



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

아밀로이드 베타에 의한 미토콘드리아의 기능  
이상이 알츠하이머병의 병인기전에 미치는  
메커니즘 연구

Investigating the mechanism of  
 $A\beta$ -induced mitochondrial dysfunction  
as a risk factor for Alzheimer's disease

2016 년 02 월

서울대학교 대학원  
의과학과 의과학 전공

변 자 영

A thesis of the Doctor's degree

Investigating the mechanism of  
 $A\beta$ -induced mitochondrial dysfunction  
as a risk factor for Alzheimer's disease  
아밀로이드 베타에 의한 미토콘드리아의  
기능이상인 알츠하이머병의 병인기전에 미치는  
메커니즘 연구

February 2016

The Department of Biomedical Sciences,  
Seoul National University  
College of Medicine

Jayoung Byun

## 초 록

알츠하이머병의 가장 큰 특징은 세포 외부의 베타-아밀로이드 ( $A\beta$ ) 플라크의 축적과 세포 내부의 과인산화된 타우 단백질의 비정상적인 접힘 현상을 들 수 있는데, 최근 이러한 현상학적인 세포 변화 뿐만 아니라 그에 의해 영향을 받는 생리적 기능의 이상이나 세포 소기관의 기능적 결함들이 직접적인 병인 기전으로써 많은 연구가 되고 있다. 미토콘드리아의 기능 이상과 autophagosome의 축적도 그들 중 하나이다. 하지만 아직까지 이에 대한 뚜렷한 메커니즘이 밝혀진 바가 없기에, 본 연구에서는 이를 구체적으로 밝히고자 하였다.

먼저, Crif1 (CR6 interacting factor 1) 이라는 단백질이 알츠하이머병 동물모델과 환자에서 감소되어 있음을 관찰하여 SY5Y 세포주에서  $A\beta$ 에 의해 감소된 Crif1의 양을 회복시켜 주었고 이때 미토콘드리아의 기능과 모양, 세포의 활성 등이 정상적으로 회복됨을 통해 Crif1이 미토콘드리아의 기능 유지를 위한 중요 단백질임인 동시에 알츠하이머병에서 주요 치료 표적으로 기능할 수 있음을 밝혀내었다. 또한, 뇌의 성상세포 (astrocyte) 에서 주로 분비되어 신경세포에 작용한다고 알려져 있는 Tsp-1 (Thrombospondin-1) 은 알츠하이머병 환자와 동물 모델에서 그 양이 감소되어 있는데, 본 연구에서 Tsp-1이  $A\beta$ 에

의한 미토콘드리아의 과분열 현상을 저해해 그에 따른 미토콘드리아의 기능 이상 및 세포 활성화에 보호 효과를 낼 수 있음을 확인하였다. 이로써 Tsp1 또한 알츠하이머병 상황에서 미토콘드리아에의 보호 효과를냄으로써 좋은 치료 표적이 될 수 있음을 확인하였다.

알츠하이머병은 제 3의 당뇨병이라고 불리어질 만큼 당뇨병과의 연관성이 깊은 것으로도 알려져 있다. 본 연구에서는 제 2형 당뇨병 치료제로 가장 흔히 쓰이는 metformin이 알츠하이머병 환자와 동물 모델에서 A $\beta$  생성을 증가시킴을 확인하고, HT22 세포주에서 metformin이 알츠하이머병의 주요 병인 기전 중의 하나인 autophagosome의 축적을 유도하여 A $\beta$  생성 증가에 기여할 수 있음을 확인하였다.

본 연구를 통해, 미토콘드리아의 구조적, 기능적 정상화가 알츠하이머병에서 중요한 치료 전략이 될 수 있음을 밝혀냄과 동시에, metformin이라는 제 2형 당뇨병 치료제가 그 병증을 가속화시킬 수 있는 가능성에 대해 제시할 수 있었다.

-----  
**주요어:** 알츠하이머병, 미토콘드리아, 베타-아밀로이드 (A $\beta$ ), Crif1 (CR6 interacting factor 1), Tsp-1 (Thrombospondin-1), Calcineurin, Metformin, 제 2형 당뇨병, Autophagosome

**학 번:** 2011 - 21942

## 도표 및 약어 목록

A $\beta$ : Amyloid-beta

AD: Alzheimer's disease

AMPK: AMP-activated protein kinase

APP: Amyloid precursor protein

ATP: Adenosine triphosphate

AV: Autophagic vacuoles

BACE1: Beta-amyloid precursor protein cleavage enzyme 1

Calcein-AM: Acetomethoxy derivate of Calcein

CC: Compound C

cDNA: Complementary DNA

Crif1: CR6 interacting factor 1

Crif1 KD cell: Crif1 knock downed cell

Crif1 o/e cell: Crif1 over expressed cell

Co-IP: Co-immunoprecipitation

DAB 3,3': Diaminobenzidine

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DPI: Diphenyleneiodonium

Drp1: Dynamin-related protein 1

EMSA: Gel electrophoresis mobility shift assay

ER: Endoplasmic Reticulum

Fis1: Mitochondrial fission 1 protein

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

HSP60: Heat-shock protein 60

IMS: Inter membrane space

MMP: Mitochondrial membrane potential

mTOR: Mammalian target of rapamycin

MTT:  $3-(4,5\text{-dimethylthiazol-2-yl})-2,5\text{-diphenyltetrazolium}$   
bromide

MIM: Mitochondrial inner membrane

Mfn: Mitofusins

MRPL1: Mitochondrial ribosomal protein of large subunit 1

NAC: N-acetylcysteine

NADPH: Nicotine adenine diphosphate oxidase

OMM: Outer mitochondrial membrane

OPA1: Optic atrophy type 1

OXA1L oxidase: Oxidase (Cytochrome C) assembly 1-like oxidase

OXPHOS: Oxidative phosphorylation

PD: Parkinson's disease

PI3-kinase: Phosphatidylinositide-3-kinase

qRT-PCR: Quantitative real-time PCR

ROS: Reactive oxygen species

RuR: Ruthenium Red

siRNA: small interference RNA

Sp1: Specificity protein 1

Tg: Transgenic

TOM: Translocase of the outer membrane

Tid1: Tumorous imaginal discs 1

TIM: Translocase of the inner membrane

Tsp1: Thrombospondin 1

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

WB: Western blotting

3-MA: 3-methyladenine

5XFAD: Transgenic mice with five familial AD mutations



# 목 차

초록.....	i
도표 및 약어 목록.....	iii
목차.....	vi
표 및 그림 목록.....	vii
서론.....	01
실험재료 및 방법 .....	17
결과.....	36
고찰.....	96
결론.....	113
참고문헌 .....	116
초록 (영문) .....	124

## 표 및 그림 목록

그림 1. 노인반점과 신경섬유덩어리의 생성.....	10
그림 2. 아밀로이드 전구 단백질의 대사과정.....	11
그림 3. 미토콘드리아에 미치는 A $\beta$ 의 영향.....	12
그림 4. 미토콘드리아 분열/융합 과정과 관련 단백질들 .....	13
그림 5. Crif1의 미토콘드리아 내 역할.....	14
그림 6. Calcineurin 활성화가 미토콘드리아 분열에 미치는 영향.....	15
그림 7. Autophagy pathway와 flux .....	16
그림 8. 알츠하이머병 모델 마우스와 환자의 뇌에서 Crif1 단백질의 감소.....	45
그림 9. A $\beta$ 에 의한 Crif1의 감소는 전사단계 조절을 통해 일어남을 확인.....	47
그림 10. A $\beta$ 에 의한 ROS 증가는 Sp1의 전사활성을 감소시킴 .....	49

그림 11. Crif1 녹다운 (KD)이 미토콘드리아 모양과 기능 이상을 초래.....	51
그림 12. Crif1 과발현이 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아 모양 망가짐과 기능 이상을 회복시킴을 확인 ...	53
그림 13. Crif1의 양이 A $\beta$ 에 의한 세포사 유도에 중요.....	55
그림 14. 다른 알츠하이머병 동물모델에서 Crif1 단백질의 감소 .....	57
그림 15. 다른 세포주에서 A $\beta$ 에 의한 Crif1 단백질의 감소.....	59
그림 16. Crif1의 미토콘드리아 내 위치 관찰.....	60
그림 17. A $\beta$ 는 다른 미토콘드리아 단백질에 아무런 영향을 미치지 않음을 확인 .....	62
그림 18. Crif1은 미토콘드리아 분열/융합 단백질에 아무런 영향이 없음을 확인 .....	63
그림 19. Crif1 KD이 미토콘드리아 막전위, ROS에 미치는 영향.....	64

그림 20. A $\beta$ 에 의한 세포사는 칼슘이온이 아닌 ROS 생성에 의한 것임을 확인.....	66
표 1. 인간 뇌조직 샘플정보.....	67
그림 21. Crif1 연구의 메커니즘 모식도.....	68
그림 22. Tsp1은 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아 과도한 분열을 저해함을 확인 .....	74
그림 23. Tsp1이 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아 기능 이상을 회복시킴을 확인.....	76
그림 24. Tsp1이 A $\beta$ 에 의한 신경세포 사멸을 회복시킴을 확인 .....	78
그림 25. Tsp1이 A $\beta$ 에 의한 calcineurin의 활성화와 p-Drp1 단백질 감소를 저해함을 확인 .....	79
그림 26. Tsp1의 보호 효과에 관한 기전을 그린 모식도 .....	81
그림 27. Metformin이 알츠하이머병 모델 마우스의 뇌에서 A $\beta$ 플라크와 A $\beta$ <sub>42</sub> 를 증가시킴을 확인.....	89

그림 28. Metformin이 SH-SY5Y세포에서 APP의 베타-, 감마-시크리테아제에 의한 잘림을 증가시킴을 확인 .....	90
그림 29. Metformin이 autophagosome을 축적시킴을 확인 .....	92
그림 30. Metformin에 의한 autophagosome 증가는 AMPK 신호 경로에 의존함을 확인.....	93
그림 31. Metformin에 의한 A $\beta$ 생성 증가 메커니즘을 나타낸 모식도.....	95

# 서 론

알츠하이머병은 전세계적으로 노인에서 가장 흔하고 빠르게 그 유병인구가 성장하고 있는 치매의 종류이다. 대표적인 특징으로는 뇌 안에서의 아밀로이드-베타 플라크와 신경섬유매듭의 형성, 과도한 신경세포의 사멸 등을 들 수 있다 (그림 1) (1). 많은 연구들이 아밀로이드-베타 전구단백질 (APP) 또는 아밀로이드-베타 ( $A\beta$ )를 표적으로 하여 진행되고 있지만 (그림 2), 아직까지도 어떻게 이 단백질들이 알츠하이머병을 악화시키는지에 대한 메커니즘은 완전히 밝혀지지 않았다. 많은 가능한 시나리오가 있겠지만  $A\beta$ 에 의한 미토콘드리아 기능 이상, 활성산소에 의한 스트레스, 심혈관계 손상, 염증반응들이 그것과 관련되어 제시되어 왔다 (2). 이러한 가설들 중, 비정상적인 미토콘드리아의 기능은 알츠하이머병을 일으키는 주요한 원인으로 최근 많은 연구를 통해 알려졌다 (그림 3) (3). 포유류에서 미토콘드리아는 에너지 생산, 칼슘 버퍼링, 신호 전달, 세포생존에 기능함으로써 아주 필수적인 소기관이며 시트르산 회로와 지방산의 베타산화, 산화적 인산화가 각각 미토콘드리아 기질과 내막에서 일어난다. (4). 그리고 이러한 미토콘드리아의 질적 조절은 분열과 융합의 과정이 계속해서 일어나며 적절히 균형을 이룸으로써 일어난다. Drp1, fis1과 같은 단백질은 미토콘드리아의 분열에, Mfn1, OPA1과 같은 단백질은

미토콘드리아의 융합에 관여하는 것으로 알려져 있다. 만약 이 분열과 융합의 적절한 밸런스가 이뤄지지 않으면 미토콘드리아 모양이 망가지고 이에 따라 미토콘드리아의 질적 조절에 실패해 기능도 망가지는 것으로 알려져 있다 (그림 4) (5, 6). 신경세포는 에너지 소모가 크고 그 에너지원으로서 ATP 의존성이 크기 때문에 (7, 8), ATP를 효율적으로 생산하는 미토콘드리아의 기능이 망가진다면, 신경세포는 곧 사멸에 이르게 될 것이다. 알츠하이머병과 관련해서는, 미토콘드리아의 망가짐이나 높은 ROS 레벨이 알츠하이머병 환자 뇌의 병변 지역에서 관찰되었으며 (9), 미토콘드리아 DNA damage나 망가진 cristae, 미토콘드리아 외막/내막 구조 등도 알츠하이머 발병과 높은 연관성을 가진 것으로 나타났다 (10). 이러한 맥락에서 다른 신경퇴행성 질환인 파킨슨병과 헌팅턴 병에서도 미토콘드리아의 망가짐과 기능상실이 주요 병인으로 지적되고 있다. 본 연구에서는 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 모양이나 기능의 망가짐을 일으키는 기전들과 관련된 주요 단백질을 밝혀내고자 하였고, 이 논문에서 그 구체적인 연구들을 소개하려고 한다.

알츠하이머병은 제 3형 당뇨병으로 불리어질 만큼 당뇨병과의 연관성이 깊다 (8, 11). 알츠하이머병 환자들에게서 제 2형 당뇨병의 발병 확률이 3배 이상 높아지는 것이 그 한가지 예다 (8). 그래서 제 2형 당뇨병 치료제로 가장 널리 쓰이는

metformin이 알츠하이머병의 증상 개선에 효과가 있지 않을까 하는 아이디어를 중심으로 많은 연구들이 진행되었다. 하지만 최근 연구들에서 예상과는 달리 metformin이 오히려 알츠하이머병의 병증과 인지 기능을 악화시킨다는 결과가 보고 되었다 (12, 13). 하지만 그 정확한 메커니즘은 밝혀지지 않았기에, 본 연구에서 그 메커니즘을 규명하고 알츠하이머병에서 metformin의 효과에 대해서도 밝히고자 한다.

## **Part 1. 알츠하이머병에서 관찰되는 Crif1 단백질의 감소로 초래되는 미토콘드리아의 기능 저해 연구**

과도한 분열과 모양 이상으로 특정 지어지는 미토콘드리아의 기능 이상은 잘 알려진 알츠하이머병의 위험인자이다 (3, 4). 한가지 원인으로 A $\beta$ 의 축적이 있지만 아직까지 A $\beta$ 와 미토콘드리아의 기능이상 사이의 메커니즘은 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 Crif1이라는 미토콘드리아 내막 단백질이 그 메커니즘에 관여하는 핵심 단백질임을 밝혔다. CR6-interacting factor 1 (Crif1)은 GADD45 연관 단백질 그룹에 속하면서, 처음에는 세포 주기와 성장에 관여하는 단백질로 알려 졌다 (14). 하지만 대부분의 세포주에서 미토콘드리아 내 발현량이 높아 미토콘드리아에서의 기능이 주목 받고 있는 상황에서, 최근 미토콘드리아의 ribosome 단백질과 상호작용하며 새롭게 번역되어 나오는 nascent



polypeptide들을 미토콘드리아 내막에 삽입하여 OXPHOS 단백질들의 조립과 올바른 배열을 돕는 것으로 알려졌다 (그림 5) (15). 본 연구에서는 알츠하이머병 동물모델인 5XFAD의 뇌의 병변 지역에서 이러한 Crif1 단백질이 감소되어 있음을 관찰하고, 실제 환자의 뇌에서, 또 A $\beta$ 를 처리한 SH-SY5Y 세포에서도 감소됨을 확인할 수 있었다. siRNA를 이용해 Crif1을 감소시켰을 때, 미토콘드리아의 기능 이상이 나타났고, Crif1을 과발현 시킨 세포에서 A $\beta$ 를 처리해주면 미토콘드리아의 기능 이상과 세포사도 막아줄 수 있음을 밝혀내었다. 마지막으로, 이러한 Crif1의 감소가 A $\beta$ 에 의한 ROS의 증가, 그로 인한 Crif1 전사인자인 Sp1에 SUMOylation의 증가로 전사 정도가 감소하기 때문에 일어남을 규명하였다. 그러므로 ROS 증가 - Sp1 전사인자의 전사 활성 감소 - Crif1 단백질의 감소의 경로를 통해서 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 기능 이상의 메커니즘에 Crif1이라는 단백질이 중요한 역할을 함을 규명하였다.

## Part 2. Tsp-1의 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 구조 망가짐 및 기능 이상에의 회복 기전 연구

알츠하이머병의 발병과 진행에는 미토콘드리아의 기능 저하 뿐만 아니라 (3, 4, 7), A $\beta$ 에 의해 적정 수준 이상으로 증가된 세포 내 칼슘 이온에 의해 항상성이 깨지고 세포 독성을 일으킴으로써

발병시키는 것이 알려져 있다 (2).

Tsp-1 (Thrombospondin-1) 은 주로 중추신경계의 정상세포에서 분비되며 알츠하이머병의 진행에서 신경세포의 망가진 시냅스를 회복시켜 보호 효과가 증명된 바 있다 (16). 본 연구에서는 A $\beta$ 를 처리한 조건에서 쥐의 해마 HT22 세포에서 Tsp1을 함께 처리하면 기존에 보였던 미토콘드리아의 모양과 기능의 망가짐을 회복시킴으로써, Tsp-1이 알츠하이머병의 치료제로 쓰일 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다. A $\beta$ 에 의한 세포 내 칼슘이온의 증가로 인해 활성화되는 calcineurin은 p-Drp1의 인산기를 떨어뜨림으로써 상대적으로 Drp1의 양을 증가시켜 미토콘드리아로 이동해 과분열 현상을 일으키는데 (그림 6), Tsp1은 이러한 calcineurin의 활성화를 막고, 미토콘드리아의 과도한 분열 뿐만 아니라 그로 인해 초래되는 미토콘드리아 기능 이상도 막을 수 있을 가능성이 높은 것으로 나타났다. 이러한 Tsp1의 효과는 신경세포에 발현량이 높은  $\alpha 2 \delta 1$ 이라는 수용체에 의해 작용할 것으로 예상되는 바이고 후속 연구를 통해 Tsp1의 작용 기전을 규명할 계획에 있다.

### Part 3. Metformin에 의한 A $\beta$ 생성 증가 메커니즘에 대한 연구

제 2형 당뇨병과 알츠하이머병 간의 연관성에 대한 증거가

계속해서 제시되고 있는 가운데 (8), 기존에 보고되었던 metformin의 알츠하이머병 증상에 긍정적 효과가 아닌 부정적 효과에 대한 보고가 있어왔다 (12, 13, 17). Biguanide-class 당뇨병 치료제인 metformin (Glucophage®; 1, 2-dimethylbiguanide hydrochloride)는 hyperglycemia를 낮춰주는 약물로써 가장 흔히 또 널리 쓰여온 제 2형 당뇨병 치료제이다. 이러한 Metformin은 대사 조절에 중요한 효소인 AMPK (AMP-activated protein kinase)의 활성화를 통해 그 작용이 이뤄지는데, 이러한 metformin의 효과로는 peripheral glucose uptake 증가, 지방산 산화 증가 등이 알려져 있다 (18). 알츠하이머병과 당뇨병 사이의 높은 상관관계와 망가진 glucose 대사 과정, 고지혈증, 고혈압과 같은 많은 병적 증상들의 공유 등을 고려해 볼 때, glucose-utilizing effect를 통해 당뇨병 치료에 효과적이라고 알려져 있는 metformin은 알츠하이머병의 진행과 병증 정도에 긍정적인 역할을 할 것으로 예상된다. 하지만 선행 연구 결과에서는 metformin이 오히려 BACE1 activity와 그에 따른 A $\beta$ 의 생성을 증가시켜 알츠하이머병의 진행을 오히려 가속화시킬 수 있음을 보고 하였다 (12). 또한, Picone과 그의 동료들은 metformin이 APP와 감마-시크리테아제의 구성 성분인 presenilin의 발현을 증가시키고, A $\beta$ 의 축적과 산화적 스트레스, 미토콘드리아의 기능 이상을 야기시킬 수 있음을 보고하였다 (13).

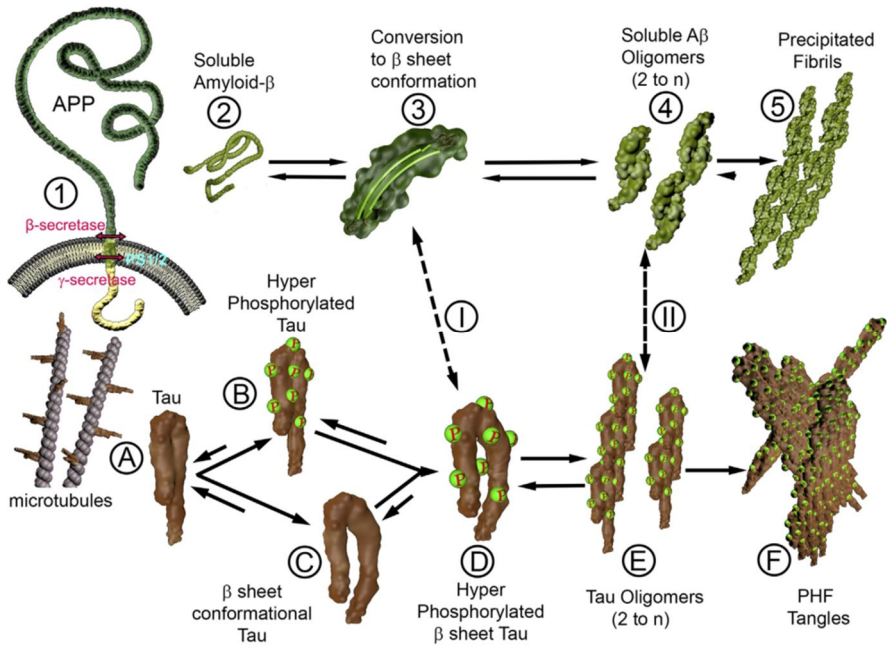
하지만 metformin이 어떻게 알츠하이머병의 위험 인자들에 영향을 미쳐 이러한 결과를 낳게 되는지의 메커니즘에 대해서는 구체적으로 밝혀진 바가 없다.

한편, autophagy는 lysosomal fusion을 통해서 세포 내부의 단백질 분해-주로 세포 내 노후한 소기관들, 단백질 응집체-를 통해 여러 가지 세포 스트레스 상황이나 영양 결핍 상황에서 세포 사멸사를 막기 위해 세포를 보호하는 역할을 한다 (19, 20). Autophagosome 형성은 이러한 autophagy 유도에 의해 일어나며 autophagosome이 lysosome과 융합되어 lysosome 내 가수분해 효소들이 autophagosome 내 단백질을 분해시키게 되는데 알츠하이머병에서는 이러한 autophagy의 유도과정이나 lysosome과 융합되어 내용물이 분해되는 과정에 문제가 생긴 것이 환자의 뇌조직 관찰을 통해 보고 되었다 (그림 7) (21). 또한, 알츠하이머병 환자의 신경세포에서 내용물이 분해되지 않은 autophagosome이 과량 축적되어 있음으로써 세포독성을 가진 A $\beta$ 와 같은 aggregated protein들을 포함한 내용물이 분해되지 않아 세포 내에 계속 존재함으로써 신경 세포사를 일으켰을 가능성이 또 다른 연구 결과를 통해 제시되었다 (22). A $\beta$ 의 축적은 신경세포 독성을 지니는 것으로 알려져 있는데 주요 원인 중의 하나가 lysosome과 autophagy의 기능 이상을 초래하기 때문임이 알려져 있고, 이렇게 비정상적인 autophagosome이 축적되면 그

내부에서  $A\beta$ 의 생성을 증가시키는 새로운 장소가 될 수 있음이 보고된 바도 있다 (22, 23). 알츠하이머병의 가장 큰 특징 중 하나인  $A\beta$ 는 APP로부터 만들어지고 베타-시크리테아제 (BACE 1)에 의해 잘린 뒤 감마-시크리테아제에 의해 잘려 서로 엉킴 현상이 일어나면서 세포독성을 가진 형태가 된다 (그림 2). 하지만 베타가 아닌 알파-시크리테아제에 의해 먼저 잘린 뒤 감마-시크리테아제에 의해 잘린 생성물은 세포에 무해하다고 알려져 있다 (24). 이러한 APP processing을 조절하는 것이 현재 알츠하이머병의 주요 치료 기전으로 연구가 이뤄지고 있다. 베타-, 감마-시크리테아제는 ER (Endoplasmic Reticulum), endosome, lysosome, autophagic vacuole (AV) 내부에 존재하는데 (25) Nixon과 동료들의 연구 결과에 의하면 알츠하이머병 환자의 뇌세포에서 AV가 축적되어 있고, 그 내부에는 APP,  $\beta$ -CTF ( $\beta$ -secretase-derived C-terminal fragments), 감마-시크리테아제가 축적되어 있음을 확인하였다 (26).

이러한 선행 연구결과들을 토대로, 본 연구에서는 metformin이 어떻게  $A\beta$  생성을 증가시킬 수 있는지 그 메커니즘을 규명하고자 하였고 SH-SY5Y 세포에서 metformin이 베타-, 감마-시크리테아제 활성을 증가시켜  $A\beta$ 의 생성을 증가시킴을 확인하였다. 이것은  $A\beta$ 에 의한 autophagosome의 비정상적 축적에 의해 일어나고 autophagosome의 증가는 metformin에 의한

AMPK 활성화에 의존적임을 확인하였다. 이를 통해, 당뇨병 치료제인 metformin이  $A\beta$  생성을 증가시킴으로써 알츠하이머병의 진행에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다.



