

영구적 국소 대뇌 허혈 생쥐
모델에서 활성산소종에 의한
세포고사 유도인자의 핵내 이동과
세포고사

연세대학교 대학원

의 과 학 과

이 용 현

영구적 국소 대뇌 허혈 생쥐
모델에서 활성산소종에 의한
세포고사 유도인자의 핵내 이동과
세포고사

지도 이 병 인 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2004년 12월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

이 용 현

이용현의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004년 12월 일

<차례>

국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 영구적 국소 허혈 모델	7
2. 세포 단백질의 분리	8
3. Western blotting	8
4. 면역조직화학염색	9
5. <i>in situ</i> 과산화 음이온 라디칼 검출	10
6. Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)	11
7. MnTBAP 처리	12
8. Caspase 활성 측정	12
9. Caspase inhibitor 처리	13
10. AIF와 DNA 분절현상을 분석하기 위한 이중형광 염색	13
11. 세포사멸 분석	14
12. 통계학적 분석	14
III. 결과	15
1. 생리학적 자료	15
2. 영구적 국소 대뇌 허혈 유도 후 AIF의 핵내 이동	15
3. NeuN과 AIF의 이중형광 표지로 AIF의 핵내 이동현상 확인	18
4. MnTBAP 처리군에서 과산화 음이온 라디칼 생산의 억제	18

5. MnTBAP 처리군과 SDO1 Tg 군에서의 AIF의 핵내 이동 감 소	20
6. 허혈 유도 후 MnTBAP 처리군과 SOD1 Tg군에서 커다란 DNA 분절현상 억제	22
7. Caspase와 독립적 경로를 통한 AIF의 핵내 이동	22
 IV. 고찰	 27
 V. 결론	 31
 참고문헌	 32
 영문요약	 41

그림 차례

Fig. 1. The change of AIF protein levels in nuclear and mitochondrial fractions after permanent MCAO	17
Fig. 2. Nuclear AIF translocation after permanent MCAO	19
Fig. 3. Suppression of O_2^- production after MnTBAP pretreatment	21
Fig. 4. Inhibition of AIF translocation after MnTBAP pretreatment or in SOD1 Tg mice	23
Fig. 5. Representative photographic findings of large scale DNA fragmentation	25
Fig. 6. AIF translocation and subsequent DNA fragmentation via caspase-independent pathway after permanent MCAO	26

표 차례

Table 1. Summary of selected physiological data	16
---	----

국문요약

영구적 국소 대뇌 허혈 생쥐 모델에서 활성산소종에 의한 세포고사 유도인자의 핵내 이동과 세포고사

미토콘드리아는 세포고사(apoptosis)를 일으키는 단백질을 방출시키는 기능을 통해 세포사멸(apoptotic cell death)을 조절하는데 중요한 역할을 수행한다. 미토콘드리아 단백질에는 cytochrome c, endonuclease G, 그리고 세포고사 유도인자(apoptosis-inducing factor; AIF)등이 있다. 이러한 단백질들은 여러 세포고사를 유도하는 조건에서 미토콘드리아의 외부막을 통해 세포질로 방출되는데, AIF의 경우에는 유리된 AIF가 핵으로 이동되어 caspase와 독립적인 경로를 통한 신경세포사멸을 일으키는 것으로 보고되어 있다. 그러나 AIF의 핵내 이동으로 인한 세포사멸이 영구 국소적 대뇌 허혈 유도 후 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)과 관련되어 발생한다는 사실에 대해서는 아직 확실히 규명되어지지 않고 있다. 본 실험에서는 AIF의 역할을 규명하기 위해 ICR 마우스와, copper/zinc-superoxide dismutase (SOD1) transgenic (Tg) 마우스와 야생형 마우스를 사용하여 영구적 중대뇌동맥 폐색(middle cerebral artery occlusion; MCAO) 모델을 만들었다. AIF의 핵내 이동을 확인하기 위해 Western blot 분석과 면역조직화학 염색을 실시하였다. AIF의 핵내 이동으로 인한 커다란 DNA 분절현상을 확인하기 위해 pulse field gel electrophoresis (PFGE)를 실시하였다. AIF의 핵내 전이현상과 활성산소종과의 관계를 확인하기 위해 활성산소종 scavenger인

Manganese(III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP)과 SOD1 Tg 마우스를 사용하였다. Western blot 분석과 면역조직화학 염색 분석으로 AIF의 핵내 이동이 영구적 국소 대뇌 허혈 유도 후 1 시간부터 검출되었다. ~50 kbp의 커다란 DNA 조각들은 영구적 국소 대뇌 허혈 유도 후 8 시간부터 검출되었다. MnTBAP 처리군과 SOD1 Tg 군에서는 AIF의 핵내 이동은 대조군에 비하여 감소되었고, 커다란 DNA 분절현상은 차단되었다. 이러한 결과들은 superoxide 생산이 영구적 국소 허혈 유도 후에 AIF의 핵내 이동과 그로 인한 세포고사적 신경세포사멸을 유도한다는 사실을 제시한다.

핵심되는 말 : 활성산소종, 세포고사 유도인자, 핵내 이동, 뇌 허혈

영구적 국소 대뇌 허혈 생쥐 모델에서 활성산소종에 의한
세포고사 유도인자의 핵내 이동과 세포고사

<지도교수 이병인>

연세대학교 대학원 의과학과

이 용 현

I. 서론

활성산소종(reactive oxygen species)은 신경학적 질병들의 병태생리학적 측면에서 중요한 역할을 한다.¹⁻³ 활성산소종 중에서 특히 과산소 음이온 라디칼(superoxide anion radical)이 세포고사적 신호 전달경로의 활성화에 관련되며 대뇌 허혈과 밀접하게 관련되어 있다고 보고되고 있다.⁴ 이러한 사실들은 설치류의 일시적 국소 허혈 모델이나^{5,6} 전체 허혈 모델 등을^{7,8} 이용한 연구에서도 뇌혈관의 폐색 이후 재관류를 시킬 경우에 산소가 여러 효소적 산화반응의 기질로 공급되어 재산소화 반응이 일어나게 되며,⁹ 미토콘드리아로부터 발생하는 활성산소종에 의해 유도되는 신호전달이 미토콘드리아의 수용성 막 단백

질과 미토콘드리아 호흡사슬의 본질적 구성 요소인 cytochrome c를 방출시킨다는 것이 증명되었다.^{10,11} 세포사멸(cell death)에는 미토콘드리아 손상 정도에 따라 세포괴사(necrosis)와 세포고사(apoptosis)가 각각 일어나게 되는데,¹² 그 예로 심한 중추 허혈이 유도되면 미토콘드리아가 ATP 생산을 못하게 되어 세포괴사적 세포사멸을 일으키게 되는 반면에, 그 이하의 중추 허혈에서는 미토콘드리아, 사멸 막 수용체, 그리고 DNA 효소를 포함하는 산화환원 신호전달의 가능한 표적과 그 신호전달 과정들을 통한 세포고사적 세포사멸이 유도된다고 알려져 있다.¹³

세포고사는 세포수축, 단백질 가수분해, 염색질 응축, DNA 분절현상들과 같은 형태학적 특징들에 의해 확인되었으며, 최근에 미토콘드리아가 세포고사의 조절자로서 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.^{14,15} 미토콘드리아 외부막의 투과성 변화가 일어날 경우에 미토콘드리아 중간막 공간에 존재하는 세포고사를 일으키는 여러 단백질들이 방출되는데, 이들은 Cytochrome c, 세포고사 유도 요소인자(apoptosis-inducing factor, AIF),¹⁶ endonuclease G와 caspase의 이차 미토콘드리아 활성화자(second mitochondrial activator of caspase, Smac)¹⁷를 포함한다.¹⁸ 특히 cytochrome c는 세포고사의 기전에 가장 중요한 실행자로 알려져 있는데,¹⁹⁻²¹ 미토콘드리아의 cytochrome c가 세포질로 방출되면 apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1), caspase-9과 함께 세포복합체(apoptosome)를 형성하고 하위 실행자인 caspase를 활성화시키게 된다. Caspase의 활성화 후에는 caspase에 의해 활성화된 CAD (caspase-activated DNase)가 oligonucleosomal DNA 조각들로 분절시키며,¹⁶ 활성화된 caspase 자체도 핵 골격 단백질을 분해함으로써 세포사멸을 일으키게 된다. 그러나 신경세포에서

