

인간 신경 줄기세포 HB1.F3에서 alpha-synuclein과 synphilin-1 유전자 전이를 통한 봉입체 형성과 세포 자멸사

동아대학교 의과대학 신경과, 아주대학교 뇌질환 연구센터^a

천상명 이 광^a 김재우 김승업^a

Inclusion Body Formation and Apoptotic Cell Death in the Human Neural Stem Cells HB1.F3 Following Gene Transfection of Alpha-Synuclein and Synphilin-1

Sang-Myung Cheon, M.D., Gwang Lee, Ph.D.^a, Jae Woo Kim, M.D., Seung Up Kim, M.D.^a

Department of Neurology, College of Medicine, Dong-A University, Busan; Brain Disease Research Center, Ajou University^a, Suwon, Korea

Background: The etiology of Parkinson's disease (PD) has not been established, but familial forms of the disease have some clues for its pathogenesis. Autosomal dominantly inherited familial PD induced by aberrations of the alpha-synuclein gene has been known as a genetic model of PD and sheds light to the understanding of PD pathogenesis. Synphilin-1 is a protein which interacts with alpha-synuclein and constitutes the Lewy body.

Methods: Immortalized human neural stem cells were transfected with the alpha-synuclein gene and synphilin-1 gene, to define the role of Lewy body inclusions in neuronal cell death.

Results: Human neural stem cells with Lewy body-like inclusions showed an increased apoptotic cell death compared to those with diffuse alpha-synuclein-positive and synphilin-1-positive reaction after transfection with the alpha-synuclein gene and synphilin-1 gene. Tyrosine hydroxylase over-expressing cells produced a high level of levodopa and showed a higher rate of the apoptotic marker.

Conclusions: These results suggest that the formation of Lewy body-like inclusions by the over-expression of alpha-synuclein and synphilin-1 could be an underlying cause of apoptotic neuronal cell death and the dopaminergic cell might be more susceptible.

J Korean Neurol Assoc 25(3):344-352, 2007

Key Words: Parkinson's disease, Alpha-synuclein, Lewybody, Levodopa, Apoptosis

서 론

파킨슨병(Parkinson's disease)은 대표적인 신경계 퇴행성

질환의 하나로 서동, 강직, 진전, 보행 장애 등의 운동 증상을 주증상으로 하고 중뇌 흑색질의 도파민성 신경세포의 변성과 소실, 신경세포질 내의 루이체(Lewy body)가 특징적인 병리 소견이다.¹ 대부분 특발성으로 발병하게 되고 다양한 유전적, 환경적 요인 등이 원인으로 추정되고 있으나 현재까지 뚜렷한 병인이 밝혀지지는 않았다.²

특발성 발병이 대부분이지만 일부는 유전자 이상으로 인해 가족성으로 발병하게 되는데 원인 유전자로는 alpha-synuclein, parkin, ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1, DJ-1 등이 알려져 있다.³⁻⁶ 이 가운데 alpha-synuclein 유전자 이상

Received January 19, 2007 Accepted March 9, 2007

* Jae Woo Kim, M.D.

Department of Neurology, College of Medicine, Dong-A University 1, 3-ga, Dongdaesin-dong, Seo-gu, Busan, 602-715, Korea

Tel: +82-51-240-5266 Fax: +82-51-244-8338

E-mail: jwkim@mail.donga.ac.kr

* 이 논문은 2004학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제)에 의하여 연구되었음.

으로 인한 가족성 파킨슨병은 병리 소견을 포함하여 대부분의 특발성 질환의 특징을 가지고 있어 파킨슨병의 병태 생리를 이해하는 중요한 병리 기전으로 주목받고 있다.⁷

루이체를 구성하는 중요 성분이 alpha-synuclein이고 이 단백질의 이상이 루이체를 형성하고 신경세포 손상과 연관된다는 기존의 가정에 반해서, 최근에는 세포 보호를 위한 기제로 루이체가 만들어진다는 연구 결과가 보고되고 있다.^{8,9} 즉 정상적으로 세포질 내에 용해되어 존재하는 alpha-synuclein 등의 단백질이 과발현되거나 돌연변이, 혹은 산화 손상 등에 의해 응집된 형태로 변하게 되고 이들의 축적으로 인한 세포 독성을 막기 위해 불필요한 단백질 제거 기체인 ubiquitine-proteasome system이 작동하여 이들을 격리 혹은 제거시키고, 이러한 과정의 산물이 루이체라는 것이다.^{10,11} 그러나 이에 대한 뚜렷한 결론은 아직 내려지지 않았다.

또한 파킨슨병에서 루이체가 중뇌 흑색질의 도파민성 신경세포뿐 아니라 뇌간, 대뇌 피질, 척수 그리고 말초신경에서도 발견되기는 하지만 질환 초기에 선택적이며 우선적으로 중뇌에서 발견되고 중뇌의 도파민성 신경세포의 소실 정도가 운동 증상의 발현을 예측할 수 있다고 알려져 있는데,¹² 모든 신경세포에 존재하는 alpha-synuclein이 유독 중뇌의 도파민성 세포에 루이체를 형성하고 세포 자멸사를 유발하는 이유에 대해서는 명확히 밝혀져 있지 않다. 비록 도파민이 대사 과정에서 산화되어 다양한 반응성 산소 화합물을 생성해 내고 이에 의한 산화 손상이 도파민성 신경세포를 먼저 손상시킨다는 가설이 있고 도파민으로 인한 직접적인 세포손상을 확인한 보고도 있으나,¹³⁻¹⁵ 이는 다양한 손상 기전에 대한 일반적인 설명일 뿐 alpha-synuclein이라는 특정 단백질과의 연관성을 설명하기에는 미흡하다.

alpha-synuclein과 반응하는 단백질로 밝혀진 synphilin-1은 alpha-synuclein과 같이 시냅스전 신경말단에 존재하며 루이체를 구성하는 한 요소이다.^{16,17} alpha-synuclein과 synphilin-1 유전자를 동시에 전이시켜 과발현시킨 경우 세포 내 두 단백질이 같은 위치에 존재하는 것이 면역염색을 통해 밝혀졌고 루이체와 같은 세포 내 봉입체 생성이 증가한다고 알려져 있다.^{18,19}

