

도파민 세포에서 Paraquat에 의한 헴산화효소-1의 유도

전 홍 성

조선대학교 자연과학대학 생명공학과, 단백질소재연구센터
(접수 : 2004. 7. 26., 게재승인 : 2005. 2. 10.)

Paraquat Induced Heme Oxygenase-1 in Dopaminergic Cells

Hong Sung Chun

Department of Biotechnology, College of Natural Sciences and Research Center for Proteineous Materials,
Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

(Received : 2004. 7. 26., Accepted : 2005. 2. 10.)

Paraquat, a widely used herbicide, has been suggested as a potential risk factor for Parkinson's disease. Heme oxygenase-1 (HO-1), a marker for oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress, is known to catalyze heme to biliverdin, carbon monoxide and free iron in response to various stimuli. Here we show that paraquat activates HO-1 expression in a time- and dose-dependent manner in substantia nigra (SN) dopaminergic neuronal cells. Activation of HO-1 by paraquat was regulated primarily at the level of gene transcription. Deletion analysis of the promoter and the 5' distal enhancers, E1 and E2, of the HO-1 gene revealed that the E2 enhancer is a potent inducer of the paraquat-dependent HO-1 gene expression in dopaminergic neuronal cells. Mutational analysis of the E2 enhancer further demonstrated that the transcription factor activator protein-1 (AP-1) plays an important role in mediating paraquat-induced HO-1 gene transcription. Moreover, using specific inhibitors of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs), we investigated the role of paraquat and MAPKs for HO-1 gene regulation in dopaminergic cells. The c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor SP600125 significantly suppressed the expression of HO-1 by paraquat. All these results demonstrate that induction of HO-1 by paraquat requires the activation of the AP-1 and JNK pathway.

Key Words : Dopaminergic cells SN4741, paraquat, heme oxygenase-1, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase

서 론

파킨슨병의 원인은 아직 확실히 밝혀지지 않았지만, 몇 가지 유전적인 요소 외에 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro pyridine (MPTP)이라는 신경독성 물질이 파킨슨병 증상을 일으키는 것으로 밝혀진 이후로, 다양한 환경 독성물질들이 파킨슨병과 관련이 있다고 알려졌다(1). 그 중에서 제조제인 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium (paraquat)은 MPTP의 대사산물인 MPP⁺와 구조가 매우 흡사해서 파킨슨병의 위험 인자일 가능성이 높다(2). Paraquat는 여전히 개발도상국에서는 사용되고 있는 제조제인데, 벼 농사 지역에서 흔하게 살포된다. Liou 등(3)의 연구에서는 paraquat에 20년 이상

노출된 농부들에게서 파킨슨병의 발병율이 6.4배 이상 높은 것으로 판명되었다. Paraquat는 활성산소종을 발생시키는 과정을 통해 도파민 세포에 독성 효과를 나타냄으로써 파킨슨병을 유발하고, superoxide dismutase (SOD) 유사체가 paraquat의 독성을 막아 주었다(4, 5). 또한 파킨슨병의 특징으로 최근에 알려진 Lewy body의 구성분인 α -synuclein 단백질의 응집을 paraquat가 가속화시켰다(6). 파킨슨병과 관련된 Lewy body의 또 다른 주 구성분으로는 헴산화효소-1 (HO-1)이 있는데, 이것은 비정상적인 단백질 응집과 관련한 소포체 스트레스의 marker이기도 하고, 산화적 스트레스의 marker로 잘 알려져 있다(7-9). 이와 같이 paraquat가 산화적 손상과 특정 단백질의 응집을 통해 도파민 세포를 사멸시키는 것으로 밝혀졌지만, 아직까지 그 정확한 기작에 대해서는 알려진 바가 없다. HO-1은 32kDa의 열충격 단백질인데, 여러 다른 조직의 세포에서 다양한 자극에 의해 발현이 유도되어서 헴 (heme)을 분해시켜 일산화탄소 (CO), 철 (iron), biliverdin으로 전환시키는데, biliverdin은 이어서 bilirubin으로 바뀌게 된다(10, 11). 도파민 세포에서

