creative commons
COMMONS DEED

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

dCollection

[UCI]I804:48009-200000366465

이학석사 학위논문

ADAM10 매개 품질 제어에 의한 프리온 단백질 독성 기전 연구

Molecular basis of prion proteotoxicity induced by ADAM10-mediated peripheral quality control

울 산 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

신 예 진

ADAM10 매개 품질 제어에 의한 프리온 단백질 독성 기전 연구

지 도 교 수　　강 상 욱

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2021 년　02 월

울 산 대 학 교 대 학 원

의　과　학　과

신　예　진

신예진의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 강 민 지 인

심사위원 송 영 섭 인

심사위원 강 상 욱 인

울 산 대 학 교 대 학 원

2021 년 02 월

국문 요약

비정상적인 구조의 GPI-고정 단백질의 세포 내 유입 (endocytosis)은 종종 돌연변이 선택적 방식으로 세포막 (plasma membrane, PM)에서 조절되며, 이는 구조적 독성이 예측되는 단백질로부터 세포의 단백질 유입 경로 (endocytic pathway)의 안전을 보장한다는 점에서, 세포에 유리한 전략임이 분명하다. 본 연구에서는, ADAM10을 통해 급속한 세포막 회전율 및 세포 외 방출을 겪는 병원성 프리온 단백질 (PrP) 돌연변이 (Q212)의 선제적 품질 관리 (preemptive quality control, pQC)를 입증함으로써, 세포막 매개 단백질 유입 조절 기전과 생리학적 중요성에 대한 분자적 기초를 제시한다.

Q212P에 대한 ADAM10 매개 분류 반응은 소포체 (ER) 및 PM에서 발생한다. ER에서 비활성 형태의 ADAM10은 새로 합성된 Q212P를 인식하고 ER 내보내기를 가속화하며, 후속 분비 경로를 통과하는 동안 획득된 활성 ADAM10의 sheddase 활성이 막에 연결된 GPI 앵커에서 Q212P를 절단하여 가용성 Q212P가 원형질막에서 빠르게 방출되도록 한다. 이 과정은 산화 환원 섭동에 의해 저해되고, 세포 표면에 Q212P 올리고머를 축적시키지만, 산화 환원 회복에 의해, Q212P 올리고머는 결국 세포 밖으로 가역적으로 방출되며, 방출된 Q212P 올리고머는 주변 세포에 단백질 독성을 유발한다. 하지만, ADAM10 결핍 유도를 통해, Q212P 올리고머의 세포 외 방출을 억제할 수 있으며, 결국, 세포의 생존 가능한 회복 능력을 증진시킬 수 있다.

이 연구는 단백질 독성을 유발하는 병원성 프리온을 선택적으로 제거하는 신규 개념의 말초 품질 관리 기전 (peripheral quality control)의 분자생물학적 기전과, 예기치 못했던 생리학적 유해성에 대한 기초 지식을 제공한다.

중심 단어 : 프리온 단백질, ADAM10, 단백질 품질관리, 단백질 분해, 소포체

차례

국문요약 ····· i

차례 ····· ii－iii

그림 목차 ····· iv－vi

서론 ····· 1－2

연구방법 ····· 3－8

1. 항체 및 시약 ····· 3

2. 분자생물학 실험 ····· 3－5

3. 세포 배양 실험 ····· 5－6

4. 생화학 실험 ····· 6－8

연구결과 ····· 9－15

1. 특이적 대사 패턴의 인간 프리온 돌연변이 발견 ····· 9－10

2. Q212P 돌연변이의 세포 외 방출 ····· 10－11

3. ADAM10에 의한 Q212P 돌연변이의 세포 외 방출 ····· 11－13

4. 산화－환원 반응 교란에 의한 독성 Q212P 올리고머 생성 ····· 13－14

5. ADAM10 결핍에 의한 Q212P 올리고머의 단백질 독성 완화 ····14-15

고찰 ·····48-50

참고문헌 ·····51-53

Abstract ·····54

그림 목차

표 1. Primer sequence ·····4-5

그림 1. 야생형 프리온과 Q212P의 대사 패턴 ·····16

그림 2. 야생형 프리온과 Q212P의 발현 위치 가시화 ·····17

그림 3. 야생형 프리온과 Q212P의 당수식 패턴 분석 ·····18

그림 4. 당수식된 야생형 프리온과 Q212P의 정량적 비교 ·····19

그림 5. RFP 융합 프리온의 라이소좀 분해에 의한 자유 RFP 생성 ·····20

그림 6. RFP 융합 야생형 프리온과 Q212P의 당수식 패턴 변화에 의한 대사 분석과 세포 내 유입량 분석 ·····21

그림 7. 세포 외 트립신 처리에 의한 세포막 프리온의 선택적 제거 ·····22

그림 8. 프리온의 세포 외 방출 ·····23

그림 9. N-EM에 의한 프리온의 세포 외 방출량 분석 ·····24

그림 10. ADAM10 결핍 세포주 제작 ·····25

그림 11. ADAM10 결핍 세포에서 N-EM에 의한 프리온의 세포 외 방출량 분석 ·····26

그림 12. ADAM10 결핍 세포의 프리온 세포 외 방출 ·····27

그림 13. ADAM10 결핍에 의한 Q212P 발현 변화 분석 ·····28

그림 14. ADAM10 결핍 세포에서 프리온 세포 내 유입량 분석 ·····29

그림 15. GFP 나노항체(nanobody) 정제 ·····30

그림 16. 나노항체를 이용한 세포 표면의 프리온의 선택적 검출 ·····31

그림 17. 근접 기반 비오틴화(proximity-based biotinylation) 최적화 ·····32

그림 18. 야생형 프리온과 Q212P의 근접 기반 비오틴화 ·····33

그림 19. 세포 표면에서의 Q212P와 상호작용하는 활성 ADAM10 검출 ·····34

그림 20. ADAM10과 Q212P의 상호작용 분석 ·····35

그림 21. Q212P 위치 변화에 미치는 ADAM10의 영향 ·····36

그림 22. ADAM10 결핍에 의한 Q212P의 당수식 및 트래피킹 변화 분석 ···37

그림 23. ADAM10 결핍 세포에서 RFP 융합 Q212P의 당수식 패턴 분석 ···38

그림 24. Q212P의 당수식 패턴에 미치는 소포체 스트레스의 영향 ·····39

그림 25. ADAM10 결핍 세포에서 Q212P의 당수식 패턴에 미치는 소포체 스트레스의 영향 ·····40

그림 26. Tg에 의한 RFP 융합 Q212P 대사 분석 ·····41

그림 27. DTT에 의한 RFP 융합 Q212P 대사 분석 ·····42

그림 28. 소포체 스트레스에 의한 RFP 융합 Q212P의 세포 외 방출 변화 분석 ·····43

그림 29. ADAM10 결핍이 Q212P 올리고머 생성에 미치는 영향 분석 ·····44

그림 30. ADAM10 결핍이 Q212P 올리고머의 세포 외 방출에 미치는 영향 분석 ·····45

그림 31. ADAM10이 산화-환원 섭동으로부터의 세포 생존 회복능에 미치는 영향 분석 ·····46

그림 32. 병원성 프리온의 잠재적 말초 품질관리 기전 ·····47

서론

잘못 접힌 단백질 (misfolded protein)이 세포 내에 축적되지 않도록 하는 것은 세포 항상성에 필수적이며, 이는 단백질 처리 과정의 균형이 무너져 세포의 생존에 위협이 되면 활성화되는 단백질 품질관리 (protein quality control)에 의해 유지된다. 이 과정은 세포 내 신호 전달, 이온 전달, 세포 간 소통에 중요한 역할을 하는 막단백질 (membrane protein)에게 특히 중요하다. 세포질 단백질 (cytosolic protein)과 달리 막단백질은 정교한 메커니즘을 통해 소포체로 들어가는 동시에 번역 (co-translation)되며 접히고 조립된다[1,2]. 이 복잡한 과정은 종종 돌연변이 (mutation)나 번역 오류, 환경적 스트레스에 의해 교란되며, 막단백질이 소포체에 축적될 경우, 소포체 기능을 손상시킨다[3].

잘못 접힌 막단백질이 소포체에서 축적되면, 세포는 소포체 매개 단백질 분해 (ER-associated degradation, ERAD) 기전을 활성화시켜 이를 식별하고 소포체 막으로부터 분리해 제거한다[4,5]. 하지만 소포체 막에 공유결합적으로 연결되어있는 GPI (glycosylphosphaticylinositol)가 막단백질의 C-말단에 연결되어 소포체 막에 결합되어 있다면 ERAD로 제거될 수 없으며, 대신, 세포막으로 이동 후 다시 세포 내로 유입되어 라이소좀 (lysosome)에서 분해된다[6]. 이 과정은 기질 선택적으로, 소포체 스트레스에 의해 가속화 된다 (이는 'RESET', rapid ER stress-induced export 과정이라고 한다). RESET에 의해 단백질의 분비 기전이 가속화되는 전형적인 기질 단백질로 프리온 단백질 (prion protein, PrP)이 있다[7,8].

프리온 단백질은 정상 형태 (PrP^{c})에서 병원성 형태 (PrP^{sc})로 구조가 변형됨으로써 치명적 신경병성 장애 (fatal neurodegenerative disorder)를 일으킬 수 있는 단백질이다[9]. 형태학적 결함이 있는 프리온의 생성 기전은 아직 명확히 밝혀진 바가 없지만, 스트레스를 받은 소포체로부터 방출된, 잘못 접힌 프리온이 골지체와 세포막에서 활성화되는 품질관리 기전 (peripheral quality control, periQC)에 의해 선택적으로 제거된다는 것이 입증되었으며, 이는 프리온의 형태

변화로 인한 축적 원인이 periQC의 결함에 있을 가능성을 제시한다[10,11].

Protein quality control의 궁극적인 목적은 비정상 단백질의 제거에 있다. 프리온을 포함한 GPI-고정 단백질들의 제거는 주로 라이소좀에서 일어난다. 하지만, GPI sequence를 가진 30개 이상의 질병 유발 돌연변이 중 상당한 수의 프리온 돌연변이가 정상과 다른 세포 내 이동, 대사 패턴을 보임에도 불구하고 단백질 독성 (proteotoxicity)을 보이지 않는다는 실험적 증거들은[12,13] 돌연변이 특이적 periQC가 세포에 확립되어 있음을 의미한다. 이때, periQC에 기여하는 핵심 인자들이 돌연변이 프리온을 인식하여 라이소좀으로 전달하는 것으로 판단된다. 예를 들어, Tmp21은 free-thiol을 가진 돌연변이 프리온 (C179A)을 소포체에서 인식하고 빠르게 수송한다[7]. 최근에 C179A는 ER-resident chaperon과 cargo receptor들과 복합체를 형성함으로 분비 경로를 통과하는 동안 안정성을 획득하며, 라이소좀까지 안정적으로 이동되는 것으로 확인되었다[14]. 이 과정은 비정상적인 구조의 프리온 단백질이 보유한 자유 티올기 (free-thiol group)에 의해 촉진되며, 자유 티올기가 환원될 경우, 세포막에서 라이소좀으로의 유입이 억제된다 (이는 'pmQC', plasma membrane quality control 이라고 한다)[15].

pmQC는 세포 독성이 예측되는 프리온으로부터 세포를 보호하는데 유리한 전략임이 분명하지만, 실질적으로 소포체와 세포막에서 pmQC의 기질이 어떻게 선별되는지는 밝혀지지 않았다. 본 연구를 통하여, pmQC의 기질이 되는 인간 병원성 돌연변이 프리온을 찾았다. 그리고 시공간적으로 병원성 프리온의 대사를 분석하고, 프리온의 분해 과정에 밀접하게 관련된 pmQC의 핵심제어 인자로서 ADAM10을 도출하였다. 본 연구에서는 ADAM10에 의해 매개되는 병원성 프리온 선택적 세포 외 방출을 입증하였으며, 이에 기인한 예기치 않은 프리온 독성 유도와 유해성에 대한 타당성 실험적 근거를 제시한다.

연구 방법

항체 및 시약

본 연구에 사용된 항체 (antibody)는 다음과 같다. 프리온의 발현을 검출하기 위해, PrP-A와 3F4 (BioLegend; San Diego, CA, USA) 항체를 사용하였고, RFP, GFP, ADAM10은 Milipore Sigma (Burlington, MA, USA)에서 구입하였다. TRAPalpha (cysteine plus residue 272-286)와 Sec61beta (residues 2-10 plus a cysteine)는 Lampire Biological Laboratories를 통해 keyhole limpet hemocyanin이 붙은 peptide를 토끼에 주입하여 회수한 항혈청으로 검출하였다.

Endoglycosidase H (Endo H), peptide N-glycosidase (PNGase F)를 포함한 수식 및 제한 효소들은 New England Biolabs에서 구입하였다. Trypsin, N-ethylmaleimide, Bafilomycin-A1, Thapsigargin은 MiliporeSigma에서 구입하였다.

분자생물학 실험

인간 프리온 단백질 (human prion) (Genebank accession number : AB300823)의 유전자를 PCR 증폭하여 pcDNA5/FRT/TO vector (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)를 HindIII/XhoI으로 절단하여 삽입하였다 (pcDNA-FRT/TO-PrP). 부위-지향적 돌연변이 유발 (site-directed mutagenesis)를 통해 Q212P 돌연변이를 제작하였다. pcDNA-FRT/TO에 클로닝 된, 야생형과 Q212P 유전자내 Bsu36I에, PCR 증폭된 GFP 및 RFP 유전자를 삽입하여, 형광 단백질이 융합된 PrP를 발현하는 플라스미드 벡터를 제작하였다. ADAM10 유전자는 동일한 방법으로 클로닝하되, pcDNA-FRT/TO-HA 벡터에 클로닝하여, C-말단에 HA가 융합된 ADAM10을 발현하는 플라스미드 벡터를 제작하였다.

Guide RNA는 lentiGuide-puro vector (Addgene; Watertown, MA,USA, plasmid #52963)의 BsmBI 제한 효소 부위에 미리 디자인된 3가지 ADAM10 표적 시퀀스 (https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design)를 삽입하여 제작하였다. 제작한 플라스미드 벡터는 Cosmogenetech에 의뢰하여 DNA 시퀀스를 확인하였다.

