



의학박사 학위논문

## 윌슨병에서 간질환과 신경질환의 발병기전에 대한 동물모델연구

## Study on the molecular mechanisms of hepatic and neurological diseases in an animal model of Wilson disease

2016년 2월

서울대학교 대학원 의학과 분자유전체학전공 이 범 희 A thesis of the Doctor of Philosophy

# Study on the molecular mechanisms of hepatic and neurological diseases in an animal model of Wilson disease

# 윌슨병에서 간질환과 신경질환의 발병기전에 대한 동물모델연구

Feb 2016

The Department of Molecular Genetics,

**Seoul National University** 

**College of Medicine** 

**Beom Hee Lee** 

# 윌슨병에서 간질환과 신경질환의 발병기전에 대한 동물모델연구

지도교수 정해일

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

2015 년 10 월

서울대학교 대학원

의학과 분자유전체학전공

이 범 희

2015년 12월

<u>위</u> 육	신 장	양	세	원	(인)
<u>부위</u>	<u>원장</u>	정	해	일	<u>(인)</u>
<u><u>भ</u></u>	원	ቶ	한	욱	(인)
위	원	하	일	수	(인)
위	원	김	不ら	일	<u>(인)</u>

### 학위논문 원문 이용에 대한 동의서

본인은 아래의 학위논문이 제 3 자의 권리를 침해하지 않았음을 서약하며, 서울대학교가 다음과 같이 저작물을 이용하는 것에 동의합니다.

ਮੁਸ ਗੇਸ਼	윌슨병의	간질환과	신경질환의	발병기전에	대한			
근군 세국	동물모델연구							
학위 구분			박 사					
학 과	서울대학교	대학원의학	과 분자유전체	학전공				
학 번	2009-30574							
연 락 처	mdlbh@han	mail.net						

 본인은 서울대학교가 위 저작물을 인터넷 등 정보통신망을 통해 복제·전송·배포하는 것에 동의합니다.

- 본인은 서울대학교가 위 저작물에 대해 무료로 온라인 서비스를 제공하는 것에 동의합니다.
- 서울대학교는 내용을 변경하지 않는 범위 안에서 위 저작물을 다른 파일 형식으로 변경할 수 있습니다.
- 본인은 위 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락하는 등
  동의 내용을 변경하고자 할 경우 소속대학(원)에 공개의 유보 또는
  해지를 즉시 통보하겠습니다.
- 서울대학교는 저작권법 및 도서관법을 준수하며 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않습니다.

제 출일: 2015 년 10월 20일

#### 저 작 자 : 이범희 (인)

#### 서울대학교총장 귀하

#### 초 록

서론: 윌슨병은 간에서 구리 대사를 관장하는 ATP7B단백의 결함에 발생하는 대표적 선천성 대사 이상 질환이다. 본 질환은 간 조직의 구리 침착에서 시작하여 간질환 및 신경계의 이상을 보인다. 본 연구에서는 윌슨병의 동물모델을 이용하여 간 조직 및 뇌조직에서 질환의 경과에 중요한 역할을 하는 분자생물학적 변화를 조사하였다.

방법: 윌슨병의 동물모델인 Long-Evans Cinnamon (LEC) 랫트와 정상 군의 Long-Evans Agouti 랫트를 생후 6주령, 12주령, 24주령별로 각각 3마리씩 선별하였다. 간 조직에서 연령에 따른 병리소견을 조사하였 고, 2차원 겔 전기영동과 MALDI-TOF-MS를 이용하여 단백발현양상 을 조사하였고, Western Blotting으로 검증하였다. 뇌조직에서는 RNA 를 추출하여 RatRef-12 expression bead array를 수행하여 연령대별로 발현양상의 차이가 나는 유전자들을 선별 후, real-time polymerase chain reaction로 검증하였다.

결과: 간 조직의 병리 소견은 사람의 윌슨병의 자연 경과와 비슷한 소견을 확인하였다. 단백발현 양상의 조사를 통해 초기시기부터 사 립체에 발현하는 단백질의 발현이 감소됨을 확인하였으며, 연령이 지남에 따라 사립체 손상이 광범위해지며, malate dehydrogenase 1, annexin A5, transferrin, S-adenosylhomocysteine hydrolase, and sulfite oxidase 1와 같은 산화 독성 및 세포 자멸사에 관련하는 단백질의 발 현이 감소됨을 확인 할 수 있었다.

뇌조직에서는 뇌에서 구리의 침착이 뚜렷해지는 24주령의 랫트에서 발현양상의 차이를 보이는 유전자들을 선별하여 총 179개의 유전자 들을 발견하였다. 이들을 기능적으로 분석하여 대부분의 유전자들이 신경계의 발달 및 활성도, 산화 독성 및 세포 자멸사, 염증반응 및 신호전달체계에 관여함을 알 수 있었다. 특히 알츠하이머병, 파킨슨 병과의 유사한 병인의 가능성, calcium-calcineurin 신호 전달 체계 및 철분에 매개되는 독성, S-adenosylhomocysteine의 대사과정의 변화를 확인할 수 있었다.

결론: 본 연구의 결과는 윌슨병의 자연경과에 산화 독성 및 세포자 멸사 과정이 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 이외에 좀더 다양한 병 데 생리의 과정이 발생함을 알 수 있었다. 향 후 다른 동물 모델 및 사람에서 채집이 가능한 조직을 통한 연구를 통해 이들의 역할에 대 한 검증이 필요하다.

**주요어:** 윌슨병, LEC 랫트, 프로테오믹스, cDNA 마이크로어레이 **학 번:** 2009-30574

본 내용은 아래의 두 학술지에 출판 완료된 내용임.

1. Lee BH, Kim JM, Heo SH, Mun JH, Kim J, Kim JH, et al. Proteomic analysis of the hepatic tissue of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats according to the natural course of Wilson disease. Proteomics. 2011 Sep;11(18):3698-705.

2. Lee BH, Kim JH, Kim JM, Heo SH, Kang M, Kim GH, et al. The early molecular processes underlying the neurological manifestations of an animal model of Wilson's disease. Metallomics. 2013 May;5(5):532-40.

목	차
4	~r

초록i
목차iv
표 및 그림 목록v
서론1
실험재료 및 방법8
결과16
고찰40
참고문헌53
약어집62
초록 (영문)63

## 표 및 그림 목록

표 1 RT-PCR에 사용된 시발체들15
표 2 LEC 랫트와 LEA 랫트의 생화학적 분석17
표 3 연령에 따라 LEC랫트에서 유의한 발현 차이를 보이는
단백
표4 구리 대사에 관여하는 유전자 들의 연령에 따른 변화40
그림 1 연령에 따른 LEC 랫트와 LEA 랫트의 간조직 소견의
변화 비교19
그림 2 LEC 랫트와 LEA랫트에서 2-DE comparison image의
비교21
그림 3 Western blotting을 이용한 발현 검증25
그림 4 Complete linkage and Euclidean distance as a measure of
similarity로 hierarchical clustering을 수행27
그림 5 K-means clustering28
그림 6 생후 24주령의 LEC 랫트에서 발현 양상의 차이를
보이는 유전자들의 기능에 따른 분류31
그림 7 기능적 분류에 따른 유전자들

그림 8. cDNA 어레이에서 LEC	랫트의 뇌조직에서 발현 양상의
차이를 보이는 유전자들의 연령이	게 따른 연령에 따른 변화 양상
과 realtime-PCR를 이용한 분석	
그림 9 LEC 랫트와 LEA 랫트의	l 혈청에서 Hepcidin 발현 양상
비교	

서 론

원슨병(Wilson disease; OMIM 277900)은 간에서 구리의 대사를 주관하는 P-type copper-transporting ATPase의 결핍에 의해 발생하는 상염색체 열성으로 유전되는 질환이다 (1, 2). 윌슨병은 가장 흔한 선천성 대사이상 질환으로 인종에 따라 30,000명 혹은 100,000명 당 1명의 발생률을 보이나, 우리나라는 그 중에도 발병률이 가장 흔한 민족으로서 약 30,000명 당 1명의 꼴로 발생하는 것으로 알려져 있다 (3).

월슨병은 환자마다 발생 임상 양상이 차이가 난다. 대부분의 환자는 다양한 간 기능의 이상 징후를 보이거나 추체 외로의 이상에 의한 신경증상을 보인다. 그러나, 일부의 환자는 임상 증상이 없는 상태에서 발견되고 있다 (1, 2). 최근 윌슨병에 대한 관심이 늘면서 이런 무증상 시기에 발견되는 환자가 점차 늘고 있다 (4). 윌슨병은 평생 동안 진행되는 질환으로 신경학적 증상으로 발현되는 환자들은 간질환으로 발현되는 환자보다 좀더 많은 나이에서 진단되는 경향이 있다. 반면 무증상 시기에 발견되는 환자들은 간질환 혹은 신경질환으로 발현한 환자들보다는 좀더 어린 나이에 발견된다 (1,4-6).

