



저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



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](#)

이학박사 학위논문

번역 후 수식화가 알츠하이머병의  
병인기전에 미치는 영향 연구

**The role of post translational modification on  
the pathogenesis of Alzheimer's disease**

2013 년 02 월

서울대학교 대학원

의학과 생화학전공

김 채 영

**A thesis of the Doctor's degree**

**The role of post translational  
modification on the pathogenesis of  
Alzheimer's disease**

**번역 후 수식화가 알츠하이머병의  
병인기전에 미치는 영향 연구**

**February, 2013**

**The Department of Biochemistry,**

**Seoul National University**

**College of Medicine**

**Chaeyoung Kim**



# 학위논문 원문제공 서비스에 대한 동의서

본인의 학위논문에 대하여 서울대학교가 아래와 같이 학위논문 제공하는 것에 동의합니다.

## 1. 동의사항

- ① 본인의 논문을 보존이나 인터넷 등을 통한 온라인 서비스 목적으로 복제할 경우 저작물의 내용을 변경하지 않는 범위 내에서의 복제를 허용합니다.
- ② 본인의 논문을 디지털화하여 인터넷 등 정보통신망을 통한 논문의 일부 또는 전부의 복제 및 배포 및 전송 시 무료로 제공하는 것에 동의합니다.

## 2. 개인(저작자)의 의무

본 논문의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락하는 등 동의 내용을 변경하고자 할 때는 소속대학(원)에 공개의 유보 또는 해지를 즉시 통보하겠습니다.

## 3. 서울대학교의 의무

- ① 서울대학교는 본 논문을 외부에 제공할 경우 저작권 보호장치(DRM)를 사용하여야 합니다.
- ② 서울대학교는 본 논문에 대한 공개의 유보나 해지 신청 시 즉시 처리해야 합니다.

논문 제목: 번역 후 수식화가 알츠하이머병의 병인기전에 미치는 영향 연구.

학위구분: 박사 과정

학 과: 생화학 교실

학 번: 2007-30547

연 락 처:

저 작 자: 김 채 영 (인)

제 출 일: 2013 년 02 월 5 일

서울대학교총장 귀하

## 초 록

**서론:** Alzheimer' s disease (AD)의 특징으로는  $A\beta$ 의 축적과 tau의 과인산화 (hyperphosphorylation)가 있으며, 병인기전의 원인으로는 glucose metabolism과 axonal transport의 저해 등을 들 수 있다. Glucose metabolism의 저해는 결국 세포내의 O-GlcNAc을 낮추어 tau의 과인산화를 일으키고,  $A\beta$ 는 GSK3 $\beta$ 관련 신호전달을 통해 HDAC6의 활성을 높여 세포내의 acetylation을 낮추어 axonal transport를 저해한다. 단백질의 활성은 인산화, acetylation, O-GlcNAc등의 다양한 번역 후 수식화 (post-translation modification; PTM)에 의해 조절 되며, AD에서는 PTM의 조절이 망가져 있어서 단백질의 기능이 정상인에 비해 높거나 저해되어 있다. 본 연구에서는 AD에서 낮아져 있는 세포내의 O-GlcNAc과 acetylation을 증가시켜 준 후, O-GlcNAc관련해서는  $A\beta$ 의 생성에 어떠한 효과를 주는지를 확인 하였으며, acetylation 관련해서는 미토콘드리아의 axonal transport에 어떻게 영향을 주는 지를 규명하였다.

**방법:** (1) O-GlcNAc을 증가시키기 위해서 O-GlcNAcase 저해제인 NButGT를 이용하였으며, AD 병인기전에서의 효과를

확인하기 위해서는 AD 동물모델 인 5XFAD mice를 사용하여, 5XFAD mice에 NButGT를 복강내 주사하여 A $\beta$ 의 축적과 A $\beta$ 에 의한 증상들의 변화를 확인하였다.

(2)  $\alpha$ -tubulin의 acetylation을 증가시키기 위해서는 HADC6의 저해제인 Tubastatin A (TBA)를 사용하였으며, primary hippocampal neuron에 A $\beta$ 와 TBA를 처리하여, 미토콘드리아의 axonal transport를 microfluidic chamber system에서 관찰하였다.

**결과:** (1) NButGT를 주사한 5XFAD mice는 주사하지 않은 5XFAD mice 와 비교하였을 때, A $\beta$ 의 축적과 생성이 감소하였으며, 신경 염증 (neuroinflammation)과 기억력 저하 (memory impairment)가 회복 되었다. 이것은 감마 시크리테아제의 구성 단백질 중에 하나인 NCT의 Ser 708에 O-GlcNAc 결합이 증가함에 따른 것으로, NButGT에 의해 NCT의 O-GlcNAc이 증가함에 따라 감마시크리테아제의 활성이 낮아졌다.

(2) 5XFAD mice의 뇌 조직에서  $\alpha$ -tubulin의 acetylation의 정도를 확인한 결과 낮아져 있었다. A $\beta$ 로 인해 미토콘드리아의 axonal transport는 anterograde와 retrograde 양방향에서 모두 저해되는데, 이때 TBA를 처리하게 되면 A $\beta$ 에 의해 감소된 미토콘드리아의 속도와 운동성 모두 회복 되었다. 또한 A $\beta$ 에 의해

짧아진 미토콘드리아의 길이도 TBA에 의해 회복되는 것을 확인하였다.

**결론:** AD에서 감소되어 있던 단백질의 PTM을 각각의 저해제를 이용하여 조절 한 결과 AD의 병인기전으로 알려진 A $\beta$ 의 축적, 기억력 저하, 신경 염증의 증가 등이 호전되었고, 미토콘드리아의 axonal transport의 저하도 회복 되었다. 따라서 단백질의 PTM을 조절하는 것이 AD 병인기전을 치료하는데 하나의 치료 표적이 될 수 있을 것이라 생각된다.

---

**주요어:** 알츠하이머병 (AD), 번역 후 수식화 (PTM), O-GlcNAc, acetylation, 아밀로이드 베타 (A $\beta$ ), 감마 시크리테아제, HDAC 6, 미토콘드리아, NButGT, Tubastatin A (TBA)

**학 번:** 2007 - 30547

## 발표 논문

1. Kim C, Nam DW, Park SY, Song H, Hong HS, Boo JH, et al. O-linked beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor attenuates beta-amyloid plaque and rescues memory impairment. *Neurobiology of aging*. 2012. Epub 2012/04/17.
2. Kim C, Choi H, Jung ES, Lee W, Oh S, Jeon NL, et al. HDAC6 Inhibitor Blocks Amyloid Beta-Induced Impairment of Mitochondrial Transport in Hippocampal Neurons. *PloS one*. 2012;7(8):e42983. Epub 2012/09/01.

# 목 차

초 록.....	i
목 차.....	v
표 및 그림 목록 .....	vi
서 론.....	1
실험 재료 및 방법 .....	12
결 과.....	27
고 찰.....	62
결 론.....	75
참 고 문 헌.....	76
초 록 (영 문) .....	91

## 표 및 그림 목록

그림 1. APP processing .....	4
그림 2. $\gamma$ -secretase의 구성 단백질 .....	5
그림 3. O-GlcNAc의 특징 .....	6
그림 4. 미토콘드리아의 axonal transport .....	10
그림 5. Microfluidic chamber의 구조 .....	11
그림 6. Mice에 NButGT를 복강내 주사할 적정 양과 투여 기간 조사 .....	40
그림 7. 5XFAD mice에서 NButGT에 의한 A $\beta$ 의 생성과 축적 ...	41
그림 8. 5XFAD mice에서 NButGT에 의한 신경 염증과 기억력 저하의 회복 .....	43
그림 9. NButGT 처리와 감마 시크리테아제의 활성과의 상관관계 .....	45
그림 10. NButGT에 의한 NCT의 O-GlcNAc 수식화 증가 .....	47
그림 11. NButGT와 NCT의 인산화와의 상관관계 연구 .....	49
그림 12. NCT의 O-GlcNAc site mapping .....	50
그림 13. SA NCT mutant에서 NButGT에 의한 감마 시크리테아제의 활성 변화 관찰 .....	52

그림 14. 5XFAD mice에서 $\alpha$ -tubulin의 acetylation 감소.....	57
그림 15. A $\beta$ 와 TBA에 의한 $\alpha$ -tubulin의 acetylation.....	58
그림 16 A $\beta$ 와 TBA에 의한 미토콘드리아의 axonal transport ...	59
그림 17. A $\beta$ 와 TBA에 의한 미토콘드리아의 길이.....	61
그림 18. O-GlcNAc과 AD 병인기전과의 상관관계 모식도.....	67
그림 19. HDAC6 저해제가 AD 병인기전에 미치는 영향의 모식도 .....	74

# 서론

알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD)의 병리학적인 특징으로는 세포 밖의 아밀로이드 베타 (Amyloid beta; A $\beta$ )의 과다 축적과 세포내의 tau의 neurofibrillary tangle이 있다. 이 중 A $\beta$ 는 아밀로이드 전구체 단백질 (amyloid precursor protein; APP)이 두 개의 시크리테아제 (secretase)인 베타 와 감마 시크리테아제에 의해 연속적으로 잘리면서 생성된다 (1). 베타 시크리테아제가 APP를 자르면 APP C-terminal fragments (APP-CTF)가 생성되고, 이렇게 생성된 APP-CTF를 다시 감마 시크리테아제가 잘라줌으로써 A $\beta$ 가 생성된다 (그림 1). 감마 시크리테아제는 네 개의 단백질인 anterior pharynx-defective phenotype 1 (APH-1), presenilin1 (PS1), PS enhancer 2 (PEN-2), 와 nicastrin (NCT)로 구성되어있다 (그림 2) (2). NCT는 감마 시크리테아제의 문지기 (gatekeeper)로써 감마 시크리테아제의 기질들을 선별하고 기질과 처음에 결합하는데 관여한다 (3).

## Part 1: O-GlcNAcase 저해제가 A $\beta$ 와 AD

### 병인기전들에 미치는 영향 연구

O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc)는 번역 후 수식화 (post-translation modification)로써, ER과 Golgi에서 수식화가 일어나는 N-과 O-glycosylation과는 달리 핵과 세포질에서 Ser과 Thr 잔기에 결합한다. 이러한 O-GlcNAc의

특성은 인산화 (phosphorylation)와 비슷하기 때문에, O-GlcNAc과 인산화는 상호간에 경쟁 (competition)하는 경우가 많고, 기능에 있어서도 단백질의 안정화 (stabilization)와 활성화 또는 신호 전달을 조절 하는데 관여한다 (1). O-GlcNAc은 O-GlcNAc transferase (OGT)에 의해 단백질에 결합되며, O-GlcNAc-selective N-acetylglucosaminidase (O-GlcNAcase)에 의해 단백질에서 제거된다 (그림 3) (2). 세포내의 O-GlcNAc 정도는 glucose metabolism에 의해 조절 되는데, AD 환자의 경우 glucose metabolism이 저해되어 있기 때문에, O-GlcNAc의 정도도 정상인과 비교했을 때 거의 반 가까이 낮아져있다 (3, 4). AD에서 O-GlcNAc관련 연구로는 주로 tau에 대해 많이 연구가 되어왔고, A $\beta$  생성 또는 축적 관련해서는 보고된 것이 없다. 본 연구에서는 AD 동물모델인 5XFAD mice에 O-GlcNAcase 저해제인 1,2-dideoxy-2'-propyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-[2,1-d]-2'-thiazoline (NButGT)를 투여하여 O-GlcNAc을 증가시킴으로써 O-GlcNAc과 A $\beta$  생성에 어떠한 연관성이 있는지를 규명해 보고자 하였다. 그 결과, NButGT를 처리한 5XFAD mice에서는 처리하지 않은 5XFAD mice와 비교했을 때, 감마 시크리테아제의 활성이 낮아짐에 따라 A $\beta$  생성이 낮아져 있으며, A $\beta$  축적으로 인한 신경 염증 (neuroinflammation)과 기억력 저하 (memory impairment)가 회복 되었다. 또한 감마 시크리테아제 중에서도 NCT이 O-GlcNAc 되고, NCT의 O-GlcNAc이 결합하는 위치가 Ser708 인 것을 프로테오믹스 (proteomics) 방법을 사용하여 확인하였다. 본 연구의 결과들을

바탕으로 AD 환자의 뇌에 O-GlcNAc을 증가시키는 것이 A $\beta$ 의 생성을 감소시킴으로써 AD를 치료하는데 하나의 방법이 될 것이라 예상된다.

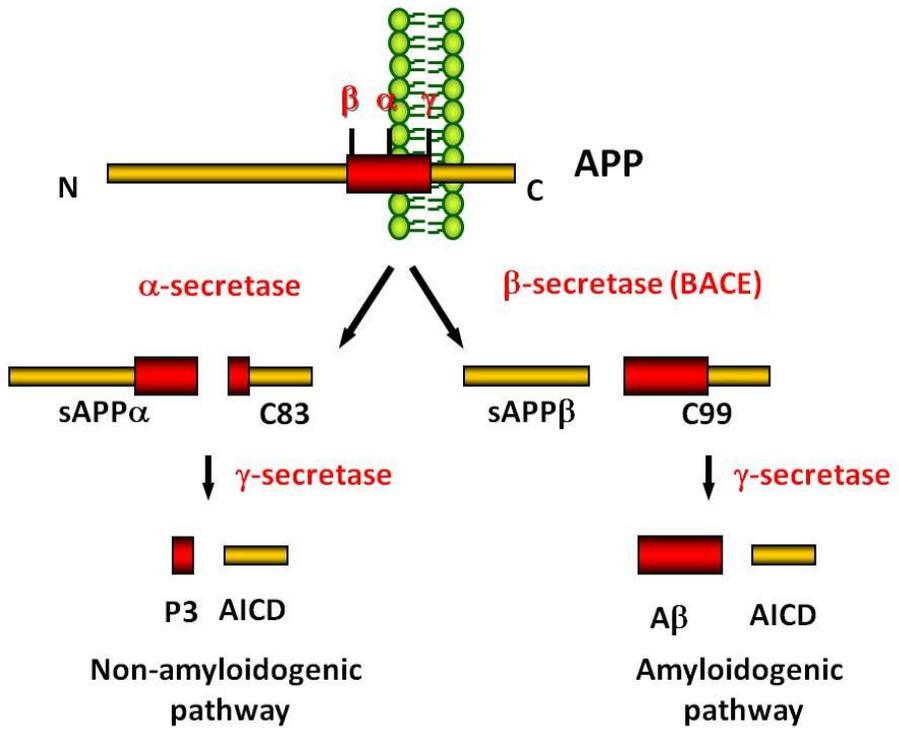


그림 1. APP processing

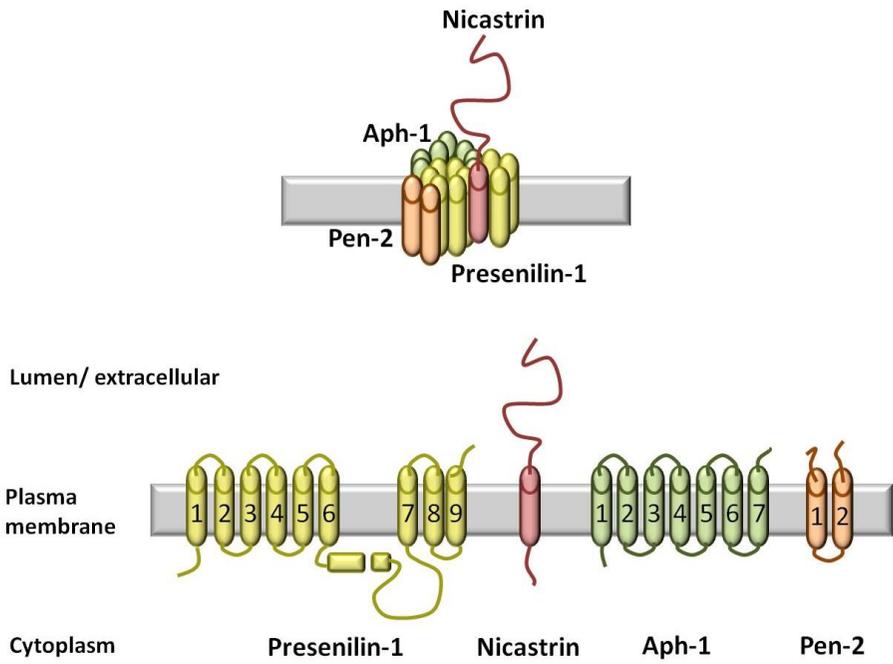


그림 2.  $\gamma$ -secretase의 구성 단백질

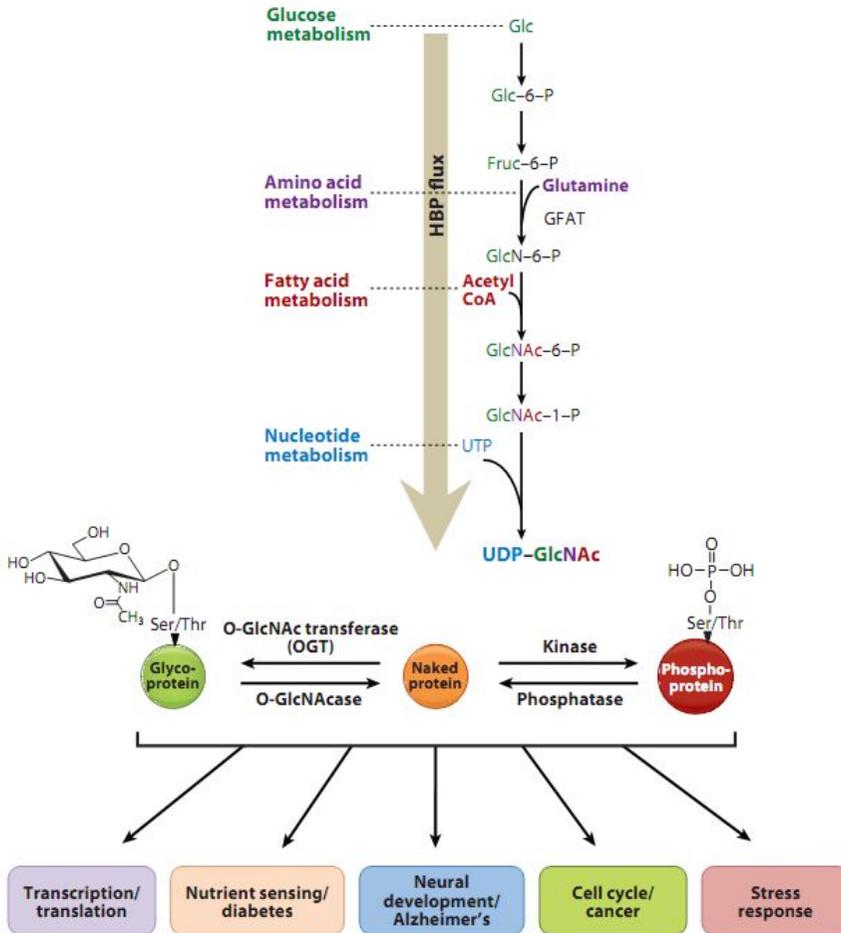


그림 3. O-GlcNAc의 특징 (5)

