



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사학위논문

파킨슨병 원인유전자 Parkin의  
질병 관련 유전자변이에 대한 연구

Studies on the pathogenic mutations of  
Parkin in Parkinson's disease

2018년 2월

서울대학교 대학원

생명과학부

조 현 호

## 국문초록

RING-between-RING (RBR) E3 ligase는 RING 또는 HECT E3 ligase와는 구별되는 ubiquitin ligase의 한 종류이다. Parkin은 잘 알려진 RBR ligase의 예로, 파킨슨병 환자에서 Parkin의 돌연변이가 많이 보고되어있다. Parkin과 다른 RBR ligase는 촉매의 기능을 하는 RBR module을 공통적으로 가지고 있으나 평상시에 autoinhibition 되어있고, 일련의 과정을 통해 활성화가 일어난다. 기존에 Parkin의 돌연변이에 대한 활성화 및 Parkin이 주요하게 작용하는 mitophagy 과정에 대한 연구는 어느 정도 진행되었으나 유전자변이에 의해 발생하는 Parkin의 구조적인 결함에 대한 연구는 부족한 편이다. 이번 연구에서는 Parkin의 환자 돌연변이에 의해 발생하는 구조적 결함을 연구하기 위해 돌연변이가 일어난 Parkin을 세포에 발현하여 기능적, 구조적 변화를 분석했다. 파킨슨병 환자의 돌연변이 데이터를 수집해 세포에 발현할 수 있는 플라스미드에 클로닝하였고, 이를 HeLa 세포에 발현하여 Parkin의 발현 양상과, 활성화 과정을 살펴봤다. 그 결과 45개의 Parkin 유전자변이에 의해 발현된 돌연변이는 표현형이 크게 4종류로 분류될 수 있었다. 이렇게 분류한 돌연변이들을 PyMOL 프로그램을 이용해 유전자변이에 의해 어떤 구조적인 차이가 발생되었는지 확인하고, 표현형간 구조적 차이를 분석했다. 본 연구를 통해 환자 유전자변이로 생긴 Parkin의 세포 내 기능 변화에 대한 이해 뿐 아니라 이를 구조적인 측면에서 이해도를 높였다.

**주요어** : Parkin, RBR ligase, mitochondria, structure, PyMOL

**학 번** : 2015-20448

# 목 차

제 1 장 INTRODUCTION .....	1
제 1 절 파킨슨병의 병리학적 정의와 발병요인 .....	1
1. 병리학적 정의 .....	1
2. 파킨슨병의 발병요인-유전학적 요인 .....	3
3. 파킨슨병의 발병요인-환경적 요인 .....	4
제 2 절 RING-between-RING E3 ligase Parkin .....	4
1. 초기의 Parkin 연구 .....	4
2. Parkin의 기능과 기질 .....	5
3. Parkin의 구조 및 활성화 기전 .....	8
4. Parkin의 환자 돌연변이 .....	10
제 2 장 MATERIALS and METHODS .....	11
제 1 절 항체와 시약 .....	11
제 2 절 환자 유전자변이 라이브러리 제작 .....	11
제 3 절 세포 배양 및 트랜스펙션 .....	11
제 4 절 면역형광 .....	11
제 5 절 PyMOL 분석 .....	12
제 3 장 RESULTS .....	13
제 1 절 Parkin 환자 유전자변이 라이브러리 제작 및 스크리닝 .....	13
제 2 절 CCCP에 의해 정상적으로 이동하는 유전자변이 .....	17
제 3 절 뭉쳐서 발현되며 CCCP 자극에 의해 미토콘드리아로 이동하지 않는 유전자변이 ..	20
제 4 절 CCCP에 의해 미토콘드리아로 이동하지 않는	

유전자변이 .....	24
제 4 장 DISCUSSION .....	29
제 5 장 CONCLUSIONS .....	32
참고문헌 .....	35
Abstract .....	41

## 그 립 목 차

[Figure 1] 파킨슨병의 발병과 관련된 위험 요소 .....	2
[Figure 2] Parkin의 구조 .....	7
[Figure 3] Parkin의 조절 기전 .....	9
[Figure 4] Parkin의 환자 유전자변이 라이브러리 제작 ....	14
[Figure 5] CCCP에 의해 정상적으로 미토콘드리아로 이동하는 유전자변이 .....	16
[Figure 6] CCCP에 의해 정상적으로 미토콘드리아로 이동하는 유전자변이의 구조적 분석 .....	18
[Figure 7] 뭉쳐서 발현되며 CCCP 자극에 의해 미토콘드리아로 이동하지 않는 유전자변이 ....	21
[Figure 8] 뭉쳐서 발현되며 CCCP 자극에 의해 미토콘드리아로 이동하지 않는 유전자변이의 구조적 분석 .....	23
[Figure 9] CCCP에 의해 세포질에서 미토콘드리아로 이동하지 않는 유전자변이 .....	25
[Figure 10] CCCP에 의해 세포질에서 미토콘드리아로 이동하지 않는 유전자변이의 구조적 분석 .....	27

# 제 1 장 Introduction

## 제 1 절 파킨슨병의 병리학적 정의와 발병요인

### 병리학적 정의

파킨슨병은 뇌의 도파민을 분비하는 세포가 모여 있는 중뇌 흑질(substantia nigra pars compacta)에 분포하는 세포들의 죽으면서 치명적인 운동 장애를 일으키는 만성 진행성 및 퇴행성 뇌질환이다. 파킨슨병에 대한 상세한 병적 소견은 두 세기 전부터 이루어졌지만, 현재까지도 병의 개념적인 해석은 지속적으로 변화하고 있다(Lorraine et al., 2015). 파킨슨병은 알츠하이머병 다음으로 가장 발병률이 높은 퇴행성 뇌질환으로 60세 인구의 약 1% 정도가 질환을 가지고 있다. 파킨슨병은 유럽과 북미, 남미에서 상대적으로 환자의 수가 많다. 성, 민족성, 특히 나이에 따라 발병률의 차이를 보인다. 노인의 증가와 고령화 사회로 점차 발병률이 증가해 2030년에는 50세 인구에서 발병률이 10년 전에 비해 두 배 이상이 될 것으로 예상하고 있다(Dorcey et al., 2007).

파킨슨병의 대표적인 증상인 운동장애는 19세기에 James Parkinson에 의해 정의되었다(Goetz, 2011). 운동장애는 운동완만(bredikinesia), 근성방어(muscular rigidity), 휴식진전(rest tremor), 자세 및 걸음 장애(postural and gait impairment)를 포함하며(Gibb et al., 1988). 환자마다 다른 증상을 보인다(Marras et al., 2013). 운동장애 외에 파킨슨병에 의해 생기는 비운동장애도 있다. 비운동장애의 종류는 후각 기능장애, 인지장애, 정신증상, 수면장애, 피로 등이 있으며 이러한 증상들은 파킨슨병 발병 초기에 공통적으로 나타난다(Khoo et al., 2013).

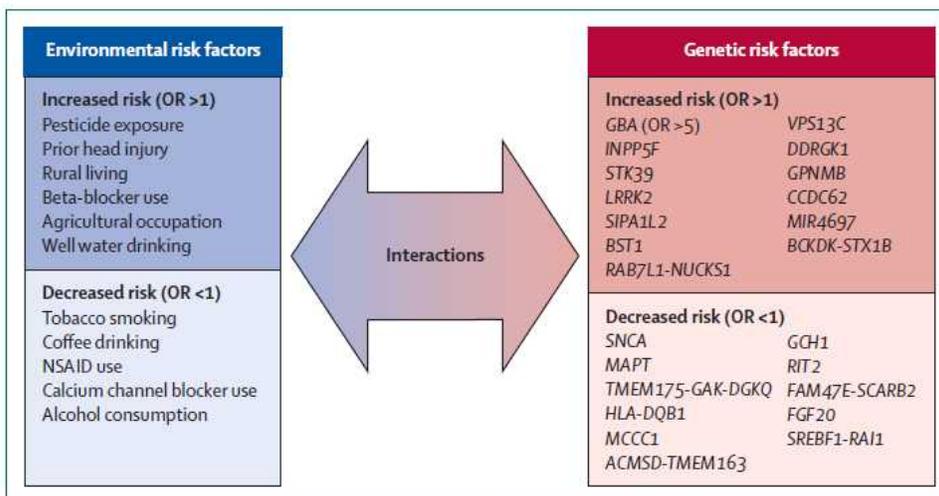


Figure 1. 파킨슨병의 발병과 관련된 위험 요소.

## 파킨슨병의 발병요인-유전학적 요인

파킨슨병이 알려진 초기에는 환경적인 요인으로 병이 생긴다고 생각했지만, 의학적, 생물학적 연구가 진행됨에 따라 파킨슨병은 다양한 환경적, 유전학적 요소들이 복잡하게 상호작용하여 발병하는 것으로 밝혀졌다(Fig. 1; Lorraine et al., 2015). 지난 15년간 파킨슨병 발병에 관한 유전학적인 연구 결과들이 나오면서 발병 기전에 대한 이해도를 높였다.

초기의 유전학적인 연구는 친척간 연관 연구를 통해 이루어졌고, 처음 파킨슨병 원인 유전자로 *SNCA* (*PARK1*,  $\alpha$ -synuclein)가 밝혀졌다(Polymeropoulos et al., 1997). *SNCA* 돌연변이는 상염색체 우성으로 파킨슨병을 발병시켰다(Devine et al., 2011). 질병을 일으키는 돌연변이는 아미노산의 치환을 야기하는 과오돌연변이(missense mutation)였으며 그 결과로  $\alpha$ -synuclein이 뭉쳐 Lewy body라는 병적 산물을 만들어낸다.

