Parkin 단백에 의한 α-Synuclein의 신경 독성 억제 기전

연세대학교 대학원
의과학사업단
김 세 정

Parkin 단백에 의한 α-Synuclein의 신경 독성 억제 기전

지도교수 이 배 환

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원
의과학사업단
김 세 정

김세정의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인
심사위원_____인
심사위원_____인

연세대학교 대학원
2002년 6월 일

감사의 글

먼저 여러 가지로 부족한 저에게 배움의 길을 열어주시고, 연구의 즐거움을 깨우쳐주신 정광철 교수님께 크나큰 감사를 드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 논문을 완성할 수 있도록 많은 도움을 주신 이배환 교수님, 저에게 훌륭한 교수님들과 좋은 동료들과 인연을 맺게 해 주시고 배려해주신 안영수 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 약리학 교실의 여러 교수님들께 옆에서 묵묵히 많은 가르침 주신 것에 감사를 드립니다. 대학원을 입학하여 제 연구의 첫 걸음을 잘 보살펴준 은진언니, 지영언니, 영규오빠, 대학원 생활의 큰 힘이 되어준 정범오빠, 재은 그리고 동기 경하에게도 마음깊이 고마움을 전하고 싶습니다. 힘들고 지칠 때마다 위안과 격려를 아끼지 않았던 너무나도 사랑하는 좋은 친구들 수인, 정민, 지화를 비롯한 95동기와 항상 옆에서 묵묵히 응원을 아끼지 않은 익제, 성래오빠에게도 진심으로 고마움을 전합니다. 또한 2년간 약리학교실에 있는 동안 많은 관심과 충고를 아끼지 않았던 서울오빠, 우인오빠, 진우오빠, 인숙언니, 주영언니에게도 감사함을 드리고 그밖에 서면으로 고마움을 표시하지 못한 여러분들께 감사드립니다. 마지막으로, 항상 저를 위해 쉼없이 기도하시는 할머니, 외할머니, 부족한 조카를 늘 걱정해주신 친척분들께도 진심으로 감사드리며, 끝까지 저를 믿어주시고 헌신적인 성원을 보내주신 사랑하는 나의 어머니, 아버지께 그리고 동생 세진, 필석에게 감사의 마음을 전하며 이 작은 결실을 바칩니다.

2002. 6. 김 세 정 씀

목 차

국문요약 ····· 1

Ⅰ. 서 론 ····· 3

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 8

1. 쥐 해마 신경 세포 배양과 transfection ····· 8
2. 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 parkin 유전자 재조합 ····· 8
3. 면역침전과 Western blot 분석 ····· 9
4. MTT 방법을 이용한 세포 생존율 측정 ····· 10
5. GFP-based reporter를 이용한 proteasome 활성도 측정 ····· 11
6. Suc-LLVY-AMC를 기질로 이용한 효소 활성 측정 ····· 12

Ⅲ. 결 과 ····· 13

1. parkin 재조합 유전자의 세포내 발현 ····· 13
2. α-synuclein과 parkin의 세포내 결합 ····· 14
3. α-synuclein과 결합하는 parin 단백의 도메인 분석 ····· 16
4. 세포내 parkin의 α-synuclein에 의한 세포사멸 조절 효과 ····· 18
5. 세포내 proteasome에 대한 parkin의 효과 ····· 20
6. parkin의 α-synuclein에 의한 세포사멸 조절에 미치는 proteasome 효과 ····· 23
7. parkin에 의해 활성화되는 세포내 단백 분해 기전 ····· 24
8. Suc-LLVY-AMC 기질을 이용한 calpain 효소 활성도 측정 ····· 26
9. parkin의 α-synuclein에 의한 세포사멸 조절에 미치는 calpain의 효과 ····· 28

Ⅳ. 고 찰 ····· 30

Ⅴ. 결 론 ····· 36

참고문헌 ····· 37

영문요약 ····· 41

그림 차례

그림 1. parkin에 의한 ubiquitination경로와 AR-JP의 병인 기전 모델 ···· 7
그림 2. 해마 신경세포내 parkin 플라스미드 발현 확인 ····· 14
그림 3. 해마신경세포내 parkin과 α-synuclein과의 결합 분석 ····· 15
그림 4. parkin 단백 야생형과 각각의 도메인별 parkin 돌연변이 플라스미드 ····· 17
그림 5. parkin 야생형과 각각의 도메인별 돌연변이 플라스미드의 해마 신경세포내 발현 확인 ····· 17
그림 6. 해마신경세포내 α-synuclein과 결합하는 parkin 단백의 도메인 분석 ····· 18
그림 7. α-synuclein에 의해 유도되는 세포사멸시, parkin의 세포사멸 조절 효과 ····· 20
그림 8. GFP based reporter를 이용한 해마신경세포의 proteasome 기능에 미치는 parkin 단백의 효과 ····· 22
그림 9. parkin의 α-synuclein에 의한 세포사멸 조절에 미치는 proteasome 효과 검색 ····· 24
그림10. parkin에 의해 유도되는 protease 활성으로 인한 Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)의 절단 양상 ····· 26
그림11. Suc-LLVY-AMC 기질을 이용한 parkin 단백에 의한 calpain 효소 활성도 측정 ····· 27
그림12. parkin의 α-synuclein에 의한 세포사멸 조절에 미치는 calpain의 효과 ····· 29

표 차례

표 1. 가족성 파킨슨병과 병인 유전자 ····· 5

국문요약

Parkin 단백에 의한 α-Synuclein의 신경 독성 억제 기전

Autosomal recessive juvenile parkinsonism (AR-JP)은 흑색질내의 도파민성 뉴론의 소실을 특징으로 하는 유전성 파킨슨병의 하나이다. AR-JP에 관계하는 병인 유전자로 최근 규명된 parkin은 proteasome을 통한 단백 대사과정 중 접합효소인 E2와 세포내에서 결합하는 ubiquitin-protein 연결효소 E3 활성도를 가지고 있음이 밝혀졌다. α-synuclein은 파킨슨병 병인 유전자의 하나로서, 정상적인 시냅스 발달과 형성에 관여하는 시냅스전 단백 (presynaptic protein)이지만 세포내 생리학적 기능에 대해서는 자세히 알려진 바 없다. 본 연구에서는 파킨슨 병인 유전자인 parkin과 α-synuclein의 관계를 검색해 보기위해 먼저 태아 흰쥐의 해마에서 유래된 신경선조 세포주 H19-7 내에서 두 단백이 선택적으로 결합하는지를 확인하였다. 세포 외부에서 α-synuclein를 처리한 경우와 세포내 α-synuclein 단백을 과발현시킨 경우 parkin과 선택적으로 결합함을 확인하였다. 이러한 결합이 어떻게 이루어지는지를 알아보기위해 parkin의 다양한 deletion 돌연변이 단백을 이용하여 parkin의 결합 도메인을 확인한 결과 parkin의 아미노산말단 부위의 ubiquitin 유사 도메인에 α-synuclein이 결합함을 관찰하였다. 또한 green fluorescent protein (GFP)-based reporter를 이용하여 parkin 단백이 ubiquitin-proteasome 경로에 대한 효과를 시험한 결과 parkin 과발현시 GFP 융합 단백의 분해가 촉진됨을 확인하였다. 이 효과는 proteasome 저해제 처리시에도 나타나 parkin이 해마 신경세포내에서 ubiquitination기능과 독립적으로 proteasome과는 무관한 경로에 의해 일어

나는 단백분해를 촉진시킬 수 있다는 가능성을 보여준다. 또한 parkin이 α-synuclein에 의해 유도되는 세포사멸을 봉쇄함을 확인하였으며, 이러한 효과가 proteasome 저해제 처리에 의해서도 사라지지 않음을 관찰했다. 이것은 parkin이 proteasome 이외의 다른 세포 단백 분해 효소를 활성화시켜 세포사멸을 억제할 수 있다는 선행결과를 뒷받침해준다. parkin 과발현시 나타나는 novel PARP cleavage pattern을 통해 parkin이 의해 cysteine protease 중 하나인 calpain을 활성화시킬 수 있음을 예측하고 Suc-LLVY-AMC을 기질로 이용한 calpain 효소 활성 측정을 통하여 parkin에 의해 calpain이 활성화됨을 확인하였다. 또한 parkin의 α-synuclein에 의해 유도되는 세포사멸 억제효과가 calpain 저해제로 인해 소실됨을 확인하였다. 이는 세포내의 parkin이 calpain효소를 활성화하여, α-synuclein 단백의 분해를 촉진시킴으로 인해 α-synuclein 처리에 의해서 유도되는 해마 신경세포주에서의 세포사멸을 선택적으로 억제함을 보여준다.

핵심되는 말 : 신경계 퇴행성 질환, 해마배양세포, parkin, α-synuclein

parkin 단백에 의한 α-synuclein의 신경 독성 억제 기전

< 지도교수 이 배 환 >

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 세 정

Ⅰ. 서 론

파킨슨병은 흔하게 발생하는 신경계 퇴행성 질환의 하나로서 휴식시 사지를 떠는 휴지기 진전증, 근육경직으로 표정이 없어지고 가면모양의 얼굴이 되는 가면상 얼굴, 몸 동작이 느려지는 운동 완서와 보행장애 등 특징적인 이상을 보이는 대표적 운동 장애질환이다.[1] 병리학적으로 파킨슨병은 세포질내의 루이소체 (Lewy body)를 특징으로 하는 흑색질내 도파민성 뉴론의 소실을 보인다.[2-6] 신경계 퇴행과 루이소체는 청반 (locus ceruleus), 시상하부 (hypothalamus), 대뇌피질 (cerebral cortex), 뇌신경 (cranial nerve), 운동핵 (motor nuclei), 자율신경계의 중추, 말초에서 관찰된다.[1] 많은 연구에도 불구하고 파킨슨병은 아직 명확한 병인이 규명되어 있지 않은 실정이다. 현재 파킨슨병을 유발시키는 원인으로는 환경적 요인과 유전적 요인 크게 두가지로 분류되고 있다.[1] 환경적으로 여러 인자들이 파킨슨병을 유발시킬 수 있는 위험도를 증가시키고 있는데, 살충제나 제초제, 산업화합물 등이 여기 포함된다. 또한 원인 물질로서 일산화탄소, 황화탄소, 유기용매, 중금속같은 외인성 독소와 tetrahydroquinoline과 같은 내인성 독소에 많은 관심이 집중되고 있다. 파킨슨 질병을 일으키는 환경적 요인의 대

표적 증거로는 meperidine 유도체 합성 부산물인 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)가 있다. MPTP를 복용한 약물 남용자는 임상적으로나 병리학적으로 파킨슨병과 매우 유사한 증상이 나타남이 보고되었다. MPTP는 생체내 대사를 통하여 MPP+로 전환되어 도파민성 뉴론에 흡수되어 파킨슨병과 유사한 미토콘드리아 복합체 I 의 결손을 야기한다. 이러한 환경적 요인이 파킨슨병을 유발시킬 수 있다는 가능성을 제시하지만, 지금까지 파킨슨 환자에게서 MPTP와 유사한 인자는 밝혀지지 않고 있다.

