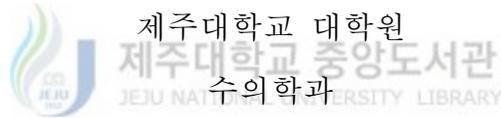


수의학석사 학위논문

$A\beta_{1-42}$ 와 CT105에 의한 사람 신경세포종
SK-N-SH의 신경독성효과에 Lactacystin이
미치는 효과



방성현

2001년 11월

A β ₁₋₄₂ 와 CT105에 의한 사람 신경세포종
SK-N-SH의 신경독성효과에 Lactacystin이
미치는 효과

지도교수 이 영재

방성현

이 논문을 수의학 석사학위 논문으로 제출함

2001년 10월

 제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY
방성현의 수의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____

위 원 _____

위 원 _____

제주대학교 대학원

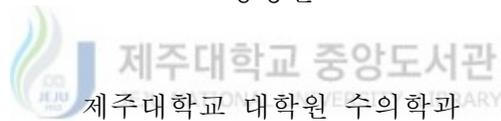
2001년 12월

초 록

A β ₁₋₄₂ 와 CT105에 의한 사람 신경세포종 SK-N-SH의 신경독성효과에 Lactacystin이 미치는 효과

(지도교수 : 이 영 재)

방성현



알츠하이머병 환자의 뇌에서는 ubiquitin화된 단백질이 발견된다. 이는 신경세포단백질의 변성에 있어서 ubiquitin과 관련된 proteasome의 병태생리학적인 역할과 관련이 있다. 이에 본 연구에서는 마이크로몰 수준의 농도에서도 신경세포를 죽일 수 있는 A β ₁₋₄₂와 CT105를 신경세포종인 SK-N-SH cell line에 투여하여 신경단백질의 ubiquitination과 연관된 proteasome에 의한 신경세포단백질의 변성을 일으켜보고, specific proteasome inhibitor인 lactacystin을 투여하여 A β ₁₋₄₂와 CT105에 의한 신경독성효과가 차단되는 것을 확인하였다. A β ₁₋₄₂와 CT105에 의해서 일어나는 세포형태상의 변화가

lactacystin의 선 투여로 인하여 발생하지 않았다는 결과로 볼 때 $A\beta_{1-42}$ 와 CT105에 의한 신경독성효과는 ubiquitin-proteasome 경로를 거친 단백질의 변성을 통하여 일어난다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 알츠하이머병 또는 그와 연관된 신경변성성 질병에 있어서 그 치료와 예방에 새로운 약리학적인 지표를 제시할 수 있을 것이라고 사료된다.

주요어 : Ubiquitin, Proteasome, 알츠하이머병, $A\beta_{1-42}$, CT105, Ubiquitination, 신경독성효과, SK-N-SH cell line



목 차

초록	i
목차	iii
List of figures	V
I. 서론	1
1. 연구배경	1
2. 연구목적	4
II. 실험재료 및 방법	5
1. 시약	5
2. Cell Culture	5
3. LDH assay	6
4. C단 단백질의 합성, 정제	6
5. Western Blot	7
III. 결과	8

IV. 고찰-----	18
V. 결론-----	21
VI. 참고문헌-----	22



List of Figures

Figure 1. Expression of CT105 by IPTG induction.

Figure 2. Purification of CT105 (18 kDa) through ion exchange chromatography.

Figure 3. Purification of CT105(18 kDa) by Ni-NTA affinity chromatography.

Figure 4. Western blot analysis of purified CT105. Western blot analysis was performed using anti-4G8 and anti-6-HIS monoclonal antibodies.

Figure 5. Cytotoxic effects of CT105 in SK-N-SH cells.

Figure 6. Microscopic observation of $A\beta_{1-42}$ induced damage in SK-N-SH cell after 24 hours treatment (phase-contrast, 20X).

Figure 7. Microscopic observation of CT105 induced damage in SK-N-SH cell after 24 hours treatment (phase-contrast, 20X).

I. 서 론

1. 연구배경

알츠하이머병은 소위 치매라고 불리워지는 심각한 인지기능 손실 질환의 주요한 한 질병이다 (Hof 등, 1995). 오늘날까지도 치매라고 알려진 신경질환의 억제나 치료법에 관해서는 파악하지 못하고 있다. 최근 몇 년간 알츠하이머병과 같은 신경변성성 질환의 병변에 관한 연구가 집중적으로 이루어졌지만 근본적으로 이러한 질병에 관한 결정적인 분자수준에서의 기전은 아직까지 이해하지 못하고 있다 (Martin, 1999).

알츠하이머병의 주요한 신경 병리학적인 특징은 신경세포내 신경섬유 덩어리와 노인반, 그리고 혈관내 아밀로이드 베타 단백질의 침착이다 (Wischik 등, 1988). 아밀로이드 베타 단백질은 알츠하이머 환자의 노인반에서 비용해성 세포외 침착물로써 축적되는 아미노산 40-42개의 폴리펩티드이다 (Selkoe, 1991). 아밀로이드 베타 단백질은 아밀로이드 베타 전구단백질로부터 잘려져 나온것으로, 이 전구단백질의 변이는 알츠하이머병과 관련이 있다 (Tanzi 등, 1993; Price 등, 1998). 아밀로이드 베타 단백질을 포함하는 아밀로이드 베타 전구단백질은 신경세포의 괴사(necrosis), 세포사멸(apoptosis), 및 활성산소물질(reactive oxygen species)과 관련된 세포 손상을 일으킨다고 보고되었다 (Davis, 1996; Suzuki, 1997; Mattson and Pedersen, 1998; Yan 등, 1999).

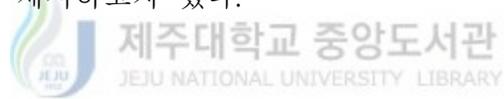
초기 또는 말기 familial 알츠하이머병 환자의 lymphoblastoid 배양
포의 세포질 및 배양액에서 아밀로이드 베타전구단백질의 C단 펩티
드(carboxy-terminal fragment)가 발견된다 (Matsumoto, 1994). 알
츠하이머병 환자의 신경반(plaque), 모세혈관, 신경섬유 덩어리속에
서도 C단 펩티드가 발견되었다 (Maruyama 등, 1990; Dyrks, 1992).
Familial 알츠하이머병을 일으키는 아밀로이드 전구단백질의 변이는
신경세포내에서 아밀로이드 베타 전구단백질의 amyloidogenic and
neurotoxic carboxy terminal fragment의 세포내 축적을 증가시킨다
(McPhie 등, 1997). 비록 그 기전은 밝혀지지 않았으나, 아밀로이드
베타단백질을 포함하는 carboxy-terminal fragment는 신경세포에
독성이 있는 것으로 보인다 (Yanker 등, 1989; Fukuchi 등, 1992,
1993; Hayashi 등, 1992).

