
碩士學位論文

말 精巢내 Protein Kinase C의 發現

濟州大學校 大學院

獸 醫 學 科



1997年 12月

말 精巢내 Protein Kinase C의 發現

指導教授 申 台 均

秦在光

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

1997年 12月

秦在光의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ (인)

委 員 _____ (인)

委 員 _____ (인)

濟州大學校 大學院

1997年 12月

초 록

말 정소내 Protein Kinase C의 발현

(지도교수 : 신태균)

진 재 광

제주대학교 대학원 수의학과

Protein Kinase C(PKC)는 transmembrane signal transduction에 중요한 역할을 하는 조절효소로서 세포의 증식과 분화, 호르몬 분비등에 관여하고 있다. 정소는 hormone 조절과 생식세포분화가 일어나는 장기로서 PKC와 같은 신호전달효소가 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으나 PKC 아형에 따른 정소내 분포에 대해서는 알려진 바 많지 않다. 본 연구에서는 정소내 PKC의 발현양상을 확인하기 위하여 말의 정소를 Western blotting과 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

Western blot 결과 미성숙 및 성숙한 말의 정소에서 조사한 4종의 PKC α , PKC β I, PKC δ 그리고 PKC θ 의 발현이 확인되었다. 면역염색 결과 미성숙한 말(1년생 이하)의 정소에서는 정모세포에서 PKC β I만이 양성반응을 보인 반면 PKC α , PKC δ 및 PKC θ 는 어느 세포에서도 양성반응을 나타내지 않았다. 성숙한 말(3년생 이상)의 정소에서 PKC β I은 정모세포 및 정자에 이르기까지 양성반응을 보인 반면 PKC δ 는 정자세포 특이성을 나타내었으며 간질세포에서는 조사한 4종의 PKC α , β I, δ 및 θ 모두 인정되었다.

이상의 결과 말의 정소내 세포분화에 신호전달효소 PKC α , β I, δ , θ 가 관여함을 확인하였으며 성숙함에 따라 PKC의 발현도 증가되었다. 특히 PKC β I은 정자형성세포계에서, PKC δ 는 정자세포 특이성을 가진 신호전달효소로 생각되며 정소내에서 발현되는 PKC 아형의 특성 규명은 번식과 관련된 연구에 도움을 줄 것으로 생각된다.

주요어: Protein Kinase C, 말, 정소, Western blot, 면역조직화학

목 차

I. 서 론-----	1
II. 재료 및 방법-----	3
III. 결 과-----	6
IV. 고 찰-----	11
V. 결 론-----	14
VI. 참고문헌-----	15
VII. 영문초록-----	18



I. 서 론

Protein kinase C (PKC)는 transmembrane signal transduction에 중요한 역할을 담당하는 효소(Nishizuka, 1984; Nishizuka, 1986)로써 뇌, 신장, 폐, 심장, 비장, 난소 및 정소등 거의 모든 조직에 분포하며 세포의 분화와 증식에 관여하고 있다(Wetsel 등, 1992). PKC는 domain 구성에 따라 conventional PKC(cPKC) α , β I, β II, γ 와 novel PKC(nPKC) δ , ϵ , ζ , η , θ 의 2 가지 그룹으로 나누어 진다(Nishizuka, 1989). cPKC(α , β I, β II, γ)는 3개의 domain, 즉 인지질, DAG/phorbol ester 결합 C1 domain, 칼슘 결합 C2 domain 그리고 촉매성 C3 domain을 함유하여 칼슘, 인지질, DAG에 의해 활성화된다(Burns 등, 1990; Nishizuka, 1988). 반면 nPKC(δ , ϵ , ζ , η)는 칼슘 결합 C2 domain이 없으므로 Ca^{2+} 에 관계없이 활성화 될 수 있다(Nishizuka, 1988; Osada 등, 1990). 이상과 같이 PKC아형에 따라 서로 다른 경로를 통해 활성화된 PKC는 세포 고유의 기능을 담당할 수 있게 된다(Nishizuka, 1988). 비록 PKC는 활성화 시킬 수 있는 인자에 의해 2군으로 구분되나 PKC는 아형에 따라 장기 및 조직내에서 발현은 상당한 차이를 나타낼 뿐만아니라(Osborne 등, 1994; Brandt 등, 1987) 비록 유전자수준에서 구조적으로 유사한 PKC 아형도 세포내 분포는 다른 것으로 알려져 있다(Shin 등, 1997).