파킨슨 환자의 약 5~10%가 상염색체 우성 유전형태의 가족성 파킨슨병을 보여 파킨슨 병인론에 있어 유전적 요인이 중요함을 보이고 있다.[5-6] 최근 몇 년 동안 가족성 파킨슨병이 세가지 유전자의 돌연변이와 관련되어 있다고 보고되어 파킨슨병의 병인론과 유전적 인자와의 관계에 대한 관심이 커지고 있다(표 1). 1997년 α-synuclein 유전자가 가족성 파킨슨병을 일으키는 단일 유전자로 처음 밝혀졌으며, 루이소체의 주요 구성 성분이며 또한 α-synuclein에서 나타나는 두가지 형태의 돌연변이 A30P, A53T은 상염색체 우성으로 유전되는 파킨슨병을 유발한다고 보고된 바 있다. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1)은 뇌에 다량으로 존재하는 단백으로 중합체 형태의 ubiquitin을 단량체 형태로 잘라주는 deubiquitinating 효소의 하나로서 ubiquitin-proteasome 체계에 밀접하게 관계한다. UCH-L1의 돌연변이는 proteasome을 통한 정상적인 단백분해에 장애를 일으키게 되고 이러한 현상이 파킨슨병 유발 기전과 연관되어 있다고 알려져 왔다.[7-9]

표 1. 가족성 파킨슨병과 병인 유전자

Pattern	LB	Chromosome	Gene
AD	Positive	4q21-23	α-synuclein
AD	Unknown	4P14.1-15.1	UCH-L1
AR	Negative	6q25.2-q27	parkin

AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive

Parkin은 α-synuclein, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-L1과 더불어 가족성 파킨슨에 관계하는 병인 유전자로서, 1998년 일본에서 상염색체 열성 유전 가족성 파킨슨병 (Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism; AR-JP)을 유발하는 유전자 돌연변이 분석을 통하여 알려지게 되었다.[10-12] 상염색체 열성 유전 가족성 파킨슨병은 전형적인 파킨슨병과 달리 발병 평균 연령이 26.1세로 비교적 이르게 증상을 보이며, 전체적인 증상이 전형적인 파킨슨병에 비해 경미하며, 병리학적으로 루이소체를 보이지 않는 특징을 갖는다.[3,13] Parkin은 12개의 exon으로 이루어진 약 1.4 kb의 유전자로 52 kDa의 분자량을 가진 465개 아미노산을 암호화한다.[14] Parkin 유전자는 아미노산 말단에는 ubiquitin과 유사한 domain을, 카르복실 말단에는 ring finger motif를 가지고 있다.[2] Ubiquitin system 과 파킨슨병과의 관련성은 앞서 언급한 UCH-L1와 α-synuclein의 병리학적 분석을 통해 제시되었다. UCH-L1의 돌연변이는 상 염색체 우성 유전형태의 가족성 파킨슨병을 일으키고, 루이소체의 주요 성분인 α-synuclein은 ubiquitination 되어 26S proteasome에 의해 분해되고 돌연변이에 의해 분해속도가 느려진다고 보고되었다.[15] Proteasome은 세포주기 진행, 세포내 신호전달, 분화, 세포 사멸과 같은 생명유지 현상을 조절하는 여러 단백질의 분해를 담당한다.[16] 또한 폴딩 오류(misfolding)나 비정상 단백들을 제거하는 데 참여하게

된다.[17,18] 세포내 단백분해는 lysozyme, proteasome 등에 의해서 이루어지는데 proteasome은 ubiquitination된 단백을 분해대상으로 인식하여 분해한다. Ubiquitination 되는 과정은 일련의 연속적인 효소 반응에 의해 일어나게 된다. Ubiquitin 활성화 단백 (E1), ubiquitin 접합효소 (E2), ubiquitin-protein 연결효소 (E3) 반응에 의해 기질단백이 ubiquitination되어 proteasome을 통하여 분해된다.[19,20] Parkin 단백의 카르복실 말단의 2개의 ring finger motif는 주로 E2와 결합하는 부위로 알려져있다.[21-27] 이런 부위의 존재로 parkin이 E2와 결합하는 E3 효소일 것이라는 가능성이 제기되었고, 2000년 Shimura 등은 parkin 단백이 proteasome을 경유하여 분해되는 단백질의 ubiquitination에 관여하는 효소 가운데 ubiquitin-protein ligase (E3)로 작용한다고 보고하였다.[2,19,28-30] 이를 바탕으로 이들 연구자들은 parkin 단백의 돌연변이로 인해 proteasome을 경유하는 기질단백 분해의 장애로 인해 파킨슨병이 유발될 것이라고 제안하였다 (그림 1). Parkin이 ubiquitin-protein 연결효소 (E3)로서, 세포내 기질 단백의 필수요소임이 밝혀졌지만 아직까지 신경세포내에서의 역할 및 세포사멸에서의 조절기능에 대해서는 명확하게 밝혀져 있지 않은 실정이다. 또한 신경세포내에서 parkin의 기질 단백을 밝힐 수 있다면, 파킨슨병의 병인기전을 이해할 수 있는 큰 실마리가 될 것으로 생각된다. 본 연구는 쥐의 해마 배양세포내에서 parkin 단백의 역할 및 활성화 기전을 밝히고, 이것이 파킨슨병을 일으키는 다른 병인 유전자인 α-synuclein과 세포 내에서 어떤 관계에 있는지 규명하고자 하였다.

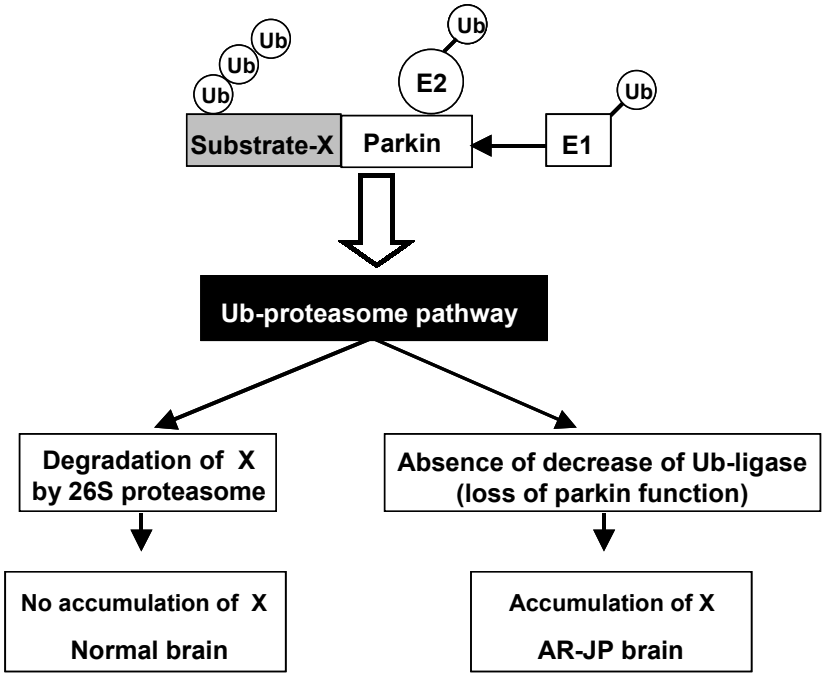

그림 1. Parkin에 의한 ubiquitination경로와 AR-JP의 병인 기전 모델

Ub, ubiquitin; E1, Ub-activating enzyme; E2, Ub-conjugating enzyme이며, parkin은 E3 (Ubiquitin-ligase)의 하나로 작용한다. Substrate-X는 parkin이 인식할 수 있는 기질단백이며, AR-JP는 autosomal recessive juvenile parkin-sonism을 뜻한다. Hattori는 세포내 parkin단백이 substrate-X를 ubiquitination 시켜 proteasome을 통한 기질단백의 정상적 분해가 이루어지도록 하지만, parkin 유전자가 돌연변이되어 정상적인 parkin 단백이 생성되지 않는다면 기질단백의 분해가 이루어지지 않아 뇌에 축적될 것이고, 축적된 단백질이 AR-JP를 일으킬 수 있을 것이라는 모델을 제시하고 있다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 쥐 해마 신경 세포 배양과 transfection

흰쥐의 태아에서 유래된 해마신경배양 세포주 (H19-7)[31]는 33℃에서 기능적으로 활성이 유지되고 39℃에서는 활성이 억제되는 온도에 민감한 SV-40 T antigen을 발현하는 retroviral vector를 세포 내 transduction함으로써 만들었다. H19-7 세포주는 T-antigen 기능이 활성화되는 33℃에서는 EGF에 대해 반응하여 성장하며, T-antigen 기능이 비활성화되는 39℃에서는 FGF에 대해 반응하여 분화하는 특성을 갖는다. 분화하지 않고 분열 성장하는 세포는 10% FBS와 50 μM/ml streptomycin, 50 U/ml penicilin을 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)에 200 μg/ml geneticin (Life Technologies Inc. Grand Island, NY, USA)을 selective antibiotics로 사용하였다. 세포를 분화시키기 위해서는 2 mM의 glutamine이 포함된 N_2 배지에 48시간 배양하여 준 후 10 ng/ml의 bFGF를 처리해준다.[32] Transfection은 LipofecAMINE reagent (Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)를 이용하여 제공된 사용법에 따라 수행하였다. 48시간 후 transfection한 단백에 대한 assay를 실시하였다.

2. 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 parkin 유전자 재조합

마우스의 도파민성 신경세포에서 trizol reagent (Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA 5 μg에 random hexamer 0.1 μg, 10mM dNTP 1 μl, RNasin 1 μl, 0.1 M

DTT, 20 U RNase H-reverse transcriptase (Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 42℃에서 2시간동안 역전사 반응법으로 first strand cDNA를 합성하였다. Parkin 단백을 암호화하는 서열을 포함하는 유전자 부위를 5′-EcoRI 과 3′-XhoI 의 제한효소 염기서열이 도입된 primer (5′-CGGGAATTCATGATAGTGTTTGTCAGG-3′, 5′-ATCTCGAGCTACACGTCAAACCAGTGA-3′)와 first strand cDNA 10 μl, 그리고 1 U Tag polymerase로 중합효소 연쇄반응을 시행하여 증폭하였다. 중합효소 연쇄반응은 denaturation 94℃에서 30초 동안, annealing을 55℃에서 1분 동안, extension을 72℃에서 2분 동안, 총 30회 시행하였다. 생성된 중합효소 연쇄반응 산물을 DNA gel elution 방법을 사용하여 분리해낸 후 각각의 제한효소로 처리한 뒤, 해마배양세포내 유전자 발현을 위한 발현벡터인 pcDNA3.1 MycHis(+) (Invitrogen, Groningen, Netherland)에 ligation하였다. 클로닝으로 재조합된 DNA들을 대장균 균주 DH 5α에 transformation하였으며, 적절한 제한효소를 처리하여 확인하였고, 염기서열 분석으로 다시 확인하였다.

