



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

초파리 *Gongpo* 유전자 돌연변이에
의한 미토콘드리아 이상 및
세포사멸 연구

Mutation of *Drosophila Gongpo* Gene Causes
Mitochondrial defect and Cell death

2019년 8월

서울대학교 대학원

과학교육과 생물전공

김성경

초파리 *Gongpo* 유전자 돌연변이에
의한 미토콘드리아 이상 및
세포사멸 연구

지도 교수 전 상 학

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함
2019년 6월

서울대학교 대학원
과학교육과 생물전공
김 성 경

김성경의 교육학석사 학위논문을 인준함
2019년 7월

위 원 장 _____ 이 준 규 _____ (인)

부위원장 _____ 김 영 수 _____ (인)

위 원 _____ 전 상 학 _____ (인)

초 록

phosphatidylserine (PS)은 세포막을 구성하고 있는 중요한 인지질 중 하나이다. 이러한 구조적 중요성 외에도, 세포 신호와 apoptotic cell의 cell clearance에 있어서 중요한 역할을 수행하며, 신경 퇴행에 관여하는 것으로 보인다. 본 연구에서는 PS 합성효소를 암호화하는 초파리의 유전자 *Gongpo*의 돌연변이 표현형을 확인하였다. *Gongpo* 유전자 돌연변이의 *trans*-heterozygous mutant에서 신경퇴행성 질환의 대표적인 표현형이라고 알려진, 수명 단축, 운동능력 감퇴, 충격민감성 및 신경조직의 퇴화를 확인하였다. 또한 *Gongpo* 돌연변이에서 ROS의 증가와 함께 신경계의 미토콘드리아 형태 및 기능의 이상을 확인하였으며, autophagy 및 apoptosis의 증가 또한 확인할 수 있었다. *Gongpo* 돌연변이에서 Secondary necrosis가 크게 증가하여 발생함을 확인하였는데, 이러한 secondary necrosis가 돌연변이에서의 광범위한 세포사멸을 야기시키는 듯하다. 본 연구는 신경계 내 PS의 합성 이상에 의해 유발되는 신경퇴행성 질환의 새로운 기전을 제안한다.

주요어 : 인지질, 신경퇴행성 질환, *Gongpo*, Phosphatidylserine, PSS(Phosphatidylserine synthase)

학 번 : 2017-29791

목 차

제 1 장 서 론	1
제 1 절 신경퇴행성 질환과 인지질.....	1
제 2 절 Phosphatidylserine(PS)와 Phosphatidylserine synthase ...	3
제 3 절 선행연구 결과 및 연구 목표.....	5
제 2 장 실험 방법 및 재료.....	7
제 1 절 실험에 사용된 초파리.....	7
제 2 절 단백질 서열 alignment 및 서열 상동성 확인.....	7
제 3 절 유전자 발현량 확인(Quantitative real-time PCR)	8
제 4 절 신경퇴행성 질환의 표현형 확인	8
제 5 절 초파리의 뇌 절편 제작 및 관찰	9
제 6 절 투과전자현미경(TEM)	10
제 7 절 근육 미토콘드리아 관찰	10
제 8 절 뇌 조직의 ROS 측정	10
제 9 절 뇌 조직의 세포사멸 확인.....	11
제 10 절 뇌 조직의 Necrosis 확인	12
제 3 장 실험 결과.....	13
제 1 절 포유류의 PSS와 초파리의 Gong의 상동성 확인.....	13
제 2 절 <i>Gong</i> 유전자 돌연변이의 신경퇴행성 질환 표현형 확인.....	17
제 3 절 <i>Gong</i> 유전자 돌연변이의 미토콘드리아 형태 이상 확인.....	22
제 4 절 <i>Gong</i> 유전자 돌연변이의 ROS 발생량 확인.....	27
제 5 절 <i>Gong</i> 유전자 돌연변이의 autophagy 증가량 확인.....	30

제 6 절	<i>Gong</i> 유전자 돌연변이의 apoptosis 및 secondary necrosis 확인	34
제 7 절	Cortex glia 특이적 <i>Gong</i> 유전자 knock down 돌연변이의 신경퇴행성질환 표현형 확인	39
제 4 장	고찰.....	41
참고문헌	45
Abstract	55

그림 목차

[그림 1] Gong 단백질의 상동성	15
[그림 2] <i>trans</i> -heterozygous mutant의 치사 및 행동이상 확인	16
[그림 3] <i>trans</i> -heterozygous mutant의 <i>Gong</i> 유전자 발현량 및 생존율 확인.....	19
[그림 4] <i>trans</i> -heterozygous mutant의 행동능력 및 충격 민감성 확인.....	20
[그림 5] <i>trans</i> -heterozygous mutant의 뇌 조직 단면 확인 ...	21
[그림 6] <i>trans</i> -heterozygous mutant의 미토콘드리아 형태 확인	25
[그림 7] 근육의 <i>trans</i> -heterozygous mutant 미토콘드리아 형태 확인	26
[그림 8] <i>trans</i> -heterozygous mutant의 ROS 측정 결과.....	28
[그림 9] <i>trans</i> -heterozygous mutant의 lipid peroxidation 측정결과.....	29
[그림 10] <i>trans</i> -heterozygous mutant의 autophagy 확인	31
[그림 11] <i>trans</i> -heterozygous mutant의 autophagosome/ autolysosome 확인	32
[그림 12] AO를 이용한 <i>trans</i> -heterozygous mutant의 apoptosis 확인	36

[그림 13] Anti-cleaved caspase 3를 이용한	
<i>trans</i> -heterozygous mutant의 apoptosis 확인.....	37
[그림 14] <i>trans</i> -heterozygous mutant의 secondary	
necrosis 확인.....	38
[그림 15] Cortex glia 특이적 knock down 돌연변이의	
신경퇴행성 질환 표현형 확인	40

제 1 장 서 론

제 1 절 신경퇴행성 질환과 인지질

평균수명 증가로 세계적으로 인구 고령화가 빠르게 진행되면서 신경퇴행성질환 환자가 급속도로 증가하고 있다. 신경퇴행성 질병에는 알츠하이머병 (Alzheimer's disease, AD)이나 파킨슨병 (Parkinson's disease, PD), 헌팅턴병 (Huntington's disease, HD), 루게릭병 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 등이 있다. 하지만, 이러한 질병에 대한 치료제 개발이 시급한 것에 반해 아직까지 발병기전이 완전히 밝혀지지 않았으며, 현재까지는 주로 증상완화를 위한 치료제 개발만이 이루어지고 있다. 신경퇴행성 질병에 대한 연구는 특정 단백질들이 비정상적인 구조를 지니게 되고 서로 응집하여 내포체 (inclusion body)를 형성하는 데에 초점을 맞추어 진행되어 왔다. 예를 들어, 알츠하이머병에서는 베타아밀로이드 (Amyloid β , $A\beta$)로 형성된 노인성 플라크 (senile plaque, $A\beta$ plaque)와 타우 (tau) 단백질이 주성분인 신경섬유덩어리 (Neurofibrillary tangles, NFT)에 초점을 맞추어 연구가 진행되어왔다 (Irvine, El-Agnaf, Shankar, & Walsh, 2008). 파킨슨병의 경우에는 루이소체 (Lewy body)라 불리는 alpha-synuclein 단백질의 봉입체 (inclusion body)에 대하여 많은 연구가 진행되었다 (Remy, Doder, Lees, Turjanski, & Brooks, 2005). 이러한 신경퇴행성질환 연구에서 흥미로운 발견 중 하나는 인지질 구성의 변화가 관찰된다는 것이다 (Farooqui, Rapoport, & Horrocks, 1997; Li, Zhang, & Sun, 2015; Pettegrew, Panchalingam, Hamilton, & McClure, 2001; Wells, Farooqui, Liss, & Horrocks, 1995). 신경조직은

지방조직 다음으로 인지질의 밀도가 높은 지역으로, 매우 활발한 인지질 대사를 보인다(O'Brien & Sampson, 1965; Sastry, 1985). 이러한 신경조직에서의 인지질합성 효소의 문제가 신경퇴행성질환과 밀접한 관계가 있다는 연구들이 밝혀졌다(Kretzschmar, Hasan, Sharma, Heisenberg, & Benzer, 1997; Pavlidis, Ramaswami, & Tanouye, 1994). 하지만 인지질 조성의 변화 또는 합성효소의 이상이 신경퇴행성 질환의 발병에 있어 어떠한 역할을 하고 있는지는 거의 알려져 있지 않다. 한편, PS를 섭취하는 것이 신경퇴행성 질환으로 고통받는 환자의 인지 기능과 기억력을 향상시키는 데 도움이 된다는 많은 임상 연구가 20년 이상 수행되어오고 있다(Baumeister, Barthel, Geiss, & Weiss, 2008; Heiss, Kessler, Mielke, Szelies, & Herholz, 1994; Liu et al., 2012). 최근에는 PhosphatidylSerine(PS)의 섭취를 통해 파킨슨병을 앓고있는 환자의 수면장애를 개선시킬 수 있음이 밝혀졌다(Valadas et al., 2018). 이렇듯이 많은 연구들이 신경퇴행성질환에 있어서 PS가 치료제로써 가능성이 있음을 제시하고 있지만, PS가 신경퇴행성질환과 어떠한 상관관계를 가지고 있으며, 어떤 분자적 기전에 의해 이러한 효과를 낳는가에 대해서는 거의 연구된 바가 없다.

제 2 절 Phosphatidylserine (PS)과 Phosphatidylserine synthase

PS는 세포막을 구성하는 주요 인지질 중 하나로, 세포막 안에서 신경의 생존과 성장, 시냅스 형성에 중요한 역할을 수행하는 protein kinase C (PKC), Akt, Raf-1과 같은 세포 내 신호 전달을 담당하는 단백질들의 개시 및 활성화를 조절한다(Kim, Huang, & Spector, 2014). 또한 PS는 신경세포 축삭돌기의 미세소관들을 안정시키는데 필요하다(Naftelberg et al., 2016; Seidel, Schnekenburger, Dicato, & Diederich, 2015). 이뿐만이 아니라 PS는 apoptotic cell에서 세포막 표면으로 노출되어 식세포 작용으로 이루어지기 위한 “Eat-me” 신호로써 잘 알려져 있다(Fadok, Bratton, Frasch, Warner, & Henson, 1998; Ravichandran, 2010). Apoptotic cell가 이러한 cell clearance작용에 의해 적절히 제거되지 못하면, apoptotic cell가 터져서 주변 세포까지 염증반응을 일으키는 ‘secondary necrosis’로 이어질 수 있다(Muñoz, Lauber, Schiller, Manfredi, & Herrmann, 2010). Cell clearance은 개체의 발생과 항상성에 필수적인 요소로써 이 과정의 실패는 암, 당뇨병 등과 같은 다양한 질병으로 이어질 수 있다(Elliott & Ravichandran, 2010).

PS는 효소활성에 의한 head group 치환을 통해 phosphatidylcholine(PC) 또는 phosphatidylethanolamine(PE)로부터 합성된다. 포유류에는 PSS1과 PSS2 두 개의 PS 합성효소가 있으며, 각각은 PC와 PE를 기질로 사용한다(Vance & Steenbergen, 2005). 두 효소 모두 소포체 막에 존재하며, 특히 미토콘드리아와 물리적, 화학적으로 결합하고 있는 ‘mitochondria-associated membrane(MAM)’에 위치하고 있다(Stone & Vance, 2000). PSS1에

의해 합성된 PS는 미토콘드리아로 옮겨져 PS decarboxylase (PSD)에 의해 PE로 합성되는데 사용된다(Choi, Wu, & Voelker, 2005; Kim et al., 2014; Tracey, Steyn, Wolvetang, & Ngo, 2018). 유전자 연구를 통해, 포유류에서 PSS1과 PSS2가 상보적인 기능을 하고 있음이 밝혀졌다. 예를 들어, PSS1 또는 PSS2 유전자 하나에만 기능 상실 돌연변이를 가진 쥐는 큰 이상없이 생존할 수 있지만, 두 유전자 모두에 돌연변이가 일어난 쥐는 태아상태에서 치사를 보였다. 이 때문에 포유류에서의 PS 합성효소에 대한 연구가 어려웠다. 포유류와 대조적으로, 초파리에는 하나의 PSS 유전자(CG4825)만을 가지고 있다. 기존에 본 연구실에서는 초파리의 PS합성효소를 암호화하고 있는 유전자의 이름을 포유류의 *Ptdss1* 유전자와 상동성을 가짐에 *dPtdss1* 이라고 통칭하여 사용하였지만, 관찰된 표현형의 따라 본 논문에서 부터는 ‘*Gongpo(Gong)*’ 이라는 이름을 사용하고자 한다. 본 이름은 한글에서 ‘vacuole(공포)’ 와 ‘scared(공포)’ 을 의미하는 다의어으로써, 뇌에서 관찰되는 많은 공포들과 1일차 돌연변이 초파리에서 보인 덜덜 떠는 운동성 퇴화의 모습을 표현한다.

제 3 절 선행연구결과 및 연구 목표

본 연구실에서 진행된 선행연구에서 *Gong* 유전자의 P-element 삽입 돌연변이에서 수명 감소, 운동 능력의 감퇴, 뇌조직의 퇴화 및 충격 민감성 발작 등과 같은 신경퇴행성 질환과 관련된 표현형을 관찰한 바 있다(조민규, 2014). 또한 CRISPR/Cas9 system을 이용하여 *Gong* 유전자의 Coding Region을 표적으로 하여 다양한 돌연변이 초파리 주를 제작하여, 기존 연구에서 사용된 P-element 삽입 돌연변이보다 이를 통해 제작된 돌연변이주가 신경퇴행성 질환의 표현형이 더 심하게 나타나는 것을 확인하였다(권아영, 2017). 이후, P-element 돌연변이에서 나타나는 여러가지 분자적 표현형의 경향성을 관찰하였다(박예진, 2018).

본 연구에서는 선행 연구에서 확인한 신경퇴행성질환 표현형이 어떤 분자적 기전에 의해 발생하는가에 대해 규명하고자 하였다. 기전 규명을 위해서는 명확한 표현형이 나타나는 것이 필요할 뿐만 아니라, 외적인 요소에 최소한의 영향을 받는 것이 중요하다. 하지만, 선행연구에서 표현형을 관찰하기 위해 사용했던 돌연변이는 heterozygote 돌연변이로써, 야생형이 가지고 있는 두 개의 정상유전자 중 한 개의 유전자에만 이상이 발생한 돌연변이주다. 이때문에 최소 10일 이상의 노화 이후에 신경퇴행성질환의 표현형을 관찰할 수 있다는 한계점이 존재했다. 본 연구에서는 P-element 삽입 돌연변이 주 사이의 교배를 통하여 두 유전자 모두 이상이 생긴 *trans*-heterozygote 돌연변이주를 대상으로 실험하였으며, 이렇게 제작된 *trans*-heterozygote는 heterozygote에 비해 훨씬 강한 표현형을 노화와 관계없이 보였다. 또한, 이를 이용한 분자적 기전 규명 실험을 통해서 *Gong* 유전자에 의한 미토콘드리아의 이상과 증가된 세포사멸을 확인하였으며, PS의 세포막에서의 주요 기능인

eat me signaling의 이상으로 인한 secondary necrosis를 확인하였다.

