



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

오글루넥과 아세틸레이션이
알츠하이머병의 병인기전에 미치는
영향 연구

The role of O-GlcNAc and acetylation
on the pathogenesis of
Alzheimer' s disease

2018 년 8 월

서울대학교 대학원
의과학과 의과학 전공
최 희 선

오글루넥과 아세틸레이션이
알츠하이머병의 병인기전에 미치는
영향 연구

지도교수 목 인 희

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

2018 년 08 월

서울대학교 대학원

의과학과 의과학 전공

최 희 선

최희선의 의학박사 학위논문을 인준함

2018 년 08 월

위원장	김영수	(인)
부위원장	목인희	(인)
위원	권용태	(인)
위원	서영호	(인)
위원	최철용	(인)

The role of O-GlcNAc and acetylation
on the pathogenesis of
Alzheimer's disease

By Heesun Choi

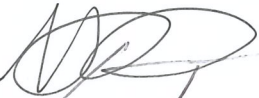
A thesis submitted to the Department of
Biomedical Sciences in partial fulfillment of the
requirements for the Degree of Doctor of
Philosophy in Medicine (Biomedical sciences) at
Seoul National University College of Medicine


August, 2018


Approved by Thesis Committee:

Professor Youngsoo Kim Chairman

Professor Inhee Mook Vice chairman 

Professor 지희영 

Professor YoungHo Suh 

Professor Cheol Yang Choi 

초 록

알츠하이머병에서 주요 원인 물질인 베타-아밀로이드와 tau 단백질에 의한 세포 독성으로 당 대사의 저하로 인한 O-GlcNAcylation 의 변화와 HDAC6 의 과활성화로 인한 acetylation 의 변화가 알려져 있다. 하지만, O-GlcNAcylation 이나 acetylation 의 변화가 관여하는 구체적인 알츠하이머병의 병인 기전은 많이 연구되어 있지 않다. 따라서, 본 연구에서는 O-GlcNAcylation 이나 acetylation 의 변화가 알츠하이머병의 병인 기전에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

먼저, 알츠하이머병에서 변화된 O-GlcNAcylation 이 기여하는 병인 기전 연구에서는, 알츠하이머병 동물 모델과 베타-아밀로이드를 처리한 세포에서 c-Fos 의 O-GlcNAcylation (S56, S57)이 증가함을 밝혔으며, 그 결과 c-Fos 의 안정화와 전사 활성의 증가로 세포 사멸을 유도하는 Bim 의 발현이 증가되어 세포 사멸이 촉진됨을 확인하였다.

다음으로, acetylation 연구에서는 HDAC6 억제제를 통한 acetylation 회복에 의해 나타나는 알츠하이머병 회복 기전을 규명하였다. 알츠하이머병 동물 모델이나 세포에 HDAC6 억제제를 처리하였을 때, HDAC6 의 기질인 Prx1 의 acetylation (K197)이 증가하여 베타-아밀로이드에 의해 유도된 산화 스트레스와 과도한

Ca²⁺을 회복시키고, 그 결과 미토콘드리아의 축삭 수송도 회복시킴을 확인하였다. 또, tau 와 Hsc70, Hsp70 의 acetylation 이 증가하여 서로 간의 상호 작용 증가를 통해 tau 의 프로테아좀으로의 분해가 촉진됨을 밝혔고, 그 결과 응집된 tau 를 포함한 전체적인 tau 의 양이 감소하여, 손상된 시냅스와 기억력이 회복됨을 확인하였다.

이러한 결과를 통해서 알츠하이머병에서 변화된 O-GlcNAcylation, acetylation 과 같은 단백질의 번역 후 수식화가 알츠하이머병의 병인 기전에 기여함을 알 수 있었고, 변화된 번역 후 수식화를 회복시켜 줌으로써 알츠하이머병의 병적 증상을 회복시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 따라서, 단백질의 번역 후 수식화를 조절하는 것은 알츠하이머병의 중요한 치료 표적이 될 수 있을 것으로 기대된다.

주요어: 알츠하이머병, 베타-아밀로이드, O-GlcNAcylation (O-linked β -N-acetyl glucosamine), c-Fos, HDAC6 (Histone deacetylase 6), acetylation, Prx1 (peroxiredoxin1), tau

학 번: 2011-21956

도표 및 약어 목록

4-HNE : 4-hydroxynonenal

8-OHdG : Hydroxydeoxyguanosine

AD : Alzheimer' s disease

ADLP : Alzheimer' s disease-like pathology

APP : Amyloid precursor protein

A β : Amyloid beta peptide

BACE : Beta site APP-cleavage enzyme

CHIP : C-terminus of Hsc70-interacting protein

CHX: Cycloheximide

CREB : cAMP response element binding protein

DAB : 3, 3' -diaminobenzidine

DCFDA : 2' , 7' -dichlorodihydrofluorescein diacetate

DMEM : Dulbesco' s modifiec Eagle' s medium

ECL : Enhanced chemiluminescence

ER : Endoplasmic reticulum

FBS : Fetal bovine serum

FDG-PET :Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography

HBSS : Hank' s Balanced Salt Solution

HDAC6 : Histone deacetylase 6

HRP : Horse radish peroxidase

Hsc70: Heat shock cognate 70

Hsp 90: Heat shock proteins 90

Hsp40 : Heat shock proteins 40

Hsp70 : Heat shock proteins 70

NFT: Neurofibrillary tangle

OGA : O-GlcNAcase

O-GlcNAcylation : O-linked β -N-acetyl glucosamine

OGT : O-GlcNAc transferase

PDMS : Polydimethylsiloxane

PHF : Paired helical filament

PMSF : Phenyl-methylsulfonyl fluoride

Prx1 : Peroxiredoxin1

PTMs : Post-translational modifications

PVDF : Polyvinylidene difluoride

ROS : Reactive oxygen species; ROS

SIM: Structured illumination microscopy

TBA : Tubastatin A

Tx-100 : Triton X-100

UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate N-acetylglucosamine

UPS : Ubiquitin-proteasome system

WGA : Wheat-germ agglutinin

β -HEX : β -hexosaminidase

목 차

초록.....	i
도표 및 약어 목록.....	iii
목차.....	v
표 및 그림 목록.....	vi
서론.....	1
실험재료 및 방법.....	26
결과.....	48
고찰.....	120
결론.....	140
참고문헌.....	142
초록 (영문).....	164

표 및 그림 목록

그림 1. APP 대사 과정과 베타-아밀로이드의 독성	19
그림 2. Tau 단백질의 응집 과정과 응집된 tau 단백질의 독성 ..	20
그림 3. O-GlcNAcylation의 기능.....	21
그림 4. 베타-아밀로이드에 의해 잘못 조절된 O-GlcNAcylation이 c-Fos를 매개하여 세포사멸에 미치는 영향 연구의 가설 모식도.....	22
그림 5. HDAC6의 기질과 그에 따른 기능	23
그림 6. HDAC6 억제제가 알츠하이머병을 회복시키는 기전의 가설 모식도	24
그림 7. Tau 단백질의 분해 기전.....	25
그림 8. 5xFAD와 베타-아밀로이드를 처리한 세포에서 c-Fos O-GlcNAcylation의 증가	76
그림 9. 베타-아밀로이드에 의한 OGA와 c-Fos의 상호작용 변화	78
그림 10. 다양한 방법으로 c-Fos의 O-GlcNAcylation 증명....	80
그림 11. S56, S57에서 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 일어남	82
그림 12. 베타-아밀로이드에 의해 c-Fos의 S56, S57자리의 O-GlcNAcylation이 세포 사멸을 촉진시킴-1	84

그림 13. 베타-아밀로이드에 의해 c-Fos의 S56, S57자리의 O-GlcNAcylation이 세포 사멸을 촉진시킴-2	86
그림 14. S56, S57 자리의 c-Fos O-GlcNAcylation에 의한 c-Fos 자체의 안정화	88
그림 15. S56, S57 자리의 c-Fos O-GlcNAcylation은 베타-아밀로이드에 의해 c-Fos의 전사활성을 증가시키고, Bim의 발현을 증가시킴	90
그림 16. c-Fos의 O-GlcNAcylation 자리와 베타-아밀로이드가 있을 때, c-Fos O-GlcNAcylation에 의한 세포사멸 촉진 기전에 관한 모식도	92
표 1. 실험에 이용된 사람 뇌조직의 정보.....	93
그림 17. Anti-acetyl-Prx1 antibody (R2-31)의 항원 특이성 확인	94
그림 18. 알츠하이머병 환자의 뇌에서 Prx1의 acetylation이 감소하고, 베타-아밀로이드와 HDAC6 억제제에 의해 Prx1의 acetylation이 조절됨	95
그림 19. HDAC6 억제제가 베타-아밀로이드에 의해 증가된 ROS와 Ca ²⁺ 을 감소시킴	96
그림 20. 베타-아밀로이드에 의해 유도된 ROS가 Ca ²⁺ 의 양을 조절함	97
그림 21. 베타-아밀로이드에 의해 유도된 Ca ²⁺ 이 ROS를 조절함	98

그림 22. HDAC6 억제제는 Prx1의 acetylation을 매개하여 베타-아밀로이드에 의해 유도된 ROS와 Ca ²⁺ 을 회복시킴	99
그림 23. 베타-아밀로이드에 의해 유도된 ROS와 Ca ²⁺ 이 미토콘드리아의 축삭 수송을 손상시킴	100
그림 24. 5xFAD에서 HDAC6 억제제에 의해 증가된 Prx1 acetylation이 산화스트레스와 미토콘드리아 수송을 회복시킴	102
그림 25. 알츠하이머병에서 Prx1 acetylation과 HDAC6 억제제의 역할에 관한 모식도.....	103
그림 26. ADLP ^{APT} 쥐에 예방 모델로 두가지 용량의 HDAC6 inhibitor를 투여했을 때 보이는 기억력과 acetyl- tubulin, PSD95의 회복	104
그림 27. ADLP ^{APT} 쥐에 예방 모델로 두가지 용량의 HDAC6 inhibitor를 투여했을 때 베타-아밀로이드 반점과 microgliosis는 변화되지 않음	105
그림 28. ADLP ^{APT} 쥐에 예방 모델로 두가지 용량의 HDAC6 inhibitor를 투여했을 때 보이는 sarkosyl-soluble tau의 감소	106
그림 29. ADLP ^{APT} 쥐에 예방 모델로 두가지 용량의 HDAC6 inhibitor를 투여했을 때 보이는 sarkosyl-insoluble tau의 감소	107

그림 30. ADLP ^{APT} 쥐에 예방 모델로 두가지 용량의 HDAC6 inhibitor를 투여했을 때 보이는 tau의 감소	108
그림 31. ADLP ^{APT} 쥐에 치료 모델로 HDAC6 inhibitor를 투여했을 때 보이는 기억력, 시냅스의 회복과 베타-아밀로이드 반점과 microgliosis의 변화 없음	109
그림 32. ADLP ^{APT} 쥐에 치료 모델로 HDAC6 inhibitor를 투여했을 때 보이는 tau의 감소	111
그림 33. HT22 세포주에서 HDAC6에 의한 tau의 조절 및 HDAC inhibitor에 의한 tau의 프로테아좀으로의 분해 촉진	113
그림 34. HDAC6 억제제에 의해 tau, Hsc70, Hsp70의 acetylation 증가로 인한 서로 간의 상호 작용 촉진 ..	115
그림 35. Hsc70, Hsp70, CHIP과의 상호작용에 영향을 주는 tau의 acetylation 자리 규명	117
그림 36. HDAC6 억제제에 의해 프로테아좀으로의 tau 분해를 통한 인지기능 회복 기전에 관한 모식도	118
그림 37. c-Fos의 O-GlcNAcylation을 억제하는 것과 HDAC6 억제제에 의한 acetylation의 회복을 통한 알츠하이머병의 치료 전략과 그 기전에 대한 모식도 ..	119

서 론

노인성 치매의 대표적인 질병인 알츠하이머병 (Alzheimer ' s disease; AD)은 노화와 연관된 신경 퇴행성 질환으로, 인구의 고령화와 맞물려 환자수가 기하급수적으로 증가하고 있다 (1). 임상 증상은 기억, 언어기능, 판단력 등의 인지기능의 저하뿐만 아니라 성격변화, 공격성 증가, 수면 장애 등의 정신행동 증상이 동반된다 (2). 병리학적 특징으로는 알츠하이머병 환자의 뇌조직에서 베타-아밀로이드 (amyloid beta peptide; $A\beta$)가 축적되어 나타나는 노인반 (senile plaque)과 세포 내의 과인산화된 tau 단백질이 비정상적으로 응집되어 생기는 신경섬유 다발 (neurofibrillary tangle; NFT)이 관찰된다 (3).

따라서, 베타-아밀로이드와 tau 단백질이 알츠하이머병의 주요원인 물질로 여겨지는데, 베타-아밀로이드는 아밀로이드 전구 단백질 (amyloid precursor protein; APP)이 베타-시크리테아제 (β -secretase; BACE1)와 감마-시크리테아제 (γ -secretase complex)에 의해 잘려서 생성되며, 스스로 응집되는 특징이 있어 이량체 (dimer), 올리고머 (oligomer), 피브릴 (fibril)로 점차 응집되면서 β -sheet 구조의 노인반을 형성한다 (3). 이러한 베타-아밀로이드 응집체들은 세포 독성을 나타낸다고 보고되어 있는데, tau 단백질의 과인산화, 오토파지-리소좀 시스템 (autophagy-

lysosome system)의 손상, 시냅스의 퇴화, 미토콘드리아의 손상, Ca^{2+} 항상성의 이상, 축삭 수송의 저해, 세포 사멸 등이 그것이다 (그림 1). 먼저, tau의 과인산화는 베타-아밀로이드가 Fyn, GSK3 β , cdk5, MAPK, Akt, PKA 등의 kinase를 과활성화시켜서 일어나는 것으로 알려져 있고, 그 결과 tau의 응집이 촉진되어 세포 내에 축적되며, tau에 따른 세포 독성도 나타난다 (3). 또, 베타-아밀로이드는 Akt 관련 경로나 RAGE-AMPK를 통한 경로로 오토파지-리소좀 시스템 (Autophagy-lysosome system)을 과활성화시키는데, 오토파지-리소좀 시스템은 베타-아밀로이드의 생성 장소 중 하나로 알려져 있다 (4-6). 리소좀이 비산성화되면 오토파지-리소좀 시스템의 흐름을 손상시켜 베타-아밀로이드의 분해가 감소된다는 보고도 있는데, 가족성 알츠하이머병에서 보이는 presenilin 1 (PS1)의 돌연변이와 베타-아밀로이드에 의한 GSK3의 과활성화는 리소좀의 산성화를 손상시킨다고 한다 (7). 이 외에도 베타-아밀로이드에 의해 수상돌기 가지 (dendritic spine)가 줄어들고, 장기 강화 작용 (long term potentiation; LTP)의 손상 및 장기 억압 (long term depression; LTD)의 촉진이 보고 되어 있는데, 이러한 시냅스의 손상으로 인해 알츠하이머병에서 인지 기능 손상 및 기억력 감퇴가 일어나는 것으로 여겨진다 (8). 다음으로, 알츠하이머병 환자 뇌의 미토콘드리아에서 축적된 베타-아밀로이드가 발견되는데, 그 결과 미토콘드리아의 효소들을 손상시켜 전자 전달계 (electron transport), ATP 생성, 산소 소비, 미토콘드리아의 막전위가 모두

손상된다고 보고되어 있다 (9). 이러한 미토콘드리아의 기능 장애로 인해 과도한 활성 산소 (reactive oxygen species; ROS)가 생성되고, 세포 내로 비정상적인 Ca^{2+} 이 분비되며, cytochrome c 분비를 통한 아포토시스 (apoptosis)가 일어나는 것도 보고되어 있다 (9). 산화 스트레스 (oxidative stress)도 베타-아밀로이드에 의한 병리학적 특징 중 하나인데, 베타-아밀로이드 자체가 유리기 (free radical)를 생성시키는 펩타이드 (peptide)이며, 미토콘드리아 손상을 통해 활성산소를 증가시키고, 소교세포 (microglia)를 과활성화시켜 활성질소 (reactive nitrogen species; RNS)를 생성시키는 것으로 알려져 있다. 그 결과, 지질의 과산화, 단백질의 과산화, DNA의 과산화를 통한 세포 독성을 일으킨다 (10). Ca^{2+} 역시 베타-아밀로이드에 의해 항상성이 손상되어 있는데, 손상된 미토콘드리아나 활성산소 혹은 glutamate에 의해 소포체 (endoplasmic reticulum; ER)에서 Ca^{2+} 분비가 촉진되어, 세포질 내에 과도한 Ca^{2+} 이 나타나고, 그 결과 calcineurin, calpain과 같은 효소를 활성화 시켜서 신경 돌기의 위축, 시냅스 가소성 장애, 세포 사멸을 유도한다고 알려져 있다 (11-14). 또한, 긴 축삭을 가진 비대칭적 구조인 신경 세포에서는 축삭 수송이 매우 중요한데, 베타-아밀로이드는 미세소관 (microtubule)의 불안정화와 미세소관, 수송 단백질 (motor protein), 어댑터 단백질 (adaptor protein)과 수송물 (cargo) 사이의 부착성을 저해시킴으로써 축삭 수송을 저해한다고 보고되어 있다 (15). 이와 같은 여러 가지 세포 독성 작용을 통해 세포 사멸이

유도 된다 (3).

또다른 알츠하이머병의 주요 원인 단백질인 tau는 주로 신경세포에서 발견되며, 교세포에서는 낮은 양으로 발견된다 (16). 프로젝션 도메인 (projectin domain)의 2개의 아미노-말단 삽입 도메인 (amino-terminal inserts)의 유무 (0N, 1N, 2N)와 미세 소관 결합 도메인 (microtubule binding domain)의 2번째 카복시-말단 반복 도메인 (carboxy-terminal repeat domain) (R2)의 유무에 따라 (3R, 4R) 6가지의 동형 (isoform)으로 존재한다 (16). 일반적으로 주로 축삭에 위치하는데, 미세 소관에 결합하여 미세 소관을 안정화시키고, 수송 단백질과 경쟁적으로 미세 소관에 결합하여 수송 단백질이 미세 소관에 결합하는 것을 조절한다고 알려져 있다. 또, tau 자체가 수송물로 작용할 수 있어, 역시 경쟁적으로 다른 수송물이 수송 단백질에 결합하는 것을 조절하여, 수송물의 이동을 조절하는데, 이와 같은 작용을 통해 축삭 수송을 제어한다고 알려져 있다 (16). 이 외에도, tau knock-out 쥐를 이용한 연구들을 통해 tau가 신경세포의 활성화, 신경발생 (neurogenesis), 시냅스 가소성에도 관여하는 것이 보고되어 있다. 베타-아밀로이드나 picrotoxin과 같은 발작 (seizure)을 일으키는 물질에 의해 신경세포의 과활성이 나타나는데, tau를 knock-out하였을 때, 신경세포의 과활성이 감소함을 통해 tau가 신경세포의 활성을 조절할 수 있음을 발견하였다 (17, 18). 또한, tau knock-out 쥐에서 해마의 성체 신경 발생이 저해되어 있다는 보고가 있고, 해마의 CA1 부위에서 장기 억제와 장기 상

승 작용의 손상이 나타난다는 보고를 통해, tau가 신경 발생과 시냅스 가소성에 관여함을 알 수 있다 (19-21).

이와 같이 세포 내에서 중요한 기능을 하는 tau가 알츠하이머병에서는 응집되어, 정상적인 기능을 잃거나, 응집에 따른 새로운 독성을 나타냄으로써 세포 독성을 일으킨다고 보고되고 있다 (그림 2). 위에서 언급했듯이 tau는 베타-아밀로이드에 의해 과인산화되는데, 그 결과 미세 소관에서 떨어져나와 응집이 시작된다 (3). 미세 소관 결합 도메인의 R2와 R3에 위치한 VQIINK와 VQIVYK 모티프 (motif)가 tau의 응집에 중요하다고 알려져 있는데, Tau는 베타-아밀로이드와 마찬가지로 이량체, 올리고머 단계를 거쳐 PHF (paired helical filament), 그 이후 신경섬유다발의 단계로 응집이 일어난다 (16). 이처럼 tau가 미세 소관에서 떨어져 나와서 응집되기 때문에, 미세 소관을 안정화시키고, 축삭 수송을 조절하는 tau의 정상 기능을 수행하지 못하여, 미세 소관이 불안정화되고 축삭 수송이 저해된다고 보고되어 있다 (16). 이 외에도 다음과 같이 시냅스의 기능 장애, 미토콘드리아 손상, 세포 사멸과 같은 세포 독성을 일으킨다. 보통 축삭에 존재해야 할 tau가 수상돌기에 과다하게 존재하게 되면, tyrosine ligase-like enzyme 6 (TLL6)과 미세 소관을 자르는 효소인 spastin을 수상돌기로 위치하게 하여, 수상돌기 내 미세 소관의 불안정화를 통한 수상돌기 감소를 불러일으킨다 (22). 또한, tau는 NR2B를 인산화시켜 glutamatergic signaling 촉진하는 fyn kinase를 포스트-시냅스 (post-synapse)로 더 잘 위

치하게 하여, 베타-아밀로이드에 의한 흥분 독성 (excitotoxicity) 를 매개하는 것으로 알려져 있다 (23). 뿐만 아니라 rTg4510과 같은 tau 모델 쥐에서 수상돌기 가시의 감소와 기억력 저하가 나타남도 보고되어 있어, tau가 시냅스의 기능 장애를 일으킴을 알 수 있다 (24, 25). Tau 응집체는 또한 미토콘드리아를 손상시키는 것으로 알려져 있는데, Drp1과 비정상적으로 결합하여 미토콘드리아의 분열을 비정상적으로 촉진시키거나, 전자전달계 효소의 활성을 저해하여 ATP 합성이나 미토콘드리아 호흡을 손상시킨다는 보고가 있다 (26). 이와 더불어, tau 모델 쥐에서 신경세포의 소실이 관찰되는데, 이는 위와 같은 세포 독성을 기반으로 하여, 세포의 생존 능력을 감소시키고, 세포 사멸을 일으키기 때문인 것으로 생각된다 (27).

이 뿐만 아니라 알츠하이머병 환자에서는 단백질의 번역 후 수식화 (Post-translational modifications; PTMs)도 변화되어 있는데 (28), 단백질의 번역 후 수식화는 단백질의 분해, 활성, 다른 단백질과의 상호 작용 등의 다양한 기능을 조절하는 중요한 과정이다(29). 본 연구에서는 알츠하이머병에서 변화된 번역 후 수식화 중 O-GlcNAcylation (O-linked β -N-acetyl glucosamine)과 acetylation이 알츠하이머병에 미치는 영향을 살펴보았다. Part 1에서는 베타-아밀로이드에 의해 O-GlcNAcylation이 잘못 조절되어 세포 사멸을 유도하는 기전을 규명하였고, Part 2와 Part 3에서는 잘못 조절된 번역 후 수식화

중 acetylation 을 회복시켰을 때 알츠하이머병에서 나타나는 분자생물학적 변화들이 다시 회복되는 것을 살펴보았다.

Part 1. 베타-아밀로이드에 의한 c-Fos 의 O-GlcNAcylation 증가가 신경세포 사멸에 미치는 영향 연구

O-GlcNAc 은 단백질의 번역 후 수식화로써, 소포체나 golgi 에서 수식화가 일어나 주로 막단백질에서 발견되는 glycosylation 과 달리 핵, 세포질, 미토콘드리아의 단백질에서 수식화가 일어나는 독특한 과정이다. 또한, 여러 개의 당이 연결되어 복잡한 구조를 이루지 않고, 하나의 O-GlcNAc 이 serine (S)이나 threonine (T)에 수식화되어, phosphorylation 과 비슷하게 단백질의 안정화, 활성 또는 신호 전달을 조절하고, phosphorylation 과는 경쟁적 혹은 상호적으로 수식화가 일어난다고 보고되어 있다. O-GlcNAc 은 단백질에 O-GlcNAc 을 붙여주는 O-GlcNAc transferase (OGT)와 O-GlcNAc 을 떨어뜨리는 O-GlcNAcase (OGA)에 의해 조절되는데, OGT 가 이용하는 O-GlcNAc 의 재료는 포도당으로부터 시작되는 hexosamine 생합성 과정의 마지막 산물인 UDP-GlcNAc (Uridine diphosphate N-acetylglucosamine)이다 (30). 이러한 O-GlcNAc 은 당뇨, 알츠하이머병과 같은 질병뿐만 아니라 기억 형성, 대사 항상성 등의 체내의 생물학적 과정에도 관여하는 중요한 요소이다 (그림 3) (31, 32).

O-GlcNAc 수식화는 체내의 당 대사에 의해 조절되는데, 생체 내에서 당 대사는 fluorine-18 동위원소를 표지한 포도당 유사체인 fluorodeoxyglucose (FDG)를 이용한 positron emission tomography (PET) 신호의 세기를 통해 측정할 수 있다. 실제로 알츠하이머병 환자의 뇌에서 FDG-PET 으로 당 대사를 측정하였을 때, 정상인에 비해 감소된 당 대사가 관찰되었다 (33). 이와 일관되게, 알츠하이머병 환자의 뇌조직을 이용하여 웨스턴 블롯 및 질량 분석을 수행한 연구들에서 알츠하이머병에서 단백질의 O-GlcNAcylation 이 비정상적으로 조절됨이 보고되어 있는데, 50~60 및 25 kDa 주위의 단백질에서는 O-GlcNAcylation 이 증가되어 있고, 70 kDa 이상의 단백질에서는 O-GlcNAcylation 이 감소되어 있으며, 질량분석에서 O-GlcNAcylation 이 증가된 펩타이드가 O-GlcNAcylation 이 감소된 펩타이드보다 더 많이 관찰되었다고 한다 (34-36). 또, 3xTg-알츠하이머병 모델 쥐의 뇌를 이용한 질량 분석 연구에서는 정상 쥐에 비해 더 적은 O-GlcNAcylation 된 단백질이 관찰되었지만, 3xTg-알츠하이머병 모델 쥐에서만 O-GlcNAcylation 이 일어난 단백질도 관찰되었음을 보고하였다 (37). 이와 더불어, OGA 억제제를 투여한 알츠하이머병 모델 쥐에서 손상된 기억력이 회복되고, γ -secretase 의 구성 단백질인 Nicastrin 의 O-GlcNAcylation 에 의해 베타-아밀로이드의 생성이 저해됨으로써 노인반이 감소하고, tau 의 O-GlcNAcylation 에 의해 신경섬유다발이 감소되었으며, 미토콘드리아의 ATP synthase 5A

가 O-GlcNAcylation 되어 이의 기능이 회복됨이 보고된 반면, OGA 를 억제하거나 knock-out 하였을 때, 베타-아밀로이드의 응집이 촉진되었다는 보고도 있다 (38-41). 이러한 선행 연구들은 잘못 조절된 O-GlcNAcylation 이 알츠하이머병의 병변 및 증상에 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다. 하지만 알츠하이머병의 병리학적 증상 중 하나인 신경 세포 사멸에 O-GlcNAcylation 이 미치는 영향은 전혀 연구된 바가 없다.

이와 관련하여, 세포 사멸을 조절하는 것으로 알려진 c-Fos 가 알츠하이머병 환자의 뇌에서 증가되어 있고, O-GlcNAcylation 되는 단백질이라는 보고가 있다 (42, 43). c-Fos 는 1 시간 가량의 굉장히 짧은 반감기를 가져, 세포 내에서 극소량 존재하는 단백질이기 때문에 질량 분석법으로는 검출이 어렵다. 하지만, Tai 외 공동연구자들은 O-GlcNAcylation 을 특이적으로 검출할 수 있는 화학효소법과 biotin-streptavidin 을 통한 증폭법을 사용하여, 세포 내에 극소량 존재하는 단백질의 O-GlcNAcylation 을 검출하였고, 이 연구를 통해 c-Fos 가 O-GlcNAcylation 되는 단백질임이 밝혀졌으나, 여전히 c-Fos 의 O-GlcNAcylation 자리는 밝혀지지 않았다. c-Fos 는 Jun family 와 결합하여 DNA 의 AP-1 자리에 붙는 전사인자로서, 세포가 받는 다양한 자극에 따라 여러 유전자의 발현을 조절한다 (44). 특히, 뇌 내 출혈이나 glutamate cytotoxicity, 신경생장인자 결핍 등의 세포 독성 상황일 때, 아포토시스를 유도하는 Fas, FasL, Bim 과 같은

유전자를 발현시키는 것으로 알려져 있다 (45-50). 하지만, 알츠하이머병에서 c-Fos 의 구체적 작용 기전은 보고된 바가 없는데, 베타-아밀로이드가 세포 사멸을 유발하고, 알츠하이머병 환자의 뇌에서 c-Fos 의 양이 증가되었다는 기존 보고는 알츠하이머병에서 일어나는 세포 사멸에 c-Fos 가 영향을 미칠 것이라는 점을 시사한다. 이에 더하여, O-GlcNAcylation 이 여러 생물학적 과정을 조절하고, 알츠하이머병의 병변 및 증상에도 중요한 영향을 미치기 때문에, c-Fos 의 O-GlcNAcylation 이 알츠하이머병에서 잘못 조절되어 있는지 평가하고, 그 결과 세포 사멸에 어떤 영향을 미치는지 그 기능을 규명할 필요가 있다.

따라서, 본 연구에서는 c-Fos 의 O-GlcNAcylation site 를 규명함과 동시에 알츠하이머병 동물 모델인 5xFAD 와 베타-아밀로이드를 처리한 세포에서 c-Fos 의 O-GlcNAcylation 변화와 그 기능을 확인하고자 하였다 (그림 4). 그 결과 베타-아밀로이드에 의해 OGA 와 c-Fos 의 상호 작용이 변화하여 c-Fos 의 O-GlcNAcylation 이 증가함을 면역침강법을 통해 확인하였고, c-Fos 의 O-GlcNAcylation 은 c-Fos 의 안정화, 전사 활성 증가를 통해 아포토시스를 유도하는 Bim 의 발현을 증가시켜서 신경세포 사멸을 촉진시킴을 웨스턴 블롯, luciferase assay, 세포 사멸 및 생존도 측정법을 통해 규명하였다. 이를 통해 알츠하이머병에서 O-GlcNAcylation 으로 매개되는 당 대사와 신경세포의 사멸이 서로 밀접한 관련이 있음을 제안하는 바이다.

Part 2. HDAC6 저해를 통해 증가된 Peroxiredoxin1 의 acetylation 이 알츠하이머병에서 손상된 미토콘드리아의 축삭 수송을 회복시키는 기전 연구

알츠하이머병의 주요 병인 중 하나인 베타-아밀로이드는 위에서 설명한 바와 같이 축삭 수송을 저해하고, 과도한 활성산소와 세포 내 Ca^{2+} 의 생성을 통해 세포 독성을 일으킨다고 알려져 있다 (3, 10, 51, 52). 축삭 수송은 안정적인 세포 내 미세 소관을 따라 kinesin, dynein 과 같은 수송 단백질 (motor protein)과 Miro, TRAK, JIP 와 같은 어댑터 단백질 (adaptor protein)이 소포 (vesicle), 미토콘드리아 (mitochondria), 단백질 등의 수송물 (cargo)을 세포 내의 필요한 곳으로 이동시키는 작용이다 (53). 신경 세포는 축삭이 매우 긴 비대칭적인 구조를 하고 있어, 축삭의 말단과 신경 세포체 사이에서 수송물이 원활히 수송되어야 신경 세포의 정상적인 기능 수행이 가능하고, 세포가 건강히 유지될 수 있다 (54, 55). 축삭 수송이 손상되면, 축삭에서 잘못 접힌 단백질의 분해와 신경영양적 신호 등이 제대로 조절되지 못하게 되고 (51, 53, 54), 특히, 미토콘드리아가 축삭 말단에 가지 못하면, 에너지를 공급하지 못해 시냅스의 기능이 저하된다 (55). 또한, 아밀로이드 전구 단백질로부터의 베타-아밀로이드의 생성 과정은 축삭 수송이 막힘으로써 더욱 촉진된다는 보고가 있다 (56). 베타-아밀로이드는 α -tubulin 의 acetylation 을 감소시키거나, tau 를

과산화시킴으로써 미세 소관을 불안정화시킴으로써 축삭 수송을 저해한다고 알려져 있다. 또, JNK, GSK3 β , CK2 와 같은 kinase 의 과활성화를 통해 kinesin 의 인산화를 증가시켜 미세 소관이나 수송물과 수송 단백질 사이의 부착성을 저해시킴으로써 축삭 수송을 손상시키는 것으로 알려져 있다 (15, 51, 52). 활성 산소는 지방, 단백질, 핵산 등을 산화시켜서 세포막의 Ca²⁺ 투과성을 증가시키고, 미토콘드리아를 손상시키며, 세포사멸을 유도한다 (10, 57-59). 이러한 과도한 활성산소를 조절하는 시스템으로 세포 내의 Superoxide dismutases (SOD), Catalase, Peroxiredoxins (Prxs), Thioredoxins (Trxs), Glutaredoxins (Grxs), Glutathione peroxidase(Gpx), Glutathione reductase (Gr)와 같은 항산화 효소와 glutathione (GSH), coenzyme Q, ferritin 과 같은 항산화 분자가 있다. SOD 는 superoxide(O₂⁻)를 H₂O₂ 로 바꿔주는 효소이고, Catalase, Prx-Trx 시스템, GSH 시스템 (GSH, Gpx, Gr, Grx)들은 H₂O₂ 를 O₂ 나 H₂O 로 바꿈으로써 항산화 기능을 한다 (60, 61). 알츠하이머병 환자의 뇌에서는 SOD, Catalase, Prx-Trx 시스템, GSH 시스템의 항산화 기능이 저하되어 있고, GSH 의 양도 감소되어 있다고 보고되어 있다 (62-64). 이처럼 대부분의 항산화 시스템이 손상되어 있기 때문에, 베타-아밀로이드에 의해 증가된 활성산소가 처리되지 못해 위와 같은 활성 산소에 의한 세포 독성이 일어나게 된다. 과도한 세포 내 Ca²⁺은 신경세포의 사멸을

일으키는 흥분 독성에 관여하며 (11, 12), ROS 와 Ca^{2+} 은 모두 미토콘드리아의 축삭 수송을 저해한다고 보고되어 있다 (65, 66).

히스톤 디아세틸레이스 6 (Histone deacetylase 6; HDAC6)는 다른 HDAC family 와 달리, 세포질에 주로 존재하여, α -tubulin, Peroxiredoxin1 (Prx1), Heat shock cognate 70 (Hsc70), Heat shock protein 90 (Hsp90), cortactin, tau 와 같은 세포질에 있는 단백질을 탈아세틸화시키는 효소이다 (그림 5). α -tubulin 의 acetylation 을 감소시킴으로써 미세 소관의 조립을 조절한다고 알려져 있으며, Prx1 의 acetylation 을 감소시킴으로써 Prx1 의 항산화능력을 감소시킨다고 보고되었다. 또한, Hsc70, Hsp90 과 같은 chaperone 의 acetylation 을 감소시켜, 각 chaperone 의 기질과의 결합력을 조절함으로써 단백질의 접힘이나 분해를 조절하는데 관여하고, cortactin 의 acetylation 을 저하시킴으로써 autophagosome 과 lysosome 의 fusion 을 조절하는 것으로 알려져 있다. Tau 에서는 KXGS 모티프 내의 K259, K321, K353 의 acetylation 과 phosphorylation 이 경쟁적으로 작용하는데, 이 잔기들의 acetylation 이 감소되면, phosphorylation 이 증가되어 tau 의 응집이 촉진된다고 한다. 이 외에도 HDAC6 자체에 유비퀴틴 결합 도메인 (ZnF)과 2 개의 디아세틸레이스 도메인 사이에 dynein 결합 도메인이 있어, 폴리유비퀴틴 (poly-ubiquitin)된 분해될 단백질을 분해할 수 있는 장소로 수송하는 기능을 가지고 있다. 즉, HDAC6 는 오토파지-리소좀 시스템이나

유비퀴틴-프로테아좀 시스템 (ubiquitin-proteasome system; UPS) 모두에 관여하여 단백질의 항상성을 조절하는 데 기여할 수 있는 단백질이다 (67-69).

이처럼 많은 기질을 조절하여, 세포 내의 다양한 기능에 관여하는 HDAC6 는 알츠하이머병 환자의 뇌에서 단백질의 양과 활성이 증가되어 있어 (70, 71), 최근 많은 연구자들이 꾸준히 알츠하이머병 치료의 표적으로 HDAC6 를 보고하고 있다. 베타-아밀로이드 병변을 보이는 알츠하이머병 동물 모델에서 HDAC6 를 knock-out 하거나 억제하였을 때, 기억력을 회복시키고, 베타-아밀로이드 병변을 감소시키며, α -tubulin 의 acetylation 을 회복시킴으로써 손상된 축삭 수송을 회복시킨다는 것이 그 결과들이다 (72-75). 이 뿐만 아니라, rTg4510 과 같은 tau 병변을 보이는 동물 모델에서 손상된 기억력과 신경세포 과활성의 회복과 함께 전체적인 tau 의 양이 감소되었다는 보고도 있고, rTg4510 과 같은 tau 모델 쥐와 primary neuron, 합성된 tau 를 이용한 *in vitro* system 에서 K274, K290, K321 잔기의 acetylation 을 증가시켰을 때, tau 의 응집이 저해되었으며, K259, K353 의 acetylation 증가를 통해 S262, S356 의 phosphorylation 이 감소되어, tau 의 병변이 감소되었다는 보고도 있다 (76-78). 이처럼 HDAC6 를 억제하는 것이 알츠하이머병 치료의 잠재적 표적으로 생각되고 있지만, HDAC6 의 많은 기질 중

α -tubulin 이나 tau 를 제외한 다른 기질의 작용에 대해서는 아직까지 구체적인 회복 기전이 밝혀진 바가 없다.

