



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](#)

석사학위논문

환경스트레스에 의한 외편모류의  
프로그래밍된 세포사(Programmed  
Cell Death)의 발현 특성

제주대학교 대학원

지구해양과학과

안 소 정

2015년 8월

# 환경스트레스에 의한 와편모류의 프로그래밍된 세포사(Programmed Cell Death)의 발현 특성

지도교수 이준백

안소정

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2015 년 6 월

안소정의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장 \_\_\_\_\_ ㉠

위 원 \_\_\_\_\_ ㉠

위 원 \_\_\_\_\_ ㉠

제주대학교 대학원

2015년 6월

Expression Characteristics of Programmed Cell  
Death by Environmental Stress in  
Dinoflagellates

So-Jeong An  
(Supervised by Professor Joon-Baek Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for  
the degree of Master of Science

Department of Earth and Marine Sciences

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

2015. 08

# 목 차

LIST OF FIGURES.....	ii
요약문.....	iv
ABSTRACT.....	v
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	4
2.1 유해미세조류의 순수 분리 및 단종 배양체 확보.....	4
2.2 PCD 발현 유도 환경 조성.....	4
2.3 세포수 변화 및 외부형태학적 변이 측정.....	5
2.4 Sytox-Green Staining.....	5
2.5 Annexin V Staining.....	5
2.6 Caspase-like enzyme activity.....	6
2.7 Caspase-like enzyme inhibitor.....	6
III. 결과.....	8
3.1 수온 변화에 따른 스트레스에 의한 <i>A. carterae</i> 의 PCD 유도.....	8
3.2 영양염 결핍에 의한 <i>A. carterae</i> 의 PCD 유도.....	18
3.3 수온 스트레스에 의한 <i>C. polykrikoides</i> 의 PCD 유도.....	23
3.4 영양염 결핍에 의한 <i>C. polykrikoides</i> 의 PCD 유도.....	28
IV. 토의.....	30
4.1 <i>A. carterae</i> 의 PCD 발현.....	30
4.2 <i>C. polykrikoides</i> 의 PCD 발현.....	32
4.3 향후연구.....	34
V. 참고문헌.....	35

## LIST OF FIGURES

Fig. 1.	Cell abundance of <i>Amphidinium carterae</i> for 72 hour at 10, 20, 30, 35°C and 40°C. ....	9
Fig. 2.	<i>A. carterae</i> (A; normal cell, B; vacuolar cell C; dead cell). ....	10
Fig. 3.	Sytox-Green staining of healthy cells (left) and temperature stressed cells (right) in <i>Amphidinium carterae</i> . ....	12
Fig. 4.	Variation in proportion of cell stained with Sytox-Green at 10, 20 and 35°C. ....	12
Fig. 5.	Variation in proportion of cell stained with Annexin V at 10, 20 and 35°C. ....	13
Fig. 6.	Variation in caspase-like activity of <i>A. carterae</i> at 10 and 20°C. ....	15
Fig. 7.	Variation in caspase-like activity of <i>A. carterae</i> at 20 and 35°C. ....	15
Fig. 8.	Variation in caspase-like activity of <i>A. cartarae</i> for 72 hours at 10°C (bar) and cell abundance of <i>A. carterae</i> for 72 hours at 10°C (broken lines). Samples were untreated or treated with caspase inhibitor. ....	17
Fig. 9.	Variation in caspase-like activity of <i>A. cartarae</i> for 72 hours at 35°C (bar) and cell abundance of <i>A. carterae</i> for 72 hours at 35°C (broken lines). Samples were untreated or treated with caspase inhibitor. ....	17
Fig. 10.	Cell abundance of <i>Amphidinium caterae</i> for 31 days at three conitions (control; normal f/2 concentration, f/2 -N; N deficient, f/2 - P; P deficient). ....	

	.....	19
Fig. 11.	Variation in proportion of cell stained with Sytox-Green and Annexin V at three conditions.....	21
Fig. 12.	Variation in proportion of cell stained with Sytox-Green and Annexin V at three conditions.....	22
Fig. 13.	Cell abundance of <i>C. polykrikoides</i> for 72 hours at 10, 20 and 30°C.....	24
Fig. 14.	<i>C. polykrikoides</i> (A:changed cell, B;dead cell).....	26
Fig. 15.	Cell abundance of <i>C. polykrikoides</i> for 2 days at three conditions(control;normal f/2 concentration, f/2 -N:N deficient, f/2 - P;P deficient).....	29

## 요약문

최근 기후변화로 인해 수온이 상승함에 따라 제주도 및 남해 연안 생태계의 변화가 일어났다. 그로 인해 제주도 연안에서는 열대성 미세조류의 출현이 빈번해졌으며 남해 경우 유해조류대발생(Harmful Algal Blooms, HABs) 출현시기가 빨라지고 지속 시간 또한 길어지고 있다. 이에 따라 미세조류에 관련되어 많은 연구가 이루어지고 있다. 지금까지는 주로 물리환경적인 특성이 미세조류의 생장과 이동 분포에 미치는 영향에 대해 연구되어져 왔다. 그러나 국내에서는 미세조류의 세포 사멸을 제어하는 기작에 대한 연구가 비교적 적었다. 최근 미세조류 또한 환경에 따라 스스로 사멸을 택하는 프로그래밍된 세포사(programmed cell death, PCD)가 작용한다는 사실이 밝혀졌다. PCD는 불필요하거나 비정상세포 등을 스스로 사멸시키는 기작이다. 이번 연구에서는 수온변화와 영양염 결핍에 따른 두 와편모류 *Amphidinium carterae*와 *Cochlodinium polykrikoides*의 PCD 발현 여부를 확인하고, 형태 및 생화학적, 분자생물학적 특성을 여러 기법을 이용하여 분석하였다. 실험 결과 *A. carterae*는 수온 변화에 따라서 10°C와 35°C에서 배양하였을 때 PCD 발현의 주요 특징인 세포막 역전 현상, Caspase-like activity 및 세포의 공포화 현상 등이 나타났으나 영양염 결핍에 대해서는 세포의 사멸 정도가 적어 발현됐다고 보기 어려웠다. 한편 *C. polykrikoides* 경우 수온과 영양염 변화에 따라서 세포수 감소 및 외부 형태 변화를 보였으나 PCD 발현 여부를 확인할 수 없었다.

## ABSTRACT

Due to climate change, water temperature of Korean coast has been gradually increased. So tropical dinoflagellates appear frequently in around Jeju island. Also occurrence of Harmful Algal Bloom have become fast and duration of HAB is longer in the southern coast of Korea. Many marine biologist study about microalgae, but few marine biologist study about dead of microalgae. Programmed cell death (PCD) is a mechanism of cell death that has been received increasing attention. This study focus on bloom forming species which might initiate PCD in response to environmental stress, leading to the hypothesis that an active cell death pathway may contribute to the decline of blooms in situ. We measured PCD markers in *Cochlodinium polykrikoides* and *Amphidinium carterae* under temperature and nutrient stress. Some results show that *C. polykrikoides* does not display clearly molecular hallmarks when exposed to stress. Whereas *A. carterae* was temperature-stressed at 10 and 35°C, where it showed the highest proportion of cell exhibiting PCD hallmarks after 24 hour. On the other hand, *A. carterae* did not show PCD hallmarks when it encountered nutrient stress during culture experiments with nitrate or phosphate deficiency.

## I. 서론

기후 변화로 인해 제주도를 비롯해 국내의 인접 해역의 수온이 많이 상승하였다. 국립수산과학원에서 1968년부터 2002년까지 35년간 관측한 정선관측자료와 연안정지관측자료를 분석한 결과 마라도의 표층수온이 매년 평균 0.0074°C 증가하고 있으며, 남해 경우 표층 0.0267°C, 수심 50m에서는 0.0117°C, 수심 100m 경우 0.0055°C씩 상승하고 있는 것으로 밝혀졌다(Jeong et al., 2003).

그로 인해 제주도 주변 해역의 생태계는 온대에서 아열대성으로 바뀌고 있다. 지난 10년동안 기존에 국내에 보고되지 않았던 부유성 및 저서성 와편모류들이 제주도 주변 해역 및 조간대에 출현하였다. 이들 대부분은 열대/아열대 해역에서 서식하는 것으로 알려진 생물종들이다(Kim et al., 2013; Shah et al., 2013a). 그 중에서 특히 열대/아열대에 서식하며 맹독성을 지니고 있는 *Gambierdiscus spp.* 등의 저서성 와편모류의 출현은 해양생태계에 잠재적 위험요소가 여겨지고 있으며, 저서성 와편모류 *Ostreopsis ovata*, *Amphidinium carterae* 경우 독성을 지니고 있는 와편모류로 아직 국내에 피해가 보고되고 있지 않지만 여름철 제주도 조간대에서 해조류, 모래 등에 부착하여 빠르게 수가 늘고 있다(Shah et al., 2013b). 이들 중 *A. carterae* 경우 대서양 주변 국가에서는 주요 적조발생 유발종으로 알려져있다(Mandal et al., 2011). 성장률이 2.7 day<sup>-1</sup>로 비교적 높은 편이며, 또한 혈액의 용혈 현상을 일으키는 독성유기물질 hemolysin을 5종류나 가지고 있어 어류의 대량 폐사를 발생시킨다. 또한 어패류에 의한 ciguatera의 원인종에 해당되기 때문에 이들로 인해 경제적, 사회적 심각한 피해를 입을 수 있다(Yasumoto et al., 1987; Hallegraeff, 1993; Ismael et al., 1999). 이러한 이유로 인해 *A. carterae*는 Intergovernmental Oceanographic Commission and United Nations Educational Scientific and Cultural Organization (IOC-UNESCO)에 유해독성미세조류 목록에 올라가있다(Mandal et al., 2011).

