

FUN14 Domain-Containing Protein 1 Is Involved in Amyloid Beta Peptide-Induced Mitochondrial Dysfunction and Cell Injury in HT-22 Neuronal Cells

Jae Hoon Kang and Jae Suk Woo*

Department of Physiology, College of Medicine, Pusan National University, Yangsan-si 50612, Korea

Received October 29, 2023 / Revised January 16, 2024 / Accepted January 17, 2024

FUN14 domain-containing protein 1 (FUNDC1), an outer mitochondrial membrane protein, contributes to removal of damaged mitochondria through mitophagy. In this study, to elucidate the role of the FUNDC1 in the amyloid beta peptide ($A\beta$)-induced neuropathy, changes in the degree of mitochondrial dysfunction and cell injury caused by $A\beta$ treatment were examined in the HT-22 neuronal cells in which the FUNDC1 expression was transiently silenced or overexpressed. We found that $A\beta$ treatment causes a time-dependent decrease of the FUNDC1 expression. In the $A\beta$ -treated cells, there were a drop in MTT reduction ability, depletion of cellular ATP, disruption of mitochondrial membrane potential, stimulation of cellular ROS production, and increased mitochondrial Ca^{2+} load. Activation of caspase-3 and induction of apoptotic cell death were also observed. Transient silencing of the FUNDC1 expression by transfection with the FUNDC1 small interfering RNA *per se* caused mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death like the effect of $A\beta$ treatment. Conversely, in cells in which the FUNDC1 was transiently overexpressed by FUNDC1-Myc transfection, overexpression itself had no effect on the mitochondrial functional integrity and cell survival but showed a significant prevention effect against mitochondrial and cell injury caused by $A\beta$ treatment. Overall, these results suggest that the FUNDC1 is importantly involved in the $A\beta$ -induced mitochondrial dysfunction and cell injury in the HT-22 neuronal cells.

Key words : Amyloid beta peptide, cell injury, FUNDC1, mitochondrial dysfunction, mitophagy

서 론

알츠하이머병(Alzheimer's disease)은 노인반(senile plaque)의 형성과 뉴런 소실(neuronal loss), 신경돌기 이영양증(dystrophic neurites), 신경섬유 엉킴(neurofibrillary tangles), 신경연접 소실(loss of synapse) 등의 병리 조건을 특징으로 하며, 임상적으로는 진행성의 기억력 결핍과 인지 장애 등을 초래하는 퇴행성 신경 질환의 일종이다[3, 11]. 알츠하이머병의 병인에는 유전적 요인과 노화, 생활 환경 요인, 타우 단백질 엉킴(tau tangles), 염증, 산화 스트레스 등의 다양한 요인이 관여하는 것으로 알려져 있으나[3, 11], 가장 중요하고 직접적인 요인은 아밀로이드 베타 펩티드(amyloid beta peptide, $A\beta$)의 축적이다[28, 29].

$A\beta$ 는 알츠하이머병의 발현 과정에서 미토콘드리아에

다양한 기능적, 형태학적 손상을 유발하는 것으로 밝혀지고 있다[27, 33]. 미토콘드리아는 ATP의 형태로 에너지를 생산하여 세포 생존에 핵심적인 역할을 수행한다. 따라서 $A\beta$ 에 의해 유발되는 미토콘드리아 손상은 알츠하이머병의 병리 기전에 핵심 기여 요인이 될 수 있으며, $A\beta$ 에 의한 미토콘드리아 손상 기전을 이해하는 것은 알츠하이머병의 잠재적인 예방, 치료 전략을 개발하는 데 중요한 접근법이 될 수 있다.

Fun14 도메인 함유 단백질(Fun14 domain-containing protein 1, FUNDC1)은 미토콘드리아 외막에 존재하는 단백질로, 손상된 미토콘드리아의 마이토파지(mitophagy)에 관여하는 수용체로 작용함이 확인되면서[13] 주목받게 되었다. 마이토파지는 미토콘드리아의 무결성(integrity)과 기능을 유지하는 데 핵심적인 역할을 하는데[21, 24], FUNDC1은 미토콘드리아의 손상을 감지하고 그에 대응하는 마이토파지 기전을 활성화하여 손상된 미토콘드리아의 제거를 촉진한다[12, 13]. 이러한 과정을 통해 세포는 미토콘드리아의 무결성을 유지하고 에너지 생산을 원활하게 수행할 수 있다.

최근 산화성 세포 손상과 연관된 다양한 급, 만성 질환들에서 FUNDC1이 중요한 역할을 할 가능성들이 제시되고 있다. FUNDC1의 발현이나 활성이 증가하는 조건에서

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8072, Fax : +82-51-510-8076

E-mail : jswoo@pusan.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.

는 심혈관에서 허혈/재관류에 의한 심근 세포 손상을 완화하는 효과가 있으며[5], 뇌내출혈 후 염증반응이 감소하고[36], 뇌 허혈/재관류에 의한 손상으로부터 뉴런을 보호하는 효과가 있음이[6] 보고된 바 있다. 반대로 FUNDC1의 발현이나 활성이 감소하는 조건에서는 고지방 식이에 따른 심장의 형태학적 변형과 수축 기능 장애가 악화되며[22], 식이성 비만과 대사질환의 위험이 증가한다는[34] 결과가 보고된 바 있다. 또한 FUNDC1 및 이와 연관된 미토콘드리아는 인슐린 저항성을 치료하는 전략적 표적이 될 수 있음이 제시된 바 있다[20]. 한편 미토콘드리아 기전의 이상이 알츠하이머병과도 깊은 연관성이 있음이 제시된 바 있으며[10], 알츠하이머병을 예측하고 세부 유형을 추정하는 생물학적 지표로 유용한 미토콘드리아 유전자의 하나로 FUNDC1이 제시된 바도 있다[15].

위에서 제시한 여러 연구 결과들은 FUNDC1이 A β 에 의한 미토콘드리아와 세포 손상 및 알츠하이머병의 병리 기전에 중요한 역할을 할 수 있음을 강하게 시사하나, 현재까지 이를 입증할 수 있는 직접적인 증거는 없다. 본 연구에서는 FUNDC1의 발현을 일시적으로 차단(silencing)하거나 과발현(overexpression)시킨 세포에서 A β 에 의한 미토콘드리아와 세포 손상의 정도 변화를 관찰함으로써 이들 손상 기전에서 FUNDC1의 역할을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

화학물질 및 시약

세포배양에 필요한 배지와 시약은 Gibco 제품(Thermo Fisher Scientific, Inc.)을 사용하였으며, 웨스턴 블롯(Western blot)을 위한 FUNDC1, PTEN-induced kinase 1(PINK1), BCL2 interacting protein 3(BNIP3) 및 beta-actin에 대한 1차 항체들과 이들에 대한 2차 항체(HRP 결합 항 토끼 혈청 Ig G 항체, anti-rabbit Ig G, HRP-linked Ab)는 Cell Signaling Technology사 제품을 사용하였다. FUNDC1 발현의 일시적 차단을 위한 siRNA 유전자 주입(transfection)에는 Sigma-Aldrich사의 Mission esiRNA FUNDC1을 사용하였으며, 과발현을 위한 FUNDC1-Myc 유전자 주입에는 Origene 제품을 사용하였다. DiOC $_6$ (3) 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific, Inc.) 제품을 사용하였다. Mitotracker green (MTG)과 rhod2/AM은 Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Inc.) 제품을 사용하였다. A β 펩티드 25~35(A β ₂₅₋₃₅)를 포함하여 따로 언급하지 않은 화학물질과 시약은 Sigma-Aldrich사의 제품을 사용하였다.

