

저산소환경이 일차 배양된 대뇌겉질 신경세포의 ubiquitin-proteasome system에 미치는 영향

양성준, 김민정¹, 정호중², 김기찬², 길영기, 김강련, 김 현
고신대학교 의과대학 해부학교실, ¹신경과학교실, ²재활의학교실

간추림 : 저산소환경에 만성으로 노출된 경우 신경세포는 적응하기 위하여 세포 내의 다양한 신호 경로의 활성화를 통해 반응한다. 그 중 ubiquitin-proteasome system은 세포의 생존을 위한 핵심적인 기전으로 proteasome이 억제될 때 비정상적인 단백질이 세포 내에 축적되어 세포자멸사와 신경세포의 퇴행이 일어난다.

이번 실험에서 저자들은 ubiquitin-proteasome system을 억제하는 proteasome 억제제와 저산소환경이 일차 배양된 대뇌 겉질 세포에 미치는 영향을 관찰하였으며, 도파민생성 세포에서의 결과와 비교하였다.

저산소환경이나 합성된 억제제인 PSI (Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-al)를 투여한 신경세포의 자멸사는 증가하였으며, PARP와 caspase 3의 활성도 증가하였다. 특히 NF- κ B의 발현이 PSI를 처리한 경우와 저산소환경에서 증가하였다. 저산소환경에서 배양한 신경세포에 PSI를 처리한 경우에는 이들 단백질의 발현이 현저하게 증가하였다. α -synuclein의 발현 역시 증가하였는데 특히 저산소환경에서 현저하게 증가하였다.

이 실험을 통해 저산소환경과 proteasome 억제제를 처리했을 경우 신경세포의 자멸사가 증가하였을 뿐 아니라, α -synuclein의 생성 및 NF- κ B의 발현이 증가하였음을 확인하였다. 이를 통해 저산소환경이 ubiquitin-proteasome system을 교란할 수 있음을 제시하였다. 이러한 결과는 저산소환경이 신경퇴행성질환의 원인이 될 수 있음을 제시하는 것이다.

찾아보기 낱말 : 일차배양 대뇌겉질 신경세포, 저산소증, proteasome 억제제, α -synuclein, NF- κ B

서론

레비소체 (Lewy body)는 원형의 호산성 세포 내 함입물 (intracellular inclusions)로서 α -synuclein, parkin, ubiquitin 등의 단백질로 구성된다 (Pappolla 1986). 레비소체는 흑색질 (substantia nigra)의 치밀부 (pars compacta, SNpc)에서 특징적으로 나타난다. 그러나 레비소체는 뇌의 전 부위에서도 나타나며 특히 대뇌겉질 신경세포에서 발현되기도 한다 (Spillantini 등 1998). 레비소체가 신경세포의 사멸

과정에서 수행하는 역할에 대해서는 명확하지 않으나, 레비소체의 형성이 증가할수록 파킨슨병의 발생이 증가하는 결과로 미루어 볼 때 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다 (Schulz와 Dichgans 1999). 파킨슨병은 만성신경퇴행성질환의 일종으로 다양한 운동 부조화를 특징으로 한다 (McNaught 등 2004). 파킨슨병의 병리학적인 특징은 흑색질의 치밀부분 (pars compacta)에 존재하는 도파민 신경세포에 특징적으로 레비소체가 형성되는 것이다 (Zarow 등 2003). 파킨슨병의 원인은 아직 확실하게 밝혀지지 않고 있으며, 유전적인 요인이나 환경적인 요인으로 유발된다 (Snyder와 Wolozin 2004).

Ubiquitin-proteasome system (UPS)은 세포의 정상적인 생존과 증식을 방해하는 변형된 혹은 손상된

*본 연구는 2007년도 고신대학교 의과대학 학술연구비의 지원에 의해 수행되었음
교신저자: 김 현 (고신대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: drhkim@kosin.ac.kr

단백질을 세포 내에서 제거하는 기전이다(Aguilar와 Wendland 2003). 이것은 세포의 정상적인 기능 즉, 세포주기의 진행, 세포의 발생과 분화 등에 관여한다(Adams 2003). 신경계에서 UPS에 장애가 생기면 parkin이나 ubiquitin 등에 돌연변이가 생긴다. 이로 인해 변형되거나 손상된 단백질들이 세포 내에서 제거되지 않게 되면서 α -synuclein 등이 축적되어 알츠하이머병, 파킨슨병 등의 만성신경퇴행성질환이 나타나는 것으로 알려져 있다. 그러나 α -synuclein의 돌연변이가 어떤 기전으로 신경세포의 퇴행을 유발하는 지는 확실하지 않다(Snyder 등 2003).

