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

세포 죽음을 이용한 *eve* 특이적 발현 세포의 기능 이해

Understanding of the Function of *eve*-Specific Expressed Cells by Apoptosis

2015년 2월

서울대학교 대학원

과학교육과 생물전공

김 가 예

세포 죽음을 이용한 *eve* 특이적 발현 세포의 기능 이해

Understanding of the Function of *eve*-Specific Expressed Cells by Apoptosis

지도교수 전 상 학

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함
2014 년 12 월

서울대학교 대학원
과학교육과 생물전공
김 가 예

김가예의 석사 학위논문을 인준함
2015 년 1 월

위 원 장 건 재 근 (인)
부위원장 이 준 규 (인)
위 원 전 상 학 (인)

국문초록

초파리 *eve*-RN2 enhancer는 배아의 반 체절 당 하나씩 존재하는 aCC, pCC, RP2 신경세포에서 *eve* 유전자의 특이적인 발현을 조절한다. 이러한 신경세포들은 초파리 신경발생 초기에 나타나며, 신경계 형성과정에서 선구적인 역할을 할 것으로 알려져 있으나 아직 논의가 이루어지고 있다. 본 연구에서는 UAS/GAL4 시스템을 이용하여 *eve*-RN2 enhancer에 의해 특이적으로 조절되는 신경세포에서 세포사멸 유전자를 발현시킴으로써 이들 세포의 죽음이 신경계 발달에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 먼저 세포사멸 유전자를 2가지 이상 동형접합으로 갖는 초파리주와 RN2-Gal4를 두 복사본을 갖는 초파리주를 생산하였다. *grim* 및 *reaper* 단독으로는 신경계 발생에 영향을 주지 못했지만, *reaper(rpr), grim*과 RN2-Gal4를 두 복사본을 동시에 갖는 배아에서는 세포 사멸이 증가하였다. 이로 인해, 중추신경계(CNS)의 축삭다발(axonal track)과 연계신경(commissure neuron)의 형성에 이상이 생겼으며, 말초신경계(PNS)의 축삭이 뻗어나가는 것에도 이상이 관찰되었다. 이를 통해 *eve*-RN2 enhancer에 의해 특이적으로 조절되는 신경세포가 CNS 및 PNS 형성에 관여하고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

주요어 : 초파리, 세포사멸, RN2, 인핸서, 신경발생, *eve*

학 번 : 2013-21436

목 차

제 1 장. 서 론 ····· 1

제 2 장. 실험재료 및 실험방법 ····· 10

제 1 절. 실험재료 ····· 10

제 2 절. 실험방법 ····· 11

1. 교배과정 ····· 11

2. 배아의 수집 및 고정 ····· 14

3. 항체 염색 ····· 14

4. AO(Acridine Orange) staning ····· 15

제 3 장. 결 과 ····· 17

제 1 절. cell death 확인 ····· 17

제 2 절. RN2 인핸서의 작용 위치 확인 ····· 19

제 3 절. 신경계 발생 과정 확인 ····· 21

제 4 절. *eve* RN2 인핸서의 조절을 받는 세포의 죽음이 신경계 형성에 미치는 영향 ····· 23

제 4 장. 고 찰 ····· 31

참고문헌 ····· 34

Abstract ····· 41

표 목 차

[표 1] 세포사멸 유전자 발현 정도에 따른 신경계 발생의 이상 빈도 ····· 26

그 림 목 차

[그림 1] UAS/GAL4 system ····· 2

[그림 2] 신경계 분화과정 ····· 4

[그림 3] CNS에서 *eve*의 발현 ····· 5

[그림 4] 세포사멸 과정 ····· 7

[그림 5] DNA 상의 세포사멸 유전자의 위치 ····· 8

[그림 6] 예쁜꼬마선충(*C. elegans*), 초파리(*Drosophila*),
포유류(mammal)의 세포사멸 과정 비교 ····· 9

[그림 7] *UAS-rpr; UAS-grim*의 교배과정 ····· 12

[그림 8] *RN2-Gal4 ; RN2-Gal4*의 교배과정 ····· 13

[그림 9] 세포죽음을 확인하기 위한 AO 염색 ····· 18

[그림 10] RN2 인핸서의 조절에 의한 *eve* 발현 ····· 20

[그림 11] 야생형 초파리 배아에서 BP102 마커의 발현 및
신경계 발달 과정 ····· 22

[그림 12] 야생형 배아와 중추신경계 신경장축 형성 과정
에서 약한 돌연변이 표현형을 보여주는 배아 ·· 27

[그림 13] 야생형 배아와 중추신경계 신경장축 형성 과정
에서 심각한 돌연변이 표현형을 보여주는 배아
(14-15단계) ····· 28

[그림 14] 야생형 배아와 말초신경계에서 이상이 나타나는
돌연변이 배아(14-15단계) ····· 29

[그림 15] PNS 감소를 보이는 돌연변이 배아 ····· 30

제 1 장. 서 론

하나의 세포인 동물의 수정란이 복잡하고 다양한 형태의 세포로 분화되는 것은 유전자가 차별적으로 발현됨으로서 가능하다. 진핵세포에서 유전자의 차별적인 발현 조절은 염색체의 응축을 포함하는 수준에서부터 단백질의 변형까지 매우 다양한 단계에서 일어난다(Wu, 1997).

이 중 전사 과정에서 유전자 발현조절이 가장 핵심적이며, 이 과정에는 전사인자와 전사인자가 결합하는 DNA 상의 조절 부위가 필수적이다. 진핵세포에서 유전자의 발현을 촉진하고, 시공간적으로 조절하는 조절 부위로 인핸서(enhancer)가 있으며, 인핸서는 동물의 발생 과정에서 유전자의 특이적인 발현 과정에 매우 중요한 역할을 한다(Maniatis, 1987).

초파리에서는 이러한 유전자 발현 조절 메커니즘을 이용하여 유전자 발현을 조절하는 UAS/GAL4 system이 잘 갖추어져 있다(Brand and Perrimon, 1993). UAS/GAL4 system은 효모의 전사인자인 GAL4 단백질을 특정 시기, 특정 세포에서만 발현하도록 조절하는 인핸서와 연결하여 형질전환 한 초파리주와 GAL4가 결합하는 UAS(upstream activation sequence) 구조 뒤에 발현시키고자 하는 유전자를 연결한 UAS 라인을 형질전환 한 초파리주를 교배하여 특정세포에서만 발현시키고자 하는 유전자를 발현시키는 system이다(그림 1). UAS 구조에 세포죽음을 유도하는 유전자나, 세포 독성 물질을 만드는 유전자를 연결시켜 만든 UAS 형

질전환 초파리와 특정 시기, 특정 세포에서 발현되는 GAL4 형질전환 초파리를 교배하게 되면, 주변 세포에 손상 없이 특정 시기, 특정세포만을 제거할 수 있다.

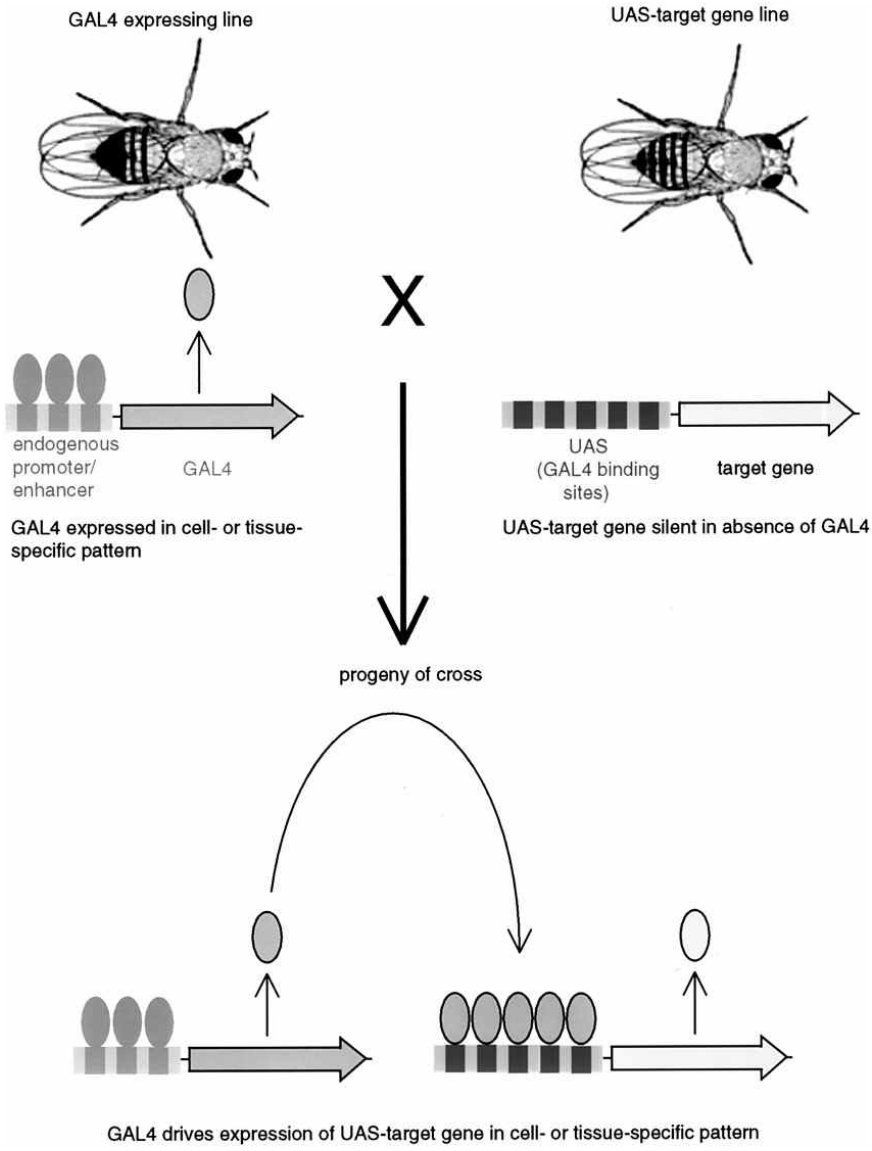

그림 1. UAS-GAL4 system (Phelps and Brand, 1998).