세포 배양

HT-22 세포(Salk Institute, 미국, 샌디에고)를 10%(v/v) FBS, 페니실린 G, 150 IU/ml와 스트렙토마이신, 50 mg/ml

을 포함한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)이 들어있는 75 cm² 배양 플라스크에서 유지 배양하였다. 세포가 서로 닿을 정도로 고밀도로 자라면(대략 4-5일) 0.05% 트립신/0.53 mM EDTA 용액으로 처리하여 세포를 분리 수확한 후 원래 밀도의 1/6로 재분주하였다. 실험 목적에 따라 12~24웰 배양 플레이트에 분주하여 배양하거나 콜라젠으로 코팅하여 6웰 배양 플레이트에 설치한 유리 커버 글래스 등 적절한 배양 용기에 분주 배양하였다.

MTT 환원능의 측정

미토콘드리아 기능 지표의 하나로 3-(4,5-dimethyl-2-thiazyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 환원능을 환원산물인 포르마잔(formazan)을 비색분석법으로 측정하여 분석하였다[19]. 세포를 12웰 플레이트에 배양한 후 각 웰에 10 ml의 MTT를 첨가하고(최종 농도는 62.5 mg/ml) 30분간 반응시켰다. 반응 시간이 경과 후 상층 배양액을 제거하고 세포 내 형성된 포르마잔 결정을 DMSO에 용해시켰다. 포르마잔의 농도는 분광광도계를 사용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하여 구하였다.

siRNA 유전자 주입

FUNDC1의 일시적인 발현 차단을 위해 Sigma-Aldrich사의 Mission esiRNA FUNDC1 (#EHU13890)을 사용하였다. 세포에 Lipofectamine RNAiMax transfection reagent (Invitrogen, #13778-075)를 이용하여 제조업체에서 제공한 설명서에 따라 유전자 주입을 시행하였다. 유전자 주입 반응액에서 4시간 반응시킨 후 반응액과 배양액을 제거하고 신선한 배양액으로 갈아주었다. 이후 웨스턴 블롯으로 FUNDC1의 발현 변화를 확인하였다.

FUNDC1-Myc 유전자 주입

Origene사의 FUNDC1-Myc (#RC20811) 1.5 mg/ml을 Megatrans 2.0 transfection reagent (#TT210003, Origene)을 이용하여 제조업체에서 제공한 설명서에 따라 유전자 주입을 시행하였다. 유전자 주입 반응액에서 3시간 반응시킨 후 반응액과 배양액을 제거하고 신선한 배양액으로 갈아주었다. 이후 웨스턴 블롯으로 FUNDC1의 발현 변화를 확인하였다.

웨스턴 블롯

단백분해 효소(protease)와 포스포타제(phosphatase) 차단제를 첨가한 Pierce RIPA 완충액(Thermo Fisher Scientific, Inc.)을 이용하여 전세포 용해물(whole cell lysates)을 추출하였다. 단백 샘플을 SDS-PAGE (6-15% 겔)에서 분리한 후 PVDF 멤브레인(membrane)에 옮기고, 5% 탈지 분유로 1시간 동안 블로킹(blocking)하였다. 이후 멤브레인을 FUNDC1, PINK1, BNIP3, b-actin 등에 대한 1차 항체를

포함한 반응 용액에 담근 후 4°C에서 밤새(overnight) 반응시켰다. 이후 HRP 결합 항 토끼 혈청 IgG 항체가 포함된 반응 용액에 25°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 단백 밴드들은 화학발광분석법으로 분석하였다.

ATP 농도의 측정

세포 내 ATP 농도는 루시페린-루시페라제(luciferin-luciferase) 분석법을 이용하여 측정하였다[14]. 세포를 500 ml의 0.5% Triton X-100으로 용해시킨 후 100 ml의 0.6 M 과염소산(perchloric acid)으로 산성화한 후 얼음 위에 두었다. 이후 세포 현탁액(cell suspension)을 4 mM MgSO₄ (pH 7.4)가 포함된 10 mM 글루타민산칼륨(potassium glutamate) 완충액에 희석하였다, 희석한 세포 현탁액 10 ml에 20 mg/ml 루시페린-루시페라제 반응액 100 ml를 첨가하고 20초 후 광 방출을 루미노미터(MicroLumat LB96P, Berthold, Germany)로 측정하였다.

미토콘드리아 막전위의 측정

미토콘드리아 막전위는 형광 색소 DiOC₆(3)을 사용하여 분석하였다. DiOC₆(3)는 미토콘드리아 막전위에 의존하여 미토콘드리아에 축적되며, 음전위가 클수록 축적 정도도 커진다. 따라서 세포에서 DiOC₆(3) 형광 신호의 변화를 공초점현미경이나 유세포 분석기 등으로 분석하면 미토콘드리아 막전위의 변화를 추산할 수 있다. 암실에서 세포에 50 nM의 최종 농도로 DiOC₆(3)를 20분 동안 부하시켰다. 세포를 세척한 후 PBS에 재현탁하고, FACsort (Becton, Dickinson and Company) 유세포분석기를 사용하여 DiOC₆(3) 형광 신호를 분석하였다.

반응성 산소종의 측정

세포 내 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성은 DCF 형광 분석법으로 측정하였다. 비형광 에스테르형인 DCFH-DA는 세포 내로 들어가면 세포 내 에스테라제(esterases)에 의해 DCFH로 가수분해된다. DCFH는 세포 내 반응성 산소종과 반응하여 고형광성의 2',7'-DCF로 빠르게 산화된다. 24웰 플레이트에 배양한 세포를 암실에서 30 mM의 DCFH-DA가 포함된 반응액에서 37°C에서 1시간 동안 배양하여 DCFH-DA를 부하시켰다. 세포를 세척한 후 PBS에 재현탁하고, FACsort(Becton, Dickinson and Company) 유세포분석기를 사용하여 DCF 형광 신호를 분석하였다.

미토콘드리아 Ca²⁺ 부하의 측정

미토콘드리아 Ca²⁺ 부하는 rhod2 형광분석법으로 측정하였다. 미토콘드리아 내rhod2의 축적을 확인하기 위하여 세포를 rhod2/AM과 미토콘드리아를 표적으로 축적되는 MTG를 이중 부하하고 공초점현미경(confocal microscope)

으로 분석하여 두 형광신호를 분석하였다. 24웰 플레이트에 배양한 세포에 암실에서 3 mM의 최종 농도로 DCFH-DA와 MTG가 포함된 배양액에서 37°C에서 30분간 색소를 부하시켰다. 세포를 세척한 후 PBS에 재현탁하고, FACsort (Becton, Dickinson and Company) 유세포분석기를 사용하여 DCF 형광 신호를 분석하였다. 공초점현미경을 이용한 분석 시에는 콜라젠으로 코팅하여 6웰 플레이트에 설치한 유리 커버글라스에 배양한 세포를 사용하였다.

카스파아제-3 활성의 측정

카스파아제-3(caspase-3) 활성은 비색 분석 키트(R&D Systems)를 사용하여 제조업체의 설명서에 따라 측정하였다. 배양액에 포함된 세포를 250 g에서 원심분리하고 상층액을 부드럽게 제거하여 세포들을 모았다. 세포 침전물에 세포 용해 완충액을 첨가하여 4°C에서 10분간 용해시켰다. 이후 세포 용해물을 카스파제-3 비색 기질인 DEVD-pNA와 함께 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 카스파아제-3 활성에 의한 펩티드 절단 정도를 405 nm의 파장에서 분광광도계로 측정하여 정량화하였다.

세포사멸의 측정

세포사멸은 Hoechst-33258로 염색법으로 분석하였다. 형광현미경 분석을 위해 콜라젠으로 코팅하여 6웰 플레이트에 설치한 유리 커버글라스에 세포를 배양하여 사용하였다. 배양 후 실험 절차를 거친 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 5 mM Hoechst-33258를 포함한 HBSS에서 37°C에서 30분간 반응시켰다. 커버글라스와 세포를 세척 후 PBS:글리세롤(1:1) 용액을 사용하여 슬라이드 유리 위에 장착한 후 형광 현미경으로 관찰하였다. 응축되거나(condensed) 파편화된(fragmented) 핵이 관찰되는 세포를 세어 세포사멸의 정도를 분석하였다.