† Corresponding Author : Department of Biotechnology, College of Natural Sciences, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Gwangju 501-759, Korea

Tel. : +82-62-230-6609, Fax : +82-62-230-6619

E-mail : hchun18@hotmail.com

HO-1이 정상 조건에서는 낮은 농도로 발현되지만 파킨슨 병에서는 Lewy body가 형성되면서 급격히 HO-1의 발현량이 증가한다(7). 이와 같은 HO-1의 발현 증가는 주로 유전자 전사 수준에서 조절되는 것으로 알려져 있다(12, 13). 하지만, 아직까지 paraquat에 의한 HO-1의 발현 조절에 대해서는 알려진 바가 없다. 따라서, 본 연구에서는, 도파민 세포에서 paraquat에 의해 HO-1이 유도되는 기작을 살펴 보았다.

재료 및 방법

재료 및 시약

Paraquat를 비롯한 화학물질은 Sigma 사 (St. Louis, MO, USA)의 것을 사용하였다. pGL2-basic vector와 pSV β -gal vector, luciferase assay kit, β -gal assay kit는 Promega (Madison, WI, USA)로부터 구입하였다. Fugene 6 transfection 시약은 Roche 사 (Indianapolis, IN, USA)로부터 구입하여 사용하였고, HO-1 항체는 Stressgen (Victoria, Canada), actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology 사 (Santa Cruz, CA, USA)의 것을 사용하였다.

세포배양

도파민 세포주인 SN4741(14)은 33°C, 5% CO₂ 조건으로 RF 배지 (10% FBS, 1% glucose, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin 첨가 D-MEM 배지)에서 배양하였으며, 실험에는 계대수가 8 이내인 세포를 사용하였다.

헵산화효소 활성 조사

헵산화효소 활성은 이전의 방법에 기초하여 측정하였다(15). 세포를 세차레 동결-해동 과정을 통해 균질화시킨 다음 50 mM phosphate 반응 혼합물 (2 mM MgCl₂, 2 mM glucose-6-phosphate, 0.2 unit glucose-6-phosphate dehydrogenase, 0.8 mM NADPH, 3 mg rat liver cytosol, 0.02 mM hemin, pH 7.4) 1 ml에 현탁시켰다. 1시간 동안 암상태로 37°C에서 반응시키고 나서 동량의 chloroform을 넣어 반응을 중지시켰고, 464 nm과 530 nm에서의 흡광도 차이를 측정하여 bilirubin 형성 정도를 계산하였다.

Western blot 분석

도파민 세포주 SN4741을 여러 가지 실험 조건에서 배양한 후 1 x PBS로 두 번 씻고, 5 x 10⁵ cell 당 100 μ l의 RIPA buffer (1% NP40, 0.5% Na deoxycholate, 0.1% SDS, 100 μ g/ml PMSF, 30 mg/ml aprotinin, 1 mM Na orthovanadate)로 용해시켰다. 이전의 방법대로(14), 단백질 전기영동 후 PVDF membrane으로 electrotransfer하고, 항체와 반응 후 ECL chemiluminescence (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)로 단백질 발현 정도를 검출하였다.

플라스미드와 돌연변이 벡터 제조

생쥐 HO-1 유전자의 15-kb promoter 부위를 promoter 없는 luciferase reporter 플라스미드인 pGL2-basic vector에 클로닝 하였고, pHO-1-WT으로 정하였다. p Δ E1은 pHO-1-WT

에서 E1 enhancer 부위가 포함된 600 bp의 SacI/SacI 제한 효소 부위를 제거시켜서 만들었다. 마찬가지로 p Δ E2는 E2 enhancer 부위를 AflIII/BsrBI 제한효소 처리하여 161 bp 부위를 제거함으로써 만들었다. E1과 E2를 모두 제거시켜서 p Δ (E1+2)를 준비하였다. E2 부위의 전사인자 활성단백질-1 (AP-1) 결합 부위를 돌연변이시키고, 최소한의 HO-1 promoter와 연결한 luciferase plasmid들인 pABIM15 (한개의 AP-1 결합부위 돌연변이), pABIM31 (두개의 AP-1 결합부위 돌연변이), pABIM45 (3개의 AP-1 결합부위 돌연변이)와 정상 control인 pAB1 (정상적인 E2 부위와 최소한의 promoter 부위만 luciferase gene에 연결한 vector) (16) 등은 J. Alam 박사로부터 제공받아 사용하였다.

