

## Ganglioside 합성 유도제인 L-PDMP는 배양 중인 도파민생성 신경세포에서 $\alpha$ -synuclein의 축적과 세포사를 억제한다

김민정<sup>1</sup>, 양성준, 김강련, 김 현

고신대학교 의과대학 해부학교실, <sup>1</sup>신경과학교실

(2011년 5월 2일 접수, 2011년 6월 7일 수정접수, 2011년 6월 15일 게재승인)

**간추림** : Ganglioside은 신경세포의 세포막의 주요 구성 물질이며, 용해소체의 활성도를 증가시켜 세포의 소화 기능을 유도한다. 또한 세포자멸사 인자에 의해 발현이 증가하여 세포자멸사를 초래하는 것으로 알려져 있다. 신경세포에서 이 물질의 생성 이상은 파킨슨병과 같은 만성신경퇴화질환을 일으키는 것으로 알려져 있다. 단백질분해소체는 비정상적으로 형성된 단백질을 세포내에서 제거하는 역할을 하며, 기능의 이상은 만성신경퇴화질환의 원인 중의 하나로 알려져 있다. 이번 연구에서 단백질분해소체 기능의 억제에 의한 도파민생성 신경세포의 변화에 ganglioside 발현 유도 물질 투여가 미치는 영향을 관찰하였다.

도파민 생성 신경세포인 PC12 cell을 배양하여 단백질분해소체 억제물질인 PSI(proteasomal synthetase inhibitor)를 투여하였다. 또한 ganglioside3 synthetase 유도물질인 L-PDMP를 동시에 투여하여 세포의 변화를 관찰하였다.

PSI와 L-PDMP를 동시에 투여한 경우 활성화된 PARP의 발현은 PSI를 단독으로 투여한 세포에 비해 뚜렷하게 감소하였으며, 신경세포의 생존율은 증가하였다. 또한  $\alpha$ -synuclein의 세포내 축적 역시 감소하였다. PSI는 ganglioside3의 발현을 증가시켰으며, L-PDMP와 동시에 투여한 경우 ganglioside3는 급격하게 증가하였다.

이번 실험의 결과는 ganglioside3의 생성을 증가시키면 단백질분해소체 억제로 인하여 증가하는 세포사를 막을 수 있으며,  $\alpha$ -synuclein과 같은 파킨슨병의 원인으로 추정되는 단백질의 세포내 축적을 막는다는 것을 보여준다. 나아가 단백질분해소체의 기능과 ganglioside3의 생성 조절은 파킨슨병과 같은 만성신경퇴화질환의 치료 전략이 될 수 있을 것이다.

**찾아보기 낱말** : Ganglioside3, L-PDMP, 단백질분해소체억제제,  $\alpha$ -synuclein, 도파민생성신경세포

### 서 론

Ubiquitin-proteasome system(UPS)은 세포질이나 핵, 세포질그물(endoplasmic reticulum)에서 비정상적으로 형성된 변형되거나 손상된 단백질을 제거하는 주요 경로로 알려져 있다. 신경계에서 이 시스템에 장애가 생기면, 알츠하이머병이나 파킨슨병 등과 같은 만성신경퇴화질환이 나타난다. 특히 파킨슨병의 경우는 ubiquitin-proteasome system의 주요 효소인 ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1의 돌연변이로 인하여 손상된 단백질들을 세포 내에서 제거하지 못하여 발생한다고 알려져

있다(Kitada 등 1998, Shimura 등 2001). 신경세포에서 단백질분해소체(proteasome)의 기능을 실험적으로 방해했을 때 세포사가 증가할 뿐 아니라 Lewy body와 같은 파킨슨 병에서 특징적으로 나타나는 세포내 포함물(inclusion)들이 증가한다(Zhang 등 2007). 그러므로 ubiquitin-proteasome system을 조절할 수 있으면 파킨슨병과 같은 만성신경퇴화질환을 조절할 수 있다는 가설이 제시되고 있다(Olanow와 McNaught 2006).

Glycosphingolipids는 세포막을 구성하는 물질 중 하나이며, 다양한 신호 전달에 관계하는 것으로 알려져 있다(Morales 등 2004). 그러나 세포내에서의 기능에 대해서는 논란이 있으며, 아직까지 분명하지 않다(Wei 등 2009a). Glycosphingolipids의 일종인 ganglioside는 세포의 성장과 분화에 관여한다. 이와 반대로 세포자멸사(apoptosis)를 조절하는 역할을 하며, 사립체를 통한 세

\*본 연구는 2009년도 고신대학교 의과대학 학술연구비를 지원받아 작성되었음.

교신저자 : 김 현 (고신대학교 의과대학 해부학교실)

전자우편 : drhkim@kosin.ac.kr

포자멸사를 유도하는 것으로도 알려져 있다(Bektas와 Spiegel 2004).

GD3 (ganglioside3)가 세포사를 유도하는 기전은 CD95/TNF-alpha 등의 시토키인들이 수용체와 결합으로 시작된다. 이때 GD3가 골지장치에서 합성되고(Omran 등 2006, Sano 등 2009, Sorice 등 2009) 합성된 GD3는 사립체로 이동하여 사립체막의 막전하의 변화를 유도하게 되며 caspase-3등의 작용을 통해 세포사가 일어나게 된다(Morales 등 2004, Garofalo 등 2007).

또한 흑색종 등 여러 종류의 암세포를 대상으로 하는 실험에서 TNF-alpha의 신호에 의해 fas ligand 등 세포사수용체의 활성화를 통해 GD3의 생성이 증가하며 암세포의 세포사를 방해한다고 알려져 있다(Raval 등 2007, Tarhini와 Kirkwood 2009).

그러나 ganglioside의 세포내 생성 기전에 문제가 발생하였을 때  $\alpha$ -synuclein과 같은 단백질이 제거되지 않고 축적되어 파킨슨병과 같은 만성뇌신경질환의 병인으로 제시되고 있다(Wei 등 2007).

Ubiquitin-proteasome system과 GD3와 같은 ganglioside의 기능 사이의 상관관계에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다.  $\beta$ -amyloid와 같은 만성신경퇴화질환에서 나타나는 단백질을 투여한 신경세포 배양 실험에서 단백질분해소체의 활성에 영향을 미치지 않고 지질대사를 촉진한다고 보고된 바 있다(Cazzaniga 등 2007).

이번 실험에서 만성신경퇴화질환의 원인 중 하나로 생각되는 GD3의 생성 기전을 조절하여 세포의 생존에 있어 그 역할을 확인하고자 하였다. 또한 동시에 단백질분해소체의 기능 방해를 통한 GD3의 생성 변화를 관찰하여 ganglioside와 ubiquitin-proteasome system과의 관계에 대해 알아보고자 하였다. 도파민생성 신경세포에 단백질분해소체 억제제와 GD3 합성 억제제를 동시에 투여하여 세포의 생존의 변화를 관찰하였으며, 만성신경퇴화질환의 신경세포에서 특징적으로 나타나는 단백질인  $\alpha$ -synuclein 발현 변화를 관찰하였다.

이러한 연구를 통하여 도파민생성 신경세포에서 만성신경퇴화질환을 치료하거나 그 발병을 늦출 수 있는 가능성을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. PC cell 배양

PC12 cell은 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Korea)에서 구입하여, RPMI 1640에 FBS, 2mM gluta-

mine, Pen/strep solution (이상 GIBCO-BRL, USA)을 혼합한 배양액에서 배양하였다. 이때 배양조건은 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 85~95% 습도를 유지하였다. 48시간 배양 후 배양액을 완전히 교체하였으며 1  $\mu$ M의 synthetic proteasome inhibitor (Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-all, 이하 PSI) (Sigma Co., USA)와 20 mM의 GD3 합성 유도제인 L-PDMP (L-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol) (Sigma Co., USA)를 투여한 후 24시간 동안 배양하였다.

### 2. Cell viability assay

Cell viability의 분석은 MTT assay를 통해 이루어졌다. 약  $5 \times 10^3$  정도의 세포를 96 well plate에 분주하였다. 그리고 24시간 동안 배양하여 세포들이 잘 부착할 수 있게 하였다. PSI와 L-PDMP를 24시간 투여하여 배양한 후 배양액을 제거하고 50  $\mu$ L의 MTT stock solution과 DMSO를 투여하고 Bio-Tek microplate reader를 이용하여 570 nm의 파장에서 측정하였다.

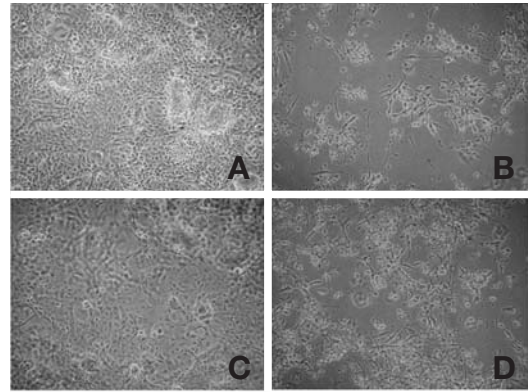
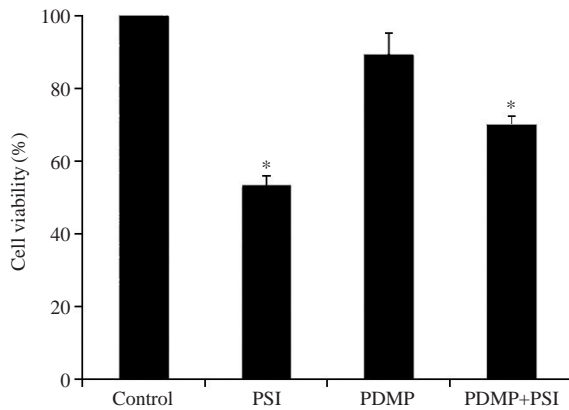
### 3. Western blotting

배양된 신경세포를 PBS에 세척하고 단백질을 추출하여 immunoblotting분석을 시행하였다. Lysate를 만들기 위한 buffer로는 modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mg/mL Aprotinin, leupeptin, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF)를 사용하였다. 일차 항체로는 anti-GD3, anti- $\alpha$ -synuclein 및 anti-cleaved caspase-3, anti-PARP (이상 Cell signaling technology, USA, 1:1,000), anti-ERK2 (Santa Cruz Biotechnology, USA, 1:10,000)를 사용하였다. 면역 반응을 감지하기 위하여 Supersignal detection reagent (Pierce Co., USA)를 사용하였으며, Hyperfilm (Kodak, USA)에 노출시킨 후, 평판 스캐너를 이용하여, 현상된 필름의 디지털 영상을 얻었다. 밴드의 농도를 정량적으로 분석하기 위하여, BioMax program을 사용하였다. 모든 실험은 3번 이상 시행하였으며, 통계학적인 분석을 위하여 student t-test를 사용하였다.

## 결 과

### 1. L-PDMP는 도파민생성 신경세포의 세포사를 억제한다

GD3의 대사가 도파민 신경 세포의 생존에 미치는



**Fig. 1.** PDMP increases cell viability in presence of proteasomal inhibition. *Right Panel*, Effect of PDMP and PSI on cell viability of PC12 cell cultures. Cells were exposed to 1  $\mu$ M PSI, 20  $\mu$ M PDMP for 48 hrs. Cell viability was evaluated using the MTT assay. Exposure of cells to PSI, PC12 cell viability decreases but was improved by PDMP treatment. Note that there are statistically significant increase (\*) in cell viability in treatment of PSI and PDMP ( $p < 0.05$ ; vertical line=standard deviations). *Right Panel*, representative fields of PC12 cells in presence of PDMP and PSI. A, control group, B, PSI treatment group, C, PDMP treatment group, D, PSI and L-PDMP treatment group. Note the increased numbers of cells in presence of PDMP (PSI: synthetic proteasome inhibitors, PDMP: *L-threo*-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol).

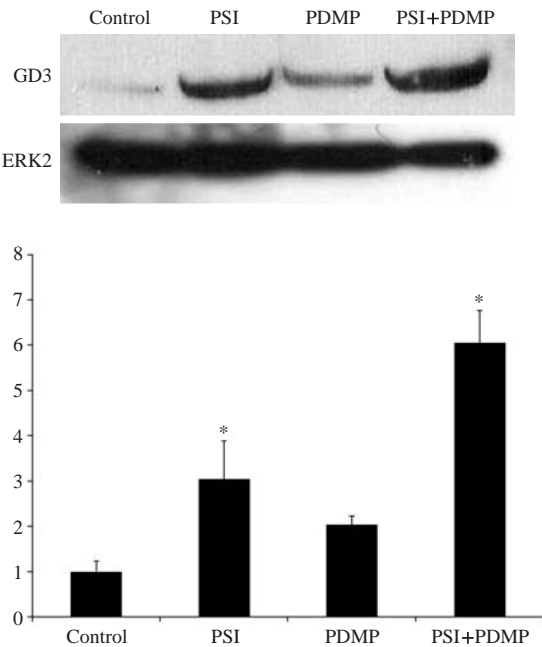
영향을 관찰하기 위하여 MTT assay를 시행하였다. PSI를 투여한 실험에서 도파민형성 신경세포의 생존율은 현저하게 감소하였다. L-PDMP를 단독으로 투여한 세포에서는 신경세포의 생존율이 약간 감소하였으나, PSI를 투여한 세포에 비해서는 세포사의 비율은 매우 적었다. 그러나 PSI와 L-PDMP를 동시에 투여한 경우 PSI를 단독으로 투여한 경우와 비교하여 세포의 생존율이 뚜렷하게 증가하였다(Fig. 1).

## 2. Proteasomal inhibitor는 ganglioside3의 세포내 축적을 증가시킨다

Ubiquitin-proteasome system이 GD3의 세포내 축적에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 도파민형성 신경세포에 PSI와 L-PDMP를 단독 혹은 동시에 투여하여 GD3의 세포내 양의 변화를 확인하였다. 단백질분해소체 방해 물질인 PSI를 처리한 세포에서는 GD3의 양이 현저하게 증가하였다. PSI와 L-PDMP를 동시에 투여한 경우 GD3의 양은 증가하였으며, PSI를 단독으로 처리한 신경세포에 비해 뚜렷하게 증가하였다(Fig. 2). 이 결과는 PSI가 GD3의 양의 증가시키며, PSI와 L-PDMP와 동시에 투여한 경우 PSI를 단독으로 처리한 경우에 비해 GD3의 양이 증가하는 것을 보여준다.

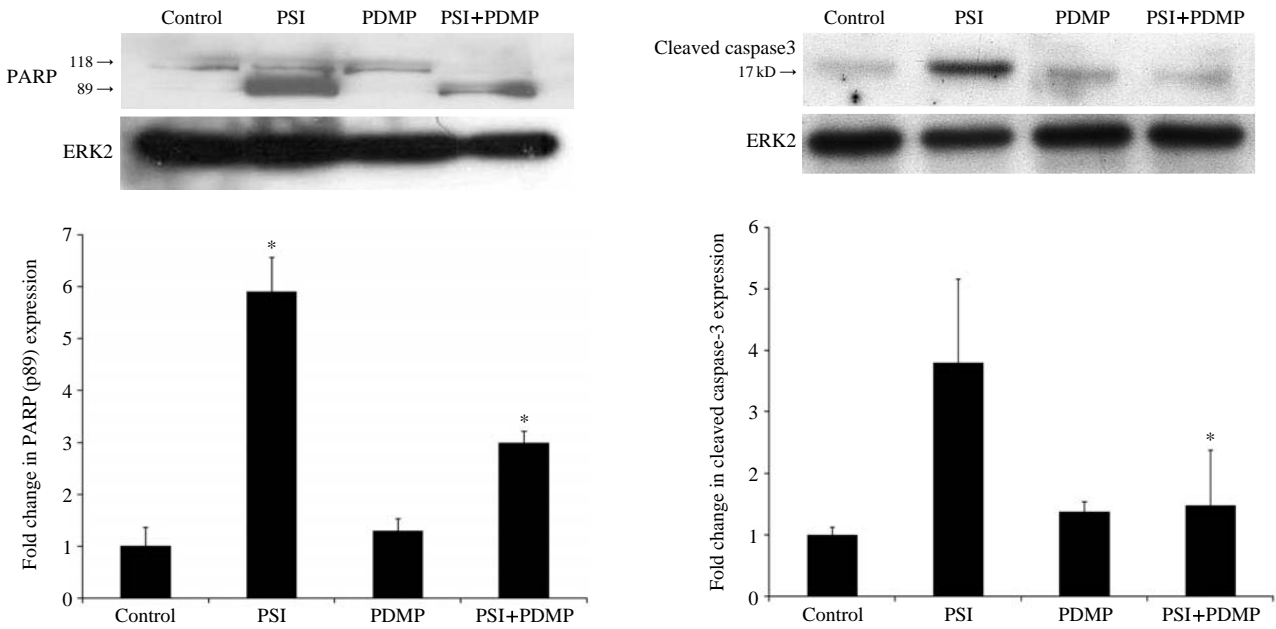
## 3. GD3는 PSI에 의한 신경세포자멸사를 억제한다

도파민형성 신경세포에서 단백질분해소체의 기능이

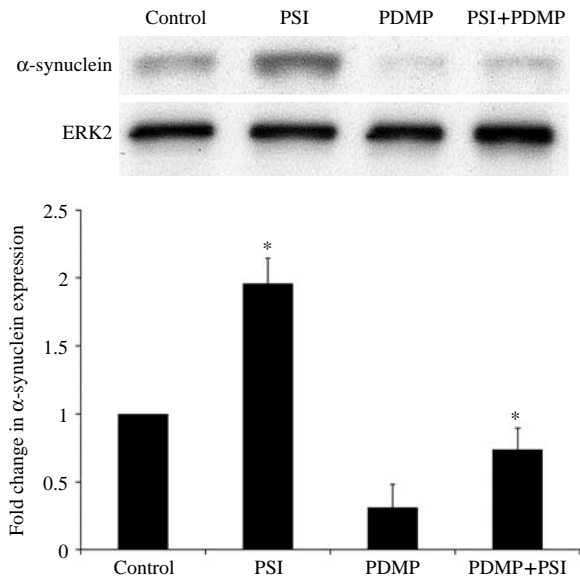


**Fig. 2.** PSI induces the expression of Ganglioside3 (GD3). A representative Western blot of lysates of PC12 cells cultured in the presence of PDMP and PSI illustrating GD3 expression normalized for ERK2. A lower panel: quantitation of GD3 expression in PC12 cells as described above. Note that there are statistically significant increase (\*) in GD3 expression in treatment of PSI and PDMP ( $p < 0.05$ ; vertical line=standard deviations).

억제된 경우, 화학적으로 GD3의 형성을 유도하면 세포사에 어떤 변화가 있는지를 관찰하기 위하여 세포자멸



**Fig. 3.** L-PDMP decreases PARP (p89) and cleaved caspase 3 after the induction of their expression by the proteasomal inhibition. Representative Western blots for PARP (Left Panel) and cleaved caspase 3 (Right Panel) expressions in lysates of PC12 cells in the presence of PDMP with PSI, normalized for ERK2. Note that there are statistically significant changes (\*) in PARP and cleaved caspase 3 expression in treatment of PSI and PDMP ( $p < 0.05$ ; vertical line=standard deviations).



**Fig. 4.** L-PDMP decreases the accumulation of  $\alpha$ -synuclein after the treatment of PSI. Representative Western blot of lysates of PC12 cells cultured in the presence of PDMP and PSI illustrating  $\alpha$ -synuclein expression. Note that there are statistically significant decrease (\*) in  $\alpha$ -synuclein expression in treatment of PSI and PDMP ( $p < 0.05$ ; vertical line=standard deviations).

western blotting을 통해 확인하였다.

PSI를 투여한 경우 cleaved caspase-3의 발현은 현저하게 증가하였으나, L-PDMP를 투여한 경우에는 발현되지 않았다. L-PDMP와 PSI를 동시에 투여한 경우에는 cleaved caspase-3의 양은 L-PDMP를 단독으로 투여한 신경세포와 유사하였으나, PSI를 단독으로 투여한 신경세포에 비해서는 뚜렷하게 감소하였다(Fig. 3).

또한 PARP (p89)의 발현은 cleaved caspase-3의 발현 양상과 유사하게 PSI 투여 시 정상 세포에 비해 뚜렷하게 증가하였다. 그러나 L-PDMP와 PSI를 동시에 투여한 세포에서 PSI를 단독으로 투여한 세포에 비해 현저하게 감소하였다(Fig. 3).

이러한 결과는 단백질분해효소의 기능을 억제한 경우 세포자멸사가 증가하였으며, 사립체막 투과성의 변화에 따른 caspase 경로를 통하여 이루어지고 있다는 것을 보여준다. 그러나 L-PDMP에 의해서는 세포자멸사가 뚜렷하게 나타나지 않았다. 즉 GD3의 발현이 증가하여도 세포자멸사의 변화를 유도하지 않는다는 것을 보여준다.

#### 4. GD3의 합성 유도는 $\alpha$ -synuclein의 세포내 축적을 억제한다

사의 중요한 표식자 중의 하나인 cleaved caspase-3와 세포자멸사의 결과로 나타나는 PARP의 발현 변화를

도파민형성 신경세포에서 단백질분해효소의 기능을

억제한 경우  $\alpha$ -synuclein의 세포내 양이 증가하였다. 이것은 파킨슨병 환자에서 신경세포 손상의 원인과 유사한 세포의 변화를 보여주는 것이다. 그러나 L-PDMP를 투여한 경우에는  $\alpha$ -synuclein의 발현이 정상세포에 비해 뚜렷하게 감소하였다. 또한 PSI와 L-PDMP를 동시에 투여한 경우  $\alpha$ -synuclein의 발현은 PSI를 단독으로 투여한 경우에 비해 뚜렷하게 감소하였다(Fig. 4).

이 결과는 단백질분해소체 억제에 의한 비정상적인 단백질의 세포내 축적을 L-PDMP에 의해 막을 수 있다는 것을 제시하는 것이다.

## 고 찰

도파민형성 신경세포인 PC12 세포에 단백질분해소체 억제제 (proteasomal inhibitor)를 투여하여 ubiquitin-proteasome system을 교란한 후 GD3의 변화를 관찰하였다. 이를 통해 도파민형성 신경세포에서 단백질분해소체 기능의 저해로 인해 발병할 수 있는 파킨슨병과 같은 만성신경퇴화질환과 GD3와의 관계를 관찰하였다.

세포밖에 존재하는 ganglioside는 신경세포의 생존뿐만 아니라 신경세포의 성장 및 분화를 조절한다(Kamata와 Hattori 2007). 최근 파킨슨병, 알츠하이머병과 같은 신경퇴화질환은 세포의 용해소체 기능 장애가 그 병인으로 제시되고 있다 이를 통해 세포내에서는  $\alpha$ -synuclein과 같은 단백질들이 축적되며  $\alpha$ -synuclein의 oligomer나 protofibril이 신경세포에서 독성 작용을 일으켜 세포사를 유도하게 되며 결국 만성신경퇴화질환을 일으키게 되는 것으로 알려져 있다(Lansbury 1999, Wei 등 2009a). Ganglioside는 신경세포를 방어하는 것으로 알려져 있다. 특히 ganglioside3의 생성을 유도하는 물질인 PDMP를 처리한 신경세포에 분해소체의 기능을 회복시키고 막투과성을 촉진하여 세포독성을 줄여주는 기능을 한다. 이를 통해 PDMP는  $\alpha$ -synuclein과 같은 단백질의 세포내 축적을 감소시키고 파킨슨병과 같은 질환을 방어할 수 있는 가능성을 보여준다(Wei 등 2009b).

PDMP는 ganglioside의 성분인 ceramide의 화학적인 유사체로서 ganglioside의 생물학적인 생성을 조절하는 것으로 알려져 있으며, L-PDMP와 D-PDMP가 사용되고 있다. L-PDMP는 glycosphingolipid의 생성을 촉진하며, 이에 반해 D-PDMP는 방해하는 것으로 알려져 있다(Hynds 등 2002). 이번 실험에 사용된 L-PDMP는 GD3의 생성을 유도하였다.

배양된 피질신경세포에 단백질분해소체의 기능을 방

해하는 물질을 투여하게 되면 세포자멸사가 증가한다고 하였다(Rideout과 Stefanis 2002, Rideout 등 2004). 이때 caspase 3와 PARP의 활성화를 통해 세포자멸사가 증가하게 된다(Kim 등 2008).

이번 실험에서 도파민형성 신경세포에 PSI를 투여한 결과 기존의 결과들과 마찬가지로 세포사가 증가하였으며, cleaved caspase-3와 세포자멸사의 결과로 나타나는 활성화된 PARP의 발현이 증가하였다. 그러나 L-PDMP를 동시에 투여한 경우 활성 caspase-3와 PARP의 발현이 현저하게 감소하였으며, 세포의 생존율도 증가하였다. 이 결과는 PSI를 통한 세포사와 GD3의 역할은 관계가 있는 것으로 생각된다.

GD3는 외부의 시토카인 특히 TNF- $\alpha$  등의 신호에 의해 사립체막의 투과성을 변화시켜 caspase-3를 활성화함으로 세포사를 유도하는 것으로 알려져 있으나(Garcia-Ruiz 등 2003), 다른 면으로는 분해소체의 활성을 증가시켜 세포내 단백질을 제거하는 역할을 하여 신경퇴화질환의 원인이 되는 비정상적인 단백질의 축적을 막고 이를 통해 세포의 생존율을 높이는 극단적인 양면을 보여 준다. 이번 실험의 결과는 정상 신경세포에서 GD3의 발현이 증가하더라도 caspase-3의 활성화에는 영향이 없으나 세포의 이상상태 즉 세포내 비정상적인 단백질 발현이 증가하는 조건에서는 GD3의 발현이 caspase-3의 활성화를 방해하여 세포자멸사를 방어하는 역할을 한다.

반대로 PSI가 GD3의 세포내 양과의 관계를 관찰하기 위하여 PSI를 투여한 상태에서 GD3의 양을 관찰하였다. 이때 GD3의 양은 현저하게 증가하였다. PSI와 L-PDMP를 동시에 투여한 경우 다시 GD3의 양은 오히려 증가하였다. 이것은 GD3의 생성과 단백질분해소체의 활성화와 관계 있음을 보여 주는 결과이다.

아직까지 단백질분해소체 활성화와 ganglioside의 생성이 서로 직접적인 연관성이 있다는 연구는 없다. 그러나 그 연관성에는 몇 가지 가능성을 제시할 수 있다. 첫째는 단백질분해소체가 직접 GD3의 생성을 방해하는 것이다. 두 번째 가능성은 GD3의 세포내 제거에 단백질분해소체가 작용하는 또 다른 기전이 존재한다는 것이다. 세 번째는 GD3가 관여하는 분해소체의 활성화와 단백질분해소체의 활성이 서로 연관이 있다는 가정이다.

그 외의 가정으로는 단백질분해소체를 통해 세포자멸사가 증가한 후 세포내에 생성된 다양한 시토카인들이 세포 밖으로 유출된 후 주변분비(paracrine)를 통해 세포자멸사인자의 역할을 하는 것이다. 이들이 신경세포막의 수용체와 결합하여 GD3가 골지장치에서 생성하

도록 유도하는 것이다. 이와 같은 가정은 추후 분해소체 활성화와 단백질분해소체 활성화의 변화를 교차 비교하는 실험을 통해 좀더 다가갈 수 있을 것이다.

지난 연구 결과와 같이 단백질분해소체의 기능 억제 는 신경세포에서 세포내 단백질 제거를 방해하여 원하지 않는 단백질 특히  $\alpha$ -synuclein의 생성을 초래한다 (Kim 등 2008).  $\alpha$ -synuclein은 단백질분해소체의 이상에 의해 세포내에 축적된 단백질 중의 하나이며 (Takeda 등 1998, Takeda 등 2000) Lewy body의 주성분으로 만성 퇴행성 뇌질환들을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Conway 등 1998, Rideout 등 2004). 특히 파킨슨병의 병인으로 도파민 형성 신경세포에서 Lewy body 생성을 들 수 있다 (Burn 2004). 이번 실험에서는 도파민형성 신경세포에서 PSI 투여에 의해  $\alpha$ -synuclein의 발현이 증가하였다. 이 결과는 PSI의 투여가 *in vivo*, 혹은 *in vitro* 실험에서 파킨슨병을 유발하며, 실험 모델로서의 가능성을 보여주고 있다.

또한 단백질분해소체의 기능을 방해한 경우 증가한  $\alpha$ -synuclein의 양이 L-PDMP의 투여로 인해 감소하였다는 것이다. 이는 GD3의 생성이 단백질분해소체의 기능 억제에 의한  $\alpha$ -synuclein의 축적을 막을 수 있다는 것을 보여 준다.

이번 연구는  $\alpha$ -synuclein의 세포내 축적 모델 즉 파킨슨병과 같은 만성 신경 퇴화질환 모델에서 GD3의 생성을 유도하는 것은 이들 비정상적인 단백질의 세포내 축적을 막을 수 있는 하나의 방법임을 제시한다. 또한 단백질분해소체 활성화의 조절뿐만 아니라 GD3의 생성 유도가 치료 방법의 하나이며, 두 방법의 조합은 질환의 치료에 주요한 방향이 될 수 있음을 제시한다.

## 참 고 문 헌

- Bektas M, Spiegel S : Glycosphingolipids and cell death. *Glycoconj J* 20: 39-47, 2004.
- Burn DJ : Cortical lewy body disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 175-178, 2004.
- Cazzaniga E, Bulbarelli A, Cassetti A, Lonati E, Re F, Palestini P, Mutoh T, Masserini M : Beta-amyloid (25-35) enhances lipid metabolism and protein ubiquitination in cultured neurons. *J Neurosci Res* 85: 2253-2261, 2007.
- 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.
- Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernandez-Checa JC : Defective tnf-alpha-mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest* 111: 197-208, 2003.
- Garofalo T, Tinari A, Matarrese P, Giammarioli AM, Manganello V, Ciarlo L, Misasi R, Sorice M, Malorni W : Do mitochondria act as "Cargo boats" In the journey of gd3 to the nucleus during apoptosis? *FEBS Lett* 581: 3899-3903, 2007.
- Hynds DL, Takehana A, Inokuchi J, Snow DM : L- and d-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP) inhibit neurite outgrowth from sh-sy5y cells. *Neuroscience* 114: 731-744, 2002.
- Kamata Y, Hattori Y : Neural differentiation of human neuroblastoma goto cells via a rho-rho kinase-phosphorylation signal transduction and continuous observation of a single goto cell during differentiation. *J Vet Med Sci* 69: 37-42, 2007.
- Kim H, Kim MJ, Jeong HJ, Kim G-C, Gil Y-G, Kim K-R, Yang SJ : Effects of hypoxia on the ubiquitin-proteasome system in primary cortical neuronal cell cultures. *Korean J Phys anthropol* 21: 9, 2008.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N : Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605-608, 1998.
- Lansbury PT, Jr. : Evolution of amyloid: What normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3342-3344, 1999.
- Morales A, Colell A, Mari M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC : Glycosphingolipids and mitochondria: Role in apoptosis and disease. *Glycoconj J* 20: 579-588, 2004.
- Olanow CW, McNaught KS : Ubiquitin-proteasome system and parkinson's disease. *Mov Disord* 21: 1806-1823, 2006.
- Omran OM, Saqr HE, Yates AJ : Molecular mechanisms of gd3-induced apoptosis in u-1242 mg glioma cells. *Neurochem Res* 31: 1171-1180, 2006.
- Raval G, Biswas S, Rayman P, Biswas K, Sa G, Ghosh S, Thornton M, Hilston C, Das T, Bukowski R, Finke J, Tannenbaum CS : Tnf-alpha induction of gm2 expression on renal cell carcinomas promotes t cell dysfunction. *J Immunol* 178: 6642-6652, 2007.
- 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.
- Rideout HJ, Stefanis L : Proteasomal inhibition-induced inclusion formation and death in cortical neurons require

