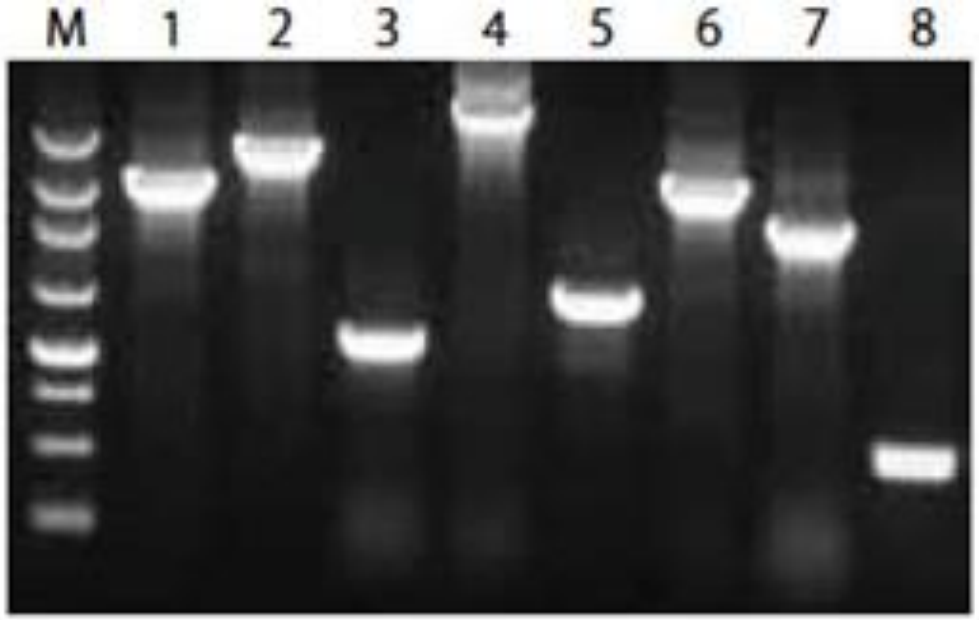
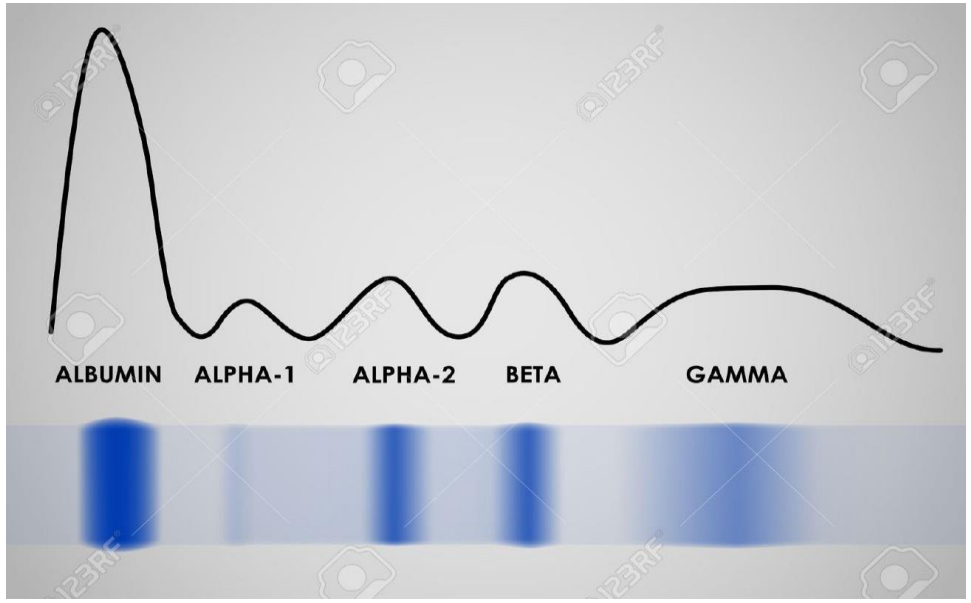
임상검사기기학 및 기초통계

중원대학교 임상병리학과

홍석현





6장 : 전기영동 (Electrophoresis)

- 전기영동(Electrophoresis) – 전기장/헤어칠 영, 움직일 동(전기장 속에서 입자가 헤엄치듯 이동)

➢ 전기영동

1. 생명과학 분야

- 단백질, 핵산(DNA/RNA)

→ 생명과학 연구, 임상검사

2. 화학 분야

- 이온, 약물, 대사체, 합성고분자, 나노입자 등

→의약품 분석, 환경 분석

3. 산업 분야

- 형광 전기영동 입자 기술 → 위조방지, 보안 마킹

• 전기영동의 이용-1: 법의학 - DNA fingerprinting(지문분석)

16년 미제 '삼척 노파 살인사건' DNA 분석으로 풀었다

권태문 기자 rhorse@sbs.co.kr



16년 동안 미궁 속에 빠져있던 '삼척 노파 살인사건'의 진범이 마침내 밝혀졌습니다.

과학수사 기법의 발달로 경찰은 사건 당시 현장에서 확보한 증거물에 남아 있던 DNA와 용의자의 DNA를 대조한 끝에 마침내 사건의 수수께끼를 풀고, 억울하게 죽은 피해자의 넋을 위로할 수 있게 됐습니다.

이 시각 인기기사

화성연쇄살인사건 DNA 분석법 어떤 것이 있을까?

심재율 기자 | 입력 2019.09.20 09:58 | 수정 2019.11.10 20:54 | 댓글 0

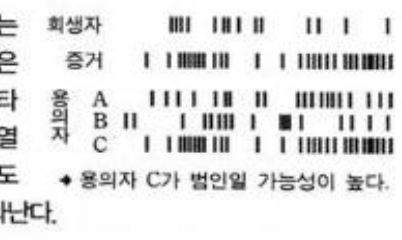
1980년대에 영국 살인사건 범인 검거에 사용
미토콘드리아 분석법, 증폭 등 다양
침, 칫솔, 머리카락, 정액 채취해서 분석

[데일리비즈온 심재율 기자] 우리나라 범죄 사상 가장 큰 미제사건으로 남아있던 1980년대 '화성연쇄살인사건'의 유력한 용의자가 발견됐다는 보도가 나가면서 DNA 분석기법에 대한 관심도 높아지고 있다.

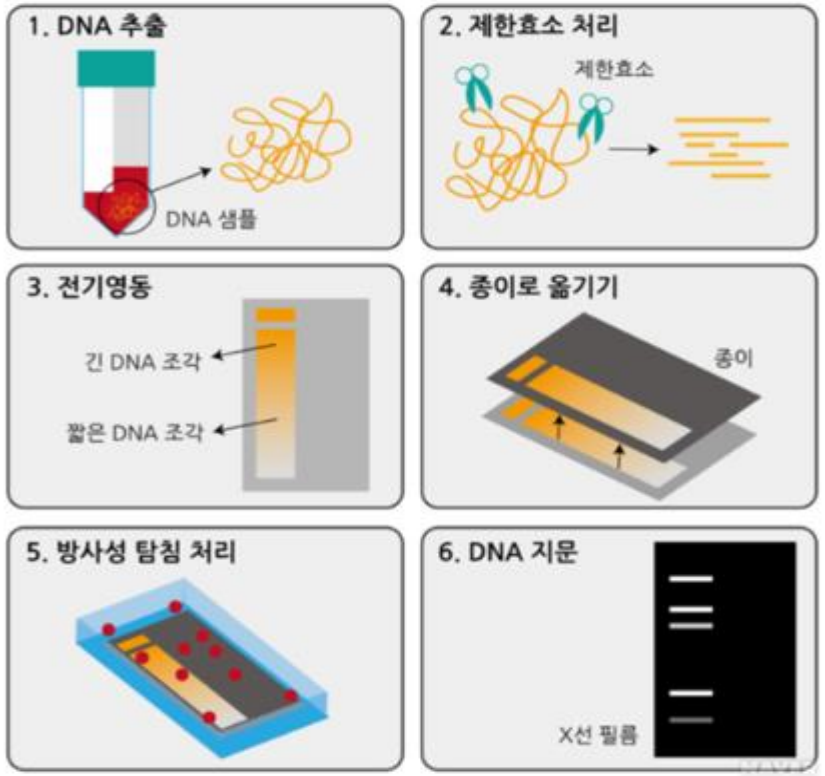
범죄수사에 이용하는 DNA 분석은 보통 'DNA 프로파일링'(profiling), 혹은 'DNA 지문채취'(fingerprinting)'라고 한다. 지문과 같이 독특한 개인의 DNA 특성을 분석하는 과정이다. DNA 프로파일링은 범죄 수사에 있어서 법의학적 기법으로 범죄 용의자의 프로필을 DNA 증거와 비교하여 그들이 범죄에 연루될 가능성을 평가한다.

전기 영동과 DNA 지문

DNA를 제한 효소로 처리하면 여러 크기의 DNA 조각이 생기는데, 이 조각들을 전기 영동 장치의 젤 안에 넣고 전기를 통하면 짧은 DNA가 먼저 이동하여 조각의 크기에 따라 분리된다. 이렇게 나타나는 DNA 조각의 띠가 DNA 지문이다. 사람의 DNA 염기 서열은 개인마다 다르므로 DNA를 절단했을 때 생기는 조각의 크기도 개인마다 다르다. 따라서 DNA 지문은 개인마다 모두 다르게 나타난다.



▲ EBS 수능특강 생명과학2 (2016)



• 전기영동의 이용-2: 분자진단

서울대학교

보 도 자 료

보도일시: 2014년 3월 6일(목) 조간부터 보도해 주시기 바랍니다

서울대학교	배 포 일	2014년 3월 4일	매 수	총 9매
연구처 연구지원과	담당과장	이 선 희	배포부서	기획처 홍보팀
	자료문의	02-880-6816 (남좌민 교수)		

빠르고 정확한 질병진단을 위한 바이오나노검지 기술 개발

세계적인 권위誌 Nature Communications에 논문 게재

□ 연구진 :

○ 본 논문의 책임저자는 서울대학교 화학부 남좌민 교수(40)이며, 공동 제1저자는 서울대학교 화학부의 이효진 박사와 박정은 학생이다.

□ 내용 및 의의 :

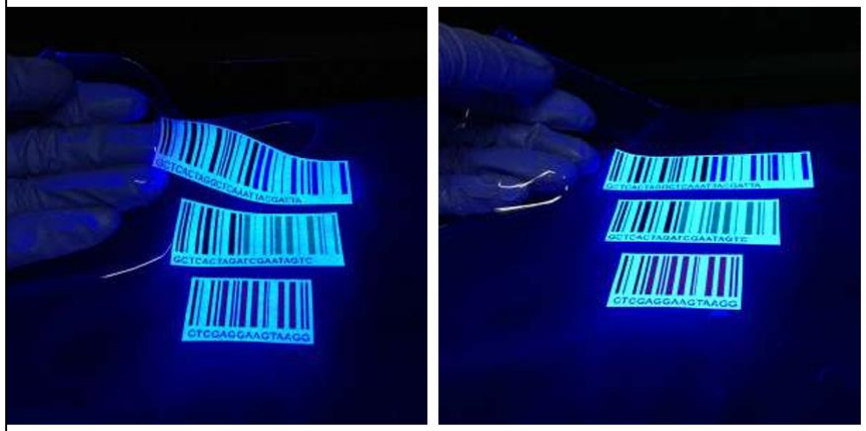
○ 서울대학교 자연과학대학 화학부 남좌민 교수팀은 **금 나노입자 화학, 이중나선 구조 DNA와 겔 전기영동을 이용한 마이크로 RNA 초고감도-다중검지 시스템을 개발**하였고 이를 **암을 더 정확하고 빠르게 진단하는데 이용할 수 있다**고 밝혔다.

○ 본 연구진은 암 진단의 생체지표로 새롭게 각광받고 있는 마이크로 RNA를 DNA 코딩 기술, 나노입자 화학 그리고 간편하고도 널리 쓰이는 겔 전기영동 시스템에 접목시켜 기존의 검지능을 획기적으로 향상시켜 최소 수백 개에서 수천 개 정도의 마이크로 RNA까지도 검지가 가능함을 발표하였다.

○ 서울대학교에서 개발한 본 기술은 "Bio-Barcode Gel Assay for MicroRNA (바이오-바코드 겔 마이크로 RNA 검지법)"라는 제명으로 **세계적인 과학전문지 '네이처' 자매지인 '네이처 커뮤니케이션(Nature Communications)' 誌 온라인 판에 2월 26일 19시(한국시간)에 게재**되었

○ 본 연구에서 개발된 검지기법은 Bio-Barcode Gel (바이오-바코드 겔) Assay라고 불리며 [줄여서, Bio-BaGel assay(바이오-베이글 검지법)라고도 불림] 초고감도 타겟 검지를 위해 검지 물질인 마이크로 RNA를 직접 검지하는 대신 타겟을 대신하여 나타내는 이중나선 구조의 바코드 DNA를 디자인하여 이를 검지하였다. 이 때, 타겟 하나를 검지할 때마다 금 나노입자당 붙은 약 1500개의 바코드 DNA를 KCN을 이용하여 금 나노입자로부터 완벽하게 분리해내여 검지해냄으로 인해 신호를 증폭해 낼 수 있었다. 특히, 서로 다른 길이의 바코드 DNA들을 겔 전기영동에서의 이동 속도 차이를 이용해 구별해 낼 수 있었고 이로 인해 여러 종류의 마이크로 RNA를 다중검지 할 수 있었으며 이를 암 세포에서도 선택적으로 검지해 낼 수 있음을 보였다.

바이오-바코드 겔 마이크로 RNA 검지법 개념도 1 – 겔 전기영동 플랫폼에 여러 가지 마이크로 RNA를 구분하여 초고감도로 검지 가능하다는 개념을 도식화



바이오-바코드 겔 마이크로 RNA 검지법 개념도 2 & 3 – 겔에 여러 가지 마이크로 RNA를 바코드 DNA로 코딩하여 이를 구분하여 검지 가능하다는 개념을 실사 사진으로 보여줌.

• 전기영동의 이용-3: 위조방지 기술

'다기능 위조 방지 장치' 형광 전기영동 입자 활용해 진품·위조품 바로 판별

제품 라벨, 여권, 기밀 문서 등의 위조 방지에 적용 가능

기존의 광학적 위조 방지(Anticounterfeiting, AC) 기술은 정지 이미지를 인쇄하는 방식으로 이루어지기 때문에 보안 수준이 낮고 쉽게 복제될 수 있다는 문제가 있다.

이를 해결할 수 있는 형광 전기영동 입자를 기반으로 하는 다기능 위조 방지(AC) 장치가 개발됐다. 이 장치는 전자장과 자외선을 전환하여 동적 AC 디스플레이를 구현할 수 있다.