본 연구에서는 알츠하이머병에서 활성산소가 증가됨이 보고되어 있고, HDAC6 의 기질 중 하나인 Prx1 이 항산화 단백질이기 때문에, HDAC6 억제제를 통한 알츠하이머병의 회복 기전에 Prx1 이 어떻게 기여하는지 살펴보고자 하였다 (그림 6). Prx1 은 항산화 단백질로써 acetylation 이 증가하면 항산화 능력이 증가하는 것으로 알려져 있다 (69). 알츠하이머병 상황에서 HDAC6 의 활성이 높기 때문에, Prx1 의 acetylation 이 감소하고, 이에 따라 Prx1 의 항산화 능력도 감소되어 있을 것으로 예상하여, HDAC6 를 억제함으로써 Prx1 의 acetylation 을 회복시켰을 때, 알츠하이머병에서 증가된 활성산소가 감소되는지 확인하고자 하였다. 또한, 베타-아밀로이드에 의해 유도된 활성산소에 의해 Ca^{2+} 이 증가되고, 축삭 수송이 저해되었을 것이므로, HDAC6 를 억제하였을 때, 이러한 현상이 회복되는지 확인하였다. 이를 통해, HDAC6 억제제가 알츠하이머병에서 베타-아밀로이드에 의한 ROS, Ca^{2+} 의 증가, 축삭 수송 저해와 같은 세포 독성을 회복시키는 기전을 밝혔다.

Part 3. HDAC6 저해에 의한 acetylation 의 증가가 tau 단백질의 감소를 통해 알츠하이머병을 회복시키는 기전 연구

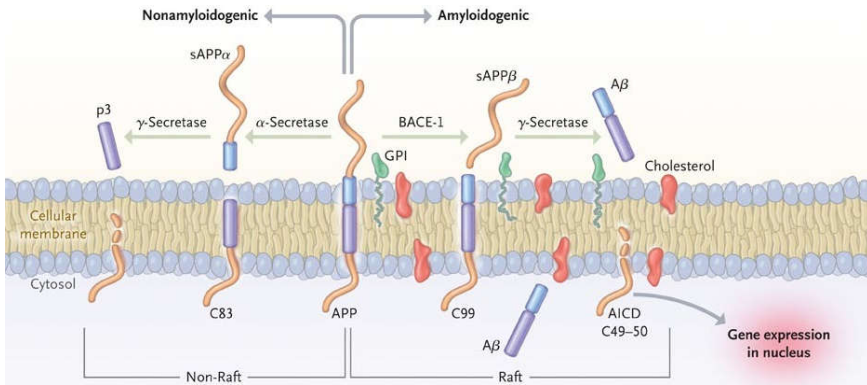
알츠하이머병의 또다른 주요 병인은 tau 단백질로써, 앞서 설명한 바와 같이 보통은 미세 소관에 붙어서 미세 소관을 안정화시키는 역할을 하지만, 알츠하이머병에서는 tau 가 과인산화되어, 그 결과 미세 소관에서 떨어져 나와 비정상적인 응집이 촉진된다 (16). 응집된 tau 는 시냅스 기능 장애와 축삭 수송 저해, 미토콘드리아 손상과 세포 사멸과 같은 세포 독성을 일으키는 것으로 보고되고 있다 (16, 26). 특히, 알츠하이머병 환자에서 신경 퇴화가 일어나는 뇌 부위는 베타-아밀로이드보다 응집된 tau 로 이루어진 신경섬유다발이 분포된 부위와 더 비슷하며 (79), 베타-아밀로이드 병변을 보이는 알츠하이머 모델 쥐에 내재성 tau 를 knock-out 하였을 때, 베타-아밀로이드에 의한 인지기능 저하, 발작, 생존도 저하, 축삭 수송의 손상과 DNA 이중 가닥의 깨짐이 없어지거나 급격히 감소한다는 보고들은 알츠하이머병에서 tau 가 작동인자 (effector)로서 세포 독성을 일으킨다는 점을 시사한다 (17, 80, 81). 또한, 지금까지 베타-아밀로이드를 표적한 semagacestat, solanezumab, bapineuzumab 과 같은 치료제들이 임상시험에서 실패를 거듭하고 있어 (82), tau 단백질을 줄이는 치료제 연구가 매우 절실한 상황이다. 현재 tau 를 표적한 치료제 후보로 응집을 저해하는 methylene blue 의 정제형인 LMTM 과, 면역 치료 전략으로 tau 를 줄이는 AADvac-1, BIIB092, C2N

8E12, anti-sense oligonucleotide (ASO)를 이용하여 tau 를 줄이는 BIIB080 을 포함한 9 개의 후보 약물이 임상 시험 진행 중이다. 이는 베타-아밀로이드를 표적하여 임상 시험을 진행 중인 치료제 후보 약물이 34 개인 것과 비교하였을 때, tau 를 표적한 치료제 후보 약물의 수가 매우 적음을 알 수 있어, 새로운 tau 표적 치료제를 발굴하는 것이 중요함을 시사한다.

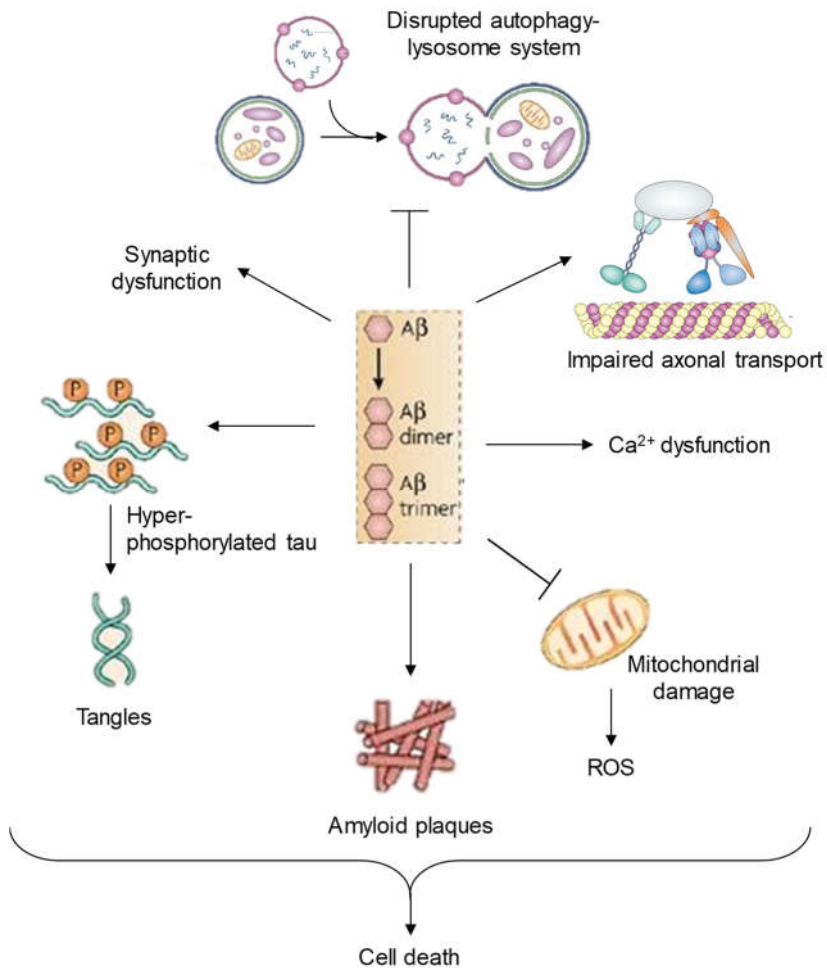
이러한 상황에서, Part 2 에 기술한 바와 같이 HDAC6 억제제를 통해 tau 병변을 보이는 동물 모델이나 *in vitro* system 에서 전체적인 tau 혹은 응집된 tau 를 감소시켰다는 보고는 HDAC6 억제제가 tau 를 줄이는 치료제 후보로 잠재력이 있음을 보여준다 (76-78). 하지만, 실제 알츠하이머병 환자와 같이 베타-아밀로이드와 tau 병변을 모두 가지면서, 신경 세포의 사멸, 기억력의 손상이 모두 나타나는 알츠하이머병 모델 동물에서의 HDAC6 억제 효과는 입증된 바가 전혀 없다. 또한, tau 는 chaperone 복합체의 조절을 통한 UPS 와 오토파지-리소좀 시스템 의 두 가지 경로 모두로 분해된다는 것이 알려져 있고 (그림 7) (83), Part 2 에 기술한 바와 같이 HDAC6 가 위의 두 가지 시스템에 모두 관여하는 바가 알려져 있지만, HDAC6 억제제가 어떻게 작용하여 tau 를 감소시키는지에 대한 구체적인 기전 역시 밝혀진 바가 거의 없다.

따라서, 본 연구에서는 베타-아밀로이드와 tau 의 병변을 모두 보이는 알츠하이머병 동물 모델인 ADLP^{APT} (Alzheimer' s

disease-like pathology^{APP & Tau}) 쥐에서 HDAC6 억제제의 치료 효과를 살펴보고자 하였다 (그림 6). 그 결과, 손상된 기억력의 회복, 시냅스 구조의 회복과 더불어 전반적인 tau 단백질의 현저한 감소를 확인하였고, HDAC6 억제를 통해 chaperone 을 조절하여 UPS 의 tau 단백질 분해를 촉진시킴을 확인하였다. 이를 통해, HDAC6 의 억제가 UPS 와 연결된 chaperone 을 조절하여 tau 단백질을 표적함으로써, 시냅스와 기억력의 회복까지 가져오는 효과적인 알츠하이머병의 치료 전략임을 제안하는 바이다.

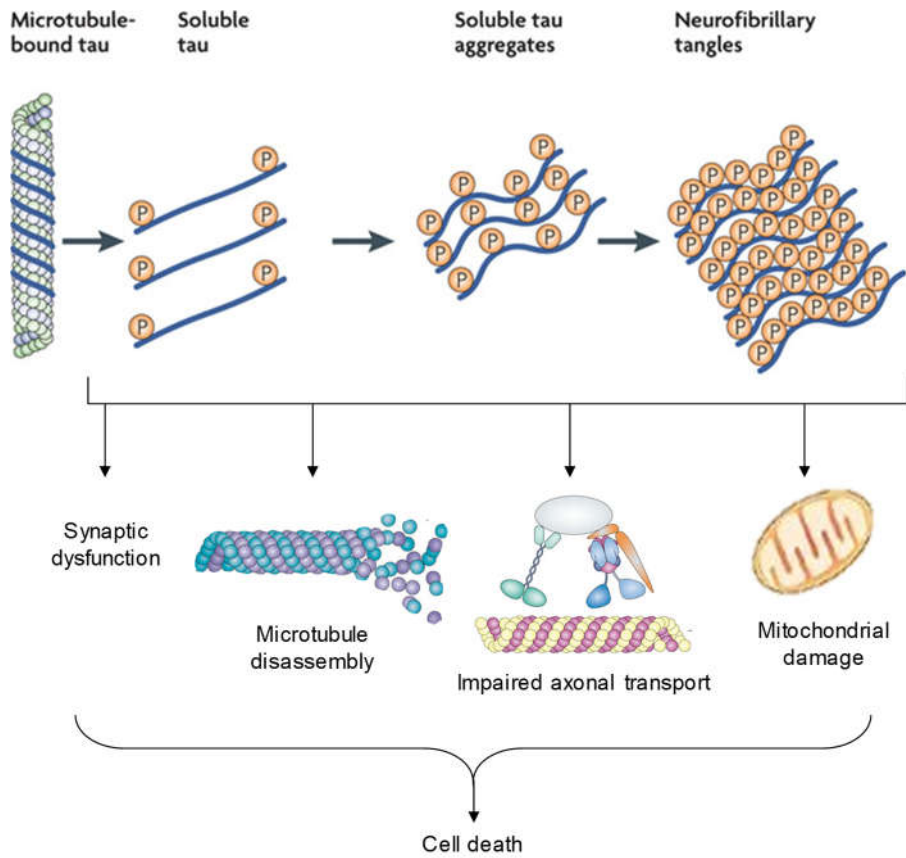


(Querfurth et al., NEJM, 2010)



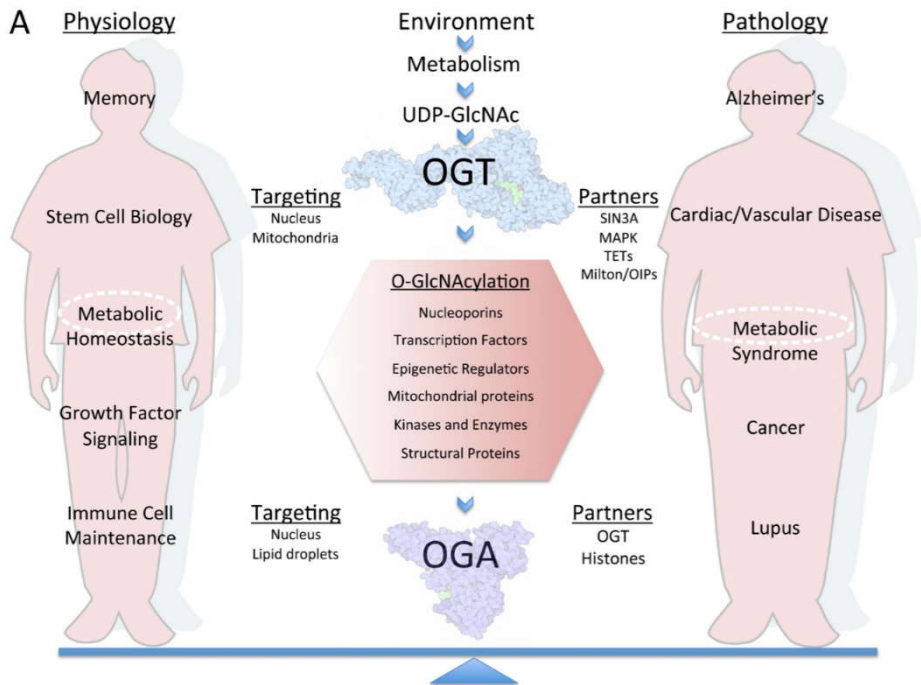
(Modified from LaFerla et al., Nature Reviews Neuroscience, 2007)

그림 1. APP 대사 과정과 베타-아밀로이드의 특성



(Modified from Citron et al., Nature Reviews Drug Discovery, 2010)

그림 2. Tau 단백질의 응집 과정과 응집된 tau 단백질의 독성



(Hanover et al., JCB, 2015)

그림 3. O-GlcNAcylation의 기능

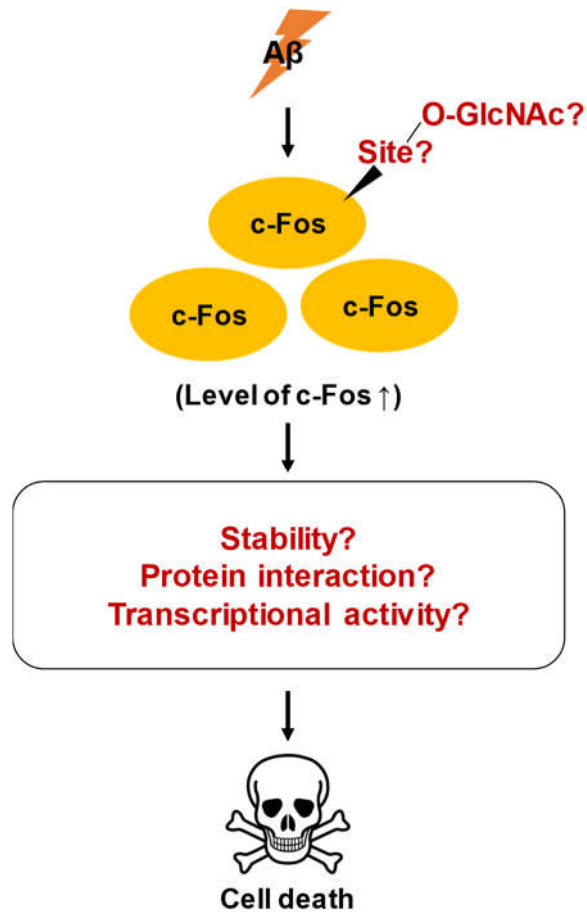
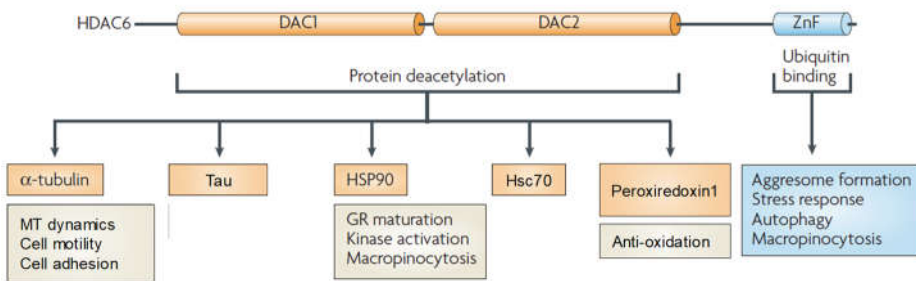
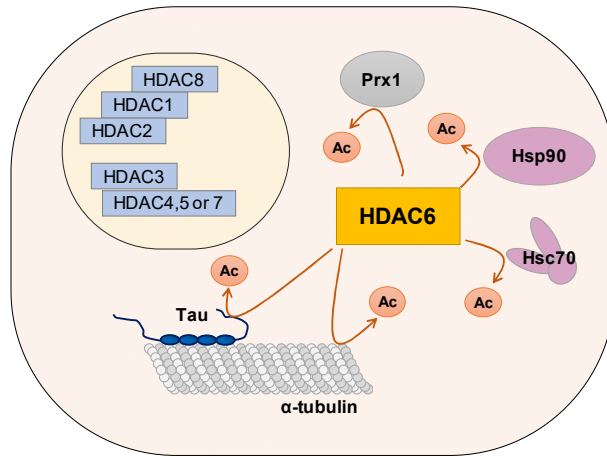


그림 4. 베타-아밀로이드에 의해 잘못 조절된 O-GlcNAcylation이 c-Fos를 매개하여 세포사멸에 미치는 영향 연구의 가설 모식도



(Modified from Aleksey et al, Nature Reviews Drug Discovery, 2008)

(Modified from Yang et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008)

그림 5. HDAC6의 기질과 그에 따른 기능

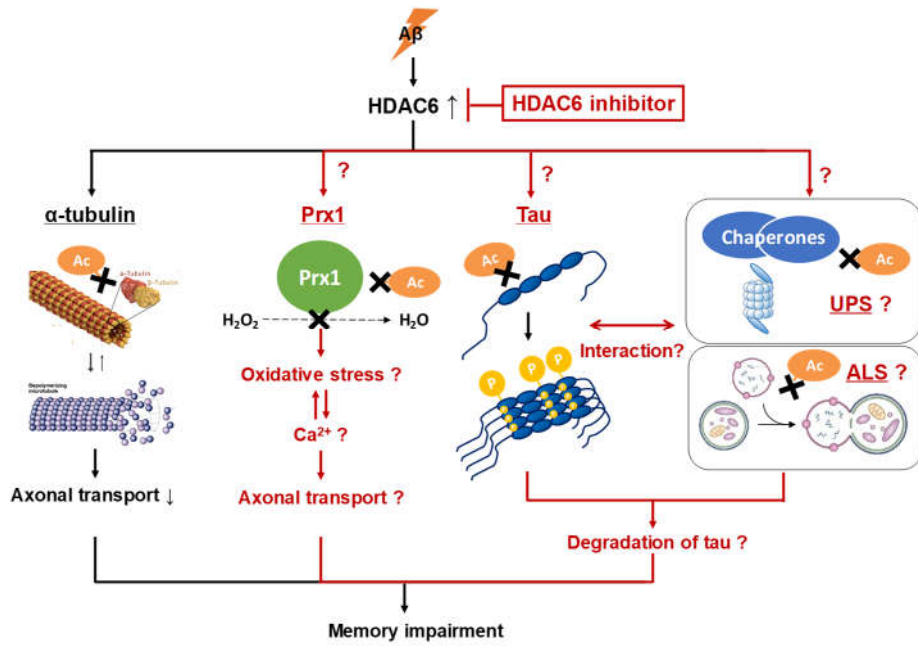
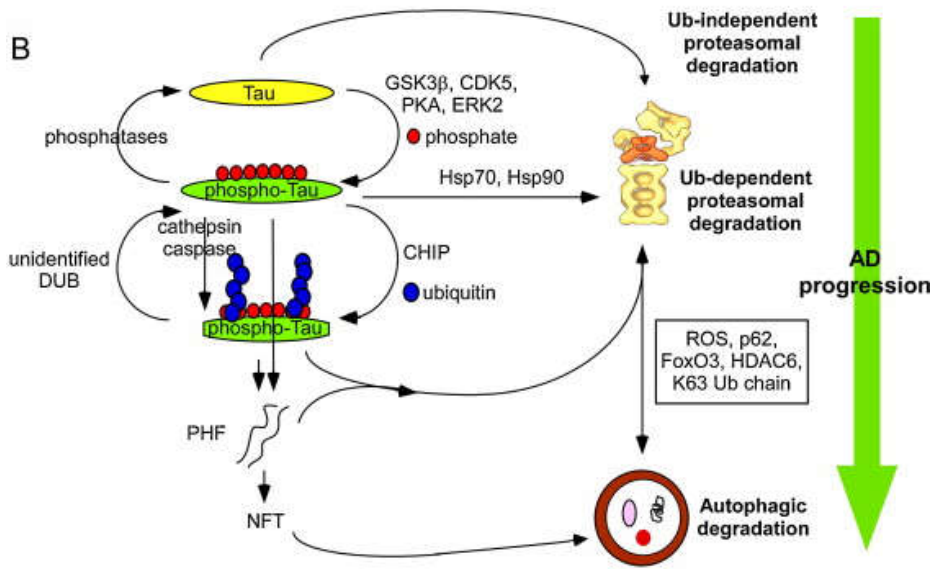


그림 6. HDAC6 억제제가 알츠하이머병을 회복시키는 기전의 가설 모식도



(Lee et al., Prog Neurobiol., 2013)

그림 7. Tau 단백질의 분해 기전

실험 재료 및 방법

Part 1. 베타-아밀로이드에 의한 c-Fos 의 O-GlcNAcylation 증가가 신경세포 사멸에 미치는 영향 연구

1. 실험에 이용된 실험동물

8개월령의 알츠하이머병 동물 모델인 5xFAD 쥐 (Tg6799; B6SJL-Tg (APP^{SwFILon}, PSEN* M146L*L286V) 6799Vas/J, stock number 006554, Jackson Labs, USA)를 사용하였다. 5xFAD는 사람의 5가지 알츠하이머병 유발 돌연변이를 가진 쥐로써 human APP695 돌연변이 (K670N/M671L (Swedish), I716V (Florida), V717I (London))와 human presenilin 1 돌연변이 (M146L, L286V)가 Thy-1 프로모터에 의해 신경세포에서만 과발현되는 쥐이다. 동물들은 실험 동물 관리 원칙 (Principle of Laboratory Animal Care; NIH publication No. 85-23, 1985 개정) 과 서울대학교 실험 동물 관리 및 지침서를 준수하여 관리되었고, 모든 동물 실험은 서울대학교 IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받았다.

2. 초대 신경 세포 배양 (Primary neuronal culture)

18일 된 Sprague-Dawley rat (KOATECH, Korea)의 배아에서 뇌를 분리한 뒤, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS;

WeiGENE, Korea)으로 옮기고, 0.5% trypsin (2.5% trypsin; Sigma, USA)을 처리하여 하나의 세포로 분리시킨다. Poly-D-lysine (Sigma, USA)으로 미리 코팅한 plate에 위의 세포를 넣었고, B27 (Gibco, USA)과 penicillin/streptomycin (Sigma, USA)가 포함된 NeuroBasal medium (Gibco, USA)에서 배양하였다. 세포 배양 배지는 3일에 한 번씩 교체하였다.

3. 세포주 (Cell lines) 및 형질 주입 (Transfection)

Human neuroblastoma 세포주인 SH-SY5Y와 human kidney 세포주인 HEK293T 세포주를 사용하였다. 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, USA)와 1% penicillin/streptomycin가 포함된 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM; HyClone, USA)를 사용하여 배양되었다. 형질 주입을 위해서, 플라스미드 DNA와 siRNA를 Lipofectamine[®]이나 Lipofectamine LTX를 Plus reagent (Invitrogen, USA)와 함께 사용하여 Opti-MEM (Gibco, USA)에서 섞어 사용하였다. SH-SY5Y 세포주에는 Lipofectamine[®]을, HEK293T 세포주에는 Lipofectamine LTX를 사용하였다.

4. 플라스미드 DNA, siRNA 및 시약 (DNA constructs, siRNA and reagents)

EGFP-tagged c-Fos 플라스미드 DNA (EGFP-c-Fos-WT과

EGFP-c-Fos-돌연변이 플라스미드 DNA)와 두 가지의 tag-free c-Fos 플라스미드 DNA (c-Fos-WT과 c-Fos-S56A-S57A)를 사용하였다. Tag-free c-Fos-WT 플라스미드 DNA는 OriGene (USA)에서 구매하였고, c-Fos-S56A-S56A 플라스미드는 site-directed mutagenesis kit (Enzymomics, Korea)를 사용하여 point-mutation을 통해 만들었다. EGFP-tagged c-Fos 플라스미드 DNA는 Gateway cloning technology (Invitrogen, USA)를 이용하여 만들었다. AP-1 프로모터에 의해 luciferase의 발현이 조절되는 AP-1-luc 플라스미드 DNA는 Promega (USA)에서 구매하였고, OGT siRNA는 Bioneer (Korea)의 pre-designed siRNA 제품으로 구매하였다. OGA 억제제인 Thiamet G와 β -hexosaminidase (Sigma, USA), MG132 (Sigma, USA), Cycloheximide (CHX; Sigma, USA)도 사용하였다.

5. A β 준비 (Preparation of A β)

A β ₁₋₄₂ peptide (American peptide, USA와 Bachem, Switzerland)를 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (Sigma, USA)에 녹이고, Speedvac (Labconco, USA)을 이용해 동결건조한다. 이를 최종 농도가 1mM이 되도록 anhydrous dimethyl sulfoxide (Sigma, USA)에 녹이고, DMEM이나 세포 배양 배지에 적절한 농도로 처리한다. 세포에 처리한 뒤 배양되는 동안, 대부분의 A β 는 주로 올리고머 상태로 존재하고, 일부 적은 양만 단량체

(monomer)로 존재한다.

6. WGA-agarose pull down, 면역침강법 (Immunoprecipitation) 및 웨스턴 블롯 (Western blot)

1) WGA (Wheat-germ agglutinin)-agarose pull down 분석

세포나 뇌조직에서 protease inhibitor cocktail, phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma, USA), OGA 억제제를 포함한 RIPA buffer (iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 단백질을 추출한다. BCA 방법으로 정량하여, 동량의 단백질을 WGA가 붙어있는 agarose beads (Vector, USA)와 4 °C에서 overnight 반응시킨다. 반응 후 RIPA buffer로 3회 세척한 뒤, 3x sample buffer를 bead의 절반 volume만큼 넣고, 95 °C에서 끓여 단백질을 elution하였다.

2) 면역침강법 (Immunoprecipitation)

EGFP-tagged c-Fos를 면역침강시키기 위해, EGFP-tagged c-Fos가 형질 주입된 세포에서 1% Triton X-100이 함유된 TBS buffer (1% Tx-100 buffer; 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4)를 이용하여 단백질을 추출하였다. 1% Tx-100 buffer 역시 protease inhibitor cocktail, PMSF (Sigma, USA), OGA 억제제가 포함되었다. 추출한 단백질은 anti-GFP antibody와 4 °C에서 overnight 반응시킨 뒤, protein A/G agarose beads (SantaCruz, USA)와도 4 °C에서 3 시간 반응시켰다. 그 뒤, 1% Tx-100

buffer로 3회 세척하고, 3x sample buffer를 넣어 단백질을 elution 하였다.

3) 웨스턴 블롯 (Western blot)

1)과 2)의 elution된 단백질과 input 샘플을 NuPAGE Bis-Tris gel (Invitrogen, USA)에서 전기영동하여, polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, USA)에 transfer 하였다. Membrane은 5% skim milk (Bioworld, USA)로 blocking하고, 각 단백질의 특이적인 1차 항체와 4 °C에서 overnight 반응시켰다. 그 뒤, horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시키고, Enhanced chemiluminescence (ECL) solution (GE Healthcare, UK)을 이용하여 Bio-imaging analyzer (LAS-3000과 LAS-4000; Fuji photo Film, Japan)로 분석하였다. 사용한 1차 항체는 다음과 같다. anti-c-Fos, anti-c-Jun, anti-Bim, anti-Caspase-3 (CST technologies, USA), anti-O-GlcNAc (CTD110.6, Covance, USA), anti-GFP (Abcam, USA for immunoprecipitation과 SantaCruz, USA for immunoblotting), anti-OGA, anti-OGT, anti- β -actin (Sigma, USA), anti- α -tubulin (Millipore, Germany), anti-Histone H3 antibodies (Abcam, USA).

7. 형광염색 및 이미징 (Fluorescence imaging)

1) Structured illumination microscopy (SIM) 이미징

OGA와 c-Fos의 상호작용을 측정하기 위해서, 면역세포염색 (Immunocytochemistry)을 수행하였다. EGFP-c-Fos-WT이 형질 주입된 세포를 poly-D-lysine이 코팅된 coverslip에 깔고, 베타-아밀로이드를 처리한다. 이렇게 준비된 세포를 4% paraformaldehyde (BIOSESANG, Inc., Korea)로 고정시킨 뒤, anti-OGA (Sigma, USA)와 anti-GFP (Osenses, Australia) antibodies와 4 °C, overnight 반응시킨다. Antibody는 0.5% Tx-100, 1% goat serum이 포함된 PBS에 희석하여 반응시켰다. 그 뒤, 형광이 표지된 2차 항체를 1시간 동안 상온에서 반응시키고, SIM (Nikon N-SIM, Nikon Instruments, Inc., Japan)으로 이미징 후, NIS-E software (Nikon Instruments, Inc., Japan)로 분석하였다.

2) Confocal 이미징

c-Fos의 양을 측정하기 위해서, EGFP-c-Fos를 형질 주입한 세포에 CHX나 MG132를 처리한 뒤, 세포 내의 EGFP 형광을 confocal 현미경 (Olympus FV10i; Olympus, Japan and LSM710; Carl Zeiss, Germany)으로 라이브 셀 이미징 (live cell imaging)하였다.

8. 세포 사멸 및 생존도 측정 (TUNEL, Calcein-AM, MTS assays)

1) TUNEL assay

세포 사멸을 측정하기 위한 방법으로, EGFP-c-Fos가 형질주입

된 세포에 베타-아밀로이드를 처리한 뒤, 4% paraformaldehyde로 고정하고, PBS에 희석한 0.1% Tx-100으로 permeabilization한다. 그 후, TUNEL 반응 용액 (TMR Red; Roche, Germany)을 넣고, 37 °C, 1 시간 반응시킨 뒤, 형광현미경 (EVOS FL Auto2; Thermo Fisher Scientific, USA)으로 이미징하였다. 이미지는 Celleste software (Thermo Fisher Scientific, USA)로 분석하였다.

2) Calcein-AM assay

세포 생존도를 측정하기 위한 방법으로, Tag-free c-Fos를 형질주입한 세포에 베타-아밀로이드를 처리한 뒤, 1 μ M Calcein-AM (Invitrogen, USA)을 DMEM에서 37 °C, 1 시간 동안 반응시킨다. 배지를 PBS로 바꿔준 뒤에, 형광 세기를 luminometer (Infinite M200; Tecan, Switzerland)로 측정하였다. (Excitation: 490 nm, Emission: 520 nm)

3) MTS assay

또다른 세포 생존도 측정법으로, 2)와 동일하게 처리한 세포에 MTS solution (Promega, USA)을 세포 배양 배지에 넣고, 37 °C, 1 시간 동안 반응시킨다. 그 후 분광광도계 (spectrophotometer)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. Luciferase assay

Tag-free c-Fos와 AP-1-luc 플라스미드 DNA를 함께 형질주

입한 세포에 베타-아밀로이드를 처리하여 준비한 뒤, passive lysis buffer (Promega, USA)로 단백질을 추출하였다. 동량의 단백질을 luciferase assay reagent (Promega, USA)와 섞은 뒤, luminometer로 측정하였다.

10. 통계처리

그룹 간의 통계적 유의성은 상황에 따라 unpaired t-tests나 one-way analysis of variance (ANOVA), two-way ANOVA의 Bonferroni post-hoc tests로 분석하였다. *P* values가 0.05보다 작을 때, 통계적으로 유의하다고 판정하였으며, 모든 데이터는 mean ± SEM으로 나타내었다. 통계 분석은 GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA)를 이용해 수행하였다.

Part 2. HDAC6 저해를 통해 증가된 Peroxiredoxin1의 acetylation이 알츠하이머병에서 손상된 미토콘드리아의 축삭 수송을 회복시키는 기전 연구

1. 실험에 이용된 사람의 뇌조직

정상인과 알츠하이머병 환자 (표 1)의 뇌조직은 다음과 같은 Boston University Alzheimer's Disease Center (BUADC)의 신경병리학적 과정에 따라 준비되었다. 신경병리학적 검사를 통해 다

른 신경 질환이 없고, 부검을 통해 알츠하이머병이 사인인 사람의 조직이 연구용으로 준비되었고, 뇌조직은 사전 동의를 한 사람이나 기부를 통해 수집되었다. Declaration of Helsinki의 principles of human subject protection에 따라 연구가 수행되었으며, Boston University School of Medicine Institutional Review Board의 검수를 받았다. 내후각 피질 (entorhinal cortex)과 해마 (hippocampus) 부위가 실험에 이용되었다.

2. 실험에 이용된 실험동물 및 HDAC6 억제제 투여

6개월령의 암컷 5xFAD 쥐를 사용하였다. HDAC6 억제제로 Tubastatin A (TBA; Sigma, USA와 U-chem (Korea))를 사용하였고, 100 mg/kg의 TBA나 생리식염수 (saline)을 매일, 4주 동안 복강 투여 (intraperitoneal (i.p.) injection) 하였다.

3. 세포주 (Cell lines) 및 형질주입 (Transfection)

Mouse hippocampal 세포주인 HT22 세포주와 초대 배양 해마 신경세포 (primary hippocampal neuron)을 이용하였고, 세포배양 방법은 Part 1과 같다. 다만, 미토콘드리아 축삭 수송 분석을 위해 primary neuron을 poly-D-lysine이 코팅된 microfluidic chamber에 배양하였다. HT22 세포주에는 Lipofectamine LTX을 이용하여 Part 1의 방법으로 형질 주입하였고, primary neuron에는 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA)과 플라스미드 DNA를 새

로운 신경세포 배양 배지에서 섞어 형질 주입하였다.

3. 플라스미드 DNA, 시약 및 항체 (DNA constructs, reagents and antibodies)

세 가지의 Flag-tagged Prx1 플라스미드 DNA (Prx1-WT-Flag, Prx1-K197Q-Flag, Prx1-K197R-Flag)와 AcGFP를 동시에 발현하게 한 또다른 세 가지 tag-free Prx1 플라스미드 DNA를 사용하였다. Prx1-WT-Flag 플라스미드 DNA는 pCR3.1 vector를 기반으로 만들어졌으며, 이화여자대학교의 강상원 교수님으로부터 제공받았다. Prx1-K197Q-Flag과 Prx1-K197R-Flag vector는 site-directed mutagenesis kit를 이용해 돌연변이시켜 만들었다 (Part 1과 동일). AcGFP가 동시에 발현되는 tag-free Prx1 vector는 Flag-tagged Prx1 vector로부터 BamHI과 NotI 제한효소를 이용해 Prx1 서열을 자르고, 이를 pBI-CMV2 vector (Clontech, USA)로 옮겨서 제작하였다. pBI-CMV2 vector는 동일한 프로모터를 2개 가지고 있어, 위 과정을 통해 tag-free Prx1과 AcGFP를 동시에 발현할 수 있는 플라스미드 DNA를 만들 수 있었다. 미토콘드리아를 보기 위해, pDsRed2-Mito (Clontech, USA)를 사용하였다.

사용한 시약은 TBA, Trolox (Sigma, USA), BAPTA-AM (ThermoFisher Scientific, USA), A β 1-42 peptide (American peptide, USA와 Bachem, Switzerland)이다.

사용한 항체는 anti-Flag, anti-acetyl-tubulin, anti- β -actin (Sigma, USA), anti-Prx1 (CST, USA), 4-HNE, 8-OHdG (Abcam, UK), Tom20 antibody (SantaCruz, USA)이다. anti-acetyl-prx1 antibody는 BSA가 결합된 Prx1의 C-말단 합성 peptide (SKEYFSK(Ac)QK) (Peptron Inc., Korea)에 acetylation이 된 것을 이용하여 닭에서 만들었다. 항체 선별은 4번의 bio-panning을 거쳤는데, BSA가 결합된 non-acetylated-Prx1 peptide (BSA-CGGGSSKEYFSKQK)를 이용하여 먼저 non-specific 항체를 제거한 뒤에, BSA-acetylated Prx1 peptide를 이용해 specific 항체를 선별하였다. Protein A agarose beads가 있는 affinity chromatography (Repligen 16 Corp., USA)를 사용하였고, 최종적으로 정제된 acetyl-Prx1 antibody의 clone 이름은 R2-31이다.

4. 면역침강법 (Immunoprecipitation) 과 웨스턴 블롯 (Western blot)

세포에서 protease inhibitor cocktail, PMSF, HDAC6 inhibitor가 포함된 1% Tx-100 buffer로 단백질을 추출하였다. Flag-tagged Prx1을 면역침강하기 위해, 동량의 단백질을 anti-Flag M2 magnetic beads (Sigma, USA)와 4 °C, overnight 반응시키고, 3xFlag peptide (Sigma, USA)를 이용하여 elution 한 뒤, 5x sample buffer를 넣고 95 °C, 3 분간 끓였다. 내재성 Prx1을 면역

침강하기 위해서는 anti-Prx1 antibody를 protein A/G agarose beads에 BS3를 이용해 crosslinking시키고, 이를 동량의 단백질과 4 °C, overnight 반응시켰다. 1% Tx-100 buffer로 세척 후, 3x sample buffer를 넣고, 95 °C, 5 분간 끓여 elution하였으며, 웨스턴 블롯 방법은 Part 1의 방법과 동일하다.

