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

교육학석사 학위논문

초파리 장 특이적 *Pss* 유전자 돌연변이에서 나타나는 성장 이상에 관한 연구

Mutation of *Drosophila melanogaster* Phosphatidylserine Synthase (*Pss*) gene in Midgut Causes Abnormal Growth

2022년 8월

서울대학교 대학원

과학교육과 생물전공

염 선 우

초파리 장 특이적 *Pss* 유전자 돌연변이에서 나타나는 성장 이상에 관한 연구

Mutation of *Drosophila melanogaster* Phosphatidylserine Synthase (*Pss*) gene in Midgut Causes Abnormal Growth

지도 교수 전 상 학

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함
2022년 6월

서울대학교 대학원
과학교육과 생물전공
염 선 우

염선우의 교육학석사 학위논문을 인준함
2022년 8월

위 원 장 이 준 규 (인)

부위원장 김 재 근 (인)

위 원 전 상 학 (인)

초 록

Phosphatidylserine (PS)은 인지질 이중층의 주요 구성 성분 중 하나이다. PS는 소포체의 미토콘드리아 관련 막에 있는 Phosphatidyl-serine Synthase라는 효소에 의해 합성된다. 이 효소는 *Pss* 유전자로부터 만들어지며, 이 유전자에 이상이 생기면 초파리에서 퇴행성 신경질환을 유발한다. 초파리 *Pss* 유전자와 유사한 사람의 *Ptdss1* 유전자에 돌연변이가 일어나면 Lenz-Majewski hyperostotic dwarfism (LMHD)이라는 희귀 질환이 발병한다. 해당 질환은 왜소증과 같은 발생 및 성장 이상을 보인다. 본 연구에서는 *Pss* 유전자에 이상이 생기면 사람에서와 같이 개체의 성장에 이상을 주는지 확인하고자 하였다. 이를 확인하기 위해 *Pss* 유전자를 장세포 특이적으로 발현을 억제함으로써 번데기와 성체의 크기가 작아지는 것을 확인하였다. PS는 dAkt 신호 전달의 활성에 영향을 준다고 알려진바 있다. Akt 신호 전달 경로는 주로 세포의 성장 및 분화 그리고 종양 발생에 중요한 역할을 한다. 해당 하위 신호 전달 경로 중 세포성장 및 분화에 관여하는 dAkt - dFOXO- *d4EBP* 로 이어지는 신호 전달 경로를 선정하여 실험을 진행하였다. *Pss* 유전자 발현 Knock down에 의해 dAkt 활성이 감소되면 dFOXO의 활성이 증가하고 *d4EBP*의 활성도 증가하여 그 결과 세포의 성장과 분화가 억제되는 것이라 예상하였다. 본 연구에서는 Western blot을 통해 Akt의 활성감소를 확인하였고 qRT-PCR을 통해 *Pss* 유전자 발현 Knock-down 돌연변이 초파리의 *dFOXO*와 *d4EBP*의 발현량 증가를 확인하였다. 추가적으로 장세포 특이적 유전자와 Akt 신호가 계속 발현되도록 하는 Akt-Constant 돌연변이(dAkt(myr), $dAkt^c$)를 재조합하여 만들고 해당 초파리에 *Pss* 유전자 발현 Knock down 을 발생시켜 dAkt 신호 전달 기작에 의한 회복 효과를 $dAkt^c$가 포함된 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 개체의 성체 우화율 증가를 통해 확인하였다. 이러한 연구 결과들은 *Pss* 유전자가 초파리의 신경 활동 유지를 하는 것 이외에도 발생과 성장 과정에 있어서도 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 또한 *Pss* 유전자가 이러한 발생과 성장에 Akt 신호 전달 경로를 통해 작용함을 보여준다.

주요어 : 포스파티딜세린(phosphatidylserine), 포스파티딜세린 합성 효소(phosphatidylserine synthase), 장, 발생, 성장 이상

학 번 : 2018-27642

목 차

제 1 장 서 론 1
제 1 절 인지질과 동물의 발생 1
제 2 절 PS와 Phosphatidlyserine synthase 2
제 3 절 Phosphatidylserine synthase와 성장 이상 4
제 4 절 초파리 장 구성 세포 6
제 5 절 PS와 Akt 신호 전달 경로 7
제 6 절 선행연구 분석 및 연구 목표 10

제 2 장 실험재료 및 방법 12
제 1 절 실험에 사용한 초파리와 교배 scheme 12
제 2 절 성체 우화율(lethality) 및 수명 15
제 3 절 면역화학염색법 17
제 4 절 성장 이상 표현형 18
제 5 절 유전자 발현량 19
제 6 절 단백질 발현량 20

제 3 장 실험 결과 21
제 1 절 초파리 3령 유충 장에서 *Pss* 유전자 발현양상 21
제 2 절 초파리 발생 단계에서 장세포(Enterocyte) 특이적 *Pss* 돌연변이의 영향 23
1. 장 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 성체 우화율 23
2. 초파리 3령 유충 장에서 Pss 유전자와 EC 세포 발현 위치 26
3. 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 *Pss* 유전자 발현량 27
4. 번데기 단계에서 *Pss* 돌연변이에 의한 발육 부진 28
5. 성체에서 *Pss* 돌연변이에 의한 발육 부진 30
6. 장세포 특이적 *Pss* 돌연변이의 생존율 32
제 3 절 장세포 특이적 *Pss* 돌연변이에서의 성장 관련 *dAkt* 신호 전달 변화 35
1. qRT-PCR을 통한 RNA 발현량 변화 35
2. Western blot을 통한 단백질 발현량 변화 37
제 4 절 $dAkt^c$(Akt constant) 돌연변이를 이용한 Pss 돌연변이 회복 양상 38

제 4 장 고 찰 40

참고문헌 45

Abstract 51

표 목차

[표 1] 실험에 사용한 초파리 12
[표 2] qRT-PCR에 사용한 프라이머 서열..... 19
[표 3] 장 관련 GAL4 line의 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이 성체 우화율 24
[표 4] 25℃에서 장세포 특이적으로 *Pss* 유전자 Knock down 하였을 때 성체 우화율..... 39
[표 5] 25℃에서 $dAkt^c$를 재조합하여 장세포 특이적으로 *Pss* 유전자 Knock down 하였을 때 성체 우화율..... 39

그림 목차

[그림 1] MAM의 위치와 포유류의 인지질 합성 경로 2
[그림 2] 포유류와 초파리의 PS 합성 경로 3
[그림 3] LMHD 환자와 발달 지연 환자의 돌연변이 위치 모식도와 Pss 유전자 서열의 L137F 잔기 상동성 5
[그림 4] 초파리 장 구성 세포와 분화 과정 6
[그림 5] 성장 및 분화 관련 Akt 신호 전달 경로 9
[그림 6] 장 특이적 GAL4 line의 *Pss* 유전자 Knock down scheme 13
[그림 7] Akt^c 돌연변이에 의한 Rescue line 제작 scheme 14
[그림 8] 3령 유충 시기의 장에서 나타나는 *Pss* 유전자의 발현 양상 22
[그림 9] 초파리 3령 유충 장에서 Pss 유전자 발현 위치와 EC 발현 위치 26
[그림 10] 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 *Pss* 유전자의 상대적 발현량 확인 27
[그림 11] 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 번데기 시기 발육 부진 29
[그림 12] 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 성체 시기 발육 부진 31
[그림 13] 29℃에서 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 생존율 및 평균 수명 그래프 33
[그림 14] 25℃에서 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 생존율 및 T_{50} 그래프 34
[그림 15] 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 *dAkt* 유전자의 상대적 발현량 35
[그림 16] 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 *dFOXO* 유전자의 상대적 발현량 36
[그림 17] 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 *d4EBP* 유전자의 상대적 발현량 36
[그림 18] 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 pAkt 단백질 발현량 37

제 1 장 서 론

제 1 절 인지질과 동물의 발생

인지질(phospholipid)은 지질의 한 종류로서 생명체에서 중요한 역할을 하는 체내 구성 요소이다. 인지질은 글리세롤에 3개의 지방산과 한 개의 인산기가 결합한 구조를 가지고 있다. 이때 인산기에 결합한 유기물의 종류에 따라 인지질의 종류가 정해진다. 그 종류에는 phosphatidylcholine(PC), phosphatidylethanolamine(PE), phosphatidylserine(PS), phosphoinositide(PI) 등이 있다.

인지질은 생체막을 구성하는 주요 구성 성분으로 막의 외부와 내부를 구분하는 역할을 한다. 생체막을 구성하는 인지질의 종류와 비율은 세포와 세포 소기관의 종류에 따라 다양하다. 이러한 막의 인지질 구성과 분포는 다른 지질들과 함께 세포막의 유동성(fluidity)과 표면 전하(surface charge) 등에 영향을 미친다(van Meer et al., 2008; Wenk & Camilli, 2004).

인지질은 다양한 단백질과 상호작용을 하여 세포 내부와 외부로 신호를 전달하는 중요한 역할을 한다. 인지질의 종류마다 머리기(head group)의 종류가 다르기 때문에 그 종류에 따라 인지질은 각자 다른 구조와 전하를 띠고 있다. 이러한 특성을 활용하여 인지질은 신호 전달과 관련된 단백질들과 상호작용 할 수 있으며, 세포 신호 전달 경로에 관여할 수 있게 된다(Wymann & Schneiter, 2008).

생명체가 정상적으로 발생하기 위해서는 세포의 성장, 세포의 분열, 세포의 사멸 그리고 세포막의 유동성 변화 등이 적절히 이루어져야 한다. 인지질은 이러한 것들에 영향을 미침으로써 생명체의 정상적인 발생에 중요한 역할을 한다(Yao et al., 2019). PI 또는 이것으로부터 파생되는 PIP2, PI5P와 같은 인지질은 TOR, Akt와 같은 세포의 성장과 분열에 관련된 세포 신호 전달 단백질과 상호작용 함으로써 정상적인 발생에 중요한 역할을 하게 된다(Gupta et al., 2013).

제 2 절 PS와 Phosphatidylserine synthase

PS는 세포막을 구성하는 주요 인지질 중 하나로, 원핵생물과 진핵생물 모두에 존재한다. 사람을 포함한 포유류의 경우 전체 인지질에서 PS는 2-10%의 비율을 차지하고 있다(Garcia et al., 1998; E. Vance & R. Steenbergen, 2005). PS는 mitochondria associated membranes (MAM)이라는 소포체의 특정 영역에서 합성된다(그림 1-A) (Dyzma et al., 2012). MAM에서 합성된 PS는 미토콘드리아 막으로 이동하거나 세포막으로 이동한다(Stone & Vance, 2000; Vance, 2008).

미토콘드리아 막으로 이동한 PS는 PE 합성을 위한 전구체로 사용되며 미토콘드리아에 존재하는 phosphatidylserine decarboxylase (PSD)에 의해 PE로 합성된다(그림1-B) (Vance & Tasseva, 2013). 또한 세포막으로 이동한 PS는 내외의 신호 전달에 관여한다. 세포막으로 이동한 PS는 주로 인지질 이중층의 안쪽 막(inner leaflet)에 불균등하게 분포되어 있다.

PS는 세포막의 안쪽에서 protein kinase C(PKC), Protein kinase B(PKB, Akt), Raf-1과 같은 세포 내 신호 전달 단백질들의 개시 및 활성화를 조절한다(Kim et al., 2014).

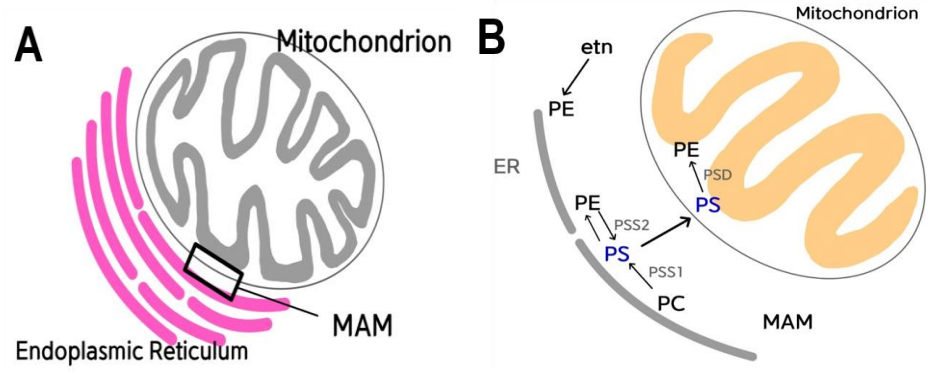

그림 1. MAM의 위치와 포유류의 인지질 합성 경로 (Dyzma et al., 2012)

안쪽 막에만 비대칭적으로 분포하는 PS가 세포막의 바깥쪽으로 노출되는 경우 식세포 작용이 이루어지기 위한 “Eat-me” 신호로 작용하여 세포 사멸의 중요한 신호가 된다(Fadok et al., 1992). 정상적인 세포 사멸은 발생 과정에서 필수적인만큼 PS 또한 정상적인 발생에 중요한 역할을 한다. 예를 들어 정상적인 근육 형성을 위해서는 근원세포의 융합이 필수적으로 이루어져야 하는데, 이러한 과정에 세포사멸을 통해 방출된 PS에 의한 신호 전달이 필요하다(Hochreiter-Hufford et al., 2013; van den Eijnde et al., 2001).

PS는 Phosphatidylserine synthase(PSS)에 의해 합성된다. 포유류의 경우 Phosphatidylserine synthase-1(PSS1)과 Phosphatidylserine synthase-2(PSS2)라는 두 가지의 PS 합성 효소가 존재한다(Stone & Vance, 1999; Voelker, 1985). 인산기에 붙어 있는 머리기를 바꿔주는 방식을 이용하여 PSS1은 PC를 기질로 PS를 합성하고, PSS2는 PE를 기질로 PS로 합성한다. 두 효소는 각각 *Ptdss1* 과 *Ptdss2*에 의해 암호화 된다(E. Vance & Steenbergen, 2005). 포유류에서 *Ptdss1*과 *Ptdss2*의 결손 돌연변이를 유도하였을 때 두 경우 모두 생존이 가능하고 두 효소가 서로 상보적으로 작용하여 특이적인 표현형을 나타내지 않았기 때문에 결손 돌연변이에 대한 연구가 쉽지 않다. 또한 *Ptdss1*과 *Ptdss2*를 동시에 결손을 유도하였을 때는 배아 시기에 치사되기 때문에 포유류를 활용한 배아 이후 시기에 대한 연구가 어렵다(Arikketh et al., 2008; Bergo et al., 2002). PSS의 합성 도메인의 아미노산 서열 분석 결과 PSS는 효모부터 인간에 이르기까지 진화적으로 잘 보존되어 있다(Yang et al., 2019).

초파리는 포유류와 달리 PS 합성 효소를 PSS 한 가지만 가지고 있다. 초파리의 PSS는 사람의 PSS1과 진화적으로 상동성을 갖는다. 이 효소는 *Pss* 유전자에 의해 암호화된다(그림 2; Yang et al., 2019; 김성경, 2019).

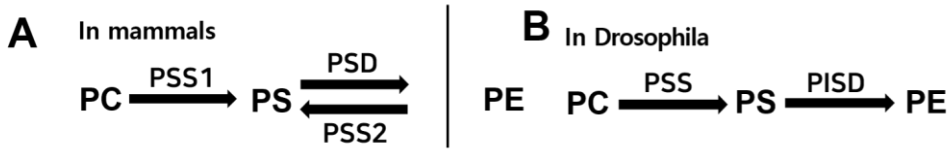

그림 2. 포유류와 초파리의 PS 합성 경로

(A)포유류의 PS 합성 경로 모식도. (B)초파리의 PS 합성 경로 모식도.

