

Ceramide에 의한 신경세포 사멸과정에서 p62의 역할

정인실^{1*}

¹한서대학교 생명과학과

The role of p62 in ceramide induced neuronal cell death

Insil Joung^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Hanseo University

요 약 p62는 산화스트레스가 주요 원인 중 하나인 퇴행성 뇌질환과 연관된 엉킨 물질(aggregate)의 주요 구성성분이다. 퇴행성 뇌질환과 관련된 것으로 알려진 hydroxydopamine이나 C₂-ceramide를 신경모세포종 세포주인 SH-SY5Y에 처리하였을 때 p62의 발현이 유도되며 시간이 지날수록 그 양이 증가되었다. 또한 p62를 과발현시키면 ceramide에 의한 SH-SY5Y 세포의 사멸이 지연되었다. 이 과정에서 p62는 시간이 경과됨에 따라 침전화되며 절단되었다. 이 결과로 p62의 신경보호효과와 여러 종류의 퇴행성 뇌질환에서 p62가 엉킨 물질에서 발견되는 이유를 추측할 수 있다.

Abstract p62 is a key component of protein aggregates found in brains of neurodegenerative diseases in which oxidative stress is involved in the pathogenesis. p62 was induced in SH-SY5Y, a neuroblastoma cell line, by hydroxydopamine or C₂-ceramide known to be related to neurodegenerative diseases. The over-expression of p62 showed the neuroprotective effect against the ceramide induced cell death. In addition, p62 became insoluble and cleaved forms as time proceeded after the ceramide treatment, suggesting the mechanism by which p62 is associated with aggregates in neurodegenerative diseases.

Key Words : C₂-ceramide, Cell death, Insolublization, Neuroprotection, Protein cleavage, p62

1. 서론

신경세포는 발생하고 시냅스를 재구성하는 과정에서 끊임없이 사멸하며, 스트레스와 세포독성인자에 의한 세포사멸은 퇴행성 뇌질환의 주요 요인이 된다. 이 중 산화스트레스(oxidative stress)는 알츠하이머병, 파킨슨씨병, 헌팅톤질환 및 뇌허혈성 질환등과 같은 다양한 퇴행성 뇌질환을 유발하는 원인과 많은 연관 관계를 가진 것으로 알려져 있다[1, 2]. 뇌허혈성 질환(cerebral ischemia)은 산화제의 증가와 많이 관련되어져 있고, 특히 산소에서 유리되는 유리 라디칼(free radical)은 조직손상의 주요 원인으로 알려져 있다[3, 4]. 신경독성과 관련된 산화 라디칼의 종류에는 과산화수소(H₂O₂), superoxide anions(O₂⁻), 수산화기(OH) 등이 있다.

p62는 p56^{lck} 결합단백질로서[5] 산화스트레스를 비롯한 여러 종류의 스트레스 조건에서 발현이 유도된다[6-8]. 또한 p62는 다양한 퇴행성 뇌질환 환자의 뇌에서 단백질 엉킴(protein aggregates)으로 존재하는데, 알츠하이머병 환자 뇌의 neurofibrillary tangle, 파킨슨씨병에서 Lewy체, ALS의 단백질 엉킴 등에 p62가 존재하는 것이 보고되었다[9-11]. 이번 연구에서는 유리 라디칼을 생성하는 것으로 알려진 6-hydroxydopamine (6-OHDA)과 산화스트레스를 비롯한 TNF α , interleukin 1 β 등의 자극에 의해 세포에 축적되어 퇴행성 뇌질환의 원인이 되는 것으로 알려져 있는 ceramide가[12, 13] 신경세포에 작용할 때 p62가 어떤 역할을 하는지 알아보았다.

본 논문은 한국과학재단(KOSEF RO1-2003-000-11694-0)연구과제로 수행되었음.

*교신저자: 정인실(ijoung@hanseo.ac.kr)

접수일 09년 03월 10일

수정일 09년 03월 19일

게재확정일 09년 03월 23일

2. 재료 및 방법

2.1 세포배양과 처리

Human embryonic kidney cell line인 293 세포와 인간 신경모세포종 세포주인 SH-SY5Y는 ATCC(USA)에서 구입하여 ATCC에서 추천하는 다음의 조건에서 배양하였다. 즉 DMEM에 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone, USA), 0.1 mg/ml antibiotics, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1.5 mg/ml sodium bicarbonate를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 이 외 SH-SY5Y 세포의 배양에는 0.1 mM MEM non-essential amino acid를 첨가하였다. 실험을 수행할 때 SH-SY5Y 세포에 여러 농도의 C₂-ceramide와 hydroxydopamin(100 µM)을 처리한 후, 2% FBS가 첨가된 media에서 세포를 배양하였다.