노화나 그 이외의 다양한 요인으로 인해 손상된 세포내 단백질의
분해는 한 개 또는 그이상의 ubiquitin분자의 공유결합으로 인해 표
적 단백질이 인식되고 그 신호가 proteasome으로 전달되어 발생한
다 (Laney and Hochstrasser, 1999). 이러한 반응(ubiquitination)은
연속해서 반응하는 세가지 조절효소, 즉 E1(ubiquitin 활성화효소)
E2(ubiquitin 결합효소) E3(ubiquitin ligase)와 관련이 있다
(Ciechanover and Schwartz, 1994). 또한 ubiquitin 항원은 알츠하이
머병의 주요한 두개의 병변인 신경섬유덩어리와 노인반에서 발견되
었고, 그 병변에서 tau ubiquitin conjugate가 존재한다고 보고되었
다 (Mesco 등, 1991). Ubiquitin과 단백질의 결합은 약 2,000-kDa
의 ATP의존성 단백분해복합체인 26S proteasome에 의해서 빠르
게 분해된다.

이러한 거대 구조물은 중심에 20S(700kDa) proteasome을 포함하고 있으며 이는 단백질을 분해시키고, 두 개의 19S 복합체는 기질 특이성과 조절능력을 부여한다 (Coux 등, 1996). Proteasome inhibitor인 lactacystin은 20S proteasome의 아직 알려지지 않은 촉매 단위와 결합하여 chymotrypsin-like, trypsin-like activities를 비가역적으로 caspase-like activity는 가역적으로 각각 다른 비율로 억제한다 (Fenteany 등, 1995). Lactacystin은 거대 26S 복합체에 의해서 일어나는 펩티드의 가수분해를 억제하고 세포 내에서 단기간 또는 장기간 생존하는 단백질의 ubiquitin/proteasome 매개성 분해를 억제한다. 그리고 세포내 다른 protease를 억제하지 않고 특이하게 proteasome을 유일하게 억제하는 물질이며 세포내 lysosome에 의한 단백질 분해는 억제하지 않는다 (Craiu 등, 1997; Fenteany 등, 1995; Omura 등, 1991). Lactacystin은 major histocompatibility complex (MHC) class I 항원의 출현을 차단한다 (Cerundolo 등, 1997). Proteasome inhibitors는 NF- κ B의 활성을 억제하여 수많은 질병에서 지배적인 역할을 담당하는 다양한 leukocyte adhesion 분자들 뿐만 아니라 감염매개 인자들의 생성을 in vivo와 in vitro상에서 극적으로 감소시킬수 있다 (Adams 등, 1996). 신경세포나 thymocyte에서 lactacystin은 apoptosis를 감소시키는 것으로 보인다(Grimm 등, 1996; Sadoul 등, 1996).

2. 연구목적

본 연구는 아밀로이드 베타 전구단백질의 C단 펩티드에 의해 일어나는 신경세포독성이 ubiquitin/proteasome 매개성 단백질에 의해 중재되는지 조사하였다. 이를 위하여 Chong등(1994)의 방법을 개선하여 C단 단백질을 정제하고, 사람의 신경세포종인 SK-N-SH세포에 specific proteasome inhibitor인 lactacystin을 사용하여 먼저 proteasome inhibition을 일으킨 후 대표적인 알츠하이머병의 원인 물질인 아밀로이드 베타 단백질 그리고 C단 단백질에 의해 일어나는 신경세포독성에 대한 lactacystin의 효과를 보고자 했다. 이러한 결과들로 알츠하이머병의 치료적인 대안과 그분자적 기전에 관한 새로운 시도를 제시하고자 했다.



II. 실험재료 및 방법

1. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS). 항생제 및 trypsin 등의 세포배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며 배양용기(24 well plate, 96 well plate, 10cm dish)는 Falcon(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Lactacystin은 Sigma Chemical Co. Ltd. (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. A β 1-42는 U.S. Peptide (Rancho Cucamonga, CA, U.S.A.)에서 구입하였다.



2. Cell Culture

사람 신경세포종인 SK-N-SH는 서울대학교 의과대학 약리학교실로부터 분양받아 100 I.U. penicillin, 100 μ g streptomycin, 10% fetal bovine serum(Gibco, U.S.A.)를 첨가하여 사용하였다. 세포의 배양은 온도 37OC, 습도 95%, CO₂ 농도 5%의 배양기(CO₂ incubator, JOHNSAM CORP, KOREA)를 사용하였다. Late log phase에 있는 cell을 trypsin으로 바닥으로부터 해리시켜 모운 후 Hemocytometer로 cell count를 시행하여 4cm culture dish에 saturation density가 10%가 되도록 뿌린다. 3일에 한번 씩 계대배양을 실시하였다.

3. LDH assay

세포를 배양한 medium으로 release되어 나온 LDH양을 Cytotox96 nonradioactive cytotoxicity assay kit(Promega)를 이용하여 제조업체의 사용설명서에 따라 측정하였다. 4cm culture dish에 cell을 80-90% confluence가 될 때까지 배양한 다음 각 dish에 최종농도가 Lactacystin 1 μ M, CT105 5 μ M, A β 1-42 20 μ M 되도록 처리한다. 24시간 배양후에 250g에서 5분간 원심분리한 후 supernatant 200 μ l. 를 96well plate에 모은다. 각 well에 substrate mix를 50 μ l씩 추가하고 30분간 암실에서 배양하면 LDH에 의해 형성된 formazan에 의해서 붉은색이 나타나게 된다. 30분후 stop solution을 첨가하고 ELISA reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 sample의 LDH activity는 1% Triton X-100에 의해 유리되는 LDH 값을 100%로 하고 이 값에 대한 media에 유리되어 나온 LDH값을 상대적인 값으로 표시하였다.

4. C단 단백질의 합성, 정제

C단 단백질의 합성은 기존의 서울대학교 약리학교실에서 이루어지던 방법(Chong 등, 1994)을 개선하여 실시하였다. Expression pld인 pQE9-CT105를 E.coli(JM109)에 형질전환 시킨 후 600nm에서 흡광도가 0.6이 될 때까지 세포를 배양하고 IPTG(1mM)를 induction한 후 4시간동안 배양하여 pellet을 얻은 후

IPTG를 induction하지 않은 세포의 pellet을 모아 SDS-PAGE를 실시하였다. 그 세포의 pellet을 lysis한 후 이온교환성 수지를 이용하여 CT105 펩티드를 정제하였다. CT105가 용해되어있는 8M urea 용액을 Q-sepharose 이온교환컬럼에 적용하고 15분이상 반응시킨 후 run through에서 받아내었다. Low salt solution (100mM NaCl, 4M urea, 10mM mercaptoethanol, tris(pH7.4))를 컬럼용량의 10volume이상 적용시켜 wash를 받아내었다. Watman paper에 각 wash solution을 10 μ l를 떨어뜨린 후 말린 다음 coomassie blue염색을 실시하여 빠져나오는 단백질이 없음을 확인한 후 200mM과 400mM NaCl low salt solution을 각각 2volume씩 적용시켜 elution을 하였다. 이렇게 정제된 CT105 펩티드는 다시 Ni-NTA affinity 컬럼에 적용하였다. 6M guanidine hydrochloride solution과 이온교환컬럼의 elution 용액을 3:1의 비율로 희석하고 얼음에 막은 상태에서 30초 간격으로 10분 동안 sonication을 실시한 후 컬럼에 적용시키고 20분 이상 반응시키고 run through를 받고 low salt solution pH 7과 pH 5.9 그리고 pH 4 로 wash를 한 다음 컬럼의 pH를 높이기 위해 low salt solution pH 7을 다시 적용하고 1M imidazole 4M urea solution으로 elution을 하였다. 차례로 받은 fraction들은 watman paper를 이용하여 spotting으로 확인하였고 이중 imidazole fraction들을 SDS-PAGE로 각각의 순도를 확인하였다. 정제된 단백질의 양을 측정하고 증류수로 투석한 후 냉동건조시키고 30% Acetonitrile, 0.1% Trifluoro acetic anhydrous solution에 녹여서 사용하였다. 세포(2.4L)를 배양하고 위의 정제과정과 투석 그리고 냉동

건조를 거쳐 우리가 얻을수 있는 CT105 펩티드의 양은 250 μ g 정도였다.