## Part 2: HDAC6 저해제가 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 axonal transport 에 미치는 영향 연구

신경 세포 (neurons)는 길게 뻗은 구조에 비대칭적인 구조를 갖고 있으며, axon 을 가운데 두고 세포체 (cell body)와 신경 말단 (nerve terminal)을 갖고 있다. 세포체와 신경 말단의 상호 정보 교환은 신경 기능을 유지하는데 있어서 중요하며, 여기에는 미소관 (microtubule; MT)을 기반으로 하는 axonal transport 가 관여한다. MT 는  $\alpha$ -tubulin 과  $\beta$ -tubulin 이 역동적으로 결합하는 중합체 (polymer)이다 (6). Tubulin 은 acetylation, tyrosination, 그리고 인산화 (phosphorylation) 등의 다양한 번역 후 수식화 (post-translation modification; PTM)에 의해 결합된다 (7, 8). Tubulin 의 PTM 은 MT 와 MT 관련 단백질 사이의 결합뿐만이 아닌 MT 의 안정성 (stability)도 조절하여, axon guidance, 시냅스의 형성, 그리고 신경 물질의 이동에 영향을 준다 (7-9).  $\alpha$ -tubulin 의 acetylation 은 MT 의 안정성을 증가시켜 axonal transport 를 향상시켜준다 (8, 10, 11). Histone deacetylase 6 (HDAC6)는 두 개의 deacetylase domain 과 한 개의 zinc finger motif 를 갖고 있는,  $\alpha$ -tubulin 을 deacetylation 시키는 세포질 효소 (cytosolic enzyme)이다 (12). AD 환자는 정상인에 비해서

HDAC6 활성이 높으며 (13), acetylated  $\alpha$ -tubulin 은 낮다 (14, 15). 또한 AD 주요 병인기전 중에 초기에 나타나는 증상으로 axonal transport 의 기능 저하가 있는데 (16), 이런 모든 것을 종합해 보면 HDAC6 가 AD 병인기전에 있어서 주요할 역할을 할 것이라 예상할 수 있다. Amyloid beta ( $A\beta$ )는 APP 에서 잘려 나온 생성물으로써 AD 를 유발시키는 주요 요인으로, MT 의 안정성과 세포 내 신호 전달을 조절하여 axonal transport 를 저해 한다 (17-19). 이러한  $A\beta$  에 의한 axonal transport 의 기능 저하는 (17, 20), 미토콘드리아의 이동과 시냅스의 기능에 필수적인 신경전달 물질의 이동을 막아 결국 synaptic degeneration 과 신경 세포의 사멸을 유도한다 (15, 16, 21).

미토콘드리아는 axon을 따라 이동하며, 이것은 세포의 기능을 유지하는데 있어서 에너지를 제공하는 중요한 세포소기관이다 (그림 4). Axonal transport하는 동안 미토콘드리아는 운동 단백질(motor protein)과 연결 단백질(adaptor protein)과 결합하는데, 미토콘드리아가 결합하는 운동 단백질로는 anterograde transport에는 kinesin이 retrograde transport에는 dynein이 있으며 (6, 7), 연결 단백질에는 Miro와 Milton이 있다 (22, 23). 비록  $A\beta$  가 있을 때 미토콘드리아의 axonal transport가

저해된다는 것은 잘 알려져 있으나 (17),  $A\beta$ 에 의해 유도되는 정확한 과정은 아직 불분명하다. 본 연구에서는  $\alpha$ -tubulin의 acetylation 과  $A\beta$ 에 망가지는 미토콘드리아의 axonal transport의 관계를 primary hippocampal neurons에서 microfluidic system을 이용하여 규명하고자 하였다 (그림 5).  $\alpha$ -tubulin의 acetylation을 증가시키기 위해 HDAC6의 저해제인 Tubastatin A (TBA)를 사용하였으며, 미토콘드리아의 axonal transport는 미토콘드리아의 속도 (velocity), 운동성 (motility), 그리고 미토콘드리아의 길이를 갖고 분석하였다. 그 결과  $A\beta$ 에 의해 감소되었던 미토콘드리아의 속도와 운동성이 TBA를 처리하면 모든 방향 (anterograde와 retrograde)에서 회복되었으며,  $A\beta$ 에 의해 짧아졌던 미토콘드리아의 길이도 길어졌다. 이러한 데이터들은 HDAC6의 활성을 저해하는 것이  $A\beta$ 에 의해 유도된 미토콘드리아의 axonal transport와 길이를 모두 회복시키므로, HDAC6를 조절하는 것이 AD의 병인기전을 치료하는 가능한 표적이 될 수 있음을 보여주고 있다.

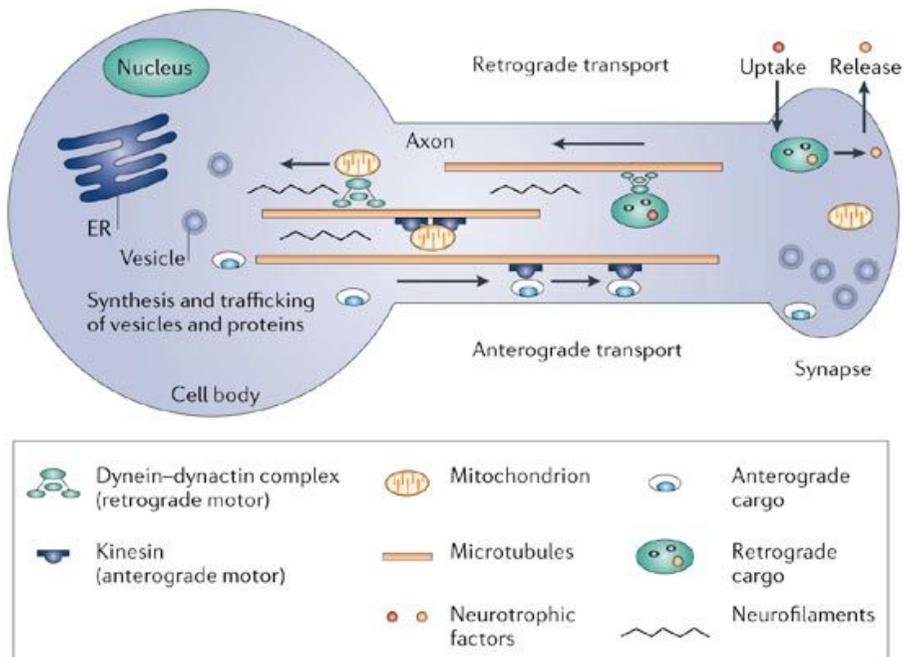


그림 4. 미토콘드리아의 axonal transport (24)

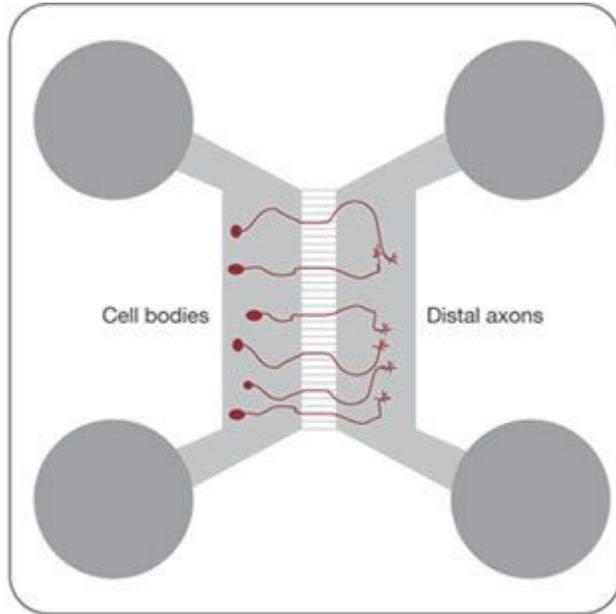


그림 5. Microfluidic chamber 의 구조 (25)

# 실험 재료 및 방법

## Part 1: O-GlcNAcase 저해제가 A $\beta$ 와 AD

### 병인기전들에 미치는 영향 연구

#### 1. 실험에 이용된 실험동물

5X FAD transgenic mice (Tg6799; B.6SJL-Tg [APP<sup>SwFlon</sup>, PSEN\*<sup>M146L</sup>\*<sup>L286V</sup>]6799<sup>Vas/J</sup>, stock no. 006554)는 human APP 695에 3개의 mutation (Swedish, Florida, 과 London)과 PS1에 2개의 mutation (M146L 과 L286V)은 murine Thy-1 promoter의 전사 조절 하에 과발현 한다 (26). 실험으로는 5XFAD mice 와 B6SJL wild type (WT) mice를 사용하였으며, 5XFAD mice, C57B6와 SJL line은 Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA)에서 구입하였다. 동물들은 Helsinki Treaty, the Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication no. 85-23, revised 1985) 그리고 서울대학교의 동물 관리와 지침서를 준수하여 유지하고 다루었다.

#### 2. 세포주 (cell lines) 및 세포배양

세포는 ANPP, NCT<sup>-/-</sup> MEF, CHO-C99, CHO-APP<sup>sw</sup> 를 썼다. ANPP 세포는 human embryonic kidney 293 (HEK 293) 세포에 APP<sup>sw</sup>, PS1, NCT, PEN-2를 과발현 하고 있으며 이것은 University of Chicago (IL, USA)의 Dr Sangram Sisodia로부터 제공 받았다. NCT<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblasts (MEF) 세포는 Johns Hopkins University 의 Dr Phillip Wong으로부터 제공 받았다. Chinese hamster ovary (CHO)-C99 세포는 감마 시크리테아제 활성을 측정하기 위한 reporter system인 UAS 와 C99-GVP가 과발현 되어있는 세포이다 (27). CHO-APP<sup>sw</sup> 세포는 human Swedish APP mutation이 과발현되어 있다. Wild type APP와 PS M146L이 동시에 과발현되어있는 CHO 세포는 UC San Diego의 David Kang으로부터 제공 받았다. 모든 세포는 10% fetal bovine serum (FBS; HyClone, Logan, UT, USA) 와 0.1 mg/ml penicillin 과 streptomycin (P/S; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)가 포함되어 있는 Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM; HyClone, Logan, UT, USA)에 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 3. 시약 및 항체 (antibody)

NButGT는 연세대학교 조진원 교수님으로부터 제공 받았다 (28). Doxycycline (DOX)는 Clontech (Mountain Vies, CA, USA)로부터 구입하였고, polybrene는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Anti-PS1 N-terminal fragment (PS1-NTF)는 1:2000으로 희석하여 썼으며, Zymed (South San Francisco, CA, USA)로부터 구입하였다. Anti-PS loop은 PS1-CTF를 확인하는데 1: 2000으로 희석하여 썼으며, Chemicon (Temecula, CA, USA)제품을 구매하였다. Anti-APH-1aL (1:1000) 과 anti-PEN-2 (1:2000)는 감마 시크리테아제의 구성 단백질을 확인하는데 썼으며 각각 Covance (Berkeley, CA, USA)와 Zymed (South San Francisco, CA, USA)에서 구매하였다. APP C-terminal fragment (APP-CTF)는 human APP의 762-770 아미노산 부분을 잡는 Chemicon (Temicula, CA) 제품의 anti-APP-CTF 를 사용하였다. 6E10과 anti-sAPP $\beta$ 는 Signet Laboratories (Dedham, MA) 제품으로써 conditioned media에서 sAPP $\alpha$  와 sAPP $\beta$ 를 확인하기 위해서 사용하였다. O-GlcNAc으로 수식화된 단백질을 pull-down하기 위해서 agarose succinylated wheat germ agglutinin (sWGA; Vector Laboratories, Burlingame, CA)을 사용하였고, western

blotting하기 위해서 Covance (Berkeley, CA) 제품의 CTD 110.6  
와 Abcam (Cambridge, UK) 제품의 RL2를 각각 1:1000으로  
희석하여 사용하였다. 인산화 되어있는 Ser만을 특이적으로  
확인하는 항체로는 Abcam (Cambridge, UK) 제품의 Anti-  
phospho-Ser을 사용하였다. SDS-PAGE에서 단백질을 염색하기  
위해서 BIO-RAD (Hercules, CA) 제품의 Bio-Safe Coomassie  
G-250을 사용하였다.

#### 4. 면역조직염색 (Immunohistochemistry; IHC)

쥐는 NButGT를 복강내 주사 24시간 후에 Zoletil 50® (Virbac  
Laboratories, Carros, France) 과 Rompun solution® (Bayer  
Korea, Seoul, Korea) 을 3 : 1 비율로 섞은 후 1 ml/kg으로  
복강내 주사하여 마취를 시킨 후 phosphate-buffered saline  
(PBS)로 심장을 통해 피를 관류 시켰다. CM 1950 cryostat  
(Leica Microsystems, Bannockburn, IL)을 사용하여, 연속적으로  
30-mm 두께의 coronal 조직 부분을 만들었다. 실험에는  
bregma에서 1.70 mm 와 2.30mm 사이에 해당하는 조직 부위를  
사용하였다. 조직내의 아밀로이드 베타를 보기 위해서 조직을 70%  
formic acid에 20분 동안 두고, 1차 항체로는 biotinylated-4G8

(Signet, Dedham, MA)를 사용하였으며, Chromagen으로 3,3-diaminobenzidine (DAB) tetrahydrochloride을 이용한 streptavidin 또는 avidin-biotin-peroxidase (Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 사용하였다. A $\beta$ 의 축적을 보기 위한 또 다른 방법으로 (E, E)-1-Fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy) styrylbenzene (FSB; Calbiochem, La Jolla, CA)를 PBS에 희석하여 20분 동안 염색하였다. 염증 반응 관련 세포인 astrocyte를 보기위해 anti-GFAP (Invitrogen, Carlsbad, California)를 microglia를 보기위해 anti-CD11b(MAC-1; Chemicon, Temecula, CA)를 사용하였다. 이차 항체는 Streptavidin, Alexa Fluor-594, Fluor-488 (Invitrogen, Carlsbad, California)를 사용하였다. 형광 현미경 (IX71, Olympus, Tokyo, Japan)과 confocal microscope (FV10i, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 이미지를 얻었으며, Image J program (NIH, Bethesda, MD)을 이용하여 이미지를 분석하였다.

## 5. NButGT의 복강내 주사

기존 보고된 연구와 선행 연구를 바탕으로, 150 mg/kg의 NButGT를 식염수 (saline)에 희석하여 복강내 주사하였다 (29).

WT mice (WT; n=15) 와 5XFAD mice (n=13)에 NButGT를 주사하였으며, WT mice (n=14)와 5XFAD mice (n=13)에 식염수를 주사하였다. 실험에는 암컷 수컷 모두 사용하였으며, 2개월째부터 6개월 동안 3일마다 한번씩 복강내 주사를 하였다. 행동실험은 복강내 주사를 한 후 다음날인 둘째 날 행동실험을 수행할 장소에 쥐를 두어 환경적응을 시키고, 셋째 날 Y-maze 또는 contextual fear conditioning 실험을 수행하였다. Y-maze 실험 후 10일 후 contextual fear conditioning 실험을 수행하였다. contextual fear conditioning 실험 후, 다음 날 쥐의 뇌를 적출하였으며, 좌반구는 액체 질소에 얼리고, 우반구는 4% paraformaldehyde (PFA)로 고정시켰다.

## 6. Y-maze spontaneous alternation

Y-maze는 쥐의 특정 기억을 실험하기 위해 6.5개월 된 쥐에서 수행하였다 (30). 쥐를 Y-maze의 중앙에 놓고, 각 통로로 번갈아 들어가는 순서와, 전체 통로로 들어간 수를 기록한다. 연속해서 번갈아 세 군데의 통로로 들어간 것을 하나의 alternation로 보고 (예, ABC, CAB, 또는 BCA), 중복되는 경우는 제외한다 (예, ABA, CCA). alternation의 퍼센트 공식은 아래와 같다. [(alternation

수)/(전체 통로로 들어간 수)] X 100 (31).

## 7. Contextual Fear Conditioning 실험

이 실험은 conditioning chamber (model H10-11M-TC, Coulbourn Instruments, Allentown, PA)에서 수행되었다. 이 chamber는 FreezeFrame software (Coulbourn Instruments, Allentown, PA)를 통해 연결하였으며, 쥐의 움직임은 chamber에 연결된 digital camera를 통해 컴퓨터에 저장되고 분석되었다 (32). 첫 째날 실험 장소에 적어도 4시간을 두어 환경 적응 기간을 갖고, 다음날 1분 30초 동안 1분 간격으로 두 번 전기충격을 (0.8mA, 2 s)을 주고 30초를 더 chamber안에 두었다. 그리고 24시간 후에 똑 같은 chamber에 5분 동안 두고 freezing behavior를 관찰하였다.

