

## Regulation of Histone Acetylation and Methylation of the p11 Gene in the Hippocampus of Chronic Unpredictable Stress-induced Depressive Mice

Mi Kyoung Seo<sup>1</sup>, Dae-Hyun Seog<sup>2,3,4</sup> and Sung Woo Park<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Paik Institute for Clinical Research, Inje University, Busan 47392, Korea

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, College of Medicine, Inje University, Busan 47392, Korea

<sup>3</sup>Dementia and Neurodegenerative Disease Research Center, College of Medicine, Inje University, Busan 47392, Korea

<sup>4</sup>Department of Convergence Biomedical Science, College of Medicine, Inje University, Busan 47392, Korea

Received August 11, 2021 / Revised August 20, 2021 / Accepted September 16, 2021

Chromatin remodeling regulates gene expression through epigenetic mechanisms. Aberrations in histone modification have been associated with depression-like behaviors in animal models. Additionally, growing evidence also indicates that epigenetic modification is associated with depression. p11 (S100A10) has been implicated in the pathophysiology of depression both in human and rodent models. In the present study, we investigated alterations in histone acetylation and methylation at the promoter of the p11 gene in the hippocampus of mice subjected to chronic unpredictable stress (CUS). C57BL/6 mice were exposed to CUS daily for 3 weeks. Depression-like behaviors were measured with the forced swimming test (FST). The levels of hippocampal p11 expression were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) and Western blotting. The levels of acetylated and methylated histone H3 at the promoter of p11 were measured by chromatin immunoprecipitation followed by real-time PCR. CUS-exposed mice displayed depression-like behaviors with prolonged immobility in FST. CUS led to significant decreases in the expression of p11 at both protein and mRNA levels. Meanwhile, there was a decrease in histone H3 acetylation (Ac-H3) and H3-K4 trimethylation (H3K4me3) and an increase in H3-K27 trimethylation (H3K27me3) at the p11 promoter. These results indicate that chronic stress causes the epigenetic suppression of p11 expression in the hippocampus.

**Key words** : Chronic unpredictable stress, depression, epigenetic alterations, histone modification, p11

### 서 론

우울증은 심각한 건강문제를 야기하는 흔한 정신질환으로써, 나날이 그 유병률이 증가하여 2030년에는 질병 부담 2위가 될 것으로 예측하고 있다[14]. 우울증은 우울한 기분, 무쾌감증, 수면 방해, 식욕 및 체중의 변화, 집중력 저하, 자살사고 등의 증상을 보인다. 우울증 발생 원인은 명확히 밝혀져 있지 않지만, 유전적 요인, 생물학적 요인 및 환경적 요인이 복합적으로 작용 하는 것으로 추정하고 있다[10, 19]. 성인기에 스트레스가 많은 생활이 지속되면 우울증에 대한 취약성이 증가한다[22]. 만성 스트레스는 성인 해마의 치상회에서 신경세포 생성(neurogenesis)을 저하시키고, 해마 CA1 부위에서는 스냅스 가소성(synaptic plasticity)을 억제시키며, CA3에서는 수상돌기의 위축을 야기하는 등 해마의 구조적인 변화 일으킨다[1, 15]. 나아가 학습과 기억을 손상시키는 기능적인 변화도 일

키는 것으로 알려져 있다[36]. 만성 스트레스가 해마의 구조적 변화 및 기능적 변화를 야기하는 원인을 밝혀내기 위해, 많은 연구자들은 염색질(chromatin)의 후성유전기전(epigenetic mechanisms)에 초점을 맞추고 있다. 후성유전기전의 변화가 우울증 발생에 중요한 역할을 할 것이라고 보고되어[32], 후성유전기전 조절이 우울증의 새로운 치료전략으로 관심을 받고 있다.

후성유전은 환경이 염색질 구조에 변화를 일으켜 DNA 염기서열의 변화 없이 유전자 발현을 변화시키는 유전현상이다[43]. 후성유전학적 변화는 외부환경이 변화되거나 수정되면 원상태로 돌아가는 가역반응이지만, 세포분열 후에도 한 세대에서 다음 세대로 안정적으로 전달되는 특성을 가지고 있다. 후성유전기전에는 히스톤 변형(histone modification), 비암호화 RNA (noncoding RNA) 그리고 DNA 메틸화(methylation)가 있다. 이러한 화학적 변형을 통해 응축된 염색질이 열리거나 닫힘으로써 유전 발현이 조절된다.

특히 히스톤 변형의 중요한 화학적 변형 중 하나인 히스톤 아세틸화(acetylation)는 유전자 활성화 및 밀접한 관련이 있다. 히스톤 아세틸화는 히스톤 꼬리의 라이신(K) 잔기(lysine residue)에서 일어난다. 라이신 잔기에 아세틸화 반응이 일어나면, 응축되어 있던 DNA와 히스톤 단백질의 결합이 풀어지고, 이로 인해 전사조절인자들이 프로모터(promoter)에 쉽게 결

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-6071, Fax : +82-51-894-6709

E-mail : [swpark@inje.ac.kr](mailto:swpark@inje.ac.kr)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

합하여 전사 활성을 촉진시켜 타겟 유전자의 발현을 증가시킨다[4, 5]. 반면, 히스톤 아세틸화가 부족하면 유전자 발현이 억제된다. 이렇게 히스톤 아세틸화가 일어나면 전사 활성이 증가되어 유전자 발현이 증가하는데 반면, 히스톤 메틸화(methylation)는 메틸화가 일어나는 라이신 잔기의 위치와 원자가 상태에 따라서 유전자 발현을 증가시키거나 억제시키는 것으로 알려져 있다[18]. 예를 들어 히스톤 H3의 4번째 라이신에 3분자의 메틸기가 결합하고(H3K4met3), H3의 36번째 라이신에 3분자의 메틸기가 결합하면(H3K36met3) 유전자 발현이 증가한다. 반면 H3의 9번째 라이신에 3분자의 메틸기(H3K9met3), H3의 27번째 라이신에 3분자의 메틸기(H3K27met3), 그리고 H4의 20번째 라이신에 3분자의 메틸기가 결합하면(H4K20met3) 유전자 발현이 감소하는 것으로 알려져 있다[3, 18].