현재까지 6개의 유전자가 상염색체 우성 파킨슨병과 관련되어 있다고 보고되었다. 이는 *SNCA*, *LRRK2*, *VPS35*, *EIF4G1*, *DNAJC13*, *CHCHD2*이며 이들은 세포 내에서 시냅스 형성, 자가소화작용(autophagy), 단백질 합성 및 수송 등에 관여하는 유전자이다. *LRRK2* 돌연변이는 파킨슨병의 유전학적 발병 요인 중 가장 큰 비중을 차지한다(Healy et al., 2008). *Parkin*, *PINK1*, *DJ-1*은 상염색체 열성 파킨슨병의 발병에 연관된 유전자이다. 상염색체 열성 파킨슨병은 발병연령이 있는 상염색체 우성 파킨슨병과 달리 40세 이하에서 조기 발병하는 파킨슨병이다(Schrag et al., 2006). 특히 *Parkin*의 돌연변이는 상염색체 열성 파킨슨병의 발병 원인 중 가장 큰 비중을 차지한다. 45세 이하의 파킨슨병 환자 중 가족력이 있는 경우의 50%, 없는 경우의 15%가 *Parkin*의 돌연변이를 가지고 있다(Lücking et al., 2000; Periquet et al., 2003).

*Parkin, PINK1, DJ-1*에 의해 발현되는 단백질들은 모두 정상적인 미토콘드리아의 유지와 관련이 깊다(Mccoy et al., 2012). E3 ubiquitin ligase인 Parkin과 serine-threonine protein kinase인 PINK1은 mitophagy라고 하는 비정상적인 미토콘드리아의 선택적 제거 과정에 함께 작용한다. 이는 초파리 모델 동물을 이용해 증명되기도 했다(Park et al., 2006).

이 외에 *ATP13A2, C9ORF72, FBXO7, PLA2G6* 등의 추가적인 파킨슨병 원인 유전자들이 밝혀지고 있고, 그 생물학적 기전들이 연구되고 있다.

## 파킨슨병의 발병요인-환경적 요인

유전적 요인 외에 메타분석을 통해 파킨슨병의 발병에 중요한 역할을 하는 환경적 요인 11개가 보고되었다(Noyce et al., 2012). 더 높은 발병률을 일으키는 환경적 요소는 살충제 노출, 두부 외상, 베타차단제( $\beta$ -blocker) 복용 등이다. 반대로 낮은 발병률에 관여하는 환경적 요소는 흡연, 커피 섭취, 비스테로이드 항염증제 복용이다. 혈청 요산염 농도도 파킨슨병의 발병률과 반대의 경향성을 보이며, 남성에서 발병률이 더욱 두드러진다는 연구결과도 발표되었다(Cipriani et al., 2010). 또한, 유행병학 연구에 따르면, phenothiazines, benzamides, haloperidol, risperidone과 같은 항정신병제의 복용도 파킨슨병의 발병률을 높일 수 있다(Foubert-Samier et al., 2012; Samuel et al., 2012).

## 제 2 절 RING-between-RING E3 ligase Parkin

### 초기의 Parkin 연구

Parkin은 E3 ubiquitin ligase로, 40세 이하의 파킨슨병 환자 중

유전적 발병 요인의 18%가 Parkin을 암호화하는 *Parkin* 유전자에 생긴 돌연변이로 알려져 있다(Poorkaj et al., 2004). *Parkin*은 1997년 유전자 연관 분석으로 처음 파킨슨병과의 연관성이 보고되었고(Matsumine et al., 1997), 1년 뒤에 *Parkin* 유전자가 처음 클로닝이 되면서 연구가 본격적으로 시작되었다(Kitada et al., 1998). 이후로 Parkin의 기능을 저해하는 다양한 결손, 점 돌연변이가 밝혀졌다. *Parkin*은 465개의 아미노산을 암호화하는 12개의 exon으로 구성되어 있다.

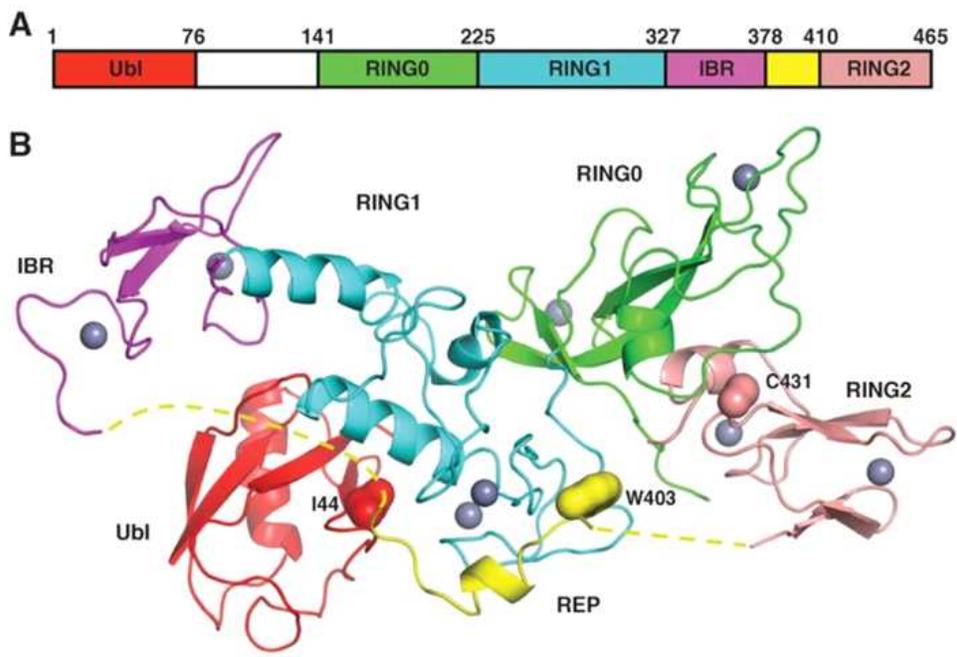
## Parkin의 기능과 기질

E3 ubiquitination ligase인 Parkin은 다양한 기질을 ubiquitination 시킴으로써 세포 내에서 여러 신호전달 체계를 조절한다. 그 중 가장 잘 알려진 Parkin의 기능은 미토콘드리아 외막의 기질들을 ubiquitination 시켜 세포 내에 비정상적으로 축적되는 미토콘드리아를 선택적으로 제거하는 것이다. 이 과정에 serine-threonine kinase인 PINK1이 관여하면서 이 신호전달체계는 PINK1-Parkin pathway로 명명되었다.

정상적인 미토콘드리아는 막전위를 통해 PINK1을 미토콘드리아 안으로 수송하면서 PARL, MPP와 같은 protease를 이용해 자른다(Deas et al., 2011; Greene et al., 2012). 그러나, 세포에 주어지는 자극에 의해 비정상적인 미토콘드리아가 생기면, 미토콘드리아의 막전위가 사라지면서 PINK1은 미토콘드리아 안으로 이동하지 못하고 미토콘드리아 외막에 분포하게 된다. 이후에 PINK1은 Parkin, ubiquitin을 인산화시키면서 Parkin의 ubiquitin ligase 기능을 활성화시킨다. Parkin이 활성화되면, 세포질과 미토콘드리아 외막에 있는 여러 종류의 기질들을 ubiquitination 시켜 K48- 그리고 K68-linked ubiquitin chain을 만든다.

K68-linked chain은 자가소화작용 수용체인 p62를 미토콘드리아로 유인하여 미토콘드리아를 특이적으로 제거하는 mitophagy 과정이 일어나도록 한다.

지금까지 Parkin의 다양한 기질들에 대한 연구가 진행되었다. 대표적인 예로 미토콘드리아 융합에 관여하는 Mfn1/2가 있고, 미토콘드리아 Rho GTPase인 Miro1이 있다. 이 외에 quantitative diGly capture proteomics 를 이용해 다양한 Parkin의 기질들이 밝혀졌다(Sarraf et al., 2013). 물질대사에 관여하는 ACSL1, MDH1, HK1, CISD1과 미토콘드리아 융합/수송에 관여하는 FIS1, MFN1/2, MARCH5, TBC1D15, 자가포식에 관여하는 TAX1BP1, SQSTM1, CALCOCO2 등이 그 기질로 밝혀졌다.