## 8. 감마 시크리테아제 활성 측정을 위한 *In vitro* peptide cleavage assay

감마 시크리테아제의 활성을 측정하기 위해, 세포의 막만을 분리하여, 형광이 결합되어있는 펩타이드 기질 (NMA-GGVVIATVK(DNP)-DRDRDR-NH<sub>2</sub>, Calbiochem, La Jolla,

CA)와 37 °C에서 24시간 둔다. 감마 시크리테아제의 저해제인 inhibitor X (L-685 458; Calbiochem, La Jolla, CA)를 처리한 것을 기본 값으로 해서, 각 측정된 값에서 기본 값을 뺀 값을 정확한 감마 시크리테아제의 값으로 한다. 기질이 잘려 나오는 형광은 plate reader (infinite M200, TECAN, Männedorf, ZH)기기에서 excitation wavelength 355 nm 와 emission wavelength 440 nm에서 측정하였다 (33).

## 9. ESI-MS/MS 방법

NCT에 O-GlcNAc 수식화 위치를 알기 위해 electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)를 이용하였다 (34, 35). 감마 시크리테아제가 과발현 되어있는 ANPP 세포에서 NCT항체를 이용하여, NCT을 IP 한 후, SDS-PAGE를 수행 후, chymotrypsin (Roche, Mannheim, Germany) (25 ng/ $\mu$ l)으로 37°C에서 16시간 동안 in-gel digestion 한다. O-GlcNAc을 DTT로 치환하기 위해 mild-elimination and then the Michael addition (BEMAD)를 수행 후, reverse-phase C18 spin columns (Nest Group, Southborough, MA)로 펩타이드만을 정제 한다. 펩타이드의 시퀀싱은 nano-electrospray ion sources

(Protana, Odense, Denmark)가 설치되어 있는 QSTAR Pulsar Q-TOF MS (Applied Biosystems)를 사용하였다. 데이터 분석은 MASCOT software package (Matrix Science, London, UK)를 사용하는 National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) non-redundant database에서 수행하였다.

## 10. ELISA

ELISA kit (Immuno-Biological Laboratories Co., Gunma, Japan)를 사용하여 Human A $\beta$ 40 와 A $\beta$ 42를 측정하였다. 조직은 complete protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 넣은 PBS로 균질화 (homogenization)한다. 균질화된 조직을 70% formic acid에 넣고 35초간 초음파 분해 (sonication) 후, 4°C에서 1시간 동안 100,000g로 원심 분리한다. Formic acid를 1 M Tris phosphate (pH11)로 중화 시킨 후 ELISA sample 버퍼에 희석한다. ELISA는 plate reader (POWER-XS; BIO-TEK, Winooski, VT)에서 450nm에서 흡광도를 측정한다.

## 11. 통계처리

결과들은 t-test, one-way 또는 two-way analysis of variance (ANOVA)와 unpaired t-tests 와 Bonferroni post-test 로 분석하였다. 그림에 표시되어있는 error bar 는 mean  $\pm$  SEM 을 의미한다 (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001).

## Part 2: HDAC6 저해제가 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 axonal transport 에 미치는 영향 연구

### 1. 실험에 이용된 실험동물

암컷 Sprague-Dawley (36) rats (KOATECH, Gyeonggido, Korea) 의 18일된 배아 (embryos; E18)를 primary hippocampal neuronal culture를 하는데 사용하였다. AD의 동물 모델로는 13개월 된 5XFAD mice (Tg6799; B6SJL-Tg (APP<sup>SwFlon</sup>, PSEN\* M146L\*L286V) 6799Vas /J, stock number 006554, Jackson Labs, Bar Harbor, ME) 쥐를 사용하였다. 모든 동물을 관리하고 유지하는 데 있어서 Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication No. 85-23, revised 1985) 인 Helsinki Treaty와 서울대학교의 사용 지침서를 준수하였다. 모든 동물의 실험 과정은 서울대학교의 동물 실험 윤리 위원회에 승인을 받았다 (승인 번호, SNU060519-5, IACUC).

### 2. DNA와 시약

세포에서 미토콘드리아의 axonal transport를 관찰하기 위해 pDsRed2-Mito (Clontech, Mountain View, CA)를 transfection하여 사용하였다. Acetylated  $\alpha$ -tubulin 과  $\beta$ -actin

항체는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구매하였으며,  $\alpha$ -tubulin 항체는 abm (Applied Biological Materials Inc., Richmond, BC)에서 구입하였다. Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG은 immunofluorescence 분석을 하는데 사용하였다. HDAC6 저해제로써 Tubastatin A (TBA; BioVision, Mountain View, California)를 그리고  $A\beta_{1-42}$  peptides는 American peptide (Sunnyvale, CA)를 사용하였다.

### 3. 세포 배양과 Transfection

SD rat의 E18의 뇌에서 해마 부분만 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; WelGENE, Daegu, Korea) 미디어에 분리 한 후, 0.5% trypsin (2.5% trypsin; Sigma, St. Louis, MO)로 세포들을 서로 하나씩 떨어뜨려 놓는다 (20, 37). 세포는 poly-D-lysine (Sigma, St. Louis, MO)로 코팅해 둔 microfluidic chamber 또는 plate에 두고 0.1 mg/ml penicilin/streptomycin (Sigma, St. Louis, MO)이 포함되어있는 Neurobasal/B27 medium (Invitrogen, Carlsbad, California)에서 배양된다. pDsRed2-Mito DNA는 in vitro 7 (DIV 7) 일째 되는 날 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California)을 사용하여 transfection 하고 24시간

배양한다. DIV 8일에  $A\beta_{1-42}$  peptides ( $2 \mu\text{M}$ )을 24시간 처리 후, TBA ( $5 \mu\text{M}$ ) 을 3시간 처리한다 (38).

#### 4. Microfluidic chamber system

axonal transport를 좀더 효과적으로 분석하기 위해 microfluidic chamber를 사용하였다 (39). Chamber를 조립 후 poly-D-lysine로 코팅을 한다. 세포는 chamber의 한쪽 부분에만 깔며, 신경세포의 neurite가 자람에 따라 처음 세포를 둔 부분은 soma 부분이 되고 다른 반대쪽 부분은 axon 부분이 된다.

#### 5. Live cell imaging 과 이미지 분석

Axonal transport 이미지는 Cool SNAP HQ2 CCD camera (Photometrics, Ltd., Tucson, AZ 85706)가 설치된 Olympus IX81 microscope (Tokyo, Japan)에서 MetaMorph Software (Universal Imaging, PA, USA) 를 사용하였다. 이미지를 찍는 동안에 세포는 5 %  $\text{CO}_2$ /95 % air (Live cell instrument, Seoul, Korea)가 제공되는  $37^\circ\text{C}$  chamber에 있었다. Time-lapse image recording은 microfluidic chamber내의 microgroove에 있는 axon을 2분 동안 1 초의 간격을 두고 500 ms의 exposure

time에서 찍었다. Movie는 MetaMorph를 이용하여 만들었다. 미토콘드리아의 속도와 운동성 (motility)는 ImageJ (rsb.info.nih.gov, by W. Rasband) 프로그램의 multiple kymograph plugins (by J. Rietdorf and A. Seitz)를 이용하여 분석하였다. 미토콘드리아의 속도를 분석하기 위해 ImageJ를 이용하요 kymograph에서 움직이는 미토콘드리아의 각도를 측정하였다. 그리고 아래의 식을 이용하여 계산하였다: “Velocity ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) =  $\text{Tangent}(\text{Angle}^\circ + 90^\circ) * 0.111276$ ”. ImageJ에서 측정한 각도는 모두  $0^\circ \sim -180^\circ$  이기 때문에, “ $\text{Tangent}(\text{Angle}^\circ)$ ”의 값은 항상 0 미만이다. 그래서 우리는 측정된 각도에  $90^\circ$ 를 더하여서 양수 (positive)와 음수 (negative) 값으로 각각 anterograde와 retrograde를 구분하였다. 본 연구에 사용된 이미지 시스템에서는 1 pixel ( $\mu\text{m}$ )의 길이는 0.111276이다. 미토콘드리아의 운동성은  $0.0019 \mu\text{m}/\text{sec}$  이상의 속도를 기준으로 움직이는 미토콘드리아와 움직이지 않는 미토콘드리아를 구별하였다. 미토콘드리아의 길이는 time laps 이미지에서 한 장을 취하여 ImageJ를 사용하여 직접 측정하였다.

## 6. 면역세포염색 (Immunocytochemistry, ICC)

Primary hippocampal neuron을 poly-D-lysine이 코팅되어있는 18-mm round coverslips에 놓고 키운다. A $\beta$ 와 TBA를 처리하고, 4% paraformaldehyde (PFA; BIOSESANG, Inc., Gyeonggi-do, Korea)로 세포를 고정 시킨다. 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 과 % goat serum (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)으로 세포 속으로 투과할 수 있게 해주고 비특이적인 반응을 막아준다. 1차 항체로는 acetylated  $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 사용하였다. ICC 이미지는 confocal microscope (Olympus FV10i; Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 찍었다.

## 7. 통계 처리

그룹 간의 유의한 차이는 t-test 또는 one-way analysis of variance (ANOVA)와 Bonferroni post-test를 이용하여 분석하였다. 모든 데이터의 표시된 것은 means  $\pm$  SEM이다 (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

## 결 과

### Part 1: *O*-GlcNAcase 저해제가 $A\beta$ 와 AD

#### 병인기전들에 미치는 영향 연구

#### 1. 5XFAD mice의 뇌에서 NButGT에 의한 $A\beta$ 의

#### 생성과 축적 감소

최근 *O*-GlcNAcase 저해제는 in vivo에서 tau의 인산화를 감소시키고, long-term potentiation (LTP)를 증가시킨다고 보고되었다 (40, 41).  $A\beta$ 관련하여 *O*-GlcNAc이 어떠한 영향을 주는지 보고된 것이 없기 때문에,  $A\beta$  생성에 있어서 *O*-GlcNAc의 효과를 보고자, 본 연구에서는 5XFAD mice에 NButGT를 복강내 주사하여 단백질의 *O*-GlcNAc을 증가시켜 주었다 (42). 본격적인 실험에 앞서 적당한 NButGT의 복강내 주사 양과 처리 주기를 결정하기 위해 다양한 농도로 주사 후 24시간 뒤에 해마 (hippocampus) 와 대뇌 피질 (cortex)를 분리하여 세포 내 단백질들의 *O*-GlcNAc 수식화 정도를 확인한 결과 150 mg/kg 농도에서부터 충분히 *O*-GlcNAc이 증가되어 있는 것을 확인하였다. (그림 6A). 투여 주기를 결정하기 위해서는 150

mg/kg으로 복강내 주사 후, 24시간과 48시간 뒤에 해마와 대뇌피질을 분석해 본 결과 48시간 까지도 증가된 *O*-GlcNAc이 그대로 유지되는 것을 관찰하였다 (그림 6B). 이 실험에서 NButGT를 복강내 주사를 하였을 때, 해마와 대뇌피질에 *O*-GlcNAc이 증가한 것으로 보아, NButGT가 혈액뇌장벽 (blood brain barrier; BBB)을 통과하는 데 문제가 없다는 것을 알 수 있었다 (29). 5XFAD mice는 2개월 때부터 A $\beta$ 가 축적되며, 4개월 때부터 기억력 저하를 보이기 때문에 (26), 본 연구에서는 A $\beta$  축적 전 2개월 초부터 6개월 동안 3일에 한번 150 mg/kg NButGT를 처리하였다. 기존에 *O*-GlcNAcase 저해제 (PUGNAG, streptozotocin)의 경우엔 선별적으로 *O*-GlcNAcase만을 저해시키지 못해, 부작용으로 인슐린 저항성 (insulin resistance)을 유도하여 당뇨 (diabetes)를 유발한다고 알려져 있어서 NButGT 주사 기간 동안 세 달에 한번씩 혈당을 측정하였다 (43). 그 결과 NButGT를 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹간에 혈당의 차이는 보이지 않았다 (그림 7A).

6개월 동안 NButGT를 주사하고, 뇌에 *O*-GlcNAc 정도가 증가되었는지 western blot을 통해 확인한 결과, NButGT를 처리한 쥐의 뇌에서 *O*-GlcNAc이 증가한 것을 확인하였다 (그림 7B,

7C). AD 병인기전에 있어서 NButGT의 효과를 보기 위해, A $\beta$  축적 정도와 농도를 측정하였다. A $\beta$ 의 축적은 A $\beta$ 를 특이적으로 인지하는 항체인 4G8을 이용하여 면역조직염색(IHC)을 통해 관찰한 결과, NButGT를 처리한 5XFAD mice의 대뇌피질에서 A $\beta$  축적이 감소되었다 (그림 7D, 7E). A $\beta$ 만 특이적으로 염색하는 FSB ((E, E)-1-Fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene), a fluorine analog of BSB ((trans, trans)-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene)dye를 이용하여 염색한 결과 4G8으로 염색한 것과 같은 A $\beta$ 의 축적 감소의 결과가 나왔다 (그림 7F, 7G; \*\*\*P < 0.001) (44). 이러한 결과는 NButGT가 뇌 내의 A $\beta$  축적을 감소시킨다는 것을 의미한다. Formic acid를 처리하여 뇌 내의 A $\beta$ 를 추출하여 A $\beta_{1-40}$  와 A $\beta_{1-42}$  농도를 ELISA를 통해 측정한 결과, NButGT를 주사한 그룹에서 A $\beta_{1-40}$  와 A $\beta_{1-42}$  모두 감소되었다 (그림 7H; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01). 이러한 결과들은 NButGT가 BBB를 통과하여 뇌의 O-GlcNAc을 증가 시키고, 이것이 A $\beta$  축적과 생성에 영향을 준다는 것을 보여주고 있다. 따라서 이러한 결과들은 NButGT가 A $\beta$ 와 관련된 AD의 병인기전에 관여하여 A $\beta$ 의 생성 혹은 축적을 감소시키는 효과를 갖는다는 것을 의미한다.

## 2. 5XFAD mice의 뇌에서 NButGT에 의한 신경염증과 기억력 저하 회복

AD 환자의 뇌와 비슷하게 5XFAD mice에서 A $\beta$ 가 축적이 되는 부위에 신경 염증 (neuroinflammation)이 증가되어 있다는 보고가 있다 (26). 5XFAD mice에서 NButGT에 의한 신경 염증의 효과는 astrocyte와 microglia의 활성화 정도를 살펴보면서 확인하였다. astrocyte는 GFAP 항체로 IHC와 western blot을 통해 조사해 본 결과, NButGT를 주사한 5XFAD mice의 대뇌피질에서 모두 유의하게 astrocyte의 활성이 감소하는 것을 확인하였다 (그림 8A-D, \*\*P<0.01). 활성화된 microglia는 CD11b (MAC-1)이라는 항체를 사용하여 IHC를 수행하여 측정하였다 (그림 8E). 그 결과 astrocyte와 유사하게, NButGT를 주사한 5XFAD mice에서 microglia의 활성이 감소하는 것을 확인하였다 (그림 8F; \*\*P < 0.01). 이러한 결과들은 NButGT가 5XFAD mice의 신경염증을 줄이는 데 효과적이라는 것을 의미한다.

5XFAD mice는 4개월부터 기억력 저하를 보인다는 보고가 있다 (26). NButGT가 5XFAD mice의 기억력에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴보기 위해서 본 연구에서는 두 가지의 다른

행동실험을 수행하였다. 첫 번째는 공간지각능력 (spatial working memory)를 측정하는 방법으로 Y-maze에서 쥐의 spontaneous alternation을 수행하여 보았다 (그림 8G). Y-maze 수행 후, two-way ANOVA로 분석한 결과, 형질 (genotype;  $P=0.015$ )과 NButGT를 주사함에 따라 ( $P=0.023$ ) 유의한 효과가 있으며, post-hoc Bonferroni test 수행결과 식염수를 주사한 5XFAD mice는 다른 세 그룹과는 유의하게 차이가 나지만 ( $P<0.05$ ), 그 다른 세 그룹 간에는 차이가 없는 것을 확인하였다 ( $P>0.05$ ). 이러한 결과는 NButGT가 WT mice의 기억력에는 어떠한 영향도 주지 않고, 5XFAD mice의 기억력 저해를 회복시킨 것을 보여준다. 반면에, NButGT는 전체 통로로 들어간 수에 있어서는 차이가 없는데, 이것은 모든 그룹에 운동기능은 정상이라는 것을 의미한다 (그림 8H). 해마 (hippocampus)의 기능에 관련 있는 contextual fear conditioning을 수행하였다 (그림 8I). 앞의 Y-maze와 유사하게 형질 ( $P=0.011$ )과 NButGT를 주사함에 따라 (two-way ANOVA,  $P=0.019$ ) 유의한 차이가 있으며, post-hoc Bonferroni test 수행결과 식염수를 주사한 5XFAD mice는 다른 세 그룹과는 유의하게 차이가 나지만 ( $P>0.05$ ), 다른 세 그룹 간에는 차이가 없는 것을 확인하였다 ( $P<0.05$ ). 이러한 결과들은 NButGT가

5XFAD mice의 기억력 저하를 효과적으로 회복시켜 주는 것을 보여준다.