통계 처리

실험 결과는 평균 ± S.E.M.로 나타내었으며, 두 그룹 간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 평가하였다. 다중 그룹 비교는 일원분산분석(ANOVA test)과 Tukey 사후테스트(Tukey post hoc test)를 사용하여 평가하였다. *p* 값이 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의한 수준의 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

MTT 환원능에 미치는 A_β의 효과

MTT 환원능에 미치는 효과를 측정하여 A_β에 의한 미토콘드리아의 기능적 손상의 정도를 관찰하였다. 본 연구에서는 온전한 길이의 A_β, 즉 A_{β1-40/42} 대신 A_{β25-35}의 11개 아미노산으로 구성된 짧은 길이의 A_β를 사용하였다. A_{β25}

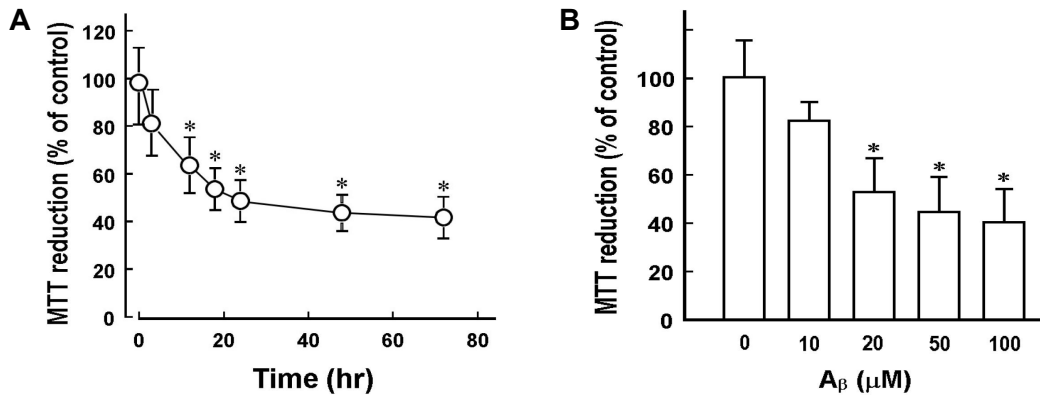


Fig. 1. Effect of A β on MTT reduction ability. (A) Time-dependent effect of A β . Cells were treated with 50 μ M A β for the indicated time periods. (B) Dose-dependent effect of A β . Cells were treated with the indicated concentrations of A β for 48 hr. Data are represented as the mean \pm the standard error of the mean of 5 repeats. * p <0.01 vs. the respective control. A β , amyloid beta peptide.

~35는 다수의 연구에서 채택되어 사용된 바 있으며, A $\beta_{1-40/42}$ 에 상응하는 효과를 나타내는 것으로 입증된 바 있다[17, 23, 26]. A β 처리 세포에서 MTT 환원능은 처리 용량과 시간에 의존적으로 감소하였다(Fig. 1A, 1B). A β 는 처리 시간 약 48시간과 처리 용량 약 50 μ M 이상에서 최대 효과를 나타내었다. A β 의 효과를 관찰하는 후속 실험에서는 달리 명시하지 않는 한 50 μ M의 농도와 48시간의 처리 시간을 사용하였다.

FUNDC1 발현에 미치는 A β 의 효과

FUNDC1 발현에 미치는 A β 의 효과를 시간에 따라 관찰하였다. A β 처리 시 시간에 의존적으로 FUNDC1의 발현이 감소됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A). FUNDC1 발현에 미치는 A β 의 효과가 세포 혹은 미토콘드리아 손상과 연관

되어 나타나는 비특이적인 현상인지를 확인하고자 FUNDC1의 작용과 유사하게 미토콘드리아 외막에서 마이토파지 기전 조절에 관여하는 것으로 알려진[1, 2, 7] PINK1, BNIP3 단백질의 발현에 영향을 미치는 지 확인하였다. 그 결과 A β 는 이들 두 단백질의 발현에는 의미 있는 변화를 주지 못하였다(Fig. 2A).

FUNDC1의 일시적 발현 차단 및 과발현 세포군에서 A β 의 효과

A β 에 의한 미토콘드리아의 기능 저해 효과에 FUNDC1의 관여 여부와 역할을 확인하기 위하여 FUNDC1 siRNA와 FUNDC1-Myc을 유전자 주입하여 FUNDC1의 발현을 일시적으로 차단 혹은 과발현시킨 세포를 제작하였다. 이들 세포군에서 FUNDC1의 발현 변화를 확인하고, 이에

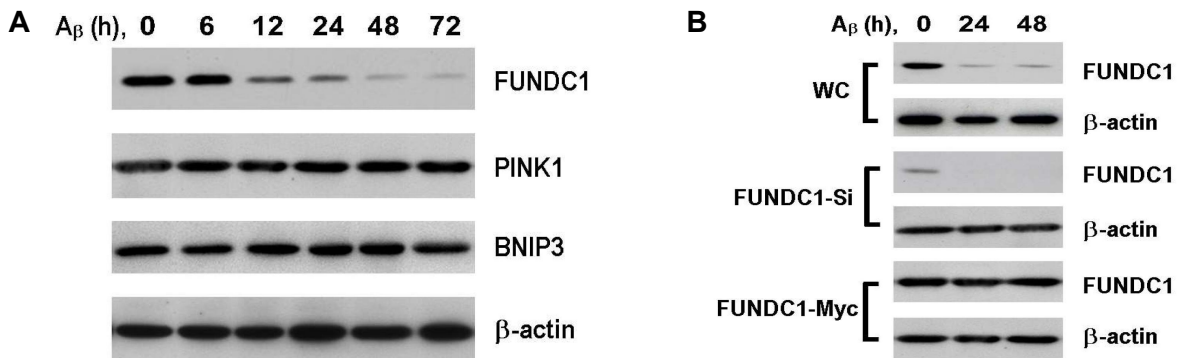


Fig. 2. Changes in FUNDC1 protein levels caused by A β treatment in wild type control cells, FUNDC1 siRNA-transfected cells, and FUNDC1-Myc-transfected cells. (A) Wild type control cells were treated with 50 μ M A β for indicated time periods, and then Western blot analyses were performed to determine the protein levels of FUNDC1, PINK1, BNIP3, and b-actin. (B) Wild type control cells, FUNDC1 siRNA-transfected cells, and FUNDC1-Myc-transfected cells were treated with 50 μ M A β for indicated time periods, and then Western blot analyses were performed to determine the protein levels of FUNDC1. A β , amyloid beta peptide; WC, wild type control, FUNDC1-Si, FUNDC1 siRNA-transfected; FUNDC1-Myc, FUNDC1-Myc-transfected; PINK1, PTEN-induced kinase 1; BNIP3, BCL2 interacting protein 3.

미치는 A_{β} 의 효과를 확인하였다. 유전자 주입 과정에서 사용하는 도구(tool) 혹은 조작(manipulation) 자체가 FUNDC1 발현에 영향을 줄 수도 있으므로 그 가능성을 배제하고자 파괴, 변질시킨(scrambled) siRNA 혹은 FUNDC1이 빠진(empty) 플라스미드를 유전자 주입하여 FUNDC1의 발현에 영향을 미치는 지를 확인하였다. 그 결과 이들 세포군에서는 유전자 주입 조작을 하지 않은 대조 세포군과 비교하여 FUNDC1의 발현에 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 siRNA 혹은 FUNDC1-Myc 유전자 주입 세포군을 관찰하는 실험 모두에서 유전자 주입 조작을 하지 않은 정상 세포군을 야생형 대조 세포군(wild type control)으로 사용하였다.