HO-1 유전자의 세포내 발현양 조사

도파민 세포내로 다양한 플라스미드의 도입은 Fugene 6 transfection 시약을 사용하였다. 각각의 실험에서 β -galactosidase 유전자를 가진 pSV β -gal 벡터를 위에서 언급한 다양한 luciferase reporter 플라스미드와 함께 transfection 해서 transfection 효율을 표준화하는데 사용하였다. SN4741 세포주는 transfection 하루 전에 24 well plate에 5 x 10⁴ cell로 배양하여 transfection 당일에는 50-60%의 밀집도로 자라게 준비하였다. Fugene 6 transfection 시약 제조회사의 기준에 의거하여 0.1 μ g의 다양한 luciferase reporter 플라스미드와 0.05 μ g의 pSV β -gal 벡터를 함께 24시간 동안 transfection 하였다. 그런 후 저농도 혈청 (0.5% FBS) 배지 (기타 성분은 배양 배지와 동일)에 500 μ M의 paraquat를 첨가하여 SN4741 도파민 세포에 24시간 동안 처리하였다. 여러 가지 mitogen-activated protein (MAP) kinases 저해제를 처리할 때는 paraquat 처리 1시간 전에 사용하였다. Luciferase와 β -galactosidase 활성도는 제조사의 지시대로 세포 추출물을 준비한 후 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회씩 수행하였으며, 평균값과 오차범위로 나타내었다. 결과는 GraphPad Prism data analysis program (GraphPad Software, San Diego, CA)으로 분석하였고, 유의성은 1-way ANOVA와 post-hoc 비교분석법을 사용하여 검사하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 를 기준으로 하였다.

결과 및 고찰

체초제인 paraquat가 HO-1의 발현을 유도하는지의 여부를 확인하기 위해 도파민 세포주 SN4741에 0, 100, 250, 500 μ M의 다양한 농도로 24시간 paraquat를 처리하였다. Fig. 1A에서 보듯이 헵산화효소의 활성이 paraquat 농도가 높아짐에 따라 증가하였고, 500 μ M의 농도에서 뚜렷하게 높은 활성도를 나타내었다. 헵산화효소는 세 가지 종류가 있는데 다양한 자극에 의해 현저하게 발현이 유도되는 HO-1이 있고, 그와는 달리 HO-2와 HO-3는 발현의 변화가 심하지 않다(17). 세 가지 헵산화효소 중 HO-1이 파킨슨병과 밀접한 관련이 있는데 HO-1은 정상 조건에서는 도파민 세포에서 낮은 농도로 발현되지만, 파킨슨병에서는 Lewy body 형성과 함께 극적으로 많이 증가한다(7). Fig. 1B의 Western blot 결과를

