

아밀로이드 베타에 의한 신경세포 사멸과 이에 대한 열충격 단백질 90의 세포 보호효과

이현정, 김도희, 김옥현, 정윤희, 김경용, 김성수, 이원복
중앙대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : 본 연구에서는 열충격 단백질 90이 아밀로이드 베타에 의한 신경세포 사멸에 대해 나타내는 보호효과의 분자적 기전을 알아보고자 하였다.

사람의 신경모세포종 SK-N-SH 세포를 이용하였고, 실험을 위하여 AlamarBlue assay, Western blotting assay, Immunofluorescence assay 등을 수행하였다.

그 결과 아밀로이드 베타를 세포에 처리한 경우 세포 사멸이 일어났으며, 이 때 온화한 열충격에 의해 HSP90의 발현이 증가할 경우 신경세포 사멸이 저해되는 것을 확인하였다. 이 때 존재하는 HSP90의 기능이 무엇인지 알아보기 위해 HSP90의 세포 내 위치를 확인하였는데, 온화한 열충격이 주어질 때 HSP90은 사립체 내에서 특히 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 HSP90의 발현이 증가하거나 외부에서 처리해 주는 경우 Bcl-2의 발현이 증가하였고, 반대로 HSP90 antisense oligonucleotide를 처리하여 HSP90의 발현을 억제시킨 경우 Bcl-2의 발현이 감소하였다. 그러나 Bcl-2와는 다르게 Bax의 경우는 HSP90의 발현 증감과는 상관없이 없었다. 더욱이 HSP90의 발현이 증가한 경우 아밀로이드 베타에 의해 감소되는 사립체 막전위차가 대조군과 유사한 수준으로 유지되는 것을 관찰할 수 있었고, 반대로 HSP90 antisense oligonucleotide를 처리한 경우 아밀로이드 베타에 의한 사립체 막전위차 감소를 더욱 크게 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과는 HSP90이 chaperone 단백질로서 신경독성물질에 의해 나타나는 신경세포 손상을 효과적으로 저해하고, 세포를 보호하고 있음을 보여준다.

찾아보기 낱말 : 아밀로이드 베타, HSP90, 사립체, Bcl-2, Bax, 세포사멸

서론

알츠하이머질환(Alzheimer's disease, AD)은 공통적이고, 복잡한 과정으로 발병하는 신경퇴행성 질환이다. 전 세계적으로 대략 1,500만 명 정도 앓고 있는 것으로 판단되며, 65세 이상의 인구에서는 연간 0.5%, 85세 이상의 인구에서는 연간 8% 정도의 발병률을 나타낸다(Geldmacher 등 1996, Mayeux와 Sano 1999). 사람들의 수명이 연장됨에 따라 알츠하

이머 질환은 더욱 의학적인 문제와 사회적 문제로 대두되고 있다. 알츠하이머질환은 기억력, 언어적 능력과 동시에 행동적인 능력이나 감성적인 능력 및 사회성 등의 점진적이고 지속적인 감퇴 현상을 나타낸다. 이는 치매의 가장 공통적인 현상이며, 인지능력 감퇴와 더불어 나타나는 현상이다(Hofman 등 1997).

알츠하이머질환의 가장 주요한 병리학적 특징은 42개의 아미노산으로 이루어져 있는 아밀로이드 베타 펩티드(A β)의 광대한 침착의 존재다. 이는 특히 학습이나 기억능력과 관련되어 있는 뇌의 부위에 신경돌기판(neurite plaque)을 구성 한다(Soto 등 1994, Sisodia와 Price 1995, Forloni 등 1996). 아밀로

*본 연구는 2007학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

교신저자: 이원복(중앙대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: whitefox@cau.ac.kr

이드베타는 아밀로이드전구단백질 (amyloid precursor protein, APP)이라는 제1형 내재성 막단백질에서 부터 유래된 단백질 분해효소에 의한 대사산물로서 세포외영역과 막영역으로 이루어져 있는 39~43개의 펩티드이다(Kang 등 1987). 아밀로이드 전구단백질은 2번의 단백질 분해를 거쳐서 아밀로이드 베타가 된다. 처음에 β -secretase라고 불리는 단백질 분해효소에 의해 아밀로이드 베타 영역의 아미노 말단이 잘려져 용해성 부분인 APPs와 막에 부착된 C99 조각을 형성 한다(Vassar 등 1999). 그 다음으로 두 번째 단백질 분해효소인 γ -secretase가 막 사이에 존재하는 c99를 잘라서 아밀로이드 베타를 형성하여 세포로부터 배출한다.