FUNDC1 siRNA를 유전자 주입한 세포군에서는 FUNDC1의 발현이 현저하게 억제되어 있으며, 반대로 FUNDC1-Myc을 유전자 주입한 세포군에서는 FUNDC1의 발현이 현저하게 증가해 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 특히 FUNDC1 과발현 세포군에서는 A_{β} 를 처리하더라도 증가된 FUNDC1 발현을 감소시키지 못하였다. 그러나 대조 세포군에서는 A_{β} 처리시 FUNDC1 발현이 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

FUNDC1의 일시적 발현 차단 및 과발현 세포에서 MTT 환원능과 세포 내 ATP 농도의 변화

FUNDC1을 일시적 발현 차단 혹은 과발현시킨 세포군에서 미토콘드리아의 기능적 지표인 MTT 환원능과 세포 내 ATP 농도의 변화를 관찰하였다. 대조세포군에 A_{β} 를 처리하면 MTT 환원능의 저하와(Fig. 3A) 함께 세포 내

ATP 농도의 현저한 감소가(Fig. 3B) 관찰되었다. FUNDC1 발현을 일시적 차단한 세포군에서는 그 자체로 MTT 환원능과 세포 내 ATP 농도의 현저한 저하가 관찰되었으며, 이들 세포군에서는 A_{β} 를 처리 시 이들 지표들에 부가적인 변화는 나타나지 않았다. 한편 FUNDC1을 일시적 과발현시킨 세포군에서는 그 자체로 MTT 환원능과 세포 내 ATP 농도에 영향을 주지 못하였다. 하지만 이들 세포군에서는 A_{β} 처리에 의한 이들 지표들의 저하를 유의하게 완화시키는 효과를 보였다(Fig. 3A, 3B).

미토콘드리아 막전위 및 반응성 산소종 생성에 미치는 효과

FUNDC1을 일시적 발현 차단 혹은 과발현시킨 세포군에서 미토콘드리아의 기능적 지표인 미토콘드리아 막전위와 반응성 산소종 생성에 미치는 효과를 유세포분석법으로 관찰하였다. 대조세포군에 A_{β} 를 처리 시 미토콘드리아 막전위의 감소와(Fig. 4A 윗 패널, Fig. 4B) 반응성 산소종 생성의 증가(Fig. 4A 아래 패널, Fig. 4C) 관찰되었다. FUNDC1 발현을 일시적으로 차단한 세포군에서는 그 자체로 미토콘드리아 막전위의 감소와 반응성 산소종 생성의 증가 효과를 보였다. 이들 세포군에 A_{β} 를 처리 시 미토콘드리아 막전위와 반응성 산소종 생성에 작지만 추가적인 변화(미토콘드리아 막전위의 감소와 반응성 산소종 생성의 증가)를 보였으나 통계학적으로 유의한 변화는 아니었다(Fig. 4B, 4C). 한편 FUNDC1을 일시적 과발현시킨 세포군에서는 A_{β} 처리에 의한 이들 지표들의 변화(미토콘드리아 막전위의 감소와 반응성 산소종 생성의 증가)를 유의하게 억제하는 효과를 보였다(Fig. 4B, 4C).

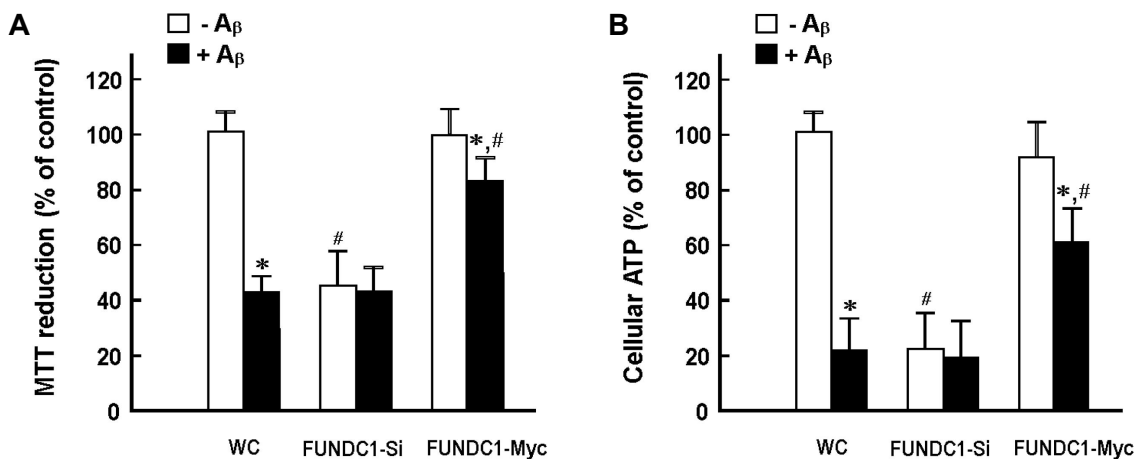


Fig. 3. A_{β} -induced mitochondrial dysfunction estimated by reduced MTT reduction ability and decreased cellular ATP concentration. (A) Wild type control cells and FUNDC1 siRNA- or FUNDC1-Myc-transfected cells were treated with 50 μ M A_{β} for 48 hr, and then MTT reduction ability was determined by a colorimetric assay. (B) Wild type control cells, FUNDC1 siRNA- or FUNDC1-Myc-transfected cells were treated with 50 μ M A_{β} for 48 hr, and then cellular ATP content was measured using a luciferin-luciferase assay. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean of 4 repeats. * p <0.01 vs. A_{β} -untreated (- A_{β}) group; # p <0.01 vs. the respective WC group. A_{β} , amyloid beta peptide; WC, wild type control, FUNDC1-Si, FUNDC1 siRNA-transfected; FUNDC1-Myc, FUNDC1-Myc-transfected.

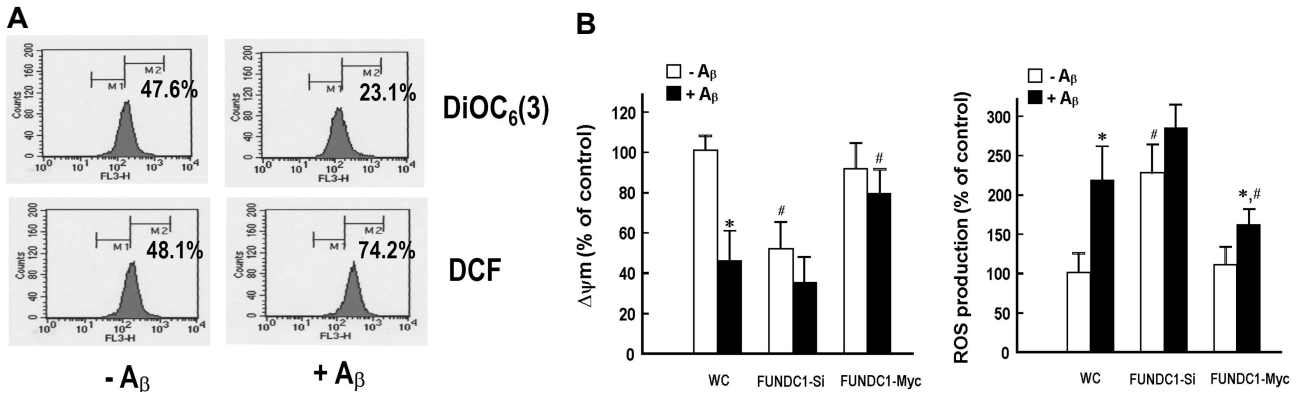


Fig. 4. A_β-induced mitochondrial dysfunction estimated by reduced mitochondrial membrane potential and increased ROS production. (A) Representative graphs of the flow cytometry analyses of DiOC₆(3) and DCF fluorescence to measure the changes in mitochondrial membrane potential and ROS production, respectively. Cells were treated with 50 μM A_β for 48 hr, loaded with DiOC₆(3) or DCFH/DA, and then flow cytometry was performed. (B) Δψ_m estimated from the flow cytometry analyses was presented in arbitrary unit. (C) ROS production estimated from the flow cytometry analyses was presented in arbitrary unit. Data are presented as the mean ± standard error of the mean of 5 repeats. **p*<0.01 vs. A_β-untreated (-A_β) group; #*p*<0.01 vs. the respective WC group. DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; Δψ_m, mitochondrial membrane potential; A_β, amyloid beta peptide; WC, wild type control, FUNDC1-Si, FUNDC1 siRNA-transfected; FUNDC1-Myc, FUNDC1-Myc-transfected.

