai 등 2010). aBC mRNA 발현세포는 세포 표지자와의 비교염색에서 희소돌기아교세포임이 확인되었다. aBC mRNA를 발현하는 희소돌기아교세포는 발생 16일부터 망막의 신경섬유층에서 적은 수가 관찰되었고, 이후 발생이 진행될수록 신경섬유층 뿐만 아니라 신경절세포층에서도 관찰되었으며 그 수도 뚜렷하게 증가하였다. 이는 aBC에 대한 면역조직화학 염색을 시행하여 관찰한 이전의 연구 보고와 유사한 결과였다(Song 등 2006). 따라서 aBC 전사물과 단백질의 발현 시점은 크게 다르지 않으며 결과적으로 aBC mRNA 발현세포는 성숙한 분화 단계의 희소돌기아교세포로 판단되었다. 흥미로운 점은 역전사연쇄중합반응에서 발생 8일과 15일의 망막에서 aBC mRNA의 발현이 관찰되었던 점이다(Fig. 1). 이는 발생 12일과 14일 망막을 대상으로 한 제자리부합법에서 시각신경에 인접한 부위에 위치하는 유두주위아교세포에서 aBC mRNA 양성반응이 관찰된 것과 일치하는 결과라고 판단되었다(Fig. 3). 유두주위아교세포는 조류의 망막과 시각신경의 경계 부위에 존재하고 망막부챗살아교세포(Müller cell)와 형태적으로 유사하며 발생 중에 신경세포의 표지자인 3BA8, 희소돌기아교세포의 표지자인 MOSP 및 별아교세포의 표지자인 3CB2를 일시적으로 발현하는 특이한 신경아교세포이다(Quesada 등 2004). 조류 망막이 무

혈관조직 (avascular tissue)이라는 점에서 유두주위아교세포가 망막의 혈관신생 (angiogenesis)을 방해할 가능성이 제기된 바가 있지만 아직 이 세포의 정확한 역할은 알려져 있지 않다 (Schuck 등 2000, Quesada 등 2004). 따라서 조류 망막의 유두주위아교세포에서 aBC mRNA의 역할 뿐만 아니라 이 세포의 역할도 밝혀야 할 과제이다.

성숙 회소돌기아교세포를 미성숙 회소돌기아교세포와 구분짓는 특이적 발현 물질은 myelin basic protein (MBP)와 proteolipid protein (PLP)이다 (Castro와 Bribian 2005). 그러나 MBP와 PLP는 말이집의 주요성분이기 때문에 세포질에서는 잘 관찰되지 않는다. 따라서 성숙 회소돌기아교세포의 위치를 파악하는데 적합한 표지자가 아니다. aBC 단백질의 경우, 성숙 회소돌기아교세포의 세포질에서 집중적으로 발현하고 발생이 진행될수록 단백질이 말이집으로 다량 이동하여 강한 염색성을 나타냄으로써 세포의 위치 파악에 어려움을 주지만 aBC mRNA는 말이집으로 이동하지 않는 특성상 제자리부합법을 통해 mRNA를 검출하는 것은 성숙 회소돌기아교세포의 위치를 파악하는데 유리한 장점이 있다 (Fig. 2B, D). 본 연구는 단일가닥 DNA 탐색자를 이용한 제자리부합법을 통해 조류 망막의 정상 발생과정에서 aBC mRNA의 발현을 시공간적으로 관찰하여 처음으로 보고한 연구로서 의미가 있다. 단일가닥 DNA 탐색자를 이용한 제자리부합법은 쉽고 빠르게 특정 mRNA의 위치를 확인할 수 있는 유용한 실험방법이었으며, 발생 망막에서 aBC mRNA는 성숙 회소돌기아교세포에서 특이적으로 발현하는 것을 관찰하였다. 향후 aBC 전사물 탐색자를 이용한 제자리부합법은 성숙 회소돌기아교세포의 분포 특성을 밝히는 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Aigner S, Pette D : In situ hybridization of slow myosin heavy chain mRNA in normal and transforming rabbit muscles with the use of a nonradioactively labeled cRNA. *Histochemistry* 95: 11-18, 1990.
- Bhat SP, Nagineni CN : alpha B subunit of lens-specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 158: 319-325, 1989.
- Cai J, Zhu Q, Zheng K, Li Hong, Qi Y, Cao Q, Qiu M : Co-localization of Nkx6.2 and Nkx2.2 homeodomain proteins in differentiated myelinating oligodendrocytes. *Glia* 58: 458-468, 2010.
- Cowan WM : Studies on the development of the avian visual system. *UCLA Forum Med Sci.* 14: 177-222, 1971.
- de Castro F, Bribian A : The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development. *Brain Res Rev* 49: 227-241, 2005.
- Dubin RA, Wawrousek EF, Piatigorsky J : Expression of the murine alpha B-crystallin gene is not restricted to the lens. *Mol Cell Biol* 9: 1083-1091, 1989.
- Fu H and Qiu M : Migration and differentiation of Nkx-2.2+ oligodendrocyte progenitors in embryonic chicken retina. *Dev Brain Res* 129: 115-118, 2001.
- Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Takebayashi H, Nakafuku M, Richardson W, Qiu M : Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation. *Development* 129: 681-693, 2002.
- Hamburger V, Hamilton H : A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev Dyn* 195: 231-272, 1992.
- Iwaki T, Kume-Iwaki A, Liem RK, Goldman JE : Alpha B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. *Cell* 57: 71-78, 1989.
- Kitazawa S, Kitazawa R, Maeda S : In situ hybridization with polymerase chain reaction-derived single-stranded DNA probe and S1 nuclease. *Histochem Cell Biol* 111: 7-12, 1999.
- LaVail JH, Cowan WM : The development of the chick optic tectum. I. Normal morphology and cytoarchitectonic development. *Brain Res* 28: 391-419, 1971.
- Minami M, Mizutani T, Kawanishi R, Suzuki Y, Mori H : Neuronal expression of α B crystallin in cerebral infarction. *Acta Neuropathol* 105: 549-554, 2003.
- Ono K, Tsumori T, Kishi T, Yokota S, Yasui Y : Developmental appearance of oligodendrocytes in the embryonic chick retina. *J Comp Neurol* 398: 309-322, 1998.
- Qi Y, Cai J, Wu Y, Wu R, Lee J, Fu H, Rao M, Sussel L, Rubenstein J, Qiu M : Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor. *Development* 128: 2723-2733, 2001.
- Quesada A, Prada FA, Aguilera Y, Espinar A, Carmona A, Prada C : Peripapillary glial cells in the chick retina: A special glial cell type expressing astrocyte, radial glia, neuron, and oligodendrocyte markers throughout development. *Glia* 46: 346-355, 2004.
- Renkawek K, de Jong WW, Merck KB, Frenken CW, van Workum FP, Bosman GJ : Alpha B-crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 83: 324-327, 1992.
- Schuck J, Gerhardt H, Wolburg H : The peripapillary glia of

