

---

석사학위논문

노랑초파리 발생과정에서  
기능적 Ecdysone Receptor의 발현

제주대학교 대학원

생물학과



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

박 지 권

1997년 12월

---


노랑초파리 발생과정에서  
기능적 Ecdysone Receptor의 발현

지도교수 김 세 재

박 지 권

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

1997년 12월

 제주대학교 중앙도서관  
박지권의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 \_\_\_\_\_

위 원 \_\_\_\_\_

위 원 \_\_\_\_\_

제주대학교 대학원

1997년 12월

---

Expression of Functional Ecdysone Receptor  
during Development of *Drosophila melanogaster*

**Ji-Gweon Park**

(Supervised by professor **Se-Jae Kim**)

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER  
OF SCIENCE**



DEPARTMENT OF BIOLOGY

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1997. 12

## ABSTRACT

In *Drosophila*, the steroid hormone ecdysone triggers the key regulatory cascades controlling the coordinated change in the developmental pathway of molting and metamorphosis. Ecdysone action is mediated by heterodimer consisting of the ecdysone receptor (EcR) and *ultraspiracle* proteins (Usp). The heterodimers of these proteins bind to ecdysone response element and modulate gene transcription.

In this study, the transcripts of functional ecdysone receptors at the various developmental stages and individual tissues were analyzed by using conventional and competitive RT-PCR. The transcripts of *usp* and *EcR* isoforms were detected throughout all the developmental stages. The *usp* transcripts were detected with nearly equal amount at all developmental stages. *EcR* isoforms were also expressed simultaneously with *usp* at all developmental stages. The expression of *EcR-A* was maintained in a high level during the embryogenesis, decreased during the larval stages, and increased again after the prepupal stage. *EcR-B1* was expressed with higher level during larval stages comparing to *EcR-A*. These results suggest that the functional ecdysone receptors are ubiquitous throughout *Drosophila* life cycle, but their expression level is regulated according to the specific developmental stage.

Also, the expression patterns of each *EcR* isoforms in the late 3rd instar larval tissues showed that *EcR-A* was specific in the imaginal tissues and *EcR-B* was specific in the larval tissues. These results suggest that differential combination between ecdysone isoforms and Usp control the developmental pathway in different tissues. The transcripts of the functional ecdysone receptors were quantified by competitive RT-PCR. The ratios of *usp* and *EcR* transcripts were different each other at the various stages. This results suggests that other receptors, which are interacted with *usp* or *EcR*, modulate the tissue-specific ecdysone response.

Key word: *Drosophila*, ecdysone receptor, *ultraspiracle*, RT-PCR

## LISTS OF TABLES

	page
Table 1. Primer sets used conventional and competitive RT-PCR assay. -----	7
Table 2. Dilutions of serial $\phi$ X174/ <i>Hae</i> III-digested DNA and PCR MIMIC DNA. -----	12
Table 3. Comparison of the expression pattern of <i>usp</i> and <i>EcR</i> isoforms transcripts in 3rd instar larval and adult tissues. -----	17



## LISTS OF FIGURES

	page
Figure 1. Gene structure and RT-PCR strategy. -----	8
Figure 2. Outline for constructing a PCR MIMIC and competitive PCR. -----	9
Figure 3. Agarose gel electrophoretic patteern of PCR product used competitor DNA construction. -----	10
Figure 4. Agarose gel eletrophoresis used for quantification of competitor DNA -----	11
Figure 5. Developmental profiles of each transcripts of functional ecdysone receptor using conventional RT-PCR assay. -----	15
Figure 6. Analysis of functional ecdysone receptor transcripts in different tissues. -----	16
Figure 7. Agarose gel profile of competitive RT-PCR for <i>usp</i> transcripts quantification. -----	19
Figure 8. Agarose gel profile of competitive RT-PCR for <i>EcR</i> transcripts quantification. -----	21
Figure 9. Quantification of the functional ecdysone receptor in embryo stage, and late 3rd instar larval and adult tissues. -----	22

## 목 차

ABSTRACT	i
LISTS OF TABLES	ii
LISTS OF FIGURES	iii
목 차	iv
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 초파리 사육과 조직분리	
2. RNA 분리	
3. Primer 고안	
4. PCR MIMIC DNA 준비	
5. RT-PCR	
III. 결과	13
1. 발생 시기별 기능적인 <i>ecdysone receptor</i> 의 발현 양상	
2. 각 조직에서 기능적인 <i>ecdysone receptor</i> 의 발현 양상	
3. Competitive RT-PCR에 의한 <i>usp</i> 와 <i>Ecr</i> 전사체의 정량	
IV. 고찰	23
V. 참고문헌	26
VI. 적요	29

## I. 서론

지질성 호르몬인 steroids, retinoids, thyroid 호르몬은 핵호르몬 수용체 대가족 (nuclear hormone receptor superfamily)에 속하는 수용체에 결합함으로써 동물의 발생, 세포 분화, 기관 생리 등을 조절한다 (Mangelsdorf *et al.*, 1995). 핵호르몬 수용체들은 보존이 잘 된 DNA-binding domain과 ligand의 결합과 dimerization의 기능을 갖는 보존이 덜 된 carboxyl 말단이 있다 (Evans, 1988). DNA-binding domain은 다른 종류의 DNA-binding 단백질들과 구별되는 두 개의 zinc finger motif로 구성되어 있고, ligand-binding domain은 ligand가 결합하면 receptor을 전사활성화상태로 전이시키는 분자적인 switch로서의 역할을 한다고 생각되고 있다 (Berg, 1989; Klug and Schwade, 1995). 핵호르몬 수용체들은 hormone response element (HRE)라고 불리는 특별한 DNA 서열에 결합함으로써, ligand-dependent한 방식으로 표적유전자의 발현을 활성화하거나 억제함으로써 생리적인 기능을 수행한다 (Beato, 1992).

노랑초파리에서 20-hydroxyecdysone (20-HIE)은 탈피와 변태과정에서 유충과 성체 원기 조직의 발생경로를 조정하는 시발자이다 (Ashburner *et al.*, 1974; Ashburner and Richards., 1976; Riddiford *et al.*, 1985). 초파리에서 ecdysone의 작용은 nuclear hormone receptor의 일원인 ecdysone receptor (*EcR*)에 의해 매개된다 (Koelle *et al.*, 1991). *EcR* 유전자는 3종류의 isoform인 *EcR-A*, *EcR-B1*, *EcR-B2*를 암호화하며, 이들은 공통된 DNA-binding domain과 hormone-binding domain을 가지며 서로 다른 N-terminal region에 의해 구별된다. (Segraves, 1988; Koelle *et al.*, 1991). *EcR-A*와 *EcR-B1*은 서로 다른 promotor에 의해 전사되며, *EcR-B1*과 *EcR-B2*는 alternative splicing에 의해 생성된다 (Talbot *et al.*, 1993).

*ultraspiracle* 유전자 산물 (Usp)은 초파리에서 보고된 orphan receptor 중의 하나로 포유동물의 retinoid X receptor (RXR)와 DNA-binding domain의 86%, ligand-binding domain의 46% 정도의 아미노산 상동성을 갖는다 (Oro *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1993). RXR의 homolog인 Usp는 RXR이 결합하는 retinoic acid receptor (RAR), vitamin D<sub>3</sub> receptor (VDR), thyroid hormone receptor (TR), peroxisome proliferator-activator receptor (PPAR)와도 heterodimer을 형성한다 (Yao *et al.*, 1992). *usp*는 유전적으로 1령 유충 말단 부위의 organization을 저해하는 3종류의 치사돌연변이를 이용하여 X 염색체상의 2C부위에 위치한다고 알려져 있다. 이형 접합자인 암컷(*usp/+*)에서 생긴 숫컷 2령 유충 (*usp/Y*)은 기문 (spiracle)이 하나 더



있는 반면에, germline clone (*usp/usp*)를 가진 암컷에서 생긴 embryo (*usp/Y*)는 9번째 혹은 8번째 뒤쪽의 abdominal segment에 ventral defect를 보인다 (Perrimon *et al.*, 1985 ; Oro *et al.*, 1992). *usp* germline mutant clone들을 사용한 연구에 의하면 embryogenesis를 완성하기 위해서는 maternal *usp* 기능이 요구된다고 하였다 (Perrimon *et al.*, 1985 ; Oro *et al.*, 1992). 또한 *usp*는 s15 chorion 유전자 발현을 조절하며 (Shea *et al.*, 1990 ; Khoury Christinosan *et al.*, 1992), retinal morphogenesis와 female reproduction에도 기능을 한다 (Oro *et al.*, 1992).

EcR은 Usp와 heterodimer를 형성해야만 ecdysone과 결합해서 ecdysone response element (EcRE)와 상호작용할 수 있다 (Oro *et al.*, 1990; Yao *et al.*, 1992; Yao *et al.*, 1993). 3종류의 EcR isoform 모두가 Usp와 이합체를 형성하여 EcREs에 결합할 수 있다 (Koelle, 1992; Yao *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1993). Ecdysone titer는 발생 과정에서 다양하고 복잡한 변화를 보여준다 (Riddiford, 1993). 따라서, Usp와 EcR isoform들의 발생에 따른 다양한 발현 조절은 ecdysone의 표적조직에 독특한 기능을 나타낼 것으로 예견된다 (Koelle *et al.*, 1991; Robinow *et al.*, 1992; Talbot *et al.*, 1993).