형광 전기영동 입자는 전기장을 이용해 이동하는 형광 물질을 포함한 미세한 입자이다. 이 입자들은 특정 파장의 빛에 노출되면 형광을 방출하며, 전기영동 기술을 통해 표적 위치로 정밀하게 이동할 수 있다. 이러한 특성은 높은 감도와 선택성을 제공하여 다기능 위조 방지(AC) 장치에 사용된다.

위조 방지 장치에서 형광 전기영동 입자는 문서나 제품에 삽입되어, 특정 조건에서만 드러나는 고유한 형광 패턴을 생성한다. 이를 통해 위조품과 진품을 쉽게 구별할 수 있어, 보안 수준을 극대화하고 위조 시도를 방지하는 역할을 한다.

이 연구는 형광 전기영동 디스플레이(EPD)가 빠른 반응 속도와 동적 이미지 전환, 높은 발광을 제공하여 다기능 AC 응용 분야에 활용 가능하다는 것을 보여주었다.

※전기영동 현상을 응용한 나노보안 기술

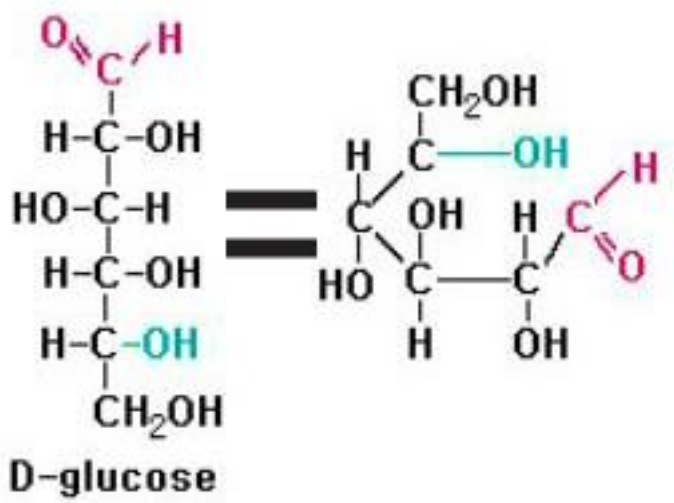
• 전기영동(Electrophoresis)

➢ 전기영동

- **전하(charge)를 띤** 입자가 전기장(electric field)에서 이동하는 속도 차이를 이용해 분리하는 방법
- 즉, **전하가 있어야 하고**, 용액 안에서 안정적으로 존재해야 이동 가능
- 입자의 **전하량, 크기, 모양, 구조** 등에 따라 이동도가 결정되고 그 차이를 이용하여 **분리 분석**
- 전기장(electo-)을 걸어줬을 때 분자들이 이동(-phoresis)

종류	전하 유무	수용성 (물에 녹는 여부)	전기영동 가능	비고
탄수화물 (Carbohydrate)	대부분 **전하 없음** (중성)	수용성	불가능	변형을 하면 가능 → 유도체화 하여 전하 부여
지질 (Lipid)	대부분 **비극성, 전하 없음**	비수용성	불가능	일부만 가능(인지질, 당지질)
단백질 (Protein)	**전하 존재 (아미노산 구성)**	수용성	가능	SDS-PAGE, IEF 등 가능

• 전기영동(Electrophoresis) – 탄수화물

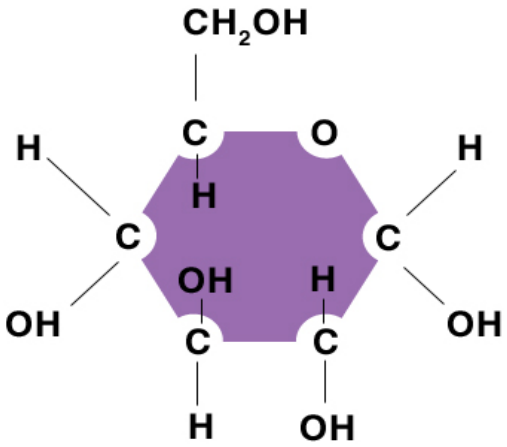


➢ 탄수화물의 극성이 나타날 수 있는 이유

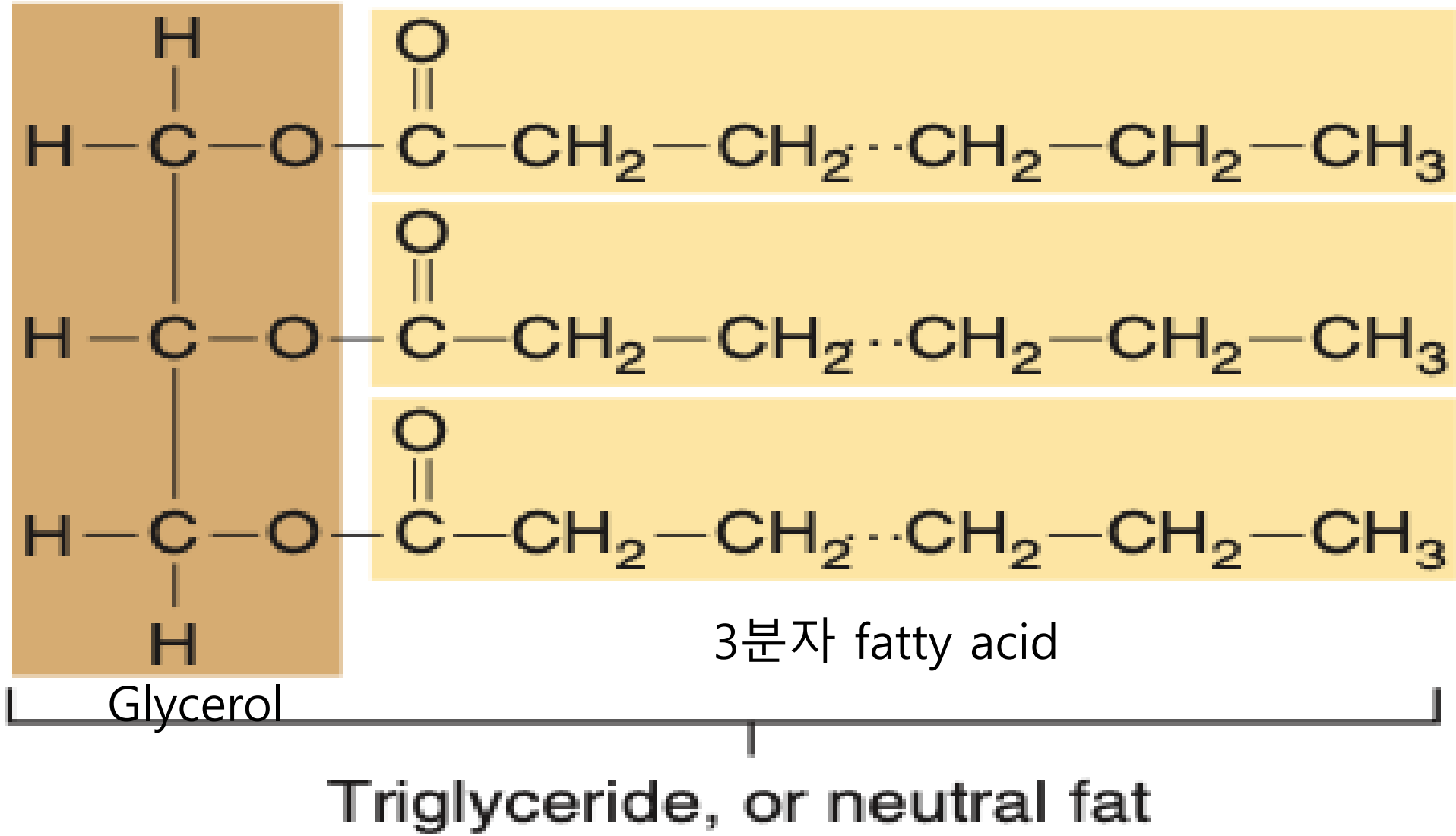
- 다수의 수산기(-OH)가 존재
- 이 수산기(-OH)들은 극성 공유결합을 이루며 수소결합을 통해 물과 상호작용할 수 있음
- 카르복실기(-COOH), 아미노기($-NH_2$), 인산기($-PO_4$)와 결합하여 극성을 나타낼 수 있음

* But, 일반적인 상태에서는 전하를 띠지 이동하지 않음.

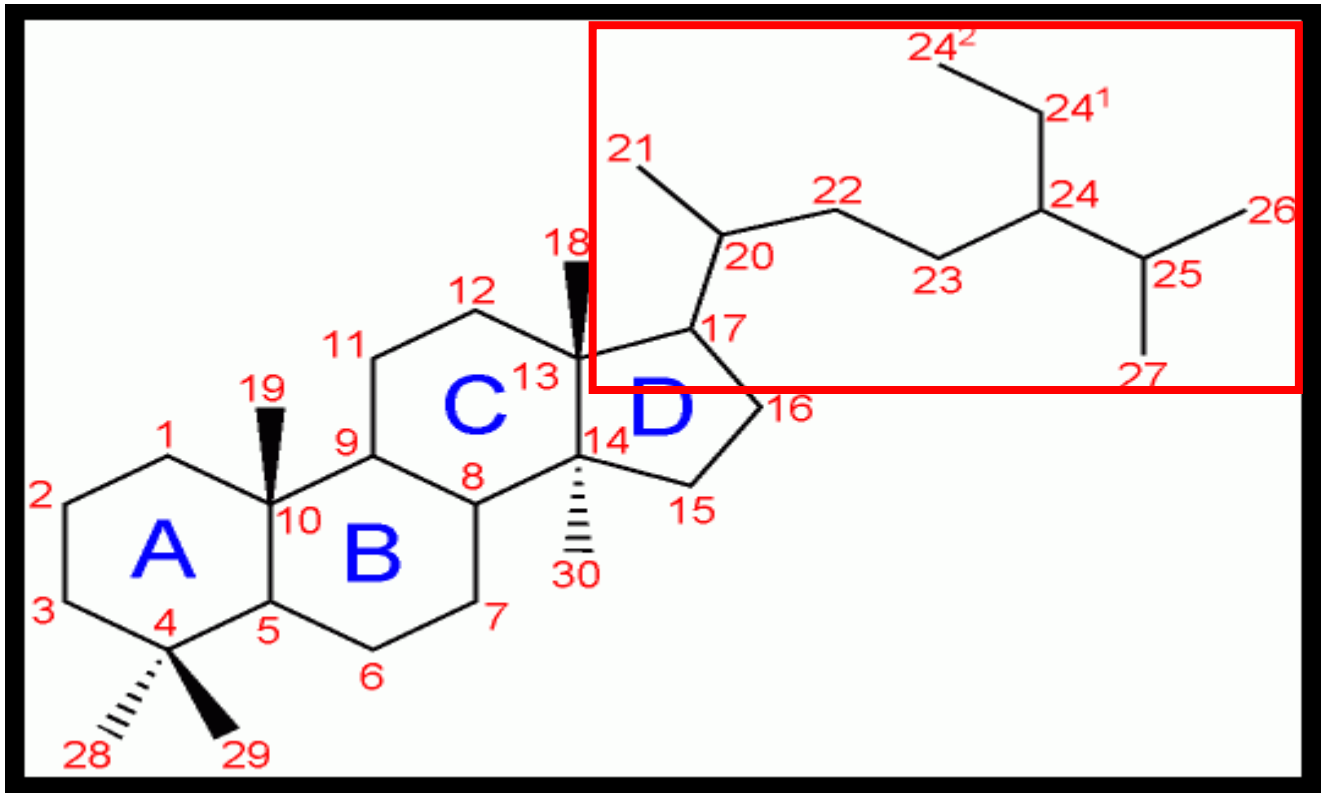




- 전기영동(Electrophoresis) – 지질(Lipid): 중성지방



• 전기영동(Electrophoresis) – 지질(Lipid): 스테로이드



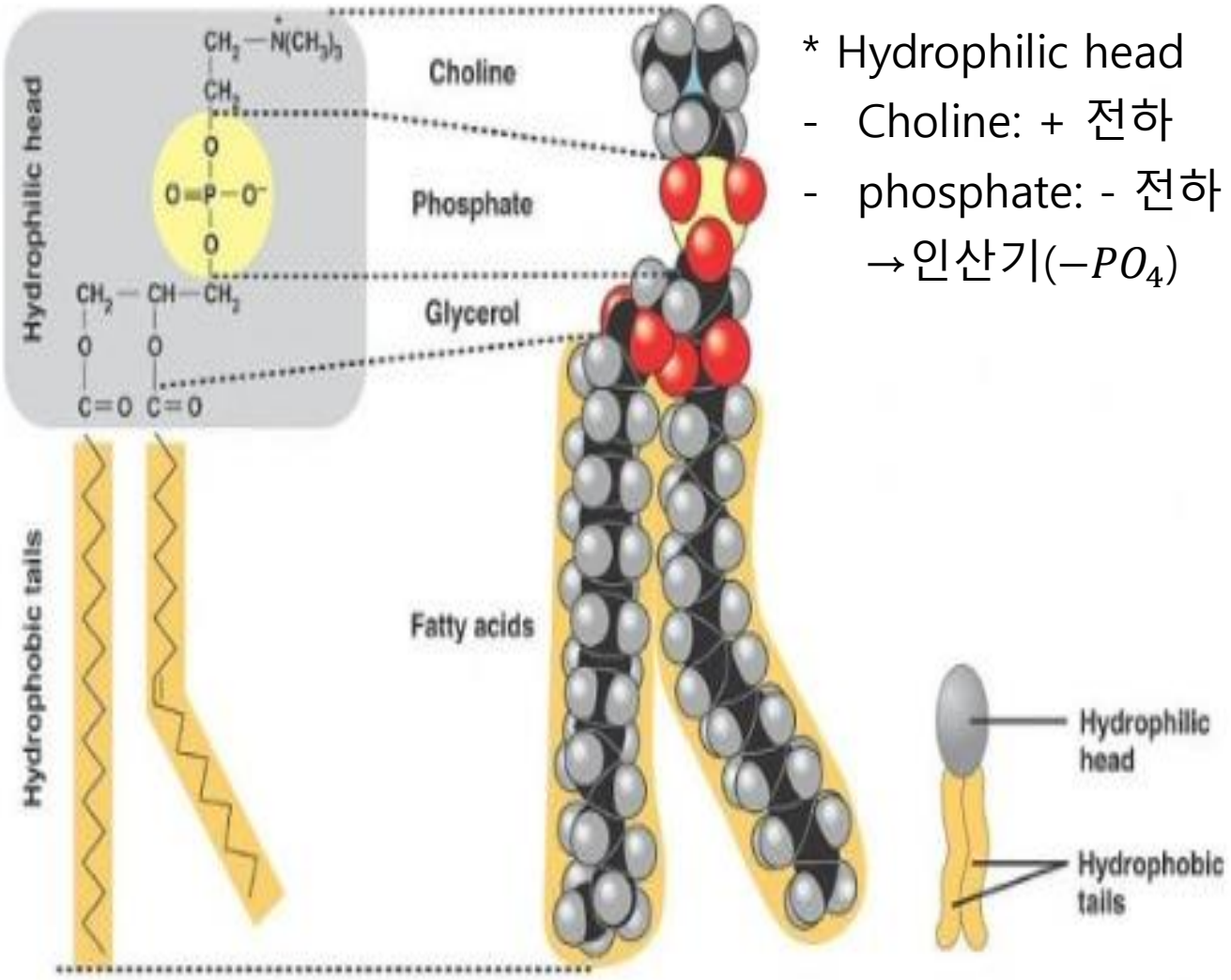
* Alkyl tail(빨간색 네모박스)