다양한 동물모델을 사용한 연구에 의하면, 히스톤 탈아세틸화 효소(histone deacetylases; HDACs)의 억제제를 단독 투여하거나 항우울제와 병용 투여하였을 때 항우울효과를 개선시켰다는 보고들이 있다[35, 44, 46]. 이러한 연구결과들로 인해 히스톤 아세틸화가 우울증 발생에 주요한 기전 중의 하나로 추정되기 시작하였다. 스트레스가 해마 전체의 히스톤 아세틸화를 감소시켰는데 이러한 기전에 HDAC5이 관여하는 것으로 보고되었다[21]. 또한 스트레스가 뇌유래신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor; BDNF) 유전자의 promoter에 히스톤 변형을 야기하여 BDNF 전사를 억제시켰다[12, 35]. 현재까지 스트레스 및 우울증 관련 유전자들의 후성유전기전에 관한 연구들은 BDNF 및 glucocorticoid receptor에 국한되어 왔다. 이들 유전자 외에 우울증 관련 유전자들에 관한 추가적인 연구들이 필요하다.

p11 (S100A10)은 우울증 발생과 항우울작용에 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있다[34]. p11은 세포 표면에서 세로토닌 1B (5-HT1B) 및 4 (5-HT4) 수용체와 결합하여 세로토닌 신경전달(neurotransmission)을 촉진시킴으로써, 이들 수용체의 신호전달을 향상시킨다[33, 39]. 세로토닌 신경전달이 유전적으로 결핍되어 있는 마우스(H/Rouen mouse)가 우울 유사 행동을 보이는데, 이 마우스의 전뇌에서 p11 mRNA 발현이 감소하였다[33]. 유사한 결과가 우울증 환자의 사후검정연구에서도 확인되었다[33]. p11 knockout 마우스는 강제수영검사, 꼬리매달기검사, 자당 섭취량 검사와 같은 다양한 우울증 동물모델에서 우울 유사 행동을 보여주었다[7, 33, 38]. 반면, 뇌에서 p11이 과발현(overexpression) 되는 형질전환 마우스가 꼬리매달기검사에서 야생형 마우스 보다 부동시간을 감소시켜 우울 유사 행동을 보여주었다[33]. 또한 p11 knockout 마우스는 수동적 회피 작업(passive avoidance task)에서 정서적 기억 손상을 유발하기도 하였다[9]. 해마에 특이적으로 p11을 발현시켰더니 이러한 기억 손상이 회복하였는데, 이러한 연구결과들은 우울증에서 나타나는 인지 손상에 p11이 관여한다는 것을 의미한다.

본 연구는 만성 스트레스가 히스톤 변형을 통해 해마의 p11 발현을 조절하는지를 조사하였다. 만성 스트레스는 우울증 동물모델로 알려져 있는 장기간 예측 불가능한 스트레스(chronic unpredictable stress; CUS)를 사용하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

7주령 C57/BL6 마우스(Orient Bio, Songnam, Korea)를 1주일 동안 사육 환경에 적응시켰다. 적정 온도(21±2℃)와 습도(50±10%), 12시간 낮/밤 주기를 유지하여 충분한 물과 사료를 공급하였다. 본 동물실험은 인제대학교 의과대학 동물실험 윤리 위원회의 심의를 통해 승인(승인번호 2016-025) 받았다.

### 장기간 예측 불가능한 스트레스(chronic unpredictable stress; CUS)

Willner과 Banasr 등이 사용한 방법을 일부 수정하여 7 종류의 스트레스를 사용하였다[2, 42]. 스트레스 종류는 깔짚 제거, 구속스트레스, 사육 상자 기울이기, 수영, 꼬리 꼬집기, 물과 먹이 박탈, 축축한 깔짚 사용을 포함하였다(Table 1). 매일 한 종류의 스트레스를 1주일 동안 가하고, 매주 순서를 바꾸어 3주 동안 지속적으로 적용하였다.

### 강제수영검사(forced swimming test; FST)

강제수영검사는 Porsolt 등의 방법을 일부 수정하여 수행하였다[27]. 마지막 CUS를 가한 다음날 강제수영검사를 수행하였다. 뒷면이 개방된 원통모양의 아크릴 수조(높이 40 cm, 지름 20 cm)에 깨끗한 수돗물(수온 25±2℃)을 수조 바닥에서부터 15 cm까지 채운 후, 마우스를 수조에 넣어 7분 동안 수영시켰다. 검사 시행 전체를 디지털 카메라에 기록하였다. 최초 2분은 적응시간으로 하였고, 마지막 5분 동안의 부동(immobility) 시간을 측정하였다.

### RNA 추출 및 역전사

강제수영검사가 끝난 직후 알파산(Alfaxan, 80 mg/kg, i.p.;

Table 1. Stressor used in the chronic unpredictable stress (CUS)

Day	Stressors	Duration
1	Empty cage	24 hr
2	Restraint stress	4 hr
3	Tilt cage at 45°	4 hr
4	Swim	5 min
5	Nip tail	1 min
6	Water and food deprivation	24 hr
7	Wet cage	24 hr

During the CUS protocol, one stressor was applied daily for 3 weeks.

Jurox, NSW, Australia)을 사용하여 마취시켰다. 뇌에서 해마를 적출하여 즉시 액체 질소로 동결시켜 실험에 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다. 해마의 전체 RNA를 Qiazol (Qiagen, Valencia, CA, USA) 방법으로 추출하였다. RNA 농도는 NanoDrop 2000/2000c UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. RNA로부터 cDNA를 합성하기 위해, amfiRivertII™ cDNA Synthesis Master Mix (GenDepot, Baker, TX, USA)를 이용하였다. 1 µg RNA 시료를 사용하여 25°C에서 5분, 50°C에서 1시간, 70°C에서 15분간 반응하여 cDNA를 합성하였다.

### Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 mRNA 정량분석

Real-time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 기기를 사용하여 mRNA를 정량 분석하였다. 합성한 cDNA 100 ng, 2X PreMIX (SYBR Green with low ROX; RT500, Enzynomics, Daejeon, Korea) 12.5 µl, 10 pmole forward primer 0.5 µl, 10 pmole reverse primer 0.5 µl와 멸균수로 최종 25 µl를 맞추어 수행하였다. 반응 조건은 95°C에서 10분, 95°C에서 15초, 55°C에서 35초, 72°C에서 35초로 하여 총 40 cycles을 수행하였다. Melting curve의 분석은 0.5°C 간격으로 55°C에서부터 95°C까지 상승시켰다. 상대적인 유전자 발현 양은 2<sup>-ΔΔCt</sup> 방법(comparative Ct method)을 이용하였다. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하여 보정하였다. p11과 GAPDH의 real-time PCR 분석에 사용된 primer 염기서열은 Table 2와 같다.