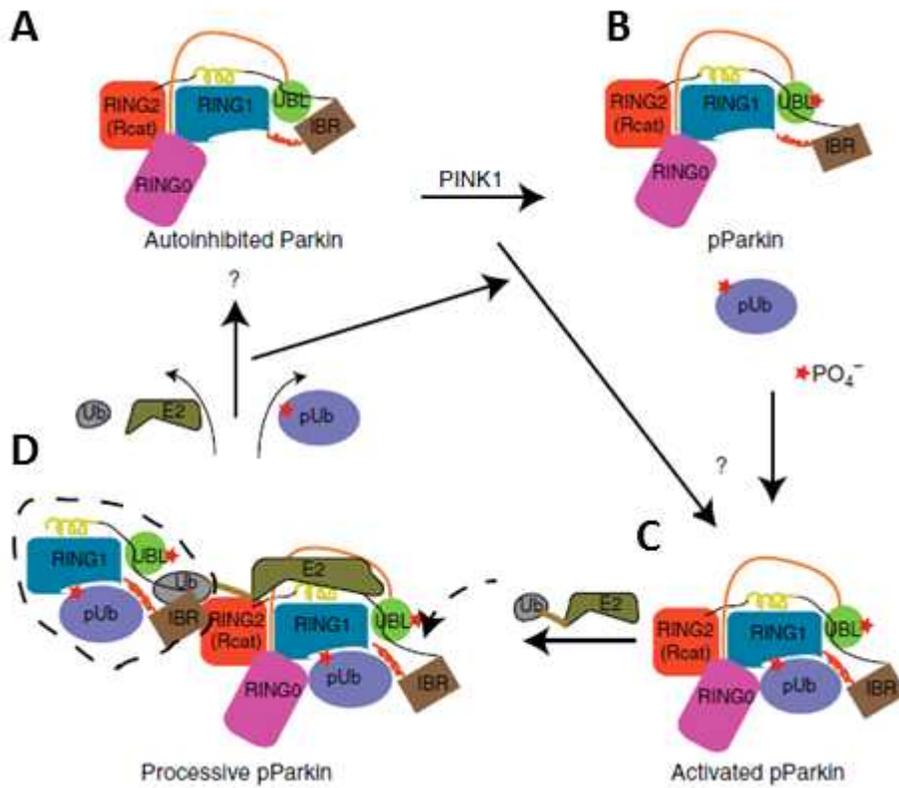


**Figure 2. Parkin의 구조.** (A) Parkin의 domain과 그 위치. (B) Parkin의 3차 구조.

## Parkin의 구조 및 활성화 기전

Parkin은 zinc coordination domain을 가지는 RING-between-RING family에 속하는 E3 ubiquitin ligase로 N-terminal region부터 UBL, RING0, RING1, IBR, RING2 순으로 총 5개의 domain으로 구성되어 있다(Fig. 2; Pickrell et al., 2014). Parkin은 RING1 domain을 이용하여 E2-ubiquitin과 결합한 후 RING2의 촉매 잔기인 Cys431에 ubiquitin을 thioester bond를 통해 옮긴 후 최종적으로 기질에 ubiquitin을 다시 결합시키는 역할을 한다.

활성화되지 않은 Parkin의 RING2 domain은 RING0에 의해, E2 ligase 결합 부위인 RING1 domain은 UBL, REP에 의해 구조적으로 가려져 있다(Seirafi et al., 2015). Parkin이 활성화되기 위해서는 PINK1에 의한 UBL domain의 Ser65의 인산화와 인산화된 ubiquitin인 phospho-ubiquitin (pUb)가 결합해야한다. 이후에 ubiquitin이 결합한 E2 ligase가 REP, RING1과의 접점에 결합하고 ubiquitin을 주변에 있는 다른 Parkin에 옮기면서 활성화된다(Fig. 3; Kumar et al., 2017).



**Figure 3. Parkin의 조절 기전.** (A) IBR (갈색)과 RING1의 H3 (짙은 빨간색)를 막는 UBL에 의해 autoinhibition 되어있는 Parkin. (B) UBL의 인산화나 pUb의 결합으로 H3-IBR과 UBL 사이에 공간이 생기면서 Parkin이 활성화됨. (C) 활성화된 Parkin은 H3-IBR helix를 뺏으면서 구조의 변화가 일어남. (D) E2-ubiquitin이 이 접점에 인식되면서 E2가 REP, RING1에 붙고 ubiquitin을 주변의 다른 Parkin에 넘김.

## Parkin의 환자 돌연변이

상염색체 열성 파킨슨병 발병의 가장 큰 유전적 요인을 차지하는 것이 *Parkin*의 돌연변이이다. *Parkin*의 exon 결손은 처음 일본 환자에서 보고가 되었다(Kitada et al., 1998). 20살 이전에 발병하는 경우의 환자도 꾸준히 보고되었다. 이 환자들은 levodopa 복용의 효과를 봤지만, levodopa-induced dyskinesia가 발병하기도 했다. 그동안의 연구로 *Parkin*의 결손, 복제, 과오돌연변이를 갖는 환자가 보고가 되었다(Nuytemans et al., 2010).

파킨슨병 환자들의 유전체 분석을 통해 다양한 *Parkin*의 질병 관련 유전자변이가 보고되어 있다. *Parkin*을 구성하는 총 5개의 domain을 아우르는 약 50 여개의 SNP가 밝혀졌다(Corti et al., 2011). 이 연구 결과를 활용하여 실제 각 유전자변이들의 기능 연구가 진행되었고 상당수 유전자변이에서 *Parkin*의 ubiquitination activity에 문제가 있음이 밝혀졌다. 하지만 이에 대한 구체적인 기작에 대한 연구는 많이 진행되지 않았다.

## 제 2 장 MATERIALS and METHODS

### 제 1 절 항체와 시약

Mouse anti-Myc (MBL), mouse anti-GST (Upstate Biotechnology), rabbit anti-TOM20 (Santa Cruz)가 immunocytochemistry 실험에 쓰였다. Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP)은 Sigma aldrich (C2759)의 제품을 사용하였다.

### 제 2 절 환자 유전자변이 라이브러리 제작

Parkin의 pathogenic mutant library는 두 종류의 플라스미드를 이용하여 제작하였다. 기본적으로 pEBG-Parkin (GST-Parkin)을 사용했고, 발현이 되지 않은 유전자변이는 pcDNA3.1-zeo(+)-Myc-Parkin을 이용하여 library를 제작했다. 유전자변이 라이브러리 제작을 위해서 해당 nucleotide가 변화가 생기도록 forward, reverse primer를 디자인했다. 이를 template이 되는 플라스미드를 이용해 PCR하였고, Dpn-1를 37°C 1h 처리했다. 이후 DH 10 $\beta$  competent cell에 transformation시켜 seeding, mini-prep을 거쳐 플라스미드를 얻었다. 얻은 플라스미드는 sequencing 하여 유전자변이가 일어났는지 확인했다.

### 제 3 절 세포 배양과 트랜스펙션

HeLa cell은 10% fetal bovine serum (Gibco)이 들어간 DMEM (Welgene)을 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. HeLa에 transfection을 할 때는 Lipofectamine LTX & Plus Reagent (Invitrogen)을 사용했다.

## 제 4 절 면역형광

HeLa cell은 12-well tissue culture plate에 배양하였다. 실험에 필요한 DNA를 Transfection하고 하루 뒤에 20  $\mu$ M CCCP 또는 DMSO를 4시간 처리하였다. 이어서 PBS washing, 4% paraformaldehyde fixation 15분, 0.5% Triton X-100 in PBS (PBS-T) permeabilization 10분, blocking solution (3% BSA 0.1% PBS-T)에 1% goat serum을 추가하여 1시간 처리 후 blocking solution에 1:200으로 primary antibody를 섞어 4°C에 overnight 처리하였다. 그리고 PBS로 네 차례 washing후 blocking solution에 1:200으로 secondary antibody를 섞어 상온에서 한시간 처리하였다. 추가적인 PBS washing 후에 100mg/ml 1,4-diazabicyclo[2.2.2] octane (DABCO) in 90% glycerol을 이용하여 mounting하였다. 제작한 샘플은 LSM 710 laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss)를 이용하여 관찰하였다.

## 제 5 절 PyMOL 분석

Parkin과 유전자변이의 구조를 분석하기 위해 PyMOL (version 2.0.4) 프로그램을 이용하였다. 활성화되지 않은 상태의 Parkin (UBLR0RBR, PDB ID: 5C1Z)의 구조를 기준으로 야생형과 유전자변이의 구조 차이를 분석했다. Mutagenesis wizard를 이용해 특정 아미노산이 치환된 구조를 확인하고 그 중 확률이 가장 높은 구조 이성질체(rotational isomer, rotamer)를 기준으로 그 구조를 분석했다.

## 제 3 장 RESULTS

### 제 1 절 Parkin 환자 유전자변이 라이브러리 제작 및 스크리닝

Parkin 의 환자 유전자변이에 의해 야기되는 Parkin 의 활성화 및 하위 신호전달체계의 변화를 살피기 위해 세포에서 발현시킬 수 있는 유전자변이 플라스미드 라이브러리를 제작하였다. 기본적으로 N-terminus 에 GST tag 가 연결되어있는 플라스미드인 pEBG-Parkin 을 이용, mutagenesis 를 통해 유전자변이를 만들어냈고, 이중 발현이 잘되지 않았던 유전자변이는 따로 N-terminus 에 Myc tag 가 있는 pcDNA3.1-zeo(+)-Myc-Parkin 을 이용해서 제작하였다. 유전자변이의 후보군은 2011년에 발표된 파킨슨병 환자의 유전학적 근거를 제시한 리뷰 논문을 참고하여 결정하였다(Corti et al., 2011, Fig. 4).