2.2 Adenovirus의 정제 및 처리

p62 단백질을 과발현하도록 고안한 아데노바이러스 p62-Ad[14]는 Joung[14] 등이 사용한 표준방법에 의해 증폭하고 cesium chloride density gradient 원심분리를 이용하여 정제하였다. Adenovirus는 C₂-ceramide를 처리하기 24시간 전에 2% FBS가 첨가된 media에서 SH-SY5Y 세포에 100 MOI (multiplicity of infection)로 감염시켰다.

2.3 RT-PCR

SH-SY5Y 세포로부터 Trizol을 이용하여 RNA를 추출한 후 이를 AMV reverse transcriptase과 random hexamer를 이용하여 역전사하여 cDNA를 합성하였다. p62 서열은 5'-TGCCAGACTACGACTTGTG-3'과 5'-CCAGCCGCC-TTCATCAGAGA-3'을 이용하여 증폭시켰다. 시료에 동일한 양의 RNA가 들어 있는지 확인하기 위해 GAPDH 서열을 5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3'과 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'을 이용하여 증폭시켰다.

2.4 세포 처리 및 Western blot 분석

C₂-ceramide(50 µM)를 처리 한 SH-SY5Y 세포는 시간에 따라 lysis buffer(20 mM Tri-Cl pH 7.5, 137 mM NaCl, 40 mM β-glycerophosphate, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM Na₃VO₄, 50mM NaF, 10 µg/ml aprotinin, leupeptin, pepstatin A, 1.0 mg/ml AEBSF)에 용출시켜 10분간 원심분리 한 후 상층액(soluble fraction)을 취하였다. 침전물(insoluble fraction)에 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% SDS 용액 50 µl를 넣고 상온에서 10분간 반응시키고 20초간 sonication 처리 후 10분간 원심분리하

여 상층액을 사용하였다. 상층액의 단백질 30 µg을 SDS-PAGE로 분리 한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하고 여러 종류의 항체와 반응시킨 후 pico-enhanced chemiluminescence (Dongin biotech, Korea)를 이용하여 확인하였다. 실험에 사용한 1차 항체는 다음과 같다. anti-phospho-Akt (Thr308; Cell Signaling, USA), anti-Akt(Cell Signaling, USA), anti-T7 (BD Bioscience, USA), anti-β-galactosidase (Promega, USA), anti-PARP(Santa Cruz), anti-Flag(Sigma, USA), anti-p62(BD Bioscience, USA), anti-actin(Promega, USA).

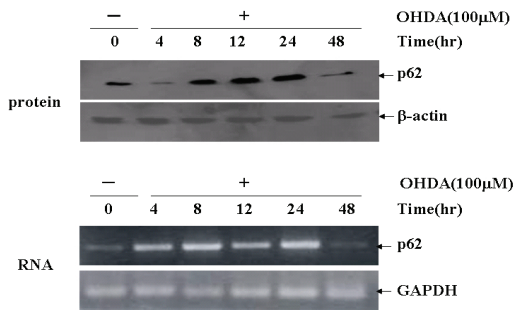
2.5 MTT assay

MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide}를 이용하여 세포의 생존률을 측정하였다. 96 well에 배양한 SH-SY5Y 세포에 C₂-ceramide (50 µM)를 처리한 후 시간에 따라 5 mg/ml MTT 용액을 배양액 부피의 1/10이 되게 넣고 37°C에서 4-6시간 반응시켰다. 용해성 용액을 넣고 다시 12시간 반응시킨 후 microplate reader로 570 nm에서 O.D를 측정하였다. Ceramide를 처리하지 않았을 때의 값을 100%로 하여 세포 생존률을 구하였다. 각 실험은 5번 이상 반복하여 가장 대표적인 값을 제시하였다.