의 세포사멸이 caspase와는 독립적인 기전을 통해서도 발생할 수 있다는 것이 보고 되었는데,²¹ 그 예로 흥분독성 세포사멸에서는 caspase가 활성화 되지 않으며, caspase 억제자들을 처리하여도 신경세포의 보호효과가 관찰되지 않았다.^{22,23} 뇌졸중의 실험적 모델에서도 마찬가지로 caspase의 억제는 신경세포 집단에서 신경세포 보호효과를 보이지 않았는데,^{23,24} 최근의 연구들은 뇌졸중 모델에서 caspase의 활성이 일어나는 것은 확인하였으나, 이러한 caspase의 활성을 억제시킨다고 해도 세포사멸의 시간만 지연될 뿐 세포사멸을 억제하지 못한다고 보고하였다.²⁴⁻²⁶

이러한 연구들은 세포고사의 기전이 caspase와 독립적으로 일어날 수 있다는 것을 시사하였는데, 그 대표적인 세포고사를 유도하는 단백질로써 AIF가 최근 주목받고 있다.¹⁶ AIF는 미토콘드리아 중간막 공간에 존재하며 NADH 산화 효소 활성을 가진 미토콘드리아 플라보단백질이지만,¹⁵ 세포고사적 자극으로 AIF는 미토콘드리아에서 방출되어 핵으로 이동되고 caspase와 독립적인 경로로 염색질 응축과 커다란 DNA 분절화를 유도한다.²⁷ 최근 AIF의 핵내 이동이 랫트와 마우스를 사용한 급성적 국소 대뇌 허혈,^{12,16,28} 랫트에서의 급성 전체 허혈,²⁹ 그리고 신생아 랫트 뇌에서 저산소증 허혈 유도 모델³⁰ 연구에서 증명되었으며, 또한 AIF의 핵내 이동은 과산소 아질산염³¹이나 신경독소,³² 그리고 자외선 조사에 의해 발생한 활성산소종에³³ 의해 유도될 수 있다고 보고 되었다. 그러나 영구적 국소 대뇌 허혈 모델에서는 아직까지 AIF의 핵내로의 이동이 보고된바 없으며, 그 이동기전에 관여하는 요인이나 신경세포사멸 효과에 대해서는 아직 확실히 규명되지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 활성산소종이 AIF의 핵내 이동에 관여한다는 가설하에 과산소 제거자(superoxide scavenger)인

Manganese(III) tetrakis (4-Benzoic acid) porphyrin chloride (MnTBAP)와⁴¹⁻⁴³ copper-zinc 과산소 제거효소 유전적 변형 마우스 (superoxide dismutase transgenic mice, SOD1 Tg)를 사용하여 영구적 국소 대뇌 허혈 유도 후 AIF의 핵내 이동과 과산소 음이온 라디칼과의 관계를 연구하였으며. AIF의 핵내 이동이 caspase와 독립적으로 일어나며 독립적 경로를 통한 DNA 분절현상이 나타나는지 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 영구적 국소 허혈 모델

수컷 ICR 마우스(3 개월령, 35~40 g)를 나일론 봉합사를 이용해 중대뇌동맥을 폐색함으로써 영구적 국소 허혈 모델을 실험에 적용하였다.^{34,35} 마우스는 안면 마스크를 사용하여 30%의 산소와 70%의 질소와 함께 20% isoflurane을 사용하여 마취시켰고, 체온은 homeothermic blanket으로 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였다. 대퇴부 동맥(femoral artery)을 cannulation하여 혈압과 동맥 혈액 내 가스를 관찰하였다. 경부의 정중부를 절개한 후 바깥 왼쪽 경동맥(extracranial carotid artery)을 노출시키고 그 가지 동맥들은 전기적으로 응고시켰다. 끝을 열로 처리하여 무디게 만든 11.0-mm 길이의 5-0의 수술용 단일 섬유 나일론 봉합사는 외부 경동맥을 통해 왼쪽 내부 경동맥(intracranial carotid artery)으로 삽입한 후 6-0 실크로 봉합사의 끝부분을 묶어 고정시킨다. 본 실험에서 실험용 동물들의 사용과 관리는 연세대학교의 동물 사용과 관리 지침과 규율을 준수하였다.

허혈 후 AIF의 전이와 과산소 음이온 라디칼의 발생과의 관련을 확인하기 위해서 SOD1 유전자를 3배 이상 발현시킨 heterozygous SOD1 Tg 마우스와 C57BL/6 야생형 마우스를 사용하였다. 수술은 ICR 수술과정과 같은 방식으로 9.0-mm 길이의 봉합사를 삽입하는 방법으로 실시하였다. 항산화제인 Manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP)과 vehicle(증류수)은 허혈 유도 30분전에 뇌실 내로 주입하였다.

2. 세포 단백질의 분리

허혈 유도 후 1, 2, 4, 24 시간에 대조군의 뇌조직과 허혈 유도군의 병변 부위의 뇌조직을 얻어내었다. 각각의 조직은 용해 완충액 (120 mM HEPES-KOH pH 7.05, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM Na-EDTA, 1 mM Na-EGTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, proteinase inhibitor cocktail (Sigma, St Luise, USA), 250 mM sucrose) 에서 균질화 시켰고, 미토콘드리아/세포질 층을 4°C에서 10분 동안 750 ×g로 원심 분리하여 세포질 단백질과 핵을 포함하고 있는 침전물을 4°C에서 15분 동안 1,025 ×g로 원심 분리하였다. 핵이 포함된 침전물을 얼음에서 15분 동안 둔 후, 완충액으로 재부유시켜 4°C에서 20분 동안 16,000 ×g로 원심 분리하여 핵 분획으로 사용하였다. 상층액은 의 글리세롤 (50 μl/mL in buffer)에 옮겨 -80°C에서 보관하였다. 상층액은 미토콘드리아 침전물을 얻기 위해 4°C에서 15분간 10,000 ×g로 원심 분리하였다. 미토콘드리아 침전물은 3% Ficoll 용액 (120 mM manitol, 30 mM sucrose, 25 M EDTA)에 녹이고, 6% Ficoll용액 (240 mM manitol, 60 mM sucrose, 50 M EDTA)으로 농도구배 후 상층액을 채취하여 4°C에서 25분 동안 16,000 ×g로 원심 분리하여 미토콘드리아 분획으로 사용하였다. 단백질정량은 Bradford protein assay (Bio-Rad)방법을 이용하였다.

3. Western blotting

단백질은 6% PolyAcrylamide Gel에서 전기영동으로 분리하고, polyvinylidene fluoride (PVDF) 막에 옮긴 후, 16시간 동안 3%

non-fat dried milk (10 mmol/L Tris, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20)로 blocking 시켰다. 그 후 일차항체로 goat polyclonal AIF antibody (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 실온에서 1 시간 동안 반응시킨 후, 3% non-fat dried milk에 2 시간 동안 blocking 시켰다. 막을 horseradish peroxidase가 결합된 anti-goat IgG와 반응시켰고, chemiluminescence detection system (ECL plus kit, Amersham International, Buckinghamshire, England)를 사용하여 발색시켰다. 발현된 단백질의 상대적인 양은 X-ray film (Fuji Film Co., Tokyo, Japan)으로 현상하여 Image analyzer LAS-1000을 사용하여 측정하였다.

4. 면역조직화학염색

마취된 동물에서 심장을 통해 10 U/mL 헤파린이 첨가된 생리식염수와 3.7% 포르말데히드로 관류 후 각 시간대별 모델의 뇌를 적출한다. 적출해 낸 뇌를 3.7% formalin에 고정시킨 후, vibratome으로 50 μm 두께의 절편을 만들어 면역조직화학염색을 실시하였다. 내재성 과산화 분해효소는 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)에 0.3% Triton X-100과 0.65% NaN_3 , 1%의 H_2O_2 로 30분 반응시켜 억제시켰다. 비특이적 면역 반응을 차단하기 위해 60분 동안 20%의 rabbit serum에 반응시킨 후, 일차 항체인 AIF (1:200, Santa Cruz Biotechnology)로 4°C에서 16시간 반응 하였다. 바이오틴이 결합된 anti-goat IgG (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)와 아비딘이 결합된 horseradish peroxidase (Vectastatin Elite ABC Kit, Vector laboratories) 복합체를 사용하여 면역반응을 실시하

였으며, 조직은 diaminobenzidine (DAB)으로 가시화시켰다. 메틸 그린(Vector laboratories)으로 핵 대조염색을 실시하였다. 음성적 대조군으로서 일차항체를 걸핍시켜 반응시켰다.