제 2 장 실험 방법 및 재료

제 1절 실험에 사용된 초파리

본 연구에서 사용된 *Gong* 돌연변이 초파리 라인은 #22115, #14017, #76627, #11632, #104172로, 편의를 위하여 뒤 두 자리 수를 이용하여 각각 *Gong*¹⁵, *Gong*¹⁷, *Gong*²⁷, *Gong*³², and *Gong*⁷²로 표기하였다. 야생형 초파리 *Canton-S*를 대조군으로 사용하였다. 조직, 세포 특이적으로 *Gong* 유전자 발현 조절을 위하여 GAL4-UAS system을 이용하였으며(Brand & Perrimon, 1993), 이를 위해, cortex glia 특이적인 GAL4라인인 *NP2222-GAL4* (#112830, Kyoto Stock Center), 근육 조직 특이적인 GAL4라인인 *Mhc-gal4*(#55133, Bloomington Stock Center), 그리고 *Gong* 유전자 발현 억제를 위한 *UAS-RNAi-Gong* (V5391, Vienna *Drosophila* Resource Center)을 사용하였다. 초파리 배양은 옥수수와 효모(cornmeal/yeast) 배지가 든 관병에서 이루어졌다. 인큐베이터 습도는 50%, day/night 주기는 12시간으로 맞추고 실험에 따라 25°C와 29°C에서 각각 배양하였다. 29°C에서 배양된 초파리는 25°C에서 발생과정을 마치고, 우화(eclosion)한지 24시간 안에 29°C로 옮겨 배양하였다.

제 2절 단백질 서열 alignment와 서열 상동성 확인

Gong 유전자 서열과 단백질 서열 정보는 flybase.org의 데이터베이스를 이용하였으며, 서열 유사도 검사를 위해 National Center for Biotechnology Information의 web-blast 프로그램을 사용하였다. 서열 alignment는 PRALINE을 이용하였다 (Simossis and Heringa, 2005).

제 3절 유전자 발현량 확인(Quantitative real-time PCR)

NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel)를 이용하여 1일차 수컷 초파리에서 RNA를 추출한 뒤, 5X All-In-One RT MasterMix (abm)를 이용하여 각 라인 당 1.5 μ g의 RNA를 cDNA로 합성하였다. TOPreal qPCR 2X PreMix (SYBR green with low ROX, enzynomics)와 Rotor-Gene Q (QIAGEN)를 이용하여 qPCR을 진행하였다. normalization을 위한 유전자로 *Actin 42A* (*Act42A*)를 사용하였다. primer 정보는 다음과 같다.

Act42A-forward (5' -AAGAGGTTGCAGCTTTAGTGG-3'),

Act42A-reverse (5' -TCCCATTCTACCATTACGCC-3'),

Gong-forward (5' -CATCAGTTGGGATCGCGTT-3'),

Gong-reverse (5' -CACAGAAATGGCCACAGA-3').

제 4절 신경 퇴행성 질환의 표현형 확인

생존률 측정을 위해서는, 관병당 수컷 30마리씩 넣어 29°C에서 노화시키며, 3일에 한번씩 transfer를 하면서 남은 개체 수를 관병 별로 기록한 뒤, 총 생존률을 그래프로 나타냈다, 각 관병에서 15마리 이하로 남는 날을 T50으로 기록하고 그 평균을 구하였다.

운동 능력 측정을 위한 climbing assay의 경우, 25°C에서 키운 깨어난 지 24시간 내의 초파리 수컷을 CO₂를 이용하여 마취한 뒤, 각 20마리씩 나누어 배지가 들어있는 새 관병으로 옮기고 마취가 풀리고 온도에 적응할 때까지 25°C에서 30분 동안 배양하였다. 약 25cm 길이의 climbing assay 용 vial에 마취 없이 transfer 한 후 1시간동안 25°C에 두면서 새로운 환경에 적응할 때까지 기다렸다. 이후 동영상으로

촬영할 카메라를 설치한 후, 초파리를 넣은 vial을 바닥에 두드려 초파리들이 모두 밑으로 내려오도록 하였다. 이렇게 촬영한 동영상을 이용하여, 10초의 시간 동안 각각의 초파리가 올라간 거리를 측정 후 대조군과 비교하였다. 결과는 Student's t-test로 통계처리 하였다(Le Bourg & Lints, 1992).

충격민감성 측정을 위해 빈 플라스틱 관병에 1일차 수컷 초파리를 각각 10마리씩 넣고 볼텍서를 이용하여 5초 동안 충격을 가하였다. 충격에서 깨어나는 과정을 모두 동영상으로 촬영한 뒤, 초파리가 충격에서 깨어나 열 걸음을 걷는 순간까지 걸리는 시간을 각각 기록하였다. 최소 10관병 이상(총 100마리 이상)이 각 라인 별로 진행되었다(Fergestad, Bostwick, & Ganetzky, 2006).

제 5절 초파리 뇌 절편 제작 및 관찰

초파리 머리에서 입을 완전히 제거한 뒤 carnoy's solution (ethanol:chloroform:acetic acid=6:3:1)에 넣은 후 4℃에서 24시간 이상 고정하였다. 고정된 초파리 머리는 70%, 85%, 95%, 100% 에탄올을 이용하여 점진적으로 탈수시킨 뒤 xylene에 담가 투명화 과정을 거쳤다. 그 후 xylene과 파라핀을 1:1로 섞은 용액에 15분씩 2번, 100% 파라핀에 30분씩 3번 담가 침투과정을 진행하였다. 초파리 머리를 mold에 넣고 굳힌 후 미세절편기(Leica, RM2235)를 이용하여 5 μ m 간격으로 잘라 HistoBond slide에 붙여 H&E staining을 진행한 뒤, Canada Balsam을 발라 영구 고정하였다. 초파리 뇌 단면은 DE/Axio Imager A1 microscope(Carl-Zeiss)와 DE/Axiocam HR를 통해 촬영되었다(Smith & Taylor, 2011).

제 6절 투과전자현미경(TEM)

입을 완전히 제거한 초파리의 머리를 4% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde solution in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)에 넣고 4° C 에서 24시간 이상 고정한다. 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)로 10분씩 3회 세척한 뒤, 에탄올을 이용하여 점진적으로 탈수 반응을 진행하였다. 100% ethanol, 100% propylene, 100% eponate 812 resin에 초파리 머리를 넣고, 65° C에서 24시간 이상 구워 굳혔다. Ultramicrotome을 이용하여 절편을 잘라낸 뒤, 2% uranyl acetate, lead citrate로 염색하여 시료를 준비하였다. FE-TEM (Field Emission Transmission Electronic Microscope, JEM- 2100F, JEOL. Korea Basic Science Institute, Chuncheon Center)을 이용하여 촬영하였다 (한국기초과학지원연구원 춘천센터).

제 7 절 근육 미토콘드리아 관찰

머리와 복부를 제거한 초파리의 가슴부분을 4% paraformaldehyde에서 고정한 뒤, 해부용 칼로 세로로 자른 뒤, streptavidin과 phalloidin으로 염색하였다. streptavidin은 미토콘드리아를 탐지하며, phalloidin은 actin을 탐지하여 근육의 형태를 나타낸다 (Rana et al., 2017). Intravital Multi-Photon Confocal Laser Scanning Microscope (IMP-LSM; LSM 780 NLO, Carl-Zeiss)를 이용하여 촬영하였다.

제 8 절 뇌 조직의 ROS 측정

초파리를 마취없이 포셉을 이용하여 잡아 몸통과 머리를 분리한 뒤,

머리를 Schneider' s drosophila medium(SDM)에 담그고 큐티클을 제거하여 뇌를 꺼냈다. 그 후 3-Well Glass slide에 뇌를 옮겨 SDM으로 희석한 $30\mu\text{M}$ 의 Dihydroethidium (DHE, Invitrogen, D11347) 용액 $150\mu\text{l}$ 를 넣고 shaker에서 5분동안 처리하였다. 지질과산화 측정의 경우에는 이 단계에서 SDM으로 희석한 $2\mu\text{M}$ 의 C11-BODIPY^{581/591}(Invitrogen, D3861) 용액 $150\mu\text{l}$ 를 넣고 shaker에서 5분동안 처리하였다. 염색이 끝나면 빠르게 용액을 제거하고 SDM으로 파이펫팅하여 세척한 뒤 shaker에서 5분씩 3번 더 SDM으로 세척하고, 마운팅 직전에 마지막으로 한 번 더 용액을 갈아주었다. Fluoromount-G 용액에 마운팅하여 공초점 현미경 Intravital Multi-Photon Confocal Laser Scanning Microscope (IMP-LSM; LSM 780 NLO, Carl-Zeiss)를 이용하여 촬영을 한다. 모든 과정에서 지연이 없도록 하였으며, 뇌의 모양이 이상하거나 상처가 나거나, 뇌 구조 중 일부라도 유실된 경우 제외하였다 (Arias et al., 2012; Fan et al., 2017).

제 9 절 뇌조직에서의 세포사멸 확인

뇌 조직에서의 세포사멸을 관찰하기 위하여 Acridine Orange 염색법과 anti-cleaved-Caspase3 항체를 사용하였다. Acridine Orange (AO, Invitrogen, A1301), $1.3\mu\text{L}$ of 1mM AO in 1mL of 1X PBS; rabbit anti-cleaved caspase 3 antibody (#9661, 1:100, Cell signal); Alexa Fluor 594 conjugated goat anti-rabbit-IgG (1:1000, Invitrogen).

AO 염색의 경우, 1X PBS 상에서 뇌를 꺼내어, 1X PBS에 희석한 AO 용액 $150\mu\text{L}$ 에서 10분간 염색하였다. 염색이 끝나면 빠르게 용액을 제거하고 1X PBS로 파이펫팅하여 세척한 뒤 shaker에서 5분씩 3번

더 1X PBS로 세척하고, 마운팅 직전에 마지막으로 한 번 더 용액을 갈아주었다. Fluoromount-G 용액에 마운팅하여 공초점 현미경 Intravital Multi-Photon Confocal Laser Scanning Microscope (IMP-LSM; LSM 780 NLO, Carl-Zeiss)를 이용하여 촬영을 하였다. apoptosis를 의미하는 single-strand DNA는 excitation: 488nm, emission: 650 nm 조건에서, autophagic activity를 알 수 있는 lysosome의 탐지는 excitation: 561nm, emission: 579-620nm 조건에서 촬영하였다 (Griswold, Chang, Runko, Knight, & Min, 2008).

제 10 절 뇌조직의 Necrosis 확인

RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (Promega, JA1011)의 Necrosis Detection Reagent (1,000X)를 이용하여 뇌 조직에서의 necrosis를 관찰하였다(Kupcho et al., 2019). 시약은 사용 직전에 SDM에 1X로 희석하여 사용하였다. 입만 제거하고 고정하지 않은 초파리의 머리를 통째로 1X Necrosis Detection Reagent에 넣고 상온에서 2시간 동안 처리하였다. 뇌를 꺼내기 위한 해부과정에서 인위적인 피사가 탐지되는 것을 막기 위해 용액을 완전히 제거한 뒤, 깨끗한 SDM으로 세척하였다. 빠르고 조심스럽게 머리의 큐티클을 제거하여 뇌를 꺼낸 뒤, Fluoromount-G 용액에 마운팅하여 Olympus 형광현미경을 이용하여 촬영하였다.

제 3 장 실험 결과

제 1 절 포유류의 PSS와 초파리의 GONG의 상동성 확인

포유류에서 PS는 PC 또는 PE의 콜린 또는 에탄올아민을 세린으로 바꿔주는 효소의 작용에 의해 합성된다. 이 두 효소를 각각 PSS1과 PSS2라고 한다(Vance & Steenbergen, 2005). 반면 초파리에서는 오직 PC를 사용하여 PS를 합성하는 GONG 단백질만이 있다(그림 1-A). GONG과 인간의 PSS1과 PSS2의 단백질 상동성 확인을 통하여, GONG 단백질이 PSS1과 전체 단백질 상에서는 53%, PSS domain에서는 51%의 상동성이 있음을 확인하였다. 반면에, PSS2와는 전체 단백질 상에서 35%, PSS domain에서 40%의 상동성을 보였다(그림 1-B). 이러한 결과는 GONG 단백질이 PSS1과 더 높은 유사성을 갖음을 알 수 있다. 특히 나선형 구조 형성에 있어서 GONG과 PSS1이 매우 높은 구조적 유사성을 보임을 통해, 두 단백질이 상당히 보존되어 있음을 알 수 있다(그림 1-C).

선행연구에서, *Gong* 유전자의 heterozygous mutants의 경우 발생과정에서 결함이 관찰되지 않았으며, 10일 이상의 노화 이후 에야 신경퇴행성 질환의 표현형을 관찰할 수 있었다. 분자적 규명을 위해서는 더 확실한 표현형과 노화에 의한 외재적 요소의 개입을 최소화해야 하기 때문에, 한 쌍의 유전자가 모두 이상이 생긴 돌연변이를 만들고자 하였고, P-element 삽입 돌연변이들의 교배를 통하여 *trans*-heterozygous mutants를 만들었다(그림 2-A). 각 *trans*-heterozygous mutants는 *Gong*^{32/15}, *Gong*^{32/27}, *Gong*^{32/72}, *Gong*^{15/72}였고, 각각의 치사율 및 1일차 행동이상은 [그림 2-B]와 같다. 결과적으로 *Gong*^{15/72}는 완전한 치사를 보였으며, *Gong*^{32/15}, *Gong*^{32/27}, *Gong*^{32/72}는

반치사를 보였다. 이러한 반치사를 보이는 trans-heterozygous mutants 모두 수컷보다 암컷에서 그 치사율이 더 강하게 나타났다. 반치사 trans-heterozygote mutant에서 태어난 나머지 개체들도 우화한 바로 직후부터 매우 느리게 걷거나, 설 새 없이 온 몸을 떠는 등의 심각한 행동 이상을 보였다. 더욱이, 관병 밖에서도 전혀 날지 못한 채 날개가 의미없이 펼쳐진 채로 위아래로 흔들리는 현상을 반복했다. *Gong*^{32/17}의 경우에는 어떠한 발생학적 결함이나 행동 이상을 보이지 않았다.