- C8~C10 정도의 탄화수소 꼬리

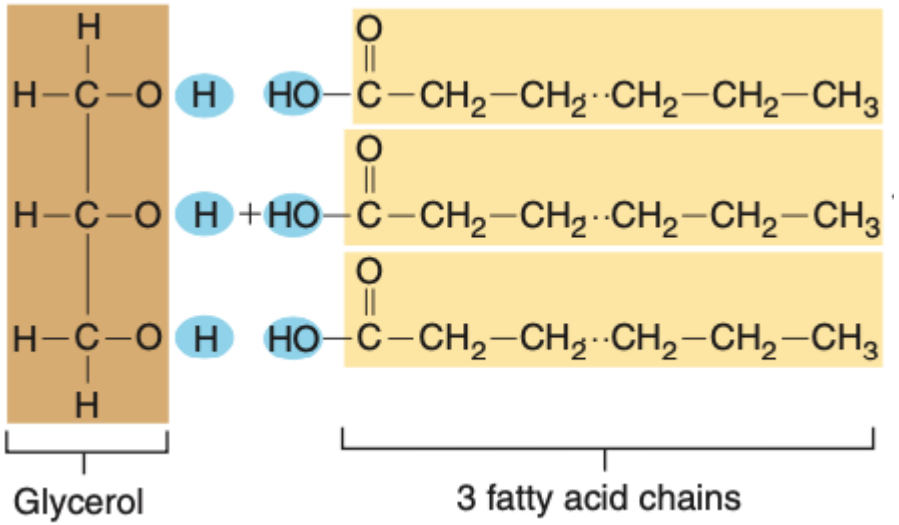
➢ 구조

- 사이클로헥세인 고리 3개(A,B,C) + 사이클로펜테인 고리1개(D)로 구성된 sterol 구조 → 즉, 고리 4개가 결합되어 있음.

• 전기영동(Electrophoresis) – 지질(Lipid): 인지질



* Hydrophilic head
- Choline: + 전하
- phosphate: - 전하
  →인산기($-PO_4$)

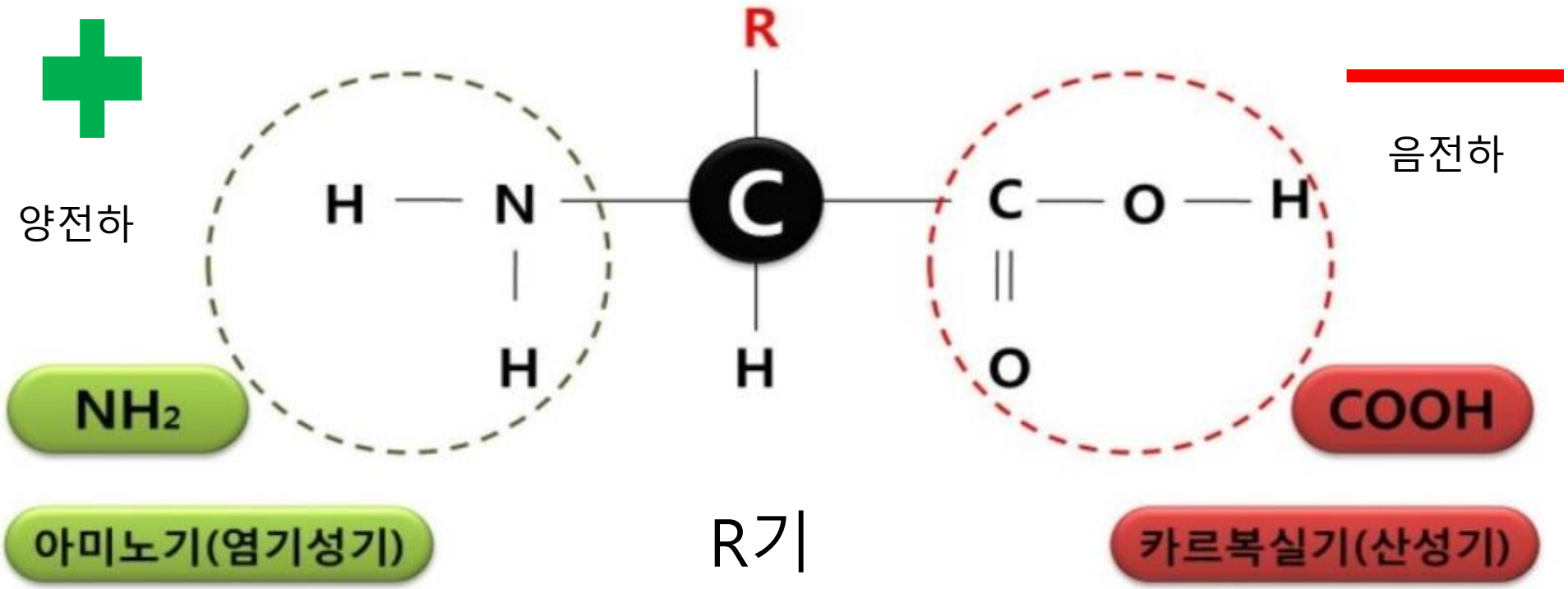


* Hydrphobic tails
- 무극성
- 소수성

• 전기영동(Electrophoresis) – 단백질(protein)

➢ 단백질(Protein)

- Amino acid로 구성: **아미노기($-NH_2$)group, 카르복실기(-COOH)group**
- **Peptide 결합**



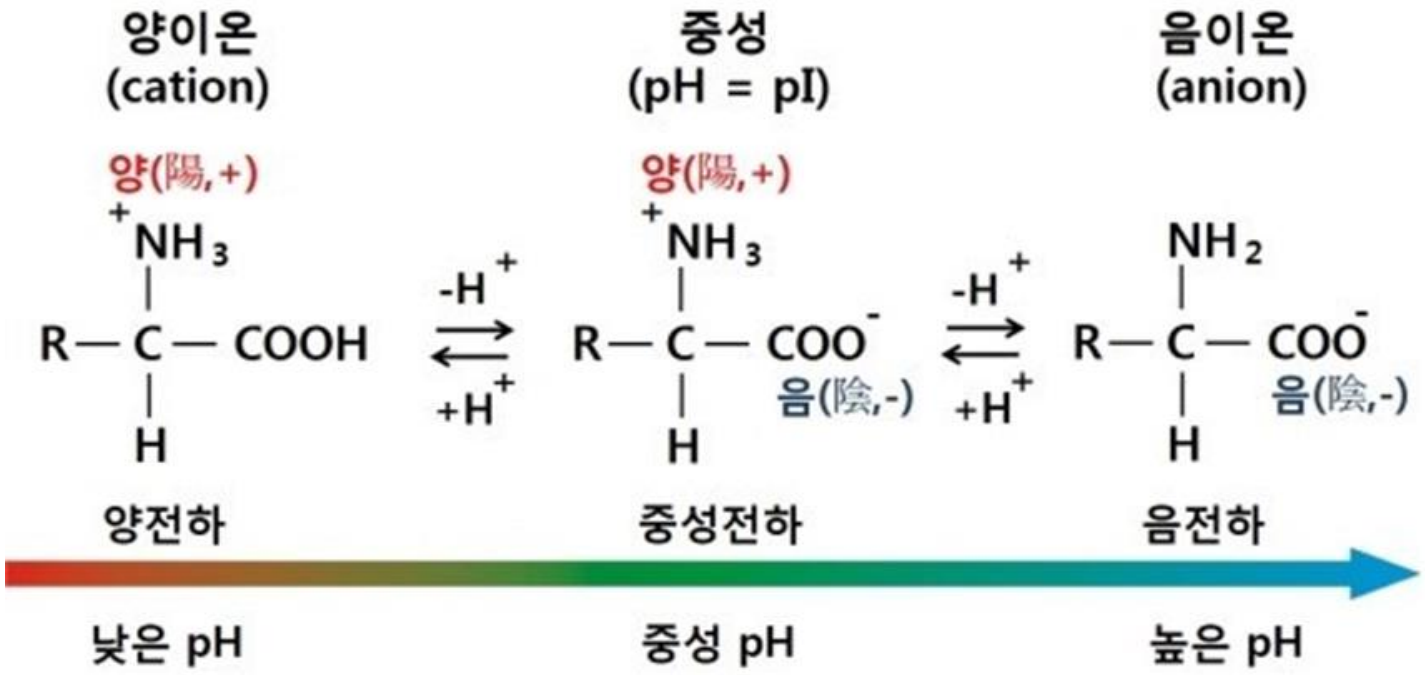
• 전기영동(Electrophoresis) – 단백질(protein)

- 단백질 전기영동(Protein Electrophoresis)

1) Protein은 Amino acid로 구성: 아미노기($-NH_2$)group, 카르복실기(-COOH)group

2) Buffer의 pH에 따라 (+)와 (-) 전하를 가진 분자: **Zwittzer ion(Amphoteric molecule, 양쪽성 성질)**

3) 등전점(Isoelectric point: pI): (+)극과 (-)극이 평형을 이뤄 전기적으로 중성, 이동하지 않음.

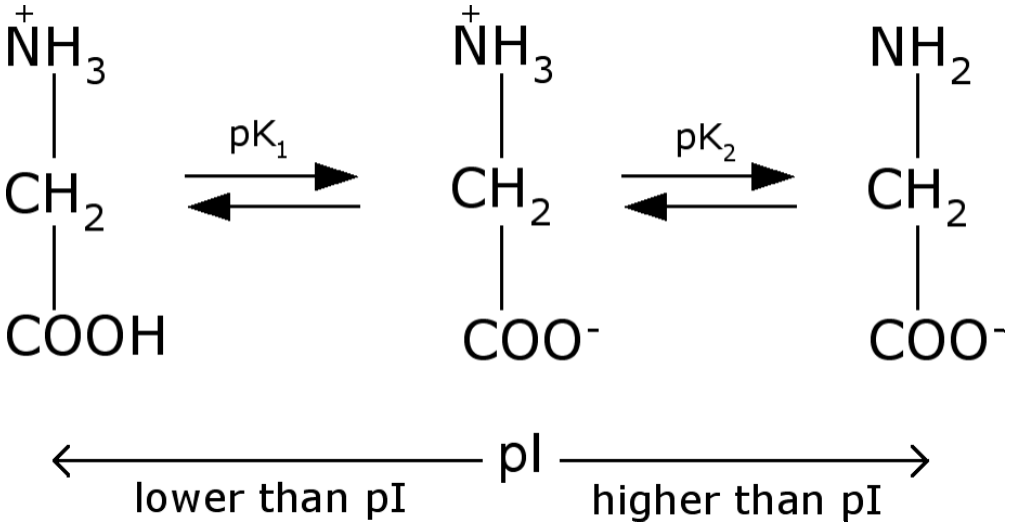


*** Albumin = 4.9**
α - globulin = 4.9~5.4
β – globulin = 5.9
γ – globulin = 5.7~7.3

• 전기영동(Electrophoresis) – 등전점(pI)

➢ 등전점(pI)

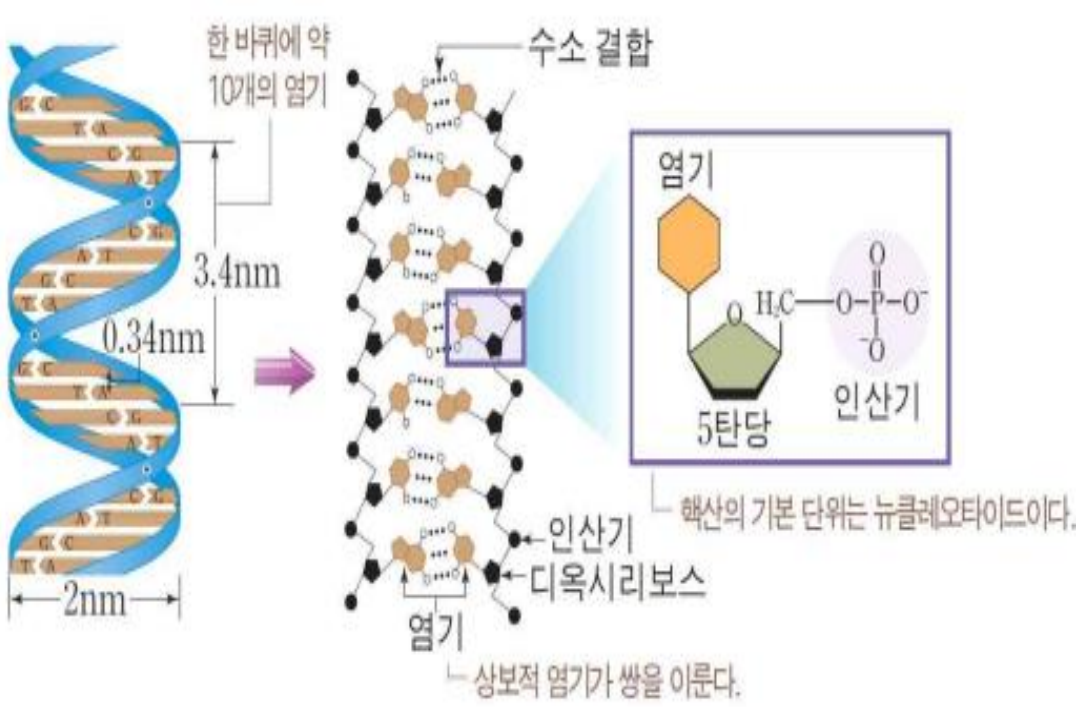
- 의미: 단백질 전체의 전하가 0이 되는 값 → (+)와 (-)가 같은 양
- pH < pI : 단백질에 (+) 多 → H^+ 증가 → 용액: 산성 (+성질)
  pH > pI : 단백질에 (-) 多 → H^+ 감소 → 용액: 염기성 (-성질)
- pH < pI : 단백질은 전기영동 시 (-)극으로 이동
  pH > pI : 단백질은 전기영동 시 (+)극으로 이동
  pH = pI : 전하가 0 → 전기장에 의해 이동하지 않음

