



의학박사 학위논문

# 파킨슨병에서 TNF-α에 의한 알파-시뉴클린 응집체의 세포간 전이 조절 연구 및 알파-시뉴클린 응집체를 타겟으로 하는 면역 치료법 연구

Studies on the role of TNF- $\alpha$  in propagation of alphasynuclein aggregates and immunotherapy targeting alpha-synuclein aggregates for Parkinson's disease

2022년 8월

서울대학교 대학원

의과학과 의과학전공

최민선

# 파킨슨병에서 TNF-α에 의한 알파-시뉴클린 응집체의 세포간 전이 조절 연구 및 알파-시뉴클린 응집체를 타겟으로 하는 면역 치료법 연구

최민선의 의학박사 학위논문을 인준함 2022년 7월



# 초 록

# 파킨슨병에서 TNF-α에 의한 알파-시뉴클린 응집 체의 세포간 전이조절 연구 및 알파-시뉴클린

응집체를 타겟으로 하는 면역 치료법 연구

최민선

의과학과, 의과학전공

서울대학교 대학원

최근 연구에 의하면 파킨슨병의 진행을 설명하는 주요 기전은 알파-시뉴클린 응집체의 세포간 전파이며[1], 다양한 세포주, primary 세포, 동물모델에서 알파-시뉴클린의 세포간 전파에 대한 증거가 보고되었다.

알파-시뉴클린 응집체는 신경세포에 의해 흡수되고 축삭을 통해 이동하여 다른 신경세포로 전파된다고 알려져 있다 [2, 3]. 이전 연구에서 알파-시뉴클린 응집체는 세포 외 이입을 통해 유입되고 [4] 세포 외 방출을 통하여 인접 세포로 전파될 수 있다고 보고되었다[5-7]. 또 다른 연구는 알파-시뉴클린의 세포 간 전파를 터널링 나노튜브로 설명한다[8].

이뿐만 아니라 설치류 및 비인간 영장류에서 미리 형성된 알파-시뉴클린 파이브릴의 선조체에 주입하였을 때 뇌전역으로 알파-시뉴클린의 응집이 확인되었으며, 흑질 지역의 도파민성 신경세포의 사멸이 유도되는 것을 확인하였다[9].

최근 연구에 따르면 염증반응이 단백질 응집체의 전파에 중요한 역할을 한다고 알려져 왔다. 그러나 아직 염증반응이 어떻게 단백질 응집체 전파를

i

조절하는지에 대한 메커니즘 규명은 명확하지 않은 상태이다.

본 논문에서는 염증인자인 TNF-α가 알파-시뉴클린 응집체의 전파를 조절하는 기전에 대하여 규명하였고, 나아가 알파-시뉴클린 응집체를 타겟으로 하는 면역 치료법을 제시하였다.

본 논문의 1장에서는 전체적인 연구에 필요한 배경지식을 설명하였고, 2장에서는 *in vitro* 실험을 통하여 활성화된 미세아교세포에서 생성되는 가용성 인자들이 알파-시뉴클린의 세포간 전파를 증가시킨다는 것을 확인하였다. 그 중에서 TNF-α가 가장 두드러진 효과를 보여 TNF-α를 신경세포에 직접 처리하여 변화를 확인하였다. RNAseq분석을 통해 노화 관련 유전자의 활성을 확인하였으며, 면역 분석을 통하여 노화 관련 특징들이 나타나는 것을 확인하였다.

이뿐만 아니라 라이소좀 세포 외 배출 억제제인 vacuolin-1과 *rab27a*에 대한 RANi를 사용하여 알파-시뉴클린의 분비가 라이소좀 세포 외 배출 경로를 통하여 이루어짐을 확인했다. 이는 SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype)의 분비가 라이소좀 세포 외 배출에 의해 매개된다는 것을 의미한다. 이러한 사실은 면역전자현미경과 CLEM (Correlative Light, Electron Microscopy)을 통해 알파-시뉴클린의 응집체가 라이소좀에 존재한다는 것을 한 번 더 확인하였다. 즉 TNF-α는 세포노화를 유도하고, 라이소좀 세포 외 배출을 통한 SASP 경로를 통하여 알파-시뉴클린 응집체의 분비 및 전파를 증가시킴을 확인하였다.

3장에서는 이렇게 분비된 알파-시뉴클린 응집체의 전파가 파킨슨병 병리현상에 관련 있다는 점에 착안하여 알파-시뉴클린 응집체를 타겟으로

ii

하는 항체를 개발하였다. 개발된 항체는 세포간 응집체의 전파를 막을 뿐 아니라, 미세아교세포의 알파-시뉴클린의 식균작용을 촉진하였다. 또 항체의 효과는 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo* 실험인 알파-시뉴클린 형질전환 마우스 실험에서도 다양한 병리 현상에 대해 효과가 있음이 확인되었다.

마지막으로, 4장에서는 본 학위논문의 전반적인 요약과 고찰을 하였다. 본 논문의 결과를 통해 알파-시뉴클린의 전파조절 기전을 이해할 수 있었고, 이를 활용하여 파킨슨병 진행을 늦추는 면역 치료법 개발을 위한 통찰을 얻을 수 있었다.

**주요어:** 파킨슨병, 단백질응집, 신경염증, 미세아교세포, 노화, 면역치료법 **학 번:** 2016-22010

2장의 연구결과는 Experimental & Molecular Medicine, Jul 5 (2022) 에 논문으로 발표되었다.

3 장의 연구결과는 Experimental Neurobiology (EN), Feb 28;31(1):29-41 (2022)에 논문으로 발표되었다.

iii

목차	
----	--

초록 i
목차iv
그림 및 표 목록viii
약어 목록xii
1장1
서론2
1.1. 신경퇴행성질환2
1.1.1. 단백질 응집2
1.1.2. 뇌 염증 반응2
1.1.3. 세포노화
1.2. 파킨슨병4
1.2.1. 파킨슨병의 증상4
1.2.2. 파킨슨병의 병리적 특징5
1.2.2.1. 알파-시뉴클린의 응집5
1.2.2.2. 신경염증반응6
1.2.2.3. Braak stage7
1.2.3. 파킨슨병의 발병기전7
1.2.3.1. 알파-시뉴클린의 잘못접힘과 응집7
1.2.3.2. 미토콘드리아 기능장애8
1.2.3.3. 산화스트레스9
1.2.3.4. 신경염증10

1.2.3.5. 세포노화11
1.2.4. 파킨슨병의 유전학12
1.2.4.1. 가족성 파킨슨병에서의 유전자12
1.2.4.1.1. 상염색체 우성유전자12
1.2.4.1.2. 상염색체 열성유전자15
1.2.4.2. 파킨슨병에서의 위험유전자16
1.3. 알파-시뉴클린17
1.3.1. 알파-시뉴클린의 구조18
1.3.2. 알파-시뉴클린의 생리적 기능19
1.3.3. 세포 외 알파-시뉴클린20
1.3.4. 알파-시뉴클린의 세포간 전파21
1.4. 파킨슨병 치료법25
1.4.1. 면역치료법25
1.4.1.1. 능동면역치료법25
1.4.1.2. 수동면역치료법26
1.4.2. 다른 치료법27
1.4.2.1. 도파민성 치료법27
1.4.2.2. 비도파민성 치료법
표&그림
표 1. 신경퇴행성 질환에서 응집되는 단백질의 종류
그림 1. Braak stage

	<u></u>										 	 	 	 		
그학	킘 2	2. 파	킨슨	는병 s	의 발미	병기	전.				 ••••	 ••••	 •••••	 •••••	••••	.36
표	2.	가족	성	파킨	슨병:	과관	<u></u> 년	유?	전지	ŀ	 	 	 	 		.37

표 3. 파킨슨병 위험인자 (GWAS)
그림 3. 알파-시뉴클린 구조40
그림 4. 알파-시뉴클린의 세포간 전파41
표 4. 알려진 파킨슨병 면역치료법42
표 5. 면역치료법 외 알려진 파킨슨병 치료법43
2장
TNF-α 에 의한 알파-시뉴클린 응집체의 세포간 전이 조절45
실험재료 및 방법46
결과
활성화된 미세아교세포에서 분비되는 알파시뉴클린의 전파를 조절하는 가용성 인자들
TNF-α 의 알파-시뉴클린 전파와 분비 증가60
TNF-α 에 의해 유도되는 신경노화62
TNF-α 는 라이소좀 세포외 배출을 통해 SASP를 유도65
그림68
고찰
3장
알파-시뉴클린 응집체를 치료 타겟으로 하는 파킨슨병 수동면역 치료법 91
실험재료 및 방법92
결과101
응집체 특이 알파-시뉴클린 항체 생성102

응집체 특이적 항체의 세포외 알파-시뉴클린 응집체의 제거 향상과

세포간 전파 차단효과	103
응집체 특이적 항체 수동면역의 알파-시뉴클린 응집, 신경퇴화,신경아교증, 신경염증에서의 효과	104
그림	108
고찰	127
4장	132
전체적인 고찰 및 결론	132
참고문헌	137
초록 (영문)	161
추가 정보	165

# 그림 및 표 목차

# 1장

표 1. 신경퇴행성 질환에서 응집되는 단백질의 종류	.34
그림 1. Braak stage	.35
그림 2. 파킨슨병의 발병기전	.36
표 2. 가족성 파킨슨병과 관련 유전자	.37
표 3. 파킨슨병 위험인자 (GWAS)	.38
그림 3. 알파-시뉴클린 구조	.40
그림 4. 알파-시뉴클린의 세포간 전파	.41
표 4. 알려진 파킨슨병 면역치료법	.42
표 5. 면역치료법 외 알려진 파킨슨병 치료법	.43