3. 면역침전과 Western blot 분석

H19-7 세포주를 배양한 후 phosphate-buffered saline으로 세척하였다. 그 후 1 mM PMSF, 50 μg aprotinin, 50 μM leupeptin, 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4를 첨가한 RIPA lysis buffer로 세포액을 추출하였다. 단백질은 Bradford법을 이용하여 bovine serum albumin을 기준으로 정량하여 동일한 양의 단백질이 포함되게 한 다음 분리해내고자 하는 단백에 대한 항체를 넣어 4℃에서 overnight 반응시키고 10% protein-A bead (Amersham Pharmacia Biotech, UK)를 30 μl 넣어 4℃, 2시간 동안 반응시켰다. 그

후 bead를 RIPA lysis buffer로 충분히 씻어준 후 전기 영동을 위해 sample buffer를 첨가하여 5분간 끓여 loading할 시료를 준비하여 각각의 분리하고자 하는 단백의 분자량에 따라 acrylamide의 농도를 결정하여 SDS-PAGE gel을 만들었다. 시료를 각 well에 loading한 후 전기영동을 실시하고, nitrocellulose membrane에 단백질을 이동시킨다. 5% non-fat dry milk에 1시간동안 반응시켜 비특이적인 단백질의 결합을 배제시킨 후 확인하고자 하는 1차항체를 4℃에서 overnight 반응시킨다. Tris-buffered saline (0.1% tween20)으로 세 번 세척한 후 1차 항체의 유래 종에 따라 발색반응을 일으키는 효소가 부착되어 있는 적절한 2차 항체를 4℃에서 2시간 동안 반응시키고 Tris-buffered saline (0.1% Tween20)으로 세 번 세척하였다. 발색반응은 enhanced chemiluminoscence kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK)을 이용한 후, X-ray 필름에 노출하여 확인하였다. Myc 항체와 Poly (ADP-ribose) polymerase 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, α-synuclein 항체는 BD Biosciences (Circle Palo Alto, CA, USA)에서 구입하였다.

4. MTT 방법을 이용한 세포 생존율 측정

24-well culture plate에 H19-7 세포주를 plating 하고 실험군에 따라 α-synuclein과 parkin을 각각 transfection하였다. DMEM을 N_2 배지로 교체한 후 24시간 반응시키고 세포 생존율 측정을 위해 MTT 추출방법을 수행하였다.[33] 62.5 μl의 5 mg/ml 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, St. Louis, MO, USA) stock solution을 250 μl의 세포 배양액을 포함하는 24 well plate에 각각 첨가하여 2시간, 37℃에서 incubation한 후, 20% sodium dodecyl sulfate 와 50%

N,N-dimethyl formamide가 함유된 extraction buffer 250 μl를 첨가하여 formazan을 37℃, 20시간 이상 용해시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 최고 흡광도를 측정하여 세포 생존률을 구하였다.

5. GFP-based reporter를 이용한 proteasome 활성도 측정

Dantuma 등[34]에 의해 2000년에 보고된 방법으로 살아있는 세포의 ubiquitin/proteasome dependent proteolysis을 정량화 할 수 있는 GFP-reporter system을 이용, 해마세포주의 proteasome 활성도를 측정했다. 이 방법은 해파리의 GFP를 ubiquitin-proteasome에 의존하는 단백질 분해 경로를 위한 기질로 변환시킨 것으로 Ub^{G76V}GFP는 살아있는 세포내의 ubiquitin-proteasome 경로의 활성도를 조사하기 위한 도구로 사용할 수 있다. Ub^{G76V}GFP는 발현시 정상적으로 세포내에서 빠르게 분해되어 형광을 확인할 수 없지만, proteasome을 봉쇄하는 저해제를 처리한 양성 대조군의 경우, 시간에 따라 분해되지 않고 축적되는 GFP의 형광을 확인할 수 있다. proteasome 활성도는 형광현미경을 통하여 형광을 시각화하였으며, 형광 정도를 정량화하여 비교하였다. GFP-reporter와 parkin을 해마 배양세포에 transfection하여 GFP의 형광을 관찰하여 parkin이 proteasome activity에 미치는 효과를 측정하였다. Proteasome 저해제로 사용한 MG 132와 clasto-Lactacystin β-lactone 는 Biomol Research Labs (Plymouth meeting, PA, USA)에서 구입하였다.

6. Suc-LLVY-AMC를 기질로 이용한 효소 활성도 측정

해마배양세포내 calpain 효소 활성을 확인하고자, N-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin (Suc-LLVY-AMC) (Biomol Research Labs., Inc., PA, USA)를 기질로 사용한 calpain 효소활성 측정법[35]을 수행하였다. Calpain의 효소활성은 80 μM Suc-LLVY-AMC를 기질로 세포내에 처리하여 33℃에서 배양하였다. 시간의 경과에 따라 효소 반응에 따라 잘려지는 산물인 유리된 AMC (7-amino-4-methylcoumarin)는 spectrofluorometer를 사용하여 흡광도 λ_{EX}=380/λ_{EM}460에서 측정하여, 효소활성도를 관찰하였다. Calpain 억제를 위한 저해제 calpeptin은 Calbiochem (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

Ⅲ. 결 과

1. Parkin 재조합 유전자 transfection을 통한 해마배양세포내 발현 확인

Parkin mRNA는 다양한 발생단계의 뇌에서 발현되는 것으로 알려져 있으며, 마우스의 경우 배아 15일째부터 발현되기 시작하여 중추신경계의 발달과 평행하게 태생기 (fetal life)의 마지막 단계까지 발현 양이 점점 증가하는 것으로 보고되었다.[14] 우선 본 연구의 모델 세포주인 해마 신경세포주에서 parkin 단백이 발현되는지를 검색하였다. 33℃에서 H19-7 세포주를 배양한 후 세포를 lysis buffer를 이용하여 세포내 단백질을 추출하였다. 10% SDS-PAGE gel로 전기영동을 실시하고, parkin 항체를 이용하여 Western blot을 실시하여 발현여부를 시험하였다. 50 kDa 의 marker 단백을 기준으로 50 kDa과 52 kDa의 분자량으로 보이는 두 개의 band를 확인할 수 있었는데 50 kDa으로 추정되는 단백은 미규명된 상태이며, 52 kDa의 분자량으로 확인되는 parkin 단백이 H19-7 세포주에서 내재적으로 발현되고 있음을 확인하였다. 또한 parkin 단백의 생리적 기능 규명을 목적으로 epitope Myc peptide가 들어있는 mammalian expression vector에 parkin 유전자를 클로닝하고자 하였다. Parkin 단백을 암호화하는 서열(coding sequence)을 마우스의 도파민성 신경세포에서 역전사 중합효소 연쇄반응법으로 증폭한 뒤, 해마배양세포내 단백질 발현을 위하여 pcDNA3.1 *myc*・*His*(+)에 클로닝하였다. 클로닝된 유전자를 해마배양세포내에 transfection하여 48시간 동안 33℃에서 배양한 다음 lysis buffer를 이용하여 세포내 단백질을 추출해내었다. parkin 유전자를 transfection하지 않은 대조군과 함께 Bradford법을 이용하여 동일양의 단백질을 10% SDS-PAGE gel에서 전기영동하였다. Western blot에 의한 parkin 단백의

발현 확인은 parkin 재조합 유전자의 카르복실 말단에 부착된 Myc 단백을 탐지하는 항체를 이용하였는데 실험결과, 52 kDa의 재조합 parkin 단백의 발현을 확인할 수 있었다 (그림 2).

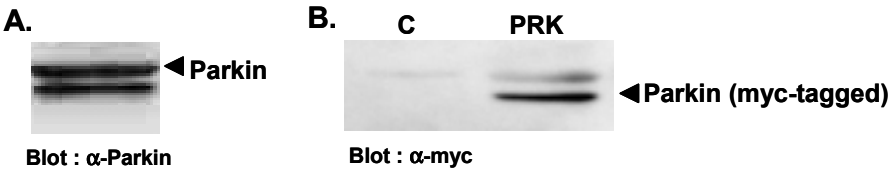

그림 2. 해마 신경세포내 parkin 발현 확인 A. 해마신경 H19-7 세포를 lysis buffer를 이용하여 세포내 단백을 준비한 후 10% SDS-PAGE gel로 전기영동시키고, anti-parkin antibody를 사용하여 Western blot 분석을 실시하여, 분자량 52 kDa의 내재성 parkin 단백의 발현을 확인하였다. B. 도파민성 신경세포에서 역전사 중합효소 연쇄반응을 통하여 얻은 cDNA를 pcDNA3.1 myc · his(+)에 클로닝한 후, 해마신경세포에 transfection하여 48시간 후 세포 부유액을 얻어 대조군과 함께 동일양의 단백질을 10% SDS-PAGE gel에 부하하여 전기영동 시킨다음, transfer하였다. Western blot 분석은 vector에 tagging되어 있는 anti-Myc antibody를 사용하였다. Transfection 하지않은 대조군 (C)과 비교하였을 때 분자량 52kDa으로 추정되는 parkin (PRK) 단백이 발현됨을 확인할 수 있었다.

2. 해마 신경세포내 α-synuclein과 parkin과의 결합 확인

가족성 파킨슨병의 유전적 인자로 알려진 α-synuclein과 parkin의 관계를 검색해보고자 두 단백이 해마신경세포 내에서 결합하는지 여부를 확인하였다. H19-7 세포주에서 α-synuclein을 세포의 외부에서 처리한 경우 Rab5A 단백에 의존적인 endocytosis에 의해 세포내로 수송됨이 확인되었다.[33] H19-7 세포 배양액에 10 μM bacterial recombinant α-synuclein 단백을 1시간 동안 처리한 후 세포 단백 부유액을 얻어 parkin 항체로 면역

침전을 시행한 후, α-synuclein 항체를 이용한 Western blot 분석을 통해 약 19 kDa의 α-synuclein을 확인하였다 (그림 3A). 이는 H19-7 세포의 외부에 처리한 α-synuclein이 세포내로 endocytosis를 통하여 수송된 후 세포내 내재적으로 존재하는 parkin 단백과 결함함을 보여주는 것이다. 또한 α-synuclein 단백을 세포내에서 발현시킬 수 있는 플라스미드와 M*yc* epitope이 부착되고 parkin 단백을 발현하는 플라스미드를 세포내에 co-transfection하여 함께 과발현시킨 후 parkin 단백을 침전시킬 수 있는 M*yc* 항체로 면역침전을 시행한 후 α-synuclein 항체로 Western blot 분석을 시행해보니, 위의 결과와 동일하게 세포내에서 과발현시킨 α-synuclein 단백과 parkin 단백이 해마신경세포에서 선택적으로 결합함을 확인할 수 있었다 (그림 3B).