5. 활성산소 측정 (DCFDA assay)

활성산소를 측정하기 위해, 세포에 1 μ M 의 2', 7' - dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA; DCFDA로 표기) (Invitrogen, USA)를 DMEM 배지에서 처리한다. 37 °C에서 1 시간 동안 반응시킨 뒤, 새로운 DMEM으로 배지를 바꾸고 형광현미경 (Olympus, Japan)이나 CellInsight (Thermo Scientific, USA)로 이미징하여 형광 세기를 측정하였다. 이미지는 Image J (NIH) 프로그램이나 CellInsight의 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

6. Ca²⁺ 측정 (Fluo-4 assay)

Ca²⁺의 농도를 측정하기 위해서, 세포에 Fluo-4 (Invitrogen, USA)를 배지와 동량 처리하고, 37 °C, 1 시간 동안 반응시킨다. 그 뒤, DMEM으로 배지를 교체하고, 형광현미경이나 CellInsight로 이미징하고, 형광 세기를 위와 같은 방법으로 분석하였다.

7. 미토콘드리아 축삭 수송 분석

신경세포의 세포체와 축삭을 분리하여 배양할 수 있는, polydimethylsiloxane (PDMS)로 만들어진 microfluidic chamber에 primary neuron을 7일간 배양한다 (DIV7). pDsRed2-Mito와 tag-free Prx1과 AcGFP를 동시에 발현하는 pBI-CMV2 플라스미드 DNA를 동시에 형질주입하여, 미토콘드리아를 형광표지하고, Prx1을 과발현한 세포도 형광표지한다. 세포에 표기된 시약을 처리한 뒤에, 형광현미경 (Olympus IX81 microscope (Japan), CoolSNAP HQ2 CCD camera (Photometrics, USA), MetaMorph Software (Universal Imaging, USA))으로 1분 간격으로 2분 동안 live cell imaging 하였고, 이미징하는 동안 37 °C와 5% CO₂를 유지시켜주는 배양 장비 (Live cell instrument, Korea)에 세포를 유지시켰다. 미토콘드리아 축삭 수송의 분석은 MetaMorph software와 multiple kymograph plugins (by J. Rietdorf, A. Seitz)가 설치된 Image J 프로그램을 이용해 수행하였다.

8. 면역 조직 염색 (Immunohistochemistry)

Zoletil 50 (Virbac, France)과 Rompun (Bayer, USA) 용액 (3:1 ratio, 1 ml/kg, i.p.)으로 마취시킨 쥐를 PBS로 관류하여 피를 제거하고, 뇌를 적출한 뒤, 4% paraformaldehyde에 4 °C, 36 시간 동안 반응시켜 고정하였다. 그 뒤 30% sucrose에서 4 °C, 72 시간 동안 반응시켜 cryoprotection 과정을 거친 뒤, Cryostat (Leica, USA)을 이용하여 30 μm 두께로 잘라 조직 절편을 만들었다.

1) DAB 염색

4-HNE 와 8-OHdG는 3, 3' -diaminobenzidine (DAB)을 이용하여 염색하였는데, 그 과정은 다음과 같다. 조직 절편을 0.3% Tx-100, 0.05% BSA와 normal horse serum이 포함된 PBS에 희석한 anti-4-HNE (1:200)와 8-OHdG (1:400) antibodies와 4 ° C, overnight 반응시킨다. 그 뒤, PBS에 희석한 3% H₂O₂와 상온에서 30 분 동안 반응시켜 내재된 peroxidase를 비활성화시킨 뒤, biotin이 결합된 2차 항체 (1:200; Vector Laboratories, USA)를 상온에서 2시간 동안 반응시키고, HRP-avidin (Vector Laboratories, USA)으로 avidin-biotin 복합체를 만들기 위해 상온에서 1 시간 동안 더 반응시켰다. 0.05 M Tris-buffered saline (pH 7.6; TBS)에 희석된 DAB을 반응시켜 면역 염색한 뒤, 염색된 절편을 poly-L-lysine (Sigma, USA)가 코팅된 Histobond glass slides (Marienfeld, Germany)에 올리고, overnight하여 건조시킨 뒤, 순차적인 ethanol dehydration을 거치고, Permount (Fisher Scientific, USA)를 떨어뜨리고 coverslip을 덮어 염색을 완료하였다.

사람의 뇌조직을 acetyl-Prx1으로 염색할 때는, paraffin에 내장된 조직 절편을 55 ° C, dry-oven에서 overnight 반응시켜 deparaffinization하였고, rehydration, 내재성 peroxidase를 비활성화시킨 뒤에 anti-acetyl-Prx1 antibody (1:100)를 4 ° C, overnight 반응시켰다. 이후 과정은 앞서 기술한 것과 동일하다. 각

반응 과정마다 중간에 PBS로 세척하였고, 염색된 조직은 광학 현미경 (Olympus FSX 100 (Olympus, Japan))으로 이미징하여, Image J로 분석하였다.

2) 형광 염색 (Fluorescent staining)

Acetyl-Prx1과 미토콘드리아를 표지하기 위한 Tom20은 형광염색하였다. Anti-acetyl-Prx1 (1:50)과 Tom20 (1:200) antibodies를 1% Triton X-100과 normal horse serum이 포함된 PBS에 희석하여 4 ° C, overnight하여 조직과 반응시킨다. 그 뒤, Alexa Fluor 488과 594가 결합된 2차 항체 (ThermoFisher Scientific, USA)를 상온에서 1시간 동안 반응하여, 형광 염색하였다. 형광 신호는 confocal microscope (Carl Zeiss, Germany)으로 이미징하였고, Image J로 분석하였다.

9. 통계처리

그룹 간의 통계적 유의성은 one-way analysis of variance (ANOVA)나 two-way ANOVA의 Bonferroni post-hoc tests로 분석하였다. *P* values가 0.05보다 작을 때, 통계적으로 유의미하다고 판정하였으며, 모든 데이터는 mean ± SEM으로 나타내었다. 통계 분석은 GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA)를 이용하였다.

Part 3. HDAC6 저해에 의한 acetylation 의 증가가 tau 단백질의 감소를 통해 알츠하이머병을 회복시키는 기전 연구

1. 실험에 이용된 실험동물 및 HDAC6 억제제 투여

4.5개월, 6.5개월령의 암컷 ADLP^{APT} 쥐를 사용하였다. ADLP^{APT} 쥐는 5xFAD와 JNPL3 쥐 (TauP301L-JNPL3; Taconic, Stock#2508 homozygote)를 교배하여 만든 알츠하이머 동물 모델로써, 실제 알츠하이머병 환자와 비슷하게 베타-아밀로이드 병변과 tau 병변을 모두 보이는 특징을 가지고 있다 (84). HDAC6 억제제는 1) 약물 용량 적정성 확인 및 예방 모델, 2) 치료 모델의 두 가지의 실험 구성으로 투여하였고, 사용한 HDAC6 억제제는 HDAC6 inhibitor (Chong Kun Dang pharmaceutical Corp., Korea)로 표기하였다.

1) 약물 용량 적정성 확인 및 예방 모델

4.5개월령의 ADLP^{APT} 쥐에 생리식염수 혹은 HDAC6 inhibitor (1 mg/kg과 2.5 mg/kg)를 하루에 두 번씩 4개월간 복강으로 투여하였다.

2) 치료 모델

6.5개월령의 ADLP^{APT} 쥐에 생리식염수 혹은 HDAC6 inhibitor (2.5 mg/kg)를 하루에 두 번씩 2개월간 복강으로 투여하였다.

2. Y-maze

항상 새로운 곳을 찾는 쥐의 특성을 이용한 기억력 평가 방법이다. Day 1에는 쥐를 Y-maze로 옮겨 적응시키고, Day 2에 쥐를 Y-maze (정도비앤피, Korea)의 중앙에 놓고, 8분 동안 들어가는 통로 순서대로 움직임을 기록한다. 쥐가 연속해서 3가지 통로를 번갈아 들어가면 (spontaneous alteration) 이전에 들어간 통로를 잘 기억한 것으로 간주해, 이를 전체 통로로 들어간 횟수로 나누어 % alteration 수치로 나타내어 기억력을 평가한다.

3. Contextual fear conditioning

특정 공간에서 쥐에게 foot-shock 을 주어 공간에 대한 기억을 시킨 뒤에, 다시 그 공간에 들어갔을 때 shock 에 대한 반응 (freezing)을 얼마나 하는지를 수치화하여, hippocampal-dependent memory 를 측정할 수 있는 평가 방법이다. Day1 에 contextual fear conditioning chamber (H10-11M-TC; Coulbourn Instruments, USA) 에서 총 300 초 동안, 0.55 mA, 2 sec 로 2 번 foot-shock 을 주어 학습시킨 뒤, Day2 에 foot-shock 없이 300 초 동안 chamber에 두어 얼마나 freezing 하는지를 FreezeFrame 프로그램으로 정량화하여 기억력을 측정한다.

4. 면역 조직 염색 (Immunohistochemistry)

Part 2의 형광염색법과 동일하고, 사용한 항체는 다음과 같다. Biotin-4G8 (1:700, COVANCE, USA), anti-Iba-1 (1:500,

Wako, Japan), tau-13 (1:500, Abcam, USA), AT8, AT180 (1:300, Thermo Scientific, USA) antibody를 사용하였다.

5. Golgi staining

FD rapid Golgistain™ Kit을 사용했다. 쥐의 뇌를 적출하여 해당 kit 의 solution A와 B 를 섞은 용액에 2 주간 반응시켰다. 이후 조직을 solution C로 옮기고, 72 시간 이상 실온에서 반응시킨 뒤, cryosection으로 절편을 만들어, gelatin이 코팅된 microscope slide로 옮겼다. 조직 절편을 증류수 (Distilled water; DW)로 세척하고, solution D, E와 증류수의 혼합액에 넣었다. 다시 증류수로 세척한 후에 cresyl violet으로 염색하였다. 이후 Dehydration 과정을 거치고 xylene으로 투명화 과정을 거친 후 Permount로 cover slip 과 함께 고정하였다. Neocortex의 layer 5 와 3 를 이미징하여, 이 부위의 apical dendrite와 basal dendrite의 spine 개수를 측정하였다.

6. Sarkosyl soluble, insoluble tau의 분류 (tau fractionation) 및 웨스턴 블롯 (Western blot)과 닷 블롯 (Dot blot)

응집된 tau와 비응집 혹은 올리고머 tau를 나누어 분석하기 위해 sarkosyl soluble과 insoluble fraction으로 나누었다. 이를 위해 뇌 조직을 protease inhibitor, phosphatase inhibitors, HDAC6 inhibitor가 포함된 TBS buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150

mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA)에 homogenization하여, 13,000 rpm, 4 °C에서 10 분 동안 원심분리하여, 상층액 (TBS-soluble fraction)을 모은다. 이 상층액에 1% Sarkosyl (Sigma, USA)이 되도록 넣고, 37 °C에서 1 시간 동안 반응시킨다. 그 후, 150,000x g로 1 시간 동안 상온에서 원심분리하면, 상층액은 sarkosyl-soluble fraction (비응집된 tau, 올리고머 tau를 포함하는 것으로 알려져 있다.), 침전물은 sarkosyl-insoluble fraction (PHF나 NFT를 포함하는 것으로 알려져 있다.)으로 나뉘어, tau를 응집된 정도에 따라 나눌 수 있다. Sarkosyl-soluble fraction은 BCA 정량을 통해 동량의 단백질에 sample buffer를 넣었고, sarkosyl-insoluble fraction은 sample buffer에 녹여서 두 fraction 모두 95 °C, 5 분 동안 끓였다. 이들을 웨스턴 블롯을 통해 total tau와 phosphorylated tau를 측정하였다. 닷 블롯은 tau의 모든 형태가 포함된 TBS-soluble fraction에서 동량의 단백질을 nitrocellulose (NC) membrane에 점적하여 수행하였다. Membrane에 단백질을 점적한 이후의 과정은 웨스턴블롯과 동일하며, 사용한 항체는 다음과 같다. Tau-13, anti-pS262 antibodies (Abcam, USA), tau-5, AT8, AT180, anti-pT181, pS199, pT231, pS396, pS356 antibodies (Thermo Scientific, USA).

뇌 내 혹은 세포의 전반적인 단백질 양의 증감을 확인하기 위해서는 RIPA buffer를 이용해 단백질을 추출하고, 위와 같은 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였고, 이 때 사용된 항체는 다음과 같다.

Anti-acetyl-tubulin (Sigma, USA), α -tubulin (Millipore, USA), PSD-95 (Abcam, USA), synaptophysin (BD, USA), HDAC6, β -actin antibodies (CST, USA).

7. 세포주 (Cell lines) 및 형질주입 (Transfection)

HT22 세포주를 이용하였고, 세포배양 방법과 형질 주입 방법은 Part 2와 동일하다.

8. 플라스미드 DNA 및 시약 (DNA constructs, reagents)

사용한 플라스미드 DNA는 pRK5-EGFP-Tau-P301L (Addgene, USA), pCMV6-XL4-HDAC6 (Origene, USA)이며, pRK5-EGFP-WT-Tau는 pRK5-EGFP-P301L-Tau vector로부터 돌연변이시켜 만들었다. 사용한 시약은 Proteasome inhibitor (MG132), lysosome inhibitor (NH₄Cl + Leupeptin, Bafilomycin), autophagy inhibitor (3MA), translation blocker (cycloheximide (CHX)), Ponceau S (Thermo Scientific, USA)이다.

9. 면역침강법 (Immunoprecipitation)

HT22 세포주 혹은 ADLP^{APT} 쥐의 뇌조직에서 1% Tx-100 buffer 나 RIPA buffer로 단백질을 추출한다. Tau-13, anti-GFP antibody (Abcam, USA)를 BS3를 이용하여 protein A/G agarose beads에 crosslinking시키거나, Acetyl-Lysine Affinity Beads

(Cytoskeleton Inc., USA)를 이용하여, Part 2와 동일한 방법으로 면역침강 및 웨스턴 블롯을 수행하였다. 사용한 항체는 anti-Hsc70 (Enzo Life Sciences Inc., USA), Hsp70, CHIP (CST, USA) antibodies 이다.

10. 정량적 역전사 PCR (Quantitative RT-PCR)

쥐의 뇌조직에서 RNeasy mini kit (QIAGEN, USA)를 사용해 RNA를 추출한다. 동량의 RNA를 Maxime RT PreMix kit (iNtRON BIOTECH, Korea)을 사용해 cDNA로 합성한다. KAPA SYBR FAST ABI Prism qPCR kit (KAPA Biosystems, USA)에 human tau 프라이머 (Forward: 5' -CTCCAAAATCAGGGGATCGC-3', Reverse: 5' -CCTTGCTCAGGTC AACTGGT-3')나 internal control로 GAPDH 프라이머 (Forward: 5' -GGCCTTGACTGTGCCGTTGAATTT-3', Reverse: 5' -ACAGCCGCATC TTCTTGTGCAGTG-3')와 동량의 cDNA를 넣고, qRT-PCR을 수행하였다.

11. 통계 처리

그룹 간의 통계적 유의성은 unpaired t-tests나 one-way analysis of variance (ANOVA), two-way ANOVA의 Bonferroni post-hoc tests로 분석하였다. *P* values가 0.05보다 작을 때, 통계적으로 유의미하다고 판정하였으며, 모든 데이터는 mean ± SEM

으로 나타내었다. 통계 분석은 GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA)를 이용해 수행하였다.

결 과

서론에서 설명한 선행 연구들을 바탕으로, Part 1에서는 c-Fos의 O-GlcNAcylation site를 규명하고, 알츠하이머병 동물 모델인 5xFAD나 베타-아밀로이드 처리와 같은 알츠하이머병 상황에서 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 변화하는지, 또한 변화된 O-GlcNAcylation에 의해 c-Fos의 기능이 어떻게 조절되어 세포사멸에 관여하는지에 관한 기전을 알아보려고 하였다 (그림 4). Part 2에서는 HDAC6 억제제에 의해 그 기질 중 하나인 Prx1의 acetylation이 증가하여 항산화 능력이 증가됨으로써 알츠하이머병 상황에서 보이는 산화 스트레스가 회복되고, 하위 단계인 손상된 Ca^{2+} 항상성과 미토콘드리아의 축삭 수송도 회복될 수 있다는 가설을 증명하고자 하였다 (그림 6). 또한, Part 3에서는 베타-아밀로이드와 tau의 병변을 모두 가지고 있어 알츠하이머병 환자와 유사한 동물 모델인 ADLP^{APT} 쥐에서 HDAC6 억제제의 치료 효능을 평가하고자 하였고, HDAC6의 또다른 기질인 tau와 HDAC6가 모두 관여하는 UPS와 ALS의 두가지 단백질 분해 시스템이 HDAC6 억제제에 의해 조절되어 tau를 감소시키는지, 그리고 그 기전은 무엇인지 규명하고자 하였다 (그림 6).

Part 1. 베타-아밀로이드에 의한 c-Fos 의 O-GlcNAcylation 증가가 신경세포 사멸에 미치는 영향 연구

1. 베타-아밀로이드에 의한 c-Fos의 O-GlcNAcylation 증가와 c-Fos의 증가

알츠하이머병 환자의 뇌에서는 c-Fos가 증가되어 있고, 단백질들의 O-GlcNAcylation도 변화되어 있다 (34, 35, 42, 85). 그런데 c-Fos가 O-GlcNAcylation될 수 있는 단백질이라는 보고가 있어 (43), c-Fos의 O-GlcNAcylation이 알츠하이머병에서 변화되어 있을 가능성을 생각해 볼 수 있다. 이에, 알츠하이머병 상황에서 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 변화되어 있는지 확인해보기 위해, 5xFAD 쥐의 뇌와 베타-아밀로이드를 처리한 primary neuron과 SH-SY5Y 세포주에서 O-GlcNAc과 붙는 WGA가 결합된 agarose beads로 O-GlcNAcylation된 단백질을 pull-down 하여 c-Fos를 확인하였다 (그림 8A-I). 그 결과, 5xFAD와 primary neuron, SH-SY5Y 세포주에서 모두 베타-아밀로이드에 의해 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 증가됨을 확인하였으며, 이 때 기존 보고와 마찬가지로 c-Fos의 양도 함께 증가되어 있음을 확인할 수 있었다. c-Fos의 O-GlcNAcylation 양은 Input의 c-Fos의 양으로 보정하여 정량화하였다. 또한, O-GlcNAc을 제거하는 β -hexosaminidase (β -HEX)와 반응시켰을 때, 5xFAD 쥐와 베타-

아밀로이드를 처리한 조건에서 전체적인 c-Fos의 양은 변화가 없으나, O-GlcNAcylated c-Fos가 현저히 감소하는 것을 확인한 결과는 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 베타-아밀로이드에 의해 증가함을 뒷받침한다 (그림 8A-C, G-I). 이에 더하여, 베타-아밀로이드에 의한 c-Fos 자체의 증가 효과를 배제하기 위해, EGFP-c-Fos를 SH-SY5Y 세포주에 과발현시켜 c-Fos의 양을 베타-아밀로이드 처리와 상관없이 비슷하게 만든 뒤, 이를 anti-GFP antibody로 면역침강하였다. 그 결과, O-GlcNAc을 특이적으로 검출하는 CTD110.6 antibody 신호의 세기가 베타-아밀로이드를 처리하였을 때 증가하는 것을 다시 한 번 확인할 수 있었다 (그림 8J-K).

또한, pull down, 면역침강 실험에서 흔히 발생하는 비특이적 반응이 없음을 확인하기 위해, 우선 세포에서 추출한 단백질을 agarose beads와 반응시킨 결과 어떤 신호도 관찰되지 않았다 (그림 8A의 첫번째 lane과 그림 10A의 두번째 lane). 다음으로 세포에서 추출한 단백질에 GlcNAc을 추가로 넣어서 경쟁적 분석을 수행하였다. 이는 WGA에 비특이적으로 반응하는지를 보고자 했던 실험으로 GlcNAc을 추가로 넣고 반응시켰을 때, c-Fos의 신호가 사라지는 것을 확인함으로써, WGA에 붙은 c-Fos가 특이적으로 반응한 O-GlcNAcylated c-Fos임을 확인하였다 (그림 10A의 세번째, 네번째 lane). 마지막으로 EGFP에 의한 비특이적 반응이 아님을 확인하기 위해, EGFP만을 과발현시켜 WGA-pull down과 면역침

강 후, CTD110.6 antibody로 확인한 결과 O-GlcNAc 특이적인 어떤 신호도 관찰되지 않았다 (그림 10E). 이와 같은 결과들을 통해 베타-아밀로이드가 c-Fos의 양 뿐만 아니라 c-Fos의 O-GlcNAcylation도 증가시킴을 규명하였고, 이는 알츠하이머병에서 O-GlcNAcylation이 잘못 조절되고 있음을 시사한다.

2. 베타-아밀로이드에 의한 OGA와 c-Fos의 상호작용 변화

위의 결과는 알츠하이머병 환자의 뇌에서, 특히 50~60 kDa과 25 kDa에 해당하는 단백질의 O-GlcNAcylation이 정상인에 비해 증가되어 있음을 보여주는 기존 보고와 일관되는 결과이며 (34), 베타-아밀로이드에 의해 OGT와 이 효소의 기질 (ATP synthase 5A) 간의 상호 작용이 달라졌다는 또다른 보고를 생각해볼 때 (40), 베타-아밀로이드에 의해 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 달라진 결과도 O-GlcNAc을 조절하는 효소와의 상호 작용이 달라져서 나타난 결과라고 예상해 볼 수 있다. 이를 확인하기 위해, EGFP-c-Fos를 면역침강하여 OGT나 OGA와의 상호 작용을 관찰한 결과, 베타-아밀로이드에 의해 OGT와 c-Fos의 상호작용에는 변화가 없으나 (그림 9A-B), OGA와의 상호작용은 현저히 감소함을 알 수 있었다 (그림 9C-D). 또한, 고해상도의 이미징이 가능한 SIM으로도 베타-아밀로이드에 의해 OGA와 c-Fos 사이의 상호작용이 감소함을 확인하였다 (그림 9E-F). 이를 통해, 베타-아밀로이드가 OGA와 c-Fos의 상호작용을 약화시켜, 그 결과 c-Fos O-

GlcNAcylation을 증가시켰음을 알 수 있다.

3. c-Fos의 O-GlcNAc 자리 규명

O-GlcNAc 자리 규명에 앞서, c-Fos가 O-GlcNAcylation되는 지 여러가지 방법으로 다시 한번 확인하였다. GlcNAc과의 경쟁적 분석실험에서, 내재성 c-Fos와 과발현시킨 외재성 EGFP-c-Fos 모두 GlcNAc을 추가로 넣어주었을 때 c-Fos의 신호가 사라짐을 확인함으로써, c-Fos가 O-GlcNAcylation되는 단백질임을 확인하였다 (그림 10A). 또한, β -HEX로 O-GlcNAc을 제거하였을 때, WGA-pull down된 c-Fos 양이 줄어들고 동시에 de-O-GlcNAcylation된 c-Fos의 양은 증가함을 확인하였다 (그림 10B). Thiamet G로 OGA를 억제하거나 siOGT로 OGT를 knockdown하였을 때, 이에 맞추어 c-Fos O-GlcNAcylation이 각각 증가하거나 감소하였다 (그림 10C-D). 또 다른 세포주인 HEK293T 세포주에서도 OGA 억제에 의해 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 증가됨을 확인하였다 (그림 10E). 위와 같은 결과를 통해 c-Fos가 O-GlcNAcylation되는 단백질임을 확실히 증명하였다.

다음으로, c-Fos의 어떤 잔기가 O-GlcNAcylation되는지 규명하고자 하였다. 이를 위해 O-GlcNAcylation될 가능성이 있는 S이나 T이 alanine(A)으로 치환된 돌연변이를 만들어, O-GlcNAcylation되지 못하게 한 뒤, 먼저 WGA-pull down으로 실제 O-GlcNAcylation이 감소된 돌연변이가 무엇인지 확인하였다 (그림

11A-D). 13가지의 돌연변이 중 EGFP-c-Fos-S56A-S57A, S84A, S88A, T90A 돌연변이에서 O-GlcNAcylation이 감소하는 경향이 보였다. 이 돌연변이들을 과발현시켜 anti-GFP antibody로 면역침강한 뒤, CTD110.6 antibody로 O-GlcNAcylation 감소를 다시 확인한 결과, EGFP-c-Fos-S56A-S57A 돌연변이에서 O-GlcNAcylation이 유의하게 감소함을 확인하였고, 따라서 S56과 S57이 O-GlcNAcylation 될 가능성이 매우 높은 자리로 생각된다 (그림 11E-F). 다음으로 S56과 S57이 각각 O-GlcNAcylation되는지 확인하였다. WGA-pull down과 anti-GFP antibody를 이용한 면역침강을 통해 EGFP-c-Fos-S56A와 EGFP-c-Fos-S57A 돌연변이를 EGFP-c-Fos-S56A-S57A 돌연변이와 비교하였을 때, EGFP-c-Fos-WT에 비해 EGFP-c-Fos-S56A와 -S57A 각각의 신호가 감소하였고, EGFP-c-Fos-S56A-S57A는 더욱 현저하게 감소한 것을 확인하였다 (그림 11G-H). 위 결과를 통해, c-Fos의 S56, S57이 O-GlcNAcylation되는 자리임을 규명하였다.

4. 베타-아밀로이드가 있는 상황에서 c-Fos O-GlcNAcylation에 의한 세포 사멸 촉진

c-Fos는 세포 독성 상황에서 아포토시스와 관련된 유전자를 발현시켜 세포 사멸을 조절하는 것으로 알려져 있는데 (45, 46, 49, 50), 베타-아밀로이드는 신경 돌기의 위축, 시냅스 기능 장애, 신경 세포 사멸 등을 불러일으키는 세포 독성 단백질이다 (3, 86). 이

러한 선행 연구에 근거하여, 베타-아밀로이드에 의해 유도된 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 세포 사멸을 조절할 것이라는 가설을 세웠다. 이 가설을 증명하기 위해, 신경세포주인 SH-SY5Y 세포주에 c-Fos-WT과 O-GlcNAc이 되지 않는 c-Fos-S56A-S57A를 과발현시킨 뒤, 세포 사멸을 측정하는 TUNEL assay와 세포 생존도를 측정할 수 있는 MTS, Calcein-AM assay를 수행하여, c-Fos O-GlcNAcylation의 기능을 관찰하였다. 베타-아밀로이드를 처리하였을 때, EGFP-c-Fos-WT이 발현된 세포에 비해 EGFP-c-Fos-S56A-S57A가 발현된 세포에서 TUNEL 신호가 유의하게 줄어든 것을 확인하였고 (그림 12A-B), MTS와 Calcein-AM assay에서도 c-Fos-S56A-S57A를 발현시킨 그룹에서 세포 생존도가 유의하게 높은 것을 확인하였다 (그림 12C-D). c-Fos의 O-GlcNAcylation site를 확인하였던 HEK293T 세포주에서도 MTS와 Calcein-AM assay를 수행하였을 때, 역시 c-Fos-WT에 비해 c-Fos-S56A-S57A 과발현 그룹에서 세포 생존도가 유의하게 높음을 확인하였다 (그림 13A-B). 이러한 결과는 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 베타-아밀로이드에 의한 세포사멸을 촉진시킨다는 것을 시사한다. 하지만 이를 보다 더 정확히 확인하기 위해, 몇 가지 추가 실험을 수행하였다. 우선, 위의 결과가 c-Fos 과발현에 의한 다른 효과 때문에 나타난 결과인지, 또 내재성 c-Fos도 같은 현상을 보이는지 확인하기 위해, mock과 c-Fos-WT 그룹에서 세포생존도를 비교하였다 (그림 13C-D). 그 결과, 베타-아밀

로이드에 의한 세포생존도의 감소는 두 그룹 간의 차이가 보이지 않았으며, 이를 통해 c-Fos를 과발현하였을 때 보이는 베타-아밀로이드에 의한 세포사멸은 내재성 c-Fos에 의해 보이는 세포사멸을 대변할 수 있음을 알 수 있다. 두 번째로, 그림 12C-D에서 내재성 c-Fos의 간섭효과를 확인하기 위해, c-Fos knock-out 안정화 세포주 (stable cell line)에 c-Fos-WT과 c-Fos-S56A-S57A를 과발현한 뒤, 베타-아밀로이드에 의한 세포생존도를 관찰하였다 (그림 13E-G). 그 결과 c-Fos-S56A-S57A 그룹에서 WT에 비해 유의하게 높은 세포 생존도를 보였고, 이는 보통의 세포주와 비슷한 결과로써, 내재성 c-Fos의 간섭효과는 매우 미미하다는 것을 보여준다. 따라서, 위의 결과를 통해 c-Fos의 S56, S57에 일어나는 O-GlcNAcylation은 베타-아밀로이드에 의한 세포 사멸에 중요한 역할을 함을 규명하였다.

5. c-Fos O-GlcNAcylation에 의한 c-Fos의 안정화

앞서 그림 6에서 베타-아밀로이드에 의한 c-Fos O-GlcNAcylation의 증가와 함께 전반적인 c-Fos 양도 증가하는 것을 보았고, c-Fos의 N-말단이 c-Fos의 안정화를 조절하는 부위이기 때문에 (87), c-Fos의 O-GlcNAcylation의 또다른 기능으로 c-Fos 자체의 안정화를 조절할 수 있을 것으로 예상하였다. 이를 증명하기 위해, SH-SY5Y 세포주에 EGFP-c-Fos-WT과 EGFP-c-Fos-S56A-S57A를 과발현시킨 뒤, 단백질의 합성을

막는 cycloheximide (CHX)나 프로테아좀(proteasome)을 막는 MG132를 시간별로 처리하였다 (그림 14). O-GlcNAc이 일어나지 않는 c-Fos-S56A-S57A 돌연변이 그룹에서는 CHX를 처리한 지 0.5 시간부터 c-Fos의 유의한 감소가 확인되었으나, WT에서는 3시간부터 유의한 감소가 확인됨을 웨스턴블롯과 이미징을 통해 확인하였다 (그림 14A, C). MG132를 처리하였을 때는 돌연변이 그룹에서 WT에 비해 프로테아좀으로 분해되지 못하고 쌓인 c-Fos가 훨씬 많은 것을 확인할 수 있었다 (그림 14B, D). 이러한 결과는 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 c-Fos 자체를 더욱 안정화시키는 기능을 함을 의미한다.

6. 베타-아밀로이드에 의해 유도된 c-Fos O-GlcNAcylation에 의한 전사 활성 증가

그림 12-13을 통해 c-Fos의 O-GlcNAcylation은 베타-아밀로이드에 의한 세포 사멸에 중요한 역할을 하는 것을 밝혔는데, 이러한 현상이 구체적으로 어떤 기전에 의해 일어나는지 알아보았다. c-Fos는 Jun family와 이합체 (dimer)를 이루어 AP-1 DNA 자리에 붙어, 유전자의 발현을 조절한다고 알려진 전사 활성 인자이기 때문에 (44), c-Fos의 O-GlcNAcylation에 의해 c-Jun과의 결합이나 전사활성이 조절될 수 있는지 관찰하였다. EGFP-c-Fos-WT과 EGFP-c-Fos-S56A-S57A를 면역침강하여 c-Jun과의 결합을 확인하였을 때, c-Fos-WT은 베타-아밀로이드에 의해 c-Jun과의

결합이 증가하였으나, c-Fos-S56A-S57A에서는 이 현상이 관찰되지 않았다 (그림 15A-B). AP-1-luciferase assay를 통해 확인한 c-Fos의 전사 활성화도 베타-아밀로이드가 있을 때, 돌연변이에 비해 WT에서 훨씬 증가하였다 (그림 15C). 이러한 결과는 베타-아밀로이드에 의한 세포독성 자극에 의해 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 c-Jun과의 결합을 증가시키고, 이에 따라 전사 활성화도 증가시킨다는 것을 의미한다. 또한, 베타-아밀로이드에 의해 아포토시스를 유도하는 것으로 알려진 Bim (47)의 mRNA와 단백질 양이 돌연변이 그룹에 비해 WT에서 유의하게 높은 것이 관찰되었고 (그림 15D-F), Bim의 하위단계이자, 아포토시스의 작동인자인 잘려진 caspase-3 (cleaved caspase-3)도 WT에서 더 증가한 것이 관찰되었다 (그림 15E, G). 위의 결과를 토대로, 베타-아밀로이드에 의해 증가된 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 c-Jun과의 결합 증가를 통한 전사 활성화 증가를 촉진시키고, 그 결과 Bim 발현 증가와 이에 따른 cleaved caspase-3의 증가를 통해 세포 사멸을 촉진시킴을 밝혔다.

Part 2. HDAC6 저해를 통해 증가된 Peroxiredoxin1의 acetylation이 알츠하이머병에서 손상된 미토콘드리아의 축삭 수송을 회복시키는 기전 연구

1. 알츠하이머병 환자의 뇌에서 감소된 Prx1의 acetylation과 베타-아밀로이드와 HDAC6에 의한 Prx1 acetylation의 조절

본격적인 연구에 앞서, HDAC6가 조절하는 Prx1의 acetylation을 확인하기 위해, 새롭게 만든 anti-acetyl-Prx1 (lysine (K) 197) antibody (R2-31)의 특이성을 확인하였다 (그림 17). Prx1-WT-Flag과 K가 arginine (R)으로 치환되어 acetylation이 되지 않는 돌연변이인 Prx1-K197R-Flag을 각각 HT22 세포주에 형질 주입하고, TBA를 이용해 acetylation을 증가시킨 조건을 추가하여, Flag으로 면역침강한 뒤 항체의 특이성을 확인하였다. 그 결과 Prx1-WT-Flag에서 acetyl-Prx1의 신호가 보였고, TBA를 처리했을 때 이 신호가 더 증가하는 것을 관찰하였다. 반면, Prx1-K197R-Flag에서는 TBA를 처리하여도 어떤 신호도 관찰되지 않음을 통해, Prx1의 K197 자리의 acetylation을 R2-31 항체가 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

알츠하이머병 환자에서는 HDAC6의 양과 활성이 증가되어 있고, Prx1이 HDAC6의 기질 중 하나이기 때문에 (69-71), 알츠하이머병 상황에서 Prx1의 acetylation이 감소되어 있을 것이라고 예상하

였다. 이를 먼저 알츠하이머병 환자의 내후각 피질 (entorhinal cortex)과 해마 부위에서 DAB 염색을 통해 확인한 결과, 나이와 성별이 비슷한 정상인에 비해, Prx1의 acetylation이 감소되어 있음을 확인하였다 (그림 18A). 이 결과는 알츠하이머병 환자의 뇌에서 HDAC6가 상향조절되어 있어 Prx1의 acetylation에 영향을 미쳤음을 시사하며, 감소된 Prx1 acetylation도 알츠하이머병의 하나의 병리학적 특징임을 보여준다. 다음으로, Prx1의 acetylation에 HDAC6와 베타-아밀로이드가 영향을 미치는지 확인하기 위해, primary hippocampal neuron과 HT22 세포주에 베타-아밀로이드와 HDAC6 억제제인 TBA를 처리하였다. 그 결과, primary hippocampal neuron에서 내재성 Prx1의 acetylation이 베타-아밀로이드에 의해 감소되고, TBA를 함께 처리했을 때는 다시 증가되는 것을 확인하였다 (그림 18B). HT22 세포주에는 Prx1-Flag을 과발현시켜 확인하였는데, primary neuron과 마찬가지로 베타-아밀로이드에 의한 Prx1 acetylation의 감소, TBA에 의한 회복이 관찰되었다 (그림 18C). 이러한 결과는 Prx1의 acetylation이 알츠하이머병의 병인 기전을 조절하는 중요한 요소 중의 하나임을 시사하고, HDAC6가 이에 관여함을 보여준다.

2. HDAC6 억제제에 의한 ROS와 Ca²⁺의 조절

Prx1의 acetylation이 증가되면 항산화 효능이 증가하기 때문에 (69), Prx1의 acetylation이 베타-아밀로이드에 의해 증가된 ROS

를 줄일 수 있는지 확인해보았다. 이를 위해, HT22 세포주에 베타-아밀로이드와 TBA를 처리한 뒤, ROS를 측정할 수 있는 DCFDA assay를 수행한 결과, 베타-아밀로이드를 처리한 그룹에서 증가한 DCFDA 형광 신호가 TBA를 함께 처리하였을 때는 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 19A). 이는 HDAC6 억제제가 베타-아밀로이드에 의해 증가된 ROS를 줄일 수 있음을 보여준다. 또한, 과도한 ROS가 IP₃R나 RyR을 통해 세포질 내의 Ca²⁺을 증가시킨다는 보고가 있어 (88-90), 위와 같은 실험 조건에서 Fluo-4 assay를 통해 Ca²⁺의 양을 측정해 보았다. ROS와 마찬가지로, 베타-아밀로이드 그룹에서 증가된 Ca²⁺의 양이 TBA를 함께 처리하였을 때 감소하였다 (그림 19B). 이러한 결과는 베타-아밀로이드가 있는 상황에서 HDAC6 억제제에 의해 증가된 Prx1의 acetylation이 ROS 뿐만 아니라 Ca²⁺도 조절할 수 있을 것이라는 단서를 제공한다.

3. 베타-아밀로이드에 의해 유도된 ROS의 세포 내 Ca²⁺ 조절

베타-아밀로이드가 있을 때, ROS가 Ca²⁺을 조절할 수 있는지 확인하기 위해, HT22 세포주에 ROS inhibitor인 trolox를 처리하였다. 베타-아밀로이드와 함께 200 μM의 trolox를 처리했을 때 ROS를 충분히 억제한다는 것을 찾은 뒤 (그림 20A), 이 조건에서 Fluo-4 assay를 통해 Ca²⁺의 양을 측정하였다 (그림 20B). 그 결과, 베타-아밀로이드에 의해 증가된 Ca²⁺이 ROS inhibitor에 의해 감소함을 확인하였는데, 이는 베타-아밀로이드가 있는 상황에서 ROS가

Ca²⁺을 조절할 수 있다는 것을 보여준다. 하지만, 반대 방향, 즉 Ca²⁺에 의한 ROS의 조절도 일어남을 확인하였는데, HT22 세포주에 베타-아밀로이드와 Ca²⁺ chelator인 BAPTA-AM을 처리하였을 때 베타-아밀로이드만 처리한 그룹에 비해 ROS의 양이 감소함을 관찰한 것이 그 결과이다. 이 때, BAPTA-AM은 2 μM을 처리하였다 (그림 21). 이러한 결과는 ROS와 Ca²⁺이 서로를 조절할 수 있는데, 이 때문에 악순환이 생겨 알츠하이머병을 더욱 가속화시킬 수 있음을 시사한다.