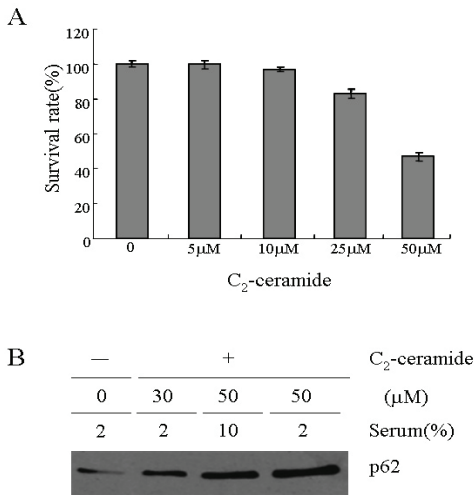
3. 결과 및 고찰

3.1 신경세포 사멸을 유도하는 6-OHDA와 ceramide에 의한 p62의 발현 유도

우리는 신경세포의 사멸과정 동안 p62의 역할을 규명하기 위해 먼저 퇴행성 뇌질환과 관련되어 세포사멸을 유도하는 두 가지 조건에서 p62의 발현양상을 조사하였다. 카테콜아민성 신경독소인 6-hydroxydopamine(6-OHDA)은 쉽게 유리 라디칼을 형성하며 파킨스씨병 환자에게서 내생적으로 형성된다고 보고되었다 [15]. p62는 파킨스씨병을 비롯한 다양한 퇴행성 뇌질환 환자의 뇌에서 영긴 물질로 발견되므로 6-OHDA에 의한 신경손상 과정에서 p62의 역할을 알아보았다. 인간 신경모세포종 세포주인 SH-SY5Y에 6-OHDA를 처리하였을 때 시간이 경과함에 따라 단백질과 RNA 수준에서 p62의 발현이 증가되는 것을 Western Blotting과 RT-PCR을 이용한 실험에서 알 수 있었다(그림 1).



[그림 1] SH-SY5Y 세포에서 6-Hydroxydopamine (OHDA)에 의한 p22의 발현 유도.



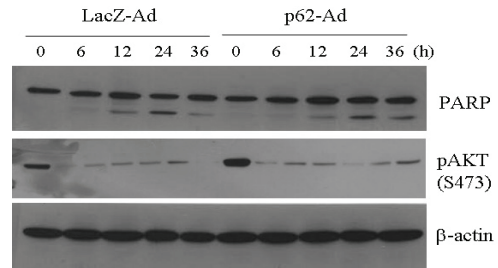
[그림 2] C₂-ceramide에 의한 SH-SY5Y 세포의 사멸과 p22의 발현. (A) C₂-ceramide의 농도에 따른 SH-SY5Y 세포의 사멸 증가. (B) C₂-ceramide를 세포에 처리했을 때 p22의 발현 유도

다음에는 ceramide에 의한 신경손상 과정동안 p22의 역할을 알아보았다. Ceramide는 신경성 허혈[16], 알츠하이머병[17]과 같은 급성 또는 만성 퇴행성 신경질환의 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 여러 가지 농도의 C₂-ceramide를 이용하여 신경세포에 손상을 주는 최적농도를 확인하는 실험에서 50 μM의 C₂-ceramide를 SH-SY5Y 세포에 24시간 처리했을 때 50% 정도의 세포가 사멸하는 것을 확인하였다(그림 2A). 이 조건에서 endogenous p22의 발현이 현저히 증가되는 것을 Western blot 분석으로 확인하였다(그림 2B). C₂-ceramide의 농도가 증가하거나 media의 혈청 농도가 감소할수록 p22의 발현 정도가 증가함으로, 세포사멸이 더욱 진행되면서 p22의 발현이 유도되는 것을 알 수 있다. 이는 신경전구 세포가 혈청을 제거한 상태에서 분화가 진행될 때 p22의 발현이 유도되는 이전의 연구 결과와 일치한다[14]. 이상

의 결과로 C₂-ceramide, 6-OHDA등 퇴행성 뇌질환의 발병과 관련이 있는 물질로 처리하였을 때 SH-SY5Y 세포에서 p22의 발현이 증가되므로 이는 p22가 신경세포의 손상에 의한 퇴행성 뇌질환에 연관되어 있음을 시사한다.