## 2장

## 실험재료 및 방법

표	6.	실험에서	사용된	항체 정	보4	ł7
표	7.	실험에서	사용된	사용된	재조합 염증인자들	18
표	8.	실험에서	사용된	사용된	프라이머	51

### 결과

# 활성화된 미세아교세포에서 분비된 가용성 인자들의 알파시뉴클린의 전파증가

# TNF-α 의 알파-시뉴클린 전파 조절

그림 8. TNF-α 의 알파-시뉴클린 전파 조절72
그림 9. TNF-α 유전자 제거의 알파-시뉴클린 전파 감소효과73
그림 10. In vivo에서 알파-시뉴클린 전파에 대한 TNF-α효과74
그림 11. 신경세포에서 알파-시뉴클린 축적과 분비에 대한 TNF-α
효과

## TNF-α 의 신경노화 유도

그림 12. TNF-α 에 의해 유도된 신경노화	76
그림 13. TNF-α 에 의해 유도된 JAK-STAT 노화경로에 관여 22 DEG	하는 78
그림 14. TNF-α 에 의해 유도되는 신경세포에서의 노화특징	80
그림 15. p21억제에 의한 TNF-α 유도 알파-시뉴클린의 분비	감소 81

# TNF-α 가 유도하는 SASP는 알파-시뉴클린의 분비를 라이소좀 세포외 분비로 매개

# 3장

## 실험재료 및 방법

#### 결과

## 항체의 특성 분석

그림 19. 알파-시뉴클린 항체 개발을 위해 사용된 두가지 종류의 알파- 시뉴클린109
그림 20. 알파-시뉴클린 응집체에 대한 항체의 특이성 (dot blot)110
표 10. 생성된 항체의 정보111
그림 21. 알파-시뉴클린 응집체에 대한 항체의 특이성 (ELISA)112
그림 22. 다른 퇴행성 신경 질환 관련 단백질과의 교차 반응성113

# In vitro 에서의 효능검증

그림 23. 항체의 작용기전	.114
그림 24. 항체 존재 시 BV-2 미세아교세포로의 알파-시뉴클린 유입증가	.115
그림 25. 산성 용액으로 세척 후, 항체 존재 시 BV-2 미세아교세표 알파-시뉴클린 유입 증가확인	폰로의 116
그림 26. 항체의 알파-시뉴클린 응집체의 세포간 전파 억제	.118

# In vivo 에서의 효능검증

그림 32. mThy-10-알파-시뉴클린 형질전환 마우스에서 수동	
면역화는 성상교세포증을 감소	124

그림 33. mThy-10-알파-시뉴클린 형질전환 마우스에서 수동 면역화는 알파-시뉴클린 미세아교세포증을 감소 ......125

그림 34. mThy-10-알파-시뉴클린 형질전환 마우스에서 수동 면역화는 알파-시뉴클린 염증을 감소 ......126

# 4장

# 요약

그림 35. 염증반응의 알파-시뉴클린 응집체의 세포간 전이 증가 메커니즘과 면역 치료타켓으로서의 알파-시뉴클린 응집체......136

# 추가정보

# 실험재료 및 방법

표 11. 2장에서의 Differentially expressed genes (DEGs)......165

# 약어 목록

A $\beta$ : Amyloid  $\beta$ 

AD: Alzheimer's disease

 $\alpha$ -syn: Alpha-synuclein

 $\alpha$ -syn<sup>v40g</sup>: Multimers of V40G variant  $\alpha$ -synuclein

AP-1: Activator protein-1

BiFC: Bimolecular fluorescence complementation:

C12FDG: 5-dodecanoylaminofluorescein di-β-D-galactopyranoside

CLEM: Correlative light-electron microscopy

Ctx: Cortex

DDR: Damage response

DEGs: Differentially expressed genes

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assays

F: Fibril

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

GO: Gene Ontology

GSEA: Gene set enrichment analysis

HMGB1: High mobility group box 1

HP.: Hippocampal area

Iba1: Ionized calcium binding adaptor molecule 1

IFN-: Interferon-

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LAMP1: Lysosomal membrane protein 1

LPS: Lipopolysaccharide

M: Monomer

MgCM: Conditioned media from microglia cultures

MgCM-Control: conditioned media from microglia cultures treated with

DMEM

MgCM-LPS: Conditioned media from microglia cultures treated with LPS

NLRP3: NLR family, pyrin domain containing 3

Pacx: Parietal cortex

PD: Parkinson's disease

Pfcx.: Prefrontal cortex

PFA: paraformaldehyde

PMX: Polymyxin B

pS129: Phosphorylated α-synuclein

RT-qPCR: Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

RNAi: RNA interference

RNAseq: RNA sequencing

SA- $\beta$ -gal: Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase

SASP: Senescence-associated secretory phenotype

SNpc.: Substantia nigra pars compacta

TFEB: Transcription factor EB

Tg: Transgenic

TLR2: Toll like receptor 2

TNF- $\alpha$  -/-: TNF- $\alpha$  knockout

TNF- $\alpha$  +/+: TNF- $\alpha$  WT

# TRPML1: Mucolipin TRP cation channel 1

WT: Wild type

# 서 론

# 1.1. 신경 퇴행성 질환

## 1.1.1. 단백질 응집

알츠하이머 (AD), 파킨슨병 (PD), 헌팅턴병 (HD), 근위축성 측삭경화증 (ALS)등 많은 신경퇴행성질환은 단백질 응집 및 잘못된 단백질 접힘을 공통적인 특징으로 하고 있다. 각 퇴행성 질환에 대한 병리적 특징을 가진 단백질의 종류는 다르지만 각 단백질 응집체는 아밀로이드라고 불리는 β-sheet-rich 한 구조를 가지고 있다 (표 1).

이러한 단백질 응집 및 축적은 뇌의 특정지역에서의 신경세포 사멸을 유도한다고 알려져 있다[10-12].

# 1.1.2. 뇌 염증반응

퇴행성신경질환의 공통적 특징인 단백질 응접과 관련하여 신경염증의 중요성이 보고되어지고 있다. 아교세포와 성상교세포의 활성화는 교세포와 신경세포사이의 상호작용이 신경염증 반응을 조절하여 단백질 응집에 관여한다는 연구 결과가 있다[13, 14].

알츠하이머병에서 TREM, CD33을 포함한 면역 수용체 유전자가 알츠하이머 병과 관련이 되어있다는 연구결과가 보고되었다[15, 16]. 헌팅턴병 환자의 CSF에서 염증 메개체들이 발견됐으며[17, 18], 헌팅턴 환자의 사후 뇌분석에서 IL-6, IL-8, TNF-α의 증가를 확인했다[17]. 파킨슨병 환자의 사후 뇌 조직 분석에서도 활성화된 미세아교세포 및 사이토카인의 분비증가 등 염증특징을 확인하였다 [19-21]. 이처럼 많은 퇴행성신경질환에서 뇌 염증 반응을 공통된 특징으로 하고 있음을 알 수 있다.

## 1.1.3. 세포노화

세포노화는 다양한 내적, 외적 자극 (DNA손상, telomere 기능장애, 종양 유전자 활성화 및 세포 소기관 스트레스)에 의하여 세포 주기가 안정적으로 정지한 상태로 세포의 분열이 멈춘 상태를 뜻하는 용어이다. 최근 많은 연구들에서 신경퇴행성질환에서 나이가 듦에 따라 노화세포가 축적된다는 사실을 확인하였다[22, 23].

노화 세포는 노화관련 효소인 β-galactosidase (SA-β-gal)의 활성증가, cyclin-dependent kinase inhibitors/cell cycle repressors p16, p53, p21의 증가, retinoblastoma protein (pRb)의 인산화 감소, cytological markers (노화-관련 이질염색질 foci; SAHFs, 노화-관련 DNA 손상관련 foci; SDFs) 증가가 나타나며 형태학적으로도 확대되고 납작해진다는 특징을 가지고 있다[24-26]. 또 만성 세포 노화는 신경 퇴행성 질환과 관련된 기능적 변화에도 기여한다는 것을 확인했다 [27].

SA-β-gal 활성증가, p53 및 DNA 손상 반응(DDR) 신호를 포함한 세포 노화 특징이 알츠하이머 및 파킨슨병 환자의 뇌에서 확인되었다 [28]. 파킨슨병 환자의 뇌 조직과 CSF에서 증가된 SA-β-gal의 레벨을 측정했으며[29, 30], 노화 성상세포의 수가 증가하는 것을 확인했다 [30].

이러한 결과는 알츠하이머, 파킨슨병을 포함하여 여러 신경퇴행성 질환의 병인과 세포 노화가 관련이 있음을 의미한다[31-35]. 이러한 증거들을 통해 세포 노화가 파킨슨병 발병에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

# 1.2. 파킨슨병

## 1.2.1 파킨슨병의 중상

파킨슨병 (PD)은 SNpc (substantia nigra pars compacta)에서 도파민성 신경세포의 선택적 퇴화로 인한 복잡한 운동 증상을 특징으로 하는 두번째로 흔한 연령 관련 신경 퇴행성 질병이다.