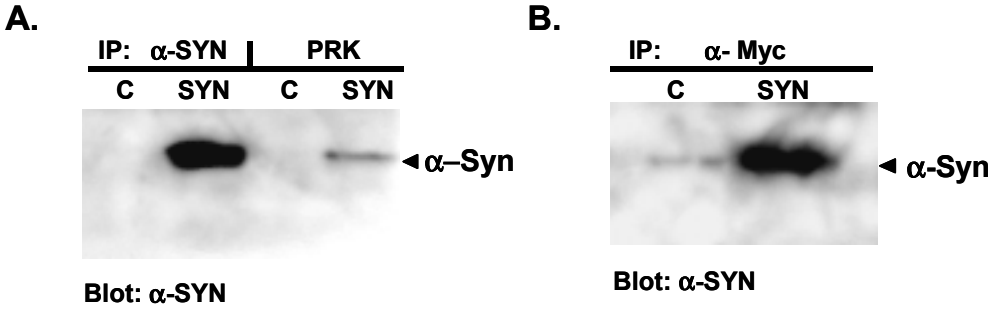

그림 3. 해마 신경세포내 parkin과 α-synuclein과의 결합 분석 A. 외부에서 α-synuclein을 처리한 후, 세포 부유액을 얻어 parkin 항체로 면역침전을 시행한 후, α-synuclein 항체로 Western blotting을 시행하여 parkin(PRK)과 α-synuclein(α-Syn)이 결합함을 확인하였다. B. 세포내에 α-synuclein과 c-Myc epitope이 부착된 parkin을 과발현시킨 후, 세포 부유액으로부터 c-Myc 항체로 면역침전을 시행한 후, α-synuclein 항체로 parkin과 α-synuclein이 서로 결합함을 확인하였다.

3. α-Synuclein과 결합하는 parkin 단백의 도메인 분석

해마 신경세포에서 parkin과 선택적으로 결합하는 α-synuclein이 parkin 단백의 어느 domain과 결합하는지 알아보기 위해, parkin 야생형 이외에 도메인 별 다양한 deletion 돌연변이 발현 플라스미드 (그림 4)를 이용하여 우선 발현을 확인하였다. 각각의 도메인별 플라스미드를 해마배양세포에 transfection한 후, 세포 부유액을 SDS-PAGE로 단백질을 분리하여 플라스미드에 tagging 된 Myc peptide에 대한 항체로 Western blot 분석을 통해 각각의 분자량 위치에서 발현됨을 확인하였다 (그림 5). 다음으로 세포에 α-synuclein과 함께 도메인별 플라스미드를 transfection하여 Myc 항체로 면역침전을 수행하였다. 이어서 15% SDS-PAGE를 시행하고, α-synuclein 항체로 Western blotting 분석을 실시하였다. 그림 6에서 보는 바와 같이, parkin 야생형과 카르복실 말단의 ring finger motif가 소실된 Q311X만이 세포내에서 α-synuclein과의 결합을 나타내었을 뿐, 나머지 아미노산 말단의 ubiquitin 유사 도메인이 소실된 parkin은 α-synuclein과의 결합을 관찰할 수 없었다. 이 결과는 parkin과 α-synuclein의 세포내 결합에 있어, parkin 단백의 아미노산 말단부위의 ubiquitin 유사 도메인이 중요한 역할을 수행함을 보여주는 것이다.

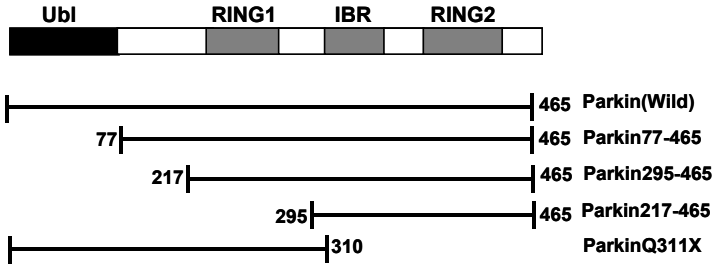

그림 4. Parkin 단백 야생형과 제작된 도메인별 parkin 돌연변이 플라스미드의 지도.

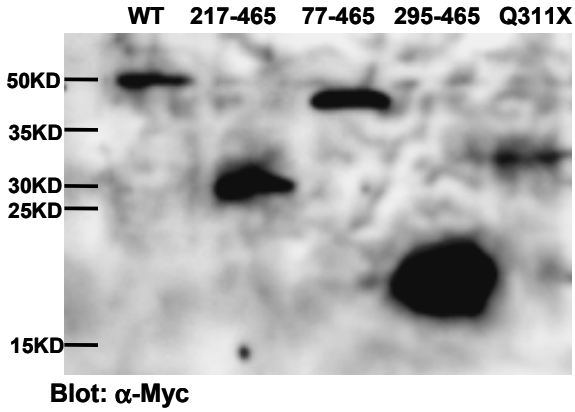

그림 5. Parkin 야생형과 각각의 도메인별 돌연변이 플라스미드의 해마 신경세포내 발현 확인 각각의 플라스미드를 해마신경세포에 transfection하여 48시간 후, 10% SDS-PAGE gel로 전기영동을 실시하고 anti-Myc antibody를 사용하여 Western blot 분석을 수행하였다. 각각의 분자량으로 추정되는 단백의 발현을 확인할 수 있었다.

그림 6. 해마 신경세포내 α-synuclein과 결합하는 parkin 단백의 도메인 분석

α-Synuclein과 야생형 parkin과 더불어 각각의 도메인별 parkin 플라스미드를 세포내에 transfection하고, 48시간 후, 세포 부유액을 얻어 anti-Myc antibody로 면역침전을 수행하고, anti-α-synuclein antibody로 Western blot 분석을 실시하여 결합여부를 확인하였다. Parkin 야생형(WT)과 ring finger motif만 소실된 parkin 단백 (Q311X)은 α-synuclein (α-syn)과 결합하였으며, 아미노산 말단의 ubiquitin 유사 도메인이 소실되어있는 경우 (77-465, 217-465, 295-465)는 α-synuclein과의 결합이 소실되었다.

4. 해마 신경세포내 parkin의 α-synuclein에 의한 세포사멸 조절 여부 검색

선행실험을 통하여 해마신경세포를 혈청배지 배제 후 bFGF로 분화를 유도한 후에 외부에서 정제된 α-synuclein 단백을 처리하고 24시간 경과 후 α-synuclein 30 μM 까지 농도에 의존적으로 세포 사멸이 일어남을 MTT 분석을 통하여 확인하였다. 또한 외부에서 처리한 α-synuclein이 세포내에서 나타내는 독성효과는 α-synuclein이 세포내로 endocytosis되어 세포사멸을 유도하기 때문인데, α-synuclein은 세포내로 신속하게 수송되어 세포내에서 과립형의 α-synuclein aggregate를 형성하며 세포내 ubiquitin, synaptophysin, tau 단백 등과 결합하여 퇴행성 신경계 질환에서 발견되는 루이소체와 유사한 병리적 형태를 나타낸다고 보고하였다.[33]

이로써 α-synuclein 은 해마신경세포에서 세포독성을 나타냄을 증명하였다. Parkin과 상호결합하는 α-synuclein이 결합 후 세포내 대사과정에 어떠한 영향을 미치는지 좀 더 알아보고자 해마 신경세포주에 α-synuclein 및 parkin 플라스미드 각각을 혹은 두개의 플라스미드를 함께 co-transfection하고 48시간 후, MTT 추출방법을 이용하여 세포 생존율을 검색하였다. 그 결과 α-synuclein을 세포 내에서 과발현하였을 경우, α-synuclein을 외부에서 처리하였을 때와 비슷하게 세포독성을 나타내었는데, 세포 생존율 측정결과 대조군에 비해 40%만의 세포 생존율을 보이는 유의적인 세포사멸이 관찰되었다. 흥미롭게도 parkin을 동시에 발현시켰을 경우 α-synuclein에 의한 세포독성이 현저하게 억제되어 세포 생존율이 95%까지 회복되었으며, parkin의 과발현 경우에는 세포 생존률에 큰 영향을 미치지 않음을 관찰할 수 있었다 (그림 7). 본 실험결과를 통해서 해마 세포주에서 parkin 단백의 과발현이 세포 생존율 자체에 영향을 미치지 않았으나, α-synuclein과 같이 발현되었을 때에는 α-synuclein에 의한 세포독성을 선택적으로 봉쇄하여 세포사멸이 거의 일어나지 않음을 확인하였다.

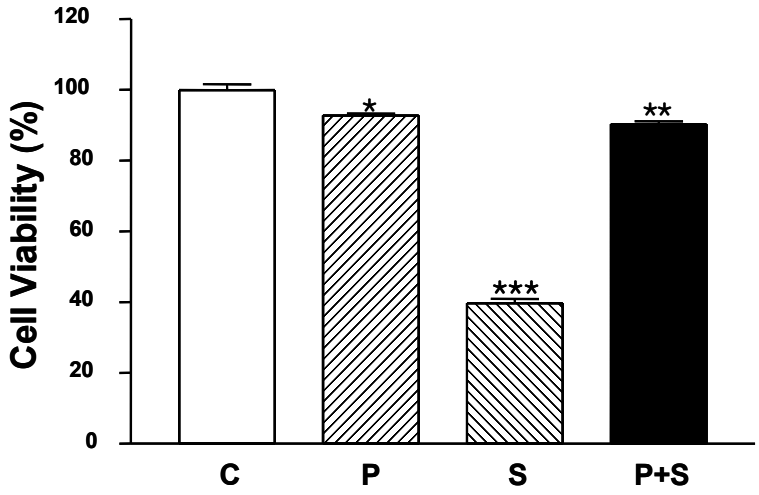

그림 7. α-synuclein에 의해 유도되는 세포사멸시, parkin의 세포사멸 조절 효과

Parkin (P)을 신경 세포에 과발현시키면 세포 생존율에 변화가 없고, α-synuclein (S)에 의해 60%의 세포생존율 감소를 보였으나, parkin과 동시에 발현시켰을 경우 (P+S) 95%로 세포 생존율이 회복되었다. (* $p<0.05$ vs. C, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

