



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](#)

윤진호 교수지도

석사학위 청구논문

초파리의 후각 학습 및 기억을  
조절하는 X-linked mental  
retardation 연관 유전자 탐색

2014

성신여자대학교 대학원

생물학과

장수연

초파리의 후각 학습 및 기억을  
조절하는 X-linked mental  
retardation 연관 유전자 탐색

윤진호 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2013년 11월

성신여자대학교 대학원

생물학과

장수연

# 인 준 서

장수연의 석사학위 논문으로 인준함.

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

성신여자대학교 대학원

## 논문개요

X-염색체 연관 정신지체(X-linked mental retardation, XLMR)는 인간에서 인지적 장애를 수반하는 대표적인 뇌신경 질환으로 알려져 있다. 현재까지 많은 XLMR 연관 유전자들이 밝혀졌지만, 이들의 돌연변이에 의하여 정신지체가 유발되는 기전에 대한 연구는 미미한 실정이다. 본 학위논문은 초파리를 모델동물로 이용하여 XLMR 연관 유전자의 상동 유전자가 후각 연합기억에 미치는 영향을 분석하였다. 27종의 XLMR 상동 유전자에 대한 RNAi 라인을 초파리 성체 뇌의 학습센터인 mushroombody (MB) 특이적으로 발현시킨 후, 후각 연합 기억의 초기 단계인 학습과 단기 기억의 변화를 조사하였다. 조사한 모든 XLMR 초파리 상동유전자들은 학습과 단기 기억 모두에 영향을 미치지 않음을 밝혔다. 초파리 초기발달시기부터 MB 특이적으로 9종의 XLMR 초파리 상동 유전자의 발현 저하를 유도한 후, 후각 연합 학습을 추가로 조사하였다. 그 결과로서, *S6kII* 유전자가 후각 연합 학습에 필수적임을 규명하였으며 이는 기존의 연구결과와 부합한다.

# 목 차

논문개요	i
목차	ii
표 목차	iii
그림목차	iv
I. 서론	1
II. 실험 재료 및 방법	11
III. 결과	19
1. GeneSwitch GAL4 System을 이용한 성체 Mushroombody에서의 특이적인 발현 유도	19
2. 대상 유전자의 RNAi Strain의 OCT와 MCH의 냄새자극의 농도에 따른 선호도	20
3. 학습과 단기기억에 영향을 미치는 대상 유전자 탐색	23
4. <i>MB-GAL</i> 를 이용하여 후각연합학습에 관여하는 유전자 탐색을 위한 XLMR 연관 대상 유전자	26
5. <i>MB-GAL4</i> 를 이용한 실험의 냄새자극 선호도와 학습에 영향을 미치는 유전자 탐색	29
IV. 토의	35
참고문헌	v
ABSTRACT	xv

## 표 목 차

표 1. 후각 연합학습과 기억에 관여하는 유전자 탐색을 위해 선정된 X-linked Mental Retardation 연관 유전자	15
표 2. 후각연합학습에 관여하는 유전자 탐색을 위한 XLMR 연관 대상 유전자	30

# 그림 목 차

그림 1. 곤충과 포유류의 Olfactory Bulb의 구조	3
그림 2. <i>Drosophila</i> 의 해부학적 후각신경 구조	5
그림 3. 성체 뇌 조직 특이적 발현을 위한 RU486 처리	16
그림 4. Aversive Olfactory Conditioning 과정	17
그림 5. UAS/Gene switch GAL4 system을 이용한 성체 뇌의 Mushroombody에서 특이적인 Switch-On 양상 관찰	21
그림 6. 대상 유전자의 RNAi Strain에서 냄새 자극 OCT와 MCH의 선호도	24
그림 7. 대상 유전자들의 성체 MB에서 발현 저하에 따른 후각연합 학습과 단기 기억 분석 결과	27
그림 8. <i>MB-GAL4</i> 를 이용한 실험의 냄새자극 선호도와 학습에 영향을 미치는 유전자 탐색 결과	32

# I. 서 론

인간의 정신지체 (mental retardation, MR)는 정신적 기능을 담당하는 central nervous system (CNS)의 기능 결함에 의해 일어난다고 알려져 있다 (Luckasson et al., 2002). 최근 분자유전학의 획기적인 발전을 통해 지능의 발달에 영향을 미치는 많은 유전자들이 X염색체 상에 놓여 있다는 것이 밝혀졌다 (Inlow et al., 2004). 이러한 유전자들을 통칭하여 X-연관 정신지체 (X-linked mental retardation, XLMR 또는 X-linked intellectual disability, XLID)라 일컫는다 (Schalock et al., 2007). 현재까지 XLMR의 연관 유전자로 102개의 유전자들이 알려져 있지만 (Stvenson et al., 2012), 이들 유전자가 뇌에서 어떠한 기능을 가지고 어떠한 기전을 통해 인간의 학습과 기억에 영향을 끼치는지는 알려진 바가 거의 없다. 인간에서의 정신지체와 관련한 병리생리학적인 접근은 매우 복잡하며 연구기간이 오래 소요되기 때문에 정신지체에 대한 기전연구 및 연합기억 회로의 활성을 가시화 할 수 있는 효율적인 동물모델의 구축이 요구된다.

곤충의 후각신경계는 포유류와 후각인식, 식별 그리고 학습기작 등 기능적으로 포유류와 유사하다고 보고되었다 (Berry et al., 2008). 해부학적으로 포유류의 후각 정보의 경우, olfactory receptor neuron (ORN)에서 Mitral/Tufted neuron (M/T neuron)을 지나 pyramidal neuron으로 전달되고, 곤충의 경우 ORN을 지나 projection neuron (PN)을 거쳐서 MB 또는 lateral horn으로 전달된다 (Davis, 2004) (그림 1). 후각정보전달 과정 중 거치게 되는 조직으로 ORN 뿐만 antennal lobe (AL)의 glomeruli가 곤충에서도 존재한다 (Shepherd, 1998; Mori, 1999). 이러한

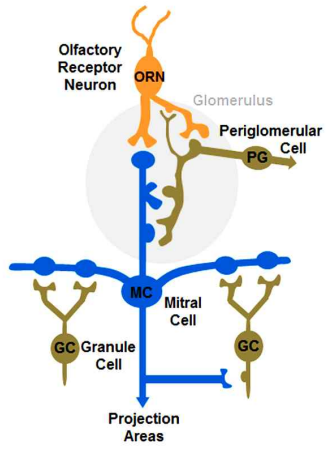
후각신경계의 해부학적 유사성과 3단계의 후각정보전달 구조의 공통점은 고등동물의 후각연합 학습과 기억을 이해하는데 초파리를 동물 모델로 이용한 연구가 매우 중요한 단초를 제공할 것으로 기대하게 한다.

초파리에서 후각정보 전달은 antennal lobe (AL)로부터 mushroombody (MB)까지 3단계를 거치며 전달된다 (Busto GU et al., 2010). 환경에 존재하는 냄새는 olfactory receptor neuron (ORN)의 dendrite 표면에서 발현되는 olfactory receptor (OR)에 도달해, 활동전위와 탈분극을 일으키며 신호전달을 시작한다 (Clyne et al., 1999; Kaupp UB, 2010). 다음으로, 냄새는 ORN의 axon을 통해 AL로 전달되며, AL과 projection neuron (PN)이 함께 형성한 glomerulus에 도달하는데, 이 부위에서의 공간적 패턴형성을 통해 냄새정보가 가공된다. 마지막 단계로, 대략 180개의 PN이 axon을 MB의 calyx 또는 lateral horn (LH)로 뺏어 가공된 후각 정보를 통합하여 전달한다. MB neuron (MBN)은 calyx에서 나온 그들의 axon을 세 가지 각기 다른 부위로 뺏는다 (Aso et al., 2009). 각 부위는  $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  그리고  $\gamma$ 이다.  $\alpha/\beta$ 와  $\alpha'/\beta'$  axon은 각각 두 개의 가지 (branch)로 나뉜다.  $\alpha$ 와  $\alpha'$  가지는 수직의 (vertical) lobe를 구성하고,  $\beta$ 와  $\beta'$  가지는 수평의 (horizontal) lobe를 구성한다.  $\gamma$  neuron은 오직 horizontal lobe로만 뺏는다. 즉, PN을 거쳐 MBN에 도달한 냄새 정보는 calyx로부터 뺏어 나온 각 MB lobe로 전달된다 (그림2).

초파리의 후각연합 학습 및 기억 연구는 이를 위한 연구 방법과 동반해 발전해 왔다 (Quinn et al., 1974). 초파리에서 가장 널리 쓰이는 후각학습 및 기억의 연구방법은 초기의 operant conditioning에서 초파리의 주광성 한계를 극복한 방법인 classical conditioning 이다 (Tully et al., 1985). Classical conditioning의 학습은 냄새와 같은 조절자극 (conditioned stimulus, CS), 그리고 전기충격 (aversive)이나 보상먹이 (