이에 아직 확립되지 않은 루이체 병리 소견과 세포 자멸사와의 연관성을 밝히고 도파민성 신경세포에서 이러한 연관성이 어떻게 변화하는지 알아보고자 alpha-synuclein과 synphilin-1 유전자를 이용하여 본 연구를 수행하였다. 사용된 인간 신경세포주는 *v-myc*로 불사화된 인간 신경줄기 세포주이며 여기에 human tyrosine hydroxylase 유전자로 형질 전환된 세포주에서 도파민을 생성하는지 확인하여 도파민성 세포로

간주하고 이 두 세포주를 비교하여 도파민성 세포에서 세포자멸사의 변화를 확인하고자 하였다. 그리고 alpha-synuclein과 synphilin-1 유전자를 전이시킨 뒤 면역염색을 통하여 유전자 발현을 확인하고 루이체와 같은 봉입체 형성과 세포 자멸사를 관찰하여 연관성을 살펴보고, 두 세포주를 비교하여 도파민성 세포에서 봉입체 형성과 세포 자멸사의 관계를 확인하고자 하였다.

대상과 방법

1. 세포배양

이 연구에서는 15주 된 인간 태아 중뇌(human embryonic telencephalon)에서 얻은 일차 세포를 배양하여 *v-myc* oncogene으로 형질 전환하여 불사화된 신경줄기세포(neural stem cell)를 이용하였다.¹⁹⁻²¹ 이 세포주 가운데 하나의 클론인 HB1.F3는 신경줄기세포에 특이적인 nestin과 vimentin을 발현하고 신경세포(nerve cell)와 신경교세포(glial cell)의 표지도 포함하고 있다.^{19,22} 여기에 human tyrosine hydroxylase gene (hTH)으로 형질 전환시킨 HB1.F3.TH를 HB1.F3와 함께 사용하였다.²³ 두 세포주를 10% fetal bovine serum이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-BRL, Gathersberg, MD, USA)에서 배양하였고 10 μM의 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 세포 성장과 형태, 배양 시간 등이 두 세포 사이에서 차이가 없음을 확인한 후 이를 이용하였다.

2. 유전자 전이

사용한 유전자는 Lee 등의 연구에서 제작한 인간 alpha-synuclein 유전자와 N-terminal FLAG tag synphilin-1 유전자를 사용하였다.²⁴ HB1.F3와 HB1.F3.TH 두 세포에 정상 인간 alpha-synuclein 유전자와 synphilin-1 유전자를 Super-Fect Transfection Reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 일시적 유전자 전이(transient transfection)를 수행하였다.

3. 레보도파(Levodopa)와 도파민의 측정

두 세포주에서 BH₄를 첨가하기 전과 첨가한 후의 레보도파와 도파민을 측정하였다. 배양액은 세포를 2일 동안 배양한 뒤 alumina (180 mg/ml, Sigma)와 섞어 4℃에서 하루 동안 반응

시켰다. Sample buffer (0.1 M perchloric acid, 0.1 mM EDTA) 400 μ l로 세척 분리하고 0.22 μ m filter로 걸러냈다. 세포부분의 분석을 위해 세포를 긁어 모은 뒤, 400 μ l의 sample buffer와 혼합하여 분쇄시켰다. 이를 원심분리한 뒤 상층액을 0.22 μ m filter로 걸러냈다. 이렇게 정제된 배양액과 세포부분을 Reverse-Phase HPLC (Waters, Milford, MA, USA) system에 각각 10 μ l 주사하고, 0.5 ml/min으로 mobile phase (0.07 M sodium phosphate monobasic, 1 mM sodium octanesulfonic acid, 0.1 mM EDTA, 8% acetonitrile, pH3.4)를 흘려주었다. Column은 HR-80 RP-C18 (Esa, Chelmsford, MA, USA)을 이용하였으며, 400 mV에서 coulchem II electrochemical detector (Esa)로 분석하였다.

4. Western blot analysis

배양된 세포를 Phosphate buffered saline (PBS)로 세척하고 lysis buffer (0.1% SDS, 1.0% Triton X-100 and 1.0% Deoxycholate in PBS containing 1 mM DTT, 1% protease inhibitor cocktail (Sigma), 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF and 1 mM α -glycerophosphat)를 첨가하여 용해시켰다. 이 용해물을 4°C에 30분 간 정치시킨 후 13000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취한다. 취해진 상층액을 Protein assay kit (Bio-Rad)를 이용하여 단백질 농도를 측정 한 다음 동일한 양의 단백질을 사용하여 실험을 수행하였다. 100°C에서 8분 동안 denaturation시킨 뒤 SDS-polyacrylamid gel (SDS-PAGE)을 사용하여 분리하고 Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, Boston, MA, USA)로 옮겼다. 이를 1시간 동안 상온에서 blocking buffer (5% skim milk, and 0.1% Tween 20 in PBS)를 처리한 뒤 4°C에서 rabbit anti-tyrosine hydroxylase antibody (Chemicon, Temecula, CA, USA), monoclonal mouse anti- α -synuclein antibody (Sigma), monoclonal rabbit anti-Flag antibody (Sigma)의 일차항체로 각각 16시간 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 wash buffer (PBS with 0.1% Tween 20)로 세척 한 다음 상온에서 1시간 동안 Hoarseradish peroxidase-conjugated anti-mouse, anti-rabbit immunoglobulin G (Amersham Pharmacia)의 2차 항체와 각각 반응시킨 후 ECL kit (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)에 반응시켜 Luminescent image analyzer system (Fujifilm, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

5. 면역염색

세포를 ECM gel (Sigma)이 도포된 Aclar plastic coverslip 에서 배양한 다음 4% formaldehyde로 상온에서 30분간 고정 하였다. PBS로 세척한 뒤 0.3% Triton X-100와 0.1% bovine serum albumin, 10% normal goat serum으로 permeabilization과 blocking 한 다음 다시 PBS로 세척하고 rabbit anti-tyrosine hydroxylase antibody (Chemicon), monoclonal mouse anti- α -synuclein antibody (Sigma), monoclonal rabbit anti-Flag antibody (Sigma)의 일차 항체로 4°C에서 16시간 동안 각각 반응시켰다.

