



## 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](#)

의학석사 학위논문

히스톤 디아세틸라아제 6 저해를 통한 활성산소종 감소와 베타 아밀로이드 단백질에 의해 망가진 축삭수송의 회복관계 연구

A study on the link between ROS  
recovery by HDAC6 inhibition and  
amyloid beta induced axonal transport  
impairment

2015 년 2 월

서울대학교 대학원

의과학과 의과학 전공

김지수

A thesis of the Master's degree

A study on the link between ROS  
recovery by HDAC6 inhibition and  
amyloid beta induced axonal transport  
impairment

히스톤 디아세틸라아제 6 저해를 통한 활성산소종 감소와 베타 아밀로이드 단백질에 의해 망가진 축삭수송의 회복관계 연구

February 2015

The Department of Biomedicine,

Seoul National University

College of Medicine

Kim, Jisoo

히스톤 디아세틸라아제 6 저해를 통한 활성산소종 감소와 베타 아밀로이드 단백질에 의해 망가진 축삭수송의 회복관계 연구

지도교수 목 인 희

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함

2015 년 2 월

서울대학교 대학원

의과학과 의과학 전공

김 지 수

김지수의 의학석사 학위논문을 인준함

2015 년 2 월

위 원 장 (인)

부위원장 (인)

위 원 (인)

A study on the link between ROS  
recovery by HDAC6 inhibition and  
amyloid beta induced axonal transport  
impairment

by

Kim, Jisoo

A thesis submitted to the Department of Medicine  
in partial fulfillment of the requirements for the  
Degree of Master of Medicine (Biomedical Science)  
at Seoul National University College of Medicine

February 2015

Approved by Thesis Committee:

Professor	_____	<u>Chairman</u>
Professor	_____	<u>Vice chairman</u>
Professor	_____	

## 초 록

알츠하이머 병에서는 신경세포 내의 베타 아밀로이드 단백질 (Amyloid  $\beta$ ; A $\beta$ )의 과도한 축적으로 신경세포 내 축삭수송의 저해와 활성산소종의 증가현상이 나타나게 된다. 저하된 축삭수송은 히스톤 디아세틸라아제 6 (Histone deacetylase 6; HDAC6)의 저해에 의해 회복될 수 있음이 보고되어있다. 본 연구에서는 알츠하이머 병 상황에서 HDAC6의 기질인 퍼록시레독신의 항산화능저하가 활성산소종의 증가를 야기하며, 하향조절로 세포 내  $Ca^{2+}$  농도를 높인다는 사실을 HT22 세포주에 A $\beta$ 와 HDAC6 저해제인 Tubastatin A (TBA)를 처리하여 확인하였다. 결과적으로, 증가된 활성산소종과  $Ca^{2+}$ 이 축삭수송을 망가트리는데 관여되어있음을 live cell imaging을 이용한 미토콘드리아 운동성 관찰을 통해 규명하였다.

그리고, A $\beta$ 에 의해 저해된 미토콘드리아의 축삭수송이 HDAC6 저해제에 의해 회복되는 점에 착안하여, HDAC6를 목표 단백질로 한 저해물질들을 western blot과 live cell imaging을 통해 선별하는 스크리닝 방법을 확립하였다.

연구결과를 바탕으로, 알츠하이머 병에서 축삭수송의 망가짐이 HDAC6의 주요기질인  $\alpha$ -tubulin 외에 peroxiredoxin도 연관되어

있다는 가능성을 제시하고자 한다.

---

**주요어:** 알츠하이머 병, 히스톤 디아세틸라아제 6, 퍼록시레독신, 미  
토콘드리아, 축삭수송, 활성산소종, 칼슘

**학 번:** 2013 - 21769

## 목 차

초록 .....	i
목차 .....	iii
표 및 그림 목록 .....	iv
서론 .....	1
실험재료 및 방법 .....	5
결과 .....	12
고찰 .....	38
참고문헌 .....	45
초록 (영문) .....	49



## 표 및 그림 목록

그림 1. A $\beta$ 에 의한 peroxiredoxin의 acetylation 감소와 HDAC6 저해로 인한 회복양상 .....	13
그림 2. A $\beta$ 에 의해 증가된 ROS, Ca <sup>2+</sup> 과 HDAC6 저해로 인한 회복양상 .....	17
그림 3. A $\beta$ 에 의해 증가된 ROS의 Ca <sup>2+</sup> 하위 조절 ...	21
그림 4. 항산화제와 Ca <sup>2+</sup> 제거제에 의한 축삭수송의 회복 .....	26
그림 5. $\alpha$ -tubulin 의 acetylation 과 축삭수송과의 관계 .....	28
그림 6 HDAC6 저해제의 효능평가를 위한 스크리닝 방법 .....	31
그림 7. HDAC6 저해제가 축삭수송에 미치는 영향의 모식도 .....	39

## 서 론

알츠하이머 병 (Alzheimer' s disease; AD)은 65세 이상 인구의 10% 이상에서 나타나며, 치매의 대표적 질환이다 [1]. 고연령 인구에서 관찰되는 대표적인 신경 퇴행성 질환으로, AD 는 유전적으로 발병하는 가족성 알츠하이머 병 (Familial Alzheimer ' s Disease; FAD)과 65세 이상의 노인에게서 주로 발병하는 산발성 알츠하이머 병 (Sporadic Alzheimer' s Disease; SAD)으로 구분될 수 있다. AD의 두 가지 대표적인 병리학적 특징으로는 신경세포 외 기질에서 베타 아밀로이드 단백질 (Amyloid  $\beta$ ;  $A\beta$ )이 비정상적으로 축적되어 나타나는 노인반점 (senile plaque) 과 신경세포 내 타우 단백질 (Tau)의 과인산화로 인한 신경섬유 농축체 (neurofibrillary tangle; NFT)가 있다 [2]. 이러한 병리학적 특징과 더불어 질병이 진행될수록 신경세포의 사멸 및 시냅스의 소실에 의해 학습능력과 기억력이 점진적으로 감퇴된다 [3-5].

축적된  $A\beta$ 는 신경세포 막의 N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA receptor, NMDAR)를 자극시켜 세포 내부로 유입되는 칼슘 (calcium ion;  $Ca^{2+}$ )의 양을 과도하게 증가시킨다. 또, 신경세포 막에 응집하여 직접  $Ca^{2+}$ 의 통로가 되어 세포 내 칼슘 이온의 농도를 높이는 현상을 일으킨다 [6, 7]. 세포 내  $Ca^{2+}$ 의 항상성이 깨지게 되면 미토콘드리아의 전자전달계가 저해되어 세포 내 활성산소종 (Reactive Oxygen Species; ROS)의 생산량이 증가하게 된다 [8].

그 외에도  $A\beta$ 는 그 자체의 독성으로 직접 미토콘드리아의 제 3

전자전달계와 크랩스 회로의 주요 효소인  $\alpha$ -ketoglutarate, pyruvate dehydrogenase를 저해하여 세포 내 ROS 생성을 증가시킨다 [9, 10]. ROS는 자유라디칼의 높은 반응성과 산화력으로 세포 내 신호전달과 소기관의 기능을 망가트리며, 세포사멸을 유도한다 [11-13].

신경세포는 시냅스 형성을 위해 길게 뻗는 구조적 특징을 가지며, 축삭(axon)을 중심으로 세포체 (cell body)와 신경 말단 (nerve terminal)을 가지고 있다. 그러므로, 축삭을 통한 세포체와 신경 말단 간 물질교환은 신경 기능을 유지하는데 있어서 중요한 역할을 한다. 소기관 및 소낭을 통한 물질교환에는 미세소관(microtubule; MT)을 기반으로 하는 축삭수송(axonal transport)이 관여한다.

미토콘드리아는 축삭을 따라 역동적으로 이동하며, 에너지 생산으로 세포기능 유지에 필수적인 소기관이다. 미토콘드리아는 운동단백질 (motor protein), 연결 단백질 (adaptor protein)과 복합체를 이루어 미세소관에 결합하여 축삭수송이 된다. 미토콘드리아가 결합하는 운동단백질에는 kinesin과 dynein이 있으며[14, 15], 이 중 세포체 방향 수송 (anterograde transport)에 관여하는 kinesin은 연결 단백질인 miro, milton과 결합하여 미토콘드리아를 미세소관을 따라 이동시킨다 [16].

AD 상황에서는 신경세포 내의 축삭수송이 여러 가지 원인으로 망가져있다 [17]. 이 중 주요한 원인은 미세소관을 구성하는 단량체인  $\alpha$ -tubulin에 번역 후 수식화 (post-transcriptional modification; PTM)과정을 통해 결합된 아세틸화 (acetylation)의 감소다 [18, 19].  $\alpha$ -tubulin의 acetylation은 미세소관의 안정성을 증가시켜 축삭수송을 향상시켜준다.

histone deacetylase 6 (HDAC6)는 두 개의 deacetylase domain을 가지고 있으며,  $\alpha$ -tubulin을 주요기질로 하는 효소이다. 세포핵 속의 histone 단백질을 주로 deacetylation하여 유전자 발현을 조절하는 다른 HDAC isotype들과 달리, HDAC6는 세포질에서  $\alpha$ -tubulin과 peroxiredoxin, cortactin, HSP90 등과 같은 non-histone 단백질을 기질로 가진다 [20]. 이렇듯, HDAC6는 단백질의 활성화, 분해, 결합에 주요하게 작용하는 PTM인 acetylation을 조절하는 역할을 하는데, AD 환자는 정상인에 비하여 대뇌피질과 해마에서 HDAC6 활성이 높으며,  $\alpha$ -tubulin의 acetylation은 낮은 상태로 유지된다 [18, 19, 21]. AD 형질전환동물에 HDAC6 저해제를 주사하였을 때, 기억력이 개선되는 현상 [22] 및 HDAC6 저해로 인해 A $\beta$ 에 의해 감소된  $\alpha$ -tubulin의 acetylation이 증가하고, 축삭수송이 회복되는 결과에 착안하여 [23], 본 연구에서는 AD 치료제 개발을 위한 western blot과 live cell imaging을 이용한 HDAC6 저해제 스크리닝 방법을 확립하였다.

