creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

교육학석사학위논문

산화 스트레스 조건에서 초파리 *phosphatidylserine synthase1* 유전자 돌연변이가 신경퇴화에 미치는 영향

Effects of *phosphatidylserine synthase1* gene mutation under oxidative stress on neurodegeneration in *Drosophila*

2017년 8월

서울대학교 대학원

과학교육과 생물전공

서혜원

산화 스트레스 조건에서 초파리 *phosphatidylserine synthase1* 유전자 돌연변이가 신경퇴화에 미치는 영향

Effects of *phosphatidylserine synthase1* gene mutation under oxidative stress on neurodegeneration in *Drosophila*

지도교수 전 상 학

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함
2017년 6월

서울대학교 대학원
과학교육과 생물전공
서 혜 원

서혜원의 교육학석사 학위논문을 인준함
2017년 7월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

초 록

인지질은 신경세포에 많이 존재하고 있고, 신경세포의 유지와 생존에 중요하다. 선행 연구에 의하면 인지질의 구성 비율의 변화가 신경 퇴행성 질환을 유발 시킨다고 밝혀지고 있다. *phosphatidylserine synthase*1(*ptdss*1)은 phosphatidyl serine(PS)을 합성하는 효소이며, 선행연구는 *ptdss*1 돌연변이의 신경 퇴행성 질환의 지표는 확인하였지만, 구체적인 기작을 밝히지 못한 한계가 있다. 본 연구는 Mitochondria-associated membrane에 다량 존재하는 *ptdss*1에서 돌연변이가 일어났을 때 미토콘드리아 막의 항상성에 문제가 발생함에 따라, Reactive oxygen species(ROS)가 과량 발생하는 산화 스트레스 상황에 처하고 이러한 조건이 신경 퇴행성 질환을 유발한다고 예상하였다. H_2DCF법을 통해 *ptdss*1 돌연변이 뇌에서 ROS의 과다 발생을 확인하였다. 그리고 인공적으로 유도한 산화 스트레스 조건에서 *ptdss*1 돌연변이의 신경 퇴행성 질환의 지표인 생존율의 감소, 뇌의 공포 발생, 뇌에서의 세포사멸 등을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 노화가 진행된 *ptdss*1 돌연변이에서 공포의 형성과 동일하며, 결과적으로 *ptdss*1 돌연변이에서 노화가 진행되면서 ROS가 축적되고, 이에 따라 뇌조직의 퇴화가 일어날 수 있음을 유추해 볼 수 있다.

주요어 : 초파리, *ptdss1*, ROS, Oxidative stress, neurodegeneration

학 번 : 2015-21630

목 차

제 1 장 서 론 **1**

1. 인지질 1

2. Phosphatidylserine synthase1과 미토콘드리아 막의 안정성 4

3. ROS와 신경 퇴행성 질환 6

4. 연구 목표 7

제 2 장 실험방법 및 실험재료 **8**

1. 사용된 초파리 8

2. 산화스트레스 처리법 (Oxidative stress treatment) 10

3. ROS level 측정법 (Reactive oxygen species Level Measurement) 11

4. 초파리 수명 측정 (Lifespan) 12

5. 파라핀 절편법 (paraffin section) 13

6. AO 염색법 (Acridine Orange staining) 14

7. 초파리 뇌 해부도 (Drosophila brain anatomy) 14

제 3 장 결 과 **16**

1. *ptdss*1 돌연변이 ROS 발생량 16

2. Oxidative stress 조건에서 *ptdss*1 돌연변이 수명 감소 21

3. Oxidative stress 조건에서 *ptdss*1 돌연변이 신경 퇴화 24

4. Oxidative stress 조건에서 Cell death (Apoptosis)측정 29

제 4 장 고 찰 **36**

참고문헌 **39**

Abstract **50**

표 목 차

[표 1] *ptdss*1 돌연변이 line 특징 8

그 림 목 차

[그림 1] Phosphatidylserine 구조 2

[그림 2] PS 합성과정 4

[그림 3] Mitochondria-associated membranes(MAMs)에서의 Lipid metabolism 5

[그림 4] Line 별 DNA상의 *ptdss*1 유전자 돌연변이 위치 9

[그림 5] 산화스트레스 처리법 10

[그림 6] 초파리 뇌 해부도 15

[그림 7] 1일차 *ptdss*1 돌연변이 초파리에서 ROS 발생량 측정 17

[그림 8] 10일차 *ptdss*1 돌연변이 초파리에서 ROS 발생량 측정 19

[그림 9] 야생형과 ptdsss1돌변변이들의 생존율 그래프 22

[그림 10] 산화 스트레스 조건에서 CantonS와 *ptdss*1 돌연변이들의 T_{50}값 23

[그림 11] 자연 노화 조건의 5일차 초파리 뇌의 파라핀 절편 사진 25

[그림 12] 산화 스트레스 1, 5일차 조건의 초파리 뇌의 파라핀 절편 사진 27

[그림 13] 자연 노화 조건 초파리 뇌의 AO staining 사진 31

[그림 14] 산화 스트레스 조건의 초파리 뇌의 AO staining 사진 34

제 1 장 서 론

1. 인지질

인지질은 세포 내에서 다양한 역할을 생체내의 주요 물질이다. 인지질은 세포막과 세포내부기관의 투과성을 조절하는 장벽을 구성하거나, 효소작용을 위한 기반을 제공하고, 신호전달의 전구체 형성 또는 세포내외부의 자극을 전달함으로써 신호전달에 관여하는 역할을 한다 (William, 1997).

인지질은 인산과 지방산으로 구성 되어있으며, 인지질은 구성 염기에 따라 phosphatidyl choline(PC), phosphatidyl ethanolamine (PE), phosphatidyl inpsitol(PI), phosphatidyl serine(PS), phosphatidic acid(PA) 및 phosphatidyl glycerol(PG)등이 있다 (Manuela, 1998).

특히, 신경조직은 인지질이 많이 분포되어 있으며 인지질 대사과정이 일어나는 조직 중 하나이다(Sastry, 1985). 따라서 인지질의 구성의 불균형이 생기거나 인지질 대사과정의 문제가 나타나면 신경 퇴행성 질환으로 이어질 수 있다(Farooqui et al., 2004).

인지질 중의 하나인 PS(포스파티딜세린)는 글리세롤의 첫번째와 두번째 탄소에 Ester 결합으로2개의 지방산으로 연결 되어 있고, 세번째 탄소에 Phosphodiester 결

합으로 세린이 붙어있다(Acid, 2004).

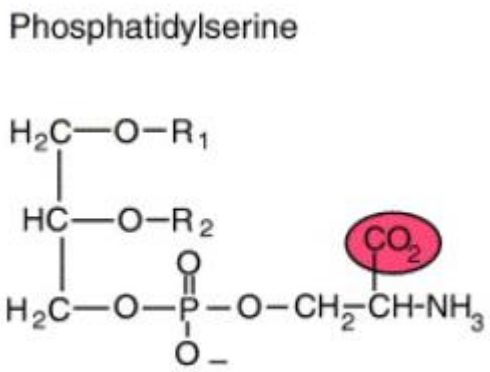


그림 1 . Phosphatidylserine 구조 (Voelker, 2005)

이 PS의 조성은 생체 내에서 매우 중요하다고 알려져 있다. PS는 조직에 따라 다른 분포로 존재하는데 특히, 뇌와 망막에 많이 존재하고 있다. 또한 PS는세포 소기관 마다 막의 조성이 다르다(Vance & Steenbergen, 2005). 일반적으로 PS는 세포막과 endosome에 많이 존재하는데, 세포막 중에서도 안쪽 leaflet에 많이 존재하고 있다. 반면에 미토콘드리아의 내막에 매우 낮은 비율로 존재하고 있다(Schick, Kurica, & Chacko, 1976).

이중막에서 PS의 안쪽에서 바깥쪽으로 이동은 세포 사멸에서 잘 알려져 있다. 세포 바깥쪽에 노출된 PS는 세포 사멸의 신호이며 식세포의 표면에는 이 PS의 receptor가 있어서 식세포작용을 하게 한다(Fadok et al., 1992).

PS 합성이나 변환에 여러 경로가 존재하여 세포의 전체 PS의 생산량이 95%로 줄어도 세포 사멸에는 영향이 없었다(Grandmaison, Nanowski & Vance, 2004).

세포 내부에서 PS의 기능은 다양하다. 미토콘드리아에 존재하는 효소의 기질이며 PE의 전구체가 되기도 하고(Vance, 2014), 음전하를 띄어(Sigal, 1994) Akt, PKC 신호 전달, Hsp70 관련 단백질과 상호작용한다(Verdaguer, 1999; Arispe, 2004; Huang, 2011)고 알려져 있다.

또한 뇌의 PS의 the acyl-chains중 36%는 docosahexaenoyl으로 되어 있는데 이것은 신경계의 정상 기능에 필수적이다(Kim, 2007)고 알려져 있다.

신경계와 관련성이 많은 PS에 관심을 가지고 선행연구에서 신경 퇴행성 질환 쥐에 PS를 투여하고 증상이 호전되었다는 결과를 얻었고(Naftelberg, 2016), PS 합성 효소인 *ptdss*1 돌연변이를 관찰하여 신경 퇴행성 질환의 표현형을 확인하였지만 (조민규, 2014), 아직 그 기작은 정확히 밝혀져 있지 않다.

2. Phosphatidylserine synthase1과 미토콘드리아 막의 안정성

초파리의 *phosphatidylserine synthase*1(*ptdss*1)은 phosphatidylserine을 합성하는 효소로 포유류에서는 *pss*1과 *pss*2로 존재한다(Arikketh, 2008)(그림 2).

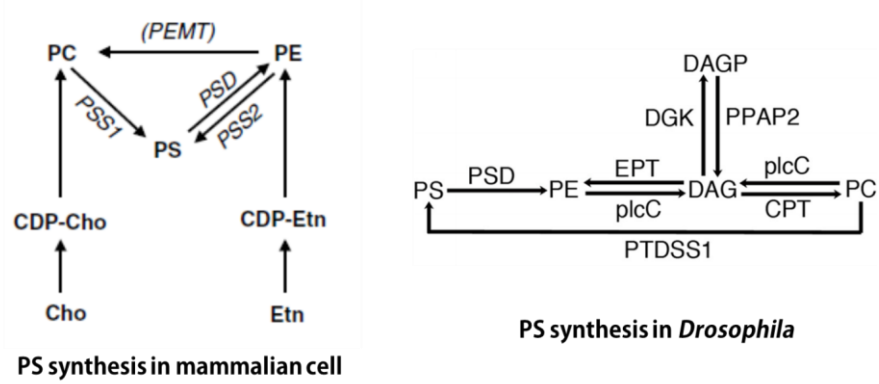


그림 2. PS 합성과정 (Vance & Steenbergen, 2005; Midorikawa et al., 2010)

이 *phosphatidylserine synthase*는 Mitochondria-associated membranes(MAMs)에 많이 존재하고 있다. 이 지역은 소포체의 보조 도메인으로서 소포체와 미토콘드리아의 직접 접촉하는 지역으로, lipid metabolism 과 calcium signaling에 중요한 역할을 한다(Michiel, 2016). 최근 연구에 의하면 이 지역이 미토콘드리아의 안정성을 조절하는 것으로 밝혀졌는데, 이 때 이 효소가 관여한다(Michiel, 2016).

