

## HtrA2 유전자가 결손된 mouse embryonic fibroblast 세포주의 형태학적 특징 및 세포사멸 자극에 대한 감수성 조사

이상규 · 남민경 · 김구영 · 임향숙\*

가톨릭대학교 생명과학과, 분자유전학연구소

Received March 5, 2008 / Accepted April 11, 2008

**Characterization of HtrA2-deficient Mouse Embryonic Fibroblast Cells Based on Morphology and Analysis of their Sensitivity in Response to Cell Death Stimuli.** Sang-Kyu Lee, Min-Kyung Nam, Goo-Young Kim and Hyangshuk Rhim\*. *Research Institute of Molecular Genetics and Department of Biomedical Sciences, College of Medicine, the Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea* - High-temperature requirement A2 (HtrA2) has been known as a human homologue of bacterial HtrA that has a molecular chaperone function. HtrA2 is mitochondrial serine protease that plays a significant role in regulating the apoptosis; however, the physiological function of HtrA2 still remains elusive. To establish experimental system for the investigation of new insights into the function of HtrA2 in mammalian cells, we first obtained *HtrA2<sup>+/+</sup>* and *HtrA2<sup>-/-</sup>* MEF cells lines and identified those cells based on the expression pattern and subcellular localization of HtrA2, using immunoblot and biochemical assays. Additionally, we observed that the morphological characteristics of *HtrA2<sup>-/-</sup>* MEF cells are different from those of *HtrA2<sup>+/+</sup>* MEF cells, showing a rounded shape instead of a typical fibroblast-like shape. Growth rate of *HtrA2<sup>-/-</sup>* MEF cells was also 1.4-fold higher than that of *HtrA2<sup>+/+</sup>* MEF cells at 36 hours. Furthermore, we verified both MEF cell lines induced caspase-dependent cell death in response to apoptotic stimuli such as heat shock, staurosporine, and rotenone. The relationship between HtrA2 and heat shock-induced cell death is the first demonstration of the research field of HtrA2. Our study suggests that those MEF cell lines are suitable reagents to further investigate the molecular mechanism by which HtrA2 regulates the balance between cell death and survival.

**Key words :** High-temperature requirement A2, mouse embryonic fibroblast (MEF) cells, cell death, heat shock

### 서 론

Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Huntington disease (HD)와 같은 퇴행성 뇌질환들은 특정 단백질들의 misfolding에 의하여 형성된 단백질 응집체들이 세포내외 독성을 유발하여 세포의 기능을 손상시켜 발병하게 되는 만성중추신경계 질환이다[25,28,38]. 이 퇴행성 뇌질환 중의 하나인 PD에서 가장 중요한 병리학적 특성은 흑색질에 있는 도파민 신경세포가 점진적으로 소실된다는 것과 흑색질에서 단백질 응집체인 Lewy body (루이소체, LB)가 존재한다는 것이다[3]. 최근 연구에 의하면 루이소체와 같은 단백질 응집체의 형성이 뇌세포들의 점진적인 퇴행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다[29]. 또한, 단백질 응집체 형성이 신경세포 사멸에 영향을 미칠 수 있다는 결과들이 보고되고 있다[7,27]. PD 발병의 중요한 요인 중의 하나로 추정되는 루이소체의 형성과정과 그 정확한 작용기전에 대해서는 여전히 잘 알려져 있지 않으나, PD 원인 단백질인 al-

pha-synuclein (*Scna*, PARK1, PARK4)이 루이소체의 주요 구성성분으로서 PD 발병과 관련된 다른 단백질 응집 및 루이소체 형성에 중요한 역할을 할 것으로 예상되고 있다[11, 24,30,37].

이 *Scna* 유전자와 더불어 현재까지 밝혀진 PD의 원인 유전자에는 parkin [*Parkin*, PARK2] [18], PTEN induced putative kinase 1 [*Pink1*, PARK6] [36], *DJ-1* [PARK7] [4], leucine-rich repeat kinase 2 [*Lrrk2*, PARK8] [22,40], high-temperature requirement protein A2 [*HtrA2*, PARK13] [31] 등이 있다. 이 중 *HtrA2*는 stress-activated kinase인 p38의 alternatively spliced form인 Mix2와 결합하는 분자로 처음 밝혀졌다[10]. *HtrA2*는 미토콘드리아에 존재하는 serine protease로 세포사멸 자극에 의해 미토콘드리아에서 세포질로 방출되어 caspase들의 활성을 막고 있는 apoptosis 단백질의 저해제인 IAP 기능을 저해함으로써 세포사멸을 유도하기도 하며, 한편으로는 이 caspase-dependent cell death pathway를 거치지 않고 자체적인 serine protease 활성을 통해 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다[2,34,39].

Bacterial HtrA 단백질은 37도의 정상 온도에서는 chaperone으로 작용하다가 *E. coli*가 고온(42도)의 스트레스나 oxi-

\*Corresponding author

Tel : +82-2-590-2390, Fax : +82-2-594-2395

E-mail : hrhim@catholic.ac.kr

ductive 스트레스 상황에 노출될 때, HtrA의 serine protease 작용을 통해 비이상적으로 축적된 단백질을 제거함으로써 *E. coli*의 정상적인 생존을 가능하게 하는 것으로 알려져 있다 [19,20]. 이러한 HtrA family의 human homologue인 HtrA2도 chaperone으로서의 역할을 할 뿐만 아니라, heat shock과 같은 비정상적인 환경에서 자신의 serine protease 활성을 증가시켜 세포의 운명을 조절하는데 관여할 수 있을 것이라 예상하고 있다. 최근 *HtrA2* 유전자를 knockout시킨 mouse나 *mnd2* mouse (*HtrA2*의 serine 276 residue가 cysteine으로 mutation)를 이용한 연구를 통해 HtrA2가 신경세포를 보호하는 작용을 한다는 연구결과가 발표되었다[16,17,21]. 따라서 HtrA2는 세포의 생존과 사멸의 균형을 조절함으로써 생명현상에 핵심적인 역할을 할 것으로 사료되나, 여전히 그 정확한 기능은 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 heat shock과 *HtrA2* 유전자와의 상관관계 및 HtrA2의 작용기전을 규명하기 위한 시스템을 구축하고자 HtrA2를 발현하는 mouse embryonic fibroblast (MEF) 세포주(*HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF)와 *HtrA2* 유전자가 knockout된 MEF 세포주(*HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF)의 특성을 조사하고 45도의 고온 처리 시 발현되는 단백질의 변화를 관찰하였다. 이 연구는 heat shock이나 각종 세포사멸 자극에 의해 유도되는 세포사멸에서의 HtrA2의 역할을 규명할 수 있는 좋은 시스템과 정보를 제공할 수 있을 것이다.

### 재료 및 방법

#### 세포 배양

*HtrA2* knockout (*HtrA2*<sup>-/-</sup>) MEF 세포주와 wild-type (*HtrA2*<sup>+/+</sup>) MEF 세포주는 Cancer Research UK London Research Institute로부터 제공받았다[21]. Homologous recombination 방법으로 *HtrA2* 유전자(exon I ~ exon VII)를 포함하는 1.9 kb의 genomic DNA 부분을 *neomycin phosphotransferase II* (neomycin resistant 유전자, *Neo*)로 치환하여 *HtrA2* 유전자를 제거한 mouse를 만들고, 이 mouse의 MEF에 simian virus 40 large T antigen (SV40 T)을 stable하게 발현시켜 immortalized된 세포를 선택하여 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주를 구축한 것이다(Fig. 1) [21].