5. Western Blot

정제한 CT105를 확인하기 위해서 Western blot을 실시하였다(Fig. 4.). Western blot을 위한 항원으로는 정제한 CT105 단백질을 사용하였고, 항체는 6-HIS와 4G8을 사용하였다. 먼저, 13.5% SDS-Polyacrylamide gel의 각 well에 15 μ g의 sample을 loading하고 40mA에서 100분간 전기영동한 다음 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell(Bio Rad Co.)로 PVDF membrane에 전사한 후 항원이 전사된 membrane을 5% 탈지유가 포함된 Tween-20, Tris-buffered saline(TTBS)로 shaking 하면서 1시간 동안 blocking 시키고 6-HIS(1:2,500), 4G8(1:5,000)으로 희석하여 실온에서 각각 1시간동안 반응시킨후, peroxidase labelled anti-rabbit IgG (Amersham LIFE SCIENCE Co.) 를 2차항체로 사용하여 실온에서 반응시킨 후 Western blotting analysis system (Amershampharmacia biotech Co.)을 이용하여 발색시켜서 CT105의 특이 밴드를 확인하였다.

III. 결과

Expression plasmid인 pQE9-CT105를 E.coli(JM109)에 형질전환 시킨 후 IPTG(1mM)를 induction하고 4시간동안 배양하여 IPTG를 induction하지 않은 세포의 pellet을 모아 SDS-PAGE를 실시하였다. 그 결과 IPTG induction시킨 세포에서 CT105 펩티드의 분자량인 18 kDa에서 현저하게 두꺼워진 밴드를 확인하여 원하는 단백질이 정상적으로 형질전환되고 발현되었다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 이렇게 발현된 단백질을 정제하기 위하여 그 세포의 pellet을 lysis 한 후 이온교환성 수지를 이용하여 CT105 펩티드를 정제하였다. CT105가 용해되어있는 8M urea 용액을 Q-sepharose 이온교환컬럼에 적용하고 15분이상 반응시킨 후 run through에서 받아내었다. Low salt solution (100mM NaCl, 4M urea, 10mM mercaptoethanol, tris(pH7.4))을 컬럼용량의 10volume이상 적용시켜 wash를 받아내었다. 200mM과 400mM NaCl low salt solution을 각각 2volume씩 적용시켜 elution을 해본 결과 Run through에서는 31kDa-14.4kDa크기의 펩티드 일부분이 컬럼과 반응하지 못하고 빠져 나왔고 wash에서는 low salt solution의 적용용량에 따라 점차적으로 gel과 반응하지 못하고 남아있는 펩티드가 다 배출되었고 200mM(Fig. 2, elution 1,2)과 400mM(Fig. 2, 3,4) NaCl low salt solution으로 적용한 결과 CT105 펩티드(18kDa)가 cell extract(Fig. 1, +IPTG)에 비해 더 깨끗하게 정제되었다(Fig. 2). 이렇게 정제된

단백질중에서 부가적으로 N-terminus에 6개의 histidine이 붙여진 pQE9 vector에 형질전환된 CT105 펩티드를 정제하기 위해서 다시 Ni-NTA affinity 컬럼에 적용하였다. Imidazole elution fraction들은 SDS-PAGE로 각각의 순도를 확인하였다. CT105 펩티드 자체가 응집덩어리(self aggregate)이기 때문에 순도가 아주 좋진 않았다(Fig. 3). 세포(2.4L)를 배양하고 위의 정제과정과 투석 그리고 냉동건조를 거쳐 우리가 얻을수 있는 CT105 펩티드의 양은 250 μ g 정도였다. 정제한 CT105 펩티드를 확인하기 위해서 아밀로이드 전구단백질에 특이성이 있는 4G8 monoclonal antibody를 사용하였고 N-terminus에 부가로 6개의 histidine이 붙여진 pQE9-CT105임을 확인하기 위해서 6-His monoclonal antibody를 사용하여 western blot을 실시하였다. 그 결과 정제된 CT105 펩티드와 cell extract 모두 이 두 항체에 대하여 특이성을 갖고 있음을 확인 할 수 있었다(Fig. 4). 이렇게 정제한 CT105 펩티드의 사람 신경 세포종인 SK-N-SH cell에 대한 독성을 알아보기 위하여 lactate dehydrogenase(LDH) assay를 실시해본 결과 정상 그룹에 비해서 약 2배 이상의 독성을 나타냈다(Fig. 5). 이러한 독성효과를 막아보기 위해서 Proteasome 억제제인 lactacystin을 사람 신경세포종인 SK-N-SH 세포에 먼저 투여하고 4시간 후에 아밀로이드 베타 단백질₁₋₄₂와 CT105를 투여하여 신경독성을 유발하여 보았다. 두 물질 투여 후 24시간동안 배양하고 도립 현미경으로 형태학적인 변화를 관찰하였다. 그 결과 정상그룹 (Fig. 6a, 7a)과 lactacystin 단독투여군 (Fig. 6b, 7b) 그리고 독성물질과 lactacystin 투여군 (Fig. 6d, 7d)에서는 세포형태상에 있어서 뚜렷한

변화를 보이지 않았으나 두 독성물질인 아밀로이드 베타 단백질₁₋₄₂ (Fig. 6, c)와 CT105투여군 (Fig. 7, c)에서는 세포 응집덩어리가 많이 관찰되었고 특히 아밀로이드 베타 단백질₁₋₄₂투여군 (Fig. 6, c)에서는 응집덩어리가 많이 관찰되었고, CT105투여군 (Fig. 7, c)에서는 응집덩어리 뿐만 아니라, 세포의 정상적인 형태를 전혀 찾아 볼 수 없었고 윤곽이 소실되고 세공이 관찰되었다. 이러한 결과로 인해 lactacystin 아밀로이드 베타 단백질₁₋₄₂와 CT105 펩티드에 의해서 일어나는 세포독성을 막아준다는 것을 확인할 수 있었다.