(Wisniewski et al. Neuron (2015))

그림 1. 노인반점과 신경섬유 덩어리의 생성

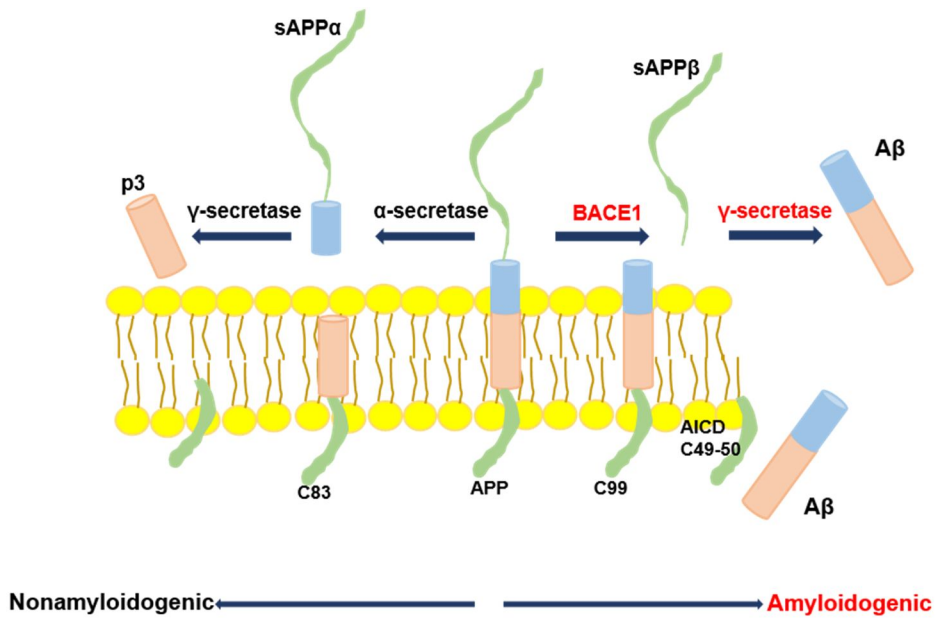
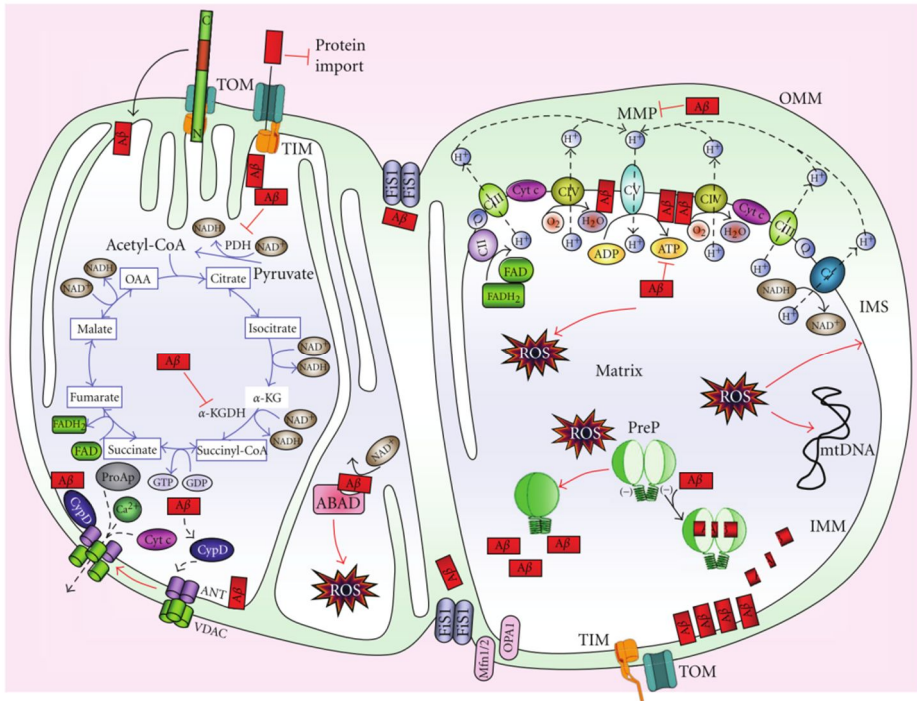


그림 2. 아밀로이드 전구단백질 (APP) 의 대사과정





(Eckert et al. International Journal of Alzheimer' s disease (2011))

그림 3. 미토콘드리아에 미치는 Aβ의 영향

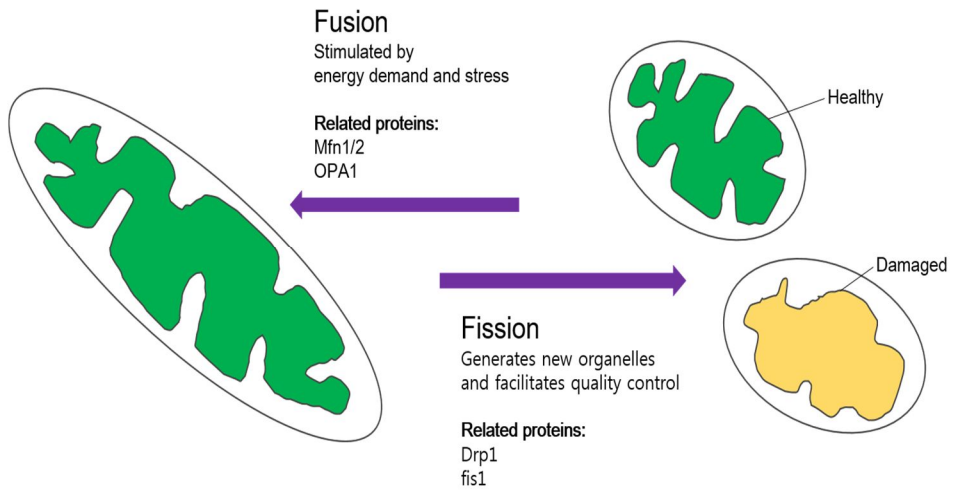


그림 4. 미토콘드리아 분열/융합과정과 관련 단백질들

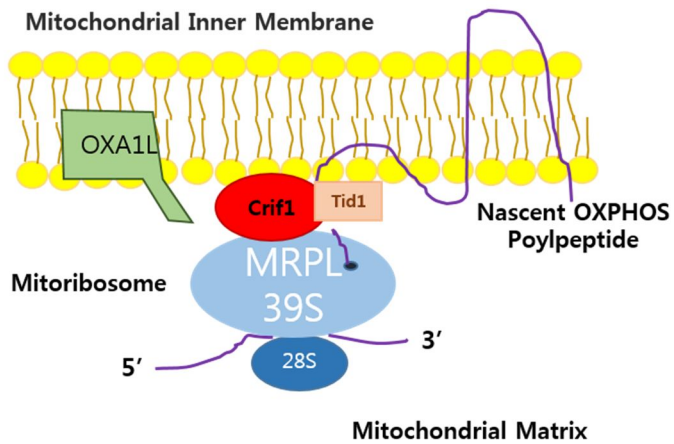


그림 5. Crif1 의 미토콘드리아 내 역할

Crif1 은 MRPL (Mitochondrial ribosomal protein of large subunit) 과 mitochondrial chaperon 단백질인 Tid1 (Tumorous imaginal discs 1)과 상호 작용하며 번역되어 나오는 nascent OXPHOS polypeptide 를 미토콘드리아 내막에 삽입함.

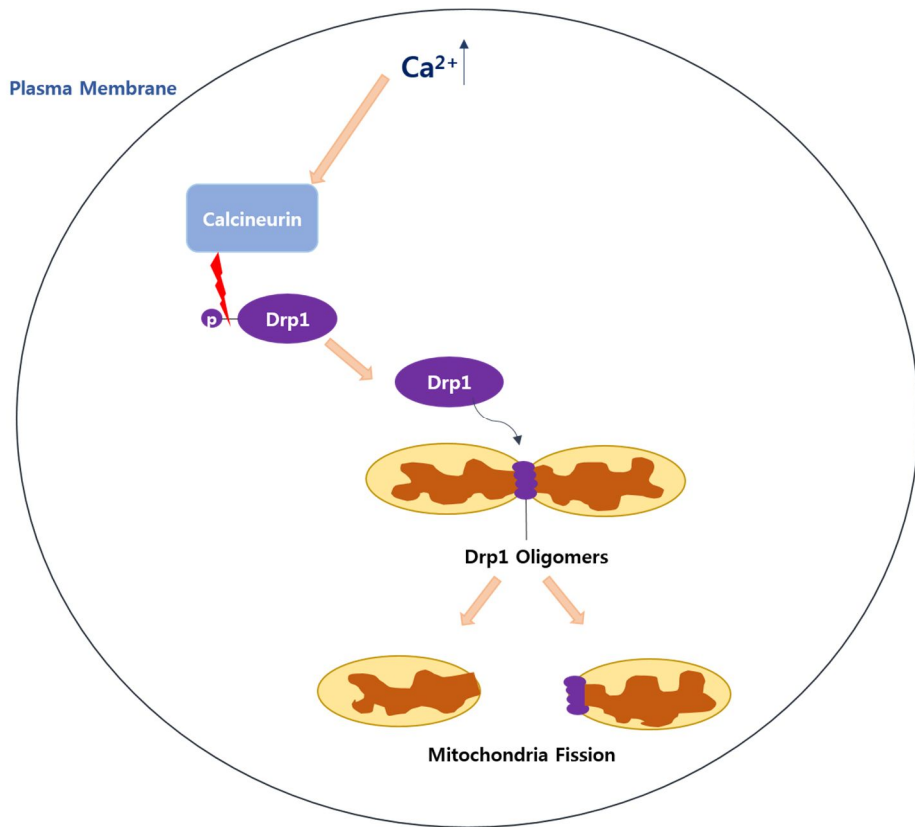


그림 6. Calcineurin 활성화가 미토콘드리아 분열에 미치는 영향

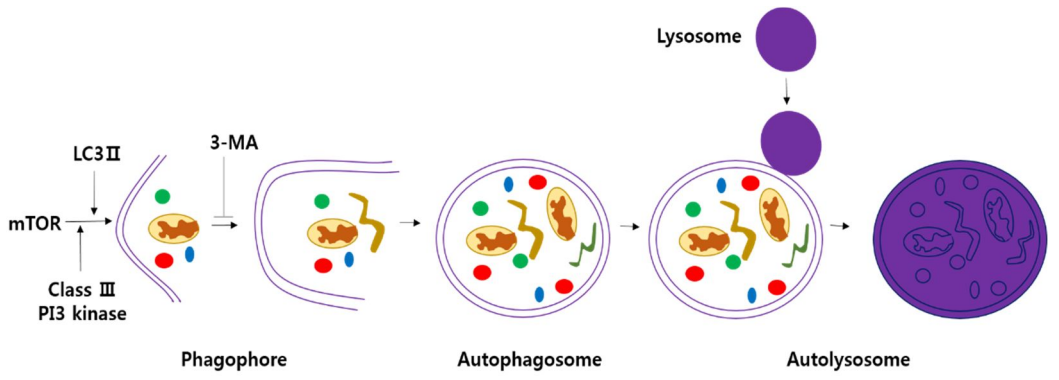


그림 7. Autophagy pathway 와 flux

# 실험재료 및 방법

## 1. 실험에 이용된 실험동물

알츠하이머병 동물 모델로 5XFAD (JAX Stock No. 008730, (인간의 APP695, Swedish (K670N, M671L), Florida (I716V), London (V717I) familial AD (FAD)변이들과 2 가지의 인간 PS1 변이를 발현), Tg2576 (APP Swedish 변이를 발현), APP/PS1 mice (Swedish APP and Presenilin1 delta exon 9 변이를 발현)를 사용하였고, 모든 쥐는 Jackson laboratories (Bar Harbor, ME; catalog number 006554)에서 구입되었다.

환자 뇌조직 샘플은 보스턴 대학교에서 웨스턴 블롯팅과 qRT-PCR 을 위해 얻어졌고 알츠하이머병 환자의 해마 부위를 사용하였다. 그리고 정상인의 뇌조직 샘플의 경우는 Harvard Brain Tissue Resource Center 에서 얻어서 사용하였다. 동물들의 유지는 Helsinki Treaty 와 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 85-23, revised 1985), 그리고 서울대학교의 실험동물 관리 및 지침서를 준수하였다.

## 2. 제 2 형 당뇨병 치료제인 metformin 투여 방법

3.5 개월된 5XFAD 쥐에 9 일간 metformin(200mg/kg)을 투여하였다. Metformin 은 염화나트륨 용액에 녹여진 상태로 매일 200 $\mu$ l 씩 복강 내 투여되었다 (n=7/그룹). 마지막 투여 이후 여섯 시간이 지난 후, 뇌를 분리해 왼쪽 반구는 micro-dissection 하여 액체질소에 보관하였고, 오른쪽 반구는 4% PFA 와 PBS 에 고정, 보관되었다.

## 3. 세포주 및 세포배양 (Cell line and Cell culture)

SH-SY5Y (인간 신경아 세포종) 와 HT22 (마우스 해마 신경 세포종) 를 사용하였다. 10 %의 소 태아혈청 (FBS; HyClone Laboratories, Salt Lake City, UT), 100 U/mL penicillin 과 0.1 mg/mL streptomycin(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)이 첨가된 Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium (DMEM; HyClone Laboratories, Salt Lake City, UT)에 37° C, 5% CO<sub>2</sub> 의 조건으로 배양하였다.

#### 4. 시약 (Reagents)

A $\beta$ <sub>1-42</sub> 는 American Peptide(Sunnyvale, CA, USA) 에서 구입하였고, 실험에 사용한 시약은 다음과 같다. MG132 (10 $\mu$ M; M7449, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 3-MA (2-5 mM; M9281, Sigma-Aldrich); bafilomycin (5 nM; B1793, Sigma-Aldrich); NAC (1 mM; A7250, Sigma-Aldrich); apocynin (10  $\mu$ M; A10809, Sigma-Aldrich); DPI (10  $\mu$ M; D2926, Sigma-Aldrich); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (216763, Sigma-Aldrich); Tsp1 (500 ng/ml, R & D systems); Metformin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Compound C (6-[4-(2-Piperidin-1-ylethoxy)phenyl]-3-pyridin-4-ylpyrazolo[1,5-a] pyrimidine) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

#### 5. 플라스미드 DNA 및 siRNA 형질주입

##### (Transfection)

형질주입에 사용된 플라스미드 DNA는 다음과 같다. Crif1 cDNA는 충남의대의 송민호 박사님께 받았다. 그 외에도, Sp1 (hMU003598; provided from Korea Human Gene Bank, Medical



Genomics Research Center, KRIBB, Korea), Sp1 K16A or Mito-DsRed cDNA를 사용하였고, 형질주입을 위해 각 세포주를 Lipofectamine와 Plus reagents (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 를 이용해 형질 주입시켰다. Crif1 siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 는 RNAiMax reagents (Invitrogen) 를 48시간동안 처리해서 형질 주입하였다.

## 6. 미토콘드리아의 기능 분석

미토콘드리아의 막의 전위를 측정하기 위해서, TMRM, JC-1 어세이를 수행하였다. JC-1의 분석을 위해서 JC-1 dye (2  $\mu$ M) 을 처리한 뒤, 초록에 대한 빨강 형광의 비율을 계산하였다. Part 1과 2 모두에서, ROS의 측정을 위해서는 dichloro-dihydrofluoresceindiacetate (Invitrogen)을 사용하였고, 추가적으로 mitochondria 특이적인 ROS는 MitoSOX Red dye (5 mM for 15분, 37° C) 를 처리하고 측정되었다. 모든 미토콘드리아 기능 분석 실험은, Crif1 siRNA 또는 cDNA를 형질주입 시키고 24 시간 이후에 5 $\mu$ M A $\beta$ 를 24 시간 처리한 후 진행되었거나 (Part 1), Tsp1을 한 시간 선처리 한 뒤 1  $\mu$ M A $\beta$ 를 24 시간 처리한 후 진행되었다 (Part 2). 또한 Part 2에서는 추가적으로 seahorse

assay 를 Seahorse XF analyzer (Seahorse bioscience) 를 이용하여 진행 하였다. 이는 mitochondrial oxygen consumption rate을 측정하여, basal OCR, ATP synthase 의존도, 전자 전달계의 maximum capacity 등을 간접적으로 추론하여 전반적인 mitochondria의 기능을 알고자 하였다.

## 7. 미토콘드리아의 모양 분석

미토콘드리아 모양은 Part 1에서는 Mito-DsRed construct를 주입시킨 SH-SY5Y cell에서 이루어졌다. 5  $\mu$ M의 A $\beta$ 를 12시간 처리한 세포에서 confocal laser scanning microscope (FV10i-w, Olympus, Tokyo, Japan)를 이용해 이미지를 얻고, Image J program (NIH, Bethesda, MD, USA) 으로 정량 하였다. 좀 더 자세히 보기 위해서 super-resolution structured illumination microscopy (SIM; Nikon N-SIM) 를 이용해 이미지를 얻었다. 고정된 세포의 3D-SIM image를 z축을 중심으로 stage를 옮겨가며 얻을 수 있었다. 이 때 한 step의 크기는 0.150  $\mu$ m이다. 이미지는 Eclipse Ti-E research inverted microscope with Nikon's legendary CFI Apo TIRF  $\times$ 100 oil objective lens (NA 1.49) 와 512 $\times$ 512 픽셀 해상도의 iXon DU-897 EMCCD

camera (Andor Technology, South Windsor, CT, USA) 를 이용하여 얻을 수 있었다. Part 2에서는 A $\beta$  1  $\mu$ M을 1시간 동안 선처리 한 뒤 Tsp1 (500 ng/ml) 을 24시간 처리한 HT22 세포주에서 mitotracker로 염색한 뒤, confocal laser scanning microscope (FV10i-w, Olympus, Tokyo, Japan) 를 이용해 이미지를 얻고, 미토콘드리아를 길이와 모양 측면에서 Image J program (NIH, Bethesda, MD, USA) 으로 정량 하였다. 또한 전자 현미경 관찰을 통해서도 같은 그룹에서 미토콘드리아의 길이, 세포당 손상된 또는 비어있는 미토콘드리아의 개수, 세포당 전체 미토콘드리아의 개수를 직접 정량 하였다.

## 8. 웨스턴 블롯 (Western Blot)

단백질의 발현량을 확인하기 위해서 시약처리가 끝난 세포에 phosphate-buffered saline (PBS) 로 세척 해주었고, 단백질 분해효소 저해제 (Sigma-Aldrich, USA) 가 포함된 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 % Nonidet P-40; 0.1% SDS; 0.5% deoxycholic acid sodium salt) 를 사용해서 단백질을 추출하였다. 추출된 동량의 단백질을 NuPAGE Bis-Tris gel (Invitrogen, USA) 에서 전기영동 한 후, PVDF membrane

(Millipore, USA) 에 100 분간 transfer 하였다. 그리고 1 시간 동안 5% skim milk와 실온에서 반응시켜 blocking 과정을 거쳤다. 그 이후 각 단백질의 특이적인 1차 항체와 반응시켰다. 단백질과 결합한 항체는 enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, England) 를 이용하여 Bio-imaging analyzer (LAS-3000; Fuji, Japan) 로 분석하였다. 사용된 일차 항체는 anti-Crif1 (sc-134882), TOM20 (sc-17764), TOM40 (sc-11414), Drp1 (sc-32898), Fis1 (sc98900), Mfn1 (sc-50330), OPA1 (sc-30573)이다. 이들 모두 Santa cruz 항체이며 1:500으로 희석하였고, anti-TIM50 (ab23938; 1:1000); anti-GAPDH (ab9485; 1:3000); anti-Sp1 (07-645, Millipore (Billerica, MA, USA; 1:1000)); anti-Sumo-1 (4930, Cell signaling, 1:1000) & HSP60 (4870, Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA; 1:1000 for WB; 1:200 for IP)); anti-LC3B (1:2,000; MBL; Cell Signaling Technology); anti- $\alpha 2 \delta 1$  (1:1,000; SantaCruz); anti-TSP-1 (1:2,000; Abcam, Cambridge, MA, USA); Mouse anti-human A $\beta$ 1-17 monoclonal antibody (6E10; Signet Labs., USA), mouse monoclonal anti-APP antibody, mouse monoclonal anti-PS1 loop antibody,

mouse anti-Alzheimer precursor protein A4 monoclonal 22C11 antibody, mouse monoclonal anti-Alzheimer precursor protein A $\beta$ PP 643-695 C-terminal fragment antibody (모두 EMD-Millipore, Temecula, CA, USA), rabbit anti-Pen-1 polyclonal antibody (Oncogene, La Jolla, CA, USA), rabbit anti-nicastrin polyclonal antibody (Affinity Bioreagents, Golden, CO, USA), rabbit anti-aph-1a polyclonal antibody (Covance Research Product, Denver, PA, USA), anti-sAPP $\beta$  antibody (Signet), rabbit anti-AMPK polyclonal antibody, rabbit anti-calreticulin polyclonal antibody (Cell Signaling, Beverly, MA, USA); rabbit anti-calcineurin A antibody (1:2000; Abcam), goat anti-calpain1 antibody (1:1000; SantaCruz), rabbit anti-pDrp1 antibody (1:1000; Cell signaling); anti- $\alpha$ -tubulin and anti-GAPDH (1:4000; Sigma-Aldrich); anti- $\beta$ -actin (1:3000; Sigma-Aldrich) 으로 희석하여 사용하였다.

## 9. 세포 활성 분석 실험

Calcein-AM, MTT assay를 수행하였다. 세포 내에 esterase라는 효소는 calcein과 acetoxymethyl ester (AM)의

결합을 절단해 calcein dye가 세포 내에 머무르게 하나, 세포 상태가 나빠지면 이런 작용을 더 이상 할 수 없어 세포 내 존재하는 calcein dye의 양이 감소한다. 최종 농도 1  $\mu\text{M}$ 의 농도로 calcein-AM을 처리하고, 37°C에서 1시간 배양 후 형광측정기로 (Fluorometer; Infinite M200, TECAN, Austria) 측정되었다. MTT assay는, 미토콘드리아 내 dehydrogenase라는 효소에 의한 세포 활성을 측정하는 것인데, MTT dye를 넣어주면 이 효소에 의해 잘려져 MTT formazan을 형성한다. 하지만 세포 상태가 나빠지면, 미토콘드리아 내 dehydrogenase도 그 기능이 감소해 formazan 형성을 하지 못하게 된다. 최종농도 1 mg/ml로 MTT dye를 처리하고 1시간 배양 후, DMSO로 결정을 녹여 multiplate reader (Powerwave XS; BIO-TEK, USA) 로 570 nm에서 측정하였다. TUNEL assay는 Deadend Colorimetric TUNEL System (Promega, Madison, WI, USA) 를 이용하여 수행하였다. TUNEL assay결과를 분석하기 위해서, 각각의 그룹으로부터 유사한 세포 개수가 사용되었다 (n=200/그룹). 마지막으로, 모든 세포 활성 측정 실험을 할 때는 Crif1 siRNA 또는 Crif1 cDNA을 형질 주입 시키고 24시간이 지난 후 5  $\mu\text{M}$ 의 A $\beta$ 를 24시간 동안 처리된 후 어세이를 시작하였고 (Part. 1), 또는 Tsp1을 1시간

선처리 한 뒤 1  $\mu\text{M}$ 의  $\text{A}\beta$ 를 24시간 동안 처리한 후 어세이를 시작하였다 (Part. 2).

## 10. RNA 분리와 역전사 중합연쇄효소반응 (RT-PCR)

Crif1 mRNA의 양을 측정하기 위해서 RNA는 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 를 이용해 분리되었고, 분리된 RNA의 RT-PCR은 다음과 같은 sense와 antisense primer에 대해 이루어졌다. human Crif1: 5' -GACAGGCACGC AGCCTACTA-3' (sense), 5' - ATCATCTGTGGCATCTTGGC-3' (antisense).

## 11. 정량적 실시간 중합연쇄효소반응 (qRT-PCR)

Crif1 mRNA의 양, 미토콘드리아 단백질의 mRNA 양을 알아보기 위해서 qRT-PCR을 수행하였다. 다음과 같은 sense, antisense primer가 사용되었다. Crif1: 5' - GATGCCACAGATGATTGTGA-3' (sense), 5' - CCGTTTCTGTTT TCCTCTCCT-3' (antisense) for Crif1; Tom20: 5' -CGACCGCAAAGACGAAGTGAC-3' (sense),

5' -GCTTCAGCATCTTTAAGGTCAGG-3' (antisense);  
Tim50: 5' -AGCA CTATGCCCTGGAGGATGA-3' (sense),  
5' -GAGCCAAGGAAGAGGTTCTGCT-3' (antisense);  
GAPDH: 5' -ACAGCCGCATCTTCTTGTGCAGTG-  
3' (sense), 5' -GGCC TTGACTGTGCCGTTGAATTT-3'  
(antisense)

## 12. 전기이동 기동성 교대 실험 (EMSA)

Crif1의 promoter부위와 Sp1 전사 인자간의 상호작용을 알아보기 위해서, EMSA를 수행하였다. Light Shift Chemiluminescence EMSA kit (Thermo Scientific, Hudson, NH, USA)를 이용해서, 24시간 동안 vehicle이나 A $\beta$ 를 처리한 그룹에서 실험을 수행하였다. 이중가닥의 probe는 두 개의 biotin-labeled oligonucleotides 를 인간의 Crif1 유전자의 promoter부위에 대해서 만들었다; forward probe (5' -biotin-TTTAATCGACCCG CCCCACC-3' ), reverse probe (5' -biotin-GGTG GGGCGGGTCGATTAAA-3' ).

## 13. 면역침강법 (Immunoprecipitation)



Sp1의 SUMOylation 정도를 알아보기 위해 면역침강법을 수행하였다. 세포주에 단백질 분해효소 저해제 (Sigma-Aldrich)가 포함된 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM sodium chloride; SDS 0.1%; Na-Deoxycholate 0.5% (m/v); Triton X-100 1% (v/v); 1 mM EDTA, 5% Glycerol) 로 세포 내 단백질을 추출하였다. 4° C 에서 24 시간가량 로테이터에서 반응시켰다. Protein A/G agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) 를 반응이 끝난 샘플에 넣어주었고, 추가로 2 시간가량 로테이터에서 더 반응 시켰다. 반응 후, RIPA buffer를 이용해서 세척해주었고 5X sample buffer를 10 µl 넣어준 다음 95° C 에서 10분간 끓여주어 agarose bead 에서 단백질을 분리하였다. 그 이후 상층액을 새로운 튜브로 옮겨 웨스턴 블롯 실험을 진행하였다.

#### 14. 면역조직염색 (Immunohistochemistry)

면역염색법에 의해 염색된 세포를 confocal laser scanning microscope (FV10i-w, Olympus) 에 의해 관찰하였다. Part1에서는 실험동물의 뇌조직을 관찰하기 위해서, 5XFAD 쥐의 (6개월, 그룹당 6마리) 뇌조직은 절편화 되었고, Crif1 (Santa Cruz

Biotechnology; 1:250) 에 대해서 염색하였다. 인간의 뇌조직에 대해서는 40  $\mu\text{m}$ 의 연속적인 절편화 과정을 거쳤고, 절편들은 cryoprotectant 용액 (30% glycerol, 30% ethylene glycol, 0.1% sodiumazide in PBS; pH 7.4) 에  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관되었다. 절편조직은 48시간동안 Crif1 항체 (Santa Cruz Biotechnology; 1:100) 를 처리하였고, 다음으로 biotinylated horse anti-mouse IgG 항체 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; 1:500) 에 상온에서 2시간 동안 함께 처리되었다. 다음으로, streptavidin (Invitrogen; 1:5000) 을 상온에서 2시간동안 처리하였고, Nickel-enhanced DAB/oxidase 반응 (0.02% DAB (Sigma-Aldrich), 0.08% nickel-sulfate, 0.006% hydrogen peroxide) 을 시켜서 신호를 눈에 보이게 했다. Part 3에서는 9일 연속으로 복강 내 주사로 metformin 주사를 받은 5XFAD 쥐를 Part 1에서와 같은 방법으로 뇌조직 절편을 만들어내고, A $\beta$  양을 측정하기 위해서, 4G8에 대해서 관찰하였다. 각각의 쥐에서 6장의 뇌조직 절편이 관찰되었으며, bregma로부터 0.14 mm 앞의 부분 (전두엽 부분) 을 주로 관찰하였다.

## 15. 세포 내 칼슘 측정

이 실험을 위해서는 fluo-4 (Thermo Fischer scientific) 라는 염색물질을 이용해 실험을 실시하였다. 세포 내 칼슘양이 많을수록 fluo-4 라는 물질에 의한 초록 형광 신호 강도가 세지므로 그 원리를 이용해서, Part 2에서 Tsp1에 의한 칼슘양의 조절 여부를 알아보려고 하였다.