핵을 확인하기 위해 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI, Sigma)로 5분 동안 염색하였고 세포 자멸사를 확인하기 위해서는 TUNNEL kit (Takara, Otsu, Japan)을 사용하여 제조사의 방법에 따라 염색하였다. 다시 세척한 후 상온에서 1시간 동안 fluorescein-conjugated goat anti-mouse, anti-rabbit immunoglobulin G (Molecular Probe, Eugene, OR, USA)로 반응시킨 후 Crystal-mount (Biomed)를 사용하여 glass silde 에 올린 다음 형광현미경(Carl Zeiss)으로 관찰하였다.

결 과

1. Tyrosin hydroxylase의 발현

이 연구에서 불멸화된 인간 신경줄기세포주 HB1.F3와 여기에 human tyrosin hydroxylase (TH) 유전자를 삽입시켜 형질 전환시킨 HB1.F3.TH를 실험에 사용하였다. 두 세포주가 성장 속도와 형태에 있어 차이가 없음을 확인하고 HB1.F3.TH에서 TH가 발현되는가를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 단백질 수준의 발현을 확인하기 위해 western blot assay를 시행한 결과 60-62 kDa의 띠가 HB1.F3.TH에서 확인되었고 HB1.F3에서는 관찰되지 않았다(Fig. 1-A). TH 항체를 이용하여 면역 세포화학염색을 시행한 결과 HB1.F3에서는 염색이 되지 않았고 HB1.F3.TH에서 세포질에 고르게 TH 항체로 염색이 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1-B).

2. 레보도파와 도파민의 측정

두 세포주에서 HPLC를 시행하여 배양액과 세포 내에서 레보 도파와 도파민의 양을 측정하였다. 세포내에서와 배양액에서 도파민의 양은 측정하기 힘들 정도로 소량이었고 두 세포주 사이의 차이도 없었다.

생성되는 레보도파의 양은 HB1.F3와 HB1.F3.TH에서 24 시간 배양액에서는 10⁶개 세포에 363 pg과 921 pg이었고 세포

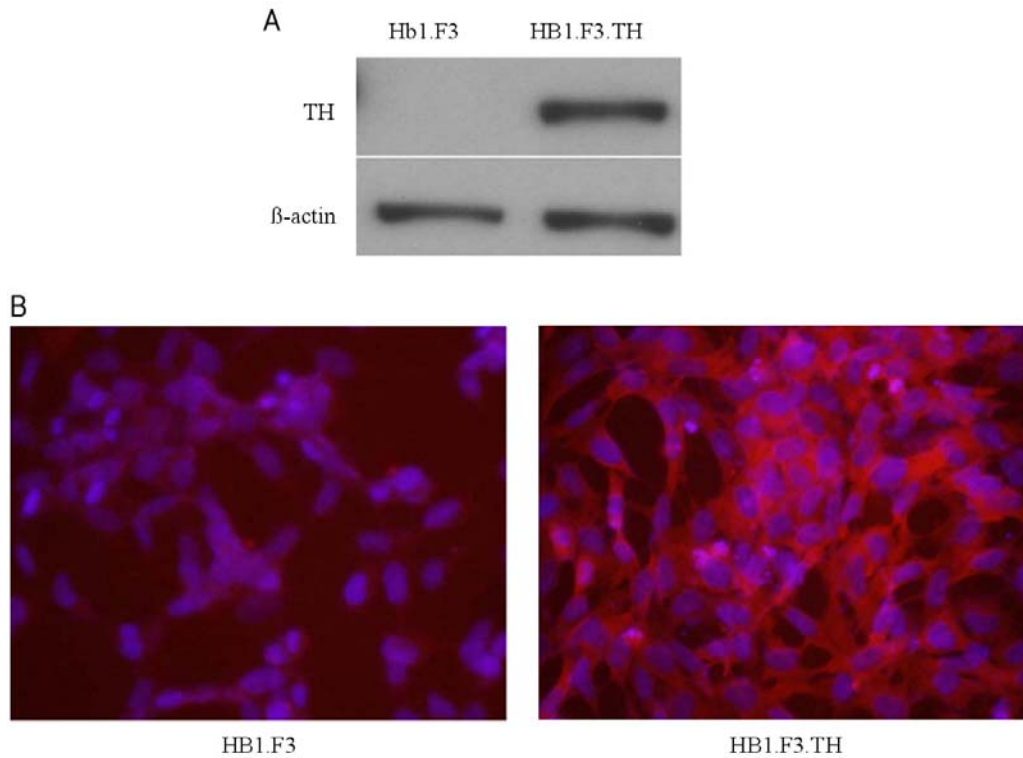


Figure 1. Expression of tyrosine hydroxylase (TH) in HB1.F3.TH. (A) Western blotting analysis showed 60 kDa band in HB1.F3.TH. (B) Immunostaining with anti-TH antibody showed homogenous expression of TH (red) in cytoplasm of HB1.F3.TH.

내에서는 10^6 개 세포에 5.8 pg과 8.5 pg이었다. 세포 내보다 배양액에서 높은 농도로 확인되었는데 이는 세포 내에서 생산된 후 배양액에 분비되어 측정되었기 때문으로 보인다.

