

## 논문개요

fission yeast 인 *Schizosaccharomyces pombe*에서 mRNA의 nuclear export에 관여하는 factors를 밝히기 위해 *spmex67* null mutant allele와 synthetic lethality를 보이는 3종류의 돌연변이주를 screening하였다. 이들 돌연변이주는 기존에 *S. pombe*에서 밝혀진 mRNA export factors인 *Gle1*, *Rae1*, *Nup184*, *Elf3*, *Crp79*, *Npp106*가 아닌 다른 유전자에서 mutation이 일어난 것임을 확인하였다. 이들 SLMex1, SLMex3, SLMex9에서 각각의 cognate 유전자들을 cloning 하였다. 이들 중 SLMex1 으로부터 cloning한 *rsm1* (the mRNA export defect and Synthetic lethality with *Mex67*) 유전자는 chromosome III 상에 존재하고 그 기능이 알려져 있지 않은 hypothetical protein을 encoding하고 있다. Rsm1 유전자의 기능을 연구하기 위해 야생형 haploid 균주에 이 유전자가 *Ura4<sup>+</sup>/Kna<sup>r</sup>*로 치환된 knock-out 돌연변이주를 만들었다. 그 결과 *rsm1*은 성장에 필수 유전자는 아니지만 mRNA export에 결함을 보이는 새로운 mRNA export factor임을 알 수 있었다. *Rsm1* 유전자가 mRNA export와 관련된 중요 유전자들과 유전학적으로 서로 연관되어 있는 지를 알아 보기 위해 double mutants를 제조, synthetic lethality를 조사 했다. Synthetic lethality를 보이는 유전자는 찾을 수 없었지만, double mutants의 growth defect 정도와 *in situ* hybridization을 통한 mRNA export의 결함을 조사한 결과  $\Delta rsm1$  돌연변이가 mRNA export에 관여하는 것으로 알려진 다른 유전자들의 돌연변이와 함께 있는 경우, mRNA export 결함을 악화시키던지( $\Delta mex67$ ,  $\Delta npp106$ ), 약화시키는( $\Delta thp1$ ) 것으로 보아, *rsm1*은 여러 mRNA export factors 들과 상호작용 하면서 mRNA export에 관련이 있음을 암시한다.

# 목 차

논문개요	
표목록 (List of Tables)	
그림목록 (List of Figures)	
I 서론 .....	1
II. 재료 및 방법	
1. 재료.....	6
1.1 균주 .....	6
1.2 plasmids .....	6
1.3 배지 및 배양조건 .....	6
1.4 효소 및 시약 .....	7
1.5 primer 및 sequence analysis .....	7
1.6 완충용액 및 반응용액 .....	7
2. 방법.....	11
2.1 <i>S. pombe</i> 의 형질 전환 .....	11
2.2 <i>E. coli</i> 의 형질 전환 .....	11
2.3 Gene disruption .....	11
2.4 효모 genomic DNA isolation .....	12
2.5 Genomic Southern blot analysis .....	13
2.6 Random spore analysis .....	13
2.7 <i>In situ</i> hybridization .....	14
2.8 Spot assay for growth .....	14
2.9 Construction of plasmid .....	15
III. 결과.....	16

1. <i>rsm1</i> 결손균주(deletion mutant)의 제작과 분석 .....	16
2. <i>rsm1</i> 유전자와 <i>Mex67</i> 유전자와의 synthetic lethality 여부.....	21
3. <i>rsm1</i> 유전자와 <i>p15</i> , <i>mlo3</i> 유전자와의 synthetic lethality 여부 확인 .....	23
4. <i>rsm1</i> 결손 돌연변이와 mRNA export와 관련 있는 돌연변이 ( <i>rae1-167</i> , <i>npp106</i> , <i>nup184</i> , <i>Thp1</i> )와의 double mutants 제작 및 생장 관찰 .....	23
5. 돌연변이 균주들의 mRNA export 결함 여부 .....	25
IV. 토의 .....	29

참고문헌

Abstract

## 표목록 (List of Tables)

1. *S. pombe* strains used in this study .....9
2. Oligonucleotide Primer used in this study .....10

## 그림목록 (List of Figures)

1. Construction of *rsm::Kan<sup>r</sup>* disruptant ..... 17
2. *rsm1* deletion mutant shows growth retardation .....18
3. Poly(A)+RNA localization In  $\Delta rsm1::kan^r$  .....19
4. Poly(A)+RNA localization In  $\Delta rsm1$  mutants transformed with pREP3x-, pREP41x-, pREP81x-Rsm1 in the absence and the presence of thiamine..... 20
5. Growth of double mutants in EMM and YES .....22
6. Growth of mutants involved in mRNA export .....24
7. Poly(A)+RNA distribution in mutant strains .....27-28

# 서론

진핵세포(Eukaryotic cells)는 이중막으로 된 핵막(Nuclear membrane)에 의해 핵(nuclear)과 세포질(cytoplasm)로 구획화(compartmentation)되어 있다. DNA로부터 mRNA로의 전사(transcription)는 핵 안에서 일어나고, mRNA로부터 단백질이 합성되는 번역(translation)은 세포질에서 일어나므로, 유전 정보 발현의 중요한 두 단계인 전사와 번역은 공간적으로 분리되어 있다. 그러므로 유전정보가 전달된 mRNA는 핵막을 통해 핵에서 세포질까지 긴 여행(mRNA export)을 거쳐야만 한다. 이 여정에는 안내자와 출입국 관리자가 필요하고, 그들은 매우 다이내믹한 대화망을 가지고 있다. 아직 베일에 가려진, 그들의 정확하고 짜임새 있는 대화는 적절한 mRNA에게만 세포질로의 이동을 허락한다. 최근 연구들은 안내자와 출입국 관리자의 역할을 담당하고 있는 mRNA export factors, mRNA export adaptors, 핵공복합체(nuclear pore complexes, NPCs) 뿐만 아니라 transcription factors, mRNA processing factors 등 mRNA 대사과정에 관련된 factors까지 mRNA export에 관여되어 있다는 것을 보여준다 (Vinciguerra and Stutz, 2004; Sommer and Nehrass 2005).

대부분의 단백질과 mRNA를 제외한 RNA (rRNA, tRNA, snRNA 등)는 importin- $\beta$  type family에 속하는 transport receptors와 각각 결합하여 복합체를 형성함으로써 핵공을 통해 이동한다. 이러한 receptors는 NPC의 중앙 터널에 위치한 FG nucleoporins와 일시적인 결합을 통하여 transport를 매개한다. 또한, receptors의 N말단 부위는 small GTPase인 Ran과 결합하는데, 핵에는 Ran-GTP가, 세포질에는 Ran-GDP가 각각 분포되어 이동하는 거대분자들의 운반 방향성을 결정한다 (Weis, 2003; Lei and Silver, 2002).

mRNA transport는 단백질과 다른 RNA(rRNA, tRNA, snRNA 등)의

transport pathways와 3가지 정도면에서 구별된다. 첫째, 다수의 mRNA transport는 GTPase Ran의 농도 구배에 직접적으로 의존하지 않는다. 둘째, mRNA transport는 mRNA 자체 (naked free mRNA)로 이동되지 않는다. 전사되는 순간부터 mRNA는 heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs)와 결합하여 messenger ribonucleoparticle (mRNP)이라는 커다란 복합체를 이루어 이동하게 된다. 셋째, mRNA transport는 전사과정과 전사후 processing event (5'capping, splicing, 3'cleavage, 3'polyadenylation)와 밀접하게 연관되어 있다 (Jensen *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2004). 예를 들면 yeast의 mRNA에 결합하는 Nab2는 핵과 세포질을 shuttling하는 단백질로 poly(A)<sup>+</sup>의 길이 조절과 mRNA export 두 과정에 다 필요하다 (Hector *et al.*, 2002). 더욱이 pre-mRNA와 transcription factors(set of protein)의 결합은 잇따른 mRNA export factors의 결합을 용이하게 한다 (Benoit *et al.*, 2005).

mRNA receptor로 알려진 heterodimeric NXF-NXT 단백질은 non- $\beta$  type으로 하등 진핵생물인 효모(발아효모인 *Saccharomyces cerevisiae*에서는 Mex67p-Mtr2, 분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe*에서는 Mex67p-Nxt1)에서부터 사람(TAP-p15)에 이르기까지 잘 보존되어 있는데 (Segref *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 2000; Kang and Cullen, 1999), mRNP complex를 NPC까지 연결시키는 역할을 하는 것으로 추측된다 (Cullen, 2003; Erkmann and Kutay, 2004). 즉, NXF-NXT는 nucleoporins에 반복적으로 존재하는 phenylalanine-glycine (FG) motifs 부분과 상호작용함으로써 export competent mRNPs를 NPC에 도킹시키는 것으로 추측된다 (Rodriguez *et al.*, 2004). 또한, NXF-NXT는 nucleoporins에 결합한 이후 nuclear pore를 통한 mRNA transport를 촉진한다 (Vinciguerra and Stutz, 2004; Jensen *et al.*, 2003; Stutz and Izaurralde, 2003).

*S. cerevisiae*에서 Mex67p를 mRNPs로 recruit하는 hnRNP-like 단백질

인 Yra1은 mRNA와 Mex67p-Mtr2 heterodimer 사이에서 adapter 역할을 한다 (Luo et al, 2001; Strasser and Hurt, 2001). Yra1(고등생물에서는 Aly)는 진화적으로 잘 보존된 REF (RNA export factor) family의 구성원이다. Yra1p은 *S. cerevisiae*에서 mRNA export에 필수적이다 (Strasser and Hurt, 2000).

UAP56/Sub2p은 ATP-dependent DExD RNA helicase family에 속하는 splicing factor로서 초기 spliceosome에서 발견되는데, splicing 중인 pre-mRNP complex에 REF 단백질을 recruit한다 (Straber and Hurt, 2001; Zenklusen *et al.*, 2002). 최근 연구에서 위에서 언급한 export 단백질들 (TAP/ALY/UAP56)이 nonsense mediated decay (NMD) 단백질과 함께 exon-junction complex (EJC)의 구성요소임이 밝혀짐으로써, splicing과 export 사이의 연결고리에 대한 단서를 제공하였다 (Sommer and Nehrbass, 2005).

