

의학 석사학위 논문

Deferoxamine에 의해 유도된
세포노화에서의 거대 미토콘드리아 형성
기전 연구

아주대학교 대학원

의학과

윤동선

Deferoxamine에 의해 유도된
세포노화에서의 거대 미토콘드리아 형성
기전 연구

지도교수 윤 계 순

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2005년 2월

아주대학교 대학원

의학과

윤동선

윤동선의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 조 혜 성 인

심사위원 이 재 호 인

심사위원 윤 계 순 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2004년 12월 22일

Deferoxamine에 의해 유도된 세포노화에서의 거대 미토콘드리아 형성 기전 연구

목적 미토콘드리아는 세포가 필요로 하는 대부분의 에너지를 생산하며 또한 환경의 변화나 요구에 따라 자신의 모양, 이동 및 수가 다양하게 변하는 아주 역동적인 세포내 소기관이다. 본 연구에서는 철 이온 흡착제인 Deferoxamine (DFO)으로 유도시킨 세포노화 과정에서 나타난 거대 미토콘드리아의 형성과정을 조사하고, 이와 함께 동반되어 나타나는 여러 가지 미토콘드리아의 기능 이상 중에 어떤 것이 이 현상을 매개하는지를 조사하며, 또한 미토콘드리아 형태 조절인자들로 알려진 Drp1과 Mfn이 이 과정에서 어떻게 작용하는지를 분석함으로써 세포 노화중에 나타나는 거대 미토콘드리아 형성기전을 이해하고자 한다.

방법 및 재료: Deferoxamine에 의해 유도된 세포노화에서 complex II의 기능손상, 활성산소 증가, 미토콘드리아 DNA의 감소현상이 관찰되었기 때문에 이들 손상에 의한 미토콘드리아 형태에 미치는 효과를 알아보기 위해 hydrogen peroxide (H_2O_2), etidium bromide (EtBr), 2-thenoyltrifluoroacetone (TTFA) 를 Chang 세포에 처리 하거나, 미토콘드리아 DNA가 결핍된 ρ^0 세포주를 구축하여 사용하였고, 전자현미경을 통해서 미토콘드리아 형태를 관찰하였다. 미토콘드리아 형태 조절인자인 Drp1, Mfn1, Mfn2의 발현도를 조사하기 위해 cell lysate 와 SD rat에서 분리한 미토콘드리아에서 Western blot을 시행하였다. Drp1의 조절기전을 알아보기 위하여 Drp1 항체를 이용하여 면역침전을 수행하였고, 이때 GSK3 β 가 같이 면역침전 되는지를 알아보았다. Drp1의 인산화를 조사하기

위하여 인산화된 잔기를 인지하는 항체로 immunoblotting을 시행하였다.

결과: 고농도의 $H_2O_2(1mM)$ 를 Chang 세포에 처리하였을 때는 미토콘드리아가 핵 주변에 모여면서 fragmentation되고, 내막이 소실되면서, 세포가 죽어가는 것이 확인되었으나, 저농도의 $H_2O_2(200\mu M)$ 를 처리하여 세포노화가 유도되는 조건에서는 길어지거나 거대한 미토콘드리아 형성이 유도되는 것이 관찰되었다. 그러나 EtBr을 처리하여 미토콘드리아 DNA에 손상을 유도하거나 미토콘드리아 DNA를 완전히 제거시킨 ρ^0 세포에서는 단지 미토콘드리아들의 내막구조만이 변형된 형태를 갖고 있는 것을 확인하였다. 또한 complex II 억제제인 TTFA를 세포에 처리 하였을 때는 대부분 미토콘드리아의 내막구조가 변형되거나 fragmentation 되는 것을 관찰하였다. 거대 미토콘드리아의 형성은 DFO와 H_2O_2 에 의한 세포노화 모델에서 뿐 아니라 primary human diploid fibroblast를 지속적으로 계대 배양하여 노화를 유도시킨 old HDF에서도 관찰 할 수 있었다. DFO로 유도된 세포노화과정에서 미토콘드리아 분열 조절 인자인 Drp1의 총 발현도의 변화는 없었으나 Mfn2는 일시적으로 증가하였고, H_2O_2 를 처리한 세포군에서는 Drp1의 발현도 감소와 Mfn1과 Mfn2의 발현도 증가가 동시에 나타났다. 또한 old HDF 세포에서도 Drp1의 발현도 감소와 Mfn2의 발현도 증가가 나타났다으며 Mfn1의 발현도에는 변화가 없었다. Mfn1과 Mfn2의 증가는 또한 정상적인 노화과정에 있는 SD rat에서도 관찰하였다. 그러나 EtBr을 처리한 세포군에서는 Drp1과 Mfn2의 발현량에 뚜렷한 변화는 없었다. DFO로 유도시킨 세포노화에서 glycogen의 축적현상이 관찰되었고, 이와 함께 GSK3 β 의 인산화도 증가하는 것이 관찰 되었다. Chang 세포에서는 정상적으로 Drp1이 GSK3 β 와 상호작용하는 것을 면역침전법으로 확인하였고, 특히 DFO를 처리한 세포군에서는 Drp1과 상호작용하고 있는 GSK3 β 의 양이 감소하는 것을 관찰하였다. 또한 Drp1을 면역침전시켜 Drp1의 인산화를 확인하였을 때, tyrosine잔기의 인산화는

DFO처리 하였을 때에도 변화는 없었으나 serine, threonine잔기의 인산화는 감소함이 확인되었다.

결론: 이상의 결과에서 DFO에 의해 유도된 세포노화과정에서 나타난 미토콘드리아의 기능이상 중에서 활성산소 생성 증가가 거대 미토콘드리아 형성을 매개하는 인자임이 확인되었다. 또한 세포가 노화로 진행 될 때 거대 미토콘드리아의 형성은 일반적으로 나타나는 현상임을 알 수 있었다. 이러한 거대 미토콘드리아 형성은 형태조절 인자인 Mfn/Drp1의 발현비율이 Mfn이 증가하는 방향으로 shifted balance 에 의한 융합과정이 활성화되어 나타나는 것을 생각 되었다. 또한 본 연구에서는 endogenous Drp1의 인산화와 GSK3 β 와의 상호작용을 확인함으로써 Drp1의 조절 기전을 이해하기 위한 하나의 단서를 제공하였다.

핵심 되는 말 : 미토콘드리아, 세포 노화, mitofusin, fusion, Drp1

차 례

국문요약	i
차례	iv
그림 차례	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
A. 세포주 배양	6
B. 미토콘드리아 DNA가 결핍된 세포주(ρ^0) 구축	6
C. 면역형광 염색법	6
D. 전자 현미경 (Electron microscopy)	7
E. Sprague-Dawley (SD) rats의 간 조직에서	8
미토콘드리아 분리 (Fractionation)	8
F. 미토콘드리아 DNA 분석	8
G. Western blot analysis	9
H. Senescence associated β -galactosidase assay	9
I. 면역침전	10
J. Protein phosphatase 처리	10
III. 결과	12
A. Complex II의 기능저하가 미토콘드리아 형태에 미치는 영향	12
B. H_2O_2 가 미토콘드리아 형태에 미치는 영향	12
C. 미토콘드리아의 DNA 손상이 미토콘드리아의 형태에 미치는 영향	13
D. 세포 노화모델에서의 거대 미토콘드리아 형성 확인	14
E. 미토콘드리아 형태조절인자인 Drp1과 Mfn 단백질의	

발현 양상	13
F. SD rat의 노화과정에서의 미토콘드리아 형태조절인자의 발현양상	16
G. Drp1의 발현 양상의 변화 분석	16
H. Drp1의 인산화 조사	17
I. Drp1의 인산화에 대한 GSK3 β 의 연관성 분석	17
IV. 고찰	32
V. 결론	37
참고문헌	38
영문요약	44

그림 차례

Fig. 1. Effect of complex II inhibition by TTFA on mitochondrial morphology	19
Fig. 2. Morphological changes of mitochondria of senescent Chang cells induced by H ₂ O ₂1.....	2
Fig. 3. Effect of mtDNA depletion by EtBr on mitochondrial morphology	3..... 2
Fig. 4. Changes of mitochondrial morphology in the cellular senescent process of HDF cells	25
Fig. 5. Expression of Drp1, Mfn1, and Mfn2 proteins	26
Fig. 6. Induction of Mfn1 and Mfn2 proteins in aging process of SD rats	27
Fig. 7. The distinct expression pattern of endogenous Drp1 in DFO treated Chang cells	28
Fig. 8. Phosphorylation of endogenous Drp1 revealed by phospho-specific antibody	29
Fig. 9. Induction of phospho GSK3 β (serine9) in the DFO-induced senescent Chang cells	30
Fig 10. Interaction between Drp1 and GSK3 β	31

I. 서론

미토콘드리아는 산화적 인산화 (oxidative phosphorylation) 과정을 통해 세포 내에서 요구되는 에너지 즉 ATP의 대부분을 생산하는 주요 소기관이다. 이러한 미토콘드리아는 세포의 요구나 환경의 변화에 따라 세포 내에서 자신의 분포 (distribution)와 수 (number) 그리고 형태 (morphology)를 자유자재로 변화시킬 수 있는 아주 역동적 (dynamic)인 능력을 가진 세포소기관으로 알려져 있다 (Bereiter-Hahn 와 Voth, 1994 ; Karbowski 와 Youle, 2003). 구체적으로 이러한 미토콘드리아의 역동성 (dynamics)은 세포의 환경변화, 즉 세포가 증식할 때나 세포에 에너지가 더 많이 요구될 때 이를 충족시킬 수 있도록 그리고 세포 전체에 또는 국소적으로 에너지를 충분히 공급하기 위해 다양하게 미토콘드리아의 분포(distribution)나 수가 조절되는 것을 가능하게 해준다고 알려져 있다 (Bereiter-Hahn 와 Voth, 1994 ; Karbowski 와 Youle, 2003). 최근들어 몇 가지 정상적인 세포의 성장이나 분화과정에서 미토콘드리아의 이동과 형태변화가 역동적으로 나타나는 것이 보고되어 있는데, 대표적으로 호기성 성장을 하는 조건 하에서 yeast *S. cerevisiae*의 mitosis 동안에 미토콘드리아는 세포의 periphery 가까이 위치하며 branched, tubular network 구조로써 보이고 S phase 초기 부터 cytokinesis까지 모세포에서 딸세포로 미토콘드리아들이 지속적으로 분할 되는 것이 관찰되었고, yeast meiosis 과정에서는 세포의 분열과정에서 거대한 4개의 미토콘드리아로 융합된 후 딸세포로 분열되는 것이 보고되어 있다 (Jensen 등, 2000; Hermann 와 Shaw, 1998). 또한 *Drosophila*의 spermatogenesis과정에서 미토콘드리아가 반수체 핵 주위로 모여서, 서로 융합 하여 두 개의 거대 미토콘드리아 (giant mitochondria)가 형성되는 것을 관찰하였다 (Hales 와 Fuller, 1997). 이와 같이 yeast의 세포분열 과정 (Jensen 등,

2000; Hermann 와 Shaw, 1998)이나 *Drosophila*의 spermatogenesis (Hales 와 Fuller, 1997)과정동안에 미토콘드리아의 이동성이나 형태학적 역동성은 대표적인 모델로 연구되고 있다.

미토콘드리아의 형태는 융합 과 분열과정의 균형을 통해서 유지된다고 보고되어 있으며 (Scheffler, 1999), 이 두 과정사이의 균형이 깨어지게 되면 미토콘드리아는 과도하게 fragmentation되거나 tubulation된다고 알려져 있다 (Yoon 등, 2003). 일반적으로 미토콘드리아의 분열과정은 세포주기 진행이나 세포성장 동안에 미토콘드리아의 수를 적절하게 유지하게 하는데 기여한다고 알려져 있다 (Hermann 와 Shaw, 1998). 그러나 미토콘드리아 융합은 근본적으로 미토콘드리아 compartment를 혼합하여 단일화시키는데 관여하고 있다 (Westernmann, 2002). 일부 보고에서 활성화된 융합 과정을 통한 미토콘드리아 component들의 재 분포 (redistribution)의 중요성이 강조되고 있다. 첫째, yeast의 세포분열 단계에서 설명된 것처럼 미토콘드리아 genome 의 homogenous inheritance를 유지하는 것이다 (Westernmann, 2002; Shaw 와 Nunnari, 2002). 둘째, interconnected 미토콘드리아 구조를 가진 diaphragm muscle 에서와 같이 세포의 서로 다른 부위로의 에너지나 calcium channel을 효과적으로 전달하는 것이다 (Skulachev, 2001). 셋째, *Drosophila*의 spermatogenesis와 rat lung에서의 Type II pneumocyte의 발달 과정에서 미토콘드리아 융합의 중요성이 인지되고 있다 (Hales 와 Fuller, 1997; Yoon 등, 1991).