정소는 생식세포 분화 및 응성호르몬의 분비가 일어나는 장기로서 성장함에 따라 뇌하수체로부터 전달되는 FSH 등의 호르몬뿐만 아니라 간질세포에서 방출되는 응성호르몬 등에 의해 곧은 정세관내 정자발생세포는 분화하여 정자를 생산하게 된다. 이와같은 세포분화 과정에는 PKC와 같은 신호전달효소가 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으며(Um 등, 1995; Shin 등, 1997) nPKC δ 와 같은 일부 PKC 아형이 결손될 경우 응성 불임을 초래하기도 한다(Um 등, 1995). 지금까지 일부 PKC 아형이 수컷생식기계통에서 확인되었으나(Breibart 등, 1992; Lax 등, 1997; Mischak 등, 1993), 정소내에서 PKC 아형에 따른 세포내 발현에 대해서는 알려진 바 많지 않으며 더구나 가축의 정소에서는 보고된 바 거의 없다.

본 연구에서는 성장함에 따른 정소내 PKC의 역할을 확인하기 위하여 말의 정소 조직에서 PKC 아형의 발현양상을 면역조직화학적으로 비교검사하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험에 이용된 말의 정소는 더러브렛종 7두(1년생 미만 1두, 3년생 이상 6두)로부터 거세를 통해 얻었다.

2. 항체 및 시약

사용한 1차 항체는 rabbit anti-PKC α , rabbit anti-PKC β I, rabbit anti-PKC δ , rabbit anti-PKC θ (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)를 사용하였으며, 면역조직화학은 avidin-biotin peroxidase complex Elite kit(Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 사용하였다. 그리고 Western blotting을 위한 시약은 Bio-Rad Laboratories(Richmond, CA)에서 구입하여 사용하였고 horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG와 3,3-diaminobenzidine DAB)는 Sigma로부터 구입하였다.

3. Western blotting

냉동보관(-70°C)된 조직을 10% phosphate buffered saline(PBS)용액에 균질화하고 12,000g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 취하여 Lowry(1951)법으로 정량한 다음 30 μ g/ml 되게 2 x SDS sample buffer [10% SDS, 1% Bromophenyl Blue, Glycerol, 0.5M tris-HCL, pH 8.0]를 첨가한 후 5분동안 boiling 한 다음 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다(Laemmli, 1970). separating gel로는 7.5% linear gradient gel을 사용하였으며, stacking gel의 acrylamide 농도는 4.5%였다. 전기영동이 끝난 겔은 coomassie blue R-250으로 염색한 후 단백질의 분리양상을 조사하였다(Fig. 1).

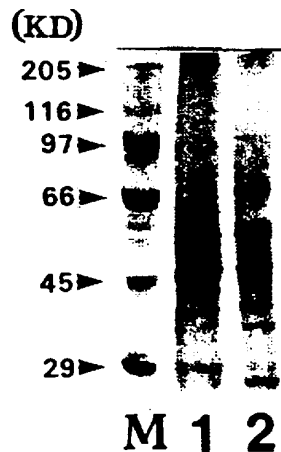


Fig 1. Protein component of testis in 7.5% SDS-PAGE and stained with coomassie blue R-250

M : molecular weight standard Lane 1 : horse testis(juvenile)

Lane 2 : horse testis(adult)

전기영동이 끝난 후 전이완충용액(25mM Tris, 14.4g glycine, 20%v/v methanol, pH 8.3)을 이용하여 100mA에서 4시간 동안 니트로셀룰로오스 막 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)에 전이하였다. 전이가 끝나면 니트로셀룰로오스를 blocking solution[5% BSA; bovine serum albumin/TBS; Tris-buffered saline(50mM Tris, 20mM NaCl, pH 7.4)]에서 1시간 동안 반응시켰다. 그후 TBS-5% BSA 용액에 희석한 rabbit anti-PKC α (1:1,000), PKC β I(1:1,000), PKC θ (1:1,000), PKC δ (1:1,000)를 넣고 4°C에서 overnight 시킨 후 horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG(1:1,000, TBS)를 1시간 반응시켜 TBS 용액으로 5분간 두번, TNT(0.1% Triton X-100/TBS) 용액으로 한번 수세 후 diaminobenzidine(DAB)를 넣고 상온에서 발색시킨 후 증류수로 수세하여 발색을 정지시켰다.