더 나아가서, 최근에는 mRNA export와 전사(transcription)와의 연결고리에 대한 단서도 밝혀졌다. Transcription elongation에 관여하는 THO complex (Hpr1-Tho2-Mft1-Thp2)는 transcription initiation 동안 mRNA export adaptor인 Yra1과 Sub2를 recruit한다. 이렇게 형성된 complex는 transcription and export complex (TREX)라 불린다 (Strasser *et al.*, 2002). 이들 component는 이름처럼 transcription에 관여하며, Mex67과 결합하여 mRNA export에도 관여한다. TREX complex의 각 component를 제거하면 핵 안에 poly(A)<sup>+</sup> RNA가 축적되는 것을 볼 수 있다 (Zenk *et al.*, 2002; Strasser *et al.*, 2002; Libri *et al.*, 2002).

mRNA export machinery와 유전학적, 기능적으로 연관된 새로운 mRNA export factor인 Sac3가 Mex67p, nucleoporins, Thp1p과 결합하는 것이 보고되었다. Sac3는 NPC의 핵 쪽에서 FG-nucleoporins과 결합하여 핵공 주변에 Thp1 (transcription elongation factor)을 매어 두는 것 같다(Strasser *et*

*al.*, 2002). 잇따른 연구에서 Sac3p은 NPC의 cytoplasmic fibrils에도 위치하고, *SAC3* mutant 하에서 Mex67p이 nuclear rim에 축적되는 것을 볼 수 있었다 (Lei *et al.*, 2003). 이것은 Sac3p가 mRNP를 NPC를 통해 이동시킨 뒤에 mRNP로부터 Mex67p를 떼어놓는데 필요할 것으로 추측된다 (Sommer and Nehrbass, 2005).

Sac3p-Thp1p complex와 결합하는 또 다른 mRNA export factor인 Sus1은 transcription을 조절하며, transcription initiation에 참여하는 SAGA histon acetylase complex와 결합한다 (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2004). Sus1p의 제거는 transcription과 mRNA export에 결함을 준다. 아마도 Sus1p은 Thp1p-Sac3p complex을 recruit하고 NPC와 결합하고 있는 Thp1p-Sac3p complex에 SAGA-regulated genes을 잡고 있음으로써 적절한 transcripts export를 조절할 것으로 추측된다 (Sommer and Nehrbass, 2005).

새로운 연구 결과들은 NPC가 역동적인 macromolecular complex로 transport pathway를 조절할 수 있음을 보여 준다. NPC가 고정된 문이 아니라 해도 transport에서 여전히 수동적으로 여겨지는데, 최근 몇몇 연구에서 특별한 Nups는 direct transport facilitators이고 transport에서 보다 적극적인 역할을 하는 것으로 보여진다. Nup98과 FG Nups가 그 예이다 (Elizabeth and Susan, 2006). FG nucleoporins은 효모에서 Nups의 절반 가량을 차지하며 Mex67p-Mtr2p는 Nup100, Nup116p, Nup42p, Nsp1p, Nup159p 등과 같은 여러 FG repeat 단백질과 직접 작용하고 그것의 유전학적인 자료들은 이들의 상호작용이 기능적으로 연관되어 있음을 제공한다. 효모에서 Nup84와 Nup159 두 개의 sub-complex는 mRNA export에 필수적이다. Nup84 sub-complex는 핵공에 Mex67p-Mtr2p의 binding site를 제공하며 Nup159 sub-complex는 cytoplasmic fibril과 조합되어 있어 export의 마지막 단계에서 그 역할을 수행한다 (Stoffler *et al.*, 1999, Rout *et al.*, 2000, Bailer *et al.*,

2000, Ho *et al.*, 2000).

하등진핵생물로서 분열효모인 *S. cerevisiae*와 발아효모인 *S. pombe*는 유전학적, 분자/세포생물학적 연구방법이 잘 확립되어 있어 진핵생물의 기본적인 생명현상을 연구하는데 좋은 model systems로 이용되고 있다. 하지만, *S. pombe*와 *S. cerevisiae*는 전체유전자의 30%정도가 서로 완전히 다를 만큼 여러 면에서 많은 차이점을 보이고 있다. mRNA export 기작에 있어서도 두 효모는 상당한 차이점을 보인다. NXF-NXT인 *S. cerevisiae* Mex67p-Mtr2 는 mRNA export에 필수적이거나, *S. pombe* Mex67p-Nxt1 는 필수적이지 않다. 오히려 *S. cerevisiae*에서는 mRNA export에 필수적이지 않은 Rae1p이 *S. pombe*에서는 필수적이다 (Segref *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 2000; Thakurta *et al.*, 2004). 실제로 Rae1p과 고등생물의 Rae1p homologs는 mRNA export carrier인 NXF-NXT heterodimers와 유사한 성질을 보임으로써, 비슷한 역할을 담당하는 것으로 추측된다 (Pritchard *et al.*, 1999; Sabri and Visa, 2000; Yoon *et al.*, 2000; Blevins *et al.*, 2003).

본 study에서는 *S. pombe* system을 이용하여 *spmex67* null mutant allele와 synthetic lethality를 보이는 3 종류의 돌연변이주를 screening하여 얻은 novel gene *rsm1* 을 knock-out시켜 봄으로써 *rsm1p*의 기능과 mRNA export와의 관련 여부를 살펴 보았다. 나아가서 *Rsm1* 유전자가 위에서 언급한 mRNA export와 관련된 중요 유전자들과 유전학적으로 서로 연관되어 있는 지를 알아 보기 위해 double mutants를 제조, synthetic lethality를 조사했다. 그리고 *in situ* hybridization을 통해 다양한 mutant 균주에서 mRNA export defect 정도를 관찰했다.

# 재료 및 방법

## 1. 재료

### 1.1. 균주

재조합 plasmids의 propagation과 selection을 위한 형질전환용 균주로 *E.coli* Top10'을 사용하였다.

본 실험에 사용된 효모 *Schizosaccharomyces pombe* 효모균주 목록은 Table1에 제시하였다.

### 1.2. Plasmids

PCR products와 그 밖의 DNA를 subcloning하기 위해서 pBluescript SK(+) vector, pDW232 vector, pDW234 vector, pREP series, (41U GFP, 41U3GFP)를 사용하였다.

### 1.3. 배지 및 배양조건

*E. coli* Top10'의 배양을 위해서는 일반적으로 사용되고 있는 Luria-Bertani (LB : 0.5% yeast extract, 1% bacto-tryptone, 1% NaCl) 액체 배지를 사용하였고, 필요 시에는 LA액체 배지 (LB 액체 배지에 ampicillin을 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가)를 사용하여 37°C에서 키웠다. 고형 배지는 2% agar를 첨가하였다.

효모 균주의 배양을 위한 배지는 EMM(Edinburgh minimal medium)과 YES(Yeast extract with supplements : 0.5% yeast, 3% glucose, supplements : 225mg/l adenine, leucine, uracil)배지를 사용하였고 mating을 시키기 위해서는 ME(malt extract : 3% bacto-malt extract)를, 돌연변이주의

분리를 위해서는 YES배지에 G418 (100mg/L)를 첨가하였다. 필요 시에는 EMM(Edinburgh minimal medium)배지에 15 $\mu$ M Thiamin을 첨가하여 사용하였으며, 고형 배지는 2% Bacto-agar를 첨가하였다. 28 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

#### 1.4. 효소 및 시약

각종 제한 효소들과 T4 DNA ligase는 New England Biolabs. 에서 구입하였고, Taq DNA polymerase는 제넨메드에서, *Pyrobest* DNA polymerase는 Takara 에서 구입하였다. 대부분의 시약은 Sigma Chemical Co.와 MP 그리고 Difco에서 구입하였다. Southern blotting을 위한 ECL (Enhanced Chemiluminescence labeling and detection) kit는 Amersham Life Science에서 구입하였으며, *In Situ* Hybridization을 위한 Fluorescin-Antidig -oxigenin Ab.는 Roche에서 구입하였다.

#### 1.5. primer 및 sequence analysis

Primer는 GC함량을 40%-60%로 맞추고 반복적인 염기서열을 피해 20mer 정도를 0.02 $\mu$ mol scale로 제노텍에 주문했다. 본 실험에 사용된 primer는 table2에 제시하였다.

Subcloning하여 얻은 constructs를 확인하기 위하여 plasmid DNA를 추출하여 제노텍에 sequencing을 의뢰하여 sequence analysis를 하였다. Sequencing에 사용된 primer는 rsm-s1, rsm-s2, rsm-s3 이고 18mer이다. Sequencing한 data는 Europea Bioinformatics Institute에서 ClustalW를 통해 multifule sequence alignment했다.

#### 1.6. 완충용액 및 반응용액

- 1) 완충용액

DNA 전기영동에 사용된 완충용액은 기본적으로 Sambrook *et al.* (1989)를 따랐다.

2) 효모의 형질 전환용 용액 : Lithium Acetate 방법

10× LiAc : 1 M Lithium Acetate pH 7.5

10×TE : 0.1 M Tris-HCl pH 7.0, 0.01M EDTA

1×TE/LiAc : 1.0 mM TE/LiAc

50% PEG4000 : 50% Polyethylene glycol 4000 in 1×TE/LiAc

3) 효모의 DNA isolation 시약

CSE Buffer : 50 mM Citrate/phosphate pH5.6, 1.2 M sorbitol,  
40 mM EDTA pH 8.0

Spheroplast buffer : zymolase 20T(2.5 mg/ml) in CSE buffer

4) Southern blotting 용 용액

20×SSC : 0.3 M Na<sub>3</sub>citrate, 3 M NaCl, pH 7.0

Primary wash buffer : 6 M urea, 0.4% SDS, 0.5×SSC

Second wash buffer : 2×SSC

Hybridization buffer : 0.5 M NaCl, 5% blocking agent  
to ECL gold hybridization buffer

5) *In Situ* Hybridization용 용액

30% formaldehyde : paraformaldehyde, 10 N NaOH, PBS

Spheroplast buffer :

SCE (1 M sorbitol, 0.5 M EDTA, Citrate phosphate)

Hybridization buffer : 20×SSC, 50% Detran sulfate, 2% BSA,  
vanadyl complex, tRNA(1 mg/ml), olgo  
dT50

Fluorescin-Antidioxigenin solution : 1 M Tris pH 7.5,  
5 M NaCl, 2% BSA, Antidioxigenin(200µg/ml),

10% Triton X-100

DAPI mounting medium :

