

## Differential Expression of Ubiquitin-Specific Protease 16 Gene by Methylprednisolone in Neuronal Cells

Seung Won Choi, Hyon-Jo Kwon, Hyeon Song Koh, Shi-Hun Song,  
O-Yu Kwon<sup>1</sup> and Seon-Hwan Kim<sup>†</sup>

Departments of Neurosurgery & <sup>1</sup>Anatomy, Chungnam National University School of Medicine,  
Daejeon 301-721, Korea

Methylprednisolone (MPD) is a synthetic glucocorticoid drug used in treatment of many neurological diseases and neurotraumas, including spinal cord injuries. Little is known of the mechanism of MPD in neuronal cells, particularly the genetic expression aspect. DD-PCR was used in identification of genes expressed during MPD treatment of PC12 cells. We have isolated 3 predicted up- or down-regulated genes, which are differentially expressed in neurons by MPD. One of these genes, USP16 (ubiquitin specific protease 16), is the deubiquitinating enzyme that is up-regulated by MPD in neurons. In order to observe the effect of MPD on USP16 gene expression, PC12 cells were treated under several experimental conditions, including endoplasmic reticulum stress drugs. We have isolated the total RNAs in PC12 cells and detected USP16 and ER related genes by RT-PCR. Because its expression pattern is similar to expression of ER chaperons, USP16 gene expression is strongly associated with unfolded protein response. A meaningful negative effect on each tissue treated by methylprednisolone is not shown *in vivo*. USP16 gene expression is suppressed by LY294002 (phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor), which suggests that USP16 gene expression is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway.

**Key Words** Methylprednisolone (MPD), DD-PCR, PC12 cells, Ubiquitin-specific protease 16 (USP16)

### 서 론

스테로이드는 강력한 항염증작용과 면역억제기능을 가지고 있어서 내분비 질환에서 광범위하게 사용되는 합성 부신피질 호르몬제제이다. 특히 많은 부작용에도 불구하고 신경외과영역에서는 생명을 위협하는 여러 급성기 질환과 외상에서 매우 필수적으로 사용되고 있는 현실이다. Methylprednisolone (MPD)은 합성 스테로이드 제제의 한 종류로 hydrocortisone에 비하여 약 5배의 높은 역가를 가지면서, mineralocorticoid에 대한 작용은 없으며 고용량의 스테로이드 투여가 필요한 신경계 질환에서 dexamethasone과 함께 많이 사용되는 대표적인 스테로이드 제제이다. 스테로이드의 세포에 대한 작용기전은 크

게 두 가지로 나눌 수 있다. 첫째는 즉각적으로 나타나는 non-genomic mechanism으로 세포막에 존재하는 특정 수용체에 결합한 스테로이드는 세포내 불활성 단백질의 활성화 등을 통하여 작용을 나타낸다. 두 번째 기전은 서서히 나타나는 genomic mechanism으로서 혈중의 스테로이드는 세포막을 확산 또는 촉진 이동하여 세포질에 도달한다. 세포질 내에는 HSP90, HSP70, immunophilin 및 glucocorticoid receptor의 복합체가 존재하는데, 스테로이드가 그 수용체에 결합하게 되면 형태적 변형이 이루어져 복합체 결합이 분리되며 활성화된 스테로이드-수용체의 dimer가 핵에 도달하게 된다. 이 dimer는 핵에서 DNA의 특정 서열에 결합하게 되어 transcription이 이루어지거나 전사조절 부위와 결합하여 특정 유전자 발현을 촉진시킴으로 단백질을 생합성하여 다양한 생리적 기능을 수행하게 된다 (Craig et al., 2005; Gomes et al., 2005).

스테로이드의 신경계 질환에 대한 효과 및 기전들은 그동안 많은 연구들을 통하여 규명하고자 하였다. 뇌종양이나 뇌농양 등에 의해 잘 발생하는 혈관인성 부종의 치료에서 스테로이드는 뇌척수액의 생산을 억제하고 세

\*접수일: 2010년 5월 31일 / 수정일: 2010년 6월 22일  
채택일: 2010년 6월 23일

<sup>†</sup>교신저자: 김선환, (우) 301-721 대전광역시 중구 대사동 640,  
충남대학교병원 신경외과  
Tel: 042-280-7368, Fax: 042-280-7364  
e-mail: neons@cnu.ac.kr

포막을 안정시키며 혈뇌관문 기능의 정상화 등을 통하여 뇌부종의 호전을 유도하여 두개강 내압을 저하시키는 매우 중요한 약물로 알려져 있다 (Anderson & Cranford, 1979). 특히 전이성 뇌종양 환자에서의 스테로이드 치료는 의식저하, 두통 등과 같은 일반적 뇌압증상에 대하여 매우 극적이고 효과적인 완화를 유도할 수 있어 현재는 가장 표준화된 치료의 한가지로 이용되고 있다 (Sinha et al., 2004).