5. 세포내 proteasome에 의한 단백 분해에 미치는 parkin 효과 검색

Parkin이 proteasome에 미치는 효과를 알아보기 위해 Dantuma 등[34]에 의해서 이용된 GFP-based reporter를 사용하였다. 이 방법은 해파리의 green fluorescent protein (GFP)를 ubiquitin-proteasome에 의존하는 단백 분해경로를 위한 기질로 변환시킨 것으로 Ub^{G76V}GFP는 살아있는 세포내의 ubiquitin/proteasome 경로의 활성도를 조사하기 위한 도구로 사용할 수 있다. 세포내 ubiquitin/proteasome을 경유하여 GFP가 분해될 경우에는 형광을 확인할 수 없지만, 분해되지 않은 경우에는 형광을 확인할 수 있어, proteasome의 활성도를 관찰할 수 있다. 그림 8에서 보듯이 Ub^{G76V}GFP만을 H19-7 세포주에 transfection하여 세포내 발현시켰을 시 일정한 양의

GFP 형광단백의 발현을 관찰하여, H19-7 세포에서 proteasome이 활성화되고 있음을 보여주며, proteasome 저해제인 clasto-Lactacystin β-lactone 처리하였을 경우, proteasome의 활성도가 억제되어 GFP의 형광이 대조군에 비해 5배이상 축적되는 것을 확인하여 GFP-based reporter 체계가 proteasome의 활성도를 잘 반영할 수 있음을 확인하였다. H19-7 세포주에 Ub^{G76V}GFP와 함께 parkin을 transfection하였을 경우, GFP의 형광이 감소하여 parkin 단백 발현에 의해 proteasome 활성도가 증가하는 결과를 얻을 수 있었으며 이것은 parkin이 기존에 알려진 단백의 ubiquitination을 촉진시켜 결과적으로 proteasome의 활성도를 증가시키거나 아니면 proteasome에 의한 단백분해를 촉진시킬 수 있음을 암시한다. Parkin에 의한 proteasome의 활성화 여부를 확인하기 위해 Ub^{G76V}GFP와 함께 parkin을 transfection한 후, clasto-Lactacystin β-lactone을 처리하여 proteasome을 억제한 후 전체 GFP 단백의 형광정도를 측정한 결과, 흥미롭게도 proteasome의 활성도를 저해한 경우에도 여전히 parkin 단백에 의해 GFP 단백 분해의 촉진을 확인할 수 있었다. 이는 parkin에 의해 일어난 GFP의 분해촉진이 proteasome의 경로와 무관하게 또 다른 단백 분해 기전에 의해 일어날 수 있다는 가능성을 보여준다.

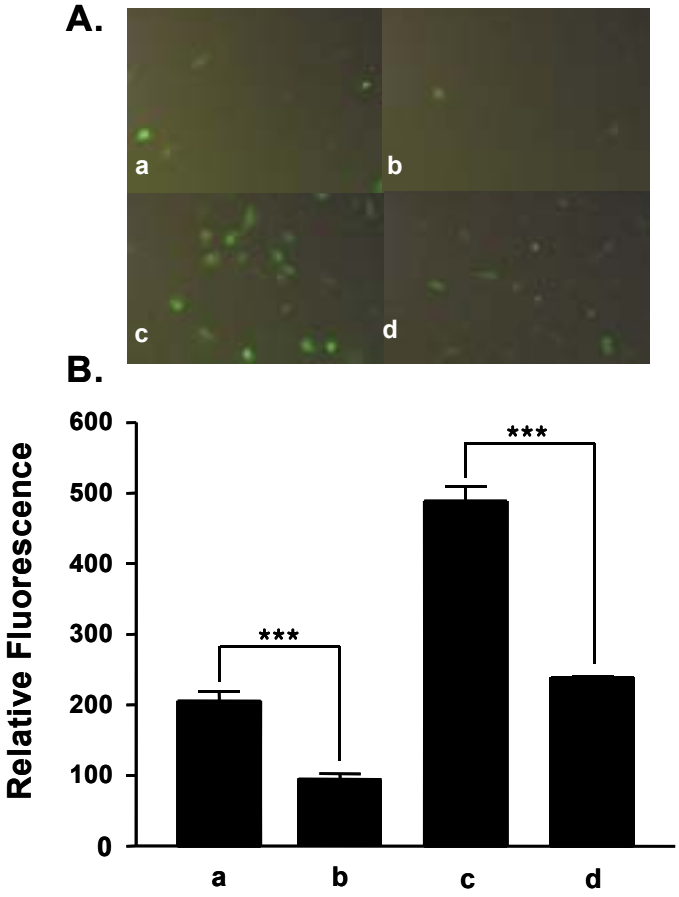

그림 8. GFP based reporter를 이용한 해마 신경세포의 proteasome 기능에 미치는 parkin 단백의 효과 A. Ub^{G76V}GFP만을 transfection한 경우 (a), Ub^{G76V}GFP와 parkin을 transfection한 경우 (b), Ub^{G76V}GFP transfection 한 후, proteasome 억제제 clasto-Lactacystin β-lactone를 처리한 경우 (c), Ub^{G76V}GFP 와 parkin을 transfection한 후, MG 132를 처리한 경우 (d) 정상적인 상태에서 Ub^{G76V}GFP는 빠른 단백 분해 대사를 거치나 proteasome을 봉쇄하였을 경우, 세포내에서 대사되지 않고 축척 되는 것을 단백의 형광발현을 통하여 확인할 수 있었다. 또한 parkin을 과발현하였을 시, Ub^{G76V}GFP 형광 감소로 proteasome의 전반적인 활성도를 parkin이 촉진하는 것처럼 관찰되었으나, lactacystin을 처리하였을 경우에도 형광의 감소를 그대로 보여 Ub^{G76V}GFP 단백의 분해가 proteasome 과 독립적으로 일어날 수 있음을 보였다. B. A그림을 정량 분석 하였다. (*** $p<0.001$)

6. Parkin의 α-synuclein에 의한 세포사멸 조절에 미치는 proteasome 효과 검색

위의 선행 연구 결과를 통하여 parkin은 α-synuclein과 결합하여 α-syn -nuclein 에 의해 유도되는 세포독성을 억제하는데, 이런 세포보호 효과는 parkin이 세포내 α-synuclein의 분해를 촉진함으로써 나타나는 것이라 예측할 수 있다. Parkin은 proteame에 의한 세포내 단백 분해기전에서 ubiquitin-protease 연결효소로 작용하여 세포내 단백 분해에 관여한다고 보고되었다. 이를 바탕으로 proteasome 저해제를 처리하여 proteasome을 봉쇄한 경우 parkin의 α-synuclein에 의해 유도되는 세포보호 효과가 관찰되는지를 시험하였다. α-synuclein과 parkin 발현벡터를 각각 또는 함께 transfection한 후, proteasome 저해제로 10 μM 의 clasto-Lactacystin β -lactone을 처리한 후, 세포 생존율을 MTT 시험을 통하여 측정하였다. 시험결과, α-synuclein에 의해 40%의 세포 생존율의 감소를 확인하였고, parkin을 동시에 과발현시켰을 경우, 다시 세포 생존율이 회복됨을 확인하였다. 이러한 세포보호 효과는 proteasome을 봉쇄하였을 경우에도 세포 생존율에 차이를 나타내지 않았다 (그림 9). 이 결과는 parkin에 의한 α -synuclein에 의해 유도되는 세포사멸 억제 현상이 proteasome 이외의 다른 분해 기전에 의함을 보이는 선행결과와 일치한다.

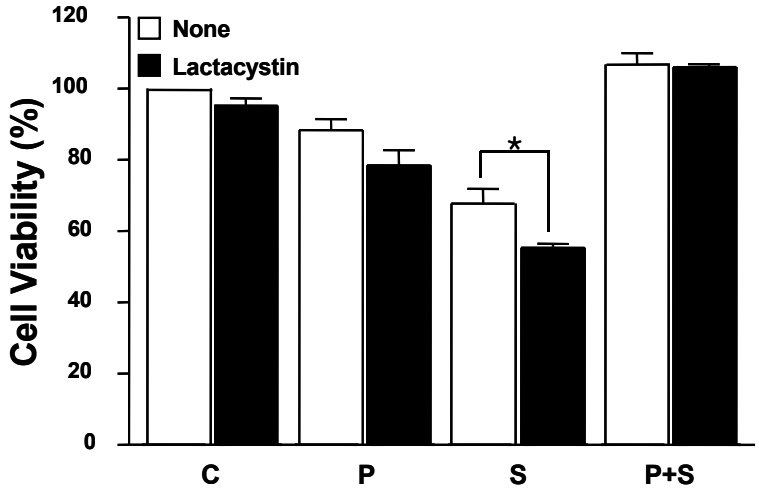

그림 9. Parkin의 α-synuclein에 의한 세포사멸 조절에 미치는 proteasome 효과 검색

H19-7 세포를 각각의 발현벡터를 이용하여 transfection한 후, 10 μM clasto-Lactacystin β-lactone 24시간 동안 처리한 후 MTT assay를 통하여 세포 생존율을 측정하였다. 세포내 α-synuclein (S)을 과발현하였을 시 세포생존율이 60%로 감소하였으며, parkin을 동시에 과발현하였을 경우 (P+S), 세포 생존율이 회복되어 parkin에 의한 세포보호 효과를 보였다. 이러한 결과와 함께 clasto-Lactacystin β-lactone 처리하여 proteasome을 봉쇄하였을 경우에도 세포생존율의 차이를 보이지 않았다. 이로써, α-synuclein에 의해 유도되는 세포사멸시 parkin 단백의 세포사멸 봉쇄효과는 proteasome과 독립적으로 나타남을 암시한다. (* $p<0.05$ vs. None)

7. parkin에 의해 활성화되는 세포내 단백 분해 기전 확인

다음으로 proteasome system 이외에 parkin에 의해 유도될 수 있는 여러 protease 활성화를 검색하고자 하였다. 먼저 세포내 다양한 기질 단백을 분해하는 것으로 알려져있는 caspase 효소 활성이 parkin 단백에 의해 유도되는지 확인하기 위해 기존에 잘 알려져있는 caspase의 세포내 기질인 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)가 parkin의 과발현 후 잘려지는

지를 살펴보았다. Staurosporine은 세포내 caspase를 활성화시켜 116 kDa 크기의 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)를 85 kDa의 단편으로 자르는 것으로 알려져있다. H19-7 세포주에 staurosporine 1 μM을 3시간 동안 처리한 후, 세포 부유액을 얻어 10% SDS-PAGE gel로 전기영동을 실시하고 난 후, PARP 항체를 이용한 Western blot을 실시하여 86 kDa의 단편으로 PARP가 잘림을 확인하였다. 한편 H19-7 세포주에 parkin을 transfection하고 48시간 배양한 후, PARP 항체를 이용하여 caspase 활성화로 인한 85 kDa의 단편이 형성되는지를 확인하였는데, PARP 단백은 85 kDa의 단편으로 잘라지지 않고 32 kDa으로 추정되는 단백 절편을 확인하였다. 이것은 parkin이 caspase의 활성과는 다른 미지의 단백분해효소(protease)의 활성화를 유도하여 나타나는 cleavage pattern이라고 생각된다. PARP가 cysteine protease인 calpain에 의해서 caspase에 의한 절단양상과 다른 단편화 양상을 보여준다는 보고[36]를 바탕으로 calpain 저해제인 calpeptin을 이용하여 parkin 과발현에 의한 PARP의 단편화 양상이 억제되는 지를 시험하였다. parkin 단백을 H19-7 세포주에 transfection하고 48시간 배양한 후 50 μM의 calpeptin을 2시간 처리하였다. 세포를 lysis한 후, 세포부유액을 10% SDS-PAGE gel에서 전기영동한 다음 PARP 항체를 이용하여 Western blotting을 실시하였다. Parkin 단백에 의해 활성화되는 단백분해 효소에 의한 32 kDa 의 단편화 양상이 calpain 효소를 봉쇄하였을 경우 억제되고 116 kDa PARP가 분해되지 않고 대조군과 비슷한 양으로 남아있음을 확인하였다. 이로써 parkin이 해마 신경세포주에서 calpain을 활성화하여 32 kDa의 새로운 PARP 단편화를 유도할 수 있음을 알았다.

