

과산화수소에 의한 산화스트레스가 영아형 바텐병에서 neurogranin의 인산화에 미치는 영향

윤동호·김한복·박주훈¹·김성조*호서대학교 생명공학과, ¹한방화장품학과

Received March 18, 2009 / Accepted April 16, 2009

Effect of Neurogranin Phosphorylation on Oxidative Stress by Hydrogen Peroxide in Early Onset of Batten Disease. Dong-Ho Yoon, Han Bok Kim, Joo-Hoon Park¹ and Sung-Jo Kim*. *Department of biotechnology, Hoseo university, 165, Baebang-Myun, Asan, Chungnam, Republic of Korea, 336-795, ¹Department of cosmetic science, Hoseo university, 165, Baebang-Myun, Asan, Chungnam, Republic of Korea, 336-795* - Early onset of Batten disease (EBD), one of the most lethal neurodegenerative storage disorders of childhood, is caused by inactivating mutations in the Ceroid Lipofuscinosis, Neuronal (CLN1) gene. Neurogranin, a calmodulin-binding protein, is expressed in the brain and participates in the protein kinase C (PKC) signaling pathway. While oxidative stress is the suggested cause of neurodegeneration in EBD, its molecular mechanism(s) remains obscure. In this research, we examined the levels of neurogranin in the brain mRNA of wild-type (WT) mice and EBD knockout (KO) mice, as well as the proteins. We also performed neuronal cultures to measure the expression levels of neurogranin and phosphorylated-neurogranin with or without oxidative stress inducers and anti-oxidants. Results showed that neurogranin in both EBD KO mice brain mRNA and protein extracts decreased in an age dependent manner. However, high amounts of phosphorylated-neurogranin were detected in the 6-month brain. This pattern was also confirmed by cultured neurospheres samples. Moreover, neurospheres treated with H₂O₂, an oxidative stress inducer, showed increased phosphorylated-neurogranin patterns. Interestingly, this pattern returned to normal status when treated with N-acetyl-L-cysteine, an anti-oxidant, after H₂O₂ treatment was performed. Our results suggest that the phosphorylation of neurogranin is affected by oxidative stress status in EBD, and appropriate anti-oxidant treatment will relieve hyper-phosphorylation of neurogranin.

Key words : Neurogranin, oxidative stress, anti-oxidant, early onset of Batten disease (EBD)

서 론

Neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs)는 바텐병(Batten disease)이라 불리며, 12,500명 당 1명의 발병률을 가진 신경 퇴행 축적 질환(neurodegenerative storage disease)이다[9]. 영아형 바텐병(early onset of Batten disease, EBD)은 Ceroid Lipofuscinosis, Neuronal 1 (CLN1) 유전자의 산물인 palmitoyl-protein thioesterase 1 (PPT1)의 기능상실로 인해 신경 퇴행 질환인 영아형 바텐병으로 유도되며[12], 다양한 형태의 NCLs 중에서도 가장 치명적이고 파괴적인 질병으로 인구 10,000명 당 1명의 발병률과 70명 중 1명이 보인자 빈도를 보이며, 핀란드 사람에게서 많이 보고되고[1,9,10,17,20,22], 출생 후 약 6~24 개월 이내에 발병한다[4]. 영아형 바텐병은 리소좀(lysosome)에 ceroid (thioesterified polypeptides)라는 waste product가 비정상적으로 축적 되어지는 증상을 보인다[1,7,11,21,22]. 현재까지 다양한 연구 결과를 통해 영아형 바텐병 환자에서 PPT1 효소의 불활성과 수송의 중단을 이끄는 다수의 missense mutation 및 nonsense mutation들이 보고 되어

졌다[6,7,16,17,20].