또한 남해안의 수온 상승으로 인하여 *Cochlodinium polykrikoides*에 의한 적조의 발생 빈도가 증가하고 있다. *C. polykrikoides*는 자체에 독성은 없는 것으로

알려져 있으나 매년 남해와 동해에서 심각한 적조를 일으켜 상당수의 어류의 질 식사를 일으키는 등 사회적, 경제적 피해를 입히고 있다(Kim et al., 2001a).

*C. polykrikoides*를 포함하여 유해조류에 대한 연구는 국내에서도 활발히 진행되고 있다(Park et al., 2001; Lee, 2006; Lee, 2008). 그러나 모두 주로 물리환경적인 특성이 미세조류의 성장과 이동 분포에 미치는 영향에 대해 연구되고 있으며 상대적으로 미세조류의 사멸 유도 및 사멸 과정에 관한 연구는 적은 편이며 *A. carterae*와 같이 국내에서 적조를 유발한 기록이 없는 열대성 저서와편모류 경우는 성장과 관련된 연구도 드문 편이다.

지금까지 미세조류는 상위 포식자의 포식 및 바이러스, 세균에 의한 감염으로 인한 괴사, 침강 등 외부 요인에 의해 타의적으로 사멸되는 것으로 알려져 있었다. 그러나 최근 미세조류의 사멸 원인에 프로그램된 세포사(programmed cell death, PCD) 기작이 높은 비중을 차지하는 것으로 알려졌다(Kirchman, 1999; Bidle and Falkowski., 2004). PCD는 다세포생물에서 필연적으로 일어나는 현상으로 성장 과정에서 불필요한 세포나 바이러스, 세균 감염으로 인해 손상된 세포를 제거하는 과정이다. 이 과정을 통해 다세포생물에서는 발달 과정을 진행하거나 병원체로부터 몸을 보호하게 된다(Kim, 2008). 이러한 과정은 Kerr et al.(1972)에 의해 처음 알려지게 되었으며 현재 PCD는 여러 기작으로 발현되는 것으로 밝혀졌다. 그 중 최근까지도 PCD의 가장 대표적인 기작으로 알려져 있는 apoptosis 기작은 단백질 분해 효소인 caspase에 의해 활성화되며, 염색체 응축 및 DNA 절단, 세포의 수축, 세포막의 역전 및 세포막의 기포 형성, apoptotic bodies라는 소체의 형성 등의 여러 현상이 발생하는 것으로 알려졌다(Kim 2008; Choi et al., 2013). 식물플랑크톤과 같은 단세포 생물 경우, PCD는 외부환경에 대한 스트레스로 인해 세포 스스로가 죽음을 선택하는 능동적인 세포 죽음(apoptosis)을 의미하고 있다. 아직 프로그램된 세포사 연구에서는 세포내에 프로그램된 세포사의 역할과 범위에 대해서는 아직 확립되어 있지 않고 있지만, 단세포 생물에서도 이와 유사한 과정을 설명하기 위해 받아들여지고 있다(Bidle and Falkowski 2004; Franklin et al., 2006). 아직 국내에서 와편모류를 비롯해 미세조류를 대상으로 PCD를 연구한 사례는 없으나 국외에서는 규조류 *Thalassiosira weissflogii*, 침편모조류 *Heterosigma akasiwo*, 녹조류 *Micrasterias denticulata*,

*Dunaliella tertiolecta* 등 여러 식물플랑크톤을 대상으로 연구되고 있으며, 와편모류 역시 *Amphidinium carterae*, *Peridinium gatumense*, *Karenia brevis*를 대상으로 연구된 사례가 있다(Berges and Falkowski, 1998; Vardi et al., 1999; Segovia et al., 2003; Franklin and Berges, 2004; Dingman and Lawrence, 2012. Johnson et al., 2014).

따라서 이 연구에서 수온 변화와 영양염 결핍에 따른 저서성 와편모류 *Amphidinium carterae*와 부유성 와편모류 *Cochlodinium polykrikoides*의 PCD 발현 여부를 확인하고, 형태 및 생화학적, 분자생물학적 기법을 이용하여 PCD 발현 특성을 분석하였다.

## II. 재료 및 방법

### 2.1 유해미세조류의 순수 분리 및 단종 배양체 확립

두 실험 대상 중 저서성 외편모류인 *Amphidinium carterae*은 제주도 화순 해수욕장에서 채수하여 단일종을 capillary pipette washing method를 이용하여 분리하였다. 분리된 *A. carterae* 세포는 multiwell에 옮겨 배양하였고 이후 배양용기를 늘려가며 대량 배양체로 확보하였다. 부유성 외편모류인 *Cochlodinium polykrikoides*는 한국해양과학기술원 남해연구소 해양시료도서관에서 배양주(LMBE-V1)를 분양받아 실험에 이용하였다.

*A. carterae*와 *C. polykrikoides* 배양체 모두 f/2 배지를 이용하여 1L를 배양하였으며 수온은 20°C, 광주기는 12L:12D, 광량은  $100-150\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 배양조건을 유지하였다. 배양체 유지 중에는 세포수의 변화를 2-3일 간격으로 1ml의 시료를 취하여 최종농도 1% Lugol solution로 고정 후 Sedgwick-Rafter 계수판(cell counting chamber)을 이용하여 광학현미경(BX50, Olympus)으로 측정하였다.

### 2.2 PCD 발현 유도 환경 변화

*A. carterae*와 *C. polykrikoides*의 수온에 따른 PCD 발현을 확인하기 위해 배양기의 온도를 10, 20, 30, 35, 40°C로 설정한 뒤 일정 세포수로 성장한 배양체를 옮겨 배양한 뒤 세포의 외부형태학적, 생화학적 변화들을 조사하였다. 수온에 대한 영향은 수온 변화 후 0, 1, 6, 12, 24, 48, 72시간 후에 시료를 취해서 확인하였다.

*A. carterae*와 *C. polykrikoides*의 영양염 결핍에 따른 PCD 발현을 확인하기

위해 f/2 Medium Kit(f/2 Medium Kit 50L, National Center for Marine Algae and Microbiota)를 이용하여 정상적으로 제조된 f/2 배지, 질산염 성분이 없는 f/2 배지, 인산염 성분이 없는 f/2 배지 1L씩 준비한 뒤 성장이 활발한 배양체를 일정 세포수가 되도록 각각 주입하고 20°C에서 배양하였다. 영양염 결핍 스트레스에 따른 세포수 변화는 2-3일마다 측정하였으며 세포수가 감소하는 시기에 도달하였을 때부터 PCD 발현 여부를 확인하였다.

### 2.3 세포수 변화 및 외부형태학적 변화 측정

세포수 변화는 1ml의 시료를 취하여 최종농도 1% Lugol solution로 고정 후 Sedgwick-Rafter 계수판을 이용하여 광학현미경으로 계수하였다.

외부형태학적 변화는 홀 슬라이드 글라스 위에 시료를 떨어뜨리고 커버글라스로 덮은 뒤 광학현미경으로 관찰하였다.

### 2.4 Sytox-Green staining

시료 1mL을 기준으로 SYTOX(SYTOX-Green Nucleic Acid Stain, Invitrogen-Molecular probes)을 5 $\mu$ M 농도로 처리하여 빛을 차단한 상태에서 10-15분 배양시킨 후 형광현미경(AXIOPLAN, Carl Zeiss)을 이용하여 positive cell과 negative cell의 수를 각각 측정하여 전체 세포 수에 대한 stained cell의 비율을 계산하였다.

### 2.5 Annexin V staining

세포막의 phosphatidylserine(PS)이 외부로 노출되는 막 역전현상을 Annexin V (Annexin V Conjugates for Apoptosis Detection, Invitrogen-Molecular probes)

를 이용하여 형광현미경으로 반응 비율을 측정하였다. 배양한 시료 1mL씩 원심 분리(3000rpm, 20°C, 5min)하여, 상등액을 제거한 후 PBS(phosphate -buffered saline)로 세포를 씻었다. 그 후 원심분리한 후 상등액을 제거하고, Annexin-binding buffer(10mM HEPES, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) 100 $\mu$ L와 Annexin V 5 $\mu$ L 첨가한 뒤 실온에서 빛을 차단한 상태로 15분 배양하였다. Annexin V 처리한 시료는 형광현미경으로 관찰하여 stained cell과 unstained cell을 계수하여 전체 세포수에 대한 stained cell의 비율을 계산하였다.

## 2.6 Caspase-like enzyme activity (Metacaspase) 측정

Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 assay (Promega)로 시료를 처리하여 형광분광광도계를 이용하여 시간에 따른 형광량을 시료의 단백질량으로 나뉘어 단위질량당 Caspase-like enzyme activity를 측정하였다. 시료 10 - 15mL을 원심 분리(3000rpm, 20°C, 5min)하여 1mL로 농축한 뒤 Homogeneous Caspase-3/7 Reagent와 시료의 양은 1:1 비율(100 $\mu$ L:100 $\mu$ L)로, 96-cell plate에 각각 분주하고, plate shaker을 이용하여 혼합하였다. Fluorescent microplate reader(GloMax Microplate Reader E8051, Promega, Madison USA)를 이용하여 499/521nm에서 2시간 동안 15분 간격으로 측정하였다. 단백질은 대부분이 histidine과 cysteine을 포함한다는 점을 이용해 Pierce BCA protein assay kit(Thermo)를 이용하여 시료의 총 단백질량을 측정하였다. 시료 10 - 15mL을 원심분리(3000rpm, 20°C, 5min)하여 1mL로 농축하여 96-well plate에 시료 25 $\mu$ L에 working reagent 200 $\mu$ L를 각각 넣은 후 30초 동안 plate shaker를 이용해 혼합하였다. 마지막으로 37°C에서 30분 동안 배양한 후 plate reader를 이용하여 562nm에서 측정하였다.