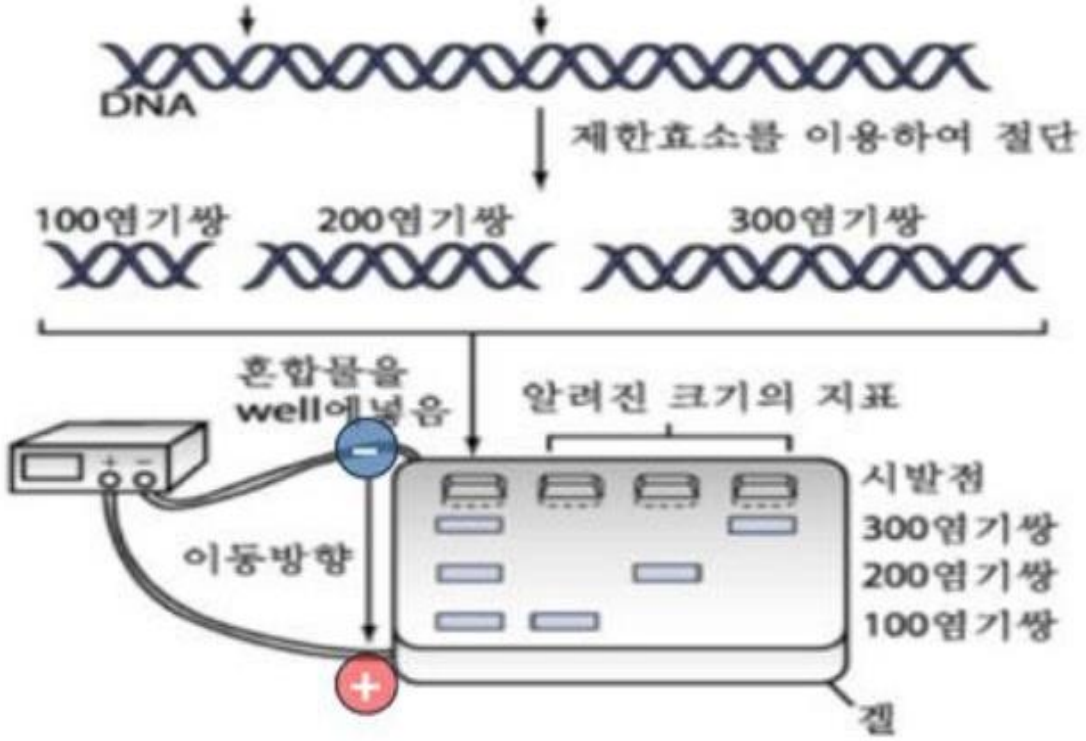


• 전기영동(Electrophoresis) – 핵산(DNA)

➢ DNA 전기영동

- DNA 절편의 혼합물을 다공성 겔의 홈(well)에 넣어주고 전기장을 걸어주면 DNA는 (+)극으로 이동
- 크기(분자량)가 작은 절편은 큰 절편에 비해 빠르게 이동





- 전기영동(Electrophoresis) – 입자(단백질)는 어떻게 움직일까?

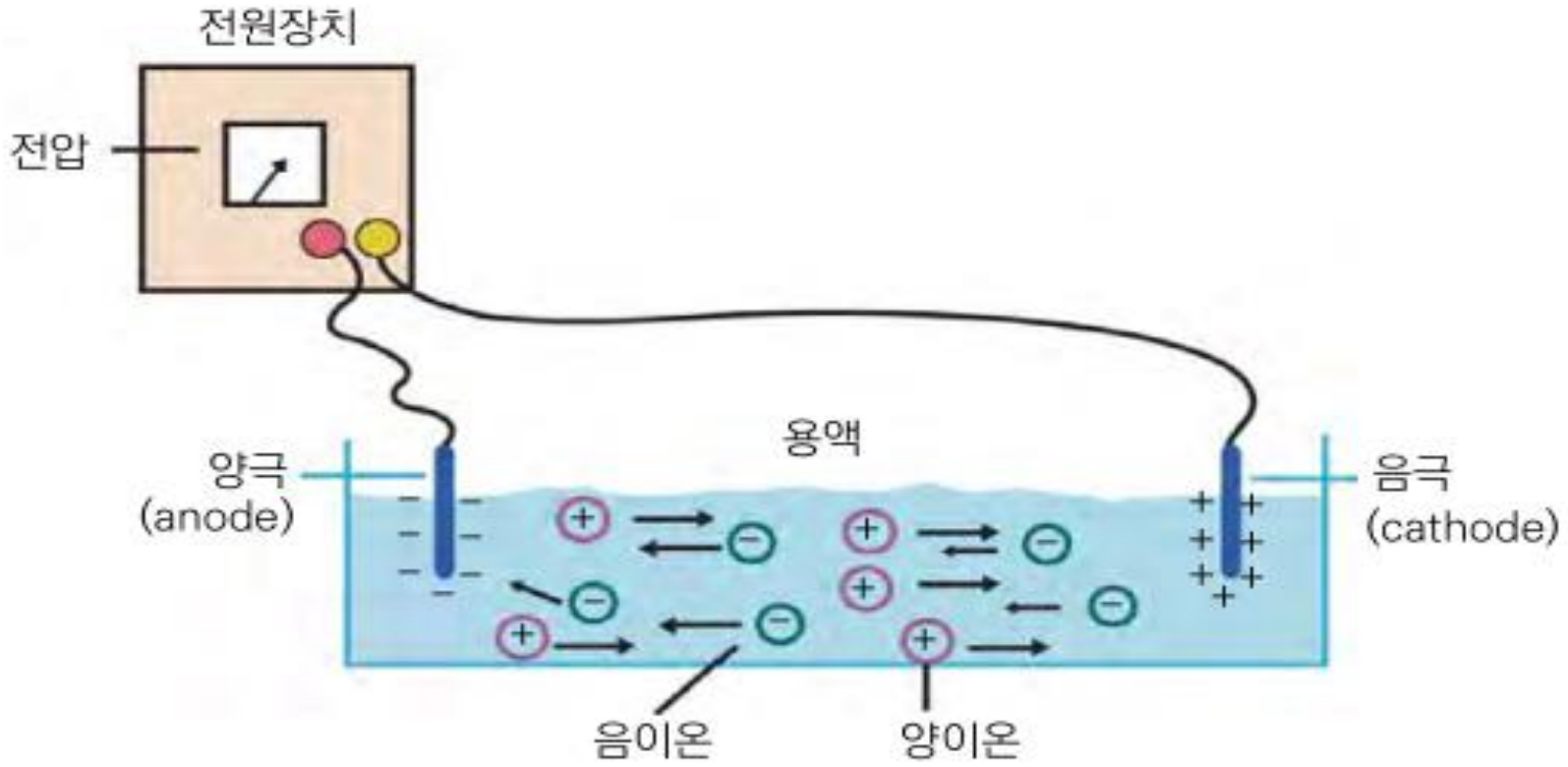
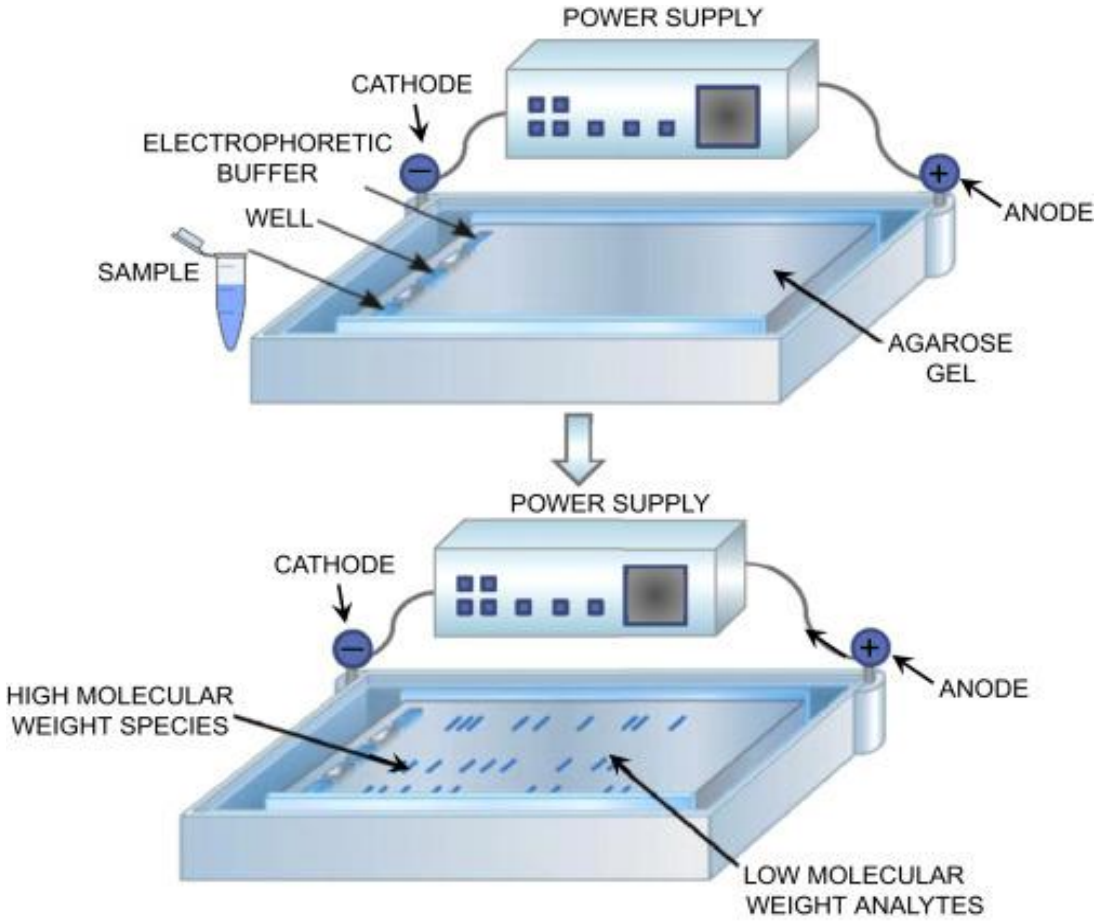


그림 5-1 전기영동의 원리; 전기장 내에서 양이온과 음이온의 이동

• 전기영동(Electrophoresis) – 지지체 전기영동

➢ Agarose gel electrophoresis



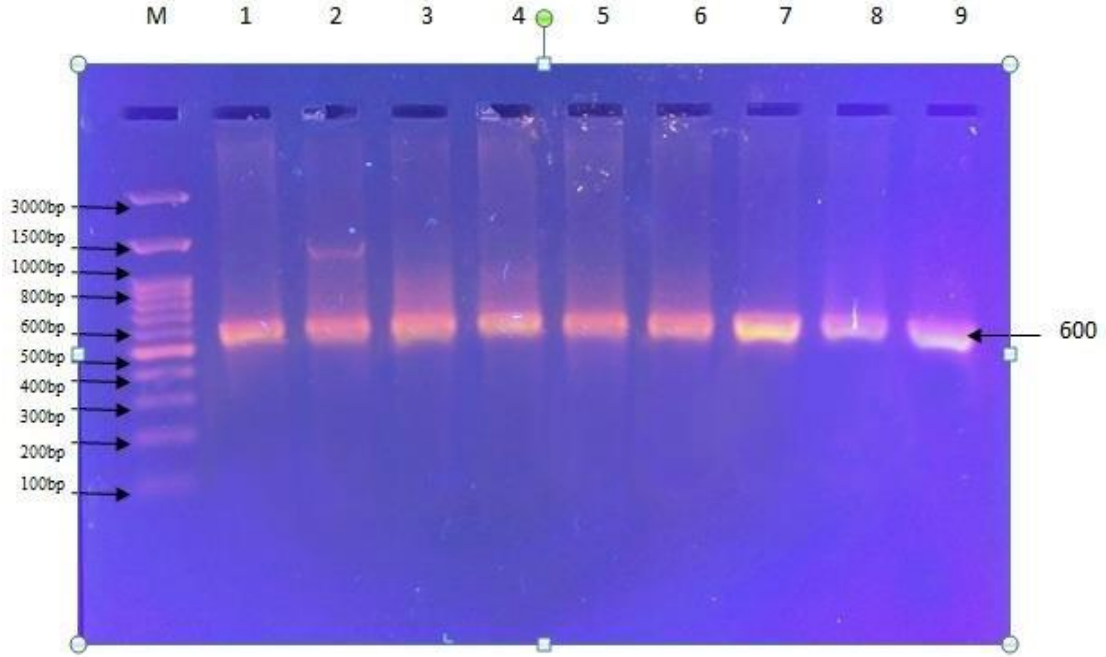
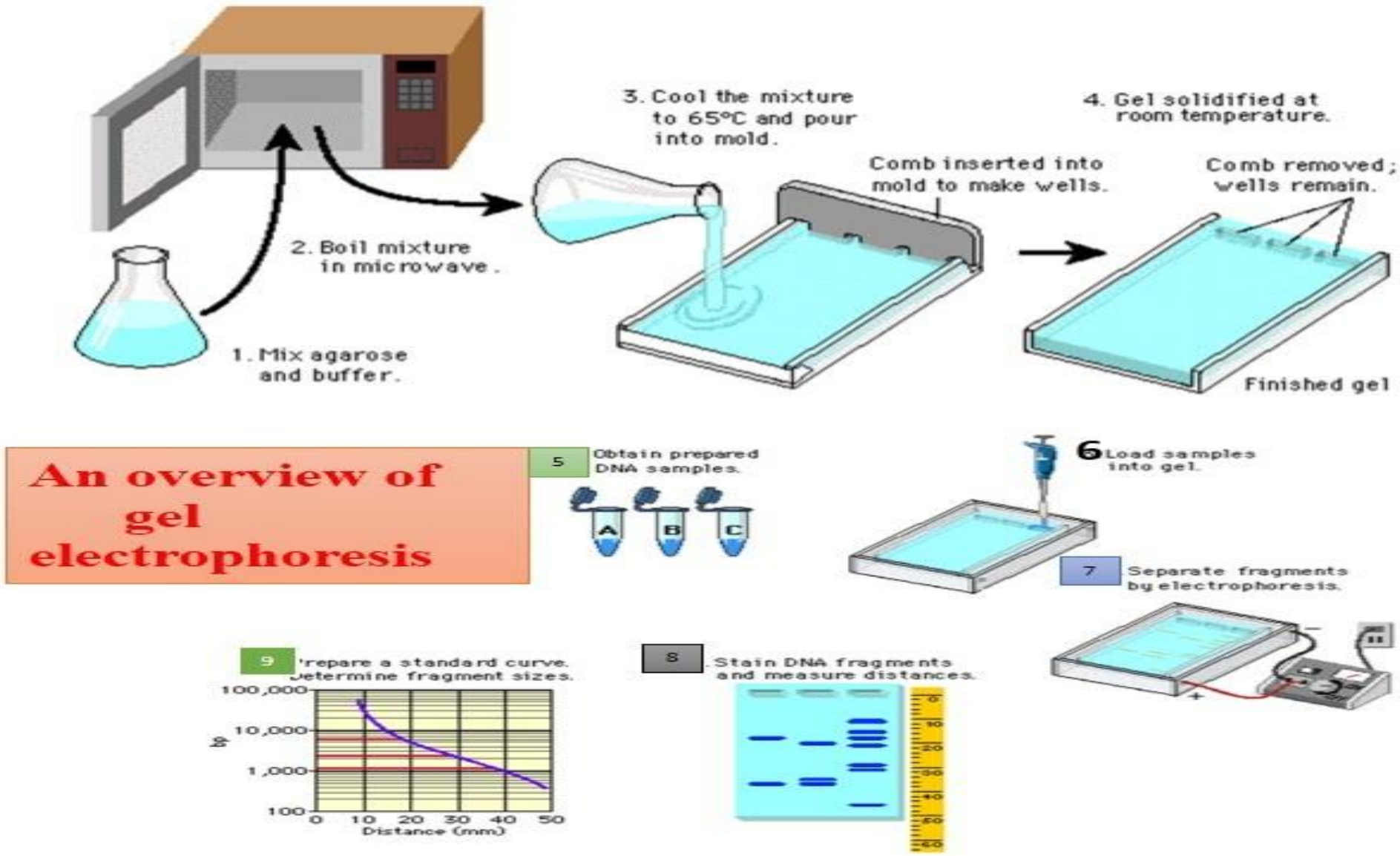


