



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](#)

교육학석사 학위논문

초파리의 *Pss* 유전자 기능 상실 돌연변이에
의한 미토콘드리아 이상 및 근감소증 연구

Loss of Function Mutation in *Phosphatidylserine Synthase* Causes
Abnormal Mitochondria and Muscle Atrophy in *Drosophila*

2023년 2월

서울대학교 대학원

과학교육과 생물전공

김 상 섭

초파리의 *Pss* 유전자 기능 상실 돌연변이에
의한 미토콘드리아 이상 및 근감소증 연구

Loss of Function Mutation in *Phosphatidylserine Synthase* Causes
Abnormal Mitochondria and Muscle Atrophy in *Drosophila*

지도 교수 전 상 학

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함

2022년 12월

서울대학교 대학원

과학교육과 생물전공

김 상 섭

김상섭의 교육학석사 학위논문을 인준함

2023년 1월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

초 록

인체의 주요 부분인 골격근은 전체 체중의 약 40-50%를 차지한다. 적절한 근육량을 유지하는 것은 신체활동과 물질대사에 매우 중요한데, 근육량은 근육 단백질의 합성과 분해에 의해서 조절될 수 있다. 근육의 단백질량을 조절하는 주요 신호 전달 경로는 Akt/FoxO pathway로, 전사인자인 FoxO가 과도하게 활성화되면 근감소증이 나타날 수 있다. 그러나 여전히 어떤 메커니즘들이 FoxO와 상호작용하여 근감소증을 유발하는지 완전히 밝혀지지 않고 있다. 최신 연구 결과에 따르면, 초파리의 *Phosphatidylserine synthase (Pss)* 유전자 기능 상실 돌연변이는 미토콘드리아 이상과 Akt 활성 감소를 유발한다고 한다. 이에 *Pss* 유전자가 근육에 미치는 영향을 확인하기 위해, 초파리에서 근육 특이적으로 *Pss* 유전자를 knockdown(KD) 혹은 overexpression(OE)시켰다. 이후, 초파리의 thorax에서 indirect flight muscle (IFM)을 해부하여 immunohistochemistry (IHC), western blot, paraffin-embedded section 등의 실험을 진행하였다. 실험 결과, *Pss*를 KD한 초파리는 운동 능력 감소, 미토콘드리아 이상, Akt 활성 감소, 그리고 근감소증을 보였다. 나아가 *Pss*를 KD한 초파리의 IFM에서 과도한 세포사멸과 autophagy가 나타나며, 과도한 세포사멸과 autophagy는 근감소증으로 이어졌다. 본 연구 결과는 PS와 연관된 인지질 대사 경로가 온전한 미토콘드리아와 근육량을 유지하는데 필수적이라는 것을 보여준다.

주요어 : 근감소증, Phosphatidylserine synthase, 미토콘드리아 이상, Akt/FoxO 신호 전달

학 번 : 2021-20987

목 차

제 1 장 서 론	1
제 1 절 근감소증과 미토콘드리아.....	1
제 2 절 근감소증과 Akt/FoxO	3
제 3 절 Phosphatidylserine	4
제 4 절 연구의 필요성 및 목적.....	6
제 2 장 실험 방법 및 재료.....	8
제 1 절 사용된 초파리	8
제 2 절 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).....	10
제 3 절 Western blot.....	11
제 4 절 운동능력 측정.....	11
제 5 절 초파리 IFM의 immunohistochemistry (IHC)	12
제 6 절 초파리 IFM의 paraffin-embedded section.....	15
제 3 장 결 과.....	16
제 1 절 <i>Mef2>Pss^{RNAi}</i> 초파리의 근육 기능 이상 확인	16
제 2 절 <i>Mef2>Pss^{RNAi}</i> 초파리의 미토콘드리아 이상 확인.....	21
제 3 절 <i>Mef2>Pss^{RNAi}</i> 초파리의 근감소증 표현형 확인.....	25
제 4 절 <i>Mef2>Pss^{RNAi}</i> 초파리의 Akt/FoxO 신호 전달 확인.....	29
제 4 장 고 찰.....	33
참고문헌.....	39
Abstract	46

표 목차

[표 1] Primer 서열 모음.....	10
-------------------------	----

그림 목차

[그림 1] Mating scheme 모음.....	9
[그림 2] 초파리 thorax에서의 Pss 발현량 확인.....	18
[그림 3] 초파리의 wing posture 확인.....	19
[그림 4] 초파리의 운동 능력 확인.....	20
[그림 5] 초파리 IFM의 미토콘드리아 및 actin fiber 형태 확인.....	22
[그림 6] 초파리 IFM의 ROS level 확인.....	23
[그림 7] 초파리 IFM의 세포사멸 확인.....	24
[그림 8] 초파리 IFM의 vacuolation 확인.....	26
[그림 9] 초파리 IFM의 ectopic fat accumulation 확인.....	27
[그림 10] 초파리 IFM의 크기 감소 확인.....	28
[그림 11] 초파리 thorax에서의 Akt/FoxO/4E-BP 신호 전달 확인....	31
[그림 12] 초파리 IFM의 autophagy 확인.....	32
[그림 13] Pss가 근감소증을 유발할 수 있는 두 가지 경로...	38

제 1 장 서 론

제 1 절 근감소증과 미토콘드리아

인체에서 가장 풍부한 조직인 근육은 전체 체중의 약 40-50%를 차지한다. 근육은 인체에서 가장 큰 단백질 저장고로 다른 기관들에서 사용할 수 있도록 한다. 영양분 공급과 운동을 통해 적절한 근육량을 유지하는 것은 정상적인 일상생활을 위해서 뿐만 아니라, 심장병, 당뇨병, 암 등의 위험을 줄이기 위해서도 매우 중요하다(Pate et al., 1995). 근감소증은 근육량과 근력의 상실로, 암, 후천성 면역결핍 증후군, 울혈성 심부전, 신부전 등 많은 질병에서 발생한다(Andres-Mateos et al., 2013). 근감소증의 특징으로는 근섬유 면적 감소, 근핵수, 단백질 함량, 근력 감소, 인슐린 저항성 등이 있다(Dutt et al., 2015).

미토콘드리아는 핵 DNA와 미토콘드리아 DNA 모두에서 유래한 유전자 산물로 구성되어 있으며, 어느 한 genome의 유전자 돌연변이는 산화적 인산화 장애, ATP 생산 감소 등의 미토콘드리아 질환을 야기한다. 미토콘드리아 질환은 뇌, 심장, 근육과 같은 많은 에너지를 필요로 하는 조직에 특히 심각한 영향을 미친다. 에너지 대사가 활발한 근육 조직은 미토콘드리아가 풍부하게 존재하는데, 근육에서의 미토콘드리아 이상은 과도한 세포사멸로 인한 근육량이 감소하는 근감소증(muscle atrophy)의 원인이 될 수 있다(Adhietty et al., 2008). 미토콘드리아 이상으로 인한 세포사멸은 proapoptotic 단백질과 reactive oxygen species(ROS)로 설명할 수 있다.

미토콘드리아는 cytochrome c, apoptosis-inducing factor (AIF), endonuclease G(Endo G) 등 세포질로 방출되면 세포사멸을 유도하는 proapoptotic 단백질을 갖고 있다. 미토콘드리아에서 방출된 cytochrome c는 apoptotic protease-activating factor 1(APAF-1)과

caspase-9과 단백질 복합체인 apoptosome을 형성하여 caspase-3의 절단하며, 절단된 caspase-3는 핵으로 들어가 DNA fragmentation을 유도한다(Green et al., 2004). 반면에, 미토콘드리아에서 방출된 AIF와 Endo G는 caspase의 관여 없이 직접 핵 안으로 들어가 DNA fragmentation을 유도할 수 있다.

미토콘드리아 호흡은 미토콘드리아 내막의 전자 전달 과정을 통해 일어난다. 그러나 전자 전달 과정의 이상은 매우 불안정하고, 잠재적으로 피해를 미칠 수 있는 ROS를 생산할 수 있다. 이 때문에 세포에서 미토콘드리아는 제일의 ROS 생산자이며, 미토콘드리아는 세포질보다 약 5-10배 많은 ROS를 갖고 있다(Auten & Davis, 2009). 이러한 미토콘드리아 ROS는 미토콘드리아 내막의 cytochrome *c*를 미토콘드리아 밖으로 방출시켜 초기 세포사멸을 유발하게 된다(Adhietty et al., 2008). 또한 ROS는 mitochondrial permeability transition pore(mtPTP)를 열어 proapoptotic 단백질들을 방출시키거나, 다양한 전사인자를 활성화시켜 간접적으로 세포사멸 신호전달을 유발하기도 한다.

이처럼 근육 미토콘드리아 이상은 근육에서 세포사멸을 유발하며, 이는 근감소증으로 이어질 수 있다. 그러나 근육에서의 세포사멸은 몇 가지 독특한 특징을 가지고 있다. 첫째, 근육은 다핵성 세포로 세포사멸로 인해 하나의 근핵이 사라져도 근세포 전체가 사멸하지 않는다. 다만, 이는 부분적 유전자 발현의 감소로 근세포의 크기가 줄어든다. 둘째, subsarcolemmal과 intermyofibrillar의 미토콘드리아는 형태학적, 생화학적으로 차이를 보인다. 이는 근육 세포의 세포사멸에 대한 위치적 민감도의 차이를 유발할 수 있다. 셋째, 근육은 만성적 변화(근육의 사용 혹은 비사용)에 반응하여 미토콘드리아 함량 및 구성을 바꿀 수 있다. 이러한 근육에서 미토콘드리아의 다양성은 세포사멸에 영향을 미칠 수 있다(Adhietty et al., 2008).

제 2 절 근감소증과 Akt/FoxO

근육량은 근육 단백질의 합성과 분해의 조절로도 유지될 수 있다 (Bonaldo & Sandri, 2013). 이러한 조절에 실패하여 단백질이 과도하게 분해되거나 단백질의 합성이 억제되면 근감소증이 나타난다(Ciciliot et al., 2013). 단백질 분해는 ubiquitin proteasome system과 autophagy/lysosome 경로를 통해 일어나며, 단백질 합성은 인슐린 신호 전달 경로를 통해 작동하는 Akt/TOR/FoxO에 의해 조절된다(Glass, 2010). 근감소증이 일어나는 동안 ubiquitin proteasome system과 autophagy/lysosome이 모두 활성화되며, 이 과정의 핵심 인자들은 전사인자인 FoxO family(Sandri et al., 2004)와 $\text{nF-}\kappa\text{B}$ (Cai et al., 2004)에 의해 유도된다.

Akt 경로에 의한 FoxO의 조절은 근감소증에서 Akt의 기능을 이해하는데 중요하다. 다양한 조직에서 성장 또는 생존 신호의 감소는 Akt를 비활성화하여 FoxO의 탈인산화로 이어진다. 탈인산화된 FoxO는 핵에 들어가 세포 사멸, 세포 주기 억제 등에 관련된 유전자를 활성화한다(Tran et al., 2003). Akt가 활성화되면 FoxO는 인산화되어 핵에서 세포질로 이동한다. 근감소증이 일어나는 동안 Akt 활성의 감소는 FoxO의 활성을 통해 단백질 합성을 저해하고, 단백질 분해를 증가시킨다. FoxO는 autophagy/lysosome 및 ubiquitin proteasome system에 관여하는 단백질의 발현을 유도하여 단백질의 분해를 조절한다(Milan et al., 2015; Zhao et al., 2007). 특히, autophagy는 pro-survival 메커니즘으로서, 세포내의 독성 단백질이나 손상된 세포소기관을 제거하는 기능을 한다. 그러나 과도한 autophagy는 단백질 항상성 변화, 근감소증을 유발할 수 있다(Mammucari et al., 2007).

제 3 절 Phosphatidylserine

Phosphatidylserine(PS)은 생체막을 구성하는 인지질의 한 종류로 다른 인지질들에 비해 상대적으로 소량만 존재한다. 그러나 PS가 갖는 특수한 생화학적 특성 때문에 소량으로 존재함에도 생리학적으로 매우 중요한 역할을 수행한다. PS는 원형질막 인지질 이중층의 inner leaflet에 불균형하게 분포하지만, apoptotic cell에서 세포막의 바깥쪽 표면으로 노출되어 식세포작용이 일어나도록 하는 ‘Eat-me’ 신호로도 작용한다(Fadok et al., 1998). 이외에도 PS는 신경세포 축삭돌기의 미세소관 안정화에 필요하며(Naftelberg et al., 2016), 세포외유출 과정에서 소포와 세포막의 융합에도 관여한다(Williams et al., 2009).