## 2.7 Caspase-like enzyme inhibitor

배양체에 Caspase Inhibitor(Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK, Promega

Corporation)을 농도 20 $\mu$ M 되도록 가한 뒤 동일하게 배양하여 Sytox-Green, Annexin V 처리 후 inhibitor 비처리 시료와 비교하였다.

### 3. 결과

#### 3.1 수온 변화에 따른 스트레스에 의한 *A. carterae*의 PCD 유도

##### 3.1.1 세포수(cell abundance)의 변동

10°C에서 초기 세포수는  $1.2 \times 10^4$  cells/mL이었으며 12시간이 지난 후에는  $0.8 \times 10^4$  cells/mL, 24시간 후에는  $0.6 \times 10^4$  cells/mL으로, 72시간 이후에는  $0.3 \times 10^4$  cells/mL로 감소하였다. 30°C에서는  $1.6 \times 10^4$  cells/mL에서 시간이 지남에 따라 증가하여 72시간 이후에는  $8.4 \times 10^4$  cells/mL 가 되어 control인 20°C보다 성장이 더 빠르게 일어났다. 35°C 경우 초기 세포수는  $1.0 \times 10^4$  cells/mL이었으며 1시간동안 40% 감소하여  $0.6 \times 10^4$  cells/mL로 감소하였고 6시간 후는  $1.0 \times 10^4$  cells/mL, 24시간 후에는  $0.6 \times 10^4$  cells/mL으로, 72시간 후에는 거의 사멸하였다. 40°C에서는 1시간 만에 전부 사멸하였다(Fig. 1).

##### 3.1.2 세포의 외부형태학적 변화

PCD 발현이 일어날 때 나타나는 주요한 특징 중 하나는 세포의 수축이 일어나는 것이나 *A. carterae* 경우 공포화로 인한 팽창이 발생하였다. 건강한 정상 *A. carterae* 세포는 크기가 20-40 $\mu$ m으로 비교적 작은 세포로 노란색을 띠고 있다. 그러나 PCD 발현이 된 것으로 보이는 세포 내에 투명한 공포가 형성되는 것을 관찰할 수 있으며, 최종적으로 세포가 터져서 죽어있는 것이 관찰되었다(Fig. 2).

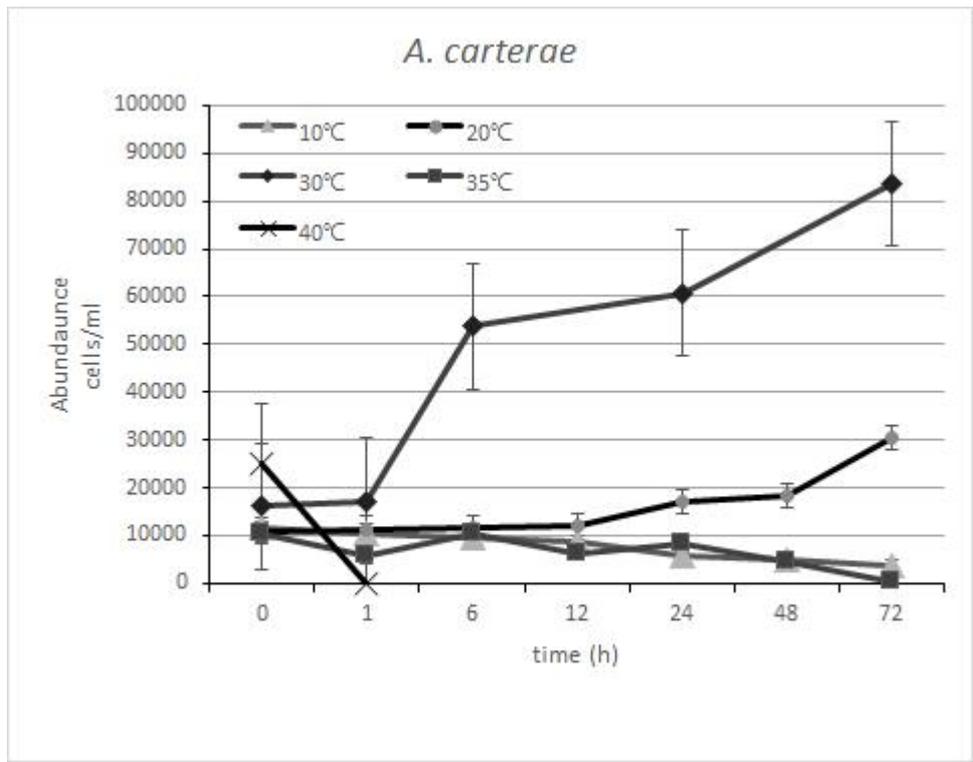


Fig.1. Cell abundance of *Amphidinium carterae* for 72 hour at 10, 20, 30, 35 and 40°C.



Fig.2. *A. carterae* (A;normal cell, B;vacuolar cell C;dead cell).

### 3.1.3 세포의 생화학적 변화

세포가 죽으면 세포막의 무결성(membrane integrity)이 파괴되어 Sytox-Green 시약이 세포막을 통과하여 핵의 염색체를 염색시킨다. 이와 같은 원리로 세포에 Sytox-Green을 처리하고 10분 후 형광현미경으로 관찰하였을 때 살아있는 건강한 세포는 chlorophyll로 인해 빨간색으로 나타나며, 죽은 세포는 핵 부분이 시약에 염색되어 밝은 녹색을 띤다(Fig. 3).

그 결과 10°C에서 배양하였을 때 24시간 후에 급격하게 반응률이 증가하였다. 즉, 24시간 후에 35°C에서 배양하였을 경우 초기에는 12시간 이내에서는 반응이 없었으나 24시간 이후부터 급격하게 반응률이 높아졌다(Fig. 4).

Annexin-V staining은 PCD 발현이 시작되면 나타나는 주요한 특징 중에 하나인 세포막 역전 현상의 발현 여부를 확인하기 위한 실험으로 세포의 세포 외막과 내막이 역전되면, Phosphatidylserine(PS)이 외부에 노출된다. 이 때 형광현미경으로 시약이 처리된 시료를 보게 되면 역전 현상이 일어난 세포는 PS가 Annexin-V의 형광 물질과 결합하여 밝은 녹색을 띠며, 역전 현상이 일어나지 않은 세포는 형광을 흡수하고 장파장의 빛을 내보내는 chlorophyll에 의해 빨간색으로 나타난다.

10°C에서 배양한지 12시간 후에 25%로 가장 높은 Annexin-V 반응률을 보였다. 35°C에서 배양한 경우 12시간 이후부터 30% 이상의 반응률을 보여주었으며 72시간 이후에는 전부 반응하였다(Fig. 5).



Fig. 3. Sytox-Green staining of healthy cells (left) and temperature stressed cells (right) in *Amphidinium carterae*.

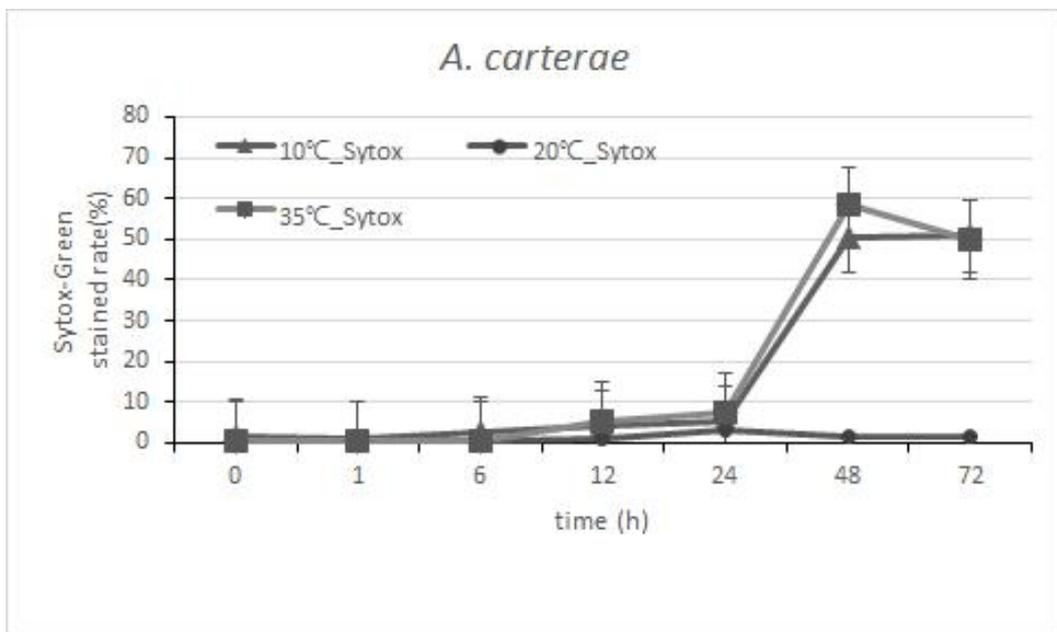


Fig. 4. Variation in proportion of cell stained with Sytox-Green at 10, 20 and 35°C.

