

## ***Drosophila* as a Model System for the Mammalian Signal Transduction Study**

**Jongkyeong Chung, Ph.D.**

*Department of Biological Sciences, KAIST, Daejeon, Korea 305-701*

### **Abstract**

The current knowledge on mammalian signal transduction is mainly based on cell biology studies from the past 10 years. While many singular gene functions and gene relationships may be discovered, a global signaling network, having complex and multiple interactions, could not be elucidated by such conventional means. The realization that the fundamental processes within the cell are similar in all eukaryotes has revolutionized the field. The high tractability of simpler animals to genetic analysis allows gene discovery based on actual *in vivo* gene function. Among the various organisms, the striking similarities between mammalian and fly signal transduction systems made the *Drosophila* genetics system the most favorable system for understanding mammalian signal transduction. Previous genetic researches on the Ras/MAP kinase, Wnt and TGF-beta signaling pathways demonstrated that the *Drosophila* model provides powerful screening tools for dissecting mammalian signaling networks. In addition to the traditional screening methods in *Drosophila*, recently developed, innovative techniques such as the UAS-Gal4, FLP-FRT systems improved the accuracy and reliability of screening. Using these advantages, we have conducted screenings on the PI3 kinase/Akt signaling pathway, and have produced highly successful results, discovering many known and novel genes that interact with the PI3 kinase/Akt signaling pathway components. We expect that these newly identified factors will help unravel this important yet mysterious signaling network.

Mammalian system의 signal transduction을 연구하는 방법은, 여태까지 기본적으로 정제된 단백질을 이용한 biochemistry와 over-expression에 기초한 세포주를 이용한 실험으로 거의 국한되어 있었다. signal transduction에 관여하는 효소 및 factor들은 대개 biochemical한 방법에 의해 정제되고, 그 peptide sequence로부터 해당 유전자를 찾아내는 것이 일반적인 연구 방법이었다.

하지만 생체 내 signal transduction system의 복잡성은 이러한 생화학적 방법만으로 연구하기에는 여러 한계점을 보이게 만들었고, 따라서 genetic approach가 필요하게 되었다. 이러한 접근

방법으로 부각되었던 것이 homologous recombination을 이용한 mouse에서의 knockout 접근 방식이었다. 하지만, 이러한 reverse-genetic한 접근 방식은 어떠한 유전자에 대한 예측되는 지식이 있는 경우에만 사용될 수 있었고, 얻을 수 있는 정보 또한 pathway를 새로 밝혀낼 수 있는 정보라기보다는 이미 밝혀진 pathway, 혹은 그 pathway상의 인자가 관계하는 형질을 찾아내는 것에 국한되어 있었다. 결국 불완전한 pathway의 새로운 인자들을 찾아내기 위해서는 forward-genetic approach가 필수적이게 되었고, 따라서 genetic manipulation이 간편한 하등 eukaryotic organism을 연구하고자하는 mammalian system에 대한 모델로 사용하는 것이 불가피하게 되었다.

이러한 하등 eukaryotic model system으로 yeast(*S. cerevisiae* & *S. pombe*), Slime mold(*D. discoideum*), nematode(*C. elegans*), fruit fly(*D. melanogaster*) 등이다. 이러한 하등 eukaryotic model system들은 genome structure가 mammalian system에 비하여 간단하고, mutagenesis와 그에 따른 mutant locus에 따른 gene identification이 빠르고 간편하며, gene redundancy가 적기 때문에 일정 family의 protein에 대한 general function을 밝히는 데에 여러 장점들을 가지고 있다. 반면 하등 eukaryotic system들은 (특히 yeast의 경우) metazoan 혹은 mammalian system에서 보이는 복잡한 다세포 생물의 function들을 수행하지 않는 측면에서, 그에 따른 유전자와 protein group을 모두 결손할 가능성이 있다. 즉, yeast의 경우에, metazoan system에 존재하는 mitogen-induced growth regulation system이 MAP kinase pathway를 제외하고 상당수 존재하지 않는 것을 그 실례로 들 수 있다.