PS는 endoplasmic reticulum(ER)의 mitochondria-associated membrane에서 합성되며(Rusiñol et al., 1994; Stone & Vance, 2000), 합성된 PS는 미토콘드리아로 이동하거나(Voelker, 1989), plasma membrane으로 전달된다(Leventis & Grinstein, 2010). PS는 Ups2-Mdm35 복합체를 통해 미토콘드리아로 이동하는데(Aaltonen et al., 2016), 미토콘드리아로 이동한 PS는 기질로서 phosphatidylserine decarboxylase(PSD)에 의해 미토콘드리아의 형태와 기능 유지에 필수적인 phosphatidylethanolamine(PE)로 합성된다(Tasseva et al., 2013). 이는 PS의 합성이 미토콘드리아의 형태와 기능 유지에 중요하다는 것을 의미한다. 실제로 최근 연구 결과에 따르면, 초파리에서 PS를 합성하는 *Phosphatidylserine synthase(Pss)* 유전자의 발현을 억제하였을 때 미토콘드리아의 형태와 기능 이상을 보이는 것이 보고되고 있다(Park et al., 2021; Yang et al., 2019).

원형질막으로 전달된 PS는 Akt, Raf-1, protein kinase C(PKC) 등 많은 중요한 신호 단백질이 활성화되기 위한 docking site로서 작용한다(Kim et al., 2014). 그 중에서도 Akt(protein kinase B)는 세포의

생존, 성장, 증식에 중요한 역할을 하는데(Brazil & Hemmings, 2001), 그 기능 중 하나가 바로 FoxO를 인산화 시켜서 억제하는 것이다(Matsuzaki et al., 2003). 이러한 Akt가 온전히 활성화되기 위해선 PDK1과 TOR에 의해 인산화 되어야 하는데, 이때 원형질막의 PS가 필요하다(Huang et al., 2011). 최근 연구 결과에 따르면, 초파리 *Pss* 유전자의 발현을 억제하였을 때 야생형 초파리에 비해 PS가 약 20%로 감소하였으며, 그에 따라 Akt의 활성화도 감소한 것을 확인하였다(Yang et al., 2019).

제 4 절 연구의 필요성 및 목적

근감소증의 핵심 요소는 전사인자인 FoxO family다(Piccirillo et al., 2014) 최근에 초파리는 근감소증의 메커니즘을 연구하는데 유용한 모델 시스템으로 떠오르고 있다(Blazquez-Bernal et al., 2021; Graca et al., 2021; Ribot et al., 2022). 나아가 포유동물과 마찬가지로 초파리에서 FoxO를 과발현 시켰을 때 근감소증이 유발되는데, 이는 초파리가 진화적으로 보존된 근감소증 메커니즘을 갖고 있음을 의미한다(Demontis & Perrimon, 2009). 그러나 근감소증에 대한 연구가 활발히 이뤄졌음에도, 여전히 어떤 메커니즘이 FoxO와 상호작용하여 근감소증을 유발하는지는 여전히 불분명하다.

PS와 PS 대사에 관여하는 효소들의 기능을 연구하는 주요 방법은 phosphatidylserine synthase (PSS)의 발현을 변화시키는 것이다. 포유류에서 발견된 두 가지 PS 합성효소인 PSS1과 PSS2는 기질로 phosphatidylcholine(PC)와 PE를 각각 사용한다(Vance & Steenbergen, 2005). 그러나 PSS1 또는 PSS2 single knockout mouse는 생존 가능하지만 double knockout mouse는 배아 단계에서 치사한다(Arikketh et al., 2008; Bergo et al., 2002). 이러한 결과를 통해 포유류 PS의 대사는 PSS1과 PSS2 사이의 compensatory mechanism을 보여준다. 포유류와 달리 초파리는 오직 하나의 PS 합성 효소를 암호화하는 유전자(*Pss*)를 가지고 있다(Yang et al., 2019). 또한 초파리의 *Pss*는 인간의 PSS1과 PSS2 모두와 상동성을 보이며, 초파리의 *Pss* null mutant는 포유류와 마찬가지로 배아 단계에서 치사한다(Park et al., 2021). 이는 초파리가 *Pss* 유전자 기능 연구에 적합한 모델 동물이라는 것을 보여준다. 그러므로 초파리 *Pss* 유전자의 생체 내 기능들에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

이에 본 연구는 근육 특이적으로 *Pss* 유전자의 발현을 조절하여, 미토콘드리아 이상과 Akt 활성 감소에 따른 근감소증을 연구하였다. 우선, 초파리에서 근육 특이적 *Pss* 유전자 기능 상실이 근육 이상 표현형을 나타내는지 확인하기 위해 운동능력을 측정하고 근육 조직의 형태를 관찰하였다. 다음으로, 초파리의 근육에서 미토콘드리아 이상을 관찰하기 위해 형광 염색을 통해 미토콘드리아의 형태를 확인하고, ROS level을 측정하였다. 마지막으로, 근감소증의 핵심 요소인 FoxO의 활성 변화를 확인하기 위해 western blot과 qRT-PCR을 진행하였다. 이에 연구 질문을 요약하면 다음과 같다.

1. 초파리 근육 특이적으로 *Pss*를 knockdown하였을 때 근감소증 표현형이 관찰되는가?
2. 초파리 근육 특이적으로 *Pss*를 knockdown하였을 때 미토콘드리아 이상이 나타나는가?
3. 초파리 근육 특이적으로 *Pss*를 knockdown하였을 때 Akt/FoxO 신호 전달에 영향을 미치는가?

본 연구를 통해서 근감소증이 유발될 수 있는 새로운 메커니즘을 밝히고, 초파리 *Pss* 유전자가 근육에서 어떠한 기능을 하는지 규명할 수 있을 것으로 기대된다.

제 2 장 실험 방법 및 재료

제 1 절 사용된 초파리

본 연구에 사용된 *CantonS*(야생형)와 *Mef2-GAL4(y[1]w[*]; P{GAL4-mef2.R}3)* 초파리는 Bloomington Drosophila Stock Center(BDSC)에서 분양을 받았다. *Myocyte enhancer factor 2(Mef2)*는 곤충의 근육 분화에 필수적인 전사인자로, *Mef2-GAL4*는 대표적인 근육 특이적 *GAL4*-driver로 많은 초파리 근육 연구에 활용되고 있다(Yun et al., 2014). *UAS-Pss-RNAi(w[1118]; P{GD2753} v5391/CyO)* 초파리는 Vienna Drosophila Resource Center(VDRC)에서 분양을 받았으며, VDRC *Pss^{GD2753}* line의 KD 효과는 선행연구에서 검증되었다(Yang et al., 2019). *UAS-Pss(w[*]; UAS-Pss (III))* 초파리는 본 연구실의 선행연구에서 제작되었는데(Park et al., 2021), 기존의 *UAS-Pss* line이 존재하지 않아 해당 line을 사용하였다. 유전자 발현을 조절하기 위해 *GAL4/UAS* 시스템을 이용하였다(Brand & Perrimon, 1993). 대조군으로는 *GAL4* control인 *Mef2>+*를 이용하였으며, KD과 OE 초파리는 각각 *Mef2>Pss^{RNAi}*와 *Mef2>Pss*로 표기하였다. 본 연구에 사용된 모든 초파리는 수컷 초파리로, 표준 옥수수와 효모(cornmeal/yeast) 배지에서, 온도 25°C, 습도 50%, 12h:12h light:dark 주기의 인큐베이터에서 배양되었다.

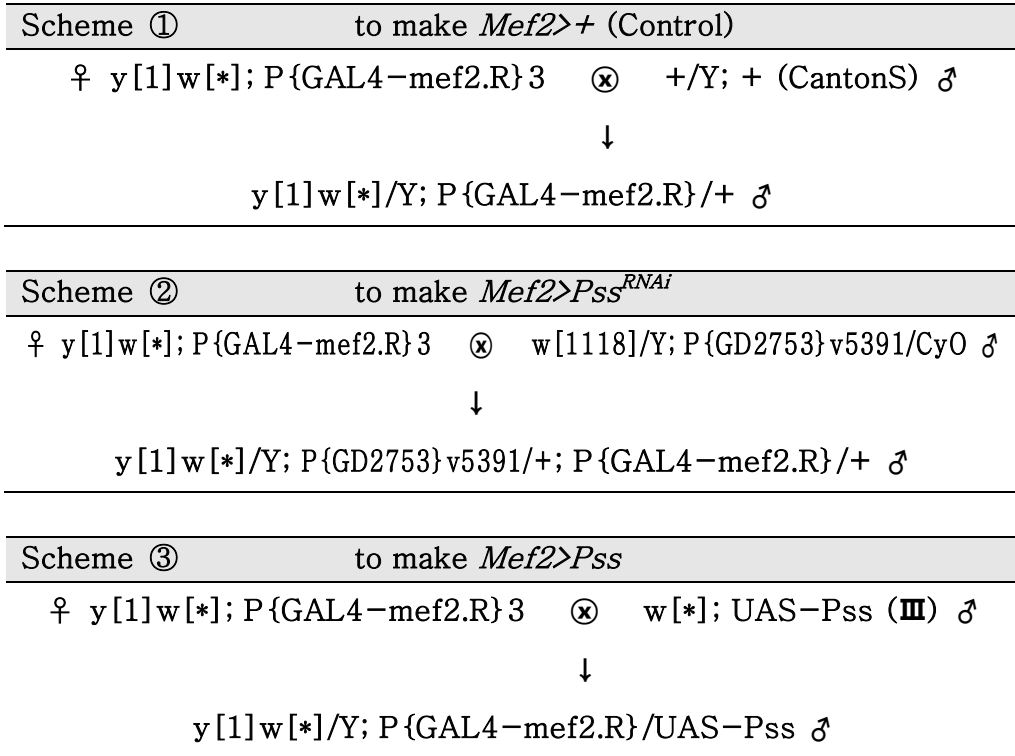


그림 1. Mating schemes 모습

제 2 절 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

특정 유전자 발현량의 변화를 mRNA level에서 확인하기 위해 qRT-PCR을 진행하였다. *Mef2-GAL4*는 초파리의 thorax에서 강하게 발현하는데(Yun et al., 2014), 근육 특이적으로 mRNA level을 확인하기 위해 초파리의 thorax만을 해부하여 실험하였다. 5일차 초파리 7마리의 thoraces에서 NucleoZOL(MN)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA를 역전사를 통해 cDNA를 합성하기 위해 All-In-One 5X RT MasterMix(abm)를 사용하였다. TOPreal™ SYBR Green qPCR PreMIX(enzymomics)를 사용하여 Rotor-Gene Q(QIAGEN)에서 qRT-PCR를 수행하였다. 유전자 발현량은 *Ribosomal protein L32(RpL32, Rp49)*를 reference gene으로 정량 하였으며, 3번의 experimental repeat과 biological repeat을 진행하였다. 통계 분석은 two-tailed, unpaired *t*-test 검정을 통해 이뤄졌다.

표 1. Primer 서열 모음

유전자 종류	Primer 서열
RpL32-F	5' -GGATCGATATGCTAAGCTGTCGCACA-3'
RpL32-R	5' -GGTGCGCTTGTTTCGATCCGTAACC-3'
Pss-F	5' -ACTGTCCAAGTAATAATCTCG-3'
Pss-R	5' -GGCGACAATTTACCTTTCGAG-3'
Akt-F	5' -CATGTACGAGATGATCTGTGG-3'
Akt-R	5' -AGAATGGATGTGCTTGTATCTC-3'
4E-BP-F	5' -TGATCACCAGGAAGGTTGTCATCTC-3'
4E-BP-R	5' -GAGCCACGGAGATTCTTCATGAAAG-3'

제 3 절 Western blot

특정 단백질을 정량 하거나 인산화 정도를 확인하기 위해 western blot을 진행하였다. 5일차 초파리 7마리의 thoraces는 lysis buffer에서 motorized pestle을 이용하여 homogenization되었다. Lysis buffer는 RIPA buffer(150mM Sodium chloride, 1% Triton X-100, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 2mM EDTA)에 Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific)를 희석하여 만들었다. 15µg의 샘플 단백질은 6% 혹은 10% SDS-PAGE gel을 이용하여 분리하였고, PVDF membrane (Millipore)로 transfer되었다. 본 연구에 사용된 항체는 anti-Pss (Custom antibody, Thermo Scientific), anti-beta Actin(abcam) anti-Akt(Cell signaling), anti-phospho-Akt(Ser473) (Cell signaling), 그리고 anti-dFoxO(Cosmo Bio)가 있으며, loading control로 β -Actin을 이용하였다. anti-Akt 항체와 anti-phospho-Akt (Ser473) 항체는 포유류의 Akt 단백질에 대한 항체이지만 해당 항체가 초파리의 Akt 단백질도 탐지하는 것으로 확인되었다(Yang et al., 2019). 이는 포유류 Akt 인산화 자리인 Ser473과 Thr308이 초파리 Akt 인산화 자리인 Ser505와 Thr342와 매우 높은 상동성을 보이기 때문이다(Scanga et al., 2000).