미토콘드리아 Ca²⁺ 부하의 변화

Fig. 5A에 나타난 결과는 대조 세포군을 rhod2와 MTG로 이중 염색한 후 공초점현미경으로 관찰한 결과로, rhod2가 MTG와 함께 미토콘드리아에 효과적으로 부하됨을 확인할 수 있다. 이는 rhod2 형광 분석법이 미토콘드리아 Ca²⁺ 부하를 평가하는 유용한 지표임을 확인해준다. 공초점 현미경 관찰 결과에서 대조세포군에 A_β를 처리 시 미토콘드리아 Ca²⁺ 부하가 증가함을 확인할 수 있다(Fig. 5A). Rhod2 염색 세포를 유세포분석기로 분석한 결과에서도 동일한 결과를 확인할 수 있다. Fig. 5B에 나타난 유세포분석 그래프에서 A_β를 처리한 세포군에서 rhod2 형광 신호가 강한 오른쪽 영역으로 우편위가 일어남(41.2%에서 67.5%)로 관찰할 수 있는데, 이는 미토콘드리아 Ca²⁺ 부하가 증가함을 의미한다.

FUNDC1을 일시적 발현 차단 혹은 과발현시킨 세포군에서 미토콘드리아 Ca²⁺ 부하의 변화와 A_β의 효과를 유세포분석법으로 분석한 결과를 종합하여 Fig. 5C에 나타내었다. FUNDC1발현을 일시적 차단한 세포군에서 미토콘드리아 Ca²⁺ 부하의 감소가 관찰되었으며, 이들 세포군에 A_β를 처리 시 대조 세포군에 A_β를 처리 시 나타나는 크기에 상응하는 정도의 미토콘드리아 Ca²⁺ 부하의 증가를 보였다(Fig. 5C). 한편 FUNDC1을 일시적 과발현시킨 세포군에서는 그 자체로 미토콘드리아 Ca²⁺ 부하에 영향을 주지 못하였다. 하지만 이들 세포군에서는 A_β 처리에 의한 미토콘드리아 Ca²⁺ 부하의 증가를 유의하게 억제하는 효과를 보였다(Fig. 5C).

카스파아제-3 활성 및 세포사멸에 미치는 효과

앞에서 설명한 미토콘드리아의 기능적 손상이나 변화들이 세포사멸에 대한 변화로 이어지는지 확인하고자 카스파아제-3 활성과 Hoechst 염색법으로 세포사멸에 미치는 효과를 확인하였다. FUNDC1발현을 일시적 차단한 세포군에서는 그 자체로 카스파아제-3활성(Fig. 5)과 세포사멸을(Fig. 5B, 5C) 현저히 증가시켰으며, 이들 세포군에서는 A_β를 처리 시 이들 지표들에 부가적인 변화는 나타나지 않았다. 한편 FUNDC1을 일시적 과발현시킨 세포군에서는 그 자체로 카스파아제-3활성(Fig. 5A)과 세포사멸에(Fig. 5C) 영향을 주지 못하였다. 하지만 이들 세포군에서는 A_β 처리에 의한 이들 지표들의 증가를 유의하게 억제하는 효과를 보였다(Fig. 5A, 5C).

고 찰

본 연구에서는 해마 뉴런 기원의HT-22 세포에서[8] A_β 펩티드에 의한 미토콘드리아와 세포 손상 과정에 FUNDC1의 관련 가능성과 역할을 조사하였다. 연구에는 온전한 길이(full length)의 A_β, 즉 A_β1-40/42 대신 11개 아미노산으로 구성된 단축 A_β 펩티드, A_β25-35를 사용하였다. A_β1-40/42는 신경 독성을 유발하는데 필수적 과정인 응집이 일어나기까지 노화변성(aging) 과정이 필요해 시간이 소요된다. 반면에 A_β25-35는 이러한 과정 없이 빠르게 응집되어 β-주름시트 구조를 형성하기 때문에, 상대적으로 빠른 시간에 독성 작용의 관찰이 가능하다. 이 점이 본 연구에서 A_β25-35를 사용한 이유이다. A_β25-35는 A_β의 생물학적 작용을 연구

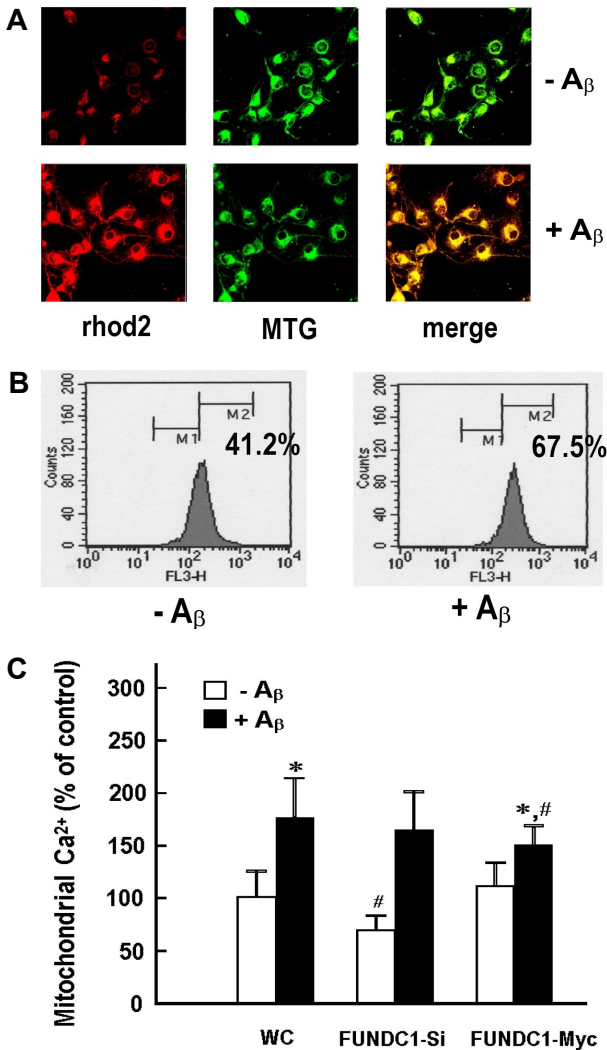


Fig. 5. A_β-induced changes in mitochondrial Ca²⁺ load. (A) Representative confocal microscopic images of the cells that were double stained with rhod2/AM and MTG. Cells grown on collagen-coated glass cover slips were treated with 50 μM A_β for 48 hr, loaded with rhod2/AM and MTG, and then examined under a confocal microscope. (B) Representative graphs of the flow cytometry analyses of rhod2 fluorescence to measure the changes in mitochondrial Ca²⁺ load. (C) Mitochondrial Ca²⁺ load estimated from the flow cytometry analyses was presented in arbitrary unit. Data are presented as the mean ± standard error of the mean of 5 repeats. **p*<0.01 vs. A_β-untreated (- A_β) group; #*p*<0.01 vs. the respective WC group. MTG, Mitotracker green; A_β, amyloid beta peptide; WC, wild type control, FUNDC1-Si, FUNDC1 siRNA-transfected; FUNDC1-Myc, FUNDC1-Myc-transfected.

하는 다수의 비생체(*in vitro*) 연구에서 채택되어 사용되었으며, A_{β1-40/42}에 상응하는 생물학적 효과를 나타내는 것으로 확인된 바 있다[17, 22, 26]. 해마 신경세포에서도 A_{β25-35}

가 A_{β1-40/42}에 상응하는 강도의 독성 작용을 유발하는 것으로 보고되었다[25].