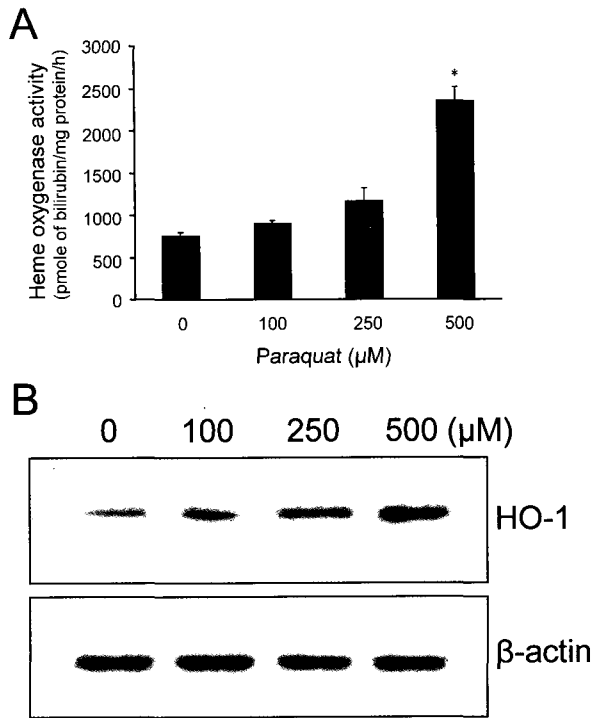


Figure 1. Dose-dependent effects of paraquat on the heme oxygenase activity and HO-1 protein expression in SN4741 dopaminergic cells. SN4741 cells were treated with various concentrations of paraquat for 24h. Heme oxygenase activity (A) and HO-1 protein expression (B) were measured as described in the Materials and methods. All values are the means \pm S.E.M. from three experiments.; * $p < 0.05$

보면, 전체 헴산화효소 활성의 변화와 일치해서, paraquat에 의해 HO-1이 500 μ M의 농도에서 3배 이상 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 더 높은 농도로 24시간 paraquat를 처리하면, 도파민 세포가 90% 이상 사멸하여 결과를 얻을 수 없었다. 따라서, 이후의 모든 실험은 500 μ M의 농도로 paraquat를 처리하였다. Fig. 2에서는 500 μ M paraquat를 다양한 시간 별로 SN4741 세포에 처리하여 전체 헴산화효소 활성도를 측정하였고, HO-1의 발현을 Western blot으로 확인하였다. 12-24시간 paraquat를 처리했을 때 현저하게 헴산화효소 활성이 증가하였고, 그와 일치되게 HO-1도 증가하였다. 하지만, 더 오랜 시간 paraquat를 처리했을 때는 급격히 원래의 수준으로 발현양이 감소되었다.

산화적 스트레스나 중금속, 열충격, 싸이토키인, 자외선 조사 등의 다양한 자극에 의한 HO-1의 활성화는 주로 전사 단계에서 조절된다(12, 13, 16, 18). 생쥐 HO-1의 프로모터 부위에는 E1 (이전에는 SX2로 알려짐)과 E2 (이전에는 AB1으로 알려짐)라는 두 개의 유도성 enhancer가 있어서 HO-1의 발현을 조절한다(12, 19). HO-1이 paraquat에 의해 유도되는 기작을 조사하기 위해서 여러가지 HO-1 promoter/enhancer 부위를 luciferase 유전자에 결합시킨 재조합체를 SN4741 세포에 transfect하고 나서 500 μ M paraquat로 24시간 자극을 주었다.

Fig. 3에서 보듯이, HO-1의 전체 promoter/enhancer 부위

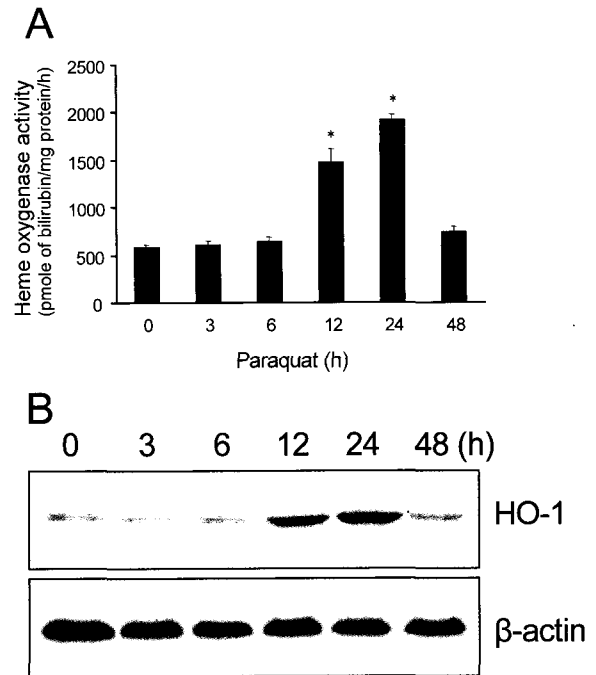


Figure 2. The time-course of heme oxygenase activity and HO-1 level after paraquat treatment in dopaminergic cells. 500 μ M paraquat was applied at various time points 0, 3, 6, 12, 24, or 48h and then heme oxygenase activity (A) and HO-1 protein expression (B) were measured in SN4741 cells. Data represent means \pm S.E.M. from three independent experiments.; * $p < 0.05$