DAPI(1 mg/ml), Antifade(10 mg/ml), PBS, glycerol

**Table 1** *S. pombe* strains used in this study

Strains	Genotype	Source
Wild type	h- leu-32 ura4D18	Yoon <i>et al</i> (2000)
$\Delta rsm1$	h- leu-32 ura4D18 <i>ram::karf</i>	this study
$\Delta rsm1$	h+ leu-32 ura4D18 <i>ram::karf</i>	this study
$\Delta rsm1$	h- leu-32 ura4D18 <i>ram::ura</i>	this study
$\Delta mex67$	h+ leu-32 ura4D18 <i>mex67::karf</i>	Yoon <i>et al</i> (2000)
$\Delta mex67$	h+ leu-32 ura4D18 <i>ade6 mex67::ura</i>	Yoon <i>et al</i> (2000)
$\Delta p15$	h+ leu-32 ura4D18 <i>p15::karf</i>	Yoon <i>et al</i> (2000)
<i>rae1-167</i>	h+ leu-32 ura4D18 <i>rae1-167</i>	Yoon <i>et al</i> (2000)
$\Delta npp106$	h+ leu-32 ura4D18 <i>ade6 npp106::ura</i>	Yoon <i>et al</i>
$\Delta nup184$	h+ leu-32 ura4D18 <i>ade6 nup184::ura</i>	Yoon <i>et al</i>
$\Delta thp1$	h- leu-32 ura4D18 <i>thp1::ura</i>	this study
$\Delta mlo3$	h+ leu-32 ura4D18 <i>mlo3::karf</i>	Yoon <i>et al</i> (2000)
$\Delta rsm1 \Delta mex$	h- leu-32 ura4D18 $\Delta mex67::ura$ <i>rsm1::karf/pREP81X-rsm1</i>	this study
$\Delta rsm1 \Delta mex$	h- leu-32 ura4D18 $\Delta rsm1::ura mex67::karf/pREP81X-$ <i>mex67</i>	this study
$\Delta rsm1 \Delta p15$	h- leu-32 ura4D18 $\Delta p15:: karf rsm1::ura/ pREP81X-$ <i>rsm1</i>	this study
$\Delta rsm1 \Delta mlo3$	h- leu-32 ura4D18 $\Delta mlo3:: karf rsm1::ura/ pREP81X-$ <i>rsm1</i>	this study
$\Delta rsm1 \Delta npp106$	h- leu-32 ura4D18 $\Delta rsm1::karf npp106::ura$	this study
$\Delta rsm1 \Delta nup184$	h- leu-32 ura4D18 <i>ade6</i> $\Delta rsm1::karf nup184::ura$	this study
$\Delta rsm1 \Delta thp1$	h- leu-32 ura4D18 $\Delta rsm1::karf thp1::ura$	this study
$\Delta rsm1 rae1-167$	h- leu-32 ura4D18 $\Delta rsm1::karf rae1-167$	this study

**Table 2** Oligonucleotide Primer used in this study

---

Rsm-1	5'-CTTGTCGACATGTCATTTCTACCGATAT-3'
Rsm-2	5'-ATAGGATCCCCGAAGTCCTTGGAGCAAAC-3'
Rsm-3	5'-CTTGTCGACTCATTTCTACCGATATGGA-3'
Rsm-4	5'-ATAGGATCCCTACCGAAGTCCTTGGAGCA-3'
Rsm-5	5'-CGCAATGGTCGTATGTGGAC-3'
Rsm-pdw1	5'-GAAGCTACTGCAGCTGTAAC-3'
Rsm-pdw2	5'-ATACCTAGGAGACAATTAGTAACGGAC-3'
Rsm-c1	5'-GTGGACTTTGGATCCCATTG-3'
Rsm-c2	5'-TTAACTCGAGCGCATTCTCA-3'
Rsm-c3	5'-AATGCGGCCGCCAGCAGGAATCAAGGTAGC-3'
Rsm-c4	5'-AATGCGGCCGCTTAGCAATGACTGCTACGC-3'
Rsm-s1	5'-CGAATCGTTCTCTGCATC-3'
Rsm-s2	5'-CATCGCATTGACTGGATG-3'
Rsm-s3	5'-GACTTATAGAAGTCGGTG-3'
Rsm-his1	5'-ATACATATGTCATTTCTACCGATATG-3'
Rsm-his2	5'-CTTGGATCCTTACCGAAGTCCTTGGAGCA-3'
Rsm-gst1	5'-ATAGGATCCTGTCATTTCTACCGATATG-3'
Rsm-gst2	5'-CTTCTCGAGTTACCGAAGTCCTTGGAGCA-3'
Rsm-mal	5'-ATAGAATTCTCATTTCTACCGATATGGA-3'
Rsm-mal2	5'-CTTCTGCAGTTACCGAAGTCCTTGGAGCA-3'
Ura2R	5'-CACAAATGCATACATATAGCCAG-3'
Ura4F	5'-TGAATGTAAAATACCATGTAGAC-3'
Kan1	5'-ATTGCGGCCGCTTTAGCTTGCCTCGTCCC-3'
Kan2	5'-AATGCGGCCGCTGGATGGCGGCGTTAGTAT-3'
Kan2R	5'-CGCACGTCAAGACTGTCAAGGAG-3'
Kan4F	5'-GCAGTTTCATTTGATGCTCGATG-3'

---

## 2. 방법

### 2.1 *S. pombe*의 형질전환

*S. pombe*의 형질전환은 Lithium Acetate 방법(Warbrick *at al*, 1993)으로 수행하였다. 효모를 적정배지에 seed하여 overnight culture한 다음 50 ml에 transfer하여  $0.5-1 \times 10^7$  cell/ml ( $OD_{595} = 0.2 \sim 0.5$ )되게 키운다. 세포를 harvest하여 10 ml의 멸균 증류수로 1회 세척하고 LiAc/TE (0.1 M LiAc, 1XTE)를 1 ml 넣어 다시 세척한 뒤  $1 \times 10^9$  cell/ml 되게 풀어 준다.

분주한 세포 100  $\mu$ l에 1  $\mu$ g의 형질전환용 DNA, 5  $\mu$ l의 salmon sperm DNA(10mg/l)를 넣고 50% PEG용액 300  $\mu$ l을 첨가하여 28  $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 다음 42  $^{\circ}$ C에서 10분 동안 (knock-out균주의 경우는 5분)heat shock을 주었다. 세포를 적당한 선별 배지에 plating하여 28  $^{\circ}$ C에서 3일~4일간 배양하였다.

### 2.2 *E. coli*의 형질전환

*E. coli*의 형질전환은  $CaCl_2$  방법 (Kushner, 1978)을 사용하였다.

### 2.3. Gene disruption

*Rsm1* 유전자의 gene disruption을 위해 *Rsm1* 유전자 (891 bp)의 upstream 방향으로 1189 bp와 downstream 방향으로 1394 bp의 DNA 절편을 PCR reaction을 통해 얻었다. rsm-c1과 rsm-c3 primer를 사용한 PCR으로 *rsm1* ORF의 upstream 방향으로 1189 bp의 DNA fragment를 증폭하였다. rsm-c1 primer에는 *Bam*HI site가 들어있고 (5' GTGGACTTTGGATCCATTG 3'), rsm-c3 primer에는 5' 끝에 *Not*I sequence를 붙여 주었다 (5' AATGCGGCCGCAGCAGGAATCAAGGTAGC

3'). 그러므로 PCR reaction으로 얻은 DNA fragment는 양 끝 부분에 각각 *Bam*H I 과 *Not*I site를 갖게 된다. 마찬가지로 rsm-c4와 rsm-c2로 rsm ORF의 downstream 방향으로 1394 bp DNA fragment를 증폭했다. rsm-c4 primer 5' ' 끝에 *Not*I sequence가 삽입됐고(5' ' AATGCGGCGCTTAGCAATGACTGCTACGC 3'), rsm-c2 primer 내에는 *Xho*I site가 있다 (5' TTAACCTCGAGCGCATTCTCA 3'). 각 DNA fragment를 restriction enzyme로 37°C에서 2시간 동안 잘랐는데, *rsm* ORF의 upstream 방향은 *Bam*H I /*Not*I 으로, downstream 방향은 *Not*I /*Xho*I 으로 digestion 했다. 잘려진 이 fragment를 *Bam*H I /*Xho*I 으로 자른 pBluscript sk(+) vector에 T4 DNA ligase로 상온에서 2시간 반응시켜 붙여 넣었다. 이렇게 형성된 construct를 *Not*I 으로 자르고, 여기에 selective marker로 사용하기 위한 *Ura4* 또는 *Kan<sup>r</sup>* gene을 포함하고 있는 DNA fragments를 *Not*I 으로 잘라서 넣었다. 즉, *Rsm1* 양쪽 flanking region 사이에 *Rsm1* 유전자가 *Ura4* 또는 *Kan<sup>r</sup>* 유전자로 치환되도록 구성한 것이다. 이것을 *Bam*H I /*Xho*I 으로 잘라 *S. pombe*의 야생형 균주인 (wild type)인 217 strain에 형질전환함으로써, homologous recombination에 의해 *rsm1*가 deletion된 균주를 얻을 수 있다.

## 2.4. 효모 genomic DNA isolation

효모 세포를 stationary phase까지 키운 후 수확하여 spheroplast buffer로 세척함으로써 cell condition을 바꿔준다. Zymolase 20T (2.5 mg/ml)를 넣은 spheroplast buffer 1 ml로 cell을 잘 풀어준 뒤 37°C에서 1시간 정도 반응시킨 후 10  $\mu$ l의 배양액과 10% SDS 5  $\mu$ l를 떨궈 세포벽이 깨지는 것을 확인하고 세포벽이 깨진 것이 확인되면 2000 rpm에서 2분간 harvest하여 TE 550  $\mu$ l에 풀어 10% SDS 55  $\mu$ l를 첨가하고 65°C에서 10분간 반응시킨다. 5 M potassium acetate를 175  $\mu$ l 첨가하여 ice에서 DNA가 엉기는 현상을 보일

때까지 방치하고 13000 rpm으로 15분간 centrifugation하여 상등액만 Phenol/chloroform extraction을 두 번 수행하고 ethanol로 침전시킨다. 침전된 DNA를 멸균된 증류수에 녹인 다음 agarose gel에 걸어 확인한다.

## 2.5. Genomic Southern blot analysis

효모에서 *Rsm1* 유전자가 정확히 disruption되었는가를 확인하기 위해 Amershams ECL nonisotopic method를 사용하여 Southern blotting을 수행하였다. 뽑아놓은 Genomic DNA를 *Pst*I/*Bgl*III 제한효소로 자른 후 DNA 절편을 size marker와 함께 1% agarose gel에서 전기영동 하여 분리한 후, depurination 용액 (0.25 M HCl)에서 15분, denaturation 용액 (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl)에서 40분 그리고 neutralization 용액 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.5)에서 45분간 상온 처리하였다. 이어 gel 상의 DNA 단편들을 capillary transfer를 이용하여 상온에서 20X SSC 내에서 Hybond-N<sup>+</sup> membrane으로 3~4시간동안 이동시켰고 UV로 cross-link하여 membrane에 고정하였다.

Prehybridization 은 42°C에서 1시간 동안 ECL prehybridization solution으로 하였고 Hybridization은 42°C 에서 6~20시간 동안 labeled fragment를 넣은 hybridization solution으로 하였다. filter를 씻은 후 detection은 ECL DNA detection system을 이용하여 수행한 다음, Bio-Rad의 젤 형광분석기를 통해 signal을 확인하였다.

## 2.6. Random Spore analysis

random spore analysis는 다른 phenotype을 보이는 strain과 cross 시키기 위한 방법으로, *h*<sup>-</sup> strain과 *h*<sup>+</sup> strain을 ME plate에서 멸균된 증류수로 섞은 다음, 2~3일간 28~30°C에 배양하여 cell을 cross시키고 cross되어 이배체가 된 세포들이 감수분열 하여 sporulation되게 한다. cell을 1ml의 증류수

에 풀어주고 여기에 glucosylase를 5~7  $\mu\text{l}$  첨가한 후 6시간 더 배양하여 형성된 유성포자를 제외한 영양세포를 lysis시킨다. 28°C에서 증류수로 세척한 후 적당한 수의 spores를 (EMM: 1000 spores/plate, YES: 100 spores/plate) 적정배지에 plating하였다.