윌슨병의 원인 유전자는 ATP7B (ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide)으로서 13번 장완(13q14.3)에 위치하고 있으며 1993년도에 유전자의 염기서열이 알려졌다 (7). 이 후 현재까지 500개 이상의 돌연변이가 발견되었다(http://www.hgmd.cf.ac.uk). 인종에 따라 흔한 돌연변이가 차이가 나는데 유럽이나 북아메리카의 경우는 p.His1069Gln이 대표적 돌연변이이고 (8, 9), p.Arg778Leu은 한국, 중국, 일본 등의 동북아시아국가에서 가장 흔한 돌연변이이다 (10-15). 본 연구자 등은 237가계의 한국인 윌슨병 환자들에서 p.Arg778Leu (36.5%), p.Ala874Val (9.9%), p.Asn1270Ser (8.0%), p.Lys838SerfsX35 (4.2%), p.Leu1083Phe (4.0%)등의 5가지 돌연변이가 전체 돌연변이 중 63% 차지함을 알 수 있었다. 발현

2

양상의 차이와 환자의 ATP7B 유전자 돌연변이와 상관분석을 시행하여 missense 돌연변이를 가진 환자가 nonsense/frameshift 돌연변이를 가진 환자보다 발현 시기가 더 늦고, 심한 발현의 빈도가 적음을 발견하였다 (4).

윌슨병의 임상상의 구분은 Ferrenci등에 의해 제시된 분류법이 현재 널리 사용되고 있는데 (16), 본 연구자 등이 시행한 한국인 윌슨병 코호트의 연구에서는 무증상의 환자군이 간질환 혹은 신경질환으로 발현한 환자보다 임상 경과가 확연히 양호함을 발견하여, 임상상의 구분에서 무증상 환자군을 하나의 특징적 환자군으로 구분하도록 제시한 바 있다 (4). 윌슨병의 자연경과가 나이가 지남에 따라 무증상의 시기에서 간질환이 생기고, 이후 신경계의 증상이 발현하는 것이므로 이러한 임상상의 구분은 당연한 것이라 생각될 수도 있으나, 실제적으로 무증상으로 발현 하는 환자 중에는 60대 이후에 발현하는 환자들이 있고, 신경학적 증상을 10세 이전의 나이에 보이는 환자들도 있다 (17-19). 따라서, 윌슨병은 환자마다

З

임상상의 진행에 차이가 있는 것으로 판단된다.

본 연구자 등은 이러한 윌슨병의 임상상에 기저하는 분자 생물학적 변화를 연구하고자 윌슨병의 동물 모델을 이용하였다. 현재까지 알려진 윌슨병의 동물모델은 toxic milk 마우스, Long-Evans Cinnamon (LEC) 랫트, Atp7b-/- 마우스 등 세가지 모델이 있다. 이들은 모두 윌슨병에서 보이는 간질환의 임상상을 보이는데, 신경학적 증상이 드문 것으로 알려져 있다. 그러나 최근에는 6개월 이상 장기간 생존 시 신경학적 증상을 발견하여 이에 대한 연구들이 발표되고 있다 (20-23).

월슨병에서 보이는 ATP7B의 결핍은 간에 구리의 과도한 침착을 유도하고, 이렇게 침착 된 구리는 간에 산소화 독성과 사포 자멸사 과정을 촉진하여 간세포에 손상을 일으킨다. 간 손상에서 시작된 구리 독성은 뇌조직과 신장 등의 간 외 조직에 진행하게 된다 (24, 25). 이러한 조직 특이적이고 순차적인 병리현상은 윌슨병 환자의 자연 경과에 따른 임상상의 변화로 나타나게 된다 (1,2,4,26).

한편 ATP7B는 정상적인 기능을 위해 구리를 필요로 하는 단백질에

구리를 전달해 주는 기능을 하고 있으며, 이러한 단백질 중 대표적인 것이 세룰로플라즈민(ceruloplasmin)이다 (27, 28). 따라서 윌슨병의 ATP7B의 결핍은 구리를 필요로 하는 단백질에 기능 결핍을 또한 유도하게 된다. 특히 윌슨병에서 뇌조직은 간 조직에 비해서 더 다양하고 복잡한 병리현상이 있을 것으로 생각되다. 이 중 구리의 침착에 따른 손상이 주가 될 것으로 예상하고 있으나. 이외에도 아직 알려지지 않은 다양한 반응들이 발생할 것으로 생각된다 (28-31). 특히 뇌조직에서 구리의 대사를 주로 담당하는 역할은 ATP7B가 아니고 ATP7A이므로, 윌슨병에서 뇌조직에서의 병리현상은 구리의 축적에 의한 독성 혹은 구리를 필요로 하는 단백질의 기능 이상만으로는 설명이 되지 않는다. 한가지 특이한 점은 윌슨병 뇌조직에서 ATP7A의 발현이 변화되지 않는다는 것이고, 이에 대해서는 정확한 원인이 알려져 있지는 않다 (28). 따라서, 윌슨병의 뇌조직에서의 구리대사의 현상과 이에 수반하는 다양한 반응들에서 대해서 좀더 많은 연구가 필요하다.

LEC 랫트는 *Atp7b*유전자의 3'말단에 900 bp정도의 결실이 있는 동물이다 (32). Atp7b의 결핍에 의해 LEC 랫트는 연령에 따라 사람의 윌슨병과 같은 간질환의 양상을 보여 윌슨병의 병리현상을 이해하기에 적절한 동물 모델로 알려져 있다. LEC 랫트는 생후 3-

5

4개월 경 급성 간염의 증상을 보이며, 만성 간염으로 진행하여, 결국 간경화증을 보인다. 또한 LEC 랫트는 생후 1세경부터 간암이 발생하여 간암의 연구 모델로도 연구가 되고 있다 (33-35). 따라서, 본 연구자 등은 LEC 랫트에서 간질환의 진행에 따른 단백발현 양상을 조사한다면, 윌슨병에서 간질환의 진행을 반영하는 주요 단백 표지물질을 발견할 수 있을 것으로 예상하였다.

반면 LEC 랫트는 신경학적 증상이 드문 것으로 알려져 있어 뇌조직에서의 병리현상에 대한 연구는 거의 없었다 (36). 그러나 24주령부터는 뇌조직에서도 구리의 축적이 관찰되며, 이에 따라 산소화 독성이 보이는 것이 발견되었다 (33). 따라서, 본 연구자 등은 24주령의 뇌조직에서 유전자의 발현 양상을 조사한다면, 윌슨병에서 신경학적 증상의 발생에 기저하는 초기 생물학적 변화를 확인할 수 있을 것이고, 신경학적 증상의 발현을 유도하는 주요 후보 유전자 군을 확인 할 수 있을 것으로 예상하였다.

이에 본 연구자 등은 LEC 랫트의 간 조직과 뇌조직을 연령대별로 분석하여, 간질환의 진행을 반영하는 주요 단백질을 조사하고, 신경학적 증상을 유도하는 주요 유전자들을 발견하고자 본 연구를

6

수행하였다. 간 조직의 단백발현의 양상을 분석하기 위하여 프로테오믹스(Proteomics) 분석을 수행하였으며, 뇌조직의 유전자 발현 양상을 조사하기 위해서 RNA microarray를 수행하였다.

### 실험 재료 및 방법

#### 1. 실험에 이용된 실험동물

본 연구에서는 각각 주령 6주, 12주, 24주 별로 3마리씩 LEC 랫트를 실험에 사용하였다. 정상군으로는 LEA (Long-Evans Agouti) 랫트를 주령 6주, 12주, 24주 별로 3마리씩 사용하였다. 본 연구는 대한민국의 동물 보호법을 준수하여 수행되었다.

#### 2. 간 조직에서 프로테오믹스 분석

2.1. 간 조직의 병리학적 소견의 분석

각 주령별로 신선한 간 조직을 0.2-mm의 두께로 자른 뒤 10% 포르말린 플라스틱 통에 24시간 동안 담가 두었다. 고정된 조직을 파라핀 처리 후 색션별로 나눈 뒤 수산화 작용을 한 후 hematoxylin과 eosin으로 염색하였다

2.2 Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

간 조직을 녹인 후 상층액을 (각각 300 mg) immobiline dry strips (pH 3-10, 18 cm; Amersham Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden)에

적용한 후 125 mL의 8 M urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer (Amersham Pharmacia Biotechnology)와 2.8 mg/mL dithiothreitol (DTT)에 14시간 동안 담가두었다. 수산화 과정 후 20℃에서 500 V의 50 mA/strip으로 1시간 동안, 1000 V으로 1시간, 8000 V으로 2시간 동안 isoelectric focusing (IEF)을 수행하였다. Strips은 50 mM Tris containing 6 M urea, 30% glycerol과 2% sodium dodecyl sulfate (SDS)으로 10분간 평형화 작업을 2회 반복 후 Dithiothreitol과 iodoacetamide를 추가하였다. 이 후 12.5% non-gradient SDS-polyacrylamide 젤에 2차원 단면으로 600 V, 20 mA(30분), 600 V, 50 mA(70분)의 조건으로 Multiphor horizontal electrophoresis unit (Amersham Pharmacia Biotechnology)에서 전기영동을 수행하였다. 1시간 동안 단백을 고정한 후 겔을 Coomassie Brilliant Blue G250으로 24시간 동안 염색하였다. 이후 과산화 수소로 탈색 후 Umax Power Look 1100 (Umax Data System Inc., Dallas, TX, USA)으로 스캔 후 electronic files로 변환하였다. 이 후 Image Master Platinum 5.0 image analysis program (Amersham Pharmacia Biotechnology)으로 분석하였다. Log2 ratio상 2배 이상 차이가 나는 것을 유의한 발현 양상의 차이로 간주하였다.