신경계는 신경세포와 신경교세포로 구성되어 있으며, 이들은 신경외배엽으로부터 분화된다. 초파리의 중추신경계는 복측으로 길게 뻗은 longitudinal axon과 이들 사이를 연결하는 연계신경(commissural axon)으로 이루어지며, longitudinal axon 사이에 midline glia가 존재한다. 이러한 구조는 척추동물과 유사하기 때문에 초파리를 이용한 신경계 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다. 초파리에서는 체절극성 유전자(segment polarity gene)와 등배축 유전자(dorsal/ventral gene)에 의한 위치정보에 따라 신경외배엽의 일부가 신경계로 발생한다. Proneural gene이 발현되어 전 신경 클러스터(proneural cluster)로 분화한 뒤 신경형성 유전자(neurogenic gene)의 발현에 따라 신경아교세포(neuroglioblast)를 거쳐 신경절모세포(ganglion mother cell, GMC)를 형성한다. 신경절모세포는 발현하는 유전자에 따라 신경세포나 신경교세포로 분화하게 된다(Jones, 2001; Bernardoni et al., 1999, 그림 2).

초파리 배아의 신경계 형성은 9-10 단계에서부터 이루어진다. 신경계 형성 과정에서 일부 신경세포가 신경장축(longitudinal track)을 형성하는데 핵심적인 역할을 하며, 이들 신경세포의 세포체는 중추신경계(CNS)에 존재하며 축삭이 신경장축 밖으로 뻗어나가 근육과 만나게 된다(Broadus and Doe, 1995). 이렇게 뻗어나가는 신경에는 ISN, SNa, ISNb 등이 있는데, ISN(intersegmental motor nerve)은 체절간 경계를 넘어 근육까지 뻗어나가기 위해 주변과 상호작용한다(Kuzin et al., 2005).

eve 유전자는 초기 발생 과정에서 표피의 발생에 관여하지만(Goto et al, 1989), 배아 발생 중후기로 가면서 신경세포 발생에 관여한다(Frasch,

1987). *eve*유전자의 RN2 enhancer는 aCC, pCC, RP2 neuron에서 발현된다. *eve* 발현 세포는 배 발생 10단계에서 최초로 등장하며 이후 분열과 분화를 통해 신경세포와 신경교세포를 형성하게 된다. 16단계에는 aCC, pCC는 신경장축(longitudinal track)의 두 개의 가로 연계선(commissure) 중 뒤쪽 부분으로, RP2는 앞쪽 부분으로 이동하여 위치한다(Broadus et al., 1995).

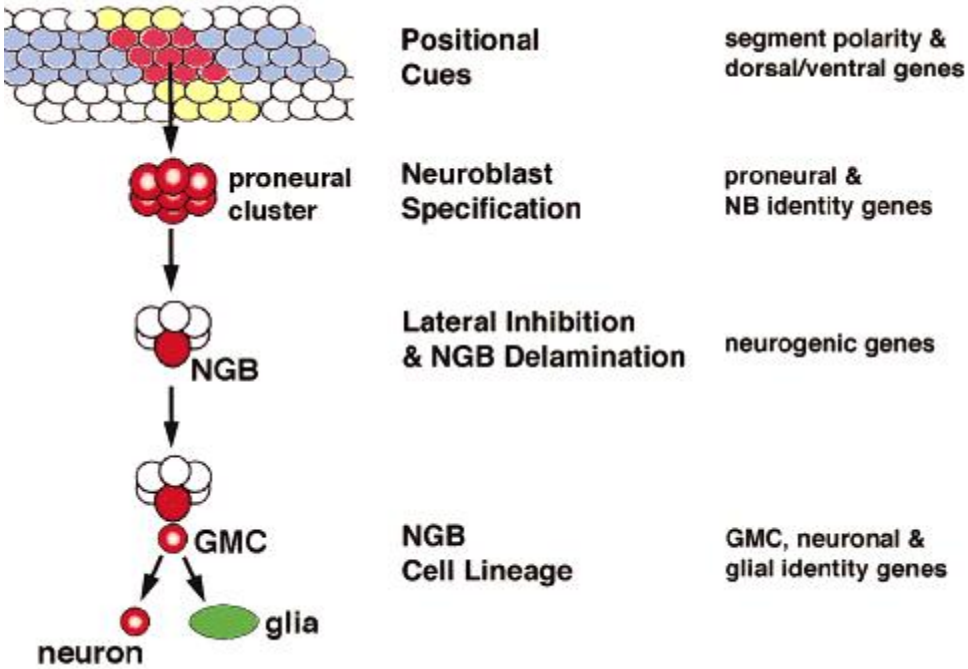

그림 2. 신경계 분화과정. 신경외배엽에서 유해한 신경절모세포(GMC)에서 발현하는 유전자에 따라 신경세포(neuron) 또는 신경교세포(glia)로 분화한다.

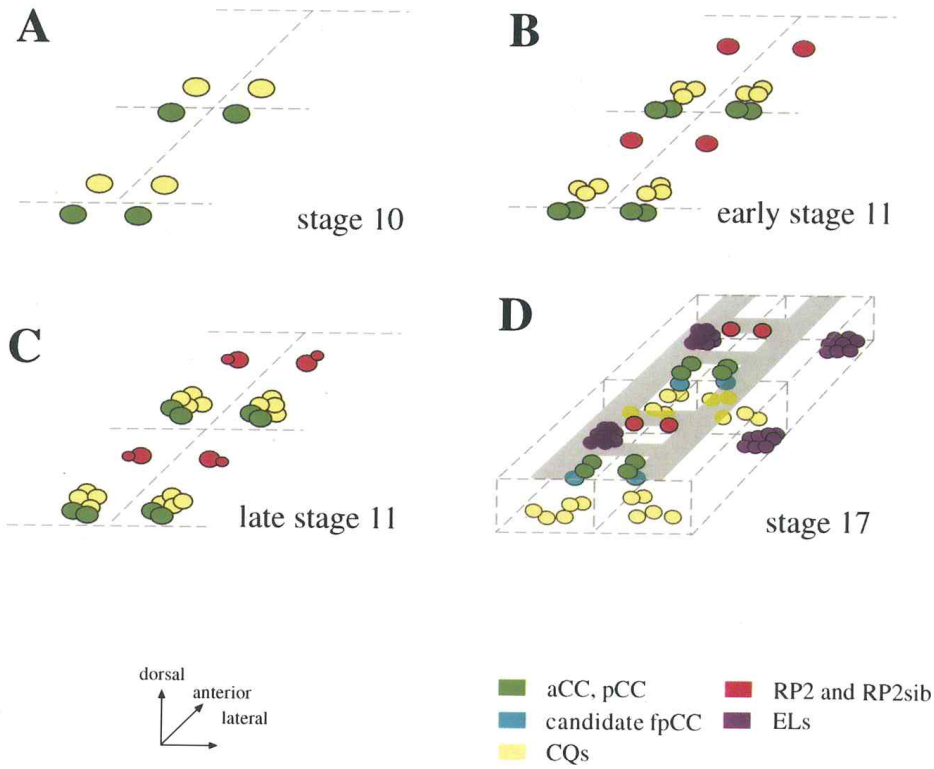

그림 3. CNS에서 *eve*의 발현. aCC/pCC (green); CQ neurons (yellow), RP2 and RP2sib (red); fpCC (turquoise); EL neurons (purple). 점선은 체절을 나누고 있다(Broadusa et al., 1995).

동물 발생이 세포의 분화를 통해서 이루어지기 때문에 유전자의 기능을 이해하는 것도 중요하지만 세포의 유무를 조절하여 발생을 살펴보는 것이 발생 과정을 이해하는데 많은 정보를 제공해 주고 있다(Wu et al., 2010). 동물의 발생이 정상적으로 진행되기 위해서는 불필요한 세포의 사멸은 필수적이다(Abrams et al., 1993; Twome and McCarthy, 2005). 예를 들면, 초파리의 배아 발생 과정에서는 계획된 세포사멸(programmed cell death, PCD) 과정을 통해 기존에 존재하던 세포 및 조직을 제거하고 향후에 필요한 세포 및 조직으로 대체한다. 특히 급격한 형태의 변화가 나타나는 배아 발생(embryonic development) 과정과 번데기에서 일어나는 변태(metamorphosis) 과정 동안 많은 세포에서 계획된 세포사멸이 일어난다(Abrams, 1993; Jiang, 1997). 세포 사멸은 세포 간 상호작용(cell-cell interaction), 영양상태, 호르몬 등의 영향을 받아 세포 사멸 유전자가 발현되어 일어난다(Bangs et al., 2000, 그림 4). 세포 사멸에 관련되는 유전자에는 *reaper(rpr), head involution defective(hid), grim, sickle*가 존재한다. 이들 중 *H99* 부위에 존재하는 *reaper(rpr), head involution defective(hid), grim*을 묶어 RHG family라고 통칭한다(Xu et al., 2009; Lee et al., 2013, 그림5). Rpr, Grim, Hid, Sickle 단백질은 N말단 부위에 RHG 모티프가 보존되어 있어, 항세포사멸 단백질(Inhibitors of Apoptosis protein, IAP, 초파리의 dIAP1, dIAP2, detrin)에 결합할 수 있다. 여러 가지 조절 신호들에 의해 *rpr, hid, grim*이 발현되면 RHG 모티프가 항세포사멸 단백질의 BIR(Baculovirus IAP Repeat) 도메인에 결합하여 불활성화 시킨다. 항세

포사멸 단백질이 불활성화되게 되면 Caspase 활성이 촉진되어 세포사멸이 일어나게 된다(Goyal et al., 2000; Yin and Thummel, 2004). 세포사멸(programmed cell death)은 초파리를 비롯하여 많은 생물체에서 진화적으로 잘 보존되어 있다(Twomey & McCarthy, 2005, 그림 6).

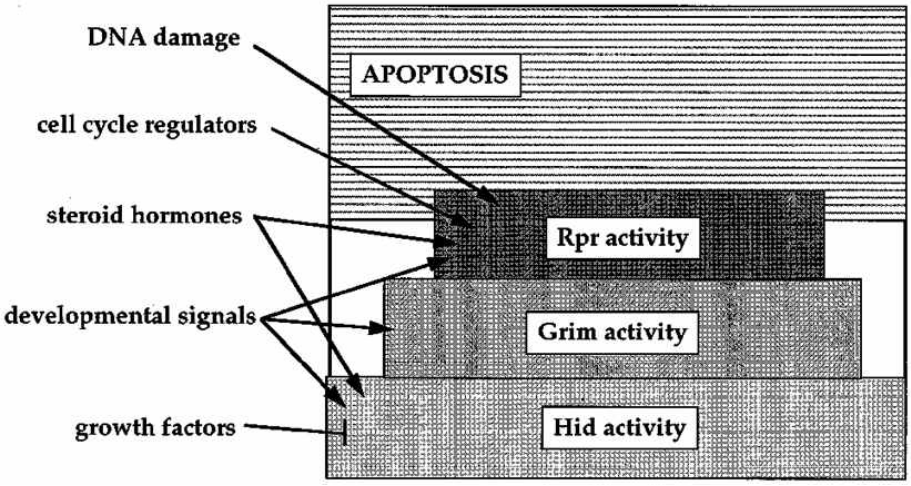

그림 4. 세포사멸 과정(Bangs et al., 2000).