초과리 발생과정에서 다양한 기능을 나타내는 ecdysone의 작용 기작을 이해하기 위해서는 ecdysone의 작용을 매개하는 기능적 ecdysone receptor 복합체의 유전자 발현에 대한 정밀한 분석이 필요하다. 본 연구는 적은 양의 RNA 분석도 가능한 RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)과 경쟁적 RT-PCR (competitive RT-PCR) 방법을 사용하여 초과리 발생단계와 다양한 조직에서 *usp*와 *EcR*의 발현양상을 분석하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 초파리 사육과 조직 분리

본 실험에 사용된 노랑초파리는 Canton-S 계통이며, 표준배지 (1L당 cornmeal 64 g, wheat meal 10 g, sucrose 25 g, dry yeast 18 g, agar 15 g, propionic acid 2.5 ml)가 들어 있는 사육병에서 25℃, 70%의 습도, 그리고 광조건은 12시간-light, 12시간-dark 조건에서 사육하였다.

각 발생시기별 시료는 Ashburner와 Tompson (1978)의 방법에 따라 수집하였고, 유충의 각 조직들은 후기 3령유충을 Ringer's 용액하에서 해부하여 수집하였다. 수집된 모든 재료는 액체질소에서 즉시 동결한 후, RNA분리전까지 -70℃에 보관하였다.

### 2. RNA 분리

각 발생 시기별 동물의 total RNA는 RNAgents Total RNA Isolation System (Promega)을 사용하여 분리하였고, 유충과 성체 조직의 total RNA는 Micro-Scale Total RNA Separator Kit (Clontech)을 사용하거나 Huet *et al.* (1993)의 방법에 따라 분리하였다. Microtube에 denaturing solution (4.0 M Guaninium thiocyanate, 25 mM sodium citrate (pH 7.0), 0.5% sodium N-lauroylsarcosine, 0.1 M 2-mercaptoethanol) 1.2 ml을 넣은 후 여기에 각 재료를 0.1 g씩 넣고 액체질소에 여러 번 동결과 해동 과정을 반복하여 세포를 파괴하였다. RNA 추출을 위해 이 혼합액을 균질화한 후, 2 M sodium acetate (pH 4.0) 200  $\mu$ l를 넣고 잘 혼합하고, phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)를 동량으로 넣어 혼합한 후 15분동안 얼음에 방치하였다. 10,000 $\times$  g, 4℃조건에서 원심분리하여 상정액을 조심스럽게 새로운 microtube에 옮기고, 동량의 Isopropanol을 넣고 -20℃에서 12시간 동안 RNA를 침전시켰다. 10,000 $\times$  g, 4℃에서 15분간 원심분리하여 침전된 RNA를 얻은 후 여기에 500  $\mu$ l의 denaturing solution을 넣어 재현탁하고, 동량의 Isopropanol을 넣어 앞의 과정을 반복하였다. 다시 원심분리하여 RNA pellet을 얻은 후, ice-cold 75% ethanol로 세척하였다. RNA pellet은 실온에서 15분간 건조시킨 후 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 처리된 증류수에 녹여 -70℃에 보관하였다. RNA 정량은 260nm의 흡광도를 측정하여 계산하였고, A260/A280nm의 비율이 1.7-2.0 범위내의 값을 갖는 RNA를 cDNA 합성에

사용하였다.

### 3. Primer 고안

RT-PCR에 사용된 primer sets은 이미 보고된 유전자의 sequence를 참고하여 <G+C> 함량이 50%이상 구성되게 고안하였다. 고안된 primers는 DNA International Inc. (USA)에 의뢰하여 합성하였다. *EcR*의 primer는 *EcR* isoform에 특이적인 sequence와 common region에 해당하는 sequence로 구분하여 고안하였고, competitive RT-PCR을 위해서 *usp*와 *EcR*의 composite primer를 합성하여 target (*usp*, *EcR*) 특이적인 서열과 MIMIC DNA가 결합된 형태로 PCR MIMIC DNA를 합성하기 위해 사용하였다. 사용된 primer의 sequence는 Table 1에 나타내었고, 유전자 상의 primer위치와 PCR 산물의 크기는 Figure 1에 나타내었다.

### 4. PCR MIMIC DNA 준비

PCR MIMIC DNA는 PCR MIMIC Construction Kit (Clontech)을 이용하여 준비하였고 그 전과정은 Figure 2에 나타내었다. 우선 *v-erbB*의 *Bam*HI/*Eco*R I 단편 (574bp)을 *usp*와 *EcR*의 composite primers를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 5  $\mu$ l 10 $\times$  PCR reaction buffer, 4  $\mu$ l 10 $\times$  dNTP mix (각 10 mM), 4  $\mu$ l *v-erbB* fragment (2 ng), 1  $\mu$ l upstream composite primer (각 20  $\mu$ M), 0.4  $\mu$ l *Taq* DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l)를 최종 부피가 50  $\mu$ l가 되도록 3차 증류수를 첨가하여 수행하였다. PCR은 denature 과정을 94 $^{\circ}$ C에서 45초간, anneal 과정을 50 $^{\circ}$ C에서 45초간, extend 과정을 72 $^{\circ}$ C에서 45초간 하여 총 20 cycle을 수행하였다. 1차 PCR 반응산물 중 5  $\mu$ l를 1.6% agarose gel 전기영동하여 458bp 크기의 PCR 산물 (Figure 3A)를 확인하였다. 1차 PCR 산물을 주형으로 하여 *usp*와 *EcR* 특이적인 primer를 가지고 두 번째 증폭 반응을 실시하였다. 첫 번째 PCR 산물 2  $\mu$ l을 증류수 200  $\mu$ l로 희석한 후, 희석된 PCR산물 2  $\mu$ l을 두 번째 증폭 반응의 template로 사용하였다. 두 번째 증폭 반응은 10  $\mu$ l 10 $\times$  PCR reaction buffer, 8  $\mu$ l 10 $\times$  dNTP mix, 2  $\mu$ l primary PCR reaction dilution, 2  $\mu$ l gene specific (*usp*, *EcR*) primer (각 20  $\mu$ M), 0.6  $\mu$ l *Taq* DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l)를 3차 증류수로 최종 부피를 100  $\mu$ l로 맞추어 1차 PCR 반응조건과 동일하게 25 cycle 실시하였다. PCR 산물은 1.6% agarose gel에서 전기영동하여 458bp의 competitor DNA를 확인하였다 (Figure 3B). 2차 PCR 산물로 얻어진 MIMIC DNA는 CHROMA SPIN+TE-100 column (Clontech)을 사용하여 순수 정제하였다.

PCR MIMIC DNA 정량은 이미 알고 있는 marker DNA의 양과 PCR MIMIC

DNA를 전기영동한 후 band의 강도를 비교하여 정량하였다 (Figure 4). DNA size marker ( $\phi$ X174 DNA fragment)와 PCR MIMIC DNA를 table 2와 같이 희석하여 1.6% agarose gel에서 전기영동하여 band 강도를 비교하여 다음 식에 의해 정량하였다.

$$\# \text{ ng}/\mu\text{l} = \frac{(\text{size of } \phi\text{X174 DNA fragment})(\text{amount of } \phi\text{X174 DNA})}{(\text{sum of all } \phi\text{X174 DNA fragment})(\text{vol. of MIMIC loaded on gel})}$$

정량된 PCR MIMIC DNA는 MIMIC Dilution Solution (10 $\mu$ g/ml ultrapure glycogen)으로 100 attomole/ $\mu$ l 되게 희석하여 competitive RT-PCR 분석에 사용하였다.

## 5. RT-PCR

### 1) cDNA 합성

cDNA는 발생단계별 동물과 3령 유충조직에서 분리한 total RNA를 사용하여 Advantage RT-for-PCR Kit (Clontech)으로 합성하였다. 2  $\mu$ g의 RNA를 DEPC 처리된 물로 녹여 total volume을 12.5  $\mu$ l 되게 희석하여 1.0  $\mu$ l의 oligo(dT)primer (18mer)를 넣어 70 $^{\circ}$ C에서 2분간 annealing한 후 4.0  $\mu$ l의 5 $\times$  reaction buffer, 1.0  $\mu$ l의 dNTP mix (각 10 mM), 0.5  $\mu$ l의 RNase inhibitor, 1.0  $\mu$ l의 MMLV reverse transcriptase을 넣어, 42 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응하였다. 반응 후, 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하여 cDNA합성을 멈추고, 80  $\mu$ l의 DEPC 처리된 증류수로 최종 부피를 100  $\mu$ l 되게 희석하여 PCR 반응에 사용하였다.