파킨슨병은 운동증상과 비운동증상 모두를 가지고 있다고 알려져 있다. 가장 대표적인 운동증상으로는 떨림, 느린 운동, 강직 및 자세 불안정이 있다[36]. 운동증상에 따라 5단계로 나누어진다. 1단계는 가벼운 떨림과 걸을 때의 어려움을 느끼는 정도의 증상을 나타내며 신체의 한쪽에만 영향을 끼친다고 알려져 있다. 일상생활의 큰 어려움을 주지 않는 1단계에서 2단계로 가면 증상이 악화되어 몸 양쪽에 영향을 주게 된다. 3단계에서는 균형감각장애로 인한 넘어짐 등이 증상이 나타나며, 일상생활의 어려움을 갖게 된다고 알려져 있다. 단계가 지속됨에 따라 운동 증상이 심하게 나타난다고 알려져 있으며 5단계에서는 환각이나 망상 등 증상이 나타난다고 알려져 있다.

파킨슨병의 신경병리특징은 청반, 등쪽 미주핵, 뇌간의 등줄핵, 시상하부, 후각 결절, 변연 피질 및 신피질과 같이 운동 조절에 직접적으로 관여하지

않는 영역이 포함 되어있다고 알려져 있다[37]. 또 교감신경절, 심장 교감신경 원심성 및 장의 근신경총을 포함하는 말초자율신경계까지 확장되어 확인이 되고 있다[38].

이에따라 파킨슨병은 비운동증상을 수반하는 질병으로 자율신경 및 감각장애, 빠른 안구운동, 수면행동장애, 치매, 환각 등 다양한 증상이 나타나며 이는 질병의 경과에 따라 발생하는 진행성 질환으로 알려져 있다[39]. 또한 후각상실, 변비, 우울증 및 REM수면행동장애와 같은 일부 증상은 파킨슨병 진단 몇 년 전에 발생할 수 있다고 알려져 있다.

# 1.2.2. 파킨슨병의 병리적 특징

파킨슨병의 병리학적 특징은 알파-시뉴클린으로 구성된 루이소체 및 루이신경돌기의 점진적인 축적과 [40] 신경염증 반응이다 [20, 41].

#### 1.2.2.1 알파-시뉴클린의 응집

시뉴클린병증은 뇌의 신경세포와 아교세포에 알파-시뉴클린 응집체가 존재하는 것을 병리적 특징으로 하는 신경성질환이다. 이러한 시뉴클린병증은 파킨슨병, 루이소체를 가진 치매병, 다계통위축 (MSA)을 포함한다[42].

루이소체와 루이신경돌기는 파킨슨병의 가장 두드러진 병리적 특징이고 [43], 이들은 알파-시뉴클린 응집체로 구성 되어있다. 알파-시뉴클린의 잘못 접힘과 응집은 다른 뇌 영역에 영향을 미치고 세포독성, 신경기능 장애, 신경세포의 사멸 등을 초래한다고 알려져 있다. 이전 연구에 따르면,

특발성 파킨슨병, 루이소체치매 (DLB)환자에서 알파-시뉴클린 응집체의 존재를 확인하였다[43-46]. 이처럼 많은 증거에서 알파-시뉴클린의 잘못된 접힘과 응집이 질병의 발병기전에 중요한 요소임을 시사한다 [42].

## 1.2.2.2 신경염증반응

파킨슨병 환자의 사후 뇌 조직 분석에서 "활성화된" 미세아교세포 및 성상세포, 염증유발 사이토카인, NLRP3(NLR 계열, 3을 포함하는 피린도메인) 인플라마좀을 비롯한 여러 염증 특징의 상승을 확인하였다 [19-21]. 또 MPTP-PD마우스 모델에서, 항염증제를 투여했을 때에 도파민성 신경세포의 소실이 감소하는 것을 확인하였다[47]. 이러한 연구들은 염증반응이 파킨슨병과 밀접한 관계가 있음을 보여준다.

이전연구에 따르면 염증은 단백질 응집체의 형성을 촉진했다. 염증 유발 물질인 지질 다당류 (LPS)를 주사한 쥐에서 알파-시뉴클린의 응집과 도파민성 세포의 사멸을 확인하였다 [14]. 최근 본 연구진의 이전 연구에 따르면 알파-시뉴클린의 다량체를 striatum에 주입한 마우스에서 알파-시뉴클린의 응집체의 전파 이전에 염증반응을 확인하였다. 또한 항염증제를 투여했을 때에 병리현상이 완화되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 파킨슨병환자의 뇌에 이식된 중뇌 조직에서 염증이 알파-시뉴클린 응집보다 먼저 일어난다는 연구 결과와 일치한다 [48]. 따라서 이러한 결과들을 종합해보면, 염증성 미세환경이 뇌에서 병리학적인 알파-시뉴클린 응집 및 전파를 촉진하여 질병진행에 기여함을 시사한다. 그러나

염증성 미세환경이 알파-시뉴클린 응집을 촉진하는 메커니즘에 대한 연구는 명확하지 않은 상태이다.

#### 1.2.2.3 Braak stage

파킨슨병은 질병 진행에 따라 신경병리학적으로 6단계로 나눌 수 있다(그림 1)[37, 49]. 단계에 따라 증상도 심해진다는 특징이 있다. Olfactory bulb와 enteric plexus에서 발생한 알파-시뉴클린은 연수 및 뇌교로 이동 및 전파된다.

이때 파킨슨병의 자율신경계 증상, 수면관련 증상 및 우울증 관련 증상들이 나타난다고 알려져 있다. 이후 알파-시뉴클린은 중뇌로 전파되면서 도파민 소실에 의한 진전, 서동, 경직 및 보행장애등 운동성 증상들이 나타나게 된다. 이후 알파-시뉴클린은 limbic cortex를 포함한 대뇌영역으로 이동 및 전파되어 치매관련 증상들이 나타나게 된다.

## 1.2.3. 파킨슨병의 발병기전

파킨슨병의 신경병리는 알파-시뉴클린의 축적, 미토콘드리아의 기능장애, 산화 스트레스, 신경염증 그리고 세포 노화에 의해 악화된다고 알려져 있다 (그림 2)[50].

#### 1.2.3.1. 알파-시뉴클린의 잘못접힘과 응집

알파-시뉴클린은 구조화되지 않은 가용성 단백질로써, 음전하를 띤 지질과 상호작용시 알파-시뉴클린은 N-말단을 통해 알파-나선구조로

접히며, 수용액 상에선 응집에 저항하는 안정적으로 접힌 사량체를 형성한다[51].

하지만 병리조건에서 알파-시뉴클린은 불용성 파이브릴을 형성한다고 알려져 있으며[43], 파킨슨병 환자의 뇌에서 단량체, 가용성 올리고머, 파이브릴 등 다양한 형태의 알파-시뉴클린이 발견되었다 [52].

파킨슨병에서 알파-시뉴클린은 응집될 때 β-sheet rich한 아밀로이드구조를 가지며, 잘못접힌 알파-시뉴클린은 루이바디를 구성한다. 세린129인산화, 유비퀴틴화, C-말단절단 알파-시뉴클린은 비정상적인 알파-시뉴클린의 응집을 유도한다고 알려져 있다[53, 54]. 이뿐만 아니라 형태에 따라 알파-시뉴클린의 독성이 다르다고 제안되어지고 있는데 한 연구에서는 세포 외 알파-시뉴클린의 올리고머가 세포내 알파-시뉴클린의 응집을 유도하는 "seed" 로서 작용 한다는 것이 확인되었고 비정상적인 단백질 응집을 가속화 한다는 것이 알려졌다[3].

이것은 뇌에서 알파-시뉴클린 병리현상이 전파되는 것에 대한 하나의 메커니즘으로써 제안되어지고 있다.

#### 1.2.3.2. 미토콘드리아 기능장애

미토콘드리아의 기능장애는 특발성, 가족성 파킨슨병 모두에 발병기전에 해당된다. 기능이 손상된 미토콘드리아는 산화스트레스를 증가시키고 많은 세포경로에 영향을 미쳐 세포 내 구성요소의 손상과 세포 사멸을 초래할 수 있다.

사후 연구는 파킨슨병 환자의 SNpc에서 미토콘드리아 복합체-I의 결핍이 확인되었다[55]. 또, 마이토콘드리아의 복합체-I의 활성을 손상시킬 때 파킨슨병 표현형이 나타나며 및 도파민성 세포의 소실을 동물 모델에서 확인했다[56]. 이것은 미토콘드리아 복합체-I이 도파민성 세포 사멸에 관여하다는 것을 의미한다.

또한 가족성 파킨슨병을 유발하는 많은 유전자가 미토콘드리아 항상성에서 중요한 역할을 한다. SNCA, PINK1, DJ-1, LRRK2는 미토콘드리아 기능에 영향을 주며 ROS를 생성하고 산화스트레스에 취약하다는 특징이 있다.

알파-시뉴클린은 미토콘드리아 수용체 TOM20과 상호작용하고, 소기관 내부에 축적될 수 있다. 이것은 복합체-I의 손상을 일으키며 미토콘드리아 기능저하 및 산화 스트레스를 증가시킬 수 있다[57]. 이러한 미토콘드리아의 기능저하와 증가된 산화스트레스는 라이소좀의 제거를 이끌고, 이는 파킨슨병과 관련된 병인기작을 발전시킬 수 있다.

#### 1.2.3.3. 산화스트레스

산화 스트레스는 파킨슨병에서 도파민성 신경세포의 사멸을 포함하여 병인 및 진행에 필수적인 역할을 한다[58]. 질병의 초기 단계에서 도파민성 신경세포의 소실 전에, 증가된 ROS가 확인되었다[59]. 이것은 산화스트레스는 신경세포의 사멸로 인해 생기는 것 외에 신경세포

소실에도 영향을 줄 수 있음을 의미한다.

