creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

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

dCollection

의학석사 학위논문

마우스에서 종양괴사인자-α가 알파 시뉴클린 단백질 전파에 미치는 영향

Effect of inflammatory factor TNF-α on α-synuclein protein propagation in mice

2022년 2월

서울대학교 대학원

의과학과 의과학전공

김 정 태

마우스에서 종양괴사인자-α가 알파 시뉴클린 단백질 전파에 미치는 영향

지도 교수 이 승 재

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함

2021년 10월

서울대학교 대학원

의과학과 의과학전공

김 정 태

김정태의 의학석사 학위논문을 인준함

2022년 1월

위 원 장 _____ 묵 인 희 _____ (인)

부위원장 _____ 이 승 재 _____ (인)

위 원 _____ 이 민 재 _____ (인)

초 록

퇴행성 뇌질환(neurodegenerative disease) 중 파킨슨 병은 알파 시뉴클린 단백질의 응집과 전파현상이 특징적으로 관찰되고, 신경염증(neuroinflammation)이 단백질의 응집에 영향을 미치고 도파민성 신경 퇴화에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다[1-4]. 하지만 신경염증 반응과 단백질의 응집과 퇴행성 뇌질환의 발병 간에 명확한 기전이 확실하게 밝혀지지 않은 상태이다. 이 연구는 생체 외(in vitro) 실험에서 종양괴사인자-α가 세포 간 알파 시뉴클린의 전파를 증가시킨다는 결과[발표되지 않은 자료]를 토대로 종양괴사인자-α가 마우스에서 알파 시뉴클린의 전파에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

본 실험에서는 알파 시뉴클린의 V40G변종[5]을 종양괴사인자-α KO 마우스의 선조체에 주사하였을 때 마우스의 뇌에서 알파 시뉴클린병증의 특징인 인산화 된 알파 시뉴클린을 확인하였다. V40G변종은 Wild type 알파 시뉴클린을 주사하였을 때 보다 더 빨리 전파되었으며 미세아교의 비정상적 증가와 염증 반응이 wild type 알파 시뉴클린을 주사하였을 때 보다 뚜렷하게 관찰[발표되지 않은 자료]되었기 때문에 본 실험에서는 V40G 주사를 통하여 wild type 알파 시뉴클린을 주사했을 때보다 더 강한 병리반응을 유도하여 종양괴사인자-α의 영향을 보고자 하였다. 또한, 병리학적 특징인 인산화 된 알파 시뉴클린에 영향을 미치는 신경아교세포를 확인하기 위하여 대표적인 신경아교세포인 성상세포와 미세아교세포의 변화를 확인하였다. 그 결과 종양괴사인자-α의 결손에 의해 운동피질, 대상엽, 내후각피질, 편도체에서 알파 시뉴클린의 전파가 감소된 것을 확인할 수 있었고, 종양괴사인자-α WT 마우스와 종양괴사인자-α KO 마우스 간에 V40G 다량체 주사 후 성상세포에는 차이가 없었지만, 미세아교세포는 종양괴사인자-α KO 마우스에서 감소한 경향성을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통해 종양괴사인자-α와 미세아교세포가 알파 시뉴클린의

전파에 중요한 역할을 하고 있음을 확인함으로써 종양괴사인자-α의 신호전달 연구가 알파 시뉴클린병증에 대한 이해에 중요하다는 것을 시사한다.

주요어 : 퇴행성 뇌질환, 알파 시뉴클린, 알파 시뉴클린의 전파, 신경염증, 종양괴사인자-α, 미세아교세포

학 번 : 2020-29580

목 차

초 록 i

그림 목록 iv

약어 목록 v

서 론 1

실험 재료 및 방법 17

결 과 21

고 찰 34

결 론 38

참고 문헌 39

초 록(영문) 47

그림 목록

[그림 1] 파킨슨병의 진행에 따른 루이소체의 전파 과정 14

[그림 2] 종양괴사인자-α Knock out 마우스 만드는 과정..... 15

[그림 3] 소섬유화 된 V40G변종의 형광 염료 결합 실험..... 26

[그림 4] V40G 알파 시뉴클린 다량체의 정위주사 후 시뉴클린병증의 확산 확인 28

[그림 5] 알파 시뉴클린이 전파된 뇌 지역에서 성상세포의 비정상적인 증가 확인 30

[그림 6] 알파 시뉴클린 전파된 지역에서 TNF-α 결손에 의해 비정상적인 미세아교세포 감소 32

[그림 7] V40G 전파 모델에서 알파 시뉴클린 전파와 미세아교세포 활성화에 종양괴사인자-α가 미치는 영향..... 33

[표 1] V40G 변종 다량체와 Wild type 소섬유에 의한 병리현상과 염증반응 변화..... 16

약어 목록

6-OHDA	: 6-hydroxydopamine
AAV	: Adeno-associated virus
AD	: Alzheimer's disease
ALS	: Amyotrophic lateral sclerosis
BBB	: Blood-brain barrier
BSA	: Bovine serum albumin
CNS	: Central nervous system
CSF	: Cerebrospinal fluid
CSP-α	: Cysteine string protein- α
DAB	: 3′-Diaminobenzidine
DLB	: Dementia with Lewy bodise
ESC	: Embryonic stem cell
GFAP	: Gial fibrillary acidic protein
GFP	: Green fluorescent protein
HRP	: Horse radish peroxidase
IL-1β	: Interleukin-1 beta
IL-6	: Interleukin-6
L-DOPA	: Levodopa
LPS	: Lipopolysaccharide
MHC	: Major histocompatibility complex

MPTP : 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

MSA : Multiple system atrophy

NAC : Non-amyloid-β component

NO : Nitric oxide

NSAIDs : Non-steroidal anti-inflammatory drugs

PBS : Phosphate buffered saline

PD : Parkinson's disease

PFF : Pre-formed fibril

PLD2 : Phospholipase D2

PLKs : Polo-like kinases

ROS : Reactive oxygen species

SN : Substantia nigra

SNpc : Substantia nigra pars compacta

SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor

TACE : TNF-α cleaving enzyme

TDP-43 : Transactivation response DNA binding protein 43

Tg : Transgenic

TLR : Toll-like receptor

TNF-α : Tumor necrosis factor alpha

서 론

1.1. 퇴행성 뇌질환(neurodegenerative diseases)과 알파 시뉴클린(α-synuclein)

퇴행성 뇌질환은 특정 병인 단백질과 해부학적 취약성에 의해 다른 질병으로 분류되지만, 단백질의 구조 이상(misfolding), 응집(aggregation), 축적(accumulation)에 의해 신경세포 기능 이상, 시냅스 연결 상실, 뇌 손상으로 이어지는 공통적인 병리적 특징이 있다[6]. 가장 일반적인 퇴행성 뇌질환은 아밀로이드증(amyloidosis), 타우병증(tauopathies), 알파 시뉴클린병증(α-synucleinopathies), TDP-43 단백질병증(transactivation response DNA binding protein 43 proteinopathies) 이 있다. 아밀로이드증과 타우병증을 동반하는 대표적인 질병으로는 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)이 있으며 알파 시뉴클린병증을 동반하는 질병으로는 파킨슨병(Parkinson's disease, PD), TDP-43 당백질병증을 동반하는 질병으로는 근위축성 측색 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)가 있다[7]. 앞서 언급한 파킨슨병 이외에 루이소체 치매(dementia with Lewy bodise, DLB), 척수소뇌변성증(multiple system atrophy, MSA) 또한 알파 시뉴클린병증에 해당된다. 알파 시뉴클린병증은 알파 시뉴클린 단백질 응집체가 신경세포, 신경섬유, 신경아교세포(glial cell)에 비정상적으로 축적되는 특징이 있으며[8], 각 질병에 따라 다른 지역에서 루이소체(Lewy body), 루이신경돌기(Lewy neurite)로 관찰된다[9-11]. 루이소체에서 관찰되는 알파 시뉴클린은 인산화(phosphorylation), 유비퀴틴화(ubiquitination)가 되어 있고 β-sheet구조가 많은 소섬유(fibril) 형태로 축적된다는 특징이 있다[12, 13]. 루이소체는 신경세포사멸과 함께 관찰되어 알파 시뉴클린병증의 전형적인 특징으로 알려져 있지만, 정확한 생성 과정과 원인은 밝혀지지 않은 상태이다. 많은 연구들에서 사전 형성된 소섬유(pre-formed fibril, PFF)에 의한 질병의 진행을 확인하고, 루이소체 형성 이전에 신경세포

사멸이 관찰되고 있기 때문에 루이소체 자체가 질병의 원인이라고 생각할 수 없는 상황이다[14, 15].

수많은 부검의 체계적인 분석에 기초하여, 루이 병리학(Lewy pathology)은 질병이 진행됨에 따라 신경계의 더 많은 영역에서 발견된다고 알려져 있다. 질병의 초기 단계부터 진행 단계에 있는 파킨슨병 환자들의 사후 부검 결과와 파킨슨병으로 진단받지 않았지만 루이 병증이 관찰되는 환자들의 부검 결과에서 루이 병증이 처음으로 발견되는 지역은 후 신경구(olfactory bulb)와 장신경계(enteric nervous system)이다[4]. Heiko braak에 의해 정의된 파킨슨병의 진행 단계에 의하면, 1단계에서는 등쪽 Ⅸ/Ⅹ 운동핵(dorsal Ⅸ/Ⅹ motor nucleus)와 전후각신경핵(anterior olfactory nucleus)에서만 루이소체와 루이신경돌기가 관찰된다. 2단계에서는 솔기핵(raphe nucleus)과 청반(locus coeruleus)에서 루이소체와 루이신경돌기과 관찰되고, 3단계에서는 흑질치밀부(substantia nigra pars compacta) 일부에서 관찰된다. 4단계에는 해마(hippocampus)의 CA2 지역과 측면 중간피질(temporal mesocortex)에서, 5단계에는 신피질(neocortex)의 감각(sensory) 관련 지역에, 6단계에서는 신피질의 감각 관련 지역과 운동 지역에서 루이소체와 루이신경돌기가 관찰된다(그림 1)[16]. 이러한 전파는 무작위적으로 이루어지는 것이 아닌 구조적으로 연결된 신경망을 따라 이루어진다. 이에 전파 가능한 물질이 해부학적으로 연결된 지역으로 이동하여 알파 시뉴클린의 응집을 유도하는데 이 물질을 프리온(prion)으로 명명한다[17]. 사람의 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)에서 알파 시뉴클린이 관찰되었고[18], 선조체에 태아의 흑질을 이식 받은 후 10년 뒤에 죽은 파킨슨병 환자의 뇌에서 이식 된 신경에서도 루이소체가 관찰되었다[19, 20]. 이를 통해 알파 시뉴클린의 응집체는 프리온 같은 행동(prion-like manner)을 보이며 세포에서 다른 세포로 퍼져 나간다고 알려져 있다. 세포를 이용한 생체 외(in vitro) 실험에서도 신경세포를 배양하였을 때, 알파 시뉴클린이 배양액(conditioned media)에서 발견되었다[21]. 또한 세포 밖에 있는 알파 시뉴클린이 주변의 신경세포로 이동하고 신경아교

세포를 활성화시킬 수 있음이 밝혀졌다[22]. 알파 시뉴클린과 관련된 질병들의 발병 원인과 과정을 이해하고 치료법을 찾기 위해서는 알파 시뉴클린에 대한 이해와 특정 상황에서 알파 시뉴클린의 응집, 축적, 전파 현상에 대한 이해가 필요하다.

1.2. 알파 시뉴클린(α-synuclein)

알파 시뉴클린은 내재적으로 무질서한(intrinsically disordered) 140개의 아미노산으로 이루어진 단백질로 본질적으로는 응집될 가능성이 매우 낮다고 알려져 있다[23, 24]. 최근에 많은 연구를 통해 알파 시뉴클린은 자연적으로 나선(helical) 구조를 형성할 수 있고, 나선 구조가 많은 알파 시뉴클린은 지질 세포막(phospholipid membrane) 주변에 존재한다는 것을 확인했다[25, 26]. N말단(1-60 aa)은 공통염기배열(consensus sequence) KTKEGV를 포함한 서열이 반복되는 지역으로 양친매성(amphiphatic) 나선형의 구조를 가져 세포막과 상호작용(interaction)할 수 있다. 중간(61-95 aa)지역은 단백질 응집과 관련된 비아밀로이드-β 성분(non-amyloid-β component, NAC)을 포함하는 소수성(hydrophobic) 지역으로 이 도메인은 시뉴클린 계열에서 알파 시뉴클린이 유일하게 포함하고 있다. C말단(96-140 aa)은 뚜렷한 구조가 없는 산성(acidic)이 높고 프롤린(proline)이 풍부한 지역으로 다중 인산화 지역(Y-125, S-129, Y-133, Y-136)을 포함한다[27-29]. 본 실험에서는 알파 시뉴클린의 연결(linker)부위에 있는 발린(valine)을 글라이신(glycine)으로 바꾼 V40G 변종을 사용했다. V40G변종은 알파 시뉴클린의 소섬유 형성(fibrillation)을 방해한다[5].

