

碩士學位論文

속후각결질내  $A\beta$  1-42 투여에  
따른 Tau의 과인산화에 관한  
형태학적 연구



濟州大學校 大學院  
獸醫學科

金大成

2002年 12月

속후각결질내  $A\beta$  1-42 투여에  
따른 Tau의 과인산화에 관한  
형태학적 연구

指導教授 李 榮 載

金 大 成

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2002 年 11 月

金大成的 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_  
委 員 \_\_\_\_\_  
委 員 \_\_\_\_\_

濟州大學校 大學院

2002年 12月

## Abstract

# The morphological study on the hyperphosphorylated tau after amyloid beta 1-42 injection into entorhinal cortex

Dae Sung Kim

(Supervised by Prof. Young Jae Lee)

 제주대학교 중앙도서관  
Department of Veterinary Medicine

Graduate School, Cheju National University, Jeju, Korea

Alzheimer's disease(AD) is a neurodegenerative disease characterized by affecting mainly the cortical brain areas. Neuronal degeneration observed in brains of AD patients is the direct consequence of amyloid beta hyperproduction, thus, causing the formation of amyloid deposit, which, in turn, induce dendrite, axon retraction, and neuronal death. The hyperphosphorylation of the axonal protein tau can lead to the accumulation of hyperphosphorylated and polymerized tau in neurons, to a strong disturbance of intracellular communication, and to neuronal

death. Microtubule associated protein tau is abnormally phosphorylated in AD and aggregates as paired helical filaments(PHF) in neurofibrillary tangles. The purpose of this study was to investigate whether amyloid beta 1-42 injection may cause the changes of the hyperphosphorylation of tau in the rat brain and to check the portion and ratios of the hyperphosphorylated tau. The freshly solubilized amyloid beta 1-42 was injected into the entorhinal cortex of the SD rats using stereotaxic instrument. The expression of PHF/hyperphosphorylated tau was analyzed by immunohistochemistry and western blot analysis at 7 days after post amyloid beta injection. The PHF/hyperphosphorylated tau expression appeared in several different areas including amyloid beta injection site. western blot analysis showed that the amount of PHF/hyperphosphorylated tau was increased at the cortical and hippocampal extracts after amyloid beta injection. These data suggest that the PHF/hyperphosphorylated tau was increased in several different areas as well as injection sites and tau was hyperphosphorylated on entorhinal tract.

Key word: amyloid beta 1-42 protein, phosphorylated PHF/tau,  
entorhinal cortex,

# 목 차

Abstract-----	i
목차-----	iii
List of figures-----	iv
List of table-----	vi
I. 서론-----	1
II. 재료 및 방법-----	4
1. 실험동물-----	4
2. 실험동물의 마취-----	4
3. 아밀로이드 베타 1-42의 속후각겉질내의 주입-----	4
4. 면역조직화학염색-----	5
1) 뇌조직 절편 준비-----	5
2) 면역조직화학염색법-----	6
5. Western blot-----	7
1) 단백질 정량-----	7
2) Gel electrophoresis-----	7
3) Electrotransfer-----	8
III. 결과-----	10
1. 아밀로이드 침착에 대한 면역조직화학분석-----	10
2. 과인산화된 tau의 면역조직화학분석-----	10
3. 과인산화 tau의 정량분석-----	11
IV. 고찰-----	22
V. 결론-----	25
VI. 참고문헌-----	27

## List of Figures

Figure 1. Amyloid protein deposition in the brain.

Figure 2. Amyloid protein deposition in amyloid beta 1-42 injection group.

Figure 3. Amyloid protein deposition in amyloid beta 1-42 injection group.

Figure 4. Amyloid beta 1-42 induced AT-8 immunoreactivity in entorhinal cortex.

Figure 5. Amyloid beta 1-42 induced AT-8 immunoreactivity in hippocampus.

Figure 6. Amyloid beta 1-42 induced AT-8 immunoreactivity in tuberomammillary nucleus.

Figure 7. Amyloid beta 1-42 induced AT-8 immunoreactivity in hippocampus.

Figure 8. Western blot analysis of tau protein in cortex

Figure 9. Western blot analysis of tau protein in hippocampus

## List of Table

Table 1. Hyperphosphorylated tau immunoreactivity after amyloid  
beta 1-42 injection



## I. 서론

치매(dementia)는 뇌의 퇴행성 질병 중 하나이며, 대표적인 임상증상은 기억장애, 언어장애, 방향감각저하, 계산력저하, 성격 및 감정의 변화이다 (Talaga, 2001).

치매는 크게 혈관성과 알츠하이머형으로 분류된다 (Fahlander 등, 2002; Herrmann, 2002; Posner 등, 2002; Yuspeh 등, 2002). 그 중 알츠하이머형은 전체 치매환자의 반 이상을 차지하고 있으며 (Jellinger 등, 1998), 특히 뇌 신경세포들의 퇴행성 병변으로 인해 대뇌 피질의 콜린성 신경계 활성을 감소시킨다고 알려졌다 (Langlais 등, 1993; Lehericy 등, 1993; Gonzalo-Ruiz, 1999). 알츠하이머환자에 있어서 뇌의 사후 조직병리학적 병변은 노인반 (senile plaque), 신경섬유 덩어리 (neurofibrillary tangles), 아밀로이드 혈관 (vascular amyloid) 등이 관찰되어지며 (Pappolla 등, 1992; Defigueiredo 등, 1995; Haww 등, 1996; Dai 등, 2002), 특히 측두엽, 전두엽, 두정엽의 일차적 손상역과 해마 및 편도핵에 심하게 나타난다 (Masters 등, 1995; Sturchler-Pierrat과 Staufenbiel, 2000; Rockenstein 등, 2001). 또한 최근 연구 결과에 따르면, 아밀로이드 베타 단백질이 세포와 혈관에 침착되어 신경세포에 독성작용을 함으로써 뇌기능 장애를 초래한다고 보고 되었다 (Kennedy 등, 1993; Shimizu 등, 2000; Sjogren 등, 2001; Tan 등, 2002).

아밀로이드 베타 단백질은 pleated sheet 구조로 그 자체가 비용해성 섬유 구조를 가지고 있는 것이 특징이다 (Chaney 등, 1998; Kowalewski 와



Holtzman, 1999; Olga와 Sergei, 2000). 이 단백질은 세포막에 있는 전구단백질(amyloid precursor protein)로부터 유래되어져 나오는 42-43개의 아미노산 잔기로 구성되어진다 (Glenner와 Wong, 1984; Masters 등, 1985). 아밀로이드 베타 단백질은 세포막내에 1/3, 세포막 바깥 부분에 2/3가 위치하고 있으며, 정상상태에서는 아밀로이드 베타 단백질의 중간 부분인 N단 15-16번째 아미노산 부위에서 잘라짐으로써 세포외로 유리되어지지만 알츠하이머 환자의 뇌에서는 정상과 달리 베타 단백질 부분이 잘라져서 침착 되어진다 (Anderson 등, 1991; Busciglio 등, 1993). 이 전구단백질은 여러 조직에서 발현되지만 (Sisodia 등, 1993), 베타 단백질은 뇌에서만 침착된다고 보고 되었다 (Whitehouse, 1997). 또한 *in vitro* 연구 결과 아밀로이드 베타 단백질 중 1-42가 신경독성 작용을 한다고 보고 되었다 (Yankner 등, 1990; Morelli 등, 1999).