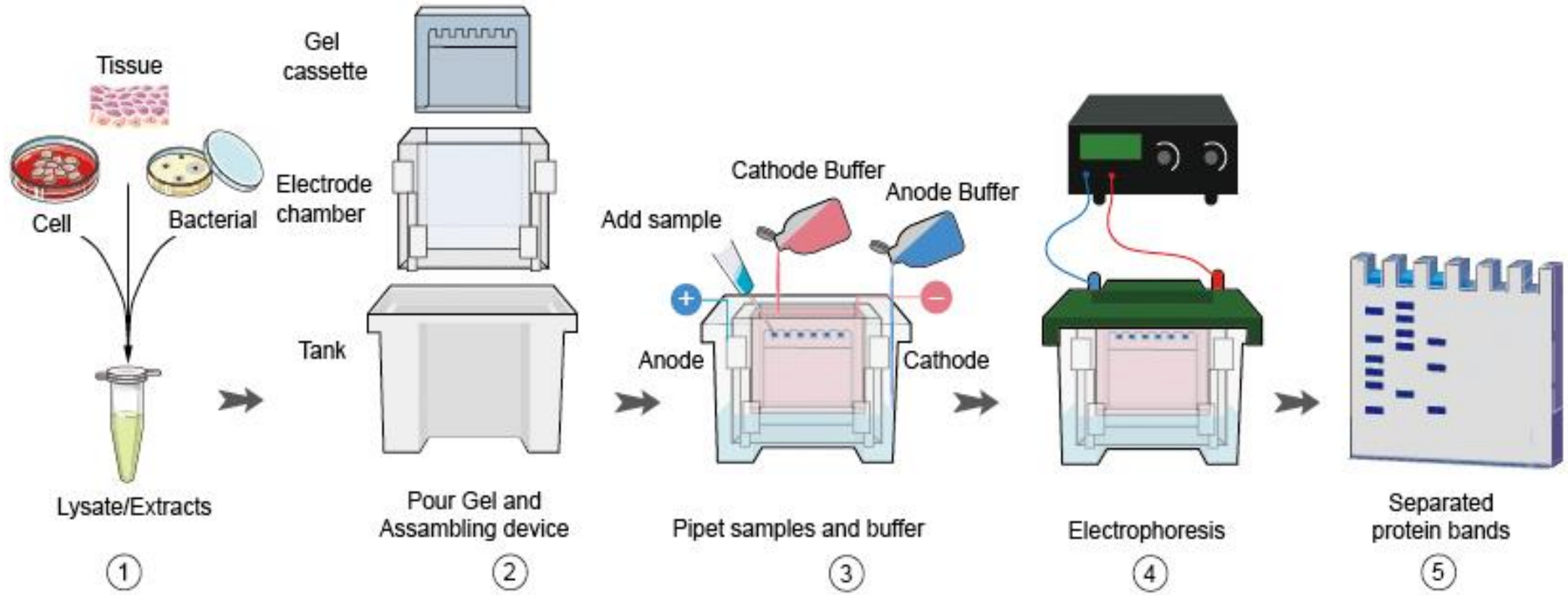
Figure (4) Agarose gel electrophoresis for amplified TGFβ1gene of DM patients. Bands were fractionated by electrophoresis on a 2 % agarose gel (1 h., 80V/cm) and visualized under U.V. light after staining with ethidium bromide staining. (L:100 - 3000bp M: ladder,); Lane: 1,2,3,4,5,6,7,8 and 9. positive results.

- 전기영동(Electrophoresis) – 지지체 전기영동



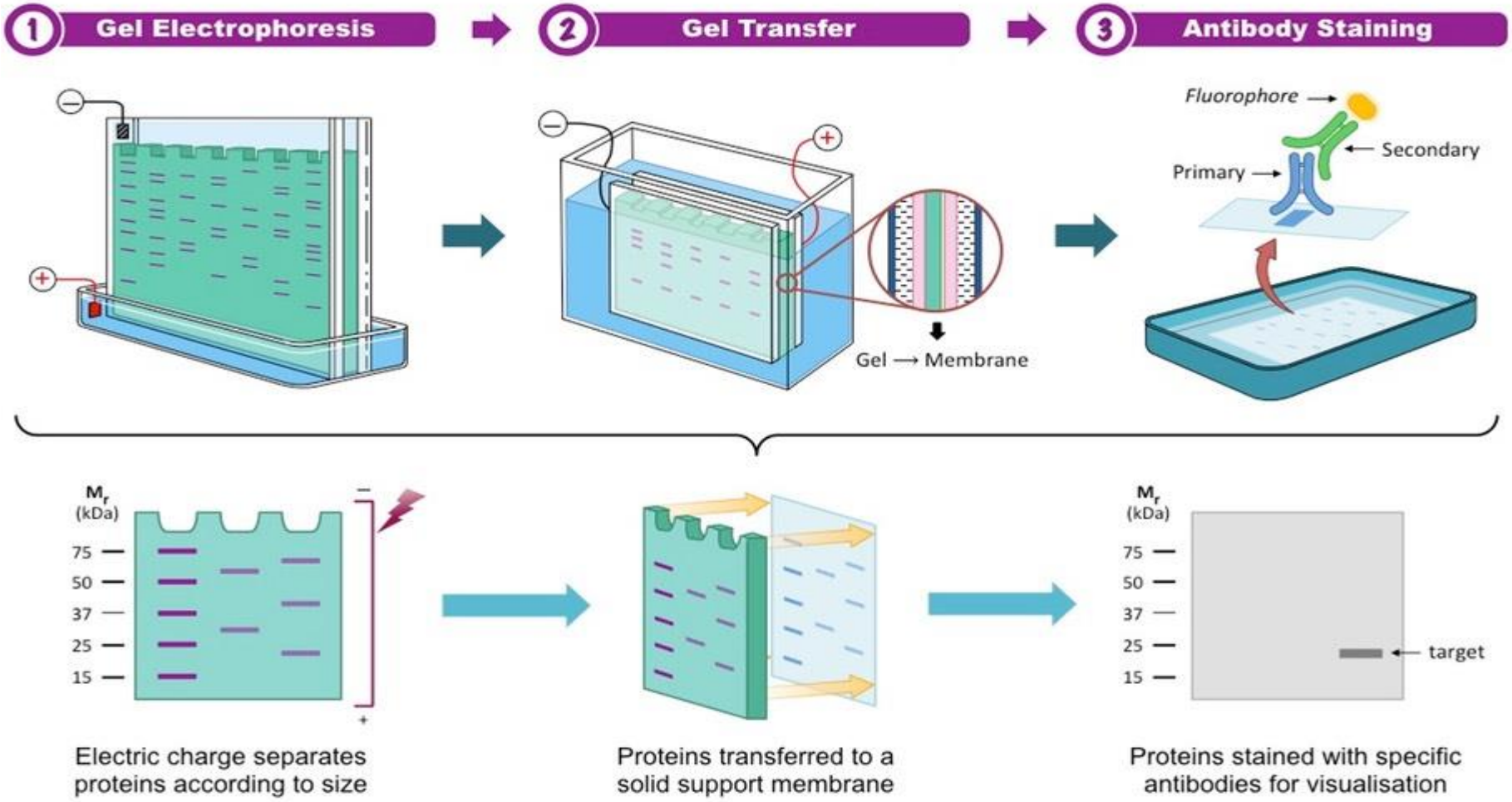
• 전기영동(Electrophoresis)

➢ Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)



• 전기영동(Electrophoresis)

➢ SLS PAGE – 단백질 분석



• 전기영동(Electrophoresis)-1

➢ 전기영동 종류: 지지체 전기영동

지지체 종류	주요 시료	분리 기준	목적
Cellulose acetate	혈청 단백질 등	**전하 (이동도)**	**혈청 단백질 분획** 등 분리
Agarose Gel	**DNA, RNA,** 혈청단백질 등	**분자량**	지질단백질, 효소, **DNA 분석, 면역전기영동**
Polyacrylamide Gel(PAGE)	단백질	**분자량**	**단백질 분리**
SDS(SLS)-PAGE	단백질	**분자량**	**단백질 분석**

• 전기영동(Electrophoresis) – 이동속도 영향인자

➢ 전기영동 이동속도에 영향을 주는 인자

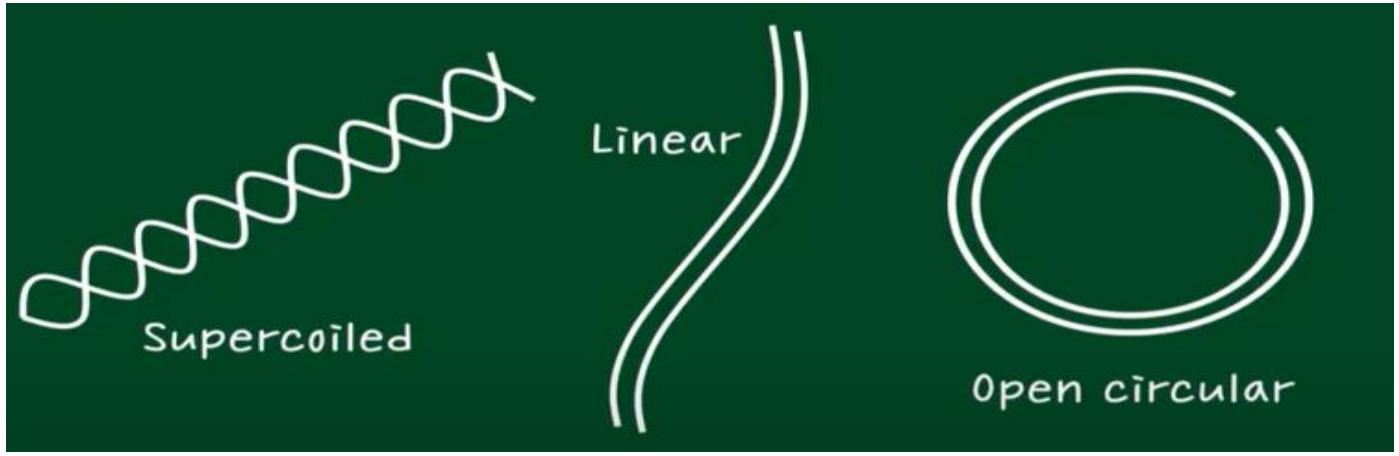
DNA: Agarose Gel
단백질: Polyacrylamide

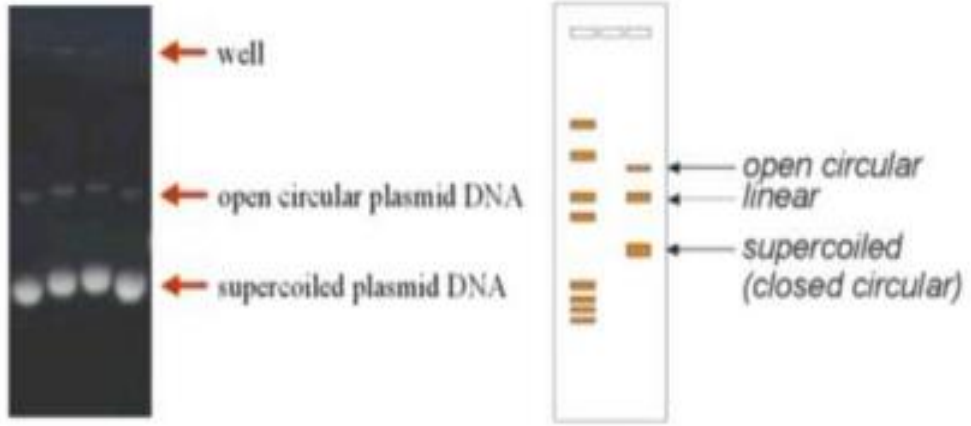
1) Sample 유형: 전하량(charge), 분자량(MW), 크기(Size), 구조, 지지체 종류, Gel 농도 등

2) 전기장: 전압(Voltage)・전류(Ampere)에 비례, 저항(Ω)과 반비례

3) 완충용액 종류: Barbital buffer(Veronal buffer) = [pH : 8.6]

<DNA구조>





빠름 ← 느림

• 전기영동(Electrophoresis) – 완충 용액(Buffer solution)

➢ 완충 용액

- 산이나 염기를 가해도 용액의 수소 이온 농도(pH)가 크게 변하지 않는 용액
- 알칼리 영역 **pH: 8.6** 을 가장 많이 사용

용액명	구성	사용 예시
TAE buffer	Tris + Acetate + EDTA	DNA 전기영동
TBE buffer	Tris + Borate + EDTA	해상도가 높은 DNA 분리
Barbital buffer	바르비탈산염 (barbital) 기반	단백질 전기영동 (특히 γ-globulin 분석)

=Veronal buffer

• 전기영동(Electrophoresis) – 검출

➢ 염색

- 분리된 단백질이나 DNA는 무색
  → 염색하여 시각화
- Fixation(고정)
  → 단백질을 Gel에 고정(단백질 용출 방지)
  → 아세트산, 메탄올