MEF 세포주는 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen, CA), 8.5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, CA)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, CA)을 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

#### Polymerase chain reaction (PCR)

*HtrA2*<sup>+/+</sup>, *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주에서 genomic DNA를 추출하여 *Neo* specific한 primer NeoF (5'-CCGGCCGCTTGGGT

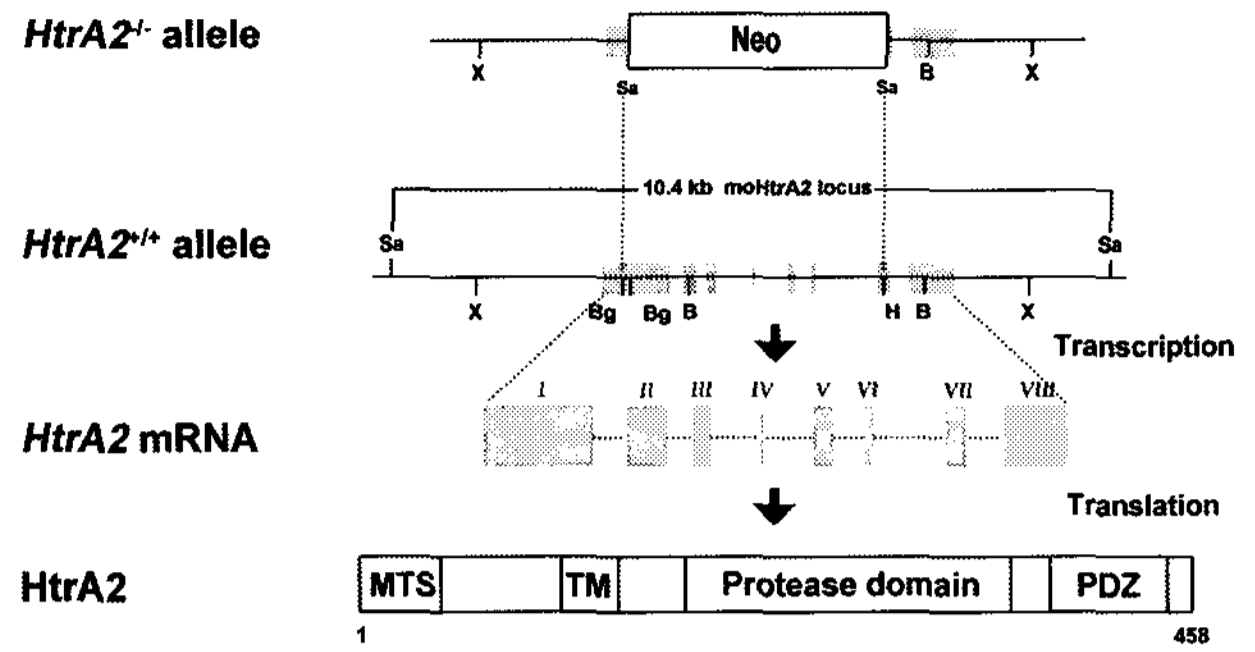


Fig. 1. Schematic representation of *HtrA2* alleles and of the *HtrA2* mRNA and protein of HtrA2. Schematic diagram of the wild-type mouse *HtrA2* locus (*HtrA2*<sup>+/+</sup> allele, middle) and the targeted *HtrA2* allele (*HtrA2*<sup>-/-</sup> allele, top). The region encompassing exons I ~ VII between the BglIII (Bg) and HindIII (H) restriction sites of a *HtrA2* genomic locus was replaced by a neomycin resistance (*Neo*) gene. XhoI (X); SacI (Sa); and BamHI (B). *HtrA2* consists of four functional domains: mitochondrial targeting sequence (MTS, aa 1-40); transmembrane domain (TM, aa 105-123); protease domain (aa 150-343); and PDZ domain (aa 346-445).

GGAGAGG-3')와 NeoR (5'-TCGGCAGGAGCAAGGTGAG ATGACA-3')과 *HtrA2*의 exon I (1-523 bp)과 exon II (524-728 bp)를 인지하는 specific한 primer AM04230701 (5'-CCCCGGATCTCTGGGCACGATTGAAT-3')과 AM05230701 (5'-ATCCCCGCTAGGCAGCCTCACTCGTA-3')을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건: 95°C에서 3분 동안 genomic DNA를 denaturation한 다음, 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분의 조건으로 30 cycle을 진행한 다음 72°C에서 10분 동안 polymerase extension반응을 하였다.

#### 세포증식 측정과 Coomassie staining을 이용한 세포 형태 조사

Culture dish (60 mm)에 3×10<sup>5</sup> 개의 MEF 세포를 접종하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 배양하고 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72시간마다 세포의 수를 측정하였다. 이를 위해 배양액을 제거한 후 1 ml의 1 trypsin을 1분간 처리한 후 다시 1 ml의 배양액을 넣어주어 trypsin을 inactivation시킨 다음, single cell로 suspension하였다. 세포를 0.4% trypan blue로 염색하여 염색되지 않은 살아있는 세포의 수를 hemacytometer로 측정하였다. 각 실험은 한 dish에서 키우던 세포를 3회 counting하여 평균을 구하고, 이 개별 실험을 2번 더 실시하여 총 3회 개별 counting 실험을 수행한 후, 측정값과 평균값, 표준편차, 표준오차를 SigmaPlot 9.0 program을 이용하여 분석하여 그래프로 나타내었다. Error bar는 표준오차로 표시하였다.

세포의 형태를 관찰하기 위해 culture dish (35 mm)에

$1 \times 10^4$  개의 MEF 세포를 접종하고, 12시간 뒤에 배양액을 제거하고 cold PBS로 2회 washing한 다음 5분 동안 4% paraformaldehyde를 세포에 처리하여 세포를 고정하였다. 고정액을 제거한 후 0.1% Coomassie brilliant blue solution (0.1% Brilliant blue R, 45% methanol, 10% acetic acid)으로 5분 동안 염색한 다음 cold PBS로 2회 washing하고 증류수로 1회 washing하였다. 세포의 형태는 Leica MZFLIII microscope (Leica, Germany)에서 관찰한 후 Canon PowerShot S70 digital camera (Japan)를 이용하여 사진으로 나타내었다.

### Immunoblot (IB) assay

세포를 수거하여 RIPA buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin]를 넣어 ice에서 30분 동안 incubation시켰다. 이어서 원심분리 후에 상등액을 수거하고 Bradford assay를 이용하여 단백질을 정량하였다. 이 중 30  $\mu$ g의 단백질을 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 electrophoresis (SDS-PAGE)하였다. 다음으로, gel 상에 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Protran, Gemerny)으로 옮기고, nonspecific background를 최소화하기 위해 5% skim milk/TBS-T buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% tween-20]에 membrane을 넣고 상온에서 1시간 동안 rocker 위에서 shaking하였다. Blocking 후 TBS-T buffer로 washing하여 skim milk를 제거하고, 각각의 primary antibody (Ab) [anti-HtrA2 (ATGene, Korea), anti-HSP60 (Santa Cruz Biotechnology), anti-SOD1 (Santa Cruz Biotechnology), anti-PARP1 (Cell Signaling Technology), anti-cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology), anti- $\beta$ -actin (Sigma)]를 넣고 상온에서 1시간 정도 반응하였다. Horseradish peroxidase (HRP)가 결합되어 있는 secondary antibody들을 5% skim milk에 1:5,000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 rocking하면서 incubation하였다. Ab와 특이적으로 결합하는 단백질 밴드는 ECL (enhanced chemiluminescence) 방법을 이용하여 확인하였다.