신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangles)는 ubiquitin에 연관되어 있는 tau 단백질의 기본 구성요소로 비정상적인 인산화에 의해 세포내 PHFs(paired helical filaments)의 형태로 침착되어 나타난다 (Morishima 등, 1993; Hall 등, 1999). 이 변성단백은 세포내 퇴화체계와 관련이 있으며, 세포내 비용해성 구조의 단백질 침착은 세포질의 기능, 축삭의 신경전달물질 수송등에 장애를 일으킨다고 알려졌다 (Delacourte 등, 1999). tau는 세포내 미세관에 결합되어 있는 정상 축삭 단백질이며 미세관의 결합을 안정화시켜주는 기능을 가지고 있다 (Jellinger와 Bancher, 1998). 이런 정상 tau가 과인산화된 tau의 형태로 전환되는 것은 세포내 인산화와 탈인산화의 균형 붕괴로 인해 발생되어지며, 알츠하이머병의 조직병리학적 병변인 신경섬유 덩어리들 역시 과인산화된 tau가 침착되는 것으로 알려졌다 (Mandelkow와 Mandelkow, 1998). 또한, 아밀로

이드 베타 단백질을 해마(hippocampus)와 편도체(amygdala)에 주입한 결과 과인산화된 tau가 증가된다고 보고되었다 (Sigurdsson 등, 1997; Rapoport 등, 2002; Ramirez 등, 2002).

속후각겉질(entorhinal cortex)은 편도체 표면에 있으며, 측해마이랑의 앞쪽에 위치하고 있다. 속후각겉질은 해마의 연결로와 밀접한 관계를 가지고 있으며 (Hauss-Wegrzyniak 등, 2002), 해마는 기억의 주 저장소라고 알려져 있다(Golomb 등, 1993; Henke 등, 1999). 해마 연결로 중 구심성 섬유는 주로 속후각겉질에서 유래하고 관통로를 따라서 지각을 횡단하여 치아이랑의 과립신경세포와 연결을 형성한다 (Chow와 Leiman, 1970). 알츠하이머병에서는 속후각겉질중 II, IV층에서 조직 병리학적인 병변이 관찰되어지며 (Giannakopoulos 등, 2000), 속후각겉질의 전기적 손상을 가했을 경우 쥐와 사람에게 있어서 역방향성 기억 손상을 준다고 보고 되었다 (Nagahara 등, 1995; Gutierrez 등, 1997).

위의 내용을 종합한 결과 속후각겉질내에 아밀로이드 베타 1-42를 주입할 경우 아밀로이드 베타 1-42가 세포내 미세관에 결합하고 있는 인산 단백질인 tau를 과인산화 시킬 것으로 추측된다.

따라서 본 연구는 속후각겉질내에 아밀로이드 베타를 주입한 후 면역조직화학염색과 western blotting을 사용하여 과인산화된 tau의 발현 위치나 양적변화를 보고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

체중 250-300 g의 Sprague-Dawley계 rat male을 사용하였으며, 대조군 (n=10)과 실험군 (n=10)으로 나누어 온도  $21 \pm 2$  °C, 습도(50%), 낮과 밤 주기 (12:12 시간)가 일정하게 유지되는 동물 사육장에서 충분한 물과 사료를 공급하였다.



### 2. 실험동물의 마취

실험동물의 마취는 ketamine hydrochloride (60 mg/kg, Youhan corp.)와 xylazine (6 mg/kg, Bayer corp.)을 복강내 주사하였다.

### 3. 아밀로이드 베타 1-42의 속후각겉질내의 주입

아밀로이드 베타 1-42(Peptide institute. inc.)는 PBS로 200 uM로 녹여

사용직전까지 냉동(-70℃)에 보관하고, 주입직전에 녹여 사용하였다. 뇌정위수술기구(stereotaxic instrument)에 쥐 머리를 고정시킨 후 Swanson (1988)의 brain map:structure of rat map (No. 46)을 참고로 하여 속후각겉질내에 아밀로이드 베타 1-42를 주입하였다.

아밀로이드 베타 1-42의 주입 위치는 Bregma를 기준으로 하여 뒤쪽으로 8.3 mm(AP -8.3 mm), 우측으로 5.4 mm(ML -5.4 mm), 그리고 뇌의 표면에서 아래로 4.5 mm으로 속후각겉질을 목표지점으로 하였다.

대조군과 실험군은 각각 PBS 5  $\mu$ l와 아밀로이드 베타 1-42 200  $\mu$ M 5  $\mu$ l를 주입하였다. 주입은 electrical injector를 사용하고 주입속도는 0.04  $\mu$ l/min 로 하였다. 주입 후 생존기간은 7일로 하였다.



#### 4. 면역조직화학염색

제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

##### 1) 뇌조직 절편 준비

대조군(n=5)과 실험군(n=5)은 시료 투여 7일 후에, 심장을 통하여 관류 고정하였다. 관류 고정은 생리식염수에 heparin (1000 IU/1000 ml)을 섞은 용액을 10 ml/min의 유속으로 약 30분간, 4% paraformaldehyde를 30분간 관류하였다. 관류 고정이 끝난 후 뇌를 적출하여 동일한 고정액인 4% paraformaldehyde에 넣고 4℃에서 4시간 동안 후 고정을 실시하였고, 18% sucrose in 0.1 M phosphate buffered saline(pH 7.4, 이후 0.1 M PBS라 칭함)용액에 2시간동안 담근 후, 20% sucrose in 0.1 M PBS용액에 24~48시간동안 담가 보관하였

다. 전뇌는 동결절편기(Cryotome, A0)를 이용하여 30  $\mu\text{m}$  두께로 관상연속절편하였으며 4  $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 사용하였다. 모든 염색은 free floating method(De vries 등, 1985)로 실시하였다.