초파리(*Drosophila melanogaster*)는 forward genetic approach가 가능한 organism인 동시에 multicellular(metazoan) system이 수행하는 대개의 process를 가지고 있는 최적의 model system이다. 이러한 model system으로서의 장점 외에도, 초파리는 유전학 태동기로부터 생물학 연구의 기초재료로서 사용되어 오고 있다.

초파리는 한 세대가 10일에서 15일 정도 사이로 매우 짧은 편에 속하며, 한번 교배에 500여 개의 산란을 하기 때문에, 유전학 연구에 필수적인 연구결과의 통계처리가 가능한 장점이 있다. 또한 산란 수가 많다는 것은 mutagenesis와 mutant screening이 쉽게 이루어진다는 것을 의미한다. 초파리의 돌연변이는 적은 chromosome 개수(4개)와 각 염색체별로 개발되어 있는 balancer chromosome이라는 recessive lethal mutation을 효율적으로 보존할 수 있는 특이 염색체가 존재하기 때문에, 다양한 종류의 중요한 유전자의 돌연변이를 자손대대로 보존시킬 수 있는 방법이 있다. 침샘에 있는 거대 염색체를 이용하면, 염색체 단위의 deletion, inversion, duplication, transposition 등의 관찰이 용이하다. 또한, P-element의 존재는 외부 유전자에 의한 초파리 형질전환을 매우 쉽게 만들었고, P-element를 이용한 mutagenesis는 돌연변이를 얻은 이후, 그 원인 유전자를 분자 수준에서 밝히는 과정을 매우 용이하게 만들었다.

이러한 학문적인 관점 외에도, 초파리 배양에 필요한 배지의 가격이 저렴하며, 또 실험을 하기 위해 많은 공간이 필요하지 않다는 것, 마취가 용이하고, 초파리 염색체상의 유전자에 대해 이미 많은 종류의 돌연변이와 그 위치가 확인되어 있기 때문에, 기존 연구와의 연계가 쉽다는 것과, flybase (<http://www.flybase.org>)라는 잘 짜여진 초파리계의 연구네트워크가, 무료 혹은 저렴한 가격으로 기존 연구 정보와 파리 돌연변이주를 제공해 주고 있다는 것 등이 현실적으로 초파리를 유전자

기능연구에 이용하는 것을 쉽게 해 주고 있다.

Ras-MAP kinase pathway는 초파리 시스템을 이용하여, signal transduction pathway를 연구한 아주 중요하고도 전형적인 사례이다. 초파리에서 이 signaling pathway의 연구는 초파리 눈에서 UV를 detect하는 R7 photoreceptor 세포의 형성에 영향을 미치는 돌연변이의 연구로부터 시작되었다. 초파리의 compound eye는 이 외에도 8개의 neuronal photoreceptor cell과 4개의 lens secreting cell, 8개의 accessory cell로 구성되어 있다. 발생 과정에서, R7 photoreceptor는 8개의 photoreceptor 중 가장 마지막으로 분화하게 되며, *sevenless* mutation은 이러한 R7 photoreceptor cell의 분화를 막는 것으로 알려졌다. 반면 이 *sevenless* signaling을 dominant하게 조절하는 대개의 mutant들은 R7의 숫자를 늘려, 눈 구조를 파괴하는 'rough eye' phenotype을 보이게 되었으며, 이 mutant들의 연구를 통해 *sevenless*와 관련된 여러 유전자들을 규명할 수 있게 되었다.