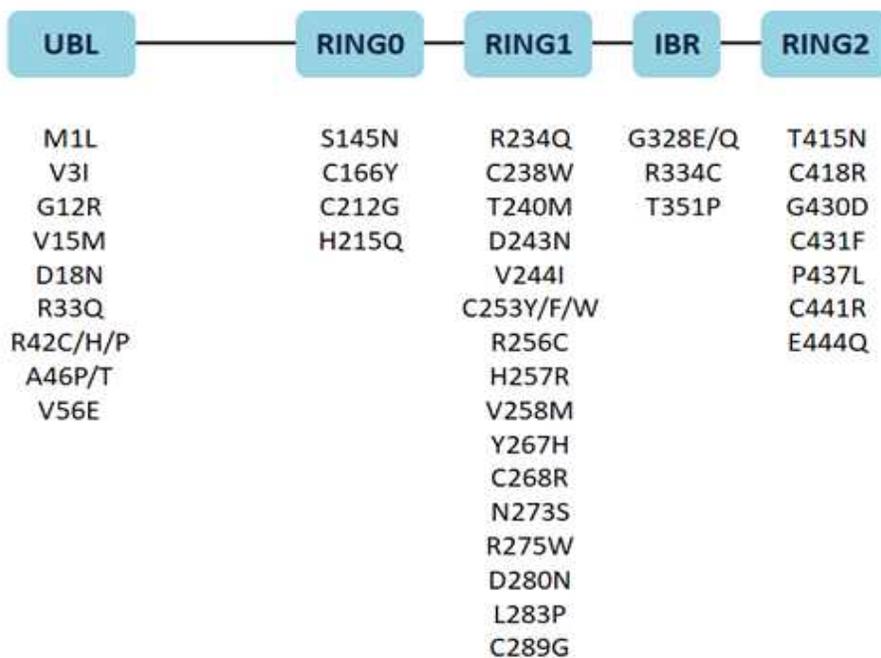
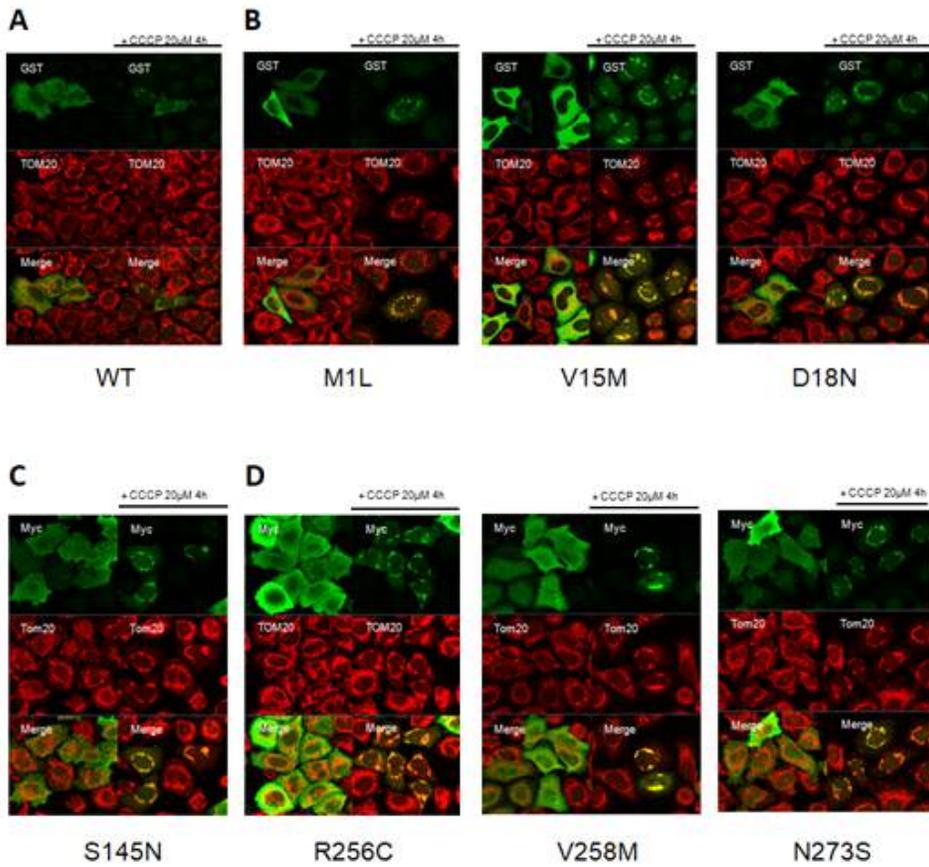


Figure 4. Parkin의 환자 유전자변이 라이브러리 제작.

제작한 라이브러리를 각각 HeLa 세포에 과발현시키고 immunocytochemistry 를 이용해 Parkin 의 기본적인 발현 양상을 확인했다. 그리고 CCCP 20 $\mu$ M 4시간을 추가적으로 처리하여 각 유전자변이에 의한 Parkin 의 활성화 및 하위 신호전달에 미치는 영향을 확인하였다. CCCP 는 protonophore 로, 미토콘드리아 내에 생성된 양성자 농도 기울기를 제거해 세포 내에 비정상적인 미토콘드리아를 늘릴 수 있는 약물이며, PINK1-Parkin 신호전달체계를 활성화시키는데 널리 쓰이는 약물이다. CCCP 를 처리하게 되면 Parkin 은 순차적으로 미토콘드리아로 이동하게 되고 이어서 여러 기질들을 ubiquitination 시킨다.

Immunocytochemistry 를 통해 파킨슨병 환자 유전자변이들의 발현 양상, 그리고 CCCP 자극에 대한 이동을 확인하고 표현형에 따라 분류하였다. 그리고 이 결과들의 구조적인 분석 및 공통점을 찾기 위해 PyMOL 프로그램을 이용하여 유전자변이에 의한 특정 잔기의 변화가 어떻게 구조와 표현형에 영향을 줄 수 있는지 확인하였다. X-ray diffraction 을 통해 구조가 밝혀진 사람의 Parkin (PDB ID: 5C1Z)을 기준으로 분석했고 이는 일부분을 제외하고 full-length 로 구조가 알려진 구조이다(Kumar et al., 2015). PyMOL 로 Parkin 의 특정 아미노산 잔기(보라색)의 3차원적 위치나 주변 잔기와의 극성 결합 등의 유무를 확인하였다. 그리고 mutagenesis wizard 기능을 이용하여 환자 유전자변이에 해당하는 아미노산으로 치환(흰색)하여 구조적인 변화를 확인했다.



**Figure 5.** CCCP에 의해 정상적으로 미토콘드리아로 이동하는 유전자변이. (A) 야생형 Parkin을 과발현하면 세포질에 위치하며, CCCP를 처리시 미토콘드리아로 이동하는 것을 확인할 수 있다. (B) (A)와 같은 표현형을 보이는 UBL domain 유전자변이. (C) RING0 domain 유전자변이. (D) RING1 domain 유전자변이.

## 제 2 절 CCCP에 의해 정상적으로 이동하는 유전자변이

HeLa 세포에 야생형 Parkin 을 과발현 시키고 CCCP 20 $\mu$ M 을 4시간동안 처리하면 미토콘드리아가 뭉치고 동시에 Parkin 이 미토콘드리아로 이동하는 것을 확인할 수 있다(Fig. 5A). 스크리닝을 통해 확인한 결과, 야생형처럼 CCCP 자극에 의해 미토콘드리아로 이동하는 유전자변이들이 있었다(Fig. 5B-D). 이 유전자변이들은 아무런 자극 없이 과발현이 되면 세포질에 위치하며, CCCP 20 $\mu$ M 4시간에 의해 미토콘드리아로 이동하고 미토콘드리아도 뭉치는 것을 확인할 수 있었다.

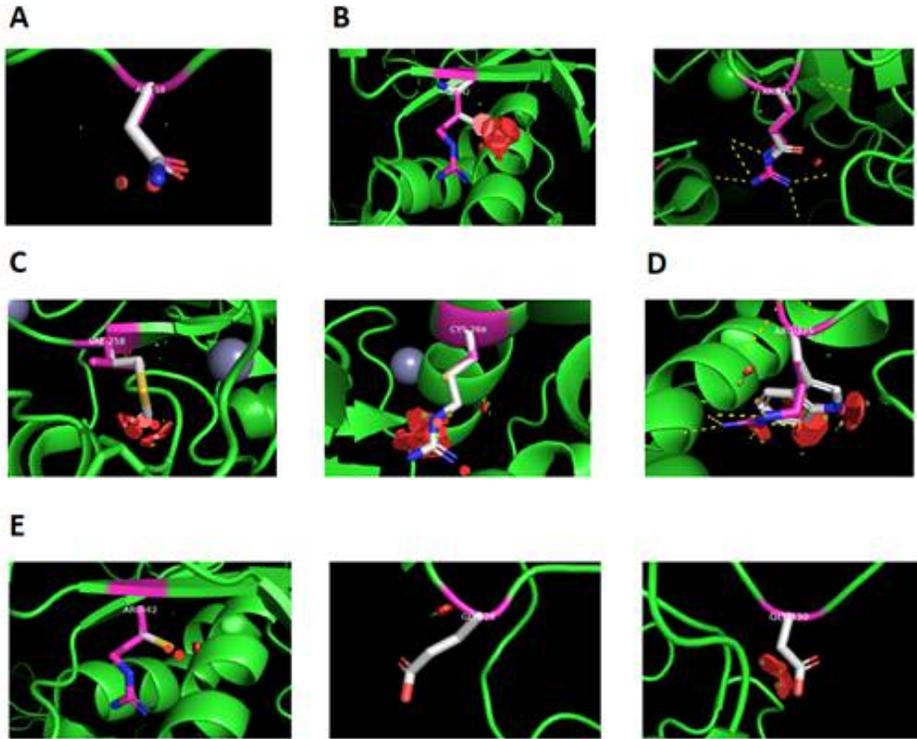


Figure 6. CCCP에 의해 정상적으로 미토콘드리아로 이동하는 유전자변이의 구조적 분석. (A) 잔기가 외부를 향하고 있는 D18N. (B) UBL domain의 잔기와의 충돌을 일으키는 R42H (왼쪽), R234Q (오른쪽). (C) RING1 내의 구조적 접힘을 저해하는 V258M (왼쪽), C268R (오른쪽). (D) (B)와 (C)의 혼합적인 표현형을 보이는 R275W. (E) 이외의 유전자변이(왼쪽부터 R42C, G328E, G430D)

첫 번째로 잔기가 단백질의 바깥쪽을 향하고 있는 유전자변이가 있었다. D18N의 경우, 아미노산이 야생형인 aspartate 일 때나 유전자변이에 의해 유도된 asparagine 모두 잔기가 단백질의 외부를 향하고 있으며, 아미노산 치환으로 인한 주변 잔기와의 충돌도 거의 없는 것을 확인할 수 있다(Fig. 6A). D18N 외에 M1L이나 V244I 유전자변이도 잔기가 Parkin의 외부를 향하고 있다. 따라서 잔기가 단백질의 외부를 향하는 경우에 유전자변이가 일어나도 구조에 차이가 크지 않으며 Parkin의 이동 및 활성화 과정에 큰 영향을 주지 않는다고 볼 수 있다.