저산소증과 proteasome의 기능과의 상관관계에 대해서는 아직 알려진 바가 없다. 그러나 저산소증에 대해 세포가 적응하기 위하여 발현하는 단백질인 HIF(hypoxic-inducible factor)는 UPS에 의해 파괴되며(Kaluz 등 2006), 핵 속에 존재하는 ubiquitin이 활성화되어 DNA 변성을 재촉하는 것으로 알려져 있다(Risuleo 등 2003).

우리는 일차 배양한 쥐의 대뇌겉질 신경세포에 UPS의 손상을 화학적으로 유발하여 α -synuclein의 생성에 미치는 영향을 관찰하였으며, 파킨슨병에서 일어나는 변화인 도파민생성 세포에서의 발현 변화와 비교할 수 있는 근거를 제시하고자 하였다. 또한 저산소증이 UPS에 미치는 영향을 확인하고 세포사멸과정과 세포 내 전달과정과의 연관성을 관찰하였다. 이러한 연구를 통하여 UPS를 교란하였을 때 대뇌겉질세포에서도 파킨슨병과 유사한 세포 내 변화가 일어나는 지를 관찰하여 뇌퇴행성 질환이 치매를 동반한 경우에 있어 그 근거를 제시하고자 하였다. 또한 저산소환경이 UPS이 미치는 영향을 관찰하여 파킨슨병의 실험모델 중의 하나임을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대뇌 겉질 신경 세포의 일차 배양 (primary cortical neuronal cultures)

임신 15일 된 생쥐의 자궁에서 배자를 추출하고,

배자의 끝뇌(telencephalon)로부터 서술한 방법에 의해 신경세포를 분리하였다(Sestan 등 1999). 분리된 세포들을 poly-L-ornithine과 laminin(Sigma Co., USA)으로 코팅된 plastic petri dish에서 배양을 시작하였다. 배양액은 neurobasal media에 sodium pyruvate solution, fetal bovine serum, L-glutamine solution, B-27 supplement, Pen/strep solution(GIBCO Co., USA)를 조합하여 제조하였다. 세포들은 24시간 저산소환경에 노출시켰다. 이때 완전히 밀폐된 저산소통(hypoxic chamber)에서 배양하였으며, 저산소 가스의 조성은 N_2 87%, O_2 8% CO_2 5%로 구성하였다. 세포들은 합성 proteasome 억제제(Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-all, PSI)(Sigma Co., USA)를 $1 \mu M$ 의 농도로 투여하여 24시간 동안 배양하였다.

2. 면역형광염색

일차 배양된 대뇌겉질 신경세포에서 α -synuclein의 발현을 확인하기 위해서 PSI를 24시간 처리한 후 통상적인 방법에 따라 면역형광염색을 시행하였다. 1차 항체로는 monoclonal α -synuclein(Santa Cruz Biotechnology, USA)을, 2차 항체로는 donkey CY3 anti-rabbit IgG(Jackson Immunoresearch Lab., West Grove, PA, USA)를 각각 1:200의 농도로 사용하였다. 염색이 끝난 후 광학현미경(Eclipse 80i, Nikon, Japan)으로 관찰하고, 현미경용 디지털 카메라(DS-5MC, Nikon, Japan)를 이용하여 촬영하였다.

3. Western blotting

배양된 신경세포를 지난 실험에서 사용하였던 것과 같은 방법으로 immunoblotting분석을 시행하였다. Lysate를 위한 buffer로는 modified RIPA buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 g/mL Aprotinin, leupeptin, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF)를 사용하였다. 일차항체로는 anti- α -synuclein 및 anti-cleaved caspase-3, anti-PARP, anti-NF- κB (Cell signaling technology, USA, 1:1,000), anti-ERK2(Santa Cruz Biotechnology, USA, 1:10,000)를 사용하였다. 밴드의 농도를 정량적으로 분석하기 위