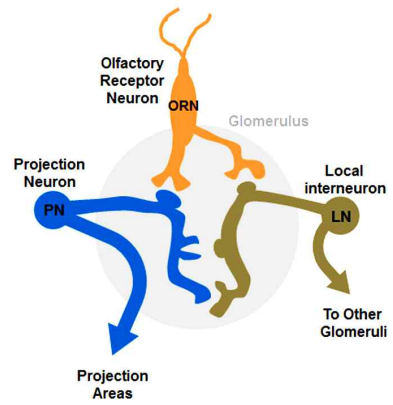
A

Mammals



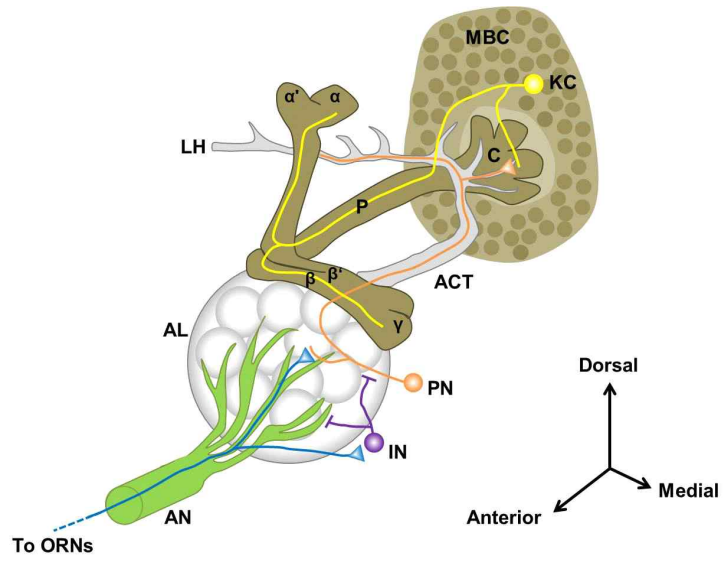
B

Insects



## 그림 1. 곤충과 포유류의 Olfactory Bulb의 구조

곤충과 포유류의 해부학적인 후각연합신경구조의 유사성은 냄새의 인지와 식별 부분에서 비슷한 메커니즘을 공유함. 곤충과 포유류에서 냄새는 후각 수용체 (olfactory receptor, OR) (주황색)의 표면에 닿아 가장 먼저 인식됨. OR에서 인식된 후각 정보는 OR neuron (ORN) (주황색)을 따라 olfactory bulb의 glomeruli (회색 원형) 내부 neuron으로 전달됨. (A) 포유류의 mitral cell neuron (파란색)은 glomeruli 내부에 ORN과 시냅스를 형성하여 후각 정보를 받고 pyramidal neuron로 neuron을 형성하여 전달함. mitral cell neuron은 granule cell (GC), periglomerular (PG)와 GABAergic interneuron을 형성함. GC (갈색)는 mitral cell neuron과 이중으로 interneuron을 형성하여 흥분성 또는 억제성 신호를 전달함. 이 신호는 mitral cell neuron의 활성을 조절함. PG는 dopaminergic neuron으로 ORN의 활성을 조절하며, mitral cell neuron에 억제성 신호를 전달함. (B) 초과리의 projection neuron (PN) (파란색)은 glomeruli 내부로 axon을 뻗어 ORN으로부터 후각 정보를 받고 glomeruli를 지나 다른 부위 (MB 또는 lateral horn)로 후각 정보를 전달하게 됨. local interneuron (LN) (갈색)은 GABAergic inhibition neuron으로 ORN과 PN의 활성을 조절함. 즉, 곤충과 포유류는 ORN에서 냄새의 인지를, 곤충에서 PN과 포유류의 mitral cell neuron은 후각 정보를 받고 전달하고, 곤충의 LN과 포유류의 PG, CG는 GABAergic neuron을 형성하여 ORN과 PN 그리고 mitral cell neuron의 활성을 조절함. (곤충과 포유류의 신경구조에서 색은 서로 유사한 기능을 맡음을 표지함). 그림 1은 Davis (2004) 논문에서 인용하였음.



## 그림 2. *Drosophila*의 해부학적 후각신경 구조

간단히 각각 하나씩의 olfactory receptor neuron (ORN) (파란색), projection neuron (PN) (주황색), interneuron (IN) (보라색) 그리고 mushroombody neuron (MBN) (노란색)이 존재하는 초파리 뇌의 한 반구를 모식도로 나타냄. ORN은 그들의 axon을 antennal nerve (AN)을 통해 antennal lobe (AL)로 뻗음. ORN과 시냅스를 형성하는 PN, IN의 cell body는 AL의 주변에 위치함. PN은 AL의 glomeruli로 axon을 뻗고, antenno-cerebral tract (ACT)를 통해 lateral horn (LH)으로 뻗으며, mushroombody cell (MBC)와 시냅스를 형성하기 위해 calyx로도 뻗음. MBC로부터 뻗어 나온 axon은 pedunculus (P)를 통해 세 가지 타입의 MB lobe들로 뻗음.  $\alpha/\beta$ 와  $\alpha'/\beta'$  axon은 각각 두 개의 가지 (branch)로 나뉨.  $\alpha$ 와  $\alpha'$  가지는 수직의 (vertical) lobe를 구성하고,  $\beta$ 와  $\beta'$  가지는 수평의 (horizontal) lobe를 구성함.  $\gamma$  neuron은 오직 horizontal lobe로만 뻗음. (각 조직이 향한 방향을 나타내기 위해 방향지시를 표기함. Dorsal은 등쪽, Medial은 안쪽, Anterior은 앞쪽). 그림 2는 Busto (2010) 논문에서 인용하였음.

apetitive)와 같은 비조절자극 (unconditioned stimulus, US) 간의 연합으로 이루어진다. 즉, 초파리를 특정 냄새와 전기충격 또는 보상먹이에 동시에 노출한 후, 특정 냄새에 대한 초파리의 반응을 토대로 학습의 효과를 알 수 있다 (Buesto et al., 2010; Roman et al., 2001; Tully et al., 1985). 이러한 olfactory classical conditioning이 지금까지의 초파리의 학습 관련 연구에서 중요한 이유는 인간과 초파리 간의 후각연합신경 유사성 이외에도 다음과 같은 이점이 있다 (Busto et al., 2010). 파리들은 냄새에 대한 학습을 잘 하기 때문에 정확한 학습과 기억의 측정이 가능하다. 또한, 파리에서의 후각 classical conditioning은 냄새와 강화요인 (전기충격 또는 보상먹이) 사이의 연합에 의해 빠르게 이뤄진다. 이러한 classical conditioning의 신속성은 시간의 흐름에 따른 기억의 여러 가지 양상 (memory phase)을 간단하게 연구할 수 있어 매우 유용하다.

초파리의 기억단계 (memory phase)는 short-term memory (STM), intermediate-term memory (ITM) 그리고 long-term memory (LTM)로 나뉘어진다 (Davis., 2011). STM은 학습 후 수 분 내, ITM은 학습 후 3시간 이후로 정의된다. 이 두 memory phase는 학습 후 24시간 내로 소멸되는 반면, LTM은 여러 번 반복되는 spaced conditioning에 의해 학습 후 9시간부터 최소 24시간까지 지속됨이 관찰되었다 (Pascual et al., 2001; Tully et al., 1994; Yu et al., 2006). 이와 동반하여 영상 (imaging) 기술을 사용해, 각각의 기억 단계에서 작용하는 신경세포를 추적하였다 (Brand et al., 1993; Miesenbock et al., 1998; Nakai et al., 2001). 먼저, CS와 US의 연합을 동반한 초기 기억은 AL의 PN과  $\alpha'/\beta'$  MBN 그리고 GABAergic anterior paired paternal (APL) neuron등의 세 가지 신경에서 1시간 내에 이뤄진다. ITM은 dorsal paired medial (DPM) neuron에서 MB vertical lobe로 신경전달이 일어나 학습 후 3시

간 내에 이뤄지며, LTM은 학습한 지 24시간 전, 후에  $\alpha/\beta$  MBN과  $\gamma$  MBN에서 이뤄진다고 보고되었다 (Quinn et al., 1976; Tully et al., 1994; Yin et al., 1994).  $\alpha/\beta$  MBN에서 LTM의 반응은 학습 후 최대 36시간까지,  $\gamma$  MBN에서 최소 48시간까지 존재하여 late-phase LTM (LP-LTM)을 형성한다 (Davis, 2011). 이와 같은 결과들은 초파리에서 olfactory classical conditioning이 MB에서 형성되는 각 memory phase를 연구하는 간단하고 신뢰할 수 있는 방법임을 보여준다.

Dopamine (DA)는 행동, 인지, 학습 그리고 기억을 포함하는 많은 뇌 기능에 관련된 catecholamine 신경전달물질이다. 초파리에서 DA neuron은 aversive US에 반응해 MB에서 CS와의 연합을 형성한다 (Davis, 2005). 해부학적으로 DA neuron은 MB의  $\alpha$  lobe와 synapse를 형성하며,  $\alpha$  lobe에서 전기충격에 의해 DA-dependent calcium signal이 인지된다고 보고되었다 (Mao et al., 2009). 또한 DA neuron에서 신호전달을 방해했을 때, 1시간의 기억 효과가 사라진다고 알려져 있다 (Schwaerzel et al., 2003). 초파리가 발현하는 두 DA receptor는 MB neuron에서 *dDA1* 그리고 *DAMB* gene에 의해 발현된다. *dDA1* receptor가 돌연변이를 갖게 되면 (*dumb*), olfactory classical conditioning이 이루어지지 않으며, 이는 rescue 실험을 통해 증명되었다 (Kim et al., 2007). 또한 MB neuropil 의 PPL1, PPL2ab 은 aversive olfactory learning에 필수적인 DA input을 제공한다고 알려져 있다 (Mao et al., 2009). 이러한 결과들을 바탕으로 초파리에서 MB에 위치한 DA neuron은 US input이 요구되는 aversive olfactory classical conditioning에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

앞에 언급한 연구들을 바탕으로 초파리 MB는 후각연합 학습의 형성과 시간에 따른 기억의 흐름에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있으

며, 현재까지 다양한 유전자의 돌연변이를 통해 학습센터인 MB의 후각 연합학습에 미치는 유전자들은 많이 밝혀져 왔다. MB에서 발현하는 유전자인 *dunce (dnc)* 와 *rutabaga (rut)* 돌연변이에서 초기기억 형성에 장애가 유발됨이 보고되어졌다 (Dudai et al., 1976; Mao et al., 2004; McGuire et al., 2003; Nighon et al., 1991). *fasciclin II (fasII)* 돌연변이에서 STM가 손상됨이 관찰되었으며 (Cheng et al., 2001), 또한 DPM neuron의 *amnesiac (amn)* 돌연변이에서 ITM이 손상되며 LTM까지 영향을 미침이 보고되어 있다 (DeZazzo et al., 1999; Waddell et al., 2000). 그리고 cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB)의 신호를 block 시켰을 경우 LTM이 형성되지 않음이 밝혀졌다 (Perazzona et al., 2004). 그러나 이러한 결과들은 대부분 초기 발생단계부터 MB에서 영향을 미치는 결손 돌연변이를 이용한 결과이며, 초파리의 성체시기에 MB에서 유전자 발현 조절을 유도하여 후각연합 기억에 영향을 미치는 유전자들을 규명한 연구는 아직까지 보고된 바가 없다. 또한 대표적인 뇌신경질환인 인간의 XLMR 상동유전자의 돌연변이를 이용한 후각연합학습과 기억에 관련이 있는 유전자는 밝혀져 있으나 (Bolduc et al 2008; Michel et al., 2004), 성체 뇌의 MB에 국한하여 후각 학습과 기억에 영향을 미치는 상동유전자는 밝혀진 바가 없다.

본 학위논문에서는 초파리를 모델동물로 이용하여 후각 연합기억을 조절하는 신규 유전자를 탐색하고자 하였다. 인간에게서 XLMR 연관 단백질에 대한 초파리의 상동유전자 27개가 발현 저하된 초파리 32라인들을 대상으로 후각 연합기억과 관련한 행동의 이상을 분석하였다. 초파리의 성체 시기에서 MB 조직 특이적으로 발현저하를 유도하여 olfactory aversive classical conditioning을 수행한 결과, 대상이 되었던 XLMR 초파리 상동유전자들은 학습과 단기 기억에 이상을 보이지 않음을 밝혔다.