ADAM10 의 유전자 편집은 역 전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)과, 면역블러팅 (immunoblotting)으로 확인하였다. RNA extraction 은 Total RNA Purification Mini kit (FAVOGEN, Pingtung, Taiwan)을 사용하였고, 분리된 RNA 는 nanodrop2000 (Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA)으로 농도를 측정하였다. cDNA 는 SuperScriptⅢ (Invitrogen)를 이용해 RNA 500 ng 으로 합성하였다. 그리고 표 1 의 ADAM10 RT-PCR F, R primer 를 이용해 PCR 하여 증폭시켰다.

표 1. Primer sequence

primer	Sequence (5’ - 3’)
Human prion(wild) F	CGC AAG CTT ACC ATG GCG AAC CTT GGC TGC TGG ATG
Human prion(wild) R	CGC CTC GAG TCA TCC CAC TAT CAG GAA GAT GAG
Human prion(Q212P) F	GAG CGC GTG GTT GAG CCG ATG TGT ATC ACC CAG
Human prion(Q212P) R	CTG GGT GAT ACA CAT CGG CTC AAC CAC GCG CTC
sgADAM10 #1 F	CAC CGC CCA TAA ATA CGG TCC TCA G

sgADAM10 #1 R	AAA CCT GAG GAC CGT ATT TAT GGG C
sgADAM10 #2 F	CAC CGG AAG GAT TCA TCC AGA CTC G
sgADAM10 #2 R	AAA CCG AGT CTG GAT GAA TCC TTC C
sgADAM10 #3 F	CAC CGT TTC AAC CTA CGA ATG AAG A
sgADAM10 #3 R	CAC CGT TTC AAC CTA CGA ATG AAG A
ADAM10 RT-PCR F	CTT AAG CTT ACC ATG GTG TTG CTG AGA GTG TTA
ADAM10 RT-PCR R	ACT GGA TAT CTG GGC AAT CAC AGC TTC

F : forward R : reverse

세포 배양 실험

Flp-In T-REx 293 세포는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였고, 10 % fetal bovine calf serum (Corning, NY, USA)을 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에서, 5 % CO_2, 37 ℃에서 배양하였다. DNA 의 세포내 도입은 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하였으며, doxycycline (10 ng/ml) (약 16 시간)에 의해 발현이 안정적으로 유도 (induction) 되는 293 기반 세포주를 제작하였다. 제작된 세포주에 세가지의 LentiGuide-Puro-sgADAM10 와 pcDNA-Cas9 를 혼합하여 도입하고, puromycin 에 저항성을 나타내는 세포를 선별하여 ADAM10 결핍 세포주를 제작하였다.

세포 내 프리온의 위치를 확인하기 위해서 공초점 현미경 (confocal microscope) (Zeiss LSM780; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 가시화한 후, ZEN2012 프로그램을 이용해 분석하였다. 세포의 단백질 독성을 비교하기 위해서는 집락 형성법 (colony forming assay)을 이용하였다.

대조군과 실험군 세포를 100 개씩 35 mm 6 well plate 에 분주한 후, 2 주간 doxycycline (10 ng/ml) 처리하며 배양하였다. 집락 (colony)이 형성되면 staining buffer (6 % glutaraldehyde, 0.5 % crystal violet)으로 하루 간 염색 후, GelCount (Oxford Optronix, Abington, UK)으로 분석하였다.

생화학 실험

야생형 프리온과 Q212P 돌연변이 프리온 단백질의 합성/분해의 차이는 펄스-체이스 실험을 통해 비교 분석하였다. 프리온을 발현하는 세포주를 serum-free & methionine/cysteine-free media 로 30 분간 starvation 한 후, trans-labeling mixture ($[^{35}S]$-methionine/cysteine) (PerkinElmer, Watham, MA, USA)으로 30 분 또는 6 시간 동안 단백질에 동위원소를 표지 하였다. 체이스(chase)를 위해, 동위원소를 제거한 정상 세포 배양액으로 바꿔주었고, 시간에 따라 세포를 용해하였다. 각 세포는 1 XPBS 로 세척한 후, lysis buffer (1 % SDS, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5)를 넣고 끓이면서 용해하였다. 그리고 IP buffer (1 % TritonX-100, 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.5, 150 mM NaCl)으로 10 배 희석하였다. 세포 배양액에서 프리온을 검출할 때는, 배양액을 모아 3000 rpm 에서 10 분간 원심분리하고, 0.45 uM filter (Thermo fisher scientific)로 필터 한 후, 1/10 배의 10 % SDS 를 혼합하였다. 항체를 첨가한 후, 4 ℃ 90 분 동안 결합시키고, protein G Mag Sepharose (GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA, USA) 또는 protein A agarose (Bio-rad, Hercules, California, USA) bead 와 90 동안 결합시켜 면역침강하였다. Bead 는 IP buffer 로 5 회 세척한 후, 30 ul 2 X SDS-PAGE sample buffer 로 회수하였다. 10 ul 의 샘플을 10 분간 끓이고, 10 % Tricine gel 에 분리시킨 후, 자기 방사법 (autoradiography)으로 x-ray 필름에 노출시켰다.

ADAM10 과 프리온 단백질의 세포내 상호작용은 공동 면역침강 (co-immunoprecipitation)을 통해 확인하였다. 프리온을 발현하는 세포의 세포질

단백질은 semi-permeabilize buffer (0.015 % digitonin, 110 mM KoAC, 20 mM HEPES, 2 mM MgAC)을 이용하여 선택적으로 제거하였으며, 막 단백질을 포함한 잔류물은 lysis buffer (2 % digitonin, 50 mM HEPES, 1 mM DTT, 150 mM NaCl, 2 mM MgAC)으로 용해하였다. 프리온과 결합하는 PrP-A 항체와 4 ℃ 90 분 동안 결합시키고, protein G Mag Sepharose bead 와 90 동안 결합시켜 면역침강하였다. bead 는 0.2 % digitonin buffer 로 5 회 세척한 후, 30 ul 2X SDS-PAGE sample buffer 로 회수하였다. 10 ul 의 샘플을 10 분간 끓이고, 10 % Tricine gel 에 분리 시킨 후, ADAM10 항체로 웨스턴 블러팅하였다.

축적된 프리온 단백질의 양은 웨스턴 블러팅을 통해 분석하였다. 200 ul Lysis buffer (1 % SDS, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5)에 용해된 총 단백질을 SDS-PAGE sample buffer 와 섞은 후, 10 ul 을 10 % Tricin gel 에 전기영동 (SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)으로 분리시켰다. 그리고 nitrocellulose (NC) membrane 을 이용해 wet transfer system (Bio-rad) 하였다. Membrane 은 30 분 동안 5 % skim milk in PBS-T (1 X PBS, 0.1 % Tween-20)에서 blocking 시킨 후, 1 차 항체 1 시간, 30 분 세척, houseradish peroxidase (HRP)가 결합된 2 차 항체 1 시간, 1 시간 세척하였다. 그리고 SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo fisher scientific)에 3 분간 반응시킨 후, C-DiGit Blot Scanner (LI-CDR)를 이용해 확인하였다.

세포막에 노출된 GFP 융합 프리온 단백질은 *BL21(DE3)pLysS Escherichia coli (E. coli)*에서 합성한 재조합 GFP 나노항체 (nanobody)를 이용해 선택적으로 검출할 수 있다. 나노항체는 cobalt chloride 가 결합된 chelating Sepharose bead 를 이용해 정제하였고, 12 % TGX gel (Bio-rad)에서 확인한 후(그림 15), BCA assay (Thermo fisher scientific)으로 농도를 측정하였다. 세포 표면에 나노항체는 10 % FBS 가 들어있는 PBS 에 100 nM 4 ℃ 30 분 처리하여 표지하였다. 잔류 나노항체는 PBS 로 세척하여 제거하고, 나노항체가 표지된 세포를 CHAPS buffer (1 % CHAPS, 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl)에 용해시킨 뒤 13.3 krpm 4 ℃ 10 분 원심분리하였다.

GFP 나노항체가 결합된 세포막 프리온과 선택적으로 상호작용하는 ADAM10 은 근접기반 비오틴화 (proximity-based biotinylation)를 통해 검출할 수 있다. APEX 가 결합되어 있는 나노항체를 10 % FBS 를 포함하는 PBS 에 100 nM 농도로 4℃에서 30 분간 반응하여 세포막 프리온 단백질을 표지한 후, 잔류 나노항체는 PBS 로 세척하여 제거하였다. 25 ℃에서 500 uM biotin-phenol (Iris Biotech LS-3500)을 넣고 1 mM H_2O_2 (Sigma) 1 분간 반응시킨 후, quenching buffer (1 XPBS, 10 mM sodium ascorbate, 5 mM Trolox, 10 mM sodium azide (sigma))으로 3 번 세척하였다. 비오틴화 된 세포는 용해 후 streptavidin-HRP 항체로 면역블러팅 (immunoblotting) 하였다. 또는 면역침강이 필요한 경우에는 minute plasma membrane isolation and cell fractionation KIT (Invent, Minneapolis, USA)로 세포막 단백질을 분리한 후, Urea buffer (8 M urea, 50 mM Tris, pH 7.4, protease inhibitor, 1 mM DTT)에 용해시키고 streptavidin bead (GE Healthcare Life Sciences)로 면역침강하였다. 그 후, 필요한 항체로 면역블러팅을 하거나, SYPRO RUBY protein gel staining (Invitrogen)으로 염색하였다.

연구 결과

특이적 대사 패턴의 인간 프리온 돌연변이 발견

본 연구는 병원성 돌연변이인 Q212P 프리온 단백질이 세포 내에서 야생형 프리온 단백질과는 다른 대사 패턴을 보이는 것에서부터 시작되었다. 야생형 프리온 단백질은 비 당수식, 단일 당수식, 2중 당수식, 완전 당수식, 총 4가지 다른 형태로 합성된다[13]. 이와 달리 Q212P는 2중 당수식, 완전 당수식, 2가지 형태만 보이며, 여러 당수식이 복합적으로 이루어진 완전 당수식은 야생형 프리온보다 많은 양이 합성된다. 또 다른 병원성 돌연변이인 H187R에서는 보이지 않는 패턴인 것으로 보아, 돌연변이 프리온 단백질의 전형적인 패턴이 아닌 Q212P에 특이적인 것으로 보인다 (그림 1). 또한 녹색 형광 단백질 (GFP)을 삽입한 야생형 프리온과 적색 형광 단백질 (RFP)을 삽입한 Q212P 프리온의 세포 내에서 위치를 겹쳐보았을 때, 대부분 일치하는 것을 보아, Q212P 돌연변이는 일반적인 프리온 단백질의 발현 위치에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다 (그림 2).

Q212P의 대사 과정을 더 정확히 이해하고자 펄스-체이스 (pulse-chase) 실험을 진행하였고, Q212P와 야생형 프리온이 소포체에서 합성되어 세포 표면으로 이동하는데 까지의 당수식 단계를 비교, 분석하였다[13]. 펄스 동안 새롭게 합성된 Q212P와 야생형 프리온은 미묘하게 다른 패턴을 보였다. 야생형 프리온은 비 당수식 (~13 %), 단일 당수식 (~28 %), 2중 당수식 (~59 %) 형태로 합성되는 반면, Q212P는 대부분이 2중 당수식 (~81 %) 형태로 합성되었다 (그림 3). 체이스 동안 Q212P와 야생형 프리온은 30분 이내에 소포체에서 2중 당수식을 이루고, 1시간 이내에 골지체를 거쳐 완전 당수식되는 반면, 동일한 체이스 시간에서 Q212P는 야생형 프리온에 비해 더 많은 비율의 2중 당수식과 완전 당수식 형태를 가지고 있었다 (그림 4). 전체적으로 Q212P는 야생형 프리온과 같은 수송 과정을 거치지만, 야생형 프리온에 비해 빠른 당수식을 이루고 성숙한 형태로 만들어지며, 사라지는 속도 또한 빨랐다. 이는 Q212P가 수송 과정에 유리한 2중 당수식 형태로 빠르게 전환됨으로써, 소포체에서 세포 표면으로의 세

포 내 빠른 수송을 가능하게 하는 것으로 보인다.

Q212P 돌연변이의 세포 외 방출

프리온의 대사 패턴을 분석하기 위한 펄스-체이스 실험에서, 야생형 프리온과 달리 Q212P의 성숙형태 (mature form)가 4시간 체이스 때부터 사라지고 있는 것을 확인하였다 (그림 4). 이는 Q212P가 빠르게 세포 표면으로 수송되었다가, 선택적으로 라이소좀 (lysosome)으로 이동해, 분해가 촉진되었다는 것을 의미한다[7]. 이 논리를 확인하기 위해, 야생형 프리온과 Q212P가 라이소좀으로 전달되는 양을 비교할 수 있는 실험이 필요하였다. 적색 형광 단백질 (RFP)은 라이소좀의 산성 프로테아제 (protease)에 저항이 있어, 프리온에 RFP를 융합하면, 프리온은 사라지지만 남아있는 자유 RFP (free RFP)가 라이소좀에 잔류하며, 잔류 RFP의 양을 비교함으로 세포막에서 유입된 프리온의 양적 차이를 정량적으로 입증할 수 있다고 추론하였다 (그림 5)[15].

야생형 프리온과 Q212P에 RFP를 융합하고 펄스-체이스 실험을 하자, RFP를 융합하지 않은 채 실험을 했을 때와 동일한 당수식 패턴이 나타났다. 이를 통해 RFP 자체가 프리온의 대사 과정에 있어 교란을 일으키지 않는 것을 확인하였다. 또한 라이소좀의 활성을 저해하는 바필로마이신 (bafilomycin)은 프리온이 라이소좀에서 분해되어 나타나는 자유 RFP의 생성을 억제하였다. 이는 야생형 프리온과 Q212P이 일반적인 경로를 경유하여 라이소좀에서 분해되고 있음을 보여준다 (그림 6). 동일하게 펄스-체이스 실험을 하면서, 세포 밖으로 적은 농도의 트립신 (trypsin)을 처리해 세포 표면으로 노출되어 있는 완전 당수식된 프리온을 선택적으로 제거했을 때, 프리온은 합성 후 1시간 이내에 세포 표면에 도달하고, 2시간 내, 라이소좀에서 분해되어 free RFP가 보이기 시작했다 (그림 7). 공통적으로 알 수 있는 것은 야생형 프리온과 Q212P의 free RFP의 양이 체이스 시간에 따라 동일하게 증가한다는 것이다. 이는 Q212P의 분해를 위해 세포 내로 유입되는 양이 야생형 프리온과 동일함을 의미한다.