3.2 p22의 과발현에 의해 C₂-ceramide에 의한 SH-SY5Y 세포의 사멸 지연

앞의 실험에서 C₂-ceramide에 의해 p22의 발현이 유도되는 것을 관찰하였으므로 p22가 ceramide에 의한 신경세포 사멸과정에서 어떤 역할을 하는지 알아보았다. p22를 과발현하는 아데노바이러스(p22-Ad)를 SH-SY5Y 세포에 감염시킨 후 C₂-ceramide를 처리하였을 때 caspase의 작용으로 poly (ADP-ribose) polymerase(PARP)가 절단되는 현상을 조사하였다. 세포 사멸과정동안 caspase의 활성화에 의해 PARP는 116 kDa의 full-length 단백질이 사라지며 96 kDa의 절단된 펩티드가 생성된다[18]. p22-Ad가 감염된 세포에서는 대조군인 LacZ-Ad를 감염시킨 세포에 비해 C₂-ceramide 처리 후 12시간까지 PARP의 절단이 지연되는 것을 알 수 있었다. 그 이후에는 PARP의 절단 정도는 비슷하게 나타났다(그림 3). 또한 생존 키나제인 Akt는 p22-Ad를 감염한 세포에서 인산화가 더 많이 일어났으며, LacZ-Ad를 감염한 세포에서는 36시간 후에 Akt의 인산화를 관찰할 수 없는 반면 p22-Ad를 감염시킨 세포에서는 Akt가 계속 인산화되어 있는 것을 알 수 있었다(그림 3). Akt는 여러 종류의 생존 신호전달과정동안 인산화되며 Akt의 인산화는 신경세포의 생존에 중요하다고 알려져 있다[19]. 이 결과는 p22의 발현이 C₂-ceramide에 의해 야기되는 신경세포의 사멸을 지연시키는 것을 시사한다.

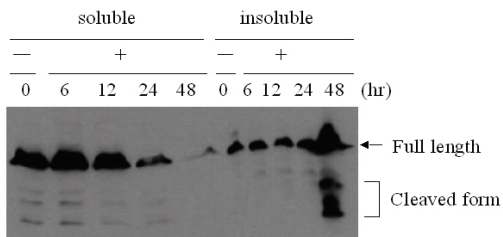


[그림 3] C₂-ceramide에 의한 세포사멸과정에 있는 SH-SY5Y 세포에서 p22의 과발현에 의한 세포사멸의 저해와 생존 키나제 Akt의 인산화 증가. PARP 항체를 이용한 Western Blot에서 위의 밴드는 full length PARP, 아래 밴드는 caspase에 의해 절단된 펩티드 산물을 나타낸다. β-actin의 양으로 각 시료에 같은 양의 단백질이 들어있는 것을 알 수 있다.

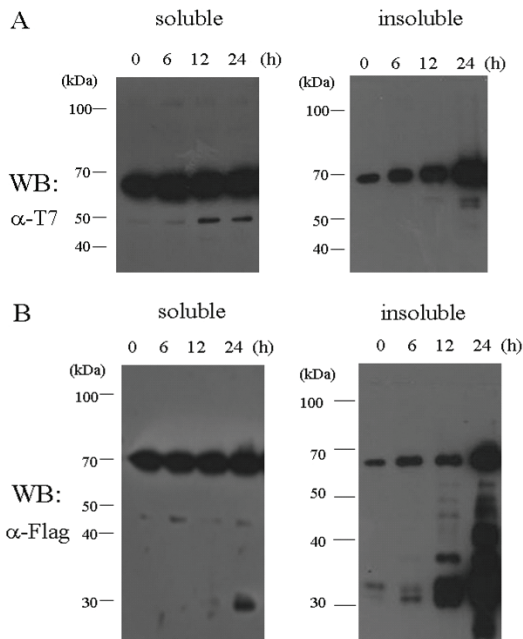
3.3 C₂-ceramide 처리 후 p62의 절단과 불용화 현상

다음에 p62가 신경세포의 사멸을 지연시킬 때 어떤 현상이 일어나는지 조사하였다. C₂-ceramide를 처리한 SH-SY5Y 세포의 추출액 중 시간이 경과함에 따라 Triton X-100에 용해되는 endogenous p62의 양(soluble)은 점차 감소하는 반면 불용성 분획에 있는 endogenous p62의 양(insoluble)은 증가하였으며, 불용성 분획에서 p62의 절단 산물이 발견되었다(그림 4).

이는 퇴행성 뇌질환이 진행되는 동안 p62가 단백질 엉킴에서 발견되는 것과 비슷한 현상이다.



[그림 4] C₂-ceramide를 처리한 SH-SY5Y 세포에서 관찰되는 p62의 절단현상.