최근에 연구된 바에 의하면 아밀로이드 베타는 생체 조건 내외 실험실 조건 모두에서 신경독성을 가지고 있음이 알려졌다. 특히 합성된 아밀로이드 베타($A\beta_{1-40}$, $A\beta_{25-35}$)나 그들의 응집체 또한 쥐의 해마부위 신경세포와 배양한 신경세포 모두에서 독성을 나타내었다(Yankner 등 1990, Mattson 등 1992, Pike 등 1993, Takashima 등 1993, Behl 등 1994, Shearman 등 1994). 합성된 $A\beta_{1-40}$ 와 알츠하이머질환을 가진 환자의 뇌에서 얻은 아밀로이드판 중심부위를 쥐의 대뇌에 주입하였을 때 알츠하이머에 특이적으로 나타나는 신경세포 사멸을 유발하였다(Frautschy 등 1991, Kowall 등 1991). 현재까지 아밀로이드 베타에 의해 유도되는 신경세포 사멸 과정에 관한 연구들이 많이 이루어져왔지만, 아밀로이드 베타에 의해 유도되는 신경세포 손상을 효과적으로 저해하거나 아밀로이드 베타로부터 신경세포를 보호할 수 있는 치료 방법이 미미한 상태이다.

열충격은 열충격 단백질 (heat shock protein, HSPs)이라 불리는 다양한 단백질들의 발현을 빠르게 유도한다. 이러한 열충격 단백질은 세포의 스트레스에 대해 견딜 수 있게 하고, 단백질들의 구조를 안정화할 수 있는 chaperone으로서의 역할을 담당한다. 이러한 단백질 중의 하나가 heat shock protein 90 (HSP90)인데, 다양한 세포 내 단백질들의 세포 내 이동이나 활성화와 성숙화를 조절하는 것으로 알려져 있다. 더욱이 HSP90은 대부분의 세포에 풍부하게 존재하고, 열충격이나 세포 내 스트레스에 의해

발현이 더욱 증가한다. HSP90은 신경세포를 비롯한 다양한 형태의 세포를 보호할 수 있다. 그러나 지금까지 아밀로이드 베타와 HSP90을 이용한 연구에 대해서는 자세히 알려진 바가 없다.

본 연구에서는 아밀로이드 베타에 의한 신경세포 사멸과정을 확인하고, 특히 HSP90이 사립체를 경유하는 보호작용을 나타냄을 확인하였다. 이러한 결과는 HSP90이 아밀로이드 베타에 의한 사립체 막전위차 감소와 Bcl family 단백질들을 조절할 수 있음을 의미하는 결과이다.

재료 및 방법

1. 세포배양

사람의 신경모세포종 SKN-SH를 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL, CA, USA)을 넣은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco-BRL)배양액으로 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 37°C 조건으로 배양한다. 배지는 아밀로이드 베타($A\beta$, 20 μ M)를 처치하기 2시간 전에 1% fetal bovine serum이 들어있는 DMEM 배지로 바꾸어준다.

2. 시약준비

아밀로이드 베타 1-42 ($A\beta_{1-42}$)는 Biosource (CA, USA)에서 구입하였고, phosphate buffered saline (PBS)으로 용해시켜 사용하였다. $A\beta_{1-42}$ 를 사용하기 전에 37°C에서 1일간 배양하여 aging을 하였다. $A\beta_{1-42}$ 는 10 μ M로 사용하였고, 이 농도는 36시간에 50%정도의 세포 생존율을 보인다. HSP90은 stress-gen (Ann Arbor, Michigan, USA)에서 구입하였고, $A\beta_{1-42}$ 처치하기 2시간 전에 각각의 지시된 농도대로 사용하였다.

3. 세포 생존율 측정 (AlamarBlue test)

SKN-SH 세포는 96-well plates (Nunc, Slangerup, Denmark)에 15,000 cells/well의 밀도로 깔아주고 24 시간 동안 배양한다. 세포에 $A\beta$ 처치하기 2시간 전에 배지를 1% fetal bovine serum이 들어 있는 DM-

EM으로 알아준다. 이후 AlamarBlue (Serotec, Oxford, UK)를 10 μ L 처리한 후 3시간 배양하고 ELISA Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배경 흡광도는 600 nm에서 측정하여 값을 빼준다. 세포 생존율은 다음과 같은 공식을 이용하였다.

$$\frac{(test\ sample\ count) - (blank\ count)}{(untreated\ control\ count) - (blank\ count)} \times 100$$

(Shimoke와 Chiba 2001).