4. 면역조직화학 염색

조직을 10% buffered formalin 용액에서 고정시킨 후 ethanol과 xylene으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 paraffin에 포매한 후 5 μ m 두께로 절편을 만들었다. 파라핀을 제거한 후 조직 절편을 항체에 반응시키기 전에 내재성 peroxidase를 제거하기 위하여 3% H₂O를 첨가한 methanol 용액에 20분간 반응시켰으며 비특이적 면역반응을 방지하기 위하여 10% normal goat serum으로 1시간 반응시켰다. 1차 항체 rabbit anti-PKC α (1:100), PKC β I(1:100), PKC δ (1:100), PKC θ (1:100)를 실온에서 1시간동안 반응시킨 후 biotinylated anti-rabbit IgG(1:200)를 실온에서 45분간 반응시켰다. 이어서 avidin-biotin peroxidase complex(Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 실온에서 45분간 반응시켰으며 각 단계별 반응 후에는 PBS로 5분간 3회 충분히 세척하였다. 면역반응이 끝난 조직은 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB, 0.5mg/ml) 용액에 H₂O₂가 0.009% 되게 희석된 용액에서 발색반응을 나타내었다. 양성반응이 나타난 조직을 hematoxylin 용액으로 대조염색을 하고, ethanol, xylene의 탈수 및 투명화 과정을 거쳐 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다.



Ⅲ. 결 과

정소의 조직학적 관찰

말의 정소를 조직학적으로 관찰한 결과 미성숙한(1년생 미만) 말 정소에서는 정조세포, 정모세포 및 Sertoli 세포의 발달은 미약하였고 정자세포는 관찰되지 않았으며 정세관 주위에서 소수의 간질세포가 관찰되었다(Fig. 2, A). 성숙(3년생 이상)한 말의 정소에서는 정세관내 Sertoli cell, 정조세포, 정모세포, 정자세포가 관찰되었으며 곡정세관의 내강에서 정자가 관찰되었다(Fig. 2, B). 실험에 이용한 정소는 조직학적 소견상 병변이 없는 것을 활용하였으며 이 실험에서는 정소의 곡정세관내 정자 유무에 따라 1년생 미만을 미성숙 말로 그리고 3년생 이상을 성성숙된 말로 간주하였다.

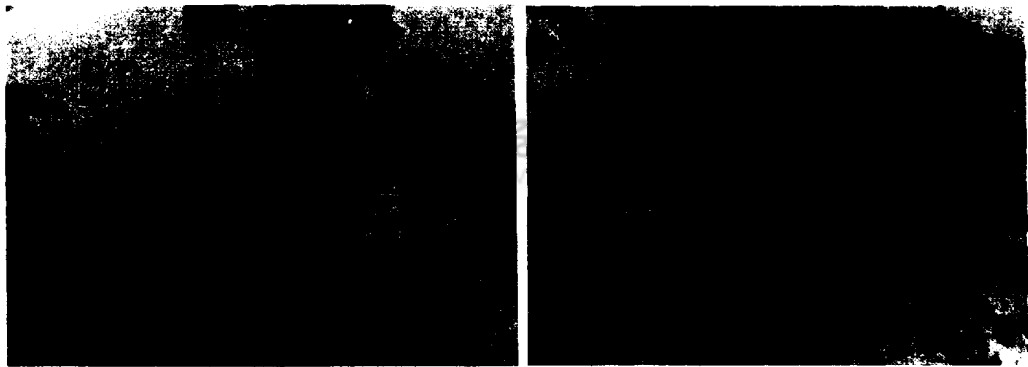


Fig 2. Testes section of a juvenile(A) and adult(B) horse showing interstitial cell(IL) and three portions of seminiferous tubules(ST) are shown. H-E stain x 100.

Western blotting analysis

말의 정소에서 PKC α , PKC β I, PKC δ 그리고 PKC θ isoenzyme의 발현을 확인하기 위하여 Western blotting을 실시하였다. cPKC인 PKC α , PKC β I는 대략 82KD에서 면역반응을 보였으며(Fig. 3), nPKC인 PKC δ 와 PKC θ 는 약 80KD에서 면역반응을 보였다(Fig. 3).