4. HDAC6 억제제는 Prx1의 acetylation을 통해 베타-아밀로이드에 의해 증가된 ROS와 Ca²⁺을 회복시킨다

베타-아밀로이드에 의해 증가된 ROS와 Ca²⁺을 Prx1의 acetylation이 회복시킬 수 있는지 규명하기 위해, acetylation을 모방한 돌연변이 (K197Q)와 acetylation되지 않도록 한 돌연변이 (K197R)를 만들었다. WT과 이들의 발현량은 서로 비슷함을 확인하였고, 돌연변이가 잘 되었음을 anti-acetyl-Prx1 antibody로 확인하였다 (그림 22A). 선행 연구에서 acetylation 모방 돌연변이는 WT보다 더 강력한 항산화능을 보임을 보고하였는데 (69), 실제로 HT22 세포주에서도 베타-아밀로이드에 의해 유도된 ROS가 acetylation 모방 돌연변이 (K197Q)에서는 덜 증가된 것을 확인할 수 있었다. 또, 베타-아밀로이드에 TBA가 함께 처리된 상황인데도 WT에서는 회복되는 ROS가 acetylation 되지 않는 돌연변이

(K197R)에서는 회복되지 않았다 (그림 22B). Ca^{2+} 양의 변화 역시 ROS와 비슷한 결과를 보여준다 (그림 22C). 즉, acetylation 모방 돌연변이는 베타-아밀로이드에 의한 ROS와 Ca^{2+} 증가에 대해 회복 효과를 보이지만, acetylation 되지 않는 돌연변이는 이러한 기능을 잃어버린다고 할 수 있고, 이 결과는 베타-아밀로이드에 의해 증가된 ROS를 Prx1의 acetylation이 조절함으로써, 그 결과 Ca^{2+} 도 조절할 수 있음을 제시한다. 또한, acetylation 모방 돌연변이에서 베타-아밀로이드와 TBA를 함께 처리했을 때, 베타-아밀로이드만 처리했을 때에 비해 ROS와 Ca^{2+} 의 추가적인 감소는 보이지 않는데, 이는 TBA에 의한 Prx1의 항산화능 조절이 K197에 의존적이라는 것을 보여준다. 따라서, 위의 결과를 통해 HDAC6 억제제에 의해 증가된 Prx1의 K197의 acetylation이 베타-아밀로이드에 의해 유도된 ROS를 회복시킴으로써 Ca^{2+} 의 양까지 회복됨을 증명하였다.

5. HDAC6 억제제는 Prx1의 acetylation을 통해 베타-아밀로이드에 의해 손상된 미토콘드리아 축삭 수송을 회복시킨다

과도한 ROS와 Ca^{2+} 이 축삭 수송을 저해한다는 보고가 있다 (65, 66). 특히, Ca^{2+} 은 미토콘드리아와 수송 단백질인 kinesin을 연결해주는 어댑터 단백질인 Miro에 결합하여, 미토콘드리아와 kinesin의 연결을 억제하여 축삭 수송을 저해한다고 한다 (66). 이와 더불어, 본 연구의 선행연구로써 HDAC6 억제제를 처리하였을 때, 베타-아

밀로이드에 의해 손상된 미토콘드리아의 축삭 수송이 회복됨을 보여준 바 있고 (75), 본 연구의 그림 23A에서도 이를 재현하였다. 이를 근거로, 증가된 ROS와 Ca^{2+} 이 베타-아밀로이드에 의한 축삭 수송 손상의 원인이라는 가설을 세웠고, Prx1의 acetylation에 의해 축삭 수송이 조절될 수 있다고 생각하였다. 이 가설을 규명하기 위해, 베타-아밀로이드에 의해 손상된 미토콘드리아의 축삭 수송이 ROS 억제제나 Ca^{2+} chelator에 의해 회복될 수 있는지 먼저 확인해 보았다. pDsRed2-Mito를 형질주입하여 미토콘드리아를 표지한 primary neuron에 베타-아밀로이드와 trolox 혹은 BAPTA-AM를 처리하였을 때, 베타-아밀로이드에 의해 손상된 미토콘드리아의 수송 속도가 회복됨을 관찰하였다 (그림 23B). 이는 베타-아밀로이드에 의해 증가된 ROS와 Ca^{2+} 이 미토콘드리아 축삭 수송 손상의 원인임을 보여준다. 다음으로, HDAC6 억제제를 통한 Prx1의 acetylation이 베타-아밀로이드에 의한 ROS와 Ca^{2+} 을 조절할 수 있기 때문에, Prx1의 acetylation에 따라 미토콘드리아의 축삭 수송이 조절되는지 확인하였다. 미토콘드리아를 형광 표지한 primary neuron에 Prx1-WT이나 acetylation 모방 돌연변이 (K197Q), acetylation 되지 않는 돌연변이 (K197R)를 형질 주입하여, 미토콘드리아의 수송 속도를 측정하였다 (그림 23C). 그 결과, WT에서 베타-아밀로이드에 의해 감소한 미토콘드리아의 수송 속도가 K197Q에서는 감소되지 않음을 관찰하였고, 반면, K197R에서는 TBA를 함께 처리해도 수송 속도의 회복이 보이지 않았다. 이러한

결과는 HDAC6 억제제에 의해 증가된 Prx1의 acetylation이 베타-아밀로이드에 의해 손상된 미토콘드리아 축삭 수송의 회복에 관여함을 보여준다. 따라서, 위 결과를 통해 HDAC6 억제제를 통한 Prx1 acetylation의 증가가 베타-아밀로이드에 의해 증가된 ROS와 Ca^{2+} 을 회복시키고, 그 결과 미토콘드리아의 축삭 수송도 회복되는 기전을 규명하였다.

6. HDAC6 억제제는 Prx1의 acetylation을 통해 5xFAD 쥐에서의 산화스트레스와 미토콘드리아 축삭 수송을 회복시킨다

위의 세포 배양 시스템의 결과로부터 HDAC6 억제제를 통한 Prx1 acetylation 증가가 가진 알츠하이머병의 잠재적 치료 능력을 알 수 있는데, 이러한 현상이 *in vivo*에서, 즉 알츠하이머병 동물 모델인 5xFAD에서도 일어나는지 확인해 보았다. 이를 위해 6개월령 5xFAD 쥐에 100 mg/kg의 TBA를 하루 한 번씩, 4주 동안 복강 투여하였다. 세포 배양 시스템과 동일하게, WT에 비해 5xFAD 쥐에서 Prx1의 acetylation이 감소되어 있었는데, TBA에 의해 회복됨을 면역조직염색을 통해 관찰하였다 (그림 24A). 다음으로, 알츠하이머병 환자의 뇌에서 DNA와 RNA의 산화적 손상 마커인 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)과 지질 과산화의 산물인 4-hydroxynonenal (4-HNE)과 같은 산화스트레스가 증가되어 있다는 보고가 있어 (91-93), 5xFAD 쥐에서도 웨스턴 블롯과 면역조직염색을 통해 이를 확인해 보았다 (그림 24B, C). 그 결과, WT에

비해 5xFAD 쥐에서 4-HNE와 8-OHdG가 증가하였으나, TBA를 투여한 그룹에서는 이러한 표지들이 회복됨을 관찰하였다. 이는 베타-아밀로이드에 의한 Prx1 acetylation의 감소가 5xFAD의 산화 스트레스 증가에 관여할 수 있음을 시사한다. 또한, 세포 배양 시스템에서 ROS의 회복이 미토콘드리아 축삭 수송의 회복을 가져옴을 확인했는데, 쥐에서는 미토콘드리아 마커인 Tom20을 면역조직염색하여 조직에서 미토콘드리아의 분포를 살펴봄으로써 (72), 축삭 수송의 손상을 간접적으로 관찰하였다 (그림 24D). 그 결과, WT에 비해 5xFAD 쥐에서 CA1의 신경 세포체 (somata) 부위에 미토콘드리아가 더 많이 쌓여있는 것을 관찰하였고, TBA를 투여한 그룹에서는 신경세포체 부위부터 방사층 (stratum radiatum)까지 미토콘드리아가 균일하게 분포하는 것을 관찰하였다. 이는 *in vivo*에서도 HDAC6 억제에 의한 미토콘드리아 축삭 수송의 회복이 일어남을 의미하며, 5xFAD에서 산화 스트레스가 미토콘드리아의 축삭 수송 손상에 관여함을 시사한다. 위 결과를 토대로, 5xFAD 쥐에서 HDAC6 억제제에 의한 Prx1 acetylation의 증가는 산화 스트레스 회복에 중요한 역할을 하며, 그 결과 미토콘드리아 축삭 수송도 회복시킬 수 있음을 규명하였다. 따라서, 알츠하이머병의 새로운 치료 전략으로 HDAC6 억제제를 사용한 Prx1 acetylation의 조절을 제안하는 바이다.

Part 3. HDAC6 저해에 의한 acetylation 의 증가가 tau 단백질의 감소를 통해 알츠하이머병을 회복시키는 기전 연구

1. ADLP^{APT} 쥐에서 HDAC6 억제제에 의한 기억력과 시냅스의 회복

지금까지 베타-아밀로이드와 tau의 병변이 모두 있는 알츠하이머병과 가장 유사한 상황에서 HDAC6의 억제 효과를 확인한 연구는 없다. 이에 본 연구에서는 실제 알츠하이머병 환자와 비슷한 베타-아밀로이드 병변과 tau 병변을 모두 보이는 ADLP^{APT} 쥐에서 HDAC6 inhibitor의 치료 효과를 확인하고자 하였고, 최근 진행되는 임상시험과 비슷하게 알츠하이머병의 이른 단계부터 HDAC6 억제제를 투여하여 예방 효과를 확인하고자 하였다 (예방 모델). 이를 위해 기억력 손상이 나타나기 전인 4.5 개월령의 ADLP^{APT} 쥐에 저용량 (1 mg/kg)과 고용량 (2.5 mg/kg)의 HDAC6 inhibitor를 하루에 두 번씩 4개월 동안 복강 투여하였다. 먼저, 기억력 손상 정도를 측정할 수 있는 Y-maze와 contextual fear conditioning을 수행한 결과, ADLP^{APT} 쥐에서 손상되었던 기억력이 HDAC6 inhibitor에 의해 1 mg/kg의 저용량부터도 회복됨을 관찰하였다 (그림 26A-B). α -tubulin은 HDAC6의 잘 알려진 기질이기에 때문에 (67), ADLP^{APT} 쥐에서 감소되었던 acetylated tubulin이 HDAC6 inhibitor에 의해 증가된 결과를 통해 HDAC6가 효과적으로 억제되

있음을 확인하였고 (그림 26C-D), 손상되었던 기억력의 회복이 HDAC6 억제제에 의한 효과임을 간접적으로 확인할 수 있었다. 기억력의 회복은 시냅스의 회복과 밀접한 관련이 있기 때문에 (94), 시냅스의 대표적 단백질인 PSD95의 발현을 확인해 보았을 때, ADLP^{APT} 쥐에서 감소된 PSD95가 HDAC6 inhibitor에 의해 다시 증가됨을 관찰하였다 (그림 26E-F). 위 결과들을 통해, HDAC6 억제제가 비슷한 베타-아밀로이드 병변과 tau 병변을 모두 가진 알츠하이머병 모델 동물에서도 치료 효과를 보일 수 있음을 알 수 있다.

선행 연구에서는 알츠하이머병 모델 동물에서 HDAC6 억제제에 의한 기억력 회복이 베타-아밀로이드 병변의 감소 때문에 일어난 결과라는 것을 보여주었다 (74). ADLP^{APT} 쥐에서도 베타-아밀로이드 병변이 회복되었는지를 확인해 본 결과, 4G8으로 염색되는 베타-아밀로이드 반점은 치아이랑 (dentate gyrus; DG)에서 HDAC6 inhibitor에 의해 감소하는 경향은 보이지만, 전반적으로 유의한 감소는 보이지 않았다 (그림 27A-C). 또한, neuroinflammation을 볼 수 있는, Iba-1으로 대표되는 microgliosis도 에서 HDAC6 inhibitor에 의해 회복되지 못했다 (그림 27D-F). 이러한 결과는 ADLP^{APT} 쥐에서 HDAC6 억제제에 의해 나타난 기억력 회복이 베타-아밀로이드가 아닌 다른 기전에 의해 일어났음을 의미한다.

2. ADLP^{APT} 쥐에서 HDAC6 억제제에 의한 전반적인 tau 양의 감소

ADLP^{APT} 쥐는 tau의 병변도 보이기 때문에, 다음으로 HDAC6 억제제에 의한 tau의 변화를 관찰하였다. Tau는 올리고머, PHF를 거쳐 신경섬유다발이 되어 세포 내에 축적되는데 (16), sarkosyl을 이용하여 응집된 정도에 따라 tau를 나눌 수 있다. Sarkosyl-soluble fraction에는 주로 단량체부터 올리고머 tau와 같은 작은 응집체가 포함되어 있고, sarkosyl-insoluble fraction에는 PHF나 NFT와 같은 큰 응집체가 포함되어 있다고 여겨진다 (95, 96). 먼저 작은 응집체가 포함된 sarkosyl-soluble fraction에서 HDAC6 inhibitor에 의한 tau의 변화를 관찰하였다 (그림 28). 그 결과, 1 mg/kg의 저용량에서부터 전체 tau의 양과 phosphorylated tau의 양이 감소되어 있음을 확인할 수 있었다. 분석에 이용된 phosphorylation 자리는 알츠하이머병에서 과인산화된 자리로 알려진 T181, S199, S262, T231, S396 이다. 큰 응집체가 포함된 sarkosyl-insoluble fraction의 tau를 관찰하였을 때도 전체 tau의 양과 AT8 (pS202, pT205), AT180 (pT231), S262, S356이 인산화된 tau가 HDAC6 inhibitor에 의해 감소하였다 (그림 29). AT8과 AT180 항체는 알츠하이머병 환자 뇌에서 유래한 PHF를 항원으로 만들어진 항체로 PHF-tau의 phosphorylation을 탐지한다. 면역조직염색법을 통해서도 HDAC6 inhibitor에 의한 tau의 변화를 확인하였는데, 해마의 CA1과 DG에서 전체 tau의 양 (anti-tau-13 antibody)과 AT8, AT180 형광 신호가 감소하였다 (그림 30A-G). 또한, HDAC6 억제제는 tau의 mRNA는 변화시키지 않는

결과를 통해 (그림 30H), 위의 결과에서 보인 tau의 감소는 분해에 의한 감소임을 예상할 수 있다. 위의 결과를 통해 HDAC6 억제제는 저용량 (1 mg/kg)에서부터 ADLP^{APT} 쥐에서 phosphorylated tau와 함께 모든 형태의 전체적인 tau의 양을 줄임을 알 수 있었고, tau의 감소가 기억력 회복을 가져왔을 것으로 예상된다.

3. ADLP^{APT} 쥐의 기억력이 손상된 이후에도 HDAC6 억제제에 의한 기억력 회복과 시냅스의 회복이 일어난다

앞에서는 ADLP^{APT} 쥐의 기억력 손상이 나타나기 전부터 HDAC6 inhibitor를 투여하여 알츠하이머병을 예방할 수 있는 가능성을 살펴보았는데, 이번에는 기억력 손상이 나타난 뒤부터 투여하여 알츠하이머병을 치료할 수 있는지에 대한 가능성을 살펴보았다 (치료 모델). 6.5개월령의 ADLP^{APT} 쥐에 생리식염수나 HDAC6 inhibitor (2.5 mg/kg)를 하루에 두 번씩 2개월간 복강으로 투여하여, 먼저 기억력과 시냅스의 손상을 관찰하였다. 앞선 예방 모델과 마찬가지로 Y-maze와 contextual fear conditioning을 수행하였고, 그 결과 HDAC6 inhibitor에 의해 ADLP^{APT} 쥐에서 손상된 기억력이 회복됨을 확인하였다 (그림 31A-B). 또, 대뇌신피질 (neocortex)의 layer 5 와 3의 신경 세포에서 나오는 apical dendrite와 basal dendrite의 spine 개수를 측정하였을 때, ADLP^{APT} 쥐에서 감소되었던 spine 개수가 HDAC6 inhibitor에 의해 회복됨을 관찰하였다 (그림 31C-D). 이러한 결과는 HDAC6 억제제가 기억력이 손상된

뒤에도 시냅스를 회복시켜 알츠하이머병을 치료할 수 있다는 가능성을 제시한다.

다음으로 이러한 치료 효과가 베타-아밀로이드 병변에도 영향을 미쳤는지 확인해 본 결과, 예방 모델의 결과와 마찬가지로 해마 부위의 4G8 형광 신호는 HDAC6 inhibitor에 의한 변화가 보이지 않았다 (그림 31E-G). Iba-1으로 대변되는 microgliosis 역시 변화되지 않았다 (그림 31H-I).

4. ADLP^{APT} 쥐의 기억력이 손상된 이후에도 HDAC6 억제제에 의해 tau의 양이 감소한다

치료 모델에서도 예방 모델과 마찬가지로 tau의 병변이 회복되었는지 확인해 보았다 (그림 32). 우선, sarkosyl-soluble과 -insoluble fraction을 나누기 전인 모든 형태의 tau를 포함한 TBS-soluble fraction으로 닷 블롯을 수행하였을 때, ADLP^{APT} 쥐에서 HDAC6 inhibitor에 의해 전체 tau의 양이 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 32A-C). 다음으로 sarkosyl-soluble fraction에서 전체 tau와 phosphorylation tau (pT181, pS199, pT231)을 관찰하였을 때도 HDAC6 inhibitor에 의한 감소가 확인되었고 (그림 32D-I), sarkosyl-insoluble fraction에서도 전체 tau와 phosphorylated tau (AT180, AT8, pS356)가 감소하였다 (그림 32J-N). 또, 알츠하이머병에서 tau의 병적 상황을 대표할 수 있는 면역조직염색에서의 AT180 신호도 HDAC6 inhibitor에 의해 현저

히 감소하였다 (그림 32O-P). 이 결과들은 ADLP^{APT} 쥐에서 HDAC6 억제제를 2개월 동안으로 더 짧게 투여하여도 모든 응집된 형태 및 전체 tau와 phosphorylated tau를 효과적으로 감소시킬 수 있음을 보여준다.

5. HDAC6 억제제에 의한 UPS로의 tau 분해 촉진

위의 동물 실험 결과를 통해 HDAC6 억제제는 모든 형태의 tau를 감소시킨다는 것을 확인하였다. 하지만, 지금까지 HDAC6가 tau의 분해를 조절하는 기전은 밝혀진 바가 없어, HDAC6 억제제에 의한 tau의 분해 기전을 알아보려고 하였다. 먼저 HDAC6에 의해 tau의 분해가 직접 조절되는지를 HT22 세포주를 이용한 *in vitro* 시스템에서 확인하였다 (그림 33A-D). HT22 세포주에 ADLP^{APT} 쥐와 같은 P301L-tau를 과발현시키고, 동시에 HDAC6를 과발시키거나, HDAC6 inhibitor를 이용해 HDAC6를 억제한 뒤, 단백질의 생합성을 막는 CHX를 시간별로 처리하여 tau의 분해 속도를 관찰하였다. 그 결과 HDAC6를 과발현하면 tau의 분해 속도가 느려지고, HDAC6를 억제하면 tau의 분해 속도가 더 빨라지는 것을 확인하였다. 이는 HDAC6가 tau의 분해를 조절할 수 있음을 의미한다. 다음으로, tau는 UPS와 오토파지-리소좀 시스템의 두 가지 경로 모두로 분해된다는 것이 알려져 있기 때문에 (83), HDAC6에 의해 어떤 경로로 tau의 분해가 촉진되는지 확인하고자 하였다 (그림 33E-F). 이를 위해, P301L-tau를 과발현시킨 HT22 세포주에 각

각의 경로를 막는 저해제와 HDAC6 inhibitor를 함께 처리하여, tau의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 프로테아좀 저해제인 MG132를 처리하였을 때 HDAC6 inhibitor에 의해 tau가 쌓이는 현상을 관찰할 수 있었고, 리소좀 저해제 인 NH_4Cl + leupeptin이나 bafilomycin과 오토파지 저해제인 3MA를 처리하였을 때는 HDAC6 inhibitor에 의해 tau가 쌓이는 현상을 관찰할 수 없었다. 이 결과는 HDAC6 억제제에 의해 프로테아좀으로의 tau의 분해가 촉진된다는 것을 의미한다. HDAC6 억제제가 프로테아좀으로 tau의 분해를 촉진시킨다면, tau의 ubiquitination이 증가되어 있을 것이라고 예상할 수 있다. 실제로 tau를 면역침강하여 ubiquitination된 정도를 관찰하였을 때, HDAC6 억제제에 의해 tau의 ubiquitination이 증가된 것을 확인할 수 있었다 (그림 33G). 위와 같은 결과를 통해 HDAC6 억제제가 UPS를 통해 tau의 분해를 촉진시킬 수 있음을 알 수 있다.

6. HDAC6 억제제에 의해 chaperone과 tau의 acetylation 변화로 인한 tau의 분해 촉진

단백질이 프로테아좀으로 분해되기 위해서는 chaperone과 유비퀴틴을 붙여주는 E3 ligase, 유비퀴틴을 떨어뜨리는 deubiquitinase 등의 조절이 필수적이다 (97). 특히, tau가 프로테아좀으로 분해될 때, Heat shock proteins 90 (Hsp90), Hsc70, Heat shock proteins 70 (Hsp70), Heat shock proteins 40 (Hsp40)과 같은 chaperone이 조절하여 E3 ligase인 C-terminus of Hsc70-

interacting protein (CHIP)이 tau를 ubiquitination시킨다고 알려져 있다 (98, 99). 따라서, HDAC6 억제제가 tau와 이들 chaperone이나 E3 ligase와의 상호 작용을 변화시켜서 프로테아좀으로의 분해 촉진시킨다는 가설을 세웠다. 이를 증명하기 위해, HT22 세포주에 EGFP-P301L-tau을 과발현시키고, anti-GFP antibody로 tau를 면역침강하여 HDAC6 inhibitor에 의해 chaperone이나 E3 ligase의 상호작용이 변화했는지 확인하였다 (그림 34A-D). 그 결과, HDAC6 inhibitor에 의해 여러 chaperone 중 Hsc70, Hsp70과 E3 ligase인 CHIP이 tau와 더 강하게 결합하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 HDAC6 억제제에 의해 tau의 ubiquitination이 증가하는 것과 일치하는 결과이다.

HDAC6는 acetylation을 조절하는 효소이고, tau도 HDAC6의 대표적인 기질 중 하나이다 (68, 70). 이를 근거로 생각해보면, 앞에서 관찰된 HDAC6 억제제에 의해 증가한 chaperone, E3 ligase와 tau의 상호작용이 각각의 acetylation 변화 때문에 나타난 결과일 수 있을 것이다. 이 가설을 증명하기 위해, 위와 같은 *in vitro* 시스템을 이용하였고, anti-acetyl-K beads로 면역침강하여 Hsc70, Hsp70, tau의 acetylation 변화를 관찰하였다 (그림 34E-H). 그 결과, HDAC6 억제제에 의해 Hsc70, Hsp70, tau의 acetylation이 증가함을 확인하였다. 또한, 이러한 현상이 tau가 감소했던 동물모델에서도 일어나는지 확인하기 위해, ADLP^{APT} 쥐의 뇌조직을 anti-tau-13 antibody나 anti-acetyl-K beads로 면역침강하였다

(그림 34I-O). 그 결과 *in vivo* 시스템에서도 HDAC6 inhibitor에 의해 tau와 Hsc70, Hsp70, CHIP의 상호 작용이 증가함을 확인하였고, Hsc70과 Hsp70, tau의 acetylation도 증가됨을 확인하였다. Acetylation을 확인하는 과정에서 CHIP은 acetylation되지 않음을 확인하였는데, Hsp70이나 Hsc70이 CHIP을 불러올 수 있다는 보고가 있어 (98, 99), Hsp70이나 Hsc70이 매개하여 HDAC6 억제제에 의해 CHIP과 tau의 결합이 증가된 것이라고 생각된다. 이 결과를 통해 HDAC6 억제제는 Hsc70, Hsp70, tau의 acetylation을 증가시켜 서로의 상호작용을 증가시키고, 그 결과 CHIP과의 결합도 증가하여 tau가 ubiquitination되어 프로테아솜으로의 분해가 촉진됨을 알 수 있다.

Tau는 HDAC6의 기질로 알려져 있는데, tau가 프로테아솜으로 분해되기 위해서 어떤 자리의 acetylation이 작용하는지는 밝혀진 바가 없다. 기존 보고에 의하면, tau의 미세 소관 결합 부위 (microtubule-binding region) 중 VQII/IV motif가 Hsc70과의 결합에 중요한 역할을 하는데 (100), 이와 가까운 tau의 acetylation 자리는 K274이다. 또한 덜 응집된 tau가 프로테아솜으로 분해된다고 알려져 있기 때문에 (83), tau의 응집을 감소시키는 acetylation 자리도 중요한데, K290, K321, K353 자리의 acetylation 모방 돌연변이에서 tau의 응집이 억제된다는 보고가 있다 (78). 따라서, K274, K290, K321, K353의 acetylation에 여부에 따라 tau와 Hsc70, Hsp70, CHIP과의 결합 정도가 달라지는지 확인하고자 하

였다 (그림 35). 이를 위해, EGFP-WT-tau와 EGFP-P301L-tau에 위의 4가지 lysine 잔기의 acetylation 모방 돌연변이 (4KQ)와 acetylation되지 않는 돌연변이 (4KR)를 각각 만들고, 이들 6가지 플라스미드 DNA를 HT22 세포주에 형질 주입하였다. 과발현된 WT-tau, WT-tau-4KQ, WT-tau-4KR과 P301L-tau-WT, P301L-tau-4KQ, P301L-tau-4KR을 anti-GFP antibody로 면역침강하여 Hsc70, Hsp70, CHIP과의 상호작용을 관찰한 결과, WT-tau, P301L-tau 모두 acetylation 모방 돌연변이에서 WT에 비해 Hsc70, Hsp70, CHIP과의 결합이 증가한 것을 확인할 수 있었고, acetylation 되지 않는 돌연변이는 모방 돌연변이에 비해 Hsc70, Hsp70, CHIP과의 결합이 낮은 것을 확인하였다. 이 결과는 tau의 K274, K290, K321, K353에서 일어나는 acetylation이 Hsc70, Hsp70, CHIP과의 상호작용에 영향을 미친다는 것을 보여주고, HDAC6가 이 자리들의 acetylation을 조절하여 tau의 프로테아좀을 통한 분해를 촉진시킬 수 있다는 단서를 제공한다.

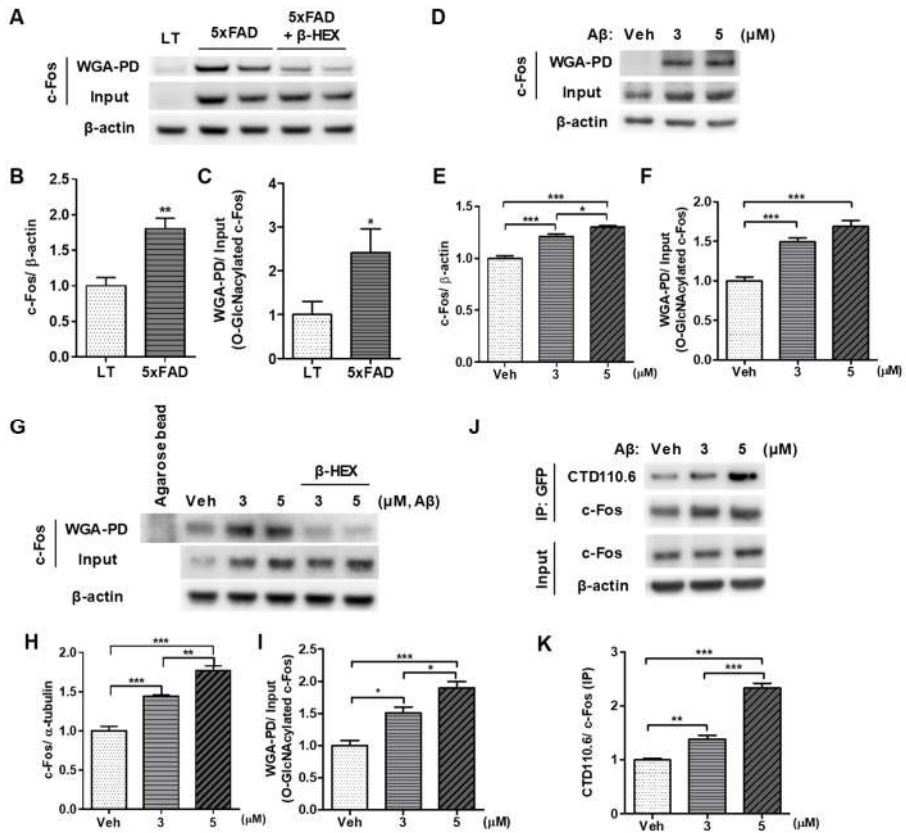


그림 8. 5xFAD와 베타-아밀로이드를 처리한 세포에서 c-Fos O-GlcNAcylation의 증가

(A-C) 5xFAD에서 c-Fos의 O-GlcNAcylation과 c-Fos 양의 증가 확인. (A)는 대표사진, (B)는 β -actin으로 보정한 전체 c-Fos 양의 정량화 그래프, (C)는 전체 c-Fos 양으로 보정한 O-GlcNAcylation된 c-Fos 양의 정량화 그래프이다 (그룹 당 n=5). *P < 0.05, **P < 0.01, (Student's t-test). (D-I) primary neuron (n=5) (D-F)과 SH-SY5Y 세포주 (n=4) (G-I)에서 베타-아밀로이드에 의한 c-Fos의 O-GlcNAcylation과 c-Fos 양의 증가 확인. (D, G)는 대표사진, (E, H)는 β -actin으로 보정한 전체 c-Fos 양의 정량화 그래프, (F, I)는 전체 c-Fos 양으로 보정한

O-GlcNAcylated c-Fos 양의 정량화 그래프이다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). (J-K) SH-SY5Y 세포주에서 베타-아밀로이드에 의한 과발현된 c-Fos의 O-GlcNAcylation 증가 확인. (J)는 대표사진, (K)는 면역침강된 EGFP-c-Fos의 양으로 O-GlcNAc 특이적 항체 (CTD110.6)로 검출한 O-GlcNAcylated c-Fos를 보정한 정량화 그래프이다 (n=4). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). (A)와 (G)에서는 β -HEX assay도 수행하였는데, 전체 세포 추출액과 WGA-pull down된 O-GlcNAcylated 단백질을 β -HEX와 37°C에서 overnight 반응시켰다.

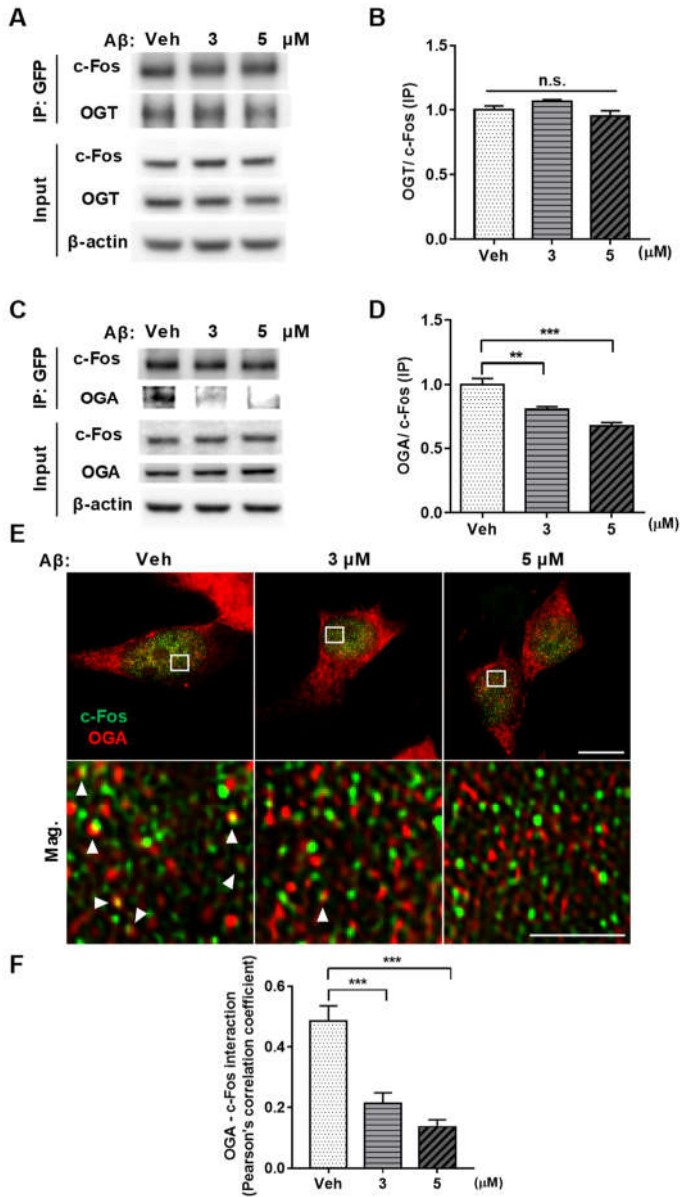


그림 9. 베타-아밀로이드에 의한 OGA와 c-Fos의 상호작용 변화

(A-B) 베타-아밀로이드에 의한 OGT와 c-Fos의 상호작용의 변화 없음 확인. (A)는 대표 사진, (B)는 면역침강된 EGFP-c-Fos로 보정한 OGT 양의 정량화 그래프이다 (n=4). (C-F) 베타-아밀로이드에 의한 OGA와

c-Fos의 상호작용 변화 확인. (C)는 대표사진, (D)는 면역침강된 EGFP-c-Fos로 보정한 OGA 양의 정량화 그래프이다 (n=5). (E-F) c-Fos (녹색)와 OGA (적색)의 상호 작용을 SIM으로 확인. (E)는 대표 사진 (Scale bar: 위쪽 패널 - 5 μ m, 아래쪽 패널 - 5 μ m), (F)는 Pearson's correlation coefficient로 정량화한 그래프이다 (n=14, 16, 12개 세포 (veh, 3, 5 μ M)). 화살표는 녹색과 적색이 겹친 신호를 의미한다. **P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

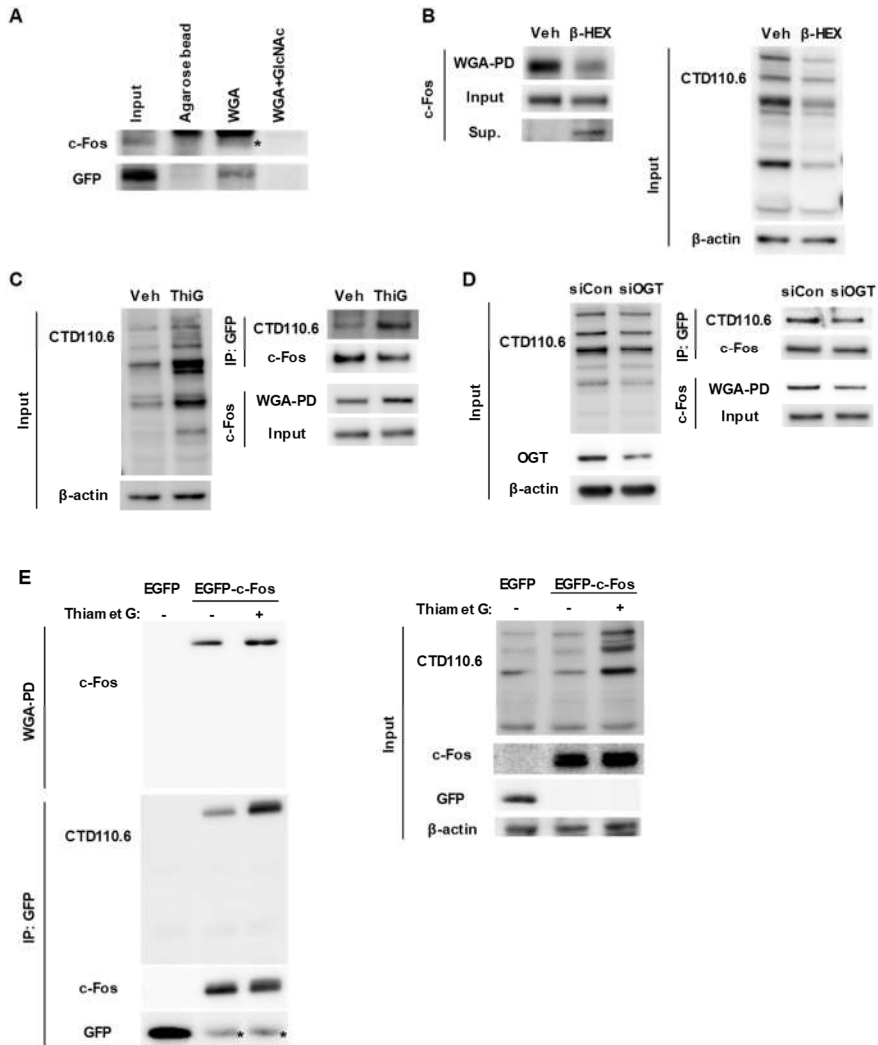


그림 10. 다양한 방법으로 c-Fos의 O-GlcNAcylation 증명

(A) SH-SY5Y 세포주에서 WGA-pull down assay와 경쟁적 분석을 통한 내재성, 외재성 c-Fos의 O-GlcNAcylation 확인. 별표는 c-Fos 신호를 의미한다. (B) SH-SY5Y 세포주에서 β -HEX assay를 통한 c-Fos의 O-GlcNAcylation의 감소 확인 (C) SH-SY5Y 세포주에서 Thiamet G 처리를 통한 c-Fos의 O-GlcNAcylation의 증가 확인 (D) SH-SY5Y 세

포주에서 OGT knock-down을 통한 c-Fos의 O-GlcNAcylation의 감소 확인 (E) HEK293T 세포주에서 Thiamet G 처리를 통한 c-Fos의 O-GlcNAcylation의 증가 확인. 별표는 면역침강에 사용된 anti-GFP antibody의 가벼운사슬 (light chain)으로 생각된다.