이처럼, 라이소좀에서 분해되는 양은 동일하지만 (그림 6) Q212P가 야생

형 프리온보다 세포막에서 빠르게 사라진다는 증거는 (그림 4), 세포가 Q212P를 선택적으로 세포막에서 제거하기 위해, 세포 안으로 유입시켜 라이소좀에서 분해하는 방법 외에 세포 밖으로 방출하는 알려지지 않은 신규 경로가 있음을 의미한다. 이를 확인하기 위해, 6시간 동안 펄스한 후, 세포와 세포 배양액에서 RFP 융합 프리온을 분리하였다. 세포에서 동위원소 표지된 새로 합성된 프리온은 총 N-말단 당수식 (glycan modification)을 비특이적으로 절단하는 PNGase F에 민감한 반면, 소포체에서 일어나는 N-말단 당 수식을 특이적으로 절단하는 Endo H에 저항력이 있는 것으로 보아, 골지체에서 당수식을 완료한 성숙한 프리온임을 예측할 수 있었다. 이와 같은 결과는, 세포 배양액에서 Q212P가 선택적으로 회수되며 라이소좀에 축적된 자유 RFP의 양이 다소 감소한다는 결과와 함께 (그림 8), Q212P가 특이적으로 세포 밖으로 방출됨을 의미한다.

ADAM10에 의한 Q212P 돌연변이의 세포 외 방출

Q212P 돌연변이가 야생형 프리온과 다르게 세포 밖으로 방출되는 현상을 통해 세포는 Q212P를 구별할 수 있는 핵심 인자를 가지고 있을 것이라고 추측하였다. ADAM10은 세포 표면에서 세포막 단백질을 자르는 효소로, 프리온을 그 기질로 함이 잘 알려져 있다[16,17]. ADAM10이 Q212P의 세포 외 방출에 기능적으로 관여한다는 것을 밝히기 위해서, ADAM10을 직접적으로 활성화시킬 수 있는 N-ethylmaleimide (N-EM)을 사용하였다[18]. N-EM을 처리한 세포 배양액에서 프리온의 양을 분석함으로써, 프리온의 세포 외 방출에 ADAM10이 기여함을 간접적으로 알 수 있을 것이라 추론하였다.

펄스 동안 합성된 프리온이 세포 표면으로 도달할 수 있도록 N-EM을 처리하기 전 1시간 30분 동안 체이스 하였다 (그림 7). 그 후 4시간 30분 동안 N-EM을 처리하여 프리온의 세포 외 방출을 유도하였다. 그러자 세포배양액에서 새로 합성된 프리온의 양이, 처치한 N-EM 농도에 의존적으로 증가한 반면 (0~5 mM, 5 mM에서는 세포 독성이 나타났다), 세포 표면 및 세포 내부로 유입되는 프리온의 양은 감소함을 자유 RFP의 양적 감소를 통해 확인하였다. 이 현

상은 야생형 프리온에서도 동일하게 나타났는데, 이는 N-EM의 작용이 Q212P에 특이적인 반응이 아님을 의미한다 (그림 9).

프리온의 세포 외 방출에 ADAM10의 직접적인 효과를 시험해보기 위해 CRISPR/Cas9을 이용해 ADAM10 유전자를 편집한 세포주 (ADAM10 knock out, K/O)를 만들었다. 그리고 ADAM10의 유전자와 단백질 발현이 사라진 것을 역 전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)과 면역블러팅 (immunoblotting)을 통해 확인하였다 (그림 10). 이 세포주에 RFP가 융합된 Q212P를 발현시키고, N-EM을 이용해 위와 같은 방식으로 세포 외 방출된 프리온의 양을 분석하였다. 그러자 예상했던 바와 같이, ADAM10이 없는 경우에는 N-EM을 처리했음에도 불구하고 프리온이 세포 외로 방출되지 못하고 세포 표면에 쌓여 있음을 확인하였다 (그림 11). Q212P는 야생형 프리온과 다르게 N-EM 없이도 세포 배양액에서 검출되지만, ADAM10이 결핍되면 세포 외 방출이 완전히 억제되고 (그림 11의 1, 6번 레인과 그림 12번), 세포 표면에 쌓인 Q212P 양을 증가시켰다 (그림 13). 따라서 Q212P의 세포 외 방출에 ADAM10이 관여하고 있음을 알 수 있다. 더불어, ADAM10이 결핍되어도 라이소좀에서 분해되는 프리온의 양이 정상 세포와 동일하다는 결과 (그림 14)는 ADAM10이 프리온의 세포내 유입에는 영향을 끼치지 않음을 의미한다.

추가적으로, Q212P와 ADAM10이 세포 표면에서 직접적으로 서로 결합하는지 알아 보기 위하여 GFP가 융합된 프리온을 이용해 근접 기반 비오틴화 (proximity-based biotinylation) 실험을 하였다 (그림 16, 17)[14]. 이 실험은 GFP를 특이적으로 인식하는 나노항체 (nanobody)에 APEX를 융합하여, 세포 표면에 위치한 프리온과 주변 결합 단백질들을 비오틴화시켜 검출을 가능하게 하는 방법이다 (그림 18). 일반적으로 ADAM10은 비활성인 전구체 형태 (precursor form)와 활성 형태 (active form)로 검출이 되는데, 두 형태 중, 활성 형태만 세포 표면에서 특이적으로 비오틴화되는 결과 (그림 19)를 통해, 활성 형태의 ADAM10이 프리온과 세포 표면에서 결합함을 알 수 있다. 하지만, 야생형 프리온과 Q212P와 결합하는 ADAM10의 양은 동일하였으며, 이는 Q212P가 세포 외로 방출되기 전 세포 표면에 노출되는 시간이 극도로 일시적이

어서 나타나는 기술적 제약이라 판단된다.

산화-환원 반응 교란에 의한 독성 Q212P 올리고머 생성

세포 표면으로 이동하는 동안 ADAM10은 전구체 형태 (precursor form)일 때 감춰져 있던 단백질 절단 활성 부위가 단백질 분해 효소에 의해 잘려 노출되면서 활성 형태 (active form)가 된다. 또한 ADAM10의 세포막 단백질 절단 기능은 세포 내 이동과 세포 표면으로의 이동에 따라 조절된다고 알려져 있다[19]. 이를 통해 Q212P가 소포체에서 세포 표면으로 이동하는데 ADAM10이 관여할 수 있다고 추측하였고, ADAM10과 Q212P의 상호작용을 공동면역침강(co-immunoprecipitation)법을 통해 확인하였다. 흥미롭게도, 세포막에서와는 다르게 전구체 형태의 ADAM10이 Q212P와 특이적으로 결합하였고 (그림 20), 이는 전구체 형태의 ADAM10이 활성 형태로 변하는 골지체로 이동하기 이전에 서로 결합함을 의미한다. 하지만, ADAM10 결핍 세포주에서 Q212P는 정상 세포주에서와 동일한 위치에서 가시화 되었으며 (그림 21), 이를 통해, 소포체 내에서 ADAM10과의 결합이 Q212P의 고유한 위치에 영향을 끼치지 않음을 알 수 있었다.

다음으로, ADAM10과 Q212P의 결합이 Q212P의 세포 내 수송 과정에 영향을 미치는지 알아보기 위해, ADAM10 결핍 세포주에서 펄스-체이스 실험을 통해 새로 합성된 Q212P의 세포 소기관 특이적 당수식 정도를 분석하였다. 펄스 시, ADAM10 결핍 세포주와 정상 세포주는 모두 Q212P가 2중 당수식 형태로 동일하게 만들어졌으며, Q212P의 합성에는 ADAM10이 영향을 끼치지 않음을 확인하였다. 하지만 4시간 동안, ADAM10 결핍 세포주에서 세포밖으로 방출된 Q212P의 양이 감소하였으며, 이에 따른, 세포 표면에 남아있는 Q212P의 양이 증가하였다. 주목할 것은, 1시간 체이스 때, 정상 세포주에서와는 다르게, 복합 당수식이 결핍되어 골지체로 이동되지 못한 2중 당수식 형태의 Q212P가 ADAM10 결핍 세포에 선택적으로 남아있었다 (그림 22). 이는 RFP를 삽입했을 때 더욱 분명해졌다 (그림 23). 이를 통해 ADAM10의 결손은 Q212P의 소

포체 이동을 지연시킨다는 것을 알 수 있다.

게다가 정상 세포주는 타프시가진 (Thapsigargin, Tg)으로 소포체 스트레스를 유도할 경우, 스트레스가 유도되지 않은 세포의 Q212P 대사와 차이가 없었지만 (그림 3과 그림 24 비교), ADAM10 결핍 세포주에서는 스트레스에 민감하게 반응하여 Q212P의 소포체 이동 속도가 더욱 감소하였다(그림 25). 결과적으로 ADAM10은 Q212P의 소포체 내 빠른 수송에 역할을 하고 있음을 알 수 있었다. ADAM10이 Q212P의 소포체 수송에 관여하고 있지만, ADAM10이 결핍되어도 소포체 이후에 일어나는 복합 당수식은 정상적으로 이루어졌고, 소포체 스트레스에 의해서도 동일하였다 (그림 22과 23). 이를 통해 소포체 이후에 세포막으로 이동하는 과정 (post-ER trafficking)에는 ADAM10이 관여하지 않음을 확인하였다.

Tg은 소포체의 Ca2+ 유입을 저해하지만, 디티오트레이톨 (Dithiothreitol, DTT)은 강한 환원제로서 단백질의 이황화 결합 (disulfide-bond) 형성을 억제하는 방법으로 소포체 스트레스를 유도한다[21]. Tg과 DTT를 각각 처리하여 RFP 융합 Q212P를 펄스-체이스 분석하였을 때, 소포체 이후 형태 (post-ER form)의 당수식 패턴이 보이며 라이소좀에서 분해되어 생기는 자유 RFP의 양도 동일하였다 (그림 26과 27). 이는 소포체 스트레스가 Q212P의 소포체 이후 수송과정 뿐 아니라, 라이소좀 전달 과정에도 영향을 끼치지 않음을 의미한다. 그러나 DTT를 처리했을 경우, Q212P는 올리고머화 (oligomerization)되어 세포 표면에 축적되었다 (그림 27). 이는, DTT에 의해 유도된 산화-환원 반응의 교란이 Q212P의 올리고머화를 촉진함을 의미한다. Q212P 올리고머는 DTT 제거를 통해 결국 세포 밖으로 방출되었으며 (그림 28), 이는 산화-환원 반응의 일시적 교란 후 회복하는 과정에서 방출된 Q212P 올리고머가 세포 독성의 원인일 수 있음을 의미한다.

ADAM10 결핍에 의한 Q212P 올리고머의 단백질 독성 완화

본 연구를 통해, Q212P의 선택적 방출이, ADAM10에 의해 매개됨을 알았

다 (그림 12). 그리고 Q212P가 올리고머화되면 세포 방출이 일시적으로 억제되는 것을 확인하였다(그림 28). 그러면, ADAM10이 Q212P 올리고머의 생성 및 방출에 기능적으로 관여하는지 확인하기 위하여 ADAM10 결손 세포주에서 동일한 방법으로 DTT를 처리한 후, 펄스-체이스 하여 Q212P의 올리고머화와 세포 외 방출을 분석하였다. 하지만, ADAM10 결손 세포주에서도 정상 세포와 동일하게 Q212P가 올리고머화 되었으며 (그림 29), 이는 ADAM10이 Q212P의 올리고머화에는 관여하지 않음을 의미한다. 또한 정상 세포주에서는 DTT를 제거하여 세포를 회복시켰을 때, Q212P가 세포 밖으로 방출되었지만, ADAM10 결손 세포주에서는 여전히 세포 외 방출이 억제되었다 (그림 30). 시간이 지남에도 불구하고 정상 세포주에 비해 Q212P 올리고머의 양도 감소하지 않았다. 이는 ADAM10의 결손이 올리고머화된 Q212P를 절단하지 못함을 의미한다.

올리고머화되어 고유의 형태를 잃은 단백질은 세포에게 독성을 일으킬 수 있고, 여러 질병들의 원인이 된다[22]. ADAM10 결손 세포주에서 올리고머화된 Q212P가 방출되지 못하면 세포에 유해할 것이라는 추측에서, Q212P를 발현하는 정상 세포주와 ADAM10 결손 세포주에 DTT를 일시적으로 처리한 후, 회복시키면서 집락 형성법 (colony forming assay)을 통해 세포 생존력을 평가하였다. 예상과는 반대로, ADAM10 결손 세포주의 집락 (colony)이 많이 형성되었고, 밀도 또한 높았다 (그림 31). 이는 DTT를 처리하였다가 제거하여 회복을 시키면 정상 세포주는 Q212P를 다시 세포 외부로 방출시키는데, 이때 방출된 올리고머화 Q212P가 주변에 위치한 다른 세포에게 독성을 일으키는 반면, ADAM10 결핍 세포주에서는 독성 Q212P 올리고머가 방출되지 못하여, 상대적으로 주변 세포에 미치는 단백질 독성이 완화되는 것으로 판단된다.