## 2) 면역조직화학염색

조직절편은 실온에서 0.1 M PBS로 15분씩 3회 세척하였다. 1차 항체인 mouse anti-AT8(epitope: PHF/Tau ser199, ser202, thr205)과 mouse anti-6E10(epitope: amino acid 1-16 of A domain)은 분양(Dr. Mikoto Michikawa, National Institute for Longevity Sciences) 받아 사용하였다. 1차 항체는 각각 1:500으로 희석한 후 조직을 넣어 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 17-20시간을 반응시켰다. 이 때 희석액은 0.1 M PBS에 1% normal rabbit serum, 0.3% Triton X-100(Sigma)와 0.1% bovine serum albumin(Sigma)이 섞여 있는 것을 사용하였다. 그 후 조직 절편은 실온에서 0.1 M PBS로 15분간 3회 세척하였다.

2차 항체인 biotinylated anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Inc.)를 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 2차 항체 반응이 끝난 후 0.1 M PBS로 조직을 15분간 3회 세척하였다.

peroxidase가 표지된 avidin-biotin complex (Vector Laboratories, Inc.)용액으로 넣어 실온에서 1시간 반응시킨 후 0.1 M PBS로 15분간 3회 세척하고 0.03% 3-3' diaminobenzidine을 0.1 M PBS에 녹인 후 0.003%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 첨가하여 착색반응을 시행하였다.

반응이 끝난 후 0.1 M PBS로 15분간 3회 세척하고 gelatin coated

slide위에 조직 절편을 올려 놓고 실온에서 건조시켰다. Alcohol과 xylene으로 탈수와 투명화 과정을 거친 후 polymount로 봉입하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

## 5. Western blot analysis

### 1) 단백질 정량

대조군(n=5)과 실험군(n=5)은 시료 투여 7일 후에, 심장을 통하여 생리식염수에 heparin (1000 IU/1000 ml)을 섞은 용액을 10 ml/min의 유속으로 약 20분간 흘려서 혈액을 제거하였다. 혈액을 제거한 후 뇌를 적출하여 피질과 해마로 분리하였다. 분리한 조직에 2-4배의 lysis buffer(1% Triton X-100, 0.1% SDS, 200 mM PMSF, 12 mM deoxycholic acid in PBS)가 담긴 시험관에 조직을 넣었다. 조직이 담긴 시험관을 얼음이 채워진 비이커에 넣고 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후 약 1초간 3번 초음파기를 사용하여 초음파 분쇄를 하였다. 분쇄가 끝난 후 4 °C 15,000 X g에서 10분간 원심 분리를 한 후 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 정량은 BCA방법에 따라 시행하였다.(Pierce Chemical Company)

### 2) gel electrophoresis

전기영동장치는 Bio-Rad mini-protean electrophoresis kit을 이용하였다. 0.75mm 두께의 5% stacking gel(H<sub>2</sub>O 1.15 ml, 30% acrylamide mix

0.33 ml, 0.5 M Tris 0.5 ml in pH 6.8, 10% SDS 0.02 ml, 10% ammonium persulfate 0.02 ml, TEMED 0.002 ml)과 10% separating gel(H<sub>2</sub>O 4 ml, 30% acrylamide mix 3.3 ml, 1.5 M Tris 2.5 ml in pH 8.8, 10% SDS 0.1 ml, 10% ammonium persulfate 0.1 ml, TEMED 0.004 ml)를 만들어 사용하였다. 시료는 80 ug 단위로 시험관에 넣고 2 X SDS sample beffer(0.125M Tris-Cl pH6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.2% bromophenol blue)를 첨가하여 95 °C 3분간 끓인 후 loading하였다. loading이 끝난 후 100 V 50분간 전기영동을 하였다.

### 3) Electrotransfer

전기 영동 후 gel를 떼어내서 transfer buffer(25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol)에 10분간 담가두었다. 3 M filter paper와 porous pad를 transfer buffer에 담그고, PVDF membrane은 100% methanol에 담갔다가 3차 증류수로 세척 후 transfer buffer에 담가 두었다. transfer buffer 내에 electrotransfer kit를 장착하여 4 °C에서 200 mA로 2시간동안 transfer 하였다. transfer가 끝난 후 electrotransfer kit를 분리하여 PVDF membrane을 꺼내서 TTBS(20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH7.6)로 10분씩 3회 세척한 후 5% 탈지유가 포함된 TTBS로 실온에서 1시간동안 담가 두었다. TTBS로 10분씩 3회 세척한 후 1차 항체인 Mouse anti AT-8(PHF/Tau ser199, ser202, thr205), Mouse anti AT100(PHF/Tau thr212, ser214), Mouse anti PHF-1(PHF/tau ser396, ser404), Mouse anti T-46(normal tau)은 각각 1:250, 1:500, 1:100, 1:500으로 4 °C에서 흔들면서 17-20시간을 반응시켰다. 1차 반응이

끝난 후 TTBS로 10분씩 3회 세척한 후 2차 항체를 1:5,000으로 TTBS로 희석한 후 실온 1시간동안 흔들면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 TTBS로 10분씩 3회 세척하였다. 세척 후 ECL kit (Amersham pharmacia biotech Co.)을 이용하여 발색시켜 AT-8, AT-100, PHF-1, T-46에 대한 특이밴드를 확인하였다.





### Ⅲ. 결과

#### 1. 아밀로이드 침착에 대한 면역조직화학분석

아밀로이드 베타 1-42를 속후각겉질내에 주입한 후 아밀로이드 침착을 관찰하기 위하여 6E10항체를 사용하여 면역조직화학 염색한 결과 대조군에서는 관찰되지 않았지만 아밀로이드 베타 1-42 투여군에서는 관찰되었다 (Fig. 1). 또한 아밀로이드 침착된 크기가 각기 다른 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1B). 아밀로이드 베타 1-42를 주입한 군에서 목표지점이었던 속후각겉질에서 가장 많이 관찰할 수 있었다.

속후각겉질에서 반대측성(contralateral)보다 동측성(ipsilateral)에서 훨씬 많이 관찰되었다 (Fig. 2).

해마와 사이뇌(diencephalon)에서도 관찰되었다 (Fig. 3).

#### 2. 과인산화된 tau의 면역조직화학분석

과인산화된 tau를 관찰하기 위하여 AT-8항체를 사용하여 면역조직화학 염색한 결과 속후각겉질, 해마, 용기유두핵(tuberomammillary nucleus), 가쪽사이막핵(lateral septal), 뒤시상하부구역(posterior hypothalamic area), 수도관주위흑색질(periaquedal gray matter)과 상측중심솔기핵(superior central nucleus raphe)에서 양성반응을 보인 신경세포와 섬유

들이 관찰되었으며 (Fig. 4, 5, 6, Table 1), 특히 속후각겉질에서 많이 관찰되었다 (Fig. 4).

해마내 치아이랑, CA3와 CA2에서 강한 양성반응이 관찰되었다 (Fig. 7). 또한 실험군과 대조군의 혈관주위에서 과인산화된 tau의 형태를 관찰되었으나 대조군보다는 실험군에서 더 많이 관찰되었다.