4. Western blot 분석

아밀로이드 베타를 처리한 세포들로부터 배양액을 제거한 후 RIPA buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM Na_3VO_4 , 40 mM NaF, 5 mM EGTA, 0.2% SDS, 0.2 mM PMSF, 100 μ M Leupeptin)로 용해하고 원심하였다. 상층액에 존재하는 단백질을 정량하여 일정량의 단백질을 8~12% SDS-polyacrylamide gel에서 분리하였다. Gel에서 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane에 옮기고 Bcl2, Bax (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 항체를 1:1000의 비율로 희석하여 4시간 반응시켰다. 0.1% TBS 완충액 (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 10분간 3회 수세하여 1차 항체를 제거한 후, peroxidase가 붙어 있는 2차 항체를 1시간 반응시켰다. 다시 0.1% TBS 완충액으로 10분간 3회 수세한 후, enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK)을 사용하여 항체와 결합한 단백질을 필름에 감광시켜서 결과를 관찰하였다.

5. 사립체 막전위차 측정

사립체 막전위 (mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$)의 변화를 측정하기 위하여 tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 이용하였다. $\Delta\Psi_m$ 을 측정하기 위하여 TMRE 100 nM을 15분간 37°C에서 배양하고 TMRE 형광 세기를 fluorometer (TECAN, GENios)를 이용하여 excitation 549 nm, emission 574 nm에서 측정하

였다. $\Delta\Psi_m$ 의 세기는 상대적인 값으로 표현하였다.

6. 면역형광염색법

세포를 메탄올과 아세톤 1:1 혼합 용액으로 실온에서 5분간 고정하고 PBS로 3번 수세한다. 세포는 내부의 peroxidase를 제거하기 위해 0.1 M PB-3% H_2O_2 로 5분간 배양한 후 10% normal goat serum (ABC kit, Zymed, San Francisco, CA, USA)로 1시간 동안 배양한다. 세포는 rabbit anti-cytochrome c antibody (1:100)를 4°C에서 밤새 배양한다. 이후 fluorescence-tagged secondary antibodies (Alexa 594, Molecular probes, Oregon, USA)로 37°C에서 1시간 배양한 후 사립체의 위치를 확인하기 위하여 MitoTracker Green FM (Molecular probes, USA)로 20분간 배양한다. 표본제작용 용액으로 표본을 제작하여 공초점현미경 (LSM 510 meta, Zeiss, Feldbach, Switzerland)하에서 관찰하였다.

7. 통계처리

모든 자료는 mean (S.E.M)으로 표시하였고, 실험군 간의 차이는 Student's *t*-test를 이용하여 확인하였다.

결 과

1. $A\beta_{1-42}$ 에 의해 유도되는 신경세포 사멸과 Heat Shock Protein 90의 세포 보호효과

아밀로이드 베타 1-42 ($A\beta_{1-42}$)에 의한 신경세포 사멸에 대한 HSP90의 효과를 알아보기 위하여, 세포 생존율 측정 방법으로 AlamarBlue assay를 실시하였다 (Fig. 1). 정상적인 상황에 $A\beta_{1-42}$ 를 10 μ M 처리한 경우 24시간 이내에 약 40% 정도의 세포 생존율이 감소하고 시간에 따라 사멸이 더욱 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 42°C로 온화한 열충격을 30분간 주고, 37°C에서 5시간 더 배양하여 HSP의 발현을 유도한 경우 $A\beta_{1-42}$ 에 의한 세포 사멸이 20% 이상 억제되었다. 특히 온화한 열충격으로 HSP이 발현된 경우 $A\beta_{1-42}$ 에 의한 세포 사멸이 36시간

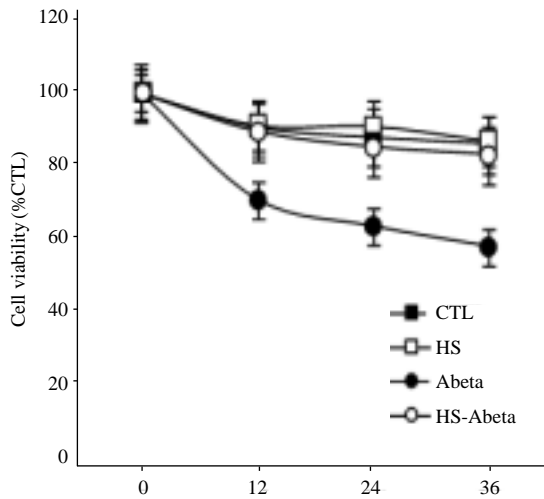


Fig. 1. Effect of mild heat shock on A β -induced neuronal apoptosis. Cells were untreated (A β) or treated with 10 μ M A β ₁₋₄₂. Heat-shocked (heat shock for 30 min at 42°C and recovery for 5 h at 37°C) cells were treated with 10 μ M of A β ₁₋₄₂. Values, presented as percentage of control cells incubated with vehicle, are mean \pm S.E.M of five separate experiments.