알파 시뉴클린은 시냅스 전 말단(presynaptic terminal)에 존재하며 뇌 세포의 전체 세포질 단백질의 1%를 차지한다. 알파 시뉴클린의 정확한 기능은 밝혀지지 않았지만, 현재까지는 알파 시뉴클린이 막 곡률(membrane curvature)을 촉진하여 시냅스 이동(synaptic trafficking)과 소포 발아(vesicle budding)에 관여한다고 알려져

있다[30, 31]. 뉴런의 형태와 시냅스의 연결의 확립에 따라 뉴런 발달 중에 알파 시뉴클린의 발현이 유도되며, 이는 시냅스 구조에 관여하는 단백질의 유도 이후에 발현되게 된다[32, 33]. 알파 시뉴클린 발현 수준은 가소성(plasticity)를 바꾸거나 부상을 주는 조건에서 조절된다[34, 35]. 이러한 결과는 알파 시뉴클린이 시냅스 전달(synaptic transmission)의 변조체(modulator)일 수 있다는 것을 시사한다. 알파 시뉴클린은 뉴런 발화(neuronal firing)중에 소포에 일시적으로 결합할 수 있고[36], 포스파티드 산(phosphatidic acid) 대사에 영향을 주어 소포체 형성에 관여할 수 있다[37]. 이러한 기능은 알파 시뉴클린이 시냅스 전 단백질인 CSP-α(cysteine string protein-α)와 함께 SNARE 단백질(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein)에 붙어 SNARE 복합체를 모음으로써 조절하며, SNARE 복합체는 시냅토태그민-2(synaptotagmin-2)와 결합할 수 있다[38, 39]. 알파 시뉴클린은 포스포라이페이스 D2(phospholipase D2, PLD2)의 억제자로서 기능하여 막 수송(membrane trafficking)과 세포 외 유출(exocytosis)를 조절한다[40, 41].

특정 상황에서 β-sheet구조를 갖는 알파 시뉴클린은 β-아밀로이드의 β-sheet구조와 유사하며 가장 흔한 두 가지 퇴행성 뇌질환에서 공통적으로 관찰되는 특징이기 때문에 많은 연구가 진행되었다. 질병과 관련된 돌연변이가 있는 알파 시뉴클린 뿐만 아니라 Wild type 알파 시뉴클린도 수용액에서 오랫동안 배양하면 아밀로이드와 비슷한 소섬유 형태가 된다[42]. 소섬유는 알파 시뉴클린병증에서 루이소체와 루이신경돌기 형성에 기여한다. 알파 시뉴클린의 부분적으로 접힌 구조가 있거나 내재적으로 높은 알파 시뉴클린의 농도, 단백질이나 핵산, 탄수화물 등과 같은 고분자의 높은 농도 등이 알파 시뉴클린의 소섬유 형성을 촉진하는 원인으로 알려져 있다[43-45]. 가족성 파킨슨병(familial PD)에서 발견된 알파 시뉴클린의 유전자인 SNCA 유전자의 미스센스 점 돌연변이(missense

point mutation) A30P, E46K, A53T는 반드시 소섬유 형성을 하지 않지만 알파 시뉴클린의 응집을 가속화한다. A30P, A53T 돌연변이는 Wild type 알파 시뉴클린과 유사한 구조를 갖고 있으며, 단량체에서의 구조변화는 크지 않지만, β-sheet구조의 특정한 안정화를 통해 알파 시뉴클린의 응집에 영향을 미칠 것으로 생각된다[46-51]. 알파 시뉴클린의 응집은 알파 시뉴클린병증의 주요한 원인으로 생각되고 있으며, 다양한 알파 시뉴클린병증 모델에서 특징적으로 나타난다. 이는 Wild type 베타(β) 시뉴클린이나 NAC 도메인이 없는 알파 시뉴클린은 응집이 나타나지 않으며 독성이 없다는 결과[52]와 세포 모델에서 알파 시뉴클린의 응집을 억제하거나 중화시켰을 때 독성이 낮아진다는 결과[53]를 통해 확인할 수 있다.

알파 시뉴클린은 인산화(phosphorylation), 산화(oxidation), 나이트로실화(nitrosylation), 당화반응(glycation), 당화(glycosylation)에 의해 변형될 수 있다. 정상적인 환경에서 인산화 되지않은 알파 시뉴클린이 대부분이지만 알파 시뉴클린병증의 병변에서는 129번째 세린(Ser129)에 인산화 되어있는 알파 시뉴클린이 광범위하게 관찰된다. Ser129에서 casein kinase 2와 Polo-like kinases(PLKs)에 의한 알파 시뉴클린의 특정 인산화는 올리고머화(oligomerization)와 소섬유화(fibrillation)를 가속화 시킨다. 알파 시뉴클린의 과도한 인산화는 알파 시뉴클린병증의 병적인 상태의 발달에 기여할 것으로 생각된다[54-57]. 또한 알파 시뉴클린 인산가수분해효소(phosphatase)의 활성을 향상시키는 것은 알파 시뉴클린 매개 신경독성(neurotoxicity)에 대해 방어적인 효과가 있었으며 이는 질병 과정에서 알파 시뉴클린 인산화의 해로운 역할을 시사한다[58].

V40G 변종(V40G variant)

소섬유 형성이 잘 되지 않는 V40G 알파 시뉴클린을 마우스의 선조체에 주사하였을 때, Wild type 알파 시뉴클린을 주사하였을 때

보다 더 빨리 전파되었으며, 인산화 된 알파 시뉴클린의 양이 더 많았다. 또한 미세아교의 비정상적 증가(microgliosis)가 wild type 알파 시뉴클린을 주사하였을 때 보다 뚜렷하게 관찰되었다. 또한 1차 미세아교세포(primary microglia)를 이용한 실험에서 V40G 다량체를 처리했을 때 염증소체(inflammasome) 표지인 NLRP3가 Wild type 소섬유를 처리했을 때 보다 더 증가하였고, 종양괴사인자-α, IL-1β, IL-6와 같은 염증성 사이토카인(proinlammatory cytokines)이 증가하였다(표 1)[발표되지 않은 자료]. 따라서 이 실험에서는 마우스에 wild type 알파 시뉴클린보다 더 강한 병리반응을 보이는 V40G변종을 주사하여 TNF-α의 영향을 보고자 하였다.

1.3. 신경염증(Neuroinflammation)

신경염증은 신경 조직의 염증반응을 나타내며 다양한 독소(toxins), 뇌 손상(brain insult), 염증원(proinflammagen)에 의해 유발된다. 파킨슨병 환자의 흑질(substantia nigra, SN)에서 도파민 신경세포의 퇴화와 관련하여 신경아교 변화와 증가된 항염증(proinflammatory) 인자의 축적과 같은 염증 표지가 관찰되었다[59, 60]. 이에 신경염증에 대한 다양한 실험들이 진행되었는데, 염증원인 지질다당체(lipopolysaccharide, LPS)는 로테논(rotenone)과 같은 다른 환경 독소와 결합하거나 단독적으로 도파민성 신경 퇴화를 일으킬 수 있다고 알려져 있다[1, 2]. 또한 지질다당체를 통해 신경염증을 유도함으로써 알파 시뉴클린의 응집을 유도할 수 있다는 실험 결과도 밝혀진 상태이다[3]. 말초에서 백혈구의 침투(infiltration)은 제한적이고 임상 질환의 후기 단계에서만 약하게 발견되기 때문에 신경염증은 중추신경계(central nervous system, CNS) 내에서 발견되는 세포에 의해 발생될 가능성이 있다[61, 62].

신경아교세포의 한 종류인 성상세포(astrocyte)는 신경아교세포와 신경세포의 연결, 이온의 항상성(ionic homeostasis), 과도한 신경전달물질의 완충, 신경영양적 요소를 분비하는 기능을 하는 것으로

알려져 있다[63, 64]. 면역학적 반응이나 뇌수술에 의해 성상세포는 활성화되며, 신경교섬유질산성단백질(glial fibrillary acidic protein, GFAP)과 같은 세포형 특이 단백질의 발현이 증가한다[65]. 또한 다양한 염증성 사이토카인도 분비하는 것으로 알려져 있다. 하지만 지질다당체에 의한 종양괴사인자-α의 생산은 미세아교세포에서는 관찰되지만 성상세포에서는 관찰되지 않고[66]. 미세아교세포에서는 산화질소(nitric oxide, NO)의 지표인 아질산염(nitrite)을 성상세포보다 몇 배 더 많이 생성하고[67], 지질다당체에 의한 IL-1β의 생성 또한 미세아교세포에서 훨씬 더 우세하다[68, 69]. 또한 지질다당체에 의한 염증 자극에 대해 산화질소를 생성하는 속도도 미세아교세포가 빠르고, 지질다당체에 민감하게 반응하지 않았던 성상세포가 IL-1β의 자극에 의해서는 종양괴사인자-α나 IL-6와 같은 염증성 사이토카인의 분비가 증가했다[68]. 이러한 결과들을 토대로 미세아교세포가 뇌의 염증 과정에 주요한 역할을 하고 병리학적 조건에서 염증을 유발하는 신경 퇴행성 과정에 주요한 기여를 하고 있다고 생각한다.

미세아교세포(microglia)는 뇌의 상주하는 식세포(resident phagocytes)로 알려져 있으며 시냅스 모니터링, 시냅스 발달 중 시냅스 가지치기(pruning), 성인의 뇌에서 새로 생긴 신경세포의 형성 등 중추신경계의 정상적 생리학에서 필수적인 역할을 수행한다[70]. 미세아교세포는 뇌의 선천적 면역 반응의 첫 번째 장벽을 구성하며 신경염증반응의 핵심요소로 생각되고 있다. 죽은 신경세포나 잘못 접히거나 응집된 단백질과 같은 비정상적인 변화가 있을 때, 미세아교세포는 휴지기의 가지를 뻗고있는 형태(ramified)에서 활성화된 아메바모양(ameboid)으로 변화하여 식세포작용에 의한 외래물질 제거를 목표로 하는 염증 매개체(inflammatory mediators)를 방출하여 회복 시스템을 작동한다[71]. 잘 조절된 염증 과정은 조직 복구와 중추신경계 온전성(integrity)에 필수적이지만, 과도하고 오래 지속되는 미세아교세포와 염증은 세포독성으로 작용하여 파킨슨병을 포함한 다양한 질병의 진행을 촉진하는 세포 및 조직 손상을 야기할 수 있으며,

이는 염증성 사이토카인, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS), 글루탐산(glutamate)을 포함한 다양한 요소의 생성을 통해 진행된다[72]. 미세아교세포는 항원 유래 펩타이드(peptide)를 주조직적합성복합체(major histocompatibility complex, MHC)Ⅱ를 통해 CD4 T 림프구에 제시함으로써 염증 반응을 전파하는데 이 과정은 도파민성 신경세포의 퇴화에 기여하는 것으로 알려져 있다[73]. 파킨슨병 환자 사후 뇌의 흑질치밀부(substantia nigra pars compacta, SNpc)에서 HLA 양성 반응성 미세아교세포 뿐만 아니라 염증성 사이토카인의 수치가 높아진 것이 관찰되었다[74]. 사이토카인은 염증을 조절하고 성장, 생존, 분화와 같은 세포 활동을 조절하기 위해 picomolar, nanomolar 농도에서 신호 분자(signaling molecules)로 작용하는 작은 단백질의 한 종류이다[75]. 케모카인(chemokine)은 세포 이동(migration)을 유도하는 일반적인 기능을 가진 사이토카인 계열의 단백질 그룹이다. 생리학적으로, 케모카인과 사이토카인은 염증과 발생을 조절하는 신경 조절물질로서 기능한다. 신경염증 상황에서 세포는 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier, BBB)을 손상시킬 수 있는 사이토카인과 케모카인을 지속적으로 방출한다. 뇌 손상에 의해 생성되는 일반적인 사이토카인에는 astrogliosis동안 생성되는 interleukin-6(IL-6), 신경세포독성(neuronal cytotoxicity)을 유발할 수 있는 interleukin-1 beta(IL-1β), 종양괴사인자-α(TNF-α)가 있다[76, 77].

1.4. 종양괴사인자-α(Tumor necrosis factor alpha, TNF-α)

종양괴사인자-α는 세균에 감염된 생쥐의 혈청 단백질 성분으로 처음 알려졌으며, 생체 외 실험에서 암세포의 죽음을 유도하고 생체 내(in vivo) 이식된 육종(sarcoma)를 제거하는 것으로 알려졌다[78]. 종양괴사인자-α는 233개의 아미노산으로 이루어진 단백질로 세포

표면에 pro-form으로 존재한다. 이 type-Ⅱ 막관통성단백질(transmembrane protein)은 종양괴사인자-α 절단 효소(TNF-α cleaving enzyme, TACE)에 의해 분해된 후 세포와 연관된 수용성 형태로 활성화되어 방출된다[79]. 박테리아와 바이러스 단백질에 노출되는 등의 외인성 신호(exogenous signal)는 중추신경계내에서 염증 반응을 유도한다[80]. 말초신경계의 슈반세포(Schwann cell)에 신경세포의 용해물(lysate)를 처리하면 MCP-1, iNOS, 종양괴사인자-α의 발현이 유도되는 결과를 통해 외인성 신호 외에도 물리적 손상과 관련된 세포 내적 자극에 의해 종양괴사인자-α 발현이 유도되기도 한다는 것을 밝혔다. 이러한 종양괴사인자-α의 발현은 Toll-유사수용체(Toll-like receptor, TLR)에 의해 매개된 것으로 알려져 있다[81]. 또한 포유류의 핵산은 종양괴사인자-α와 다른 염증 매개체의 생성을 자극할 수 있다. 자가-RNA와 DNA 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)에 특이적인 항체는 Toll-유사수용체 7,9를 활성화 시킬 수 있으며, 이는 염증성 사이토카인의 생성을 초래한다[82]. 또한 글루탐산염(glutamate)와 같은 신경전달물질의 비정상적인 방출이나 흡수는 중추신경계 염증의 활성화를 초래할 수 있다[83].