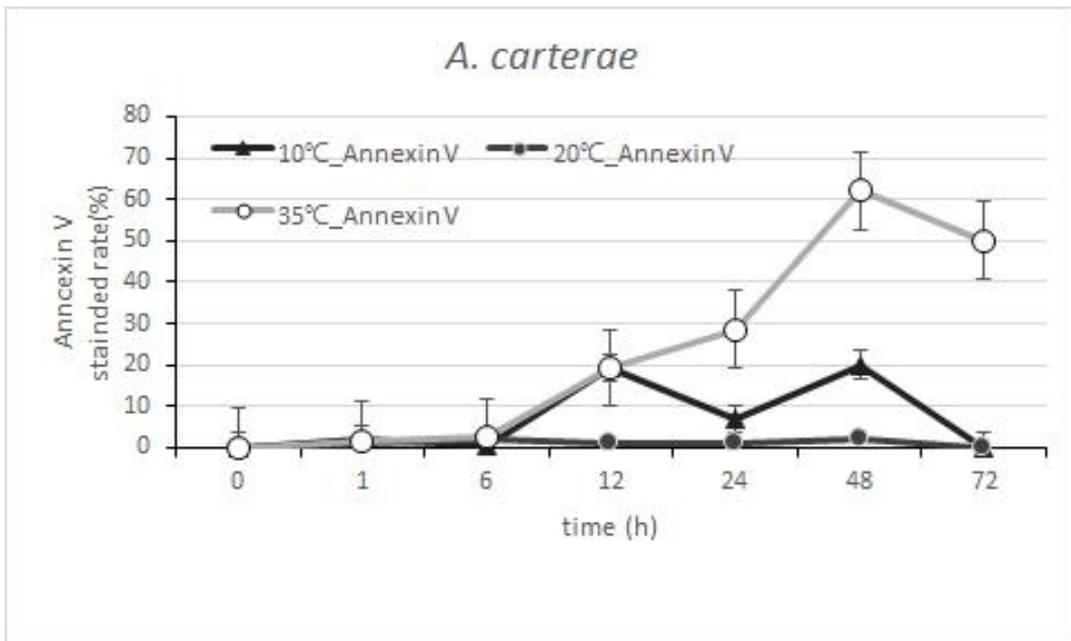


Fig. 5. Variation in proportion of cell stained with Annexin V at 10, 20 and 35°C.

#### 3.1.4 *In-situ* caspase-like activity

*A. carterae*의 caspase-like activity는 10°C에 배양하기 전에 각각 4.6, 3.9 RFU h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein에서 1시간 후는 50% 감소된 것으로 나타났다. 그러나 1시간 이후부터 Caspase activity가 증가하여 72시간 후에 13.2 RFU h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein로 증가하였다. 이 수치는 control인 20°C의 3.2 RFU h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein보다 약 4배였다(Fig 6).

35°C에서는 수온이 변하기 직전에 각각 2.8, 7.4 RFU h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein로 검출되었고, 35°C로 수온이 변화시킨 직후부터 증가하는 것으로 나타났다. 가장 높은 수치는 24시간 후로 40.8 RFU h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein였다(Fig. 7).

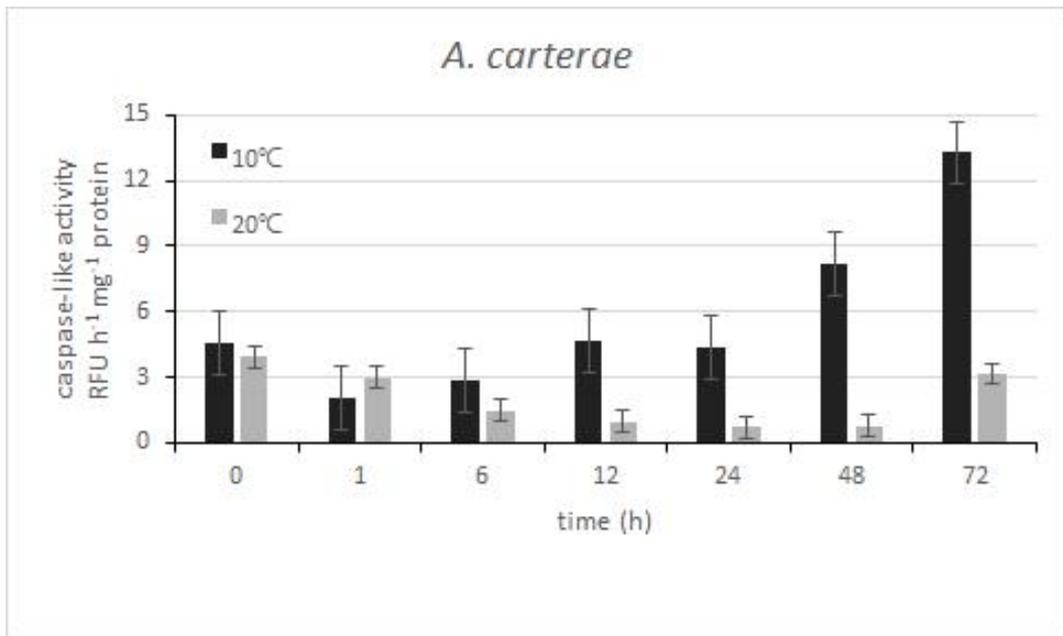


Fig. 6. Variation in caspase-like activity of *A. carterae* at 10 and 20°C.

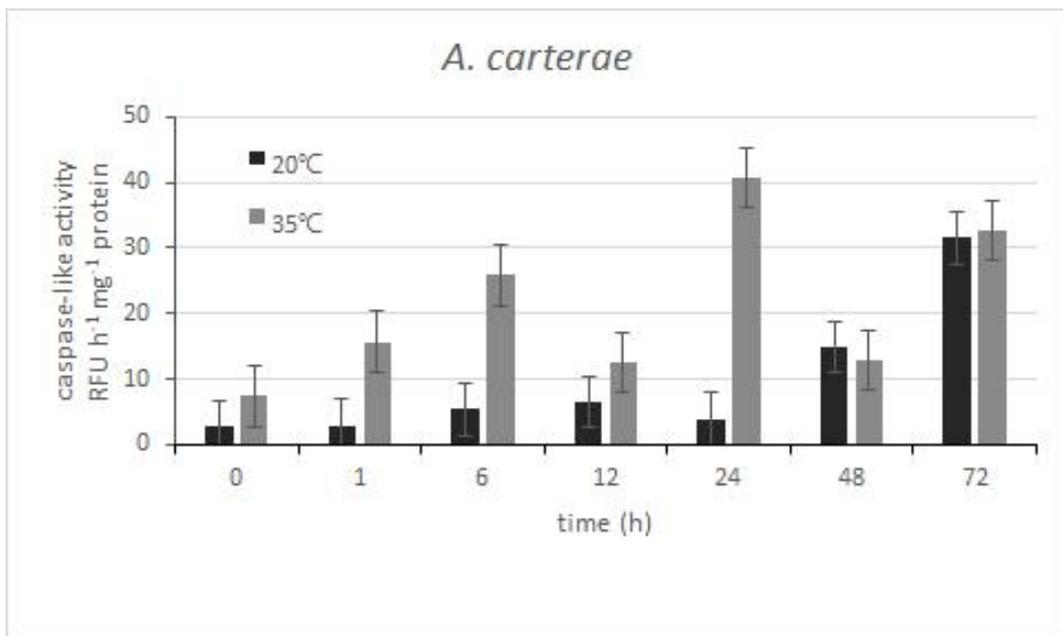


Fig. 7. Variation in caspase-like activity of *A. carterae* at 20 and 35°C.

### 3.1.5 Caspase inhibitor 처리

caspase inhibitor로 처리한 시료를 그렇지 않은 시료와 세포수를 비교하였을 경우 10℃ 경우 12시간까지는 유사한 경향을 보였으나 12 - 24시간 사이에 비처리 시료는 0 - 12시간에 비해 급격한 감소를 보인 반면, caspase inhibitor 처리 시료는  $1.3 \times 10^4$  cells/ml로 증가하였다(Fig. 8).

35℃에서 배양하였을 경우는 세포수를 비교하였을 경우 1시간까지는 유사한 경향을 보이고 6시간 후 경우는 caspase inhibitor 처리가 되지 않은 시료가 더 많은 세포수를 보였으나 12시간 후에는 inhibitor 처리 시료가  $1.4 \times 10^4$  cells/ml로 비처리 시료의  $0.6 \times 10^4$  cells/ml보다 2배 이상 높았으며, 12시간 - 72시간 사이에서 inhibitor 처리를 하지 않은 시료보다 높게 나타났다(Fig. 9).

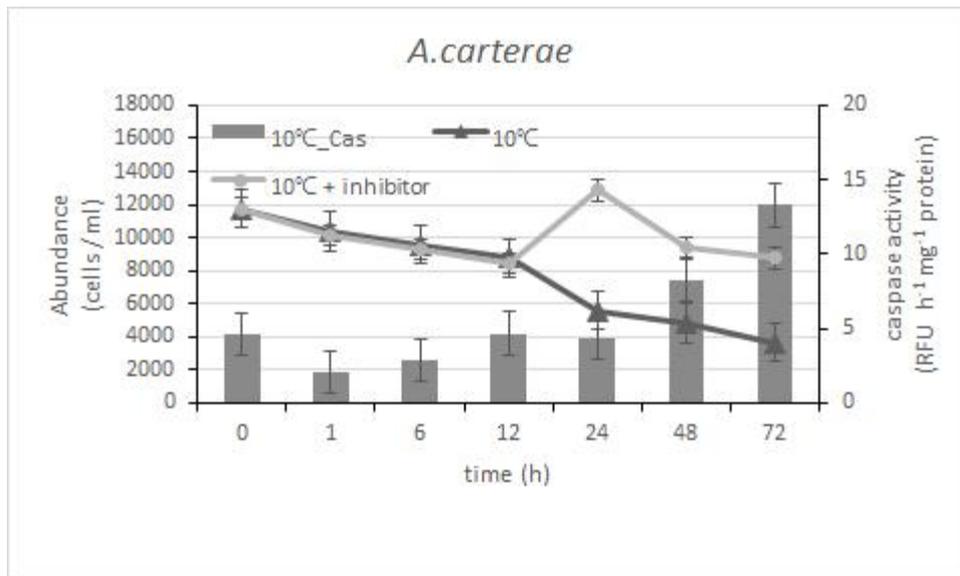


Fig. 8. Variation in caspase-like activity of *A. carterae* for 72 hour at 10°C (bar) and Cell abundance of *Amphidinium carterae* for 72 hour at 10°C (broken lines). Samples were untreated or treated with caspase inhibitor.