### Subcellular fractionation

Culture dish (100 mm)에  $4 \times 10^6$  개의 MEF 세포를 접종한 후 24시간 뒤에 세포를 수거하여 digitonin lysis buffer [250 mM sucrose, 20 mM HEPES (pH 7.4), 5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), and 0.02% digitonin, 1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin]를 넣어 ice에서 10분 동안 incubation하였다. 다음으로 27-gauge needle을 이용하여 세포를 분쇄하고  $4^\circ C$ 에서  $900 \times g$ 로 2분간 원심분리하여 unbroken 세포와 nuclei pellet을 제거하고 supernatant를 새 tube로 옮겼다.

Supernatant를 다시 13,200 rpm으로 10분간 원심분리하여 cytosolic fraction (supernatant)과 mitochondrial fraction (pellet)으로 분리하였다. 분리된 mitochondrial fraction은 ice에서 1시간 동안 0.02% digitonin lysis buffer로 lysis하여 13,200 rpm으로 10분간 원심분리하여 cellular debris를 제거하였다. 분리한 cytosolic fraction과 mitochondrial fraction은 IB assay를 이용하여 단백질을 확인하였다[5].

### Heat shock에 의해 유도되는 세포사멸 조사

Culture dish (100 mm)에  $4 \times 10^6$  개의 MEF 세포를 접종하고 24시간 지난 후,  $45^\circ C$ 로 고정된 5%  $CO_2$  인큐베이터에 각 분(30, 60, 90분) 별로 세포를 배양하여 세포에 heat shock을 주었다. 세포를 수거한 후 RIPA buffer로 lysis하여 추출한 total lysate를 IB assay를 이용하여 단백질을 확인하였다.

### 세포사멸자극 화합물을 이용한 세포사멸 조사

Culture dish (60 mm)에  $4 \times 10^5$  개의 MEF 세포를 접종하고  $37^\circ C$ 로 고정된 5%  $CO_2$  인큐베이터에서 24시간 배양 후, 10  $\mu$ M rotenone (ROT), 0.5  $\mu$ M staurosporine (STS), ROT과 STS를 녹인 용매인 DMSO (1  $\mu$ l/ml, 0.05%)를 같은 부피로 세포에 처리하여 control로 사용하였다. ROT을 처리한 후 6시간, STS를 처리한 후 24시간 후에 세포를 수거하고 RIPA buffer로 lysis하여 추출한 total lysate를 IB assay를 이용하여 단백질을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### *HtrA2*<sup>+/+</sup> 와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주에서 *HtrA2* 유전자와 *HtrA2* 단백질 발현양상 비교분석

본 연구의 주 목적은 세포의 생존과 사멸의 균형 조절에 관여하는 *HtrA2*의 기능을 보다 더 심도 있게 연구하기 위한 시스템을 구축하는 것이다. 이를 위해 정상세포인 *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포주와 *HtrA2* 유전자가 knockout된 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주의 특성을 조사하였다. 먼저 확보한 *HtrA2*<sup>+/+</sup>와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주에서 genomic DNA를 추출하여 *HtrA2* 유전자의 존재 여부를 polymerase chain reaction (PCR)으로 확인하였다(Figs. 1, 2A). *HtrA2*를 인지하는 *HtrA2F* (nucleotide, nt 371-396), *HtrA2R* (nt 678-703) primer pair와 *Neo*를 인지하는 *NeoF* (nt 34-55), *NeoR* (nt 308-332) primer pair를 이용하여 PCR을 한 결과, *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포에서는 *HtrA2* primer가 특이적으로 결합하는 *HtrA2*의 exon I (nt 1-506)과 exon II (nt 507-711)가 존재하므로 591 bp 크기의 fragment를 확인할 수 있었다. 이와는 달리 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포에서는 591 bp의 *HtrA2* fragment 대신 299 bp의 *Neo* fragment의 존재를 확인할 수 있었다. 위 결과를 바탕으로 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주는 *HtrA2* 유전자 대신 *Neo*로 치환된 세포주임을 알 수 있다.