추가적으로 초파리 초기발달시기부터 MB 조직 특이적으로 9종의 XLMR 초파리 상동유전자의 발현 저하를 유도하여 후각 연합 학습을 조사하였다. 그 결과, *S6kII* 유전자가 후각 연합 학습에 필수적임을 규명하였으며 이는 기존의 연구결과와 부합한다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. *Drosophila* Strains

모든 실험에 사용된 초파리는 Bloomington Stock Center (Bloomington, USA)로부터 얻은 living stock이다. 먼저, 야생형 초파리로는 Canton-S (CS)를 대조군 (Wild Type. WT, positive control) 으로 사용하였다. 실험대상으로는 인간의 XLMR (X-linked mental retardation) 관련 유전자중 초파리 상동유전자로 보고된 27개의 유전자를 선택하였으며 (Lubs et al., 2012), *in vivo* knock-down 실험을 할 수 있는 총 32라인의 *UAS-dXLMR<sup>RNAi</sup>*를 사용하였다 (표 1). 각 유전자의 단백질 발현을 초파리 뇌 조직 특이적으로 조절하기 위해 사용된 GAL4 초파리들은 mushroombody-GAL4 인 *OK107-GAL4* (Aso et al., 2009)와 mushroombody-GeneSwitch-GAL4인 *MB-GeneSwitch-GAL4* (Mao et al., 2004)를 Gregg Roman 으로부터 얻어 사용하였다. 초파리들은 실험 직전까지 25°C 표준조건에서 길러졌다.

실험대상이 될 초파리들은 bottle에서 대량 증폭시킨 후, *UAS-dXLMR<sup>RNAi</sup>*와 *OK107-GAL4* 또는 *MB-GeneSwitch-GAL4* 와 교배 시켰으며, 10 ~ 12일 이후 깨어난 성체를 한 vial 당 60마리씩 옮겨 담아 2일 마다 새로운 vial로 옮겨 건강한 상태를 유지시켜줬으며, 4-6일이 지난 초파리를 이용하여 실험을 진행하였다 (Tully et al., 1985) (그림 3).

## 2. 조직 특이적 발현을 위한 RU486 처리

*UAS-dXLMR<sup>RNAi</sup>* 와 *MB-GeneSwitch-GAL4*를 fresh normal food 에서 교배 시킨 후, 10 ~ 12일이 지나 깨어난 성체 초파리를 500  $\mu$ M RU486 (Sigma, #M8046) food에 48시간을 키워 *MB-GeneSwitch-GAL4* 의 작용을 유도하였다. 이후 다시 fresh normal food로 옮겨 2일후 실험 을 진행하였다 (Mao et al., 2004) (그림 3).

## 3. Aversive Olfactory Conditioning과 Odor Preference Test

Aversive Olfactory condition은 Tully et al (1985)의 실험 방법을 따라 진행하였다. 온도 (25°C), 습도 (70%) 및 광원이 통제된 암실에서 적색등 하에, 나이 및 RU486 먹이조절이 완료된 파리를 2개의 training tube에 각각 60마리씩 옮겨 넣는다. Training tube는 구리그리드가 장착 되고 grass S88X Stimulator 에 연결되어 전기 자극을 줄 수 있으며, 양 끝이 플라스틱 망으로 막혀있어 공기가 흐를 수 있다. 각각의 튜브는 진공펌프에 연결되어 약 30초간 비교적 일정하게 무취한 공기가 흐르게 하여 파리가 적응할 수 있도록 한다 (Resting interval). 30초가 지난 후 각각의 튜브는 mineral oil (Sigma, #330760)에 실험 직전 희석된 odors, 즉 1.5% 3-Octanol (OCT, Merck #8.21859) 또는 0.7% 4-methylcyclohexanol (MCH, Sigma #153095)와 연결됨과 동시에 90V의

전압에 분당 12 pulse의 빈도로 1분간 노출된다 (conditioning phase #1, CS+). 다시 30초간 resting interval을 준 후, OCT에 노출되었던 파리들은 MCH에, MCH에 노출되었던 파리들은 OCT에 전기 자극 없이 노출된다 (conditioning phase #2, CS-). 최종 resting interval 30초 후에, 실험적 필요에 따라 일정시간 경과 후 T-Maze를 사용하여 파리들의 연합기억을 측정한다 (그림 4).

연합기억의 측정 또한 Tully et al (1985)의 방법을 따른다. Conditioning이 완료된 파리들은 T-Maze의 중간 대기위치로 옮겨져, 30초간 일정하고 무취한 공기흐름에 노출된다. 이 동안 T-Maze의 양 팔에 위와 같은 농도로 희석된 OCT와 MCH가 연결된다. 30초가 지난 후 파리를 담고 있는 엘리베이터가 내려져 파리들이 두 odor사이에 선택이 가능하게 되며, 이는 2분간 지속된다. 2분후 엘리베이터는 다시 올려져 파리들의 이동을 차단한다. 양 팔로 이동한 파리들은 이산화탄소 가스로 마취된 후, 그 숫자가 세어진다 (그림 4).

데이터 분석은  $n(\text{CS-})-n(\text{CS+})/n(\text{CS-})+n(\text{CS+})\times 100$  수식을 이용해 PI (performance index) 값을 구하며, 한 세트 (2vial=1set) 를 최소 4 번을 반복해 ( $N\geq 4$ ) 평균을 얻어 대조군과 비교하여 판단한다.

#### 4. 성체 초파리 뇌 조직의 면역 염색

RU486 food에 48시간을 키워 *MB-GeneSwitch-GAL4*의 작용을 유도한 뒤, 다시 fresh normal food로 옮겨 2일이 지난 성체 초파리의 머리

만을 얻어, 차가운 1X phosphate-buffer saline (PBS)에서 해부하여 큐티클과 지방조직을 제거한 뒤, 4% paraformaldehyde로 30분 동안 고정시켰다. 고정된 뇌 조직을 차가운 1X PBS로 15분간 3번 반복하여 세척하였으며, PBT (0,2% Triton X-100)로 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 1차 항체로는 성체 뇌의 mushroombody를 염색하는 anti-Fasciclin II (Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:5)를 4°C에서 overnight으로 반응시켰으며 이후 PBT로 15분간 3번 반복하여 세척하였다. Cy3 가 결합된 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch, 1:200)를 사용하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, PBT로 15분간 3번 반복하여 세척하였으며, 50% glycerol을 이용하여 슬라이드글라스에 마운팅 하였다. 초파리 성체 뇌 조직의 형광 이미지는 LSM 5 pascal microscope (Carl Zeiss)를 이용하여 얻어냈다.

Human gene annotation symbol	Fly ortholog (symbol)	Bloomington RNAi line	Function
PGK1	CG3127 (Pgk)	33632 35220	ENZYME
DMD	CG34157 (Dys)	31553	structure of skeletal muscle membrane
NDP	CG2210(awd)	35145	Neuroectodermal cell interaction
OCRL1	CG3573 (Ocr1)	34722	ENZYME
ATP7A	CG1886 (ATP7)	31083	COPPER TRANSPORT
GDI1	CG4422 (Gdi)	27309 36603	STABILIZED GDP BOUND CONFORMATION
RPS6KA3 (RSK2)	CG17596 (S6kl1)	35583	KINASE SIGNALING PATHWAY
DKC1	CG3333 (Nop608)	36595	CELL CYCLE, NUCLEOLAR FUNCTION
FLNA (FLN1)	CG3937 (cher)	26307	ACTIN BINDING PROTEIN
PAK3	CG14895-PA (Pak3)	35373	Rac/Cdc 42 effector
LAMP2	CG3305 (Lamp1)	35675	Membrane, lysozyme
Neuroigin	CG13772-PA (neuroigin)	28331	Cell adhesion
FANCI	CG13745 (FANCI)	32972	DNA repair
SMC1L1 (SMC1A)	CG6057-PA (SMC1)	34351	Cell cycle, mitotic spindle organization and biogenesis, chromosome segregation
UBE2A	CG2013 (UbcD6)	35476	Ubiquitin-cycle, ubiquitin-protein ligase
BRWD3	CG31132 (BRWD3)	33421	Transcription factor
GRIA3	CG43743 (GluRIB)	27673	Signal transduction, ion transport, glutamate signalling pathway
MED12 (HOPA)	CG8491 (kto)	34588	transcription regulation, RNA polymerase II transcription mediator activity, ligand-dependent nuclear receptor transcripton coactivator activity, vitamin D receptor and thyroid hormone receptor binding
PRPS1	CG6767	35619	Ribonucleotide monophosphate biosynthesis
RPL10	CG17521-PC (RpL10)	29356	Protein synthesis, ribosomal protein
HUWE1	CG8184	36714 36715	Ubiquitin-protein ligase, mRNA transfort
CASK	CG6703 (CASK)	27556 32857 35309	Signal transduction, protein trafficking, synaptic function
MBTPS2	CG8988 (S2P)	35760	Protease activity, activates signaling proteins
RAB39B	CG12156 (Rab39)	25953	Formation and maintenance of synapse
EIF2S3	CG43665 (eIF-2γ)	33401 32914	Initiates translation
THOC2	CG31671-PA (tho2)	28537	mRNA transcription or export

표 1. 후각 연합학습과 기억에 관여하는 유전자 탐색을 위해 선정된 X-linked Mental Retardation 연관 유전자

Human X-linked mental retardation 연관 단백질의 초파리 homolog를 암호화하고 있는 27개 유전자를 선정하여, 이들 유전자에 대한 *UAS-dXLMR<sup>RNAi</sup>* 라인 확보하였으며, 이들 RNAi 라인을 이용하여 후각 기억 능력을 분석함.

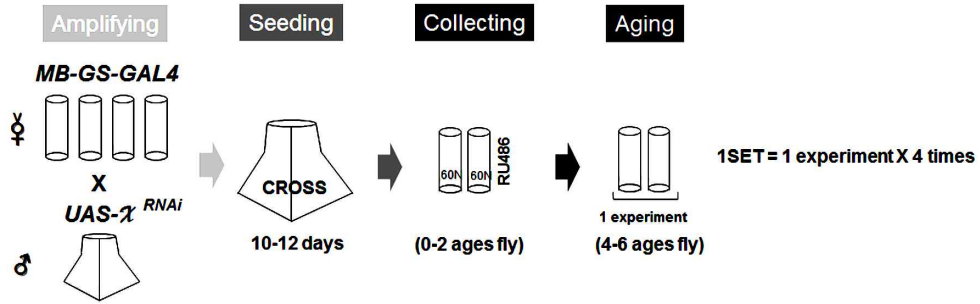
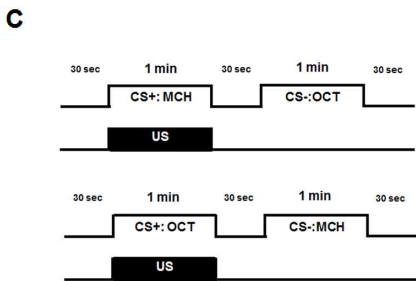
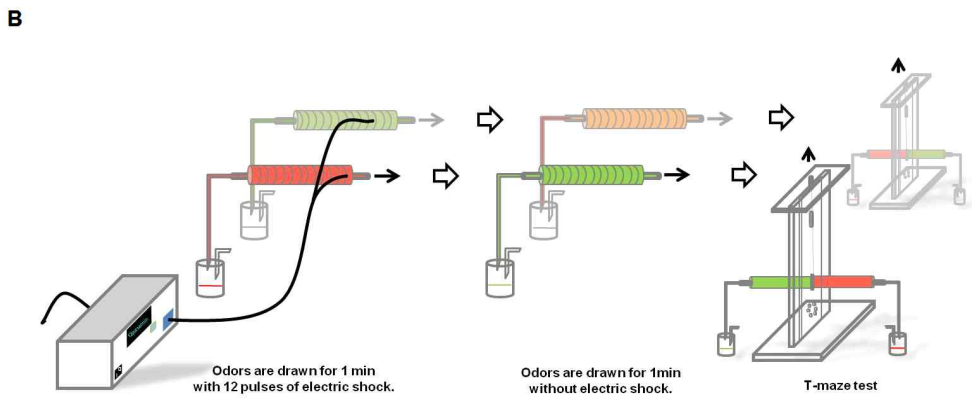
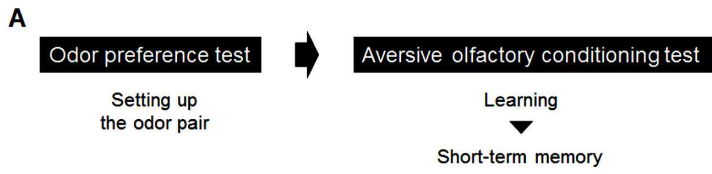