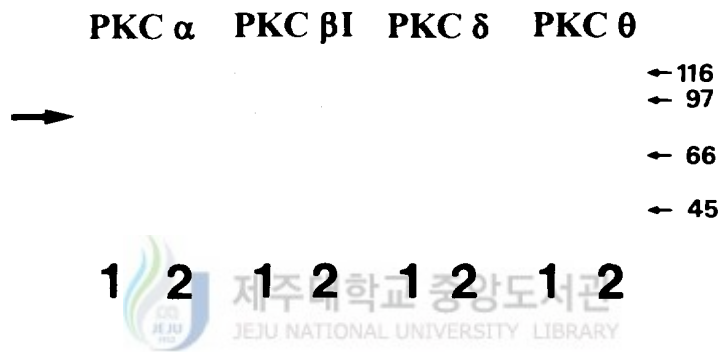


Fig 3. Western blot analysis of PKC α , PKC β I, PKC δ and PKC θ in the testes of adult(lane 1) and juvenile(lane 2) horses.

면역조직화학 염색

미성숙한 말의 정소내 간질세포, Sertoli cell 그리고 정세관내 어느 세포에서도 cPKC인 PKC α (Fig. 4, A), 그리고 nPKC인 PKC δ (Fig. 5, A), PKC θ (Fig. 5, B)는 양성반응이 관찰되지 않았으나 PKC β I(Fig. 4, B)은 정소의 정세관내 정모세포에서 약한 양성반응이 관찰되었다.

성숙한 말 정소에서는 간질세포에서 정도의 차이는 있으나 PKC α (Fig. 4, C), PKC β I(Fig. 4, D), PKC δ (Fig. 5, C) 그리고 PKC θ (Fig. 5, D) 모두 발견되었다. 정세관내에서는 정자 및 정모세포, 정자세포에서 PKC β I(Fig. 5, D), 정자세포에서 PKC δ (Fig. 5, C)가 각각 면역반응을 보인 반면 다른 PKC 아형은 양성세포가 확인되지 않았다(Table 1).

Table 1. Cellular distribution of PKC α , PKC β I, PKC δ and PKC θ in juvenile(below 1 year) and adult(over 3 years) horse testes.

age	PKC α	PKC β I	PKC δ	PKC θ	cell/tissue
juvenile	-	-	-	-	Leydig cell
	-	-	-	-	Sertoli cell
	-	-	-	-	spermatogonium
	-	-	-	-	spermatocyte
	-	-	-	-	spermatid
	-	-	-	-	spermatozoa
adult	++	+	++	++	Leydig cell
	-	-	-	-	Sertoli cell
	-	-	-	-	spermatogonium
	-	+	-	-	spermatocyte
	-	+	-	++	spermatid
	-	++	-	-	spermatozoa