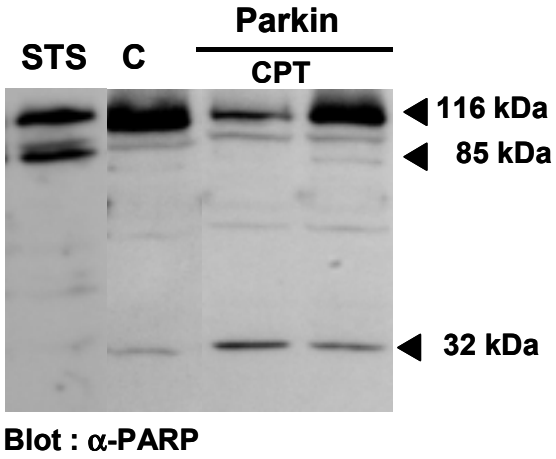

그림 10. Parkin에 의해 유도되는 protease 활성으로 인한 Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)의 절단 양상 Staurosporine (STS) 1μM은 caspase를 활성화시켜 PARP 116 kDa을 85 kDa으로 자르는 전형적인 절단 양상을 보이지만, parkin을 transfection하였을 경우, 알려지지 않은 단편인 32 kDa의 PARP 단편화가 나타난다. 이러한 현상은 50μM calpeptin (CPT)으로 calpain 효소를 봉쇄하였을 경우 억제되는 것으로 보아 parkin이 caspase가 아닌 cysteine protease인 calpain의 활성화를 유도함을 암시한다.

8. 해마 신경세포내 parkin 과발현시 Suc-LLVY-AMC 기질을 이용한 calpain 효소 활성도 측정

Parkin에 의해 활성화되는 protease가 calpain인지를 좀 더 알아보기 위해 parkin 플라스미드를 transfection한 후, 48시간 동안 33℃에서 배양하였다. calpain에 대한 기질로 80 μM Suc-LLVY-AMC(N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin)를 이용하여 세포내에 처리한 다음, 시간에 따라 반응을 정지시키고 기질 분해 산물인 자유 AMC (free 7-amino-4-methylcoumarin)의 양을 spectrofluorometer를 이용하여 정량하였다. 흡광도 λ_{EX}=380nm/λ_{EM}=460nm에서 측정하여, 효소 활성도를 확

인하였다 (그림 11). 그 결과 기질은 처리한 1시간 후에는 대조군과 비교하여 80% 효소 활성도 증가를 확인할 수 있었으며, calpain 저해제인 calpeptin 50 μM을 처리하였을 경우 55% 정도 효소 활성이 억제됨을 확인하였다. 이로써 H19-7 세포주에서 parkin은 세포내 calpain 효소의 활성화를 유도하게 된다는 것을 알 수 있다.

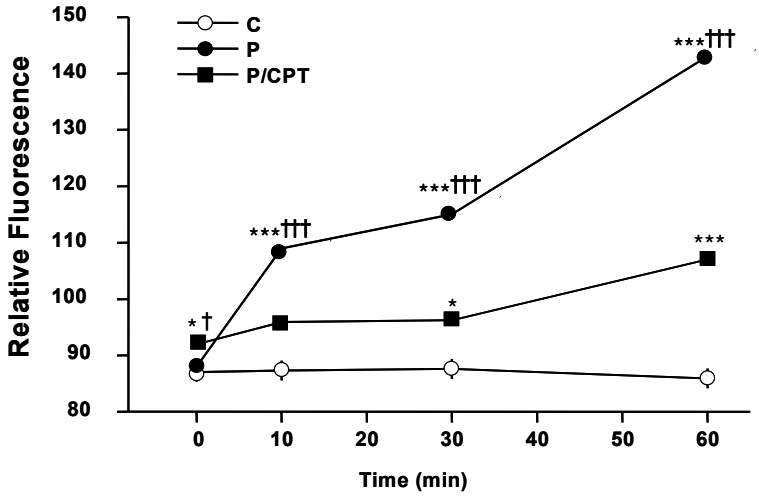

그림 11. Suc-LLVY-AMC 기질을 이용한 parkin 단백에 의한 calpain 효소 활성도 측정

H19-7 cell에 parkin 단백 (P)을 과발현하여, Suc-LLVY-AMC 기질을 사용하여 시간의 경과에 따라 calpain 활성도를 측정하였다. 1시간 경과후, calpain 활성도가 대조군 (C)에 비해 80% 증가하였으며, 이때 calpain의 선택적 저해제인 calpeptin (CPT)에 의해 55%까지 calpain 활성이 억제되었다. (* $p<0.05$ vs. C, *** $p<0.001$, † $p<0.05$ vs. P/CPT, † † † $p<0.001$)

9. Parkin의 α-synuclein에 의한 세포사멸 조절에 미치는 calpain의 효과 검색

Parkin 단백의 과발현으로 유도되는 calpain의 활성화가 결과적으로 세포내 α-synuclein 단백의 분해를 촉진하여 α-synuclein에 의해 유도되는 세포독성에 대한 세포보호 효과를 나타내는지 알아보기 위해서 parkin과 α-synuclein을 co-transfection 한 후, calpain 억제제인 calpeptin 50 μM을 처리하여 parkin의 α-synuclein에서 유도되는 세포 사멸 봉쇄 효과에 대한 변화를 관찰하였다. α-Synuclein 과발현에 의해 세포생존율이 30% 감소한데 반해 parkin을 α-synuclein과 동시에 발현시켰을 경우 대조군과 비교 100% 세포 생존율이 회복되었고 calpeptin을 처리하여 calpain을 억제하였을 경우에는, 세포생존율이 다시 70%로 감소하여 α-synuclein에 의해 유도되는 세포사멸에 대해 parkin 단백의 세포보호 효과가 발휘되지 않았다 (그림 12). 이로써, parkin의 α-synuclein의 세포사멸에 대해 보이는 세포보호 효과는 parkin의 calpain 활성도 증가에 기인함을 알 수 있었다.

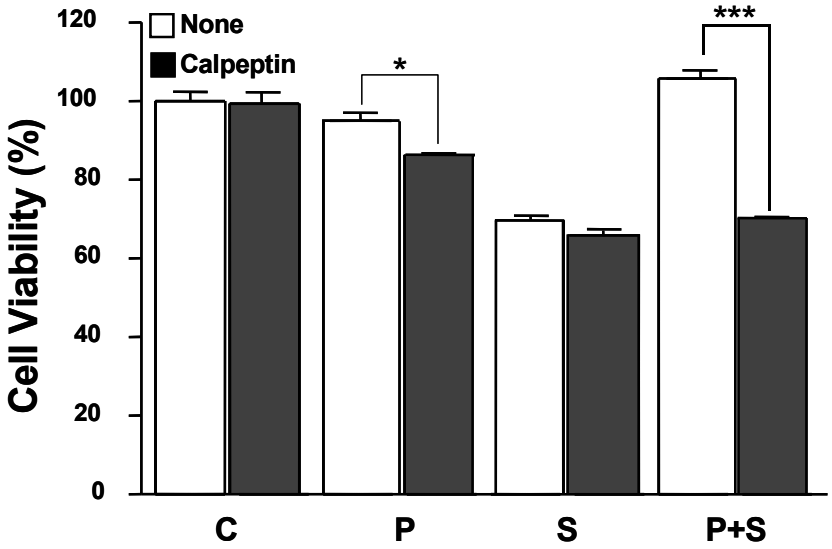

그림 12. Parkin의 α-synuclein에 의한 세포사멸 조절에 미치는 calpain의 효과

해마 신경세포에 대조군 (C), parkin (P)과 α-synuclein (S)플라스미드를 transfection하여 24시간 배양한 후, 50 μM calpeptin을 처리하여 calpain을 억제한 후 MTT exclusion 방법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. calpain 활성을 억제한 결과 parkin에 의한 세포독성 봉쇄 효과가 상실됨을 확인할 수 있었다.

(* $p<0.05$ vs. None, *** $p<0.001$)

Ⅳ. 고 찰

본 연구에서는 해마 신경세포주를 모델로 하여 파킨슨병 유전인자인 α-synuclein과 parkin의 세포내 생리적 역할을 연구하고, 특히 parkin의 α-synuclein에 의해 유도되는 세포사멸 조절기전에 대해 연구함으로써 파킨슨병의 병인론에 새로운 가능성을 제시하고자 하였다. α-Synuclein은 비정형구조 단백질로 중추신경계에 특징적으로 분포하며, 신경가소성에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있으나, 그 생리적 기능에 대해서는 잘 알려져 있지 않고 있다. 가족성 파킨슨병 환자에서 α-synuclein 유전자의 돌연변이가 관찰됨으로써 이 단백질의 구조 및 생리학적 기능과 병리학적 기능에 대해 흥미를 가지게 되었다. 1997년 α-synuclein 유전자가 가족성 파킨슨병을 일으키는 단일 유전자로 밝혀진 후, 파킨슨 병의 중요한 병리학적 현상으로 볼 수 있는 루이소체의 주요 구성성분임이 알려졌다. 이러한 일련의 연구들이 α-synuclein과 퇴행성 신경질환과의 연관성을 보여주지만, 신경계에서 α-synuclein에 대한 역할은 아직까지 명확하게 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 먼저 해마에서 유래한 신경세포주 (H19-7)를 모델로 하여 α-synuclein에 대한 세포 독성을 확인하였다. 현재까지 α-synuclein이 어떠한 기전으로 세포사멸을 일으키는지는 잘 알려져 있지 않으나, α-synuclein의 세포내 침착이 파킨슨병에서 관찰되는 루이소체와 비슷한 소견을 보임을 관찰하였다. 이때 우성열성형태의 파킨슨 증상을 보이는 autosomal recessive juvenile parkinsonism (AR-JP)을 통해 병인 유전자로 밝혀진 parkin을 H19-7 세포주에 동시 발현시켰을 경우 α-synuclein에 의해 일어나는 세포사멸을 억제하는 효과를 나타내었다. 이런 결과를 바탕으로 파킨슨병에 관여하는 이 두 단백의 세포내 생리적 관계를 알아보고자 하였다.

