



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사학위논문

AhR에 의한 간세포의 자식작용 조절

Regulation of autophagy in hepatocytes by AhR

2017년 2월

서울대학교 대학원

의과대학 협동과정 임상약리학 전공

고 봉 섭

초록

AhR에 의한 간세포의 자식작용 조절

자식작용 (autophagy)은 세포질 성분을 분해해 세포 내 에너지 균형과 항상성 유지에 기여한다. 간에서 자식작용의 불균형은 여러 대사질환의 원인으로 지목된다. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)은 간에서 생체이물대사를 조절하는 주요 핵 수용체로 알려져 있으며, 최근 AhR 유전자 변형 마우스 모델을 통해 다양한 대사질환과 연관됨이 보고되었다. 하지만 아직까지 자식작용을 제어하는 조절자로서 AhR의 역할에 대해서는 연구된 바가 없다.

본 연구는 간에서 자식작용을 제어하는 핵심 조절자로서 AhR을 제시하였다. AhR이 자식작용에 관여하는지를 파악하고, 자식작용을 조절하는 분자적 기전을 규명하고자 하였다. AhR이 자식작용에 미치는 영향을 확인하기 위해 간세포에 리간드를 처리하였고, LC3 단백질과 mCherry-GFP-LC3 형광변화 관찰을 통해 자식작용의 감소를 확인하였다. 또한 AhR의 활성화는 에너지 대사의 센서 단백질로서 자식작용을 촉진하는 AMPK의 활성을 감소시키는 것으로 나타났다. AhR 발현 벡터의 과발현과 siRNA를 이용한 반전 실험을 통해서 리간드에 의한

자식작용 억제현상과 AMPK의 활성화가 AhR을 매개한 반응이라는 것을 규명하였다. AMPK는 T172의 인산화를 통해 활성이 증가한다. AMPK T172의 인산화는 인산화효소와 탈인산화효소의 균형에 의해 조절된다. 본 연구에서는 AhR이 Protein phosphatase-2A (PP2A)의 B subunit isoform 중 PPP2R2D의 발현을 mRNA 수준에서 선택적으로 증가시킨다는 것을 밝혔다. 또한, 크로마틴 면역침강법을 통해 AhR이 직접 PPP2R2D의 프로모터에 결합한다는 것을 증명하였다. 간질환 모델에서 AhR의 자식작용 조절이 미치는 영향에 대해 탐구해보고자 만성적 알코올 섭취에 의한 알코올성 간질환을 대표하는 Lieber-Decarli 식이 마우스 모델을 사용하였다. Control 식이 마우스에 비해 Lieber-Decarli 식이 마우스에서 간 조직 내 Kynurenine의 농도가 유의적으로 증가되어 있음을 확인하였고, 이와 함께 AhR 활성화에 의한 PPP2R2D의 발현증가를 관찰할 수 있었다.

본 연구는 간세포에서 AhR의 활성화는 자식작용을 억제하며, 이 과정에서 PP2A B subunit의 발현을 조절하여 에너지 센서 단백질인 AMPK의 활성을 억제한다는 것을 새롭게 규명하였다. 또한 Lieber-Decarli 식이 마우스 모델에서 알코올성 간질환과 AhR의 상관성을 제시하여, 알코올성 간질환의 병리기전에 대한 주요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

주요어: 자식작용, AhR, AMPK, PP2A, PPP2R2D, 알코올성 간질환

학번: 2015-22066

이름: 고봉섭

목 차

List of Abbreviations.....	v
List of Figures	vi
I. 서론.....	1
II. 실험재료 및 방법.....	4
1. 시약 및 항체.....	4
2. 세포배양.....	4
3. 실험동물.....	5
4. 세포 분획의 분리.....	5
5. 면역 화학적 분석 (Immunoblotting).....	6
6. 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응법 (Real-Time RT-PCR).....	6
7. 형질도입 (Transfection).....	8
8. siRNA 트랜스펙션 (Transfection).....	8
9. 컨포칼 현미경 (Confocal microscopy).....	9
10. 크로마틴 면역침강법 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP).....	9
11. 통계처리.....	9
III. 실험 결과.....	10
VI. 결론 및 고찰.....	28
V. 참고 문헌.....	33
ABSTRACT.....	38

List of Abbreviations

AA	Anthranilic acid
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AMPK	AMP-activated kinase
CQ	Chloroquine
CYP1A1	Cytochrome P450 1A1
FICZ	6-Formylindolo[3,2-b]carbazole
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
KA	Kynurenic acid
Kyn	Kynurenine
LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
OA	Okadaic acid
PP2A	Protein phosphatase-2A
TDO	Tryptophan-2,3-dioxygenase
Trp	Tryptophan

List of Figures

- Figure 1.** Inhibition of autophagy by AhR activation
- Figure 2.** AhR-mediated inhibition of autophagy
- Figure 3.** Inhibition of AMPK signaling pathway by AhR
- Figure 4.** PP2A as a putative target for AhR-mediated AMPK regulation
- Figure 5.** Alterations of the identified pathway in alcoholic liver disease

1. 서론

자식작용 (Autophagy)은 간세포의 생존에 필수적인 과정으로, 영양부족 상태에서 세포질 성분을 분해해 에너지원으로 사용하고 항상성을 유지하는 역할을 한다 (Madrigal-Matute J et al., 2016). 하지만 지방간, 인슐린 저항성, 간암 등 다양한 간질환 상황에서는 항상성 유지에 중요한 자식작용의 기능장애가 관찰된다 (Schneider JL et al., 2014).

자식작용의 활성조절이 다양한 질환의 중요한 치료학적 타겟으로 생각되면서, 세포가 자식작용을 조절하는데 관여하는 여러 단백질들이 연구를 통해 밝혀졌다. 하지만 자식작용을 조절하는 단백질들의 발현을 장기적으로 조절하는 전사적 조절에 대한 이해는 부족하며, 특히 활성화된 자식작용을 조절하는 억제적 메커니즘에 대한 이해가 부족하다. 최근 Farnesoid X receptor (FXR)이 간에서 담즙산을 인식하여 자식작용을 전사적으로 조절함이 밝혀지면서 (Jae Man Lee et al., 2014; Sunmi Seok et al., 2014), 핵 수용체가 자식작용에 관여하는 단백질들의 발현을 조절하는 잠재적 조절자로서 주목을 받고 있다.

Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)은 TCDD, benzopyrene 등 유해물질을 인식하고 해독작용을 매개하는 핵 수용체로 가장 잘 알려져 있다. 하지만 최근에는 AhR 유전자변형 마우스모델 연구를 통해 AhR 유전자결손 마우스가 야생형에 비해 고지방식이에 의한 비만과 당뇨,

지방간으로부터 저항성을 가지는 것으로 보고되었고 (Xu CX et al., 2015), 이와 반대로 고히모시스테인혈증을 유도한 마우스의 간에서 AhR이 활성화되어 지방간을 유도한다는 것이 알려졌다 (Yao L et al., 2016). AhR이 해독작용을 매개할 뿐 아니라 다양한 대사질환에 관여함이 보고되면서 에너지 대사에서 AhR이 에너지 대사 항상성 조절에 관여할 수 있을 것으로 추측되고, 약물학적 치료의 타겟으로 부상하고 있다. Kynurenine은 AhR의 내인성 리간드로 암세포의 생존과 면역관용에 관여한다고 알려져 있다 (Opitz CA et al., 2011). Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO)와 Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)는 Kynurenine을 생성하는 주요 효소이며, 체내 에너지 대사의 핵심 장기인 간에도 많이 분포되어 있다. 하지만 간에서 Kynurenine에 의한 AhR의 활성조절이 에너지 항상성 조절에 미치는 영향에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 특히, Kynurenine에 의한 AhR의 활성화가 자식작용에 미치는 영향은 연구된 바 없다.

만성적 알코올 섭취에 의한 알코올성 간질환은 세계적으로 발병률과 사망률이 높은 질환이다. 알코올성 간질환은 과도한 알코올 섭취로 인해 지방간에서부터 더 나아가 간염, 간경화 및 간암까지 단계적으로 진행된다 (Gao B et al., 2011). 사회적으로도 큰 문제가 되고 있는 질병이지만 아직까지 알코올성 간질환의 근본적인 발병기전에 대한 이해는 많이 부족한 실정이다 (Mathews S et al., 2013). 따라서 알코올성

간질환의 치료제 개발을 위해서는 정확한 병리적 기전에 대한 이해가 중요할 것으로 보인다.