이상 지속이 되는 것을 확인할 수 있었다.

2. A β ₁₋₄₂에 의한 신경세포 사멸 시 HSP90의 세포 속 위치 변화

앞서 A β ₁₋₄₂에 의한 신경세포 사멸을 HSP 발현이 효과적으로 저해할 수 있음을 확인하였다. HSP는 HSP27, HSP70, HSP90 등 그 구조와 기능에 따라 여러 종류가 존재한다. 하지만 본 연구자는 기존에 HSP90이 다른 HSP들 보다도 더 우세하게 신경세포 보호작용을 할 수 있음을 발표하였다 (Lee 등 2001). 따라서 본 연구에서는 HSP90의 세포 보호작용을 주요하게 확인을 하였고, A β ₁₋₄₂에 의한 신경세포 사멸 시 HSP90의 세포 내 위치를 확인해 보고자 하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 세포 내 사립체의 위치의 표지자인 mitotracker와 HSP90 항체를 이용하여 면역형광염색법을 시행하여 HSP90의 발현이 증가함에 따른 세포 내 위치 변화를 확인하였다. 그 결과 정상적인 배양 상태인 37°C에서는 HSP90

의 발현이 적게 나타나고, 위치도 세포질 쪽보다는 핵 주변 부위에 약하게 존재하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2A, B, C). 하지만 42°C에서 30분간 온화한 열충격을 준 경우 HSP90의 발현이 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 이는 mitotracker와 같은 위치에 존재, 즉 사립체로 위치 이동을 하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2D, E, F).

3. HSP90의 Bcl family 단백질 발현에 대한 영향

본 연구자는 HSP90의 사립체로의 이동이 사립체의 보호 및 손상과 깊은 연관이 있는 Bcl family 단백질들의 발현에도 영향을 미칠 수 있는 지 알아보기 위하여 정상 배양 상태와 온화한 열충격으로 HSP90을 발현시킨 상태에서의 Bcl family 단백질의 발현 양상을 확인하였다 (Fig. 3). HSP90은 정상적인 배양 상태에서는 낮게 발현되지만 42°C의 온화한 열충격을 주는 경우 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 6시간 전 처리한 HSP90 anti-sense oligonucleotide에 의해 HSP90의 발현이 현저하게 감소되는 것을 확인하였다. 이 때 Bcl family 중 대표적인 antiapoptotic 단백질인 Bcl-2와 proapoptotic 단백질인 Bax의 발현을 확인하였는데, Bcl-2의 경우 정상에서 높게 발현되지만 A β ₁₋₄₂를 처리한 경우 발현이 감소되는 것을 알 수 있었고, 반대로 HSP90을 처리하거나 열충격으로 HSP90을 발현시킨 경우 Bcl-2의 발현이 다시 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 HSP90의 anti-sense oligonucleotide를 전 처리한 경우 HSP90의 발현 억제와 같은 양상으로 Bcl-2의 발현 역시 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 한편 Bax의 경우 A β ₁₋₄₂에 의한 발현이 증가하지만 Bcl-2와는 반대로 HSP90을 처리한 경우 발현이 감소되지 않았고, HSP90의 anti-sense oligonucleotide를 전 처리한 경우에도 Bax의 발현이 크게 증가하지는 않았다. 이는 사립체로 이동한 HSP90이 Bcl family 단백질 중 bcl-2의 발현에는 영향을 미치지 않지만 Bax의 발현에는 관여하지 않음을 보여주는 것이다.