*Ptdss*1 의해 합성된 PS은 미토콘드리아로 옮겨진다. 이 PS는 미토콘드리아 안쪽 막에서 decarboxylation이 되어서 phosphatidyl ethanolamine (PE)으로 전환되는데, 따

라서 미토콘드리아 안쪽 내막에 PE 함유량이 많고 PS의 함유량이 적다(그림 3).

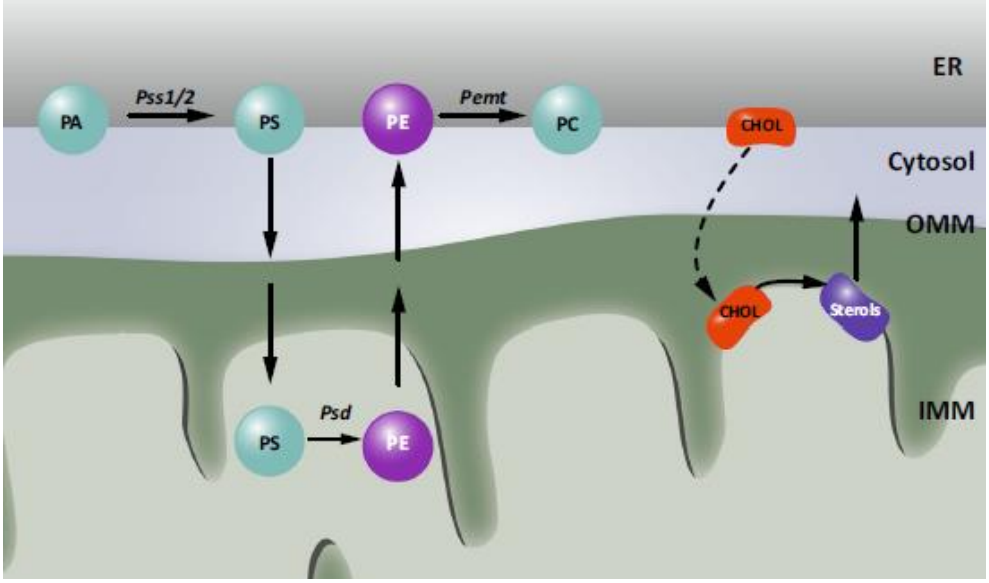


그림 3. Mitochondria-associated membranes(MAMs)에서의 Lipid metabolism (Vance, 2014).

인지질 조성의 항상성은 미토콘드리아 막의 안정성과 연관이 있다. 미토콘드리아 막의 인지질 조성은 호흡 연쇄(mitochondrial respiratory chain (MRC) complexes)가 supercomplexes로 모이는데 작용하여 미토콘드리아의 기능에 영향을 준다. 미토콘드리아 인지질 조성의 변화는 호흡연쇄의 supercomplexes의 부전을 일으키게 되고 Reactive oxygen species(ROS)생성에 영향을 끼친다(Miwa & Brand, 2003; Schenkel & Bakovic, 2014; Vance, 2014; Baker, 2016).

3. ROS와 신경 퇴행성 질환

Reactive oxygen species(ROS)는 산소 호흡 대사 과정의 부산물로서(Schieber, 2014) 주로 산소를 포함 하고 있는 반응성이 강한 분자를 의미한다. 이러한 ROS의 종류에는 superoxide ion, hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical(OH-) 등이 있다. 체내에 ROS가 많아져서 생체내의 항산화 능력을 벗어나게 되면 산화스트레스 상황에 놓이게 된다(Helmut, 2017).

산화 스트레스 상황에서는 ROS가 체내의 지방, 단백질, DNA에 손상을 주게 된다(Schieber, 2014). 미토콘드리아에서 생성된 ROS는 시토크롬 *c* 와 다른 세포사멸 단백질의 전구체를 내보내는데 중요한 역할을 하고, 이것은 caspase작용을 활성화시키거나 세포사멸을 유도한다. 미토콘드리아 안쪽 내막의 cardiolipin의 산화는 시토크롬 *c*를 막사이 공간으로 내보내는 것으로 이 기작을 유도한다(Ott, 2007). 또한 ROS는 세포신호전달 단백질을 변형시키는데, 이는 atherosclerosis, diabetes, unchecked growth, neurodegeneration, inflammation, and aging 등의 질환 발생으로 이어진다. ROS는 NF-*κ*B, MAPKs, Keap1-Nrf2-ARE, and PI3K-Akt와 같은 신호전달 관련 단백질, ion channels, transporters($Ca2^+$와 mPTP), protein kinase에 영향을 미치는데 이로 인해 Ubiquitination/ProteasomeSystem의 변형이 나타날 뿐만 아니라 신경 퇴행성 질환 발생이 나타난다(Zhang, 2016).

4. 연구 목표

인지질의 합성 효소의 기능 이상과 인지질 구성 비율의 변화는, 신경 퇴행성 질환과 연관성이 있다. 새로운 퇴행성 신경질환 유전자로 *phosphatidylserine synthase*1이 예측되었지만(조민규, 2014), *ptdss*1 유전자와 퇴행성 신경질환 사이의 구체적인 관계는 아직 규명되지 않고 있다.

본 연구는 *ptdss*1 유전자와 퇴행성 신경질환과의 구체적 관계를 규명하기 위해 ROS에 의한 산화스트레스에 주목하였다. 인지질 합성 효소의 기능과 관련하여 인지질 조성에 변화가 미토콘드리아에서의 ROS 발생에 영향을 끼치고(Baker, 2016), ROS 발생량 증가는 신경 퇴행성 질환의 발생 또는 악화와 관련되어 있다(Zhang, 2016). 이와 같은 선행연구를 토대로 본 연구는 *ptdss*1 유전자 돌연변이에서 ROS 발생량이 증가하는지와 인공적으로 가한 ROS가 산화 스트레스를 일으켜 신경 퇴행을 유도하는지를 통해 *ptdss*1 유전자가 퇴행성 신경 질환과 관련되어 있음을 밝히고자 하였다.

제 2 장 실험방법 및 실험재료

1. 사용된 초파리

모든 초파리는 cornmeal/yeast 배지가 들어있는 관병에 dry yeast를 넣고 day/night를 12시간 간격으로, 습도를 60%로 유지하여 배양하였다. 실험의 목적에 따라 25도와 29도에서 배양하였다. 대조군으로서 CantonS 초파리를 사용하였으며, 실험군으로 사용된 *ptdss*1 유전자 돌연변이 초파리는 선행연구에서 가장 좋은 표현형을 보인 아래의 두 종류를 사용하였다.

CantonS Wild type (이과대학 분자유전학 및 유전체학 연구실)

11632 P{PZ}l(3)77CDf^{04521} ry^{506}/TM3, ry^{RK} Sb^{1} Ser^{1} (from Bloomington stock center)

104172 w*; P{GawB}CG4825^{NP2363} / TM3, Sb^{1} Ser^{1} (from Drosophila Genetic Resource center)

line	P element insertion 위치	Chromosomal location	
11632	3L:20,526,138..20,526,138	77c7	Homozygote lethal
104172	3L:20,526,151..20,526,151	77c7	Homozygote lethal

표 1. *ptdss*1 돌연변이 line 특징

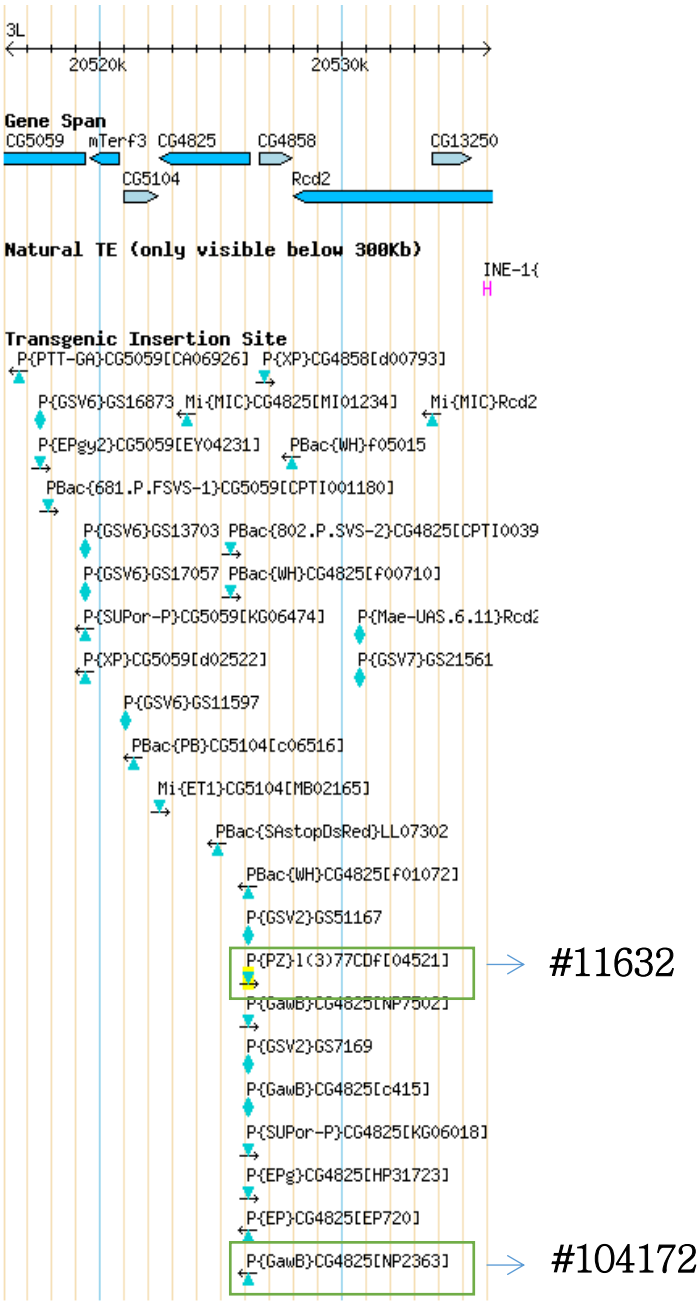


그림 4. Line 별 DNA상의 *ptdss1* 유전자 돌연변이 위치

2. 산화스트레스 처리법 (Oxidative stress treatment)

인공적인 ROS(Reactive oxygen species)에 의한 산화 스트레스 조건을 위해 산화 스트레스 처리방법(Hwang et al., 2013)을 변형하여 본 연구에 적용하였다. 깨어난지 하루 미만의 수컷초파리들을 20마리씩 골라 29도에서 3일간 cornmeal/yeast 배지가 들어있는 관병에 dry yeast를 넣고 배양했다. 초파리들을 한천만 들어있는 배지에 옮겨 6시간 starvation 시킨 후 5%설탕용액을 사용해 과산화수소(hydrogen peroxide)의 섞어 최종 농도 0.5%인 만든 용액을 거름종이(1cm × 3cm)에 적셔서 관병에 꽂아주었다. 이후 5일 동안 동일 시간에 설탕 용액과 0.5% 과산화수소 용액을 적신 종이가 꽂힌 새 관병으로 교체해주었다.