### 3. NButGT에 의한 감마 시크리테아제의 활성 감소와 NCT의 O-GlcNAc 수식화

A $\beta$ 의 축적과 생성에 NButGT가 어떻게 영향을 주는지를 알아보기 위해, NButGT 처리 후, APP processing 관련 시크리테아제들의 발현 및 활성이 조절되는지를 보았다. APP processing에는 알파, 베타 그리고 감마 시크리테아제가 관여하는데, 우선 NButGT가 감마 시크리테아제의 활성을 조절하는 지를 보기 위해, human Swedish APP를 과발현 하고 있는 CHO-swAPP 세포에 NButGT를 처리하고 24시간 후에 APP-CTF를 western blot으로 확인하였다 (그림 9A). 그 결과 NButGT 농도가 높아 질수록, 세포 내 protein의 O-GlcNAc이 증가하고, APP-CTF 또한 증가하였다. 하지만, APP-CTF는 APP가 베타 시크리테아제에 의해 잘리고 난 후의 생산물이면서 감마 시크리테아제의 기질 (substrate)이기 때문에, APP-CTF의 증가는 감마 시크리테아제의 활성이 감소했음을 의미함과 동시에 베타 시크리테아제의 활성이 증가되었을 가능성도 있다. 그러므로 직접적인 감마 시크리테아제의

활성을 측정하기 위해, C99-Gal4 luciferase reporter gene 시스템을 갖고 있는 CHO-C99 세포에 NButGT를 처리 한 후 luciferase activity를 보았다 (그림 9B) (27). 그 결과 NButGT 농도가 높아 질수록, luciferase activity가 유의하게 감소하였다 (\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001). NButGT가 알파 또는 베타 시크리테아제의 활성화에는 어떠한 영향을 주는지 보기 위해, wild type APP와 PS M146L을 과발현하는 CHO 세포에 100  $\mu$ M NButGT를 처리하고 24시간 후에 conditioned media를 걷어 western blot을 수행하였다. 알파 시크리테아제의 활성화는 APP가 알파 시크리테아제에 의해 잘려 세포 밖으로 나가는 soluble APP alpha (sAPP  $\alpha$ )를 sAPP  $\alpha$ 를 인지하는 6E10 항체를 사용하여 보았으며, 베타 시크리테아제의 활성화는, APP가 베타 시크리테아제에 의해 잘려 세포 밖으로 나가는 soluble APP beta (sAPP  $\beta$ )를 보기 위해 sAPP  $\beta$ 만을 특이적으로 인지하는 sAPP  $\beta$  항체를 사용하여 확인하였다 (그림 9C, 9D). 그 결과 NButGT를 처리함에 따라 sAPP  $\alpha$  (P=0.0920) 와 sAPP  $\beta$  (P=0.1499) 모두 유의하게 증가하지 않았다. 이러한 결과들을 종합해 보면, NButGT는 알파, 베타 시크리테아제의 활성이 아닌 감마 시크리테아제의 활성만을 조절하는 것을 알 수 있다. NButGT가 *in*

*vivo*에서도 감마 시크리테아제 활성을 조절하는지를 살펴보기 위하여 5XFAD mice의 뇌에서 막 단백질 (membrane protein)만을 분리하여 C99를 기질로 사용하는 *in vitro* peptide cleavage 방법을 통해 측정하였다 (그림 9E) (45). 그 결과 감마 시크리테아제의 활성은 식염수를 주사한 5XFAD mice보다 NButGT를 주사한 5XFAD mice에서 유의하게 감소하였다 (\*\*P<0.01).

감마 시크리테아제의 각 구성 단백질들의 성숙 (maturation)과 안정성 (stability)은 긴밀하게 서로 조절되며 (46), O-GlcNAc 또한 단백질의 안정성과 분해를 조절하기 때문에, NButGT가 감마 시크리테아제의 활성을 조절하는데 있어서 감마 시크리테아제의 각 구성 단백질의 안정성 또는 발현 정도를 조절하는 지를 western blot 방법을 통하여 확인하였다 (47). 감마 시크리테아제의 구성 단백질인 APH-1, NCT, PS1, 과 PEN-2를 과발현 하는 ANPP 세포에 100  $\mu$ M NButGT를 처리하고 24시간 후에 각 감마 시크리테아제의 단백질을 western blot을 통해 확인한 결과, NButGT 처리에 의한 각 단백질의 발현 정도에는 차이가 없었다 (그림 10A). 또한 감마 시크리테아제의 단백질 중에서 O-GlcNAc으로 수식화 (modification)되는 단백질이 있는지를

알아보았다. Succinylated wheat germ agglutinin (sWGA)는 GlcNAc만을 인지하기 때문에, sWGA를 사용하여 GlcNAc으로 수식화된 단백질만을 분리하여 western blot으로 각 감마 시크리테아제의 구성 단백질을 확인한 결과 오직 NCT만이 sWGA를 통해 결합되어 분리되었다 (그림 10B). sWGA에 결합되어 분리된 NCT의 specificity를 확인하기 위해, free O-GlcNAc과 sWGA 미리 배양시킨 (preincubate) 후, 세포 액(cell lysate)과 반응시키는 경쟁적인 실험 (competitive assay)를 수행하였다 (그림 10C). 그 결과 free O-GlcNAc과 sWGA에 먼저 결합함에 따라 sWGA에 결합되었던 NCT은 미리 배양시킨 free O-GlcNAc의 농도가 높아짐에 따라 결합되지 않는 것을 확인하였다. 이러한 데이터들은 감마 시크리테아제의 구성 단백질 중 NCT만이 O-GlcNAc으로 수식화 되어있음을 보여준다. 그렇다면 앞에서는 NButGT에 의해 NCT의 안정성 또는 발현 정도에는 차이가 없었지만, NButGT에 의해 NCT에 결합하는 O-GlcNAc은 증가하는 지를 NButGT를 다양한 농도로 처리 후, sWGA로 결합되는 양을 살펴 보았다 (그림 10D). 그 결과 NButGT에 의해 NCT의 전체 발현은 변화가 없지만, NCT에 결합하는 O-GlcNAc은 NButGT에 의해 증가되는 것을 확인하였다

(\*\*\*P<0.001). 또한 *in vivo*에서도 NCT의 O-GlcNAc이 결합되어 있는지 와 NCT의 O-GlcNAc이 NButGT에 의해 조절되어 지를 5XFAD mice에서 확인하였다 (그림 10E). 그 결과 *in vivo* 에서도 NCT은 O-GlcNAc으로 수식화 되며, NButGT에 의해 전체 NCT의 발현에는 변화가 없지만, O-GlcNAc이 결합된 NCT은 증가되어 있는 것을 보았다 (\*\*P<0.01).

O-GlcNAc은 인산화와 단백질에 결합하는 아미노산이 같아서, 상호간에 경쟁적인 관계에 있는 경우가 있다. 따라서 NButGT에 의해서 증가되는 NCT의 O-GlcNAc이 NCT의 인산화와는 어떠한 관계가 있는지를 확인하였다. ANPP 세포에 NButGT를 처리하여 O-GlcNAc을 증가시킨 후, NCT으로 IP 후 Phospho-Ser을 western blot하고, 반대로 Phospho-Ser으로 IP 후 NCT으로 western blot을 한 결과 NButGT에 의해 세포내의 O-GlcNAc은 증가 하였지만 NCT의 인산화는 변화가 없었다 (그림 11).

#### 4. NCT의 O-GlcNAc site mapping

O-GlcNAc은 세포질과 핵에서 일어나며, 결합하는 아미노산은 Ser과 Thr이다. NCT은 transmembrane 단백질로써 19개의 아미노산으로 된 짧은 Cytosolic domain (CD)를 갖고 있고, 이중

O-GlcNAc이 결합 할 수 있는 Ser 또는 Thr으로는 Ser 708이 있으므로 NCT의 Ser 708이 O-GlcNAc이 되는지를 quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF MS) 기계를 사용하여 실험하였다. ANPP 세포 용액에서 NCT만을 IP하여 모은 샘플을, SDS-PAGE를 통하여 분리한 후, Coomassie 방법으로 단백질을 염색하였다 (그림 12A). NCT은 110 KDa과 130 KDa 두 개의 size에서 보이며, 110 KDa는 immature, 130 KDa는 mature form으로 N-Glycosylation의 정도에 따라 나뉘어 진다. SDS-PAGE에서 NCT protein을 잘라서, Chymotrysin으로 in-gel digestion 후,  $\beta$ -elimination followed by Michael addition with the DTT (BEMAD) 방법을 수행하였다. BEMAD는 O-GlcNAc을 DTT로 치환시켜 주는 방법으로써, O-GlcNAc이 MS/MS과정에서 단백질과 쉽게 떨어지기 때문에 O-GlcNAc 위치를 찾는 데 적합한 방법이다 (48). O-GlcNAc이 결합된 펩타이드의 경우 기존 펩타이드의 무게에서 DTT가 붙어 136.2 Da이 늘어나며, 136.2가 붙어 MS/MS되는 위치가 O-GlcNAc이 결합하는 위치가 된다. BEMAD 후 Q-TOF MS를 수행한 결과 단백질은 NCT으로 확인 되었으며, 예상하고 있는 Ser 708을 포함한 어떠한 수식화 (modification)가 결합되어 있지 않은

NCT의 698-709 (<sup>698</sup>FIAPREPGAVSY<sup>709</sup>) 펩타이드가 하나의 chymotryptic miss cut을 갖고 [M+2H]<sup>2+</sup> m/z 653.78 값으로 확인되었다 (그림 12B). 또한 앞의 펩타이드와 똑같은 시퀀스를 갖고 있으면서 DTT가 붙어서 136.2 Da이 늘어난, [(653.78 x 2) + 136.2] / 2, [M+2H]<sup>2+</sup> m/z 721.79 값의 펩타이드에서, MS/MS로 시퀀싱 결과 DTT가 붙은 아미노산의 위치는 Ser708으로 확인되었다 <sup>698</sup>FIAPREPGAVS\*Y<sup>709</sup> (그림 12C).

MS 결과로 나온 NCT의 O-GlcNAc의 위치를 다른 방법으로 재확인 하기 위해, NCT의 Ser 708을 Ala (SA)으로 point mutation하였다. 그리고 mutation 시키지 않은 wild type (WT)의 NCT과 mutation 시킨 SA NCT을 세포에 transfection 시킨 후, NCT로 IP 후, O-GlcNAc의 유무를 western blot 방법으로 살펴보았다 (그림 12D). WT NCT과 SA NCT 모두 발현이 비슷하게 되었음에도 불구하고, O-GlcNAc은 WT NCT에서만 보였다. 이러한 결과들은 NCT이 O-GlcNAc으로 수식화되어 있으며, 그 위치가 Ser708이라는 것을 보여준다.

## 5. NCT의 O-GlcNAc 수식화와 감마 시크리테아제 활성과의 상관관계

NCT Ser708의 O-GlcNAc의 여부가 감마 시크리테아제의 활성과 연관이 있는지를 살펴 보았다. 기존 세포 내에 존재하는 NCT의 효과를 배제하기 위해 NCT<sup>-/-</sup> MEF 세포를 사용하였고, inducible retroviral system을 사용하여, WT NCT과 SA NCT을 발현하는 세포를 만들었다. NButGT 처리 24시간 후, APP-CTF를 western blot 방법으로 확인 결과 WT NCT을 발현하는 세포의 경우 앞서와 마찬가지로 NButGT처리에 의해 APP-CTF가 축적되었지만, SA NCT을 발현하는 세포에서는 NButGT처리에 의한 APP-CTF의 축적이 보이지 않았다 (그림 13A, 13B; \*P<0.05). 감마 시크리테아제의 활성만을 측정하는 실험으로 *in vitro* peptide cleavage assay를 위와 동일한 조건하에 수행한 결과, NButGT에 의해 WT NCT을 발현하는 MEF 세포는 감마시크리테아제의 활성이 감소되었지만, SA NCT를 발현하는 세포에서는 NButGT에 의한 감마시크리테아제의 활성에 변화가 없었다 (그림 13C; \*\*P<0.01). 이러한 결과들은, NCT Ser708 잔기에 붙은 O-GlcNAc에 의해 감마 시크리테아제의 활성이 조절되었음을 보여준다.

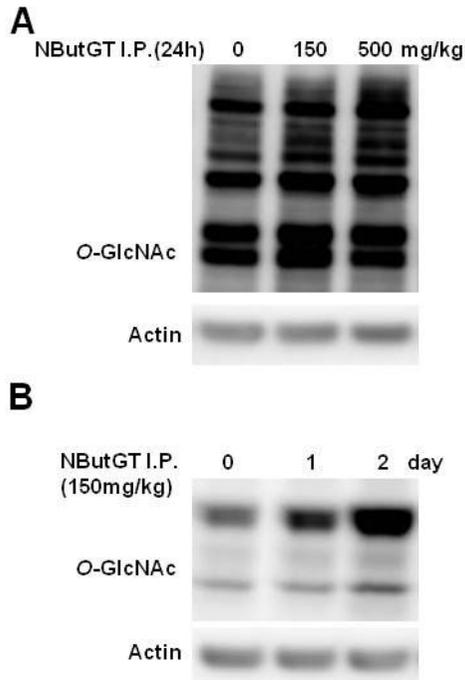


그림 6. Mice에 NButGT를 복강내 주사할 적정 양과 투여 기간 조사

(A) NButGT를 식염수에 다양한 농도로 희석 한 후, 복강내 투여 하고 24시간 후 쥐 뇌 조직을 분리하여 O-GlcNAc이 증가 한 양을 western blot을 통하여 확인하였다. (B) NButGT의 투여 주기를 정하기 위해 NButGT의 효과가 며칠까지 지속되는 지를 확인하였다. 150 mg/kg의 NButGT를 복강내 투여 후 24시간, 48시간이 지난 후 쥐 뇌 조직을 분리하여 western blot을 통하여 O-GlcNAc증가를 확인하였다.

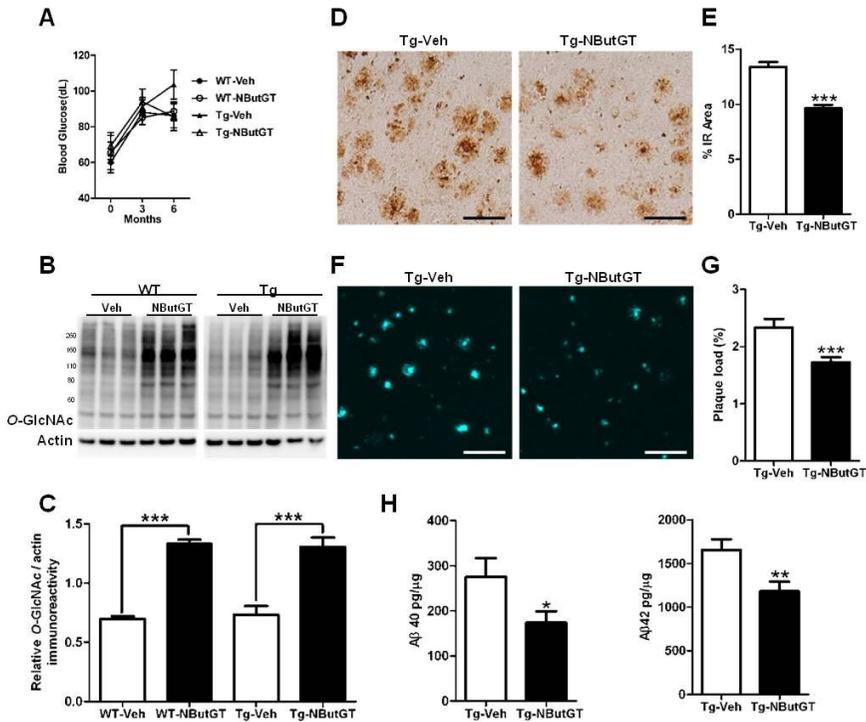


그림 7. 5XFAD mice에서 NButGT에 의한 Aβ의 생성과 축적의 감소

(A) NButGT를 투여하는 기간 동안 혈당을 측정하였다. 쥐 혈당 측정은 3개월 마다 측정하였고, 그 결과 투여기간 총 6개월 동안 NButGT와 식염수를 처리한 그룹간의 유의한 차이는 없었다. (B) 6개월의 NButGT의 투여기간이 끝나 후, 쥐 뇌의 조직에서의 세포내 단백질의 O-GlcNAc 수식화 정도를 O-GlcNAc을 선별적으로 인지하는 항체 (CTD110.6)를 사용하여 western blot으로

확인하였다. Actin은 loading control로써 사용하였다. (C) Actin을 이용하여 normalization 후에 O-GlcNAc 정도를 정량적으로 비교한 그래프이다. (D-H) NButGT를 투여한 5XFAD mice는 A $\beta$  축적과 농도가 낮아져있다. (D) 식염수와 NButGT를 투여한 쥐의 뇌를 A $\beta$  항체 (4G8)를 사용하여 A $\beta$ 의 축적을 IHC 통해 확인하였다. (F) 5XFAD mice의 뇌에 FSB 염색을 하였다. 축적된  $\beta$ -sheet의 구조를 염색 하는 FSB의 특성을 이용하여 A $\beta$ 의 축적만을 염색하였다. (E)와 (F)는 각각 (D)와 (F)를 정량적으로 분석한 그래프이다. (H) Human specific A $\beta$ 를 측정하는 ELISA를 이용하여 70% formic acid에 녹은 A $\beta_{40}$ 과 A $\beta_{42}$ 를 측정하였다 (각 그룹의 n=12). Scale bar는 100  $\mu$ m이다. 그룹간의 차이는 two-way analysis of variance (ANOVA), unpaired t-test 그리고 Bonferroni post test를 이용하여 분석하였다 (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