Abbreviations: -,negative; +,weak; ++,intense

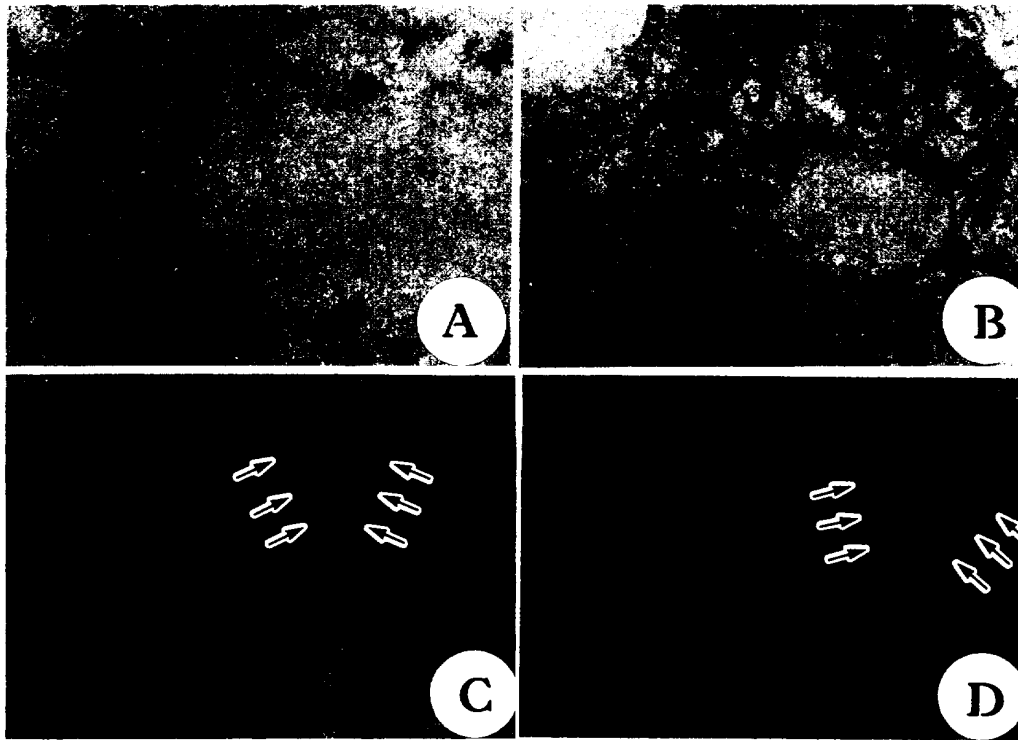
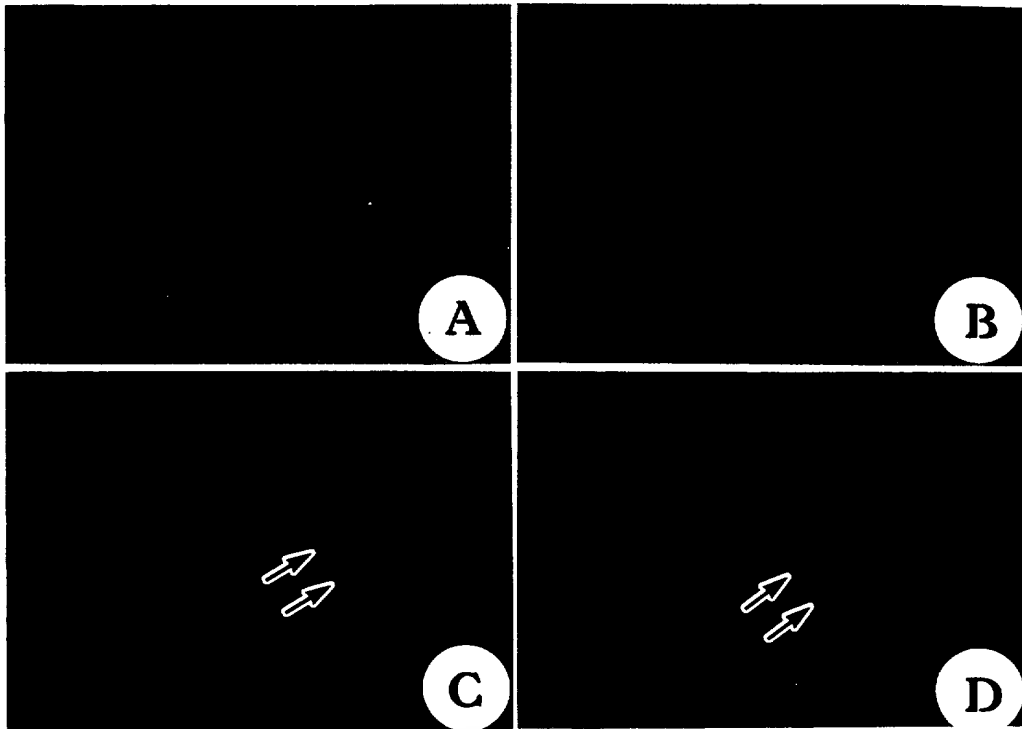


Fig 4. Immunostaining of PKC α and PKC β I in juvenile and adult horse testes by avidin-biotin complex method. In juvenile testes, immunoreactivity of PKC α (A) is not detected in any cells, and PKC β I(B) is seen in the spermatocyte(arrow head). In adult testes, immunoreactivity of PKC α (C) is localized in interstitial cells(arrow) and PKC β I(D) is seen in not only interstitial cells(arrow) but also spermatocytes and spermatozoa(star).



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig 5. Immunostaining of PKC δ and PKC θ in juvenile and adult horse testes by avidin-biotin complex method. In juvenile testes, immunoreactivity of PKC δ (A) and PKC θ (B) is not detected in any cells. In adult testes, immunoreactivity of PKC δ (C) is seen in not only interstitial cells (arrow) but also spermatid (star) and PKC θ (D) is localized in interstitial cells (arrow).