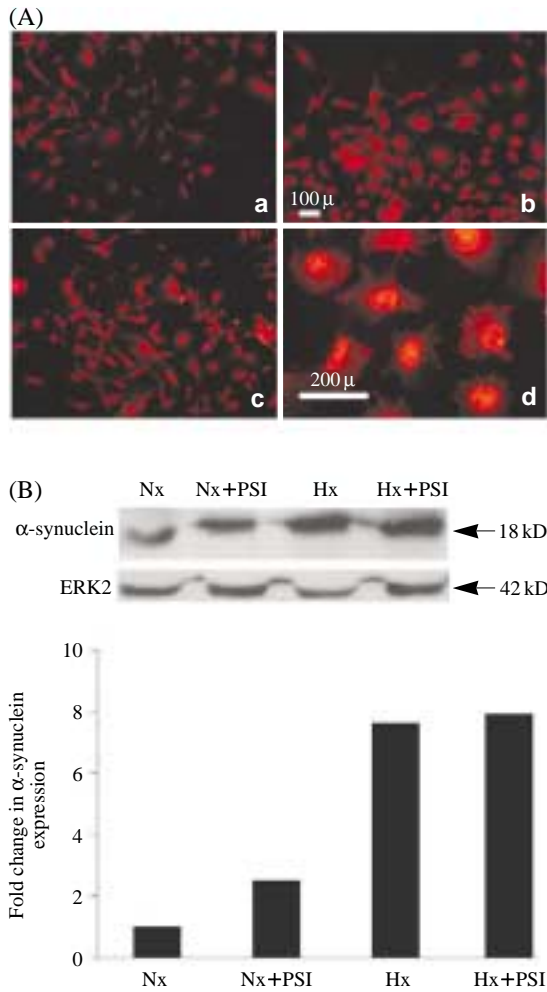


Fig. 1. A: Representative immunofluorescent micrographs of primary cultured cortical neurons. Immunoreactivity of activated α -synuclein (CY3) increases in hypoxic neuron (A-b) as compared of normoxia (A-a). Note a robust activated α -synuclein following treatment of PSI (A-c & A-d). A-d shows detailed α -synuclein immunoreactivity. Scale bar : 100 μ m in a-c, 200 μ m in A-d. B: upper panel, representative Western blots for α -synuclein expression in lysates of normoxic (Nx) cortical neurons cultures in the absence or presence of PSI and hypoxic (Hx) culture, normalized for ERK2. Note the increases in band intensity in the cultures treated with PSI in normoxic conditions. Also note the extensive increases in band intensity in the cultures in hypoxic conditions. Lower panel, Note that there are significant increases in α -synuclein expression in the cultures in the absence or presence of PSI in hypoxic conditions.

하여, 평판스캐너를 이용하여, 현상된 필름의 디지털 영상을 얻은 후 BioMax program을 사용하였다.

4. Flow cytometry

신경세포의 자멸사를 정량적으로 확인하기 위하여 일차 배양된 대뇌피질 신경세포를 trypsin-EDTA (Bioneer Co., Korea)로 처리한 후 원심 분리하여 세포를 채취하였다. 세포의 밀도에 따라 annexin binding buffering와 V-FITC를 투여한 후 원심 분리하여 pellet을 획득하고 propidium iodide로 염색한 후 flow cytometry를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. PSI와 저산소증은 대뇌피질 신경세포에서 α -synuclein의 발현을 증가시킨다.

면역형광법을 이용하여 일차 배양된 대뇌피질 신경세포에서 α -synuclein의 발현과 세포 내 발현의 위치를 관찰하였다. 정상적인 대뇌피질세포에 비해 저산소환경에서 배양한 실험군에서 α -synuclein을 발현하는 세포의 수가 증가하였으며 (Fig. 1A-b), PSI를 처리한 실험군에서는 α -synuclein이 발현하는 세포의 수가 급격하게 증가하였다 (Fig. 1A-c). 특히 PSI를 처리한 신경세포에서 세포질 내의 발현이 증가하였으며, 특히 핵 주위의 발현이 현저하게 증가하였다 (Fig. 1A-d).

Immunoblotting을 시행한 결과 PSI를 처리한 실험군과 저산소증을 처리한 실험군에서 α -synuclein의 발현이 대조군에 비해 증가하였다. PSI를 24시간 처리한 신경세포에서 이 단백질의 발현이 증가하였으며, 특히 저산소환경에서 배양한 경우에는 정상 산소환경에서 PSI를 투여한 실험군에 비해 더욱 현저하게 증가하였다. 또한 저산소환경에서 배양하면서 PSI를 투여한 경우 이 단백질의 발현은 증가하였으며, PSI를 투여하지 않은 저산소환경 실험군에 비교하여 큰 차이는 없었다 (Fig. 1B).