## 16. Luciferase reporter gene assay

약물 처리한 세포들을 1X Passive Lysis Buffer (Promega, Schildkrotstr, Mannheim, Germany) 에 용해시키고, BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford/IL, USA) 를 이용해 정량한 뒤  $\gamma$ -secretase substrate을 첨가해 주어 반응을 일으켰다.  $\gamma$ -secretase는 그것의 기질을 자르게 되고, AICD/GVP는 핵으로 들어가 luciferase 유전자를 발현시키고, 빛을 방출하게 된다. 그 빛은 luminometer (Infinite® 200, Tecan, Austria) 에 의해 읽혀졌다.

## 17. BACE1 promoter activity assay

Plasmid uBACE-2K (pGL3-Basic vector 안에 BACE1 promoter 지역을 가짐 (+50 to -2100 bp)) 이 BACE1 promoter

activity 측정을 위해 사용되었다. 세포들은 Lipofectamine Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 를 이용해 uBACE-2K와 pRL-TK (Promega, Madison, WI, USA) vector를 형질주입 시켰다. 형질 주입효율을 normalization 하기 위해서 형질주입 후 24시간 후에 세포들은 metformin을 24시간 동안 처리 받고, 1X Passive Lysis Buffer (Promega, Schildkrotstr, Mannheim, Germany) 로 용해되어, luciferase activity를 luciferase kit (Promega) 을 사용해 측정하였다. 형광신호는 luminometer (Infinite® 200, Tecan, Austria) 를 이용해 측정되었다.

## 18. A $\beta$ ELISA assay

A $\beta$  농도는 sandwich ELISA를 가지고 뇌조직이나 세포 lysate을 대상으로 측정되었다. 전체 뇌조직이나 세포들은 protease inhibitor (PI) mixture (Sigma) 가 포함된 RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0) 로 용해되었다. 용해물은 1:5의 비율인 PI/RIPA buffer로 희석되어서 13,000 rpm으로 30분간 4°C에서 원심분리되어서 단백질 정량을 위해 쓰였다. 상층액은 50  $\mu$ g의 단백질을 가지게끔 희석되어 100  $\mu$ l씩 보관되었다. 샘플은 다시 100,000  $\times$

g, 4°C 에서 1시간 동안 원심분리 되었다. 상층액은 RIPA에 용해되는 분획이며 따로 모아졌으며, 나머지는 150 μl씩 보관되었는데 4°C 에서 70 % formic acid에 녹이기 위해 파이프팅을 20-30 회 하여 각각 100,000 × g, 4°C 에서 1시간 동안 원심분리 되었다. 상층액은 SpeedVac concentrator (ThermoFisher Scientific, USA) 에서 2시간동안 건조되었고, 증발과정이 끝난 뒤 침전물은 100 μl의 RIPA buffer에 용해되었으며 그 중 2-3 μl만이 ELISA 분석을 위해 사용되었다. Aβ의 양은 ELISA Kit 제조사 ((ImmunoBiological Laboratories, Gunma, Japan) 의 프로토콜에 따라 실험되고 측정되었다.

## 19. Trichloroacetic acid (TCA) precipitation

Media 속의 단백질을 분석하기 위해, TCA를 시행하였다. 세포의 media를 5,000 rpm에 5분간 원심분리하여 세포에서 잔재들을 없애주고, 바로 TCA precipitation (10%) (T6399, Sigma-Aldrich) 을 수행하였다.

## 20. 전자현미경 관찰

Part 1,2 에서는 미토콘드리아 모양을 분석하기 위해, Part 3

에서는 autophagosome의 축적을 관찰하기 위해서 전자현미경 관찰을 하였다. 기본적인 세포의 고정원리와 샘플 준비방법은 모두 같다. 세포에 약물을 처리한 뒤, 24 시간 동안 EM fixative (cold 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) and 2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate or cacodylate buffer (pH 7.2))로 고정 후 epoxy resin을 이용해 묻게 된다. 다시 sample은 12 시간 동안 38°C에 배양되고 48 시간 동안 60°C 에서 배양된다. 샘플은 초박 절편으로 만들어지고 (65 nm, Ultramicrotome (RMC MTXL)) 구리 grid위에 놓여진다. 4% uranyl acetate와 4% lead citrate으로 염색한 뒤, transmission electron microscopy (JEM-1400; Japan), 80 kV에서 관찰하게 된다.

## 21. Microsome enriched crude fraction 분리

세포에 hypotonic buffer (10 mM KCl, 30 mM Tris, pH 7.5, 5 mM MgOAc, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) 를 처리한 뒤, piston stroke에 의해 분리되었다. 그 용액은 다시 핵을 침전시키기 위해서 1,000 x g 에서 원심 분리 되었고, 상층액은 다시 모아져 100,000 x g, 4 °C에서 한 시간 동안 원심 분리되었다.

## 22. In vitro peptide cleavage assay

### 1) BACE1

BACE1 활성을 측정하기 위해 이 효소의 기질을 넣어준 뒤 효소 반응이 일어난 후 방출되는 형광을 측정하는 원리이다. 사용한 기질은 MCA-S-E-V-N-L-D-A-E-F-R-K (DNP)-R-R-NH<sub>2</sub> (Bachem) 이다. BCA 정량으로 단백질 50  $\mu$ g에 MEST buffer에 녹이고, 기질 (1  $\mu$ M)을 녹인 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 기질에서 방출되는 형광을 측정하였다. BACE1 inhibitor IV (Bachem)가 처리된 값과의 차이로 BACE1 activity를 간접적으로 측정한다.

### 2) $\gamma$ -secretase

세포에 hypotonic buffer (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7.4)를 넣고 homogenizer로 파쇄하였다. 2000 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 30 분간 원심분리하고 상층액을 다시 13,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 30 분간 원심분리 하였다. 침전물은 0.5% CHAPS가 포함된 hypotonic buffer로 다시 용해해 세포막 분획을 얻고, BCA 정량해 40  $\mu$ g의 세포막 단백질을 20  $\mu$ M의 기질 (Nma-G-G-V-V-I-A-T-V-K (Dnp)-R-R-R-NH<sub>2</sub>; Calbiochem, La Jolla, CA,

USA)와 2시간 동안 반응시켜 기질이 잘릴 때 나오는 형광을 측정하였다.

## 23. A $\beta$ <sub>1-42</sub> 준비 (A $\beta$ <sub>1-42</sub> preparation)

A $\beta$ <sub>1-42</sub> 펩타이드 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP; Sigma-Aldrich, USA) 로 녹인 후 분주하였고, SpeedVac concentrator Savant Instrument, Hyderabad, India) 를 이용하여 HFIP 를 증발시킨 후 -80 °C에서 보관하였다. 세포에 처리할 때는 DMSO (anhydrous dimethyl sulfoxide) 에 녹이고, DMEM 에 희석하여 실험 조건에 맞게 다양한 농도로 처리하였다.

## 24. 통계처리

통계처리를 위해서 데이터는 mean  $\pm$  SEM 값으로 나타내었다. 그룹간의 통계적인 유의성은 Student *t*-test or one-way ANOVA 를 이용해서 분석하였다. 모든 통계분석은 GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Software, USA)을 이용해서 수행되었다 (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, \*\*\*\**p* < 0.0001)



## 결 과

### Part 1. A $\beta$ 에 의한 Crif1 단백질의 감소로 초래되는 미토콘드리아의 기능 저해 연구

#### 1. 5XFAD 쥐와 알츠하이머병 환자의 병변 지역에서 보이는 Crif1 단백질의 저하

Crif1의 발현이 알츠하이머병 모델 쥐에서 변동이 있는지 알아보고자, 전두엽 (frontal cortex), 해마 (hippocampus) 그리고 소뇌 (cerebellum) 에서 Crif1의 양을 6개월된 5XFAD에서 측정해본 결과, Crif1의 양이 전두엽, 해마에서 유의하게 감소되었다. (그림 8A-B, 14A). 하지만 소뇌에서는 유의한 변화가 보이지 않았다 (그림 8A-B). 이를 통해 Crif1의 감소가 단지 알츠하이머 병변 지역 국한적으로 일어남을 알 수 있다. 조직염색을 통해 Crif1의 발현 정도를 알아보았는데, Crif1 형광 신호 강도와 차지하는 넓이 또한 알츠하이머병 모델 쥐의 뇌에서는 감소되었다 (그림 8C-E). 이것은 5XFAD가 아닌 다른 알츠하이머 병 모델 쥐인 APP/PS1 쥐에서도 같은 경향으로 나타났다 (그림 14B). PS1의 변이는 소포체의 항상성을 깬으로써 조기발병 알츠하이머병의 원인이 되므로, 5xFAD에서의 Crif1의 감소가

이러한 변이 때문인지를 알기 위해서, 12개월된 Tg2576 쥐에서-APP변이만을 가지고 있는- Crif1의 양을 측정해보았다. Crif1은 감소되어 있었으며, 이를 통해서 A $\beta$ 의 축적만으로도 Crif1 발현의 감소를 일으키기에 충분하다는 것을 알 수 있었다. qRT-PCR과 웨스턴 블롯팅을 통해서 알츠하이머병 환자 뇌조직의 상위 측두엽 부위에서 Crif1의 발현을 살펴본 결과, mRNA와 단백질 모두 각각 35%, 21%만큼 감소되어 있는 것을 알 수 있었다 (그림 8F, G). 또한, CA3, CA1지역의 인간 뇌조직의 조직염색실험을 통해서 Crif1 단백질이 알츠하이머병 환자에서 유의하게 감소되어 있었음을 알 수 있었다 (그림 8H, 표 1). 이를 통해서, Crif1의 발현이 알츠하이머 병변 지역에서 감소되어 있음을 알 수 있었다.

위의 동물실험 결과는 알츠하이머 병변 지역에서 Crif1의 감소가 일어남을 보여주며 (그림 8, 14A), APP 변이만을 가진 동물모델 (Tg2576) 도 Crif1의 발현 감소를 보여주었으므로 (그림 14B), 이러한 Crif1의 변화가 A $\beta$ 에 의해 유도된 것이라는 가정하에 다음 실험을 진행하였다. 외부적으로 처리해준 A $\beta$ <sub>1-42</sub>는 -A $\beta$ <sub>42-1</sub>은 효과없음- SH-SY5Y 세포에서 농도와 시간에 의존적으로 Crif1 단백질의 감소를 일으킴을 알 수 있었다 (그림 9A, B). Crif1과 HSP60라는 미토콘드리아 표지 단백질로 쓰이는 항체를 이용해

형광염색 실험을 수행했을 때, A $\beta$ 를 처리한 그룹에서 Crif1의 형광 신호가 현저히 감소되는 것을 알 수 있었다 (그림 9C). 이러한 A $\beta$ 에 의한 Crif1의 감소가 세포의 종류에 특이적인 반응인지 알아보기 위해서, HT22 세포나 mouse hippocampal primary neuron을 이용해 실험해 보았을 때 A $\beta$  처리에 의한 감소 경향성을 확인함으로써, 이것이 특정 세포주에 국한된 현상이 아니라, A $\beta$ 에 의한 보편적인 현상임을 알 수 있었다 (그림 15A). A $\beta$ 에 의한 Crif1의 감소 메커니즘을 알아보기 위해서, 단백질 분해 경로 이상에 의한 것인지 먼저 알아보았다. 단백질 분해효소 복합체의 저해제인 MG132 또는 autophagy의 저해제인 3MA나 bafilomycin을 처리하였지만 A $\beta$ 에 의한 Crif1의 감소는 회복 되지 않았다 (그림 9D). 그렇다면, 전사 수준에서의 조절인지 알아보기 위해서 qRT-PCR을 실시 해보았는데, A $\beta$ 를 처리한 그룹에서 24시간 정도 지속적으로 Crif1 mRNA의 감소가 됨을 확인했다 (그림 9E). 하지만 다른 미토콘드리아 단백질들의 mRNA에는 아무 변화가 없었기에, 이 현상이 미토콘드리아 단백질 전반적으로 일어난 것이 아니라, A $\beta$ 에 특이적으로 Crif1 단백질의 mRNA의 감소가 일어남을 알 수 있었다.

## 2. A $\beta$ 에 의해 증가한 ROS가 Sp1의 전사 활성화에 미치는 영향

A $\beta$ 에 의한 ROS증가가 알츠하이머병 진행에 영향을 미치므로, 이러한 ROS의 증가가 Crif1에 영향을 미칠 수 있을 것이라고 생각하였고, 과산화수소를 처리해 Crif1의 감소를 확인하였다 (그림 10A). ROS 제거를 하는 N-acetylcysteine (NAC)을 A $\beta$ 를 처리해 준 그룹에 함께 처리하였더니 (그림 10B), Crif1의 감소가 회복되었다. ROS는 미토콘드리아 호흡이나 산화제 등에 의해 생성되는데, A $\beta$ 는 이러한 산화제를 활성화 시킴으로써 ROS를 증가시키는 것으로 알려져 있다 (27). NADPH 산화제가 이러한 현상을 매개하는지 알아보기 위해, NADPH 산화제의 저해제인 apocynin과 diphenyleneiodonium (DPI) 를 A $\beta$ 와 함께 처리하였더니 A $\beta$ 만 처리해준 그룹에 비해서 Crif1의 감소가 회복되었다 (그림 10C). 이를 통해, A $\beta$ 에 의한 NADPH 산화제의 활성화 증가가 ROS를 증가시키고, 이에 의해서 Crif1의 전사량이 감소함을 확인하였다. A $\beta$ 에 의한 Crif1 전사 조절을 좀더 구체적으로 연구해 보기 위해서, 프로모터 지역의 서열을 입력하면 결합해 전사를 유도할 가능성이 높은 전사인자를 찾아주는 소프트웨어 프로그램을 이용해 그 후보를 추려보았다 (<http://www.genetools.us/genomics/>). 이 분석을 통해서 AML-1A, SRY, Sp1과 같은 Crif1 전사인자 후보를 추려내었고 문헌 조사를

통하여, Sp1이 ROS에 예민하게 조절되는 전사인자임을 알 수 있었다 (28). EMSA 분석을 통해서 Crif1의 프로모터 부위에 Sp1 전사인자가 붙게 됨을 알 수 있었는데 (그림 10D), 경쟁 표지자를 과량 처리해 준 그룹에서 Sp1이 Crif1의 프로모터 서열에 붙지 못하므로 밴드의 이동 변환 정도가 줄어들음을 알 수 있었다 (그림 10D, 화살표). 선행 연구에서, Sp1에 SUMOylation이 되면 Sp1의 전사작용을 방해하는 쪽으로 조절하는 부위의 잘림을 막으므로 표적 유전자의 전사가 줄어든다는 보고가 되어있다 (29). 그래서 A $\beta$ 에 의한 Sp1의 SUMOylation 증가 여부를 알아보기 위해, Sp1과 SUMO-1의 결합이 증가하는지를 공동 면역 침강법을 이용해 알아 보았다. A $\beta$ 를 처리해준 그룹에서 vehicle 처리 그룹에 비해 Sp1과 SUMO-1의 결합이 증가함을 확인함으로써 A $\beta$ 에 의해 Sp1의 SUMOylation을 증가되는 것을 확인하였다 (그림 10E, F). 또한, Sp1의 sumoylation site를 변이시킨 Sp1 K16A를 형질 주입시킨 그룹에 A $\beta$ 를 처리시에는 Crif1 단백질의 감소가 보이지 않음을 관찰함으로써 (그림 10G), A $\beta$ 에 의한 Crif1의 감소가 Sp1의 SUMOylation에 증가에 의한 *Crif1* 유전자의 전사량이 감소되기 때문임을 확인하였다.

### 3. 미토콘드리아 모양 유지에 있어서의 Crif1의 역할

선행 연구에서 알츠하이머병에서 미토콘드리아 모양과 기능의 망가짐이 보고 된 바 있다 (3, 30).  $A\beta$ 는 미토콘드리아의 분열을 과도하게 유도함으로써 이 현상에 기여한다 (30). 알츠하이머병 동물모델에서도 미토콘드리아 모양이 망가지고 과분열된 것을 전자현미경 관찰을 통해 확인할 수 있었다 (그림 11A). 한편, Crif1은 미토콘드리아 내막에 존재하면서 (그림 16) 새롭게 합성되는 미토콘드리아 단백질-대부분 산화적 인산화와 관련된 전자 전달계 구성단백질-을 내막으로 자리잡게 삽입을 도와주는 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다 (15). 그러므로 Crif1 siRNA를 이용해 Crif1 단백질 양을 감소 시켰을 때 미토콘드리아 구조에 변화 여부를 확인하고자 하였고, 이 때 siRNA에 의해서 Crif1 단백질의 양은 60% 정도 감소하는 것으로 나타났다. Mito-DsRed를 발현시키는 SH-SY5Y 세포에서 control siRNA,  $A\beta$  처리한 control siRNA ( $A\beta$ ), Crif1 siRNA (Crif1 KD),  $A\beta$  처리한 Crif1 siRNA이 형질 주입된 그룹 (Crif1 KD+ $A\beta$ ) 을 분석해 보았을 때, Crif1 KD만으로도  $A\beta$ 에 의한 미토콘드리아 모양의 망가짐과 과분열 현상이 관찰되었다 (그림 11B, C). 그리고 Crif1 KD과  $A\beta$ 처리를 동시에 해준 그룹에서는 추가적인 망가짐이 보이지 않아,  $A\beta$ 에 의해 Crif1이 감소되고 이것이 미토콘드리아 구조를

망가뜨리는데 기여함을 추가적으로 확인할 수 있었다. 전자 현미경 관찰을 통해서 Crif1 KD 그룹에서 미토콘드리아의 분열이 심하게 일어났음과, 크리스테가 없어진 망가진 구조를 확인하였다 (그림 11D). Crif1이 미토콘드리아 분열/융합 단백질에 영향을 미치거나 상호작용을 통해 이런 결과가 나타나는지 확인을 위해 공동면역침강 실험을 하였으나, 어떠한 상호작용도 발견하지 못했다 (그림 18A, B). 이를 통해 Crif1의 감소가 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아 구조의 망가짐에 중요한 역할을 할 수 있음을 확인하였다.

#### 4. Crif1의 감소가 미토콘드리아 기능에 미치는 영향

Crif1의 감소가 미토콘드리아 모양의 망가짐 뿐만 아니라 기능 이상도 초래하는지 알아보려고 Crif1 siRNA를 형질 주입하고 A $\beta$ 를 처리한 그룹에서 미토콘드리아의 기능을 분석해 보았다. 미토콘드리아 막전위 (MMP)는 Crif1 KD그룹에서 유의한 감소를 보임을 JC-1, TMRM 분석을 통해 확인하였다 (그림 11E, 19A). 그리고 동일한 그룹에서 ATP의 유의한 감소도 관찰되었다 (그림 11F). ROS 생성을 측정하기 위해 MitoSOX 실험을 수행한 결과, 유의한 증가를 확인하였다 (그림 11G). 이를 통해, A $\beta$ 에 의한 Crif1의 감소가 미토콘드리아의 과분열에 의한 모양의 망가짐 뿐만

아니라 기능 이상도 초래함을 확인 하였다.

## 5. A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아 모양 망가짐과 기능 이상에 Crif1 과발현이 가지는 회복 효과

Crif1 cDNA (complementary DNA) 를 SH-SY5Y 세포에 형질 주입시키고 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 구조와 모양을 관찰해 보았다. A $\beta$ 를 함께 처리하였을 때, Crif1의 과발현 만으로도 미토콘드리아의 모양이 건강하게 유지됨을 알 수 있었고 (그림 12A, B), 이 그룹에서 미토콘드리아의 기능 이상도 회복됨을 알 수 있었다. MMP와 ATP의 경우, 유의하지만 부분적인 회복만을 관찰하였다 (그림 12C, D). 놀랍게도, A $\beta$ 에 의한 ROS증가는 Crif1 과발현에 의해서 거의 완벽히 회복되는 것을 DCFDA와 MitoSOX 실험으로 확인하였다 (그림 12E, F). 이를 통해 Crif1 단백질의 양을 정상 수준으로 유지하는 것이 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 구조적 망가짐과 기능 이상을 회복시킬 수 있음을 확인하였다.

## 6. Crif1의 양이 A $\beta$ 에 의한 세포 활성 감소에 미치는 영향

미토콘드리아의 기능 이상은 곧 내재적 경로를 통해 apoptosis로 이어지므로 A $\beta$ 에 의한 Crif1감소가 세포 활성에 영향을 미치는 지 알아보기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 Calcein-AM 실험을



수행하였다 (그림 13A, B). Crif1 KD 만으로도 세포활성은 유의하게 감소하였고 apoptosis를 증가시켰다. 하지만 Crif1을 과발현 시킨 그룹에서는 A $\beta$ 를 처리하여도, 감소된 세포활성이 유의하게 회복 되었다 (그림 13C, D). TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) 실험을 통해서 Crif1 과발현에 의한 세포활성 회복을 눈으로 확인 가능하였다 (그림 13E). 이를 통해, Crif1 단백질이 A $\beta$ 에 의한 세포 활성 감소에 기여함을 알 수 있었다.

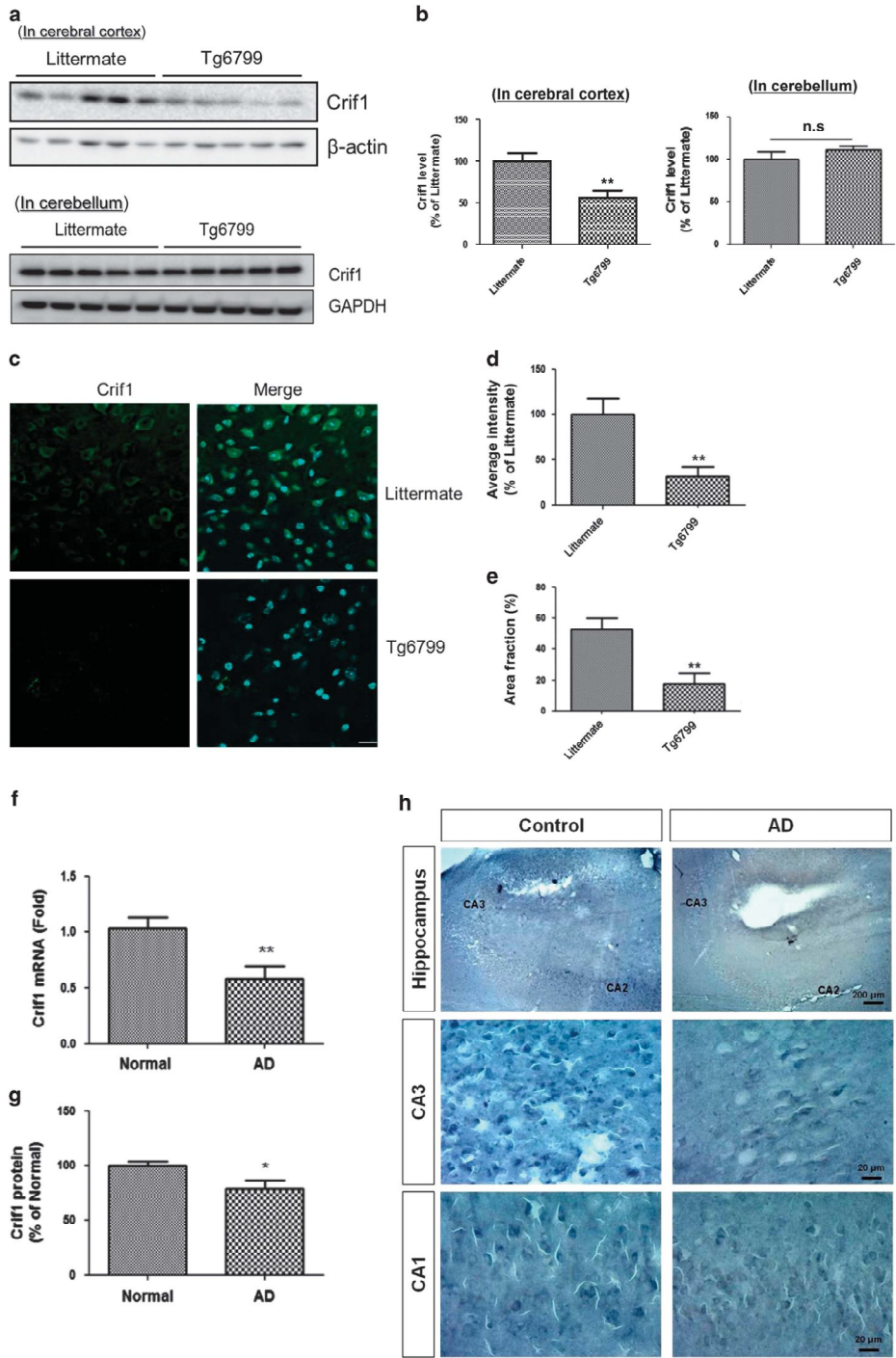


그림 8. 알츠하이머병 모델 마우스와 환자의 뇌에서 Crif1 단백질의 감소

(A) 5XFAD 쥐의 대뇌피질에서 Crif1의 감소, 소뇌에서 변화 없음

(B) (A)의 정량을 수행, \*\*  $p < 0.01$  (vehicle 처리 그룹 기준); n.s 는 유의한 변화 없음

(C) 조직면역염색으로 Crif1신호 (Alexa 488) 감소를 확인 (6개월, 그룹당 6마리)

(D) (C)를 정량화, Crif1 형광신호의 평균세기가 5XFAD 에서 감소, \*\*  $p < 0.01$  (vehicle 처리 그룹 기준)

(E) (C)를 정량화, Crif1 형광신호의 단위면적당 비율이 5XFAD 에서 감소, \*\* $p < 0.01$  (vehicle 처리 그룹 기준)

(F) Crif1 mRNA 가 알츠하이머병 환자의 상위 측두엽에서 감소를 확인, \*\* $p < 0.01$  (vehicle 처리 그룹 기준)

(G) Crif1 단백질이 알츠하이머병 환자의 상위 측두엽에서 감소를 확인, \* $p < 0.05$  (vehicle 처리 그룹 기준)