## 2.7. *In situ* Hybridization

50 ml의 배지에  $2-4 \times 10^6$  cell/ml되게 키워 30% formaldehyde를 6 ml 첨가하여 45분간 fixing하고 0.3 M glycine 용액으로 washing 한 후 spheroplast buffer 에  $1 \times 10^7$  cell/ml되게 풀어주어 37°C에서 1시간 배양하였다. poly-lysine으로 coating된 slides에 SCE(sorbitol, citrate-phosphate, EDTA)로 풀어 준 cells을 놓아 4°C에서 2시간 방치하고 -20°C methanol에 slides을 2시간 이상 넣어두었다. methanol을 완전히 말린 후 2×SSC로 washing하고 10  $\mu\text{l}$ 의 hybridization solution을 첨가하여 coverglass를 덮어 37°C에서 overnight하였다. 2×SSC로 상온에서 5분, 다시 상온에서 20분간 washing하고 37°C에서 20분간 2번씩 washing한 후 Fluorescein-Antidigoxigenin Antibody solution을 10  $\mu\text{l}$  첨가하여 coverglass를 덮어 37°C에서 1시간 배양하였다. 2×SSC로 상온에서 15분간 2번씩 washing하여 air dry 후 DAPI mounting medium을 12  $\mu\text{l}$  첨가하여 coverglass를 덮고 sealing하였다. 이를 형광현미경을 통해 signal을 관찰하였다.

## 2.8. Spot assay for growth

Single transformant를 적당한 selective auxotroph가 있는 EMM 고형배지에 patch해서 키운뒤, 이것을 5ml의 액체배지에서 seed해서 stationary phase로 키운다. 10 fold로 serial dilution해서 ( $2 \times 10^7$  cells/ml) YES, adenine, leucine, uracil이 들어 있는 EMM, leucine이 없는 EMM, final 농도가 15  $\mu\text{M}$ 인 thiamine이 있는 EMM 배지에 plating 하였다.

## 2.9. Construction of plasmid

pREP3X-*rsm1* vector는 *rsm1*을 *rsm1* gene이 들어있는 vector를 통해 PCR reaction으로 증폭하여, pREP3X와 같이 *Sal I/BamHI*으로 자른 뒤 subcloning하여 형성하였다. pREP41X, pREP81X vector는 *Xho I/BamHI*으로 subcloning하여 만들었다. pREP series vector는 leucine marker를 가지고 있어서, transformants를 leucine 을 뺀 EMM배지에서 골라 낼 수 있었다.

N-terminal/C-terminal GFP fusion vector는 *Sal I/BamHI*으로 subcloning하여 형성하였고, vector의 uracile marker를 통해 transformants를 uracile이 없는 EMM배지에서 골라 낼 수 있었다.

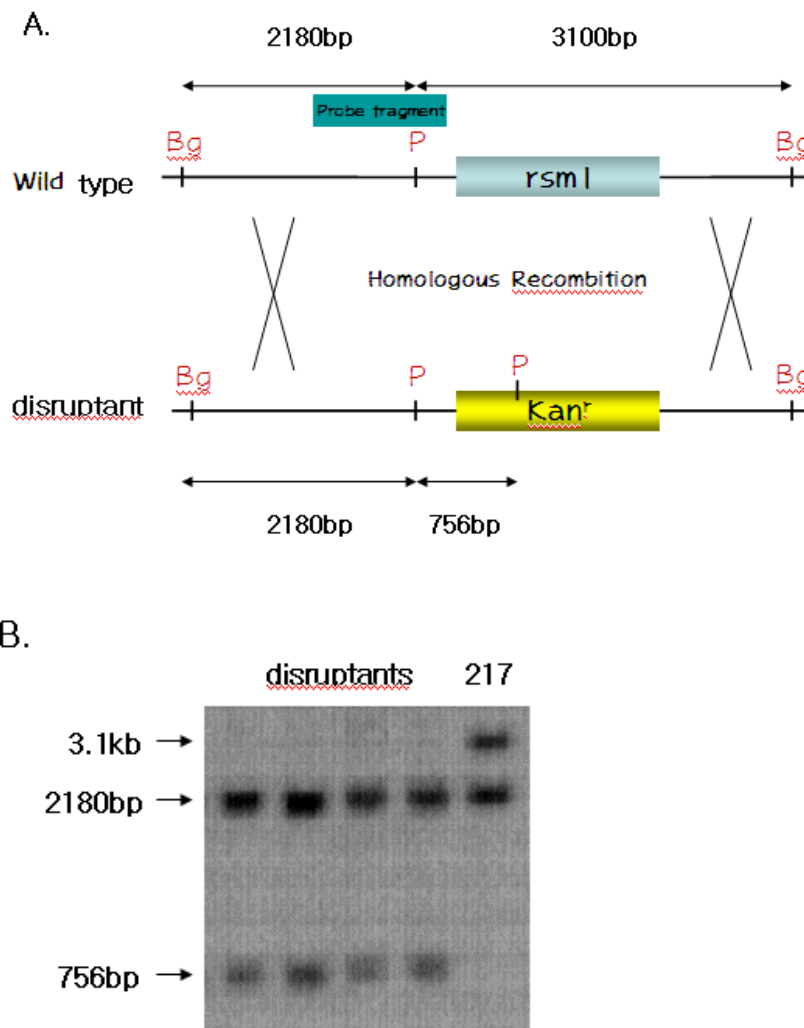
# 결 과

## 1. *rsm1* 결손균주(deletion mutant)의 제작과 분석

앞선 실험에서 mRNA export에 관여하는 *mex67*과 유전적으로 연관이 있는 유전자들을 찾기 위해, 분열효모인 *S. pombe*에서 *mex67* 유전자 전체가 deletion된 균주를 이용하여 mRNA export에 결함이 있는 3개의 synthetic lethal mutant를 screen하였다(Yoon, 2003). 이 중 SLMex1이라 명명 하였던 유전자를 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과, 이 유전자는 기능이 알려져 있지 않은 새로운 유전자임을 알아내고, *rsm1* (the mRNA export defect and Synthetic lethality with Mex67)이라 명명 하였다 (Yoon, 2004). 본 실험에서는 *rsm1*이 mRNA export에 관여하는지, *rae1*, *mex67*, *npp106*, *nup184* 등과 같은 다른 mRNA export 와 관련된 중요 유전자들과 유전학적으로 연관이 있는지의 여부를 확인하였다.

이를 위해 ‘방법’에 서술한대로 *rsm1* 결손 균주를 만들었다 (Fig. 1). 정확히 *rsm1* deletion이 되었는지 확인하기 위해, 야생형 (wild type) 균주와 형질전환체(transformants)의 genomic DNA를 각각 추출해서 PCR 반응을 했다. 확인에 사용한 primers는 constructs를 제작할 때 사용했던 primer의 위치보다 바깥쪽에서 design한 primers와 *Ura4* 또는 *Kan<sup>r</sup>* 유전자들의 primers(Ura-2R, Ura-4F, Kan-2R, Kan-4F)로, 야생형 균주의 genomic DNA에서는 upstream과 downstream 방향 모두에서 PCR로 증폭된 DNA fragments가 없었으나, *rsm1* deletion mutants에서는 upstream 방향으로 1391 bp, downstream 방향으로 1693 bp의 DNA fragments가 증폭되었다. 또한 *rsm1* 유전자의 flanking region에 존재하는 primers로 PCR을 하면 야생형 균주에서의 크기 (3618 bp)와 다른 크기의 DNA fragments가 *rsm1* 결

손 균주에서 증폭되었다. 그리고 genomic DNA를 *Bgl*II/*Pst*I 으로 자르고 upstream flanking region을 probe로 Southern hybridization 실험을 한 결과, 야생형에서는 2180 bp, 3100 bp 크기의 band를, 결손균주에서는 756 bp, 2180 bp 크기의 band를 확인함으로써, *rsm1* 유전자가 disruption되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).



**Fig. 1. Construction of *rsm1::Kan<sup>r</sup>* disruptants**

A) Schematic diagram representing the constructs of the *rsm1* null allele in *S. pombe*.

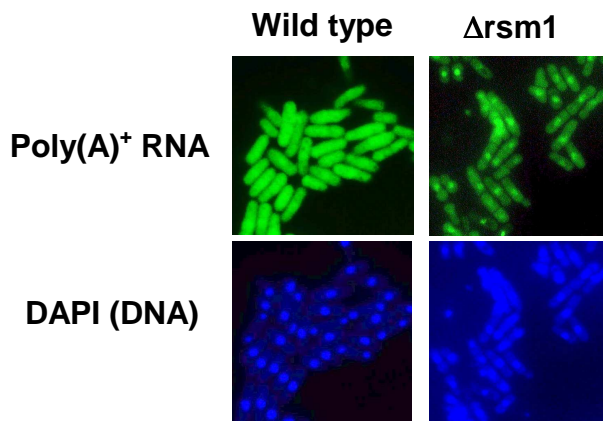
B) Southern blotting analysis of disruptants digested by *Bgl* II/*Pst* I

*rsm1* gene 결손 균주가 죽지 않는 것으로 보아, *rsm1*는 성장에 필수 유전자는 아니라는 것을 알 수 있다. *rsm1* 결손 균주의 성장정도를 알아보기 위해 spot assay를 실시한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 wild type보다 growth가 느렸다. *Rsm1* deletion mutant를 현미경 하에서 관찰해 보면 wild type보다 긴 abnormal한 형태의 cell을 볼 수 있었다. 그리고 plate에 streaking을 하거나 spot assay를 통해 보면 colony의 크기가 균일하지 못하고, 큰 것과 작은 colony가 섞여 있는 것을 볼 수 있었다. 큰 colony와 작은 colony에서 각각 세포들을 취해서 따로 streaking해도 크고 작은 colony가 섞여 나왔다. 이렇게 colony가 균일하게 나오지 못하는 것이 *rsm1* deletion mutants의 pattern이라고 생각되고, 작은 colony만을 골라 새 배지에 2번 정도 계대배양한 후 작은 colony를 따서 현미경 관찰을 하면 긴 형태뿐만이 아니라, fission이 정확히 되지 않는 것, 매우 동그란 형태, 구부러진 형태, 머리가 부푼 형태 등의 비정상(abnormality)을 관찰할 수 있었다. 이것은 YES plate에서 두드러지게 관찰된다. *Rsm1*의 제거는 mRNA export에 혼란을 가져다 주고 그로 인해 생기는 문제의 정도와 심각성은 세포마다 차이가 있을 것이다. 따라서 정도의 차이에 따라 콜로니의 크기와, 세포 모양의 이상 정도가 차이를 보일 것으로 추측된다.