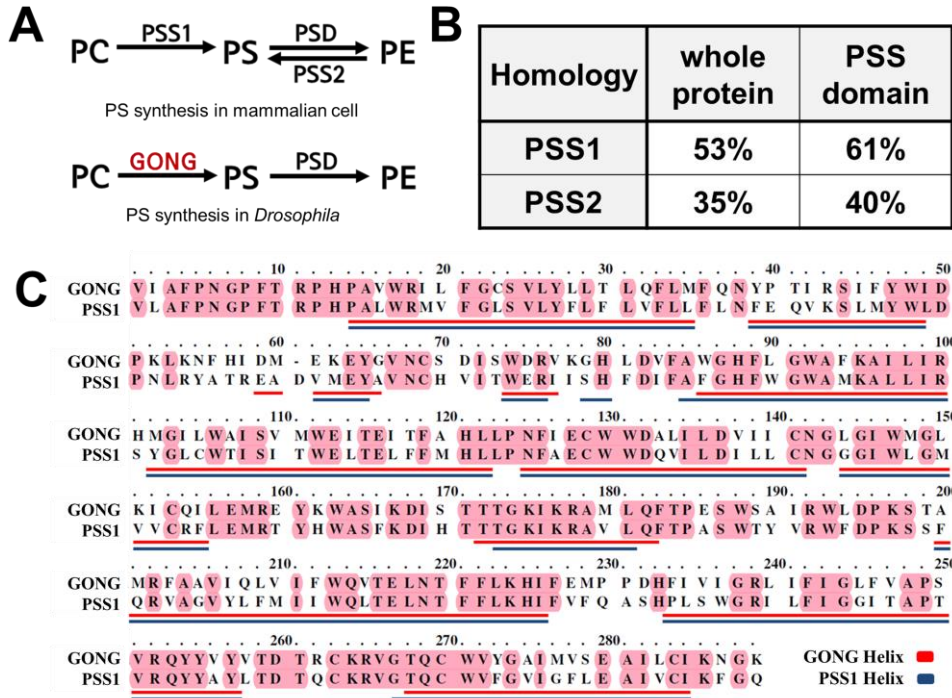
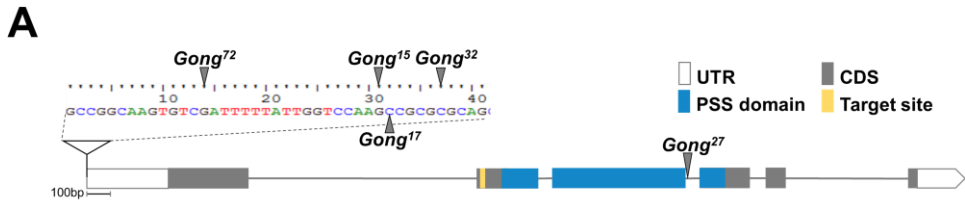


그림 1. GONG 단백질의 상동성.

(A) 포유류와 초파리의 Phosphatidylserine (PS) 합성 과정. 초파리의 PS 합성효소인 GONG은 Phosphatidylcholine (PC)를 이용하여 PS를 합성한다.

(B) Gong 단백질과 인간의 PSS1 및 PSS2의 상동성 확인.

(C) PSS domain내의 PSS1과 GONG의 서열 상동성 확인. PRALINE를 이용하여 서열내 상동성 확인을 진행하였다. 동일한 서열일 경우 붉은색으로 표시하여 나타냈다. 단백질 구조 중 특히, 나선형 구조의 경우에는 서열의 하단부에 파란색(PSS1)과 붉은색(GONG)으로 나타내었다.



B

Gong trans-heterozygote	32/15	32/17	32/27	32/72	15/72
Lethality	SL	V	SL	SL	L
Locomotion Defect (DAY1)	Yes	No	Yes	Yes	-

V: Viable, 생존 SL: Semi-Lethal, 반치사 L: Lethal, 치사

그림 2. *trans*-heterozygous mutant의 치사 및 행동이상 확인.

(A) 본 연구에서 사용된 *Gong* 돌연변이들의 P-element 삽입 지점. *Gong*¹⁵, *Gong*¹⁷, *Gong*³², *Gong*⁷² 4개의 돌연변이는 *Gong* 유전자의 5' UTR에 P-element가 삽입되어 제작되었다. *Gong*²⁷은 3번 인트론에 Mi-element가 삽입되어 제작되었다. PSS domain으로 예측되는 부분은 CDS 내에 파란색 박스로 표기하였다.

(B) *trans*-heterozygous mutant들의 치사여부 및 1일차 행동 이상 여부 확인. *Trans*-heterozygous mutant들 대부분이 반치사 및 1일차 행동 이상을 보였다. V: Viable, 생존 SL: Semi-Lethal, 반치사 L: Lethal, 치사

제 2 절 *Gong* 유전자 돌연변이의 신경퇴행성 질환 표현형 확인

우화 직후 1일차 에서부터 *trans*-heterozygous mutants 돌연변이가 큰 행동이상을 보였기에, 반치사율과 행동이상을 보이면서도 태어나는 수가 많았던 *Gong*^{32/15}을 대상으로 신경퇴행성 질환 표현형을 확인하고자 하였다. 상대적인 발현 양을 알아보기 위한 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)에서 *trans*-heterozygous mutants에서 *Gong*의 발현이 야생형에 비해 35% 감소함을 확인할 수 있었다(그림 3-A).

야생형과 *Gong*^{32/15} 초파리들의 수명을 측정하기 위하여 각각의 생존율 그래프를 그리고, 50%의 개체 수가 생존하는 날인 T50값을 측정하였다(그림 3-B). 그 결과 *Gong*^{32/15}에서 야생형에 비해 매우 감소된 수명을 관찰할 수 있었다. 대부분의 *trans*-heterozygous mutant가 20일 내에 죽었고, T50의 경우 *Gong*^{32/15}는 14.6일로, 야생형이 37.2일을 보인 것에 비해 반 이상 감소하였다.

행동 능력을 관찰하기 위해서, 1일차의 *Gong*^{32/15}와 야생형의 climbing test를 수행하였다(그림 4-A). 그 결과 1일차 야생형 초파리가 평균 15.77cm만큼 올라간 것에 반해, 돌연변이 초파리의 경우에는 평균 1.33cm만을 올라갔다.

충격민감성을 확인하기 위한 bang-sensitivity assays에서는 1일차 야생형 초파리가 28.3% 만이 충격에 의해 기절한 것에 비해, *Gong*^{32/15}돌연변이의 경우에는 62.7%이 기절하였다(그림 4-Ba). 기절로부터 깨어나는데 얼마나 걸리는가에 대한 recovery time 측정 결과 야생형이 깨어나는데 평균 27.65초가 걸렸던 것에 반해, *Gong*^{32/15} 돌연변이는 평균 66.51초로 깨어나는데 굉장히 긴 시간이 필요함을 확인할 수 있었다(그림 4-Bb).

초파리의 뇌조직에서 발견되는 공포의 크기와 수는 신경퇴행의 심각도와 밀접한 연관 관계가 있다(Fergestad et al., 2008; Palladino, Hadley, & Ganetzky, 2002; Wittmann et al., 2001). 직접적인 신경퇴행을 확인하고자 야생형과 *Gong*^{32/15} 돌연변이 초파리의 뇌를 절삭하여 공포의 형성을 관찰하였다(그림 5). 뻣뻣하고 건강한 1일차 야생형 초파리의 뇌에 비해, 1일차 *Gong*^{32/15} 돌연변이 뇌에서 심각한 피질부위의 손상을 확인할 수 있었으며, 작지만 많은 수의 공포로 뇌조직이 스폰지와 같은 형상을 보였다. 5일차 노화된 *Gong*^{32/15} 돌연변이의 뇌조직에서는 공포의 크기와 수가 크게 증가하였다. 이러한 결과를 통해 *trans*-heterozygous mutant가 수명감소, 운동능력 감퇴, 충격민감성 증가 및 뇌조직의 손상과 같은 신경퇴행성 질환의 표현형을 나타내는 것뿐 만이 아니라, 선행연구 들에서 수행하였던 heterozygous mutant보다 훨씬 더 강한 표현형을 보임을 확인할 수 있었다.

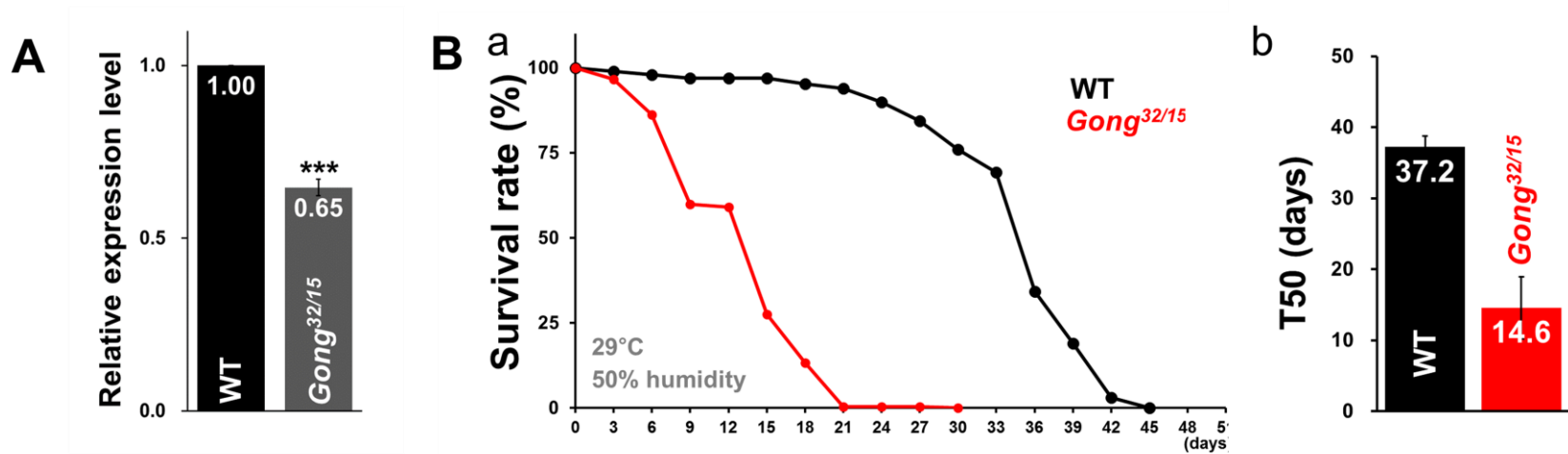


그림 3. *trans*-heterozygous mutant의 *Gong* 유전자 발현량 및 생존율 확인.

(A) Gong^{32/15}, *trans*-heterozygous mutant의 상대적 발현량 확인. qRT-PCR을 시행하여Gong^{32/15}에서 *Gong* 유전자의 상대적인 발현량을 측정하였다. Bar는 ± SEM (***)*p*<0.001)를 의미한다.

(B) (a) 29° C에서의 생존율 그래프. *Gong*^{32/15}의 경우 20일차에서 급감하는 양상을 보였으며, 이에 비해 야생형은 45일차까지 천천히 감소되는 양상을 보였다. (b) 야생형과. *Gong*^{32/15}의 T50 그래프. 야생형은 약 37.2일에 관병 내 50%의 초파리가 죽은 것에 반해, *Gong*^{32/15}는 14.6일에 관병 내 50%의 초파리가 죽었다. 각 라인별 최소 210마리 이상의 초파리가 실험에 사용되었다.

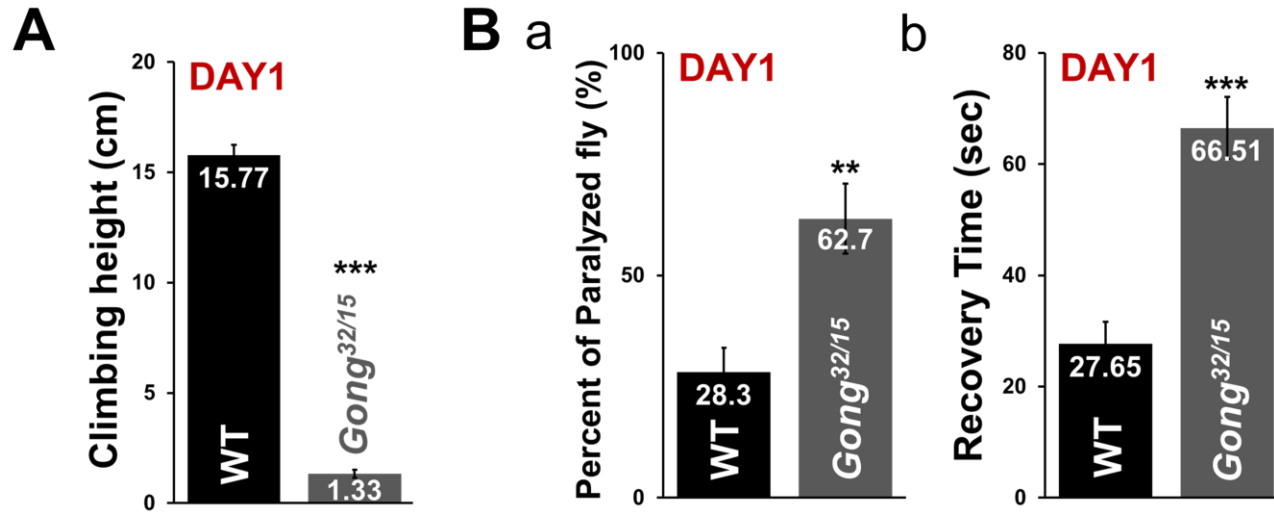


그림 4. *trans*-heterozygous mutant의 행동 능력 및 충격 민감성 확인.

(A) *Gong*^{32/15}, *trans*-heterozygous mutant의 행동능력 측정. 1일차 *Gong*^{32/15}에서 야생형에 비해 크게 감소된 행동능력을 관찰할 수 있었다. 각 라인별로 최소 80마리 이상의 초파리가 실험에 사용되었다.

(B) *Gong*^{32/15}, *trans*-heterozygous mutant의 충격민감성 측정. 야생형에 비해 1일차 *Gong*^{32/15}에서 큰 충격민감성을 보였다. (a). 충격에 의한 기절을 비교. (b). 충격 후 깨어나는 시간 측정 결과. Bar는± SEM (**p<0.01 and ***p<0.001)을 의미한다. bar내의 숫자는 mean values를 의미한다.

