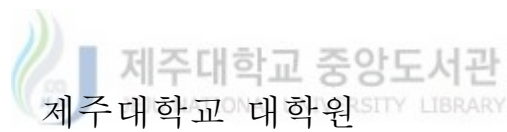


의학박사학위논문

Niemann-Pick disease, type C의 신경  
전달물질 변화와 치료표적물질로서의  
galectin-1에 관한 연구



의학과

변 경 희

2006년 6월

Niemann-Pick disease, type C의 신경  
전달물질 변화와 치료표적물질로서의  
galectin-1에 관한 연구

지도교수 이 봉 희

변 경 희

이 논문을 의학 박사학위 논문으로 제출함

2006년 6월

변경희의 의학 박사학위 논문을 인준함



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

심사위원장

위 원 \_\_\_\_\_

위 원 \_\_\_\_\_

위 원 \_\_\_\_\_

위 원 \_\_\_\_\_

제주대학교 대학원

2006년 6월

A study on the alteration of neurotransmitter  
system in Niemann-Pick disease, type C  
and galectin-1 as a novel therapeutic molecule

Kyung-Hee Byun

(Supervised by professor Bong-Hee Lee)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
DOCTOR OF PHILOSOPHY IN MEDICINE



DEPARTMENT OF MEDICINE  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

June, 2006

## ABSTRACT

Niemann-Pick disease type C (NPC) is a fatal autosomal recessive cholesterol disorder characterized by severe progressive neurodegeneration.

In this study, the alteration of neurotransmitter system and its recovery by galectin-1 has been investigated in NPC using proteomics, immunohistochemistry, Western blotting and image analysis equipped with a confocal microscope.

By proteomics study, glutamate receptor 2 (Glur R2) became up-regulated in 8-week-old npc<sup>-/-</sup> mice. The immunohistochemical study on neurotransmitters showed that glial GABA transporter (GAT-3) increased in both 4- and 8-week-old npc<sup>-/-</sup> mice and glutamic acid decarboxylase (GAD6) increased in 8-week-old npc<sup>-/-</sup> mice. Glial glutamate transporter, excitatory amino acid carrier-1 (EAAC1), decreased in 8-week-old npc<sup>-/-</sup> mice. When ionophore was treated in CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 cells, Ca<sup>2+</sup> influx was derived and lysosome was moved and decreased. Also, Ca<sup>2+</sup> influx was not derived after galectin-1 treatment, but lysosome was moved and reduced. By Western blotting study, P38, phospho p38, ERK1/2, phospho ERK1/2 decreased in CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 cells. Phospho p38, ERK1/2, phospho ERK1/2 increased by galectin-1 treatment in CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 cells.

In conclusion, these results may provide an insight for

understanding the basic mechanism of NPC in brain areas. These results also can provide applicability to gene therapy regarding several neurodegenerative diseases involving lipid accumulation.

Key word :  $\text{Ca}^{2+}$  influx, GABA, galectin-1, glutamate, lipid accumulation, lysosomal exocytosis, neurotransmitter system, Niemann-Pick disease type C



## 목 차

ABSTRACT .....	i
List of figures .....	iv
List of tables .....	vii
사용된 약어 .....	viii
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	7
1. npc +/+와 npc -/- 생쥐 해마의 단백질체 발현 조사 .....	7
2. GABA와 glutamate 수송체 발현 조사 .....	14
3. 리소솜 세포의 유출 조사 .....	20
4. MAP kinase 신호전달경로 조사 .....	26
III. 결과 .....	30
1. npc +/+, npc +/- 및 npc -/- 생쥐의 뇌조직에서 콜레스테롤 발현 .....	30
2. npc +/+와 npc -/- 생쥐 해마의 단백질체 발현 .....	30
3. GABA 및 glutamate 수송체 발현 .....	31
4. 리소솜 세포의 유출 .....	32
5. MAP kinase 신호전달 경로 .....	34
IV. 고찰 .....	66
V. 결론 .....	75
VI. 참고문헌 .....	76

## List of figures

Figure 1. Genotyping analysis with tail DNA by RT-PCR .....	31
Figure 2. Filipin staining of mouse brain tissue .....	32
Figure 3. Comparison of 2-DE maps from the hippocampal of npc +/+ and npc -/- mice .....	34
Figure 4. Immunohistochemical localization of GAT-1 in the hippocampal formation .....	37
Figure 5. Immunohistochemical localization of GAT-3 in the hippocampal formation .....	38
Figure 6. Immunohistochemical localization of GAD6 in the hippocampal formation .....	39
Figure 7. Immunohistochemical localization of EAAC1 in the hippocampal formation .....	40
Figure 8. Immunohistochemical localization of GLAST in the hippocampal formation .....	41
Figure 9. Immunohistochemical localization of GLT1 in the hippocampal formation .....	42
Figure 10. Densitometric analysis of GAT-1 immunoreactivity in the hippocampal formation .....	43
Figure 11. Densitometric analysis of GAT-3 immunoreactivity in the hippocampal formation .....	44
Figure 12. Densitometric analysis of GAT6 immunoreactivity in the hippocampal formation .....	45

Figure 13. Densitometric analysis of EAAC1 immunoreactivity in the hippocamal formation .....	46
Figure 14. Densitometric analysis of GALAST immunoreactivity in the hippocamal formation .....	47
Figure 15. Densitometric analysis of GLT1 immunoreactivity in the hippocamal formation .....	48
Figure 16. Schematic diagrams illustrating the expression patterns of the GABAergic and glutamatergic transporter system in npc -/- compared to npc-/- and npc+/- mice .....	49
Figure 17. Confocal fluorescence microscopy images after U18666A and ionophore treatment in CHO npc+/+ 25RA cells .....	51
Figure 18. A graph image of Ca <sup>2+</sup> influx and lysosomal exocytosis after U18666A and ionophore treatment in CHO npc +/+ 25RA cells .....	52
Figure 19. Confocal fluorescence microscopy images after ionophore treatment in CHO npc-/- CT43 cells .....	53
Figure 20. A graph image of Ca <sup>2+</sup> influx and lysosomal exocytosis after ionophore treatment in CHO npc-/- CT43 cells .....	54
Figure 21. Filipin staining in CHO npc-/- CT43 cells .....	55
Figure 22. Confocal fluorescence microscopy images after U18666A and galectin-1 treatment in CHO npc +/+ 25RA cells .....	58
Figure 23. Graph image of lysosomal exocytosis after U18666A and galectin-1 treatment in CHO npc +/+ 25RA cells .....	59
Figure 24. Confocal fluorescence microscopy images after galectin-1 treatment in CHO npc -/- CT43 cells .....	60



Figure 25. A graph image of lysosomal exocytosis after galectin 1 treatment in CHO npc $-/-$ CT43 cells .....	61
Figure 26. Filipin staining in CHO npc $-/-$ CT43 cells .....	62
Figure 27. Detection of ERK1/2, p38, JNK, pERK1/2, pp38, pJNK and beta-actin by Western blot analysis .....	65
Figure 28. The densitometric analysis of MAPK protein (ERK1/2, p38, phospho ERK1/2, phopho p38) .....	66



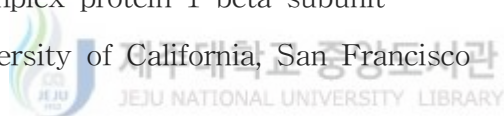
## List of tables

Table 1.	List of chemicals used in tail DNA analysis and proteome analysis .....	8
Table 2.	List of chemicals used in tail DNA analysis and immunohistochemistry .....	16
Table 3.	List of chemicals used in cell culture and lysosomal exocytosis .....	21
Table 4.	List of chemicals used in cell culture and western blotting .....	27
Table 5.	Up-regulated protein identified by MALDI-TOF analysis of the npc $-/-$ hippocampus .....	35
Table 6.	Cholesterol quantitative analysis after ionophore treatment in CHO npc $-/-$ CT43 cells using cholesterol quantitative kit .....	56
Table 7.	Cholesterol quantitative analysis after galecin-1 treatment in CHO npc $-/-$ CT43 cells using cholesterol quantitative kit .....	63

## 사용된 약어

ACTH	adrenocorticotrophic hormone
CAML	calcium signal modulating cyclophilin ligand
CHCA	$\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic-acid
ECL	chemiluminescence substrate system
DG	dendate gyrus
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	dithiothreitol
EAAT	excitatory amino acid transporter
ERK	extracellular signal-related kinase
FBS	heat-inactivated fetal bovine serum
F-12	ham's F-12
GAD	glutamate decarboxylase
GLAST	L-glutamate/L-aspartate transporter
GLT1	glutamate transporter 1
Glur R2	glutamate receptor 2
Hsp60	60-kDa heat shock protein, mitochondrial precursor
IDPc	NADP(1)-dependent isocitrate dehydrogenase
IEF	isoelectric focusing
IPG	immobilized pH gradient
JNK	stress-activated protein kinase
LDL	low-density lipoprotein
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight

MKK	MAP	kinase kinase
N-CAM	2	neural cell adhesion molecule 2
NFTs		neurofibrillary tangles
NPC		Niemann-Pick disease type C
PB		sodium phosphate buffer
PBS		phosphate buffered saline
PCR		polymerase chain reaction
PMF		peptide mass fingerprinting
PMSF		phenylmethylsulfonyl fluoride
PMT		photo multiplier tube
p38		p38 map kinase
SDS		sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE		sulfate-polyacrylamide
TCP-1-beta		t-complex protein 1 beta subunit
UCSF		University of California, San Francisco



# I. 서론

## 1. 연구배경

지질대사장애 질환인 지질 축적 질환은 특이한 지질 대사에 필요한 효소 결핍으로 야기되고 대사 이상의 정도는 완전한 정도에서 중간정도까지 다양하게 나타나며, 지질들이 조직 또는 장기에 축적된다. 특히 치명적으로 간, 비종대와 중추신경계의 손상을 동반하는 경우가 많으며 대표적으로 소아형 고셔병(Gaucher's disease), NPC 등이 여기에 속하고 중추신경계의 손상 없이 간, 비종대에만 손상이 있는 질환으로는 고셔병 type 1, Niemann-Pick병 type B(만성형)등이 있다 (Jin 등 2004; Vanier와 Millat, 2003).

Niemann-Pick 병은 3가지 주요한 유형이 있다. 이는 A, B, C 3가지를 들 수 있는데 모든 유형이 상염색체 열성유전을 하는 것으로 알려져 있다 (Schuchman과 Miranda, 1997). Type A와 B는 주로 Ashkenazi 유대인들에게 흔히 발병하며, type C는 생화학적으로나 유전학적인 배경이 다른 질환으로 모든 인종에서 나타난다고 알려져 있다 (Ip와 Davis, 1998).

NPC는 서로 다른 두개의 유전자에 의해 영향을 받는다는 보고되었다 (Castea 등 1997). 그 중 하나는 환자의 약 95%에서 돌연변이를 일으키는 18번 염색체의 장완(18q11-12)에 위치하여 콜레스테롤 대사에 관여하는 npc1 유전자이고 (Castea 등 1997), 다른 하나는 5%의 돌연변이를 일으키는 HE1 유전자이다 (Naureckiene 등 2000). 이 두개의 유전자가 콜레스테롤의 세포내 수송체에 영향을 주는 단백질을 만든다. 이러한

npc 유전자의 변화는 콜레스테롤의 축적을 야기시킨다고 알려져 있는데 특히 중추신경계와 간 등에서 많은 양의 콜레스테롤이 세포 내에 축적되어 저 콜레스테롤 혈증을 보인다.

NPC 질환에서 특징적으로 나타나는 축색돌기(axon), 스페로이드(spheroid)는 뇌줄기(brain stem)나 소뇌의 백색질과 같은 유수축삭(myelinated axon)을 갖는 지역에 집중되지만, 신경섬유원 농축(NFTs)은 알츠하이머병에서 신경섬유원 농축이 호발 하는 부위인 해마(hippocampus), 내후각뇌피질(entorhinal cortex), 시상(thalamus), 기저핵(basal ganglia)에서 발견된다. 즉 항원이나 구조적인 면에서 알츠하이머병과 유사한 NFTs의 생성은 알츠하이머병보다 NPC에서 20~30년 더 빠르게 나타난다 (Auer 등 1995; Vanier와 Millat, 2003).

NPC에 대한 다양한 연구가 진행되고 있으며 최근에 npc1 유전자가 클로닝되었고, 이 유전자를 knock out 시킨 생쥐가 개발되어 *in vitro* 및 *in vivo* 수준에서 연구가 가능하게 되었다 (Morris와 Carstea, 1998; Somers 등 1999). 그러나 NPC의 생물학적인 특성이나 치료에 관한 보고는 없다.

최근 다양한 질환의 병인을 밝혀내기 위하여 단백질의 기능을 대규모 적이며, 효율적으로 파악할 수 있는 단백질체학(proteomics)이 다방면에서 적용되고 있다. 단백질체학은 단백질의 발현과 발현 후 변형, 기능 및 조절작용, 다른 단백질과의 상호작용, 결합 등에 초점을 두어 분자생화학적으로 이들 단백질간의 기능 및 상호연관 네트워크를 규명하는 분야이다. 단백질체학의 일차적인 목적은 어떤 단백질이 어떠한 환경에서 어느 정도 발현되는가를 파악하는 것이다. 한사람의 체세포에 있는 유전자 집합 즉 게놈은 세포마다 모두 동일하지만 그것이 발현하여 생성해내는 단백질들은 발현 시기, 장소, 환경에 따라 모두 달라진다고 알려져 있다

(Pandy와 Mann, 2000; Wilinks 등 1995, 1996). 거의 모든 질병의 원인은 단백질의 작용 이상 나아가서 그것을 발현하는 유전자의 조절 이상에 기인하는 것이므로 질병에 걸린 세포에서는 정상 세포와는 다른 단백질 유형을 보일 것으로 추정된다. 단백질체학으로 여러 가지 병인을 밝힐 수 있음에도 불구하고 현재 NPC에 대한 단백질체 분석에 대한 연구는 미흡하다.

중추신경계의 신경전달에는 많은 종류의 아미노산 신경전달물질이 관여하는데 높은 비율을 차지하고 있는 물질이 GABA와 glutamate이다. 그 중 GABA는 중추신경계 시냅스 중 약 40%의 시냅스에서 신경전달을 담당하고 특히 해마에 높은 농도로 존재하고 있으며, GABA성 신경전도로는 여러 종류의 장애에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다 (Iadarola와 Gale, 1982; Reynolds 등 1990; Schuchman과 Miranda, 1997). 또한 생리학적, 생화학적, 약리학적 그리고 형태학적 연구에 의하면 (Roberts와 Kuriyama 1968; Wu 1983) GABA는 세포질 효소인 GAD에 의해 glutamate로부터 생합성된다고 알려져 있다. 이 GAD에 의한 GABA 농도의 극심한 감소는 동물의 경련 및 발작현상과 같은 큰 변화를 가져오며 간질병, 헌팅턴병(Huntington's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 정신분열증, 지연성운동장애, 노인성치매 등 여러 가지 비이상적인 신경증세의 원인이 된다. 그러므로 GAD는 GABAergic neuron과 그들의 신경전달 대사에 특이적인 표지물질로 이용되고 있다. 그리고 glutamate는 척추동물 중추신경계에서 가장 중요한 흥분성 신경전달물질로서 기억력, 학습 및 운동기능 등에 관여하고 중추신경계의 발달과정에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Mattson 등 1988; Pearce 등 1987). 척추동물에서 EAAT는 신경세포와 신경교세포에 존재하는 흥분성 신경전달물질을 세포 내로 다시 유입시킴으로써 흥분성

신경전달물질의 농도를 세포독성을 유발하는 수준 이하로 유지하는 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다 (Kannai와 Hediger, 1992; Nicholls와 Atwell, 1990). 이처럼 GABA와 glutamate는 중추신경계의 신경전달에 중요한 역할을 하지만, 중추신경계에 손상이 있는 NPC 질환에서의 신경전달물질의 변화에 대한 보고는 미흡하다.

콜레스테롤 생성은 내부와 외부 기원의 두 가지로 이루어지며 내부 기원은 세포내 합성에 의하고, 외부기원인 경우는 LDL receptor를 경유한 LDL에 의하여 생성되는 기전을 밟는다. 즉 LDL receptor는 세포막에 존재하며 LDL을 세포 안으로 받아들여 외부 기원의 콜레스테롤을 생성한다 (Voyno-Yasenetskaya 등 1993).

칼슘 이온이 신경세포로 들어오면 소포를 원형질막으로 이동시켜 신경전달물질을 방출해 다른 신경세포를 활성화시켜 신경 메시지를 전달한다고 알려져 있고, 칼슘 통로를 통해 유입된 칼슘에 의해 세포질 내에 있는 소포들이 원형질막의 안쪽 표면으로 이동하여 막융합으로 소낭의 내용물을 막외부로 방출시키는 작용인 세포외 유출이 발생하며 (Jaiswal과 Andrews, 2002; Terasaki 등 1997), 세포 외부로 분비예정인 많은 단백질들은 분비 소낭내에서 포장된 후 세포외 유출에 의해 외부로 방출된다. 그러나 NPC의 경우 npc1 유전자의 부재로 이러한 작용이 이루어지지 못한다고 알려져 있다.

특히 galectin-1은 당단백질로 세포내에서 자유롭게 돌아다니는 ribosome에 의해 합성된다 (Wilson 등 1989). 생체 조직에서 정제한 galectin-1은 폴리펩티드 서열을 분석하면 N-말단에 acetylation되어 있는 것을 확인할 수 있는데, 이것은 일반적으로 분비되는 단백질의 특성을 가지고 있지 않으면서 세포의 내외에서 여러 가지 특성을 나타낸다 (Clerch 등 1988; Wilson 등 1989). Galectin-1은 다양한 세포에서 여러



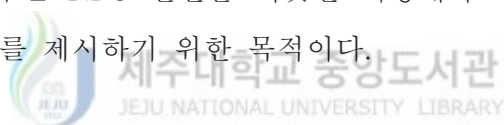
가지 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 세포 특이적으로 작용할 수도 있는데 세포 주기의 조절자의 역할을 수행하기도 하며, 세포 스스로 죽는 기능도 수행하는 것으로 알려져 있으며 세포와 세포간 혹은 세포와 세포의 물질간의 결합에 있어서도 유착을 촉진한다거나 방해하는 서로 반대의 역할을 하기도 한다 (Clerch 등 1988). 또한 galectin-1은 칼슘 유입을 유도한다고 알려져 있지만 현재까지 리소솜 세포의 유출을 유도한다는 보고는 없다.

MAP kinase 신호전달 경로는 세포가 외부의 환경변화에 따른 자극들을 인지하여 그 정보를 세포질 및 세포핵 내부로 전달하는 과정에 관여하는 대표적인 신호전달 경로이다. 특히 세포의 성장, 발생, 분화, 사멸 등의 조절기전에 관여 한다 (Lai 등 2001). 척추동물세포에 존재하는 MAP kinase에는 ERK, JNK, p38 등이 있다 (Xiao 등 2000). 이들은 세가지의 구별적인 신호전달을 통해 조절되어지는 것으로 알려져 있다. ERK의 활성화는 다양한 성장인자, cytokines, 그리고 phorbol esters에 의해 이루어지며, 많은 세포에서 세포 증식과 분화를 유도하는 기능을 나타낸다. 반면 JNK와 p38은 성장인자와 염증유도 cytokine(tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1), 자외선 노출, 방사선 조사, 열 충격, 그리고 삼투 효과 등의 스트레스에 의해 활성이 증가되는 것으로 알려져 있다 (Adler 등 1992; Barr와 Bogoyecitch, 2001; Davis, 2000).