AIF의 핵으로의 전이를 확인하기 위해 신경세포의 핵에 특이적인 마우스 단일 항체인 NeuN (Chemicon, Temecula, CA, USA)과 goat polyclonal AIF (Santa Cruz Biotechnology)로 이중 형광 염색을 실시하였다. NeuN의 형광 표지 반응을 위해 단일항체 kit (DAKO ARK kit, K3954; Dako, Carpinteria, CA)을 사용하여 비특이적 면역 반응 차단 과정과 바이오틴화 과정을 실시하였다. AIF의 형광 표지 반응을 위해 위와 같은 방법으로 AIF 염색 실시 후 아비딘이 연결된 fluorescent avidin DCS (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Vector laboratories)와 Cy3가 연결된 anti-goat IgG (1:200, Jackson Immunoresearch Laboratories, CA, USA)로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Hoechst 33258 (2.5×10^{-3} mg/mL in PBS; Molecular Probes, Eugene, OR)로 상온에서 5분 동안 대조염색을 실시한 후 유리판 위에 올려 LSM 510 confocal laser scanning 현미경(Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)으로 관찰하였다.

5. *in situ* 과산화 음이온 라디칼 검출

허혈 후 과산화 음이온 라디칼의 발생을 확인하기 위해 허혈 후 4시간에 oxidized hydroethidine (HEt) 검출법을 사용하였다.¹⁸ HEt (Molecular Probes)를 dimethylsulfoxide (DMSO)에 100 mg/mL로 용해시켜 만들고 이 용액을 phosphate buffered saline (PBS) 완충액으로 1:100 비율로 희석시켰다. ICR 마우스를 희생시키기 1시간 전에

호흡 마취시킨 후 200 μ l HEt을 정맥 내 주입하였다. 심장을 통해 10 U/mL 헤파린이 첨가된 생리식염수와 3.7% 포르말알데히드로 관류 후 뇌를 적출하였다. 3.7% formaldehyde로 16시간 동안 4°C에서 후고정시킨 후 vibratome을 사용하여 50 μ m의 두께로 절편을 만들었다. 조직 절편이 준비된 즉시 뇌 절편을 유리판 위에 올리고 현미경으로 관찰하였다. 핵 염색에는 Hoechst 33258 (Molecular Probes)을 사용하였다. 정량 비교를 위해 상해 피질부위 조직과 대조군 피질부위 조직을 구분하여 형광 현미경으로 확인하고 촬영하였다. 뇌조직 관찰은 computerized digital camera system 형광 현미경 (Ex=510-550 nm, Em>580 nm; BX51, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하였고 전산화된 분석 프로그램으로 분석하였다 (MetaMorpho, imaging, version 5.0; Molecular devices, Downinton, PA, USA).

6. Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)

우레탄을 복강 주입하여 마취시킨 후 적출한 뇌의 병변 부위를 얼음상에서 분리하였다. 대조군으로는 대조군의 뇌 조직을 사용하였다. Phenol/chloroform을 사용한 단백질 추출 시 야기되는 비특이적 DNA 절단을 피하기 위해 염색질 DNA 표본을 CHEF Mammalian Genomic DNA Plug kit (Bio-Rad Hercules, CA, USA)를 사용하여 agarose 플러그를 준비하였다.^{40,41} Kit 내의 세포 현탁 완충액으로 균질화 시킨 조직(15-20 mg)은 50°C의 2% low melting point (LMP) agarose와 혼합하여 주형에 옮겨 agarose 플러그를 만들었다. 이 플러그를 50°C, 1 mg/mL proteinase K 용액에서 16시간 정체 반응시켰다. 단백질이 제거된 DNA만 들어있는 agarose 플러그를 완충액으로

씻어내고 well에 넣은 후 LMP agarose로 밀봉했다. PFGE는 CHEF-DR III Pulse Field Electrophoresis Systems (Bio-Rad)를 사용하여 실시하였다. DNA 조각들은 1.2% agarose gel에 14°C에서 17시간 동안 전기 영동하여 분리했다. 범위강도는 전 180 V, 후 120 V 이고 선형램프에서 시작과 마지막 변환시간은 0.1~10초로 설정했다. 겔은 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 UV로 관찰하였다.

7. MnTBAP 처리

항산화제인 MnTBAP (BioMol)를 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 MCAO 30분 전에 뇌실 내로 주입하였다(2 μl , 정수리점; 1.0 mm, 측두; 0.2 mm, 후두; 3.1 mm, 깊이). 실험군은 MnTBAP (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 주입하고 대조군에는 생리 식염수를 주입하였다.

8. Caspase 활성 측정

Caspase의 활성을 측정하기 위해 활성화된 caspase-3에 의해 기질의 *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AFC (DEVD-AFC) 절단부위를 특이적으로 인식하여 생물학적 발광을 내는 효소 면역활성 측정용 시약 (Oncogene, San Diego, CA, USA)을 사용하였다. 세포질 표본은 Western blot 방법대로 준비되었다. 세포질 표본의 단백질 농도(20 μg)는 ELISA로 측정하여 결정하였다. 단백질을 kit내에 제공된 caspase buffer E (20 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, and 4 mM dithiothreitol) 용해시킨 후 37°C에서 45분 동안 반응시켰다. 형광은(excitation/emission: 400/505 nm for AFC)

96-well 플레이트에서 측정하였다.

9. Caspase inhibitor 처리

Pan-caspase inhibitor인 *N*-Benzyloxycarbonyl-valinyl-alaninyl-a-spartyl-(*O*-methyl)-fluoromethyl ketone (*z*-VAD.fmk)(Sigma, St. Louis Mo, USA)를 5 μ l Hamilton syringe (Hamilton, Reno, NV, USA)를 사용하여 뇌실(2 μ l, 정수리점; 1.0 mm, 측두; 0.2 mm, 후두; 3.1 mm, 깊이)로 MCAO 30분 후 주입하였다. 실험군은 *z*-VAD.fmk (125 μ g/ μ l)를 0.3% DMSO에 녹여 주입하고 대조군은 vehicle을 0.3% DMSO에 녹여 주입하였다.

10. AIF와 DNA 분절현상을 분석하기 위한 이중형광 염색

AIF의 면역조직화학 염색은 위의 방법처럼 실시하였고 조각화된 DNA의 형광 표지를 위해 fluorescent isothiocyanate (FITC)가 결합된 anti-goat IgG (1:200, Jackson Immunoresearch laboratories)로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 조직을 씻어낸 후 조직은 50 μ l terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated uridine 5'-triphosphate biotin nick-end labeling (TUNEL) 반응 혼합액 (terminal deoxynucleotidyl transferase and fluorescein-dUTP, Roche)으로 37°C의 어두운 곳에서 60분 동안 반응시켰다. 포배 시약 (Vectasheild, Vector Laboratories)을 사용하여 유리판 위에 올려둔 후 LSM 510 confocal laser scanning 현미경(Carl Zeiss)으로 관찰하여 분석하였다.

11. 세포사멸 분석

세포고사와 관련해 나타나는 DNA 분절현상을 정량화하기 위하여 histone 단백질과 연관된 DNA 조각들에 대해 특이적인 효소를 사용한 면역적 분석 시약(Cell death detection kit, Roche Diagnostics)을 사용하여 세포고사적 oligonucleosomal DNA 조각들을 검출하였다. 표본들은 병변 부위와 대조 부위의 중대뇌동맥 구역 전체를 얻어내었다. 각 시간대별 신선한 뇌 조직을 분리해 내어 5배 부피의 차가운 균질화 완충액(50 mM KH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA, pH 7.8)을 사용해 Teflon homogenizer로 균질화한 후 750 \times g에서 10분 동안 spin하였다. 상층액을 분리해서 10,000 \times g에서 20분 동안 spin한 후 100,000 \times g로 4°C에서 60분 동안 원심 분리하였다. 다시 세포질에 해당되는 상층액을 얻어낸 후 분석 시약 내에 제공된 방법에 따라 ELISA를 사용하여 측정하였다.

12. 통계학적 분석

데이터들은 mean \pm SD로 표현하였다. 여러 집단간의 통계학적 비교는 ANOVA를 사용하였고, 두 집단간의 차이는 *t* test를 통해 실시되었고(StatView; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), $p < 0.05$, $p < 0.001$ 을 유의한 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결과

1. 생리학적 자료

체온, 혈압, 그리고 동맥혈 내 가스 분석결과 ICR 마우스, ICR 마우스에서 MnTBAP 처리군과 비처리군, 그리고 SOD1 Tg 마우스간의 생리학적 자료에 차이가 없음을 보여주었다(Table 1).