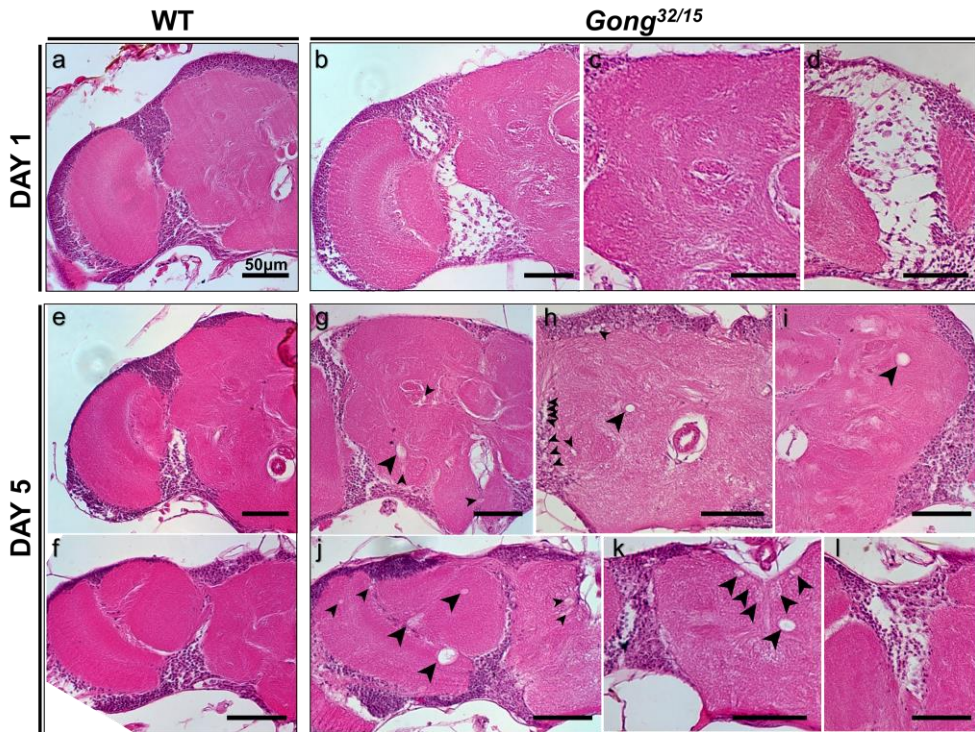


그림 5. *trans*-heterozygous mutant의 뇌 조직 단면 확인.

Gong^{32/15}에서 뇌조직의 퇴화를 확인하기 위하여 뇌 조직의 절편을 절단한 결과, 돌연변이에서 더 많은 수의 공포를 확인할 수 있었다. 일부 공포의 경우는 화살표를 이용하여 표기하였다. 야생형 (a, e, f). *Trans*-heterozygous *Gong* mutants (b-d, g-l). Scale bar, 50 μ m.

제 3 절 *Gong* 유전자 돌연변이의 미토콘드리아 형태 이상 확인

포유류의 PSS1 단백질은 소포체가 미토콘드리아와 밀접하게 접하고 있는 부위인 Mitochondria-Associated Membrane (MAM)에 위치하고 있다(Stone & Vance, 2000; Szymanski et al., 2017). MAM의 PSS1에 의해 합성된 PS는 mitochondria로 옮겨지고, PE가 합성되는데 사용된다(Vance & Tasseva, 2013). PE는 mitochondria 내막의 안정성 유지에 매우 중요한 기능을 하고 있다(Baker, Basu Ball, Pryce, & Gohil, 2016; Schenkel & Bakovic, 2014; Tamura et al., 2012; Vance, 2014). 그렇기 때문에, PS 합성효소의 이상은 PE 합성의 문제로 이어지고 이는 미토콘드리아의 안정성에 이상을 줄 것이라고 생각할 수 있다. 진핵세포에서 미토콘드리아의 형태는 융합(fusion)과 분열(fission)에 의해 조절된다. 분열에 문제가 생기면 미토콘드리아의 분절화가 발생하고, 융합에 문제가 생기면 미토콘드리아가 길어진다. 이러한 과정은 단순히 미토콘드리아의 형태에만 영향을 미치는 것이 아니라, 미토콘드리아의 기능과 밀접한 연관 관계가 있다. 이러한 미토콘드리아 역학은 미토콘드리아가 스스로를 포함한 다른 소기관들과 상호작용을 하거나, 내부 이상을 회복하는 데에 중요한 역할을 한다. 또한 세포예정사에 있어서의 미토콘드리아의 역할을 조절함에도 이러한 미토콘드리아의 역학이 매우 중요하다. 예를 들어, 융합단계에서의 이상은 쥐에서 발생학적 결함을 야기시킬 뿐만 아니라, 인간에서 신경퇴행성 질환 또한 야기시킨다. 이렇듯 미토콘드리아의 형태의 확인은 해당 세포와 조직의 이상을 확인하는 데에 중요한 요소이다(Su et al., 2010).

Trnas-heterozygous mutant의 미토콘드리아의 형태를 관찰하기 위하여, 뇌조직의 손상이 심했던 5일차 돌연변이 초파리를 transmission electron microscope (TEM)을 이용하여 관찰하였다(그림 6). 5일차 야생형의 경우 타원형의 정형화된 내막(cristae)을 가진 미토콘드리아를 볼 수 있었던데에 반해, *Gong*^{32/15}돌연변이 초파리의 경우 부풀어 오르고 확장된 형태의 미토콘드리아를 확인할 수 있었다. 이 뿐만이 아니라 이러한 미토콘드리아는 비정상적인 내막 형태를 지녔으며, 파열된 형태의 막을 보였다. 이러한 미토콘드리아의 이상을 통해 PS 합성 이상이 미토콘드리아의 안정성에 영향을 미쳐 미토콘드리아의 형태 이상을 초래했음을 확인할 수 있다.

위에서 살펴보았던 미토콘드리아의 내막의 모양, 파열 등은 미토콘드리아의 이상을 살펴봄에 있어서 중요한 요소이기도 하지만, 미토콘드리아 간의 상호작용 (fission과 fusion)을 살펴보는 것 또한 중요하다. TEM을 통해 살펴본 뇌 조직은 세포의 분포가 일정하지 않아, 미토콘드리아의 역학을 살펴보기에는 적절하지 않다. 이를 살펴보기 위해, 세포가 정렬되어 있는 초파리 성체의 비상근(flight muscle)에서 미토콘드리아를 살펴보았다(Greene et al., 2003)(그림 7). 그 결과, 미토콘드리아의 융합이 과하게 발생하여 미토콘드리아 축적이 되었음을 확인할 수 있다(Deng, Dodson, Huang, & Guo, 2008). *trans*-heterozygote mutants에서 근육에서의 미토콘드리아 이상이 관찰되었기 때문에, 유전자가 근육에서 knock-down되었을 경우에 어떠한 표현형을 보이는가를 연구하기 위하여 근육 특이적으로 발현하는 *Mhc-gal4* 라인을 이용하여, *Gong* 유전자를 knock-down하였다. 그

결과 배아상태에서 치사됨을 확인할 수 있었다. 이는 *Gong* 유전자가 신경계뿐만 아니라 근육에서도 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다.

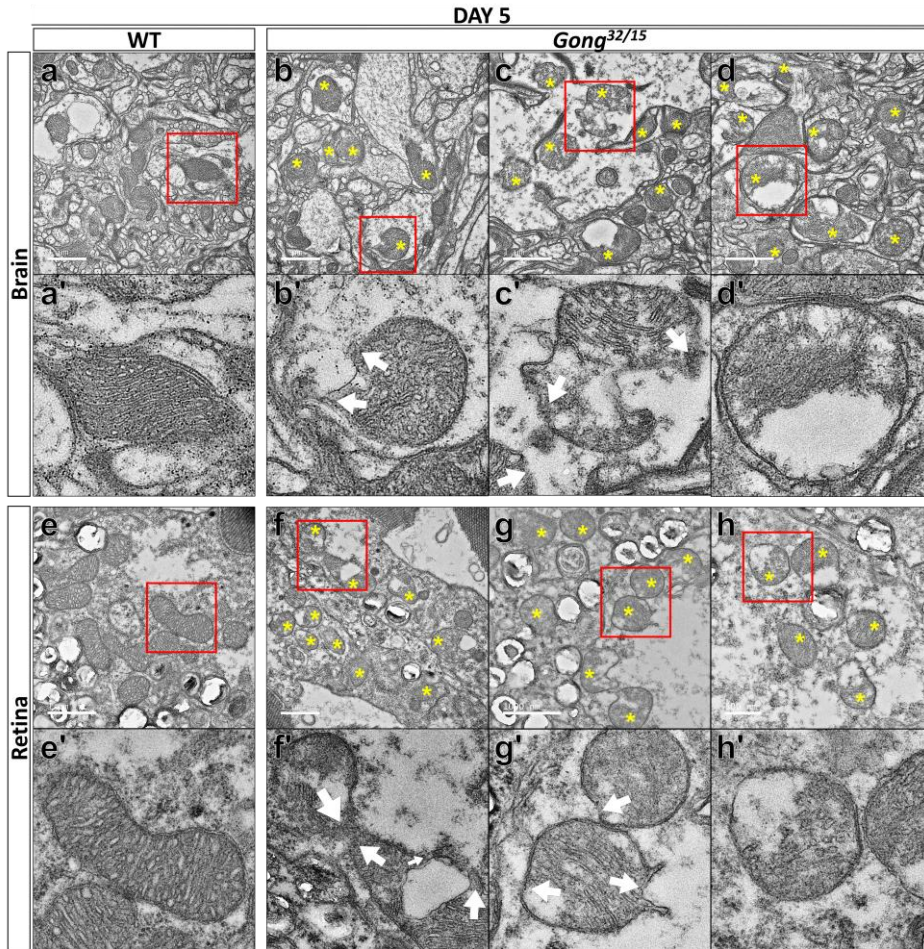


그림 6. *trans*-heterozygous mutant의 미토콘드리아 형태 확인

5일차 야생형과 *trans*-heterozygous mutant의 미토콘드리아 형태를 TEM을 통해 살펴보았다. 뇌에서 살펴본 5일차 야생형 (a)과 *Gong*^{32/15} (b-d), 망막의 신경교세포에서 살펴본 5일차 야생형(e)과 *Gong*^{32/15} (f-h). 붉은색 박스는 상단부의 사진(a-h)을 확대한 하단부 사진(a'-h')의 위치를 나타낸다. 야생형의 미토콘드리아가 정형화된 내막과 전체 형태를 가지고 있었다면(a', e'). *Gong*^{32/15} 돌연변이의 미토콘드리아의 경우 비정형화된 내막의 형태를 보일 뿐만 아니라, 흰색화살표에서 살펴볼 수 있듯이 터진 형태를 보였다(b', c', f', g'), 또한 터지지 않는 않지만 상당히 부분형태 또한 관찰할 수 있었다(d', h').

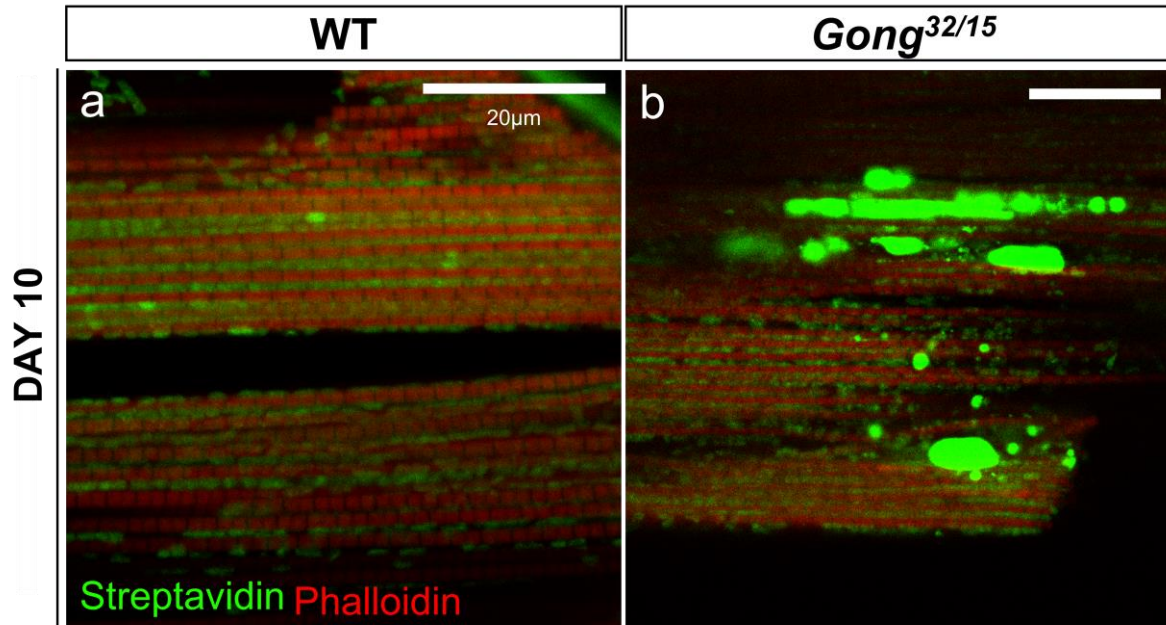


그림 7. 근육의 *trans*-heterozygous mutant 미토콘드리아 형태 확인.

Streptavidin(미토콘드리아)와 Phalloidin(근육) 항체를 이용하여 근육에서의 미토콘드리아 형태를 확인하였다. 야생형에서는 미토콘드리아가 근육 사이에서 정형화되어 긴 형태로 발견된 것에 반해, *Gong*^{32/15}에서는 일부 부위에서 미토콘드리아가 과하게 fusion(융합)되어 미토콘드리아가 축적된 상태임을 확인할 수 있었다. Scale bar 20 μm

제 4 절 *Gong* 유전자 돌연변이의 ROS 발생량 확인

Reactive oxygen species (ROS)는 대부분 미토콘드리아에서 생성되며, 미토콘드리아에는 이러한 ROS를 조절하는 효소적 기전이 존재한다(Starkov, 2008). 이러한 ROS에 의한 oxidative stress는 신경퇴행의 주요한 원인이기도 하며 (Sies, 2017), 미토콘드리아 기능에 이상이 생기면 미토콘드리아 내에 존재하는 ROS 조절 기전이 무너질 뿐만 아니라 ROS가 미토콘드리아 밖으로 방출되게 된다. 즉, 미토콘드리아에 이상이 생기게 되면, 해당 조직의 ROS 농도가 증가하게 되는 것이다. 따라서 앞에서 관찰한 비정상적인 미토콘드리아의 형태가 조직내 ROS 증가로 이어졌는가를 확인하고자 dihydroethidium (DHE)를 이용하여 trans-heterozygous mutant의 뇌세포에서 ROS의 농도를 측정하였다(Owusu-Ansah, Yavari, & Banerjee, 2008). 1일차의 *Gong*^{32/15} 돌연변이에서 이미 심각한 뇌조직의 손상이 보였었기 때문에, ROS의 발생은 그 이전이라 생각되어 깨어나기 직전의 번데기상태의 초파리의 뇌를 꺼내어 ROS를 측정하였다. 그 결과 번데기 상태의 *Gong*^{32/15} 돌연변이 뇌에서 야생형에 비해 더 많은 ROS를 확인할 수 있었다(그림 8).