두 세포주에서 큰 차이가 없다고 판단하고 카테콜아민 생성의 보조인자인 5,6,7,8,-Tetrahydrobiopterin (BH₄)를 배양액에 첨가하여 보았다. 세포독성이 있는 BH₄를 농도에 따라 배양액에 첨가하여 본 결과 10 μM의 BH₄가 첨가 된 경우 두 세포가 성장과 형태에 있어 차이가 없는 것을 확인하고 2시간 배양액에서 레보도파 농도를 측정하였다. HB1.F3와 HB1.F3.TH에서 10^6 개 세포에 1.6 ng과 20.3 ng으로 10배 이상 차이를 보여,

Table 1. Inclusion body formation in human neural stem cells following gene transfection of a-synuclein and synphilin-1

	Inclusion body formation		
	a-synuclein (+)	synphilin-1 (+)	a-synuclein (+) & synphilin-1 (+)
HB1.F3	13.6±9.2%	ND	20.0±11.8%
HB1.F3.TH	16.2±12.4%	ND	23.5±18.5%
HB1.F3.TH-BH ₄ *	24.4±14.8%	ND	42.3±16.1%

*HB1.F3.TH cells grown in BH₄-containing media, ND; Not detectable.

의미 있게 차이나는 것으로 판단하고 BH₄를 배양액에 첨가하여 실험을 수행하고 첨가하지 않은 경우와 비교하였다.

3. Alpha-synuclein과 synphilin-1의 발현

두 세포주를 배양하여 alpha-synuclein과 synphilin-1 유전자가 일시적 유전자 전이를 통해 발현되는지 단백질 수준에서 확인하기 위해 시행한 western blotting assay에서 유전자 삽입을 하지 않은 대조군에서 나타나지 않는 40 kDa의 alpha-synuclein 띠를 유전자 전이시킨 HB1.F3와 HB1.F3.TH 두 세포주에서 관찰할 수 있었다(Fig. 2-A). 두 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 면역화학적 염색을 시행한 결과 각각 10% 이하의 발현율을 보였으며 그 중 20-30% 정도에서 이중으로 염색되는 것을 확인하였다(Fig. 2-B).

4. 봉입체(Inclusion body)와 세포 자멸사(Apoptosis)의 확인

Alpha-synuclein과 synphilin-1을 모두 발현하여 면역세

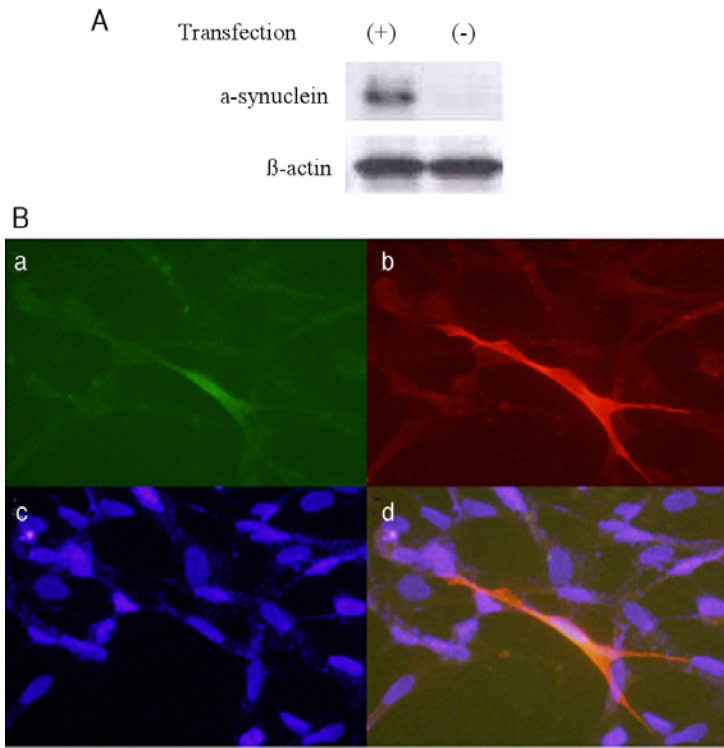


Figure 2. Expression of a-synuclein and synphilin-1 in HB1.F3 following gene transfection of a-synuclein and synphilin-1. (A) Western blotting analysis showed 40 kDa alpha-synuclein band following gene transfection. (B) Immunostaining with anti-a-synuclein (a), anti-synphilin-1 (b) antibody showed diffuse expression of alpha-synuclein (green) and synphilin-1 (red), and merged image (d) showed colocalization of two proteins in cytoplasm of transfected cells.

포화학적 염색에서 이중으로 염색되는 세포 가운데 루이체와 유사한 붕입체를 가진 세포는 30% 미만으로 적게 관찰되었다. 그러나 alpha-synuclein 만을 발현하는 세포에 비해 붕입체가 관찰되는 비율은 약 2배 정도 증가되어 관찰되었고, synphilin-1만 발현하는 세포에서는 붕입체를 관찰할 수 없었다 (Table 1). 그리고 BH₄를 배지에 첨가하여 레보도파를 생산하는 HB1.F3.TH (HB1.F3.TH-BH₄)와 HB1.F3를 비교해 보았을 때 붕입체가 나타나는 비율이 더 증가되는 양상이었으나 통계적 유의성은 없었다.

DAPI 염색으로 핵이 분절되거나 응축되는 염색질(fragmented or condensed chromatin)이 관찰되거나 TUNNEL assay를 통해 발색되는 것을 형광 현미경을 통해 확인한 경우를 자멸사로 보고 확인한 결과 각 세포군에서 alpha-synuclein

과 synphilin-1을 모두 발현하는 경우는 alpha-synuclein만을 발현하는 경우보다 세포 자멸사 비율이 높게 관찰되었으며 HB1.F3와 HB1.F3.TH 두 세포주 사이에는 큰 차이가 없었으나 HB1.F3.TH-BH₄에서는 alpha-synuclein만을 발현하는 경우에도 세포 자멸사가 관찰되는 비율이 높았다(Table 2, Fig. 3)

붕입체가 관찰되는 세포와 세포질에 미만성으로 염색이 되는 세포 두 군에서 세포 자멸사를 DAPI염색과 TUNNEL assay를 통해 비교한 결과 HB1.F3.TH와 HB1.F3, 그리고 HB1.F3.TH-BH₄ 모두에서 붕입체가 관찰되는 세포가 미만성으로 발현되는 세포에 비해 세포 자멸사의 비율이 더 높았다(Fig. 4).