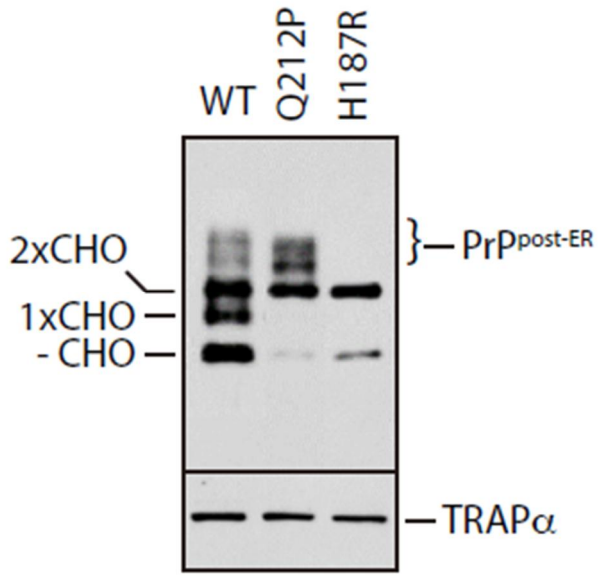

그림 1. 야생형 프리온과 Q212P의 대사 패턴

293T-Trex 세포에 야생형 프리온, Q212P, H187R을 도입하고, 합성된 프리온 단백질의 양을 프리온 특이적 3F4 항체 (1:10000)를 이용하여 면역블러팅 (immunoblotting)하여 검출하였다. 당수식 결핍 (-CHO), 단일 당수식 (1XCHO), 2중 당수식 (2XCHO), 골지체에서 일어나는 복합 당수식된 프리온 (post-ER)을 표시하였다. 단백질 양의 동일성은 TRAPa의 면역블러팅을 통해 확인하였다.

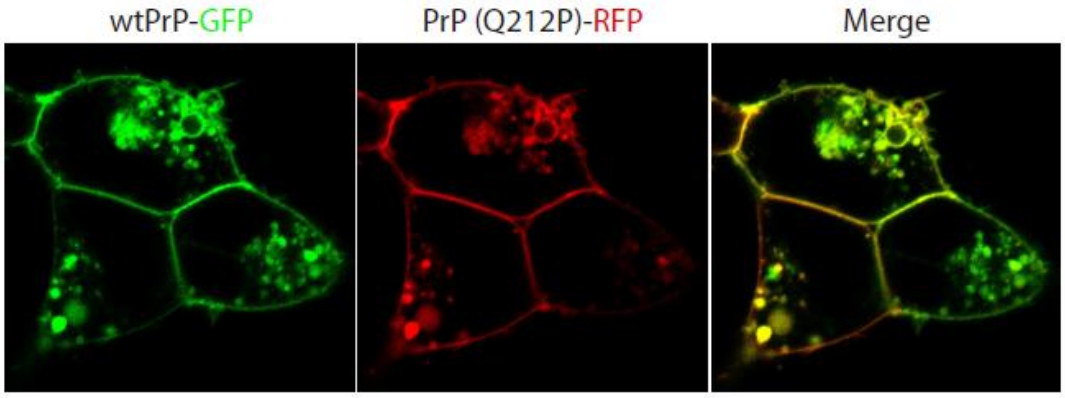

그림 2. 야생형 프리온과 Q212P의 발현 위치 가시화

GFP가 삽입된 야생형 프리온과 RFP가 삽입된 Q212P를 293-Trex 세포에 도입하여 발현 시킨 후, 공초점 현미경 (confocal microscope)으로 가시화하였다. 프리온은 세포 내부 소기관에 흩어져 있으며, 세포 표면에도 위치한다. 녹색과 적색의 위치가 거의 비슷하며, 두 사진을 겹치면 발현 위치가 일치하는 부위는 노란색으로 보인다.

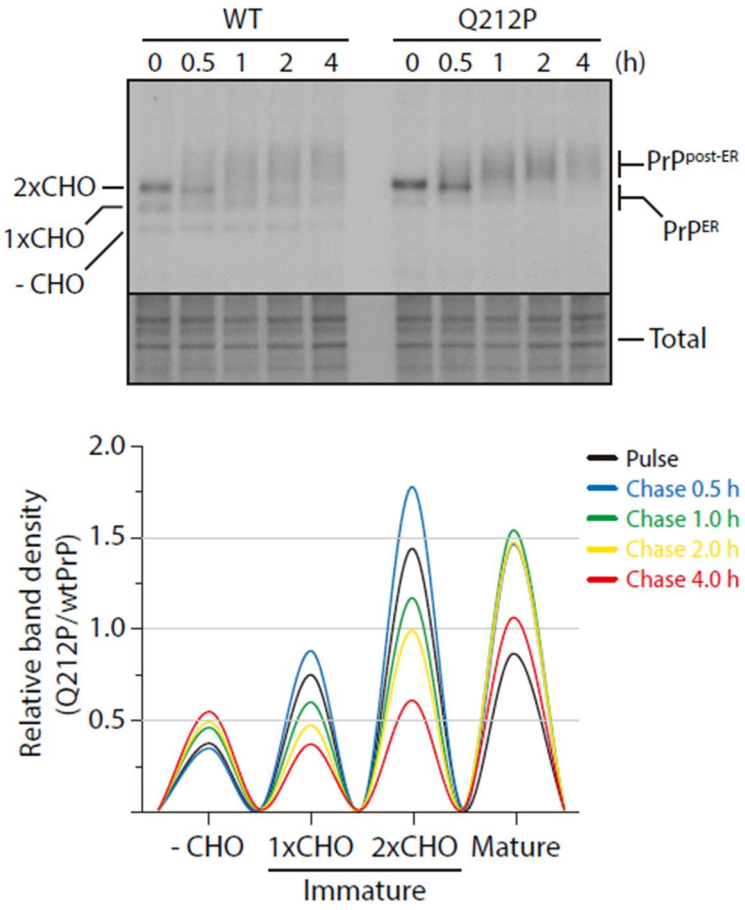

그림 3. 야생형 프리온과 Q212P의 당수식 패턴 분석

야생형 프리온과 Q212P를 발현하는 세포주 (stable cell line)를 만들고, 펄스-체이스 (pulse-chase) 실험을 통해 새로 합성된 단백질에 [^{35}S]-methionine/cysteine을 표지한 후, 시간 별로 세포를 용해 (lysis)하고 PrPA-R2 항체로 프리온을 면역침강 (immunoprecipitation)하여 분리하였다 (상). 각 펄스-체이스 시간별로 당수식된 프리온 양을 Q212P/야생형 프리온 값으로 플롯팅 하였다 (하).

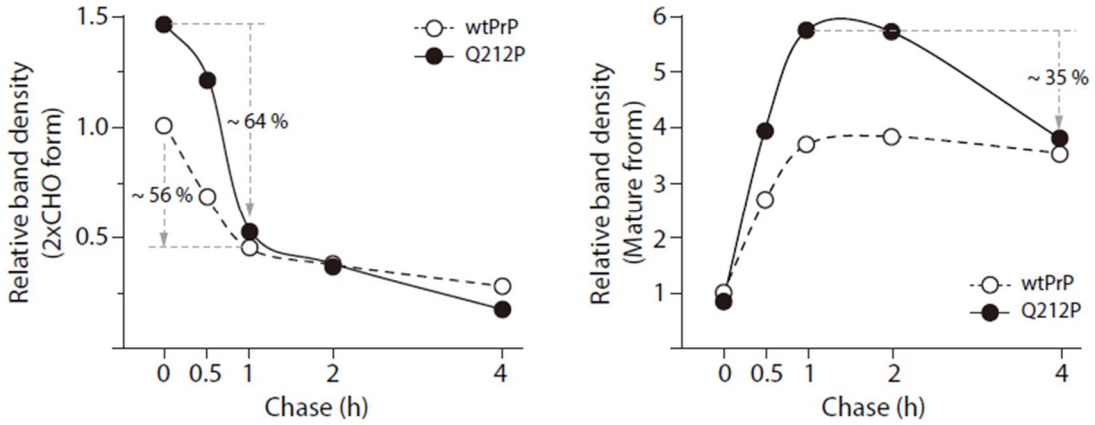

그림 4. 당수식된 야생형 프리온과 Q212P의 정량적 비교

그림 3의 펄스-체이스실험 결과에서, Q212P와 야생형 프리온의 2중 당수식 (2XCHO) (좌)와 성숙형태 (mature form) (우)의 양을 플롯팅 하였다. 펄스 30 분 동안 Q212P는 야생형 프리온에 비해 약 1.5배의 2XCHO가 합성된 반면, 체이스 1시간 안에 야생형 프리온과 같은 양으로 감소하였다. Q212P는 약 64 %, 야생형 프리온은 약 56 % 감소하였다 (mature form으로 전환됨을 의미한다). Q212P는 체이스 1시간 내 야생형 프리온에 비해 약 1.6배의 mature form을 생산했지만, 4시간 안에 야생형 프리온과 같은 수준으로 빠르게 감소하였다.

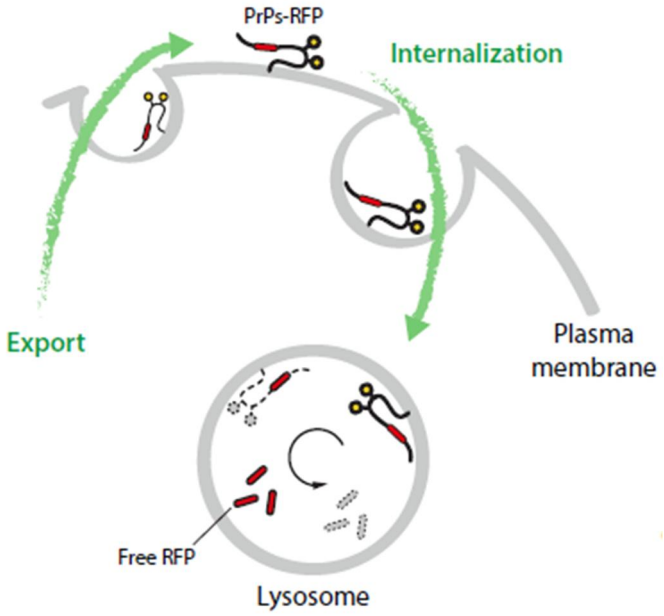

그림 5. RFP 융합 프리온의 라이소좀 분해에 의한 자유 RFP 생성

새로 합성된 프리온은 소포체에서 세포 표면으로 수송된 후, 내포 작용(endocytosis)으로 다시 세포 안으로 유입되어 라이소좀에서 분해된다. 이 때, 프리온에 RFP을 삽입하면 라이소좀에서 프리온은 분해되어 사라지지만 자유 RFP는 남아있다.

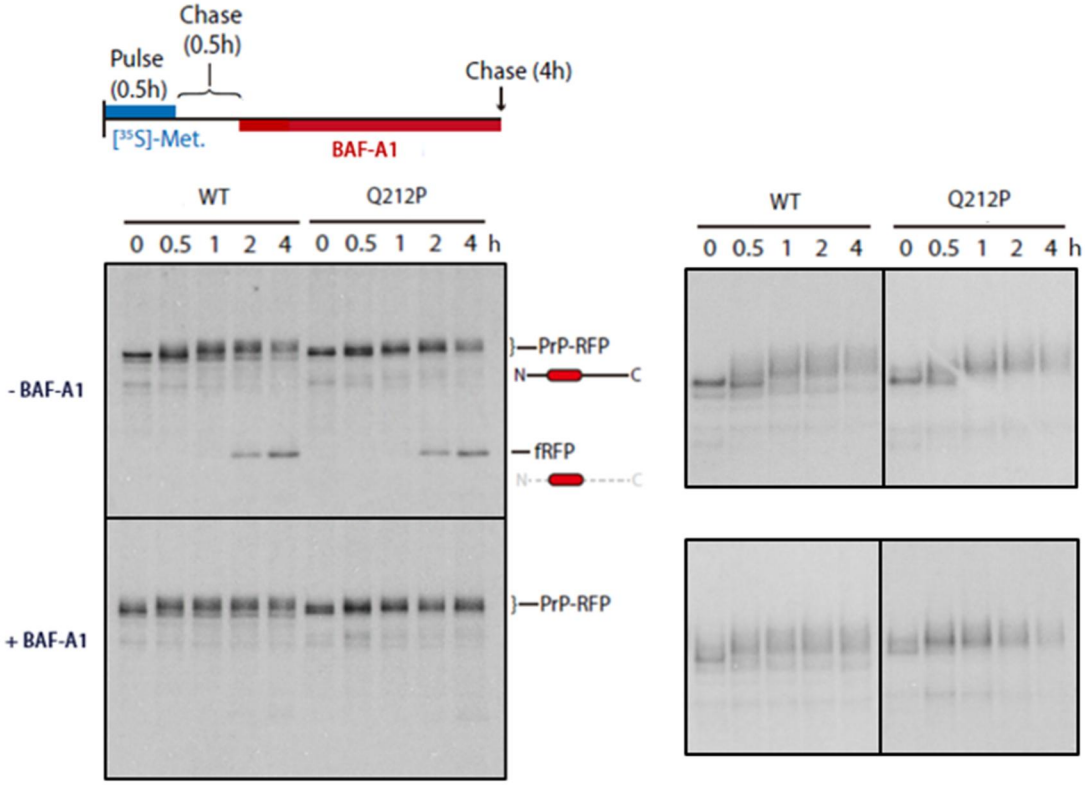

그림 6. RFP 융합 야생형 프리온과 Q212P의 당수식 패턴 변화에 의한 대사 분석과 세포 내 유입량 분석

RFP가 융합된 야생형 프리온과 Q212P를 발현하는 세포주를 제작하였으며, 바필로마이신 (bafilomycin, BAF-A1) 100 nM과 함께 펄스-체이스한 후, RFP 항체로 프리온을 면역침강하여 회수하였다 (좌: 12% Tricine gel, 우: 10% Glycine gel).