Yeast와 human을 포함한 진핵생물에서 미토콘드리아의 융합과 분열의 조절은 두 가지의 다른 GTPase의 작용을 통하여 이루어지고 있으며, 이들의 작용 조절을 통해 균형 상태를 유지함으로써 정상적인 미토콘드리아 형태가 유지된다고 알려져 있다 (Otsuga 등, 1998; Pitts 등, 1999; Santel 와 Fuller, 2001; Sesaki 와 Jensen, 1997; Hermann 등, 1998). 이에 관련된 GTPase들 중 한 부류는 dynamin과 유사성을 가지고 있어서 dynamin-like enzyme이라 불리우며

yeast에서는 Dnm1p, 다른 고등진핵생물에서는 Drp/DLP1으로 밝혀져 있는데 여러 연구를 통해 이 단백질들이 미토콘드리아 분열에서 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다. Dnm1/Drp1의 대부분은 세포질과 ER, microtubules, peroxisome 과 같은 다른 세포 소기관에 주로 존재 하고 일부분이 미토콘드리아 외막에 위치하고 있다고 알려져 있으며 미토콘드리아 분열 위치에서 Dnm1/Drp1가 중합체로 결합되어 있다고 보고되어 있다 (Yoon 등, 2003; Otsuga 등, 1998; Pitts 등, 1999; Smirnova 등 1998; Smirnova 등, 1998). Drp1의 GTP binding motif (Drp1K38A)를 돌연변이 시킨 기능손상 변이체를 세포에 과 발현 시켰을 때 매우 interconnected되고 융합된 미토콘드리아가 형성된다고 보고 되어있다 (Smirnova 등, 1998). Yeast에서는 두 개의 단백질 Mdv1과 Fis1 (human 동족체로 hFis1)과 같은 단백질들이 Dnm1과 복합체를 이루어서 미토콘드리아 분열을 조절한다고 알려져 있다 (Mozdy 등, 2000; Tieu 등, 2000).

미토콘드리아의 형태를 조절하는 또 다른 부류의 GTPase로는 Fzo1이 알려져 있는데, Fzo1은 미토콘드리아 외막에 위치하고 있는 GTPase로써 미토콘드리아 융합에 필요한 단백질로 보고되어 있다 (Santel 와 Fuller, 2001; Sesaki 와 Jensen, 1997; Hermann 등, 1998; Rapaport 등, 1998; Rojo 등, 2002). 최근에 알려진 Ugo1도 yeast에서 미토콘드리아 융합과정에서 작용한다고 보고되어있다 (Sesaki 와 Jensen 2001). Fzo1의 human과 mouse에서의 동족체로는 Mitofusin 1과 2 (Mfn1과 Mfn2)가 보고되어있고 (Santel 와 Fuller, 2001; Rojo 등, 2002), rat에서는 FZO1B 와 FZO1A로 알려져 있다. Yeast에서 또 다른 dynamin-like protein 인 Mgm1p가 미토콘드리아 내막의 융합에 필요한 단백질로 알려져 있다 (Wong 등, 2003). Mgm1p의 human 동족체인 OPA1 역시 미토콘드리아 내막의 융합에 필요한 단백질로 알려져 있으며 autosomal dominant optic atropy 질환을 가진 환자에서 돌연변이가 보고 되어있으며, HeLa 세포주에 OPA1을 RNAi 로 knock down을 시키면 미토콘드리아의 fragmentation을 유도했으며

cytochrom c 방출로 이어지는 세포사멸이 유도 되었다 (Olichon 등, 2003). 특히 Mitofusin1과 2 (Mfn1과 Mfn2)가 knockout 된 MEF (mouse embryonic fibroblast) 세포주에서 미토콘드리아가 fragmentation되었으며, 특히 Mfn1과 Mfn2가 knockout된 mouse에서 배 발생 치사 (embryonic development lethality) 를 일으켰다고 보고되었다 (Chen 등, 2003).

정상적인 세포의 성장이나 분화과정 이외에, 세포가 손상되었을 때에도 미토콘드리아의 형태가 비정상적으로 변화되는 것이 관찰되고 있다. 예를들어 apoptosis 동안에 분열과정을 통한 미토콘드리아의 fragmentation이 중요한 인자로 작용한다는 것이 알려져 있다 (Karbowski 와 Youle, 2003; Frank 등, 2001). 또한 간경화와 같은 간 손상이 유도된 질환이나 (Tandler 와 Hoppel, 1985) 노화된 조직에서 관찰 되고 있는데 노화된 rat adrenal cortical cell에서 크기가 상대적으로 크고 형태가 상당히 불규칙한 미토콘드리아의 관찰이 보고 되어있다 (Murakosh 등, 1985). 이는 손상된 미토콘드리아의 기능을 복구하기 위한 세포의 노력의 일환으로 형성되었을 것으로 가정되고 있을 뿐 이에 대한 기전연구는 미약한 실정이다.

노화과정에서 미토콘드리아의 기능이상도 동반되고 있는 것은 잘 알려져 있으며, 이는 활성산소의 축적과 더불어 미토콘드리아 DNA의 somatic 돌연변이의 축적과 깊은 관련이 있는 것으로 생각되고 알려져 있다 (Wallace, 1999; Nagley 와 Wei, 1998). 그러므로 노화된 조직에서의 거대 미토콘드리아의 발견은 기능이상을 가진 미토콘드리아들이 융합과정을 통해 내용물들의 complementation 시킴으로서 기능을 유지하기 위한 세포의 노력이라고 생각되고 있다 (Ono 등, 2001). 그러나 노화과정동안의 미토콘드리아의 기능이상과 형태변화에 대한 명확한 상관관계에 대해서 확실히 설명된 보고가 없는데 이는 이러한 연구를 위한 적절한 모델 체계가 없기 때문이다. 이러한 상관관계를 설명하기 위해서는 이 현상을 보여주는 다양한 세포 노화 시스템 구축이 필수적

이다. 최근에 본 연구실에서는 정상 간세포주인 Chang 세포주에 이온 흡착제 Deferoxamine (DFO)를 처리하여 세포노화가 유도되고 (Yoon 등, 2002), 이 과정에서 complex II의 활성이 감소됨으로써 미토콘드리아의 기능이상이 동반됨을 보고 하였다 (Yoon 등, 2003). 또한 이 과정에서 흥미롭게도 미토콘드리아가 DFO처리 3일만에 형태가 정상보다 5배 이상으로 길어진 미토콘드리아를 관찰 하였다.

본 연구에서는 DFO로 유도된 세포노화 과정에서 관찰된 거대 미토콘드리아가 어떠한 기전을 통하여서 형성되었는지를 연구 하였다. 첫째, DFO에 의해 나타난 미토콘드리아 기능손상인 complex II 활성 억제, 활성산소 생성 증가, 미토콘드리아 DNA 감소 중 어떤 것이 거대 미토콘드리아 형성에 직접적으로 관여하고 있는지를 알아보았고, 또한 이러한 미토콘드리아 형태변화가 노화과정에서 나타나는 일반적인 현상인가에 대해서도 알아보았다. 둘째, 미토콘드리아의 형태를 조절하는 단백질인 Drp1, Mfn1과 Mfn2가 어떻게 관여하며 그리고 어떠한 작용기전을 통해 일어나는 현상인지를 알아보았다.

II. 재료 및 방법

A. 세포주 배양

사람의 정상 간 세포인 Chang 세포주 와 네 살 소년 음경꺼풀(foreskin)에서 분리한 primary HDF (human diploid fibroblast)세포배양을 위해 DMEM배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco Grand Island, NY)에 56 ° C에서 30분간 비동화 시킨 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum)과 1% antibiotic-antimycotic (Gibco BRL)을 첨가하여 사용하였다. HDF 세포주는 배양접시에 90%이상 차면 새 배양접시로 계대배양을 했으며, 세포주의 population doubling 횟수와 시간을 지속적으로 기록하였다. 본 실험에서는 증식 시간이 각각 24시간과 14일 이상인 young 과 old HDF세포주를 사용하였다.

B. 미토콘드리아 DNA가 결핍된 세포주 (ρ^0) 구축

미토콘드리아 DNA 가 결핍된 세포주를 구축하기 위하여 Chang 세포주를 높은 농도의 glucose (4.5g/ml), uridine (50 μ g/ml), pyruvate (110 μ g/ml)가 들어있는 DMEM 배지에 56 ° C에서 30분간 비동화 시킨 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum)과 1% antibiotic-antimycotic (Gibco BRL)을 첨가하고 미토콘드리아 DNA 복제를 억제제인 Ethidium Bromide (EtBr, 50ng/ml)를 첨가 하여 117일 동안 배양하였다. PCR을 통해 미토콘드리아 DNA결핍을 확인 하였고 Ethidium Bromide 없이 24일 더 배양하여서 미토콘드리아 DNA양이 증가되지 않음을 확인하였다.

C. 면역형광 염색법

세포내의 미토콘드리아 위치를 알아보기 위하여 면역형광 염색법을 시행하였다. 세포를 cover slip이 들어있는 배양접시에 seeding한 후 고정 하기 전에 미토콘드리아 염색 시약인 MitoTracker Red (Molecular probe, Eugene, USA) 250nM를 첨가하여 30분동안 배양하였다. 그 다음 PBS로 세척한 후 고정액 (Methanol 과Acetone)을 1:1 의 비율로 넣어 10분간 고정 하였다. Blocking buffer (1% BSA 가 함유된 PBS)로 세포를 상온에서 1시간동안 방치한 후 1:200 으로 희석된 일차항체 α -tubulin (Oncogene, Boston, MA, USA)를 첨가하여 4 °C에서 하루 동안 반응 시켰다. PBS로 충분히 세척한 후 FITC가 결합되어있는 anti-mouse antibody (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)를 1:200으로 희석한 후 상온에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. PBS로 충분히 세척 후 90% glycerol 가 함유된 PBS로 mounting한 후 Confocal Laser Scanning Microscope (FLUOVIEW FV300, Olympus, Tokyo, Japan)를 이용하여 세포를 관찰하였다.

D. 전자현미경 (Electron microscopy)

세포를 24mm 배양접시에 90%이상 배양시킨 후 Karnovsky 고정액 (1% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde, 2M calcium chloride, 100M cacodylate buffer, pH 7.4)으로 2시간동안 고정하였다. 그다음 cacodylate buffer 로 세척한 후 1% osmium tetroxide 와 1.5% potassium ferrocyanide 로 1시간동안 다시 고정하였다. 고정 후 세포를 0.5% uranyl acetate 로 염색하고 graded ethanol로 탈수 시켰다. 그런다음 Poly/Bed 812 resin (Pelco, CA, U.S.A.)으로 세포를 embedding 시켰고 Reichert Jung Ultracut S (Leica, Cambridge, UK)를 사용하여 세포를 sectioning 하였다. Uranyl acetate 와 Lead citrate로 세포를 염색한 후에 transmission electron microscope (Zeiss EM 902A, Leo, Oberkohen, Germany)를 사용하여 관찰하고 사진촬영을 실시했다.

E. Sprague-Dawley (SD) rats의 간 조직에서 미토콘드리아 분리 (Fractionation)

잘려진 rat 간 조직 (0.1g)을 medium A (250mM sucrose, 0.1mM EDTA, 2mM HEPES, pH 7.4, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin A, 1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 1mM NaF)에 잘 섞은 후 Dounce homogenizer (StedFast™ Stirrer, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, U.S.A.)를 사용하여 homogenation 을 하였다. 그 다음 580g에 10분간 원심분리 한 후 핵(nuclei)과 세포 부유물을 버리고 상등액을 취했다. 상등액을 다시 14920g에 10분간 원심분리 하여 상등액 (세포질 분획) 과 침전물 (미토콘드리아 분획)을 얻었다.

F. 미토콘드리아 DNA 분석

세포내 미토콘드리아 DNA 양을 알아보기 위하여 미토콘드리아 유전자가 포함된 total genomic DNA를 이전에 보고된 방법으로 분리 하였다 (Hauswirth 등, 1987). 두 개의 primer set, 즉 미토콘드리아DNA에 대응하는 ND2 (complex I 소단위체 2) primer 와 nuclear DNA에 대응하는 28srRNA primer set을 사용하여 분리한 total genomic DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 최종 PCR 산물을 1.5% agarose gel에 전기영동 한 후 0.5 μ g/ml EtBr 용액으로 염색한 후 UV trans-illuminator (Gel Doc 2000, Bio-Rad, Milan, Italy)로 관찰하였다. 본 실험에 사용한 primer set의 서열은 다음과 같다: 미토콘드리아 ND2, 정방향 5'-A G G T T A C C C A A G G C A C C C C T-3'과 역방향 5'-A G T A G A T T A G G C G T A G G T A G 이고 28srRNA는 정방향 5'-T A G C A G C C G A C T T A G A A C T G G-3'과 역방향 5'-C T C C C A C T T A T T C T A C A C C T C-3' 이다.

