

Increased Association of α -synuclein to Perturbed Cellular Membranes

Yoon Suk Kim^{1,†} and Seung-Jae Lee^{2,†}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea,

²Department of Biomedical Science and Technology, IBST, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

α -synuclein (α -syn) is implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD) and other related diseases. We have previously reported that α -syn binds to the cell membranes in a transient and reversible manner. However, little is known about the physiologic function and/or consequence of this association. Here, we examined whether chemically induced perturbations to the cellular membranes enhance the binding of α -syn, based on hypothesis that α -syn may play a role in maintenance of membrane integrity or repair. We induced membrane perturbations or alterations in α -syn-overexpressing human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) by treating the cells with hydrogen peroxide (H₂O₂) or oleic acid. In addition, membranes fractionated from these cells were perturbed by treating them with proteinase K or chloroform. Dynamic interaction of α -syn to the membranes was analyzed by the chemical cross-linking assay that we developed in the previous study. We found that membrane interaction of α -syn was increased upon treatment with membrane-perturbing reagents in a dose and time dependent manner. These results suggest that perturbations in the cellular membranes cause increased binding of α -syn, and this may have significant implication in the physiological function of α -syn in cells.

Key Words: α -synuclein, Membrane perturbations, Membrane interaction, Oxidative stress

알파-시뉴클린 (α -synuclein)은 신경세포에 풍부한 단백질로 현재까지 정확한 세포 내 생리학적 기능은 밝혀져 있지 않으나 파킨슨씨병 (Parkinson's disease) 발병에 관여하는 유전적 요인의 하나로 알려져 있다 (Athanassiadou et al., 1997; Maries et al., 2003; Singleton et al., 2003).

아미노산 서열분석을 통해 알파-시뉴클린의 아미노 말단 (N-terminus)부위가 ApoE 단백질 내의 인지질 결합부위와 유사하다는 것이 보고된 이후 알파-시뉴클린과 인지질 또는 알파-시뉴클린과 세포막 결합에 관한 많은 연구가 진행되었다. 알파-시뉴클린은 세포막과 일시적이고 가역적으로 결합하며, 세포막 결합 시 Western blotting 분석에서 기존의 알파-시뉴클린 (p16; 16,000da)보다 조

금 큰 크기의 (p17)의 알파-시뉴클린 밴드가 관찰된다. 또한 알파-시뉴클린 단백질의 아미노 말단부위에 α -helix 구조의 형성이 세포막과의 결합에 중요하다고 알려져 있다 (Davidson et al., 1998; Kim et al., 2006; Perrin et al., 2000).

알파-시뉴클린이 세포 내 지질 또는 세포막과 관련되어 매우 중요한 역할을 할 것이라는 연구결과가 지속적으로 보고되고 있다. 알파-시뉴클린이 세포 내 지질 성분비율, 흡수, 대사, 세포막으로의 삽입 (incorporation) 등에 영향을 미친다는 사실이 발표되었으며 (Castagnet et al., 2005; Golovko et al., 2005; Sharon et al., 2003) 알파-시뉴클린이 세포막을 구성하는 지질의 산화 (lipid peroxidation)를 억제하는 항산화 기능을 가진다는 것이 발표되었다 (Zhu et al., 2006). 또한 알파-시뉴클린이 세포막의 굴곡 (curvature)에 영향을 미친다는 것이 보고되었다 (Varkey et al., 2010). 최근에는 알파-시뉴클린이 신경세포에서 각종 과립의 분비 시 세포막과 결합하여 작용하는 SNARE-complex 기능에 관여한다는 사실이 발표되었다 (Burre et al., 2010; Darios et al., 2010; Thayanidhi et al., 2010). 그러나 현재까지 알파-시뉴클린과 세포막 결합이 어떠한 생리, 병리적 의미가 있는지는 정확히 밝혀져 있지 않다. 따라서 세포 내에서 어떠한 감각 (stimulation)에 의해 또는