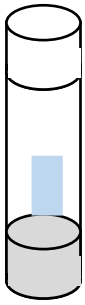


그림 5. 산화스트레스 처리법

3. ROS level 측정법 (Reactive oxygen species Level Measurement)

초파리 뇌에서 발생하는 ROS level 측정을 위해 2′,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA)를 사용하였다(Scialo et al., 2016) . H_2DCFDA시약은 초기상태에서는 DCFH_2로 존재하며 ROS를 만나면 산화된 상태의 2′,7′-dichlorofluorescein (DCF)가 되며 형광을 나타낸다(Wrona, 2006).

세포내 ROS발생시 492–495nm(excitation)에서 517–527nm(emission)로 녹색 형광을 띄며, ROS양에 비례해서 형광 세기가 증가하는 특징이 있다(Scialo et al., 2016).

.H_2DCFDA를 사용해 초파리 뇌에서 발생하는 ROS 측정 과정은 다음과 같다. PBS용액 상에서 초파리의 뇌를 꺼낸다. PBS용액으로 꺼낸 뇌를 씻어준 후 500 μM농도로 에탄올에 녹여져 있는 H_2DCFDA(Invitrogen) stock용액을 최종농도 20 μM가 되도록 PBS에 희석하여 50$\mu\ell$를 초파리 뇌에 20분 처리한다. PBS로 3번 씻어준 후 492–495nm(excitation) /517–527nm(emission)을 형광 Confocal microscope (LSM 510 META)로 촬영하였다. 촬영된 confocal 사진은 Zen 2.3 lite 프로그램을 이용 사진을 maximum intensity projection로 합쳤다.

4. 초파리 수명 측정 (Lifespan)

초파리에서의 산화 스트레스에 의한 신경 퇴화 영향을 알기 위해 수명 측정을 하였다(Linford, 2013). 29도에서 산화 스트레스를 처리된 조건 별 20마리씩 수컷 초파리를 매일 같은 시간에 관찰하였다. 관병 내 죽은 파리 수를 세고 제거한 후, 새로운 관병으로 교체해 주었다. 산화 스트레스 조건의 대조군으로는 cornmeal/yeast 배지가 아닌 설탕만 넣은 배지의 영향을 배재하기 위해 설탕물만 주는 조건으로 하였다. 설탕물 조건은 산화스트레스 조건에서 과산화수소를 제외하고 같은 방식으로 유지하였다. 1일 마다 각 관병에서 살아있는 초파리 개체 수를 측정하였고, 생존율을 계산하여 생존 곡선을 구하였다. 생존 곡선을 구하고 Student’s t-test로 통계 처리하여 생존율 50%인 일자인 T_{50}을 측정하였다.

5. 파라핀 절편법 (paraffin section)

산화 스트레스로 인한 뇌의 구조 변화를 측정하기 위해 파라핀 절편법을 사용하였다. 파라핀 절편법(조민규, 2014)을 적용하기위해, 산화스트레스 처리법으로 5일간 배양된 각각의 초파리 라인에서 머리를 분리하여 다음의 과정을 진행하였다. 머리를 카노이 용액에 넣은 후 4도에서 12시간 이상 고정하였다. 고정된 초파리 머리를 70%, 85%, 95%, 100% 에탄올 용액에 5분씩 2회 담가 탈수과정을 진행하였다. 탈수 후 xylene에 30분씩 2번 담가 투명화 과정을 거쳤다. 그 후 xylene과 파라핀을 1:1로 섞은 용액에 15분씩 2번 담아 둔 뒤 파라핀에 30분씩 3번 담아 침투과정을 진행하였다. 파라핀이 침투된 머리를 틀에 넣고 굳힌 후 미세절편기(Leica, RM2235)를 이용하여 5~6㎛로 자른 후 HistoBond slide에 붙였다. 55도의 슬라이드 워머에서 20분간 예열 한 뒤 xylene에 10분씩 2번담가 탈파라핀 하였다. 그 후 100%, 95%, 85%, 70% 에탄올 용액에 5분씩 담가 침수과정을 거친다. Hematoxylin으로 4분간 염색 후 5분간 수세하였다. 100% 에탄올에 넣고 5분간 수세하고 0.3% 암모니아수로 중화 후 5분간 수세하였다. Eosin용액에 3분간 대조염색 하였다. 70% 에탄올에 4번 담근 뒤 85%, 95%, 100% 에탄올 용액에 2분씩 탈수하였다. xylene으로 5분간 투명하게 한 뒤 Canada Balsam을 발라 영구 보존하였다.

6. AO 염색법 (Acridine Orange staining)

세포사멸(Apoptosis)이 얼마나 발생했는지 측정하기 위해 AO 염색법(Hwang et al., 2013)을 변형하여 사용하였다. Acridine orange는 세포막을 통과하는 핵산에 붙는 염색약으로서 짧은 dsDNA에 붙어 초록색 형광을 나타낸다. 세포사멸이 일어나면 DNA가 짧은 dsDNA상태가 되고 AO염색을 하면 초록색형광이 나타난다(Aubry, 1990).

초파리의 뇌를 PBS용액상에서 꺼낸다. PBS용액으로 꺼낸 뇌를 씻어준 후 PBS 용액에 1:1000로 희석한 Acridine Orange (VectaCell™) 10㎕를 초파리 뇌에 15분 처리한다. 이후 PBS로 3번 씻어준 후 492–495nm(excitation) /517–527nm(emission) 파장의 형광을 Confocal microscope (LSM 510 META)로 촬영하였다. 촬영된 confocal 사진은 Zen 2.3 lite 프로그램을 이용 사진을 maximum intensity projection로 합쳤다.

7. 초파리 뇌 해부도 (drosophila brain anatomy)

초파리 뇌의 해부도를 이용하여 각 실험 결과의 뇌의 위치를 확인하였다.

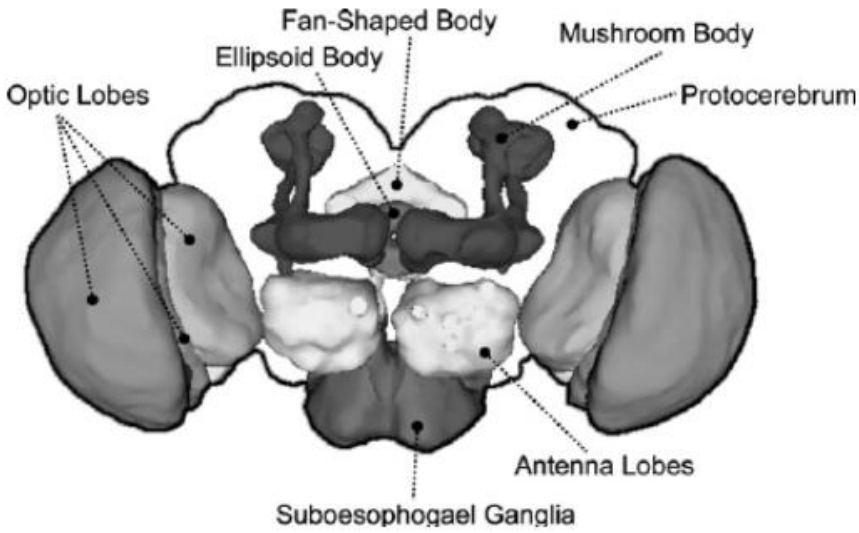


그림 6. 초파리 뇌 해부도(Nichols, 2006)

제 3 장 결 과

1. *ptdss*1 돌연변이 ROS 발생량

본 연구에서는 *ptdss*1 돌연변이에서 나타나는 신경 퇴행성 질환 표현형의 발생 원인과 ROS의 관계를 살펴보고자 하였다. 이를 위해 먼저 노화가 진행된 *ptdss*1 돌연변이에서 ROS의 발생량을 측정하였다. 초파리 뇌에 H_2DCF법을 사용하여 나타나는 형광 세기를 토대로 ROS 발생량을 측정하였다.

그림 7은 1일차 야생형 및 돌연변이 초파리 뇌에 H_2dCF을 처리한 결과이다. 야생형(CantonS)을 비롯한 돌연변이에서 ROS 발생량의 차이가 크게 나타나지 않은 것을 볼 수 있었다.

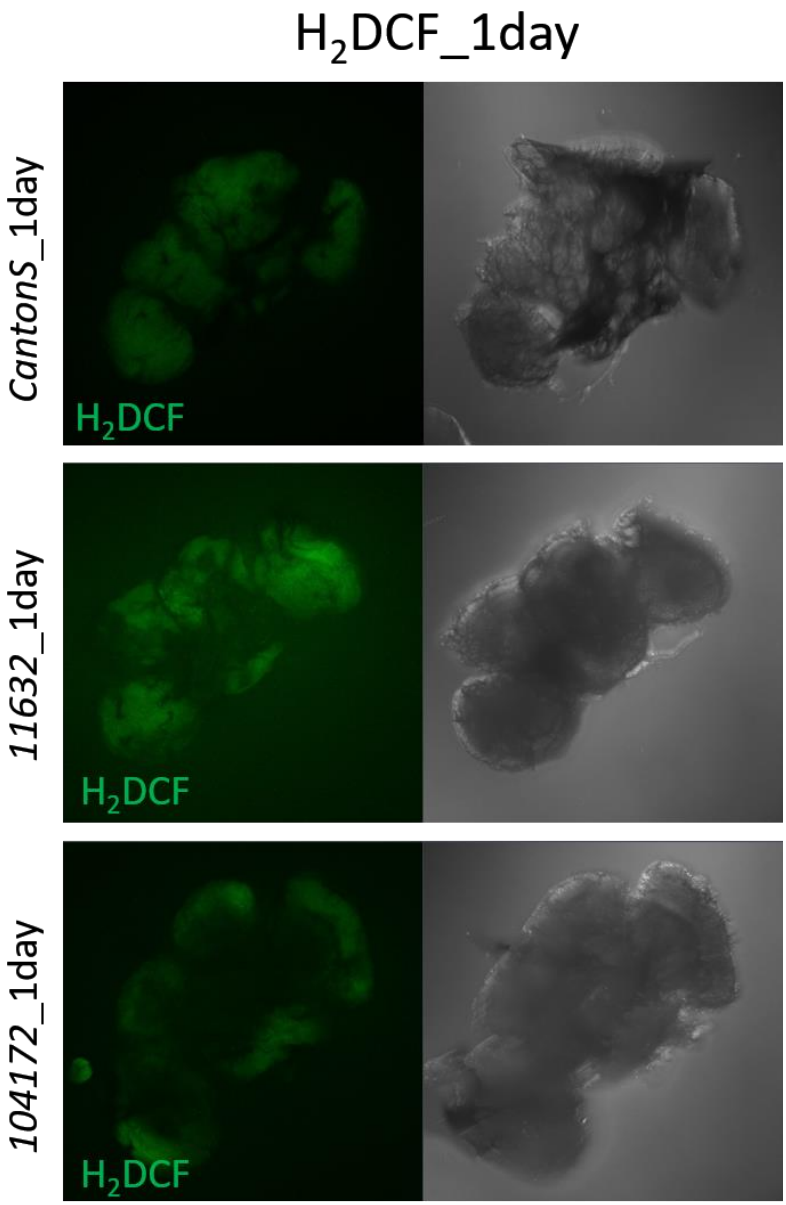


그림 7. 1일차 *ptdss*1 돌연변이 초파리에서 ROS 발생량 측정

(그림 7)은 29 도에서 자연 노화 시킨 초파리의 1 일차 뇌를 H_2DCFDA 로 염색하여 찍은 형광사진이다. 대조군인 CantonS 와 *ptdsss*1 돌변변이들 사이에서 형광의 강도가 비슷하였다.