PPT1 은 수용성 리소좀 가수분해효소(soluble lysosomal hydrolases)로 생체내의 거대분자(macromolecules)들을 분해하는 것으로 예상되지만 현재까지 PPT1의 기질은 명확하게 확인되지 않았고[3-6,15,20], 또한 PPT1 knockout mice (EBD KO)와 이의 대조군인 wild type mice (WT)를 이용한 실험에서, PPT1은 S-acylated 단백질의 분해대사에 관여하는 soluble lysosomal enzymes으로 S-acylated (palmitoylated)된 단백질 분해를 촉진하기 위해서 단백질에서 thioester 결합의 절단을 촉진하여 palmitate 잔기를 제거하는 역할을 수행한다[8,19,20]. 이러한 PPT1의 기능상실로 인해 소포체(endoplasmic reticulum, ER)내에 unfolding protein response (UPR)이 발생하고 소포체 스트레스(ER stress)를 유발하며, 발생된 소포체 스트레스는 소포체 내 Ca²⁺의 항상성을 붕괴하여 Ca²⁺ 방출을 유도하고 최종적으로 세포사멸(apoptosis)을 유도한다는 사실이 보고되었으나[9], 아직 그 명확한 발병기전 및 치료 방법이 발견되어지지 않고 있다.

Neurogranin은 calmodulin 결합 단백질로서 RC3, p17 또는 BICK라 불리며 cerebral cortex, hippocampus, amygdale 및 basal ganglia 등 뇌에서 풍부하게 발현된다[2]. Neurogranin은 78개의 아미노산으로 이루어져 있으며, pro-

*Corresponding author

Tel : +82-41-540-5571, Fax : +82-41-548-6231

E-mail : sungjo@hoseo.edu

tein kinase C (PKC) 신호전달 경로에 관여하며, dendritic spine 및 시냅스 가소성(Synaptic Plasticity)형성과정에 참여하며 시냅스 말단에서 Ca^{2+} 부족 시 calmodulin과 결합하는 것으로 알려져 있다[14]. 또한 인산화된 neurogranin은 neurogranin과 결합하는 calmodulin과의 친화력을 감소시키며, ischemic (국소빈혈), hypoxic (혈중산소감소) 등의 조절자로서 역할을 수행할 뿐 아니라, calmodulin에 의존적인 nitric oxide synthase (NOS), calmodulin protein kinase II (CaMKII) 및 adenylate cyclase (AC) 등의 활성화에 영향을 미친다[13].

최근 EBD KO에서 소포체 스트레스 발생이 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 생산을 증가시켜 Ca^{2+} 의 항상성에 혼란을 야기하며 미토콘드리아 막(mitochondria membrane)을 불안정 하게 하여 caspase-9이 활성화 되어 최종적으로 세포사멸을 유도 또는 가속화 한다는 결과가 보고되어 있다[9]. 이를 바탕으로 본 논문에서는 Ca^{2+} 부족에 의해 결합하는 calmodulin 결합 단백질인 neurogranin이 WT과 EBD KO 쥐의 뇌에서 발현되는 수준과 인산화된 neurogranin의 수준, 그리고 산화스트레스와 항산화제가 인산화된 neurogranin에 어떠한 효과를 나타내는지 알아보려고 한다.

재료 및 방법

신경세포 배양 및 약물 처리

EBD KO와 정상 쥐 각각에서 임신 후 15일 경과한 태아 쥐의 뇌를 적출하고 NeuroCult NSC proliferation supplements (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada)와 human epidermal growth factor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 함유된 NeuroCult NSC Basal Medium (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada)에서 신경세포(Neurosphere)를 배양하였다. 이후 100 μ M H_2O_2 를 처리하고 24시간 경과 후 대조군에 4 mM N-acetyl-L-cysteine (Sigma, Saint Louis, MO, USA)을 처리하고 24시간 경과 후 실험에 사용하였다.