HDAC6의 또 다른 기질인 peroxiredoxin이 있는데 [24], 이 단백질은 이황화결합의 환원력을 이용하여 세포 내의 ROS를 환원하여 그 독성을 제거하는 기능을 하는 효소이다 [25]. 그리고  $\alpha$ -tubulin과 유사하게 acetylation에 의해 그 활성이 조절되고, acetylation이 결합되어있을 경우, ROS 제거능이 더 높아지는 특징을 가진다 [24].

보고되어 있는 현상들을 미루어 볼 때, AD 환자의 신경세포에서 과발현된 HDAC6에 의해 peroxiredoxin의 acetylation이 감소된 상태로 유지되고, A $\beta$ 에 의해 세포 내에서 높아진 ROS 제거능이 정상인 보다 낮아져 있을 것이라는 예측을 할 수 있다.

ROS와  $\text{Ca}^{2+}$ 은 모두 축삭수송을 저해하는 것으로 알려져 있으며 [26, 27], 특히 세포 내 높은  $\text{Ca}^{2+}$ 농도는 미토콘드리아의 축삭수송을 막는다 [27].  $\text{Ca}^{2+}$ 이 연결 단백질인 miro의 calcium binding site에 결합하면, 복합체를 이루고 있던 운동 단백질인 kinesin이 구조적 변화가 생겨 미세소관에서 분리되게 만든다 [27]. 다음 내용을 종합하여 볼 때, AD상황에서 감소된 peroxiredoxin의 acetylation으로 인해 증가된 ROS가  $\text{Ca}^{2+}$ 의 농도를 증가시키고, 최종적으로 미토콘드리아의 축삭수송을 방해하여 그 증상을 방조시킨다는 가설을 세우게 되었다. 본 논문은 다음 가설을 증명하기 위해 진행한 실험들의 결과와 고찰로 구성되어있다.

# 실험 재료 및 방법

## 1. 실험에 이용된 실험동물

암컷 Sprague-Dawley rats (KOATECH, Gyeonggi-do, Korea)의 임신 후 18일 된 배아를 신경세포 배양을 하는데 사용하였다.

모든 동물의 실험 절차는 서울대학교의 동물 실험 윤리 위원회의 승인을 받았으며, 서울대학교 실험 동물 자원관리원의 규정을 따랐다.

## 2. 세포주 및 세포배양

세포주는 HT22 (immortalized mouse hippocampal neuronal cell line) 세포를 사용하였고, 세포주의 배양은 Dulbescco's modified eagle's medium (DMEM; Hyclone, Salt Lake City, Utah, USA)에 10% fetal bovine serum (Hyclone)와 penicillin/streptomycin 0.1 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA)이 첨가된 배양액에 37° C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지된 환경에서 배양하였다.

신경세포는 SD rat의 임신 후 18일 된 배아의 뇌에서 해마 부분만 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Welgene, Daegu,

Korea) 배지에서 분리 한 뒤, 0.5% trypsin (2.5% trypsin; Sigma-Aldrich)로 세포 간 결합을 끊어준다. 수집된 세포는 poly-D-lysine (PDL; Sigma-Aldrich)으로 코팅해 둔 microfluidic chamber 또는 plate에서 penicillin/streptomycin 0.1 mg/ml (Sigma-Aldrich)이 포함되어 있는 Neurobasal/B27 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)배지로 배양하였다.

### 3. 시약 및 시약처리

HDAC6 저해제로써 Tubastatin A (TBA; BioVision, Mountain View, CA, USA)를 사용하였으며, ROS 저해제로는 Trolox (Sigma Aldrich)와 N-Acetyl cysteine (NAC; Sigma Aldrich)를,  $A\beta_{1-42}$  peptide는 American peptide (Sunnyvale, CA, USA)를 사용하였다. 칼슘 킬레이트제로 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N, N, N', N'-tetra acetic acid (BAPTA; Sigma-Aldrich) Acetylated  $\alpha$ -tubulin,  $\beta$ -actin 항체는 Sigma-Aldrich,  $\alpha$ -tubulin 항체는 Millipore (Billerica, MA, USA)사의 제품을 사용하였다. Peroxiredoxin 1 항체는 Ab Frontier (Seoul, Korea) 사의 제품을 본 실험에 사용하였다.

## 4. Transfection

미토콘드리아 이동 분석을 위해 pDsRed2-Mito (Clontech, Mountain View, CA, USA)를 해마 조직에서 분리된 후 7일째 되는 날 (DIV 7; Days in vitro)에 Lipofectamin 2000 (Invitrogen)을 사용하여 transfection시켰다.

## 5. DCFDA assay

CM-H<sub>2</sub>DCFDA는 활성산소의 지시약물로 세포에 산화가 일어나면 아세트산염이 제거되어 녹색 형광을 띠게 된다. HT22 세포에서 배지를 제거한 후, dichloro-fluoreceindiacetate (DCFDA; Invitrogen)를 1  $\mu$ M로 DMEM에 희석하여 세포에 처리하고 37° C 배양기에서 45분 간 반응시켰다. 반응이 끝난 후에 새로운 배지로 교체해준 뒤, 형광현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰 및 촬영을 하였다.

## 6. Fluo-4 assay

Fluo-4 AM 은 칼슘 이온의 지시약물로 세포 내 유리칼슘과 결합하면 녹색 형광의 세기가 증가하게 된다. HT22 세포에 5mM fluorescent calcium indicator dye (Fluo-4; Invitrogen)를



DMEM에 희석하여 처리하고 37° C 배양기에서 5시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후에 새로운 배지로 교체해준 뒤, 형광현미경 (DP50; Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰 및 촬영을 하였다.

## 7. Western blotting

단백질 발현양을 측정하기 위해 약물 처리가 끝난 세포를 protease inhibitor (Sigma-Aldrich)와 Tubastatin A를 5  $\mu$ M로 희석한 RIPA buffer (iNtRON, Gyeonggi-do, Korea)를 사용하여 총 단백질을 추출하였다. BCA 방법으로 정량 후, 측정하고자 하는 단백질의 양과 크기 등의 특징에 따라 5~20  $\mu$ g의 단백질을 SDS buffer가 포함된 8%, 12% Tris-glycine polyacrylamide gel 또는 4-12% gradient Bis-Tris gel (Invitrogen)에 전기영동 하였다. Gel 에 크기 별로 분리 되어 있는 단백질을 PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA)에 4° C에서 70 v, 100분간 transfer step을 거쳐 이동시켰다. 단백질 이동이 완료된 PVDF membrane에 단백질 특이적인 1차 항체를 4° C 에서 12시간 이상 반응 시킨 후, horse radish peroxidase가 결합된 2차 항체 (Thermo, Waltham, MA, USA)를 상온에서 1시간 동안 반응 시켰다. 단백질에 결합된 항체는 Enhanced chemiluminescence

solution (GE health care, Waukesha, WI, USA) 로 발광시켜 LAS-3000 (Fuji Film, Tokyo, Japan)으로 감광촬영 하였다.

## 8. Microfluidic chamber system

축삭수송의 분석을 위해 microfluidic chamber에 해마 신경세포를 배양하여 live cell imaging 방법을 사용하였다 [28]. Microfluidic 구조가 각인된 원판에 PDMS polymer를 굳혀서 chamber를 잘라낸다. 조립 후 PDL을 처리하여 코팅한다. 해마 신경세포는 chamber 의 왼쪽 channel에만 배양하였으며, 세포의 신경돌기가 자라남에 따라 chamber의 중앙에 위치한 microgroove로 축삭이 들어가 직선으로 뻗게 된다.

## 9. Live cell imaging과 이미지 분석

축삭수송 촬영은 Cool SNAP HQQ2 CCD camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA)가 설치된 IX81 microscope (Olympus, Tokyo, Japan)에서 Metamorph Software (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA)를 사용하였다. Microfluidic chamber의 중앙에 위치한 microgroove 내의 축삭을 Time-lapse imaging recording 방법으로, 2분 동안 1초의 간격을 두고 500 ms 의 노출

시간으로 촬영하였다. 미토콘드리아의 속도 (velocity)와 운동성 (motility)은 Image J (National insitute of Health, Bethesda, MD, USA) 프로그램의 multiple kymograph plug-in (by J. Rietdorf and A. Seitz)을 이용하여 분석하였다. 미토콘드리아의 속도를 분석하기 위해 Image J를 이용하여, kymograph에서 미토콘드리아 동선의 각도 (angle)를 측정하였다. 그리고 다음의 공식을 이용하여 속도 값을 계산하였다: “velocity( $\mu\text{m/sec}$ ) =  $\text{Tangent}(\text{angle}^\circ + 90^\circ) * 0.111276$ ”. Image J 에서 측정한 각도는 모두  $0 \sim -180^\circ$  이기 때문에, “Tangent (angle $^\circ$ )” 의 값은 항상 0 미만이다. 측정된 각도에  $90^\circ$  를 더하여서 양수와 음수 값으로 각각 축삭 말단 방향 (anterograde)와 세포체 방향 (retrograde)의 이동을 구분하였다. 본 연구에 사용된 이미지 시스템에서는 1 pixel ( $\mu\text{m}$ ) 의 길이는 0.111276이다.

형광 현미경으로 얻은 영상을 Image J 프로그램을 이용하여 DCFDA와 Fluo-4로 염색된 형광의 세기 정도를 분석하였다.