2. 영구적 국소 대뇌 허혈 유도 후 AIF의 핵내 이동

Western blot 분석에서 AIF는 영구적 중대뇌동맥 폐색 1시간 후부터 병변 부위의 핵과 미토콘드리아에서 ~67kDa 분자량의 위치에서 확인되었으며. 대조 부위의 세포핵에서는 거의 검출되지 않았다(Figure 1A). AIF의 핵내 농도는 허혈 유도 후 4 시간과 24 시간에서 더욱 증가되었는데 시간에 따른 AIF의 핵내 증가는 통계학적 분석으로 유의성이 있었다(optical density [O.D.]; Ctr, 0.8 ± 0.2 ; 1h, 8.0 ± 0.37 ; 2h, 11.87 ± 0.38 ; 4h, 14.75 ± 0.4 , 24h, 28.87 ± 0.79 ; ANOVA, $p < 0.001$)(Figure 1B). 반면에 미토콘드리아 AIF는 대조 부위와 병변 부위 모두에서 검출되었지만, 병변 부위에서는 영구적 허혈 유도 후 1, 2, 4 시간에서는 감소하다가 24 시간에서는 다시 증가하였다. 통계학적으로 분석된 데이터는 미토콘드리아의 AIF가 대조 부위와 비교했을 때 영구적 국소 대뇌 허혈 후 2 시간과 4 시간에서 유의성있게 감소되는 것으로 나타났다. 그러나 대조 부위와 비교했을 때 허혈 유도 후 24 시간에서는 현저히 증가되었다(O.D.; Ctr, 1.0 ± 0.06 ; 1h, 0.83 ± 0.09 ; 2h, 0.71 ± 0.1 ; 4h, 0.60 ± 0.07 ; 24h, 1.29 ± 0.24 ; ANOVA)(Figure 1C).

Table 1. Summary of selected physiological variables at baseline (before ischemia), during ischemia, and after MCAO (after ischemia)

	<u>ICR</u>	<u>SOD1 Tg</u>
Baseline	Mean value±SD	Mean value±SD
Before MCAO		
pH	7.4±0.1	7.5±0.1
PCO ₂ (mm Hg)	29±5	24.8±4.5
PO ₂ (mm Hg)	153.5±4.5	152.5±14
BP	83.6±6.5	90.6±9.5
Temperature(°C)	36.8±0.3	37.2±0.2
After MCAO		
pH	7.4±0.1	7.4±0.1
PCO ₂ (mm Hg)	29.5±6.5	28.2±5.2
PO ₂ (mm Hg)	166.3±6.4	144.3±12.2
BP	87.3±5.7	91.9±3.7
Temperature(°C)	37.0±0.2	37.0±0.3
Before MnTBAP treatment		
pH	7.5±0.1	
PCO ₂ (mm Hg)	28.0±2.0	
PO ₂ (mm Hg)	169±9.0	
BP	79.9±7.1	
Temperature(°C)	37.1±0.7	
After MnTBAP treatment		
pH	7.5±0.1	
PCO ₂ (mm Hg)	24.8±1.2	
PO ₂ (mm Hg)	165.2±5.8	
BP	75.6±5.5	
Temperature(°C)	37.5±0.4	

Values are mean±SEM. n=4-5 per group.

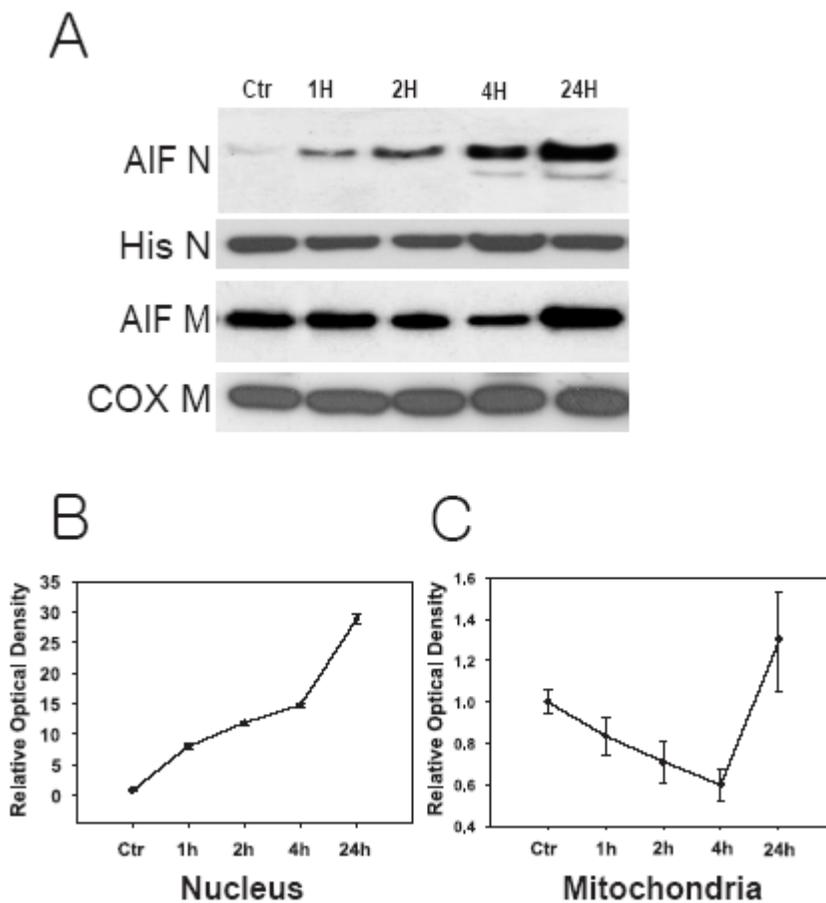


Figure 1. The change of AIF protein levels in nuclear and mitochondrial fractions after permanent MCAO. (A) Western blots of AIF. Histone and COX show bands only within nuclear and mitochondrial fractions, respectively, confirming successful separation of nuclear and mitochondrial fractions. (B) and (C) AIF protein levels present optical density (OD) values. Ctr, control; AIF, apoptosis-inducing factor; His, histone; COX, cytochrome oxidase; N, nuclear subfraction; M, mitochondrial subfraction. $P < 0.001$

3. NeuN과 AIF의 이중형광 표지로 AIF의 핵내 이동현상 확인

영구적 국소 허혈 유도 후 병변 부위의 피질부에서 AIF의 핵내 이동을 확인하기 위해 면역조직화학 염색을 실시하였다(Figure 2A). 대조군에서는 AIF의 핵내 면역활성이 거의 검출되지 않았으나 병변 부위에서는 허혈 후 시간의 경과에 따라 AIF의 핵내 면역활성이 점차적으로 증가하는 것이 관찰되었다. 신경세포에서 AIF의 핵내 이동을 확인하기 위해서 영구적 국소 허혈 유도 후 24 시간의 병변 뇌 조직을 사용하여 AIF와 anti-neuronal nuclei (anti-NeuN)으로 이중 형광 염색을 실시하여 confocal 현미경으로 관찰하였다(Figure 2B). 대조 부위에서는 AIF의 면역형광활성이 미토콘드리아가 위치하고 있는 세포질에서 점 형상으로 약하게 염색되어 나타나는 반면에 병변 부위에서는 AIF 양성세포들과 NeuN 양성 세포들이 co-localization하고 있는 것이 관찰되었다.

4. MnTBAP 처리군에서의 과산소 음이온 라디칼 생산의 억제

과산소 음이온 라디칼의 발생은 허혈 유도 후 세포질에서 산화된 H₂O₂이 적색 입자 형태로서 관찰되었다(Figure 3). 영구적 허혈 유도 후 1 시간에서는 산화된 H₂O₂이 대조군에 비해 병변부위의 미토콘드리아에서 발현이 약간 증가된 것이 관찰되었지만, MnTBAP 처리군의 병변부위와는 현저한 차이를 보이진 않았다. 영구적 허혈 유도 후 4 시간에서 병변 부위에서는 산화된 H₂O₂이 현저히 증가되어 나타난 반면에, 대조군에서는 미토콘드리아가 있는 핵 주위의 세포질에서 아주 미량의 적색 입자들이 보였다. MnTBAP를 처리한 결과 병변 부위의