#### 2.3. MALDI-TOF-MS를 이용한 단백의 확인

6주, 12주와 24주의 LEC 랫트와 LEA 랫트의 단백 스팟을 CBB-

stained gels에서 자른 후 trypsin (Promega, Madison, WI, USA) 처리하였다. 잘라진 펩타이드는 POROS R2, Oligo R3 column (Applied Biosystems, CA, USA)으로 농축하였다. 각각의 컬럼은 70%와 100%의 acetonitrile (ACN)와 50 mM ammonium bicarbonate으로 세척 후, R2, R3 적용 후 70% ACN and 0.1% TFA에 녹인 컬럮에 cyano-4hydroxycinamic acid (CHCA) (Sigma, St Louis, MO, USA)으로 용출 후 MALDI-TOF 분석을 하였다 (37). 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems)을 이용하여 매스 스펙트럼을 얻은 후 매뉴얼 de novo 시컨싱 후 Data Explorer software의 reflectron 모드와 4700 calibration mixture (Applied Biosystems)으로 계산하여 단백의 이름을 찾아내었다. 각각 샘플의 스펙트럼은 또한 trypsin autolysis peaks를 이용하여 계산하였다. 단백 팹타이드의 확인 작업은 GPS Explorer software에 포함된 Mascot search engine을 이용하였다. 팹타이드 메칭과 단백 검색은 Swiss-Prot 과 NCBI databases (ver. 20070629, 5207057 sequences, 1806282460 residues)와 ProFound program (http://prowl.rockefeller.edu/)을 이용하여 수행하였다.

2.4. Western Blot analysis

30 µg의 간 조직의 단백을 10% SDS-polyacrylamide겔에 전기 영동 후 PVDF막(BioRad, Hercules, CA, USA)에 전달 후, 고정액으로 하룻밤 고정 후(Tris-buffered saline, 5% skimmed milk, 0.1% Tween 20), 막을 다클론항체로 배양 후(Abcam, Cambridge, UK) horseradish-peroxidaselabeled 2차 항체로 재차 배양하였다. SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE, Rockford, IL, USA)으로 발현 하였고, 대조군으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)을 이용하였다.

2.5. 통계 분석

모든 통계 분석은 SPSS for Windows (version 12.0, SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하였고, LEC랫트와 LEA 랫트의 비교를 위해 Student's *t*test를 수행하였다.

### 3. 뇌조직에서 유전자 발현양상의 조사

3.1. RNA 추출 및 표시화

LEC 랫트와 LEA 랫트의 전 뇌조직을 이용하였다. Total RNA는 Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 뇌조직에서 분리하였고, RNeasy columns (Qiagen, Valencia, CA, USA)으로 정제하였다. 전체 RNA는 AmbionIllumina RNA amplification kit (Ambion, Austin, TX, USA)를 이용하여 biotinylated cRNA를 만들었다.

3.2. 교잡 (Hybridization) 및 데이터 추출

라벨화 된 cRNA샘플을 각각 750 ng씩 RatRef-12 expression bead 어레이(Illumina, San Diego, CA, USA)에 58°C에서 16-18시간 동안 교잡하였다. 어레이 신호는 Amersham FluoroLink streptavidin-Cy3 (GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, UK)를 이용하여 탐색 후 Illumina bead array reader confocal scanner (Illumina)로 스캔하였다. 어레이 데이터 축출은 BeadStudio version 2.1.12 software (Illumina)를 이용하였다. 3.3. 데이터 형성 및 통계 분석

추출된 데이터는 적어도 50%의 샘플에서 *P* value < 0.05 (similar to signal-to-noise)의 값을 보이는 데이터들을 분석하였다. Gene signal 값은 로그화 하여 표본 분 위화 하였다. Local pooled error (LPE) test 후, Benjamin-Hochberg multiple-testing with false discovery rate (FDR) 교정하였다.

Hierarchical cluster analysis를 complete linkage와 Euclidean distance as a measure of similarity으로 수행하였다. K-means clustering을 timedependent profiling으로 수행하였다. 발현이 차이가 나는 유전자들의 발견은 ArrayAssist<sup>®</sup> (Stratagene, La Jolla, CA, USA)와 R statistical software package (version 2.4.1)를 이용해서 하였다. 생물학적 온톨로지(ontology)에 기반한 분석은 Panther (http://www.pantherdb.org), Genatlas (http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr), Genome RGD (http://rgd.mcw.edu/rgdweb/search/genes.html)와 NCBI Gene 데이터베이스를 이용하여 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)의 수행하였다.

3.4. 정량적 실시간 (Quantitative real-time) polymerase chain reaction

전체 데이터에서 7개의 유전자를 선택하여 real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)을 수행하였다. 각각의 유전자에 사용된 시발체(primer)들은 표1에 기술 하였다. 전체 뇌조직에서 추출한 50 ng의 전체 RNA를 주형으로 사용하였다. MJ Research PTC-200 PCR system (Bio-Rad, Watertown, MA, USA)으로 RT-PCR 후 SYBR Green dye (Takara, Shiga, Japan)으로 증폭 하였다. 각각의 RT-PCR은 3번씩 반복 실험 후 평균과 오차로 표시하였다. LEA랫트와 LEC랫트에서의 발현의 비율은 비율은 2<sup>-ΔCt</sup>방법으로 분석하였고 GAPDH발현으로 보정하였다.

#### 3.5. 혈청 Hepcidin analysis

각 주령별로 LEC랫트와 LEA랫트의 혈액을 응고 시킨 후 3000 rpm에서 5분간 침전 시켰다. 상층액에서 혈청 hepcidin 수치는 ELISA (Uscn Life Science Inc., Houston, TX, USA) 기법으로 수행하였다. 통계 분석은 Mann-Whitney test, SPSS for Windows (version 12.0, SPSS, Chicago, IL, USA)을 이용해서 수행하였다.

표1. RT-PCR에 사용된 시발체들 (38)

Gene	FORWARD PRIMER 5'>3'	<b>REVERSE PRIMER 5'&gt;3'</b>		
Ppp3cb	GCAATTGGCAAGATGGCAAG	CCTCAATAGCCTCAACTGTG		
Snca	GAGGGAGTCCTCTATGATGG	CTGCTGTCACACCAGTCACC		
Ср	CGTGAGTACACAGATGATTC	CTGAATGCTGAGAGGAAATTG		
Hamp	CAACAGACGAGACAGACTAC	GACCACAGGAGGAATTCTTAC		
Asmt	CACAGGAAGTGGCATGC	CCATTCCCAGGGACATC		
Bhmt	GAAGGAGATCTACATGGCGTG	GTAAGCCTTCAGCCGAGCTGC		
Atp7a	GCGCTGAGGCATAAGACAGC	CCTTCGCTATGTGTTCCAGC		

### 결 과

# 가. LEC 랫트의 생화학적 특성 및 간 조직의 병리 소견

혈청 간 효소인 alanine transferase와 aspartate transferase는 LEA 랫트에서 보다 LEC 랫트에서 유의하게 증가하였고, 이는 연령에 따라 증가하는 양상이었다. 이와 유사하게 혈청 총 빌리루빈도 증가되었고, 반면 혈청 총 단백은 감소하였다 (표2).

	Normal LEA		LEC rats		
	(n=3)	6 Weeks (n=3)	12 Weeks (n=3)	24 Weeks (n=3)	
Total bilirubin (mg/dL)	$0.2 \pm 0.0$	$0.210 \pm 0.0$	7.4± 5.0	43.2±3.0	
Aspartate transaminase (IU/L)	$88.3 \pm 8.0$	$143.2 \pm 1.0$	853.4±100.0	$2161.9 \pm 100.0$	
Alanine transaminase(IU/L)	$60.1 \pm 4.0$	$160.4 \pm 20.0$	$897.5{\pm}50.0$	$679.5{\pm}200.0$	
Total protein (g/dL)	$6.1 \pm 0.4$	5.5±0.1	5.1±0.2	4.6± 0.3	

표2. LEC랫트와 LEA랫트의 생화학적 분석(평균±표준편차)(39).

간 조직의 병리소견 분석 상 6주령의 LEC 랫트에서 중등도의 핵 크기의 변화와 간세포의 팽창 및 체세포 분열의 경미한 증가를 보였다 (그림 1). 그러나, 이시기에는 유의할 만큼의 간문맥이나 소엽에 염증소견이나 섬유화가 진행되지는 않았다. 12주령에서는 체세포 분열이 확연히 증가된 타원형의 크기가 큰 세포들이 보였고, 간문맥을 따라서 초기 단계의 단관 암이 보였다. 또한 괴사된 간세포와 간 소절들의 재생화가 보였다. 유동과 간질은 활성화된 Kupffer 세포를 포함한 다양한 염증세포의 침윤을 볼 수 있었다. 24주령의 LEC 랫트에서는 다수의 담관암이 진행함을 알 수 있었고, 근처의 간 실질을 침범하고 있었다. 또한 체세포 분열 및 소절의 증가가 더 증가된 양상을 보였으며, 심한 담즙정체 및 염증 세포들의 침윤이 더 증가된 양상이었다 (그림1).



그림 1. 연령에 따른 LEC 랫트와 LEA 랫트의 간조직 소견의 변화 비교 (H&E 염색. 확대 배율, x100)(39).