### 2) Competitive RT-PCR

Competitive RT-PCR을 수행하기 위해서 희석된 MIMIC stock DNA를 10배씩 (ten-fold) 희석하여 (10 attomole/ $\mu$ l - 10 $^{-4}$  attomole/ $\mu$ l; M1-M6) 1차 PCR을 수행하여 *usp*와 *EcR*의 cDNA 주형과 같은 양의 PCR MIMIC dilution을 결정하였다. 1차 PCR 반응 결과를 참고하여 dilution stock을 다시 2배씩(two-fold) 연속된 희석 stock을 만들어 2차 PCR을 수행한 후 1.6% agarose gel 전기영동하여 *usp*와 *EcR* 전사체를 정량하였다. Competitive PCR 반응액은, 2  $\mu$ l cDNA, 2  $\mu$ l MIMIC DNA, 5  $\mu$ l 10 $\times$  PCR reaction buffer, 2.5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 4  $\mu$ l dNTP mix, 1  $\mu$ l primer (*EcR*, *usp*), 0.4  $\mu$ l *Taq* DNA polymerase을 혼합한 후 최종 부피가 50  $\mu$ l 되도록 증류수를 첨가하였다. PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 45초간 denature, 60 $^{\circ}$ C에서 45초간 anneal, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간

extend 조건으로 총 35 cycle을 수행하였다.

### 3) Conventional RT-PCR

Conventional RT-PCR은 5  $\mu$ l의 cDNA를 주형으로 하여, 5  $\mu$ l의 10 $\times$  PCR buffer, 2.5  $\mu$ l의 MgCl<sub>2</sub>, 4  $\mu$ l의 dNTP mix, 1  $\mu$ l의 primer (*EcR*, *usp*), 0.4  $\mu$ l의 *Taq* DNA polymerase를 최종 50  $\mu$ l 반응되게 증류수로 맞춘 후 수행하였다.



Table 1. Primer sets used for conventional and competitive RT-PCR assay

Gene	Primer sequence	Product size
Composite Primer (usp)	5'-TATTCACAGTCCAGCCGGACTACCGCAAGTGAAATCTCCTCCG-3'	458bp
	5'-GAAGAGAGGCAGATGATCCIGGCAICIGCAATGCAGITTIAG-3'	
Composite Primer (Ecr)	5'-CAGGATGGCTATGAGCAGCCATCTGGCAAGTGAAATCCTCCG-3'	458bp
	5'-CTCCAGATCCTCTGAGGAACITTTCTGTCAATGCAGTTGTAG-3'	
<i>usp</i> <sup>1)</sup>	5'-TATTCACAGTCCAGCCGGACTAC-3'	632bp
Ecr	5'-GAAGAGAGGCAGATGATCCCTGGCA-3'	663bp
common region	5'-CAGGATGGCTATGAGCAGCCATCT-3'	
	5'-CTCCAGATCCTCTGAGGAACIT-3'	
<i>usp</i> <sup>1)</sup>	5'-TTTGTCCAGCGTCCITTAGAGTCGGGACC-3'	707bp
	5'-AAGGGTCCGTTGTCGGC	
Ecr-A	5'-GTATCCGTTCAAGCTGCTCG-3'	633bp
	5'-ATGTTGACGACGAGTGGACAA-3'	
Ecr-B1	5'-GTATCCGTTCAAGCTGCTCG-3'	720bp
	5'-ATGAAGCGGGCTGGTCCAAC-3'	
Ecr-B2	5'-GTATCCGTTCAAGCTGCTCG-3'	336bp
	5'-GACATAAGACGCCCGTCTAG-3'	
rp49	5'-GTGTATCCGACCCAGTTACA-3'	460bp(519bp)
	5'-TCCTACCAGCTTCAAGATCAC-3'	

Notes: 1) *usp* primer used for competitive RT-PCR, 2) *usp* primer used for conventional RT-PCR.

Where DNA or pre-mRNA products are detected, their sizes given in bracket.

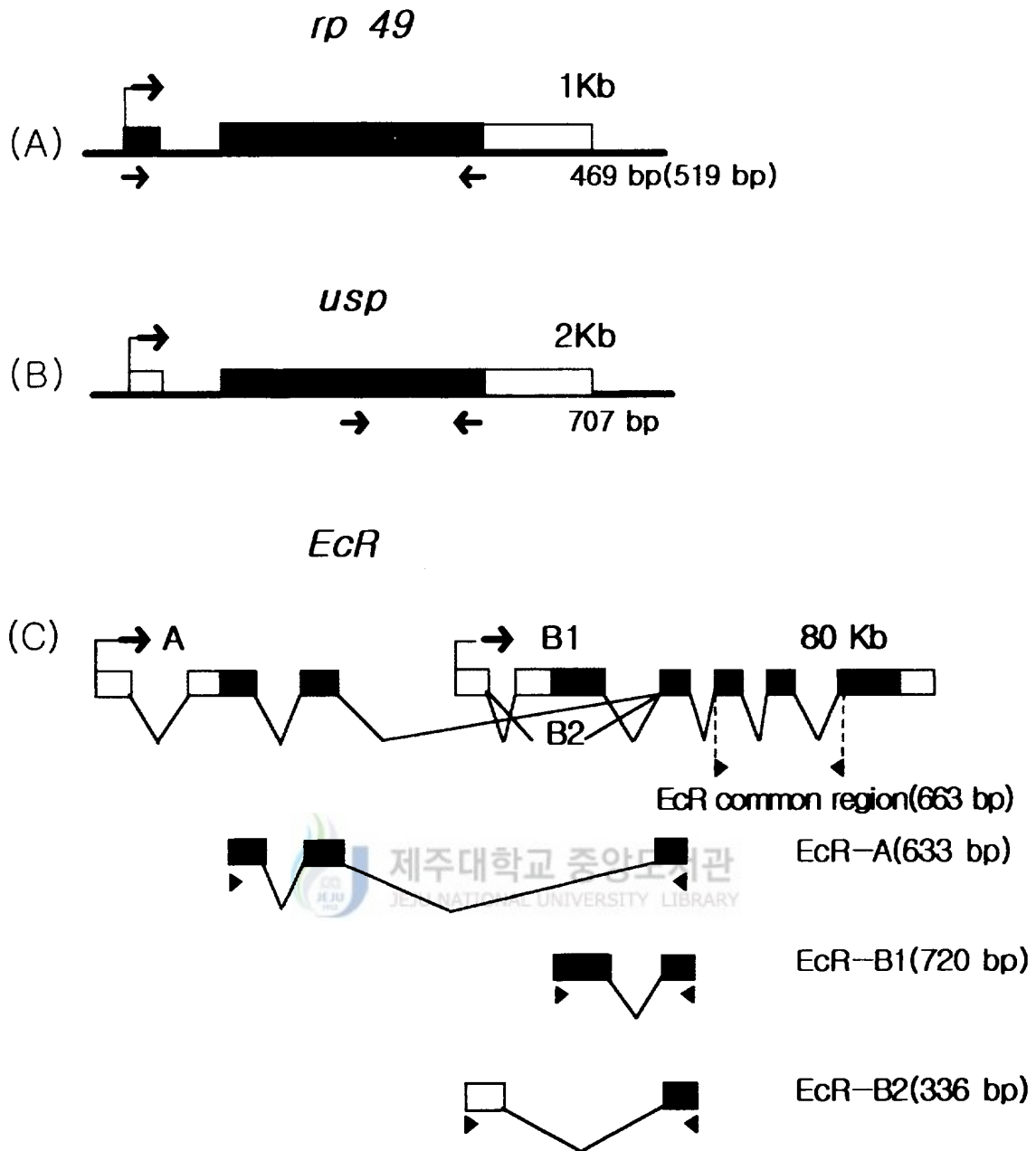


Figure 1. Gene structure and RT-PCR strategy. For each gene, transcribed regions are depicted as box segments positioned on the genomic DNA. Coding regions are shown as solid boxes, non-translated regions as open box segments. The positions of PCR primers are shown by arrow heads together with the size of the corresponding PCR products. (A) Ribosomal proteins *rp49* (O' Connel and Rosbash, 1984). (B) *usp* (*ultraspiracle*; Henrich *et al.*, 1990), (C) *EcR* (the ecdysone receptor gene; Koelle *et al.*, 1991).