제 4 절 운동능력 측정

Climbing ability를 측정하기 위해, 5일차 초파리 20마리를 높이 27.7cm, 직경 2.6cm의 vial로 옮겼다. 초파리를 옮긴 뒤, vial을 조심스럽게 두드리며 모든 초파리가 바닥에 위치하도록 하였다. 이후, 초파리가 기어올라가는 것을 비디오로 촬영하고 촬영한 비디오를 분석하여 10초 동안 초파리가 올라간 거리의 평균을 구했다. Vial 당 5번씩 실험을 반

복하였으며, 통계 분석은 two-tailed, unpaired *t*-test 검정을 통해 이뤄졌다.

Flight ability를 측정하기 위해, (Babcock & Ganetzky, 2014)의 방법을 변형하여 실험하였다. 5일차 초파리 30마리를 높이 46.5cm, 직경 6.5cm의 mass cylinder에 떨어뜨렸다. 이때, mass cylinder의 안쪽 표면은 mineral oil을 발라 초파리들이 착지하였을 때 고정될 수 있도록 하였다. 이후, 초파리가 착지한 위치의 높이를 측정하였으며, 통계 분석은 two-tailed, unpaired *t*-test 검정을 통해 이뤄졌다.

제 5 절 초파리 IFM의 immunohistochemistry(IHC)

초파리의 근육에서 미토콘드리아를 관찰하기 위해 thorax에서 indirect flight muscle(IFM)을 해부하였다. IFM은 미토콘드리아와 actin fiber가 평행하게 나열되어 있어 초파리의 미토콘드리아 연구에 많이 이용되고 있다(Chen et al., 2020; Katti et al., 2021). 해부한 IFM은 streptavidin과 phalloidin으로 염색하였다. 미토콘드리아의 matrix에는 biotinylated protein이 풍부한데, 이를 활용하여 streptavidin으로 미토콘드리아를 특이적으로 labeling할 수 있다(Hollinshead et al., 1997). Phalloidin은 *Amanita phalloides*에서 추출된 bicyclic peptide로, 선택적으로 F-actin을 labeling할 수 있다(Faulstich et al., 1988). 5일차 초파리의 머리와 날개를 제거하고 4% paraformaldehyde(PFA)로 상온에서 1시간 동안 고정시켰다. 0.1% PBST(PBS + Triton X-100)로 washing한 뒤, PBS에서 초파리의 thorax에서 IFM을 해부하였다. 해부한 조직은 0.5% PBST에서 5분간 permeabilization 시킨 뒤, 다시 0.1% PBST로 washing을 했다. 10% normal goat serum(NGS)으로 30분간 blocking한 뒤, actin fiber는 Rhodamine Phalloidin (Invitrogen)으로, mitochondria는 streptavidin, Alexa Fluor 488-conjugate(Invitrogen)로 각각 overnight, 4°C로 처리하였다. 다음 날, 0.1% PBST로 조직을 washing하고, slide에 Fluoromount-G

(SouthernBiotech)로 mounting하였다. Slide는 LSM880 laser scanning confocal microscopy(Carl Zeiss)를 이용하여 1,000X 배율로 관찰하였다.

미토콘드리아 이상에 따른 ROS level의 변화를 확인하기 위해 IFM을 dihydroethidium(DHE)로 염색하였다. ROS에 의해 DHE가 산화되면 DNA에 binding하여 붉은색 형광을 띠는 ethidium이 생성된다(Kitada et al., 2003). 이에 DAPI로 핵을 함께 염색하여 붉은색 형광이 푸른색 형광과 겹치는지 확인하였다. PBS에서 5일차 초파리의 IFM을 해부하였다. 해부한 조직은 바로 30 μ M Dihydroethidium(DHE, Invitrogen)로 7분 간 처리하였다. 조직을 PBS로 washing한 뒤에 4% PFA로 8분 간 고정시켰다. 다시 PBS로 washing한 조직은 slide에 Antifade Mounting Medium with DAPI(Vector)로 mounting하였다. Slide는 LSM880 laser scanning confocal microscopy(Carl Zeiss)를 이용하여 400X 배율로 관찰하였다.

ROS 증가에 따른 세포사멸을 확인하기 위해 IFM에서 Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling(TUNEL) assay를 진행하였다. 세포사멸 중에 DNA fragmentation이 일어나는데, label된 dUTP와 함께 terminal deoxynucleotidyl transferase를 반응시키면 세포사멸 중인 세포를 특이적으로 탐지할 수 있다(Gavrieli et al., 1992). 초파리의 IFM에서 세포사멸을 관찰하기 위해, 5일차 초파리의 IFM을 해부하고 4% PFA로 상온에서 1시간 동안 고정시켰다. 0.1% PBST로 washing한 뒤, 0.1M sodium citrate로 65 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리하여 permeabilization 시켰다. PBS로 washing한 뒤, in Situ Cell Death Detection Kit, TMR red(Roche)를 이용하여 38 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 TUNEL 반응을 일으켰다. 이후, 0.1% PBST로 조직을 washing하고, slide에 Antifade Mounting Medium with DAPI(Vector)로 mounting하였다. Slide는 LSM880 laser scanning confocal microscopy(Carl Zeiss)를 이용하여 400X 배율로 관찰하였다.

과도한 autophagy는 근감소증을 유발할 수 있다(Mammucari et al.,

2007). 초파리의 thorax에서 autophagy/lysosome을 관찰하기 위해, PBS에서 5일차 초파리의 IFM을 해부하였다. 해부한 조직은 바로 100 μ M LysoTracker Yellow HCK(Invitrogen)로 37°C에서 30분 간 처리하였다. 조직을 PBS로 washing한 뒤에 slide에 Antifade Mounting Medium with DAPI(Vector)로 mounting하였다. Slide는 LSM880 laser scanning confocal microscopy(Carl Zeiss)를 이용하여 400X 배율로 관찰하였다.

제 6 절 초파리 IFM의 paraffin-embedded section

초파리의 근감소증을 형태학적으로 분석하기 위해, 선행연구에서 제시한 방법을 응용하여 paraffin-embedded section을 진행하였다 (Kucherenko et al., 2010). 5일차 초파리를 Carnoy's solution (ethanol: chloroform: acetic acid at 6: 3: 1)에서 고정시킨 뒤, 40%, 70%, 100% ethanol 용액을 이용하여 탈수 과정을 진행하였다. 이후, 초파리에 paraffin을 침투시킨 뒤 RM2235 Manual Rotary Microtome (Leica)를 이용하여 5um 두께로 잘랐다. Paraffin 절편을 HistoBond slide에 붙인 뒤, Hematoxylin and eosin staining (H&E staining)하였다. 염색된 slide는 DE/Axio Imager A1 microscope (Carl Zeiss)를 이용하여 관찰하였다.

제 3 장 결 과

제 1 절 *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리의 근육 기능 이상 확인

초파리 thorax에서 *Mef2-GAL4*의 KD과 OE의 효과를 확인하기 위해 qRT-PCR과 western blot을 통해 mRNA level과 protein level을 확인하였다. qRT-PCR의 결과, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리는 대조군 초파리보다 *Pss*의 mRNA level이 약 $0.14(\pm 0.029)$ 배로 감소한 것을 확인하였다(그림 2A). 반면에 *Mef2>Pss* 초파리는 대조군 초파리보다 *Pss*의 mRNA level이 약 $39.14(\pm 7.186)$ 배 증가한 것을 보여주었다. 통계 분석은 unpaired *t*-test로 진행하였으며, *Mef2>Pss^{RNAi}* ($p=0.0002$)와 *Mef2>Pss* ($p=0.0008$) 모두 대조군과 mRNA level의 차이를 보임을 통계적으로 확인하였다. Western blot의 결과, 대조군에서 약 40kDa 부근에서 *Pss*의 band를 관찰하였다(그림 2B). 반면, *Mef2>Pss^{RNAi}*는 해당 부근에서 band가 관찰되지 않았고, *Mef2>Pss*는 해당 부근에 매우 두꺼운 band가 관찰되었다. 이를 통해 효과적으로 *Pss*의 KD과 OE가 일어난 것을 확인할 수 있었다.

대조군 초파리와 *Mef2>Pss* 초파리는 몸의 축과 평행하게 날개를 모으고 있는 반면, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리는 ‘들린 날개 자세(held-up wing posture)’를 나타내는 것을 관찰하였다(그림 3). 이는 IFM에 이상이 있다는 것을 의미한다. 근육 이상에 따른 운동 능력 감소를 확인하기 위해 climbing assay와 flight assay를 진행하였다. Climbing assay 결과, 대조군 초파리는 평균 $17.47(\pm 0.224)$ cm, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리는 평균 $3.61(\pm 0.797)$ cm, *Mef2>Pss* 초파리는 평균 $10.50(\pm 1.017)$ cm를 올라갔다(그림 4A). 통계 분석은 unpaired *t*-test로 진행하였으며, *Mef2>Pss^{RNAi}* ($p<0.0001$)와 *Mef2>Pss* ($p=0.0003$) 모두 대조군과 climbing ability의 차이를 보임을 통계적으로 확인하였다. Flight assay 결과, 대조군 초파리는 평균 $30.88(\pm 5.898)$ cm, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리는 평균 $19.67(\pm 11.573)$ cm, *Mef2>Pss* 초파리는 평균

26.60(\pm 8.855)cm에서 착지하였다(그림 4B). 통계 분석은 unpaired t -test로 진행하였으며, $Mef2 > Pss^{RNAi}$ ($p < 0.0001$)와 $Mef2 > Pss$ ($p = 0.0159$) 모두 대조군과 flight ability의 차이를 보임을 통계적으로 확인하였다.

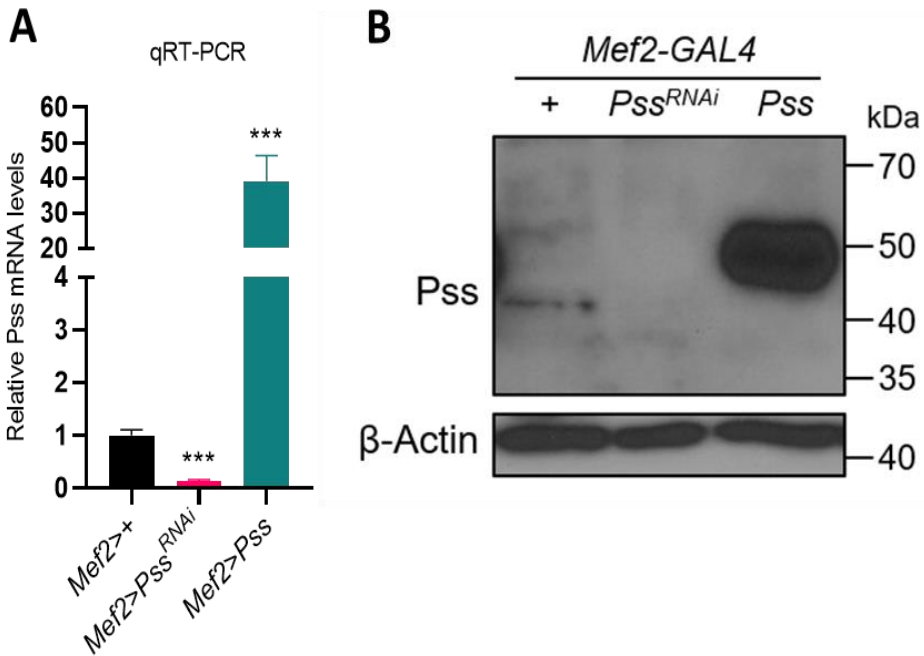


그림 2. 초파리 thorax에서의 Pss 발현량 확인

(A) 초파리 thorax에서 Pss에 대한 qRT-PCR을 진행하였다. 3번의 biological repeat을 하였다. 데이터는 mean ± SD를 보여주며, 통계 분석은 unpaired *t*-test을 통해 이뤄졌다. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (B) 초파리 thorax에서 Pss에 대한 western blot을 진행하였다. Loading control로 β-Actin을 이용하였다.