이뿐만 아니라 산화스트레스는 도파민 대사, 미토콘드리아의 기능장애, 신경염증으로부터 생성될 수 있다. 즉 산화스트레스는 세포기능 장애 및 세포사멸을 초래하는 공통적인 기본 메커니즘으로 제안된다.

또 ROS는 프로테아좀, 라이소좀, 미토콘드리아의 기능에 영향을 준다고 알려져 있다. ROS에 의한 각 소기관의 기능장애는 알파-시뉴클린의 잘못된 접힘을 유도할 수 있으며 유비퀴틴, 프로테아좀, 라이소좀의 기능장애는 알파-시뉴클린 단백질을 분해하지 못하며 항상성 조절에 실패할 수 있다. 이전연구에서는 이러한 단백질 분해 시스템의 기능장애로 인해 파킨슨병의 병리현상을 설명하였다 [60].

이뿐만 아니라 ROS는 특정 환경독성 및 내인성 단백질에 반응하여 미세아교세포는 과활성화되며 ROS를 방출하여 신경독성을 유발한다고 알려져 있다[61]. 이처럼 ROS는 다양한 병리현상의 원인이자 결과로써 파킨슨병의 병인기작에 관여함을 알 수 있다.

## 1.2.3.4. 신경염증

사후 뇌 분석은 파킨슨병 환자에서 사이토카인, 성상교세포, 미세아교세포, 보체활성화 등 증가된 염증인자들을 확인했다[19-21, 62-64]. 또 활성화된 미세아교세포는 흑색질에서의 도파민성 세포의 소실을 유도한다[65]. 이뿐만 아니라 파킨슨병 쥐 모델 (6-hydroxydopamine, MPTP)에서 미세아교세포활성 억제는 SNpc에서 도파민성세포 사멸을 감소시켰으며 이는 미세아교세포가 관여하는 염증반응이 세포사멸에 기여한다는 것을 의미한다[66].

또 다른 연구에서는 알파-시뉴클린에 의해 미세아교세포의 활성이 증가되는 것을 보여줌으로써, 알파-시뉴클린이 염증반응을 유도할 수 있다는 것을 보여준다[67].

최근에 본 연구진의 그룹은 파킨슨병 모델에서 알파-시뉴클린의 다량체를 주입하였을 때, 알파-시뉴클린의 전파 이전에 신경염증반응이 선행된다는 것을 확인했다. 즉 신경염증반응이 알파-시뉴클린의 전파 및 파킨슨병 병리현상에 기여함을 의미한다.

이처럼 많은 연구들에서 신경염증 반응의 중요성을 강조하고 있으며 신경염증을 신경세포의 사멸을 유도하는 원인과 손상에 의한 결과인지에 관계없이 악순환의 고리로 신경기능 장애를 더 악화시킬 수 있다고 제안하고 있다.

#### 1.2.3.5. 세포노화

세포노화가 파킨슨병 발병기전에 필수적인 역할을 한다는 많은 증거가 있다. 파킨슨병 환자의 CSF와 뇌에서 증가된 SA-β-gal을 확인했으며[29] [30], 흑질에서 노화된 성상세포의 수가 증가했고 이는 알파-시뉴클린의 침착과 관련이 있음을 확인했다[30]. 이는 노화세포의 마커인 SASP 와 알파-시뉴클린 관련성이 도파민성 신경세포의 소멸에 기여하여 파킨슨병의 병리기전에 관여함을 알 수 있다. 또 다른 이전연구는

미리형성된 알파-시뉴클린 파이브릴에 의해 노화마커인 Lamin B1, HMGB1, p21이 증가되는 것을 성상교세포, 미세아교세포, 마우스 뇌에서 확인하였다[68]. 이는 알파-시뉴클린에 의해 세포 노화가 유도될 수 있음을 의미한다.

## 1.2.4. 파킨슨병의 유전학

### 1.2.4.1 가족성 파킨슨병에서의 유전자

파킨슨병은 파킨슨병의 대부분 케이스인 특발성 파킨슨병 그리고 유전자 돌연변이와 관련 있는 가족성 파킨슨병(약 10%)으로 나뉜다[69].

가족성 파킨슨병 환자에서 상염색체 우성 및 열성 유전자와 같은 여러 유전자가 확인되었다[70]. 또 GWAS (Genome-wide-associated studies)로부터 많은 위험 유전자 (SNCA, LRRK2, MAPT, GBA) 가 밝혀졌다[71],[72]. 상염색체 우성 형태는 돌연변이 1개가 복사되어 부모 중 하나로부터 유전될 때 발생하고, 상염색체 열성 형태 돌연변이는 유전자의 2개의 복사가 양쪽 부모로부터 유전될 때 나타난다. 파킨슨병과 관련된 상염색체 우성에는 PARK-1,4,5,8,11,17,18,21이 포함되며, 상염색체 열성에는 PARK-2,6,9,13,14,15,19,20,23 이 포함된다 (표 2).

#### 1.2.4.1.1. 상염색체 우성유전자

#### -PARK1/4

SNCA 유전자는 단백질 알파-시뉴클린을 만든다. 파킨슨병 환자의 병리학적특징인 루이소체를 구성하는 성분은 알파-시뉴클린이다[43]. 또한 SNCA의 돌연변이는 파킨슨병 초기 발병과 관련이 있다. 가족성파킨슨병과 관련하여 상염색제 우성 관련 유전자이며 다형성 유전자이다. SNCA point 돌연변이, multiplication, 단일염기다형성(SNP)은 유전자 발현에 영향을 미쳐 질병의 위험에 영향을 미친다고 알려져 있다. 또 GWAS 로부터 알파시뉴클린의 4번 인트론에서 3'UTR의 뒤까지 PD와 연관성이 있음을 보여준다.

알려진 SNCA의 missense 돌연변이는 A53T, A30P, E46K [73-77], GWAS 연구로부터 G51D, H50Q가 있다[78, 79]. 각 돌연변이는 민족에 따라 다르게 나타난다고 알려져 있다. A53T는 53번째 아미노산이 A(알라닌)에서 T(트레오닌)으로 바뀐 missense 돌연변이이다. A53T돌연변이를 가진 환자는 조기 발병과 함께 질병의 진행이 가속화 된다는 보고가 있으며 [80], WT알파-시뉴클린보다 빠르게 파이브릴화 되는 특징이 있다[81]. E46K돌연변이를 가진 환자에서는 치매를 동반한 루이바디가 발견되며 특정한 파이브릴 구조를 가지고 있다는 것이 확인되었다. 또 인지 쇠퇴, 환각 등의 증상을 보인다고 보고되었다 [77, 82]. SNCA의 multiplication은 단백질 응집을 증가시키고 파킨슨병 관련 증상을 증가시킨다는 보고가 있다 [83, 84]. SNCA triplication 환자가 duplication 환자보다 더 심각한 증상 (조기 발병, 급속진행, 치매, 조기사망 등)을 보였는데, 이는 발현정도가 질병의 증상정도와 관련이 있음을 의미한다 [85].

## -PARK8

LRRK2(leucine-rich repeat kinase 2)는 카이네이즈와 GTPase 효소 활성을 가진 단백질을 만든다. 상염색체 우성 파킨슨병을 유발한다고 알려져 있으며 후기 발병 파킨슨병과 관련이 있다. 산발성 파킨슨병의 1%, 가족력이 있는 파킨슨병 환자의 약 4%를 차지한다고 알려져 있다 [86]. LRRK2는 가장 흔한 단일 유전자형태의 파킨슨병으로도 알려져 있다[87, 88]. LRRK2 돌연변이 중 가장 흔한 병원성 변이는 p. G2019S이며 카이네이즈 활성을 증가시킨다고 보고 되어있으며 세포독성, 도파민성 신경세포의 소실에 관여한다고 것이 C.elegans, 마우스모델, 세포모델에서 확인되었다[89-91].

또한 LRRK2는 소포, 라이소좀, 엔도좀, 미토콘드리아 등에서 발견이 되었는데 이러한 세포 내 위치로부터 소포트래피킹, 미토콘드리아의 완전성, 단백질 품질관리에 관여함을 알 수 있다 [92]. 파킨슨병 환자의 뇌에서 LRRK2의 발현을 확인했으며 알파-시뉴클린과 함께 발견이 되었다 [93, 94].

## -PARK17

VPS35는 가장 최근에 발견된 상염색체 우성 파킨슨병 관련 유전자로 whole-exosome next generation sequencing(NGS)으로부터 찾아졌다 [95, 96]. 가장 잘 알려진 VPS35 돌연변이는 D620N이다. VPS35는 trans-golgi 네트워크의 엔도좀의 역행 수송에 중요한 레트로머 복합체의

구성요소로 알려져 있으며, 자가포식 매개 경로에 중요한 단백질로 알려져 있다. D620N 돌연변이는 손상된 레트로머 트래피킹 및 카뎁신 D처리 결함을 유발한다고 보고되었으며[97], 또한 형질전환 마우스에서 VPS35 돌연변이는 미토콘드리아의 결함을 의미하는 미토콘드리아 2 단백질의 손실이 확인되었다. 또 파킨슨병 관련 단백질의 분해에 중요한 자가포식 매개 경로와 관련이 있다. Hela 세포에서 VPS35 D620N의 발현은 자가포식소체의 형성과 관련된 ATG9의 불완전한 수송을 유발하는 것을 확인하였다[98].