(H) DAB 염색을 통해서 알츠하이머병 환자의 CA3, CA1, 해마에서 Crif1 감소를 확인

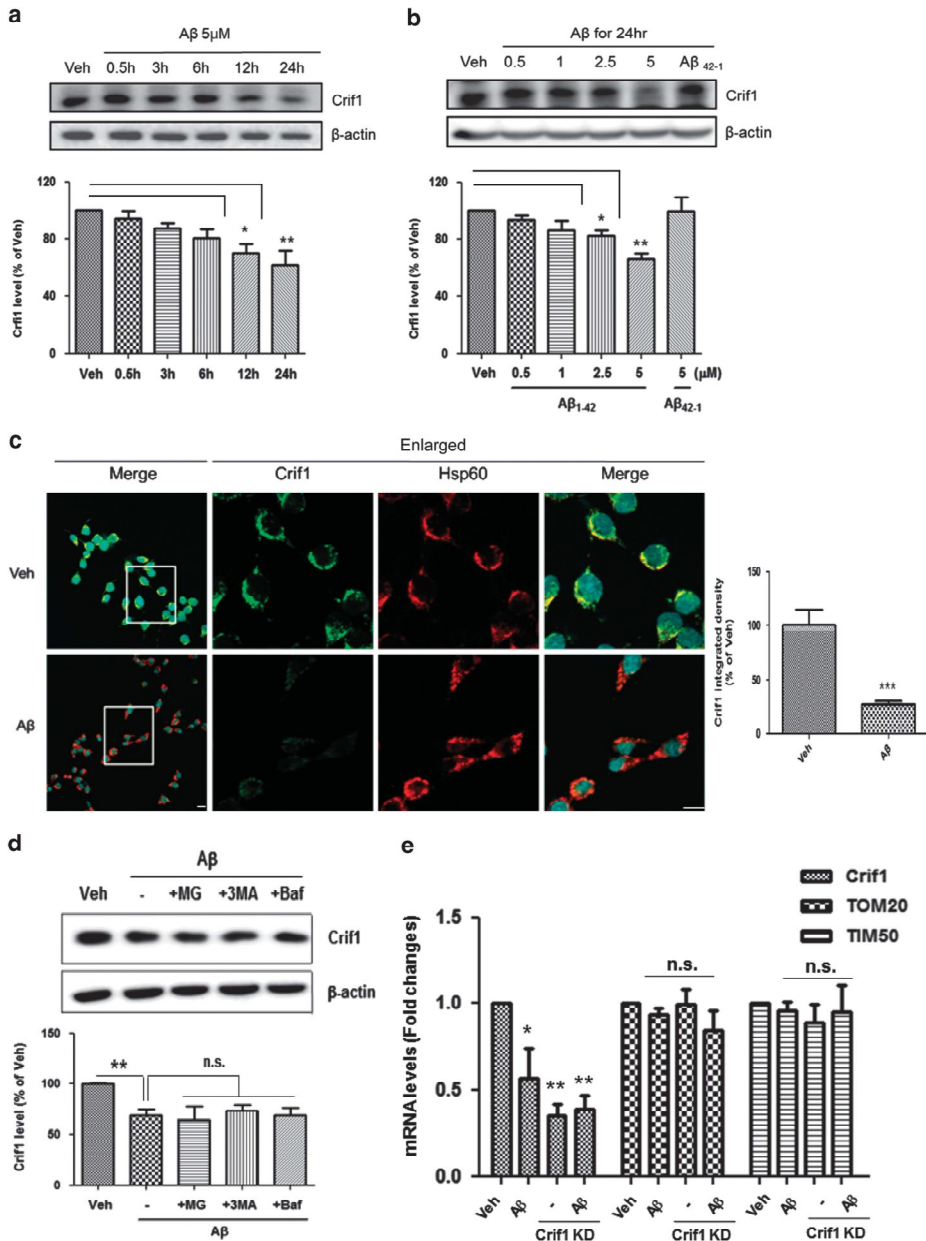


그림 9. Aβ에 의한 Crif1의 감소는 전사단계 조절을 통해 일어남을 확인  
 (A) Aβ (5 μM) 처리에 의한 시간 의존적 Crif1의 감소, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (vehicle 처리 그룹 기준)  
 (B) Aβ 24시간 처리에 의한 농도 의존적 Crif1의 감소, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (vehicle 처리 그룹 기준)

(C) Confocal microscope 관찰을 통해 Crif1 신호가 A $\beta$  (2.5  $\mu$ M) 24시간 처리 (Alexa 488) 감소를 확인 (스케일바는 10 $\mu$ m 를 나타냄), \*\*\*p < 0.001 (vehicle 처리 그룹 기준)

(D-E) A $\beta$  에 의한 Crif1 감소는 단백질 분해시스템에 의한 조절이 아니라 전사 단계의 조절임을 확인, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; n.s 는 유의하지 않음을 나타냄 (vehicle 처리 그룹 기준)

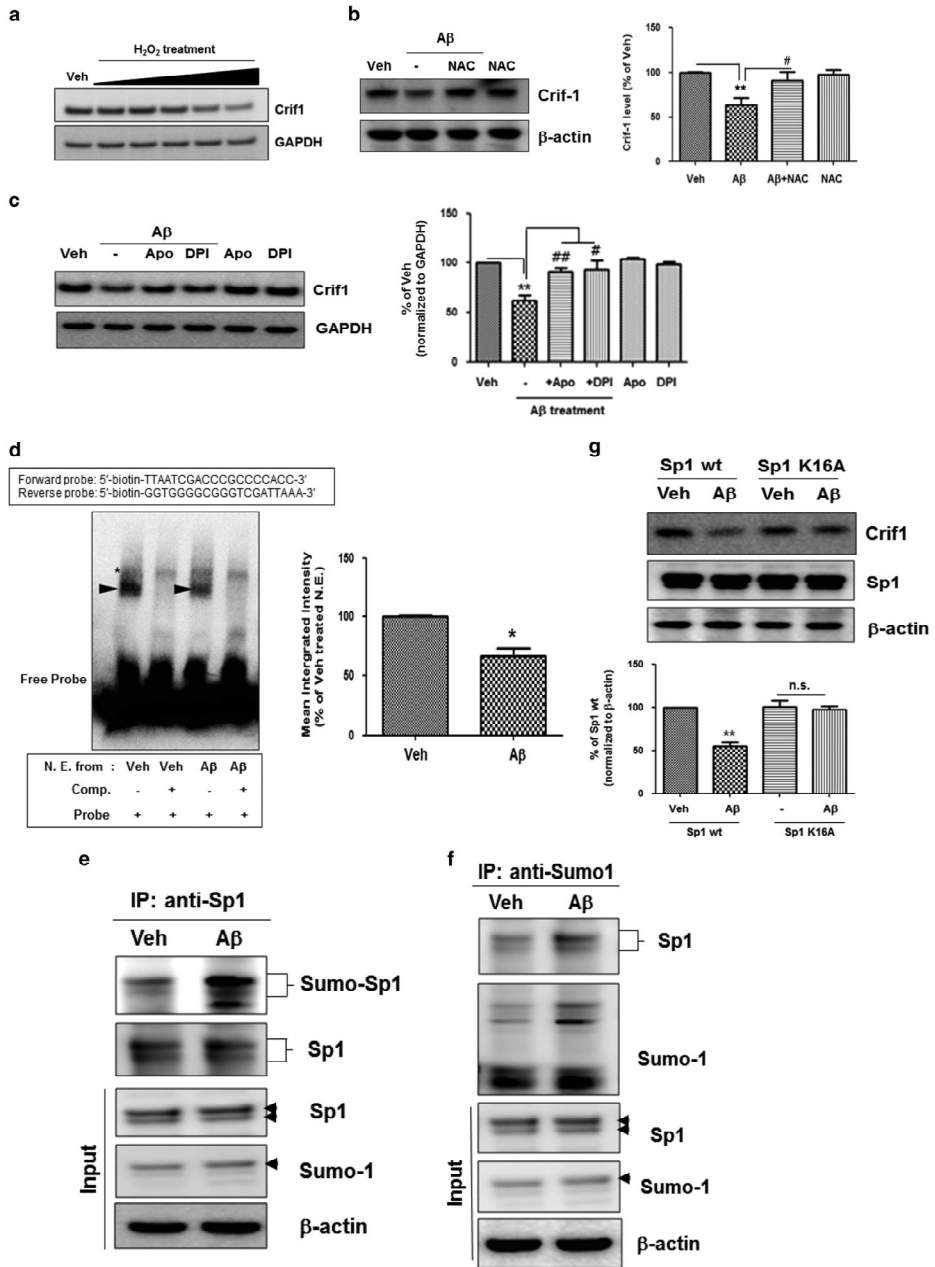


그림 10. Aβ에 의한 ROS 증가는 Sp1의 전사활성을 감소시킴

(A) 과산화수소 처리 (10~750 μM, 6시간)에 의한 Crif1의 감소

(B) ROS 를 제거하는 NAC 처리시 (1 mM) A $\beta$ 에 의한 Crif1의 감소가 회복됨, \*\*p < 0.01 (Vehicle 처리 그룹 기준); #p < 0.05 (A $\beta$  처리 그룹 기준)

(C) NADPH 산화제 저해제 처리시 A $\beta$ 에 의한 Crif1 감소가 회복됨, Apocynin (10  $\mu$ M), DPI (10  $\mu$ M), A $\beta$  (2.5  $\mu$ M), \*\*p < 0.01 (Vehicle 처리 그룹 기준); #p < 0.05, ##p < 0.01 (A $\beta$  처리 그룹 기준)

(D) EMSA 분석을 통해서 A $\beta$  (5  $\mu$ M, 24시간) 가 Sp1이 Crif1 프로모터 지역으로 결합하는 것을 감소시킴, \*: 비특이적 밴드, 검은 화살표: 단백질-DNA 표지자 복합체로써 특이적 밴드를 나타냄, NE: 핵 추출액, Comp: 경쟁 표지자, free probe: 결합하지 못하는 표지자

(E-F) 공동면역 침강법을 통해서 A $\beta$  처리가 Sp1의 SUMOylation 을 증가시킴을 확인 (E)는 A $\beta$ 에 의한 Sp1-SUMO1간의 상호결합이 증가하고, (F)는 Sumo1 항체를 이용해 A $\beta$ 를 처리시, Sp1의 SUMOylation 이 증가됨을 보여줌

(G) Sp1K16A 는 ROS 에 의한 SUMOylation 이 불가능한 돌연변이로 이 DNA 를 과발현시킨 그룹에서는 A $\beta$ 를 처리하여도 Crif1 감소가 현저히 나타나지 않음, \*\*p < 0.01 (Sp1 wild type cDNA 가 형질 주입 그룹 기준); n.s 는 유의하지 않음을 나타냄

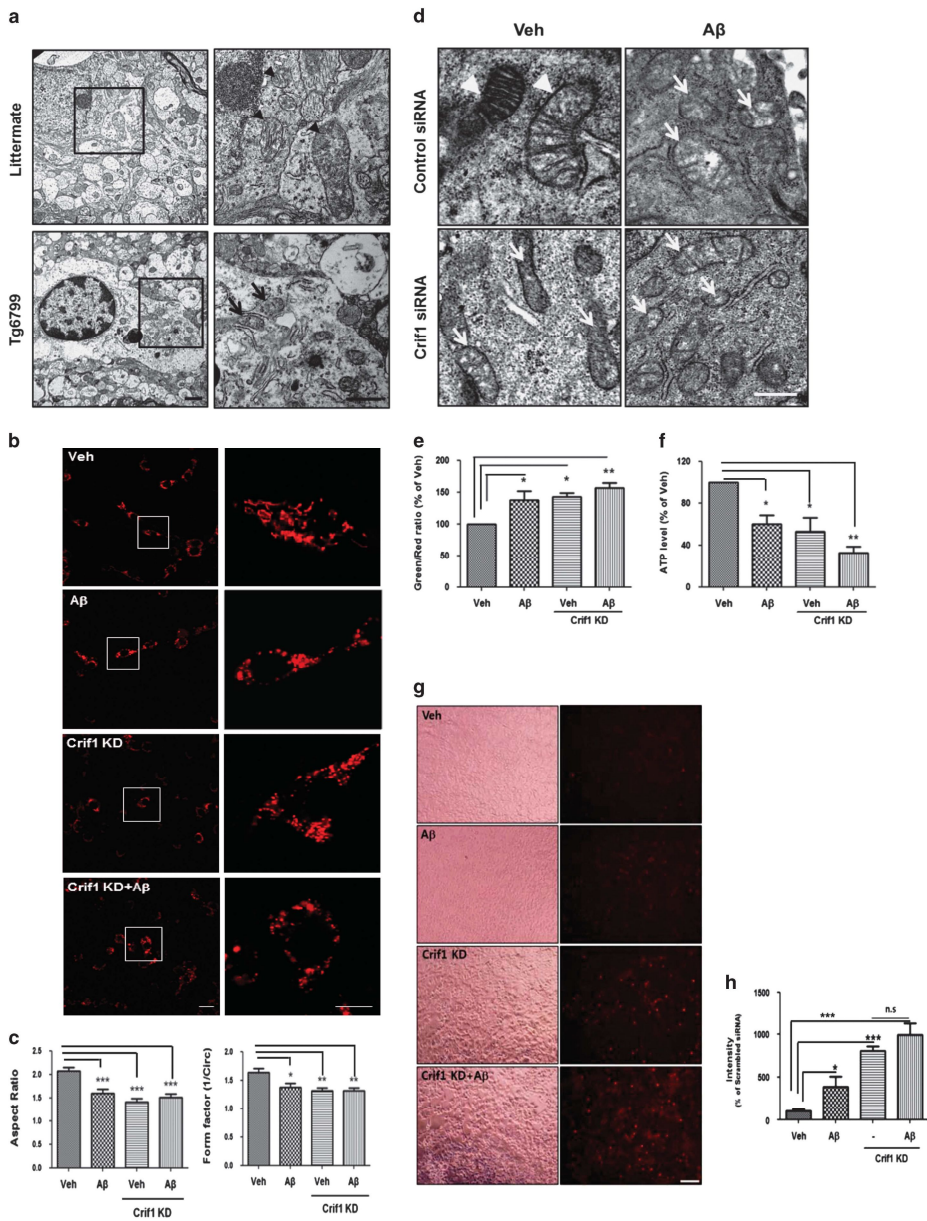


그림 11. Crif1 녹다운 (KD) 이 미토콘드리아 모양과 기능 이상을 초래  
 (A) 6 개월된 5XFAD 의 뇌조직을 전자현미경으로 관찰해보면, littermate  
 그룹에 비해서 미토콘드리아 모양이 망가지고 분열이 심하게 일어난  
 상태임 (스케일바는 2  $\mu$ m (왼쪽), 1  $\mu$ m (오른쪽))



(B-C) Crif1 KD 은 미토콘드리아 분열을 증가시킴, (C)에서는 image j 프로그램을 이용하여 미토콘드리아 모양을 분석 (그룹당 200 개의 세포), 스케일바는 10  $\mu\text{m}$ , \*\*p < 0.01 (Vehicle 처리 그룹 기준); #p < 0.05, ##p < 0.01 ( $\text{A}\beta$  처리 그룹 기준)

(D) 전자현미경 관찰을 통해서 Crif1 KD 그룹에서  $\text{A}\beta$  (5  $\mu\text{M}$ , 24시간) 처리한 그룹과 유사하게 미토콘드리아의 모양이 망가짐을 확인 (전체 화살표는 건강한 미토콘드리아, 화살표 머리부분은 망가진 미토콘드리아를 나타냄)

(E) 미토콘드리아 막전위를 JC-1으로 측정함, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (Vehicle 처리한 control siRNA 형질 주입 그룹 기준)

(F) Crif1 KD 그룹에서 ATP-luciferase 실험을 진행하여, ATP 생산이 감소됨을 확인, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (Vehicle 처리한 control siRNA 형질 주입 그룹 기준)

(G-H) Crif1 KD 그룹에서 ROS 생성이 유의하게 증가함. (G)는 MitoSOX 관찰 결과를 나타낸 것이고 (H)는 그것을 정량함, \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 (Vehicle 처리 그룹 기준)

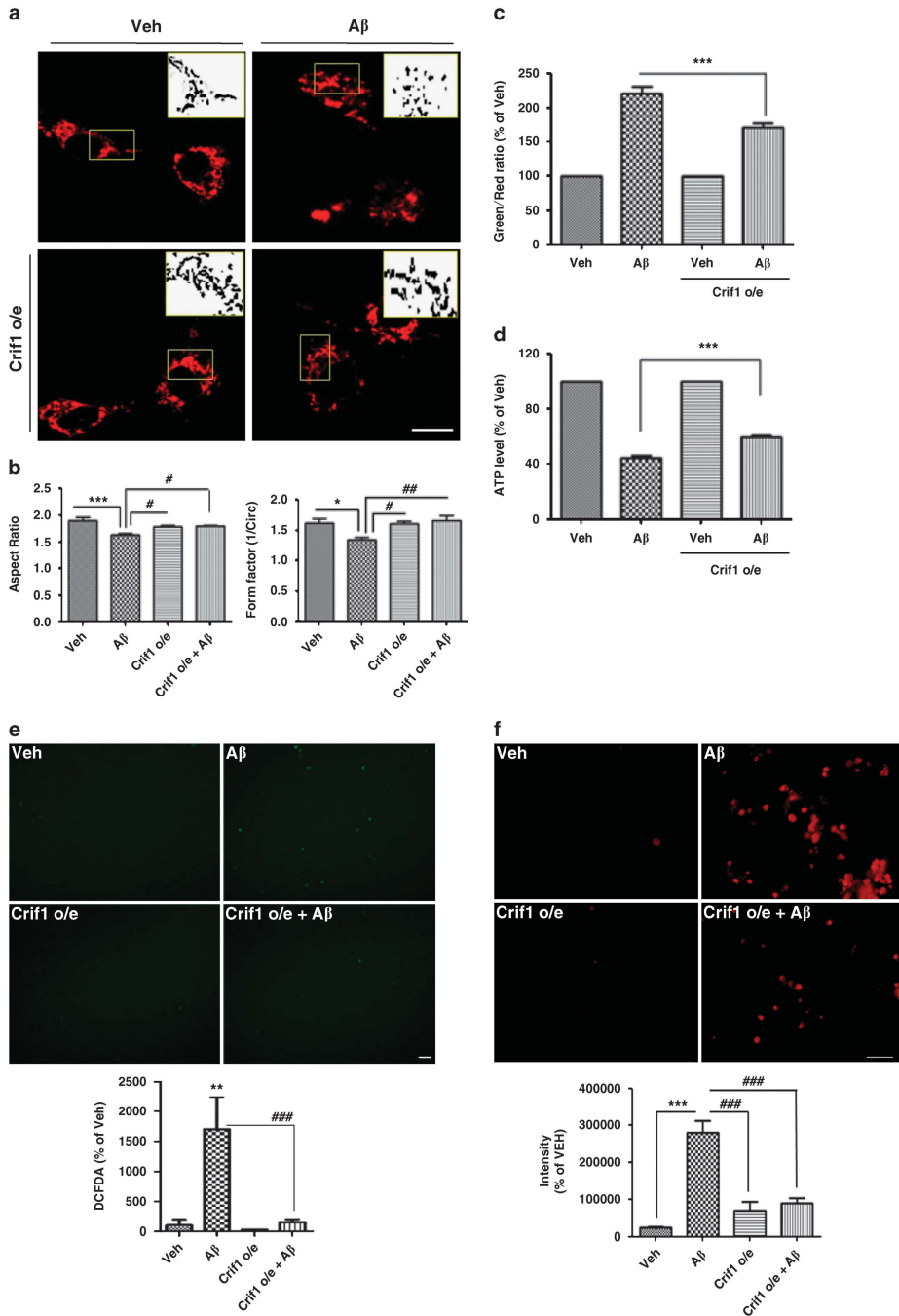


그림 12. Crif1 과발현이 Aβ에 의한 미토콘드리아 모양 망가짐과 기능 이상을 회복시킴을 확인

(A-B) 공백터 또는 Crif1 cDNA 를 형질주입시킨 MitoDsRed 를 발현시키는 SH-SY5Y 세포에서 A $\beta$  (5  $\mu$ M, 24 시간) 를 처리하고 미토콘드리아를 관찰, image J program 을 사용하여 분석 (그룹당 200 개의 세포)한 결과 (B), A $\beta$ 에 의해 망가졌던 미토콘드리아 모양과 길이가 모두 회복됨 (스케일바는 10  $\mu$ m), \*\*\*p < 0.001 (Vehicle 처리한 공백터 형질 주입 그룹 기준); #p < 0.05, ##p < 0.01 (A $\beta$  처리한 공백터 형질 주입 그룹 기준)

(C) 미토콘드리아 막전위를 JC-1으로 측정한 결과, A $\beta$ 에 의해 망가졌던 막전위가 회복됨, \*\*\*p < 0.001 (A $\beta$  처리한 공백터 형질 주입 그룹 기준)

(D) ATP 생산을 ATP-luciferase 로 측정한 결과, A $\beta$ 에 의해 감소된 ATP 생산이 회복됨, \*\*\*p < 0.001 (A $\beta$  처리한 공백터 형질 주입 그룹 기준)

(E) A $\beta$ 에 의한 ROS 생성이 Crif1 과발현에 의해서 유의하게 회복됨, DCFDA 실험을 수행함 (스케일바는 10  $\mu$ m), \*\*p < 0.01 (Vehicle 처리한 공백터 형질 주입 그룹 기준); ###p < 0.001 (A $\beta$  처리한 공백터 형질 주입 그룹 기준)

(F) A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아 내부 ROS 생성이 Crif1 과발현에 의해서 유의하게 회복됨, MitoSOX 실험을 수행함 (스케일바는 20  $\mu$ m), \*\*\*p < 0.001 (Vehicle 처리한 공백터 형질 주입 그룹 기준); ###p < 0.001 (A $\beta$  처리한 공백터 형질 주입 그룹 기준)

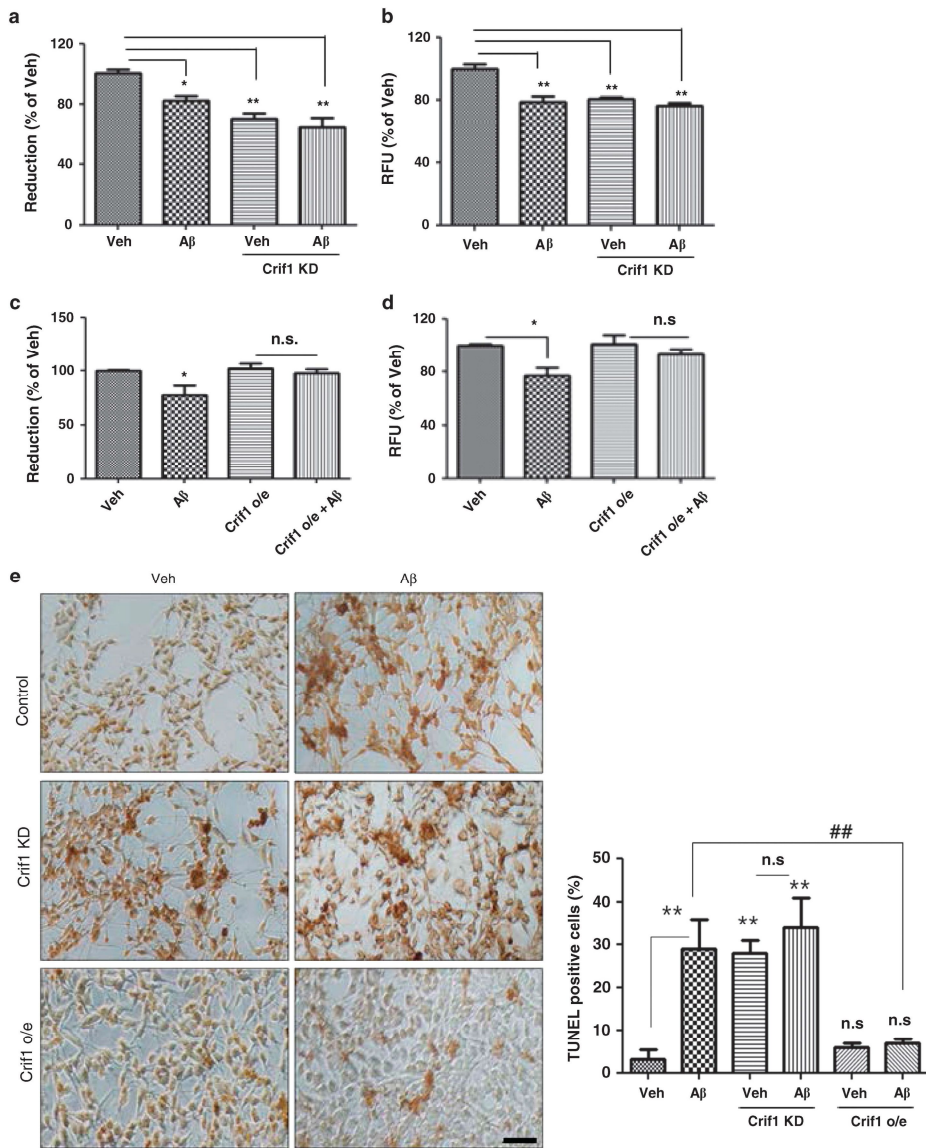


그림 13. Crif1의 양이 Aβ에 의한 세포사 유도에 중요

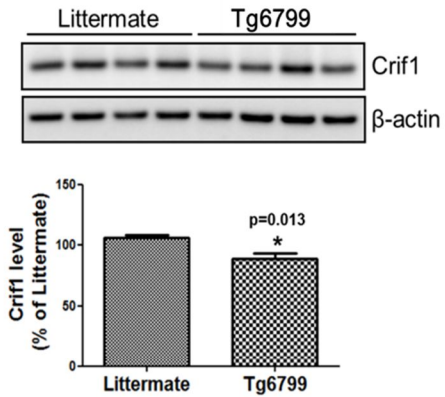
(A-B) Crif1 KD은 세포사를 유도함을 MTT (A), Calcein-AM (B) 실험으로 확인함, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (Vehicle 처리한 control siRNA 처리 그룹 기준)

(C-D) Crif cDNA 형질주입 24 시간 후, Aβ (5 μM, 24 시간)를 처리하고 세포의 활성을 측정해보면 Aβ에 의한 활성감소가 회복됨을 MTT (C),

Calcein-AM (D) 실험을 통해서 알 수 있다, \* $p < 0.05$  (Vehicle 처리한 공백터 형질 주입 그룹 기준)

(E) 세포사를 눈으로 확인하기 위해 TUNEL 실험을 수행함 (스케일바는 20  $\mu\text{m}$ ), \*\* $p < 0.01$  (Vehicle 처리 그룹 기준); ## $p < 0.01$  (A $\beta$  처리 그룹 기준); n.s 는 유의하지 않음을 나타냄

a



b

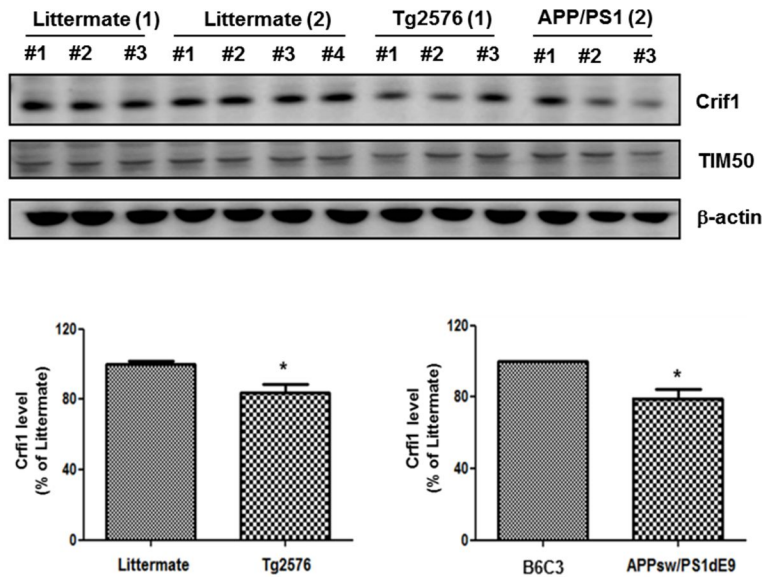


그림 14. 다른 알츠하이머병 동물모델에서 Crif1 단백질의 감소

(A) Crif1 단백질이 5XFAD (Tg6799)의 해마에서 유의하게 감소함

(그룹당 4 마리), \* $p < 0.05$  (Littermate 그룹 기준)