를 포함한 pHO-1-WT을 SN4741 세포에 transfect 후 paraquat로 24시간 처리한 경우는 HO-1의 발현이 약 7.6배 증가하였다. 하지만, HO-1의 발현에 중요한 조절자로 작용하는 E1과 E2를 모두 제거한 실험에서는 HO-1의 발현이 완전히 저해되었다. 또한 E1 부위만 제거했을 때는 HO-1의 발현이 21% 감소했지만, E2 부위를 제거한 경우에는 70%나 감소하였다. 이 결과는 paraquat에 의해 HO-1의 발현이 유도될 때 E1과 E2가 모두 관여하지만, E2가 보다 더 중요하게 발현을 조절함을 의미한다. E2 enhancer 부위에는 전사인자 활성 단백질-1 (AP-1) 결합 부위가 3개 있어서 유전자 전사를 활성화하는데 중요하게 작용한다(12). 따라서, AP-1 결합 부위를 돌연변이시킨 재조합체를 SN4741 세포에 transfect한 후 500 μ M paraquat로 24시간 처리하여 HO-1의 발현 여부를 조사하였다.

Fig. 4에서 보듯이, 온전한 E2 부위를 최소한의 HO-1 promoter와 luciferase 유전자에 연결한 pAB1은 paraquat에 의해 6배 이상 HO-1을 증가시켰지만, AP-1 결합부위 1개만 돌연변이 시킨 pAB1M15는 2.7배 증가시키는 것으로 줄어들었고, AP-1 결합부위 2개를 돌연변이시킨 pAB1M31은 HO-1을 1.4배 증가시켰다. AP-1 결합부위 3개를 모두 돌연변이 시킨 pAB1M45는 HO-1의 발현을 전혀 유도하지 못하였다. 따라서, 도파민 세포에서는 E2 부위의 AP-1 결합부위를 통해서 paraquat가 HO-1의 발현을 유도한다는 사

실을 처음으로 밝히게 되었다.

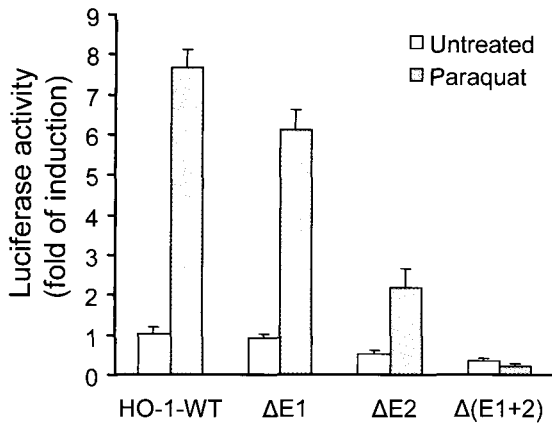


Figure 3. Deletion analysis of promoter and enhancer region of the HO-1 gene in SN4741 dopaminergic cells. SN4741 cells were transfected with various HO-1 promoter/enhancer-luciferase fusion constructs and treated for 24h with or without paraquat (500 μ M). Cells were transfected with the wild type 15-kb HO-1 promoter construct (pHO-1-WT) or mutants with deletion of either one (pΔE1, pΔE2) or both of E1 and E2 enhancers (pΔ(E1+2)). pSVβ-gal vector was cotransfected for normalization when transfected various luciferase constructs. Luciferase and β-galactosidase assays were performed as described in the Materials and methods. Data represent means \pm S.E.M. from three independent experiments.