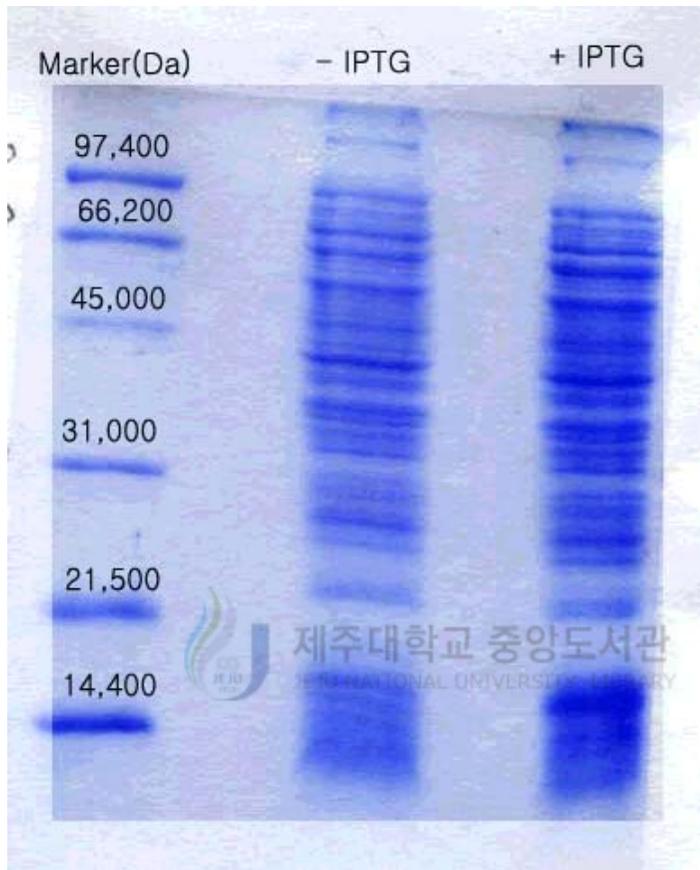


Fig 1. CT105 peptide(18,000 Da) expression by IPTG induction.
 - IPTG) no IPTG induction cell lysate. + IPTG) 4 hours culture after IPTG(1mM) induction. The band representing CT105 peptide (18 kDa) is indicated by the arrowhead.

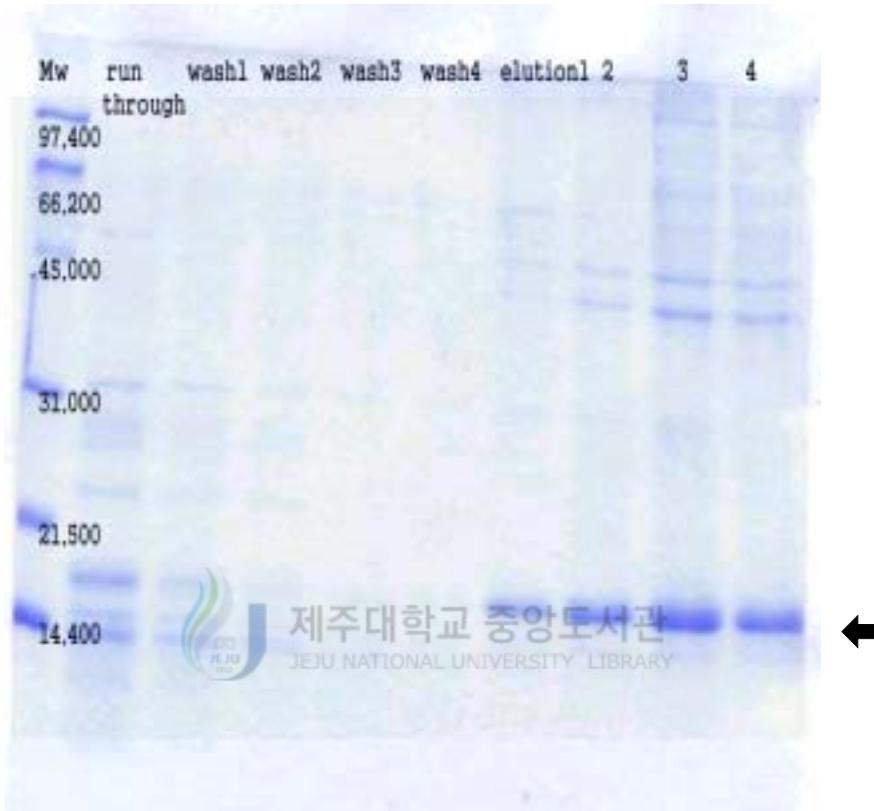


Fig 2. Purification of CT105 (18,000 Da) through ion exchange chromatography. The band (Elution 1-4) representing CT105 peptide (18 kDa) is indicated by the arrowhead.

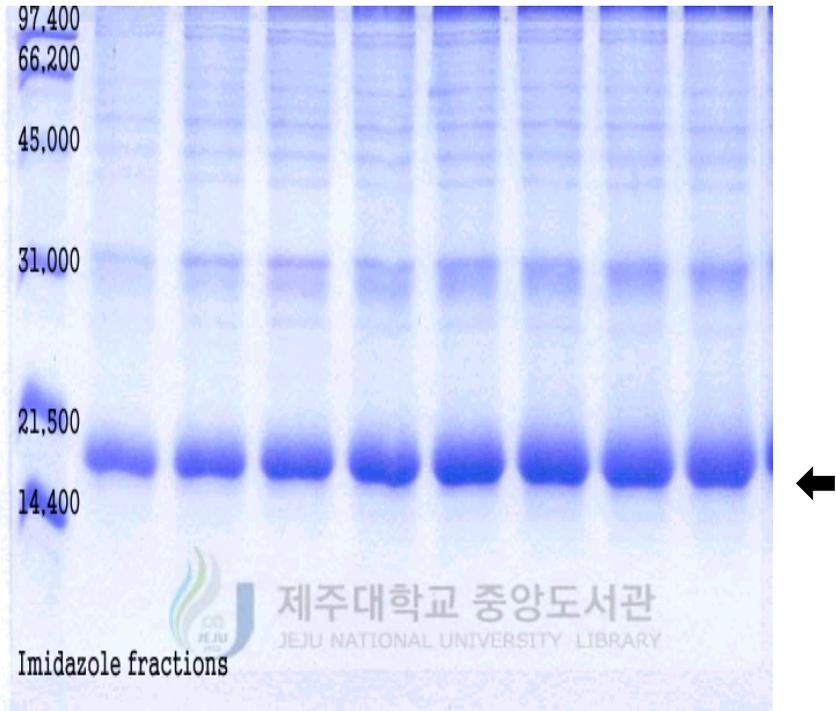


Fig 3. Purification of CT105(18,000 Da) by Ni-NTA affinity chromatography. The band representing CT105 peptide (18 kDa) is indicated by the arrowhead.