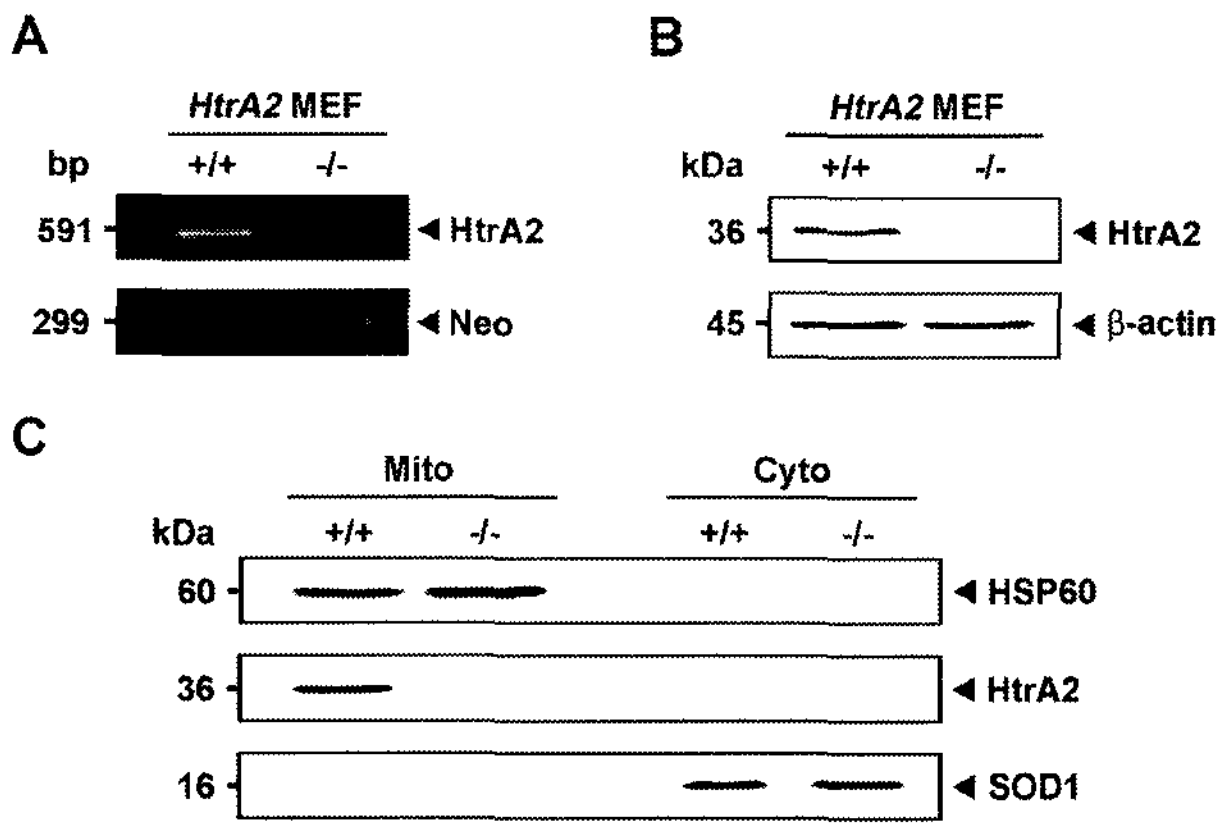


Fig. 2. Identification of *HtrA2*<sup>+/+</sup> and *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF cell lines. (A) PCR-based genotyping. Genomic DNA isolated from *HtrA2*<sup>+/+</sup> and *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF cell lines was performed by PCR with HtrA2 and Neo specific primers. (B) An immunoblot (IB) assay for HtrA2. Cell extracts obtained from *HtrA2*<sup>+/+</sup> and *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF cell lines were processed to 15% SDS-PAGE and analyzed by IB with anti-HtrA2 antibody (Ab).  $\beta$ -actin was used as a loading control. (C) Subcellular localization of HtrA2. Each fraction was subjected to 15% SDS-PAGE and analyzed by IB with anti-HtrA2 Ab, anti-HSP60 Ab as a mitochondrial marker, and anti-SOD1 Ab as a cytosolic marker.

*HtrA2*<sup>+/+</sup>와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주의 genotype을 확인한 후, 두 MEF 세포주에서 HtrA2 단백질의 발현양상을 조사하였다(Fig. 2B). *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포주에서는 36 kDa 크기의 mature form의 HtrA2 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었지만, *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주에서는 이 크기의 단백질 밴드를 관찰할 수 없었다. 이는 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주는 HtrA2 단백질이 발현되지 않는 HtrA2 knockout 세포라는 것을 유전자 발현 수준에서 확인한 결과이다.

MEF 세포주에서 HtrA2가 어느 subcellular compartment에 존재하고 있는지를 조사하기 위하여 digitonin을 이용하여 세포를 lysis하고 침강속도를 달리하여 미토콘드리아층과 세포질층으로 분리하였다. 미토콘드리아와 세포질 단백질을 15% SDS-PAGE로 분리한 후, *HtrA2*<sup>+/+</sup>와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주에서 HtrA2 Ab와 특이적으로 반응하는 밴드들이 존재하는지를 비교 분석하였다(Fig. 2C). 먼저 미토콘드리아와 세포질이 잘 분리되었는지 확인하기 위하여 미토콘드리아의 대표 단백질 marker로 이용되는 heat shock protein 60 (HSP60)과 세포질의 대표 단백질 marker인 superoxide dismutase1 (SOD1)의 존재를 IB으로 비교 분석하였다. *HtrA2*<sup>+/+</sup>와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주 모두 미토콘드리아층에서는 HSP60 단백질 밴드가 확인되었고 세포질층에서는 SOD1 밴드가 확인되었는데, 이 결과는 *HtrA2*<sup>+/+</sup>, *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주 모두 미토콘드리아층과 세포질층으로 잘 분리되었다는

것을 의미한다. *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포주에서 약 36 kDa의 mature form의 HtrA2 단백질이 미토콘드리아층에서는 존재하는 것을 관찰할 수 있었으나, 세포질층에서는 거의 존재하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이 실험을 통해서 HtrA2 단백질이 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주에는 존재하지 않는다는 것을 재확인할 수 있었다.

이전 HtrA2의 localization에 관한 연구결과에서 HeLa나 HEK293 세포주에서도 HtrA2 단백질이 미토콘드리아에 주로 존재한다는 결과들이 보고되었다[26,33]. 최근 subcellular fractionation 방법과 confocal immunofluorescence imaging system 등을 이용한 정밀 분석 연구에서 HtrA2의 일부가 세포질, endoplasmic reticulum (ER), nucleus에도 존재할 뿐만 아니라, 미토콘드리아에 존재한다는 결과들이 보고되고 있다[12,15]. 이들 연구를 통하여 HtrA2가 cervical carcinoma, embryonic kidney, ovary로부터 유래된 세포에서 미토콘드리아에 주로 존재한다는 것을 알 수 있다. 따라서 HtrA2가 mouse embryo로부터 유래된 fibroblast에서도 미토콘드리아에 주로 존재한다는 본 연구결과와 더불어 HtrA2가 발생 초기 embryo의 발생과 생존에 중요한 역할을 할 것이라는 가능성을 제시하고 있다[16,21].

### HtrA2가 MEF 세포의 증식과 형태에 미치는 영향에 대한 분석

*HtrA2*<sup>+/+</sup>와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주를 광학현미경상에서 관찰하면 정상 세포인 *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포가 fibroblast 형태인 평평하고 긴 형태를 갖는 것과는 달리, HtrA2가 knockout된 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포는 둥글고 퍼지는 형태를 나타내는 것을 확인할 수 있다(Fig. 3A, B). 세포의 형태를 보다 더 자세히 관찰하기 위해 Coomassie brilliant blue dye로 세포를 staining한 후 두 세포주의 세포 외형 및 내부 형태를 비교 분석하였다(Fig. 3C, D, E, F). Coomassie dye는 세포 단백질들과 membrane에 비 특이적으로 결합하여 세포가 blue color로 염색이 되므로 세포의 핵과 전체적인 결합을 보다 더 자세히 관찰할 수 있다[9]. *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포는 세포 양단에 세포질 돌기를 가진 평평한 긴 morphology를 나타내는데, 이는 fibroblast의 전형적인 형태학적 특징임을 알 수 있다(Fig. 4C, E). 이에 반해 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포의 모양은 대체적으로 넓고 둥글게 퍼지는 형태로 기존의 fibroblast의 형태학적 특징을 상실한 것을 관찰할 수 있다(Fig. 4D, F). 본 연구결과와 마찬가지로 p53-knockout MEF, p19<sup>arf</sup>-knockout MEF, heat shock factor 2 (HSF2)를 knockout시킨 MEF 세포주에서도 fibroblast의 전형적인 형태학적 특징과는 다르게 세포가 둥근 모양을 나타낸다는 보고가 있다[13,23].

*HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주는 형태학적으로도 다를 뿐만 아니라, 배양하는 과정 중에서도 세포증식의 차이를 관찰할 수 있었다. 정상세포인 *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포주와