알츠하이머병에서 아밀로이드반(amyloid plaque)와 관련하여 미세아교세포의 활성화와 알츠하이머병 발병의 연관성이 알려지면서[84], 활성화된 면역 세포들이 세포 외 퇴적물을 제거하는 과정에 기여한다는 연구들이 진행되었다. 아밀로이드-β에 노출이 증가하면 미세아교세포의 Toll-유사수용체와 종양괴사인자-α의 발현이 증가한다고 알려져 있고[85], 다양한 알츠하이머병 관련 동물 모델에서 종양괴사인자-α의 증가가 아밀로이드-β의 축적을 증가시키는 것을 확인하였다[86, 87]. 종양괴사인자-α의 신호전달과 염증을 조절함으로서 병원성 아밀로이드-β의 생성을 조절할 수 있다는 연구결과는 초기에 질병을 발견하고 개입하는 것이 알츠하이머병의 점진적인 진행을 막을 수 있다고 생각한다. 하지만 알츠하이머병의 치료에 있어서

종양괴사인자-α에 의한 신호전달경로를 이용하려는 노력에도 뚜렷한 치료 효과를 나타내지 못하고 있는 상황이다[88].

파킨슨병 환자의 뇌척수액과 선조체, 흑질에서 염증성 사이토카인 중 종양괴사인자-α의 수준이 높다는 연구결과들을 통해 종양괴사인자-α 신호전달이 파킨슨병과 관련된 발병에 영향을 주고 있을 것으로 예상된다[74, 89]. 이러한 결과는 파킨슨병 환자와 유사한 신경병리학 상태를 나타내는 다양한 마우스 모델에서 확인되었다. 독소인 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)나 6-hydroxydopamine(6-OHDA)를 주입한 마우스는 흑질-선조체 경로의 퇴화를 유도하고 선조체와 흑질내의 종양괴사인자-α 수치를 증가시킨다. 또한 종양괴사인자-α 수용체를 실험적으로 절제하면 MPTP에 의한 도파민성 신경독성으로부터 보호하는 결과를 얻는다[90, 91]. 파킨슨병의 증상을 완화하기 위해 사용되는 1차 치료제인 레보도파(levodopa, L-DOPA)에 대한 연구 중 파킨슨병 환자에게서 얻은 말초혈액 단핵세포에 레보도파를 처리했을 때 종양괴사인자-α 생성의 증가가 관찰된 연구가 있다. 이는 파킨슨병 환자에서 종양괴사인자-α의 증가가 약물의 투여 때문이며 파킨슨병 발병에 의한 것은 아니라고 주장한다[92]. 하지만 파킨슨병의 6-OHDA 신경독성 마우스 모델에서는 레보도파가 체내 중추신경계의 염증을 증가시키지 않는다는 결과를 얻었다[90]. 또한 전염병학적(epidemiological) 연구에서 ibuprofen과 같은 비스테로이드성 항염증제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)의 사용이 중추신경계의 염증을 제한함으로써 이론적으로 파킨슨병의 발병 위험을 줄일 수 있다고 예상하였지만 큰 상관관계를 찾기 어려웠다[93, 94]. 종양괴사인자-α와 파킨슨병 발병 사이의 연관성에 대한 다양한 연구들이 진행되고 있지만 명확한 연관성을 찾지 못한 상황이다.

선행 연구에서 1차 미세아교세포에 지질다당체를 처리하여 염증반응을 유도한 뒤 그 세포를 배양하던 배지를 신경세포에 처리해보았을 때, 알파 시뉴클린의 분비가 증가되었음을 확인하였다.

이에 관련된 사이토카인을 찾기 위해 다양한 염증성 사이토카인을 처리하여 알파 시뉴클린의 분비를 확인했을 때 종양괴사인자-α에 의한 알파 시뉴클린의 분비가 가장 크게 증가하였다. 또한 종양괴사인자-α에 의해 신경세포 사이의 알파 시뉴클린 전파가 증가하는 것을 확인했다[발표되지 않은 자료].

1.5. 동물 모델(Animal model)

알파 시뉴클린 응집체의 전파를 연구하기에 사람의 뇌를 사용하는 것은 사람이 죽고 나서 질병 진행의 마지막을 분석할 수 있기 때문에 많은 제한이 있다. 따라서 사람 질병의 특징과 질병의 원리를 포함할 수 있는 동물 모델을 만드는 것이 중요하다.

선조체에 태아의 흑질을 이식받은 후 10년 뒤에 죽은 파킨슨병 환자의 뇌에서 이식 된 신경에서 루이소체가 관찰되었던 특징[19, 20]을 연구하기위해 사람의 알파 시뉴클린을 발현하는 유전자가 이식된(transgenic, Tg) 마우스의 뇌에 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)이 표지 된 마우스 신경전구세포(neural precursor cells)을 주사한 모델이 있다[95]. 또한 알파 시뉴클린의 병리현상이 장신경계에서 시작되어 중추신경계로 이동하는 것을 연구하기위해[4] 사람의 알파 시뉴클린 cDNA를 운반하는 아데노 연관 바이러스(adeno-associated virus, AAV)를 Wild type 쥐의 미주신경(vagus nerve)에 주사하여 사람의 알파 시뉴클린의 이동을 확인한 모델이 있다[96]. 마지막으로 유전자 이식 마우스나 알파 시뉴클린 병리를 보이는 환자의 알파 시뉴클린 응집체를 포함하는 뇌 추출물이나 체외에서 생성된 사전 형성된 소섬유를 마우스 뇌에 주사하여 알파 시뉴클린의 전파를 확인한 모델이 있다[13, 97, 98]. 사전 형성된 소섬유를 마우스 뇌에 주사하면 병리학적인 루이소체나 루이신경돌기 같은 포함물(inclusion)의 형성이 가속화되고 주사 지역에서 멀리 떨어진 지역까지 전파된다. 사전 형성된 소섬유 주입 후 알파 시뉴클린 포함물의 분포는 주사 부위, 사전 형성된 소섬유의 양과

종류, 동물의 종과 lines에 의해 달라지지만, 주사하기 쉽고 연구가 많이 된 선조체 내 주사(intrastriatal injection)을 주로 이용한다[13, 15, 97, 99].

종양괴사인자-α를 Knock out하기 위하여 129/sv 마우스에서 얻은 배아줄기세포(embryonic stem cell, ESC)에 MC1neopA cassette가 포함된 표적 벡터(targeting vector)를 전기천공법(electroporation)을 이용하여 넣는다. 상동 재조합(homologous recombination)을 유도하여 표적 벡터에 있는 유전자를 종양괴사인자-α 유전자 사이에 넣는다. 이후 종양괴사인자-α가 Knock out된 세포를 EcoR I 효소와 탐침(probe)을 이용하여 southern blot을 진행하여 확인한다. 종양괴사인자-α Knock out이 확인된 세포를 C57BL/6 마우스의 배반포(blastocyst)에 미세주사법(microinjection)을 이용하여 주입한 후 키메라(chimera) 마우스를 얻는다. 남성인 키메라 마우스를 C57BL/6 마우스와 교배한 뒤 Southern blot을 통해 종양괴사인자-α 유전자가 이형접합(heterozygous)인 마우스를 확인하고, 이형접합 마우스끼리 교배(intercross)한다. 이를 통해 종양괴사인자-α Knock out 마우스를 얻는다(그림 2)[100].

연구목적

다양한 연구에도 불구하고 신경염증반응이 다양한 퇴행성 뇌질환에서 발견되는 병인 단백질에 미치는 영향과 퇴행성 뇌질환의 발병에 미치는 영향이 확실하게 밝혀지지 않은 상태이다. 특히 파킨슨병과 관련하여 신경염증반응에서 중요한 분자로 생각되는 종양괴사인자-α가 알파 시뉴클린의 전파를 증가시킨다는 생체 외 실험결과를 토대로 생체 내에서의 영향을 확인하고자 하였다.

이를 확인하고자 종양괴사인자-α가 Knock out된 마우스에 선행 연구에서 wild type 알파 시뉴클린보다 더 강한 응집체 전파를 유도한다는 결과를 얻은 V40G 변종을 정위주사하여 알파 시뉴클린의

병리현상을 유도했다. 이후 마우스 뇌에 면역조직화학염색법을 이용하여 인산화된 알파 시뉴클린, 성상세포, 미세아교세포를 확인해보았다. 이를 통해 마우스 모델에서 종양괴사인자-α가 알파 시뉴클린의 전파에 미치는 영향을 알아보고, 이에 영향을 미치는 신경아교세포를 확인하고자 하였다.

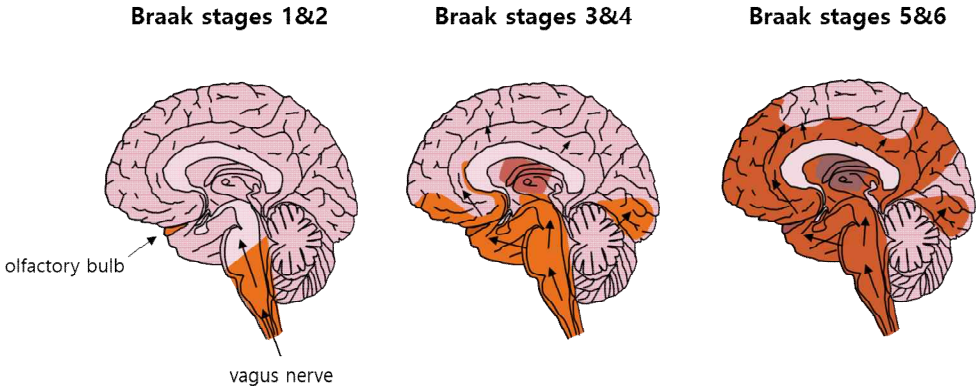


그림 1. 파킨슨병의 진행에 따른 루이소체의 전파 과정

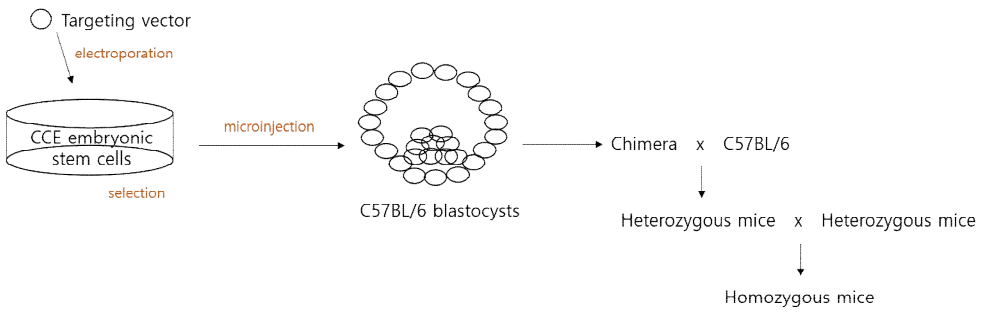


그림 2. 종양괴사인자-α Knock out 마우스 만드는 과정[100]

	PBS	WT	V40G
Pathology	-	++	++++
Propagation	-	++	++++
NLRP3	-	++	++++
TNF-α	-	++	++++
IL-1β	-	+	++

표 1. V40G 변종 다량체와 Wild type 소섬유에 의한 병리현상과 염증반응 변화 [발표되지 않은 자료]

실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

실험에 사용된 항체는 다음과 같다: phospho-α synuclein(pS129; Abcam, EP1536Y, 1:500 dilution), Iba- I (Wako, Osaka, Japan, 019-19741, 1:200 dilution), glial fibrillary acidic protein(GFAP; Abcam, ab7260, 1:500 dilution), Horse radish peroxidase(HRP)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G(IgG; H+L)(Bio-Rad Laboratories, 170-6515, 1:200 dilution).

실험에 사용된 시약은 다음과 같다: Avidin-Biotin Complex(ABC complex; Vector laboratories, PK-6200), Triton X-100(Bio-Rad, 161-0407), DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline; GenDEPOT, CAP08-050), 30% H_2O_2(Hydrogen peroxide solution in H_2O; Sigma, H1009), DAB(3,3′-Diaminobenzidine; Sigma, D5637), BSA(bovine serum albumin; Sigma, A7906), Canada balsam(Sigma, C1795).

2. 소섬유 준비(fibril preparation)

Escherichia coli 에서 정제한 V40G 단량체(monomer)를 ThermoMixer C (Eppendorf, Hamburg, Germany, 5382000015)에서 1050rpm, 37℃에서 9일간 배양하였다. 주사 전, 소섬유는 진폭30%로 1분동안 초음파를 쬐어 분쇄하여 다량체(multimer)로 만들어 이용하였다. V40G 단량체는 PBS에 200μM의 농도로 같은 실험실의 신수진 연구원에게 받아 이용하였다.

3. 형광 염료 결합 실험(Fluorescent dye binding assay)

재조합한 알파 시뉴클린 표본을 glycine (Fisher Scientific,

Hampton, NH, USA, BP3815)-NaOH (pH 8.5) 수용액에 포함된 10μM 농도의 Thio T (Sigma, T3516) 50μL, 50μM X-34 (Sigma, SML1954) 40μL, 0.001% Sybr Green commercial stock solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, S7563) 40μL, 50μM curcumin (Sigma, C1386) 100μL에 섞은 후 실온에서 배양하였다. 이후 Synergy NEO plate reader (Biotek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 형광을 측정하였다. 자극(excitation) 파장과 방사(emission) 파장은 Thio T는 440nm와 490nm, X-34는 380nm와 520nm, Sybr Green은 485nm와 520nm, Curcumin은 440nm와 519nm로 설정하였다.