*접수일: 2011년 6월 20일 / 수정일: 2011년 6월 22일
채택일: 2011년 6월 23일

†Corresponding author: Yoon Suk Kim, Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea.
Tel: +82-33-760-2860, Fax: +82-33-760-2195
e-mail: yoonsukkim@yonsei.ac.kr

†Corresponding author: Seung-Jae Lee, Department of Biomedical Science and Technology, IBST, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea.
Tel: +82-2-450-4166, Fax: +82-2-447-5683
e-mail: sjlee@konkuk.ac.kr

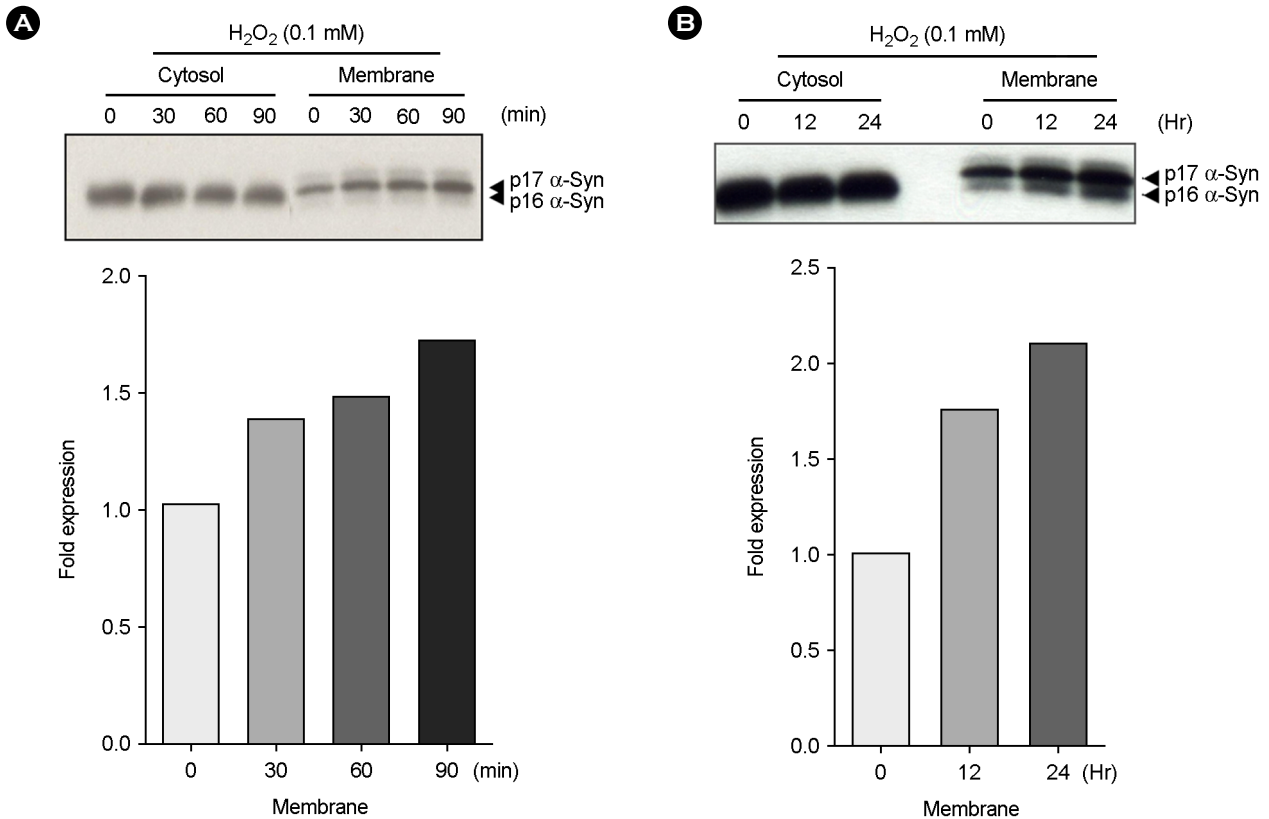


Fig. 1. Interaction of α -syn with cellular membrane is enhanced by incubation of SH-SY5Y cells with hydrogen peroxide in a time-dependent manner. SH-SY5Y cells expressing α -syn were incubated with 0.1 mM hydrogen peroxide (H_2O_2) for the indicated times (A: 0, 30, 60, or 90 min B: 0, 12, or 24 h). Cells were subjected to *in vivo* crosslinking using disuccinimidyl glutarate (DSG) and the cell homogenates separated into the cytosolic fraction and membrane fraction by flotation centrifugation. The fractions were subjected to Western blot analysis using anti- α -syn antibodies (upper panel) and the band intensity measured by densitometric analysis (lower panel).