Real-time PCR 분석

EBD KO 쥐와 정상 쥐의 뇌를 적출하여 TriZol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 전체 RNA를 분리하였고 RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)과 DNase를 처리하여 RNA를 정제하였다. 이후 SuperScript III first-strand synthesis system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 역전사효소를 처리하고 정량한 후, 각 시료별로 10 ng의 전체 RNA와 RNASYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 혼합한 뒤, neurogranin primer를 통해 ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 통해 real-time PCR을 수행하였다. 얻어진 결과는 ABI Prism Software ver-

sion 1.01 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 통해 분석하였고 최종결과는 β -actin과 비교하여 정량분석을 실시하였다. 각각 3회의 반복실험을 통해 얻어진 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성 검정은 Student's t-test를 통해 실시하였으며, p 값이 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

Western blot 분석

각 연령대 별로 쥐의 뇌를 적출하여 단백질 추출용 용해액인 PhosphoSafe extraction reagent (EMD Biosciences, San Diego, CA, USA)와 protease-inhibitor cocktails (Sigma, Saint Louis, MO, USA)를 섞고 조직과쇄기를 통해 단백질을 추출하였다. 배양된 신경세포는 PhosphoSafe extraction reagent (EMD Biosciences, San Diego, CA, USA)와 섞은 뒤 얼음에서 1시간 반응시켜 단백질 추출물을 얻었다. 각 시료별로 20 μ g의 단백질을 4-15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 실시하였고 이후 전기 이동을 통해 nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 단백질을 이동시켜 western blot에 사용하였다. 단백질을 보유한 membranes은 5% non-fat dry milk (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 통해 1차 처리를 한 후 anti-neurogranin과 anti-phospho-neurogranin 1차 항체(Millipore, Billerica, MA, USA) 및 anti- β -actin (Sigma, Saint Louis, MO, USA)항체를 처리하였다. 2차 항체는 goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하였고 Supersignal west pico luminol/enhancer solution (Pierce, Rockford, IL, USA)을 통해 단백질 밴드를 확인하였다.

결 과

본 논문에서는 1월령, 3월령, 6월령으로 분리되는 WT 및 EBD KO 쥐의 뇌에서 neurogranin의 상대적인 발현 수준을 알아보기 위해 mRNA를 이용한 real-time PCR 및 추출된 단백질을 이용한 western blot을 수행하였고, neurogranin의 인산화정도, 배양된 신경세포인 neurospheres를 이용한 neurogranin 및 인산화된 neurogranin의 수준을 확인하였다. 나아가 산화스트레스와 항산화제가 neurogranin의 인산화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 neurogranin에 산화스트레스 유발 물질인 H_2O_2 를 처리하였고, 24시간 경과 후 일부 대조군에는 항산화제인 N-acetyl-L-cysteine (NAC)을 처리하여 그 결과를 확인하였다.

Real-time PCR을 통한 WT 및 EBD KO 쥐 뇌의 neurogranin 상대적 발현수준

1월령, 3월령, 6월령 WT, EBD KO 쥐에서 적출한 뇌의

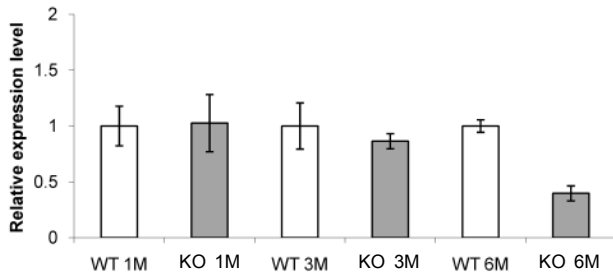


Fig 1. Expression levels of neurogranin mRNA in the brain of wild-type (WT) mice and EBD KO (KO) mice by real-time PCR. 1 M: 1 month, 3 M: 3 months, 6 M: 6 months.

mRNA를 이용하여 neurogranin 발현 수준을 real-time PCR을 수행하여 확인하였다. WT 쥐에서는 1월령, 3월령, 6월령 등 노화가 진행되는 상황에서도 neurogranin mRNA의 생성 수준에는 차이가 없었으나, EBD KO 쥐에서는 1월령, 3월령, 6월령과 같이 노화가 진행됨에 따라 neurogranin mRNA의 생성 수준은 감소되었다(Fig. 1). 이 결과를 통해, 1월령 EBD KO 쥐에서는 neurogranin mRNA가 WT 쥐와 동일하게 정상적으로 생성되지만 노화가 진행됨에 따라 neurogranin mRNA의 생성 수준이 현저히 감소한다는 것을 발견하여, PPT1 결핍이 정상적인 neurogranin의 발현에 영향을 주는 것을 확인 하였다.