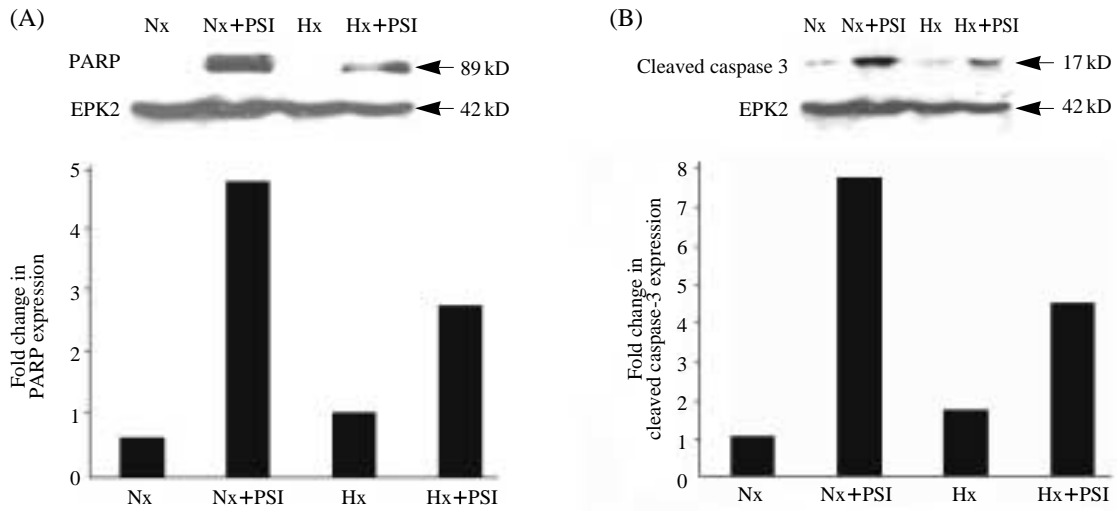


Fig. 2. Representative Western blots for PARP (A) and cleaved caspase 3 (B) expression in lysates of normoxic (Nx) cortical neurons cultures in the absence or presence of PSI and hypoxic (Hx) culture, normalized for ERK2. Note the increases in band intensity in the cultures treated with PSI in normoxic and hypoxic conditions. Note that there are significant increases in cleaved caspase 3 and PARP expressions in the cultures treated with PSI in normoxic and hypoxic conditions.

2. Proteasome 억제제는 대뇌피질 신경세포에서 세포자멸사를 증가시킨다.

일차 배양된 대뇌피질 신경세포에 대하여 PSI와 저산소환경이 세포자멸사에 미치는 영향을 확인하기 위하여 caspase 3의 활성 변화와 PARP의 발현을 관찰한 결과 PSI를 투여한 경우 이들의 발현이 현저하게 증가하였으며, 저산소환경에서 배양한 경우 역시 정상 실험군에 비해 증가하였다. 또한 PSI를 투여하고 저산소환경에서 배양한 경우 이들 단백질의 발현이 증가하였다. 그러나 정상 산소환경에서 배양하면서 PSI를 투여한 실험군에 비해서는 발현이 감소하였다 (Fig. 2).

저산소환경에서 배양할 때 PSI가 피질 신경세포의 세포자멸사에 미치는 영향을 확인하기 위하여 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. 저산소환경에서 배양한 신경세포들은 정상 실험군에 비해 높은 세포자멸사 비율을 보여 주었으며 (약 3.75%), 저산소환경에서 배양하며 PSI를 투여한 실험군에서 역시 정상환경이나 PSI를 투여하지 않고 저산소환경에서 배양한 경우에 비해 세포자멸사의 비율이

현저하게 증가하였다 (약 3.86%) (Fig. 3).

3. 일차 배양 대뇌피질 신경세포에서의 NF-κB(p50)의 발현

일차 배양된 대뇌피질 신경세포에 대하여 PSI와 저산소환경이 세포자멸사를 증가시켰는데 PSI가 교란하는 UPS의 변화를 확인하기 위하여 NF-κB의 발현을 관찰하였다. Immunoblotting을 통하여 NF-κB의 발현을 확인한 결과 PSI를 투여한 경우 NF-κB의 발현이 현저하게 증가하였으며, 저산소환경에서 배양한 경우 역시 정상 실험군에 비해 증가하였다. 또한 PSI를 투여하고 저산소환경에서 배양한 경우 역시 발현이 증가하였다 (Fig. 4).