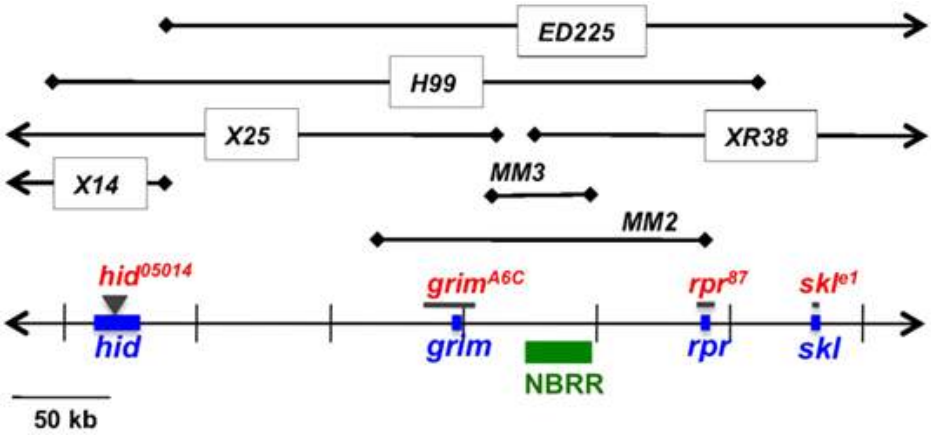

그림 5. DNA 상의 세포사멸 유전자의 위치(Lee et al., 2013).

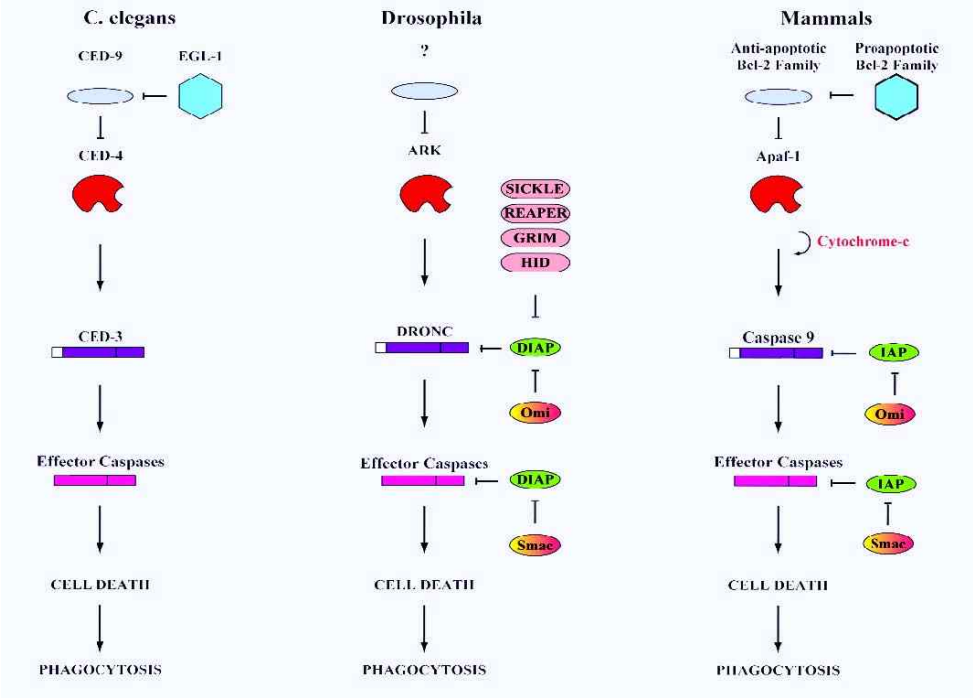

그림 6. 예쁜 꼬마선충(*C. elegans*), 초파리(*Drosophila*), 포유류(mammal)의 세포사멸 과정 비교. 예쁜 꼬마선충, 초파리, 포유류의 세포사멸 과정 및 구성요소는 진화적으로 보존되어 있다.

본 연구에서는 eve 유전자의 RN2 인핸서가 작용하는 aCC, pCC, RP2 신경세포의 기능을 세포죽음을 유도하여 알아보고자 하였다. 세포의 기능을 확인하기 위해 초파리의 세포사멸과 관련한 유전자(*rpr, grim*)를 UAS/GAL4 system을 이용하여 RN2 enhancer의 작용부위에서 과발현시켜, aCC(anterior Commisure Cell), pCC(posterior Commosure Cell), RP2 뉴런을 특이적으로 제거하여 중추신경계 및 말초신경계에 미치는 영향을 확인하였다.

제 2 장. 실험재료 및 실험방법

1. 실험재료

초파리는 cornmeal/yeast 배지가 들어있는 20mm 관병에 dry yeast를 넣고 필요에 따라 20℃와 25℃에서 배양하였다. 야생형 초파리는 Oregon R을 사용하였다. aCC, pCC, RP2 신경세포에서만 발현되는 RN2 인핸서와 연결된 Gal4 라인과, 세포죽음과 관련된 *rpr, grim, hid*가 UAS 구조에 연결된 *UAS-reaper, UAS-grim* 등의 초파리 라인을 실험의 필요에 따라 교배하여, *UAS-rpr; UAS-grim* (1, 3번 염색체), *UAS-rpr; UAS-rpr* (1, 2번 염색체), *UAS-rpr; UAS-hid/CyO* (1, 2번 염색체), *RN2-Gal4/CyO; UAS-grim* (2, 3번 염색체), *RN2-Gal4; RN2-Gal4* (2, 3번 염색체), *UAS-rpr; UAS-grim* (2, 3번 염색체)를 제작하였으며, 이 중에서 *RN2-Gal4; RN2-Gal4* (2, 3번 염색체), *UAS-rpr; UAS-grim* (1, 3번 염색체)각각을 대조군으로 사용하였으며, 실험군으로 사용할 배아는 *RN2-Gal4; RN2-Gal4* (2, 3번 염색체)와 *UAS-rpr; UAS-grim* (1, 3번 염색체)의 교배, *UAS-rpr; UAS-grim* (1, 3번 염색체)과 RN2-Gal4의 교배, UAS-grim과 *RN2-Gal4; RN2-Gal4* (2, 3번 염색체)의 교배, *RN2-Gal4*와 *UAS-grim*의 교배로 얻었다.

2. 실험방법

1) 교배과정

RN2-enhancer가 발현되는 신경세포를 세포사멸 유전자 발현을 통해 제거하여 이들 aCC, pCC, RP2 신경세포의 기작을 이해하기 위하여, *RN2-Gal4* 초파리주와 programmed cell death에 관여하는 *UAS-reaper, UAS-grim* 등의 초파리주의 교배를 통해 다양한 조합을 가진 초파리주를 생산하였다. 교배과정에서는 다수의 역위와 우성 표현형 마커를 가지고 있는 다양한 밸런서를 이용하여 해당되는 초파리를 선별하였다. 교배 과정은 아래와 같다.

P : *UAS-rpr/UAS-rpr; +/+ (Ⅰ)* ⓧ *+/Y; D^3/TM3(Ⅲ)*

(*TM3* 밸런서에는 *Sb*가 함께 존재한다.)

↓

Sb 표현형을 나타내는 수컷을 선택하여, *UAS-rpr* 암컷과 교배한다. 이때, D^3 표현형을 나타내는 수컷 또한 다음 교배를 위하여 선별하여 놓도록 한다.

F1 : *UAS-rpr/Y; +/TM3* ⓧ *UAS-rpr/UAS-rpr; +/+*

↓

Sb 표현형을 나타내는 암컷을 선택하여, F1에서 얻은 D^3 표현형을 나타내는 수컷과 교배한다.

F2 : *UAS-rpr/UAS-rpr; +/TM3* ⓧ *UAS-rpr/Y; D^3/+* (F1에서 나온 것)

↓

D^3와 Sb 표현형을 모두 갖는 암컷을 선별하여 *UAS-grim(Ⅲ)*과 교배한다.

F3 : *UAS-rpr/UAS-rpr; D^3/TM3* ⓧ *+/Y; UAS-grim/UAS-grim*

↓

Sb 표현형을 나타내는 수컷과 F3에서 사용하였던 암컷을 다시 교배한다.

F4 : *UAS-rpr/Y; UAS-grim/TM3* ⓧ *UAS-rpr/UAS-rpr; D^3/TM3*

↓

Sb만을 나타내는 암컷과 수컷을 선별하여 교배한다.

F5 : *UAS-rpr/UAS-rpr; UAS-grim/TM3* ⓧ *UAS-rpr/Y; UAS-grim/TM3*

↓

F6 : *UAS-rpr/UAS-rpr; UAS-grim/UAS-grim*

& *UAS-rpr/Y; UAS-grim/UAS-grim*

그림 7. *UAS-rpr; UAS-grim* (1, 3번 염색체)의 교배과정.

P : *RN2-Gal4/RN2-Gal4; +/+* (Ⅱ) ⓧ *y w; Bl/CyO y+; Sb/TM6B* (*TM6B* 밸런서는 *Tb*를 함께 가짐) ↓ CyO 표현형과 Tb 표현형을 나타내는 초파리와, CyO 표현형과 Sb표현형을 나타내는 초파리를 서로 다른 성으로 선별하여 교배한다. F1 : *RN2-Gal4/CyO; +/TM6B* ⓧ *RN2-Gal4/CyO; +/Sb* ↓ Tb와 Sb 표현형을 모두 나타내는 초파리를 선별한다. F2 : *RN2-Gal4/RN2-Gal4; TM6B/Sb*	P : *+/+; RN2-Gal4/RN2-Gal4* ⓧ *y w; Bl/CyO y+; Sb/TM6B*(Ⅲ) (*TM6B* 밸런서는 *Tb*를 함께 가짐) ↓ CyO 표현형과 Tb 표현형을 나타내는 초파리와, Bl 표현형과 Tb 표현형을 나타내는 초파리를 서로 다른 성으로 선별하여 교배한다. F1 : *+/CyO; RN2-Gal4/TM6B* ⓧ *+/Bl; RN2-Gal4/TM6B* ↓ CyO와 Bl 표현형을 모두 나타내는 초파리를 선별한다. F2 : CyO/Bl; RN2-Gal4/RN2-Gal4

암수를 다르게 하여 선별한 초파리를 교배한다.