IV. 고 찰

본 실험에서 말의 정소내 PKC의 발현여부를 조사한 바 cPKC인 PKC α , PKC β I 그리고 nPKC인 PKC δ , PKC θ 등 조사한 4종의 PKC가 말의 정소내에 발현함을 처음으로 확인하였으며 이 결과는 mouse의 정소에서 PKC mRNA의 발현을 조사한 Mischak 등(1993)의 Northern blot 결과와 일치하는 경향이였다. 그러나 mouse의 정소내에서는 PKC θ 의 발현이 다른 PKC 아형에 비해 많이 발현된다고 한 Northern blot 결과(Mischak 등, 1993)와 차이는 있으나 PKC는 뇌조직(Mochly-Rosen 등, 1987)에서 뿐만 아니라 정소내 신호전달체계에서도 중요한 역할을 담당할 것으로 생각된다.

성성숙에 따른 말의 정소내 PKC의 발현을 Western blotting한 결과로 비교한 결과 정자세포가 발생되지 않은 1년생 이하 말과 정자가 곡정세관내에서 확인되는 성성숙한 말의 경우 조사한 4종의 PKC(α , β I, δ , θ) 아형은 두 연령군 모두에서 발현됨을 확인하였다. 비록 본 실험에서는 정량적 분석이 이루어지지 않아 발현정도를 연령에 따라 비교하기는 곤란하였으나 PKC δ 와 같이 mouse 정자세포의 발육(Um 등, 1995)과 관련성이 큰 PKC 아형은 말의 경우에서도 성성숙에 따라 발현도 증가할 것으로 생각된다. 이와같이 발육단계에 따른 PKC의 발현차이는 뇌조직에서도 분명하게 나타난다고 한다(Yoshida 등, 1988).

본 실험에서 4종의 PKC 아형이 모두 확인된 Western blot 결과와 달리 면역조직화학적 소견상 미성숙한 말의 정소에서는 정모세포에서 PKC β I만이 양성인 반면 PKC α , δ , θ 는 정소내 어느 세포에서도 확인되지 않았다. 이와같이 PKC는 아형에 따라 미숙한 말의 정소내에서 면역양성세포를 동정하기 어려운 점은 정소내 세포에서 극히 적은 PKC를 발현함으로써 면역조직화학적 소견에서는 확인되지 않았을 것으로 생각된다.

정소내 세포형에 따라 PKC 아형의 발현을 비교해보면 mouse 정소 간질세포에서 PKC α (Pelosin 등, 1991) 및 PKC θ (Shin 등, 1996)등이 단편적으로 확인된 바 있으나 본 실험에서 말의 경우 조사한 4종의 PKC(α , β I, δ , θ)가 모두 확인되어 이들은 말의 정소 간질세포에서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 이

와같은 소견은 PKC δ 가 정자세포 특이성을 갖는다(Um 등, 1995)는 기존의 결과와 다소 다른점으로써 동물종간의 차이로 생각된다. 이와같은 PKC δ 발현에 관한 종간의 차이는 안구에서도 확인되어 포유류에서는 안구 망막내 muller cell에서, 그리고 금붕어에서는 망막내 일부 신경절세포에서 면역양성반응을 보인다고 한다(Osborne 등, 1994).

Sertoli cell에서 PKC의 발현을 비교해 보면 PKC α 가 Sertoli cell line에서 발현된다(Pelosin 등, 1991)고 보고하였고 Wetsel(1992)등은 랫드의 정소를 면역조직화학 염색결과 Sertoli cell에 PKC β I이 분포한다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서 말의 정소 조직을 면역조직화학 염색한 결과 조사한 PKC α , PKC β I, PKC δ 그리고 PKC θ 모두 양성반응을 나타내지 않아 큰 차이를 보였으며 이와같은 결과는 염색방법에 따른 차이거나 또한 동물에 따른 차이라고 생각된다.

정모세포에서 PKC isoenzyme의 정소내 세포 형태별 분포여부에 대한 연구 결과 본 실험에서 처음으로 PKC β I이 미성숙한 말의 정소 정모세포에서 분포하고 있음을 확인하였다. 이는 이 isoenzyme이 정자를 형성하기 위해 진행중인 정모세포의 분화과정에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 특히 성성숙한 말의 정소 곡정세관내 정자세포와 정자도 PKC β I을 발현하고 있는점으로 보아 정모세포로부터 정자에 이르기까지 전과정에 걸쳐 avidin-biotin complex법에 의해 확인될 수 있는 유일한 PKC 아형으로 생각된다.