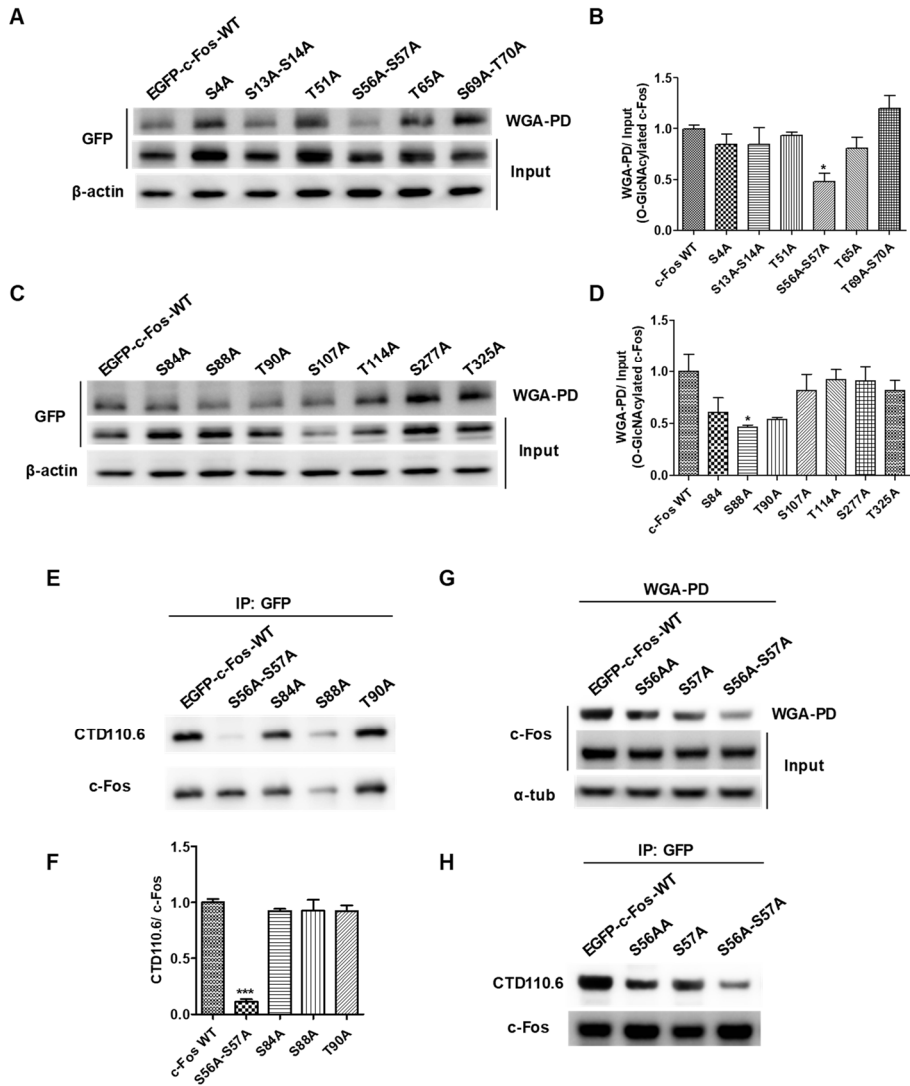


그림 11. S56, S57에서 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 일어난다

(A-D) 예상 O-GlcNAcylation 자리를 alanine으로 치환시킨 O-GlcNAcylation 되지 않는 돌연변이를 이용하여 WGA-pull down을 통해 O-GlcNAcylation site 확인. (A, C)는 대표 사진, (B, D)는 O-GlcNAcylated c-Fos 신호 정량화 그래프이다 (n=3). *P < 0.05 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). (E-F) c-Fos를 면역침강하여

O-GlcNAcylation 되지 않는 돌연변이에서 O-GlcNAcylation 양 확인. (E)는 대표사진, (F)는 정량화그래프이다 (n=3). . ***P < 0.001 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). (G-H) c-Fos의 S56과 S57 자리에 대한 O-GlcNAcylation 확인. (G)는 WGA-pull down assay, (H)는 c-Fos를 면역침강하여 O-GlcNAcylation을 확인하였다.

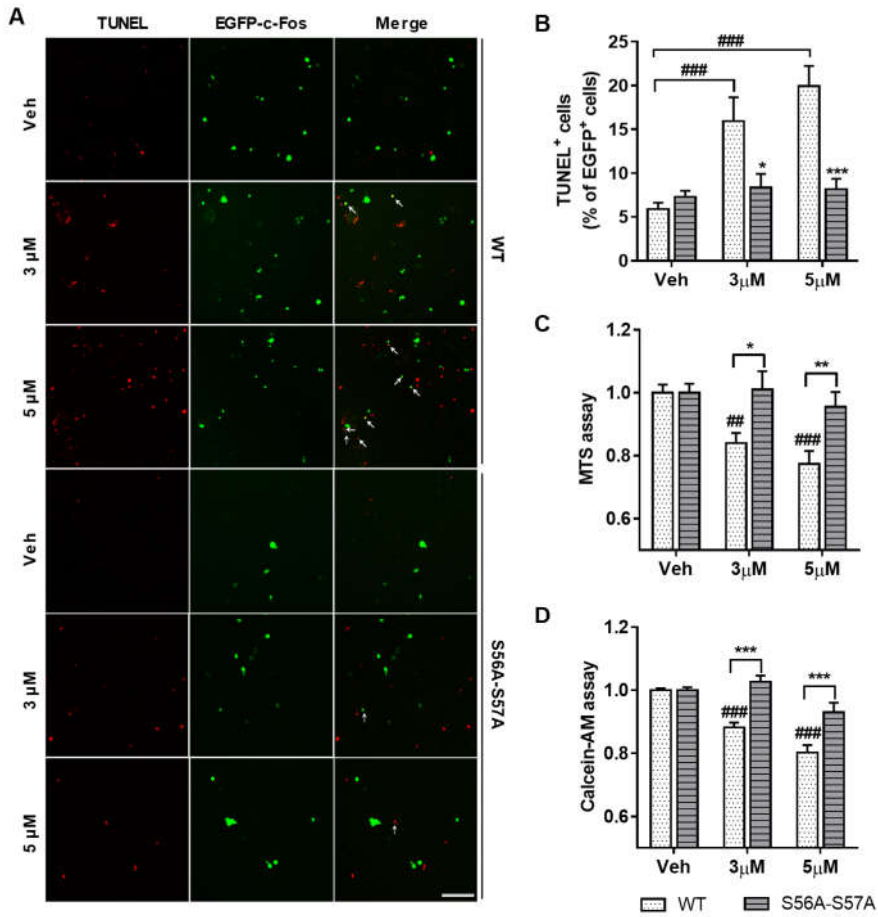


그림 12. 베타-아밀로이드에 의해 c-Fos의 S56, S57 자리의 O-GlcNAcylation이 세포 사멸을 촉진시킴-1

(A-B) EGFP-c-Fos-WT이나 EGFP-c-Fos-S56A-S57A를 과발현한 SH-SY5Y 세포주에 베타-아밀로이드를 처리하여 TUNEL assay를 통한 세포 사멸 확인 (A)는 대표 사진 (scale bar: 250 μm), (B)는 EGFP⁺TUNEL⁺ 세포를 정량화한 그래프이다 (n=6). 화살표는 EGFP⁺TUNEL⁺ 세포를 나타낸다. (C-D) Tag free-c-Fos-WT이나 Tag free-c-Fos-S56A-S57A를 과발현한 SH-SY5Y 세포주에 베타-아밀로이드를 처리하여 세포 생존도 확인. (C)는 MTS assay (n=8), (D)

는 Calcein-AM assay (n=8) 결과이다. c-Fos-WT 그룹 간, c-Fos-S56A-S57A 그룹 간은 ## P < 0.01, ### P < 0.001 로 나타냈다 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). c-Fos-WT과 c-Fos-S56A-S57A 사이의 비교는 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 로 나타냈다 (two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

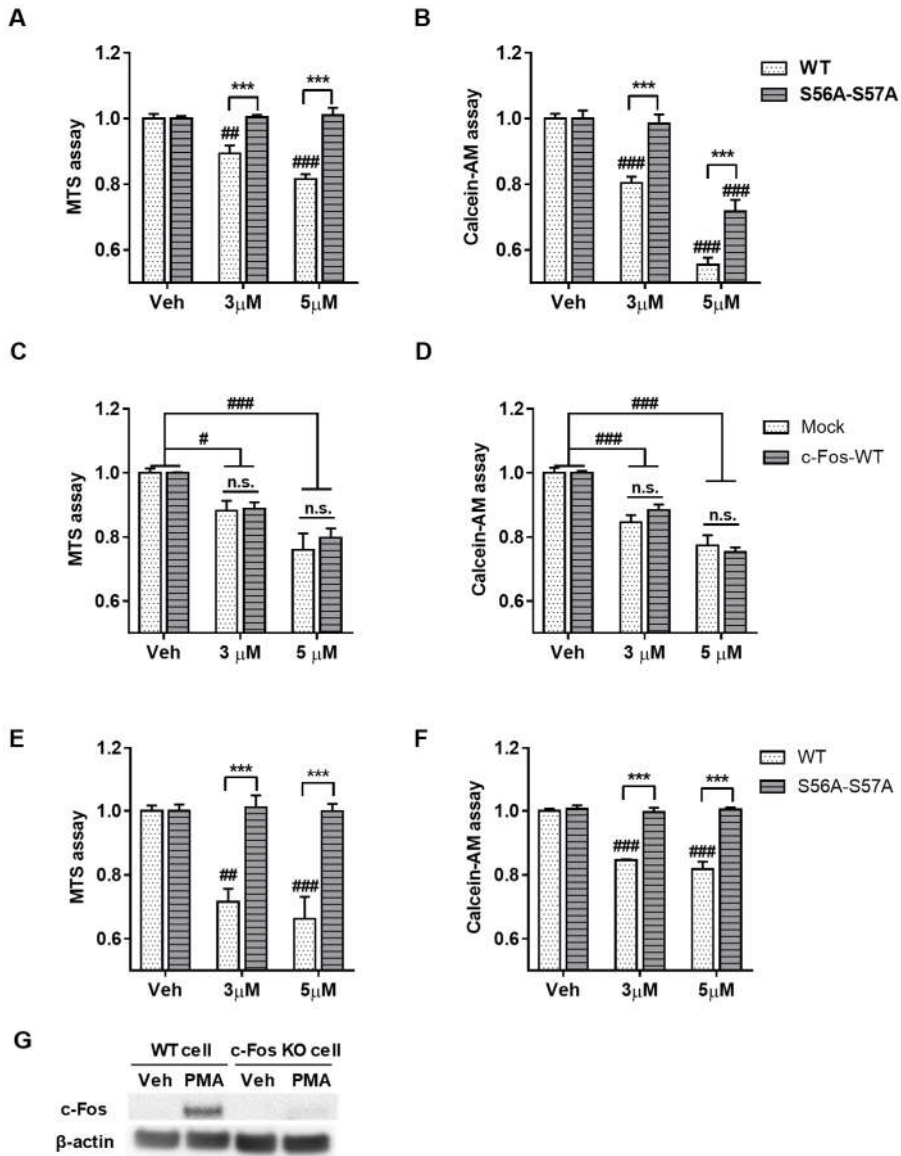


그림 13. 베타-아밀로이드에 의해 c-Fos의 S56, S57 자리의 O-

GlcNAcylation이 세포 사멸을 촉진시킴-2

(A-B) Tag free-c-Fos-WT이나 Tag free-c-Fos-S56A-S57A를 과발현한 HEK293T 세포주에 베타-아밀로이드를 처리하여 세포 생존도 확인. (A)는 MTS assay (n=8), (B)는 Calcein-AM assay (n=8) 결과

이다. (C-D) Mock이나 Tag free-c-Fos-WT을 과발현한 SH-SY5Y 세포주에 베타-아밀로이드를 처리하여 세포 생존도 확인. (C)는 MTS assay (n=6), (D)는 Calcein-AM assay (n=6) 결과이다. (E-F) Tag free-c-Fos-WT이나 Tag free-c-Fos-S56A-S57A를 과발현한 c-Fos knock-out 안정화 SH-SY5Y 세포주에 베타-아밀로이드를 처리하여 세포 생존도 확인. (E)는 MTS assay (n=7), (F)는 Calcein-AM assay (n=6) 결과이다. (G) c-Fos knock-out 안정화 세포주에서 웨스턴 블롯을 통한 c-Fos knock-out 확인. PMA로 c-Fos를 유도하였을 때, WT 세포주에서는 c-Fos가 유도되었지만, c-Fos knock-out 세포주에서는 c-Fos가 보이지 않았다. c-Fos-WT 그룹 간, c-Fos-S56A-S57A 그룹 간은 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 로 나타냈다 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). c-Fos-WT과 c-Fos-S56A-S57A 사이의 비교는 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 로 나타냈다 (two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

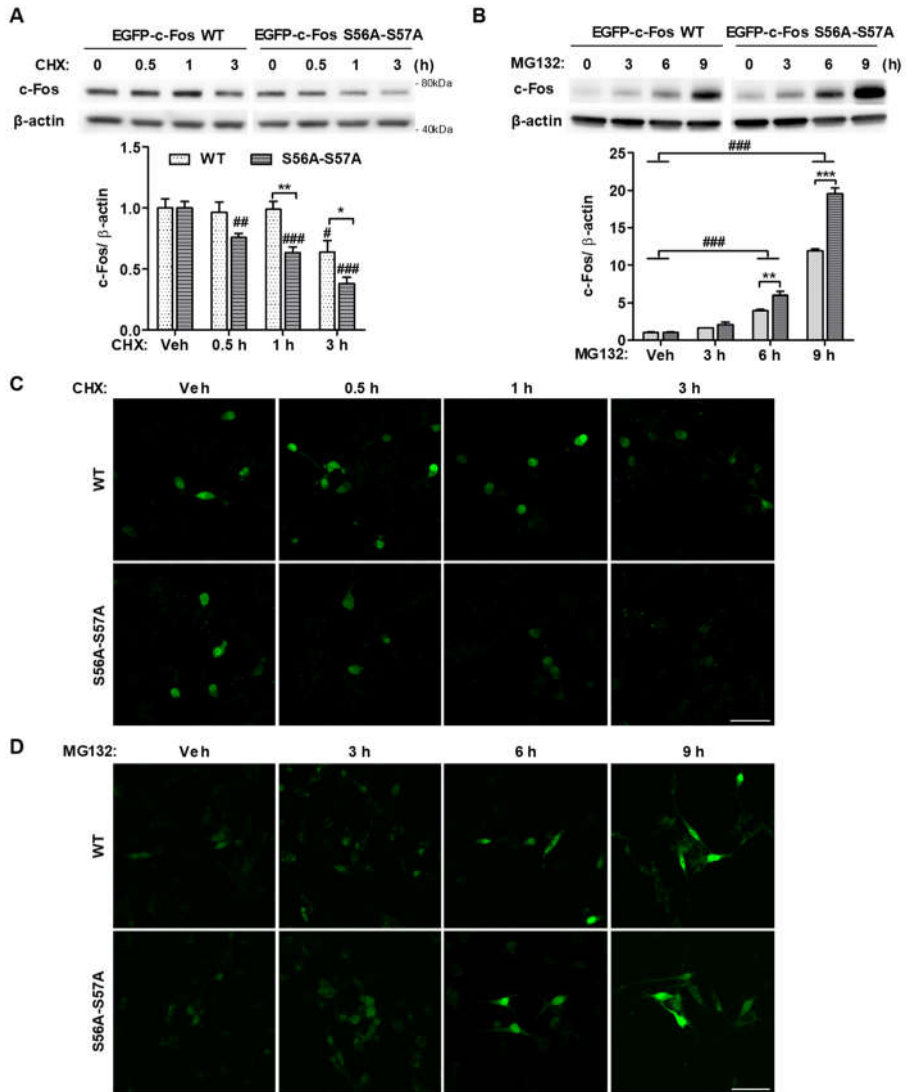


그림 14. S56, S57 자리의 c-Fos O-GlcNAcylation에 의한 c-Fos 자체의 안정화

(A, C) EGFP-c-Fos-WT이나 EGFP-c-Fos-S56A-S57A를 과발현한 SH-SY5Y 세포주에 CHX를 처리하여 c-Fos의 분해 속도 확인. (A)는 웨스턴 블롯 (n=4), (B)는 EGFP 신호를 confocal 이미징한 결과이다. (B, D) EGFP-c-Fos-WT이나 EGFP-c-Fos-S56A-S57A를 과발현한 SH-SY5Y 세포주에 MG132를 처리하여 c-Fos가 쌓이는 정도를 비

교. (B)는 웨스턴 블롯 (n=5), (D)는 EGFP 신호를 confocal 이미징한 결과이다. c-Fos-WT 그룹 간, c-Fos-S56A-S57A 그룹 간은 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 로 나타냈다 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). c-Fos-WT과 c-Fos-S56A-S57A 사이의 비교는 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 로 나타냈다 (two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

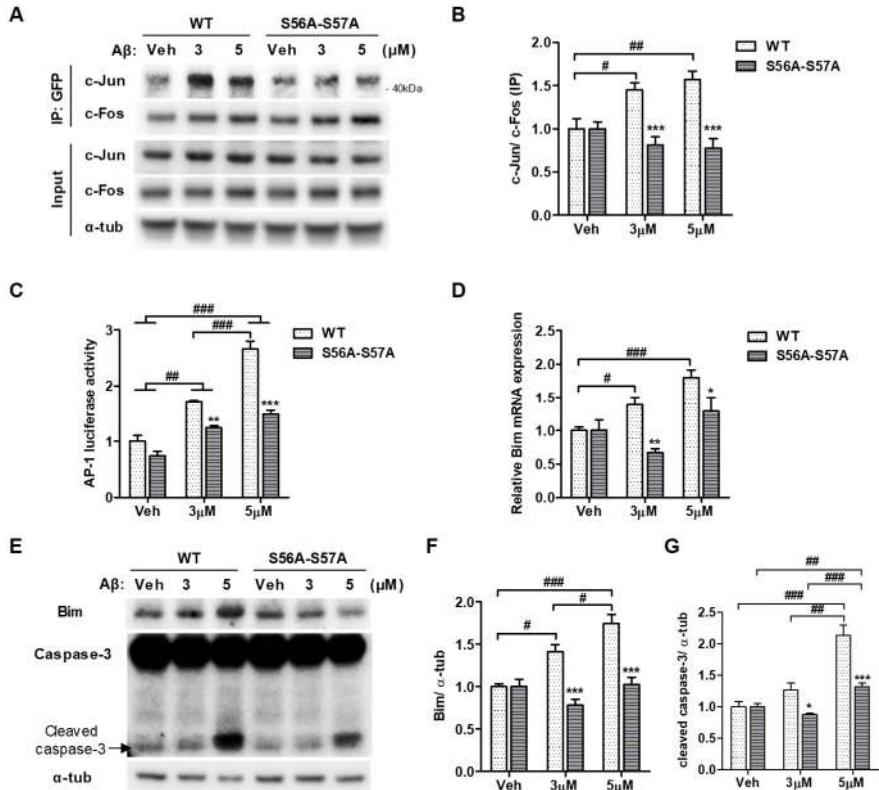


그림 15. S56, S57 자리의 c-Fos O-GlcNAcylation은 베타-아밀로이드에 의해 c-Fos의 전사활성을 증가시키고, Bim의 발현을 증가시킴

(A-B) EGFP-c-Fos-WT이나 EGFP-c-Fos-S56A-S57A를 과발현한 SH-SY5Y 세포주에 베타-아밀로이드를 처리하여 c-Fos와 c-jun의 상호작용 확인. (A)는 대표 사진, (B)는 면역침강된 c-Fos로 보정한 c-jun 양의 정량화 그래프 (n=5). (C) Tag free-c-Fos-WT이나 tag free-c-Fos-S56A-S57A를 과발현한 HEK293T 세포주에 베타-아밀로이드를 처리하여 AP-1 luciferase 활성을 확인 (n=4). (D-F) Tag free-c-Fos-WT이나 tag free-c-Fos-S56A-S57A를 과발현한 SH-SY5Y 세포주에 베타-아밀로이드를 처리하여 Bim의 발현량을 확인. (D)는 mRNA 발현량 (n=5), (E-F)는 단백질 발현량을 확인하였다 (n=5).

(E, G) 위와 같은 조건에서 cleaved caspase-3의 양을 확인. (E)는 대표 사진, (G)는 정량화 그래프이다 (n=5). c-Fos-WT 그룹 간, c-Fos-S56A-S57A 그룹 간은 # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 로 나타냈다 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). c-Fos-WT 과 c-Fos-S56A-S57A 사이의 비교는 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 로 나타냈다 (two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

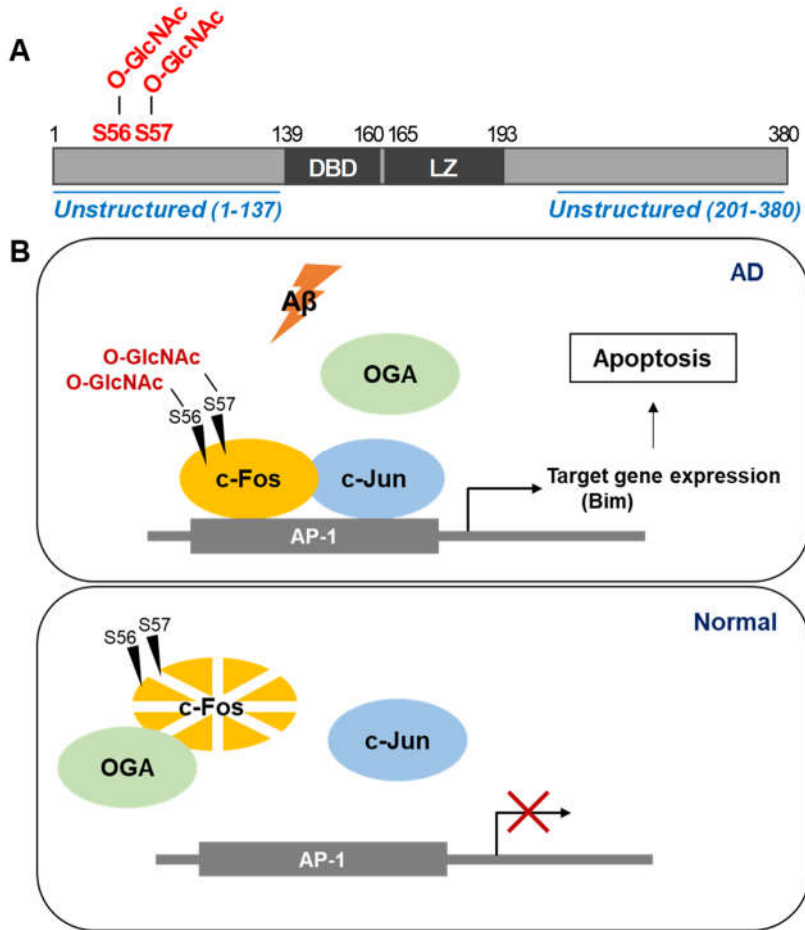


그림 16. c-Fos의 O-GlcNAcylation 자리와 베타-아밀로이드가 있을 때, c-Fos O-GlcNAcylation에 의한 세포사멸 촉진 기전에 관한 모식도
 (A) c-Fos의 O-GlcNAcylation 자리를 나타낸 모식도 (DBD: DNA-binding domain, LZ: Leucine zipper domain), (B) 베타-아밀로이드가 있을 때, c-Fos O-GlcNAcylation에 의한 세포사멸 촉진 기전에 관한 모식도

	Age	Sex	Braack stage
Normal:			
1	101	F	I
2	78	F	II
AD:			
1	100	F	V
2	79	F	VI

표 1. 실험에 이용된 사람 뇌조직의 정보

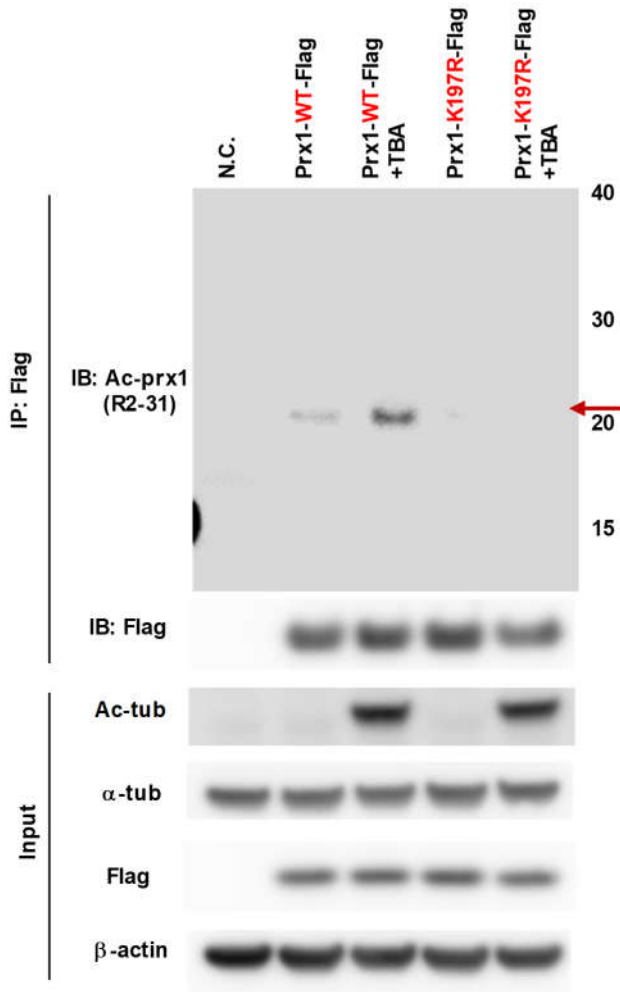


그림 17. Anti-acetyl-Prx1 antibody (R2-31)의 항원 특이성 확인

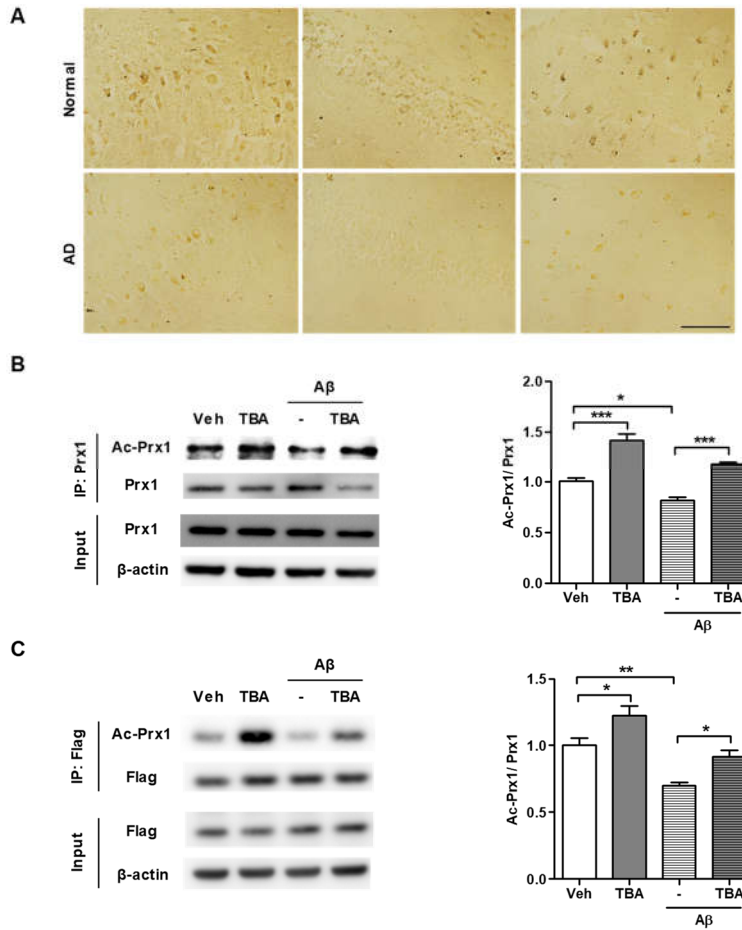


그림 18. 알츠하이머병 환자의 뇌에서 Prx1의 acetylation이 감소하고, 베타-아밀로이드와 HDAC6 억제제에 의해 Prx1의 acetylation이 조절됨

(A) 정상인과 알츠하이머병 환자의 뇌조직에서 DAB 염색을 이용한 acetyl-Prx1 변화 확인 (Scale bar: 100 μ m). (B) primary neuron에서 베타-아밀로이드와 HDAC6 억제제에 의한 Prx1의 acetylation 조절 확인 (n=4). (C) HT22 세포주에서 베타-아밀로이드와 HDAC6 억제제에 의한 Prx1의 acetylation 조절 확인 (n=4). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test)

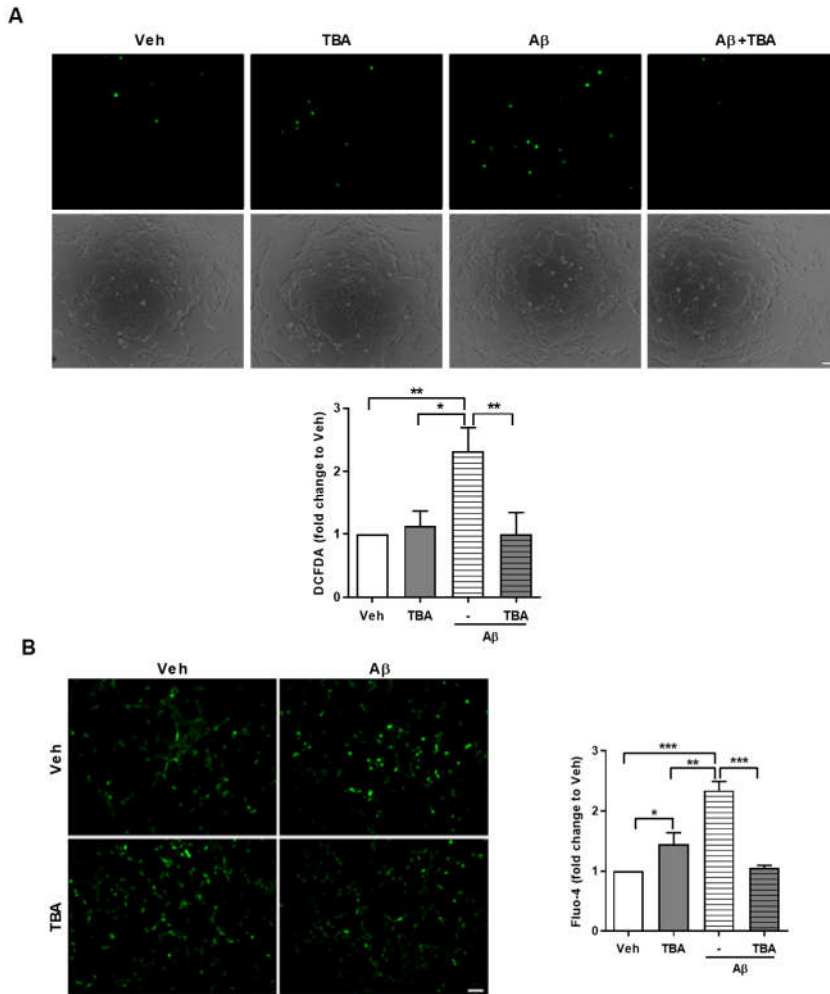


그림 19. HDAC6 억제제가 베타-아밀로이드에 의해 증가된 ROS와 Ca^{2+} 을 감소시킴

(A) 베타-아밀로이드와 HDAC6 억제제인 TBA를 처리한 HT22 세포주에서 DCFDA assay를 통한 ROS 양의 변화 확인 (n=5). (B) 베타-아밀로이드와 HDAC6 억제제인 TBA를 처리한 HT22 세포주에서 Fluo-4 assay를 통한 Ca^{2+} 양의 변화 확인 (n=5). Scale bar: 100 μ m. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

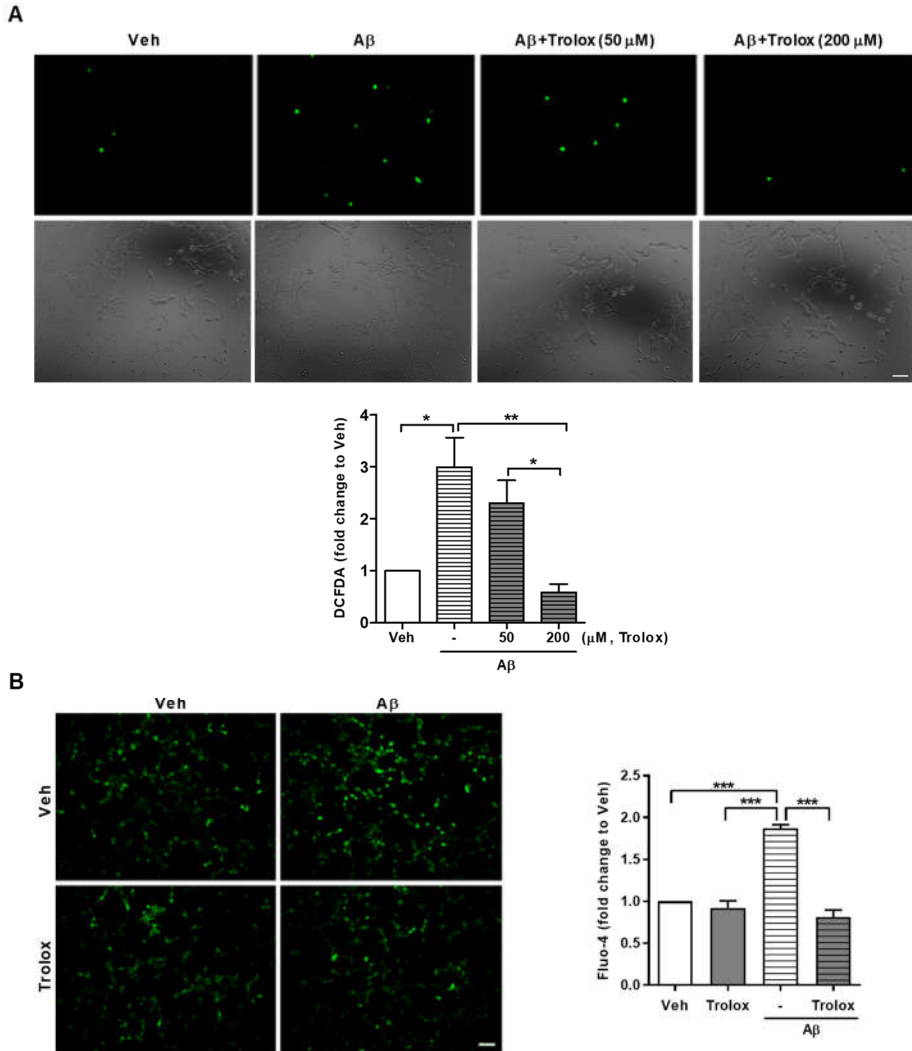


그림 20. 베타-아밀로이드에 의해 유도된 ROS가 Ca^{2+} 의 양을 조절함

(A) 베타-아밀로이드와 농도별로 trolox를 처리한 HT22 세포주에서 DCFDA assay를 통한 ROS 양의 변화 확인 (n=4). (B) 베타-아밀로이드와 trolox (200 μ M)를 처리한 HT22 세포주에서 Fluo-4 assay를 통한 Ca^{2+} 양의 변화 확인 (n=5). Scale bar: 100 μ m. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

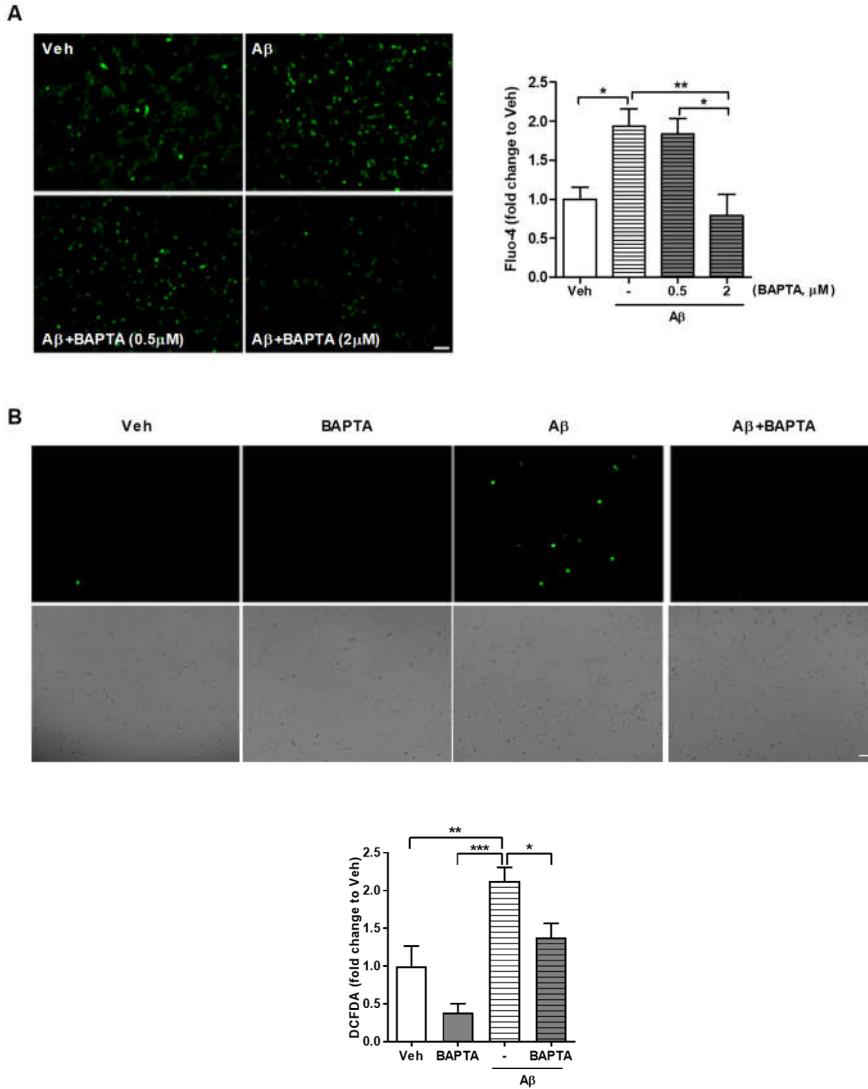


그림 21. 베타-아밀로이드에 의해 유도된 Ca^{2+} 이 ROS를 조절함

(A) 베타-아밀로이드와 BAPTA를 농도별로 처리한 HT22 세포주에서 Fluo-4 assay를 통한 Ca^{2+} 양의 변화 확인 (n=6). (B) 베타-아밀로이드와 BAPTA (2 μ M)를 처리한 HT22 세포주에서 DCFDA assay를 통한 ROS 양의 변화 확인 (n=6). Scale bar: 100 μ m. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