G. Western blot analysis

세포 또는 분리한 미토콘드리아를 lysis buffer (50mM Tris-HCl, 1%NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150mM NaCl, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin A, 1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 1mM NaF)로 lysis 하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 microcentrifuge에서 11,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 상등액을 새 튜브로 옮겨 정량 하였다. 40 μ g의 단백질을 8~12% SDS-PAGE gel에 전기영동한 후 nitrocellulose membrane 으로 200mA에서 2시간 동안 전기이동 (electrotransfer)시켰다. 전기이동이 끝난 membrane에 blocking buffer (5%탈지분유가 함유된 PBS)를 넣고 실온에서 1시간동안 방치하고 blocking buffer에 1:1000으로 희석한 일차항체를 넣고 4° C에서 하루 동안 반응시켰다. 일차 항체로는 complex II의 flavoprotein (Molecular probe corp, Eugene, USA), α -tubulin (ab-1) (Oncogene, Boston, MA, USA), Drp1 (BD Science, Franklin Lakes, USA), α -actin (Sigma, St. Louis, USA), pGSK3 β (ser 9) (Cell signaling Technology, Beverly, USA), GSK3 β (Santa cruz Biotechnology, Santa cruz, USA), pY (Upstate, Waltham, USA), pS/T (BD Science, Franklin Lakes, USA)를 사용하였다. Mfn1 과 Mfn2는 Dr. Manuel Rojo (Institut de Myologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpê trière, Paris)그룹에서 제공하였다. Washing buffer (0.05% Tween 20이 함유된 PBS)로 충분히 세척한 후 horseradish peroxidase가 결합된 anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)이차 항체를 실온에서 1시간30분동안 반응시켰다. Washing buffer로 충분히 세척한 후 ECL(Amersham Pharmacia)을 처리하고 X-ray 필름에 감광시켰다.

H. Senescence associated β -galactosidase assay

Senescence associated β -galactosidase assay는 이전에 보고된 방법을 약

간 변형하여 시행하였다 (Dimri 등, 1995). Chang 세포주 를 배양접시에 배양한 후 Hydrogen peroxide (H_2O_2) $200\mu M$ 을 2, 3, 4, 5, 6일 처리하고 난 뒤, 세포를 PBS로 두 번 세척하고 3%formaldehyde로 5분간 고정하였다. 그런 다음 PBS로 다시 세척한 후 다음과 같은 염색혼합액을 첨가하여 $37^\circ C$ 에서 하루 동안 방치시켰다. $1mg/ml$ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal; Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), $5 mM$ potassium ferrocyanide, $5 mM$ potassium ferricyanide, $150 mM$ NaCl, and $2 mM$ $MgCl_2$ 를 포함하는 $40mM$ citrate-phosphate buffer, pH6.0.

I. 면역침전

$100mm$ 배양접시에 80%이상 가득 찬 상태의 세포를 차가운 PBS로 두 번 깨끗이 씻어내고 lysis buffer ($50mM$ Tris-HCl, 1%NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, $150mM$ NaCl, $1\mu g/ml$ leupeptin, $1\mu g/ml$ pepstatin A, $1mM$ PMSF, $1mM$ Na_3VO_4 , $1mM$ NaF)로 얼음 위에서 30분간 두어 세포를 용해 하였다. Cell lysate는 $11,000rpm$ 에서 10분간 원심분리 하여 얻은 상등액 만을 취하였다. Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 사용하여 단백질을 정량하였고, Anti-Drp1 항체 $1\mu g$ 과 recombinant Protein G Agarose (Invitrogen, Carlsbad, USA) 50% slurry $20\mu l$ 를 넣어 $4^\circ C$ 에서 하루 동안 면역반응 시켰다. $5000rpm$ 에서 2분간 원심 분리하여 recombinant Protein G Agarose를 침강 시켰다. 상등액은 새 튜브에 따로 보관하고 침강된 bead slurry는 lysis buffer로 세 번 세척 하였고 1X sample buffer를 넣고 5분간 끓였다. 준비된 샘플은 western blot을 실시하였다.

J. Protein phosphatase 처리

Chang 세포에 DFO ($500\mu M$)을 처리안한것과 2일 처리한 세포를 harvest

한 후 lysis buffer (50mM Tris-HCl, 1%NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150mM NaCl, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin A, 1mM PMSF,)로 얼음 위에서 30분간 두어 세포를 용해하였다. Cell lysate는 11,000rpm에서 10분간 원심 분리 하여 얻은 상등액 만을 취하였다. 단백질 30 μ g을 반응용액에 (50mM Tris-HCl, 0,1mM Na₂EDTA, 5mM dithiothreitol, 0.01% Brij 35, 2mM MnCl₂) 넣고 λ -phosphatase (NEB, Beverly, USA)을 30° C에서 10분, 20분, 30분, 60분 처리한 후 1X sample buffer를 넣고 100° C에서 5분 끓이고 western blot을 실시하였다. Drp1을 면역침시킨 후 에도 위와 같은 방법으로 λ -phosphatase를 처리하였다.

III. 결 과

A. Complex II의 기능저하가 미토콘드리아 형태에 미치는 영향

정상 간세포주인 Chang 세포주에 철 이온 흡착제인 Deferoxamine (DFO)를 처리하였을 때 세포노화가 유도되고 (Yoon 등, 2002), 이 과정의 초기에 complex II의 활성이 저하됨과 함께 미토콘드리아의 기능이 손상되고 있음을 보고 하였다 (Yoon 등, 2003). 또한 이 과정에서 DFO를 처리 한 후 3일 만에 정상보다 5배 이상 길어진 거대 미토콘드리아가 점진적으로 나타나는 것을 관찰하였고, 이때 미토콘드리아 DNA 감소와 활성산소 (ROS)생성 증가가 동반됨이 확인되었다. 본 실험에서는 먼저 DFO에 의해 유도된 세포노화과정에서 동반되어 나타나는 미토콘드리아 기능이상 중 어떠한 인자에 의해 거대 미토콘드리아가 형성 될 수 있는지를 알아보는 실험을 수행하였다.

먼저 Chang 세포에 DFO를 처리하였을 때 나타난 complex II의 기능저하가 거대 미토콘드리아 형성에 관여하였는지를 알아보기 위하여, complex II 억제제로 알려진 TTFA를 세포에 처리하였다. Chang 세포에 TTFA 400 μ M을 3일 동안 처리한 후 MitoTracker Red로 미토콘드리아를 염색하여 관찰한 결과 미토콘드리아가 fragmentation 된 것을 확인 하였다 (Fig. 1A, B). 이 현상은 TTFA를 여러 농도 (200, 600, 800 μ M)에 처리했을 때나 높은 농도의 glucose가 포함되어있는 배지에서 실험하였을 때에도 동일한 결과를 얻었다 (Fig. 1C). 위의 결과로써 complex II기능 억제만으로는 거대 미토콘드리아 형성이 관찰되지 않았고 오히려 미토콘드리아가 fragmentation되는 것을 확인하였다.

B. H₂O₂가 미토콘드리아 형태에 미치는 영향

다음은 활성산소의 생성증가가 거대 미토콘드리아 형성에 관여되었는지를

알아보기 위하여, Chang 세포에 H_2O_2 를 $200\mu M$ 로 2, 3, 4, 5, 6일 동안 처리하거나, $1mM$ 로 12 시간 처리하여 미토콘드리아 형태를 관찰하였다. 그 결과 H_2O_2 를 $200\mu M$ 로 처리하였을 때 세포 노화가 유도되는 것을 senescence associated- β galactosidase assay (Fig. 2A)를 통해 확인하였고, 전자 현미경을 통해서 H_2O_2 처리하지 않은 세포의 미토콘드리아보다 미토콘드리아가 길어지거나 커진 것을 관찰하였다 (Fig. 2C). 그러나 고농도 ($1mM$)의 H_2O_2 를 12시간 처리한 세포에서는 미토콘드리아가 fragmentation된 것이 관찰되었는데 (Fig. 2D, E), 이 실험조건에서는 세포사멸이 증가하였다. 이 결과는 세포가 세포사멸로 유도될 때 미토콘드리아가 fragmentation된다는 보고와 일치하는 결과이다 (Karbowski와 Youle, 2003). 이 결과로부터 특정농도의 활성산소가 거대 미토콘드리아에 형성에 직접적으로 연관이 되어 있다는 것을 알 수 있었다.

C. 미토콘드리아의 DNA 손상이 미토콘드리아의 형태에 미치는 영향

마지막으로 DFO를 처리하였을 때 나타난 미토콘드리아 기능이상 중 미토콘드리아의 DNA 손상이 미토콘드리아 형태 변화에 관련이 있는지를 알아보기 위하여, 미토콘드리아 DNA복제를 특이적으로 억제한다고 알려진 조건인 저농도의 EtBr ($100ng/ml$)을 사용하였다. Chang 세포에 EtBr ($100ng/ml$)을 1일, 2일, 3일, 4일 처리한 다음 미토콘드리아 DNA의 함유량이 감소하는 것을 확인하였고 (Fig. 3B), 이 때 미토콘드리아 형태를 관찰하였는데 길어진 미토콘드리아는 관찰하지 못했지만 cristae구조가 비규칙적으로 변한 것을 관찰하였다 (Fig. 3C). 또한 단시간 내에 급격한 미토콘드리아 손상이 아닌 장기간 동안의 미토콘드리아 DNA에 손상을 주었을 때의 효과를 알아보기 위하여 EtBr ($50ng/ml$)을 3개월 정도 처리하여 미토콘드리아 DNA가 결핍된 ρ^0 세포주를 구축한 후 미토콘드리아 형태를 관찰하였다. 흥미롭게도 ρ^0 세포에서 대부분의 미토콘드리아는 concentric multilayer (onion-like)형태의 내막구조를 나타내는 것

을 관찰하였는데 (Fig. 3D), 이 구조는 이전에 보고된 다른 ρ^0 세포주에서 나타난 미토콘드리아 형태와 일치한다는 것을 알 수 있었다 (Gilkerson 등, 2000). 이 결과로 미토콘드리아 DNA의 손상이 유도되면 미토콘드리아의 내막구조가 변형됨을 알 수 있었다. 위의 결과들을 종합하여 볼 때, DFO를 처리하여 유도된 세포노화과정에서 나타난 거대 미토콘드리아는 일정농도 즉, 세포노화를 유도시킬 수 있는 subcytotoxic 농도로 증가된 활성산소와 연관이 있음을 알 수 있었고 complexII의 기능저하나 미토콘드리아 DNA 손상은 거대 미토콘드리아 형성에 직접적으로는 관련이 없음을 암시하였다.

D. 세포 노화모델에서의 거대 미토콘드리아 형성 확인

위의 실험으로부터 DFO로 유도시킨 노화나 H_2O_2 로 유도시킨 노화과정에서 거대 미토콘드리아가 형성되는 것을 확인하였으므로, 이러한 거대 미토콘드리아 형성이 세포가 노화되는 과정에서 나타나는 일반적인 현상인지를 알아보았다. 최근에 본연구실에서 TGF β 1을 Mv1Lu 세포주에 처리 하였을 때 세포노화가 유도되고, complexIV의 활성억제를 통한 미토콘드리아 기능이상도 동반되는 것을 보고하였다 (Yoon 등, 2004). 이 과정에서 TGF β 1처리 후 5일 만에 Mv1Lu 세포에서도 거대 미토콘드리아가 형성됨을 관찰하였고, 더욱이 H_2O_2 를 $800\mu M$ 로 Mv1Lu 세포에 일시적으로 3시간동안 처리 한 후 3일 만에 세포노화가 유도되었고 길어진 미토콘드리아가 형성되는 것을 관찰하였다 (Yoon 등, unpublished data). 그리고 본 연구에서는 primary HDF (human diploid fibroblast)를 지속적으로 계대배양시킴으로서 세포노화를 유도시켜 얻은 young 세포 (PD 30, doubling time 24시간)와 old세포 (PD 91, doubling time 14일)에서의 미토콘드리아 형태를 관찰하였다. 그 결과 PD 91인 old HDF세포에서 아주 길어진 혹은 거대한 미토콘드리아가 확인 되었다 (Fig. 4C).