척수손상 또한 급성기 고용량의 MPD투여로 동물실험과 임상에서 운동기능의 의미 있는 호전을 유도한다는 많은 보고 후 신경보호기능으로서 급성기 스테로이드 치료가 보편화 되어 왔다 (Hall, 1992). 미국에서 척추전문 의사를 대상으로 한 최근의 한 설문에서도 90% 이상이 척수손상 후 스테로이드를 사용한다고 답하였다 (Eck et al., 2006). 하지만 그간의 스테로이드의 척수손상에 대한 여러 보고를 바탕으로 분석한 최근 자료에서는 그 효과에 여러 의문을 제기하기도 하였다 (Sayer et al., 2006). 또한 두부외상으로 인한 뇌손상 환자에서도 스테로이드는 뇌압조절과 신경보호기능으로 주목받고 많은 사용이 있었으나 현재는 그 효과와 부작용에 대하여 많은 논란이 있는 현실이다 (Chyatte et al., 1987). 이처럼 어느 정도 신경세포의 보호기능을 가진 것으로 알려진 스테로이드는 많은 연구를 통한 작용기전 규명에도 불구하고, 신경세포 스트레스 상황에서 과연 어떻게 세포보호기능을 수행하는지에 대한 유전자 및 단백질 발현과 관련된 보고는 현재 매우 미미하다. 따라서 본 연구자는 MPD에 의해 신경세포에서 발현되는 유전자를 DD-PCR 방법을 이용하여 찾고자 하였으며 특이적으로 발현되는 유전자가 있다면 과연 어떠한 방법으로 신경세포를 보호하는지, 또는 다른 어떠한 영향을 줄 수 있는지에 대하여 알아보 고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 세포배양과 MPD처리

PC12 세포를 10% horse serum과 5% calf serum이 함유된 RPMI 1640 (McCoy's 5A modified media; Sigma-Aldrich Co.)배지 내에서 80~100% 충실도가 되도록 배양하였다. 배양기의 조건은 37°C, 5% 이산화탄소, 90% 이상의 습도가 유지되는 환경이며 배지를 2~3일마다 교환하고 7~10일 마다 계대배양 하였다. MPD에 차별적으로 발현하는 유전자를 확인하기 위하여 배양세포를 PBS로 3회

세척 후 MPD (Solu-Medrol<sup>®</sup>; Pharmacia, Stockholm, Sweden) 4,000 ng/ml를 처리하여 8시간이 지난 다음에 세포로부터 total RNA를 얻었다.

### Total RNA 분리

Total RNA의 분리에는 RNazol-B Kit (TEL-TEST, Inc. TX, USA)를 사용하였다. 충분히 자란 PC12 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하여 긁어 모은 후 RNAzol-B 1 ml에 homogenization 시켰다. 그 다음 chloroform 200 µl을 첨가하여 잘 섞어주고 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 500 µl의 상층액에 500 µl의 isopropanol를 첨가하여 4°C에서 15분간 방치 후 다시 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 침전물을 얻었다. 침전물에 75% ethanol 1 ml을 첨가하고 잘 교반하여 10,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 RNA를 얻었으며 spectrophotometer로 RNA 양을 측정하였다.

### Differential Display-PCR

GeneFishing<sup>™</sup> DEG premix kit, K1040 (Seegene, Seoul, Korea)을 이용하여 DD-PCR를 시행하였다. Harvest한 세포에서 얻은 RNA 3 µg를 10 µM의 dT-ACP1 2 µl와 함께 80°C에서 3분간 가열하여 변성 시킨 후, 얼음물에서 급랭한다. 4 µl의 5×RT buffer, 4 µl의 dNTP (each 2.5 mM), 0.5 µl의 RNase inhibitor (40 u/µl), 1 µl M-MLV reverse transcriptase (200 u/µl)를 가하고 총 반응액이 20 µl가 되도록 조절한 후 42°C에서 90분 동안 반응시키고 94°C에서 2분간 처리 후 얼음물에 2분간 냉각시킨다. 합성된 cDNA를 180 µl DNase-free water로 희석하여 -20°C에 보관하였다. GeneFishing PCR을 위하여 얼음에서 3 µl의 cDNA, primer로서 GeneFishing<sup>™</sup> DEG premix kit 각각의 5 µM arbitrary ACP, 10 µM dT-ACP2 1 µl, 2×SeeAmp<sup>™</sup>ACP<sup>™</sup> Master Mix 10 µl을 가하고 총량이 20 µl가 되게 증류수를 첨가한다. PCR 조건은 첫 번째 반응은 94°C에서 5분간 충분히 변성을 시킨 후 50°C에서 3분 동안 primer annealing하고 72°C에서 1분간 polymerization 시킨다. 이후 반응은 94°C 40초, 65°C 40초, 72°C 40초로 30 cycle을 반응시키고, 마지막 반응은 72°C에서 5분 동안 충분히 polymerization을 시켰다. 증폭된 PCR product를 2%의 agarose gel에서 전기 영동하여 차별화 발현되는 유전자를 찾았다.

## RT-PCR

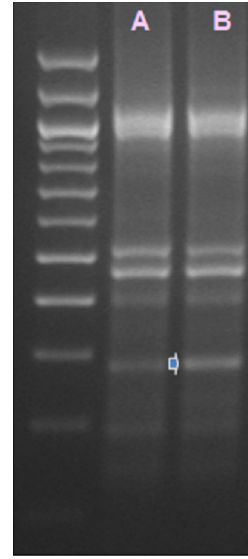
PCR의 template로 사용하기 위해 M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 분리한 3 µg의 RNA를 oligo d(T), Nuclease-Free Water와 함께 1.5 ml tube에 넣고 70°C에서 5분간 가열하여 변성시킨 다음 즉시 얼음에 차게 식힌 후, M-MLV 5× Reaction Buffer 6 µl, dNTP mixture (2.5 mM) 4 µl, M-MLV RT 200 units, Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor 25 units를 첨가하고 Nuclease-Free Water로 최종 반응량을 30 µl로 맞추는 다음 42°C에서 90분간 반응시켰다. 반응 후에는 95°C에서 2분간 M-MLV를 불활성 시킨 후 Nuclease-Free Water 70 µl을 더하여 최종 볼륨 100 µl로 맞추는 다음 효소중합 연쇄 반응을 2 µl씩 사용하였다. USP16의 primer는 Forward primer: 5'-gaa ctt gtc aca aac gcc agt gct-3', Reverse primer: 5'-ctt tcg ttg gtt ctt ggc ttg ctt-3'을 사용하였으며 32 cycle의 PCR을 시행하여 얻은 산물을 전기 영동으로 확인하였다.