그림 3. 성체 뇌 조직 특이적 발현을 위한 RU486 처리

실험에 사용된 *mushroombody-GeneSwitch-GAL4* (*MB-GS-GAL4*)는 mushroombody에 특이적인 promoter를 사용하여 GAL4 전사인자가 mushroombody에서만 발현될 수 있음. 이렇게 발현된 GAL4 전사인자는 RU486에 의해 활성화된다. 즉, RU486에 의해 활성화된 GAL4 전사인자는 특정유전자 (X)에 대한 RNAi를 발현함으로써 MB에서 특정유전자의 발현을 억제함. 확보된 RNAi 라인을 *MB-GS-GAL4*와 교배한 후 그 자손세대의 초파리 성체에 RU486이 포함된 밥을 제공하여 후각 연합기억 실험에 사용함. 성체 부화 후 4일 또는 6일 사이의 성체를 사용하며, 60마리의 초파리가 하나의 실험군이 되고, 한 번의 실험마다 counter-balance한 방법으로 2개의 실험군이 사용되며, 총 4 번의 실험을 반복하여 평균적인 실험값을 얻게 됨.



#### 그림 4. Aversive Olfactory Conditioning 과정

후각 연합 학습과 단기기억을 실험하기 위한 순서 및 과정. (A) 실험에 사용되는 초파리들의 특정한 냄새자극에 대한 선호도를 보이는지 확인하기 위해 이에 대한 preference test를 시행함. 이 preference test를 통해 OCT와 MCH에 대한 균등한 선호도를 보이도록 각각의 농도를 조절하고, 이 농도를 이용하여 aversive olfactory conditioning test 로 learning 과 STM 을 수행함. (B) Aversive olfactory conditioning을 위하여 stimulator를 이용한 전기충격과 하나의 냄새자극 (녹색)을 동시에 1분간 주고 난 뒤, 냄새자극을 나머지 하나 (빨간색)로 바꾼 후 전기충격 없이 1분간 자극을 주고 나서, 2분간 T-maze 에서 테스트 하게 됨. 각 순서 사이에는 30 초간 공기흐름을 두어 냄새자극에 대한 오차를 줄임. 또한 실험 모두 parallel 하게 수행되어 정확성을 높임. Conditioning 과정에서 learning 과 STM 두 실험의 training 과 testing 그리고 waiting 구간은 차이가 존재함. (C) 다음은 aversive olfactory classical conditioning의 training 을 나타내는 모식도임.

Conditioning 실험은 동일한 개체수의 파리로 reciprocal하게 진행되어 어느 한 odor에 대한 파리의 특징적 반응에 의해 나타날 수 있는 artifact의 형성을 방지함. 각 실험군은 30초간 무취한 공기의 흐름에 노출되어 적응시킨 후, 1분간 전기자극과 하나의 odor에 노출되어 연합학습을 하도록 함. 이후 30초간 다시 무취한 공기흐름에 노출 된 후, 다른 odor에 전기 자극 없이 1분간 노출됨. 마지막 30초간 무취한 공기 흐름을 거친 후, 실험목적에 따라 즉시, 혹은 1시간 후 T-Maze 를 이용해 학습, 또는 기억을 실험함.

### III. 결 과

#### 1. GeneSwitch GAL4 System을 이용한 성체 Mushroombody에서의 특이적인 발현 유도

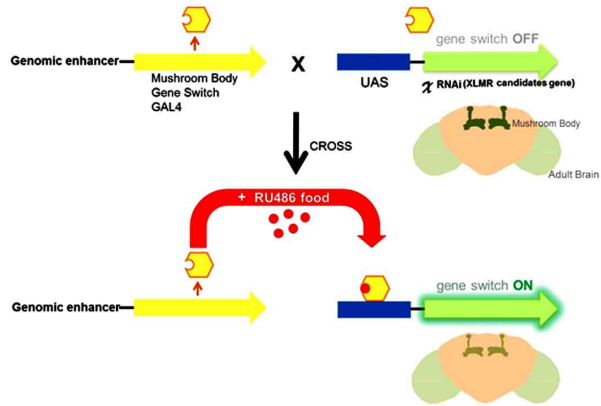
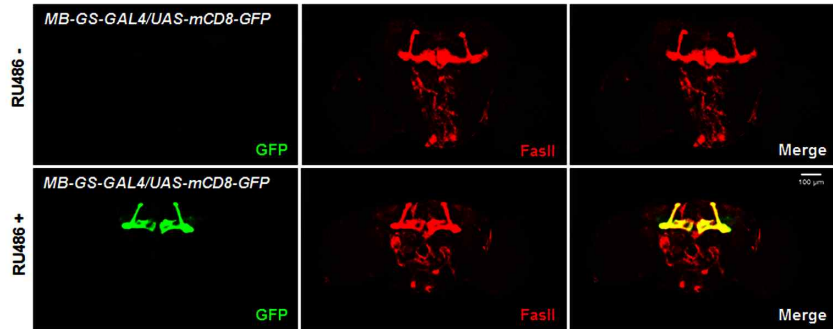
본 실험은 초파리의 성체시기에서 MB 조직 특이적으로 knockdown 현상을 유도하여 기능적으로 후각연합 학습 또는 기억에 영향을 미치는 유전자 탐색을 한 것이 큰 특징이다. 이러한 성체시기에서의 조직 특이적인 발현을 유도하기 위하여, UAS/Geneswitch GAL4 system 을 이용하여 성체의 MB 에서 특이적으로 RNAi를 Switch-On 함으로써 특정 유전자를 knock-down 현상이 일어나도록 하였다. Mushroom body gene-switch GAL4 (*MB-GS-GAL4*)와 확보한 *UAS-dXLMR<sup>RNAi</sup>*을 교배한 후 그 자손세대의 초파리 성체에 RU486이 포함된 밥을 제공하여 후각 연합 기억 실험에 사용하였다. Transcription factor인 Gene-Switch는 progesterone receptor ligand binding domain을 가져 antiprogestin인 RU486 분자가 결합해야만 GAL4 DNA binding domain이 UAS에 결합할 수 있다. 그렇게 되면 *dXLMR* RNAi가 Switch-On이 되어 *dXLMR* gene의 MB 에서의 발현 저하가 일어나게 되는 것이다. 이 과정에서 RU486 약물을 먹이에 넣어 원하는 초파리의 성장시기에 맞게 먹이조절을 하면 시간적 특이성을 유도할 수 있다 (Mao et al., 2004). 이번 실험에서는 성체가 된지 2일째에 48시간 동안 먹이를 통해 RU486을 제공하였으며, 따라서 초파리의 성체시기에서 MB 조직 특이적으로

knock-down 현상을 유도하여 기능적으로 후각연합 학습 또는 기억에 영향을 미치는 유전자를 탐색하고자 하였다 (그림 5A).

그리고 본 연구는 RU486 먹이 의존적인 과정이기에 RU486 먹이가 제대로 만들어졌는지 확인함과 동시에, 교배에 쓰이는 *MB-GS-GAL4* 라인의 확인을 검증하기 위한 실험이 필요하였다. 실험은 *MB-GS-GAL4* 와 *UAS-mCD8-GFP*의 교배 후 동일한 RU486 먹이조건이 끝나고 나서 성체 뇌를 해부하여 Switch-On이 일어났는지를 살폈다. 이 과정에서 MB의 구조의 표지로 FasII를 사용하였다. 초파리에서 FasII는 cell adhesion molecule을 인코딩하며 MB의  $\alpha/\beta$  lobe에서 강하게 발현하고  $\gamma$ 에서는 상대적으로 약하게 발현하면서 단기기억에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Cheng et al., 2001). 실험 결과, MB 세포막에 특이적으로 GFP가 발현되었고 이는 MB를 표지하는 FasII와 colocalization함을 관찰할 수 있었다. 반면, RU486 먹이를 먹지 않으면 MB에 GFP가 발현하지 않았다 (그림 5B). 이러한 결과는 RU486 먹이가 제대로 만들어졌으며, mushroombody에서 특이적으로 발현된 *MB-GS-GAL4*를 충분히 활성화시킴으로써 *UAS-mCD8-GFP* 유전자가 Switch-On 됨을 알 수 있었다.