## 10. 통계처리

모든 통계적 분석은 Prism 5 (Graphpad, La Jolla, CA, USA) 프로그램을 이용하였다. 그룹 간의 유의한 차이는 t-test, 또는 one-

way analysis of variance (ANOVA) 와 Bonferroni post-test 를 이용하여 분석하였다. 모든 분석결과는 mean  $\pm$  SEM 값으로 나타내었다. (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ )

## 결 과

### 1. A $\beta$ 에 의한 peroxiredoxin의 acetylation 감소와 HDAC6 저해로 인한 회복양상

A $\beta$ 에 의한 tubulin acetylation의 감소는 여러 논문에서 보고가 되어있지만, HDAC6의 다른 기질인 peroxiredoxin의 acetylation에 A $\beta$ 가 어떠한 영향을 미치는지는 밝혀지지 않았다. 또, 감소한 tubulin acetylation이 HDAC6를 저해했을 경우, 회복되는 현상도 연구가 되어있다. AD 환자에서 HDAC6가 과발현 및 과활성 되어있으나, 그 기질 중 하나인 peroxiredoxin은 어떻게 변화되는지를 살펴보고자 하였다. A $\beta$ 와 HDAC6 특이적 저해제인 Tubastatin A (TBA)가 acetylation을 조절하는데 있어서의 역할을 효과적으로 규명하기 위해, 본 연구에서는 rat 해마 신경세포와 HT22 세포주를 사용하였다. 각각의 세포에 A $\beta$  2  $\mu$ M을 19~24 시간 처리 후 western blot으로 확인하였을 때, peroxiredoxin의 acetylation이 감소하였다. A $\beta$  처리 후 TBA를 500 nM로 3시간 추가 처리한 결과, A $\beta$ 에 의해 감소된 peroxiredoxin의 acetylation이 다시 회복되었다. (그림 1)

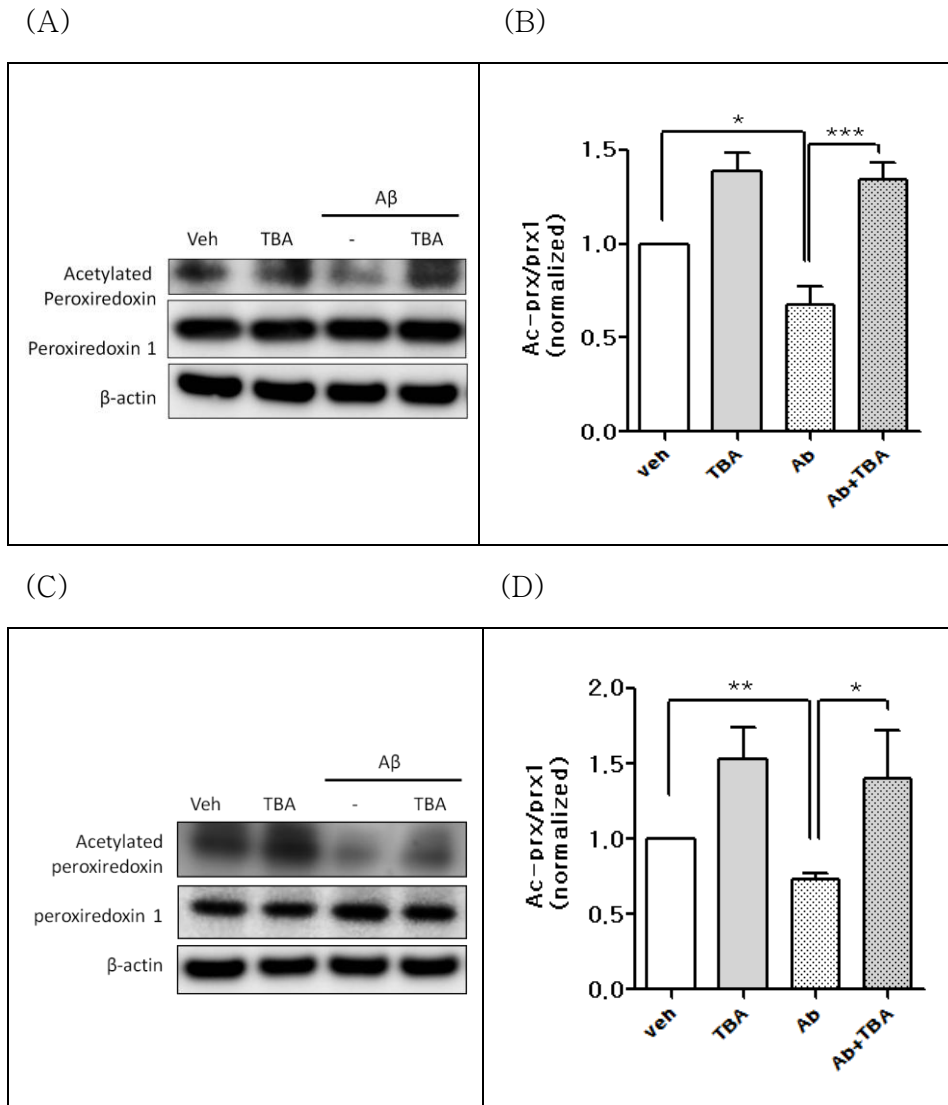


그림 1.  $A\beta$ 에 의한 peroxiredoxin의 acetylation 감소와 HDAC6 저해로 인한 회복양상

(A, B) HT22 세포주에  $A\beta$  2  $\mu$ M을 19시간 처리 후, TBA 500 nM을 3시간 처리하였다. Western blot을 통해 확인하였다. (n=5)

(C, D) rat 해마 신경세포에  $A\beta$  2  $\mu$ M을 24시간 처리 후, TBA 500 nM을 3시간 처리하였다. Western blot을 통해 확인하였다.

(n=5)

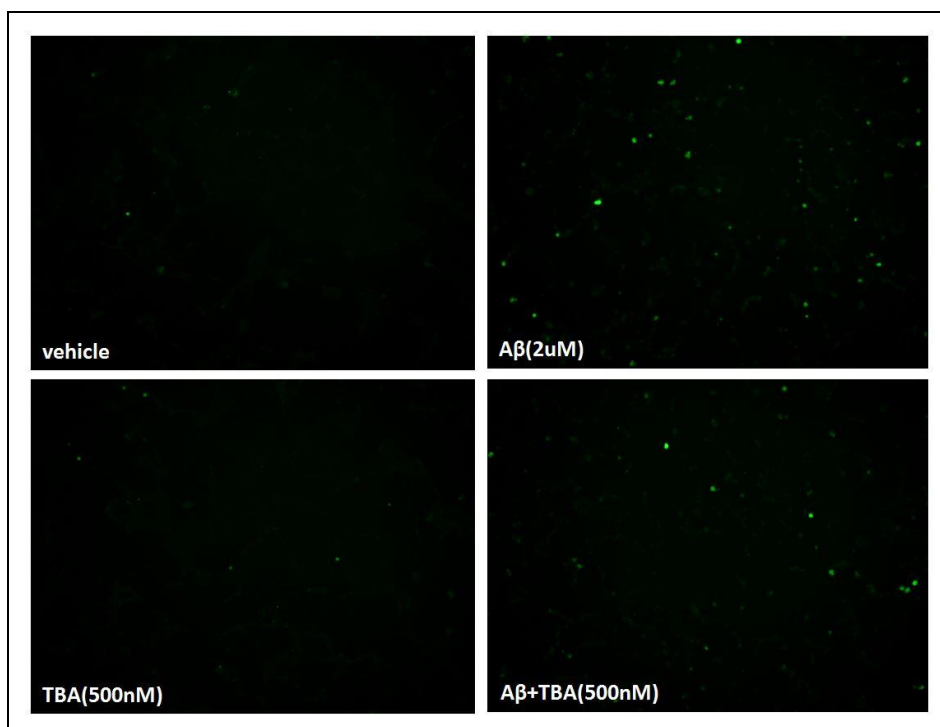
## 2. A $\beta$ 에 의해 증가된 ROS와 Ca<sup>2+</sup>과 HDAC6 저해로 인한 회복양상

AD 상황에서 해마 신경세포와 세포주 모두에서 peroxiredoxin의 acetylation이 감소되고, TBA 처리로 회복되는 것을 확인하였다. peroxiredoxin의 항산화능력도 acetylation의 정도에 따라 조절이 되는지를 확인하기 위해, HT22 세포주에서 DCFDA 방법을 이용하여 ROS 양의 증감을 관찰하였다. DCFDA는 ROS에 의해 산화되면 2, 7-dichlorofluorescein으로 탈에스틸화되어 녹색형광을 띄게 되는 ROS의 지시약물이다. 실험결과, A $\beta$ 를 처리한 그룹에서는 vehicle 그룹 대비 2배 이상 증가되었던 DCFDA 신호가 TBA를 처리하자 유의하게 감소하였다 (그림 2A, 2B). 알츠하이머 병에서는 세포 내 환경에서 A $\beta$ 에 의해 ROS와 Ca<sup>2+</sup>이 모두 증가되어 있다. ROS에 의해 축삭수송이 망가진다는 기존 보고가 있으며, 그 원인 중의 하나로 예상되는 기작이 ROS에 의한 Ca<sup>2+</sup>증가이다 [26]. 또, Ca<sup>2+</sup>자체도 연결단백질에 결합하여 축삭수송을 망가트린다는 보고가 있기에 [27], ROS의 증감과 더불어 Ca<sup>2+</sup>의 농도변화도 일어나는지를 관찰하였다. 유리 Ca<sup>2+</sup>과 결합하면 녹색형광을 띄는 지시약물인 Fluo-4를 이용하여, 세포 내 Ca<sup>2+</sup>양을 측정하기 위해 처리 후, 관찰 전 새로운 배지로 교체한 뒤 형광 정도를 관찰하였다.

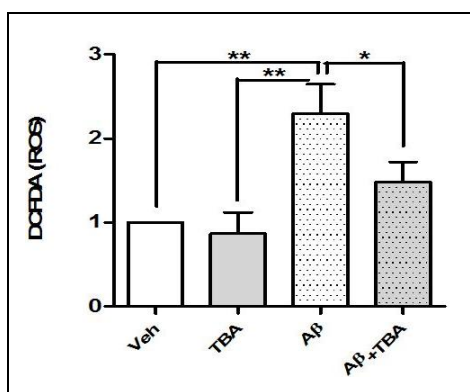


그 결과, ROS의 경향과 마찬가지로  $A\beta$ 를 처리하여 증가된  $Ca^{2+}$ 이 TBA에 의한 HDAC6 저해로 유의하게 감소하였다 (그림 2C).