제 3 절 Phosphatidylserine synthase와 성장 이상

인간의 경우 *Ptdss1* 유전자에 기능 획득 돌연변이가 발생하게 되면 Lenz-Majewski hyperostotic dwarfism(LMHD)라는 희귀질병이 발생한다(Sousa et al., 2014). LMHD는 지적장애, 경화성 골 형성장애, 두개안면 이상(distinct craniofacial), 말단 사지기형, 왜소증과 같은 발생 및 성장 이상을 나타낸다(Lenz & Majewski, 1974; Sousa et al., 2014). PSS1의 효소 활성은 합성 산물인 PS에 의해 조절된다. LMHD 환자의 경우 *Ptdss1*유전자에 돌연변이가 발생하여 음성 되먹임 체계(negative feedback)에 문제가 발생하여 PS 합성이 제대로 조절되지 않게 된다. 그 결과 ER에 과도하게 쌓인 PS는 Sacl을 활성화하고 Phosphatidylinositol 4-phosphate(PI4P)에 작용하여 골지체와 세포막의 PI4P 농도 기울기가 감소하게 된다. PI4P 농도 기울기의 감소는 PI, PS, Cholesterol 등의 지질 수송에 문제를 일으킨다. 즉, *Ptdss1* 유전자 돌연변이에 의해 PS 합성 조절이 제대로 이루어 지지 않으면 전체적인 지질 수송 및 대사에 문제가 발생하여 발생과 성장의 문제를 일으키는 것이다(Sohn & Balla, 2016).

또한 최근 밝혀진 연구에 의하면 인간의 Ptdss1 유전자가 기능 결손 돌연변이가 발생하였을 때 경증에서 중증의 발달 지연이 일어난다고 밝혀졌다. 이 질환은 *Pss* 유전자의 결손 돌연변이로 인한 L137F 서열의 변이 문제가 나타난다(그림 3). 이 경우 또한 LMHD와 같이 희귀한 질병으로 아직까지 보고된 환자는 3명이고 모두 어린아이들이다. 대부분 키가 작고 폐동맥 협착증, 안면 비대칭, 자폐증 등의 문제를 보이며 말하기나 기어다니기, 걷기, 등에 있어서도 상당히 늦게 진행되는 모습을 보였다(Gracie et al., 2022).

두 가지 희귀 질환이 각각 *Ptdss1* 유전자 기능 획득 돌연변이와 기능 결손 돌연변이에서 일어난 것이라는 점으로 보아 PSS가 생명체의 발생과 성장에 있어서 중요한 역할을 하고 또 한 그 발현이 적절한 수준에서 유지되는 것이 중요하다는 것을 알 수 있다.

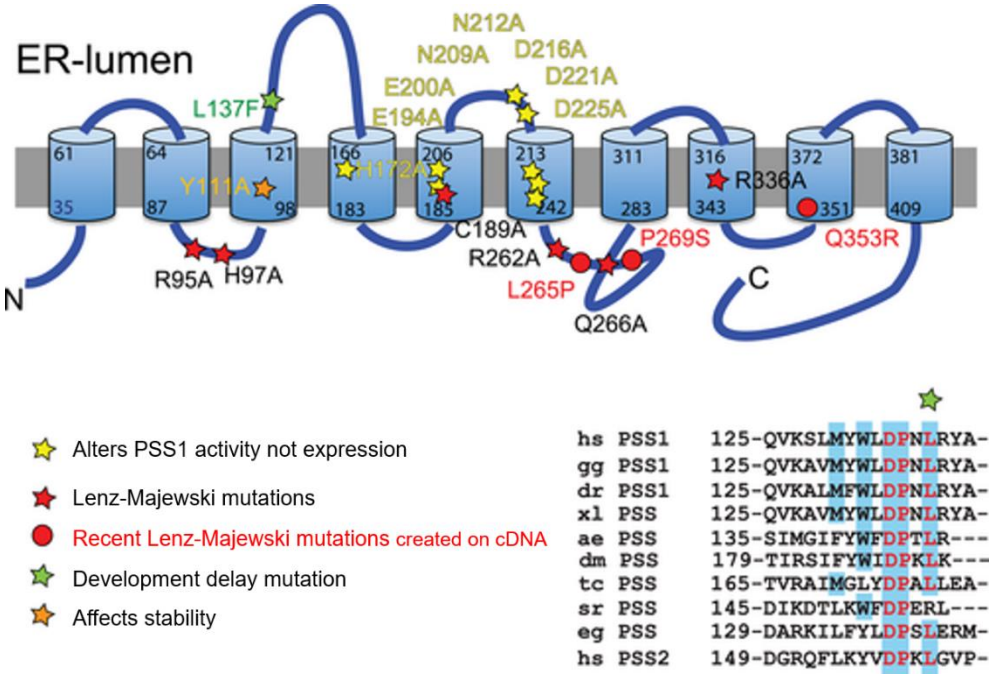

그림 3. LMHD 환자와 발달 지연 환자의 돌연변이 위치 모식도와 Pss 유전자 서열의 L137F 잔기 상동성 (Gracie et al., 2022)

제 4 절 초파리 장 구성 세포

초파리의 장은 음식물의 연동운동 같은 불수의운동에 관여하는 내장근(visceral muscle)에 의해 둘러싸여 있고, 장줄기세포(intestinal stem cells, ISCs), 장벽모세포(enteroblast, EB), 장세포(enterocyte, EC), 그리고 장내분비세포(enteroendocrine cell, EE) 4가지 세포로 구성되어 있다. ISC는 줄기세포 중 하나로 초파리 장의 상피세포에서 체세포 분열을 할 수 있는 세포의 대부분을 구성하고 다양한 환경 스트레스 요인 및 영양조건에 반응을 한다. 이를 통해 장의 전반적인 항상성이 유지가 되도록 해준다. ISC는 딸세포인 EB로 분화가 된다. 포유류의 장과 달리 초파리의 상피에서 ISC는 내장 근육에 존재하는 반면 EB는 장의 세포 정점(apical)에 위치하여 모체 줄기세포가 된다. EB의 90%는 배수체 EB로 분화되어 장의 상피를 형성하고 10%는 EE와 EC로 분화된다. ISC에서 먼저 Delta 신호가 방출되면 이것이 EB의 Notch 신호를 활성화 시킨다. Notch 신호에 의해 인접한 EB세포의 분화와 운명이 결정된다. Notch 신호의 세기가 강하면 EC로 낮으면 EE로 분화된다(그림 4; Loza-Coll et al., 2014). EE는 호르몬의 항상성 조절을 하며 EC는 소화효소 분비 및 양분 흡수의 역할을 한다(Lian et al., 2018).

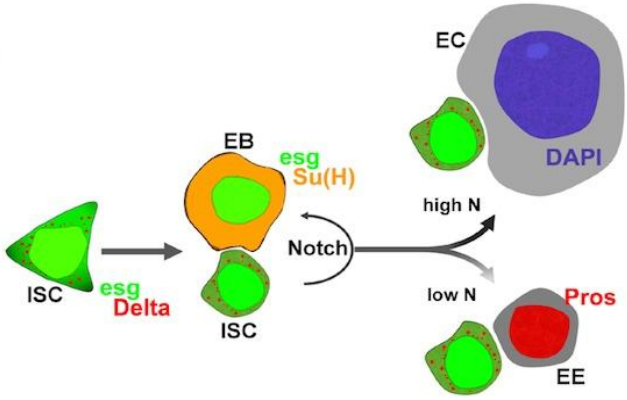

그림 4. 초파리 장 구성 세포와 분화 과정 (Loza-Coll et al., 2014)

제 5 절 PS와 Akt 신호 전달 경로

PS는 신경 조직의 원형질막 내부에 풍부하게 분포되어 있으며 음전하를 띠고 있다. 음이온성을 갖는 특성으로 PS는 각종 신호 전달 관련 단백질들과 상호작용하여 신호의 활성화 등의 신호 전달 체계에 관여를 한다(Yeung et al., 2008). PS는 C2 domain을 가지고 있는 세포 내 신호 전달 단백질인 protein kinase C(PKC), synaptotagmin 등과 상호작용을 하고, Akt 단백질의 pleckstrin homology domain(PH domain)과 상호작용하여 Akt 신호 전달에 중요한 역할을 한다(Huang et al., 2011). 또한 PS는 머리기가 음전하를 띠기 때문에 Rac1, RhoB, CDC42와 같은 신호 전달 단백질과 상호작용이 가능하다 (Vance et al., 2005).

protein kinase B (PKB)라고도 불리는 Akt는 세포 생존, 세포 분화, 세포 크기조절, 가용 영양분에 대한 반응성, 중간 대사 과정, 혈관 신생(angiogenesis), 조직 침해(tissue invasion) 등의 세포작용들을 조절하며 이러한 과정들은 종양 발생에도 중요한 역할을 하고 있다 (Kandel et al., 2002; Shiojima & Walsh, 2002). Akt 신호 전달의 활성은 Ras에 의해 양성 되먹임 조절(positive feedback)이 되고 PTEN에 의해 음성 되먹임 조절(negative feedback)이 된다(Chang et al., 2003).

PS는 Akt와 phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate(PIP3)의 결합을 촉진하고 Akt의 pleckstrin homology domain(PH domain) 및 regulatory domain(RD)의 특정 잔기와 상호작용을 하여 Akt를 인산화시키고 Akt의 활성을 유도한다(Huang et al., 2011).

초파리의 Drosophila Akt(*dAkt*)는 사람의 *Akt*와 진화적으로 상동성을 갖는다. 초파리의 난포 세포에서 *dAkt* 기능 상실을 유도하였을 때 세포 크기가 감소하였고 반면 지속적으로 *dAkt*가 발현되도록하는 활성형태인 미리스틸화된 키나아제(*dAkt(myr),Akt*^{c})의 발현은 세포의 크기 증가를 유도하였다(Cavaliere et al., 2005). 또한 초파리의 침샘에서 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 하였을 때 *dAkt* 신호 전달 단백질의 활성이 감소하였고 그 결과 침샘의 세포 크기가 감소하였다(Yang et al., 2019).

Akt는 다양한 단백질들과 상호작용을 통해 생명체의 여러가지 조절에 참여한다. as160과 상호작용을 통해 해당과정을 조절하고,

Tuberous sclerosis proteins 1/2(TSC1/2)와의 상호작용으로 자가포식과 단백질 신생 합성에 관여한다(Mîinea et al., 2005; Schultze, Hemmings, Niessen, & Tschopp, 2012). 또한 Glycogen Synthase Kinase-3(GSK3)를 통해 글리코젠 합성(glycogen synthesis)에도 참여하며 Fork head box O(FOXO)와 상호작용으로 세포의 생존과 분화에도 영향을 미친다. 이러한 여러가지 Akt 신호전달의 영향을 받는 단백질 중 FOXO는 세포의 분화, 기관 및 개체의 성장, 줄기세포유지 그리고 인슐린 신호 전달 과정에 중요한 역할을 한다(Farhan et al., 2020). 포유류의 경우 주로 FOXO1, FOXO3, FOXO4, FOXO6의 네가지 FOXO가 주로 발현되고 초파리의 경우 Drosophila forkhead-related transcription factor dFOXO(*dFOXO*) 한 가지가 있으며 이들은 서로 진화적으로 상동성을 갖는다. 초파리에서 *dFOXO*의 발현을 억제시켰을 때, 세포의 크기가 감소하지는 않았으나 세포의 수가 감소하는 것을 확인하였다 (Jünger et al., 2003). 평소에는 dAkt에 의해 인산화된 *dFOXO*는 세포질 유지 및 전사활성이 억제된 상태로 존재한다. 인슐린 신호 감소 등에 의해 *dAkt*의 활성이 억제되면 *dFOXO*가 활성화 되고 그 결과 표적 유전자인 *d4EBP*를 활성화시켜 세포의 성장 및 분화를 억제시킨다.(Puig et al., 2003). *dFOXO*의 경우 dAkt 이외의 상위 신호의 영향을 받는 것으로 보이나 그것이 어떤 신호에 의한 작용인지는 아직 밝혀지지 않았다.

*4EBP*는 Foxo뿐 아니라 Akt에 의해 TOR 신호가 활성화 되면 TOR에 의해 조절되기도 한다(그림 5; Teleman et al., 2005). 또한 *4EBP*는 굶주림(starving) 스트레스 상황에서 더 활성화되며 대사 브레이크(metabolic brake)로 작용하며 지방의 대사를 조절하기도 한다 (Teleman et al., 2005).

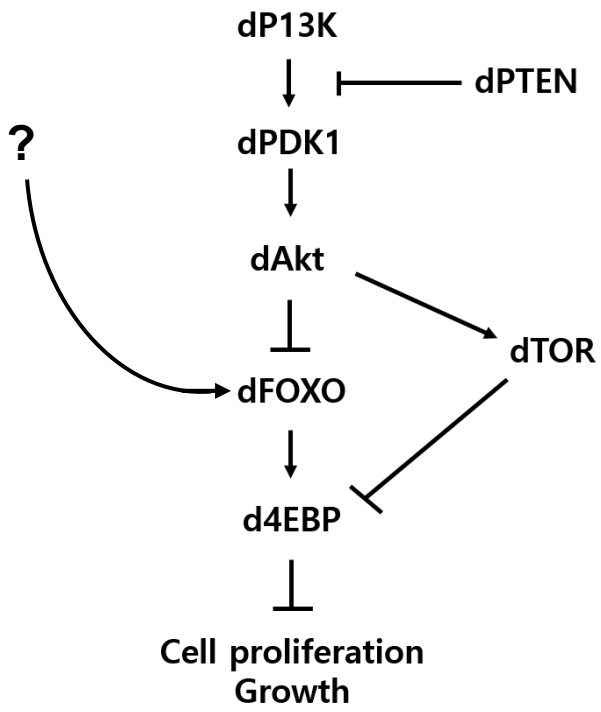

그림 5. 성장 및 분화 관련 Akt 신호 전달 경로 (Puig et al., 2003)

제 6 절 선행연구 분석 및 연구 목표

Pss 유전자의 P-element 삽입 돌연변이에서 수명 감소, 뇌조직의 퇴화 및 충격 민감성 발작의 증가, 운동능력 감소 등의 신경퇴행성 질환의 표현형이 관찰되었다(Park et al., 2021). 또한 초파리 배아 발생 단계에서 *Pss* 유전자 돌연변이의 현음기관(chordotonal organ)에 있는 lch5라는 신경세포의 모양 이상이 확인되었고 *Pss* 유전자 발현을 조직 특이적으로 Knock down 하였을 때 일부 조직에서 발육 부진이 확인되었다(김관영, 2021). 이러한 결과들로 보았을 때 PS와 PSS가 신경 관련 퇴행성 질환뿐만 아니라 성장과 발생에도 중요한 기능을 하고 있음을 알 수 있다.

인간의 경우 *Ptdss1* 유전자의 돌연변이 발생 시 LMHD라는 성장과 발생에 치명적인 문제를 일으키는 희귀 질환이 발생하기 때문에 *Ptdss1* 유전자에 대한 돌연변이 모델 개발과 질병 치료를 위한 유전자 기능 연구가 필요하다(Sohn & Balla, 2016; Tamhankar et al., 2015).

그러나 포유류에서 쥐에게 *Ptdss1*과 *Ptdss2* 유전자 모두에 돌연변이를 일으켰을 경우 배아 시기에 개체가 치사되었고, *Ptdss1* 또는 *Ptdss2*를 각각 따로 돌연변이를 일으켰을 때에는 두 유전자 간의 상호 과잉성(redundancy)으로 특별한 발생 이상 표현형을 보이지 않았다. 이 때문에 쥐를 통한 *Ptdss1* 유전자 연구와 유전자 모델 개발에는 어려움이 많다(Arikketh et al., 2008; Bergo et al., 2002).

초파리의 경우 포유류와 달리 한 종류의 PSS를 가지고 있고 인간의 PSS1과 진화적으로 높은 상동성을 나타낸다(Yang et al., 2019; 김성경, 2019). 또한, 초파리는 포유류에 비해 크기가 작고 대량 교배가 가능하며 생활사가 짧아 세대 간 분석에도 용이하다. 또한 4쌍의 비교적 적은 수의 염색체가 존재하고 P-element, CIRSPR-Cas9 등을 활용하여 형질전환 돌연변이 초파리를 쉽게 제작할 수 있다는 장점도 있다. 이러한 이유들로 초파리는 유전학 분야에서 훌륭한 모델 동물로 사용되고 있다(Kondo & Ueda, 2013; Robertson et al., 1988).