면역침전에 의한 실험결과, α-synuclein은 해마 신경세포내에서 parkin의 아미노산 말단의 ubiquitin 유사 도메인에 의존하여 선택적으로 결합함을 확인할 수 있었으며, 이러한 세포내 결합이 α-synuclein에 의해 유도되는 세포사멸현상을 parkin이 조절할 수 있다는 단서를 얻을 수 있었다. Parkin 단백은 현재 ubiquitin-proteasome 체계에 관여하는 ubiquitin-protein 연결효소 (E3)라 보고되었다. Ubiquitin-proteasome은 세포내에 존재하는 세포내 단백 분해 기전의 하나로서, 세포주기 진행, 신호전달, 분화와 세포사멸과 같은 중추적인 기능에 필요한 여러 단백질의 분해와 관련되어 있다. Proteasome을 통하여 단백의 분해가 이루어지기 위해서는 ubiquitin 중합체가 대상 단백질에 부착되어야 하고, 이러한 일련의 과정에는 연속적인 ubiquitin 활성 효소 (E1), ubiquitin 접합 효소(E2) 와 ubiquitin-protein 연결효소 (E3)의 반응이 요구된다. 이때 parkin은 ubiquitin 접합 효소 (E2)와 결합하는 ubiquitin-protein 연결효소 (E3)로 작용하여, 대상기질의 분해에 관련하게 된다. parkin 유전자의 돌연변이는 ubiquitin-protein 연결효소로서의 기능에 결함을 가지게 되고 이것이 대상기질 분해장애를 동반하여 AR-JP를 유발할 것이라 생각되고 있다. 하지만 parkin 단백에 대한 기질이 밝혀지지 않고 있어, AR-JP의 병인론은 잘 알려져 있지않다. 또한 parkin은 이렇게 proteasome을 경유하는 세포단백 분해 기능과 관련하여 endoplasmic reticulum stress를 유도할 수 있는 폴딩 (folding)되지 않은 세포막 관통 폴리펩티드를 신속하게 분해시켜 세포보호를 발휘한다고 보고된 바 있다.[28-30]

본 실험에서 관찰된 parkin 단백의 α-synuclein에 의해 유도된 세포사멸 봉쇄효과 또한 기존의 보고들과 관련하여, parkin의 ubiquitin-protein 연결효소의 기능을 통하여 세포내 α-synuclein의 분해를 촉진하여 세포사멸을 억제할 것이라 생각하게 되었다. 2000년 Dantuma 등[34]에 의해서 살아

있는 세포내에서 ubiquitin/proteasome 의존적 단백분해를 정량하기 위한 목적으로 green fluorescent protein-based reporter가 개발되었다. 이 system을 이용하여 살아있는 세포내에서 proteasome을 통하여 이 단백이 대사되지 않을 경우에는 형광을 통하여 proteasome 활성도를 측정할 수 있는데, 본 연구에서 이런 GFP-fusion reporter를 이용하여 parkin이 proteasome의 활성화시켜 단백의 분해를 촉진하는지를 시험하였다. GFP-fusion reporter와 함께 parkin을 과발현하였을 때, GFP의 형광이 감소하여, parkin이 proteasome을 활성화시킨다고 생각하였으나, proteasome 저해제를 이용하여 proteasome을 억제하였을 경우에도 GFP 형광의 감소를 관찰하여 parkin이 proteasome과는 독립적으로 세포내 단백 분해기전의 활성화를 유도할 수 있음을 생각하게 되었다.

proteasome 경로 이외에 세포내 단백 분해 효소를 parkin이 활성화할 수 있음을 생각하고, 다양한 protease를 확인해보고자 하였다. 우선 caspase의 활성을 점검해보고자 parkin 과발현시 caspase의 활성화로 인해 잘려지는 기질인 PARP의 절단양상을 확인한 결과, caspase 활성화로 잘려지는 전형적인 PARP의 단편이 아닌 약 30 kDa 크기의 단편이 생성되었다. Pink 등은 caspase 활성화에 의해 유도되는 전형적인 단편화외에도 breast cancer cell인 MCF-7 세포에서는 고농도의 β-Lapachone 처리에 의해 유도되는 세포사멸현상에서 PARP가 전형적인 단편 생성 외에 60 kDa의 PARP 단편 생성을 관찰하였으며, 이러한 PARP의 단편화 양상이 caspase 저해제에 의해 봉쇄되지 않아 caspase가 아닌 또다른 cystein protease인 calpain에 의해 일어날것이라 제시하였다.[37] 또한 in vitro에서 α-synuclein이 칼슘의 농도와 무관하게 calpain에 의해 잘려진다는 보고[38]를 바탕으로 세포내에서 parkin이 calpain 활성을 유도하여 세포내 α-synuclein의 분해를 유도할 수 있음을 추정할 수 있다. 다음으로, parkin

이 calpain을 활성화시키는지 확인하기 위해 기질로 Suc-LLVY-AMC를 이용하여 calpain 활성도를 측정하였다. Parkin 과발현시 calpain 효소 활성이 대조군에 비해 촉진되었으며, 이러한 활성화 유도가 calpain 저해제인 calpeptin에 의해 억제되어, parkin이 세포내에서 calpain을 활성화시킴을 알 수 있었다. 다음으로 세포내의 calpain 활성화가 α-synuclein 단백분해에 직접 관여하는지 알아보기 위해 parkin과 α-synuclein을 co-transfection하고 세포내 분해되지 않고 남아있는 α-synuclein의 양은 현저히 적은데 반하여 calpain 저해제를 처리하였을 경우, 훨씬 더 많은 양의 α-synuclein이 세포내에 축적됨을 관찰하였다.[39] 일련의 실험결과를 바탕으로 parkin이 calpain 효소의 활성도를 증가시켜, 세포내 α-synuclein의 분해를 촉진하게 되고 이것이 α-synuclein에 의한 세포독성을 억제할 수 있음을 알 수 있었다. 이는calpain 저해제를 이용하여 parkin의 α-synuclein에 의해 유도되는 세포 사멸 봉쇄 효과가 상실됨으로 확인하였는데 이로써 해마 신경세포내의α-synuclein에 의한 세포독성 효과에 대한 parkin의 세포보호 효과는 parkin이 calpain 효소의 활성도 증가를 유도하고 활성화된 calpain이 세포내 α-synuclein 분해를 촉진해서 이루어짐을 보여준다.

파킨슨병 환자의 루이소체에서 α-synuclein과 함께 parkin이 공존함이 알려졌으며,α-synuclein 유전자의 단독적인 돌연변이 외에 parkin 유전자의 돌연변이를 동반하는 경우 파킨슨병 환자의 증상이 훨씬 심각함이 보고되어 있다. 이는 본 연구의 결과를 바탕으로, parkin이 calpain 효소 활성화라는 기능을 통하여 α-synuclein 분해에 밀접하게 연관되어있으며, 이를 통해 세포사멸을 조절하여 파킨슨병의 병인론에 관여함을 나타내는 것이라 볼 수 있겠다. 하지만 Selkoe 등[21]은 monomer 형태의 α-synuclein이 아닌 glycosylation된 형태의 22 kDa 크기의 α-synuclein만이 parkin 단백과 결합하며, ubiquitin-protein 연결효소(E3) 활성도를 통해 22 kDa의 α

-synuclein을 ubiquitination 한다고 보고하였다. 또한 상염색체 열성 유전성 파킨슨병 환자의 뇌에서 glycosylation된 형태의 22 kDa의 α-synuclein이 축적되는 반면 modification되지않은 monomer 형태의 α-synuclein의 세포내 양은 대조군과 비교하여 별다른 차이가 없다고 보고하였다.

이런 결과와는 상반되게 본 연구결과에서는 α-synuclein monomer와 야생형 parkin이 결합하는데 이는 본 연구에서 사용한 모델 세포주가 흰쥐 태아의 태생기에서 유래되었고, 아마도 신경계 발달 단계상의 특이적 현상으로 추정할 수 있다. 또한 본 연구에서는 기존에 보고된 parkin 단백의 ubiquitin-protein 연결효소(E3)의 기능외에 proteasome 과 독립적으로 calpain을 활성화시키는 기능을 나타내었다. 임상적으로 상염색체 우성 파킨슨병에서 발견되는 루이소체는 parkin 유전자의 돌연변이로 유발되는 AR-JP에서는 발견되지 않는다고 보고되고 있다. 본 연구결과에서, parkin이 세포내 전반적인 단백 분해기전을 활성화시킨다면, parkin 돌연변이로 인해 분해기전의 장애가 유발되어 루이소체의 생성이 더욱 촉진되어야 할 것으로 예측되나 임상적으로 루이소체가 관찰되지 않는 점은 parkin이 α-synuclein 대상기질에 대해 ubiquitin-protein 연결효소 (E3)로 작용하여 세포내 분해를 촉진하는 것 외에 세포내 α-synuclein을 기질로 인식하는 또다른 ubiquitin-protein 연결효소 (E3)의 존재에 의해 α-synuclein 분해가 촉진될 수 있다는 가능성을 생각하게 한다. 또한 parkin이 세포내 단백분해효소인 granzyme, cathepsin, trypsin, chymotrypsin 등의 활성화를 조절하여 전반적인 세포내 단백 분해를 활성화할 수 있으므로, 앞으로 세포내 여러 단백분해효소에 대한 parkin의 생리적 효과를 검색해 보아야 할 것으로 생각된다. 향후 parkin이 해마신경배양세포에서 어떻게 calpain의 활성화를 조절하는지 그 기전을 밝히고 그 이외 다른 protease의 활성화

기전을 밝힌다면 알쯔하이머, 헌팅턴, 파킨슨병 등의 여러 퇴행성 신경계 질환의 발병기전의 이해, 새로운 치료약제의 개발이나 유전자 치료법의 가능성을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

본 연구에서는 해마 신경세포에서 parkin 단백을 발현시킨 뒤, parkin의 α-synuclein에 의해 유도되는 세포사멸 억제효과의 기전을 연구함으로써, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 해마 신경세포에 α-syuclein을 외부에서 처리하였을 경우와 세포내 과 발현시킨 경우 모두 선택적으로 parkin과 결합과 결합하였으며, 두 단백이 결합하는 도메인을 분석한 결과 parkin 단백의 아미노산 말단의 ubiquitin 유사 도메인이 결합에 중요함을 확인하였다.
2. 해마 신경세포에서 α-synuclein는 세포사멸을 유도하고, parkin은 α-synuclein에 의해 유도된 세포사멸을 봉쇄하였다.
3. Parkin 단백은 proteasome 체계와 독립적으로 세포내 단백 분해를 촉진하였으며, α-synuclein에 의해 유도된 세포사멸을 봉쇄하는 parkin의 효과는 proteasome과 독립적으로 일어났다.
4. Parkin은 알려지지 않은 protease를 활성화시켜 Poly (ADP-ribose) polymerase(PARP)절단을 유도하였으며, 기질을 이용한 calpain 효소 활성도 측정을 통해 parkin이 calpain 효소를 활성화시킴을 알 수 있었다.
5. Calpain을 억제하였을 경우, parkin의 α-synuclein에 의한 세포사멸 효과가 소실되었다.