두 번째는 유전자변이에 의해 UBL domain과의 충돌 및 결합의 차이가 생기는 것이다. R42H의 경우, 환자 유전자변이에 의해 아미노산이 arginine에서 histidine으로 바뀌면 UBL domain의  $\alpha$ -helix와 구조적으로 충돌하는 것을 확인할 수 있다(Fig. 6B). R234Q 유전자변이는 arginine과 UBL domain과의 수소결합을 제거하는 효과를 가진다(Fig. 6B). V15M과 N273S는 유전자변이에 의해 각각 UBL domain의  $\alpha$ -helix와의 충돌 및 hydrogen bonding의 제거를 초래한다. 따라서 Parkin의 유전자변이로 인해 UBL domain과의 충돌 및 결합의 감소가 일어나도 CCCP에 의한 Parkin의 이동이나 활성화 과정에 큰 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다.

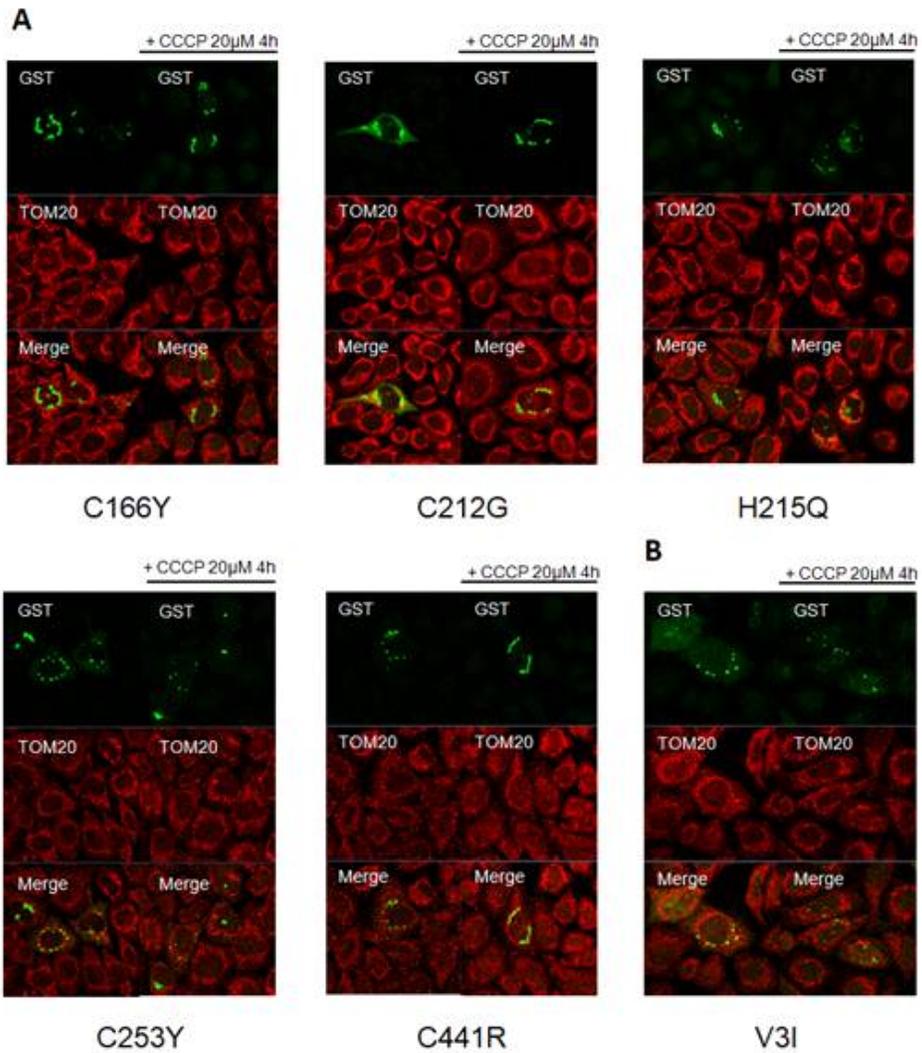
세 번째는 RING1 domain 내의 구조적 결함을 일으키는 유전자변이다. V258M, C268R에 의한 구조변화는 공통적으로 RING1 domain 내로 더 구조가 큰 잔기를 위치시킴으로써 RING1 domain의 3차원적 접힘을 저해한다(Fig. 6C). R275W는 유전자변이에 의해 RING1 잔기와의 수소결합이 없어지면서 RING1 domain의 구조적 결함을 일으킴과 동시에 UBL domain과 충돌을 일으킨다(Fig. 6D). R256C,

D280N 도 유전자변이도 각 잔기와 RING1 domain 사이의 수소결합을 방해한다. 결론적으로 Parkin 의 RING1 domain 내의 구조적 결함을 일으켜도 Parkin 의 이동이나 활성화에는 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

그 다음으로 R42C (구조적인 차이 크게 없음), G328E (외부를 향하는 잔기, 약간의 구조적 차이 동반), G430D (RING0, RING2 domain ) 등도 CCCP 에 의해 정상적으로 미토콘드리아로 이동한 유전자변이들이며 각각의 잔기들의 변화로 큰 구조적인 차이가 없을 것으로 판단된다.

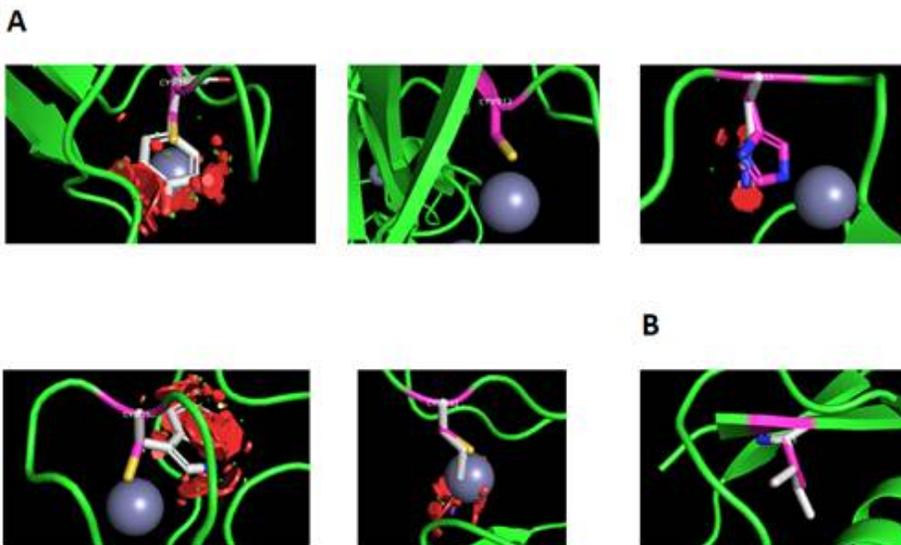
### 제 3 절 뭉쳐서 발현되며 CCCP 자극에 의해 미토콘드리아로 이동하지 않는 유전자변이

야생형 Parkin 과는 다르게 과발현만 해도 세포 내에서 세포질에 고르게 퍼지 것이 아닌 뭉쳐 보이는 Parkin 유전자변이도 있었다(Fig. 7A-B). 과발현이 되면 세포질 내에서 뭉쳐서 보이며, 이는 TOM20와 함께 위치하지 않는 것으로 보아 미토콘드리아가 아닌 다른 곳에 위치하는 것을 알 수 있다. 이 유전자변이는 CCCP 자극에 의해 발현 양상이 바뀌지 않았으며, 미토콘드리아로의 이동도 일어나지 않았다. 이 표현형을 보이는 유전자변이는 C166Y, C212G, H215Q, C253Y, C441R, V3I 등이었다.



**Figure 7.** 몽쳐서 발현되며 CCCP 자극에 의해 미토콘드리아로 이동하지 않는 유전자변이. (A) Parkin의 zinc finger domain에 속하는 잔기들. (B) zinc finger domain에 속하지 않는 잔기.