**Fig. 2** *rsm1* deletion mutant shows growth retardation

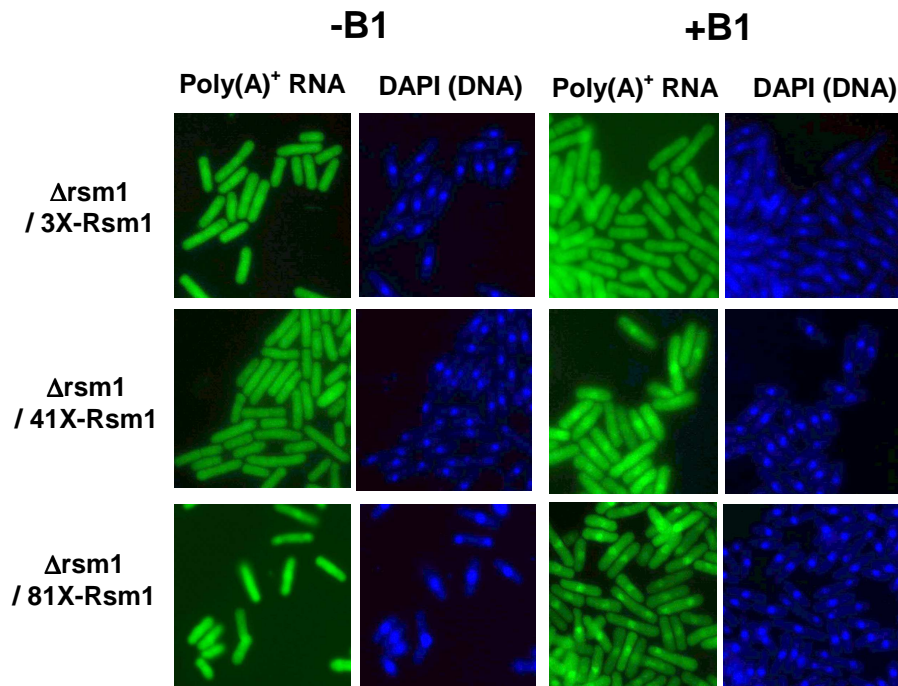
*In situ* hybridization을 통해 *rsm1* 결손 균주의 poly(A)<sup>+</sup> RNA 분포를 관찰하였다(Fig. 3). 야생형 균주에서는 poly(A)<sup>+</sup> RNA가 세포 전체에 균일하게 분포하는 반면, *Rsm1*이 제거된 돌연변이 균주에서는 poly(A)<sup>+</sup> RNA가 핵 안에 축적되는 현상을 볼 수 있었다. 이는 *Rsm1* 유전자가 없으면 mRNA export에 결함이 생기는 것으로 *rsm1*이 mRNA export에 관여하는 factor라는 것을 시사한다.



**Fig. 3 Poly(A)<sup>+</sup> RNA localization in  $\Delta rsm1::kan^r$**

Thiamine의 유무에 의해 발현이 조절되는 *nmt* (no message in thiamine) promoter를 가진 pREP vector에 *rsm1*을 subcloning하여 *rsm1* 결손균주에 형질전환하였다. *nmt* promoters는 thiamine이 존재할 때 발현이 억제되고, thiamine이 없을 때 발현이 유도되는 promoter이다. 3종류의 pREP vector들은 각각 다른 세기의 *nmt* promoter를 가지고 있는데, pREP3X는 가장 큰 세기의 promoter를 가지고 있고, 중간 정도의 발현량을 가진 것은 pREP41X이고, 가장 소량을 발현하는 것이 pREP81X이다. 이 vector들은 모두 selective marker로는 leucine 유전자를 가지고 있다. 각각의 vector들이 형질전환된 세포들을 EMM-L(EMM배지에서 supplement인 adenine, uracile만 들어있음)

과 EMM-L+B1(앞의 배지에 thiamine을 넣어줌)에서 배양한 후, *in situ* hybridization을 통해 mRNA export 정도를 관찰하였다. Thiamine이 첨가된 배지(EMM-L+ B1)에서 *Rsm1*의 발현이 억제되면 pREP41X-*Rsm1*와 pREP81X-*Rsm1*를 가진 *rsm1* 결손 균주는 poly(A)<sup>+</sup>RNA가 핵 안에서 축적되었고, thiamine이 없는 배지에서는 야생형과 비슷하게 mRNA export 결함이 완화되었다(Fig. 4). 즉, pREP81X-*rsm1*에서 발현되는 적은 양의 *Rsm1* 만으로도 mRNA export 결함이 상보(complementation)되는 것으로 보아 *Rsm1*은 소량만으로도 그 역할이 가능하다는 것을 시사한다. 또한 thiamine이 없는 배지에서 pREP3X-*Rsm1*으로부터 과량의 *Rsm1*이 발현되더라도 생장이나 poly(A)<sup>+</sup>RNA의 분포에 이상이 없었다.

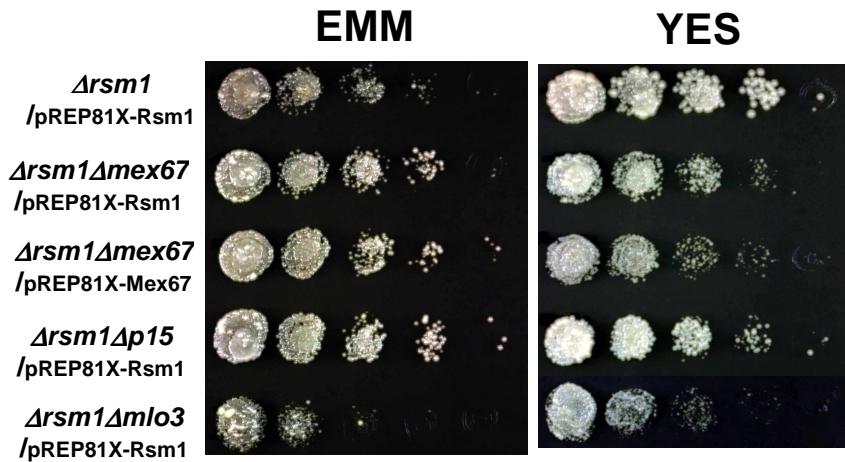


**Fig. 4 Poly(A)<sup>+</sup> RNA localization in  $\Delta rsm1$  mutants transformed with pREP3x-, pREP41x-, pREP81x-*Rsm1* in the absence and the presence of thiamine**

## 2. *Rsm1* 유전자와 *Mex67* 유전자와의 synthetic lethality 여부

두 유전자 각각에 mutation이 따로 일어났을 때는 growth에 영향을 주지 않지만 기능적으로 연관이 있는 두 유전자 모두에 mutation이 생기면 cell이 죽어 버리는 것을 synthetic lethality라고 한다. *Rsm1*과 *Mex67*가 유전적으로 연관이 있는지 알기 위해 *rsm1* 결손 균주인  $\Delta rsm1::kan^r$  ( $h^-$ )과 *rsm1* 결손 균주인  $\Delta mex67::ura$  ( $h^+$ )를 ME plate에서 crossing 시킨 후, random spore analysis (무작위 포자 분석) 방법으로 두 유전자가 모두 결손된 균주를 얻고자 하였다. 발아한 포자들 중에서  $\Delta rsm1\Delta mex67$ 의 double mutant가 있는지 확인하기 위해 각 mutants의 selective markers를 조사하였다.  $\Delta mex67::ura$  allele을 가지고 있는 세포들은 EMM-Ura 배지에서 성장하고,  $\Delta rsm1::kan^r$  allele을 가지고 있는 세포들은 YE+ G418 배지에서 성장할 수 있으므로, 두 유전자가 synthetic lethality를 보이지 않는다면 두 배지에서 동시에 성장하는 균주를 얻을 수 있다. 만약 synthetic lethal 이라면 두 marker를 동시에 만족시키는 것은 나타날 수 없게 된다. 본 실험에서는 두 marker를 동시에 갖는 균주를 찾을 수 없었다. 이 실험 결과는 두 유전자가 synthetic lethal일 가능성을 강하게 암시하지만, 두 유전자가 모두 결손되었을 때 포자 형성이나 발아에 문제가 생겨 두 유전자가 모두 결손된 균주를 얻지 못했을 가능성도 존재한다.

이러한 가능성을 확인하기 위해 *Rsm1*이 *nmt* promoter에 의해 전사가 조절되는 pREP81X-*Rsm1* vector를 갖고 있는 균주( $\Delta rsm1::kan^r$ /pREP81X-*Rsm1*)와  $\Delta mex67::ura$  균주를 cross 시켜 얻은 포자들을 EMM-Leu 배지에서 발아시켰다. 이렇게 pREP81X-*Rsm1* vector를 갖고 두 유전자가 모두 결손된 균주 ( $\Delta rsm1::kan^r\Delta mex67::ura$ /pREP81X-*Rsm1*)를 얻었다. 이 균주는 pREP81X-*Rsm1* vector로부터 *Rsm1*이 발현되는 thiamine이 없는 배지에서 는 생장이 정상이었고, *Rsm1*이 발현이 억제되는 thiamine이 첨가된 배지에서 는 생장이 느렸지만 죽지는 않았다 (Fig. 5).



**Fig. 5 Growth of double mutants in EMM and YES**

위의 결과를 확인하기 위해 pREP81X-Rsm1 vector 대신 pREP81X-Mex67 vector를 갖고, 두 유전자가 모두 결손된 균주 ( $\Delta rsm1::kan^r\Delta mex67::ura/pREP81X-Mex67$ )를 같은 방법으로 얻었다, 이 균주도 thiamine이 첨가된 배지에서 *Mex67* 발현을 억제하였을 때, 성장속도가 pREP81X-Rsm1 vector를 가진 균주 보다 더 느렸지만 죽지는 않았다 (Fig. 5). 이러한 실험 결과들로부터 두 유전자가 synthetic lethality를 보인다고 결론을 내리기는 어려웠다. 그러나 pREP81X vector로부터 *Mex67* 유전자의 발현을 억제하였을 때가 *Rsm1* 유전자를 억제할 때보다 생장이 더 느려지는 것으로 보아, 두 유전자가 모두 결손된 균주는 실제로 synthetic lethal이어서 생장을 못하지만, 발현을 억제하더라도 (thiamine이 첨가된 배지) basal level로 발현되는 *Mex67* 또는 *Rsm1*이 두 유전자가 모두 결손된 균주 ( $\Delta rsm1::kan^r\Delta mex67::ura /pREP81X-Mex67$  or  $pREP81X-Rsm1$ )를 느리게 성장할 수 있도록 할 가능성도 있다. 어느 경우이든 두 유전자의 결합이 생장에 영향을 미치는 것으로 보아, *Rsm1*과 *Mex67*의 유전적 연관성을 알 수

있었다.

### 3. *Rsm1* 유전자와 *p15*, *Mlo3* 유전자와의 synthetic lethality 여부 확인

mRNA export에 관여하는 또 다른 유전자인 *Mlo3*의 결손 균주 ( $\Delta mlo3::karf$ ) 역시 *Rsm1* 결손 균주 ( $\Delta rsm1::ura$ )와 cross를 시켜 두 유전자가 모두 결손된 균주를 얻지 못했기 때문에, 두 유전자의 synthetic lethality를 의심하였다. 그러나  $\Delta rsm1::ura/pREP81X-Rsm1$ 과  $\Delta mlo3::karf$ 을 cross시켜 얻은 균주 ( $\Delta rsm1::ura \Delta mlo3::karf /pREP81X-Rsm1$ )도 성장속도가 매우 느리지만  $\Delta mlo3::karf$  균주의 자체의 성장속도가 매우 느리기 때문에, 두 유전자의 synthetic lethality를 판정하기가 어려웠다 (Fig. 5).