본 연구는 처음으로 AhR이 핵 수용체로서 자식작용에 관여하는 단백질들의 발현을 조절하는 잠재적 조절자로 제시하였다. 간에서 AhR이 에너지 대사의 조절자로서 자식작용에 미치는 영향을 연구하고, 어떤 분자기전을 통해 조절하는지 규명하고자 하였다. 또한 알코올성 간질환 동물모델을 사용하여 알코올성 간질환의 병리기전과 AhR의 상관성을 분석하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시약 및 항체

Kynurenine, Chloroquine, Okadaic acid와 β -actin 항체는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였다. FICZ는 Enzo life sciences (Farmingdale, NY)에서 구입하였다. LC3b 항체는 Novus biological (Littleton, CO)에서 구입하였다. p-AMPKa, AMPKa, p-ACC, ACC 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA)에서 구입하였다. AhR 항체는 Abcam (Cambridge, MA)에서 구입하였다. TDO2, IDO 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit, goat anti-Mouse IgG는 Zymed Laboratories (San Francisco, CA)에서 구입하였다.

2. 세포배양

AML-12, HepG2는 모두 American Type Culture Collection (Rockville, MD)에서 구입하였다. Primary Mouse hepatocyte의 분리는 기존에 사용하던 방법으로 진행하였다 (Kay HY, J Nutr 140, 2010). 모든 세포는 37°C 및 5% CO₂ 조건하에 약 80%-90%의 confluency 를 갖도록 배양하였다. AML-12 세포는 DMEM/F-12 medium (GIBCO-BRL) 에서 10% fetal bovine serum (FBS), 50units/ml penicillin 및 50 μ g/ml streptomycin, insulin-transferrin-selenium X (ITSX) (GIBCO-BRL), dexamethasone (40 ng/ml; Sigma) 이 함유된

DMEM/F-12 medium (GIBCO-BRL) 배양하였고, HepG2 세포는 10% fetal bovine serum (FBS), 50units/ml penicillin 및 50 μ g/ml streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다.

3. 실험동물 (Animal treatment)

동물 실험은 ‘실험동물 관리 및 이용에 관한 지침’에 따라 시행되었다. 실험동물로 사용된 음성 C57/BL6 mice를 Charles River Orient (Seoul, Korea)에서 공급받아 55 \pm 5% 의 습도, 22 \pm 2 C 의 온도 및 환기가 조절된 서울대학교 약대 동물실험 연구동에서 1주 이상 사육하여 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 6주 된 C57BL/6 마우스에 일반식이와 Lieber-Decarli ethanol diet를 4주간 제공하였다.

4. 세포 분획의 분리

배양 세포의 배지를 제거한 후 PBS 로 세척하고 세포를 긁어 모아 3000g 에서 3분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 단백질 분해효소 억제제를 첨가한 용해 완충액 [10 mM Tris (pH 7.1), 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 1mM dithiothreitol, 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride] 을 가하여 1시간 동안 얼음 위에서 완전히 용해한 후 10,000g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 전세포 추출액으로 사용하였다. 단백질 농도는 Bradford 정량법

(Bio-Rad® protein assay kit, Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 정량 하였다.

5. 면역 화학적 분석 (Immunoblotting)

획득한 세포 분획의 단백질을 Mighty Small II SE 250 장치 (Hoefer, Inc, San Francisco, CA) 를 이용하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 방법으로 분리하였다. 시료를 시료희석완충액 [63mM Tris (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 0.0013% bromophenolblue]에 희석하여 7.5%, 9%, 15%의 젤을 사용하여 전기 완충액 (0.12M Tris, 0.96M glycine, 0.5% SDS) 내에서 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 젤은 전기영동 전달장치를 이용하여 전이 완충액 (25mM Tris, 192mM glycine, 20% v/v methanol, pH 8.3) 내에서 190mA 로 1시간 10분동안 nitrocellulose지에 단백질을 전이시켰다. 관찰하려는 단백질에 대한 1차 항체와 반응시킨 후 이어서 Horseradish peroxidase (HRP) 와 결합되어 있는 2차 항체와 1시간 반응시키고 ECL chemiluminescence 시스템 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) 을 이용하여 발색 하였다.

6. 실시간 역전사 증합 효소 연쇄 반응법 (Real-Time RT-PCR)

총 RNA 는 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 제조사의 권장방법에 따라 추출하였다. 1 μ g 의 RNA 와 AMV 역전사 효소

(Promega, Madison, WI), 프라이머로서 oligo(dT)16을 사용하여 cDNA를 합성하였다. LightCycler 2.0 System (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)과 SYBR Premix Ex Taq (Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 제조사의 지시된 방법에 따라 수행하였고 결과값은 18s rRNA와 β -actin 의 상대적인 값으로 보정하였다. 증폭된 산물의 특이성은 melting curve 분석을 통하여 확인하였다. DNA 증폭에 사용된 primer 는 다음과 같다.

Mouse β -actin, 5'-CTGAGAGGGAAATCGTGCGT-3' (sense) 5'-TGTTGGCATAGAGGTCTTTACGG-3' (antisense); 18s rRNA, 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3' (sense) 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' (antisense); Mouse CYP1A1, 5'-GACACAGTGATTGGCAGAG-3' (sense) 5'-GAAGGTCTCAATGAAGG-3' (antisense); Mouse AhR, 5'-AGGATCGGGGTACCAGTTCA (sense) 5'-GTCAGTGGTCTCTGAGTGGC-3' (antisense); Mouse PPP2R2D, 5'-GAGAAGGCCGCCTCTATCTG-3' (sense) 5'-TTTCAAATGGCGCCCAATG-3' (antisense); Mouse PPP2R5C, 5'-TTAGCCCCTTCCCACATTGC-3' (sense) 5'-ATGAGATTCTGCCTGCCAC-3' (antisense);

Mouse PPP2R5D, 5'-TATTCAGCCCGGTTCCACC-3' (sense) 5'-AGGCCCTAACACGAAAAGGG-3' (antisense); Mouse TDO2, 5'-CTGGGGGATCCTCAGGCTAT-3' (sense) 5'-TGTCAGTGTACTCGGCTGTG-3' (antisense); Mouse IDO1, 5'-TGCTTACTCTTTTTCCCTTCC-3' (sense) 5'-CATCAGACCTGGTGCTTCA-3' (antisense)

7. 형질도입 (Transfection)

형질도입은 6-well plate의 세포 배양 용기에서 약 50-70% 배양된 세포를 혈청 및 항생제가 없는 Opti-MEM® (Life Technologies, Grand Island, NY)에서 약 6시간 정도 안정화 시킨 후, Fugene HD (Roche, Indianapolis, IN)를 사용하여 플라스미드를 세포 내 형질도입하였다. 플라스미드 1µg 당 3µl의 Fugene HD와 혈청과 항생제가 없는 1ml의 Opti-MEM® 과 반응시켜서 세포에 넣어주고 약 6시간 반응시켰다. 이때 대조군 세포에는 형질도입되는 플라스미드의 총량을 보정하기 위하여 과발현 플라스미드의 backbone만을 가지는 플라스미드 (Mock)를 형질도입하였다. 형질도입 후 1% 혈청이 포함된 항생제가 없는 Eagle's minimum essential medium에 12시간 정도 안정화시킨 후 약물을 처치하였다.

8. siRNA 트랜스펙션

siRNA 트랜스펙션을 위해서 6-well plate에서 24시간 배양된 AML12 세포주 (2×10^5 cells/well)를 AMAXA Nucleofection system (Lonza, Basel, Basel Stadt)을 이용하여 트랜스펙션하였다. 세포에 상응하는 siRNA (200 pmol)를 도입하고 혈청을 포함한 medium 으로 24시간 동안 배양한 뒤 실험에 사용하였다. AhR siRNA, non targeting control siRNA 는 Dharmacon (Chicago, IL)에서 구입하였다. PP2A/CA siRNA는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다.

9. 키포칼 현미경 (Confocal microscopy)

AML12 세포 또는 Mouse primary hepatocytes를 커버글라스 위에 배양하였다. mCherry-GFP-LC3 아데노바이러스를 12시간 동안 감염시킨 뒤 실험을 진행하였고, 배지를 제거한 후 세포를 4% paraformaldehyde로 30분 간 고정하였다. 커버글라스를 슬라이드글라스 위에 고정하여 laser-scanning confocal microscope (PCM-2000_Diaphot 300; Nikon Inc)로 촬영하였다.