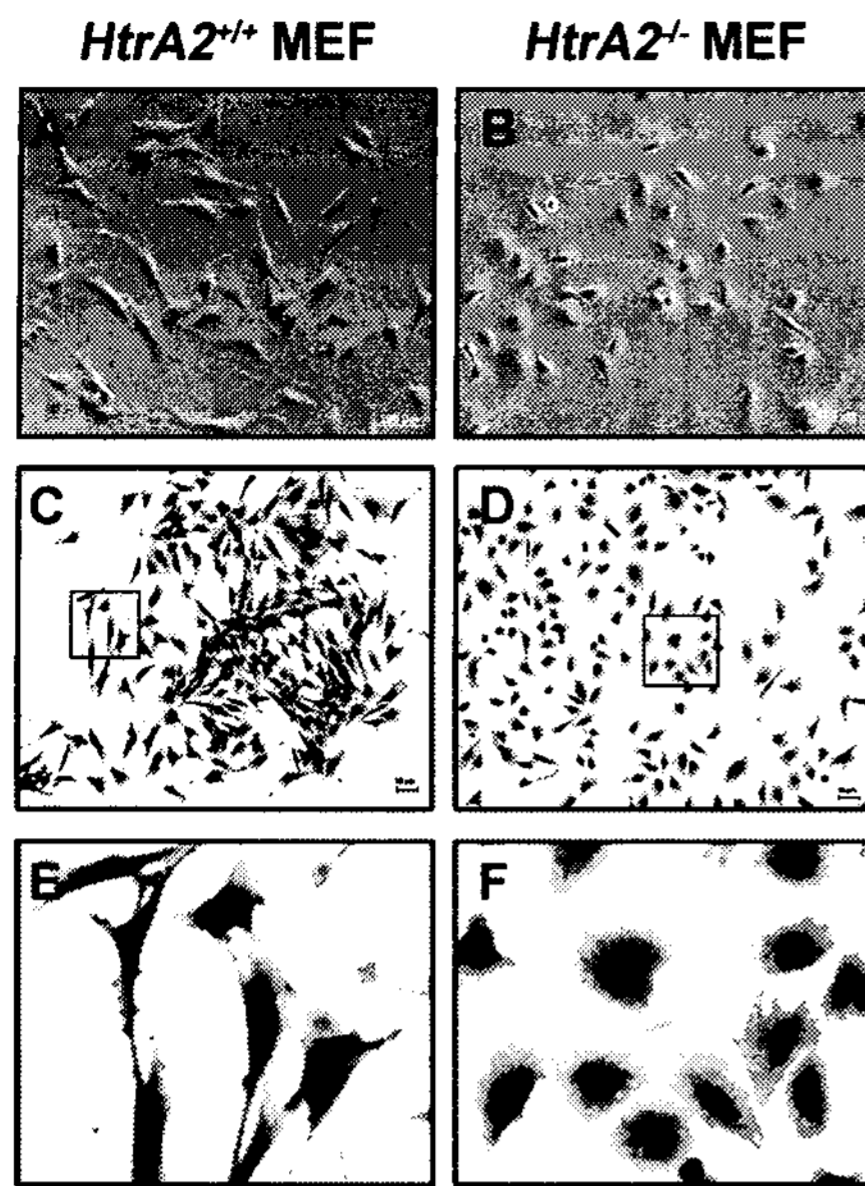


Fig. 3. Morphological difference between *HtrA2*<sup>+/+</sup> and *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF cells. Morphology of *HtrA2*<sup>+/+</sup> (A) and *HtrA2*<sup>-/-</sup> (B) MEF cells was visualized by Leica MZFIII microscope (Leica). (A, B) scale bar=100 mm. (C-F) Cell images stained with Coomassie brilliant blue dye: (C, D) magnification  $\times 200$ , scale bar=10 mm. (E, F) Enlarged images of the box areas in C and D.

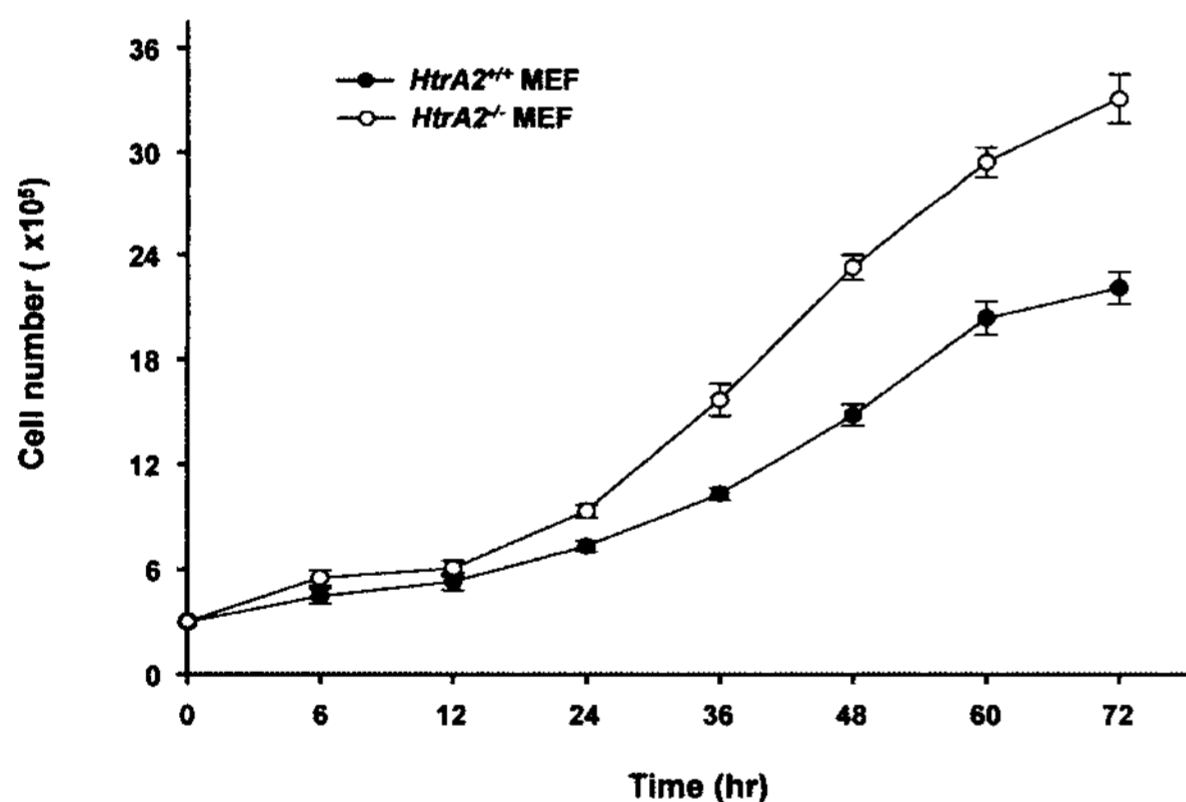


Fig. 4. Growth curve of *HtrA2*<sup>+/+</sup> and *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF cells. Equal numbers ( $3 \times 10^5$ ) of *HtrA2*<sup>+/+</sup> and *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF cells were plated in 60 mm culture dish. At the indicated times, cells were trypsinized and stained with 0.4% trypan blue, and living cells were counted in a hemacytometer. Data are expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments.

*HtrA2*가 knockout된 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주의 성장속도를 조사하기 위해  $3 \times 10^5$  세포를 seeding한 후 일정 배양시간 후 세포 수를 counting하였다(Fig. 4). *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포주는 배양시간이 18시간 정도, *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주 12시간 정도 경과하였을 때 모두 두 배로 증식한 것을 확인할 수 있었으

나, 배양시간이 길어질수록 두 세포간의 증식속도가 확연히 차이가 나는 것을 관찰할 수 있었다. 배양 24시간에는 *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포 증식 보다 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포 증식이 약 1.2배, 36시간과 48시간에는 약 1.4배 더 높은 것으로 나타났다. 배양 72시간이 경과하면 culture dish의 한정적인 면적으로 인해 세포들이 더 이상 증식할 수 없어 세포 성장의 plateau 현상을 나타내는 것을 관찰할 수 있다. 상기의 결과들을 통하여 *HtrA2* 유전자가 knockout된 MEF 세포의 형태는 정상세포와 다른 형태를 나타내는 것을 확인하였고, 또한 세포 증식에서도 확연한 차이를 나타내는 것을 관찰할 수 있었다. 이런 현상들이 *HtrA2*의 특이적인 기능으로 인해 나타나는 것인지 규명하는 연구들이 앞으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

#### 세포 사멸자극에 대한 *HtrA2*<sup>+/+</sup> 와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주의 감수성 분석

세포의 생존과 사멸의 균형 조절에 *HtrA2*가 어떻게 관여하는지 그 기능을 연구하기 위한 시스템 구축을 위한 일환으로 *HtrA2*<sup>+/+</sup>와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주에 세포사멸 자극으로 STS, ROT, heat shock을 가한 후 caspase-dependent pathway를 경유하는 세포사멸이 유도되는지 여부를 분자 수준에서 조사하였다(Fig. 5).