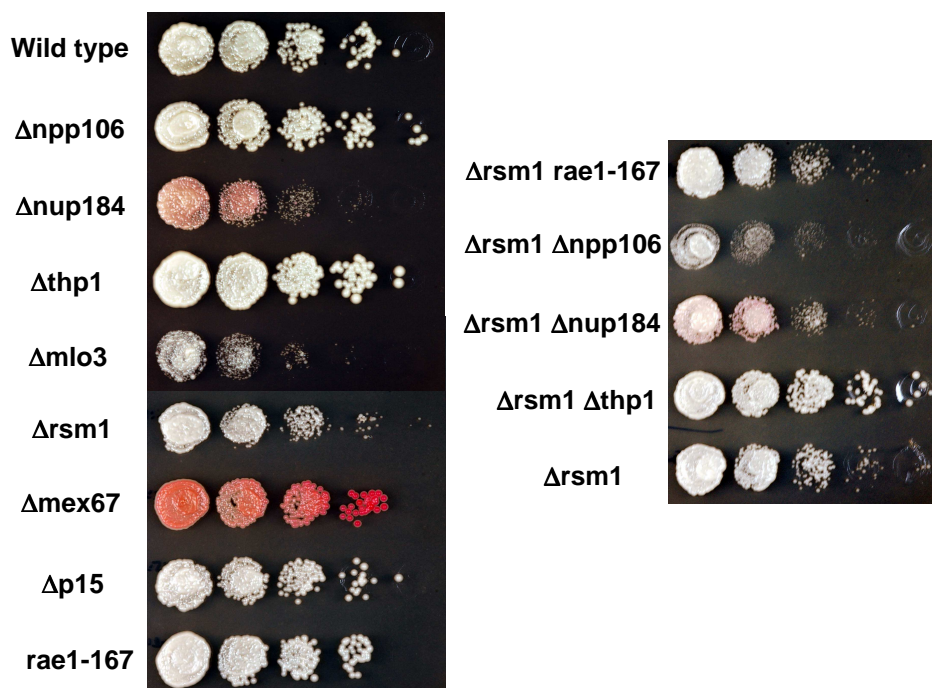
$\Delta rsm1::ura/pREP81X-Rsm1$  균주와  $\Delta p15::karf$  균주를 cross시킨 결과도 synthetic lethality를 보이지 않으며, 이것은 성장에도 큰 영향을 주지 않는다.

### 4. *rsm1* 결손 돌연변이와 mRNA export와 관련 있는 돌연변이 (*rae1-167*, $\Delta npp106$ , $\Delta nup184$ , $\Delta thp1$ )와의 double mutants 제작 및 성장 관찰

$\Delta rsm1::karf$ 과 *rae1-167*,  $\Delta npp106::ura$ ,  $\Delta nup184::ura$ ,  $\Delta thp1::ura$ 를 cross시켜 각각의 double mutants를 얻어서 성장 여부를 관찰한 결과, 이 균주들은 모두 synthetic lethality를 보이지 않았다. 하지만 몇몇 균주들은 재미있게도 성장속도에 차이를 보였다 (Fig. 6).  $\Delta rsm1\Delta thp1$  균주는 YES 배지에서  $\Delta rsm1$  균주보다 빠른 성장을 보였다. 즉, *thp1* 결손 돌연변이 ( $\Delta thp1$ )가

*rsm1* 결손 돌연변이 ( $\Delta rsm1$ )의 성장 결함을 억제(suppression)해서 더욱 빠른 생장이 가능 하도록 한 것이다. 반면에,  $\Delta rsm1\Delta npp106$  균주는 각각의 결손 돌연변이 균주들 보다 매우 느린 성장을 보였다. 즉, *npp106* 결손돌연변이 ( $\Delta npp106$ )가 *rsm1* 결손돌연변이 ( $\Delta rsm1$ )의 성장 결함을 더욱 촉진시켰다.

이처럼 다르게 보여지는 double mutants의 성장속도의 차이는 mRNA export에서 Rsm1 단백질과 위에서 언급한 다른 단백질과의 상호 역할을 유추할 수 있게 한다. 이 단백질들의 정확한 역할은 아직 모르지만 이들과 *rsm1*이 동시에 문제가 생기면, quality control이나 export과정의 어느 단계에서 문제가 생겨 오히려 mRNA의 export가 -부적절한 mRNA라 할지라도- 원할해 짐으로써 생장이 좋아질 가능성이 있다.



**Fig. 6 Growth of mutants involved in mRNA export.**

5. 돌연변이 균주들의 mRNA export 결함 여부

각각의 돌연변이 균주들에서 성장과 mRNA export 결함 정도와의 연관성을 알아보기 위해 *in situ* hybridization을 수행하여 전체적인 poly(A)<sup>+</sup> RNA 분포를 알아보았다. mRNA export에 결함이 없는 정상 세포에서는 mRNA가 단백질로 발현되기 위하여 세포질로 이동하게 되므로, poly(A)<sup>+</sup> RNA 분포가 세포 전체에 균일하게 나타난다. 하지만 mRNA export에 결함을 보이는 돌연변이 균주에서는 mRNA가 세포질로 빠져나가지 못하고 핵 안에 축적된다. 예를 들어 *Rae1-167* 균주는 ts 돌연변이로 28°C에서는 야생형 균주와 같이 정상적인 poly(A)<sup>+</sup> RNA 분포를 보이지만 제한온도인 37°C에서는 성장도 멈추고 poly(A)<sup>+</sup> RNA가 핵 안에만 축적되고 세포질에는 감소한다 (Fig. 7).

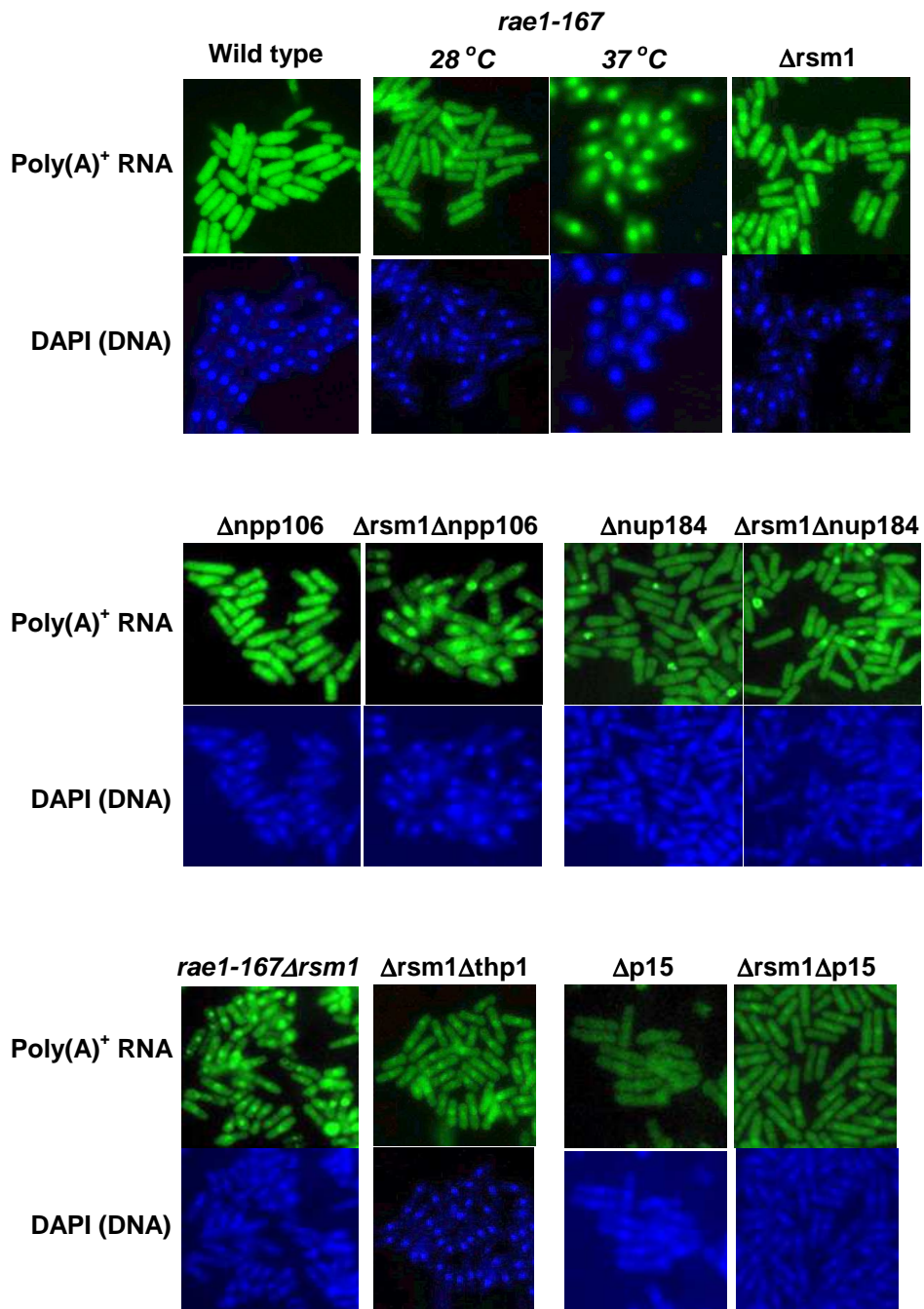
이 실험에서 사용된 단일 돌연변이 (single mutant) 균주들 가운데  $\Delta nup184$  균주와  $\Delta npp106$  균주에서 핵 안에 poly(A)<sup>+</sup> RNA가 축적되는 현상이 보였는데, 이러한 mRNA export 결함은 세포마다 균일하지 못했다. mRNA export 결함을 보이는 세포들에서도  $\Delta nup184$  균주 보다  $\Delta npp106$  균주가 결함 정도가 약했다 (Fig. 7).  $\Delta rsm1\Delta nup184$  double mutation이 되어도 mRNA export 결함 정도는 심해지지 않았다.  $\Delta nup184$  single mutant에서 보여지는 결함 정도만을 보여준다. 하지만,  $\Delta rsm1\Delta npp106$  double mutation에서는 mRNA export 결함 정도가 훨씬 심해졌다. 이러한 실험 결과는  $\Delta rsm1\Delta npp106$  균주의 느린 성장속도와 일치한다. *rae1-167* $\Delta rsm1$  균주는  $\Delta rsm1$  single mutant와 비슷한 정도의 결함을 보였고,  $\Delta rsm1\Delta thp1$  균주는  $\Delta rsm1$  균주 보다 작은 정도의 결함을 보였다 (Fig. 7). Single mutant일 때 거의 정상적인 poly(A)<sup>+</sup> RNA 분포를 보이는  $\Delta p15$ 는  $\Delta rsm1$  과 double mutant가 되어서도 아주 미세한 정도의 결함만을 보였다.