ROS의 존재하에 지방(특히, PUFA)은 산화될 수 있으며, 이러한 지방의 산화(lipid peroxidation)는 세포가 산화적 상태에 있음을 상징하는 생체표지자로서 사용될 수 있다 (Abuja & Albertini, 2001). 이에 BODIPY(581/591)를 이용하여 3일차의 야생형과 *Gong*^{32/15} 돌연변이의 lipid peroxidation 정도를 측정한 결과, 야생형에 비해 *Gong*^{32/15} 돌연변이에서 lipid peroxidation이 더 강하게 발생하였음을 확인할 수 있었다(그림 9).

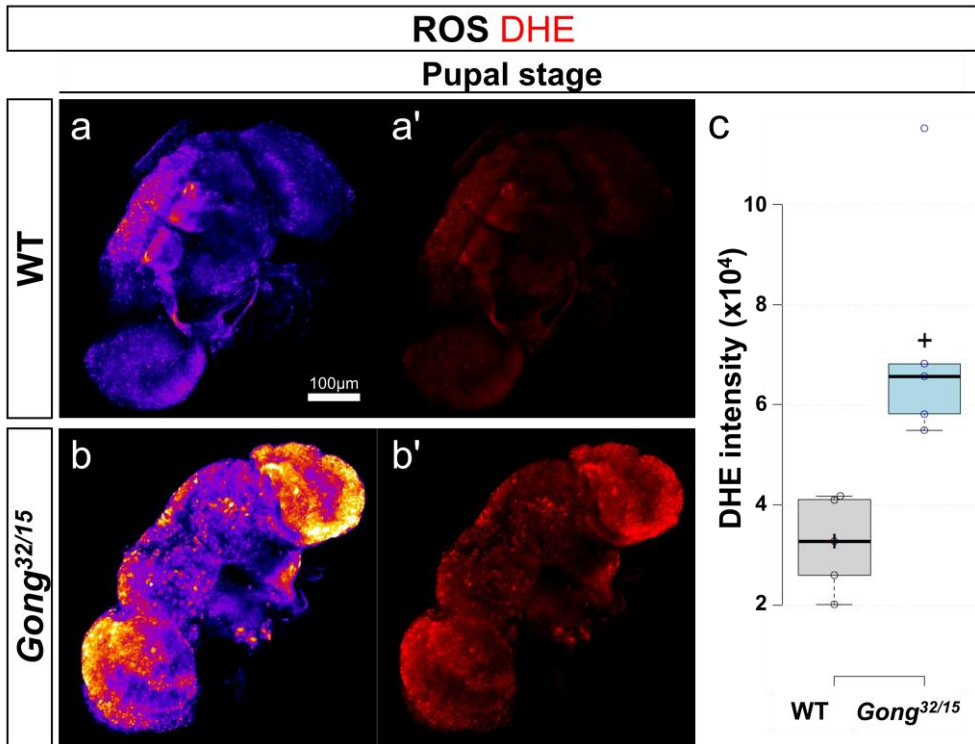


그림 8. *trans*-heterozygous mutant의 ROS 측정 결과.

Dihydroethidium (DHE)를 이용하여 뇌에서의 ROS를 측정하였다. (a, a') 번데기상태(pupal stage)의 야생형. (b, b') 번데기 상태의 *Gong^{32/15}*. 야생형에 비해 *Gong^{32/15}*에서 더 강한 ROS를 확인할 수 있었다. 위의 이미지는 명확한 형광의 밝기비교를 나타내기 위하여 fire mode로 나타내었다(a, b). DHE 강도의 정량화를 그래프로 나타내었다(c). 정량화에는 각기 다른 4개 이상의 조직이 사용되었다. Scale bar, 100 μ m.

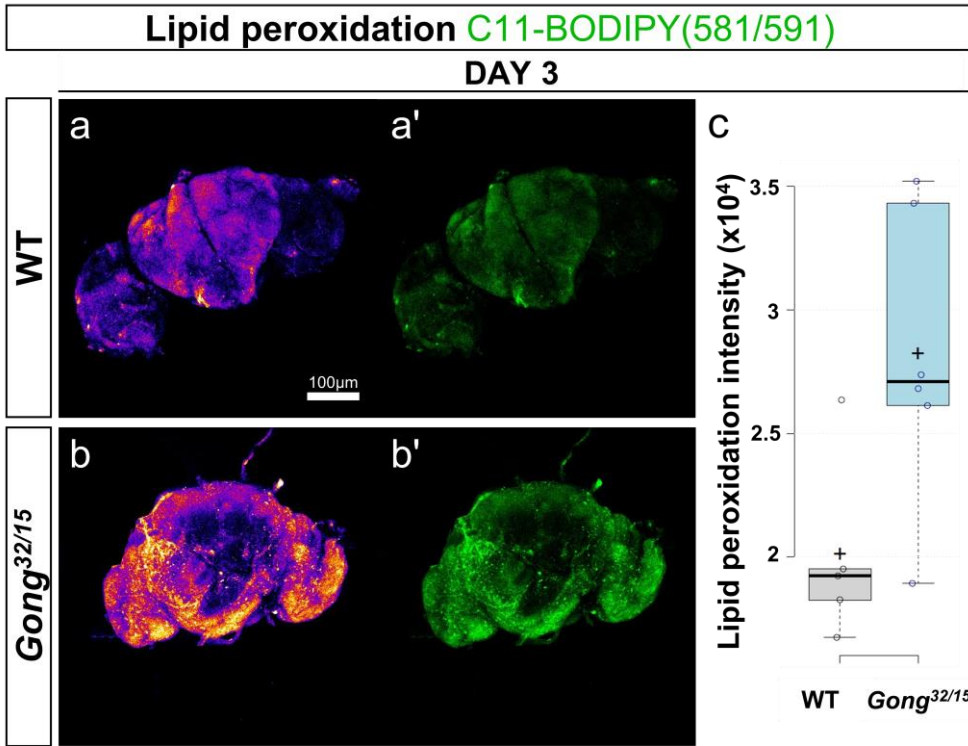


그림 9. *trans*-heterozygous mutant의 lipid peroxidation 측정 결과.

C11-BODIPY(581/591)을 이용하여 뇌조직에서의 lipid peroxidation(지질 과산화)을 측정하였다. (a, a') 3일차 야생형. (b, b') 3일차 *Gong*^{32/15}. 위의 이미지는 명확한 형광의 밝기비교를 나타내기 위하여 fire mode로 나타내었다(a, b). C11-BODIPY (581/591)강도의 정량화를 그래프로 나타내었다(c). 정량화에는 각기 다른 5개 이상의 조직이 사용되었다. Scale bar, 100 μm..

제 5 절 *Gong* 유전자 돌연변이의 autophagy 증가량 확인

Autophagy는 비이상적인 세포 또는 소기관들을 없애는 기전으로써, autophagosome 및 autolysosome의 형성을 포함한다(Mizushima, 2007). Acridine orange (AO)를 이용하여 돌연변이에서의 autophagy 증가량을 확인하고자 하였다(Thome et al., 2016). 이를 이용하여 세포내의 autophagic activity를 측정할 수 있다. 1일차 야생형과 *Gong*^{32/15} 돌연변이의 뇌를 AO를 이용하여 측정한 결과 *Gong*^{32/15} 돌연변이에서 야생형에 비해 더 많은 autophagosome이 형성되었음을 확인할 수 있었다(그림 10). 이러한 결과를 통해 돌연변이의 뇌에서 autophagic activities가 크게 증가하였음을 알 수 있다.

증가된 autophagic activities의 조직학적 증거를 얻기 위하여, 초파리의 눈조직을 절편하여 TEM을 이용하여 망막의 색소세포의 autophagosome/autolysosome 구조를 관찰하였다(그림 11). 이 결과 *Gong*^{32/15} 돌연변이에서 더 많은 autophagosome /autolysosomes를 관찰할 수 있었다(Eskelinen, Reggiori, Baba, Kovacs, & Seglen, 2011)). 이러한 결과는 앞서 살펴보았던 돌연변이에서 autophagocytic activity가 증가됨을 뒷받침한다. 이러한 증가된 autophagic activities는 미토콘드리아의 이상을 회복시키기 위한 세포의 방어적 기작의 일환으로 볼 수 있으나, 증가된 autophagy는 이후 세포사멸을 일으키는데에 영향을 줄 것이다(Kroemer & Levine, 2008).

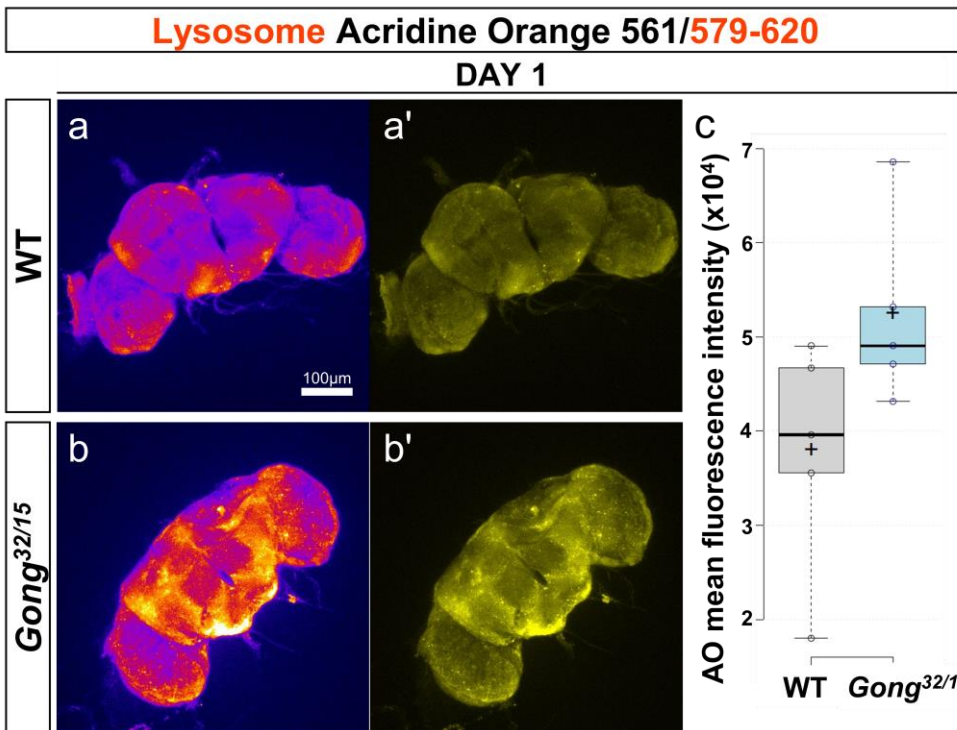


그림 10. *trans*-heterozygous mutant의 autophagy 확인.

AO(excitation/emission: 561/579-620)를 이용하여 뇌 조직에서 autophagic activities를 측정하였다. (a, a') 1일차 야생형. (b, b') 1일차 *Gong*^{32/15}. 위의 이미지는 명확한 형광의 밝기비교를 나타내기 위하여 fire mode로 나타내었다(a, b). AO (excitation/emission: 561/579-620) 강도의 정량화를 그래프로 나타내었다(c). Scale bar, 100 μm.

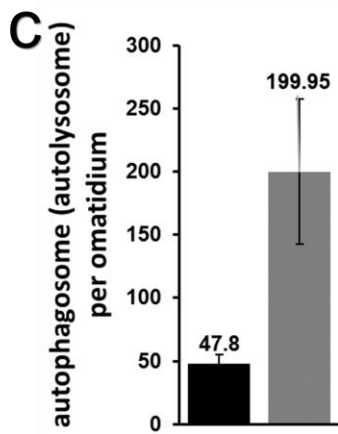
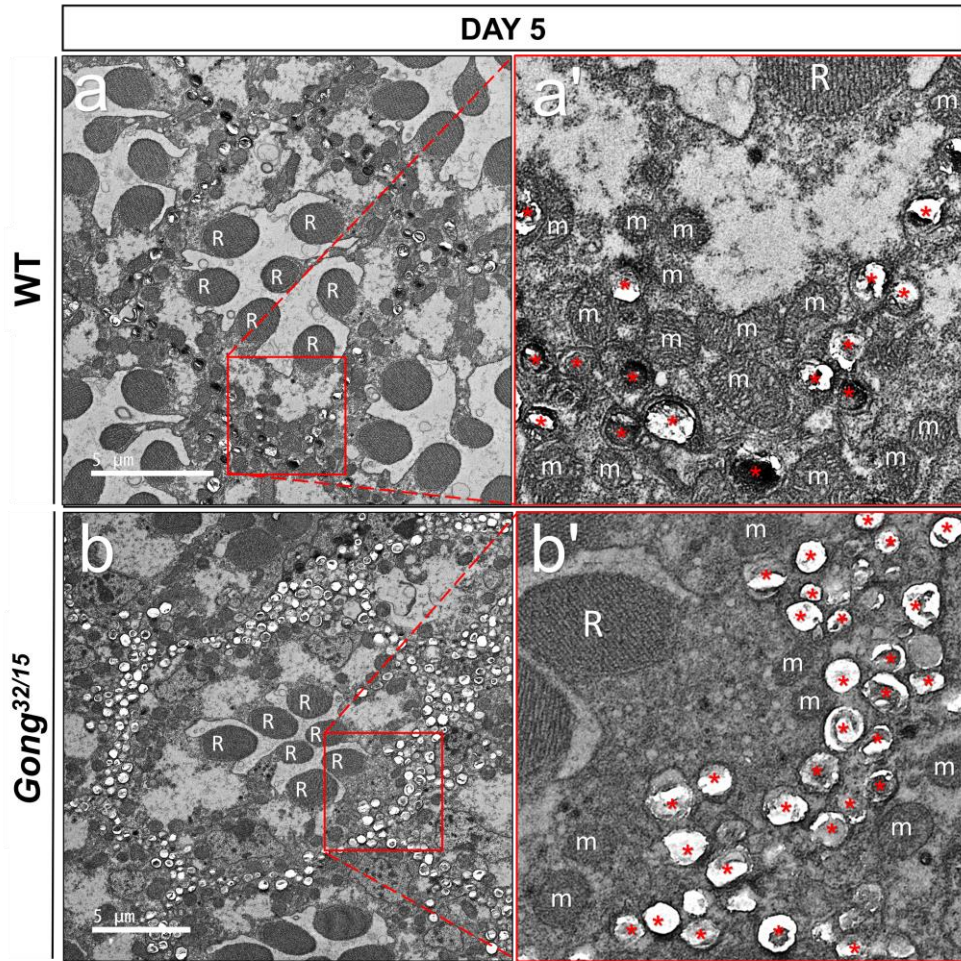


그림 11. *trans*-heterozygous mutant의 autophagosome
/autolysosome 확인.