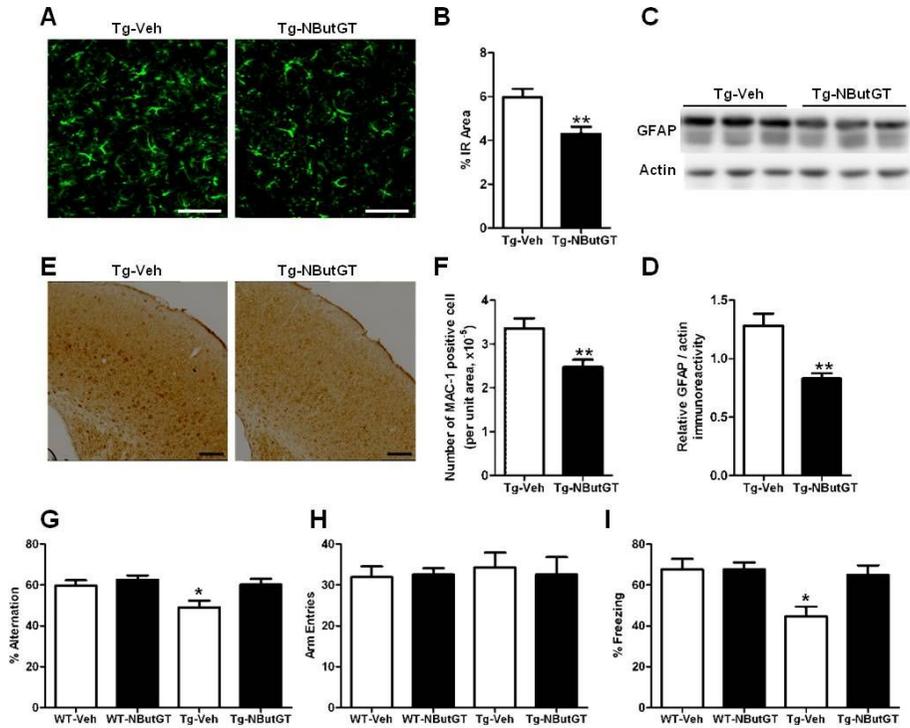


그림 8. 5XFAD mice에서 NButGT에 의한 신경 염증과 기억력 저하의 회복

(A, B) Astrocyte의 과다 활성화 정도를 보기 위해 GFAP 항체를 사용하여 IHC하였다. Scale bar는  $100\ \mu\text{m}$ 를 나타낸다 (각 그룹의  $n=6$ ). (C, D) 5XFAD mice 뇌 세포 용액에서 GFAP 항체를 이용하여 western blot을 통해 astrocyte의 활성화 정도를 확인하였으며, actin을 이용하여 normalization후 정량 분석 한 결과 NButGT를 투여한 그룹이 식염수를 투여한 그룹보다 astrocyte의 GFAP 발현 정도가 낮았다. (E, F) 5XFAD mice에서

microglia 활성 정도를 확인 하기 위해 CD11b (MAC-1) 항체를 이용하여 IHC하였다. 그 결과 NButGT를 투여한 그룹이 식염수를 투여한 그룹보다 microglia의 MAC-1 발현 정도가 낮았다. (G) 5XFAD mice의 spatial working memory를 측정하기 위해 Y-maze에서 spontaneous alternation test를 수행하였다. (H) 각 그룹이 통로에 들어간 전체의 수이며 이것은 운동성을 나타내는 것으로 NButGT와 식염수를 투여한 그룹간의 차이는 없는 것으로 보아 운동성에는 차이가 없음을 알 수 있다. (I) 해마에 의존적인 기억력을 확인하기 위해 contextual fear conditioning을 수행하였다. 그 결과 freezing 시간이 NButGT를 투여한 그룹에서 더 길게 나타났으며, 이것은 NButGT의 투여에 의해 5XFAD mice에서 보이는 기억력 저하가 회복되었음을 나타낸다. WT mice (n=15), 5XFAD mice (n=13)은 NButGT를 처리하였으며, WT mice (n=14), 5XFAD mice (n=13)은 식염수를 처리하였다 (\*P<0.05, \*\*P<0.01).

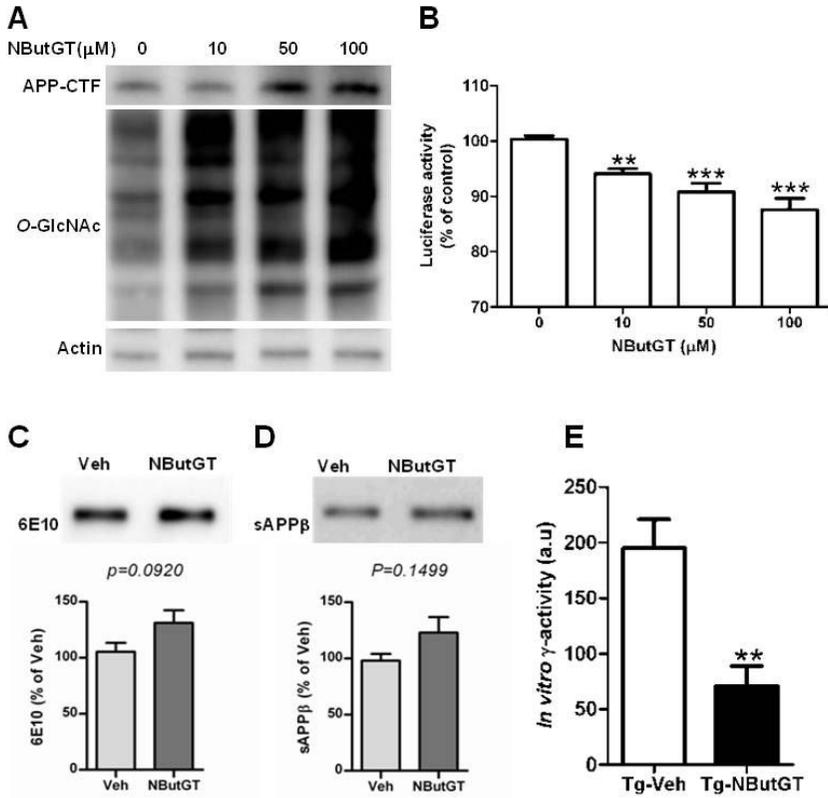


그림 9. NButGT 처리와 감마 시크리테아제의 활성과의 상관관계  
 (A) swAPP를 과발현 하는 CHO-swAPP 세포에 NButGT를 농도별로 처리하고 24시간 후 APP-CTF의 축적과 O-GlcNAc의 증가를 western blot으로 확인하였다. (B) 감마 시크리테아제의 luciferase reporter system을 과발현 하고 있는 CHO-C99 세포에 NButGT를 처리한 후 직접적인 감마 시크리테아제의 활성 정도를 측정하였다. (C, D) Wild type APP와 PS M146L을 과발현 하는 세포에 NButGT를 처리 후 배양한 미디어를 이용하여, 6E10

항체를 통해서  $sAPP\alpha$  를,  $sAPP\beta$  항체를 통해서  $sAPP\beta$  를 확인함으로써 알파와 베타 시크리테아제의 활성을 측정하였다. (E) NButGT의 주사한 5XFAD mice의 뇌 조직액을 사용하여 감마 시크리테아제의 활성을 *in vitro* peptide cleavage assay를 통하여 측정하였다 (각 그룹당  $n=6$ ; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ).

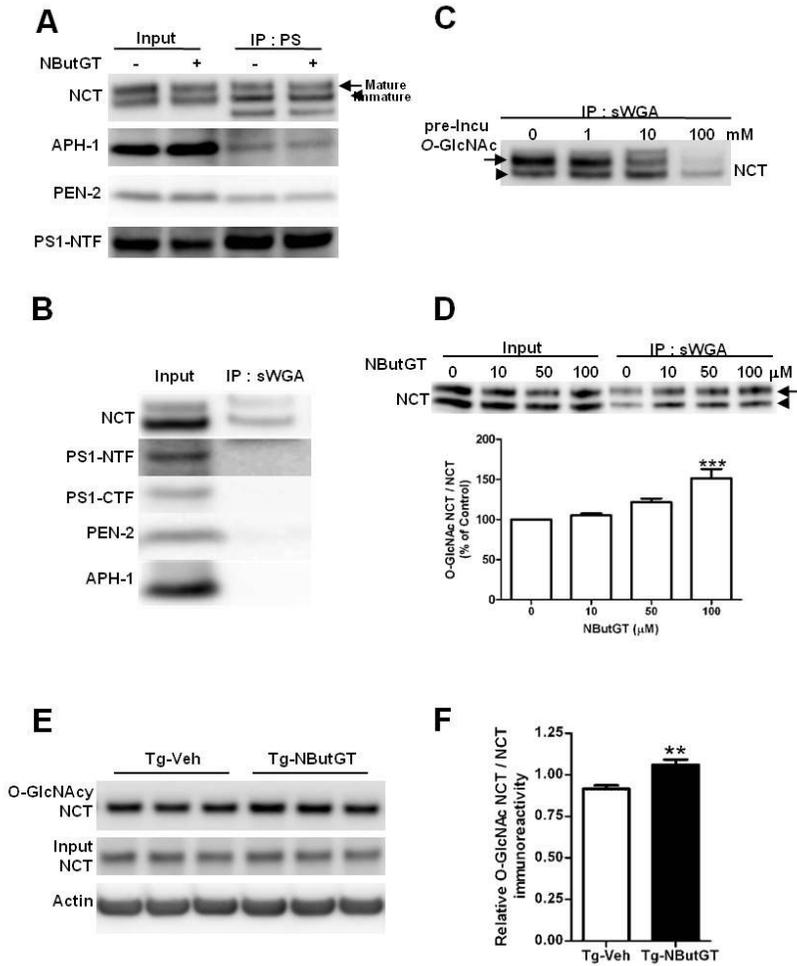


그림 10. NButGT 에 의한 NCT 의 O-GlcNAc 수식화 증가

(A) 감마 시크리테아제의 구성 단백질들을 과발현 하는 ANPP 세포에서 NButGT 의 처리에 의해 감마 시크리테아제 구성 단백질의 발현 정도 혹은 complex 형성 정도가 달라지는 지를 PS1 으로 IP 후, 각각의 구성 단백질의 항체 (NCT, APH-1, PEN-2, PS1)를 이용하여 western blot 을 통해 확인 하였다. (B)

GlcNAc 을 인지하는 sWGA 를 이용하여 감마 시크리테아제의 구성 단백질 중에서 GlcNAc 이 결합하는 단백질을 분리 한 후, western blot 을 통해 확인하였다. (C) NCT 이 O-GlcNAc 으로 수식화되는지를 competition assay 를 사용하여 다시 살펴보았다. Free O-GlcNAc 을 sWGA 와 미리 반응시키고, 그 후 세포 용액과 반응 시켰다. (D) NButGT 처리 24 시간 후, sWGA 로 pull down 하고 western blot 을 통해, NButGT 에 의해 NCT 의 정도가 조절되는지를 조사하였다. 그 결과 전체적인 NCT 의 양은 NButGT 에 의해 변화가 없지만, O-GlcNAc 으로 수식화된 NCT 의 양은 증가 하였다. (E, F) 5XFAD mice 에서, sWGA 로 IP 후 NCT 으로 western blot 을 통해, *in vivo* 에서 NCT 의 O-GlcNAc 수식화를 확인 하였다 (각 그룹당 n=6, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

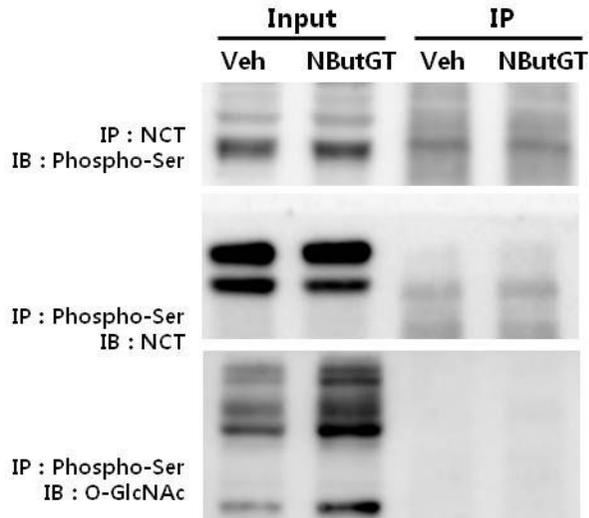


그림 11. NButGT 와 NCT 의 인산화와의 상관관계 연구

ANPP 세포에 NButGT 를 처리 후, NCT 로 IP 후, western blot 은 phosphors-Ser 을 이용하고, 반대로 phospho -Ser 으로 IP 후 NCT 으로 western blot 을 수행하였다.

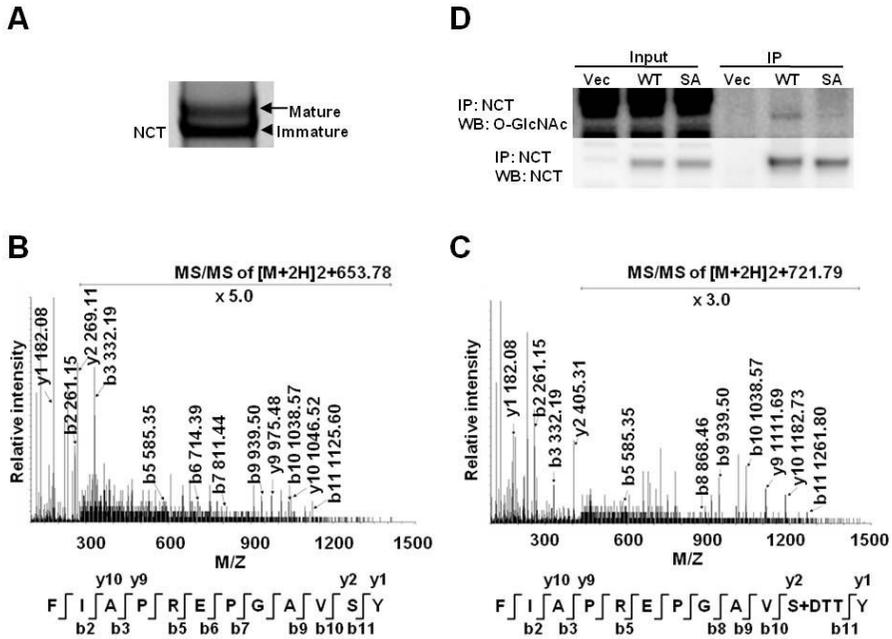


그림 12. NCT 의 O-GlcNAc site mapping

(A) ANPP 세포에 100  $\mu$ M NButGT 처리 하고 24 시간 후, NCT 으로 IP 하고 Coomassie 염색을 하였다. (B, C) NCT 의 mature 와 immature form 의 band 를 SDS-PAGE 에서 잘라서 in-gel chymotryptic digestion 을 하고 BEMAD 과정을 수행 후, Q-TOF 을 찍었다. (B) 어떠한 수식화도 없는 NCT 의 698-709 (FIAPREPGA VSY) 펩타이드의 Q-TOF spectrum 이며, 이 펩타이드의 값은  $[M+2H]^{2+}$  m/z 653.78 이다. (C) NCT 의 698-709 에 DTT 가 붙어 136.2 의 값이 더 늘어난 Q-TOF

spectrum 이며,  $[M+2H]^{2+}$  m/z 721.79 그 값을 갖는다. Q-TOF MS/MS 를 통해 시퀀싱 한 결과 DTT 가 붙은 위치는 Ser708 (FIAPREPGAV(S\*)Y) 이다. (D) Ser708 을 Ala 으로 mutation (S708A)하여 O-GlcNAc 의 결합하지 못하게 하고, Wild type (WT) NCT 과 SA NCT 를 각각 CHO 세포에 transfection 하였다. NCT 으로 IP 후 O-GlcNAc (CTD110.6)으로 western blot 을 하였다.

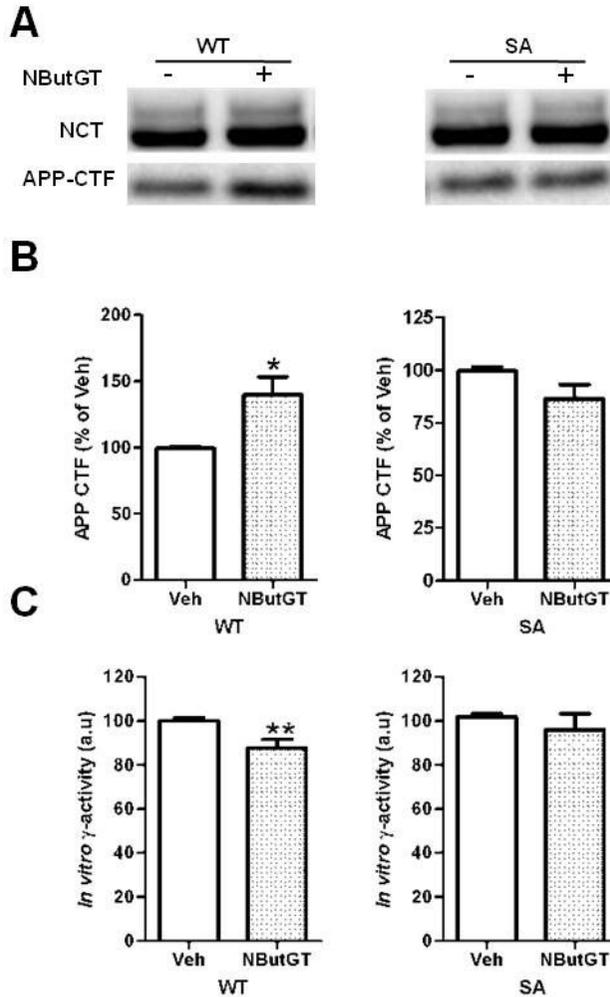


그림 13. SA NCT mutant 에서 NButGT 에 의한 감마 시크리테아제 활성 변화 관찰

(A, B) WT NCT 와 mutant SA NCT 를 NCT<sup>-/-</sup>MEF 세포에 infection 시킨 후, NButGT 를 처리하여 APP CTF 의 축적을 western blot 으로 확인하였다 (n=5). (C) 같은 조건에서 세포의 막 단백질을 분리하여 *in vitro* peptide cleavage assay 를 수행하였다 (n=10, \*P<0.05, \*\*P<0.01).

## Part 2: HDAC6 저해제가 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 axonal transport 에 미치는 영향 연구

### 1. 5XFAD mice 뇌에서 $\alpha$ -tubulin의 acetylation 정도 조사

AD 환자의 뇌에는 HDAC6가 증가되어 있으며 (13),  $\alpha$ -tubulin의 acetylation이 낮아져 있다 (14, 15). 본 연구에서는 AD에서  $\alpha$ -tubulin의 acetylation의 역할을 규명하기 위해, AD의 동물 모델인 5XFAD mice의 뇌에서 AD 환자와 같이  $\alpha$ -tubulin의 acetylation이 낮아져 있는지를 western blot으로 조사하였다. 그 결과 wild type (WT) mice에 비해 5XFAD mice에서  $\alpha$ -tubulin의 acetylation 양은 유의하게 감소되어 있었다 (WT mice:  $1.145 \pm 0.059$ , 5XFAD mice:  $0.96 \pm 0.026$ , 그림 14; \*P<0.05).