4. 동물(Animal)

B6;129S-Tnf^{tm1Gkl}/J 마우스를 The Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME, USA, 003008)에서 구입하여서 사용했다. 마우스들은 서울대학교 의과대학 내 동물 시설인 의생명동물자원연구센터에서 표준화된 조건에 따라 쥐를 수용하였다. 모든 마우스 연구는 관련 윤리규정에 따라 수행되었으며 서울대학교 윤리위원회(IACUC SNU-190721)의 승인을 받았다.

5. 정위주사(stereotactic injection)

10주령의 TNFα Wild type(WT)/Knock Out(KO) 마우스를 염산케타민(ketamine hydrochloride)와 염산자일라진(xylazine hydrochloride)를 3.5:1비율로 섞어 마우스의 몸무게 1g당 2.5μl를 주사하여 마취하였다. 마취 후 PBS와 V40G 다량체를 오른쪽 선조체(striatum) 앞(anterior)/뒤(posterior) 1.0mm, 안쪽(medial)/측면(lateral) 1.5mm. 등(dorsal)/배(ventral) 3.0mm 지역에 0.5μl/min의 속도로 2μl씩 주입하였다.

6. 표본 준비(sample preparation)

정위주사 20주 후 각 마우스들을 1.2% Avertin을 몸무게 1g당 0.23ml를 주사하여 마취하였다. 마취 후 식염수로 심장을 통해 관류한 후 차가운 4%PFA로 관류하였다. PFA로 충분히 관류한 후 뇌를 꺼내 4%PFA에 최소 48시간 동안 4℃에서 고정시켰다. 이후 PBS로 뇌를 세척한 후 Vibratome(Leica VT1000S)를 이용하여 40μm두께로 free-floating section을 진행하였다.

7. 면역조직화학염색법(Immunohistochemistry)

내생의(endogenous) peroxidase의 영향을 없애기 위하여 3%H_2O_2 수용액에 조직을 담은 뒤 상온(RT)에서 30분간 incubation시킨다. 이후 세포막 투과성을 증가시키기 위해 0.1% Triton X-100이 포함된 PBS(phosphate buffered saline with Triton X-100; PBS-T)를 이용하여 세척해준다. 4% BSA을 이용하여 상온에서 1시간 동안 blocking을 진행하였다. 1차 항체를 처리한 후 4℃에서 하룻밤 동안(overnight) 반응 시켰다. 이후 PBS-T를 이용하여 세척한 뒤 HRP가 포함되어있는 2차 항체를 처리하여 상온에서 1시간 30분 동안 incubation하였다. 이후 신호 증폭을 위해 ABC-HRP kit를 이용하여 상온에서 1시간동안 incubation하였다. 다시 PBS-T로 세척 후 0.1M Tris-HCl을 처리하여 4℃에서 30분간 incubation하였다. 0.1M Tris-HCl에 DAB과 0.3%H_2O_2를 포함시킨 수용액에서 develop하였다. 염색이 완료된 조직들은 젤라틴(gelatin)이 coating된 slide에서 하룻밤 동안 건조시킨다. 건조된 표본들은 Xylene에서 10분 incubation한 뒤 Canada Balsam으로 mounting한 뒤 ZEISS AX10 현미경을 이용하여 관찰하였다.

8. 이미지 분석(Image analysis)

인산화 된 알파 시뉴클린을 보기 위한 pS129, 성상세포의 변화를 보기 위한 GFAP, 미세아교 세포의 변화를 보기 위한 Iba-Ⅰ 항체를

이용한 염색 후 얻은 이미지를 ImageJ (NIH)를 이용하여 분석하였다. 배경 신호 수준(background signal level)에 대해 보정하여 각 항체의 광학 밀도(optical density)를 분석하여 각 이미지를 정량화 하였다.

9. 통계 처리(Statistical analysis)

모든 결과는 mean ± standard error of the mean(SEM) 값으로 표시하였고, 그룹 간 통계적인 유의성은 GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)의 two-way ANOVA를 이용하여 분석하였다(*,#p<0.05, **,##<0.01, ***,###<0.001, ****,####<0.0001, n.s, not significant).

결 과

V40G 변종의 구조 확인

알파 시뉴클린의 소섬유는 루이소체와 루이신경돌기 형성에 기여하는 것으로 알려져 있다. 파킨슨병에서 관찰되는 알파 시뉴클린 소섬유를 구성하는 알파 시뉴클린은 β-sheet구조를 갖고 있으며, β-sheet구조의 안정화가 알파 시뉴클린의 응집에 영향을 미칠 것으로 생각되고 있다[43, 49].

본 실험에서 마우스 주사에 이용된 소섬유화 된 V40G는 1050rpm, 37℃에서 9일간 배양하였고, 소섬유화 된 V40G 변종 알파 시뉴클린의 β-sheet구조를 소섬유화 된 WT 알파 시뉴클린과 비교하기 위하여 형광 염료 결합 실험을 진행하였다(그림 3A). β-sheet구조를 확인하기 위해 가장 많이 사용되는 Thioflavin T(Thio T)[101]와 Thio T가 β-sheet구조에 결합하는 부분과 각각 다른 부분에 결합하는 X-34, Sybr Green(SG), Curcumin 염료를 이용하여 실험하였다[102-104]. 그 결과 V40G에는 Thio T 염료가 거의 결합하지 못하며 WT과 유의미한 차이가 있다(그림 3B). X-34와 Curcumin은 V40G에 일부 결합할 수 있지만 WT과는 유의미한 차이가 있고, 또한 WT과 V40G에서 SG 결합 또한 차이가 있다(그림 3C-E). 이를 통해 소섬유화 시킨 WT과 V40G에는 β-sheet구조에 차이가 있음을 확인했다.

알파 시뉴클린 변종의 정위주사에 따른 인산화 된 알파 시뉴클린 확인

알파 시뉴클린병증의 병변에서 관찰되는 129번째 세린(Ser129)에 인산화 되어있는 알파 시뉴클린이 올리고머화(oligomerization)과 소섬유화(fibrillation)을 가속화시키고, 알파 시뉴클린의 과도한 인산화는 알파 시뉴클린병증의 병적인 상태의 발달에 기여할 것으로 생각된다[12, 54]. 본 실험에서는 알파 시뉴클린 변종인 V40G 알파 시뉴클린을 이용하여 알파 시뉴클린병증을 유도하기 위해 마우스에 정위주사를

진행하였다. 종양괴사인자-α의 효과를 확인하기 위하여 종양괴사인자-α Wild type(WT) 마우스와 종양괴사인자-α Knock out(KO) 마우스에 V40G 알파 시뉴클린 다량체를 각각 주사하였으며, 주사에 의한 효과를 확인하기 위하여 vehicle(PBS; phosphate buffered saline)을 주사한 그룹을 추가하였다.

10주령이 된 마우스를 이용하여 PBS와 V40G 알파 시뉴클린 다량체를 각 그룹의 선조체에 주사하였다. 주사 후 20주에 식염수와 4%PFA로 관류한 후 뇌를 얻어 free-floating section을 진행한 뒤 알파 시뉴클린병증의 소섬유성 응집체(fibrillary aggregate)의 표지(marker)인 인산화 된 알파 시뉴클린(pS129)을 확인하였다(그림 4A). 그 결과 V40G를 주사한 그룹의 선조체에서는 많은 인산화 된 알파 시뉴클린이 확인되었으며, PBS를 주사한 그룹의 선조체에서는 인산화 된 알파 시뉴클린이 확인되지 않았다. 알파 시뉴클린의 전파를 확인하기 위해 편도체(amygdala)와 내후각피질(entorhinal cortex), 대상엽(cingulate cortex), 운동피질(motor cortex)에서 인산화 된 알파 시뉴클린을 확인하였다. 선조체에서와 마찬가지로, V40G를 주사한 그룹의 편도체, 내후각피질, 대상엽, 운동피질에서는 인산화 된 알파 시뉴클린이 확인되었지만, PBS를 주사한 그룹의 편도체, 내후각피질, 대상엽, 운동피질에서는 인산화 된 알파 시뉴클린이 확인되지 않았다(그림 4B). 이를 정량화하여 확인해본 결과 종양괴사인자-α WT 마우스에 V40G를 정위주사한 그룹이 PBS를 정위주사한 그룹보다 편도체, 내후각피질, 대상엽, 운동피질에서 모두 인산화 된 알파 시뉴클린 양이 증가한 것을 확인할 수 있다. 종양괴사인자-α KO 마우스에 V40G를 정위주사한 그룹의 대부분의 지역에서 인산화 된 알파 시뉴클린이 확인되었지만, 종양괴사인자-α WT 마우스에 V40G를 정위주사한 그룹보다 인산화 된 알파 시뉴클린의 양이 더 적게 관찰되었다. 편도체, 대상엽, 운동피질에서는 V40G를 정위주사 하였을 때, 종양괴사인자-α WT 마우스보다 종양괴사인자-α KO 마우스에서 인산화 된 알파 시뉴클린이 유의미하게 감소된 것을 확인할 수

있으며(그림 4C,D,F), 내후각피질에서는 유의미하지 않지만 종양괴사인자-α KO 마우스의 내후각피질에서 인산화 된 알파 시뉴클린이 더 적게 관찰되는 것을 확인할 수 있었다(그림 4E).

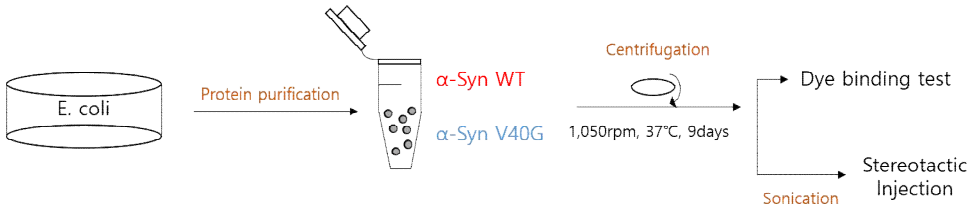
운동피질, 대상엽, 내후각피질, 편도체에서 성상세포의 비정상적인 증가(astrogliosis) 확인

V40G 다량체를 정위주사한 그룹에서 인산화 된 알파 시뉴클린이 증가하였던 운동피질, 대상엽, 내후각피질, 편도체에서 성상세포가 증가하였는지 확인하기 위해 GFAP 항체로 염색하여 분석을 진행하였다. 그 결과 PBS를 정위주사한 그룹에서는 종양괴사인자-α WT마우스와 종양괴사인자-α KO 마우스의 대상엽과 운동피질에서는 성상세포가 거의 확인되지 않았으며 내후각피질과 편도체에서는 성상세포가 확인되었고 종양괴사인자-α WT 마우스와 종양괴사인자-α KO 마우스 사이에는 큰 차이가 없어 보였다. 또한 V40G를 정위주사한 그룹에서는 PBS를 정위주사한 그룹보다 성상세포가 많이 관찰되는 것으로 추측되었고, 종양괴사인자-α KO 마우스와 종양괴사인자-α WT에서 성상세포의 수는 차이가 없는 것으로 관찰되었다(그림 5A). 이를 정량화하여 확인한 결과, 종양괴사인자-α WT 마우스에서 PBS를 정위주사한 그룹과 V40G를 정위주사한 그룹간의 차이가 내후각피질에서만 확인되었다(그림 5C). 그 외에 편도체, 대상엽, 운동피질에서는 통계적으로 유의미하지 않은 차이를 확인하였다. 하지만 대부분의 지역에서 PBS를 주사하였을 때 보다 V40G를 주사하였을 때, 성상세포의 수와 크기가 증가하는 경향성을 보였다. V40G를 정위주사한 그룹에서 종양괴사인자-α WT 마우스와 종양괴사인자-α KO 마우스 간에 성상세포 수의 차이는 운동피질, 대상엽, 내후각피질, 편도체에서 통계적으로 차이가 유의미하지 않았다(그림 5C-E).

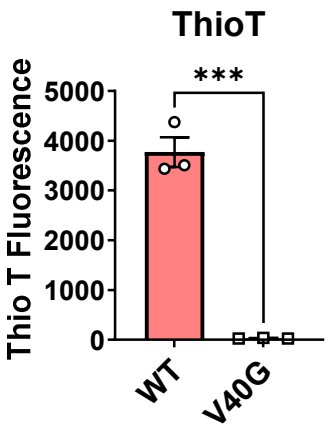
운동피질, 대상엽, 내후각피질, 편도체에서 미세아교세포의 비정상적인 증가(microgliosis) 확인

V40G 다량체를 정위주사한 그룹에서 인산화 된 알파 시뉴클린이 증가하였던 운동피질, 대상엽, 내후각피질, 편도체에서 미세아교세포가 증가하였는지 확인하기 위해 Iba I 항체로 염색하여 분석을 진행하였다. 그 결과 PBS를 정위주사한 그룹에서 종양괴사인자-α WT 마우스와 종양괴사인자-α KO 마우스의 운동피질, 대상엽, 내후각피질, 편도체의 미세아교세포의 수와 크기는 큰 차이가 없어 보였다. 또한 V40G를 정위주사한 그룹에서는 PBS를 정위주사한 그룹보다 편도체, 내후각피질, 대상엽에서 미세아교세포가 더 많고 크게 관찰되는 것으로 관찰되었고, 종양괴사인자-α KO 마우스가 종양괴사인자-α WT 마우스보다 미세아교세포의 수와 크기가 감소한 것으로 관찰되었다(그림 6A). 이를 정량화하여 확인한 결과, 종양괴사인자-α WT 마우스에서 PBS를 정위주사한 그룹과 V40G를 정위주사한 그룹의 편도체에서만 미세아교세포의 차이가 확인되었고(그림 6E), 대상엽, 내후각피질, 운동피질에서는 통계적으로 차이가 유의미하지 않았다. 하지만 V40G를 주사하였을 때 PBS를 주사하였을 때 보다 대부분의 지역에서 미세아교세포의 수와 크기가 증가하는 경향성을 확인할 수 있었고, V40G를 정위주사한 그룹에서 종양괴사인자-α WT 마우스와 종양괴사인자-α KO 마우스 간에 미세아교세포 수와 크기의 차이는 편도체, 내후각피질, 대상엽에서 통계적으로 차이가 유의미하지 않았지만, 대부분의 지역에서 종양괴사인자-α WT 마우스보다 종양괴사인자-α KO 마우스에서 미세아교세포의 수와 크기가 감소하는 경향을 보이는 것을 확인하였다(그림 6B-E).