➢ 농도 측정

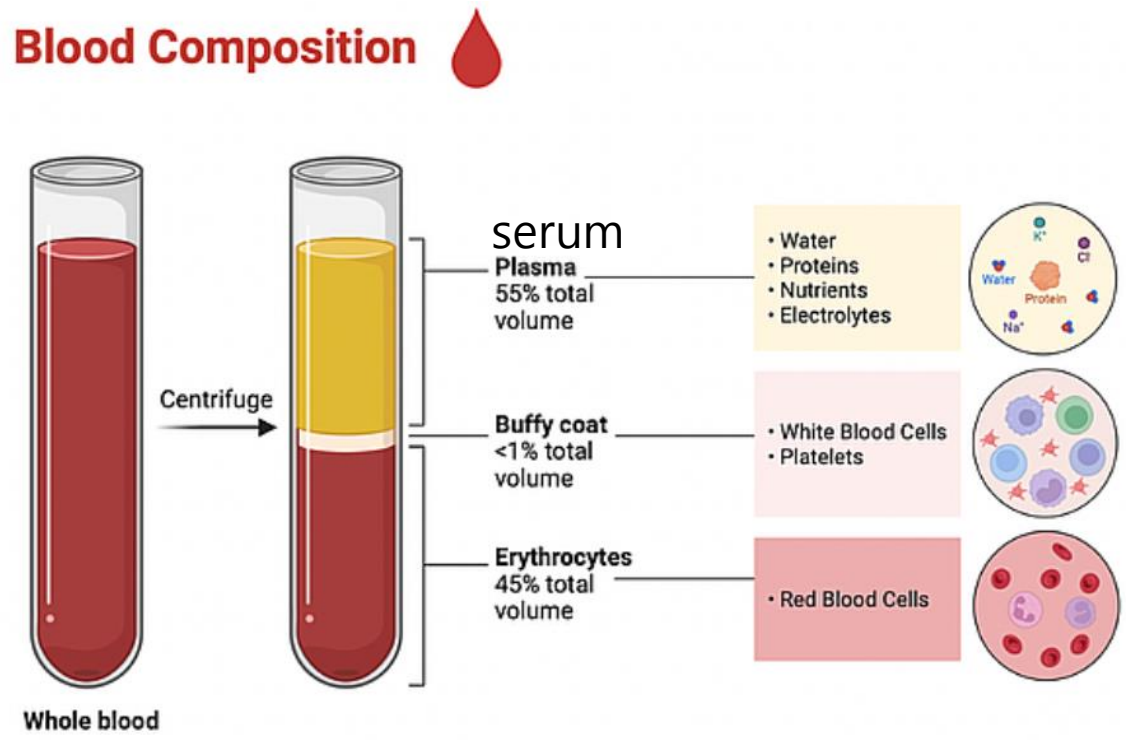
- 농도계(Densitometer)로 염색띠를 정량 측정

표 5-1 전기영동에서 단백질 분획의 염색과 측정 파장

분리 물질	염색	파장(nm)
혈청 단백질	Amido Black(Naphthol Blue Black) Agarose	640
	Coomassie Brilliant Blue G-250 (Brilliant Blue G) PAGE	595
	Coomassie Brilliant Blue R-250 (Brilliant Blue R)	560
	Ponceau S cellulose	520
	Ponceau 3R acetate	498
동종 효소	Nitrotetrazolium Blue	570
지질단백질	Fat Red 7B(Sudan Red 7B)	540
	Oil Red O	520
	Sudan Black B	600
DNA 단편	Ethidium bromide(fluorescent)	254(여기광) 590(형광)
	SYBR Green, GelRed, GelGreen	
뇌척수액 단백질	Silver nitrate	-

※ Etbr
- 독성이 있는 물질
- 현재는 거의 사용하지 않음

• 혈청 단백질(Serum protein)

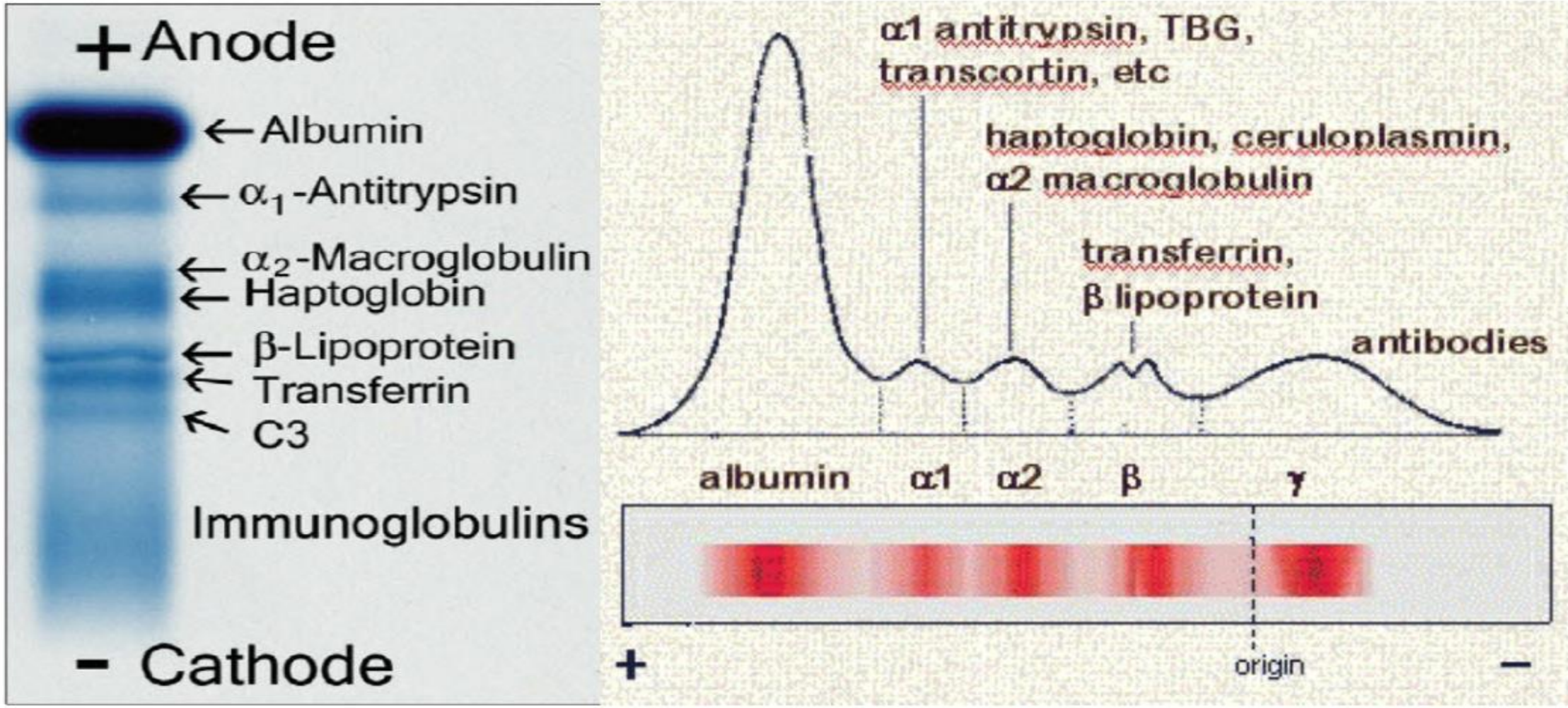


➢ Total protein(총 단백질)

- 정상농도: 6.5~8.5g/dL
- 주로, 알부민(Albumin)과 글로불린(Globulin)으로 구성
- **Albumin: 약 60-70%,** Globulin: 약 30-40%
- Albumin: 4.2~5.4g/dl, Globulin: 2.4~3.5g/dl
  - ① $\alpha_1 - Globulin$: 0.2~0.4 g/dl
  - ② $\alpha_2 - Globulin$: 0.4~0.9 g/dl
  - ③ $\beta - Globulin$: 0.4~0.8 g/dl
  - ④ $\gamma - Globulin$: 0.7~1.3 g/dl
- **Albumin/Globulin(A/G비): 1.1~1.7**

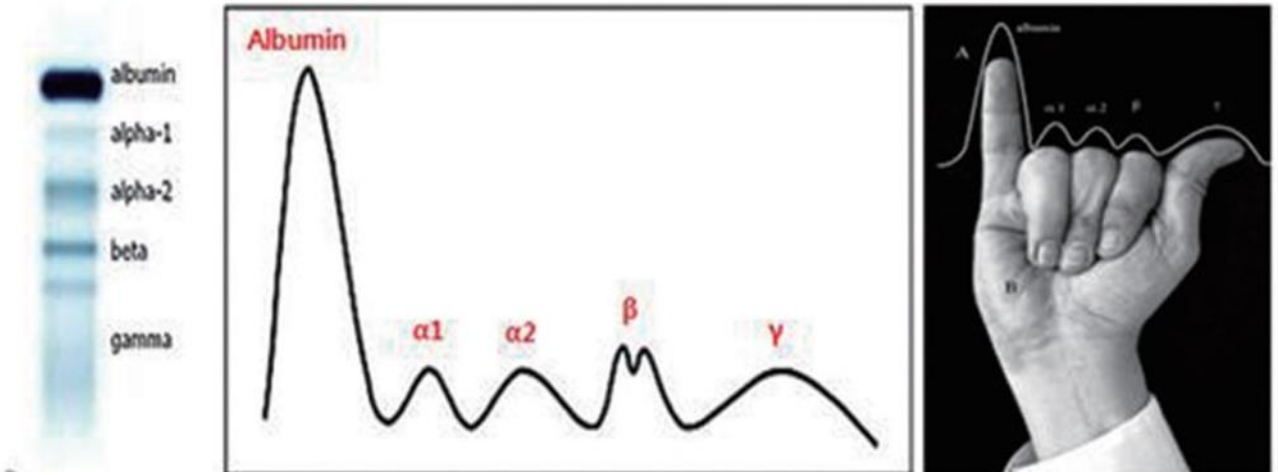
• 전기영동(Electrophoresis) – 혈청단백: Cellulose acetate 지지체

➢ **혈청단백 전기영동(Serum Protein Electrophoresis, SPEP) – 등전점 전기영동**



• 전기영동(Electrophoresis) – 혈청단백

➢ **혈청단백 전기영동(Serum Protein Electrophoresis, SPEP)**



Fraction	%	g/dL	g/dL Range	
Albumin	58.67	3.46	2.93	3.68
Alpha 1	3.39	0.20	0.11	0.31
Alpha 2	9.98	0.59	0.42	1.02
Beta	16.68	0.98	0.80	1.11
Gamma	11.28	0.67	0.53	0.89
Total Protein		5.90	4.90	6.90
Ratio				
A/G	1.42			

A/G Ratio = Albumin / Globulin

분획	합성장소	구성 단백질	역할
Albumin (알부민)		가장 많이 존재	혈장 삼투압 조절, 운반 역할
Alpha-1		α₁-antitrypsin 등	급성 염증 반응
Alpha-2	간	haptoglobin 등	염증, 조직손상
Beta		transferrin 등	철 운반
Gamma (γ)	**형질세포**	면역글로불린	면역 기능 (항체)

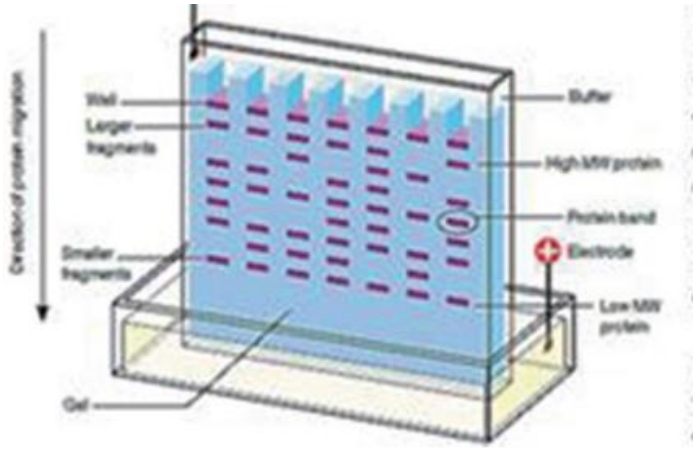
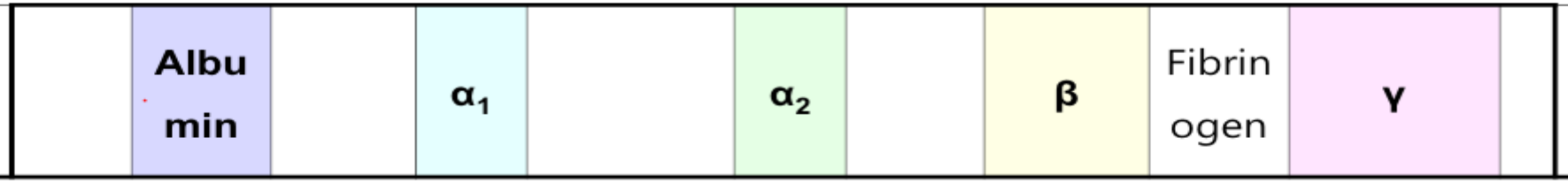


그림 7-16. 혈청 단백전기영동 결과: Amido Black 10 B 염색상, 영동된 분획을 Densitometer로 scanning한 결과, 혈청 단백분획 5가지의 정상치 분포

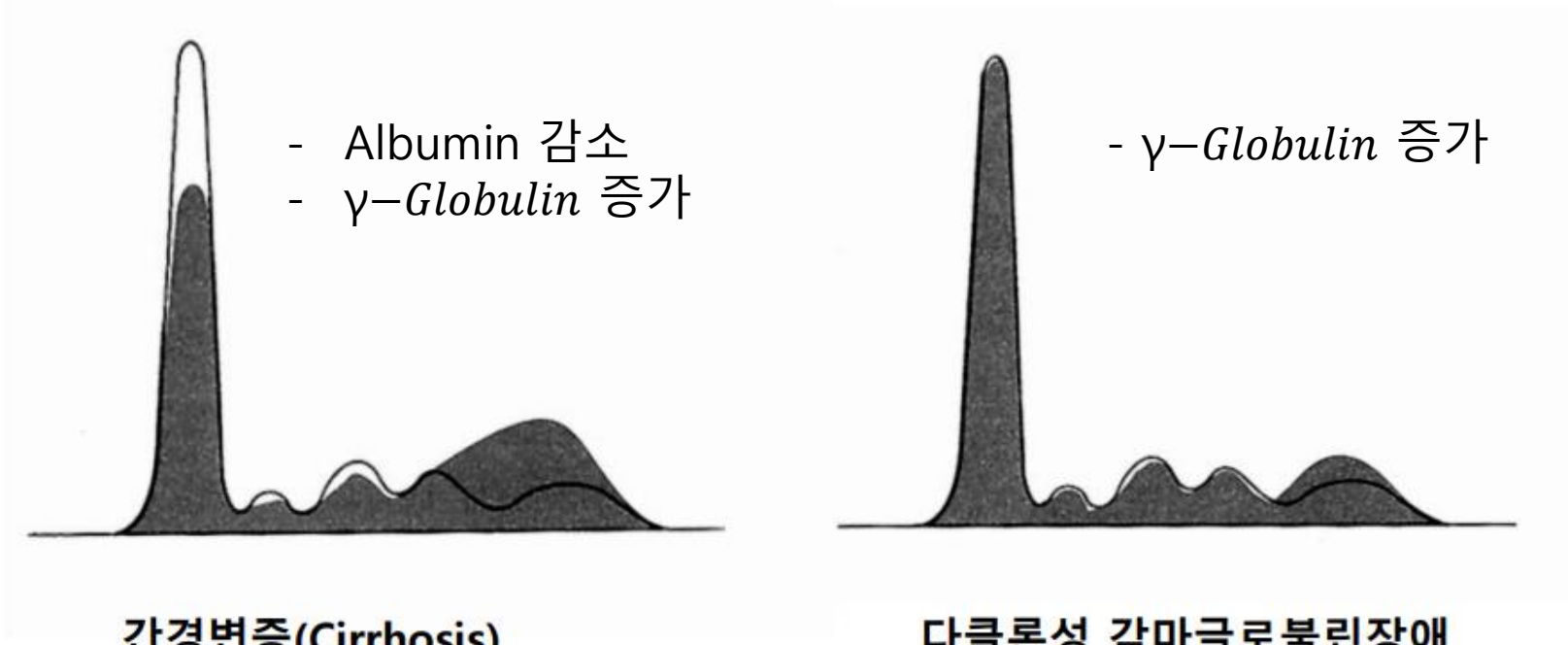
• 전기영동(Electrophoresis) – 혈청단백

➢ **혈청단백 전기영동(Serum Protein Electrophoresis, SPEP)**

전기영동시 Supporting Media (지지체)					
단백질 분획	Albumin	α_1-Globulin	α_2-Globulin	β-Globulin	γ-Globulin
정 상 치	50~65%	2~6%	4~8%	8~15%	12~20%
구 체 적 성 분	Pre-Albumin Albumin	α_1-Acid glycoprotein α_1-Antitrypsin α_1-Lipoprotein (HDL) α_1-Fetoprotein Mucoprotein	α_2-Macroglobulin Haptoglobin Ceruloplasmin Glycoprotein Prothrombin	β-Lipoprotein (LDL) Preβ-Lipoprotein (VLDL) Transferrin Hemoglobin (Hemopexin) C_3 Complement C_4 Complement CRP	IgG IgM IgA IgD IgE