## 1.2.4.1.2. 상염색체 열성 유전자

#### -PARK2

PARK2는 E3 유비퀴틴 라이가아제 파킨 단백질은 암호화한다. 파킨 단백질은 프로테아좀 매개 분해 시스템을 포함하여 PINK1과 관련하여 미토콘드리아 미토파지에 역할을 한다고 알려져 있다 [99]. 이 유전자는 SNCA 다음으로 확인된 파킨슨병 유전자이다. 1998년 상염색체 열성 청소년 파킨슨증 (ARJP)환자에서 PARK2의 결실을 발견하였다 [100]. ARJP는 질병의 조기 발병, 특발성 파킨슨병의 증상과 비슷하다고 알려져 있다 [101].

#### -PARK6

PINK1(PTEN-induced kinase 1)단백질을 만들며 스트레스토부터

미토콘드리아를 보호하며 미토콘드리아 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다[102]. Chromosome 1번에 위치한 PINK1의 동형 돌연변이는 상염색체 열성유전자로써 조기 발병 파킨슨병과 관련이 있다[103]. Parkin과 함께 mitophagy에 관여한다고 알려져 있으며[104] PINK1의 결핍은 미토콘드리아의 기능장애를 유발할 수 있다고 알려져 있다.

## -PARK7

이 유전자의 돌연변이는 드문 형태의 조기 발병 파킨슨병을 유발한다. 상염색체 열성으로써 미토콘드리아 스트레스로부터 보호하는 단백질 DJ-1을 만든다. DJ-1 유전자 돌연변이 (엑손결실, 절단 동형/이형 돌연변이)는 단백질의 기능상실을 유도한다고 알려져 있다 [105, 106]. DJ-1의 발현은 알파-시뉴클린의 응집을 억제하며[107], Parkin과 PINK1과 함께 산화스트레스로 인한 미토콘드리아를 조절한다고도 알려져 있다 [107]

## 1.2.4.2 파킨슨병에서의 위험 유전자

현재까지 여러 게놈관련 연구(GWAS)로부터 파킨슨병과 관련된 많은 위험 유전좌를 확인하였다 (표 3) [108-110]. 흥미롭게도 SNCA (locus 23)와 LRRK2 (locus 49)가 모두 상염색체 우성 파킨슨병 유발 돌연변이일 뿐만 아니라 유전적 위험 요인임이 밝혀졌다.

알파-시뉴클린을 코딩하는 유전자의 프로모터 영역에 있는 다형성 다이뉴클리오타이드 미세부수체 서열인 알파-시뉴클린 Rep1이 파킨슨병의 위험 증가와 관련이 있음을 보여주었다 [72]. Rep1유전좌의 변동성은 일반 인구의 위험의 3%정도를 차지한다. 또 다른 상염색체 우성 파킨슨병 돌연변이인 LRRK2는 P755L, M1869V, E1874stop 및 G2385R과 같은 여러 LRRK2 돌연변이가 아시아인구 내에서 파킨슨병의 위험을 증가시키는 것으로 나타났다 [111].

상염색체 열성 라이소좀 축적 장애인 고셔병과 관련이 있는 GBA1 (Glucocerebrosidase)는 라이소좀효소인 글루코세레브로시다이제를 코딩하는 GBA유전자로 가수분해에 의해 베타-글루코시드 결합을 절단하는데 필요한 글루코실세라미다제 활성을 갖는 효소이다. GBA1 의 돌연변이는 단백질의 분해, 라이소좀의 기능 저하, 알파-시뉴클린 응집에 관여한다고 알려져 있다[112]. 이형돌연변이를 가진 환자에서 파킨슨병 위험도가 증가함이 확인되었다 [113].

여러 GWAS 에서는 GBA변이가 파킨슨병의 위험인자임을 보여주었다 (locus 1) [114]. GBA 변종은 지역인구에 따라 다양하게 나타나며 한국에서 N188S, P201H, R257Q, S271G, L444P 와 같은 여러 돌연 변이 사례가 확인되었고 파킨슨병 사례의 3.2% 가 확인되었으며 대조군 사례에서는 확인되지 않았다.

# 1.3. 알파-시뉴클린

## 1.3.1. 알파-시뉴클린 구조

알파-시뉴클린은 SNCA유전자에 의해 암호화되며, 140개의 아미노산으로 구성 되어있다. 소량의 단백질이 심장, 근육 및 다른 조직에서 발현되지만 주로 뇌에서 발현되는 단백질이다 [115]. 알파-시뉴클린은 본질적으로 구조화되지 않은 단백질이며 용액에서 무질서한 구조를 가지고 있다. 알파-시뉴클린의 1차구조는 아래의 3개의 도메인으로 나뉠 수 있다 (그림 3) [116].

N-말단영역(잔기1-60): 양친매성 라이신이 풍부한 지역으로써,
 컨센서스 서열 KTKEGV를 포함하여 4개의 잔기 반복에 의해 구성되며
 알파 나선 경향을 갖는다. 현재까지 발견된 SNCA관련 돌연변이는 모두 이
 말단에 위치한다 [117]. 양친매성의 성질 때문에 단백질과 멤브레인의
 결합을 가능하게 한다 [118]

- 잔기 61-95 (중간에 위치하는 소수성 지역): β-sheet 구조를 형성하려는 경향이 강하고 단백질 응집에 관여하는 비-아미로이드-β (NAC)영역을 포함한다[119-121]. 이 부분 역시 membrane binding에 관여한다.

C-말단 영역(잔기 96-140): 번역 후 수정[122, 123], 단백질단백질 상호작용[124, 125], 용해도 및 다양한 기능을 담당하는
영역으로써 고도로 산성화 되어있으며 프롤린이 풍부한 영역이다[122, 124, 126, 127]. 따라서 C-말단을 제거하면 알파-시뉴클린의 응집이
증가하고 샤페론과 같은 활성이 감소한다는 보고가 있다[128].

## 1.3.2 알파-시뉴클린의 생리적 기능

비록 병리학적인 기능을 하는 알파-시뉴클린은 시뉴클린병증과 관련하여 많은 연구가 진행이 되었지만, 알파-시뉴클린의 생리적 기능에 대한 것은 명확하지 않다. 알파-시뉴클린은 세포질 단백질로써 시냅스 전 말단에 존재한다[129]. 신경세포에서 시냅스 과정과 관련하여 시냅스 소포 트래피킹 및 도파민과 같은 후속 신경전달 물질의 방출을 조절하는 신경 단백질로 알려져 있다[130-132].

또한 알파-시뉴클린은 SNARE assembly의 유지 및 분해를 조절하는 시냅스 전 SNARE complex와 관련하여 샤페론으로써의 역할을 한다고도 알려져 있다. 이러한 SNARE complex는 도파민을 포함한 신경전달 물질방출에 직접적으로 관여한다고 알려져 있다. [124]

In vitro실험에서 알파-시뉴클린이 tubulin과 상호작용을 하며 알파-시뉴클린의 파이브릴 형성을 촉진한다는 것이 확인되었다 [133]. 이것은 알파-시뉴클린이 미세소관 중합 활성을 갖는다는 것을 의미한다 [134].

이뿐만 아니라 알파-시뉴클린은 생물학적 세포막, 인지질 시냅스 소포[44], 지질 땟목 등[135] 음전하를 띤 그룹과 결합하며 상호작용을 한다[136,137].

또 알파-시뉴클린의 샤페론 활성을 가지는 것이 *in vitro*실험에서 확인되었다. 이러한 활성은 온도, metal, 유기용매 등 알파-시뉴클린의 구조적 재구성을 유도하는 것들에 의해 조절되고 이러한 구조적 변화는 알파-시뉴클린이 샤페론 활성을 잃어 알파-시뉴클린의 응집에 영향을
주는 것이 확인되었다[138]. 알파-시뉴클린에서 샤페론 활성을 나타내는 부위는 잔기61-140 이며 이 부위는 샤페론 결합 부위를 포함하며 전체길이 알파-시뉴클린과 비슷한 정도의 샤페론 활성을 가지고 있는 반면 N말단(1-60), C말단(96-140)은 샤페론 활성이 없는 것이 확인되었다[139].

마지막으로 알파-시뉴클린의 지질대사에 관련한 다음과 같은 결과가 있다[140]. 알파-시뉴클린 knock-down마우스에서 AA(Arachidonic acid) 와 DHA(Docosahexaenoic acid)는 반대로 대사되며, AA의 유입은 감소하고 PI (Phosphatidylinositol)와 PS(Phosphatidylserine)에서의 DHA의 턴오버와 아실화는 증가하였다. 반면 알파-시뉴클린 과발현 마우스에서는 아실-CoA 합성효소의 활성과 HMG-CoA 환원효소를 통하여 lipid droplet을 축적되며, TAG(triacylglycerol)가 증가하는 것이 확인되었다. 알파-시뉴클린 과발현으로 인해 lipid droplet이 증가하는 비정상적인 지질대사를 효소 및 다양한 세포주에서 확인되었다 [141, 142]. 이러한 결과는 알파-시뉴클린의 지질대사로써의 역할을 제안한다.