*HtrA2*는 bacterial *HtrA*와는 높은 상동성을 지니므로 heat shock에 대한 response와 밀접한 상관관계가 있을 것으로 예상된다. 이를 조사하기 위해 45°C로 고정된 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에 *HtrA2*<sup>+/+</sup>와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주를 일정 시간 동안 배양한 후, IB assay를 통해 caspase dependent pathway에 관여하는 단백질인 caspase-3의 활성과 이에 따른 poly(ADP-ribose) polymerase1 (PARP1) 절단으로 세포사멸 유도 여부를 확인하였다(Fig. 5A). Pro-caspase-3 (32 kDa)는 세포사멸 자극에 의해 절단되고, 이 절단된 20 kDa의 caspase-3는 autoprocessing으로 인하여 p19/p17의 active caspase-3를 생성하게 된다[14]. 이 활성화된 caspase-3는 세포 내에서 세포의 생존에 중요한 역할을 하는 단백질들을 분해하여 세포사멸을 유도하게 되는데, 이 caspase-3의 기질 중의 하나가 핵 내에서 복구효소로 작용하는 PARP1이며, 이 효소는 caspase-3에 의한 절단으로 효소가 불활성화된다고 알려져 있다[6]. *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포주에서 세포자극을 처리하지 않은 control (C)과 비교하면 heat shock 60분 후부터 17 kDa의 절단된 caspase-3 form이 확인되었고 90분에는 이 밴드의 intensity가 조금 더 증가하는 것을 확인하였다. Caspase-3의 활성화로 인하여 full-length PARP1 (116 kDa)이 heat shock 30분 후부터 90분까지 점진적으로 감소하였고, 절단된 PARP1 form (85 kDa)은 60분에 나타나기 시작하여 90분에 좀 더 명확한 밴드를 확인할 수 있었다. 그리고 90분에 PARP1 form이 잘 확인되지 않는 이유는 다른 세포사멸 자

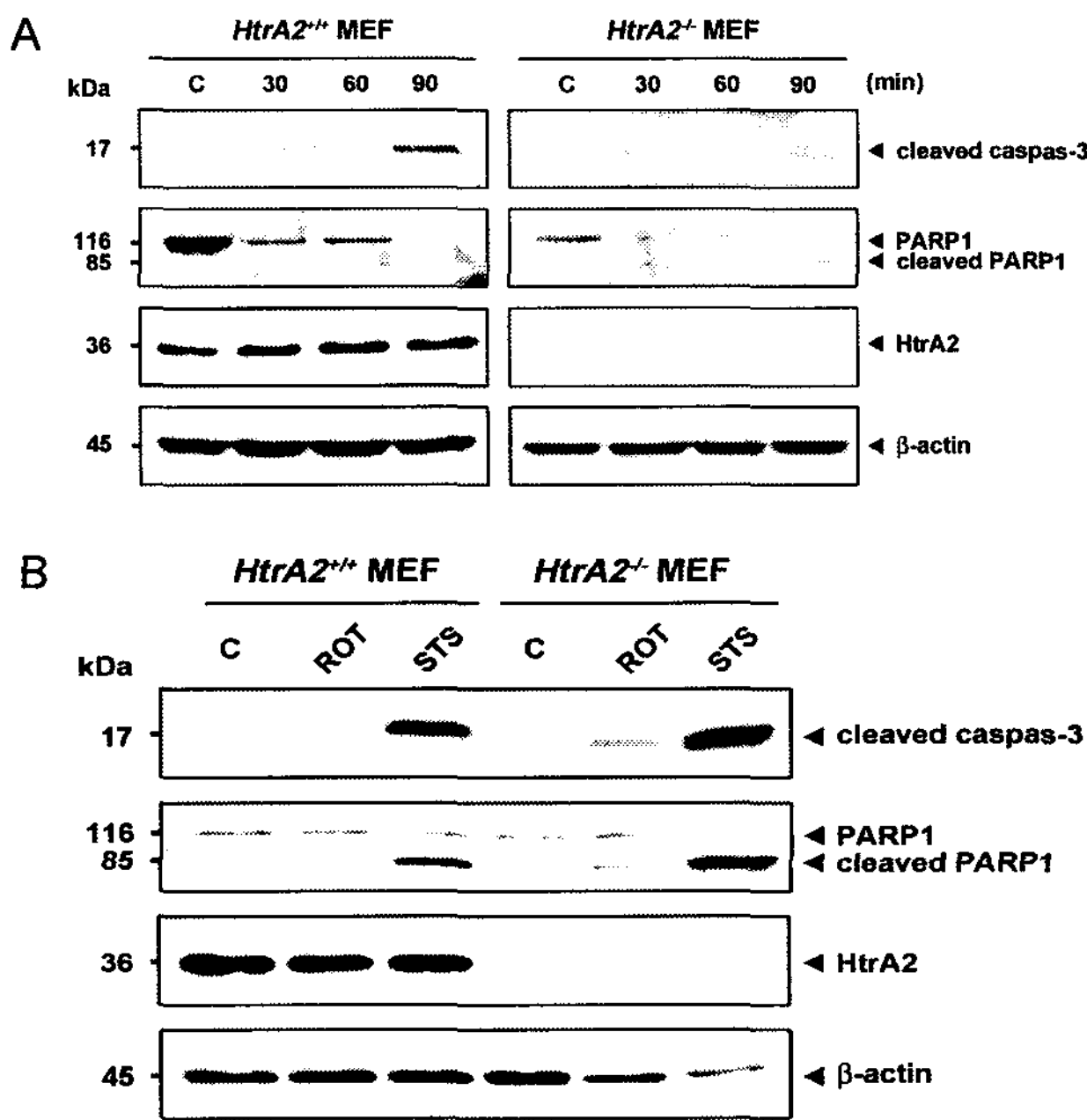


Fig. 5. Induction of cell death in *HtrA2*<sup>+/+</sup> and *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF cells in response to cell death stimuli. (A) Heat shock-induced cell death via caspase-dependent pathway. *HtrA2*<sup>+/+</sup> and *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF cells were cultured at 45°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, and cells were harvested at the indicated times. (B) Staurosporine (STS)- and rotenone (ROT)-induced cell death via caspase-dependent pathway. *HtrA2*<sup>+/+</sup> and *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF cells were treated with 0.5 μM STS and 10 μM ROT for 6 hr and 24 hr, respectively. Cell lysates were subjected to 15% SDS-PAGE and analyzed by IB with Abs specific for the indicated molecules. C indicates cultures exposed to the vehicle control DMSO (0.05%).