정자세포에서 PKC δ 는 정자세포의 분화에 중요한 인자로 알려져 있으며 (Um 등, 1995) 그외 PKC isoenzyme인 PKC α , PKC β I 그리고 PKC θ 의 분포여부에 대한 연구는 보고된 바는 없다. 본 실험에서도 PKC δ 만이 정자세포에서 양성반응을 보인점으로 보아 말에서도 정자형성에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

정자에서 PKC의 발현은 정자의 선체 반응(Brandt 등, 1987) 및 편모운동 (Rotem 등, 1992)에 관여하며 소의 정자를 분리하여 PKC를 검사한 결과 PKC α , PKC β I이 발현된다(Lax 등, 1997)고 보고하였으나 말의 정소내 정자에서는 PKC α 의 양성반응은 관찰되지 않았고 PKC β I은 소(Lax 등, 1997)에서와 같이 양성반응을 보였다. 이와같은 소견은 PKC β I의 경우 미성숙 단계의 정모세포에

서부터 정자에 이를 때까지 이들 세포계에서 중요한 역할을 담당하며, 그 외 PKC 아형은 정자형성세포 자체가 유전자를 가지고 있으면서 발달단계에 따라 mRNA를 형성함과 동시에 막투과신호전달에 활용될 수 있는 protein을 생산하는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 말의 정소에서는 cPKC인 PKC α , β I 그리고 nPKC인 PKC δ 와 θ 가 발현되고 있으며 PKC 아형에 따라 정자발생 및 응성호르몬 분비에 중요한 역할을 할 것으로 생각되며 정소내 각 PKC의 특성 규명은 번식과 관련된 세포의 신호전달체계의 이해에 도움을 줄 것으로 생각된다.



V. 결 론

정자발생 및 융성호르몬을 분비하는 정소내 PKC의 역할을 유추하기 위하여 말의 정소를 대상으로 PKC의 발현양상을 Western blotting과 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다. Western blot 결과 미성숙 및 성숙한 말의 정소에서 조사한 4종의 PKC α , PKC β I, PKC δ 그리고 PKC θ 의 발현이 확인되었다. 면역염색 결과 미성숙한 말(1년생 이하)의 정소에서는 정모세포에서 PKC β I만이 양성반응을 보인 반면 PKC α , PKC δ 및 PKC θ 는 어느 세포에서도 양성반응을 나타내지 않았다. 성숙한 말(3년생 이상)의 정소에서 PKC β I은 정모세포 및 정자에 이르기까지 양성반응을 보인 반면 PKC δ 는 정자세포 특이성을 나타내었으며 간질세포에서는 조사한 4종의 PKC α , β I, δ 및 θ 모두 인정되었다. 이상의 결과는 말의 정소내 신호전달효소 PKC α , β I, δ , θ 의 발현을 조사한 첫 보고이며 특히 PKC β I은 정자형성세포계에서, PKC δ 는 정자세포 특이성을 가진 신호전달효소로 생각되며 정소내에서 발현되는 PKC 아형의 특성 규명은 번식과 관련된 연구에 도움을 줄 것으로 생각된다.



VI. 참고문헌

- Brandt SJ, Niedel JE, Bell RM. 1987. Distinct pattern of expression of different protein kinase C mRNAs in rat tissues. *Cell*, 49. 57-63,
- Breitbart H, Lax J, Rotem R, Naor Z. 1992. Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem. J.*, 281. 473-476.
- Burns DJ, Bloomenthal J, Lee MH and Bell RM. 1990. Expression of the α , β II, and γ protein kinase C isozymes in the baculovirus-insect cell expression system. Purification and characterization of the individual isoforms. *J. Biol. Chem.*, 265. 12044-12051.
- Lax Y, Rubinstein S, Breitbart H. 1997. Subcellular distribution of protein kinase C α and β I in bovine spermatozoa and their regulation by calcium and phorbol ester. *Biol. Reprod.*, 56. 454-459.
- Mischak H, Goodnight J, Henderson DW, Osada S, Ohno S and Mushinski JF. 1993. Unique expression pattern of protein kinase C- θ : high mRNA levels in normal mouse testes and in T-lymphocyte cells and neoplasms. *F.E.B.S. Lett.*, 326. 51-55.
- Mochly-Rosen D, Basbaum AI and Koshland DE. 1987. Distinct cellular and regional localization of immunoreactive protein kinase C in the rat brain. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 84. 4660-4664.
- Nishizuka Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233. 305-312.