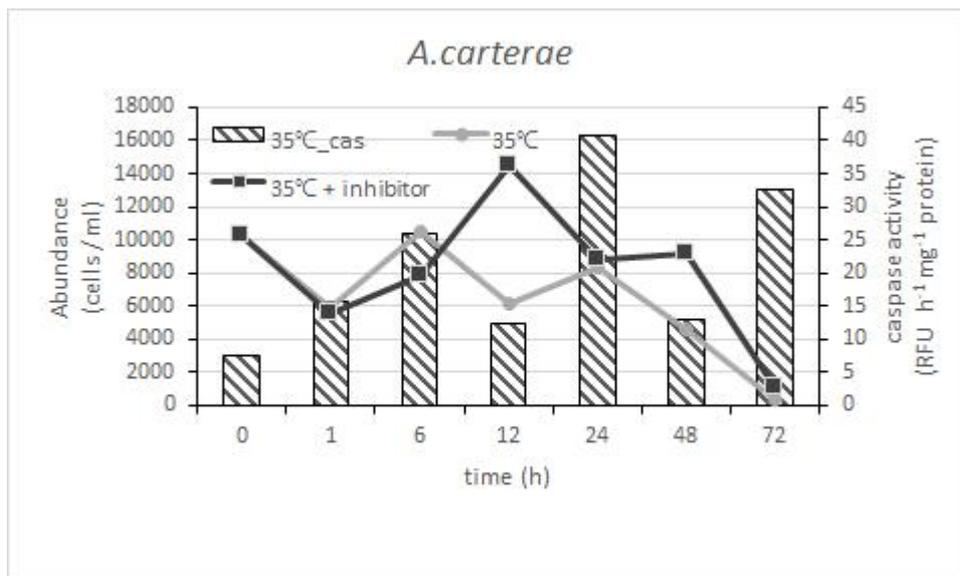


Fig. 9. Variation in caspase-like activity of *A. carterae* for 72 hour at 35°C (bar) and Cell abundance of *Amphidinium carterae* for 72 hour at 35°C (broken lines). Samples were untreated or treated with caspase inhibitor.

### 3.2 영양염 결핍에 의한 *A. carterae*의 PCD 유도

#### 3.2.1 세포수(cell abundance)의 변동

초기 세포밀도  $1.0 \times 10^4$  cells/ml로 배양 시작 후 일주일은 배지에 남아있는 영양염이 소진되는 시기로 보아 배양 시작 7일 이후부터 2일 간격으로 시료를 채취하여 세포수를 측정하였다.

정상적으로 제조된 F/2 배지의 배양체(control)의 14일까지 급격히 18일까지 세포수가 증가하여  $1.5 \times 10^4$  cells/ml이 된 후 29일에는  $2.0 \times 10^4$  cells/ml까지 증가하였다.

질산염과 인산염이 각각 결핍된 배양체들(f/2 -N, f/2 -P)는 정상 배지 배양체에 비해 성장 속도가 느렸다. 최대세포수가 된 시기는 배양 시작 16일 후로 최대세포수가 각각  $4.6 \times 10^4$  cells/ml와  $4.2 \times 10^4$  cells/ml로 정상 배지 배양체보다 낮았으며 이후 세포수의 변동이 거의 없었다(Fig. 10).

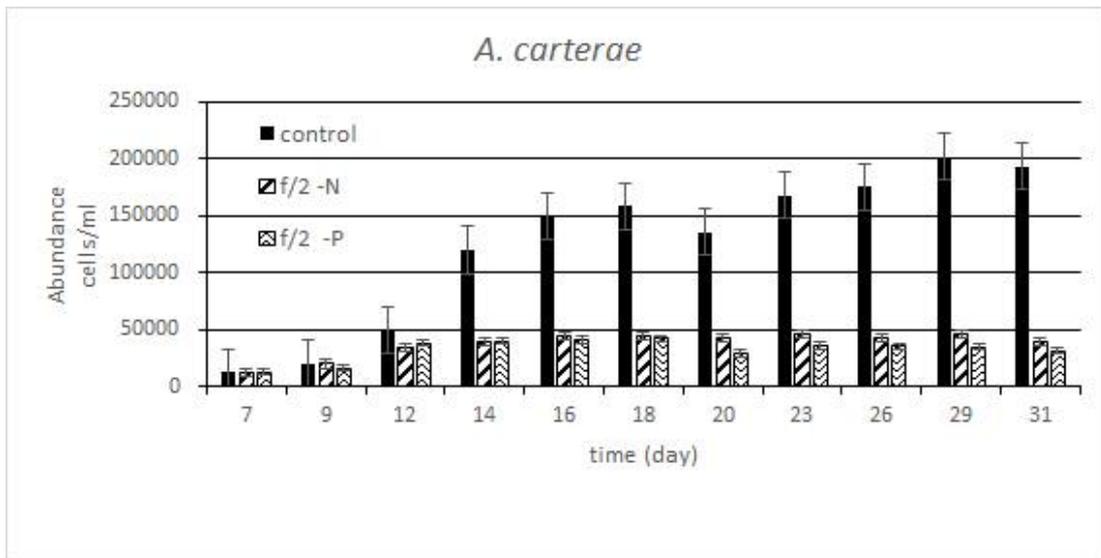


Fig.10. Cell abundance of *Amphidinium carterae* for 31days at three conditions (control;normal f/2 concentration, f/2 -N;N deficient, f/2 -P;P deficient)

### 3.2.2 세포의 생화학적 변화

수은 변화 실험과는 달리 영양염 고갈 상태에서는 일정 기간 동안 생존이 가능할 것으로 보았다. 또한 Franklin and Berges(2004)에 의하면 일괄배양 중인 *A. carterae*는 분열이 활발히 일어나는 동안 2% 이하의 사멸이 발생한다고 한다. 그래서 생화학적 분석은 영양염이 고갈되었을 거라 생각되는 7일 후에 한 번 실시하고 그 후에는 세포수가 감소하기 시작한 18일 후부터 이루어졌다.

Sytox-Green staining에서 정상적으로 제조된 배지(control)에서는 29일에 1.9%로 가장 높은 반응률을 보였다. 질산염이 결핍된 배양체는 18일까지 사멸이 거의 일어나지 않았으며 20일 이후에도 4% 이하로 증가와 감소가 반복되는 양상을 보였다. 인산염이 결핍된 배양체는 31일 후가 가장 높은 비율로 반응하였고, 26일 후가 그 다음으로 높은 반응을 보였다. 그러나 실험 기간 동안 세 배양체 모두 반응률은 6%를 넘지 않았다(Fig. 11).

반면 Annexin V 경우 정상적으로 제조된 f/2 배지(control)에서는 26일에 12%로 가장 높은 반응률을 보였고 이후 계속 감소하는 추세였다. 질산염이 결핍된 배양체는 26일 후에 25%로 나타나 세 배양체 중에서 가장 높은 반응률을 보였으며 29일 후까지 감소하였다가 다시 증가하는 양상을 보였다. 인산염이 결핍된 배양체는 26일 후가 13%로 가장 높게 나왔으며 29일까지 정상 배지에서의 배양과 비슷한 양상을 보였으나 그 이후 다시 반응률이 높아졌다(Fig.12).

실험기간 동안 Sytox-Green stained rate 낮게 나와 사멸이 진행되지 않는 것으로 보고 In-situ caspase-like activity와 Total protein assay는 경우는 진행하지 않았다.

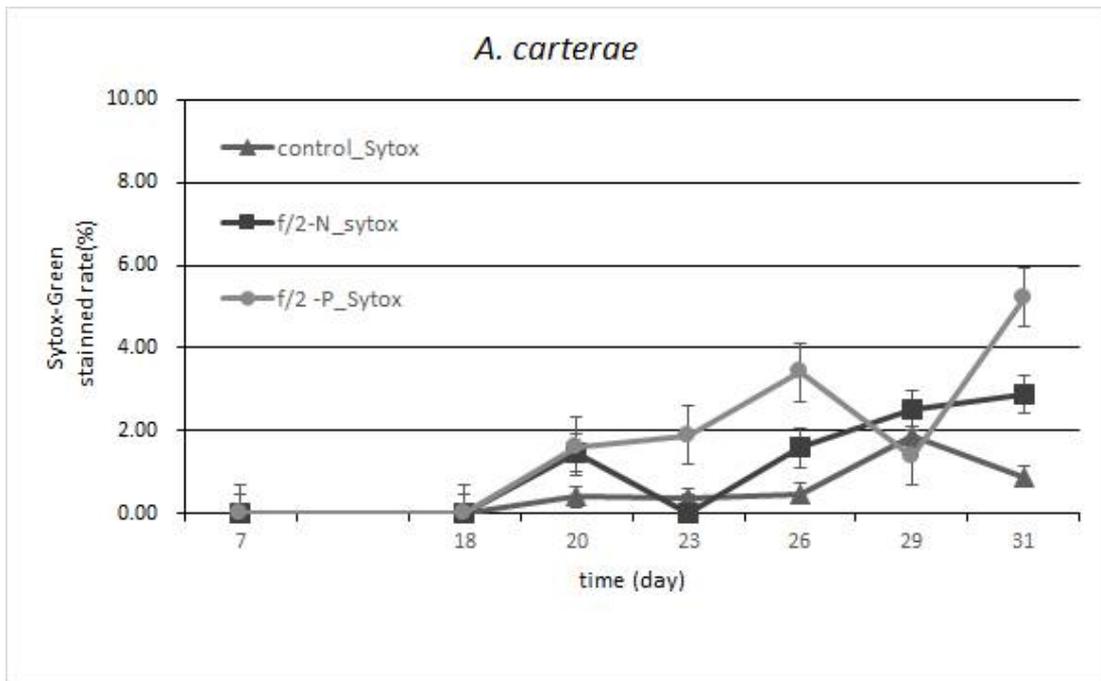


Fig. 11. Variation in proportion of cell stained with Sytox-Green at three conditions.