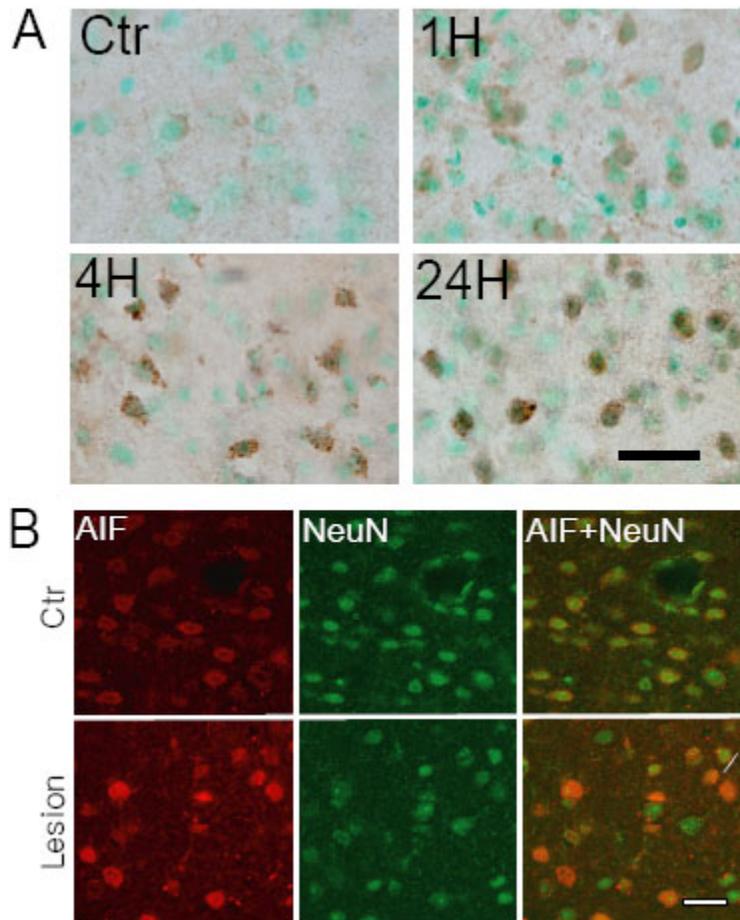


Figure 2. Nuclear AIF translocation after permanent MCAO. (A) Immunohistochemistry of AIF. Nuclei were counterstained with methyl green. (B) Double labeling immunofluorescence of AIF and NeuN. AIF positive cell is red and NeuN positive cell is green. NeuN is neuronal marker. Ctr, control. Scale bar=(A) 50 μm , (B) 20 μm .

산화된 HEt는 vehicle을 처리한 군에 비해 현저히 감소하였으며, 대조 부위에서는 거의 검출되지 않았다(Figure 3B).

5. MnTBAP 처리군과 SOD1 Tg 군에서의 AIF의 핵내 이동 감소

영구적 허혈 유도 후 4 시간에서 Western blot 분석에 의한 AIF 단백질 발현은 MnTBAP 처리군과 vehicle 처리군(Figure 4A), 그리고 SOD1 Tg군과 야생형군(Figure 4B)에서 비교하였다. MnTBAP 처리군에서 핵으로 이동된 AIF는 vehicle 처리군에 비해 현저히 낮았으며(O.D.; vehicle, 1.0 ± 0.23 ; MnTBAP, 0.22 ± 0.13 ; $p < 0.001$)(Figure 4A, a and b), SOD1 Tg군에서도 핵으로 이동된 AIF가 야생형 군에 비해 현저히 낮았다(O.D.; Wt, 1.0 ± 0.09 ; SOD1 Tg, 0.41 ± 0.11 ; $p < 0.001$)(Figure 4B, c and d). 미토콘드리아 내 AIF의 밀도측정 수치는 핵 내 AIF의 측정 수치와는 상반되는 양상으로 분석되었다(O.D.; Wt, 1.0 ± 0.11 ; SOD1 Tg, 2.22 ± 0.08 ; $p < 0.001$)(Figure 4A). MnTBAP 처리군과 vehicle 처리군, 그리고 SOD1 Tg군과 야생형군끼리 비교했을 때 대조 부위에서 미토콘드리아 내 AIF 양에는 거의 차이가 없었다(data not shown).

MnTBAP 처리군과 vehicle 처리군, 그리고 SOD1 Tg 마우스와 야생형 마우스끼리 영구적 허혈 유도 후 4 시간에서 면역조직화학염색을 통한 AIF의 면역 활성을 비교하였다(Figure 4B). 병변 부위에서의 핵내 AIF 면역활성반응은 MnTBAP를 처리하지 않은 군에 비해 MnTBAP 처리군에서 감소되었으며, SOD1 Tg 마우스에서도 야생형 마우스에 비해 핵내 AIF의 면역 반응성이 감소되었다.

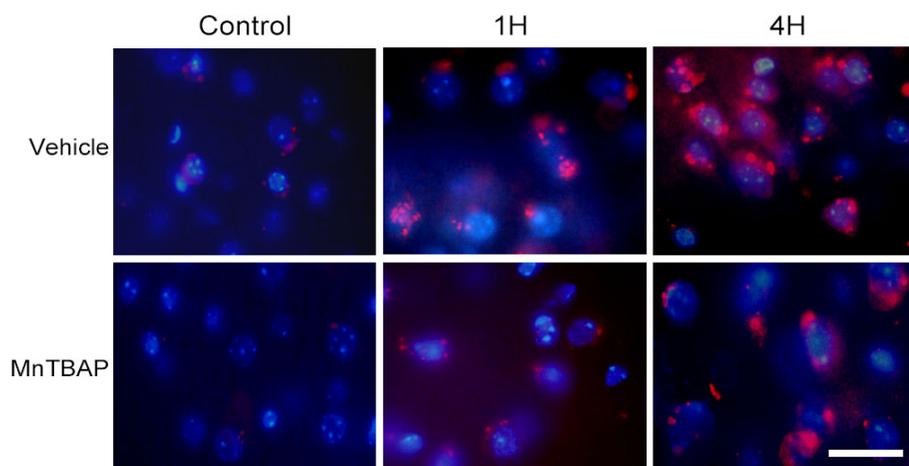


Figure 3. Suppression of O_2^- production after MnTBAP pretreatment. Oxidized HET signals (red) were detected in the perinuclear area (blue). Scale bar=20 μ m.

6. 허혈 유도 후 MnTBAP 처리군과 SOD1 Tg군에서 커다란 DNA 분절현상 억제

PFGE의 방법으로 영구적 허혈 유도 후 ~50kbp 크기의 커다란 DNA 조각들이 영구적 허혈 유도 후 8 시간부터 검출되었으며 허혈 유도 후 14 시간과 24 시간에서 현저히 증가되었다(Figure 5A). 커다란 DNA 분절현상은 대조군에서는 나타나지 않았다. 큰 DNA 분절현상은 MnTBAP 처리군에서 나타나지 않았지만, 반면에 vehicle 처리군에서 허혈 유도 후 24 시간에서 큰 DNA 조각들이 검출되었다(Figure 5B). 커다란 DNA 분절현상은 야생형군에서는 현저하게 검출되었으나 SOD1 Tg군에서 허혈 유도 후 24 시간에서는 관찰되지 않았다(Figure 5C).

7. Caspase와 독립적 경로를 통한 AIF의 핵내 이동

Western blot 분석으로 vehicle 처리군과 caspase 저해제인 z-VAD.fmk 처리군에서 AIF 단백질은 뚜렷한 양의 차이가 없음을 보였다(O.D.; vehicle, 1.0 ± 0.06 ; z-VAD.fmk, 0.96 ± 0.08 , $p < 0.05$)(Figure 6A). 이는 pan-caspase inhibitor가 AIF의 핵내 이동에는 영향을 끼치지 않는다는 사실을 보여준다. AIF와 TUNEL과의 관계를 확인하기 위해 이중 면역조직화학염색을 실시하였다(Figure 6B). TUNEL 양성 반응 세포와 AIF 양성 반응 세포들은 영구적 허혈 유도 후 24 시간의 병변 부위에서 보였다. AIF 양성 반응 세포는 병변 부위에서 TUNEL 양성 반응 세포와 대부분 겹쳐서 관찰되었다.

본 연구에서는 MnTBAP 처리에 의한 과산소 음이온 라디칼 발생의

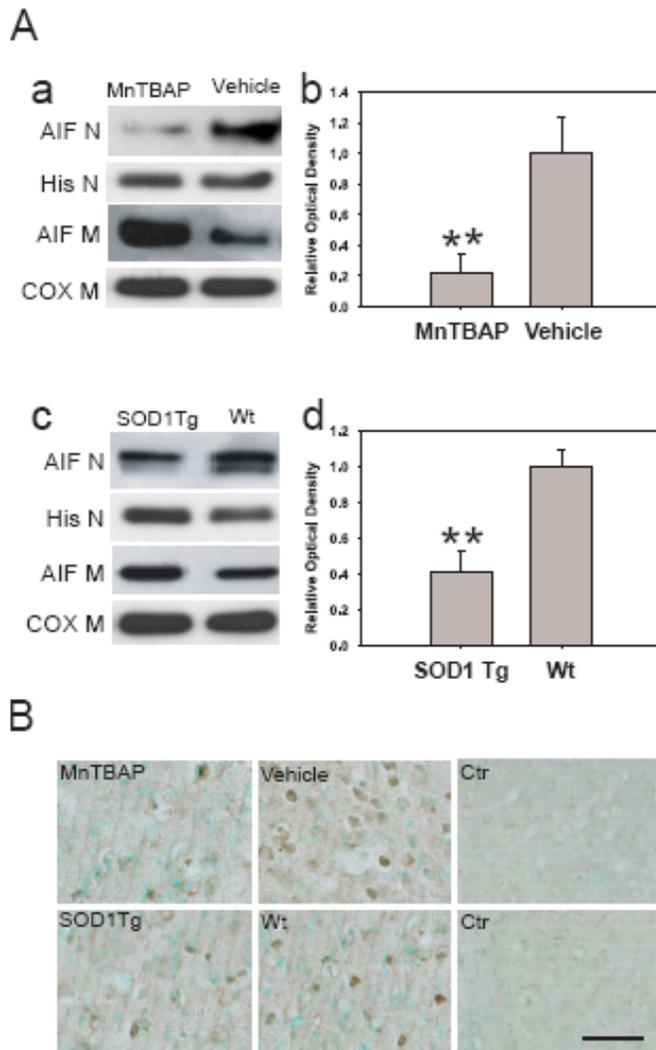


Figure 4. Inhibition of AIF translocation after MnTBAP pretreatment or in SOD1 Tg mice. (A) Western blots (a and c) and protein levels of AIF (b and d). AIF protein levels present OD values. Wt, wild type mice; AIF, apoptosis-inducing factor; His, histone; COX, cytochrome oxidase; N, nuclear subfraction; M, mitochondrial subfraction. $**p < 0.001$. (B) Immunohistochemistry of AIF. Ctr, control. Scale bar=50 μm .