*Sevenless* mutant의 원인 유전자는 receptor tyrosine kinase(RTK)로 밝혀졌고, R8 cell의 *bride-of-sevenless* gene의 product가 이 *sevenless* RTK를 stimulation하는 것으로 밝혀졌다. receptor의 activation은 tyrosine residue의 phosphorylation을 유발하여, SH2와 PTB domain을 가지고 있는 Drk와 DAB(disabled)과 같은 adaptor protein에 대한 docking site를 만들어내게 된다. Drk는 *Sevenless* receptor에 Sos (Son of *sevenless*)를 끌고 가게 되며, 이 Sos는 Ras가 GTP에 결합하여 activated state가 되도록 유도하게 된다. 즉, *Sevenless*의 활성화는 Ras의 activation을 유도하고, 또한 Ras activation은 Raf를 통해 MAP kinase signaling cassette을 activation시키게 된다. mammalian의 Raf-MEK-MAP kinase에 대응하는 각 component들이 초파리에서 Phl-DSor-Rolled로 밝혀지게 되었고, 그 downstream으로 Yan, Pnt, Jun, Sina 등의 transcription factor들이 연이어 밝혀지게 되었다. 이러한 transcription factor의 activation은 Phyllopod, Prospero 등의 유전자들의 transcription을 올려, 결국 R7 세포의 fate를 촉진시키는 것으로 나타났다.

연구를 통하여 밝혀진 이들 인자는 모두 R7 cell development에 관련되었다고 생각되는 기존의 mutant이거나 *sevenless* 혹은 그 이후에 밝혀진 이 pathway상의 gain-of-function mutant, 혹은 loss-of-function mutant들을 이용한 modifier screening을 통하여 발견된 유전자들이다. 화학적인 돌연변이방법을 통해 만들어진 여러 mutant들은 게놈상에서 그 locus를 좁혀나간 후 coding region을 찾아 원인 유전자와 그 product protein의 기능을 찾아내게 되었다. 이러한 유전학적 연구결과들은 mammalian system의 새로운 component를 찾는 데 필요한 정보를 제공해 주기도 했으며, 이미 biochemical하게 밝혀진 pathway에 대한 부연 데이터로서도 큰 의미를 가지게 되었다. 또한 중요한 것은 이미 mammalian에서 중요하다고 알려진 이 MAP kinase pathway가 실제 생리학적으로 혹은 발생학적으로 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었고, 그 기능에 관한 자세한 유전학적 분석이 이들 단백질과 연관되는 새로운 신호전달 인자를 발굴해 내는 데에 유용함을 추가적으로 보여줄 수 있었다.

Mammalian에서의 Ras-MAP kinase pathway가 receptor로부터 transcription factor까지 모두 초파리 시스템에 보존되어 있다는 사실 외에도, 초파리에서 시작된 또 다른 signal transduc-

tion 연구가 mammalian system의 유사한 인자에 대한 연구로 성공적으로 연역된 경우는 일일이 열거할 수 있을 정도로 많다. Hedgehog/Sonic hedgehog pathway로부터, Wingless/Wnt signaling pathway, Decapentaplegic/TGF-beta pathway, Notch pathway, Patterning시에 작용하는 다양한 homobox 단백질들의 보존 등이 그 대표적인 예이다. 이러한 pathway를 천명하는 데에 있어서 초파리 모델 시스템은 각 돌연변이와 원인 유전자를 밝혀 줌으로써, pathway의 존재, 혹은 그 관련 유전자의 발굴 등에 크나큰 역할을 해 왔다.

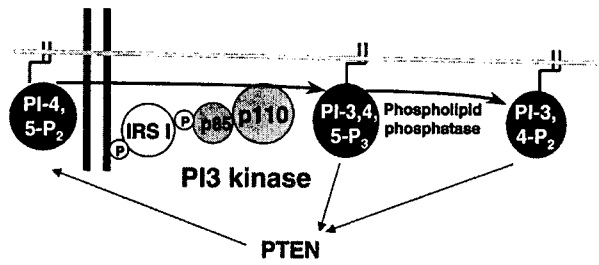
초파리와 사람의 게놈서열 결정작업이 완료되면서, mammalian system과 Drosophila system 사이에 gene level에서는 많은 부분이 동일한 것으로 밝혀지고, 이는 앞으로 초파리 모델을 사용하여 mammalian signal transduction을 연구하는 분야에 매우 고무적인 사실로 받아들여졌다. 실제 사람에 있어서 질병의 원인 유전자로 알려진 유전자의 70% 이상이 초파리에도 동일하게 존재한다는 사실은 학문적인 흥미 외에도 초파리를 이용해 밝혀진 signal transduction pathway가 질병치료와 관련되어 산업적 가치를 가지고 있음을 시사하고 있다.