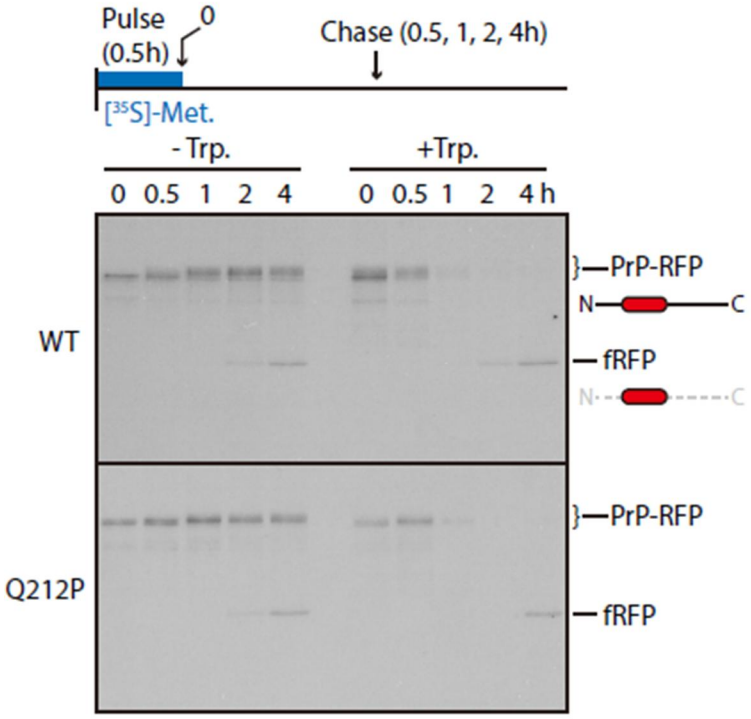

그림 7. 세포 외 트립신 처리에 의한 세포막 프리온의 선택적 제거

RFP 융합 야생형 프리온과 Q212P를 발현하는 세포주를 펄스-체이스한 후, 세포 밖에서 0.25 % 트립신 (trypasin)처리하고 면역침강하여 프리온을 분리하였다. 트립신 처리시, 체이스 30분까지의 프리온 (PrP-RFP)은 사라지지 않고, 체이스 1시간부터 완전 당수식화된 성숙형태의 프리온이 선택적으로 외부 트립신에 의해 제거되었다. 이는 외부 트립신이 접근하기 용이한 세포막에, 성숙한 프리온이 노출되어 있음을 의미한다. 이때, 자유 RFP는 보존되는 것으로 보아, 외부 트립신은 세포막 단백질에 선택적으로 작용한 것으로 판단된다.

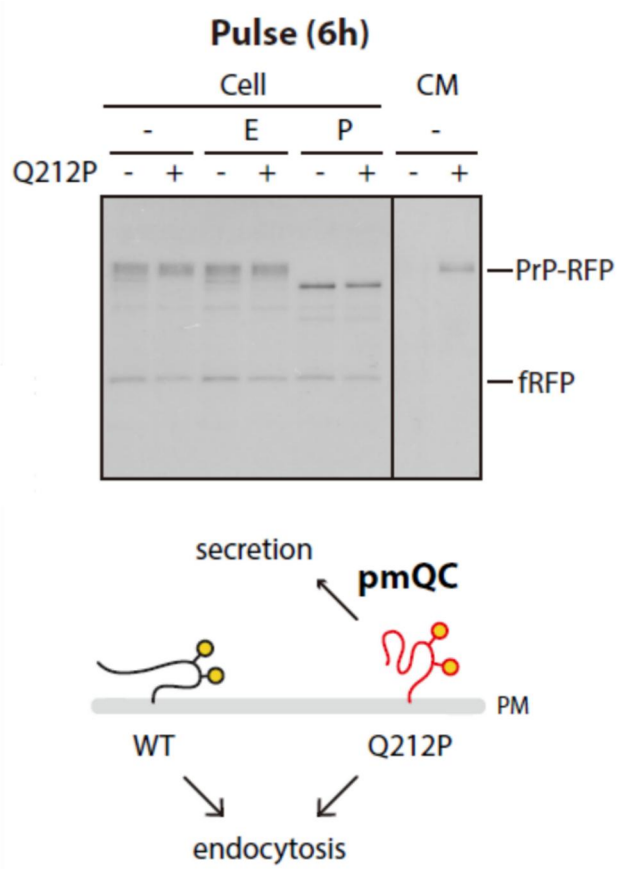

그림 8. 프리온의 세포 외 방출

RFP 융합 야생형 프리온과 Q212P를 발현하는 세포주를 6시간 동안 펄스하여 새롭게 합성된 단백질을 동위원소로 표지한 후, 세포 (Cell)와 세포를 배양한 배지 (conditioned media, CM)에서 프리온을 RFP 특이 항체로 면역침강하여 분리하였다. 세포에서 분리한 프리온은 Endo H (E)와 PNGase F (P)를 각각 처리하여 세포소기관 특이적 당수식을 분석하였다. 각각의 세포 배양액에서 분리한 프리온을 통해, Q212P 특이적 세포 외 방출을 확인할 수 있었다. 세포에서는 자유 RFP가 보이지만, 배양액에서는 보이지 않는 것을 보아 세포가 손상되지 않은 상태에서 프리온이 회수 된 것을 알 수 있다.

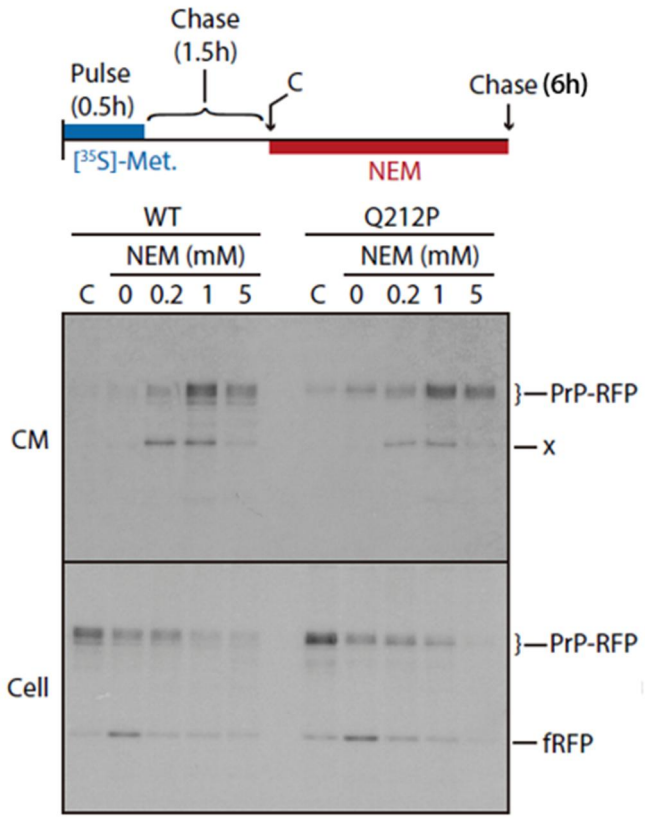

그림 9. N-EM에 의한 프리온의 세포 외 방출량 분석

RFP 융합 야생형 프리온과 Q212P를 발현하는 세포주에 N-EM 처리와 더불어 펄스-체이스한 후, 세포 (Cell)와 세포를 배양한 배지 (conditioned media, CM)에서 프리온을 면역침강하여 분리하였다. C는 1시간 30분 동안 체이스, 나머지는 6시간 동안 체이스하며 N-EM을 0~5 mM까지 처리하였다. 5 mM N-EM에서는 세포 독성이 일어나 세포 내 남아있는 프리온과 방출 된 프리온 모두 감소하였다.

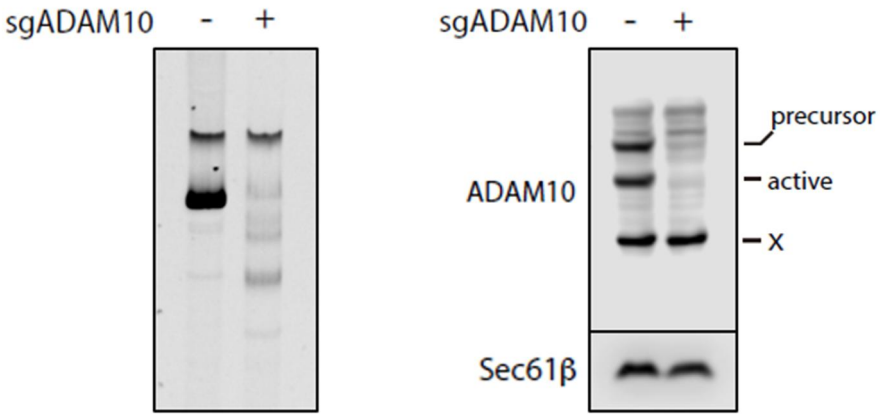

그림 10. ADAM10 결핍 세포주 제작

야생형 세포와 ADAM10 결핍 세포 주에서 각각 총 RNA 추출한 후, ADAM10 특이적 프라이머로 역 전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 하였다. 야생형 세포에서는 ADAM10 유전자가 증폭된 것이 보이지만, ADAM10 결핍 세포에서는 유전자의 증폭이 확인되지 않았다 (좌).

각 세포를 용해시켜 ADAM10 (1:1000)과 sec61b항체로 면역블러팅하였다. 야생형 세포에서는 ADAM10의 전구체와 활성체가 모두 검출되지만, ADAM10 결핍 세포에서는 검출되지 않았다. Sec61b 양이 일정 하므로 동일한 양의 단백질이 사용되었다 (우).

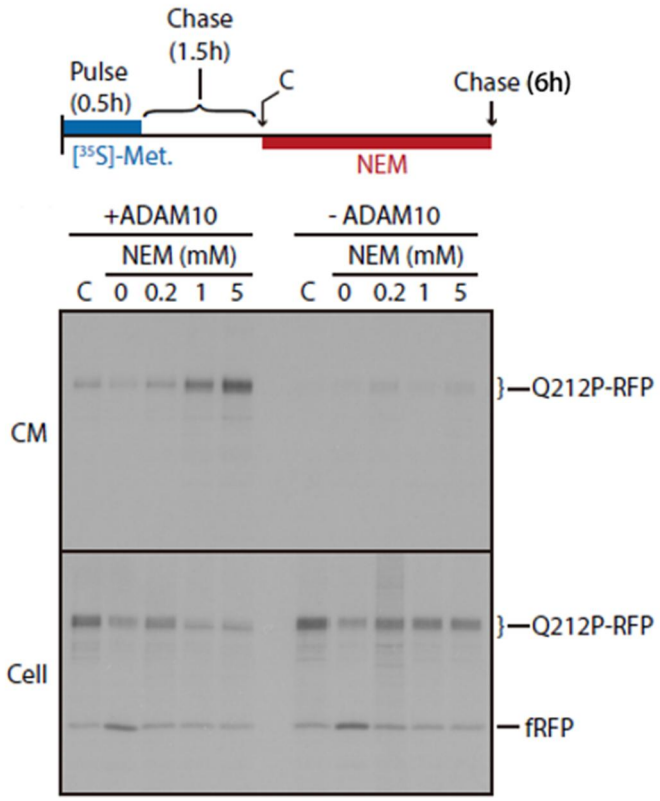

그림 11. ADAM10 결핍 세포에서 N-EM에 의한 프리온의 세포 외 방출량 분석

RFP 융합 Q212P를 발현하는 야생형 세포주와 ADAM10 결핍 세포주를 N-EM과 더불어 펄스-체이스하고 세포 (Cell)와 세포를 배양한 배지 (conditioned media, CM)에서 프리온을 면역침강하여 분리하였다. 그림 9와 동일한 방법으로 실험하였다.

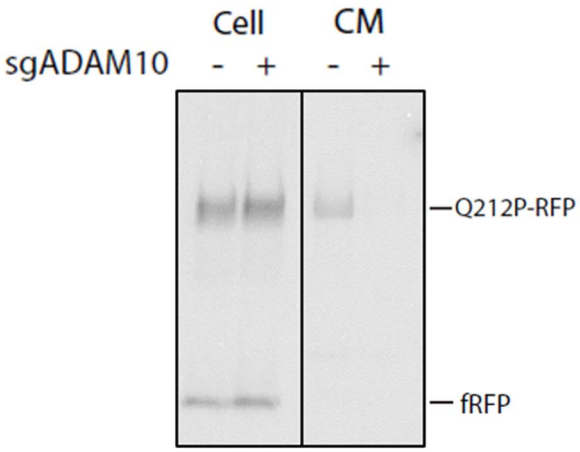

그림 12. ADAM10 결핍 세포의 프리온 세포 외 방출

RFP 융합 Q212P를 발현하는 ADAM10 결핍 세포주를 6시간 동안 펄스하여 단백질에 동위원소를 표지한 후, 세포 (Cell)와 세포를 배양한 배지 (conditioned media, CM)에서 프리온을 면역침강하여 분리하였다. 그림 8과 동일한 방법으로 실험하였다.

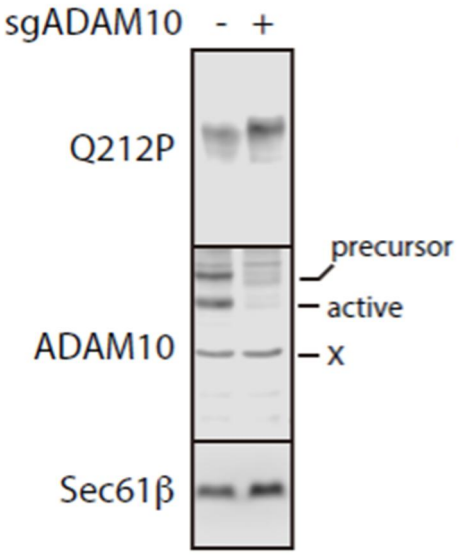

그림 13. ADAM10 결핍에 의한 Q212P 발현 변화 분석

Q212P를 발현하는 야생형 세포주와 ADAM10 결핍 세포주를 용해 시킨 후, PrPA-R2 (1:1000), ADAM10 (1:1000), sec61b 항체로 면역블러팅하였다. ADAM10이 결핍은 post-ER 형태의 Q212P 축적을 증가시켰다. Sec61b 양이 일정 하므로 동일한 양의 단백질이 사용되었다.

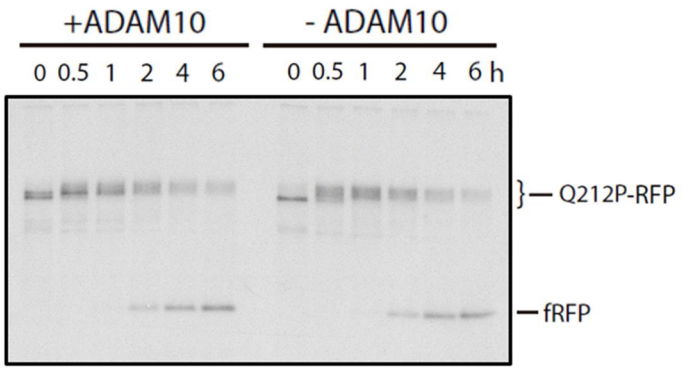

그림 14. ADAM10 결핍 세포에서 프리온 세포 내 유입량 분석

RFP 융합 Q212P를 발현하는 야생형 세포주와 ADAM10 결핍 세포주를 펄스-체이스한 후, RFP 항체로 프리온을 면역침강하여 분리하였다. Q212P가 라이소좀에서 분해되어 나타나는 자유 RFP의 양이 ADAM10 결핍 세포주와 야생형 세포에서 동일하다.