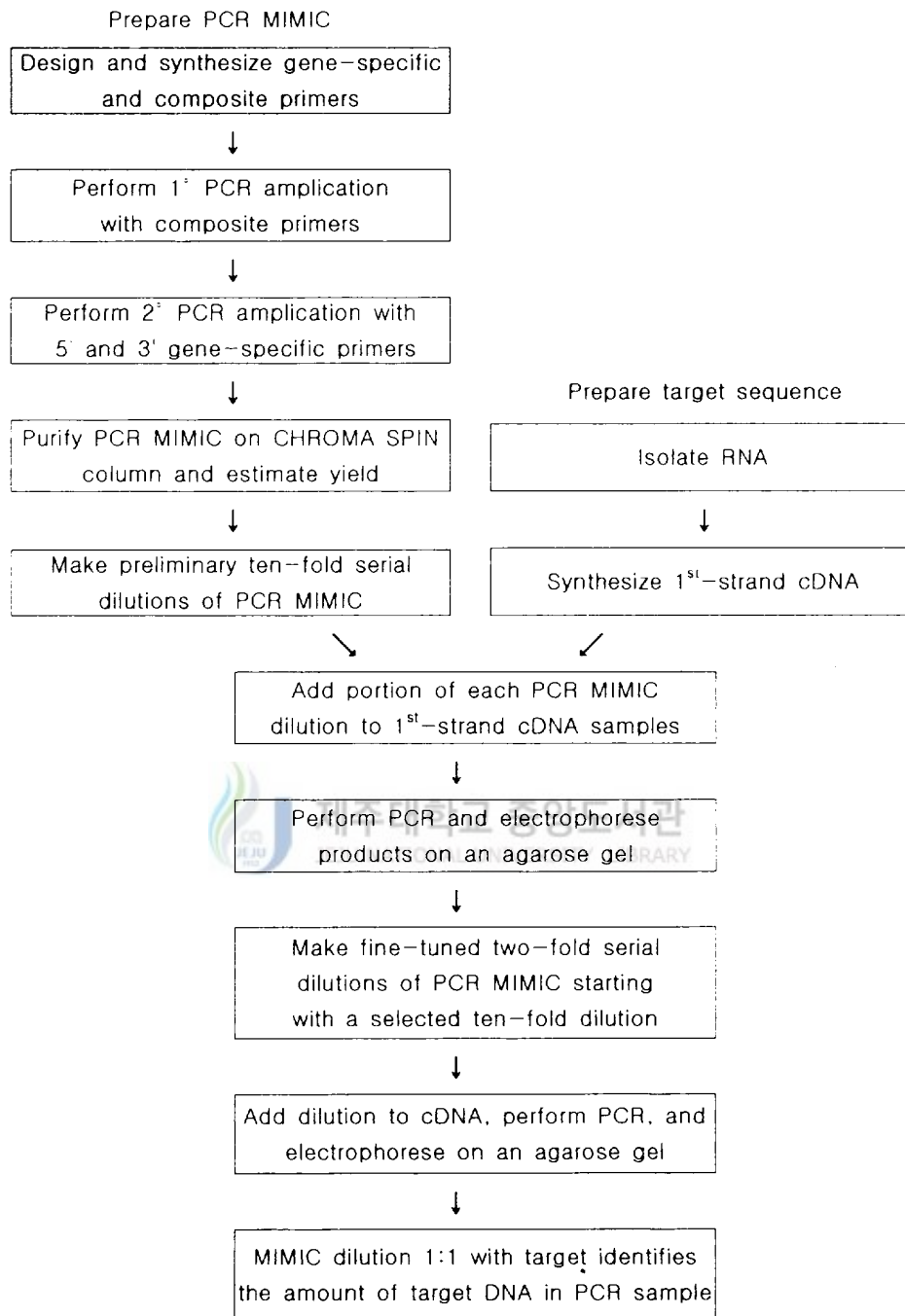


Figure2. Outline for constructing a PCR MIMIC and competitive PCR.



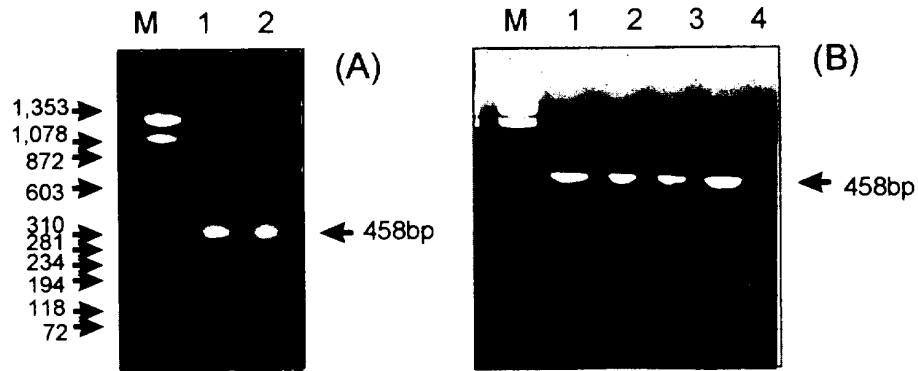


Figure 3. Agarose gel electrophoretic patterns of PCR product used for competitor DNA construction. (A) Primary PCR product with composite primer. DNA marker(M) was  $\phi$ X174/*Hae* III digested DNA. Lane 1 and 2 were PCR products of 458 bp size, amplified with composite primer of *usp* and *EcR*. (B) Secondary PCR product with gene-specific primer. Lane 1 and 2 were PCR products produced by using *usp* specific primer. Lane 3 and 4 were PCR products produced by using *EcR* specific primer.

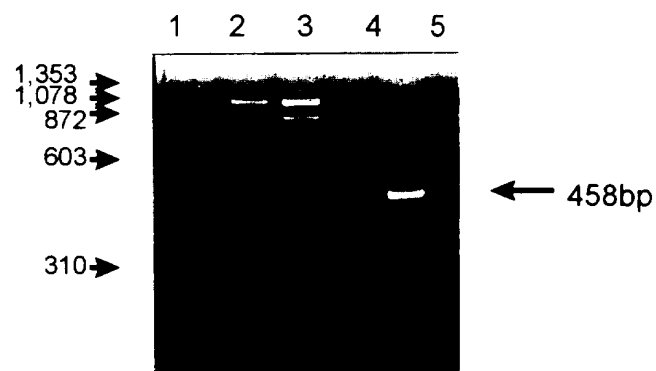


Figure 4. Agarose gel electrophoresis used for quantification of competitor DNA. Lane 1, 2, and 3 were various dilutions of  $\phi$ X174/*Hae* III digested DNA, with concentration of 100 ng, 200 ng, 400 ng. Lane 4 and 5 were dilution of competitor DNA of *usp* and EcR.

Table 2. Dilutions of serial  $\phi$  X174/*Hae*III-digested DNA and PCR MIMIC DNA

	DNA volume	H <sub>2</sub> O	10× PCR buffer	Dye
PCR MIMIC <sup>1)</sup>	5 $\mu$ l	6.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	2 $\mu$ l
$\phi$ X174 DNA(100ng)	1 $\mu$ l	10.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	2 $\mu$ l
$\phi$ X174 DNA(200ng)	2 $\mu$ l	9.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	2 $\mu$ l
$\phi$ X174 DNA(400ng)	4 $\mu$ l	7.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	2 $\mu$ l

Note : 1) used the construction of *usp* and *Eco*R competitor DNA

### III. 결 과

#### 1. 발생 시기별 기능적인 ecdysone receptor의 발현 양상

노랑초파리의 발생단계에 따른 기능적인 ecdysone receptor complex의 발현 양상을 알기 위해서, 모든 발생 시기별 시료로부터 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR을 수행하는데 있어서 *usp*를 제외한 각 전사체는 오염된 pre-mRNA와 DNA에 의해 생성되는 PCR 산물과 구별되도록 intron사이의 염기서열을 가지고 primer를 고안하였다 (Figure 1). Ribosomal protein 49 (*rp49*)는 모든 발생시기에서 동등하게 발현되기 때문에, RNA 분리와 RT-PCR분석에 대조구로 사용하였다.

*rp49*는 조사된 모든 발생시기에서 거의 같은 수준으로 발현하였으며, 크기가 다른 두 종류의 band가 검출되었는데, 519bp크기의 band는 genomic DNA가 증폭된 것이며, 460bp크기의 band는 cDNA가 증폭된 것이다 (Figure 5A). *usp* 전사체는 모든 발생 시기에서 검출되었고 (Figure 5B), EcR isoforms 역시 모든 발생 시기에서 *usp*와 유사하게 발현하였다 (Figure 5C, D). *EcR-A*는 embryogenesis동안 높은 수준으로 발현이 유지되고, 유충 시기에는 감소되다가 번데기 시기에 다시 증가하였다. 반면에 *EcR-B1*은 *EcR-A*의 발현 양상과 다르게 유충시기에서 더 높은 수준으로 발현되었다.



#### 2. 각 조직에서 기능적인 ecdysone receptor의 발현 양상

다양한 조직들에서 기능적 ecdysone receptor의 발현 양상을 분석하기 위해서 노랑초파리의 3령 유충말기의 각 조직과 성체 조직에서 분리한 RNA를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. *usp*는 분석된 모든 조직에서 비슷한 수준으로 발현하였다. 후기 3령 유충시기의 각 조직들의 EcR isoform의 발현은 각 조직마다 다른 양상의 발현을 나타내었다 (Figure 6, Table 3). 3령 유충조직에서 brain ventral ganglion, wing disc, 그리고 eye disc는 *EcR-A*가 높게 발현되는 반면(Figure 6A, B, C), salivary gland와 epidermis에서는 *EcR-B1*이 높게 발현되었다 (Figure 6D, E). 일반적으로, 성체 원기조직인 imaginal 조직들에서는 *EcR-A*가 *EcR-B1*보다 더 강하게 발현된 반면에, 유충 조직들에서는 *EcR-B1*이 *EcR-A*보다 높게 발현되었다. 그리고 *EcR-B2*는 brain ventral ganglion, wing disc, salivary gland, epidermis에서 발현되었다. 성체

조직에서의 EcR isoform의 발현양상을 보면, ovary는 *EcR-A*가 높은 수준으로 발현되었고 (Figure 6F), testis에서는 *EcR-A*와 *EcR-B1*이 거의 같은 수준의 발현양상을 나타낸 반면, *EcR-B2*는 검출되지 않았다 (Figure 6G).