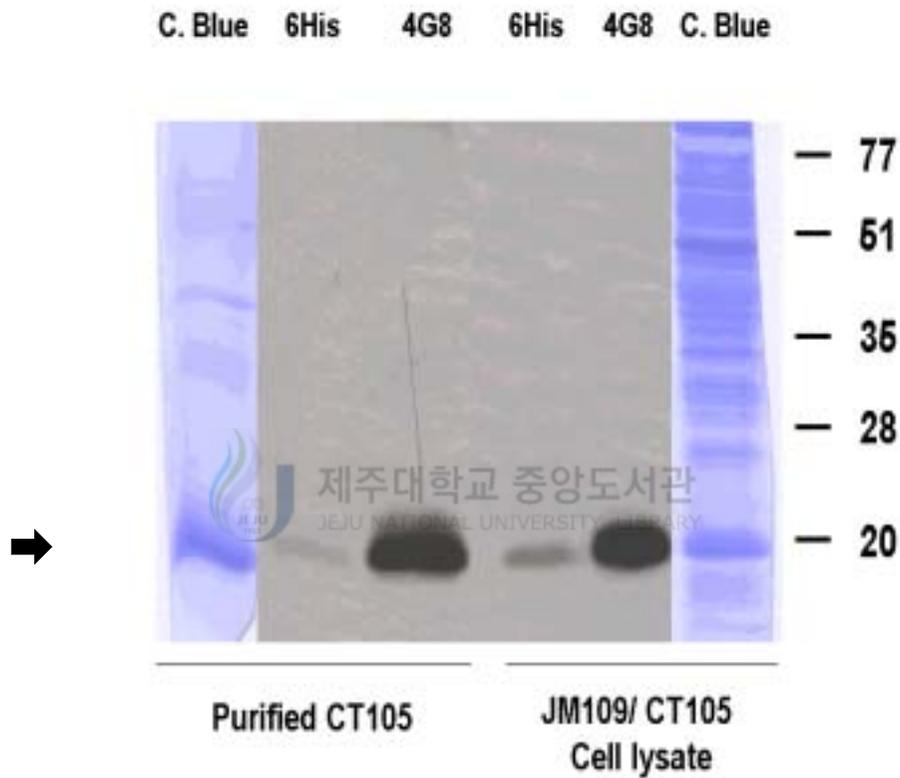


Fig 4. Western blot analysis of purified CT105. Western blot analysis was performed using 4G8 and 6-HIS antibodies. The band representing CT105 peptide(18 kDa) is indicated by the arrowhead.

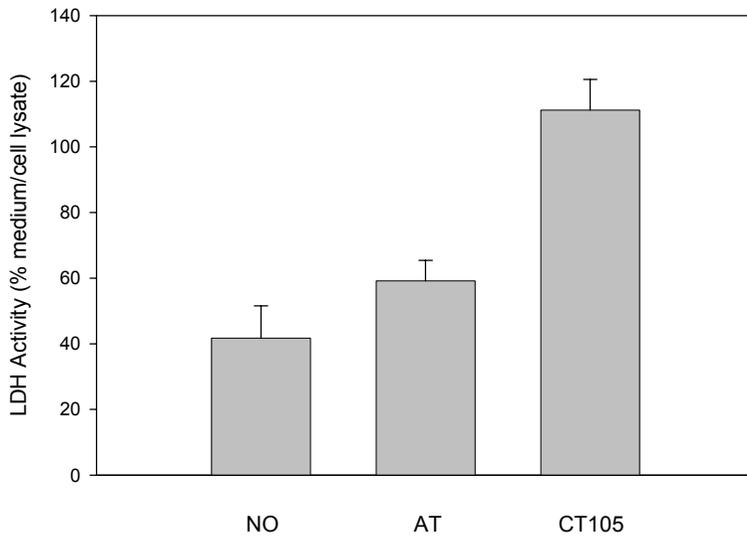


Fig 5. Cytotoxic effects of CT105 in SK-N-SH cells. Cells in the NO group received no treatment. AT group were treated with 0.1% acetonitrile and 0.0005% trifluoro acetic anhydrous solution for 24h. CT105 group were treated with 3.84 μ M CT105 peptide for 24h. The results are percentages of maximal LDH release that was obtained on complete cell lysis. Data are mean \pm SEM (bars) value obtained from five culture wells per experiment, determined in three separate experiments.

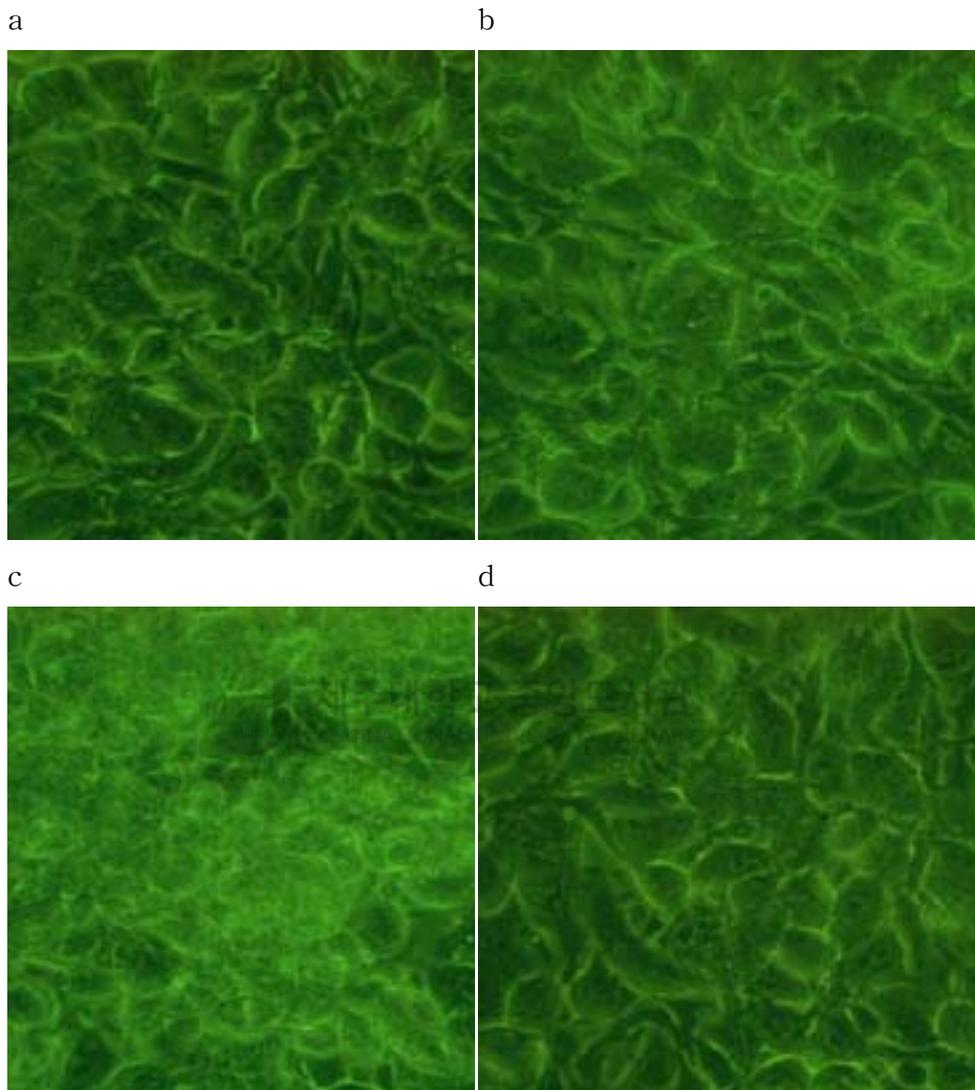


Fig 6. Microscopic observation of A β ₁₋₄₂ induced damage in SK-N-SH cell after 24 hours treatment (phase-contrast, 20X). Cells were treated for 24 hours with (a) control, (b) 1 μ M lactacystin, (c) 20 μ M A β ₁₋₄₂, (d) 20 μ M A β ₁₋₄₂ and 1 μ M lactacystin.