#### 나. 프로테오믹스 분석

6주, 12주, and 24주의 LEC 랫트와 LEA 랫트의 간 조직을 대상으로 2-DE (그림 2) 이미지 분석을 하였다. LEA 랫트에 비해서 LEC 랫트에서 2 배 이상의 발현 차이가 나는 16 개의 점들을 발견하였다. 이중, 4 개의 점 (10 번, 12 번, 13 번과 19 번)은 LEC 랫트에서 발현이 증가되었고, 12 의 점 (1-9 번, 11 번, 14-18 번, 20 번과 21 번)은 발현이 감소되었다 (표 3).



그림 2. LEC 랫트와 LEA랫트에서 2-DE comparison image의 비교 그 림. 2배 이상의 발현 차이를 보이는 단백질들에 대하여 화살표와 번 호를 표기하였다 (39).

#### 표 3. 연령에 따라 LEC 랫트에서 유의한 발현 차이를 보이는 단백

(39).

Spot No.	Protein name	Accession no.		MALDI-TOF-MS <sup>b)</sup>			Fold change
		NCBI	Swiss-Prot	Mass	Mascot Score <sup>c)</sup>	Matched peptide	
	6 week						
1	Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	gi 15100179	O88989	36460	105	14	-2.68
3	Tropomyosin alpha-3 chain (Tropomyosin-3)	gi 148840439	Q63610	28989	76	14	-2.38
4	Chain , Solution Structure Of Reduced Microsomal Rat Cytochrome B5	gi 2554670	P00173	10788	80	8	-1.94
	12 week						
1	Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	gi 15100179	O88989	36460	105	14	-2.74
5	Isovaleryl Coenzyme A dehydrogenase	gi 6981112	P12007	46406	116	19	-2.68
6	Beta-actin	gi 119959830	P60711	31727	70	15	n.d. <sup>a)</sup>
9	Agmatinase	gi 114687632	Q0D2L3	37963	77	12	-2.69
10	Annexin A5	gi 51858950	P14668	35750	215	25	5.82
11	Ketohexokinase	gi 13994119	Q02974	32729	129	16	-3.87
12	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	gi 31982030	Q5XI73	23392	104	11	2.22
	24 week						
1	Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	gi 15100179	O88989	36460	105	14	-3.20
4	Chain, Solution Structure Of Reduced Microsomal Rat Cytochrome B5	gi 2554670	P00173	10788	80	8	-2.06
10	Annexin A5	gi 51858950	P14668	35750	215	25	36.62
13	Transferrin	gi 61556986	P12346	76346	147	26	2.57
14	Sulfite oxidase	gi 38303839	Q07116	54320	166	21	-2.02
15	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	gi 57527919	O35077	37428	133	20	-3.47
16	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	gi 57527919	O35077	37428	204	24	-3.52
18	rCG34031	gi 149054922	-	34347	82	12	n.d. <sup>a)</sup>
19	Expressed in non-metastatic cells 2	gi 55926145	P19804	17272	114	14	2.38
20	Abhydrolase domain containing 14b	gi 56090461	Q6DGG1	22604	106	10	-2.85
21	S-Adenosylhomocysteine Hydrolase	gi 8392878	P10760	47507	193	25	-2.61

a) n.d., not detected in LEC but detected in LEA rats.

b) Protein score is -10\*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.

c) Protein scores greater than 61 are significant (p < 0.05) for MS data.

6주령의 LEC 랫트에서는 malate dehydrogenase 1, tropomyosin alpha-3 chain과 the solution structure of reduced microsomal rat cytochrome B5의 발현이 감소되었다. 12주령의 LEC 랫트에서는 malate dehydrogenase 1, isovaleryl coenzyme A dehydrogenase, beta-actin, agmat과 ketohexokinase 가 발현이 감소되었고, annexin A5와 Rho GDP dissociation inhibitor alpha가 발현이 증가되었다. 24주령에서는 malate dehydrogenase 1 (MDHC), solution structure of reduced microsomal rat cytochrome B5, sulfite oxidase, glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1, rCG34031, abhydrolase domain containing 14b와 rat liver S-adenosylhomocysteine hydrolase가 발 현이 감소되었으나, annexin A5와 transferrin의 발현이 증가되었다. 이 들 중에서 MDHC는 연령에 따라 점차 발현이 감소하였으나, annexin A5는 12주와 24주에서 모두 발현이 증가되는 것을 알 수 있었다

### 다. Immunoblotting 을 이용한 검증

MDHC와 annexin A5의 발현 양상을 immunoblotting으로 검증하였다. 또한, 구리대사 과정에 관여할 것으로 알려진 S-adenosylhomocysteine hydrolase의 발현 양상도 같이 조사하였다 (40). Immunoblotting으로 annexin A5의 발현이 6주령에 비해 12주와 24주의 LEC 랫트에서 뚜 렷이 증가하는 것을 알 수 있었으며, MDHC와 Sadenosylhomocysteine hydrolase (SAHH)는 LEA 랫트에서는 연령에 따 라 점차 증가하는 양상을 보였으나, LEC 랫트에서는 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3).


그림 3. Western blotting을 통해 LEA 랫트에 비해서 LEC 랫트에서 annexin A5의 발현은 증가하나, SAHH와 MDHC의 발현은 연령에 따라 점차 감소하는 것을 알 수 있었다. 각각 단백의 발현 정도는 GAPDH의 발현에 따라 보정하였다. \*, P< 0.05 for the comparisons (twotailed Student's *t*-test) (39).

### 라. LEC 랫트 뇌조직 cDNA microarray 분석

생후 6주령, 12주령, 24주령 중 적어도 한 연령 시기에서 LEA 랫트와 LEC 랫트에서 log2 ratio상 2배 이상의 발현 차이를 보이며, *P* 값이 0.05 미만의 유의성을 보이는 유전자는 총 505개였다. Hierarchical cluster분석과 K-means clustering with time-dependent profiling으로 총 9개의 cluster를 확인하였다 (그림 4-5).





그림 4. Complete linkage and Euclidean distance as a measure of similarity로 hierarchical clustering을 수행하였다 (38).



그림 5. K-means clustering을 time-dependent profiling으로 수행하였고, 총 9개의 군집이 연령에 따라 유사한 발현 양상을 보였다 (38).

LEC 랫트의 뇌조직에서 구리의 침착은 생후 24주령부터 보이므로 (33), 본 연구자들은 이 연령대에서 2배 이상의 발현차이가 나는 유전자들을 선별하였고, 총 251개의 유전자가 선별되었다. 이 중 기능이 잘 알려져 있지 않은 72개의 유전자를 제외 한 후 총 134개의 유전자가 발현이 증가되었으며, 45개의 유전자들이 발현이 감소되었다. 이들 중 단지 2개의 유전자, *Spock2와 Ptpn5*, 만이 전 연령대에서 지속적으로 발현이 감소되거나 증가되었다, 그러나, 이외 대부분의 유전자들도 연령에 따라 비슷한 발현 양상을 보였다 (그림 5).

# 마. 24주령의 LEC 랫트에서 발현 양상의 변화를 보이는 유전자들의 기능에 따른 분석

24주령에서 발현양상의 차이를 보이는 총 186개의 유전자들을 기능에 따라 구분하였다. 이 중 71개의 유전자들이 뇌의 발달과 활성에 관여하였고, 37개의 유전자들 (*Spock2* 포함)이 산소화 독성 및 세포 자멸사와 관련된 기능을 보였고, 21개의 유전자는 염증반응에 관여하였다. 이 외 14개의 유전자들이 암의 발생에 관여하며, 9개의 유전자들(*Ptpn5* 포함)은 세포 내 신호전달체계에 관여하는 유전자들이었다. 7개 유전자들은 시각에 관련되었고, 나머지 27개의 유전자들은 다른 광범위한 기능과 연관이 되었다 (그림 6-7).



그림 6. 생후 24주령의 LEC 랫트에서 발현 양상의 차이를 보이는 유전자들의 기능에 따른 분류 (38).



시신경계 (E)와 발암작용 (F)(38).

# **B.** Antioxidation and apoptosis









# 바. 기능적 분류에 따른 주요 유전자들 발현에 대한 Realtime-PCR를 통한 검증

본 연구에서 각 기능별로 중요 기능을 내포하는 유전자들에 대해 전 뇌조직의 RNA에서 realtime-PCR을 통해 검증작업을 하였다. 총 6유전자들(*Snca, Cp, Hamp, Ppp3cb, Asmt, Bhmt*)에 대해 검증을 하였으며, 모든 유전자에서 cDNA어레이 분석과 같은 경향을 보임을 확인하였다(그림 8). *Hamp*에 의해 전사되는 단백질인 Hepcidin을 LEA랫트와 LEC 랫트에서 측정하였으며, 24주의 LEC랫트에서 유의하게 증가되는 것을 확인하였다 (201 ± 105 pg/mL vs. 167 ± 83 pg/mL, *P*=0.021; 그림 9).







그림 8. cDNA 어레이에서 LEC 랫트의 뇌조직에서 발현 양상의 차이를 보이는 유전자들의 연령에 따른 연령에 따른 변화 양상 과 realtime-PCR를 이용한 분석 (38).



그림 9. LEC 랫트와 LEA 랫트의 혈청에서 Hepcidin 발현 양상 비교하였으며, 24주령에서 LEC랫트의 혈청에서 유의한 증가를 확인하였다 (\*, *P*=0.021)(38).