## 2. 연구목적

본 연구에서 NPC의 생물학적 특성을 조사하기 위해 첫째, NPC 질환 생쥐 모델에서 단백질체의 발현 차이를 조사하고, 둘째 GABA 및 glutamate 신경전달 물질 발현 양상의 차이를 조사한다. 또한 NPC 질환의 직접적인 원인인 리소솜 세포외 유출을 유도하기 위하여 칼슘 유입에 의해 리소솜 세포외 유출 유도된다는 보고를 근거로 galectin-1을 이용해 리소솜 세포외 유출이 유도되어 정상 회복되는지 조사하는 것이 목적이다. 마지막으로 galectin-1에 의해 정상 회복되는 신호전달 경로를 확인하기 위해 세포가 외부의 환경 변화에 따른 자극들을 인지하여 그 정보를 세포질 및 세포핵 내부로 전달하는 과정에 관여하는 대표적인 신호전달 경로인 MAP kinase 신호전달 경로를 확인하고자 하는 것이 목적이다.

이상과 같이 본 연구는 NPC 질환을 비롯한 지방대사 질환의 치료에 관한 중요한 기초자료를 제시하기 위한 목적이다.



## II. 재료 및 방법

### 1. npc<sup>+/+</sup>와 npc<sup>-/-</sup> 생쥐 해마의 단백질체 발현 조사

#### 1-1. 재료

##### 1-1-1. 실험동물

체중 30 g 내외의 npc<sup>+/+</sup>와 npc<sup>-/-</sup> 생쥐를 암수 구별 없이 각각 3마리 씩 사용하였다. 실험동물은 성숙한 npc<sup>+/+</sup> 암컷과 수컷을 교배시켜 태어난 새끼의 꼬리 DNA 검사 후 npc<sup>+/+</sup>와 npc<sup>-/-</sup> 생쥐를 구별하여 외부와 격리된 20~25℃의 온도를 유지하는 사육장에서 사료와 물을 자유롭게 공급하며 사육하였다. 실험에는 혈액 내나 세포 내의 콜레스테롤 농도에 변화가 크게 나타나는 생후 8주령의 생쥐를 사용하였다.

##### 1-1-2. 시약

꼬리 DNA 검사, 단백질체 발현 조사를 위해 사용한 시약은 Table 1과 같다.

Table 1. List of chemicals used in tail DNA analysis and proteome analysis.

Experiment	Reagent	Company
tail DNA analysis	genomic DNA extraction kit	Intron biotechnology, Korea
	premix	Intron biotechnology, Korea
proteome analysis	PMSF	Sigma Inc., USA
	acrylamide	Amresco Inc., USA
	bis-acrylamide	Amresco Inc., USA
	SDS	Amresco Inc., USA
	DTT	Amresco Inc., USA
	CHAPS	Sigma Inc., USA
	iodoacetamide	Sigma Inc., USA
	tris base	Amresco Inc., USA
	urea	Amresco Inc., USA
	thiourea	Amresco Inc., USA
	immobiline drystrip gel	Ammersham Biotec Inc., USA
	IPG buffer	Ammersham Biotec Inc., USA
	2D quant kit	Ammersham Biotec Inc., USA
	sequencing grade modified trypsin	Promega Inc., USA
	sodium thiosulfate	Sigma Inc., USA
	potassium fericyanide	Sigma Inc., USA
	ammonium bicarbonate	Sigma Inc., USA
	trifluoroacetic acid	Sigma Inc., USA
	octyl $\beta$ -D-thiogluopyranoside	Sigma Inc., USA
	CHCA	Sigma Inc., USA
	angiotensin I	Sigma Inc., USA
	des-Arg bradykinin(fragment 2-9)	Sigma Inc., USA
	ACTH fragment 1-17	Sigma Inc., USA
	micro-adsorptive C18 ZipTip	Millipore Inc., USA

## 1-2. 실험방법

### 1-2-1. 꼬리 DNA 검사

npc<sup>+/-</sup> 생쥐 암컷과 수컷을 교배시켜 태어난 새끼의 꼬리 1 cm를 잘라 액체 질소가 들어있는 막자사발에 넣은 후 갈았다. 잘 갈아진 꼬리를 1.5 ml 튜브에 넣고 genomic DNA extraction kit을 이용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA는 PCR에 의해 npc<sup>+/+</sup>, npc<sup>+/-</sup> 및 npc<sup>-/-</sup> 생쥐를 구별하였다. PCR은 premix에 증류수 15  $\mu$ l, 4종류의 primer(A: TCT CAC AGC CAC AAG CTT CC, B: GGT GCT GGA CAG CCA AGT A, C: TGA GCC CAA GCA TAA CTT CC, D: CTG TAG CTC ATC TGC CAT CG)를 각각 1  $\mu$ l, DNA 1  $\mu$ l를 잘 혼합한 다음 Perkin-Elmer thermal cycler를 이용하여 수행하였다. 이때 PCR 조건은 94°C에서 4분(hot start) 반응시키고, 94°C에서 30초 (denaturation), 60°C에서 45초(annealing), 72°C에서 45초 extension)를 35회 반복하여 반응시켰다. PCR에 의해 생성된 산물은 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다.

### 1-2-2. 단백질 분석 시료준비

npc<sup>+/+</sup>와 npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 해마를 분리한 후 protease inhibitor를 첨가한 lysis buffer(7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 2% DTT) 200  $\mu$ l를 넣고 초음파로 분쇄하였다. 초음파 분쇄가 끝난 추출물에 DNase I을 넣어 30분간 반응시키고 19,000  $\times$  g로 15분간 원심분리한 후 상층액

을 시료로 사용하였다. 해마의 추출과정은 4°C에서 수행하였고 추출한 시료는 2D quant kit을 이용하여 정량하여 npc<sup>+/+</sup>와 npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 해마 단백질을 각각 50 µg씩 사용하였다.

### 1-2-3. IEF

추출물한 단백질 50 µg을 rehydration buffer(7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 0.2% DTT, 0.5% IPG buffer, 0.001% bromophenol blue) 350 µl에 완전히 녹인 후 IPG strip holder(Ammersham Biotec Inc. USA)에 고르게 퍼지게 분주한 다음 IPG strip(linear pH gradient 3-10, 18 cm)을 올리고 cover fluid oil 1.5 ml로 strip을 완전히 덮은 다음 isoelectric focusing을 수행하였다. IPGphor system(Ammersham Biotec Inc. USA)을 이용한 focusing 조건은 electronic panel의 온도가 20°C로 실험이 끝날 때까지 유지되게 하였으며, 12시간 동안 전기를 걸지 않고 rehydration 시킨 후 양전극에 electrode wick을 넣고 50 volt에서 1시간, 100 volt에서 1시간, 200 volt에서 1시간, 500 volt에서 1시간, 1000 volt에서 1시간, 8000 volt까지 점진적으로 4시간, 8000 volt에서 최종 60,000 Vhrs가 되도록 프로그래밍하여 실험을 수행하였다.

#### 1-2-4. Strip 평형 및 SDS-PAGE

IPG strip을 SDS-PAGE에 적용하기 전에 equilibration 과정을 수행하였다. Equilibration holder에 10 ml의 SDS-PAGE equilibration buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromphenol blue)와 100 mg의 DTT를 넣고 15분간 교반기에서 반응시키고 다시 equilibration buffer에 400 mg의 iodoacetamide를 넣어 15분간 반응시켰다. 평형이 끝난 IPG strip을 전기영동 완충용액(0.025 M Tris-Cl, pH 8.3, 0.195 M glycine, 0.1% SDS)으로 수세한 다음 acrylamide gel의 상단부에 넣고 빈공간은 0.5% agarose 용액으로 채워 넣었다. 초기에는 IPG strip의 단백질들이 안정적으로 SDS-PAGE gel 속으로 들어갈 수 있게 낮은 전력과 짧은 시간 동안(3 W/gel, 30분) 전기영동 한 후 전력을 올려 (100 W) 수 시간 전기영동을 수행하였다.

#### 1-2-5. Silver 염색



전기영동한 gel을 고정화 용액(30% ethanol, 10% acetic acid)에 15분씩 2회 동안 교반기에서 교반시켜 gel을 고정시키고, sensitization 용액(10% ethanol, 0.2% sodium thiosulfate, 6.8% sodium acetate)으로 30분간 sensitization하였다. Sensitization한 gel을 증류수로 5분씩 3번 수세하였다. 이 gel을 0.2% AgNO<sub>3</sub> 용액에 넣어서 교반기에서 20분간 반응시킨 후 증류수로 1분간 2회 수세하였다. 단백질 분리대의 현상은 현상액(0.025% formaldehyde, 0.001% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O)에 gel을 넣어 관찰하였으며, 단백질 분리대가 충분히 현상된 후 착상용액(2.5% EDTA)으로 gel

을 옮겨 분리대를 착상시켰다. Silver 염색이 끝난 gel은 4℃에 보관하여 MALDI-TOF 분석에 사용하였다.

#### 1-2-6. 이미지 분석

염색이 끝난 gel을 EPSON 사의 epon expression 1680 PRO를 사용하여 이미지화하였다. 이 이미지화된 gel을 amersham 이미지 분석 도구인 melanie 프로그램을 사용하여 분석하였고, spot은 프로그램에 의해 자동으로 선택되어져 분석되었다.

#### 1-2-7. MALDI-TOF 분석

##### 1-2-7-1. In-gel digestion



Silver 염색한 gel에서 spot을 지름 1 mm가 되도록 팁(tip)을 사용하여 잘라내어 30 mM potassium ferricyanide/100 mM sodium thiosulfate (1:1)를 혼합한 용액에 넣어서 탈 염색시켰다. Gel 조각을 200  $\mu$ l 증류수로 10분간 4번 수세하고, 50% ACN/25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.0) 용액 200  $\mu$ l를 넣어 15분간 탈수시켰다. 탈수된 gel 조각을 speed-vac에서 1시간 동안 건조시키고 10 mM DTT/0.1 M ammonium bicarbonate(pH 8.0)용액 40  $\mu$ l를 넣어 56℃에서 45분 동안 반응 시킨 후 용액을 제거하였다. 0.1 M ammonium bicarbonate(pH 8.0)/55 mM iodoacetamide 용액 40  $\mu$ l를 넣어 상온의 압실에서 30분간 반응 시켜 용



액을 제거하고 0.1 M ammonium bicarbonate(pH 8.0) 20  $\mu$ l를 넣고 5분간 반응시킨 후 acetonitrile 20  $\mu$ l를 넣어 15분간 더 반응시켰다. 위 과정을 1회 반복한 후 gel 조각을 speed-vac에서 1시간 동안 건조시켰다. 10  $\mu$ g/ml의 sequencing grade modified trypsin 18  $\mu$ l와 1% Octyl  $\beta$ -D-thioglucoopyranoside 2  $\mu$ l를 혼합하여 gel에 분주하여 37°C에서 16시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 상층액을 새 튜브에 옮기고 5% TFA/Acetinitrile(1:1) 혼합용액을 넣어 45분간 교반하여 단백질을 용출하였다. 상층액을 모은 후 위 과정을 2회 반복 수행하였다. 모아진 용액을 speed-vac을 사용하여 완전히 건조하고 micro-adsorptive C18 ZipTip을 사용하여 용출된 단백질의 불순물을 제거하였다. 먼저 ZipTip을 100% ACN 10  $\mu$ l로 수세하고 0.1% TFA 10  $\mu$ l로 3회 반복하여 수세해서 완전히 건조한 단백질 시료에 0.1% TFA 5  $\mu$ l를 넣어 현탁하였다. ZipTip에 시료를 6회 pipetting한 후 액체를 제거하고 0.1% TFA 10  $\mu$ l로 3회 수세한 후 30% ACN/0.1% TFA 2  $\mu$ l로 단백질을 용출하였다.



#### 1-2-7-2. MALDI-TOF를 이용한 분석

추출한 혼합물을 10 mg/ml의 CHCA 용액과 1:1 비율로 섞어 시료 플레이트에 분주하여 건조시켰다. MALDI-TOF를 통하여 대상 단백질의 전체 질량이나 절단효소에 의해 조각난 단백질 절편들의 분자량을 측정하였다. 단백질분석을 위해 Voyager DE-STR MALDI-TOF spectrometer(Applied Biosystems Inc., USA)를 사용하였다. 스펙트럼은 delayde extraction reflector 모드에서 20 kV acceleration voltage와 200 ns delay time으로 얻었다. 분자량 보정은 외부 표준물질인 angiotensin

I, des-Arg bradykinin(fragment 2~9), adrenocorticotrophic hormone(ACTH) fragment 1-17을 이용하였다. 최종 스펙트럼은 200회 레이저를 조사하고 평균하여 얻었다.

### 1-2-7-3. 데이터베이스 검색

PMF를 통한 단백질의 확인은 UCSF에서 제공하는 MS-Fit나 Rockefeller University에서 제공하는 ProFound를 이용하여 검색하였다. 단백질 검색은 monoisotopic mass를 사용하였고 mass tolerance는 50 ppm으로 하였다.



## 2. GABA와 glutamate 수송체 발현 조사

### 2-1. 재료

#### 2-1-1. 실험동물

체중 30 g 내외의 npc<sup>+/+</sup>, npc<sup>+/-</sup> 및 npc<sup>-/-</sup> 생쥐를 암수 구별 없이 각각 3마리씩 사용하였다. 실험동물은 성숙한 npc<sup>+/-</sup> 암컷과 수컷을 교배시켜 태어난 새끼의 꼬리 DNA 검사 후, npc<sup>+/+</sup>, npc<sup>+/-</sup> 및 npc<sup>-/-</sup> 생쥐를 구별하여 외부와 격리된 20~25°C의 온도를 유지하는 사육장에서 사료와 물을 자유로이 공급하며 사육하였다. 실험에는 생후 4주령 생쥐와 생후 8주령 생쥐를 사용하였다.

#### 2-1-2. 시약



GABA 및 glutamate 수송체의 면역반응을 조사하기 위한 시약은 Table 2와 같다.

Table 2. List of chemicals used in tail DNA analysis and immunohistochemistry.

Experiment	Reagent	Company
tail DNA analysis	genomic DNA extraction kit	Intron biotechnology, Korea
	premix	Intron biotechnology, Korea
primary antibody	GAT-1	Oncogene Inc., USA
	GAT-3	Oncogene Inc., USA
	GAD6	Oncogene Inc., USA
	EAAC1	Chemicon Inc., USA
	GLAST	Chemicon Inc., USA
	GLT1	Chemicon Inc., USA
secondary antibody	biotinylated anti-rabbit IgG	Vector Laboratories Inc., USA
	biotinylated anti-goat IgG	Vector Laboratories Inc., USA
	biotinylated anti-guinea pig IgG	Vector Laboratories Inc., USA
ABC	ABC solution	Vector Laboratories Inc., USA

## 2-2. 실험방법

### 2-2-1. 꼬리 DNA 검사

npc<sup>+/-</sup> 생쥐 암컷과 수컷을 교배시켜 태어난 새끼의 꼬리 1 cm를 잘라 액체 질소가 들어있는 막자사발에 넣은 후 갈았다. 잘 갈아진 꼬리를 1.5 ml 튜브에 넣고 genomic DNA extraction kit을 이용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA는 PCR에 의해 npc<sup>+/+</sup>, npc<sup>+/-</sup> 및 npc<sup>-/-</sup> 생쥐를 구별하였다. PCR은 premix에 증류수 15  $\mu$ l, 4종류의 primer(A: TCT CAC AGC CAC AAG CTT CC, B: GGT GCT GGA CAG CCA AGT A, C: TGA GCC CAA GCA TAA CTT CC, D: CTG TAG CTC ATC TGC CAT CG)를 각각 1  $\mu$ l, DNA 1  $\mu$ l를 잘 혼합한 다음 Perkin-Elmer thermal cycler를 이용하여 수행하였다. 이때 PCR 조건은 94°C에서 4분(hot start) 반응시키고, 94°C에서 30초(denaturation), 60°C에서 45초(annealing), 72°C에서 45초(extension)를 35회 반복하여 반응시켰다. PCR에 의해 생성된 산물은 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다.

### 2-2-2. npc<sup>+/+</sup>, npc<sup>+/-</sup> 및 npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 해마 조직준비

관류고정은 먼저 0.1 M PB에 heparin(1000 IU/1000 ml)을 혼합한 용액을 10분간 관류시키고 4% paraformal dehyde-lysine-periodate를 30분간 관류시켰다. 관류고정이 끝난 후 대뇌, 소뇌 및 뇌줄기 등을 적출하고 동일 고정액에 넣어 4°C에서 4시간 동안 후고정 하였다. 그 후 다시

0.1 M PB로 1시간 동안 수세하고 20% phosphate buffered sucrose 용액에 24시간 동안 담가 보관하였다. 보관된 뇌조직들은 동결절편기 (LEICA Inc., USA)를 이용하여 30  $\mu\text{m}$  두께의 관상연속절편을 만들어 6 well plate에 순서대로 보관하였으며 총 약 300장 정도의 조직절편을 free floating 방법으로 면역조직화학염색을 시행하였다.

### 2-2-3. GABA와 glutamate 수송체의 면역화학염색

6 well plate의 조직 중 일부의 조직절편으로 GAT-1, GAT-3, GAD6, EAAC1, GLAST, GLT1에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다. 염색은 GAT-1(1:1,000), GAT-3(1:1,000), GAD6(1:100), EAAC1(1:4,000), GLAST(1:8,000), GLT1(1:10,000)으로 희석한 1차 항체에 조직절편들을 담가 실온에서 15시간 동안 반응시켰다. 이때 1차 항체의 희석은 0.1 M PB에 1% normal goat serum과 0.3% Triton X-100을 혼합한 용액을 사용하였다. 그 후 조직절편들은 0.1 M PB로 실온에서 15분간 2회 수세하여 2차 항체인 biotinylated anti-rabbit IgG(1:200), biotinylated anti-goat IgG(1:200), biotinylated anti-guinea pig IgG(1:200)와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 조직절편들은 0.1 M PB로 15분간 2회의 수세과정을 거친 후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에 담가 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 0.1 M PB로 15분간 2회 수세하고 30 mg의 3-3' diaminobenzidine를 150 ml의 0.1 M PB에 녹인 용액에서 5분간 반응시킨 후 0.005% 과산화수소를 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 5분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 0.1 M PB로 15분간 3회 수세하고 gelatin이 입혀진 슬라이드 위에 차례대로 얹어

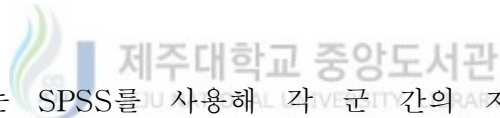
4°C에서 12시간 이상 건조시켰다. 그 후 통상적인 방법에 따라 ethanol과 xylene의 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 2-2-4. Filipin 염색

준비된 npc+/+, npc+/- 및 npc-/- 생쥐의 뇌조직을 0.1 M PB로 3회 수세하고 조직을 filipin 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PB 용액에 넣어 암실의 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 glycerin/0.1 M PB(29:1)로 봉입하여 형광현미경으로 관찰하였다.