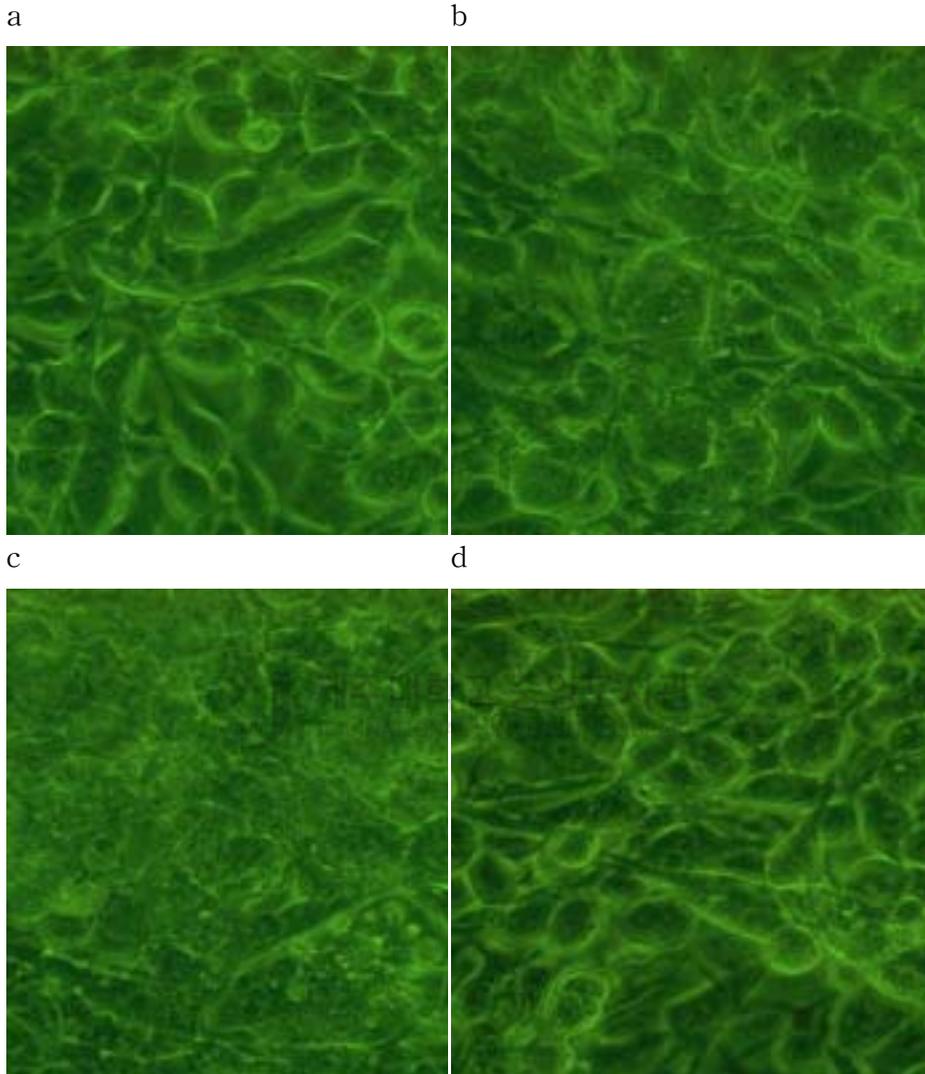


Fig 7. Microscopic observation of CT105 induced damage in SK-N-SH cell after 24 hours treatment (phase-contrast, 20X). Cells were treated for 24 hours with (a) control, (b) 1 μ M lactacystin, (c) 5 μ M CT105, (d) 5 μ M CT105 and 1 μ M lactacystin.

IV. 고찰

본 연구에서는 이러한 사실을 바탕으로 아밀로이드 베타 단백질₁₋₄₂와 CT105에 의해서 일어난 신경변성과 proteasome간의 관계를 살펴보고자 하였으며 이에 proteasome inhibitor인 lactacystin을 이용하여 실험을 수행하였다. 그 결과 정상그룹 (Fig. 6a, 7a)과 lactacystin 단독투여군 (Fig. 6b, 7b) 그리고 독성물질과 lactacystin 투여군 (Fig. 6d, 7d)에서는 세포형태상에 있어서 뚜렷한 변화를 보이지 않았으나, 아밀로이드 베타단백질₁₋₄₂ (Fig. 6, c)와 CT105투여군(Fig. 7, c)에서는 세포 응집덩어리가 많이 관찰되었고, 특히 아밀로이드 베타단백질₁₋₄₂투여군 (Fig. 6, c)에서는 심각한 응집덩어리가 많이 관찰되었고, CT105투여군 (Fig. 7, c)에서는 응집덩어리 뿐만 아니라, 세포의 정상적인 형태를 전혀 찾아 볼 수 없었고 윤곽이 소실되고 세포가 관찰되었다. 일반적으로 Proteasome activity와 연관이 있는 산화반응의 증가와 에너지의 감소는 일반적으로 아밀로이드 베타 단백질에 의해서 일어난다 (Davis, 1996; Suzuki. 1997; Yan 등, 1999). 신경변성과 proteasome activity간의 관계에 대한 가설이 세워지고 있는 상태이다. 많은 신경변성성 질병에서 ubiquitin-conjugate 단백질이 양적으로 증가하고 또한 neurofibrillary tangles, amyloid plaque, senile plaques와 같은 병변 부위에서 축적이 일어난다고 보고되었다 (Lennox 등, 1988; Lowe 등, 1988; Alves-Rodrigues 등, 1998). Proteasome 활성을 증가시키는 산화반응의 증가와 에너지의 감소는 일반적으로 in vitro상에서 아