노화에 따른 초파리의 ROS 발생을 알아보기 위하여 29 도에서 자연 노화 시킨 10 일차 야생형 및 돌연변이 초파리 뇌에 H_2dCF 을 처리하였다(그림 8). 그 결과 야생형에 비해 돌연변이에서의 ROS 발생량이 많음을 관찰 하였다. 결과를 1 일차와 비교해보면 야생형에서는 ROS 발생량이 1 일차에 비하여 크게 증가하지 않았지만 돌연변이들에서는 크게 증가하였음을 알 수 있었다.

특히, 초파리 뇌의 Optic Lobe 와 Antennal Lobe 쪽에서 가장 많이 발생했음을 관찰 할 수 있었다.

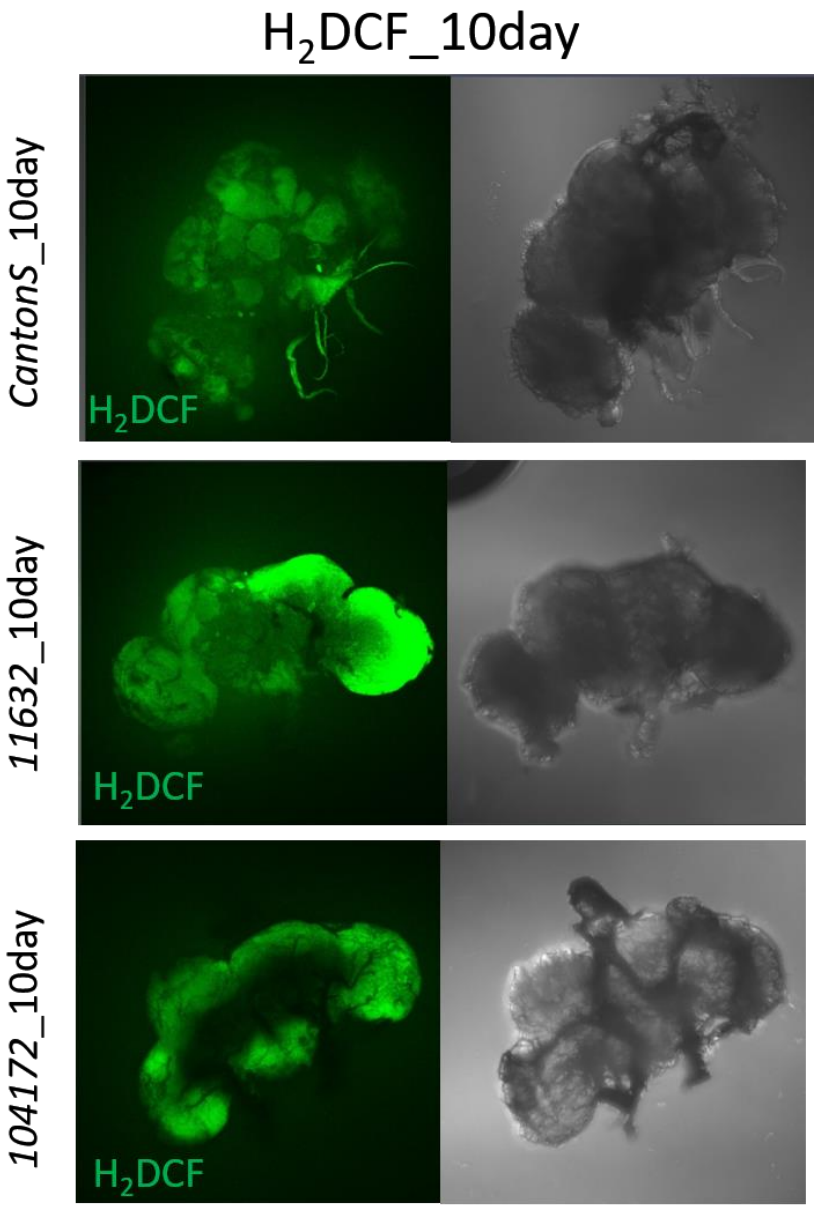


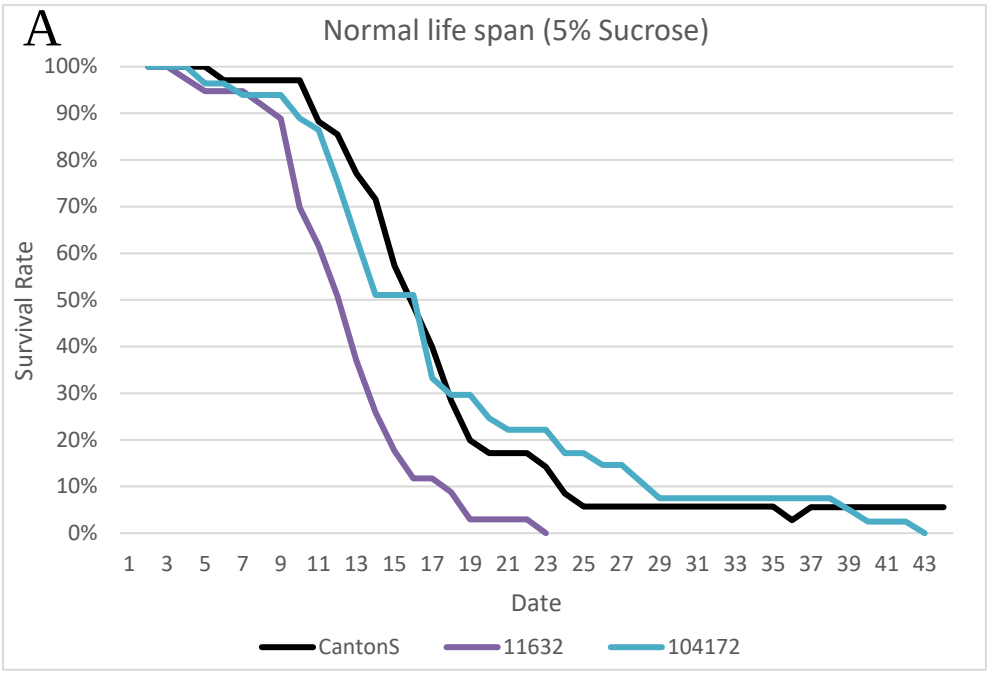
그림 8. 10일차 *ptdss*1 돌연변이 초파리에서 ROS 발생량 측정

(그림 8)은 같은 조건에서 기른 10일차 초파리의 뇌를 H_2DCFDA로 염색하여 찍은 형광 사진이다. CantonS와 비교하여 *ptdsss*1 돌연변이 뇌들의 형광 강도가 세게 나타났다.

그림 7과 그림 8의 비교 결과 야생형에 비해 돌연변이 뇌에서 노화가 되었을 때 형광 강도가 더 많이 증가했으며, 이는 노화된 돌연변이에서 ROS의 발생량이 많다는 것을 의미한다. 이는 *ptdss*1의 기능인 PS합성하는데 발생한 문제점이 노화가 진행됨에 따라 누적되고, ROS발생에 영향을 끼친다는 것을 보여주는 결과이다. 이와 같은 결과는 *ptdss*1 돌연변이의 신경퇴행현상 발생과정은 ROS와 연관된 신호과정이 관여한다는 것을 유추할 수 있다.

2. Oxidative stress 조건에서 *ptdss*1 돌연변이 수명 감소

앞 절에서는 노화가 진행된 *ptdss*1 돌연변이에서 ROS 발생량의 증가함을 이야기하였다. 본 절에서는 증가한 ROS 발생량이 *ptdss*1 돌연변이의 신경 퇴행성질환 관련 표현형의 발생에 영향을 미치는 지 살펴보고자 하였다(Gnerer, 2006). 이를 위해, 산화스트레스 조건에서 *ptdss*1 돌연변이의 수명 변화를 살펴보았다. 대조군으로 세 초파리 라인에 설탕물만 먹인 조건으로 하여, *CantonS* 초파리와 *ptdss*1 돌연변이 초파리들과 생존율을 측정 하였다(그림 9A). 야생형과 *ptdss1* 돌연변이들 사이 생존율의 특별한 차이가 나타나지 않았다. 하지만 산화 스트레스 조건에서 보면 야생형과 *ptdss1* 돌연변이들 사이에서 생존율 차가 6일 이후 두드러지게 나타남을 관찰 하였다(그림 9B).



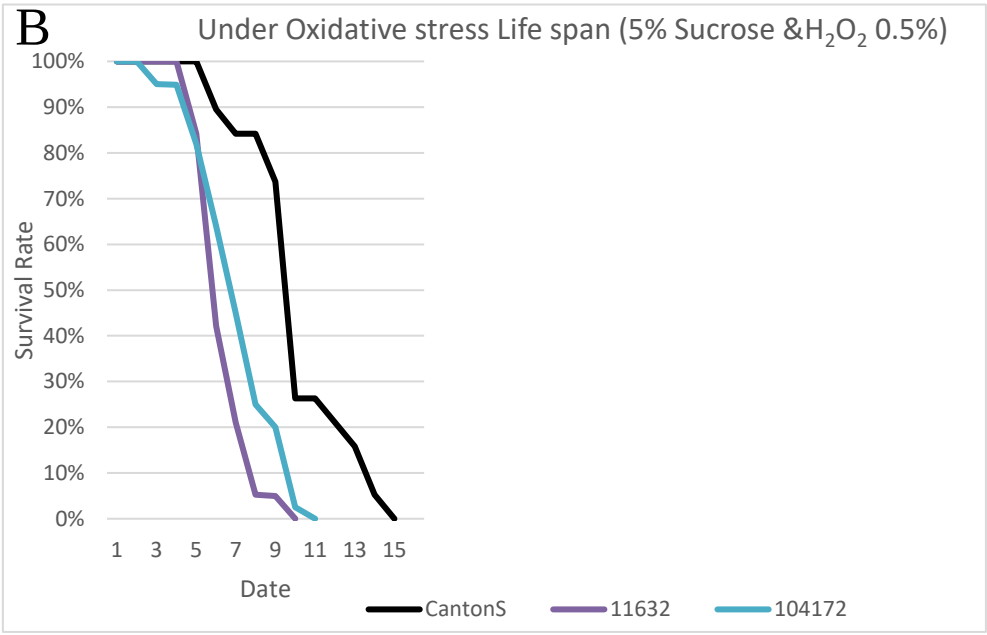


그림 9. 야생형과 ptdsss1 돌변변이들의 생존율 그래프

그림 9A는 초파리들에게 설탕물만 먹였을 때 생존율이다. 그림 9B는 초파리들에게 산화스트레스를 준 결과 생존율이다.

산화 스트레스 조건에서, *CantonS* 초파리와 *ptdss*1 돌연변이 초파리들은 50%생존율의 일자인 T_{50}값에서도 유의미한 차이가 나타났다(그림 10). (Gnerer, 2006).