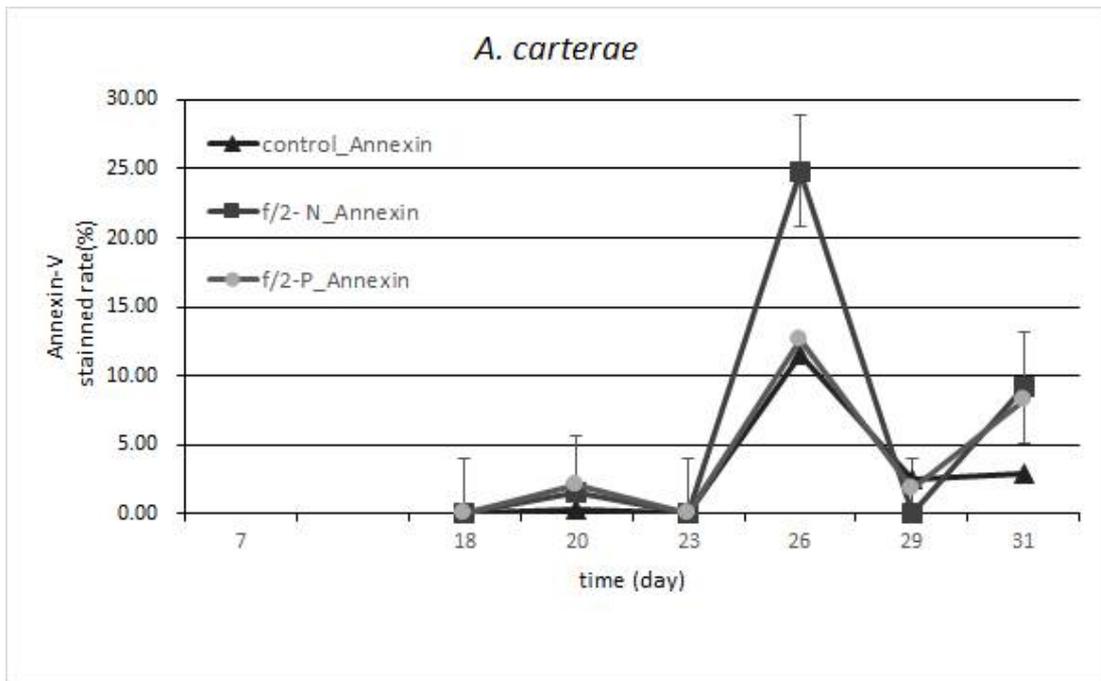


Fig. 12. Variation in proportion of cell stained with Annexin V at three conditions.

### 3.3 수온 스트레스에 의한 *Cochlodinium polykrikoides*의 PCD 유도

#### 3.3.1 수온변화에 의한 세포수(cell abundance) 변동

수온 변동이 *C. polykrikoides*에게 주는 영향을 보기 위해 초기 세포수  $2.0 \times 10^3$  cells/ml인 배양체를 각각 10°C, 20°C, 30°C에서 배양하였다. 그 결과 10°C에서 48시간까지  $2.0 \times 10^3$  cells/ml로 세포수가 완만하게 감소하다가 48시간 이후에 빠르게 감소하였고, 30°C에서는 급하게 감소하다가 24시간 이후로 세포수가 완만하게 감소하였다(Fig. 13).

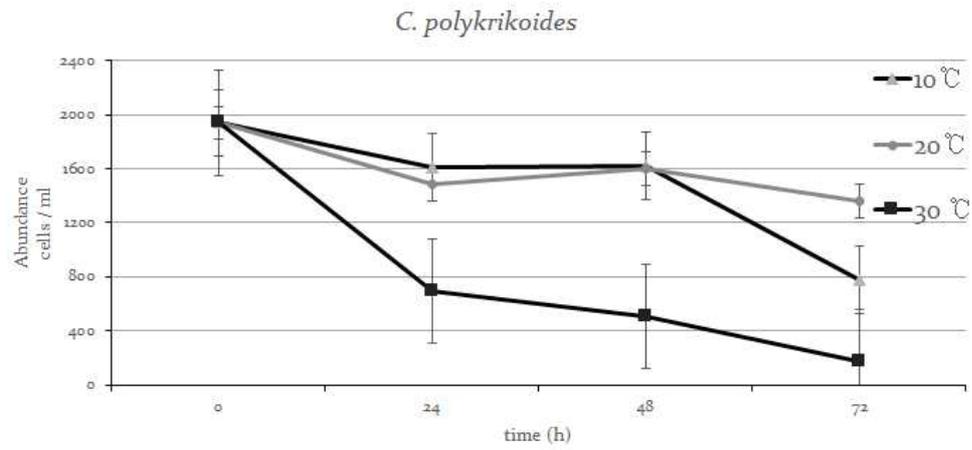


Fig. 13. Cell abundance of *C. polykrikoides* for 72 hours at 10, 20 and 30 °C.

### 3.3.2 수온 변화에 의한 세포의 외부형태학적 변화

PCD 발현이 일어날 때 나타나는 주요한 특징 중 하나는 세포의 수축이 일어나는 것이나 *C. polykrikoides* 경우 공포화로 인해 세포 내부가 투명해지는 현상이 나타났다. 건강한 정상 세포는 크기가 30-50 $\mu\text{m}$ 의 노란색을 띠고 있다. 그러나 시간이 지남에 따라서 외부 형태가 비정상적으로 변한 세포가 증가하였고 노란 세포질이 투명해지거나 외부로 유출되는 현상이 나타났으며, 결국 세포가 터져서 죽어있는 것이 관찰되었다(Fig. 14).

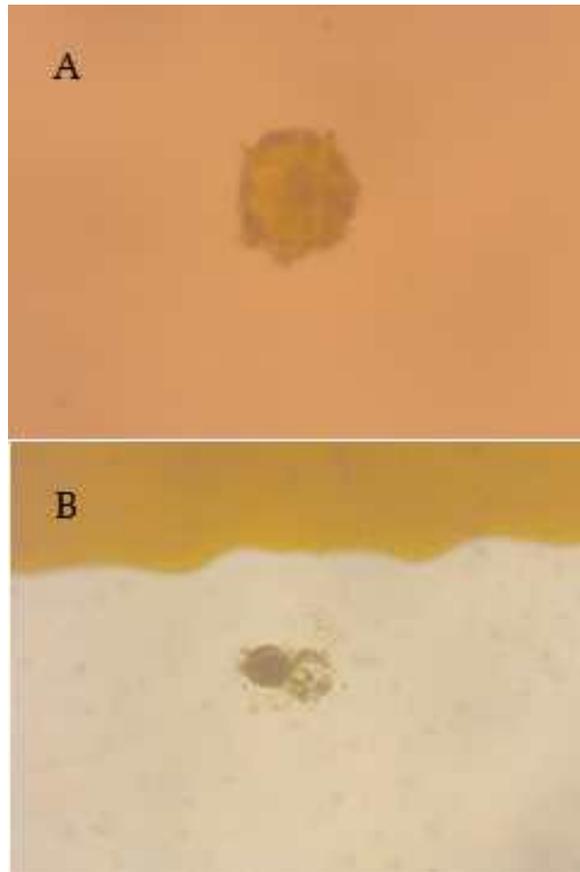


Fig. 14. *C. polykrikoides* cell(A;changed cell, B;dead cell)

### 3.3.3 세포의 생화학적 변화

세포의 사멸 여부를 확인하기 위해 사용되는 Sytox-Green 염색 시약은 살아있는 세포의 막을 침투하지 못하기 때문에 살아있는 세포의 핵을 염색할 수가 없다. 그러나 *C. polykrikoides* 경우 활발한 운동성을 보이는 건강한 세포에서도 핵이 염색되어서 죽은 세포와 구별할 수 없었기 때문에 전체 세포에 대한 사멸 세포의 비율을 구할 수 없었다.

또한 Gymnodiniaceae과에 속하는 *C. polykrikoides*는 무각와편모류 중에서도 외막이 약해 쉽게 손상을 입는다. 이 때문에 외막과 내막의 역전 현상 발생 여부를 확인하는 Annexin V staining 처리 과정에서 세포의 손상, 유실되거나 반응여부 판단이 어려워 반응 비율을 구할 수 없었다.

In-situ caspase-like activity와 Total protein assay 역시 추출되는 단백질 양의 부족으로 검출이 되지 않았다.

### 3.4 영양염 결핍에 의한 *C. polykrikoides*의 PCD 유도

#### 3.4.1. 세포수(cell abundance) 변동

영양염 결핍이 *C. polykrikoides*에게 주는 영향을 보기 위해 정상 f/2 배지(control)와 질산염 또는 인산염이 결핍된 f/2 배지를 준비하고 비교적 많은 세포수의 배양체 일부를 접종해 초기 세포수를  $225 \pm 25$  cells/mL로 맞추고 배양을 시작하였다. 그러나 접종 시 받은 스트레스로 인한 사멸로 인해 실험 2일 후에 배양체 내 세포들 대부분이 사멸되었다(Fig. 15).