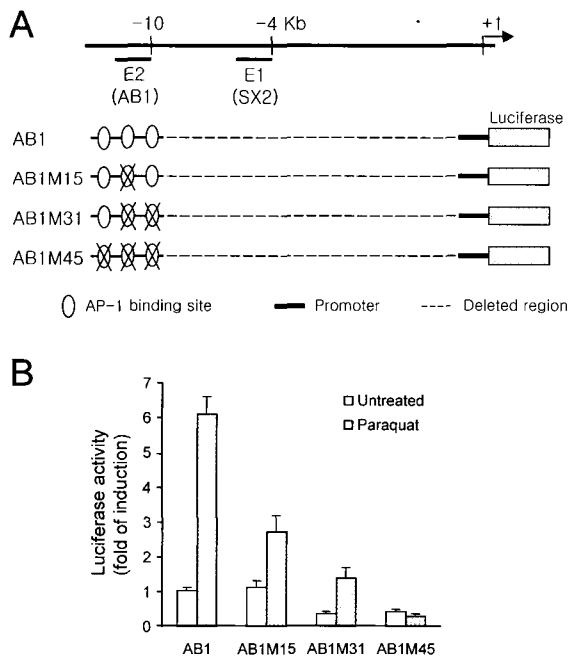


Figure 4. Mutational analysis of the E2 enhancer of the HO-1 gene in SN4741 cells. (A) Diagram of site-directed mutagenesis of the AP-1 binding elements in the E2 enhancer. Mutations are indicated by an X across the appropriate AP-1 sites. (B) SN4741 cells were transfected with wild type E2 having intact AP-1 sites (AB1) or mutants, AB1M15 (one mutated AP-1 site), AB1M31 (two mutated AP-1 sites), or AB1M45 (three mutated AP-1 sites). Cells were cotransfected with pSVβ-gal vector for normalization. After transfection for 24h, cells were treated with or without 500 μ M paraquat for another 24h, and then assayed for luciferase activity. Each data represents the mean \pm S.E.M. from three independent experiments.

AP-1의 활성화는 산화환원 반응이나 여러 가지 인산화 단백질-의존성 신호전달 경로를 통한 인산화 과정 등의 다양한 기작으로 조절된다(20). 특히, MAP kinase family 중에서 JNK가 AP-1 등의 전사인자를 활성화시켜 여러 가지 유전자 발현을 조절한다(21). 따라서, 도파민 세포에서 paraquat가 유도하는 HO-1의 발현이 MAP kinase 신호전달과 관련이 있는지의 여부를 확인하였다. 전체 HO-1 promoter/enhancer를 luciferase 유전자에 연결한 pHO-1-WT을 SN4741 세포에 transfect 후 MAP kinase family의 저해제 (ERK1/2의 저해제, PD98059; p38의 저해제, SB203580; JNK의 저해제, SP600125)를 각각 10 μ M 농도로 1시간 처리 후 500 μ M의 paraquat로 24시간 자극하였다. Fig. 5에서 보듯이, HO-1의 전사 활성도는 JNK 저해제에 의해 50% 이상 감소한 반면 ERK 1/2나 p38 저해제에는 큰 반응이 없었다. 이 결과는 도파민 세포에서 paraquat에 의해 HO-1의 발현이 유도될 때 JNK를 필요로 함을 의미한다.

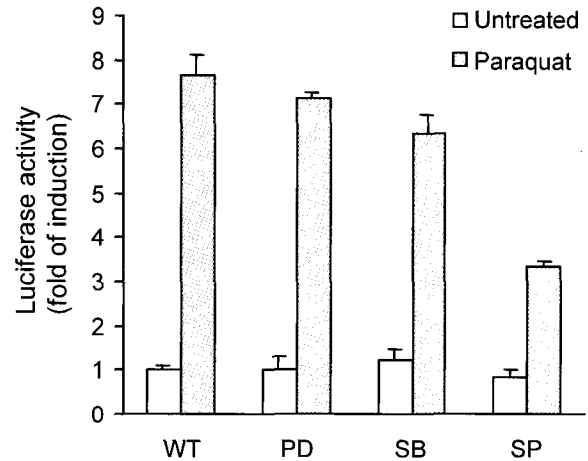


Figure 5. Effect of MAP kinase inhibitors on paraquat-mediated HO-1 gene activation. SN4741 cells were cotransfected with plasmid pHO-1-WT and pSVβ-gal vector and then treated with each 10 μ M of MAP kinase inhibitors for 1h before adding paraquat or not as described in the Materials and methods. Each data represents the mean \pm S.E.M. from three independent experiments. WT, no treatment with MAP kinase inhibitors; PD, PD98059 (ERK1/2 inhibitor); SB, SB203580 (p38 inhibitor); SP, SP600125 (JNK inhibitor).