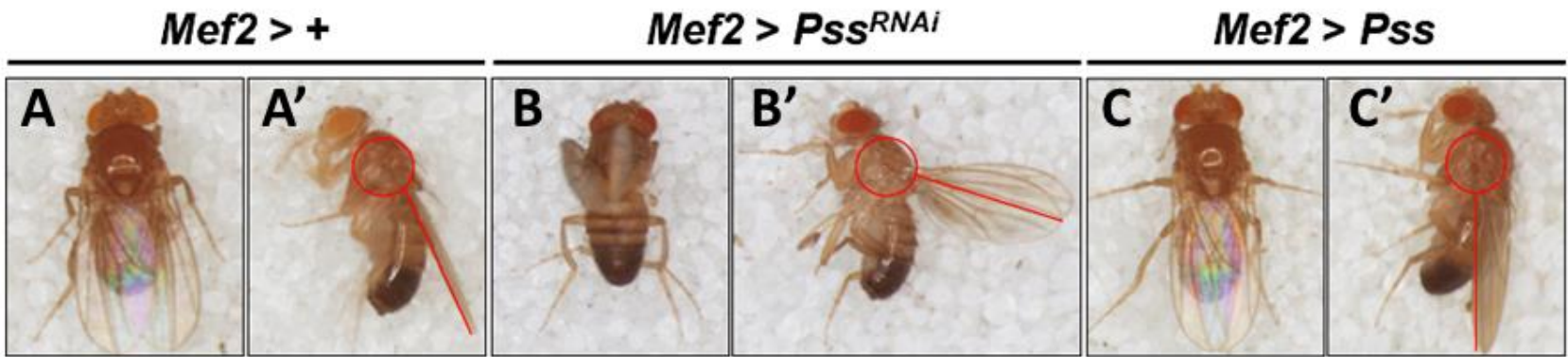


그림 3. 초파리의 wing posture 확인

5일차 초파리의 whole body image. (A, A') 대조군 초파리 wing posture는 몸의 축과 평행하다. (B, B') *Mef2*>*Pss*^{RNAi} 초파리는 'held-up' wing posture를 가지고 있다. (C, C') *Mef2*>*Pss* 초파리 wing posture는 몸의 축과 평행하다. 사진의 붉은 선은 날개의 축을 표시한 것이다.

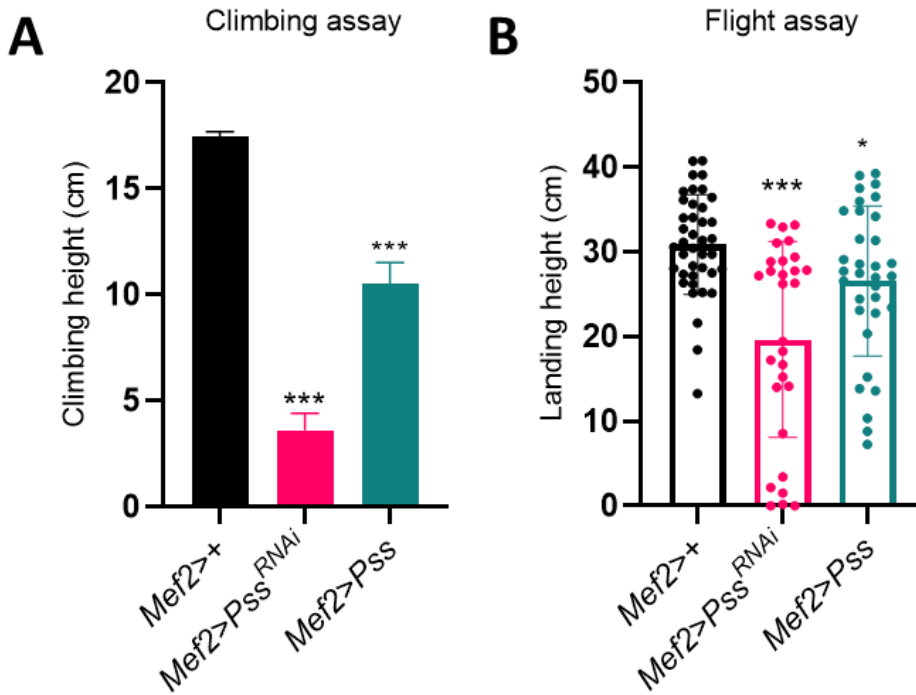


그림 4. 초파리의 운동 능력 측정

(A) 각 genotype에 따른 5일차 초파리의 climbing ability를 측정하였다. 각 line은 20마리의 초파리로 5번의 experimental repeat을 하였다. (B) 각 genotype에 따른 5일차 초파리의 flight ability를 측정하였다. 각 line 당 30마리의 초파리로 실험을 진행하였다. 데이터는 mean \pm SD를 보여주며, 통계 분석은 unpaired *t*-test을 통해 이뤄졌다. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

제 2 절 *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리의 미토콘드리아 이상 확인

초파리 IFM에서 미토콘드리아 형태와 actin fiber를 관찰하기 위해 IHC를 진행하였다. 대조군 초파리의 미토콘드리아는 대부분 정상적인 크기와 tubular한 형태로 관찰되었고(그림 5A), actin fiber 또한 정상적인 두께와 서로 평행하게 존재하는 것을 확인하였다(그림 5A'). 반면, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리의 미토콘드리아는 대부분 작고 circular한 형태로 관찰되었으며(그림 5B), actin fiber는 대조군에 비해 얇아졌으며 흐트러진 상태로 존재했다(그림 5B'). *Mef2>Pss* 초파리는 대조군 초파리와 비슷하게 tubular한 미토콘드리아와(그림 5C) 정상적인 actin fiber를 보였다(그림 5C'). 이를 통해 근육 특이적으로 *Pss*를 KD하면 심각한 미토콘드리아 이상이 생기는 것을 확인하였다.

미토콘드리아 이상에 따른 ROS level 증가를 확인하기 위해 초파리 IFM에서 DHE staining을 진행하였다. 대조군 초파리와 *Mef2>Pss* 초파리는 모두 DHE 형광 신호가 거의 나타나지 않았다(그림 6A', C'). 그에 따라 대조군 초파리와 *Mef2>Pss* 초파리의 DAPI 형광 신호와 DHE 형광 신호가 겹치는 부분을 발견하지 못했다(그림 6A'', C''). 반면, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리에서는 매우 강한 DHE 형광 신호가 관찰되었다(그림 6B'). 또한 DHE 형광 신호가 강한 부분이 DAPI 형광 신호와 겹치는 것을 확인하였다(그림 6B''). 이를 통해 근육 특이적으로 *Pss*를 KD하면 ROS level이 증가하는 것을 확인하였다.

ROS level 증가에 따른 세포사멸 증가를 확인하기 위해 초파리 IFM에서 TUNEL assay를 진행하였다. 대조군 초파리와 *Mef2>Pss* 초파리는 모두 TUNEL 형광 신호가 거의 나타나지 않았다(그림 7A, C). 반면, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리에서는 매우 강한 TUNEL 형광 신호가 관찰되었다(그림 7B). 또한 TUNEL 형광 신호가 DAPI 형광 신호와 겹치는 것을 확인하였다(그림 7B''). 이를 통해 근육 특이적으로 *Pss*를 KD하면 세포사멸이 증가하는 것을 확인하였다.

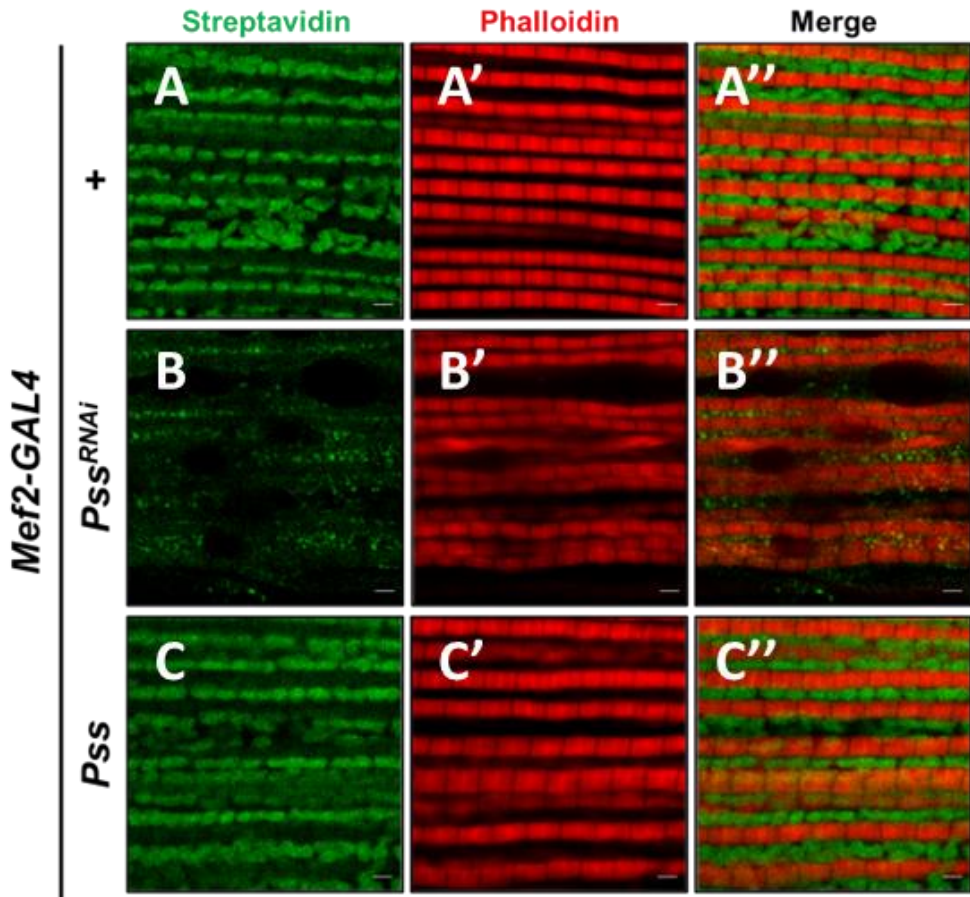


그림 5. 초파리 IFM의 미토콘드리아 및 actin fiber 형태 확인

각 genotype에 따른 5일차 초파리의 IFM을 형광 염색 사진. (A, B, C) Streptavidin(초록색)으로 염색된 부분은 미토콘드리아다. (A', B', C') Phalloidin(붉은색)으로 염색된 부분은 actin fiber를 나타낸다. Scale bar, 2 μ m

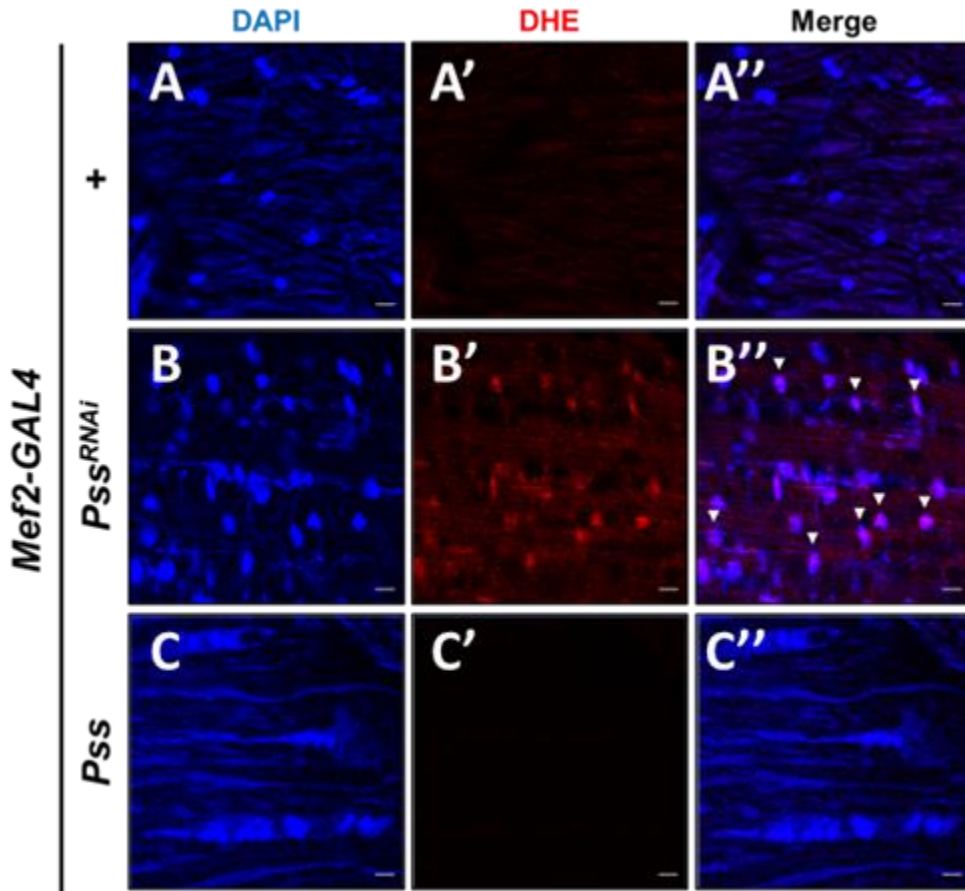


그림 6. 초파리 IFM의 ROS level 확인

각 genotype에 따른 5일차 초파리의 IFM을 형광 염색 사진. (A, B, C) DAPI(파란색)로 염색된 부분이 핵이다. (A', B', C') DHE(붉은색)로 염색된 부분은 ROS level을 나타낸다. DAPI와 DHE의 신호가 겹치는 부분(보라색)을 하얀색 화살촉으로 표시하였다. Scale bar, 5 μ m