• 전기영동(Electrophoresis) – 혈청단백

➢ **혈청단백 전기영동(Serum Protein Electrophoresis, SPEP)**



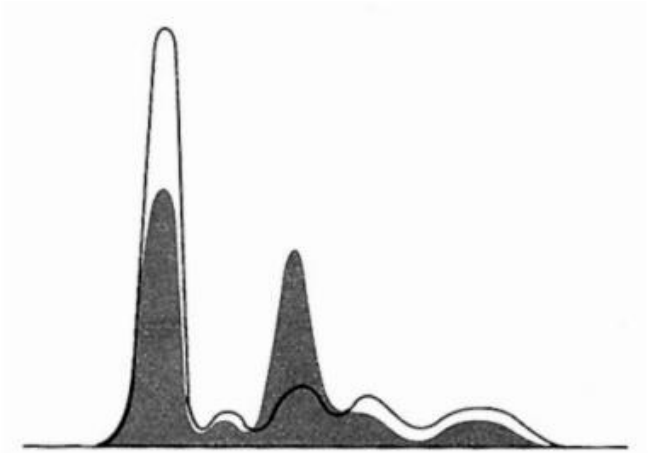
간경변증(Cirrhosis)

다클론성 감마글로불린장애
(Polyclonal Gammopathies)

만성 염증, 자가면역질환, 감염

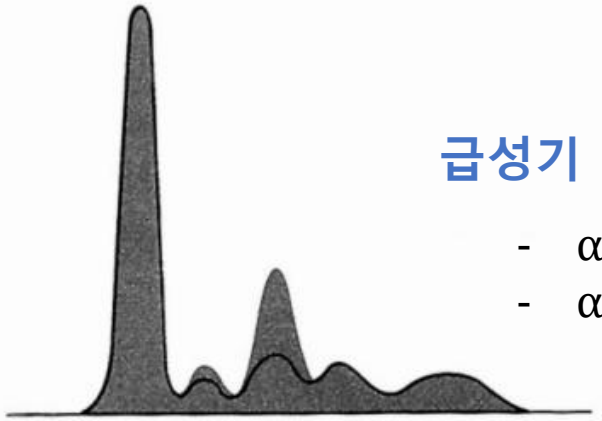
• 전기영동(Electrophoresis) – 혈청단백

➢ **혈청단백 전기영동(Serum Protein Electrophoresis, SPEP)**



신증후군(Nephrotic Syndrome)

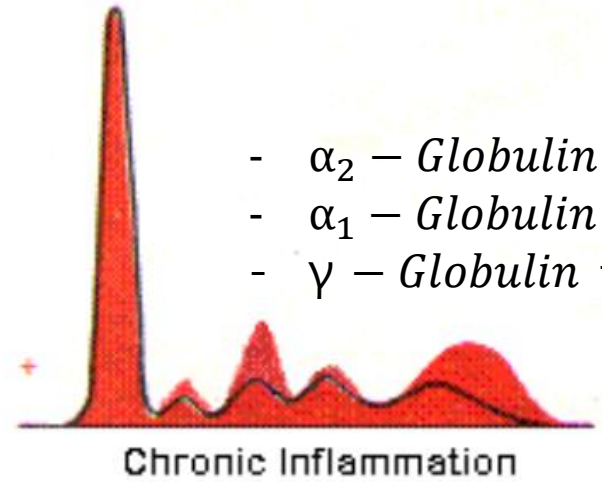
- Albumin 감소
- $\alpha_2 - Globulin$ 증가



급성 염증(Acute Inflammation)

급성기 반응 단백질이 증가

- $\alpha_2 - Globulin$ 증가
- $\alpha_1 - Globulin$ 증가



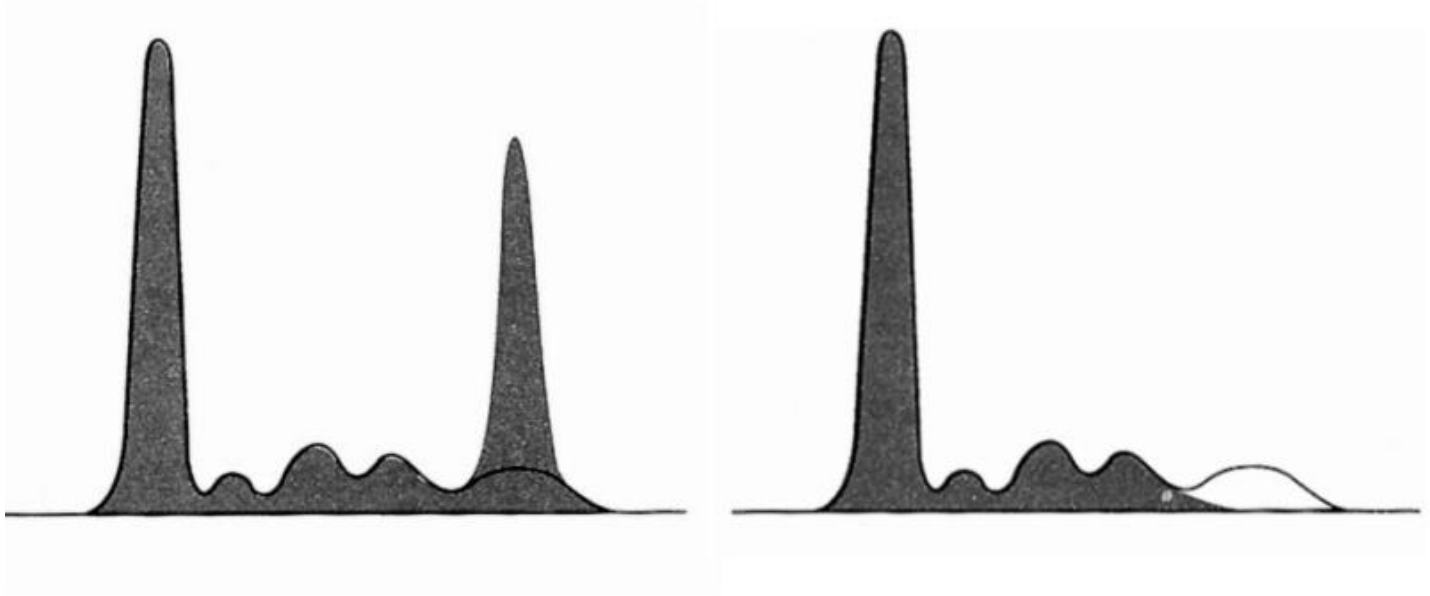
Chronic Inflammation

- $\alpha_2 - Globulin$ 증가
- $\alpha_1 - Globulin$ 증가
- $\gamma - Globulin$ 증가

장기간 염증 반응 → 면역세포가 지속적으로 항체(γ-globulin) 생성

• 전기영동(Electrophoresis) – 혈청단백

➢ **혈청단백 전기영동(Serum Protein Electrophoresis, SPEP)**



단클론성 감마글로불린장애
(Monoclonal Gammapathies)

한 종류의 클론이 비정상적으로 증식
→ 같은 면역글로불린 과다 생성

다발성 골수종 (Multiple Myeloma)

저감마글로불린혈증
(Hypogammaglobulinemia)

· 선천성 면역결핍증
· 백혈병, 림프종
· 면역억제 치료 중인 환자

• 전기영동(Electrophoresis)-2 :면역전기영동, 면역고정전기영동

구분	지지체 종류	시료	분리 기준	검출원리	결과	목적
면역전기영동 (IEP)	Agarose Gel	혈청 등	전하 (이동도)	**항원 – 항체 반응**	아치형(Arc) 침전선	면역글로불린(γ-globulin) 이상 단백 검출
면역고정전기영동 (IFE)	Agarose Gel	혈청, 소변, CSF	전하 (이동도)	**항혈청 고정**	단백질 밴드 형태	**다발성 골수종**, 단클론성 감마글불린증 등 질병 진단

➢ **면역전기영동(Immuno electrophoresis, IEP)**

- 전기영동으로 단백질을 분리한 후, 분리된 단백질이 들어 있는 Gel 위에 '항혈청 ' 확산시켜 '**항원-항체**'반응으로 침전선 형성
- 전기영동 → 항혈청 확산 → 항원-항체 결합 → 침전선(arc) 형성

➢ **면역고정전기영동(Immunofixation electrophoresis, IFE)**

- 전기영동으로 단백질을 분리한 후, 각 트랙에 특정 **'항혈청'을 덮어 고정(fixation)** → 항원-항체 복합체 형성 → 염색으로 단백질 밴드 확인

• 전기영동(Electrophoresis)-2 :면역전기영동, 면역고정전기영동

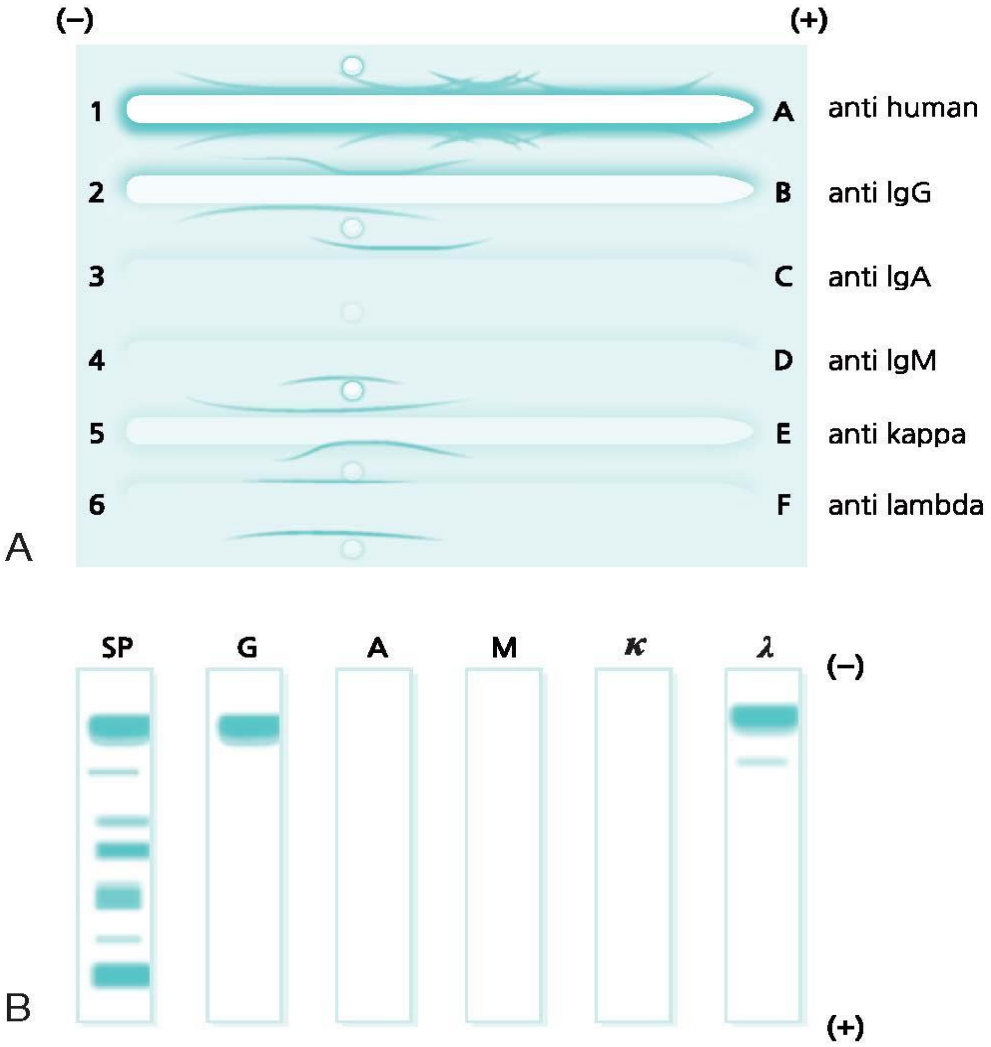
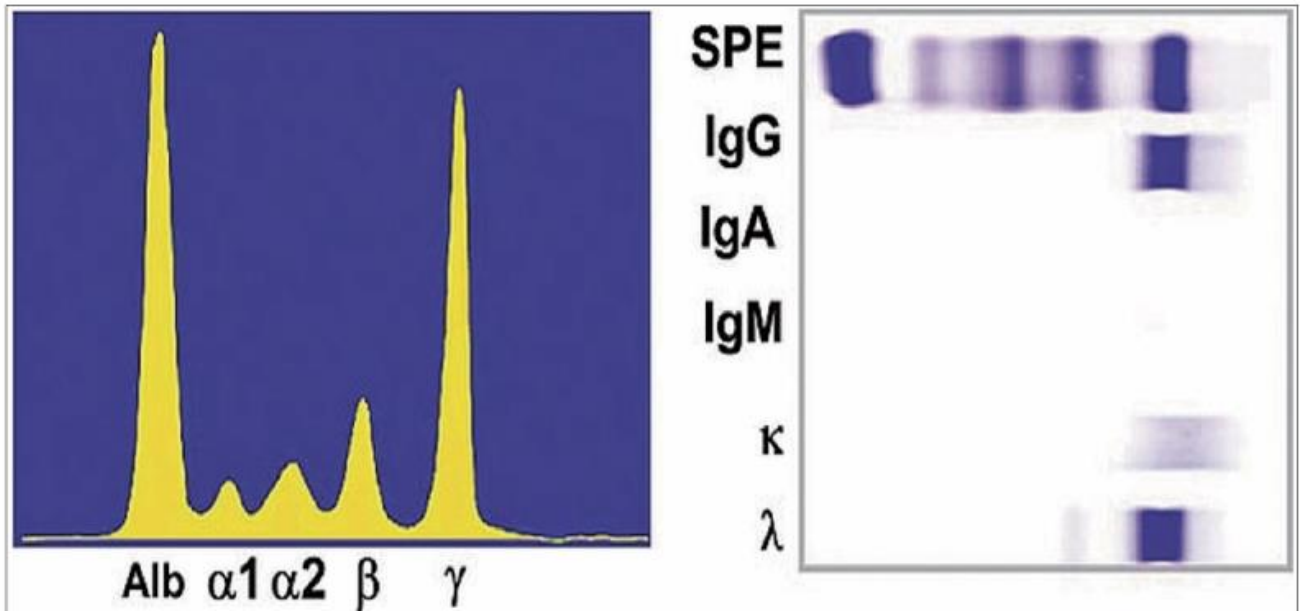