## 2. 대상 유전자의 RNAi Strain의 OCT와 MCH의 냄새 자극의 농도에 따른 선호도

본 실험은 olfactory의 학습과 기억을 측정하기 위해 aversive classical conditioning 실험기법을 이용하였다. 이 실험기법은 약한 전기

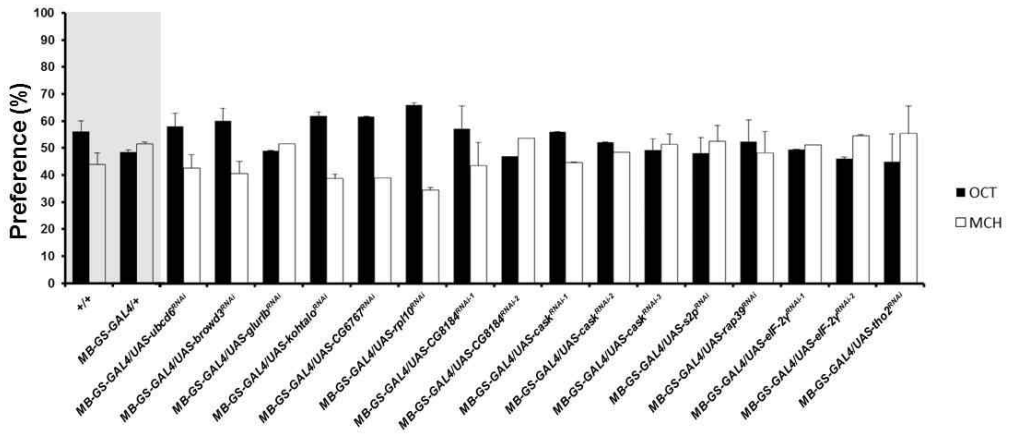
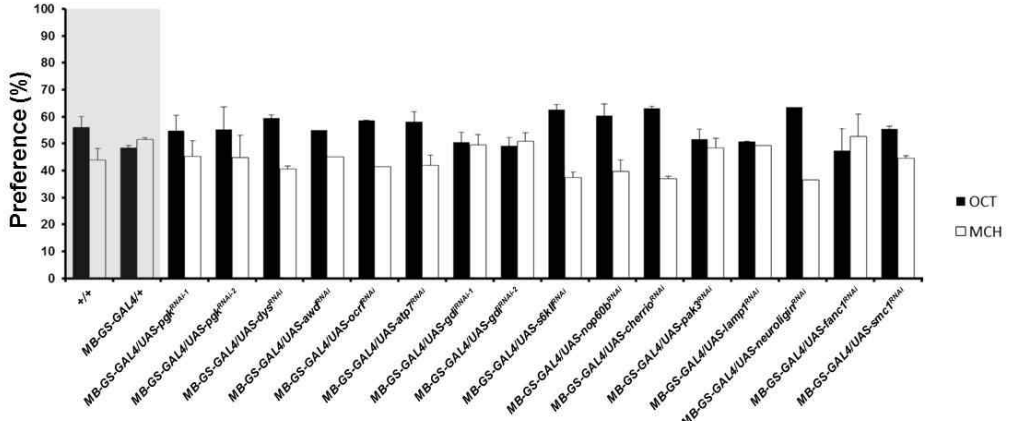
**A****B**

## 그림 5. UAS/Gene Switch GAL4 System을 이용한 성체 뇌의 Mushroombody 에서 특이적인 Switch-On 양상 관찰

실험에 사용된 *MB-GS-GAL4*는 리간드인 RU486에 의해 GAL4 전사인자가 활성화되며, mushroombody에 특이적인 promoter로 인해 해당 유전자의 발현이 mushroombody에서만 일어나도록 조절할 수 있음. (A) *MB-GS-GAL4*와 *UAS-dXLMR<sup>RNAi</sup>*의 교배 후 genomic enhancer 뒤의 gene switch transcription factor 유전자 (노란색 화살표)가 발현하는 단백질 (노란색 육각형)은 progesterone receptor ligand binding domain을 가져 antiprogesterin인 RU486 분자 (빨간 동그라미)와 결합해야만 GAL4 DNA binding domain이 UAS (파란색 바)에 붙게 된다. 그 결과, UAS 뒤의 *dXLMR<sup>RNAi</sup>*이 발현 (진한녹색 화살표)하여 Switch-On이 되면서 knock-down이 유도됨. (B) *MB-GS-GAL4/UAS-mCD8-GFP* 라인을 이용한 실험에서 500  $\mu$ M의 RU486을 처리하였을 때 대조군에 비해 mushroombody 에서의 GFP 발현이 뚜렷해지는 것을 확인함 (녹색). MB를 표지하는 FasII (빨간색)와 발현 양상이 일치함을 보여줌 (노란색). 이러한 발현 양상은 이 실험을 통해, RU486의 농도가 500  $\mu$ M일 때, GAL4가 충분히 활성화되어 mushroombody에서 작용함을 의미함. scale bar, 100  $\mu$ m.

충격과 함께 학습이 된 냄새 자극을 기억하고 초파리가 두 냄새 자극 중에서 어느 쪽으로 회피하는지에 대한 반응을 보고 기억의 척도로 삼는다. 따라서 눈에 띄지 않는 수많은 다양한 제약이 존재하는 행동을 관찰한다는 면에서 여러 가지 조건들이 일정해야만 한다 (Tully et al., 1985). 가장 기본적인 조건 중 하나는 냄새자극이 CS (conditioned stimulation)로 작용한다는 면에서 서로 다른 냄새에 대한 선호도가 비슷해야 한다는 것이다. 두 냄새 중 어느 한 냄새에서 더 회피하는 반응을, 또는 선호하는 반응을 보인다면 실험결과에 영향을 미칠 수도 있기 때문이다. 따라서 두 냄새에 대한 선호가 비슷한 각 냄새의 농도 (%)의 기준을 먼저 잡고 나서 실험이 이뤄져야 할 것이다. 이번 실험에서 쓰이는 냄새자극은 OCT와 MCH이다. 선호도 조사는 *MB-GS-GAL4*와 *UAS-dXLMR<sup>RNAi</sup>* 32 라인의 각 교배를 통해 나온 자손 32 라인과 대조군으로는 CS와 *MB-GS-GAL4*와 CS와의 교배를 통해 나온 *MB-GS-GAL4/CS*가 대상이 된다. 선호도 조사 결과, 1.5% OCT와 0.7% MCH의 조건에서 각 라인들의 선호도가 5:5에서 6:4를 넘지 않는 정도로 비슷했다 (그림 6). 따라서 1.5% OCT와 0.7% MCH의 조건으로 다음 conditioning 실험을 진행하였다. 이 실험은 T-maze의 양쪽 팔에서의 70% 습도와, 25°C 온도, 그리고 광도 조건이 동일한 상태 하에서 각 냄새를 동시에 2분간 노출시켜 이동하는 파리의 수를 세고 비교 분석하여 그래프를 그려 결과를 나타내었다. 모든 RNAi 실험대상은 RU486 먹이 조절도 동일하게 이루어진 상태에서 이 결과를 얻었다.

### 3. 학습과 단기기억에 영향을 미치는 대상 유전자 탐색



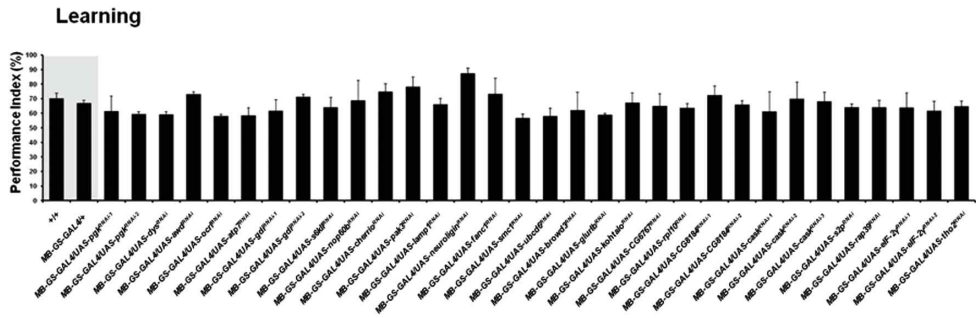
## 그림 6. 대상 유전자의 RNAi Strain에서 냄새 자극 OCT와 MCH의 선호도

Aversive olfactory classical conditioning 실험에 들어가기에 앞서, OCT와 MCH의 선호도를 조사하였음. 대조군 두 라인과 각 RNAi 32 라인에 대해 OCT (검정색 바)와 MCH (흰색 바)의 선호도는 6:4를 넘지 않는 선에서 비슷한 것을 관찰할 수 있음.

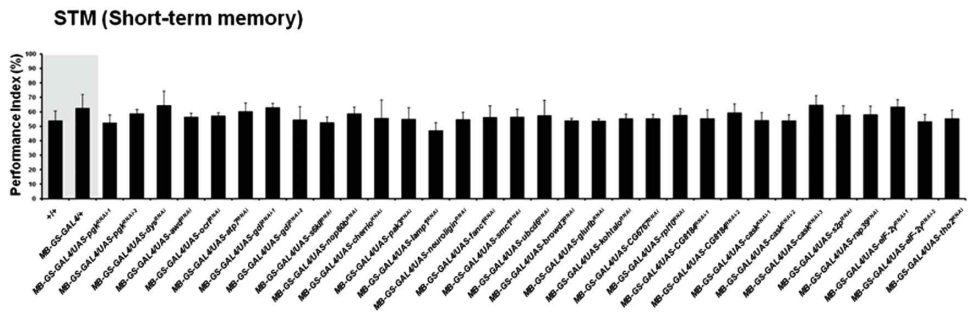
초파리에서 후각연합 학습과 기억에서의 MB의 연구는 활발히 이루어 졌다. MB에서 기능함이 보고된 유전자의 돌연변이를 이용한 실험 결과들을 통해 MB는 후각연합 학습 형성과 단기기억 형성에 필요한 다양한 MBN을 가지고 있고 기억을 유지하고 강화 또는 쇠퇴시키는 데에 필수임이 밝혀졌다 (McGuire et al., 2003). 정신지체에 관련이 있는 XLMR의 초파리에서의 상동 유전자가 학습과 단기기억 (STM)에 미치는 영향을 조사하기 위해 aversive olfactory classical conditioning 실험을 수행하게 되었다. 앞선 실험으로 알아낸 OCT와 MCH의 비슷한 선호도를 만족하는 odor들의 농도 (1.5% OCT와 0.7% MCH)를 바탕으로 실험은 이루어졌다. 이전 냄새자극 선호도 실험과 마찬가지로 대상은 CS, *MB-GS-GAL4/CS*의 두 대조군과 32 라인의 *MB-GS-GAL4/UAS-dXLMR<sup>R</sup><sup>NAi</sup>*이다. Aversive olfactory classical conditioning은 90V 전압의 약한 전기적 충격과 동시 분당 12 pulse로 1분간 냄새와 자극간의 학습을 한번 시킨 후 2분간 냄새를 주어 기억을 테스트하였다. STM의 경우 학습 후 1시간의 휴식기를 가진다. T-maze의 양쪽 팔에서의 70% 습도와, 25°C 온도, 그리고 광도 조건이 동일한 상태에서 양쪽 팔 끝으로 이동한 파리의 수를  $(CS^-)-(CS^+)/((CS^-)+(CS^+))$ 의 수치화 하여 그 값을 그래프로 그렸다 (그림 7). 그 결과, 두 대조군과 마찬가지로 32 라인에서 학습과 단기기억에서 모두 50% 이상의 PI 값을 갖는 것이 관찰되었다. 이는 초파리에서 각 27개의 XLMR 상동 유전자의 성체 MB에서 발현저하를 유도하더라도 학습과 단기기억에 이상을 보이지 않는다고 볼 수 있다.

#### 4. *MB-GAL4*를 이용하여 후각연합학습에 관여하는 유전자 탐색을 위한 XLMR 연관 대상 유전자

**A**



**B**



## 그림 7. 대상 유전자들의 성체 MB에서 발현 저하에 따른 후각연합 학습과 단기 기억 분석 결과

초파리에서 XLMR 상동유전자를 대상으로 한 MB 특이적인 발현 저하를 유도하여 후각연합 학습과 단기기억에 영향을 미치는지 aversive olfactory classical conditioning 실험을 진행함. (A) 학습 결과, 야생형과 *MB-GS-GAL4*가 한 copy 있는 대조군과 비교하였을 때 RNAi 라인 모두 PI 값이 50% 이상인 값으로 학습에 영향을 미치지 않음을 확인함. (B) 단기기억 결과, 학습과 마찬가지로 야생형과 *MB-GS-GAL4*가 한 copy 있는 대조군과 각 32개 대상 라인에서 모두 PI 값이 50% 이상인 값으로 단기기억 이상이 없는 것이 관찰됨. 두 그래프를 비교해 보면 학습과 단기기억의 PI 값에서 단기기억의 PI 값이 대체적으로 낮음을 알 수 있음.