이렇듯 초파리는 유전자 연구에 적합한 다양한 장점을 갖는 훌륭한 모델 동물이며, 초파리의 경우 포유류와 달리 *Pss* 유전자를 한가지만 가지고 있어 *Pss* 유전자 연구 기능에 더욱 적합하다. 하지만 초파리에서는 *Pss* 유전자 발현과 관련하여 왜소증과 같은 발생 및 성장 이상에 대한 연구는 보고된 것이 많지 않다. 침샘 특이적으로 GAL4

line으로 *Pss* 유전자를 Knock down 하였을 때 Akt 활성이 감소하여 세포의 성장에 중요한 인슐린 신호전달에 문제가 생겨 침샘의 세포 크기가 작아졌다는 연구 결과가 있다(Yang et al., 2019).

이러한 선행 연구와 더불어 인간 성장과 관련된 희귀 질환인 LMHD (Lenz & Majewski, 1974; Sohn & Balla, 2016), 그리고 *Ptdss1* 유전자 기능 결손 돌연변이로 인한 발달 지연에 관한 연구결과로 미루어 볼 때 *Pss* 유전자는 개체의 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다(Gracie et al., 2022). 개체 수준에서의 *Pss* 유전자 돌연변이의 성장 이상 관련 표현형 확인과 더불어 이러한 문제가 어떠한 경로에 의해 이루어지는지에 대하여 확인해보고자 한다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 실험에 사용한 초파리와 교배 scheme

본 연구에서 사용한 초파리는 <표 1>과 같다. *Pss* 돌연변이 초파리의 경우 편의를 위해 stock number 끝의 두 자리 수를 이용하여 Pss^{72}으로 표현하였다. 모든 초파리는 옥수수와 효모(cornmeal./yeast) 배지에 dry yeast를 추가한 관변에서 배양하였다. 인큐베이터는 습도 50%, day/night 주기 12시간으로 설정하였고, 온도는 실험에 따라 20℃, 25℃, 29℃로 조절하였다.

성체 이전 단계에 유전자형을 구분할 필요가 있는 경우 형광을 나타내는 balancer로 교체하여 실험을 진행하였다. 또한 RNAi를 활용하여 유전자의 발현을 억제하여 실험하였는데 보다 더 효과적인 억제를 위해서는 miRNA의 성숙을 도와주는 다이서(dicer)가 필요하다 (Pham et al., 2004). 본 연구에서는 Vienna Stock Center에서 구매한 Pss^{RANi} 초파리에 Dicer 중 하나인 *Dicer-2(Dcr2)*를 추가한 *UAS-Dcr2;*Pss^{RNAi}*/CTG* 초파리를 사용하여 *Pss* 유전자 발현량을 Knock down을 시켜 실험을 진행하였다.

표 1. 실험에 사용한 초파리

구분	Stock Number	Stock Center	Genotype	Remarks
Pss mutant	#104172	Kyoto	w^*; P{GawB}Pss^{NP2363} / TM3, Sb^1 Ser^1	Pss^{72}
GAL4 lines	Bruno Lab		y^1; P{GawB}$Myo31DF^{NP0001}$	NP1-GAL4
	Bruno Lab		Pm/Gla; Delta/TM3, Sb	Dl-GAL4
	Bruno Lab		Su(H)/Cyo; pre/TM3, Sb	Su(H)-GAL4
	Bruno Lab		Escargot, UAS-GFP/Cyo	esg-GAL4
	Bruno Lab		Prospero/TTG	Prospero-GAL4
UAS lines	GD Lab		UAS-Dcr2; v5391 (CG4825-Pss RNAi)/CTG	UAS-Pss^{RNAi}
	#80935	BDSC	w*; P{UAS-myr-Akt.$^{\Delta PH}$}3/TM3, Sb^1	Akt^c
	#4775	BDSC	w^{1118}; P{UAS-GFP.nls}14	UAS-GFP(II)
	#4776	BDSC	w1118; P{UAS-GFP.nls}8	UAS-GFP(III)
기타 lines	#130386	Kyoto	w^{1118}; wg^{Sp-1} /CyO; MKRS / TM6B, Tb^1	Sp/Cyo; MKRS/TM6B, Tb

Pss 돌연변이 유전자 중 선행연구에서 사용한 Pss^{72}를 사용하였고 장을 구성하는 세포들 특이적인 GAL4 line 5가지를 사용하였다. ISC 세포에 특이적인 GAL4 line으로는 *Dl-GAL4*를, EB 세포에 특이적인 GAL4 line으로는 *Su(H)-GAL4*를, ISC와 EB 모두에 특이적인 GAL4 line으로는 *esg-GAL4*를, EE 세포에 특이적인 GAL4 line으로는 *Prospero-GAL4*를, EC 세포에 특이적인 GAL4 line으로는 *NP1-GAL4*를 사용하여 Pss 유전자의 발현을 Knock down시켜 실험을 진행하였다(그림 6).

Scheme①	to make *NP1> Pss^{RANi}*
NP1-GAL4	*UAS-Pss^{RNAi}*
y1; P{GawB}Myo31DF^{NP0001} ⊗ *UAS-Dcr2; v5391(CG4825-Pss RNAi)/CTG*	
↓	
UAS-Dcr2; P{GawB}Myo31DF^{NP0001}/ v5391(CG4825-Pss RNAi)	
Scheme②	to make *Dl> Pss^{RANi}*
Dl-GAL4	*UAS-Pss^{RNAi}*
Pm/Gla; Delta/TM3, Sb ⊗ *UAS-Dcr2; v5391(CG4825-Pss RNAi)/CTG*	
↓	
UAS-Dcr2;Pm/v5391(CG4825-Pss RNAi);Delta/+,	
UAS-Dcr2;Gla/v5391(CG4825-Pss RNAi);Delta/+	
Scheme③	to make *Su(H)> Pss^{RANi}*
Su(H)-GAL4	*UAS-Pss^{RNAi}*
Su(H)/Cyo; pre/TM3, Sb ⊗ *UAS-Dcr2; v5391(CG4825-Pss RNAi)/CTG*	
↓	
UAS-Dcr2; Su(H)/v5391(CG4825-Pss RNAi); pre/+,	
UAS-Dcr2; Su(H)/v5391(CG4825-Pss RNAi); TM3, Sb/+,	
Scheme④	to make *esg> Pss^{RANi}*
esg-GAL4	*UAS-Pss^{RNAi}*
Escargot, UAS-GFP/Cyo ⊗ *UAS-Dcr2; v5391(CG4825-Pss RNAi)/CTG*	
↓	
UAS-Dcr2; Escargot, UAS-GFP/v5391(CG4825-Pss RNAi)	
Scheme⑤	To make Prospero>Akt^{c}
Prospero-GAL4	*UAS-Pss^{RNAi}*
Prospero/TTG ⊗ *UAS-Dcr2; v5391(CG4825-Pss RNAi)/CTG*	
↓	
UAS-Dcr2; v5391(CG4825-Pss RNAi)/+; Prospero/+	

그림 6. 장 특이적 GAL4 line의 *Pss* 유전자 Knock-down scheme

5가지 장 특이적 GAL4 line을 *UAS-Pss^{RNAi}* 으로 Knock-down된 개체를 선별하기 위한 scheme. 각각의 GAL4 line과 *UAS-Pss^{RNAi}* 가 함께 존재하여 작동하는 Knock down 돌연변이를 선별하였다.

초파리 장에서 *Pss* 발현 패턴을 보기 위해 *UAS-GFP(II)*와 *UAS-GFP(III)*를 사용하였다.

Akt^{c} 돌연변이와 *Sp/Cyo;MKRS/TM6B,Tb* 는 *Pss* 돌연변이의 Akt에 의한 회복 효과를 확인하기 위한 Rescue line 제작에 사용하였다(그림 7).

Scheme①	to make Sp,Cyo>Akt^{c}
w^{1118}; wg^{Sp-1} /CyO; MKRS / TM6B, Tb^{1} ⊗ w^{*}; P{UAS-myr-Akt$^{\Delta PH}$}3/TM3, Sb^{1} ↓ wg^{Sp-1}/+; Akt^{c}/TM6B, Tb^{1} ⊗ Cyo/+; Akt^{c} /TM6B, Tb^{1} ↓ wg^{Sp-1} /CyO; Akt^{c}/TM6B, Tb^{1}	
Scheme②	to make NP1>MKRS,TM6B, Tb^{1}
w^{1118}; wg^{Sp-1} /CyO; MKRS / TM6B, Tb^{1} ⊗ y^{1}; P{GawB}Myo31DFNP^{0001} ↓ NP1/Cyo; MKRS/+ ⊗ NP1/Cyo; TM6B, Tb^{1} ↓ NP1; MKRS/TM6B, Tb^{1}	
Scheme③	To make NP1>Akt^{c}
wg^{Sp-1} /CyO; Akt^{c}/TM6B, Tb^{1} ⊗ NP1; MKRS/TM6B, Tb^{1} ↓ NP1/Cyo; Akt^{c}/TM6B, Tb^{1}	

그림 7. Akt^{c} 돌연변이에 의한 Rescue line 제작 scheme

Scheme①을 통해 Akt^{c} 에 double-balancing을 하고 Scheme②를 통해 NP1에 balancer를 추가해준다. ①과 ②의 최종 결과물을 교배하여 NP1과 Akt^{c} 가 함께 존재하는 Rescue line 을 제작하였다.

제 2 절 성체 우화율(Lethality) 및 수명

가. 성체 우화 여부 확인

조직 특이적인 여러가지 GAL4 line 수컷과 *UAS-Pss*^{RNAi} 미교배 암컷을 29℃에서 교배하여 자손 세대를 유전자형에 따른 표현형을 기준으로, Knock down된 개체와 Knock down되지 않은 개체들의 수를 확인하다. 장 세포를 구성하는 초파리의 GAL4 유전자와 *UAS-Pss*^{RNAi} 유전자가 함께 존재하는 자손 세대의 초파리가 Pss 유전자 Knock down 돌연변이이므로 해당 표현형을 선택하여 성체 우화율을 확인하였다(그림 6). 전체 개체의 수를 나타날 수 있는 표현형의 개수로 나누어 기준을 정하고 Knock down 개체의 수를 기준으로 나누어 성체 우화율을 계산하여 확률로 나타내었다.

나. 초파리 수명 측정

장세포 특이적 GAL4 line의 수컷과 *UAS-Pss*^{RNAi} 미교배 암컷을 25℃에서 교배하였다. 자손 세대가 깨어나기 시작하면 Knock down 된 개체를 선별하고 24시간 이내에 깨어난 초파리 성체를 1일 차로 하여 암컷과 수컷을 각각 50마리씩 수집(collection) 하였다. 암컷의 경우 미교배 암컷으로 수집하였다. 초파리는 밀집 스트레스를 방지하기 위해 한 관병에 최대 20마리씩 수집 후 29℃에서 수명 측정을 진행하였다 (Linford, Bilgir, Ro, & Pletcher, 2013). 3일에 한 번씩 transfer를 해주었고, 살아남은 개체수를 관병 별로 매일 기록하였다. 장세포 특이적인 GAL4 line 수컷과 *Canton-S* 미교배 암컷을 교배하여 얻은 자손 세대를 GAL4 line 대조군으로 사용하였다. 대조군의 경우도 실험군과 동일한 온도에서 같은 방법으로 수명을 측정하였다. 이때 개체의 생존날짜에 개체수를 곱한 후 전체 개체수로 나누어 평균수명을 측정하고 통계처리하였다. 추가적으로 장세포 특이적GAL4 line의 수컷과 *UAS-Pss*^{RNAi} 미교배 암컷을 25℃에서 교배하고 수컷만 10마리씩 10개의 관병에 총 100마리를 수집하여 25℃에서 수명을 측정하였다. 마찬가지로 장세포 특이적인 GAL4 line 수컷과 Canton-S 미교배 암컷을 교배하여 얻은 자손 세대를 GAL4 line 대조군으로 사용하였고 실험군과 동일한 방법으로 수명 측적을 진행하였다. 이때 각 관병 별로 5마리 이하로 감소하게 되는 날짜를 기록하여 통계처리 후

T_{50}에 대한 그래프로 나타내었다. 장세포 특이적 GAL4 line의 수컷과 *UAS-Pss*^{RNAi} 미교배 암컷을 25℃에서 교배하였다. 자손 세대가 깨어나기 시작하면 Knock down 된 개체를 선별하고 24시간 이내에 깨어난 초파리 성체를 1일 차로 하여 암컷과 수컷을 각각 50마리씩 수집(collection) 하였다. 암컷의 경우 미교배 암컷으로 수집하였다. 초파리는 밀집 스트레스를 방지하기 위해 한 관병에 최대 20마리씩 수집 후 29℃에서 수명 측정을 진행하였다(Linford, Bilgir, Ro, & Pletcher, 2013). 3일에 한 번씩 transfer를 해주었고, 살아남은 개체수를 관병 별로 매일 기록하였다. 장세포 특이적인 GAL4 line 수컷과 *Canton-S* 미교배 암컷을 교배하여 얻은 자손 세대를 GAL4 line 대조군으로 사용하였다. 대조군의 경우도 실험군과 동일한 온도에서 같은 방법으로 수명을 측정하였다. 이때 개체의 생존날짜에 개체수를 곱한 후 전체 개체수로 나누어 평균수명을 측정하고 통계처리하였다. 추가적으로 장세포 특이적GAL4 line의 수컷과 *UAS-Pss*^{RNAi} 미교배 암컷을 25℃에서 교배하고 수컷만 10마리씩 10개의 관병에 총 100마리를 수집하여 25℃에서 수명을 측정하였다. 마찬가지로 장세포 특이적인 GAL4 line 수컷과 Canton-S 미교배 암컷을 교배하여 얻은 자손 세대를 GAL4 line 대조군으로 사용하였고 실험군과 동일한 방법으로 수명 측적을 진행하였다. 이때 각 관병 별로 5마리 이하로 감소하게 되는 날짜를 기록하여 통계처리 후 T_{50}에 대한 그래프로 나타내었다.

제 3 절 면역화학염색법

Primary antibody로 mouse anti-GFP(1:500, Developmental Studies Hybridoma Bank(DSHB)를 사용하였고, **Secondary antibody**로는 Alex Fluor 488 goat anti-mouse(1:1000, Invitrogen)를 사용하였다. **Mounting solution**은 EC세포의 핵을 관찰하기 위해 Antifade Mounting Medium with DAPI (VECTASHIELD)를 사용하였다.

초파리 3령 유충을 차가운 PBS에 옮긴 뒤 유충의 입을 잡고 절개(dissection)하여 장을 꺼내어 낸 후 바로 4% paraformaldehyde에 넣어 20분간 고정한다. 그 후 PT(PBS + 0.1% Tween20)로 5분간 5회 씻어준다. 비특이적 결합을 막기 위해 5% NGS(Normal Goat Serum)으로 30분간 Blocking을 해준 뒤 5% NGS와 1차 항체를 비율에 맞게 희석하여 500㎕ 넣어 주고 4℃ 트위스터(twister)에서 랩을 통해 빛이 들어가지 않는 상태로 만들어 준 후 16시간 반응시켜준다. 반응 후 PT로 10분간 3회 씻어주고 1차 항체에 맞는 2차 항체를 선택하여 2시간 상온에서 반응시켜준다. 이때에도 빛이 차단될 수 있도록 한다. PT로 10분간 3회 씻어주고 EC세포의 큰 핵을 관찰하기 위한 DAPI를 사용하여 30분 이상 처리한 뒤 관찰한다.