RN2-Gal4/RN2-Gal4; TM6B/Sb ⓧ *CyO/Bl; RN2-Gal4/RN2-Gal4*

↓

CyO와 Tb 표현형을 나타내는 초파리를 선별하여 교배한다.

F3 : *RN2-Gal4/CyO; RN2-Gal4/TM6B* (♀ ⓧ ♂)

↓

F4 : *RN2-Gal4/RN2-Gal4; RN2-Gal4/RN2-Gal4*

그림 8. *RN2-Gal4 ; RN2-Gal4* (2, 3번 염색체)의 교배과정.

2) 배아의 수집 및 고정

배아를 수집하기 위해서 초파리로부터 25℃에서 3시간 동안 알을 받은 후(Rothwell & Sullivan, 2007), 12시간 동안 25℃에서 보관하여 배아 발생 단계가 14-15단계 정도에 도달한 후 이용하였다. 이렇게 원하는 시기로 맞춘 배아를 증류수, 붓, 작은 그물망을 이용하여 모은 후, 50% 락스를 4분간 처리해 가장 바깥쪽 막인 융모막을 제거한 후 증류수로 깨끗이 씻어낸 후 이후 과정에서 기포가 생기지 않도록 물기를 완전히 제거하였다. 4% Paraformaldehyde 2ml와 Heptane 2ml를 넣은 유리병에 모은 배아를 넣고 교반기에서 20분간 흔들어 더 이상 발생이 진행되지 않도록 배아를 고정하였다(Rothwell & Sullivan, 2000; Rothwell & Sullivan, 2007; Kiehart et al., 2007). 고정이 끝나면 하층액인 Paraformaldehyde를 제거한 후 -20℃에서 보관한 메탄올을 2ml 넣고 교반기에서 25분간 흔들어 주어 배아의 난황막을 제거한 후, 모든 액체를 제거하였다. 메탄올을 추가하여 씻어준 후 파이펫을 이용하여 e-tube로 옮겨 메탄올로 2-3회 더 씻어준 후 메탄올을 채워 사용 전까지 - 20℃에 보관하였다.

3) 항체 염색

고정한 배아에서 메탄올을 제거한 후 PT 용액으로 5~7회 씻어준 후 1차 항체로 염색하였다. 1차 항체는 생쥐에서 얻은 BP102(1:20), 22C10(1:20)를 PT에 5% NGS(normal goat serum)와 희석 비율에 맞게 섞은 후, 고정한 배아에 200㎕를 넣고 4℃에서 12시간 이상(overnight) 반응시켰다. 1차 항체를 제거한 후 PT용액으로 충분히 씻어준 후 2차

항체는 Avidin과 Biotin이 conjugate 된 anti mouse를 200㎕정도 넣고 2~3시간정도 반응시켰다. 반응 후 PT로 충분히 씻어준 후 DAB(3,3-diaminobenzidine) 200㎕를 넣고 발색판으로 옮겨 실체 현미경으로 확인하면서 3.4% 과산화수소 2㎕를 넣어 발색반응을 진행하였으며. 발색반응이 충분히 진행되면 PT를 넣어 반응의 진행속도를 늦춘 후 용액을 제거하고, PT로 씻어 반응을 완전히 멈추게 하였다. 70%, 90%, 100% 에탄올에서 순차적으로 탈수과정을 거친 후 methyl salicylate 200㎕에 보관하였다(Zhou et al., 1995; Rothwell & Sullivan, 2000).

형광 항체를 이용할 경우에는 1차 항체 제거 후 1차 항체에 맞는 2차 항체를 선택하여 넣어준 후 20~30분간 반응시킨 후, 형광 신호를 현미경으로 확인하였고 PT를 이용하여 반응을 멈추었다. PT로 여러 회 씻어준 후 탈수과정 없이 fluoromount-G 용액 또는 글리세롤 200㎕에 보관하였다. 배아 관찰 및 사진 촬영은 Zeiss 현미경과 Olympus 현미경(BX51)을 사용하였다.

4) AO (Acridine Orange) staining

AO 염색은 살아있는 세포에서의 세포죽음을 확인하는 것이기 때문에 배아의 고정과정을 거치지 않는다. 50% 락스에서 5분간 융모막을 벗기거나, 양면테이프 위에 배아를 놓고 조심스럽게 굴려 직접적으로 융모막을 벗긴 후 heptane 및 AO 혼합액에 넣었다. 락스로 융모막을 벗긴 경우에는 증류수로 깨끗하게 씻어준 후 Heptane을 넣은 e-tube에 모아주었다. heptane : AO 용액을 1:1의 비율로 넣고 교반기에서 5분간 흔들어

주었다. 이때 AO 용액은 0.1M sodium phosphate buffer(PH 7.2)에 5㎍/ml의 AO를 녹여 만들었다. 염색이 된 배아는 Heptane으로 씻어낸 후 미네랄오일을 넣고 녹색형광필터로 관찰하였다(Abrams et al., 1993; Peterson. 2002; Arama & Steller, 2006). AO 염색은 살아있는 배아를 염색하는 것이기 때문에 보관하지 않고 바로 관찰하였다.

제 3 장. 결　　과

1. cell death 확인

RN2 enhancer 작용 지역에서 세포사멸 유전자들을 과발현 시켰을 때 세포죽음이 유도되는 것을 확인하기 위해 Acridine Orange 염색법을 사용하였다. 야생형 배아와 교배과정을 통해 제작한 *RN2-Gal4; RN2-Gal4* (2, 3번 염색체)와 *UAS-rpr; UAS-grim* (1, 3번 염색체)를 교배한 배아를 3시간 동안 받은 후 25℃에서 12시간 보관하여 12~15시간으로 통일시킨 후 AO 염색법에 따라 염색하였다. 야생형에서는 배쪽의 신경삭(ventral nerve cord, VNC)을 따라 세포사멸이 공통적인 패턴을 나타내는 것이 확인되었지만, UAS/GAL4 시스템을 이용하여 세포사멸 유전자를 과발현 시킨 배아에서는 세포사멸의 패턴이 변하고 염색 또한 더 진하게 되는 것이 확인되었다. 특히 신경 장축 부분에서 spot 들이 더 진하게 나타나는 것으로 보아 세포사멸이 유도됨을 확인할 수 있다(그림9).

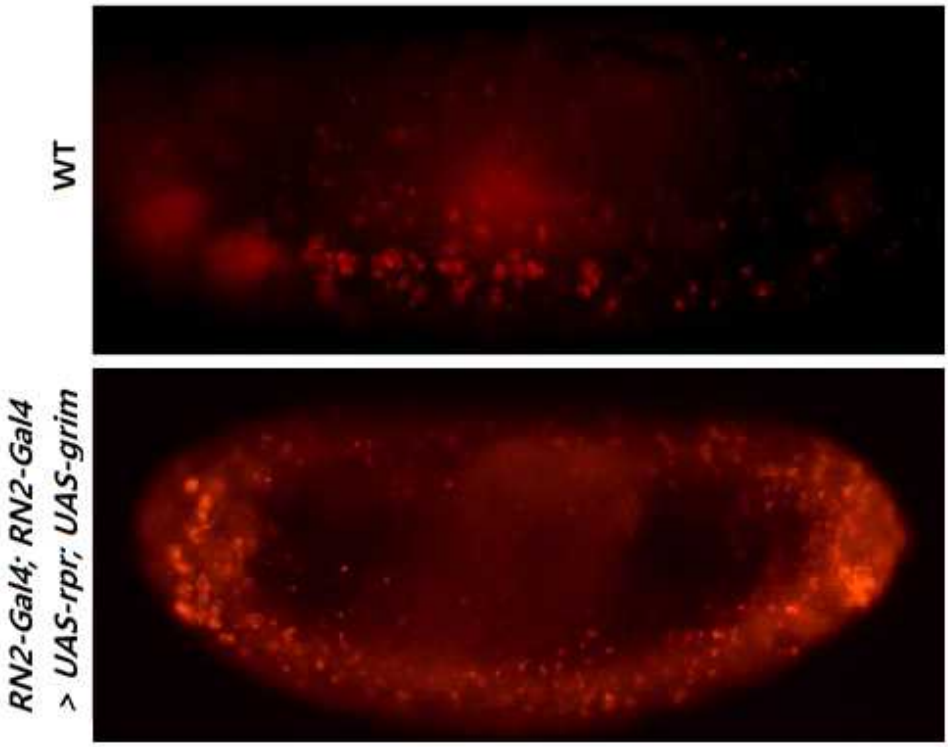

그림 9. 세포죽음을 확인하기 위한 AO 염색. 야생형보다 실험군의 VNC에서 세포사멸이 일어난 세포의 수가 크게 증가하였다.

2. RN2 인핸서에 의한 *eve* 발현 세포의 확인

RN2 인핸서에 의해 조절되는 *eve*의 발현 세포를 확인하기 위해 이들 세포에서만 효모의 전사활성 인자인 Gal4가 발현되도록 만들어진 *RN2-Gal4*에 *UAS-mCD8-GFP reporter*를 가지고 있는 초파리주를 이용하였다. 이 초파리주에서는 Gal4가 발현되는 aCC, pCC, RP2 신경세포의 세포막에서 GFP(Green fluorescent protein)가 발현되기 때문에 항체 염색 없이도 해당 세포를 확인할 수 있었다. *RN2-Gal4; UAS-mCD8-GFP* 배아에서 GFP의 발현 패턴을 보면 배아 발생 11단계에서 aCC, pCC, RP2 뉴런이 확인되었으며(그림 10A), 발생이 진행될수록 이들 세포의 배열이 규칙적이 되면서 14단계 이후에는 전형적인 두 줄로 배열된 모습이 확인되었다(그림 10C, D). aCC와 pCC는 바로 붙어 있으며, RP2 세포는 이들과 조금 떨어져서 반 체절 당 하나씩 존재하였다. 13단계 정도에서 부터는 aCC, RP2 신경세포의 세포체로부터 신경이 뻗어 나오기 시작하였으며, 두 세포에서 나온 신경이 만나서 뻗어 나가는 것이 확인되었다.