앞선 실험 결과들은 초파리의 성체시기에서만 MB의 기능저하를 유도했다면 이번 실험은 초파리의 초기 발생단계부터 MB에서 대상유전자의 발현저하를 유도하여 실험을 하였다. 초기 발생단계부터 MB의 특정 유전자의 발현저하는 구조적인 결함이나 기억력 손상 등을 초래 한다고 알려져 있다 (Michel et al., 2004). 이에 따라, 이전 연구의 대상이었던 XLMR 연관 대상 유전자 27개 중에서 9개를 선정하였다 (표 2). 선정된 9개의 유전자 중에는 이전 문헌들을 통해 인간이나 mouse를 모델로 하여 memory에 손상이 있다고 알려진 유전자들이 속해있다 (Benoit et al., 2010; Dadamo et al., 2002; Giannandrea et al., 2010; Meng et al., 2005; Putz et al., 2004; Vandewalle et al., 2013; Wu et al., 2007). 11라인의 총 9개 유전자들은 각각 *S6KII*, *lamp1*, *gdi1*, *ngl*, *pak3*, *rab39*, *ubcd6*, *glurIB*, *eIF-2 $\gamma$*  이다. 이들은 인간 XLMR 연관 유전자, *ribosomal S6 Kinase* (RSK), *lysosomal-associated membrane protein 1* (LAMP1), *GDP dissociation inhibitor-1* (GDI1), *neuroligin* (NGL), *p21-activated kinase 3* (PAK3), *RAB39B*, *ubiquitin-conjugating Enzyme E2A* (UBE2A), *glutamate receptor ionotropic AMPA3* (GRIA3), *eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3* (EIF2S3)의 초파리 상동유전자이다. 이 유전자들 중에서 유전자 결손돌연변이 초파리에서 학습장애를 일으키는 유전자인 *S6KII*는 이미 규명이 되어있다 (Putz et al., 2004). 따라서 *S6KII* 라인은 학습에 결함을 보이는 positive 대조군으로 사용하도록 한다.

## 5. *MB-GAL4* 를 이용한 실험의 냄새자극 선호도와 학습에 영향을 미치는 유전자 탐색

Human gene annotation symbol	Fly ortholog (symbol)	Bloomington RNAi line	Function
GDI1	CG4422 (Gdi)	27309 36603	STABILIZED GDP BOUND CONFORMATION
RPS6KA3 (RSK2)	CG17596 (S6kl)	35583	KINASE SIGNALING PATHWAY
PAK3	CG14895-PA (Pak3)	35373	Rac/Cdc 42 effector
LAMP2	CG3305 (Lamp1)	35675	Membrane, lysozyme
Neuroigin	CG13772-PA (neuroigin)	28331	Cell adhesion
UBE2A	CG2013 (UbcD6)	35476	Ubiquitin-cycle, ubiquitin-protein ligase
GRIA3	CG43743 (GluRIB)	27673	Signal transduction, ion transport, glutamate signalling pathway
RAB39B	CG12156 (Rab39)	25953	Formation and maintenance of synapse
EIF2S3	CG43665 (eIF-2γ)	33401	Initiates translation
		32914	

표 2. 후각연합학습에 관여하는 유전자 탐색을 위한 XLMR 연관 대상 유전자

XLMR 연관 대상 유전자 27개 중에서 문헌들을 통해 인간이나 mouse를 모델로 하여 memory에 손상이 있다고 알려진 유전자를 포함, 총 9개를 선정함.

앞선 실험과 마찬가지로 냄새자극의 선호도 조사는 aversive olfactory classical conditioning 실험 전에 수행되어야 하는 과정이다. 실험 대상은 *MB-GAL4 (OK107-GAL4)*와 *UAS-dXLMR<sup>RNAi</sup>* 11 라인의 각 교배를 통해 나온 자손 그리고 negative 대조군으로, CS 와 *MB-GAL4*를 한 copy 가지는 *MB-GAL4/CS*이 되고, positive 대조군으로 *UAS-s6kIIRNAi/MB-GAL4*가 된다. 그러나 교배 과정에서 *UAS-eif-2 $\gamma$ RNAi/MB-GAL4* 자손 (총 2 라인)은 얻을 수 없었다. 즉, 교배 후 bottle에서 *OK107-GAL4*의 balancer를 한 copy 가진 *CID,panCID,Svspa-pol/UAS-eif-2 $\gamma$ <sup>RNAi</sup>*만 살아남았기 때문이다. Bottle 을 살펴보면 더 이상 발달하지 못한 알들이 밥에 많이 쌓여 있었는데 이로써 *MB-GAL4/ UAS-eif-2 $\gamma$ <sup>RNAi</sup>*는 embryonic lethal 일 것으로 추측할 수 있다. 따라서 나머지 성공적으로 얻은 8라인으로 실험 결과를 도출하였다.

선호도 조사 결과, 1.5% OCT 와 0.7% MCH의 농도 조건에서 각 라인들의 선호도가 6:4 를 넘지 않는 정도로 비슷했다 (그림 8A). 이어서 1.5% OCT 와 0.7% MCH 의 농도조건으로 conditioning 실험을 진행하였다. 후각연합 학습의 결과, positive 대조군을 제외한 negative 대조군과 나머지 대상 라인들에서 모두 학습에 이상이 없는 것으로 나타났다 (그림 8B). 게다가 이 결과는 성체시기에서 MB에 특이적인 유전자 발현저하를 유도했을 때의 각 학습 결과 (그림 7A)와 별 차이 없는 것으로 보인다. 따라서 이것으로 *lamp1, gdi1, ngl, pak3, rab39, ubcd6, glurIB* 각 유전자들은 초파리의 MB에서 발달상, 기능상에서 후각연합 학습에 미치는 영향이 적다는 것을 알 수 있다. 그러나 *S6KII* 유전자의 경우, 학습의 결과가 초파리의 발생 시기에 따라 다르게 나타나는데, 이는 MB의 발생 시기에 따른 구조적 형성의 과정에서 학습에 연관하여 *S6KII*의 차별적

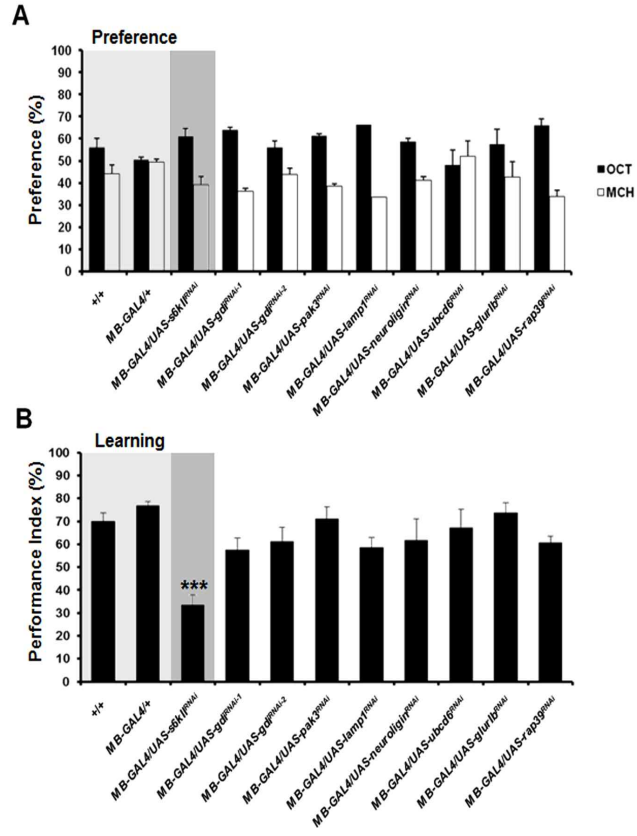


그림 8. *MB-GAL4*를 이용한 실험의 냄새자극 선호도와 학습에 영향을 미치는 유전자 탐색 결과

(A) *MB-GAL4*를 이용한 aversive olfactory classical conditioning 실험에 들어가기에 앞서서 OCT와 MCH의 냄새자극 선호도 조사를 수행. 모든 대조군과 8개의 RNAi 라인에 대해 OCT (검정색 바)와 MCH (흰색 바)의 선호도는 6:4 를 넘지 않는 선에서 유사한 결과가 관찰됨. (B) 학습 결과, negative 대조군과 마찬가지로 모든 8 라인의 PI 값이 50% 이상으로 학습에 이상을 보이는 것을 관찰함. 오직 positive 대조군만이 40%가 채 안 되는 PI 값으로 학습의 장애를 보이는 것을 확인함. 통계적 유의성은 막대그래프의 상단에 표시하였음 (\*\*\*) $p < 0.0001$ ).

기능이 있을 것이라고 추측할 수 있다.

## IV. 토 의

인간에서 CNS의 기능장애는 정신지체를 유발한다. 초파리 역시 CNS를 가지고 있으며 mushroombody (MB)라고 불리는 이곳에서 학습과 기억을 담당하고 있다. 냄새자극을 인식하고 가공하여 CNS로 전달하는 후각연합신경은 인간과 초파리에서 해부학적, 기능적으로 유사성을 갖는다 (Berry et al., 2008). 따라서 인간의 후각 학습과 기억의 연구를 위해 모델동물로 초파리는 매우 탁월하다. 최근 정신지체 유발 유전자가 X염색체에 많이 존재하는 X-linked mental retardation (XLMR) 연관 유전자 102개가 규명되었다. 이에 초파리를 모델로, XLMR 상동유전자의 결함이 일어나면 후각연합 단기 기억이 저하된다는 보고가 있다 (Bolduc et al 2008; Michel et al., 2004). 이미 밝혀진 이 유전자 외에도 초파리에는 26개의 상동유전자가 존재하나, 이 유전자들 중 어떤 유전자가 MB에서 후각연합 학습과 기억에 영향을 미치는지는 아직까지 알려진 바가 없다. 또한, 결손돌연변이가 아닌 초파리 성체시기에서부터 MB에서 유전자 발현 조절을 유도하여 후각연합 학습과 기억에 영향을 미치는 유전자들의 규명은 아직 보고된 바가 없다. 이에 따라, 본 연구자는 성체초파리의 학습센터인 MB에서 XLMR 상동유전자의 발현 저하를 유도하면 연합학습과 기억에 영향을 미칠 것이라고 예상하였다. 따라서 본 연구는 초파리 성체시기 MB에서 후각 연합 학습과 단기 기억에 영향을 미치는 XLMR 신규 유전자 탐색을 목표로 하였다.