### 3. 과인산화 tau의 정량분석

과인산화된 tau의 정량적으로 동정하기 위하여 western blotting을 실행한 결과 피질과 해마에서 정상적인 tau에 반응하는 T-46은 대조군과 실험군이 비슷한 양상을 보였지만 과인산화된 tau에 반응하는 AT-8, AT-100과 PHF-1에서는 실험군이 대조군에 비해 증가함을 볼 수 있었다 (Fig. 8, 9).



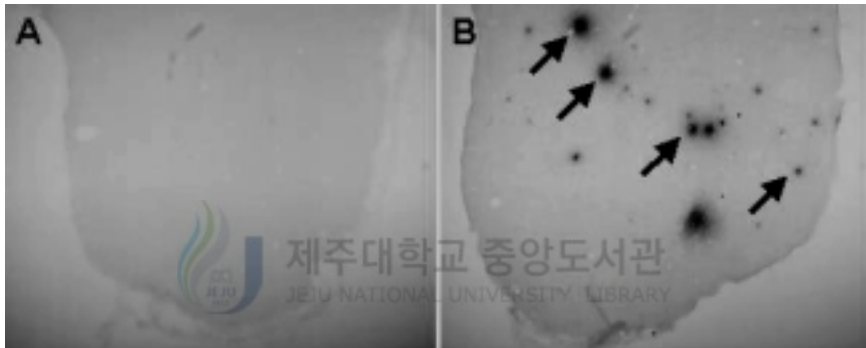


Figure 1. Amyloid protein deposition in the brain. Few amyloid was detected in sham control group (A, X40) but diffuse amyloid deposits (*arrows*) were detected in amyloid beta 1-42 injection group (B, X40). Immunohistochemistry with 6E10 (A, B) antibody.

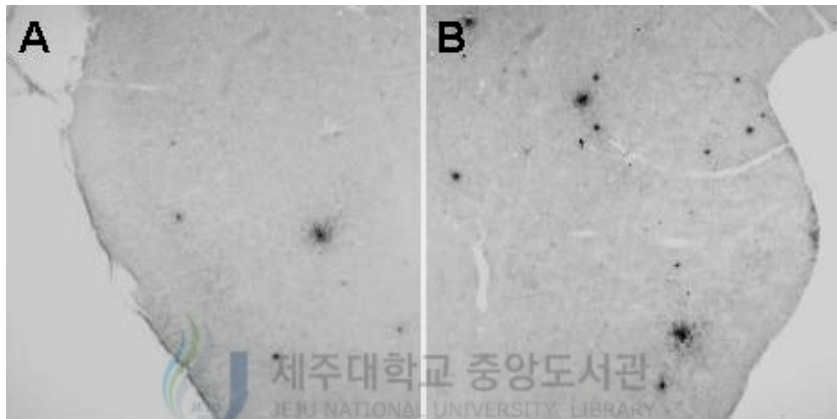


Figure 2. Amyloid protein deposition in amyloid beta 1-42 injection group. Amyloid deposits were detected in contralateral (A, X40) and ipsilateral (B, X40) entorhinal cortex. Immunohistochemistry with anti 6E10 (A, B) antibody.

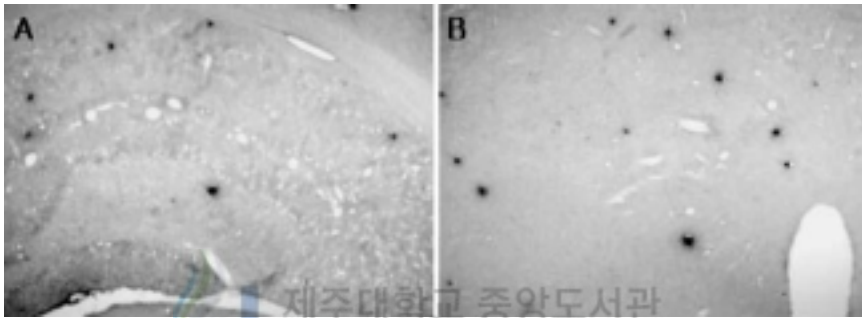


Figure 3. Amyloid protein deposition in amyloid beta 1-42 injection group. Amyloid protein deposition was detected in hippocampus (A, X40) and diencephalon (B, X40). Immunohistochemistry with anti 6E10 (A, B) antibody.

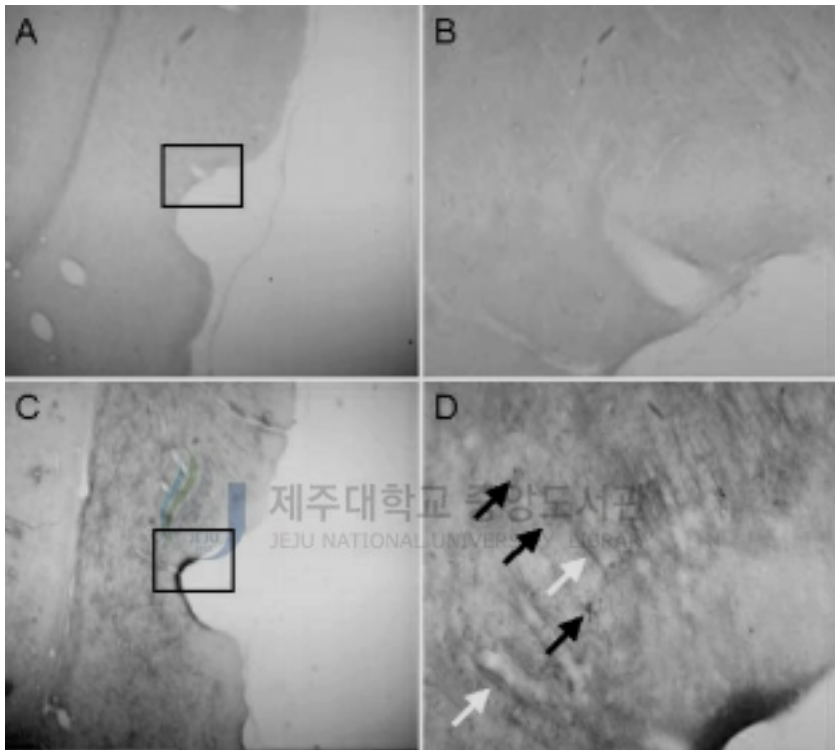


Figure 4. Amyloid beta 1-42 induced AT-8 immunoreactivity in entorhinal cortex. No hyperphosphorylated tau is detected in sham control group (A, B, X40, X200) but hyperphosphorylated tau (*arrows*) were detected in amyloid beta 1-42 injection group (C, D, X40, X200). AT-8 immunoreactivity were appeared as fiber type (*white arrows*) and cell type (*block arrows*).