- the optic nerve head in the chicken retina. *Anat Rec* 259: 263-275, 2000.
- Seo JH, Haam YG, Park SW, Kim DW, Jeon GS, Lee C, Hwang DH, Kim YS, Cho SS : Oligodendroglia in the avian retina: Immunocytochemical demonstration in the adult bird. *J Neurosci Res* 65: 173-183, 2001.
- Song SH, Sohn HJ, Goo YS, Seo JH : Specific expression of α B-crystallin in oligodendrocytes during avian retinal development. *Chungbuk Med J* 16: 12-22, 2006. (in Korean)
- Soula C, Danesin C, Kan P, Grob M, Poncet C, Cochard P : Distinct sites of origin of oligodendrocytes and somatic motoneurons in the chick spinal cord: oligodendrocytes arise from Nkx2.2-expressing progenitors by a Shh-dependent mechanism. *Development* 128: 1369-1379, 2001.
- Tsukamoto T, Kusakabe M, Saga Y : In situ hybridization with non-radioactive digoxigenin-11-UTP-labeled cRNA probes: Localization of developmentally regulated mouse tenascin mRNAs. *Int J Dev Biol* 35: 25-32, 1991.
- Turner DL, Cepko CL : A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328: 131-136, 1987.
- Vanselow J, Thanos S, Godement P, Henke-Fahle S, Bonhoeffer F : Spatial arrangement of radial glia and ingrowing retinal axons in the chick optic tectum during development. *Dev Brain Res* 45: 15-27, 1989.
- Wang YP, Dakubo G, Howley P, Campsall K, Mazarolle C, Shiga SA, Lewis PM, McMahon AP, Wallace VA : Development of normal retinal organization depends on sonic hedgehog signaling from ganglion cells. *Nat Sci* 5: 831-832, 2002.
- Watanabe M, Hadzic T, Nishiyama A : Transient upregulation of Nkx2.2 expression in oligodendrocyte lineage cells during remyelination. *Glia* 46: 311-322, 2004.
- Weidman T, Kuwabara T : Development of the rat retina. *Invest Ophthalmol* 8: 60-69, 1969.
- Wilkinson DG : The theory and practice of in situ hybridization, *In situ hybridization: A practical approach*, 2nd ed., Oxford, Oxford University Press, pp 5-10, 1998.
- Zhang X-M, Yang X-J : Regulation of retinal ganglion cell production by sonic hedgehog. *Development* 128: 943-957, 2001.

Detection of α B-crystallin mRNA using Single-stranded DNA Probe in Oligodendrocytes of the Developing Chick Retina

Ji Young Kim, Hyun Joon Sohn, Je Hoon Seo

Department of Anatomy, Chungbuk National University School of Medicine

Abstract : *In situ* hybridization (ISH) using single-stranded DNA probe (ssDNA probe) is a useful method for observing the specific transcripts in cells, since it is convenient to prepare probe which is specific and sensitive. In this study, ssDNA probe for detection of α B-crystallin (aBC) mRNA, transcript of a heat shock protein, was prepared and aBC mRNA-expressed cells were spatiotemporally observed in the retina of the developing chick embryos.

Single-stranded antisense probe produced by reverse transcription and polymerase chain reaction was identified as a specific probe for aBC mRNA in comparison to negative control using sense probe and immunohistochemistry for aBC protein. In the ISH experiment, aBC mRNA was expressed only in the peripapillary glial cells which are a specific cell type located in the avian retina adjacent to the optic nerve at E12 and E14 retinas. At E16, a small number of aBC mRNA-expressed cells were identified in the nerve fiber layer (NFL) of the retina. At E18, aBC mRNA-expressed cells were observed in the ganglion cell layer (GCL) as well as the NFL. At E20, the number of aBC mRNA-expressed cells was increased in the GCL and the NFL. Based on the same localization of nkx2.2 immunoreactive cells and aBC mRNA-expressed cells, aBC mRNA-expressed cells were identified as oligodendrocytes.

These results indicate that ssDNA probe for aBC mRNA detection is very useful tool for oligodendrocyte research such as distribution, migration and differentiation of the cells.

Keywords : *In situ* hybridization, Single-stranded DNA probe, α B-crystallin, Retina