어떠한 세포환경에서 알파-시뉴클린이 세포막과 결합하는지를 밝히는 것은 알파-시뉴클린의 생리적, 병리적 기능을 밝히는데 중요하다.

따라서, 본 연구에서는 산화스트레스 (oxidative stress) 에 의한 세포막 산화, 단백질 분해효소 처리에 의한 세포막 단백질 손상, 유기용매 처리에 의한 세포막 인지질 손상, 불포화 지방산인 oleic acid 처리에 의한 세포막 유동성 (fluidity) 변화 등이 알파-시뉴클린과 세포막 결합에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

먼저 인간 신경모세포종양 (neuroblastoma) 세포주인 SH-SY5Y 세포에 알파-시뉴클린 유전자가 재조합된 아데노바이러스를 24시간 감염시켜 알파-시뉴클린을 발현시켰다. 이 세포에 0.1 mM 과산화수소 (H_2O_2)를 여러 시간대로 처리한 후, 세포 내 투과성을 가지는 crosslinker 인 disuccinimidyl glutarate (DSG)를 처리하여 일시적이고 가역적인 알파-시뉴클린과 세포막의 결합을 비가역적으로 안정화하였다. 이 후 Dounce homogenizer를 사용하여

세포 균질액 (homogenate)을 준비하고 이를 초원심분리 (200,000 g, 2시간)하여 세포질 분획과 세포막 분획으로 구분하였다. 각 분획을 Western blotting으로 분석하여 세포막에 결합된 알파-시뉴클린량의 변화여부를 확인하였다. 0.1 mM 과산화수소를 0, 30, 60, 90분 처리 후 알파-시뉴클린과 세포막 결합을 확인한 결과, 과산화수소 처리 30분 후부터 시간 의존적으로 알파-시뉴클린의 세포막 결합이 증가함을 관찰하였다 (Fig. 1A). 과산화수소를 장시간 처리 (0, 12, 24시간) 후 알파-시뉴클린/세포막 결합을 확인한 결과 역시 시간 의존적으로 알파-시뉴클린과 세포막의 결합이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1B). 과산화수소는 세포에 산화스트레스를 야기하는 물질의 하나로 세포에 처리 시 다양한 산화스트레스를 유발하는데 이중 하나가 세포막 지질의 산화 (membrane lipid peroxidation)이며 이로 인해 세포막 손상이 일어난다. 따라서 위의 실험결과는 산화에 의한 세포막의 손상 시 알파-시뉴클린/세포막 결합이 증가함을 제안하는 기초