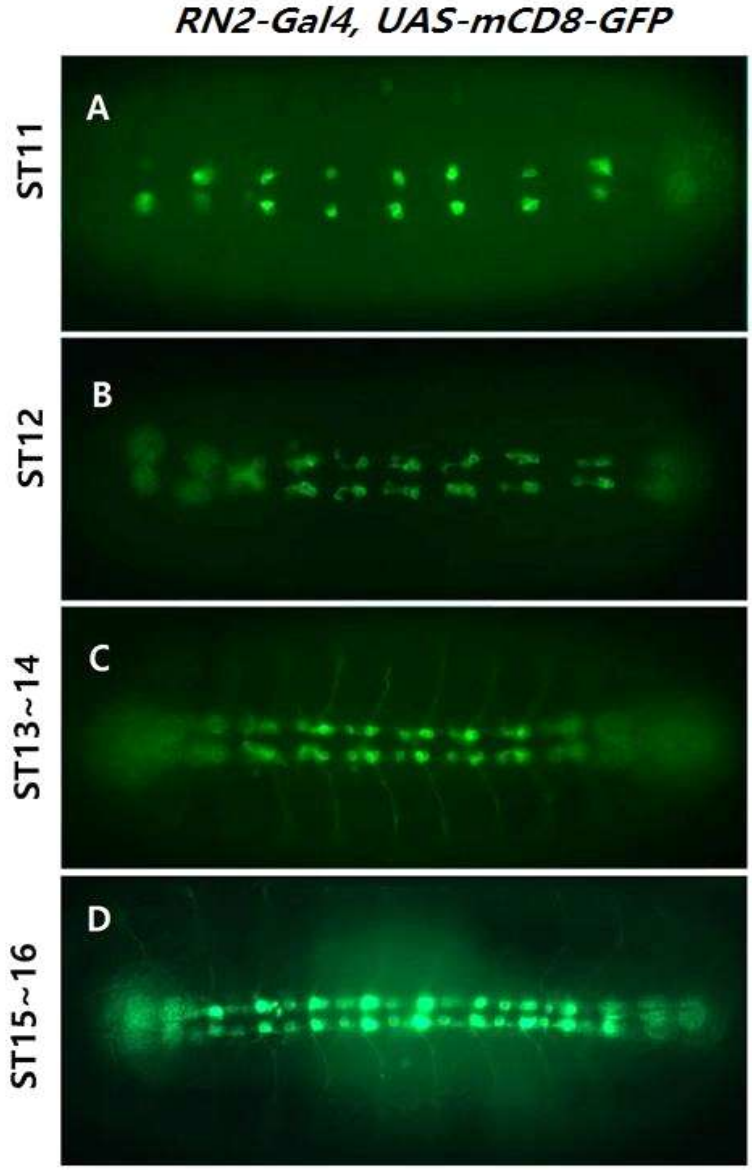

그림 10. RN2 인핸서의 조절에 의한 *eve* 발현. *RN2-Gal4, UAS-mCD8-GFP* 배아를 이용하여 RN2 인핸서에 의해서 조절되는 *eve*의 발현을 확인하였다. 11단계에서는 체절마다 점으로 나타나던 패턴이 13-14단계를 지나가면서 두 줄로 배열되며 좌우로 신경이 뻗어나가는 것이 확인된다.

3. 신경계 발생 과정을 확인할 수 있는 BP102 마커의 발현

BP102는 주로 중추 신경계(CNS)에서 발현하기 때문에 중추신경계의 형성 과정을 살펴볼 수 있는 마커이며, 부분적으로는 말초신경계(PNS)가 뻗어나가는 것도 확인이 가능하다. BP102 마커는 중추신경계 일환인 배쪽(ventral)의 복면신경삭(VNC)과 연계신경(commissure)에서 발현되며, 측면(lateral)에서 관찰하게 되면 뻗어나가는 말초신경계(PNS)에서도 관찰이 된다. 따라서 BP102를 이용하면 배아에서 VNC의 발생 및 축삭이 뻗어나가는 것도 일부 확인할 수 있었다. VNC는 12단계 배아에서부터 신경장축(longitudinal track)의 형태가 관찰되나 각 체절별로 완전히 연결되지 않은 상태로 관찰되었다(그림 11A, A'). 이 시기에는 아직 말초신경계가 뻗어나가지 않았다. 점차 발생이 진행되며 신경 장축이 연결되고 신경장축을 사다리 모양으로 연결하는 연계신경이 발달하였다. 15단계 정도가 되면 중추신경계로부터 말초신경계가 뻗어 나오며(그림 11B, B'), aCC, RP2 신경세포로부터 뻗어나오는 신경이 관찰되었다. 16단계 이상의 후기로 가게 되면 신경장축에서부터 사방으로 뻗어나가는 신경들이 관찰되었으며(그림 11C, C'), 17단계에서는 신경장축의 응축(condensation)이 일어났다(그림 11D, D').

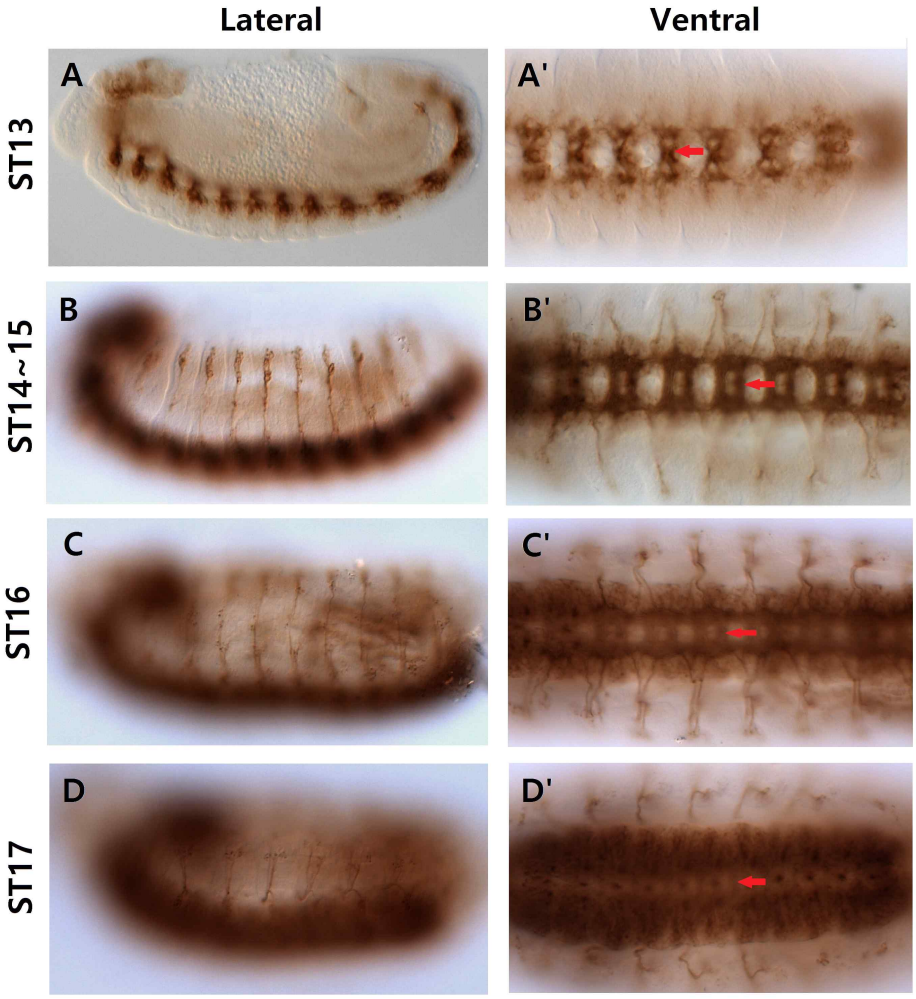

그림 11. 야생형 초파리 배아에서 BP102 마커의 발현 및 신경계 발달 과정. (A, A') 배발생 13 단계. BP102 마커가 VNC에서만 나타나며 장축 및 연계신경 발생의 초기를 보여준다. (B, B') 배발생 14-15단계. VNC와 aCC, RP2 신경세포 등에서부터 축삭이 뻗어나온다. (C, C', D, D') 배발생 16~17단계. 신경장축에서 응축이 일어나며, VNC 밖으로 축삭이 많이 뻗어나온다. (붉은 화살표는 연계신경을 표시한 것이다.)

4. *eve* RN2 인핸서의 조절을 받는 세포의 죽음이 신경계 형성에 미치는 영향

본 실험에서는 *eve*-RN2 인핸서의 작용을 받는 신경세포에 세포죽음 유전자를 발현시켜 세포사멸을 유도하고 중추신경계 및 말초신경계의 발생 과정을 살펴보고자 하였다.

선행연구에서는 *UAS-grim*과 *RN2-Gal4*를 이용하여 aCC, pCC, RP2 신경세포의 죽음을 유발하였고, 그에 따른 신경교세포의 분화 과정을 확인하였다(이은정, 2013). 이 실험에서는 *UAS-grim*과 *RN2-Gal4*를 교배하여 *RN2-Gal4/+; UAS-grim/+* 자손을 만든 후, 동계 교배하여 1/16의 확률로 나오는 *RN2-Gal4/RN2-Gal4; UAS-grim/UAS-grim* 배아를 관찰하였다. 이 선행연구에서는 이상 있는 표현형을 나타내는 배아의 유전자형을 확신하지 못하고 확률적으로만 관찰했기 때문에, 본 연구에서는 이를 보완하여 자손의 표현형을 알 수 있도록 교배를 통해 PCD 유전자를 동시에 갖는 동형의 초파리를 생산하였다. 또한, 선행연구에 따르면, 세포에 따라 세포사멸의 중심역할을 하는 유전자가 다르고, *grim*은 다른 유전자와의 조합을 통해 기능하는 경우가 많으며(Wu et al., 2010), 세포죽음을 유도하는 유전자는 단독으로 작용할 때 보다는 2가지 이상이 조합하여 작용할 때 상승적으로 세포죽음을 유도하였다(Zhou et al., 1997; Wing et al., 2001; Peterson et al., 2002). 따라서 본 연구에서는 *UAS-rpr; UAS-grim* (1, 3번 염색체), *UAS-rpr; UAS-hid/CyO* (1, 2번 염색체), *UAS-rpr; UAS-grim* (2, 3번 염색체)과 같은 2가지 이상의

세포사멸 유전자를 갖는 돌연변이 초파리주와 발현양을 증가시키기 위해 *RN2-Gal4; RN2-Gal4* (2, 3번 염색체)를 동시에 갖는 초파리주를 교배를 통해 생산하였다.

세포사멸 유전자의 발현 정도에 따른 배아 신경계 발생에서의 이상을 확인하기 위해, *RN2-Gal4/+; UAS-grim/+*, *RN2-Gal4/+; RN2-Gal4/UAS-grim, RN2-Gal4/UAS-rpr; UAS-grim/+, UAS-rpr/+; RN2-Gal4/+; RN2-Gal4/UAS-grim* 의 유전자형을 갖는 배아를 사용하여 BP102 항체 염색을 통해 신경계 발생 이상을 확인하였다(표 1). 이때 배아들은 신경계가 발달하는 14-15단계를 관찰하기 위해 3시간동안 배아를 받은 후 25℃에서 12시간 동안 보관하여 산란 된지 12~15시간으로 통일하여 염색하였다.