억제가 caspase와는 독립적인 방법으로 세포고사를 감소시킨다는 사실을 확인하기 위해 vehicle, z-VAD.fmk와 MnTBAP의 세 가지의 서로 다른 처리조건에서 허혈 유도 후 나타나는 caspase-3의 활성화와 DNA 분절현상을 관찰하였다(Figure 6C). Caspase-3 활성화는 허혈 후 24 시간의 vehicle 처리군에 비해 z-VAD.fmk와 MnTBAP 처리군에서 현저히 감소되었다(vehicle, 445.70 ± 15.10 ; z-VAD.fmk, 276.30 ± 13.30 ; MnTBAP, 287.00 ± 10.00 , % of nonischemic control brain, $p < 0.001$). Caspase 활성화는 z-VAD.fmk 처리군과 MnTBAP 처리군 사이에서는 별 차이가 없었다(Figure 6C). 세포고사적 DNA 분절현상의 정도는 vehicle 처리군에 비해 z-VAD.fmk 처리군과 MnTBAP 처리군에서 현저히 감소되었다 (vehicle, 515.00 ± 58.00 ; z-VAD.fmk, 399.00 ± 31.80 , $p < 0.01$; MnTBAP 236.00 ± 49.00 , % of nonischemic control brain, $p < 0.001$) (Figure 6C). 또한 MnTBAP 처리군에서 세포고사적 DNA 분절은 z-VAD.fmk 처리군에 비해 현저히 적었다($p < 0.01$).

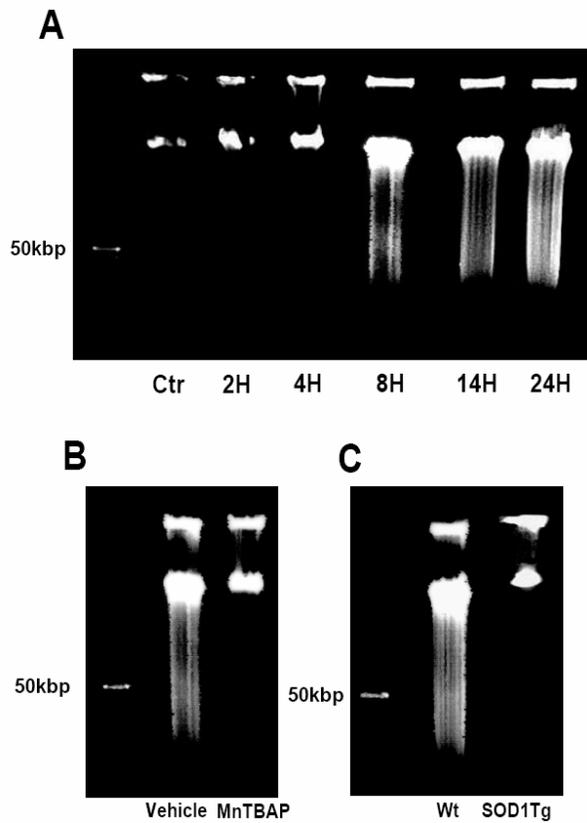


Figure 5. Representative photographic findings of large scale DNA fragmentation. (A) Large scale DNA fragmentation was shown in time-dependent pattern after permanent MCAO. (B) Inhibition of large scale DNA fragmentation after MnTBAP pretreatment. (C) Inhibition of large scale DNA fragmentation in SOD1 Tg mice compared with wild type mice.

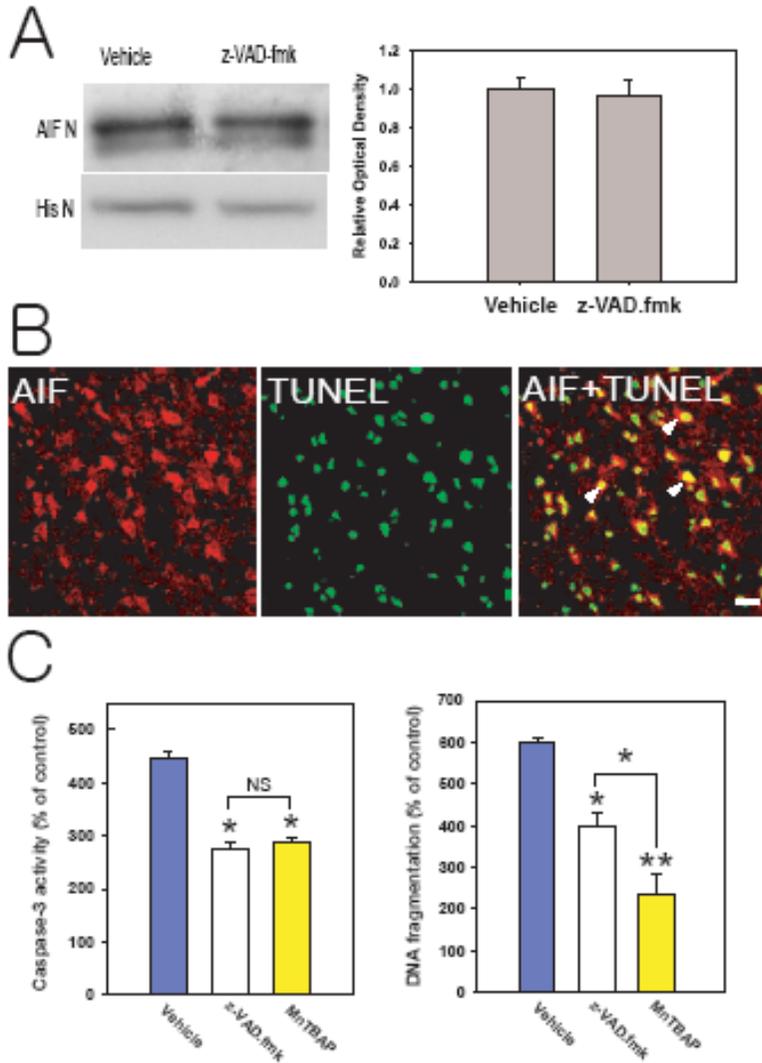


Figure 6. AIF translocation and subsequent DNA fragmentation via caspase-independent pathway after permanent MCAO. (A) AIF translocation was not inhibited after z-VAD.fmk treatment. (B) AIF (red) was partially colocalized with TUNEL (green). Scale bar=10 μ m. (C) Caspase-3 activity and cell death assay after z-VAD.fmk or MnTBAP treatment. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, NS = no significance.

IV. 고찰

본 실험 결과에서 영구적 국소 대뇌 허혈 유도 후, 초기에 일어나는 과산소 음이온 라디칼 생산이 AIF의 핵내 이동과 이에 따른 DNA 분절현상을 유도한다는 가능성에 대한 다섯 가지 증거를 제시하였다. 첫째, 영구적 국소 대뇌 허혈 유도 후, 미토콘드리아 분획에서 AIF의 단백질양이 감소된 반면에 핵 분획에서는 증가된 것을 보여주었다(Figure 1). 또한 면역조직화학염색에서도 AIF의 핵내 이동이 관찰되었다(Figure 2). 둘째, 영구적 국소 대뇌 허혈 유도 후, 대조군에 비해 MnTBAP를 처리한 군의 병변 부위에서 과산소 음이온 라디칼의 생산에 의해 산화된 H₂O₂가 감소되었다(Figure 3). 셋째, 허혈 후 AIF의 핵내 이동은 대조군에 비해 MnTBAP를 처리한 군에서 유의성있게 감소되었고, 또한 SOD1 Tg 마우스에서도 이와 똑같은 실험결과를 확인하였다(Figure 4). 넷째, PFGE의 방법을 사용한 커다란 DNA 분절현상은 영구적 국소 허혈 유도 후 대조군에서 많이 관찰되었고 MnTBAP 처리군에서는 억제되었다. 또한 SOD1 Tg 마우스에서도 이와 같은 결과를 관찰하였다(Figure 5). 마지막으로 AIF의 핵내 이동이 pan-caspase 저해제인 z-VAD.fmk에 의해 억제효과를 나타내지 않았으며, DNA 분절현상은 z-VAD.fmk 처리군 보다 MnTBAP 처리군에서 유의성있게 감소되었다(Figure 6). 이와 같은 결과들을 종합하면 영구적 대뇌 국소 허혈 후 초기에 일어나는 미토콘드리아로부터 핵으로의 AIF의 이동은 커다란 DNA 분절현상의 발생에 관여하는 것을 알 수 있었다. 따라서 과산소 음이온 라디칼의 억제가 AIF의 핵내 이동 현상을 감소시키며, 커다란 DNA 분절현상도 저해한다는 사실을 알 수 있었다.