WT 및 EBD KO 쥐의 뇌를 이용한 western blot 분석

1월령, 3월령, 6월령의 WT과 EBD KO 쥐에서 적출한 뇌의 단백질을 이용하여 western blot 분석을 수행 하였다. 그 결과 real-time PCR의 결과와 유사하게 1월령, 3월령, 6월령으로 구분된 WT 쥐의 뇌에서는 neurogranin의 발현량에 차이가 없었으나, 1월령, 3월령, 6월령으로 구분된 EBD KO 쥐의 뇌에서는 노화가 진행될수록 neurogranin의 발현이 점차 감소하는 것을 확인 하였다.

또한, 인산화된 neurogranin은 1월령, 3월령, 6월령으로 구성된 WT 및 EBD KO 쥐에서 노화가 진행될수록 그 수준이 어느정도 증가하는 형태를 확인하였으며, 흥미롭게도 6월령의 EBD KO 쥐의 뇌에서는 감소된 neurogranin의 양에 비교하여 볼 때 인산화된 neurogranin의 양이 증가해 있음이 확인 되었다(Fig. 2).

배양 신경세포인 neurospheres의 western blot 분석

WT 과 EBD KO 쥐의 태아에서 추출한 neurospheres를 배양하여 neurogranin의 양을 확인한 결과, WT 및 EBD KO neurospheres 내의 neurogranin 수준은 앞서 실험 결과와 동일하게 EBD KO 쥐에서 감소하는 형태를 확인하였으며, 인산화된 neurogranin의 수준은 WT 쥐 보다 EBD KO 쥐에서 현격하게 수준이 증가한 형태를 확인하였다(Fig. 3). 이렇듯 neural stem cell인 neurospheres에서도 감소하는 neurogranin의 발

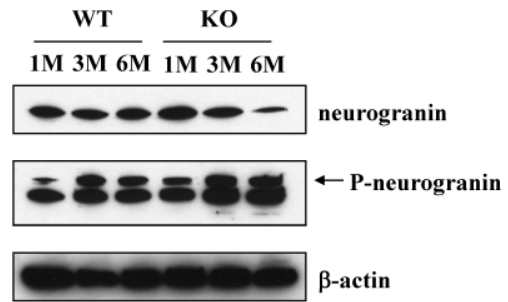


Fig 2. Western blot analysis for non-phosphorylated and phosphorylated neurogranin in the brain of wild-type (WT) and EBD KO (KO) mice. β -actin was used as a loading control. 1 M: 1 month, 3 M: 3 months, 6 M: 6 months. P-neurogranin; phospho-neurogranin.

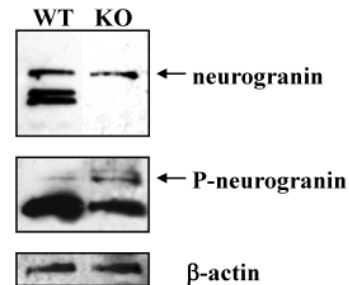


Fig 3. Western blot analysis for non-phosphorylated and phosphorylated neurogranin from the cultured brain neurospheres of wild-type (WT) and EBD KO (KO) mice. β -actin was used as a loading control. P-neurogranin; phospho-neurogranin.

현수준에 비해 인산화된 neurogranin의 양이 증가하는 것이 확인 되었다. 이전의 다양한 연구를 통해 H₂O₂ 및 nitric oxide (NO)와 같은 활성산소들에 의해 산화스트레스가 활성화 되고, 노화와 관련이 있는 신경 퇴행 질환에 영향을 미친다는 결과가 보고된 바 있다[18]. 또한 영아형 바덴병에서도 신경세포 내 산화스트레스 정도가 상승되어있음이 이전 연구를 통해 밝혀진 바[9], 산화스트레스의 정도 변화가 neurogranin의 인산화 정도를 변화시키는지의 여부를 확인 할 필요성이 대두되었다.