10. 크로마틴 면역침강법 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)

Kynurenine을 24시간 처리한 세포에 1% formaldehyde를 첨가하여 크로마틴과 가교결합을 형성하였다. 크로마틴 면역침강법은 제작자의 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) 권장방법에 따라 수행하였다.

PPP2R2D의 AHRE영역에 대한 primer (5'-CCCTGAAGTAGCACTCTGATGA-3' (sense) 5'-GCTGGACTGGATGCTCGAAG-3' (antisense))를 이용하여 중합 효소 연쇄 반응을 수행하였다.

11. 통계처리

One-way analysis of variance (ANOVA)로 처리 군간의 유의성을 평가하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 을 기준으로 하였다.

III. 실험 결과

1. AhR 리간드에 의한 자식작용의 억제

AhR이 자식작용 조절에 미치는 영향을 알아보기 위해 본 연구에서는 AhR의 내인성 리간드인 Kynurenine과 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ)를 이용하였다. Mouse primary hepatocyte에서 Kynurenine으로 AhR을 활성화 시키면 자식작용의 지표단백질인 LC3 II가 감소하였다 (Fig 1A). 또한 AML12 세포에서 Kynurenine의 처리 시간과 농도에 의존하여 LC3 II가 감소함을 확인하였다 (Fig 1B).

Chloroquine은 리소좀의 산성화를 막아 자가포식소체의 분해를 막고, 이는 LC3 II의 생성을 측정할 수 있게 한다 (Mizushima, N et al., 2010). 일반적으로 Chloroquine 처리 하에 LC3 II 단백질 양의 변화는 자식작용 활성의 지표로 사용되지만, 자식작용은 여러 단계에 의해 조절되기 때문에 자식작용의 유동성을 관찰할 필요가 있다. 대조군과 실험군에서 Chloroquine에 의해 LC3 II 단백질이 축적되는 폭의 변화를 관찰하였고, AML12 세포와 Mouse primary hepatocyte에서 Kynurenine에 의해 자식작용의 유동성이 감소함을 확인하였다 (Fig 1C). AhR에 보다 더 친화성이 높은 리간드인 FICZ 역시 같은 작용을 나타내었다 (Fig 1D).

자식작용의 유동성을 판단하는 다른 방법으로 mCherry-GFP-LC3를 이용할 수 있다 (Mizushima, N et al., 2010). GFP와 mCherry를 merge한

이미지에서 yellow puncta는 Autophagosome을 나타내고 red puncta는 Autolysosome을 나타낸다. 이러한 원리로 yellow puncta와 red puncta 수의 변화를 관찰하여 자식작용의 유동성 변화를 판단한다. AML12 세포와 Mouse primary hepatocyte에 mCherry-GFP-LC3를 발현하는 아데노바이러스를 감염시켜 컨포칼 현미경으로 관찰하였을 때도 자식작용의 유동성 감소를 관찰할 수 있었다 (Fig 1E, 1F).

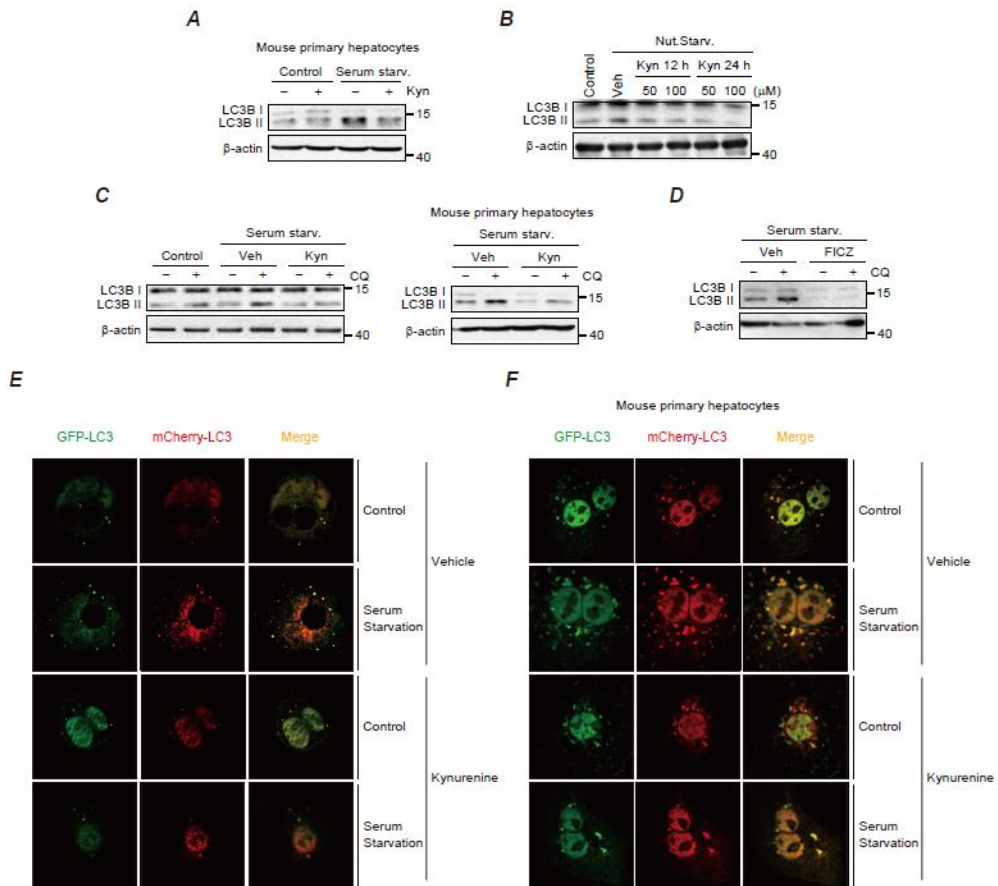


Figure 1. Inhibition of autophagy by AhR activation

(A) Effects of Kynurenine (100μM) on protein level of LC3. Immunoblots were performed on the lysates of Mouse primary hepatocytes that had been treated with Kynurenine (100μM) for 24h followed by Chloroquine (10μM) for 2h.

(B) Effects of Kynurenine on protein level of LC3. Immunoblots were performed on the lysates of AML12 cells that had been treated with different time point and concentration of Kynurenine.

(C) Effects of Kynurenine (100μM) on autophagy flux. Immunoblots were performed on the lysates of AML12 cells and Mouse primary hepatocytes that had

been treated with Kynurenine (100 μ M) for 12h followed by Chloroquine (10 μ M) for 2h.

(D) Effects of FICZ (100nM) on autophagy flux. Immunoblots were performed on the lysates of AML12 cells that had been treated with FICZ (100nM) and Chloroquine (10 μ M) for 3h.

(E) Representative confocal images of mCherry-GFP-LC3 puncta formation. AML12 cells and Mouse primary hepatocytes had been treated with Kynurenine (100 μ M) for 12h.

(F) Representative confocal images of mCherry-GFP-LC3 puncta formation. Mouse primary hepatocytes had been treated with Kynurenine (100 μ M) for 12h.

2. AhR을 매개한 자식작용의 억제

AhR 리간드에 의한 자식작용의 억제현상은 AhR을 직접 매개한 반응일 수도 있고, AhR을 매개하지 않은 독립적인 반응일 수도 있다. AhR 리간드에 의한 자식작용의 억제효과가 실제로 AhR을 매개한 효과인지를 확인하기 위해 일과성 트랜스펙션을 이용하였다. siRNA 트랜스펙션을 통해 AhR의 발현을 억제하였을 때, Kynurenine에 의해 LC3II가 줄어드는 현상이 반전되었다 (Fig 2A). 또한, HepG2 세포에서 AhR을 과발현하면 자식작용의 유동성이 감소하였다 (Fig 2B). 이와 반대로, AML12 세포에서 siRNA 트랜스펙션을 통해 AhR의 발현을 억제하면 자식작용의 유동성이 증가하는 현상을 관찰하였다 (Fig 2C). mCherry-GFP-LC3 일과성 트랜스펙션을 시켜 형광현미경으로 관찰하였을 때도 Fig 2A와 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (Fig 2D). 이를 종합하여, AhR 리간드에 의한 자식작용 억제현상은 AhR을 매개하여 일어난다는 것을 규명하였다.