### Western blot 분석

해마에서 단백질을 추출하기 위해 Protein Extraction Solution (NP-40) (ELPIS-BIOTECH, Korea)을 사용하여 해마 조직과 함께 조직분쇄기(homogenizer)로 분쇄하였다. 30분 동안 원심 분리(4°C, 13,000 rpm) 하여 상층액을 취한 다음 Bradford protein assay plus kit (GenDepot)를 이용하여 단백질을

정량 하였다. 단백질을 20 µg을 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 전기영동 하였다. Polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Germany)에 transfer 과정을 거치고 membrane을 5% skim milk blocking solution [0.15% Tween-20, tris-buffered saline (TBS-T, GenDEPOT)]에 반응시킨 다음 1차 항체인 anti-p11 (1:200; sc-28430, Santacruz Biotechnology, USA)과 anti-α-tubulin (1:2,000; T9026, Sigma)을 각각 4°C에서 밤새 반응시켰다. Horseradish Peroxidase와 결합된 2차 항체 mouse-anti-goat IgG (1:2,000; sc-2020)와 anti-mouse IgG (1:10,000; A4416)를 각각 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Clarity Western enhanced chemiluminescence solution (Bio-rad)에서 반응시킨 후 Amersham™ Imager 600 (AI600; GE healthcare, USA)을 사용하여 단백질 밴드를 확인하였다. Multi-Gauge Software (Fuji photo film Co, Ltd., Japan)를 사용하여 단백질 발현 양을 정량화 하였다. p11 발현 양은 α-tubulin으로 보정하였다.

### 염색질 면역침전분석법

특정 유전자의 히스톤 아세틸화 및 메틸화 양을 염색질 면역침전분석법(Chromatin immuno-precipitation assay, ChIP assay)으로 측정하였다. ChIP assay는 ChIP Plus Enzymatic Chromatin IP Kit (Cell Signaling, Beverly, MA, USA)를 사용하였으며, 제조업체의 프로토콜에 따라 수행하였다. 해마 조직을 1.5% formaldehyde로 고정시키고, glycine으로 고정을 멈춘 후에 초음파발생장치를 사용하여 염색질 단편이 100~500 base pairs가 되도록 하였다. 염색질 단편 10 µg에 anti-acetyl-H3 (K9+K14) (06-599, Millipore, Billerica, MA, USA), anti-histone H3 trimethyl lysine 4 (H3K4me3; ab8580, abcam, Cambridge, MA, USA), anti-histone H3 trimethyl lysine 27 (H3K27me3; ab6002, abcam) 항체를 각각 첨가하였다. Phenol/chloroform (Amresco, Solon, OH, USA) 추출 및 ethanol (Merck, Hunterdon, NJ, USA) 침전을 통해 DNA를

Table 2. Lists of all primers used in this study

Gene name		Primer Sequence (5'-3')	
Quantitative RT-PCR for mRNA	p11*	Forward	CTTCAAATGCCATCCCAAA
		Reverse	TATTTTGTCCACAGCCAGAGG
	GAPDH#	Forward	AACAGCAACTCCCATTCTTC
		Reverse	TGGTCCAGGGTTTCTTACTC
Quantitative RT-PCR for histone modification	p11 promoter <sup>†</sup>	Forward	CGTTCCTCCTGCTTATCTAG
		Reverse	GCTCTTAGTATTTACAGGGCA

\*Mus musculus S100 calcium binding protein A10 (calpactin) (S100a10), mRNA; NCBI Reference Sequence: NM\_009112.2

#Mus musculus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, pseudogene 14 (Gapdh-ps14) on chromosome 8; NCBI Reference Sequence: NG\_007829.2

<sup>†</sup>Mus musculus strain C57BL/6J chromosome 3, GRCm38.p4 C57BL/6J; NCBI Reference Sequence: NC\_000069.6 (GenBank Assembly ID: GCF\_000001635.24)

분리 정제하였다. p11 promoter에 특이적인 primer (Table 2)를 사용하여 real-time PCR을 수행하였다. 면역 침강된 샘플은 면역 침강되지 않은 input DNA로 보정하였다. 정량 값은  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  방법을 사용하였다. 연구에 사용된 primer는 본 연구자가 이전에 발표한 문헌에 사용된 primer를 사용하였다[29]. 항체들의 특이성을 확인하기 위해 normal rabbit IgG (#2729; Cell Signaling)와 연구에 사용된 3종류의 항체(anti-acetyl-H3, H3K4met3, H3K27met3)를 각각 염색질 샘플에 면역침강 시켰다. 정제된 DNA에 control primer set (Simple ChIP<sup>®</sup> Mouse RPL30 Intron 2 primers #7015; Cell Signaling)와 본 연구에 사용된 p11 promoter primer (Table 2)를 각각 사용하여 real-time PCR에서 각 항체 특이성을 확인하였다[29].

**통계처리**

모든 실험결과는 평균값±표준 오차로 나타내었다. 통계 프로그램은 GraphPad Prism 8.0 software (Windows용 ver. 8.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)를 사용하였다. 대조군과 CUS군의 결과값은 unpaired Student's t-test에서 분석하였다. p 값이 0.05 미만인 것(p<0.05)을 통계적 유의수준으로 간주하였다.

**결 과**

**강제수영검사에서 행동 변화**

강제수영검사에서 우울 유사 행동을 평가하기 위해 우울증의 지표가 되는 부동시간을 측정하였다. 장기간 예측 불가능한 스트레스 군(CUS군)은 49.00±8.60 sec 이었고, 대조군(CON군)은 23.80±5.84 sec 로 측정되었다. CON군과 비교하였을 때 CUS군의 부동시간이 유의하게 증가하였다(df=29, t=2.294, p=0.019, Fig. 1). 3주 동안의 장기간 예측 불가능한 스트레스는 마우스에 우울 유사 행동을 야기하는 것으로 보인다.