# 사. 구리 대사와 연관 유전자의 발현 양상 조사

구리의 대사에 관여한다고 알려진 *Atp7a* (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = -1.24) 유전자와 이의 상호작용 유전자, *Atox1* (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = -1.50)와 *Dctn4* (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = 1.42)들의 발현 양상을 조사하였으나 유의한 변화는 없었다.

Genes	LEC <sub>6wk</sub> /LEA <sub>6wk</sub> *	LEC <sub>12wk</sub> /LEA <sub>12wk</sub> *	LEC <sub>24wk</sub> /LEA <sub>24wk</sub> *
Atp7a	1.17	-1.33	-1.24
Atox1	3.07	-1.47	-1.50
Dctn4	-2.17	-1.07	1.42

표 4. 구리 대사에 관여하는 유전자 들의 연령에 따른 변화 (38)

\*, log2 ratio

## 고 찰

본 연구에서는 윌슨병의 동물 모델을 이용하여 연령대에 따라 간 조직에서는 단백발현의 변화를 관찰하고 뇌조직에서는 유전자의 발현양상을 조사함으로써 윌슨병의 질환의 병리 생태에서 중요한 역할을 하는 유전자들을 발견할 수 있었다. 이를 통해 윌슨병의 병리 현상이 이전에 알려진 것보다 좀더 광범위 하며 다양함을 알 수 있었다.

#### 간 조직에서의 단백발현의 고찰

윌슨병의 간 조직의 가장 특징적인 병리 생태적 변화는 구리의 축적에 따른 변화이다. 그러나 구리의 축적에 따른 전체적 분자 생물학적 변화에 대하여서는 아직 잘 알려지지 않은 상태이다. 물론 구리 축적에 따른 산화 독성 및 세포 자멸사를 촉진하는 반응의 증가에 대해서는 연구들이 있어왔다 (2, 25, 41, 42). 세포질에 축적되는 구리는 반응성산화종(reactive oxidative species; ROS)를 유도하고, 이는 사립체를 손상시켜 세포자멸사 과정을 촉진한다 (42, 43). 활성화가 증가된 ROS는 또한 DNA에 손상을 가져온다 (44). 또한 cytochrome c oxidase나 copper/zinc superoxide dismutase는 대표적인 항산화 작용을 하는 단백으로써 적절한 기능을 위해서 구리를 필요로 하는데, ATP7B의 결핍에 의해 구리가 적절히 전달되지 않음으로써, 이들의 기능이 저해되고 결국 산화 독성 과정이 촉진되게 된다 (45).

본 연구에서는 LEC랫트의 간 조직의 병리소견 분석 및 생화학적 분석을 통해 사람의 윌슨병의 징후가 보임을 증명하였다 (32,41,42). 연령이 증가함에 따라 담관암의 소견도 악화됨을 볼 수 있었는데,

이는 본 동물이 암의 연구 모델로도 사용되는 이유이기도 하다. 본 연구자 등은 간 조직의 단백 발현 양상을 조사함으로써 연령의 변화에 따라 분자 생물학적 양상이 변함을 알 수 있었다. 초기에는 agmat protein, isovaleryl coenzyme A dehydrogenas와 cytochrome b5 같이 사립체막에 존재하는 단백의 발현이 달라짐을 알 수 있었다 (46). Cytochrome b5는 막에 존재하는 여러 산소 첨가 효소(oxygenase)에 전자를 전달해 주는 역할을 한다. 따라서, 이의 발현이 감소하는 것은 간 조직을 산화 독성에 더 취약하게 만든다. 한편, 구리의 축적은 당의 대사에도 영향을 미친다. Ketohexokinase는 fructose를 fructose 1-phosphate으로 인산화 시키고, 결국 사립체에서 당분화 과정을 촉진 시킨다. 대부분의 섭취된 fructose는 간에서 fructose 1phosphate pathway를 통해 대사되는데 (47), 사립체의 손상에 의해서 이 단백도 쉽게 분해되는 것으로 보인다. Tropomyosin-3는 세포의 유동성과 골격게의 유지에 중요한 actin에 결합하는 단백이다 (48). 최근 tropomyosin-3의 과발현이 간경화와 발암작용에 관여할 것으로 제시되었다 (49, 50). 반면 세포 내 골격에 구성에 관여하는 다른 단백인tropomyosin-3은 beta-actin 발현이 감소되었는데, 이는 구리 독성에 따른 프로테오소말 열화에 의한 것으로 사료된다 (51,52).

세포 자멸사 과정을 촉진 시킴에 따라 malate dehydrogenase 1와 annexin A5의 발현이 연령에 따라 발현이 변하였는데, malate

dehydrogenase 1는 citric acid cycle의 구성원 중 하나로서, NAD/NADH 조효소를 이용해 malate를 oxaloacetate로 전환시킨다 (53). 사립체의 손상이 진행됨에 따라 NADH가 사립체의 전자전달체로 주입이 떨어지게 되고, 이에 의해 malate dehydrogenase의 발현이 떨어지는 것으로 보인다. 사립체의 손상이 진행됨에 따라, 또 다른 NAD와 연관된 세포질 탈수화 glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1도 발현이 감소되었다 (54). 반면 annexin 5는 연령이 증가함에 따라 발현이 증가하였는데, 이 단백은 음전하를 띠는 인지질에 결합하는 것으로, 이는 세포 자멸사 과정에서 세포막에 인지질에 노출됨에 따라 발현이 증가하는 것으로 추측된다 (55, 56).

24주령의 고연령의 LEC 랫트에서는 S-adenosylhomocysteine을 분해하는 adenosine과 L-homocysteine으로 S-흥미로 adenosylhomocysteinehydrolase의 감소가 왔다. Adenosylhomocysteine는 다양한 methyltransferases에 의해서  $Cu^{2+\frac{L}{1}}$ adenosylmethionine으로부터 만들어진다 (54). Sadenosylhomocysteine hydrolase에 결합하여 이의 활성도를 떨어뜨리는 것으로 알려져 있어서, 이 단백의 발현의 감소는 구리의 축적에 의 한 것으로 보인다 (40). 주목할 점은 adenosylhomocysteine 다양한 메 칠전달효소를 억제한다는 점인데, 이들에는 catechol **O**methyltransferase, phenylethanolamine N-methyltransferase, indolethylamine N-methyltransferase와 hydroxyindole O-methyltransferase등이 있다. 이들 은 모노아민 신경전달물질의 생합성과 대사에 관여한다 (57). 그래서, 24주의 LEC 랫트에서 보인 S-adenosylhomocysteine hydrolase의 간 조 직에서 발현 감소는 윌슨병에서 신경학적 증상의 발생과 관형이 있 을 수 있다는 점이다. 이외 Sulfite oxidase 1는 생화학적으로 유해한 물질인 sulfite을 무해한 sulfate로 전환하며, 황을 함유하는 메치오닌 이나 시스테인과 같은 아미노산들의 대사에 관여한다. Sulfite oxidase 1는 사립체의 막간질에 존재하며 (58, 59), 이의 발현 감소는 사립체 의 손상에 의한 것으로 생각되며, 이의 결과로 sulfite로 매개되는 세 포 손상이 촉진될 것으로 생각된다 (60-62). 반면에 transferrin의 발현 증가는 자유 철분의 증가에 의한 산화 독성에 대한 보상적 증가로 생각 된다. Ceruloplasmin은 대표적 ferroxidase로 2가 철을 3가 철로 산화하여 transferrin과 결합하게 한다 (63). Atp7b의 결핍에 의한 ceruloplasmin의 감소는 tranferrin-3가 철의 복합체 형성을 저해하고, 따라서 간조직이 자유 2가 철분의 독성에 취약해진다 (64, 65). 따라 서. transferrin의 발현 증가는 이러한 2가 철분에 의한 손상을 줄이기 위한 보상적 현상으로 이해된다.

본 연구에서는 발암작용과 관련된 단백질의 발현 양상의 변화도 확인할 수 있었는데, 특히 연령에 따라 annexin 5의 발현이 증가되는 것은 세포 자멸사 과정의 촉진뿐 만 아니라 담관암의 진행과

연관이 있다. annexin 5A의 발현 변화는 난소암 및 대장암의 발생과 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (66, 67). 따라서, 본 연구의 결과는 annexin 5A의 발현이 담관암의 발생과도 연관이 있을 수 있음을 제시해 준다. 이외 Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha and nonmetastatic cells 2 protein (NM23B), a c-myc transcription factor이 암의 발생과 연관이 있음이 알려져 있다 (68).

# 뇌조직에서 유전자 발현 양상의 고찰 가.구리 축적에 따른 신경계 발생과 활성에

관여하는

#### 유전자들의 발현 변화

구리는 신경계의 발생과 기능활성에 매우 중요한 역할을 한다. 24주령의 LEC 랫트에서는 대뇌 반구, 소뇌, 뇌간에서 구리의 침착이 보이며 특히 소뇌와 뇌간에 많은 침착을 보인다 (33). 본 연구에서 발견된 71개의 유전자들은 신경계의 발생, 분화 및 시냅스의 신호전달에 중요한 역할을 한다. 구리는 다양한 신경전달물질의 대사에 관여하며, 특히 tyrosinase 및 관련 단백질들은 적절한 기능 수행을 위해 구리를 필요로 한다 (69-71). 뇌조직에서는 도파민과 관련된 신경 독성을 조절하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 타이로신 대사와 관련된 2가지 유전자들—*Hpd* (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = 2.04)와 *Pah* (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = 3.84)—의 발현이 차이가 남을 알 수 있었다.