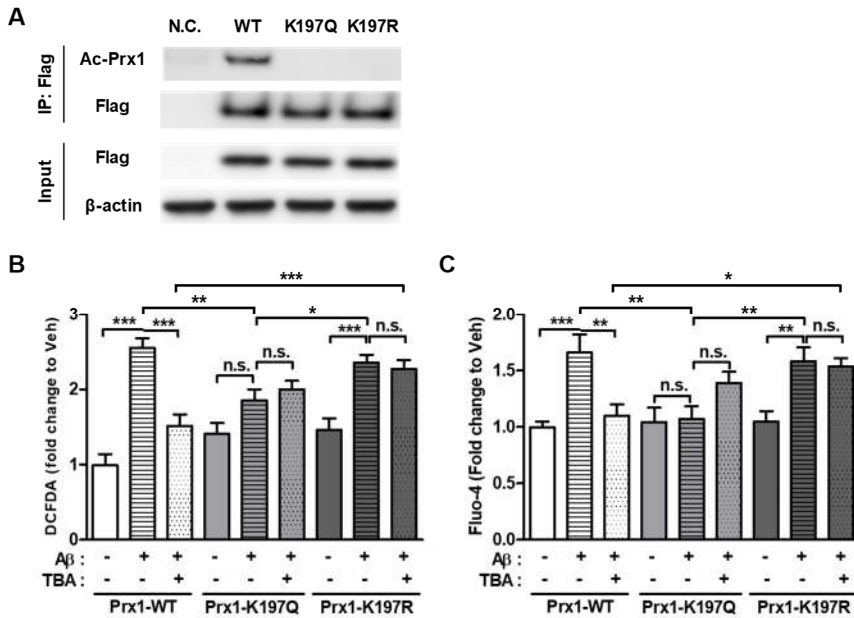


그림 22. HDAC6 억제제는 Prx1의 acetylation을 매개하여 베타-아밀로이드에 의해 유도된 ROS와 Ca²⁺을 회복시킴

(A) HT22 세포주에서 Prx1-WT-Flag, Prx1-K197Q-Flag, Prx1-K197R-Flag의 발현 및 돌연변이 확인 (B-C) HT22 세포주에 Prx1-WT-Flag, Prx1-K197Q-Flag, Prx1-K197R-Flag을 발현시키고, 베타-아밀로이드와 TBA를 처리하여, DCFDA assay를 통한 ROS (B)와 Fluo-4 assay를 통한 Ca²⁺ (C)의 변화 확인 (B: n=10, C: n=7). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

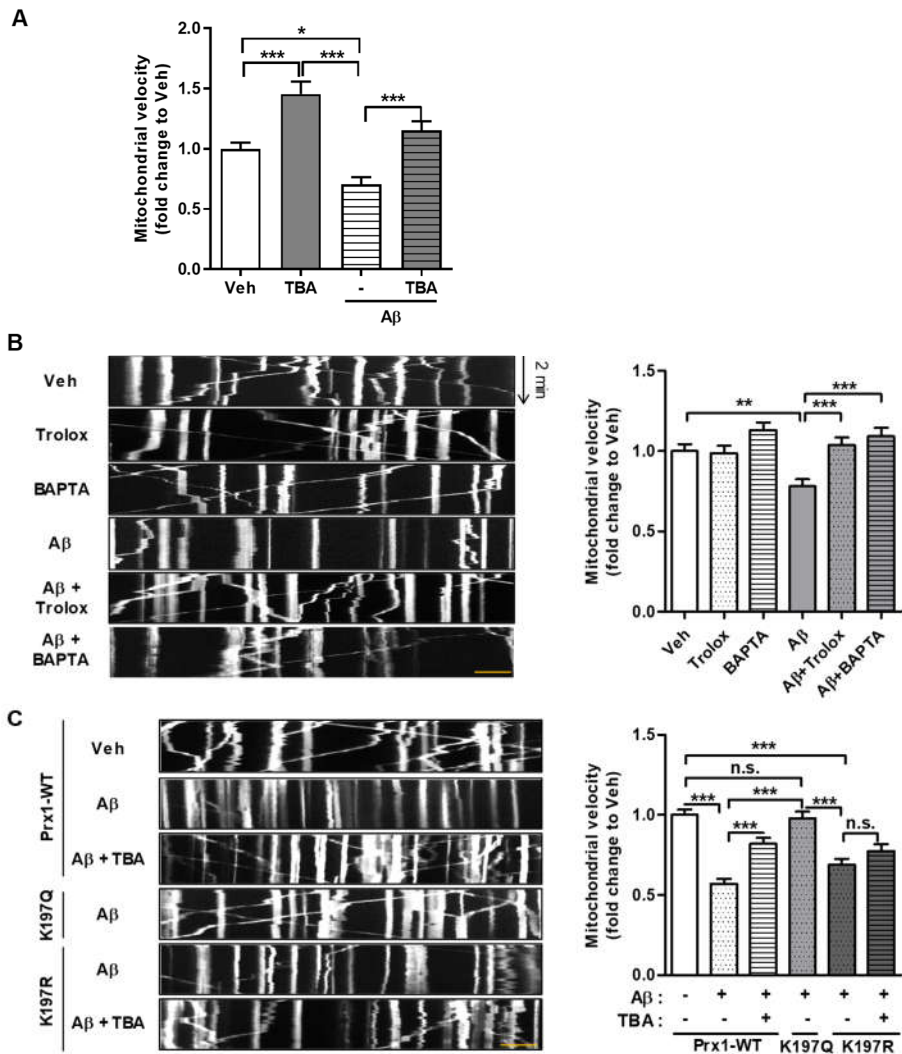


그림 23. 베타-아밀로이드에 의해 유도된 ROS와 Ca^{2+} 이 미토콘드리아의 축삭 수송을 손상시킴

(A) primary neuron에 베타-아밀로이드와 TBA를 처리한 뒤, 미토콘드리아의 축삭 수송 속도를 확인 (n=3). *P < 0.05, ***P < 0.001 (two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test) (B) primary neuron에 베타-아밀로이드와 trolox, BAPTA를 처리한 뒤, 미토콘드리아의 축삭 수송 속도를 확인 (n=4). 왼쪽 패널은 kymograph이고, 오른쪽 패널은 속도를 정량

화한 그래프이다. **P < 0.01, ***P < 0.001 (two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). (C) Prx1-WT, Prx1-K197Q, Prx1-K197R을 각각 발현시킨 primary neuron에 베타-아밀로이드나 TBA를 처리하여, 미토콘드리아의 축삭 수송 속도를 확인 (n=5). 왼쪽 패널은 kymograph이고, 오른쪽 패널은 속도를 정량화한 그래프이다. ***P < 0.001 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). Scale bar: 10 μ m

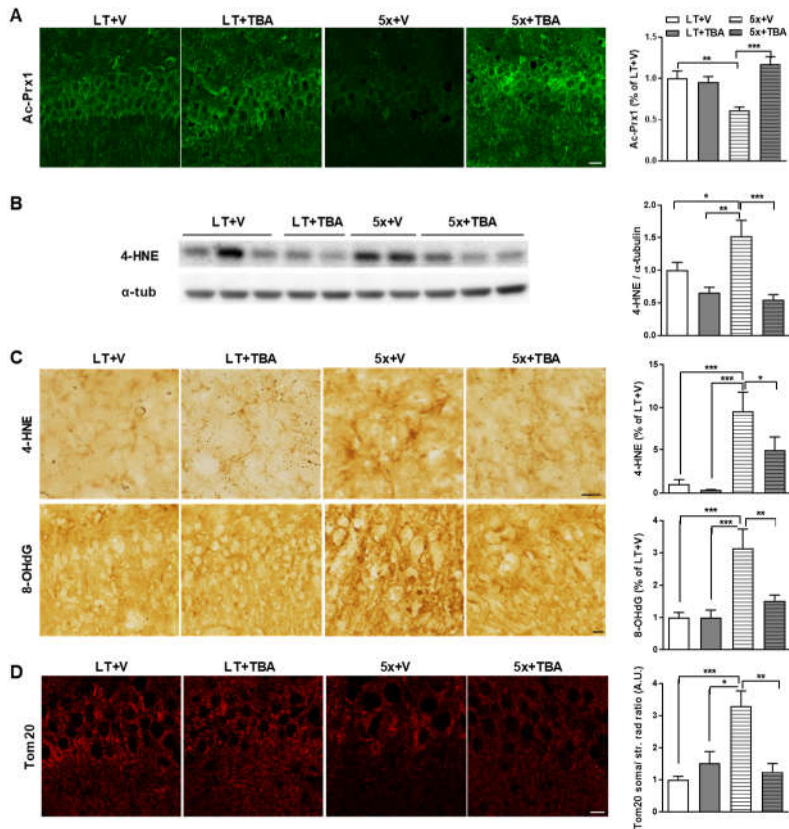


그림 24. 5xFAD에서 HDAC6 억제제에 의해 증가된 Prx1 acetylation이 산화스트레스와 미토콘드리아 수송을 회복시킴

TBA (100 mg/kg)를 투여한 5xFAD의 뇌조직을 이용하였다. (A) TBA 투여에 의한 acetyl-Prx1의 회복을 형광 면역조직염색을 통해 확인. (B) TBA 투여에 의한 4-HNE의 변화를 웨스턴블롯을 통해 확인. (C) TBA 투여에 의한 4-HNE, 8-OHdG의 변화를 DAB을 이용한 면역조직염색으로 확인. (D) TBA 투여에 의한 미토콘드리아 수송의 회복을 Tom20을 이용한 형광 면역조직염색으로 확인. 왼쪽 패널은 대표사진, 오른쪽 패널은 정량화 그래프이다 (그룹 당 n=5). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (twoway ANOVA, Bonferroni post-hoc test). Scale bar: 10 μ m

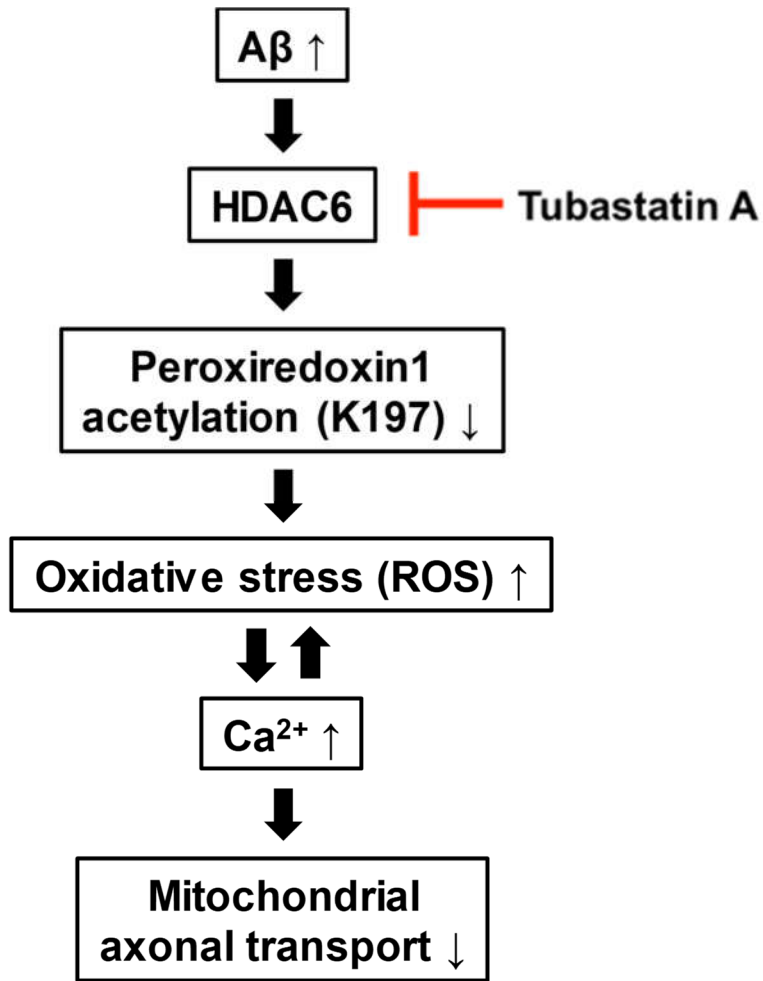


그림 25. 알츠하이머병에서 Prx1 acetylation과 HDAC6 억제제의 역할에 관한 모식도

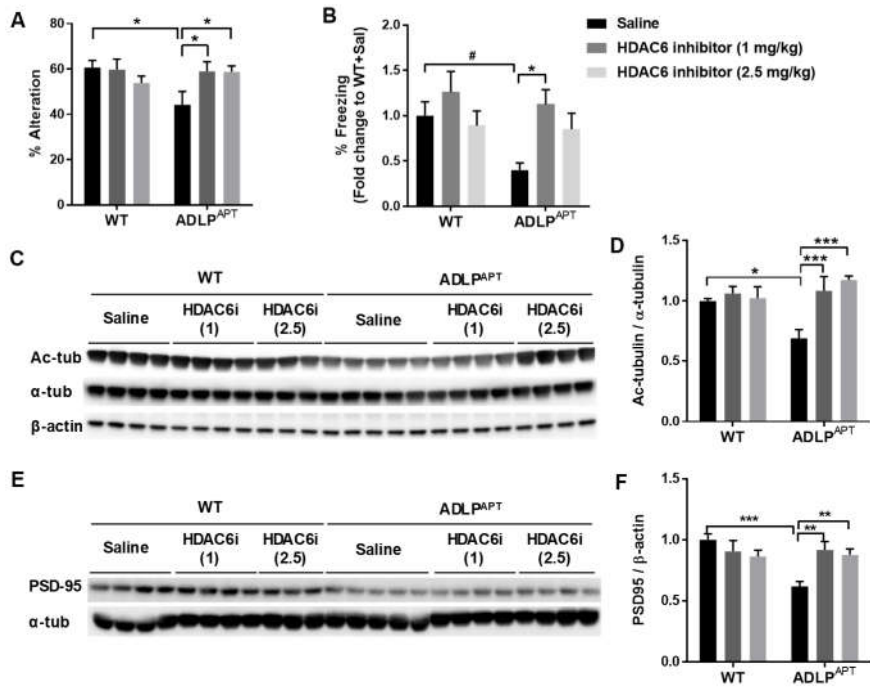


그림 26. ADLP^{APT} 쥐에 예방 모델로 두가지 용량의 HDAC6 inhibitor를 투여했을 때 보이는 기억력과 acetyl-tubulin, PSD95의 회복

(A-B) HDAC6 inhibitor에 의한 기억력 회복. (A)는 Y-maze test 결과, (B)는 contextual fear conditioning test 결과이다 (n= 12/9/10, 7/10/11). (C-D) HDAC6 inhibitor에 의한 acetyl-tubulin의 회복. (C)는 대표 사진, (D)는 acetyl-tubulin을 α -tubulin으로 보정한 정량화 그래프이다 (n= 8/7/7, 10/8/8). (E-F) HDAC6 inhibitor에 의한 PSD95 양의 회복. (E)는 대표 사진, (F)는 β -actin으로 보정한 정량화 그래프이다 (n= 8/7/7, 10/8/8). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test), #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 (Student's t-test).

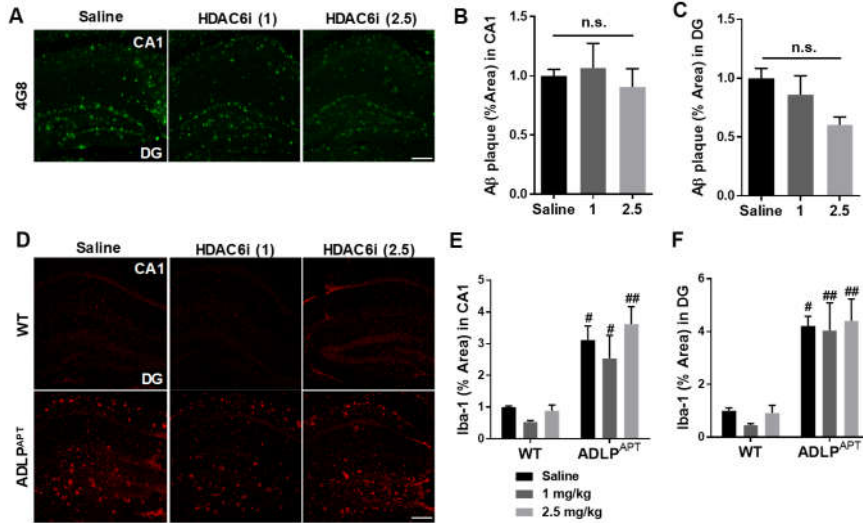


그림 27. ADLP^{APT} 쥐에 예방 모델로 두가지 용량의 HDAC6 inhibitor를 투여했을 때 베타-아밀로이드 반점과 microgliosis는 변화되지 않음

(A-C) 4G8 항체를 이용하여 HDAC6 inhibitor에 의한 베타-아밀로이드 반점의 변화를 면역조직염색으로 확인. (A)는 대표사진, (B)는 CA1, (C)는 DG의 베타-아밀로이드 반점을 정량화한 그래프이다 (n=2, 8, 4). n.s. (non-significant) $P > 0.05$ (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test) (D-E) Iba-1을 면역조직염색하여 HDAC6 inhibitor에 의한 microgliosis의 변화 확인 (D)는 대표사진, (E)는 CA1, (F)는 DG의 Iba-1으로 염색된 면적을 정량화한 그래프이다 (n=4/5/5, 5/7/5). 용량별로 비교하여 통계 분석하였고, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ (two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). Scale bar: 200 μ m.

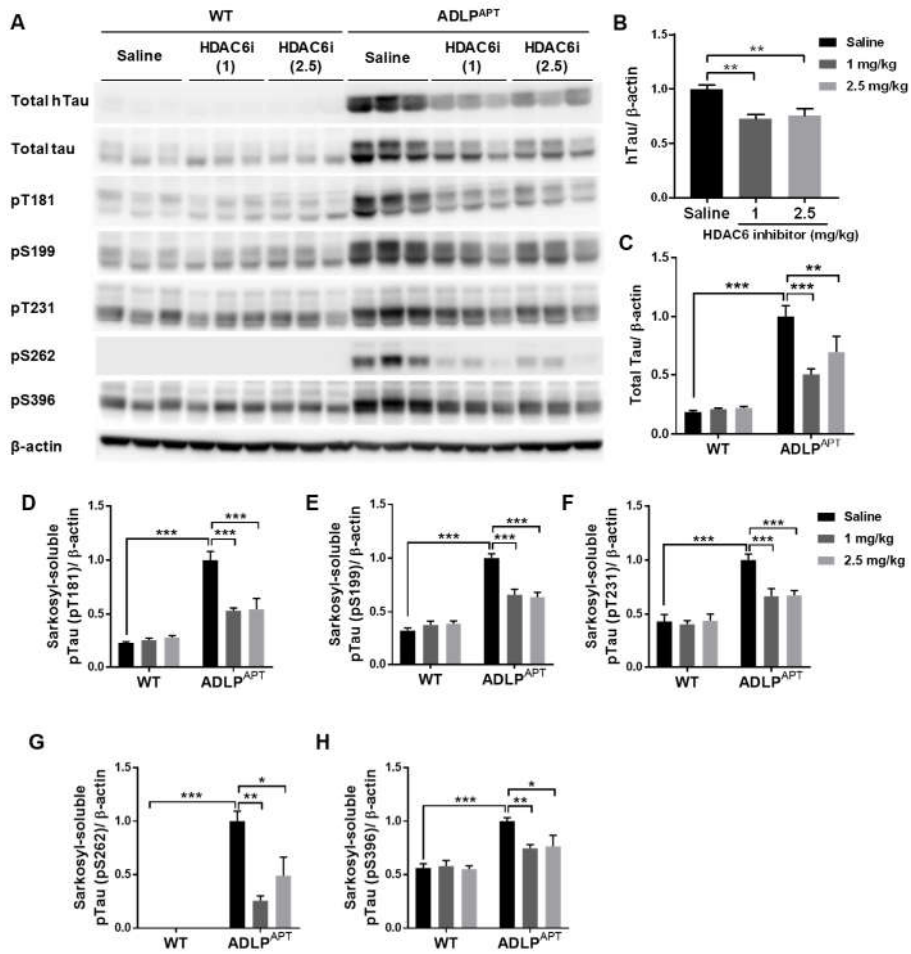


그림 28. ADLP^{APT} 쥐에 예방 모델로 두가지 용량의 HDAC6 inhibitor를 투여했을 때 보이는 sarkosyl-soluble tau의 감소

(A) 웨스턴 블롯의 대표 사진. (B)는 전체 human tau, (C)는 전체 tau의 양, (D-H)는 각각 표기된 phosphorylated tau를 β -actin으로 보정한 정량화 그래프이다 (n=6/6/5, 6/5/5). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (two-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

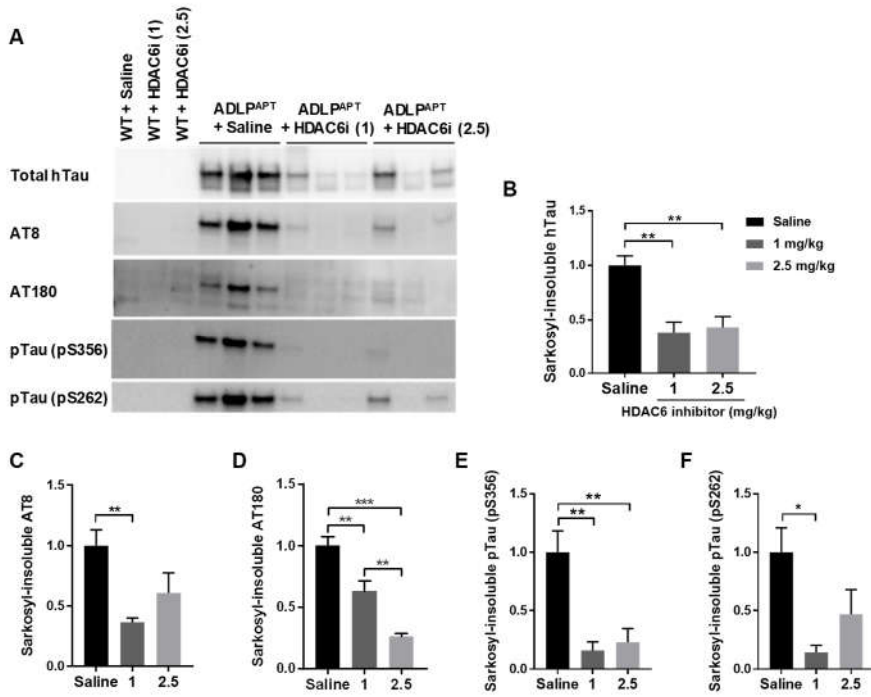


그림 29. ADLP^{APT} 쥐에 예방 모델로 두가지 용량의 HDAC6 inhibitor를 투여했을 때 보이는 sarkosyl-insoluble tau의 감소

(A) 웨스턴 블롯의 대표 사진. (B)는 전체 human tau, (C-F)는 각각 표기된 phosphorylated tau를 정량화한 그래프이다 (n=6/5/5). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

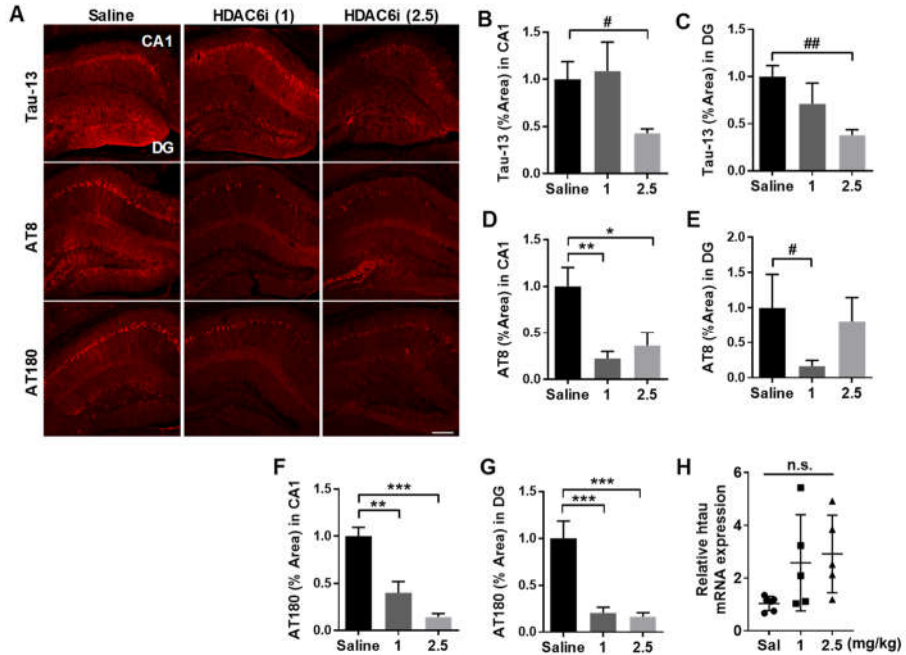


그림 30. ADLP^{APT} 쥐에 예방 모델로 두가지 용량의 HDAC6 inhibitor를 투여했을 때 보이는 tau의 감소

(A) 면역조직염색의 대표 사진. (B-C) Tau-13의 형광신호를 CA1 (B) 과 DG (C)에서 정량화한 그래프. (D-E) AT8의 형광신호를 CA1 (D)과 DG (E)에서 정량화한 그래프. (F-G) AT180의 형광신호를 CA1 (F)과 DG (G)에서 정량화한 그래프. (n=3/8/4). (H) quantitative PCR를 통해 확인한 human tau의 mRNA 양 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test), #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 (Student's t-test). n.s.: non-significant. Scale bar: 200 μ m.

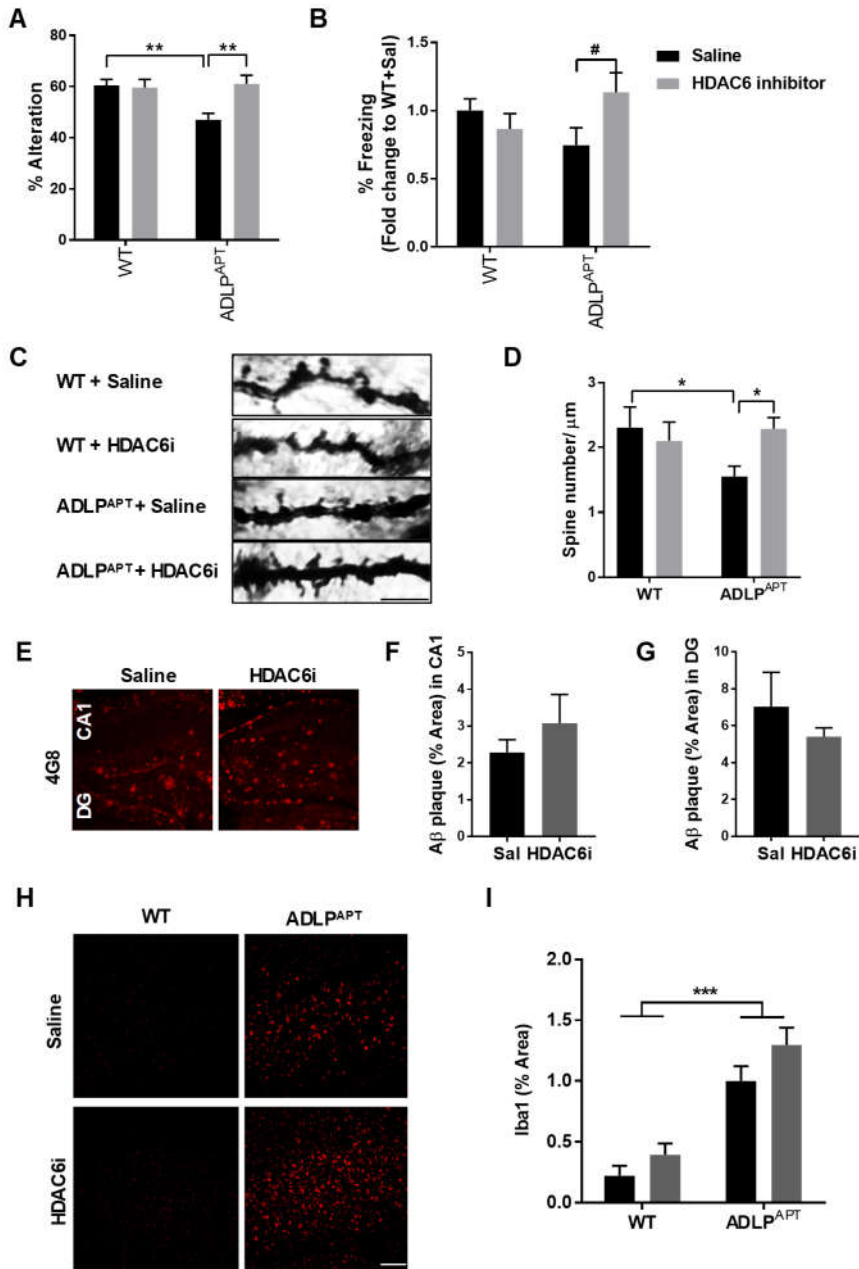


그림 31. ADLP^{APT} 쥐에 치료 모델로 HDAC6 inhibitor를 투여했을 때 보이는 기억력, 시냅스의 회복과 베타-아밀로이드 반점과 microgliosis의 변화 없음

(A-B) HDAC6 inhibitor에 의한 기억력 회복. (A)는 Y-maze test 결과, (B)는 contextual fear conditioning test 결과이다 (n= 20/20, 20/16). (C-D) Golgi-staining으로 측정된 HDAC6 inhibitor에 의한 시냅스 spine 개수의 회복. (C)는 대표 사진, (D)는 시냅스의 spine 개수를 정량한 그래프이다 (n= 3마리에서 21/16, 29/28개의 dendrites). Scale bar: 5 μ m. *P < 0.05 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test), #P < 0.05 (Student's t-test). (E-G) 4G8 항체를 이용하여 HDAC6 inhibitor에 의한 베타-아밀로이드 반점의 변화를 면역조직염색으로 확인. (E)는 대표사진, (F)는 CA1, (G)는 DG의 베타-아밀로이드 반점을 정량화한 그래프이다 (n=6, 3). n.s. (non-significant) P > 0.05 (Student's t-test). (H-I) Iba-1을 면역조직염색하여 HDAC6 inhibitor에 의한 microgliosis의 변화 확인 (H)는 대표사진, (I)는 Iba-1의 형광신호를 정량한 그래프이다 (n=5/5, 10/6). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). Scale bar: 200 μ m.

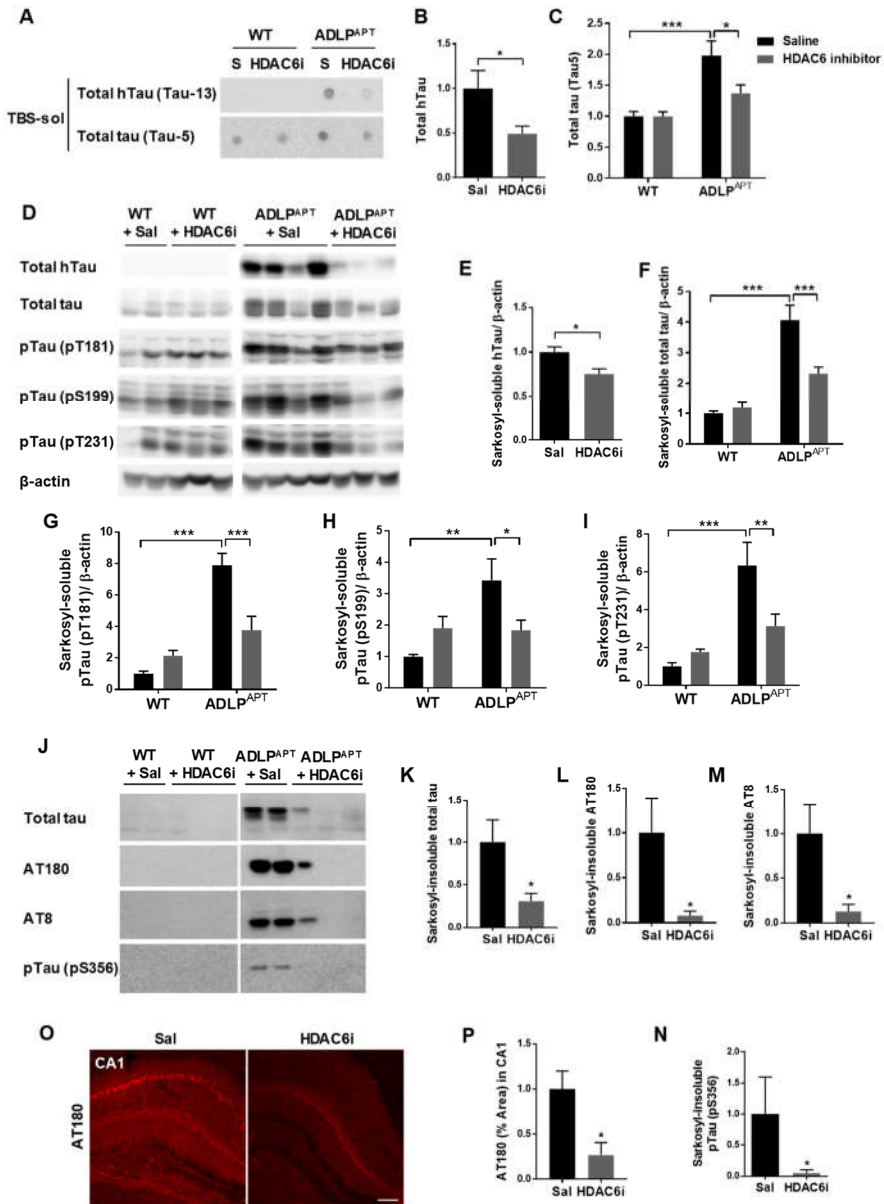


그림 32. ADLP^{APT} 쥐에 치료 모델로 HDAC6 inhibitor를 투여했을 때 보이는 tau의 감소

(A-C) TBS-soluble fraction에서 닷 블롯을 이용하여 HDAC6 억제제에 의한 tau의 감소 확인 (A)는 대표 사진. (B)는 전체 human tau (*P < 0.05 (Student' s t-test)), (C)는 전체 tau를 정량한 그래프 이다 (*P <

0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test)) (n=5/6, 6/6). (D-I) Sarkosyl-soluble fraction에서 웨스턴 블롯을 이용하여 HDAC6 억제제에 의한 tau의 감소 확인. (D)는 대표사진, (E)는 전체 human tau, (F)는 전체 tau, (G-I)는 각각 표기된 phosphorylated tau를 정량한 그래프이다 (n=4/6, 6/5). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). (J-N) Sarkosyl-insoluble fraction에서 웨스턴 블롯을 이용하여 HDAC6 억제제에 의한 tau의 감소 확인. (K)는 전체 tau, (L-N)은 각각 표기된 phosphorylated tau를 정량한 그래프이다 (n=5,5). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Student' s t-test). (O-P) AT180으로 면역조직염색하여 HDAC6 억제제에 의한 tau의 감소 확인. (O)는 대표사진, (P)는 AT180 형광신호를 정량한 그래프이다 (n=10, 5). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Student' s t-test). Scale bar: 200 μ m.

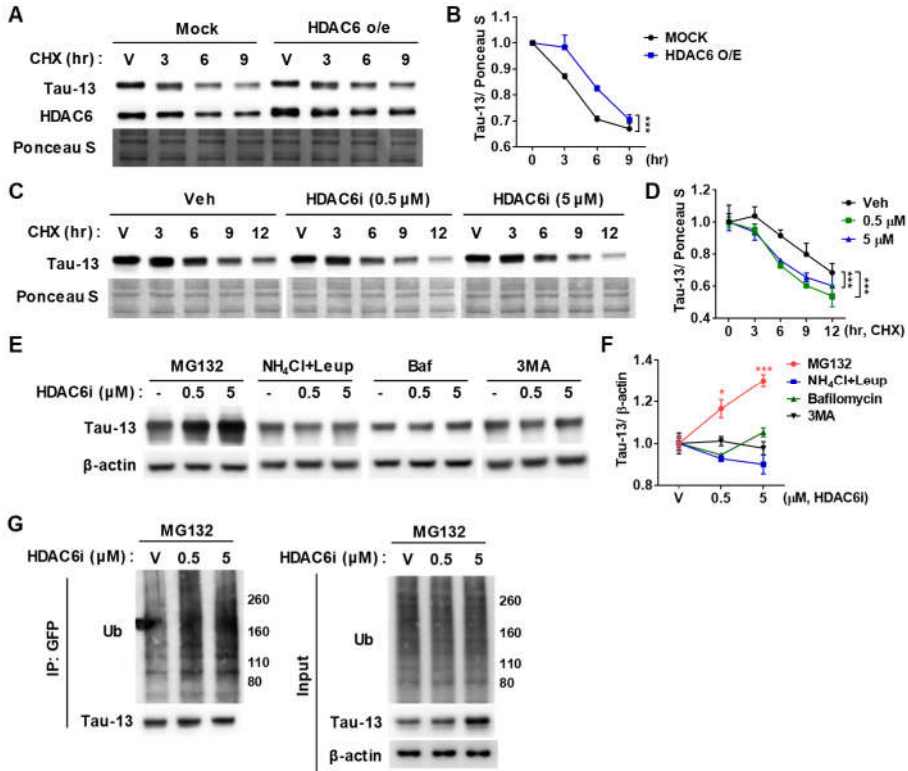


그림 33. HT22 세포주에서 HDAC6에 의한 tau의 조절 및 HDAC inhibitor에 의한 tau의 프로테아좀으로의 분해 촉진

HT22 세포주에 EGFP-P301L-tau를 과발현한 뒤, 표기된 시약을 처리하였다. (A-B) HDAC6 과발현에 의한 tau의 분해 속도 감소 확인. CHX(30 μ g/ml)를 시간별로 처리하여 tau의 분해 속도를 확인하였다. (A)는 대표 사진, (B)는 tau의 양을 Ponceau S로 보정하여 정량한 그래프이다 (n=3). ***P < 0.001 (Linear regression, comparing slope). (C-D) HDAC6 inhibitor에 의한 tau의 분해 촉진 확인. HDAC6 inhibitor와 함께 CHX(30 μ g/ml)를 시간별로 처리하였다. (C)는 대표 사진, (D)는 tau의 양을 Ponceau S로 보정하여 정량한 그래프이다 (n=3). ***P < 0.001 (Linear regression, comparing slope). (E-F) HDAC6 inhibitor에 의한

tau의 프로테아좀으로의 분해 촉진 확인. MG132 (5 μ M), NH₄Cl (20 mM) + leupeptin (0.1 mM), bafilomycin (10 nM), 3MA (5 mM)과 HDAC6 inhibitor를 함께 처리한 뒤, 웨스턴 블롯을 통해 tau가 쌓이는 양을 관찰하였다. (E)는 대표 사진, (F)는 tau의 양을 β -actin으로 보정한 정량화 그래프이다 (n=4~5). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). (G) HDAC6 inhibitor에 의한 tau의 ubiquitination 증가 확인. MG132 (5 μ M)와 HDAC6 inhibitor를 표기된 농도만큼 처리한 뒤, tau를 면역침강하여 ubiquitin을 관찰하였다.