**p11 발현 변화**

해마에서 p11 mRNA와 단백질 발현 양을 분석하였다. CON군(1.00±0.12)과 비교하였을 때, CUS군(0.67±0.06)에서 p11 mRNA 발현이 유의하게 감소하였다(df=31, t=2.427, p=0.021, Fig. 2A). 단백질 발현 양 또한 CUS군에서 31.4% 감소하였다(df=31, t=2.100, p=0.044, Fig. 2B).

**p11 promoter의 히스톤 H3 아세틸화 및 메틸화 변화**

장기간 예측 불가능한 스트레스는 p11 발현을 감소시켰다. p11발현 감소에 p11 유전자의 후성유전기전이 관여하는지를 알아보기 위하여, p11 promoter 영역에서 히스톤 H3의 아세틸화 및 메틸화 양을 측정하였다. CON군(1.00±0.11)과 비교하였을 때, CUS군(0.53±0.04)에서 H3 아세틸화(Acetyl-H3)가 유의하게 감소하였다(df=9, t=3.835, p=0.004, Fig. 3A).

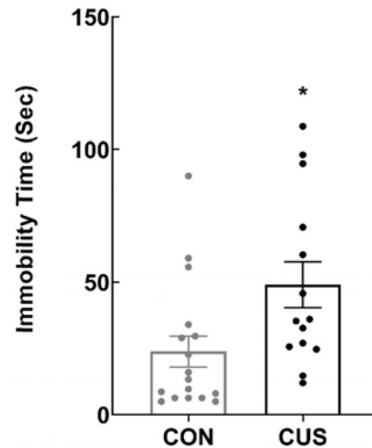


Fig. 1. Effect of chronic unpredictable stress (CUS) on mice behavior in the forced swimming test (FST). Mice were subjected to CUS (n=14-17 animals/group) for 3 weeks. Immobility time was measured 24 hr after the last CUS session. CON, control mice; CUS, CUS exposed mice. Data represent the mean ± S.E.M. \*p<0.05 vs. CON group.

히스톤 H3 메틸화 측정을 위해, 라이신 K4에 3분자의 메틸기가 결합하여 해당 유전자의 발현을 증가시키는 H3K4met3과 K27에 3분자의 메틸기가 결합하여 해당 유전자의 발현을 억제시키는 H3K27met3의 항체를 각각 사용하였다. CON군(1.00±0.11)과 비교하였을 때, CUS군(0.53±0.04)에서 H3K4met3이 유의하게 감소하였다(df=9, t=3.007, p=0.015, Fig. 3B). 반면, H3K27met3의 경우 CUS군(3.93±0.67)에서 CON군(1.00±0.19) 보다 메틸화 양이 유의하게 증가하였다(df=9, t=4.555, p=0.001, Fig. 3C).

**고 찰**

본 연구에서 우울증 모델인 장기간 예측 불가능한 스트레스(CUS)가 해마에서 p11 promoter의 히스톤 변형을 통해 p11 유전자의 발현이 감소하였다는 것을 확인하였다. CUS는 히스톤 H3에서 2개의 라이신 잔기(K9와 K14)의 아세틸화를 감소시켰다. 또한 H3K4의 트리메틸화를 감소시켰으며, H3K27의 트리메틸화를 증가시켰으므로 p11 유전자의 발현 감소에 영향을 미치는 것으로 보인다. 따라서, 만성 스트레스는 p11의 발현을 감소시키는데, 이러한 기전에 히스톤 H3 아세틸화 및 메틸화 기전이 관여한다는 것을 알 수 있다.

CUS 모델은 일상 생활의 예상치 못한 스트레스 요인에 가장 가까운 우울증 동물모델로 알려져 있다. 개발된 우울증 동물모델은 우울증 모델로서 적합한가에 대한 3가지 타당성 평가 기준에서 한가지 이상 통과해야 한다. CUS 모델은 3가지 타당성 즉, 유사 타당성(face validity), 예측 타당성(predictive validity), 구성 타당성(constructive validity)에 모두 부합되어 우울증 동물모델 중 가장 이상적인 모델인 것으로 알려져 있

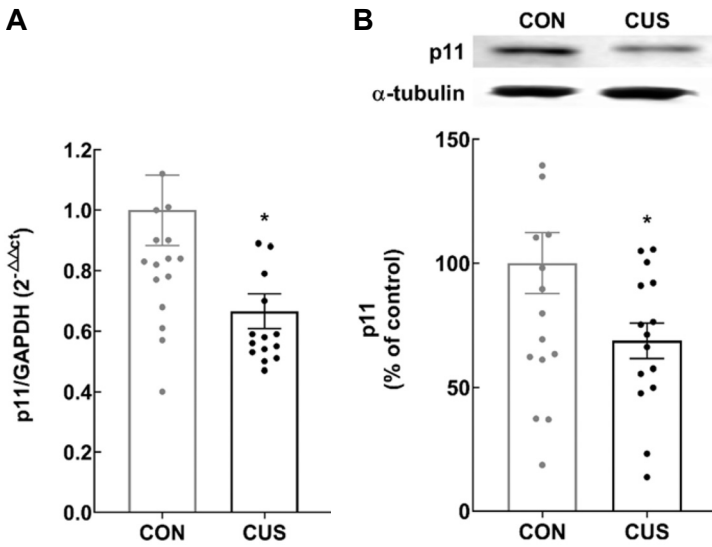


Fig. 2. Effects of CUS on the expression of p11 mRNA and protein in the hippocampus of mice. Mice were subjected to CUS (*n*=14-17 animals/ group) for 3 weeks. The p11 mRNA levels (A) in the hippocampus were measured by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Quantitative analysis was normalized to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Results are expressed as a value relative to the control group (CON) using the 2<sup>-ΔΔct</sup> method. The p11 protein levels (B) were determined by Western blotting. A representative image and quantitative analysis normalized to the α-tubulin band are shown. Values are mean ± S.E.M expressed as a percentage of the control group (CON). CON, control mice; CUS, CUS exposed mice. \**p*<0.05 vs. CON group.