27개의 XLMR 초파리 상동유전자 선정에 따라, 성체의 MB에서 발현 저하가 유도된 초파리들을 대상으로 후각연합 학습의 결과, PI 값이 모두 50% 이상으로 학습에 장애를 보이지 않았다. 후각연합 단기 기억

(1시간 기억) 결과도 PI 값이 모두 50% 이상으로 기억에 장애를 보이지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 초기발달시기부터 MB 조직 특이적으로 9종의 XLMR 상동유전자의 발현 저하를 유도하여 후각연합 학습을 추가로 수행하였다. 선행 연구를 통해 본 실험에서 positive control로 선정된 *S6KII* 유전자를 제외한 나머지 8종의 후각 연합 학습 결과, PI 값이 모두 50% 이상으로 학습에 이상을 보이지 않았다.

대상 초파리들 모두 학습과 기억에 장애를 보이지 않는 실험결과는 positive control의 학습결과가 장애를 보이는 것으로 관찰되었을 때 신빙성을 더한다. 추가로 수행된 실험에서 negative control은 *MB-GAL4/UAS-S6KII<sup>RNAi</sup>*이다. 이 유전자는 *ribosomal S6 Kinase (RSK)*의 하나로 포유동물에서 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling에 작용하며 시냅스 가소성과 기억 형성에 연관하여 결손 돌연변이에서 학습과 기억의 손상을 일으킨다고 보고가 되어있다 (Putz et al., 2004). 본 연구에서는 초파리의 초기발생단계부터 MB에서 *S6KII*의 발현을 저하 시켰을 때 40% 미만의 PI 값으로 학습효과가 현저히 줄어드는 것을 관찰하였고, 이는 기존의 연구결과와 부합한다. 선행연구에서는 null mutant를 사용하여 얻은 결과이지만 본 연구에서는 MB조직에서만 특이적인 knockdown을 유도하였을 때 학습에 장애를 보였다는 점에서 가치가 있다. 또한 초기 발달시기가 아닌 성체시기에 국한하여 MB에서 *S6KII* 발현저하를 유도한 결과는 학습에 장애가 없었다. 이것은 초파리에서 초기부터 성체까지 발생 시기를 거치며 MB구조가 형성될 때 일어난 변화가 유도한 학습결과의 차이라고 추측할 수 있다. 초기 MB는  $\gamma$  neuron이 가장 먼저 형성되고 다음으로  $\alpha'/\beta'$  neuron,  $\alpha/\beta$  neuron이 형성된다. 이 과정에서  $\gamma$  neuron의 remodeling이 일어나는데, 초기 larva에서 peduncle과 dorsal, medial부위에서 모두 neuron을 형성한다. 이후

adult시기에서는 dorsal부위를 제외하고 모든 부위에서 재 생성되면서 완성된  $\gamma$  neuron이 형성된다고 알려져 있다 (Lee et al., 2000). 또한  $\alpha'/\beta'$  neuron은 acquisition의 형성에 관여하는 것으로 알려진 바가 있다 (Wang et al., 2008). 그리고 실험에 사용된 *MB-GAL4*는 *OK107-GAL4*로 MB의 모든 neuron에서 발현하는 GAL4 line이다 (Aso et al., 2009). 이러한 연구를 토대로, S6KII의 발현저하가 초파리의 발생 시기에 따라서 다른 학습효과를 보이는 것은 초기 larva에서 생성되었던 dorsal부위의  $\gamma$  neuron에서 S6KII의 발현저하가 뒤이어 생성되는  $\alpha'/\beta'$  neuron에 변화를 일으켜 학습의 손상을 유도하고, 이미 성체가 된 초파리에서는  $\alpha'/\beta'$  neuron의 형성이 끝나 학습 손상을 비교적 덜 영향 받았던 것이 아닐까 추측할 수 있다.

추가로 수행된 연구에서 교배를 통해 얻은 실험대상 중에서 *MB-GAL4/UAS-eIf-2 $\gamma$ <sup>RNAi</sup>*은 얻을 수 없었다. *OK107-GAL4*의 balancer를 한 copy 가진 *UAS-eif-2 $\gamma$ <sup>RNAi</sup>/CID,panCID,Svspa-po1*만 살아 남고 bottle에서 더 이상 발생하지 못한 알들이 쌓여 있는 것을 관찰함으로써 *MB-GAL4/UAS-eif-2 $\gamma$ <sup>RNAi</sup>*는 embryonic lethal라고 추측할 수 있다. 그러나 성체시기 MB에서 eIf-2 $\gamma$  발현저하를 유도했을 경우, *MB-GS-GAL4/UAS-eIf-2 $\gamma$ <sup>RNAi</sup>*는 살아남아 학습과 단기 기억의 실험을 수행할 수 있었다. eif-2 $\gamma$ 는 protein synthesis의 초기과정에서 GTP와 transcription initiator tRNA의 complex를 형성하여 40S ribosomal subunit에 binding하는 protein coding gene으로 translation의 initiation에 필요한 gene이어서 eif-2 $\gamma$ 의 결손은 치사가 일어난다고 익히 알려져 있다. 따라서 초파리 발생초기의 MB 조직에서 eif-2 $\gamma$ 의 발현저하는 알에서의 발생에 치명적인 손상을 가지고 오는 것을 알 수 있다.

행동 연구 실험의 경우 다양한 환경적인 요인이 학습 및 기억에 관련된 실험 결과에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 본 연구자는 기본적인 조건과 습득한 몇 가지 조건들에 맞춰 모든 실험을 수행하였고 그 조건들은 다음과 같다. 첫째. UAS/GAL4 system을 이용한 연구이므로 RU486 food가 제대로 만들어져서 Switch-On을 작동시키는지 항상 그 양상을 확인하고 olfactory conditioning을 수행하였다. 둘째. olfactory conditioning은 항상 온도 25℃와 습도 70%가 유지되는 항온항습실에서 수행되었다. 극심한 온도를 넘나드는 계절인 여름과 겨울에는 특히 온도와 습도의 유지에 주의하였다. 셋째. 주광성에 예민한 초파리를 다루기 때문에 실험결과에 영향을 덜 미치게 하기 위해 항상 적색등 아래에서 실험하여 조도가 같게 유지했다. 넷째. 냄새자극이 실험요인이기 때문에 실험이 이뤄지는 곳의 환기를 자주 시켜주어 잔향이 사라진 무향의 상태로 유지시켜 주었고, 냄새시약을 제조할 때도 실험이 일어나는 공간과 별개의 공간에서 수행하였다. 다섯째. 수면부족이 단기 기억 손상을 가져 온다는 보고가 있어 (Li et al., 2009) 양육 incubator의 밖의 조명을 끄으로써 최소 8시간 이상씩 수면시간을 주었다. 또한 수면부족 외에도 다양한 스트레스가 학습에 영향을 미칠 것이라고 예상되어 실험대상의 모든 초파리들을 살살 다루어 충격을 최소화 하였다. 여섯 번째. 대체로 초파리의 학습효과와 기억력이 9시-16시 에 가장 뛰어난 경향을 알게 되었고 되도록 연구가 저 시간 내에 수행되도록 하였다. 일곱 번째. 냄새자극 선호도는 정해놓은 냄새농도 기준을 항상 따르지 않는 경우가 있다. 따라서 매 conditioning test 수행 전에, 선호도 조사를 먼저 수행 (N>2) 하여 conditioning 결과의 오차를 피하였다. 여덟 번째. 냄새시약은 모두 휘발성이 강하고 빛과 열에 약하므로 장기보관 시에 건조하고 어두운 공간에 sealing 하여 보관하였다. 또한 degradation의 가속 때문에 미리 농도에 맞게 제조해 놓은 시약은 어느 순간 실험결과에 영향을 끼쳤다. 따라서

제조할 때마다 아주 소량씩 원액을 덜어서 새로 만들어 실험에 사용했다. 이외에도 시행착오를 범할 때에 조건들을 정하여 실험에 오류를 줄여 연구 결과의 신뢰도를 높이고자 하였다.

결과에 제시하진 않았지만, 본 연구의 실험결과를 뒷받침 하는 다양한 검증실험들이 수행되었다. 첫째, 전기충격 US에 대한 aversive반응 (shock reactivity)이 제대로 이뤄지는지와 각 냄새자극 인지 (olfactory acuity)를 하고 있는지에 대해 CS와 *MB-GS-GAL4/CS*을 대상으로 확인해 보았다. 먼저 shock reactivity는 T-maze의 한 쪽에만 전기충격을 주고 다른 한 쪽은 전기충격 없이 conditioning test 실험과 같은 조건과 방법으로 1분간 측정 하였다. 그 결과, 모두 80-90% 정도로 높은 전기충격에 대한 회피반응을 보였다 (N>4). 둘째, Olfactory acuity 는 shock reactivity와 같은 방법으로 전기충격대신 각 냄새를 주고 냄새를 피해 공기 (air)를 선택하는 행동을 관찰한다. 그 결과, 1.5% OCT와 0.7% MCH에 대해 모두 80-90%의 인지반응을 보였다 (N>4). 이렇게 확인된 결과들은 aversive olfactory classical conditioning을 바탕으로 이뤄진 연구에서 기본적인면서 필수적인 검증이라고 할 수 있다. 그러나 실험대상 모든 초파리에서 검증하지 못한 점은 본 연구의 약점이다. 세 번째, UAS/GAL4 system을 이용한 연구이기 때문에 RNAi 32라인들을 대상으로 mRNA양이 MB에서 특이적으로 knockdown 되었음을 확인하는 실험이 필요하다. MB특이적인 knockdown 현상을 관찰하기엔 MB가 매우 작은 조직이기에 *DA-GAL4*를 이용해 초파리 전체 몸 조직에서 knockdown을 유도해 보다 더 확실하게 knockdown 현상을 확인 할 수 있다. UAS-lamp1 *DA-GAL4/RNAi*와 *DA-GAL4/UAS-neuroigin<sup>RNAi</sup>* 두 실험군과 *DA-GAL4/+* 대조군을 대상으로 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 두 실험군에서 대조군보다 mRNA 양이 감소함을 확인함으로써

RNAi라인의 efficiency를 검증할 수 있었다. 이 검증실험 역시, 모든 RNAi라인에 대해 수행되지 못하여 본 연구에 약점이 된다. 네 번째. UAS/GAL4 system을 이용한 연구인만큼 RU486 food 자체가 후각연합 학습과 단기기억에 영향을 미치지 않을까 우려되어 후각연합 학습과 단기기억에 정상반응을 보이는 CS를 대상으로 RU486 food를 먹이고 학습과 기억을 측정하였다. 그 결과, 학습은 PI 값이 69.05%, 단기기억은 PI 값이 57.75% 로 두 측정값 모두 normal food를 먹었을 때와 비슷한 값이었고, 학습과 단기기억 장애가 없는 것을 확인했다 (N > 4). 이러한 검증은 RU486 food이 후각연합 학습과 단기 기억에 적어도 negative영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

이러한 다양한 검증실험들과 함께 초파리에서 성체시기에서부터 MB조직 특이적으로 XLMR 상동유전자의 발현저하를 유도하여 후각연합 학습과 단기 기억에 이상을 보이지 않는 결과가 검증되었다. 이러한 본 연구의 실험결과는 학습과 단기 기억에 변화가 없음이 확인된 26개의 XLMR 초파리 상동유전자들은 memory phase에 따라 MB의 기억 유지 기능이 더 오랜 시간 요구되는 기억의 단계인 중기 기억 및 장기 기억에 관여할 가능성이 있음을 제시하는 바이다.