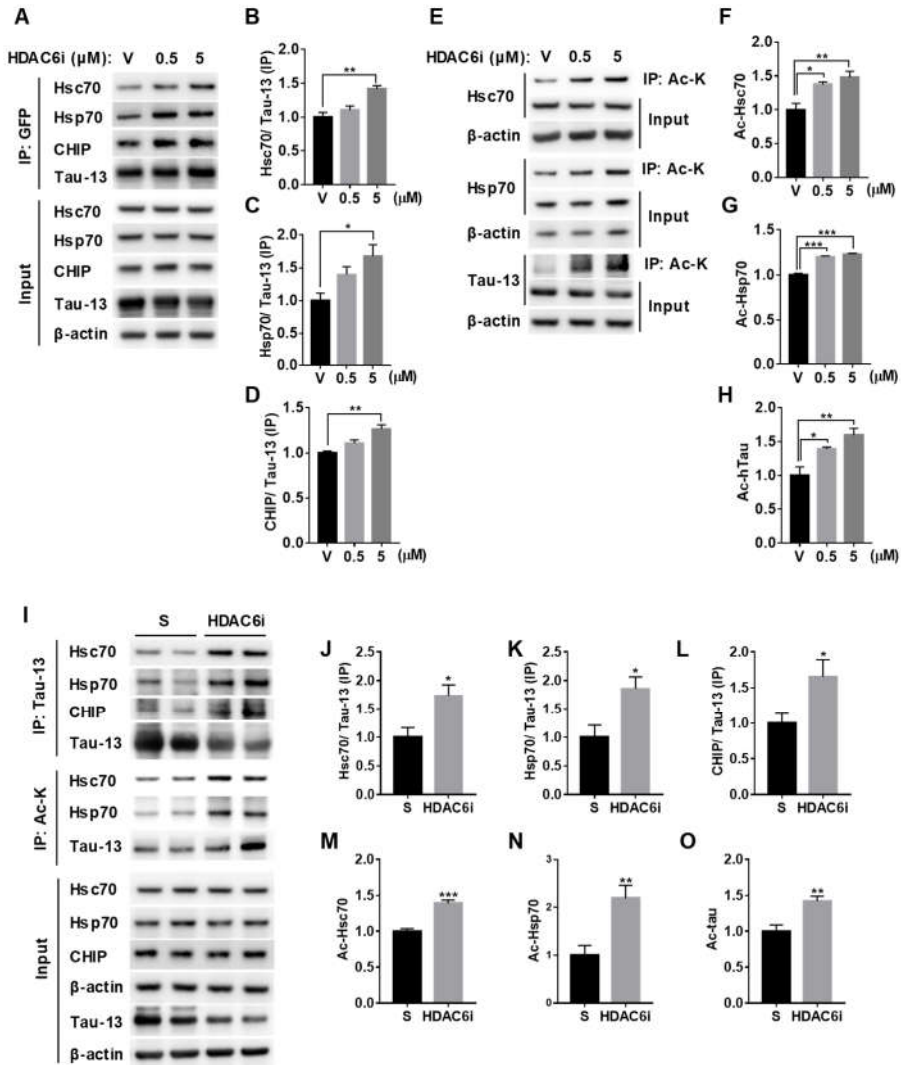


그림 34. HDAC6 억제제에 의해 tau, Hsc70, Hsp70의 acetylation 증가로 인한 서로 간의 상호 작용 촉진

(A-D) HT22 세포주에서 HDAC6 inhibitor에 의한 tau와 Hsc70, Hsp70, CHIP의 상호 작용 증가 확인. HT22 세포주에 EGFP-P301L-tau를 과 발현시켜, 이를 면역침강한 뒤 상호작용하는 단백질을 확인하였다. (A)는 대표 사진, (B-D)는 표기된 상호 작용 단백질의 양을 면역침강된 tau로 보정한 정량화 그래프이다 (n=3). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

(one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). (E-H) HT22 세포주에 HDAC6 inhibitor에 의한 Hsc70, Hsp70, tau의 acetylation 증가 확인. HT22 세포주에 EGFP-P301L-tau를 과발현시키고, anti-acetyl-K beads로 면역침강한 뒤, 표기된 단백질을 검출하였다. (E)는 대표 사진, (F-H)는 input의 양으로 보정하여 각 단백질의 acetylation 양을 정량한 그래프이다 (n=4). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). (I-N) 치료 모델의 ADLP^{APT} 쥐에서 HDAC6 inhibitor에 의해 tau, Hsc70, Hsp70의 acetylation이 증가하여 서로의 상호 작용이 증가함을 확인. (I)는 대표 사진, (J-L)은 tau로 면역침강하여 표기된 단백질과 상호 작용을 분석한 정량화 그래프, (M-O)은 anti-acetyl-K beads로 면역침강하여 표기된 단백질의 acetylation의 변화를 정량한 그래프이다 (n=5,4). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Student' s t-test).

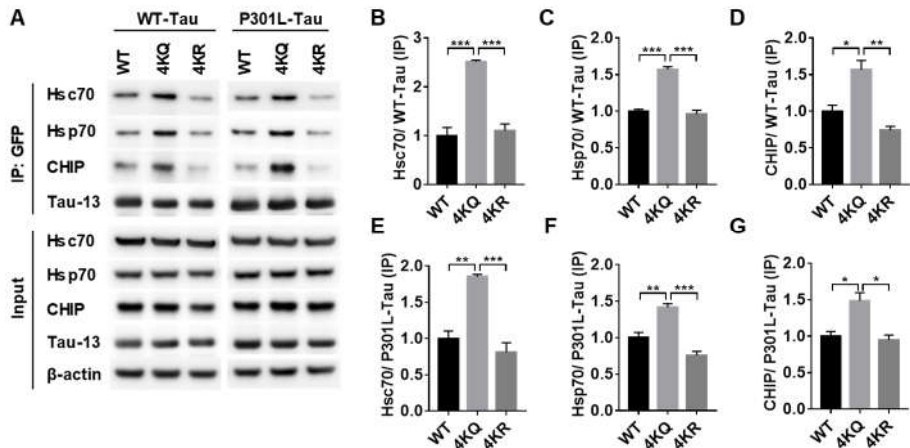


그림 35. Hsc70, Hsp70, CHIP과의 상호작용에 영향을 주는 tau의 acetylation 자리 규명

(A-G) HT22 세포주에서 WT-Tau와 P301L-Tau의 K274, K290, K321, K353 잔기의 acetylation에 따른 chaperone과의 상호 작용 변화 확인. HT22 세포주에 4가지 잔기의 acetylation 모방 돌연변이 (4KQ)나 acetylation 억제 돌연변이 (4KR)를 과발현시켜, 이를 면역침강한 뒤 chaperone과의 상호작용 변화를 확인하였다. (A)는 대표사진, (B-D)는 WT-Tau의 acetylation에 따른 chaperone의 상호 작용 변화를 면역침강된 tau로 보정한 정량화 그래프이다 (n=3). (E-G) P301L-Tau의 acetylation에 따른 chaperone의 상호 작용 변화를 면역침강된 tau로 보정한 정량화 그래프이다 (n=3). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

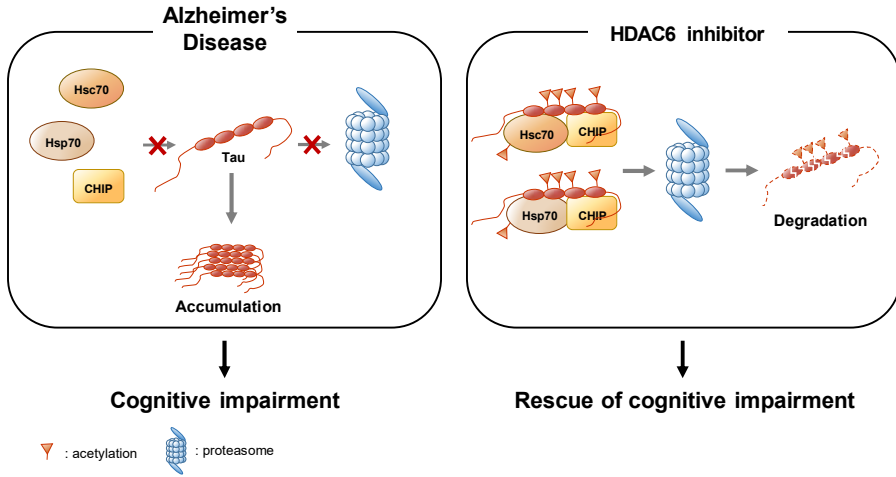


그림 36. HDAC6 억제제에 의해 프로테아좀으로의 tau 분해를 통한 인지기능 회복 기전에 관한 모식도

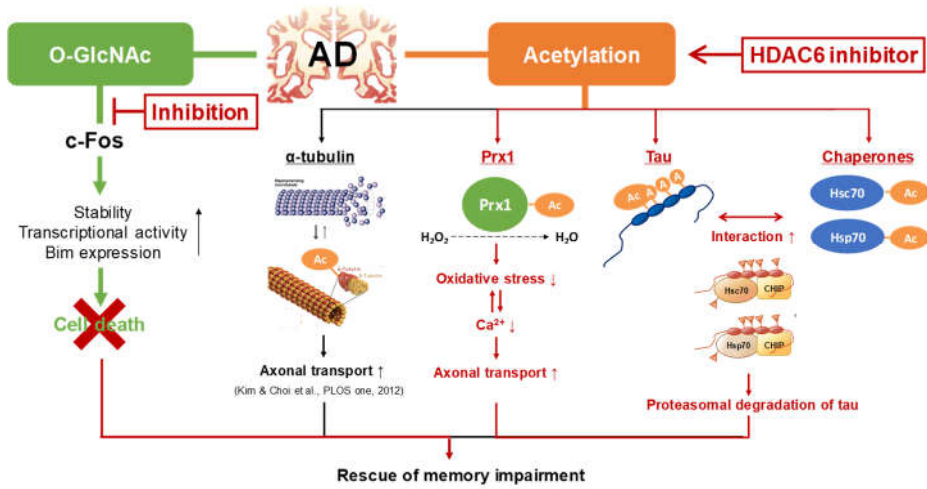


그림 37. c-Fos의 O-GlcNAcylation을 억제하는 것과 HDAC6 억제제에 의한 acetylation의 회복을 통한 알츠하이머병의 치료 전략과 그 기전에 대한 모식도

고찰

본 연구를 통해 베타-아미로이드에 의한 c-Fos 의 S56, 57 자리의 O-GlcNAcylation 증가가 c-Fos 의 안정화와 Bim 의 전사활성을 증가시켜 세포사멸을 촉진시키는 기전을 규명하였다. 또한, HDAC6 억제제가 Prx1 의 acetylation 을 증가시킴으로써 베타-아미로이드에 의해 유도된 과도한 활성산소와 Ca^{2+} 을 회복시킴으로써 손상되었던 미토콘드리아의 축삭 수송을 회복시키는 기전도 규명하였으며, tau 와 Hsc70, Hsp70 의 acetylation 을 증가시켜 tau 의 프로테아좀을 통한 분해를 촉진시키는 기전도 새롭게 밝혔다. 이러한 결과를 통해 c-Fos O-GlcNAcylation 의 억제와 HDAC6 의 억제를 통해 단백질의 번역 후 수식화를 조절하는 것이 tau 를 감소시킬 뿐만 아니라, 인지 기능도 회복시킬 수 있는 알츠하이머병의 중요한 치료 전략이 될 수 있음을 제안하는 바이다 (그림 37). 이러한 중요성과 더불어, 본 연구에서 새롭게 밝힌 점과 한계점 및 다른 연구와의 관련성에 대해 다음과 같이 각 part 별로 자세히 고찰해보고자 한다.

Part 1. 베타-아밀로이드에 의한 c-Fos 의 O-GlcNAcylation 증가가 신경세포 사멸에 미치는 영향 연구

본 연구를 통해 c-Fos가 O-GlcNAcylation되는 것을 확인하였고, c-Fos의 O-GlcNAcylation 자리를 처음으로 규명하였다. c-Fos의 O-GlcNAcylation 자리는 S56과 S57이며, 베타-아밀로이드에 의해 OGA와 c-Fos의 상호작용이 감소하여, c-Fos의 O-GlcNAcylation이 증가한다. 이는 알츠하이머병에서 O-GlcNAc이 잘못 조절되고 있음을 뒷받침하는 결과이다. c-Fos가 O-GlcNAcylation 됨으로써 c-Fos 자체의 안정성이 증가하고, 베타-아밀로이드가 있는 세포 독성 상황일 때, c-Jun과의 결합 증가로 인해 전사 활성이 증가하여, 아포토시스를 유도하는 Bim 발현의 증가, 그 결과 세포 사멸이 촉진된다. 따라서, 베타-아밀로이드에 의해 유도된 S56, S57의 c-Fos O-GlcNAcylation은 c-Fos의 안정화와 전사활성을 조절함으로써 세포 사멸을 촉진시키는 기능을 갖는 것을 알 수 있다 (그림 16).

본 연구의 결과와 더불어, 알츠하이머병에서의 O-GlcNAcylation의 역할에 대해 고찰해보고자 한다. O-GlcNAcylation은 phosphorylation과 비슷하게 단백질의 안정화, 활성화 또는 신호 전달을 조절한다고 보고되어 있다. 이처럼 여러가지 기능을 담당하기 때문에, 알츠하이머병에서 비정상적으로 조절된 O-GlcNAcylation은 다음과 같이 단백질의 다양한 기능을 변화시킨다고 보고되어 있다. 먼저, γ -secretase의 구성 단백질인 Nicastrin의 O-

GlcNAcylation을 회복시킴으로써 이 enzyme의 활성이 억제되어, 베타-아밀로이드의 생성이 감소하였다 (38). 또, tau의 O-GlcNAcylation은 phosphorylation과 경쟁적으로 작용하는데, 알츠하이머병에서 tau의 hyperphosphorylation으로 O-GlcNAcylation이 감소하여 tau의 응집이 촉진된다 (39). 이 외에도, 베타-아밀로이드에 의해 미토콘드리아의 ATP synthase 5A의 O-GlcNAcylation이 감소되는데, 그 결과 ATP synthase 5A의 활성이 감소하여 ATP 생성도 감소하게 된다 (40). 또한, 본 연구를 통해 베타-아밀로이드에 의한 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 c-Fos의 안정화를 증가시키고, 단백질의 상호작용을 증가시키며, 전사활성을 증가시킴을 밝혔다. 즉, 알츠하이머병에서도 O-GlcNAcylation은 단백질의 안정화, 활성, 상호 작용 등을 조절함을 알 수 있다.

최근 알츠하이머병 치료 전략으로 OGA를 억제하는 방법이 대두되고 있다 (32, 35, 40). 앞서 언급한 기존 보고들에 의하면, OGA 억제제를 사용하여 tau, γ -secretase의 구성 단백질인 Nicastrin, ATP synthase 5A의 O-GlcNAcylation을 조절하였을 때, 다음과 같은 알츠하이머병과 관련된 병변들이 회복되었다 (38-40). Tau의 O-GlcNAcylation을 증가시키자, 알츠하이머병의 주요 병변인 과인산화된 tau와 NFT가 감소하였고 (39, 101, 102), Nicastrin의 O-GlcNAcylation을 증가시켰을 때, γ -secretase 활성의 감소로 인해 베타-아밀로이드 반점(plaque)이 감소하고, 손상된 기억력도 회

복되었다 (38, 103, 104). 또, ATP synthase 5A의 O-GlcNAcylation을 증가시키자, 손상되었던 ATP 생성과 ATPase 활성이 회복되었다 (40). 이러한 선행 연구들은 OGA를 억제하는 것이 알츠하이머병의 치료에 긍정적 효과를 가져옴을 보여준다.

이와 더불어, 알츠하이머병 환자의 뇌에서 전반적인 O-GlcNAcylation이 감소함을 닷 블롯으로 보여준 보고가 있지만 (85), 이 방법은 단백질을 크기 별로 구분하지 못한 한계를 가지고 있다. 반면, SDS-PAGE를 통해 단백질의 크기 별 O-GlcNAcylation을 분석한 보고가 있는데, 이 보고에 따르면 알츠하이머병 환자의 뇌에서 70 kDa 이상의 단백질은 O-GlcNAcylation이 감소하는 경향이 보이지만, 50~60 kDa과 25 kDa의 단백질들은 오히려 증가한 경향을 보였다고 한다 (34). 또한, 알츠하이머병 환자의 뇌조직을 이용한 질량 분석 연구에서 O-GlcNAcylation이 증가된 펩타이드가 O-GlcNAcylation이 감소된 펩타이드보다 더 많이 관찰되었으며, 3xTg-알츠하이머병 모델 쥐의 뇌를 이용한 질량 분석 연구에서는 정상 쥐에 비해 더 적은 O-GlcNAcylation된 단백질이 관찰되었지만, 3xTg-알츠하이머병 모델 쥐에서만 O-GlcNAcylation이 일어난 단백질도 관찰되었음을 보고하였다 (36, 37). 이는 알츠하이머병에서 O-GlcNAcylation이 단순히 감소한 것이 아니라, 잘못 조절되고 있음을 보여주며, 55 kDa인 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 베타-아밀로이드에 의해 증가한 것도 알츠하이머병의 O-GlcNAcylation의 조절 장애와 일관된 결과라고 생각

된다. 게다가, 본 연구에서 밝힌 베타-아밀로이드에 의한 c-Fos의 O-GlcNAcylation의 증가는 OGA와의 상호 작용 감소가 원인이라는 것과, ATP synthase 5A의 O-GlcNAcylation 감소는 OGT와의 상호 작용 감소 때문이라는 기존 보고를 통해 (40), 알츠하이머병에서는 O-GlcNAc을 조절하는 효소 (OGA와 OGT)와 기질 사이의 상호 작용에 문제가 생겨 O-GlcNAcylation이 잘못 조절되고 있다고 제안하는 바이다.

이와 관련하여, 알츠하이머병에서 OGT와 OGA의 기질 특이성이 비정상적으로 조절되어 O-GlcNAcylation의 변화가 나타났을 수 있는데, OGT나 OGA가 기질을 인지하는 기전은 다음과 같다. 기질 자체의 OGT나 OGA 결합 도메인은 아직 밝혀진 바는 없지만, OGT의 경우, proline이나 β -branched 아미노산과 같은 잔기 옆에 O-GlcNAcylation시키는 경우가 많고, TPR 도메인을 통해 기질을 인지하게 된다고 한다 (105). 이와 일관되게, 본 연구를 통해 규명한 c-Fos의 O-GlcNAcylation site인 S56과 S57 앞의 55번 잔기는 β -branched 아미노산 중 하나인 valine이다. 하지만, 이외에도 어댑터 단백질을 매개하여 O-GlcNAcylation을 시키기도 하고, flexible element와 같은 intrinsically disordered region을 O-GlcNAcylation 시키기도 한다고 알려져 있어, OGT가 기질을 인지하는 기전은 완전히 specific sequence를 통해서 일어나는 것은 아닌 것처럼 보인다 (105). OGA 역시 sequence sensitivity보다는 OGA가 가진 deep groove에 잘 맞는 conformation을 가진

기질을 de-O-GlcNAcylation시킨다고 하고, 어댑터 단백질의 영향도 있을 것으로 보인다고 한다 (105). 베타-아밀로이드에 의해서 c-Fos와 OGT의 상호작용에는 변화가 없고, OGA와의 상호작용이 변화하였기 때문에, OGA의 기질 특이성이 비정상적으로 조절되었다고 생각되는데, 예상되는 기전은 다음과 같다. 몇몇 kinase가 OGT와 OGA의 활성이나 기질 특이성을 조절한다는 보고가 있는데 (106, 107), 대표적으로 p38 MAPK가 neuroblastoma 세포에서 neurofilament H의 O-GlcNAcylation에 영향을 미친다고 한다 (108). 이러한 현상이 알츠하이머병 상황에서 확인된 바는 없지만, 알츠하이머병에서 GSK3 β , p38 MAPK와 같은 kinase가 비정상적으로 조절되고 있음이 잘 알려져 있기 때문에 (109, 110), kinase 활성의 변화가 알츠하이머병에서 보이는 O-GlcNAc 조절 장애에 영향을 미쳤을 수 있을 것이다. 이러한 맥락에서, 베타-아밀로이드에 의해 c-Fos와 OGA의 상호 작용이 감소한 기전에 대한 연구가 더 필요하며, 기질의 O-GlcNAcylation 자체가 O-GlcNAc 조절 효소와 기질 사이의 상호 작용에 영향을 미치는지도 연구되어야 할 것이다.

기존 보고에 따르면 O-GlcNAcylation과 phosphorylation이 경쟁적이거나 상호적으로 서로 관련되어 있다고 한다 (31). 하지만, 아직까지 c-Fos의 S56, S57 자리에 phosphorylation이 일어난다는 보고는 없고, 가까운 곳 중 S32에 phosphorylation이 된다는 보고가 있는데, 이 자리의 phosphorylation이 S56, S57의 O-

GlcNAcylation에 영향을 주었을 가능성도 있다. 따라서, c-Fos에서 O-GlcNAcylation과 phosphorylation 사이의 관련성에 대한 추가 연구도 필요하다.

본 연구에서 c-Fos의 S56과 S57 자리의 O-GlcNAcylation은 c-Fos 자체의 안정성을 증가시킨다는 것을 밝혔다. 단백질의 안정성과 관련하여 또다른 단백질의 번역 후 수식화로 ubiquitination을 생각해 볼 수 있는데, O-GlcNAc이 global ubiquitination을 감소시킨다는 보고가 있고 (111), phosphorylation을 조절하거나, deubiquitinase를 조절하여 단백질을 안정화시키는 방향으로 작용한다는 보고도 있다 (112). 따라서, O-GlcNAcylation에 의한 c-Fos의 안정화도 이와 비슷한 기전으로 일어났을 것으로 생각된다. c-Fos는 E3 ligase인 UBR1에 의해 ubiquitination되어 분해된다고 알려져 있는데, 이는 S32의 phosphorylation에 의해 저해된다고 한다 (113). 따라서 S56 그리고/또는 S57의 O-GlcNAcylation이 S32의 phosphorylation을 촉진시키거나, 아직 알려지지 않았지만 deubiquitinase와의 상호작용을 증가시켜 ubiquitination의 감소를 통해 분해를 저해하였을 가능성이 있다. 이외에도, c-Fos는 아직 구체적 서열이 밝혀지지 않은 N-말단의 destabilizer region에 의해 ubiquitin-independent degradation된다고도 알려져 있어 (87, 114), c-Fos의 N-terminal destabilizer domain에 S56, S57 site가 포함되어 degradation을 저해시켰을 수도 있다. 또한, 본 연구에서 베타-아밀로이드가 있을

때, c-Fos의 O-GlcNAcylation의 증가가 c-Jun과의 상호 작용을 증가시킴을 확인하였는데, S56과 S57은 c-Fos에서 DNA 결합 자리 (139-160 아미노산)나 leucine zipper domain (165-193 아미노산)과 82~108 아미노산 정도의 거리로 멀리 떨어져 있다 (115). 하지만 S56, S57의 O-GlcNAcylation이 c-Fos의 3차 구조를 변화시켜, 서로의 상호작용을 증가시켰거나, AP-1 복합체와 상호작용한다고 알려진 CBP, CRTC1, BAF 복합체와 같은 전사 조절 인자 (transcriptional co-factor)와의 상호 작용에 영향을 미쳐 전사조절 복합체의 구성을 촉진시켜 나타난 결과일 가능성을 생각해 볼 수 있다 (116-118). 그러나, 정확한 기전을 알기 위해서는 추가 연구가 필요하고, phosphorylated tyrosine을 인지하는 SH2 도메인처럼, O-GlcNAcylation을 인지하는 도메인도 연구되어야 할 것이다. 또한, 그림 15와 더불어, c-Jun으로 면역침강했을 때나, AP-1 complex에서 O-GlcNAcylation된 c-Fos의 증가를 확인한다면, c-Fos의 O-GlcNAcylation은 c-Jun과의 상호작용 및 전사 활성을 증가시킨다는 결과를 더욱 뒷받침할 수 있을 것이다. 그러나 본 연구에서는 c-Fos의 S56, S57의 O-GlcNAcylation을 검출하는 항체가 없어 확인하지 못하였다.

단백질의 3D 구조에서 PTM을 모델링할 수 있는 PyMOL, Vienna-PTM 2.0, FF-PTM과 같은 프로그램들이 있지만 (119, 120), 이 프로그램들은 이미 crystalization이나 NMR을 통해 구조가 밝혀진 도메인으로만 simulation이 가능하다. c-Fos는 138-

200 아미노산 (DNA 결합자리 + leucine zipper 도메인)에 해당하는 부분만 구조가 밝혀져 있어, S56, S57에 해당하는 부분은 simulation이 어려웠다. 따라서, S56, S57이 한 단백질 동시에 O-GlcNAcylation될 수 있는지, 혹은 각각 따로 O-GlcNAcylation되어 c-Fos의 기능을 조절하는지에 대한 추가 연구도 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 알츠하이머병에서 나타나는 O-GlcNAcylation 조절 장애의 한 예로 c-Fos의 O-GlcNAcylation을 발견하였고, 베타-아밀로이드에 의해 c-Fos 자체의 안정성과 c-Jun과의 상호작용을 조절하여, 전사 활성을 증가시켜, 세포 사멸을 촉진시키는 기능을 밝혔다. 이 결과는 알츠하이머병의 병인 기전에 O-GlcNAcylation의 조절 장애가 미치는 영향을 보여주며, O-GlcNAcylation은 당 대사의 조절을 반영하는 단백질이 번역 후 수식화이기 때문에, 알츠하이머병에서 잘못 조절된 당 대사와 세포 사멸 사이의 연관성을 새로이 제시하였다. 또한, 기존의 단순히 O-GlcNAcylation을 증가시켰던 알츠하이머병 치료 전략보다는 O-GlcNAcylation을 조절할 수 있는 치료 전략이 더욱 적절할 것임을 제안하는 바이다.

Part 2. HDAC6 저해를 통해 증가된 Peroxiredoxin1의 acetylation이 알츠하이머병에서 손상된 미토콘드리아의 축삭 수송을 회복시키는 기전 연구

본 연구에서는 HDAC6 조절에 의한 Prx1 acetylation이 베타-아밀로이드와 관련된 알츠하이머병의 병인 기전에 미치는 영향에 대해 새롭게 규명하였다. 베타-아밀로이드에 의해 Prx1의 K197 자리의 acetylation이 감소하면, ROS와 Ca^{2+} 이 증가하고, 그 결과 미토콘드리아의 축삭 수송이 망가지는데, HDAC6를 억제함으로써 Prx1의 acetylation을 증가시키면, 이러한 병리학적 특징들이 회복된다 (그림 25). Prx1이 HDAC6의 기질이고, 알츠하이머병에서 HDAC6의 양과 활성이 증가되어 있다는 보고가 있는데 (70), 따라서 베타-아밀로이드에 의해 과활성된 HDAC6 때문에 Prx1의 acetylation이 감소되었다고 보여진다. 또, Prx1의 acetylation이 감소하면 항산화능이 감소하기 때문에 (69), 베타-아밀로이드에 의해 유도된 과도한 ROS와 Ca^{2+} 도 HDAC6의 하위 단계로 생각된다. 과도한 ROS와 Ca^{2+} 에 의해 미토콘드리아의 축삭 수송이 손상된다는 보고가 있는데 (65, 66), 이를 통해 베타-아밀로이드에 의해 망가진 축삭 수송이 과활성화된 HDAC6로 인한 Prx1의 acetylation 감소 때문에 일어난 결과임을 알 수 있다. 선행 연구에서는 HDAC6 억제제가 베타-아밀로이드에 의해 손상된 축삭 수송을 회복시킨 이유를 α -tubulin의 acetylation 회복에서 찾고 있는데, α -tubulin의 acetylation이 증가하면 미세 소관이 더 안정화되고, 수

송 단백질과 미세 소관의 결합력이 증가하기 때문이다 (51, 75, 121, 122). α -tubulin은 굉장히 잘 알려진 HDAC6의 기질로써, 많은 연구자들이 α -tubulin의 acetylation과 축삭 수송에 대해 보고하고 있다 (51, 75, 123, 124). 여기에, 본 연구를 통해 HDAC6의 억제제가 Prx1 acetylation을 조절하여 ROS와 Ca^{2+} 을 조절하고, 그 결과 미토콘드리아의 축삭 수송을 조절하는 새로운 기전을 제시하였다. 이 새로운 기전은 ROS와 Ca^{2+} 이 알츠하이머병에서 세포 독성을 일으키는 중요한 병인 요소이기 때문에, HDAC6 억제제들이들을 회복시키는 점은 매우 중요한 발견이라고 할 수 있겠다.

알츠하이머병의 치료로 Prx1 자체보다 Prx1의 acetylation을 조절하는 것이 더 중요하다. 그 이유는 Prx1이 이미 알츠하이머 환자의 뇌에서 증가되어 있기 때문인데, 많은 연구자들이 이러한 현상이 세포의 보호 작용 때문에 일어났다고 추측하고 있으나, 알츠하이머병 환자의 뇌에서 산화스트레스는 여전히 존재한다 (125, 126). 따라서, Prx1의 항산화능을 증가시키려면, Prx1의 acetylation을 증가시켜야 한다. 본 연구에서는 HDAC6의 억제를 통해 Prx1의 acetylation을 증가시킬 수 있음을 보여주었고, 그 결과 베타-아밀로이드에 의해 유도된 산화 스트레스가 회복되어 Ca^{2+} 와 미토콘드리아의 축삭 수송도 회복됨을 보여주었다. 이를 통해, Prx1 acetylation을 조절하는 것이 또 하나의 알츠하이머병 치료 전략이 될 수 있음을 제안한다.

선행 연구들에서 HDAC6를 감소시키거나 억제했을 때, 알츠하이

머병 모델 쥐에서 기억력 손상이 회복되는 것을 보여주었고, 미세 소관의 안정화에 따른 축삭 수송의 회복이나 오토파지의 회복을 회복 기전으로 설명하였다 (72-74, 76). 이와 더불어, 본 연구에서는 ROS, Ca^{2+} 과 관련하여 HDAC6 억제제를 통해 알츠하이머병에서 손상된 기억력을 회복시키는 새로운 기전을 제시한다. 알츠하이머병에서 과도한 ROS는 산화 스트레스를 유도하는데, 이는 신경 세포의 기능 장애와 베타-아밀로이드 생성에 의한 세포 사멸, 지질의 과산화, 단백질의 과산화, DNA의 과산화를 통한 유전자 발현 조절 장애를 불러 일으킨다 (10, 93, 127, 128). 지질의 과산화는 세포막을 약화시켜서 이온의 불균형과 대사 장애를 초래한다 (129). 또, 산화 스트레스의 정도와 인지 장애의 정도가 직접적인 관련이 있다는 보고도 있다 (130). 과도하게 증가된 Ca^{2+} 은 calcineurin, calpain과 같은 효소를 활성화 시켜서 신경 돌기의 위축, 시냅스 가소성 장애, 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다 (11-14). 또, 알츠하이머병에서 인지 기능 저하의 증상이 나타나는 시점은 Ca^{2+} -결합 단백질의 감소가 일어나는 시점과 밀접하게 관련되어 있다고 한다 (131, 132). 신경 세포는 긴 축삭이 있어 한 쪽으로 치우친 모습을 보이기 때문에, 세포체와 축삭 말단 사이의 물질 교환은 매우 중요하여, 축삭 수송의 손상은 신경 세포에 굉장히 해로운 영향을 미치게 된다. 먼저, 축삭에서 잘못 접힌 단백질의 분해와 신경영양적 신호 등이 제대로 조절되지 못하게 되고 (51, 53, 54), 특히, 미토콘드리아가 축삭 말단에 가지 못하면, 에너지를 공급하지 못해 시

냅스의 기능이 저하된다 (55). 아밀로이드 전구 단백질로부터의 베타-아밀로이드의 생성 과정은 축삭 수송이 막힘으로써 더 촉진된다는 보고도 있으며 (56), 과도한 ROS와 Ca^{2+} 은 미토콘드리아와 시냅스 소포의 축삭 수송을 손상시킨다고 한다 (65, 66). 이러한 보고들은 알츠하이머병의 초기 증상으로 여겨지는 과도한 ROS와 Ca^{2+} 및 축삭 수송의 손상이 신경 세포 사멸과 인지 기능 저하에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 따라서, 알츠하이머병을 치료하기 위해 HDAC6 억제제를 통해 과도한 ROS, Ca^{2+} 및 축삭 수송의 손상을 회복시키는 것이 인지 기능 회복에 중요할 것이며, 이러한 병리적 특징들은 다른 신경퇴행성 질환에서도 공통적으로 발견되는 것이므로 (11, 51, 133), 또다른 신경퇴행성 질환의 치료 전략으로도 이용될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 ROS가 Ca^{2+} 을 매개하여 미토콘드리아의 축삭 수송을 조절할 수 있다는 것을 보여주었다. 기존에도 과도한 ROS와 Ca^{2+} 이 미토콘드리아의 축삭 수송을 저해한다는 보고는 있었지만 (65, 66), ROS가 어떻게 작용하는지는 분명하지 않았다. 본 연구의 결과는 HDAC6를 억제함으로써 Prx1의 acetylation을 증가시켜 베타-아밀로이드에 의해 증가된 ROS를 회복시키자, Ca^{2+} 의 양도 감소하여 미토콘드리아의 축삭 수송이 회복됨을 확인하였다. Ca^{2+} 이 미토콘드리아와 수송 단백질을 연결하는 어댑터 단백질인 Miro에 결합하여 미토콘드리아의 수송을 조절한다는 보고가 있어 (66, 134), 본 연구를 통해 ROS에 의한 축삭 수송의 손상에는 Ca^{2+} 이

매우 중요하게 작용한다는 것을 제시하였다.

ROS에 의해 소포체나 미토콘드리아에서 Ca^{2+} 의 방출이 촉진될 수 있지만, 반대로 과도한 Ca^{2+} 에 의해 미토콘드리아가 손상되어 ROS가 증가된다는 것도 잘 알려져 있다 (11, 93, 135, 136). 실제로 본 연구에서도 베타-아밀로이드에 의해 유도된 ROS와 Ca^{2+} 도 서로를 조절할 수 있음을 확인하였고 (그림 18-19), 결국 악순환의 고리가 형성됨을 알 수 있었다. 즉, 이러한 악순환 때문에 알츠하이머병에서 미토콘드리아의 축삭 수송은 매우 손상되기 쉬운 세포 내 과정 중 하나임을 알 수 있다.

알츠하이머병에서는 대부분의 항산화 시스템이 손상되어 있다고 보고되어 있다. 알츠하이머병 환자의 뇌에서 SOD, Catalase와 GSH 시스템의 Gpx, GR의 활성이 감소되어 있으며, GSH/GSSG의 비율도 감소되어 GSH가 산화된 채로 존재한다고 한다 (62). 또한, 알츠하이머병 환자의 뇌와 AD 동물 모델인 3xTg에서 GSH 양 자체의 감소도 관찰된다 (63). 또다른 산화 환원 조절 효소인 Grx와 Trx도 베타-아밀로이드에 의해 지속적으로 산화된 상태로 존재하게 되며, 특히 Trx1의 양이 감소되어 있다는 보고도 있다 (64). 뿐만 아니라, 알츠하이머병 환자의 뇌에서 Prx의 양도 비정상적으로 변화되어 있다고 한다 (126). 본 연구에서는 HDAC6 억제제를 통해 Prx1만을 조절하여도 베타-아밀로이드에 의해 증가된 ROS의 회복이 관찰되었는데, 이는 주요 항산화 시스템인 GSH 시스템과 Trx-Prx 시스템이 모두 알츠하이머병에서 손상되어 있기 때문에,

이 중 하나인 Prx1만을 조절하여도 ROS의 회복이 뚜렷하게 관찰된 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 베타-아밀로이드가 있는 상황에서 HDAC6 억제제에 의한 Prx1의 acetylation 증가가 ROS와 Ca^{2+} 의 회복을 매개로 하여, 미토콘드리아의 축삭 수송을 회복시키는 새로운 기전을 밝혔다. 이는 미토콘드리아의 축삭 수송을 조절한다는 측면에서 Prx1의 새로운 역할을 규명한 것이며, HDAC6가 베타-아밀로이드 유래의 산화 스트레스와 잘못 조절된 Ca^{2+} 항상성에도 중요한 역할을 함을 밝힌 중요한 결과라 할 수 있겠다. 따라서, HDAC6를 억제하는 것이 알츠하이머병의 적절한 치료 전략일 수 있음을 제안하는 바이다.