고 찰

도파민성 신경세포의 자멸사를 관찰하기 위해 본 연구에서는 불사화된 인간 신경줄기세포(immortalized human neural stem cell)를 사용하였다. 이 세포주는 계대(passage) 및 배양 조건에 따라서 신경줄기세포(neural stem cell)와 신경세포(nerve cell), 신경교세포(glia cell)의 비가 달라지고 조건에 따른 정량적인 지표가 정립되어 있지 않다는 점 등이 단점으로 지적될 수 있다. 그러나 이러한 모든 세포들이 포함되어 있고 무엇보다도 한 세포에서 클론으로 분리된 세포주이므로 유전적으로나 세포생리학적으로 균질성을 가지고 있어 쉽게 유전학

Table 2. Apoptotic cell death in human neural stem cell lines as shown by DAPI staining and TUNNEL assay following gene transfection of a-synuclein and synphilin-1

	Apoptotic cells		
	control	a-synuclein (+)	a-synuclein (+) & synphilin-1 (+)
HB1.F3	10.7±2.7%	9.8±1.3%	40.0±22.5%
HB1.F3.TH	12.9±3.4%	8.8±2.1%	33.3±15.2%
HB1.F3.TH-BH ₄ *	10.7±0.8%	29.4±12.2%	53.3±18.1%

*HB1.F3.TH cells grown in BH₄-containing media.

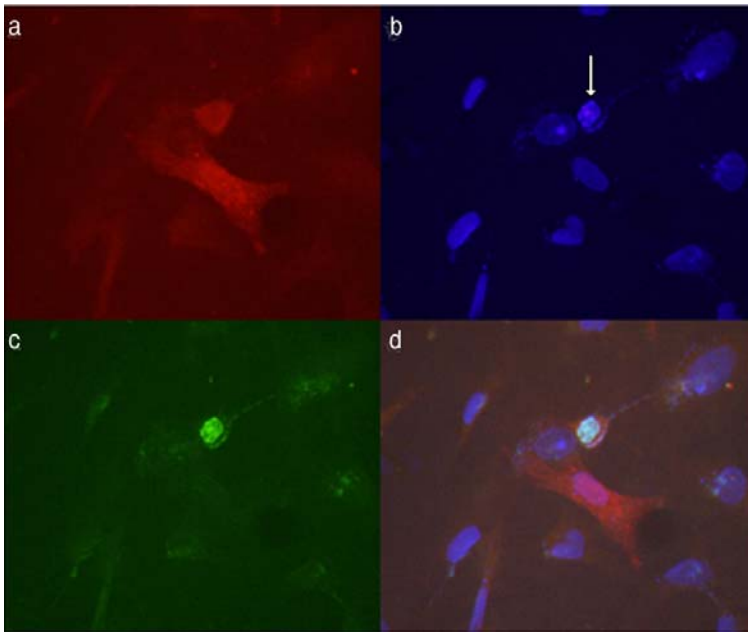


Figure 3. Apoptotic cell death in HB1.F3.TH-BH₄ as shown by DAPI staining and TUNNEL assay following gene transfection of α -synuclein and synphilin-1. Alpha-synuclein over-expressing cell (red in a) showed nuclear fragmentation and chromatin condensation (arrow in b) which was TUNNEL-positive (green in c) and co-localized in merged image (d).

적, 생화학적 조작을 할 수 있는 인간 신경세포라는 점에서 큰 장점이 있다. 불사화시키기 위해 *v-myc* 유전자로 형질 전환되었으나 신경세포의 특이적인 흥분성(excitability)을 가지고 있으며 여러 종류의 신경계 세포 지표를 포함하는 것이 확인되었다.²⁰⁻²² 도파민성 신경세포로 형질 전환을 위해 human tyrosine hydroxylase gene (TH)을 삽입시킨 HB1.F3.TH

세포주에서 단백질 수준과 그리고 면역 염색에서 고르게 발현되는 tyrosine hydroxylase (TH)를 확인하였다. 그리고 도파민과 그 전구 물질인 레보도파를 측정해 본 결과 두 세포 모두 도파민은 측정할 수 없을 정도로 생산량이 적었고 레보도파의 경우에도 극히 소량이었다. TH는 도파민을 비롯한 카테콜아민의 생성에 필요한 속도조절 효소(rate-limiting enzyme)이지만 여러 보조인자를 필요로 한다. 그 가운데 하나가 5,6,7,8,-Tetrahydrobiopterin (BH₄)이다. 이 실험에서는 HB1.F3와 HB1.F3.TH 두 세포주의 배양액에 농도에 따라 BH₄를 첨가하여 두 세포주의 성장과 형태가 차이가 없는 농도를 확인하고 도파민과 레보도파를 측정해 본 결과 도파민은 미량이었으나 레보도파는 HB1.F3.TH에서 HB1.F3보다 10배 이상 증가되는 것을 확인하였다. 여기서 도파민 생성이 적었다는 것은 레보도파 이후 필요한 단계인 aromatic acid decarboxylase 효소의 결핍 때문으로 생각한다. 그러나 레보도파 양은 연구 방법과 단위의 차이가 있어 기존의 보고들과 비교하기는 힘들지만 TH로 형질 전환된 다른 세포주와 유사한 결과를 보여 주었다.^{25,26} 레보도파는 도파민의 직접적인 전구 물질로 혈액-뇌 장벽을 통과하기 때문에 파킨슨병의 가장 중요한 치료제로 사용된다. 도파민이 분해되면서 산화되는 과정 중에 생기는 산화 부산물이 세포 독성을 유발한다는 보고와 함께 레보도파 역시 세포 독성을 가지고 세포의 산화 손상을 유발시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.^{27,28} 이에 본 연구에서는 BH₄을 보충해 주면 레보도파 생산이 증가되는 HB1.F3.TH (HB1.F3.TH-BH₄)를 도파민성 세포로 간주하고 이를 HB1.F3와 비교하여 각 세포주에서 alpha-