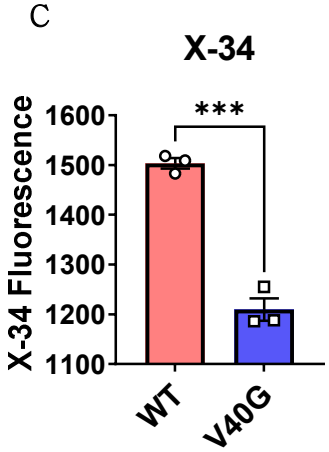
A


E. coli
Protein purification
α-Syn WT
α-Syn V40G
Centrifugation
1,050rpm, 37℃, 9days
Dye binding test
Stereotactic Injection
Sonication

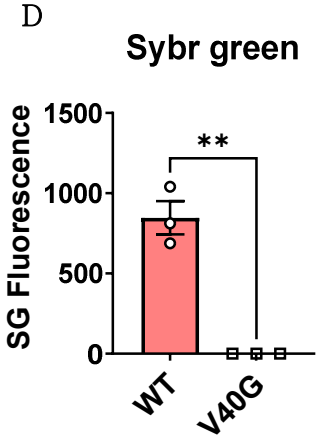
B


ThioT
Thio T Fluorescence
5000
4000
3000
2000
1000
0
***
WT
V40G

C


X-34
X-34 Fluorescence
1600
1500
1400
1300
1200
1100
***
WT
V40G

D


Sybr green
SG Fluorescence
1500
1000
500
0
**
WT
V40G

E

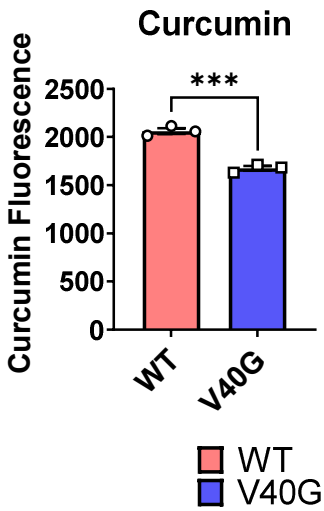
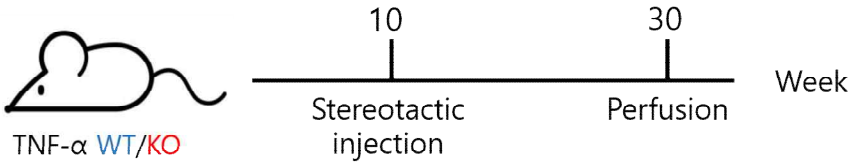

Curcumin
Curcumin Fluorescence
2500
2000
1500
1000
500
0
***
WT
V40G
WT
V40G

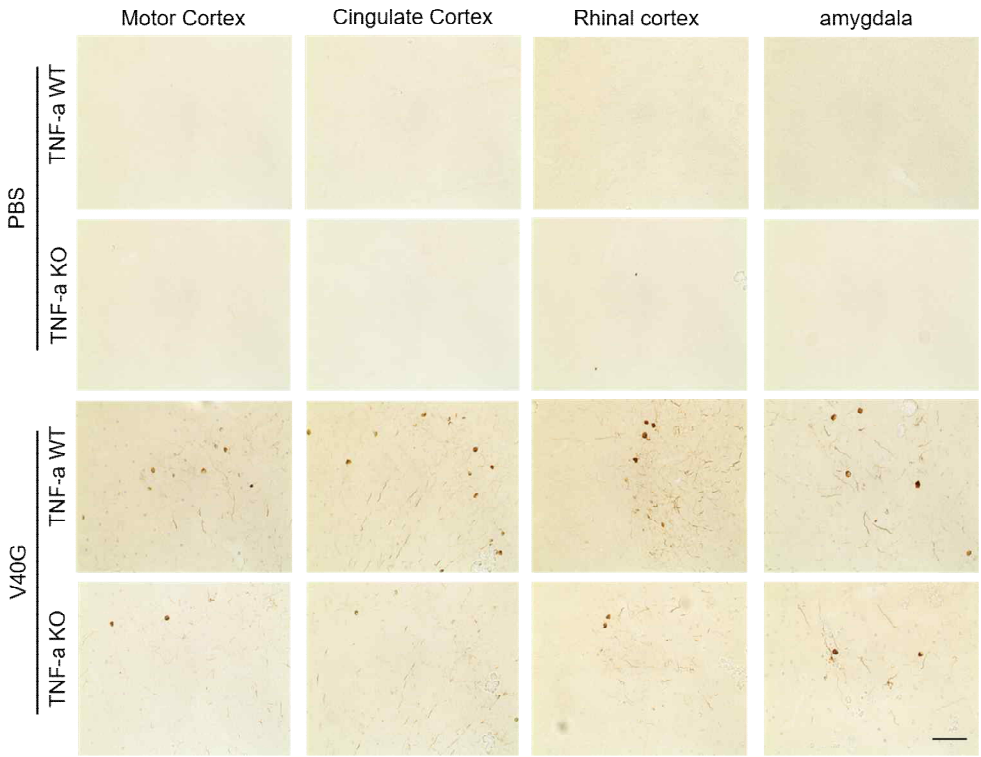
그림 3. 소섬유화 된 V40G변종의 형광 염료 결합 실험

(A) Aged WT, Aged V40G를 만드는 과정. (B-E) 각 염료 별 형광 세기 측정. (B) Thio T는 V40G에는 거의 결합하지 않고 WT에는 결합함. (C) V40G에 X-34가 결합하지만 WT보다 적게 결합함. (D) SG는 V40G에는 거의 결합하지 않고 WT에는 결합함. (E) V40G에 Curcumin이 결합하지만 WT보다 적게 결합함. Mean ± SEM; n=3 (각 그룹에서); unpaired t-test; **p<0.01, ***p<0.001

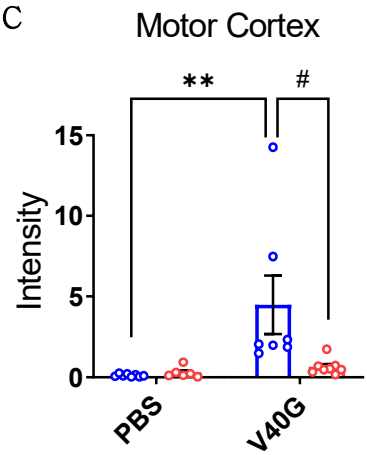
A


10
30
Week
Stereotactic injection
Perfusion
TNF-α WT/KO

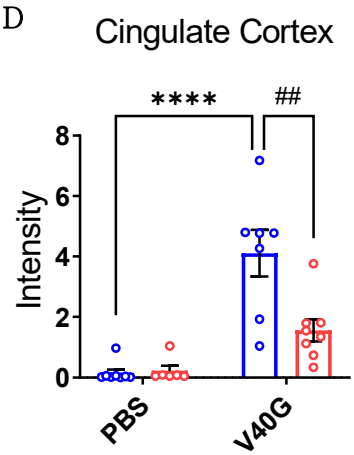
B


Motor Cortex
Cingulate Cortex
Rhinal cortex
amygdala
PBS
TNF-a WT
TNF-a KO
V40G
TNF-a WT
TNF-a KO

C


Motor Cortex
**
#
Intensity
15
10
5
0
PBS
V40G

D


Cingulate Cortex
****
##
Intensity
8
6
4
2
0
PBS
V40G

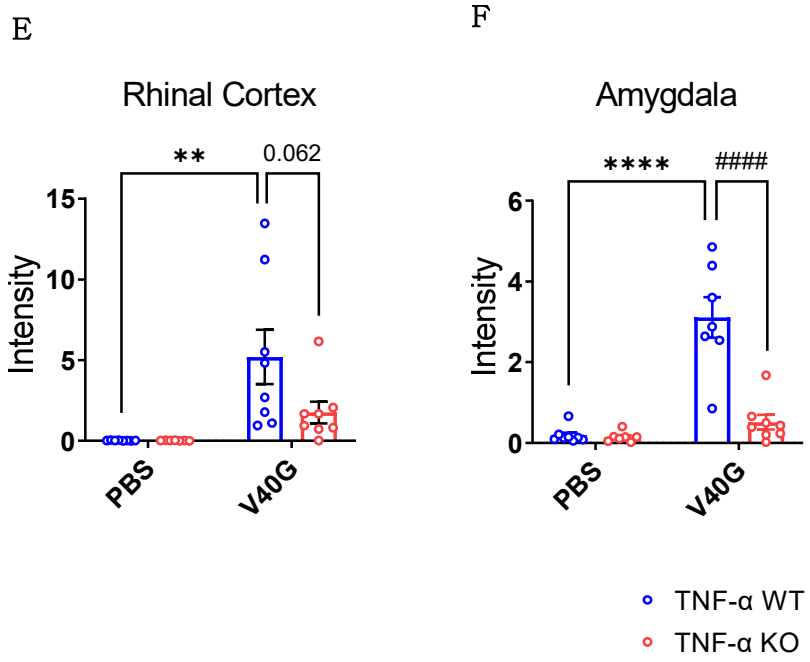
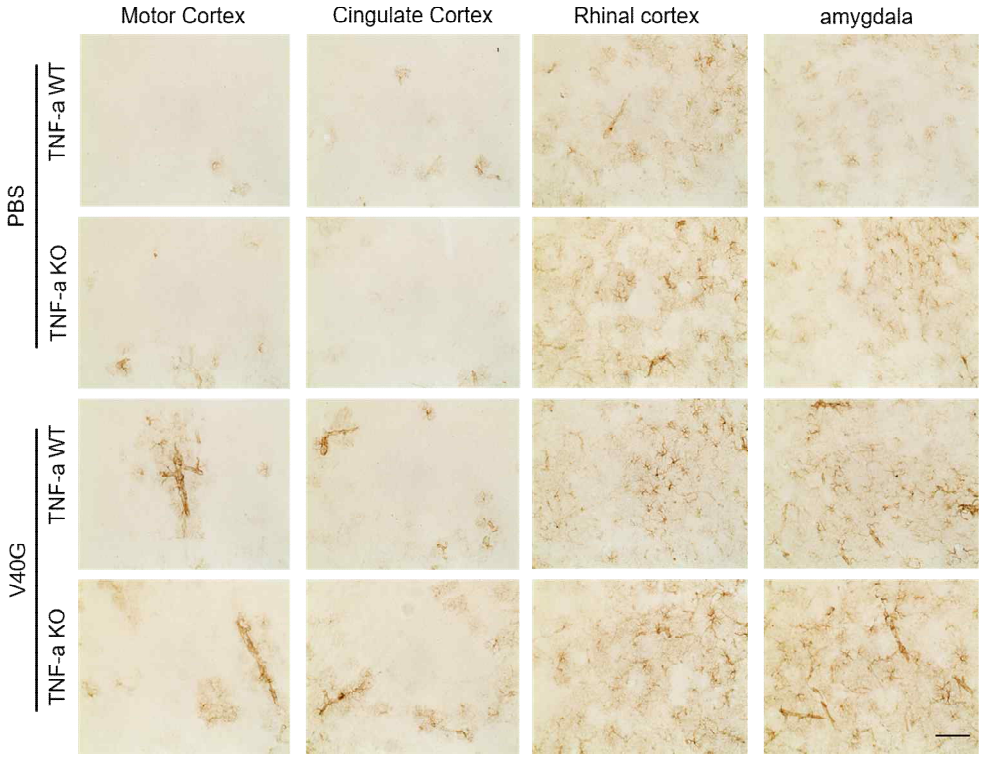


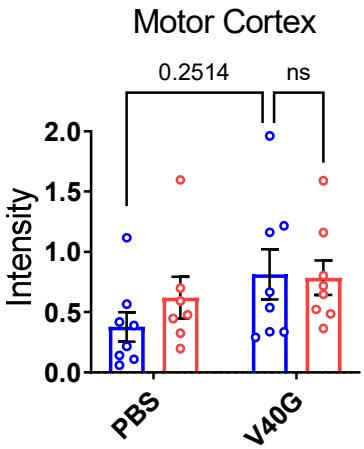
그림 4. V40G 알파 시뉴클린 다량체의 정위주사 후 시뉴클린병증의 확산