## ER stress 유도 약물 처리

PC12 세포가 80% 이상 세포충실도를 보일 때 MPD를 최종 농도 4,000 ng/ml 가 되도록 16시간 동안 배양한 후에 ER stress 유도 약물을 처리하였다. Tunicamycin 20 µg/ml, dithiothreitol (DTT) 3 mM, A23187 10 µM, brefeldin A (BFA) 10 µg/ml으로 3시간 동안 배양한 후에 total RNA를 얻었다.

## Western blotting

충분히 자란 PC12 세포들을 여러 시약을 처리한 후 세포들은 긁어모은 후 SDS sample buffer (10 mM Tris-HCl, 2% SDS, 50 mM dithiothreitol, 2 mM EDTA, 0.02% bromophenol blue, 6% glycerol, pH 6.8)를 이용하여 용해시킨 뒤 7분간 끓였다. SDS-PAGE를 시행하고서 gel의 단백질을 Immun-Blot polyvinylidene difluoride membrane (BioRad, California, USA)에 이동시켰다. Membrane의 남은 binding site를 막기 위해 3% skim milk, TPBS (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4)로 1시간 동안 처리하였다. 1 µg/ml anti-phosphated eIF2α (StressGen), 3% skim milk를 membrane과 함께 1시간 반응시켰다. 3% skim milk로 씻은 후 membrane을 0.1 µg/ml peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG (Kirkegaard and Perry Laboratories, MD, USA) 이차항체와 skim milk로 1시간 동안 반응시켰다.



**Fig. 1.** Separation of PCR products on acrylamide gel. DD-PCR products from without treatment (A) and methylprednisolone (MPD) treatment (B) were compared on the denaturing gel. The up-regulated PCR product, differentially expressed by MPD, is indicated by the arrow.

다. 다시 membrane을 TPBS와 PBS로 씻고서 Renaissance Western blot Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, MS, USA)를 사용하여 관찰하였다.

## 동물 약물 처리

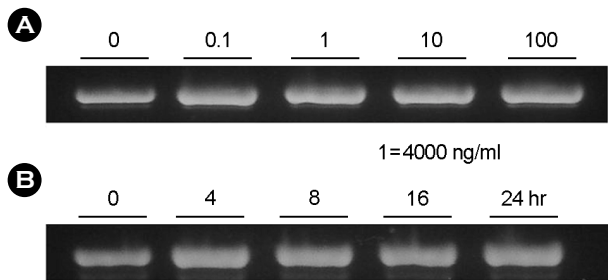
8주령 된 250~300 g의 SD rat에 MPD 30 mg/kg을 매일 1회, 2일 동안 주사한 후 3일 째에 각 장기를 채취하였다. 대조군으로는 같은 양의 생리식염수를 주사하였다.

## Protein kinase inhibitor 처리

PC12 세포가 80% 이상 세포충실도를 보일 때 각각의 kinase inhibitor (Calbiochem, Darmstadt, Germany)를 2시간 동안 처리하였다. Kinase inhibitors는 PD98059 (ERK kinase inhibitor) 20 µM, U73122 (phospholipase C inhibitor) 10 µM, KT5720 (protein kinase A inhibitor) 500 nM, LY294002 (phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor) 20 µM, SB203580 (p28MARK inhibitor) 20 µM, SP600125 (JNK inhibitor) 20 µM을 사용하였다.

## 결 과

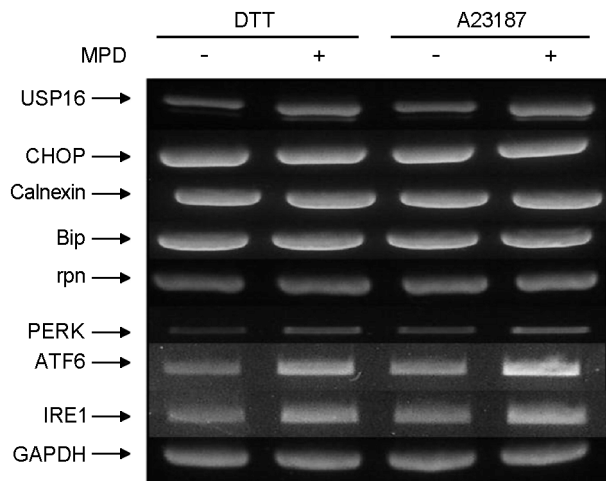
PC12 세포를 MPD 처리하여 얻은 total RNA로 DD-PCR을 실시하였다. 상향 조절되는 1개의 유전자와 하향



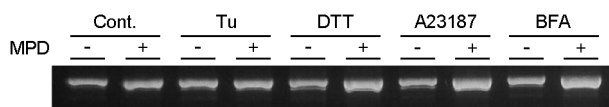
**Fig. 2.** MPD dose- and time-dependently expression of USP16. RT-PCR was performed using F-primer (5'-GAA CTT GTC ACA AAC GCC AGT GCT-3') and R-primer (5'-CCT TCG TTG GTT CTT GGC TTG CTT-3') against total RNAs isolated from the different dose (A) and time (B) of MPD treatment. The experiments are repeated three times in the same conditions and shown one of them.