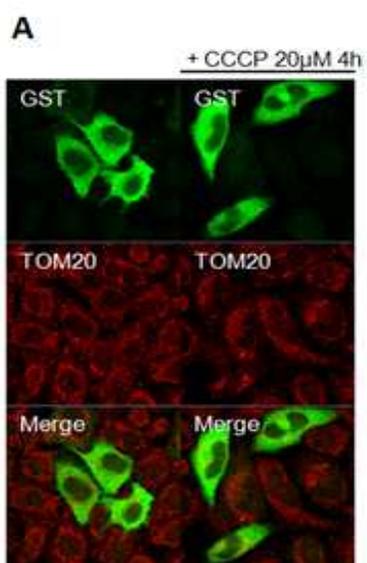
PyMOL 을 이용하여 이 잔기들을 구조적으로 분석해보면 두 종류로 나눌 수 있다. 첫 번째는 zinc coordination 에 관여하는 zinc finger domain 에 속하는 잔기들이다(Fig. 8A). 이 잔기들은 모두 Parkin 과 zinc ion 사이의 결합에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Trempe et al., 2013). C166Y, C441R 은 아미노산의 치환으로 원래 zinc ion 이 결합하는 자리에 잔기가 뺀 구조를 변화시키면서, C212G, H215Q, C253W 는 유전자변이로 인해 구조 내 잔기의 방향이 바뀌면서 zinc ion 과의 결합력이 감소한다. V3I 는 유전자변이에 의해 구조가 크게 변하지 않는 잔기이다. 아미노산이 valine 에서 isoleucine 으로 변하면 끝에 methyl 잔기가 하나 더 붙게 되는데 다른 잔기와의 충돌을 일으키지 않는다. 따라서 이 유전자변이는 다른 구조적인 영향을 미쳐 Parkin 이 세포질에 고르게 퍼지지 못하고 뭉치게 했을 것이다. 결론적으로 zinc ion coordination 을 담당하는 zinc finger domain 에 유전자변이가 생기면 Parkin 은 세포 전체에 고르게 퍼지지 않고 뭉치는 표현형을 보이며, 이는 CCCP 자극에도 반응하지 않는다.



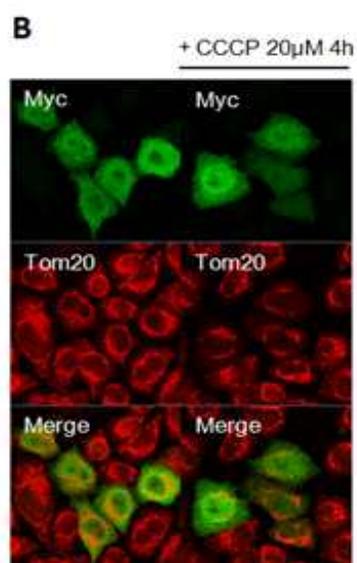
**Figure 8.** 뭉쳐서 발현되며 CCCP 자극에 의해 미토콘드리아로 이동하지 않는 유전자변이의 구조적 분석. (A) Parkin의 zinc finger domain에 속하는 잔기들(순서대로 C166Y, C212G, H215Q, C253W, C441R, 회색은 zinc ion) 유전자변이에 의해 zinc ion coordination이 크게 저해된다. (B) zinc finger domain에 속하지 않는 잔기(V3I). 유전자변이에 의해 구조적으로 크게 바뀌지 않는다.

## 제 4 절 CCCP에 의해 미토콘드리아로 이동하지 않는 유전자변이

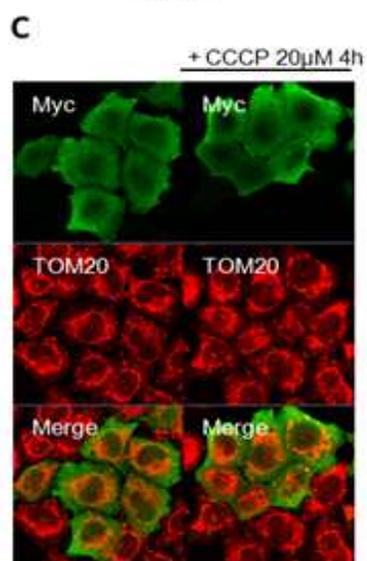
마지막으로 CCCP  $20\mu\text{M}$  4시간에 의해 세포질에서 미토콘드리아로 이동하지 않은 Parkin 유전자변이가 있었다. 총 4개의 유전자변이였으며 UBL, RING1, RING2 domain 에 각각 1개, 1개, 2개가 해당된다(Fig. 9A-D).



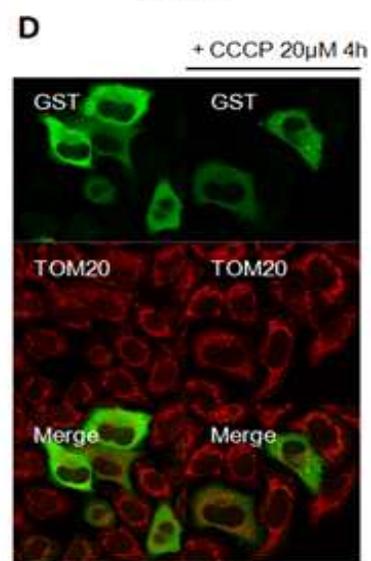
A46T



L283P



T415N



P437L

**Figure 9.** CCCP에 의해 세포질에서 미토콘드리아로 이동하지 않는 유전자변이. (A) UBL domain에 위치하는 A46T. (B) RING1 domain에 위치하는 L283P. (C) RING2 domain에 위치하는 T415N. (D) RING2 domain에 위치하는 P437L.

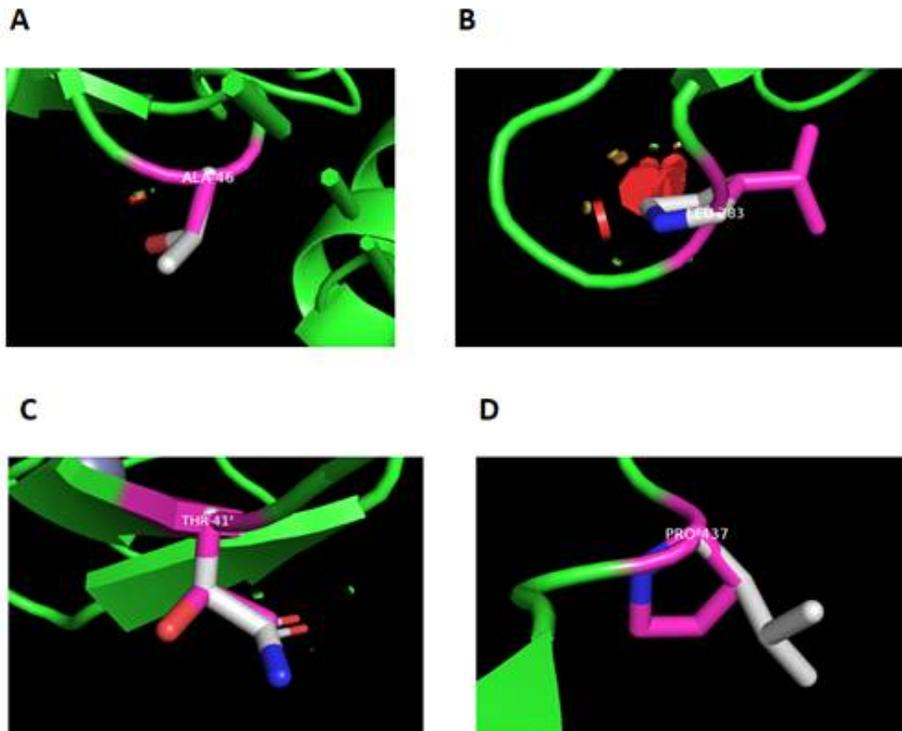


Figure 10. CCCP에 의해 세포질에서 미토콘드리아로 이동하지 않는 유전자변이의 구조적 분석. (A) UBL domain에 위치하고, 잔기가 외부로 향하고 있는 A46T. (B) RING1 domain에 위치하는 L283P. (C) RING2 domain에 위치하며 잔기가 외부로 향하고 있는 T415N. (D) RING2 domain에 위치하며 잔기가 외부로 향하고 있는 P437L.

CCCP 에 의해 미토콘드리아도 이동하지 않는 유전자변이는 크게 두 가지로 분류된다. 첫 번째는 RING1 domain 내의 3차원 구조를 변형시키는 L283P (Fig. 10B)이다. leucine 에서 proline 으로 아미노산이 치환되면 바로 근처에 있는 RING1 domain 의 다른 잔기와 구조적으로 충돌한다. 두 번째는 잔기가 외부로 향하고 있는 A46T, T415N, P437L 이다. 세 잔기는 유전자변이에 의해 구조적으로 크게 충돌을 일으키지 않고 모두 잔기가 Parkin 의 외부로 향한다. 결론적으로 RING1의 특정 구조의 유지에 필요한 잔기나 외부로 향하는 Parkin 의 잔기 중 일부에 구조적인 결함이 생기면 CCCP 자극에 Parkin 이 미토콘드리아로 이동하지 않아 하위 신호전달체계가 전달되지 않음을 알 수 있다.

## 제 4 장 DISCUSSION

Parkin 의 파킨슨병 환자 유전자변이가 보고된 이후로 그 기능에 대한 구조에 대한 연구가 진행되어왔다. Parkin 유전자변이의 활성도를 ubiquitination assay 를 통해 확인하거나 molecular dynamics 를 이용해 구조상의 변화를 예측한 보고가 있다(Fiesel et al., 2015). 본 연구를 통해 나는 Parkin 유전자변이의 기능과 그 근거가 되는 구조적인 특징을 찾아 Parkin 의 활성화 기전 및 파킨슨병의 발병의 이해에 새로운 가능성을 제시하고자했다.

Parkin 유전자변이 라이브러리를 제작하고 이를 이용해 실험한 결과, 기능에 따라 구조적인 공통점을 확인할 수 있었다. Parkin 을 과발현시킨 뒤, CCCP 를 처리하여 세포 내 기능을 분석한 결과, 크게 3가지로 나눌수 있었다.