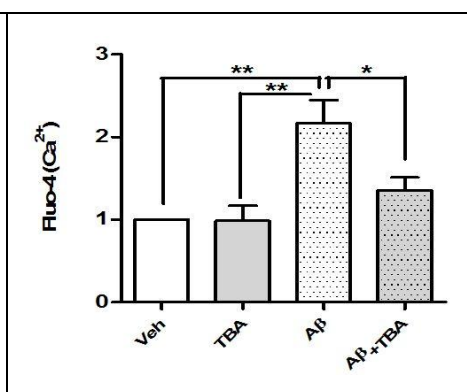
(A)



(B)



(C)



(D)

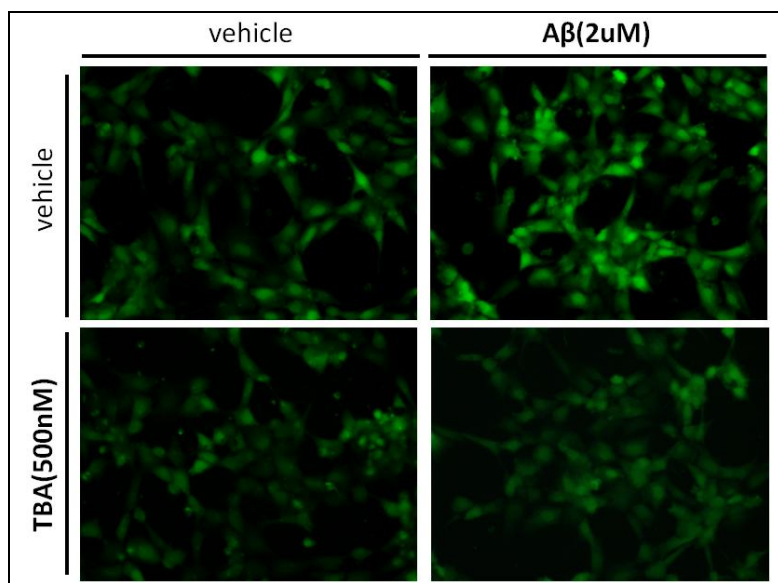


그림 2. Aβ에 의해 증가된 ROS, Ca<sup>2+</sup>과 HDAC6 저해로 인한 회복양상

(A, B) HT22 세포주에 Aβ 2 μM을 19시간 처리 후, TBA 500nM을 3시간 처리하였다. 세포 내 ROS 양을 DCFDA 방법으로 표시하여 관찰하였다. (n=6)

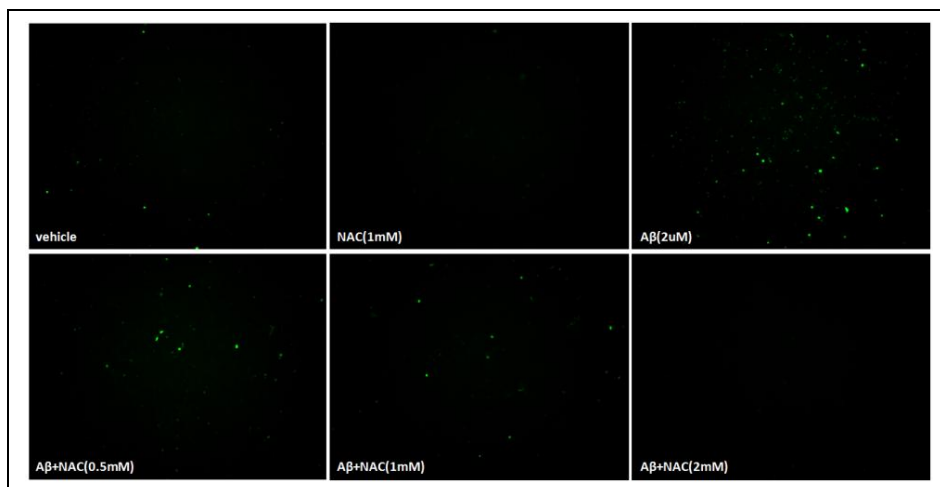
(C, D) HT22 세포주에 Aβ 2 μM을 19시간 처리 후, TBA 500nM을 3시간 처리하였다. 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 양을 Fluo-4 방법으로 표시하여 관찰하였다. (n=5)

### 3. A $\beta$ 에 의해 증가된 ROS의 Ca<sup>2+</sup>하향 조절

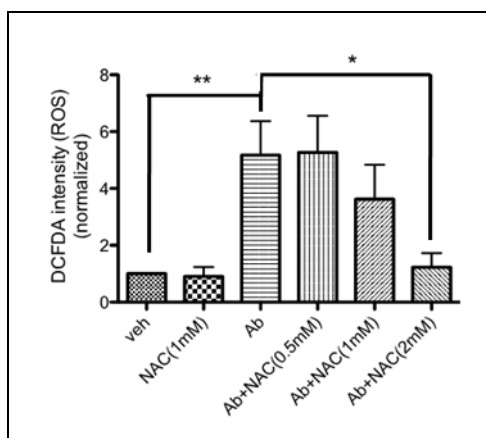
AD에서는 세포 내 ROS와 Ca<sup>2+</sup>의 증가가 모두 관찰되며, 그 기작에는 여러 경로가 보고되어 있다. A $\beta$ 는 cytochrome C oxidase의 기능을 저해시키며, 전자전달계와 미토콘드리아 막 전위를 망가트려 ROS의 과다생성을 일으킨다. 또, 축적된 A $\beta$ 는 NMDA 수용체와 결합하여 세포내부로 유입되는 Ca<sup>2+</sup>의 양을 증가시킨다. 뿐만 아니라 A $\beta$ 는 mitochondrial permeability pore (mPTP)의 구성원인 cyclophilin D와 결합하여 mPTP가 열리게 만들어, 미토콘드리아 내 Ca<sup>2+</sup>의 방출을 유도한다 [6, 9, 10, 29]. 본 연구에서도 HT22 세포주에 A $\beta$ 를 처리하여 증가된 ROS와 Ca<sup>2+</sup>의 신호를 지시약을 통해 확인한 바 있다 (그림 2). TBA의 처리로 증가된 ROS와 Ca<sup>2+</sup>의 양이 감소하였는데, 이 현상이 peroxiredoxin의 acetylation의 회복에 의한 현상이라면 두 현상 중 ROS의 증가가 Ca<sup>2+</sup>의 증가보다 선행 되어야 한다. ROS가 Ca<sup>2+</sup>을 하향 조절하는 경로로는 활면소포체 (Endoplasmic Reticulum; ER)의 표면에 존재하는 Ca<sup>2+</sup> 채널의 일종인 ryanodine receptor에 의한 ER Ca<sup>2+</sup>의 방출이 있다. 신경세포에 ROS를 처리하였을 때, 자극된 ryanodine receptor를 통한 세포 내 Ca<sup>2+</sup>농도 증가도 보고되어있다 [30, 31]. 이러한 사실들과 실험결과에 비추어 보았을 때, TBA에 의한

acetylation 회복으로 인해 증가되었던 ROS가 감소하였고 그로 인해 하향 조절되던  $\text{Ca}^{2+}$ 의 농도도 낮아졌다는 가설을 세우게 되었다. 이를 증명하기 위해, HT22 세포주에 ROS 저해제인 N-acetylcystein (NAC)를  $\text{A}\beta$ 와 함께 처리하여  $\text{Ca}^{2+}$ 의 증가를 관찰하여,  $\text{Ca}^{2+}$  증가에 ROS가 기여하는 정도를 확인하였다. NAC가 HT22에서 가장 효과적으로 ROS를 제거하는 농도를 찾기 위해서,  $\text{A}\beta$  2  $\mu\text{M}$ 과 함께 여러 가지 농도의 NAC를 처리하여 DCFDA 방법으로 ROS 신호를 형광현미경으로 관찰하였다 (그림 3A). 실험 결과, NAC 2 mM에서  $\text{A}\beta$ 에 의해 생성된 ROS가 가장 많이 제거되어 있음을 알게 되었다. (그림 3A, 3D) NAC 2 mM의 조건으로 HT22 세포주에  $\text{A}\beta$ 와 함께 처리를 해준 뒤, calcium indicator인 Fluo-4를 이용하여 세포 내  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 형광현미경으로 관찰하였다.  $\text{A}\beta$  처리 그룹에서는 vehicle 그룹 대비 3배 증가된  $\text{Ca}^{2+}$ 이 ROS가 배제된 그룹에서는 50% 가량 유의하게 감소하였다 (그림 3C, 3D). 이 결과로 볼 때, AD 상황에서 관찰되는  $\text{Ca}^{2+}$ 의 증가에 ROS의 하향 조절이 관여를 하고 있다고 할 수 있다.

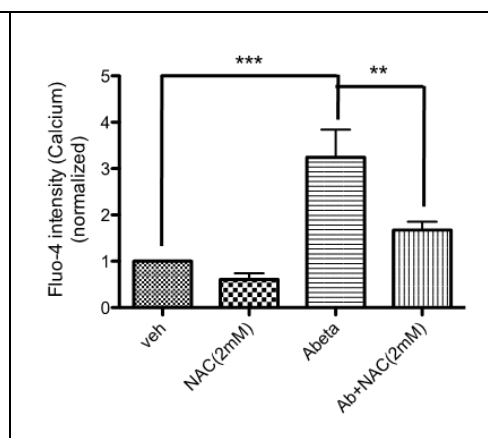
(A)



(B)



(D)



(C)