TEM을 이용하여 5일차 야생형(a)과 *Gong*^{32/15}(b)의 ommatidium의 autophagosome 및 autolysosome을 관찰하였다. *Gong*^{32/15}에서 색소세포로 구성된 Inter-ommatidial area 크게 확장되었음을 확인할 수 있었다. 붉은 상자는 왼쪽 부분(a, b)에서 오른쪽으로 확대되어 표기된 부분(a', b')을 표기하였다. R: rhabdomeres, 감간분체, m: mitochondria, 미토콘드리아. Autophagic bodies는 별(*)로 표기하여 나타냈다. (c) 그래프는 ommatidium당 autophagosomes/autolysosomes개수를 정량화 하여 나타냈다. *Gong*^{32/15}의 경우 야생형에 비해 약 4.2배 많은 autophagic bodies가 나타났다. 정량화를 위하여 각기 다른 20개 이상의 샘플을 분석하였다. Scale bar, 100 μ m. Bar는 \pm SD (***) $p < 0.001$ 를 의미하며, 바내의 숫자는 mean values를 의미한다.

제 6 절 *Gong* 유전자 돌연변이의 apoptosis 및 Secondary Necrosis 확인

미토콘드리아의 이상과 산화 스트레스는 신경퇴행성 질환의 가장 큰 위험 요인이다. 많은 연구들을 통해, 파킨슨병, 알츠하이병과 같은 다양한 신경퇴행성 질환에서 미토콘드리아 기능 이상이 조기에 발생하여 질병의 발병에 인과적으로 작용한다고 밝혀지고 있다(Lin & Beal, 2006). 동시에 미토콘드리아 손상은 세포사멸의 결정에 중추역할을 수행한다(Eckert et al., 2003). 위에서 관찰하였던 *Gong* 돌연변이 초파리의 뇌에서 관찰된 미토콘드리아의 기능 및 형태 이상과 과도한 ROS의 형성은 세포사멸로 이어지리라고 예측할 수 있다. 이러한 세포사멸을 확인하기 위하여, 5일차의 *Gong*^{32/15} 돌연변이와 야생형을 대상으로 AO염색과 anti-cleaved Caspase 3 항체염색을 진행하였다. AO 염색의 경우, 488nm의 파장을 비춰준 후, 650nm 이상의 방출 파장을 인식하여 ssDNA를 탐지하였다(Sarkissian, Timmons, Arya, Abdelwahid, & White, 2014). 이 결과 야생형에 비해 *Gong*^{32/15} 돌연변이에서 더 강한 형광신호를 탐지할 수 있었고, 이를 통해 *trans*-heterozygous *Gong* mutant의 뇌에서 야생형보다 더 많은 apoptosis가 일어남을 확인하였다(그림 12).

Anti-cleaved Caspase 3를 이용한 항체염색에서도, 야생형에 비해 1일차와 5일차의 *Gong*^{32/15} 돌연변이 초파리의 뇌에서 더 많은 apoptosis가 일어남을 확인할 수 있었다(그림 13). 더 나아가, 돌연변이에서도 1일차에 비해 5일차에서 더 많은 apoptosis가 일어남을 확인하였다. 결론적으로, 야생형에 비해 *Gong* 돌연변이에서 더 많은 autophagy와 apoptosis가 일어난다.

예정세포사라고도 잘 알려진 apoptosis는 정상적인 개체의

발생과 항상성 유지 및 병원성 물질의 제거 등의 기능을 수행하기 위하여 모든 조직에서 모든 생애 동안 발생한다(Poon, Lucas, Rossi, & Ravichandran, 2014). 따라서 *Gong* 유전자의 돌연변이에서 apoptosis와 autophagy가 증가하였지만, 이러한 증가가 뇌조직 절편에서 관찰하였던 크고 광범위한 공포로 어떻게 이어지는가에 대한 의문이 여전히 남는다. 이에 대한 답을 *Gong* 유전자의 이상에 의해 미토콘드리아의 이상을 초래했을 뿐만이 아니라 세포막의 PS 또한 달라지게 할 수 있다는 가능성에서 찾고자 하였다. 세포막의 PS는 ‘eat-me’ 신호로 작용함으로써 cell clearance 과정에 관여한다(Fadok et al., 1998; Ravichandran, 2010). 따라서 *Gong* 유전자의 돌연변이에서 apoptotic cell의 PS externalization이 더 적게 되거나 문제가 생기게 되면 이로 인해 대식세포들이 apoptotic cell을 인지하지 못하게 되면서, 제거되어야 할 apoptotic cell이 제거되지 못하고 결국은 터지게 될 것이다. 최종적으로는 터져버린 apoptotic cell 내에 존재하던 여러 물질들이 주변세포에 독성작용으로 광범위한 염증반응을 일으켜, 주변 세포의 necrosis를 야기할 것이다. 이를 ‘secondary necrosis’고 한다(Muñoz et al., 2010).

이러한 가설을 증명하기 위하여, 5일차와 10일차의 야생형과 *Gong*^{32/15} 돌연변이의 뇌를 necrosis detector로 염색하여 관찰하였다(그림 14). 그 결과 5일차와 10일차 야생형 뇌에서 아주 적은 형광만을 탐지할 수 있었던 데에 반해, 돌연변이에서는 광범위하고 강한 신호를 확인할 수 있었다. 10일차 돌연변이의 뇌에서는 5일차에 비해 더 강한 신호를 확인하였다. 결론적으로, 이것은 *Gong* 돌연변이 초파리의 뇌에서 Secondary necrosis가 발생하고 있음을 보여준다.

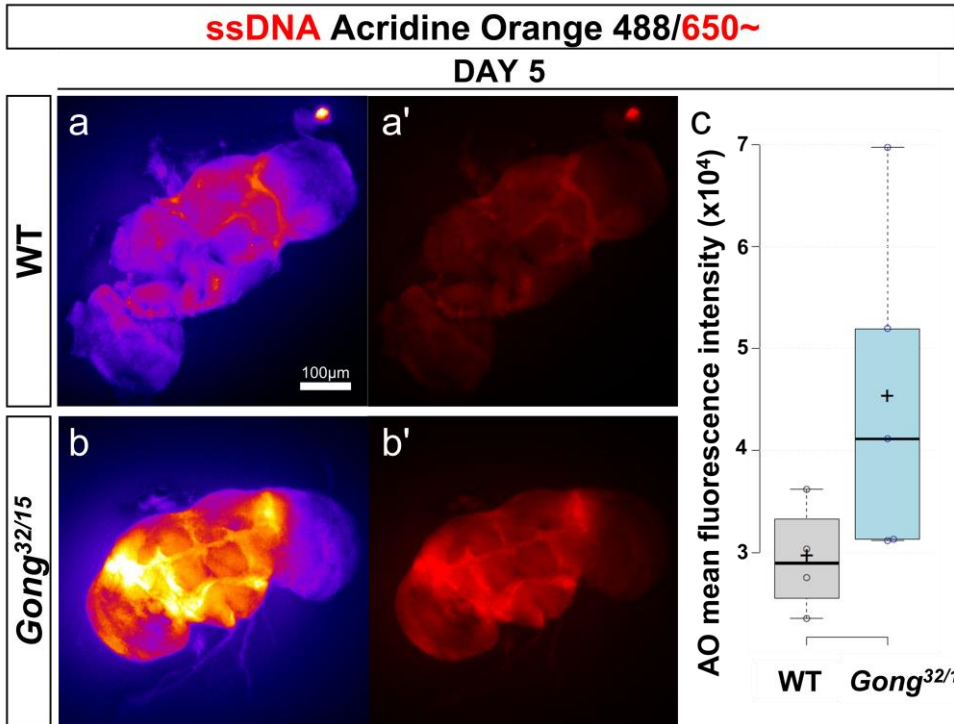


그림 12. AO를 이용한 *trans*-heterozygous mutant의 apoptosis 확인. AO(excitation/emission: 488/650~)을 이용하여 apoptotic cell 을 탐지하였다. 488nm파장에 의해 흥분되었을 경우, AO는 ssDNA 분자에 붙어 650 nm 이상의 형광을 방출한다. (a, a') 5일차 야생형. (b, b') 5일차 *Gong*^{32/15}. 위의 이미지는 명확한 형광의 밝기비교를 나타내기 위하여 fire mode로 나타내었다(a, b). AO(excitation/emission: 488/650~) 강도의 정량화를 그래프로 나타내었다(c). 정량화에는 각기 다른 5개 이상의 조직이 사용되었다. Scale bar, 100 μ m.

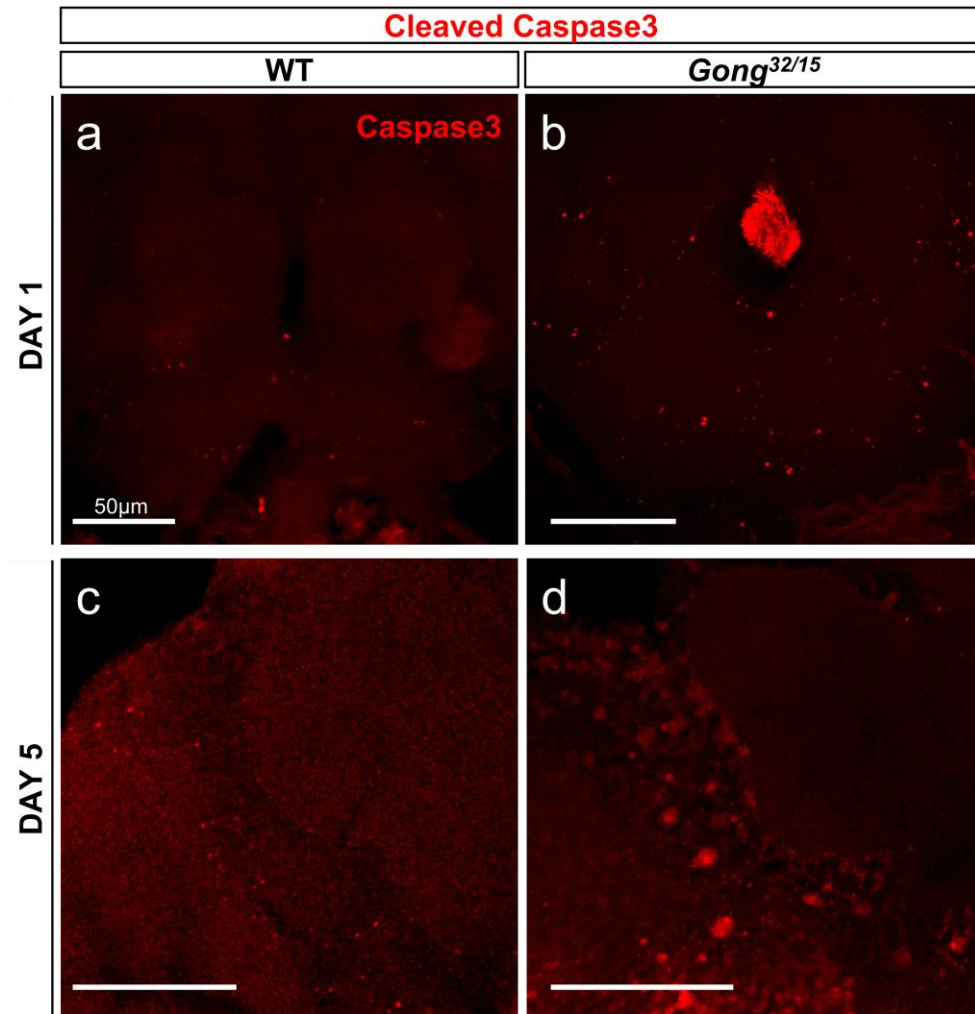


그림 13. Anti-cleaved caspase 3를 이용한 *trans*-heterozygous mutant의 apoptosis 확인.

Anti-cleaved-Caspase3 항체염색을 이용하여 apoptosis를 확인하였다. (a, c) 1일차 및 5일차 야생형. (b, d) 1일차 및 5일차 *Gong*^{32/+}. 1일차 돌연변이의 중심 뇌 전체에 걸쳐서 작고 많은 수의 형광 신호를 탐지할 수 있었으며 (b), 이러한 신호는 5일차 돌연변이에서 더 강하게 관찰할 수 있었다 (d). 반면 야생형에서는 거의 이러한 신호를 관찰할 수 없었다 (a, c). Scale bar, 50 μ m

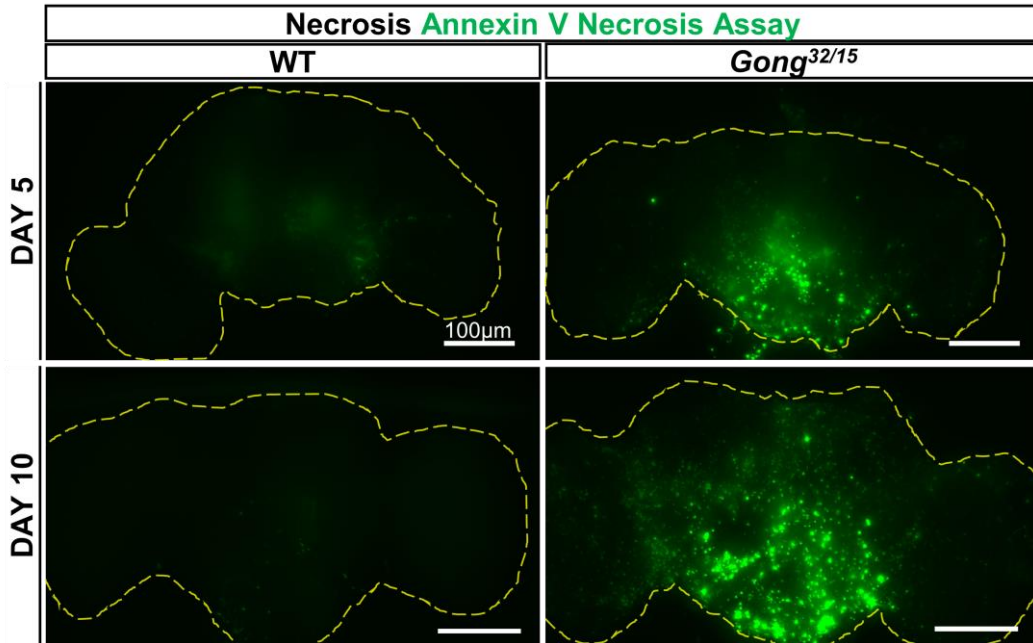


그림 14. *trans*-heterozygous mutant의 secondary necrosis 확인.

necrosis detector를 이용하여 5일차와 10일차의 야생형 초파리의 뇌와 *Gong*^{32/15} 돌연변이 초파리의 뇌에서의 secondary necrosis의 경향성을 확인하였다. 야생형에서 아주 적은 수의 신호만을 탐지할 수 있었던데에 반해(a, c), 돌연변이에서는 전체적으로 많고 강한 형광 신호를 탐지할 수 있었다(b) 이러한 경향성은 10일차 돌연변이의 뇌에서 더 강하게 관찰할 수 있었다(d).