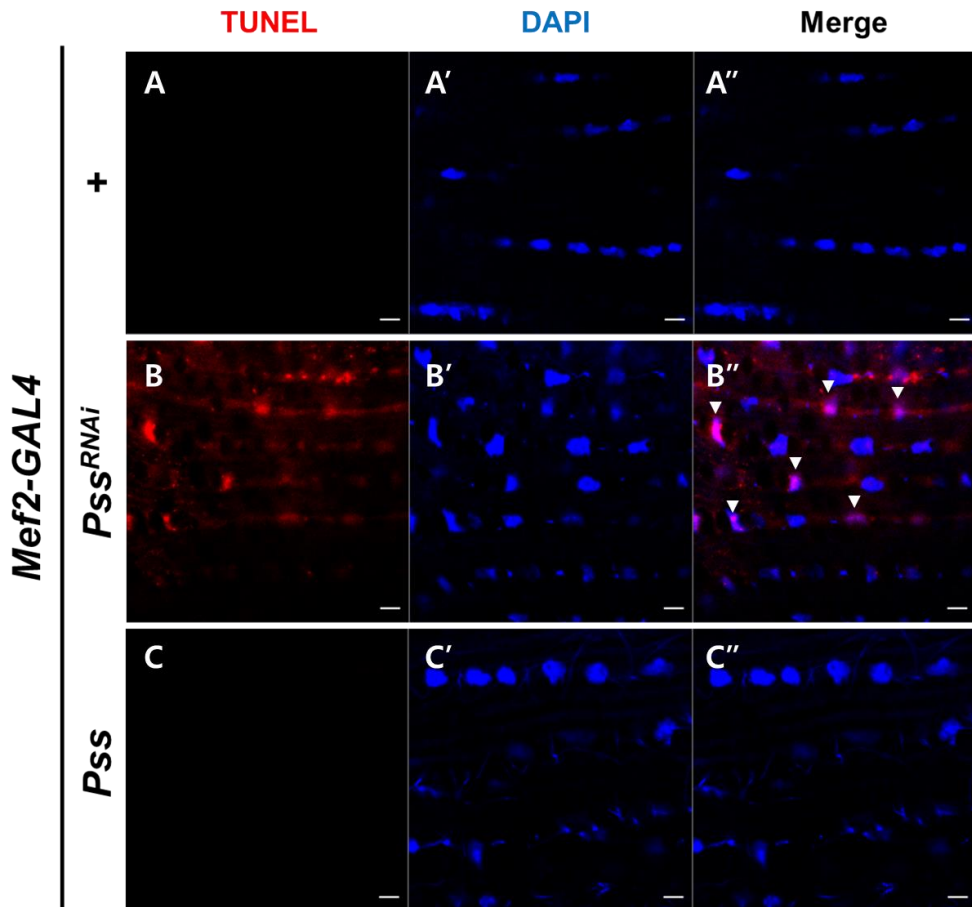


그림 7. 초파리 IFM의 세포사멸 확인

각 genotype에 따른 5일차 초파리의 IFM을 형광 염색 사진. (A, B, C) DAPI(파란색)로 염색된 부분이 핵이다. (A', B', C') TUNEL assay (붉은색)로 염색된 부분은 세포사멸을 나타낸다. DAPI와 TUNEL의 신호가 겹치는 부분(보라색)을 하얀색 화살촉으로 표시하였다. Scale bar, 5 μ m

제 3 절 *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리의 근감소증 표현형 확인

초파리 IFM에서 미토콘드리아 형태와 actin fiber를 관찰하는 과정에서 *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리에서만 특이적으로 과도한 vacuolation이 일어난 것을 확인하였다(그림 8). 선행 연구에 따르면 초파리 *Pss* loss-of-function이 ectopic lipid storage를 증가시킨다고 한다(Yang et al., 2019). Vacuole의 정체가 비대해진 lipid droplet인지 확인하기 위해 Nile red로 IFM을 staining하였다. 실험 결과, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리는 actin fiber disorganization을 보였으며, 과도한 intramuscular ectopic fat(Nile red staining)을 나타냈다(그림 9B). 이를 통해 *Pss* knockdown이 intramuscular ectopic fat accumulation을 초래한다는 것을 결론 내릴 수 있다.

근육 조직의 과도한 vacuolation은 근감소증의 표현형 중 하나이다. 이에 초파리 IFM을 조직학적으로 관찰하기 위해 paraffin-embedded section을 진행하였다. Longitudinal section에서 대조군 초파리 IFM은 thorax의 모든 부분을 채우고 있었으며(그림 10A), transverse section에서도 정상적인 크기의 IFM을 가지고 있었다(그림 10A') 반면, longitudinal section에서 *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리 IFM은 대조군에 비해 매우 얇아졌으며 끊어진 부분이 관찰되었(그림 10B). Transverse section에서도 IFM이 매우 찌그러든 모습을 보였다(그림 10B'). *Mef2>Pss* 초파리는 대조군 초파리와 비슷한 크기의 IFM이 관찰되었다(그림 10C, C'). 이를 통해 근육 특이적으로 *Pss*를 KD하면 심각한 근감소증이 나타나는 것을 확인하였다.

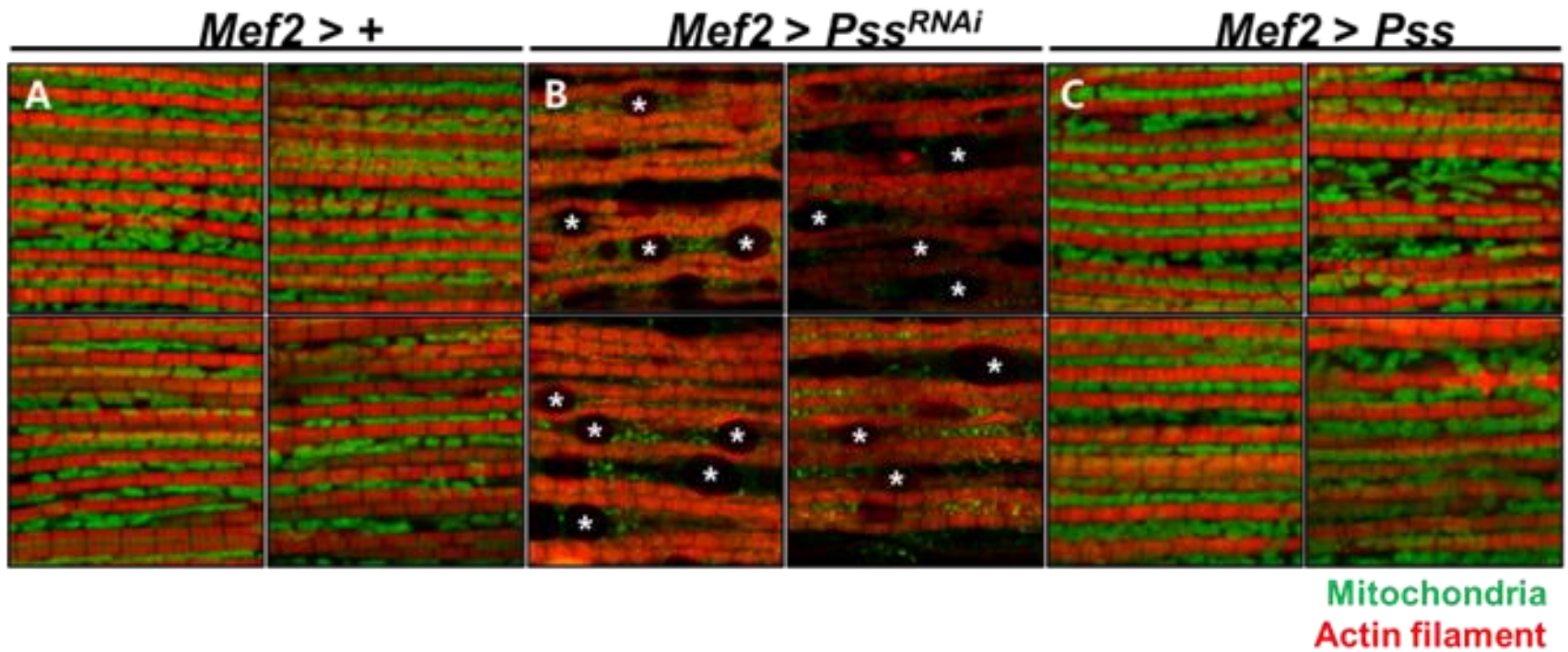


그림 8. 초파리 IFM의 vacuolation 확인

각 genotype에 따른 5일차 초파리의 IFM을 형광 염색 사진. (A, C) 대조군 초파리와 *Mef2>Pss* 초파리는 actin filament 사이로 미토콘드리아가 빼곡하게 존재한다. (B) *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리는 actin filament가 매우 얇아져 있으며, vacuole이 존재한다. Vacuole은 흰색 별표로 표시하였다. Scale bar, 2 μ m

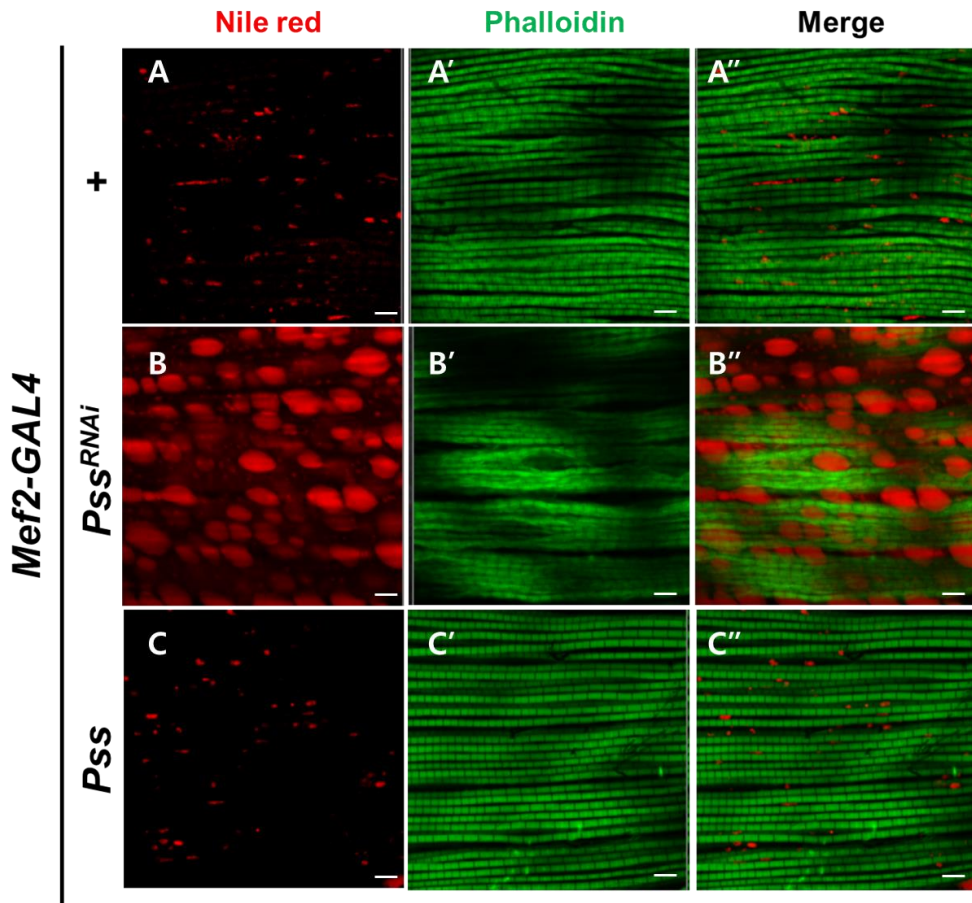


그림 9. 초파리 IFM의 ectopic fat accumulation 확인

각 genotype에 따른 5일차 초파리의 IFM을 형광 염색 사진. (A, B, C) Nile red(붉은색)으로 염색된 부분은 lipid droplet이다. (A', B', C') Phalloidin(초록색)으로 염색된 부분은 actin fiber를 나타낸다. Scale bar, 5 μ m