### 1.3.3. 세포 외 알파-시뉴클린

알파-시뉴클린은 세포질 단백질로 알려져 있지만, 소량의 알파-시뉴클린이 전자 밀도가 높은 소포에 존재한다는 것이 밝혀졌으며 이 소포는 세포 외 배출을 통하여 세포로부터 방출됨이 확인되었다 [143, 144]. In vitro실험결과에 따르면 인간 신경 모세포종 세포의 배양배지에서 알파-시뉴클린이 검출 되었고[145], 알파-시뉴클린 올리고머의 레벨은 대조군 환자와 비교하여 파킨슨병환자의 혈장 및 뇌척수액 모두에서 증가된 것이 확인되었다 [146-148]. 이 분비된 알파-시뉴클린은 단량체 형태와 다량체의 형태를 하고 있으며 후속 연구에 따르면 세포 외 알파-시뉴클린 응집체는 인접 신경세포로 전파될 수 있음이 확인되었다 [149, 150]. 이러한 발견은 세포 외 알파-시뉴클린 응집체를 파킨슨병의 발병진행을 주도하는 요인으로 제안한다[151]. 따라서 알파-시뉴클린 응집체를 타겟으로 하는 치료법이 파킨슨병 병리 진행을 지연시키는 전략이 될 수 있음을 시사한다.

### 1.3.4. 알파-시뉴클린의 세포간 전파

많은 증거에서 알파-시뉴클린 응집체의 세포 간 전파가 알파-시뉴클린 병리 확산에 대한 기본 메커니즘이라는 아이디어를 뒷받침한다[1].

이전 연구에서는, 알파-시뉴클린 응집체가 세포 외 방출과 응집체의 인접 세포로의 이입을 통해 확산된다고 보고한 반면 (그림 4)[151], 또 다른 연구에서는 나노 튜브 터널링에 의해 전파가 매개된다고 제안했다[8].

알파-시뉴클린 응집체의 세포 외 배출은 스트레스 조건에서 활성화된다고 알려져있다 [143, 152, 153]. 그러나 세포 외 배출에 대한 정확한 메커니즘은 아직 알려져 있지 않다.

고전적인 세포 외 배출은 ER-Golgi를 통해 분비되지만, 알파-

시뉴클린은 단량체, 응집체 형태로 ER-Golgi-비의존적인, 비고전적인 방법으로 신경세포에서 분비된다는 것이 확인되었다 [143, 144].

알파-시뉴클린은 1. secretory vesicle을 통해 세포 밖으로 분비되거나 2. MVB(multivesicular bodies)를 통한 exosome 관련 분비 3. 엑소파지를 통한 분비 4. 라이소좀을 통해 분비될 수 있다(그림 4).

MVB는 라이소좀과 융합을 하여 분해하거나 플라즈마 멤브레인과 융합하고 exosome을 통하여 알파-시뉴클린을 분비한다, Endosome을 통하여 MVB, 엑소좀을 통한 알파-시뉴클린의 분비가 세포에서 확인되었다[154, 155]. 엑소파지는 오토파지-매개 분비 기전인 autophagosome과 MVB의 융합을 통하여 amphisome을 만들고 plasma membrane과 융합하여 알파-시뉴클린을 분비하는 방법이다. 최근 연구에서는 알파-시뉴클린의 분비가 LRRK2-RAB에 의해 매개된다고 보고 하였다[156]. LRRK2-RAB은 알파-시뉴클린의 플라즈마 멤브레인으로 트래피킹을 바꾸거나 라이소좀의 특성을 분해가 아닌 분비-라이소좀으로 바꾸어 알파-시뉴클린을 분비한다고 제안하였다.

사후 뇌 조직을 조사한 결과, 질병이 진행됨에 따라 알파-시뉴클린 응집이 하부 뇌간 핵과 후각구에서 발생하여 점차적으로 중뇌와 중피질을 통해 확산되고 최종적으로 신피질 영역까지 확산된다는 것이 확인되었다[49]. 따라서 알파-시뉴클린 응집체의 확산에 의해 증상진행이 된다는 것이 가장 지배적인 설명이다[37, 157-160]. 이러한 가설을 뒷받침하여 최근 연구에서는 마우스와 비인간영장류 모두에서 미리 형성된

알파-시뉴클린 파이브릴을 stereotaxic 주입을 하였을 때 뇌 전역으로 알파-시뉴클린 응집체가 확산되며 신경퇴행성 질환의 행동 및 병리학적 특징이 나타나는 것을 확인하였다[161-164].

이러한 결과는 인접한 뇌지역을 통한 알파-시뉴클린 응집체의 전파가 신경세포간 전파에 의한 것임을 시사한다[1, 165, 166].

세포 외 알파-시뉴클린을 인식하는 신경아교세포의 수용체는 toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, cluster of differentitation 36 (CD36), macrophage-1 antigen (MAC1), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 (Nox2), β1-integrin 이 있다[13, 167-170]. 알려진 신경세포에서의 수용체로는 TLR2 와 lymphocyte-activation gene 3 (LAG3), cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>), Heparan sulfate proteoglycan (HSPG), α3-subunit of Na+/K+-ATPase (NKA) 가 있고, 이들은 각각 알파-시뉴클린을 인식하고 세포외 알파-시뉴클린을 세포내로 유입하는데 관여하며 신경세포간 전파와 비정상적인 응집, 신경세포의 사멸에도 관련이 있다고 알려져 있다 (그림 4)[149, 171-173].

α3-subunit of Na+/K+-ATPase (NKA) 가 세포 외 알파-시뉴클린이 유입될 때 플라즈마 멤브레인에서 알파-시뉴클린의 파트너로써 알려졌으며[174], HSPG에 의해 매개된다는 사실이 밝혀졌다[175].

이전연구에서 LAG3는 미리 형성된 알파-시뉴클린 파이브릴과 결합을

하며, 알파-시뉴클린의 엔도사이토시스를 증가시키는것을 확인하였다. 이러한 결과는 LAG3의 결실에 의해 감소함을 확인하였다. 이것을 통해 LAG3가 알파-시뉴클린의 수용체로써 엔도사이토시스를 통해 세포 간 전파에 관여함을 알 수 있다 [172]. 또 알파-시뉴클린의 *in vitro* 실험에서 TLR2는 신경세포와 성상교세포에서 알파-시뉴클린의 분해를 지연시키며, 신경세포와 교세포로의 유입을 촉진시킨다는 것이 확인되었다. 시뉴클레인병증을 가진 마우스 모델에서도 TLR2의 발현의 증가는 루이바디의 축적을 증가시키고, 미세아교세포의 형태학적 변화를 유도하였다. 이러한 결과들을 통해 TLR2가 알파-시뉴클린의 병리현상에 관여함을 알 수 있다 [176].

라이소좀은 세포내에서 가수분해효소를 포함하는 소포 형태의 기관으로써 세포 외부의 물질은 엔도사이토시스를 통해 흡수하고 세포내부의 물질은 자가포식을 통해 소화시킨다. 이러한 라이소좀의 기능 장애는 독성 응집체를 제거하는 능력을 손상시켜, 알파-시뉴클린 응집 및 전파를 증가시킨다고 알려져 있다[177].

이뿐만 아니라 알파-시뉴클린의 전파는 여러 단백질에 의해 조절될 수 있는데 파킨슨병의 가족성유전자로 알려진 PARK8 은 상염색체 우성 유전자로 인해 발병을 초래하는 유전자로써 전파에 관여한다고 알려져 있다. LRRK2 억제제의 사용은 Rab35의 인산화를 감소시키며, 알파-시뉴클린 을 감소시켰으며 이러한 발견은 C.elegans 모델, 마우스 모델 등 다양한 모델에서 확인되었다. 이는 LRRK2는 Rab35의 인산화를 매개하여

알파-시뉴클린의 전파를 조절함을 의미한다[178].

# 1.4. 파킨슨병 치료법

파킨슨병은 도파민성 신경세포의 소실로 운동 증상 및 비운동증상이 나타난다고 알려져 있다. 알려진 파킨슨병의 치료법에는 약 50가지가 보고되었는데 면역치료법 (표 4) 외에 다양한 방법을 사용한 치료법 (표 5)이 있다.

### 1.4.1. 면역치료법

파킨슨병에서 가장 두드러진 병리적 특징인 루이바디가 알파-시뉴클린 단백질로 구성되며, 알파-시뉴클린이 세포간 전파에 기여한다는 많은 증거에 따라 알파-시뉴클린을 타겟으로 하는 면역치료법이 유망한 접근법이 될 수 있다. 면역치료법이란 면역반응을 유도하는 방법으로, 알파-시뉴클린에 대한 면역반응을 유도하여 항체생성을 유도하는 능동면역치료법과 알파-시뉴클린 항체를 이용하여 치료하는 수동면역 치료법으로 나뉜다.

### 1.4.1.1. 능동면역치료법

알파-시뉴클린 단백질을 직접적으로 투여하는 방식으로, 여러 연구들에서 능동 면역 치료의 효과를 확인하였다. 알파-시뉴클린을 과발현하는 마우스에 인간 알파-시뉴클린을 능동면역접종 하였을 때, 강한 결합력을 갖는 항체형성을 보였고, 신경세포에서의 알파-시뉴클린 축적감소 및 신경퇴화의 감소를 확인하였다 [179]. 또 최근에는 두가지 파킨슨병 마우스 모델에 AFFITOPE® vaccine AFF1 (C-말단 알파-시뉴클린을 모방하는 짧은 펩타이드조각)을 접종하여 신경병리현상의 감소와 운동능력 및 기억의 향상을 확인하였다[180]. 이 백신은 파킨슨병에 대한 1 상 시험 및 MSA 에 대한 2 상 시험을 진행중이다. 하지만 이러한 전임상에서의 좋은 결과와 오래 지속되는 장점에도 불구하고, 능동 면역치료법에는 여러가지 부작용이 보고된다. 인간 실험에서 능동 면역접종으로 인한 신경염증이 보고되었고[181], 환자마다의 다른 면역반응 또한 관찰된다는 단점이 있다[182].