#### 2-2-5. 자료의 통계처리

자료의 통계처리는 SPSS를 사용해 각 군 간의 자료에 대해서 student T-test(non-paired,  $p < 0.05$ )를 시행하여 통계적으로 유의한 차이를 보이는 뇌의 각 부위를 검증하였다.



### 3. 리소좀 세포의 유출 조사

#### 3-1. 재료

##### 3-1-1. 세포

CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA 세포주와 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주는 Dr. Chang TY로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

##### 3-1-2. 시약

CHO 세포에서 리소좀 세포의 유출을 확인하기 위한 시약은 Table 3과 같다.





Table 3. List of chemicals used in cell culture and lysosomal exocytosis.

Experiment	Reagent	Company
cell culture	F-12	GIBCO Inc., USA
	L-glutamine	GIBCO Inc., USA
	penicillin	GIBCO Inc., USA
	streptomycin	GIBCO Inc., USA
	FBS	GIBCO Inc., USA
lysosomal exocytosis	U18666A	Biomol Laboratories Inc., USA
	lysotracker	Molecular probes Inc.,USA
	fluo-3 AM	Molecular probes Inc.,USA
	ionophore	Sigma Inc., USA
	filipin	Sigma Inc., USA
	cholesterol quant kit	Asan Inc., Korea
	glass bottom culture dish	Matteck Inc., USA

## 3-2. 실험방법

### 3-2-1. 세포배양

CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA 세포주와 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주는 L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 10% FBS가 첨가된 F-12 배지를 사용하여 37°C, CO<sub>2</sub> 5%가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

### 3-2-2. U18666A 투여

CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA 세포 2×10<sup>4</sup>개를 glass bottom culture dish에 분주하여 24시간 배양하여 안정화시키고, U18666A(2 µg/1 ml PBS)를 분주한 후 다시 24시간 배양하였다.



### 3-2-3. 칼슘 유입 및 리소좀 세포의 유출 조사

#### 3-2-3-1. Lysotracker 염색

U18666A를 투여하여 배양한 CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA 세포와 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포의 배지를 제거하고 새로운 F-12 배지 200 µl와 500 nM lysotracker 4 µl를 분주하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 온도를 유지한 배양기에서 1시간 동안 염색하였다.

### 3-2-3-2. Fluo-3 염색

칼슘 지시제인 fluo-3 AM을 DMSO에 50  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ 로 녹여 냉동 보관 후 사용 직전에 녹여서 사용하였다. Lysotracker 염색이 끝난 후, 배양접시에 있는 배지를 버리고 새로운 F-12 배지 200  $\mu\text{l}$ 와 fluo-3(50  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$  DMSO) 2  $\mu\text{l}$ 를 분주하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 온도를 유지한 배양기에서 20분간 염색하였다.

### 3-2-3-3. Ionophore 투여 후 칼슘 유입 및 리소솜 세포외 유출 관찰

칼슘 유입 및 리소솜 세포외 유출은 공초점 레이저 현미경을 사용하여 관찰하였다. 공초점 레이저 현미경은 IX 70 형광 도립현미경에 레이저가 부착된 Fluoview 300(Olympus, Japan)을 사용하여 20 × 대물렌즈, 해상도를 512 × 512, 레이저 감도를 30으로 맞추고 후, 초점을 맞추어 2초 간격으로 300초 동안 스캔하였으며 매 실험마다 동일한 PMT값으로 조절하여 실험하였다. Scan 27회째에 ionophore(1 mg/1.1 ml DMSO) 5  $\mu\text{l}$ 를 투여하여 300초 동안 찍었다. 300초 동안의 세포내 칼슘 유입 및 리소솜 세포외 유출의 이미지 분석은 단일세포 3개를 지정하여 단위 면적당 relative fluorescence intensity를 그래프로 그려 분석하였다.

#### 3-2-3-4. Galectin-1 투여 후 칼슘 유입 및 리소솜 세포외 유출 조사

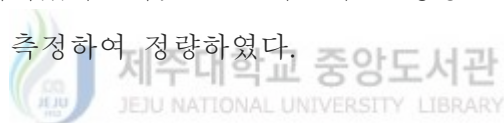
공초점 레이저 현미경은 IX 70 형광 도립현미경에 레이저가 부착된 Fluoview 300(Olympus, Japan)을 사용하여 20 × 대물렌즈, 해상도를 512 × 512, 레이저 감도를 30 으로 맞춘 후, 초점을 맞추어 2초 간격으로 300초 동안 스캔하였으며 매 실험마다 동일한 PMT값으로 조절하여 실험하였다. 27회째에 galectin-1(1 mg/1 ml PBS) 50  $\mu$ l를 투여하여 300초 간 찍었다. 300초 동안의 세포내 칼슘 유입 및 리소솜 세포외 유출의 이미지 분석은 단일세포 3개를 지정하여 단위 면적당 relative fluorescence intensity를 그래프로 그려 분석하였다.

#### 3-2-4. Filipin 염색

칼슘 유입 및 리소솜 세포외 유출을 확인한 세포는 0.1 M PB로 수세하고 4% paraformaldehyde 200  $\mu$ l를 넣어 20분 동안 고정하였다. 고정이 끝난 세포는 0.1 M PB로 3회 수세하고 filipin 50  $\mu$ g/ml PB 200 $\mu$ l를 분주하여 암실의 실온에서 2시간 동안 염색시켰다. 염색이 끝나면 glycerin/0.1 M PB(29:1)로 봉입하여 형광 현미경으로 관찰하였다.

### 3-2-5. 콜레스테롤 정량

CHO 세포  $2 \times 10^5$ 개를 6 well plate에 분주하여 48시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 PBS로 3회 수세하고 실온에서 건조시켰다. 건조된 세포에 배양액 1 ml를 분주하여 세포를 모은 후 새로운 conical tube에 넣고 chloroform/methanol(2:1)을 4 ml 넣었다. 원심분리기를 이용해서  $19,000 \times g$ 에서 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 버리고 침전물을 증류수로 2회 수세하였다. 이를 다시  $19,000 \times g$ 에서 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 버리고 침전물을 질소 가스로 건조시켰다. 건조된 세포에 hexane/isopropyl alcohol(3:2)를 넣어 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 용매를 버리고 질소가스로 건조시켰다. 유기 용매층에 chloroform 400  $\mu$ l를 넣어 용해시켰다. 이것을 96 well polypropylene plate에 150  $\mu$ l를 넣고 실온에서 건조시키고 건조된 지질을 isopropyl alcohol 20  $\mu$ l로 용해시켰다. 이것을 콜레스테롤 정량 kit을 사용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.



## 4. MAP kinase 신호전달 경로 조사

### 4-1. 재료

#### 4-1-1. 세포

CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA 세포주와 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주는 Dr. Chang TY로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

#### 4-1-2. 시약

CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA 세포주와 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주에 galectin-1을 투여한 후 MAP kinase 신호전달 경로를 확인하기 위해 사용한 시약은 Table 4와 같다.



Table 4. List of chemicals used in cell culture and Western blotting.

Experiment	Reagent	Company
cell culture	F-12	GIBCO Inc., USA
	L-glutamine	GIBCO Inc., USA
	penicillin	GIBCO Inc., USA
	streptomycin	GIBCO Inc., USA
	FBS	GIBCO Inc., USA
Western blotting	p38	Promega Inc., USA
	phospho-p38	Santa Cruz Biotech Inc., USA
	ERK1/2	Cell signaling Inc., USA
	phospho-ERK1/2	Cell signaling Inc., USA
	phospho JNK	Cell signaling Inc., USA
	β-actin	Cell signaling Inc., USA
	peroxidase labeled anti-mouse IgG	Vector Laboratories, Inc., USA
	peroxidase labeled anti-rabbit IgG	Vector Laboratories, Inc., USA
ECL	Ammersham Biotec Inc., USA	

## 4-2. 실험방법

### 4-2-1. 세포배양

CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA 세포주와 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주는 L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 10% FBS가 첨가된 F-12 배지를 사용하여 37°C, CO<sub>2</sub> 5%가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

### 4-2-2. Western blotting 분석

배양한 세포를 군에 따라 물질 처리하고 1 mM PMSF, 1 uM leupetin, 1 uM antipain, 0.1 uM sodium orthovanadate, 5 mM sodium fluoride이 포함된 lysis buffer(20 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) 500 $\mu$ l를 넣고 초음파분쇄기로 분쇄하였다. 분쇄가 끝난 세포는 19,000  $\times$  g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 상층액에 있는 단백질을 추출한 후 2D quant kit으로 단백질을 정량 하였다. 단백질 40  $\mu$ g을 12.5% SDS-PAGE gel에 분주하고 SDS-PAGE 전기영동 buffer(2.4 mM tris base, 19 mM glycine, 0.2% SDS)를 사용하여 100 volt에서 1시간 30분 동안 분리하였다. 전기영동 후 gel을 transfer buffer(2.4 mM tris base, 19 mM glycine, 20% methanol)에서 nitrocellulosemembrane에 30 volt, 350 mA 조건으로 4시간 동안 transfer시켰다. Transfer가 끝난 membrane은 5% dried skim milk가 포함된 TBS-T(0.1% Tween-20, Tris-buffered saline, pH 7.4)를 이용하여 blocking 한 후



ERK1/2 (1:1,000), phospho ERK1/2(1:1000), p38(1:1,000), phospho p38(1:1,000), JNK(1:1,000), phospho JNK(1:1,000), beta-actin(1:1,000)으로 희석한 1차 항체와 peroxidase labeled anti-mouse IgG(1:5,000)와 peroxidase labeled anti-rabbit IgG(1:5,000)의 2차 항체와 1시간 동안 차례로 반응시키고 각 단계마다 TBS-T를 이용하여 5분씩 4회 수세하였다. 항체 희석액은 TBS-T를 이용하였다. 항체와 반응이 끝난 membrane은 ECL chemiluminiscenct detection 용액을 이용하여 membrane은 상태에 따라 X-ray film에 15초에서 수분 간 노출시켜 X-ray film에 전사시켰다.



### Ⅲ. 연구 결과

#### 1. npc<sup>+/+</sup>, npc<sup>+/-</sup> 및 npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 뇌조직에서 콜레스테롤 발현

npc<sup>+/+</sup>, npc<sup>+/-</sup> 및 npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 콜레스테롤 발현 차이 조사는 꼬리 DNA 검사를 통하여 npc<sup>+/+</sup>, npc<sup>+/-</sup> 및 npc<sup>-/-</sup> 3종류의 생쥐를 분류하고 (Figure 1) 생쥐의 뇌조직을 filipin염색을 시행하여 조사하였다. 4주령 npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 filipin에 대한 발현은 npc<sup>+/+</sup>와 npc<sup>+/-</sup>와 유사한 발현 양상을 보였고 npc<sup>+/+</sup>, npc<sup>+/-</sup> 및 npc<sup>-/-</sup> 생쥐 모두 filipin에 대한 발현은 없었다(Figures 2-A, B, C). 하지만, 8주령 npc<sup>+/+</sup> 생쥐에서는 4주령 생쥐와 유사하게 염색이 거의 되지 않은 반면 npc<sup>-/-</sup> 생쥐에서는 filipin에 대한 반응성이 높았다(Figures 2-D, E, F).



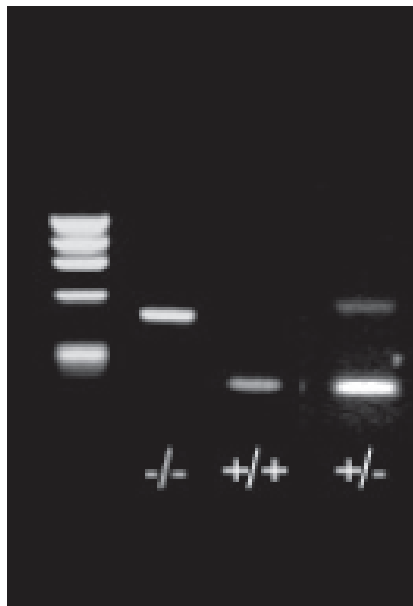


Figure 1. Genotyping analysis with tail-DNA by RT-PCR.

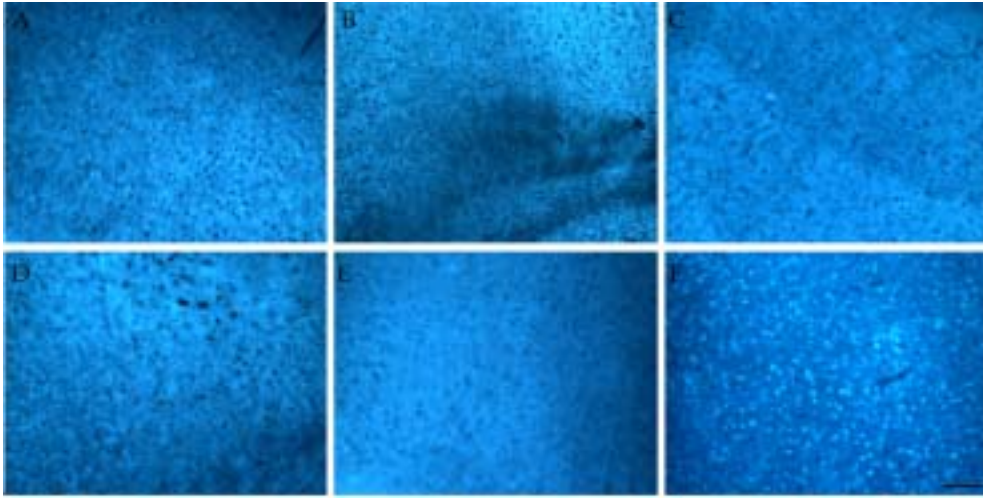


Figure 2. Filipin staining of mice brain tissues (cerebral cortex). (A) npc<sup>+/+</sup> mice (4 weeks), (B) npc<sup>+/-</sup> mice (4 weeks), (C) npc<sup>-/-</sup> mice (4 weeks), (D) npc<sup>+/+</sup> mice (8 weeks), (E) npc<sup>+/-</sup> mice (8 weeks) and (F) npc<sup>-/-</sup> mice (8 weeks). In F, the increase of fluorescence intensity reflects the accumulation of cholesterol. Bar=50  $\mu$ m.

## 2. npc<sup>+/+</sup>와 npc<sup>-/-</sup> 생쥐 해마의 단백질체 발현

npc<sup>-/-</sup> 생쥐 해마에서 일어나는 조직병리학적 변화를 알아보기 위해 npc<sup>+/+</sup>와 npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 해마에 존재하는 단백질의 종류를 확인하였다. 이를 위해 npc<sup>+/+</sup>와 npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 해마를 분리하여 2D-PAGE를 수행하였고 보다 많은 단백질을 보기 위해 silver 염색을 수행하였다 (Figure 3). 콜레스테롤 발현의 차이가 많은 8주령 npc<sup>+/+</sup>와 npc<sup>-/-</sup> 생쥐 해마에서 서로 다른 양상을 보이는 단백질 spot이 확인되었다. 차이를 보이는 단백질 spot을 취하여 MALDI-TOF를 수행하였으며, 데이터베이스 검색을 통하여 발현의 차이를 보이는 36개의 단백질을 확인하였다. 그 중 16개의 단백질이 신경퇴화와 관련이 있었고, 그 중 npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 해마에서 Glur R2가 up-regulated되어 있음을 확인하였다 (Table 5).



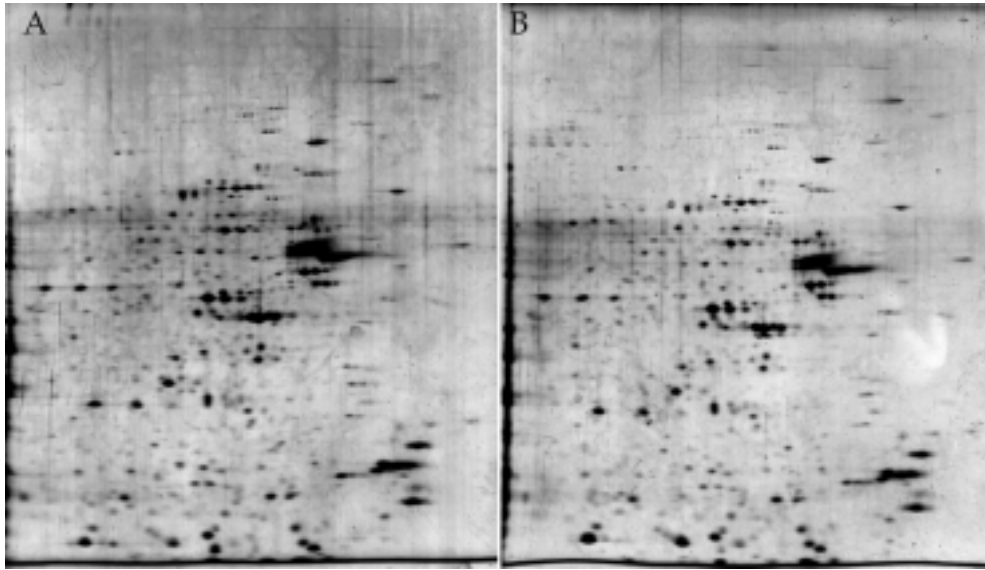


Figure 3. Comparison of 2-DE maps from the hippocampal of npc+/+ (left) and npc -/- mice (right). Proteins were prepared and separated on pH 3 - 10 linear IPG strips and then by 12.5% SDS-PAGE. Gels were stained with silver staining. The images of the each altered spots were compared. (A) In the npc+/+ gel, there were 36 significantly up-regulated spots. (B) In npc-/- gel, there were 11 significantly up-regulated spots.

Table 5. Up-regulated protein identified by MALDI-TOF analysis in the npc<sup>-/-</sup> hippocampus.

No.	MOWSE score	Masses matched	% Cov.	% TUC	Mean Err ppm	Data Tol ppm	MS-digest index	Protein MW (Da)	Accession no.	protein name
A38	2.727+04	8(42)	26.0	42.1	-19.3	38.7	51.420	40301/4.9	p51863	Glutamate receptor 2 precursor (Glu R2)



### 3. GABA와 glutamate 수송체 발현

8주령 npc+/+와 npc-/- 생쥐 해마의 단백질체학 및 데이터베이스 검색에서 차이를 보인 Glur R2를 자세하게 확인하기 위해 이들 해마 조직에서 GABA와 glutamate 수송체에 대한 면역반응성을 관찰하였다. 4주령 npc+/+, npc+/- 및 npc-/- 생쥐의 해마를 대상으로 GAT-1, GAT-3, GAD6, EAAC1, GLAST, GLT1에 대해 면역화학염색을 시행한 결과 npc-/- 생쥐 해마에서 유일하게 GAT-3만 강한 면역 반응성이 있는 것을 관찰할 수 있었다. GAT-3는 4주령 npc-/- 생쥐 해마의 CA1, CA3와 치아이랑(DG) 영역에서 각각 52.4, 45.5, 32.3% 증가하였다(Figures 5-C, 11-A).