고 찰

일차 배양된 뇌결질 신경세포에 proteasome 억제제를 투여하여 α-synuclein의 생성을 유도하고 저산소 환경에서 proteasome 억제제의 영향을 관찰하기

— 저산소증이 결질신경세포의 ubiquitin-proteasome system에 미치는 영향 —

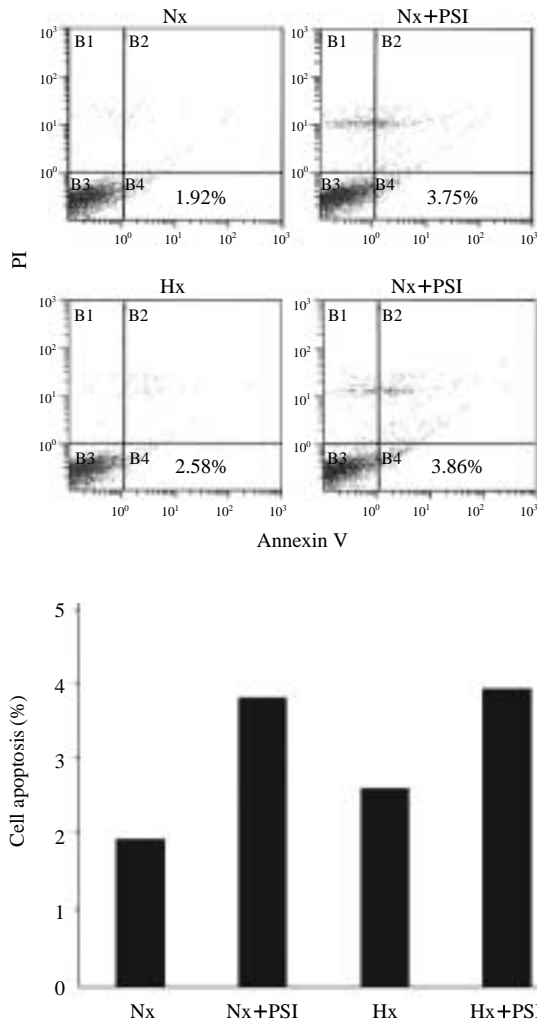


Fig. 3. Percent apoptosis determined by Annexin V FACS analysis of primary cortical neuron cultures treated with the absence or presence of PSI in normoxic (Nx) and hypoxic (Hx) conditions. Upper panels: representative FACS analyses of primary cultured cortical neurons. Lower panel: Quantitation of the FACS analyses illustrating that treatment with PSI increased apoptosis compared with the absence of PSI. As expected, hypoxia increased apoptosis.

위하여 본 실험을 시행하였다. α -synuclein은 proteasome에 의한 세포내의 단백질 제거 시스템의 이상으로 세포 내 축적된 misfolded protein 중의 하나이며 (Takeda 등 1998, Takeda 등 2000), 레비소체의 주

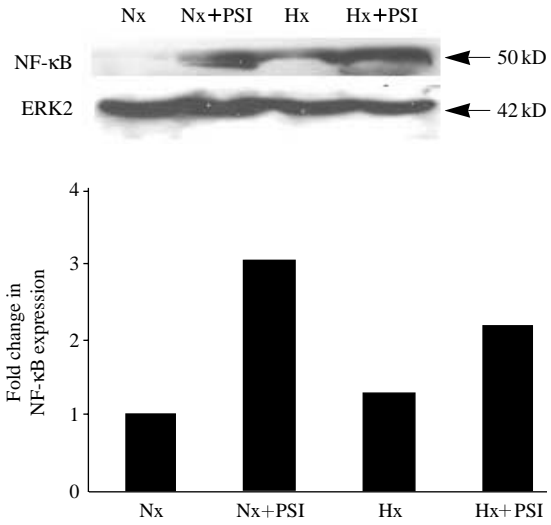


Fig. 4. Representative Western blots for NF- κ B expression in lysates of normoxic (Nx) cortical neurons cultures in the absence or presence of PSI and hypoxic (Hx) culture, normalized for ERK2. Note the increases in band intensity in the cultures treated with PSI in normoxic and hypoxic conditions. Note that there are significant increases in NF- κ B expression in the cultures treated with PSI in normoxic and hypoxic conditions.

성분이다. 이 단백질의 변이가 레비소체의 형성을 촉진하여 뇌퇴행성 질환들을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Conway 등 1998, Rideout 등 2004). 그러나 α -synuclein이 형성되는 원인이나 대뇌결질 신경 세포에 대한 연구는 많이 이루어지지 않고 있다 (Baba 등 1998).

최근의 연구에 따르면 배양된 피질신경세포나 도파민 신경세포의 일종인 PC12 세포에 proteasome 억제제를 투여하게 되면 세포사멸이 증가한다고 하였다 (Rideout 등 2004). 또한 쥐에 proteasome 억제제를 투여한 후 뇌의 SNpc의 도파민생성 신경세포에서 레비소체와 유사한 세포함입물질이 형성되었다고 보고되었다 (McNaught 등 2004). 저자들의 실험에서 배양 중인 뇌결질 신경세포에, proteasome 억제제의 일종인 PSI를 처리한 결과 세포사멸사가 증가한 것을 확인하였다. 즉, PSI의 투여가 *in vivo*, 혹은 *in vitro* 연구에서 파킨슨병을 유발하며, 실험 모

델로서의 가능성을 보여주고 있다.