MnTBAP는 허혈 후, 세포 내에서 발생하는 과산소 음이온 라디칼을 제거하고 hydroxyl radical의 생성을 저해하는 것으로 잘 알려져 있다.⁴¹⁻⁴³ 따라서 항산화제인 MnTBAP를 사용하여 중대 뇌동맥 폐색에 의해 유발되는 과산소 음이온 라디칼을 억제하는 것을 관찰 할 수 있었고, 또한 AIF가 핵내로 이동하는 것을 방해하며, DNA 분절현상도 감소시키는 사실을 확인할 수 있었다.

최근 논문에 의하면 과산소 음이온 라디칼을 제거하는 효소인 SOD1을 과발현 시킨 동물모델에서 신경세포 손상에 대해 높은 보호 효과가 있다고 한다.^{44,45} SOD1은 세포질에서 뿐만 아니라 미토콘드리아에서 생성된 과산소 음이온 라디칼을 감소시키는데 관여한다.⁴⁶ SOD1을 과발현 시킨 대뇌 허혈 동물 모델에서 미토콘드리아의 cytochrome c의 방출은 감소되며,^{10,11,47} 또한 DNA 분절현상을 감소시키는 것으로 알려져 있다.³⁷ 따라서, 본 실험에서는 SOD1 Tg 마우스를 사용하여 영구적 대뇌 허혈 유도 후, AIF의 미토콘드리아로부터 핵내 이동이 SOD1에 의해 감소되며, DNA 분절현상도 감소되는 사실을 증명하였다.

최근 논문에 의하면 AIF의 핵내 이동이 peroxynitrite가 처리된 신경 세포 배양 연구,³¹ 신경 독소 연구,^{32,48} 그리고 UV에 의해 유도된 세포사멸 연구에서³³ 활성산소종에 의해 유도될 수 있다는 사실이 알려졌다. 비록 활성산소종에 의해 AIF의 미토콘드리아에서 핵으로의 전이되는 정확한 기전은 아직 알려져 있지 않지만, 활성산소종이 미토콘드리아의 막 투과성을 활성화시켜 미토콘드리아의 외부막이 터져서 AIF와 cytochrome c 같은 세포 고사를 일으키는 기질들이 방출된다는 가능성을 제시하고 있다.^{27,36,49,50} Caspase는 대뇌 허혈 후에 세포 고사의 중요한 중재자로서 인식되고 있다.⁵¹ 그러나 전형적으로

caspase 억제는 제한적이거나 일시적으로 신경세포를 보호한다.⁵² 또한 AIF가 caspase와 독립적인 기전으로 세포사멸을 일으킨다고 보고되어져 왔는데 그에 대한 가능성으로 두 가지 정도를 들 수 있다. 첫째, AIF의 미토콘드리아로부터 핵으로의 전이가 caspase와 독립적으로 일어날 것이라는 것⁵³ 둘째, AIF가 caspase와 독립적으로 DNA 분절현상을 유도할 수 있다는 것이다.⁴⁸ 일시적 대뇌 허혈 유도 후 CA1 해마 부위에서 AIF의 핵내 이동이 caspase 활성화억제에 의해 차단되지 않는다는 동물 실험 결과가 보고 되었다.²⁹ 또한 신생아 랫트 단편적 hypoxia 허혈 유도 후에서 뇌의 피질부에서도 AIF의 핵내 이동이 차단되지 않았다.³⁰ 또한 최근 연구 결과들은 재조합 아데노바이러스 감염법을 이용하여 AIF를 과발현 시킨 후, caspase 저해제를 처리하면, 예상했던 것과는 달리 DNA 분절현상을 감소시키지 못한 것을 보여주고 있다.⁵⁴ 이러한 결과들은 AIF가 DNA 분절현상을 유발하며 caspase 활성화와는 독립적으로 신경세포사멸을 일으킬 수 있다는 사실을 보여 주고 있다. 본 실험 결과에서 caspase 활성화는 z-VAD.fmk 처리군과 MnTBAP 처리군에서 감소되었으며, DNA 분절현상은 z-VAD.fmk 처리군에 비해 MnTBAP 처리군에서 훨씬 더 억제되었다(Figure 6C). 이러한 사실은 과산소 음이온 라디칼의 생산이 caspase와 독립적인 방법으로 AIF의 핵 이동을 유발해서 세포고사를 유도할 수 있다는 가능성을 제시한다.

최근 논문에 의하면 세포고사 과정이 일어나는 동안 2 단계를 거쳐 핵 분절 현상이 일어난다는 것이 보고 되고 있다.^{55,56} 제 1 단계에서는 핵이 염색질 응축으로 주름진 형상이 나타나며 이는 전형적으로 커다란 DNA 분절현상과 관련되어 있다고 연구되어 왔다. 1 단계 후에 핵은 형태학적으로 제 2 단계에 접어들게 되는데 1 단계에서의 염

색질 응축이 더욱 확실한 형태로 진행되며 핵체가 형성된다. 2 단계 과정 진행과정에서 caspase가 억제되었을 때는 핵의 세포고사가 형태학적으로 1 단계에 국한된다고 한다.^{55,56} 이러한 사실들은 세포고사가 형태학적으로 1 단계와 2 단계로 진행되는 과정 중에 caspase가 관여되고 있음을 시사한다. 세포에서 분리해낸 핵이나 마우스의 배 섬유아세포에 재조합한 AIF가 주입되었을 때 형태학적으로 1 단계로 가게 되며 커다란 DNA 분절현상이 일어나게 되는데 두 형태학적 변화 과정들은 caspase 활성이 중재된 세포고사와는 독립적으로 발생한다.^{15,55,56} 그와 대조적으로, 활성화된 caspase-3나 caspase에 의해 활성화되는 효소인 DNase (caspase-mediated activating DNase, CAD/DNA fragmentation factor, DFF)를 주입하면 세포가 형태학적으로 2 단계로 들어가게 되어 DNA가 oligonucleosomal 조각들로 분절된다.⁵⁶ 최근 보고에서는 endonuclease G (endo G)가 핵내로 이동하여 caspase와 독립적으로 커다란 크기와 작은 크기로 DNA 분절현상을 야기시키는 것으로 보고 되고 있다.⁵⁷ 그리고 AIF는 endo G와 같은 핵 분해효소를 활성화 시킨다고 한다.^{15,18} 따라서 MnTBAP에 의한 AIF의 핵내 이동의 억제는 endo G나 또 다른 내재성 핵 분해효소의 활성을 감소시킴으로써 caspase와는 독립적인 방법으로 DNA 분절현상을 감소시킬 수 있다고 사료된다.

따라서 뇌 허혈 후, caspase의 세포고사 경로와 caspase와 독립적인 AIF의 핵 내 이동을 동시에 억제할 수 있는 신약개발과 유전자 치료법을 개발할 수 있는 연구가 앞으로 진행되어야 할 것이다.

V. 결론

본 연구에서 수행된 결과들을 종합하면, 영구적 국소 대뇌 허혈 후 과산소 음이온 라디칼에 의해 AIF의 핵내 이동이 유발되며, 이에 따른 DNA 분절현상이 유도될 수 있다는 사실과 이러한 DNA 분절현상과정이 caspase와는 독립적인 경로를 거쳐 발생할 수 있다는 사실을 제시한다.