Part 3. HDAC6 저해에 의한 acetylation 의 증가가 tau 단백질의 감소를 통해 알츠하이머병을 회복시키는 기전 연구

본 연구에서는 알츠하이머병에서 HDAC6 억제제가 보이는 치료 효과를 검증하였고, HDAC6가 tau의 분해를 조절하는 기전을 새롭게 제시하였다. 실제 알츠하이머병 환자와 비슷한 베타-아밀로이드와 tau의 병변을 모두 보이는 ADLP^{APT} 쥐에서 HDAC6 억제제는 손상되었던 기억력의 회복, 시냅스의 회복, 전체적인 tau양의 감소와 같은 치료 효과를 보였다. 또한, HDAC6 억제제에 의해 Hsp70, Hsc70과 tau의 acetylation이 증가하여 서로의 상호 작용이 증가하고, 그 결과 CHIP과의 결합도 증가하여 tau가 ubiquitination된다.

이로 인해, HDAC6 억제에 의한 tau의 프로테아좀으로의 분해가 촉진됨을 새롭게 밝혔다 (그림 36).

알츠하이머병의 주요 원인 단백질은 베타-아밀로이드와 tau로 알려져 있는데 (86), 최근 베타-아밀로이드를 타겟팅한 치료제들이 임상시험에서 잇따라 실패하고 있고 (82), 축적된 tau의 분포가 알츠하이머병 환자의 신경 퇴행이 일어나는 부위와 더 밀접한 관련이 있어서 (79), 베타-아밀로이드의 하위 단계로써 tau 단백질이 알츠하이머병을 일으키는 중요한 작동인자로 작용할 것이라는 가설이 대두되고 있다 ($A\beta$ -tau axis) (80, 137, 138). 본 연구에서도 ADLP^{APT} 쥐에서 HDAC6 억제제에 의해 베타-아밀로이드 반점은 유의한 변화는 없었으나, tau는 현저히 감소하였고, 시냅스와 기억력도 함께 회복되었다. 이 결과를 통해 tau만을 줄이는 것으로도 알츠하이머병의 치료 효과를 보이는 것을 알 수 있고, tau가 작동인자로 작용한다는 중요한 단서를 제공한다. 또한, tau를 조절할 수 있는 치료제의 중요성이 강조되고 있는 가운데 (139, 140), HDAC6 억제제가 tau를 효과적으로 조절할 수 있는 약물임을 제시한다. 뿐만 아니라, 기억력의 손상이 나타나기 전과 후에 투여를 시작한 예방 모델과 치료 모델 모두에서 tau의 감소와 함께 기억력의 회복이 나타났기 때문에, 알츠하이머병의 어느 단계에 적용해도 치료 효과를 보일 가능성이 높을 것으로 기대된다. 하지만, 예방모델 (그림 26B)과 치료모델 (그림 31B)의 contextual fear conditioning 결과를 비교하였을 때, 손상되었던 기억력 회복의 폭이 예방 모델에서 더

큰 결과는 기억력이 손상되기 전에 HDAC6 억제제를 투여하는 것이 더 효과적임을 예측해 볼 수 있다. 이와 더불어, 베타-아밀로이드 병변만 가진 2xTg (APP^{swE}/PSEN1^{dE9}) 쥐에서 HDAC6 억제제에 의해 베타-아밀로이드 반점이 감소함을 보여준 선행 연구는 HDAC6 억제제가 베타-아밀로이드도 감소시킬 수 있는 능력이 충분히 있다는 점도 시사한다 (74). ADLP^{APT} 쥐는 2xTg보다 베타-아밀로이드 병변의 진행이 훨씬 빠른 모델이기 때문에, ADLP^{APT} 쥐에서 베타-아밀로이드 병변의 회복 효과는 잘 보이지 않은 것으로 생각된다.

본 연구에서 ADLP^{APT} 쥐에서 HDAC6 억제제에 의해 tau의 감소와 함께 시냅스 단백질인 PSD95의 양이 증가하고, 시냅스 spine의 개수가 회복되며 기억력도 회복됨을 보여주었다. 돌연변이 tau, 과인산화되거나 잘려서 응집된 tau와 같은 병적인 tau에 의해 시냅스의 기능 장애가 일어난다는 보고가 많이 있다 (16, 141, 142). 예를 들어, 병적인 tau는 Fyn과 NMDA receptor를 통한 베타-아밀로이드의 시냅스 독성을 매개한다는 보고가 있고, 미세소기관을 손상시켜 이를 통한 미토콘드리아나 시냅스 소포의 수송이 손상되어 시냅스에 적절히 분포되지 못하게 되거나, 신경전달물질 방출과 같은 시냅스 소포의 기능을 방해하여 시냅스의 기능 장애를 일으킨다는 보고가 있다 (23, 142, 143). 또, 2N4R-tau를 과발현시켰을 때, 기억력 형성에 매우 중요한 단백질인 cAMP response element binding protein (CREB)을 비활성화시켜서 기억력을 저하시킨다는

보고도 있다 (144). ADLP^{APT} 쥐에서 HDAC6 억제제에 의해 시냅스와 기억력이 회복된 것은 tau의 감소를 통해 이러한 시냅스 독성이 감소하여 나타난 결과로 생각된다. 이와 더불어, 선행 연구에서 밝힌 HDAC6 억제제에 의한 다른 회복 효과들 - α -tubulin의 acetylation 증가에 의한 미세 소관의 안정화로 인한 축삭 수송의 회복, Prx1의 acetylation이 증가에 의한 산화 스트레스의 감소와 Ca²⁺ 항상성의 회복 - 도 ADLP^{APT} 쥐의 기억력 회복에 기여하였을 것이다 (75, 145). 또한, 병적인 tau는 미토콘드리아 손상, 세포 사멸과 같은 세포 독성도 일으키는 것으로 알려져 있는데 (26), HDAC6 억제제가 tau를 감소시킴으로써 이러한 세포 독성도 감소하였을 것으로 예상된다.

PHF, NFT와 같이 크게 응집된 tau는 주로 오토파지-리소좀 시스템으로 분해된다고 알려져 있는데 (83), 본 연구를 통해 HDAC6 억제제에 의해서는 오토파지-리소좀 시스템을 통한 tau의 분해는 변화가 없고, 프로테아좀을 통한 분해가 촉진되는 것을 확인하였다. 하지만, HDAC6 억제제에 의해 ADLP^{APT} 쥐에서 크게 응집된 tau인 sarkosyl-insoluble tau와 AT8, AT180으로 면역조직염색되는 tau가 감소하였다. 이는 응집이 더 진행되기 전에 프로테아좀으로 분해가 촉진되었거나, HDAC6에 의해 조절되는 tau의 acetylation이 tau의 응집을 저해한다는 보고가 있기 때문에 (78), tau의 응집 자체가 줄어들어서 결과적으로 크게 응집된 tau도 감소하였을 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 Hsp70과 Hsc70의 acetylation 증가가 이들 단백질과 tau와의 상호작용을 증가시키는 것을 관찰하였는데, HDAC6 억제제에 의해 조절되는 acetylation site를 규명하지는 못하였다. 기존 보고에 따르면, Hsp70이나 Hsc70의 ATPase 도메인 억제제가 tau의 분해를 촉진시키는데, 이는 ATPase 기능을 억제함으로써 단백질을 refolding하는 chaperone 기능을 저해하여 기질의 분해가 증가되는 방향으로 조절하기 때문이라고 한다 (146). 특히, JG-48과 같은 Hsp70 family의 ATPase 억제제는 NEF가 Hsp70 family에 미치는 기능을 저해하여, Hsp70과 기질이 잘 분리되지 못해, 결과적으로 Hsp70과 기질의 상호작용을 증가시킨다는 보고도 있다 (147). Hsp70의 경우, 질량 분석을 통해 K88, K126, K159, K523, K558, K560과 같은 HDAC6에 의해 조절될 것으로 예상되는 site가 밝혀졌는데, 이 중 K126, K159가 ATPase domain에 속하는 잔기이다 (148). 이러한 site의 acetylation이 증가되면 SUMO E3 ligase인 KAP1이 recruiting된다는 보고도 있어 (148), 이들 잔기의 acetylation 증가에 의해 Hsp70의 ATPase 기능이나 NEF의 작용이 저해되어 tau와의 상호작용이 증가하고, CHIP이 recruiting 되었을 가능성을 예상해볼 수 있다. 하지만, 정확한 기전은 추가 연구가 필요하고, Hsc70은 HDAC6에 의해 조절되는 acetylation site는 아직 보고된 바가 없어, 이러한 site도 밝혀져야 할 것이다. 이외에도 Hsp70 complex가 작용할 때, Hsp40 family가 기질의 특이성을 결정하고, Hsp70 family와 기질의 상호작용 안정화에 중요한

역할을 하므로 (149), HDAC6 억제제에 의해 조절받는 Hsp40 family를 규명하는 추가 연구도 필요할 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 HDAC6 억제제가 Hsc70, Hsp70, tau의 acetylation을 조절하여 프로테아좀을 통한 tau의 분해를 촉진시켜, ADLP^{APT} 쥐의 모든 응집된 형태의 tau를 감소시키고, 그 결과 시냅스와 기억력을 회복시키는 기전을 규명하였다. 베타-아밀로이드나 tau의 병변이 보이는 질병 동물 모델에서 HDAC6 억제제에 의한 치료 효과는 꾸준히 보고되고 있지만, tau를 감소시키는 기전은 밝혀진 바가 없었기 때문에, HDAC6가 tau를 조절하는 새로운 기전은 매우 중요한 결과라 할 수 있다. 또, 기억력이 손상되기 전과 후에 HDAC6 억제제를 투여한 예방 모델과 치료 모델 모두에서 tau의 효과적인 감소가 보였고, 최근 알츠하이머병의 치료의 표적으로 tau가 주목받고 있기 때문에, HDAC6 억제제가 효과적인 알츠하이머병의 치료제로 작용할 수 있음을 제안하는 바이다.

결 론

단백질의 번역 후 수식화는 단백질의 분해, 활성화, 다른 단백질과의 상호 작용 등의 다양한 기능을 조절하며, 병리학적 요인과 환경에 의해 영향을 받는다. 본 연구에서는 알츠하이머병에서 변화된 번역 후 수식화 중 O-GlcNAcylation과 acetylation이 알츠하이머병에 미치는 영향에 대해 규명하였다.

Part 1에서는 전사 인자인 c-Fos의 O-GlcNAcylation이 베타-아밀로이드에 의해 증가되는데, 그 결과 c-Fos 자체의 안정화와 c-Jun과의 상호작용 증가를 통한 전사 활성의 증가로, 세포 사멸을 유도하는 Bim의 발현을 증가시켜, 세포 사멸이 촉진됨을 확인하였다. 이 때 일어나는 c-Fos의 O-GlcNAcylation 자리는 S56, S57임을 처음으로 밝혔다. O-GlcNAcylation은 당 대사를 반영하는 번역 후 수식화 과정으로써, 위 결과는 알츠하이머병에서 당 대사와 세포 사멸이 서로 밀접한 관련이 있음을 시사한다.

Part 2와 3에서는 알츠하이머병에서 과활성화된 것으로 알려진 HDAC6를 억제하여 acetylation을 증가시켰을 때 알츠하이머병의 회복 효과가 나타남을 관찰하였다. HDAC6 억제제에 의해 이의 기질인 Prx1의 acetylation을 증가시켰을 때, 베타-아밀로이드에 의해 유도된 산화 스트레스와 과도한 Ca^{2+} 이 회복되어, 손상되었던 미토콘드리아의 축삭 수송도 회복되었다. 또, 베타-아밀로이드와 tau의 병변을 모두 보이는 ADLP^{APT} 쥐에서 HDAC6 억제제에 의

해 tau가 감소하여 손상되었던 시냅스와 기억력이 회복되었다. 이때, tau와 Hsc70, Hsp70의 acetylation이 증가하였고, 그 결과 서로 상호작용이 증가하여 tau의 프로테아좀을 통한 분해가 촉진됨을 밝혔다. 이러한 결과는 HDAC6 억제제가 다양한 단백질의 acetylation을 조절함으로써 여러 측면의 회복 효과를 나타내며, 특히 알츠하이머병의 원인 단백질 중 하나인 tau를 조절하는 효과적인 알츠하이머병의 치료제가 될 수 있음을 시사한다.

위와 같은 알츠하이머병에서의 O-GlcNAcylation과 acetylation에 관한 번역 후 수식화 연구를 통해 당 대사와 알츠하이머병에서의 세포 사멸이 밀접한 관련이 있음을 새롭게 규명하였고, HDAC6의 기질들의 acetylation에 따른 기능 변화가 알츠하이머병의 병변을 회복시키는 기전을 밝혔다. 이를 통해 단백질의 번역 후 수식화를 조절하는 것이 알츠하이머병의 중요한 치료 표적이 될 수 있음을 제안하는 바이다.

참 고 문 헌

1. Roberson ED, Mucke L. 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science*. 2006;314(5800):781-4.
2. Wisniewski HM, Robe A, Zigman W, Silverman W. Neuropathological diagnosis of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1989;48(6):606-9.
3. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2010;362(4):329-44.
4. Hayashi S, Sato N, Yamamoto A, Ikegame Y, Nakashima S, Ogihara T, et al. Alzheimer disease-associated peptide, amyloid beta40, inhibits vascular regeneration with induction of endothelial autophagy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(11):1909-15.
5. Son SM, Jung ES, Shin HJ, Byun J, Mook-Jung I. A β -induced formation of autophagosomes is mediated by RAGE-CaMKK β -AMPK signaling. *Neurobiol Aging*. 2012;33(5):1006 e11-23.
6. 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. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64(2):113-22.
7. Li Q, Liu Y, Sun M. Autophagy and Alzheimer's Disease. *Cell*

Mol Neurobiol. 2017;37(3):377–88.

8. Marsh J, Alifragis P. Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: the effects of amyloid beta on synaptic vesicle dynamics as a novel target for therapeutic intervention. *Neural Regen Res.* 2018;13(4):616–23.

9. Onyango IG, Dennis J, Khan SM. Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease and the Rationale for Bioenergetics Based Therapies. *Aging Dis.* 2016;7(2):201–14.

10. Huang WJ, Zhang X, Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed Rep.* 2016;4(5):519–22.

11. Bezprozvanny I. Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med.* 2009;15(3):89–100.

12. Kuchibhotla KV, Goldman ST, Lattarulo CR, Wu HY, Hyman BT, Bacskai BJ. Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron.* 2008;59(2):214–25.

13. Son SM, Byun J, Roh SE, Kim SJ, Mook–Jung I. Reduced IRE1alpha mediates apoptotic cell death by disrupting calcium homeostasis via the InsP3 receptor. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1188.

14. Trinchese F, Fa M, Liu S, Zhang H, Hidalgo A, Schmidt SD, et al. Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest.*

2008;118(8):2796–807.

15. Wang ZX, Tan L, Yu JT. Axonal transport defects in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2015;51(3):1309–21.

16. Wang Y, Mandelkow E. Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17(1):5–21.

17. Roberson ED, Scarce–Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta–induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*. 2007;316(5825):750–4.

18. DeVos SL, Goncharoff DK, Chen G, Kebodeaux CS, Yamada K, Stewart FR, et al. Antisense reduction of tau in adult mice protects against seizures. *J Neurosci*. 2013;33(31):12887–97.

19. Hong XP, Peng CX, Wei W, Tian Q, Liu YH, Yao XQ, et al. Essential role of tau phosphorylation in adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*. 2010;20(12):1339–49.

20. Kimura T, Whitcomb DJ, Jo J, Regan P, Piers T, Heo S, et al. Microtubule–associated protein tau is essential for long–term depression in the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1633):20130144.

21. Ahmed T, Van der Jeugd A, Blum D, Galas MC, D'Hooge R, Buee L, et al. Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion. *Neurobiol Aging*. 2014;35(11):2474–

8.

22. Zempel H, Luedtke J, Kumar Y, Biernat J, Dawson H, Mandelkow E, et al. Amyloid-beta oligomers induce synaptic damage via Tau-dependent microtubule severing by TLL6 and spastin. *EMBO J.* 2013;32(22):2920-37.

23. Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, et al. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell.* 2010;142(3):387-97.

24. Rocher AB, Crimins JL, Amatrudo JM, Kinson MS, Todd-Brown MA, Lewis J, et al. Structural and functional changes in tau mutant mice neurons are not linked to the presence of NFTs. *Exp Neurol.* 2010;223(2):385-93.

25. Sydow A, Van der Jeugd A, Zheng F, Ahmed T, Balschun D, Petrova O, et al. Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic Tau mutant. *J Neurosci.* 2011;31(7):2511-25.

26. Shafiei SS, Guerrero-Munoz MJ, Castillo-Carranza DL. Tau Oligomers: Cytotoxicity, Propagation, and Mitochondrial Damage. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:83.

27. Spires-Jones TL, Kopeikina KJ, Koffie RM, de Calignon A, Hyman BT. Are tangles as toxic as they look? *J Mol Neurosci.* 2011;45(3):438-44.

28. Marcelli S, Corbo M, Iannuzzi F, Negri L, Blandini F, Nistico R, et al. The Involvement of Post-Translational Modifications in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2018;15(4):313–35.
29. Bürkle A. Posttranslational Modification A2 – Brenner, Sydney. In: Miller JH, editor. *Encyclopedia of Genetics.* New York: Academic Press; 2001. p. 1533.
30. Zachara N, Akimoto Y, Hart GW. The O-GlcNAc Modification. In: rd, Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, et al., editors. *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor (NY) 2015. p. 239–51.
31. Bond MR, Hanover JA. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol.* 2015;208(7):869–80.
32. Yuzwa SA, Vocadlo DJ. O-GlcNAc and neurodegeneration: biochemical mechanisms and potential roles in Alzheimer's disease and beyond. *Chem Soc Rev.* 2014;43(19):6839–58.
33. Schubert D. Glucose metabolism and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* 2005;4(2):240–57.
34. Forster S, Welleford AS, Triplett JC, Sultana R, Schmitz B, Butterfield DA. Increased O-GlcNAc levels correlate with decreased O-GlcNAcase levels in Alzheimer disease brain. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(9):1333–9.
35. Zhu Y, Shan X, Yuzwa SA, Vocadlo DJ. The emerging link

between O-GlcNAc and Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2014;289(50):34472–81.

36. Wang S, Yang F, Petyuk VA, Shukla AK, Monroe ME, Gritsenko MA, et al. Quantitative proteomics identifies altered O-GlcNAcylation of structural, synaptic and memory-associated proteins in Alzheimer's disease. *J Pathol.* 2017;243(1):78–88.

37. Alfaro JF, Gong CX, Monroe ME, Aldrich JT, Clauss TR, Purvine SO, et al. Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(19):7280–5.

38. 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. *Neurobiol Aging.* 2013;34(1):275–85.

39. Yuzwa SA, Cheung AH, Okon M, McIntosh LP, Vocadlo DJ. O-GlcNAc modification of tau directly inhibits its aggregation without perturbing the conformational properties of tau monomers. *J Mol Biol.* 2014;426(8):1736–52.

40. Cha MY, Cho HJ, Kim C, Jung YO, Kang MJ, Murray ME, et al. Mitochondrial ATP synthase activity is impaired by suppressed O-GlcNAcylation in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.*

2015;24(22):6492–504.

41. Wang P, Lazarus BD, Forsythe ME, Love DC, Krause MW, Hanover JA. O-GlcNAc cycling mutants modulate proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans* models of human neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(43):17669–74.
42. Marcus DL, Strafacci JA, Miller DC, Masia S, Thomas CG, Rosman J, et al. Quantitative neuronal c-fos and c-jun expression in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1998;19(5):393–400.
43. Tai HC, Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. Parallel identification of O-GlcNAc-modified proteins from cell lysates. *J Am Chem Soc*. 2004;126(34):10500–1.
44. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 25):5965–73.
45. Gillardon F, Skutella T, Uhlmann E, Holsboer F, Zimmermann M, Behl C. Activation of c-Fos contributes to amyloid beta-peptide-induced neurotoxicity. *Brain Res*. 1996;706(1):169–72.
46. Whitfield J, Neame SJ, Paquet L, Bernard O, Ham J. Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron*. 2001;29(3):629–43.
47. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. 2002;4(5):E131–6.

48. Zhang J, Zhang D, McQuade JS, Behbehani M, Tsien JZ, Xu M. c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nat Genet.* 2002;30(4):416–20.
49. Fernandez M, Pirondi S, Antonelli T, Ferraro L, Giardino L, Calza L. Role of c-Fos protein on glutamate toxicity in primary neural hippocampal cells. *J Neurosci Res.* 2005;82(1):115–25.
50. Chen X, Shen J, Wang Y, Chen X, Yu S, Shi H, et al. Up-regulation of c-Fos associated with neuronal apoptosis following intracerebral hemorrhage. *Cell Mol Neurobiol.* 2015;35(3):363–76.
51. Millecamps S, Julien JP. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(3):161–76.
52. 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.
53. Maday S, Twelvetrees AE, Moughamian AJ, Holzbaur EL. Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation. *Neuron.* 2014;84(2):292–309.
54. Perlson E, Maday S, Fu MM, Moughamian AJ, Holzbaur EL. Retrograde axonal transport: pathways to cell death? *Trends Neurosci.* 2010;33(7):335–44.
55. Calkins MJ, Reddy PH. Amyloid beta impairs mitochondrial anterograde transport and degenerates synapses in Alzheimer's

- disease neurons. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(4):507–13.
56. Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature*. 2001;414(6864):643–8.
57. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem*. 2010;345(1–2):91–104.
58. Fleming JL, Phiel CJ, Toland AE. The role for oxidative stress in aberrant DNA methylation in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2012;9(9):1077–96.
59. Jin SM, Cho HJ, Jung ES, Shim MY, Mook-Jung I. DNA damage-inducing agents elicit gamma-secretase activation mediated by oxidative stress. *Cell Death Differ*. 2008;15(9):1375–84.
60. Marengo B, Nitti M, Furfaro AL, Colla R, Ciucis CD, Marinari UM, et al. Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:6235641.
61. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sanchez-Perez P, Cadenas S, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol*. 2015;6:183–97.
62. Ansari MA, Scheff SW. Oxidative stress in the progression of

Alzheimer disease in the frontal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(2):155–67.

63. Saharan S, Mandal PK. The emerging role of glutathione in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2014;40(3):519–29.

64. Massaad CA, Klann E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(10):2013–54.

65. Fang C, Bourdette D, Banker G. Oxidative stress inhibits axonal transport: implications for neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener*. 2012;7:29.

66. Wang X, Schwarz TL. The mechanism of Ca²⁺ -dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell*. 2009;136(1):163–74.

67. 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.

68. d'Ydewalle C, Bogaert E, Van Den Bosch L. HDAC6 at the Intersection of Neuroprotection and Neurodegeneration. *Traffic*. 2012;13(6):771–9.

69. Parmigiani RB, Xu WS, Venta-Perez G, Erdjument-Bromage H, Yaneva M, Tempst P, et al. HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci*

U S A. 2008;105(28):9633–8.

70. Ding H, Dolan PJ, Johnson GV. Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J Neurochem.* 2008;106(5):2119–30.

71. 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.

72. Govindarajan N, Rao P, Burkhardt S, Sananbenesi F, Schluter OM, Bradke F, et al. Reducing HDAC6 ameliorates cognitive deficits in a mouse model for Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med.* 2013;5(1):52–63.

73. Majid T, Griffin D, Criss Z, Jarpe M, Pautler RG. Pharmacologic treatment with histone deacetylase 6 inhibitor (ACY-738) recovers Alzheimer's disease phenotype in amyloid precursor protein/presenilin 1 (APP/PS1) mice. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions.* 2015;1(3):170–81.

74. Zhang L, Liu C, Wu J, Tao JJ, Sui XL, Yao ZG, et al. Tubastatin A/ACY-1215 improves cognition in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Alzheimers Dis.* 2014;41(4):1193–205.

75. 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.

76. Selenica ML, Benner L, Housley SB, Manchec B, Lee DC, Nash KR, et al. Histone deacetylase 6 inhibition improves memory and reduces total tau levels in a mouse model of tau deposition. *Alzheimers Res Ther.* 2014;6(1):12.
77. Cook C, Carlomagno Y, Gendron TF, Dunmore J, Scheffel K, Stetler C, et al. Acetylation of the KXGS motifs in tau is a critical determinant in modulation of tau aggregation and clearance. *Hum Mol Genet.* 2014;23(1):104–16.
78. Carlomagno Y, Chung DC, Yue M, Castanedes–Casey M, Madden BJ, Dunmore J, et al. An acetylation–phosphorylation switch that regulates tau aggregation propensity and function. *J Biol Chem.* 2017;292(37):15277–86.
79. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley–Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1992;42(3 Pt 1):631–9.
80. Vossel KA, Zhang K, Brodbeck J, Daub AC, Sharma P, Finkbeiner S, et al. Tau reduction prevents Abeta–induced defects in axonal transport. *Science.* 2010;330(6001):198.
81. Suberbielle E, Sanchez PE, Kravitz AV, Wang X, Ho K, Eilertson K, et al. Physiologic brain activity causes DNA double–strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid–beta. *Nat Neurosci.* 2013;16(5):613–21.

82. Anderson RM, Hadjichrysanthou C, Evans S, Wong MM. Why do so many clinical trials of therapies for Alzheimer's disease fail? *Lancet*. 2017;390(10110):2327–9.
83. Lee MJ, Lee JH, Rubinsztein DC. Tau degradation: the ubiquitin–proteasome system versus the autophagy–lysosome system. *Prog Neurobiol*. 2013;105:49–59.
84. Kim DK, Park J, Han D, Yang J, Kim A, Woo J, et al. Molecular and functional signatures in a novel Alzheimer's disease mouse model assessed by quantitative proteomics. *Mol Neurodegener*. 2018;13(1):2.
85. Liu F, Shi J, Tanimukai H, Gu J, Gu J, Grundke–Iqbal I, et al. Reduced O–GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain*. 2009;132(Pt 7):1820–32.
86. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep*. 2015;67(2):195–203.
87. Gomard T, Jariel–Encontre I, Basbous J, Bossis G, Moquet–Torcy G, Piechaczyk M. Fos family protein degradation by the proteasome. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 5):858–63.
88. Camara AK, Bienengraeber M, Stowe DF. Mitochondrial approaches to protect against cardiac ischemia and reperfusion injury. *Front Physiol*. 2011;2:13.

89. Gorlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* 2015;6:260–71.
90. Hidalgo C, Bull R, Behrens MI, Donoso P. Redox regulation of RyR-mediated Ca²⁺ release in muscle and neurons. *Biol Res.* 2004;37(4):539–52.
91. Markesbery WR, Lovell MA. Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1998;19(1):33–6.
92. Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, et al. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 1999;19(6):1959–64.
93. Zhao Y, Zhao B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:316523.
94. Mayford M, Siegelbaum SA, Kandel ER. Synapses and memory storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(6).
95. Julien C, Bretteville A, Planel E. Biochemical isolation of insoluble tau in transgenic mouse models of tauopathies. *Methods Mol Biol.* 2012;849:473–91.
96. Ren Y, Sahara N. Characteristics of tau oligomers. *Front Neurol.* 2013;4:102.
97. Vilchez D, Saez I, Dillin A. The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nat*

Commun. 2014;5:5659.

98. Wang H, Tan MS, Lu RC, Yu JT, Tan L. Heat shock proteins at the crossroads between cancer and Alzheimer's disease. *Biomed Res Int.* 2014;2014:239164.

99. Shimura H, Schwartz D, Gygi SP, Kosik KS. CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem.* 2004;279(6):4869-76.

100. Sarkar M, Kuret J, Lee G. Two motifs within the tau microtubule-binding domain mediate its association with the hsc70 molecular chaperone. *J Neurosci Res.* 2008;86(12):2763-73.

101. Borghgraef P, Menuet C, Theunis C, Louis JV, Devijver H, Maurin H, et al. Increasing brain protein O-GlcNAc-ylation mitigates breathing defects and mortality of Tau.P301L mice. *PLoS One.* 2013;8(12):e84442.

102. Graham DL, Gray AJ, Joyce JA, Yu D, O'Moore J, Carlson GA, et al. Increased O-GlcNAcylation reduces pathological tau without affecting its normal phosphorylation in a mouse model of tauopathy. *Neuropharmacology.* 2014;79:307-13.

103. Macauley MS, Vocadlo DJ. Increasing O-GlcNAc levels: An overview of small-molecule inhibitors of O-GlcNAcase. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800(2):107-21.

104. Yuzwa SA, Shan X, Jones BA, Zhao G, Woodward ML, Li X, et

- al. Pharmacological inhibition of O-GlcNAcase (OGA) prevents cognitive decline and amyloid plaque formation in bigenic tau/APP mutant mice. *Mol Neurodegener.* 2014;9:42.
105. Yang X, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(7):452–65.
106. Slawson C, Lakshmanan T, Knapp S, Hart GW. A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Mol Biol Cell.* 2008;19(10):4130–40.
107. Nagel AK, Ball LE. O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase: achieving target substrate specificity. *Amino Acids.* 2014;46(10):2305–16.
108. Cheung WD, Hart GW. AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation. *J Biol Chem.* 2008;283(19):13009–20.
109. Dolan PJ, Johnson GV. The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2010;13(5):595–603.
110. Perluigi M, Barone E, Di Domenico F, Butterfield DA. Aberrant protein phosphorylation in Alzheimer disease brain disturbs pro-survival and cell death pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(10):1871–82.
111. Guinez C, Mir AM, Dehennaut V, Cacan R, Harduin-Lepers A,

Michalski JC, et al. Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation. *FASEB J.* 2008;22(8):2901–11.

112. Ruan HB, Nie Y, Yang X. Regulation of protein degradation by O-GlcNAcylation: crosstalk with ubiquitination. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(12):3489–97.

113. Sasaki T, Kojima H, Kishimoto R, Ikeda A, Kunimoto H, Nakajima K. Spatiotemporal regulation of c-Fos by ERK5 and the E3 ubiquitin ligase UBR1, and its biological role. *Mol Cell.* 2006;24(1):63–75.

114. Ferrara P, Andermarcher E, Bossis G, Acquaviva C, Brockly F, Jariel-Encontre I, et al. The structural determinants responsible for c-Fos protein proteasomal degradation differ according to the conditions of expression. *Oncogene.* 2003;22(10):1461–74.

115. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(11):859–68.

116. Bannister AJ, Kouzarides T. CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *EMBO J.* 1995;14(19):4758–62.

117. Canettieri G, Coni S, Della Guardia M, Nocerino V, Antonucci L, Di Magno L, et al. The coactivator CRTC1 promotes cell proliferation and transformation via AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(5):1445–50.

118. Vierbuchen T, Ling E, Cowley CJ, Couch CH, Wang X, Harmin

DA, et al. AP-1 Transcription Factors and the BAF Complex Mediate Signal-Dependent Enhancer Selection. *Mol Cell*. 2017;68(6):1067–82 e12.

119. Audagnotto M, Dal Peraro M. Protein post-translational modifications: In silico prediction tools and molecular modeling. *Comput Struct Biotechnol J*. 2017;15:307–19.

120. Warnecke A, Sandalova T, Achour A, Harris RA. PyTMs: a useful PyMOL plugin for modeling common post-translational modifications. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:370.

121. 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.

122. 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.

123. Li G, Jiang H, Chang M, Xie H, Hu L. HDAC6 alpha-tubulin deacetylase: a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*. 2011;304(1–2):1–8.

124. Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berny D, et al. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J*.

2002;21(24):6820–31.

125. Chang RY, Etheridge N, Dodd PR, Nouwens AS. Targeted quantitative analysis of synaptic proteins in Alzheimer's disease brain. *Neurochem Int.* 2014;75:66–75.

126. Kim SH, Fountoulakis M, Cairns N, Lubec G. Protein levels of human peroxiredoxin subtypes in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *J Neural Transm Suppl.* 2001(61):223–35.

127. Murakami K, Murata N, Noda Y, Tahara S, Kaneko T, Kinoshita N, et al. SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid beta protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2011;286(52):44557–68.

128. Oda A, Tamaoka A, Araki W. Oxidative stress up-regulates presenilin 1 in lipid rafts in neuronal cells. *J Neurosci Res.* 2010;88(5):1137–45.

129. Madeo J. The Role of Oxidative Stress in Alzheimer ' s Disease. *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism.* 2013;3(2):116.

130. Torres LL, Quaglio NB, de Souza GT, Garcia RT, Dati LM, Moreira WL, et al. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*

2011;26(1):59–68.

131. Kook SY, Jeong H, Kang MJ, Park R, Shin HJ, Han SH, et al. Crucial role of calbindin–D28k in the pathogenesis of Alzheimer's disease mouse model. *Cell Death Differ.* 2014;21(10):1575–87.

132. Palop JJ, Jones B, Kekonius L, Chin J, Yu GQ, Raber J, et al. Neuronal depletion of calcium–dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease–related cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(16):9572–7.

133. Kang JS, Choi IW, Han MH, Kim GY, Hong SH, Park C, et al. The cytoprotective effects of 7,8–dihydroxyflavone against oxidative stress are mediated by the upregulation of Nrf2–dependent HO–1 expression through the activation of the PI3K/Akt and ERK pathways in C2C12 myoblasts. *Int J Mol Med.* 2015;36(2):501–10.

134. Stephen TL, Gupta–Agarwal S, Kittler JT. Mitochondrial dynamics in astrocytes. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(5):1302–10.

135. Hidalgo C, Carrasco MA, Munoz P, Nunez MT. A role for reactive oxygen/nitrogen species and iron on neuronal synaptic plasticity. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(2):245–55.

136. Sanmartin CD, Paula–Lima AC, Garcia A, Barattini P, Hartel S, Nunez MT, et al. Ryanodine receptor–mediated Ca(2+) release underlies iron–induced mitochondrial fission and stimulates mitochondrial Ca(2+) uptake in primary hippocampal neurons. *Front*

Mol Neurosci. 2014;7:13.

137. He Z, Guo JL, McBride JD, Narasimhan S, Kim H, Changolkar L, et al. Amyloid–beta plaques enhance Alzheimer's brain tau–seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nat Med.* 2018;24(1):29–38.

138. Pooler AM, Polydoro M, Maury EA, Nicholls SB, Reddy SM, Wegmann S, et al. Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2015;3:14.

139. Hung SY, Fu WM. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):47.

140. Panza F, Solfrizzi V, Seripa D, Imbimbo BP, Lozupone M, Santamato A, et al. Tau–Centric Targets and Drugs in Clinical Development for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int.* 2016;2016:3245935.

141. Iqbal K, Liu F, Gong CX. Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol.* 2016;12(1):15–27.

142. Pooler AM, Noble W, Hanger DP. A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neuropharmacology.* 2014;76 Pt A:1–8.

143. Zhou L, McInnes J, Wierda K, Holt M, Herrmann AG, Jackson RJ, et al. Tau association with synaptic vesicles causes presynaptic

dysfunction. *Nat Commun.* 2017;8:15295.

144. Yin Y, Gao D, Wang Y, Wang ZH, Wang X, Ye J, et al. Tau accumulation induces synaptic impairment and memory deficit by calcineurin-mediated inactivation of nuclear CaMKIV/CREB signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(26):E3773–81.

145. Choi H, Kim HJ, Kim J, Kim S, Yang J, Lee W, et al. Increased acetylation of Peroxiredoxin1 by HDAC6 inhibition leads to recovery of Abeta-induced impaired axonal transport. *Mol Neurodegener.* 2017;12(1):23.

146. Jinwal UK, Miyata Y, Koren J, 3rd, Jones JR, Trotter JH, Chang L, et al. Chemical manipulation of hsp70 ATPase activity regulates tau stability. *J Neurosci.* 2009;29(39):12079–88.

147. Young ZT, Rauch JN, Assimon VA, Jinwal UK, Ahn M, Li X, et al. Stabilizing the Hsp70–Tau Complex Promotes Turnover in Models of Tauopathy. *Cell Chem Biol.* 2016;23(8):992–1001.

148. Yang Y, Fiskus W, Yong B, Atadja P, Takahashi Y, Pandita TK, et al. Acetylated hsp70 and KAP1-mediated Vps34 SUMOylation is required for autophagosome creation in autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(17):6841–6.

149. Brehme M, Voisine C. Model systems of protein-misfolding diseases reveal chaperone modifiers of proteotoxicity. *Dis Model Mech.* 2016;9(8):823–38.

Abstract

The causative factors of Alzheimer's disease (AD), aggregated beta-amyloid ($A\beta$) and tau, have known to induce cellular toxicity which was altered O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) and acetylation resulted from disrupted glucose metabolism and upregulated histone deacetylase 6 (HDAC6) in the brains of AD patients, respectively. However, the precise mechanism how altered O-GlcNAcylation and acetylation affect AD pathogenesis is poorly understood. In this study, we explored the effects of altered O-GlcNAcylation and acetylation in AD pathophysiology.

In terms of O-GlcNAcylation, we found that O-GlcNAcylation of c-Fos on serine-56 and 57 was increased in AD model mice and in $A\beta$ -treated cells. O-GlcNAcylation of c-Fos increased its stability and potentiated the transcriptional activity, resulting in induction of Bim expression leading to promoting neuronal cell death.

With regard to acetylation, we revealed restoring mechanism of AD by elevating acetylation using HDAC6 inhibitor. Increasing Acetylation of Peroxiredoxin1 (Prx1) on lysine-197, a substrate of HDAC6, by HDAC6 inhibitor recovered oxidative

stress, excessive Ca^{2+} levels and impaired mitochondrial axonal transport, sequentially, in $\text{A}\beta$ treated cells and 5xFAD. In addition, HDAC6 inhibitor promoted proteasomal degradation of tau in cells and AD model mice by increasing acetylation of tau, Hsc70 and Hsp70, resulting in stronger interaction each other. Consequently, tau burden was dramatically reduced and synaptic pathology and cognitive impairment were recovered by HDAC6 inhibitor in AD model mice.

Taken together, we demonstrated that the altered PTMs such as O-GlcNAcylation and acetylation in AD play important roles in AD pathogenesis. Moreover, AD pathologies were recovered by restoring altered PTMs in AD. Therefore, modulating PTMs of the proteins is a potential therapeutic strategy for AD.

Keywords: Alzheimer ' s disease, $\text{A}\beta$ (β -amyloid), O-GlcNAcylation (O-linked β -N-acetyl glucosamine), c-Fos, HDAC6 (Histone deacetylase 6), acetylation, Prx1 (peroxiredoxin1), tau

Student number: 2011 – 21956