(B) Crif1 이 Tg2576, APP/PS1 Tg 의 대뇌피질과 해마에서 유의하게 감소하나 미토콘드리아 단백질은 변화가 없음, \*p < 0.05 (Littermate 그룹 기준)

a

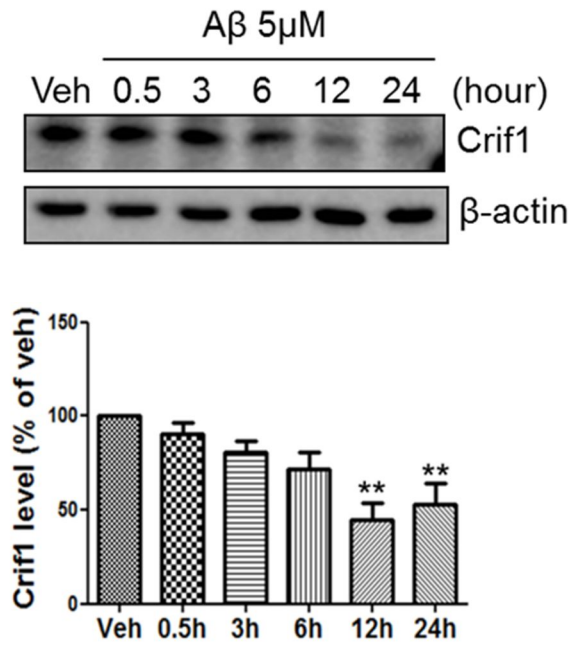


그림 15. 다른 세포주에서  $A\beta$ 에 의한 Crif1 단백질의 감소

(A) HT22 세포주에  $A\beta$  (5  $\mu$ M) 처리 후 12 시간, 24 시간이 되었을 때 Crif1의 유의한 감소를 볼 수 있음, \*\* $p < 0.01$  (Vehicle 처리 그룹 기준)



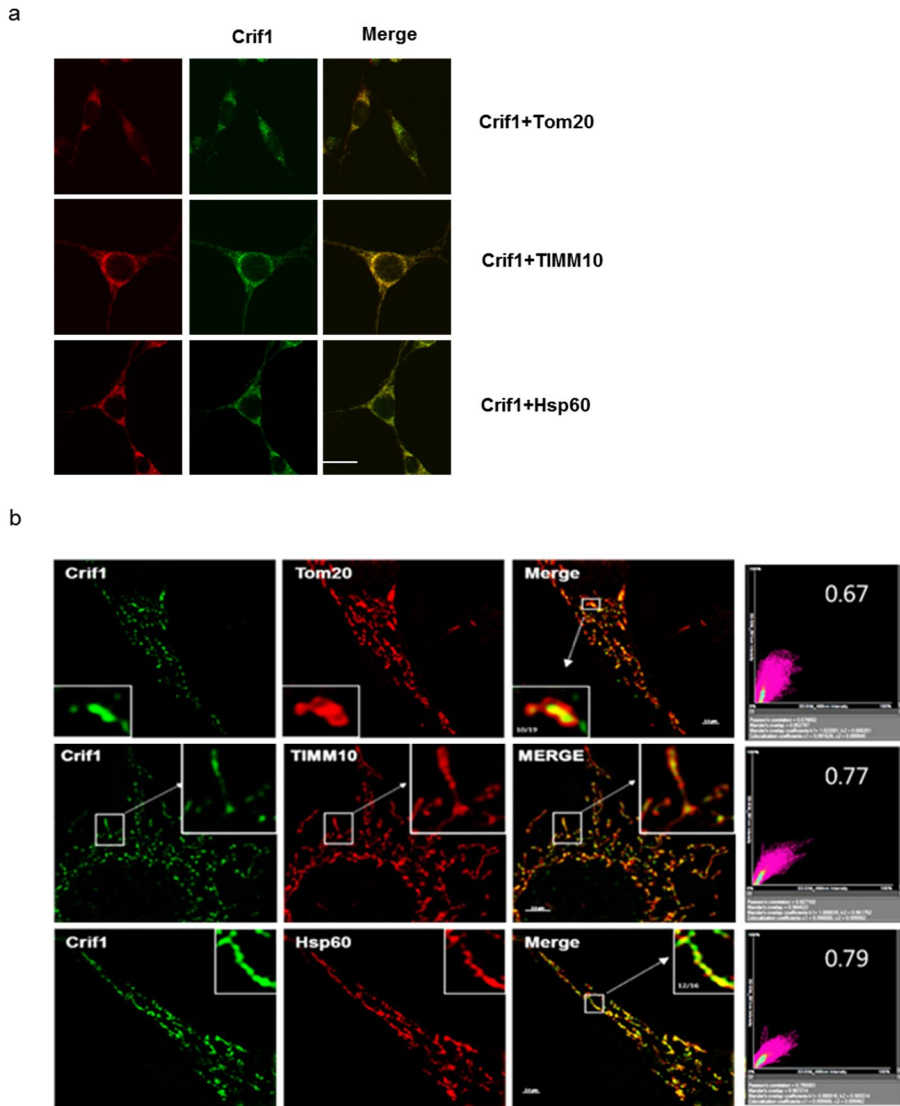


그림 16. Crif1 단백질의 미토콘드리아 내 위치 관찰

(A) TOM20, TIMM10, and HSP60의 미토콘드리아 표지자 (각각 외막, 내막, 기질)와 함께, confocal microscope 으로 관찰하여 Crif1의 미토콘드리아 내 위치를 확인

(B) 3D-SIM 관찰을 통해서, Crif1 과 TOM20 (외막), TIMM10 (내막), HSP60 (기질) 간의 위치를 확인함, 가장 오른쪽 패널에 나타난 수치는

피어슨 상관계수 값을 나타냄, Crif1 이 미토콘드리아 내막에 삽입되어  
있고 기질 쪽을 바라보며 존재함

a

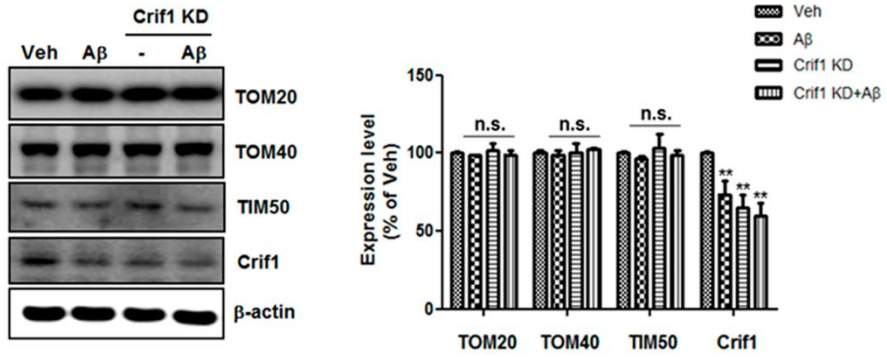


그림 17. Aβ는 다른 미토콘드리아 단백질의 발현에는 아무런 영향을 미치지 않음을 확인

(A) TOM20, TOM40, TIM50 등의 미토콘드리아 외막과 내막 단백질들은 Aβ나 Crif1 KD에 의해 감소되지 않음, \*\* p < 0.01 (vehicle 처리한 control siRNA 형질 주입 그룹 기준)

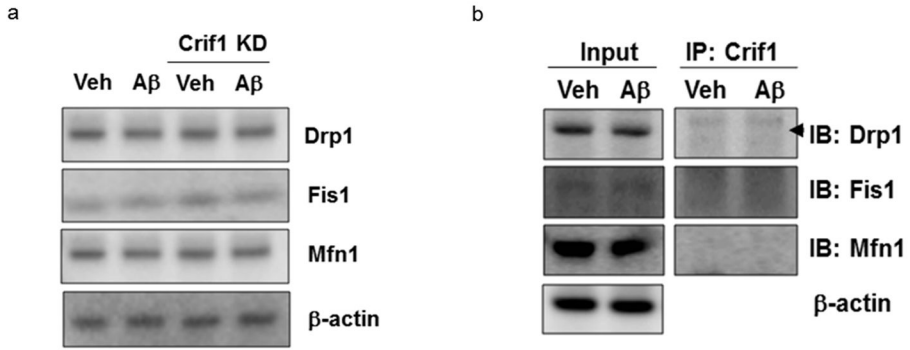
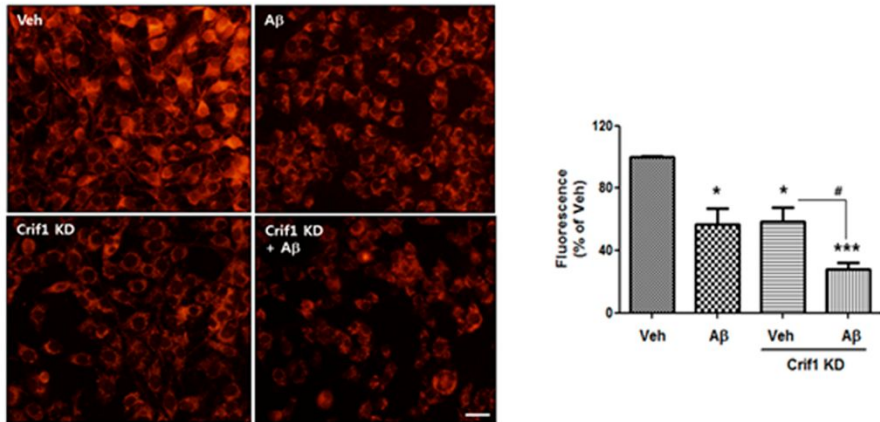


그림 18. Crif1 은 미토콘드리아 분열/융합에 관련하는 단백질에 아무런 영향이 없음을 확인

(A) Drp1, Fis1, Mfn1 등의 미토콘드리아 분열/융합 관련 단백질은 A $\beta$ 나 Crif1 KD 에 의해 감소되지 않음

(B) Drp1, Fis1, Mfn1 등의 미토콘드리아 분열/융합 관련 단백질은 Crif1 과 결합하지 않음

a



b

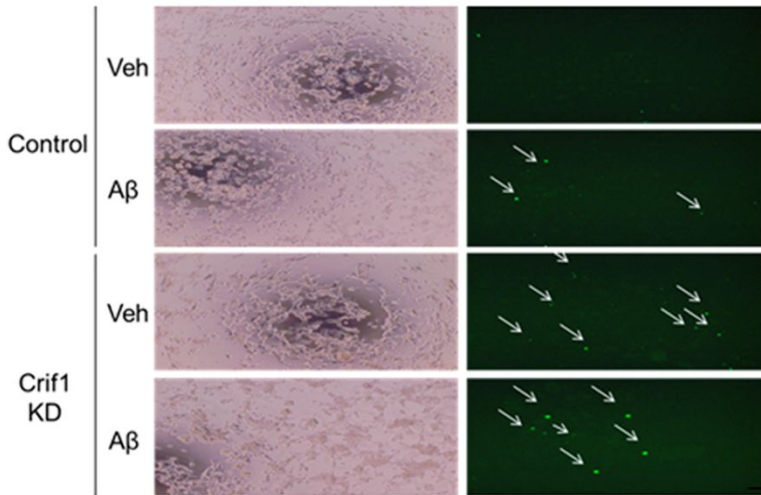


그림 19. Crif1 KD 이 미토콘드리아 막전위, ROS 에 미치는 영향

(A) TMRM 실험에서 얻은 결과, 붉은색 형광신호가 밝고 강할수록 mitochondria 의 막전위가 잘 유지되고 있는 것을 나타냄, (스케일바는 20  $\mu\text{m}$ ), \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (vehicle 처리한 control siRNA 형질 주입 그룹 기준); #  $p < 0.05$  (vehicle 처리한 Crif1 siRNA 형질 주입 그룹 기준)

(B) DCFDA 염색을 통해 측정된 ROS, 초록 형광신호가 ROS 이고,  
화살표로 표시된 부분임

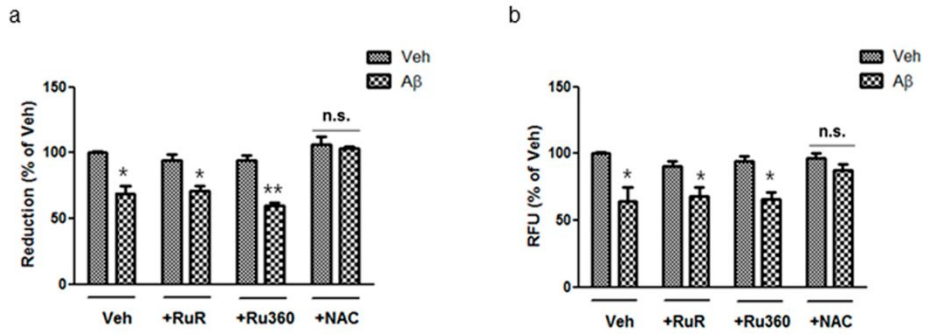


그림 20. Aβ에 의한 세포사는 칼슘이온이 아닌 ROS 생성에 의한 것임을 확인

(A) Ruthenium Red (RuR; 5 μM, MCU (mitochondrial calcium uniporter) 비특이적 저해제), Ru360 (10 μM, MCU 특이적 저해제), NAC (1 mM)을 Aβ 처리 한 시간 전에 선처리를 하고, 24시간 배양한 뒤, MTT (a)와 Calcein-AM (B) 을 측정함, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 (vehicle 처리 그룹 기준); n.s. 는 유의한 차이가 없음

	<b>Age</b>	<b>Sex</b>	<b>PMI</b>	<b>Braak score</b>
<b>Control 1</b>	61	Male	22.75	
<b>Control 2</b>	84	Male	26.75	
<b>Control 3</b>	64	Male	14.33	
<b>Control 4</b>	78	Male	19.18	
<b>Control 5</b>	76	Male	23.92	
<b>AD 1</b>	78	Male	22.48	VI
<b>AD 2</b>	61	Male	22.75	VI
<b>AD 3</b>	64	Male	14.92	VI
<b>AD 4</b>	84	Male	23.08	V
<b>AD 5</b>	76	Male	23.66	V
<b>AD 6</b>	66	Male	15.02	V

표 1. 인간 뇌조직 샘플 정보 (PMI: Postmortem interval)



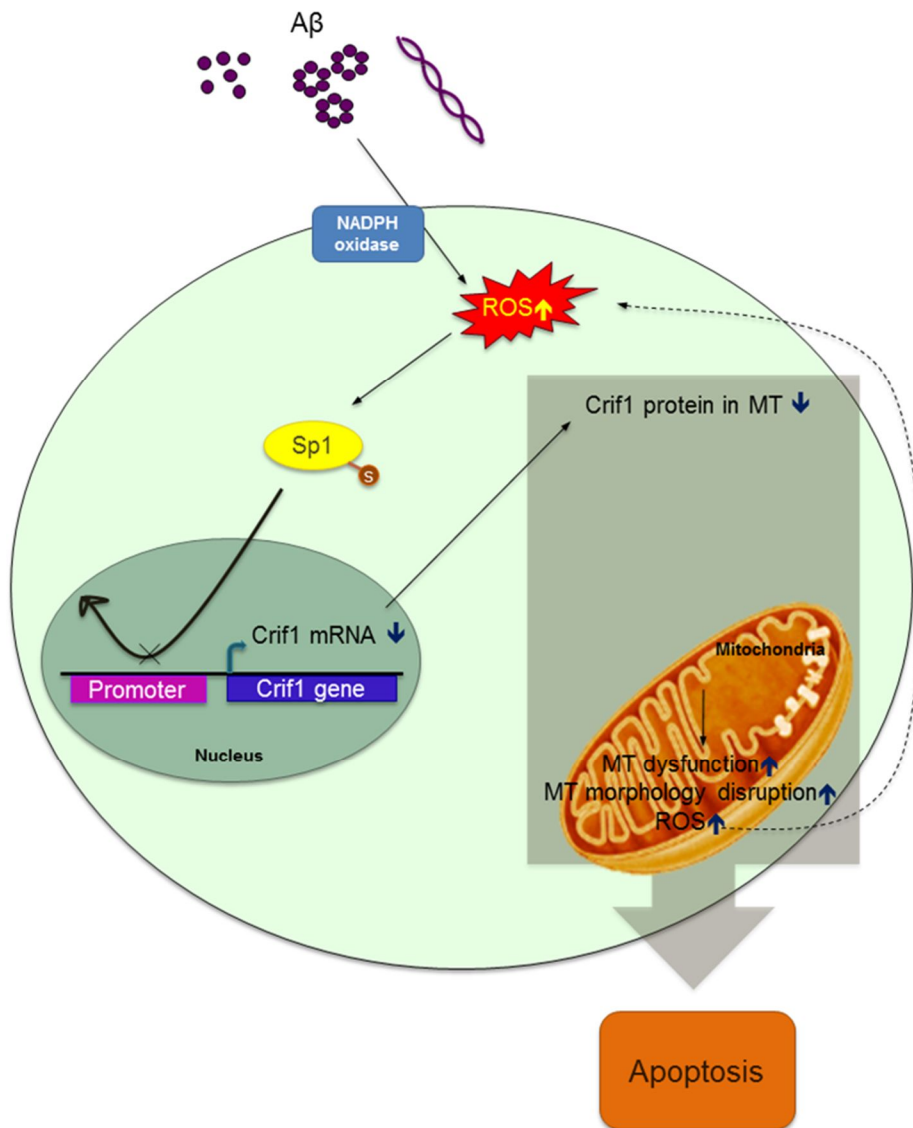


그림 21. Crif1 연구의 메커니즘 모식도

Aβ에 의해 NADPH oxidase가 활성화되어 ROS 생성을 증가시키고, Sp1의 SUMOylation이 증가한다. 이는 Sp1의 전사활성을 감소시켜 *Crif1* 유전자의 전사량과 Crif1 단백질 발현량이 감소한다. 이에 의해, 미토콘드리아의 과분열, 구조적 망가짐과 그에 따른 기능 이상을 초래하게 되고, 이것은 곧 알츠하이머병 환자의 뇌에서처럼 신경 세포사를 유도하게

된다. 한편, 망가진 미토콘드리아에 의해 ROS 생성이 더욱 증가되므로, Sp1의 SUMOylation이 더욱 증가하고, Crif1 감소에 의한 미토콘드리아 망가짐이 일어나게 되어 세포사가 더욱 증가하는 과정이 반복되어 결국 알츠하이머병의 병증을 가속화 시키게 된다.

## Part 2. Tsp1에 의한 알츠하이머병에서의 미토콘드리아 기능 이상 회복 연구

### 1. Tsp1이 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 과도한 분열을 저해함을 확인

Tsp1 (500 ng/ml) 을 한 시간 선처리 한 뒤, vehicle이나 A $\beta$  (1  $\mu$ M, 24시간) 를 HT22 세포에 처리하고 미토콘드리아 모양을 confocal microscope으로 관찰해 본 결과, Tsp1과 A $\beta$ 를 함께 처리해 준 그룹에서는 A $\beta$ 를 단독으로 처리한 그룹에 비해서 미토콘드리아의 길이와 모양이 정상의 건강한 기준으로 회복되었다 (그림 22A). 전자현미경으로 다시 관찰 하였을 때, A $\beta$ 에 의해 미토콘드리아 분열이 과도하게 일어나 길이가 짧아지고 둥근 모양이 관찰된 반면, Tsp1과 함께 A $\beta$ 를 처리시에는 다시 길쭉한 모양의 건강한 미토콘드리아 모양을 관찰하였다 (그림 22B). 또한, 미토콘드리아의 길이가 유의하게 회복되었고 한 세포당 손상된 미토콘드리아의 개수도 현저히 감소하였으며, 한 세포당 전체 미토콘드리아 개수는 A $\beta$  처리시에 증가되었다가 Tsp1을 함께 처리시에는 정상 수치를 회복하였다. 이를 통해서, Tsp1이 A $\beta$ 에

의한 미토콘드리아의 과도한 분열과 구조적 망가짐을 저해함을 확인하였다.

## **2. Tsp1이 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아 기능 이상을 저해함을 확인**

DCFDA와 MitoSOX 염색실험을 통해서, A $\beta$ 에 의한 ROS 생성이 증가되고 Tsp1과 A $\beta$ 를 함께 처리시에는 전체 ROS와 미토콘드리아 내부의 ROS가 모두 감소되는 것을 확인하였다 (그림 23A,B). 나아가, seahorse assay를 통해서 미토콘드리아의 전자전달계를 이용한 호흡에 필요한 산소 소모량을 실시간으로 측정해 미토콘드리아의 기능을 측정해 보았을 때, A $\beta$ 에 의해 급격히 감소했던 산소 소모량이 Tsp1과 함께 처리시에는 정상보다는 낮지만 부분적으로 회복됨을 확인함으로써 (그림 23C), Tsp1이 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아 모양과 구조의 망가짐 뿐만 아니라 기능 이상도 부분적으로 회복시킴을 알 수 있었다.

## **3. Tsp1이 A $\beta$ 에 의한 신경 세포사를 저해함을 확인**

미토콘드리아의 기능 이상은 곧 계획된 세포사로 이어지므로, Tsp1에 의한 보호 효과가 세포의 활성화에도 영향을 미치는지

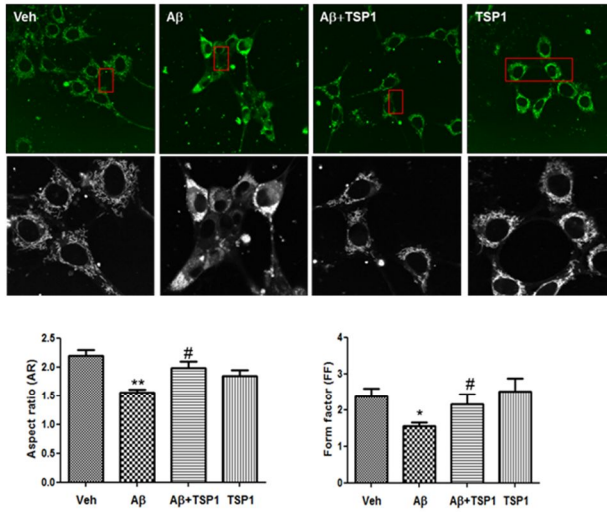
알아보고자 하였다. A $\beta$ 에 의해 감소했던 세포 활성이 Tsp1과 A $\beta$ 를 함께 처리시에는 유의하게 회복됨을 MTT (그림 24A), Calcein-AM (그림 24B) 실험을 통해 확인하였다. 나아가 TUNEL 실험을 통해서, A $\beta$ 에 의해 증가했던 DNA 절단 정도가 Tsp1과 A $\beta$ 를 함께 처리시에는 회복됨을 관찰함으로써 (그림 24C), Tsp1의 미토콘드리아 보호 효과가 세포의 활성을 높이고 세포사를 저해함을 확인 하였다.

#### 4. Tsp1이 A $\beta$ 에 의한 calcineurin 활성화와 p-Drp1 단백질의 감소를 저해함을 확인

다음으로 어떻게 Tsp1이 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 과분열 현상을 저해할 수 있는지 그 메커니즘에 대해 살펴보고자 하였다. A $\beta$ 에 의한 세포 내부의 칼슘이온의 증가, 그로 인한 calcineurin의 활성화에 의해 p-Drp1의 양이 감소하고 미토콘드리아로 이동하는 Drp1의 양은 상대적으로 증가해 미토콘드리아의 과분열 현상이 일어난다는 선행 보고가 있다 (31). 그러므로, 본 연구에서는 Tsp1에 의해서 미토콘드리아의 과분열 현상이 저해되는 것이 calcineurin의 활성화를 저해하기 때문일 것이라는 가설을 세우게

되었다. 처음으로, fluo-4 실험을 통해서 세포 내 칼슘 양을 측정해 보았을 때, Tsp1이 A $\beta$ 에 의한 칼슘의 증가를 저해하지 못하는 경향성을 확인하였다 (그림 25A). 하지만 웨스턴 블롯팅 실험을 통해서 A $\beta$ 에 의한 calcineurin 활성화가 Tsp1에 의해 유의하게 저해되는 것을 보아 (그림 25B), Tsp1이 칼슘 이온의 증가와 calcineurin 활성화 사이의 단계를 저해함을 알 수 있었다. 한편, 다른 미토콘드리아 분열/융합 관련 단백질에 Tsp1이 영향을 미칠 수 있을 가능성을 웨스턴 블롯팅 실험으로 확인해본 결과, Mfn1, fis1, OPA1과 같은 다른 분열/융합 단백질에는 큰 영향이 없음을 확인하였다 (그림 25C), 하지만 p-Drp1의 양이 A $\beta$  처리에 의해 감소하고 이것이 Tsp1에 의해 다시 회복되는 것을 확인함으로써 A $\beta$ 를 처리한 조건에서 calcineurin의 특이적 표적이 p-Drp1임을 확인하였다 (그림 25C). 이를 통해, Tsp1이 A $\beta$ 에 의한 calcineurin 활성화와 p-Drp1 단백질의 감소를 저해함으로써 미토콘드리아에 보호 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

a.



b.