제 7 절 Cortex glia 특이적 *Gong* 유전자 기능 이상 돌연변이의 신경퇴행성 질환 표현형 확인

초파리의 신경계에는 인간과 마찬가지로 cortex glia, perineurial glia, subperineurial glia, astrocyte-like glia 와 같은 다양한 종류의 신경교세포가 있다(Awasaki and Lee, 2011; Kremer et al., 2017; Stork et al., 2012; von Hilchen et al., 2008). 박예진(2018)에서 다양한 종류의 신경교세포 별 knock down실험을 수행한 결과, cortex glia specific한 lethality를 확인하였다. Cortex glia는 뇌에서 세포의 지지뿐만 아니라 draper-dependent cell clearance 작용을 수행하고 있다. Draper는 Phagocytosis를 담당하는 세포에서 발현하는 단백질로써, apoptotic cell에서 externalization된 PS를 인지하는 역할을 수행하는 단백질이다. 본 연구에서는 cortex-glia specific knock-down개체에서 치사 되지 않고 태어난 개체들이 어떤 표현형을 보이는가를 확인해보고자 하였다.

Gong 유전자가 cortex glia 특이적으로 knock down된 돌연변이에서 상대적인 발현량을 확인하기 위하여, quantitative RT-PCR (qRT-PCR) 수행한 결과 야생형에 비해 약 50% 감소되었음을 확인할 수 있었다(그림 15-A). 또한 대부분의 cortex-glia knockdown 돌연변이는 29° C에서 48 시간 내에 죽었으며, 매우 짧은 수명을 보였다(그림 15-B). *Trans*-heterozygous mutant처럼 1일차에서 행동이상을 보이지는 않았지만, 충격에 매우 민감함을 보였다(그림 15-C). 야생형의 충격 후 기절율이 약 23.6%였는데에 비해, cortex glia 특이적으로 knock down된 돌연변이에서는 충격 후 약 85.7%의 초파리가 기절하였으며, 깨어나는 데에는 *trans*-

heterozygous mutant보다 더 긴 시간인 125.2초를 필요로 했다.

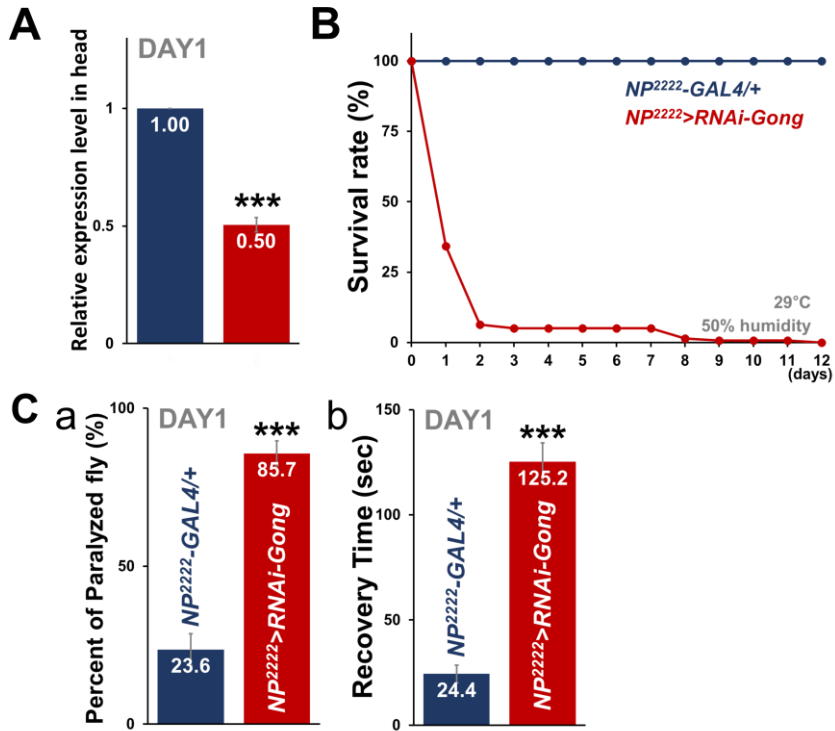


Figure 15. Cortex glia 특이적 knock down 돌연변이의 신경퇴행성질환 표현형.

(A) Cortex glia 특이적 knock down 돌연변이에서 *Gong*의 상대적 발현량 확인. qRT-PCR을 시행하여 knock down개체에서 *Gong* 유전자의 상대적인 발현량을 측정하였다. Bar는 \pm SEM (***) $p < 0.001$ 를 의미하며, 바내의 숫자는 mean values를 의미한다.

(B) (a) 29° C에서의 생존율 그래프. 대부분의 knock down개체는 48 시간 내에 죽었다. (b) 야생형과. cortex glia 특이적 knock down 돌연변이의 T50 그래프.

(C) *Gong*^{32/15}, cortex glia 특이적 knock down 돌연변이의 충격민감성 측정 결과. 야생형에 비해 1일차 돌연변이에서 큰 충격민감성을 보였다.

(a) 충격에 의한 기절을 비교. (b) 충격 후 깨어나는 시간 측정 결과.

제 4 장 고 찰

PS는 PC, PE와 함께 세포막을 구성하는 중요한 인지질 중 하나이다. 알츠하이머병과 파킨슨병과 같은 신경퇴행성 질환을 앓고 있는 환자의 신경조직에서 인지질 조성의 변화가 관찰되었다(Buccoliero, Bodennec, Van Echten-Deckert, Sandhoff, & Futerman, 2004; Pettegrew et al., 2001; Wang et al., 2014). 그러나 이러한 변화가 신경퇴행성 질환의 결과인지 원인인지는 아직 연구된 바 없다. 본 연구에서는 인간의 PSS1과 높은 상동성을 보이는 *Gong* 유전자의 돌연변이에 대하여 연구하였다. 본 연구는 인지질 합성과 인간의 신경퇴행성 질환 사이의 연관 관계를 설명할 수 있으리라 생각된다.

본 연구에서는 *Gong* 유전자의 *trans*-heterozygous mutant를 대상으로 하여, 감소된 수명, 행동 이상 및 뇌조직의 심각한 공포형성과 같은 신경퇴행성 질환의 표현형을 확인하였다. 이러한 신경퇴행성 질환의 표현형은 어디서 기인하는 것일까? 이에 대하여, PS의 기능과 연관 지어서 생각해볼 수 있다. PS는 세포막 안쪽에서 신경의 생존과 성장, 시냅스 형성에 중요한 역할을 수행하는 Akt, Raf-1과 같은 단백질들의 개시 및 활성화를 조절하는 역할을 한다(Kim et al., 2014). *Gong* 유전자의 돌연변이에 의해 PS의 합성과 이동에 이상이 생기고, 이는 세포막에서의 PS 농도 저하로 이어져 중요 단백질의 활성화 및 개시가 저해되어 결국 세포 사멸로 이어질 것이다. 다른 가능성은, 본 연구에서 살펴 보았던 돌연변이에서 미토콘드리아의 이상과 secondary necrosis와 연관 지어서 생각해볼 수 있다. 소포체에서 *Gong*에 의해 합성된 PS는 미토콘드리아로 전달되어 PSD라는 효소에 의해 PE로 합성된다. 이때, PE는 미토콘드리아 내막의 안정성에 중요한 역할을 수행하고 있으며, 이

밖에 미토콘드리아의 기능 수행과도 깊은 연관 관계가 있다(Baker et al., 2016; Choi et al., 2005; Schenkel & Bakovic, 2014; Tamura et al., 2012; Vance, 2014). 따라서 PS합성 이상은 PE합성의 이상으로 이어지고, 이는 미토콘드리아의 형태 및 기능 이상으로 이어질 것이다. 이를 본 연구에서는 *Gong*돌연변이 초파리의 미토콘드리아 형태 이상 및 ROS의 증가로부터 확인하였다. 이러한 미토콘드리아 형태 및 기능 이상은 autophagy 및 apoptosis와 이어지게 되는데, 이 또한 *Gong*돌연변이 초파리의 뇌에서 야생형에 비해 크게 증가됨을 확인할 수 있었다.

PS는 세포막 표면에 노출되어 대식세포가 apoptotic cells를 인지하는 ‘eat-me’신호로써 작용한다(Fadok et al., 1998; Ravichandran, 2010). Cell clearance 작용은 개체의 발생 및 세포의 항상성 유지에 매우 중요하며, cell clearance작용에 이상이 생기게 되면 다양한 질병을 야기시킨다(Poon et al., 2014). 만약 apoptotic cell이 정상적으로 제거되지 못하면, 세포 내부의 제거되지 못한 독성성분이 cell 밖으로 방출되게 되고, 주변세포에 염증반응을 일으켜 괴사 시키는 secondary necrosis가 발생하게 된다 (Muñoz et al., 2010). 즉, *Gong* 유전자의 돌연변이에서 미토콘드리아 이상 및 과도한 ROS에 의해 apoptosis에 이르게 된 세포의 세포막에서의 PS externalization이 일어나지 못하게 되고, 신경계에서 대식세포의 역할을 수행하고 있는 신경교세포가 이러한 이상이 생긴 세포를 인식하지 못하고 결국은 제거하지 못하게 될 것이다. 제거되지 못한 apoptotic cell은 터지게 되어 이 세포 주변의 세포들마저 광범위하게 죽어 나가게 될 것이다. *Gong*돌연변이에서 necrosis detector에 의해 탐지된 증가된 necrosis는 이러한 가설을 뒷받침한다.

한편 cortex glia는 뇌 조직의 안정성을 유지하는데 기여할 뿐만 아니라 draper-dependent phagocytosis를 담당한다(Awasaki, Lai, Ito,

& Lee, 2008; Doherty, Logan, Tasdemir, & Freeman, 2009). Draper 단백질은 PS를 인지하는 수용체로써 glia cell 표면에서 apoptotic cell 을 인지하는 역할을 수행한다 (MacDonald et al., 2006). 따라서 *Gong* 유전자의 cortex glia 특이적 knock down 돌연변이에서 보이는 짧은 수명 및 충격 민감성 등의 표현형은 *gong* 유전자가 cortex glia에서 중요 기능을 수행하고 있을 뿐만 아니라, cortex glia의 이상으로 인하여 cell clearance 작용에 문제와도 연관지어 생각해 볼 수 있다.

Gong 유전자의 돌연변이를 가진 돌연변이주들은 대부분 homologous lethality 보인다. 뿐만 아니라, 본 연구에서 살펴보았던 trans-heterozygous mutant들에서도 교배 결과에 따라 서로 다른 치사율과 발생의 차이를 보였다. 이것은 *Gong* 유전자가 초파리의 발생단계에서도 중요한 기능을 하고 있을 것이라고 생각할 수 있다. 인간의 경우 *Ptdss1*(PSS1을 암호화하고 있는 유전자) 유전자에 돌연변이가 생길 경우 인간의 Lenz-Majewski Hyperostotic Dwarfism (LMHD)을 야기시킨다고 알려져 있다. LMHD는 매우 희귀한 질병 중 하나로, 지적 장애와 다발성 선천성 이상이 일반화된 두개골과 발달상의 결함이 증상으로 나타난다(Sohn et al., 2016; Sousa et al., 2014). 이와 같은 맥락에서, *Gong* 유전자가 개체의 발생에 있어서 중요한 역할을 수행할 뿐만 아니라, 차후 *Gong* 유전자 돌연변이를 LMHD와 같은 희귀질환 연구의 모델동물로써 사용할 수 있을 것이다.

본 연구에서, *Gong* 유전자가 초파리의 신경퇴행과 발생에서 중요한 역할을 수행하고 있음을 살펴보았다. 다른 지질의 합성에 관여하는 효소들의 비정상적인 기능이 신경퇴화를 유발한다는 것이 밝혀지고 있다. 예를 들어, ethanolamine kinase을 암호화하고 있는 *easily shocked* (*eas*) 유전자의 돌연변이와, PC를 합성하는 효소를 암호화하고 있는

phosphocholine cytidyltransferase 1 (cct1) gene 돌연변이에서 신경퇴행성 질환의 표현형이 확인되었다(Fergestad et al., 2008; Pavlidis et al., 1994). 더욱이, PC를 분해하는 효소를 암호화하고 있는 *swiss cheese (sws)* 유전자의 돌연변이에서는 신경퇴행성 질환의 표현형이 관찰되었을 뿐만 아니라, 신경교세포 특이적인 표현형이 나타남 또한 확인한 바 있다(Kretzschmar et al., 1997; Muhlig-Versen et al., 2005). 최근에는 파킨슨 병과 깊은 관계가 있다고 알려진 *pink, parkin*과 같은 유전자 돌연변이가 소포체와 미토콘드리아 사이의 lipid trafficking 이상과 밀접한 관련이 있다고 연구된 바 있다(Valadas et al., 2018). 따라서, 지금까지 단순히 신경퇴행성 질환에서 나타나는 표현형 정도로 인식되었던 인지질에서의 변화가 이제는 신경퇴행성 질환의 발병 원인으로의 인식이 전환되어 더 많은 연구가 진행되어야 된다고 생각된다.

참고 문헌

- Abuja, P. M., & Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta*, *306*(1-2), 1-17.
- Arias, M., Sanchez, M., Sailem, H., Bousgouni, V., Sero, J., & Bakal, C. (2012). *Differential RNAi screening provides insights into the rewiring of signalling networks during oxidative stress* (Vol. 8).
- Awasaki, T., Lai, S. L., Ito, K., & Lee, T. (2008). Organization and postembryonic development of glial cells in the adult central brain of *Drosophila*. *J Neurosci*, *28*(51), 13742-13753. doi:10.1523/jneurosci.4844-08.2008
- Baker, C. D., Basu Ball, W., Pryce, E. N., & Gohil, V. M. (2016). Specific requirements of nonbilayer phospholipids in mitochondrial respiratory chain function and formation. *Mol Biol Cell*, *27*(14), 2161-2171. doi:10.1091/mbc.E15-12-0865
- Baumeister, J., Barthel, T., Geiss, K. R., & Weiss, M. (2008). Influence of phosphatidylserine on cognitive performance and cortical activity after induced stress. *Nutr Neurosci*, *11*(3), 103-110. doi:10.1179/147683008x301478
- 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.
- Buccoliero, R., Bodenne, J., Van Echten-Deckert, G., Sandhoff, K., & Futerman, A. H. (2004). Phospholipid synthesis is decreased in neuronal tissue in a mouse model of Sandhoff disease. *J Neurochem*, *90*(1), 80-88. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02457.x

- Choi, J. Y., Wu, W. I., & Voelker, D. R. (2005). Phosphatidylserine decarboxylases as genetic and biochemical tools for studying phospholipid traffic. *Anal Biochem*, *347*(2), 165–175. doi:10.1016/j.ab.2005.03.017
- Deng, H., Dodson, M. W., Huang, H., & Guo, M. (2008). The Parkinson's disease genes *pink1* and *parkin* promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(38), 14503–14508. doi:10.1073/pnas.0803998105
- Doherty, J., Logan, M. A., Tasdemir, O. E., & Freeman, M. R. (2009). Ensheathing glia function as phagocytes in the adult *Drosophila* brain. *J Neurosci*, *29*(15), 4768–4781. doi:10.1523/jneurosci.5951-08.2009
- Eckert, A., Keil, U., Marques, C. A., Bonert, A., Frey, C., Schüssel, K., & Müller, W. E. (2003). Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, *66*(8), 1627–1634. doi:[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00534-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00534-3)
- Elliott, M. R., & Ravichandran, K. S. (2010). Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *The Journal of Cell Biology*, *189*(7), 1059–1070. doi:10.1083/jcb.201004096
- Eskelinen, E. L., Reggiori, F., Baba, M., Kovacs, A. L., & Seglen, P. O. (2011). Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy*, *7*(9), 935–956. doi:10.4161/auto.7.9.15760
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L., & Henson, P. M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*, *5*(7), 551–562. doi:10.1038/sj.cdd.4400404
- Fan, W., Lam, S. M., Xin, J., Yang, X., Liu, Z., Liu, Y., . . . Huang, X. (2017).