결론적으로 거대 미토콘드리아의 형성은 세포가 노화로 진행되는 과정에서

나타나는 일반적인 현상이라고 생각 할 수 있다.

E. 미토콘드리아 형태조절인자인 Drp1과 Mfn 단백질의 발현 양상

세포내에서 미토콘드리아의 형태는 dynamin-related protein (Drp1) (Otsuga 등, 1998; Pitts 등, 1999) 과 mitofusin1/2(Mfn1/2) (Santel 와 Fuller, 2001; Hermann 등, 1998)에 의해 조절되는 분열과 융합의 균형에 의해 유지된다고 보고되어 있다 (Sesaki 와 Jensen, 1999). 따라서 본 연구에서는 길어진 미토콘드리아 형성에 관련된 조절 기전을 알아보기 위해 Drp1, Mfn1 과 Mfn2 의 발현량과 densitometry를 이용하여 Mfn1과 Drp1 그리고 Mfn2와 Drp1의 발현 비율을 조사 하여 Mfn1/Drp1 과 Mfn2/Drp1 으로 나타내었다. DFO에 의해 유도된 세포노화에서 DFO처리 1일과 2일째에 Mfn2/Drp1의 발현비율이 일시적으로 증가됨을 확인 하였지만 Drp1은 발현량에는 변화가 없었다 (Fig. 5A, D).

그 다음 길어진 미토콘드리아가 형성된 다른 세포노화 모델에서도 Drp1과 Mfn1/2의 발현량을 조사 하였다. 먼저 H_2O_2 를 처리하여 유도된 모델에서, H_2O_2 (200 μ M)을 4일 처리하였을 때 Mfn1/Drp1 과 Mfn2/Drp1의 발현비율이 현저하게 증가된것을 보았고 이것은 Drp1의 발현량 감소에 의한 것으로 생각되었다 (Fig. 5B, D). 길어진 미토콘드리아의 형성이 관찰되지 않은 EtBr (100ng/ml)을 처리한 세포에서는 Mfn1만 2일째 발현량이 증가하였을 뿐 Drp1과 Mfn2는 발현량은 변화는 없었다 (Fig. 5B). 또한 old HDF 세포군에서 Mfn2/Drp1 의 발현비율이 현저하게 증가하였고 이것 또한 Drp1의 발현량 감소와 Mfn2의 발현량 증가에 의한 것으로 생각되었다. 그러나 Mfn1은 young 과 old HDF 세포사이의 발현량 차이를 관찰할 수 없었다 (Fig. 5C, D).

이 결과들을 종합해서 볼 때, 길어진 거대 미토콘드리아는 Mfn/Drp1의 발현비율이 Mfn 단백질이 증가하는 방향으로의 shifted balance 에 의한 융합과정이 활성화 되어 형성되었을 것이라는 것을 제시하고 있다.

F. SD rat의 노화과정에서 미토콘드리아 형태조절인자의 발현양상

이전 논문들에서 노화된 조직에서 거대 미토콘드리아가 관찰된 예들이 보고되어 왔다 (Terman 등, 2003). 그러므로 동물의 개체노화과정에서도 미토콘드리아 형태조절인자의 발현양상 변화가 세포노화에서와 유사하게 나타나는 지를 알아보기 위하여 정상적인 노화과정에 있는 6, 12, 18, 24개월 된 SD rat의 간에서 미토콘드리아를 분리해서 Western blotting을 수행하였다. 흥미롭게도 세포노화에서와 같이 정상적인 노화과정에서 Mfn1과 Mfn2가 Drp1에 비해 발현비율이 증가 하는 것이 확인 되었다 (Fig. 6A, B).

G. Drp1의 발현 양상의 변화 분석

Chang 세포 주에 DFO를 처리하여 endogenous Drp1의 발현상태를 조사하였을 때 단백질의 크기가 서로 다른 3가지 band로 발현되는 것이 관찰되었다 (Fig. 7A). 이 경우에서 DFO 처리 2일째부터 두 번째 band가 감소하고 제일 아래의 세 번째 band가 증가하는 band shift 가 일어남을 볼 수 있었다. 그렇다면 이러한 band shift가 어떻게 형성된 것인가를 생각해 볼 때, 크게 두 가지 경우를 제시 할 수 있다. 첫째, Drp1의 post-translational modification, 즉 인산화 정도의 차이에 의한 경우이다. 둘째는, Drp1은 alternative splicing에 의한 3가지의 isoform이 존재한다고 알려져 있는데 (Chen 등, 2000), 이들 isoform의 발현 차이에 의한 경우이다. 그러므로 본 연구에서는 먼저 첫 번째 가능성에 대해서 조사하였다. 먼저 DFO를 2일 처리한 세포군과 처리하지 않은 세포군의 cell lysate에 serine, threonine, tyrosine 잔기의 탈 인산화 효소로 알려진 λ -phosphatase 를 10분, 20분, 30분, 60분 처리 한 다음 Drp1 으로 Western blotting을 수행 하였다. DFO를 처리하지 않은 세포군에서는 Drp1의 크기 감소가 일어나지 않았으나 DFO를 2일 처리한 세포군에서는 단백질 탈 인산화효소

처리 시간에 의존적으로 Drp1의 크기가 예상보다 크게 감소하였다 (Fig. 7B). 그래서 이러한 Drp1의 크기 감소가 단지 직접적인 탈 인산화효소의 작용에 의해 나타난 현상인지를 확인하기 위해, Drp1을 면역 침전 시켜서 λ -phosphatase를 1시간 동안 반응시킨 다음 Drp1으로 Western blotting을 수행하였다. 그 결과 DFO를 2일 처리한 세포군이나 처리하지 않은 세포군에서도 Drp1의 크기 감소가 일어나지 않았다 (Fig. 7C). 그러므로 DFO를 처리한 세포의 lysate에서 나타난 Drp1의 크기 감소는 λ -phosphatase처리에 의한 탈 인산화에 의해 나타난 크기 감소가 아니고 아마도 total lysate내의 어떤 protease가 λ -phosphatase작용에 의해서 활성화되고 이것에 의해 Drp1이 cleavage된 band일 것이라고 생각되었다. 그리고 이러한 현상이 DFO를 처리 했을 때만 나타나는 것은 DFO에 의해 Drp1과 결합하고 있는 중합체 또는 복합체의 구조적 변이가 일어나서 DFO를 처리하지 않은 세포군과는 다르게 protease의 접근이 더 용이하게 되어 cleavage가 일어 날 수 있었다고 생각할 수 있었다.

H. Drp1의 인산화 조사

Drp1의 인산화 가능성 여부를 조사하기 위하여 먼저 DFO를 2일 동안 처리한 것과 처리하지 않은 세포군에서 각각 Drp1을 면역 침전 시키고 pS/T과 pY를 인지할 수 있는 항체로 blotting을 하였다. 그 결과 Drp1의 serine, threonine, tyrosine잔기의 인산화가 확인 되었다 (Fig. 8). 특히 tyrosine 잔기의 인산화의 경우 DFO를 처리한 것과 하지 않은 세포군에서 크게 차이가 없어 보였지만, serine, threonine잔기의 인산화의 경우에는 DFO를 처리한 세포군에서 이들 잔기의 인산화가 감소됨을 알 수 있었다 (Fig. 8).

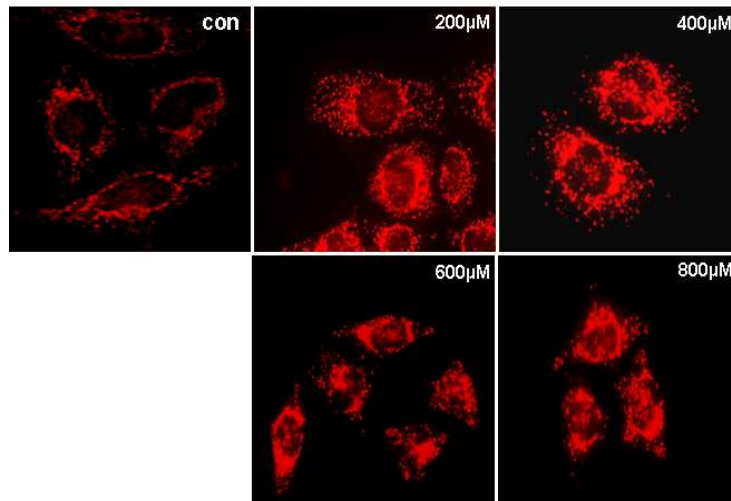
I. Drp1의 인산화에 대한 GSK3 β 의 연관성 분석

이전의 보고에서 in vitro에서 Drp1과 GSK3 β 가 상호작용을 하고 있으며

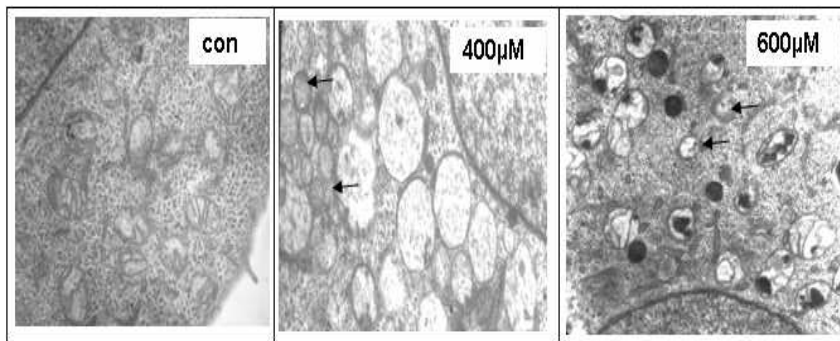
(Chen 등, 1998), Drp1 3개의 isoform 들이 모두 GSK3 β 와 상호작용이 가능함이 보고되었으며, 또한 이 kinase의 활성화에 의해 Drp1의 인산화가 일어날 수 있음이 보고되었다 (Chen 등 2000). 또한 본 연구실에서 DFO에 의해 유도된 세포 노화에서 거대 미토콘드리아 형성 뿐 아니라 glycogen이 축적되는 것을 관찰하였다 (Yoon 등, unpublished data). 따라서 본 연구에서는 glycogen 합성에 관여하는 glycogen synthase의 활성을 조절하는 GSK3 β 가 DFO로 유도된 세포노화 모델에서 Drp1의 기능을 직접 조절할 수 있는지를 조사하고자 하였다. GSK3 β 는 serine, threonine kinase로써 glycogen 대사과정 및 세포내에서 여러 가지 주요 신호전달에서 상당히 중요한 기능을 하는 단백질로 알려져 있으며, 특히 9번째 serine이 인산화 되면 불활성화 되고 216번째 tyrosine이 인산화 되면 활성화 된다고 알려져 있다 (Frame 와 Cohen, 2001). 본 연구에서 DFO를 처리한 후, GSK3 β 의 발현도와 인산화도를 조사 하였을 때, GSK3 β 의 9번째 serine의 인산화가 처리 1일 만에 증가하는 것을 보았다 (Fig. 9). 이것은 GSK3 β 의 9번째 serine의 인산화가 증가됨으로써 불활성화 되어, glycogen synthase가 활성화 되고 결과적으로 glycogen이 합성이 증가되어 축적 되었다는 것을 암시하였다.

Drp1과 GSK3 β 가 상호작용하는지 알아보기 위해, 세포에 DFO를 처리한 다음 Drp1을 면역 침전 시켜서 GSK3 β 가 함께 면역침전이 되는지의 여부를 알아보았다. 그 결과 Drp1으로 면역침전하고 GSK3 β 로 immunoblotting을 했을 때 GSK3 β 가 함께 면역침전 되는 것이 확인됨으로써 Drp1과 GSK3 β 가 서로 상호 작용 하고 있음이 확인 되었고 (Fig. 10), DFO 2일 처리 했을 때 함께 침전된 GSK3 β 의 양이 감소하는 것으로 보아 DFO에 의해 Drp1 과 GSK3 β 의 상호작용이 감소하는 것으로 생각되었다 (Fig. 9B).

A.



B.



C.