이상의 결과 parkin 단백은 해마 신경세포내에서 α-synuclein에 의해 유도되는 세포사멸을 억제함을 알 수 있었다. 이는 parkin 단백이 calpain 단백의 효소를 활성화하여, 세포내 α-synuclein 단백 분해를 촉진하여 α-synuclein에 의해 유도되는 신경세포 사멸을 억제하는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of parkinson's disease. Annu Rev Neurosci. 1999;22:123-44.
2. Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, et al. Familial parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. Nat Genet. 2000;25:302-305.
3. Saito M, Maruyama M, Ikeuchi K, Kondo H, Ishikawa A, Yuasa T, et al. Autosomal recessive juvenile parkinsonism. Brain and Development. 2000;22:S115-S117.
4. Hattori N, Shimura H, Kubo S, Kitada T, Wang M, Asakawa S. et al. Autosomal recessive juvenile parkinsonism: A key to understanding nigral degeneration in sporadic Parkinson's disease. Neuropathology. 2000;20:S85-S90.
5. Solano SM, Miller DW, Augood SJ, Young AB, Penny Jr. JB. Expression of α-synuclein, parkin and ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 mRNA in human brain: Genes associated with familial Parkinson's disease. Ann Neurol. 2000;47(2):201-210.
6. Silva HR, Khan NL,Wood NW. The genetics of Parkinson's disease. Current opinion in genetics & development. 2000;10:292-298.
7. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. Nature. 1998;395 (6701):451-452.
8. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science. 1997;276:2045-2047.
9. Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, et al. Epplen JT, Schols L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. Nat Genet. 1998 ;18:106-108.
10. Nussbaum RL. Putting the parkin into Parkinson's. Nature. 1998;392:544-545.

11. Stone M. Jumbo gene offers clue to Parkinson's. Science. 1998;280:203.
12. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature. 1998;392:605-608.
13. Nisipeanu P, Inzelberg R, Mouch SA, Carasso RL, Blumen SC. Zhang J, et al. Parkin gene causing benign autosomal recessive juvenile parkinsonism. Neurology. 2001;56:1573-1575.
14. Kitada T, Asakawa S, Minoshima S, Mizuno Y, Shimizu N. Molecular cloning, gene expression, and identification of a splicing variant of the mouse parkin gene. Mammalian genome. 2000;11:417-421.
15. Bennett MC, Bishop JF, Leng Y, Chock PB, Chase TN, Mouradian MM. Degradation of alpha-synuclein by proteasome. J Biol Chem. 1999;274:33855-33858. 16. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. Annu Rev Biochem. 1998;67:425-479.
17. Finley D, Ozkaynak E, Varshavsky A. The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation,and other stresses. Cell. 1998;48:1035-1046.
18. Heinemeyer W, Kleinschmidt JA, Saidowsky J, Escher C, Wolf DH. Proteinase ysc E, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinases: mutants unravel its function in stress-induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. EMBO J. 1991;10:555-562.
19. Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch M, Trockenbacher A, Schneider R, et al. Ubiquitination of a New form of α-synuclein by parkin from human brain: Implication for Parkinson's disease. Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. Science. 2001;293:263-269.
20. Tanaka K, Suzuki T, Chiba T, Shimura H, Hattori N, Mizuno Y. Parkin is linked to the ubiquitin pathway. J Mol Med. 2001;79:482-94.
21. Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Leverson JD, Hunter T, Liu YC. The

tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. Science. 1999;286:309-12.

22. Xie Y, Varshavsky A. The E2-E3 interaction in the N-end rule pathway: the RING-H2 finger of E3 is required for the synthesis of multiubiquitin chain. EMBO J. 1999;18:6832-6844.
23. Harper JW, Elledge SJ. Skipping into the E2F1-destruction pathway. Nat Cell Biol. 1999;1:E5-7.
24. Deshaies RJ. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. Annu Rev Cell Dev Biol. 1999;15:435-67.
25. Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. Proc Natl Acad Sci. 1999;96:11364-9.
26. Moynihan TP, Ardley HC, Nuber U, Rose SA, Jones PF, Markham AF, et al. The ubiquitin-conjugating enzymes UbcH7 and UbcH8 interact with RING finger/IBR motif-containing domains of HHARI and H7-AP1. J Biol Chem. 1999;274:30963-8.
27. Martinez-Noel G, Niedenthal R, Tamura T, Harbers K. A family of structurally related RING finger proteins interacts specifically with the ubiquitin-conjugating enzyme UbcM4. FEBS Lett. 1999;454:257-61.
28. Imai Y, Soda M, Takahashi R. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. J Biol Chem. 2000;275:35661-4.
29. Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. Cell. 200;105:891-902.
30. Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. Proc Natl Acad Sci. 2000;97:13354-9.

31. Tucker MS, Eves EM, Wainer BH, Rosner MR. Activation of mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor in hippocampal neurons and neuronal cell lines. J Neurochem. 1993;61:1376-87.
32. Eves EM, Skoczylas C, Yoshida K, Alnemri ES, Rosner MR. FGF induces a switch in death receptor pathways in neuronal cells. J Neurosci. 2001;21:4996-5006.
33. Sung JY, Kim J, Paik SR, Park JH, Ahn YS, Chung KC. Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. J Biol Chem. 2001;276:27441-8.
34. Dantuma NP, Lindsten K, Glas R, Jellne M,Masucci MG. Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome dependent proteolysis in living cells. Nat Biotech. 2000;18:538-543.
35. Sasaki T, Kikuchi T, Yumoto N, Yoshimura N, Murachi T. Compatarive specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates. J Biol Chem. 1984;259:12489-12494.
36. Tamada Y, Fukiage C, Nakamura Y, Azuma M, Kim YH, Shearer TR. Evidence for apoptosis in the selenite rat model of catatact. Biochem Biophys Res Commun. 2000;275:300-306.
37. Pink JJ, Davis SW, Tagliarino C, Planchon SM, Yang X, Froelich CJ, et al. Activation of cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during beta-lapachone-mediated apoptosis. Exp Cell Res. 2000;255:144-55.
38. Paik SR, Lee JH, Kim DH, Chang CS, Kim J. Aluminum-induced structural alterations of the precursor of the non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid. Arch Biochem Biophys. 1997;344:325-34.
39. Kim SJ, Sung JY, Ahn YS, Chung KC. Suppression of α-synuclein-induced neuronal cell death by parkin via the proteasome-independent activation of calpain. Manuscript in progress.

Abstract

The Functional Characterization of Parkin on α-Synuclein-induced Cytotoxicity in Hippocampal Neuronal Cells

Se Jung Kim

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Bae Hwan Lee)

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative disorders, and its symptoms arise primarily from a rather selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the brain stem. A mutation in the parkin gene on chromosome 6q has been identified as the cause for an early onset and autosomal recessively inherited form, of PD. The parkin gene encodes the intracellular ubiquitin ligase that consists of an N-terminal ubiquitin-like domain and a C-terminal domain with two Ring finger motifs. α-Synuclein, a small acidic protein, is also mutated in some rare hereditary cases of PD. Although its function is still unclear, there is accumulating evidence that α-synuclein is the main structural

component of the insoluble filaments that form the Lewy bodies of PD as well as those of dementia with Lewy bodies in addition to the glial cytoplasmic inclusions of multiple system atrophy (MSA). To clarify the relationship between parkin and α-synuclein, at first it was examined whether parkin binds to α-synuclein in conditionally immortalized embryonic hippocampal cell lines (H19-7). When the H19-7 cells were either treated with bacterial-recombinant α-synuclein exogenously, or transiently transfected with the expression plasmid encoding wild type α-synuclein, parkin binds to α-synuclein in a selective way. Binding assay using various forms of deleted parkin mutants showed that the loss of N-terminal ubiquitin-like domain resulted in the failure of its interaction with α-synuclein, indicating that ubiquitin-like domain of parkin is critical region to interact with α-synuclein. Next, we examined the effect of parkin on ubiquitin-proteasomal pathway by using green fluorescent protein (GFP)-based reporter system for proteasomal degradation of poly-ubiquitinated target proteins. When parkin was overexpressed in a transient manner, the accumulations of GFP were significantly decreased in the absence as well as in the presence of proteasome inhibitors, suggesting that parkin appears to stimulate a proteasome-independent protein degradation process. Interestingly, the overexpression of parkin attenuates the decrease of cell viability induced by α-synuclein in H19-7 cells. In addition, the cytoprotective effect of parkin on α-synuclein-induced cell death was not inhibited in the presence of proteasome inhibitors, suggesting that parkin modulates the degradation of α-synuclein via the activation of

proteasome-independent protease(s). The overexpression of parkin generated a novel cleavage pattern of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in H19-7 cells. Based on the previous report that non-caspase-mediated atypical cleavage of PARP is generated via cysteine protease, calpain, during the formation of selenite cataract, the possible activation of calpain and its effect on cell viability was investigated in response to parkin. We observed that the overexpression of parkin activates intracellular calpain, and the cytoprotective effect of parkin on α-synuclein-induced neurotoxicity is significantly inhibited by calpain inhibitor. These data indicated that the parkin may activate non-proteasomal protease, such as calpain, and this leads to the blockade of α-synuclein-induced cell death in hippocampal H19-7 cells Taken together, these results suggest that parkin accelerates the degradation of α-synuclein via the activation of calpain and prevents theα-synuclein-induced cytotoxicity in hippocampal neuronal progenitor cells.

Key Words : neurodegenerative disease, hippocampal progenitor cell, parkin, α-synuclein