그 결과 Gal4 한 개 복사본과 세포사멸 유전자 한 개 복사본을 갖는 배아에서는 81개의 배아 중 단 1개의 배아에서만 신경 장축 형성에 이상을 나타내었으며, Gal4 두 복사본과 세포사멸 유전자 한 개 복사본을 갖는 45개의 배아는 모두 정상적인 신경 발생을 보였으며, Gal4 한 개 복사본과 세포사멸 유전자 2종류를 각각 한 개 복사본씩 갖는 102개 배아 중에서는 1개의 배아에서만 신경 장축 형성에 이상이 나타났다.

UAS-rpr; UAS-grim (1, 3번 염색체)과 *RN2-Gal4 ; RN2-Gal4* (2, 3번 염색체)를 교배하여 얻은 *RN2-Gal4* 두 복사본과 *UAS-rpr*와 *UAS-grim*을 각각 한 개의 복사본을 갖는 배아에서는 다양한 수준으로 이상을 나타내는 배아들이 관찰되었다. 중추신경계(CNS) 형성과정에서는 신경장축(longitudinal track)의 축삭다발(axonal track)과 연계신경

(commissure neuron) 형성 과정에서 이상이 나타났다. 축삭다발이 휘거나 끊어지고 연계 신경이 비정상적으로 형성되는 표현형이 흔하게 나타났으며(그림 12), 축삭다발이 정상적으로 형성되더라도 연계신경이 사다리 모양으로 생기지 못하고 꼬이고 휘어져서 연결되는 표현형도 많이 나타났다(그림 12 D, D'). 가장 심한 경우에는 축삭다발 형성이 제대로 진행되지 못하였으며 연계신경도 형성되지 못하기 때문에, 사다리 모양의 신경장축이 만들어지지 않았다(그림 13). 중추신경계를 관찰한 40개의 배아 중에서 24개 배아에서 이러한 이상 표현형이 나타났다. 말초신경계(PNS)가 뻗어나가는 과정에서는 축삭(axon)에서 이상이 나타났다. 축삭이 휘어지는 경우(그림 14 C, C')가 많이 관찰되었으며, 옆의 축삭과 연결되는 표현형(그림 14 B, B')도 관찰되었다. 일부 배아에서는 배아의 응축(condensation)이 일어나지 않은 단계에서도 PNS의 축삭 수가 감소한 것이 확인되었으며(그림 15), 신경계 형성과정에서 이상이 강하게 나타난 경우에는 PNS가 전혀 뻗어 나오지 못하였다. 말초신경계를 관찰한 17개 배아 중에서는 14개의 배아에서 이상이 관찰되었다.

표 1. 세포사멸 유전자 발현 정도에 따른 신경계 발생의 이상 빈도

유전자형	이상 빈도
RN2-Gal4/+; UAS-grim/+	1/81 (1.2%)
RN2-Gal4/+; RN2-Gal4/ UAS-grim,	0/45 (0%)
RN2-Gal4/UAS-rpr; UAS-grim/+,	1/102 (0.01%)
UAS-rpr/+; RN2-Gal4/+; RN2-Gal4/UAS-grim	29/45 (64.4%)

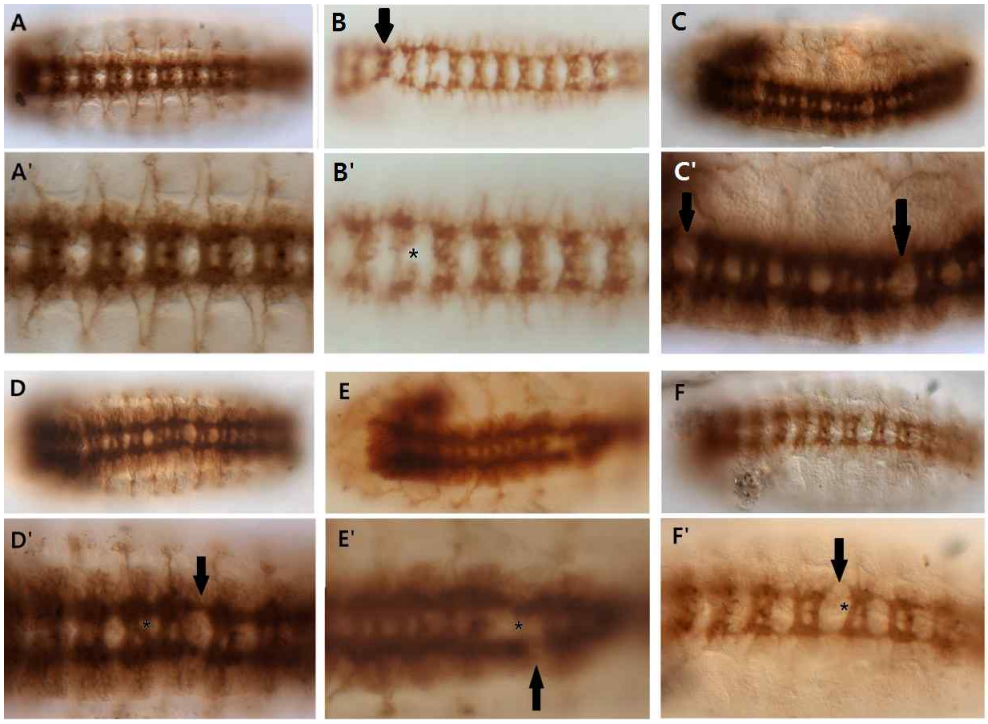

그림 12. 야생형 배아와 중추신경계(CNS) 신경장축(longitudinal track) 형성 과정에서 약한 돌연변이 표현형을 보여주는 배아. (A, A') 야생형 배아(14-15단계) (B, B') 배발생 13 단계. 머리 쪽 축삭다발이 응축되어 제대로 형성되지 못하였고, 연계신경이 정상적으로 연결되지 못하였다(*로 표시). (C, C') 배발생 14-15 단계. 축삭다발에서 머리 쪽과 중간 부분이 끊어진 것(화살표로 표시)이 확인된다. (D, D') 축삭다발이 휘어지며, 연계신경이 정상적인 방향으로 연결되지 못하고 꼬임이 나타난다(*로 표시). (E, E', F, F') 축삭다발에서 끊어짐(화살표로 표시)이 나타나고, 연계신경 또한 정상적으로 형성되지 못하였다(*로 표시).

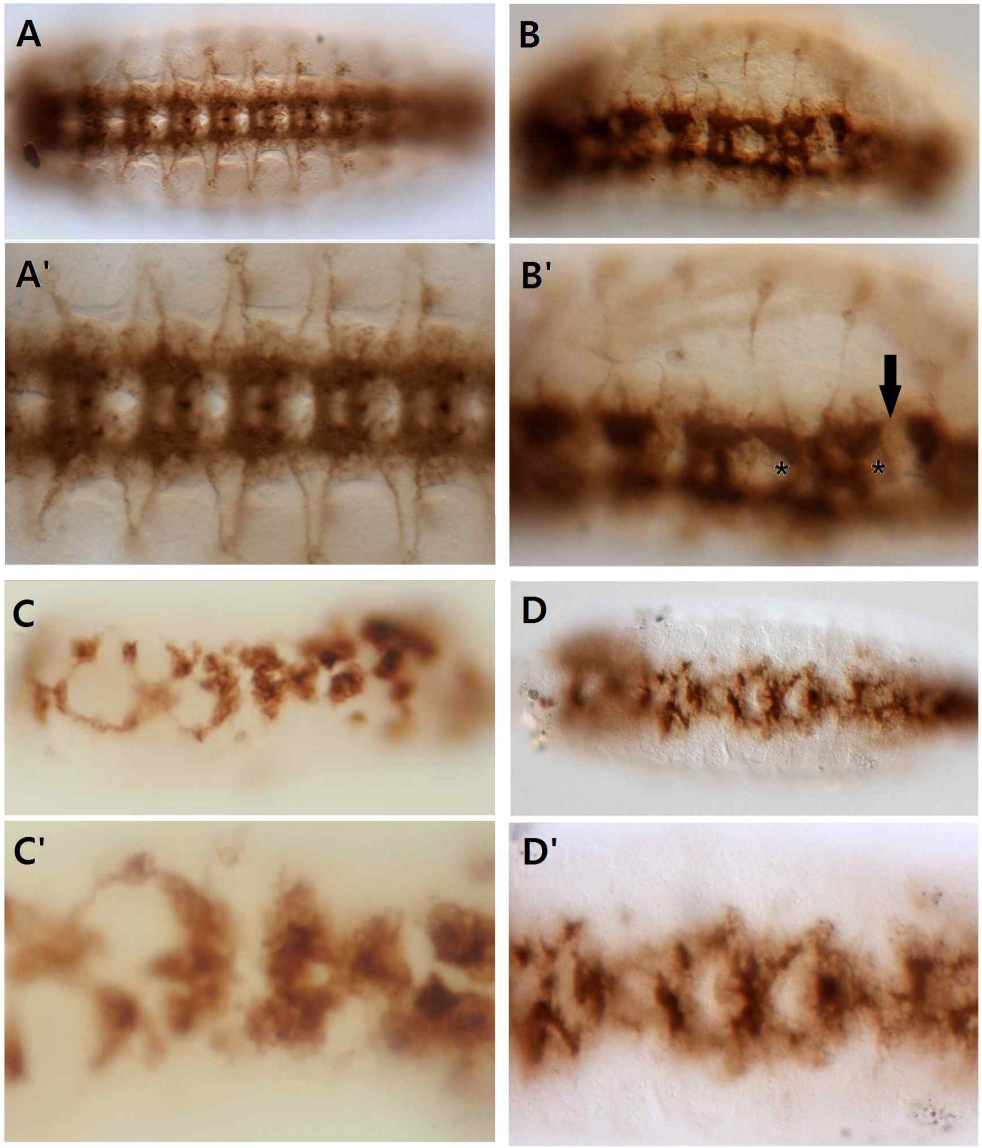

그림 13. 야생형 배아와 중추신경계(CNS) 신경장축(longitudinal track) 형성 과정에서 심각한 돌연변이 표현형을 보여주는 배아(14-15단계). (A, A') 야생형 배아 (B, B') 축삭 다발(axonal track)의 형성이 제대로 일어나지 않아 끊어지고 휘어지며, 연계 신경(commissure neuron)도 제대로 형성되지 못하였다. (C, C', D, C') 신경계 형성에 심각한 이상이 나타난다. 축삭다발의 모양이 알아보기 힘들 정도로 흐트러지며 연계신경도 정상적으로 형성되지 못하여 신경 장축의 형태가 심각한 이상을 보인다. PNS 또한 형성되지 못한다.