$\Delta mex67\Delta rsm1$  균주들은 어떤 vector를 갖고 있느냐에 따라 mRNA export 결함의 정도가 달라 보였다. pREP81X-Rsm1 vector를 갖고 있는  $\Delta mex67\Delta rsm1$  균주들은 thiamine이 없는 배지(-B1)에서 pREP81X-Rsm1

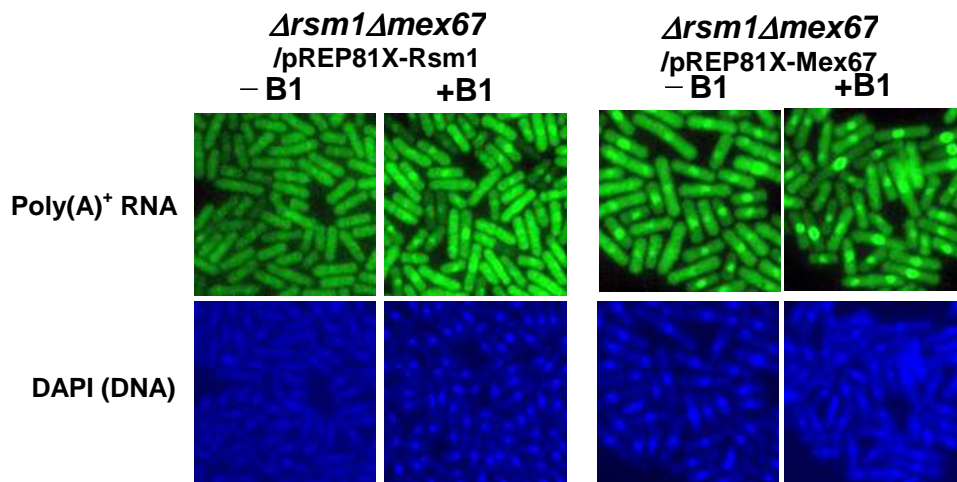
로부터 Rsm1 단백질 발현이 되므로  $\Delta mex67$  균주와 비슷하게 mRNA export 결함을 거의 보이지 않았다. 그러나 thiamine이 있는 배지(+B1)에서 Rsm1 단백질 발현이 억제되더라도 mRNA export 결함이  $\Delta rsm1$  균주만큼 심해지지 않았다.

반면에 pREP81X-Mex67 vector를 갖고 있는  $\Delta mex67\Delta rsm1$  균주들은 thiamine이 있는 배지(+B1)에서 Mex67 단백질 발현이 억제되어  $\Delta rsm1$  균주 보다 강한 mRNA export 결함을 보여 주었다. 또한 thiamine이 없는 배지에서 Mex67 단백질이 발현이 된다 하더라도 mRNA export에 결함을 보인다. 그 정도는 위에서 언급한 pREP81X-Rsm1 vector를 갖고 있는  $\Delta mex67\Delta rsm1$  균주가 thiamine이 있는 배지에서 보여준 mRNA export 결함 정도와 비슷하거나 혹은 좀 더 심해 보인다. 이 차이 나는 결과는 Rsm1 단백질이 소량만 있더라도 mRNA export 결함을 상보할 수 있다는 가능성을 다시 한번 보여준다.

$\Delta rsm1$  돌연변이가 mRNA export에 관여하는 것으로 알려진 다른 유전자들의 돌연변이와 함께 있는 경우, mRNA export 결함을 악화시키던지( $\Delta mex67$ ,  $\Delta npp106$ ), 악화시키지는( $\Delta thp1$ ) 것으로 보아,  $rsm1$ 은 위에서 언급한 다른 유전자들과 함께 mRNA export에 관련이 있음을 암시한다.



**Fig. 7 Poly(A)<sup>+</sup> distribution in mutant strains (continued)**



**Fig. 7 Poly(A)<sup>+</sup> distribution in mutant strains**

## 토 의

핵과 세포질이 분리된 진핵세포에서는 장소에 따라 그 역할을 달리 한다. 유전자를 안정적으로 저장, 발현하기 위해 생겼을 것으로 추측되는 이러한 분리는 여러 요소들을 필요로 하지만 특별히 두 공간 사이를 오고 가는 RNA와 단백질을 옮겨줄 수용체를 필요로 한다. 처음의 생각은 transcription factor는 transcription만 담당하고, processing factor의해 적절하게 processing까지 끝낸 mRNA는 export를 담당하는 수용체에 의해 세포질로 이동하는 것처럼 각 단계가 분리되어 독립적으로 수행될 것으로 생각되었다. 그래서 각각의 factor들만 찾으면 story 전개가 될 거라 기대 했었는데, 최근의 연구들은 한 factor가 다른 factor와 함께 여러 가지 일을 담당하면서 transcription, processing, quality control, export 등이 동시에 일어나고 서로 긴밀히 연관되어 있음을 보여주고 있다. 이 일은 굉장히 효율적이면서 동시에 매우 똑똑해야만 가능한 일이기때문에, 베일에 가려진 복잡한 이 사건이 호기심과 흥미를 유발했다. *Mex67*과 synthetic lethality를 보였던 mutant를 분리, 클로닝하여 찾아낸 *rsm1*은 그 기능을 모르지만 베일의 작은 부분인 새로운 mRNA export factor일 것이라 기대하면서 그 기능을 알기 위해 *rsm1*유전자를 deletion 시켰다. Growth에 essential 하지는 않지만, *in situ* hybridization에서 poly(A)<sup>+</sup> RNA가 핵 내에 축적되는 것으로 보아 mRNA export에 *rsm1*이 관계가 있음을 알 수 있다.

*rae1-167*과 double mutant를 형성해 성장 정도와 *in situ* hybridization을 통한 poly(A)<sup>+</sup> RNA의 분포를 보았을 때, *rae1-167* $\Delta$ *rsm1*은  $\Delta$ *rsm1*의과 비슷한 성장과 mRNA export 결함을 보였다. 즉, Double mutant가 되어도  $\Delta$ *rsm1*과 그 정도의 차이가 없는 것을 비추어 볼 때, *rae1*과 같은 pathway에서 *rsm1*이 역할을 하는 것으로 추측된다.

*rsm1*과 homology가 있는 *S.cerevecia*의 *Pml39*는 unspliced mRNA를 핵 안에 retention하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그리고 *Mlp1*과 함께 같은 pathway에서 그 일을 담당 할 것으로 추측된다 (Palancade *et al.*, 2005). *Pml39*는 quality control과 export 두 가지 역할을 다 담당하고 있는 것이다. 그래서 *pml39* deletion은 unspliced mRNA가 핵으로부터 leakage되게 한다. *rsm1*의 보다 정확한 역할을 알기 위해 위의 논문을 참고하여 *mlp1*, *mlp2*와의 관계를 살펴보는 것이 필요하다고 생각된다. 이 실험에서는 export factor와 nuclear pore protein과의 관계만을 살펴 보았는데 나아가서 splicing factor들과의 관계도 살펴보면 *rsm1*의 기능에 보다 정확한 접근을 할 수 있을 것이라 생각 한다

## 참고문헌

Aguilera, A. (2005) Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 242-250.

Aguilera, A. (2005) mRNA processing and genomic instability. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 737-738.

Bentley, D.L. (2005) Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 251-256.

Buratowski, S. (2005) Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 257-261.

Conti, E. and Izaurralde, E. (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 316-325.

DeCerbo, J. and Carmichael, G.G. (2005) Retention and repression: fates of hyperedited RNAs in the nucleus. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 302-308.

Erkman, J.A., Sanchez, R., Treichel, N., Marzluff, W.F. and

Kutay, U. (2005) Nuclear export of metazoan replication-dependent histone mRNAs is dependent on RNA length and is mediated by TAP. *Rna*, **11**, 45-58.

Fischer, T., Strasser, K., Racz, A., Rodriguez-Navarro, S., Oppizzi, M., Ihrig, P., Lechner, J. and Hurt, E. (2002) The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. *Embo J*, **21**, 5843-5852.

Granneman, S. and Baserga, S.J. (2005) Crosstalk in gene expression: coupling and co-regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly and pre-rRNA processing. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 281-286.

Jimeno, S., Luna, R., Garcia-Rubio, M. and Aguilera, A. (2006) Tho1, a novel hnRNP, and Sub2 provide alternative pathways for mRNP biogenesis in yeast THO mutants. *Mol Cell Biol*, **26**, 4387-4398.

Katahira, J., Strasser, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., Jung, J.U. and Hurt, E. (1999) The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *Embo J*, **18**, 2593-2609.

Kornblihtt, A.R. (2005) Promoter usage and alternative splicing. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 262-268.

Kozak, L., Gopal, G., Yoon, J.H., Sauna, Z.E., Ambudkar, S.V., Thakurta, A.G. and Dhar, R. (2002) Elf1p, a member of the ABC class of ATPases, functions as a mRNA export factor in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **277**, 33580–33589.

Lejeune, F. and Maquat, L.E. (2005) Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 309–315.

Loeillet, S., Palancade, B., Cartron, M., Thierry, A., Richard, G.F., Dujon, B., Doye, V. and Nicolas, A. (2005) Genetic network interactions among replication, repair and nuclear pore deficiencies in yeast. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 459–468.

Lund, M.K. and Guthrie, C. (2005) The DEAD-box protein Dbp5p is required to dissociate Mex67p from exported mRNPs at the nuclear rim. *Mol Cell*, **20**, 645–651.

Marzluff, W.F. (2005) Metazoan replication-dependent histone mRNAs: a distinct set of RNA polymerase II transcripts. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 274–280.

Palancade, B., Zuccolo, M., Loeillet, S., Nicolas, A. and Doye, V. (2005) Pml39, a novel protein of the nuclear periphery required for nuclear retention of improper messenger ribonucleoparticles. *Mol Biol Cell*, **16**, 5258–5268.

Reed, R. and Cheng, H. (2005) TREX, SR proteins and export of mRNA. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 269–273.

Rodriguez-Navarro, S., Strasser, K. and Hurt, E. (2002) An intron in the YRA1 gene is required to control Yra1 protein expression and mRNA export in yeast. *EMBO Rep*, **3**, 438–442.

Saguez, C., Olesen, J.R. and Jensen, T.H. (2005) Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 287–293.

Sommer, P. and Nehrbass, U. (2005) Quality control of messenger ribonucleoprotein particles in the nucleus and at the pore. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 294–301.

Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R. and Hurt, E. (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature*, **417**, 304–308.

Suntharalingam, M. and Wenthe, S.R. (2003) Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev Cell*, **4**, 775–789.

Thakurta, A.G., Gopal, G., Yoon, J.H., Kozak, L. and Dhar, R. (2005) Homolog of BRCA2-interacting Dss1p and Uap56p link Mlo3p and Rae1p for mRNA export in fission yeast. *Embo J*, **24**,

2512-2523.

Thakurta, A.G., Gopal, G., Yoon, J.H., Saha, T. and Dhar, R. (2004) Conserved nuclear export sequences in *Schizosaccharomyces pombe* Mex67 and human TAP function in mRNA export by direct nuclear pore interactions. *J Biol Chem*, **279**, 17434-17442.