(A) 정위주사 후 표본 준비 계획 (B) 운동피질, 대상엽, 내후각피질, 편도체에서 인산화 된 알파 시뉴클린을 면역조직화합염색법을 통해 확인함. Scale bar, 100μm (C-F) PBS와 V40G를 주사한 TNF-α WT, KO 마우스에서 인산화 된 알파 시뉴클린(pS129) 항체의 광학 밀도를 측정함. (C) 운동피질(WT+PBS, n=8; KO+PBS, n=6; WT+V40G, n=7; KO+V40G, n=8). (D) 대상엽(WT+PBS, n=8; KO+PBS, n=6; WT+V40G, n=7; KO+V40G, n=8). (E) 내후각피질(WT+PBS, n=8; KO+PBS, n=7; WT+V40G, n=8; KO+V40G, n=8). (F) 편도체(WT+PBS, n=8; KO+PBS, n=7; WT+V40G, n=7; KO+V40G, n=8); Mean ± SEM; two-way ANOVA; #p<0.05, **,##p<0.01, ***,###p<0.001, ****,####p<0.0001

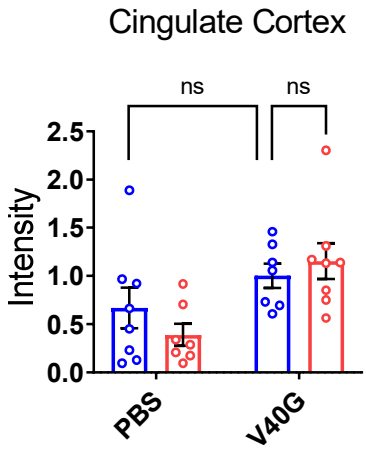
A


Motor Cortex
Cingulate Cortex
Rhinal cortex
amygdala
PBS
TNF-a WT
TNF-a KO
V40G
TNF-a WT
TNF-a KO

B


Motor Cortex
0.2514
ns
Intensity
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
PBS
V40G

C


Cingulate Cortex
ns
ns
Intensity
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
PBS
V40G

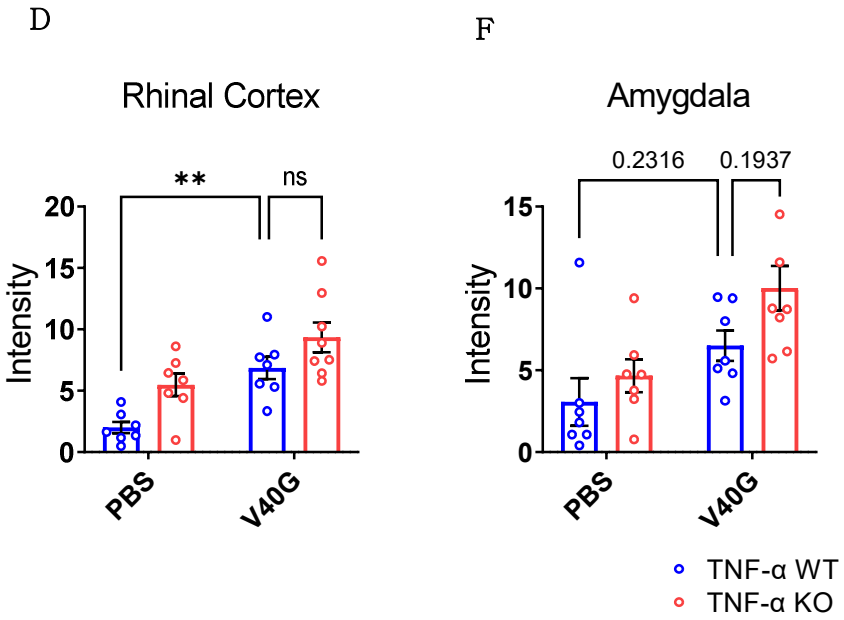
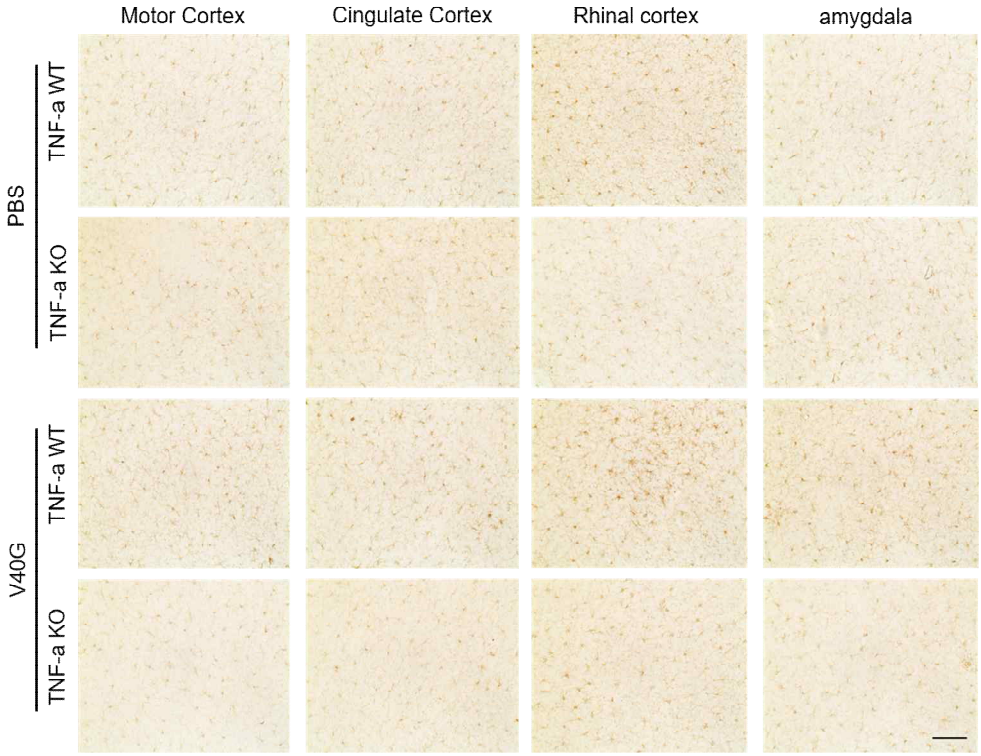


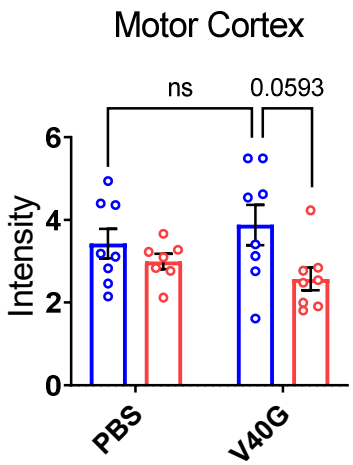
그림 5. 알파 시뉴클린이 전파된 뇌 지역에서 성상세포의 비정상적인 증가

(A) 운동피질, 대상엽, 내후각피질, 편도체에서 성상세포를 면역조직화합염색법을 통해 확인함. Scale bar, 100μm (B-E) PBS와 V40G를 주사한 TNF-α WT, KO 마우스에서 성상세포의 세포골격단백질인 GFAP 항체의 광학 밀도를 측정함. (B) 운동피질(WT+PBS, n=8; KO+PBS, n=7; WT+V40G, n=8; KO+V40G, n=8), (C) 대상엽(WT+PBS, n=8; KO+PBS, n=7; WT+V40G, n=7; KO+V40G, n=8) (D) 내후각피질(WT+PBS, n=7; KO+PBS, n=7; WT+V40G, n=7; KO+V40G, n=8) (E) 편도체(WT+PBS, n=7; KO+PBS, n=7; WT+V40G, n=7; KO+V40G, n=8); Mean ± SEM; two-way ANOVA; **p<0.01, ns; not significant.

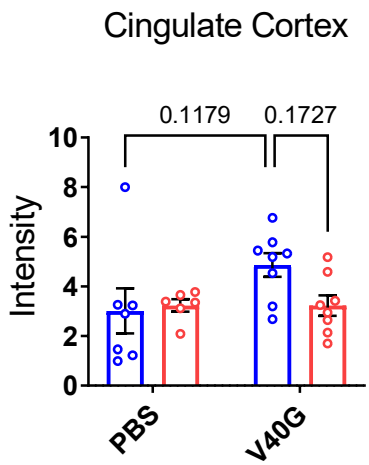
A


Motor Cortex
Cingulate Cortex
Rhinal cortex
amygdala
PBS
TNF-a WT
TNF-a KO
V40G
TNF-a WT
TNF-a KO

B


Motor Cortex
ns
0.0593
Intensity
0
2
4
6
PBS
V40G

C


Cingulate Cortex
0.1179
0.1727
Intensity
0
2
4
6
8
10
PBS
V40G

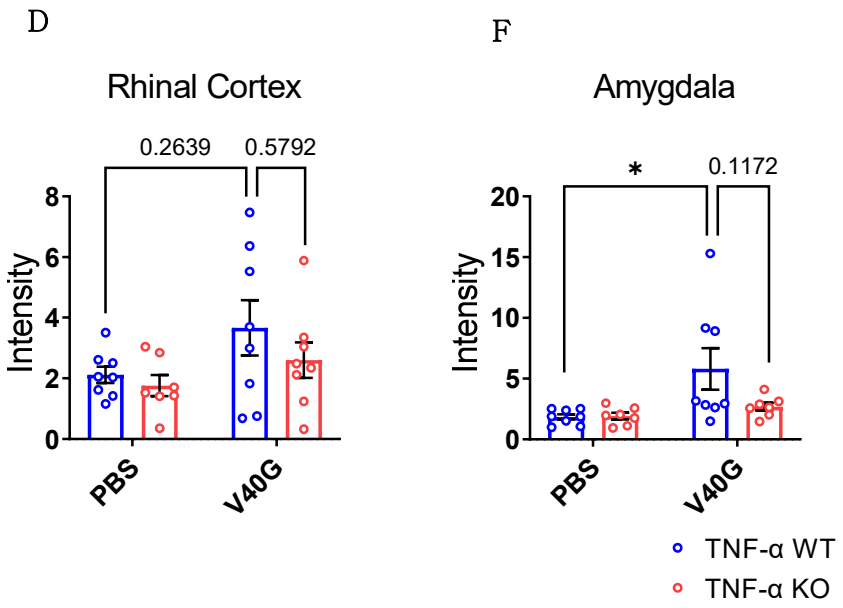


그림 6. 알파 시뉴클린 전파된 지역에서 TNF-α 결손에 의해 비정상적인 미세아교세포 감소

(A) 운동피질, 대상엽, 내후각피질, 편도체에서 미세아교세포를 면역조직화합염색법을 통해 확인함. Scale bar, 100μm (B-E) PBS와 V40G를 주사한 TNF-α WT, KO 마우스에서 미세아교세포의 액틴(actin)에 붙는 특징적인 세포 내 단백질인 Iba I 항체의 광학 밀도를 측정함. (B) 운동피질(WT+PBS, n=8; KO+PBS, n=7; WT+V40G, n=8; KO+V40G, n=8), (C) 대상엽(WT+PBS, n=7; KO+PBS, n=6; WT+V40G, n=8; KO+V40G, n=8) (D) 내후각피질(WT+PBS, n=8; KO+PBS, n=7; WT+V40G, n=8; KO+V40G, n=8) (E) 편도체(WT+PBS, n=8; KO+PBS, n=7; WT+V40G, n=8; KO+V40G, n=7); Mean ± SEM; two-way ANOVA; *p<0.05, ns; not significant.

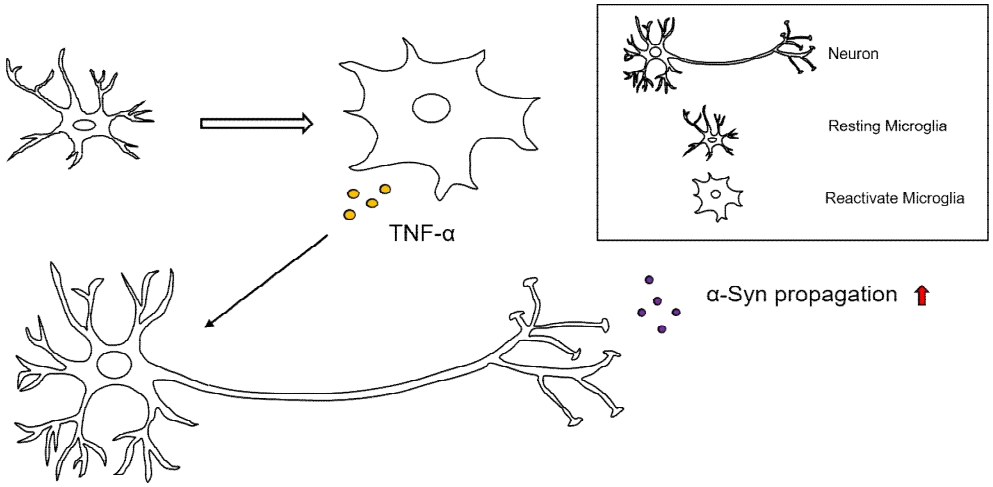


그림 7. V40G 주사 모델에서 알파 시뉴클린 전파와 미세아교세포 활성화에 종양괴사인자-α가 미치는 영향

고 찰

염증성 사이토카인 중 종양괴사인자-α가 파킨슨병 환자의 뇌에서 높은 수준으로 확인이 되고, 다양한 실험에서 종양괴사인자-α 신호전달이 파킨슨병과 관련된 발병에 영향을 주고 있을 것으로 예상된다[74, 89]. 신경염증반응이 단백질의 응집과 퇴행성 뇌질환의 발병에 중요한 요인으로 생각되지만 명확한 기전이 확실하게 밝혀지지 않은 상태이다. 특히 파킨슨병과 관련하여 신경염증반응에서 중요한 분자로 생각되는 종양괴사인자-α가 알파 시뉴클린의 응집과 축적, 전파에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 본 실험에서는 Wild type 알파 시뉴클린을 주사하였을 때 보다 더 빨리 전파되고 미세아교의 비정상적 증가와 병리 현상이 wild type 알파 시뉴클린을 주사하였을 때 보다 뚜렷하게 관찰[발표되지 않은 자료]된 알파 시뉴클린의 소섬유 형성을 방해하는 V40G 변종을[5] 이용하여 wild type 알파 시뉴클린보다 더 강한 병리현상을 유도하여 종양괴사인자-α의 영향을 보고자 하였다.