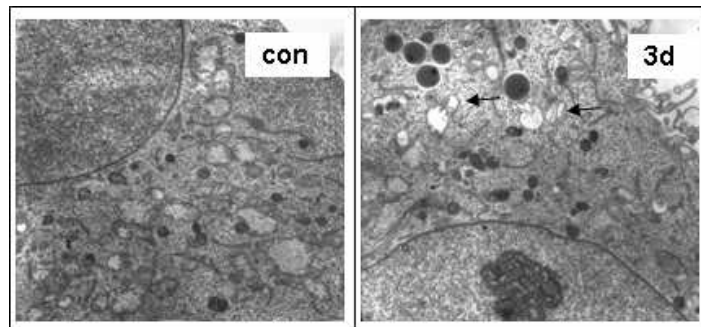
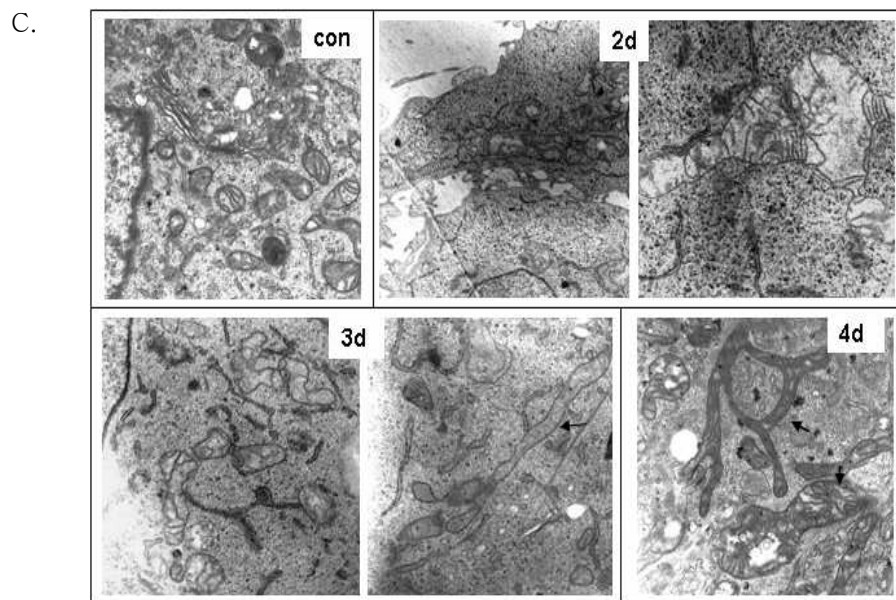
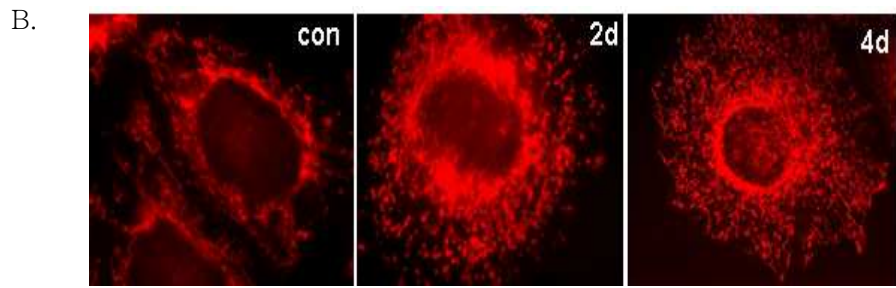
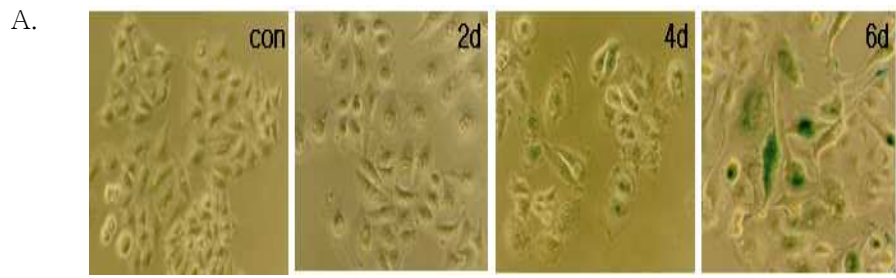


Fig. 1. Effect of complex II inhibition by TTFA on mitochondrial morphology. Chang cells were cultured in DMEM or High glucose DMEM containing 10% FBS. (A) Mitochondria (red) stained by MitoTracker Red treated with an indicated TTFA dose for 3days. (B) Electron microscopic images of mitochondria treated with TTFA 400 μ M, 600 μ M for 3days or no treatment (con). (C) Electron microscopic images of mitochondria treated with TTFA 400 μ M in high glucose DMEM media for the periods indicated. The arrows indicate representative mitochondria in each panel. Numbers in nd indicates days after exposure to TTFA



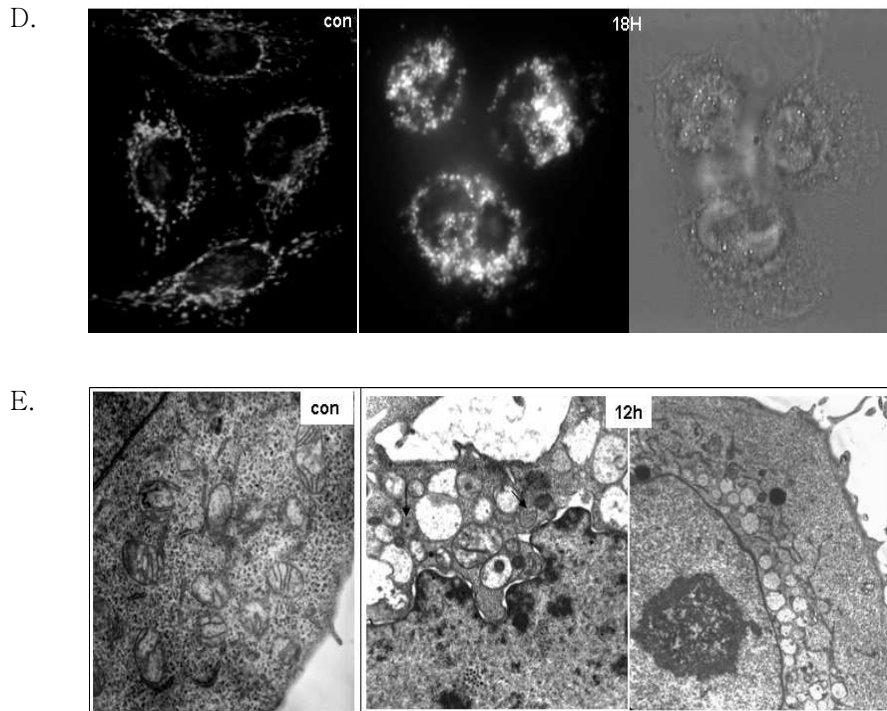
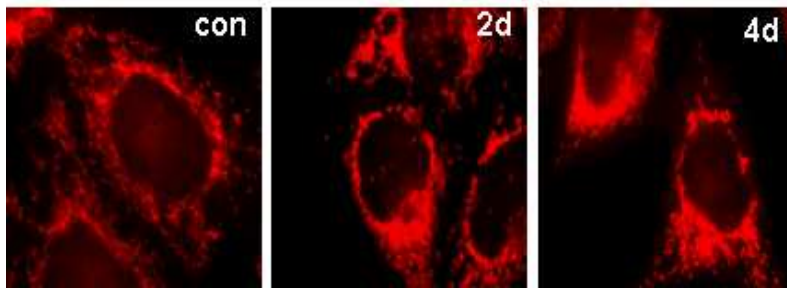
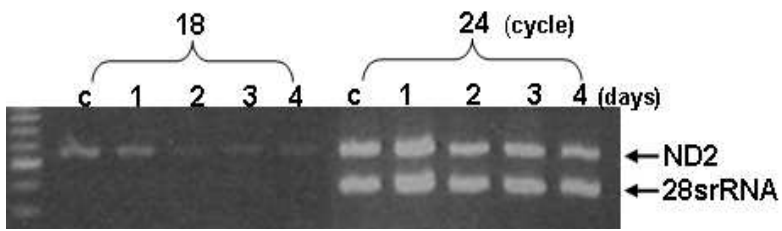


Fig. 2. Morphological changes of mitochondria of senescent Chang cells induced by H_2O_2 . Chang cells were cultured in DMEM containing 10% FBS and treated with 0.2mM H_2O_2 or 1mM H_2O_2 for the periods indicated. (A) SA- β -Gal activity treated with 0.2mM H_2O_2 for the periods indicated. (B) Mitochondria stained by MitoTracker Red treated with 0.2mM H_2O_2 for the periods indicated. (C) Electron microscopic images of mitochondria treated with 0.2mM H_2O_2 for the periods indicated. (D). Mitochondria stained by MitoTracker Red treated with 1mM H_2O_2 for the periods indicated. (E) Electron microscopic images of mitochondria treated with 1mM H_2O_2 for the periods indicated. The arrows and arrow heads indicate representative mitochondria in each panel. Numbers in nd indicates days after exposure to H_2O_2 . (arrow: mitochondria)

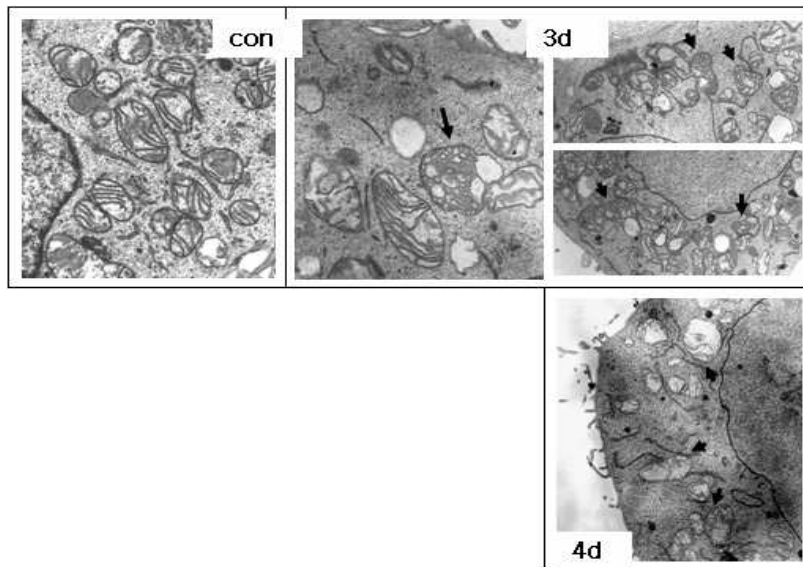
A.



B.



C.



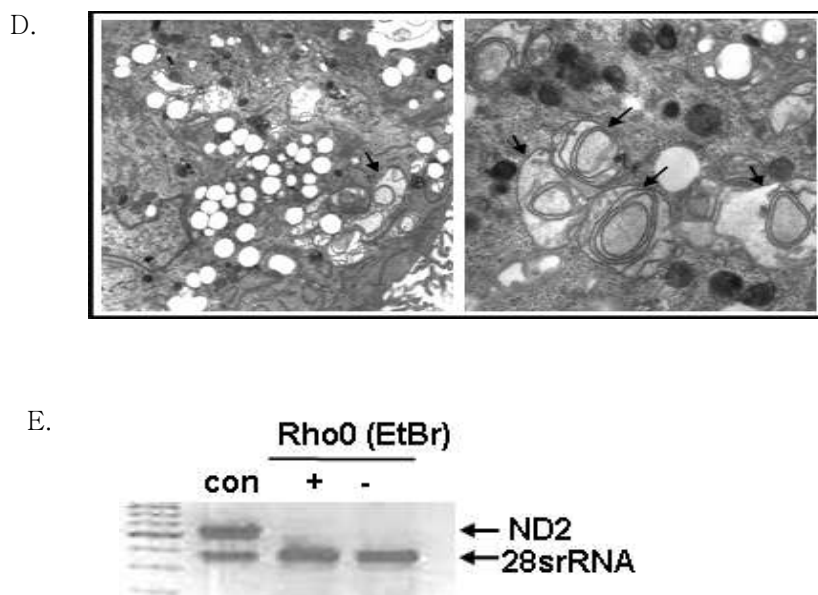


Fig. 3. Effect of mtDNA depletion by EtBr on mitochondrial morphology. Chang cells were cultured in DMEM containing 10% FBS and exposed to 100ng/ml EtBr for the periods indicated. (A) Mitochondria stained by Mitotracker Red . (B) Quantitation of mtDNA by conventional genomic PCR. Primer set for 28S rRNA was used as control for nuclear DNA. (C) Electron microscopic images of mitochondria. Numbers in nd indicates days after exposure to EtBr. (D) Electron microscopic images of mitochondria of mtDNA-less (Rho0) Chang cells. The mtDNA-less (Rho0) Chang cells were cultured in high glucose DMEM containing pyruvate and pyrimidine. (E) Absence of mtDNA in the Rho0 Chang cells was confirmed in the presence (+) or absence (-) of EtBr by conventional genomic PCR. The arrows indicate representative mitochondria in each panel.