밀로이드 베타 단백질에 의해서 일어난다 (Davis, 1996; Suzuki, 1997; Yan 등, 1999). 아밀로이드 베타 단백질은 신경세포단백질의 ubiquitination을 일으킨다. 또한 아밀로이드 베타 단백질의 독성은 단백질의 ubiquitination을 억제하거나 proteasome의 활성을 저지함으로써 차단 할 수 있다 (Antonella 등, 2000). 그러나 현재까지 아밀로이드 베타단백질 전부를 포함하고 있는 C단 단백질에 관한 연구는 이루어지지 않은 상태이다. C단 단백질 역시 그 분자적인 독성 기전은 밝혀지지 않은 상태이다. 세포내 heat-shock 단백질의 발생은 고온이나 그외 다른 독성인자에 대한 세포의 저항성을 증가시키는 일종의 보호반응을 일으킨다. proteasome 억제제를 노출시키면 열과 oxygen radical을 포함하는 치명적인 독성인자에 대한 세포저항성을 현저하게 증가시킬 수 있다 (Bush 등, 1997; Lee 등, 1998). 예를들어 disaccharide trehalose는 proteasome의 기능이 억제되었을 때 축적되며, 이러한 열예방 보호인자는 unfolded 단백질의 변성이나 응집을 억제한다 (Singer 등, 1998). 염증(inflammation)은 알츠하이머병의 질병발생에 있어서 기여를 하며, corticosteroid나 nonsteroidal 항감염성약물의 선투여는 알츠하이머병의 위험성을 감소시킨다 (McGeer and Rogers, 1992). Proteasome 억제제는 NF- κ B의 활성을 억제시켜 수많은 질병에서 주요한 역할을 하는 감염매개체들의 형성을 극적으로 감소시킨다. 이 같은 현저한 항 감염효과는 부분적으로 proteasome의 기능을 억제 할 수 있는 lactacystin의 용량을 반복 투여한 감염성 질병을 앓고 있는 몇 실험동물에서 확인할 수 있었다 (Adams 등, 1996). 본 연구에서는 이러한 사실을 바

탕으로 아밀로이드 베타 단백질₁₋₄₂와 CT105에 의해서 일어난 신경 변성과 proteasome간의 관계를 살펴보고자 하였으며 이에 proteasome inhibitor인 lactacystin을 이용하여 실험을 수행하였다. 그 결과 특히 아밀로이드 베타단백질₁₋₄₂ 투여군 (Fig. 6, c)에서는 응집덩어리가 많이 관찰되었고, CT105 투여군 (Fig. 7, c)에서는 응집덩어리 뿐만아니라, 세포의 정상적인 형태를 전혀 찾아 볼 수 없었고 윤곽이 소실되고 세포가 관찰되었다. 그 어떠한 기전으로 이러한 결과가 발생했는지는 확실히 알 수는 없으나, 두 물질의 독성효과는 lactacystin, 즉 proteasome 억제제에 의해서 발생하지 않았으며, 이상의 결과로 보아 사람의 신경세포종인 SK-N-SH 세포에서 아밀로이드 베타 단백질₁₋₄₂과 CT105에 의한 세포독성은 lactacystin에 의해 억제되는 proteasome 의존적 현상임을 알 수 있었다. CT105는 NFκB를 활성화시켜 독성을 일으키며 lactacystin은 NFκB를 억제하는 성질을 가지고 있다. 그 연관성은 NFκB에 대한 두 물질의 역할에 있을것으로 사료되며 추가적으로 NFκB의 immunoreactivity에 대한 실험이 이루어 져야 할 것이다. Lactacystin이 가지고 있는 항염증 인자로서의 기능과 세포의 생존에 영향을 주지 않으면서 proteasome을 부분적으로 억제하는 기능 열 예방 보호인자로서의 기능과 CT105를 비롯한 여러가지 신경독성 인자에 관한 연구는 계속 이루어져 할 과제이다.

V. 결론

1 . 세포(2.41)를 배양하여 정제과정과 투석 그리고 냉동조건을 거쳐 우리가 얻을수 있는 CT105 펩티드의 양은 250 μ g정도였으며 그 순도는 18 kDa이외의 펩티드가 약간 발견되었으며 3.84 μ M수준에서 매우강한 세포독성효과를 보였다.

2 . 1 μ M의 lactacystin은 세포의 형태학적인 변화에 그 어떠한 영향을 끼치지 않았다.

3 . 아밀로이드 베타 단백질 20 μ M과 CT105 5 μ M은 세포의 형태를 알아볼수없을 정도로 응집덩어리와 세공을 형성하였다.

4 . 4시간동안의 1 μ M lactacystin의 선투여는 아밀로이드 베타 단백질이나 C단 단백질에 의해 일어날 수 있는 세포의 형태학적인 변화를 막아 주었다.

이러한 결과로 인해, specific proteasome inhibitor인 lactacystin은 아밀로이드 베타단백질과 CT105에 의해서 일어날 수 있는 신경세포에 대한 독성을 억제한다는 사실을 알아낼 수 있었다. 많은 신경변성성 질병과 단백분해계인 Proteasome간에는 분명 어떠한 상관관계가 존재하고 있다. 이러한 상관관계는 이러한 질병의 치료와 분명히 그 관계가 있음이 분명하다. 이는 알츠하이머병의 예방이나 치료에 관한 연구에 새로운 방향을 제시할 수 있을 것이라고 사료된다.

VI. 참고문헌

Adams, J. and Stein, R. 1996. Novel inhibitors of the proteasome and their therapeutic use in inflammation. *Annu. Rep. Med. Chem.* 31, 279-288

Alves-Rodrigues, A., Gregori, L. and Figueredo-Pereira, M.E. 1998. Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends NEUROSCI.* 21, 516-520.

Antonella F., Maurizio G. and Daniel L. A. 2000. Prevention of β -Amyloid Neurotoxicity by Blockade of the Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway. *J. Neurochem.* 75, 1258-1263.

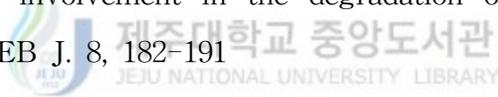
Bush, K., Goldberg, A. L. and Nigam, S. 1997. Proteasome Inhibition Leads to a Heat-shock Response, induction of Endoplasmic Reticulum Chaperones, and Thermotolerance. *J. Biol. Chem.* 272, 9086-9092.

Cerundolo, V., Benham, A., Braud, V., Mukherjee, S., Gould, K., Macino, B., Neefjes, J. and Townsend, A. 1997. The proteasome-specific inhibitor lactacystin blocks presentation of

cytotoxic T lymphocyte epitopes in human and murine cells. *Eur. J. Immunol.* 27, 336-341.

Chong Y.H., Jung J.M., Choi W., Park C.W., Choi K.S. and Suh Y.-H. 1994. Bacterial expression, purification of full length and carboxy terminal fragment of Alzheimer amyloid precursor protein and their proteolytic processing by thrombin. *Life Sci.* 54, 1259-1268.

Ciechanover, A. and Schwartz, A.L. 1994. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway : mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *FASEB J.* 8, 182-191



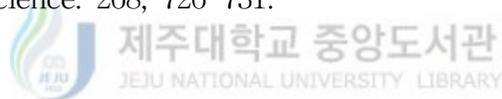
Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A. L. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 801-847.

Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C. F., Fenteany, G., Goldberg, A. L. and Rock, K. L. 1997. Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex I antigen presentation. *J. Biol. Chem.* 272, 13437-13445.

Davis J. B. 1996. Oxidative mechanisms in beta-amyloid cytotoxicity. *Neurodegeneration*. 5, 441-444

Dyrks, T., Dyrks, E., Hartmann, T., Masters, C. and Beyruther, K. 1992. Amyloidogenicity of [beta]A4 and [beta]A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation. *J. Biol. Chem.* 267, 18210-18217.

Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J. and Schreiber, S. L. 1995. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science*. 268, 726-731.