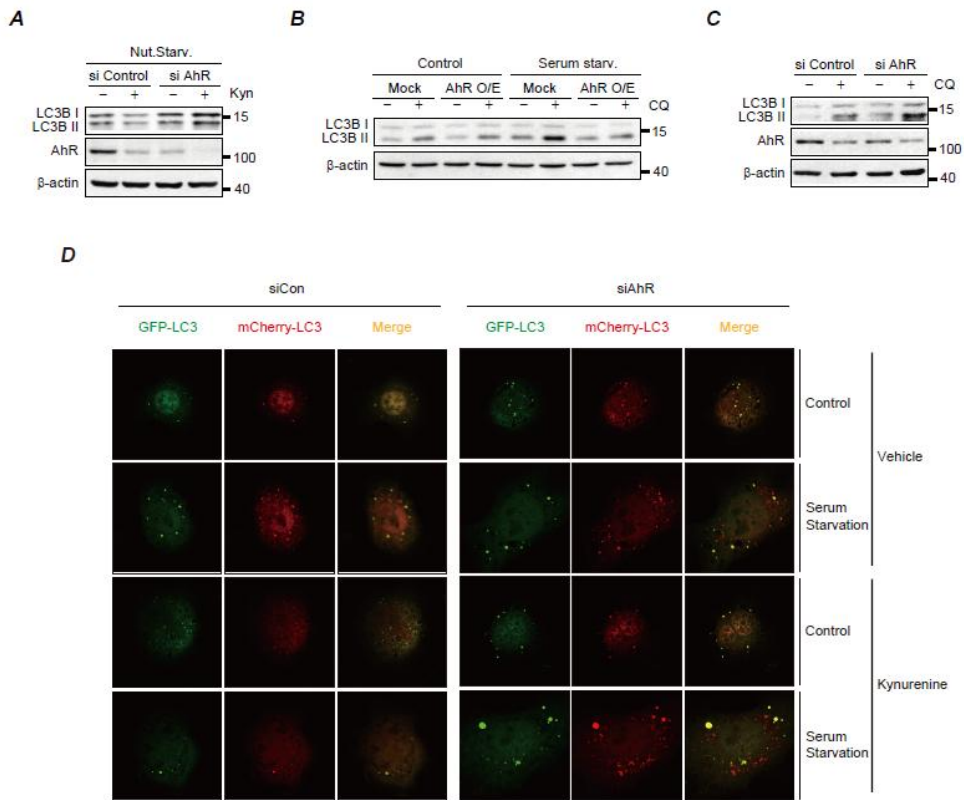


Figure 2. AhR-mediated inhibition of autophagy

(A) Inversion of AhR-mediated autophagy inhibition by AhR siRNA transfection. AML12 cells are transfected with control or AhR siRNA. After 48h incubation, Kynurenine (100 μ M) is treated for 12h.

(B) Autophagy repression by AhR overexpression. LC3 was immunoblotted from HEPG2 lysates following mock or AhR construct transfection.

(C) Autophagy induction by AhR siRNA transfection. LC3 was immunoblotted from AML12 lysates following control or AhR siRNA transfection.

(D) Representative confocal images of mCherry-GFP-LC3 puncta formation in AML12 cells. AML12 cells had been treated with Kynurenine (100 μ M) for 12h

after transfection with control or AhR siRNA.

3. AhR에 의한 AMPK의 활성억제

다음으로, AhR에 의한 자식작용 억제현상의 분자적 기전을 연구하기 위해 자식작용을 활성화시키는 단백질로 잘 알려진 AMPK의 활성을 관찰하였다. 우선, AML12 세포와 Mouse primary hepatocyte에 Kynurenine을 처리하여 AMPK의 활성변화를 관찰하였다. AML12 세포에서 Kynurenine에 처리에 의해 AMPK의 활성이 24시간까지 점진적으로 감소하였고, Mouse primary hepatocyte에서도 Kynurenine 처리에 의해 AMPK의 활성이 감소하는 것을 다시 한번 확인하였다 (Fig 3A). AhR에 보다 더 친화성이 높은 리간드인 FICZ 역시 Kynurenine과 비슷한 작용을 나타내었다 (Fig 3B). AhR 리간드에 의해 에너지 센서 단백질인 AMPK 활성이 억제되는 현상은 AhR에 의한 자식작용 억제를 설명할 수 있다.

AhR 리간드에 의한 AMPK 억제현상도 AhR을 매개한 효과인지 확인하기 위해 일과성 트랜스펙션을 이용하였다. siRNA로 AhR의 발현을 억제하였을 때, Kynurenine에 의해 AMPK 활성이 감소하는 현상이 반전되는 것을 관찰하였다 (Fig 3C). 또한, HepG2 세포에서 AhR을 과발현하면 AMPK 활성이 감소하는 것을 확인하였다 (Fig 3D). 이와 반대로, AML12 세포와 Mouse primary hepatocyte에서 siRNA 트랜스펙션을 통해 AhR의 발현을 억제하면 AMPK 활성이 증가하였다 (Fig 3E).

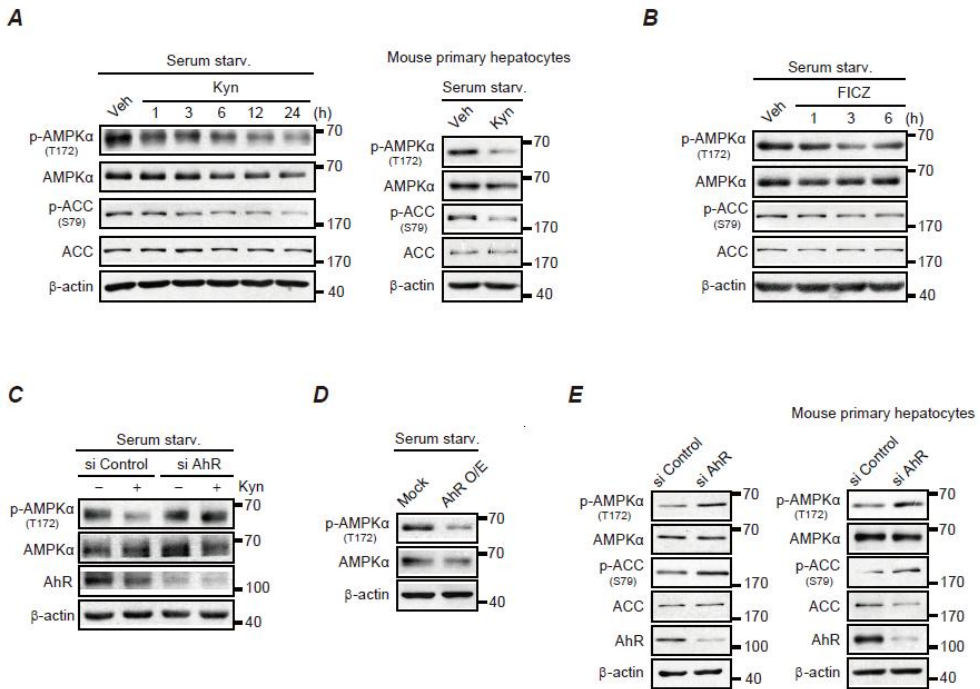


Figure 3. Inhibition of AMPK signaling pathway by AhR

(A) Effects of Kynurenine (100µM) on protein level of p-AMPK. Immunoblots were performed on the lysates of AML12 cells that had been treated with different time point of Kynurenine and the lysates of Mouse primary hepatocytes that had been treated with Kynurenine for 12h.

(B) Effects of FICZ (100nM) on protein level of p-AMPK. Immunoblots were performed on the lysates of AML12 cells that had been treated with different time point of FICZ.

(C) Inversion of AhR-mediated AMPK inhibition by AhR siRNA transfection. AML12 cells are transfected with control or AhR siRNA. After 48h incubation, Kynurenine (100µM) is treated for 12h.

(D) AMPK repression by AhR overexpression. p-AMPK was immunoblotted from

HEPG2 lysates following mock or AhR construct transfection.

(E) AMPK induction by AhR siRNA transfection. p-AMPK was immunoblotted from AML12 and Mouse primary hepatocytes lysate following control or AhR siRNA transfection.