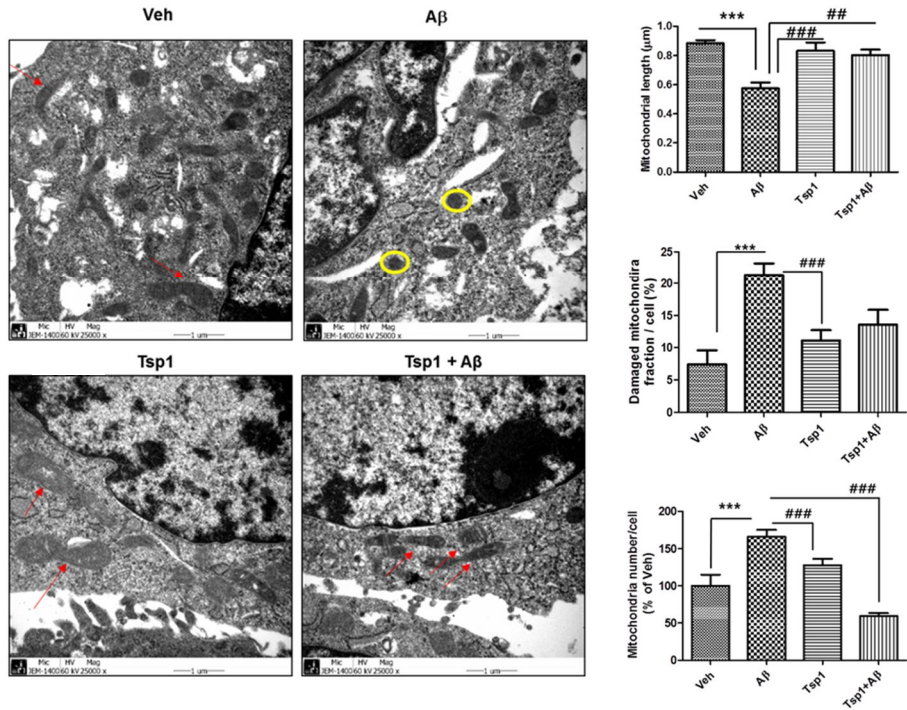


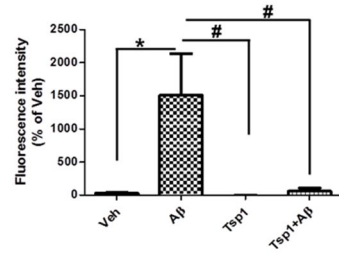
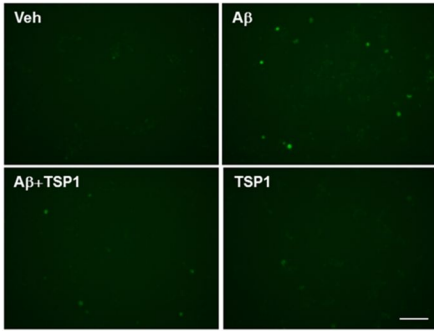
그림 22. Tsp1 이 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아 과도한 분열을 저해함을 확인  
 (A) HT22 세포에, Tsp1(500 ng/mL)을 한 시간 선처리 한 뒤, A $\beta$  (1 $\mu$ M)를 함께 24 시간동안 처리하고 image J 프로그램을 이용해

분석해본 결과, 미토콘드리아의 길이 (Aspect Ratio)와 모양 (Form Factor)이 모두 정상 수준으로 회복됨, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (vehicle 처리 그룹 기준); #  $p < 0.05$  ( $A\beta$  처리 그룹 기준)

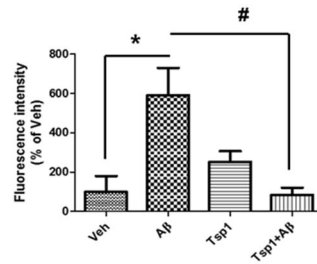
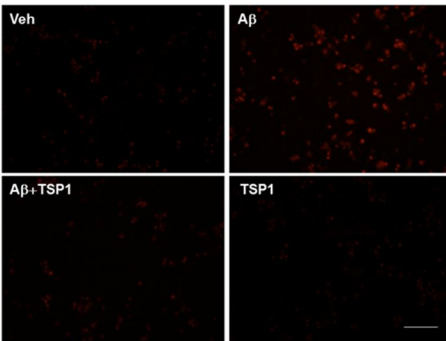
(B) (A)에서와 동일한 그룹에서 미토콘드리아 모양을 전자현미경 관찰함,  $A\beta$ 에 의해 짧아진 미토콘드리아 길이가 회복되고, 세포 하나당 망가진 미토콘드리아의 비율이 회복됨, 세포 하나당 미토콘드리아의 개수가  $A\beta$ 에 의해 증가되고 Tsp1 과  $A\beta$ 를 함께 처리시에 정상 수준으로 회복됨, \*\*\*  $p < 0.001$  (vehicle 처리 그룹 기준); ###  $p < 0.001$  ( $A\beta$  처리 그룹 기준)



a.



b.



c.

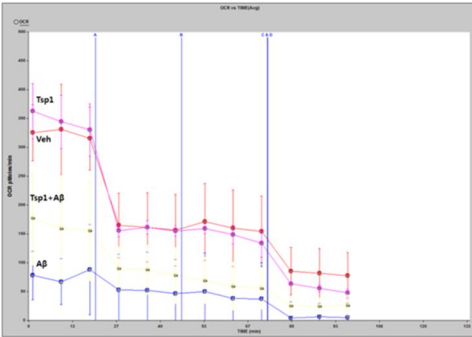


그림 23. Tsp1 이 Aβ에 의한 미토콘드리아 기능 이상을 회복시킴을 확인 (A-B) HT22 세포에, Tsp1 을 한 시간 선처리 한 뒤, Aβ (1 μM) 를 함께 24 시간 동안 처리한 후 DCFDA (그림 A) 와 MitoSOX (그림 B) 염색을 통해 Tsp1 이 Aβ에 의한 세포 전체 ROS 와 미토콘드리아 내

ROS 의 증가를 저해함을 확인함, \*  $p < 0.05$  (vehicle 처리 그룹 기준); #  
 $p < 0.05$  ( $A\beta$  처리 그룹 기준)

(C) Seahorse XF analyzer 로 미토콘드리아의 산소 소모량을 측정,  $A\beta$ 에 의해 감소된 산소 소모량을 Tsp1 이 부분적으로 회복시킴.

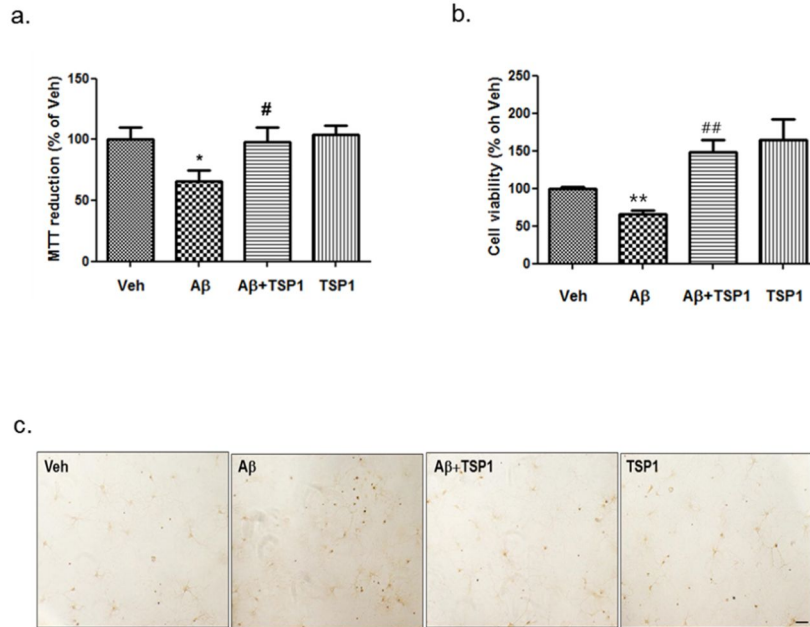


그림 24. Tsp1 이 Aβ에 의한 신경세포 사멸을 회복시킴을 확인

(A-B) HT22 세포에, Tsp1 을 한 시간 선처리 한 뒤, Aβ (1 μM) 를 함께 24 시간동안 처리함, MTT (A)와 Calcein-AM (B) 실험을 통해 Tsp1 이 Aβ에 의한 세포 사멸 증가를 저해함을 확인, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 (vehicle 처리 그룹 기준); # p < 0.05, ## p < 0.01 (Aβ 처리 그룹 기준)

(C) TUNEL 염색 실험을 통해, Aβ에 의해 증가된 세포사멸을 Tsp1 이 회복시키는 것을 육안으로 확인 가능 하였음

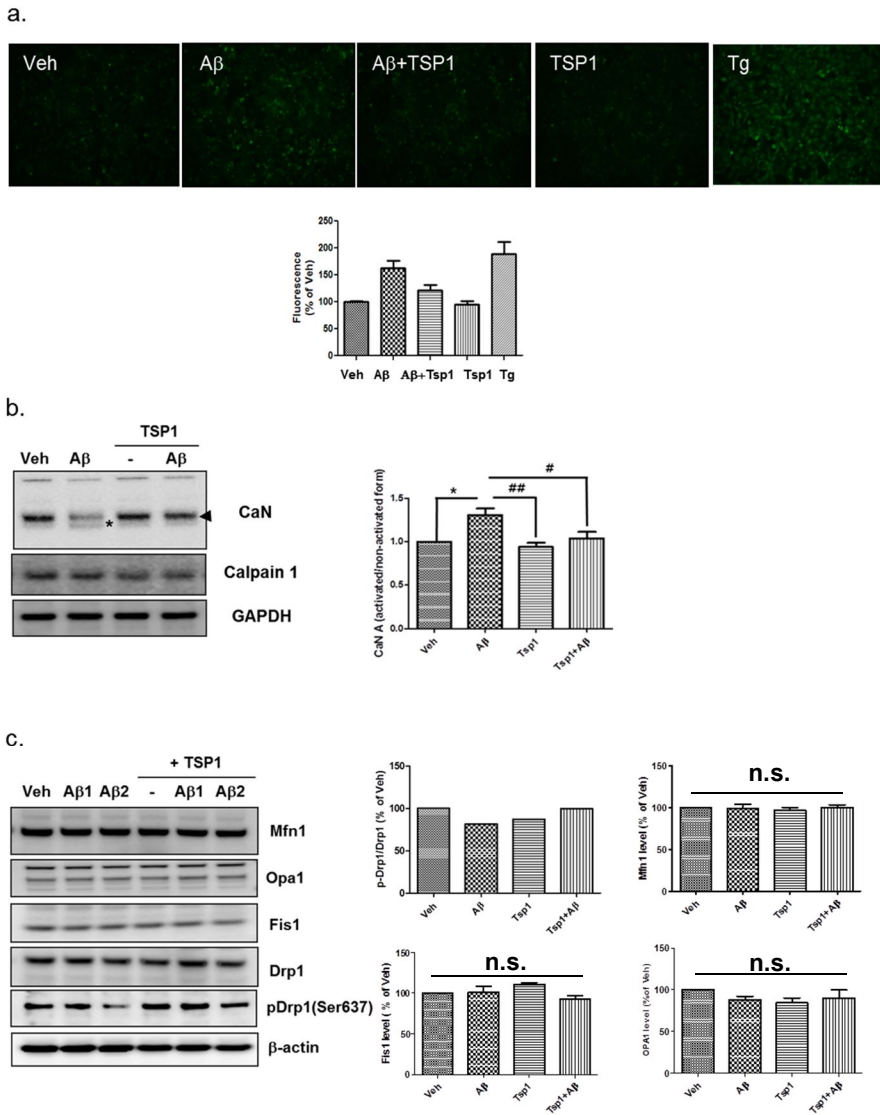


그림 25. Tsp1 이 calcineurin 의 활성화와 p-Drp1 단백질 감소를 저해함을 확인

(A) HT22 세포에, Tsp1 을 한 시간 선처리 한 뒤, Aβ (1 μM) 를 함께 24 시간동안 처리한 뒤 fluo-4 염색시, 세포 내 칼슘 이온 증가 경향성은

그대로 유지되므로 Tsp1 이 A $\beta$ 에 의한 세포 내 칼슘 이온 증가는  
저해하지 못함

(B) A $\beta$ 에 의한 calcineurin 활성화는 Tsp1 처리에 의해 저해됨을 확인, \*:  
활성화되어 잘려진 calcineurin 단백질을 나타내는 밴드, \*  $p < 0.05$   
(vehicle 처리 그룹 기준); #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  (A $\beta$  처리 그룹 기준)

(C) 미토콘드리아 분열/융합에 관련된 단백질은 A $\beta$ 나 Tsp1 처리에  
의해서 그 양에 변화가 없지만, p-Drp1 에 대한 Drp-1 의 비율은 A $\beta$ 에  
의해 감소하고 Tsp1 과 A $\beta$ 를 함께 처리할 시에 회복됨

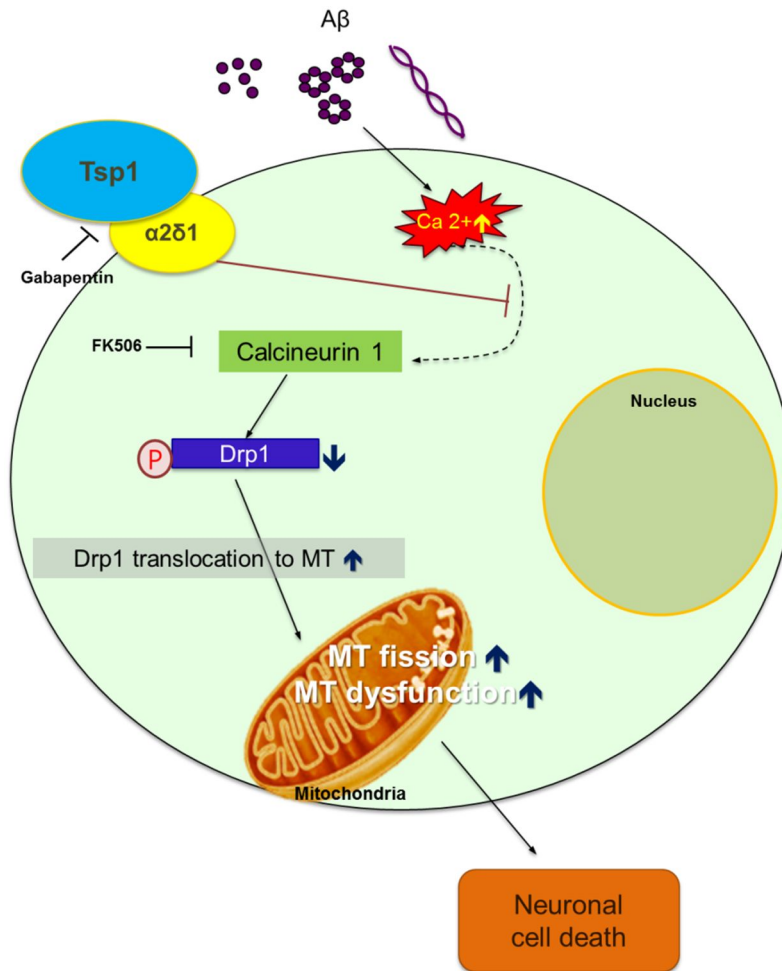


그림 26. Tsp1의 보호 효과에 관한 기전을 그린 모식도

Aβ에 의해 세포내부 칼슘이온이 증가하면, calcineurin 이 활성화되어 p-Drp1 의 인산기를 떼어내고, 미토콘드리아로의 Drp1 단백질 이동량이 증가해서 미토콘드리아 과분열을 유도, 이에 따른 미토콘드리아의 기능 이상과 세포사멸을 유도하게 된다. 이 때, Tsp1 은 신경세포에 많이 존재하는 α2δ1 수용체를 통해서 세포 내 증가된 칼슘 이온에 의해 활성화 되는 calcineurin 단백질의 증가를 막게 될 가능성이 있고, 이에 따라

calcineurin 이 p-Drp1 에 대한 Drp1 의 비율을 낮추는 것을 막아 A $\beta$ 에 대해 보호 효과를 내게 된다.

## Part 3. Metformin에 의한 A $\beta$ 생성 증가 메커니즘에 대한 연구

### 1. 5XFAD 쥐의 뇌에서 metformin의 A $\beta$ 플라크 형성 증가와 A $\beta_{42}$ 생성 증가 효과

Metformin은 A $\beta$ 를 증가시키는 것으로 알려졌으므로 (12), 알츠하이머병 동물모델에서 metformin을 주사하고 A $\beta$  양을 측정하고자 하였다. 생후 2개월부터 A $\beta$  플라크가 축적된다고 알려진, 3.5개월 된 5XFAD 알츠하이머병 모델 쥐에 복강 내 주사로 metformin (200 mg/kg•day) 을 9일간 매일 주사하였다 (그룹당 7마리). 바이오틴-4G8으로 염색된 5XFAD의 전두엽에서, metformin을 주사 받은 그룹이 vehicle 주사를 받은 그룹에 비해 A $\beta$  플라크의 양이 증가되었고, 면적당 차지하는 형광 신호의 비율도 큼을 확인했다 (그림 27A, B). 또, ELISA를 통해서 A $\beta_{42}$ 의 양을 쥐의 전체 뇌에서 측정하였을 때, metformin을 주사 받은 그룹에서 formic acid- 또는 detergent-soluble A $\beta_{42}$  모두 1.5배 정도 증가하였음을 알 수 있었다 (그림 27C, D). 이를 통해, metformin이 5XFAD 쥐의 전두엽에서 A $\beta$  플라크를 증가시킬 뿐



아니라, 전체 뇌에서도  $A\beta_{42}$ 를 증가시킴을 알 수 있었다.

## 2. Metformin이 SH-SY5Y 세포에서 베타-, 감마-시크리테아제의 활성을 증가시켜 $A\beta$ 를 증가시킴을 확인

Metformin에 의한  $A\beta$  증가가 APP의 amyloidogenic processing 조절에 의한 것인지를 확인하기 위해, metformin을 SH-SY5Y세포에 처리하였다. 이 그룹에서  $A\beta$ 가 증가하였고 (그림 28A), 베타-시크리테아제의 프로모터 활성도 증가 되어 있음을 알 수 있었다 (그림 28B). 베타 잘림에 의해 생성되는 sAPP $\beta$ 의 양도 증가되었는데 (그림 28C), 이를 통해 metformin이 베타-시크리테아제의 활성 증가와 그에 따른 APP의 베타 잘림을 증가시킴을 알 수 있었다. 또한, 감마-시크리테아제의 활성에 대한 효과를 알아보기 위해서 기질이 되는 펩타이드를 넣어주고 그것의 절단되는 정도를 측정하는 실험과 루시퍼레이즈 리포터 실험을 진행한 결과 (그림 28D, E), metformin이 베타-시크리테아제 뿐만 아니라 감마-시크리테아제의 활성도 증가시키는 것을 처음으로 밝혀냈다. 한편, 전체 APP의 양은 일정하게 유지되는 반면, APP-CTF의 양은 감소하는 경향이 보이므로 metformin이 APP의

amyloidogenic processing을 증가시킴으로써  $A\beta$ 의 양을 증가시킴을 알 수 있었다 (그림 28F). 다음으로, metformin이 감마-시크리테아제의 구성 성분의 양을 변화시킴으로써 이러한 활성 증가를 야기하는 것인지 알아보기 위해, metformin을 처리한 그룹에서 웨스턴 블롯팅을 하여 감마-시크리테아제의 구성 요소 (Nicastrin, APH-1, PS1, Pen-2) 들의 단백질양을 관찰해보았지만, 아무런 변화도 관찰되지 않았다 (그림 28G). 위 결과를 통해, metformin이 베타-, 감마-시크리테아제의 활성을 증가시켜  $A\beta$ 를 증가시킴을 알 수 있었다.

### 3. Metformin이 SH-SY5Y세포에서 autophagosome을 축적시킴을 확인

Metformin에 의한 autophagic vacuole (AV)의 증가가 보고된 바 있고 (32), AV는 잘 알려진  $A\beta$  생성장소 이므로 (33), metformin에 의한  $A\beta$  증가가 autophagy 유도에 의한 것인지 알고자 하였다. 처음으로, Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) I 과 II의 양을 웨스턴 블롯팅으로 측정했을 때, metformin을 처리한 그룹에서 LC3 II의 양이

증가하지만, 3MA와 metformin을 함께 처리시에는 이러한 증가가 보이지 않음으로써, metformin에 의해서 autophagy 유도가 증가됨을 알 수 있었다 (그림 29A). 또한 전자현미경으로 관찰 시에, autophagosome이 metformin을 처리한 그룹의 세포 내부에 축적되어 있음을 확인했다 (그림 29B). 이를 통해서, metformin이 autophagy 활성을 증가시켜 세포 내부에 autophagosome을 축적시킴을 확인 하였다.

#### 4. Metformin에 의한 autophagosome 증가는 AMPK 신호전달 경로에 의존적임을 규명

선행 연구에서 metformin에 의한  $A\beta$  증가가 AMPK 활성화에 의존한다는 보고가 있었으므로 (12). 이 가설을 검증하기 위해서 AMPK저해제인 Compound C (CC) 를 metformin과 함께 처리한 뒤 이것의 하위 단계에 위치하는 autophagosome의 축적,  $A\beta$  생성에 관여하는 베타-, 감마-시크리테아제의 활성 증가,  $A\beta$  생성 증가 경향성이 어떻게 달라지는지를 보았다. CC와 metformin을 함께 처리시, AMPK 활성화는 증가 하지 않았고, 3MA와 metformin을 함께 처리하였을 때는 AMPK 활성이 증가하였다.

이를 통해 AMPK가 autophagosome 축적의 상위단계에 존재함을 확인할 수 있었다 (그림 30A). 또한 본인의 가설과 일치하게, CC와 metformin을 함께 처리시에 sAPP $\beta$  증가, 감마-시크리테아제의 활성 증가, A $\beta$ 의 증가와 같은 metformin의 하위 단계에서 보여지는 효과가 모두 억제되는 것을 확인 하였다 (그림 30B-D). 이를 통해서 metformin에 의한 autophagy 및 autophagosome 증가는 AMPK활성에 의존적임을 알 수 있었다. 다음으로, 이러한 autophagosome 내부가 A $\beta$  생성을 위한 장소가 될 수 있는지를 확인해 보았다. 세포에서 autophagosome과 lysosome이 포함된 microsome으로 구성된 분획을 얻어내 vehicle과 metformin 처리군을 비교해 보았을 때, metformin을 처리시에 유의하게 APP, BACE1, Nicastrin의 단백질들의 양이 증가되어 있었고 PS-1도 증가하는 경향성을 관찰하였다 (그림 30E). 또한 BACE1은 세포의 전체 분획에서도 증가되어, metformin에 의해서 효소의 활성도 증가 뿐만 아니라 그 단백질 발현 자체가 증가되어 있음을 알 수 있었다 (그림 30E). 이를 통해 metformin에 의한 autophagosome의 축적이 A $\beta$  생성을 증가시키는 데 기여할 수

있음을 확인하였다.

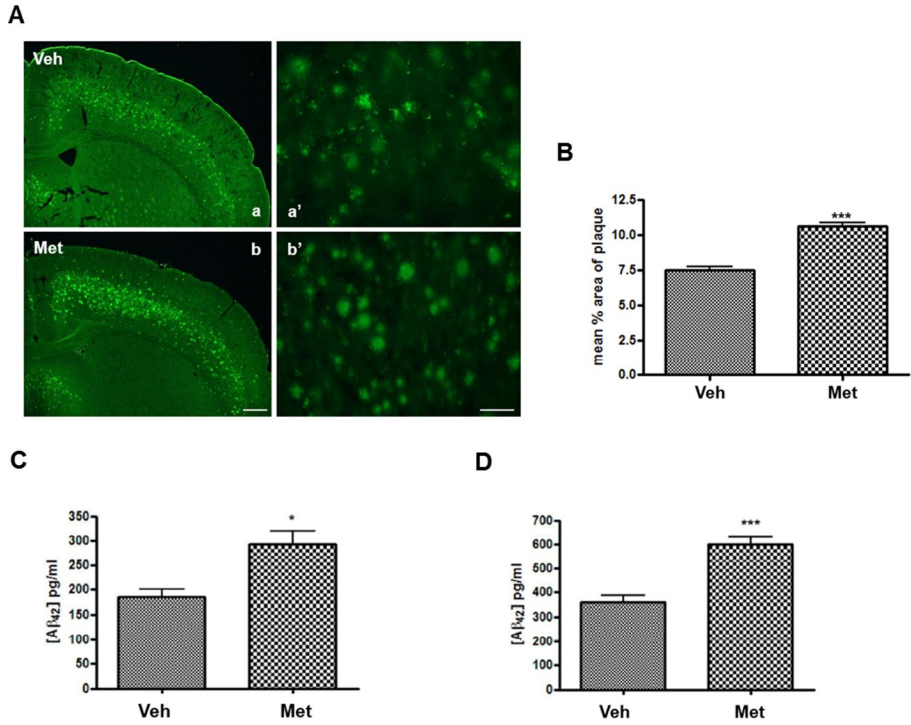


그림 27. Metformin 이 알츠하이머병 모델 마우스의 뇌에서 Aβ 플라크와 Aβ<sub>42</sub>를 증가시킴을 확인

(A) 3.5 개월 암컷 5XFAD 쥐의 복강에 metformin 을 9 일 연속 주사한 뒤, 9 일째에 쥐에서 뇌를 분리해, 대뇌 피질을 section 하여 바이오틴-4G8 으로 염색함 (스케일바는 400 μm(왼쪽), 32 μm(오른쪽)을 나타냄)

(B) (A)를 정량화함, Metformin을 복강 내 투여 받은 쥐의 전두엽에서 Aβ 플라크가 증가함, \*\*\* p < 0.001 (vehicle 처리 그룹 기준)

(C-D) Aβ<sub>42</sub> ELISA 분석을 통해서 formic acid에 녹는 (C), 계면활성제에 녹는 (D) Aβ<sub>42</sub>의 양을 측정함, \* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001 (vehicle 처리 그룹 기준)

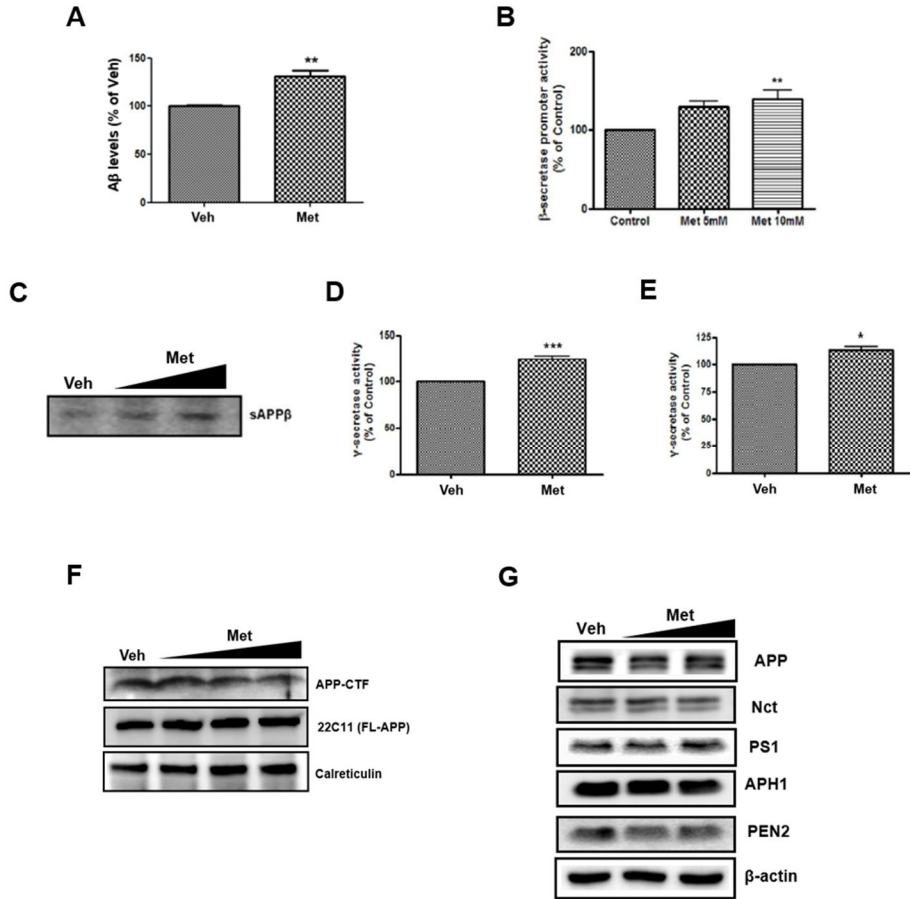


그림 28. Metformin 이 SH-SY5Y 세포에서 APP 의 베타-, 감마-시크리테아제에 의한 잘림을 증가시킴을 확인

(A) Metformin 에 의해 A $\beta$ 의 양이 증가함, \*\* p < 0.01 (vehicle 처리 그룹 기준)

(B) 베타-시크리테아제 프로모터의 활성이 metformin 에 의해 증가함

(C) sAPP $\beta$ 가 metformin의 농도에 의존적으로 증가함

(D-E) Metformin이 감마-시크리테아제의 활성을 유의하게 증가시킴을 peptide cleavage 실험을 통해서 확인하고 (D), luciferase 실험을 통해서