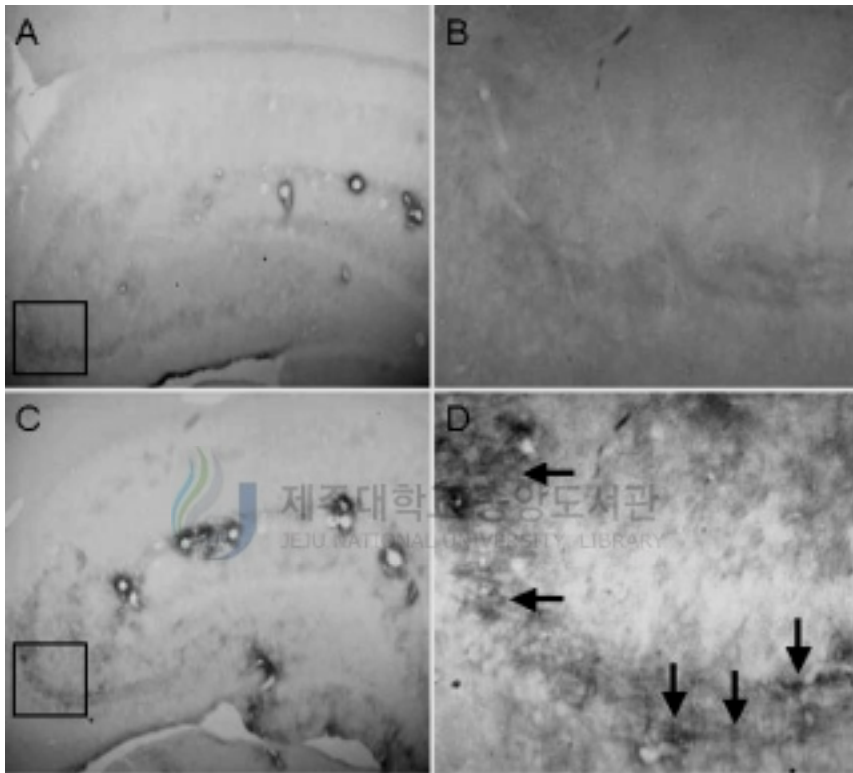


Figure 5. Amyloid beta 1-42 induced AT-8 immunoreactivity in hippocampus. No hyperphosphorylated tau was detected in sham control group (A, B, X40, X200) but hyperphosphorylated tau (*arrows*) were detected in amyloid beta 1-42 injection group (C, D, X40, X200).

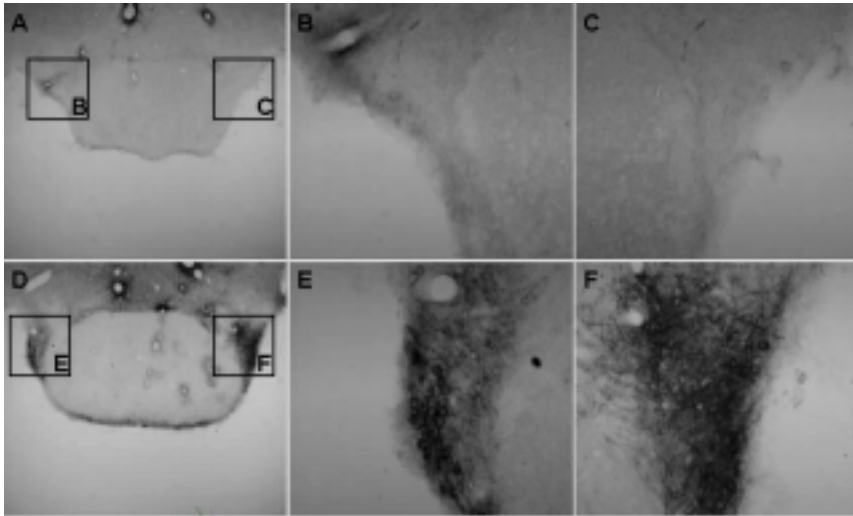


Figure 6. Amyloid beta 1-42 induced AT-8 immunoreactivity in tuberomammillary nucleus. No hyperphosphorylated tau was detected in sham control group (A, B, C, X40, X200) but hyperphosphorylated tau was detected in bilateral tuberomammillary nucleus (E, F, X200) in amyloid beta 1-42 injection group (D, E, F, X40, X200).



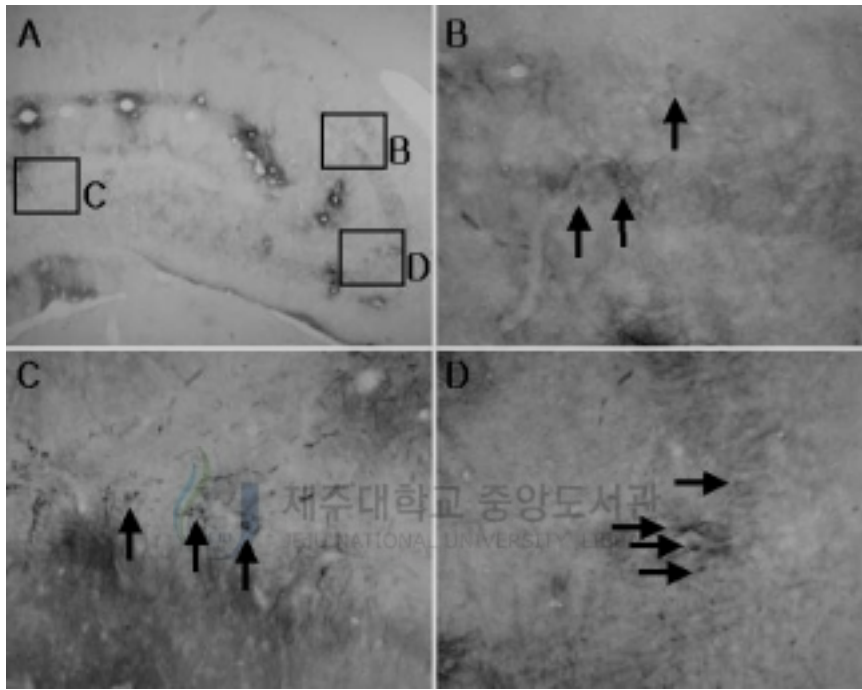


Figure 7. Amyloid beta 1-42 induced AT-8 immunoreactivity in hippocampus. Hyperphosphorylated tau was detected in CA2 (A, B, X40, X200), CA3 (A, D, X40, X200) and dentate gyrus (A, C, X40, X200).