첫 번째로, 야생형과 동일하게 CCCP 에 의해 미토콘드리아로 이동한 유전자변이가 있었는데 이는 구조적으로 나뉘서 해석할 수 있었다. UBL domain 과의 충돌 및 결합력의 차이를 보이는 유전자변이가 있었는데, 기존 보고에 따르면 활성화되지 않은 Parkin 의 UBL domain 은 RING1 domain 을 가려 Parkin 이 제 기능을 할 수 없다(Sauvé et al., 2015). 그리고 활성화되는 과정에서 UBL domain 의 분리가 일어나야한다. 따라서 Parkin 의 유전자변이에 의해 UBL domain 과의 물리적 거리가 멀어지면 Parkin 이 더 활성화될 수 있는 환경이 제공되기 때문에 정상적으로 Parkin 이 미토콘드리아로 이동했다고 생각할 수 있다. 오히려 야생형보다 더 빠른 시간동안 미토콘드리아로 이동했을 수도 있다.

그리고 Parkin 의 일부 유전자변이에 의해 RING1 domain 의 3차원적 구조에 영향을 미쳐도 Parkin 이 정상적으로 CCCP 자극에 의해 미토콘드리아로 이동했다. 이는 Parkin 의 특정 유전자변이에 의해 야기된 RING1 domain 의 구조적인 변화가 실질적인 E2-ubiquitin 과 Parkin 사이의 결합에 영향을 미치지 않았거나 실제로 유전자변이에 의해 유도된 구조적 변화가 그 자체로 크지 않았을 수 있다.

세포에 발현시켜 야생형처럼 CCCP 자극에 의해 미토콘드리아로 잘 이동하는 Parkin 이 질병을 발병하는 유전자변이임은 추가적인 실험을 통해 증명해야한다. 그 예로, Parkin 의 주요한 기능인 ubiquitination 기능이 유전자변이에서 어떻게 변해있는지, 나아가 p62/SQSTM1의 이동, 미토콘드리아 단백질양의 정량화를 통해 mitophagy 과정에 어떤 영향을 미치는지 확인해 볼 수 있다.

두 번째로 , 과발현시 뭉쳐서 세포 내에 위치하고 CCCP 자극에 의해 미토콘드리아로 이동하지 않은 유전자변이가 있었다. 이는 대부분 Parkin 의 zinc finger domain 에 생기는 유전자변이였다. Cysteine 잔기는 Parkin 의 세포내 solubility 를 유지하는 것에 필수적이고(Wong et al., 2007; Hamper et al., 2006) Parkin 과 zinc ion 의 결합은 Parkin 의 구조 형성과 안정성에 관여한다(Rankin et al., 2011). 따라서 cysteine 잔기가 치환되면 Parkin 이 세포질 내에 고르게 퍼지지 않고 뭉쳐 있을 수 있다. V3I 의 경우, zinc finger domain 에 해당하기도, 구조적으로 큰 차이를 일으키는 유전자변이가 아니지만 다른 구조적인 이유로 Parkin 의 solubility 를 낮춰 뭉쳐서 발현되게 하였을 것이다.

마지막으로 CCCP 자극에 의해 세포질에서 미토콘드리아로 이동하지 않은 유전자변이는 중 일부는 외부로 노출된 잔기라는 공통점을 가지고 있었다. 이 잔기들에 생기는 돌연변이로 인해 Parkin 이

미토콘드리아로 이동하지 않았으며 제 기능을 할 수 없다. 이는 외부로 노출되어있는 이 잔기들이 Parkin 의 활성화 과정 중에 필요한 Parkin 의 domain 간, 또는 Parkin 과 다른 기질들 사이의 상호작용에 작용한다고 볼 수 있다. 야생형 Parkin 과 유전자변이가 일어난 Parkin 을 각각 과발현한 뒤, immunoprecipitation, mass spectrometry analysis 를 통해 분석하면 새로운 Parkin 과 기질 사이의 상호작용을 확인할 수 있다. 그리고 각각의 유전자변이가 Parkin 의 활성화 과정에 얼마나 중요한지 확인하려면 CCCP 를 더 오래 처리하면서 Parkin 이 미토콘드리아로 이동하는 시간대를 확인하면 될 것이다.

이번 연구를 통해 Parkin 의 유전자변이에 의해 생기는 기능적, 구조적 변화를 연결해 그 경향성을 파악할 수 있었다. 그러나 모든 유전자변이에 대한 설명은 추가적인 구조 및 기능에 대한 연구가 수반되어야 설명이 가능할 것이다.

## 제 5 장 CONCLUSIONS

본 연구를 통해 파킨슨병 환자 유전자변이로 인한 Parkin의 세포 내 기능 변화와 그 구조적인 기전을 알고자 하였다. 우선, 기존 연구로 밝혀진 파킨슨병 환자의 SNP 데이터를 이용해 유전자변이 라이브러리를 제작하였다. 제작한 라이브러리를 각각 HeLa 세포에 transfection시켜 세포 내 발현 양상을 확인하고 Parkin을 활성화시키는 자극인 CCCP 20 $\mu$ M 4시간을 처리하여 Parkin의 미토콘드리아로의 이동을 확인했다. 그 결과, 총 45개의 Parkin 유전자변이를 이용해 실험하여 크게 3가지로 표현형을 나눌 수 있었다. 표현형을 나눈 유전자변이들은 다시 PyMOL 프로그램을 이용해 구조를 해석했다. 기존 잔기의 위치와 구조를 확인한 뒤, 유전자변이가 일으킨 아미노산 치환을 통한 구조의 변화를 확인하고 이를 통해 표현형을 설명하고자 했다.

CCCP 처리시 야생형처럼 미토콘드리아로 이동하는 유전자변이가 있었다. 이 유전자변이들을 구조적으로 해석하면 다시 네 가지로 나뉘었다. 첫 번째로 MIL, D18N, V244I 유전자변이의 경우, 기존의 잔기가 Parkin의 외부를 향하고 있으며 잔기가 치환되어도 잔기가 밖을 향하고 있었다. 두 번째로 V15M, R42H, R234Q, N273S는 유전자변이에 의해 UBL domain의 잔기와 충돌이 생기거나 결합력이 감소했다. 세 번째로 R256C, V258M, C268R, D280N은 유전자변이에 의해 RING1 domain 내의 구조에 문제가 생겼다. UBL domain의 잔기와 충돌하는 경우가 있다. 그 외에 R42C (구조적인 차이 크게 없음), G328E (외부를 향하는 잔기, 약간의 구조적 차이 동반), G430D (RING0, RING2 domain과 충돌)도 CCCP에 의해 정상적으로 미토콘드리아로 이동한 유전자변이들이며 각각의 잔기들의 변화로 큰 구조적인 차이가 없을 것으로 예상

된다. 결론적으로 잔기가 외부를 향하고 있거나 UBL domain과의 충돌을 일으키거나 결합력을 감소시키는 잔기, RING1 domain 내의 구조를 변화시키는 유전자변이는 Parkin의 기능에 영향을 주지 않거나 오히려 활성화 과정을 촉진할 수 있다.

과발현시 세포 내에서 뭉치는 Parkin의 유전자변이도 있었다. C166Y, C212G, H215Q, C238W, C253Y, C289G, C441R 등은 모두 발현되면 세포 내에 뭉치는 표현형을 보였다. 또한 CCCP 처리에도 미토콘드리아도 이동하지 않고 계속 뭉쳐있는 것을 확인할 수 있었다. 이 잔기들은 모두 잘 알려진 Parkin과 zinc ion 결합 부위인 zinc finger domain을 구성하는 잔기들이다. V3I의 경우 아미노산 치환이 일어나도 구조상 큰 차이가 없었다. 결과적으로 zinc finger domain에 유전자변이가 생기면 Parkin의 세포 내 solubility가 감소해 고르게 발현되지 않고 뭉쳐 발현된다고 볼 수 있다.

CCCP 자극에 의해 세포질에서 미토콘드리아로 이동하지 않는 유전자변이가 있었다. A46T는 alanine 잔기가 Parkin의 외부를 향하고 있었으며, threonine으로 치환하여도 구조상 충돌을 거의 일으키지 않았다. L283P는 유전자변이에 의해 RING1 domain내의 구조적인 충돌을 일으켰다. T415N, P437L의 경우 잔기가 모두 외부를 향하고 있으며 아미노산이 치환되어도 구조적인 충돌이 거의 없었다. 결론적으로 Parkin의 외부로 노출되는 잔기 중 일부는 Parkin의 활성화 과정에 영향을 주며 이는 이 잔기들이 Parkin 내부의 다른 domain과의 상호작용이나 Parkin과 기질 사이의 결합력에 영향을 줄 수 있음을 시사한다.

Parkin은 UBL부터 RING2까지 총 5개의 domain을 갖는 단백질이며, 활성화 과정에 각 domain들의 유기적인 상호작용이 일어난다. 또한 zinc ion coordination에 관여하는 zinc finger domain이 있어 구조

의 안정성을 제공한다. 각각의 유전자변이에 대한 구조적인 해석을 통해 Parkin의 domain 사이의 상호작용에 대한 새로운 이해가 가능하다. 또한 구조적으로 어려운 유전자변이는 추가적인 연구를 통해 그 기전을 밝혀야 할 것이다.

본 연구를 통해 파킨슨병 환자 유전자변이에 의해 세포 내에서 Parkin의 기능이 어떻게 차이가 나며, 그 구조적인 근거를 확인할 수 있었다. 모든 표현형에 대한 구조적인 해석이 가능하지 않았지만 이는 다른 조건의 CCCP 처리나 ubiquitination assay, 또는 그 하위신호전달과 관련된 실험을 통해 보다 정확한 해석이 가능할 것이다. 그리고 이 연구 결과가 in vivo 모델에서도 재현된다면 더욱 가치 있는 연구가 될 것이다. 본 연구를 통해 Parkin의 유전자변이에 대한 구조적인 이해를 돕고, 새로운 파킨슨병 발병 기전에 대한 시각을 제공할 수 있을 것이다.