극과는 달리 heat shock condition에서는 PARP1 form이 쉽게 degradation되기 때문인 것으로 추정할 수 있다[32,35]. *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주에서는 절단된 caspase-3 form이 heat shock 처리 30분부터 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이와 병행하여 full-length PARP1 form도 30분부터 점차적으로 감소하고 cleaved PARP1 form은 30분부터 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이 연구결과들로부터 *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포주와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주 모두 heat shock에 의해 세포사멸이 유도되는 것을 확인할 수 있으나, heat shock과 HtrA2의 상관관계는 좀 더 여러 각도에서 비교 분석할 필요가 있을 것으로 사료된다.

단백질의 phosphorylation과 Na<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>의 농도변화에 따른 pH 변화로 인한 세포의 활성에 관여하며 intracellular signaling process를 유도하는 protein kinase C의 inhibitor인 STS과 미토콘드리아의 electron transport chain을 방해함으로써 미토콘드리아 dysfunction을 유도하는 미토콘드리아 complex I inhibitor인 ROT을 세포에 처리하였을 때 많은 세

포들에서 세포사멸이 유도된다고 알려져 있다[18]. 본 연구에서도 *HtrA2*<sup>+/+</sup>와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주에 STS (0.5 μM), ROT (10 μM)를 처리한 후 세포사멸 유도 여부를 조사하였다(Fig. 5B). STS를 세포에 처리한 경우, *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주가 *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포주보다 STS에 더 민감하게 반응하여 caspase-3의 활성이 더 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있다. 이와 같이 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주에서 caspase-3의 활성이 *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포주보다 더 높기 때문에 PARP1의 절단도 더 많이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. ROT을 처리하였을 때도 *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포주에 비해 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주에서 caspase-3의 활성이 더 높은 것을 확인하였다. *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포주에서는 85 kDa의 절단된 PARP1 form의 밴드를 거의 확인할 수 없었으나, *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주에서는 이 절단된 밴드를 확인할 수 있었다. 이 연구결과들로부터 *HtrA2*<sup>+/+</sup> MEF 세포주와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주 모두 STS와 ROT에 반응하여 세포사멸이 유도되는 것을 알 수 있다.

본 연구에서는 세포의 생존과 사멸에서의 HtrA2의 기능을 다각적인 측면에서 비교 분석하기 위한 효율적인 시스템 구축하기 위한 일환으로 *HtrA2*<sup>+/+</sup>와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주를 확보하고, 이 세포주들의 증식속도와 형태등의 특성을 조사하였다. 또한, 각종 세포사멸 자극에 의해 유도되는 세포사멸에서의 HtrA2의 역할을 분석하기 위한 시스템 구축을 위해 heat shock, STS, ROT의 처리에 따른 caspase-3의 활성변화를 IB assay로 측정하였다. 따라서 이 *HtrA2*<sup>+/+</sup>와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주는 *in vivo*에서 HtrA2의 기질을 분석하는데 이용될 수 있을 뿐만 아니라, HtrA2의 기능을 심도 있게 연구하기 위한 좋은 정보와 시스템을 제공할 수 있는 reagent로 이용될 수 있을 것이다.

## 요 약

*High-temperature requirement protein A2 (HtrA2)*는 대장균에서 42도 노출 시 세포 보호 기능을 하는 단백질인 HtrA의 human homologue로 동정되었다. 현재까지 human HtrA2는 미토콘드리아에 존재하는 serine protease로 세포사멸 기능에 관여하는 것으로 알려져 있으나, 그 생리적 기능 및 mammalian 세포 내에서 heat shock에 대한 보호기능에 대해서 명확히 알려진 바가 없다. 최근 *HtrA2* 유전자가 결실된 mouse embryonic fibroblast (MEF)가 보고되어 세포 내 HtrA2의 기능 연구가 가능해 졌으나, 이 세포에 대한 정보가 많은 부분 밝혀져 있지 않다. 생리기능연구를 위해서는 자체의 특성들에 대한 조사가 선행되어야 차후 기능연구가 가능할 것이다. 본 연구는 *HtrA2*<sup>+/+</sup>, *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주를 확보하고, 두 세포주의 성장속도, 세포 형태 및, heat shock에 의한 세포사멸 정도를 측정하였다. 우선 *HtrA2*<sup>+/+</sup>, *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주에서 HtrA2의 발현 유무를 PCR과 IB로 확인하

였고, fractionation을 통해 *HtrA2*<sup>+/+</sup> 세포주에서만 HtrA2가 미토콘드리아에 위치함을 확인하였다. 두 세포에서 형태학적인 차이가 있음을 Coomassie staining으로 확인하였고, 성장속도 또한 *HtrA2*<sup>-/-</sup> 세포주가 1.4배 빠름을 확인하였다. 현재까지 보고되지 않은 HtrA2의 고온에 대한 반응연구를 위해 본 연구에서는 heat shock 자극에서 세포사멸을 측정하여, 기존에 알려진 세포사멸자극에서와 동일하게 heat shock에 의해서도 세포사멸이 야기됨을 확인하였다. *HtrA2*<sup>+/+</sup>와 *HtrA2*<sup>-/-</sup> MEF 세포주를 이용한 연구에 있어, HtrA2 유무에 따른 세포의 생리학적 특징을 제공하였고, 향후 heat shock에 의한 세포사멸에서의 HtrA2 기능연구를 위한 중요한 기본 정보를 제공함으로써 HtrA2의 기능을 심도있게 연구하는데 사용할 수 있는 좋은 자료가 될 것이다.

### 감사의 글

이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단(KRF-2007-313-C00728)과 2007년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단(M20709005447-07B0900-44710)의 지원을 받아 수행된 연구임.