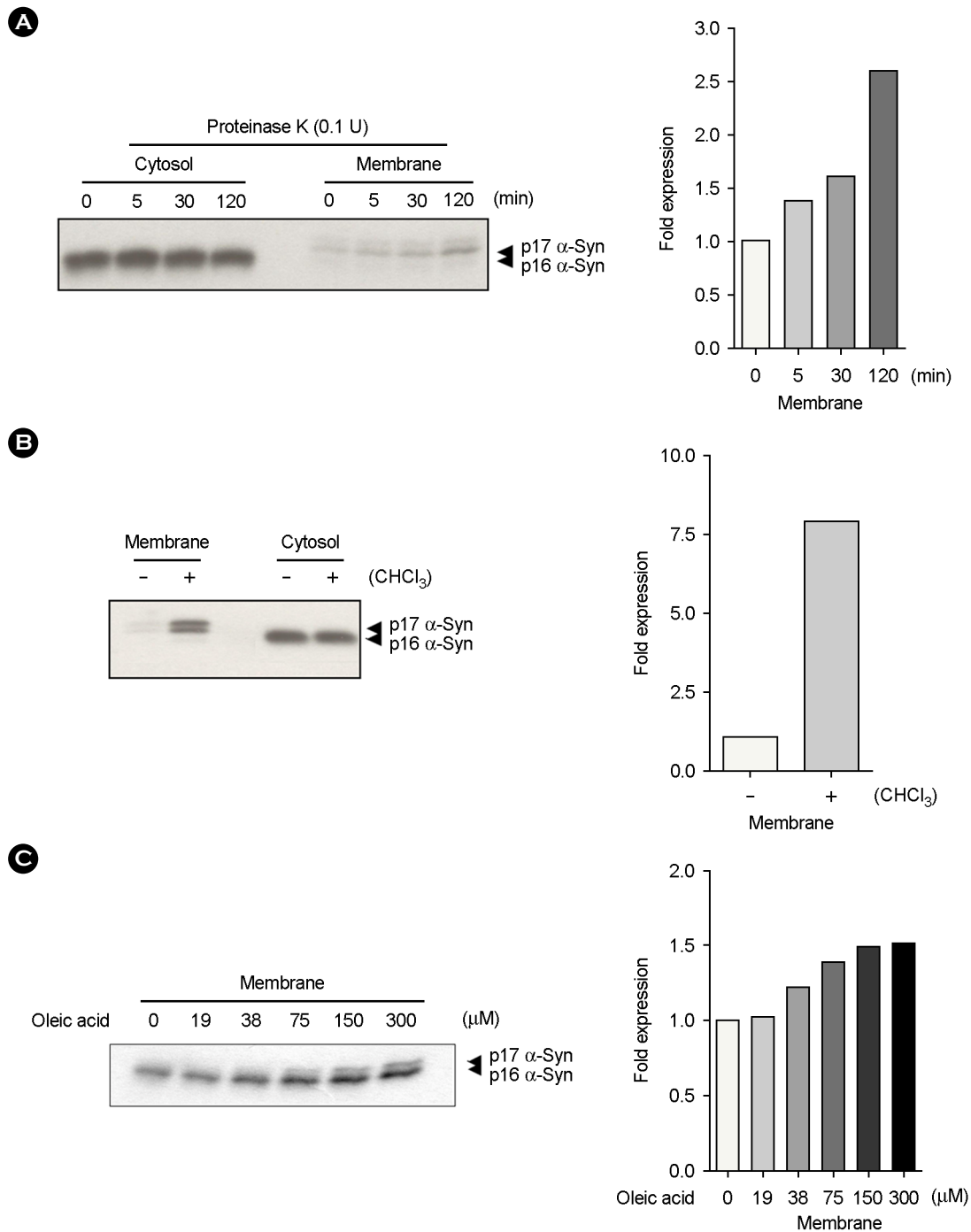


Fig. 2. Binding of α -syn to biological membrane increases in response to the treatment with agents causing membrane defect or alteration. SH-SY5Y cells expressing α -syn were homogenated first and the cell homogenates fractionated into the cytosolic fraction and membrane fraction. Membrane fractions were treated with **(A)** proteinase K for the indicated times (0, 5, 30, or 120 min) or with **(B)** chloroform for 30 min. Membrane fractions were then mixed with the cytosolic fraction and subjected to crosslinking using DSG. The crosslinked samples were separated again into cytosolic and membrane fractions by flotation centrifugation. The fractions were subjected to Western blot analysis using anti- α -syn antibody (left panel) and the band intensity measured by densitometric analysis (right panel). **(C)** SH-SY5Y cells overexpressing α -syn were incubated with indicated concentrations of oleic acid (0, 19, 38, 75, 150, or 300 μ M) for 24 h. Cells were subjected to *in vivo* crosslinking using disuccinimidyl glutarate (DSG) and the cell homogenates separated into the cytosolic fraction and membrane fraction by flotation centrifugation. The fractions were analyzed by Western blotting (left panel) and the band intensity measured by densitometric analysis (right panel).

자료라 생각된다.