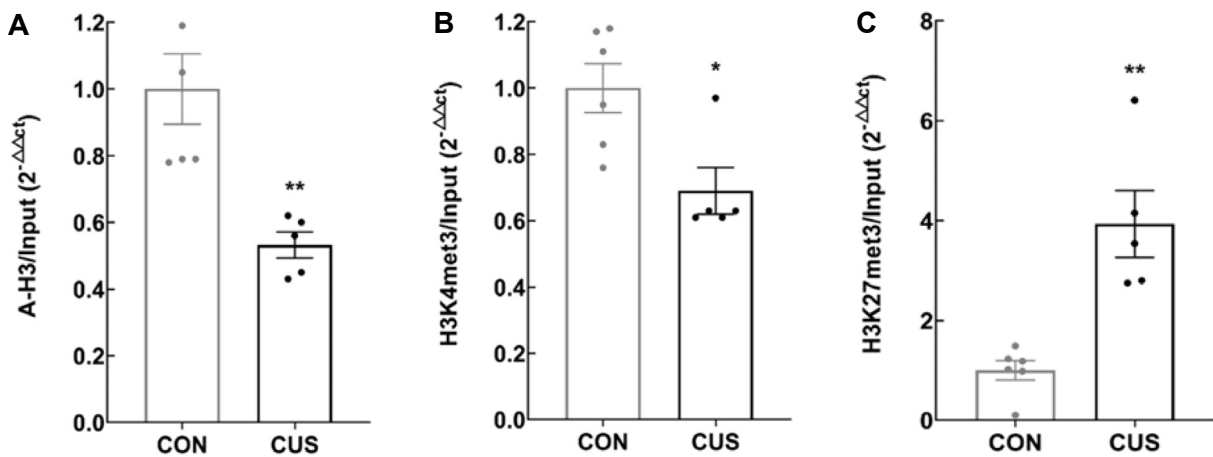


Fig. 3. Effects of CUS on the levels of histone H3 acetylation and methylation at p11 promoter in the hippocampus of mice. Mice were subjected to CUS (*n*=5-6 animals/group) for 3 weeks. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed to measure the levels of acetylated H3 (A), trimethylated H3K4 (B) and trimethylated H3K27 (C) at p11 promoter in the hippocampus using anti-acetyl-H3 (K9+K14), anti-H3K4met3, and anti-H3K27met3 antibodies, respectively. Quantitative analysis was normalized to the 'input' DNA. Results are expressed as a value relative to the control group (CON) using the 2<sup>-ΔΔct</sup> method. CON, control mice; CUS, CUS exposed mice. \**p*<0.05 vs. CON group. \*\**p*<0.01 vs. CON group.

다[45]. 유사 타당성의 기준은 동물에서 나타나는 행동 양상이 우울증의 임상 증상과 유사한가 또한 임상에서 나타나지 않는 양상이 동물모델에서도 역시 나타나지 않는가를 평가하고, 항우울효과가 약물의 장기투여시에만 나타나는가를 함께 평가하는 것이다[6]. 예측 타당성은 약리학적으로 서로 다른 종류의 항우울제들을 위양성이나 위음성 반응 없이 정확하게 구별해 낼 수 있는가를 평가하는 것이다[45]. 구성 타당성은 동물모델이 우울증 모델로 이론적으로 합당한가를 나타내는 기준으로써 동물에서 재현하고자 하는 임상 양상이 이론적으로 우울증과 관련이 있는가를 평가 기준으로 삼고 있다[6]. 이상적인 우울증 모델은 이 3가지 타당성을 모두 갖춘 모델이며, CUS가 이에 해당된다[29]. CUS 모델은 유사 타당성에 포함되는 운동

활동 감소, 혈장 corticosterone 증가, 공격성이나 성행위 감소, 렘 수면 잠복기(REM sleep latency) 감소, 체중 저하를 보여준다[26]. 또한 항우울제를 투여했을 때 항우울효과를 보이나, 항정신병약물과 항불안제 또는 중추 신경자극제를 투여하였을 때는 이러한 효과가 관찰되지 않아 예측 타당성에 부합된다[26]. 스트레스를 받은 설치류는 자당(sucrose) 섭취를 줄이는데, 이러한 현상은 보상(reward)에 대한 반응이 저하되어 나타나는 것으로 추정하고 있는데, 이는 우울증의 중심 증상인 anhedonia (무쾌감증)에 상응한다. CUS에 노출된 설치류는 시간이 지날수록 자당 섭취량이 줄어들어 즐거움이 없는 anhedonia 증상이 나타나 구성 타당성의 기준에도 적합하다[26, 45]. 본 연구에서 수행한 강제수영검사에서 CUS는 부동시

간을 증가시켜 우울 유사 행동을 보여주었으며, 이러한 결과는 이전 문헌과 일치하였다[20].

CUS에 노출된 마우스 해마에서 p11 promoter 영역의 히스톤 H3 두 잔기(K9/ K14)의 아세틸화가 감소되었다는 것을 확인하였다. 해마에서 p11 mRNA와 단백질 발현 역시 감소되었는데, 이러한 결과는 H3 아세틸화 감소와 연관된 것으로 보인다. 랫(rat) 전전두엽과 해마 조직 각각에서 히스톤 H3K14와 H3K23 및 H4K16의 아세틸화를 조사한 Li 등의 연구에 따르면, 4주 동안 지속적인 CUS는 이들 잔기의 아세틸화를 모두 감소시켰다[20]. 또한 CUS와 유사한 모델인 만성 가변성 스트레스(chronic variable stress)가 해마에서 H3K9 및 H4K12 아세틸화를 감소시켰다[11]. 이 연구들은 해마에서 우울증에 취약한 특정한 유전자의 후성유전변형을 분석한 것이 아닌 전전두엽과 해마 조직의 히스톤 아세틸화 전체 양을 정량한 것이라는 점에서 본 연구와 차별점이 있지만, 히스톤 아세틸화 감소 양상은 본 연구결과와 일치한다. 만성 스트레스로 인한 히스톤 아세틸화 감소 기전에 HDACs이 관여하는 것으로 추정하고 있다. HDACs은 탈아세틸화 반응을 통해 히스톤 아세틸화 양을 감소시켜 하위 타겟 유전자의 발현을 방해하는 것으로 알려져 있다[13]. HDACs는 4종류로 구성되어 있다. Class I HDACs는 HDAC1, 2, 3과 8이며, class II HDACs는 HDAC4, 5, 6, 7, 9와 10이고, class III HDACs는 sirtuin 1-7로 구성되어 있다[11]. 이들 중 class II에 속하는 HDAC5가 최근 우울증 발생에 관련이 있다고 보고되었다. 만성 사회적 패배 스트레스(chronic social defeat stress)로 인해 우울 유사 행동을 보이는 마우스의 전전두엽에서 HDAC5가 증가하였으며[8], HDAC5의 과발현이 항우울제인 이미프라민의 항우울효과를 차단하였다[35]. 또한 만성 구속스트레스를 받은 랫의 해마에서도 HDAC5 발현 증가가 관찰되었다[31]. 우울증 환자의 말초혈액에서도 HDAC5 발현 증가가 확인되었다[16]. HDAC 억제제인 sodium butyrate가 설치류에서 우울 증상을 완화시키는 것으로 보고 되었다[28]. 또한 CUS로 인하여 불안 행동과 우울 유사 행동을 보이는 랫에서 기분 안정 효과와 HDAC 억제제 활성을 가지고 있는 sodium valproate 역시 이러한 증상을 완화시켰을 뿐만 아니라, H3K9 및 H4K12의 아세틸화 감소를 약화시켰다[17]. 이러한 연구결과들을 종합하면, CUS 환경은 HDAC5의 활성을 증가시켜 히스톤 H3의 아세틸화 감소를 야기하는 것으로 보인다. 이러한 H3 아세틸화 감소는 염색질 상태를 닫힌 구조로 변화시켜 전사 활성을 억제시킴으로써 우울증 관련 유전자의 발현 감소를 초래하는 것으로 보인다.