Neurospheres에 H₂O₂ 및 N-acetyl-L-cysteine (NAC)의 처리

이전의 연구결과를 통해 밝혀진 바와 같이 영아형 바덴병에서 소포체 스트레스에 의해 활성산소가 발생하고 Ca²⁺ 항상성에 붕괴가 발생하여 최종적으로 세포사멸이 발생한다면 [9], neurogranin 또한 calmodulin 결합 단백질로서 Ca²⁺ 항상성 붕괴에 의한 영향을 받을 것으로 사료되어, 활성산소가 neurogranin의 인산화에 미치는 영향을 조사하기 위해, 다량의 활성산소를 지닌 EBD KO 쥐의 neurospheres [9]에 산화스트레스 유발물질인 H₂O₂를 처리하고, 24시간 경과 후 항산화제인 NAC 을 처리하여 western blot 분석을 수행하였다.

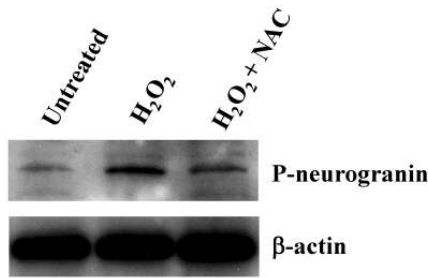


Fig 4. Western blot analysis for the treated to H_2O_2 and N-acetyl-L-cysteine (NAC) from cultured neurospheres in the EBD KO mice brain. Control: Mock treated. β -actin was used as a loading control.

Mock treat를 실시한 control의 인산화된 neurogranin 수준과 비교하여 산화스트레스 유발물질인 H_2O_2 를 처리하자 그 수준이 현격히 상승하는 것을 확인하였으며, H_2O_2 처리 후 항산화제인 NAC을 투여한 샘플에서는 neurogranin의 인산화 수준이 H_2O_2 를 처리하였을 당시보다 감소된 결과를 확인하였다(Fig. 4). 따라서 이 결과를 통해 neurogranin의 인산화 정도는 세포가 가진 산화스트레스 정도에 의해 변화함을 확인 할 수 있었다.

고 찰

영아형 바덴병은 PPT1 결핍 및 기능상실에 의해 발생하는 신경 퇴행 질환이다. 현재까지 다양한 연구를 통해 영아형 바덴병의 발병원인을 밝혀내기 위한 시도가 이루어지고 있으나 아직 명확한 발병원인 및 치료방법이 알려지고 있지 않다. 본 연구에서는 Ca^{2+} 부족 조건에서 calmodulin과 결합하는 것으로 알려진 neurogranin이 WT 및 EBD KO 쥐 뇌에서 발현되는 수준을 확인하였고, 더불어 인산화된 neurogranin의 수준, 산화스트레스와 항산화제가 인산화된 neurogranin에 어떠한 효과를 나타내는지 검토하였다. real-time PCR을 통해 WT, EBD KO 쥐 뇌에서 neurogranin mRNA의 상대적 생성수준을 확인할 결과 WT 쥐에서는 노화의 진행과 무관하게 neurogranin mRNA 생성수준은 동일하였지만, EBD KO 쥐에서는 노화가 진행되면서 점차적으로 neurogranin mRNA 생성수준이 감소하는 것이 관찰되었는데, 이를 통해 PPT1 결핍이 뇌에서 풍부하게 발현되는 neurogranin의 정상적인 발현을 저해시키는 것으로 사료된다. 이와 같은 mRNA의 감소가 단백질의 생성 감소를 의미하는지 확인하기 위하여 WT와 EBD KO 쥐 뇌의 단백질을 사용하여 western blot 분석을 수행한 결과 real-time PCR의 결과와 유사하게 WT 쥐의 경우 노화가 진행됨에 있어 neurogranin의 발현 양에는 큰 차이가 없었으나, PPT1이 제 기능을 수행하지 못하는 EBD KO 쥐에서는 노화가 진행될수록 neurogranin의 발현 양이 감소하는 것을 확인하였다. 인산화된 neurogranin의 경우 WT 및 EBD KO 쥐 모두에서 노화가