알파-시뉴클린을 발현시킨 SH-SY5Y 세포 균질액을 세포질 분획 (알파-시뉴클린이 포함되어 있는 분획)과 세포막 분획으로 먼저 구분하고 그 중 세포막 분획에 단백질 분해효소 (0.1 U proteinase K)를 0, 5, 30, 120분 처리하였다. 다음 단백질 분해효소로 처리한 세포막 분획과 알파-시뉴클린이 포함되어 있는 세포질 분획을 혼합하여 DSG로 세포막과 알파-시뉴클린의 결합을 비가역적으로 안정화 한 후 다시 초원심분리를 통해 세포질과 세포막 분획으로 구분하여 Western blotting을 통하여 알파-시뉴클린과 세포막 결합 정도를 확인하였다 (Fig. 2A). 단백질 분해효소를 처리한 세포막에 대한 알파-시뉴클린의 결합이 효소처리시간 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 세포막에 단백질 분해효소를 처리하면 세포막 주요 구성 성분인 각종 단백질의 분해를 야기하여 세포막에 손상을 야기한다. 따라서 위의 결과는 막단백질 손상에 의한 세포막 이상 시 알파-시뉴클린/세포막 결합이 증가함을 보여주는 기초 자료다. 또한 세포막 분획에 극소량의 클로로포름 (CHCl₃)을 처리 후 알파-시뉴클린이 포함된 세포질 분획과 혼합 후, DSG를 처리하여 알파-시뉴클린/세포막 결합을 비가역적으로 안정화 하였다. 이를 다시 세포질 분획과 세포막 분획으로 구분하여 Western blotting을 통해 알파-시뉴클린/세포막 결합을 확인한 결과 클로로포름을 처리한 세포막에 알파-시뉴클린의 결합이 증가함을 관찰하였다 (Fig. 2B). 클로로포름과 같은 유기용매를 극소량 첨가하면 세포막 지질이 용해되어 세포막 손상을 야기한다. 따라서 막지질 손상에 의한 세포막 이상 시에도 알파-시뉴클린/세포막 결합이 증가함을 본 실험결과를 통해 확인할 수 있었다.

다음에는 알파-시뉴클린을 발현시킨 SH-SY5Y 세포에 불포화지방산인 oleic acid를 여러 농도 (0, 19, 38, 75, 150, 300 μM)로 24시간 처리한 후 DSG를 처리하여 알파-시뉴클린과 세포막의 결합을 비가역적으로 안정화하였다. 이 후 세포 균질액을 세포질 분획과 세포막 분획으로 구분하여 세포막에 결합된 알파-시뉴클린을 양을 Western blotting을 통해 확인한 결과 oleic acid 처리농도 의존적으로 알파-시뉴클린과 세포막의 결합이 증가함을 확인하였다 (Fig. 2C). 세포에 oleic acid같은 불포화 지방산을 처리하면 세포막에 삽입 (incorporation)되어 세포막의 지질구조성이 바뀌는데 특히 불포화 지방산 처리 시에는 특징적으로 세포막 유동성 (fluidity)이 증가하게 된다. 따라서 이 실험결과는 세포막 유동성이 증가할수록 알파-시뉴클린/

세포막 결합이 증가함을 보여주는 자료이다.