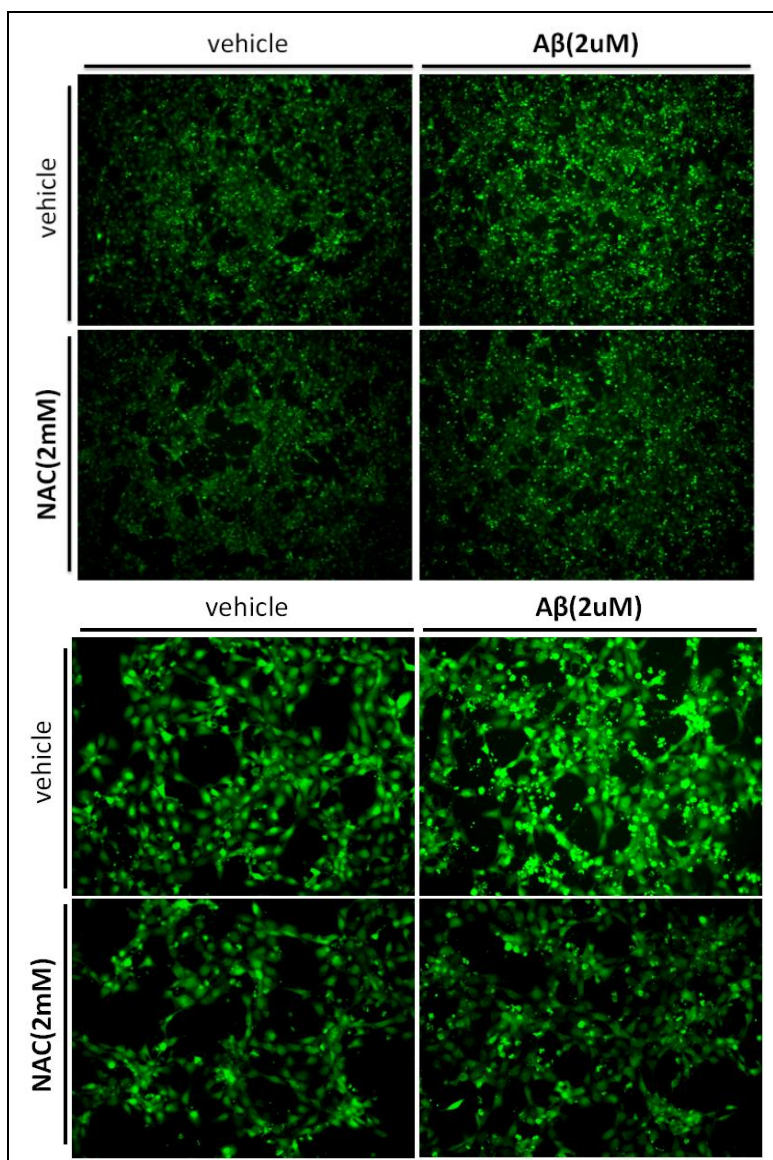


그림 3.  $A\beta$ 에 의해 증가된 ROS의  $Ca^{2+}$  하위 조절

(A,B) HT22 세포주에 NAC를 각각의 농도로 1시간 간 선처리 하고  $A\beta$  2  $\mu M$ 을 19시간 동안 처리하였다. 세포 내 ROS 양을 DCFDA 방법으로 표지 하여 관찰하였다. (n=10)

(C, D) HT22 세포주에 NAC 2 mM을 1시간 간 선처리 하고  $A\beta$  2  $\mu$ M을 19시간 동안 처리하였다. 세포 내  $Ca^{2+}$  양을 Fluo-4 방법으로 표지 하여 관찰하였다. (n=7)



#### 4. 항산화제와 $\text{Ca}^{2+}$ 제거제에 의한 축삭수송의 회복

$\text{A}\beta$ 에 의해 증가된 ROS와 그 하위조절로 증가된  $\text{Ca}^{2+}$ 이 보고되어있는 바처럼 축삭수송을 악화시키는지, 그리고 TBA에 의해 회복되는지를 보고자 실험을 진행하였다. 우선, ROS와  $\text{Ca}^{2+}$ 을 회복시켰던 TBA 500 nM의 조건에서 축삭수송의 변화를 live cell imaging 방법으로 관찰하였다. 신경세포의 축삭수송을 효과적으로 live cell imaging 할 수 있게 microfluidics chamber (그림 4A)에 rat 해마 신경세포를 배양한 뒤, 미토콘드리아 표적 형광단백질을 발현하는 mito-DsRed2를 transfection하여 그 운동성을 관찰하였다. 실험 결과,  $\text{A}\beta$  처리군에서 미토콘드리아의 평균이동속도가 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며, TBA 처리시 감소된 속도가 회복되는 양상을 관찰할 수 있었다. 이 현상에 tubulin acetylation 외에 peroxiredoxin에 의한 ROS 및  $\text{Ca}^{2+}$ 이 관여하고 있는지를 증명하기 위해 항산화제와  $\text{Ca}^{2+}$  제거제를  $\text{A}\beta$ 와 함께 처리한 뒤, 미토콘드리아 운동성을 관찰하였다. 미토콘드리아에 직접 작용하여 ROS 생성을 저해하는 NAC는 배제하고, 세포기질에서 반응하는 peroxiredoxin의 특징을 재현하고자 ROS scavenger인 Trolox를 사용하였다 [32]. ROS에 의해 ER 내의  $\text{Ca}^{2+}$ 이 세포질로 나와 세포 내  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 증가시키는 기작을 예상하고 있는 바, 세포 내

$\text{Ca}^{2+}$  chelate인 BAPTA를 처리하였다 [33].  $\text{A}\beta$ 에 의해 대조군 대비 25% 가량 감소했던 미토콘드리아의 평균이동속도가 trolox에 의해 30% 이상 회복되었으며, BAPTA 처리군에서도 13% 회복되는 현상을 관찰하였다. 두 결과로 미루어 볼 때, HDAC6 저해로 인해 축삭수송이 회복되는 현상에 ROS와  $\text{Ca}^{2+}$ 이 연관되어 있으며, 이는 peroxiredoxin의 acetylation회복에 의한 하위조절에 의한 것임을 예상해볼 수 있다.

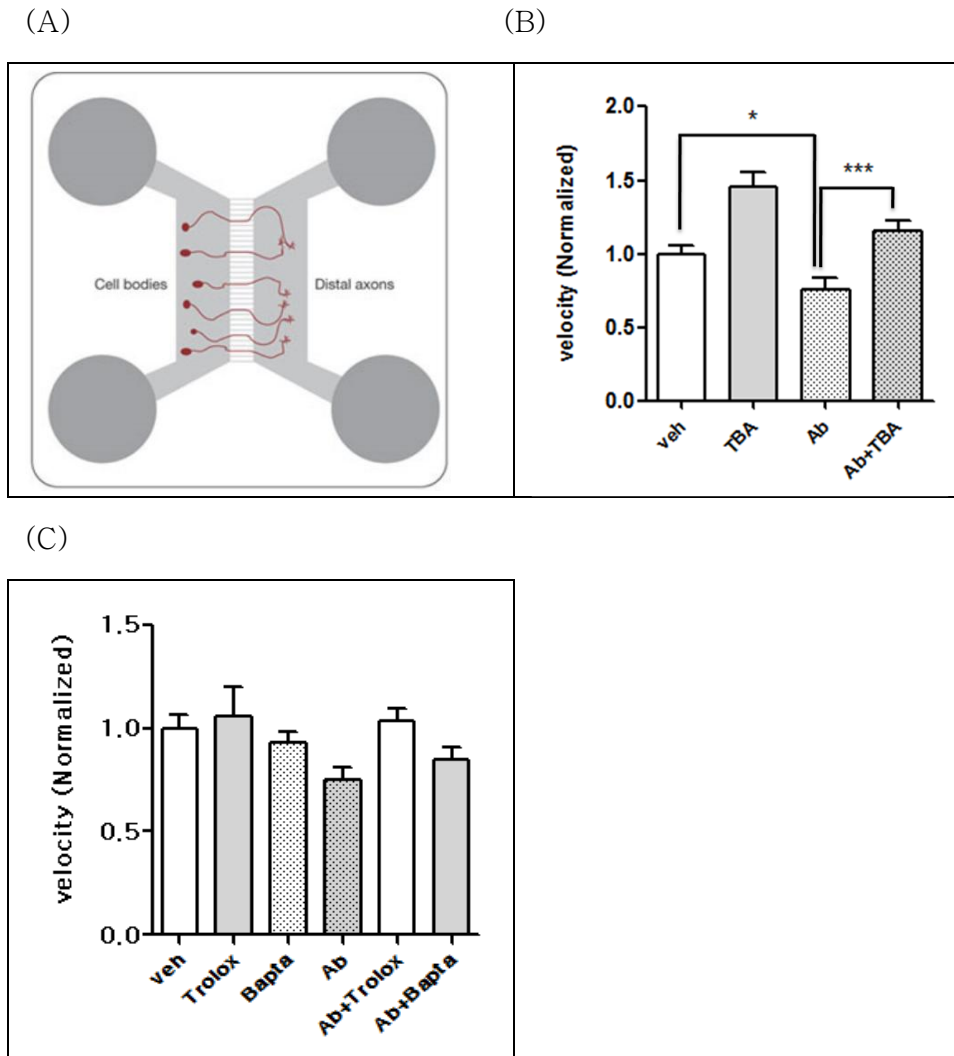


그림 4. 항산화제,  $\text{Ca}^{2+}$  제거제에 의한 축삭수송의 회복

(A) microfluidics chamber의 모식도 [34]

(B) Rat 해마신경세포에 Trolox 200  $\mu\text{M}$ , BAPTA 2  $\mu\text{M}$ 을 1시간  
선처리 후,  $\text{A}\beta$  2  $\mu\text{M}$ 을 24시간 처리하였다. 미토콘드리아의 평균이  
동속도를 live cell imaging을 통해 관찰 분석하였다. (n=1)

## 5. $\alpha$ -tubulin의 acetylation과 축삭수송

$\alpha$ -tubulin은 미세소관의 단위체로 acetylation이 증가하면 microtubule의 안정성을 증가시키게 된다 [35, 36]. 이 acetylation을 제거하는 것이 HDAC6인데 [37], 이 HDAC6가 과발현 되거나 과활성 되어있을 경우, 미세소관의 안정성이 감소하여 축삭수송이 저해된다. 연구에서 AD 상황에서 미세소관의 단위체인 tubulin acetylation이  $A\beta$ 에 의해 감소되어 있고, 이로 인해 미토콘드리아의 축삭수송이 정상적으로 이루어지지 않고 있음을 밝혔다.  $A\beta$ 는  $\alpha$ -tubulin의 acetylation 정도를 감소시키고, HDAC6 저해제인 TBA는 감소된 acetylation을 회복시켜 미세소관을 안정시킨다. 결과적으로, 감소되었던 미토콘드리아의 운동성도 회복됨을 보여주어 HDAC6 저해제가 가진 AD 치료제로써의 잠재적 가능성을 조명하였다 [23].