진행될수록 그 수준이 어느 정도 증가함이 관찰되었으나, 6월령의 EBD KO 쥐에서는 감소된 neurogranin의 발현 양과 비교할 경우 인산화된 neurogranin이 증가해 있음을 알 수 있었다. 이는 PPT1 결핍이 neurogranin의 인산화를 촉진 혹은 탈인산화를 저해하여, neurogranin과 결합하는 calmodulin과의 반응성에 영향을 미칠 수 있으며 이를 통해 NOS, CaMK-II, AC 활성화에도 영향을 줄 것으로 사료된다[13].

WT과 EBD KO 쥐의 태아에서 배양한 neurospheres를 사용하여 western blot 분석을 수행한 결과 neurospheres 내의 neurogranin 수준 및 인산화된 neurogranin의 수준은 앞서 실험결과와 동일한 양상으로 관찰되었다. 이를 통해 배양된 신경세포에서도 *in vivo* 상태와 동일한 현상이 발생하고 있음을 확인하였고, 이를 통해 배양 중인 neurospheres에 직접 산화스트레스 유발 물질 및 항산화제를 투여할 수 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 EBD KO 쥐의 neurospheres에 산화스트레스 유발물질인 H_2O_2 를 처리하였고 24시간 경과 후 대조군에는 항산화제인 NAC를 처리하고 인산화된 neurogranin의 양적 변화를 western blot 분석을 통해 확인한 결과 H_2O_2 를 처리하자 mock control과 비교하여 인산화된 neurogranin의 수준이 증가한 것을 확인하였으며, H_2O_2 를 처리 후 다시 NAC을 투여한 샘플에서는 H_2O_2 만을 처리한 샘플보다 neurogranin의 인산화 정도가 감소되는 결과를 확인하였다. 이는 인산화된 neurogranin의 수준이 세포가 가진 산화스트레스 정도에 의해 변화함을 의미하며, 항산화제에 의한 산화스트레스의 감소를 통해 neurogranin의 기능을 정상적으로 회복시킬 수 있을 것으로 사료되는 바이다.

현재 전 세계적으로 영아형 바덴병에 대한 연구가 활발히 진행 중 이지만 아직까지는 정확한 발병 원인 및 치료법이 밝혀지지 않아 보다 많은 연구가 수행되어야 할 것이라 사료되며, PPT1 결핍 및 기능장애에 의해 야기되는 neurogranin의 정상적인 발현 장애와 인산화된 neurogranin의 과다 존재에 의한 세포 내 이상 기작은 추가 연구를 통해 보다 명확하게 밝혀져야 할 것으로 생각되는 바이다.

요 약

영아형 바덴병은 PPT1 결핍 및 기능장애로 인해 발병하며, 12,500명 당 1명의 발병률을 가진 신경 퇴행 질환이다. 전 세계적으로 수많은 연구가 진행 중 이지만, 아직 명확하게 밝혀진 발병원인 및 치료방법에 대해서는 알려지고 있지 않다. 본 연구에서는 뇌에서 풍부하게 발현되는 neurogranin의 발현수준이 WT과 EBD KO 쥐에서 어떤 변화를 보이는지 확인하기 위해 mRNA, 단백질, 배양된 neurospheres를 이용하여 실험을 수행하였다. real-time PCR을 통한 neurogranin의 발현수준 비교 결과 WT에서는 노화와 무관하게 neurogranin mRNA 수준에 차이가 없었으나, EBD KO 쥐에서는 노화가 진행됨에