그동안 농업 분야에서 흔하게 쓰여온 제초제인 paraquat는 뇌-혈류-장벽을 쉽게 통과해서 도파민 세포를 손상시키고 파킨슨병을 유발한다(22). Paraquat가 활성산소종을 발생시키고, α-synuclein 응집을 가속화시켜서 도파민 세포를 손상시킨다고 밝혀졌지만, 그 자세한 기작은 아직 알려져 있지 않다. 본 연구에서는, 도파민 세포주 SN4741을 사용하여 paraquat가 산화적 스트레스와 소포체 스트레스의 marker인 HO-1을 현저하게 증가시키는 것을 처음으로 밝혀지게 되었고, HO-1 발현의 전사 단계에서의 조절 기작을 해명하였다. HO-1은 다양한 자극에 의해 발현이 유도되면, metalloporphyrin인 heme을 분해시켜 담즙색소인 biliverdin과 동량의 일산화탄소, 그리고 철 성분으로 전환시키고, 이어서 biliverdin은 강력한 항산화제인 bilirubin으로 전환된다(18). Heme의 분해로 생산되는 bilirubin으로 인해 다양한

종류의 세포가 보호되기도 하지만, heme의 또 다른 분해 산물인 일산화탄소와 철은 오히려 미토콘드리아 막을 손상시켜서 산화적 스트레스를 더욱 증가시킬 수 있다(10, 11). 파킨슨병에서는 HO-1이 많이 발현되는 Lewy body가 증가하는 것이 두드러진 특징인데(7), 본 연구 결과와 이전의 다른 연구들을 종합해보면, HO-1은 여러 가지 다양한 신호전달 경로에 의해 유도될 수 있다.

요 약

흔하게 사용되어온 제초제인 paraquat는 파킨슨병의 원인이 될 수 있는 유력한 위험 요소이다. 헵산화효소-1 (HO-1)은 산화적 스트레스와 소포체 스트레스의 marker인데, 여러 가지 자극에 의해 heme을 분해하여 biliverdin, 일산화탄소, 철 성분으로 전환시킨다. 본 연구에서는 뇌의 흑색질 유래의 도파민 세포주 SN4741에서 paraquat가 시간별, 농도별로 HO-1을 활성화시키는 기작을 조사하였다. HO-1이 paraquat에 의해 활성화되는 것은 주로 유전자 전사 수준에서 조절되었다. HO-1 유전자의 promoter와 5' enhancer인 E1, E2를 결실시킨 실험에서, E2 enhancer가 도파민 세포에서 paraquat에 의한 HO-1 유전자 발현을 유도하는 핵심 부위로 판명되었다. E2 enhancer 부위를 돌연변이시킨 실험 결과는 전사인자 활성 단백질-1 (AP-1) 결합 부위를 통해 HO-1 발현이 유도됨을 밝히게 되었다. 또한, 도파민 세포에서 HO-1 유전자 발현의 조절과 신호전달 과정의 관계를 조사하기 위해 MAP kinase들의 특이적 저해제를 처리하고 paraquat로 자극을 준 결과, JNK 저해제인 SP600125가 가장 현저하게 paraquat에 의한 HO-1 발현을 억제하였다. 결론적으로, 도파민 세포에서 paraquat가 HO-1을 유도하는 데는 E2 enhancer가 중요하게 작용하고, AP-1과 JNK 경로를 통해 HO-1 발현이 조절된다는 사실을 처음으로 밝히게 되었다.