조절되는 2개의 유전자를 발견하였다. Fig. 1의 결과는 상향 조절되는 유전자단편을 보여주고 있다. 이처럼 차별화하여 발현하는 유전자가 어떤 것인지를 알기 위하여 유전자 염기서열을 결정하였다. 3개의 차별화 유전자 중에서 상향 조절되는 유전자는 ubiquitin specific protease 16 (USP16)이었다. USP16 단백질은 cytoplasm에 존재하는 825 아미노산 염기, 93.69 kDa이며, N-terminal 영역은 전사조절에 관여하는 특이 구조인 Zn-finger를 가지고 C-terminal 영역에는 ubiquitin 활성화염기를 가진다 (Puente et al., 2003). USP16 유전자가 MPD (4,000 ng/ml, 16시간; 동물에 처리하는 용량의 1/10)에 의해서 상향 조절되는 것을 재확인하기 위하여 MPD의 투여양과 처리시간을 달리하여 RT-PCR 하였다 (Fig. 2). MPD를 400 ng/ml, 4,000 ng/ml, 40 µg/ml, 400 µg/ml로 용량의 차이를 두어 처리하여 RT-PCR을 시행하여 처리하였을 때, MPD를 처리하지 않은 것에 비하여 가장 낮은 용량인 400 ng/ml 경우에도 control에 비하여 상향 조절되었으며 그 이상의 용량에서도 상향 조절 상태가 유지되었다. 그리고 4,000 ng/ml의 농도에서 각각 처리시간을 달리했을 때의 발현양상을 확인한 결과 가장 짧은 시간인 4시간 처리한 세포에서도 강한 발현이 확인되었다.

USP16 유전자 발현과 ER의 관계를 알아보기 위하여 MPD 처리와 비처리에 의한 ER stress 유도 약물인 DTT와 A23187에 대한 발현양상을 조사하였다. USP16 유전자는 DTT와 A23187 투여시 MPD에 의해 더욱 강하게 발현되었다. 그러나 ER 전사조절인자인 CHOP, ER chaperone인 calnexin과 Bip은 MPD 처리와 상관없이 ER stress 상태에서 높은 발현양상을 보였다. GAPDH의 발현은 큰 차이가 없었으나 rpn이 상향 조절됨이 관찰되었다



**Fig. 3.** Induction of USP16 gene expression by ER stress inducible drugs. Cell treated with MPD or without under ER stress conditions (DTT and A23187). RT-PCR was performed using each total RNA isolated from indicated conditions. Primers for RT-PCR are following as; CHOP 5'-CAT GAA CAG TGG GCA TCA CC; 3'-GCT GGG TAC ACT TCC GGA GAG, calnexin 5'-GGG AGT CTT GTC GTG GAA TTG; 3'-TGC TTT CCA AG A CGG CAG A, Bip 5'-CCA GAA TCG CCT GAC ACC TG; 3'-AGC ACT AGC AGA TCA GTG TC, rpn, PERK 3'-GGT CTG GTT CCT TGG TTT CA; 5'-TTC GCT GC TGT GTA ACT TG, ATF6 3'-CTA GGC CTG GAG GCC AGG TT; 5'-ACC CTG GAG TAT GCG GGT TT, IRE1 3'-ACC ACC AGT CCA TCG CCA TT; 5'-CCA CCC TGG ACG GAA GTT TG, GAPDH 5'-ATG TTC CAG TAT GAC TCC ACT CAC G; 3'-GAA GAC ACC AGT AGA CTC CAC GAC A was used as a control. DTT: dithiothreitol, rpn: ribophorin.

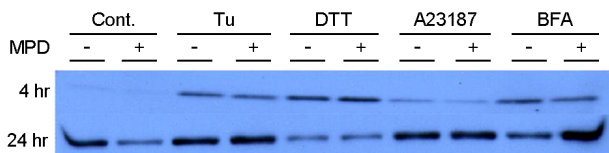


**Fig. 4.** ER stress induces USP16 gene expression. Cells were treated with MPD or without under ER stress conditions (tunicamycin, DTT, A23187 and BFA). Tu: tunicamycin, DTT: dithiothreitol, BFA: brefeldin A.

(Fig. 3). ER 막에서 신호전달에 관여하는 PERK, ATF6, IRE1는 USP16과 거의 동일한 발현양상을 보였다. ER stress에 대한 USP16 발현 증가를 더 확인하기 위해 다른 ER stress 유도 약물인 tunicamycin과 BFA를 처리하였다. 이 약물에 의해서도 모두 동일한 양상으로 MPD에 의해 USP16 발현이 증가됨을 확인하였다 (Fig. 4). MPD에 의하여 단백질 전사조절인자 중의 하나인 eIf2 $\alpha$ 의 인산화된 형태인 eIf2 $\alpha$ -p의 발현을 Western blotting으로 조사하였다. eIf2 $\alpha$ -p는 인산화로 인하여 전사조절인자로 작용하지 못하게 되어 결국엔 세포 전체의 단백질 생합성이 떨어지게 됨으로서 ER stress를 회피한다. 4시간 처리하는

MPD에 관계없이 ER stress의 영향을 거의 동일하게 받았다. 하지만 비교적 장시간인 24시간 동안 MPD를 처리하였을 때는 ER stress가 없는 상황에서 eIF2 $\alpha$ -p의 발현이 강하게 억제되었다. 그러나 ER stress 상황에서는 eIF2 $\alpha$ -p의 발현이 상향 조절되었으며 특히 BFA는 MPD에 의해서 강한 상승효과를 보였다 (Fig. 5).