따라 neurogranin mRNA 발현수준이 감소하였으며, 뇌에서 추출된 단백질을 이용한 western blot 분석에서도 real-time PCR과 동일한 결과를 확인할 수 있었다. 또한 WT, EBD KO 쥐의 태아로부터 neural stem cell 인 neurospheres를 배양하여 western blot 분석을 수행한 결과 PPT1 결핍에 의해 neurogranin의 정상적인 인산화에 문제가 발생함을 확인하였다. 이러한 결과들을 바탕으로 neurospheres에 산화스트레스 유발 물질인 H₂O₂를 처리하였고, 24시간 경과 후 항산화제인 NAC을 처리하자 H₂O₂를 처리한 시료에서는 mock control인 인산화된 neurogranin에 비해 그 수준이 증가하였으며, H₂O₂ 처리 후 NAC을 투여한 시료의 인산화 수준은 mock control 보다는 높았지만 H₂O₂만을 처리한 시료 수준보다 neurogranin의 인산화 정도가 감소하는 결과를 확인하였다. 이러한 결과들을 통해 PPT1 결핍으로 인해 신경세포 내에 과다하게 인산화된 neurogranin이 존재하며, neurogranin 인산화 정도는 세포가 지닌 산화스트레스 정도에 의해 변화함을 알 수 있었다. 또한 항산화제를 사용하여 세포의 산화스트레스 수준을 감소시킬 경우 neurogranin의 기능을 정상적으로 회복시킬 수 있는 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 호서대학교 2008년도 교내학술연구비 지원으로 수행되었으며(20080128), 이에 감사드립니다.