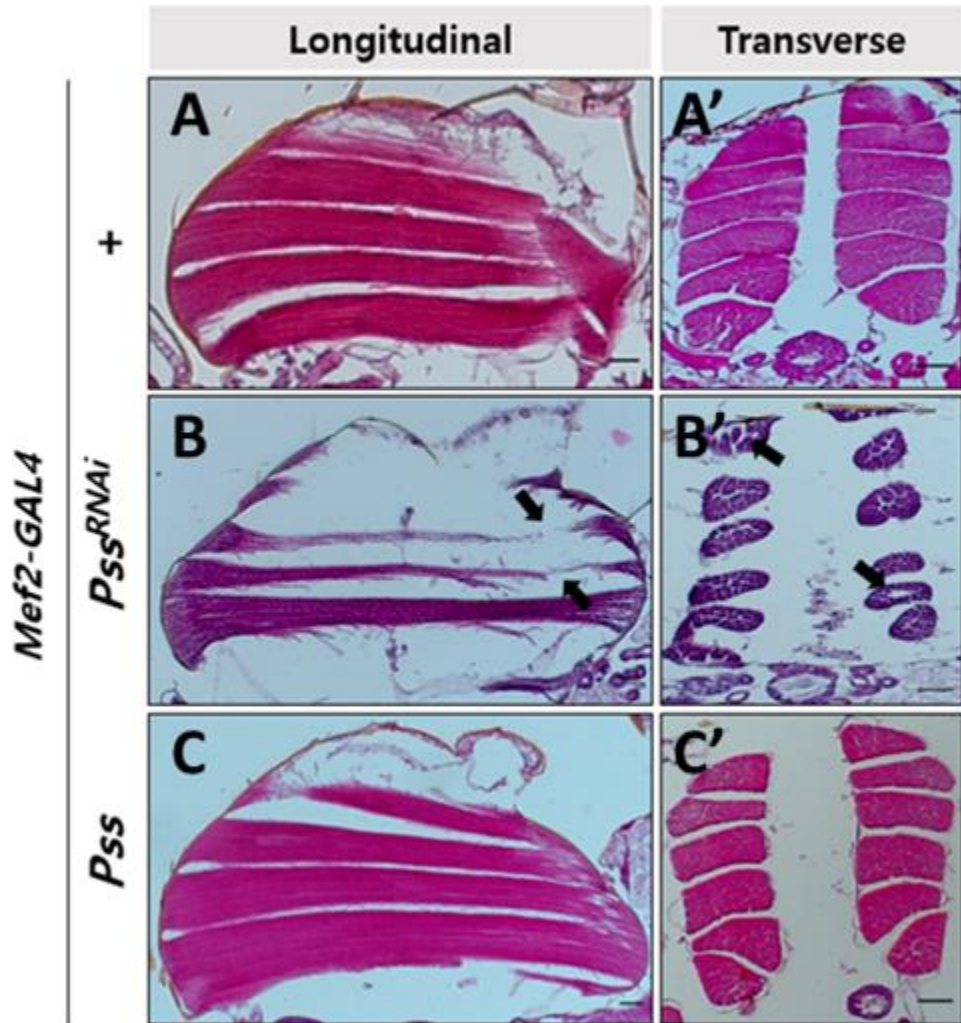


그림 10. 초파리 IFM의 크기 감소 확인

(A, B, C) 각 genotype에 따른 5일차 초파리의 IFM을 longitudinal section한 단면과 (A', B', C') transverse section한 단면을 나타낸다. Section 후 H&E staining을 하였다. 검은색 화살표는 IFM이 심각하게 감소한 부분을 나타낸 것이다. Scale bar, 100 μ m

제 4 절 *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리의 Akt/FoxO 신호 전달 확인

근육 특이적으로 *Pss*를 KD하면 근감소증이 나타나는 분자적 메커니즘을 확인하고자 western blot과 qRT-PCR을 진행하였다. Phosphorylated Akt(P-Akt)에 대한 western blot을 진행한 결과, 대조군과 *Mef2>Pss*에 비해 *Mef2>Pss^{RNAi}*의 P-Akt 양이 매우 감소한 것을 확인할 수 있었다(그림 11A). 반면, total Akt(T-Akt)의 양은 대조군, *Mef2>Pss*, *Mef2>Pss^{RNAi}* 모두 비슷한 양을 갖고 있는 것을 볼 수 있었다. Akt에 대한 qRT-PCR 결과, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리는 대조군 초파리보다 Akt의 mRNA level이 약 $1.04(\pm 0.593)$ 배, *Mef2>Pss* 초파리는 대조군 초파리보다 Akt의 mRNA level이 약 $0.81(\pm 0.491)$ 배로 각각 나타났다(그림 11B). 통계 분석은 unpaired *t*-test로 진행하였으며, *Mef2>Pss^{RNAi}* ($p=0.9254$)와 *Mef2>Pss* ($p=0.5766$) 모두 대조군과 mRNA level의 차이가 없음을 통계적으로 확인하였다. 이를 통해 근육 특이적으로 *Pss*를 KD하면, Akt의 발현량에는 변화가 없지만 Akt의 활성이 급격하게 감소하는 것을 확인하였다.

Akt 활성 감소에 따른 FoxO 활성 증가를 확인하고자 western blot과 qRT-PCR을 진행하였다. FoxO에 대한 western blot을 진행한 결과, 대조군과 *Mef2>Pss*에 비해 *Mef2>Pss^{RNAi}*의 phosphorylated FoxO (P-FoxO) 양이 매우 감소한 것을 확인할 수 있었다(그림 11C). 반면, 대조군과 *Mef2>Pss*에 비해 *Mef2>Pss^{RNAi}*에서 활성 상태의 FoxO가 더 많은 것을 볼 수 있었다. FoxO의 대표적인 target gene인 *4E-BP*에 대한 qRT-PCR 결과, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리는 대조군 초파리보다 *4E-BP*의 mRNA level이 약 $2.48(\pm 0.315)$ 배 증가하였고, *Mef2>Pss* 초파리는 대조군 초파리보다 *4E-BP*의 mRNA level이 약 $1.50(\pm 0.450)$ 배로 나타났다(그림 11D). 통계 분석은 unpaired *t*-test로 진행하였으며, *Mef2>Pss^{RNAi}* ($p=0.0039$)는 대조군과 mRNA level의 차이를 보임을 통계적으로 확인하였다. 반면, *Mef2>Pss* ($p=0.1358$)는 대조군과

mRNA level의 차이가 없음을 통계적으로 확인하였다. 이를 통해 근육 특이적으로 *Pss*를 KD하면 FoxO의 활성이 과도하게 증가하는 것을 확인하였다.

FoxO 활성 증가에 따른 autophagy 증가를 확인하기 위해 LysoTracker를 이용하여 lysosome을 염색하였다. 대조군 초파리와 *Mef2>Pss* 초파리는 모두 LysoTracker 형광 신호가 매우 약하게 나타났다(그림 12A, C). 반면, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리에서는 IFM 전체에 걸쳐서 puncta가 퍼져 있는 것을 발견하였다(그림 12B). 이러한 puncta는 대조군 초파리와 *Mef2>Pss* 초파리에서는 관찰되지 않았다. 이를 통해 근육 특이적으로 *Pss*를 KD하면 autophagy가 증가하는 것을 확인하였다.

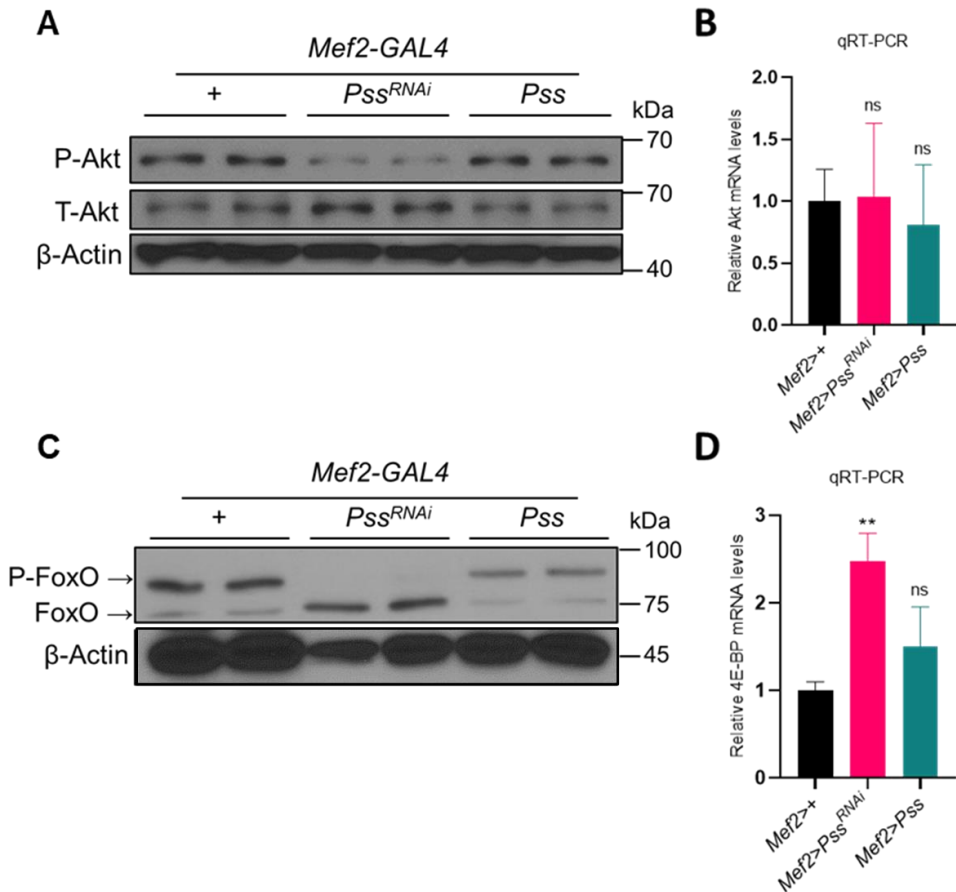


그림 11. 초파리 thorax에서의 Akt/FoxO/4E-BP 신호 전달 확인

(A, C) 초파리 thorax에서 Akt, FoxO에 대한 western blot을 진행하였다. Loading control로 β -Actin을 이용하였다. (B, D) 초파리 thorax에서 *Akt*, *4E-BP*에 대한 qRT-PCR을 진행하였다. 3번의 biological repeat을 하였다. 데이터는 mean \pm SD를 보여주며, 통계 분석은 unpaired *t*-test을 통해 이뤄졌다. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

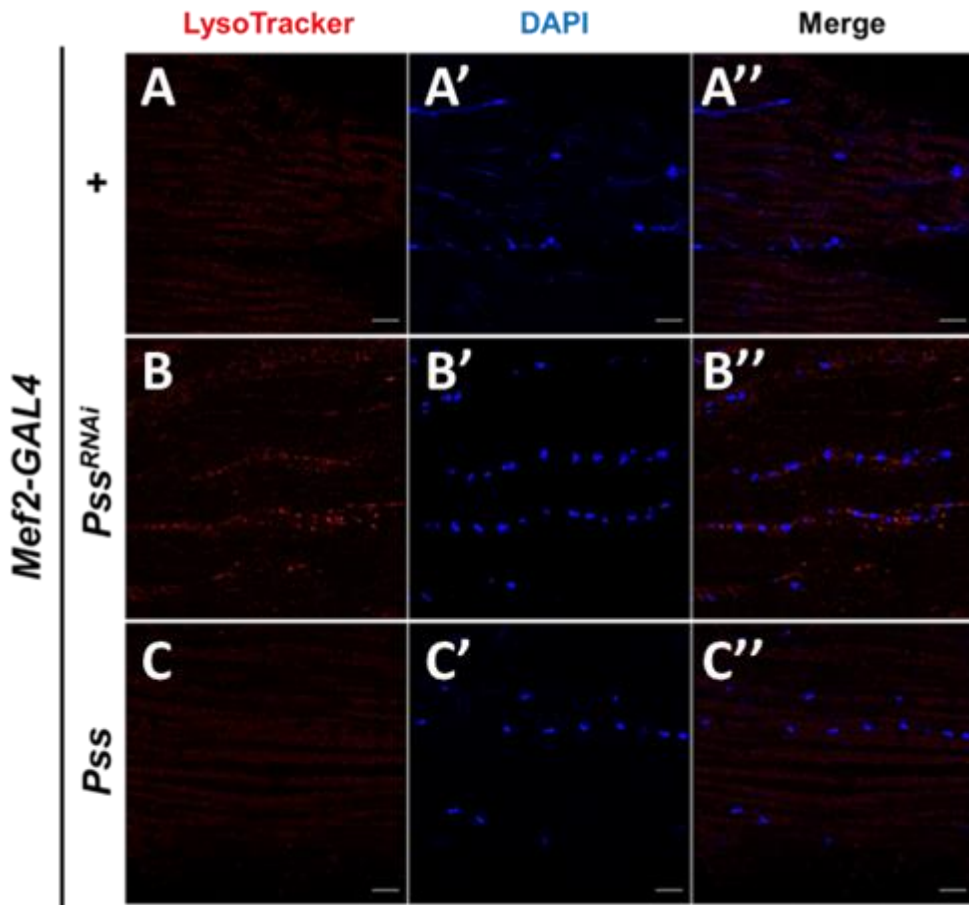


그림 12. 초파리 IFM의 autophagy 확인

각 genotype에 따른 5일차 초파리의 IFM을 형광 염색 사진. (A, B, C) lysosome을 염색하기 위해 LysoTracker(붉은색)를 이용하였다. (A', B', C') DAPI(파란색)로 염색된 부분은 핵이다. Scale bar, 10 μ m

제 4 장 고 찰

근감소증은 근육의 양과 근력의 감소로 인해 다양한 동반 질환과 사망을 유발하는 질환이다. 본 연구는 근육 특이적 *Pss* knockdown 초파리가 abnormal wing posture와 운동능력 감소를 나타내는 것을 발견했다. 또한 actin fiber는 sarcomere의 길이와 너비가 감소하였으며, 성체 초파리의 IFM이 심각하게 감소되어 있었는데, 이는 근감소증의 주요 표현형이다. 본 연구는 근육 특이적 *Pss* knockdown 초파리는 근육에서도 미토콘드리아 이상과 Akt 활성 감소를 유발한다는 것을 보여준다.