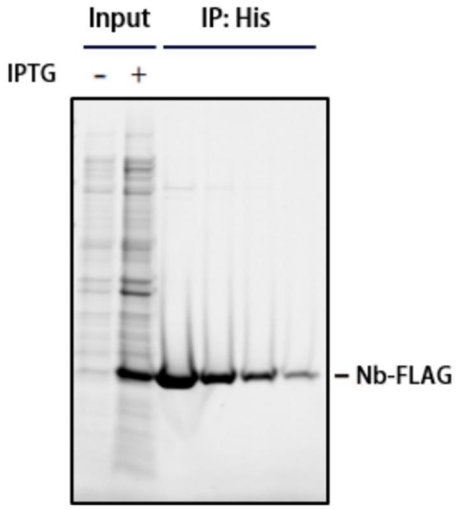

그림 15. GFP 나노항체(nanobody) 정제

BL21 대장균 (*E.coli*)에 나노항체 DNA (Nb-FLAG-His)를 형질전환시켰다. 0.5 mM IPTG로 나도항체를 발현시키고 Cobalt가 결합된 chelating sepharose bead로 정제하였다.

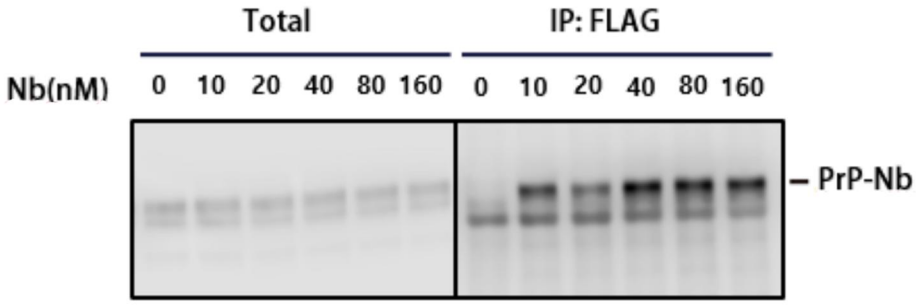

그림 16. 나노항체를 이용한 세포 표면의 프리온의 선택적 검출

GFP가 삽입된 야생형 프리온을 발현하는 세포주에 세포막이 깨지지 않은 상태에서 나노항체 (Nb−FLAG−His)를 농도별로 처리하여 세포 표면에 위치한 프리온에 표지한 후, 용해시키고 FLAG bead를 이용해 나노항체와 결합한 세포막 프리온을 면역침강하여 분리하였다. GFP (1:2000) 항체로 프리온을 면역블러팅하였다. 면역침강 시키기 전 total에서는 프리온이 모두 잡혔지만, 면역침강 시킨 후에는 나노항체를 처리하지 않은 경우 (0 nM) 프리온이 검출되지 않았다. 나노항체는 세포 표면에 노출된 프리온을 특이적으로 잡아낼 수 있음을 확인하였다.

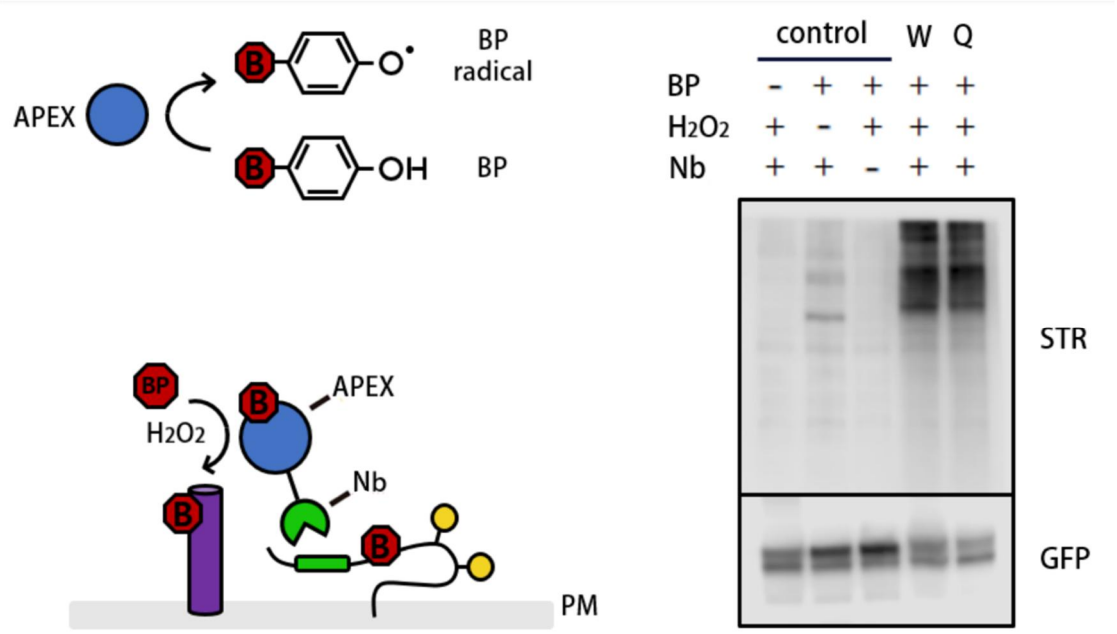

그림 17. 근접 기반 비오틴화(proximity-based biotinylation) 최적화

APEX가 결합된 나노항체를 GFP가 삽입된 프리온 발현 세포주의 세포 표면에 표지한 후, 바이오틴 페놀 (biotin-phenol, BP)과 과산화수소 (H_2O_2)를 처리하면, 나노바디에 붙은 APEX가 바이오틴 페놀 (biotin-phenol, BP)을 바이오틴페놀 라디칼 (biotin-phenoxyl radical)로 산화시킨 후 주변 단백질과의 결합을 촉진시킴으로 바이오틴화 한다. 이때, 바이오틴화된 세포를 용해하여 streptavidin-HRP (1:20000)으로 면역블러팅하였다. 비오틴화에 필요한 조건인 바이오틴 페놀, 과산화수소, 나노항체-APEX가 각각이 결핍된 실험군을 대조군으로 설정하였다. 조건이 모두 충족된 경우만 비오틴화가 되었으며, APEX를 통한 비오틴화가 작동함을 확인하였다.

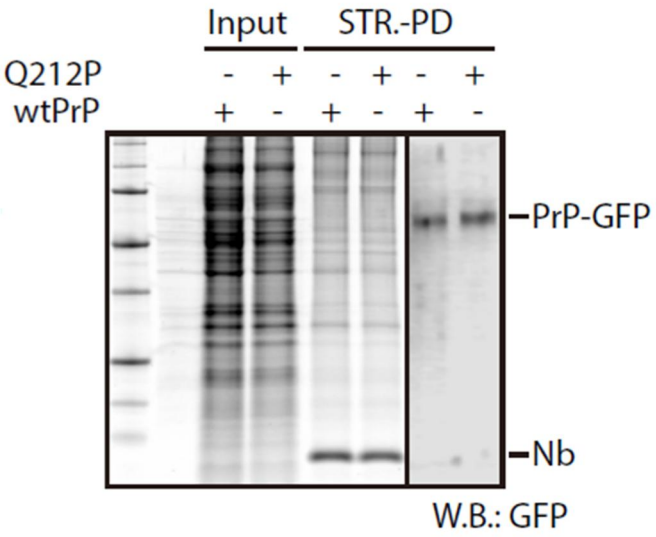

그림 18. 야생형 프리온과 Q212P의 근접 기반 비오틴화

나노항체-APEX를 GFP가 삽입된 야생형 프리온과 Q212P 세포주의 세포 표면에 표지하여 비오틴화 시킨 후, 세포막 단백질을 추출하였으며, streptavidin bead를 이용해 비오틴화 된 단백질만 분리하였다 (pull down, PD). 추출된 총 단백질은 SYPRO-RUBY로 염색하여 확인하였고, GFP 항체 (1:2000)로 면역블러팅하여 세포막 프리온의 회수를 확인하였다.

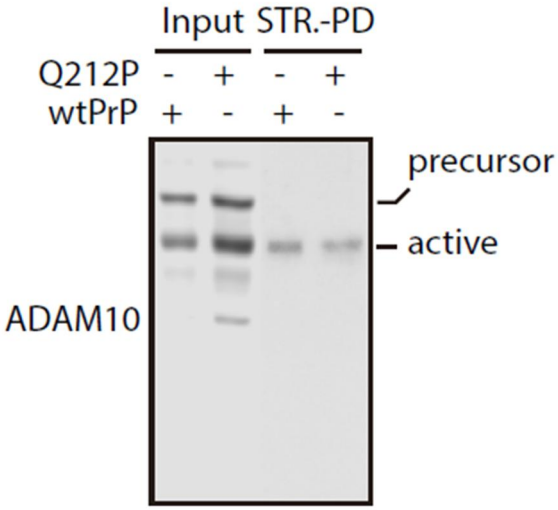

그림 19. 세포 표면에서의 Q212P와 상호작용하는 활성 ADAM10 검출

그림 18에서 사용된 샘플을 ADAM10 (1:1000) 항체로 면역블러팅하였다. 세포막 추출과 비오틴화된 단백질을 분리하기 전 총 단백질 (Input)에서는 비활성인 전구체 형태 (precursor form)와 활성 형태 (active form)가 모두 검출되지만, 근접 기반 비오틴화를 통해 활성 ADAM10이 선택적으로 바이오틴화되었다.

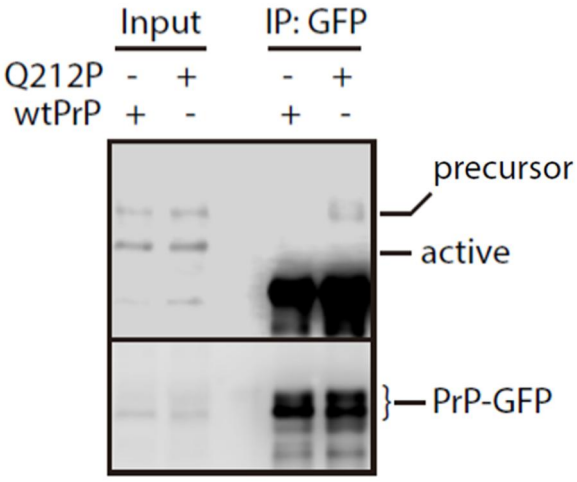

그림 20. ADAM10과 Q212P의 상호작용 분석

GFP가 삽입된 야생형 프리온과 Q212P를 발현하는 세포주의 세포질 분획을 0.015 % digitonin을 이용해 선택적으로 제거하고, 용해하여 GFP 항체로 프리온 및 결합 단백질을 공동 면역침강한 후, ADAM10 (1:1000) 항체 (상) GFP (1:2000) 항체 (하)로 면역블러팅하였다. 총 단백질에서는 (Input)에서는 ADAM10의 전구체 (precursor)와 활성체 (active form)가 모두 검출되지만, 공동 면역침강 후, Q212P 특이적으로 ADAM10 전구체가 검출되었다.

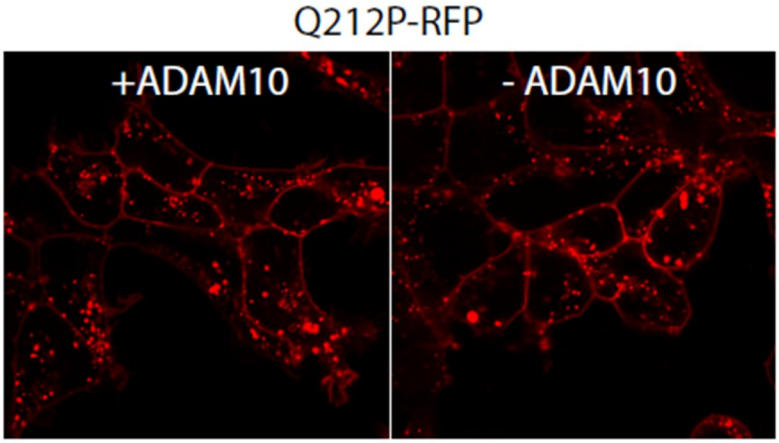

그림 21. Q212P 위치 변화에 미치는 ADAM10의 영향

야생형 세포주와 ADAM10 결핍 세포주에서 RFP가 삽입된 Q212P의 발현 위치를 공초점 현미경 (confocal microscope)으로 가시화하였다.

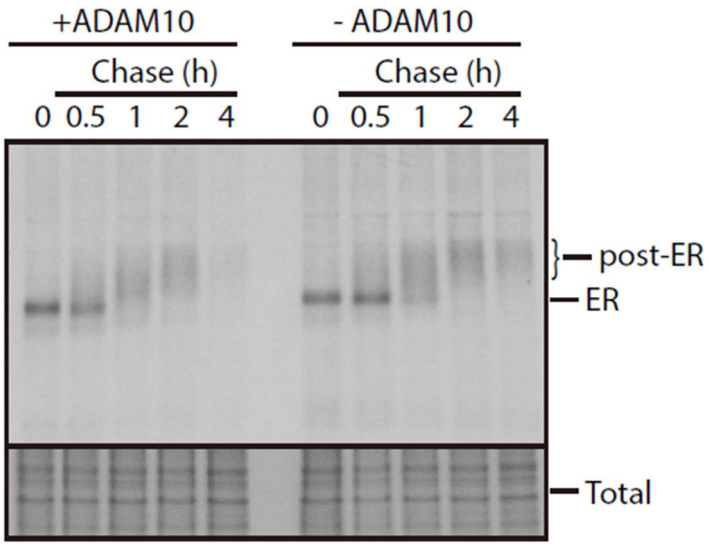

그림 22. ADAM10 결핍에 의한 Q212P의 당수식 및 트래피킹 변화 분석

Q212P를 발현하는 야생형 세포주와 ADAM10 결핍 세포주를 펄스-체이스한 후, PrPA-R2 항체로 새로 합성된 프리온을 면역침강하였다. 2중 당수식된 프리온은 소포체 (ER)에 존재하고, 복합 당수식된 프리온은 소포체를 벗어난 이후의 세포 소기관 (post-ER)에 존재한다.