(A)

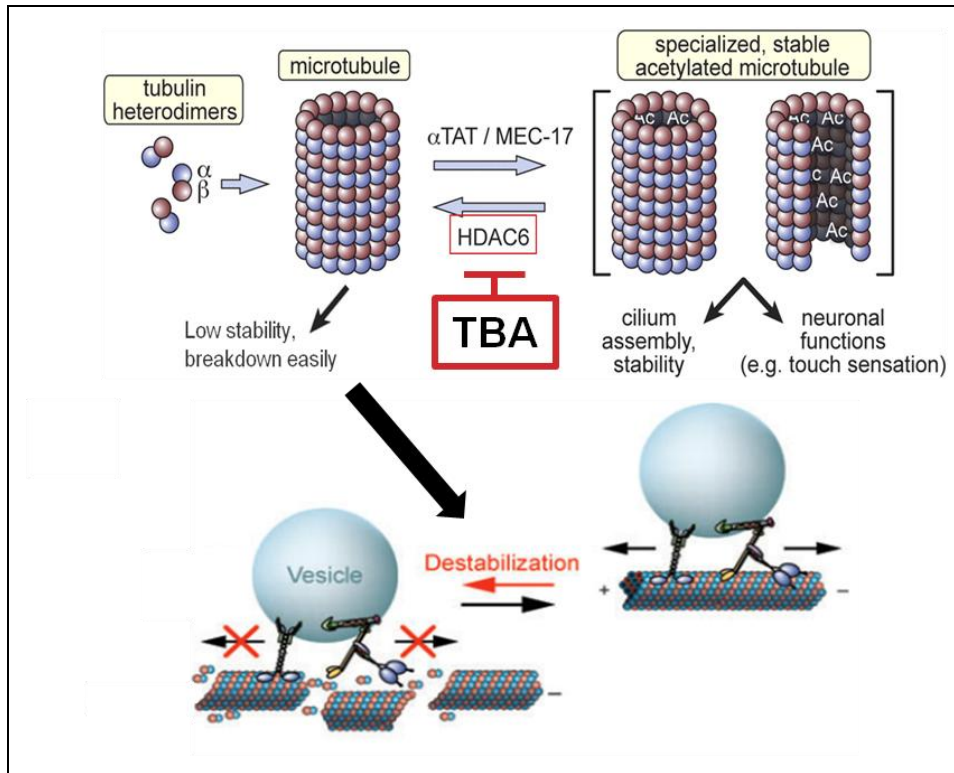


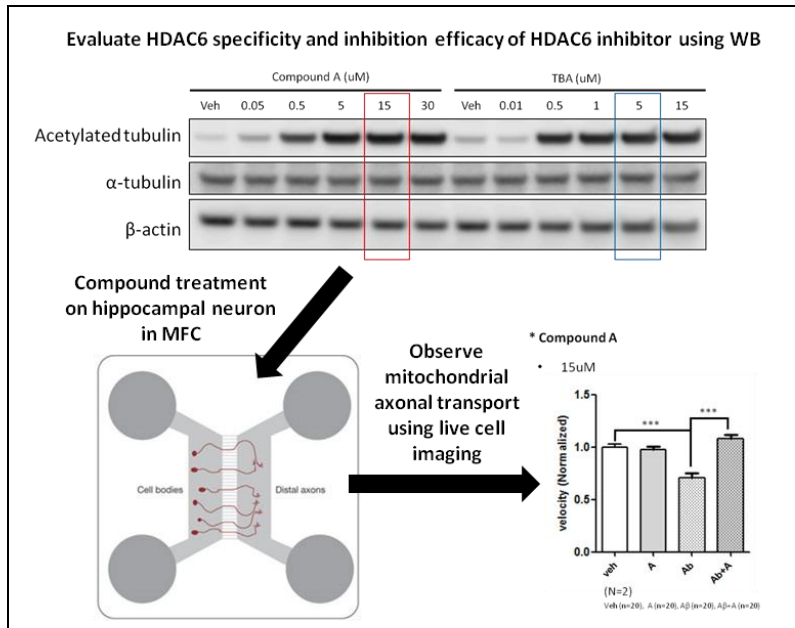
그림 5.  $\alpha$ -tubulin의 acetylation과 축삭수송 간의 관계 [38, 39]

## 6. HDAC6 저해제 효능평가를 위한 스크리닝 방법

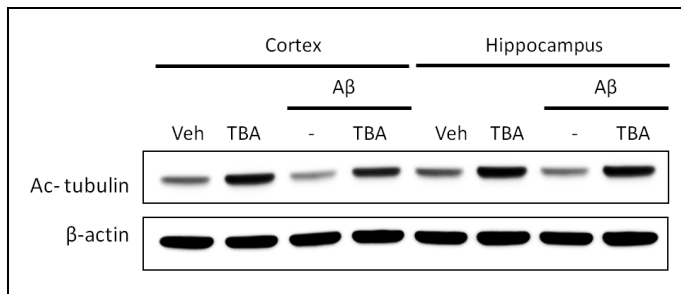
$\alpha$ -tubulin의 acetylation을 회복과 축삭수송의 회복이 상관관계를 이루고 있다는 점에 착안하여, 본 연구에서는 HDAC6의 효과적인 저해제를 선별해내고자 western blot과 live cell imaging을 이용한 compound screening 방법을 확립하였다. 평가를 하고자 하는 화합물을 우선 농도 별로 HT22 세포주에 처리하여 tubulin acetylation를 증가시킬 수 있는 정도를 western blot 방법을 통해 확인한다. 이 단계에서 화합물 별 저해능의 비교를 위해 HDAC6 저해제인 TBA의 저해 한계 농도인 5  $\mu$ M과 같은 효능을 보이는 화합물의 농도를 찾아, 해마신경세포에 처리하여 미토콘드리아의 운동성의 변화를 관찰한다 (그림 6A). 선별실험에 앞서, 각각 실험의 개념 검증을 위해 이전 연구에서 사용했던 HDAC6 저해제인 TBA를 처리하여 tubulin의 acetylation의 회복과 미토콘드리아의 운동성의 회복이 재현되는지를 확인하는 실험을 진행했다. Rat 해마와 대뇌피질의 신경세포에 A $\beta$ 를 처리하였을 때, 두 부위 모두 tubulin의 acetylation이 유의미하게 감소하였으며, TBA로 대조군 수준까지 회복됨을 western blot으로 보았다 (그림 6B, 6C, 6D). 이를 통해 TBA가 HDAC6를 목표단백질로 삼고 있으며, 효과적으로 저해하고 있음을 알 수 있다. 신경세포의 축삭수송을 live cell imaging

방법으로 rat 해마신경세포에서 미토콘드리아의 운동성을 관찰하였다. 그 결과, 미토콘드리아의 평균 이동속도가 tubulin acetylation의 증감과 상관관계를 보이며 변화하는 것을 관찰하였다 (그림 6E). 위 결과들을 통해 HDAC6 저해제의 효능평가를 위한 스크리닝 방법이 HDAC6의 저해능과 세포수준의 축삭수송 회복능 모두를 평가하는데 적합하다는 사실을 알 수 있다.

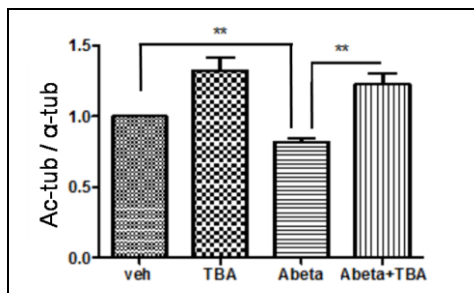
(A)



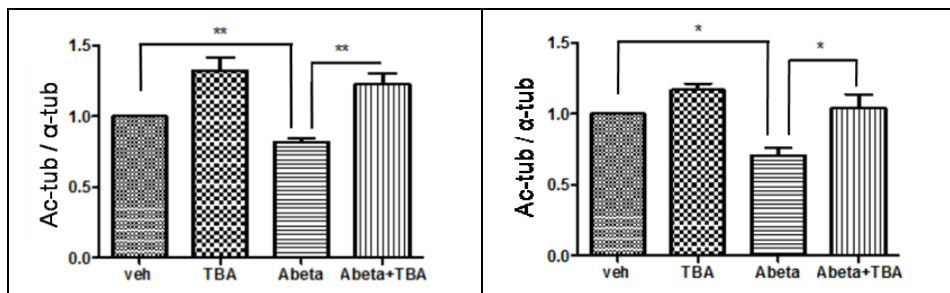
(B)



(C)



(D)





(E)

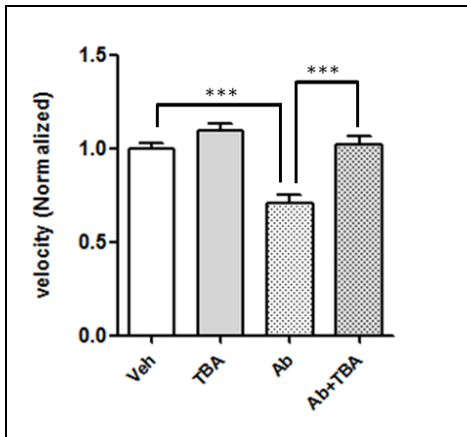


그림 6. HDAC6 저해제의 효능평가를 위한 스크리닝 방법

(A) Compound screening 과정의 모식도 [32]

(B) Rat 해마 및 대뇌피질 신경세포에  $A\beta$ 를 24시간 처리 후, TBA 5  $\mu$ M을 3시간 처리하였다. Western blot을 통해 확인하였다.