P-element를 이용해 만들어진 형질전환 초파리 라인의 구축과, 다양한 P-element source의 구축, 그리고 그 P-element들을 이용한 다양한 mutant line의 확보는 초파리를 이용한 genetic approach를 더욱 쉬우면서도 정교하게 만들었다. P-element 안에 minimal promoter를 포함하는 lacZ gene을 삽입하여 P-element의 flanking sequence에 들어있는 enhancer의 pattern을 lacZ를 통해 추측하게 하는 enhancer trap study, P-element 안에 UAS sequence를 한쪽으로 삽입하여 frame이 맞는 flanking endogenous gene을 Gal4 driver를 사용하여 over-expression시킬 수 있는 EP modifier study 등이 대표적인 예이다.

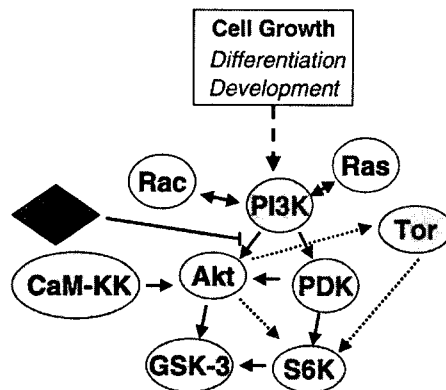
UAS-Gal4 system은 우리가 원하는 유전자를 UAS promoter 뒤에 cloning하여 초파리에 한번만 injection할 경우 다양한 tissue-specific Gal4 driver를 사용하여 우리가 원하는 시간과 장소에 특정 유전자를 발현시킬 수 있도록 하는 기술이다. FRT-FLP system은 lethal mutation을 초파리 개체의 일부분에만 발생시킴으로서 치사 유전자의 phenotype을 파리를 생존시키면서도 관찰할 수 있는 기술이다. 이러한 다양한 유전학적 연구기술의 발전은 먼저 다양한 screening method를 가능하게 하여 signaling pathway의 관계하는 새로운 인자를 정밀하게 찾을 수 있다는 의미를 가지며, 일단 확인된 인자에 대해서는 epistatic study를 이용하여 기 밝혀진 인자간의 상하관계를 알아볼 수 있는 방법을 제공하게 되었다.

실제 우리 연구단에서는 UAS-Gal4 system과 EP line에 기초하여 PI3 kinase-Akt 신호전달계에 관여하는 인자를 발굴할 수 있는 system을 개발한 바 있고, 공개된 2,500여 개의 EP line에 대한 pioneer screening을 수행한 바 있다. 그 과정을 통해 이미 mammalian system에서 알려진 PI3 kinase/Akt 신호전달계의 여러 인자들 - PI3 kinase, PDK, insulin receptor 등의 유전자를 발견할 수 있었으며, 다른 여러 신규 유전자도 발견할 수 있었다. 이 결과는 PI3 kinase signaling에 관련된 새로운 인자들이 Drosophila 연구를 통하여 발견될 수 있음을 말해주는 것이고, 다른 신호전달 연구에도 초파리가 매우 중요하고도 확실한 게놈 분석의 유전학적 기술이 된다는 것을 입증하고 있다.