Anks1b (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = 4.83)와 A2m (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = -2.79)는 아밀로이드 전구 물질의 대사에 관여하는데 특히 알츠하이머 질환의 병인 기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (72, 73). Snca (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = 3.42)은 파킨슨병의 발생에 관여하는 alpha-synuclein을 생성하는데 이의 발현 증가는 alpha-synuclein의 생성도 증가시킬 것으로 생각된다 (74). 또한 실시간 realtime-PCR을 이용한 정량 분석 상에도 동일한 결과를 보였다. 구리의 침착에 따른 아밀로이드 전구 단백과 alphasynuclein의 변화에 대한 증거들이 증가하고 있고 (28, 75), 윌슨병 환자들의 가장 전형적인 신경계 증상이 구음장애, 근긴장도이상, 보행장애, 진전 등은 파킨슨병 및 알츠하이머질환에서도 보이는 대표적 증상으로 (29), 아밀로이드전구물질 및 alpha-synuclein의 침착이 윌슨병에서 신경계 증상의 발현에 관여할 것을 제시한다.

# 나.구리 침착에 따른 사립체 기능에 관여하는 유전자들의 발현 양상의 변화

앞의 간 조직의 단백발현 양상을 통해 구리는 사립체의 세포 자멸사, 항산화 과정에 중요한 역할을 함을 알 수 있었다 (39). 뇌조직에서는 37개의 유전자가 연관성을 보였다. 또한 이는 19개의 염증반응에 관여하는 유전자들과 세포 내 신호 전달체계에 관여하는 9개의 유전자들의 발현 변화로 반영되었다. 항 산화작용과 세포 자멸사에 관여하는 37개의 유전자 중 발현이 증가된 유전자들은 주로 자멸사 과정을 촉진하는 기능을 보였으며, 발현이 감소된 유전자들은 항 산화작용과 항-세포자멸사 과정에 중요한 역할을 하는 유전자 들이었다. 이 중 *Sdhaf2* (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = -2.95)와 *Ndufb7* (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = -2.75)는 각각 succinate dehydrogenase complex assembly factor와 NADH dehydrogenase를 전사하는 유전자로서 사립체의 전자전달체계의 원활한 기능에 관여한다. 이들의 발현 감수는 신경세포에서 사립체의 손상을 반영하는 것으로 보인다. *Hspb1*는 신경세포를 스트레스에서 보호하는 기능을 하는 것으로, 이의 발현 변화는 Charcot-Marie-Tooth 병과 척수소뇌 실조증에서 발견되어, 신경계 질환의 병인에 관여하는 것으로 알려져 있고 (76), 본 연구에서 발견된 발현의 감소도 (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = -5.33) 윌슨병의 신경계 증상의 발현에 관여할 가능성을 제시한다.

Cu, Zn-dependent superoxide dismutase 1 (Sod1)는 대표적 구리의존 효소로서 항 산화기능을 수행한다 (77). 비록 24주령의 LEC 랫트에서 이의 발현의 변화는 없었으나 (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = -1.31), 이의 상호작용 유전자인 *Ppp3ca* (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = 2.00)와 *Ppp3cb* (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = 2.93) (78)는 유의한 발현의 증가를 보였다. 이들은 calmodulin-dependent calcineurin 구성요소를 만들며, 신경세포에서 이온채널의 조절, 시냅스의 유동성, 유전자의 발현 등 다양한 칼슘 매게 반응을 이끌어낸다 (79). 따라서, 이들의 발현 증가는 Sod1의 기능억제에 따른 산화 독성을 보상하려는 것으로 생각된다 (78). 또한 calcium-/calmodulin-dependent protein kinase를 전하사는 *Camk2a* (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = 2.84)의 발현도 증가함을 알 수 있었는데 이는 윌슨병의 신경세포에서 calcium-/calmodulin-신호 전달 체계에 변화가 있음을 시사한다.

#### 다. 철분 대사에 관여하는 유전자들의 발현 양상 변화

철분과 관련된 독성은 뇌조직에서도 예상이 되는데 윌슨병 환자의 뇌에서 철분의 축적이 증가됨이 알려져 있었다 (80). 본 연구에서는 24주령의 LEC 랫트(150 ± 37 µg/dL)와 LEA 랫트(201 ± 75 µg/dL)에서 혈청 철의 농도는 큰 차이가 없었으나, 좀더 나이가 든 주령(30-50주)에서는 LEC 랫트의 뇌 조직에 철분의 침착이 있음이 알려졌고, 특히 기저핵에서 뚜렷이 나타남이 알려져 있다 (64). 본 연구에서는 Cp (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = 4.67)와 Hamp (LEC<sub>24 week</sub>/LEA<sub>24 week</sub> ratio = 9.2)가 LEC 랫트에서 발현이 증가됨을 알 수가 있었는데, Cp는 세룰로플라즈민을 전사하는 것으로 철분의 축적에 따른 보상성 증가로 생각된다. 간 조직에 Atp7b의 결핍에 의해 세룰로플라즈민의 생성이 떨어지나, 뇌 조직에서는 Atp7a가 정상적 기능을 하므로, Cp의 발현이 증가되는 것으로 보인다. Hamp는 철분 대사에 관여하는 대표적 유전자로서 (81), hepcidin을 전사하며 본 연구에서는 24주령의 LEC 랫트의 혈청에서 hepcidin의 농도가 유의하게 증가함을 알 수 있었다. 따라서, Cp와 Hamp의 발현 증가는 뇌조직에서 철분의 축적에 따른 보상적 반응이라 생각된다. 그러나,

이 두 유전자는 또한 염증반응 시에도 발현이 증가할 수 있으므로, 철분 대사 이상에 따르는 변화와의 정확한 관계를 확인하기 위해서는 좀더 연구가 필요하겠다.

#### 라. S-adenosylhomocysteine 대사의 변화와 간 손상과의 관계

간 조직의 연구에서 본 바와 같이 LEC 랫트에서는 Sadenosylhomocysteine hydrolase의 감소에 의하 Sadenosylhomocysteine의 영향이 있을 것으로 예상이 되었는데 (39). 뇌조직에서도 이와 일치하는 소견으로 methyltransferase인 Asmt  $(LEC_{24 week}/LEA_{24 week} ratio = -7.31)$ 와 Bhmt  $(LEC_{24 week}/LEA_{24 week} ratio =$ 2.71)의 발현 양상이 바뀌는 것을 확인 할 수 있었다. Asmt는 hydroxyindole O-methyltransferase를 전사하며 이의 발현 감소는 Sadenosylhomocysteine에 의한 것으로 생각된다. 반면, Bhmt는 betaine-S-methyltransferase를 전사하며, 0] 단백은 homocysteine 호모시스테인을 메치오닌으로 전환시키는 작용을 하는 것으로 증가하는 양상을 확인할 수 있었다. 상보적으로 따라서 adenosylhomocysteine의 대사이상은 간 조직의 손상에도 관여하나 윌슨병의 신경학적 증상의 발현에도 관여할 것으로 생각된다.

마.시각 전달체계 및 발암성과의 관계

구리는 시각 전달 체계의 발달에도 관여할 것으로 제시되고 있다 (82). 본 연구에서도 이에 관여하는 여러 유전자들의 발현 변화를 발견할 수 있었다. 향후 구리 침착에 따른 시신경의 기능과의 연관관계에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다. 간 조직에서의 단백 발현 양상에서 관찰한 바와 같이 뇌조직에서도 암의 발생과 관련된 유전자들의 변화를 확인할 수 있었다 (83).

#### 바. 구리 대사 관여 유전자들의 변화

구리의 축적에 따른 다양한 뇌조직의 변화에도 불구하고 표4에 제시한 것처럼 구리의 대사를 직접 관장하는 *Atp7a, Atox1* 및 *Dctn4*의 발현 양상에는 큰 변화가 없었는데, 이는 *Cp*의 발현이 증가되는 양상을 고려할 때 더더욱 의문점이 나는 현상이다. 구리의 침착에도 불구하고 이들 유전자들의 발현양상에 변화가 없는 것은 뇌조직을 구리에 의한 손상에 더 취약하게 할 것으로 보이며, 구리 대사에 관여하는 아직 알려지지 않은 다른 유전자들이 있을 가능성을 시사한다.

#### 결론

본 연구를 통해 우리는 윌슨병의 병태생리 과정에서 구리의 침착에 따른 산화 독성 및 세포자멸사 과정이 광범위하게 진행됨을 알 수 있었다. 그러나, 이외에도 좀더 다양하고 복잡한 병태 생리 과정의 존재를 목격할 수 있었으며, 일부에서는 간질환의 진행에 따른 신경증상의 발현을 매게 하는 후보 대사 과정을 제시하게 되었다. 향후 윌슨병의 다른 동물 모델 및 윌슨병 환자에서 채집이 가능한 시료를 이용한 검증이 필요하다.

## 참고문 헌

1. Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. Lancet. 2007;369(9559):397-408.