### 3. Competitive RT-PCR에 의한 *usp*와 *EcR* 전사체의 정량

발생시기와 각 조직에서 기능적인 ecdysone receptor 복합체의 구성비율을 분석하기 위해서 *usp*와 common region의 *EcR* primer를 사용하여 competitive RT-PCR을 수행하였다 (Figure 9). *usp* 전사체는 embryo시기 (Figure 7A), 3령 유충 말기 조직의 wing disc, brain ventral ganglion, gut에서 높게 발현되었고 (Figure 7B, D), 성체에서는 ovary에서 높게 발현되었다 (Figure 7E). 그리고, *EcR* 전사체의 분석에서는 common region의 primer를 사용하였기 때문에 3종류 EcR isoform 모두가 검출되게 하였다. *EcR* 전사체의 발현은 초기의 embryo시기 (Figure 8A), 3령 유충 말기의 조직인 fat body, salivary gland에서 (Figure 8C, D), 성체에서는 ovary에서 높게 발현되었다 (Figure 8E). 특히, salivary gland와 gut에서의 *EcR*은 *usp* 보다 높게 발현되었다 (Figure 9).



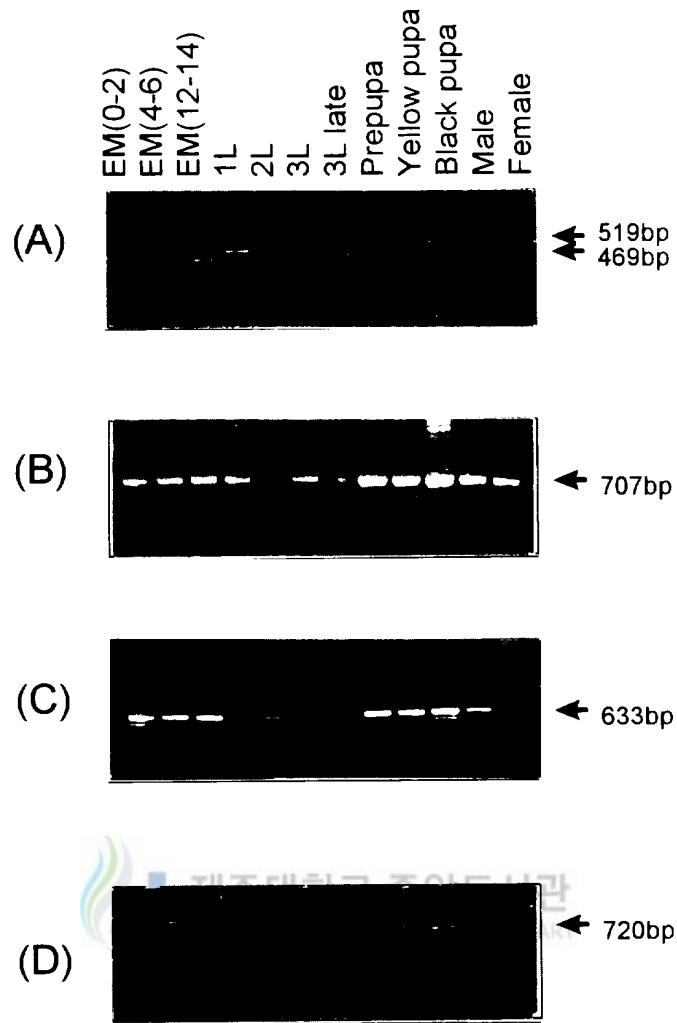


Figure 5. Developmental profiles of each transcripts of functional ecdysone receptor using conventional RT-PCR assay. Each column was derived from the RNA of all developmental stage animals analyzed for *rp49*(A), *usp*(B), *EcR-A*(C), *EcR-B1*(D). RT-PCR products(20  $\mu$ l of a 50  $\mu$ l reaction) were separated on 1.6% agarose gels and photographed after ethidium bromide staining. *rp49* transcripts are used as control for RNA extraction and RT-PCR.



Figure 6. Analysis of functional ecdysone receptor transcripts in various tissues. Each column was derived from the RNA of late 3rd instar larval and 5-day old adult tissues analyzed for *usp* and *EcR* isoforms. Each lane were transcripts of *usp*, *EcR-A*, *EcR-B1*, and *EcR-B2*, with the size of 707bp, 720bp, 633bp, and 336bp, respectively. *usp* transcripts were detected in all tissues. *EcR-A* were detected with high level in brain ventral ganglion(A), wing disc (B), eye disc (C), and ovary (F). *EcR-B1* were detected with high level in salivary gland (D), epidermis (E), and testis (G). E-A, *EcR-A* ; E-B1, *EcR-B1* ; E-B2, *EcR-B2*.

Table 3. Comparison of the expression pattern of *usp* and *EcR* isoform in 3rd instar larval and adult tissues

tissues	Ecr isoform				
	USP	Ecr-A	Ecr-B1	Ecr-B2	
Salivary gland	++	+	++	++	++
Brain	+++	+++	-	++	++
Wing disc	+	+++	+	+	+
Eye-antenna	+	++	+	+	+
Epimerdis	+++	-	+++	+	+
Ovary(adult)	++	+++	-	-	-
Testis(adult)	++	-	++	++	++

++++ : very strong intensity of band

+++ : strong intensity of band

++ : mild intensity of band

+

- : no detection



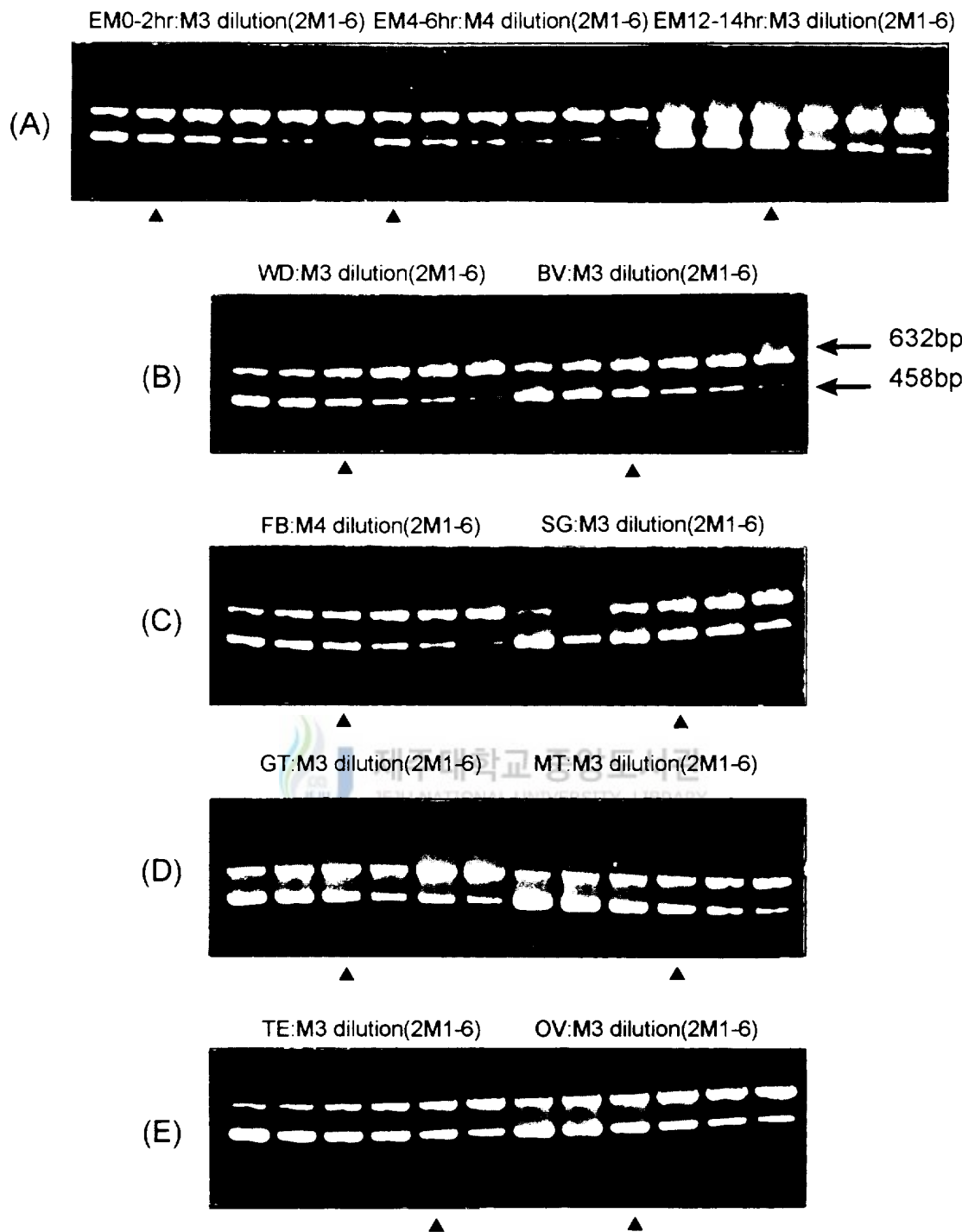
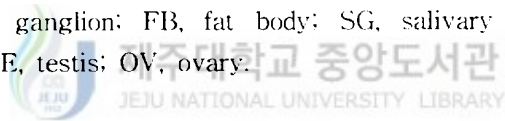