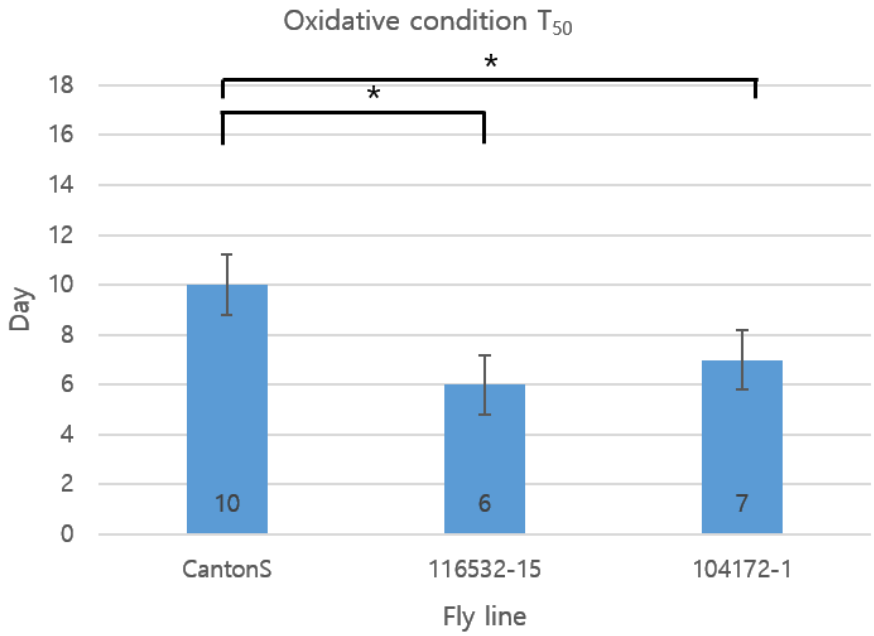


그림 10. 산화 스트레스 조건에서 CantonS와 *ptdss*1 돌연변이들의 T_{50}값

그림 10은 산화 스트레스를 준 상황에서의 생존율 50%의 T_{50}값의 통계치이다. 그래프는 Student's *t*-test로 통계처리 하였다. (*p<0.05 ** p<0.01, ***p<0.001)

결과적으로 산화스트레스 조건에서 *ptdss*1 돌연변이의 생존율이나 T_{50}값이 야생형에 비해 감소하는 것을 관찰할 수 있었고, 이는 *ptdss*1 돌연변이가 산화 스트레스에 대한 저항성이 약함을 보여준다. 또한 산화 스트레스의 영향을 신경 퇴행성 질환 관련 표현형인 수명의 감소를 확인하였다

3. Oxidative stress 조건에서 *ptdss*1 돌연변이 신경 퇴화

*ptdss*1 돌연변이에서 나타나는 뇌 조직의 신경 퇴화 현상과 ROS의 발생과의 관계를 살펴보기 위해, 산화스트레스 조건에서의 *ptdss*1 돌연변이의 뇌조직을 절편화 하여 관찰하였다. 신경 퇴화 발생여부는 지표 중 하나인 뇌의 공포 발생 여부를 통해 분석하였다(Lu, 2009).

그림 11는 대조군인 자연 노화 조건의 5일차 초파리에서 얻은 뇌의 파라핀 절편 결과이다. 야생형에서는 조직이 매우 치밀하며 공포가 관찰 되지 않았다. *ptdss*1 돌연변이에서는 공포는 관찰 되지않았지만, 야생형보다는 성긴 조직임을 알 수 있었다. 이는 자연 노화 5일차 조건에서는 신경 조직의 퇴화가 아직 확연히 일어나지 않았음을 보여준다.

그림 12A,B는 산화 스트레스 조건에서의 초파리 뇌의 파라핀 절편 사진이다. 그림12A는 1일차이며, *ptdss*1 돌연변이에서 작은 공포들을 관찰할 수 있다. 그림12B는 5일차이며, *ptdss*1 돌연변이에서 1일차보다 상대적으로 큰 공포를 관찰할 수 있었다

A

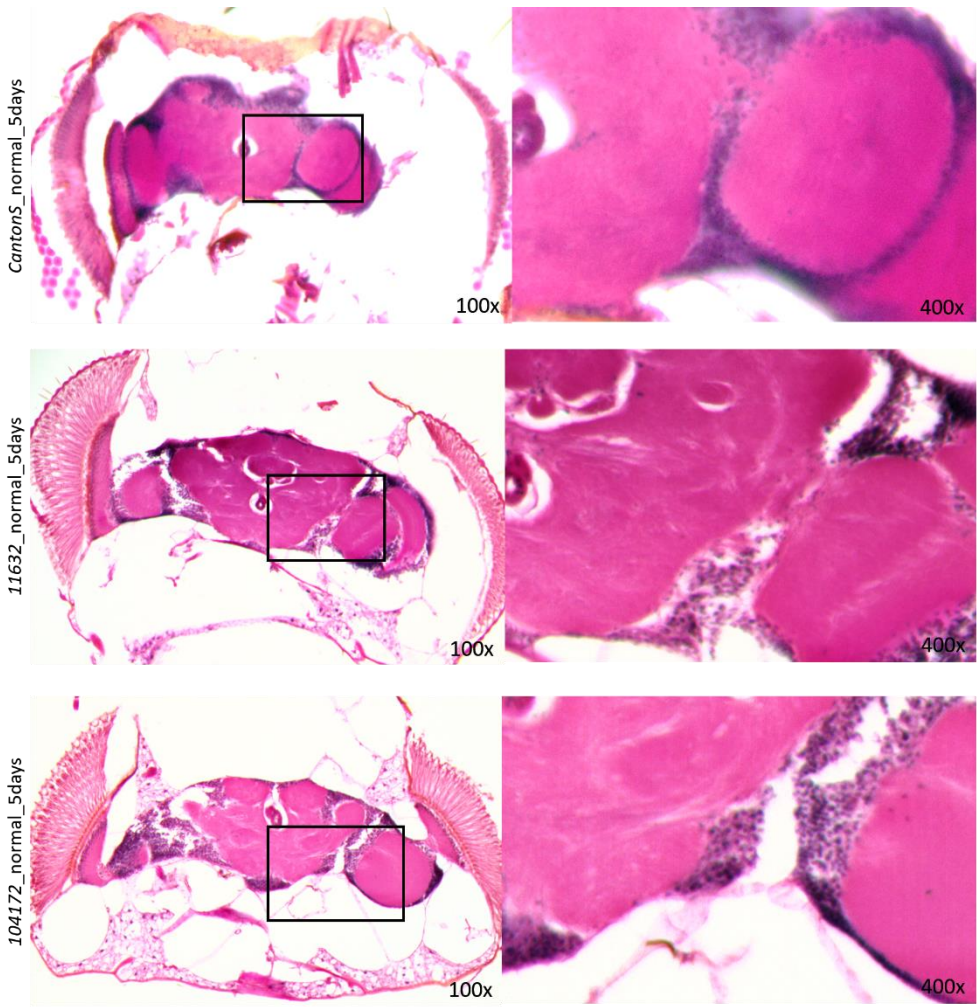
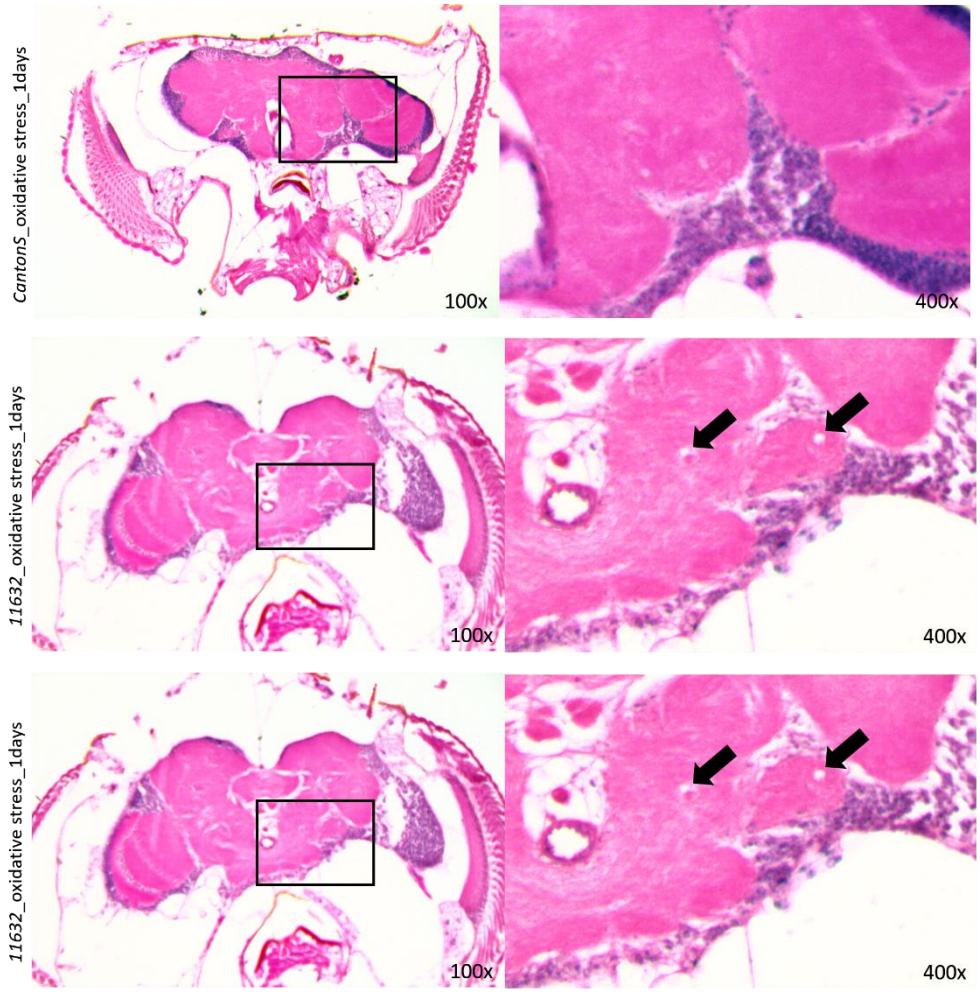


그림 11. 자연 노화 조건의 5일차 초파리 뇌의 파라핀 절편 사진

대조군인 자연 노화조건 5일차에서는 야생형과 *ptdss*1 돌연변이에서 공포가 관찰 되지않았다.

A


CantonS_oxidative stress_1days
100x
400x
11632_oxidative stress_1days
100x
400x
11632_oxidative stress_1days
100x
400x

.