### 1.4.1.2. 수동면역치료법

항체를 투여하여, 치료 효과를 기대하는 방법으로, 앞서 설명한 능동면역치료법의 부작용을 방지할 수 있으며, 환자마다의 농도를 조절하고 투여를 중지할 수 있다는 장점이 있다. C-말단 알파-시뉴클린에 대한 항체의 파킨슨병 마우스 모델(Transgenic mice expressing human a-syn under the PDGF- promoter, M-line) 에서의 사용은 알파-시뉴클린 축적과 행동실험에서 효과를 보였다 [183, 184]. 또 다른 파킨슨병 마우스 모델(Transgenic mice expressing human a-syn under the Thy-1 promoter, line 61)에서의 항체 사용도 시냅스 및 엑손 병리현상을 완화시켰으며, 알파-시뉴클린 축적감소, 행동장애완화 등 효과를 확인하였다 [185], 이는, 많은 연구들에서 알파-시뉴클린 항체에 대한 치료 효과를 확인했음을 의미한다[186-189].

### 1.4.2. 다른 치료법

파킨슨병은 흑색질의 도파민성 신경세포의 소실이 특징이다. 따라서 도파민성 치료접근과 항콜린제 사용, cell-based 치료, 알파-시뉴클린 관련 치료, LRRK2 관련 치료법, GBA관련 치료법, metal관련 치료법, GLP-1관련 치료법, 수용체 관련치료법 등이 있다.

#### 1.4.2.1 도파민성 치료법

#### -레보도파

레보도파를 이용한 치료법은 알려진 치료법 중에 가장 효과적이고 널리 사용되는 치료법이다. 도파민은 혈-뇌 장벽을 통과하지 못하므로 도파민의 전구체인 레보도파를 사용하는 방법이다[190]. 레보도파는 혈-뇌 장벽을 통과한 후 뇌로 전달되어 도파민으로 전환되며 운동증상을 감소시킨다고 알려져 있다. 처음 투여할 경우 효과가 매우 극적이지만 시간이 지나면서 신경세포가 소실될수록 약을 흡수하는 정도가 적어지면서 효과가 오래 지속되지는 않는다. 따라서 장기 복용할 경우 복용농도를 증가시켜야하는데 장기 치료할 경우 운동변동, 이상운동증 및 합병증이 올 수 있다는 부작용이 있다.

### -도파민 작용제

뇌에서 도파민을 대체하는 역할을 하며 레보도파보다 효과는 약하지만 유사한 효과를 가지고 있다. 레보도파보다 덜 자주 투여해도 된다는 장점이 있고, 레보도파와 동시에 투여하여 증상완화를 한다고 알려져 있다. 함께 사용할 경우 레보도파의 용량을 줄일 수 있게 해준다는 장점이 있다. 하지만 환각, 혼돈증가의 부작용이 있어 노령환자에게 사용하는 것은 주의가 필요하다. 또한 갑작스러운 수면시작등의 부작용을 가지고 있다. 잘 알려진 dopamine agonist로는 ropinirole과 pramipexole이 있다.

### - MAO-B (monoamine oxidase-B) 억제제

도파민을 분해하는 효소인 모노아민 산화효소 B의 활성을 억제하여 기저핵의 도파민 양을 증가시키는 방법이다. Rasagiline, Safinamide가 가장 잘 알려진 MAO-B 억제제이며, 초기 파킨슨병 치료를 위해 레보도파 대신 사용할 수 있는 방법이다. 효과는 레보도파보다 작지만 레보도파나 도파민 작용제와 함께 사용할 수 있다. 때때로 두통, 복통, 고혈압 등의 부작용을 동반한다고 알려져 있다.

### -COMT (catechol-O-methyltransferase) 억제제

보통 파킨슨병 후기 단계의 환자에게 처방되는 방법이다. 레보도파가 효소 (COMT)에 의해 분해되는 것을 방지하는 방법이다. 보통 레보토파와 함께 사용하영 레포도파 활성시간을 연장한다.

### 1.4.1.2. 비도파민성 치료법

### -Anticholinergic agent (Trihexyphenidyl, Benztropine)

항콜린제는 파킨슨병 치료에 사용된 최초의 의약품으로써 주로 진전을

감소시키나 도파민성 치료보다 효과가 약하다고 알려져있다. 아세틸콜린의 작용을 차단하여 뇌에서 근육으로 보내는 신호에 관여한다. 또 무스칼린성 아세틸콜린 수용체와 콜린성 신경활성을 억제하는데 이는 뇌 영역에서 아세틸콜린과 도파민 사이의 불균형을 조절하는 작용을 한다. 시야가 흐려지거나 입이 마르고, 변비 배뇨이상 등 부작용이 때때로 발생한다.

### -NMDA antagonists (Amantadine)

파킨슨병 원숭이에서 레보도파가 유발하는 운동 이상증을 감소시킨다는 보고가 있었다[191]. 파킨슨병환자에서 레보도파에 의한 운동증상에 효과가 입증된 유일한 약물로써 신경말단부에서 도파민의 분비를 촉진시키고 재흡수를 차단한다고 알려져있으며, 항콜린 작용 및 글루타메이트 수용체를 차단한다고 알려져있다. 초기 환자에서 효과적으로 치료효과가 보이지만 치료를 중단하였을 때 증상이 악화되는 경우가 보고되었다.

### -Cell-based 치료법

Cell-based 치료법으로 MSK-DA01이 있으며 신경세포를 이식하는 방법이다. 파킨슨병을 모방하기 위해 6-hydroxydopamine과 함께 병변이 있는 면역결핍 마우스에서 운동 결핍이 완화되었다는 보고가 있다.

### -알파-시뉴클린 관련 치료법

알파-시뉴클린의 mRNA 번역을 억제하는 Posiphen과 단백질 응접을 억제하는 Anle138b (diphenyl pyrazole), UCB0599 가 있다. Posiphen은 알파-시뉴클린의 mRNA 번역을 억제하여 [192], 파킨슨병 모델인 A53T 형질전환 마우스에서 장과 뇌에서 알파-시뉴클린의 발현은 감소시키고, 장내기능을 향상시켰다는 보고가 있다[193]. Anle138b의 사용으로 in vitro, in vivo에서 올리고머의 형성이 감소하는 것이 확인되었다. 파킨슨병 마우스모델에서 증상 이후 사용했을 때 알파-시뉴클린의 응접이 감소, 신경세포의 기능 향상, 행동 개선이 확인되었다 [194]. 또한 UCB0599는 알파-시뉴클린의 응접을 감소시킨다는 것을 *in vitro, in vivo* 모두에서 확인했으며 마우스에 매일, 두달 동안 투여했을 때 retinal 알파-시뉴클린을 감소가 보고되었다. 그 뿐만 아니라 cortical 알파-시뉴클린, 성상교증, 도파민의 소실이 감소하였고, 행동장애도 완화되었다[195].

### -LRRK2 관련 치료법

파킨슨병에서 증가된 LRRK2 카이네이즈 활성은 소포 트래피킹 및 라이소좀 기능을 손상시키며 신경염증반응을 촉진한다고 알려져있다. 파킨슨병 마우스 모델에서 LRRK2의 억제제 사용이나 유전적 제거에 의한 LRRK2 활성의 감소는 알파-시뉴클린 응집, 신경염증 및 도파민선 신경세포의 소실을 감소시키는 것으로 알려져있다[196, 197]. 보고된 LRRK2 관련 치료제는 DNL151 과 BIIB094 가 있다. BIIB094 는 안티센스 올리고뉴클리오타이드를 사용하는 방법으로, LRRK2 의 mRNA 에 결합하여 LRRK2 의 분해를 조절하여 LRRK2 단백질 양을 줄인다. 전임상에서 알파-시뉴클린의 파이브릴 형성을 감소시키며, 도파민성 신경세포의 소실을 감소시키고 행동의 완화를 확인하였다[198].

### -GBA 관련 치료법

Glucocerebrosidase (Gcase)의 결핍은 알파-시뉴클린의 축적을 유도한다고 알려져 있으며 [199] Gcase의 과발현은 뇌에서 병리현상을 완화하고 기억향상이 된다는 것이 마우스 모델에서 확인되었다[200]. Gcase관련 치료법으로는 LTI-291, PR001과 Ambroxol이 있다. PR001은 유전자 대체 치료법으로써 아데노 관련 바이러스9(AAV9)를 이용하여 뇌로 GBA1 유전자를 전달하는 방법이다. Ambroxol은 in vitro에서 glucocerebrosidase의 활성을 증가시키는 것으로 알려진 소분자 샤페론이다. Ambroxol 처리는 WT 마우스, 뮤린 글루코세레브로시다제 1 유전자에서 이형접합체 L444P 돌연변이를 발현하는 형질전환 마우스, 인간 알파-시뉴클린을 과발현하는 형질전환 마우스 모두에서 glucocerebrosidase활성의 증가, 알파-시뉴클린의 감소를 확인하였다[201, 202].

### -Metal 관련 치료법

알려진 metal관련 치료법으로는 deferiprone이 있다. 뇌에 투과가능한 철 킬레이트제로써 뇌에서 철을 제거한다. 파킨슨병에서 철과 관련하여 신경변성의 관련성이 보고되었다. 파킨슨병 환자의 뇌에서 높은 수치의 철을 확인하였다. 파킨슨병 모델에서 Deferiprone은 철을 제거하여 알파-시뉴클린의 응집을 막고 행동이상을 완화시킴이 확인되었다 [203].