*In vivo*에서 MPD 처리에 의한 USP16과 ER stress 관련 두 유전자 (Bip & PERK) 발현의 장기별 변화를 알기 위하여 RT-PCR을 행하였다. 이와 함께 조직의 육안적 변화를 알기 위하여 H&E 염색도 시행하였다. 8주령 생쥐에 30 mg/kg의 dose로 하루 간격으로 두 번 주사한 후 3일 째에 각 장기로부터 total RNA를 얻었다, 일부 장기는 H&E 염색을 위하여 4% paraformaldehyde에 고정하였다. 광학현미경 관찰결과 유의성 있는 조직의 육안적 변화는 없었다 (data not shown). 대조군으로는 같은 양의 생리식염수를 주사하였다. USP16 유전자의 발현이

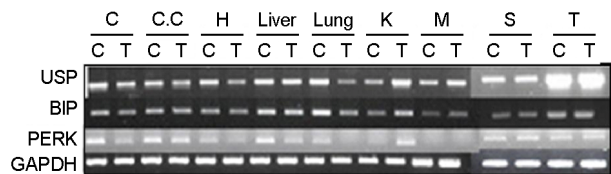


**Fig. 5.** Western blotting of phosphorylated eIF2 $\alpha$ . Cells were incubated 4 hours and 24 hours with MPD or without under ER stress conditions (tunicamycin, DTT, A23187 and BFA). Tu: tunicamycin, DTT: dithiothreitol BFA: brefeldin A.

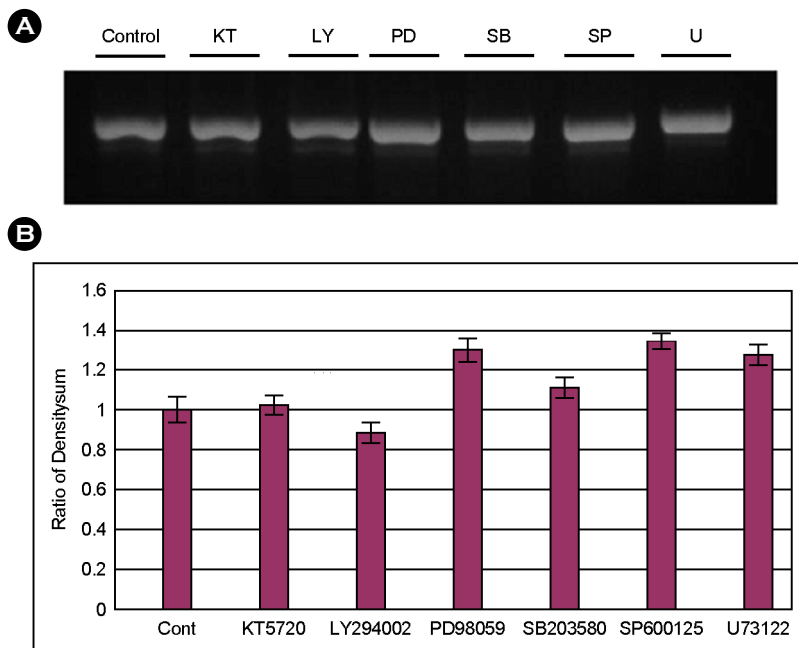
상향 조절되는 장기는 콩팥과 근육이고 하향 조절하는 장기는 심장과 허파였으며 Bip와 PERK도 유사한 발현 양상을 보였다 (Fig. 6). USP16 유전자 발현이 세포내의 어떤 kinase에 의해서 조절되는지를 알기 위하여 대표적인 protein kinase inhibitor들을 세포에 처리한 뒤에 USP16의 발현을 RT-PCR를 통하여 조사하였다. 조사한 protein kinase inhibitor들 중 대부분은 정도의 차이는 있으나 control군에 비하여 USP16을 상향 조절하는 양상을 보이고 LY294002 (phosphatidylinositol 3 kinase inhibitor)만이 하향 조절하였다 (Fig. 7).

## 고 찰

인체는 270여 종류의 각종 세포가 총 70조 개로 구성



**Fig. 6.** Expression of USP16 and ER stress genes (Bip & PERK) in each tissue. Rat was treated with MPD (T) or without (C) for 48 hours. Total RNA was isolated from each tissue and performed RT-PCR. Kidney and muscle tissue show up-regulate the expression these genes, however it is down regulated in heart and lung. USP: USP16, C: PC12 cell, CC: cerebral cortex, H: heart, K: kidney, M: muscle, S: spleen, T: testis.



**Fig. 7.** Effect of protein kinase inhibitors to the USP16 expression. Cells were treated with six different kinds of protein kinase inhibitors for 2 hours and estimate the amount of USP16 expression by RT-PCR. (A) is a representative of RT-PCR analysis. (B) Quantitative data showing the average fold change in USP16 mRNA levels obtained from the three independent experiments. This result shows that LY294002 down regulate the expression of USP16 the control groups. Cont: control group, KT: KT5720 (protein kinase A inhibitor), LY: LY294002 (phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor), PD: PD-98059 (ERK kinase inhibitor), SB: SB203580 (p38MARK inhibitor), SP: SP600125 (JNK inhibitor), U: U73122 (phospholipase C inhibitor).