지금까지 많은 연구들에서 미토콘드리아가 알츠하이머병과 관련된 병리 기전의 촉발(triggering), 증재, 악화 등에 중요한 역할을 할 수 있음이 제시되었다[16, 18, 31]. 최근에는 알츠하이머병 뿐만 아니라 파킨슨병, 당뇨병 뇌 질환 등 다양한 신경퇴행성 질환들에서 미토콘드리아가 핵심적 역할을 하며, 따라서 미토콘드리아가 이들 질환들을 완화, 치료 혹은 예방하는 전략적 도구 개발의 목표가 될 수 있음이 제시되었다[16]. 본 연구에서도 A_β로 처리한 HT-22 세포에서 미토콘드리아의 기능적 지표들, 즉 MTT 환원능, 세포 내 ATP 농도, 미토콘드리아 막전압이 감소함을 확인하였다(Fig. 3, 4). 또한 반응성 산소종 생성의 증가, 미토콘드리아 Ca²⁺ 부하의 증가를 동반하는 결과를 보였다(Fig. 4, 5).

신경퇴행성 질환들에서 이러한 기능적 지표들의 변화가 단순히 질환의 진행 과정에 동반되어 나타나는 미토콘드리아의 손상을 수동적으로 반영하는 것이 아니고, 질환과 관련된 핵심 병리 기전을 촉발하거나 매개할 수 있음은 앞에서 설명한 바와 같다[16, 18, 31]. 이 과정에서 미토콘드리아와 연관된 핵심 병리 기전의 하나가 세포사멸이다. 미토콘드리아 손상과 관련되어 위에서 제시한 기능적 지표들의 변화와 동반하여 세포사멸로 진행되는 과정은 비교적 잘 밝혀져 있다. 미토콘드리아 막전위의 변화, Ca²⁺부하의 증가, 반응성 산소종 생성의 증가 등 미토콘드리아의 기능적 지표들의 변화에 동반, 혹은 기인하여 미토콘드리아의 팽대(swelling)와 미토콘드리아 내막의 투과도 증가가 유발되는 것으로 알려져 있다. 이러한 특징적인 투과도 변화는 미토콘드리아 막투과도 전이 통로(mitochondrial permeability transition pore, MPT 통로)의 형성에 기인한다[4, 9]. MPT 통로의 형성은 치토크롬 c의 유리, 아포토솜(apoptosome)의 형성, 카스파아제의 단계적 활성화로 이어지며, 최종적으로 카스파아제-3가 활성화되어 세포사멸이 실행된다. 본 연구에 나타난 결과에서도 A_β에 의한 미토콘드리아의 기능 손상을 반영하는 일련의 지표들의 변화와 동반되어 카스파아제-3의 활성화와 세포사멸이 진행됨을 확인할 수 있다(Fig. 6).

미토콘드리아의 기능적, 형태학적 무결성의 유지에 가장 중요한 역할을 하는 세포 기전은 마이토파지이다. 마이토파지는 손상되거나 기능 장애가 있는 미토콘드리아를 선택적으로 자가포식하는 과정이다. 이 기전을 통해 세포는 기능적, 형태학적 손상이 있는 미토콘드리아를 제거하고, 미토콘드리아의 에너지 생산성, 산화/환원 전위(redox potential), 미토콘드리아 DNA의 무결성 등을 유지하게 하며, 세포사멸을 방지한다[21, 24]. 이러한 마이토파지 기전은 알츠하이머병을 포함한 신경질환에서도 중요한 역할을 함이 알려져 있다[10, 35]. 이처럼 미토콘드리아

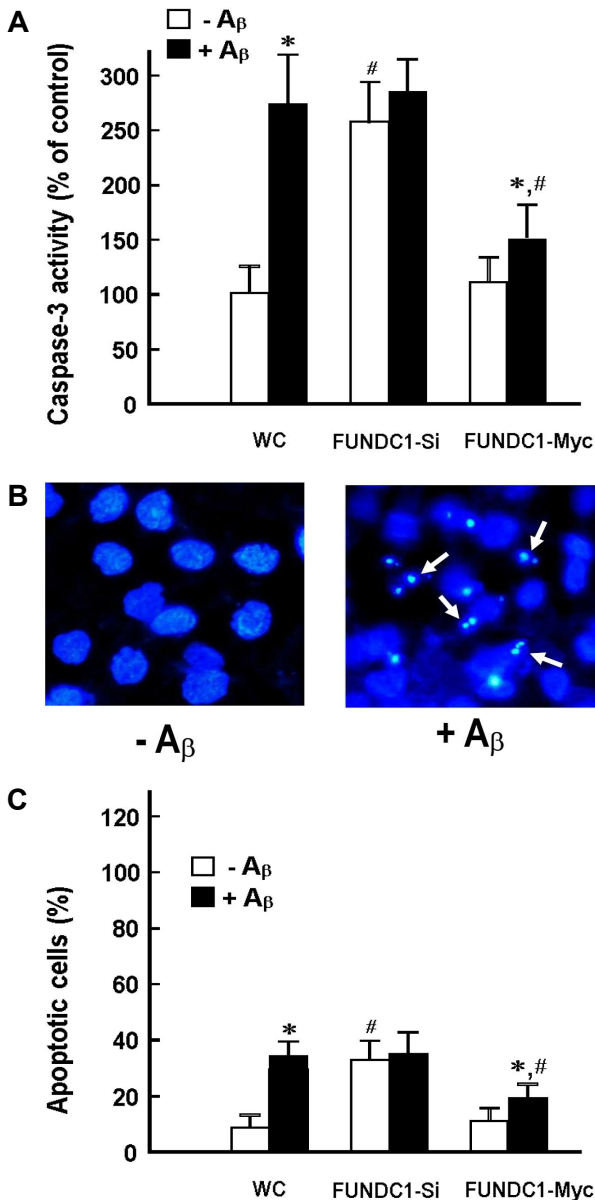


Fig. 6. A β -induced changes in caspase-3 activity and apoptotic cell death. (A) Wild type control cells, FUNDC1 siRNA- or FUNDC1-Myc-transfected cells were treated with 50 μ M A β for 48 hr. Cells were then collected by centrifugation and lysed in a lysis buffer and caspase-3 activity was determined by a colorimetric assay. (B) Apoptosis was analyzed by microscopic examination of Hoechst-33258 stained cells. Arrows in the representative micrographs indicate apoptotic cells that show condensed or fragmented nuclei. (C) The number of counted apoptotic cells is presented as a percentage of the total number of cells. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean of 4 repeats. * p <0.01 vs. A β -untreated (- A β) group; # p <0.01 vs. the respective WC group. A β , amyloid beta peptide; WC, wild type control, FUNDC1-Si, FUNDC1 siRNA-transfected; FUNDC1-Myc, FUNDC1-Myc-transfected.

기능 손상과 미토파지가 알츠하이머병의 병리 기전에 중요한 역할을 한다면 미토파지 기전의 중요한 조절 인자인 FUNDC1도 그 병리 기전에 중요한 역할을 할 가능성이 높다.

FUNDC1은 세포의 선택적 자가포식(autophagy) 기전의 한 형태인 미토파지의 핵심 조절자로 처음 확인되었다 [13]. FUNDC1의 주요 기능은 손상된 미토콘드리아를 인식하여 제거함으로써 미토콘드리아의 전반적인 기능적, 형태학적 무결성을 유지하는 것이다. FUNDC1은 인산화/탈인산화에 의해 미토파지를 억제 또는 활성화하는데, 미토콘드리아에 기능적, 형태학적 손상이 초래되면 FUNDC1이 탈인산화되고, 이는 자가포식소체(autophagosome)의 단백질 표지자(marker), LC3-II와의 결합을 촉진하여 미토파지 기전을 활성화시킨다[12, 21, 24]. FUNDC1의 발현이 감소하거나 기능이 저하되면 손상된 미토콘드리아를 제거하는 세포의 능력이 저해되어 장애가 있는 미토콘드리아가 축적되고, 이는 다양한 질병들의 병리 기전에 기여할 수 있다.