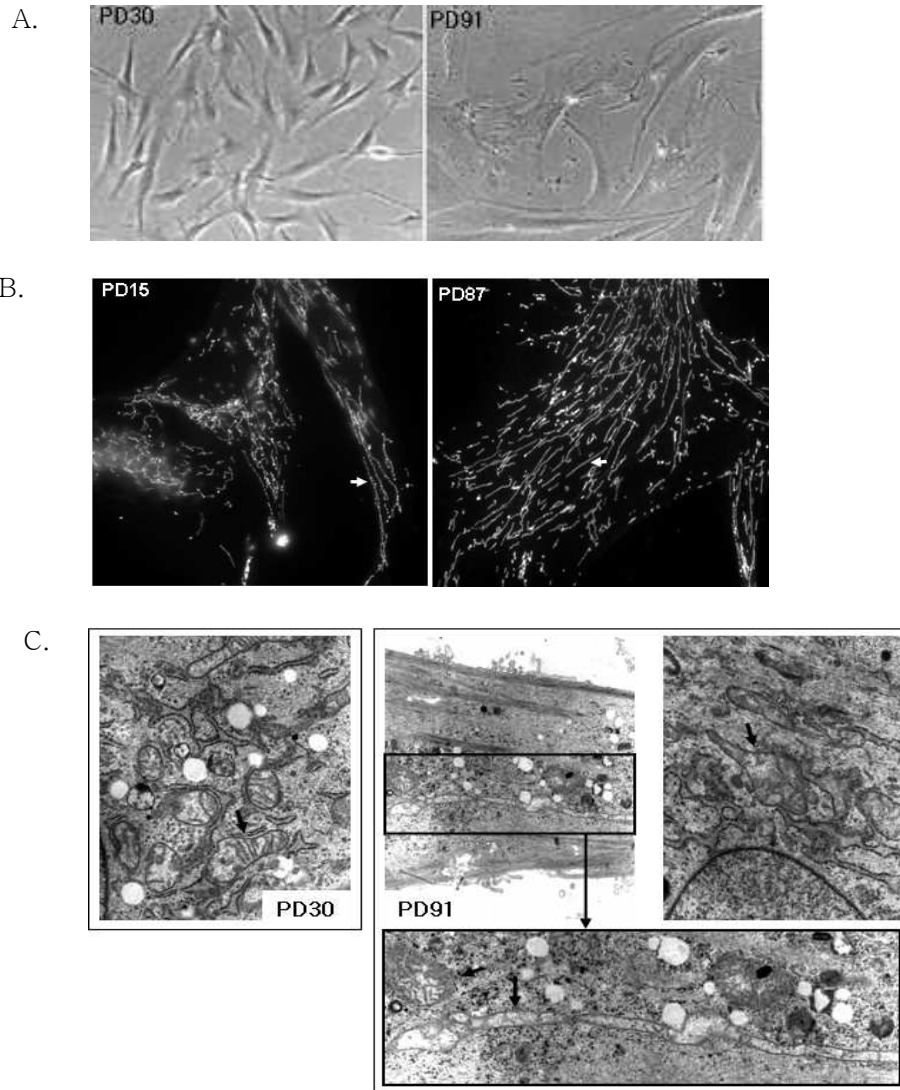


Fig. 4. Changes of mitochondrial morphology in the cellular senescent process of HDF cells. (A) Enlarged and flattened cellular morphology of old HDFs (PD91). (B) Mitochondria stained by MitoTracker Red. (C) Electron microscopic images of mitochondria. highly elongated or enlarged mitochondria (PD91 HDFs) were observed by electron microscopy. The arrows indicate representative mitochondria in each panel.

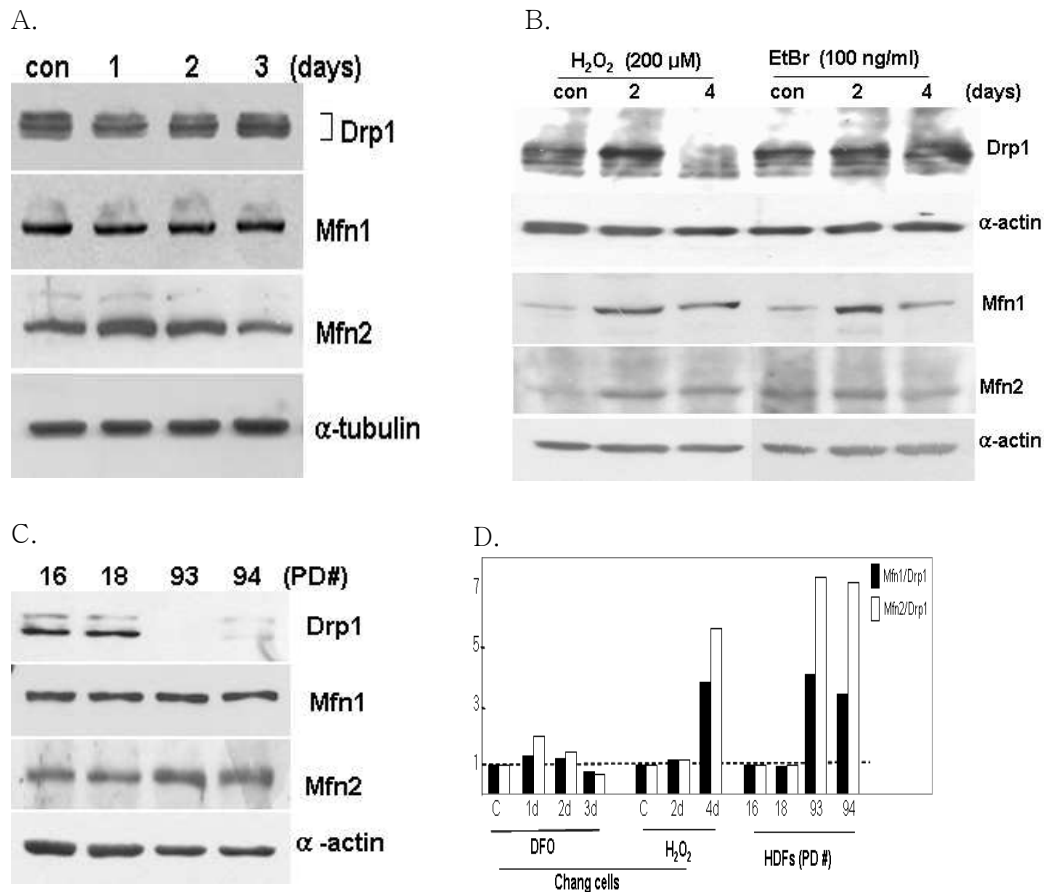


Fig. 5. Expression of Drp1, Mfn1, and Mfn2 proteins. (A) Chang cells were cultured in DMEM containing 10% FBS, and treated with 0.5mM DFO for the periods indicated. And they harvested at each time points. Expression levels of the molecules (Drp1, Mfn1 and Mfn2) in the DFO-induced senescent Chang cells were monitored by Western blot analysis. (B) Chang cells were treated with 0.2mM H_2O_2 or 100ng/ml EtBr for the periods indicated. And they were harvested and performed with western blot analysis of H_2O_2 - or EtBr-treated Chang cells at each time points. (C) Western blot analysis of young and old HDFs. (D) Expression ratios of Mfn1/Drp1 (■) and Mfn2/Drp1 (□) was quantitated by densitometry

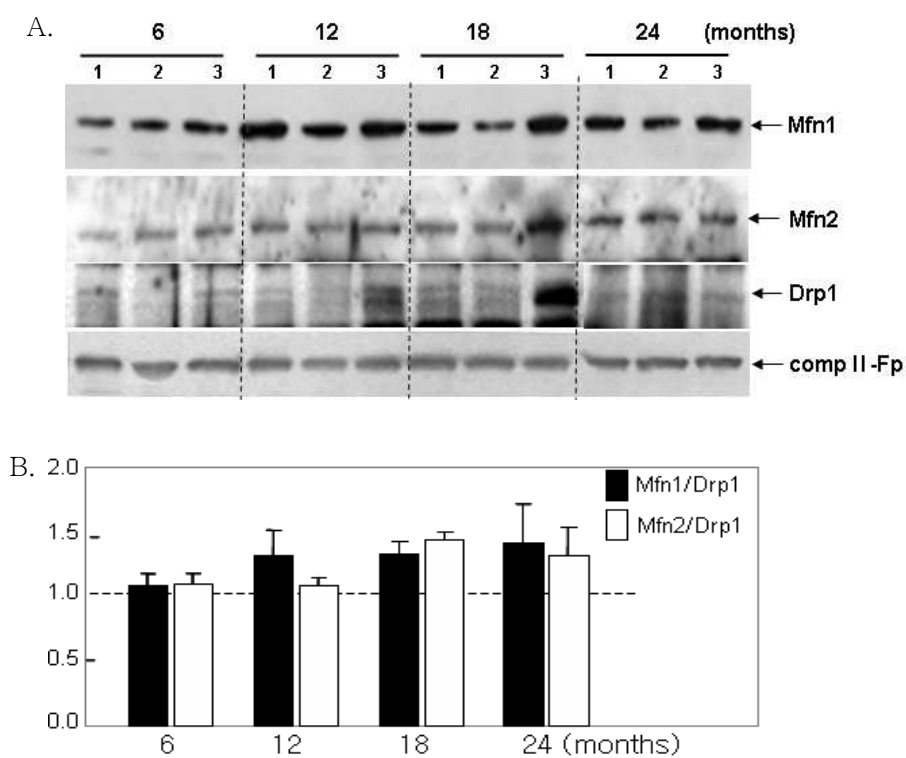


Fig. 6. Induction of Mfn1 and Mfn2 proteins in aging process of SD rats. (A). Expression levels of the molecules (Drp1, Mfn1 and Mfn2) in mitochondria isolated from liver of SD rats (6, 12, 18, and 24 months) were monitored by Western blot analysis. (B) Expression ratios of Mfn1/Drp1 (■) and Mfn2/Drp1 (□) was obtained by densitometry

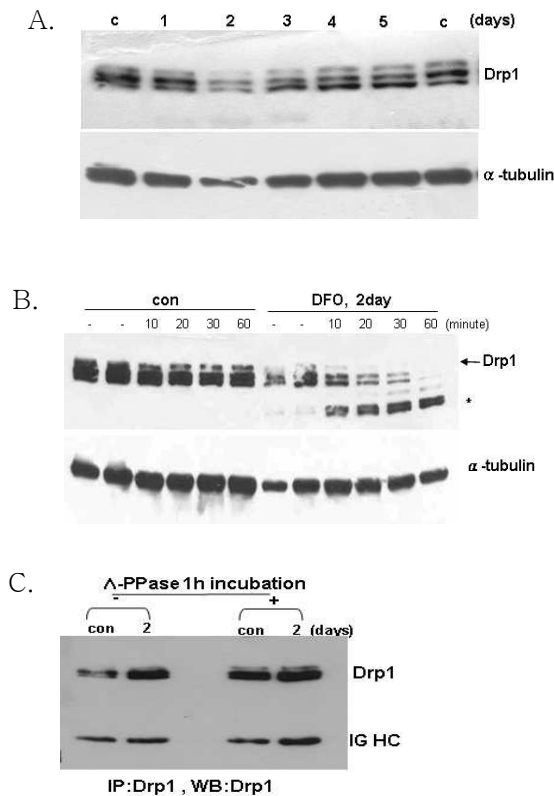


Fig. 7. The distinct expression pattern of endogenous Drp1 in DFO treated Chang cells. (A) Chang cells were cultured in DMEM containing 10% FBS, and treated with 0.5mM DFO for the periods indicated. And they harvested at each time points. Expression pattern of endogenous Drp1 in the DFO-induced senescent Chang cells were monitored by Western blot analysis. (B). Chang cells were treated with 0.5mM DFO for 48 hours or nutreated. they were harvested at indicated time points and then incubated with λ -phosphatase for indicated time points(10m, 20m, 30m, 60m). Western blot analysis of endogenous Drp1 with anti-Drp1 antibody. (C) Chang cells were treated with 0.5mM DFO for 48 hours or untreated. They were harvested at each time points and performed the immunoprecipitation with anti-Drp1 antibody. The immunoprecipitate were taken by centrifuge and then incubated with λ -phosphatase for 1 hours. Werstern blot analysis of the immunoprecipitate. (* : clevaged Drp1 band, IG HC : heavy chain)