본 연구에서는 *Mef2-GAL4*를 이용하여 근육 특이적으로 *Pss* 유전자의 발현을 조절하였다. 실제로 *Mef2-GAL4*는 초파리를 이용한 근감소증 연구에서 대표적으로 이용되는 근육 특이적 *GAL4-driver*다 (Graca et al., 2021; Yoon et al., 2019; Yun et al., 2014). 초파리 thorax에서 *Mef2-GAL4*의 KD과 OE의 효과를 확인하기 위해 qRT-PCR을 한 결과, *Mef2>Pss^{RNAi}*는 대조군에 비해 *Pss* mRNA level이 약 90% 감소하였다. 이는 대조군 초파리의 근육 조직에서 *Pss* 유전자가 활발히 발현되고 있다고 해석할 수 있다. 같은 목적으로 진행한 western blot도 비슷한 결과를 보였다. 흥미로운 점은 초파리 *Pss* 단백질의 band가 인간 PSS1 단백질과 같은 40kDa 부근에서 관찰되었다는 것이다(Sousa et al., 2014). 이는 초파리 *Pss*와 인간 PSS1가 높은 상동성을 보인다는 주장을 지지한다(Park et al., 2021).

초파리를 관찰하는 과정에서 *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리만 과도하게 날개를 들고 있는 모습을 발견하였다. 이러한 ‘held-up’ wing posture는 초파리의 IFM에 이상이 있을 때 나타나며(Clark et al., 2006), 근육에 이상이 있는 많은 초파리에서 ‘held-up’ wing posture 표현형이 보고되고 있다(Fuger et al., 2012; Yoon et al., 2019). 이를 통해 *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리도 IFM에 심각한 이상이 있을 것으로 예상하고, 운동능력을 측정하였다. 실험 결과, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리의 climbing

ability는 대조군 초파리의 약 20% 정도로 감소하였다. Flight ability는 약 60% 정도로 감소하였으며, 몇 초파리는 착지하지 못하고 바닥에 떨어지는 flightless 표현형을 나타내기도 하였다. 이를 통해 *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리의 근육의 기능이 심각하게 떨어진 것을 확인할 수 있었으며, 이는 *Pss*가 근육에서 중요한 기능을 한다는 것을 알 수 있다.

에너지 대사가 활발한 근육 조직은 미토콘드리아가 풍부하며, 근육 조직의 미토콘드리아에 이상이 생기면 다양한 근육 질환을 야기할 수 있다(Chen et al., 2022). IFM은 미토콘드리아와 actin fiber가 평행하게 나열되어 있어 초파리의 미토콘드리아 연구에 많이 이용되고 있다(Chen et al., 2020; Katti et al., 2021). 선행연구에 따르면 초파리에서 *Pss* 기능 상실은 미토콘드리아 이상으로 이어진다는 것이 침샘과 뇌에서 각각 밝혀졌다(Park et al., 2021; Yang et al., 2019). 앞선 실험에서 *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리 근육 이상의 원인이 미토콘드리아 이상으로 인한 것인지 확인하기 위해 초파리의 thorax에서 IFM을 해부하였다. 실험 결과, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리의 미토콘드리아는 대부분 작고 circular한 형태로 관찰되었다. 흥미로운 점은 이러한 미토콘드리아의 형태 이상이 PE 합성 감소로 인한 미토콘드리아의 fragmentation과 유사하다는 것이다(Steenbergen et al., 2005). PE는 미토콘드리아의 PSD에 의해 합성되는데, PSD가 기질로 이용하는 것이 바로 PSS에서 합성된 PS다(Tasseva et al., 2013). 즉, *Pss*를 KD 했을 때 나타나는 미토콘드리아 형태 이상은 PS 합성 감소로 인한 미토콘드리아의 PE 감소로 해석할 수 있다.

Mef2>Pss^{RNAi} 초파리의 IFM에서 미토콘드리아와 actin fiber를 관찰하는 과정에서 actin fiber가 얇아지고 흐트러진 형태로 존재하는 것을 발견하였다. 이러한 actin fiber의 이상은 근감소증의 대표적인 표현형이다(Katti et al., 2021). 또한, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리 IFM에서 매우 많은 수의 vacuole을 발견할 수 있었다. 초파리 IFM에서 일어나는 과도한 vacuolation은 근육의 퇴화를 나타내는데(Yun et al., 2014), 실험 결과, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리의 IFM이 매우 심각하게 감소한 것을 확인할 수

있었다. 이러한 결과는 *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리가 근감소증을 나타낸다는 명백한 증거로, 앞의 결과인 ‘held-up’ wing posture와 운동 능력 감소 등의 원인으로 해석할 수 있다.

근감소증은 근육 조직의 세포사멸 증가로 야기될 수 있다 (Dupont-Versteegden, 2005). 미토콘드리아는 이러한 세포사멸 신호 전달과 programmed cell death(PCD)의 중심에 있으며, 근육의 미토콘드리아 이상으로 인한 세포사멸 증가는 근육의 크기가 감소하는 근감소증의 주요 원인 중 하나이다(Adhietty et al., 2008). 미토콘드리아에 이상이 생기면 ROS가 미토콘드리아 밖으로 방출되는데, 이렇게 방출된 ROS는 초기 세포사멸을 유발하게 된다(Li et al., 2003). *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리 IFM은 심각한 미토콘드리아 이상을 보여주고 있다. 이에 미토콘드리아 이상에 따른 ROS level을 측정하였으며, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리 IFM에서 ROS level이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한 TUNEL assay 결과, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리의 모든 IFM이 TUNEL positive한 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리의 IFM에 과도한 세포사멸이 일어나고 있음을 의미한다. 이러한 결과들을 종합해보면, *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리의 근감소증의 원인으로 미토콘드리아 이상에 의한 세포사멸 증가를 들 수 있다.

Intramuscular triacylglycerol(IMTG)은 골격근 섬유 내부에 있는데, IMTG는 미토콘드리아와 매우 가까이 있는 lipid droplet에 저장되며, 운동 중에 필요한 에너지를 제공한다(Roepstorff et al., 2005). Phospholipid homeostasis와 lipid storage는 매우 깊게 연관되어 있는데(Takeuchi & Reue, 2009), 최근 연구 결과에 따르면, *Pss* knockdown이 phospholipid homeostasis를 깨트리고, ectopic lipid storage를 증가시켰다고 한다(Yang et al., 2019). 이런 이유로, 근육 특이적 *Pss* knockdown 초파리의 근육에서도 ectopic lipid storage가 증가한 것으로 보인다. Skeletal muscle과 같은 non-adipose tissue에서의 ectopic fat accumulation은 cytotoxic한 effect를 나타낸다(Unger et al., 2010). 근육에서의 ectopic fat은 미토콘드리아 기능을

손상시키고 ROS의 생산을 촉진한다(Bondia-Pons et al., 2012). 근육은 largest glucose-metabolizing organ으로 insulin-mediated glucose 소비의 75-95%를 차지한다(Jensen et al., 2011). 인간의 경우, 근육 내 지방의 과도한 축적은 인슐린 저항성 및 제2형 당뇨병과 같은 질병을 야기할 수 있다(Nadeau et al., 2006).

근감소증의 주요 원인 중 다른 하나는 과도한 autophagy로 인한 근육 단백질의 감소다(Mammucari et al., 2007). 특히, 근감소증에서 autophagy를 증가시키는 핵심 요소에는 전사인자인 FoxO가 있는데(Piccirillo et al., 2014), FoxO는 인슐린/IGF-1 신호 전달 경로 중 Akt에 의해 활성이 조절된다(Glass, 2010). 선행연구에서는 초파리의 *Pss* 유전자를 침샘 특이적으로 KD 하였을 때, Akt 활성이 감소하는 것을 보여주었다(Yang et al., 2019). 이에 초파리의 *Pss* 유전자를 근육 특이적으로 KD 하였을 때에도 Akt 활성이 감소하는지 western blot을 통해 확인하였고, *Mef2>Pss^{RNAi}*에서 Akt의 활성이 감소하는 것을 발견할 수 있었다. 나아가 Akt 활성 감소에 따른 FoxO의 활성이 증가도 확인할 수 있었다. 전사인자인 FoxO의 대표적인 target gene에는 *4E-binding protein(4E-BP)*가 있다(Puig et al., 2003). 4E-BP 또한 translation repressor로 단백질 합성을 저해하는 역할을 하는데(Lin et al., 1994), FoxO의 활성을 추가적으로 확인하기 위해 *4E-BP*의 mRNA level을 정량하였고, *Mef2>Pss^{RNAi}*에서 *4E-BP*의 mRNA level이 대조군에 비해 약 2배 이상 증가한 것을 발견하였다. 이를 통해 FoxO가 전사인자로서 정상적인 활성을 갖는 것을 알 수 있었다. 그 밖에도 FoxO는 autophagy/lysosome에 관여하는 다양한 단백질의 발현을 유도하여 단백질 분해를 조절한다(Milan et al., 2015). 실제로 *Mef2>Pss^{RNAi}* 초파리의 IFM 전체에 걸쳐서 autophagy가 일어나는 것을 확인하였으며, 이는 결국 근감소증으로 이어지는 것으로 보인다.

FoxO는 Akt 외의 다양한 kinase에 의해 활성이 조절된다. 그 중 stress-induced JNK는 FoxO의 활성을 조절하는데(Essers et al., 2004), oxidative stress는 stress-responsive JNK를 활성화시켜

FoxO의 활성을 촉진한다(Huang & Tindall, 2007). 본 연구는 *Pss* knockdown 초파리가 미토콘드리아 이상으로 ROS level이 과도하게 증가한 것을 확인하였다. 결국, 이러한 ROS 증가가 FoxO의 활성에 영향을 미쳤을 수도 있다. 또한 선행연구에 따르면, ROS 증가에 따른 FoxO의 과도한 활성이 muscle atrophy를 유발할 수 있다고 한다(Dodd et al., 2010). 이에 *Pss* knockdown 시에 ROS 증가에 따른 JNK signaling pathway 활성화에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

*Pss*는 muscle mass 유지 외에도 근육의 발달에도 중요한 것으로 보인다. 근육의 발달 이상은 개체의 전체 발달에 영향을 미치는데, 실제로 연구 과정에서 근육 특이적 *Pss* knockdown은 viability 감소, developmental delay를 관찰하였다. 인간에서, PTDSS1의 돌연변이는 LMHD (MIM 151050)를 야기하는데, 이는 developmental defects, severe growth retardation를 보이는 질환이다. Zebrafish에서 PTDSS1을 과발현 시켜도 development 이상이 생기며(Sousa et al., 2014), mice에서 PTDSS1/2를 knockout하면 prenatally lethal이다(Arikketh et al., 2008). 최근 연구에서는 loss-of-function PTDSS1 또한 developmental delay를 보인다고 한다(Gracie et al., 2022). 이러한 결과들과 본 연구의 관찰은 *Pss*가 발생에 vital role을 하는 것을 의미하며, 발생과정 중의 *Pss*의 specific한 역할에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

본 연구는 초파리에서 *Pss*가 근육의 미토콘드리아 유지와 Akt 활성화에 중요한 역할을 한다는 것을 보여준다. 또한, 근육에서 *Pss* 기능 상실은 세포사멸과 autophagy를 증가시켜 근감소증을 유발할 수 있음을 확인하였다. 이는 PS가 근감소증에 관여한다는 사실을 처음 발견한 것이며, PS와 연관된 인지질 대사 경로가 근감소증을 유발할 수 있는지에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