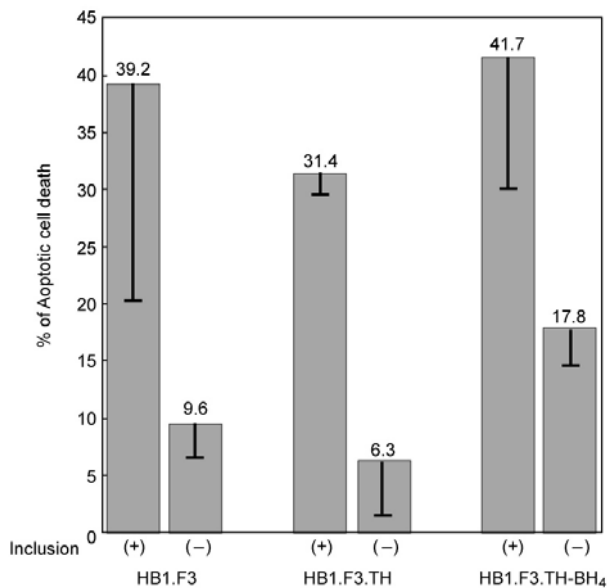


Figure 4. Apoptotic cell death as shown by DAPI staining and TUNNEL assay in human neural stem cells with or without inclusions following gene transfection of α -synuclein and synphilin-1. Lines indicate standard deviation.

synuclein과 synphilin-1 유전자에 의한 봉입체 생성과 세포 자멸사를 관찰하였다.

Synuclein은 신경세포에 용해되어 존재하는 단백질로 정확한 생리적 기능은 알려지지 않았으나 시냅스낭(synaptic vesicle)의 재순환에 기여한다는 가설이 지지를 받고 있다.²⁹ 사람에서 발견되는 synuclein은 alpha-, beta-, gamma- 세 종류가 확인되었는데 그중 alpha-synuclein은 알츠하이머병 환자에서 발견되는 senile plaque을 이루는 성분의 하나로 non-amyloid component (NAC)로도 알려져 있다.^{3,29} 이 유전자는 염색체 4q21.3-q22에 존재하며 2종류의 점돌연변이에 의해 발병된 가족성 파킨슨병 가계가 확인되었다.⁷ 최근에는 정상 alpha-synuclein의 발현이 증가된 triplet으로 발병된 가계가 발견되어 돌연변이가 아닌 정상 단백질의 과발현으로도 파킨슨병이 발병된다는 것이 확인되었다.^{30,31} 이러한 가족성 파킨슨병의 원인 유전자라는 이유 외에도 파킨슨병에서 alpha-synuclein이 주목받고 있는 이유는 이 질환의 가장 중요한 병리 소견인 루이체(Lewy body)를 구성하는 주요 성분이기 때문이다. 루이체는 세포질 내에 존재하는 지름 8-30 μm 정도의 봉입체로 일반적인 Hematoxylin-Eosin 염색에서는 분홍색으로 보인다.² 면역염색을 통해 루이체를 구성하는 성분을 확인할 수 있게 되어 neurofilament, ubiquitin, alpha-synuclein, synphilin-1, torsin A, heat shock protein 등의 단백질이 밝혀졌다.^{17,32-34} 또한 ubiquitination과 deubiquitination 효소, proteosomal subunit, proteasome activator 등 진핵세포에서 불필요한 단백질을 제거하는 중요한 기체인 ubiquitin-proteasome system의 구성 요소도 포함하고 있는 것이 확인되었다.^{35,36} 전자현미경으로 관찰한 소견에서 중앙에는 과립형 물질이 존재하고 그 주변으로 방사형으로 fibrillar alpha-synuclein과 신경미세섬유가 구성하고 있는데 중앙의 과립형 물질은 ubiquitin화된 단백질로 추정되고 있다.³⁷

Synphilin-1은 alpha-synuclein과 작용하며 루이체를 구성하는 한 성분으로 알려져 있고 alpha-synuclein과 같은 제거 기체인 ubiquitin-proteasome system을 통해 분해된다.^{16,17,38} 자세한 생리적 역할은 알려져 있지 않으나 시냅스전 신경말단에 존재하여 시냅스낭과 결합하는 역할을 하며 alpha-synuclein을 시냅스낭에 연결시키는 고리 역할을 한다고 보고되었고 alpha-synuclein과 같이 과발현시킨 경우 봉입체 생성이 증가한다고 알려져 있다.^{16,18,39}

본 연구에서는 루이체와 유사한 병리 소견을 얻기 위해 alpha-synuclein과 synphilin-1 두 유전자를 동시에 과발현시켰는데 전반적인 유전자 전이(transfection) 효율은 10% 이하였고 이 가운데 alpha-synuclein과 synphilin-1 두 단백질 모

두를 발현하는 것은 20-30% 정도로 전체 세포의 2-3%였다. 두 단백질 모두를 발현하는 세포 가운데 세포질 전체에 걸쳐 미만성으로 염색되는 경우가 많고 루이체와 같은 봉입체가 확인된 경우는 20% 이하로 소수인데 이에 대한 명확한 설명을 하기 어렵지만 유전자 삽입 후의 배양 시간에 따른 차이 즉 세포질에서 발현된 두 단백질이 다시 봉입체를 형성할 만한 충분한 기체나 시간이 경과하지 않았을 가능성이 크다. 이 결과는 HEK293 세포를 사용하여 유전자 전이 효율은 30-40%로, 그리고 두 단백질 모두 과발현되어 봉입체가 생성되는 것은 15-20%로 보고한 타 연구에 비해 전이 효율은 상당히 낮다고 보인다.¹⁸ 그러나 이러한 차이는 세포 성상의 차이로 인한 결과로 보이며, 태아 신경기원인 HEK293 세포에 비해 본 연구에 사용된 뇌신경세포 기원의 HB1.F3가 파킨슨병의 병태생리 모델로 적절할 것임은 더 언급할 필요가 없을 것이다.