(C) Rat 해마 신경세포의 acetylated tubulin의 western 밴드의  $\beta$ -actin 대비 정량결과이다. (n=3)

(D) Rat 대뇌피질 신경세포의 acetylated tubulin의 western 밴드의  $\beta$ -actin 대비 정량결과이다. (n=3)

(E) Rat 해마 신경세포에  $A\beta$ 를 24시간 처리 후, TBA 5  $\mu$ M을 3시간 처리하였다. 미토콘드리아의 평균이동속도를 live cell imaging을 통해 관찰분석하였다. (n=3)

## 고찰

알츠하이머 병 (AD; Alzheimer's Disease)은 고연령 군에서 신경세포의 사멸 및 기능저하가 진행되는 퇴행성 신경질환이다. AD의 병인기작과 그에 대한 치료법의 연구가 다방면에서 진행되고 있으나 구체적으로 밝혀진 바는 없다. 이 질병의 주요 병인 중 하나인 베타 아밀로이드 단백질 ( $A\beta$ ; Amyloid Beta protein)은 신경세포에 전방위적인 손상을 입히는 것으로 보고되어 있으며, 특히 활성산소종 (ROS; Reactive Oxygen Species)의 과도한 생성을 방조하여 질병을 진행시키는 것으로 알려져 있다 [9, 10]. ROS는 높은 반응성으로 직접적인 단백질 및 소기관의 손상을 입히거나, 세포 신호전달계의 교란을 통해 세포 항상성에 치명적인 영향을 준다 [11–13].

$A\beta$ 에 의해 증가된 ROS를 제거하는 기작으로는 항산화기능을 하는 단백질들의 작용이 주로 알려져 있으며, superoxide dismutase, catalase, GSH peroxidase, peroxiredoxin 등과 같은 효소들이 세포 내 방어기전에 기여한다. 이 중, peroxiredoxin은 AD에서 과발현 되어있는 효소인 Histone deacetylase 6 (HDAC6)의 기질로 항산화능이 HDAC6의 활성화에 의해 조절된다.

HDAC6는 AD상황에서 미세소관의 단위체인  $\alpha$ -tubulin의

acetylation을 과도하게 감소시켜 축삭수송을 저해한다. 하지만 이는 HDAC6의 저해제인 tubastatin A에 의해 감소된 acetylation과 수송능력이 회복될 수 있다고 밝혀진 바 있다 [23]. 이는 특정 단백질의 번역 후 수식화 (PTM; post transcriptional modification)의 조절로 AD 병인을 완화시키는 접근법이라 할 수 있다.

AD환자의 뇌에서 peroxiredoxin 1, 2의 발현이 증가되어있음이 보고 되어 있으며, 과도한 ROS를 제거하기 위한 보상성 발현이라고 연구자들은 예상하고 있다 [40, 41]. 하지만, AD에서 peroxiredoxin의 acetylation의 변화나 활성의 증감에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 상황이다.

위와 유사한 맥락에서 AD 상황에서 HDAC6에 의해 조절되는 peroxiredoxin의 acetylation이  $A\beta$ 에 의해 감소되어 있을 것이라 예상하였다. 또, HDAC6를 저해함으로써 활성산소 제거능을 증가시켜  $A\beta$ 에 의한 손상을 회복시키고자 하였다.

peroxiredoxin의 acetylation이  $A\beta$ 를 처리하였을 때 감소하며, TBA로 인해 회복되는 것을 HT22 세포주와 해마신경세포에서 확인하였다. peroxiredoxin은 여러 가지 isotype이 존재하며, 이 중 HDAC6의 기질로 밝혀진 것은 type 1, 2이다 [24]. 하지만 그 외의 isotype이 HDAC6의 기질이 아니라는 증명 또한 없었다. 본 연

구에서 western blot으로 감지한 peroxiredoxin의 acetylation 신호는 특정 isotype의 것이 아닌 total level 이기 때문에, TBA에 의해 주요하게 영향을 받는 isotype이 무엇인지를 확인하는 보충실험이 필요하다. 하지만, 위에 밝힌 대로 AD brain에서 발현의 변화가 있는 isotype은 1, 2 이고, 이 두 isotype이 HDAC6의 기질이라는 보고로 미루어 보아 다른 isotype이 관여되어있을 가능성은 적다고 예상할 수 있다.

peroxiredoxin의 total acetylation 회복이 세포 내 활성산소를 감소시킴을 DCFDA 방법으로 확인하였다. HDAC6 저해제가 활성산소 감소를 통해 AD 병인개선에 기여할 수 있음을 시사하는 결과로, 기존의 축삭수송 회복에만 주목하던 연구 방향에 새로운 길을 제시하고 있다. 하지만 이는 peroxiredoxin의 acetylation과의 연관성을 보이기엔 간접적인 데이터로, 좀 더 직접적인 증명을 위해서는 acetylation site mutant를 이용한 실험을 통해 활성산소 제거능과의 연결고리를 보여야 할 것이다. 후속연구로 acetylation site mutant construct를 제작 중이며, 앞으로 실험이 진행되면 AD의 주요 병인인 A $\beta$ 에 의한 세포스트레스를 경감시킬 수 있는 기작을 찾는 데 기여할 수 있을 것이라고 예상된다.

ROS와 칼슘 (Ca<sup>2+</sup>; Calcium ion)은 AD상황에서 세포 내부에 축

적되는 물질들로 세포항상성을 망가트린다. 이 둘은 서로를 상향 및 하향조절을 하는 특징을 가지며 밀접하게 연결되어 있다. 기존 연구에서는 A $\beta$ 에 의해 증가된 Ca<sup>2+</sup>이 ROS의 생성을 증가시키는 경로가 주로 연구되어 왔다. Ca<sup>2+</sup>은 미토콘드리아의 전자전달계 중 complex IV를 저해하며, nitric oxide synthase를 저해하여 ROS 생성을 증가시킨다 [8, 42]. 하지만 그 반대 경로도 신경세포에서 연구가 진행되어 있으며, ROS에 의한 활면소포체의 ryanodine receptor의 자극을 통해 세포 내 Ca<sup>2+</sup>이 증가된다는 보고가 있다 [30, 31]. HDAC6와 Ca<sup>2+</sup>의 변화에 대한 직접적인 연결고리가 아직 밝혀진 바 없어, ROS에 의한 Ca<sup>2+</sup>의 하향조절을 예상하고 설계한 실험으로 이를 증명하였다. 하지만 이 외에도 HDAC6 저해가 Ca<sup>2+</sup>의 변화에 있어 또 다른 경로가 관여 되어 있을 것이며, 그러한 가능성들을 완전히 배제할 수는 없다.

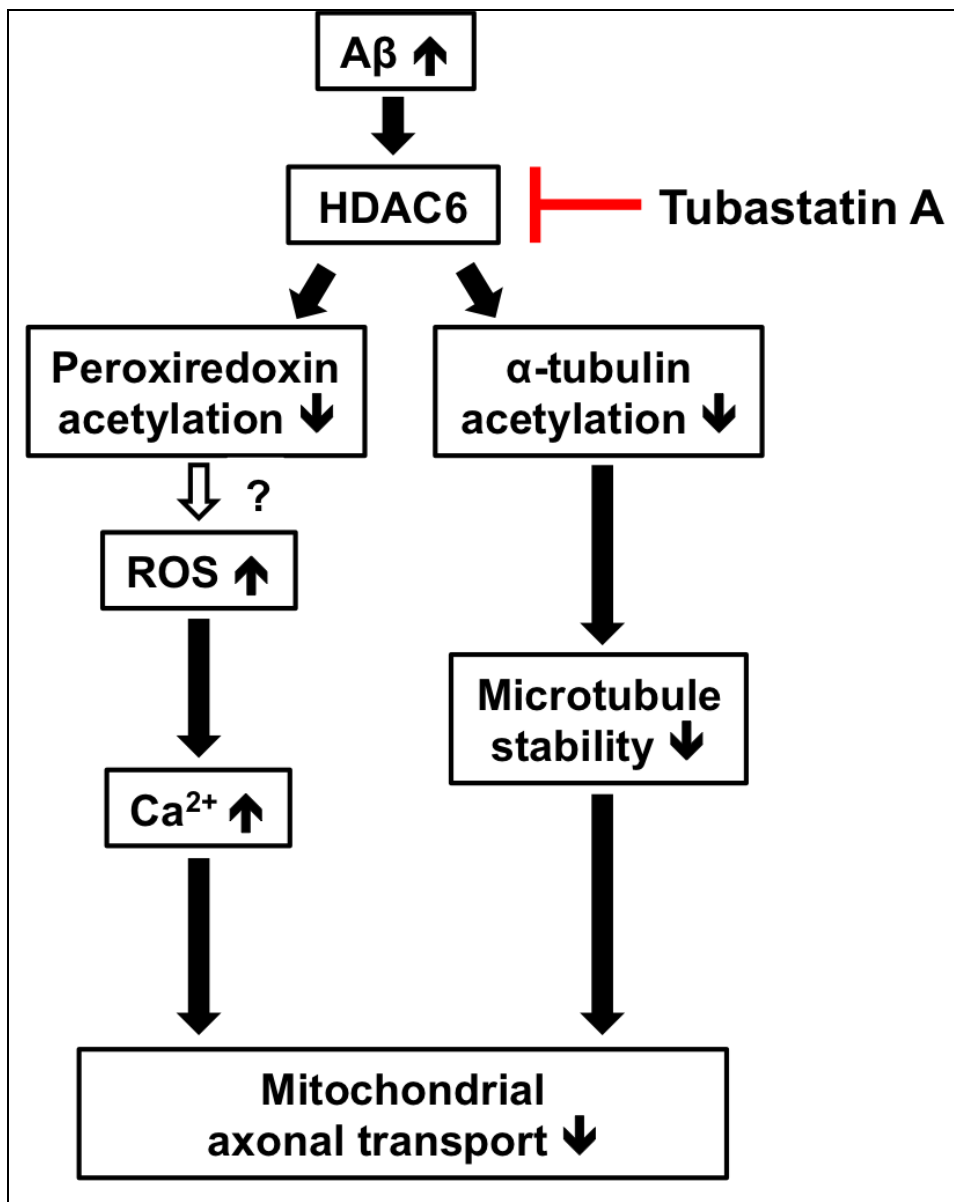
증가된 Ca<sup>2+</sup>에 의해 kinesin, milton, miro와 같은 운동단백질 및 연결단백질이 미세소관에서 유리된다는 사실은 밝혀진 바 있다 [27]. 본 연구에서 나온 결과들을 종합해보면, HDAC6의 저해에 의한 축삭수송의 회복은 peroxiredoxin의 항산화능 회복에 기인한다고 생각할 수 있다. A $\beta$ 에 의해 증가되었던 ROS와 Ca<sup>2+</sup>이 정상수준으로 돌아가게 된다. 이로 인해, 운송체와 미세소관을 연결하는

단백질 간의 친화력이 회복됨으로 축삭수송이 회복되었다고 예측할 수 있다 (그림 6). TBA에 의한 축삭수송 회복은 현재까진 주로 tubulin acetylation 증가로 인한 축삭의 안정화에 의한 것으로 알려져 왔다 [43, 44]. 하지만 본 연구에서 또 다른 기질인 peroxiredoxin이 축삭수송에 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 live cell imaging 방법으로 보여주었다. peroxiredoxin과 축삭수송의 관계에 대한 가설을 더 공고히 다지기 위해서, 마찬가지로 acetylation site mutant를 이용한 추가실험을 계획 중이다.