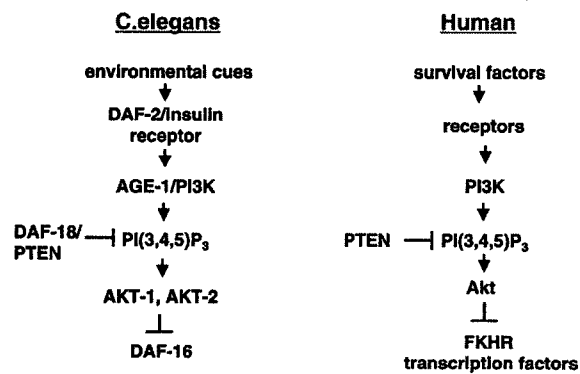
### Phosphatidylinositide-3 kinase



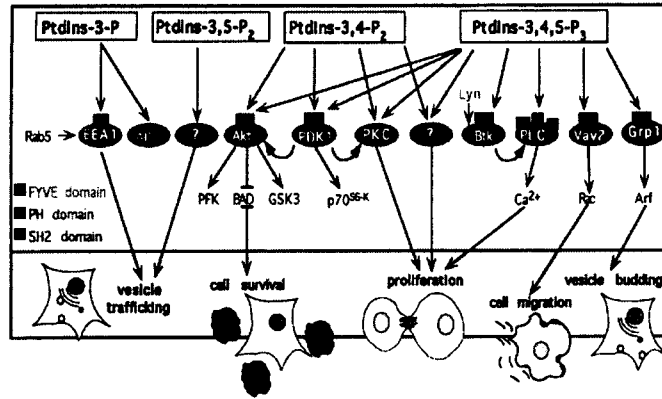
### The PI3 kinase signaling pathway



### Evolutionarily conserved signaling pathway



### In vivo functions of PI3 kinase

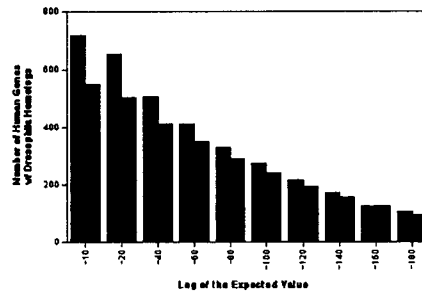


### Representative model systems

Species	Genome size	Gene number	Unique genes
<i>H. influenzae</i>	1.8 x 10 <sup>6</sup>	1,709	88.8%
<i>S. cerevisiae</i>	1.2 x 10 <sup>7</sup>	6,241	71.4%
<i>C. elegans</i>	1.0 x 10 <sup>8</sup>	19,099	55.2%
<i>D. melanogaster</i>	1.8 x 10 <sup>8</sup>	13,601	72.5%
<i>H. Sapiens</i>	3.4 x 10 <sup>9</sup>	26,588	?
<i>Arabidopsis</i>	1.0 x 10 <sup>8</sup>	25,498	35.0%

### Strong homology with human

77% (715/929) of human disease gene associated sequences in Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) have strong matches ( $e < 10^{-10}$ ) to one or more sequences in the *Drosophila* database



<http://homophila.edsc.edu/>



### Comparison of *Drosophila* and mouse in the view of model system

	<i>D. melanogaster</i>	<i>Mus musculus</i>
<b>General aspects</b>		
Life span	Short (1 – 2 month) (Fast results)	Long (2 – 3 years) (Slow results)
Cost	Inexpensive	Expensive
Size	Small (easy to care)	Large (Relatively tricky)
Research scale	Large	Small
<b>Cell biology studies</b>		
Cell culture system	Available	Available
<b>Genetic studies</b>		
Visible genetic markers	Many	Small
Transgenic Genomic library	Available	Not available
Genetic modification	Easy	Hard
Mutants (hypermorph, hypomorph, null, etc.)	Many	Small
<b>Molecular studies</b>		
Genomic DNA sequence	Available	Not available
Data base		
External gene insertion	Easy	Hard

### Novel screening method for genetic modifiers