B

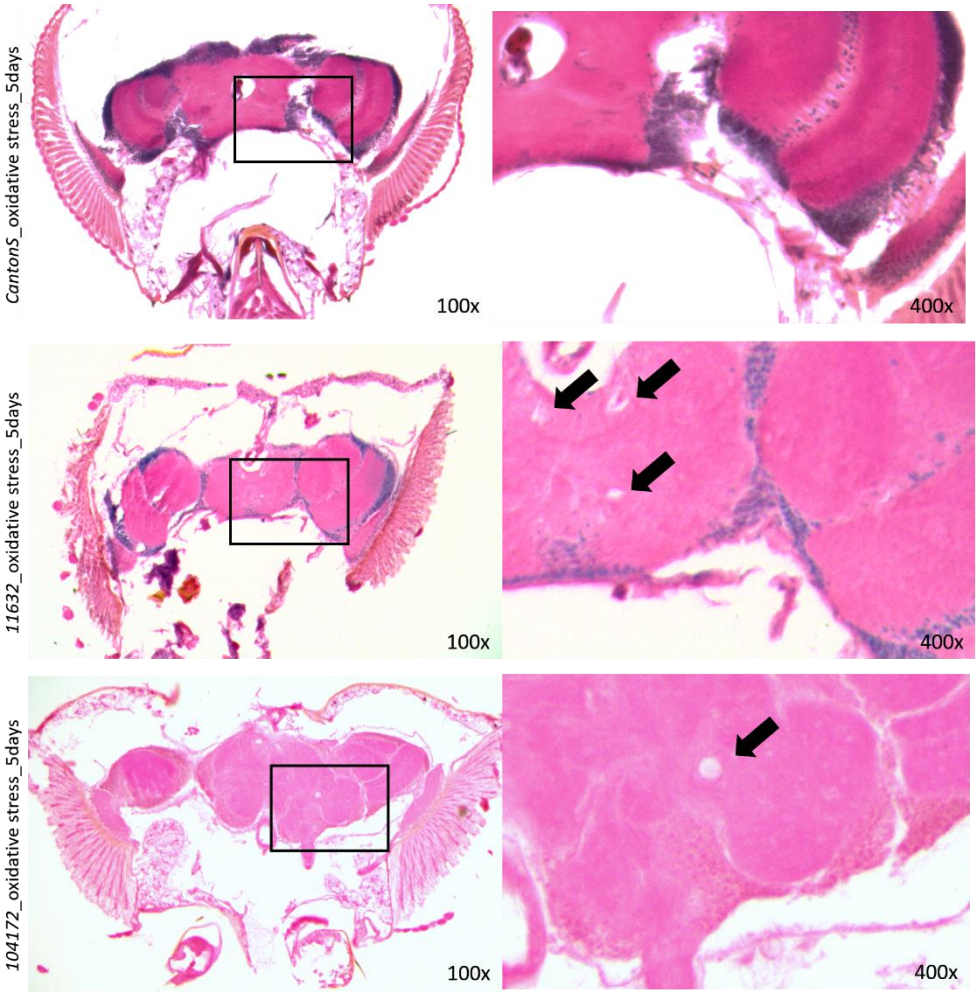


그림 12. 산화 스트레스 1, 5일차 조건의 초파리 뇌의 파라핀 절편 사진

그림12A는 산화 스트레스 조건 1일차의 초파리 뇌의 파라핀 절편 사진이며, 그림12B는 산화스트레스 조건 5일차의 초파리 뇌의 파라핀 절편 사진이다.

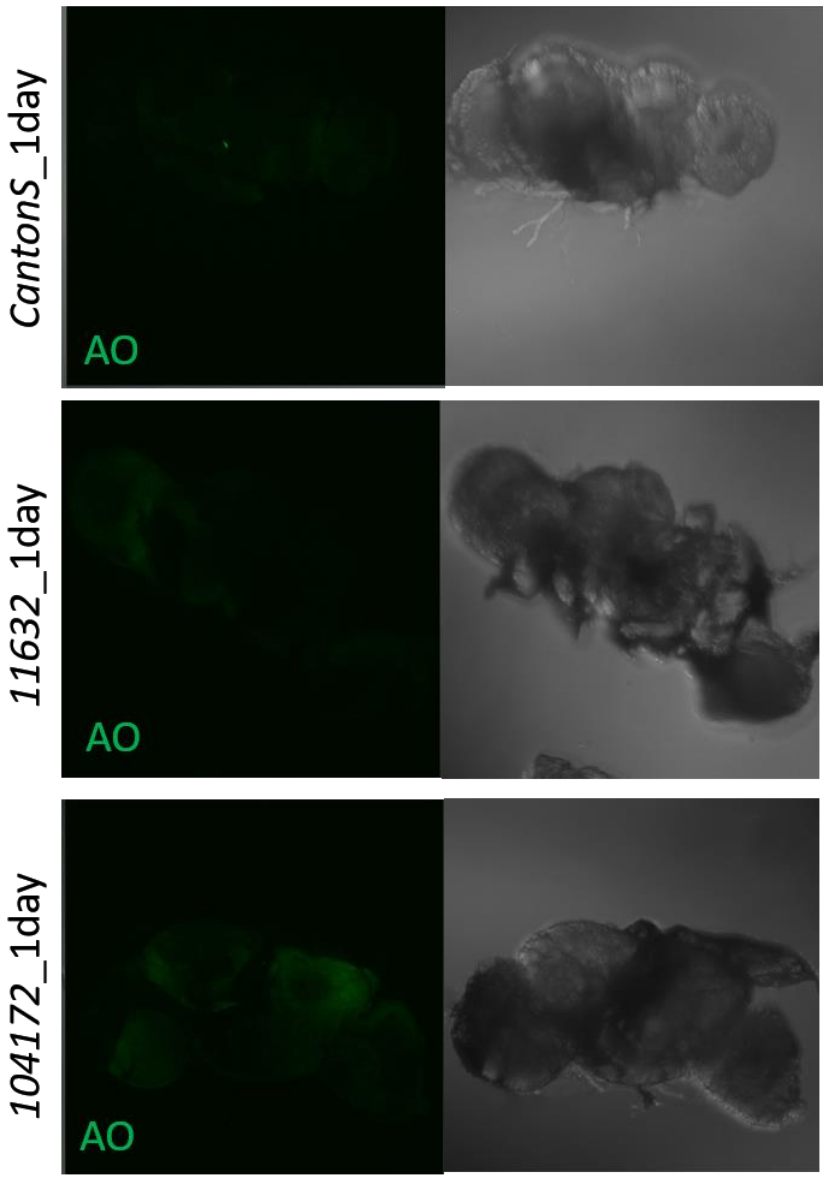
전체적으로 보면 5일차(그림 11) 자연 노화 조건의 뇌가 산화 스트레스 조건의 1일차와 5일차(그림 12)와 비교하여 공포도 없고 조직도 치밀하였다. 이에 비해 산화스트레스 조건에서는 1일차라도 자연 노화 5일차에 비해 공포가 발견되었고 조직도 성겼다. 그리고 5일차는 조직의 공포가 더 크게 발견되었다. 그리고 Antennal Lobe쪽에서 대부분의 공포는 발견되었고, 뇌의 Optic Lobe에서는 작은 공포들과 조직이 성겨지는 현상을 발견 할 수 있었다. 같은 일차의 그림11와 그림12B를 비교하면 노화 현상을 ROS가 가속화 시켜 신경 퇴화 현상이 조기에 표현되고 있음을 알 수 있다.

4. Oxidative stress 조건에서 Cell death (Apoptosis)측정

산화 스트레스에 의한 영향을 세포 수준에서 살펴보기위해, 뇌조직의 퇴화에 의한 세포 사멸을 관찰할 수 있는 AO 염색법을 실시하였다(McCall, 2004).

자연 노화 조건의 1일차(그림 13A)와 5일차(그림 13B)에서 *CantonS* 초파리와 *ptdss*1 돌연변이 초파리 모두 뇌에서 형광이 거의 발생하지 않았는데, 이는 자연 노화의 경우 해당 기간 동안 세포 사멸이 거의 발생하지 않았음을 나타낸다.

A AO_Normal condition_1day



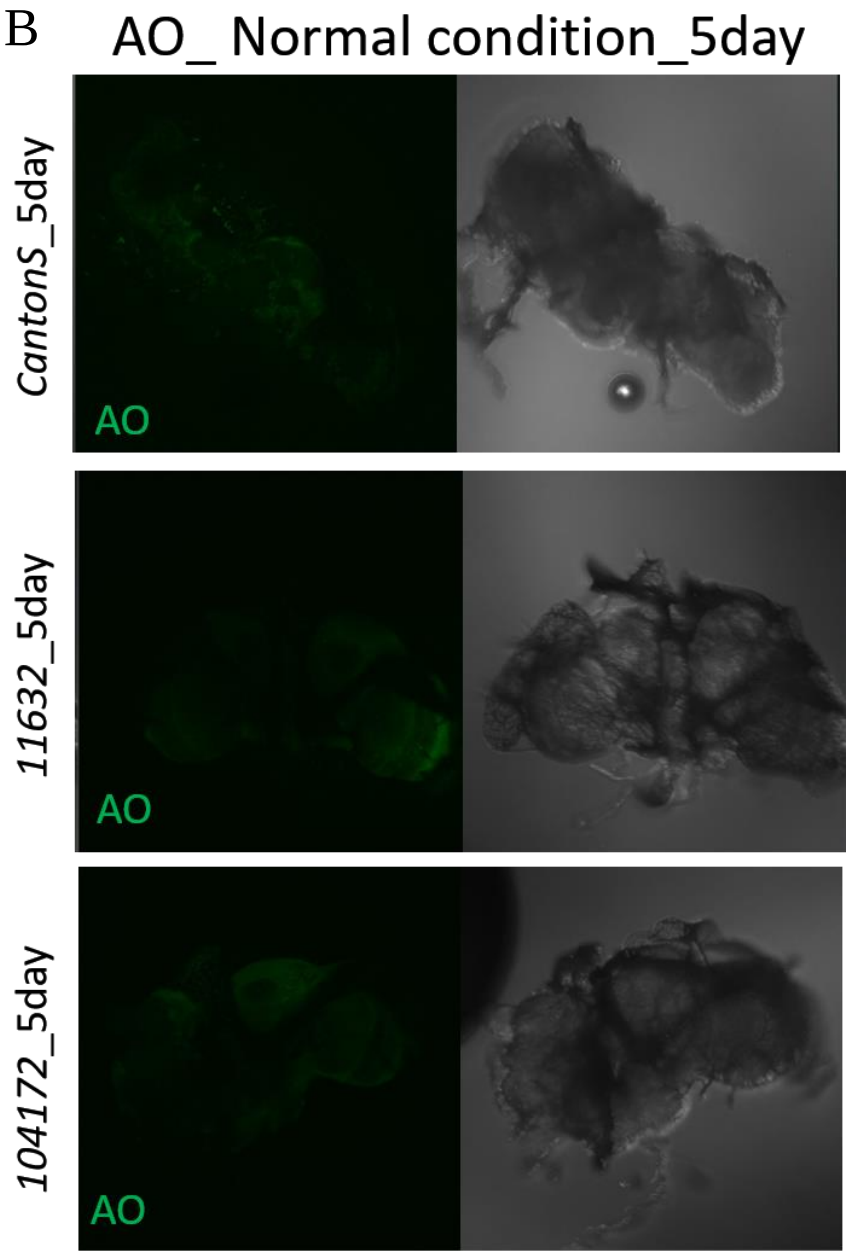
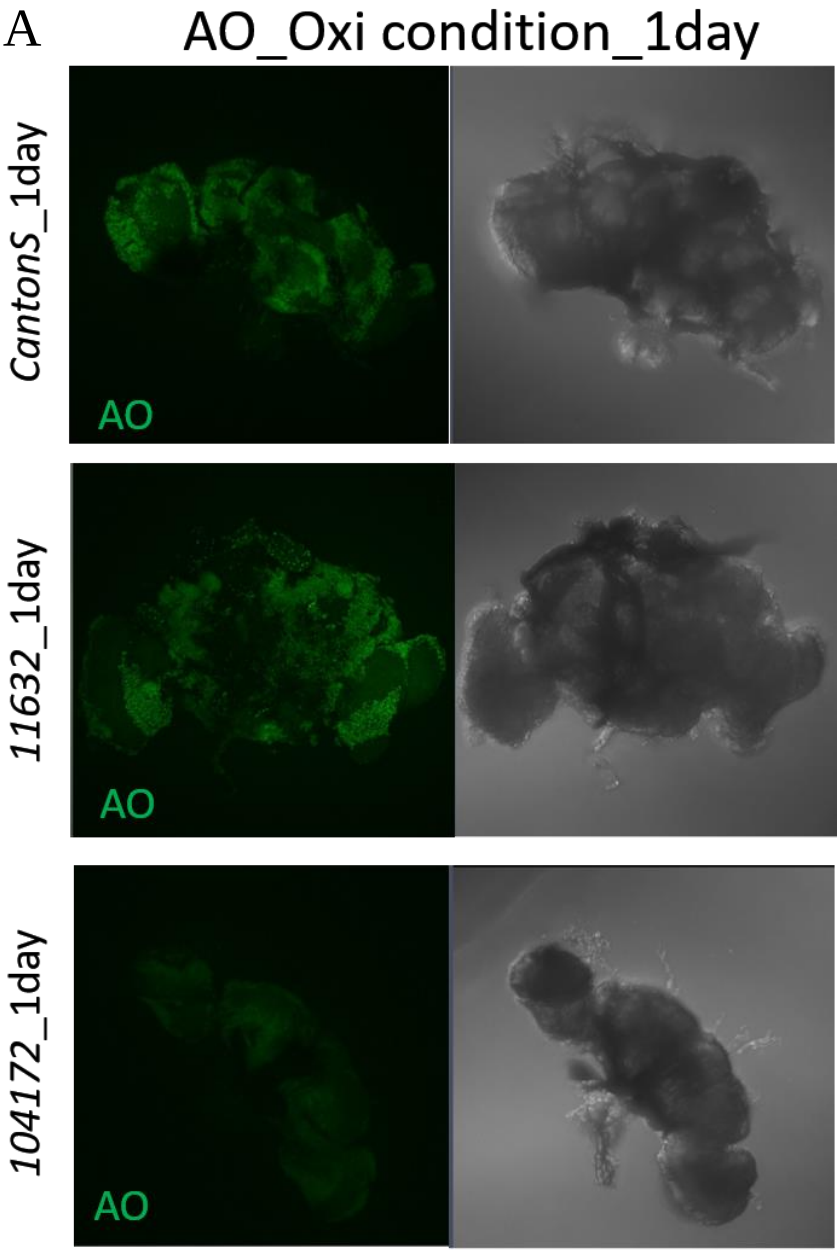