종합하면, 1) 과산화수소 등의 산화 스트레스에 의한 세포막 산화 시, 2) Proteinase K 등의 단백질 분해효소 처리에 의한 세포막 단백질 손상 시, 3) 클로로포름 등의 유기용매 처리에 의한 세포막 지질 손상 시, 4) oleic acid 등의 불포화 지방산 처리로 인한 세포막 유동성 변화 시 알파-시뉴클린의 세포막 결합이 증가함을 확인하였다. 이러한 연구결과를 토대로, 여러 원인에 의해 세포막에 이상이 생기거나 세포막에 화학적, 물리적 변화가 생겼을 때 알파-시뉴클린이 세포막에 결합한다는 사실을 확인할 수 있었다. 본 연구결과는 알파-시뉴클린의 세포 내 기능을 이해하는데 기초 자료로 이용할 수 있으리라 생각되며 앞으로 이러한 손상된 세포막과 알파-시뉴클린의 결합이 생리학적, 병리학적으로 어떤 의미가 있는지에 대한 추가연구가 필요하다 사료된다.

Acknowledgements

이 논문은 2008년도 정부재원 (교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2008-331-C00237).

REFERENCES

- Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with parkinson's disease. *Science* 1997. 276: 2045-2047.
- Burre J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Sudhof TC. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 2010. 329: 1663-1667.
- Castagnet PI, Golovko MY, Barcelo-Coblijn GC, Nussbaum RL, Murphy EJ. Fatty acid incorporation is decreased in astrocytes cultured from alpha-synuclein gene-ablated mice. *J Neurochem*. 2005. 94: 839-849.
- Darios F, Ruiperez V, Lopez I, Villanueva J, Gutierrez LM, Davletov B. Alpha-synuclein sequesters arachidonic acid to modulate SNARE-mediated exocytosis. *EMBO Rep*. 2010. 11: 528-533.
- Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem*. 1998. 273: 9443-9449.
- Golovko MY, Faergeman NJ, Cole NB, Castagnet PI, Nussbaum RL, Murphy EJ. Alpha-synuclein gene deletion decreases

- brain palmitate uptake and alters the palmitate metabolism in the absence of alpha-synuclein palmitate binding. *Biochemistry* 2005. 44: 8251-8259.
- Kim YS, Laurine E, Woods W, Lee SJ. A novel mechanism of interaction between alpha-synuclein and biological membranes. *J Mol Biol.* 2006. 360: 386-397.
- Maries E, Dass B, Collier TJ, Kordower JH, Steece-Collier K. The role of alpha-synuclein in parkinson's disease: insights from animal models. *Nat Rev Neurosci.* 2003. 4: 727-738.
- Perrin RJ, Woods WS, Clayton DF, George JM. Interaction of human alpha-synuclein and parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 2000. 275: 34393-34398.
- Sharon R, Bar-Joseph I, Mirick GE, Serhan CN, Selkoe DJ. Altered fatty acid composition of dopaminergic neurons expressing alpha-synuclein and human brains with alpha-synucleinopathies. *J Biol Chem.* 2003. 278: 49874-49881.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. Alpha-synuclein locus triplication causes parkinson's disease. *Science* 2003. 302: 841.
- Thayanidhi N, Helm JR, Nycz DC, Bentley M, Liang Y, Hay JC. Alpha-synuclein delays endoplasmic reticulum(ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs. *Mol Biol Cell.* 2010. 21: 1850-1863.
- Varkey J, Isas JM, Mizuno N, Jensen MB, Bhatia VK, Jao CC, Petrlova J, Voss JC, Stamou DG, Steven AC, Langen R. Membrane curvature induction and tabulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *J Biol Chem.* 2010. 285: 32486-32493.
- Zhu M, Qin ZJ, Hu D, Munishkina LA, Fink AL. Alpha-synuclein can function as an antioxidant preventing oxidation of unsaturated lipid in vesicles. *Biochemistry* 2006. 45: 8135-8142.
-