Nishizuka Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334. 661-665.

Nishizuka Y. 1989. Studies and perspectives of the protein kinase C family for cellular regulation. *Cancer*, 63. 1892-1903.

Osada S, Mizuno K, Saido TC, Akita Y, Suzuki K, Kuroki T and Ohno S. 1990. A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC η , a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J. Biol. Chem.*, 265. 22434-22440.

Osborne NN, Wood J, Groome N. 1994. The occurrence of three calcium-independent protein kinase C subspecies(δ , ϵ and ζ) in retina of different species. *Brain Res.*, 637. 156-162.

Pelosin JM, Ricouart A, Sergheraert C. 1991. Expression of protein kinase C isoforms in various steroidogenic cell types. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 75. 149-155.



Rotem R, Paz GF, Hominnai ZT, Kalina M, Lax J, Breitbart H, Naor Z. 1992. Ca⁺⁺ independent induction of acrosome reaction by protein kinase C in human sperm. *Endocrinology*, 131. 2235-2243.

Shin T, Jin JK, Kim SJ, Kim JJ, and Kim HM. 1996. Immunohistochemical localization of protein kinase C in mouse tissues. *Korean J. of Lab. Anim. Sci.*, 12. 189-191.

Um JY, Choi BM, Kim JS, Rim JS, Kim HM and Chung HT. 1995.

Expression of protein kinase C δ gene in germ cells. *J. Urol.*, 154. 1237-1240.

Wetsel WC, Khan WA, Merchenthaler I, Rivera I, Halpern AE, Phung HM, Negro-Vilar A, and Hannun YA. 1992. Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J. Cell. Biol.*, 117. 121-133.

Yoshida Y, Huang FL, Nakabayashi H, and Huang KP. 1988. Tissue distribution and developmental expression of protein kinase C isoenzymes. *J. Biol. Chem.*, 263. 9868-9873.



Expression of Protein Kinase C in the testes of horse

Jaekwang Jin

Department of Veterinary Medicine
Graduate School, Cheju National University
Cheju, Korea
(Supervised by Professor Taekyun Shin)

(Abstract)

To investigate the involvement of Protein Kinase C(PKC) isoenzyme in the testes which control spermatogenesis and hormone secretion, we examined cellular distribution of four types of PKC α , β I, δ and θ in the horse testes using PKC antisera by Western blot analysis and immunohistochemistry.

By the Western blot analysis, PKC α and β I were detected at 82KD, while PKC δ and θ were detected at 80KD in the testes of both juvenile and adult horses. In juvenile horse, PKC α , δ and θ except β I were not detected in the cells of the testes, whereas PKC β I was immunoreacted with only in spermatocytes. In adult, PKC α , β I, δ and θ isoenzymes were localized in interstitial cells of the testes. In the seminiferous tubules, PKC β I is localized

A thesis submitted to the Committee of the Graduate School of Cheju National University in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of veterinary medicine.

in spermatocyte, spermatid and spermatozoa, while PKC δ is localized only in spermatids.

We support that this is a first report to localize PKC in the testes of horse and PKC isoenzymes are upregulated in the cells of horse testes depending on ages. These findings also suggest that certain PKC isoenzymes play an important role in the signal transduction of spermatogenic cells and interstitial cells in horse testes.

KEY WORDS: Protein Kinase C, horse, testes, Western blot, immunohistochemistry



감사의 글

이 논문이 쓰여지기까지 지도와 편달을 아끼지 않으신 은사 신태균 교수님께 감사드립니다. 아울러 논문을 심사해주신 김희석 교수님, 박전홍 교수님과 수의학과 임윤규 교수님, 이두식교수님, 우호준 교수님, 배중희 교수님, 이경감 교수님, 정중태 교수님, 위명복 교수님, 이영재 교수님, 명예교수이신 김승호 교수님 그리고 생물학과 김세재 교수님의 가르침에 감사드립니다. 또한 실험실 생활을 애나가는 데 항상 도움을 준 애양연구소 고경민 선생님, 동료, 그리고 후배들에게도 고마운 마음을 전합니다. 끝으로 제가 있기까지 사랑으로 감싸주신 부모님, 항상 옆에서 보살펴주신 큰 누나, 큰 매형, 작은 누나, 작은매형, 형 그리고 영수, 동생들과 조카 지연, 지미, 성중, 민범, 성아, 지훈에게 이 조그마한 결실을 올립니다.