### 2. TBA에 의한 A $\beta$ 에 의해 감소된 $\alpha$ -tubulin의 acetylation의 변화 양상

A $\beta$ 는  $\alpha$ -tubulin의 acetylation 정도를 조절하고 (15), HDAC6 저해제인 TBA는  $\alpha$ -tubulin의 acetylation을 증가시킨다는 기존의 보고가 있었다 (38, 49, 50). A $\beta$ 와 TBA가  $\alpha$ -tubulin의

acetylation을 조절하는데 있어서의 역할을 효과적으로 규명 하기 위해, 본 연구에서는 primary hippocampal neuron을 사용하였다. primary hippocampal neuron에 monomer form의  $A\beta$   $2\mu\text{M}$ 을 24시간 처리 후, western blot과 면역세포염색(ICC)을 통해 확인하였을 때, 기존의 보고된 것과 같이 (15, 51),  $A\beta$  처리시  $\alpha$ -tubulin의 acetylation은 유의하게 감소하였다 (그림 15; \* $P < 0.05$ ). 이때  $5\mu\text{M}$  TBA를 3시간 동안 처리한 결과,  $A\beta$ 에 의해 감소된  $\alpha$ -tubulin의 acetylation은 다시 회복 되었다 (그림 15; \*\*\* $P < 0.001$ ).

### 3. TBA에 의한 $A\beta$ 에 의해 감소된 미토콘드리아의 axonal transport 변화 양상

$A\beta$ 에 의해 MT를 따라 이동하는 미토콘드리아의 이동이 망가졌을 때, TBA에 의한 미토콘드리아의 axonal transport에 변화를 효과적으로 보기 위해 microfluidic system을 이용하였다. microfluidic system은 hippocampal neuron culture 시에 soma와 axon을 구획 지음으로써 axonal transport를 관찰하는데 용이하다 (52). 미토콘드리아의 움직임을 보기 위해, pDsRed2-Mito DNA를 transfection 하였으며, neuron의 soma와 axonal 양쪽

부위에  $A\beta$  와 TBA 처리 후, live cell imaging system 에서 총 2 분 동안 1 초마다 이미지를 얻었다. 이미지는 ImageJ 프로그램의 multiple Kymograph plugin 과 z-projection 을 이용하여 미토콘드리아의 속도와 운동성의 방향을 분석하였다. 그 결과  $A\beta$  에 의해 미토콘드리아의 움직임은 감소하고, TBA 처리시  $A\beta$  에 의한 미토콘드리아의 움직임의 감소가 회복 되었다 (그림 16A 와 16B).  $A\beta$  처리시, 미토콘드리아의 anterograde 와 retrograde 양 방향의 속도는 모두 감소하였고, 이것은 TBA 처리에 의해 다시 회복 되었다 (그림 16C; \*\*\* $P < 0.001$ ). 전체에서 움직이는 미토콘드리아만을 분석한 운동성도 속도와 같은 결과를 보였다 (그림 16D; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). 이러한 결과들은  $\alpha$ -tubulin 의 acetylation 이  $A\beta$  가 있을 때에도 미토콘드리아의 axonal transport 를 조절할 수 있음을 보여준다.

#### 4. $A\beta$ 와 TBA처리에 의한 미토콘드리아의 형태 변화

미토콘드리아의 형태에 있어서 운동 단백질 (motor protein)인 dynein 이 관련이 있으며 (53, 54), HDAC6 를 저해하는 것도 미토콘드리아의 길이를 늘리는데 영향을 준다는 기존의 보고가 있다 (55). 그래서  $\alpha$ -tubulin 의 acetylation 이 미토콘드리아의

길이를 조절하는데 관여하는지를 위의 실험 조건에서 조사해보았다.  $A\beta$  처리시, 전반적인 미토콘드리아의 길이는 짧아졌고, TBA 를 처리한 그룹에서는 다시 회복 되었다 (그림 17A; Veh:  $1.168 \pm 0.02$ ,  $A\beta$ :  $0.904 \pm 0.02$ , TBA:  $1.228 \pm 0.02$ ,  $A\beta$  & TBA:  $1.159 \pm 0.02$ ,  $***P < 0.001$ ). 미토콘드리아의 길이와 운동성을 비교하기 위해서 움직이지 않는 미토콘드리아와 움직이는 미토콘드리아의 길이를 나누어 분석하였다. 움직이는 것과 멈추어 있는 미토콘드리아의 길이가 각 약을 처리한 그룹에서 비슷한 경향성을 갖고 있지만, 전반적으로 멈추어 있는 미토콘드리아의 길이는 움직이는 미토콘드리아의 길이보다 짧았다 (그림 17B;  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ). 이것은 미토콘드리아의 길이가 미토콘드리아의 axonal transport 속도와 관련 있음을 보여준다. 그러나 이때 axon  $100\mu\text{m}$  에 있는 미토콘드리아의 수는 각 그룹 사이에 유의한 차이가 없었다 (그림 17C). 이러한 결과들은  $A\beta$  와 HDAC6 가 미토콘드리아의 길이와 axonal transport 에 중요하다는 것을 말한다.

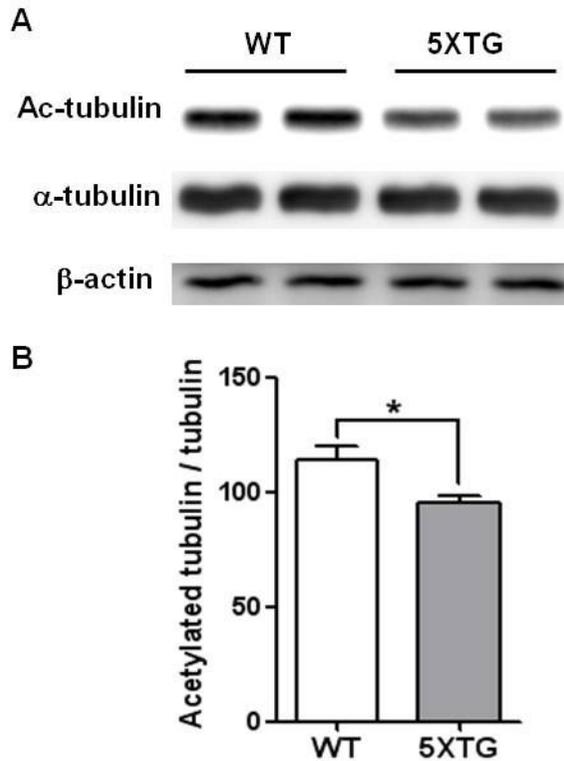


그림 14. 5XFAD mice 에서  $\alpha$ -tubulin 의 acetylation 감소

(A, B) Wild Type (WT) mice 와 5XFAD mice 의 뇌 조직에서  $\alpha$ -tubulin 의 acetylation 을 western blot 을 통해 확인하였다. 13 개월의 쥐의 frontal cortex 를 사용하였다 (WT mice n=4, 5XFAD mice n=3; \*P<0.05).

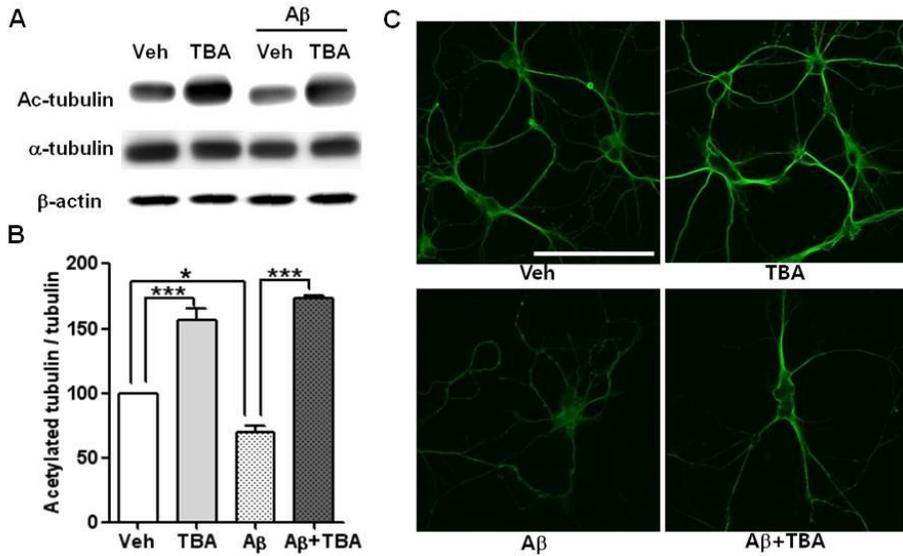


그림 15. Aβ와 TBA에 의한 α-tubulin의 acetylation

(A, B) Primary hippocampal neuron에 Aβ 2 μM을 24 시간 동안 처리 후, TBA 5 μM을 3 시간 처리하였다. Western blot을 통해 α-tubulin의 acetylation 확인하였다. (C) 위와 동일한 조건에서 α-tubulin의 acetylation을 ICC로 확인하였다 (Scale bar는 100 μm를 나타낸다. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001)

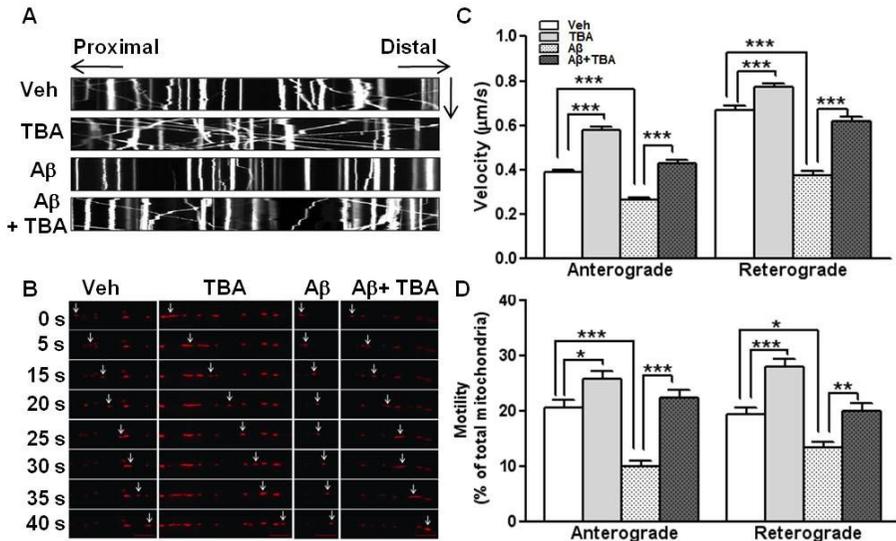


그림 16. Aβ와 TBA에 의한 미토콘드리아의 axonal transport

(A) 미토콘드리아의 움직임을 보여주는 kymograph를 분석에 사용하였다. Primary hippocampal neuron을 microfluidic chamber에 키운 후, pDsRed2-Mito를 transfection하고 Aβ와 TBA를 처리하고 총 2분 동안 1초씩 이미지를 얻었다. 얻은 이미지는 ImageJ를 사용하여 kymograph를 만들었다. 가로는 길이 (152.7 μm)를 세로는 시간 (2분)을 나타낸다. (B) 각 그룹의 5초마다의 이미지로써, 화살표는 움직이는 미토콘드리아를 나타낸다. (C) 움직이는 미토콘드리아의 평균 속도를 그래프로 정량화하였다. Anterograde와 retrograde를 각각 나누어 분석하였다. (D) 미토콘드리아의 운동성(motility)을 그래프로

정량화 하였다. 운동성은 전체 미토콘드리아 중에서 움직이는 미토콘드리아를 퍼센트로 나타내었다. (Veh n=41, TBA n=44, A $\beta$  n=42, A $\beta$  + TBA n=43, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001)

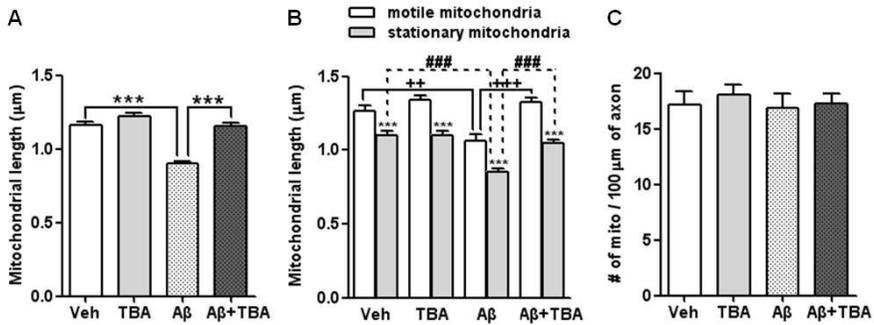


그림 17. Aβ와 TBA에 의한 미토콘드리아의 길이

(A) 전체 미토콘드리아 길이의 평균을 그래프로 정량화 하였다. 양쪽 방향, anterograde와 retrograde로 이동하는 미토콘드리아와 움직이는 것과 움직이지 않는 미토콘드리아 모두 포함한 각 그룹의 미토콘드리아의 길이이다. (B) 각 그룹에서 움직이는 미토콘드리아와 움직이지 않는 미토콘드리아를 나누어 길이를 표시하였다. (C) Axon 100 μm에 있는 미토콘드리아의 수를 나타낸다. (Veh n=35, TBA n=42, Aβ n=38, Aβ & TBA n=38, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

## 고 찰

### Part 1: *O*-GlcNAcase 저해제가 $A\beta$ 와 AD

#### 병인기전들에 미치는 영향 연구

AD 병인기전과 *O*-GlcNAc사이의 관계를 확인하기 위해, 본 연구에서는 *O*-GlcNAcase inhibitor로 NButGT를 사용하였다. 하지만 이전의 보고서에서는 다른 종류의 *O*-GlcNAcase inhibitor인 PUGNAG 과 streptozotocin (STZ)를 많이 사용하였는데, 이것은 specificity가 떨어지고, 세포 독성(cellular toxicity)을 갖고 있거나, 인슐린 저항 (insulin resistance)을 유발하는 등의 부작용이 있다 (43). 이러한 특징을 이용하여, 기존에는 쥐에 STZ를 주사하여 AD의 병리학적인 특징을 갖게 하거나, 제 2 형질의 당뇨를 유발시켰다 (56). 그러나 NButGT는 이전에 나왔던 다른 *O*-GlcNAcase inhibitor보다 *O*-GlcNAcase에만 더 선별적으로 작용하고, 세포 독성이 없어 인슐린 저항을 유발 시키지 않는다 (57). 이 외에도 최근 새로이 개발된 *O*-GlcNAcase inhibitor를 처리하였을 때, tau의 인산화가 줄고, *in vivo*에서는 long-term potentiation (LTP)가 증가한다는 보고도 있다 (40, 41). 하지만 AD에서 *O*-GlcNAc과  $A\beta$  관련 연구는

거의 보고된 것이 없다. 본 연구에서는 NButGT를 이용하여 *O*-GlcNAc을 증가 시킨 후, *O*-GlcNAc과  $A\beta$ 의 생성 및 축적과의 상관관계를 보았다. NButGT를 AD 동물 모델 인 5XFAD mice에 주사한 결과  $A\beta$ 의 축적과 생성이 줄었으며, 신경 염증과 관련된 세포도 감소 시켰는데, 이것은 *O*-GlcNAc을 증가시키는 것이 AD 진행단계를 개선시킨다는 것을 보여주고 있다.

*O*-GlcNAc과 인산화가 단백질의 같은 아미노산에 결합하여 대부분 경쟁적인 관계에 있긴 하지만, 이것은 자극 (stimulus), 세포의 종류, 단백질, 그리고 세포 내 신호 전달에 따라 같은 부위 또는 바로 옆에 결합하여 경쟁적인 관계를 갖거나, 아예 다른 부위에 각각 결합 하기도 한다 (58). 이전 보고에 의하면, NCT의 인산화 또한 감마 시크리테아제의 활성을 조절한다 (59). 하지만, 본 연구에서는 NButGT 처리에 의해 NCT의 *O*-GlcNAc은 증가하지만, NCT의 인산화에는 변화가 없었다. 이것은 NCT의 Ser708에서는 *O*-GlcNAc과 인산화가 서로 경쟁적이지 않다는 것을 의미한다.

APP 또한 *O*-GlcNAc이 결합하는 단백질이다 (60). 최근 다른 보고에 의하면 PUGNAG을 처리하여, APP의 *O*-GlcNAc을 증가시킨 결과 non-amyloidogenic 과정과 관련된 알파

시크리테아제의 활성이 증가되어  $A\beta$ 를 낮춘다고 한다 (61). 비록 본 연구에서는 알파와 베타 시크리테아제의 활성을 직접적으로 확인하지는 않았지만, 알파와 베타 시크리테아제 활성 이후의 생성물인  $sAPP\alpha$ 와  $sAPP\beta$ 를 통하여 간접적으로 확인한 결과, 증가하는 경향을 보이기는 하지만 유의하지는 않았다. 또한 본 연구에서는 *in vitro*와 *in vivo*에서 각각 알파와 베타 시크리테아제의 활성에 영향을 받지 않는, 감마 시크리테아제의 기질인 C99를 기반으로 하는 luciferase assay와 *in vitro* peptide cleavage assay를 사용하여 NButGT에 의한  $A\beta$ 의 조절이 감마 시크리테아제에 의한 것임을 확인하였다. NButGT를 처리시 NCT뿐만이 아닌 세포 내 다른 많은 단백질도 O-GlcNAc이 증가되어  $A\beta$ 를 조절하였을 가능성도 있다. 하지만 본 연구에서는 NCT O-GlcNAc site만을 mutation하여 NCT의 O-GlcNAc 결합 유무에 따른  $A\beta$ 의 축적을 확인함으로써 다른 단백질에 의한 가능성을 제외시켰으며, NCT이 비록 감마 시크리테아제를 구성하는 여러 단백질 중에 하나이지만 (62), APP를 인지하여 직접적으로 결합하며, 발현 양과 성숙 (maturation) 정도에 의해 감마 시크리테아제의 활성을 조절하는, APP 처리과정 (processing)에 있어서 중요한 단백질이기 때문에 (63), NCT에 O-GlcNAc의

수식화에 만으로도 감마 시크리테아제 활성을 조절 할 수 있다.