[그림 5] C₂-ceramide를 처리한 SH-SY5Y 세포에서 p62의 절단산물의 운명을 Western Blot으로 조사. (A) T7 항체로 조사한 C-말단의 위치. (B) Flag 항체로 조사한 N-말단의 위치.

Ceramide에 의한 신경세포 손상과정에서 일어나는 p62의 절단과 불용화 현상을 좀 더 자세히 규명하기 위해 p62-Ad를 세포에 감염시킨 후 p62의 운명을 조사하였다. p62-Ad에 의해 발현되는 p62 단백질은 N-말단에 Flag tag을, C-말단에는 T7 tag을 달아 N-과 C-말단을 구별할 수 있게 고안하였다. T7 항체로 검출한 결과 p62는 C₂-ceramide 처리 후 12시간부터 C-말단 부위를 포함한 절단 산물(약 45 kDa)이 명확히 보이고, 대부분 가용성 분획에 존재하지만 시간이 갈수록 불용성 분획으로 들어가는 양이 증가하였다(그림 5A). 흥미로운 사실은 Flag-항체로 조사한 결과 p62의 N-말단 절단 산물(약 25 kDa)은 12시간이나 24시간에서 가용성 분획에서는 잘 발견되지 않지만 불용성 분획에서 뚜렷이 관찰되며, 24시간 후에는 더욱 더 작은 조각으로 절단되며 모두 불용성 분획으로 들어가는 것이다(그림 5B).

C₂-ceramide에 의한 신경세포 사멸과정동안 p62가 계속해서 불용성 분획으로 들어가는 것을 보여주는 위의 결과는 퇴행성 뇌질환 환자의 뇌의 엉킨 물질에서 p62가 발견되는 이유를 추측할 수 있게 한다. 이는 다양한 퇴행성 뇌질환에서 sphingomyelin의 가수분해에 의하여 ceramide의 생성이 촉진된다고 알려져 있기 때문이다 [16]. 또한 이번 연구의 결과는 p62가 세포사멸과정에서 활성화되는 caspase에 의해 절단되어 N-말단 부위가 침전하는 것을 보여준다. p62의 N-말단 부위는 PKC ξ 등 여러 종류의 단백질과 결합하는 것으로 알려져 있으므로 [20] 신경세포의 사멸과정동안 활성화된 caspase에 의해 p62가 절단된 후 N-말단 부위가 다른 단백질과 결합하여 엉킨 물질을 형성할 수도 있을 것이다. 이런 일련의 현상이 ceramide에 의해 p62의 발현이 유도되고, p62의 과발현이 ceramide에 의한 신경세포 사멸을 지연시키는 메커니즘과 연관이 있을 가능성이 있다.

실제 알츠하이머병에서 산화스트레스에 의해 유도된 철에 의해 알츠하이머 아밀로이드 전구체 완전단백질(APP; Alzheimer's amyloid precursor holo-protein)의 발현이 증가되며 APP는 절단되어 amyloid-beta 단백질(Abeta protein)을 형성하는데, 알츠하이머병에서 Abeta 단백질이 산화스트레스를 감소시키는 보완적인 역할을 한다는 보고가 있다[21]. 또 다른 퇴행성 뇌질환의 하나인 헌팅톤병에서 돌연변이 헌팅톤 단백질의 N-말단 절단과 엉킴 현상이 독성을 일으키는 원인이 되지만, 이 엉킴이 신경세포의 보호 효과를 보인다는 보고도 있다[22]. p62도 Abeta, 헌팅톤 단백질과 같이 퇴행성 뇌질환의 진행과 함께 절단되며 특정 부위로 엉킴을 형성할 가능성이 있다. 그러나 이와 같은 p62의 절단과 침전화 현상이 어떻게 신경세포의 사멸을 지연하는지에 대한 메커니즘을 자세

히 규명하기 위해 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다. p62에 의한 신경세포 사멸 메커니즘이 자세히 규명되면 p62를 퇴행성 뇌질환의 치료제 또는 진단 마커로 사용할 수 있을 것이다.