본 연구에서 FUNDC1이 A β 에 의한 미토콘드리아와 세포 손상의 기전에 중요한 역할을 할 가능성을 제시하는 결과들을 확인하였다. 첫째, A β 를 처리한 신경세포에서 FUNDC1의 발현이 처리 시간에 의존적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 2). 미토콘드리아 외막에 존재하는 또다른 유비퀴틴-의존성 미토파지 조절 단백질, PINK1과[1, 2, 7] 유비퀴틴-비의존성 미토파지 조절 단백질의 하나로 알려진 BNIP-3의[1, 2, 7] 발현에는 변화가 없었다. 이는 A β 에 의한 FUNDC1의 발현 감소가 미토콘드리아의 형태학적 손상에 동반되는 비특이적 소실에 의한 결과가 아님을 시사한다. 이 결과에서 A β 처리 시 PINK1과 BNIP-3의 발현에는 변화 없이 FUNDC1의 발현에만 영향을 미치는 점도 흥미로운 결과이다. A β 에 의한 FUNDC1 발현 감소에 관여하는 표적 단계나, 기전, 미토파지 조절 단백질들의 발현에 미치는 효과의 차이도 본 연구의 결과만으로 확인하기는 어렵다. 하지만 FUNDC1이 PINK1 또는 BNIP-3과 다르게 소포체-미토콘드리아 연결막(mitochondria-associated membrane, MAM) 형성에 관여한다는 점을 고려하면[30, 32] A β 에 의한 FUNDC1 발현 감소가 소포체 스트레스(ER stress)와 연관이 있을 수도 있으며 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다. 둘째, siRNA를 유전자 주입하여 FUNDC1의 발현을 일시적으로 차단하면, 그 자체로 미토콘드리아의 기능 손상을 나타내는 지표 변화들과 세포사멸의 증가가 관찰되었다(Fig. 3, 4, 6). 셋째, FUNDC1-Myc을 유전자 주입하여 FUNDC1을 일시적으로 과발현시킨 세포에서 그 자체로는 미토콘드리아의 기능적 지표들에 변화가 관찰되지 않았으나, 이들 세포군에 A β 를 처리하면 A β 에 의한 미토콘드리아의 기능적 손상과 세포 사멸이 현저하게 억제되었다. 이들 결과는 FUNDC1

이 A β 에 의한 미토콘드리아와 세포 손상의 기전에 중요하게 관여할 가능성을 제시한다.

마이토파지 조절과 함께 FUNDC1의 또 다른 알려진 기능이 소포체(endoplasmic reticulum)와 미토콘드리아 사이의 연결막 형성이다. 소포체-미토콘드리아의 연결 부위를 미토콘드리아 연결막(mitochondria-associated membrane, MAM)이라고 한다[30, 32]. MAM의 형성은 세포 내 Ca²⁺ 이동과, 미토콘드리아 분열, 융합, 세포사멸, 마이토파지 제어에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[30, 32]. MAM의 형성에는 FUNDC1을 포함하여 VDAC1, FACL4, 칼넥신, 이노시톨 1, 4, 5-트리포스페이트 수용체(IP3R) 등 여러 단백질들이 관여하는 것으로 보고되었다[30, 32].

FUNDC1이 MAM을 통하여 소포체와 미토콘드리아의 Ca²⁺ 교통에 관여한다는 사실을 전제한다면, FUNDC1의 발현을 일시 차단한 세포에서 미토콘드리아의 Ca²⁺ 부하 감소(Fig. 5)는 소포체와의 Ca²⁺ 교통로 차단에 의한 결과로 추정할 수 있다. 안정 상태에서는 세포질의 Ca²⁺ 농도가 매우 낮은 수준을 유지하고 있으므로 미토콘드리아의 Ca²⁺ 부하에 세포질의 Ca²⁺은 영향이 미미할 것이다. 따라서 이 경우 미토콘드리아의 Ca²⁺ 부하는 주로 소포체와의 Ca²⁺ 교통에 영향을 받으며, 소포체와의 Ca²⁺ 교통로 차단은 미토콘드리아 Ca²⁺ 부하를 감소시킬 것으로 추정할 수 있다. 그러나 A β 를 처리한 세포에서는 세포외부로부터 Ca²⁺ 유입이 증가하여 세포질의 Ca²⁺ 농도가 급격하게 증가하며[28, 31], 이러한 환경에서는 미토콘드리아의 Ca²⁺ 부하가 소포체보다 세포질의 Ca²⁺ 환경에 더 영향을 받을 것이다. FUNDC1이 일시적으로 과발현된 세포에서 A β 에 노출되더라도 MAM의 기능이 유지된다면 소포체는 증가한 미토콘드리아의 Ca²⁺ 부하를 완충하는 기전으로 작용할 수 있을 것이다. 본 연구의 결과에서 FUNDC1의 발현을 일시적으로 차단한 세포군에서 미토콘드리아 Ca²⁺ 부하가 유의하게 감소하는 소견을 보였고, FUNDC1을 일시적으로 과발현시킨 세포군에서는 A β 처리에 의한 Ca²⁺ 부하의 증가가 유의하게 억제되는 소견을 보였는데(Fig. 5), 이는 위의 추론을 뒷받침하는 결과들로 사료된다.

본 연구의 결과들을 요약하면, 해마 뉴런 기원의 HT-22 세포에서 A β 펩티드를 처리하면 처리 시간에 의존적으로 FUNDC1의 발현 감소와 함께, 미토콘드리아의 기능적 손상을 나타내는 지표들의 변화와 세포사멸의 증가가 관찰되었다. FUNDC1의 발현을 일시적으로 차단한 세포군에서도 A β 펩티드를 처리한 세포와 유사한 양상의 미토콘드리아의 기능적 지표들의 변화와 세포사멸의 증가 소견을 보였다. 반면에 FUNDC1을 일시적으로 과발현시킨 세포군에서는 A β 처리에 의한 미토콘드리아 손상과 세포 사멸이 현저히 억제되었다. 이와 같은 결과들은 A β 에 의한 미토콘드리아와 세포손상 기전에 FUNDC1이 중요하게 관여함을 시사한다.

감사의 글

이 과정은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

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

References

1. Ashrafi, G. and Schwarz, T. L. 2013. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* **20**, 31-42.
2. Belousov, D. M., Mikhaylenko, E. V., Somasundaram, S. G., Kirkland, C. E. and Aliev, G. 2021. The Dawn of Mitophagy: What Do We Know by Now? *Curr. Neuropharmacol.* **19**, 170-192.
3. Bondi, M. W., Edmonds, E. C. and Salmon, D. P. 2017. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **23**, 818-831.
4. Bonora, M., Patergnani, S., Ramaccini, D., Morciano, G., Pedriali, G., Kahsay, A. E., Bouhamida, E., Giorgi, C., Wieckowski, M. R. and Pinton, P. 2020. Physiopathology of the Permeability Transition Pore: Molecular Mechanisms in Human Pathology. *Biomol.* **10**, 998.
5. Cai, C., Guo, Z., Chang, X., Li, Z., Wu, F., He, J., Cao, T., Wang, K., Shi, N., Zhou, H., Toan, S., Muid, D. and Tan, Y. 2022. Empagliflozin attenuates cardiac microvascular ischemia/reperfusion through activating the AMPK α 1/ULK1/FUNDC1/mitophagy pathway. *Redox Biol.* **52**, 102288.
6. Cai, Y., Yang, E., Yao, X., Zhang, X., Wang, Q., Wang, Y., Liu, J., Fan, W., Yi, K., Kang, C. and Wu, J. 2021. FUNDC1-dependent mitophagy induced by tPA protects neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury. *Redox Biol.* **38**, 101792.
7. Choubey, V., Zeb, A. and Kaasik, A. 2021. Molecular Mechanisms and Regulation of Mammalian Mitophagy. *Cells* **11**, 38.
8. Davis, J. B. and Maher, P. 1994. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* **652**, 169-173.
9. Hunter, D. R., Haworth, R. A. and Southard, J. H. 1976. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J. Biol. Chem.* **251**, 5069-5077.
10. Kerr, J. S., Adriaanse, B. A., Greig, N. H., Mattson, M. P., Cader, M. Z., Bohr, V. A. and Fang, E. F. 2017. Mitophagy and Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Mechanisms. *Trends Neurosci.* **40**, 151-166.
11. Lane, C. A., Hardy, J. and Schott, J. M. 2018. Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* **25**, 59-70.