제 4 절 성장 이상 표현형

가. 번데기 크기 및 부피 측정

장세포 특이적인 GAL4 line의 수컷과 *UAS-Pss*^{RNAi} 미교배 암컷을 교배하여 16시간 동안 알을 받고 인큐베이터에서 발생시켰다. 번데기가 형성되면 스페츌러를 이용하여 조심스럽게 관병에서 떼어내고 balancer를 이용하여 형광을 나타내지 않는 번데기들을 골라서 모눈종이 위에 수집하고 실체현미경으로 촬영을 하였다. 대조군은 장세포 특이적인 GAL4 line 수컷과 *Canton-S* 미교배 암컷을 교배한 자손 세대를 사용하였다. Image J 프로그램을 활용하여 번데기의 최대 면적을 측정하여 크기 비교를 진행하였다 (Rodriguez-Jato et al., 2011). 또한 번데기의 세로 길이와 가로 지름을 측정하고 부피를 구하는 공식에 대입하여 번데기의 부피 크기를 비교하였다(Layalle et al., 2008). 모든 실험은 25℃와 29℃에서 한 번씩 진행하였다.

나. 성체 무게 측정

장세포 특이적인 GAL4 line의 수컷과 *UAS-Pss*^{RNAi} 미교배 암컷을 25℃에서 교배하여 알을 받고 25℃ 인큐베이터에서 발생시켰다. 성체가 깨어나기 시작하면 24시간 단위로 같은 날짜의 수컷 성체와 미교배 암컷을 수집하여 5일간 관병에서 안정화된 상태로 유지시킨뒤 -80℃에 냉각하여 보관하고 10마리가 모이면 10마리씩 전자저울을 이용하여 무게를 측정한다(Gündner et al., 2014; H. Huang et al., 2013). 29℃의 실험군에서는 Knock down된 수컷의 개체가 거의 태어나지 않아서 개체 수집의 어려움이 있어 25℃에서만 성체 무게 측정 실험을 진행하였다.

제 5 절 유전자 발현량

실시간 중합효소 연쇄반응(real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)을 위해 모든 mRNA를 NucleoSpin RNAfmf 이용하여 3령 유충의 장 10~12개에서 추출하였다. 추출한 mRNA는 5X-All-In-One RT MasterMix(Abm)를 이용하여 각각 1㎍의 RNA를 cDNA로 합성하였다. 합성한 cDNA를 TOPreal qPCR 2X Premix(SYBR green with low ROX, Enzynomics)와 Rotor-Gene Q(QIAGEN)를 이용하여 qRT-PCR을 진행하였다. 실험의 표준화를 위해 사용한 House-keeping gene으로 F-Actin을 암호화하고 있는 유전자 *Actin 88F(Act88F)*를 사용하였다(Ponton et al., 2011). 실험에 사용한 프라이머 서열의 정보는 아래의 <표 2>와 같다.

표 2. qRT-PCR에 사용한 프라이머 서열

유전자명	프라이머 방향	프라이머 서열
Act88F	Forward	5'-TCGATCATGAAGTGCGACGT-3'
	Reverse	5'-ACCGATCCAGACGGAGTACT-3'
Pss	Forward	5'-ACTGTCCAAGTAATAATCTCGGTG-3'
	Reverse	5'-GGCGACAATTTACCTTTCGAG-3'
dAkt	Forward	5'-CATGTACGAGATGATCTGTGG-3'
	Reverse	5'-AGAATGGATGTGCTTGTATCTC-3'
dFoxo	Forward	5'-AGGCTGACCCACACAGATAAC-3'
	Reverse	5'-GGCTCCACAAAGTTTTCGGG-3'
d4EBP	Forward	5'-CAGATGCCCGAGGTGTACTC-3'
	Reverse	5'-CATGAAAGCCCGCTCGTAGA-3'

제 6 절 단백질 발현량

Primary antibody로 rabbit anti-pAkt(Ser473, 1:400, Cell signaling), mouse anti-βactin(ab8224, 1:1000, abcam)를 사용하였다. **Secondary antibody**는 Anti-rabbit IgG (#7074, 1:1000, Cell signaling), Anti-mouse IgG (#7076, 1:2000, Cell signaling)를 사용하여 실험을 진행하였다.

Western blot 실험을 위해 3령 유충의 장을 40개 이상 모아서 Urea buffer와 Protease inhibitor (Sigma-Aldrich), EDTA (Sigma-Aldrich)를 혼합하여 만든 Lysis buffer에 넣어준다. Homogenizer로 충분히 장을 갈아주고 Spin down 처리 후 상층액을 모아서 주사기 바늘을 통해 10회정도 뽑고 다시 빼는 과정을 반복해 준다. 그 후 Direct Sonication을 실시해주고 Spin down 후 상층액을 모아준다. BCA assay를 통해 실험군과 대조군의 샘플의 정량을 맞춰준 뒤 100℃에 10분간 처리해준다. 그 후 10% SDS-Polyacrylamide gel에 Protein Ladder (Thermo Scientific)과 실험군 및 대조군의 샘플을 넣고 loading을 실시한다. 이 후 Protein transfering으로 loading 된 겔을 membrane으로 옮겨준 후 3% skim milk (MB cell)로 비특이적 결합을 막는 처리는 1시간 실시한다. 그 후 1차 항체를 비율에 맞게 3% skim milk로 희석하여 4℃에서 12시간 이상 처리한다. PT로 10분간 3회 씻어준 뒤 2차 항체를 비율에 맞게 희석하여 상온에서 2시간 처리해준다. PT로 5분간 5회 씻어준 뒤 Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)를 처리하고 Membrane을 현상판에 옮겨준 뒤 암실에서 필름과 반응시키고 Developer와 Fixer (KONICA MINOLTA)를 처리하여 단백질 발현량을 확인한다.

제 3 장 실험 결과

제 1 절 초파리 3령 유충 장에서 *Pss* 유전자 발현 양상

초파리의 장에서 *Pss* 유전자의 발현 양상을 확인해보고자 하였다. 이때 사용된 P-element 삽입 돌연변이는 Pss^{72}를 사용하였고, 5' UTR 지점에 P-element가 삽입되어 있다(그림 8-A). *Pss* 유전자가 초파리 발생 시기 3령 유충의 장에서 어떻게 발현 되는지 확인하기 위해 Pss^{72}*-Gal4/UAS-GFP.nls(II)*를 통해 살펴보았다. 확인 결과 3령 유충 장의 전장 (foregut) 부분의 gastric caeca(GC)부위에 일부 발현이 나타났고 중장(midgut) 부분의 copper cell 지역 근처와 그 바로 뒤쪽에서 발현되는 양상을 나타내었다(그림 8-B, 8-B').

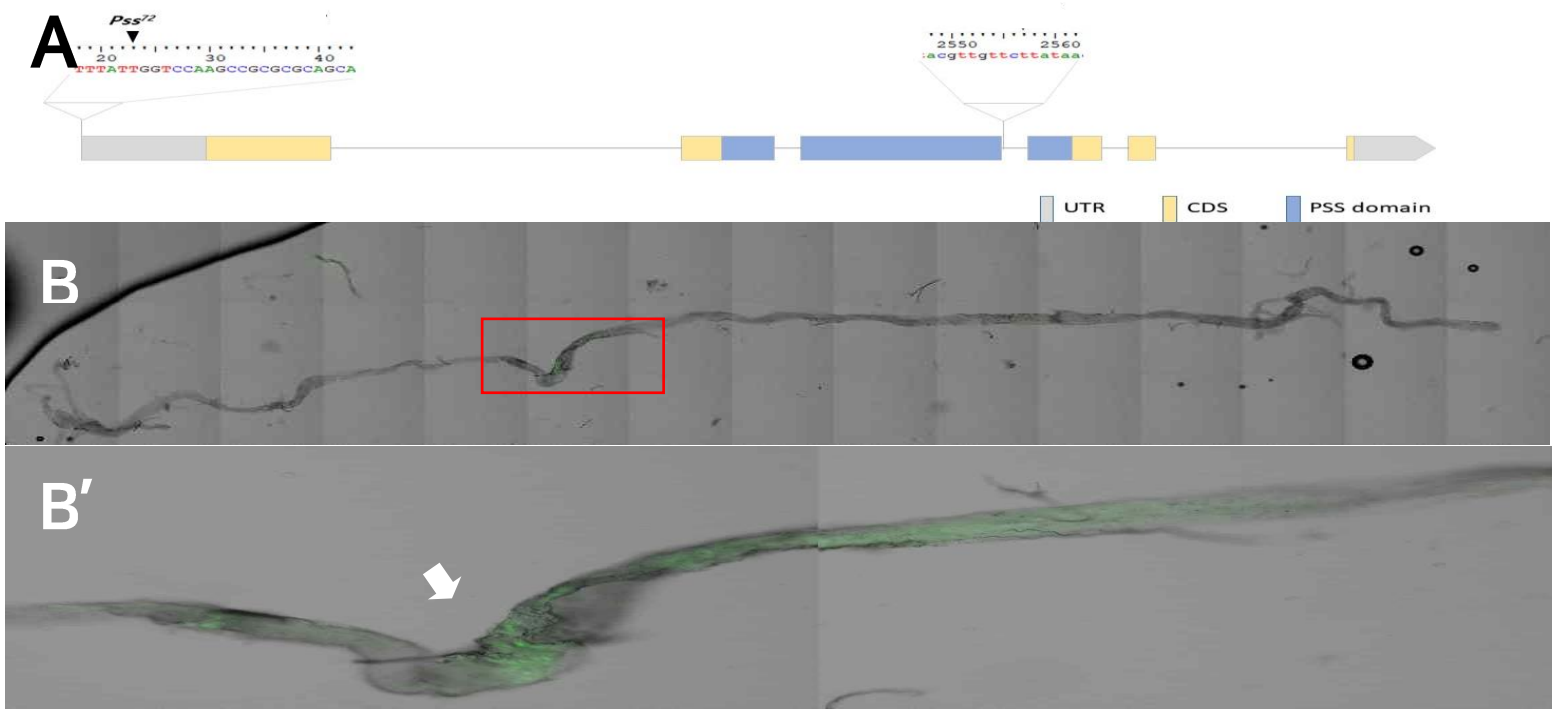

그림 8. 3령 유충 시기의 장에서 나타나는 *Pss* 유전자의 발현 양상

(A) *Pss*^{72} 돌연변이의 P-element 삽입 지점 모식도. (B) 3령 유충 장의 Pss^{72} 발현 양상. 좌측 전장의 gastric caeca(GC)부위에 일부 형광이 나타나고 중장 부분의 copper cell 지역 근처와 그 바로 뒤쪽에서 유전자 발현이 관찰된다.(B') (B)의 붉은색 상자로 나타낸 copper cell 지역 부분을 20배 확대하여 관찰한 것. 흰색 화살표: Copper cell 지역에 발현되는 *Pss* 유전자

제 2 절 초파리 발생 단계에서 장세포(Enterocyte) 특이적 *Pss* 돌연변이의 영향

1. 장 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 성체 우화율

선행 연구에서 침샘, 지방체, 중장, 편도세포, 기관, 신경세포, 신경교세포 등의 조직특이적 GAL4 line들을 이용하여 *Pss* 유전자를 Knock down 하였을 때 중장의 장세포 특이적인 GAL4 line(NP1-GAL4)에서 성체의 크기가 감소하는 모습을 확인하였으나 정량화하지는 못하였다. 따라서 본 연구에서는 장을 구성하는 세포별 GAL4 line을 활용하여 *Pss* 유전자로 Knock down을 하였을 때 성체 우화율을 확인하고 번데기와 성체시기에서 왜소증과 같은 성장 이상의 표현형을 기준을 정하여 정량화 하였다.

우선적으로 GAL4/UAS system을 활용하여 장을 구성하는 세포별 GAL4 라인의 수컷과 *UAS-Pss*^{RNAi}를 교배하여 Knock down 을 발생시켜 돌연변이에 따른 치사율을 확인해보았다. 초파리의 장은 음식물의 연동운동 같은 불수의운동에 관여하는 내장근(visceral muscle)에 의해 둘러싸여 있고, 장줄기세포(intestinal stem cells, ISCs), 장벽모세포(enteroblast, EB), 장세포(enterocyte, EC), 그리고 장내분비세포(enteroendocrine cell, EE) 4가지 세포로 구성되어 있다.

이러한 장을 구성하는 세포들에서 *Pss* 유전자의 작용을 알아보기 위하여 각 세포 종류별로 특이적인 GAL4 line을 활용하여 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 시켜보았다(그림 7)(표 3). ISC 세포에 특이적인 GAL4 line으로는 *Dl-GAL4*를, EB 세포에 특이적인 GAL4 line으로는 *Su(H)-GAL4*를, ISC와 EB 모두에 특이적인 GAL4 line으로는 *esg-GAL4*를, EE 세포에 특이적인 GAL4 line으로는 *Prospero-GAL4*를, EC 세포에 특이적인 GAL4 line으로는 *NP1-GAL4*를 사용하였다.

표 3. 장 관련 GAL4 line의 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이 성체 우화율

	ISC (Dl-gal4)		EB (Su(H)-gal4)		ISC&EB (esg-gal4)		EE (prospero-gal4)		EC (NP1-gal4)	
Gal4>Pss^{RNAi}	Viable		Lethal		Rarely-Viable		Lethal		Rarely-Viable	
	84.00%		0%		33.73%		0%		39.49%	
	Gal4>Pss^{RNAi} (K.D)	Not K.D	Gal4>Pss^{RNAi} (K.D)	Not K.D	Gal4>Pss^{RNAi} (K.D)	Not K.D	Gal4>Pss^{RNAi} (K.D)	Not K.D	Gal4>Pss^{RNAi} (K.D)	Not K.D
Male	12	53	0	48	3	69	0	87	8	188
Female	24	61	0	59	16	81	0	73	100	251
Total	36	114	0	107	19	150	0	160	108	439

각각의 GAL4 line과 *Dcr2;UAS−Pss*^{RNAi}*/CTG* 을 교배하여 GAL4와 *UAS−Pss*^{RNAi} 가 함께 존재하는 자손 세대를 *Pss* 유전자에 대해 Knock−down 되었다고 보고 태어나는 자손 세대의 전체 수를 자손 세대에서 나타날 수 있는 종류의 수로 나누어주면 특정 경우의 수가 태어나는 평균 수를 알 수 있게 된다. 이때, Knock−down 된 개체수를 앞서 계산된 숫자로 나누어준 후 100을 곱하면 Knock−down 개체의 성체 우화율이 계산된다. 이를 GAL4 line 별로 계산하여 표로 나타내었다(표 3).

예시로 ISC 특이적인 *Dl−GAL4*의 경우 *Pm/Gla;Dl−gal4/TM3,Sb* 와 *Dcr2;UAS−Pss*^{RNAi}*/CTG* 를 교배하면 나타날 수 있는 자손 세대의 경우의 수는 8가지가 존재한다.(*Dcr/+;Gla/ UAS−Pss*^{RNAi}*;Dl−gal4/+, Dcr/+;Pm/UAS−Pss*^{RNAi}*;Dl−gal4/+, Dcr/+;Gla/UAS−Pss*^{RNAi}*;TM3, Sb/+, Dcr/+;Pm/ UAS−Pss*^{RNAi}*;Dl−gal4/+, Dcr/+;Gla/CTG;Dl−gal4/+, Dcr/+;Pm/CTG;Dl−gal4/+, Dcr/+;Gla/CTG;TM3,Sb/+, Dcr/+;Pm/CTG;TM3,Sb/+)* 이들 중 *Pss* 유전자 발현량을 억제한 Knock−down 개체는 GAL4 line 과 *UAS−Pss*^{RNAi}가 모두 존재하는 *Dcr/+;Gla/UAS−Pss*^{RNAi}*;Dl−gal4/+, Dcr/+;Pm/UAS−Pss*^{RNAi}*;Dl−gal4/+* 이렇게 두 가지가 있다. 또 한 8가지의 자손 세대 중 *Dcr/+;Gla/CTG;TM3,Sb* 의 경우 개체 치사가 되므로 해당 개체를 제외한 7로 전제 자손 세대의 수 인 150을 나누고 Knock−down 개체의 종류가 2가지 이므로 2를 곱한다. 그 결과 42.86이 나오는데 이 숫자가 전체 자손이 150마리 일 때 Knock−down 개체의 종류가

정상적으로 깨어날 때의 평균 숫자이다. Knock-down 개체 수 인 36을 42.86로 나누고 100을 곱하면 84.00%의 성체 우화율 결과값이 나온다.