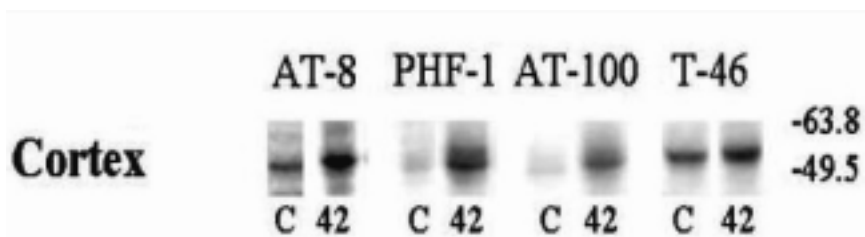


Figure 8. Western blot analysis of tau protein in cortex. Immunoblotting analysis showed that the total amount of PHF/tau immunoreactivity was equal (T-46) but the amount of phosphorylated tau was increased at the cortical extracts after amyloid beta 1-42 injection.

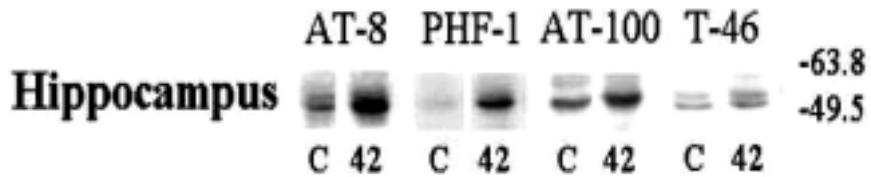


Figure 9. Western blot analysis of tau protein in hippocampus. Immunoblotting analysis showed that the total amount of PHF/tau immunoreactivity was equal (T-46) but the amount of phosphorylated tau was increased at the cortical extracts after amyloid beta 1-42 injection.

Table 1. Hyperphosphorylated tau immunoreactivity after amyloid beta 1-42 injection

Nucleus	Positivity
HP	++++
EC	++++
LS	+++
TM	++++
PH	++
PAG	+++
CSm	++

The quantify of cells were counted in each group of nuclei and presented as follow (+:moderate; ++:abundant; +++:extremely rich).

Abbreviations: EC, entorhinal cortex; HP, hippocampus; TM, tuberomammillary nucleus; LS, lateral septal; PH, posterior hypothalamic area; PAG, periaquedal gray matter; CSm. superior central nucleus raphe

## IV. 고찰

알츠하이머병의 발병 기전중 뇌에 아밀로이드 베타 단백질이 침착되어 정상 tau를 과인산화 시킨다는 것이 가장 유력한 가설중 하나이다 (Anderson 등, 1991; Busciglio 등, 1993). 아밀로이드 베타 단백질은 세포막에 존재하는 분자량이 큰 전구단백질(amyloid precursor protein)로부터 유래되어지며, 42-43개의 아미노산 잔기로 구성되어진다 (Glenner와 Wong, 1984; Masters 등, 1985 ).

알츠하이머 환자들 뇌에서 관찰되어지는 세포변성은 아밀로이드 베타의 과생산과 직접적으로 연관되어지고 그 결과 아밀로이드가 침착되어지는 형태로 나타나며, 결국 수상돌기(dendrite)와 축삭돌기(axon)의 수축(retraction)과 세포사를 일으킨다고 보고 되어지고 있다(Delacourte 등, 1999). 해마 및 편도핵에 아밀로이드 베타를 주입하면, 병리학적 병변이 나타난다고 보고 되어지고 있으나 (Sigurdsson 등, 1997; Rapoport 등, 2002; Ramirez 등, 2002), 속후각겉질에 대한 병리학적 병변에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

따라서, 본 실험에서 아밀로이드 베타 1-42를 속후각겉질내에 주입한 후 아밀로이드 침착을 관찰하기 위해 6E10항체를 사용한 결과 대조군에서는 아밀로이드 침착이 관찰되지 않은 반면에 아밀로이드 베타 1-42를 투여군에서는 아밀로이드 침착이 관찰되었다. 그리고 아밀로이드 침착되는 크기가 각기 다를 수 있었다. 또한 속후각겉질에서 가장 많이 관찰 되었고, 해마와 사이뇌에서도 관찰되었다. 반대측성보다

동측성에서 더 많이 관찰되었다. 따라서 본 연구의 결과는 외상에 의한 것이 아닌 아밀로이드 베타 1-42를 주입함으로써 아밀로이드 침착이 유도 되어지는 결과라고 사료된다.

아밀로이드 침착이 미세관(microtubule)에 결합되어 있는 인산단백인 tau를 과인산화 시키므로 인해 비정상적인 인산화가 일어나고, 이는 paired helical filament 구조로 침착되며 (Morishima 등, 1993; Hall 등, 1999), 그 결과 세포가 손상을 받는다고 알려져 있다 (Delacourte 등, 1999).

본 실험에서 아밀로이드 베타 1-42를 속후각겉질내에 주입한 후 과인산화된 tau를 관찰하기 위해 AT-8항체를 사용한 결과 속후각겉질, 해마, 용기유두핵, 가쪽사이막핵, 뒤시상하부구역, 수도관주위흑색질과 상측중심술기핵에서 강한 양성반응을 보인 신경세포와 섬유들이 관찰되었으며, 특히 속후각겉질에서 가장 많이 관찰되었다. 또한 과인산화된 tau의 정량적으로 동정하기 위해 western blotting을 실행한 결과 피질과 해마에서 정상 tau에 반응하는 T-46은 대조군과 실험군 모두 비슷한 양상을 보였지만 과인산화된 tau에 반응하는 AT-8, AT-100과 PHF-1에서는 실험군이 대조군에 비해 훨씬 증가함을 볼 수 있었다.

따라서 이상의 결과로 보아 아밀로이드 베타 1-42 주입이 안정화된 tau를 과인산화 시키고 그 결과 paired helical filaments의 구조로 세포내에 침착되어지는 것이라고 사료된다.

또한 속후각겉질은 기억력의 저장소라고하는 해마형성체와 깊은 관계를 가지고 있다. 속후각겉질은 구심성 섬유로 지각을 횡단 하여 치아이랑의 수상돌기와 연접을 형성한다 (Chow와 Leiman, 1970). 치아이랑은 해마 내 CA3, CA2에 시냅스를 형성하고 있다. 본 실험 결과에서 속후

각결질내에 과인산화된 tau 발현이 가장 많이 관찰되었다. 속후각결질과 시냅스를 형성하고 있는 해마내 치아이랑, CA3와 CA2에서도 과인산화된 tau에 대한 양성반응이 관찰되었다. 그러므로 아밀로이드 베타 1-42가 속후각결질내에 투여된 후 해마와 연결된 신경로를 통해서 정상적인 tau를 과인산화 시키는 결과로 해마내 치아이랑, CA3와 CA2에서 과인산화된 tau가 발현하는 것으로 사료된다.