4. AhR에 의한 PPP2R2D의 증가

AMPK의 활성화는 LKB1, CAMKK, TAK1 등 카이네이스와 PP2A, PP2C 등 포스파테이스에 의해 조절된다고 알려져 있다. 포스파테이스에 의해 AMPK 활성화가 억제되는지 알아보기 위해 PP2A의 특이적 저해제인 Okadaic acid를 사용하였다. AML12 세포에서 Okadaic acid 전처리로 PP2A의 활성화가 저해되면 Kynurenine에 의해 AMPK 활성화가 감소하는 현상이 반전되었다 (Fig 4A). 또한 Mouse primary hepatocyte에서 siRNA 일과성 트랜스펙션을 통해 PP2A의 C subunit의 발현을 억제하였을 때도 Fig 4A와 같은 결과를 얻었다 (Fig 4B). 따라서, AhR에 의한 AMPK 억제현상은 PP2A를 매개한 경로가 관여하는 것으로 생각된다.

PP2A는 세 가지 subunit으로 구성된 단백질 복합체를 형성하여 포스파테이스로 작용한다. 세 가지 subunit 중 B subunit은 PP2A의 기질 특이성을 결정하는 조절 부위로 알려져 있다. 문헌조사와 프로모터 분석을 통해 AMPK와 결합한다고 알려진 B subunit의 여러 isoform 중 PPP2R2D와 PPP2R5C, PPP2R5D가 AhR에 의해 전사적으로 조절될 수 있을 것이라 예측하였다 (Joseph BK et al., 2015; Yong-Sheng Cheng et al., 2015; Xiao-nian Zhu et al., 2014). 실험결과 Kynurenine을 처리하였을 때 PPP2R2D의 발현만이 유의적으로 증가하는 것을 관찰하여, AhR에 의한 PPP2R5C와 PPP2R5D의 발현조절 가능성은 배제하였다 (Fig 4C). 다음으로, 마우스 PPP2R2D 유전자의 프로모터를 분석하여 AhR이

결합할 수 있는 잠재적 결합부위 한 곳을 찾았다. 크로마틴 면역침강법을 통해 실제로 AhR이 PPP2R2D 프로모터의 -432bp ~ -424bp 결합부위에 결합하고, Kynurenine 처리에 의해 AhR이 활성화되면 PPP2R2D 프로모터에 결합이 증가한다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig 4D). 결과적으로, AhR은 PP2A의 B subunit인 PPP2R2D의 발현을 증가시켜 AMPK의 탈인산화를 유도하고 이를 통해 자식작용을 억제하는 것으로 해석된다.

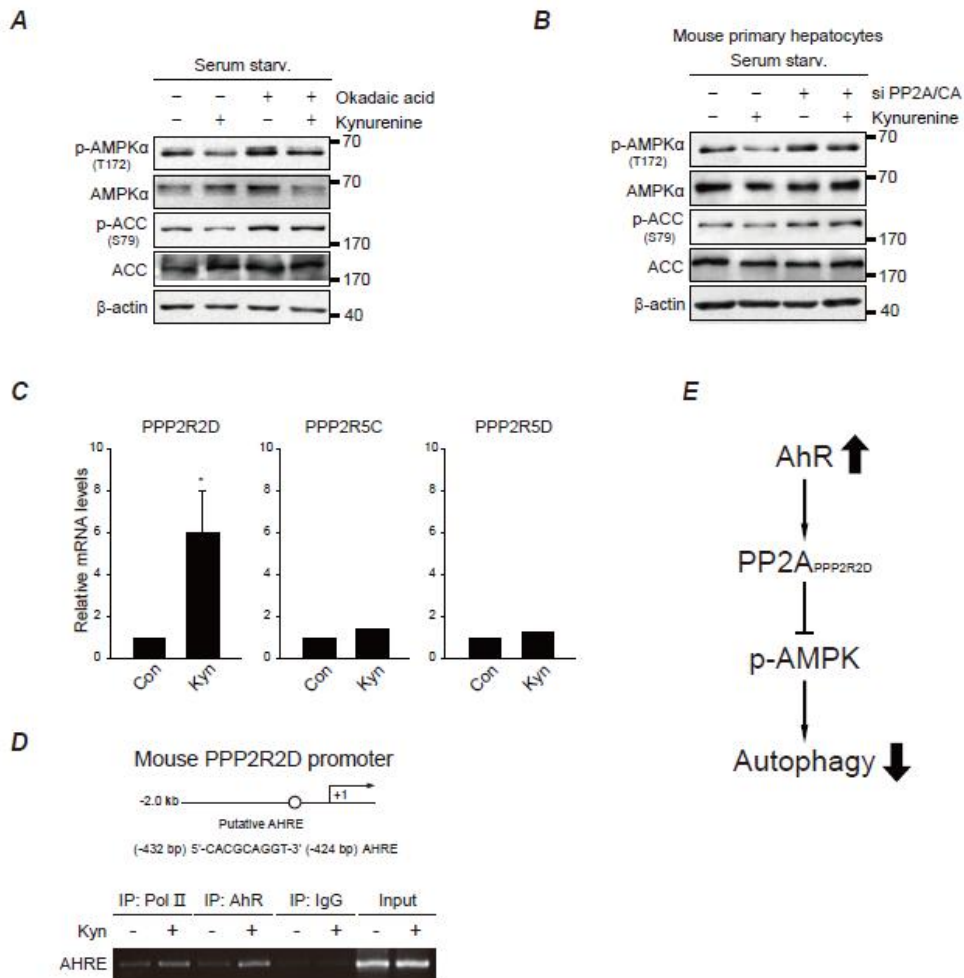


Figure 4. PP2A as a putative target for AhR-mediated AMPK regulation

(A) Inversion of AhR-mediated AMPK inhibition by Okadaic acid (10nM) treatment. AML12 cells were pretreated with Okadaic acid for 2h and continuously incubated with Kynurenine (100 μ M) for 12h.

(B) Inversion of AhR-mediated AMPK inhibition by PP2A C subunit siRNA transfection. Mouse primary hepatocytes were transfected with control or PP2A C subunit siRNA. After 48h incubation, Kynurenine (100 μ M) is treated for 12h.

(C) Induction of PPP2R2D by Kynurenine (100 μ M) treatment. The levels of PPP2R2D, PPP2R5C, PPP2R5D were measured using real-time PCR assays in AML12 cells. AML12 cells were treated with Kynurenine for 24h (* $p < 0.05$).

(D) Chromatin immunoprecipitation assays. DNA-protein complexes prepared from AML12 cells were immunoprecipitated using anti-AhR antibody, anti-RNA Polymerase II antibody or preimmune-IgG. PCR-amplification utilized DNA primers flanking 1 putative AhR binding site of the mouse PPP2R2D promoter.

(E) The proposed scheme illustrating that AhR mediated autophagy regulation.

5. 알코올성 간질환 모델과 AhR의 상관성

알코올성 간질환 모델과 AhR의 상관성을 살펴보기 위해, 현재 동국대학교 약학대학에 재직하고 계신 최영희 교수님의 도움을 받아 Control 식이 마우스 군과 Lieber-Decarli 식이 마우스 군의 간 조직에서 Tryptophan, Kynurenine, Kynurenic acid, Anthranilic acid의 농도를 측정하였다. 그 결과 Lieber-Decarli 식이 마우스 군의 간 조직에서 Kynurenine 농도가 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig 5A). Kynurenine의 대사체인 Kynurenic acid 농도는 감소하는 것으로 나타났고, Anthranilic acid는 유의적인 변화가 없었다 (Fig 5B). 이러한 Kynurenine 농도변화의 원인을 파악하기 위해 Kynurenine 생성효소인 TDO와 IDO의 mRNA 레벨과 단백질 레벨을 확인해본 결과 Lieber-Decarli 식이 마우스 군에서 모두 증가되어 있었다 (Fig 5C). 이는 Lieber-Decarli 식이 마우스 군의 간 조직에서 Kynurenine의 농도증가를 설명한다. 다음으로는 Kynurenine 증가에 의한 AhR의 활성변화를 관찰하였다. 간 조직의 Nuclear fraction에서 AhR이 Lieber-Decarli 식이 마우스 군에서 핵으로의 이동이 증가됨을 확인하였고, 이와 함께 AhR의 가장 잘 알려진 타겟 유전자인 CYP1A1 발현도 유의적으로 증가함을 확인하였다 (Fig 5D). 또한 p-AMPK와 LC3의 감소를 단백질 레벨에서 확인하였다 (Fig 5E). 마지막으로, AhR의 활성화에 의해 발현이 증가하였던 PPP2R2D의 발현도 유의적으로 증가되어 있었고, AMPK의

인산화를 조절한다고 알려진 PP2A의 다른 B isoform인 PPP2R5C와 PPP2R5D는 변화가 없었다 (Fig 5F).