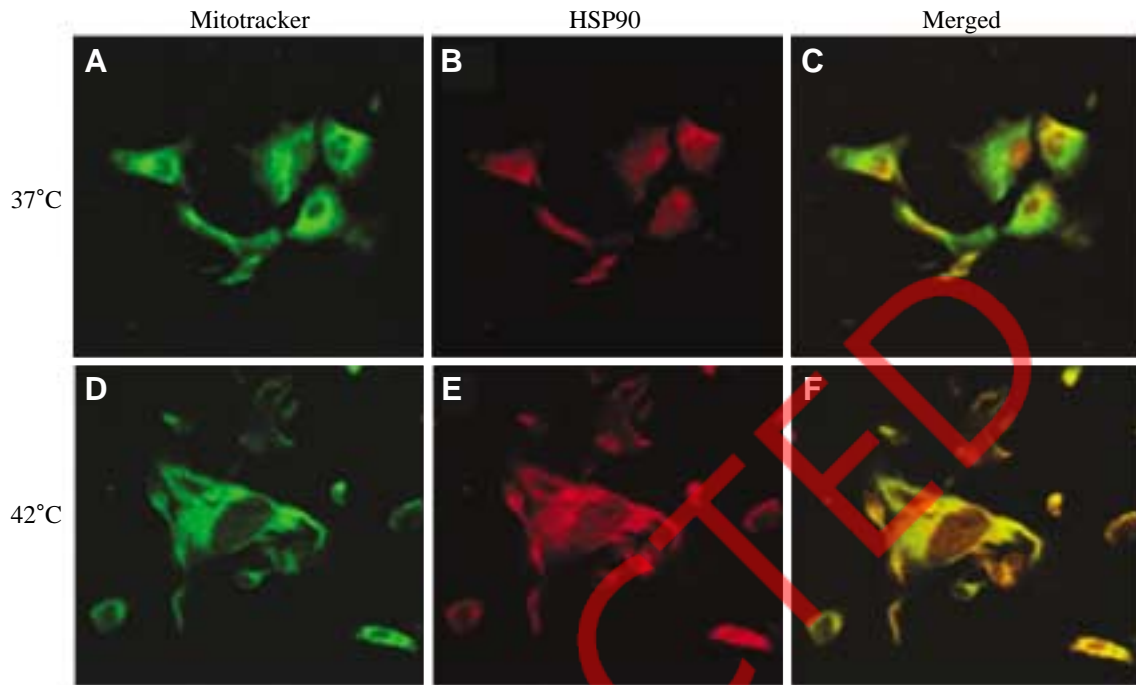


Fig. 2. Translocation of HSP90 into mitochondria in mild heat shocked condition. Localization of HSP90 were detected by immunofluorescence technique using anti-HSP90 antibody as a primary antibody, anti-rabbit IgG as a secondary antibody (B, E). Localization of mitochondria was detected by MitoTracker, as a mitochondrial local marker (A, D). Images were assessed with Confocal Microscope (LSM 510 meta, Zeiss, Feldbach, Switzerland). The data indicate the mean \pm S.E.M of four separate experiments.

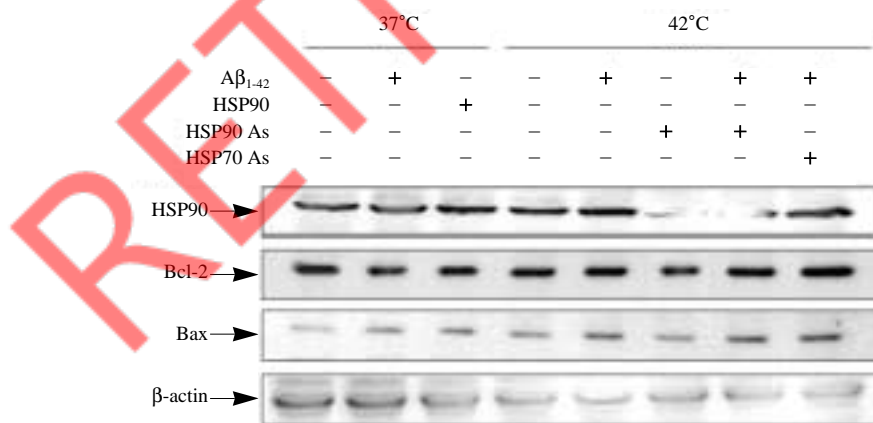


Fig. 3. Western blot analysis of HSP90 induced by mild heat shock in A β_{1-42} -treated SK-N-SH cells. The expression of HSP90 was detected by western blotting with an HSP90 antibody at indicated conditions. 10 μ M of HSP90 and HSP70 anti-sense oligonucleotides were preincubated for 6 h, and then heat-shocked condition for 30 min at 42°C was followed. The levels of β -actin were used as an internal standard for quantifying HSP90, Bcl-2 and Bax expression.