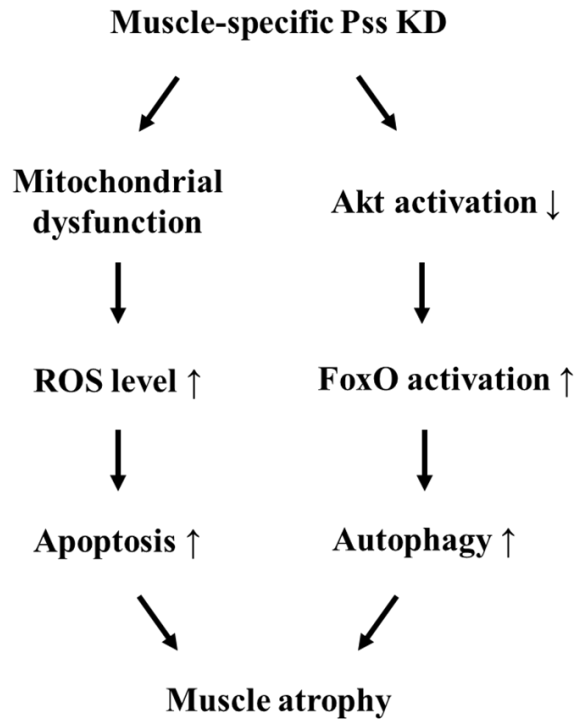


그림 13. Pss가 근감소증을 유발할 수 있는 두 가지 경로

참고 문헌

- Aaltonen, M. J., Friedman, J. R., Osman, C., Salin, B., di Rago, J. P., Nunnari, J., Langer, T., & Tatsuta, T. (2016). MICOS and phospholipid transfer by Ups2-Mdm35 organize membrane lipid synthesis in mitochondria. *Journal of Cell Biology*, *213*(5), 525-534.
- Adhihetty, P. J., O'Leary, M. F., & Hood, D. A. (2008). Mitochondria in skeletal muscle: adaptable rheostats of apoptotic susceptibility. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, *36*(3), 116-121.
- Arikketh, D., Nelson, R., & Vance, J. E. (2008). Defining the importance of phosphatidylserine synthase-1 (PSS1): unexpected viability of PSS1-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(19), 12888-12897.
- Auten, R. L., & Davis, J. M. (2009). Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatric Research*, *66*(2), 121-127.
- Babcock, D. T., & Ganetzky, B. (2014). An improved method for accurate and rapid measurement of flight performance in *Drosophila*. *Journal of Visualized Experiments*(84), e51223.
- Bergo, M. O., Gavino, B. J., Steenbergen, R., Sturbois, B., Parlow, A. F., Sanan, D. A., Skarnes, W. C., Vance, J. E., & Young, S. G. (2002). Defining the importance of phosphatidylserine synthase 2 in mice. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(49), 47701-47708.
- Blazquez-Bernal, A., Fernandez-Costa, J. M., Bargiela, A., & Artero, R. (2021). Inhibition of autophagy rescues muscle atrophy in a LGMDD2 *Drosophila* model. *FASEB Journal*, *35*(10), e21914.
- Bonaldo, P., & Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Model and Mechanism*, *6*(1), 25-39.
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, *118*(2), 401-415.

- Brazil, D. P., & Hemmings, B. A. (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends in Biochemical Sciences*, *26*(11), 657–664.
- Chen, P. L., Huang, K. T., Cheng, C. Y., Li, J. C., Chan, H. Y., Lin, T. Y., Su, M. P., Yang, W. Y., Chang, H. C., Wang, H. D., & Chen, C. H. (2020). Vesicular transport mediates the uptake of cytoplasmic proteins into mitochondria in *Drosophila melanogaster*. *Nature Communication*, *11*(1), 2592.
- Chen, T.-H., Koh, K.-Y., Lin, K. M.-C., & Chou, C.-K. (2022). Mitochondrial Dysfunction as an Underlying Cause of Skeletal Muscle Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*, 21.
- Ciciliot, S., Rossi, A. C., Dyar, K. A., Blaauw, B., & Schiaffino, S. (2013). Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *International Journal of Biochemical Cell Biology*, *45*(10), 2191–2199.
- Clark, I. E., Dodson, M. W., Jiang, C., Cao, J. H., Huh, J. R., Seol, J. H., Yoo, S. J., Hay, B. A., & Guo, M. (2006). *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*, *441*(7097), 1162–1166.
- Demontis, F., & Perrimon, N. (2009). Integration of Insulin receptor/Foxo signaling and dMyc activity during muscle growth regulates body size in *Drosophila*. *Development*, *136*(6), 983–993.
- Dupont-Versteegden, E. E. (2005). Apoptosis in muscle atrophy: relevance to sarcopenia. *Experimental Gerontology*, *40*(6), 473–481.
- Faulstich, H., Zobeley, S., Rinnerthaler, G., & Small, J. (1988). Fluorescent phallotoxins as probes for filamentous actin. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *9*(5), 370–383.
- Fuger, P., Sreekumar, V., Schule, R., Kern, J. V., Stanchev, D. T., Schneider, C. D., Karle, K. N., Daub, K. J., Siegert, V. K., Flotenmeyer, M., Schwarz, H., Schols, L., & Rasse, T. M. (2012). Spastic paraplegia mutation N256S in the neuronal microtubule motor KIF5A disrupts axonal transport in a *Drosophila* HSP model. *PLoS Genetics*, *8*(11), e1003066.

- Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, *119*(3), 493–501.
- Glass, D. J. (2010). Signaling pathways perturbing muscle mass. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *13*(3), 225–229.
- Graca, F. A., Sheffield, N., Puppa, M., Finkelstein, D., Hunt, L. C., & Demontis, F. (2021). A large-scale transgenic RNAi screen identifies transcription factors that modulate myofiber size in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, *17*(11), e1009926.
- Hollinshead, M., Sanderson, J., & Vaux, D. J. (1997). Anti-biotin antibodies offer superior organelle-specific labeling of mitochondria over avidin or streptavidin. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *45*(8), 1053–1057.
- Huang, B. X., Akbar, M., Kevala, K., & Kim, H.-Y. (2011). Phosphatidylserine is a critical modulator for Akt activation. *Journal of Cell Biology*, *192*(6), 979–992.
- Katti, P., Rai, M., Srivastava, S., D'Silva, P., & Nongthomba, U. (2021). Marf-mediated mitochondrial fusion is imperative for the development and functioning of indirect flight muscles (IFMs) in *Drosophila*. *Experimental Cell Research*, *399*(2), 112486.
- Kim, H. Y., Huang, B. X., & Spector, A. A. (2014). Phosphatidylserine in the brain: metabolism and function. *Progress in Lipid Research*, *56*, 1–18.
- Kitada, M., Koya, D., Sugimoto, T., Isono, M., Araki, S.-i., Kashiwagi, A., & Haneda, M. (2003). Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C- β activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. *Diabetes*, *52*(10), 2603–2614.
- Kucherenko, M. M., Marrone, A. K., Rishko, V. M., Yatsenko, A. S., Klepzig, A., & Shcherbata, H. R. (2010). Paraffin-embedded and frozen sections of *Drosophila* adult muscles. *Journal of Visualized Experiments*, *46*, e2438.

- Leventis, P. A., & Grinstein, S. (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annual Review of Biophysics*, *39*, 407-427.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A., & Robinson, J. P. (2003). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(10), 8516-8525.
- Lin, T.-A., Kong, X., Haystead, T. A., Pause, A., Belsham, G., Sonenberg, N., & Lawrence Jr, J. C. (1994). PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science*, *266*(5185), 653-656.
- Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S. J., Di Lisi, R., Sandri, C., & Zhao, J. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism*, *6*(6), 458-471.
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., & Fukamizu, A. (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(20), 11285-11290.
- Milan, G., Romanello, V., Pescatore, F., Armani, A., Paik, J. H., Frasson, L., Seydel, A., Zhao, J., Abraham, R., Goldberg, A. L., Blaauw, B., DePinho, R. A., & Sandri, M. (2015). Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nature Communication*, *6*, 6670.
- Park, Y. J., Kim, S., Shim, H. P., Park, J. H., Lee, G., Kim, T. Y., Jo, M. C., Kwon, A. Y., Lee, M., Lee, S., Yeo, J., Chung, H. L., Bellen, H. J., Kwon, S. H., & 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.

- Pate, R. R., Pratt, M., Blair, S. N., Haskell, W. L., Macera, C. A., Bouchard, C., Buchner, D., Ettinger, W., Heath, G. W., & King, A. C. (1995). Physical activity and public health: a recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *Journal of the American Medical Association*, *273*(5), 402-407.
- Piccirillo, R., Demontis, F., Perrimon, N., & Goldberg, A. L. (2014). Mechanisms of muscle growth and atrophy in mammals and *Drosophila*. *Developmental Dynamics*, *243*(2), 201-215.
- 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 and Development*, *17*(16), 2006-2020.
- Ribot, C., Soler, C., Chartier, A., Al Hayek, S., Nait-Saidi, R., Barbezier, N., Coux, O., & Simonelig, M. (2022). Activation of the ubiquitin-proteasome system contributes to oculopharyngeal muscular dystrophy through muscle atrophy. *PLoS Genetics*, *18*(1), e1010015.
- Rusiñol, A. E., Cui, Z., Chen, M. H., & Vance, J. E. (1994). A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(44), 27494-27502.
- Scanga, S. E., Ruel, L., Binari, R. C., Snow, B., Stambolic, V., Bouchard, D., Peters, M., Calvieri, B., Mak, T. W., & Woodgett, J. R. (2000). The conserved PI3' K/PTEN/Akt signaling pathway regulates both cell size and survival in *Drosophila*. *Oncogene*, *19*(35), 3971-3977.
- Sousa, S. B., Jenkins, D., Chanudet, E., . . . Moore, G. E. (2014). Gain-of-function mutations in the phosphatidylserine synthase 1 (PTDSS1) gene cause Lenz-Majewski syndrome. *Nature Genetics*, *46*(1), 70-76.

- Starkov, A. A. (2008). The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, 37–52.
- Steenbergen, R., Nanowski, T. S., Beigneux, A., Kulinski, A., Young, S. G., & Vance, J. E. (2005). Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), 40032–40040.
- Stone, S. J., & Vance, J. E. (2000). Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34534–34540.
- Tasseva, G., Bai, H. D., Davidescu, M., Haromy, A., Michelakis, E., & Vance, J. E. (2013). Phosphatidylethanolamine deficiency in Mammalian mitochondria impairs oxidative phosphorylation and alters mitochondrial morphology. *Journal of Biological Chemistry*, 288(6), 4158–4173.
- Vance, J. E., & Steenbergen, R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Progress in Lipid Research*, 44(4), 207–234.
- Voelker, D. R. (1989). Phosphatidylserine translocation to the mitochondrion is an ATP-dependent process in permeabilized animal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 9921–9925.
- Yang, X., Liang, J., Ding, L., Li, X., Lam, S. M., Shui, G., Ding, M., & Huang, X. (2019). Phosphatidylserine synthase regulates cellular homeostasis through distinct metabolic mechanisms. *PLoS Genetics*, 15(12), e1008548.
- Yoon, W., Hwang, S. H., Lee, S. H., & Chung, J. (2019). Drosophila ADCK1 is critical for maintaining mitochondrial structures and functions in the muscle. *PLoS Genetics*, 15(5), e1008184.

- Yun, J., Puri, R., Yang, H., Lizzio, M. A., Wu, C., Sheng, Z. H., & Guo, M. (2014). MUL1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway in regulating mitofusin and compensates for loss of PINK1/parkin. *eLife*, 3, e01958.
- Zhao, J., Brault, J. J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S. H., & Goldberg, A. L. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metabolism*, 6(6), 472-483.

Abstract

Loss of *Phosphatidylserine synthase* Causes Abnormal Mitochondria and Muscle Atrophy in *Drosophila*

Sangseob Kim

Department of Science Education, Biology Major

The Graduate School

Seoul National University

In the endoplasmic reticulum (ER), Phosphatidylserine synthase (Pss) produces phosphatidylserine (PS), which is then transported to the plasma membrane (PM) and mitochondria. PS delivered to PM is engaged in numerous signaling pathway, and PS supplied to mitochondria is essential for the construction of the mitochondrial membranes. Previous studies have shown that *Pss* mutations in *Drosophila* affect Akt signaling pathway and mitochondrial abnormalities. Here, we report that muscle-specific knockdown of *Pss* in *Drosophila* results in abnormal mitochondria and muscle atrophy. For this study, we used *Mef2-GAL4* as a muscle-specific driver and indirect flight muscle (IFM) from adult flies were dissected. Muscle-specific *Pss* knockdown flies exhibited decreased locomotor activity, abnormal mitochondria, increased ROS, and muscle atrophy. We also observed an increase in FoxO activities in muscle-specific *Pss* knockdown flies, which is a key factor in muscle atrophy. These finding suggest that muscle atrophy is brought on by upregulation of FoxO via Akt signaling pathway.

These studies show that the *Pss* affects a number of physiological functions in muscles and PS may play a significant role in the health and performance of muscle.

Keywords : Muscle atrophy, Phosphatidylserine synthase, Drosophila, Mitochondrial dysfunction, Akt/FoxO signaling

Student Number : 2021–20987