Proteasome 억제제는 ubiquitin-proteasome system을 손상시켜 α -synuclein의 생성을 유도하게 된다. 그러나 실제로 proteasome 억제제가 신경세포에서 레비소체를 형성하는 지에 대해서는 확실하지 않으며, 연구에 따라 다양한 보고가 있었다(Sakurai 등 2006). Proteasome 억제제의 일종인 Z-LLLal은 UPS를 연구하는데 유용한 화학물질로 잘 알려져 있다(Figueiredo-Pereira 등 1994, Saito 등 1998). 본 실험에서 사용한 PSI의 주성분으로, 뇌결질 신경세포에서 단백질의 합입체 중의 하나인 α -synuclein의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 일차 배양된 대뇌결질 신경세포에서 proteasome의 기능을 약리학적으로 억제한 경우 미토콘드리아의 손상과 caspase 3의 활성화에 의해 세포자멸사가 일어나는 것으로 알려져 있다(Piccioli 등 2001, Suh 등 2005). 이번 실험에서도 proteasome 억제제를 투여한 대뇌결질 신경세포에서 세포자멸이 증가하였으며, cleaved caspase 3와 PARP의 발현이 증가하여 세포자멸사에 의한 것임을 확인하였다.

비치명적 만성 저산소증(chronic sublethal hypoxia)은 흡연 등 일반적으로 접할 수 있는 환경에서 일어날 수 있다. 뇌허혈 등과 같은 급성저산소증에 비해 그 증상이 뚜렷하게 나타나지 않으나, 만성적으로 노출되면 신경세포의 죽음과 세포자멸사를 유도하는 것으로 알려져 있다. 흥미로운 사실은 저산소환경이 뇌결질 신경세포에서 α -synuclein의 생성을 유도한다는 것이다. 이번 실험에서 저자들은 저산소증 환경이 α -synuclein의 생성을 현저하게 증가시킨다는 것을 확인하였다. UPS는 환경적인 스트레스에 대한 반응으로 활성화되거나 다양한 형태로 나타나게 될 수 있으며, 세포의 기능과 생존에 핵심적인 기전으로 반응할 수 있다(Brahimi-Horn과 Pouyssegur, 2005). 이는 저산소환경이 UPS의 이상을 초래하는 것을 보여 주는 것이며, PSI를 투여한 실험군과 비교하여 α -synuclein의 발현은 더욱 증가하였다. 저산소환경에서 PSI를 투여한 경우 α -synuclein의 발현은 투여하지 않은 경우와 비교하여 큰 차이는 없었다. 이러한 결과는 저산소환경에 의

한 영향이 더욱 중요하다는 것을 제시하는 것이며, PSI의 역할과 중복되는 것으로 생각된다. 그 동안 저산소증환경이 UPS를 교란한다는 보고는 아직 없으나, ubiquitin을 활성화하여 DNA 파괴를 유도한다는 실험 결과는 보고된 적이 있다(Risuleo 등 2003). 이번 실험의 결과는 저산소증이 세포 내 정상적인 단백질 제거 시스템을 교란할 수 있음을 보여 준다.

또한 그 동안 저자들은 저산소환경이 세포자멸사를 유발하는 세포 내 기전으로 caspase 경로를 통해 이루어진다고 보고하였으나(Kim 등 2005), 이번 실험의 결과는 caspase 경로뿐 아니라 UPS의 교란을 통하여 세포자멸사를 일으킬 수 있음을 보여주었다. 이러한 결과는 저산소환경이 파킨슨병이나 레비소체치매와 같은 신경퇴행질환의 잠재적인 원인이 될 수 있음을 제시하는 것이다.

본 실험에서 결질신경세포에 proteasome 억제제를 투여한 경우 α -synuclein이 발현되는 것을 확인하였다. 실험의 결과들이 레비소체치매와 관계가 있는지 아니면, 파킨슨병 이후에 나타나는 치매와 연관이 있는 지는 확실하지 않다. 그러나 도파민생성 신경세포에서의 실험과 유사하게 proteasome 억제제가 신경세포의 증류에 관계없이 영향을 주고 α -synuclein의 발현을 증가시키며, 세포자멸사를 유도한다. 환경적인 스트레스 역시 UPS에 손상을 주어 레비소체치매와 유사한 변화를 유도할 수 있다는 것을 증명하였다.