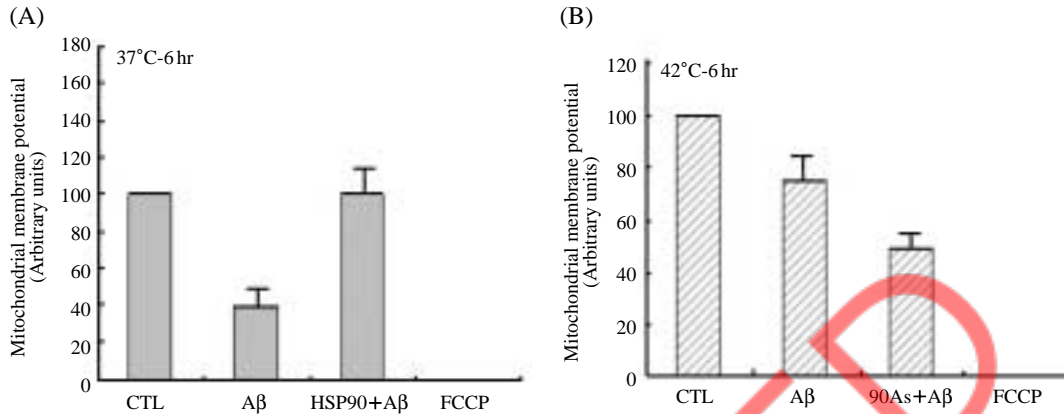


Fig. 4. The effect on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) by pretreatment with mild shock or HSP90 in $A\beta_{1-42}$ treated SK-N-SH cells. Quantification of $\Delta\Psi_m$ with a fluorometer (Tecan, GENios). The intensity of TMRE fluorescence was detected with excitation set at 549 nm and emission set at 574 nm. Fluorescent levels are expressed as arbitrary units of relative value. (A) Cells were cultured in normal condition. (B) Cells were treated with mild heat shock of 42°C. The data indicate the mean \pm S.E.M of four separate experiments.

4. $A\beta_{1-42}$ 에 의한 사립체 막전위차 감소와 HSP90에 의한 보호효과

사립체로 위치 이동한 HSP90이 사립체 보호효과를 나타낼 수 있는 지 알아보기 위하여 사립체 막전위차 ($\Delta\Psi_m$)를 측정하였다. 사립체 손상은 $\Delta\Psi_m$ 감소 여부를 측정하는 것으로 판단할 수 있는데, 본 연구에서는 $\Delta\Psi_m$ 를 측정하기 위하여 TMRE 염색을 실시하였다. Fig. 4A에서와 같이 정상적인 배양 시 $A\beta_{1-42}$ 를 처리한지 6시간 후 $\Delta\Psi_m$ 는 대조군의 40% 수준으로 감소하였다. 그러나 HSP90을 처리한 경우 $A\beta_{1-42}$ 에 의한 $\Delta\Psi_m$ 감소를 완벽하게 억제하여 $\Delta\Psi_m$ 이 대조군 수준으로 유지될 수 있었다. 또한 온화한 열충격으로 HSP90을 발현시킨 경우, $A\beta_{1-42}$ 에 의한 $\Delta\Psi_m$ 감소가 37°C 정상 배양 상태에서 보다 훨씬 적게 일어남을 확인하였고, 이 때 HSP90의 anti-sense oligonucleotide를 6시간 전 처리한 경우 $\Delta\Psi_m$ 감소폭이 크게 증가함을 관찰할 수 있었다. 이는 HSP90이 $A\beta_{1-42}$ 에 의한 $\Delta\Psi_m$ 감소를 억제하여 세포 보호효과를 나타낼 수 있음을 의미하는 결과이다.

고찰

본 연구에서는 알츠하이머 모델을 사람의 신경모세포종인 SK-N-SH에 유도하였다. 알츠하이머병은 대표적인 신경퇴행성 질환 중의 하나이므로, 세포는 물론 동물 모델에서 신경세포 보호 메커니즘을 밝히는 연구는 매우 중요하다. 본 연구자는 세포 내, 외 스트레스에 의해 발현이 증가하는 chaperone 단백질인 HSP90이 시험관 조건에서 신경세포 사멸을 억제하는데, 특히 사립체를 경유한 세포 보호작용을 나타내는 것을 확인하였다.

알츠하이머 환자의 뇌에서 $A\beta$ plaque이나 deposit이 발견되는데, 이는 39~40개 정도의 아미노산으로 구성되고 4kDa이며, 아밀로이드 전구단백질의 절단에 의해 형성된 것으로 알려져 있다 (Selkoe 2001). 알츠하이머 병에서 $A\beta$ plaque의 주요 구성 성분인 $A\beta$ 는 신경세포 손상을 유도하고 자유 라디칼의 발생과 사립체의 산화적 손상, 시냅스의 손상과 염증반응을 통해 인지기능 소실을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Selkoe 2001, Mattson 2004, Reddy와 Beal 2005, Reddy와 McWeeney 2005, Tanzi와 Bertram 2005). 그러나 알츠하이머 병으로 진전되는 분자적 기전은 아직까지 확실하게 알려진 바

가 없다.