*esg-GAL4*의 경우 자손 세대 전체 169마리 개체 중 나올 수 있는 경우의 수가 4인데 그 중 *Dcr/+Cyo/CTG*의 경우 개체 치사가 되므로 이를 제외한 3으로 전체 개체를 나누어주면 56.33이 나온다. Knock-down된 *esg-GAL4/UAS-Pss*^{RNAi} 의 개체 수인 19를 56.33으로 나누고 100을 곱하면 33.73%의 성체 우화율 결과값이 나온다.

*NP1-GAL4*의 경우는 *Dcr2;UAS-Pss*^{RNAi}*/CTG*와 교배 결과 *Dcr/+;NP1-GAL4/UAS-Pss*^{RNAi}, *Dcr/+;NP1-GAL4/CTG* 이렇게 두 종류의 자손 세대가 나올 수 있는데 전체의 자손 세대 개체 수 인 547을 2로 나누어주면 273.5가 나온다. Knock-down된 개체인 *Dcr/+;NP1-GAL4/UAS-Pss*^{RNAi} 의 개체 수 인 108을 273.5로 나누고 100을 곱하면 39.49%의 성체 우화율 결과값이 나온다.

*Su(H)-GAL4*와 *Prospero-GAL4*를 사용하여 *Pss* 유전자를 Knock down 하였을 때 초파리는 성체로 우화하지 못하여 성체 우화율을 0%로 나타내었다. *Dl-GAL4*, *esg-GAL4*, 그리고 *NP1-GAL4*를 사용한 경우에는 성체로 우화 하였으나 *esg-GAL4*와 *NP1-GAL4*는 온전히 성체로 우화하지 못하였고 성체 우화율은 각각 33.73%, 39.49% 였다(표 3).

5가지 GAL4 line Knock down 실험 결과 번데기 및 성체 시기에 크기가 감소하는 것은 *NP1-GAL4* 한가지였다. 특히 EC 세포 특이적인 *NP1-GAL4*의 *Pss* 유전자 Knock down의 경우 암컷의 성체 우화율은 56.98%인 것에 비해 수컷의 성체 우화율은 8.16%로 약 7배의 차이를 보였다.

2. 초파리 3령 유충 장에서 *Pss* 유전자와 EC 세포 발현 위치

초파리의 3령 유충의 장에서 *Pss* 유전자가 발현되는 위치와 EC 세포가 발현되는 부분이 겹치는지를 면역조직화학 염색법을 통해 확인하였다. 실험 결과 초파리 장에서 *Pss* 유전자가 발현되는 copper cell 지역에서 EC세포와 공통으로 발현되는 부분이 다수 존재하였다.

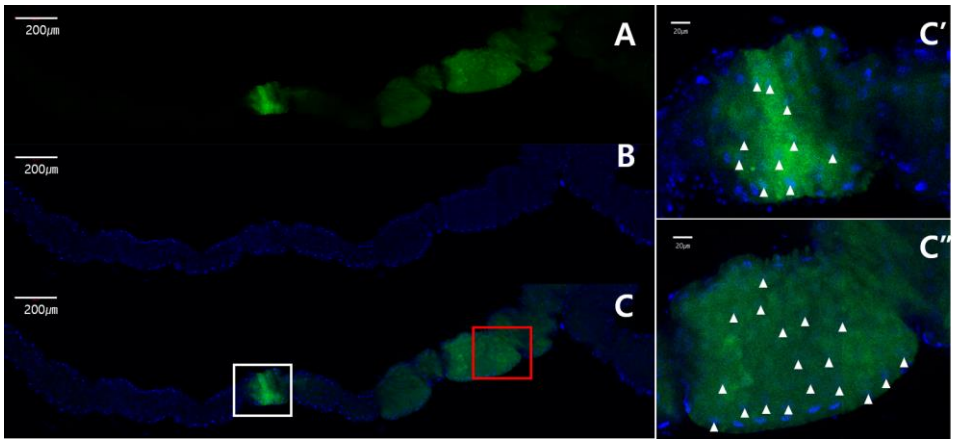

그림 9. 초파리 3령 유충 장에서 *Pss* 유전자 발현 위치와 EC 발현 위치
(A) 초파리 3령 유충 장의 *Pss* 발현 (B) 3령 유충 장의 EC 세포 발현 (C) A와B 병합 사진.Scale bar, 200㎛ (C'),(C") copper cell 지역 확대 사진. 흰색 화살표; EC와 *Pss* 유전자가 겹쳐서 나타나는 위치. Scale bar, 20㎛

3. 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 *Pss* 유전자 발현량

*NP1-GAL4*로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 한 개체가 실제로 *Pss* 유전자의 발현이 제대로 감소하였는지 qRT-PCR을 통해 확인하였다. 실험 결과 EC 세포 특이적으로 *Pss* 유전자 발현이 Knock down 된 초파리에서 *Pss* 유전자의 발현이 대조군 초파리(*NP1*/+)에 비해 약 72% 감소함을 보였고 이는 통계적으로 유의미한 차이를 보였다(그림 10).

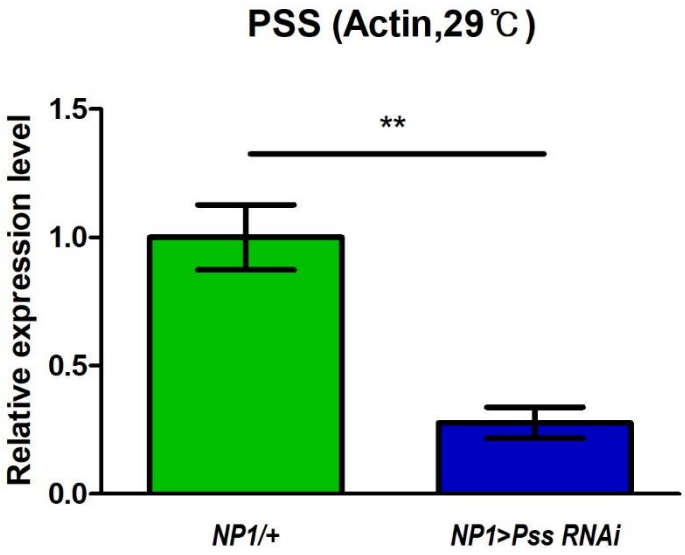

그림 10. 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 *Pss* 유전자의 상대적 발현량. n=10 (**p<0.005)

4. 번데기 단계에서 *Pss* 돌연변이에 의한 발육 부진

EC 세포 특이적 GAL4 line인 *NP1-GAL4*를 이용하여 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 하였을 경우 번데기 시기에 왜소증과 같은 성장 이상 표현형을 나타내었다(그림 11-A). 이를 Image J를 사용하여 번데기의 최대 면적을 측정하고 비교하였다(그림 11-B, 11-C). 또한 번데기의 지름과 입부터 항문까지의 세로 길이를 측정하고 부피를 계산하여 성장 이상의 표현형을 확인하고 정량화 하였다(그림 10-D, 10-E). 두 가지 실험 모두 25℃에서 진행한 뒤 돌연변이 표현이 최대로 나타나는 29℃에서 *NP1-GAL4*로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down하여 번데기의 최대 면적과 부피를 측정하였다. 대조군으로는 *NP1-GAL4*의 수컷과 Canton-S 미교배 암컷을 교배한 자손 세대를 사용하였다.

정량화 결과, 25℃에서는 GAL4 line 대조군에 비해 *NP1-GAL4*로 Knock down된 번데기의 크기는 약 29% 감소하였고 29℃에서는 33%정도 감소하였다(그림 11-B, 11-C). 두 가지 모두 통계적으로 유의미한 결과를 나타내었다. 또 한 추가적으로 번데기의 지름(diameter)과 입부터 항문에 이르는 세로 길이(length)를 측정하고 번데기 부피를 구하는 공식에 적용하여 계산해준다 (Layalle et al., 2008). 부피 측정 결과 GAL4 line 대조군에 비해 *NP1-GAL4*로 Knock down된 번데기의 크기는 25℃와 29℃ 모두에서 34%정도 감소한 결과를 보였다(그림 11-D, 11-E).

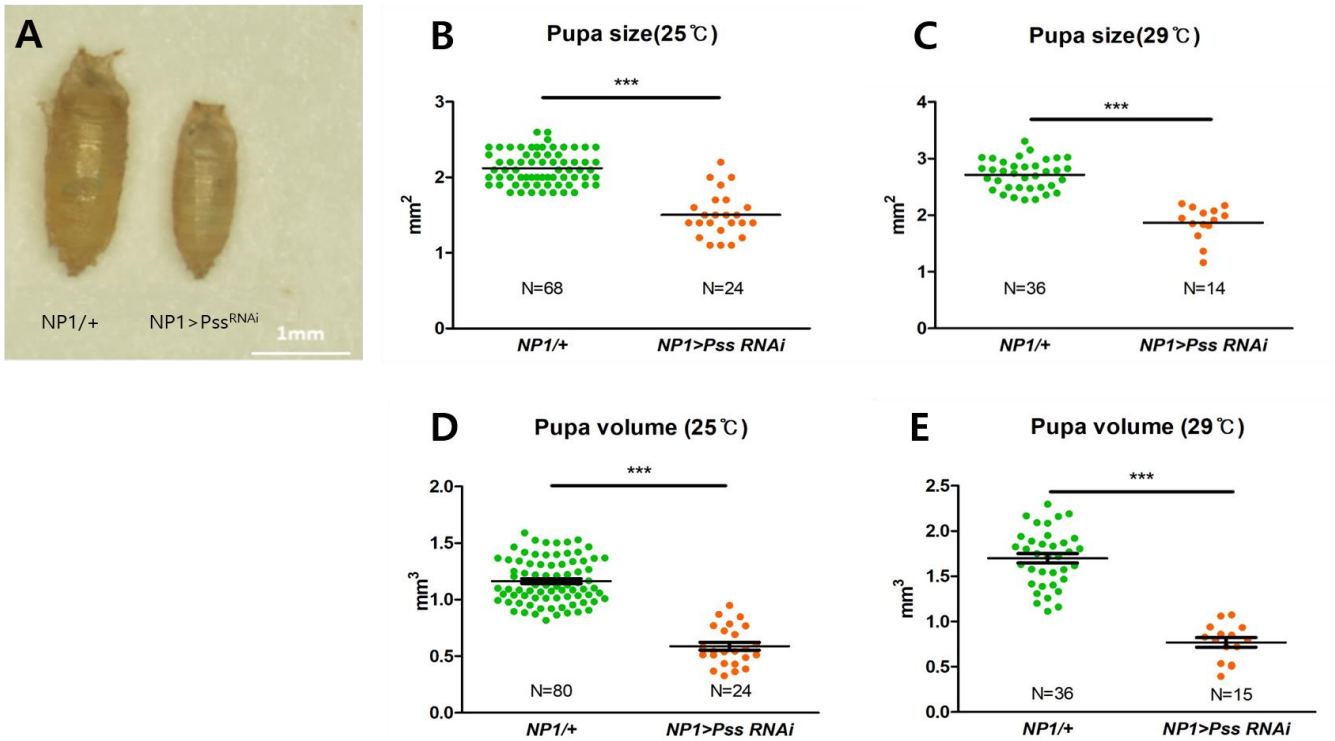

그림 11. 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 번데기 시기 발육 부진

(A) *NP1-GAL4*로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 하였을 때 나타나는 번데기 발육 부진 표현형 대표사진(Scale bar, 1mm). (B, C) *NP1-GAL4*로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 하였을 때 번데기의 최대 면적 비교 및 정량화(B: 25℃, C: 29℃). (D, E) *NP1-GAL4*로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 하였을 때 번데기의 부피 비교 및 정량화(D: 25℃, E: 29℃). (Volume = $4/3\pi(L/2)(l/2)^2$ (L, length; l, diameter)). (***$p<0.0001$).

5. 성체에서 *Pss* 돌연변이에 의한 발육 부진

EC 세포 특이적으로 *Pss* 유전자 발현이 Knock down된 개체는 번데기뿐만 아니라 성체의 크기도 대조군과 비교하였을 때 암컷과 수컷 모두에서 왜소증 같은 성장 이상의 표현형을 나타내었다(그림 12-A, 12-B). 성체 시기의 경우는 *Pss* 유전자 발현 Knock down 개체를 수컷과 미교배 암컷으로 구분하고 10마리씩 모아서 전자저울을 통해 무게를 측정하여 발육 부진 표현형을 비교하고 정량화 하였다(그림 12-B, 12-D).

정량화 결과, 25℃에서 EC 세포 특이적으로 *Pss* 유전자 발현이 Knock down된 수컷 돌연변이의 무게가 대조군과 비교하였을 때 약 26% 감소하였다. 같은 온도에서 암컷 돌연변이의 경우 무게가 약 31% 감소한 결과를 보였다(그림 12-B, 12-D). 29℃에서 EC 세포 특이적으로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 하였을 때 수컷의 경우 돌연변이 초파리가 성체까지 우화되는 비율이 극히 낮기 때문에 29℃에서 성체의 무게를 통한 발육 부진 표현형을 확인할 수 없었다.

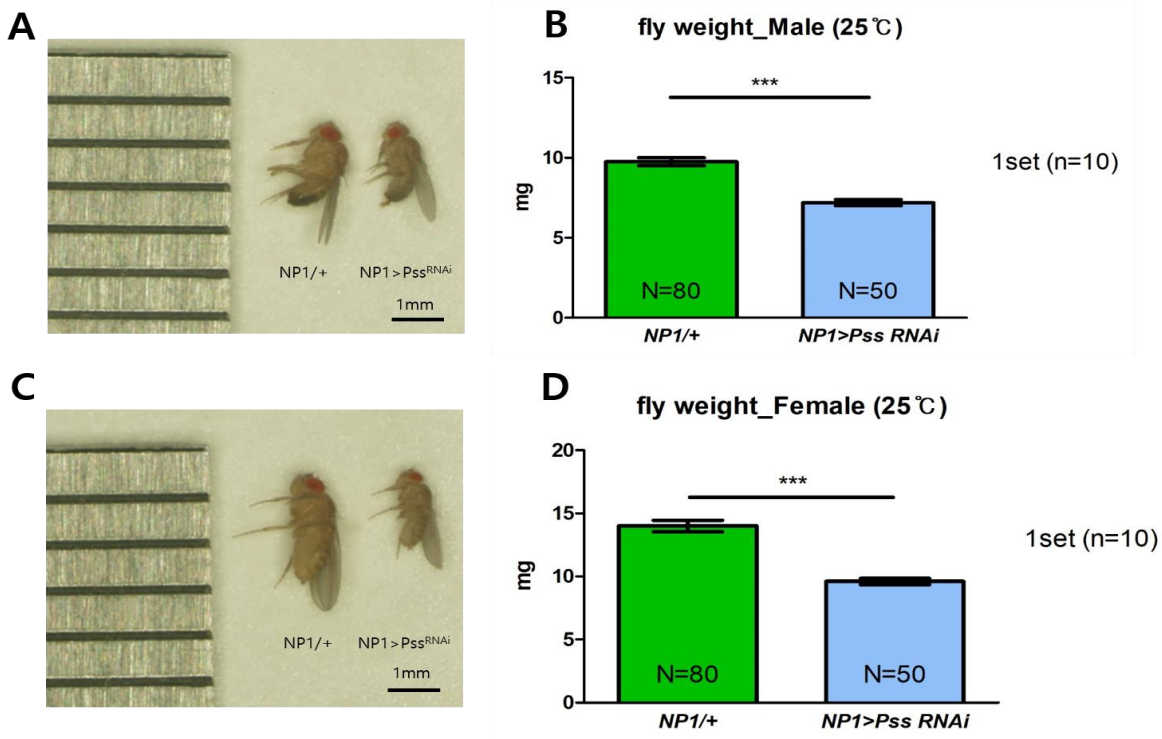

그림 12. 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 성체 시기 발육 부진

(A, C) *NP1-GAL4*로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 하였을 때 나타나는 성체 발육 부진 표현형 대표사진 (A: Male, C: Female. Scale bar, 1mm) (B) *NP1-GAL4*로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 하였을 때 수컷 성체의 무게 감소 비율 정량화(1set(n=10)). (D) *NP1-GAL4*로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 하였을 때 암컷 성체의 무게 감소 비율 정량화 (1set(n=10)). (***$p<0.0001$).