알파 시뉴클린병증의 병적인 상태를 확인하기 위해서 소섬유성 응집체의 표지인 129번째 세린(Ser129)에 인산화 되어있는 알파 시뉴클린을 면역조직화학염색법을 통하여 확인해보았다. V40G를 주사한 종양괴사인자-α WT, 종양괴사인자-α KO 마우스 그룹의 선조체에서는 많은 인산화 된 알파 시뉴클린이 확인되었으며, PBS를 주사한 마우스 그룹의 선조체에서는 인산화 된 알파 시뉴클린이 확인되지 않았다. 이는 V40G 변종이 일련의 과정을 통해 인산화 된 알파 시뉴클린을 유도하고 알파 시뉴클린의 응집과 전파를 야기할 수 있음을 의미한다. 또한 운동피질, 대상엽, 내후각피질, 편도체에서 인산화 된 알파 시뉴클린을 확인함으로써 V40G 주사에 의한 알파 시뉴클린의 전파를 확인하였다(그림 4B). 이를 통해 선조체에 V40G 변종 알파 시뉴클린을 주사함으로써 편도체를 포함하여 내후각피질, 대상엽, 운동피질까지 인산화 된 알파 시뉴클린을 유도할 수 있음을 확인하였다. 이 과정에서

종양괴사인자-α가 없는 종양괴사인자-α KO 마우스는 종양괴사인자-α WT 마우스보다 인산화 된 알파 시뉴클린이 유도되는 정도가 내후각피질을 제외한 대상엽, 편도체, 운동피질에서 훨씬 적었다(그림 4C,D,F). 내후각피질에서도 인산화 된 알파 시뉴클린은 종양괴사인자-α KO 마우스에서 감소하는 경향성을 확인하였다(그림 4E). 이는 종양괴사인자-α가 인산화 된 알파 시뉴클린의 유도에 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

신경염증이 신경아교세포와 높은 관련이 있기 때문에[59], 알파 시뉴클린의 병원성에 영향을 미치는 신경아교세포를 확인하기 위하여 대표적인 신경아교세포인 성상세포와 미세아교세포를 면역조직화학염색법을 통해 확인해보았다. 우선 성상세포는 종양괴사인자-α WT 마우스에 PBS를 정위주사 하였을 때 보다 V40G를 정위주사 하였을 때 내후각피질에서만 증가한 것을 확인하였고, 대상엽, 편도체, 운동피질에서의 차이는 통계적으로 유의미하지 않았지만 증가하는 경향성을 확인했다. 또한 V40G를 정위주사한 종양괴사인자-α KO 마우스에서 관찰되는 성상세포의 수와 크기는 V40G를 정위주사한 종양괴사인자-α WT 마우스에서 관찰되는 성상세포의 수와 크기와 차이가 없었다(그림 5B-F). 이는 종양괴사인자-α의 신호전달에 성상세포가 크게 관여하고 있지 않을 수 있음을 시사한다.

미세아교세포는 종양괴사인자-α WT 마우스에 PBS를 정위주사 하였을 때 보다 V40G를 정위주사 하였을 때 편도체에서만 증가한 것을 확인하였고, 대상엽, 내후각피질, 운동피질에서는 차이가 통계적으로 유의미하지 않았지만 증가하는 경향성을 확인했다. 또한 V40G를 정위주사한 종양괴사인자-α KO 마우스에서 관찰되는 미세아교세포의 수와 크기는 종양괴사인자-α WT 마우스에서 관찰되는 미세아교세포의 수와 크기와 크게 차이가 없었지만, 대부분의 지역에서 감소하는 경향성을 확인할 수 있었다(그림 6B-E). 이와 같이 각 그룹에서 확인된 미세아교세포의 수와 크기의 패턴(그림 6B-E)이 인산화 된 알파

시뉴클린의 패턴(그림 4C-F)과 비슷한 점을 확인함으로써 각 지역에서 알파 시뉴클린의 응집과 전파에서 종양괴사인자-α의 신호전달에는 성상세포보다는 미세아교세포가 관여하고 있을 것으로 추측된다.

종양괴사인자-α를 포함한 항염증 반응과 만성 염증(chronic inflammation)은 성장 정지, DNA 손상을 유발하며 정상 세포와 암세포에서 노화의 필수적인 요소로 생각되고 있다[105]. 세포 노화는 안정적인 세포 주기(cell cycle)를 정지시킴으로써 손상된 세포의 증식을 제한하는 종양 억제 방법으로 알려져 있다[106]. 세포 노화는 중추신경계에서 질병을 유도하는 하나의 요소로 생각되고 있으며, 미세아교세포의 노화는 염증성 사이토카인인 IL-1β, IL-6, 종양괴사인자-α가 높은 수준으로 확인된다는 특징이 있다[107]. 미세아교세포의 노화는 손상과는 독립적인 질병 관련 미세환경(microenvironment)을 제공함으로써 미세아교세포의 식세포 능력의 장애와 이동 장애 같은 비정상적인 기능을 유지하게 된다[108]. 또한 성상세포의 노화는 시냅스에서 세포 외 아연을 올바르게 처리하는 능력이 손상되어 환경의 불균형을 초래하여 신경세포의 죽음이나 손상을 야기한다[109]. 올리고덴드로사이트(oligodendrocyte)의 노화는 미엘린의 재생(remyelination)의 효율을 감소시켜 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS)에서 관찰되는 미엘린의 병리학적 감소를 야기한다[110]. 성상세포와 미세아교세포의 노화는 질병 상황에서 신경세포의 건강과 항상성에 주요한 영향을 미치며 적은 수의 노화된 세포로 조직의 항상성에 큰 영향을 미칠 것으로 생각된다[111]. 종양괴사인자는 사멸 수용체(death receptor)에 붙어 세포 자살(apoptosis)를 야기시킬 수 있는데, 이 중 종양괴사인자-α가 중요한 역할을 하고 있다[112]. 종양괴사인자-α만으로는 신경세포의 사멸을 유도할 수 없기 때문에 적절한 세포 환경이나 2차 신호가 신경세포의 사멸에 필요한 것으로 보인다[113]. 알츠하이머병과 파킨슨병과 같은 만성 질환과 관련된 퇴화 환경은 염증 유발 세포 사멸이 유도되거나 염증 유발 세포에 변화가 생겼을 때 이에 민감하게 반응할 가능성이

있다[114, 115]. 또한 해마의 절편을 이용한 실험에서 염증성 사이토카인을 추가하였을 때 장기강화작용(long-term potentiation, LTP)가 감소하는 것을 통해 염증성 사이토카인과 학습과 기억의 연관성에 대해 연구가 진행되었고[116], 이 중 종양괴사인자-α 신호 전달은 장기저하작용(long term depression, LTD)에 관련이 있다는 것을 밝혔다[117]. 또한 종양괴사인자-α는 이온 신호와 관련된 단백질에도 영향을 미칠 수 있다. 종양괴사인자-α에 의한 TNF-R1의 활성화는 배근 신경절(dorsal root ganglia, DRG) 신경세포에서 테트로도톡신 불감성(tetrodotoxin insensitive) Na+ channel 전류를 강화하며[118], 이와 반대로 피질 뉴런을 이용한 실험은 종양괴사인자-α 신호가 외부 K+ 전류를 증가시켜 사이토카인이 특정 신경세포의 특수형의 막 전위를 과분극(hyperpolarize)시키고 결과적으로 그 신경세포의 발화율(firing rates)를 낮추는 기능이 있다고 한다[119]. 이처럼 종양괴사인자-α는 세포 노화, 자가 사멸을 통한 신경세포 생존력(neuronal viability), 시냅스 가소성(synaptic plasticity), 이온의 항상성(ionic homeostasis)에 영향을 미칠 것으로 생각되며, 본 실험에서 사용된 모델에서도 해당 기능들을 확인해 볼 필요가 있다.

결 론

본 연구 결과를 통해 종양괴사인자-α는 알파 시뉴클린 전파 모델에서 알파 시뉴클린의 전파를 증가시키며, 성상세포의 활성화보다 미세아교세포의 활성화를 증가시킨다는 것을 확인함으로써 미세아교세포의 종양괴사인자-α 신호 전달이 알파 시뉴클린의 전파를 매개할 수 있음을 확인하였다(그림 7).

참고 문헌

1. Gao, H.M., et al., *Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease.* J Neurosci, 2003. **23**(4): p. 1228-36.
2. Ling, Z., et al., *Progressive dopamine neuron loss following supra-nigral lipopolysaccharide (LPS) infusion into rats exposed to LPS prenatally.* Exp Neurol, 2006. **199**(2): p. 499-512.
3. Gao, H.M., et al., *Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration.* J Neurosci, 2008. **28**(30): p. 7687-98.
4. Braak, H., et al., *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease.* Neurobiol Aging, 2003. **24**(2): p. 197-211.
5. Song, M.Y., *Role of seeded fibrillation in transcellular transmission of alpha-synuclein aggregates*. 2012, Konkuk university.
6. Soto, C. and S. Pritzkow, *Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases.* Nat Neurosci, 2018. **21**(10): p. 1332-1340.
7. Dugger, B.N. and D.W. Dickson, *Pathology of Neurodegenerative Diseases.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(7).
8. McCann, H., et al., *alpha-Synucleinopathy phenotypes.* Parkinsonism Relat Disord, 2014. **20 Suppl 1**: p. S62-7.
9. Irizarry, M.C., et al., *Nigral and cortical Lewy bodies and dystrophic nigral neurites in Parkinson's disease and cortical Lewy body disease contain alpha-synuclein immunoreactivity.* J Neuropathol Exp Neurol, 1998. **57**(4): p. 334-7.
10. Lantos, P.L., *The definition of multiple system atrophy: a review of recent developments.* J Neuropathol Exp Neurol, 1998. **57**(12): p. 1099-111.
11. Spillantini, M.G., et al., *Alpha-synuclein in Lewy bodies.* Nature, 1997. **388**(6645): p. 839-40.
12. Anderson, J.P., et al., *Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease.* J Biol Chem, 2006. **281**(40): p. 29739-52.
13. Luk, K.C., et al., *Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice.* Science, 2012. **338**(6109): p. 949-53.
14. Mahul-Mellier, A.L., et al., *The process of Lewy body formation, rather than simply alpha-synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(9): p. 4971-4982.
15. Karampetsou, M., et al., *Phosphorylated exogenous alpha-synuclein fibrils exacerbate pathology and induce neuronal dysfunction in mice.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 16533.

16. Doty, R.L., *Olfactory dysfunction in Parkinson disease.* Nat Rev Neurol, 2012. **8**(6): p. 329-39.
17. Braak, H., et al., *Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen.* J Neural Transm (Vienna), 2003. **110**(5): p. 517-36.
18. El-Agnaf, O.M., et al., *Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma.* FASEB J, 2003. **17**(13): p. 1945-7.
19. Kordower, J.H., et al., *Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease.* Nat Med, 2008. **14**(5): p. 504-6.
20. Li, J.Y., et al., *Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation.* Nat Med, 2008. **14**(5): p. 501-3.
21. Lee, H.J., S. Patel, and S.J. Lee, *Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates.* J Neurosci, 2005. **25**(25): p. 6016-24.
22. Lee, H.J., et al., *Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies.* J Biol Chem, 2010. **285**(12): p. 9262-72.
23. Breydo, L., J.W. Wu, and V.N. Uversky, *Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease.* Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(2): p. 261-85.
24. Theillet, F.X., et al., *Structural disorder of monomeric alpha-synuclein persists in mammalian cells.* Nature, 2016. **530**(7588): p. 45-50.
25. Bartels, T., J.G. Choi, and D.J. Selkoe, *alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation.* Nature, 2011. **477**(7362): p. 107-10.
26. Rovere, M., et al., *Refolding of helical soluble alpha-synuclein through transient interaction with lipid interfaces.* FEBS Lett, 2018. **592**(9): p. 1464-1472.
27. Clayton, D.F. and J.M. George, *The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease.* Trends Neurosci, 1998. **21**(6): p. 249-54.
28. Kahle, P.J., et al., *Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases.* J Neurochem, 2002. **82**(3): p. 449-57.
29. Negro, A., et al., *Multiple phosphorylation of alpha-synuclein by protein tyrosine kinase Syk prevents eosin-induced aggregation.* FASEB J, 2002. **16**(2): p. 210-2.
30. Chandra, S., et al., *A broken alpha -helix in folded alpha -Synuclein.* J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 15313-8.
31. Varkey, J., et al., *Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins.* J Biol Chem, 2010. **285**(42): p. 32486-93.
32. Rideout, H.J., et al., *Regulation of alpha-synuclein by bFGF in*