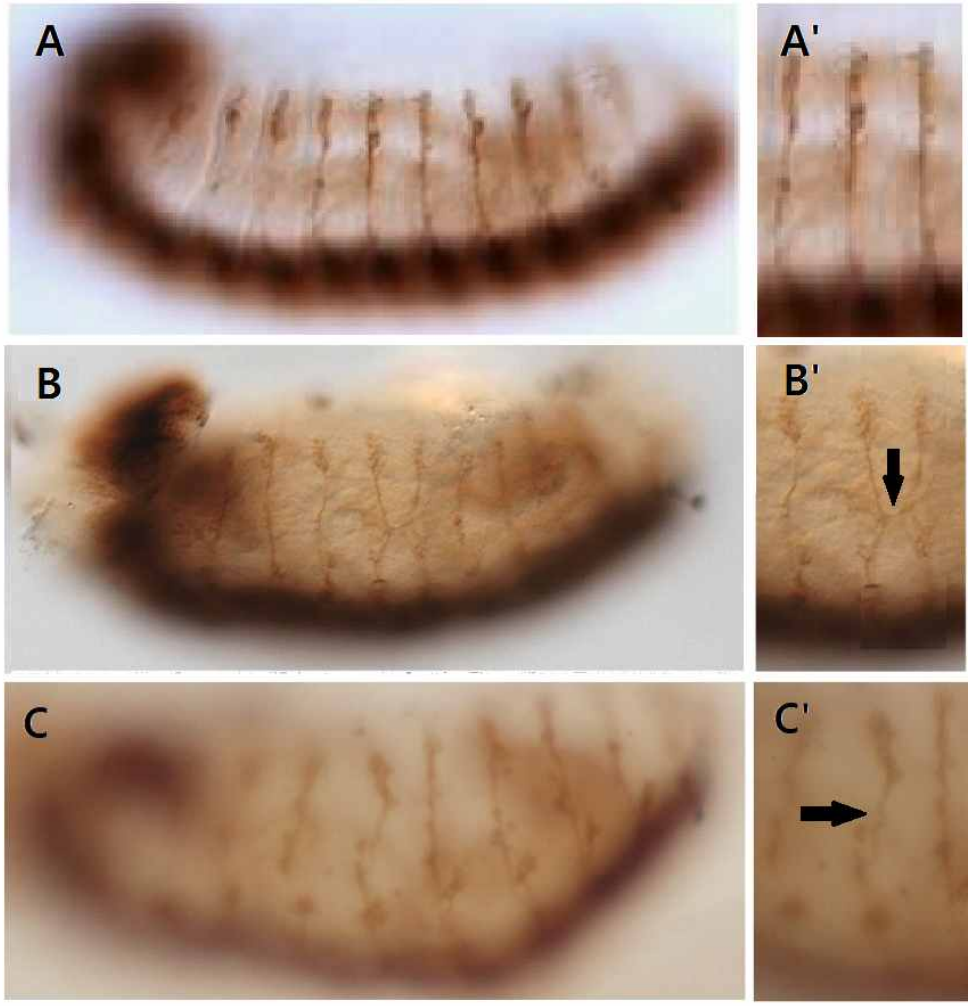

그림 14. 야생형 배아와 말초신경계(PNS)에서 이상이 나타나는 돌연변이 배아(14-15단계). (A, A') 야생형 배아. (B, B', C, C') 뻗어나가는 PNS의 축삭이 꺾어지고 두 가닥이 엉킨 모습(화살표)이 확인된다.

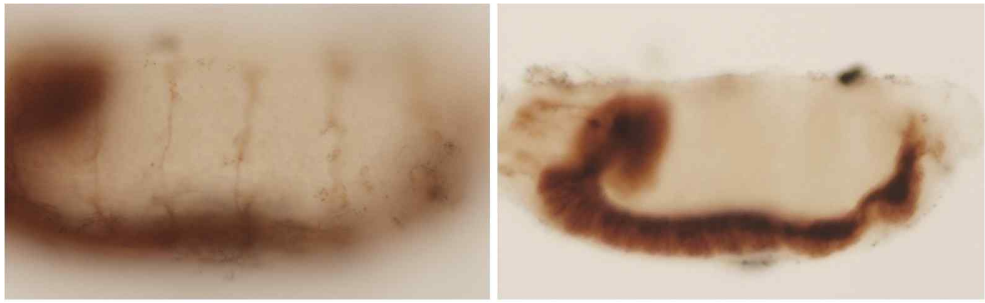

그림 15. PNS 감소를 보이는 돌연변이 배아. 14-15 단계의 배아로 신경 장축의 응축(condensation)이 일어나지 않은 상태(우측 사진 참고)에서 뻗어나가는 PNS의 감소가 확인된다(좌측 사진 참조).

제 4 장. 고　　찰

신경계는 신경세포와 신경 교세포로 구성되어 있으며 이들은 많은 유전자를 통해서 형성되고 분화가 일어난다. 신경계 형성의 궁극적인 단위는 신경세포이기 때문에 이러한 세포의 존재 유무를 조절함으로써 신경세포의 기능을 살펴보는 것이 하나의 방법이 되었다(Zhou et al, 1997). 본 연구에서는 *eve*-RN2 인핸서에 의해 조절되는 세포에서 UAS/GAL4 시스템(Brand and Perrimon, 1993)을 이용하여 세포사멸유전자를 전위적으로 발현시켜 신경세포의 기능을 확인하고자 하였다.

*UAS-rpr; UAS-grim*의 과발현에 의한 세포사멸 유도(ectopic cell death)를 확인하기 위하여 살아 있는 상태의 배아를 염색하는 AO 염색을 시행한 결과 야생형에 비해 신경 장축(longitudinal track) 부분에서 머리 및 꼬리 부분에서 더 진하게 염색되었다. 이 결과는 돌연변이 배아에서 신경 장축 및 머리 부분에 해당하는 뇌에서 UAS/GAL4 시스템에 의해 세포사멸이 추가적으로 일어났다는 것을 보여줌으로써 신경계 이상이 세포죽음에 의해서라는 것을 알려준다.

Sa´nchez-Soriano와 Prokop(2005)은 aCC, RP2 신경세포가 운동 신경세포로 분화하여 말초신경계로 뻗어나가는 초기에 나타나기 때문에 이들이 신경계 형성에 중요한 역할을 할 것이라 예측하였다. 본 연구에서는 이를 확인하기 위하여 신경세포에서 세포사멸 유전자인 *grim* 단일 유전자 과발현 혹은 *grim*, *reaper*와 같은 PCD 유전자의 조합을 동시 발현

시켜 세포의 기능을 확인하였다. 다른 한편으로는 PCD 유전자의 과량 발현을 좀 더 강하게 유도하기 위해서 GAL4 유전자를 두 복사본을 함께 이용하는 경우도 만들어 종합적으로 확인하고자 하였다. 유전자의 발현 수나 강도를 높이고자 하였던 것은 PCD 유전자가 단독으로는 효과가 없는 경우가 보고되었기 때문이었다(Zhou et al, 1997; Wu et al., 2010).

세포사멸 유전자의 종류 및 발현 정도를 달리하여 *RN2-Gal4 > UAS-grim, RN2-Gal4; RN2-Gal4 > UAS-grim, RN2-Gal4 > UAS-rpr; UAS-grim, RN2-Gal4; RN2-Gal4 > UAS-rpr; UAS-grim* 배아에서 신경계를 관찰한 결과, 세포사멸 유전자를 2종류 갖고 *RN2-Gal4*를 두 복사본 가진 경우에만 유의미한 신경계 발생 이상이 확인되었다(표 1). 세포사멸 유전자가 *grim* 한 종류인 배아에서 정상적인 표현형이 나타나는 것은 *grim* 단일 유전자가 세포사멸을 유도하기에는 충분치 않으며(Julie N. Wu et al., 2010), 2가지 이상의 세포사멸 유전자의 조합에 의해 세포사멸이 유도된다(Zhou et al., 1997)는 선행연구에서 보여준 것과 일치하는 결과를 보여주었다. 또한 세포사멸 유전자의 발현양의 조합이 일정 수준 이상을 넘어갈 때 세포 사멸이 일어난다는 선행연구(Bangs et al., 2000)에 비추어서, *RN2-Gal4*가 한 개 복사본만을 가진 경우에는 세포 사멸 유전자의 발현양이 비정상적인 세포사멸을 유도하기에는 불충분하다고 생각되었다.

RN2-Gal4; RN2-Gal4 > UAS-rpr; UAS-grim 배아에서 aCC, pCC, RP2 신경세포의 세포사멸을 유도한 결과 중추신경계(CNS)를 형성하는

신경장축(longitudinal track)의 축삭다발(axonal track)과 연계신경(commissure neuron)의 이상이 확인되었으며, 말초신경계(PNS)로 뻗어나가는 축삭에서도 이상이 관찰되었다. 말초신경계로 뻗어나가는 신경의 이상은 aCC, pCC 신경세포가 중추신경계에서 말초신경계로 뻗어나가는 일부 신경(intersegmental motor nerve, ISN)에 대해 선구적인(pioneer neuron) 역할을 한다는 선행연구(Sa´nchez-Soriano and Prokop, 2005)로 추청할 수 있었다. 또한 중추신경계를 구성하는 축삭다발과 연계신경에서의 이상은 이들 세포가 사라짐으로 연결고리를 찾지 못함으로서 나타는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 이들 신경세포가 반 체절 당 하나의 세포씩만 존재하기 때문에 대체되지 못하여 심각한 이상을 나타낼 수도 있을 것이라 생각된다.

CNS 및 PNS에서의 이상 정도가 다양하게 나타나는 것은 UAS/GAL4 system을 이용하여 세포사멸을 유도하여도 RN2 enhancer의 조절을 받는 세포가 모두 사라지지는 않기 때문이다. 배아에 따라 세포사멸이 일어난 부위 및 정도가 다를 수 있기 때문에 이들 신경세포에서부터 뻗어나오는 PNS의 운동 신경의 수가 배아에 따라 차이가 나는 것으로 보인다.

요약하면 *eve* RN2 인핸서에 의해서 조절되는 신경세포가 세포죽음을 통해서 기능을 하지 못하면 중추신경계와 말초신경계 형성에 영향을 주는 것을 확인하였다.

참 고 문 헌

Abrams, J. M., White, K., Fessler, L. I., & Steller, H. (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development, 117*, 29-43.