8주령 npc+/+, npc+/- 및 npc-/- 생쥐의 해마를 대상으로 GAT-1, GAT-3, GAD6, EAAC1, GLAST, GLT1에 대해 면역화학염색을 시행한 결과 npc-/- 생쥐의 해마에서 GAT-3가 CA1, CA3, DG 영역에서 각각 52.8, 49.7, 17.9%, GAD6가 CA1, CA3, DG 영역에서 각각 52.2, 50.5, 56.9% 면역반응성이 증가하였고(Figures 5-G, 6-G, 11-B, 12-B), EAAC1은 CA1, CA3, DG 영역에서 각각 50.0, 48.0, 45.8% 면역반응성이 감소하였다(Figures 7-F, 13-B).



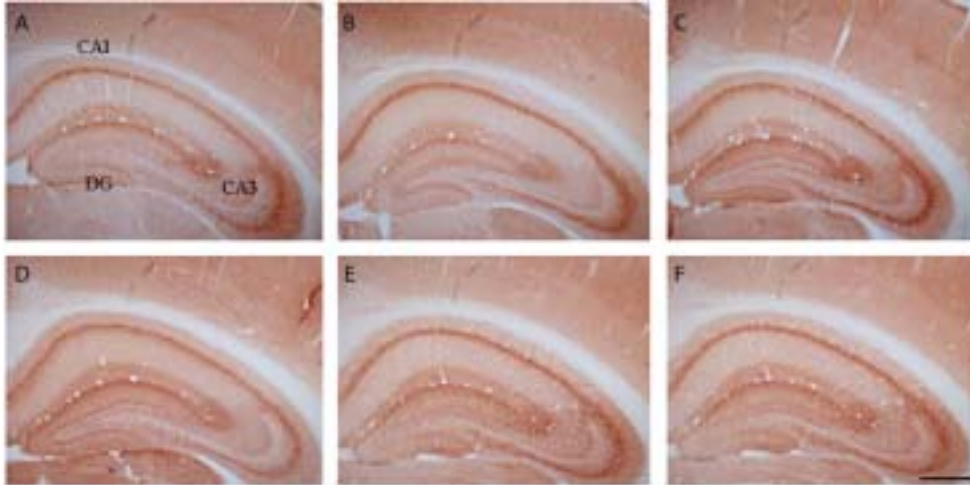


Figure 4. Immunohistochemical localization of GAT-1 in the hippocampal formation. (A)  $npc^{+/+}$  mice (4 weeks), (B)  $npc^{+/-}$  mice (4 weeks), (C)  $npc^{-/-}$  mice (4 weeks), (D)  $npc^{+/+}$  mice (8 weeks), (E)  $npc^{+/-}$  mice (8 weeks) and (F)  $npc^{-/-}$  mice (8 weeks). There was no change in GAT-1 immunoreaction in all tissues. Bar=100  $\mu$ m.

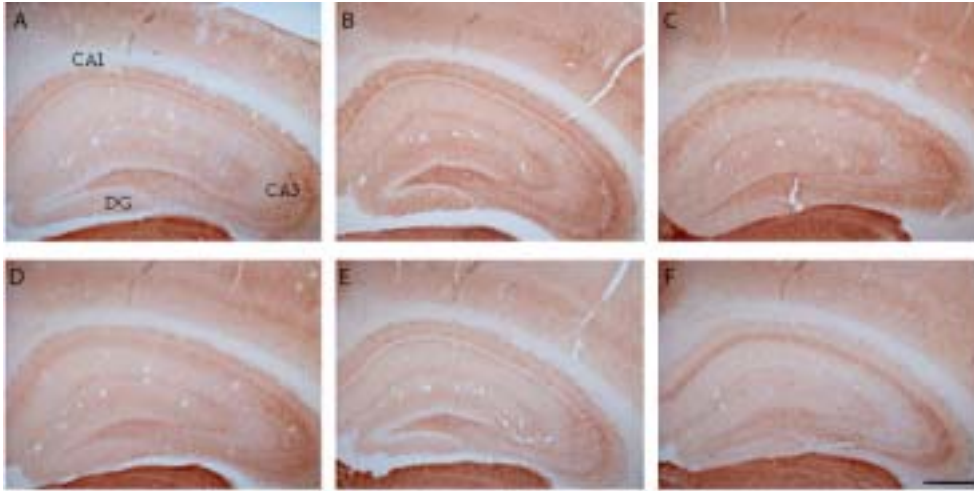


Figure 5. Immunohistochemical localization of GAT-3 in the hippocampal formation. (A) npc<sup>+/+</sup> mice (4 weeks), (B) npc<sup>+/-</sup> mice (4 weeks), (C) npc<sup>-/-</sup> mice (4 weeks), (D) npc<sup>+/+</sup> mice (8 weeks), (E) npc<sup>+/-</sup> mice (8 weeks) and (F) npc<sup>-/-</sup> mice (8 weeks) In C and F, GAT-3 immunoreaction was detected in CA1, CA3 and dentate gyrus (DG). Bar=100  $\mu$ m.

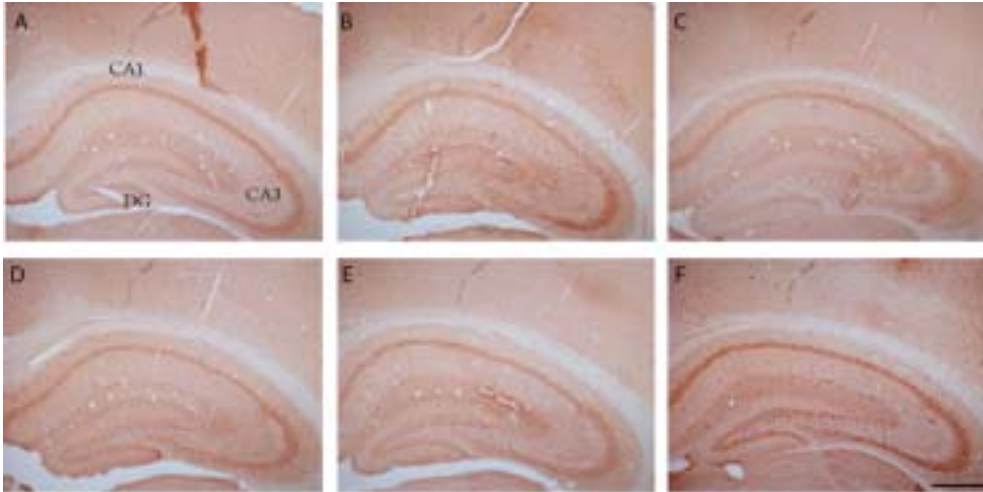


Figure 6. Immunohistochemical localization of GAD6 in the hippocampal formation. (A) npc<sup>+/+</sup> mice (4 weeks), (B) npc<sup>+/-</sup> mice (4 weeks), (C) npc<sup>-/-</sup> mice (4 weeks), (D) npc<sup>+/+</sup> mice (8 weeks), (E) npc<sup>+/-</sup> mice (8 weeks) and (F) npc<sup>-/-</sup> mice (8 weeks) In F and GAD6 immunoreaction was detected in CA1, CA3 and dentate gyrus (DG). Bar=100  $\mu$ m.

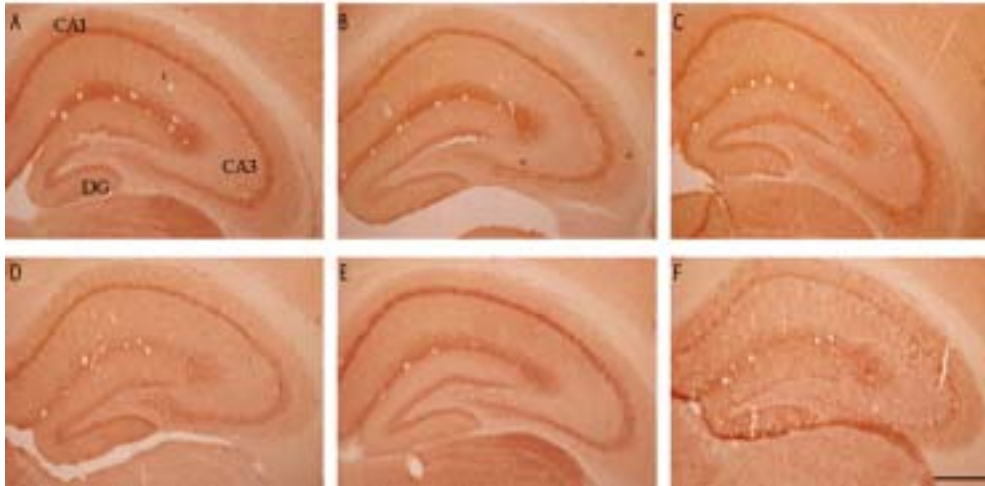


Figure 7. Immunohistochemical localization of EAAC1 in the hippocampal formation. (A) npc<sup>+/+</sup> mice (4 weeks), (B) npc<sup>+/-</sup> mice (4 weeks), (C) npc<sup>-/-</sup> mice (4 weeks), (D) npc<sup>+/+</sup> mice (8 weeks), (E) npc<sup>+/-</sup> mice (8 weeks) and (F) npc<sup>-/-</sup> mice (8 weeks) In F and EAAC1 immunoreaction was decreased in CA1, CA3 and dentate gyrus (DG). Bar=100  $\mu$ m.

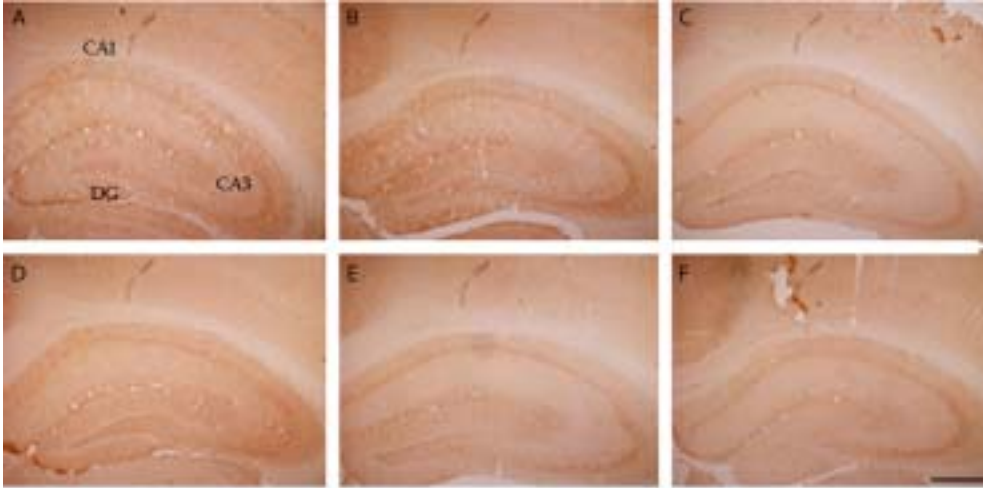


Figure 8. Immunohistochemical localization of GLAST in the hippocampal formation. (A) npc<sup>+/+</sup> mice (4 weeks), (B) npc<sup>+/-</sup> mice (4 weeks), (C) npc<sup>-/-</sup> mice (4 weeks), (D) npc<sup>+/+</sup> mice (8 weeks), (E) npc<sup>+/-</sup> mice (8 weeks), (F) npc<sup>-/-</sup> mice (8 weeks). There was no change in GLAST immunoreaction in all tissues. Bar=100  $\mu$ m.

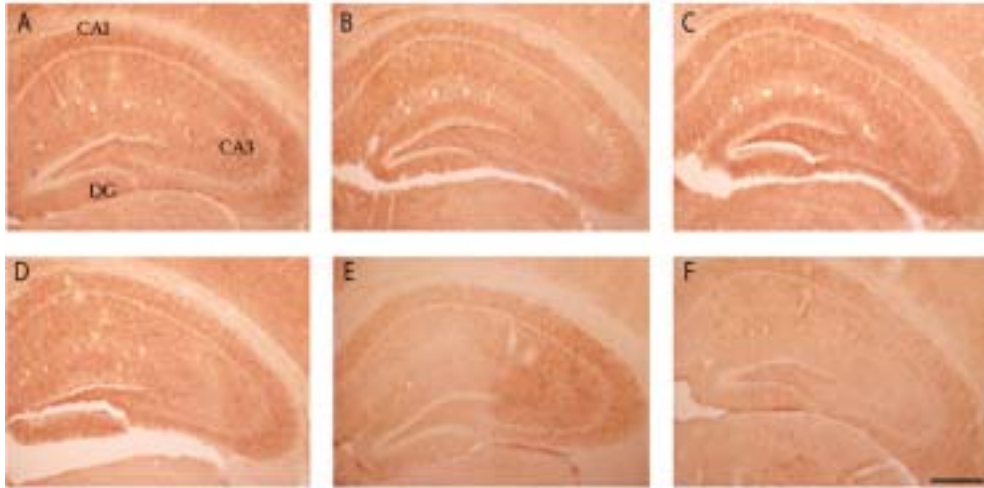
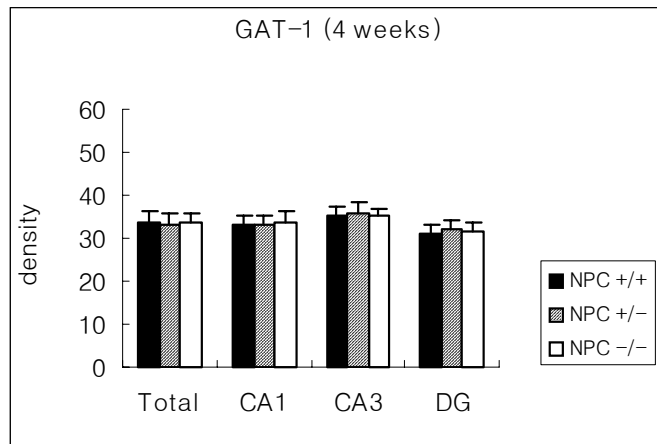


Figure 9. Immunohistochemical localization of GLUT1 in the hippocampal formation. (A) npc<sup>+/+</sup> mice (4 weeks), (B) npc<sup>+/-</sup> mice (4 weeks), (C) npc<sup>-/-</sup> mice (4 weeks), (D) npc<sup>+/+</sup> mice (8 weeks), (E) npc<sup>+/-</sup> mice (8 weeks), (F) npc<sup>-/-</sup> mice (8 weeks). There was no change in GLUT1 immunoreaction in all tissues. Bar=100  $\mu$ m.

A



B

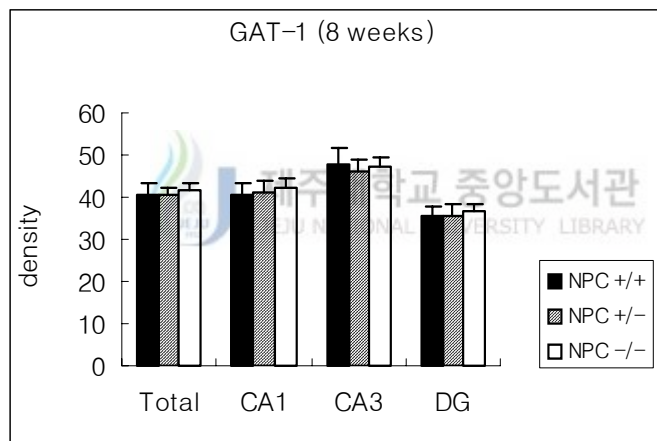
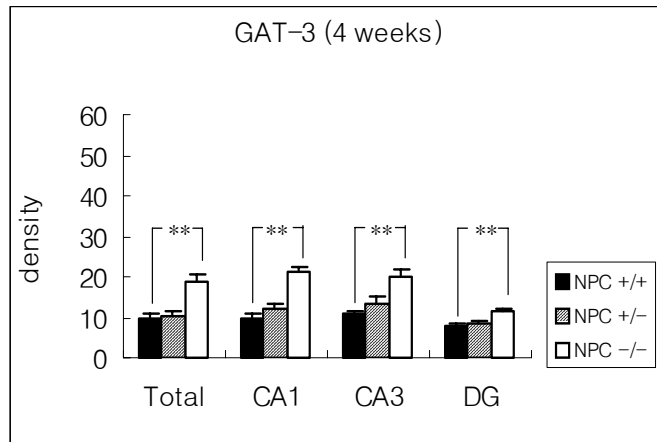


Figure 10. Densitometric analysis of GAT-1 immunoreactivity in the hippocampal formation. (A) 4 weeks mice, (B) 8 weeks mice (dentate gyrus : DG).

A



B

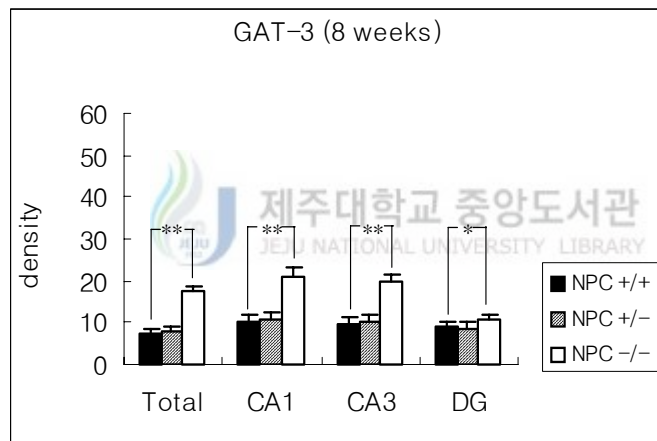
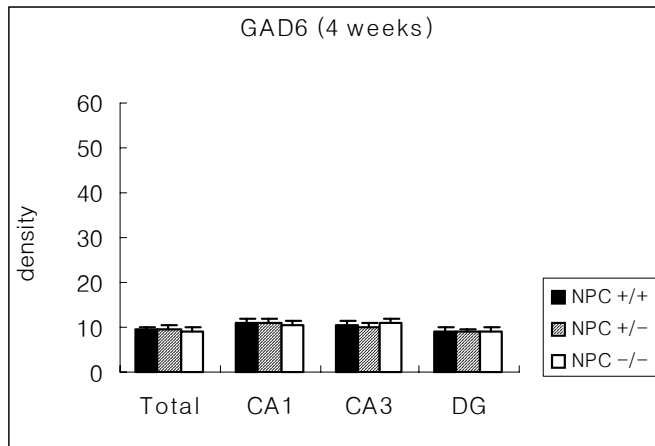


Figure 11. Densitometric analysis of GAT-3 immunoreactivity in the hippocampal formation. (A) 4 weeks mice, (B) 8 weeks mice (dentate gyrus : DG), \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  (dentate gyrus : DG).