본 실험 결과에서, NButGT를 처리하여 감마 시크리테아제의 활성을 보이는 실험에 있어서 감소되는 정도가 다르나, 그것은 실험상 방법의 차이로써, 그림 13의 경우에는 NCT<sup>-/-</sup> MEF 세포에 NCT를 transfection하여 감마 시크리테아제의 활성을 측정하는 것으로, NCT<sup>-/-</sup> MEF에 transfection 효율은 10%이하로써, 이 실험에서 NButGT에 의한 감마 시크리테아제의 활성의 변화가 작다. 그러나 그림 9E에서는 mutation되어 있는 APP와 PS1이 과발현 되어있는 5XFAD mice를 하였는데, 감마 시크리테아제의 경우 서로 구성 단백질간의 발현이 긴밀하게 조절되기 때문에, NCT의 발현 또한 높으며, NButGT에 의한 감마 시크리테아제의 활성의 변화가 크게 나타났다.

본 연구에서는 AD 병인기전과 관련하여 A $\beta$ 와 O-GlcNAc과의 관련성에 대해 *in vivo*와 *in vitro*에서 연구하였다. NCT Ser708의 O-GlcNAc 증가는 감마 시크리테아제의 활성을 낮추고, A $\beta$ 의 생성에도 영향을 주어, A $\beta$ 와 관련된 신경 염증과 기억력 저하를 회복시킨다. 기존에는 O-GlcNAc과 AD관련하여 tau와의 연관성에 대해 많은 연구가 되어왔고, tau의 O-GlcNAc의 증가 또한 neuroprotective effect를 갖고 있다고 보고되었다 (64). 하지만

본 연구에 사용한 5XFAD mice의 경우 tau와 관련한 병인기전이 보이지 않기 때문에, 5XFAD mice에서 O-GlcNAc증가에 의한 이러한 결과들은 오직 A $\beta$ 와 관련된 효과라고 할 수 있겠다. 따라서 본 연구는 *in vivo*에서 처음으로 O-GlcNAc과 A $\beta$ 의 연관성을 보았으며, O-GlcNAc의 증가가 AD를 치료하는데 있어서 효과적인 치료제가 될 수 있음을 보여주고 있다.

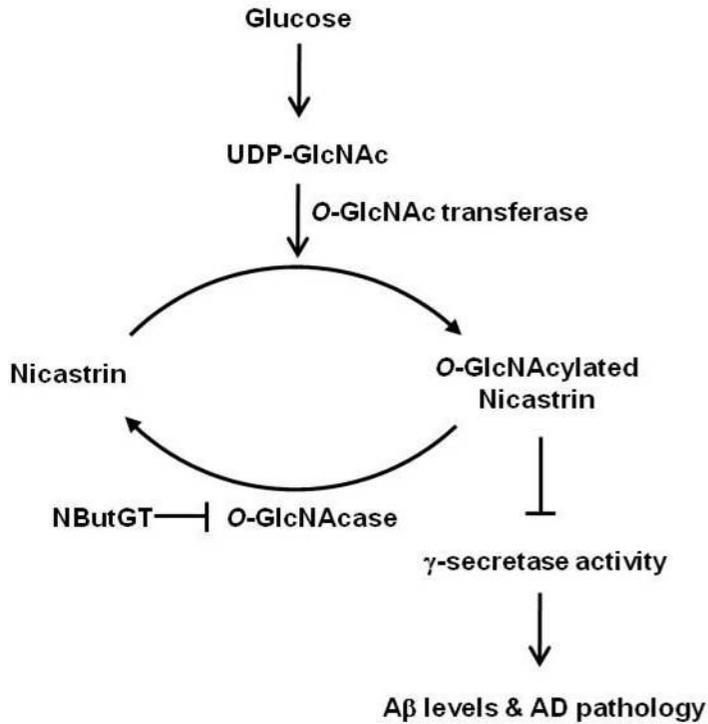


그림 18. *O*-GlcNAc 과 AD 병인기전과의 상관관계 모식도

세포 내의 Glucose 의 양은 *O*-GlcNAc 의 기질인 UDP-GlcNAc 의 양을 결정하게 된다, AD 의 경우엔 Glucose metabolism 이 망가져 있고, Glucose 의 흡수가 잘 안되어 세포 내에는 hypoglycemia 조건이 된다. UDP-GlcNAc 은 *O*-GlcNAc transferase 에 의해 단백질에 붙으며, *O*-GlcNAcase 에 의해 떨어진다. 본 연구에서는 *O*-GlcNAcase 저해제인 NButGT 를 사용하여 세포 내 단백질의 *O*-GlcNAc 수식화를 증가시켰다. 그 결과 *O*-GlcNAc 으로 수식화된 NCT 이 더 많아지게 되고, 이것은 감마 시크리테아제의 활성을 낮추어  $A\beta$  의 생성을 감소시킨다.

## Part 2: HDAC6 저해제가 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 axonal transport 에 미치는 영향 연구

신경세포의 axonal transport와 미토콘드리아의 기능 저하는 AD의 발병과정 중의 초기에 나타나는 증상이다 (16, 20). 이러한 증상들은 AD의 주요 병인 중의 하나인 A $\beta$ 에 의해 유도된다 (65-68). A $\beta$ 는 GSK3 $\beta$  활성을 증가시키는데 이때 GSK3 $\beta$ 의 여러 기질(substrate)들이 axonal transport의 기능과 관련 되어 있다. GSK3 $\beta$ 는 tau를 과인산화 시켜 neurofibrillary tangles (NFT)를 생성함에 따라 MT의 안정성을 떨어뜨려 axonal transport를 저해한다 (69). 또한 HDAC6도 GSK3 $\beta$ 의 기질 중에 하나로써, GSK3 $\beta$ 에 의해 HDAC6의 활성이 증가하여 (70),  $\alpha$ -tubulin의 acetylation이 감소시킴으로써, axonal transport가 저해된다. 기존에 많은 연구들은 GSK3 $\beta$ 의 저해제를 사용하여 axonal transport를 조절하였는데, 본 연구에서는 GSK3 $\beta$ 의 여러 기질 중에서도 HDAC6의 저해제를 사용하여 tau 효과를 배제 한 후, A $\beta$ 에 의해 망가진 axonal transport 의 회복을 보았다. 또한 HDAC6의 활성을 조절하는데 쓰인 TBA는 기존에 쓰였던 TSA와 tubasin에 비해서 100배정도 specificity가 높다 (71). HDAC6는 다른 HDAC 효소들과는 달리 histone이 아닌  $\alpha$ -tubulin과 같은

세포질의 단백질을 acetylation시킨다 (38, 72). siRNA를 이용하여 HDAC6를 knockdown 하면  $\alpha$ -tubulin의 acetylation이 증가하는데 이것은 HDAC6 저해제를 사용했을 때의 결과와 같다 (73). Mutant heat-shock protein gene (HSPB1)에 의해 유도되는 Charcot-Marie-Tooth 모델 쥐의 neuropathies와 관련하여, TBA를 처리하였을 때 axonal transport와 움직이는 미토콘드리아의 수와 더불어  $\alpha$ -tubulin의 acetylation도 증가한다는 보고가 있다 (72). 이러한 결과들은 TBA가 HDAC6의 특이적이고 효과적인 저해제이고,  $\alpha$ -tubulin의 acetylation과 미토콘드리아의 axonal transport에 영향을 준다는 것을 뒷받침하고 있다. 미토콘드리아가 axonal transport를 하는데 있어서 운동 단백질 (motor protein)과 연결 단백질 (adaptor protein)의 결합은 필수적이다. 운동 단백질로는 anterograde transport에 관여하는 kinesin이 있으며, retrograde transport에 관여하는 dynein이 있다 (74). 이때 각각의 연결 단백질로는 kinesin은 milton, syntabulin, miro를 필요로 하며, dynein은 dynactin을 필요로 한다 (22, 23). axonal transport를 조절하는 데는 이러한 운동 단백질과 연결 단백질의 결합과 안정성 (stability)또한 중요한 요인이다 (22, 23, 74).  $\alpha$ -tubulin

Lys40의 acetylation은 kinesin과 MT 사이의 결합을 증가시키고, 결과적으로 이동 단백질의 transport를 증가시킨다는 보고가 있다 (8). Dompierre 등에 의하면 MT의 acetylation은 kinesin family motor protein 5 (KIF5)와 dynein 두 단백질과 MT의 결합을 증가시켜, anterograde와 retrograde transport를 증가시킨다고 한다 (75). 그러나 A $\beta$ 가 있는 병인기전의 조건 하에서는  $\alpha$ -tubulin의 acetylation이 미토콘드리아의 axonal transport를 어떤 기전으로 조절하는지는 아직 불분명하다. Du 등에 의하면 oligomer A $\beta$ 를 200 nM 신경 세포에 처리하면 anterograde 와 retrograde 양방향에서 미토콘드리아 운동성이 감소한다고 한다 (20). 그러나 Calkin 등은 20  $\mu$ M A $\beta$ <sub>25-35</sub> oligomer를 처리시에 미토콘드리아의 운동성은 anterograde만 감소하며, 속도는 양방향에서 감소한다고 보고하였다 (17). 그리고 Wang 등의 연구에 따르면 미토콘드리아의 운동성은 양방향에서 모두 감소한다고 한다 (76). 이렇듯 A $\beta$ 의 종류와 농도에 따라 미토콘드리아 axonal transport의 운동성과 속도의 반응은 제각기 다르다. 본 연구에서는 monomer form의 A $\beta$  2  $\mu$ M 를 primary hippocampal neuron에 24 시간 처리하였으며, 그 결과 양방향에서 모두 미토콘드리아의 운동성과 속도는 감소하였다. 본 연구에서

사용한 monomer  $A\beta$   $2\mu M$  을 24시간  $37^\circ C$ 에서 배양하고 원자간력현미경 (Atomic force microscope; AFM)을 통해 관찰 한 결과 monomer  $A\beta$ 도 있었지만, 대부분은 oligomer를 형성하고 있었다. 따라서 oligomer 형태의  $A\beta$ 를 처음부터 처리하는 것보다는 monomer를 처리하는 것이 AD의 생리적인 조건과 비슷하다고 사료된다.

미토콘드리아의 길이와 axonal transport 관련성에 대한 보고로는, 미토콘드리아의 크기와 구조는 분열 (fission)과 융합 (fusion)에 의해 조절되는데 (77, 78),  $A\beta$ 는 두 개의 분열 관련 단백질인 Fis1, Drp1을 활성화 시켜 미토콘드리아를 과도하게 분열시켜 결국 미토콘드리아의 axonal transport를 망가트린다고 한다 (17). Misko 등에 따르면 mitofusin 2는 미토콘드리아의 크기를 조절하는 단백질로써 미토콘드리아의 outer membrane에 존재하면서 직접적으로 미토콘드리아의 axonal transport에 관여한다고 한다 (79). 이러한 보고들은 본 연구에서 나온 결과 중 정지되어있는 미토콘드리아가 움직이는 미토콘드리아의 길이보다 짧은 것과  $A\beta$ 를 처리했을 때 미토콘드리아의 길이가 짧아지고 속도가 감소하는데, 이러한 현상이 TBA에 의해 길이와 속도 모두 회복된다는 점에서 비슷하다. 이러한 결과로부터 미토콘드리아의

길이와 이동 속도는 어느 정도 연관이 있을 것이라 예상되며, HDAC6 또한 미토콘드리아의 크기와 형태를 조절할 것이라 생각된다. 하지만 아직 HDAC6 저해제가 MT와 연결 단백질 사이의 결합에는 어떠한 영향을 주는지는 알지 못한다. 이외에도  $A\beta$ 에 의해 ATP 생성이 낮아지고 막 전위 (membrane potential)가 망가지며,  $Ca^{2+}$ 과 ROS의 생성이 증가되는 등의 미토콘드리아 자체 기능이 저해되기 때문에 (80), HDAC6 저해제가 미토콘드리아 기능을 조절하여 미토콘드리아의 axonal transport 를 증가시켰을 가능성도 간과 할 수 없다. 그래서  $A\beta$ 와 TBA를 순차적으로 처리한 후, ATP의 생성을 측정해 본 결과,  $A\beta$ 에 의해 ATP의 생성은 유의하게 감소하였지만, TBA처리시  $A\beta$ 의해서 감소된 ATP의 생성은 회복되지 않았다. 이것은 ATP의 생성은 적어도 TBA 처리에 의한 미토콘드리아의 길이와 axonal transport와는 관련이 없음을 의미한다. 막 전위와 axonal transport 관련하여, Miller와 Sheetz의 보고에 따르면, 막 전위가 높은 미토콘드리아는 axon terminus로 이동하며, 막 전위가 낮은 미토콘드리아는 soma쪽으로 이동한다고 하며 (81), 이것은 막 전위가 미토콘드리아의 axonal transport에 영향을 주는 하나의 요인이 될 수도 있음을 말해 주고 있다.

본 논문은  $A\beta$ 에 의해 저해된 미토콘드리아의 axonal transport가 HDAC6 저해제에 의해 회복되며,  $\alpha$ -tubulin의 acetylation과 미토콘드리아 길이의 변화가 미토콘드리아의 axonal transport와 상관관계가 있다는 것을 확인하였다. 따라서 이러한 결과들을 미루어 볼 때, HDAC6의 활성 조절이 AD 치료제 개발의 새로운 목표점이 될 수 있을 것으로 사료된다.

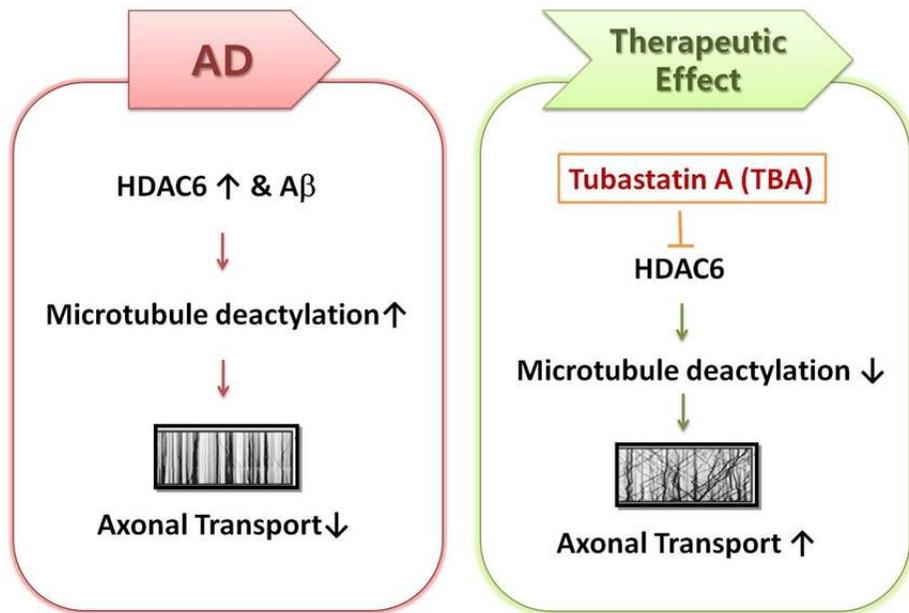


그림 19. HDAC6 저해제가 AD 병인기전에 미치는 영향의 모식도

AD 에서는 HADC6 의 활성이 높고, A $\beta$ 가 과량 존재하여, MT 의 deacetylation 이 많이 일어나,  $\alpha$ -tubulin 의 acetylation 이 낮다. 미토콘드리아의 axonal transport 또한 망가지는데, 이때 HDAC6 저해제를 처리하게 되면,  $\alpha$ -tubulin 의 acetylation 이 증가하여, 미토콘드리아의 axonal transport 가 다시 회복되어 짐으로써, AD 에서 HDAC6 의 저해제가 하나의 치료제가 될 수 있음을 보여주고 있다.

## 결 론

단백질은 어느 잔기 위치에 어떠한 수식화가 결합되냐에 따라 그 단백질의 활성, 분해 또는 다른 단백질과의 결합, 세포내 소기관 사이의 이동이 결정된다. 이러한 단백질의 수식화는 특정 효소들에 의해 조절되며, 효소들의 활성은 병리학적인 요인과 환경에 의해 영향을 받는다 (36). 본 연구에서는 AD 의 병리학적인 조건에서 감소되었다고 알려진 O-GlcNAc (3, 4)과 acetylation (14, 15)을 조절하는 효소의 저해제를 사용하여, 각각의 수식화들을 세포 내에서 증가시켜 준 후, AD 의 병인 기전들의 변화를 관찰하였다. 그 결과 O-GlcNAc 의 증가는 Ab 의 생성을 감소시킴으로써, AD 관련 병인 기전들을 호전시켰으며,  $\alpha$ -tubulin 의 acetylation 의 증가는 Ab 에 의해 저해된 미토콘드리아의 axonal transport 를 회복시켰다. 따라서 이러한 결과들을 종합해 보았을 때, 단백질의 수식화를 조절하는 것이 AD 의 병인기전 연구에 있어서 하나의 표적이 될 뿐 아니라 치료제 개발에 있어서도 도움이 될 것이라 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Wells L, Vosseller K, Hart GW. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science*. 2001;291(5512):2376-8. Epub 2001/03/28.
2. Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem*. 1997;272(14):9308-15. Epub 1997/04/04.
3. McGeer EG, McGeer PL, Akiyama H, Harrop R. Cortical glutaminase, beta-glucuronidase and glucose utilization in Alzheimer's disease. *Can J Neurol Sci*. 1989;16(4 Suppl):511-5. Epub 1989/11/01.
4. Liu Y, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Lett*. 2008;582(2):359-64. Epub 2008/01/05.
5. Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annual review of biochemistry*. 2011;80:825-58. Epub 2011/03/12.