최근에 McLellan 등 (2003)에 의해 A β plaque과 자유 라디칼의 발생 사이에 직접적인 연관이 있다는 보고가 있었는데, 그 보고에 따르면 A β plaque이 살아있는 동물 모델이나 알츠하이머를 가진 사람 조직에서 자유라디칼을 생성할 수 있으며, 항산화제를 이용한 치료법이 알츠하이머를 가진 환자를 치료하는데 중요한 방법 중의 하나가 될 것임을 제시하고 있다. Lee 등 (2005)에 의하면 HSP90이 활성기산소를 억제하여 신경세포를 보호하는데, 본 연구 결과에서도 사립체에 존재하는 HSP90이 활성기산소의 발생을 조절하였을 것이라 예상된다.

HSP90은 불안정한 신호 전달자들을 위한 chaperone 역할을 하는 단백질로 알려져 있는데 (Pratt 1998), 세포 사멸과 관련하여 HSP90은 보통 활성화된 NF- κ B의 여러 기작을 통해 세포 생존율을 높이는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Lewis 등 2000). 또한 Akt의 dephosphorylation을 저해하여 Akt가 활성화를 유지하는 데 HSP90이 직접적으로 연관되어 있음이 보고되었다 (Sato 등 2000, Basso 등 2002). 본 연구에서는 HSP90이 사립체 내에 발현에 증가하는 것을 확인하였으며, 이에 의해 Bcl-2와 Bax가 조절되는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 Bcl-2의 경우 HSP90의 발현이 증가함에 따라 발현이 증가되고, HSP90 antisense oligonucleotide 전 처리에 의해 발현이 감소하는 것으로 보아 HSP90과 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다. 현재까지 HSP90이 사립체에 존재하는 것에 대해 확실하게 밝혀진 바가 없지만, Pandey 등 (2000)에 의하면 HSP90은 Apaf-1의 oligomerization을 저해하여 활성화된 apoptosome 형성을 막을 수 있다고 한다. 이는 HSP90이 세포사멸 과정에서 사립체를 경유하는 intrinsic pathway에 관여하고 있음을 보여주는 결과이다.

HSP90과 같이 HSP70의 경우도 세포 보호작용을 하는 것으로 알려져 있는데, HSP70은 세포사멸의 intrinsic pathway와 extrinsic pathway 모두 관여하며, 특히 열에 의한 스트레스나 NO 등에 의해 일어나는 세포사멸 과정에서 Bax가 사립체로 이동하는 것이 HSP70 과발현된 경우 저해되었다 (Gotoh 등 2004,

Stankiewicz 등 2005). 더욱이 intrinsic pathway에서 HSP70은 Apaf-1과 직접적인 결합으로 apoptosome 형성을 억제할 수 있다는 것이 밝혀져 HSP90과 기능면에서 유사하기도 하다 (Beere 등 2000, Saleh 등 2000). 이전에 본 연구팀에서 보고한 바에 따르면 HSP90이 신경독성물질인 3-HK에 의한 신경세포 사멸을 보호할 수 있으며, 이때 caspase 활성화를 억제하였다 (Lee 등 2001). 또한 Lee 등 (2005)에 따르면 3-HK에 의한 활성기산소의 발생을 HSP90이 저해할 수 있었다.

본 연구에서는 A β 에 의한 신경세포 사멸 과정에서 HSP90이 세포 보호작용을 나타낼 수 있으며, 이는 Bcl-2, Bax와 같은 Bcl family 단백질들의 조절을 통한 사립체를 경유하는 과정에 관여할 수 있음을 제시하는 결과이다. 또한 이전 연구를 통해서도 HSP90에 의한 활성기산소 억제 효과와 caspase 활성화 저해 등을 확인하였는데, 이는 HSP90이 신경독성으로부터 신경세포를 보호할 수 있음을 의미한다. 신경세포 사멸을 억제하는 HSP90의 자세한 분자적 기전은 좀 더 연구를 해봐야 알 수 있겠지만, 생체 내 자연적으로 존재하는 chaperone 단백질을 이용한 신경세포 보호 기전에 대한 연구는 알츠하이머를 비롯한 여러 신경퇴행성 질환을 예방하고 치료하기 위한 연구 자료로서 가치가 크다고 할 수 있다.