그림 8.4 (A) 면역 전기영동, (B) 면역고정전기영동

[그림 3] PEP and IFE of a serum IgG–λ monoclonal protein[11]



• 전기영동(Electrophoresis)-3 :모세관 전기영동

➢ 모세관 전기영동(Capillary electrophoresis, CE)

- **전기삼투현상**을 이용
- 전기장에 의해 용액 자체가 흐름, 분자들을 이동·분리
- 모세관 내부에 적용하면 고속/고분해능 분리가 가능
- 혈액 검사나 유전자 분석에 사용

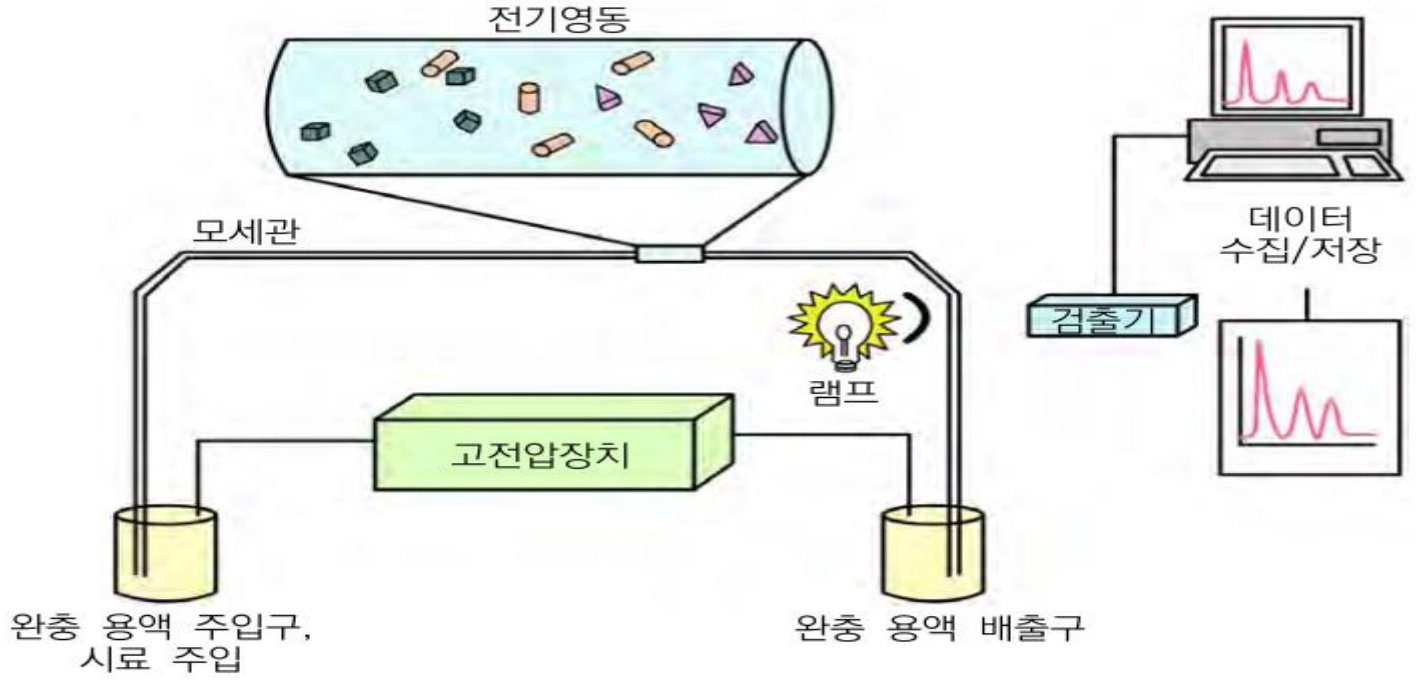


그림 5-11 모세관 전기영동 기구의 개요

• 전기영동(Electrophoresis)-3 :모세관 전기영동

Cellulose acetate Agarose gel 모세관전기영동

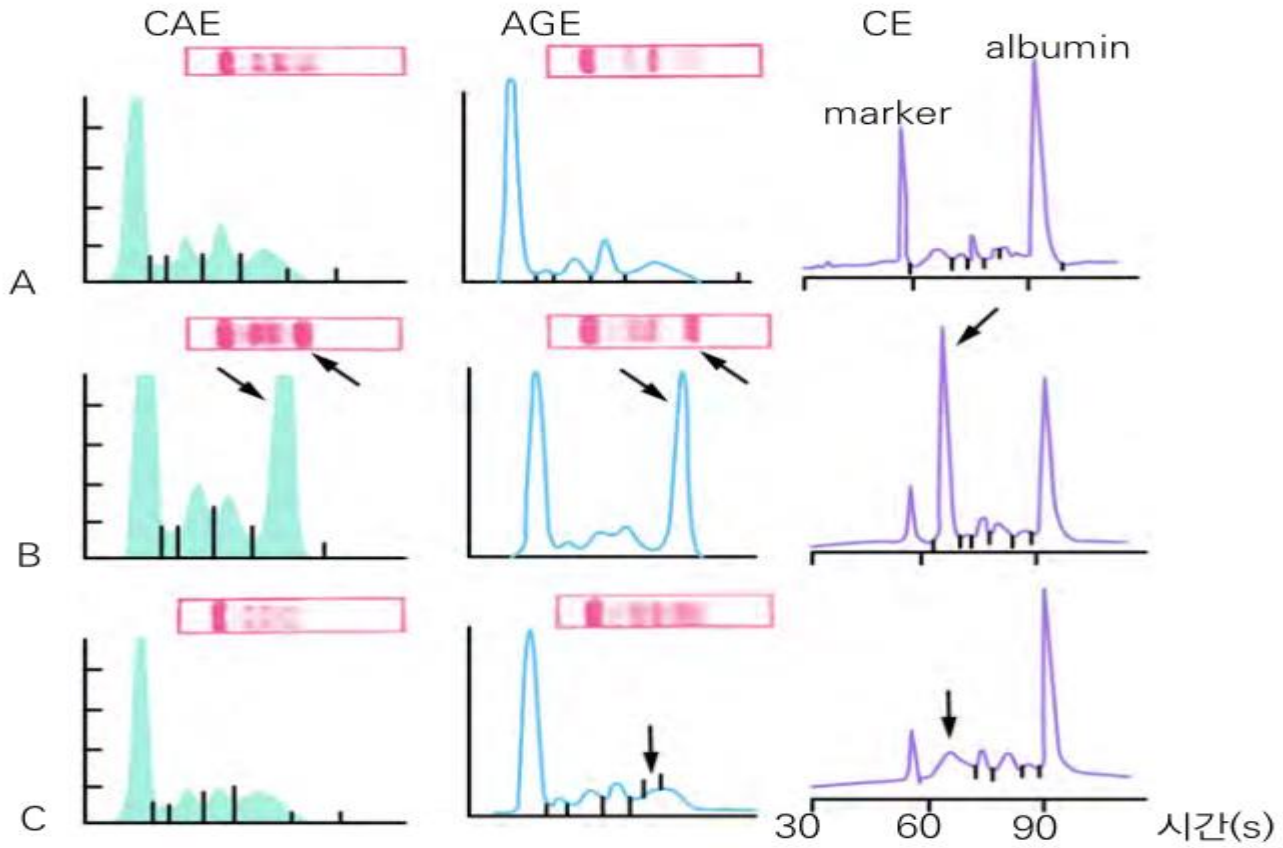
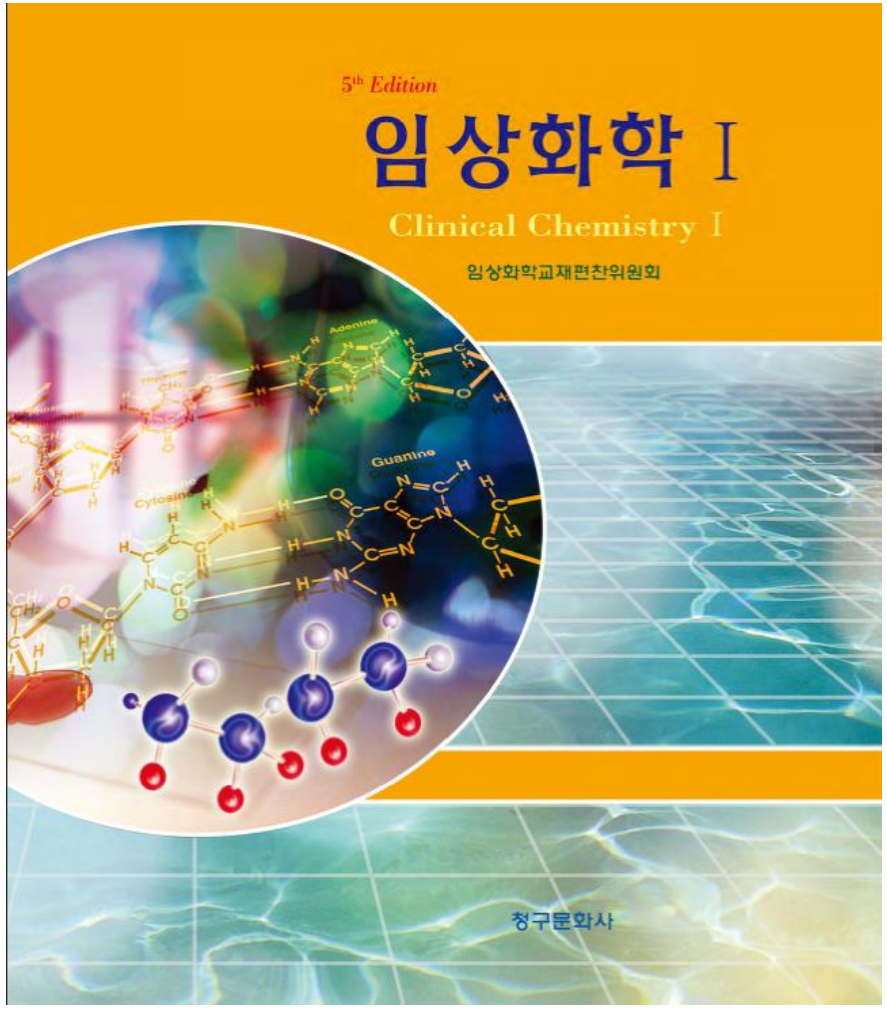
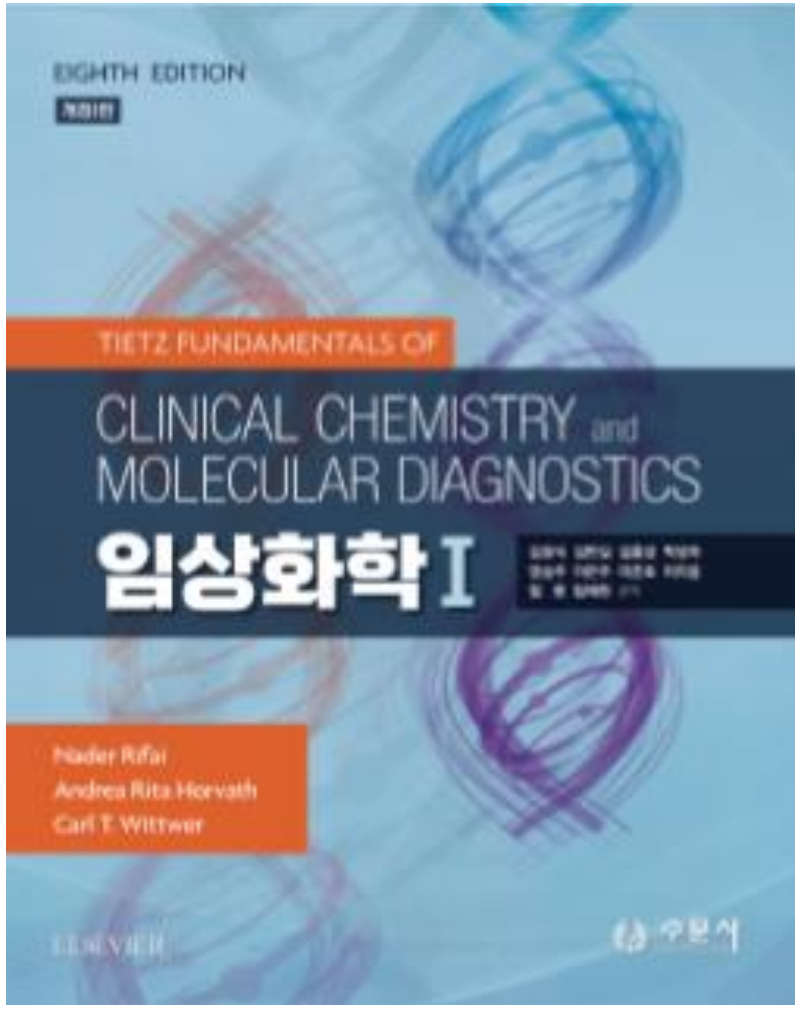


그림 5-12 모세관 전기영동(CE), 셀룰로스 아세트산염 전기영동(CAE) 및 아가로스 겔 전기영동(AGE)에 의한 혈청 단백질의 분리 비교

(A) 정상 혈청, (B) 많은 M-단백질을 포함하고 있는 환자 혈청, (C) 적은 M-단백질을 포함하고 있는 환자 혈청. 화살표는 단클론성 단백질의 위치를 가리킨다.

- 출처


5th Edition
임상화학 I
Clinical Chemistry I
임상화학교재편찬위원회
청구문화사


EIGHTH EDITION
TIETZ FUNDAMENTALS OF
CLINICAL CHEMISTRY and
MOLECULAR DIAGNOSTICS
임상화학 I
Nader Rifai
Andrea Rita Horvath
Carl T. Wittwer