## 참고문헌

- Cipriani, S., Chen, X., Schwarzschild, M.A. (2010). Urate: a novel biomarker of Parkinson's disease risk, diagnosis and prognosis. *Biomark Med* 4, 701-712.
- Corti, O., Lesage, S., Brice, A. (2011). What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev* 91, 1161-1218.
- Deas, E., Plun-Favreau, H., Gandhi, S., Desmond, H., Kjaer, S., Loh, S.H., Renton, A.E., Harvey, R.J., Whitworth, A.J., Martins, L.M., Abramov, A.Y., Wood, N.W. (2011). PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Hum Mol Genet* 20, 867-879.
- Devine, M.J., Gwinn, K., Singleton, A., Hardy, J. (2011). Parkinson's disease and alpha-synuclein expression. *Mov Disord* 26, 2160-2168.
- Dorcey, E.R., Constantinescu, R., Thompson, J.P., Biglan, K.M., Holloway, R.G., Kieburtz, K., Marshall, F.J., Ravina, B.M., Schifitto, G., Siderowf, A., Tanner, C.M. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 68, 384-386.
- Fiesel, F.C., Caulfield, T.R., Moussaud-Lamodière, E.L., Ogaki, K.I., Dourado, D.F., Flores, S.C., Ross, O.A., Springer, W. (2015). Structural and Functional Impact of Parkinson Disease-Associated Mutations in the E3 Ubiquitin Ligase Parkin. *Hum Mutat* 36, 774-786.
- Foubert-Samier, A., Helmer, C., Perez, F., Le, Goff, M., Auriacombe, S., Elbaz, A., Dartigues, J.F., Tison, F. (2012). Past exposure to

neuroleptic drugs and risk of Parkinson disease in an elderly cohort. *Neurology* *79*, 1615–1621.

Gibb, W.R., Lees, A.J. (1988). The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *51*, 745–752.

Goetz, C.G. (2011). The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med* *1*, a008862.

Greene, A.W., Grenier, K., Aguilera, M.A., Muise, S., Farazifard, R., Haque, M.E., McBride, H.M., Park, D.S., Fon, E.A. (2012). Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep* *13*, 378–385.

Hampe, C., Ardila-Osorio, H., Fournier, M., Brice, A., Corti, O. (2006). Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Hum Mol Genet* *15*, 2059–2075.

Healy, D.G., Falchi, M., O'Sullivan, S.S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S., Brice, A., Aasly, J., Zabetian, C.P., Goldwurm, S., Ferreira, J.J., Tolosa, E., Kay, D.M., Klein, C., Williams, D.R., Marras, C., Lang, A.E., Wszolek, Z.K., Berciano, J., Schapira, A.H., Lynch, T., Bhatia, K.P., Gasser, T., Lees, A.J., Wood, N.W. (2008). Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* *7*, 583–590.

Khoo, T.K., Yarnall, A.J., Duncan, G.W., Coleman, S., O'Brien, J.T., Brooks, D.J., Barker, R.A., Burn, D.J. (2013). The spectrum of

nonmotor Dsymptoms in early Parkinson disease. *Neurology* *80*, 276–281.

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* *392*, 605–608.

Kumar, A., Aguirre, J.D., Condos, T.E., Martinez-Torres, R.J., Chaugule, V.K., Toth, R., Sundaramoorthy, R., Mercier, P., Knebel, A., Spratt, D.E., Barber, K.R., Shaw, G.S., Walden, H. (2015). Disruption of the autoinhibited state primes the E3 ligase parkin for activation and catalysis. *EMBO J* *34*, 2506–2521.

Kumar, A., Chaugule, V.K., Condos, T.E.C., Barber, K.R., Johnson, C., Toth, R., Sundaramoorthy, R., Knebel, A., Shaw, G.S., Walden, H. (2017). Parkin-phosphoubiquitin complex reveals cryptic ubiquitin-binding site required for RBR ligase activity. *Nat Struct Mol Biol* *24*, 475–483.

Lorraine, V.K., Anthony, E.L. (2015). Parkinson's disease. *Lancet* *386*, 896–912.

Lücking, C.B., Dürr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De, Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B.S., Meco, G., Denèfle, P., Wood, N.W., Agid, Y., Brice, A. (2000). Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* *342*, 1560–1567.

Marras, C., Lang, A. (2013). Parkinson's disease subtypes: lost in translation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *84*, 409–415.

Matsumine, H., Saito, M., Shimoda-Matsubayashi, S., Tanaka, H., Ishikawa, A., Nakagawa-Hattori, Y., Yokochi, M., Kobayashi, T., Igarashi, S., Takano, H., Sanpei, K., Koike, R., Mori, H., Kondo, T., Mizutani, Y., Schäffer, A.A., Yamamura, Y., Nakamura, S., Kuzuhara, S., Tsuji, S., Mizuno, Y. (1997). Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet* *60*, 588-596.

Mccooy, M.K., Cookson, M.R. (2012). Mitochondrial quality control and dynamics in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* *16*, 869-882.

Noyce, A.J., Bestwick, J.P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C.H., Giovannoni, G., Lees, A.J., Schrag, A. (2012). Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann Neurol* *72*, 893-901.

Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M., Van, B.C. (2010). Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat* *31*, 763-780.

Park, J., Lee, S.B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J.M., Chung, J. (2006). Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* *441*, 1157-1161.

Pickrell, A.M., Youle, R.J. (2015). The role of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron* *85*, 257-273.

Periquet, M., Latouche, M., Lohmann, E., Rawal, N., De, Michele, G., Ricard, S., Teive, H., Fraix, V., Vidailhet, M., Nicholl, D., Barone, P.,

Wood, N.W., Raskin, S., Deleuze, J.F., Agid, Y., Dürr, A., Brice, A. (2003). Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* *126*, 1271–1278.

Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* *276*, 2045–2047.

Poorkaj, P., Nutt, J.G., James, D., Gancher, S., Bird, T.D., Steinbart, E., Schellenberg, G.D., Payami, H. (2004). Parkin mutation analysis in clinic patients with early-onset Parkinson disease. *Am J Med Genet A* *129A*, 44–50.

Rankin, C.A., Roy, A., Zhang, Y., Richter, M. (2011). Parkin, A Top Level Manager in the Cell's Sanitation Department. *Open Biochem J* *5*, 9–26.

Samuel, M.G., Patricia, J.Q., G. Webster, R., Connie, M., Cheryl, M., Grace, S.B., Kathleen, C., Monica, K., Anabel, R.C., Meike, K., Benjamin, P., Kelvin, L.C., Hubert, H.F., Franca, C., J. William, L., Caroline, M.T. (2012). Solvent exposures and Parkinson disease risk in twins. *Ann Neurol* *71*, 776–784.

Sarraf, S.A., Raman, M., Guarani-Pereira, V., Sowa, M.E., Huttlin, E.L., Gygi, S.P., Harper, J.W. (2013). Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* *496*, 372–376.

Sauvé, V., Lilov, A., Seirafi, M., Vranas, M., Rasool, S., Kozlov, G., Sprules, T., Wang, J., Trempe, J.F., Gehring, K. (2015). A Ubl/ubiquitin switch in the activation of Parkin. *EMBO J* *34*, 2492-2505.

Schrag, A., Schott, J.M. (2006). Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. *Lancet Neurol* *5*, 355-363.

Seirafi, M., Kozlov, G., Gehring, K. (2015). Parkin structure and function. *FEBS J* *282*, 2076-2088.

Trempe, J.F., Sauvé, V., Grenier, K., Seirafi, M., Tang, M.Y., Ménade, M., Al-Abdul-Wahid, S., Krett, J., Wong, K., Kozlov, G., Nagar, B., Fon, E.A., Gehring, K. (2013). Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science* *340*, 1451-1455.

Wong, E.S., Tan, J.M., Wang, C., Zhang, Z., Tay, S.P., Zaiden, N., Ko, H.S., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Lim, K.L. (2007). Relative sensitivity of parkin and other cysteine-containing enzymes to stress-induced solubility alterations. *J Biol Chem* *282*, 12310-12318.

## ABSTRACT

# Studies on the pathogenic mutations of Parkin in Parkinson's disease

Hyunho Cho

School of Biological Sciences

The Graduate School

Seoul National University

RING-between-RING (RBR) E3 ligase is a family which is distinct from RING or HECT ligase. Parkin is an well known example of RBR E3 ligase and its mutations lead to early-onset hereditary Parkinson's disease. Parkin and other RBR ligases share RBR module, but Parkin is usually autoinhibited and activated via a distinct mechanism. Previous studies regarding mutations in Parkin were focused on estimating its ubiquitination activity but it remains unclear how mutations in Parkin contribute to its function and structure. Here, after expressing Parkin mutants in HeLa cells and measuring their activity, we classified the mutations based on their phenotypes and analyzed the structural rationales for the phenotypes. I and my colleagues did site-directed mutagenesis to generate Parkin mutants and observed their expression patterns. Also, by treating

CCCP, which is known as an activator of Parkin, I and my colleagues examined translocation of Parkin mutants to mitochondria. As a result, 45 Parkin mutants were classified into 3 groups according to the phenotypes. Using this data I analyzed mutants one by one using PyMOL program. These studies contribute to understanding the structural bases of Parkin mutations to evoke the phenotypes related to Parkinson's disease.

**Keywords :** Parkin, RBR ligase, mitochondria, structure, PyMOL

***Student Number :*** 2015-20448