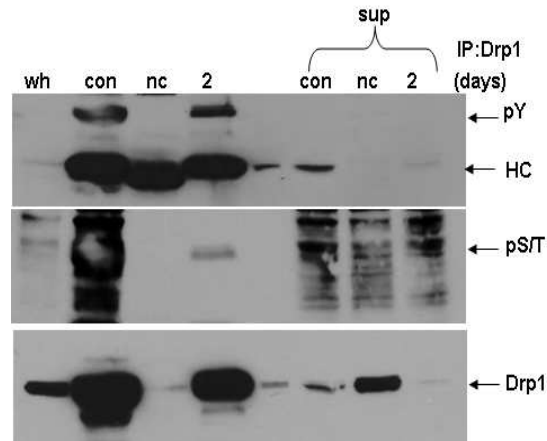


Fig. 8. Phosphorylation of endogenous Drp1 revealed by phospho-specific antibody. Chang cells were cultured in DMEM containing 10% FBS, and treated with 0.5mM DFO for the periods indicated. And they harvested at each time points. And performed the immunoprecipitation with anti-Drp1 antibody. The immunoprecipitates were taken by centrifuge and then were resolved on 8% SDS-PAGE gel and probed with anti-phosphoserine, threonine, tyrosine antibody, anti-Drp1 antibody. (wh: whole lysate, nc: negative control (IP: vimentin), sup:supernatant)

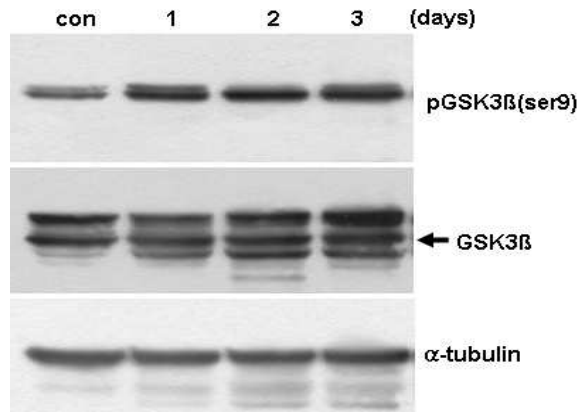


Fig. 9. Induction of phospho GSK3 β (serine 9) in the DFO-induced senescent Chang cells. Chang cells were cultured in DMEM containing 10% FBS, and treated with 0.5mM DFO for the periods indicated. And they harvested at each time points. Expression levels of GSK3 β and pGSK3 β (serine9) in the DFO-induced senescent Chang cells were monitored by western blot analysis.

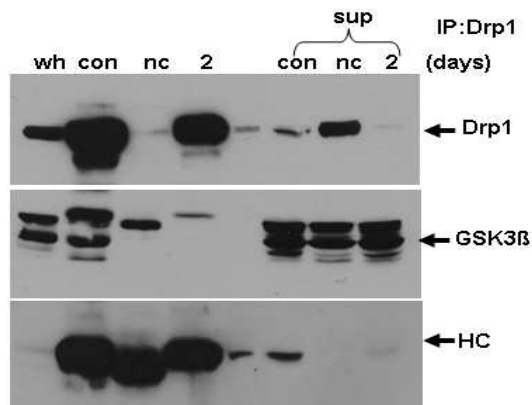


Fig. 10. Interaction between Drp1 and GSK3 β . Chang cells were treated with 0.5mM DFO for the periods indicated. And they harvested at each time points. Immunoprecipitation of endogenous Drp1 or vimentin was performed. The immunoprecipitates were taken by centrifuge and then were resolved on 8% SDS-PAGE gel and probed with anti-GSK3 β , anti-Drp1 antibody. (wh: whole lysate, nc: negative control (IP: vimentin), sup: supernatant, HC: heavy chain,)

IV. 고 찰

미토콘드리아는 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)과정을 통해 세포 내에서 요구되는 에너지 즉 ATP의 대부분을 합성하고 세포내 활성산소(ROS) 생성에 있어서 가장 중요한 세포소기관으로 알려져 있다. 노화 과정에서 미토콘드리아의 기능이상이 동반되고 있는 것은 잘 알려져 있으며, 이는 활성산소의 축적과 더불어 미토콘드리아 DNA의 somatic 돌연변이의 축적과 깊은 관련이 있는 것을 생각되고 있다 (Wallace, 1999; Nagley 와 Wei, 1998). 노화된 조직에서 거대하게 enlarged된 혹은 다양한 크기와 모양을 가진 미토콘드리아가 종종 관찰되고 있으나 (Coleman 등, 1987; Murakoshi 등, 1985), 노화가 진행되는 동안에 미토콘드리아의 기능저하와 형태학적인 변화가 어떠한 상관관계를 가지고 있는지를 명확하게 보여주는 보고는 없었으며, 이것은 아마도 이 둘 사이의 상관관계를 설명해주는 적절한 세포모델 체계가 없기 때문이다. 최근에 본 연구실에서 정상 간세포인 Chang 세포에 철 이온 흡착제 Deferoxamine (DFO)를 처리하였을 때 세포노화가 유도되고 (Yoon 등, 2002), 이 과정의 초기에 complex II의 활성 저하와 함께 미토콘드리아의 기능이상이 손상됨을 보고 하였다 (Yoon 등, 2003). 또한 이 과정에서 흥미롭게도 미토콘드리아의 형태가 DFO 처리 3일만 정상보다 5배 이상으로 길어진 미토콘드리아가 점진적으로 나타나는 것을 관찰하였고, 이때 미토콘드리아 DNA 감소와 활성산소 (ROS)생성 증가가 동반됨이 확인되었다 (Yoon 등, 2004 unpublished data). 본 연구에서는 DFO로 유도된 세포노화 과정에서 관찰된 거대 미토콘드리아 형성에 어떠한 매개인자가 직접적으로 관련되어 있는지를 확인하였고, 또한 이 과정에서 미토콘드리아 형태 조절인자인 Drp1, Mfn1과 Mfn2가 어떻게 작용하고 있는지를 알아보았다. 또한 세포가 노화로 진행 될 때 거대한 미토콘드리아의 형성은 일반적

인 현상임을 증명하였다. 그리고 미토콘드리아 분열 조절인자인 Drp1의 인산화 및 GSK3 β 와의 상호작용을 관찰함으로써 Drp1의 조절기전을 알아보았다.

먼저 DFO로 유도된 세포노화과정에서 나타난 활성산소의 증가, 미토콘드리아 DNA 양의 감소 및 complex II의 기능저하와 같은 미토콘드리아 기능이상 중 어떠한 것이 거대 미토콘드리아 형성에 관여되어 있는지를 exogenous H₂O₂, EtBr과 complex II 억제제인 TTFA를 사용하여 알아보았다. 그 결과 흥미롭게도 H₂O₂ (200 μ M)를 세포에 처리하였을 때 세포노화가 유도되는 것을 확인했으며 (Fig. 2A), 이때 길어진 미토콘드리아 형성이 유도되는 것을 관찰하였다 (Fig. 2C). 그러나 높은 농도의 H₂O₂ (1mM)를 처리하였을 때는 미토콘드리아들이 핵 주위로 모이면서 fragmentation됨이 관찰되었다 (Fig. 2D). 이것은 일정농도 즉 세포노화를 유도시킬 수 있는 subcytotoxic 농도로 증가된 활성산소가 거대 미토콘드리아 형성에 관여하고 있는 인자임을 암시한다. 한편 TTFA에 의한 complex II 기능의 억제만으로는 미토콘드리아들이 fragmentation됨이 관찰되었으며 (Fig. 1A, B), 이 현상은 높은 농도의 glucose가 포함되어 있는 배지에서 실험하여도 동일한 결과를 얻었다 (Fig. 1C). 이 결과는 세포내 에너지 level과는 상관없이 미토콘드리아들이 fragmentation되는 것을 보여준다. 그러나 TTFA에 의한 이러한 효과에 대해서는 자세히 알지는 못했다. 마지막으로 미토콘드리아 DNA의 복제를 특이적으로 억제한다고 알려진 저농도의 EtBr로 미토콘드리아의 DNA에 손상을 유도하거나 미토콘드리아 DNA를 완전히 제거시킨 ρ^0 세포주에서는 미토콘드리아의 cristae구조만이 비규칙적으로 변한 것을 관찰하였다 (Fig. 3C, D). 이 결과는 이전에 보고된 다른 ρ^0 세포주에서 관찰된 미토콘드리아 형태와 일치한다는 것을 알 수 있었으나 (Gilkerson 등, 2000) 이것에 대해 아직까지 보고된바 없다.

노화된 조직에서 거대하게 enlarged된 혹은 다양한 크기와 모양을 가진 미토콘드리아가 종종 관찰되고 있으나 (Coleman 등, 1987; Murakoshi 등, 1985),

세포노화과정에서 미토콘드리아의 형태변화에 대해서는 보고된바가 없다. 본 연구에서는 다양한 세포노화모델을 통해 거대 미토콘드리아의 형성은 세포가 노화로 진행 될 때 일반적으로 나타나는 현상임을 증명하였다. DFO나 H₂O₂를 Chang 세포에 처리하여 유도된 세포노화 모델에서 뿐 (Yoon 등, 2004 unpublished data; Fig. 2C)아니라 primary human diploid fibroblast 세포를 지속적으로 계대배양시킴으로서 세포노화를 유도시켜 얻은 old HDF세포에서도 거대 미토콘드리아가 관찰되었다 (Fig. 4C). 또한 Mv1Lu 세포주에 TGF β 1 또는 H₂O₂를 처리하여 유도시킨 세포노화에서도 (Yoon 등, 2004) 역시 거대 미토콘드리아가 관찰되었다 (Yoon 등, 2004 unpublished data). 특히 위의 모든 세포노화 모델에서 활성산소 생성의 증가는 공통적으로 나타나는 현상이었으므로 (Yoon 등, 2004 ; Kim 등, 2003), 세포노화과정동안에 생성되는 활성산소가 거대 미토콘드리아 형성에 관여할 수 있다는 것을 뒷받침 해 준다.

미토콘드리아의 형태는 분열과 융합과정이 조화로운 균형을 통해 유지된다고 알려져 있다 (Scheffler, 1999). 그러므로 세포노화과정에서 나타난 거대 미토콘드리아 형성의 가능한 기전으로써 다음과 같이 세 가지의 경우로 생각할 수 있다. 융합과정의 활성화, 분열과정의 억제 혹은 이 두 현상이 같이 작용한 경우 등이다. 그래서 이러한 기전을 알아 보기위해 본 실험에서는 미토콘드리아의 형태 조절인자들의 발현량 과 Drp1에 대한 Mfn1과 Mfn2의 발현비율을 조사하였을 때 모든 세포노화 모델에서 Mfn2/Drp1에 발현비율이 증가하는것을 관찰하였고 (Fig. 5A, B, C, D). 특히 H₂O₂에 유도된 세포노화및 old HDF세포군에서 Mfn1/Drp1 발현비율이 증가함을 보였다 (Fig. 5B, C, D). Drp1은 DFO에 의해 유도된 세포노화에서만 발현량이 변화가 없을 뿐 (Fig. 5A) 다른 세포노화 모델에서는 발현량이 감소하였다 (Fig. 5B, C). 이 처럼 Drp1은 세포가 받은 stress에 따라 그 발현양상이 다르다는 것을 알 수 있었다. 흥미로운 점은 융합 조절인자인 Mfn1과 Mfn2의 발현량 양상이 서로 다르다는 것을 볼 수 있는데,

아마도 이 두 단백질이 미토콘드리아 융합과정에서 서로 다르게 작용할 수도 있다는 것을 암시한다. 최근에 보고된 바에 의하면 Mfn1 과 Mfn2를 knock out 시킨 mouse에서 배 발생 치사를 일으켰고, 여기서 분리한 MEF (Mouse Embryonic fibroblast)세포에서 미토콘드리아의 fragmentation된 현상을 관찰하였는데, fragmentation된 미토콘드리아의 크기와 형태가 Mfn1 과 Mfn2 knock out 된 세포에서 다른 것을 관찰하였다. 이것으로 볼 때 Mfn1과 Mfn2는 미토콘드리아 융합에서 필수적인 단백질을 보여주고 서로 약간 다른 기능을 가지고 있다는 것을 제시해준다 (Chen 등, 2003). 결론적으로, 거대 미토콘드리아 형성은 형태조절 인자인 Mfn/Drp1 발현비율이 Mfn이 증가하는 방향으로의 shifted balance에 의한 융합과정의 활성화에 의해 형성되었을 것으로 생각할 수 있다.