참고문헌

1. Li, D., Ueta, E., Kimura, T., Yamamoto, T. & Osaki, T. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Sci* 2004; **95**: 644-50.
2. Chan, P. H. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 1996; **27**: 1124-9.
3. Chan, P. H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 2-14.
4. Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P. & Lipton, S. A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 7162-6.
5. Huang, C. Y., Fujimura, M., Chang, Y.Y. & Chan, P. H. Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase attenuates acute activation of activator protein-1 after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 2001; **32**: 741-7.
6. Yang, G. et al. Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke* 1994; **25**: 165-70.
7. Chan, P. H. et al. Overexpression of SOD1 in transgenic

- rats protects vulnerable neurons against ischemic damage after global cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci* 1998; **18**: 8292-9.
8. Murakami, K., Kondo, T., Epstein, C. J. & Chan, P. H. Overexpression of CuZn-superoxide dismutase reduces hippocampal injury after global ischemia in transgenic mice. *Stroke* 1997; **28**: 1797-804.
 9. Hammond, E. M., Dorie, M. J. & Giaccia, A. J. ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. *J Biol Chem* 2003; **278**: 12207-13.
 10. Fujimura, M. et al. The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 2000; **20**: 2817-24.
 11. Fujimura, M. et al. Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome C and subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 1999; **19**: 3414-22.
 12. Ferrer, I. & Planas, A. M. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; **62**: 329-39.
 13. Benchoua, A. et al. Specific caspase pathways are activated

- in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci* 2001; **21**: 7127-34.
14. Kaufmann, S. H. & Hengartner, M. O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2001; **11**: 526-34.
 15. Susin, S. A. et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; **397**: 441-6.
 16. Plesnila, N. et al. Nuclear translocation of apoptosis-inducing factor after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; **24**: 458-66.
 17. Tanaka, H. et al. Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation. *J Neurosci* 2004; **24**: 2750-9.
 18. Arnoult, D. et al. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J* 2003; **22**: 4385-99.
 19. Hara, H. et al. Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 2007-12.
 20. Yakovlev, A. G. et al. Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci* 1997;

- 17: 7415-24.
21. Cheng, Y. et al. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1992-9.
 22. Johnson, M. D., Kinoshita, Y., Xiang, H., Ghatan, S. & Morrison, R. S. Contribution of p53-dependent caspase activation to neuronal cell death declines with neuronal maturation. *J Neurosci* 1999; **19**: 2996-3006.
 23. Lankiewicz, S. et al. Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 2000; **275**: 17064-71.
 24. Zhan, R. Z. et al. Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome c From mitochondria in a rat forebrain ischemia model. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 529-40.
 25. Stefanis, L., Park, D. S., Friedman, W. J. & Greene, L. A. Caspase-dependent and -independent death of camptothecin-treated embryonic cortical neurons. *J Neurosci* 1999; **19**: 6235-47.
 26. D'Mello, S. R., Kuan, C. Y., Flavell, R. A. & Rakic, P. Caspase-3 is required for apoptosis-associated DNA fragmentation but not for cell death in neurons deprived of

- potassium. *J Neurosci Res* 2000; **59**: 24-31.
27. Daugas, E. et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 2000; **476**: 118-23.
 28. Zhao, H. et al. Bcl-2 transfection via herpes simplex virus blocks apoptosis-inducing factor translocation after focal ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; **24**: 681-92.
 29. Cao, G. et al. Translocation of apoptosis-inducing factor in vulnerable neurons after transient cerebral ischemia and in neuronal cultures after oxygen-glucose deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; **23**: 1137-50.
 30. Zhu, C. et al. Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem* 2003; **86**: 306-17.
 31. Zhang, X. et al. Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite. *J Neurochem* 2002; **82**: 181-91.
 32. Fonfria, E., Dare, E., Benelli, M., Sunol, C. & Ceccatelli, S. Translocation of apoptosis-inducing factor in cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress. *Eur J Neurosci* 2002; **16**: 2013-6.
 33. Murahashi, H. et al. Possible contribution of

- apoptosis-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced caspase-independent cell death in the T cell line Jurkat. *J Leukoc Biol* 2003; **73**: 399-406.
34. Kim, G. W., Noshita, N., Sugawara, T. & Chan, P. H. Early decrease in dna repair proteins, Ku70 and Ku86, and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 2001; **32**: 1401-7.
35. Kim, G. W., Kondo, T., Noshita, N. & Chan, P. H. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. *Stroke* 2002; **33**: 809-15.
36. Murakami, K. et al. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci* 1998; **18**: 205-13.
37. Kim, G. W. & Chan, P. H. Involvement of superoxide in excitotoxicity and DNA fragmentation in striatal vulnerability in mice after treatment with the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; **22**: 798-809.
38. Kim, G. W. et al. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption?

- J Neurosci* 2003; **23**: 8733-42.
39. Zhao, H. et al. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med* 2003; **34**: 1359-68.
 40. Gursoy-Ozdemir, Y., Can, A. & Dalkara, T. Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2004; **35**: 1449-53.
 41. Pasternack, R. F., Banth, A., Pasternack, J. M. & Johnson, C. S. Catalysis of the disproportionation of superoxide by metalloporphyrins. III. *J Inorg Biochem* 1981; **15**: 261-7.
 42. Day, B. J., Shawen, S., Liochev, S. I. & Crapo, J. D. A metalloporphyrin superoxide dismutase mimetic protects against paraquat-induced endothelial cell injury, in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; **275**: 1227-32.
 43. Szabo, C., Day, B. J. & Salzman, A. L. Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett* 1996; **381**: 82-6.
 44. Chan, P. H. et al. Neuroprotective role of CuZn-superoxide dismutase in ischemic brain damage. *Adv Neurol* 1996; **71**:

271-280.

45. Kinouchi, H. et al. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 11158-62.
46. Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D. & Cadenas, E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 2003; **278**: 5557-63.
47. Sugawara, T. et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J Neurosci* 2002; **22**: 209-17.
48. Cregan, S. P., Dawson, V. L. & Slack, R. S. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 2004; **23**: 2785-96.
49. Bindokas, V. P., Jordan, J., Lee, C. C. & Miller, R. J. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 1996; **16**: 1324-36.
50. Kannan, K. & Jain, S. K. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000; **7**: 153-163.
51. Eldadah, B. A. & Faden, A. I. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma* 2000; **17**: 811-29.
52. Rideout, H. J. & Stefanis, L. Caspase inhibition: a potential

- therapeutic strategy in neurological diseases. *Histol Histopathol* 2001; **16**: 895-908.
53. Cande, C., Vahsen, N., Garrido, C. & Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 591-5.
54. Cregan, S. P. et al. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* 2002; **158**: 507-17.
55. Daugas, E. et al. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J* 2000; **14**, 729-39.
56. Susin, S. A. et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000; **192**: 571-80.
57. Li, L., Shou, Y., Borowitz, J. L. & Isom, G. E. Reactive oxygen species mediate pyridostigmine-induced neuronal apoptosis: involvement of muscarinic and NMDA receptors. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; **177**: 17-25.

Abstract

Nuclear Translocation of Apoptosis Inducing Factor by Reactive Oxygen Species After Permanent Focal Cerebral Ischemia in Mice Model

Yong Hyun Lee

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Byung In Lee)

Mitochondria play the important roles in the regulation of apoptotic cell death through their capacity to release pro-apoptotic proteins, such as cytochrome c, endonuclease G, and apoptosis inducing factor. Above these translocate through the outer mitochondrial membrane to the cytosol and to the nucleus in response to different apoptosis-inducing conditions. Recently it has been reported that nuclear translocation of AIF has been implicated in caspase-independent neuronal cell death. However, it is not elucidated whether reactive oxygen species (ROS) is involved in nuclear translocation of AIF and subsequent caspase-independent apoptosis after permanent focal cerebral ischemia.

Permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO) was performed in adult ICR mice, and copper/zinc-superoxide dismutase (SOD1) transgenic (Tg) mice and wild type mice. Western blotting and immunohistochemistry were performed to examine the

translocation of AIF. To identify large scale DNA fragmentation via AIF translocation, pulse field gel electrophoresis (PFGE) was used. To clarify whether AIF translocation is implicated in ROS, antioxidant MnTBAP was injected before permanent MCAO and SOD1 Tg mice were induced by permanent MCAO. In Western blot and immunohistochemistry analysis, nuclear translocation of AIF was gradually increased 1h to 24h after permanent MCAO. Large-scale DNA fragments of ~50 kbp were detected 8h after permanent MCAO. MnTBAP-treated and SOD1 Tg mice showed that AIF translocation was attenuated in comparison with control and blocked large scale DNA fragmentation after permanent MCAO. Caspase activity was similarly inhibited between pan-caspase inhibitor- and MnTBAP-treated mice, But apoptotic cell death was significantly inhibited in MnTBAP-treated mice compared with pan-caspase inhibitor-treated mice.

These results suggest that inhibition of superoxide production may prevent nuclear translocation of AIF and subsequent neuronal apoptotic cell death after permanent MCAO.

Key Words : permanent focal cerebral ischemia, reactive oxygen species, nuclear translocation, large-scale DNA fragmentation