참고문헌

- [1] W. R. Markesbery, "Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease" *Free Radic. Biol. Med.*, 23, 1, pp. 134-147, Jan., 1997.
- [2] A. C. Rego and C. R. Oliveira, "Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: Implications for the pathogenesis of neurodegenerative disease", *Neurochem. Res.* 28 pp. 1563-1574, 2003.
- [3] J. M. McCord, "Oxygen-derived free radicals in postischemia tissue injury" *N. Engl. J. Med.* 312, 3, pp.159-163. Jan., 1985.
- [4] R. R. Ratan et al., "Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons" *J. Neurochem.* 62, 1, pp. 376-379, Jan., 1994.
- [5] I. Joung et al., "Modification of Ser59 in the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck regulates specificity of its Src homology 2 domain", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 13, 5778-5782, Jun., 1995.
- [6] T. Ishii et al., "Murine peritoneal macrophages induces a novel 60-kDa protein with structural similarity to a tyrosine kinase p56lck-associated protein in response to oxidative stress" *Biochem Biophys. Res. Comm.* 226, 2, 456-460, Sep., 1996,
- [7] K. Nakaso, et al., "Effects of kainate-mediated excitotoxicity on the expression of rat counterparts of A170 and MSP23 stress proteins in the brain", *Mol. Brain res.* 69, 2, pp. 155-163, June, 1999.
- [8] S. R. Heo et al., "p62 protects SH-SY5Y neuroblastoma cells against H2O2-induced injury through the PDK1/Akt pathway", *Neurosci. Lett.*, 450, 1, pp. 45-50, Jan., 2009.
- [9] U. Nagaoka et al., "Increased expression of p62 in expanded polyglutamine-expressing cells and its association with polyglutamine inclusions", *J. Neurochem.* 91, 1, pp. 57-68, Oct., 2004.
- [10] K. Nakaso et al., "Transcriptional activation of p62/A170/ZIP during the formation of the aggregates: possible mechanisms and the role in Lewy body formation in Parkinson's disease", *Brain Res.* 1012, 1-2, pp. 42-51, June, 2004.
- [11] J. Gal et al., "p62 accumulates and enhances aggregate formation in model systems of familial amyotrophic lateral sclerosis", *J. Biol. Chem.*, 282, 15, pp. 11068-11077, Apr., 2007.
- [12] Y. A. Hannun and C. Luberto, "Ceramide in the eukaryotic stress response", *Trends Cell Biol.* 10, 2, pp.73-80, Feb., 2000.
- [13] K. Thevissen et al., "Ceramide involvement in apoptosis and apoptotic diseases", *Mini Rev Med Chem.* 6, 6, pp. 699-709, June, 2006
- [14] I. Joung et al., "p62 modulates Akt activity via association with PKCzeta in neuronal survival and differentiation", *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 334, 2, pp. 654-660, Aug., 2005.
- [15] Y. Glinka et al., "Mechanism of 6-hydroxy dopamine neurotoxicity", *J. Neural Transm Suppl.* 50, pp., 55-66, 1997.
- [16] M. Nakane et al "Lethal forebrain ischemia stimulates sphingomyelin hydrolysis and ceramide generation in the gerbil hippocampus", *Neuroscience Letters*, 296, 2-3, pp. 89-92, Dec., 2000.
- [17] X. Han, "Lipid alterations in the earliest clinically recognizable stage of Alzheimer's disease: Implication of the role of lipids in the pathogenesis of Alzheimer's disease", *Curr. Alzheimer Res.* 2, 1, pp. 65-77, Jan., 2005.
- [18] G. Salvesen G and V. Dixit, "Caspases: intracellular signaling by proteolysis" *Cell* 91, 4, pp. 443-446, Nov., 1997.
- [19] H. Dudek et al., "Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt", *Science*, 275, 661-665, Jan., 1997.
- [20] A. Puls et al., "Interaction of protein kinase C with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12, pp. 6191-6196, Jun., 1997.
- [21] Y. Avramovich-Tirosh et al., "Physiological and pathological aspects of Abeta in iron homeostasis via 5'UTR in the APP mRNA and the therapeutic use of iron-chelators". *BMC Neurosci.* 3, 9, Suppl 2:S2. Dec., 2008.
- [22] S. Imarisio et al., "Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies". *Biochem. J.* 412, 2, pp. 191-209, Jun., 2008.

정 인 실(Insil Joung)

[정회원]



- 1984년 2월 : 연세대학교 생화학
과 (이학사)
- 1986년 2월 : 연세대학교 생화학
과 (이학석사)
- 1992년 12월 : University of
Alabama at Birmingham, USA
(이학박사)
- 1997년 3월 ~ 현재 : 한서대학
교 생명과학과 교수

<관심분야>

신경세포사멸 메커니즘, 뇌질환 유전자치료를 위한 유전
자 전달벡터 개발