Figure 7. Agarose gel profile of competitive RT-PCR for *usp* transcript quantification. The relative amounts of *usp* product (the upper 632bp band) and competitor product (the lower 458bp band) in each sample were compared. After the first titration of ten-fold dilutions (M1-M6;  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  attomoles) of competitor DNA, target product were compared in serial fine-fold dilutions (2M1-2M6). Concentration of the two-fold serial dilution is given in brackets (for example, in case of M3 dilution, 2M1 was the concentration of  $5 \times 10^{-7}$  attomoles/ $\mu$ l). *usp* transcripts were detected with high level at early and late embryogenesis (A), and wing disc, brain ventral ganglion (B) and gut (D) of late 3rd instar larval tissues, and ovary (E) of adult tissue. EM, embryo; WD, wing disc; BV, brain ventral ganglion; FB, fat body; SG, salivary gland; GT, gut; MT, malpighian tube; TE, testis; OV, ovary.



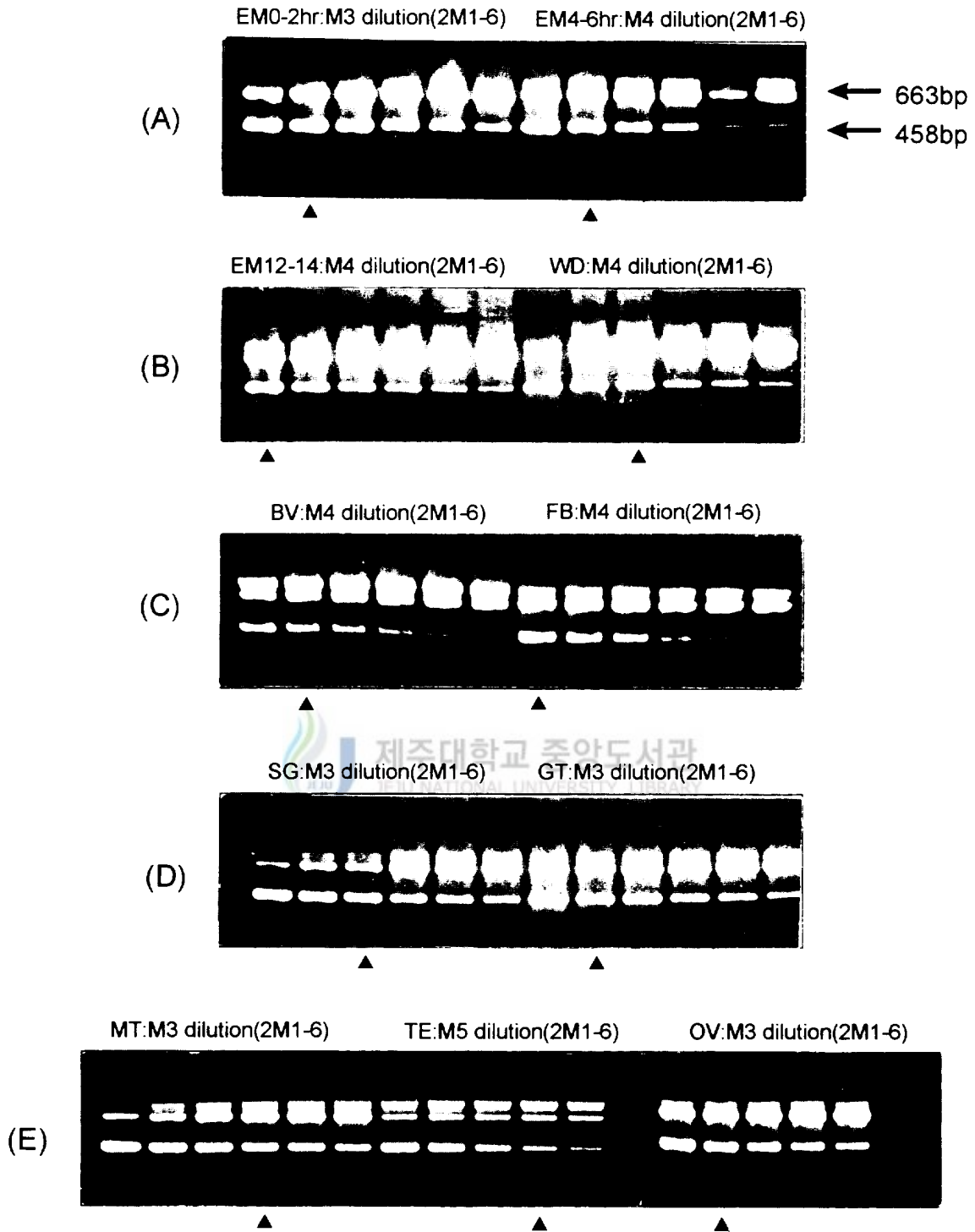


Figure 8. Agarose gel profile of competitive RT-PCR for *EcR* transcript quantification. The relative amounts of *EcR* product(the upper 663bp band) and competitor product(the lower 458bp band) in each sample were compared. PCR product titration were followed the same procedure described in the *usp* transcripts quantification. *EcR* transcripts were detected with high level at early embryogenesis(A), and salivary gland and gut(D) of late 3rd instar larval tissues, and ovary(E) of adult tissue. EM, embryo; WD, wing disc; BV, brain ventral ganglion; FB, fat body; SG, salivary gland; GT, gut; MT, malphigian tube; TE, testis; OV, ovary.