되어 있다. 각각의 세포는 약 2만 여 종류의 단백질에 의해 조절되고 있다. 세포를 만드는 각종 단백질은 기본적으로 20종류의 각기 다른 아미노산들이 정확한 순서에 따라 연결되어 정확하게 접히고 일정한 모양을 가져야만 생체활성기능을 가지게 된다. 단백질의 생합성과정은 워낙 복잡하고 정교하여서 정상인의 경우에도 최종적으로 정상적인 활성을 가진 단백질이 만들어지는 동안에 불량률이 약 30%에 이른다. 제대로 만들어진 단백질도 영원히 쓸 수 있는 것이 아니라 일정한 시간 동안 기능을 발휘한 뒤에는 수명을 다하게 된다 (Bukau & Weissman, 2006). 이에 동반하여 세포수명도 영원하지는 않다. 세포가 죽게 되면 그 속에 들어있던 엄청난 양의 단백질도 함께 폐기될 운명에 처하게 된다. 못 쓰게 된 단백질이 몸속에 그냥 남아있으면 각종 대사 및 효소작용에 독으로 작용하기 때문에 세포 속에서 잘못 만들어지거나 수명을 다 한 단백질은 곧바로 제거되어야 한다.

세포내에서 불량 혹은 운명을 다한 단백질 청소과정은 76개의 아미노산으로 구성된 ubiquitin이라는 단백질에서 시작된다 (Sulea et al., 2006). 세포 속을 돌아다니던 ubiquitin은 못쓰게 되거나 폐기해야 할 단백질을 찾아내서 공유 결합한다, 이를 ubiquitination라고 한다. Ubiquitination이 일어나는 기질 단백질의 종류는 매우 다양하여, 세포내의 거의 모든 생리활동이 ubiquitination에 연관되어 있으며, 많은 질병도 ubiquitination이 정상적인 작동을 못하여 일어나는 경우가 많다. 이처럼 '폐기용 단백질'이라고 인식되어 ubiquitin으로부터 죽음의 키스를 받게 된 단백질은 청소차 역할을 하는 proteasome이라는 단백질 분해 장치로 옮겨져서 아미노산으로 분해된다. 단백질 분해에 사용된 ubiquitin이 재활용되기 위하여, 분해된 단백질 단편에 붙어있는 ubiquitin은 deubiquitination 과정을 통해서 가역적으로 돌아갈 수 있다. 이때에 사용되는 효소를 deubiquitinating enzymes (DUB)라고 하며, 크게 네 가지 그룹으로 구분한다 (Amerik & Hochstrasser, 2004). 지금까지 100여 종류의 DUBs가 인체에 존재하는 것으로 알려지고 있다 (Baek, 2003).

본 실험에서 MPD에 의해 신경세포에서 차별화 발현되는 유전자를 DD-PCR 방법을 통하여 분석한 결과 3개의 차별화 발현되는 유전자를 발견할 수 있었다. 이 중 1개는 상향 조절되었고, 2개는 하향 조절되었다. 발현이 향상된 유전자는 DNA 분석을 통해 USP16임을 알 수 있었다. USP16은 DUBs의 한 계열로서 Cai 박사팀에 의해 처음 발견되었다 (Cai et al., 1999). Cai는 HeLa

와 Jurkat cDNA library에서 mitotic phosphoprotein에 대한 monoclonal antibody를 사용하여 세포질 내에 존재하는 USP16 유전자를 발견하였다. 이 유전자는 기존 USPs와 유사한 sequence를 가지로 있으며 당시 이를 Ubp-M (mutant deubiquitinating enzyme)이라 명명하였다. Western blot analysis를 통한 조사에서 USP16은 metaphase 직전에 가장 강한 인산화를 나타내고 anaphase에서 가장 약한 인산화를 보였으며 전체 mitosis기간 내내 산발적으로 발현됨을 발견하였다. 또한 chromatin의 주요 ubiquitination 단백질인 Histone H2A와 H2B에 작용하여 ubiquitination된 단백질을 탈 ubiquitination시킬 수 있다는 능력이 있음을 보고하였다. 그러나 그 이후에는 USP16의 뚜렷한 생물학적기능에 관한 연구가 없지만, 일반적으로 USP16과 같은 성격의 단백질은 탈 ubiquitination 효소로서의 기능 이외에 26S proteasome의 기능 조절, 세포분화 및 성장, 발생과정 조절, 발암, 퇴행성 신경질환, 염색질 구조 조절과 유전자의 전사 조절에도 관여하는 것이 알려져 있는 것으로 보아 USP16 역시 새로운 중요한 기능을 하는 것으로 생각된다 (Graner et al., 2004). USP16 유전자가 MPD에 의해서 상향 조절되는 것을 재확인하기 위하여 MPD의 용량과 처리시간에 따른 발현을 RT-PCR로 조사하였을 때 가장 낮은 농도인 400 ng/ml 경우와 가장 짧은 시간인 4시간 처리한 세포에서도 강한 발현이 확인되었다. 이 결과는 USP16 유전자의 발현은 아주 저농도와 짧은 시간의 MPD 처리에 의해서도 충분히 상향 조절 발현됨을 알 수 있다.