이상의 결과는 만성적 알코올 섭취에 따른 알코올성 간질환에서 AhR의 활성이 증가되고, 이는 PPP2R2D의 발현증가를 통해 AMPK와 자식작용을 억제할 가능성을 시사한다.

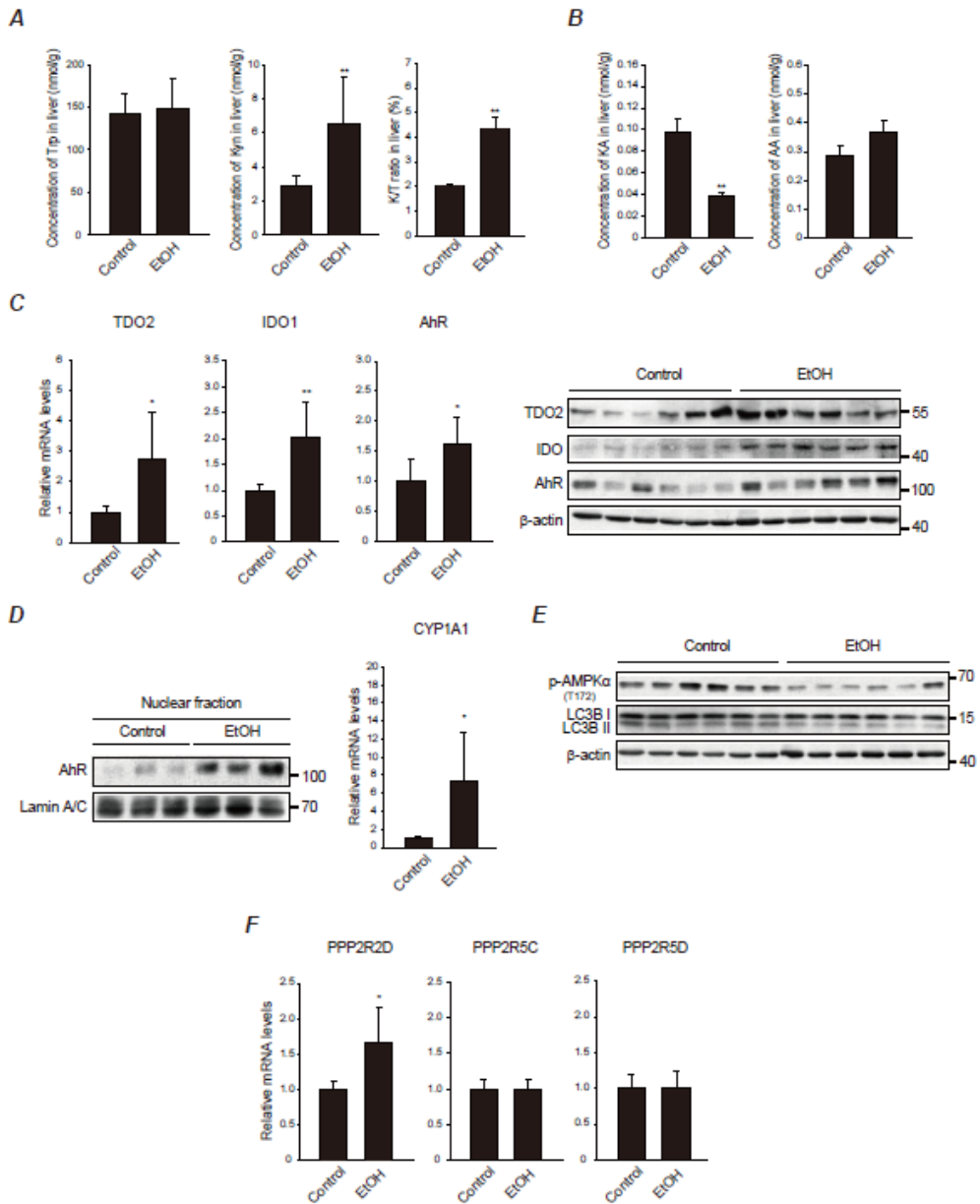


Figure 5. Alterations of the identified pathway in alcoholic liver disease

(A) Concentration of Tryptophan and Kynurenine in the liver tissue between control diet and Lieber-DeCarli diet mice (n=6, n=7 animals per each group, **p<0.01). Male C57BL/6 mice were fed on either a control diet or Lieber-DeCarli

diet for 4 weeks.

(B) Concentration of Kynurenic acid and Anthranilic acid in the liver tissue between control diet and Lieber-Decarli diet mice (n=6, n=7 animals per each group, **p<0.01).

(C) Transcript levels of TDO2, IDO1 and AhR. qRT-PCR assays for TDO2, IDO1 and AhR were done on the liver of control diet and Lieber-Decarli diet mice (n=6, n=7 animals per each group, *p<0.05, **p<0.01) (left). Immunoblottings for TDO2, IDO and AhR. The liver homogenates prepared from control diet and Lieber-Decarli diet mice (right).

(D) Immunoblottings for AhR and Lamin A/C. The nuclear fraction of liver homogenates prepared from control diet and Lieber-Decarli diet mice (left). Transcript levels of CYP1A1. qRT-PCR assays for CYP1A1 were done on the liver of control diet and Lieber-Decarli diet mice (n=6, n=7 animals per each group, *p<0.05) (right).

(E) Immunoblottings for p-AMPK and LC3. The liver homogenates prepared from control diet and Lieber-Decarli diet mice.

(F) Transcript levels of PPP2R2D, PPP2R5C, PPP2R5D. qRT-PCR assays for PPP2R2D, PPP2R5C, PPP2R5D were done on the liver of control diet and Lieber-Decarli diet mice (n=6, n=7 animals per each group, *p<0.05).

IV. 결론 및 고찰

자식작용은 간세포 내 에너지 균형과 항상성 조절을 위해 손상된 세포소기관이나 지방, 단백질 등을 분해하는 이화작용이다 (Madrigal-Matute J et al., 2016). 이러한 자식작용을 매개하는 세포질 내 구성요소들은 연구가 잘 되어있지만, 상대적으로 자식작용의 전사적 조절에 대한 분자적 이해는 부족하다. 본 연구 결과는 AhR이 전사인자로서 간 내에서 자식작용을 억제하고 간세포 내 항상성 유지에 중요한 조절자임을 처음으로 규명하였다.

AMP-activated kinase (AMPK)는 세포 내 에너지 상태를 인식하고 에너지 항상성 조절을 하는 핵심 단백질이다. 대사성 스트레스에 의해 세포 내 에너지가 감소하는 경우 활성화되어 ATP를 소비하는 과정을 억제하고 ATP를 생산하는 과정을 촉진한다. 특히, ATP를 생성하는 미토콘드리아 호흡에 연료를 공급하기 위해 세포 내 성분을 분해하는 자식작용이 활성화되고, AMPK는 자식작용에 관여하는 여러 단백질들의 발현과 활성을 증가시켜 자식작용을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Mihaylova MM et al., 2011). 자식작용은 초기에 기질을 둘러싼 이중막인 자가포식소체 (Autophagosome)가 형성되고 후기에 자가포식소체가 리소좀과 결합하여 리소좀 내 가수분해효소에 의해 분해되는 단계를 거친다. AMPK는 자식작용의 초기단계와 후기단계 모두에 관여하는 중요

단백질이다. AMPK는 ULK1 인산화를 통해 자가포식소체의 생성을 촉진하고 (Mantong Zhao et al., 2011), 전사인자인 FOXO3a를 활성화시켜 자식작용의 주요 단백질들의 발현을 증가시킨다 (Sanchez AM et al., 2012). 또한 AMPK-SKP2-CARM1으로 이어지는 신호전달체계가 고갈상태에서 전사인자인 TFEB를 활성화시켜 리소좀 생합성을 유도하고 autophagosome의 분해를 촉진시키는 것으로 알려졌다 (Shin HJ et al., 2016). 본 연구는 AhR이 자식작용의 핵심 조절단백질인 AMPK의 활성을 감소시킨다는 것을 다양한 실험기법을 통해 밝혔다. 이러한 연구 결과는 AMPK가 AhR에 의해 자식작용이 억제되는 현상을 매개하는 중요한 타겟이라는 것을 보여준다.