저자들은 PSI의 투여나 저산소환경이 NF- κ B의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. NF- κ B는 전사인자로서 Rel 단백질이 모여 형성된다. 이 dimer complex는 세포질내에서 I κ B에 의해 비활성상태로 존재하다가 I κ B가 인산화되면, 26S proteasome에 의해 ubiquitination이 일어나고, I κ B가 파괴되면서 NF- κ B가 활성화된다(Wooten 1999). 활성화된 NF- κ B는 핵 안으로 이동하여 stress-response 효소나 cell-adhesion 분자, pro-inflammatory cytokines, 그리고 Bcl-2 등과 같은 항세포자멸사 단백질(anti-apoptotic proteins)들을 만드는 유전자의 전사를 유도한다. 그 결과 세포의 생존을 유도하게 된다(Adams 2003). 현재까지 알려진 바로는 proteasome 억제는 NF- κ B

의 활성화를 억제하여, 세포자멸사를 유도시키는 것으로 알려져 있다(Russo 등 2001). 이번 실험에서 정상환경에 비해 저산소환경에서 NF- κ B의 발현이 증가하였다. 이는 저산소환경의 스트레스에 대한 반응의 일종으로 세포의 생존의 기전으로 이해할 수 있을 것이다. 그러나 다른 연구의 보고와 달리 PSI를 처리하였을 때 NF- κ B의 발현은 오히려 증가하였다. 이는 PSI에 의해 I κ B의 파괴가 억제됨으로 오히려 NF- κ B가 세포 내 축적되어 있음을 가정할 수 있다. 또한 PSI의 농도와 경과 시간 등이 그 변수로 생각할 수 있다. 중요한 것은 NF- κ B의 활성화는 I κ B의 억제 작용에 의해 핵 안으로 이동하여야 하는데, 이에 대한, 실험 즉 세포 내의 NF- κ B의 위치와 I κ B의 발현 등을 관찰하는 실험이 이루어져야 할 것이다.

본 연구에서는 proteasome 억제제를 처리하여 신경퇴행성질환을 일으키는 주요인자인 레비소체의 형성 가능성을 대뇌결질 세포에서 확인하였으며, 저산소증이 그와 유사한 결과를 나타내는지를 확인하고자 하였다. 이번 실험에서 proteasome 억제제가 신경퇴행성질환의 실험적인 모델로 적용될 수 있음을 확인하였다. 특히 저산소환경이 대뇌결질신경세포에서 α -synuclein의 발현을 증가시켰다. 이러한 결과는 저산소환경이 레비소체치매나 파킨슨병과 같은 신경퇴행성질환의 원인이 될 수 있음을 제시하는 것이다.

참 고 문 헌

Adams J : The proteasome: Structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev* 29 Suppl 1: 3-9, 2003.
Aguilar RC, Wendland B : Ubiquitin: Not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol* 15: 184-190, 2003.
Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T : Aggregation of alpha-synuclein in lewy bodies of sporadic parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Am J Pathol* 152: 879-884, 1998.
Brahimi-Horn C, Pouyssegur J : When hypoxia signalling

meets the ubiquitin-proteasomal pathway, new targets for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 53: 115-123, 2005.

Conway KA, Harper JD, Lansbury PT : Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset parkinson disease. *Nat Med* 4: 1318-1320, 1998.

Figueiredo-Pereira ME, Berg KA, Wilk S : A new inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20s proteasome) induces accumulation of ubiquitin-protein conjugates in a neuronal cell. *J Neurochem* 63: 1578-1581, 1994.

Kaluz S, Kaluzova M, Stanbridge EJ : Proteasomal inhibition attenuates transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1 (hif-1) via specific effect on the hif-1alpha c-terminal activation domain. *Mol Cell Biol* 26: 5895-5907, 2006.

Kim HJ, Baek JG, Yang SJ, Kang KY, Kim KR, Kim H : Effects of recombinant EPO on death of cortical neuron in chronic hypoxia. *Korean J Phys Anthropol* 18: 291-301, 2005.

McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW : Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of parkinson's disease. *Ann Neurol* 56: 149-162, 2004.

Pappolla MA : Lewy bodies of Parkinson's disease. Immune electron microscopic demonstration of neurofilament antigens in constituent filaments. *Arch Pathol Lab Med* 110: 1160-1163, 1986.

Piccioli P, Porcile C, Stanzione S, Bisaglia M, Bajetto A, Bonavia R, Florio T, Schettini G : Inhibition of nuclear factor-kappab activation induces apoptosis in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 66: 1064-1073, 2001.