Arama, E., & Steller, H. (2006). Detection of apoptosis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling and acridine orange in *Drosophila* embryos and adult male gonads. *Nat Protoc, 1*(4), 1725-1731. doi: 10.1038/nprot.2006.235

Bangs, P., Franc, N., & White, K. (2000). Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation, 7*, 1027-1034.

Baron, U., & Bujard, H. (2000). Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods in Enzymology, 327*, 401-421.

Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development, 118*, 401-415

Broadus, J., & Doe, C. Q. (1995). Evolution of neuroblast identity: seven-up and prospero expression reveal homologous and divergent neuroblast fates in *Drosophila* and Schistocerca.

Development, 121, 3989-3996

Broadusa, J., Skeathb, J. B., Spanab, E. P., Bossingc, T., Technaw, G., & Doe, C. Q. (1995). New neuroblast markers and the origin of the aCC/pCC neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Mechanisms of Development, 53*, 393-402.

Chen, P., Nordstrom, W., Gish, B., & Abrams, J. M. (1996). grim, a novel cell death gene in *Drosophila*. *Genes & Development, 10*(14), 1773-1782. doi: 10.1101/gad.10.14.1773

Frasch, M., Hoey, T., Rushlow, C., Doyle, H., & Levine, M. (1987). Characterization and localization of the even-skipped protein of *Drosophila*. *The EMBO Journal, 6*(3), 749-759.

Fujioka, M., Lear, B. C., Landgraf, M., Yusibova, G. L., Zhou, J., Riley, K. M., . . . Jaynes, J. B. (2003). Even-skipped, acting as a repressor, regulates axonal projections in *Drosophila*. *Development, 130*(22), 5385-5400. doi: 10.1242/dev.00770

Fujioka, M., Emi-Sarker, Y., Yusibova, G. L., Goto T., & Jaynes, J. B. (1999). Analysis of an even-skipped rescue transgene reveals both composite and discrete neuronal and early blastoderm enhancers, and multi-stripe positioning by gap gene repressor gradients. *Development, 126*, 2527-2538.

Goto, T., Macdonald, P., & Maniatis, T. (1989). Early and late periodic patterns of even skipped expression are controlled by

distinct regulatory elements that respond to different spatial cues. *Cell, 57*(3), 413-422. doi: http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(89)90916-1

Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwieg, E., & Steller, H. (2000). Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *The EMBO Journal, 19*(4), 589-597.

Jones, B. W. (2001). Glial cell development in the *Drosophila* embryo. *BioEssays, 23*, 877-887.

Kiehart, D. P., Crawford, J. M., & Montague, R. A. (2007). Collection, dechorionation, and preparation of Drosophila embryos for quantitative microinjection. Cold Spring Harb Protoc, 2007(4), pdb. prot4717.

Klambt, C. (2009). Modes and regulation of glial migration in vertebrates and invertebrates. *Nat Rev Neurosci, 10*(11), 769-779. doi: 10.1038/nrn2720

Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ, 14*(1), 32-43. doi: 10.1038/sj.cdd.4402060

Kuzin, A., Brody, T., Moore, A. W., & Odenwald, W. F. (2005). Nerfin-1 is required for early axon guidance decisions in the developing *Drosophila* CNS. *Dev Biol, 277*(2), 347-365. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.09.027

Layden, M. J., Odden, J. P., Schmid, A., Garces, A., Thor, S., & Doe, C. Q. (2006). Zfh1, a somatic motor neuron transcription factor, regulates axon exit from the CNS. *Developmental Biology, 291*(2), 253-263. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.12.009

Lee, G., Sehgal, R., Wang, Z., Nair, S., Kikuno, K., Chen, C. H., Park, J. H. (2013). Essential role of grim-led programmed cell death for the establishment of corazonin-producing peptidergic nervous system during embryogenesis and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Biology Open, 2*(3), 283-294. doi: 10.1242/bio.20133384

Lim, J. G., & Fuller, M. T. (2012). Somatic cell lineage is required for differentiation and not maintenance of germline stem cells in *Drosophila* testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109*(45), 18477-18481. doi: 10.1073/pnas.1215516109

Maniatis, T., Goodbourn, S., & Fischer, J. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science, 5*, 1237-1245.

Martin, D. N., & Baehrecke, E. H. (2004). Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development, 131*(2), 275-284. doi: 10.1242/dev.00933

Oppenheim, R. W. (1991). Cell death during development of the

nervous system. Annual review of neuroscience, 14(1), 453-501.

Peterson, C., Carney, G. E., J., T. B., & White, K. (2002). reaper is required for neuroblast apoptosis during *Drosophila* development. *Development, 129*, 1467-1476.

Phelps, C. B., & Brand, A. H. (1998). Ectopic Gene Expression in *Drosophila* Using GAL4 System. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, 14*, 367-379.

Rothwell, W. R., & Sullivan, W. (2000). Fluorescent analysis of Drosophila embryos. Sigma, 500, 9542.

Rothwell, W. F., & Sullivan, W. (2007). Drosophila embryo collection. Cold Spring Harbor Protocols, 2007(9).

Rothwell, W. F., & Sullivan, W. (2007). Fixation of Drosophila embryos. *Cold Spring Harb Protoc, 2007*(9).

Sanchez-Soriano, N., & Prokop, A. (2005). The influence of pioneer neurons on a growing motor nerve in *Drosophila* requires the neural cell adhesion molecule homolog FasciclinII. *J Neurosci, 25*(1), 78-87. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2377-04.2005

Skeath, J. B., & Doe, C. Q. (1996). The achaete - scute complex proneural genes contribute to neural precursor specification in the *Drosophila* CNS. *Current Biology, 6*, 1146-1152.

Skeath, J. B., & Thor, S. (2003). Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Current Opinion in Neurobiology, 13*(1),

8-15. doi: 10.1016/s0959-4388(03)00007-2

Stork, T., Bernardos, R., & Freeman, M. R. (2012). Analysis of glial cell development and function in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Protocols, 2012*(1), 1-17. doi: 10.1101/pdb.top067587

Twomey, C., & McCarthy, J. V. (2005). Pathways of apoptosis and importance in development *Journal of Cellular and Molecular Medicine, 8*(2), 345-359.

Vernooy, S. Y., Chow, V., Su, J., Verbrugghe, K., Yang, J., Cole, S., Hay, B. A. (2002). *Drosophila* Bruce Can Potently Suppress Rpr- and Grim-Dependent but Not Hid-Dependent Cell Death. *Current Biology, 12*, 1164-1168.

White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Kim, F., & Stelleril, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science, 264*, 677-682.

Winbush, A., & Weeks, J. C. (2011). Steroid-triggered, cell-autonomous death of a *Drosophila* motoneuron during metamorphosis. *Neural Development, 6*, 15. doi: 10.1186/1749-8104-6-15

Wing, J. P., Schreader, B. A., Yokokura, T., Wang, Y., Andrews, P. S., Huseinovic, N., Nambu, J. R. (2002). *Drosophila* Morgue is an F box/ubiquitin conjugase domain protein important for grim-reaper mediated apoptosis. *Nature Cell Biology, 4*(6),

451-456. doi: 10.1038/ncb800

Wing, J. P., Schwartza, L. M., & Nambu, J. R. (2001). The RHG motifs of *Drosophila* Reaper and Grim are important for their distinct cell death-inducing abilities. *Mechanisms of Development, 102*, 193-203.

Wu, C. (1997). Chromatin Remodeling and the Control of Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry, 272*(45), 28171-28174. doi: 10.1074/jbc.272.45.28171

Wu, J. N., Nguyen, N., Aghazarian, M., Tan, Y., Sevrioukov, E. A., Mabuchi, M., Brachmann, C. B. (2010). *grim* promotes programmed cell death of *Drosophila* microchaete glial cells. *Mechanisms of Development, 127*(9-12), 407-417. doi: 10.1016/j.mod.2010.06.001

Xu, D., Woodfield, S. E., Lee, T. V., Fan, Y., Antonio, C., & Bergmann, A. (2014). Genetic control of programmed cell death (apoptosis) in *Drosophila*. *Fly, 3*(1), 78-90. doi: 10.4161/fly.3.1.7800

Yin, V. P., & Thummel, C. S. (2004). A balance between the diap1 death inhibitor and reaper and hid death inducers controls steroid-triggered cell death in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101*(21), 8022-8027. doi: 10.1073/pnas.0402647101

Yu, S. Y., Yoo, S. J., Yang, L., Zapata, C., Srinivasan, A., Hay, B. A.,

& Baker, N. E. (2002). A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing *Drosophila* eye. *Development, 129*, 3269-3278.

Zhou, L., Hashimi, H., Schwartz, L. M., & Nambu, J. R. (1995). Programmed cell death in the *Drosophila* central nervous system midline. *Current Biology, 5*, 784-790.

Zhou, L., Schnitzler, A., Agapite, J., Schwartz, L. M., Steller, H., & Nambu, J. R. (1997). Cooperative functions of the reaper and head involution defective genes in the programmed cell death of *Drosophila* central nervous system midline cells.

심이슬. (2013). *초파리 인슐린 신호전달계의 steppke 유전자 돌연변이가 배아 교세포 형성에 미치는 영향.* 석사학위논문, 서울대학교 대학원, 서울

이은정. (2013). *even-skipped 유전자의 RN2 enhancer에 의해서 조절되는 세포의 죽음이 신경계 발생에 미치는 영향에 대한 연구.* 석사학위논문, 서울대학교 대학원, 서울

Abstract

Understanding of the Function of *eve*- Specific Expressed Cells by Apoptosis

Kim, Gaye

Department of Science Education (Biology Major)

The Graduate School

Seoul National University

Drosophila eve-RN2 enhancer regulates *eve*-specific gene expression in aCC, pCC and RP2 neurons which are present as one per half segment of embryo, respectively. These three neurons appear at a relatively early stage of *Drosophila* embryos. It was regarded that they would do a pioneering role in forming the nervous system. In this study, we induced the cell death in aCC, pCC and RP2 neurons by ectopically expressing the programmed cell death (PCD) genes using UAS/GAL4 system and then examined how loss of these cells

affect the formation of the nervous system development. The ectopic expression of the single PCD gene did not show any abnormality in the nervous system. However, when *grim* and *reaper* were driven by two copies of RN2-GAL4 at the same time, the cell death was significantly increased, and the longitudinal track and commissure neurons were disrupted and axonal growth also abnormal. This results indicate that cells expressed by the *eve* RN2-enhancer are involved in the formation of the CNS and PNS in the *Drosophila* embryos.

keywords : *Drosophila*, programmed cell death, RN2, enhancer, neurogenesis, *eve*

Student Number : 2013-21436