6. Janke C, Kneussel M. Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends in neurosciences*. 2010;33(8):362-72. Epub 2010/06/15.
7. Fukushima N, Furuta D, Hidaka Y, Moriyama R, Tsujiuchi T. Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *Journal of neurochemistry*. 2009;109(3):683-93. Epub 2009/03/03.
8. Hammond JW, Cai D, Verhey KJ. Tubulin modifications and their cellular functions. *Current opinion in cell biology*. 2008;20(1):71-6. Epub 2008/01/30.
9. Dent EW, Gertler FB. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*. 2003;40(2):209-27. Epub 2003/10/15.
10. Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, et al. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol*. 2006;16(21):2166-72. Epub 2006/11/07.
11. Bulinski JC. Microtubule modification: acetylation speeds anterograde traffic flow. *Curr Biol*. 2007;17(1):R18-20. Epub 2007/01/09.
12. Zhang Y, Gilquin B, Khochbin S, Matthias P. Two catalytic domains are required for protein deacetylation. *J Biol Chem*. 2006;281(5):2401-4. Epub 2005/11/08.

13. Ding H, Dolan PJ, Johnson GV. Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *Journal of neurochemistry*. 2008;106(5):2119-30. Epub 2008/07/19.
14. Hempen B, Brion JP. Reduction of acetylated alpha-tubulin immunoreactivity in neurofibrillary tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996;55(9):964-72. Epub 1996/09/01.
15. Henriques AG, Vieira SI, da Cruz ESEF, da Cruz ESOA. Abeta promotes Alzheimer's disease-like cytoskeleton abnormalities with consequences to APP processing in neurons. *Journal of neurochemistry*. 2010;113(3):761-71. Epub 2010/03/30.
16. Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, et al. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science*. 2005;307(5713):1282-8. Epub 2005/02/26.
17. Calkins MJ, Reddy PH. Amyloid beta impairs mitochondrial anterograde transport and degenerates synapses in Alzheimer's disease neurons. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1812(4):507-13. Epub 2011/01/19.
18. Decker H, Lo KY, Unger SM, Ferreira ST, Silverman MA. Amyloid-beta peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3beta in

primary cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2010;30(27):9166-71.

Epub 2010/07/09.

19. Rui Y, Tiwari P, Xie Z, Zheng JQ. Acute impairment of mitochondrial trafficking by beta-amyloid peptides in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2006;26(41):10480-7. Epub 2006/10/13.

20. Du H, Guo L, Yan S, Sosunov AA, McKhann GM, Yan SS. Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(43):18670-5. Epub 2010/10/13.

21. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2001;21(9):3017-23. Epub 2001/04/20.

22. Rice SE, Gelfand VI. Paradigm lost: mltin connects kinesin heavy chain to miro on mitochondria. *The Journal of cell biology.* 2006;173(4):459-61. Epub 2006/05/24.

23. Frederick RL, Shaw JM. Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. *Traffic.* 2007;8(12):1668-75. Epub 2007/10/20.

24. Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nature reviews Neuroscience.*

2006;7(9):710-23. Epub 2006/08/23.

25. Hengst U, Deglincerti A, Kim HJ, Jeon NL, Jaffrey SR. Axonal elongation triggered by stimulus-induced local translation of a polarity complex protein. *Nature cell biology*. 2009;11(8):1024-30. Epub 2009/07/22.

26. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(40):10129-40. Epub 2006/10/06.

27. Jin SM, Cho HJ, Jung MW, Mook-Jung I. DNA damage-inducing agent-elicited gamma-secretase activity is dependent on Bax/Bcl-2 pathway but not on caspase cascades. *Cell Death Differ*. 2007;14(1):189-92. Epub 2006/07/01.

28. Macauley MS, Whitworth GE, Debowski AW, Chin D, Vocadlo DJ. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *J Biol Chem*. 2005;280(27):25313-22. Epub 2005/03/30.

29. Macauley MS, Shan X, Yuzwa SA, Gloster TM, Vocadlo DJ. Elevation of Global O-GlcNAc in rodents using a selective O-GlcNAcase

inhibitor does not cause insulin resistance or perturb glucohomeostasis.

Chemistry & biology. 2010;17(9):949-58. Epub 2010/09/21.

30. Lalonde R. The neurobiological basis of spontaneous alternation.

Neurosci Biobehav Rev. 2002;26(1):91-104. Epub 2002/02/12.

31. Moon M, Choi JG, Nam DW, Hong HS, Choi YJ, Oh MS, et al.

Ghrelin ameliorates cognitive dysfunction and neurodegeneration in

intrahippocampal amyloid-beta1-42 oligomer-injected mice. J Alzheimers Dis.

2011;23(1):147-59. Epub 2010/10/12.

32. Kimura R, Ohno M. Impairments in remote memory stabilization

precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer

mouse model. Neurobiol Dis. 2009;33(2):229-35. Epub 2008/11/26.

33. Hong HS, Hwang JY, Son SM, Kim YH, Moon M, Inhee MJ. FK506

reduces amyloid plaque burden and induces MMP-9 in AbetaPP/PS1 double

transgenic mice. J Alzheimers Dis. 2010;22(1):97-105. Epub 2010/09/18.

34. Chalkley RJ, Burlingame AL. Identification of novel sites of O-N-

acetylglucosamine modification of serum response factor using quadrupole

time-of-flight mass spectrometry. Mol Cell Proteomics. 2003;2(3):182-90.

Epub 2003/04/10.

35. Yang Z, Herd GA, Clarke SM, Tajbakhsh AR, Terentjev EM, Huck

WT. Thermal and UV shape shifting of surface topography. J Am Chem Soc.

2006;128(4):1074-5. Epub 2006/01/26.

36. Leeming DJ, Bay-Jensen AC, Vassiliadis E, Larsen MR, Henriksen K, Karsdal MA. Post-translational modifications of the extracellular matrix are key events in cancer progression: opportunities for biochemical marker development. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2011;16(3):193-205. Epub 2011/04/22.

37. Kaech S, Banker G. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2406-15. Epub 2007/04/05.

38. Butler KV, Kalin J, Brochier C, Vistoli G, Langley B, Kozikowski AP. Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *Journal of the American Chemical Society*. 2010;132(31):10842-6. Epub 2010/07/10.

39. Park JW, Vahidi B, Taylor AM, Rhee SW, Jeon NL. Microfluidic culture platform for neuroscience research. *Nat Protoc*. 2006;1(4):2128-36. Epub 2007/05/10.

40. Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, et al. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat Chem Biol*. 2008;4(8):483-90. Epub 2008/07/01.

41. Tallent MK, Varghis N, Skorobogatko Y, Hernandez-Cuebas L,

Whelan K, Vocadlo DJ, et al. In vivo modulation of O-GlcNAc levels regulates hippocampal synaptic plasticity through interplay with phosphorylation. *J Biol Chem.* 2009;284(1):174-81. Epub 2008/11/14.

42. Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng.* 2001;17(6):157-65. Epub 2001/05/05.

43. Vosseller K, Wells L, Lane MD, Hart GW. Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(8):5313-8. Epub 2002/04/18.

44. Kochi S, Takanaga H, Matsuo H, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y. Effect of cyclosporin A or tacrolimus on the function of blood-brain barrier cells. *Eur J Pharmacol.* 1999;372(3):287-95. Epub 1999/07/08.

45. Farmery MR, Tjernberg LO, Pursglove SE, Bergman A, Winblad B, Naslund J. Partial purification and characterization of gamma-secretase from post-mortem human brain. *J Biol Chem.* 2003;278(27):24277-84. Epub 2003/04/17.

46. Iwatsubo T. The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Curr Opin Neurobiol.* 2004;14(3):379-83. Epub 2004/06/15.

47. Kim SH, Ikeuchi T, Yu C, Sisodia SS. Regulated hyperaccumulation of presenilin-1 and the "gamma-secretase" complex. Evidence for differential intramembranous processing of transmembrane substrates. *J Biol Chem.* 2003;278(36):33992-4002. Epub 2003/06/25.
48. Robertson DM, Stephenson T, McLachlan RI. Characterization of plasma inhibin forms in fertile and infertile men. *Hum Reprod.* 2003;18(5):1047-54. Epub 2003/05/02.
49. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature.* 2002;417(6887):455-8. Epub 2002/05/25.
50. Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, et al. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J.* 2003;22(5):1168-79. Epub 2003/02/28.
51. Silva DF, Esteves AR, Arduino DM, Oliveira CR, Cardoso SM. Amyloid-beta-Induced Mitochondrial Dysfunction Impairs the Autophagic Lysosomal Pathway in a Tubulin Dependent Pathway. *J Alzheimers Dis.* 2011. Epub 2011/06/23.
52. Taylor AM, Blurton-Jones M, Rhee SW, Cribbs DH, Cotman CW, Jeon NL. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nature methods.* 2005;2(8):599-605. Epub 2005/08/12.

53. Varadi A, Johnson-Cadwell LI, Cirulli V, Yoon Y, Allan VJ, Rutter GA. Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 19):4389-400. Epub 2004/08/12.
54. Anesti V, Scorrano L. The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta.* 2006;1757(5-6):692-9. Epub 2006/05/30.
55. Lee JS, Yoon YG, Yoo SH, Jeong NY, Jeong SH, Lee SY, et al. Histone deacetylase inhibitors induce mitochondrial elongation. *J Cell Physiol.* 2011. Epub 2011/09/20.
56. Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la Monte SM. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2006;9(1):13-33. Epub 2006/04/22.
57. Macauley MS, He Y, Gloster TM, Stubbs KA, Davies GJ, Vocadlo DJ. Inhibition of O-GlcNAcase using a potent and cell-permeable inhibitor does not induce insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Chem Biol.* 2010;17(9):937-48. Epub 2010/09/21.
58. Butkinaree C, Park K, Hart GW. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling

and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1800(2):96-106. Epub 2009/08/04.

59. Kim SK, Park HJ, Hong HS, Baik EJ, Jung MW, Mook-Jung I. ERK1/2 is an endogenous negative regulator of the gamma-secretase activity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(1):157-9. Epub 2005/11/19.

60. Griffith LS, Mathes M, Schmitz B. Beta-amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Neurosci Res*. 1995;41(2):270-8. Epub 1995/06/01.

61. Jacobsen KT, Iverfeldt K. O-GlcNAcylation increases non-amyloidogenic processing of the amyloid-beta precursor protein (APP). *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;404(3):882-6. Epub 2010/12/25.

62. Morais VA, Crystal AS, Pijak DS, Carlin D, Costa J, Lee VM, et al. The transmembrane domain region of nicastrin mediates direct interactions with APH-1 and the gamma-secretase complex. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(44):43284-91. Epub 2003/08/15.

63. Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, et al. Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell*. 2005;122(3):435-47. Epub 2005/08/13.

64. Yuzwa SA, Shan X, Macauley MS, Clark T, Skorobogatko Y, Vosseller K, et al. Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nature chemical biology*. 2012;8(4):393-9. Epub 2012/03/01.
65. Caspersen C, Wang N, Yao J, Sosunov A, Chen X, Lustbader JW, et al. Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2005;19(14):2040-1. Epub 2005/10/08.
66. Morfini GA, Burns M, Binder LI, Kanaan NM, LaPointe N, Bosco DA, et al. Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *J Neurosci*. 2009;29(41):12776-86. Epub 2009/10/16.
67. Chang DT, Reynolds IJ. Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons. *Prog Neurobiol*. 2006;80(5):241-68. Epub 2006/12/26.
68. Wang X, Su B, Siedlak SL, Moreira PI, Fujioka H, Wang Y, et al. Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(49):19318-23. Epub 2008/12/04.
69. Lei P, Ayton S, Bush AI, Adlard PA. GSK-3 in Neurodegenerative Diseases. *International journal of Alzheimer's disease*. 2011;2011:189246.

Epub 2011/06/02.

70. Chen S, Owens GC, Makarenkova H, Edelman DB. HDAC6 regulates mitochondrial transport in hippocampal neurons. *PLoS One*. 2010;5(5):e10848. Epub 2010/06/04.

71. Dallavalle S, Pisano C, Zunino F. Development and therapeutic impact of HDAC6-selective inhibitors. *Biochemical pharmacology*. 2012;84(6):756-65. Epub 2012/06/26.

72. d'Ydewalle C, Krishnan J, Chiheb DM, Van Damme P, Irobi J, Kozikowski AP, et al. HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease. *Nature medicine*. 2011;17(8):968-74. Epub 2011/07/26.

73. Zilberman Y, Ballestrem C, Carramusa L, Mazitschek R, Khochbin S, Bershadsky A. Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 19):3531-41. Epub 2009/09/10.

74. Goldstein LS, Yang Z. Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci*. 2000;23:39-71. Epub 2000/06/09.

75. Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelieres FP, King SJ, Humbert S, et al. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the

transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci*. 2007;27(13):3571-83. Epub 2007/03/30.

76. Wang X, Perry G, Smith MA, Zhu X. Amyloid-beta-derived diffusible ligands cause impaired axonal transport of mitochondria in neurons. *Neurodegener Dis*. 2010;7(1-3):56-9. Epub 2010/02/18.

77. Reddy PH. Mitochondrial dysfunction in aging and Alzheimer's disease: strategies to protect neurons. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(10):1647-58. Epub 2007/08/19.

78. Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron*. 2008;60(5):748-66. Epub 2008/12/17.

79. Misko A, Jiang S, Wegorzewska I, Milbrandt J, Baloh RH. Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(12):4232-40. Epub 2010/03/26.

80. Cha MY, Han SH, Son SM, Hong HS, Choi YJ, Byun J, et al. Mitochondria-specific accumulation of amyloid beta induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death. *PloS one*. 2012;7(4):e34929. Epub 2012/04/20.

81. Miller KE, Sheetz MP. Axonal mitochondrial transport and potential

are correlated. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 13):2791-804. Epub  
2004/05/20.

## Abstract

**Introduction:** (1) Alzheimer's disease (AD) is an age-related neurodegenerative disorder. A major hallmark of AD is extracellular deposition of beta-amyloid (A $\beta$ ) as senile plaques. Clearly, understanding cellular processes underlying A $\beta$  generation is a central issue in the field of AD research. One pathway that is potentially involved in the regulation of A $\beta$  generation is glucose metabolism. FDG-PET imaging analysis in humans has shown a strong correlation between the severity of AD and disrupted glucose metabolism. However, it is unknown whether disrupted glucose metabolism is causally involved in A $\beta$  generation; it can simply be a by-product of AD progression. Moreover, molecular mechanisms linking A $\beta$  generation and glucose metabolism are largely unknown. We investigated these issues in the present study. Changes of *O*-GlcNAcylation (*O*-GlcNAc) modification, a marker for disrupted glucose metabolism, and  $\gamma$ -secretase, an essential enzyme for A $\beta$  generation, were examined in both in vitro and in vivo preparations.

(2) The disruption of axonal transport in AD patients is an important pathophysiological factor, and affects synaptic plasticity and neuronal

networks, especially in its early stage. A $\beta$  impairs mitochondrial axonal transport. Because  $\alpha$ -tubulin acetylation is an important factor in axonal transport and HDAC6 is known to act as a deacetylase of  $\alpha$ -tubulin, we manipulated the level of  $\alpha$ -tubulin acetylation in hippocampal neurons with A $\beta$  cultured in a microfluidic system and examined its effect on mitochondrial axonal transport.

**Methods:** (1) We used 5XFAD mice to show the effect of *O*-GlcNAcylation on A $\beta$  generation and used 1,2-dideoxy-2'-propyl- $\alpha$ -D-glucopyranoso-[2,1-d]- $\Delta$ 2'-thiazoline (NButGT) as an *O*-GlcNAcase inhibitor to enhance *O*-GlcNAcylation in vivo.

(2) To increase  $\alpha$ -tubulin acetylation, we used the Tubastatin A (TBA) as the HDAC6 inhibitor. To easily analyze mitochondrial movement, primary hippocampal neurons were plated in microfluidic devices. Mitochondrial transport was analyzed by measuring the velocity, motility and size of mitochondria.

**Results:** (1) We found that nicastrin, one component of  $\gamma$ -secretase, is *O*-GlcNAcylated. The site for *O*-GlcNAc was firstly mapped (Serine 708 site on nicastrin) using proteomics as well as mutant studies. A specific inhibitor of

*O*-GlcNAcase (NButGT) increased *O*-GlcNAc on nicastrin, attenuated  $\gamma$ -secretase activity, reduced A $\beta$  generation, relieved senile plaque deposition and rescued memory impairment in an AD animal model

(2) We found that acetylated  $\alpha$ -tubulin, a key molecule for microtubule assembly, is significantly reduced in the brains of an AD animal model. We observed that inhibition of HDAC6 restored A $\beta$ -induced reduction of axonal transport including velocity and motility of mitochondria.

**Conclusions:** Increased *O*-GlcNAc on NCT reduces A $\beta$  production by lowering  $\gamma$ -secretase activity, resulting in the recovery of neuroinflammation, and memory impairment in the 5XFAD mice. Also, increased acetylation recovered mitochondrial movement and size that had been reduced by A $\beta$ . Taken together, these data show that alteration of these PTMs is a potential therapeutic target to improve AD pathogenesis.

---

**Keywords:** Alzheimer's disease (AD), Post translational modification (PTM), *O*-GlcNAc, acetylation, Amyloid beta (A $\beta$ ), mitochondria, gamma-secretase, HDAC6, NButGT, Tubastatin A (TBA)

**Student number:** 2007-30547