Rideout HJ, Dietrich P, Wang Q, Dauer WT, Stefanis L : Alpha-synuclein is required for the fibrillar nature of ubiquitinated inclusions induced by proteasomal inhibition in primary neurons. *J Biol Chem* 279: 46915-46920, 2004.

Risuleo G, Cristofanilli M, Scarsella G : Acute ischemia/hypoxia in rat hippocampal neurons activates nuclear ubiquitin and alters both chromatin and DNA. *Mol Cell Biochem* 250: 73-80, 2003.

Russo SM, Tepper JE, Baldwin AS, Jr., Liu R, Adams J, Elliott P, Cusack JC, Jr. : Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: Implications for a role of nf-kappab. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50: 183-193, 2001.

- Saito T, Ishiguro K, Onuki R, Nagai Y, Kishimoto T, Hisanaga S : Okadaic acid-stimulated degradation of p35, an activator of cdk5, by proteasome in cultured neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 775-778, 1998.
- Sakurai M, Ayukawa K, Setsuie R, Nishikawa K, Hara Y, Ohashi H, Nishimoto M, Abe T, Kudo Y, Sekiguchi M, Sato Y, Aoki S, Noda M, Wada K : Ubiquitin c-terminal hydrolase 11 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation. *J Cell Sci* 119: 162-171, 2006.
- Schulz JB, Dichgans J : Molecular pathogenesis of movement disorders: Are protein aggregates a common link in neuronal degeneration? *Curr Opin Neurol* 12: 433-439, 1999.
- Sestan N, Artavanis-Tsakonas S, Rakic P : Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* 286: 741-746, 1999.
- Snyder H, Mensah K, Theisler C, Lee J, Matouschek A, Wolozin B : Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the s6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *J Biol Chem* 278: 11753-11759, 2003.
- Snyder H, Wolozin B : Pathological proteins in parkinson's disease: Focus on the proteasome. *J Mol Neurosci* 24: 425-442, 2004.
- Spillantini MG, Bird TD, Ghetti B : Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: A new group of tauopathies. *Brain Pathol* 8: 387-402, 1998.
- Suh J, Lee YA, Gwag BJ : Induction and attenuation of neuronal apoptosis by proteasome inhibitors in murine cortical cell cultures. *J Neurochem* 95: 684-694, 2005.
- Takeda A, Hashimoto M, Mallory M, Sundsumo M, Hansen L, Masliah E : C-terminal alpha-synuclein immunoreactivity in structures other than lewy bodies in neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol (Berl)* 99: 296-304, 2000.
- Takeda A, Mallory M, Sundsmo M, Honer W, Hansen L, Masliah E : Abnormal accumulation of nACP/alpha-synuclein in neurodegenerative disorders. *Am J Pathol* 152: 367-372, 1998.
- Wooten MW : Function for nf-kb in neuronal survival: Regulation by atypical protein kinase c. *J Neurosci Res* 58: 607-611, 1999.
- Zarow C, Lyness SA, Mortimer JA, Chui HC : Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in alzheimer and parkinson diseases. *Arch Neurol* 60: 337-341, 2003.

Abstract

Effects of Hypoxia on the Ubiquitin-proteasome System in Primary Cortical Neuronal Cell Cultures

Seong-Jun Yang, Min-Jung Kim¹, Ho-Joong Jeong², Ghi-Chan Kim²,
Young-Gi Gil, Kang-Ryune Kim, Hyun Kim

*Department of Anatomy, ¹Department of Neurology, ²Department of Physical Medicine
and Rehabilitation, Kosin University, College of Medicine*

The ubiquitin-proteasome system is crucial in maintaining cellular growth and metabolism. Dysfunction of this system may contribute to neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease. But its effects on primary neurons are largely unknown.

In the present study, we investigated the effects of proteasome inhibitor and hypoxia on primary neuronal cultures to determine whether proteasomal malfunction induces neuronal death.

Neuronal apoptosis increased in primary cultured cortical neurons with treatment of proteasomal inhibitor in normoxic condition and in the presence or absence of proteasomal inhibitor in hypoxic condition. Also expression of PARP and activated caspase 3 increased. NF- κ B, a key transcription factor in this system expression increased in hypoxic condition and proteasomal inhibition. Interestingly, hypoxic condition induced an expression and accumulation of α -synuclein in neuron, one of components of Lewy body in Parkinson's disease.

Our findings determine that hypoxic condition may affect the ubiquitin-proteasome system. Furthermore, it suggests that hypoxic condition and proteasomal inhibitors are involved, at least in parts, in neurodegeneration of mouse model for Parkinson's disease.

Key words : Primary cultured cortical neuron, Hypoxia, Proteasomal inhibitor, α -synuclein, NF- κ B