A



B

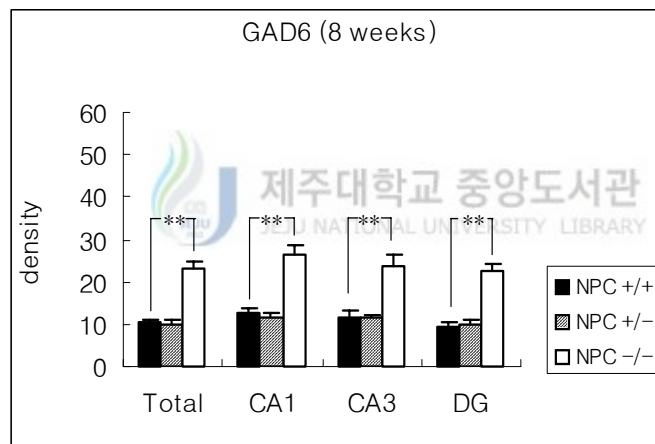
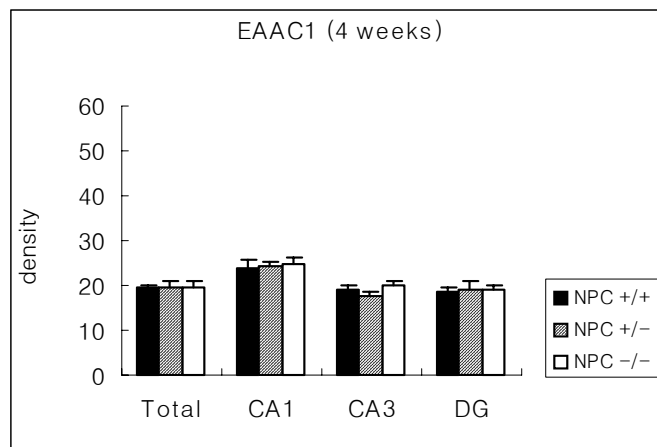


Figure 12. Densitometric analysis of GAD6 immunoreactivity in the hippocampal formation. (A) 4 weeks mice, (B) 8 weeks mice (dentate gyrus : DG), \*\* :  $p < 0.01$  (dentate gyrus : DG).

A



B

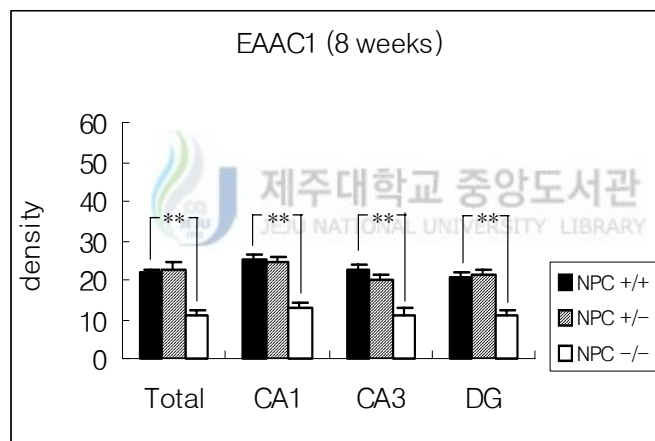
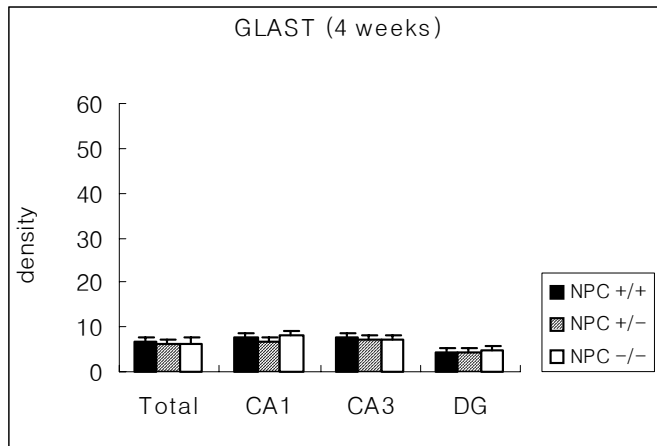


Figure 13. Densitometric analysis of EAAC1 immunoreactivity in the hippocampal formation. (A) 4 weeks mice, (B) 8 weeks mice (dentate gyrus : DG), \*\* :  $p < 0.01$  (dentate gyrus : DG).

A



B

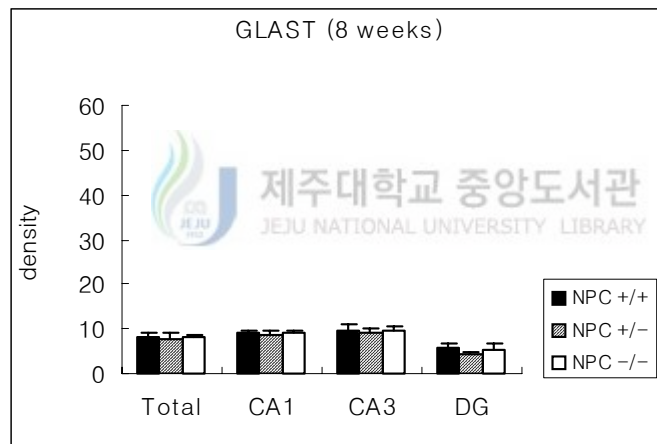
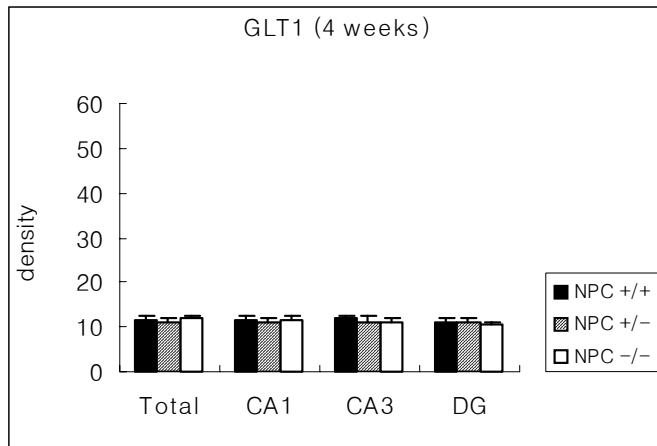


Figure 14. Densitometric analysis of GLAST immunoreactivity in the hippocampal formation. (A) 4 weeks mice, (B) 8 weeks mice (dentate gyrus : DG).

A



B

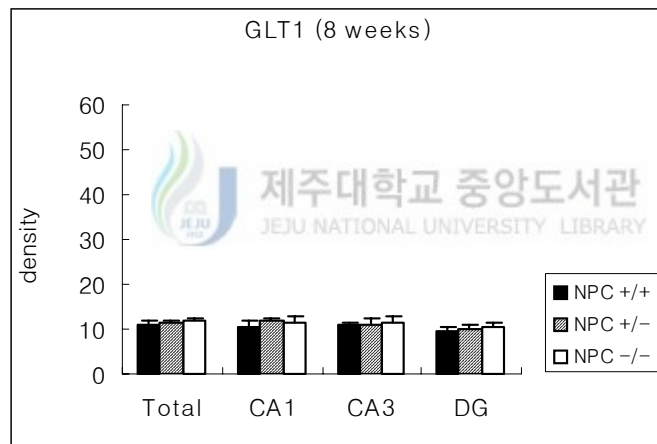


Figure 15. Densitometric analysis of GLT1 immunoreactivity in the hippocampal formation. (A) 4 weeks mice, (B) 8 weeks mice (dentate gyrus : DG).

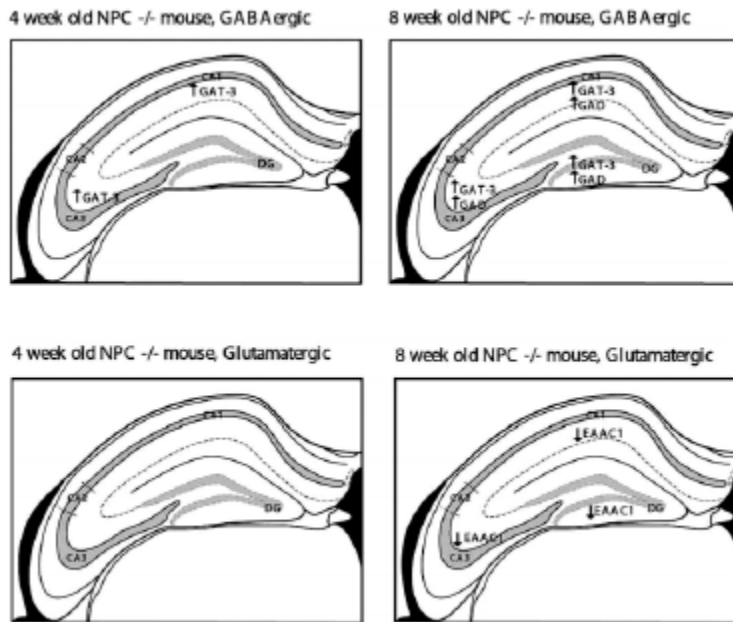


Figure 16. Schematic diagrams illustrating the expression patterns of the GABAergic and glutamatergic transporter system in  $npc^{-/-}$  mice compared to  $npc^{-/-}$  and  $npc^{+/-}$  mice. In general, there was an increase of GAT-3 in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus proper in 4-week-old  $npc^{-/-}$  mice. Whereas the level of GAT-3 of the 8-week-old  $npc^{-/-}$  mice increased in the CA1, CA3 and dentate gyrus regions of the hippocampus proper. The neuronal glutamate transporter (EAAC1) decreased in the CA1, CA3 and dentate gyrus regions of the hippocampus proper.

## 4. 리소좀 세포의 유출

### 4-1. Ionophore를 이용한 리소좀 세포의 유출

칼슘 유입이 있을 때 세포 내 칼슘 농도와 리소좀 세포의 유출과의 상관관계를 조사하기 위해 칼슘 유입 유도제인 ionophore 투여 후  $Ca^{2+}$  농도의 변화와 리소좀 세포의 유출이 일어나는지를 관찰하였다.

CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA 세포주에 U18666A를 투여하여 콜레스테롤을 세포 내에 축적시킨 뒤 ionophore를 투여하여 확인하였다. Ionophore의 투여 후 칼슘 유입이 유도되는 것을 확인할 수 있었으며 동시에 리소좀 세포의 유출이 일어나는 것을 확인하였다(Figures 17, 18). CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주에서도 ionophore를 투여하였을 때 유사하게 칼슘이 유입되는 것을 확인할 수 있었으며 동시에 리소좀 세포의 유출이 유도되는 것을 확인하였다(Figures 19, 20).

Ionophore 투여 전과 후의 세포내 콜레스테롤 양의 변화는 filipin 염색과 콜레스테롤 정량 kit을 사용하여 조사하였다. Filipin 염색으로 비교한 결과 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주에 ionophore를 투여한 세포는 ionophore를 투여하지 않은 세포에 비해 투여한 세포에서 filipin에 대한 반응성이 매우 감소된 것을 관찰할 수 있었다(Figure 21). 콜레스테롤 정량 kit을 사용하여 ionophore의 투여량에 따른 세포내의 콜레스테롤의 변화량을 측정된 결과 CT43 세포주에 ionophore를 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1  $\mu$ g/ml을 투여하였을 때, 각각 0, 1.3, 5.2, 14.7, 27.6, 35.2% 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 그 이상의 농도를 투여하였을 경우 세포사가 일어나는 것을 확인할 수 있었다(Table 6).

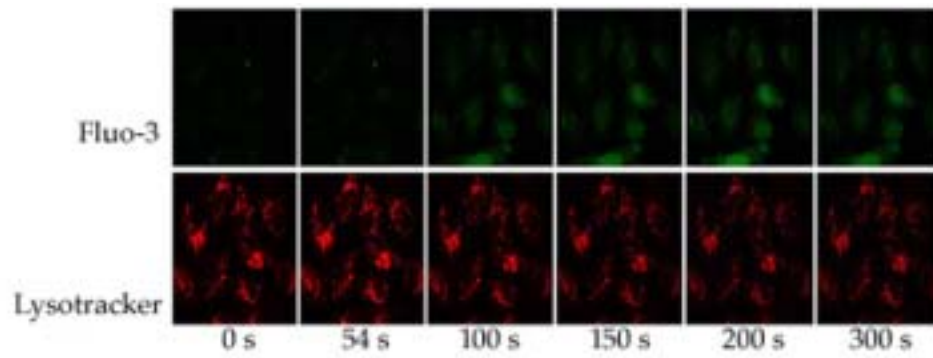


Figure 17. Confocal fluorescence microscopy images after U18666A and ionophore treatment in CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA cells. Ca<sup>2+</sup> influx was derived and lysosome was moved and decreased.

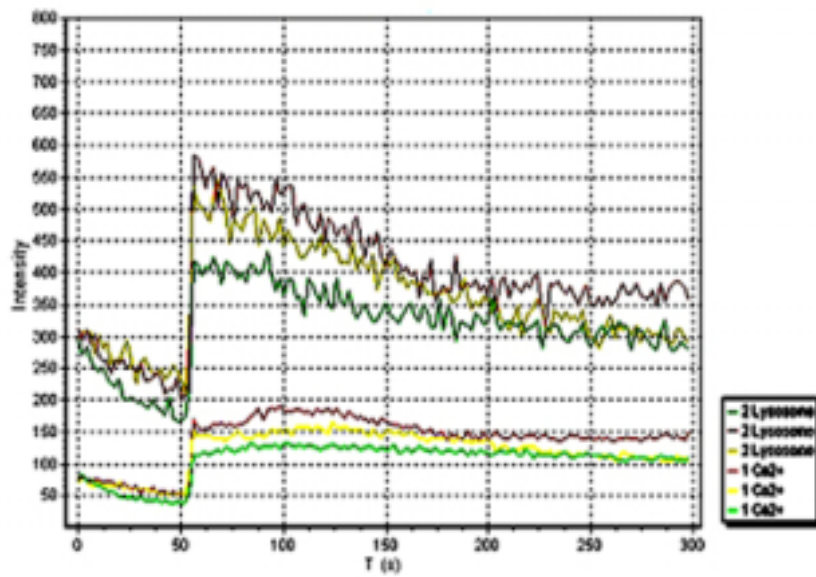


Figure 18. Graph image of  $\text{Ca}^{2+}$  influx and lysosomal exocytosis after U18666A and ionophore treatment in CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA cells.



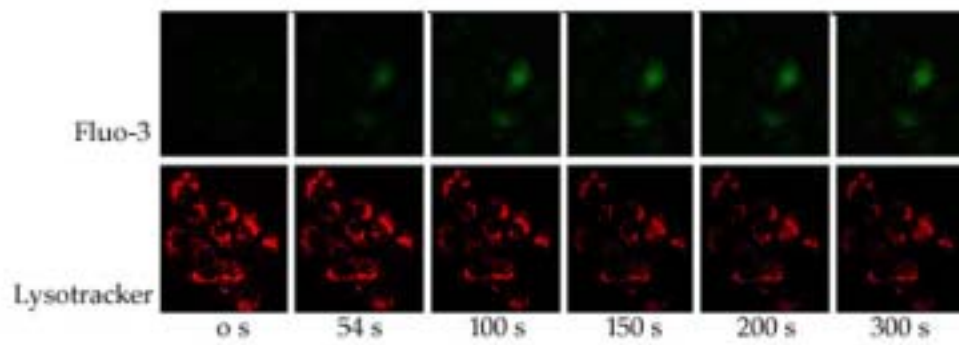


Figure 19. Confocal fluorescence microscopy images after ionophore treatment in CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 cells. Ca<sup>2+</sup> influx was derived and lysosome was moved and decreased.

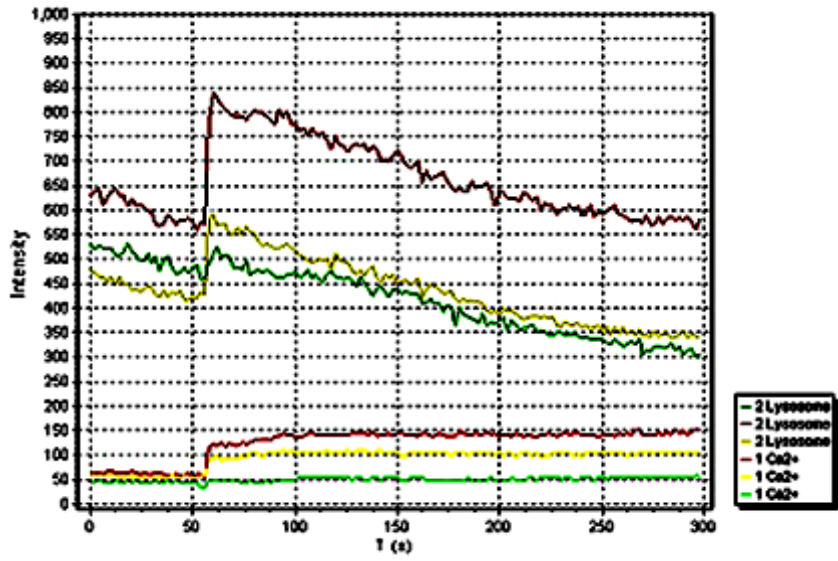


Figure 20. Graph image of  $\text{Ca}^{2+}$  influx and lysosomal exocytosis after ionophore treatment in CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 cells.



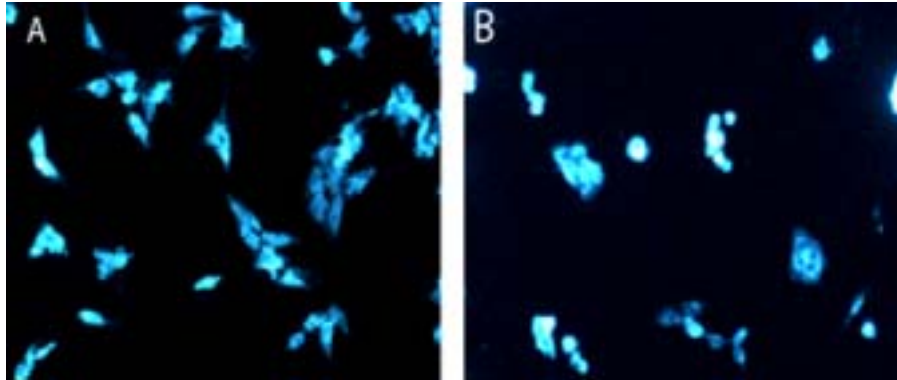


Figure 21. Filipin staining in CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 cells. (A) There was the accumulation of cholesterol before ionophore treatment. (B) Relative to untreated cells, the cholesterol was decreased after ionophore treatment.

Table 6. Cholesterol quantitative analysis after ionophore treatment in CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 cells using cholesterol quantitative kit

Treatment ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Fraction cholesterol decrease (%)
0	0
0.2	1.3
0.4	5.2
0.6	14.7
0.8	27.6
1	35.2

#### 4-2. Galectin-1을 이용한 리소좀 세포외 유출

CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주에서 칼슘 유입을 유도하는 물질인 ionophore를 이용하여 리소좀 세포외 유출을 유도하고 콜레스테롤이 감소되는 사실을 확인하였다. 하지만 ionophore는 생체내에서 만들어지지 않고 독성이 있다. 따라서 세포사를 일으키지 않으면서 리소좀 세포외 유출을 유도하는 물질을 사용한다면 리소좀 이동 및 감소가 가능할 것으로 생각되어 생체내에서 합성되는 물질인 galectin-1에 대해 조사하였다.

Galectin-1에 대한 조사는 ionophore의 조사에서와 동일한 방법으로 control 실험을 위해 CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA 세포주에 콜레스테롤 유도제인 U18666A를 투여하여 콜레스테롤을 세포내에 축적시킨 뒤 확인하였다. Galectin-1의 투여로 칼슘 유입 없이 리소좀 세포외 유출이 유도되는 것을 확인하였다(Figures 22, 23). 동일한 방법으로 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주를 배양한 후 galectin-1을 투여하여 관찰하였을 때 칼슘 유입이 유도되지는 않았지만 리소좀 세포외 유출이 유도되는 것을 확인하였다(Figures 24, 25).

CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주에서 galectin-1 투여 전과 투여 후의 콜레스테롤의 변화는 filipin 염색으로 비교한 결과 galectin-1을 투여하지 않은 세포에 비해 투여한 세포에서 filipin에 대한 반응성이 매우 감소된 것을 관찰할 수 있었다(Figure 26). 또한 콜레스테롤 정량 kit을 사용하여 galectin-1의 투여량에 따른 세포내의 콜레스테롤 변화량을 측정한 결과 CT43 세포주에 galectin-1을 0, 50, 100, 250, 500, 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였을 때, 각각 0, 0.6, 4.8, 8.9, 10.5, 28.5% 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Table 7).

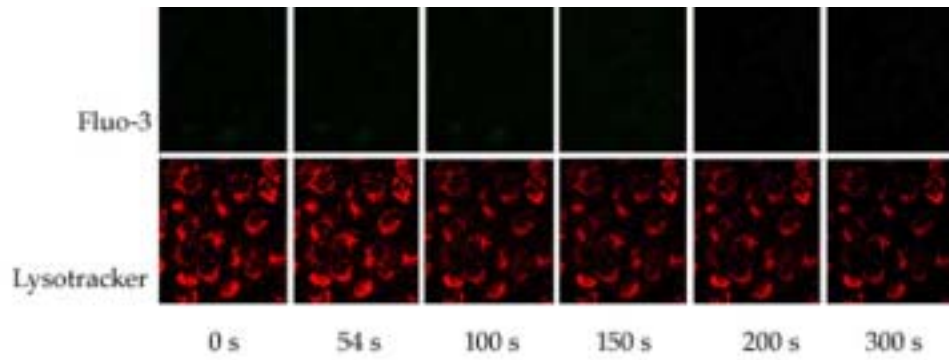


Figure 22. Confocal fluorescence microscopy images after U18666A and galectin-1 treatment in CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA cells. Ca<sup>2+</sup> influx was not derived, but lysosome was moved and decreased.

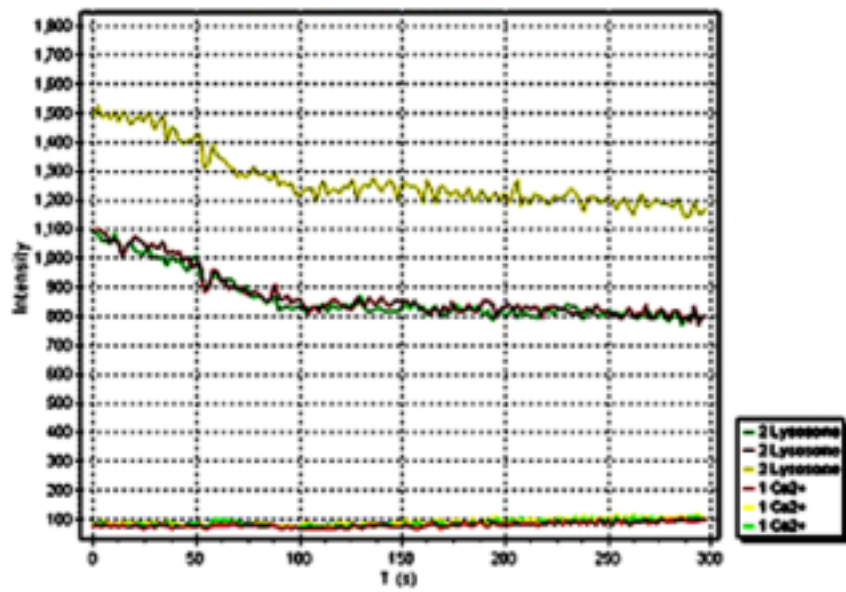


Figure 23. Graph image of lysosomal exocytosis after U18666A and galectin-1 treatment in CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA cells.

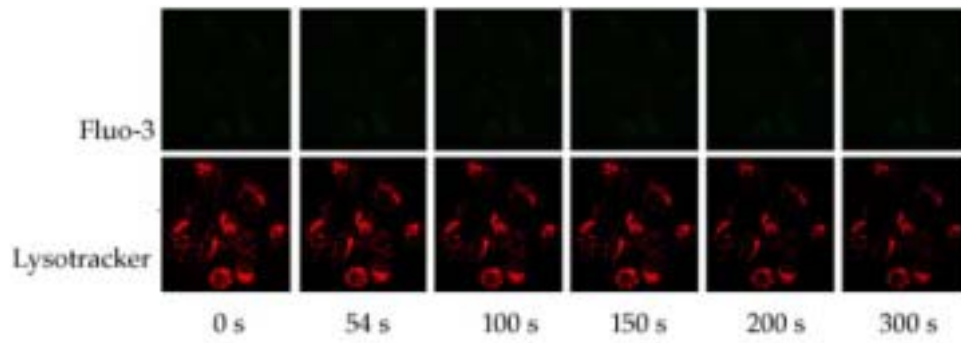


Figure 24. Confocal fluorescence microscopy images after galectin-1 treatment in CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 cells. Ca<sup>2+</sup> influx was not derived and lysosome was moved and decreased.



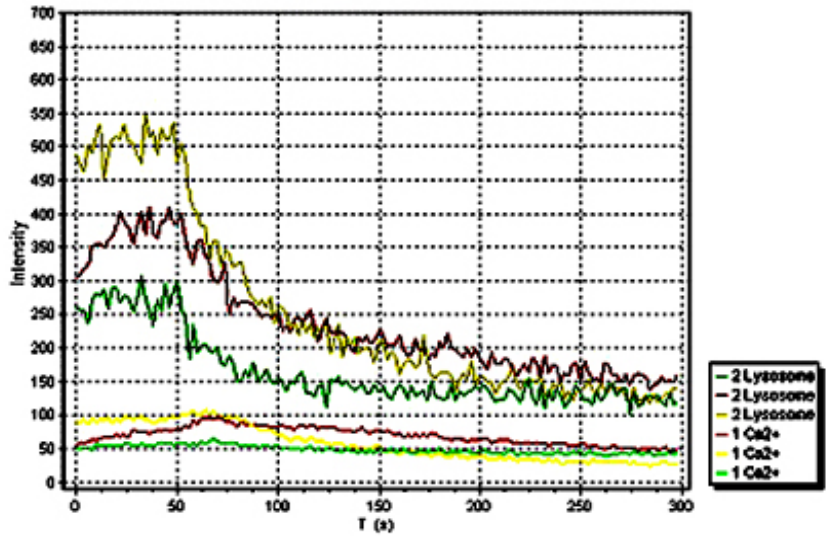


Figure 25. Graph image of lysosomal exocytosis after galectin-1 treatment in CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 cells.

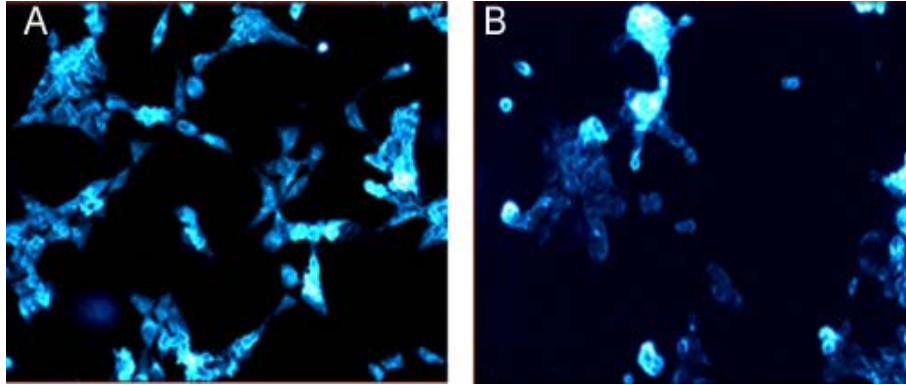


Figure 26. Filipin staining in CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 cells. (A) There was the accumulation of cholesterol before galectin-1 treatment. (B) Relative to untreated cells, the cholesterol was decreased after galectin-1 treatment.

Table 7. Cholesterol quantitative analysis after galectin-1 treatment in CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 cells using cholesterol quantitative kit

Treatment ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Fraction cholesterol decrease (%)
0	0
50	0.6
100	4.8
250	8.9
500	10.5
1000	28.5



## 5. MAP kinase 신호전달 경로

npc1 유전자와 MAP kinase 신호전달 경로와의 관계는 CHO npc<sup>-/-</sup> 25RA 세포주와 CT43 세포주의 단백질을 추출한 후 ERK1/2, p38, JNK, 인산화된 ERK1/2, 인산화 된 p38, 인산화 된 JNK의 양적인 변화를 Western blotting법을 이용하여 조사함으로써 확인하였다. 조사 결과 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주는 CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA 세포주보다 p38, 인산화 된 p38의 발현이 각각 62.0, 49.9% 감소하였다(Figure 33). 그리고 ERK1/2와 인산화 된 ERK1/2의 발현도 25RA 세포주에 비해 각각 15.0, 62.3% 감소하였다(Figures 27, 28-A).

Galectin-1이 MAP kinase 신호전달 경로에 미치는 영향을 규명하기 위해 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주에 galectin-1을 투여하여 MAP kinase 신호전달 경로를 조사하였다. Galectin-1을 투여한 CT43 세포주는 galectin-1을 투여하지 않았을 때보다 ERK1/2, 인산화 된 ERK1/2와 인산화 된 p38의 발현이 각각 14.0, 56.8, 36.6% 증가하였다(Figures 27, 28-B).



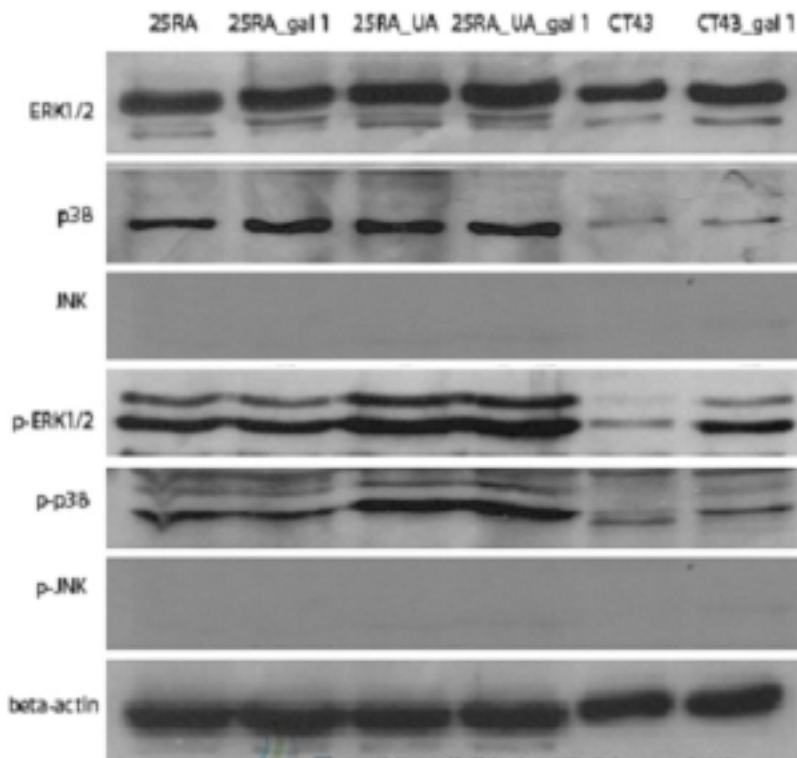
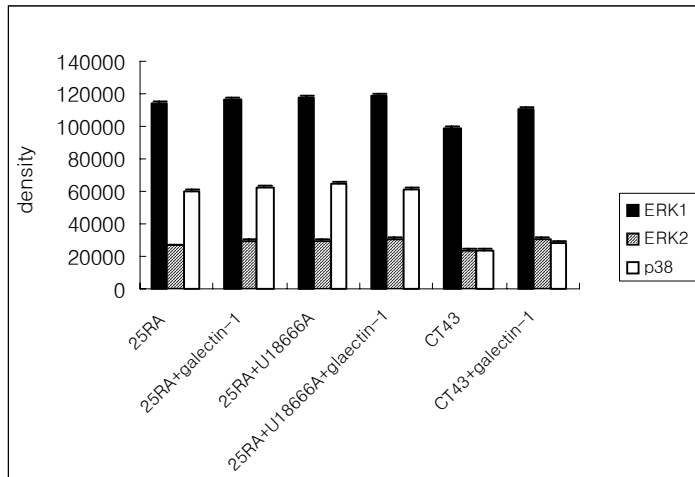


Figure 27. Detection of ERK1/2, p38, JNK, pERK1/2, pp38, pJNK and beta-actin by Western blot analysis of 25RA, 25RA treated with U18666A, 25RA treated with galectin-1, 25RA treated with U18666A and galectin-1, CT43, CT43 treated with galectin-1. Expression of ERK1/2, p38, pERK1/2 and p38 were reduced in CT43 cell. But Relative to untreated galectin-1, expression of ERK1/2 and pERK1/2 were increased CT43 cell treated with galectin-1.

A



B

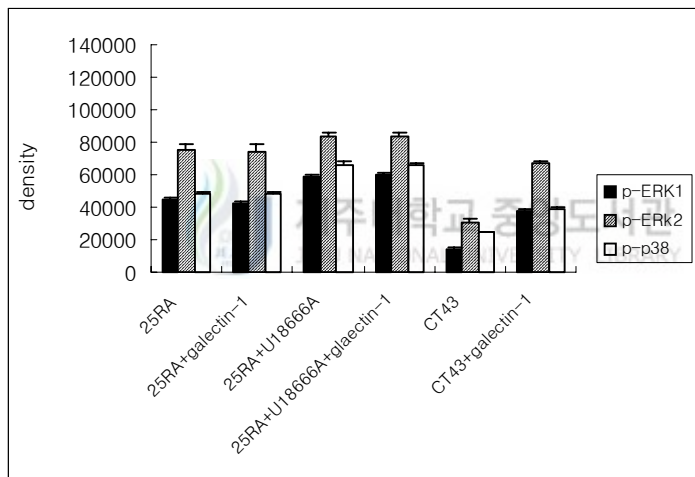


Figure 28. Densitometric analysis of MAPK protein (ERK1/2, p38, phospho ERK1/2, phospho p38) in the 25RA, 25RA treated with galectin-1, 25RA treated with U18666A, 25RA treated with galectin-1 and U18666A, CT43, CT43 treated with galectin-1.

## IV. 고찰

### 1. npc<sup>+/+</sup>, npc<sup>+/-</sup> 및 npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 뇌조직에서 콜레스테롤 발현

4주령 npc<sup>+/+</sup>, npc<sup>+/-</sup> 및 npc<sup>-/-</sup> 생쥐 모두 filipin에 대한 발현 양이 작은 것으로 보아 4주령 생쥐에는 npc1의 존재와 상관없이 모두 콜레스테롤이 적게 존재함을 확인할 수 있었다. 하지만, 8주령 npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 filipin에 대한 발현은 npc<sup>+/+</sup>와 npc<sup>+/-</sup>와 현저하게 발현 양상의 차이를 보였다. 즉, 8주가 된 npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 뇌에는 npc1 유전자의 부재로 많은 콜레스테롤이 축적되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이 연구결과는 종전의 연구결과와 유사하였다 (Kobayashi 등 1999; Loftus 등 1997; Morshead 등 1998). 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 콜레스테롤의 축적은 NPC 질병의 큰 특징 중의 하나라는 사실을 확인할 수 있었다.



### 2. npc<sup>+/+</sup>와 npc<sup>-/-</sup> 생쥐 해마의 단백질체 발현

npc<sup>+/+</sup>와 npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 해마에 존재하는 단백질의 종류를 확인하기 위해 2D-PAGE를 한 후 silver 염색을 하고 MALDI-TOF로 비교하였다. 8주령 npc<sup>+/+</sup>와 npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 해마에서는 36개의 단백질이 차이가 있었으며 그 중 16개의 단백질은 신경퇴화와 관련되어 있었다. 이는 IDPc (Lee 등 2002), N-CAM 2 (Pedersen 등 2004), CAML (Feng 등 2002), mage-like protein 2 (Barker와 Salehi, 2002), 10-kDa heat shock protein (Takayama 등 2003), Hsp10 (Takayama 등 2003), Hsp60

(Takayama 등 2003), TCP-1-beta (Takayama 등 2003), cyclophilin A (Cande 등 2004), protein kinase C (Gutcher 등 2003), proteasome subunit beta type 6 precursor (Wojcik, 2002), alpha enolase (Magi 등 2004), Glu R2 (Lu 등 2003), otubain 1 (Wojcik, 2002; Kim 등 2003), NADH-ubiquinone oxidoreductase 42-kDa subunit, mitochondrial (Kim 등 2001), cystatin C (Nishio 등 2000), and annexin V (Gidon-Jeangirard 등 1999; Hawkins 등 2002)들이다. 이 중 NPC에서 Glu R2가 up-regulate되어 있는 것은 주목할 만하다. GABA 농도의 감소는 간질병, 헌팅턴병, 파킨슨병, 정신분열증, 지연성운동장애, 노인성치매 등 여러 가지 비이상적인 신경증세의 원인이 되고, glutamate가 기억력, 학습 및 운동기능 등에 관여하고 중추신경계에 발달과정에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Mattson 등 1988; Pearce 등 1987). NPC가 알츠하이머병과 유사하고 운동장애가 있으며 GluR-2가 up-regulate되어 있는 것으로 보아 NPC에서 GABA 및 glutamate 수송체들의 이상이 있을 것으로 사료된다.



### 3. GABA와 glutamate 수송체 발현

npc1 유전인자가 부재된 생쥐의 해마에서 GABA와 glutamate 수송체들의 면역반응성을 조사하여 NPC의 생물학적 특성을 조사하였다.

본 연구결과 GAT-3가 4주령 npc+/+와 npc+/- 생쥐에 비해 npc-/- 생쥐의 CA1, CA3, DG의 각 해마 영역에서 강한 면역 반응성이 있는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 GAT-3과 GAD6가 8주령 npc+/+와 npc+/- 생쥐에 비해 npc-/- 생쥐의 CA1, CA3, DG의 각 해마의 영역에



서 강한 면역 반응성을 보인 반면 EAAC1은 약한 면역반응성을 나타내었다.

GABA는 흥분성과 억제성 신경전달 모두에 영향을 미쳐 중추신경계에서 매우 중요하다. 억제성 신경전달 물질인 GABA는 아미노산 신경전달물질로 중추신경계 전체에 존재하며, dopamine, norepinephrine, serotonin, acetylcholine과 같은 신경전달물질에 비해 약 200~1000배의 고농도를 보이고, 흑색질(substantia nigra), 창백핵(globus pallidus), 시상하부(hypothalamus), 해마(hippocampus)에서는 최고농도를 보인다 (Fahn과 Cote, 1968; McGeer, 1989; Roberts, 1976; Scherer 등 1988). 또한 GABA는 중추신경계에서 신경세포를 과분극 시키고 신경전달물질의 분비를 억제시킨다 (Potter 등 1990). GABA의 흡수와 이동은 높은 친화력을 가진 수송체 (transport system)에 의해 이루어진다. GABA 수송체라 하여 GAT로 부르는 이 물질은 신경계에 나타나는 막단백질로 현재 약리학적 특성에 따라 4종류(GAT-1, GAT-2, GAT-3 및 GAT-4)가 알려져 있다 (Clark, 1992; Durkin, 1995; Liu 등 1993; Lopez-Corcuera 등 1992). 네 종류의 수송체 모두  $\text{Na}^+$ 와  $\text{Cl}^-$ 에 의존적 방법으로 GABA를 운반하며 아미노산 배열의 상당부분이 유사한 것으로 알려져 있다 (Borden 등 1992; Guastella 등 1990).