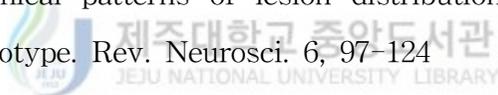
Fukuchi, K. I., Kamino, K., Deeb, S. S., Furlong, C. E., Sundstrom, J. A., Smith, A. C. and Martin, G. M. 1992. Expression of carboxy-terminal region of the [beta]- amyloid precursor protein in a heterogeneous culture of neuroblastoma cells: evidence for altered processing and selective neurotoxicity. *Mol. Brain Res.* 16, 37-46.

Fukuchi, K. I., Soper, B. and Martin, G. M. 1993. Neurotoxicity of [beta]-amyloid. *Nature*. 361, 122.

Grimm, L. M., Goldberg, A. L., Poirier, G. G., Schwartz, L. M. and Osborne, B. A. 1996. Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis. *EMBO J.* 15, 3835-3844.

Hayashi, Y., Kashiwaki, K. and Yoshikawa, K. 1992. Protease inhibitors generate cytotoxic fragments from Alzheimer amyloid protein precursor in cDNA transfected glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1249-1255.

Hof, P.R., Giannakopoulos, P., Vickers, J.C., Bouras, C., Morrison, J. 1995. The morphologic and neurochemical basis of dementia: aging, hierarchical patterns of lesion distribution and vulnerable neuronal phenotype. *Rev. Neurosci.* 6, 97-124



Laney, J. D. and Hochstrasser, M. 1999. Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell.* 97, 427-430

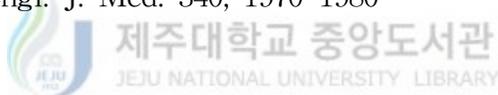
Lee, D. H. and Goldberg, A. L. 1998. Proteasome Inhibitors Cause Induction of Heat Shock Proteins and Trehalose, Which Together Confer Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 18, 30-38.

Lennox, G., Lowe, J., Morrel, K., Landon. M. and Mayer, R. J. 1988. Ubiquitin is a component of neurofibrillary tangles in a

variety of neurodegenerative disease. *Neurosci. Lett.* 94, 211-217.

Lowl, J., Blanchard, A., Morrell, K., Lennox, G., Reynolds, L., Billett, M., Landon, M. and Mayer, R. J. 1988. Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibers in cerebella astrocytomas, cytoplasmic bodies in Mallory bodies in alcoholic liver disease. *J. Pathol.* 155, 9-15.

Martin J. B. 1999. Molecular basis of the neurodegenerative disorder. *N. Engl. J. Med.* 340, 1970-1980



Mattson M. P. and Pederson W. A. 1998. Effects of amyloid precursor protein derivatives and oxidative stress on basal forebrain cholinergic systems in Alzheimer's disease. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16, 737-753

Maruyama, K., Terakabo, K., Usami, M. and Yoshigawa, K. 1990. Formation of amyloid-like fibrils in COS cells overexpressing part of the Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature (London)*. 347, 566-569.

Matsumoto, A. 1994. Altered processing characteristics of

beta-amyloid containing peptides in cytosol and in media of familial Alzheimer's disease cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1225, 304-310.

McGeer, P. L. and Rogers, J. 1992. Anti-inflammatory agent as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Neurology.* 42, 447-449

McPhie, D. L., Lee, R. K. K., Ekman, C. B., Olstein, D. H., Durham, S. P., Yanger, D., Younkin, S. G., Wurtman, R. J. and Neve, R.L. 1997. Neuronal expression of beta amyloid precursor protein Alzheimer mutations causes intracellular accumulation of C-terminal fragment containing both the amyloid beta and cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* 272, 24743-24746.

Mesco, E. R., Timilas, P. S., Mech. 1991. Tau-ubiquitin protein conjugates in a human cell line. *Ageing Dev.* 61, 1-9

Omura, S., Fujimoto, T., Ootoguro, K., Matsuzaki, K., Moriguchi, R., Tanaka. H., and Sasaki, Y. 1991. Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *J. Antibiot.* 44, 113-116.

Paradis, M., Gurubhagavatula, S., Jenkins, B., Wasco, W. 1993.

Genetic-heterogeneity of gene defects responsible for familial Alzheimer-disease. *Genetica*. 91, 255-263.

Price, D.L., Tanzi, R.E., Borchelt, D.R., Sisodia, S.S. 1998. Alzheimer's disease : genetic studies and transgenic models. *Annu. Rev. Genet.* 32, 461-493.

Sadoul, R., Fernandez, P. A., Quiquerez, A. L., Martinou, I., Maki, M., Schroter, M., Becherer, J. D., Irmeler, M., Tschopp, J. and Martinou, J. C. 1996. Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons. *EMBO J.* 15, 3845-3852.



Selkoe, D. J. 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*. 6, 487-498

Singer, M. A. and Lindquist, S. 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol. Cell* 1, 639-648.

Suzuki A. 1997. Amyloid beta-protein induces necrotic cell death mediated by ICE cascade in PC12 cells. *Exp. Cell Res.* 234, 507-511.

Tanzi, R., Gaston, S., Bush, A., Romano, D., Pettingell, W.,

Peppercorn, J., Paradis, M., Gurubhagavatula, S., Jenkins, B., Wasco, W. 1993. Genetic-heterogeneity of gene defects responsible for familial Alzheimer-disease. *Genetica*. 91, 255-263.

Wischik, C.M., Novak, M., Thogersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., Rother, M. and Klug, A. 1988. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 4506-4510

Yan, X.Z., Qiao, J.T., Dou, Y. and Qiao, Z.D. 1999. β -Amyloid peptide fragment 31-35 induces apoptosis in cultured cortical neurons. *Neuroscience*. 92, 177-184.

Yanker, B. A., Dawes, L. R., Fisher S., Villa-Komaroff, L., Oster-Granite, M. L. and Neve, R. L. 1989. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor protein associated with Alzheimer's disease. *Science*. 245, 417-420.

Abstract

Effects of Lactacystin on Neurotoxicity of $A\beta_{1-42}$ and CT105 in SK-N-SH Cell Line

Advised by professor Young-jae Lee

Sunghyun Bang

Department of Veterinary Medicine

Graduate School, Cheju National University, Cheju, Korea



In many neurodegenerative disorders like Alzheimer's disease, inclusions containing ubiquitinated proteins found in the brain suggest a possible pathophysiological role for ubiquitin-mediated proteasomal degradation of neuronal proteins. Here we show that the beta-amyloid fragment $_{1-42}$ and CT105, which in micromolar levels cause the death of cortical neurons, can block the neurotoxic effect of beta-amyloid and CT105 as inhibiting proteasome activity. These findings suggest that CT105 peptide and beta-amyloid $_{1-42}$ neurotoxicity may cause toxicity through the activation of protein degradation via the ubiquitin-proteasome

pathway, and may provide new pharmacological targets for that suggest possible new phamacological targets for the prophylaxis and/or treatment of Alzheimer's disease.

Key words: Alzheimer's disease, ubiquitin-proteasome pathway
beta-amyloid and CT105





제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY