工 學 博 士 學 位 論 文

알츠하이머 질환과 관련된 신경세포 손상기전 및 15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$-Prostaglandin J_2의 신경세포 보호효과에 관한 연구

2002年 8月

釜慶大學校 大學院

生 物 工 學 科

吳 宰 昊

工 學 博 士 學 位 論 文

알츠하이머 질환과 관련된 신경세포 손상기전 및 15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$-Prostaglandin J_2의 신경세포 보호효과에 관한 연구

指導敎授　朴 南 奎

이 論文을 工學博士 學位論文으로 提出함

2002年 8月

釜慶大學校 大學院

生 物 工 學 科

吳　宰　昊

吳宰昊의 工學博士 學位論文을 認准함

2002年 6月 29日

主 審 의학박사 변 대 석 (印)

副 審 이학박사 장 영 채 (印)

委 員 의학박사 정 수 연 (印)

委 員 공학박사 김 성 구 (印)

委 員 이학박사 박 남 규 (印)

목 차

List of Figures

List of Table

List of Abbreviations

Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
AGE	Advanced glycation endproducts
AP-1	Activator protein-1
APP	Amyloid precusor protein
CKI	Cyclin dependent kinase inhibitor
COX-2	Cyclooygenase-2
DAB	3,3'-Diamino benzidine
DAPI	4',6-Di amino-2-phenyl indole
DMSO	Di methyl sulfoxide
DTT	Di thiothreitol
EDTA	Ethylene di amine tetra acetic acid
EGTA	Ethylene glycol-bis(β-amino ethyl ether) N,N,N',N'-tetra acetic acid
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ERK -1/-2	Extracellular signal regulated kinase -1/-2
IKK	IκB kinase
iNOS	inducible Nitric oxide synthetase
JNK	Jun N-terminal kinase
MAP kinase	Mitogen activated protein kinase
MEK	MAP kinase ERK kinase kinase
MTT	Metrazolium salt 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NGF	Nerve growth factor

NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
PBS	Phosphate buffered saline
PC12 cells	Pheochromocytoma 12 cells
PS-1/-2	Presenilin-1/-2
15-deoxy-PGJ$_2$	15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J$_2$
PGs	Prostanglandins
PI	Propidium iodide
PPAR-γ	Peroxisome proliferation activated receptor γ
PPCs	Peroxisome proliferator chemicals
RXRs	Retinoid X receptors
PPREs	Peroxisome proliferator responsive elements
TNF-α	Tumor necrosis factor-α

The Studies on Neuronal Cell Injury Mechanism of Alzheimer's Disease and Neuroprotective Effect of 15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$-Prostaglandin J_2

Jae-Ho Oh

Department of Biotechnology and Bioengineering, Graduate School.
Pukyong National University

Abstract

15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J_2 (15-deoxy-PGJ_2), a naturally occurring ligand activates the peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPAR-γ). Activation of PPAR-γ has been found to induce cell differentiation of adipose cell, macrophage and many tumor cells. Recent study reported that 15-deoxy-PGJ_2 promoted the nerve growth factor (NGF)-induced neurite outgrowth of differentiating PC12 cells. The ability to promote cell differentiation through up-regulation of mitogen activated protein kinase (MAP kinase) family by 15-deoxy-PGJ_2 was evaluated and the class of MAP kinase that relay the signals was determined. The activations of transcription factors ; AP-1, SP-1 and NF-κB were studied for the examination of the downstream signals responder of MAP kinase family in PC12 cells after the treatment of 15-deoxy-PGJ_2 with or without NGF. 15-deoxy PGJ_2 promoted NGF-induced neurite outgrowth, and enhanced NGF-induced MAP kinase/ jun N-terminal kinase (JNK) expression and the activation of transcription factor AP-1. However, 15-deoxy-PGJ_2 did not induce PPAR-γ expression.

Although mutations in the presenilin genes (PS-1 and PS-2) are linked to early onset familial alzheimer's disease (FAD), its underlying molecular mechanisms have not been clearly evaluated. Patients carrying mutated genes in PS-1 and PS-2 have increased the level of plasma β-amyloid protein 1-42, a neurotoxic peptide. In this study, the effect of PS-2 mutation was evaluated for the relationship to the production of β-amyloid and the induction of apoptosis related to the mutation was determined. The expression of inflammatory mediators was evaluated that the inflammation may be a causing factor for the induction of apoptosis. PC12 cells were transfected with the human PS-2 gene containing the N141I mutation. A significant increase of β-amyloid production was observed. The expressions of genes involved in inflammation (TNF-α, COX-2, IκB), and β-amyloid induced apoptosis in PC12 cells transfected with mutant PS-2 compared to those of control PC12 cells. Also, β-amyloid prominently enhanced expressions of caspase 3, caspase 9, p21, and transcription factor NF-κB activation were observed. Moreover, NGF-induced neurite outgrowth were also significantly reduced in PC12 cells transfected with mutant PS-2. These results demonstrate that PS-2 mutation significantly contributes to the production of β-amyloid causing apoptosis through the induction of inflammation. The cell

death signal was over-expressed after the treatment of β-amyloid. The effect of 15-deoxy-PGJ_2 on the inhibition of a neuronal cell toxicity induced by β-amyloid in PC12 cells and mutant PS-2 transfected PC12 cells was studied. 15-Deoxy-PGJ_2 increased cell numbers and cell viability that were decreased by β-amyloid, and inhibited the activation of transcription factor NF-κB on dose-dependent manners. These results demonstrate that 15-deoxy-PGJ_2 can affect the activation of β-amyloid through the activation of NF-κB signal pathway.

Finally, effects of Bcl-2 gene over-expression on the toxicity of β-amyloid and apoptosis were investigated. The cell signal pathway by Bcl-2 transfected PC12 cells was determined. Neurite outgrowth rate of Bcl-2 transfected PC12 cells was higher than that of PC12 cells but apoptosis by β-amyloid was lower in Bcl-2 transfected PC12 cells. β-Amyloid enhanced the expression of p38 kinase than other MAP kinase family. However, β-amyloid induced-p38 kinase expression in Bcl-2 transfected PC12 cells was relatively lower than that in PC12 cells. The NF-κB expression level in Bcl-2 transfected PC12 cells was higher than one in PC12 cells. Transcription factor NF-κB expression was increased by β-amyloid in PC12 cells, however that was decreased by Bcl-2 transfected PC12 cells.

The data indicate that β-amyloid can induce apoptosis by trigger pro-inflammatory reaction in mutant PS-2 transfected PC12 cells. The apoptosis was occurred by the inhibition of specific target molecules or by the increase of Bcl-2 gene expression, providing the basis for novel therapeutic intervention. 15-Deoxy-PGJ_2 could be recommended as a potent drug to improve or delay the symptom of alzheimer's disease through deactivation of NF-κB signaling pathway and anti-inflammatory effect.

I. 서 론

현대사회의 발전은 질병치료와 관련하여 새로운 의학기술 및 생명공학의 발전으로 인하여 수명연장이라는 인류의 오랜 꿈을 점차 실현 가능하게 만들어 주고 있다. 그러나, 사회가 점점 고령화 되어가면서 이와 관련한 퇴행성신경질환이 증가되고 있으며 이에 대한 사회적 경제적 부담이 날로 증가하고 있는 실정이다.

퇴행성 신경질환 중의 하나인 알츠하이머병 (Alzheimer's disease, AD)은 치매를 일으키는 가장 일반적인 질환이다.

AD는 현재까지는 치료가 불가능한 질환으로서, 일단 발생이 되면 시간이 지남에 따라 점차적으로 기억장애 및 행동장애가 심해지는 결과를 가져온다. 초기증상으로서 최근 기억의 상실 또는 건망증 등이 나타나며, 이후에는 인성변화가 유발되고, 심하면 생활에 필요한 단순한 일도 할 수 없는 지경에 이르게 되는 것이다.

일반적으로 보통사람의 경우 나이가 들어감에 따라서 뇌 속에 존재하는 신경세포의 숫자가 크게 줄지는 않는다. 그러나, AD는 뇌 세포의 기능 정지를 유발하고, 뇌 세포사이의 연결을 파괴함으로서 결국에는 뇌 신경세포의 죽음을 유발한다. 이와 관련되어 나타나는 증상을 구체적으로 살펴보면 처음에 AD는 해마 (hippocamus) 부위를 포함한 기억을 조절하는 영역의 신경세포들을 파괴하는데, 이로 인해 건망증이 유발되고 쉽고 친숙한 일을 하는 능력이 감소되는 증상이 나타난다. 시간이 지나 언어 및 이해력과 관계되어진 대뇌피질 (cerebral cortex) 부분마저 손상을 입게되면 언어구사력이 떨어지고, 판단력이 변화를 입게되면서 환자의 인성 또한 점차적으로 변하게 된다. 나이가 더 들어감에 따라서 뇌는 더욱 더 손상을 입게되므로 결국에는 타인의 도움 없이 혼자서는 생활을 할 수 없는 지경에 이르게 되

는 것이다.

이러한 신경세포의 죽음과 관련된 신경세포의 세포사멸 (apoptosis)은 뇌의 분화를 조절하고 퇴행성 신경질환에 있어서 잠재적인 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있으며, Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1)과 Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) 단백질들 그리고 caspase (cysteinyl aspartate-specific proteases) 단백질들이 이 과정의 핵심적인 요소로 보고되어 있다[1].

이 단백질들의 특성 및 기능을 알아보면, 먼저 Bcl-2 단백질은 세포내 아폽토시스 신호전달에 있어서 결정적인 역할을 수행한다고 알려져 있다. 이 단백질은 서로 반대되는 기능의 anti- 및 pro-apoptotic 단백질, 두 부류를 다 가지고 있으며, 이 들 단백질들의 구조적인 공통점은 한 개 또는 그 이상의 Bcl-2 homology (BH) 도메인을 가지고 있다는 것이다[2].

주된 anti-apoptotic 단백질로서 잘 알려진 Bcl-2와 Bcl-x_L는 미트콘드리아 외막과 형질내세망 (endoplasmic reticulum) 그리고 핵주위막 (perinuclear membrane)에 분포되어 있다. 이들은 이형다량체형성 (heterodimerization)을 통해서 pro-apoptotic 단백질들을 저해하는 작용을 한다고 알려져 있다[2]. 현재까지 알려진 바로는 Bcl-2 단백질의 발현은 중추신경계가 분화하는 동안에 높게 나타나고, 출생 후에는 낮게 조절된다. 반면에 말초신경계에 있어서 Bcl-2의 발현은 살아있는 동안에 일정하게 유지된다. 따라서, Bcl-2는 신경성장인자 (nerve growth factor, NGF)가 없는 경우에 신경세포가 생존을 유지시킬 수 있도록 도와준다고 알려져 있다[3]. 그리고, Bcl-x_L는 분화중인 뇌에서 발현된다. 그러나, Bcl-2 발현과는 다르게, Bcl-x_L 발현은 어른이 될 때까지 지속적으로 증가하는 것으로 알려져 있다[4]. 그러므로, Bcl-x_L는 신경세포가 그들이 원하는 대상에 제대로 연결되기 전까지 미성숙 신경세포의 생존에 중요한 역할을 할 것으로 생각되

고 있다.

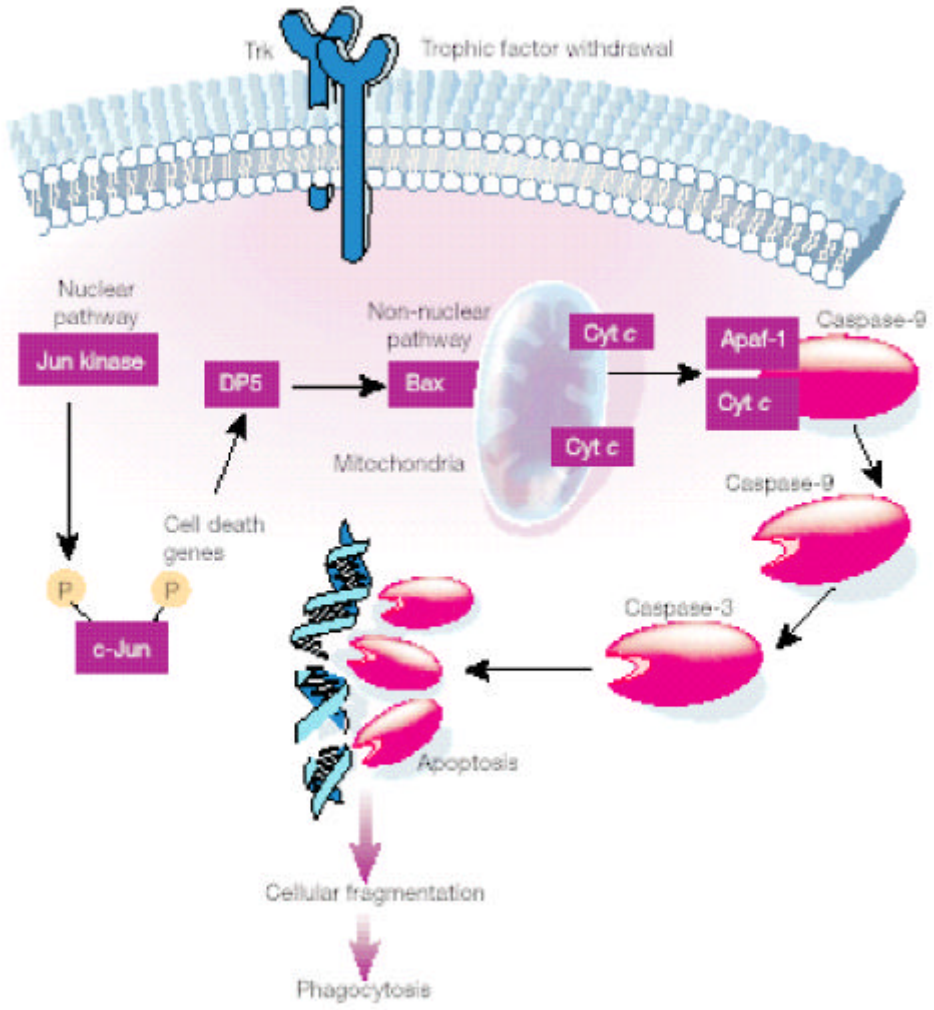
반면에 Bax (Bcl-2 associated x protein)는 pro-apoptotic member들 중 하나로서 신경계 전반에 걸쳐서 넓게 발현되는 것으로 알려져 있다[5,6]. 따라서, Bax의 활성화가 영양성분결핍이나 손상에 의하여 유도되는 신경세포의 아폽토시스작용에 있어서 매우 중요한 단계일 것으로 판단되고 있다.

한편, Apaf-1은 손상된 미토콘드리아로부터 caspase를 활성화시키는 apoptotic signal를 전달한다. Apaf-1는 pro-caspase 9의 활성을 매개하기 위해 미토콘드리아에서 유출된 cytochrome C 및 caspase 9과 복합체를 형성하며, 이 복합체로부터 활성화된 caspase 9은 분리되어져 caspase 3를 활성화시킨다고 알려져 있다[6,7] (Fig. 1). 그러므로, AD 환자의 뇌 신경세포의 죽음도 이러한 신호전달경로에 포함된 caspase 단백질들이 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

AD 환자의 뇌에는 신경세포의 죽음과 관련하여 두 가지 비정상적인 구조적 특징이 발견되었는데, 그것은 신경세포 외부에서 발견되는 amyloid plaques와 신경세포 내에서 발견되는 neurofibrillary tangles 이다.

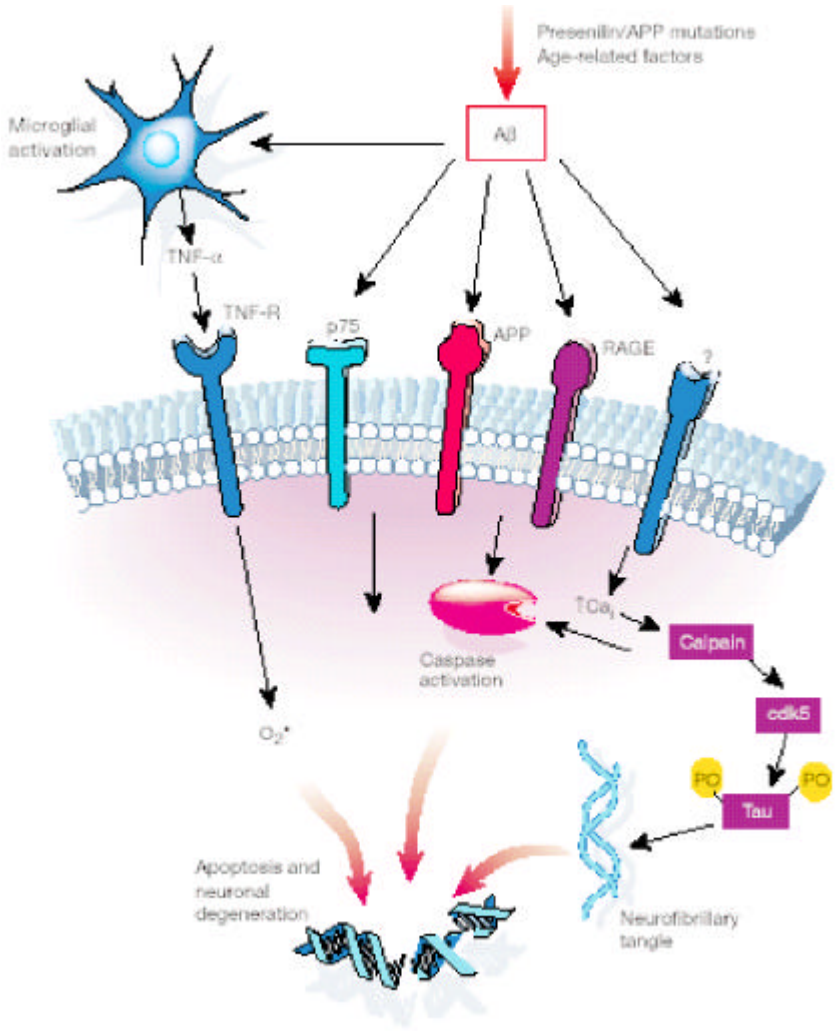
Amyloid plaques는 처음에 기억 및 인식과 관련된 뇌 영역에서 생성된다. 이것은 APP (amyloid precursor protein)으로부터 쪼개어져 생성되는 녹지 않는 β-amyloid라는 펩타이드로 구성되어 있다. 그러나 아직까지도 β-amyloid가 직접적으로 AD를 유발하는지, 아니면 β-amyloid가 AD 진행과정의 부산물인지 확실하게 밝혀져 있지는 않은 실정이다.

β-Amyloid의 정확한 신경독성기전과 그들이 작용하는 정확한 세포내 위치는 밝혀지지 않고 있으나, β-amyloid가 활성산소종 (reactive oxygens species)을 생성함으로서 세포의 산화적 손상 (oxidative stress)을 유발하고, 세포 내 Ca^{2+} 농도를 증가시키는 것으로 간주되어 있다[8,9] (Fig. 2). 또한, β-amyloid는 프리라디칼의 생성을 매개할 수 있는 AGE



trends in Nature **407**, 802-809. (2000)

Fig. 1. Activation of apoptosis in sympathic neurons by trophic factor withdrawal.



trends in Nature **407**, 802-809. (2000)

Fig. 2. Cellular pathways of β-amyloid protein neuronal toxicity in alzheimer's disease.

(advanced glycation end product)에 대한 수용체[10], 신경세포의 아폽토시스을 유발할 수 있는 p75 neurotrophin 수용체[11], 그리고 APP에 대한 수용체[12]를 포함한 여러 신경세포의 수용체와 상호작용 함으로서 아폽토시스를 유발하는 것으로 생각되고 있다.

현재까지 AD 가족력을 나타내는 환자들에게서 β-amyloid 생성 원인과 관련하여 3가지의 유전자 변형이 보고되어 있다[13].

첫 번째가 β-amyloid의 전구단백질인 APP (amyloid precusor protein) 유전자의 돌연변이다. 이 유전자의 특정부위에 변이가 있는 발생되는 경우, 그 유전자를 가진 사람의 뇌는 amyloid plagues의 침착, neurofibrillary tangles의 형성 등 AD의 모든 병리적 변화를 나타내게 된다고 보고되어 있다 (Table 1).

APP 유전자는 사람의 21번 염색체에 위치하고 있다. 재미있는 사실은 down syndrome 환자의 경우 21번 염색체가 3개 존재하며 나이가 들어가면서 AD의 병변을 나타낸다는 것이다[14]. 따라서, APP의 과잉 생산이 AD 발병의 한가지 원인으로 여겨진다.

두 번째, 14번 염색체에 위치한 presenilin-1 (PS-1) 유전자와 1번 염색체에 위치한 presenilin-2 (PS-2) 유전자의 변이이다. PS-1은 개체발달과정 중 중요한 역할을 하는 notch 단백질을 잘라서 notch signaling에 필수적인 역할을 할 뿐만 아니라 비슷한 기전으로 APP를 잘라서 β-amyloid를 만들어 내는 것으로 알려졌다[15-17]. PS-1의 경우 현재까지 50종 이상의 돌연변이 형태가 보고되어 있는데, 대부분 260잔기- 290잔기 사이의 부위에 집중적으로 돌연변이가 발생되어 있다고 알려져 있다 (Table 2). PS-2 유전자는 염색체 1번에 위치하고 있으며 이제까지 알려진 바로는 PS-2 유전자 돌연변이가 두 가족에서만 발견되었고, 이 가족들은 PS-1 돌연변이군과 비교할 때 40세에서 80세 사이의 다양한 시기에 질환을 나타낸다는

Table 1. Missense mutations in the human APP gene

Codon	Mutation	Phenotype
665	Gln → Asp	Late onset AD, no segregation
670/671	Lys-Met → Asn-Leu	Familal AD (FAD)
673	Ala → Thr	No disease
692	Ala → Gly	FAD and cerebral hemorrhage
693	Glu → Gly	Late onset AD
	Glu → Gln	HCHWA-D
713	Ala → Val	Schizophrenia, no segregation
	Ala → Thr	AD, no segregation
716	Ile → Val	FAD
717	Val → Ile	FAD
	Val → Phe	FAD
	Val → Gly	FAD

Table 2. Missense mutations in the human presenilin 1 gene

Codon	Mutation	Phenotype
79	Ala → ?	FAD, onset 64 years
82	Val → Leu	FAD, onset 55 years
96	Val → Phe	FAD
115	Tyr → His	FAD, onset 37 years
	Tyr → Cys	FAD
117	Pro → Leu	FAD
120	Glu → Asp	FAD, onset 48 years
	Glu → Lys	FAD
123	Lys → Glu	FAD
135	Asn → Asp	FAD
139	Met → Thr	FAD, onset 49 years
	Met → Val	FAD, onset 40 years
	Met → Lys	FAD
143	Ile → Phe	FAD
	Ile → Thr	FAD, onset 35 years
146	Met → Leu	FAD, onset 45 years
	Met → Val	FAD, onset 38 years
	Met → Ile	FAD, onset 40 years
163	His → Arg	FAD, onset 50 years
	His → Tyr	FAD, onset 47 years
171	Leu → Pro	FAD, onset 40 years
209	Gly → Val	FAD
213	Ile → Thr	FAD
231	Ala → Thr	FAD, onset 52 years
	Ala → Val	FAD
233	Met → Thr	FAD, onset 35 years
235	Leu → Pro	FAD, onset 32 years
246	Ala → Glu	FAD, onset 55 years
250	Leu → Ser	FAD

Codon	Mutation	Phenotype
260	Ala → Val	FAD, onset 40 years
262	Leu → Phe	FAD, onset 50 years
263	Cys → Arg	FAD, onset 47 years
264	Pro → Leu	FAD, onset 45 years
267	Pro → Ser	FAD, onset 35 years
269	Arg → Gly	FAD
	Arg → His	FAD
273	Glu → Ala	FAD
278	Arg → Thr	FAD
280	Glu → Ala	FAD, onset 47 years
	Glu → Gly	FAD, onset 42 years
282	Leu → Arg	FAD
285	Ala → Val	FAD, onset 50 years
286	Leu → Val	FAD, onset 50 years
291-319	Deletion	FAD
317	Glu → Gly	FAD
384	Gly → Ala	FAD, onset 35 years
392	Leu → Val	FAD, onset 25-40 years
410	Cys → Tyr	FAD, onset 48 years
426	Ala → Pro	FAD
436	Pro → Ser	FAD

Table 3. Missense mutations in the human presenilin 2 gene

Codon	Mutation	Phenotype
141	Asn → Ile	FAD (Volga Germans), onset 50-65 years
239	Met → Val	FAD (Florence), onset variable

특징을 가지고 있다 (Table 3). PS 유전자의 돌연변이가 AD 가계의 주된 원인 중 하나로 확인된 것은 AD와 관련된 신경세포의 아폽토시스의 관련된 기전을 이해하는데 새로운 접근법이 제시됨을 의미한다[18-20]. 이러한 PS 유전자의 돌연변이가 APP로부터 β-amyloid의 형성을 증가시키고, 이렇게 생성된 β-amyloid는 AD 환자의 뇌에 반점 (plagues)을 형성시킨다고 보고되어 있다[21].

최근의 몇 가지 연구들은 PS 유전자의 돌연변이에 의한 β-amyloid의 형성에 관여하는 프로테아제 (protease)가 λ-secretases일 것으로 제시하고 있는데 이것은 좀 더 명확한 연구가 필요할 것으로 판단된다[22,23]. 또한, PS 유전자의 돌연변이가 확실히 신경세포의 아폽토시스와 관련한 경향을 증가시킨다는 것을 보여준다[24]. 그러나, PS 돌연변이의 AD에 관여하는 기전이 무엇인지는 아직도 밝혀져야 할 과제로 남아있으며, 특히 PS-2 유전자의 돌연변이에 의한 AD 발병기전에 대한 자료는 상대적으로 매우 부족한 실정이다.

마지막으로 AD 발병과 관련된 유전자로 염색체 19번에 위치하고 있는 apolipoprotein-E (ApoE)가 있다. 이 유전자는 지방대사에 관여하는 단백질을 만드는데 E2, E3, E4의 세 가지 대립유전자 (allele)가 존재한다[25,26]. 이 중 ApoE4 대립유전자가 AD와 밀접한 연관이 있는 것으로 여겨지며, ApoE 유전자 2개가 모두 E4인 사람은 일반인과 비교하여 AD에 걸릴 확률이 8 10배나 높은 것으로 알려져 있다. 그러나, E4가 존재하는 경우에도 AD가 발생되지 않는 경우가 있고, 또한 E4가 존재하지 않는 경우에도 AD에 걸리는 사례가 보고되어져 있기에 ApoE의 경우 질병 유전자라기보다는 질병감수성 유전자로 작용한다는 보고도 있다[27].

AD 환자의 뇌신경세포 죽음과 관련된 또 다른 특징으로 과도한 염증반응이 알려져 있다. 그리고, AD 환자 뇌에서 염증반응을 유발하는 신경세포

주변의 신경아교세포 (astrocyte) 및 미세아교세포 (microglial cells)의 활성화 또한 아폽토시스에 기여하는 것으로 보고되어 있다.

AD 진행과정 중 미세아교세포 활성화에 의해서 염증반응이 일어나고, 이러한 염증반응에는 TNF-α (tumor necrosis fctor-α), PGE_2 등과 같은 염증매개물질 및 NF-κB (nuclear factor kappa B)와 같은 전사인자 (transcription factor)의 활성이 관련된다고 보고되어 있다[28]. 또한, NF-κB 활성은 염증반응에 관여하는 COX-2 (cyclooxyganase-2) 및 신경세포의 산화적 손상을 유발하는 NO (nitiric oxide) 등을 생성하는 iNOS (inducible nitric oxide synthetase)의 발현과 직접적으로 관련되어 있다고 알려져 있다. 그리고 β-amyloid에 의해서 생성되는 amyloid plagues는 세아교세포 (microglia)의 활성을 유발한다고 보고되어 있다[29,30].

이러한 보고를 종합하여 보면, β-amyloid에 의해서 유도된 미세아교세포의 활성화가 TNF-α의 분비를 가져오고 또한 신경세포의 아폽토시스를 유발할 수 있는 다른 독성요인들의 분비를 가져온다. 따라서, 병리학적으로 AD와 관련한 신경세포의 죽음은 직접적으로는 β-amyloid, 간접적으로는 신경세포의 신경아교세포, 미세아교세포 그리고 그 외 다른 독성요인들과의 상호작용에 의한 것으로 결론지을 수 있을 것이다 (Fig. 3).

그러므로, 약물에 의한 NF-κB 및 COX-2의 발현억제 즉, 염증반응의 억제는 β-amyloid에 의한 신경세포의 손상을 억제할 수 있는 효과를 가져올 것으로 기대된다.

이와 관련하여 현재까지 항염증작용 (anti-inflammatory effect)이 있는 NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drug)의 신경세포 손상회복작용과 COX-2 발현 그리고 PGE_2 및 그 관련 물질의 급성적 염증매개에 대한 연구가 진행되어 왔다[31]. 하지만, NSAID계열의 약물의 염증반응 유도농도와 치료농도 사이에 커다란 차이가 있음이 보고되면서 NSAID에 의한

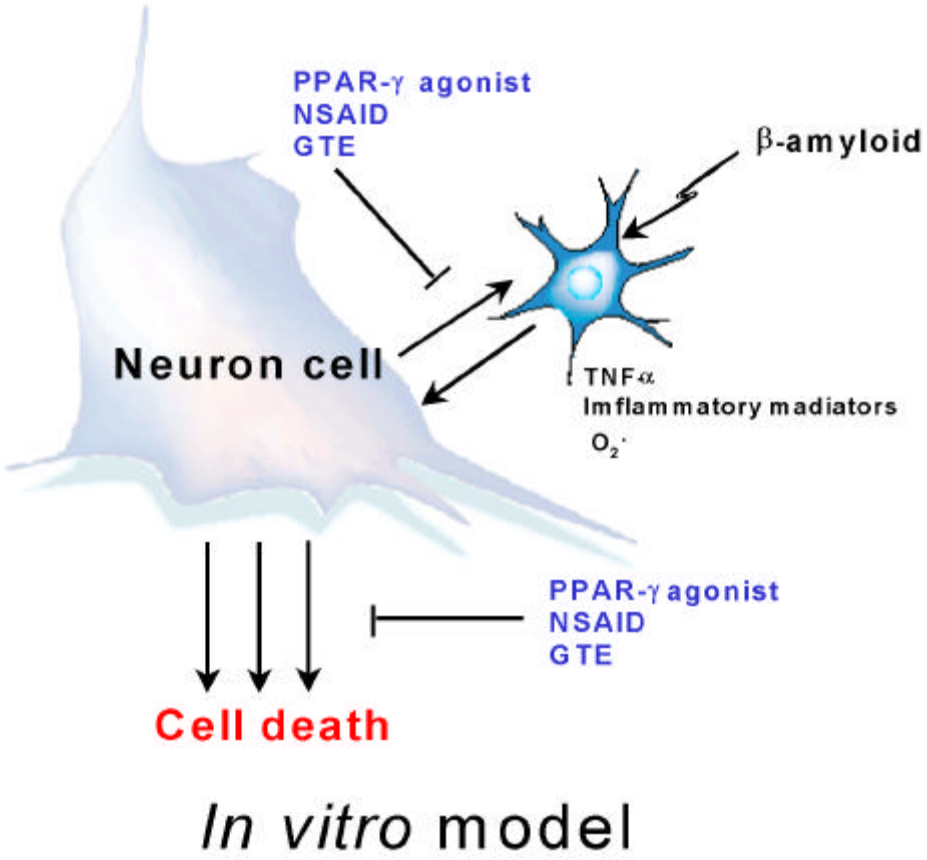


Fig. 3. Potent Therapeutic Model of alzheimer's disease

COX-2 작용의 저해 이외에 또 다른 유전자가 염증반응에 관계할 수 있을 것으로 추정되고 있으며, 최근에 NSAID의 작용이 PPARs (peroxisome proliferation activated receptors)라는 nuclear hormon receptor super family에 의하여 또한 이루어진다고 보고되고 있다[32].

PPARs는 전사를 조절하는 기능의 retinoid X receptor (RXR)와 이형다량복합체 (heterodimer complex)를 구성하는 핵호르몬수용체 (nuclear hormon receptor)의 서브패밀리로 α, β 그리고 γ 세 가지로 구분되어지며, 생체조직에 따라서 다르게 분포되어 있다.

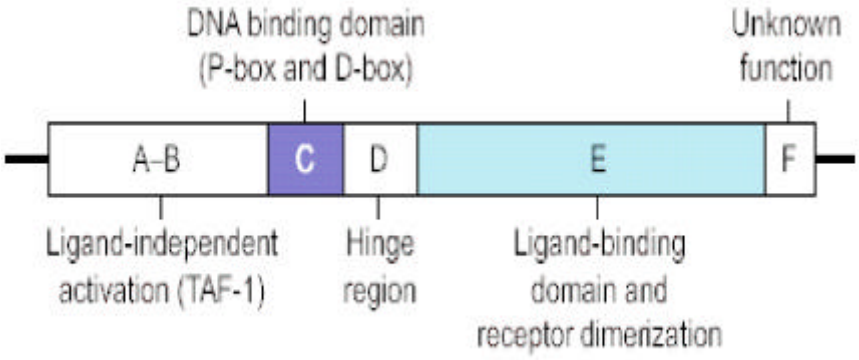
PPARs로 불리게 된 이유는, 최초로 발견되어진 PPAR-α가 생체이물질들에 의해서 활성화되어 설치류의 간세포에서 퍼옥시좀 (peroxisome)을 증식시키는 결과를 나타내었기 때문이다[33].

이러한 PPARs의 구조 및 발현과 관련되는 특성을 살펴보면, PPARs는 레티노이드, 스테로이드 그리고 타이로이드 호르몬 수용체와 관계되어 있는 리간드활성화 전사요소 (ligand-activated transcription factors)의 핵 호르몬 수용체로 구성되어 있는데 이들 모두는 유사한 구조를 보여준다[34].

리간드와 독립적으로 활성을 나타내는 N-말단 부위는 수용체에 대하여 구조적인 활성을 변화시킬 수 있으며[5], 인산화가 됨으로서 활성이 저해되는 방향으로 조절되어진다[6]. 이 부위 뒤에 연계부위 (linker region)에 의해 나누어지는 두 개의 zinc fingers로 구성되어진 DNA 결합 부위가 오고 다음에는 C-말단 리간드 결합 부위가 위치하게 된다[31] (Fig. 4 및 5).

앞서 말한 바와 같이 PPAR은 세 가지 동종효소 (isotypes)의 수용체를 가지고 있고, 형태에 따라서 여러 가지 각기 다른 생리적 기능이 있는 것으로 보고되어 있다[35-38].

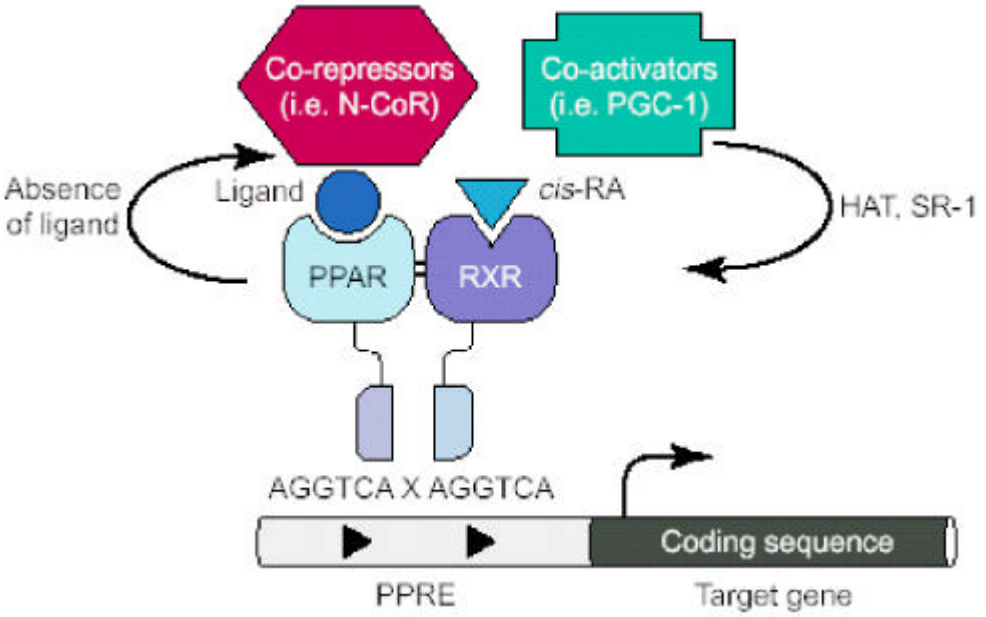
PPAR-γ는 발육 및 항상성을 조절하는 과정에 포함되어 있는 지방세포 분화 및 지방세포 유전자 발현을 조절하는데 중요한 조절인자로서 알려져



trends in Tips **21**, 469-474, (2000)

Fig. 4. Structure of nuclear hormone receptors. The N-terminal A-B domain confers ligand-independent activation.

The C domain is required for DNA binding and contains P-box (or recognition helix) that interacts directly with specific, hexametric DNA sequences and a D-box that is responsible for selecting the distance between two halves of the hexametric DNA-binding site. The D-domain is termed the hinge region of the receptor, whereas the E domain is the ligand-binding domain of the receptor and is required for receptor dimerization and ligand-dependent activation [TAF-2 (transactivation function 2)]. The F domain is not present in all nuclear receptors and its function is unknown.



trends in Tips **21**, 469-474, (2000)

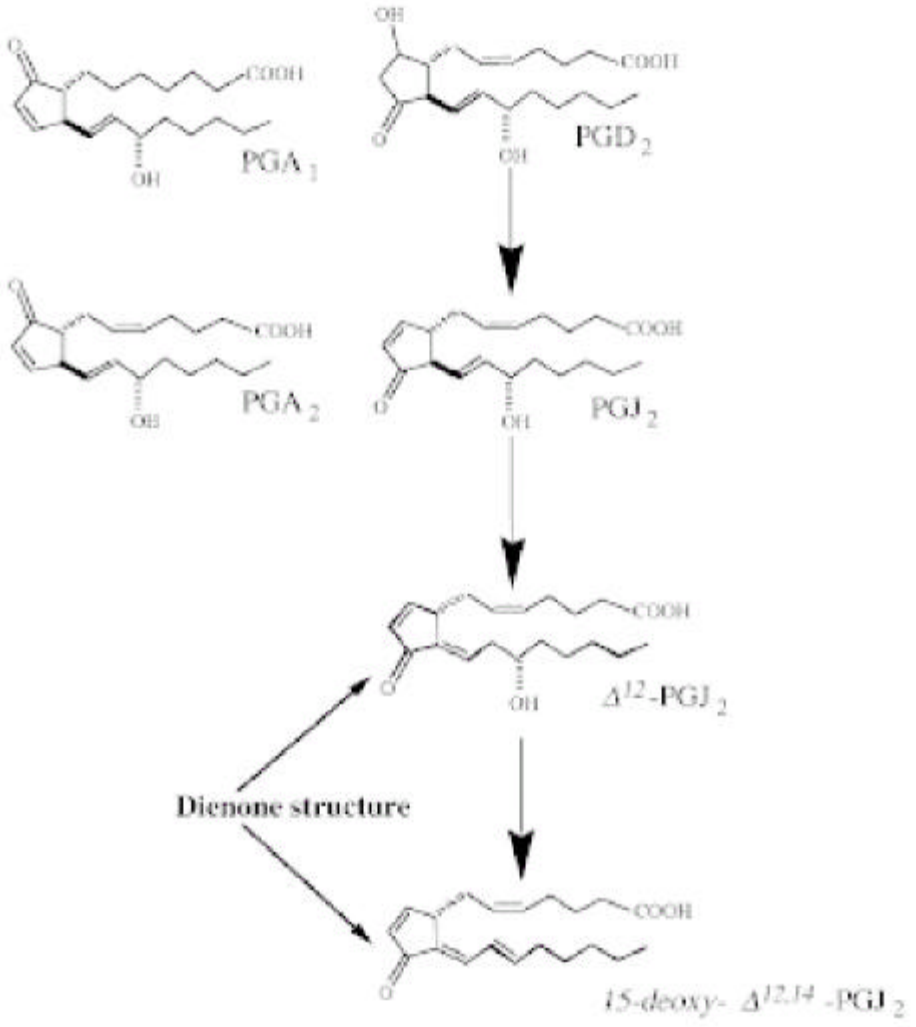
Fig. 5. Structure of peroxisome proliferator activated receptor-γ (PPAR-γ) with the retinoid X receptor (PXR). Heterodimerization of PPAR-γ with PXR produces an activive transcription complex that binds to a peroxisome proliferator -response element (PPRE). In the absence of ligand, the heterodimer forms high-affinity complex with nuclear co-repressor proteins, such as nuclear receptor co-repressor (N-CoR), which prevent transcrional activation by sequestration of receptor comlex from the promoter. Dissociation of co-repressors occurs as a consequence of a ligand-induced conformational change, and the activated heterodimer can then bind to the PPRE. This results in activation or suppression of transcription of a target gene.

있고, 글루코스 대사 (glucose metabolism), 세포주기 (cell cycle) 조절, 그리고 대식세포의 증식 및 기능과 밀접하게 관련되어 있다고 보고되어 있다[34-47]. PPAR-γ 유전자는 구조적으로 두 개의 promotor를 가지고 있기 때문에 γ1과 γ2 두 가지 이성질체로 구분할 수 있다[43]. 앞서 기술한 것처럼, PPAR-γ는 RXR α와 heterodimeric complexes를 형성함으로 기능을 나타내며, DNA에 있는 DR-1 부위와 결합하여 순차적으로 전사를 조절한다. 특히 γ의 경우 pro-inflammatory 반응에 관여하는 유전자 (TNF-α, IL-6 등)의 발현을 억제하는 것으로 밝혀져, PPAR-γ agonist는 NF-κB 및 AP-1 등과 antagonistic reaction을 통하여 이들 유전자 발현 및 대식세포의 활성을 억제하는 것으로 알려지고 있다[48-50].

그리고, 섬유아세포 (fibroblasts)에 있는 PPAR-γ1 또는 PPAR-γ2의 활성화가 지방세포의 분화를 개시한다는 보고는 PPAR-γ의 지방세포의 분화를 이끌어 내는 능력을 잘 보여 준다[46,47]. 또한 PPAR-γ는 생체 내 인슐린작용을 조절하는데 기여할 것으로 여겨져 관심의 대상이 되고 있으며, thiazolidinediones는 인슐린감수성치료제로 개발된 대표적인 PPAR-γ 리간드이다[51-59].

아라키돈산 (Arachidonic acid)의 대사경로(cascades)에 의해 생체내에서 PGA_2, PGA_2, PGI_2, PGD_2 등의 대사체가 만들어지며, PGJ 대사체들은 PGD_2에서 유래되는데, 이들은 PPAR-γ의 천연리간드로 밝혀져 있으며, 15-deoxy-PGJ_2는 가장 강력한 리간드 중 하나로 알려져 있다[60-63] (Fig. 6).

15-Deoxy-PGJ_2는 in vivo 상에서 염증이 있을 때 존재하는 물질로서 염증반응의 Feedback 조절기능을 할 것으로 보고되어 있다[64]. 더욱이 15-deoxy-PGJ_2가 활성화된 대식세포들 안의 iNOS와 TNF-α 유전자의 억제작용을 나타내었다는 보고 및 AD 환자에게서 PPAR-γ 및 COX-2 발현이 증가한다고 보고를 종합하여 보면, 15-deoxy-PGJ_2에 의해 나타날



trends in Biochem.Biophys.Res.Commun. **258**, 50-53. (1999)

Fig 6. Chemical structures of 15-deoxy-PGJ_2 and other prostaglandins

것으로 예상되는 염증반응억제 작용기전은 AD 치료에 효과적으로 작용할 것으로 기대된다[65-70].

더불어, 세포주기 조절과 관련하여 15-deoxy-PGJ_2가 아폽토시스를 유발함으로서 다양한 암세포 (유방, 전립선, 폐, 신장)의 성장을 억제한다는 등 15-deoxy-PGJ_2의 생리학적 작용에 관한 보고가 계속적으로 발표되고 있으며[71-95] 또한, 15-deoxy-PGJ_2가 NGF에 의해서 유도되는 분화중인 PC12 cells의 세포돌기의 성장을 자극한다는 보고는 15-deoxy-PGJ_2가 신경세포의 성장 분화 및 사멸에도 영향을 줄 수 있을 것임을 시사한다. 그러나, 아직까지도 이러한 세포돌기성장 (neurite outgrowth)의 촉진과 관계하는 신호전달경로가 무엇인지 명확하게 알려져 있지 않다.

따라서, 본 연구에서는 AD와 관련된 β-amyloid에 의한 신경세포의 손상 작용기전과 이를 치료 또는 억제하기 위한 신경세포 보호효과를 연구하기 위하여, 첫 번째, 신경세포의 분화 및 기능 연구에 널리 사용되고 있는 신경세포주인 PC12 cells을 이용하여 15-deoxy-PGJ_2가 어떠한 분자기전에 의하여 신경세포에 영향을 미치는지를 파악하고자 하며, 이것을 바탕으로 β-amyloid에 의한 신경세포의 손상작용을 저해할 수 있는가 하는 가능성을 알아보고자 한다.

두 번째, AD와 관계되어 있는 유전자 중 지금까지 그 기능이 제대로 밝혀져 있지 않은 PS-2 돌연변이 유전자를 transfection 시킨 PC12 cells을 사용하여 PS-2 돌연변이와 관련된 세포내 분자기전의 변화, 특히 세포사 및 염증반응과 관련된 변화를 조사함으로서, PS-2 돌연변이에 의한 AD 발생이 기존에 이미 알려져 있는 다른 유전자의 돌연변이에 의한 것과 어떤 차이가 나타나는지를 알아보고자 하며, 이를 바탕으로 AD 치료제 개발에 필요한 자료를 제시하고자 한다.

마지막으로 PC12 cells에 15-deoxy-PGJ_2와 β-amyloid를 함께 투여할

경우, 실제적으로 15-deoxy-PGJ_2가 β-amyloid의 신경독성작용을 저해함으로서 신경세포에 대한 보호효과를 나타내는지를 알아보고자 하며, 이러한 독성작용의 저해효과가 어떤 특이적인 경로 및 인자의 발현과 관련되는지를 연구하고자 한다. 그리고, 기존의 PC12 cells에 아폽토시스를 억제하는 기능을 지닌 Bcl-2 유전자를 인위적으로 증가시킨 세포를 이용하여, 즉 세포내에서 Bcl-2 유전자의 발현이 증가하는 경우에 있어서 신경세포가 β-amyloid의 신경독성 작용에 대하여 어떤 결과를 나타내는지 조사함으로서 AD 치료제 개발과 관련한 또 다른 길을 제시하고자 한다.

신경세포를 이용한 본 연구결과는 AD와 같은 퇴행성 신경질환의 발생과 관련한 기초자료를 제공할 뿐 아니라, 신경세포의 사멸의 억제와 관련한 치료제 개발에 있어서 많은 도움을 줄 수 있으리라 판단된다.

II. 재 료 및 방 법

1. 실험물질

15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J_2 (15-deoxy PGJ_2)는 Cayman chemical (18570, USA)에서 구입하였고, 세포에 투여할 때는 실험시 새로이 제조하여 적정농도를 배지에 희석하여 사용하였다. 이 물질은 빛을 차단하여야 하며, 냉동보관 시약이다. NGF와 β-amyloid$_{25-25}$는 Sigma사 (USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 사용한 모든 시약은 cell culture용 시약이나 특급시약을 사용하였다.

2. 세포배양 (Cell culture)

Rat의 pheochromocytoma로부터 유래된 PC12 cells을 37 ℃ 에서 5 % CO_2 와 95 % Air 존재 하에 10 % heat-inactivated horse serum, 5 % fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/ml) 그리고 streptomycin (100 units/ml)로 조성되어 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 F-12 nutrient (Gibco BRL, Gaithersburg,MD)로 배양시켰다. 배양된 세포는 2 3일 간격으로 주사기를 사용하여 cell을 떨어뜨린 후, DMEM을 5 ml정도 섞어서 원심분리한 뒤 위의 상층액은 버리고 가라앉은 세포만을 취하여 10 % FBS가 혼합된 DMEM으로 잘 풀어서 100 mm 배양접시에 분주시키고 세포가 배지 내에 80 90 % 정도 성장하면 계대 배양한다. 사용이상의 세포는 액화질소통에 보관하였다. 배양시 세포분화를 최소화하기 위해 horse serum의 농도를 1 %로 줄였고, bovine serum은 배지에서 제거했다. NGF (50 ng/ml)와 다양한 농도의 15-deoxy-PGJ_2를 배지에 첨가하였고, 세포는 neurite outgrowth, 세포수 및 PPAR-γ의 발현을 측정하기 위하여 72시간 배양하였으며, 전사인자의 활성을 관측하기

위해 0.5 3시간 배양시켰다. MAP kinase 종류의 발현은 24시간 배양 후 측정하였다. 세포수의 측정은 배양 후 차가운 phosphate-buffered saline (136.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 1.5 mM KH_2PO_4, pH 7.6)으로 3 회 세척하고, trypan blue dye로 염색하여 현미경상에서 보이는 살아있는 세포를 세었다.

Mutant PS-2 transfected PC12 cells는 국립독성연구원 실험동물자원실에서 만든 것을 분양 받아 사용하였으며 다음과 같은 과정을 통하여 만들어졌다. N141I mutation 유전자를 포함하고 있는 Human PS-2 cDNA를 the pTet-splice vector (Gibco BRL, Life Technologies, Inc.)의 Xho I and Spe I cutting site에 재조합하여 얻은 pNSE-Tet Vector와 조합하여 최종적으로 pNSE-PS-2 Vector를 얻어 이것을 PC12 cells에 transfection하는데 사용하였다. Lipofectamine 시약을 이용하여 linearized plasmid DNA를 PC12 cells (1×10^6 cells)에 임시적으로 transfection 시켰다. Transfection 하고 이틀 후에, 세포를 100 mm dish에 다시 $1x\,10^6$ cells/dish되게 도포한 후, 안정한 세포(stable cells)을 얻어 실험에 사용하였다. 그리고, Bcl-2 transfected PC12 cells은 충북대학교 약학대학의 홍진태 교수님으로부터 분양을 받아 사용하였으며 세포배양법은 기존의 PC12 cells 및 Mutant PS-2 transfected PC12 cells과 동일한 방법으로 처리하여 사용하였다.

3. Neurite Outgrowth 측정

세포분화는 neurite outgrowth한 수 (>2 mm)를 측정하여 평가하였다. Neurite outgrowth 정도는 Image Gauge (version 3.12, Fuji Photo co., Tokyo, Japan)로 측정한 세포사진을 사용하여 배양단위면적 당 (number/mm^2) neurite 수를 측정하여 구했다.

4. 세포생존률 및 형태변화 측정

4.1 Morphological change

세포의 confluance가 70 80 % 이상이 되면 96 well plate에 1×10^5/ml 농도의 세포를 200 ㎕씩 파종하여 37 ℃, 5 % CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양한 후 담겨있는 배지를 버리고 β-amyloid$_{25-35}$의 농도가 50 ㎛M 이 되게 배지로 희석하여 100 ㎕l을 각 well에 넣어준다. 이를 24, 48, 72시간 동안 배양한 뒤 각 농도별 시간별 세포의 형태를 광학현미경(OLYMPUS)으로 관찰하여 ×100 ×200 배율에서 사진을 찍었다.

4.2 Cell counts

96 well plate에 세포를 각 well 당 세포수가 1×10^4 개가 되게 파종한 뒤 37 ℃, 5 % CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양한 후 담겨있는 배지를 버리고 β-amyloid$_{25-35}$의 농도가 50 ㎛M이 되게 배지로 희석하고 동시에 15-deoxy-PGJ_2를 (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 ㎛M)의 농도로 배지에 희석하여 200 ㎕씩 각 well에 넣어준다. 이를 24, 48시간 동안 배양한 뒤 각 시간대별로 세포를 모아서 Trypan blue soln에 1:1로 희석하여 염색이 되지 않은 살아있는 세포만을 센다. 그리고 세포생존률은 살아있는 세포수를 총 세포수로 나누어서 viability를 계산한다. 세포를 세는 방법은 다음과 같다.

i. 잘 혼합된 세포를 10 ㎕ 취하여 여기에 0.4% Trypan blue 용액을 10 ㎕를 넣어준다 (1:1로 혼합).

ii. 혈색소계(Hemacytometer)를 사용하여 세포 수를 센다. 이 때, 9칸으로 나누어진 정사면체의 가장자리 모서리 부분의 4칸에 존재하는 세포수를 센다.

iii. 세어낸 세포를 평균을 내어 세포가 들어있는 수를 다음과 같이 계산하여 알아낸다.

$$\bigcirc\ \text{Cells/ml} = \frac{\text{count } \#}{4} \times 10^4 \times 2\ (\text{d.f.})$$

4.3 MTT assay

Tetrazolium salt 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 세포내로 흡수된 후, 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해서 formazan을 형성하는데 이 물질의 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 살아있는 세포의 활성을 의미하므로 세포의 생존율을 측정하는 방법으로 이용되고 있다. 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 세포가 되게 200 ㎕씩 파종하여, 37 ℃, 5 % CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 well당 새로운 배지 200 ㎕씩 넣어준 후 MTT (thiazolyl blue, SIGMA Co.)를 2 mg/ml의 농도로 준비하여 50 ㎕씩 첨가하고 3시간에서 4시간동안 반응을 시켰다. 각 well당 시험물질 220 ㎕를 제거하고 보라색물질 30 ㎕만 남긴 후 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 150 ㎕ 첨가하여 microplate mixer상에서 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨 후 ELISA plate reader에서 540 nm 흡광도로 O.D. (optical density)값을 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정한 값을 산출하였다.

5. 세포사멸 (Apoptosis) 측정

DAPI staining을 이용하여 세포사멸을 측정하였다. 직경이 60 mm의 petri dish에 1×10^5 cell/㎖의 세포를 각 5 ml씩 넣고 24시간동안 배양한 후 β-amyloid$_{25-35}$의 농도가 50 ㎛M이 되게 3 ml의 배지에 희석하여 24시간동안 반응시킨 뒤 반응이 끝나면 배지를 버리고 75 mM KCl을 3 ㎖정도 넣고 1분간 반응시킨다. 이것은 세포를 부풀려서 핵의 관찰을 용이하게

하기 위함이다. 그 다음 초산 (acetic acid)과 메탄올 (methanol)을 1:3으로 섞어 cold-ice 상태를 만든 뒤 이를 3 ㎖정도 넣어서 3분간 반응시켜 세포를 고정시킨다. 이 과정을 두 번 반복한다. 고정이 끝나면 공기 중에서 완전히 말린 뒤 DAPI staining 용액을 10 ㎕정도 떨어뜨린 접시에 cover glass를 덮고 20분간 염색한 뒤 형광현미경으로 (DAS Microspe LEICA DAR, ×100 ×250)으로 관찰하였다. 300개의 세포를 세어 이 중에서 핵의 단편화와 염색질의 응축을 보이는 세포사멸 형태적 판정기준에 따라 판독하여 관찰하였고 이를 대조군 대비로 %값을 구하여 그래프로 나타내었다.

6. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

6.1 핵단백질 추출 및 정량

핵추출물은 Dent와 Latchman의 변형된 방법을 사용하여 실험에 사용한 PC12 cells 등에서 분리하였다. 배양된 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 4 ℃에서 10,000 g로 5분간 원심 분리하여 PBS를 제거하였다. 세포는 10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.2 mM phenylmethylsufonyl fluoride (PMSF)로 구성된 완충액 400 ㎕ 넣어 vortexing하고 10분간 얼음에서 보관한 후, 4 ℃에서 25,000 g로 6분간 원심 분리하였다. 원심분리 후, 상층액은 버리고 얻어진 침전물에 20 mM HEPES (pH 7.9), 420 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 20% (v/v) glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF로 구성된 차가운 완충액 100 ㎕ 넣어 vortexing하고 얼음에서 20분간 보관한 후, 4 ℃에서 25,000 g로 6분간 원심 분리하고 상층액 95 ㎕를 취해 이 용액을 분주하여 -70 ℃에 저장하였다. 최종추출물의 단백질양은 Bio-rad protein assay kit를 사용하여 측정하였으며, 측정방법은 다음과 같다. 1.46 mg/ml bovine

plasma gamma globulin stock standard를 샘플에 사용한 희석용액으로 희석하여 신선한 단백질 표준품을 준비한다. 단백질 표준품과 준비한 시료를 각각 10 ㎕씩 96 well microplate에 넣고 단백질 정량을 위하여 Bio-rad protein dye reagent를 200 ㎕씩 혼합하여 5분 동안 반응시킨 후 ELISA plate reader에서 595 nm로 흡광도를 측정하여 표준품에 대한 정량곡선에 대입하여 시료의 단백질 정량 값을 산출하였다.

6.2 Oligonucleotide probe 제조

핵추출물과 AP-1 및 NF-κB oligonucleotide의 결합정도를 알아보기 위해 EMSA를 수행하였다. AP-1 oligonucleotide (Promega, Cat.No E3201)는 AP-1 DNA 결합부위에 대한 consensus sequence인 -TGAGTCAG-가 포함되어 있는 이중가닥 oligonucleotide이고, NF-κB oligonucleotide (promega, catalog E3291)는 NF-κB DNA 결합부위에 대한 consensus sequence인 -GGGGACTTTCC-가 포함되어있는 이중가닥 oligonucleotide로서 Promega사에서 구입했다. AP-1 및 NF-κB 이중가닥 oligonucleotide의 염기배열 순서는 Table 4 와 같다.

Oligonucleotide probe를 만들기 위해서는 1.5 ㎖ 소형 원심분리용 튜브에 이중가닥 oligonucleotide (5 ng) 3 ㎕와 10 x polynucleotide kinase buffer 2.5 ㎕, 100 ㎕Ci [γ-^{32}P] ATP을 혼합한 후 추가적으로 증류수를 넣어 최종 부피가 25 ㎕가 되도록 하였다. 이 혼합액에 1 ㎕의 T4 kinase (5 unit)를 최종적으로 넣어주었고 혼합액이 들어있는 튜브를 반응이 일어나도록 37 ℃에서 45분간 방치하였다. 반응을 시킨 후에 50 mM Tris/HCl (pH 7.5)을 넣어서 50 ㎕의 부피가 되도록 oligonucleotide가 들어있는 혼합액을 희석하였다. Sephadex® G-50이 들어있는 Nick column (Pharmacia Biotech)를 가지고 NF-κB oligonucleotide probe를 순수 정제하였으며, 정제방법은 다음과 같다. column안에 있는 용액을 버린 후,

equilibration buffer인 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)로 한번 세척하고 column을 지지대에 부착한 후 대략 3 ㎖의 equilibration buffer를 사용하여 gel을 균질화하였다. Equilibration buffer가 gel bed에 완전히 흡수된 후 NF-κB oligonucleotide 반응용액 50 ㎕를 column에 넣어주었고 부가적으로 400 ㎕ buffer용액을 넣은 다음 gel bed로 들어가게 하였다. Oligonucleotide probe 용액을 받기 위해 column 아래 부분에 tube를 설치한 후 추가로 400 ㎕를 더 넣어주어 방사선 표지된 oligonucleotide 용액을 정제하였다. 정제된 oligonucleotide 용액 1 ㎕를 2 ml의 scintillation cocktail 용액이 들어있는 vial에 넣어 scintillation counter (Tri-carb 2000 CA, Packard Instrument Co., Downers Grove, IL, USA)를 사용하여 oligonucleotide probe의 방사능의 정도를 측정하였다.

6.3 Gel shift mobility assay

Oligonucleotide probe와 결합반응을 일으키기 위하여 5 ㎕의 완충액 [10 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 0.1 ㎍/㎕ poly dI-dC, 0.1 ㎍/㎕ bovine serum albumin]과 5 ㎍의 핵추출물을 혼합한 후, 이 혼합액을 15분간 4 ℃에서 미리 반응시킨다. 그 다음에 [γ-^{32}P] ATP로 표지된 100,000 cpm의 oligonucleotide probe를 넣어주고 증류수로 혼합액의 최종부피를 25 ㎕로 한 후 상온에서 20분동안 방치하여 혼합액을 반응시켰다. AP-1 및 NF-κB의 결합활성을 알아보기 위한 EMSA를 수행하기 위하여, 위에서 얻은 oligonucleotide 반응액에 2 ㎕ 0.1 %(w/v) bromophenol blue dye를 넣어서 전기영동에 사용하였다. 10 ㎖의 polyacrylamide:bis (30 %:0.8 % w/v)와 38.4 ㎖의 증류수 그리고 5 x TBE (500 mM Tris pH 8.0, 450 mM borate, 5 mM EDTA) 2.5 ㎖를 혼합한 용액에 시험당일 제조된 10 % (w/v) ammonium persulfate 0.5 ㎖과 TEMED 25 ㎕를 부가 혼합하여 6 % non-denaturing

Table 4. Oligonucleotide sequences used for EMSA

AP-1 consensus Oligonucleotide	Cat. No.
5‘- CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA -3' 3'- GCG AAC TAC TCA GTC GGC CTT -5'	promega catalog E3201
SP-1 consensus Oligonucleotide	
5‘- ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C -3' 3'- TAA GCT AGC CCC GCC CCG CTC G -5'	promega catalog E3231
NF-κB consensus Oligonucleotide	
5‘- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C -3' 3'- TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G -5'	promega catalog E3291

gel을 조제한 다음, 깨끗이 세척한 후 조립된 전기영동 유리판에 용액을 부어 gel를 형성하였다. 전기영동 buffer는 0.25 x TBE buffer를 사용하였고 전기영동 gel은 150V에서 1시간동안 prerunning한 후, bromophenol blue dye가 함유된 반응액과 혼합하여 loading하고 150V로 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 3M filter paper에 polyacrylamide gel을 올려놓고 slab gel dryer (Hoffer Scientific Co. SE-1160)로 80℃에서 1시간 건조시킨 후 -70℃에서 감광시켰다. 하루 후 감광된 X-ray film (Kodak Bio-Max film)을 현상하여 AP-1 및 NF-κB 결합능의 활성도를 확인하였다.

7. Western blot analysis

7.1 시료준비 및 정량측정

원하는 물질의 처리가 끝나면 scriper로 세포를 모으고 모은 세포를 담겨있던 배지와 함께 1000 rpm에서 원심분리 하여 상층액을 버린 뒤, 2 ml의 차가운 PBS로 두 번 세척한다. 여기에 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02 % Sodium Azide, 0.2 % SDS, PMSF (Phenyl methyl sulfonnyl fluoride) 100 ㎍/ml, Aprotinin 50 ㎕/ml, Igapel 630(또는 NP-40) 1 %, NaF 100 mM, Sodium Deoxy choate 0.5 %, EDTA (Ethylne diamine tetra acetic acid-Sigma E-4884) 0.5 mM, EGTA (Ethylene glycol-bis(β-amino ethyl ether) N,N,N',N'-tetra acetic acid-sigma E-4378) 0.1 mM 로 조성된 Lysis Buffer를 50 100 ㎕를 가해 잘 vortex한 뒤 2시간 동안 4 ℃에서 lysis시킨다. 반응이 끝나면 시료를 1.5 ml tube에 담아 30초 동안 vortex 하고 4 ℃ 23,000 g에서 1시간동안 원심분리 한다. 원심분리한 상층액만 취한다. 최종추출물의 단백질양은 Bio-rad protein assay kit를 사용하여 측정하였으며, 측정방법은 다음과

같다. 1.46 mg/ml bovine plasma gamma globulin stock standard를 샘플에 사용한 희석용액으로 희석하여 신선한 단백질 표준품을 준비한다 (희석배수; 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml). 단백질 표준품과 준비한 시료를 각각 10 ㎕씩 96 well microplate에 넣고 단백질 정량을 위하여 Bio-rad protein dye reagent를 200 ㎕씩 혼합하여 5분 10분 동안 반응시킨 후 ELISA plate reader에서 595 nm로 흡광도를 측정하여 표준품에 대한 정량곡선에 대입하여 시료의 단백질 정량 값을 산출하였다.

7.2 Electrophoresis 및 transfer

정량이 된 단백질에 Lysis buffer와 60 mM Tris buffer (pH 6.8), 25 % Glycerol, 2 % SDS, 14.4 mM 2-mercapto ethanol, 0.1 % Bromo phenol Blue로 조성된 5 X sample buffer를 섞어 protein 양을 같게 한 후 100 ℃ heat block에서 5분 동안 boiling 한 후, 잠깐동안 원심분리 하여 시료를 모은다.

Seperating gel (12 %)은 4 ml의 polyacrylamide:bis (30 %:0.8 % w/v)와 6.9 ml의 증류수 그리고 3.8 ml의 1.5 M Tris, pH 8.8과 10 % SDS 150 ㎕을 혼합한 용액에 시험당일 제조된 10% (w/v) ammonium persulfate 150 ㎕와 TEMED 10 ㎕를 부가 혼합하여 만든 다음, 깨끗이 세척하여 조립된 전기영동 유리판에 용액을 부어 gel를 형성하였다. Stacking gel (5 %)은 670 ㎕의 polyacrylamide:bis (30 %:0.8 % w/v)와 2.2 ml의 증류수 그리고 1 ml의 1.5 M Tris, pH 6.8과 10 % SDS 40 ㎕을 혼합한 용액에 시험당일 제조된 10 % (w/v) ammonium persulfate 65 ㎕와 TEMED 6.5 ㎕를 부가 혼합하여 seperating gel 위에 부어 완전한 gel을 형성하였다.

전기영동 Running buffer는 Tris base 30.3 g, Glycine 144 g, SDS 10 g을 1 l에 녹여 10 × stock을 만들었다. 정량한 단백질을 10-20 ㎕를

loading하고 50 80 volt로 약 20분간 running하고 stacking gel의 전개가 끝나면 100 120 volt로 separating gel을 약 2시간 정도 전개시킨 후 transfer하였다. Transfer buffer의 조성은 1 l에 Tris base 3.03 g, Glycine 14.63 g, Methanol 200 ㎖으로 만들어서 Nitrocellulose membrane (Schleichet & Schuell, 0.45 ㎛)로 실온에서 80 volt로 1시간 10분간 transfer 하였다. transfer가 끝난 gel은 staining solution (Coomassie Blue staining slon) 용액에 2시간 담가둔 후 destaining 용액으로 넘겨 남은 protein을 확인하였고 transfer된 membrane은 0.05 % Tween-20, 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0으로 조성된 TBS-T 용액으로 세척한 후 약간 물기를 제거하고 TBS-T 용액으로 희석한 약 5 % skim milk로 약 2시간 정도 blocking한 후 TBS-T 용액으로 여러 번 세척한다.

7.3 Western blotting 및 ECL detection

TBS-T 용액으로 희석한 3 % skim milk에 1차 항체 (Table 5)를 권장 농도로 약 200 1000배 희석하여 만든 용액에 blocking된 membrane을 담가둔 후 실온에서 2시간 정도 반응시킨 후, TBS-T 용액으로 10분마다 새로운 TBS-T 용액으로 갈아주면서 1시간 동안 세척하였다. Peroxydase가 부착되어 있으며 1차 항체와 반응하기에 적합한 2차 항체를 권장농도로 약 1000 2000배 희석하여 1차 항체와 결합한 membrane을 반응시킨 후 실온에서 1시간 정도 반응시키고 TBS-T 용액으로 10분간 3 5번 세척하였다.

편평한 판에 미리 wrap을 씌워 놓고, membrane의 물기를 제거한 후 판 위에 올린다. ECL 용액 1 (black), 2 (White)를 1:1로 잘 섞어 membrane에 뿌려, 골고루 용액을 묻히고 1분 정도 반응시킨 후 ECL 용액을 충분히 제거하고 그 위에 wrap을 씌운다. film을 cassette에 올려놓고 membrane이 고정된 판을 일정 시간 film에 찍은 다음 developer에 담근다. 어느 정도 film에 band가 나타나면 fixer로 옮겨 골고루 고정이 잘 되도록 흔들어

Table 5. List of antibodies used for western blot

Target Protein	Cat. No.	Size(kDa)	구입회사
Bcl-2	554087	26	PharMingen
caspase 3	sc-7148	31	Santa Cruz Biotechnology
caspase 9	sc-7885	35	"
COX-2	sc-1746	80	"
IκB-α	sc-371	34	"
p21	sc-756	21	"
p53	sc-6243	53	"
p38	sc-7149	38	"
p-P38	sc-7973	"	"
ERK 2	sc-154	42	"
p-ERK	sc-7383	"	"
JNK 1	sc-571	46	"
p-JNK	sc-6254	"	"
MEK 2	sc-524	51	"
TNF-α	sc-1348	17	"
PS-2	sc-7861	95	"
PPAR-γ	sc-7196	55	"
β-Amyloid	A8326	130	Sigma

주며 고정시킨다. 고정이 끝나면 흐르는 물로 깨끗이 씻어 건조시키고 관찰하였다.

8. 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 자료분석에는 post hoc test와 같은 Bonferroni's test에 의한 one-way analysis of variance을 이용하여 $p<0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. PC12 cells의 neurite outgrowth에 대한 15-deoxy-PGJ_2의 생리학적 효과 및 분자기전 연구

1.1 Neurite outgrowth에 대한 영향 관측

먼저 배지에 함유된 serum이나 NGF가 세포분화의 지표인 neurite outgrowth를 증가시키는지를 조사하였다 (Fig. 7). Neurite outgrowth는 10 % heat-inactivated horse serum과 5 % fetal bovine serum을 첨가하여 배양시켰을 때 증가하였다. 그러나, 1 % serum은 neurite outgrowth를 증가시키지 못하였으므로, 15-deoxy-PGJ_2를 NGF와 함께 또는 NGF 없이 1 % 혈청이 들어있는 배지에 첨가하여 PC12 cells을 배양하였다. PC12 cells의 neurite outgrowth는 15-deoxy-PGJ_2 처리군의 경우 대조군에 비해 약 2배 정도 증가되었다. 또한 15-deoxy-PGJ_2를 NGF (50 ng/ml)와 함께 처리했을때, neurite outgrowth를 현저하게 증가시켰다.

1.2 MAP kinase signal pathway에 대한 영향 관측

MAP kinase는 신경세포로의 분화와 전사인자 (transcription factors)의 활성조절에 결정적인 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서, neurite outgrowth에 대한 15-deoxy-PGJ_2의 증가효과가 MAP kinase signal pathway의 활성에 기인하는지를 조사하였다 (Fig. 8). NGF 비처리군과 처리군에 있어서 15-deoxy-PGJ_2 (0.8 μM)는 NGF에 의해 유도되는 MAP kinase의 발현을 증가시켰다. PC12 cells에서 나타나는 이러한 결과에 어떤 MAP kinase가 특이적으로 연관되어 있는지를 측정한 결과, 15-deoxy-PGJ_2를 처리한 경우 NGF에 의해 유도되는 MAP kinase와

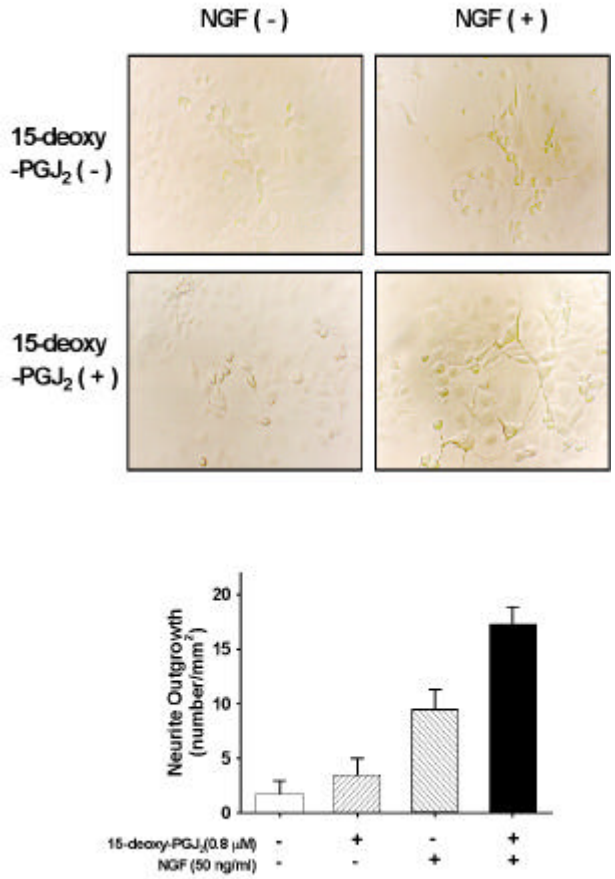


Fig. 7. Neurite outgrowth by 15-deoxy-PGJ_2 with/without NGF in cultured PC12 cells.

PC12 cells cultured with 0.8 μM 15-deoxy-PGJ_2 in the absence or presence of NGF (50 ng/ml) for 72 hrs. Neurite outgrowth was assessed by measuring the number of neurite outgrowth per unit area of culture (number/mm^2). Up, morphological observation (×40 magnification). Down, Quantitative levels of neurite outgrowth. Values are mean±standard error of three experiments, with triplicate of each experiment.

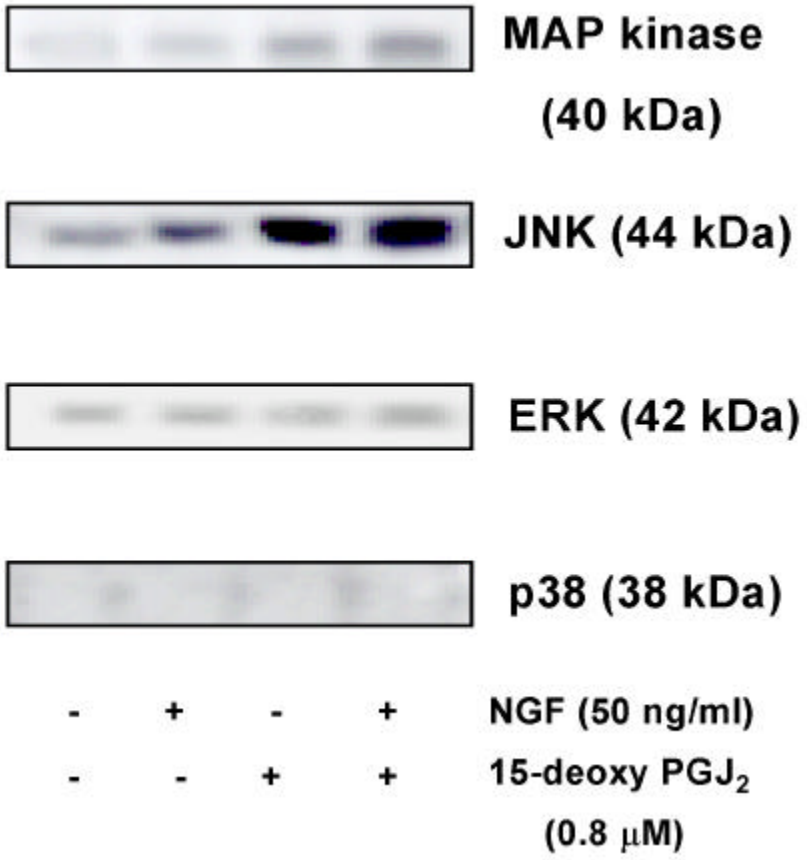


Fig. 8. Effect of 15-deoxy PGJ_2 on the expression of MAP kinase family.

PC12 cells cultured with 0.8μM 15-deoxy PGJ_2 in the absence or presence of NGF (50 ng/ml) for 24 hrs. Expression of MAP kinase family was determined by western blotting. Values are mean±standard error of two experiments, with triplicate of each experiment.

JNK의 발현증가를 제외한 다른 종류의 MAP kinase의 발현은 관측되지 않았다.

1.3 전사인자 활성에 대한 영향 관찰

15-Deoxy-PGJ_2에 의한 neurite outgrowth의 성장증가가 잘 알려진 세 가지 전사인자 AP-1, SP-1 그리고 NF-κB 중 어떠한 것과 연관되어 있는지를 알아보았다 (Fig. 9 및 10). 전사인자 AP-1과 SP-1의 활성은 시간 및 농도-의존적으로 증가하였다. AP-1의 활성은 15-deoxy-PGJ_2 0.8 μM 농도로 처리할 경우, 1시간 후 최고로 나타났고 반면 SP-1은 30분 후에 나타났다. NF-κB의 활성은 15-deoxy-PGJ_2의 처리에 의해서는 아무런 변화가 나타나지 않았다. NGF (50 ng/㎖) 존재시 15-deoxy-PGJ_2 (0.8 μM)는 NGF에 의해 유도되는 AP-1 활성을 증가시키는 반면, SP-1의 활성은 더 이상 크게 증가시키지 않았다 (Fig. 11).

1.4 PPAR-γ의 발현에 관한 영향 관측

PPAR-γ의 nature ligand 인 15-deoxy-PGJ_2 는 PPAR-γ의 활성을 통해 생리적 영향을 나타낼 것으로 예상된다. 그러므로, 15-deoxy-PGJ_2에 의한 PPAR-γ의 발현을 알아보기 위해 western blotting assay를 수행하였다 (Fig. 12). NGF와 혈청은 PPAR-γ의 발현을 유발하지 않으며 PC12 cells의 neurite outgrowth를 현저하게 증가시켰다. 하지만, 예상과 달리 PC12 cells에서 0.8 μM 15-deoxy-PGJ_2는 PPAR-γ의 발현을 유발하지 않았고, 또한 3.2 μM 농도 처리시에도 PPAR-γ의 발현이 관측되지 않았다. 그러나, 배자 중뇌세포(embryo midbrain cells) 및 neuroblastoma cells 같은 다른 분화중인 신경세포에서 PPAR-γ의 발현을 관측한 결과, 이들 세포에서는 15-deoxy-PGJ_2에 의해 PPAR-γ가 발현되었다.

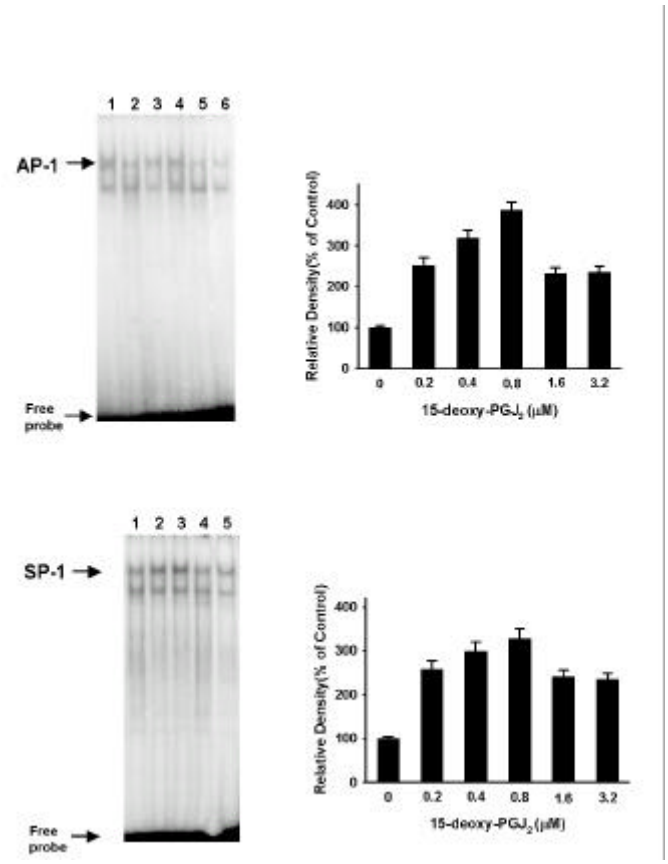


Fig. 9. Dose effect of 15-deoxy PGJ_2 on the activation of transciption factors AP-1 and SP-1.

PC12 cells cultured with 0.2 3.2 μM 15-deoxy PGJ_2 for 30 min (AP-1) or 1hr (SP-1). A DNA binding activity of AP-1 and SP-1 was determined by gel mobility shify assay. Values are mean±standard error of two experiments, with triplicate of each experiment.

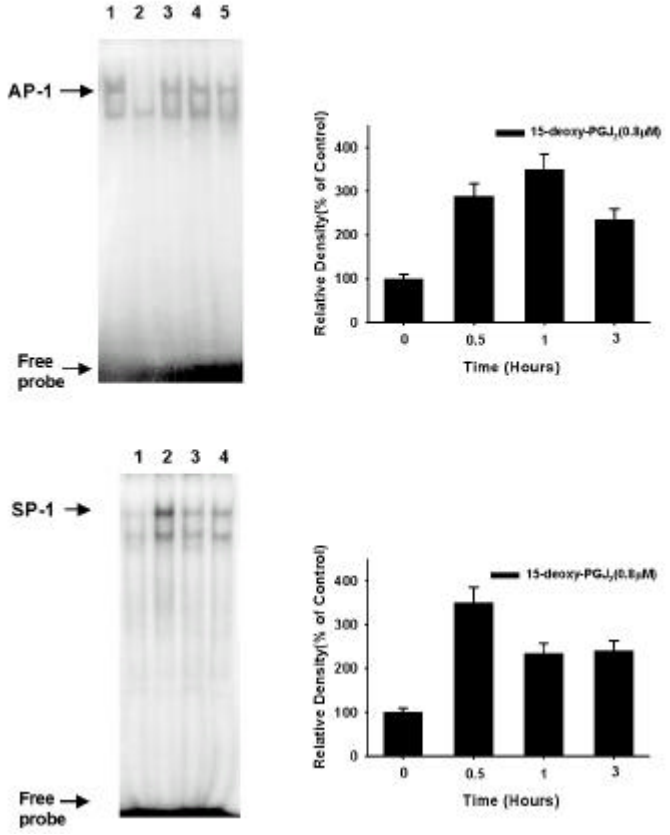


Fig. 10. Time course effect of 15-deoxy PGJ_2 on the activation of transciption factors AP-1 and SP-1.

PC12 cells cultured with 0.8μM 15-deoxy PGJ_2 for various times. A DNA binding activity of AP-1 and SP-1 was determined by gel mobility shify assay. Values are mean± standard error of two experiments, with triplicate of each experiment.

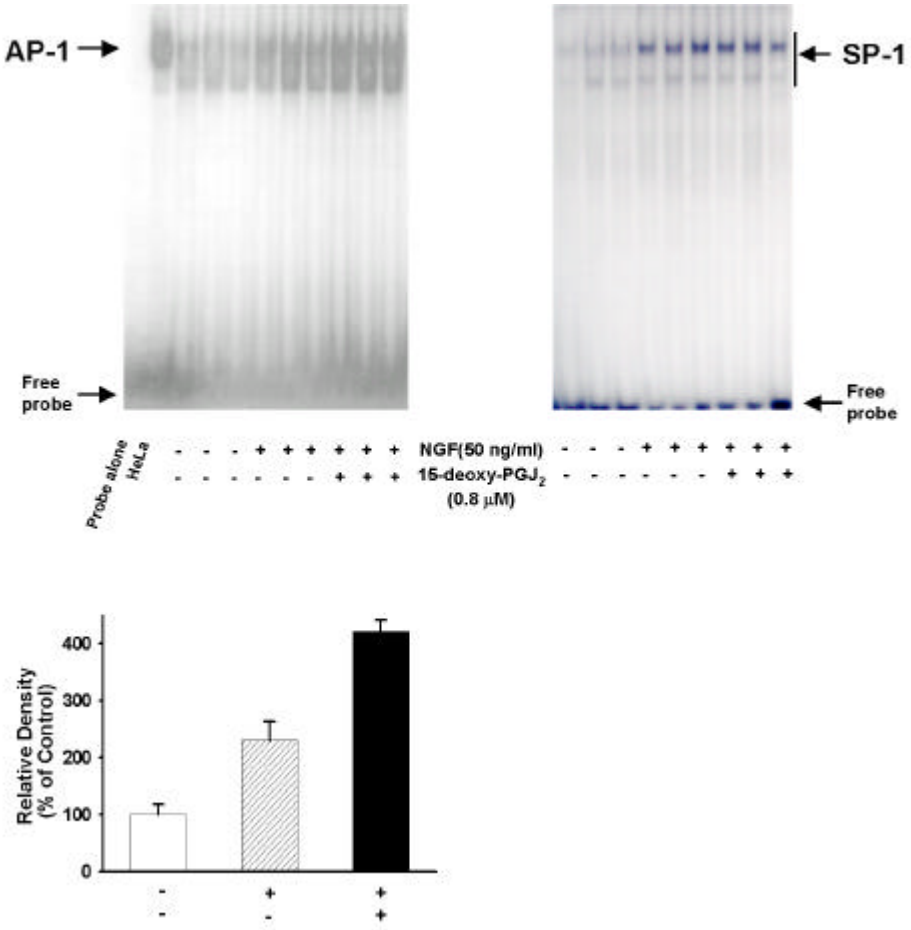


Fig. 11. Effect of 15-deoxy PGJ_2 on the NGF-induced activation of transcription factors AP-1 and SP-1. PC12 cells cultured with 0.8 μM 15-deoxy PGJ_2 with NGF (50 ng/ml) for 30 min (AP-1) or 1 hr (SP-1). A DNA binding activity of AP-1 and SP-1 was determined by gel mobility shift assay. Values are mean±standard error of two experiment, with triplicate of each experiment.

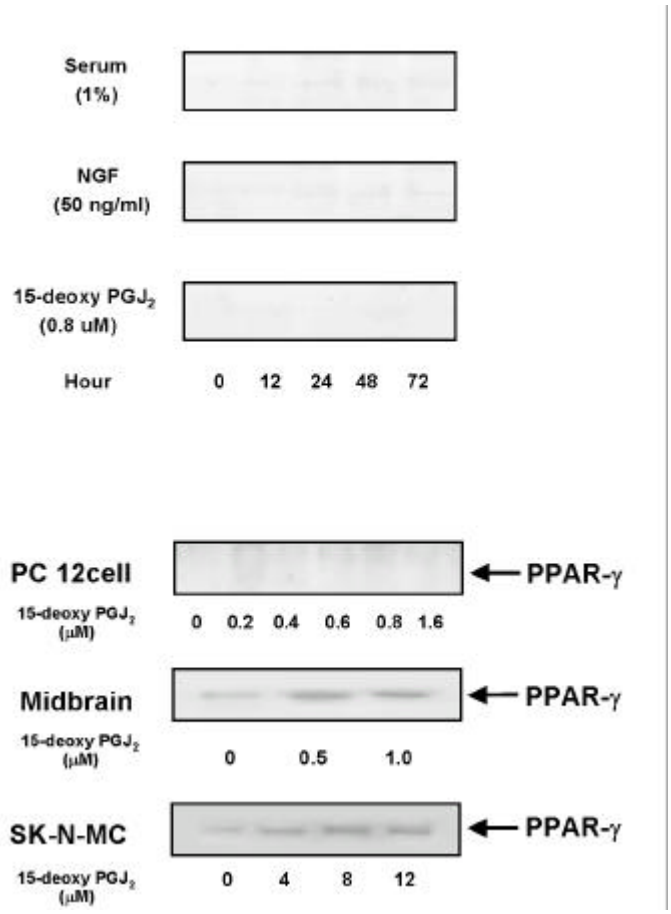


Fig. 12. Effect of 15-deoxy PGJ_2 on the expression of PPAR-γ.

PC12 cells were cultured with various doses of 15-deoxy PGJ_2 in the absence or presence of serum and-or NGF (50 ng/ml) for several different times. Neuroblastoma (SK-N-MC) cells were cultured with 0.8 μM 15-deoxy PGJ_2 for 24 hrs. Midbrain embryonic cells were isolated from rat embryos on gestation day 12, and cultured for 48 hrs, and then the cells were treated with 15-deoxy PGJ_2 for 24 hrs. Values are mean ±standard error of two experiments, with triplicate of each experiment.

2. Mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에 대한 β-Amyloid의 영향 및 그 분자기전에 관한 연구

2.1 Neurite outgrowth 및 아폽토시스 변화 관측

AD환자의 신경세포의 죽음에 직접적으로 연관되어있는 것으로 알려져 있는 β-amyloid의 신경세포에 대한 독성작용 및 AD의 유전적 원인 중의 하나로 알려져 있는 PS-2 돌연변이에 의한 영향을 알아보기 위하여, PC12 cells 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에 50 μM의 β-amyloid$_{25-35}$을 처리한 후 나타난 결과를 비교해보았다 (Fig. 13 및 14). β-Amyloid$_{25-35}$는 PC12 cells 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells의 NGF에 의한 neurite outgrowth를 현저하게 저하시키는 결과를 나타내었다. 또한, β-amyloid$_{25-35}$는 이 두 세포에서 대조군과 비교하여 현저하게 세포사멸을 증가시켰다. Neurite outgrowth 및 아폽토시스에 대한 β-amyloid$_{25-35}$의 영향은 AD 발병기전과 밀접한 관련이 있을 것으로 예상되는 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서 더 크게 나타났다.

2.2 β-Amyloid 및 PS-2 발현 변화 측정

PC12 cells 및 mutant PS-2 transfected PC12 cells에서 β-amyloid의 발현정도를 비교함으로서 PS-2의 N141I 돌연변이가 과연 신경세포에서 β-amyloid의 생성을 증가시키는지를 확인하였다. 실제로 PS-2 유전자의 돌연변이는 PC12 cells에 있어서 β-amyloid의 생성을 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 15). 또한 이들 세포에 50 μM의 β-amyloid$_{25-35}$를 가할 경우, 각 세포의 대조군과 비교할 때 β-amyloid의 생성이 현저하게 증가되었음을 관측할 수 있는 데, 이는 앞의 이들 세포의 neurite outgrowth 및 아폽토시스에 대한 β-amyloid 독성작용의 경향과 일치하였다 (Fig. 13

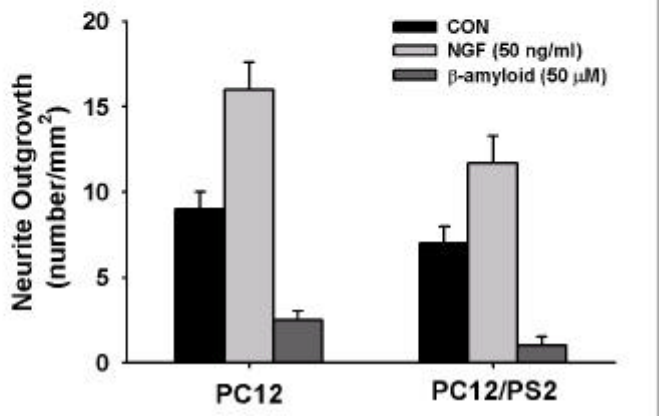


Fig. 13. Effect of β-amyloid on neurite outgrowth in PC12 cells and mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells. PC12 cells and mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells were cultured with 50 μM β-amyloid$_{25-35}$ for 72 hrs, NGF (50 ng/ml) was used as positive control. Neurite outgrowth was assessed by measuring the number of neurite outgrowth per unit area of culture (number/mm^2). Up, morphological observation (×40 magnification). Down, Quantitative levels of neurite outgrowth. Values are mean±standard error of three experiments, with triplicate of each experiment.

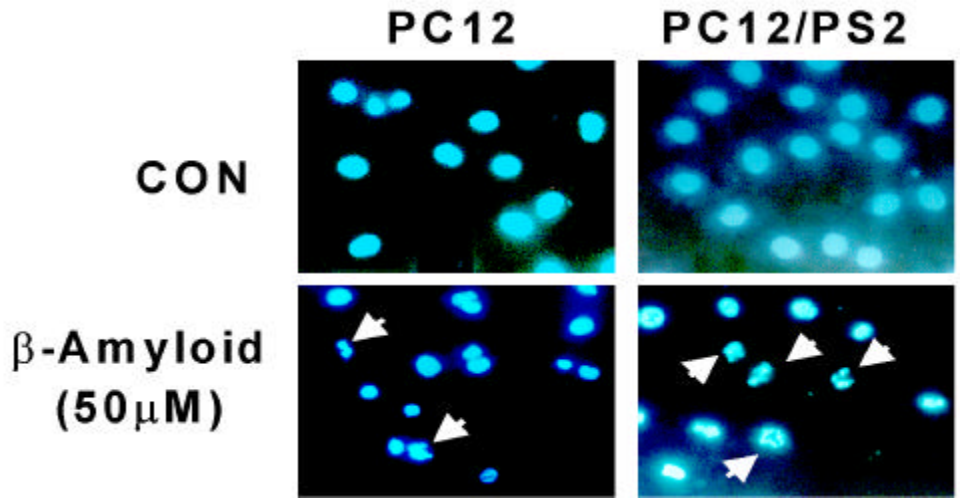


Fig. 14. Effect of β-amyloid$_{25-35}$ on apoptosis in PC12 cells and mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells.

및 14). 결국 이 결과는 신경세포에 있어서 N141I PS-2 돌연변이는 세포내 β-amyloid의 생성의 증가시킴으로서 신경세포의 아폽토시스를 유발함을 나타낸다.

2.3 세포사와 관련된 단백질의 변화측정

PC12 cells 및 mutant PS-2 transfected PC12 cells에서 β-amyloid가 신경세포의 아폽토시스를 유발하였기 때문에, 신경세포내 어떤 단백질이 관련되어 있는지를 알아보았다. 이를 위하여 세포사와 관련된 몇 가지 단백질의 변화를 측정하였다. PC12 cells과 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells을 β-amyloid (50 μM)로 처리할 경우, 신경세포의 아폽토시스와 직접적으로 관련되는 caspase 3, caspase 9, p53 그리고 p21 단백질의 변화가 관측되었다 (Fig. 16). 특히 caspase 3, caspase 9의 경우, 두 세포 모두에 대해서 β-amyloid를 처리하기 전 보다 2배 이상 발현이 증가하였다. 또한, β-amyloid에 의한 p21 단백질의 발현의 경우 PC12 cells 보다는 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서 더 강하게 발현되었다.

2.4 염증반응과 관련된 단백질 변화측정

이미 잘 알려진 것처럼 AD 환자의 뇌 신경세포의 죽음은 정상세포에서와 달리 AD 진행과정 중에서 나타나는 상대적으로 높은 염증반응과 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다[31,32]. 따라서, 본 연구에서도 PC12 cells 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서 β-amyloid에 의해서 이러한 염증반응과 관련된 단백질의 변화의 유무가 관측되는지 그리고 어떠한 단백질이 관련되는지 알아보고자 하였다. 그 결과 β-amyloid$_{25-35}$ (50 μM) 처리시 대조군에 비하여 COX-2, IκB-α 그리고 TNF-α의 발현이 증가되었다. 특히, TNF-α 및 COX-2의 경우 PC12 cells 및 mutant N141I

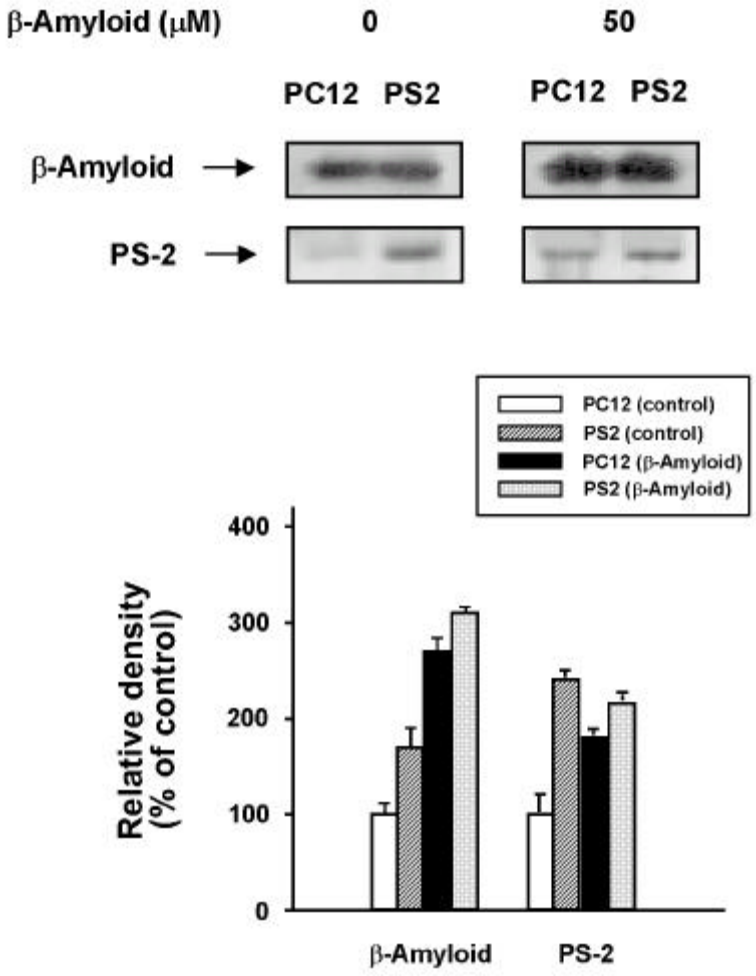


Fig. 15. Expression of β-amyloid and preseniline 2 protein in PC12 cells and mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells. PC12 cells and mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells were cultured with 50 μM β-amyloid$_{25-35}$ for 24 hrs. Expressions of β-amyloid and PS-2 protein were determined by western blotting. Values are mean±standard error of two experiments, with triplicate of each experiment.

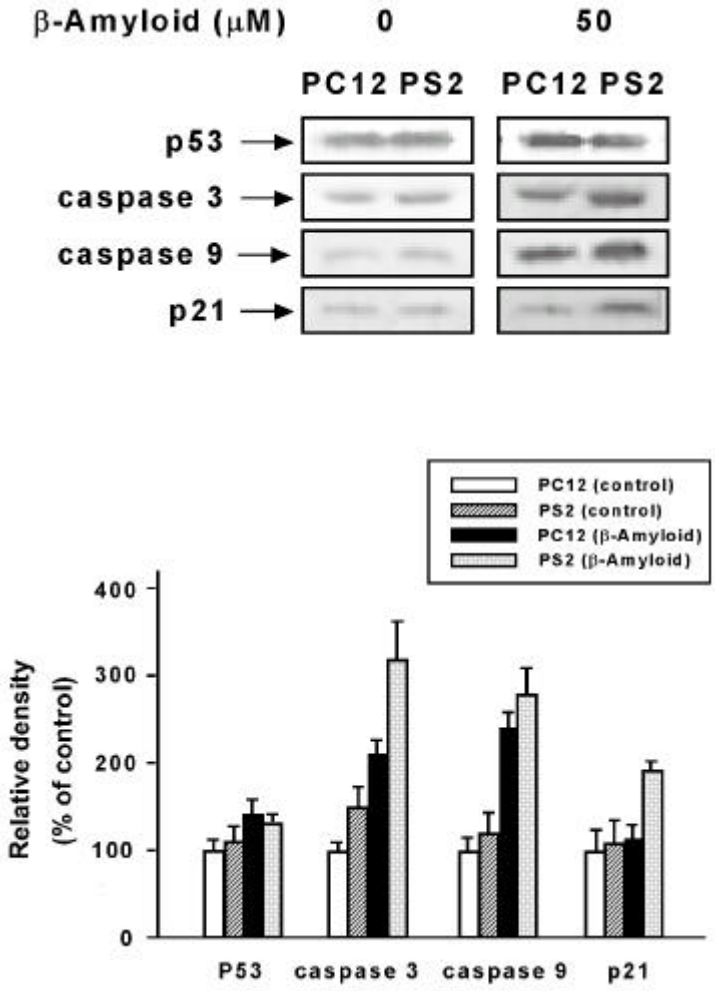


Fig. 16. Effect of β-amyloid on the expression of cell death related protein. PC12 cells and mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells were cultured with 50 μM β-amyloid$_{25-35}$ for 24 hrs. Expression of p53, caspase 3, caspase 9 and p21 were determined by western blotting. Values are mean± standard error of two experiments, with triplicate of each experiment.

PS-2 transfected PC12 cells 모두에서 발현이 현저하게 증가되었지만, IκB-α의 경우 대조군에 비해서 현저하게 발현이 증가되지 않았다 (Fig. 17). 그러나 PPAR-γ의 경우 대조군과 비교하여 볼 때 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells 보다 PC12 cells에서 발현이 더욱 강하게 측정되었다. 그러나, 전반적으로 이러한 염증반응 단백질의 발현은 PC12 cells 보다는 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서 더 강하게 나타났다.

2.5 전사인자 NF-κB의 변화 측정

NF-κB는 전사인자로서 자외선 (UV)나 성장인자 (growth factors)와 같은 1차 자극은 물론, cytokines와 같은 2차 자극에 의해서도 발현이 유도되며, 특히 염증반응과 면역반응에 밀접하게 관련된다고 알려져 있으므로, PC12 cells 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서 β-amyloid가 전사인자 NF-κB의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. β-Amyloid$_{25-35}$ (50 μM)를 3시간 처리 후, PC12 cells 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서는 NF-κB의 발현을 현저하게 증가시켰고, PC12 cells 보다는 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서 더 강하게 발현시킴을 관측할 수 있었다 (Fig. 18).

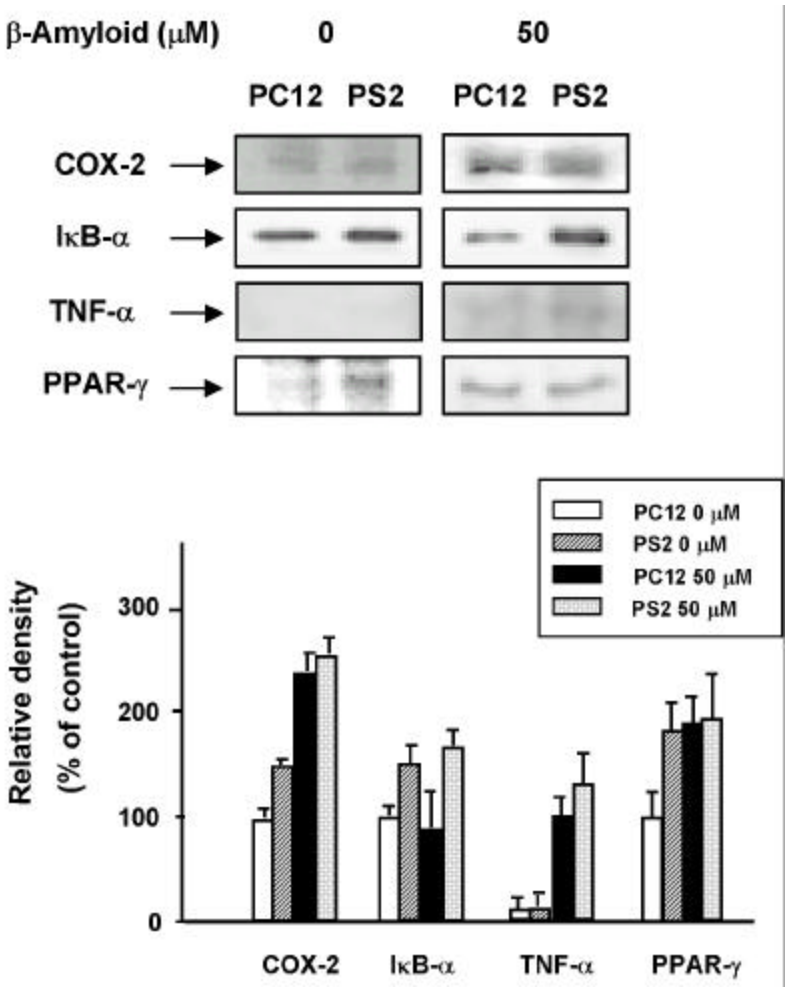


Fig. 17. Effect of β-amyloid on the expression of inflammation related proteins in neuronal cells. PC12 cells and mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells were cultured with 50 μM β-amyloid$_{25-35}$ for 24 hrs. Expression of COX-2, IκB-α, TNF-α and PPAR-γ were determined by western blotting. Values are mean±standard error of two experiments, with triplicate of each experiment.

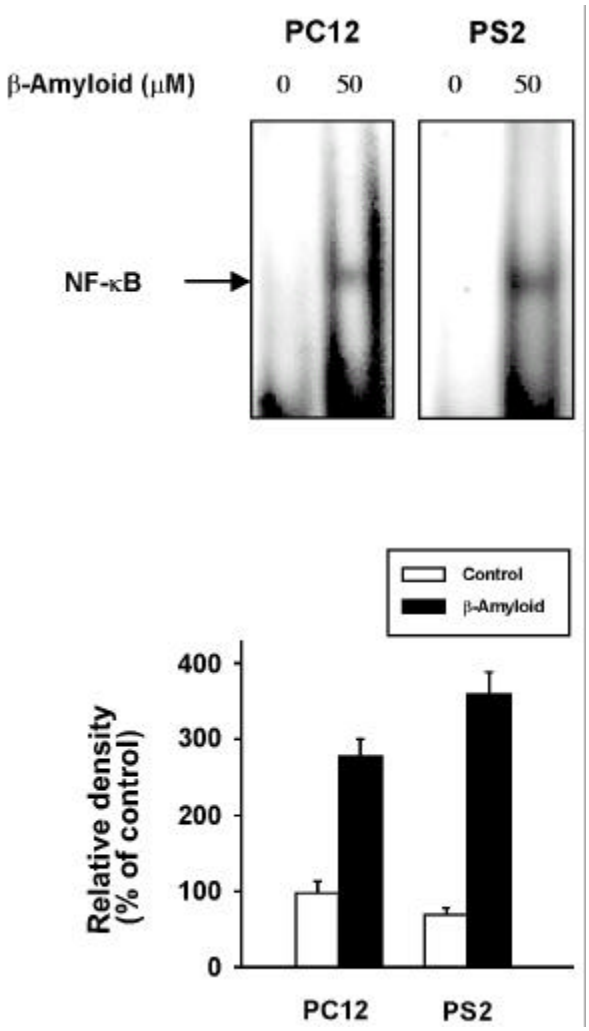


Fig. 18. Effect of β-amyloid on the activation of transcription factors NF-κB. PC12 cells and mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells were cultured with 50 μM β-amyloid$_{25-35}$ for 3 hr. A DNA binding activity of NF-κB was determined by gel mobility shift assay. Values are mean±standard error of two experiment, with triplicate of each experiment.

3. 15-Deoxy-PGJ_2의 신경세포 보호효과 및 Bcl-2 Transfected PC12 cells에 대한 β-Amyloid의 작용에 관한 연구

3.1 β-Amyloid의 신경세포 손상작용에 대한 15-deoxy-PGJ_2의 저해효과 관측

15-Deoxy-PGJ_2의 β-amyloid에 대한 신경세포 보호효과를 알아보기 위하여, PC12 cells과 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에 50 μM 농도의 β-$amyloid_{25-35}$ 와 15-deoxy-PGJ_2를 농도별 (0.2, 0.4, 0.8, 1.6 μM)로 각각 또는 함께 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 농도의존성 따른 세포수의 증가 및 세포생존률에 대한 변화를 관찰하였다 (Fig. 19-22). 각 세포를 β-$amyloid_{25-35}$ (50 μM)만 처리할 경우, β-$amyloid_{25-35}$의 독성영향으로 인해 각 세포의 증식이 억제되었고, 대조군과 비교할 경우 PC12 cells은 89.52±10.04 %, mutant PS-2 transfected PC12 cells는 79.88±3.45 %로 각각 세포생존률이 감소하였다. 그러나, 15-deoxy-PGJ_2를 함께 처리할 경우에 대조군과 비교시 각 처리농도별로 PC12 cells는 94.01±3.26, 98.10±2.73, 107.51±0.65, 105.32±4.74 %로 현저하게 세포생존률이 증가함이 관찰되었고, 또한 mutant PS-2 transfected PC12 cells도 동일하게 83.39±8.29, 86.43±5.62, 89.42±3.84, 92.96±2.32%로 15-deoxy-PGJ_2에 의한 세포생존률의 농도의존적 증가현상이 관찰되었다.

이러한 β-amyloid의 신경세포 손상작용에 대한 15-deoxy-PGJ_2의 농도별 저해효과는 상대적으로 PC12 cells 보다 mutant PS-2 transfected PC12 cells에서 보다 더 뚜렷하게 나타남을 관측할 수 있었다.

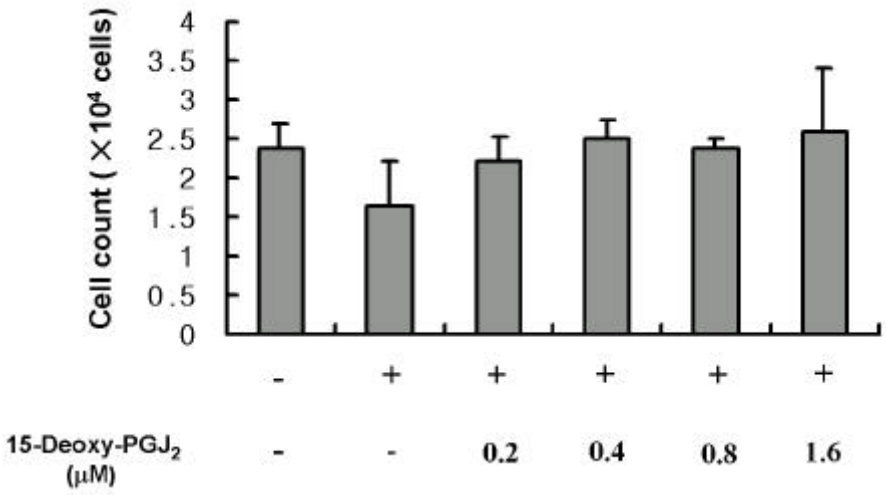


Fig. 19. Effect of 15-deoxy-PGJ_2 on toxicity of β-amyloid in PC12 cells (I).

PC12 cells was cultured with 50 μM β-$amyloid_{25-35}$ and 15-deoxy-PGJ_2 0, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 μM. Cell count was determined at 24 hour. These data were represented by mean ±S.D. (n=3).

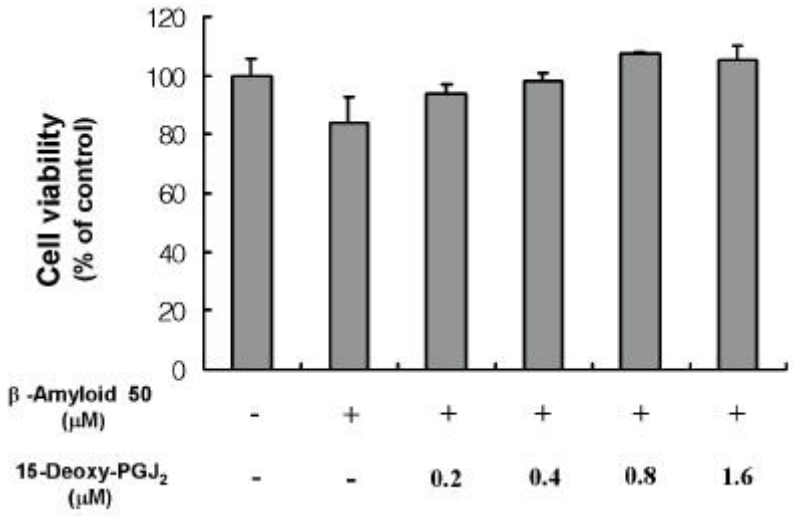


Fig. 20. Effect of 15-deoxy-PGJ_2 on toxicity of β-amyloid in PC12 cells (II).

PC12 cells was cultured with 50 μM β-$amyloid_{25-35}$ and 15-deoxy-PGJ_2 0, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 μM. Cell Viability were determined at 24 hour by MTT assay. Cell Viability was expressed as % of control culture conditions. These data were represented by mean±S.D. (n=3).

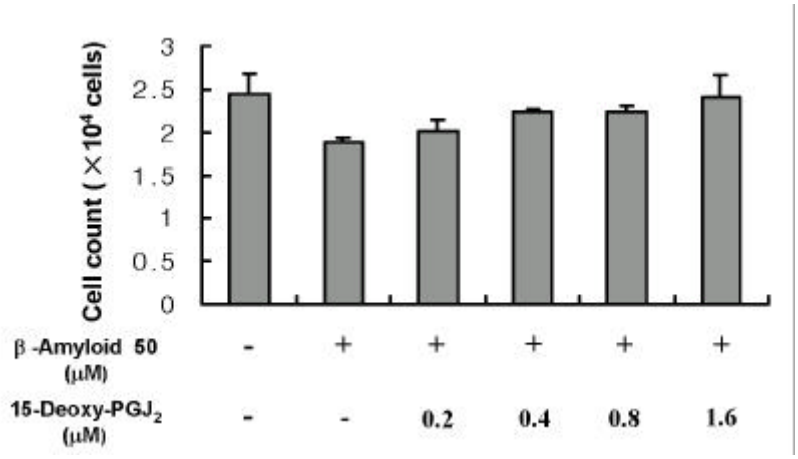


Fig. 21. Effect of 15-deoxy-PGJ_2 on toxicity of β-amyloid in mutant PS-2 transfected PC12 cells (I).

Mutant PS-2 transfected PC12 cells was cultured with 50 μM β-$amyloid_{25-35}$ and 15-deoxy-PGJ_2 0, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 μM. Cell count was determined at 24 hour. These data were represented by mean±S.D. (n=3).

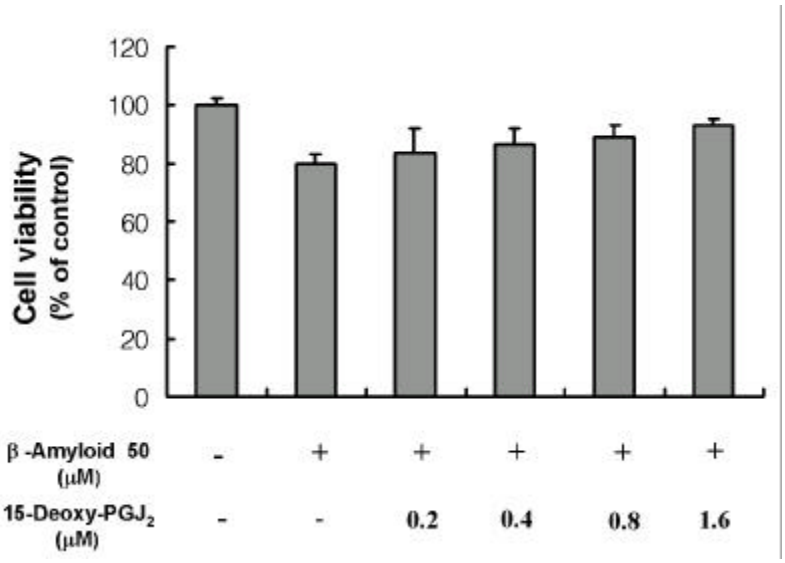


Fig. 22. Effect of 15-deoxy-PGJ_2 on toxicity of β-amyloid in mutant PS-2 transfected PC12 cells (II).

Mutant PS-2 transfected PC12 cells was cultured with 50 μM β-$amyloid_{25-35}$ and 15-deoxy-PGJ_2 0, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 μM. Cell Viability were determined at 24 hour. Cell Viability was expressed as % of control culture conditions. These data were represented by mean±S.D. (n=3).

3.2 PC12 cells 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서 β-amyloid에 의한 전사인자 활성에 미치는 15-deoxy-PGJ_2의 영향

15-Deoxy-PGJ_2의 경우 전사인자 AP-1 및 SP-1의 활성을 통하여 NGF를 처리한 PC12 cells의 Neurite outgrowth를 증가시키는 결과를 나타내었고, β-$amyloid_{25-35}$ (50 μM)는 PC12 cells 및 mutant PS-2 transfected PC12 cells에서 전사인자 NF-κB의 발현을 현저하게 증가시키는 결과를 나타내었다. 또한, 15-deoxy-PGJ_2의 경우 β-$amyloid_{25-35}$의 신경세포 손상 작용을 저해하는 결과를 보였기에 과연 이러한 신경독성 저해효과가 어떠한 전사인자에 영향을 줌으로서 매개되는지를 알아보았다 (Fig. 23 및 24). PC12 cells 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서 β-$amyloid_{25-35}$ (50 μM)와 15-deoxy-PGJ_2를 농도별 (0.2, 0.4, 0.8, 1.6 μM)로 각각 또는 함께 처리하여 3시간 후, AP-1, SP-1 그리고 NF-κB의 발현변화를 살펴보면, β-amyloid는 전사인자 NF-κB의 발현을 현저하게 활성화시켰고, β-amyloid에 의한 NF-κB의 발현은 15-deoxy-PGJ_2를 함께 처리할 경우에 농도별로 점차적으로 감소되는 것이 관측되었으며, 대조군과 비교해서 0.4 μM 이상을 처리한 경우는 오히려 대조군 보다도 NF-κB의 발현양상이 더 낮게 나타났다.

3.3 Bcl-2 transfected PC12 cells의 neurite outgrowth 및 아폽토시스에 대한 β-amyloid의 영향

β-Amyloid의 독성작용에 의한 신경세포의 죽음을 방지하거나 치료하기 위한 하나의 수단으로서 anti-apoptosis와 직접적으로 관련이 있는 Bcl-2 유전자를 신경세포 내에서 인위적으로 증가시킨 경우에 β-amyloid가 신경세포에 어떠한 결과를 나타내는지를 조사하기 위하여, neurite

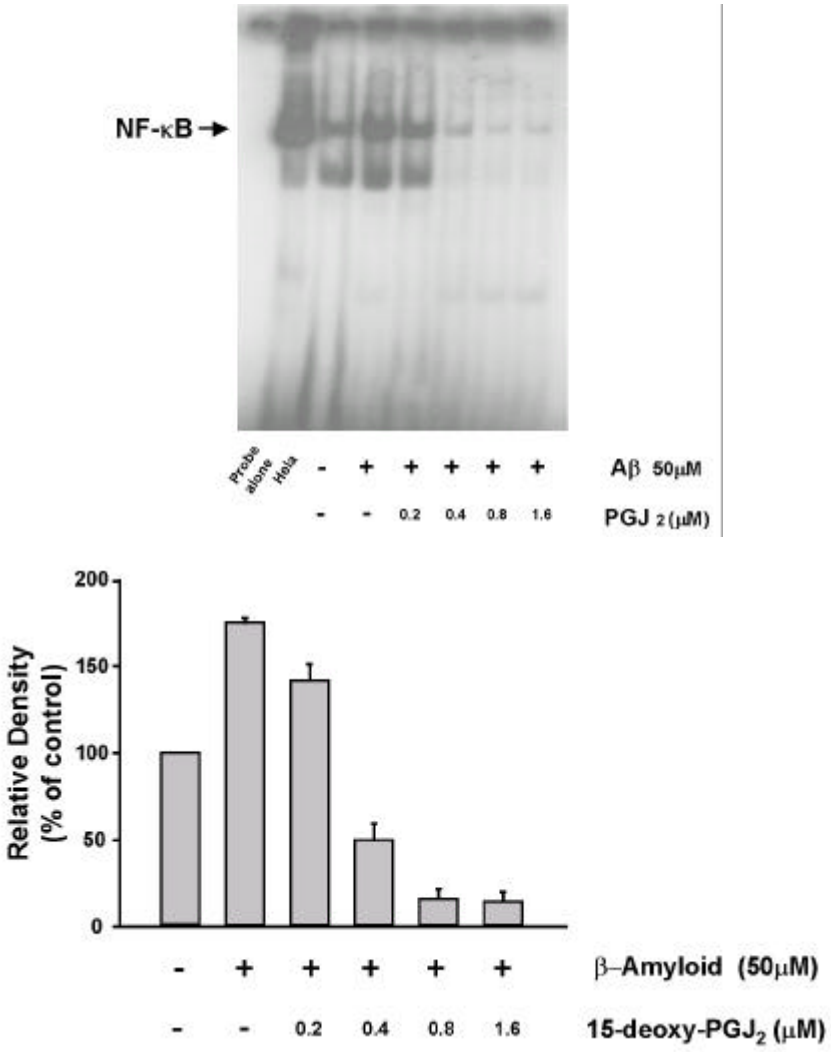


Fig. 23. Effect of 15-deoxy-PGJ_2 on β-amyloid induced the activation of transcription factors NF-κB. PC12 cells were cultured with 50 μM β-$amyloid_{25-35}$ for 3 hr. A DNA binding activity of NF-κB was determined by gel mobility shift assay. Values are mean±standard error of two experiment, with triplicate of each experiment.

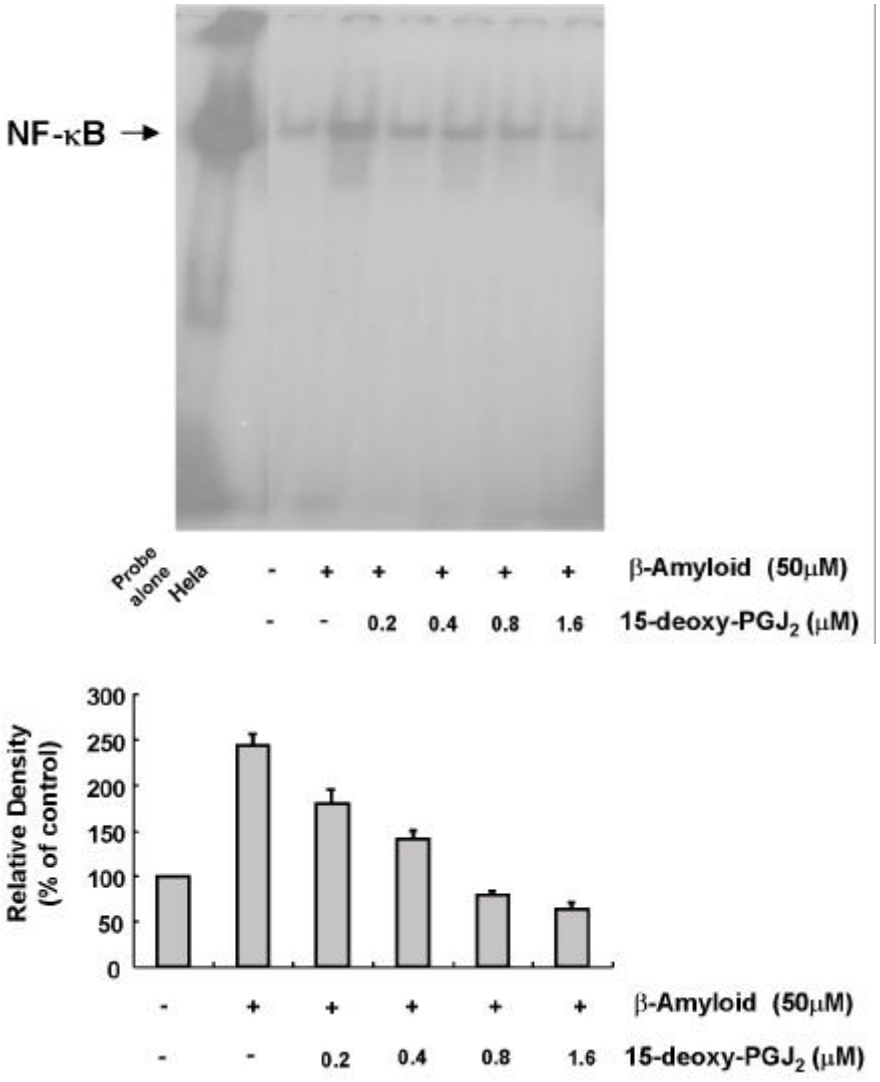


Fig. 24. Effect of 15-deoxy-PGJ2 on β-amyloid induced the activation of transcription factors NF-κB in Mutant PS-2 transfected PC12 cells. Mutants PS-2 transfected PC12 cells were cultured with 50 μM β-amyloid$_{25-35}$ for 3 hr. A DNA binding activity of NF-κB was determined by gel mobility shift assay.

outgrowth 측정 및 DAPI 염색을 통하여 아폽토시스에 대한 영향을 직접 관찰하였다 (Fig. 25 및 26). 우선 neurite outgrowth에 있어서 PC12 cells에 비해서 Bcl-2 transfected PC12 cells이 훨씬 더 성장이 컸고, NGF (50 ng/ml) 처리시 그 차이는 더 크게 나타났다. 여기에 50 μM의 β-amyloid$_{25-35}$을 처리하면, β-amyloid$_{25-35}$는 PC12 cells 및 Bcl-2 transfected PC12 cells의 NGF에 의한 neurite outgrowth를 저하시키는 결과를 나타내었다. 또한, β-amyloid$_{25-35}$는 이 두 세포에서 대조군과 비교하여 현저하게 아폽토시스를 증가시키는 결과를 나타내었다. 그러나 neurite outgrowth와 아폽토시스에 있어서 β-amyloid$_{25-35}$의 영향은 상대적으로 PC12 cells 보다 mutant Bcl-2 transfected PC12 cells에서 그 효과가 많이 감소됨을 알 수 있었다. 특히 neurite outgrowth의 측정결과에 있어서 Bcl-2 transfected PC12 cells에 50 μM 농도의 β-amyloid$_{25-35}$을 처리한 것과 β-amyloid$_{25-35}$을 처리하지 않은 PC12 cells의 대조군에 대한 결과가 비슷하게 나타났다.

3.4 Bcl-2 transfected PC-12 cell에서 cell death signal에 대한 β-amyloid의 영향

인위적으로 세포사멸 억제유전자인 Bcl-2 유전자를 증가시킨 Bcl-2 transfected PC12 cells에서 β-amyloid$_{25-35}$에 의한 신경세포의 세포사멸이 감소되는 결과가 관측되었다. 따라서, 이 현상과 관련된 Bcl-2 transfected PC12 cells내 세포사와 관련된 단백질의 변화를 알아보고자 하였다.

PC12 cells과 Bcl-2 transfected PC12 cells을 β-amyloid$_{25-35}$ (50 μM)으로 처리할 경우, 세포의 아폽토시스와 관련되는 p53 및 caspase 3 단백질의 변화가 관측되었다 (Fig. 27). p53 단백질의 경우 PC12 cells과 Bcl-2 transfected PC12 cells를 비교하여 볼 때 별 다른 차이가 나타나지 않았고,

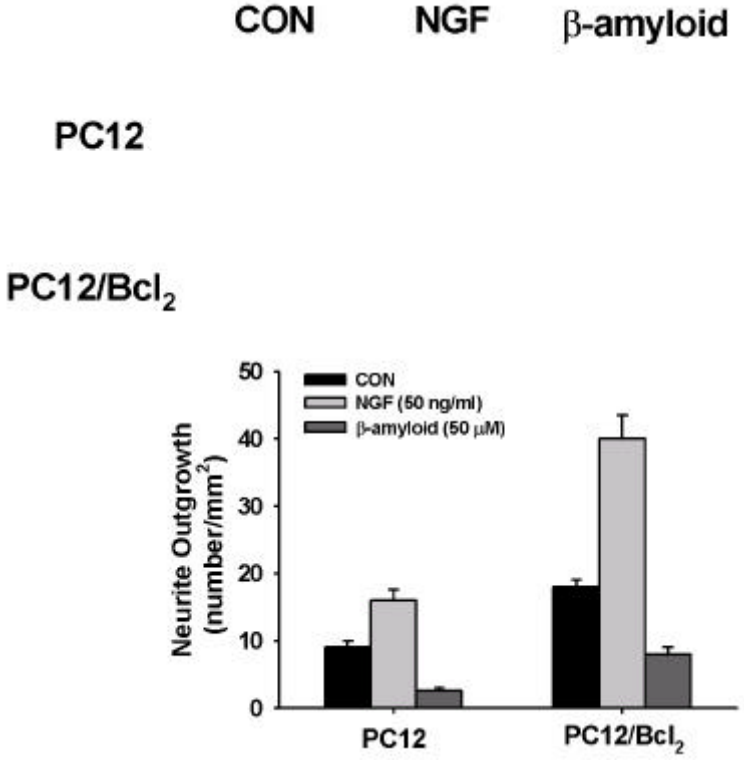


Fig. 25. Effect of β-amyloid on neurite outgrowth in PC12 cells and Bcl-2 transfected cells.

PC12 cells and Bcl-2 transfected PC12 cells were cultured with 50 μM β-amyloid$_{25-35}$ for 72 hrs, NGF (50 ng/ml) was used as positive control. Neurite outgrowth was assessed by measuring the number of neurite outgrowth per unit area of culture (number/mm^2). Up, morphological observation (×40 magnification). Down, Quantitative levels of neurite outgrowth. Values are mean±standard error of three experiments, with triplicate of each experiment.

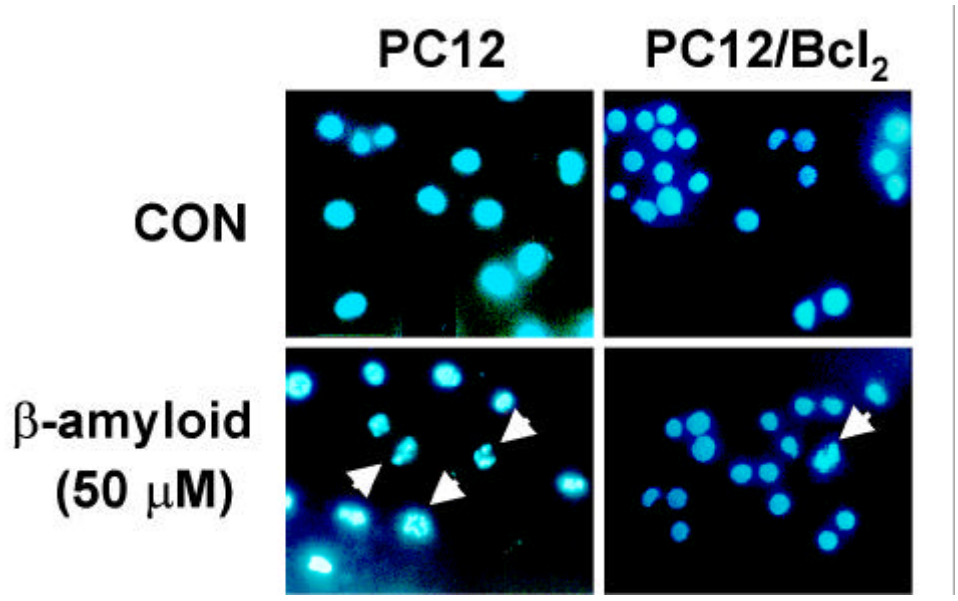


Fig. 26. Effect of β-amyloid$_{25-35}$ on apoptosis in PC12 cells and Bcl-2 transfected PC 12 cells.

β-amyloid$_{25-35}$ 처리 24시간 이후에도 각 세포는 대조군과 비교하여 약간의 발현증가만이 나타났었다. 그러나 caspase 3의 경우, PC12 cells에 비해 Bcl-2 transfected PC12 cells에서 발현정도가 현저하게 감소됨이 관측되었다.

3.5 Bcl-2 transfected PC12 cells에서 세포 내 신호전달경로에 대한 β-amyloid의 영향

앞서 서술한 바와 같이 MAP kinase는 신경세포로의 분화와 downstream 전사인자 (transcription factors)의 활성조절에 결정적인 역할을 한다고 알려져 있고, PC12 cells을 15-deoxy-PGJ$_2$로 처리한 경우에 JNK를 제외한 다른 종류의 MAP kinase의 발현은 관측되지 않았으며, 또한 NGF에 의해 유도되는 MAP kinase 와 JNK의 발현을 증가시킴으로서 neurite outgrowth를 증가시키는 결과를 얻었다 (Fig. 8). 따라서, PC12 cells과 Bcl-2를 인위적으로 증가시킨 PC12 cells에 있어서도 마찬가지로 β-amyloid$_{25-35}$ (50 μM)를 처리할 경우 신경세포의 아폽토시스와 관련하여 MAP kinase 신호전달경로가 관여하는지, 또한 어떤 특정 kinase가 영향을 받는 지를 조사하였다.

β-Amyloid 처리 전후 변화양상을 비교해볼 때, PC12 cells 및 Bcl-2 transfected PC12 cells 모두에서 다른 MAP kinase에 비해 특이적으로 p38 kinase의 발현이 크게 증가되는 것이 관측되었다 (Fig. 28). 하지만 이러한 p38의 발현증가 양상은 PC12 cells와 비교해 볼 때 Bcl-2 transfected PC12 cells에서 상대적으로 훨씬 낮게 발현됨을 관측할 수 있었다.

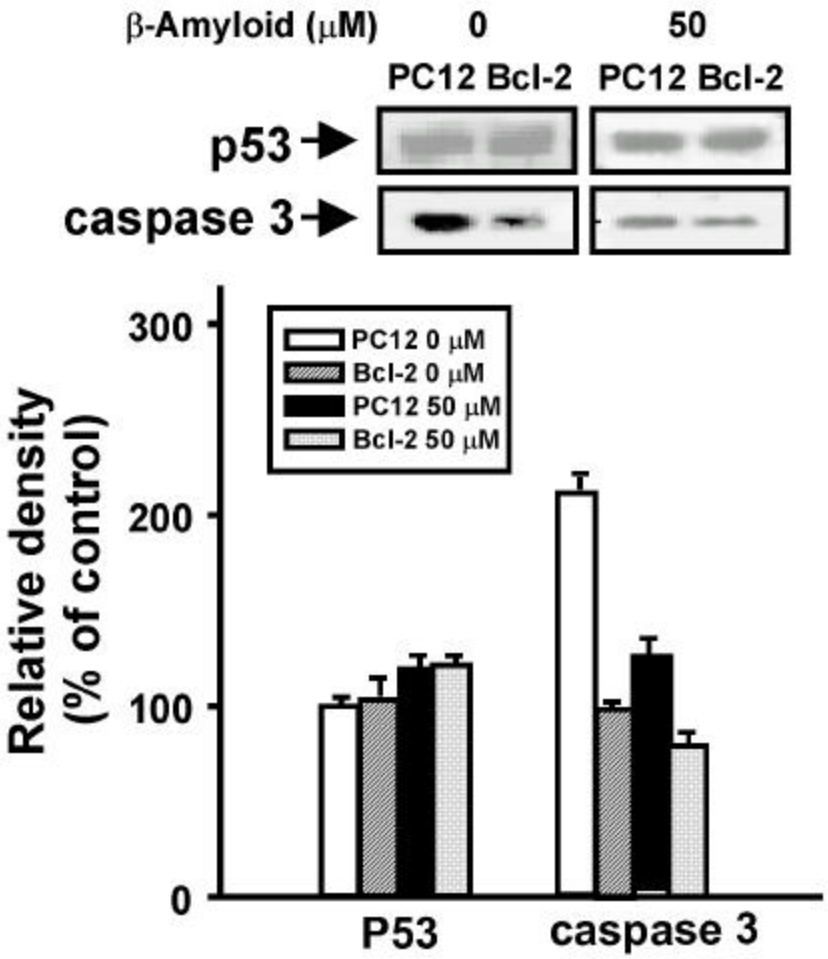


Fig. 27. Effect of β-amyloid on the expression of cell death related protein p53 and caspase 3.

PC12 cells and PS-2 transfected PC12 cells were cultured with 50 μM β-amyloid$_{25-35}$ for 24 hrs. Expression of p53, caspase 3 were determined by western blotting. Values are mean±standard error of two experiments, with triplicate of each experiment.

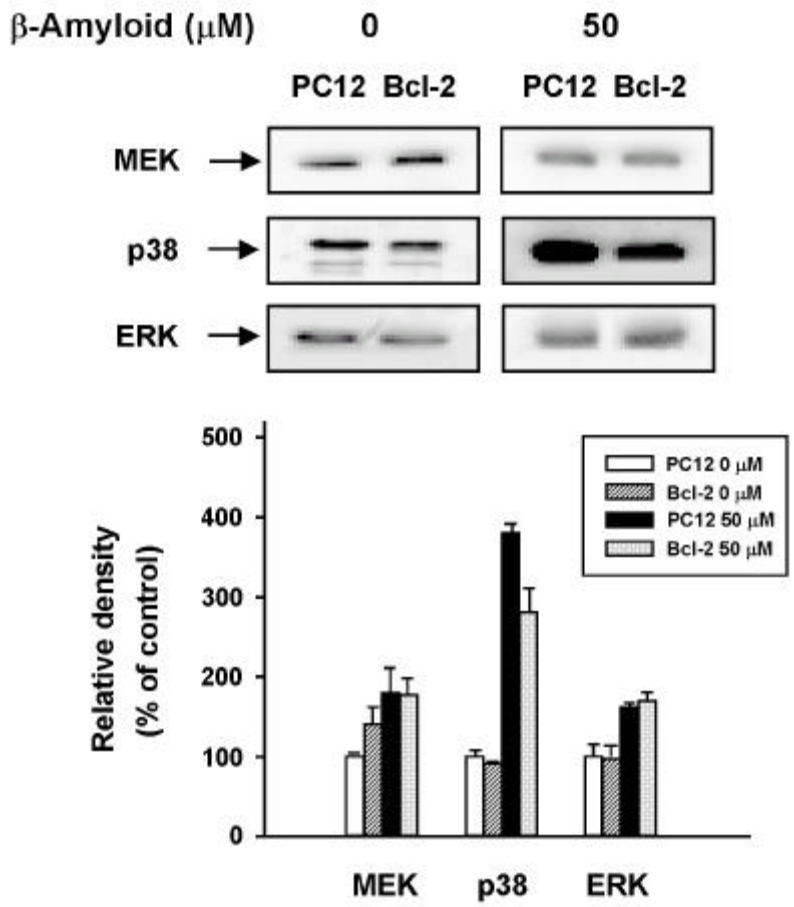


Fig. 28. Effect of β-amyloid on the expression of MAP kinase family in Bcl-2 transfected PC12 cells.

Bcl-2 transfected PC12 cells cultured with 50μM β-amyloid$_{25-35}$ in the absence or presence of NGF (50 ng/ml) for 24 hrs. Expression of MAP kinase family was determined by western blotting. Values are mean ± standard error of two experiments, with triplicate of each experiment.

3.6 Bcl-2 transfected PC12 cells에 있어서 transcription factor에 대한 β-amyloid의 영향

PC12 cells 및 Bcl-2 transfected PC12 cells을 이용하여 β-amyloid$_{25-35}$에 의한 신경세포의 아폽토시스를 방지하기 위한 Bcl-2 유전자의 인위적인 발현증가가 β-amyloid에 의한 신경세포에 있어서 NF-κB의 발현에 어떤 변화를 나타내는지 알아보았다. 대조군과 비교하여 볼 때, PC12 cells 보다 Bcl-2 transfected PC12 cells에서 NF-κB의 발현정도가 훨씬 높게 나타났다 (Fig. 29). β-Amyloid$_{25-35}$ (50 μM)를 처리할 경우, PC12 cells은 NF-κB의 발현이 현저하게 증가하였다. 그러나, Bcl-2 transfected PC12 cells의 경우, 대조군과 비교했을 때, 오히려 NF-κB의 발현이 감소되는 현상이 나타났다.

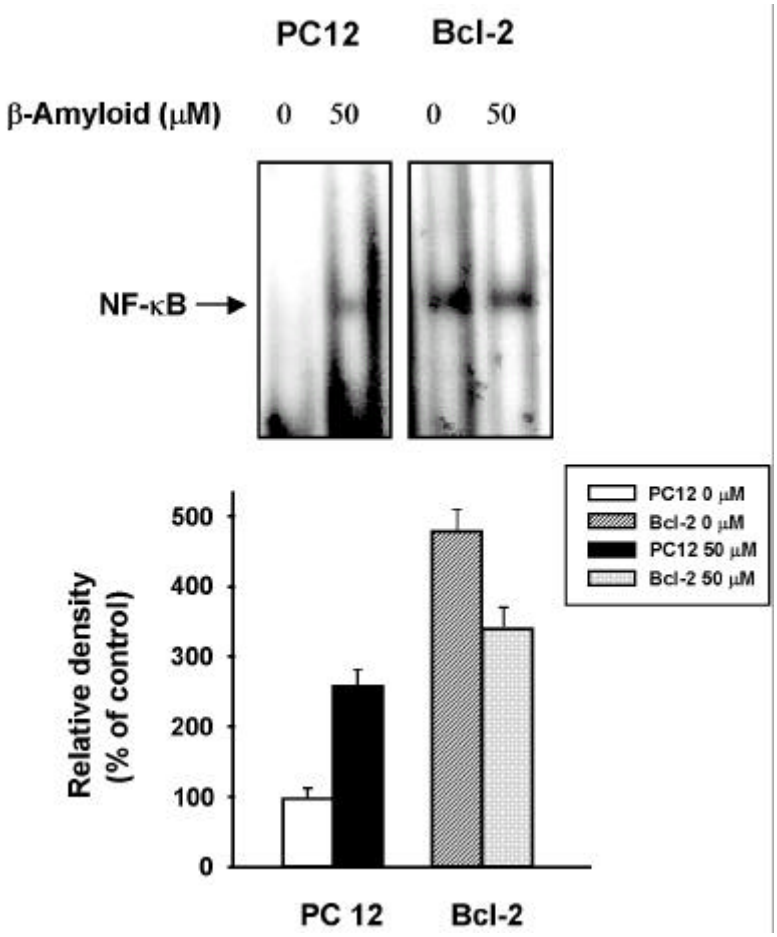


Fig. 29. Effect of β-amyloid on the activation of transcription factors NF-κB.

PC12 cells and Bcl-2 transfected PC12 cells were cultured with 50 μM β-amyloid$_{25-35}$ for 3 hrs. A DNA binding activity of NF-κB was determined by gel mobility shift assay. Values are mean±standard error of two experiment, with triplicate of each experiment.

IV. 토 론

최근의 연구결과에 의하면 15-deoxy-PGJ_2는 PC12 cells의 신경세포로 분화시, NGF에 의해 유도되는 neurite outgrowth를 촉진시킨다고 한다[70]. 그러나, 아직까지도 neurite outgrowth를 증가시키는데 어떤 신호전달경로가 요구되는지 정확하게 밝혀지지 않고 있다.

일반적으로 PC12 cells의 NGF에 의해 유도되는 신경세포로의 분화에 있어서 jun N-terminal kinase (JNK), extra-signal response kinase (ERK) 및 p38 kinase로 이루어져 있는 mitogen-activated protein (MAP) kinase가 포함되어 있다고 알려져 있다[105-107]. 그리고, nuclear hormone receptor superfamily의 한 종류인 PPAR-γ는 15-deoxy-PGJ_2에 의해서 활성화된다[96,97]. 또한 인슐린의 감수성 조절 및 염증반응과 종양성장을 조절하는데 그리고 지방세포, 대식세포와 많은 종양세포에서의 분화를 유발하는 데에도 PPAR-γ가 활성화된다는 것이 밝혀져 있다[98-104].

이러한 관점에서 먼저 15-deoxy-PGJ_2가 신경세포에서 어떤 특이적인 MAP kinase family를 활성화시키는지 조사하였다. 그 결과 Fig. 8에서 NGF와 15-deoxy-PGJ_2에 의해서 MAP kinase와 JNK의 발현이 증가되었다. 비록 MAP kinase signaling system이 서로 연계되어 활성화되지만, 각각의 kinase들은 서로 다른 신호를 전달한다고 알려져 있다. 그러므로 자극의 종류 및 세포형태에 의존하여 서로 다른 kinase가 up-regulated 된다고 생각된다. PC12 cells에서 표피성장인자 (epidermal growth factor)에 의해 MAP kinase/ERK pathway 신호가 활성화되는 반면[104], PC12 cells의 신경세포로 분화시 transforming growth factor-beta super family 중 하나인 morphogenetic protein 2가 특이적으로 p38 kinase를 활성화시킨 것은

주목할만한 보고이다[105]. 따라서, Fig. 7에서 나타난 것과 같이 NGF에 의해서 유도되는 PC12 cells의 신경세포로 분화시에 neurite outgrowth를 증가시키는 15-deoxy-PGJ_2의 촉진능력은 MAP kinase/JNK signaling pathway의 활성과 관련되어 있다고 사료된다.

MAP kinase의 생물학적 영향은 아마도 down stream signal-responsive transcription factor의 활성에 의해서 나타나며 또한, 신경세포 분화에 전사인자의 활성 또한 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 그리고, 이전의 보고에 의하면 SH-SY5Y neuroblastoma cells 분화에 NF-κB 활성이 요구되며[106], NGF에 의해서 PC12 cells이 신경세포로 분화하는 동안 전사인자 AP-1이 활성화된다고 보고되어 있다[107]. 그러므로, 15-deoxy-PGJ_2를 NGF 처리 또는 무처리군에 있어서 PC12 cells에서 발생하는 down stream signal responder를 알아보기 위하여, 15-deoxy-PGJ_2의 전사인자 AP-1, SP-1 그리고 NF-κB의 활성화에 대한 영향을 조사하였다.

Fig. 9 및 Fig. 10의 결과로부터 PC12 cells에 있어서 전사인자 AP-1 과 SP-1 활성이 15-deoxy-PGJ_2에 의해서 농도 및 시간에 의존적으로 증가되었음을 알 수 있었다. 또한, PC12 cells에서 NGF에 의한 SP-1의 활성화는 15-deoxy-PGJ_2 처리시 더 이상 증가하지 않았지만, AP-1의 활성은 NGF와 15-deoxy-PGJ_2를 함께 처리한 경우에도 증가하였다. 따라서, 이 결과는 AP-1이 15-deoxy-PGJ_2에 의해 유발되는 MAP kinase/JNK signal의 down stream responder로서 역할을 수행할 수 있음을 시사한다.

앞서 기술한 것처럼, 15-deoxy-PGJ_2의 생물학적 기능은 PPAR-γ의 활성에 의해 나타난다. 따라서, neurite outgrowth 증가에 PPAR-γ 활성이 또한 포함되어 있는지를 알아보기 위하여, 15-deoxy-PGJ_2에 의한 PPAR-γ의 발현변화를 확인하였다. 그러나, Fig. 12에서 나타난 바와 같이

15-deoxy-PGJ_2가 다른 세포와 달리 PC12 cells에서 PPAR-γ를 발현시키지 않았고, 이 결과는 이전의 Satoh 등에 의해 보고된 연구결과와 일치한다[70]. 그리고, PC12 cells에서 NGF와 혈청 또한 neurite outgrowth를 증가시키지만, PPAR-γ의 발현을 유발시키지 않았다. 이 사실을 검증하기 위하여, anti-PPAR-γ 항체를 이용한 면역조직화학적분석을 통한 실험에서 immuno-reactivity가 검출되지 않음을 확인하였다. 나아가서, neurite outgrowth 기능을 가지고 있는 또 다른 분화중인 신경세포인 배자 중뇌세포 및 neuroblastoma cells에서 PPAR-γ의 발현을 조사하였다. Fig. 12에 의하면 PC12 cells과 다르게 이들 세포에서는 15-deoxy-PGJ_2에 의한 PPAR-γ의 발현이 관찰되었다. 그러므로, PC12 cells에서 분화에 대한 15-deoxy-PGJ_2의 촉진효과는 PPAR-γ활성화를 포함하지 않을 수도 있다고 추측된다.

이러한 결과들을 종합하여 볼 때, NGF에 의해 유도되는 PC12 cells의 분화에 대한 15-deoxy-PGJ_2의 촉진능은 PPAR-γ의 활성화와는 무관하며, JNK/MAP kinase 와 AP-1 신호전달체계를 통해서 나타날 것으로 판단된다.

AD에 있어서 원인 중의 하나로 알려져 있는 PS-2 유전자의 이상은 APP 유전자의 이상이나 PS-1 유전자에 비하여 아직까지도 정확한 기전이 알려져 있지 않다. 그러나, β-amyloid의 생성으로 인한 신경세포의 아폽토시스와 직접적으로 연관된다고 보고되어 있다.

그러므로, 본 연구에서는 PC12 cells에 대한 15-deoxy-PGJ_2의 neurite outgrowth 촉진능이 퇴행성 신경질환의 치료, 특히 PS-2 유전자 돌연변이에 의해 발생되는 AD의 치료에 도움이 될 수 있을지 알아보기 위하여, N141I PS-2 돌연변이 유전자를 도입한 PC12 cells을 이용하여 아폽토시스와 관련 있는 세포내 분자기전의 변화를 조사하여 보았다.

먼저, 아폽토시스라는 용어는 1972년 Kerr, Wyllie, Currie에 의해서 제안되었다. 아폽토시스의 과정에는 세포막과 핵내의 특이한 형태학적인 변화가 동반되는 특징을 가진다. 예를 들면, 세포막에서 일어나는 대표적인 형태적 변화로 세포크기의 축소 (shrinkage of cell size), 세포막으로부터 세포융기의 돌출현상, 및 핵내 염색사의 응축 (chromatin condensation), 핵의 분절 (nuclear fragmentation)이나 DNA의 분절의 발생 등이 있다[74,108]. 이러한 아폽토시스의 진행과정은 3단계로 이루어진다. 먼저 초기단계 (initiation via the delivery of cell death signal)로 여기에 관여하는 것으로 growth factor deprivation, UV, toxins, Fas, anticancer drugs가 있다. 다음은 조절단계 (regulation via death modulators)로서 Bcl-2 familiy, p53, kinase, phosphatases 등이 관여한다. 마지막은 실행단계 (execution via death effectors)에서 핵 수용체 및 caspase가 관여한다[109].

특히, caspase family는 다양한 자극에 의해 유도된 아폽토시스에 필수적인 규칙을 행하는 유전자들로 이들은 크게 그 기능 면에 따라 두 군으로 나뉜다. 하나는 염증반응 (pro-inflammatory events)에 관여하는 것으로 여기에는 caspase 1, 4, 5, 11, 그리고 13이 속한다. 또 다른 군으로는 CED-3 (caenorhabditis elegans cell death gene-3) 관련 protaseses로 이들은 아폽토시스에 관여하며 caspase 2, 3, 6, 7, 8, 9, 그리고 10이 이에 속한다[110].

예를 들면 Bax를 통하여 전달된 신호는 caspase 9으로 전달되고 다시 이 신호는 아폽토시스을 유도하는 마지막 단계인 caspase 3로 전달되어 아폽토시스가 일어나게 된다. Caspase 3는 세포의 회복에 필수적인 단백질로 또한 알려져 있다. 이 회복시기에는 poly (ADP)-ribose polymerase와 DNA-dependant protein kinase 그리고 U-1 ribonucleoprotein들이 관여하게 된다. Caspase 3의 활성은 이들 단백질들의 cleavage를 유도하여, 이들의 nuclear repair 기능을 수행시키게 된다[111,112].

따라서, 먼저 AD와 관련한 PS-2의 N141I 돌연변이 및 β-amyloid에 의한 신경세포의 죽음에 있어서 영향을 관측한 결과, Fig. 15로부터 PS-2의 N141I 돌연변이는 세포내 β-amyloid의 생성을 증가시키는 것을 알 수 있었고, 또한 β-amyloid를 가할 경우 신경세포내 β-amyloid의 생성이 현저하게 증가됨과 동시에 PC12 cells 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells의 NGF에 의한 neurite outgrowth를 현저하게 저하시키는 결과가 Fig. 13 및 Fig. 14에서 관측할 수 있었다.

이러한 결과로부터 신경세포에서 mutant N141I PS-2 돌연변이는 β-amyloid의 생성의 증가시킴으로서 아폽토시스를 유도할 것으로 판단되며, Fig. 16의 결과로부터 아폽토시스에 p53 그리고 p21을 통한 신호전달경로보다는 caspase 3, caspase 9을 경유하는 신호전달경로가 보다 직접적으로 관련될 것으로 생각된다.

이러한 결과는 Mori 등이 mutant N141I transfected SK-N-SH human neuroblastoma cells에서 mutant N141I PS-2 유전자를 가할 경우에 세포내 Bcl-2 유전자의 발현을 감소시키고, 세포배양시 영양인자를 결핍시킬 경우 caspase 3의 발현을 증가시킴으로서 아폽토시스를 증가시켰다는 연구결과와 비교할 때 신호전달경로에 있어서 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다[113]. 그러나, PC12 cells 비해 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서 β-amyloid에 의해서 p21 단백질이 더 강하게 발현되므로 N141I PS-2유전자의 돌연변이로 인한 AD의 유발에서는 p21 단백질의 발현의 증가가 어느 정도는 중요한 역할을 할지 않을까 예상된다. 따라서, 이와 관련한 실험이 더 진행되어야 하겠다.

이미 잘 알려진 것처럼 AD 환자의 뇌 신경세포의 죽음은 정상세포에서와 달리 진행과정 중에서 나타나는 상대적으로 높은 염증반응과 밀접한 관련이 있다. 그러므로, 본 연구에서도 이러한 염증반응과 관련한 세포내 기

전변화를 살펴보았다.

PC12 cells 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서 β-amyloid에 의한 염증반응과 관련된 단백질의 변화의 유무를 관측한 결과, Fig. 17에서 나타난 것처럼 β-amyloid 처리시 COX-2, IκB-α 그리고 TNF-α의 발현이 증가됨을 관측하였다. 특히 AD환자의 특징중의 하나인 염증반응에 대한 이전의 연구결과들과 마찬가지로[85,116-117], mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서도 β-amyloid에 의해서 TNF-α 및 COX-2가 발현이 현저하게 증가되었다는 것은 다른 원인에 의한 AD 발생에 있어서와 동일하게 N141I PS-2 돌연변이에 의한 AD환자의 뇌신경세포의 죽음에 있어서도 염증반응이 역시 중요한 작용을 할 것으로 기대된다.

염증반응과 관련하여 PPAR-γ의 경우, β-amyloid 처리한 후 대조군과 비교시 약간 증가하였나 그 정도가 미미하였기 때문에, 신경세포에 있어서 β-amyloid에 의해 발생되는 비이상적으로 높은 염증반응에 기여할 지는 좀 더 연구가 필요할 것으로 생각된다.

기존의 연구결과에 의하면, 세포내 염증반응은 전사인자 NF-κB가 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다. NF-κB는 주로 불활성화된 상태로 세포질에 존재하고 있으며, 주 구성요소는 p50과 Rel-A로 이루어진 heterodimer 이다. 평상시 IκB는 NF-κB가 핵 속으로 이동하기에 필요한 부분과 결합하고 있어 세포질에서 핵 속으로 이동을 방해하고 있다[114]. 핵내 NF-κB가 결합하는 염기서열은 GG GAC TTT CCC 이며, 신호전달에 의하여 IKK (IκB kinase complex)가 활성화되어 NF-κB inhibitor 인 IκBα를 인산화하여 분해시킴으로서 분리된 NF-κB가 핵 속으로 이동한다. NF-κB의 발현과 생리적으로 직접적인 관련이 있는 유전자로 TNF, IL-1, IL-6, Interferon-β 등과 같은 cytokines유전자와 adhesion molecules의 유전자가 있을 경우에 COX-2, iNOS와 같은 효소유전자가 있다[114]. NF-κB

target 유전자는 약 2시간 후에 발현되는 후발유전자 (delay gene)이며, Ras에 의하여 NF-κB의 RelA/p65의 전사를 증가시킴으로서 NF-κB가 활성화된다고 보고되어 있다[114,115].

본 연구에서도 NF-κB의 이러한 특성과 관련하여 PC12 cells 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서 β-amyloid가 NF-κB의 발현에 어떠한 영향을 끼치는지 알아보았다. Fig. 18에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, β-amyloid는 처리 3시간 후 NF-κB의 발현을 현저하게 증가시켰다. 따라서, AD환자의 경우 NF-κB의 발현을 통하여 COX-2, IκB-α 그리고 TNF-α의 발현이 증가되었다는 이전의 연구결과[116,117]를 고려해 볼 때, Fig. 17과 같이 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서도 동일하거나 유사한 분자기전을 통하여, β-amyloid가 COX-2, IκB-α 그리고 TNF-α의 발현을 증가시켰을 것으로 생각된다.

최근 다양한 암세포에서 15-deoxy-PGJ_2가 아폽토시스를 통해 암세포의 성장을 억제한다는 보고[71-95], 15-deoxy-PGJ_2가 PC12 cells의 NGF에 의해서 유도되는 세포돌기의 성장을 촉진한다는 최근의 연구보고[70] 그리고 15-deoxy-PGJ_2가 전사인자 AP-1과 JNK/MAP kinase의 활성화에 의해 성장분화를 증가시키고 아폽토시스를 저해한다는 본 연구결과 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서 신경세포의 성장 분화 및 아폽토시스에 대한 실험 결과들은 15-deoxy-PGJ_2가 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells의 성장, 분화 및 사멸에 영향을 줄 수 있을 것임을 시사한다.