생성된 봉입체는 alpha-synuclein과 synphilin-1 모두에 염색되는 경우가 alpha-synuclein만 발현되는 경우보다 더 많은 비율로 관찰되었고 synphilin-1만 염색되는 경우에는 봉입체를 관찰할 수 없었다. 그리고 유의하지는 않으나 HB1.F3.TH-BH₄에서 봉입체 생성 비율이 더 증가되는 양상이었다. 면역염색에서 alpha-synuclein과 synphilin-1에 염색이 되는 봉입체는 대부분 작고 다발성이었고 극히 일부에서 핵 크기의 봉입체를 관찰할 수 있었다. 그리고 세포의 미세구조가 HB1.F3과 HB1.F3.TH 두 세포주에서 차이를 보이지 않았으므로 배양하면서 관찰하였던 두 세포의 유사성을 확인할 수 있었는데 이는 유전자 전이를 통한 형질 전환 후에도 큰 변화 없이 기존의 신경줄기세포의 특성을 유지하고 있는 것으로 판단할 수 있는 근거라 생각한다.

봉입체가 확인되는 경우와 미만성으로 두 단백질을 발현하는 경우에 있어 세포 자멸사의 표지를 확인한 결과 봉입체가 있는 세포에서 세포 자멸사 비율이 높게 관찰되었다. 루이체를 proteasome 혹은 aggresome으로 보고 이는 세포 보호를 위한 기제라는 것이 최근 지배적인 견해들인데, 공통적으로 언급하고 있는 것은 alpha-synuclein이 봉입체를 이루기 전인 proto-fibril 형태가 세포에 더 독성이 있다는 것이다. 본 연구에서는 같은 조건의 두 세포주를 비교하였을 때 도파민성 세포로 형질 전환시킨 HB1.F3.TH-BH₄에서 봉입체 생성 비율이 더 증가되고 봉입체가 생성된 세포에서 세포 자멸사 역시 증가되었다는 것은 봉입체가 세포 보호 기전이라는 견해에 반대되는 결과로 판단되나 세포사 비율에 유의한 차이가 없다는 결과에서 본다면 아직 결론을 내리기 힘들다고 보인다. 봉입체를 생성하는 비율이 전반적으로 매우 낮기 때문에 드물게 관찰되는 세포 자멸사 표지가 과장되었을 가능성을 배제할 수는 없으나 일관

되게 레보도파를 생성하는 세포주에서 발현이 증가된 소견이 관찰되고 있어 이 소견에 대한 계속적인 연구가 필요하다고 본다. 배양 시간이나 봉입체를 생성하는 기전(예컨대, 도파민을 분비하고 순환시키기 위한 dopamine transporter나 시냅스낭)이 부족하기 때문일 가능성이 있지만 궁극적으로 도파민을 생성하지는 못하기 때문에 이러한 결과를 설명하기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다. 그리고 정상 alpha-synuclein 단백질의 양적인 증가가 세포 자멸사와 연관성이 있고 가족성 파킨슨병을 유발하는 원인으로 보고되었으나 본 실험에서 유전자 삽입 후 일시적으로 발현되는 alpha-synuclein 단백질의 양을 세포 수준에서 확인할 수는 없으므로 정량적으로 과발현을 조절하여 확인하는 과정도 필요하리라 생각한다.

HB1.F3.TH-BH₄에서 HB1.F3와 HB1.F3.TH 두 세포주에 비해 세포 자멸사 표지가 더 많이 관찰되었는데 이는 alpha-synuclein에 의한 도파민성 세포의 선택적 세포 자멸사 기전을 설명할 수 있는 또 하나의 근거로 생각한다. 도파민의 세포 독성에 관해서는 이미 더 이상 언급할 필요가 없으나 현재까지의 실험 결과들은 배양액에 도파민을 첨가하여 세포 독성을 관찰한 것으로 세포 내에서 생성되는 도파민으로 인한 세포 독성과 같은 양상으로 설명하기 곤란하다고 판단된다. 그러므로 본 연구와 같이 유전자 삽입으로 형질전환시킨 도파민성 세포는 안정적으로 세포 내에서 레보도파를 생성하고 있다는 점과 인간 기원의 신경세포에서 현재까지 보고된 결과를 확인할 수 있었다는 점은 파킨슨병의 병태 생리를 이해하는 데 보다 효과적인 실험방법이라고 볼 수 있을 것이다.

세포 자멸사를 확인하기 위한 방법으로 DAPI 염색과 TUNEL assay를 이용하였는데 유전자 전이를 통한 세포 손상, 특히 두 유전자가 동시에 전이된 경우 손상이 클 것으로 추정되어, 두 단백질이 과발현된 경우와 하나의 단백질이 과발현된 경우의 세포 자멸사를 비교하는 것은 무리가 있을 것으로 생각된다. 그러나 본 연구에서는 두 단백질이 동시에 과발현된 경우를 비교하였으므로 유전자 전이 과정 자체로 인한 세포 손상이 봉입체가 형성된 경우나, 각각의 세포주에서 차이가 없다고 보인다. 그러므로 루이체와 같은 봉입체의 생성이 세포 자멸사에 대해 감수성이 더 높다고 판단할 수 있는 근거가 된다고 생각한다.

하지만 TH로 형질전환시킨 세포주가 도파민을 생성하지 못하므로 필요한 효소를 보완하여 도파민을 생성하는 세포주에서 확인을 하는 것이 더욱 좋았으리라는 점과 정량적으로 유전자의 발현을 조절할 수 있는 기법을 이용하여 보다 정밀한 검증을 할 필요가 있다고 생각된다. 그리고 신경줄기세포, 신경세포, 신경교세포 등이 모두 포함된 이 세포주를 이용하여 같은 syn-

nuclein에 의한 기전으로 알려져 있으나 다른 병리 소견과 임상 양상을 보이는 multiple system atrophy, 루이체 치매(Lewy body dementia) 등의 신경계 변성 질환의 모델을 확인하는 연구도 의미있을 것으로 생각한다.

도파민성 세포에서 봉입체 생성과 세포 자멸사를 연관성을 알고자 인간줄기세포주에서 alpha-synuclein과 synphilin-1 유전자를 이용하여 수행한 본 연구에서 저자들은 다음과 같은 결론을 얻었다.