본 연구에서는 p11 promoter에서 히스톤 메틸화 정도를 측정하기 위해 2가지 마커를 사용하였다. 히스톤 변형의 활성 마커인 타겟 유전자 발현을 증가시키는 H3K4 트리메틸화 항체와 히스톤 변형의 억제 마커인 유전자 발현 억제를 유도하는 H3K27 트리메틸화 항체를 사용하여 히스톤 메틸화 양을 각각 측정하였다. H3K4met3는 CUS로 인하여 메틸화 양이

감소하였으며, H3K27met3은 증가하였다. 이러한 결과는 모두 p11 유전자의 발현 감소와 연관된 것으로 보인다. 스트레스로 인한 히스톤 메틸화 조절에 관한 해마에서 분석된 보고에 따르면, 만성 사회적 패배 스트레스가 BDNF 유전자의 promoter에서 H3K27met2를 강하게 증가시켰다. 반면 또 다른 전사 억제 마커인 H3K9met3는 증가되지 않았다[35]. H3K4met2는 스트레스에는 영향받지 않았으나 만성 사회적 패배 스트레스를 받은 마우스에 이미프라민을 만성 투여하였을 때, H3K4met2의 양이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 항우울제가 히스톤 메틸화 조절을 통해 치료 가능성을 가진다고 제안하며, 항우울제의 새로운 후성유전학적 기전을 제시하고 있다. 만성 구속 스트레스는 해마에서 H3K4met3의 전체 양을 증가시켰으나, H3K27met3의 전체 양에는 영향을 미치지 못했다[17]. 본 연구결과와 함께 종합하면, 타겟 유전자의 메틸화 양을 분석하였는가, 아니면 조직의 전체 메틸화 양을 분석하였는가에 따라 해마의 히스톤 메틸화 양상은 달라지는 것으로 보인다. 따라서, 향후 히스톤 메틸화의 양상에 따른 기능적인 중요성을 밝히는 추가적인 연구들이 필요할 것으로 보인다.

DNA 메틸화 또한 우울증 발생에 관여하는 주요 후성유전 기전이다. DNA 메틸화는 아데닌(A), 시토신(C), 구아닌(G), 티민(T) 가운데 시토신 염기의 탄소 고리 5번 위치에 메틸기가 결합하여 이루어 지는 분자과정이다. 특히 시토신과 구아닌의 비율이 높은 CpG island라 불리는 영역에서 메틸화가 많이 발생하는데, 흥미롭게도 인간 유전자 promoter들의 50-60%에 CpG island가 위치하고 있다. 이들은 일반적으로 island 밖에서 발견되는 CpG보다 메틸화 정도가 낮다[37]. 이렇게 특정 유전자의 promoter 내의 CpG island에서 발생하는 DNA 메틸화는 promoter에 전사조절인자의 결합을 방해하여 gene silencing을 유발한다[25]. 청소년기의 학대 및 방임과 같은 부정적인 경험들이 성인 우울증의 위험성을 높이는데, 이러한 기전에 우울증 관련 특정 유전자들의 promoter 내에 DNA 메틸화가 관여한다고 알려져 있다. 설치류에서도 출생 후에 어미 쥐가 새끼 쥐를 돌보는 질적 차이가 새끼 쥐의 glucocorticoid receptor promoter의 DNA 메틸화 변화에 영향을 준다고 보고 하였다. 어미 쥐가 활아 주고 털 손질을 해주며 등을 아치형으로 굽혀 새끼 쥐를 품어 주었을 때, 그렇게 보살핌을 받지 못한 새끼 쥐보다 DNA 메틸화가 유의하게 감소하였다[40, 41]. 본 연구자의 최근 연구에서도 출생 직후 3주 동안 매일 3시간씩 모성 분리(maternal separation)를 경험한 마우스가 성체가 되었을 때 우울 유사 행동을 보여 주었으며, 해마의 p11 유전자의 promoter에서 DNA 메틸화가 증가 하였으며, p11 유전자 발현 역시 감소하였음을 확인하였다[30]. p11 유전자의 DNA 메틸화 증가는 항우울제 투여로 회복되는 것으로 알려져 있다. 유전자 조작으로 우울증 환자에서 보이는 신경 화학적, 행동적 특징들을 보이는 FLS (Flinders Sensitive Line) 마우스

의 전전두엽에서 p11 mRNA 및 단백질 발현이 대조군 (Flinders Resistant Line; FRS)에 비해 감소하였고, p11 promoter의 DNA 메틸화 또한 대조군에 비해 증가하였다[23]. 이러한 후성유전적변화는 항우울제 escitalopram을 투여하였을 때, 회복되었다. 또 다른 연구에서는 p11 promoter의 DNA 메틸화 양상이 전기충격요법의 항우울효과를 예측한다고 보고하였다[24].