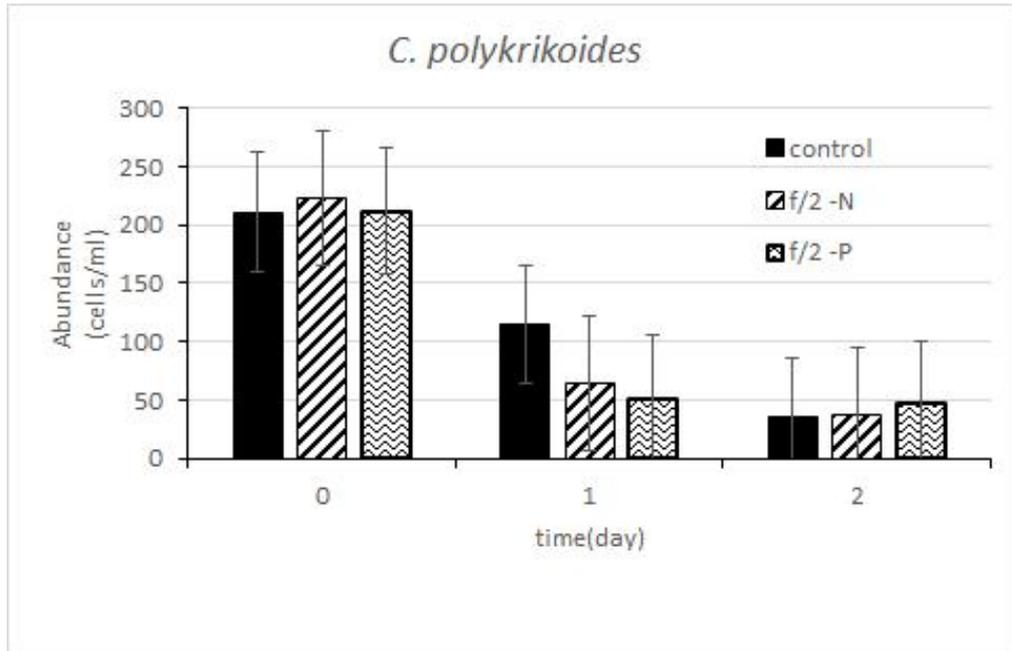


Fig.15. Cell abundance of *C. polykrikoides* for 3days at three conditions(control;normal f/2 concentration, f/2 -N;N deficient, f/2 -P;P deficient).

## IV. 토의

### 4.1 *A. carterae*의 PCD 발현

*A. carterae*는 수온 변화로 인해 세포수의 감소, 세포의 팽창 및 세포 내의 공포화, 배양체 내에서 사멸 세포의 비율(Sytox-Green stained rate) 증가와 세포막 역전 현상 발생(Annexin V stained rate의 증가), caspase-like activity 활성이 일어났다. 또한 배양체에 caspase inhibitor를 처리했을 경우 수온 변화에 의해 스트레스를 받아도 사멸하는 과정이 억제된다는 결과를 얻었다.

*A. carterae* 경우 빛의 부족과 노화로 인해 PCD가 발현된다는 것이 밝혀졌으며, 이 때 광합성효율의 감소, 세포의 수축, 세린 분해 효소 증가 외에도 세포막 역전 현상 발생, 세포 내 공포 형성 등이 일어나는 것으로 알려져 있다(Franklin and Berges, 2004). 녹조류 *Micrasterias denticulata* 역시  $H_2O_2$ 에 의해 사멸시 세포 내의 공포가 형성된다고 보고되었다(Darehshouri et al., 2008). 계통분류학적으로 유사한 분류군인 침편모류의 *Heterosigma akashiwo* 경우 수온 스트레스에 의해 세포막 역전 현상, caspase-like activity가 활성화되며, caspase inhibitor를 처리하였을 경우에 사멸 기작이 억제된다는 것이 밝혀졌다. 그리고 이러한 현상은 *Heterosigma akashiwo*가 수온 스트레스에 의해 PCD가 유도된다는 증거로 보고 있다(Dingman and Lawrence, 2012).

이러한 이전 연구들의 결과는 이번 연구에서 본 결과들이 PCD가 발현되면서 나타나는 현상임을 뒷받침하며, 따라서 *A. carterae*는 수온이 10°C 이하 또는 35°C 이상으로 변화하였을 때 PCD가 발현된다고 생각된다.

한편 질산염, 인산염이 결핍되었을 경우 배양 26일 후에 Annexin-V stained rate이 각각 25%, 13%로 비교적 높은 비율을 보였다. 반대로 동시간에 측정된 Sytox-Green stained rate은 3.4%, 0.5%로 낮은 반응을 보였다. 이러한 결과는 실험적으로 PCD 초기로 보는데(김, 2008), 그 이후로도 6% 미만의 Sytox-Green

stained rate은 세포막이 역전된 세포 일부만이 사멸까지 진행되고 대부분의 *A. carterae*는 사멸이 진행되지 않는 것으로 보인다. Franklin and Berges(2004)에 의하면 일괄배양 중인 *A. carterae*는 배양에 적절한 환경에서는 자연적인 사멸 또는 노화로 인하여 항상 2% 이하의 사멸이 발생하며 배양 25일 이후부터는 노화로 인하여 세포수가 최대세포수의 10~25%가 감소한다. 이를 감안하면 실험 기간 동안 일어난 사멸은 영양염의 결핍에 영향을 거의 안 받는 것으로 보였다. 따라서 영양염 결핍이 *A. carterae*에게서 PCD 발현을 유도한다고 보기 어려웠다.

#### 4.2 *C. polykrikoides*의 PCD 발현

수온 변화에 의한 스트레스, 영양염 결핍 스트레스 모두 *C. polykrikoides* 배양체에서 세포수가 감소하도록 영향을 주었다. 그러나 발현 여부를 확인하기 위해 진행했던 Sytox-Green staining과 Annexin V staining의 세포 상태에 관계없이 반응이 일어나서 *C. polykrikoides*의 PCD 발현 여부를 판단할 수 없었다.

이러한 현상은 *C. polykrikoides*의 특성때문에 일어나는 것으로 생각된다. *C. polykrikoides*는 혼합영양을 하는 생물이다. 광합성을 할 수 있는 광합성 색소를 지니고 있지만 광합성만 할 경우와 다른 플랑크톤을 먹으면서 광합성한 경우를 비교하였을 때 다른 플랑크톤을 먹었을 경우가 성장률이 약 2배로 높게 나타날 정도로 섭식활동의 영향이 큰 것으로 알려져 있다(Jeong et al., 2004). 그렇기 때문에 세포 스스로 영양분을 구하지 않는 다세포 동/식물의 세포나 광합성만 하는 다른 식물플랑크톤과는 다르게 *C. polykrikoides*는 활발한 섭식활동을 통해 고분자의 물질을 스스로 세포 내로 흡수하게 된다. 그렇기 때문에 정상적인 세포막을 통과할 수 없는 시약들이 세포내로 들어갈 수 있었고, Sytox-Green staining과 Annexin V staining에서 모든 세포들이 반응한 결과가 나타난 것으로 의심하고 있다. 그러나 아직 그것을 받쳐줄 근거는 없다.

비록 이번 실험에서 얻은 결과는 환경 스트레스가 *C. polykrikoides*의 사멸을 유도한다는 사실 밖에 없지만 수온 변화와 영양염 결핍 스트레스로 인한 사멸이 PCD에 의한 사멸일 가능성은 여전히 남았다고 생각한다. Kim et al.(2001b)에 의하면 실험실에서 배양할 경우 16 ~ 19°C, 25 ~ 29°C에서 급격한 성장을 감소시키거나 실제 해양에서는 31°C에서도 적조를 일으킨다는 보고가 있다. 이는 30°C 이상의 수온에서도 세포가 용해되지 않고 물질대사가 가능하다는 증거이다. 또한 *C. polykrikoides*는 영양염 농도에 따른 반포화상수가 질산염, 암모늄, 인산염에 각각 2.10, 1.03, 0.57로 와편모류 중에서 비교적 낮아서 외양의 낮은 영양염 농도에서도 대발생이 일어날 수 있었던 것으로 보고 있다. 그러나 사랑도 연안에서 발생된 적조는 발생 단계에 따라 제한영양염의 종류 및 그에 대한 반응이 달라

지며, 발생 초기에 높은 영양염 농도를 필요로 하는 것으로 밝혀졌다(Kim et al. 2001a). 이 사실을 반대로 생각하면 영양염의 농도가 생명 유지에 적합하더라도 사멸이 발생하며, 이때의 사멸은 PCD일 가능성이 높다. *A. carterae*를 비롯해 여러 와편모류 연구에서 PCD 발현이 나타난 것 역시 *C. polykrikoides*가 PCD 발현할 가능성이 있다는 근거가 된다.