## 참 고 문 헌

Aso Y, Grübel K, Busch S, Friedrich AB, Siwanowicz I, Tanimoto H. (2009). The mushroombody of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J Neurosci.* 23(1-2), 156-172.

Benoit CE, Rowe WB, Menard C, Sarret P, Quirion R. (2010). Genomic and proteomic strategies to identify novel targets potentially involved in learning and memory. *Trends Pharmacol Sci.* 32(1), 43-52.

Berry J, Krause WC, Davis RL. (2008). Olfactory memory trace in *Drosophila*. *Prog Brain Res.* 169, 293-304.

Bolduc FV, Bell K, Cox H, Broadie KS, Tully T. (2008). Excess protein synthesis in *Drosophila* fragile X mutants impairs long-term memory. *Nat Neurosci.* 11(10), 1143-1145.

Brand AH, Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.

Development. 118, 401-415.

Busto GU, Cervantes-Sdoval I, Davis RL. (2010). Olfactory learning in *Drosophila*. *Physiology*. 25, 338-346.

Cheng Y, Endo K, Wu K, Rodan, AR, Heberlein U. Davis RL. (2001). *Drosophila* fasciclinII is required for the formation of odor memories and for normal sensitivity to alcohol. *Cell*. 105, 757-768.

Clyne PJ, Warr CG, Freeman MR, Lessing D, Kim J, Carlson JR. (1999). A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron*. 22, 327-338

D'Adamo P, Welzl H, Papadimitriou S, Raffaele di Barletta M, Tiveron C, Tatangelo L, Pozzi L, Chapman PF, Knevett SG, Ramsay MF, Valtorta F, Leoni C, Menegon A, Wolfer DP, Lipp HP, Toniolo D. (2002). Deletion of the mental retardation gene *Gdil* impairs associative memory and alters social behavior in mice. *Hum Mol Genet*. 11(21), 2567-2580.

Davis RL. (2004). Olfactory learning. *Neuron*. 44, 31-48.

Davis RL. (2005). Olfactory memory formation in *Drosophila*: From molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci.* 28, 275–302.

Davis RL. (2011). Traces of *Drosophila* memory. *Neuron.* 70(1), 8–19.

DeZazzo J, Xia S, Christensen J, Velinzon K, Tully T. (1999). Developmental expression of an *amn*<sup>(+)</sup> transgene rescue the mutant memory defect of amnesiac adult. *J. Neurosci.* 19, 8740–8746.

Dudai Y, Jan YN, Byers D, Quinn Wg, Benzer S. (1976). *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73, 1684–1688.

Giannandrea M, Bianchi V, Mignogna ML, Sirri A, Carrabino S, D'Elia E, Vecellio M, Russo S, Cogliati F, Larizza L, Ropers HH, Tzschach A, Kalscheuer V, Oehl-Jaschkowitz B, Skinner C, Schwartz CE, Gecz J, Van Esch H, Raynaud M, Chelly J, de Brouwer AP, Toniolo D, D'Adamo P. (2010). Mutations in the small GTPase gene RAB39B are responsible for X-linked mental retardation associated with autism, epilepsy, and macrocephaly. *Am J Hum Genet.* 86(2), 185–195.

Inlow JK Restifo LL. (2004). Molecular and comparative genetics of mental retardation. *Genetics*. 166, 835-881.

Kaupp UB. (2010). Olfactory signalling in vertebrates and insect: differences and commonalities. *Nat Rev Neurosci*. 11, 188-200

Kim YC, Lee HG, Han KA. (2007). D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila*. *J Neurosci*. 27, 7640-7647.

Lee T, Marticke S, Sung C, Robinow S, Luo L. (2000). Cell-autonomous requirement of the USP/EcR-B ecdysone receptor for mushroom body neuronal remodeling in *Drosophila*. *Neuron*. 28(3), 807-818.

Li X, Yu F, Guo A. (2009). Sleep deprivation specifically impairs short-term olfactory memory in *Drosophila*. *Sleep*. 32(11), 1417-1424.

Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE. (2012). Fragile X and X-linked intellectual disability: four decades of discovery. *Am J Hum Genet*. 90(4), 579-590.

Luckasson R, Borthwick-Duffy S, Buntix WHE, Coulter, DL, Craig EM, Reeve A, Schalock R, Snell ME, Spitalnik DM, Spreat S, Tassé MJ. (2002). Mental retardation: Definition, classification, and systems of supports 10th edn. American Association on Mental Retardation: Washington DC.

Mao Z, Roman G, Zong L, Davis RL. (2004). Pharmacogenetic rescue in time and space of the rutabaga memory impairment by using Gene-Switch. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(1), 198-203.

Mao Z, Davis RL. (2009). Eight different type of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroombody neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. Front Neural Circuits. 3, 5.

McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Masumoto K, Davis RL. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. Science. 302(5651), 1765-1768.

Meng J, Meng Y, Hanna A, Janus C, Jia Z. (2005). Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. J Neurosci. 25(28), 6641-6650.

Michel CI, Kraft R, Restifo LL. (2004). Defective neuronal development in the mushroom bodies of *Drosophila* fragile X mental retardation 1 mutants. *J Neurosci.* 24(25), 5798–809.

Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature.* 394, 192–195.

Mori K, Nagao H, Yoshihara Y. (1999). The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science.* 286, 711–715.

Nakai J, Ohkura M, Imoto K. (2001). A high signal-to-noise  $\text{Ca}^{2+}$  probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 19, 137–141.

Nighon A, Healy M, Davis RL. (1991). The cAMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila* dunce gene is concentrated in mushroom body neuropil. *Neuron.* 6, 455–467.

Pascual A, Preat T. (2001). Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science.* 294, 1115–1117.

Perazzona B, Isabel G, Preat T, Davis RL. (2004). The role of cAMP response element-binding protein in *Drosophila* long-term memory. *J. Neurosci.* 24(40), 8823-8828.

Putz G, Bertolucci F, Raabe T, Zars T, Heisenberg M. (2004). The S6KII (rsk) gene of *Drosophila melanogaster* differentially affects an operant and a classical learning task. *J Neurosci.* 24(44), 9745-9751.

Quinn WG, Dudai Y. (1976). Memory phases in *Drosophila*. *Nature.* 262 (5569), 576-577.

Quinn WG, Harris WA, Benzar S. (1974). Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71, 708-712.

Roman G, Davis RL. (2001). Molecular biology and anatomy of *Drosophila* olfactory associative learning. *BioEssays.* 23, 571-581.

Schalock RL, Luckasson RA, Shogren KA, Borthwick-Duffy S, Bradley V, Buntinx WH, Coulter DL, Craig EM, Gomez SC, Lachapelle Y, Reeve A, Snell ME, Spreat S, Tassé MJ, Thompson JR, Verdugo MA, Wehmeyer ML, Yeager MH. (2007). The renaming of

mental retardation: understanding the change to the term intellectual disability. *Intellect Dev Disabil.* 45, 116-124.

Schwaerzel M, Monastirioti M, Scholz H, Friggi-Grelin F, Birman S, Heisenberg M. (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 23, 10495-10502.

Shepherd GM, Greer CA. (1998). Olfactory bulb. In the synaptic organization of the brain. Oxford: Oxford University Press. pp, 159-203.

Stvenson RE, Schwartz CE, Rogers RC. (2012). Atlas of X-linked intellectual Disability Syndromes. NewYork. Oxford University Press.

Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M. (1994). Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell.* 79, 35-27.

Tully T, Quinn WG. (1985). Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol.* 157, 263-277.

Vandewalle J, Bauters M, Van Esch H, Belet S, Verbeeck J, Fieremans N, Holvoet M, Vento J, Spreiz A, Kotzot D, Haberlandt E, Rosenfeld J, Andrieux J, Delobel B, Dehouck MB, Devriendt K, Fryns JP, Marynen P, Goldstein A, Froyen G. (2013). The mitochondrial solute carrier SLC25A5 at Xq24 is a novel candidate gene for non-syndromic intellectual disability. *Hum Genet.* 132(10), 1177–1185.

Waddell S, Armstrong JD, Kitamoto T, Kaiser K, Quinn WG. (2000). The amnesiac gene products is expressed in two neurons in the *Drosophila* brain that are critical for memory. *Cell.* 103, 805–813.

Wang Y, Mamiya A, Chiang AS, Zhong Y. (2008). Imaging of an early memory trace in the *Drosophila* mushroom body. *J Neurosci.* 28(17), 4368–4376.

Wu Y, Arai AC, Rumbaugh G, Srivastava AK, Turner G, Hayashi T, Suzuki E, Jiang Y, Zhang L, Rodriguez J, Boyle J, Tarpey P, Raymond FL, Nevelsteen J, Froyen G, Stratton M, Futreal A, Gecz J, Stevenson R, Schwartz CE, Valle D, Haganir RL, Wang T. (2007). Mutations in ionotropic AMPA receptor 3 alter channel properties and are associated with moderate cognitive impairment in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(46), 18163–18168.

Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, Tully T. (1994). Induction of dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell*. 79, 49-58.

Yu D, Alkalal DB, Davis RL. (2006). *Drosophila* alpha/beta mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron*. 52, 845-855.

# ABSTRACT

## The Screening of genes associated XLMR involved *Drosophila* Olfactory Learning and Memory

Sooyeon Jang

Department of Biology

Graduate School

Sungshin Women's University

X-linked mental retardation is a relatively well known neurological disease involving, among others, cognitive impairment. Despite discoveries of a variety of genes found to be associated with

the cause of the disease, it is yet to fully lend itself to our understanding mechanisms leading to mental retardation caused by mutations in these genes. In this study, I explored the effect of XLMR fly orthologues on whether any is involved in olfactory associative memory using *Drosophila Melanogaster* as the animal model. RNAi lines of the 27 XLMR fly orthologues are specifically expressed in memory center, the mushroombody of adult fly, to investigate their impact on acquisition of and 1 hour maintenance of memory. All the genes tested are discovered to not have an impact on either learning or the short term memory. In addition, I explored the effect of 9 XLMR fly orthologues on olfactory associative learning by mushroombody-specific, RNAi-mediated knockdown of these genes from the early stages of fly development. As result of this, the *S6kII* gene is found to be required to olfactory associative learning, corresponding to the previous studies.