그림 13. 자연 노화 조건 초파리 뇌의 AO staining 사진

그림 13A,B는 자연 노화 1일차, 5일차의 *ptdss*1 돌연변이 초파리 뇌의 AO staining 사진이다.

산화 스트레스 조건 1일차(그림 14A)는 자연 노화 조건의 뇌에 비해 형광 세기가 커졌고, 5일차(그림 14B)는 형광 세기가 초파리 뇌의 Optic Lobe와 Antennal Lobe 쪽에서 커진 결과를 얻었다. 자연 노화 조건에 비해 산화 스트레스 조건에서 *CantonS* 초파리의 뇌에서는 형광 세기는 유의미한 증가가 나타나지 않았지만 *ptdss*1 돌연변이 초파리들은 유의한 증가가 나타났다.

A


AO_Oxi condition_1day
CantonS_1day
AO
11632_1day
AO
104172_1day
AO

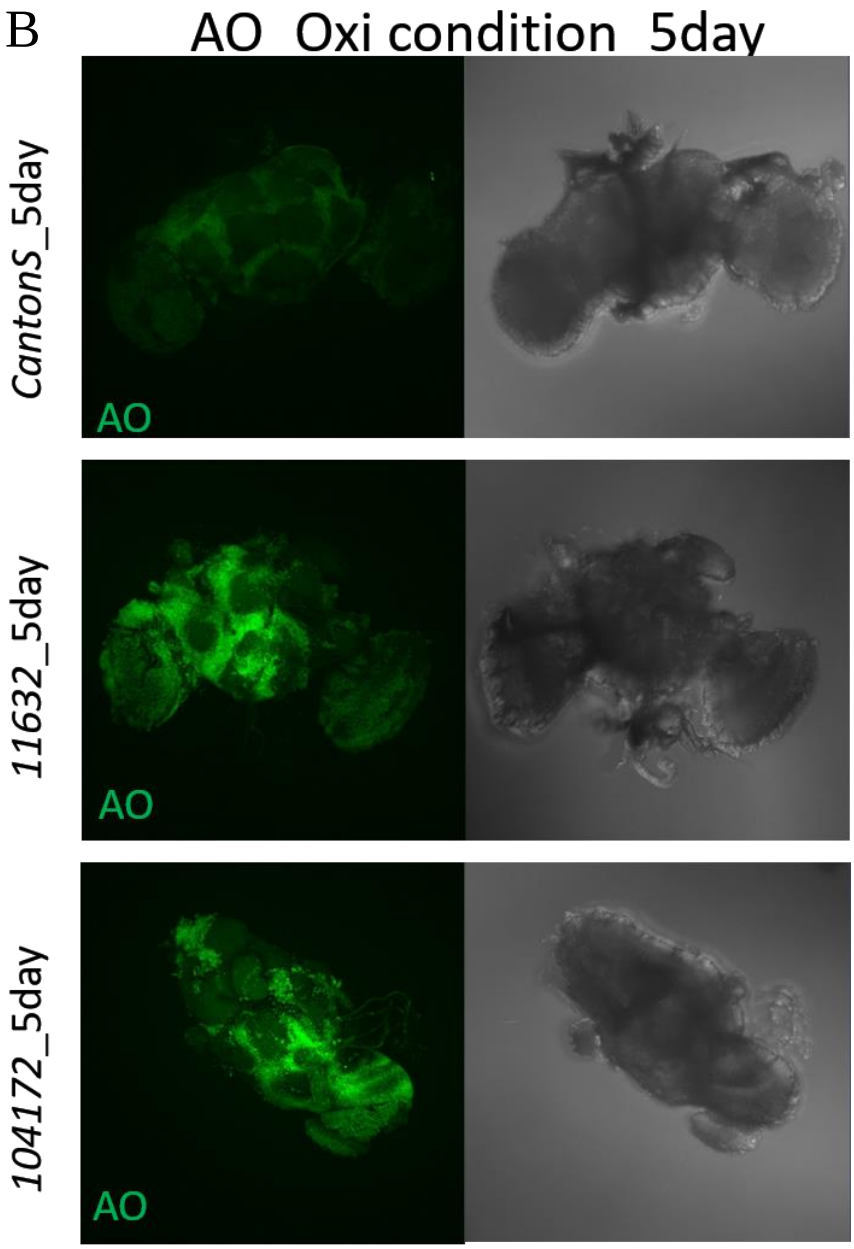


그림 14. 산화 스트레스 조건의 초파리 뇌의 AO staining 사진

그림 14A,B는 산화스트레스를 가한 1일차, 5일차의 *ptdss*1 돌연변이 초파리 뇌의 AO staining 사진이다.

이 결과는 노화가 진행됨에 따라 세포 사멸이 더 진행되며, *ptdss*1 돌연변이 초파리가 *CantonS* 초파리 보다 산화 스트레스 조건에서 세포 사멸이 더 많이 발생하는 것을 보여준다. 또한 산화 스트레스가 초파리 뇌의 세포수준에서 세포사멸을 가속화 시켜 일으켰고, 노화와 신경 퇴행 현상을 앞당겼다는 것이다. 이는 *ptdss*1 유전자의 기능과 신경 퇴행과의 연관성을 보여준다.

제 4 장 고 찰

초파리의 *ptdss*1유전자는 phosphatidylserine을 합성하는 효소를 코딩하고 있으며, 이 유전자에 돌연변이가 일어나면 신경 퇴행성 질환과 관련된 지표들이 나타난다 (조민규, 2014). 인지질 합성 효소와 퇴행성 신경질환과의 연관성에 관한 연구는 현재 활발히 진행되고 있으나, *ptdss*1 유전자와 퇴행성 신경질환 사이의 구체적인 관계는 아직 규명되지 않고 있다. 본 연구는 *ptdss*1 유전자와 퇴행성 신경질환과의 구체적 관계를 규명하기 위해 ROS에 의한 산화스트레스에 주목하였다.

이미 미토콘드리아 막의 인지질 조성이 변화가 막의 안정성에 영향을 끼치고, 막의 안정성은 Reactive oxygen species(ROS)생성에 영향을 끼치는데 ROS 발생의 증가는 신경 퇴행성 질환의 발생 또는 악화와 관련되어 있다는 결과가 있었다. 하지만 지금까지는 PS가 미토콘드리아 내막에 중요한 영향을 주지 않는다고 알려져 있어 PS가 주목받지 못하였다. 최근 연구에 의하면 *phosphatidylserine synthase*는 미토콘드리아의 직접 접촉하는 지역인 Mitochondria-associated membranes(MAMs)에 많이 존재하고 있고, 이 지역이 lipid metabolism 과 calcium signaling에 중요한 역할을 하며(Michiel, 2016), 이 지역이 미토콘드리아의 안정성을 조절하는 것으로 밝혀졌다. 이는 미토콘드리아 내막에서의 PS에서 PE로의 합성 과정의 PE의 전구체로서의 기능과, 미토콘드리아 항상성 유지에 PS의 중요성을 보여주고 있다.

선행연구를 토대로 본 연구는 *ptdss*1 유전자 돌연변이에서 ROS 발생량이 증가하는지와 인공적으로 가한 ROS가 산화스트레스를 일으켜 신경 퇴행을 유도하는지를 통해 *ptdss*1 유전자의 신경 퇴행성 질환과의 관련 관련 기작을 규명하고자 하였다.

*ptdss*1 유전자 돌연변이의 1일차 초파리 뇌에서 발생하는 ROS 발생량은 대조군에 해당하는 자연 노화된 10일차 초파리 뇌와 비교했을 때 유의미한 차이가 있었다. 이와 같은 결과는 *ptdss*1 돌연변이의 신경 퇴행 현상 발생과정은 초기 10일차까지는 ROS와 연관된 신호 과정이 관여한다는 것을 나타낸다.

ROS가 신경퇴화현상에 미치는 영향을 확인하기 위해 초파리에 과산화수소를 먹이는 방식으로 대조군과 *ptdss*1 돌연변이 초파리에 인공적으로 ROS를 과발생시켜 산화스트레스를 주고, 신경퇴화현상의 지표인 생존율과 뇌의 공포 발생, 세포사멸 정도를 살펴보았다. 생존율 지표에서는 설탕물만 먹인 경우 두 집단의 생존율은 유의미한 차이가 없었지만, 인공적인 산화스트레스 상태에서는 두 집단의 생존율에 유의미한 차이가 나타났다. 이와 같은 결과는 *ptdss*1 돌연변이가 대조군에 비해 ROS에 더 민감하다는 것을 낸다. 또한 인공적인 산화스트레스 조건에서 일반적인 자연노화상태 보다 다른 신경 퇴화 지표인 뇌의 공포 발생 빈도와 뇌 조직의 치밀성이 떨어짐을 확인하였다.

마지막 지표인 세포사멸 정도에서도 자연 노화 조건에 비해인공적인 산화스트레스 조건의 초파리 뇌에서 세포 사멸이 더 많이 일어났음을 확인하였다.