### 4.3 향후 연구

지금까지 식물플랑크톤의 PCD 연구에서는 세포의 사멸 여부(DAPI staining, Sytox staining), 세포막 역전현상(Annexin V staining), DNA fragment(TUNEL assay), 단백질 분해효소의 활성화도 또는 caspase-like enzyme activity 등의 여러 발현 특성 확인 실험이 이루어왔다(Berges and Falkowski, 1998; Franklin and Berges, 2004; Darehshouri et al., 2008; Dingman and Lawrence, 2012). 그러나 이들 확인 실험 대부분은 PCD의 여러 기작 중에서도 apoptosis의 발현에서 나타나는 특징을 확인하는 실험이었다.

apoptosis는 PCD의 가장 대표적인 기작으로 지금도 PCD라고 하면 대개 apoptosis로 통용된다. 그러나 Kerr et al.(1972) 이후 현재까지 진행된 연구들을 통해 caspase가 관여하지 않는 여러 PCD도 존재하는 것이 밝혀졌다. 리소좀의 산성 가수분해 효소에 의해 세포 내 세포질, 세포소기관이 용해되어 영양분이 주변 세포로 흡수하게 되는 과정인 autophagy를 비롯하여(Jeong et al., 2005; Kim, 2008) *A. carterae*에서의 PCD 기작으로 알려진 paraptosis 역시 caspase가 관여하지 않는 PCD 과정이다(Franklin and Berges, 2004). Kroemer et al.(2009)은 개념이 확립된 사멸 기작이 apoptosis, autophagy, necrosis, cornification으로 4종류이며, 개념이 확립되지 않는 사멸 기작은 8종류로 정리하였다. 이 중 확립된 사멸 기작 세 종류는 caspase과 독립적이며, 확립되지 않는 사멸 기작 경우 몇몇 기작은 caspase가 관여하거나 apoptosis와 유사한 현상을 보이거나 apoptosis와는 다른 기작으로 보고 있다.

이번 실험에서 paraptosis가 발현되는 것으로 알려진 *A. carterae*에게서 Caspase-like enzyme activity가 확인되고, caspase inhibitor가 사멸을 억제할 수 있었다는 결과나, *C. polykrikoides*가 지금까지 이용해왔던 방식으로 PCD 발현 여부를 확인할 수 없었다는 점에서도 앞으로의 연구에서는 좀 더 다양한 검증 실험을 진행할 필요성이 있다고 생각된다.

## V. 참고 문헌

- 김노수, 2008. Programmed Cell Death 과정에서 미토콘드리아 Apoptosis Inducing Factor의 역할. 생화학분자생물학뉴스 28(1) : 11-16.
- 정영화, 이상준, 김영옥, 2005. Autophagy 의 생성기전과 생물학적 의의. 생화학 분자생물학뉴스 25(2) : 131-138.
- Berges, J.A. and P.G. Falkowski, 1998. Physiological stress and cell death in marine phytoplankton: Induction of proteases in response to nitrogen or light limitation. Limnology and Oceanography, 43: 129-135.
- Bidle, K.D and P.G. Falkowski, 2004. Cell death in planktonic, photosynthetic microorganisms. Nature reviews, 2: 643-655.
- Choi, S.D., H.K. Kwon, H.J. Shin, 2013. The Mechanisms of cell death: apoptosis, necrosis and necroptosis. The National Academy of Sciences, Republic of Korea(Nature Science) 52(2): 165-182
- Darehshouri, A., M. Affenzeller and U.L. Meindl, 2008. Cell death upon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induction in the unicellular green alga *Micrasterias*. Plant Biology, 10(6) : 732-745.
- Dingman, J.E. and J.E. Lawrence, 2012. Heat-stress-induced programmed cell death in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). Harmful algae, 16 : 108-116.
- Franklin, D.J. and J.A. Berges, 2004. Mortality in cultures of the dinoflagellate *Amphidinium carterae* during culture senescence and darkness. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 271(1553) : 2099-2107.
- Franklin D.J. C.P.D. Brussaard and J.A. Berges, 2006. What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology? European Journal of Phycology, 41: 1-14.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent

global increase. *Phycologia*, 32(2) : 79–99

- Ismael A.A. H., Y. Halim and A.G. Khalil, 1999. Optimum growth conditions for *Amphidinium carterae* Hulburt from eutrophic waters in Alexandria (Egypt) and its toxicity to the brine shrimp *Artemia salina*. *Grana*, 38: 179–185
- Jeong H.D., J.D. Hwang, K.K. Jung, S. Heo, K.T. Sung, W.J. Go, J.Y. Yang and S.W. Kim, 2003. Long Term Trend of Change in Water Temperature and Salinity in Coastal Waters around Korean peninsula. *Journal of The Korean Society of Marine Environment & Safety*, 9(2) : 59 - 64.
- Jeong H. J.Y. D. Yoo, J.S. Kim, T.H. Kim, J.H. Kim, N.S. Kang, W.H. Yih, 2004. Mixotrophy in the phototrophic harmful alga *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae): prey species, the effects of prey Concentration, and Grazing Impact. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51(5):563–569.
- Johnson, J.G., M.G. Janech and F.M.V. Dolah, 2014. Caspase-like activity during aging and cell death in the toxic dinoflagellate *Karenia brevis*. *Harmful Algae*, 31 : 41–53.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie and A.R. Currie, 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239.
- Kim H.C., C.K. Lee, S.G. Lee, G.K. Park and C.K. Hak. 2001a. Physico-Chemical Factors on the Growth of *Cochlodinium polykrikoides* and Nutrient Utilization. *Bulletin of the Korean Fisheries Society*, 34(5) : 445–456.
- Kim H.C., D.M. Kim, D.I. Lee, C.K. Park and H.G. Kim, 2001b. Limiting Nutrients of *Cochlodinium polykrikoides* red tide in Saryang Island Coast by algal growth potential (AGP) Assay. *Bulletin of the Korean Fisheries Society*, 34(5): 457–464

- Kim H.S., S.H. Kim, M.M. Jung, J.B. Lee., 2013. New record of dinoflagellates around Jeju Island. *Journal of Ecology and Environment*, 36(4) : 273-291.
- Kirchman DL 1999. Phytoplankton death in the sea. *Nature*, 398: 293-294.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, ... & G. Melino, 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation*, 16(1) : 3-11.
- Lee D.K. 2008. *Cochlodinium polykrikoides* blooms and eco-physical conditions in the South Sea of Korea. *Harmful Algae*, 7 : 318-323.
- Lee Y.S. 2006. Factors affecting outbreaks of high-density *Cochlodinium polykrikoides* red tides in the coastal seawater around Yeosu and Tongyeong, Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 52: 1249-1259.
- Mandal., S.K., R.P. Singh and V. Patel 2011. Isolation and characterization of exopolysaccharide secreted by a toxic dinoflagellate, *Amphidinium carterae* Hulburt 1957 and Its probable role in harmful algal blooms (HABs). *Microbial Ecology*, 62 : 518-527.
- Park J. G., M.K. Jeong, J.E. Lee, K.J. Cho and O.S. Kwon, 2001. Diurnal vertical migration of a harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae), during a red tide in coastal waters of Namhae Island, Korea. *Phycologia*, 40: 292-297.
- Segovia M, L. Haramaty, J.A. Berges and P.G. Falkowski, 2003. Cell death in the unicellular Chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. A hypothesis on the evolution of apoptosis in higher plants and metazoans. *Plant Physiology*, 132: 99-105.
- Shah, M.M.R., S.J An and J.B Lee, 2013a. Presence of benthic dinoflagellates around coastal waters of Jeju Island including newly recorded species. *Journal of Ecology and Environment*, 36(4) : 347-370.

- Shah, M.M.R., S.J. An and J.B. Lee., 2013b. Seasonal abundance of epiphytic dinoflagellates around coastal waters of Jeju Island, Korea. *Journal of Marine Science and Technology*, 21, 156-165.
- Vardi A, Berman-Frank I, Rozenberg T, Hadas O, Kaplan A and Levine A 1999. Programmed cell death of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* is mediated by CO<sub>2</sub> limitation and oxidative stress. *Current Biology*, 9: 1061-1064.
- Yasumoto, T., Seino, N., Murakami, Y., Murata and M. 1987. Toxins produced by benthic dinoflagellates. *The Biological Bulletin*, 172(1) : 128-131.

## 감사의 글

부족한 것이 많은 제게 많은 것을 가르쳐주시고 여기까지 이끌어주신 교수님 감사합니다. 뭐 하나 제대로 해내는 법이 없어 많이 답답했음에도 포기하지 않고 많은 도움을 주신 강윤희 박사님께도 감사의 말씀을 전하며 항상 따뜻한 격려를 아끼지 않으신 방익찬 교수님, 윤석훈 교수님, 송상근 교수님, 논문 심사를 맡아 주신 박상률 교수님, 감사합니다. 지금은 퇴임하고 안 계시는 고유봉 교수님, 윤정수 교수님, 최영찬 교수님, 학부생 때 많은 조언을 해주셔서 감사드립니다. 3년 동안 같이 실험실 생활하다 1년 전에 다른 나라로 떠나신 샤 박사님, 늦었지만 실험에 대해 많은 것을 가르쳐주셔서 감사합니다.

그 외에도 세준이, 규범이 오빠, 수민 언니, 모두 실험실 일 하느라고 고생 많으셨고, 고맙습니다.

한식이 오빠, 승현이 오빠, 같이 지낸 시간은 얼마 안 되지만 그래도 선배라고 졸업했음에도 불구하고 실험실 일 신경써주셔서 감사합니다.

상득이 오빠, 준상 오빠, 학교가 다름에도 불구하고 실험실 선배 역할 해주셔서 고맙습니다. 하시는 일 잘 되시길 바랍니다.

그동안 저를 키워주신 할머니, 아버지, 큰고모, 작은고모께도 감사드립니다. 실험실 생활한다고 한 시간 거리임에도 집에 자주 못 갔었는데, 이제는 자주 찾아 뵙도록 하겠습니다.

유신재 박사님, 손영백 박사님, 이태희 박사님, 순미 언니, 수인 언니, 소연 언니, 예슬이, 인턴 연구원으로 들어간 지 두 달 다 되어감에도 불구하고 논문 수정 작업 때문에 업무에 소홀히 해서 죄송하고, 이해해주셔서 감사합니다.

그리고 자취생활 내내 가족처럼 뒷바라지를 해준 내 남자친구 김정근 씨, 그동안 고생 많으셨어요.

기타 저를 도와주시고 지켜봐주신 많은 분들께도 감사드립니다.