12. Liu, H., Zang, C., Yuan, F., Ju, C., Shang, M., Ning, J., Yang, Y., Ma, J., Li, G., Bao, X. and Zhang, D. 2022. The role of FUNDC1 in mitophagy, mitochondrial dynamics and human diseases. *Biochem. Pharmacol.* **197**, 114891.
13. Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., Huang, L., Xue, P., Li, B., Wang, X., Jin, H., Wang, J., Yang, F., Liu, P., Zhu, Y., Sui, S. and Chen, Q. 2012. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nature Cell Biol.* **14**, 177-185.
14. Lyman, G. E. and DeVincenzo, J. P. 1967. Determination of picogram amounts of ATP using the luciferin-luciferase enzyme system. *Anal. Biochem.* **21**, 435-443.
15. Ma, W., Su, Y., Zhang, P., Wan, G., Cheng, X., Lu, C. and Gu, X. 2023. Identification of mitochondrial-related genes as potential biomarkers for the subtyping and prediction of Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* **16**, 1205541.
16. Macdonald, R., Barnes, K., Hastings, C. and Mortiboys, H. 2018. Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: can mitochondria be targeted therapeutically? *Biochem. Soc. Trans.* **46**, 891-909.
17. Mark, R. J., Pang, Z., Geddes, J. W., Uchida, K. and Mattson, M. P. 1997. Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *J. Neurosci.* **17**, 1046-1054.
18. Monzio Compagnoni, G., Di Fonzo, A., Corti, S., Comi, G. P., Bresolin, N. and Masliah, E. 2020. The Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: the Lesson from Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Mol. Neurobiol.* **57**, 2959-2980.
19. Morgan, D. M. 1998. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol. Biol.* **79**, 179-183.
20. Ning, P., Jiang, X., Yang, J., Zhang, J., Yang, F. and Cao, H. 2022. Mitophagy: A potential therapeutic target for insulin resistance. *Front. Physiol.* **13**, 957968.
21. Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N. and Okamoto, K. 2021. Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *EMBO J.* **40**, e104705.
22. Pei, Z., Liu, Y., Liu, S., Jin, W., Luo, Y., Sun, M., Duan, Y., Ajuolabady, A., Sowers, J. R., Fang, Y., Cao, F., Xu, H., Bi, Y., Wang, S. and Ren, J. 2021. FUNDC1 insufficiency sensitizes high fat diet intake-induced cardiac remodeling and contractile anomaly through ACSL4-mediated ferroptosis. *Metabol.* **122**, 154840.
23. Pereira, C., Santos, M. S. and Oliveira, C. 1999. Involvement of oxidative stress on the impairment of energy metabolism induced by A beta peptides on PC12 cells: protection by antioxidants. *Neurobiol. Dis.* **6**, 209-219.
24. Pickles, S., Vigié, P. and Youle, R. J. 2018. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr. Biol. CB* **28**, R170-R185.
25. Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. and Cotman, C. W. 1993. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J. Neurosci.* **13**, 1676-1687.
26. Pike, C. J., Walencewicz-Wasserman, A. J., Kosmoski, J., Cribbs, D. H., Glabe, C. G. and Cotman, C. W. 1995. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem.* **64**, 253-265.
27. Reddy, P. H., Manczak, M., Mao, P., Calkins, M. J., Reddy, A. P. and Shirendeb, U. 2010. Amyloid-beta and mitochondria in aging and Alzheimer's disease: implications for synaptic damage and cognitive decline. *J. Alzheimer's Dis.* **20**, S499-S512.
28. Reitz C. 2012. Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *Int. J. Alzheimer's Dis.* **2012**, 369808.
29. Selkoe, D. J. 1994. Amyloid beta-protein precursor: new clues to the genesis of Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 708-716.
30. Silva-Palacios, A., Zazueta, C. and Pedraza-Chaverri, J. 2020. ER membranes associated with mitochondria: Possible therapeutic targets in heart-associated diseases. *Pharmacol. Res.* **156**, 104758.
31. Swerdlow R. H. 2018. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **62**, 1403-1416.
32. Tagaya, M., and Arasaki, K. 2017. Regulation of Mitochondrial Dynamics and Autophagy by the Mitochondria-Associated Membrane. *Advan. Exp. Med. Biol.* **997**, 33-47.
33. Torres, A. K., Jara, C., Park-Kang, H. S., Polanco, C. M., Tapia, D., Alarcón, F., de la Peña, A., Llanquino, J., Vargas-Mardones, G., Indo, J. A., Inestrosa, N. C. and Tapia-Rojas, C. 2021. Synaptic Mitochondria: An Early Target of Amyloid- β and Tau in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **84**, 1391-1414.
34. Wu, H., Wang, Y., Li, W., Chen, H., Du, L., Liu, D., Wang, X., Xu, T., Liu, L. and Chen, Q. 2019. Deficiency of mitophagy receptor FUNDC1 impairs mitochondrial quality and aggravates dietary-induced obesity and metabolic syndrome. *Autophagy*, **15**, 1882-1898.
35. Zhang, L., Dai, L. and Li, D. 2021. Mitophagy in neurological disorders. *J. Neuroinflamm.* **18**, 297.
36. Zheng, S., Jian, D., Gan, H., Wang, L., Zhao, J. and Zhai, X. 2021. FUNDC1 inhibits NLRP3-mediated inflammation after intracerebral hemorrhage by promoting mitophagy in mice. *Neurosci. Lett.* **756**, 135967.

초록 : HT-22 신경세포에서 아밀로이드 베타 펩티드에 의한 미토콘드리아와 세포 손상 기전에서 FUN14 도메인 함유 단백질 1의 역할

강재훈 · 우재석*

(부산대학교 의과대학 생리학교실)

Fun14 도메인 함유 단백질 1(Fun14 domain-containing protein 1, FUNDC1)은 미토콘드리아 외막에 존재하는 단백질로, 미토콘드리아의 마이토파지(mitophagy) 기전 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 해마 뉴런 기원의 HT-22 세포에서 아밀로이드 베타 펩티드($A\beta$)에 의한 미토콘드리아와 세포 손상 과정에서 FUNDC1의 개재 가능성과 역할을 조사하였다. HT-22 세포에서 $A\beta$ 를 처리하면 처리 시간에 의존적으로 FUNDC1의 발현 감소가 관찰되었다. 또한 MTT 환원능과 세포 내 ATP 농도, 미토콘드리아 막전압의 감소, 반응성 산소종의 생성과 미토콘드리아 Ca^{2+} 부하의 증가 등 미토콘드리아의 기능적 손상을 나타내는 지표들의 변화와 함께 세포사멸의 증가가 관찰되었다. FUNDC1의 발현을 일시적으로 차단한 세포군에서도 미토콘드리아의 기능적 손상을 나타내는 지표 변화와 세포사멸의 증가가 관찰되었다. 반면에 FUNDC1을 일시적으로 과발현시킨 세포군에서는 $A\beta$ 처리에 의한 미토콘드리아 손상과 세포 사멸이 유의하게 억제되었다. 이와 같은 결과들은 $A\beta$ 에 의한 미토콘드리아와 세포 손상 기전에 FUNDC1이 중요하게 관여할 가능성을 시사한다.