특히, 이 실험들의 결과인 ROS 발생과 신경 퇴화 현상이 초파리 뇌의 Optic Lobe와 Antennal Lobe에 많이 발생했다는 것에 주목하였다. PS은 뇌와 망막 등에 많이 존재 한다고 선행연구에서 밝혀져 있는데 *ptdss*1 돌연변이에서 PS가 많이 분포하는 지역에 ROS 발생과 신경 퇴행 현상이 더 활발하다는 것은 이들과의 상관 관계를 더욱 확연하게 해주는 것으로 보이기 때문이다.

이와 같은 연구의 결과들을 토대로 *ptdss*1 돌연변이에서의 신경 퇴화 과정에서 ROS가 중요하게 작용하고 있다고 유추할 수 있었다. 이미 ROS에 의해 신경 세포 사멸이 일어나고 이 과정에서 여러 신호전달과정이 관여 되어 있음이 선행 연구를 통해 밝혀져 있으므로 이 신호전달에 관여하는 단백질의 발현을 확인하는 것을 통해 신경퇴화과정의 관계를 명확히 규명할 수 있을 것이다. 또한 미토콘드리아막의 인지질 조성의 연구도 추가 된다면 더욱 명확해 질 것이다.

*ptdss*1유전자와 산화스트레스 신경 퇴행성 질환과의 구체적 연관성은 앞으로 다양한 실험과 연구를 통해 더 자세히 밝힐 필요가 있다. 본 연구는 신경 형성과 유지에 핵심적인 기능을 하는 phosphatidylserine과 신경 퇴행성 질환의 연관성을 확인하는데 중요한 모델로서 사용될 수 있을 것이다.

참고문헌

Acid, S. A. (2004). Lehninger principles of biochemistry.

Arikketh, D., Nelson, R., & Vance, J. E. (2008). Defining the Importance of Phosphatidylserine Synthase-1 (PSS1) Unexpected Viability of PSS1-Deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry, 283*(19), 12888-12897.

Arispe, N., Doh, M., Simakova, O., Kurganov, B., & De Maio, A. (2004). Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. *The FASEB Journal, 18*(14), 1636-1645.

Aubry, J.-P., Durand, I., De Paoli, P., & Banchereau, J. (1990). 7-Amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid-conjugated streptavidin permits simultaneous flow cytometry analysis of either three cell surface antigens or one cell surface antigen as a function of RNA and DNA content. *Journal of Immunological Methods, 128*(1), 39-49.

doi:http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(90)90461-4

Baker, C. D., Ball, W. B., Pryce, E. N., & Gohil, V. M. (2016). Specific requirements of nonbilayer phospholipids in mitochondrial respiratory chain function and formation. *Molecular biology of the Cell, 27*(14), 2161-2171.

Cordeiro, R. M. (2014). Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: Distribution, mobility and permeation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1838*(1, Part B), 438-444. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.09.016

Dowhan, W. (1997). The role of phospholipids in cell function. *Advances in Lipobiology, 2*, 79-107. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1874-5245(97)80006-7

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews, 82*(1), 47-95.

Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic

lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology, 148*(7), 2207-2216.

Farooqui, A. A., Ong, W.-Y., & Horrocks, L. A. (2004). Biochemical Aspects of Neurodegeneration in Human Brain: Involvement of Neural Membrane Phospholipids and Phospholipases A2. *Neurochemical Research, 29*(11), 1961-1977. doi:10.1007/s11064-004-6871-3

Gnerer, J. P., Kreber, R. A., & Ganetzky, B. (2006). wasted away, a Drosophila mutation in triosephosphate isomerase, causes paralysis, neurodegeneration, and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103*(41), 14987-14993. doi:10.1073/pnas.0606887103

Grandmaison, P. A., Nanowski, T. S., & Vance, J. E. (2004). Externalization of phosphatidylserine during apoptosis does not specifically require either isoform of phosphatidylserine synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 1636*(1), 1-11.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal, 219*(1), 1.

Hicks, A. M., DeLong, C. J., Thomas, M. J., Samuel, M., & Cui, Z. (2006). Unique molecular signatures of glycerophospholipid species in different rat tissues analyzed by tandem mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 1761*(9), 1022-1029.

Huang, B. X., Akbar, M., Kevala, K., & Kim, H.-Y. (2011). Phosphatidylserine is a critical modulator for Akt activation. *The Journal of Cell Biology, 192*(6), 979-992.

Hwang, S., Song, S., Hong, Y. K., Choi, G., Suh, Y. S., Han, S. Y., . . . Lee, S. (2013). Drosophila DJ-1 decreases neural sensitivity to stress by negatively regulating Daxx-like protein through dFOXO. *PLoS Genet, 9*(4), e1003412.

Jensen, S. J. K. (2003). Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 666*, 387-392. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.theochem.2003.08.037

Kim, H.-Y. (2007). Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells. *Journal of Biological Chemistry, 282*(26), 18661-18665.

Krols, M., Van Isterdael, G., Asselbergh, B., Kremer, A., Lippens, S., Timmerman, V., & Janssens, S. (2016). Mitochondria-associated membranes as hubs for neurodegeneration. *Acta Neuropathologica, 131*(4), 505-523.

Linford, N. J., Bilgir, C., Ro, J., & Pletcher, S. D. (2013). Measurement of lifespan in Drosophila melanogaster. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(71), e50068-e50068.

Lu, B., & Vogel, H. (2009). Drosophila models of neurodegenerative diseases. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease, 4*, 315-342.

Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions, 224*, 164-175.

Martínez, M., & Mougan, I. (1998). Fatty Acid Composition of Human Brain Phospholipids During Normal Development. *Journal of Neurochemistry, 71*(6), 2528-2533. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.71062528.x

McCall, K., & Peterson, J. S. (2004). Detection of Apoptosis in Drosophila (Vol. 282, pp. 191-205).

Midorikawa, R., Yamamoto-Hino, M., Awano, W., Hinohara, Y., Suzuki, E., Ueda, R., & Goto, S. (2010). Autophagy-dependent rhodopsin degradation prevents retinal degeneration in Drosophila. *Journal of Neuroscience, 30*(32), 10703-10719.

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal, 417*(1), 1-13.

Naftelberg, S., Abramovitch, Z., Gluska, S., Yannai, S., Joshi, Y., Donyo, M., . . . Farhy, C. (2016). Phosphatidylserine Ameliorates Neurodegenerative Symptoms and Enhances Axonal Transport in a Mouse Model of Familial Dysautonomia. *PLoS Genetics, 12*(12), e1006486.

Namiki, S., & Kanzaki, R. (2016). Comparative Neuroanatomy of the Lateral Accessory Lobe in the Insect Brain. *Frontiers in Physiology, 7*(244). doi:10.3389/fphys.2016.00244

Nichols, C. D. (2006). Drosophila melanogaster neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics, 112*(3), 677-700.

Otsuna, H., & Ito, K. (2006). Systematic analysis of the visual projection neurons of Drosophila melanogaster. I. Lobula-specific pathways. *Journal of Comparative Neurology, 497*(6), 928-958.

Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis, 12*(5), 913-922. doi:10.1007/s10495-007-0756-2

Pavelescu, L. A. (2015). On reactive oxygen species measurement in living systems. *Journal of Medicine and Life, 8*(Spec Issue), 38-42.

Sastry, P. S. (1985). Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Progress in Lpid Research, 24*(2), 69-176.

Schenkel, L. C., & Bakovic, M. (2014). Formation and regulation of mitochondrial membranes. *International Journal of Cell Biology, 2014*.

Schick, P., Kurica, K., & Chacko, G. (1976). Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane. *Journal of Clinical Investigation, 57*(5), 1221.

Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current biology : CB, 24*(10), R453-R462. doi:10.1016/j.cub.2014.03.034

Scialò, F., Sriram, A., Fernández-Ayala, D., Gubina, N., Lõhmus, M., Nelson, G., . . . Sanz, A. (2016). Mitochondrial ROS Produced via Reverse Electron Transport Extend Animal Lifespan. *Cell Metabolism, 23*(4), 725-734. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.03.009

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology, 82*(2), 291-295.

Sigal, C. T., Zhou, W., Buser, C. A., McLaughlin, S., & Resh, M. D. (1994). Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences, 91(25), 12253-12257.

Vance, J. E. (2014). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1841*(4), 595-609. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.014

Vance, J. E., & Steenbergen, R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Progress in Lipid Research, 44*(4), 207-234.

Vance, J. E., & Tasseva, G. (2013). Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1831*(3), 543-554. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.08.016

Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., Ochoa, W. F., Fita, I., & Gómez-Fernández, J. C. (1999). Ca2+ bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase Cα directly to phosphatidylserine. *The EMBO journal, 18*(22), 6329-6338.

Voelker, D. R. (2005). Bridging gaps in phospholipid transport. *Trends in*

Biochemical Sciences, 30(7), 396-404. doi:https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.05.008

Wang, X., Fang, H., Huang, Z., Shang, W., Hou, T., Cheng, A., & Cheng, H. (2013). Imaging ROS signaling in cells and animals. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany), 91*(8), 917-927. doi:10.1007/s00109-013-1067-4

White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K., & Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in Drosophila. *Science, 264*(5159), 677-684.

Wrona, M., & Wardman, P. (2006). Properties of the radical intermediate obtained on oxidation of 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein, a probe for oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine, 41*(4), 657-667. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.006

Wu, C.-C., Chen, G.-Y., Chen, Y.-C., Shao, H.-C., Wu, C.-C., Chang, H.-M., . . . Chen, Y.-C. (2008). Algorithm for the creation of the standard Drosophila brain model and its coordinate system.

Yeung, T., Heit, B., Dubuisson, J.-F., Fairn, G. D., Chiu, B., Inman, R., . . . Grinstein, S. (2009). Contribution of phosphatidylserine to membrane surface charge and protein targeting during phagosome maturation. *The Journal of Cell Biology, 185*(5), 917-928.

Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016*.

김영두. (2007). 발암억제유전자 *expanded*와 cg4825 유전자의 교세포 유지 및 분화 조절에 관한 연구. 석사학위논문, 서울대학교 대학원, 서울.

김태엽. (2017). 초파리 *phosphatidylserine synthases*1 유전자가 시냅스의 성장과 기능에 미치는 영향. 석사학위논문, 서울대학교 대학원, 서울.

조민규. (2014). 초파리 cg4825 돌연변이가 수명과 신경 퇴화에 미치는 영향.

Abstract

Effects of phosphatidylserine synthase1 gene mutation under oxidative stress on neurodegeneration in *Drosophila*

Seo, Hye Won

Department of Science Education (Biology Major)

The Graduate School

Seoul National University

Phospholipids are exist in the neuron, and play important roles in maintenance and survival of neurons. Resent studies have reported that phospholipid's composition changes may affect neurodegeneration disease. *Phosphatidy lserine synthase*1 is an enzyme that synthesize phosphatidylserine. Resent studies have been checked about indicator of neurodegeneration, but not the function are unknown.. In this study *ptdss*1 mutation which are widespred in the Mitochondria-associated membrane cause ROS and oxidative stress and lead to neurodegenerations. . we use H_2DCF to check ROS levels. After that we give artificial oxidative stress to the fly can conduct a life span assay, brain section, apoptosis level to find out neurodegenerations. The results are similar to the aging flys.

Keyword : *drosophila melanogaster, ptdss1,* ROS, Oxidative stress, neurodegeneration

Student number: 2015-21630