본 실험에서 Drp1을 면역침전 시킨 후 인산화된 serine, threonine, tyrosine 잔기만을 특이적으로 인지 하는 항체로 immunoblotting하여 Drp1 이 인산화 되어 있음을 확인하였다 (Fig. 8). 더욱이 tyrosine 잔기의 인산화도는 DFO 처리에 의해 영향을 받지 않았으나, serine, threonine잔기의 인산화도는 DFO를 처리한 세포군에서는 감소하는 형태를 나타내었다 (Fig. 8). 그리고 본 연구에서 한 가지 재미있는 사실을 관찰하였는데 바로 GSK3 β 가 Drp1과 같이 면역 침전 되는 것을 확인함으로써 (Fig. 10), GSK3 β 가 Drp1과 결합하여 인산화 시킬 수 있는 가능성을 제시하였다. GSK3 β 는 serine, threonine 잔기를 인산화 시키는 kinase로서 세포내에서 여러 가지 주요 신호전달에서 상당히 중요한 기능을 하고, 특히 glycogen 대사과정을 조절하는 중요한 단백질로 알려져 있다 (Frame 와 Cohen, 2001). 이와 더불어 본 연구에서는 DFO를 처리 했을때 glycogen이 축적 되는 것을 확인 하였는데, 이것은 GSK3 β 의 불활성화에 따른 glycogen 합성 효소의 활성화로 인한 결과로 생각 할 수 있다. GSK3 β 는 현재 까지 9번째 serine 잔기의 인산화에 의해 불활성화 된다고 알려져 있다 (Frame

와 Cohen, 2001). 흥미롭게도 DFO를 처리한 세포군에서 GSK3 β 의 9번째 serine 잔기의 인산화가 증가하는 것을 확인하였으며 (Fig. 9), 이 결과로써 GSK3 β 가 DFO를 처리 했을 시 불활성화가 되며 결과적으로 glycogen 합성효소의 활성화에 의해서 glycogen 합성이 증가한 것이라고 생각되었다. 한편, 이전의 보고에서 Drp1과 GSK3 β 가 상호작용을 한다는 것을 보고되어 있고, Drp1이 GSK3 β 에 의해 인산화가 일어날 수 있는 하나의 기질로 작용 할 수 있다는 것이 알려져 있다 (Chen 등, 1998; Chen 등, 2000). 그러므로 위의 결과들을 종합하여 살펴 볼 때 GSK3 β 가 Drp1과 상호작용을 하여 Drp1의 인산화를 통해서 기능을 조절 할 수 있는 기전을 생각하게 되었다. 특히 DFO를 처리한 세포군에서 GSK3 β 의 9 번째 serine의 인산화 증가에 의한 이 단백질의 활성 감소와 이에 따른 Drp1의 serine, threonine 잔기의 인산화 감소가 Drp1 단백질의 기능이 조절되는 하나의 기전으로 생각 할 수 있었다. 하지만 GSK3 β 에 의한 Drp1의 조절 기전을 자세 히 이해하기 위해서는 좀 더 면밀한 연구가 수행되어야 한다고 생각한다.

V. 결 론

본 연구에서는 철 이온 흡착제 (Deferoxamine, DFO)을 Chang 세포에 처리 하였을 때 유도된 세포노화 과정에서 나타난 거대 미토콘드리아의 형성의 기전을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다. DFO를 처리해서 나타난 활성산소 생성증가, 미토콘드리아 DNA 양 감소, complex II 기능저하 와 같은 미토콘드리아 기능 이상 중에서 활성산소 생성 증가가 거대 미토콘드리아 형성을 매개하는 인자임을 확인 했고, 세포가 노화로 진행 될 때 거대 미토콘드리아의 형성은 일반적으로 나타나는 현상이라는 것을 알았다. 그리고 여기에는 미토콘드리아 형태조절인자인 Mfn 과 Drp1의 발현비율이 Mfn 단백질의 발현량이 증가하는 방향으로의 shifted balance에 의해 매개되는 융합과정의 활성화로 인해서 거대 미토콘드리아가 형성되었을 것이라는 결론에 도달하였다. 또한 GSK3 β 와 Drp1의 상호작용과 Drp1의 인산화를 확인함으로써 Drp1 단백질의 조절기전을 이해 하는데 하나의 단서를 제공하였다.

참고문헌

1. Bereiter-Hahn J, Voth M: Dynamics of mitochondria in living cells, shape changes, distribution, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 27:198-219, 1994
2. Benzi G, Pastoris O, Marzatico RF, Villa RF, Curti D: The mitochondrial electron transfer alteration as a factor involved in brain aging. *Neurobiol. Aging.* 13:361-368, 1992
3. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC: Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell. Biol.* 160:189-200, 2003
4. Chen CH, Hwang SL, Hwang SL, Chou CK, Hong YR: Three rat brain alternative splicing dynamin-like protein variants: interaction with the glycogen synthase kinase 3 β and action as a substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:893-898, 2000
5. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9363-9367, 1995
6. Frame S, Cohen P: GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* 359:1-6, 2001
7. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ: The role of dynamin-related protein 1, a mediator

- of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell.* 1: 515-525, 2001
8. Gilkerson RW, Margineantu DH, Capaldi RA, Selker J: Mitochondrial DNA depletion causes morphological changes in the mitochondrial reticulum of cultured human cells. *FEBS Lett.* 474:1-4, 2000
 9. Hong YR, Chen CH, Cheng DS, Howng SL, Chow CC: Human dynamin-like protein interacts with the glycogen synthase kinase 3beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249:697-703, 1998
 10. Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, Takasawa M, Osawa T: Age associated damage in mitochondrial DNA in human hearts. *Mol. Cell. Biochem* 119:95-103, 1993
 11. Hermann GJ, Shaw JM: Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu Rev Cell Biol* 14:265-303, 1998
 12. Hales KG, Fuller MT: Developmentally Regulated Mitochondrial Fusion Mediated by a Conserved, Novel, Predicted GTPase. *Cell* 90:121-129, 1997
 13. Hermann GJ, Thatcher JW, Mills JP, Hales KG, Fuller MT, Nunnari J, Shaw JM: Mitochondrial fusion in Yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell. Biol.* 143:359-373, 1998
 14. Hauswirth WW, Lim LO, Dujon B, Turner G: Methods for studying the genetics of mitochondria. *Mitochondria: a practical approach.* (ed. V. M. Darly-Usmar., D. Rickwood. and M. T. Wilson), Washington DC: IRL Press pp.171-244, 1987
 15. Jensen RE, Aken Hobbs AE, Cervey KL, Sesaki H: Yeast mitochondrial

- dynamics: fusion, division, segregation, and shape. *Micro. Res. Tech.* 51: 573–583, 2000
16. Karbowski M, Youle RJ: Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ.* 10:870–880, 2003
 17. Kim HS, Song MC, Kwak IH, Park TJ, Lim IK: Constitutive induction of p-Erk1/2 accompanied by reduced activities of protein phosphatases 1 and 2A and MKP3 due to reactive oxygen species during cellular senescence. *J. Biol. Chem.* 278:37497–37510, 2003
 18. Mozdy AD, McCaffery JM, Shaw JM: Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 151:367–380, 2000
 19. Murakosh M, Osamura Y, Watanabe K: Mitochondrial alterations in aged rat adrenal cortical cells. *Tokai J Exp Clin Med* 10:531–536, 1985
 21. Nagley P, Wei YH: Ageing and mammalian mitochondrial genetics. *Trends Genet.* 14:513–517, 1998
 22. Olichon A, Bariacult L, Guillou E, Valette A, Belenguer P L: Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 278:7743–7746, 2003
 23. Ono, T, Isobe K, Nakada K, Hayashi JI: Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nature Genet.* 28:272–275 , 2001
 24. Otsuga D, Keegan BR, Brisch E, Thatcher JW, Hermann GJ, Bleazard W,

- ShawJM: The dynamin-related GTPase, dnmlp, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* 143:333-349, 1998
25. Pitts KK, Yoon Y, Krueger EW, Mcniven MA: The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell.* 10:4403-4417, 1999
 26. Rapaport D, Brunner M, Neupert W and Westermann B : Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol.Chem.* 273:20150-20155 ,1998
 27. Rojo M, Legros ., Chateau D and Lombes A : Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins. ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.* 115:1663-167, 2002
 28. Shaw JM, Nunnari J: Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol* 12:178-184, 2002
 29. Sesaki H, Jensen RE: UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol.* 152:1123-1134, 2001
 30. Skulachev VP: Mitochondrial filaments and clusters as Intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.* 26:23-29, 2001
 31. Santel A, Fuller MT: Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J.Cell Sci* 114:867-874, 2001
 32. Sesaki H, Jensen RE: Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biol.* 147:699-706,

1999

33. Scheffler I: Mitochondria. New York: John Wiley & Sons Inc, 1999
34. Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, Van der Bliek AM: A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biol.* 143:351-358, 1998
35. Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, Van der Bliek, AM: Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 12:2245-2256, 2001
36. Terman A, Dalen H, Eaton JW, Neuzil J, Brunk UT: Mitochondrial recycling and aging of cardiac myocytes: the role of autophagocytosis. *Exp. Gerontol.* 38 :863-876, 2003
37. Tieu Q, Nunnari J: Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J Cell Biol* 151:353-366, 2000
38. Tandler B, Hoppel CL: Studies on giant mitochondria. *Ann. NY Acad. Sci* 488:65-81, 1985
39. Wong E, Wagner JA, Scott SV, Okreglak V, Holewinski TJ, Cassidy-Stone A: The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p is a component of a protein complex that mediate mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 160:303-311, 2003
40. Wallace D C: Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 256:628-632, 1992

41. Westernmann B: Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep* 3:527-531, 2002
42. Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, Mcniven MA: The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol. Cell. Biol* 23:5409-5420, 2003
43. Yoon YS, Lee JH, Hwang, SC. Kim YS, Baek CM, Yoon G: TGF β 1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mv1Lu cells. *Oncogene* (in press), 2004
44. Yoon G, Kim HJ, Yoon YS, Cho H, Lim, IK, Lee J: Iron chelation-induced senescence-like growth arrest in hepatocyte cell lines: association of transforming growth factor β 1 (TGF β 1)-mediated p27^{Kip1} expression. *Biochem. J.* 366:613-621, 2002
45. Yoon YS, Byun HO, Cho H, Kim BK, Yoon G: Complex II defect via down-regulation of iron-sulfur subunit induces mitochondrial dysfunction and cell cycle delay in iron chelation-induced senescence-associated growth arrest. *J. Biol. Chem.* 278:51577-51586, 2003
46. Yoon DS, Yoon YS, Lim IK, Chung HY, Yoon SH, Rojo M, Byun HO, Lim, JJ, Yoon GS: Formation of elongated giant mitochondria during cellular senescence:switched balance of Drp1 and mitofusin expressions toward enhanced fusion process (unpublished data), 2004
47. Young SL, Fram,EK, Spain CL, Larson EW: Development of type II pneumocyte in rat lung. *Am. J. Physiol* 60:L113-L122, 1991

-ABSTRACT-

Mechanism on Elongated Mitochondria Formation during Iron Chelation-Induced Senescent Arrest

Dong-Sun Yoon

Department of Medical Sciences

The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Assistant Professor Gyesoon Yoon)

Enlarged or giant mitochondria have often been documented in aged tissues and several human disease harboring impaired function, although their role and the mechanism involved remain unclear. Recently, we observed progressive changes of mitochondrial morphology to highly elongated form during iron chelation-induced senescence-associated growth arrest of Chang cells. Interestingly, addition of H₂O₂ (200uM) was enough to induce mitochondrial elongation with cellular senescent phenotypes, whereas ethidium bromide (100ng/ml) which was employed to damage mtDNA only reformed cristae structure. TTFA, which is known to complex II inhibitor was induced fragmentation of mitochondria. Elongated giant mitochondria also found in old human diploid fibroblast. Next, we examined expression levels of Drp1 and Mfn proteins, which are known as molecules directly regulating mitochondrial fission and fusion process, respectively. The total cellular expression levels of Drp1 was not significantly changed or decreased, showing diversity of its regulation depending on the stress, whereas expression level of Mfn2 increased in all senescent systems employed. Finally, the increased expression level of Mfn1 and Mfn2 proteins were also observed in the aging process of

Sprague–Dawley rats. Taken together, we propose that formation of elongated mitochondria is one of common phenomena developed in the cellular progress to senescence or aging and it might be promoted through ROS production and through enhanced fusion process mediated by a shifted balance of Mfn/Drp1 expression ratio toward Mfn proteins.

Additionally, we observed the interaction between Drp1 and GSK3 β and also found phosphorylation of Drp1, providing the clue of Drp1 regulation by GSK3 β .

Key words: Mitochondria, cellular senescence, fusion, mitofusin, Drp1