(E) 다시 한 번 확인함, \* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001 (vehicle 처리 그룹

기준)

(F) Metformin에 의해서 APP-CTF는 감소하는 경향성을 보이고, 전체 APP 양은 변화하지 않음

(G) Metformin은 APP와 감마-시크리테아제의 구성 요소들의 양을 변화시키지 않음



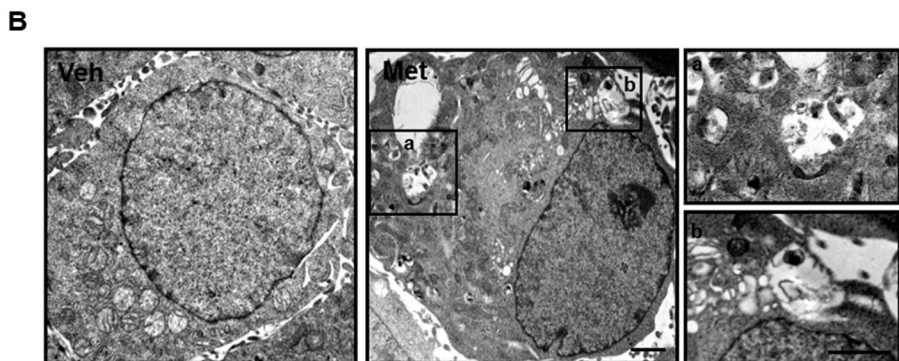
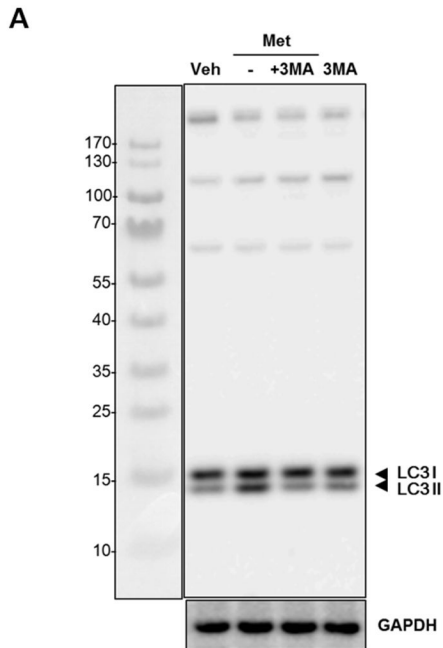


그림 29. Metformin 이 autophagosome 을 축적시킴을 확인

(A) LC3-II의 양이 metformin 에 의해 증가되고, autophagy 저해제인 3MA 를 함께 처리시에 회복됨

(B) 전자 현미경 관찰을 통해 metformin 을 처리한 세포에서 vehicle 처리한 세포에 비해서 내부에 autophagosome 이 축적되어 있음을 확인 (중간), a 또는 b 로 표시된 사각형 안쪽 지역을 확대하여 autophagosome 을 자세히 확인함 (맨 오른쪽)

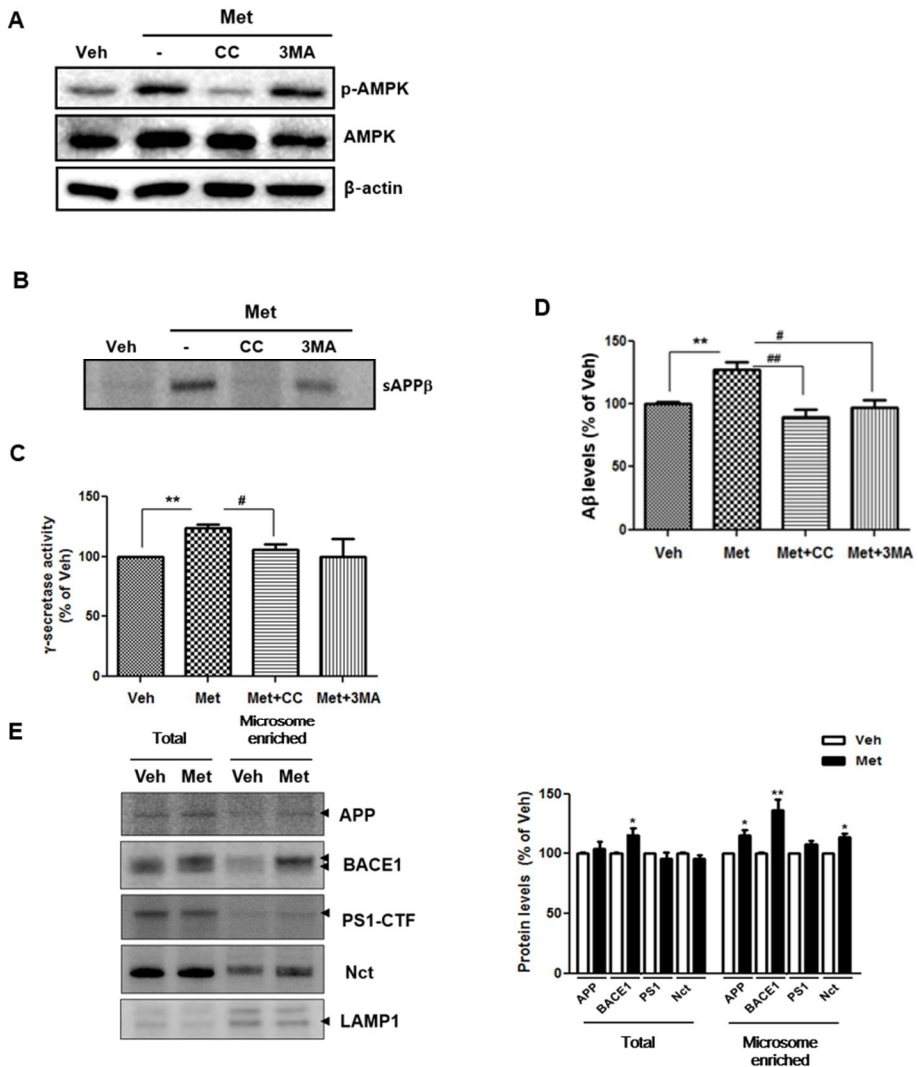


그림 30. Metformin 에 의한 autophagosome 증가는 AMPK 신호 경로에 의존함을 확인

(A) Metformin 은 AMPK 의 phosphorylation 을 증가시켜 AMPK 신호 전달 경로를 활성화 시키며, AMPK 특이적 저해제인 Compound C (CC)나 autophagy 저해제인 3MA 처리시 AMPK 활성이 저해됨

(B) sAPPβ의 양이 metformin 에 의해 증가되는 것이 CC 또는 autophagy 저해제인 3MA 를 처리시에는 나타나지 않음

(C) 감마-시크리테아제의 활성을 peptide cleavage assay를 통해 확인, metformin 처리시 활성 증가, AMPK 저해제 (CC) 나 autophagy 저해제 (3MA) 처리시 회복, \*\* p < 0.01 (vehicle 처리 그룹 기준); # p < 0.05 (metformin 처리 그룹 기준)

(D) A $\beta$ <sub>40</sub>의 양을 metformin을 처리한 세포에서 CC 또는 autophagy 저해제를 처리하고 확인함, metformin 처리시 증가하나 AMPK 저해제 (CC) 나 autophagy 저해제 (3MA) 처리시 회복됨, \*\* p < 0.01 (vehicle 처리 그룹 기준); # p < 0.05, ## p < 0.01 (metformin 처리 그룹 기준)

(E) APP, BACE1, Nicastrin 의 양이 metformin 에 의해 축적된 autophagosome 이나 lysosome 이 포함된 microsome 으로 구성된 분획에서 vehicle 처리한 그룹에 비해 증가되어 있음, 세포의 전체 분획에서는 metformin 에 의해 BACE1의 양만 증가됨, “microsome enriched”는 autophagosome 과 lysosome 이 포함된 microsome 분획을 뜻함, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 (vehicle 처리 그룹 기준)

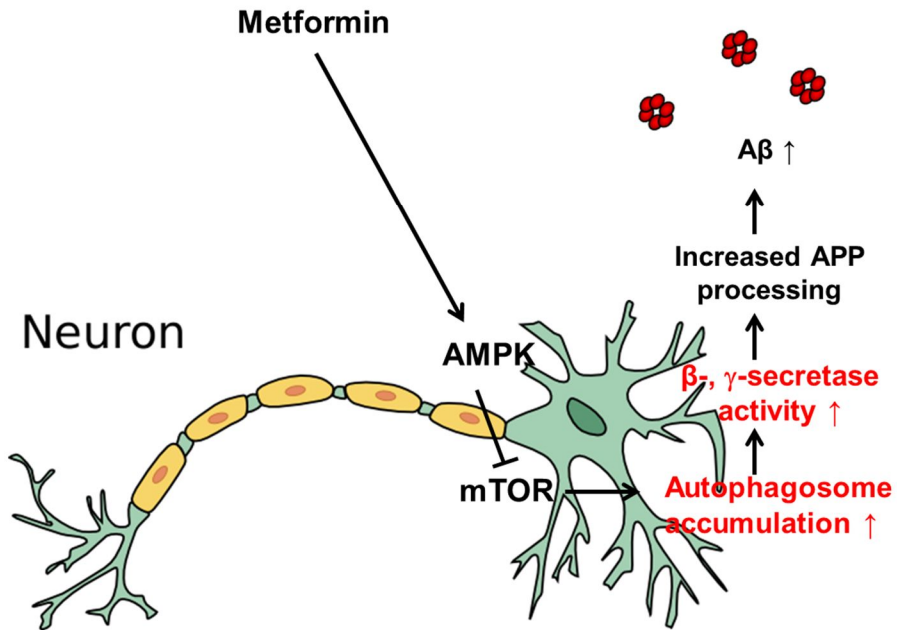


그림 31. Metformin 에 의한  $A\beta$  생성 증가 메커니즘을 나타낸 모식도

제 2형 당뇨병의 1차 치료제로 가장 널리 쓰이는 metformin 은 AMPK 를 활성화 시킴으로써 신경 세포 내 autophagosome 을 축적 시킨다. Autophagosome 의 내부는 베타-, 감마- 시크리테아제의 활성을 높이는 한편, APP 가 국소적으로 밀집되어 있어서 amyloidogenic APP processing 을 촉진시키게 되고 결과적으로  $A\beta$ 의 생성 증가에 기여한다.

## 고 찰

알츠하이머병은 뇌에서 신경세포의 사멸이 일어나 인지기능에 장애를 겪게 되는 대표적인 퇴행성 신경질환이다 (2). 알츠하이머병의 병인 기전과 치료에 대한 뚜렷한 해결책이 없는 가운데 많은 과학자들은 원인물질로 알려진  $A\beta$ 의 신경세포 독성에 관해 많은 연구를 진행해 왔다. 이 물질은 칼슘이온의 증가, 활성 산소의 증가, 염증 반응의 증가, 미토콘드리아의 망가짐 등을 야기해 질환을 악화시키는 것으로 알려져 있다 (2, 4, 34). 이에 이번 연구에서는 특히,  $A\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 망가짐에 대한 기전에 대해서 다각도에서 접근해보았다. 미토콘드리아는 세포 내에서 에너지를 생산하고 세포 사멸을 조절하는 직접적인 소기관이므로 세포의 생존에 매우 중요한 역할을 한다 (4, 7). 하지만 현재까지 어떻게  $A\beta$ 가 미토콘드리아의 기능을 망가뜨리는지 정확한 기전이 밝혀져 있지 않아 그것을 이 연구의 Part 1 과 Part 2 에서 밝히고자 하였다.

Part 3에서는 제 2형 당뇨병의 치료제인 metformin의 알츠하이머병에서의 효과를 연구하였다. 알츠하이머병은 제 3형 당뇨병이라고 불릴 정도로 당뇨병과 알츠하이머병 간의 상관관계가 깊은 것으로 알려져 있다 (8, 35). 그래서 가장 널리 쓰이는 당뇨병 치료제인 metformin은 알츠하이머병 치료제 후보로써도 많은 주목을 받고 있는 한편, 아직까지 그 정확한 효과에 대해서는 논쟁이 많다. 하지만 인지기능의 저하를 가지는 많은 당뇨병 환자에게도 널리 쓰이고 있는 약인 만큼, 그 효과에 대해 신속하고도 정확한 규명이 필요한 시점이다. 이를 위해 Part 3에서는 metformin이 알츠하이머병의 병증에 어떠한 영향을 미치는지 연구하고자 하였다.

## Part 1. 알츠하이머병에서 관찰되는 Crif1 단백질의 감소로 초래되는 미토콘드리아의 기능 저해 연구

많은 선행연구에서, A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 기능 이상을 보고하였지만 아직까지 어떤 메커니즘에 의한 것인지에 대해서는 확실치 않다. 미토콘드리아의 내막에 존재하는 Crif1이라는 단백질은 미토콘드리아의 ribosome에서 번역되어 나오는 전자

전달계의 구성 단백질들을 미토콘드리아의 내막에 삽입되는 것을 도와주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (그림 5) (15). 하지만 Crif1의 발현이 저해된 세포에서 미토콘드리아의 모양이 망가져 있음이 보고가 되었고, 미토콘드리아의 기능 이상에도 관련 되어진 것으로 나타났다 (8). 따라서, 본 연구에서는 알츠하이머병에서 A $\beta$ 에 의해 유도되는 미토콘드리아의 기능 이상이 Crif1 단백질의 부족으로 생기는 결과일 것이라는 가설을 세우게 되었고 이에 연구를 진행함으로써, 알츠하이머병 환자나 동물모델, A $\beta$ 를 처리한 세포 등에서 Crif1 단백질의 발현이 줄어들어 있음을 발견했다 (그림 8, 9, 14, 15) (36).

한편, A $\beta$ 는 세포 내부의 ROS 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있고 (37), Crif1의 전사 인자 중 Sp1은 ROS 증가에 의해 전사인자 활성이 감소되는 것으로 밝혀져 있다 (38). 본 실험에서는, 여러 가지 실험을 통해 A $\beta$ 에 의한 ROS 생성 증가로 Sp1의 전사활성이 감소해 Crif1의 전사량이 감소하여 Crif1 단백질의 양이 줄어들음을 밝혀냈다 (그림 10). NADPH 산화제의 저해제를 처리했을 때는 A $\beta$ 에 의한 Crif1의 감소가 회복되는 것을 확인함으로써, 다시 한번 A $\beta$ -ROS-Sp1-Crif1의 경로를 확인할 수 있었다 (그림 10C) (36). 한편, A $\beta$ 에 의해 활성화된다고 알려진 AP-1이나 NF- $\kappa$ B와 같은 전사인자의 저해제를 처리시에는, A $\beta$ 에 의한 Crif1의 감소를 회복시키지 못함을

확인함으로써 (data는 보여지지 않음), A $\beta$ 가 존재하는 조건에서 *Crif1* 유전자의 전사에 주로 Sp1 전사인자가 관여함을 간접적으로 뒷받침해 낼 수 있었다. 한편, A $\beta$ 는 세포 내 칼슘 이온을 증가시킨다고 알려져 있는데 (39), 이에 의해 *Crif1*의 단백질 양의 변화가 야기되는 것이 아닌지를 확인하기 위해 칼슘 이온을 없애주는 약물을 처리해보았지만, A $\beta$ 에 의한 *Crif1* 감소의 회복은 보이지 않았다 (data는 보여지지 않음), ROS의 증가는 알츠하이머병의 병변 지역과 상관관계가 있는데 (37), ROS에 의해 조절 받는 *Crif1* 단백질의 감소가 병변 지역인 해마나 대뇌피질 부위에서만 관찰되고 비병변 지역인 소뇌에서는 관찰되지 않아, 본 연구의 실험 가설을 뒷받침 해주는 결과로 확인되었다 (그림 8A, B, 14A). 이러한 맥락에서 볼 때, 파킨슨병과 헌팅턴병과 같은 ROS가 증가한다고 알려져 있는 다른 신경퇴행성 질환에서도, *Crif1*에 관한 후속 연구가 필요할 것으로 보인다. *Crif1*을 과발현 시킨 그룹에서 보여진 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 기능 이상 회복의 기작이 A $\beta$ 에 의한 *Crif1*의 감소로 인해 새로 번역된 전자 전달계 단백질들의 folding과 미토콘드리아 내막으로의 삽입이 감소함으로써 전자 전달계를 이루는 단백질의 양이 감소된 것을 *Crif1*이 다시 회복시켜 야기된 것이 아닌지를 확인하고자 하였다. 웨스턴 블롯팅 실험을 통해 complex 4의 구성 요소인 Cox2와 complex 5의 구성 요소인 ATP5A의 발현량을 살펴보았을 때,



A $\beta$ 에 의한 단백질 양의 감소나 Crif1의 과발현에 의한 단백질 양의 변화가 관찰되지 않았다 (data는 보여지지 않음). 그러므로 이러한 Crif1에 의한 미토콘드리아의 기능 회복은 여러 선행 연구 결과들과 마찬가지로 각 complex의 단백질 양에는 변화가 없지만 complex들의 활성화 증가로 나타났을 가능성이 높다고 할 수 있겠다 (40, 41). Crif1을 과발현시킨 세포에서 A $\beta$ 에 의한 ROS증가는 회복되지만, 미토콘드리아 막전위나 ATP 생성에 있어서는 완전한 회복을 보이지 않았다 (그림 12C, D). 이는 A $\beta$ 가 ATP synthase나 cyclophilin D와 결합하여서 미토콘드리아 막전위와 ATP 생성을 저해하는 것으로 알려져 있으므로 (30, 41), Crif1의 과발현 만으로는 미토콘드리아의 막전위나 ATP 생성을 완전히 회복시키지 못했던 것으로 사료된다. 하지만 ROS 증가의 저해만으로도, A $\beta$ 에 의한 세포 활성 감소를 회복시키는 데는 충분했던 것으로 보이기 때문에 (그림 12E, F), Crif1의 미토콘드리아 기능 유지와 세포생존에의 역할은 매우 중요한 것으로 추측된다. 또한, A $\beta$ 에 의해 증가되는 칼슘 이온의 유입은 미토콘드리아의 기능이상, 세포사멸을 일으키는 요인으로 알려져 있지만 (39), 미토콘드리아의 칼슘이온 펌프 저해제를 처리한 조건에서도 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아 기능 회복이 일어나지 않음으로써, 칼슘 이온의 증가보다는 ROS의 증가가 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 기능 이상에 중요함을 알 수 있었다 (그림 20).

하지만 Crif1 뿐만 아니라, 미토콘드리아 내막에 존재하는 단백질이면서 그 기능 유지에 중요한 여러 가지 단백질들, chchd3, mitofilin, ATP synthase 단백질들에 대한 추가적인 연구도 더 행해져야 정확하고도 구체적인 메커니즘이 성립될 것이다 (42-44). 한편, 선행 연구에서는 oxidative stress에 의한 세포 내 단백질 번역 과정의 저해와 그로 인한 세포 사멸의 증가가 보고된 바 있다 (45). 그런데 정상 세포에서는 미토콘드리아 내 Crif1의 역할이 미토콘드리아 내 ribosome에서 새로이 번역되어 나오는 전자 전달계 단백질들을 내막으로 삽입하는 역할을 하므로 (15) 본 연구에서 확인한 알츠하이머병에서의 Crif1의 감소가, A $\beta$ 에 의한 oxidative stress로 인해 미토콘드리아 내 단백질 번역을 막기 위한 번역 과정 관련 단백질들의 발현 감소 현상 중 한 부분이 될 가능성도 있다. 이 가능성에 대해서는, Crif1이 직접적인 단백질 번역에 관련된 ribosome 복합체의 구성 요소가 아닌 chaperone을 돕는 단백질이라는 점과, oxidative stress에 의한 단백질 번역 차단의 일부는 미토콘드리아 내 ribosome 단백질보다는 세포질 내 ribosome 단백질의 조절로써 주로 일어나며 두 위치에서의 단백질 번역 차단의 조절이 독립적으로 일어난다는 선행 연구 결과를 고려해 보았을 때 (46), 이 가능성에 대해서는 좀 더 구체적인 후속 연구가 뒷받침 되어야 할 것으로 보인다.

최근 들어, 미토콘드리아의 전자 전달계의 기능 이상은 당뇨나

파킨슨병, neuromuscular degeneration 과 같은 많은 병들에서 보고가 증가되고 있으므로 Crif1이 이러한 미토콘드리아 기능 이상을 병증으로 가진 많은 질환들에서도 좋은 치료 후보 물질이 될 수 있을 것으로 기대하는 바 이다 (47, 48).

Part 1의 연구 결과는 Cell Death & Differentiation, January, 22(6): 959-73 (2015)에 논문으로 발표한 바 있다.

## Part 2. Tsp1의 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 구조 망가짐과 기능 이상에의 회복 기전 연구

Tsp1은 중추신경계의 대부분을 차지하고 있는 정상세포로부터 신경세포로 분비 되는 물질이며, 알츠하이머병에서는 그 분비가 줄어들어 있음이 밝혀져 있다 (49). A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 기능 이상은 잘 알려져 있지만, 그 회복 메커니즘에 대해서는 많은 연구가 되지 않았다. 본인의 실험에서는 Tsp1을 처리시에 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아 구조의 망가짐 회복 및 기능 이상의 부분적 개선을 관찰하게 되었고, 이에 Tsp1이 알츠하이머병에서 미토콘드리아에 대한 보호 효과를 가질 수 있을 가능성에 대해 확인 하였다.

선행 연구에서 calcineurin의 활성화가 p-Drp1의 양을 낮춰 미토콘드리아로의 Drp1 이동을 증가시키고 이에 따라 미토콘드리아의 과도한 분열과 기능 이상이 초래될 수 있음이

밝혀졌다 (그림 6) (31). 알츠하이머병에서  $A\beta$ 에 의한 세포 내 칼슘 이온이 증가하고, 그에 의해 calcineurin이 활성화 되는데 Tsp1이 이러한 경로상에서 보호작용을 하는 것이라고 가설을 세우게 되었고, 실험을 통해서 Tsp1이 calcineurin 활성화를 막아 다음에 이어지는 미토콘드리아의 과분열 현상과 그에 따른 기능 이상 및 신경 세포사를 막을 가능성이 있음을 확인하였다. 미토콘드리아의 과도한 분열은 곧 미토콘드리아의 기능 이상을 야기시키는데 선행 연구 결과에 따르면, 미토콘드리아 과분열시 미토콘드리아 내 전자 전달계들의 양과 제대로 구성 요소들을 갖추고 있는 전자 전달계 복합체들의 비율이 적어지면서 원활하고 효율적인 ATP 생산이 일어나지 않고, 전자 전달계의 흐름이 막힘으로써 추가적인 ROS 축적이 야기되며, 미토콘드리아 내 대사에 중요한 효소들의 활성이 떨어지고, 미토콘드리아 막전위가 깨지게 되는 등 전형적인 미토콘드리아 기능 이상의 징후들을 초래하는 것으로 알려져 있다 (50). 그러므로  $A\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 과분열 현상을 저해하는 Tsp1의 효과는 비단 미토콘드리아의 분열/융합에 관련된 역학적 균형을 회복시켜 줄 뿐만 아니라 미토콘드리아의 기능 이상도 막아줄 수 있음으로써 신경세포의 생존에 중요한 역할을 할 것으로 보인다. Tsp1은 Neuroligin1, CD45,  $\alpha 2\delta 1$ 과 같은 다양한 수용체에 작용하는 리간드이지만 (51-53), 뇌의 신경세포에서는 특히  $\alpha 2\delta 1$  수용체를

통해서 시냅스 형성이나 스파인의 밀도를 높이는 등 신경세포의 활성을 증가시키고 인지기능을 향상시키는 데 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (49). 본인의 실험에서도,  $\alpha 2\delta 1$  수용체를 통해  $A\beta$ 에 대해 보호작용을 할 것으로 예상되고 그것은 후속 연구에서 밝힐 예정이다. 그 구체적인 방법으로  $\alpha 2\delta 1$  수용체에 높은 친화도를 가진 gabapentin을 처리해 (54) Tsp1에 의한 보호 효과가 교란되는 지의 여부를 통해, Tsp1이  $\alpha 2\delta 1$  수용체를 통해 신경세포를 보호하는 역할을 할 수 있음을 밝혀낼 것이다.  $\alpha 2\delta 1$  수용체는 처음으로 골격근에서 L-type calcium channel의 비필수적 구성요소로써 발견되었기 때문에 (55), calcium channel의 기능과 trafficking에 관련되어 많은 연구가 행해졌다. 그러므로 본 연구에서  $A\beta$ 의 신경세포 독성에 대한 Tsp1의 보호 작용이  $\alpha 2\delta 1$ 에 의한 calcium channel 조절을 통해 일어날 가능성이 있을 수 있다. 하지만,  $\alpha 2\delta 1$ 은 잘 알려진 단백질-단백질 상호작용을 할 수 있는 extracellular Von Willebrand domain을 가지고 있고 이는 곧 다양한 extracellular ligand에 대한 수용체로 기능할 수 있음을 시사해주는 것이기 때문에, Tsp1- $\alpha 2\delta 1$ 에 의한 신호 전달이 calcium signaling에 국한되지 않을 가능성도 배제할 수 없다. 그것을 뒷받침해주는 한 예로, 최근  $\alpha 2\delta 1$ 의 발현량이 높다고 알려진 골격근에 대한 연구 결과에서,  $\alpha 2\delta 1$ 이 calcium channel의 기능 조절과는 무관한, myoblast attachment나

extracellular signaling 조절에 관여함을 밝혀냈다 (56). 또한 본 연구와 관련해 더 직접적으로는, 신경세포에서  $\alpha 2\delta 1$ 의 calcium channel 조절 기능과는 독립적으로 Tsp1이  $\alpha 2\delta 1$  수용체를 통한 하위 신호 전달을 통해 신경세포의 시냅스 형성을 촉진한다는 연구 결과가 보고된 바 있다 (51). 나아가 후속 연구에서 사용할 예정인,  $\alpha 2\delta 1$ 의 agonist인 gabapentin은  $\alpha 2\delta 1$ 에 결합해 Tsp1과  $\alpha 2\delta 1$ 의 결합은 차단하지만, calcium channel 조절에는 영향을 미치지 않음이 밝혀져 있고 아직까지 그 분자생물학적 기전은 밝혀져 있지 않다 (57). 그러므로 후속 연구에서 gabapentin에 의한 Tsp1의 차단이  $\alpha 2\delta 1$ 의 calcium channel의 기능 조절을 차단해서가 아닌, 그것과는 독립적인 Tsp1에 의한  $\alpha 2\delta 1$ 의 하위 신호 전달을 차단할 것으로 예상하는 바이다.