진핵세포에서 분비단백질과 막형성단백질은 반드시 ER lumen에서 post-translational modification step을 거침으로서 완전한 단백질기능을 발휘할 수 있다. 간혹 ER 내에서 잘못 접히거나 (misfolding) 혹은 접히지 않은 (unfolding) 단백질이 생성되면 이들 단백질의 일부가 풀려서 세포질로 나오게 된다. 이때에 세포질로 나온 단백질부분에 ubiquitin이 결합하여, 결국에는 26S proteasome에 의해서 분해가 일어나게 된다 (Nishikawa et al., 2005). 실험적으로도 세포질의 26S proteasome 기능을 저하시키면 ER 내의 ER quality control (ERQC)이 정상적으로 일어나지 않는다. 이러한 이유로부터 불량단백질의 세포질분해와 ERQC는 상호관계가 있는 것으로 생각할 수 있다 (van Laar, 2001). 그래서 MPD에 의해 특이적으로 발현되는 ubiquitin specific protease 중의 하나인 USP16 기능으로 ER과의 밀접한 관련성을 추측할 수 있다. 따라서 본 연구는 MPD에 의해 선택적으로 발현 증강되는



USP16의 ER에 대한 역할에 초점을 두게 되었다. 특히 MPD의 ER stress 및 세포생존에 대한 반응인 ER UPR (unfolded protein response)과의 연관성에 대하여 연구하게 되었다.

ER stress의 신호전달은 외부의 급격한 자극에 세포가 대응하는 방법으로 크게 3종류의 ER 막단백질 의해서 조절된다 (Schroder & Kaufman, 2006). PERK는 ER stress를 받으면 인산화가 일어나며 2당체가 된다. 그 결과 eIF2 $\alpha$ 에 인산화 (eIF2 $\alpha$ -p)가 일어나 구조적으로 translational step에 참여할 수 없게 되어 전체 단백질합성을 낮춤으로서 세포의 생존을 연장시키려고 한다. IRE1은 ER stress를 받으면 인산화가 일어나며 2량체가 되는 것은 PERK와 동일하지만 그 이하의 신호전달방식은 달라서 XBP-1 mRNA splicing을 유도하여 XBP-1 단백질을 만들어 이것이 ER chaperone의 전사인자로 작용하여 많은 양의 ER chaperone을 생합성함으로써 세포의 생존을 연장시킨다. 그리고 ATF6은 ER stress를 받으면 세포질 쪽의 단백질이 절단되어 이것이 ER chaperone의 전사인자로 작용하는 양식을 취하는 세포방어기전이다.

MPD에 의해 항상 발현되는 USP16 또한 이 UPR 과정에 어떤 영향을 줄 것으로 추측된다. 따라서 USP16 유전자의 발현과 ERQC와의 관계를 증명하기 위하여 MPD 처리와 비처리에 의한 ER stress 유도 약물로서 단백질의 disulfide band를 환원시키는 DTT와 ER 내 칼슘을 교란시켜 정상적 단백질 접힘을 방해하는 칼슘이온 운반체인 A23187에 대한 발현양상을 조사한 결과 USP16은 동일한 ER stress 조건에서도 MPD 유무에 따라서 확연하게 다른 발현양상을 보임을 알 수 있었다. 즉 USP16 유전자의 발현은 동일한 ER stress 하에서도 MPD에 의해 더욱 강하게 발현되었다. 그러나 ER 전사조절인자인 CHOP, calnexin과 Bip은 MPD의 유무와 관계없이 ER stress 상태에서 높은 발현양상을 보인다. 또한 control로 사용한 GAPDH의 변화가 없는 것에 비하여 ER 막을 형성하는 주요 단백질인 rpn이 상향 조절되는 것으로 보아 ER 막과 관련된 변화를 생각할 수 있다. ER 막에서 신호전달에 관여하는 PERK, ATF6, IRE1은 USP16과 거의 동일하게 상향 발현됨을 보아 USP16은 ERQC 중 특히 소포체 막의 신호전달인자들과 밀접한 관계가 있음을 추정할 수 있다. DTT와 A23187과는 다른 성격의 ER stress 유도 약물에 의한 반응을 확인하기 위하여 ER 내의 N-glycosylation을 방해하는 tunicamycin과 ER에서 만들어진 단백질이 골지체로 이동하는 것을 저해하는 brefeldin

A (BFA)를 처리하였을 때에도 마찬가지로 MPD에 의해 USP16 발현이 증가되는 것을 확인하였다.

eIF2 $\alpha$ -p는 단백질 전사조절인자 중 하나인 eIF2 $\alpha$ 의 인산화된 형태로서, 인산화로 인하여 유전자 번역과정을 저하시켜 결국엔 세포 전체의 단백질 생합성을 떨어뜨려 ER로 들어오는 단백질 부담을 줄여줌으로서 ER stress를 회피하는 역할을 한다 (Harding & Ron, 2002). MPD에 대한 eIF2 $\alpha$ -p의 발현 정도를 조사하였을 때 짧은 시간의 MPD 처리로는 큰 변화가 없었으나 장시간 MPD의 처리로는 eIF2 $\alpha$ -p의 발현이 강하게 억제됨을 알 수 있었다. 이는 MPD의 처리로 eIF2 $\alpha$ -p로의 인산화가 강하게 억제되어 eIF2 $\alpha$ 를 통한 단백질 생합성이 늘어나는 것을 의미한다, 그러나 ER stress 상황에서는 오히려 MPD에 의하여 eIF2 $\alpha$ -p의 발현이 상향 조절됨을 알 수 있었으며 이는 MPD가 ER stress 상황에서는 단백질 생합성을 오히려 억제한다는 것을 시사한다. 특히 BFA를 처리한 경우에는 MPD에 의해 eIF2 $\alpha$ -p 발현이 더욱 강한 상승효과를 보였다. 위의 결과를 정리하면 비교적 장시간 동안 MPD를 처리하는 것은 세포의 단백질합성을 활발하게 할 수 있으며, ER stress와 같은 외부자극에 대하여 MPD는 단백질 생합성을 저하시켜 ER내 단백질 처리 부담을 줄여주는 긍정적인 방향으로 작용한다고 할 수 있다. 실제로 MPD이 eIF2 $\alpha$ -p의 발현을 억제함으로써 단백질생산을 촉진하는지를 확인한 결과로도 24시간 MPD를 처리한 세포의 총 단백질양이 상대적으로 약간 증가한 것을 볼 수 있었다. 즉, MPD는 eIF2 $\alpha$ -p의 발현을 억제하는 과정을 통해서 단백질의 생합성을 조절하는 것으로 생각된다. 결국 USP16은 소포체 막의 PERK에 대한 ER chaperone의 작용과 유사한 기능을 하는 것으로 추정할 수 있다.