6. 장세포 특이적 *Pss* 돌연변이의 생존율

EC 세포에서 *Pss* 유전자 발현이 초파리 수명에 미치는 영향을 확인하기 위해 초파리의 수명을 측정하였다(그림 13). *NP1-GAL4*로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 한 개체가 성체로 우화되기 시작할 때 24시간을 기준으로 같은 일자의 수컷 초파리와 미교배 암컷 초파리를 각각 수집하였다. 해당 초파리를 관병에 옮겨 담아 29℃ 인큐베이터에서 키우며 수명을 측정하였다(그림 13-A, 13-C). *NP1-GAL4* 수컷과 *Canton-S* 미교배 암컷을 교배하여 얻은 자손 세대를 GAL4 line 대조군으로 사용하였다. 또 한 초파리의 최종 생존 일자와 해당 초파리 개체수를 곱하고 평균을 구하여 초파리의 평균 수명을 비교하였다. 생존율을 비교하여 봤을 때 대조군에 비해 EC 세포에서 *Pss* 유전자 발현이 Knock down된 돌연변이 초파리가 더 이른 시기에 급격하게 생존율 하락을 보였다. 수컷의 경우 대조군 초파리는 35일 전후로 생존율 그래프 곡선이 급격하게 감소하는 반면, 돌연변이 초파리는 생존율 그래프 곡선이 15일 전후로 급격하게 감소하는 모습을 보였다(그림 13-A). 수컷의 경우 평균 수명은 대조군와 돌연변이 초파리가 각각 36.8일과 18.4일로 확인되었다. 약 50% 정도의 평균수명 차이를 보였다(그림 12-B). 암컷의 경우 대조군 초파리는 50일 전후로 급격하게 치사하는 반면, 돌연변이 초파리는 20일 전후로 급격하게 치사하는 경향을 보인다(그림 13-C). 암컷의 경우 평균 수명은 대조군과 돌연변이 초파리가 각각 49.9일과 22.6일로 확인되었다. 약 55% 정도의 평균수명 차이를 보였다(그림 13-D).

추가적으로 *NP1-GAL4*로 Pss 유전자 발현을 Knock down 시킨 돌연변이 수컷 초파리의 수명을 25℃에서 측정하였다(그림 14-A). 또한 각 관병에서 초파리 개체수가 50% 이하로 감소하는 날인 T_{50} 값을 측정하여 비교하였다(그림 14-B). 25℃에서 대조군 초파리는 36일 기점으로 급격하게 생존율이 떨어지는 반면, 돌연변이 수컷 초파리에서는 24일을 기점으로 급격하게 생존율이 떨어지는 모습을 보였다(그림 14-A). 대조군과 돌연변이 수컷 초파리의 평균 T_{50} 값은 각각 49.8일과 27.6일로 약 45%정도 차이를 보였다(그림 14-B).

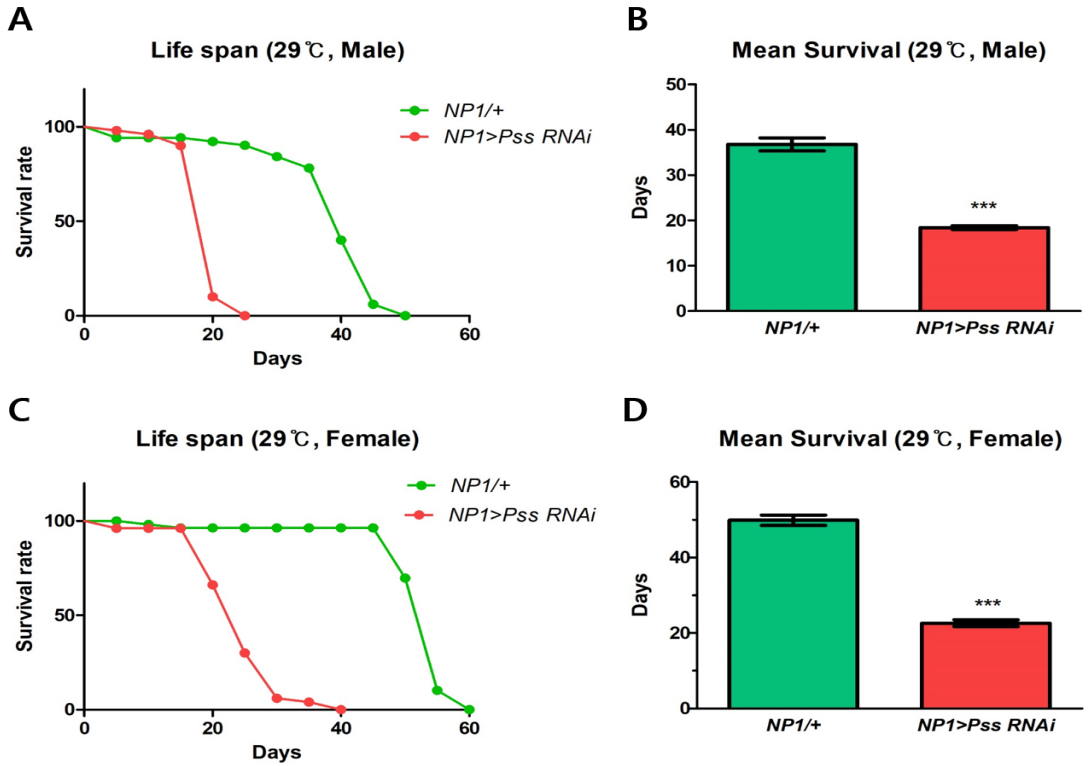

그림 13. 29℃에서 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 생존율 및 평균 수명 그래프

(A)NP1-GAL4로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 한 수컷 초파리의 29℃에서 생존율 그래프. (B) 29℃에서 *Pss* 돌연변이 수컷 초파리의 평균 수명 그래프. (C) NP1-GAL4로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 한 암컷 초파리의 29℃에서 생존율 그래프. (D)29℃에서 *Pss* 돌연변이 암컷 초파리의 평균 수명 그래프. (Log-rank test; $p<0.0001$).(***$p<0.0001$).

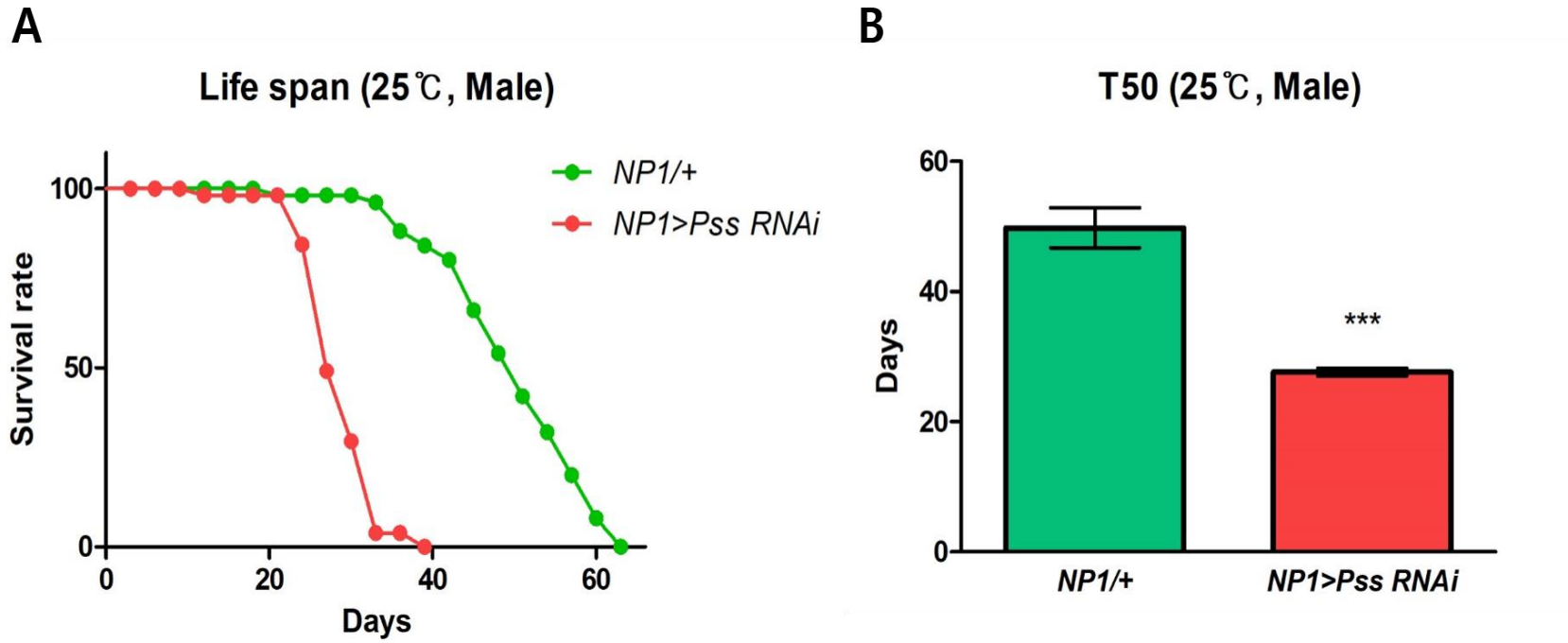

그림 14. 25℃에서 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 생존율 및 T_{50} 그래프

(A)NP1-GAL4로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 한 수컷 초파리의 25℃에서 생존율 그래프. (B)25℃에서 *Pss* 돌연변이 수컷 초파리의 T_{50} 그래프. (Log-rank test; $p<0.0001$).(***$p<0.0001$).

제 3 절 장세포 특이적 *Pss* 돌연변이에서의 성장 관련 *dAkt* 신호 전달 변화

1. qRT-PCR을 통한 RNA 발현량 변화

NP1-GAL4로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 시킨 초파리의 3령 유충 장을 활용하여 실험을 진행하였다. 발생시기 때의 *dAkt*와 그 하위 신호 중 성장과 분화에 관련된 *dFOXO*와 *d4EBP*의 발현량을 qRT-PCR을 통해 확인하였다(그림 15, 16, 17).

qRT-PCR 결과, *dAkt*의 발현량은 EC 세포 특이적으로 *Pss* 유전자 발현이 Knock down 된 초파리와 대조군(*NP1*/+)에서 별다른 차이가 없었다(그림 15). *dFOXO*의 발현량은 대조군(*NP1*/+)에 비해 Knock down 돌연변이 초파리에서 약 3.49배 증가한 결과를 보였다. 이는 통계적으로 유의미하였다(그림 16).

마지막으로 *d4EBP*의 경우, 그 발현량이 대조군(*NP1*/+)에 비해 Knock down 돌연변이 초파리에서 약 1.98배 증가하였다. 이 차이는 통계적으로 유의미하였다(그림 17).

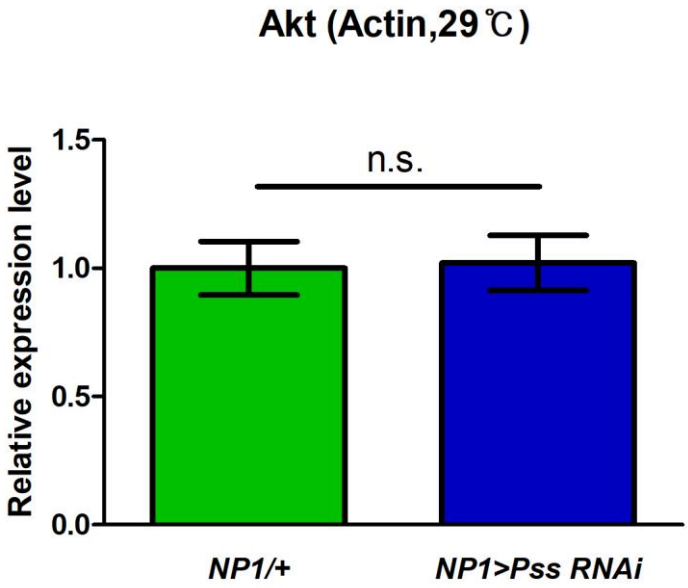

그림 15. 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 *dAkt* 유전자의 상대적 발현량. n=12 (p>0.5, n.s.)

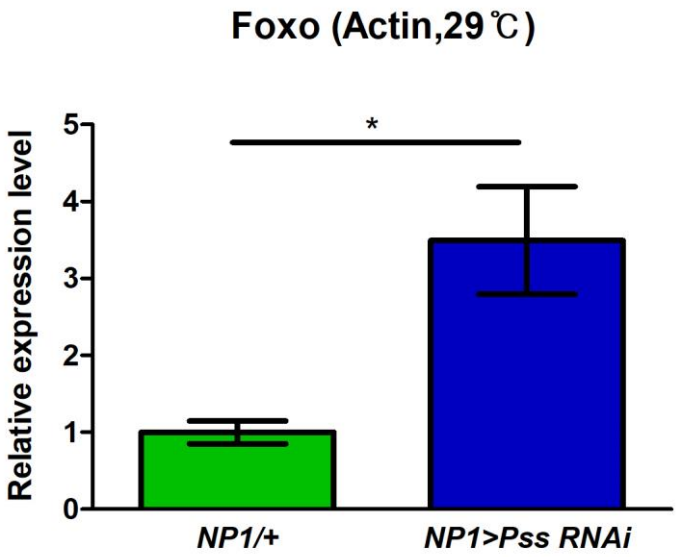

그림 16. 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 *dFOXO* 유전자의 상대적 발현량. n=12 (*p<0.05)

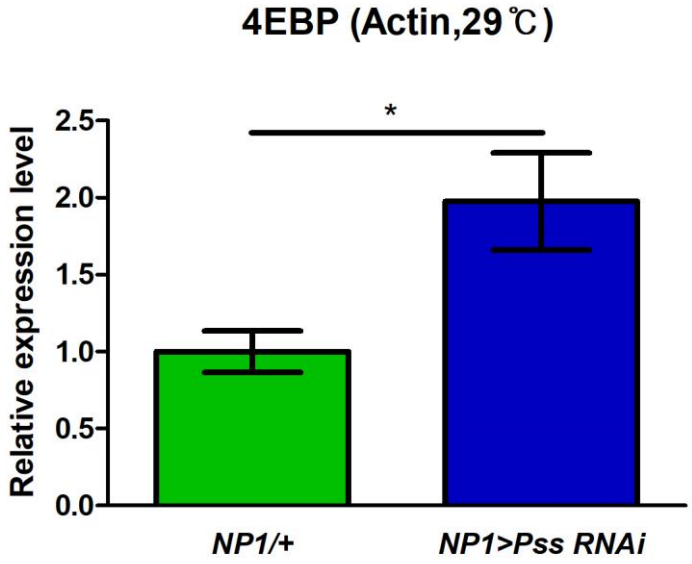

그림 17. 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이의 *d4EBP*유전자의 상대적 발현량. n=12 (*p<0.05)

2. Western blot을 통한 단백질 발현량 변화

NP1-GAL4로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 시킨 초파리와 대조군 초파리(NP1/+)의 3령 유충 장을 통해 Akt의 활성형인 pAkt 단백질의 양을 western blot 을 통해 확인하였다. 실험 결과 *Pss* 유전자 Knock down 초파리에서 pAkt의 단백질 양이 감소하였음을 확인하였다(그림 18)

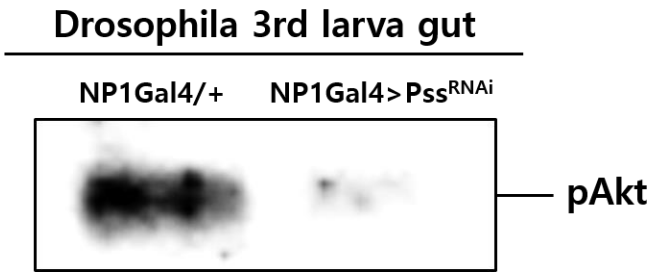

그림 18. 장세포 특이적 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이 pAkt 단백질 발현량 pAkt의 크기는 약 65kDa에 위치하였다.