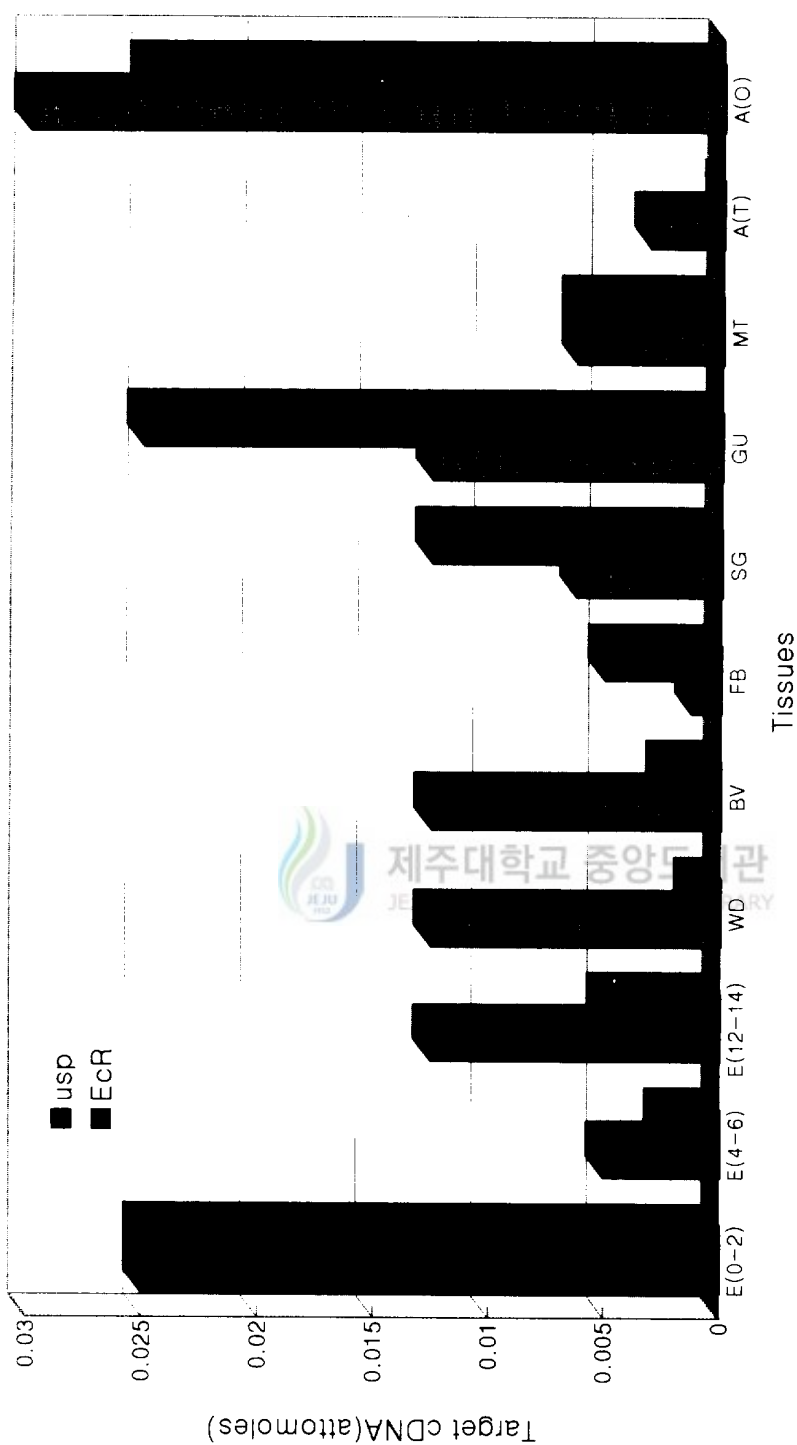


Figure 9. Quantification of the functional ecdysone receptor in embryo stage, and late 3rd instar larval and adult tissues. Animals of the embryo stage(E), each the period of 0-2, 4-6, 12-14hr after egg laying, were prepared. Wing disc(WD), brain and ventral ganglion(BV), fat body(FB), salivary gland(SG), gut(GU), malpighian tube(MT) were dissected from the late 3rd larvae. Ovary and testis were dissected from 5-day old adult after eclosion. The amount of *usp* and *EcR* transcripts were showed the differential expression pattern.

#### IV. 고 찰

초파리의 발생단계에서 적어도 6차례(embryo, 3단계의 유충시기, prepupa, pupa)의 ecdysone pulse가 관찰된다. 배발생 과정에 관찰되는 ecdysone peak는 배발생 경로를 결정하는 시발자 역할을 한다. 유충의 각 단계에 나타나는 ecdysone peak는 각피의 탈피를 시발한다 (Riddiford, 1993). 3령 유충말기에 관찰되는 ecdysone pulse는 puparium 형성을 시발한다. 유충조직들은 초기 변태시기 동안에 조직분해에 의해 파괴되고, imaginal 세포 집단들은 성체조직으로 분화된다 (Riddiford, 1993; Thummel, 1995). 그러므로, 변태과정을 통해 유충은 운동성과 생식능력을 갖춘 성체로 형태와 기능면에서 완전 변태된다. 최근에는 체계적인 hormone에 의한 신호가 적절한 시기와 조직 특이적인 발생경로를 어떻게 조절하는지에 대한 관심이 많다.

Ecdysone의 작용은 EcR과 Usp간에 형성된 heterodimer에 의해 매개되기 때문에 초파리 발생과정에서 기능적인 ecdysone receptor의 발현 양상을 RT-PCR 방법을 이용하여 분석하였다. *usp*와 *EcR*은 모든 발생시기에서 발현되었다. *usp*는 embryogenesis 시기, 모든 유충과 번데기 시기, 성체의 모든 발생 시기에서 거의 같은 양으로 발현되는데, 이는 *usp*가 다양한 발생 시기에서 pleiotrophic한 기능을 한다는 보고와 일치하였다 (Oro *et al.*, 1992; Henrich *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1995).

또한 EcR isoform도 *usp*가 발현되는 모든 발생시기에서 발현되었다. 각 isoform의 발현을 보면, *EcR-A*는 embryogenesis에서 높은 수준의 발현을 유지하며 유충 시기 동안에 감소하다가 다시 prepupa시기에 증가하였다. 반면에 *EcR-B1*은 *EcR-A*에 비해서 유충시기 동안에 높은 수준으로 발현하였다 (Figure 5). 이와 같은 결과는 *EcR*은 초파리 life cycle을 통해 광범위하게 발현되지만 그들의 발현 수준은 특이적인 발생시기에서 차등적으로 조절됨을 암시한다 (Koelle *et al.*, 1991; Talbot *et al.*, 1993). EcR isoform의 이런 차등적 발현은 Usp와 EcR isoform간의 결합에 의해 구성되는 기능적인 ecdysone receptor 복합체가 발생시기에 따른 독특한 발생 경로를 조절하는 것으로 생각된다.

Ecdysone pulse가 관찰되는 3령 유충말기 조직에서 wing disc, brain ventral ganglion, eye discs는 *EcR-A*가 높은 수준으로 발현된 반면, salivary gland와 epidermis는 *EcR-B1*이 높은 수준으로 발현되었다 (Figure 6). 이런 결과는 imaginal 조직은 *EcR-A*가 강하게 발현되는 반면에, *EcR-B1*은 유충 조직에서 강하게 발현됨을 나타낸다. 이것은 EcR 특이적인 monoclonal antibody에 의한 결과와 일치하므로

(Talbot *et al.*, 1993), 조직에 따른 전사후 변형은 없는 것으로 사료된다. 이 결과는 EcR isoform이 발생과정동안 독립적이며, 서로 독특한 공간적, 시간적 발현을 한다는 것을 암시한다. 그리고, *usp* 전사체는 조사된 각 조직에서 거의 같은 수준으로 검출되었다. 이것을 EcR isoform의 발현 양상과 비교해 보면, 3령 유충조직의 각 조직마다 특이적인 isoform과의 결합에 의해 기능적 ecdysone receptor를 형성할 수 있음을 보여준다. 성체조직인 ovary에서 EcR-A가 높은 수준으로 발현되기 때문에 *usp*와 EcR-A의 기능적 복합체가 암컷의 생식에 관여할 것으로 생각된다. 특이한 것은 EcR-B2의 발현양상인데, EcR-B2는 imaginal 조직인 brain ventral ganglion과 wing disc, 유충조직인 salivary gland와 epidermis에서 발현되었다. 따라서 EcR-B2의 발현은 EcR-B1과 다르게 조절되며 EcR-B2와 Usp간에 형성된 기능적 ecdysone receptor는 조직-특이적인 기능을 하는 것으로 생각된다.

발생시기별, 조직별, 기능적인 ecdysone receptor 복합체의 구성비율을 competitive RT-PCR을 수행하여 정량하였다. *usp*의 발현은 초기와 후기의 embryo, 3령 유충조직의 wing disc, brain ventral ganglion, gut에서, 그리고 성체의 ovary에서 높은 수준으로 발현되었다. EcR은 embryo 초기, 3령 유충조직인 salivary gland와 gut에서, 그리고 성체의 ovary에서 높게 발현되었다. 초기 embryo 시기에는 *usp*와 EcR이 같은 수준으로 발현되었는데, 이는 Usp와 EcR이 동등하게 heterodimer의 형성에 기여함을 의미한다. 또한 salivary gland와 gut에서는 EcR이 *usp*에 비해 높은 수준으로 발현되는데, 이것은 이들 조직들에서 EcR receptor의 특이적인 발현으로 EcR B의 높은 수준의 발현때문인 것으로 생각된다. 성체 ovary에서 *usp*와 EcR의 높은 발현은 Usp가 암컷의 생식에 관여하는 것과 함께 EcR도 ovary의 기능에 관여하는 것으로 생각된다. *usp*와 EcR의 전사체의 양이 다르게 나타나는 것은 기능적인 ecdysone receptor에 의한 ecdysone 작용이 EcR 혹은 Usp와 heterodimer를 형성할 수 있는 다른 receptor들에 의해 조절되는 수단이 될 것으로 생각된다. 최근의 연구에 의하면, *Drosophila* hormone receptor 38(DHR 38)이 Usp와 heterodimer를 형성하는 EcR과 경쟁하며, *in vitro*와 cell culture에서 EcR-Usp 이합체의 형성을 방해한다고 알려져 있다 (Sutherland *et al.*, 1995). 또한 Seven-up(Svp)은 *in vitro*와 *in vivo*에서 Usp-based 신호를 억제한다 (Zelhof *et al.*, 1995). 이렇게 기능적인 ecdysone receptor의 구성 요소인 Usp와 EcR이 heterodimer를 형성하지 못하게 함으로써, 발생과정에서 ecdysone 반응을 조절할 수 있을 것으로 생각된다. Ecdysone titre의 변화에 따라 발생 과정에 관여하는 여러 nuclear receptor들이 최근에 밝혀지고 있다. 앞으로 이러한 receptor와 기능적 ecdysone receptor와의 관계를 조사함으로써 ecdysone에 의한 신호가 어떻게 다양한 작용을 나타내는지 밝혀야 한다고 사료된다.