2. Das SK, Ray K. Wilson's disease: an update. Nat Clin Pract Neurol. 2006;2(9):482-93.

3. Kim GH, Yang JY, Park JY, Lee JJ, Kim JH, Yoo HW. Estimation of Wilson's disease incidence and carrier frequency in the Korean population by screening ATP7B major mutations in newborn filter papers using the SYBR green intercalator method based on the amplification refractory mutation system. Genet Test. 2008;12(3):395-9.

4. Lee BH, Kim JH, Lee SY, Jin HY, Kim KJ, Lee JJ, et al. Distinct clinical courses according to presenting phenotypes and their correlations to ATP7B mutations in a large Wilson's disease cohort. Liver Int. 2011;31(6):833-41.

5. Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W. Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study. Gut. 2007;56(1):115-20.

6. Bruha R, Marecek Z, Pospisilova L, Nevsimalova S, Vitek L, Martasek P, et al. Long-term follow-up of Wilson Disease: natural history, treatment, mutations analysis and phenotypic correlation. Liver Int. 2010;31(1):83-91.

7. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. Nat Genet. 1993;5(4):344-50.

8. Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. Nat Genet. 1995;9(2):210-7.

9. Shah AB, Chernov I, Zhang HT, Ross BM, Das K, Lutsenko S, et al. Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. Am J Hum Genet. 1997;61(2):317-28. 10. Kim EK, Yoo OJ, Song KY, Yoo HW, Choi SY, Cho SW, et al. Identification of three novel mutations and a high frequency of the Arg778Leu mutation in Korean patients with Wilson disease. Hum Mutat. 1998;11(4):275-8.

11. Nanji MS, Nguyen VT, Kawasoe JH, Inui K, Endo F, Nakajima T, et al. Haplotype and mutation analysis in Japanese patients with Wilson disease. Am J Hum Genet. 1997;60(6):1423-9.

12. Yoo HW. Identification of novel mutations and the three most common mutations in the human ATP7B gene of Korean patients with Wilson disease. Genet Med. 2002;4(6 Suppl):43S-8S.

13. Tsai CH, Tsai FJ, Wu JY, Chang JG, Lee CC, Lin SP, et al. Mutation analysis of Wilson disease in Taiwan and description of six new mutations. Hum Mutat. 1998;12(6):370-6.

14. Gu YH, Kodama H, Du SL, Gu QJ, Sun HJ, Ushijima H. Mutation spectrum and polymorphisms in ATP7B identified on direct sequencing of all exons in Chinese Han and Hui ethnic patients with Wilson's disease. Clin Genet. 2003;64(6):479-84.

15. Park S, Park JY, Kim GH, Choi JH, Kim KM, Kim JB, et al. Identification of novel ATP7B gene mutations and their functional roles in Korean patients with Wilson disease. Hum Mutat. 2007;28(11):1108-13.

16. Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I, et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. Liver Int. 2003;23(3):139-42.

17. Wu ZY, Lin MT, Murong SX, Wang N. Molecular diagnosis and prophylactic therapy for presymptomatic Chinese patients with Wilson disease. Arch Neurol. 2003;60(5):737-41.

18. Walshe JM. Diagnosis and treatment of presymptomatic Wilson's disease. Lancet. 1988;2(8608):435-7.

19. Sternlieb I, Scheinberg IH. Prevention of Wilson's disease in asymptomatic patients. N Engl J Med. 1968;278(7):352-9.

20. Fujiwara N, Iso H, Kitanaka N, Kitanaka J, Eguchi H, Ookawara T, et al. Effects of copper metabolism on neurological functions in Wistar and

Wilson's disease model rats. Biochemical and biophysical research communications. 2006;349(3):1079-86.

21. Kawano H, Takeuchi Y, Yoshimoto K, Matsumoto K, Sugimoto T. Histological changes in monoaminergic neurons of Long-Evans Cinnamon rats. Brain research. 2001;915(1):25-31.

22. Saito T, Nagao T, Okabe M, Saito K. Neurochemical and histochemical evidence for an abnormal catecholamine metabolism in the cerebral cortex of the Long-Evans Cinnamon rat before excessive copper accumulation in the brain. Neurosci Lett. 1996;216(3):195-8.

23. Terwel D, Loschmann YN, Schmidt HH, Scholer HR, Cantz T, Heneka MT. Neuroinflammatory and behavioural changes in the Atp7B mutant mouse model of Wilson's disease. Journal of neurochemistry. 2011;118(1):105-12.

24. Harris ED. Cellular copper transport and metabolism. Annu Rev Nutr. 2000;20:291-310.

25. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radic Biol Med. 1995;18(2):321-36.

26. Schilsky ML. A century for progress in the diagnosis of Wilson disease. J Trace Elem Med Biol. 2014;28(4):492-4.

27. de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LW. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. J Med Genet. 2007;44(11):673-88.

28. Lutsenko S, Bhattacharjee A, Hubbard AL. Copper handling machinery of the brain. Metallomics. 2010;2(9):596-608.

29. Lorincz MT. Neurologic Wilson's disease. Ann N Y Acad Sci. 2010;1184:173-87.

30. Stuerenburg HJ. CSF copper concentrations, blood-brain barrier function, and coeruloplasmin synthesis during the treatment of Wilson's disease. J Neural Transm. 2000;107(3):321-9.

31. Walshe JM. Wilson's disease presenting with features of hepatic dysfunction: a clinical analysis of eighty-seven patients. Q J Med. 1989;70(263):253-63.

32. Wu J, Forbes JR, Chen HS, Cox DW. The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. Nat Genet. 1994;7(4):541-5.

33. Hayashi M, Fuse S, Endoh D, Horiguchi N, Nakayama K, Kon Y, et al. Accumulation of copper induces DNA strand breaks in brain cells of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats, an animal model for human Wilson Disease. Exp Anim. 2006;55(5):419-26.

34. Schilsky ML, Stockert RJ, Sternlieb I. Pleiotropic effect of LEC mutation: a rodent model of Wilson's disease. Am J Physiol. 1994;266(5 Pt 1):G907-13.

35. Tsujikawa K, Suzuki N, Shimaoka T, Iida K, Kohama Y, Otaki N, et al. Abnormal accumulation of copper-metallothionein in the liver and kidney of Long-Evans rats with a cinnamon-like coat color (LEC rats). Biol Pharm Bull. 1994;17(5):591-5.

36. Terada K, Sugiyama T. The Long-Evans Cinnamon rat: an animal model for Wilson's disease. Pediatr Int. 1999;41(4):414-8.

37. Choi BK, Cho YM, Bae SH, Zoubaulis CC, Paik YK. Single-step perfusion chromatography with a throughput potential for enhanced peptide detection by matrix-assisted laser desorption/ ionization-mass spectrometry. Proteomics. 2003;3(10):1955-61.

38. Lee BH, Kim JH, Kim JM, Heo SH, Kang M, Kim GH, et al. The early molecular processes underlying the neurological manifestations of an animal model of Wilson's disease. Metallomics. 2013;5(5):532-40

39. Lee BH, Kim JM, Heo SH, Mun JH, Kim J, Kim JH, et al. Proteomic analysis of the hepatic tissue of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats according to the natural course of Wilson disease. Proteomics. 2011;11(18):3698-705.

40. Li M, Li Y, Chen J, Wei W, Pan X, Liu J, et al. Copper ions inhibit Sadenosylhomocysteine hydrolase by causing dissociation of NAD+ cofactor. Biochemistry. 2007;46(41):11451-8.

41. Li Y, Togashi Y, Sato S, Emoto T, Kang JH, Takeichi N, et al. Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis. A model of Wilson's disease. J Clin Invest. 1991;87(5):1858-61.

42. Samuele A, Mangiagalli A, Armentero MT, Fancellu R, Bazzini E, Vairetti M, et al. Oxidative stress and pro-apoptotic conditions in a rodent model of Wilson's disease. Biochim Biophys Acta. 2005;1741(3):325-30.

43. Yamamoto H, Watanabe T, Mizuno H, Endo K, Hosokawa T, Kazusaka A, et al. In vivo evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in liver of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats with acute hepatitis. Free Radic Biol Med. 2001;30(5):547-54.

44. Ueda J, Takai M, Shimazu Y, Ozawa T. Reactive oxygen species generated from the reaction of copper(II) complexes with biological reductants cause DNA strand scission. Arch Biochem Biophys. 1998;357(2):231-9.

45. Finney LA, O'Halloran TV. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. Science. 2003;300(5621):931-6.

46. Dallmann K, Junker H, Balabanov S, Zimmermann U, Giebel J, Walther R. Human agmatinase is diminished in the clear cell type of renal cell carcinoma. Int J Cancer. 2004;108(3):342-7.

47. Hayward BE, Bonthron DT. Structure and alternative splicing of the ketohexokinase gene. Eur J Biochem. 1998;257(1):85-91.

48. Gunning P, O'Neill G, Hardeman E. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. Physiol Rev. 2008;88(1):1-35.

49. Molleken C, Sitek B, Henkel C, Poschmann G, Sipos B, Wiese S, et al. Detection of novel biomarkers of liver cirrhosis by proteomic analysis. Hepatology. 2009;49(4):1257-66.

50. Choi HS, Yim SH, Xu HD, Jung SH, Shin SH, Hu HJ, et al. Tropomyosin3 overexpression and a potential link to epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma. BMC Cancer. 2010;10:122.