제 4 절 *dAkt^{c}(Akt constant)* 돌연변이를 이용한 *Pss* 돌연변이 회복 양상

*dAkt*가 지속적으로(constant) 발현되는 *dAkt^{c}* 돌연변이(*w*;P{UAS−myr−Akt.$^{\Delta PH}$}3/TM3,Sb^{1})와 EC세포 특이적인 *NP1−GAL4*를 재조합하여 하나의 개체에 존재하는 *NP1/Cyo;Akt^{c}/TM6B,Tb^{1}*를 만들었다(그림 7). 그 후 25℃에서 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 시켜 기존의 Knock down 돌연변이(*NP1/UAS−Pss^{RNAi}*)와 비교하여 회복 양상을 성체 우화율을 통해 확인해 보았다(표 4, 5).

25℃에서 EC 세포 특이적으로 *Pss* 유전자를 Knock down 하였을 때 수컷과 암컷 돌연변이 초파리는 각각 40.7%, 77.44%가 성체로 우화하였고 전체적으로는 63.55%가 성체로 우화하였다(표 4).

반면 *NP1−GAL4*와 *dAkt^{c}* 돌연변이가 재조합된 초파리로 *Pss* 유전자를 Knock down 하였을 때 성체 우화율은 수컷과 암컷 각각 68.57%, 102.43%로 나타났고 전체적으로는 86.84%의 초파리가 성체로 우화하였다(표 5). 수컷의 경우 약 28%, 암컷의 경우 약 25% 성체 우화율의 증가를 확인할 수 있었다. 전체적으로는 약 23%의 성체 우화율 증가를 보였다.

표 4. 25℃에서 장세포 특이적으로 *Pss* 유전자 Knock down 하였을 때 성체 우화율

25℃	EC (NP1-GAL4)		
Gal4> *Pss*^{RNAi}	63.55%		
	Gal4> *Pss*^{RNAi} (K.D)	Not K.D	viability
Male	89	348	40.73%
Female	278	440	77.44%
Total	367	788	63.55%

표 5. 25℃에서 *dAkt*^{c}를 재조합하여 장세포 특이적으로 *Pss* 유전자 Knock down 하였을 때 성체 우화율

25℃	EC (NP1-GAL4)		
Gal4> *Pss*^{RNAi} ,Akt^{c}	86.84%		
	Gal4> *Pss*^{RNAi} , Akt^{c} (Rescue)	Not Rescue	viability
Male	4	31	68.57%
Female	7	34	102.43%
Total	11	65	86.84%

제 4 장 고 찰

포유류에서 *Pss* 유전자 돌연변이가 발생하는 경우 배아 시기에 치사되거나 발육 부진과 같은 성장 이상을 확인하였으나 초파리의 *Pss* 유전자를 활용한 발생과 성장 관련 연구는 찾아보기 어렵다. 본 연구실의 선행연구에서 조직 특이적 GAL4 line을 활용하여 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 하는 Screening 실험을 진행하였을 때 지방체와 중장의 장세포 특이적인 GAL4 line에서 초파리 성체 크기의 감소를 발견하였다. 이에 본 연구에서는 초파리의 장세포 특이적인 GAL4 line(*NP1-GAL4*)을 활용하여 초파리의 발생과 성장에서 *Pss* 유전자가 미치는 영향에 대해 살펴보고자 하였다. *NP1-GAL4*의 경우 초파리의 침샘과 장에서 전체적으로 발현이 되는데 사전 연구 결과 침샘 특이적인 *AB-GAL4*의 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 시킨 경우 Viable 한 성체 우화율을 나타내었고 번데기와 성체에서의 크기 감소 또 한 관찰되지 않았기 때문에 *NP1-GAL4*의 장 발현에 초점을 맞추어 실험을 진행하였다.

Pss 유전자가 발생단계에서 장의 어느 위치에 발현되는지를 Pss^{72}*-Gal4/UAS-GFP.nls(II)*로 확인해보았다. 해당 개체의 3령 유충의 장을 추출하여 관찰한 결과 전장 부분의 GC 부위에 일부 발현이 나타나고 중장의 copper cell 지역 근처와 그 바로 뒤쪽에서 형광 발현을 확인하였다. Copper cell의 뒤쪽 부위는 기능 중 하나는 cell cycle을 조절하는 것인데 해당 부위에서 돌연변이가 발생하면 세포의 분화 및 성장이 제대로 일어나지 못할 것으로 생각된다(Marianes et al., 2013). 또 한 *NP1-GAL4*로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 시킨 개체의 3령 유충의 GC부위의 손가락 모양 가닥들이 대조군(*NP1*/+)에 비해 상당히 짧아진 모습을 나타내기도 하였다. EC 세포는 장 전체에 골고루 분포되어 있고 주요 기능이 양분흡수라고 알려져 있다 (Loza-Coll et al., 2014). 하지만 Pss^{72}*-Gal4/UAS-GFP.nls(II)* 로 살펴보았을 때 *Pss*는 장의 극히 일부분에만 발현되어 있기 때문에 단순히 양분을 제대로 흡수하지 못하여 발육 부진과 같은 성장 이상이 일어난 것으로 보이진 않는다. 29℃에서 EC 세포 특이적으로 *Pss* 유전자 발현을 억제하였을 때 치사율이 60% 이상 나타난 것으로 보아 *Pss*가 초파리의 장세포에서 단순히 양분을 제대로 흡수하도록 하는 것이 아니라 발생 단계에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

Pss 유전자가 장에서 발현되는 부위에 GFP 항체 염색을 하고 EC 세포가 발현되는 위치를 DAPI 염색을 통해 확인하였다. EC 세포는 장을 구성하는 세포들과 구분될 정도의 큰 핵을 갖고 있어 DAPI 염색을 통해 EC를 확인하기도 한다(Loza-Coll et al., 2014). 실험 결과 *Pss* 유전자와 EC 세포가 3령 유충의 장에 copper cell 지역에서 상당 부분 겹쳐서 발현되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 앞서 연구한 것과 같이 *Pss* 발현이 cell cycle 조절에 영향을 주어 세포의 성장과 분열에 영향을 미치고 있음을 나타낸다.

Pss 유전자가 EC세포에서 Knock down 이 제대로 되었는지 확인하기 위해 *Pss* primer를 이용하여 qRT-PCR을 실행하여 *Pss* 유전자 발현량 변화를 확인해보았다. 대조군에 비해 Knock down 돌연변이의 *Pss* 유전자 발현량이 72% 이상 감소하였음을 확인하였다

EC 세포 특이적으로 *Pss* 유전자를 Knock down 하였을 경우 발생 단계에서 개체의 성장이 제대로 이루어지지 못해 크기가 작아지는 성장 이상 표현형을 보였다. 이를 번데기 시기와 성체 시기로 나누어 발육 부진의 정도를 정량화 하였다. 번데기 시기에는 우선 최대 면적을 측정하여 비교하였고 번데기의 지름과 입부터 항문까지의 세로 길이를 측정하여 부피를 계산하여 성장 이상의 표현형을 확인하고 정량화 하였다. 성체 시기의 경우는 몸의 길이를 측정하여 비교하기도하지만 이산화탄소로 마취를 하였을 때 성체의 몸이 굽혀져 있거나 다리와 날개의 형태가 일정하지 않아 성체 무게를 측정하여 성장 이상 표현형을 확인하였다. 성체의 경우 29℃에서 수컷의 우화율이 약 8%로 매우 낮기 때문에 개체를 수집하는데 어려움이 있어 성체 무게 측정은 25℃에서 발생한 개체들을 대상으로 진행하였다. 또 한 성체의 발육 부진 표현형을 초파리의 날개 크기를 통해서 확인하기도 하여 해당 실험을 진행하였다. 초파리 날개의 정맥부분들이 교차되는 지점을 기준으로 길이와 폭을 측정하였는데 EC 세포에서 *Pss* 유전자의 발현이 억제된 돌연변이에서 감소되지 않고 대조군과 유의미한 차이가 없었다 (Lack et al., 2016). 실험을 진행하면서 Knock down 돌연변이(*NP1/UAS-Pss*^{RNAi})의 경우 대조군(*NP1/+*)이나 같은 관병 속의 Knock down 되지 않은 개체(*NP1/CTG*)에 비해 발생의 속도가 느린 것으로 보였다. 최근 이와 관련하여 사람의 *Ptdss1* 돌연변이에서 발달 지연을 보인다는 연구결과가 나왔다(Gracie et al., 2022). 초파리의 *NP1-GAL4*의 *Pss* 유전자 Knock down 에서도 이러한 발달 지연에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

이러한 성장 이상은 단순히 개체의 크기를 감소시키는 것 뿐만 아니라 개체의 수명에도 영향을 주었다. 대조군에 비해 EC 세포에서 *Pss* 유전자의 발현이 억제된 돌연변이는 25℃와 29℃ 모두에서 수명이 감소되었음을 확인하였다. 29℃에서 평균 수명을 측정한 결과 암컷과 수컷 모두에서 50% 이상의 평균 수명의 차이를 보였다. 또 한 25℃에서 개체의 수가 절반 이하로 감소하는 시기인 T_{50} 값을 측정하여 비교한 결과 대조군에 비해 Knock down 돌연변이의 경우 약 45% 감소하였음을 확인하였다. 이는 초파리 장세포에서 *Pss* 유전자가 성체 이후의 단계에서도 생존과 관련하여 중요한 역할을 하고 있음을 제시해 준다.

장세포 특이적 NP1-GAL4 line으로 *Pss*를 Knock down 하였을 때 어떠한 경로를 통해 개체의 발육 부진과 같은 성장 이상이 나타나는지를 확인하고자 하였다. PS는 음전하는 띠는 특성을 활용하여 각종 신호 전달 관련 단백질들과 상호작용을 하고 활성화 등의 신호 전달 체계에 관여를 한다(Yeung et al., 2008). Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt, Ras/Raf, protein kinase C (PCK) 등 의 신호 전달 체계에 관여를 한다(Akbar et al., 2005; Improta-Brears et al., 1999; Johnson et al., 2000). 이들 중 Akt 신호 전달 경로가 주로 세포의 성장과 분화에 중요한 역할을 한다. PS는 Akt와 phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate(PIP3)의 결합을 촉진하고 Akt의 pleckstrin homology(PH) 및 regulatory do- main(RD)의 특정 잔기와 상호작용을 하여 Akt의 활성을 유도한다 (Huang et al., 2011). 또한 초파리에서 *dAkt*의 기능의 상실을 유도하였을 때 세포 크기가 감소하였다는 연구결과와 초파리의 침샘에서 *Pss* 유전자 특이적으로 Knock down 하였을 때 *dAkt* 신호 전달 단백질의 활성도 감소하고 침샘의 세포 크기가 감소한 연구 결과도 존재하여 dAkt의 신호 전달 경로를 선정하여 연구를 진행하였다(Cavaliere et al., 2005; Yang et al., 2019).

*dAkt*의 경우 다양한 하위 신호 전달 경로로 뻗어나가는데 그 중 신호 말단의 한 가지인 *d4EBP*가 세포의 성장 및 분화를 억제하는 역할을 하고 있기 때문에 dFoxo와 *d4EBP*로 이어지는 신호 전달 경로를 선정하여 살펴보았다(Jünger et al., 2003; Puig et al., 2003).

qRT-PCR 실험을 통해 장세포 특이적으로 *Pss* 유전자 Knock down된 초파리의 3령 유충 발생 단계에서의 *Akt, Foxo, 4EBP* 발현량을 대조군(*NP1*/+)과 비교하여 살펴보았다. *Akt*의 경우 대조군과

Knock down 돌연변이에서 RNA 발현량에 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 Akt가 활성을 나타낼 때에 인산화되어 pAkt의 형태가 되는데 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 하였을 때 전체 Akt의 총량이 변화하는 것이 아니라 활성 형태인 pAkt가 감소한 것이기 때문에 qRT-PCR 실험결과에는 큰 차이가 없었던 것으로 보인다.

Western blot 실험 결과 장세포 특이적으로 *Pss* 유전자를 Knock down 시킨 돌연변이에서 pAkt의 발현량이 감소하였음을 확인하였다. Foxo의 경우도 Akt와 마찬가지로 활성의 형태가 변하는 것이기 때문에 qRT-PCR 결과에는 큰 차이가 없을 것으로 예상하였지만 실험 결과 *Foxo*의 발현량이 약 3.49배 증가한 것으로 나타났다. 이는 Foxo가 Akt 뿐만 아니라 다른 여러가지 상위 신호의 영향을 받기 때문인 것으로 보인다. *4EBP*의 경우 Knock down 돌연변이에서 약 1.98배 증가한 것으로 나타났다. *NP1-GAL4*로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 시킨 돌연변이에서 발육 부진과 같은 성장 이상 표현형을 보였는데 이것은 *4EBP*가 세포의 성장과 분화를 억제한다는 것에 부합하는 결과로 보인다.

EC 세포 특이적으로 *Pss* 유전자의 발현을 Knock down 하였을 때 나타나는 발육 부진과 같은 성장 이상이 Akt에서 시작되어 *4EBP*까지 이어지는 신호 전달 경로에 문제가 생겨 발생한 것이라면 억제된 Akt신호가 다시 작동하도록 해주면 돌연변이의 회복 양상을 확인할 수 있을 것이다.

Akt 신호가 지속적으로 발현되도록 하는 Akt constant($dAkt^c$) 돌연변이를 활용하여 *Pss* 유전자 돌연변이 회복 양상을 확인해 보았다. *NP1-GAL4*와 $dAkt^c$ 를 재조합하여 초파리의 한 개체에 존재하도록 만들고(*NP1/Cyo; $dAkt^c$/TM6B, Tb*) *UAS-Pss^{RNAi}* 를 사용하여 Knock down 돌연변이를 만들고 $dAkt^c$로 회복된 개체(*NP1/UAS-Pss^{RNAi}; $dAkt^c$/+*)와 기존의 Knock down 개체(*NP1/UAS-Pss^{RNAi}*)의 성체 우화율을 비교해보았다. 그 결과 수컷과 암컷에서 각각 28%, 25% 의 성체 우화율 증가를 확인할 수 있었다. 이 결과는 기존의 *Pss* 유전자 Knock down 돌연변이에 의해 PS가 제대로 생성되지 않아 Akt 신호 전달 경로에 문제가 발생하였고, 그 결과 발육 부진 같은 성장 이상 표현형이 나타났을 것이라는 가능성을 제시한다. 다만, $dAkt^c$를 이용하여 회복 돌연변이를 재조합 하는 과정에서 얻고자 하는 개체(*NP1/Cyo; $dAkt^c$/TM6B,Tb*)가 성체로 깨어나지 못하여서 기존의 25℃ 인큐베이터에서 20℃로 옮겨 교배를 진행하였고 그 결과 낮은

확률로 원하는 개체(*NP1/Cyo; dAkt^{c}/TM6B,Tb*)를 얻어 실험을 진행할 수 있었다. *UAS-Akt^{c}* 와 *NP1-GAL4*를 25℃에서 교배하였을 때 100% 치사되는 결과를 나타냈다. 이는 장세포에 Akt 신호가 너무 과하게 작동되면 발생 과정에 문제를 생기는 것으로 보인다. 또한 교배를 통해 새롭게 만든 개체(*NP1/Cyo;dAkt^{c}/TM6B,Tb*)와 *UAS-Pss^{RNAi}*를 29℃에서 교배하였을 때 재조합된 초파리가 치사되거나 해당 관병에서 배아 발생이 관찰되지 않아 25℃ 인큐베이터로 옮겨 교배를 진행하였다. 그 결과 25℃에서 *dAkt^{c}*를 재조합하여 장세포 특이적으로 *Pss* 유전자 Knock down 하였을 때의 성체 우화율을 확인 하였고, 이 결과를 해석하기 위하여 대조군으로 25℃에서 *NP1-GAL4*로 *Pss* 유전자 발현을 Knock down 시킨 것의 성체 우화율 데이터를 사용하였다.