## V. 결론

아밀로이드 베타 1-42를 이용하여 속후각겉질내 주입한 후 면역조직화학 염색한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다. 본 실험에서 아밀로이드 침착을 확인하기 위한 6E10항체를 사용한 경우, 속후각겉질, 해마와 사이뇌에서 관찰되었으며, 아밀로이드 침착되는 크기가 각기 다를 수 있었다. 또한 주입한 위치에서 가장 많이 관찰할 수 있었다. 외상에 의한 것이 아닌 아밀로이드 베타 1-42를 주입함으로써 아밀로이드 침착이 유도 되어지는 결과라고 사료된다.

과인산화된 tau의 변화를 보기 위한 AT-8항체의 면역조직화학 염색한 경우, 속후각겉질, 해마, 용기유두핵, 가쪽사이막핵, 뒤시상하부구역, 수도관주위흑색질과 상측중심술기핵에서 신경세포와 섬유들이 강한 양성반응을 보이는 것을 알 수 있었다. 그리고 속후각겉질내에서 가장 많이 관찰되었으며, 해마내의 치아이랑, CA3와 CA2에서도 강한 양성반응이 관찰되었다. 또한 과인산화된 tau를 측정하기 위해 western blot analysis를 실행한 결과 피질과 해마에서 정상적인 tau에 반응하는 T-46은 대조군과 실험군이 모두 같은 양상을 보였지만 과인산화된 tau에 반응하는 AT-8, AT-100와 PHF-1에서는 실험군이 대조군에 비해 증가함을 볼 수 있었다. 따라서 이상의 결과로 보아 아밀로이드 베타 1-42 주입이 안정화된 tau를 과인산화 시키고 그 결과 paired helical filaments의 구조로



세포내에 침착되어지는 것이라고 사료되며, 또한 아밀로이드 베타 1-42가  
속후각겉질내에 투여된 후 해마와 연결된 신경로를 통해서 정상적인  
tau를 과인산화 시키는 결과로 해마내 치아이랑, CA3와 CA2에서 과인산  
화된 tau가 발현하는 것으로 사료된다.



## VI. 참고문헌

Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Lieberburg I, Robakis NK. Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci Lett* 1991; 128(1):126-8

Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA. Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(5):2092-6

Chaney MO, Webster SD, Kuo YM, Roher AE. Molecular modeling of the Abeta1-42 peptide from Alzheimer's disease. *Protein Eng* 1998; 11(9):761-7

Chow KL, Leiman AL. Aspects of the structural and functional organization of the neocortex. *Neurosci Res Program Bull* 1970; 8(2): 157-220

Dai J, Buijs RM, Kamphorst W, Swaab DF. Impaired axonal transport of cortical neurons in Alzheimer's disease is associated with neuropathological changes. *Brain Res* 2002; 948(1-2): 138-44

De vries, G.J., Buijs, R.M., Leeuwen, F., Caffè, A.R. and Swaab, D.F.  
The vasopressinergic innervation of the brain in normal and castrated rats. *J. Comp. Neurol.* 1995; 233: 236-254

Defigueiredo RJ, Cummings BJ, Mundkur PY, Cotman CW. Color image analysis in neuroanatomical research: application to senile plaque subtype quantification in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1995; 16(2): 211-23

Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A, Vermersch P, Ghzali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 1999; 52(6): 1158-65

Fahlander K, Wahlin A, Almkvist O, Backman L. Cognitive Functioning in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia: Further Evidence for Similar Patterns of Deficits. *J Clin Exp Neuropsychol* 2002; 24(6): 734-744

Giannakopoulos P, Gold G, Duc M, Michel JP, Hof PR, Bouras C Neural substrates of spatial and temporal disorientation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2000; 100(2): 189-95

Giannakopoulos P, Hof PR, Kovari E, Vallet PG, Herrmann FR, Bouras

C. Distinct patterns of neuronal loss and Alzheimer's disease lesion distribution in elderly individuals older than 90 years. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55(12): 1210-20

Glenner G. G, Wong C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; 120: 885-890

Golomb J, de Leon MJ, Kluger A, George AE, Tarshish C, Ferris SH. Hippocampal atrophy in normal aging. An association with recent memory impairment. *Arch Neurol* 1993; 50(9): 967-73

Gonzalo-Ruiz A. Changes in neurotransmission systems after the injection of beta-amyloid protein beta (12-28) in the hypothalamus and anterior thalamus of the rat. *Rev Neurol*. 1999; 28(10): 931-41.

Gutierrez-Figueroa, G. P., C. Dalmaz, and I. Izquierdo, Effects of entorhinal cortex lesion on memory in different tasks. *Brazilian J. of Medical and Biological Research* 1997; 30: 769-774

Hall GF. PHF-Tau from Alzheimer Brain is Rapidly Dephosphorylated and Degraded When Injected into Neurons in situ. *J Alzheimers Dis* 1999; 1(6): 379-386

Hauss-Wegrzyniak B, Lynch M, Vraniak P, Wenk G. Chronic brain inflammation results in cell loss in the entorhinal cortex and impaired LTP in perforant path-granule cell synapses. *Exp Neurol.* 2002; 176(2): 336.

Hauw JJ, Seilhean D, Piette F, Uchihara T, Duyckaerts C. Alzheimer's disease lesions: from morphology to cell biology. *Bull Acad Natl Med* 1996; 180(7): 1687-700

Herrmann N. Cognitive pharmacotherapy of Alzheimer's disease and other dementias. *Can J Psychiatry* 2002; 47(8): 715-22

Henke K, Weber B, Kneifel S, Wieser HG, Buck A. Human hippocampus associates information in memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 11; 96(10): 5884-9

Jellinger KA, Bancher C. Neuropathology of Alzheimer's disease: a critical update. *J Neural Transm Suppl* 1998; 54: 77-95

Kennedy AM, Newman S, McCaddon A, Ball J, Roques P, Mullan M, Hardy J, Chartier-Harlin M-C, Frackwiak RSJ, Warrington EK, Rossor MN. Familial Alzheimer's disease: a pedigree with a missense mutation in amyloid precursor protein gene. *Brain* 1993; 116: 309-24

Kowalewski T, Holtzman DM. In situ atomic force microscopy study of Alzheimer's beta-amyloid peptide on different substrates: new insights into mechanism of beta-sheet formation. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(7): 3688-93

Langlais PJ, Thal L, Hansen L, Galasko D, Alford M, Masliah E. Neurotransmitters in basal ganglia and cortex of Alzheimer's disease with and without Lewy bodies. Neurology 1993; 43(10): 1927-34

Lehericy S, Hirsch EC, Cervera-Pierot P, Hersh LB, Bakchine S, Piette F, Duyckaerts C, Hauw JJ, Javoy-Agid F, Agid Y. Heterogeneity and selectivity of the degeneration of cholinergic neurons in the basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. J Comp Neurol 1993; 330(1): 15-31

Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau in Alzheimer's disease. Trends Cell Biol 1998; 8(11): 425-7

Masters C. L, Simms G, Weinman N. A, Multhaup G, McDonald B. L, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995; 82: 4245-4249

Mattson MP, Mattson EP. Amyloid peptide enhances nail rusting: novel insight into mechanisms of aging and Alzheimer's disease. Ageing Res

Rev. 2002; 1(3): 327-30.