또한, calcineurin 저해제인 FK506을 처리하거나, Drp1의 phosphorylation site를 mutation 시킨 DNA construct를 형질 주입시켜, 실험 가설로 내세우고 있는  $A\beta$  - 세포 내  $Ca^{2+}$  이온 증가 - calcineurin 활성화 - phospho-Drp1의 감소 - Drp1의 미토콘드리아로 이동 증가 - 미토콘드리아의 분열 증가 - 미토콘드리아 기능 이상 - 신경 세포사 증가 - 알츠하이머병의 진행이라는 가설의 축에서 각각의 단계의 저해제들을 처리해 실험 가설을 한 부분씩 증명해나갈 생각이다. Tsp1은 anti-angiogenic effect를 가지거나 neuro-inflammation의 저하를 가져오므로

(58), 알츠하이머병 상황에서는 이번 연구에서 보았던 미토콘드리아의 모양과 기능의 회복과 더불어 BBB integrity를 낮추는 신생 혈관 생성 방지 및 중추 신경계 내 염증의 감소로 더욱 좋은 치료 효과를 낼 수 있는 가능성이 높을 것으로 보인다. 하지만 아직까지 중추 신경계에서, 특히 알츠하이머병 상황에서는 그 역할과 작용 메커니즘이 규명되지 않은 상황이기 때문에 더 많은 후속 연구가 필요한 시점이다.

정상세포는 신경세포보다 그 수가 월등히 많고, 여러 가지 neurotrophic factor 들을 분비해 신경세포가 살아가기에 적합한 환경을 만들어 주기에, 중추 신경계에 매우 중요한 것으로 확인되었다 (59, 60). 그러므로 정상세포에서 분비되는 인자들 중 신경세포의 생존에 긍정적 기능을 하는 다른 분비 인자들에 대한 연구도 질환의 병증 개선을 위한 연구에 필수적일 것으로 추측된다. 이러한 연구들이 활발히 진행 되고 이것이 알츠하이머병의 증상 개선과 치료를 목적으로 임상에 적용되었을 때, 신경세포에 국한되어 효과를 내기보다는 뇌 전반적인 환경을 신경 세포의 생존에 유리하도록 만들어줌으로써 궁극적으로 좋은 치료 효과를 낼 수 있을 것이다.

Part 2의 연구는 현재 진행 중에 있는 상태이다.

### Part 3. Metformin에 의한 A $\beta$ 생성 증가 메커니즘에 대한

## 연구

베타-, 감마-시크리테아제는  $A\beta$ 를 생성해내는 데 있어 가장 중요한 두 효소이다 (그림 2) (61, 62). 그러므로 이 효소들의 조절이 잘못되면 알츠하이머병의 진행이 가속화될 것이며, 실제로 다양한 세포 스트레스 조건에서 이 두 효소의 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다 (61, 63).

Metformin은 제 2형 당뇨병의 치료제로써 가장 널리 쓰이는 약물이다. 알츠하이머병은 제 3형 당뇨병이라는 별명을 가질 정도로 알츠하이머병과 당뇨병과의 연관성은 높은 것으로 알려져 있다. 실제로, 알츠하이머병 환자들이 정상인에 비해서 제 2형 당뇨병에 걸릴 위험이 높아, 전체 환자군의 80% 정도가 제 2형 당뇨병이나 그보다 경증의 대사성 질환을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다 (64). 두 질환간의 높은 연관성으로 인해 제 2형 당뇨병의 치료제로 널리 쓰이는 metformin이 알츠하이머병 개선에 어떤 역할을 할 수 있을까에 대한 아이디어가 제시되어 온 가운데 몇몇 선행 연구가 행해져 왔다. Metformin은 BBB를 통과할 수 있어 알츠하이머병의 증상 개선을 위한 치료제가 될 수 있는 가능성이 있지만, 연구 결과들에 따르면 아직까지는 그 효과의 방향성이 정확히 정해지지 않고 있다. 예를 들어, Kickstein et al.의 연구에서는 metformin이 human tau transgenic mice와 non-transgenic mice의 신경세포에서 mTOR 신호 전달 경로를 막고



phosphatase 2A의 활성도를 감소시킴으로써 tau의 과인산화를 감소시킴을 밝혔고 (65), 또한 다른 선행 연구에서는 당뇨병 모델 쥐에서 지속적으로 metformin을 투여하였더니 tau의 과인산화나 A $\beta$  플라크가 감소하는 효과를 보였다 (66). 하지만, 이 연구에서 인지 기능의 개선은 보이지 않았다. 이와 반대로, metformin의 부정적 기능을 보고하는 연구들도 많았다. 예를 들어, chen et al.의 연구에서는 N2a695 세포주와 쥐의 신경세포에서 metformin을 처리시에 A $\beta$ 의 생성을 증가하였고 이것이 베타-시크리테아제의 활성 증가를 통해 일어남을 밝혔다 (12). 하지만 어떻게 metformin에 의해서 amyloidogenic APP processing에 관여하는 효소들의 활성이 증가하는지 밝혀지지 않았기에 본 연구에서 그 기전을 밝히고자 하였다. 본 연구의 실험가설은 두 선행 연구 결과를 토대로 수립되었는데, 첫째는 metformin이 AMPK 신호 경로를 활성화시키고 이는 결과적으로 autophagy를 활성화시킨다는 사실이다 (67). 두 번째는 Son et al.의 연구 결과에서 인슐린 저항성에 의해 autophagosome이 축적되고, 이 내부에는 APP와 amyloidogenic processing에 관여하는 시크리테아제들이 많이 존재하고 있어, 새로운 A $\beta$  생성 장소가 될 수 있다는 점이다 (33). 이러한 결과들을 토대로 metformin - AMPK 활성화 - mTOR 저해 - autophagy 유도 - autophagosome 축적으로 인한

A $\beta$  증가 라는 가설을 세웠고, 이 실험 가설을 증명하기 위해서 처음으로, 3.5개월된 5XFAD 알츠하이머병 모델 쥐에서 A $\beta$  플라크와 A $\beta_{42}$ 가 증가됨을 관찰하였다 (그림 27). 다음으로, HT22 세포주에서 metformin을 처리시에 비정상적으로 autophagosome이 축적됨을 관찰하였다 (그림 29). 이러한 결과가 autophagosome의 생성 자체가 많아지는 것인지 또는 autophagosome과 lysosome의 융합이 저해되어 autophagy flux가 막혀서 나타나는 현상인지 알아보기 위해, tf-LC3를 형질 주입시킨 세포에서 RFP-positive signal을 형광 현미경으로 측정해 보았다 (data는 보여지지 않음). Tf-LC3 construct는 autophagosome과 lysosome이 융합하게 될 시에, 내부의 산도 (pH) 가 감소하므로 초록색 형광은 사라지고 빨강색 형광만 남게 되는데 (68), 본인의 실험에서는 metformin에 의해서 RFP-positive signal이 증가하였으므로 autophagy flux가 막혔다기 보다는 autophagosome으로 유도되는 autophagy의 활성화가 증가됨을 유추해 볼 수 있었다. 다음으로 이러한 autophagy의 비정상적인 활성화가 AMPK에 의존적임을 AMPK 저해제를 사용하여 확인할 수 있었다 (그림 30). 또한, autophagosome의 증가는 베타-, 감마-시크리테아제의 활성을 높일 것이므로, metformin과 autophagy 저해제인 3MA를 함께 처리시에 이러한 metformin에 의한 sAPP $\beta$ 의 증가도 회복될 것으로 예상하였다. 하지만, metformin과 3MA를 함께 처리한

그룹에서 최종 생성물인 A $\beta$ 의 증가는 회복되었지만, sAPP $\beta$ 의 양의 증가는 회복되지 않았다 (그림 30B). 이러한 현상은 아마도 3MA 처리가 완벽하게 metformin에 의한 autophagy 활성화를 막지 못하지만 부분적으로 autophagosome 축적을 막아 이것이 감마-시크리테아제의 전체 활성도를 vehicle 처리 그룹의 그것과 비슷한 정도로 유지하기에는 충분하므로, 최종적으로 생성되는 A $\beta$ 의 증가는 막아줄 수 있기 때문일 가능성이 있다. 마지막으로, autophagosome과 lysosome이 포함된 micrososome으로 구성된 세포 분획에서 APP, BACE1, Nicastrin (감마-시크리테아제의 구성요소) 이 유의하게 증가된 반면 세포질 전체에서는 BACE1을 제외한 APP나 감마-시크리테아제의 구성요소들의 양에 큰 변화가 없음을 보여주어 (그림 30E), 축적된 autophagosome 내부에서 amyloidogenic APP processing이 활발히 일어날 가능성이 높음을 확인할 수 있었다.

한편, 본 연구결과와는 달리, 알츠하이머병에서 AMPK나 autophagy의 활성화가 이로운 효과를 낸다는 여러 선행 보고들도 있어왔다. Spilman et al. 의 연구에서 대부분의 A $\beta$ 가 autophagy-lysosome system에 의해 분해되므로, AMPK activation과 mTOR 활성 저하는 autophagy를 유도할 수 있고, A $\beta$  플라크를 감소시킬 수 있음을 밝혀냈다 (69). 또한, Yang et al. 의 연구 결과에 의하면 알츠하이머병 모델 쥐에서 AMPK 활성제나 mTOR 저해제에

의해서 autophagy를 유도하면 알츠하이머병에서 보여지는 병증을 완화시킬 수 있음을 보고하였다 (70). 그러므로 알츠하이머병 상황에서 AMPK의 효과나 autophagy 활성화의 직접적 효과에 대해서는 아직까지 단정짓기 어려울 듯 하며, 더 많은 후속 연구가 필요한 것으로 보인다.

이 연구결과는, 지금껏 제 2형 당뇨병자에게 가장 널리 쓰여왔던 당뇨 치료제인 metformin이 인지기능에의 부작용을 야기시킬 수 있다는 주의 의식을 일으키게 한다. 실제 임상적 케이스 스터디를 분석한 결과를 보면, metformin을 복용한 당뇨병자들이 다른 약을 복용한 당뇨병자들 보다 인지기능이 훨씬 감소되어 있는 것으로 나타났다 (17). 흥미롭게도, 이러한 metformin의 인지능력 저하는 비타민 B<sub>12</sub>를 보충해줌으로써 완화되는 양상을 나타내었다 (17). 또한 sulfonyl urea나 insulin을 metformin과 함께 투여하였을 때도 이러한 A $\beta$ 생성의 증가에 의한 인지기능 저하가 어느 정도 회복 되어지는 것으로 나타났다 (71). 하지만 이러한 임상 케이스 스터디의 분석 결과는 대상군의 약물섭취 히스토리, metformin의 복용량이나 복용기간, 유전적 위험인자 (APOE gene polymorphism) 에 대한 정보의 미고려 등 많은 약점을 가지고 있기 때문에 완전히 신뢰될 수는 없으나, 본 연구에서 밝혀진 것처럼 metformin의 인지기능에의 부작용이 의심되고 있으므로 완전히 배제 되어질 수 없다. 최근에는 metformin에 대한 생체

대사의 반응이 유전적 영향을 받는다는 보고도 있어서 (72), 이러한 metformin에 의한 효과를 임상적으로 분석시에는 좀 더 많은 변수를 고려해 통계적 분석을 했을 때 더욱 정확하고 임상적으로 유의미한 결과를 얻을 수 있을 것이라고 생각한다. 이러한 유의미한 결과들이 합쳐졌을 때, metformin의 인지 기능에 대한 긍정적, 부정적 면을 정확히 알 수 있을 것이며, 약의 처방 시에 개인에 맞는 처방을 할 수 있어 당뇨병의 효율적 치료와 동시에 인지기능 저하라는 부작용은 최소화할 수 있는 효과를 낼 수 있을 것이라 기대하는 바이다.

Part 3의 연구 결과는 Journal of Alzheimer's Disease에 accept (8<sup>th</sup>, January, 2016) 되어 논문으로 게재될 예정 이다.

## 결 론

알츠하이머병은 미토콘드리아의 구조적 망가짐과 기능 이상으로 인한 신경 세포의 활성 감소와, 단백질 분해 시스템에서 중요한 machinery 이자 최근 A $\beta$ 의 새로운 생성 장소로도 알려진 autophagosome 의 과다 축적 등의 원인들이 복합적으로 작용해 발병되거나, 병의 진행을 가속화시킬 수 있는 것으로 알려진 질환이다. 본 연구에서는 알츠하이머병에서 신경 독성을 일으키는 원인인 A $\beta$ 에 의해 ROS 가 증가하고 그로 인해 *Crif1* gene 의 전사인자인 Sp1 의 전사 활성이 감소되어 그 전사량이 감소되어 결과적으로 미토콘드리아 내막 단백질인 Crif1 의 양이 감소됨을 관찰하였다. 이러한 Crif1 의 감소는 미토콘드리아의 구조적인 망가짐과 기능 이상을 유도해 세포 활성의 감소를 가져왔지만, A $\beta$ 가 존재하는 상황에서도 Crif1 의 과발현을 통해 그 단백질 양을 정상 수준으로 유지했을 경우 미토콘드리아의 구조와 기능, 나아가 세포 활성까지 정상으로 회복됨으로써 알츠하이머병 상황에서 Crif1 단백질의 보호 효과를 확인할 수 있었다. 이렇게 미토콘드리아의 구조와 기능의 유지가 알츠하이머병 상황에서 좋은 치료 표적이 될 수 있음을 확인한 가운데, 정상 세포에서 분비된 Tsp1 이라는

물질이 또한 신경 세포에서 A $\beta$ 에 의한 미토콘드리아의 구조적 망가짐과 그에 따른 기능 이상에 보호 효과가 있음을 관찰하였다. Tsp1 은 A $\beta$ 에 의한 세포 내 칼슘 이온 증가에 의한 calcineurin 활성화를 저해함으로써 미토콘드리아의 구조를 견고히 유지하여 미토콘드리아의 기능이나 세포 활성을 정상 수준으로 유지해 보호 작용을 할 가능성이 높음을 확인하였다.

미토콘드리아의 기능 이상 뿐만 아니라 autophagosome 의 축적 또한 알츠하이머병의 주요 병인 기전 중의 하나로 주목 받고 있다. 이에 대해서 본 연구에서는 임상 역학 조사에서 알츠하이머병과 높은 상관관계를 가진다고 알려진 제 2 형 당뇨병에 쓰이는 치료제인 metformin 이 오히려 autophagosome 의 축적을 통해서 A $\beta$  생성에 기여함을 확인함으로써, metformin 복용에 의해 발생하는 당뇨병 환자에서의 인지 기능 저하에 대해서 알츠하이머병의 병증과 연관성을 제시할 수 있었다. 본 연구 결과에 따르면, metformin 은 AMPK 신호 경로를 활성화시킴으로써 autophagy 를 유도해 세포 내 autophagosome 을 축적시키고, 그 내부에 APP, 베타-, 감마-시크리테아제가 증가되고 그 활성 또한 증가됨으로써 A $\beta$ 의 생성에 기여함을 관찰하였다. 이를 통해

autophagosome 축적이 알츠하이머병의 병증을 가속화시킬 수 있는 주요 원인이 될 수 있음을 확인하였다.

본 연구 결과들을 종합해 보았을 때, A $\beta$  에 의해 야기되는 미토콘드리아의 기능 이상과 autophagosome 의 축적 등이 알츠하이머병의 발병과 병증의 가속화에 주요 기전으로 작용함을 확인할 수 있었다. 또한, 미토콘드리아 내막 단백질 양의 유지나 정상 세포로부터의 Tsp1 과 같은 물질 분비를 통해 미토콘드리아의 구조적 망가짐이나 기능 이상으로부터 신경 세포를 보호하는 것이 중요한 치료 표적이 될 수 있음을 확인하였다. 나아가, 알츠하이머병의 원인 물질이라고 알려진 A $\beta$  뿐만 아니라 당뇨병 치료제인 metformin 과 같은 약물에 의해서도 autophagosome 축적을 통한 병증의 가속화를 야기할 수 있음을 확인함으로써 현재 널리 쓰이는 제 2 형 당뇨병 치료제인 metformin 의 처방에 세심한 주의가 필요함을 제안하는 바이다.



## 참 고 문 헌

1. Hardy J, Selkoe DJ. Medicine - The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297(5580):353-6.
2. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2010;362(4):329-44.
3. Baloyannis SJ. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2006;9(2):119-26.
4. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006;443(7113):787-95.
5. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell*. 2009;138(4):628-44.
6. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012;337(6098):1062-5.
7. 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.
8. Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC, Butler PC. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes*. 2004;53(2):474-81.
9. Perry G, Smith MA. Is oxidative damage central to the pathogenesis of Alzheimer disease? *Acta neurologica Belgica*. 1998;98(2):175-9.
10. de la Monte SM, Luong T, Neely TR, Robinson D, Wands JR. Mitochondrial DNA damage as a mechanism of cell loss in Alzheimer's disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2000;80(8):1323-35.
11. Ott A, Stolk RP, Hofman A, van Harskamp F, Grobbee DE,

Breteler MM. Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. *Diabetologia*. 1996;39(11):1392-7.

12. Chen Y, Zhou K, Wang R, Liu Y, Kwak YD, Ma T, et al. Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(10):3907-12.

13. Picone P, Nuzzo D, Caruana L, Messina E, Barera A, Vasto S, et al. Metformin increases APP expression and processing via oxidative stress, mitochondrial dysfunction and NF-kappaB activation: Use of insulin to attenuate metformin's effect. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(5):1046-59.

14. Oh NS, Yoon SH, Lee WK, Choi JY, Min do S, Bae YS. Phosphorylation of CKBBP2/CRIF1 by protein kinase CKII promotes cell proliferation. *Gene*. 2007;386(1-2):147-53.

15. Kim SJ, Kwon MC, Ryu MJ, Chung HK, Tadi S, Kim YK, et al. CRIF1 is essential for the synthesis and insertion of oxidative phosphorylation polypeptides in the mammalian mitochondrial membrane. *Cell Metab*. 2012;16(2):274-83.

16. Son SM, Nam DW, Cha MY, Kim KH, Byun J, Ryu H, et al. Thrombospondin-1 prevents amyloid beta-mediated synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2015.

17. Moore EM, Mander AG, Ames D, Kotowicz MA, Carne RP, Brodaty H, et al. Increased risk of cognitive impairment in patients with diabetes is associated with metformin. *Diabetes Care*. 2013;36(10):2981-7.

18. Hundal HS, Ramlal T, Reyes R, Leiter LA, Klip A. Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology*. 1992;131(3):1165-73.

19. Menzies FM, Ravikumar B, Rubinsztein DC. Protective roles for induction of autophagy in multiple proteinopathies. *Autophagy*. 2006;2(3):224-5.

20. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H,

Yoshimori T, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 2004;432(7020):1032-6.

21. Nixon RA, Yang DS. Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect. *Neurobiology of disease*. 2011;43(1):38-45.

22. Komatsu M, Ueno T, Waguri S, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. *Cell Death Differ*. 2007;14(5):887-94.

23. Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, et al. Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *The Journal of cell biology*. 2005;171(1):87-98.

24. Zheng H, Koo EH. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener*. 2006;1:5.

25. Pasternak SH, Bagshaw RD, Guiral M, Zhang S, Ackerley CA, Pak BJ, et al. Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. *J Biol Chem*. 2003;278(29):26687-94.

26. Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, et al. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2005;64(2):113-22.

27. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(5-6):509-17.

28. Sang J, Yang K, Sun Y, Han Y, Cang H, Chen Y, et al. SUMO2 and SUMO3 transcription is differentially regulated by oxidative stress in an Sp1-dependent manner. *Biochem J*. 2011;435(2):489-98.

29. Spengler ML, Brattain MG. Sumoylation inhibits cleavage of Sp1 N-terminal negative regulatory domain and inhibits Sp1-dependent transcription. *J Biol Chem*. 2006;281(9):5567-74.

30. Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, et al. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal

perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2008;14(10):1097–105.

31. Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P, et al. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(41):15803–8.

32. Teng AC, Miyake T, Yokoe S, Zhang L, Rezende LM, Jr., Sharma P, et al. Metformin increases degradation of phospholamban via autophagy in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(23):7165–70.

33. Son SM, Song H, Byun J, Park KS, Jang HC, Park YJ, et al. Accumulation of autophagosomes contributes to enhanced amyloidogenic APP processing under insulin-resistant conditions. *Autophagy.* 2012;8(12):1842–4.

34. Baloyannis SJ, Costa V, Michmizos D. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2004;19(2):89–93.

35. Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol.* 2004;61(5):661–6.

36. Byun J, Son SM, Cha MY, Shong M, Hwang YJ, Kim Y, et al. CR6-interacting factor 1 is a key regulator in Aβ-induced mitochondrial disruption and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Cell Death Differ.* 2015;22(6):959–73.

37. Xie H, Hou S, Jiang J, Sekutowicz M, Kelly J, Bacskai BJ. Rapid cell death is preceded by amyloid plaque-mediated oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(19):7904–9.

38. Ryu H, Lee J, Zaman K, Kubilis J, Ferrante RJ, Ross BD, et al. Sp1 and Sp3 are oxidative stress-inducible, antideath transcription factors in cortical neurons. *J Neurosci.* 2003;23(9):3597–606.

39. Cali T, Ottolini D, Brini M. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and neurodegeneration. *Cell Calcium.* 2012;52(1):73–85.

40. Rhein V, Song X, Wiesner A, Ittner LM, Baysang G, Meier F, et

- al. Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(47):20057-62.
41. Schmidt C, Lepsverdize E, Chi SL, Das AM, Pizzo SV, Dityatev A, et al. Amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide bind to ATP synthase and regulate its activity at the surface of neural cells. *Molecular psychiatry*. 2008;13(10):953-69.
42. Darshi M, Mendiola VL, Mackey MR, Murphy AN, Koller A, Perkins GA, et al. ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J Biol Chem*. 2011;286(4):2918-32.
43. Alkhaja AK, Jans DC, Nikolov M, Vukotic M, Lytovchenko O, Ludewig F, et al. MINOS1 is a conserved component of mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization. *Mol Biol Cell*. 2012;23(2):247-57.
44. Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, et al. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J*. 2002;21(3):221-30.
45. Van Der Kelen K, Beyaert R, Inze D, De Veylder L. Translational control of eukaryotic gene expression. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2009;44(4):143-68.
46. Swaminathan S, Masek T, Molin C, Pospisek M, Sunnerhagen P. Rck2 is required for reprogramming of ribosomes during oxidative stress. *Mol Biol Cell*. 2006;17(3):1472-82.
47. Devine MJ, Plun-Favreau H, Wood NW. Parkinson's disease and cancer: two wars, one front. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(11):812-23.
48. Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, et al. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*. 2006;441(7097):1157-61.
49. Son SM, Nam DW, Cha MY, Kim KH, Byun J, Ryu H, et al. Thrombospondin-1 prevents amyloid beta-mediated synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2015;36(12):3214-27.

50. Jheng HF, Tsai PJ, Guo SM, Kuo LH, Chang CS, Su IJ, et al. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(2):309–19.
51. Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Ozkan E, et al. Gabapentin receptor  $\alpha 2\delta 1$  is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell*. 2009;139(2):380–92.
52. Graf ER, Zhang X, Jin SX, Linhoff MW, Craig AM. Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell*. 2004;119(7):1013–26.
53. Ohnishi H, Kaneko Y, Okazawa H, Miyashita M, Sato R, Hayashi A, et al. Differential localization of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 and CD47 and its molecular mechanisms in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*. 2005;25(10):2702–11.
54. Gee NS, Brown JP, Dissanayake VU, Offord J, Thurlow R, Woodruff GN. The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the  $\alpha 2\delta$  subunit of a calcium channel. *J Biol Chem*. 1996;271(10):5768–76.
55. Arikath J, Campbell KP. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Current opinion in neurobiology*. 2003;13(3):298–307.
56. Garcia K, Nabhani T, Garcia J. The calcium channel  $\alpha 2/\delta 1$  subunit is involved in extracellular signalling. *The Journal of physiology*. 2008;586(3):727–38.
57. Brawek B, Loffler M, Dooley DJ, Weyerbrock A, Feuerstein TJ. Differential modulation of  $K(+)$ -evoked (3)H-neurotransmitter release from human neocortex by gabapentin and pregabalin. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2008;376(5):301–7.
58. Ko CY, Chu YY, Narumiya S, Chi JY, Furuyashiki T, Aoki T, et al. CCAAT/enhancer-binding protein  $\delta$ /miR135a/thrombospondin 1 axis mediates PGE<sub>2</sub>-induced angiogenesis in Alzheimer's disease.

Neurobiol Aging. 2015;36(3):1356-68.

59. Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(3):185-93.
60. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(8):626-40.
61. Cole SL, Vassar R. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener.* 2007;2:22.
62. Wolfe MS, Esler WP, Das C. Continuing strategies for inhibiting Alzheimer's gamma-secretase. *J Mol Neurosci.* 2002;19(1-2):83-7.
63. Shen C, Chen Y, Liu H, Zhang K, Zhang T, Lin A, et al. Hydrogen peroxide promotes Abeta production through JNK-dependent activation of gamma-secretase. *J Biol Chem.* 2008;283(25):17721-30.
64. Zhao WQ, Townsend M. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(5):482-96.
65. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011;13(2):132-41.
66. Li J, Deng J, Sheng W, Zuo Z. Metformin attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 2012;101(4):564-74.
67. Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, et al. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* 2005;2(1):21-33.
68. Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy.* 2007;3(5):452-60.
69. Spilman P, Podlutskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, et al. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2010;5(4):e9979.

70. Yang DS, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, et al. Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134(Pt 1):258-77.
71. Hsu CC, Wahlqvist ML, Lee MS, Tsai HN. Incidence of dementia is increased in type 2 diabetes and reduced by the use of sulfonylureas and metformin. *J Alzheimers Dis*. 2011;24(3):485-93.
72. Zhou Y, Guo Y, Ye W, Wang Y, Li X, Tian Y, et al. RS11212617 is associated with metformin treatment response in type 2 diabetes in Shanghai local Chinese population. *Int J Clin Pract*. 2014;68(12):1462-6.



# Abstract

Alzheimer's disease (AD), a devastating form of dementia is the most common-age related neurological disorder. Extracellular A $\beta$  accumulation and abnormal folding of intracellular hyper-phosphorylated tau proteins are two hall-marks of Alzheimer's disease pathology. Recently, many studies have been focused on the maintenance of essential and principal physiological functions or the functional recovery of cellular organelles' functions to increase the cell viability. Since mitochondrial dysfunction and accumulation of autophagosomes are one of them, this study tried to reveal the mechanisms underlying between those risk factors and AD pathology progression. We found out that A $\beta$ -induced disruption of mitochondrial morphology and function is mainly caused by Crif1 (CR6-interacting factor 1) loss. Furthermore, since Crif1 over-expression could recover A $\beta$ -induced mitochondrial dysfunction, mitochondrial morphology disruption and decrease of cell viability in SH-SY5Y cells, Crif1 might be the good therapeutic target for AD maintaining mitochondrial functions.

In addition, this study additionally confirmed that Tsp1 (Thrombospondin-1), which is released from astrocytes in CNS, appears to protect mitochondrial morphology and functions by inhibiting A $\beta$ -induced calcium mediated calcineurin activation and following decrease of p-Drp1 level, which also can be a potential therapeutic strategy for AD.

The association between type 2 diabetes and AD has been known to be quite strong. This study revealed the effect of metformin in A $\beta$  production by showing that metformin accumulates autophagosomes where amyloidogenic APP processing is facilitated in HT22 cells.

Based on these results, it is highly possible that maintaining mitochondrial function might be a good therapeutic approach in treating AD. Furthermore, this study also warns us for the effect of metformin that might contribute to AD pathology by enhancing A $\beta$  generation.

---

**Keywords:** Alzheimer's disease, mitochondria, Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ), Thrombospondin1 (Tsp1), metformin, Type 2 Diabetes.

**Student number:** 2011 – 21942