### References

- Alam, M. and W. J. Schmidt. 2002. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav. Brain. Res.* **136**, 317-324.
- Althaus, J., M. D. Siegelin, F. Dehghani, L. Cilenti, A. S. Zervos and A. Rami. 2007. The serine protease Omi/HtrA2 is involved in XIAP cleavage and in neuronal cell death following focal cerebral ischemia/reperfusion. *Neurochem. Int.* **50**, 172-180.
- Baba, M., S. Nakajo, P. H. Tu, T. Tomita, K. Nakaya, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski and T. Iwatsubo. 1998. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* **152**, 879-884.
- Bonifati, V., P. Rizzu, M. J. van Baren, O. Schaap, G. J. Breedveld, E. Krieger, M. C. Dekker, F. Squitieri, P. Ibanez, M. J. J. van Dongen, N. Vanacore, J. C. van Swieten, A. Brice, G. Meco, C. M. van Duijn, B. A. Oostra and P. Heutink. 2003. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* **299**, 256-259.
- Cho, S. W., H. J. Park, G. Y. Kim, M. K. Nam, H. Y. Kim, I. H. KO, C. H. Kim and H. Rhim. 2006. Establishment of the expression system of human HtrA2 in the zebrafish. *J. Life Science* **16**, 571-578.
- Cryns, V. and J. Yuan. 1998. Proteases to die for. *Genes. Dev.* **12**, 1551-1570.
- Dauer, W. and S. Przedborski. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889-909.
- Deshmukh, M. and E. M. Johnson, Jr. 2000. Staurosporine-induced neuronal death: multiple mechanisms and methodological implications. *Cell Death. Differ.* **7**, 250-261.
- Enaida, H., T. Hisatomi, Y. Hata, A. Ueno, Y. Goto, T. Yamada, T. Kubota and T. Ishibashi. 2006. Brilliant blue G selectively stains the internal limiting membrane/brilliant blue G-assisted membrane peeling. *Retina* **26**, 631-636.
- Faccio, L., C. Fusco, A. Chen, S. Martinotti, J. V. Bonventre and A. S. Zervos. 2000. Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *The Journal of biological chemistry* **275**, 2581-2588.
- Goedert, M. 2001. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 492-501.
- Gray, C. W., R. V. Ward, E. Karran, S. Turconi, A. Rowles, D. Viglienghi, C. Southan, A. Barton, K. G. Fantom, A. West, J. Savopoulos, N. J. Hassan, H. Clinkenbeard, C. Hanning, B. Amegadzie, J. B. Davis, C. Dingwall, G. P. Livi and C. L. Creasy. 2000. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5699-5710.
- Guo, F., Y. Gao, L. Wang and Y. Zheng. 2003. p19Arf-p53 tumor suppressor pathway regulates cell motility by suppression of phosphoinositide 3-kinase and Rac1 GTPase activities. *J. Biol. Chem.* **278**, 14414-14419.
- Han, Z., E. A. Hendrickson, T. A. Bremner and J. H. Wyche. 1997. A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17:p12 form of caspase-3 *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **272**, 13432-13436.
- Huttunen, H. J., S. Y. Guenette, C. Peach, C. Greco, W. Xia, D. Y. Kim, C. Barren, R. E. Tanzi and D. M. Kovacs. 2007. HtrA2 regulates beta-amyloid precursor protein (APP) metabolism through endoplasmic reticulum-associated degradation. *J. Biol. Chem.* **282**, 28285-28295.
- Jones, J. M., R. L. Albin, E. L. Feldman, K. Simin, T. G. Schuster, W. A. Dunnick, J. T. Collins, C. E. Chrisp, B. A. Taylor and M. H. Meisler. 1993. mnd2: a new mouse model of inherited motor neuron disease. *Genomics* **16**, 669-677.
- Jones, J. M., P. Datta, S. M. Srinivasula, W. Ji, S. Gupta, Z. Zhang, E. Davies, G. Hajnoczky, T. L. Saunders, M. L. Van Keuren, T. Fernandes-Alnemri, M. H. Meisler and E. S. Alnemri. 2003. Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice. *Nature* **425**, 721-727.
- Kitada, T., S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno and N. Shimizu. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605-608.
- Lipinska, B., O. Fayet, L. Baird and C. Georgopoulos. 1989. Identification, characterization, and mapping of the Escherichia coli HtrA gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J. Bacteriol.* **171**, 1574-1584.

20. Lipinska, B., M. Zylicz and C. Georgopoulos. 1990. The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. *J. Bacteriol.* **172**, 1791-1797.
21. Martins, L. M., A. Morrison, K. Klupsch, V. Fedele, N. Moiso, P. Teismann, A. Abuin, E. Grau, M. Geppert, G. P. Livi, C. L. Creasy, A. Martin, I. Hargreaves, S. J. Heales, H. Okada, S. Brandner, J. B. Schulz, T. Mak and J. Downward. 2004. Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol. Cell Biol.* **24**, 9848-9862.
22. Paisan-Ruiz, C., S. Jain, E. W. Evans, W. P. Gilks, J. Simon, M. van der Brug, A. Lopez de Munain, S. Aparicio, A. M. Gil, N. Khan, J. Johnson, J. R. Martinez, D. Nicholl, I. M. Carrera, A. S. Pena, R. de Silva, A. Lees, J. F. Marti-Masso, J. Perez-Tur, N. W. Wood and A. B. Singleton. 2004. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* **44**, 595-600.
23. Paslaru, L., M. Morange and V. Mezger. 2003. Phenotypic characterization of mouse embryonic fibroblasts lacking heat shock factor 2. *J. Cell Mol. Med.* **7**, 425-435.
24. Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E. S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W. G. Johnson, A. M. Lazzarini, R. C. Duvoisin, G. Di Iorio, L. I. Golbe and R. L. Nussbaum. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**, 2045-2047.
25. Ross, C. A. and M. A. Poirier. 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **10 Suppl**, S10-17.
26. Seong, Y. M., J. Y. Choi, H. J. Park, K. J. Kim, S. G. Ahn, G. H. Seong, I. K. Kim, S. Kang and H. Rhim. 2004. Autocatalytic processing of HtrA2/Omi is essential for induction of caspase-dependent cell death through antagonizing XIAP. *J. Biol. Chem.* **279**, 37588-37596.
27. Skovronsky, D. M., V. M. Lee and J. Q. Trojanowski. 2006. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pathol.* **1**, 151-170.
28. Soti, C. and P. Csermely. 2002. Chaperones and aging: role in neurodegeneration and in other civilizational diseases. *Neurochem. Int.* **41**, 383-389.
29. Soto, C. 2003. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 49-60.
30. Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes and M. Goedert. 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839-840.
31. Strauss, K. M., L. M. Martins, H. Plun-Favreau, F. P. Marx, S. Kautzmann, D. Berg, T. Gasser, Z. Wszolek, T. Muller, A. Bornemann, H. Wolburg, J. Downward, O. Riess, J. B. Schulz and R. Kruger. 2005. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Human molecular genetics* **14**, 2099-2111.
32. Sun, Y. L., Y. Zhao, X. Hong and Z. H. Zhai. 1999. Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS. Lett.* **462**, 317-321.
33. Suzuki, Y., Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio and R. Takahashi. 2001. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* **8**, 613-621.
34. Suzuki, Y., K. Takahashi-Niki, T. Akagi, T. Hashikawa and R. Takahashi. 2004. Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways. *Cell Death Differ.* **11**, 208-216.
35. Tian, R., G. Y. Zhang, C. H. Yan and Y. R. Dai. 2000. Involvement of poly (ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-3-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells. *FEBS. Lett.* **474**, 11-15.
36. Valente, E. M., P. M. Abou-Sleiman, V. Caputo, M. M. Muqit, K. Harvey, S. Gispert, Z. Ali, D. Del Turco, A. R. Bentivoglio, D. G. Healy, A. Albanese, R. Nussbaum, R. Gonzalez-Maldonado, T. Deller, S. Salvi, P. Cortelli, W. P. Gilks, D. S. Latchman, R. J. Harvey, B. Dallapiccola, G. Auburger and N. W. Wood. 2004. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **304**, 1158-1160.
37. Wakabayashi, K., K. Tanji, F. Mori and H. Takahashi. 2007. The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology* **27**, 494-506.
38. Weissman, L., N. C. de Souza-Pinto, T. Stevnsner and V. A. Bohr. 2007. DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration. *Neuroscience* **145**, 1318-1329.
39. Yang, Q. H., R. Church-Hajduk, J. Ren, M. L. Newton and C. Du. 2003. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes. Dev.* **17**, 1487-1496.
40. Zimprich, A., S. Biskup, P. Leitner, P. Lichtner, M. Farrer, S. Lincoln, J. Kachergus, M. Hulihan, R. J. Uitti, D. B. Calne, A. J. Stoessl, R. F. Pfeiffer, N. Patenge, I. C. Carbajal, P. Vieregge, F. Asmus, B. Muller-Myhsok, D. W. Dickson, T. Meitinger, T. M. Strom, Z. K. Wszolek and T. Gasser. 2004. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* **44**, 601-607.