성체 우화율을 통해 *dAkt^{c}*에 의한 Knock down 돌연변이 회복 양상을 확인하였으나, 보다 안정적이고 세대 유지가 가능한 회복 돌연변이를 활용하여 번데기의 크기와 부피, 성체의 무게, 유전자 발현량, 단백질 발현량 등을 비교한 후속 연구가 필요한 것으로 보인다.

본 연구에서는 장세포 특이적으로 *Pss* 유전자의 발현을 Knock down 하였을 때 발육 부진과 같은 왜소증 관련 성장 이상을 보여 이를 번데기 시기와 성체 시기에 정량화하여 확인하였다. 그리고 Knock down 돌연변이의 수명 감소를 확인하였다. 또 한 이러한 발생 과정의 성장 이상을 Akt 신호 전달 경로 중 *4EBP*를 타겟으로 하는 성장 관련 신호 전달 과정의 이상으로 보고 유전자 발현량과 단백질 발현량 그리고 회복 돌연변이 재조합 실험을 통해 확인하였다. 이러한 결과는 *Pss* 유전자를 신경 퇴행성 질환뿐 아니라 발생과 성장의 관점에서도 연구가 필요함을 강조하고, 개체 수준에서의 *Pss* 유전자 돌연변이의 성장 이상 관련 표현형 확인과 더불어 이러한 문제가 Akt 신호 전달 경로의 영향을 받는다는 가능성을 제시한다. 또 한 LMHD와 발달 지연과 같은 *Ptdss1* 유전자 돌연변이 희귀 질환의 치료를 위한 유전자 기능 연구와 유전자 모델 개발의 시발점이 될 수 있을 것이다.

참고 문헌

Akbar, M., Calderon, F., Wen, Z., & Kim, H. Y. (2005). Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102*(31), 10858-10863. doi:10.1073/pnas.0502903102

Arikketh, D., Nelson, R., & Vance, J. E. (2008). Defining the importance of phosphatidylserine synthase-1 (PSS1): unexpected viability of PSS1-deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry, 283*(19), 12888-12897. doi:10.1074/jbc.M800714200

Bergo, O., Gavino, B. J., Steenbergen, R., Sturbois, B., Parlow, A. F., Sanan, D. A., . . . Young, S. G. (2002). Defining the importance of phosphatidylserine synthase 2 in mice. *The Journal of Biological Chemistry, 277*(49), 47701-47708 doi:10.1074/jbc.M207734200

Cavaliere, V., Donati, A., Hsouna, A., Hsu, T., & Gargiulo, G. (2005). dAkt kinase controls follicle cell size during Drosophila oogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists, 232*(3), 845-854 . doi:10.1002/dvdy.20333

Chang, F., Lee, J. T., Navolanic, P. M., Steelman, L. S., Shelton, J. G., Blalock, W. L., Franklin, R. A., McCubrey, J. A. (2003). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia, 17*(3), 590-603. doi:10.1038/sj.leu.2402824

Dyzma, M., Szopa, P., & Kaźmierczak, B. (2012). Membrane associated complexes : new approach to calcium dynamics modelling. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena, 7*(6), 167-186. doi:10.1051/mmnp/20127608

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. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), 148*(7), 2207-2216.

Garcia, C., Ward, G., Ma, C., Salem, N., & Kim, H. Y. (1998). Effect of docosahexaenoic acid on the synthesis of phosphatidylserine in rat brain in microsomes and C6 glioma cells. *Journal of Neurochemistry, 70*(1), 24-30. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70010024.x

Gracie, S., Sengupta, N., Ferreira, C., Pemberton, J., Anderson, I., Wang, X., . . . Larson, A. (2022). De novo loss-of-function variant in PTDSS1 is associated with developmental delay. *American Journal of Medical Genetics. Part A, 188*(6), 1739-1745. doi:10.1002/ajmg.a.62695

Gündner, A. L., Hahn, I., Sendscheid, O., Aberle, H., & Hoch, M. (2014). The PIKE homolog Centaurin gamma regulates developmental timing in Drosophila. *PloS one, 9*(5), e97332. doi:10.1371/journal.pone.0097332

Gupta, A., Toscano, S., Trivedi, D., Jones, D. R., Mathre, S., Clarke, J. H., Divecha, N., Raghu, P. (2013). Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase (PIP4K) regulates TOR signaling and cell growth during Drosophila development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110*(15), 5963-5968. doi:10.1073/pnas.1219333110

Hochreiter-Hufford, A. E., Lee, C. S., Kinchen, J. M., Sokolowski, J. D., Arandjelovic, S., Call, J. A., Klibanov, A. L., Ravichandran, K. S. (2013). Phosphatidylserine receptor BAI1 and apoptotic cells as new promoters of myoblast fusion. *Nature, 497*(7448), 263-267. doi:10.1038/nature12135

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. doi:10.1083/jcb.201005100

Huang, H., Wu, W., Zhang, L., & Liu, X. Y. (2013). Drosophila ste-20 family protein kinase, hippo, modulates fat cell proliferation. *PloS one, 8*(4), e61740. doi:10.1371/journal.pone.0061740

Improta-Brears, T., Ghosh, S., & Bell, R. M. (1999). Mutational analysis of Raf-1 cysteine rich domain: requirement for a cluster of basic aminoacids for interaction with phosphatidylserine. *Molecular and Cellular Biochemistry, 198*(1-2). doi:10.1023/a:1006981411691

Johnson, J. E., Giorgione, J., & Newton, A. C. (2000). The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry, 39*(37), 11360-9. doi:10.1021/bi000902c

Jünger, M. A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J. D., Végh, M., Radimerski, T., Greenberg, M. E., Hafen, E. (2003). The Drosophila forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *Journal of Biology, 2*(3), 20. doi:10.1186/1475-4924-2-20

Kandel, E. S., Skeen, J., Majewski, N., Di Cristofano, A., Pandolfi, P. P., Feliciano, C. S., Gartel, A., Hay, N. (2002). Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Molecular and Cellular Biology, 22*(22), 7831-41. doi:10.1128/MCB.22.22.7831-7841.2002

Kim, H. Y., Huang, B. X., & Spector, A. A. (2014). Phosphatidylserine in the brain: metabolism and function. *Progress in Lipid Research, 56*, 1-18. doi:10.1016/j.plipres.2014.06.002

Kondo, S., & Ueda, R. (2013). Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in Drosophila. *Genetics, 195*(3), 715-21. doi:10.1534/genetics.113.156737

Lack, J. B., Yassin, A., Sprengelmeyer, Q. D., Johanning, E. J., David, J. R., & Pool, J. E. (2016). Life history evolution and cellular mechanisms associated with increased size in high-altitude Drosophila. *Ecology and Evolution, 6*(16), 5893-5906. doi:10.1002/ece3.2327

Layalle, S., Arquier, N., & Léopold, P. (2008). The TOR pathway couples nutrition and developmental timing in Drosophila. *Developmental Cell, 15*(4), 568-77. doi:10.1016/j.devcel.2008.08.003

Lenz, W. D., & Majewski, F. (1974). A generalized disorders of the connective tissues with progeria, choanal atresia, symphalangism, hypoplasia of dentine and craniodiaphyseal hypostosis. *Birth Defects Original Article Series, 10*(12), 133-6.

Lian, T., Wu, Q., Hodge, B. A., Wilson, K. A., Yu, G., & Yang, M. (2018). Drosophila Gut-A Nexus Between Dietary Restriction and Lifespan. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3810. doi:10.3390/ijms19123810

Linford, N. J., Bilgir, C., Ro, J., & Pletcher, S. D. (2013). Measurement of lifespan in Drosophila melanogaster. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*(71), 50068. doi:10.3791/50068

Loza-Coll, M. A., Southall, T. D., Sandall, S. L., Brand, A. H., & Jones, D. L. (2014). Regulation of Drosophila intestinal stem cell maintenance and differentiation by the transcription factor Escargot. *The EMBO Journal, 33*(24), 2983-2996. doi:10.15252/embj.201489050

Farhan, M., Silva, M., Xingan, X., Huang, Y., & Zheng, W. (2020). Role of FOXO Transcription Factors in Cancer Metabolism and Angiogenesis. *Cells, 9*(7), 1586. doi:10.3390/cells9071586

Marianes, A., & Spradling, A. C. (2013). Physiological and stem cell compartmentalization within the Drosophila midgut. *eLife,* 2,

e00886. doi:10.7554/eLife.00886
Mîinea, C. P., Sano, H., Kane, S., Sano, E., Fukuda, M., Peränen, J., Lane, W. S., Lienhard, G. E. (2005). AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *The Biochemical Journal, 391*(Pt 1), 87-93. doi:10.1042/BJ20050887
Park, Y. J., Kim, S., Shim, H., Park, J. H., Lee, G., Kim, T. Y., . . . Jeon, S. H. (2021). Phosphatidylserine synthase plays an essential role in glia and affects development, as well as the maintenance of neuronal function. *iScience, 24*(8), 102899. doi:10.1016/j.isci.2021.102899
Pham, J. W., Pellino, J. L., Lee, Y. S., Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2004). A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in Drosophila. *Cell, 117*(1), 83-94. doi:10.1016/s0092-8674(04)00258-2
Ponton, F., Chapuis, M. P., Pernice, M., Sword, G. A., & Simpson, S. J. (2011). Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in Drosophila melanogaster. *Journal of Insect Physiology, 57*(6), 840-50. doi:10.1016/j.jinsphys.2011.03.014
Puig, O., Marr, M. T., Ruhf, M. L., & Tjian, R. (2003). Control of cell number by Drosophila FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes & Development, 17*(16), 2006-20. doi:10.1101/gad.1098703
Robertson, H. M., Preston, C. R., Phillis, R. W., Johnson-Schlitz, D. M., Benz, W. K., & Engels, W. R. (1988). A stable genomic source of P element transposase in Drosophila melanogaster. *Genetics, 118*(3), 461-70. doi:10.1093/genetics/118.3.461
Rodriguez-Jato, S., Busturia, A., & Herr, W. (2011). Drosophila melanogaster dHCF interacts with both PcG and TrxG epigenetic regulators. *PloS one, 6*(12), e27479. doi:10.1371/journal.pone.0027479
Schultze, S. M., Hemmings, B. A., Niessen, M., & Tschopp, O. (2012). PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis. *Expert Reviews in Molecular Medicine,* 14, e1. doi:10.1017/S1462399411002109
Shiojima, I., & Walsh, K. (2002). Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circulation Research, 90*(12), 1243-50. doi:10.1161/01.res.0000022200.71892.9f
Sohn, M., & Balla, T. (2016). Lenz-Majewski syndrome: How a single mutation leads to complex changes in lipid metabolism. *Journal of Rare Diseases Research & Treatment, 2*(1), 47-51. doi:10.29245/2572-9411/2017/1.1080

Sousa, S. B., Jenkins, D., Chanudet, E., Tasseva, G., Ishida, M., Anderson, G., . . . Moore, G. E. (2014). Gain-of-function mutations in the phosphatidylserine synthase 1 (PTDSS1) gene cause Lenz-Majewski syndrome. *Nature Genetics, 46*(1), 70-6. doi:10.1038/ng.2829

Stone, J., & Vance, E. (1999). Cloning and expression of murine liver phosphatidylserine synthase (PSS)-2: differential regulation of phospholipid metabolism by PSS1 and PSS2. *The Biochemical Journal, 342 (Pt 1)*(Pt 1), 57-64.

Stone, J., & Vance, J. E. (2000). Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. *The Journal of Biological Chemistry, 275*(44), 34534-40. doi:10.1074/jbc.M002865200

Tamhankar, P. M., Vasudevan, L., Bansal, V., Menon, S. R., Gawde, H. M., D'Souza, A., . . . Das, D. K. (2015). Lenz-Majewski syndrome: Report of a case with novel mutation in PTDSS1 gene. *European Journal of Medical Genetics, 58*(8), 392-9. doi:10.1016/j.ejmg.2015.06.002

Teleman, A. A., Chen, Y. W., & Cohen, S. M. (2005). 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes & Development, 19*(16), 1844-8. doi:10.1101/gad.341505

van den Eijnde, S. M., van den Hoff, M. J., Reutelingsperger, C. P., van Heerde, W. L., Henfling, M. E., Vermeij-Keers, C., . . . Ramaekers, F. C. (2001). Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *Journal of Cell Science, 114*(Pt 20), 3631-42. doi:10.1242/jcs.114.20.3631

van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular Cell Biology, 9*(2), 112-24. doi:10.1038/nrm2330

Vance, E., & Steenbergen, R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Progress in Lipid Research, 44*(4), 207-34. doi:10.1016/j.plipres.2005.05.001

Vance, J. E. (2008). Phosphatidylserine and phosphatidylethanol amine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *Journal of Lipid Research, 49*(7), 1377-87. doi:10.1194/jlr.R700020-JLR200

Vance, J. E., & Tasseva, G. (2013). Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta, 1831*(3), 543-54. doi:10.1016/j.bbalip.2012.08.016

Voelker, D. R. (1985). Disruption of phosphatidylserine translocation

to the mitochondria in baby hamster kidney cells. *The Journal of Biological Chemistry, 260*(27), 14671-6.

Wenk, M. R., & Camilli, P. D. (2004). Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101*(22), 8262-9. doi:10.1073/pnas.0401874101

Wymann, M. P., & Schneiter, R. (2008). Lipid signalling in disease. *Nature reviews. Molecular Cell Biology, 9*(2), 162-76. doi:10.1038/nrm2335

Yang, X., Liang, J., Ding, L., Li, X., Lam, S. M., Shui, G., . . . Huang, X. (2019). Phosphatidylserine synthase regulates cellular homeostasis through distinct metabolic mechanisms. *PLoS Genet, 15*(12), e1008548. doi:10.1371/journal.pgen.1008548

Yao, Y., Ding, L., & Huang, X. (2019). Diverse Functions of Lipids and Lipid Metabolism in Development. *Small Methods,* 4(7), 1900564. doi:10.1002/smtd.201900564

Yeung, T., Gilbert, G. E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A., & Grinstein, S. (2008). Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science (New York, N.Y.), 319*(5860), 210-213. doi:10.1126/science.1152066

김관영. (2021). 초파리 배아 및 유충 발생 시기에 나타나는 *Pss* 유전자 돌연변이에 관한 연구. *서울 : 서울대학교 대학원, 서울*

김성경. (2019). 초파리 *Ptdss1* 유전자 돌연변이에 의한 미토콘드리아 이상 및 세포사멸 연구. *서울 : 서울대학교 대학원, 서울*

Abstract

Mutation of *Drosophila melanogaster* Phosphatidylserine Synthase (*Pss*) gene in Midgut Causes Abnormal Growth

Sun Woo Yeom
Biology major
Department of Science Education
The Graduate School
Seoul National University

Pss gene encodes a phosphatidylserine synthase, which is an enzyme located in mitochondria-associated membranes (MAM). Mutation in *Pss* gene caused neurodegenerative diseases. Mutation in mammalian homolog of *Pss* caused developmental and growth defect called Lenz-Majewski Hyperostotic Dwarfism (LMHD). However, little is known about the effects of *Pss* gene mutation on development and growth in Drosophila melanogaster. Here, we first identified *Pss* gene expression pattern in 3rd instar larval stage by using GAL4/UAS system. Then, based on the expression pattern, we characterized the effects of *Pss* gene mutation on development and growth. *Pss* gene was expressed in midgut. We observed dwarfism in pupa and adults due to the knock down of *Pss* gene in the enterocytes. PS has been known to affect the activity of Akt signaling. The Akt signaling pathway promotes survival and growth in response to extracellular signals. Among the corresponding sub-signaling pathways, the signaling pathway leading to Akt-Foxo-4EBP

involved in cell growth and differentiation was identified. 4EBP inhibits cell growth and differentiation. That is, when Akt activity is reduced by knock down of *Pss* gene, Foxo activity increases and 4EBP activity also increases. As a result, cell growth and differentiation are inhibited. We confirmed the increase in the expression level of 4EBP through Quantitative Real-Time PCR. These results suggest that mutation of *Pss* gene caused not only neurodegenerative diseases, but also development and growth defects in *Drosophila melanogaster*.

Keywords : Phosphatidylserine, Phosphatidylserine synthase, growth, development, Akt signaling pathway
Student Number : 2018 - 27642