Protein phosphatase 2A (PP2A)는 세포 내 다양한 단백질의 인산기를 떼어 내어 활성을 조절하는 효소이다. PP2A는 세 가지 subunit으로 구성된 단백질 복합체로 기능하며, 구조적 역할을 하는 A subunit과 기질 특이성을 결정하는 B subunit, 효소 활성을 나타내는 C subunit으로 이루어져 있다. 최근 기질 특이성을 결정하는 B subunit 중 하나인 PPP2R2D가 콜레스테롤에 의해 발현이 증가하고, 이로 인해 혈관 평활근 세포에서 AMPK 단백질의 Threonine 잔기 172번 위치가 탈인산화 되고 AMPK 활성이 감소되어 지질 대사가 교란된다고 보고되었다 (Joseph BK et al., 2015). 그러나 PPP2R2D가 간에서 자식작용에 미치는 영향과 이 단백질의 발현을 조절하는 전사인자에 대해서는 알려진 바가 없다. 본

연구에서는 AhR의 활성화를 통해 PPP2R2D의 발현이 증가한다는 것을 밝혔고, 이는 AhR에 의한 AMPK의 활성 억제 현상을 설명할 수 있다.

만성적 알코올 섭취는 직간접적인 증거를 통해 간세포 내 자식작용을 억제한다고 알려져 있다 (Terrence M Donohue Jr., 2009; Rautou PE et al., 2010). 알코올성 간염환자의 간세포에서는 말로리 소체라 불리는 단백질 응집체가 관찰되는데, 말로리 소체의 축적은 알코올성 간질환이 자식작용의 감소와 연관될 수 있음을 뒷받침한다 (Baraona E et al., 1975; Harada M, 2010). 또한 만성적으로 알코올을 섭취한 쥐의 간세포에서 형태학적인 자가포식소체가 감소되는 현상이 관찰되고, 단백질 분해의 억제로 인한 단백질 축적현상이 나타난다는 연구결과가 보고된 바 있다 (Poso AR et al., 1991). 알코올성 간질환에서 이러한 자식작용의 감소를 설명하는 분자기전은 명확하지 않지만, 간세포에서 에탄올에 의해 자식작용을 유도하는 에너지 센서 단백질인 AMPK가 억제되는 것이 알려져 있다 (You M et al., 2004). 본 실험실의 선행 연구를 통해서도 알코올성 간질환에서 AMPK의 억제현상이 Lieber-Decarli 식이 모델로 확인되었다. 이 연구에서는 garlic oil과 metadoxin 병용투여가 간세포의 AMPK 활성을 증가시켜 알코올성 지방간을 치료할 수 있는 가능성을 제시하였다 (Sung Hwan Ki et al., 2007). 이처럼 알코올성 간질환에서 자식작용과 AMPK의 활성조절은 중요한 치료적 타겟으로 생각되지만, 알코올성 간질환에서 자식작용과 AMPK가 억제되는 현상의 분자적

기전에 대한 이해는 아직 부족하다. 본 연구에서는 Lieber-Decarli 식이 마우스 모델을 이용하여 AhR과 알코올성 간질환의 상관관계를 관찰해보았다. Lieber-Decarli 식이 마우스 모델의 간 조직에서 AhR의 내인성 리간드인 kynurenine의 농도를 측정한 결과 Control 식이 마우스에 비해 Lieber-Decarli 식이 마우스에서 kynurenine 농도가 증가되어 있었다. 또한, 증가된 kynurenine에 의해 알코올성 간질환 모델에서 AhR이 활성화되어 있고, 이에 의해 PPP2R2D의 발현도 증가되어 있다는 것을 본 연구에서 처음으로 확인하였다. 이는 알코올성 간질환의 병리기전을 이해하는데 새로운 분자적 기전을 제시했다는 점에서 의의가 있다. 하지만 AhR knockout mice를 이용한 추가적인 동물실험을 통해, AhR을 매개한 PPP2R2D의 발현조절이 알코올성 간질환에 치료적 가치가 있는지를 검증할 필요가 남아있다.

본 연구결과를 토대로 AhR과 알코올성 간질환이 가지는 임상적 의미를 확대해 보았다. 인간의 AhR은 다양한 single nucleotide polymorphism (SNP)를 가지는 것으로 알려져 있다. 최근 연구결과에 따르면, AhR의 특정 SNP는 사람의 관상동맥질환 위험성을 증가시킨다 (Shian Huang et al., 2015). 이는 개인마다의 AhR polymorphism에 의해 만성 알코올 섭취에 의한 알코올성 간질환의 위험성도 달라질 수 있다는 것을 추측할 수 있다. 또한, 흡연에 의해 체내 흡수되는 다양한 화학물질들은 간세포 내 AhR의 활성을 증가시킨다는 것이 보고되었다 (D.Puppala et al.,

2007; Martin Krøyer Rasmussen et al., 2016). 이는 과도한 흡연과 음주가 같이 지속되면, AhR의 활성화로 인한 자식작용 억제가 더욱 증가될 것이고, 간질환이 악화될 가능성을 시사한다. 이러한 정보는 AhR에 의한 PPP2R2D의 발현조절이 간질환을 치료하는 약물학적 치료 타겟으로서 그 응용가능성의 폭을 확대시킬 수 있다고 생각된다.

종합적으로 본 연구는 (1) AhR이 자식작용을 억제한다는 점, (2) AhR이 AMPK의 활성을 억제한다는 점, (3) AhR이 PP2A의 B subunit인 PPP2R2D의 발현을 증가시킨다는 점, (4) 알코올성 간질환 모델에서 AhR이 활성화되어 PPP2R2D 발현이 증가되어 있다는 점을 규명하였다. 따라서 이 연구는 AhR이 간세포 내 자식작용을 조절하는 중요한 조절자임을 증명하였고, 알코올성 간질환의 병리기전에서 PPP2R2D라는 새로운 약물학적 타겟을 제시하여, 추후 알코올성 간질환의 치료전략을 개발하기 위한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. Madrigal-Matute J, Cuervo AM. (2016). Regulation of Liver Metabolism by Autophagy. *Gastroenterology*, 150(2):328-39. doi: 10.1053/j.gastro.2015.09.042.
2. Schneider JL, Cuervo AM. (2014). Liver autophagy: much more than just taking out the trash. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11(3):187-200. doi: 10.1038/nrgastro.2013.211.
3. Jae Man Lee, Martin Wagner, Rui Xiao, Kang Ho Kim, Dan Feng, Mitchell A. Lazar & David D. Moore. (2014). Nutrient-sensing nuclear receptors coordinate autophagy. *Nature*, 516(7529):112-5. doi: 10.1038/nature13961.
4. Sunmi Seok, Ting Fu, Sung-E Choi, Yang Li, Rong Zhu, Subodh Kumar, Xiaoxiao sun, Gyesoon Yoon, Yup Kang, Wenxuang Zhong, Jian Ma, Byron Kemper & Jongsook Kim Kemper. (2014). Transcriptional regulation of autophagy by FXR-CREB axis. *Nature*, 516(7529):108-11. doi: 10.1038/nature13949.
5. Xu CX, Wang C, Zhang ZM, Jaeger CD, Krager SL, Bottum KM, Liu J, Liao DF, Tischkau SA. (2015). Aryl hydrocarbon receptor deficiency protects mice from diet-induced adiposity and metabolic disorders through increased energy expenditure. *International journal of obesity*, 39(8):1300-9. doi: 10.1038/ijo.2015.63.
6. Yao L, Wang C, Zhang X, Peng L, Liu W, Zhang X, Liu Y, He J, Jiang C, Ai D, Zhu Y. (2016). Hyperhomocysteinemia activates the aryl hydrocarbon receptor/CD36 pathway to promote hepatic steatosis in mice.

Hepatology, 64(1):92-105. doi: 10.1002/hep.28518.

7. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, Jugold M, Guillemin GJ, Miller CL, Lutz C, Radlwimmer B, Lehmann I, von Deimling A, Wick W, Platten M. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478(7368):197-203. doi: 10.1038/nature10491.

8. Gao B, Bataller R. (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*, 141(5):1572-85. doi: 10.1053/j.gastro.2011.09.002.