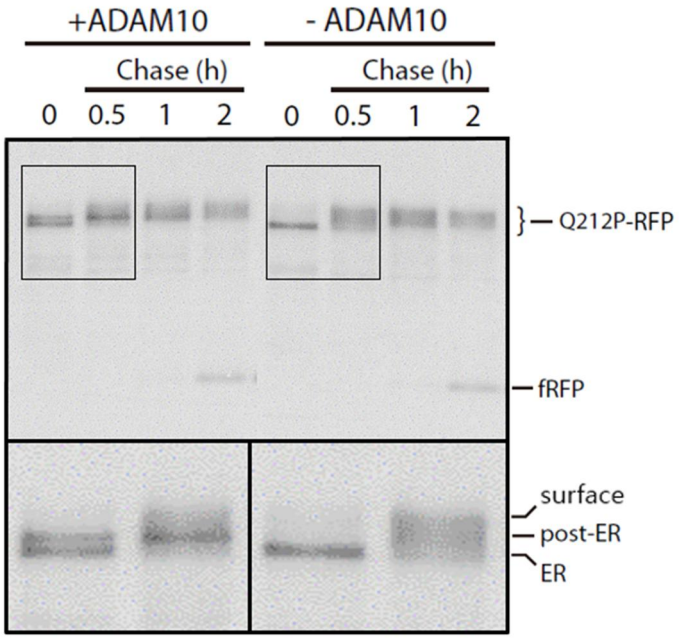

그림 23. ADAM10 결핍 세포에서 RFP 융합 Q212P의 당수식 패턴 분석

RFP가 융합된 Q212P를 발현하는 야생형 세포주와 ADAM10 결핍 세포주를 펄스-체이스한 후, RFP 특이적 항체로 프리온을 면역침강하였다. 아래는 펄스 (0)와, 체이스 30분 (0.5h)를 확대한 것이다. 정상 세포주에 비해 ADAM10 결핍 세포주는 소포체 이후 분비 기전을 통과하는 (post-ER) 프리온의 양이 상대적으로 적다.

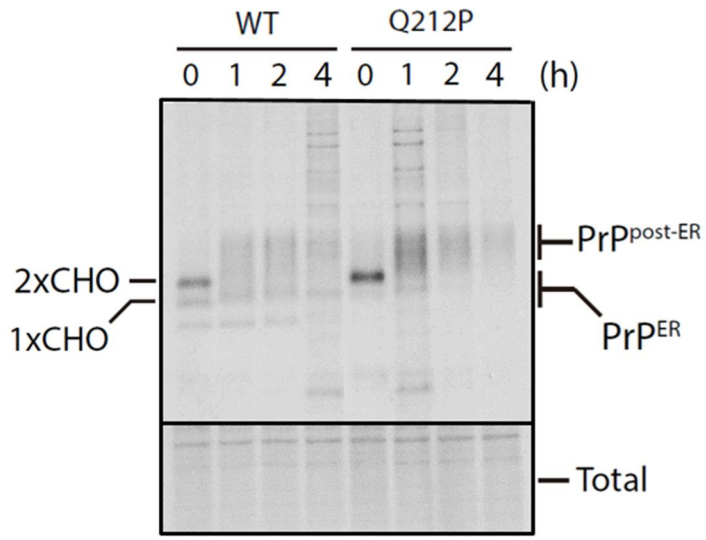

그림 24. Q212P의 당수식 패턴에 미치는 소포체 스트레스의 영향

새로 합성된 야생형 프리온과 Q212P를 펄스하여 표지한 후, 1 uM Tg과 함께 체이스하였다. 세포 용해물을 PrPA-R2 항체로 면역침강하였다. Q212P와 야생형 프리온이 그림 3의 당수식 및 대사 패턴과 큰 차이가 없다.

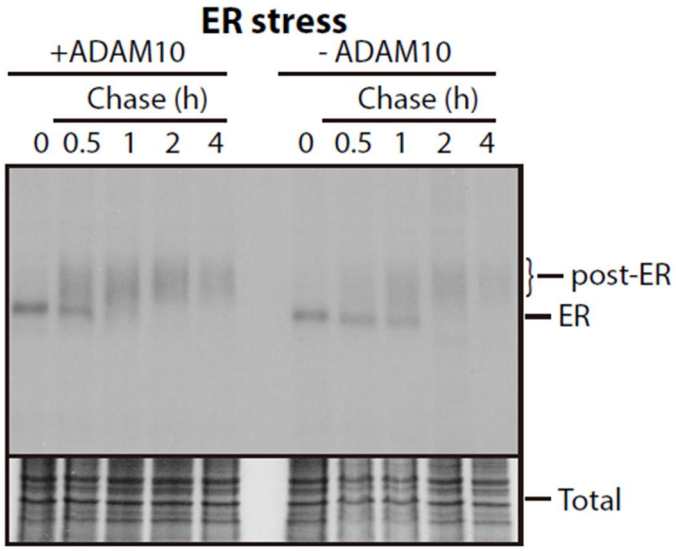

그림 25. ADAM10 결핍 세포에서 Q212P의 당수식 패턴에 미치는 소포체 스트레스의 영향

Q212P를 발현하는 야생형 세포주와 ADAM10 결핍 세포주를 그림 24에서와 동일한 방법으로 펄스-체이스하고 면역침강하였다. 펄스 시, 2중 당수식 프리온은 양적으로 동일하지만, ADAM10 결핍 세포주에서는 복합 당수식화 되기까지 시간이 지연되고 있다.

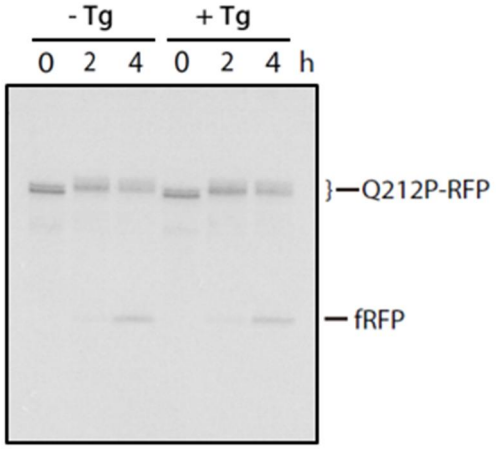

그림 26. Tg에 의한 RFP 융합 Q212P 대사 분석

RFP 융합 Q212P를 발현하는 세포주를 펄스하고, 체이스 동안 1 uM Tg을 처리하였다. 세포 용해물을 RFP 항체로 면역침강하였다. Tg를 처리에 의한 유의한 차이가 관찰되지 않는다.

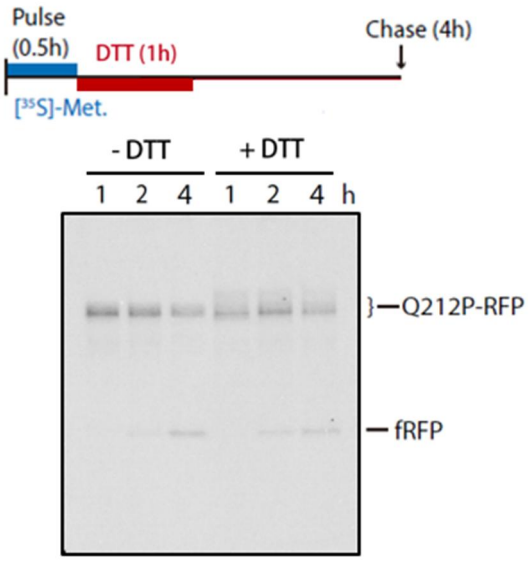

그림 27. DTT에 의한 RFP 융합 Q212P 대사 분석

RFP 융합 Q212P를 발현하는 세포주를 펄스하여 새로 합성된 총 단백질을 표지하고, 1시간 동안 10 mM DTT를 처리한 후, 3시간 동안 회복시켰다. RFP 융합 프리온은 RFP 특이적 항체로 프리온을 면역침강하였다. 자유 RFP의 변화가 없는 것으로 보아 프리온 분비 기전 및 세포 내 유입에는 DTT가 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 하지만, DTT 처리시, 특이적으로 프리온 올리고머가 관찰된다.

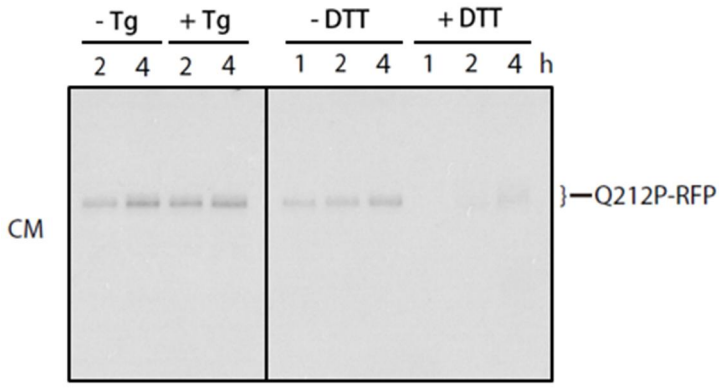

그림 28. 소포체 스트레스에 의한 RFP 융합 Q212P의 세포 외 방출 변화 분석

그림 26과 27 실험에서 세포를 배양한 배지 (conditioned media, CM)를 모아 RFP로 프리온을 면역침강하였다. Tg는 여전히 Q212P의 세포 외 방출에 영향을 미치지 않았으나, DTT는 Q212P의 방출을 일시적으로 억제하였다. DTT 제거에 의해, Q212P 올리고머의 방출이 회복되었다.

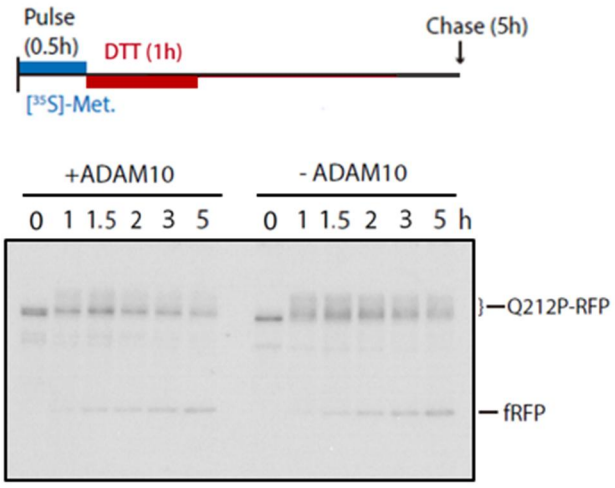

그림 29. ADAM10 결핍이 Q212P 올리고머 생성에 미치는 영향 분석

RFP 융합 Q212P를 발현하는 야생형 세포주와 ADAM10 결핍 세포주를 펄스하여 새로 합성된 총 단백질을 표지하고, 1시간 동안 10 mM DTT를 처리한 후, 5시간 까지 회복시켰다. RFP 융합 프리온은 RFP 특이적 항체로 프리온을 면역침강하였다. Q212P 프리온 올리고머 형성에 ADAM10이 관여하지는 않는 것으로 보인다.

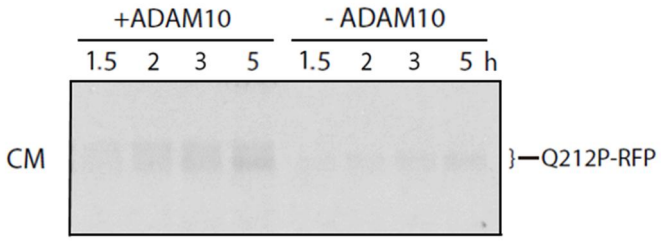

그림 30. ADAM10 결핍이 Q212P 올리고머의 세포 외 방출에 미치는 영향 분석

그림 29에서 세포를 배양한 배지 (conditioned media, CM)를 모아 RFP로 프리온을 면역침강하였다. Q212P 올리고머 방출이 ADAM10 결핍에 의해 억제되었다.

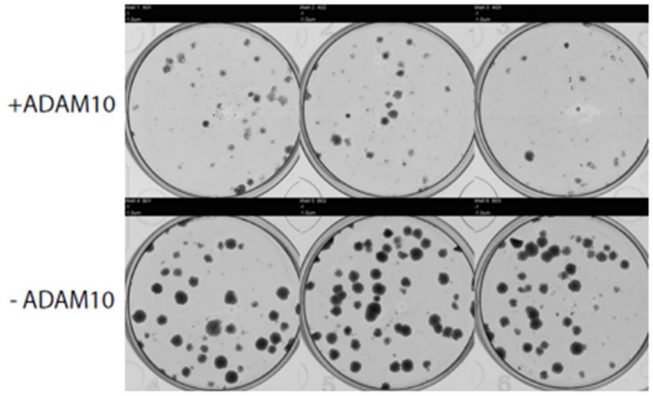

그림 31. ADAM10이 산화-환원 섭동으로부터의 세포 생존 회복능에 미치는 영향 분석

Q212P를 발현하는 야생형 세포주와 ADAM10 결핍 세포주에 1시간 동안 DTT 10 mM을 처리하고, 2주간 doxycycline을 처리하며 회복시켰다. ADAM10 결핍 세포의 집락 (colony)이 야생형 세포에 비해 많고 밀도도 높다.