이러한 결과를 바탕으로 15-deoxy-PGJ_2의 실제적인 신경세포에 대한 보호효과 또는 β-amyloid에 의한 신경독성에 대한 저해효과를 알아보기 위하여, PC12 cells 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에 β-amyloid와 15-deoxy-PGJ_2를 농도별로 따로 또는 함께 처리한 후, 농도

의존성 따른 세포성장 및 세포생존률에 대한 변화를 관찰하였다. Fig. 19부터 Fig. 22 사이에 나타난 것처럼 각 세포를 β-amyloid만 처리할 경우, 대조군과 비교할 때 β-amyloid의 독성작용으로 인해서 배양시 세포수의 증가가 감소하였고 세포생존률 또한 감소하였다. 그러나, 15-deoxy-PGJ_2를 함께 처리할 경우 농도의존적으로 현저하게 세포수가 증가함이 관찰되었고, 세포생존률 역시 회복됨이 관찰되었다.

그러나, Fig. 23 및 24의 결과 및 앞서 15-deoxy-PGJ_2가 전사인자 AP-1 및 JNK/MAP kinase의 활성을 통하여 NGF를 처리한 PC12 cells의 neurite outgrowth를 증가시키는 결과를 함께 고려해볼 때, 이러한 15-deoxy-PGJ_2의 β-amyloid에 대한 신경독성 저해효과는 AP-1의 활성과는 무관하며, β-amyloid에 의해 활성화되는 전사인자 NF-κB의 발현을 감소시킴으로서 나타난다고 생각할 수 있다. 그러므로, 이러한 결과는 15-deoxy-PGJ_2의 neurite outgrowth 증가효과와 β-amyloid에 대한 신경독성 저해효과는 다른 신호전달체계를 통하여 나타날 것임을 암시한다.

Straus 등은 HeLa cells 및 RAW cells에서 15-deoxy-PGJ_2가 NF-κB의 활성을 강력하게 저해하는 cyclopentenone과 유사한 구조를 가짐으로서 PPAR-γ의 발현과 무관하게 직접적으로 IKK를 저해하고, 또한 NF-κB의 DNA binding site를 저해함으로서 COX-2와 같은 염증반응과 관련한 유전자의 발현에 영향을 줄 수 있다는 결과를 발표하였다[114]. 따라서, Fig. 12에서 나타난 결과를 함께 고려해볼 때, 15-deoxy-PGJ_2는 PC12 cells 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서도 이와 유사한 기전을 통하여 β-amyloid에 대한 신경독성 저해효과를 나타낼 것으로 생각된다. 그러나, 대식세포에 있어서는 15-deoxy-PGJ_2가 PPAR-γ의 발현을 통하여 gelatinase B와 NOS 및 다른 NF-κB 관련 유전자의 발현을 억제한다는 보고가 있으므로, 앞으로 이러한 활성기전의 차이가 세포 종의 차이에서

기인한 결과인가에 대한 검증이 필요할 것으로 생각된다.

서론에서 기술한 바와 같이 지금까지 알려진 아폽토시스와 관련된 유전자는 여러 가지가 있는데 그중 가장 먼저 알려진 유전자가 Bcl-2이다[118]. Bcl-2는 사람의 림프종의 발생과 밀접하게 관련된 유전자로서 단백질의 분자량은 26 KDa이며 미토콘드리아의 외막, 소포체나 핵막에 위치하고 있으며 다른 암 유발 유전자와는 달리 세포 증식에는 관여하지 않고 세포의 생존을 조절하는 것으로 밝혀졌다[111,119]. 이 외에 Bcl-2 family는 세포사멸 반응을 조절하는 주요한 규칙을 행하는 단백질로 여기에는 적어도 17가지 이상의 단백질이 속한다고 보고되어있다. 이들은 anti-apoptotic 단백질 (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-W, Mcl-1)과 pro-apoptotic 단백질 (Bax, Bak, Bok, bid, Hrk)로 나누어지며[119,120] 이 중 Bcl-2와 서로 반대작용을 하는 pro-apoptotic protein인 Bax는 Bcl-2와 복합체를 형성하여 서로를 조절하면서 세포내 반응을 전달하는 것으로 알려져 있다[120]. 또한 Bax는 세포 내에서 세포사멸 관련 신호를 받게 되면 이 자극으로 인하여 미토콘드리아의 cytochrom C를 방출시켜 세포사멸 신호전달단계 중 Bax 하위단계인 caspase family로 그 반응을 전달한다[1,108,111,120-122].

그러므로, 본 연구에서는 β-amyloid의 독성작용에 의한 신경세포의 죽음을 저해하거나 치료하기 위한 하나의 수단으로서 anti-apoptosis 작용에 영향을 줄 수 있는 Bcl-2 유전자를 PC12 cells내에 인위적으로 가한 경우에 β-amyloid가 신경세포에 어떠한 결과를 나타내는지를 조사하였다.

우선 Fig. 25의 결과에서 나타났듯이, neurite outgrowth 정도가 PC12 cells에 비해 Bcl-2 transfected PC12 cells가 훨씬 더 컸고, NGF 처리시 그 차이는 더욱 더 크게 나타났다. 여기에 β-amyloid을 처리하면 NGF에 의한 neurite outgrowth의 증가가 저하되는 결과가 나타내었다. 또한, β-amyloid는 이 두 세포에서 현저하게 아폽토시스를 증가시켰다.

그러나, Fig. 26의 결과는 neurite outgrowth와 아폽토시스에 있어서 β-amyloid의 영향이 PC12 cells에 비해서 mutant Bcl-2 transfected PC12 cells에서 상대적으로 많이 감소됨을 보여주었다. 특히 Bcl-2 transfected PC12 cells에 β-amyloid을 처리한 것과 PC12 cells의 대조군 결과 수치가 비슷하게 관측됨으로서 신경세포 내에서 anti-apoptosis와 관련한 Bcl-2 유전자의 발현 증가는 AD환자의 경우에 있어서도 β-amyloid에 의한 신경세포의 죽음을 감소시키는 결과를 유도할 것으로 생각된다.

Fig. 27은 Bcl-2 transfected PC12 cells내 아폽토시스가 p53 및 caspase 3 단백질의 변화와 관련이 있음을 보여준다. Caspase 3의 경우 PC12 cells에 비해 Bcl-2 transfected PC12 cells에서 발현정도가 현저하게 감소됨이 관측되었고, β-amyloid를 처리한 경우에도 caspase 3의 경우 PC12 cells에 비해 Bcl-2 transfected PC12 cells에서 발현정도가 현저하게 감소됨이 관측되었다. 그러나, p53 단백질의 경우 PC12 cells과 Bcl-2 transfected PC12 cells를 비교하여 볼 때 별 다른 차이가 나타나지 않았고, β-amyloid$_{25-35}$ 처리 24시간 이후에도 각 세포는 대조군과 비교하여 약간의 발현증가만이 나타났다.

따라서, Bcl-2의 증가는 다른 무엇보다 casepase 3의 발현을 감소시킴으로서 β-amyloid에 의한 신경세포의 아폽토시스를 저해할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나, 예상과 달리 대조군에 비하여 β-amyloid를 처리한 경우에 발현이 감소되는 현상이 관측되었기에 이러한 현상이 유전자조작에 의한 결과인지 아니면 또 다른 원인이 있는지에 대한 실험이 필요할 것으로 생각된다.

MAP kinase 신호전달계는 세포가 외부의 환경변화에 따른 자극들을 인지하여 그 정보를 세포질 및 세포핵 내부로 전달하는 과정에 관여하는 대표적인 신호전달계이다. 특히 세포의 성장, 발생, 분화, 사멸 등의 조절기

전에 관여한다고 알려져 있다[109]. 이 mammalian cell의 MAP kinase 신호전달계의 군에는 ERK와 JNKs/SAPK (stress-activated protein kinase) 그리고 p38/HOG가 이에 속한다[64]. ERKs는 여러 개의 oncogenic potential carrying components인 Ras, Raf, MEK (MAPkinase/extracellular signal-regulated kinase kinase)경로를 통해 활성화된다. Ras는 Raf와 상호작용을 하며 활성화된 Ras는 두 개의 serine residues상에서 MEK1을 인산화시킨다[123,124]. 이렇게 활성화된 MEK1은 ERK1과 ERK2의 serine과 tyrosine 잔기를 인산화시킨다. 이 결과 세포내 전사인자들과 세포골격단백질 (cytoskeletal protiens), 효소들이 인산화된다[124]. MAP kinase의 또 다른 군으로 p38이 있는데 이들은 MKK3와 MKK6 (mitogen-activated protein kinase kinase 6)들에 의해 인산화되고 활성화된다. 마지막으로 JNK는 MKK4에 의해서 활성화된다[123,125]. ERKs는 성장인자에 의해 영향을 받고 세포의 증식 (proliferation), 분화 (differntiation), 생존 (survival)에 관여하는 반면에 JNKs와 p38은 Heat shock, UV, osmotic shock, cytokines, 단백질 합성억제제(protein synthesis inhibitor), 항산화제 (antioxidant), 독성물질 (toxic compounds) 등 스트레스 상태에 의해 세포내 반응에 관여함으로서 세포의 죽음을 유발한다고 알려져 있다[126-128]. 그러나, 최근에는 오히려 JNK와 p38 MPA kinase보다는 ERK/MAP kinase pathway를 통한 세포사멸에 관한 연구가 많이 진행되고 있으며, 실제로 신경암세포 (nuronal cancer cells) 및 다른 암세포주에서 항암제가 MAP kinase/ERK Pathway를 통하여 아폽토시스를 유발한다고 보고되고 있다[126-129].

본 연구에서도 β-amyloid에 의한 신경세포의 아폽토시스 유발과 관련하여 Bcl-2를 인위적으로 증가시킨 PC12 cells에 있어서도 MAP kinase 신호전달경로가 관여하는지, 그렇다면 어떤 특정 kinase가 관여하는지를 조사해 보았다.

β-Amyloid 처리 전후 변화양상을 비교해볼 때, Fig. 28과 같이 PC12 cells 및 Bcl-2 transfected PC12 cells 모두에서 MEK, p38 그리고 ERK의 발현이 증가되는 것으로 관측되었다. 특히 다른 MAP kinase에 비해서 p38 kinase의 변화가 현저하게 관측되었고 이러한 p38의 발현증가 양상은 PC12 cells와 비교해 볼 때 Bcl-2 transfected PC12 cells는 상대적으로 훨씬 낮게 발현되었다. 이러한 결과는 Sun 등이 differentiated PC12 cells에 PS-2 유전자를 과발현 시켰을 경우에 p38 MAP kinase pathway를 통하여 아폽토시스가 유발되었다는 보고[130]와 깊은 관련이 있다고 판단된다. 또한 AD 환자의 뇌에서 p38 kinase가 활성화되었다[131]는 실험결과 및 알츠하이머 환자의 해마와 대뇌피질에 존재하는 신경세포에서 p38 kinase의 up-stream activator인 MKK6가 활성화되었다[132]는 보고와 깊은 관련이 있다고 생각된다. 따라서, 본 연구 결과는 β-amyloid에 의한 PC12 cells의 아폽토시스에 p38 신호전달경로가 포함되어 있음을 재증명하는 자료가 될 것으로 판단된다.

마지막으로 Bcl-2 유전자의 인위적인 발현증가가 β-amyloid에 의한 신경세포에 있어서 NF-κB의 발현에 어떤 영향을 나타내는지 알아보았다.

Fig. 29에서 나타난 것 같이, β-Amyloid를 처리할 경우 PC12 cells은 NF-κB의 발현이 현저하게 증가하였다. 또한, 대조군과 비교하여 볼 때 NF-κB의 발현정도가 PC12 cells 보다 Bcl-2 transfected PC12 cells에서 훨씬 높음을 관찰하였다. 그러나 Bcl-2 transfected PC12 cells의 경우, 대조군과 비교할 경우 오히려 NF-κB의 발현이 감소되는 현상이 나타났기 때문에 결국 β-amyloid에 의한 신경세포의 죽음을 저해하는데 있어서 다른 무엇보다도 전사인자 NF-κB의 발현정도의 차이가 가장 중요한 요소라고 생각된다. 하지만, 이 또한 앞서 caspase 3의 경우와 비슷한 발현결과를 나타내었기에 좀 더 연구가 진행되어야 할 것이다.

따라서, 앞서의 실험결과들을 함께 종합하여 볼 때, 본 연구결과는 N141I PS-2 유전자의 돌연변이가 신경세포내의 β-amyloid의 생성을 증가시키고 이것은 NF-κB의 활성화시켜 이와 관련한 COX-2 등의 활성화에 의해 염증반응을 증가시킴으로서 아폽토시스를 유발함을 보여준다. 또한 15-deoxy-PGJ_2는 β-amyloid에 의한 NF-κB의 활성화를 억제함으로서 신경세포의 아폽토시스를 억제할 수 있다고 생각되며, 세포내 Bcl-2유전자의 증가 또한 β-amyloid에 의한 신경세포의 아폽토시스를 억제할 수 있을 것으로 생각되나 Bcl-2의 이러한 작용과 관련되어 있을 것으로 생각되는 MAP kinase/p38 kinase signal pathway 및 NF-κB의 활성화저해에 관한 연구는 좀 더 진행되어야 할 것이다.

이러한 결과는 AD과 관련한 퇴행성 신경질환 치료를 위한 연구 및 약물개발을 위한 기초자료가 될 것으로 생각되고, 또한 15-deoxy-PGJ_2의 경우 AD 치료를 위한 잠재적인 치료약물로 사용 가능할 것으로 판단된다. 그리고 AD 등 퇴행성 신경질환관련 치료제 개발을 위해서, 신경세포의 경우 다른 무엇보다도 약물의 caspases의 활성 및 염증반응과 관련된 전사인자인 NF-κB의 발현에 대한 영향이 가장 우선적으로 고려해야 할 요소라고 생각된다.

V. 요 약

본 연구에서는 AD와 관련된 β-amyloid에 의한 신경세포의 손상작용 기전 및 그에 대한 저해효과를 연구하기 위하여, 신경세포의 분화 및 기능 연구에 많이 사용되고 있는 PC12 cells 및 N141I PS-2 돌연변이 유전자를 도입시킨 PC12 cells을 이용하여 PPAR-γ의 리간드인 15-deoxy-PGJ_2가 신경세포에 대해 어떠한 영향을 일으키는지, 그리고 15-deoxy-PGJ_2가 β-amyloid의 신경독성작용을 저해함으로서 신경세포에 대한 보호효과를 나타낼 수 있는가를 알아보고자 하였으며, 만약 그렇다면 어떠한 기전에 의해 β-amyloid에 의한 신경세포의 손상작용을 저해할 수 있는지를 조사하였다. 마지막으로 기존의 PC12 cells에 세포사를 억제하는 기능을 지닌 Bcl-2 유전자를 인위적으로 증가시킨 세포를 이용하여, 즉 세포내에서 Bcl-2 유전자가 β-amyloid의 신경독성 작용에 대하여 어떤 결과를 나타내는지 조사해 봄으로서 AD 치료제 개발과 관련한 가능성을 제시하고자 하였다.

PC12 cells은 NGF와 15-deoxy-PGJ_2에 의해서 MAP kinase와 JNK의 발현이 증가되었다. 이와 관련하여 전사인자 AP-1과 SP-1의 활성이 15-deoxy-PGJ_2에 의해 농도 및 시간에 의존적으로 증가되었다. 그러나, NGF에 의한 SP-1의 활성화는 15-deoxy-PGJ_2 처리시 더 이상 증가하지 않은 반면, AP-1의 활성은 NGF와 15-deoxy-PGJ_2를 함께 처리한 경우에도 증가하였다. 따라서, 전사인자 AP-1의 활성이 15-deoxy-PGJ_2에 의한 neurite outgrowth 촉진작용에 보다 직접적으로 관계하고 있음을 알 수 있다. 그러나, 흥미롭게도 다른 세포에서와는 다르게 15-deoxy-PGJ_2는 PC12 cells에서 PPAR-γ를 발현시키지 않았다.

AD와 관련한 신경세포의 죽음에 있어서 PS-2의 N141I 돌연변이 및 β-amyloid에 의한 영향을 관측한 결과, PS-2의 N141I 돌연변이는 신경세포내 β-amyloid의 생성을 증가시켰고, 또한 β-amyloid를 가할 경우 신경세포내 β-amyloid의 생성이 현저하게 증가됨과 동시에 PC12 cells 및 mutaNT N141I PS-2 transfected PC12 cells의 NGF에 의한 neurite outgrowth를 현저하게 저하시키는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 p53 그리고 p21을 통한 신호전달경로 보다는 caspase 3, caspase 9을 경유하는 신호전달경로가 보다 직접적으로 연관됨을 예측할 수 있었다. β-Amyloid는 PC12 cells 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서 TNF-α 및 COX-2의 발현을 현저하게 증가시켰고, PPAR-γ의 경우 대조군과 비교시 그 정도가 미미하였다. 또한, β-amyloid는 이들 세포에서 전사인자 NF-κB의 발현을 현저하게 증가시키는 결과를 나타냈다.

15-Deoxy-PGJ_2의 신경세포 보호효과 또는 β-amyloid가 나타내는 신경독성에 대한 저해효과를 알아보기 위하여, PC12 cells 및 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에 β-$amyloid_{25-35}$와 15-deoxy-PGJ_2를 농도별로 각각 또는 함께 처리하였다. 각 세포를 β-$amyloid_{25-35}$만 처리할 경우, 세포수의 증가 및 세포생존률이 감소하였다. 그러나 15-deoxy-PGJ_2를 함께 처리할 경우, 농도의존적으로 현저하게 세포수 및 세포생존률이 회복됨이 관찰되었고 β-$amyloid_{25-35}$에 의해 활성화되는 전사인자 NF-κB의 발현이 감소되었다. 이러한 15-deoxy-PGJ_2의 β-amyloid 신경세포 손상작용에 대한 저해효과는 상대적으로 PC12 cells 보다 mutant N141I PS-2 transfected PC12 cells에서 더 뚜렷하게 나타났다.

마지막으로, β-amyloid의 독성작용에 의한 AD환자의 신경세포의 죽음을 저해하거나 치료하기 위한 또 다른 수단으로서 Bcl-2 유전자를 신경세포내에서 인위적으로 증가시킨 경우, β-amyloid가 신경세포에 어떠한 결

과를 나타내는지를 조사하였다. NGF에 의한 neurite outgrowth는 PC12 cells에 비해서 Bcl-2 transfected PC12 cells에서 더 크게 증가하였고, β-amyloid$_{25-35}$에 의한 아폽토시스는 PC12 cells에 비해서 Bcl-2 transfected PC12 cells에서 상대적으로 현저하게 감소되었다. 또한 caspase 3의 경우 PC12 cells에 비해 Bcl-2 transfected PC12 cells에서 발현정도가 감소되었다. 세포내 신호전달과 관련하여 다른 MAP kinase 단백질에 비해서 p38 kinase의 변화가 현저하게 증가되었다. 그러나, p38 kinase의 발현증가 양상은 PC12 cells와 비교해 볼 때, Bcl-2 transfected PC12 cells에서 상대적으로 훨씬 낮게 발현되었다. 그리고 Bcl-2 유전자의 인위적인 발현증가가 β-amyloid에 의한 NF-κB의 발현에 어떤 변화를 나타내는지 알아본 결과, 대조군과 비교할 경우, PC12 cells 보다 Bcl-2 transfected PC12 cells에서 NF-κB의 발현정도가 훨씬 높았다. 또한 β-Amyloid$_{25-35}$를 처리할 경우, PC12 cells에서 NF-κB의 발현이 현저하게 증가하였으나, Bcl-2 transfected PC12 cells의 경우 대조군과 비교할 경우 오히려 NF-κB의 발현이 감소되는 현상이 관측되었다.

신경세포를 이용한 본 연구결과는 AD 발생과 관련된 N141I PS-2 유전자의 돌연변이에 의한 세포사에 있어서 기초적인 세포내 분자기전 자료를 제시한다. 그리고 본 결과를 통하여 15-deoxy-PGJ$_2$의 경우 잠재적인 AD 치료제가 될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 Bcl-2의 발현 증가에 관한 연구결과는 신경세포의 사멸 억제와 관련한 치료제 개발에 있어서 또 다른 접근법을 만들어 가는데 있어서 많은 도움을 줄 수 있으리라 판단된다.

VI. 참 고 문 헌

1. Yuan, J. and Yankner, B.A. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* **407,** 802-809.
2. Merry, D.E. and Korsmeyer, S.J. (1997) Bcl-2 gene family in the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* **20,** 245-267
3. Garcia, I., Martinou, I., Tsujimoto, Y. and Martinou, J.C. (1992) Prevention of programmed cell death of sympathetic by the *bcl*-2 proto-oncogene. *Science* **258,** 302-304.
4. Gonzalez-Garcia, M., Garcia, I., Ding, L., O'Shea, S., Boise, L.H., Thompson, C.B. and Nunez, G. (1995) bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92(10),** 4304-4308.
5. Deckwerth, T.L., Elliott, J.L., Knudson, C.M., Johnson, E.M., Jr Snider, W.D. and Korsmeyer, S.J. (1996) BAX is requried for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* **17,** 401-411.
6. Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. (1995) Bad, a heterodimeric patner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80,** 285-291.
7. Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang., X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome *c*-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90,** 405-413.
8. Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R. and Schubert, D. (1994) Hydrogen

peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* **77,** 817-827.

9. Mattson, M.P., Tomaselli, K.J. and Rydel, R.E. (1993) Calcium-destablizing and neurodegenerative effect of aggregate beta-amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain Res.* **621,** 35-49.
10. Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D. and Schmidt A.M. (1996) RAGE and amyloid-β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* **382,** 685-691.
11. Yaar, M. Zhai S, Pilch PF, Doyle SM, Eisenhauer PB, Fine RE, Gilchrest BA. (1997) Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* **100,** 2333-2340.
12. Lorenzo, A., Yuan. M., Zhang, Z., Paganetti, P.A., Sturchler-Pierrat, C, Staufenbiel, M., Mautino, J., Vigo, F.S., Sommer, B. and Yankner, B.A. (2000) Amyloid-β interacts with the amyloid precursor protein : a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nature Neurosci.* **3,** 460-464.
13. Lippa, C.F. (1999) Familial Alzheimer's disease: genetic influences on the disease process (Review). *Int. J. Mol. Med.* **4**: 529-536
14. Goate, A., Chartier, H.M., Mullan, M., Brown, J., Crawford., F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., et al., (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor proteins gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-706.
15. Annaert, W. and De Strooper, B. (1999) Presenilins: molecular

switches between proteolysis and signal transduction. *Trends Neuroscience* **22**, 439-443.

16. Martys-Zage, J.L., Kim, S.H., Berechid, B., Bingham, S.J., Chu, S., Sklar, J., Nye, J. and Sisodia, S.S. (2000) Requirement for presenilin 1 in facilitating lagged 2-mediated endoproteolysis and signaling of notch 1, *J. Mol. Neurosci.* **15**, 189-204.
17. De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K. and Van Leuven, F. (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* **391**, 387-390.
18. Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G. and Holman, K., (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375,** 754-760.
19. Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., et al. (1995) Candidate gene for chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* **269,** 973-977.
20. Price, D.L., Tanzi, R.E., Borchelt, D.R. and Sisoda, S.S. (1998) Alzheimer's disease : genetic studies and transgenic models. *Annu. Rev. Genet.* **32,** 461-493.
21. Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. and Younkin, S. (1996) Secreted amyloid β-protein similar to that in the senile

plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med.* **2,** 864-870.

22. Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T. and Selkoe, D.J. (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ-secretase activity. *Nature* **398,** 513-517.
23. Li, Y.M., Xu, M., Lai, M.T., Huang, Q., Castro, J.L., DiMuzio-Mower, J., Harrison, T., Lellis, C., Nadin, A., Neduvelil, J.G., Register, R.B., Sardana, M.K., Shearman, M.S., Smith, A.L., Shi, X.P., Yin, K.C., Shafer, J.A. and Gardell, S.J. (2000) Photoactivated γ-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenlin 1. *Nature* **405,** 689-694.
24. Mattson, M.P., Guo, Q., Furukawa, K. and Pederson, W.A. (1998) Presenlins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **70,** 1-14.
25. Herz, J. and Beffert, U. (2000) Apolipoprotein E receptors: Linking brain development and Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 51-58.
26. Strittmatter, W.J. (2000) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **924**, 91-92.
27. Tomiyama, T., Corder, E.H. and Mori, H. (1999) Molecular pathogenesis of apolipoprotein E-mediated amyloidosis in late-onset Alzhemer's disease. *Cell Mol. Life Sci.* **56**, 268-279.
28. Kaltschmidt, B., Sparna, T. and Kaltschmidt, C. (1999) Related Articles : Activation of NF-kappa B by reactive oxygen

intermediates in the nervous system. *Antioxid Redox Signal.* Summer;**1(2)**:129-44. Review.

29. Giulian, D., Haverkamp, L.J., Yu, J.H., Karshin, W., Tom, D., Li, J., Kirkpatrick, J., Kuo, L.M. and Roher, A.E. (1996) Specific domains of beta-amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. *J. Neurosci.* **16,** 6021-6037.
30. Tan, J., Town, T., Paris, D., Mori, T., Suo, Z., Crawford, F., Mattson, M.P., Flavell, R.A. and Mullan, M. (1999) Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. *Science* **286,** 2352-2355.
31. Zollner, T.M., Ahlbach, S., Kaufmann, R. and Boehncke, W.H. (2001) Related Articles : Tolerability of a selective cyclooxygenase-2-inhibitor (rofecoxib) in patients with intolerance reactions to nonsteroidal anti-inflammatory agents, *Dtsch Med Wochenschr*. Apr 6, **126(14)**, 386-8. German.
32. Lehmann, J.M., Lenhard, J.M., Oliver, B.B., Ringold, G.M. and Kliewer S.A. : Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs, *J. Biol. Chem.*. 1997 Feb 7, **272(6)**, 3406-3410.
33. Desvergne, B., and Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* **20.** 649-688.
34. Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240,** 889-895.
35. Ricote, M., Huang, J., Fajas, L., Li, A., Welch, J., Najib, J., Witztum,

J.L., Auwerx, J., Palinski, W. and Glass, C.K. (1998) Expression of the peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR-γ) in human atherosclerosis and regulation of macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **95,** 7614-7619.

36. Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J. and Glass, C.K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391,** 79-82.
37. Tanaka, T., Itoh, H., Doi, K., Fukunaga, Y., Hosoda, K., Shintani, M., Yamashita, J., Chun, T.H., Inoue, M., Masatsugu, K., Sawada, N., Saito, T., Inoue, G., Nishimura, H., Yoshimasa, Y. and Nakao, K. (1999) Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones. *Diabetologia* **42,** 702-710.
38. Su, C.G., Wen, X., Bailey, S.T., Jiang, W., Rangwala, S.M., Keilbaugh, S.A., Flanigan, A., Murthy, S., Lazar, M.A. and Wu, G.D. (1999) A novel theraphy for colitis utilizing PPAR-γ ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J. Clin. Invest.* **104,** 383-389.
39. Werman, A., Hollenberg, A., Solanes, G., Bjorbaek, C., Vidal-Puig, A.J. and Flier, J.S. (1997) Ligand-independent activation domain in theN termius of peroxisome-proliferate-activated receptor γ (PPAR-γ) differential activity of PPAR-γ-1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J. Biol. Chem.* **272,** 20230-20235
40. Shao, D.L., Rangwala, S.M., Bailey, S.T., Krakow, S.L., Reginato, M.J. and Lazar, M.A. (1998) Interdomain communication regulating

ligand binding by PPAR-γ. *Nature* **396,** 377-380.

41. Moras, D. and Gronemeyer, H. (1998) The nucler receptor ligand binding domain-structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10,** 384-391.

42. Staels, B., Koenig, W., Habib, A., Merval, R., Lebret, M., Torra, I.P., Delerive, P., Fadel, A., Chinetti, G., Fruchart, J.C., Najib, J., Maclouf, J. and Tedgui, A. (1998) Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR-α but not by PPAR-γ activators. *Nature* **393,** 790-793.

43. Murphy, G.J. and Holder, J.C. (2000) PPAR-γ agonist: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *TiPS*-December **21,** 469-473.

44. Kassam, A. Hunter, J., Rachubinski, R.A. and Capone, J.P. (1998) Subtype-and response element-dependent differences in transactivation by peroxisome proliferator-activated receptors α and γ. *Mol. Cell .Endocrinol.* **141,** 153-162.

45. Houseknecht, K.L., Bidwell, C.A., Portocarrero, C.P. and Spurlock, M.E. (1998) Expression and cDNA cloning of porcine peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPARγ). *Gene* **225,** 89-96.

46. Palmer, C.N., Hsu, M.H., Griffin, H.J. and Johnson, E.F. (1995) Novel sequence determinants in peroxosome proliferator signaling. *J. Biol. Chem.* **270,** 16114-16121.

47. Hallakou, S., Doare, L., Foufelle, F., Kergoat, M., Guerre-Millo, M., Berthault, M.F., Dugail, I., Morin, J., Auwerx, J. and Ferre, P. (1997) Pioglitazone induces *in vivo* adipocyte differentiation in the obese Zucker *fa/fa* rat. *Diabetes* **46,** 1393-1399.

48. Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J. and Glass, C.K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391,** 79-82.

49. Jiang, C., Ting, A.T. and Seed, B. (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391,** 82-86.

50. Adams, M., Montague, C.T., Prins, J.B., Holder, J.C., Smith, S.A., Sanders, L., Digby, J.E., Sewter, C.P., Lazar, M.A., Chatterjee, V.K. and O'Rahilly, S. (1997) Activators of peroxisome proliferator -activated receptor γ have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J. Clin. Invest.* **100,** 3149-3153.

51. Saltiel, A.R. and Olefsky, J.M. (1996) Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and typeII diabets. *Diabetes* **45,** 1661-1669.

52. Boden, G. (1996) Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* **45,** 3-10.

53. Storlien, L.H., Jenkins, A.B., Chisholm, D.J., Pascoe, W.S., Khouri, S. and Kraegen, E.W. (1991) Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rat. *Diabetes* **40,** 280-289.

54. Hostamisligil, G.S., Shargill, N.S. and Spiegelman, B.M. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-α: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259,** 87-91.

55. Peraldi, P., Xu, M., Spiegelman and B.M. (1997) Thiazolidinediones block tumor necrosis factor α-induced inhibition of insulin signaling. *J. Clin. Invest.* **100,** 1863-1869.

56. Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H. and Evans, R.M.

(1998) Oxidized LDL regulated macrophage gene expression through ligand activation of PPAR-γ. *Cell* **93,** 229-240.

57. Spiegelman, B.M. (1998) PPAR-γ-adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* **47,** 507-514.
58. Desvergne, B., IJpenberg, A., Devchand, P.R. and Wahli, W. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptors at the cross-road of diet and hormonal signalling. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **65,** 65-74.
59. Pershadsingh, H.A., Sproul, J.A., Benjamin, E., Finnegan, J. and Amin, N.M. (1998) Treatment of psoriasis with troglitazone therapy. *Arch. Dermatol.* **134,** 1304-1305.
60. Basu-Modak, S., Braissant, O., Escher, P., Desvergene, B., Hongger, P. and Wahli, W. (1999) Peroxisome Proliferator-activated Receptor β Regulates Acyl-CoA Synthetase 2 in Reaggregated Rat Brain Cell Cultures. *J. Biol. Chem.* **274(50)**, 35881-35888.
61. Bishop-Bailey, D. and Hla, T. (1999) Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$prostaglandin J_2. *J. Biol. Chem.* **274(24)**, 17042-17048.
62. Tianxin Y., Daniel E.M., John P., Ann M.S., Zhiwu L., Frank C.B. I., Jurgen B.S. and Josephine P.B. (1999) Expression of peroxisome proliferator-activated Rreceptors and retinoid X receptor in the kidney. *Am. J. Physiol.* **277(46)**, F966-F973.
63. Maloney, E.K. and Waximan, D.J. (1999) trans-Activation α and PPARγ by Structurally Diverse Environmental Chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **161**, 209-218.

64. Zi, X. and Agarwal, R. (1999) Modulation of mitogen-activated Protein kinase activation and cell cycle regulators by the potent skin cancer preventive agent silymarin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 528-536.

65. Chang, J.W., Coleman, P.D. and O'Banion, M.K. (1996) Prostaglandin G/H Synthase-2 (Cyclooxygenase-2) mRNA Expression is Decreased in Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Aging* **17,** 801-808.

66. Lukiw, W.J. and Bazan, N.G. (1997) Cyclooxygenase 2 RNA message abundance, stability, and hypervariability in sporadic Alzheimer neocortex. *J. Neurosci. Res.* **50,** 937-945.

67. Pasinetti, G.M. and Aisen P.S. (1998) Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience* **87,** 319-324.

68. Kitamura, Y., Shimohama, S., Koike, H., Kakimura, J., Matsuoka, Y., Nomura, Y., Gebicke-Haerter, P.J. and Taniguchi, T. (1999) Incresaed expression of cyclooxygenases and peroxisome proliferator-activated receptor-γ in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254,** 582-586.

69. Vane, J.R., Bakhle, Y.S. and Botting, R.M. (1998) Cyclooxygenase 1 and 2. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38,** 97-120.

70. Satoh, T., Furuta, K., Suzuki, M. and Watanabe, Y. (1999) Prostaglandin J_2 and Its Metabolites Promote Neurite Outgrowth Induced by Nerve Growth Factor in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**, 50-53.

71. Elstner, E., Muller, C., Koshizuka, K., Williamson, E.A., Park, D., Asou, H., Shintaku, P., Said, J.W., Heber, D. and Koeffler, H.P.

(1998) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor-γ and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95,** 8806-8811.

72. Kubota, T., Koshizuka, K., Williamson, E.A., Asou, H., Said, J.W., and Holden, S. (1998) Ligand for peroxisome proliferator γ (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* **58,** 3344-3352.
73. Sarraf, P., Mueller, E., Jones, D., King, F.J., DeAngelo, D.J., Partridge, J.B., Holden, S.A., Chen, L.B., Singer, S., Fletcher, C. and Spiegelman, B.M. (1998) Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR-γ. *Nat. Med.* **4,** 1046-1052.
74. Keelan, J.A., Sato, T.A., Marvin, K.W., Lander, J., Gilmour, R.S. and Mitchell, M.D. (1999) 15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J_2, a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-γ, induces apoptosis in JEG3 choriocarcinoma cells. *Biochem. .Biophys. Res. Commun.* **262.** 579-585.
75. Han, S.W., Greene, M.E., Pitts, J., Wada, R.K. and Sidell, N. (2001) Novel expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human neuroblastoma cells. *Clin. Cancer Res.* **7**, 98-104.
76. Demetri, G.D., Fletcher, C.D., Mueller, E., Sarraf, P., Naujoks, R., Campbell, N., Spiegelman, B.M. and Singer, S. (1999) Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-γ ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96,** 3951-3956

77. Kitamura, S., Myazaki, Y., Shinomura, Y., Kondo, S., Kanayama, S. and Matsuzawa, Y. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor γ induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **90**, 75-80.
78. Sarraf, P., Mueller, E., Smith, W.M., Wright, H.M., Kum, J.B., Aaltonen, L.A., de la Chapelle, A., Spiegelman, B.M. and Eng, C. (1999) Loss-of-function mutations in PPAR γ associated with human colon cancer. *Mol. Cell.* **3,** 799-804.
79. Jiang, C., Ting, A.T. and Seed, B. (1998) PPAR-γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391,** 82-86.
80. Keelan, J.A., Sato, T.A., Marvin, K. W., Lander, J., Gilmour, R.S. and Mitchell, M.D. (1999) 15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$prostaglandin J_2, a Ligand for Peroxisome Apoptosis in JEG3 Choriocarcinoma Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**, 579-585.
81. Mauricio, J.R., Samuel, L.K., Shannon, T.B. and Mitchell, A.L. (1998) Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-acivated receptor γ. *J. Biol. Chem.* **273(4)**, 1855-1858.
82. Gregory, J.M. and Julie, C.H. (2000) PPAR-γ agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *TiPS* **21**, 469-474.
83. Evan, D.R. and Bruce, M.S. (2001) PPAR-γ: A nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J. Biol. Chem.* **276**, 45694-45703.
84. Tsubouchi, Y., Sano, H., Kawahito, Y., Mukai, S., Yamada, R., Kohno, M., ichiro, K., Hla, T. and Kondo, M. (2000) Inhibition of

Human Lung Cancer Cell Growth by the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Agonists through inducrion of Apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 400-405.

85. Breitner, J.C.S. (1996) The role of antiimflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *A. Rev. Med.* **47**, 401-411

86. Christelle, F., Sylvie, F., Veronique, A., Josette, F., Gilulia, C., Philippe, G., Philippe, D., Charlie, M., Monique, C., Bart, S., Muriel, M. and François, T. (2000) Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ activators inhibit interlukin-12 production in murine dendritic cells. *FEBS Lett.* **486**, 261-266.

87. DuBois, R.N., Gupta, R., Brockman, J., Reddy, B.S., Krakow, S.L. and Lazar, M.A. (1998) The nuclear eicosanoid receptor, PPARγ, is aberrantly expressed in colonic cancer. *Carcinogenesis* **19(1)**, 49-53.

88. Iijima, K., Yoshizumi, M., Ako, J., Eto, M., Kim, S., Hashimoto, M., Sugimoto, N., Liang, Y.Q., Sudoh, N., Toba, K., Ouchi, Y. (1998) Expression of peroxisome proliferator - activated receptor γ (PPAR γ) in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 353-356.

89. Bordji, K., Grillasca, J.P., Gouze, J.N., Magdalou, J., Schohn, H., Keller, J.M., Bianchi, A., Dauça, M., Netter, P. and Terlain, B. (2000) Evidence for the Presence of Peroxisome Proliferator - activated Receptor (PPAR)α and γ and Retinoid Z Receptor in Cartilage. *J. Biol. Chem.* **275(16)**, 12243-12250.

90. Xin, X., Yang, S., Kowalski, J. and Gerritsen, M.E. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor γ lingands are potent

inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **274(13)**, 9116-9121.

91. Vanaja, D.K., Grossmann, M.E., Celis, E., Young, C.Y. (2000) Tumor prevention and antitumor immunity with heat shock protein 70 induced by 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$prostaglandin J_2, in transgenic adenocarcinoma of moues prostate cells. *Cancer Res.* **60**, 4714-4718.
92. Eibl, G., Wente, M.N., Reber, H.A. and Hinesm O.J. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor γ induces pancreatic cancer cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 522-529.
93. Inoue, K.I., Kawahito, Y., Tsubouchi, Y., Kohno, M., Yoshinmura, R., Yoshikawa, T. and Sano, H. (2001) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in renal cell carcinoma and growth inhibition by Its agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 727-732.
94. Han, S., Wada, R.K. and Sidell, N. (2001) Differentiation of human neuroblastoma by pheylacetate is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor γ^1. *Cancer Res.* **61**, 3998-4002.
95. Butler, R., Mitchell, S.H., Tindall, D.J., Young, C.Y. (2000) Nonapoptotic cell death associated with S-phase arrest of prostate cancer cells via the peroxisome proliferator-activated receptor γ liand, 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$prostaglandin J_2. *Cell Growth Differ.* **11**, 49-61.
96. Kliewer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C. and Lehmann, J.M. (1995) A prostaglandin J_2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes

adipocyte differentiation. *Cell* **83**, 813-819.

97. Forman, B.M., Tontonoz P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M. and Evans, R.M. (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J_2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**, 803-812.

98. Tsubouchi, Y., Sano, H., Kawahito, Y., Mukai, S., Yamada, R., Kohno, M., Inoue, K., Hla, T. and Kondo, M. (2000) Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 400-405.

99. Combs, C.K., Johnson, D.E., Karlo, J.C., Cannady, S.B. and Landreth, G.E. (2000) Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. *J. Neurosci.* **20**, 558-567.

100. Ye, J.M., Doyle, P.J., Iglesias, M.A., Watson, D.G., Cooney, G.J. and Kraegen, E.W. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats: comparison with PPAR-gamma activation. *Diabetes* **50**, 411-417.

101. Tontonos, P., Nagy L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A. and Evans, R.M. (1998) PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **93**, 241-252.

102. Mueller, E., Sarraf, P., Tontonoz, P., Evans, R.M., Martin, K.J., Zhang, M., Fletcher, C., Singer, S. and Spiegelman, B.M. (1998) Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol.. Cell.* **1**, 465-470.

103. Han, S.W., Wada, R.K. and Sidell, N. (2001) Differentiation of Human Neuroblastoma by Phenylacetate Is Mediated by Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma. *Cancer Res* **61**, 3998-4002.

104. Morooka, T. and Nishida, E. (1998). Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J. Biol. Chem*. **273,** 24285-24288.

105. Leppa, S., Saffrich, R., Ansorge, W., Bohmann, D. (1998) Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC-12 cell differentiation. *EMBO J*. **17**, 4404-4413.

106. Feng, Z. and Porter, A.G. (1999) NF-kappaB/Rel proteins are required for neuronal differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem*. **274**, 30341-30344.

107. Furukawa, K., Guo, Q., Schellenberg, G.D. and Mattson„M.P. (1998) Presenilin-1 mutation alters NGF-induced neurite outgrowth, calcium homeostasis, and transcription factor (AP-1) activation in PC12 cells. *J. Neurosci. Res*. **52**, 618-624.

108. Ito, A., Uehara, Y.A., Tokumitsu, Y.O., Nomura, Y. (1999) Possible involvement of cytochrome *c* release and sequential activation of caspases in ceramid-induced apoptosis in SK-N-MC cells. *Biochim. Biophys. Acta*. **1452**, 263-274.

109. Guise, S., Braguer, D., Carles, G., Delacourte, A., and Briand, C. (2001) Hyperphosphorylation of tau is mediated by ERK activation during anticancer drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. J. *Neurosci. Res*. **63**, 257-267.

110. Chung, C.W., Song, Y.H., Kim, I.K., Yoon, W.J., Ryu, B.R., Jo,

D.G., Woo, H.N., Kwon, Y.K., Kim, H.H., Gwang, B.J., Jung, H.M., and Jung, Y.K. (2001) Proapoptotic Effects of Tau Cleavage Product Generated by Caspase-3. *Neurobiol. Disease* **8**, 162-172.

111. Bentires-Alj, M., Dejardin, E., Viatour, P., Lint, C.V., Froesch, B., Reed, J.C., Merville, M.P., and Bours, V. (2001) Inhibition of the NF-κB transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene* **20**, 2850-2813.
112. Herr, I., and Debatin, K.M. (2001) Cellular stress reponse and apoptosis in cancer therapy. *Blood* **98(9)**, 2603-2614.
113. Mori, M., Nakagami, H., Morishita, R., Mitsuda, N., Yamamoto, K., Yoshimura, S., Ohkubo,N., Sato,N., Ogihara, T., Kaneda, Y. (2002) N141 mutant Presenilin-2 gene enhances neuronal cell death and decrease bcl-2 expression. *Life Science* **70**, 1-14.
114. Straus, D.S., Pascual, G., Li, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.H. (2000) 15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J_2 inhibits multiple steps in the NF-κB signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **97(9)**, 4844-4849.
115. Jan, J.T., Chen, B.H., Ma, S.H., Liu, C.I., Tsai, H.P., Wu, H.C., Jiang, S.Y., Yang, K.D., Shaio. M.F., (2000) Potential dengue virus-triggered apoptotic pathway in human neuroblastoma cells: arachidonic acid, superoxide anion, and NF-κB are sequentially invoved. *J. Virol.* **74(18)**, 8680-8691.
116. Combs, C.K., Karlo, J.C., Kao, S.C., and Landreth, G.E. (2001) beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthease and neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* **21(4)**, 1179-1188.

117. Kaltschmidt, B., Uherek, M., Wellmann, H., Volk, B., and Kaltschmidt C. (1999) Inhibition of NF-κB potentiates amyloid beta-mediated neuronal apoptosis. Proc. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96(16)**, 9409-9714.

118. Hwang, J.H., Lim, S.C., Kim, Y.C., Park, K.O., Ahn, S.J., and Chung, W.K. (2001) Apoptosis and Bcl-2 eapression as predictors survival in radiation-treated non-small-cell lung cancer. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **50(1)**, 13-18.

119. Jung, M.Y., Kang, H.J., and Moon, A. (2001) Capsaicin-induced apoptosis in SKK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. *Cancer Lett.* **165**, 139-145.

120. Maser, R.S., Antoku, K., Scully, W.J. Jr., Cho, R.L., and Johnson, D. E. (2000) Analysis of the Role of Conserved Cysteine Residues in the Bcl-2 Oncoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 171-178.

121. Galvan, V., and Roizman, B. (1998) Herpes simplex virus 1 induces and blocks apoptosis at multiple steps during infection and protects cells from exogenous inducers in a cell-type-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **95**, 3931-3936.

122. Knudson, C.M., Johnson, G.M., Lin, Y., and Korsmeyer, S.J. (2001) Bax accelerates tumorigenesis in p53-deficient Mice. *Cancer Res.* **61**, 659-665.

123. Yu, W., Liao, Q.Y., Hantah, F.M., Sanders, B.G., and Kline, K. (2001) Activation of extracellular signal-regulared kinase and c-Jun-NH_2-terminal kinase but not p38 mitogen-activated protein

kinases is required for RRR-α-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res.* **61**, 6569-6576.

124. Flamigni, F., Facchini, A., Stanic, l., Tantini, B., Bonavita, F., Stefanelli, C. (2001) Control of svrvival of proliferating L1210 cells by soluble guanylate cyclase and p44/42 mitogen-activated protein Kinase modulators. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 319-328.

125. Seidman, R., Gitelman, I., Sagi, O., Horwitz, S.B., and Wolfson, M. (2001) The role of ERK 1/2 and p38 MAP-kinase pathways in taxol-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* **268**, 84-92.

126. Nancy, J.L,, Yaxiong., David, G.C., and Daniel, M.D. (2001) Neuronal apoptosis resulting from high doses of the isolavone genistein: role for calcium and P42/44 mitogen-activated protein kinase. *JPET* **299**, 67-75.

127. Ding, Q., Wang, Q., and Evers, B.M. (2001) Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 282-288.

128. Dai, Y., Yu, C., Singh, V., Tang, L., Wang, Z,. McInistry, R., Dent, P., and Grant, S. (2001) Pharmacological inhibitors of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase/MAPK cascade interact synergistically with UCN-01 to induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Res.* **61**, 5106-5115.

129. Mackeigan, J.P., Collins, T.S., and Ting, Y.P.J., (2000) MEK inhibition enhances paclitaxel-induced tumor apoptosis. *J. Biol. Chem.*. **275**, 38953-38956.

130. Sun, J., Li, M., Han, J. and Gu, J. (2001) Sensitization of Differentiated PC12 cells to Apoptosis by Presenilin-2 is Mediated by p38. *Biochem.. Biophy. Res. Commun.*. **287**, 536-541.

131. Hensley, K., Floyd R.A., Zheng, N.Y., Nael, R., Robinson, K.A., Nguyen, X., Stewart, C.A., Geddes, J., Markesbery W.R., Patel, E., Johnson, G.V. and Bing, G. (1999) p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J. Neurochem.* **72(5)**, 2053-2058.

132. Zhu, X., Rottkamp, C.A. Harzler, A., Sun. Z., Takeda, A., Boux, H., Shimohama, S., Perry, G. and Smith, M.A. (2001) Activation of MKK6, an upstream activator of p38, in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **79(2)**, 311-318.

감사의 글

어느덧 박사학위 과정을 시작하고서 6년의 세월을 보내게 되었습니다. 돌아보면 언제 이 만큼 시간이 흘렀을까하는 놀라움과 함께 그동안 너무 내가 나태하게 시간을 소비하였구나 하는 반성의 심정도 듭니다. 어찌 생각해보면 이 장에 적는 글이 감사의 글 보다는 반성의 글이 되어야 하지 않을까 싶기도 합니다. 그러나 학위를 끝내는 마당에 반성은 혼자만의 일이지만 그래도 이 학위라는 무거운 짊을 놓아 버림에 있어서 주위에 계신 많은 분들의 도움으로 인하여 이렇게 이 장을 적을 수 있었기에 여러 고마우신 분들께 감사하단 말을 전해야겠습니다.

"우선, 이 길을 저에게 열어주신 저의 지도교수 박남규 선생님께 정말 감사 드립니다. 그리고, 실험을 함에 있어서 너무나도 전폭적인 지원을 아끼지 않으셨던 저의 정수연 과장님께 대단한 고마움을 표하고 싶습니다. 또한, 이 실험을 수행함에 있어서 아이디어를 제공하시고 이끌어 주셨던 지금은 충북대학에서 학자로서 훌륭하게 길을 걷고있는 계시는 홍진태 교수님께 너무나도 감사 드립니다.

이 세분이야말로 이 논문이 이렇게 나올 수 있게 한 실제적인 원동력이지 않을까 싶습니다. 다시 한번 생각해봐도 이 분들이 없었다면 이 논문은 나올 수 없을 것이라 생각합니다. 정말 대단히 감사합니다. 또한, 실험에 사용할 수 있도록 세포를 제공해주신 김용규 연구관님과 이 부끄러운 논문이 나올 수 있도록 조언을 아끼지 않으시고 심사해주신 변대석, 장영채, 김성구 교수님께 머리 숙여 감사 드립니다.

그리고 아낌없는 성원을 베풀어주신 정해관, 박창원 연구관님, 박기숙, 송치원 선생님, 지금은 사회로 진출하여 누구보다도 열심히 생활하고 있을 정경미, 김은정 그리고 연구생으로서 또한 학생으로서 열심히 생활하고 있는 김용순, 이상민, 박성규, 장희원, 송예리아. 저희 신경독성과 모든 직원 및 연구생들에게 감사 드립니다. 여러분의 격려 및 도움이 없었다면 아마 정말 힘들었으리라 생각됩니다.

또한, 지금은 멀리 떨어져 제대로 볼 수 없지만 계절이 바뀔 때마다 안부

를 물어주던 부경대 생물유기실험실의 마음 착한 김은정, 마지막에 조교로서 너무나 수고해준 어여쁜 고혜진, 그리고 우리의 듬직한 찬희, 항상 웃는 얼굴의 인혜씨 및 호성군 등에게 고마움을 전합니다.

이렇게 글을 적고 있자니 주마등처럼 그간 잊고 지냈던 얼굴들이 스쳐지나갑니다. 언제나 마음 한 구석에서 나를 생각해주는 나의 知友들 철호, 진웅, 도용, 상봉, 용석. 이 들이 있었기에 지난 20년의 세월이 즐겁고 풍요로웠던 것 같습니다. 그리고 각자 나름대로 지금까지 열심히 생활하고 있는 입사동기들 및 공무원으로서 나에게 가야할 길을 보여주신 여러 선배님 그리고 후배들에게 고마움을 표합니다.

마지막으로 언제나 나의 곁에서 나와 함께 보고, 나와 함께 듣고, 나와 함께 생각하고 행동하는 나의 아내 '이은주'에게 고마움과 사랑을 표합니다. 그래서 부부는 일심동체라고 하나봅니다. 물론, 때로는 각자 따로 놀아서 부자연스러울 때도 있습니다. 그리고, 언제나 하나뿐인 아들을 그리고 사위를 말없이 지켜보시면서 후원을 아끼지 않으셨던 어머니 그리고 장인 ·장모님께 감사 드립니다. 그동안 사회생활과 학위 한답시고 틈틈이 찾아뵙기는커녕 안부인사 한번 제대로 못했기에 그래서 더욱 죄송합니다. 그리고 결혼을 하니 인사드릴 곳이 많습니다. 따라서 누나부부, 동생부부, 그리고 큰 처남부부에게도 감사를 전합니다. 또한, 비록 유일하게 짝을 이루지 못하고 있는 작은 처남에게도 고마움을 표합니다. 사실 하나뿐인 매형으로서 처남들에게 그리 잘해주지 못해 미안하게 생각합니다. 또 사랑스러운 우리 딸들 지원이, 정원이 에게 고맙다고 표하고 싶습니다. 지원아, 정원아. 무뚝뚝한 경상도 아버지 더군다나 매정한 이북출신의 할아버지에게서 자라나 고지식하고 엄하기 만한 아버지 밑에서 아무런 문제없이 자라나고 있어서 너무 고맙다.

이렇게 적다보니 이제는 그만 줄여야겠다는 생각이 듭니다. 그런데 정말 고마움을 전하고 싶은 사람이 있습니다. 지금은 가족 곁을 떠난 지 6년이 조금 넘으신 나의 아버지. 아직도 집으로 문을 열고 들어가면 언제나처럼 말없이 반겨주실 것 같은 그 아버지께 전하고 싶습니다. "아버지 고맙습니다 그리고 보고싶습니다."