첫째, 레보도파 생산이 루이체와 같은 봉입체 형성에 필수적인 것은 아니나 레보도파가 증가된 환경에서 봉입체 형성이 증가되었다. 둘째, Synphilin-1은 alpha-synuclein에 의한 봉입체 형성과 세포 자멸사를 증가시키나 단독으로 발현된 경우 의미 있는 결과를 확인할 수 없었다. 셋째, 봉입체가 관찰되는 세포에서 세포 자멸사가 증가하였다. 넷째, 레보도파가 증가한 세포에서 alpha-synuclein에 의한 세포 자멸사가 증가되어 도파민성 신경세포는 alpha-synuclein에 대해 선택적으로 감수성이 높은 것으로 보인다.

이상과 같은 결론으로 루이체와 같은 봉입체 형성이 alpha-synuclein에 의한 세포 자멸사에 기여한다는 근거가 될 수 있다고 판단되며 향후 도파민을 분비하는 신경세포에서 alpha-synuclein 유전자의 발현을 정량적으로 조절하여 alpha-synuclein과 봉입체, 도파민, 그리고 세포 자멸사의 관계를 더 명확히 밝힐 수 있는 후속 연구가 진행되었으면 한다.

REFERENCES

1. Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:259-272.
2. Olanow CW, Watts RL, Koller WC. An algorithm for the management of Parkinson's disease: treatment guidelines. *Neurology* 2001; 56:S1-S88
3. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Durta A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276:2045-2047.
4. Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998;18:106-108.
5. Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, Takara H, Ishikawa A, Nakagawa-Hattori Y, et al. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet* 1997;60:588-596.
6. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998;395:451-452.
7. Savitt JM, Dawson VL, Dawson TM. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J Clin Invest* 2006;116:1744-1754.
8. Tompkins MM, Hill WD. Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death. *Brain Res* 1997;775:24-29.

9. Volles MJ, Lansbury PT. Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry* 2003;42:7871-7878.
10. Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 2000;10:524-530.
11. Taylor JP, Tanaka F, Robitschek J, Sandoval CM, Taye A, Markovic-Plese S, et al. Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Hum Mol Genet* 2003;12:749-757.
12. Braak H, Del Tredici KF, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197-211.
13. Xu J, Kao SY, Lee FJ, Song W, Jin LW, Yankner BA. Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson's disease. *Nat Med* 2002; 8:600-606.
14. Volles MJ, Lansbury PT. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry* 2002; 41:4595-4602.
15. Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, et al. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 2006;313:324-328.
16. Kruger R. The role of synphilin-1 in synaptic function and protein degradation. *Cell Tissue Res* 2004;318:195-199.
17. Wakabayashi K, Engelender S, Yoshimoto M, Tsuji S, Ross CA, Takahashi H. Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2000;47:521-523.
18. Engelender S, Kaminsky Z, Guo X, Sharp AH, Amaravi RK, Kleiderlein JJ, et al. Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet* 1999; 22:110-114.
19. Kawamata H, McLean PJ, Sharma N, Hyman BT. Interaction of alpha-synuclein and synphilin-1: effect of Parkinson's disease-associated mutations. *J Neurochem* 2001;77:929-934.
20. Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG. Neuroprotective effects of pyruvate in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 2003;183:700-704.
21. Chu K, Kim M, Jeong SW, Kim SU, Yoon BW. Human neural stem cells can migrate, differentiate, and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett* 2003;343:129-133.
22. Cho T, Bae JH, Choi HB, Kim SS, McLarnon JG, Suh-Kim H, et al. Human neural stem cells: electrophysiological properties of voltage-gated ion channels. *Neuroreport* 2002;13:1447-1452.
23. Kim SU. Human neural stem cells genetically modified for brain repair in neurological disorders. *Neuropathology* 2004;24:159-171.
24. Lee G, Tanaka M, Park K, Lee SS, Kim YM, Junn E, et al. Casein kinase II-mediated phosphorylation regulates alpha-synuclein/synphilin-1 interaction and inclusion body formation. *J Biol Chem* 2004;279:6834-6839.
25. Anton R, Kordower JH, Maidment NT, Manaster JS, Kane DT, Rabizadeh S, et al. Neural-targeted gene therapy for rodent and primate hemiparkinsonism. *Exp Neurol* 1994;127:207-218.
26. Jiao S, Gurevich V, Wolff JA. Long-term correction of rat model of Parkinson's disease by gene therapy. *Nature* 1993;362:450-453.
27. Fahn S; and the Parkinson Study Group. Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease? *J Neurol* 2005; 252(Suppl 4):37-42.
28. Gille G, Hung S, Reichmann H, Rausch W. Oxidative stress to dopaminergic neuron as models of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1018:533-540.
29. Clayton DF, George JM. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci* 1998;21:249-254.
30. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J. Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003;302:841.
31. Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang DS, Hulihan M, et al. Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol* 2004;55:174-179.
32. Schmidt ML, Murray J, Lee VM, Hill WD, Wertkin A, Trojanowski JQ. Epitope map of neurofilament protein domains in cortical and peripheral nervous system Lewy bodies. *Am J Pathol* 1991;139: 53-65.
33. Lennox G, Lowe J, Morrell K, Landon M, Mayer RJ. Anti-ubiquitin immunocytochemistry is more sensitive than conventional technique in the detection of diffuse Lewy body disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989;52:67-71.
34. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert R. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;388:839-840.
35. Shashidharan P, Good PF, Hsu A, Perl DP, Brin MF, Olanow CW. Torsin A accumulation in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease. *Brain Res* 2000;877:379-381.
36. Sherman MY, Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 2001;29:15-32.
37. Ii K, Ito H, Tanaka K, Hirano A. Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56:125-131.
38. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. Alpha-synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6469-6473.
39. Lee G, Junn E, Tanaka M, Kim YM, Mouradian MM. Synphilin-1 degradation by ubiquitin-proteasome pathway and effects on cell survival. *J Neurochem* 2002;83:346-352.