본 연구에서는 AD 치료제 개발을 위한 western blot과 live cell imaging을 이용한 HDAC6 저해제 스크리닝 방법을 확립하였다. 본 방법을 통하여 약물 처리에 의한 acetylation의 증감관찰에서 더 나아가, in vitro에서 신경세포의 축삭을 재현하여 약물이 생체 내에서 신경세포를 개선시킬 수 있는 축삭수송 개선능력을 평가할 수 있다. 약물의 저해력과 그로 인한 세포 수준의 효과까지 살필 수 있는 본 연구의 스크리닝 방법은 HDAC6 저해제의 적합한 평가방법이라고 할 수 있다. 하지만 1차 신경세포를 사용하기 때문에, 세포주를 사용할 때보다 비용과 시간이 더 들어 실험 반복수를 무한히 늘릴 수 없다는 단점이 있다. 이를 해결하고자 본 연구에서 TBA에 의해 HT22 세포주의 ROS가 회복되는 결과를 바탕으로, 이를 이용한 새

로운 스크리닝 방법을 준비 중이다. 선별된 물질들은 AD 형질전환 동물에게 복강투여 하여 행동실험 및 조직연구를 계획 중이며, 이미 TBA를 AD 형질전환동물에게 복강투여 하였을 때, 기억력이 개선되는 현상 [22]이 보고되어 있어서 이 연구를 참고로 동물실험을 진행할 예정이다.

이상의 결과들을 바탕으로, 본 연구에서는 HDAC6의 활성을 저해하는 것이  $A\beta$ 에 의해 유도된 활성산소종, 칼슘의 증가 및 비정상적인 축삭수송을 회복시킴을 밝혔다. 최근 알츠하이머 병 치료제 개발 목표 단백질로 각광받고 있는 HDAC6의 역할을 활성산소종과 축삭수송의 관점에서 풀어나간 점에서 본 연구의 의미가 있다고 사료된다.



(그림 6) HDAC6 저해제가 축삭수송에 미치는 영향의 모식도



## 참 고 문 헌

1. Ott, A., et al., *Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study.* BMJ, 1995. **310**(6985): p. 970-3.
2. LaFerla, F.M. and S. Oddo, *Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction.* Trends Mol Med, 2005. **11**(4): p. 170-6.
3. Tomlinson, B.E., *The pathology of dementia.* Contemp Neurol Ser, 1977. **15**: p. 113-53.
4. Selkoe, D.J., *Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease.* Nature, 1999. **399**(6738 Suppl): p. A23-31.
5. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy.* Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 741-66.
6. LaFerla, F.M., *Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease.* Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(11): p. 862-72.
7. Arispe, N., H.B. Pollard, and E. Rojas, *Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10573-7.
8. Brookes, P.S., et al., *Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle.* Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(4): p. C817-33.
9. Hensley, K., et al., *A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(8): p. 3270-4.
10. Combs, C.K., et al., *beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis.* J Neurosci, 2001. **21**(4): p. 1179-88.
11. Liu, J., et al., *Memory loss in old rats is associated with brain*

- mitochondrial decay and RNA/DNA oxidation: partial reversal by feeding acetyl-L-carnitine and/or R-alpha -lipoic acid.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 2356-61.
12. Stadtman, E.R., *Protein oxidation and aging.* Science, 1992. **257**(5074): p. 1220-4.
  13. Muller, F., *The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: Its relevance to aging.* J Am Aging Assoc, 2000. **23**(4): p. 227-53.
  14. Janke, C. and M. Kneussel, *Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton.* Trends Neurosci, 2010. **33**(8): p. 362-72.
  15. Fukushima, N., et al., *Post-translational modifications of tubulin in the nervous system.* J Neurochem, 2009. **109**(3): p. 683-93.
  16. Rice, S.E. and V.I. Gelfand, *Paradigm lost: milton connects kinesin heavy chain to miro on mitochondria.* J Cell Biol, 2006. **173**(4): p. 459-61.
  17. Stokin, G.B., et al., *Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease.* Science, 2005. **307**(5713): p. 1282-8.
  18. Hempen, B. and J.P. Brion, *Reduction of acetylated alpha-tubulin immunoreactivity in neurofibrillary tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease.* J Neuropathol Exp Neurol, 1996. **55**(9): p. 964-72.
  19. Henriques, A.G., et al., *Abeta promotes Alzheimer's disease-like cytoskeleton abnormalities with consequences to APP processing in neurons.* J Neurochem, 2010. **113**(3): p. 761-71.
  20. Zhang, L., S. Sheng, and C. Qin, *The role of HDAC6 in Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis, 2013. **33**(2): p. 283-95.
  21. Ding, H., P.J. Dolan, and G.V. Johnson, *Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau.* J Neurochem, 2008. **106**(5): p. 2119-30.
  22. Zhang, L., et al., *Tubastatin A/ACY-1215 improves cognition in Alzheimer's disease transgenic mice.* J Alzheimers Dis, 2014.

- 41(4): p. 1193–205.
23. Kim, C., et al., *HDAC6 inhibitor blocks amyloid beta-induced impairment of mitochondrial transport in hippocampal neurons*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42983.
  24. Parmigiani, R.B., et al., *HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(28): p. 9633–9638.
  25. Georgiou, G. and L. Masip, *Biochemistry. An overoxidation journey with a return ticket*. Science, 2003. **300**(5619): p. 592–4.
  26. Fang, C., D. Bourdette, and G. Banker, *Oxidative stress inhibits axonal transport: implications for neurodegenerative diseases*. Mol Neurodegener, 2012. **7**: p. 29.
  27. Wang, X. and T.L. Schwarz, *The mechanism of Ca<sup>2+</sup> - dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility*. Cell, 2009. **136**(1): p. 163–74.
  28. Park, J.W., et al., *Microfluidic culture platform for neuroscience research*. Nat Protoc, 2006. **1**(4): p. 2128–36.
  29. Arispe, N., E. Rojas, and H.B. Pollard, *Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 567–71.
  30. Liu, X., et al., *Role of leaky neuronal ryanodine receptors in stress-induced cognitive dysfunction*. Cell, 2012. **150**(5): p. 1055–67.
  31. Hidalgo, C., et al., *A role for reactive oxygen/nitrogen species and iron on neuronal synaptic plasticity*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(2): p. 245–55.
  32. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radic Biol Med, 1999. **26**(9–10): p. 1231–7.
  33. Ricci, A.J., Y.C. Wu, and R. Fettiplace, *The endogenous calcium buffer and the time course of transducer adaptation in auditory*

- hair cells*. J Neurosci, 1998. **18**(20): p. 8261–77.
34. Hengst, U., et al., *Axonal elongation triggered by stimulus-induced local translation of a polarity complex protein*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(8): p. 1024–30.
  35. Takemura, R., et al., *Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau*. J Cell Sci, 1992. **103** ( Pt 4): p. 953–64.
  36. Kalebic, N., et al., *Tubulin acetyltransferase alphaTAT1 destabilizes microtubules independently of its acetylation activity*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(6): p. 1114–23.
  37. Hubbert, C., et al., *HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase*. Nature, 2002. **417**(6887): p. 455–8.
  38. Leroux, M.R., *Tubulin acetyltransferase discovered: ciliary role in the ancestral eukaryote expanded to neurons in metazoans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21238–9.
  39. De Vos, K.J., et al., *Role of axonal transport in neurodegenerative diseases*. Annu Rev Neurosci, 2008. **31**: p. 151–73.
  40. Krapfenbauer, K., et al., *Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders*. Brain Res, 2003. **967**(1–2): p. 152–60.
  41. Kim, S.H., et al., *Protein levels of human peroxiredoxin subtypes in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome*. J Neural Transm Suppl, 2001(61): p. 223–35.
  42. Camello-Almaraz, C., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(5): p. C1082–8.
  43. Zilberman, Y., et al., *Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 19): p. 3531–41.
  44. Chen, S., et al., *HDAC6 regulates mitochondrial transport in hippocampal neurons*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10848.

# Abstract

The major pathological feature of Alzheimer' s disease (AD) is extracellular accumulation of beta-amyloid protein ( $A\beta$ ). Excessive  $A\beta$  results in axonal transport inhibition in neuronal cells and increased production of reactive oxygen species (ROS), which are responsible for AD. Decreased axonal transport can be recovered through HDAC6 inhibition.

In this study, we revealed that anti-oxidant protein peroxiredoxin, one of HDAC6' s substrates, is malfunctioning in AD condition. To further clarify its ultimate outcome, we treated  $A\beta$  and HDAC6 inhibitor tubastatin A (TBA) to HT22 cell line. As a result, we observed an increase in intracellular ROS, and downregulation of intracellular calcium ion ( $Ca^{2+}$ ) level cause by high level of ROS. Moreover, by using live cell imaging method, we demonstrated that ROS and  $Ca^{2+}$  rise in cell causes axonal transport breakdown.

In addition, we set up HDAC6 inhibitor screening method using western blot and live cell imaging, based on the previous study

reporting axonal transport in AD can be reversed by treating HDAC6 inhibitor.

These results indicate that not only  $\alpha$ -tubulin which is major substrate of HDAC6, takes part in axonal transport dysfunction but also peroxiredoxin does, too.

---

**Keywords:** Alzheimer's disease, histone deacetylase 6, peroxiredoxin, mitochondria, axonal transport, reactive oxygen species, calcium

**Student number:** 2013-21769