GAT의 조직 내 분포를 조사한 실험에 따르면 중추신경계에서 중요한 역할을 하는 것은 GAT-1과 GAT-3로, GAT-1은 신경세포와 별아교세포(astrocyte)에 발현되고 GAT-3은 주로 별아교세포에 국한됨이 보고된 바 있다 (Durkin, 1995; Ikegaki 등 1994; Minelli 등 1995; Yan과 Ribak, 1998). GAT-3의 증가는 동물의 경련 및 발작 등의 큰 변화를 야기시킨다고 보고되었다 (Reynolds 등 1990).

척추동물에서 EAAT는 신경세포와 신경교세포에 존재하는 흥분성 신

경전달물질을 세포 내로 다시 유입시킴으로써 흥분성 신경전달물질의 농도를 세포독성을 유발하는 수준 이하로 유지하는 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다 (Kannai와 Hediger, 1992; Nicholls와 Atwell, 1990). EAAT는 기질 특이성에 따라 EAAT1(GLAST), EAAT2(GLT1), EAAT3 (EAAC1), EAAT4 및 EAAT5로 구별되며, 다양한 종에서 전자가 클로닝되어 있다 (Arriza 등 1994; Gallo 등 1992; Kannai와 Hediger, 1992; Lin 등 1998; Pines 등 1992; Storck 등 1992; Sutherland 등 1996). GLAST와 GLT1은 주로 신경아교세포에서 작용하며 소뇌와 중뇌에 많이 분포하는 것으로 알려져 있다 (Arriaz 등 1994; Lehre 등 1997; Stoffel 등 1996). 이에 비해 EAAC1, EAAT4 및 EAAT5는 신경세포에서 주로 작용한다고 알려져 있다 (Kannai와 Hediger, 1992). EAAC1은 glutamate 유입에 가장 많이 기여하는 것으로 알려져 있으며 (Rothstein 등 1994), 현재 중추신경계에서의 EAAT 기능에 관한 많은 연구가 진행되어 EAAT의 발현 변이에 의해 중추신경계의 퇴행이 유발되는 것이 밝혀졌다 (Szatkowaski와 Attwell, 1994; Vandenberg 등 1997; Vandenberg 등 1998). 그리고 생쥐 뇌 발달과정에서의 EAAT 유전자 및 단백질의 발현양상 규명을 통해 EAAC1, GLAST 및 GLT1이 각기 특이적으로 발현하는 것이 확인되었다 (Shibata 등 1997; Sutherland 등 1996).

NPC질환에서 GAT-3의 증가와 EAAC1의 감소로 신경세포와 신경교세포에 존재하는 흥분성 신경전달물질을 세포 내로 다시 유입시킴으로써 흥분성 신경전달물질의 농도를 필요이상으로 높여 기억력, 학습, 운동기능 및 중추신경계 발달에 장애가 있고 경련 및 발작 등의 큰 변화가 있는 것으로 사료된다.

#### 4. 리소좀 세포의 유출

본 연구에서는 칼슘 유입제로 알려진 ionophore를 이용하여 CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA 세포주와 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주에서 칼슘 유입을 유도하여 리소좀 세포의 유출이 일어나는지 조사하였다. 또한 galcetin 1을 이용하여 CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA 세포주와 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주에서 칼슘이 유입되는지를 관찰하고 동시에 리소좀 세포의 유출이 일어나는지 조사하였다.

npc1 유전자 없이 칼슘 유입 유도 여부를 확인하기 위해 ionophore를 사용하였다. Ionophore는 세포에 투여하면 내형질막과 같은 세포내 소기관에서 세포질로 칼슘이온을 유리하도록 하여 세포질 내의 칼슘이온 농도가 증가하고 diltiazem은 세포막에 작용하여 세포 밖에서 세포질내로의 칼슘이온 통과를 억제한다고 알려져 있다 (Church와 Zsoter, 1980). 세포에 fluo-3 AM을 염색하고 공초점 레이저현미경으로 300초 동안 관찰하였다. 그림 25에서와 같이 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주에 ionophore를 투여하였을 때 칼슘 유입이 일어나는 것을 확인하였고 동시에 리소좀 세포의 유출도 일어난다는 사실을 확인할 수 있었다. 콜레스테롤 양은 filipin 염색으로 확인한 결과 칼슘 유입이 있을 때 감소함을 확인하였다. 또한 콜레스테롤의 감소를 정량 분석한 결과 ionophore 농도 대비 콜레스테롤이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 콜레스테롤의 감소가 ionophore의 농도에 의존한다는 것을 증명한 것이다. 따라서 콜레스테롤의 이동에 직접적으로 관여하는 npc1 유전자가 없는 경우에도 칼슘이 유입되며, 리소좀 세포의 유출을 가능하게 하여 본 연구의 가설을 더욱 성공 가능하게 하였다.

Ionophore는 신경독성이 있어 치료제로 사용할 수 없다는 단점이 있

다. 따라서 생체내에서 합성되고 칼슘 유입을 유도한다고 보고되어진 galectin-1에 대해서 동일 실험을 시행하였다. CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포 주에서는 galectin-1을 투여하였을 때 칼슘 유입이 일어나지는 않았지만 서서히 리소솜 세포외 유출도 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 이를 filipin 염색으로 콜레스테롤 양의 변화를 조사한 결과 콜레스테롤 양이 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 콜레스테롤의 감소를 정량적으로 확인 하였을 때 galectin-1의 농도 대비 콜레스테롤이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 콜레스테롤의 감소가 galectin-1의 농도에 의존한다는 것을 증명한 것이다. 이는 세포사를 줄이면서 콜레스테롤 이동에 직접적으로 관여하는 npc1 유전자에 관계없이 칼슘이 유입되지 않는 경우에도 리소솜 세포외 유출이 가능하다는 사실을 제시하였다.

최근 혈액 내 콜레스테롤 수치가 높은 사람에게 알츠하이머병에 걸릴 위험이 높다는 연구 결과가 발표된 후 여러 연구자들에 의해 콜레스테롤과 알츠하이머병의 연관성에 관한 연구 결과들이 보고되고 있다 (Hofman 등 1997; Jarvik 등 1995; Kivipelto 등 2001; Notkola 등 1998). 반대로 혈액 내 콜레스테롤을 낮추었을 때 아밀로이드의 생성이 줄었으며, 신경반도 감소하였고 결과적으로 알츠하이머병에 걸릴 확률이 낮아지는 것으로 보고되었다 (Jick 등 2000; Wolozin 등 2000). 또한, 칼슘이 유입되면 리소솜 세포외 유출이 일어난다고 최근에 보고되었다 (Dragileva 등 1999; Breitbart, 2002; Gardella 등 2001). 본 연구에서도 ionophore의 투여로 칼슘이 유입되었을 때 리소솜 세포외 유출이 일어난다는 사실을 확인하였다.

Galectin-1은 세포 내에서 자유롭게 돌아다니는 ribosome에 의해 합성되는 것으로 알려져 있다. 생체 조직에서 정제한 galectin-1의 폴리펩티드 서열을 분석하면 N-말단에 acetylation되어 있는 것을 확인할 수 있

는데, 이것은 일반적으로 분비되는 단백질의 특성을 가지고 있지 않으면서 세포의 내외에서 여러 가지 특성을 나타낸다 (Wilson 등 1989). 그리고 galectin-1은 칼슘을 유입 시키는 등 다양한 세포에서 다양한 작용을 하는 것으로 알려져 있지만 (Clerch 등 1988), 현재까지 리소솜 세포의 유출을 유도한다는 보고는 없다.

본 연구를 통하여 npc 1 유전인자가 없이 칼슘이 유입되는 것을 확인하였으며, galectin-1이 칼슘이 유입되지 않고 리소솜 세포의 유출을 유도시킨다는 사실을 확인하였다. 그리고 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주에서 galectin-1의 투여로 리소솜 세포의 유출을 유도시킨다는 사실을 확인함으로써 NPC 질환 치료가 가능할 것으로 사료된다.

## 5. MAP kinase 신호전달 경로

본 연구에서 MAP kinase 신호전달 경로를 조사하였을 때 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주에서는 CHO npc<sup>+/+</sup> 25RA 세포주에 비해 p38, 인산화된 p38의 발현이 감소하였고, ERK1/2와 인산화된 ERK1/2의 발현도 25RA 세포주에 비해 감소하였다. 그리고 galectin-1을 투여한 CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주는 galectin-1을 투여하지 않았을 때보다 ERK1/2, 인산화된 ERK1/2와 인산화된 p38의 발현이 증가하였다.

MAP kinase는 각각 dual phosphorylation motif인 catalytic domain의 subdomain VIII에 있는 Tyr-Glu-Tyr(ERK), Tyr-Pro-Tyr(JNK) 및 Thr-Gly-Tyr(p38)에서 인산화된다. 이 인산화 과정은 다양한 MKK들의 protein cascade에 의해 일어난다. JNK는 MKK4와 MKK7에 의해, p38은 MKK3, MKK6 및 MKK4에 의해 인산화 되는 것으로 알려져 있으며

ERK는 MKK1과 MKK2에 의해 인산화된다고 알려져 있다. JNK는 c-Jun의 activation domain의 N-terminal에 binding 한다고 밝혀져 있고 (Barr와 Bogoyecitch, 2001; Davis, 2000), c-Jun의 Ser-63과 Ser-73을 인산화시킨다 (Pulcerer 등 1991). JNK은 여러 cytokine들에 의해서 활성화되며 다양한 환경스트레스에 의해서도 활성화되는 것으로 알려져 있다 (Ip와 Davis, 1998). p38은 JNK와 유사한데 여러 cytokine들과 스트레스에 반응한다.

npc<sup>-/-</sup> 생쥐의 신경줄기세포에서도 MAP kinase 단백질에 영향을 받아 증식과 분화 능력이 떨어지는 것으로 보고되었다 (Corson 등 2003; Yang 등 2006). CHO npc<sup>-/-</sup> CT43 세포주에서 ERK1/2와 인산화된 ERK1/2의 발현이 감소하는 것 또한 npc1 유전자의 부재로 MAP kinase 신호전달 경로가 원활하게 이루어지지 않는 것으로 사료된다. 또한 리소좀 세포의 유출 유도 물질인 galectin-1의 투여로 ERK1/2, 인산화된 ERK1/2가 활성화되어 MAP kinase 신호전달 경로가 원활하게 이루어지도록 유도하는 것으로 사료된다.



## V. 결 론

본 연구에서는 NPC는 흥분성 신경전달물질인 glutamate를 세포 내로 다시 유입시켜 흥분성 신경전달물질의 농도를 필요이상으로 높여 기억력, 학습, 운동기능 및 중추신경계의 발달장애가 있다는 사실을 규명하였다. 그리고 galectin-1을 이용하여 npc1 유전인자 없이 콜레스테롤의 양을 감소시키고 MAP kinase 신호전달 경로가 회복되는 것을 규명함으로써 NPC 질환의 근본적인 이해를 돕고 더 나아가 지질대사 질환의 근본적인 이해에 핵심적인 역할을 할 것으로 사료된다. 또한 향후 유전적으로 발생하는 지질축적증후군 뿐만 아니라 지질축적과 관련된 여러 퇴행성 신경질환에 대한 치료의 가능성도 제시해 줄 수 있다는데 본 연구의 중요성이 있다.



## VI. 참고 문헌

Adler, V., Polotskaya, A., Wagner, F. and Kraft, A. S. 1992. Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *J. Biol. Chem.* 267(24) 17001~17005.

Arriza, J. L., Fairman, W. A., Wadiche, J. I., Murdoch, G. H., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. 1994. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J. Neurosci.* 14(9) 5559~5569.

Auer, I. A., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Curry, B., Suzuki, K., Shin, R. W., Pentchev, P. G., Carstea, E. D., and Trojanowski, J. Q. 1995. Paired helical filament tau (PHFtau) in Niemann-Pick type C disease is similar to PHFtau in Alzheimer's disease. *Neuropathol (Berl).* 90(6) 547~551.

Barker, P. A. and Salehi, A. 2002. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *Neurosci. Res.* 67(6) 705~712.

Bar-Peled, O., Ben-Hur, H., Biegon, A., Groner, Y., Dewhurst, S., Furuta, A. and Rothstein, J. D. 1997. Distribution of glutamate



transporter subtypes during human brain development. *J. Neurochem.* 69(6) 2571~2580.

Barr, R. K. and Bogoyecitch, M. A. 2001. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33(11) 1047~1063.

Borden, L. A., Smith, K. E., Hartig, P. R., Branchek, T. A. and Weinshank, R. L. 1992. Molecular heterogeneity of the gamma-aminobutyric acid (GABA) transport system. Cloning of two novel high affinity GABA transporters from rat brain. *J. Biol. Chem.* 267(29) 21098~210104.

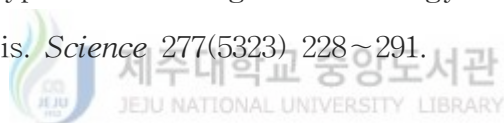
Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. and Mlodzik, M. 1998. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94(1) 109~118.

Breitbart, H. 2002. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol. Cell Endocrinol.* 187(1-2) 139~144.

Burdon, T., Smith, A. and Savatier, P. 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 12(9) 432~438.

Cande, C., Vahsen, N., Kouranti, I., Schmitt, E., Daugas, E., Spahr, C., Luban, J., Kroemer, R. T., Giordanetto, F., Garrido, C., Penninger, J. M. and Kroemer, G. 2004. AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene* 23(8) 1514~1521.

Carstea, E. D., Morris, J. A., Coleman, K. G., Loftus, S. K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M. A., Pavan, W. J., Krizman, D. B., Nagle, J., Polymeropoulos, M. H., Sturley, S. L., Ioannou, Y. A., Higgins, M. E., Comly, M., Cooney, A., Brown, A., Kaneski, C. R., Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Neufeld, E. B., Chang, T. Y., Liscum, L., Strauss, J. F., Ohno, K., Zeigler, M., Carmi, R., Sokol, J., Markie, D., O'Neill, R. R., van Diggelen, O. P., Elleder, M., Patterson, M. C., Brady, R. O., Vanier, M. T., Pentchev, P. G. and Tagle, D. A. 1997. Niemann-Pick type C1 disease gene : homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277(5323) 228~291.



Church, J. and Zsoter, T. T. 1980. Calcium antagonistic drugs. Mechanism of action. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58(3) 254~264.

Clark, J. A. 1992. Functional expression and CNS distribution of a beta-alanine-sensitive neuronal GABA transporter. *Neuron* 9(2) 337~348.

Clementi, E. and Meldolesi, J. 1996. Pharmacological and functional properties of voltage-independent  $Ca^{2+}$  channels. *Cell Calcium* 19(4)

269~279.

Clerch, L. B., Whitney, P. and Massaro, D. 1989. Rat lung lectin gene expression is regulated developmentally and by dexamethasone. *Am. J. Physiol.* 256(3) 501~505.

Corson, L. B., Yamanaka, Y., Lai, K. M. and Rossant, J. 2003. Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development* 130(19) 4527~4537.

Davis, R. J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103(2) 239~252.

Disterhoft, J. F., Moyer, J. R. and Thompson, L. T. 1994. The calcium rationale in aging and Alzheimer's disease. Evidence from an animal model of normal aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 15(747) 382~406.

Dragileva, E., Rubinstein, S. and Breitbart, H. 1999. Intracellular Ca(2+)-Mg(2+)-ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 161(5) 1226~1234.

Durkin, M. M. 1995. Localization of messenger RNAs encoding three GABA transporters in rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 33(1) 7~21.

Fahn, S. and Cote, L. J. 1968. Regional distribution of sodium-potassium activated adenosine triphosphatase in the brain of the Rhesus monkey. *J. Neurochem.* 15(5) 433~436.

Feng, P., Park, J., Lee, B. S., Lee, S. H., Bram, R. J. and Jung, J. U. 2002. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus mitochondrial K7 protein targets a cellular calcium-modulating cyclophilin ligand to modulate intracellular calcium concentration and inhibit apoptosis. *J. Virol.* 76(22) 11491~11504.

Furuta, A., Rothstein, J. D. and Martin, L. J. 1997. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* 17(21) 8363~8375.

Gallo, V., Upson, L. M., Hayes, W. P., Vyklicky, L., Winters, C. A. and Buonanno, A. 1992. Molecular cloning and development analysis of a new glutamate receptor subunit isoform in cerebellum. *J. Neurosci.* 12(3) 1010~1023.

Gardella, S., Andrei, C., Lotti, L. V., Poggi, A., Torrisi, M. R., Zocchi, M. R. and Rubartelli, A. 2001. CD8(+) T lymphocytes induce polarized exocytosis of secretory lysosomes by dendritic cells with release of interleukin-1beta and cathepsin D. *Blood* 98(7) 2152~2159.

Gibson, G. E. and Peterson, C. 1987. Calcium and the aging nervous

system. *Neurobiol. Aging*. 8(4) 329~343.

Gidon-Jeangirard, C., Solito, E., Hofmann, A., Russo-Marie, F., Freyssinet, J. M. and Martinez, M. C. 1999. Annexin V counteracts apoptosis while inducing Ca<sup>2+</sup> influx in human lymphocytic T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265(3) 709~715.

Guastella, J., Nelson, N., Nelson, H., Czyzyk, L., Keynan, S., Miedel, M. C., Davidson, N., Lester, H. A. and Kanner, B. I. 1990. Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 249(4974) 1303~1306.

Gutcher, I., Webb, P. R. and Anderson, N. G. 2003. The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell Mol. Life Sci.* 60(6) 1061~1070.



Hawkins, T. E., Das, D., Young, B. and Moss, S. E. 2002. DT40 cells lacking the Ca<sup>2+</sup>-binding protein annexin 5 are resistant to Ca<sup>2+</sup>-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(12) 8054~8059.

Henning, G., Kraft, M. S., Derfuss, T., Pirzer, R., de Saint-Basile, G., Aversa, G., Fleckenstein, B. and Meinel, E. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) regulates T cellular cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 31(9) 2741~2750.

Hofman, A., Ott, A., Breteler, M. M., Bots, M. L., Slooter, A. J., van Harskamp, F., van Duijn, C. N., Van Broeckhoven, C. and Grobbee, D. E. 1997. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet*. 349(9046) 151~154.

Iadarola, M. J. and Gale, K. 1982. Substantia nigra: site of anticonvulsant activity mediated by gamma-aminobutyric acid. *science* 218(4578) 1237~1240.

Ikegaki, N., Saito, N., Hashima, M. and Tanaka, C. 1994. Production of specific antibodies against GABA transporter subtypes (GAT1, GAT2, GAT3) and their application to immunocytochemistry. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 26(1-2) 47~54.

Ip, Y. T. and Davis, R. J. 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase(JNK)-from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10(2) 205~219.

Jaiswal J. K., Andrews N. W. and Simon S. M. 2002. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *J. Cell Biol.* 159(4) 625~635.