References

- Ahtiainen, L., J. Kolikova, A. L. Mutka, K. Luiro, M. Gentile, E. Ikonen, L. Khiroug, A. Jalanko, and O. Kopra. 2007. Palmitoyl protein thioesterase 1 (Ppt1)-deficient mouse neurons show alterations in cholesterol metabolism and calcium homeostasis prior to synaptic dysfunction. *Neurobiol. Dis.* **28**, 52-64.
- Dominguez-Gonzalez, I., S. N. Vazquez-Cuesta, A. Algaba, and F. J. Diez-Guerra. 2007. Neurogranin binds to phosphatidic acid and associates to cellular membranes. *Biochem. J.* **404**, 31-43.
- Gupta, P., A. A. Soyombo, A. Atashband, K. E. Wisniewski, J. M. Shelton, J. A. Richardson, R. E. Hammer, and S. L. Hofmann. 2001. Disruption of PPT1 or PPT2 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 13566-13571.
- Hobert, J. A. and G. Dawson. 2006. Neuronal ceroid lipofuscinoses therapeutic strategies: past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta.* **1762**, 945-953.
- Isosomppi, J., J. Vesa, A. Jalanko, and L. Peltonen. 2002. Lysosomal localization of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 protein. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 885-891.
- Jalanko, A., J. Vesa, T. Manninen, C. von Schantz, H. Minye, A. L. Fabritius, T. Salonen, J. Rapola, M. Gentile, O. Kopra, and L. Peltonen. 2005. Mice with Ppt1Deltaex4 mutation replicate the INCL phenotype and show an inflammation-associated loss of interneurons. *Neurobiol. Dis.* **18**, 226-241.
- Kalviainen, R., K. Eriksson, M. Losekoot, I. Sorri, I. Harvima, P. Santavuori, I. Jarvela, T. Autti, R. Vanninen, T. Salmenpera, and O. P. van Diggelen. 2007. Juvenile-onset neuronal ceroid lipofuscinosis with infantile CLN1 mutation and palmitoyl-protein thioesterase deficiency. *Eur. J. Neurol.* **14**, 369-372.
- Kim, S. J., Z. Zhang, E. Hitomi, Y. C. Lee, and A. B. Mukherjee. 2006. Endoplasmic reticulum stress-induced caspase-4 activation mediates apoptosis and neurodegeneration in INCL. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1826-1834.
- Kim, S. J., Z. Zhang, Y. C. Lee, and A. B. Mukherjee. 2006. Palmitoyl-protein thioesterase-1 deficiency leads to the activation of caspase-9 and contributes to rapid neurodegeneration in INCL. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1580-1586.
- Filippo, M. Santorelli, B. Enrico, P. Vittoria, D. C. Matteo, C. Stefano, G. Paolo, and Z. Massimo. 1998. A Novel Insertion Mutation (A¹⁶⁹ⁱ) in the CLN1 Gene Is Associated with Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis in an Italian Patient. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 519-522.
- Kyttala, A., U. Lahtinen, T. Bräulke, and S. L. Hofmann. 2006. Functional biology of the neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL) proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1762**, 920-933.
- Lehtovirta, M., A. Kyttala, E. L. Eskelinen, M. Hess, O. Heinonen, and A. Jalanko. 2001. Palmitoyl protein thioesterase (PPT) localizes into synaptosomes and synaptic vesicles in neurons: implications for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (INCL). *Hum. Mol. Genet.* **10**, 69-75.
- Li, J., C. Yang, S. Han, P. Zu, J. Wu, Q. Xu, and L. Fang. 2006. Increased phosphorylation of neurogranin in the brain of hypoxic preconditioned mice. *Neurosci. Lett.* **391**, 150-153.
- Martinez de Arrieta, C., B. Morte, A. Coloma, and J. Bernal. 1999. The human RC3 gene homolog, NRGN contains a thyroid hormone-responsive element located in the first intron. *Endocrinology* **140**, 335-343.
- Qiao, X., J. Y. Lu, and S. L. Hofmann. 2007. Gene expression profiling in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis reveals upregulation of immediate early genes and mediators of the inflammatory response. *BMC. Neurosci.* **8**, 95.
- Salonen, T., O. Heinonen-Kopra, J. Vesa, and A. Jalanko. 2001. Neuronal trafficking of palmitoyl protein thioesterase provides an excellent model to study the effects of different mutations which cause infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Mol. Cell Neurosci.* **18**, 131-140.
- Salonen, T., I. Jarvela, L. Peltonen, and A. Jalanko. 2000. Detection of eight novel palmitoyl protein thioesterase (PPT) mutations underlying infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (INCL;CLN1). *Hum. Mutat.* **15**, 273-279.
- Watson, J. B., H. Khorasani, A. Persson, K. P. Huang, F. L. Huang, and T. J. O'Dell. 2002. Age-related deficits in long-term potentiation are insensitive to hydrogen peroxide: coincidence with enhanced autophosphorylation of

- Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurosci. Res.* **70**, 298-308.
19. Zhang, J. P., W. Y. Liang, Z. H. Luo, Z. C. Yang, H. C. Chan, and Y. S. Huang. 2007. Involvement of p38 MAP kinase in burn-induced degradation of membrane phospholipids and upregulation of cPLA2 in cardiac myocytes. *Shock* **28**, 86-93.
 20. Zhang, Z., J. D. Butler, S. W. Levin, K. E. Wisniewski, S. S. Brooks, and A. B. Mukherjee. 2001. Lysosomal ceroid depletion by drugs: therapeutic implications for a hereditary neurodegenerative disease of childhood. *Nat. Med.* **7**, 478-484.
 21. Zhang, Z., Y. C. Lee, S. J. Kim, M. S. Choi, P. C. Tsai, A. Saha, H. Wei, Y. Xu, Y. J. Xiao, P. Zhang, A. Heffer, and A. B. Mukherjee. 2007. Production of lysophosphatidylcholine by cPLA2 in the brain of mice lacking PPT1 is a signal for phagocyte infiltration. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 837-847.
 22. Zhang, Z., Y. C. Lee, S. J. Kim, M. S. Choi, P. C. Tsai, Y. Xu, Y. J. Xiao, P. Zhang, A. Heffer, and A. B. Mukherjee. 2006. Palmitoyl-protein thioesterase-1 deficiency mediates the activation of the unfolded protein response and neuronal apoptosis in INCL. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 337-346.