감 사

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었으며 (KRF-2003-003-C00122), 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Tanner, C. M. and Y. Ben-Shlomo (1999), Epidemiology of Parkinson's disease, *Adv. Neurol.* **80**, 153-159.
- McCormack, A. L., M. Thiruchelvam, A. B. Manning-Bog, C. Thiffault, J. W. Langston, D. A. Cory-Slechta, and D. A. Di Monte (2002), Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat, *Neurobiol. Dis.* **10**, 119-127.
- Liou, H. H., M. C. Tsai, C. J. Chen, J. S. Jeng, Y. C. Chang, S. Y. Chen, and R. C. Chen (1997), Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan, *Neurology.* **48**, 1583-1588.
- Mollace, V., M. Iannone, C. Muscoli, E. Palma, T. Granato, V. Rispoli, R. Nistico, D. Rotiroti, and D. Salvemini (2003), The role of oxidative stress in paraquat-induced neurotoxicity in rats: protection by non-peptidyl superoxide dismutase mimetic, *Neurosci. Lett.* **335**, 163-166.
- Shimizu, K., K. Matsubara, K. Ohtaki, S. Fujimaru, O. Saito, and H. Shiono (2003), Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats, *Brain Res.* **976**, 243-252.
- Manning-Bog, A. B., A. L. McCormack, J. Li, V. N. Uversky, A. L. Fink, and D. A. Di Monte (2002), The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of α -synuclein in mice: paraquat and α -synuclein, *J. Biol. Chem.* **277**, 1641-1644.
- Schipper, H. M., A. Liberman, and E. G. Stopa (1998), Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease, *Exp. Neurol.* **150**, 60-68.
- Linden, T., J. Doutheil, and W. Paschen (1998), Role of calcium in the activation of erp72 and heme oxygenase-1 expression on depletion of endoplasmic reticulum calcium stores in rat neuronal cell culture, *Neurosci. Lett.* **247**, 103-106.
- Hartsfield, C. L., J. Alam, and A. M. Choi (1998), Transcriptional regulation of the heme oxygenase 1 gene by pyrrolidine dithiocarbamate, *FASEB J.* **12**, 1675-1682.
- Tenhunen R., H. S. Marver, and R. Schmid (1969), Microsomal heme oxygenase: characterization of the enzyme, *J. Biol. Chem.* **244**, 6388-6394.
- Ewing, J. F. and M. D. Maines (1991), Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase 2 is not a heat shock protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 5364-5368.
- Alam, J., S. Camhi, and A. M. Choi (1995), Identification of a second region upstream of the mouse heme oxygenase-1 gene that functions as a basal level and inducer-dependent transcription enhancer, *J. Biol. Chem.* **270**, 11977-11984.
- Camhi, S. L., J. Alam, G. W. Wiegand, B. Y. Chin, and A. M. Choi (1998), Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **18**, 226-234.
- Chun, H. S., G. E. Gibson, L. A. DeGiorgio, H. Zhang, V. J. Kidd, and J. H. Son (2001), Dopaminergic cell death induced by MPP+, oxidant and specific neurotoxicants shares the common molecular mechanism, *J. Neurochem.* **76**, 1010-1021.
- Motterlini, R., R. Foresti, M. Intaglietta, and R. M. Winslow (1996), NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **270**, 107-114.
- Alam, J., C. Wicks, D. Stewart, P. Gong, C. Touchard, S. Otterbein, A. M. Choi, M. E. Burow, and J. Tou (2000), Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor, *J. Biol. Chem.* **275**, 27694-27702.
- Maines, M. D. (1997), The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 517-554.
- Choi, A. M. and J. Alam (1996), Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **15**, 9-19.
- Kiemer, A. K., N. Bildner, N. C. Weber, and A. M. Vollmar (2003), Characterization of heme oxygenase 1 (heat shock protein 32) induction by atrial natriuretic peptide in human endothelial cells, *Endocrinology.* **144**, 802-812.
- Hunter, T. and M. Karin (1992), The regulation of transcription by phosphorylation, *Cell.* **70**, 375-387.
- Kietzmann, T., A. Samoylenko, and S. Immenschuh (2003), Transcriptional regulation of heme oxygenase-1 gene expression by MAP kinases of the JNK and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.* **278**, 17927-17936.
- Brooks, A. I., C. A. Chadwick, H. A. Gelbard, D. A. Cory-Slechta, and H. J. Federoff (1999), Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss, *Brain Res.* **823**, 1-10.