- Drosophila TRF2 and TAF9 regulate lipid droplet size and phospholipid fatty acid composition. *PLoS Genet*, *13*(3), e1006664. doi:10.1371/journal.pgen.1006664
- Farooqui, A. A., Rapoport, S. I., & Horrocks, L. A. (1997). Membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease: deficiency of ethanolamine plasmalogens. *Neurochem Res*, *22*(4), 523–527.
- Fergestad, T., Bostwick, B., & Ganetzky, B. (2006). Metabolic Disruption in Drosophila Bang-Sensitive Seizure Mutants. *Genetics*, *173*(3), 1357–1364. doi:10.1534/genetics.106.057463
- Fergestad, T., Olson, L., Patel, K. P., Miller, R., Palladino, M. J., & Ganetzky, B. (2008). Neuropathology in Drosophila Mutants With Increased Seizure Susceptibility. *Genetics*, *178*(2), 947–956. doi:10.1534/genetics.107.082115
- Greene, J. C., Whitworth, A. J., Kuo, I., Andrews, L. A., Feany, M. B., & Pallanck, L. J. (2003). Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(7), 4078–4083. doi:10.1073/pnas.0737556100
- Griswold, A. J., Chang, K. T., Runko, A. P., Knight, M. A., & Min, K.-T. (2008). Sir2 mediates apoptosis through JNK-dependent pathways in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(25), 8673. doi:10.1073/pnas.0803837105
- Heiss, W. D., Kessler, J., Mielke, R., Szelies, B., & Herholz, K. (1994). Long-term effects of phosphatidylserine, pyritinol, and cognitive training in Alzheimer's disease. A neuropsychological, EEG, and PET investigation. *Dementia*, *5*(2), 88–98.
- Irvine, G. B., El-Agnaf, O. M., Shankar, G. M., & Walsh, D. M. (2008). Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's

- and Parkinson's diseases. *Mol Med*, 14(7-8), 451-464.
doi:10.2119/2007-00100.Irvine
- Kim, H. Y., Huang, B. X., & Spector, A. A. (2014). Phosphatidylserine in the brain: metabolism and function. *Prog Lipid Res*, 56, 1-18.
doi:10.1016/j.plipres.2014.06.002
- Kretschmar, D., Hasan, G., Sharma, S., Heisenberg, M., & Benzer, S. (1997). The swiss cheese mutant causes glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila*. *J Neurosci*, 17(19), 7425-7432.
- Kroemer, G., & Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 1004.
doi:10.1038/nrm2529
- Kupcho, K., Shultz, J., Hurst, R., Hartnett, J., Zhou, W., Machleidt, T., . . . Niles, A. (2019). A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis. *Apoptosis*, 24(1), 184-197.
doi:10.1007/s10495-018-1502-7
- Le Bourg, E., & Lints, F. A. (1992). Hypergravity and Aging in *Drosophila melanogaster*. 4. Climbing Activity. *Gerontology*, 38(1-2), 59-64.
doi:10.1159/000213307
- Li, Z., Zhang, J., & Sun, H. (2015). Increased plasma levels of phospholipid in Parkinson's disease with mild cognitive impairment. *J Clin Neurosci*, 22(8), 1268-1271. doi:10.1016/j.jocn.2015.02.013
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787-795.
doi:10.1038/nature05292
- Liu, S. H., Chang, C. D., Chen, P. H., Su, J. R., Chen, C. C., & Chaung, H. C. (2012). Docosahexaenoic acid and phosphatidylserine supplementations improve antioxidant activities and cognitive functions of the developing brain on pentylenetetrazol-induced

seizure model. *Brain Res*, 1451, 19–26.
doi:10.1016/j.brainres.2012.02.060

MacDonald, J. M., Beach, M. G., Porpiglia, E., Sheehan, A. E., Watts, R. J., & Freeman, M. R. (2006). The Drosophila cell corpse engulfment receptor Draper mediates glial clearance of severed axons. *Neuron*, 50(6), 869–881. doi:10.1016/j.neuron.2006.04.028

Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & Development*, 21(22), 2861–2873. doi:10.1101/gad.1599207

Muhlig-Versen, M., da Cruz, A. B., Tschape, J. A., Moser, M., Buttner, R., Athenstaedt, K., . . . Kretzschmar, D. (2005). Loss of Swiss cheese/neuropathy target esterase activity causes disruption of phosphatidylcholine homeostasis and neuronal and glial death in adult Drosophila. *J Neurosci*, 25(11), 2865–2873. doi:10.1523/jneurosci.5097-04.2005

Muñoz, L. E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A. A., & Herrmann, M. (2010). The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nature Reviews Rheumatology*, 6, 280. doi:10.1038/nrrheum.2010.46

<https://www.nature.com/articles/nrrheum.2010.46#supplementary-information>

Naftelberg, S., Abramovitch, Z., Gluska, S., Yannai, S., Joshi, Y., Donyo, M., . . . Ast, G. (2016). Phosphatidylserine Ameliorates Neurodegenerative Symptoms and Enhances Axonal Transport in a Mouse Model of Familial Dysautonomia. *PLoS Genet*, 12(12), e1006486. doi:10.1371/journal.pgen.1006486

O'Brien, J. S., & Sampson, E. L. (1965). Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res*, 6(4), 537–544.

- Owusu-Ansah, E., Yavari, A., & Banerjee, U. (2008). A protocol for *in vivo* detection of reactive oxygen species. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.23>
- Palladino, M. J., Hadley, T. J., & Ganetzky, B. (2002). Temperature-sensitive paralytic mutants are enriched for those causing neurodegeneration in *Drosophila*. *Genetics*, *161*(3), 1197–1208.
- Pavlidis, P., Ramaswami, M., & Tanouye, M. A. (1994). The *Drosophila* easily shocked gene: a mutation in a phospholipid synthetic pathway causes seizure, neuronal failure, and paralysis. *Cell*, *79*(1), 23–33.
- Pettegrew, J. W., Panchalingam, K., Hamilton, R. L., & McClure, R. J. (2001). Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, *26*(7), 771–782.
- Poon, I. K. H., Lucas, C. D., Rossi, A. G., & Ravichandran, K. S. (2014). Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews Immunology*, *14*, 166. doi:10.1038/nri3607
- Rana, A., Oliveira, M. P., Khamoui, A. V., Aparicio, R., Rera, M., Rossiter, H. B., & Walker, D. W. (2017). Promoting Drp1-mediated mitochondrial fission in midlife prolongs healthy lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Nature Communications*, *8*(1), 448. doi:10.1038/s41467-017-00525-4
- Ravichandran, K. S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *The Journal of Experimental Medicine*, *207*(9), 1807. Retrieved from <http://jem.rupress.org/content/207/9/1807.abstract>
- Remy, P., Doder, M., Lees, A., Turjanski, N., & Brooks, D. (2005). Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain*, *128*(Pt 6), 1314–1322. doi:10.1093/brain/awh445

- Sarkissian, T., Timmons, A., Arya, R., Abdelwahid, E., & White, K. (2014). Detecting apoptosis in *Drosophila* tissues and cells. *Methods (San Diego, Calif.)*, *68*(1), 89–96. doi:10.1016/j.ymeth.2014.02.033
- Sastry, P. S. (1985). Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res*, *24*(2), 69–176.
- Schenkel, L. C., & Bakovic, M. (2014). Formation and regulation of mitochondrial membranes. *2014*, 709828. doi:10.1155/2014/709828
- Seidel, C., Schnekenburger, M., Dicato, M., & Diederich, M. (2015). Histone deacetylase 6 in health and disease. *Epigenomics*, *7*(1), 103–118. doi:10.2217/epi.14.69
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol*, *11*, 613–619. doi:10.1016/j.redox.2016.12.035
- Smith, R., & Taylor, J. P. (2011). Dissection and imaging of active zones in the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Vis Exp*(50), e2676. doi:10.3791/2676
- Sohn, M., Ivanova, P., Brown, H. A., Toth, D. J., Varnai, P., Kim, Y. J., & Balla, T. (2016). Lenz–Majewski mutations in *PTDSS1* affect phosphatidylinositol 4-phosphate metabolism at ER–PM and ER–Golgi junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(16), 4314–4319. doi:10.1073/pnas.1525719113
- 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. *Nat Genet*, *46*(1), 70–76. doi:10.1038/ng.2829
- Starkov, A. A. (2008). The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci*, *1147*, 37–52.

doi:10.1196/annals.1427.015

- Stone, S. J., & Vance, J. E. (2000). Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. *J Biol Chem*, *275*(44), 34534-34540. doi:10.1074/jbc.M002865200
- Su, B., Wang, X., Zheng, L., Perry, G., Smith, M. A., & Zhu, X. (2010). Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1802*(1), 135-142. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.09.013>
- Szymanski, J., Janikiewicz, J., Michalska, B., Patalas-Krawczyk, P., Perrone, M., Ziolkowski, W., . . . Wieckowski, M. R. (2017). Interaction of Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane in Calcium Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure. *Int J Mol Sci*, *18*(7). doi:10.3390/ijms18071576
- Tamura, Y., Onguka, O., Itoh, K., Endo, T., Iijima, M., Claypool, S. M., & Sesaki, H. (2012). Phosphatidylethanolamine biosynthesis in mitochondria: phosphatidylserine (PS) trafficking is independent of a PS decarboxylase and intermembrane space proteins UPS1P and UPS2P. *J Biol Chem*, *287*(52), 43961-43971. doi:10.1074/jbc.M112.390997
- Thome, M. P., Filippi-Chiela, E. C., Villodre, E. S., Migliavaca, C. B., Onzi, G. R., Felipe, K. B., & Lenz, G. (2016). Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *129*(24), 4622-4632.
- Tracey, T. J., Steyn, F. J., Wolvetang, E. J., & Ngo, S. T. (2018). Neuronal Lipid Metabolism: Multiple Pathways Driving Functional Outcomes in Health and Disease. *Front Mol Neurosci*, *11*, 10. doi:10.3389/fnmol.2018.00010
- Valadas, J. S., Esposito, G., Vandekerckhove, D., Miskiewicz, K., Deaulmerie,

- L., Raitano, S., . . . Verstreken, P. (2018). ER Lipid Defects in Neuropeptidergic Neurons Impair Sleep Patterns in Parkinson's Disease. *Neuron*, *98*(6), 1155-1169. doi:10.1016/j.neuron.2018.05.022
- Vance, J. E. (2014). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta*, *1841*(4), 595-609. doi:10.1016/j.bbali.2013.11.014
- Vance, J. E., & Steenbergen, R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res*, *44*(4), 207-234. doi:10.1016/j.plipres.2005.05.001
- Vance, J. E., & Tasseva, G. (2013). Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, *1831*(3), 543-554. doi:10.1016/j.bbali.2012.08.016
- Wang, S., Zhang, S., Liou, L. C., Ren, Q., Zhang, Z., Caldwell, G. A., . . . Witt, S. N. (2014). Phosphatidylethanolamine deficiency disrupts alpha-synuclein homeostasis in yeast and worm models of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(38), E3976-3985. doi:10.1073/pnas.1411694111
- Wells, K., Farooqui, A. A., Liss, L., & Horrocks, L. A. (1995). Neural membrane phospholipids in Alzheimer disease. *Neurochem Res*, *20*(11), 1329-1333.
- Wittmann, C. W., Wszolek, M. F., Shulman, J. M., Salvaterra, P. M., Lewis, J., Hutton, M., & Feany, M. B. (2001). Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science*, *293*(5530), 711-714. doi:10.1126/science.1062382
- 권아영. (2017). 초파리 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 *Ptdss1* 유전자

돌연변이 제작 (석사학위논문, 서울대학교).

서혜원. (2017). 산화 스트레스 조건에서 초파리 *Phosphatidylserine synthase1* 유전자 돌연변이가 신경 퇴화에 미치는 영향 (석사학위논문, 서울대학교).

박예진. (2018). 초파리의 *dPtdss1* 유전자 돌연변이에 의한 교세포 기능 이상 연구 (석사학위논문, 서울대학교).

조민규. (2014). 초파리 *CG4825* 돌연변이가 수명과 신경 퇴화에 미치는 영향 (석사학위논문, 서울대학교).

Abstract

Mutation of *Drosophila Gongpo* Gene Causes Mitochondrial defect and Cell death

Sungkyung Kim
Science Education, Biology
The Graduate School
Seoul National University

Phosphatidylserine (PS) is one of the integral phospholipid components in the eukaryotic cell membranes and organelles. In addition to the structural importance, it is also shown to play active roles in cellular signaling and apoptotic cell clearance. In this study, we characterized mutant phenotypes of a *Drosophila* gene *Gongpo* that encodes a PS synthase. Adult flies *trans*-heterozygous for *Gongpo* mutations showed general neurodegenerative phenotypes such as bang-sensitivity, locomotion defects, reduced life span, and excessive formation of vacuoles in the brain. *Gongpo* mutants showed defective mitochondria in nervous system in conjunction with elevated production of reactive oxygen species (ROS), increased autophagy and apoptotic cell death in the adult brain. Moreover, secondary necrosis was occurred in *Gongpo* mutants and it seems to cause cell death even to the surrounding cells. All together leading to excessive neurodegeneration. This study proposes a new mechanism of neurodegenerative diseases triggered by defective PS metabolism in nervous system.

Keywords : Phospholipid, Gongpo, Neurodegenerative disease,
Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylserine synthase (PSS)

Student Number : 2017-29791