Thakurta, A.G., Ho Yoon, J. and Dhar, R. (2002) *Schizosaccharomyces pombe* spPABP, a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Pab1p, is a non-essential, shuttling protein that facilitates mRNA export. *Yeast*, **19**, 803-810.

Thakurta, A.G., Whalen, W.A., Yoon, J.H., Bharathi, A., Kozak, L., Whiteford, C., Love, D.C., Hanover, J.A. and Dhar, R. (2002) Crp79p, like Mex67p, is an auxiliary mRNA export factor in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, **13**, 2571-2584.

Tran, E.J. and Wentz, S.R. (2006) Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell*, **125**, 1041-1053.

Weirich, C.S., Erzberger, J.P., Flick, J.S., Berger, J.M., Thorner, J. and Weis, K. (2006) Activation of the DExD/H-box protein Dbp5 by the nuclear-pore protein Gle1 and its coactivator InsP6 is required for mRNA export. *Nat Cell Biol*, **8**, 668-676.

Yoon, J.H. (2004) *Schizosaccharomyces pombe* rsml

genetically interacts with *spmex67*, which is involved in mRNA export. *J Microbiol*, **42**, 32-36.

Yoon, J.H., Love, D.C., Guhathakurta, A., Hanover, J.A. and Dhar, R. (2000) Mex67p of *Schizosaccharomyces pombe* interacts with Rae1p in mediating mRNA export. *Mol Cell Biol*, **20**, 8767-8782.

# Abstract

## The study on function of *rsml* gene involved in mRNA export in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*

Suky Kang

Department of Biology

Graduate School

Sungshin Women's University

In eukaryote, nucleocytoplasmic transport of macromolecules generally requires soluble transport receptors that specifically recognize and transport their cargoes through nuclear pore complexes (NPC) embedded in the nuclear envelope (Mattaj and Englmeier, 1998; Strasser and Hurt, 1999). These receptors mediate transport through nuclear pore complexes (NPCs), and the directionality of transport is controlled by the small GTPase Ran.

However, the export of mRNA from the nucleus to the cytoplasm is different from the other nucleocytoplasmic transport routes and is significantly complicated.

mRNA export is a conserved process. mRNA is exported by the heterodimeric NXF-NXT class of receptors. The homolog of large subunit (NXF) is Mex67 and the homolog of small subunit (NXT) is Mtr2 in yeast, and whose conserved metazoan counterparts are TAP and p15,

respectively. Although *mex67* is not essential in *Schizosaccharomyces pombe*, spMex67p binds to mRNA and functions to export mRNA.

In order to identify mutations in genes that are functionally linked to *mex67* in mRNA export, three synthetic lethal mutants with the *spmex67* null allele present in *S. pombe* were isolated.

A novel *rsm1* gene was isolated by complementation of the growth defect in one of the synthetic lethal mutants, SLMex1. The *rsm1* gene contains no introns and encodes a 296 amino-acid long protein with the RING finger domain, a C3HC4 in the N-terminal half. The  $\Delta rsm1$  null mutant is viable, but it showed a poly(A)<sup>+</sup> RNA accumulation in the nucleus. Although the combination of  $\Delta rsm1$  and  $\Delta spmex67$  mutations not showd synthetic lethality, don't appear expectation, they were shown to cause more significantly defect in the process of mRNA export.

The other deletion mutants of mRNA export factors ( $\Delta p15$ ,  $\Delta mlo3$ ,  $\Delta npp106$ ,  $\Delta nup184$ ,  $\Delta thp1$ ) and ts mutant (*rae1-167*) not showed synthetic lethality between absence *rsm1*. However, *thp1* deletion mutant suppressed the mRNA export defect of *rsm1* mutation. Also, *npp106* and *mex67* null mutations affected more strongly growth defect in  $\Delta rsm1$ .

These data suggested that *rsm1* is involved in the mRNA export and interacted genetically with mRNA export factors (*mex67*, *thp1*, *npp106*, *nup184*) in *S. pombe*.

## 감사의 마음을 담아...

1 년을 열심히 땀 흘려 일한 농부에게 그 수확물은 자식과도 같다고 하지요. 아마도 학위과정을 밟고 있는 사람에게는 이 논문이 농부의 수확물에 비교할 수 있지 않을까 생각이 듭니다. 영성하여 부족함이 많고, 그래서 아쉬움 또한 크지만 논문이 나오기까지 넘어온 한고비들이 기억나서 제게는 매우 감격적인 일인 것 같습니다. 그리고 이 고비를 지켜 봐주고 마음으로 응원하며 다른 방법으로 함께해준 사람들이 생각이 나서 그 감격이 더 큰 것 같습니다.

먼저는 부족한 논문을 지도하고 심사해주신 선생님들께 감사 드립니다. 2 년의 시간 동안 가족같이 익숙하게 정이 들어버린 우리 선생님, 아버지의 마음으로 세심하게 신경 써 주신 것 저 압니다. 무뚝뚝한 제자가 그때 그때 마음을 표현하지는 못했지만 늘 감사했습니다. 지금은 위스콘신에 계실 정 많으신 김종일 선생님, 편하게 그리고 마음으로 따뜻하게 대해 주셔서 선생님과 함께 한 시간이 즐거웠습니다. 후에 석사과정 시간을 돌아볼 때 선생님과 인연이 좋은 추억으로 기억될 것 같습니다. 선생님 고맙습니다. 언제 배도 유쾌한 전용필 교수님, 바쁜 시간을 쪼개서 부족한 논문을 고쳐주시고 신경 써 주셔서 고맙습니다.

제가 생물학을 사랑할 수 있게 학부 때 가르침을 주셨던 김진일 교수님, 박경숙 교수님, 지금은 정년퇴임을 하신 배인하 교수님, 오용자 교수님 감사합니다. 그리고 특별히 절 예뻐해 주셨던 강혜순 교수님 고맙습니다. 멀리서라도 선생님 웃으시는 모습 보면 저 정말 기뻐요. 건강하세요.

많은 힘과 격려를 보내준 사랑하는 가족 고맙습니다. 늘 가슴에 담겨 있는, 꺼내기도 전에 눈시울부터 붉어지게 하는 말을 해야겠습니다. 꿈이 무엇보다 중요하다고 생각한 고집과, 타협할 줄 모르는 제 성격이 지각 인생을 선택했습니다. 그 과정을 묵묵히 지켜보셔야 했던 엄마의 마음이 얼마나 애달프고 속상하셨을지 압니다. 쉬운 길을 포기하는 딸을 혼내고, 싸울 법도 한데 당신의 생각은 접고 못난 딸의 편이 되어 당신도 어려운 길을 선택한 나의 어머니. 어머니의 사랑을 먹으며 지금까지 왔습니다. 그 귀한 사랑을 받는 제가 누구보다 축복 받은 사람인 걸 압니다. 엄마 이 사랑을 늘 기억하고 감사하면서 좋은 사람이 될게요. 어머니 고맙습니다. 사랑해요. 생각만해도 입에 미소를 머금게 하는 사랑스런 우리 콩이, 어리기만 한 줄 알았더니 어느새 지쳐있는 언니의 식사를 챙겨주고, 계절마다 계절이 바뀌는지도 모르는 언니의 옷장을 정리해 놓고, 콩이가 언젠가부터 언니의 언니가 되어 버렸더구나. 콩아 고마워. 이제 같이 있을 시간이 얼마 없지. 언제나 사랑하는 가족이 너와 함께 한다는 것 잊지 말고, 우리 어디에서든 당당함이 부끄럽지 않은 모습으로 살자.

오랜 시간 동안 나의 지지자가 되어주고, 먼 곳에서 사람들 섬기느라 본인이 고생인데도 착한 심성으로 같이 논문 걱정해주고 진로의 방향도 양보해 주는 나의 선교사님 고마워요.

바쁘다는 핑계로 얼굴도 제대로 보이지 않았는데도, 날 친구로 붙여주는 멋진 친구들 은정, 영인, 분이, 현주, 현정아 고맙다. 내 건강을 나보다 더 맘 써 주는 희숙아 삶의 중요한 순간에 네가 있고 나눌 수 있어서 감사할 때가 너무 많았어. 사랑한다 친구야. 아기 때문에 바쁜 미경이도 내 논문이 완성 되었다는 소식을 들으면 나와 같은 맘으로 기뻐해 줄 것을 믿는다. 내 소꿉지기 희정아 그리고 재익 오빠 무심하고 독립적인 우리가 이제는 잠깐을 보아도 서로의 마음을 읽는 것 같아. 그냥 전해지는 당신들의 마음에 힘을

얻어 갈 때가 많았어. 고맙소. 공부하면서 리더로 섬기는 일이 힘이 들까 조금이라고 배려해 주고 싶으셔서, 집으로 데려다 저녁까지 먹이셨던 우리 전도사님과 사모님 늘 기도해 주신 것 감사합니다.

같은 길을 가고 있는 점점 더 예쁜 사람이 되어가는 아리야 같은 고민을 공유할 수 있어서 무척 좋았다. 실험 때문에 필요한 자료를 구할 때에 귀찮아 하지 않고 챙겨준 것 고맙다. 의사가 되기 위해 열심히 달리고 있는 지혜, 그리고 처음 만났을 때부터 십 년을 보아왔던 것처럼 코드가 맞았던 유미와 승아, 예쁜 사람 3 중 셋트인 당신들이 주는 마음에 내 마음이 풀어져 얼마나 신이 났던지. 볼 때마다 해준 격려와 칭찬 덕에 여기까지 올 수 있었어. 고마워.

한배를 타고 여정을 함께한 순임아, 여행의 동지가 되어 줘서 고마웠다. 크리스마스 때도 같이 학교에 나와 공부하고, 논문작업 때문에 밤을 샜 때 함께 할 수 있었던 사람, 함께여서 어려운 일이 즐거운 일이 됐던 것 같아.

마무리 시기에 내가 힘들어진 것을 알고 바쁜 시간에 잠깐씩 들러 맘을 쓰고, 힘을 주고 간 희경아 고맙다. 마음을 어찌지 못할 때 네 따뜻한 맘이 힘이 된 거 알지! 그리고 학교 밖에서 응원해준 유쾌한 후배 지은과 수아, 돈을 번다고 선배 밥 사주러 학교까지 찾아오고, 혹 소원해 질까 마음에 담아 두었던 얘기 풀어주고 가고 네 맘이 어찌나 고맙던지.. 논문 준비 잘 하라고 응원해 주고, 너희 들의 응원 소리가 여기까지 들리더라. 고맙다.

빡빡한 실험 스케줄과 기준이 높은 실험 조교의 마음을 고맙다고 이해한 착한 녀석들, 그 후에도 지나가다 마주치면 따뜻하게 인사하고 안부를 물어주었던 예쁜 후배들 고맙다. 인연이 되어 또 만나자.

마지막으로 형광 현미경 사용에 도움을 주신 서울대 치대 이승복 교수님과 학생분들 에게도 감사 드립니다.