참 고 문 헌

- Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tschlis P, Rosen N : Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem* 277: 39858-39866, 2002.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR : Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2: 469-475, 2000.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D : Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77: 817-827, 1994.
- Forloni G, Tagliavini F, Bugiani O, Salmona M : Amyloid in

- Alzheimer's disease and prion-related encephalopathies: studies with synthetic peptides. *Prog Neurobiol* 49: 287-315, 1996.
- Frautschy SA, Baird A, Cole GM : Effects of injected Alzheimer beta-amyloid cores in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8362-8366, 1991.
- Geldmacher DS, Whitehouse PJ : Evaluation of dementia. *N Engl J Med* 335: 330-336, 1996.
- Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M : hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ* 11: 390-402, 2004.
- Hofman A, Ott A, Breteler MM, Bots ML, Slooter AJ, van Harskamp F, van Duijn CN, Van Broeckhoven C, Grobbee DE : Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* 349: 151-154, 1997.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B : The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733-736, 1987.
- Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA : An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7247-7251, 1991.
- Lee MW, Lee HJ, Bach JH, Park SC, Park JS, Lee KG, Yeo JH, Lee WB, Lee SH, Kim SS : Down-regulated reactive oxygen species by HSP90 in 3HK-induced SKN-SH cell death. *J Thermal Biol* 30: 43-49, 2005.
- Lee MW, Park SC, Chae HS, Bach JH, Lee HJ, Lee SH, Kang YK, Kim KY, Lee WB, Kim SS : The protective role of HSP90 against 3-hydroxykynurenine-induced neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 261-267, 2001.
- Lewis J, Devin A, Miller A, Lin Y, Rodriguez Y, Neckers L, Liu ZG : Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* 275: 10519-10526, 2000.
- Mattson MP : Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430: 631-639, 2004.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE : beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 12: 376-389, 1992.
- Mayeux R, Sano M : Treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 341: 1670-1679, 1999.
- McLellan ME, Kajdasz ST, Hyman BT, Bacskai BJ : In vivo imaging of reactive oxygen species specifically associated with thioflavine S-positive amyloid plaques by multiphoton microscopy. *J Neurosci* 23: 2212-2217, 2003.
- Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbanda S : Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J*. 19: 4310-4322, 2000.
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW : Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13: 1676-1687, 1993.
- Pratt WB : The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 420-434, 1998.
- Reddy PH, Beal MF : Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res Brain Res Rev* 49: 618-632, 2005.
- Reddy PH, McWeeney S : Mapping cellular transcriptosomes in autopsied Alzheimer's disease subjects and relevant animal models. *Neurobiol Aging* 27: 1060-1077, 2006.
- Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES : Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2: 476-483, 2000.
- Sato S, Fujita N, Tsuruo T : Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10832-10837, 2000.
- Selkoe DJ : Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81: 741-766, 2001.
- Shearman MS, Ragan CI, Iversen LL : Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1470-1474, 1994.
- Shimoke K, Chiba H : Nerve growth factor prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced cell death via the Akt pathway by suppressing caspase-3-like

- activity using PC12 cells: relevance to therapeutical application for Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 63: 402-409, 2001.
- Sisodia SS, Price DL : Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *FASEB J* 9: 366-370, 1995.
- Soto C, Brañes MC, Alvarez J, Inestrosa NC : Structural determinants of the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 63: 1191-1198, 1994.
- Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD : Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* 280: 38729-38739, 2005.
- Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K : Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7789-7793, 1993.
- Tanzi RE, Bertram L : Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120: 545-555, 2005.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M : Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286: 735-741, 1999 .
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA : Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250: 279-282, 1990.

RETRACTED

Abstract

Protective Effect of HSP90 on Neuronal Cell Death-induced by β -Amyloid Peptide

Hyun-Jung Lee, Do-Hee Kim, Ok-Hyun Kim, Yoon-Hee Chung,
Kyung-Yong Kim, Sung-Su Kim, Won-Bok Lee

Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University

In the present study, we determined the protective mechanism of HSP90 against neuronal cell death induced by $A\beta$.

For the evaluation of protective role of HSP90, we used human neuroblastoma SK-N-SH cell lines, examined AlamarBlue assay, Western blot analysis and immunofluorescence assay.

Incubation of SK-N-SH cells with $A\beta$ significantly induced neuronal cell death. However, HSP90 induced by mild heat shock could attenuate neuronal apoptosis in $A\beta$ treated condition. To identify the role of HSP90, we determined localization of HSP90 in SK-N-SH cells. Interestingly, HSP90 was increased and localized in mitochondria as treatment of mild heat shock. Also, treatment or increase of HSP90 largely elevated level of Bcl-2 expression, whereas inhibition of HSP90 with HSP90 antisense oligonucleotide significantly decreased Bcl-2 expression. In contrast to Bcl-2, Bax expression was regulated independently by HSP90. Moreover, increase of HSP90 could attenuate collapse of mitochondrial membrane potential induced by $A\beta$. However, HSP90 antisense oligonucleotide largely increase breakdown of mitochondrial membrane potential induced by $A\beta$.

These data suggest that HSP90 as chaperone protein significantly attenuates neuronal damage and protects neuronal cells from neurotoxin such as $A\beta$.

Key words : Amyloid beta ($A\beta$), HSP90, Mitochondria, Bcl-2, Bax, Apoptosis