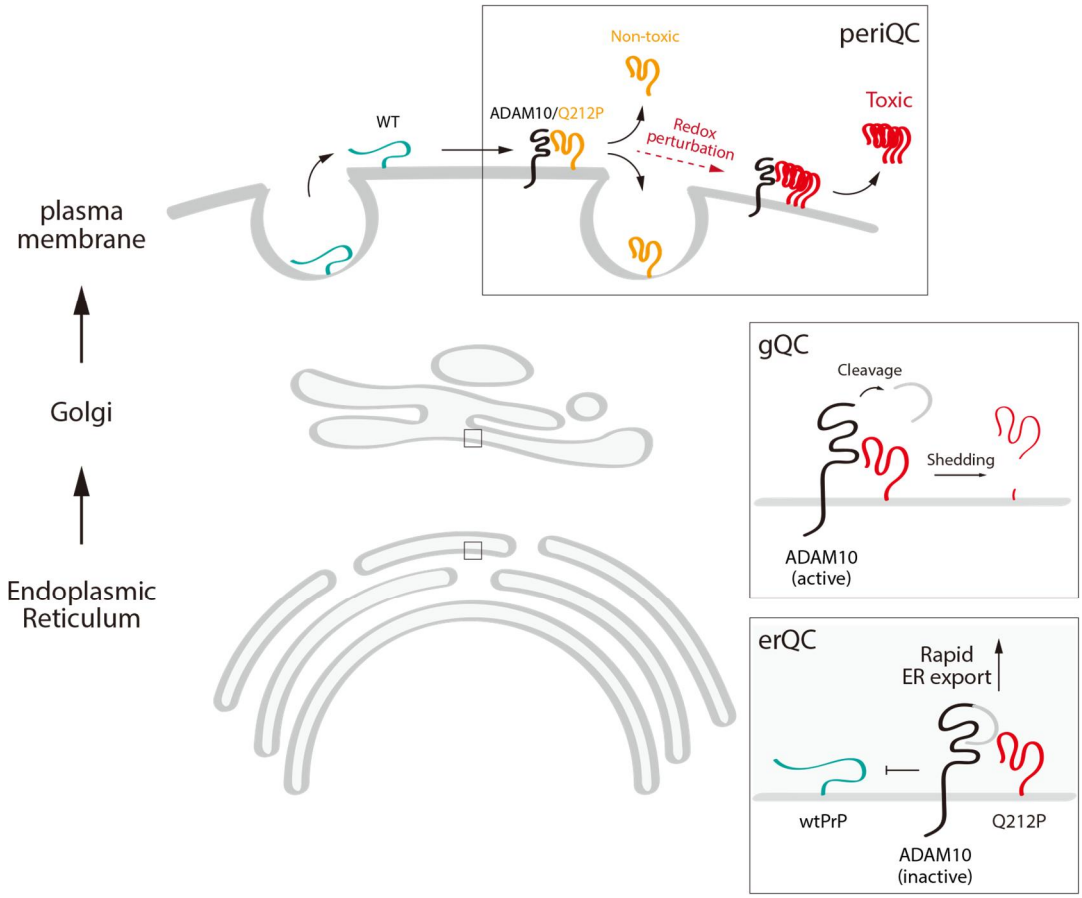

그림 32. 병원성 프리온의 잠재적 말초 품질관리 기전

고찰

본 연구는 새로운 개념의 병원성 프리온 선택적 잠재적 말초 품질관리 기전을 설명하고 있으며, 지속적인 품질관리 기전의 활성화가 오히려 세포에 해로울 수 있다는 예기치 못한 결과에 대한 실험적 근거를 제공하고 있다. 본 연구를 통해 세가지 주요 결과를 도출하였다. 첫째, 신규 말초 품질관리 기전(peripheral quality control, periQC)에 의해 세포밖으로 방출되는 인간 돌연변이 프리온 (Q212P)을 발견하였다. 둘째, Q212P의 periQC는 ADAM10에 의해 조절된다. 마지막으로, Q212P는 산화-환원 섭동에 의해 쉽게 올리고머화 되며, ADAM10에 의해 세포 밖으로 방출되어 주위 세포에 독성을 유발할 수 있다. 본 연구는, 프리온 항상성 조절 기전의 이해하는데, 몇가지 중요한 단서와 의문점을 제시한다.

첫째, 어떻게 ADAM10이 야생형과 Q212P를 구별하는가?

병원성 프리온으로 알려진 Q212P 돌연변이는 야생형 프리온과는 다른 독특한 당수식 패턴을 보인다. 프리온이 세포 내에서 이동하는 과정을 분석한 결과, Q212P는 야생형 프리온보다 소포체에서부터 빠른 수송을 거쳐 세포 표면으로 이동하였다. 프리온은 GPI가 붙어있는 막단백질이기 때문에 ERAD로 분해될 수 없어 RESET 과정을 통해 라이소좀으로 이동되어야 한다[6,7,8]. 따라서, 돌연변이 프리온인 Q212P가 세포에 독성을 일으키기 전 빠른 분해를 위해 세포 표면으로의 빠른 수송이 이루어져야 하며. 이는 세포가 Q212P를 선제적으로 인식하여 폴딩 우선 순위를 부여함으로써 빠르게 소포체로부터 방출 시킴으로 가능하다. 이때, 관여하는 단백질이 ADAM10이다. 하지만, ADAM10은 소포체에서 전구체 형태로 존재하기 때문에, 전구체 형태의 ADAM10이 Q212P와 선택적으로 결합하여, 소포체로 안전하게 이동시키는 것으로 보인다. 유사한 기능을 하는 것으로 보이는 Tmp21에 의해 매개되는 RESET 기전과는, 정상 상태에서 자발적으로 활성화되는 반응이라는 측면에서 상이하나, 결국, 돌연변이 프리온을 선별하여 제거하기 위한 반응이라는 측면에서, RESET과 궁극적으로 유사한 형태의

Q212P 특이적 단백질 품질관리 기전인 것으로 판단된다 (그림 32, "erQC").

둘째, 어떻게 ADAM10이 Q212P를 세포막에서 선택적으로 제거하는가?

erQC에 의해 선별되어 야생형보다 빠르게 골지체로 이동한 Q212P는 세포막까지 비교적 안전하게 수송된다[14]. 이때, 전구체 ADAM10의 N-말단은 골지체에 상주하는 SP1에 의해 제거되고, 비로서, 활성체로서의 형태를 갖추게 된다 (그림 32, "gQC"). 본 연구에서는 ADAM10의 기능적 활성화가 골지체에서 획득되는지, 세포 표면에서 획득되는지는 다루지 않았으나, Q212P는 ADAM10에 의해 특이적으로 절단되어 세포 밖으로 방출되며, 이는 기질 특이성이 결여된 (야생형 프리온도 절단) N-EM에 의해 유도된 ADAM10 활성화와는 다소 상이한 것으로 판단된다. 예상컨대, N-EM에 의해 유도된 ADAM10 활성화는 ADAM10의 구조 변성에 기인하며, Q212P를 선택적으로 절단하는 ADAM10의 활성은 Q212P의 구조적 변성에 기인하는 것으로 판단된다 (그림 32 "periQC"). 이는, 산화-환원 섭동에 의해 생성된 Q212P 올리고머가 ADAM10에 의해 절단되지 않는다는 실험 결과에 의해 뒷받침 된다. 이렇듯, ADAM10은 Q212P의 선택적 대사, 트래피킹 및 제거 과정 전반에 걸쳐 관여하고 있는 것으로 보인다 (그림 32).

셋째, ADAM10 매개 말초 품질관리 기전의 생리학적 중요성은 무엇인가?

periQC에 의한 Q212P의 세포 외 방출은 세포막으로부터, 세포 내로 지속적으로 유입되는 병원성 프리온의 양을 제한하여, endocytosis에 관여하는 세포 소기관의 부담을 감소시킨다는 측면에서 세포에 유익한 반응임이 분명하다. 이는 결국, 프리온이 제거되는 세포 소기관인 라이소좀의 기능적 용량을 확보하기위해 세포가 선호하는 조절 기전일 것이다. 구조 결함 단백질의 라이소좀 축적이 다양한 퇴행성 뇌질환의 중요한 원인 중 하나임을 고려할 때, periQC의 조절에 관여하는 ADAM10과 같은 세포막 단백질은 이들 질환의 극복을 위한 치료 타겟으로서 충분한 가치가 있을 것이다. 반대로, 산화-환원 섭동에 의해 생성된 프리온 단백질 올리고머의 periQC에 의한 세포 외 방출은 오히려 세포에 해가 될 수 있다는 연구 결과는 periQC의 생리학적 양면성을 시사하며, 치료학적 측면에

서, 세포 내/외 단백질 항상성 유지를 위해, periQC의 시기 적절한 조절이 필요함을 의미한다.

약 40가지 이상의 인간 프리온 단백질 돌연변이가 세포 내에서 서로 다른 형태로 축적됨을 고려할 때, 돌연변이 특이적 품질관리 기전에 의해 프리온 항상성이 유지되는 것으로 추측되며, 소포체에서 일어나는 품질관리 기전과 더불어 본 연구에서 밝힌, 세포막 매개되는 신규 말초 품질관리 기전을 조절하는 핵심 인자를 도출하여 치료 타겟을 제시하고, 이를 제어할 수 있는 전략을 개발함으로, 머지않은 시간 내에, 소포체 및 라이소좀 기능 손상에 기인한 퇴행성 뇌질환을 포함한 다양한 인간질환에 궁극적인 치료책을 제시할 수 있을 것으로 기대한다.

참고 문헌

[1] Skach, W.R. (2009). Cellular mechanisms of membrane protein folding. Nature structural & molecular biology;16;606-612.

[2] White, S.H., and Wimley, W.C. (1999). Membrane protein folding and stability: physical principles. Annu Rev Biophys Biomol Struct;28;319-365.

[3] Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. Nature reviews Molecular cell biology;4;181-191.

[4] Hegde, R.S., and Ploegh, H.L. (2010). Quality and quantity control at the endoplasmic reticulum. Current opinion in cell biology;22;437-446.

[5] Koenig, P.A., and Ploegh, H.L. (2014). Protein quality control in the endoplasmic reticulum. F1000Prime Rep 6;49.

[6] Sikorska, N., Lemus, L., Aguilera-Romero, A., Manzano-Lopez, J., Riezman, H., Muniz, M., and Goder, V. (2016). Limited ER quality control for GPI-anchored proteins. The Journal of cell biology;213;693-704.

[7] Satpute-Krishnan, P., Ajinkya, M., Bhat, S., Itakura, E., Hegde, R.S., and Lippincott-Schwartz, J. (2014). ER Stress-Induced Clearance of Misfolded GPI-Anchored Proteins via the Secretory Pathway. Cell;158;522-533.

[8] Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., and Prusiner, S.B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. Cell;51;229-240.

[9] Colby, D.W., and Prusiner, S.B. (2011). Prions. Cold Spring Harbor perspectives in biology;3;a006833.

[10] Goold, R., McKinnon, C., and Tabrizi, S.J. (2015). Prion degradation pathways: Potential for therapeutic intervention. Mol Cell Neurosci;66;12-20.

[11] Okiyoneda, T., Apaja, P.M., and Lukacs, G.L. (2011). Protein quality control at the plasma membrane. Current opinion in cell biology;23;483-491.

[12] Ashok, A., and Hegde, R.S. (2008). Retrotranslocation of prion proteins from the endoplasmic reticulum by preventing GPI signal transamidation. Molecular biology of the cell;19;3463-3476.

[13] Ashok, A., and Hegde, R.S. (2009). Selective processing and metabolism of disease-causing mutant prion proteins. PLoS pathogens;5;e1000479.

[14] Zavodszky, E., and Hegde, R.S. (2019). Misfolded GPI-anchored proteins are escorted through the secretory pathway by ER-derived factors. eLife;8.

[15] Lee, D., Lee, S., Shin, Y., Song, Y., and Kang, S.W. (2019). Thiol-disulfide status regulates quality control of prion protein at the plasma membrane. FASEB J;33;11567-11578.

[16] Altmeppen, H.C., Prox, J., Krasemann, S., Puig, B., Kruszewski, K., Dohler, F., Bernreuther, C., Hoxha, A., Linsenmeier, L., Sikorska, B., et al. (2015). The sheddase ADAM10 is a potent modulator of prion disease. eLife;4.

[17] Linsenmeier, L., Mohammadi, B., Wetzel, S., Puig, B., Jackson, W.S., Hartmann, A., Uchiyama, K., Sakaguchi, S., Endres, K., Tatzelt, J., et al. (2018). Structural and mechanistic aspects influencing the ADAM10-mediated shedding of the prion protein. Mol Neurodegener;13;18.

[18] Andrews, R.K., Karunakaran, D., Gardiner, E.E., and Berndt, M.C. (2007). Platelet receptor proteolysis: a mechanism for downregulating platelet reactivity. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology;27;1511-1520.

[19] Marcello, E., Gardoni, F., Di Luca, M., and Perez-Otano, I. (2010). An arginine stretch limits ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum. The Journal of biological chemistry;285;10376-10384.

[20] Aguilar-Calvo, P., Xiao, X., Bett, C., Erana, H., Soldau, K., Castilla, J., Nilsson, K. P., Surewicz., W. K., and Sigurdson, C. J. (2017) Post-translational modifications in PrP expand the conformational diversity of prions in vivo. Sci. Rep;7;43295.

[21] Oslowski, C. M. and F. Urano (2011). Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. Methods Enzymol;490;71-92.

[22] Bemporad, F. and F. Chiti (2012). Protein misfolded oligomers: experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationships. Chem Biol;19(3);315-327.

Abstract

The endocytosis of misfolded-GPI-anchored proteins is often regulated at the plasma membrane (PM) in a mutant-selective manner, which is advantageous to cells in that it ensures the safety of the endocytic pathway from misfolded proteins. Here, we present the molecular basis for this regulation by demonstrating the preemptive quality control of a pathogenic prion protein (PrP) mutant (Q212) that undergoes rapid plasma membrane turnover and extracellular release via ADAM10. The ADAM10-mediated triage reaction for Q212P occurs in the endoplasmic reticulum (ER) and PM. In the ER, the inactive form of ADAM10 recognizes the newly synthesized Q212P and accelerates its ER export. The sheddase activity of active ADAM10, acquired during passage through the subsequent secretory pathway, liberates Q212P from the GPI-anchor linked to the membrane and allows soluble Q212P to be released rapidly from the plasma membrane. This process is susceptible to redox perturbation, thereby accumulating Q212P oligomers at the cell surface. During the redox recovery, proteotoxic Q212P oligomers are reversibly released to the extracellular space, while ADAM10 deficiency interferes with the extracellular release of Q212P oligomers and renders cells more capable of viable recovery. This study provides insight into the mechanism underlying peripheral quality control of aberrant PrP that unexpectedly causes proteotoxicity.

Keywords : prion protein, ADAM10, protein quality control, protein degradation, endoplasmic reticulum