본 연구결과를 통해 CUS 우울증 모델에서 해마의 p11 유전자 발현은 p11 프로모터의 히스톤 아세틸화 및 메틸화 조절과 서로 가깝게 연관된다는 것을 알 수 있다. 이러한 기전은 우울증 발병 이전에 부분적으로 기여할 것으로 추정된다. 현재 사용 중인 항우울제들은 치료 반응이 지연되고, 충분한 치료 반응을 보이지 않는 한계를 가지고 있다. 이는 우울증 발생 기전이 정확히 밝혀져 있지 않기 때문이다. 이를 개선하기 위해서는 우울증 발생 이전에 대한 포괄적인 연구가 수행되어야 한다. 따라서 CUS 모델을 활용하여 향후 우울증 치료제의 후성유전학적 항우울작용 기전을 조사한다면 우울증 후성유전치료제 개발 및 우울증 후성유전 중개연구 활성화에 도움이 될 것이다.

## 감사의 글

이 성과는 정부(과학기술정보통신부 및 교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2020R1A2C1010148, 2020R1I1A3060731 및 2019R1F1A1040903).

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Alvarez, D. N., Joëls, M. and Krugers, H. J. 2003. Chronic unpredictable stress impairs long-term potentiation in rat hippocampal CA1 area and dentate gyrus *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 1928-34.
- Banasr, M., Valentine, G. W., Li, X. Y., Gourley, S. L., Taylor, J. R. and Duman, R. S. 2007. Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. *Biol. Psychiatry* **62**, 496-504.
- Berger, S. L. 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407-412.
- Borrelli, E., Nestler, E. J., Allis, C. D. and Sassone-Corsi, P. 2008. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron* **60**, 961-974.
- Choi, J. K. and Howe, L. J. 2009. Histone acetylation: truth of consequences? *Biochem. Cell Biol.* **87**, 139-150.
- Chung, Y. I. 1999. Experimental models of depression. *Kor. J. Biol. Psychiatry* **6**, 161-169.
- Egeland, M., Warner-Schmidt, J., Greengard, P. and Svenningsson, P. 2010. Neurogenic effects of fluoxetine are attenuated in p11 (S100A10) knockout mice. *Biol. Psychiatry* **67**, 1048-1056.
- Erburu, M., Muñoz-Cobo, I., Domínguez-Andrés, J., Beltran, E., Suzuki, T., Mai, A., Valente, S., Puerta, E. and Tordera, R. M. 2015. Chronic stress and antidepressant induced changes in Hdac5 and Sirt2 affect synaptic plasticity. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **25**, 2036-2048.
- Eriksson, T. M., Alvarsson, A., Stan, T. L., Zhang, X., Hascup, K. N., Hascup, E. R., Kehr, J., Gerhardt, G. A., Warner-Schmidt, J., Arango-Lievano, M., Kaplitt, M. G., Ogren, S. O., Greengard, P. and Svenningsson, P. 2013. Bidirectional regulation of emotional memory by 5-HT1B receptors involves hippocampal p11. *Mol. Psychiatry* **18**, 1096-1105.
- Feder, A., Nestler, E. J. and Charney, D. S. 2009. Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 446-457.
- Ferland, C. L. and Schrader, L. A. 2011. Regulation of histone acetylation in the hippocampus of chronically stressed rats: a potential role of sirtuins. *Neuroscience* **174**, 104-114.
- Fuchikami, M., Morinobu, S., Kurata, A., Yamamoto, S. and Yamawaki, S. 2009. Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **12**, 73-82.
- Gallinari, P., Di Marco, S., Jones, P., Pallaoro, M. and Steinkühler, C. 2007. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res.* **17**, 195-211.
- Go, D. S., Kim, Y. E., Paik, J. W., Roh, S. W. and Yoon, S. J. 2020. A comparison of disease burden and the government budget for mental health in Korea. *J. Ment. Health* <https://doi.org/10.1080/09638237.2020.1765999>
- Heine, V. M., Maslam, S., Zareno, J., Joëls, M. and Lucassen, P. J. 2004. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 131-144.
- Hobara, T., Uchida, S., Otsuki, K., Matsubara, T., Funato, H., Matsuo, K., Suetsugu, M. and Watanabe, Y. 2010. Altered gene expression of histone deacetylases in mood disorder patients. *J. Psychiatr. Res.* **44**, 263-270.
- Hunter, R. G., McCarthy, K. J., Milne, T. A., Pfaff, D. W. and McEwen, B. S. 2009. Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 20912-20917.
- Izzo, A. and Schneider, R. 2010. Chatting histone modifications in mammals. *Brief Funct. Genomics* **9**, 429-443.
- Krishnan, V. and Nestler, E. J. 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature* **455**, 894-902.
- Li, H. Y., Jiang, Q. S., Fu, X. Y., Jiang, X. H., Zhou, Q. X. and Qiu, H. M. 2017. Abnormal modification of histone acetylation involved in depression-like behaviors of rats induced by chronically unpredicted stress. *Neuroreport* **28**,