*In vivo*에서 MPD처리에 의한 USP16과 ER stress 관련 두 유전자 (Bip & PERK) 발현의 장기별 변화를 알기 위하여 RT-PCR을 행한 결과에서는 USP16 유전자 발현이 콩팥과 근육에서는 상향 조절되었지만 심장과 허파조직에서는 오히려 하향 조절됨을 확인하였다. 또한 Bip와 PERK도 유사한 발현양상을 보였다. 이러한 장기별 발현의 차이는 향후 추가적인 *in vivo* 연구를 통하여 각 장기에서의 USP16 역할과 관련하여 조사해볼 필요가 있겠다. USP16 유전자 발현이 세포내의 어떤 kinase에 의해서 조절되는지를 알기 위하여 대표적인 protein kinase inhibitor들을 세포에 처리한 뒤에 USP16의 발현을 RT-PCR를 통하여 조사하였다. 조사한 protein kinase inhibitor 들 중 대부분은 정도의 차이는 있으나 대조군에 비해

여 USP16을 상향 조절하는 양상을 보이고 LY294002 (phosphatidylinositol 3 kinase inhibitor)만이 하향 조절함을 알 수 있다. 이를 결과로 볼 때 MPD에 의해 특이하게 발현되는 USP16 유전자는 phosphatidylinositol 3-kinase가 관련된 signal pathway에 의해서 조절되는 것으로 추측할 수 있다. 나머지 kinase inhibitor가 상향 조절되는 현상의 의미는 잘 알 수 없지만 세포내의 각종 kinase에 의한 cross talk의 결과로 추정한다.

---

#### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호: 20070401034024)의 지원에 의해 이루어진 것임.

#### REFERENCES

- Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2004. 1695: 189-207.
- Anderson DC, Cranford RE. Glucocorticoids in ischemic stroke. *Stroke* 1979. 10: 68-71.
- Baek KH. Conjugation and deconjugation of ubiquitin regulating the destiny of proteins. *Exp Mol Med*. 2003. 35: 1-7.
- Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 2006. 125: 443-451.
- Cai SY, Babbitt RW, Marchesi VT. A mutant deubiquitinating enzyme (Ubp-M) associates with mitotic chromosomes and blocks cell division. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999. 96: 2828-2833.
- Chyatte D, Fode NC, Nichols DA, Sundt TM Jr. Preliminary report: Effects of high dose methylprednisolone on delayed cerebral ischemia in patients at high risk for vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 1987. 21. 157-160.
- Craig MA, Beppler GA, Santos C, Raffa RB. A second (non-genomic) steroid mechanism of action: possible opportunity for novel pharmacotherapy? *J Clin Pharm Ther*. 2005. 30: 305-312.
- Eck JC, Nachtigall D, Humphreys SC, Hodges SD. Questionnaire survey of spine surgeons on the use of methylprednisolone for acute spinal cord injury. *Spine* 2006. 31: E250-E253.
- Gomes JA, Stevens RD, Lewin JJ 3rd, Mirski MA, Bhardwaj A. Glucocorticoid therapy in neurologic critical care. *Crit Care Med*. 2005. 33: 1214-1224.
- Graner E, Tang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein LJ, Lechpammer M, Huesken D, Zimmermann J, Signoretti S, Loda M. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell* 2004. 5: 253-261.
- Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg*. 1992. 76: 13-22.
- Harding HP, Ron D. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: *Diabetes* 2002. 51 Suppl 3: S455-S461.
- Nishikawa S, Brodsky JL, Nakatsukasa K. Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J Biochem (Tokyo)*. 2005. 137: 551-555.
- Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, Lopez-Otin C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet*. 2003. 4: 544-558.
- Sayer FT, Kronvall E, Nilsson OG. Methylprednisolone treatment in acute spinal cord injury: the myth challenged through a structured analysis of published literature. *Spine J*. 2006. 6: 335-343.
- Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*. 2005. 569: 29-63.
- Schroder M, Kaufman RJ. Divergent roles of IRE1alpha and PERK in the unfolded protein response. *Curr Mol Med*. 2006. 6: 5-36.
- Sinha S, Bastin ME, Wardlaw JM, Armitage PA, Whittle IR. Effects of dexamethasone on peritumoural oedematous brain: A DT-MRI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004. 75: 1632-1635.
- Sulea T, Lindner HA, Menard R. Structural aspects of recently discovered viral deubiquitinating activities. *Biol Chem*. 2006. 387: 853-862.
- van Laar T, van der Eb AJ, Terleth C. Mif1: a missing link between the unfolded protein response pathway and ER-associated protein degradation? *Curr Protein Pept Sci*. 2001. 2: 169-190.