## V. 참고문헌

- Ashburner, M., C. Chihara., P. Meltzer., and G. Richards. 1974. Temporal control of puffing activity in polytene chromosome. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38: 655-662.
- Ashburner, M., and G. Richards. 1976. The role of ecdysone in the control of gene activity in the polytene chromosome of *Drosophila*. In *Insect Development*, P. A. Lawrence, ed. (New York: Wiley & Sons), pp. 203-225.
- Ashburner, M., and J. N. Tompson, Jr. 1978. The laboratory culture of *Drosophila*. In the *Genetics and Biology of Drosophila* Vol. 2a.(M. Ashburner and T. R. F. Wright, eds.) pp. 2-81. Academic Press, London.
- Beato, M., 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56: 335-344.
- Berg, J. M. 1989. DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 57: 1065-1068.
- Evans, R. M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily: transcriptional regulators of development and physiology. *Science* 240: 889-895.
- Henrich, V. C., A. A. Szekeley., S. J. Kim., N. E. Brown., C. Antoniewski., M. A. Hayden., J-A. Lepesant., and L. I. Gilbert. 1994. Expression and function of the *ultraspiracle(usp)* gene during development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 165: 38-52.
- Henrich, V. C., T. J. Sliter., D. B. Lubahn. A. MacIntyre., and L. I. Gilbert. 1990. A steroid/thyroid hormone receptor superfamily member in *Drosophila melanogaster* that shares extensive sequence similarity with a mammalian homologue. *Nucl. acids Res.* 18: 4143-4148.
- Huet, Francois., C. Rulz., and G. Richards. 1993. Puffs and PCR: the in vivo dynamics of early gene expression during ecdysone responses in *Drosophila*. *Development.* 118: 613-627.
- Khoury Christianson, A. M., D. L. King., E. Hatzivassiliou., J. E. Casas., P. L. Hallebeck., V. M. Nikoderu., S. AlexMitsialis., and F. C. Kafatos. 1992. DNA binding and heterodimerization of the *Drosophila* transcription factor



- chorion factor 1/Ultraspiracle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 11503-11507.
- Kim, S. J., C. W. Chung., and C. C. Lee. 1995. The expression of *ultraspiracle* gene product during development of *Drosophila melanogaster*. *Korean J. Zool.* 38: 220-229.
- Klug, A., J. W. R. Schwabe. 1995. Zinc fingers. *FASEB J.* 9: 597-604.
- Koelle, M. R. 1992. Molecular analysis of the *Drosophila* ecdysone receptor complex. *Ph. D. thesis*, Stanford University, Stanford, California.
- Koelle, M. R., W. S. Talbot., W. A. Se Graves., M. T. Bender., P. Cherbas., and D. S. Hogness. 1991. The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid superfamily. *Cell* 68: 377-395.
- Mangelsdorf, D. J., C. S. Thummel., M. Beato., P. Herrlich., G. Schutz., K. Umesono., B. Blumberg., P. Kastner., M. Mark., P. Chambon., and R. M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83: 836-839.
- O'Connell, P., and M. Rosbach. 1984. Sequence, structure and codon preference of the *Drosophila* ribosomal protein 49 gene. *Nucl. acids Res.* 12: 5495-5513.
- Oro, A. E., M. McKeown., and R. M. Evans. 1990. Relationship between the product of the *Drosophila ultraspiracle* locus and vertebrate retinoid X receptor. *Nature.* 347: 298-301.
- Oro, A. E., M. McKeown., and R. M. Evans. 1992. The *Drosophila* retinoid X receptor homolog *ultraspiracle* functions in both female reproduction and eye morphogenesis. *Development* 115: 449-462.
- Perrimon, N., L. Engstrom., and A. P. Mahowald. 1985. Developmental genetics of the 2C-D region of the *Drosophila* X chromosome. *Genetics* 111: 23-41.
- Riddiford, L. M. 1985. Hormone action at the cellular level. In *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. (Edited by Kerkut A, and Gilbert L. D). vol. 8G. pp 38-75. Pergamon Press, Oxford.
- Riddiford, L. M. 1993. Hormones and *Drosophila* development. In *the Development of Drosophila melanogaster*, Volume 2, M. Bate and A. Martinez Arias, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 899-939.
- Robinow, S., W. S. Talbot., D. S. Hogness., and J. W. Truman. 1992. Programmed cell death in the *Drosophila* CNS is ecdysone regulated and

- coupled with a specific ecdysone receptor isoform. *Development* 119: 1251-1259.
- Segraves, W. A. 1988. Molecular and genetic analysis of the E75 ecdysone-response of *Drosophila melanogaster*. *PhD thesis*, Stanford University, Stanford, California.
- Shea, M. J., D. L. King., M. J. Conboy., B. D. Mariani., and F. C. Kafatos. 1990. Proteins that bind to chorion cis-regulatory elements: A new C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein and a C<sub>2</sub>C<sub>2</sub> steroid receptor-like component. *Genes Dev.* 4: 1128-1140.
- Sutherland, J. D., T. Kozlova., G. Tzertzinis and F. C. Kafatos. 1995. *Drosophila* hormone receptor 38: a second partner for *Drosophila* USP suggests an unexpected role for nuclear hormone receptor of the nerve growth factor-induced protein B type. *Proc. Natl. Sci. USA.* 92: 7966-7970.
- Talbot, W. S., H. G. Stunnenberg., and D. S. Hogness. 1993. *Drosophila* tissues with different metamorphic response to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* 73: 1323-1337.
- Thomas, H. E., H. G. Stunnenberg., and A. F. Stewarf. 1993. Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and Ultraspiracle. *Nature.* 362: 471-475.
- Thummel, C. S. 1995. From embryogenesis to metamorphosis: The regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members. *Cell* 83: 871-878.
- Yao, T. B., B. M. Forman., Z. Jiang., L. Cherbas., J. D. Chen., M. McKeown., P. Cherbas., and R. M. Evans. 1993. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and *ultraspiracle* genes. *Nature* 366: 476-479.
- Yao, T. S., W. A. Segraves., A. E. Oro., M. McKeown., and R. M. Evans. 1992. *Drosophila ultraspiracle* modulates ecdysone receptor functions via heterodimer formation. *Cell* 71: 63-72.
- Zelhof, A. C., T. Yao., R. M. Evans., and M. McKeown. 1995. Identification and characterization of a *Drosophila* nuclear receptor with the ability to inhibit the ecdysone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 10477-10481.

## VI. 적 요

노랑초파리에서 스테로이드 호르몬인 ecdysone은 탈피와 변태과정에서 발생경로를 조정하는 시발자 역할을 한다. Ecdysone의 작용은 ecdysone receptor (EcR)과 *ultraspiracle* 단백질(Usp)간에 형성된 이합체에 의해 매개된다. 이들 이합체는 ecdysone response element (EcRE)에 결합하여 유전자의 전사를 조절한다. 본 연구는 모든 발생시기와 각 조직에서 기능적인 ecdysone receptor 전사체의 발현 양상을 RT-PCR과 competitor DNA를 사용한 competitive RT-PCR 방법을 이용하여 분석하였다.

발생시기에 따라 *usp*와 *EcR*은 양적인 차이는 있지만 모든 시기에서 발현되었다. 그러나 *EcR* isoforms의 발현은 발생시기에 따라 다른 양상을 보였다. 즉, *EcR-A*는 embryo시기에 증가하였다가 유충시기에 감소하고 다시 번데기시기에 증가한 반면, *EcR-B1*은 *EcR-A*에 비해 유충시기에 더 높은 수준으로 발현되었다. 3령 유충 조직에서 *EcR* isoform들의 발현 양상을 보면, 성체조직으로 발생할 imaginal 조직들은 *EcR-A*가 강하게 발현된 반면, 유충 조직들은 *EcR-B*가 강하게 발현되었다. 이런 결과는 EcR isoform은 발생시기와 조직에서 차등적인 시간적, 공간적 발현을 나타내며, 유충조직에서 특이적인 EcR-B isoform의 발현은 EcR-B isoform (특히 EcR-B1)이 유충조직의 분해에 관여하는 것으로 사료된다. Competitive RT-PCR 방법으로 정량한 *usp*와 *EcR*의 발현 비율은 조직마다 다르게 나타났다. 이러한 결과는 Usp나 EcR과 상호작용할 수 있는 다른 수용체들이 기능적인 ecdysone receptor의 형성을 방해함으로써 ecdysone의 작용을 조절할 수 있는 수단이 될 수 있다고 사료된다.

## 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 격려와 관심을 아끼지 않으신 김세재 교수님께 먼저 이 지면을 통해 감사드립니다. 앞으로도 더 많은 조언을 부탁드립니다. 항상 건강하시길 기원합니다. 그리고 바쁘신 가운데 저의 부족한 논문을 잘 다듬어 주신 오문유 교수님과 김원택 교수님께 감사드립니다.

배움의 길로 이끌어주신 허인옥 교수님, 이용필 교수님, 오덕철 교수님, 김문홍 교수님, 이화자 교수님, 고석찬 교수님께 감사드립니다.

저의 이 논문이 있기까지 항상 관심을 가져준 여러 선배님들과 동료, 후배들에게 감사드리며 아울러 실험 과정에 있어서 많은 도움을 준 고인숙 후배와 실험실 학생들에게도 감사드립니다.

이 논문이 있기까지 항상 사랑으로 지켜봐주신 부모님과 동생들에게 이 논문을 바칩니다.