- 1054-1060.
21. Liu, D., Qiu, H. M., Fei, H. Z., Hu, X. Y., Xia, H. J., Wang, L. J., Qin, L. J., Jiang, X. H. and Zhou, Q. X. 2014. Histone acetylation and expression of mono-aminergic transmitters synthetases involved in CUS-induced depressive rats. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **239**, 330-336.
  22. McEwen, B. S. and Morrison, J. H. The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. *Neuron* **79**, 16-29.
  23. Melas, P. A., Rogdaki, M., Lennartsson, A., Björk, K., Qi, H., Witasp, A., Werme, M., Wegener, G., Mathé, A. A., Svenningsson, P. and Lavebratt, C. 2012. Antidepressant treatment is associated with epigenetic alterations in the promoter of P11 in a genetic model of depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **15**, 669-679.
  24. Neyazi, A., Theilmann, W., Brandt, C., Rantamäki, T., Matsui, N., Rhein, M., Kornhuber, J., Bajbouj, M., Sperling, W., Bleich, S., Frieling, H. and Löscher, W. 2018. p11 promoter methylation predicts the antidepressant effect of electroconvulsive therapy. *Transl. Psychiatry* **8**, 25.
  25. Newell-Price, J., Clark, A. J. and King, P. 2000. DNA methylation and silencing of gene expression. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**, 142-148.
  26. Planchez, B., Surget, A. and Belzung, C. 2019. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *J. Neural. Transm. (Vienna)* **126**, 1383-1408.
  27. Porsolt, R. D., Le Pichon, M. and Jalfre, M. 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* **266**, 730-732.
  28. Schroeder, F. A., Lin, C. L., Crusio, W. E. and Akbarian, S. 2007. Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse. *Biol. Psychiatry* **62**, 55-64.
  29. Seo, M. K., Choi, A. J., Seog, D. H., Lee, J. G. and Park, S. W. 2021. Early enriched environment prevents epigenetic p11 gene changes induced by adulthood stress in mice. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1928.
  30. Seo, M. K., Lee, J. G. and Park, S. W. 2021. Early life stress induces age-dependent epigenetic changes in p11 gene expression in male mice. *Sci. Rep.* **11**, 10663.
  31. Seo, M. K., Ly, N. N., Lee, C. H., Cho, H. Y., Choi, C. M., Nhu, L. H., Lee, J. G., Lee, B. J., Kim, G. M., Yoon, B. J., Park, S. W. and Kim, Y. H. 2016. Early life stress increases stress vulnerability through BDNF gene epigenetic changes in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* **105**, 388-397.
  32. Sun, H., Pamela, J. K. and Nestler, E. J. 2013. Epigenetics of the depressed brain: role of histone acetylation and methylation. *Neuropsychopharmacology* **38**, 124-137.
  33. Svenningsson, P., Chergui, K., Rachleff, I., Flajolet, M., Zhang, X., El, Y. M., Vaugeois, J. M., Nomikos, G. G. and Greengard, P. 2006. Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. *Science* **311**, 77-80.
  34. Svenningsson, P., Kim, Y., Warner-Schmidt, J., Oh, Y. S. and Greengard, P. 2013. p11 and its role in depression and therapeutic responses to antidepressants. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 673-680.
  35. Tsankova, N. M., Berton, O., Renthal, W., Kumar, A., Neve, R. L. and Nestler, E. J. 2006. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat. Neurosci.* **9**, 519-525.
  36. Wang, J., Yuan, J., Pang, J., Ma, J., Han, B., Geng, Y., Shen, L., Wang, H., Ma, Q., Wang, Y. and Wang, M. 2016. Effects of Chronic Stress on Cognition in Male SAMP8 Mice. *Cell Physiol. Biochem.* **39**, 1078-1086.
  37. Wang, Y. and Leung, F. C. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. 2004. *Bioinformatics* **20**, 1170-1177.
  38. Warner-Schmidt, J. L., Chen, E. Y., Zhang, X., Marshall, J. J., Morozov, A., Svenningsson, P. and Greengard, P. 2010. A role for p11 in the antidepressant action of brain-derived neurotrophic factor. *Biol. Psychiatry* **68**, 528-535.
  39. Warner-Schmidt, J. L., Flajolet, M., Maller, A., Chen, E. Y., Qi, H., Svenningsson, P. and Greengard, P. 2009. Role of p11 in cellular and behavioral effects of 5-HT4 receptor stimulation. *J. Neurosci.* **29**, 1937-1946.
  40. Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M. and Meaney, M. J. 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* **7**, 847-854.
  41. Weaver, I. C., D'Alessio, A. C., Brown, S. E., Hellstrom, I. C., Dymov, S., Sharma, S., Szyf, M. and Meaney, M. J. 2007. The transcription factor nerve growth factor-inducible protein 11 mediates epigenetic programming: altering epigenetic marks by immediate-early genes. *J. Neurosci.* **27**, 1756-1768.
  42. Willner, P. 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* **52**, 90-110.
  43. Wu, C. T. and Morris, J. R. 2001. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* **293**, 1103-1105.
  44. Yamawaki, Y., Fuchikami, M., Morinobu, S., Segawa, M., Matsumoto, T. and Yamawaki, S. 2012. Antidepressant-like effect of sodium butyrate (HDAC inhibitor) and its molecular mechanism of action in the rat hippocampus. *World J. Biol. Psychiatry* **13**, 458-467.
  45. Yan, H. C., Cao, X., Das, M., Zhu, X. H. and Gao, T. M. 2010. Behavioral animal models of depression. *Neurosci. Bull.* **26**, 327-337.
  46. Zhu, H., Huang, Q., Xu, H., Niu, L. and Zhou, J. N. 2009. Antidepressant-like effects of sodium butyrate in combination with estrogen in rat forced swimming test: involvement of 5-HT(1A) receptors. *Behav. Brain Res.* **196**, 200-206.



## 초록 : 장기간 예측 불가능한 스트레스를 받은 마우스 해마에서 p11 유전자의 히스톤 아세틸화 및 메틸화의 조절

서미경<sup>1</sup> · 석대현<sup>2,3,4</sup> · 박성우<sup>1,4\*</sup>

(<sup>1</sup>인제대학교 백인계기념임상의학연구소, <sup>2</sup>인제대학교 의과대학 생화학교실, <sup>3</sup>인제대학교 의과대학 치매 및 퇴행성 신경질환 연구센터, <sup>4</sup>인제대학교 의과대학 생의학융합교실)

크로마틴 리모델링은 후성유전기전을 통해 유전자 발현을 조절한다. 비정상적인 히스톤 변형이 우울증 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. p11 (S100A10)은 인간과 설치류에서 우울증의 병태생리에 관여한다고 보고되었다. 본 연구는 우울증 동물모델인 장기간 예측 불가능한 스트레스가 마우스 해마에서 p11 유전자 promoter의 히스톤 변형에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. C57BL/6 마우스에 21일 동안 스트레스를 가하고, 강제수영검사를 수행하여 우울 유사 행동 양상을 측정하였다. Real time PCR 및 Western blotting 분석법으로 p11 발현 변화를 조사하였으며, 염색질 면역침전분석법을 수행하여 p11 promoter의 히스톤 H3 아세틸화 및 메틸화 양을 측정하였다. 장기간 예측 불가능한 스트레스는 강제수영검사에서 부동시간을 증가시켜 우울 유사 행동을 나타내었으며, 해마의 p11 mRNA 및 단백질 발현을 유의하게 감소시켰다. 또한 p11 promoter의 히스톤 H3 아세틸화(Ac-H3) 및 H3-K4 트리메틸화(H3K4met3)를 유의하게 감소시켰으며, H3-K27 트리메틸화(H3K27met3)를 증가시켰다. 본 연구결과는 만성 스트레스가 해마에서 p11 유전자의 후성유전적 억제를 야기하여 p11 유전자의 발현을 감소시킴을 시사한다.