Morelli L, Giambartolomei GH, Prat MI, Castano EM. Internalization and resistance to degradation of Alzheimer's A beta 1-42 at nanomolar concentrations in THP-1 human monocytic cell line. *Neurosci Lett* 1999; 262(1): 5-8

Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y. Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* 1993; 10(6): 1151-60

Nagahara AH, Otto T, Gallagher M. Entorhinal-perirhinal lesions impair performance of rats on two versions of place learning in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 1995; 109(1): 3-9

Olga Gursky, Sergei Aleshkov. Temperature dependent sheet formation in amyloid A1-40 peptide in water: uncoupling-structure folding from aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1476: 93-102

Pappolla MA, Omar RA, Sambamurti K, Anderson JP, Robakis NK. The genesis of the senile plaque. Further evidence in support of its neuronal origin. *Am J Pathol* 1992; 141(5): 1151-9

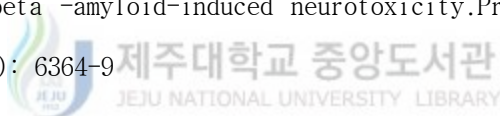
Pierce Chemical Company (1984) BCA protein assay reagent, Technical

Bulletin 23225, Rockford, Ill

Posner HB, Tang MX, Luchsinger J, Lantigua R, Stern Y, Mayeux R. The relationship of hypertension in the elderly to AD, vascular dementia, and cognitive function. *Neurology* 2002; 58(8): 1175-81

Ramirez MJ, Heslop KE, Francis PT, Rattray M. Expression of amyloid precursor protein, tau and presenilin RNAs in rat hippocampus following deafferentation lesions. *Brain Res* 2001; 907(1-2): 222-32

Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A. Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(9): 6364-9



Rockenstein E, Mallory M, Mante M, Sisk A, Masliaha E. Early formation of mature amyloid-beta protein deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of Abeta(1-42). *J Neurosci Res* 2001; 66(4): 573-82

Rogan S, Lippa CF. Alzheimer's disease and other dementias: a review *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias* 2002; 17(1): 11-17

Shimizu T, Watanabe A, Ogawara M, Mori H, Shirasawa T. Isoaspartate



formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. Arch Biochem Biophys 2000; 381(2): 225-34

Sisodia SS, Koo EH, Hoffman PN, Perry G, Price DL. Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. J Neurosci 1993; 13(7): 3136-42

Sigurdsson EM, Lee JM, Dong XW, Hejna MJ, Lorens SA. Bilateral injections of amyloid-beta 25-35 into the amygdala of young Fischer rats: behavioral, neurochemical, and time dependent histopathological effects. Neurobiol Aging 1997; 18(6): 591-608

Sjogren M, Davidsson P, Gottfries J, Vanderstichele H, Edman A, Vanmechelen E, Wallin A, Blennow K. The cerebrospinal fluid levels of tau, growth-associated protein-43 and soluble amyloid precursor protein correlate in Alzheimer's disease, reflecting a common pathophysiological process. Dement Geriatr Cogn Disord 2001; 12(4): 257-64

Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M. Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. Ann N Y Acad Sci 2000; 920: 134-9

Swanson, L. W., 1998. Brain Maps: structure of the rat brain. 2nd Ed.

Elsevier. Amsterdam.

Tan J, Town T, Crawford F, Mori T, DelleDonne A, Crescentini R, Obregon D, Flavell RA, Mullan MJ. Role of CD40 ligand in amyloidosis in transgenic Alzheimer's mice. *Nat Neurosci* 2002

Talaga P. beta-Amyloid Aggregation Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: Dream or Reality? *Mini Rev Med Chem.* 200; 11(2): 175-86.

Whitehouse PJ. Genesis of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1997; 48(5): S2-7.



Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 1990; 250(4978): 279-82

Yuspeh R, Vanderploeg R, Crowell T, Mullan M. Differences in executive functioning between Alzheimer's disease and subcortical ischemic vascular dementia. *J Clin Exp Neuropsychol* 2002; 24(6): 745-54

국문초록

# 속후각겉질내 $A\beta$ 1-42 투여에 따른 Tau의 과인산화에 관한 형태학적 연구

김대성

(지도교수 : 이영재)



제주대학교 대학원 수의학과

알츠하이머병은 대개 뇌 피질지역 영향에 의해 특징되어지는 신경퇴행성 질병이다. 알츠하이머 환자들 뇌에서 직접적인 아밀로이드 베타의 과생산이 일어나고, 이로 인해 아밀로이드 침착이 야기되어지며, 결국 수상돌기와 축삭돌기의 수축과 세포사로 유도되어지는 신경변성이 관찰된다. 축삭돌기의 과인산화된 tau는 신경세포내에서 과인산화되거나 중합되어지는 tau의 침착, 세포내 물질 교류를 강하게 방해하는 것과 세포사를 유도할 수 있다. 알츠하이머병에서 미세관에 연합되어진 tau는 비정상적인 인산화가 일어나고 신경세포내에 PHFs의 형태로 침착된다. 본 연구의 목적은 쥐 뇌에 아밀로이드 베타 1-42 주입한 후 과인산화된

tau의 발현유무, 비율과 위치를 보고자 하였다. 신선한 상태의 아밀로이드 베타 1-42를 뇌정위수술기구를 이용하여 쥐의 속후각겉질내 주입하였다. PHF/tau의 발현은 아밀로이드 베타를 주입하고 7일이 지난 후에 면역조직화학염색과 immunoblotting로 분석하였다. PHF/tau 면역반응 결과 아밀로이드 베타를 주입한 위치와 다른 여러 지역들에서도 관찰되었다. Immunoblotting 결과 분석에서 아밀로이드 베타 주입 후 PHF/tau의 양이 피질과 해마에서 증가됨을 알 수 있었다. 이들 자료는 아밀로이드 베타 주입한 위치뿐만 아니라 다른 곳에서도 PHF/tau가 증가되어짐을 제시하여 tau가 속후각겉질과 연결된 신경로를 따라 과인산화 되었다는 것을 보여주었다.



검색어 : amyloid beta 1-42 protein, phosphorylated PHF/tau, entorhinal cortex