51. Drake SK, Bourdon E, Wehr NB, Levine RL, Backlund PS, Yergey AL, et al. Numerous proteins in Mammalian cells are prone to iron-dependent oxidation and proteasomal degradation. Dev Neurosci. 2002;24(2-3):114-24.

52. Rodriguez-Ortega MJ, Grosvik BE, Rodriguez-Ariza A, Goksoyr A,

Lopez-Barea J. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (Chamaelea gallina) exposed to four model environmental pollutants. Proteomics. 2003;3(8):1535-43.

53. Tanaka T, Inazawa J, Nakamura Y. Molecular cloning and mapping of a human cDNA for cytosolic malate dehydrogenase (MDH1). Genomics. 1996;32(1):128-30.

54. Nelson DL, Cox, Michael M. Leninger Principles of Biochemistry.5th ed. New Yoerk: Freeman 2008.

55. Hayes MJ, Moss SE. Annexins and disease. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Oct 1;322(4):1166-70.

56. Hawkins TE, Das D, Young B, Moss SE. DT40 cells lacking the Ca2+-binding protein annexin 5 are resistant to Ca2+-dependent apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(12):8054-9.

57. Feng Q, Keshtgarpour M, Pelleymounter LL, Moon I, Kalari KR, Eckloff BW, et al. Human S-adenosylhomocysteine hydrolase: common gene sequence variation and functional genomic characterization. J Neurochem. 2009;110(6):1806-17.

58. Johnson-Winters K, Nordstrom AR, Emesh S, Astashkin AV, Rajapakshe A, Berry RE, et al. Effects of interdomain tether length and flexibility on the kinetics of intramolecular electron transfer in human sulfite oxidase. Biochemistry. 2010;49(6):1290-6.

59. Hille R. The Mononuclear Molybdenum Enzymes. Chem Rev. 1996;96(7):2757-816.

60. Abedinzadeh Z. Sulfur-centered reactive intermediates derived from the oxidation of sulfur compounds of biological interest. Can J Physiol Pharmacol. 2001;79(2):166-70.

61. Herken EN, Kocamaz E, Erel O, Celik H, Kucukatay V. Effect of sulfite treatment on total antioxidant capacity, total oxidant status, lipid hydroperoxide, and total free sulfydryl groups contents in normal and sulfite oxidase-deficient rat plasma. Cell Biol Toxicol. 2009;25(4):355-62.

62. Kucukatay V, Turgut S, Kocamaz E, Emmungil G, Bor-Kucukatay M, Turgut G, et al. Effect of sulfite exposure on zinc, iron, and copper levels in

rat liver and kidney tissues. Biol Trace Elem Res. 2006;114(1-3):185-95.

63. Sun H, Li H, Sadler PJ. Transferrin as a metal ion mediator. Chem Rev. 1999;99(9):2817-42.

64. Kim JM, Ko SB, Kwon SJ, Kim HJ, Han MK, Kim DW, et al. Ferrous and ferric iron accumulates in the brain of aged Long-Evans Cinnamon rats, an animal model of Wilson's disease. Neurosci Lett. 2005;382(1-2):143-7.

65. Arredondo M, Nunez MT. Iron and copper metabolism. Mol Aspects Med. 2005;26(4-5):313-27.

66. Dong HP, Holth A, Kleinberg L, Ruud MG, Elstrand MB, Trope CG, et al. Evaluation of cell surface expression of phosphatidylserine in ovarian carcinoma effusions using the annexin-V/7-AAD assay: clinical relevance and comparison with other apoptosis parameters. Am J Clin Pathol. 2009;132(5):756-62.

67. Xue G, Hao LQ, Ding FX, Mei Q, Huang JJ, Fu CG, et al. Expression of annexin a5 is associated with higher tumor stage and poor prognosis in colorectal adenocarcinomas. J Clin Gastroenterol. 2009;43(9):831-7.

68. Zhao L, Wang H, Sun X, Ding Y. Comparative proteomic analysis identifies proteins associated with the development and progression of colorectal carcinoma. FEBS J. 2010;277(20):4195-204.

69. Greggio E, Bergantino E, Carter D, Ahmad R, Costin GE, Hearing VJ, et al. Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. J Neurochem. 2005;93(1):246-56.

70. Higashi Y, Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. Inhibition of tyrosinase reduces cell viability in catecholaminergic neuronal cells. J Neurochem. 2000;75(4):1771-4.

71. Tief K, Hahne M, Schmidt A, Beermann F. Tyrosinase, the key enzyme in melanin synthesis, is expressed in murine brain. Eur J Biochem. 1996;241(1):12-6.

72. Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, et al. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease.

Nat Genet. 1998;19(4):357-60.

73. Ghersi E, Noviello C, D'Adamio L. Amyloid-beta protein precursor (AbetaPP) intracellular domain-associated protein-1 proteins bind to AbetaPP and modulate its processing in an isoform-specific manner. The Journal of biological chemistry. 2004;279(47):49105-12.

74. Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, et al. Ubiquitination of a new form of alphasynuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. Science (New York, NY). 2001;293(5528):263-9.

75. Inestrosa NC, Cerpa W, Varela-Nallar L. Copper brain homeostasis: role of amyloid precursor protein and prion protein. IUBMB Life. 2005 Sep;57(9):645-50.

76. Friedman MJ, Li S, Li XJ. Activation of gene transcription by heat shock protein 27 may contribute to its neuronal protection. The Journal of biological chemistry. 2009;284(41):27944-51.

77. Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. The Journal of biological chemistry. 2001;276(41):38084-9.

78. Volkel H, Scholz M, Link J, Selzle M, Werner P, Tunnemann R, et al. Superoxide dismutase mutations of familial amyotrophic lateral sclerosis and the oxidative inactivation of calcineurin. FEBS Lett. 2001;503(2-3):201-5.

79. Yakel JL. Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription. Trends Pharmacol Sci. 1997;18(4):124-34.

Bruehlmeier M, Leenders KL, Vontobel P, Calonder C, Antonini A,
Weindl A. Increased cerebral iron uptake in Wilson's disease: a 52Fe-citrate
PET study. J Nucl Med. 2000;41(5):781-7.

81. Weizer-Stern O, Adamsky K, Margalit O, Ashur-Fabian O, Givol D, Amariglio N, et al. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism, is transcriptionally activated by p53. Br J Haematol. 2007;138(2):253-62.
82. Cronin CA, Ryan AB, Talley EM, Scrable H. Tyrosinase expression during neuroblast divisions affects later pathfinding by retinal ganglion cells. J Neurosci. 2003;23(37):11692-7.

83. Marquez A, Villa-Trevino S, Gueraud F. The LEC rat: a useful model for studying liver carcinogenesis related to oxidative stress and inflammation. Redox Rep. 2007;12(1):35-9.

## 약어집

ATP7B, , ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide)

LEC, Long-Evans Cinnamon

LEA, Long-Evans Agouti

2-DE, Two-dimensional gel electrophoresis

IEF, isoelectric focusing

LPE, Local pooled error

FDR, false discovery rate

RT-PCR, real-time polymerase chain reaction

MDHC, malate dehydrogenase 1

ROS; reactive oxidative species

SAHH, S-adenosylhomocysteine hydrolase

## Abstract

**Introduction:** Wilson disease is caused by ATP7B deficiency, and characterized by progressive Cu accumulation in liver and subsequently brain. This study was performed to identify the important molecular biological changes underlying liver and brain injuries in an animal model of Wilson disease.

**Methods:** LEC (Long-Evans Cinnamon) rats and LEA (Long-Evans Agouti) rats, a non-diseased LEC rats, aged 6, 12 and 24 weeks (3 each per group) were used for the study. Hepatic histological examination was done in each age group. Proteomic profiles were investigated in hepatic tissues by two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF-MS, and validated by Western Blot analysis. Total RNA was extracted from the whole brain tissue in each-age group. cDNA microarray was performed using RatRef-12 expression bead arrays, and validated by quantitative real-time polymerase chain reaction.

**Results:** Hepatic histological features were similar in LEC rats as in Humans with Wilson disease. Hepatic proteomic profiles in LEC rats were characterized by decreased expressions of the proteins in mitochondrial matrix even in the early ages. This change progressed in age-dependent manner, reflected by the differential expressions of malate dehydrogenase 1, annexin A5, transferrin, S-adenosylhomocysteine hydrolase, and sulfite oxidase 1, indicating progressive oxidative stress and pro-apoptotic conditions in LEC liver.

Cu accumulation is pronounced in LEC brain since 24 weeks of age. A total of 186 genes were differentially expressed at this age. Functional analyses of these genes revealed that neuronal development and activities might be altered. In addition, oxidative injury, pro-apoptotic process with inflammatory reaction and altered signal transduction might be involved in the neurological manifestations of Wilson disease. Of note, these pathogenic processes might shared by those in Alzheimer disease and Parkinson disease. Alterations in calcium-calcineurin signal transduction, iron metabolism, Sadenosylhomocysteine metabolism might play additional important roles.

**Conclusions:** The results of our study indicate that oxidative injury and proapoptotic conditions play important roles in pathogenic process in Wilson disease. In addition, more complicated and diverse pathogenic processes might underlie these processes as well, for which more solid evidences are needed using other animal models of Wilson disease and easily-accessible human tissues. **Keywords:** Wilson disease, LEC rat, proteomics, cDNA microarray **Student number:** 2009– 30574