Jarvik, G. P., Wijsman, E. M., Kukull, W. A., Schellenberg, G. D., Yu,

C. and Larson, E. B. 1995. Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. *Neurology* 45(6) 1092~10926.

Jick, H., Zornberg, G. L., Jick, S. S., Seshadri, S. and Drachman, D. A. 2000. Statins and the risk of dementia. *Lancet*. 356(9242) 1627~1631.

Jin, L. W., Shie, F. S., Maezawa, I., Vincent, I. and Bird, T. 2004. Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid-beta precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities. *Am. J. Pathol.* 164(3) 975~985.

Kannai, K. and Hediger, M. A. 1992. Primary structure and functional characterization of high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360(6403) 467~471.

Kanner, B. I. and Schuldiner, S. 1987. Mechanism of transport and storage of neurotransmitters. *Rev. Biochem.* 22(1) 1~38.

Khachaturian, Z. S. 1994. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 747(15) 1~11.

Kim, J. H., Park, K. C., Chung, S. S., Bang, O. and Chung, C. H. 2003. Deubiquitinating enzymes as cellular regulators, *J. Biochem.* 134(1) 9~18.

Kivipelto, M., Ngandu, T., Fratiglioni, L., Viitanen, M., Kareholt, I., Winblad, B., Helkala, E. L., Tuomilehto, J., Soininen, H. and Nissinen, A. 2001. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ.* 322(7300) 1447~1451.

Kobayashi, T., Beuchat, M. H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R. D., Sakuraba, H., Parton, R. G. and Gruenberg, J. 1999. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat. Cell. Biol.* 1(2) 113~118.

Lai, C. F., Chaudhary, L., Fausto, A., Halstead, L. R., Ory, D. S., Avioli, L. V. and Cheng, S. L. 2001. ERK is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 276(17) 14443~14450.

Lee, S. M., Koh, H. J., Park, D. C., Song, B. J., Huh, T. L. and Park, J. W. 2002. Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radical. Biol. Med.* 32(11) 1185~1196.



Lehre, K. P., Davanger, S. and Danbolt, N. C. 1997. Localization of the glutamate transporter protein GLAST in rat retina. *Brain Res.* 744(1) 129~137.

Lin, T. Y., Wang, S. M. and Yin, H. S. 1998. Downregulation and subcellular redistribution of the gamma-aminobutyric acidA receptor induced by tunicamycin in cultured brain neurons. *J. Cell Biochem.* 70(1) 38~48.

Liu, Y. B., Disterhoft, J. F. and Slater, N. T. 1993. Activation of metabotropic glutamate receptors induces long-term depression of GABAergic inhibition in hippocampus. *J. Neurophysiol.* 69(3) 1000~1004.

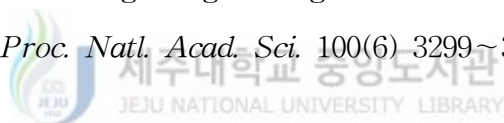
Loftus, S. K., Morris, J. A., Carstea, E. D., Gu, J. Z., Cummings, C., Brown, A., Ellison, J., Ohno, K., Rosenfeld, M. A., Tagle, D. A., Pentchev, P. G. and Pavan, W. J. 1997. Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* 277(5323) 232~235.

Lopez-Corcuera, B., Liu, Q. R., Mandiyan, S., Nelson, H. and Nelson, N. 1992. Expression of a mouse brain cDNA encoding novel gamma-aminobutyric acid transporter. *J. Biol. Chem.* 267(25) 17491~17493.

Lu, J., Goula, D., Sousa, N. and Almeida, O. F. 2003. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor mediation of glucocorticoid-induced apoptosis in hippocampal cells and the neuroprotective role of synaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 121(1) 123~131.

Magi, B., Ettore, A., Liberatori, S., Bini, L., Andreassi, M., Frosali, S., Neri, P., Pallini, V. and Di Stefano, A. 2004. Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation. *Cell Death Differ.* 11(8) 842~852.

Maretto, S., Cordenonsi, M., Dupont, S., Braghetta, P., Broccoli, V., Hassan, A. B., Volpin, D., Bressan, G. M. and Piccolo, S. 2003. Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(6) 3299~3304.



Mattson, M. P., Lee, R. E., Adams, M. E., Guthrie, P. B. and Kater, S. B. 1988. Interaction between entorhinal axons and target hippocampal neurons : a role of glutamate in the development of hippocampal circuitry. *Neuron* 1(9) 865~876.

McGeer, E. G. 1989. Cortical glutaminase, beta-glucuronidase and glucose utilization in Alzheimer's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* 16(4) 511~515.

Minelli, A., Brecha, N. C., Karschin, C., DeBiasi, S. and Conti, F. 1995. GAT-1, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to neurons and astroglia in the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 15(11) 7734~7746.

Morris, J. A. and Carstea, E. D. 1998. Niemann-Pick C disease: cholesterol handling gone awry. *Mol. Med. Today* 4(12) 525~531.

Morshead, C. M., Craig, C. G. and van der Kooy, D. 1998. In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development* 125(12) 2251~2261.

Mutka, A. L., Lusa, S., Linder, M. D., Jokitalo, E., Kopra, O., Jauhiainen, M. and Ikonen, E. 2004. Secretion of sterols and the NPC2 protein from primary astrocytes. *J. Biol. Chem.* 279(47) 48654~48662.

Nagao, S., Kwak, S. and Kanazawa, I. 1997. EAAT4, A glutamate transporter with properties of a chloride channel, is predominantly localized in Purkinje cell dendrites, and forms parasagittal compartments in rat cerebellum. *Neuroscience* 78(4) 929~933.

Nakagawa, T. and Sheng, M. 2000. Neurobiology. A stargazer foretells the way to the synapse. *Science* 290(5500) 2298~2301.

Nicholls, D. and Atwell, D. 1990. The release and uptake of excitatory amino acid. *Trends Neurosci.* 11(11) 462~468.

Nishio, C., Yoshida, K., Nishiyama, K., Hatanaka, H. and Yamada, M. 2000. Involvement of cystatin C in oxidative stress-induced apoptosis of cultured rat CNS neurons. *Brain Res.* 873(2) 252~262.

Notkola, I. L., Sulkava, R., Pekkanen, J., Erkinjuntti, T., Ehnholm, C., Kivinen, P., Tuomilehto, J. and Nissinen, A. 1998. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17(1) 14~20.

Pandy, A. and Mann, M. 2000. Proteomic to study genes and genomes. *Nature* 405(6788) 837~846.

Patel, S. C., Suresh, S., Kumar, U., Hu, C. Y., Cooney, A., Blanchette-Mackie, E. J., Neufeld, E. B., Patel, R. C., Brady, R. O., Patel, Y. C., Pentchev, P. G. and Ong, W. Y. 1999. Localization of Niemann-Pick C1 protein in astrocytes: implications for neuronal degeneration in Niemann-Pick type C disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(4) 1657~1662.

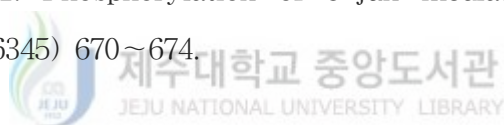
Pearce, I. A., Cambray-Deakin, M. A. and Burgoyne, R. D. 1987. Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth

from cerebellar granule cells. *FEBS Letter* 223(1) 143~147.

Pedersen, M. V., Kohler, L. B., Ditlevsen, D. K., Li, S., Berezin, V. and Bock, E. 2004. Neuritogenic and survival-promoting effects of the P2 peptide derived from a homophilic binding site in the neural cell adhesion molecule. *J. Neurosci. Res.* 75(1) 55~65.

Pines, G., Danbolt, N. C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E. and Kanner, B. I. 1992. Cloning and expression of the rat brain L-glutamate. *Nature* 360(6403) 464~467.

Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E. and Woodgett, J. R. 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353(6345) 670~674.



Reynolds, G. P, Czudek, C. and Andrews, H. B. 1990. Deficit and hemispheric asymmetry of GABA uptake sites in the hippocampus in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 27(9) 1038~1044.

Roberts, E. and Kuriyama, K. 1968. Biochemical-physiological correlations in studies of the gamma-aminobutyric acid system. *Brain Res.* 8(1) 1~35.

Roberts P. J. 1976. Gamma-aminobutyric acid homoexchange in sensory ganglia. *Brain Res.* 113(1) 206~209

Rothstein, J. D., Martin, L., Levey, A. I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N. and Kuncl, R. W. 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13(3) 713~725.

Sawamura, N., Gong, J. S., Garver, W. S., Heidenreich, R. A., Ninomiya, H., Ohno, K., Yanagisawa, K. and Michikawa, M. 2001. Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. *J. Biol. Chem.* 276(13) 10314~10319.

Sawamura, N., Gong, J. S., Chang, T. Y., Yanagisawa, K. and Michikawa, M. 2003. Promotion of tau-phosphorylation by MAP kinase Erk1/2 is accompanied by reduced cholesterol level in detergent-insoluble membrane fraction in Niemann-Pick C1-deficient cells. *J. Neurochem.* 84(5) 1086~1096.

Scherer, R. W., Ferkany, J. W. and Enna, S. J. 1988. Evidence for pharmacologically distinct subsets of GABAB receptors. *Brain Res. Bull.* 21(3) 439~443.

Schuchman, E. H. and Miranda, S. R. 1997. Niemann-Pick disease: mutation update, genotype/phenotype correlations, and prospects for

genetic testing. *Genet. Test* 1(1) 13~19.

Seger, R. and Krebs, E. G. 1995. The MAPK signaling cascade. *Faseb. J.* 9(9) 726~735.

Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., Tanaka, K. and Inoue, Y. 1997. Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J. Neurosci.* 17(23) 9212~9219.

Somers, K. L., Wenger, D. A., Royals, M. A., Carstea, E. D., Connally, H. E., Kelly, T., Kimball, R. and Thrall, M. A. 1999. Complementation studies in human and feline Niemann-Pick type C disease. *Mol. Genet. Metab.* 66(2) 117~121.

Stoffel, W., Sasse, J., Duker, M., Muller, R., Hofmann, K., Fink, T. and Lichter, P. 1996. Human high affinity, Na(+)-dependent L-glutamate/L-aspartate transporter GLAST-1 (EAAT-1): gene structure and localization to chromosome 5p11-p12. *FEBS Lett.* 386(2-3) 189~193.

Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K. and Stoffel, W. 1992. Structure, expression and functional analysis of a Na<sup>+</sup>-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(22) 10955~10959.

Sun, X., Marks, D. L., Park, W. D., Wheatley, C. L., Puri, V., O'Brien, J. F., Kraft, D. L., Lundquist, P. A., Patterson, M. C., Pagano, R. E. and Snow, K. 2001. Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1. *Am, J. Hum. Genet.* 68(6) 1361~1372.

Sutherland, M. L., Delaney, T. A. and Noebels, J. L. 1996. Glutamate transporter mRNA expression in proliferative zones of the developing and adult murine CNS. *J. Neurosci.* 16(7) 2191~2207.

Suzuki, H., Sakiyama, T., Harada, N., Abe, M. and Tadokoro, M. 2003. Pathologic changes of glial cells in murin model of Niemann-Pick disease type C: immunohistochemical, lectin-histochemical and ultrastructural observations. *Perdiatr. Int.* 46(1) 1~4.

Szatkowaski, M. and Attwell, D. 1994. Triggering and execution of neuronal death in brain ischemia : two phases of glutamate release by different mechanism. *Trends Neurosci.* 17(9) 359~365.

Takayama, S., Reed, J. C. and Homma, S. 2003. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* 22(56) 9041~9047.

Tanaka, K. 1993. Expression cloning of a rat glutamate transporter. *Neurosci. Res.* 16(2) 149~153.



Terasaki, M., Miyake, K. and McNeil, P. L. 1997. Large plasma membrane disruptions are rapidly resealed by  $Ca^{2+}$ -dependent vesicle-vesicle fusion events. *J. Cell Biol.* 139(1) 63~74.

Uddin, S., Ah-Kang, J., Ulaszek, J., Mahmud, D. and Wickrema, A. 2004. Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(1) 147-152.

Vandenberg, R. J., Mitrovic, A. D., Chebib, M., Balcar, V. J. and Johnston, G. A. 1997. Contrasting modes of action of methylglutamate derivatives on the excitatory amino acid transporters, EAAT1 and EAAT2. *Mol. Pharmacol.* 51(5) 809~815.

Vandenberg, R. J., Mitrovic, A. D. and Johnston, G. A. 1998. Molecular basis for differential inhibition of glutamate transporter subtypes by zinc ions. *Mol. Pharmacol.* 54(1) 189~196.

Vanier, M. T. and Millat, G. 2003. Niemann-Pick disease type C. *Clin. Genet.* 64(4) 269~281.

Voyno-Yasenetskaya, T. A., Dobbs, L. G., Erickson, S. K. and Hamilton, R. L. 1993. Low density lipoprotein-and high density lipoprotein-mediated signal transduction and exocytosis in alveolar type II cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(9) 4256~4260.

Wilkins, M. R. 1995. Progress with proteome project: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Gene. Eng. Rev.* 13(1) 19~50.

Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K. L. and Hochstrasser, D. F. 1996. From proteins the proteomes: Large-scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio. Technology* 14(1) 61~65.

Wilson, T. J., Firth, M. N., Powell, J. T. and Harrison, F. L. 1989. The sequence of the mouse 14 kDa beta-galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis free cytoplasmic ribosomes. *Biochem. J.* 261(3) 847~852.

Wojcik, C. 2002. Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *Cell Mol. Med.* 6(1) 25~48.

Wolozin, B., Kellman, W., Russeau, P., Celesia, G. G. and Siegel, G. 2000. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* 57(10) 1439~1443.

Wu, J. Y. 1983. In Glutamine glutamate and GABA in the Central Nervous System. *Raven, N. Y.* 1(1) 355~361.

Xiao, G., Jiang, D., Thomas, P., Benson, M. D., Guan, K., Karsenty, G. and Franceschi, R. T. 2000. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor. *J. Biol. Chem.* 275(6) 4453~4459.

Yang, S. R., Kim, S. J., Byun, K. H., Hutchinson, B., Lee, B. H., Michikawa, M., Lee, Y. S. and Kang, K. S. 2006. NPC1 gene deficiency leads to lack of neural stem cell self-renewal and abnormal differentiation through activation of p38 MAP kinase signaling. *stem cell* 24(2) 292~298.

Yan, X. X. and Ribak, C. E. 1998. Developmental expression of gamma-aminobutyric acid transporters (GAT-1 and GAT-3) in the rat cerebellum: evidence for a transient presence of GAT-1 in Purkinje cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 111(2) 253~269.

Zhang, W. and Liu, H. T. 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 12(1) 9~18.



## 감사의 글

이제 새로운 첫 발걸음을 내딛으려 합니다. 이 한걸음을 내딛을 수 있기까지 정말 오랜 시간이 걸렸습니다. 몇 해 전 처음으로 이 곳 의과대학에 들어올 때의 제 모습이 떠오릅니다. 새로운 시작에 대한 설렘과 두려움, 앞으로 이루어 나가야 할 연구에 대한 열정 등으로 가득한 저였습니다. 이러한 열정 앞에서도 지난 시간 동안 수 없이 많은 좌절과 어려움이 저를 힘들게 하였습니다. 이런 저를 옆에서 지켜보아 주시며 끊임없이 힘을 주신 많은 분들께 이 글을 통해 감사의 마음을 전해드리고자 합니다.

먼저 이 논문이 완성되기까지 많은 관심과 격려로 늘 변함없이 따뜻하게 지도해 주신 이봉희 교수님께 진심으로 감사드립니다. 교수님으로부터 참된 연구자의 마음가짐과 삶에 대한 성실한 태도를 마음 깊이 새길 수 있었습니다. 학문과 삶에 대한 교수님의 진심 어린 말씀 하나 하나 새겨가며 최선을 다해 살아가겠습니다.

연구와 강의로 바쁘신 가운데에도 저의 미흡한 논문을 자상하게 심사해 주시고 방대한 여러 분야를 체계적으로 정리해 주신 화학과의 강창희 교수님, 한림대학교의 원무호 교수님, 의학과 의 은수용 교수님, 국가유전체정보센터의 추인선 박사님께 감사드립니다. 아울러 대학원 과정동안 늘 관심과 조언으로 이끌어주신 이영기 교수님, 박덕배 교수님, 정영배 교수님, 강현욱 교수님, 조문제 교수님, 현진원 교수님, 고영상 교수님, 이근화 교수님, 배종면 교수님, 홍성철 교수님, 이상이 교수님, 김수영 교수님, 강희경 교수님, 유은숙 교수님, 조수현 교수님, 심기범 교수님, 장원영 교수님, 송병철 교수님, 정광훈 교수님, 이광복 교수님께도 감사드립니다.

제 박사학위 연구에 관해 많은 관심을 가져주시며 연구방향과 과정에 있어 많은 조언을 해주셨을 뿐만 아니라, 제 잦은 부탁에도 아낌없는 도움을 안성민 선생님께 감사드립니다.

해부학교실에서 오랜 시간동안 많은 실험을 같이 하면서 동고동락한 한은혜 선생님, 문상돈 선생님, 고선영, 김재우, 강혜정, 현진욱에게도 감사의 마음을 전합니다.

함께 울고 웃으며 보낸 지난 시간은 그 무엇과도 바꿀 수 없는 소중한 경험이고 추억입니다. 아울러 연구를 수행함에 있어 관심과 조언을 통해 늘 옆에서 도움을 주신 미생물학교실 윤지현 선생님, 구정은 선생님, 생화학교실 임희경 선생님, 임상연구실 안춘산 선생님, 약리학교실 혜자, 재희, 화학과의 선후배님에게도 감사의 마음을 전합니다.

미생물학교실에서 같이 실험했던 김정희 선생님과 임성인 선생님에게도 고마움을 전합니다. 이들의 따뜻한 관심과 끊임없는 애정은 지치고 힘들 때마다 저에게 큰 힘이 되어 주었습니다.

부족한 저를 며느리로 삼아 아낌없는 지원과 믿음으로 지켜봐 주신 사랑하는 부모님, 그리고 항상 애정 어린 관심과 따뜻한 정으로 대해주시는 시댁 식구들, 친정 식구들, 그리고 친지 어른들께 진심으로 감사드립니다.

제 모든 힘의 원천이며 살아가는 원동력인 사랑하는 저의 남편 호석씨와 좁은 벅속에서 많이 힘들었을 텐데도 잘 참아준 곧 만나게 될 저의 아기에게도 감사의 마음을 전합니다. 헤아릴 수 없이 가득한 사랑과 관심, 인내가 없었다면 지금의 저는 결코 있을 수 없었을 것입니다.

마지막으로, 지금까지 저를 낳아 길러 주시고 끊임없이 사랑을 보내주신 부모님께 감사드립니다. 그 무엇으로도 다 표현할 수 없을 만큼의 헌신적인 두 분의 사랑으로 이 자그마한 논문은 빛어졌습니다. 오늘의 작은 열매에 자만하지 않고 계속 정진하면서 살아가도록 하겠습니다.

이 외에 제가 미처 언급하지 못한 고마운 분들이 너무나 많습니다. 그 분들의 이름을 하나하나 되새기지 못함을 죄송하게 생각하며, 대신 제 깊은 감사의 말로 이 글을 마칠까 합니다. “모두들 감사드립니다.”

2006년 6월

변 경 희