- transcription and ubiquitination. *Mol Cell Neurosci* 21: 223-238, 2002.
- Sano R, Annunziata I, Patterson A, Moshiach S, Gomero E, Opferman J, Forte M, d'Azzo A : Gm1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated membranes links membrane stress to calcium(2+)-dependent mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 36: 500-511, 2009.
- Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ : Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: Implications for parkinson's disease. *Science* 293: 263-269, 2001.
- Sorice M, Matarrese P, Tinari A, Giammarioli AM, Garofalo T, Manganelli V, Ciarlo L, Gambardella L, Maccari G, Botta M, Misasi R, Malorni W : Raft component gd3 associates with tubulin following cd95/fas ligation. *Faseb J* 23: 3298-3308, 2009.
- Takeda A, Hashimoto M, Mallory M, Sundsmo 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.
- Tarhini AA, Kirkwood JM : Clinical and immunologic basis of interferon therapy in melanoma. *Ann N Y Acad Sci* 1182: 47-57, 2009.
- Wei J, Fujita M, Nakai M, Waragai M, Sekigawa A, Sugama S, Takenouchi T, Masliah E, Hashimoto M : Protective role of endogenous gangliosides for lysosomal pathology in a cellular model of synucleinopathies. *Am J Pathol* 174: 1891-1909, 2009a.
- Wei J, Fujita M, Nakai M, Waragai M, Watabe K, Akatsu H, Rockenstein E, Masliah E, Hashimoto M : Enhanced lysosomal pathology caused by beta-synuclein mutants linked to dementia with lewy bodies. *J Biol Chem* 282: 28904-28914, 2007.
- Wei J, Fujita M, Sekigawa A, Sekiyama K, Waragai M, Hashimoto M : Gangliosides' protection against lysosomal pathology of synucleinopathies. *Autophagy* 5: 860-861, 2009b.
- Zhang L, Chang M, Li H, Hou S, Zhang Y, Hu Y, Han W, Hu L : Proteomic changes of pc12 cells treated with proteasomal inhibitor psi. *Brain Res* 1153: 196-203, 2007.

# L-PDMP, Ganglioside Synthesis Enhancer Protects Dopaminergic Neurons from Death by Proteasomal Inhibition and the Accumulation of $\alpha$ -synuclein

Min Jung Kim<sup>1</sup>, Seong Joon Yang, Kang-Ryune Kim, Hyun Kim

*Department of Anatomy and <sup>1</sup>Neurology, Kosin University, College of Medicine, Busan, Korea*

---

**Abstract** : Gangliosides are components of the membranous constituents and abundant in the nervous system. And they are implicated in a wide range of biological activities including the regulation of cell proliferation, differentiation and lysosomal activity. But they have a diverse action to induce neuronal cell death by the interaction with some ligands. The interference of their biosynthesis is accompanied by the intracellular accumulation of unwanted and neurotoxic proteins and might underlie the neurodegeneration diseases including Parkinson's disease. However the mechanism has not been elucidated. In this study, we report that the enhancement of biosynthesis of ganglioside GD3 protects the intracellular accumulation of  $\alpha$ -synuclein and neuronal death.

PC12 cells, dopaminergic neurons are cultured with synthetic proteasomal inhibitor (PSI, Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-al) and L-PDMP (GD3 synthetase enhancer, L-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol). We found that the neuronal viability was recovered by L-PDMP from the proteasomal inhibition and also the expression of activated caspase-3 and PARP was reduced. L-PDMP decreased in the intracellular accumulation of  $\alpha$ -synuclein. Interestingly, PSI induced the expression of ganglioside3 in PC12 cell.

Our findings suggest that proteasomal inhibition may modulate the biosynthesis of GD3 and L-PDMP protects dopaminergic neurons from death by proteasomal inhibition and the accumulation of  $\alpha$ -synuclein.

---

**Keywords** : Ganglioside3, L-PDMP, Proteasomal inhibitor,  $\alpha$ -synuclein, Dopaminergic neuron