9. Mathews S, Gao B. (2013). Therapeutic potential of interleukin 1 inhibitors in the treatment of alcoholic liver disease. *Hepatology*, 57(5):2078-80. doi: 10.1002/hep.26336.

10. Mizushima, N., Yoshimori, T., & Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140(3), 313-326. doi:10.1016/j.cell.2010.01.028.

11. Joseph BK, Liu HY, Francisco J, Pandya D, Donigan M, Gallo-Ebert C, Giordano C, Bata A, Nickels JT Jr. (2015). Inhibition of AMP Kinase by the Protein Phosphatase 2A Heterotrimer, PP2A^{PPP2R2d}. *J Biol Chem*, 290(17):10588-98. doi: 10.1074/jbc.M114.626259.

12. Yong-Sheng Cheng, Oksana Seibert, Nora Klötting, Arne Dietrich, Katrin Straßburger, Sonia Fernández-Veledo, Joan J. Vendrell, Antonio Zorzano, Matthias Blüher, Stephan Herzig, Mauricio Berriel Diaz, Aurelio A. Teleman. (2015). PPP2R5C Couples Hepatic Glucose and Lipid Homeostasis. *PLOS Genetics*,

11(10):e1005561. doi: 10.1371/journal.pgen.1005561. eCollection 2015.

13. Xiao-nian Zhu, Li-ping Chen, QingBai, LuMa, Dao-chuanLi, Jin-miao Zhang, ChenGao, Zi-ning Lei, Zheng-bao Zhang, Xiu-mei Xing, Cai-xia Liu, Zhi-ni He, Jie Li, Yong-mei Xiao, Ai-hua Zhang, Xiao-wen Zeng, Wen Chen. (2014). PP2A–AMPK α –HSF1 axis regulates the metal-inducible expression of HSPs and ROS clearance. *Cellular Signaling*, 825-32. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.01.002.

14. Mihaylova MM, Shaw RJ. (2011). The AMPK signaling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*, 13(9):1016-23. doi: 10.1038/ncb2329.

15. Mantong Zhao, Daniel J. Klionsky. (2011). AMPK-Dependent Phosphorylation of ULK1 Induces Autophagy. *Cell Metabolism*, 13(2):119-20. doi: 10.1016/j.cmet.2011.01.009.

16. Sanchez AM, Csibi A, Raibon A, Cornille K, Gay S, Bernardi H, Candau R. (2012). AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *J Cell Biochem*, 113(2):695-710. doi: 10.1002/jcb.23399.

17. Shin HJ, Kim H, Oh S, Lee JG, Kee M, Ko HJ, Kweon MN, Won KJ, Baek SH. (2016). AMPK-SKP2-CARM1 signalling cascade in transcriptional regulation of autophagy. *Nature*, 534(7608):553-7. doi: 10.1038/nature18014.

18. Terrence M Donohue Jr. (2009). Autophagy and ethanol-induced liver injury. *World J Gastroenterol*, 15(10): 1178-1185. doi:10.3748/wjg.15.1178.

19. Rautou PE, Mansouri A, Lebrec D, Durand F, Valla D, Moreau R. (2010). Autophagy in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 53(6):1123-34. doi:

10.1016/j.jhep.2010.07.006

20. Baraona E, Leo MA, Borowsky SA, Lieber CS. (1975). Alcoholic hepatomegaly: accumulation of protein in the liver. *Science*, 190(4216):794-5.
21. Harada M. (2010). Autophagy is involved in the elimination of intracellular inclusions, Mallory-Denk bodies, in hepatocytes. *Med Mol Morphol*, 43(1):13-8. doi: 10.1007/s00795-009-0476-5.
22. Poso AR, Hirsimaki P. (1991). Inhibition of proteolysis in the liver by chronic ethanol feeding. *Biochem J*, 273(Pt 1):149-52.
23. You M, Matsumoto M, Pacold CM, Cho WK, Crabb DW. (2004). The Role of AMP-Activated Protein Kinase in the Action of Ethanol in the Liver. *GASTROENTEROLOGY*, 127(6):1798-808. doi:10.1053/j.gastro.2004.09.049.
24. Sung Hwan Ki, Jae Hoon Choi, Choon Won Kim, Sang Geon Kim. (2007). Combined metadoxine and garlic oil treatment efficaciously abrogates alcoholic steatosis and CYP2E1 induction in rat liver with restoration of AMPK activity. *Chemico-Biological Interactions*. 169(2):80-90. doi: 10.1016/j.cbi.2007.05.008.
25. Shian Huang, Xiaorong Shui, Yuan He, Yiqiang Xue, Jianwen Li, Guoming Li, Wei Lei, Can Chen. (2015). AhR expression and polymorphisms are associated with risk of coronary arterial disease in Chinese population. *Scientific Reports*, 5:8022. doi: 10.1038/srep08022.
26. D.Puppala, C.G.Gairola, H.I.Swanson. (2007). Identification of kaempferol as an inhibitor of cigarette smoke-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor and cell transformation. *Carcinogenesis*, 28(3):639-47. doi:10.1093/carcin/bgl169.

27. Martin Krøyer Rasmussen, Patrick Balaguer, Bo Ekstrand, Martine Daujat Chavanieu, Sabine Gerbal Chaloïn. (2016). Skatole (3-Methylindole) Is a Partial Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist and Induces CYP1A1/2 and CYP1B1 Expression in Primary Human Hepatocytes. *PLoS One*, 11(5):e0154629. doi: 10.1371/journal.pone.0154629.

Abstract

Regulation of autophagy in hepatocytes by AhR

Ko, Bong sub

Department of Clinical Pharmacology

College of Medicine

The Graduate School

Seoul National University

Autophagy is an essential catabolic process that recycles nutrients and maintains energy homeostasis in the liver. Aryl hydrocarbon receptor (AhR), a nuclear receptor to regulate xenobiotic metabolism, may be associated with the development of obesity and metabolic disorders. Despite the impact of autophagy on maintenance of metabolic homeostasis in liver, the information on the role of AhR in autophagy is unavailable. This study investigated whether AhR regulates autophagy process for metabolic homeostasis, and if so, what the underlying mechanism is.

AhR activation by the treatment with kynurenine decreased LC3-I processing to

LC3-II which is indicator of autophagosome formation. Imaging analysis using mCherry-GFP-LC3 showed that AhR activation inhibited autophagic flux. Of note, AhR activation decreased the phosphorylation of AMPK. AMPK activity was downregulated in response to kynurenine treatment. Consistently, AhR overexpression had a similar effect. In contrast, AhR knockdown restored AMPK phosphorylation and LC3 conversion, supporting the role of AhR in kynurenine-mediated autophagy regulation. These results also suggest a novel role of AhR in suppressing autophagy during metabolic stress by downregulating the AMPK signaling pathway. AMPK is activated by phosphorylation which is regulated by kinases and phosphatases. To investigate whether PP2A is involved in AhR mediated AMPK regulation, We used chemical inhibitor of PP2A and siRNA targeting catalytic subunit of PP2A. Inhibition of PP2A activity restored AMPK phosphorylation, supporting that AhR mediated AMPK downregulation is related to PP2A. To further confirm the role of AhR in regulation of PP2A activity, We tested changes in mRNA level of PP2A isoform by kynurenine treatment. PPP2R2D, regulatory subunit of PP2A, was upregulated by kynurenine treatment. PP2A complexes containing PPP2R2D is known as regulator of AMPK activity by dephosphorylating Thr-172. These results suggest that AhR suppresses phosphorylation of AMPK via PPP2R2D. AhR mediated autophagy inhibition might be closely associated with the pathogenesis of liver disease. Aberrant autophagy is observed in alcoholic liver disease (ALD). To find the relationship between ALD and AhR, We used mouse model of ALD by feeding mice with Lieber-Decarli ethanol-containing diet for 4 weeks. Concentration of kynurenine in

liver tissues was much higher in Lieber-Decarli diet group compared with Control diet group. At the same time, PPP2R2D gene expression was transcriptionally induced by AhR in Lieber-Decarli diet group.

In conclusion, this study uncovered a new molecular pathway that AhR acts as a novel inhibitor of autophagy via PP2A mediated AMPK regulation in hepatocytes. Also, our findings highlight the impact of AhR on the regulation of autophagy, proposing a new molecular mechanism of pathogenesis of ALD.

Key words : Autophagy, AhR, AMPK, PP2A, PPP2R2D, ALD

Student number : 2015-22066