cultured ventral midbrain dopaminergic neurons. J Neurochem, 2003. **84**(4): p. 803-13.
33. Withers, G.S., et al., *Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons.* Brain Res Dev Brain Res, 1997. **99**(1): p. 87-94.
34. Kholodilov, N.G., et al., *Increased expression of rat synuclein in the substantia nigra pars compacta identified by mRNA differential display in a model of developmental target injury.* J Neurochem, 1999. **73**(6): p. 2586-99.
35. Vila, M., et al., *Alpha-synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP.* J Neurochem, 2000. **74**(2): p. 721-9.
36. Fortin, D.L., et al., *Neural activity controls the synaptic accumulation of alpha-synuclein.* J Neurosci, 2005. **25**(47): p. 10913-21.
37. Murphy, D.D., et al., *Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons.* J Neurosci, 2000. **20**(9): p. 3214-20.
38. Burre, J., et al., *Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro.* Science, 2010. **329**(5999): p. 1663-7.
39. Chandra, S., et al., *Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration.* Cell, 2005. **123**(3): p. 383-96.
40. Humeau, Y., et al., *A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15300-5.
41. Zeniou-Meyer, M., et al., *Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage.* J Biol Chem, 2007. **282**(30): p. 21746-57.
42. Conway, K.A., et al., *Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 571-6.
43. Uversky, V.N., J. Li, and A.L. Fink, *Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation.* J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 10737-44.
44. Uversky, V.N., J. Li, and A.L. Fink, *Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure.* J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 44284-96.
45. Zimmerman, S.B. and S.O. Trach, *Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of Escherichia coli.* J Mol Biol, 1991. **222**(3): p. 599-620.
46. Greenbaum, E.A., et al., *The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation.* J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 7800-7.
47. Kruger, R., et al., *Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease.* Nat Genet, 1998. **18**(2): p. 106-8.
48. Li, J., V.N. Uversky, and A.L. Fink, *Effect of familial Parkinson's*

disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. Biochemistry, 2001. **40**(38): p. 11604-13.
49. Li, J., V.N. Uversky, and A.L. Fink, *Conformational behavior of human alpha-synuclein is modulated by familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T.* Neurotoxicology, 2002. **23**(4-5): p. 553-67.
50. Polymeropoulos, M.H., et al., *Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease.* Science, 1997. **276**(5321): p. 2045-7.
51. Zarranz, J.J., et al., *The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia.* Ann Neurol, 2004. **55**(2): p. 164-73.
52. Periquet, M., et al., *Aggregated alpha-synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity in vivo.* J Neurosci, 2007. **27**(12): p. 3338-46.
53. Bieschke, J., et al., *EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(17): p. 7710-5.
54. Fujiwara, H., et al., *alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions.* Nat Cell Biol, 2002. **4**(2): p. 160-4.
55. Nishie, M., et al., *Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in the brain and peripheral ganglia of patients with multiple system atrophy.* Acta Neuropathol, 2004. **107**(4): p. 292-8.
56. Okochi, M., et al., *Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein.* J Biol Chem, 2000. **275**(1): p. 390-7.
57. Mbefo, M.K., et al., *Phosphorylation of synucleins by members of the Polo-like kinase family.* J Biol Chem, 2010. **285**(4): p. 2807-22.
58. Lee, K.W., et al., *Enhanced phosphatase activity attenuates alpha-synucleinopathy in a mouse model.* J Neurosci, 2011. **31**(19): p. 6963-71.
59. Liu, B., H.M. Gao, and J.S. Hong, *Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation.* Environ Health Perspect, 2003. **111**(8): p. 1065-73.
60. McGeer, P.L., et al., *Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains.* Neurology, 1988. **38**(8): p. 1285-91.
61. Lewicki, H., et al., *T cells infiltrate the brain in murine and human transmissible spongiform encephalopathies.* J Virol, 2003. **77**(6): p. 3799-808.
62. Williams, A.E., S. Ryder, and W.F. Blakemore, *Monocyte recruitment into the scrapie-affected brain.* Acta Neuropathol, 1995. **90**(2): p. 164-9.
63. Aloisi, F., *The role of microglia and astrocytes in CNS immune surveillance and immunopathology.* Adv Exp Med Biol, 1999. **468**: p. 123-33.

64. Hansson, E. and L. Ronnback, *Astrocytes in glutamate neurotransmission.* FASEB J, 1995. **9**(5): p. 343-50.
65. Diedrich, J., et al., *The molecular pathogenesis of astrogliosis in scrapie and Alzheimer's disease.* Microb Pathog, 1987. **2**(6): p. 435-42.
66. Giulian, D., et al., *Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia.* J Exp Med, 1986. **164**(2): p. 594-604.
67. Iravani, M.M., et al., *Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration.* Neuroscience, 2002. **110**(1): p. 49-58.
68. Lee, S.C., et al., *Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta.* J Immunol, 1993. **150**(7): p. 2659-67.
69. Fontana, A., et al., *Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells.* J Immunol, 1982. **129**(6): p. 2413-9.
70. Wake, H. and R.D. Fields, *Physiological function of microglia.* Neuron Glia Biol, 2011. **7**(1): p. 1-3.
71. Garden, G.A. and T. Moller, *Microglia biology in health and disease.* J Neuroimmune Pharmacol, 2006. **1**(2): p. 127-37.
72. Mosley, R.L., et al., *Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease.* Clin Neurosci Res, 2006. **6**(5): p. 261-281.
73. Harms, A.S., et al., *MHCII is required for alpha-synuclein-induced activation of microglia, CD4 T cell proliferation, and dopaminergic neurodegeneration.* J Neurosci, 2013. **33**(23): p. 9592-600.
74. Mogi, M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients.* Neurosci Lett, 1994. **165**(1-2): p. 208-10.
75. Maher, J.J., *Cytokines: overview.* Semin Liver Dis, 1999. **19**(2): p. 109-15.
76. Ramesh, G., A.G. MacLean, and M.T. Philipp, *Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain.* Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 480739.
77. Zhu, H., et al., *Role and mechanisms of cytokines in the secondary brain injury after intracerebral hemorrhage.* Prog Neurobiol, 2019. **178**: p. 101610.
78. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
79. Kriegler, M., et al., *A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF.* Cell, 1988. **53**(1): p. 45-53.
80. Lokensgard, J.R., et al., *Robust expression of TNF-alpha, IL-1beta, RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus.* J Neurovirol, 2001. **7**(3): p. 208-

19.
81. Lee, H., et al., *Necrotic neuronal cells induce inflammatory Schwann cell activation via TLR2 and TLR3: implication in Wallerian degeneration.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **350**(3): p. 742-7.
82. Barrat, F.J., et al., *Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus.* J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1131-9.
83. Kaushal, V. and L.C. Schlichter, *Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra.* J Neurosci, 2008. **28**(9): p. 2221-30.
84. McGeer, P.L., et al., *Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR.* Neurosci Lett, 1987. **79**(1-2): p. 195-200.
85. Jin, J.J., et al., *Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.* J Neuroinflammation, 2008. **5**: p. 23.
86. Blasko, I., et al., *TNFalpha plus IFNgamma induce the production of Alzheimer beta-amyloid peptides and decrease the secretion of APPs.* FASEB J, 1999. **13**(1): p. 63-8.
87. Janelsins, M.C., et al., *Chronic neuron-specific tumor necrosis factor-alpha expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice.* Am J Pathol, 2008. **173**(6): p. 1768-82.
88. Pasqualetti, P., et al., *A randomized controlled study on effects of ibuprofen on cognitive progression of Alzheimer's disease.* Aging Clin Exp Res, 2009. **21**(2): p. 102-10.
89. Mogi, M., et al., *Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain.* J Neural Transm (Vienna), 2000. **107**(3): p. 335-41.
90. Mogi, M., et al., *Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF-alpha induction.* Neurosci Lett, 1999. **268**(2): p. 101-4.
91. Sriram, K., et al., *Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease.* FASEB J, 2002. **16**(11): p. 1474-6.
92. Bessler, H., et al., *IL-1 beta, IL-2, IL-6 and TNF-alpha production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease.* Biomed Pharmacother, 1999. **53**(3): p. 141-5.
93. Chen, H., et al., *Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease.* Ann Neurol, 2005. **58**(6): p. 963-7.
94. Ton, T.G., et al., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease.* Mov Disord, 2006. **21**(7): p. 964-9.
95. Desplats, P., et al., *Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein.* Proc

Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 13010-5.
96. Ulusoy, A., et al., *Caudo-rostral brain spreading of alpha-synuclein through vagal connections.* EMBO Mol Med, 2013. **5**(7): p. 1119-27.
97. Luk, K.C., et al., *Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice.* J Exp Med, 2012. **209**(5): p. 975-86.
98. Masuda-Suzukake, M., et al., *Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain.* Brain, 2013. **136**(Pt 4): p. 1128-38.
99. Chung, H.K., et al., *Modeling alpha-Synuclein Propagation with Preformed Fibril Injections.* J Mov Disord, 2019. **12**(3): p. 139-151.
100. Pasparakis, M., et al., *Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response.* J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1397-411.
101. Khurana, R., et al., *Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils.* J Struct Biol, 2005. **151**(3): p. 229-38.
102. Styren, S.D., et al., *X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology.* J Histochem Cytochem, 2000. **48**(9): p. 1223-32.
103. Condello, C., et al., *Structural heterogeneity and intersubject variability of Abeta in familial and sporadic Alzheimer's disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(4): p. E782-E791.
104. Reinke, A.A. and J.E. Gestwicki, *Insight into amyloid structure using chemical probes.* Chem Biol Drug Des, 2011. **77**(6): p. 399-411.
105. Correia-Melo, C., G. Hewitt, and J.F. Passos, *Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence?* Longev Healthspan, 2014. **3**(1): p. 1.
106. Tchkonia, T., et al., *Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities.* J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 966-72.
107. Xie, Z., et al., *Aging and glial responses to lipopolysaccharide in vitro: greater induction of IL-1 and IL-6, but smaller induction of neurotoxicity.* Exp Neurol, 2003. **182**(1): p. 135-41.
108. Griciuc, A., et al., *Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta.* Neuron, 2013. **78**(4): p. 631-43.
109. Orre, M., et al., *Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice.* Neurobiol Aging, 2014. **35**(1): p. 1-14.
110. Franklin, R.J.M. and C. Ffrench-Constant, *Regenerating CNS myelin - from mechanisms to experimental medicines.* Nat Rev Neurosci, 2017. **18**(12): p. 753-769.
111. Nelson, G., et al., *A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence.* Aging Cell, 2012. **11**(2): p. 345-9.
112. Baker, S.J. and E.P. Reddy, *Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily.* Oncogene, 1998. **17**(25): p. 3261-70.
113. Badiola, N., et al., *Activation of caspase-8 by tumour necrosis factor receptor 1 is necessary for caspase-3 activation and apoptosis in*

oxygen-glucose deprived cultured cortical cells. Neurobiol Dis, 2009. **35**(3): p. 438-47.
114. Pratico, D., *Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows.* Ann N Y Acad Sci, 2008. **1147**: p. 70-8.
115. Tsang, A.H. and K.K. Chung, *Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(7): p. 643-50.
116. Tancredi, V., et al., *Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices.* Neurosci Lett, 1992. **146**(2): p. 176-8.
117. Albensi, B.C. and M.P. Mattson, *Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity.* Synapse, 2000. **35**(2): p. 151-9.
118. Jin, X. and R.W.t. Gereau, *Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha.* J Neurosci, 2006. **26**(1): p. 246-55.
119. Houzen, H., et al., *Tumor necrosis factor enhancement of transient outward potassium currents in cultured rat cortical neurons.* J Neurosci Res, 1997. **50**(6): p. 990-9.

Abstract

Effect of inflammatory factor TNF-α on α-synuclein protein propagation in mice

Jeong-Tae Kim
Department of Biomedical Science
The Graduate School
Seoul National University

Parkinson's diseases is a neurodegenerative disease characterized by aggregation and propagation of α-synuclein protein, and it is known that neuroinflammation affects protein aggregation and is associated with the degeneration of dopaminergic neurons. Neuroinflammatory reactions are thought to be an important factor in protein aggregation and neurodegenerative diseases, but the mechanism is not clearly identified. Based on in vitro results that TNF-α increases the cell-to-cell propagation of α-synuclein, I investigated whether TNF-α also affects the propagation of a-synuclein in a mouse model.

In the previous study, when the V40G variant of α-synuclein was injected into the striatum of the mouse, phosphorylated α-synuclein

was identified in the mouse brain. When the V40G variant was injected, it spreaded faster than when wild type α-synuclein was injected; abnormal increase in microglia and inflammatory reactions were clearly observed. Therefore, in this study, I tried to investigate the effect of TNF-α on a-synuclein propagation using the V40G variant. In addition, I examined the changes in astrocyte and microglia to identify which glial cells affect propagation of α-synuclein. As a result, I found that the propagation of α-synuclein was decreased in the motor cortex, cingulate cortex, rhinal cortex, and amygdala of TNF-α KO mice compared to WT mice. In addition, TNF-α KO mice showed a decrease in microgliosis in various brain regions compared to WT mice, whereas astrogliosis was not changed.

This study suggests that TNF-α and microglia play an important role in the propagation of α-synuclein, implicating the role of TNF-α signaling in progression of synucleinopathy.

Keywords : Neurodegenerative diseases, α-synuclein, propagation of α-synuclein, neuroinflammation, TNF-α, microglia

Student Number : 2020-29580