### -GLP-1 관련 치료법

호르몬 글루카콘 유사 펩타이드-1(GLP-1)의 지속성 유사체로써, 음식섭취에 반응하여 이자가 인슐린을 방출하도록 한다. 당뇨병 치료법으로 알려져 있지만, 최근에는 파킨슨병 동물모델에서 GLP-1 이 신경발생을 촉진하고, 도파민의 불균형을 조절하며 염증반응을 감소시킨다는 것을 확인되었다[204, 205]. 알려진 GLP-1관련 치료제로써는 Exenatide (3상), Semaglutide (2상), Liraglutide (2상)가 있다.

### -수용체 관련 치료법

β2-adrenergic receptor의 작용제인 CST2032와 TLR2의 길항제인 NPT520-34, NMDA, Sigma-1수용체 관련 AVP-923 이 있다.

AVP-923는 FDA 승인된 두가지 약물(dextromethorphan 과 quinidine)을 혼합하여 사용하는 방법이다. Dextromethorphan은 NMDA 수용체의 길항제로써 glutamate와 serotonin을 조절하고, sigma-1 수용체의 작용제로써 작용한다. Quinidine를 함께 사용했을 때 dextromethorphan의 산화대사를 지연시켜 AVP-923의 지속력을 증가시킨다고 알려져 있으며 이것을 사용하여 levo-dopa가 유발하는 이상운동증을 감소시켰다는 결과가 보고되었다[206]. 현재 파킨슨병에서는 임상 3까지 진행되었다.

NPT520-34는 TLR2의 길항제로써 알파-시뉴클린의 분해를 촉진하고 미세아교세포와 성상아교세포에 의해 신경염증을 조절하며 알파-시뉴클린을 감소하는 것이 확인되었다. 알파-시뉴클린 형질전환 마우스에서 신경염증 마커들의 감소와 알파-시뉴클린 병리현상 감소, 행동기능 향상이 확인되었다[207].

CST2032는 피질 및 변연 뇌 영역에서 노르에피네프린 수용체를 활성화한다. 파킨슨병에서 병리 및 증상이 진행됨에 따라 노르에프린이 소실된다는 보고가 있다. CST2032는 알파-시뉴클린의 발현을 억제하여 신경보호 효과를 나타내며 파킨슨병 발병률을 낮춘다는 결과가 보고되었다.

표 1. 신경퇴행성 질환에서 응집되는 단백질의 종류

신경퇴행성 질환	단백질 종류
알츠하이머 (AD)	아밀로이드베타, 타우
파킨슨병 (PD)	알파-시뉴클린
헌팅턴병 (HD)	Huntingtin
측삭경화증(ALS)	Superoxide dismutase 1
	(SOD1), TDP-43



그림 1. Braak stage 단계에 따라 병의 진행과정을 화살표로 나타냄. 단계가 진행됨에 따라 알파-시뉴클린 응집체 (루이바디)가 뇌 전역으로 퍼지며 전증상에서 증상이 나타남 (파란색 동그라미: Cortical Lewy body, 노란색 동그라미: Brainstem Lewy body)



**그림 2. 파킨슨병의 발병기전** 단백질 잘못 접힘과 응집, 미토콘드리아 기능장애, ROS (산화스트레스)의해 신경세포가 사멸됨. ROS에 의한 기전은 파란색으로 표시함.

Locus	Gene	Inheritance	Description	References
Park 1	SNCA	AD	α-synuclein	[208-210]
Park 4				
Park 2	PRKN	AR	parkin RBR E3	[100]
			ubiquitin protein ligase	
Park 5	UCHL1	AD	ubiquitin C-terminal	[211]
			hydrolase L1	
Park 6	PINK1	AR	PTEN-induced putative	[102]
			kinase 1	
Park 7	DJ-1	AR	Parkinsonism-associated	[105]
			deglycase	
Park 8	LRRK2	AD	Leucine-rich repeat	[212, 213]
			kinase 2	
Park 9	ATP13A2	AR	Cation-transporting	[214]
			ATPase 13A2	
Park 11	GIGYF2	AD	GRB10 interacting GYF	[215]
			protein 2	
Park 13	HTRA2	AR	HtrA serine peptidase 2	[216]
Park 14	PLA2G6	AR Calcium-independent		[217]
		phospholipase A2		
			enzyme	
Park 15	FBX07	AR	F-box protein 7	[218]
Park 17	VPS35	AD	Vacuolar protein	[95, 219,
			sorting-associated	220]
			protein 35	
Park 18	EIF4G1	AD	Eukaryotic translation	[221]
			initiation factor 4	
			gamma 1	
Park 19	DNAJC6	AR	HSP40 Auxilin	[222]
Park 20	SYNJ1	AR	Synaptojanin 1	[223]
Park 21	DNAJC13	AD	Receptor-mediated	[224]
			endocytosis 8 (RME-8)	
Park 23	VPS13C	AR	Vacuolar protein	[225]
			sorting-associated	
			protein 13C	

표 2. 가족성 파킨슨병과 관련 유전자

\*AD: autosomal dominant, AR: autosomal recessive

CHR	BP	Nearest gene	Effect ellele	Other ellele	EAF	Odds ratio
1	161469054	FCGR2A	С	G	0.501	1.07 (1.05–1.09)
1	171719769	VAMP4	Т	С	0.195	0.93 (0.91–0.95)
2	18147848	KCNS3	А	Т	0.904	1.12 (1.08–1.16)
2	96000943	KCNIP3	А	Т	0.242	0.94 (0.92–0.96)
3	28705690	LINC00693	Т	С	0.379	1.07 (1.05–1.09)
3	122196892	KPNA1	Т	С	0.172	1.09 (1.06–1.12)
3	151108965	MED12L	А	Т	0.367	0.94 (0.92–0.96)
3	161077630	SPTSSB	А	G	0.674	0.94 (0.92–0.96)
4	17968811	LCORL	А	Т	0.159	0.92 (0.90-0.94)
4	170583157	CLCN3	А	G	0.326	0.94 (0.92–0.96)
5	102365794	PAM	С	G	0.703	1.06 (1.04–1.09)
5	134199105	C5orf24	А	С	0.102	0.91 (0.88–0.94)
6	30108683	TRIM40	Т	С	0.245	0.94 (0.92–0.96)
6	72487762	RIMS1	Т	С	0.284	1.07 (1.05–1.09)
6	112243291	FYN	А	G	0.805	1.07 (1.05–1.10)
6	133210361	RPS12	Т	С	0.967	0.80 (0.75–0.86)
7	66009851	GS1- 124K5·11	А	Т	0.051	0.87 (0.82–0.91)
8	130901909	FAM49B	Т	С	0.723	0.94 (0.92–0.96)
9	34046391	UBAP2	Т	С	0.734	0.94 (0.92–0.96)
10	104015279	GBF1	А	G	0.851	0.92 (0.90-0.95)
11	10558777	RNF141	А	G	0.878	1.09 (1.06–1.12)
12	46419086	SCAF11	Т	С	0.404	0.95 (0.93–0.97)
12	133063768	FBRSL1	А	G	0.490	1.06 (1.04–1.08)
13	49927732	CAB39L	Т	С	0.740	1.06 (1.04–1.09)
13	97865021	MBNL2	Т	С	0.230	1.07 (1.05–1.09)
14	37989270	MIPOL1	Т	С	0.438	0.95 (0.93–0.97)
14	75373034	RPS6KL1	А	С	0.787	1.07 (1.05–1.10)
16	28944396	CD19	С	G	0.309	0.94 (0.92–0.96)
16	50736656	NOD2	А	G	0.599	1.06 (1.04–1.08)
17	7355621	CHRNB1	А	С	0.648	0.95 (0.93-0.96)

표 3. 파킨슨병의 위험인자 (GWAS)

17	42294337	UBTF	А	С	0.653	1.07 (1.04 - 1.09)
17	42434630	FAM171A2	А	G	0.606	0.93 (0.91–0.95)
17	59917366	BRIP1	Т	С	0.164	1.09 (1.06–1.11)
17	76425480	DNAH17	А	Т	0.833	1.08 (1.05–1.11)
18	31304318	ASXL3	Т	G	0.498	1.05 (1.04–1.07)
18	48683589	MEX3C	Т	G	0.550	0.94 (0.93–0.96)
20	6006041	CRLS1	Т	С	0.128	1.08 (1.05–1.11)
21	38852361	DYRK1A	A	G	0.283	1.07 (1.05–1.10)

\*CHR: chromosome, BP: base pair position, EAF: Effect allele frequency



그림 3. 알파-시뉴클린 구조 N-말단영역(회색)은 잔기 1-60으로 구성되며, 양친매성 영역으로써 다양한 SNCA돌연변이가 이 영역에 위치함. NAC지역(초록) 은 잔기 61-95로써 소수성 지역이며 알파-시뉴클린 파이브릴에서 코어 지역으로써 β-sheet rich한 지역. C-말단지역(파랑)은 잔기 96-140이며, 산성화되어 있으며 알파-시뉴클린 파이브릴에서 flexible하고 unfolded한 구조를 가진다는 특징이 있음.



그림 4. 알파-시뉴클린의 세포간 전파 알파-시뉴클린은 세포 외 방출과 인접 세포로의 이입을 통해 전파됨. 알려진 분비기전은 1. Secretory vesicle을 통해 분비됨, 2. MVB (multivesicular bodies)는 exosome을 통해 분비됨, 3. Autophagosome과 MVB는 융합하여 Amphisome을 만들어 분비됨, 4. LRRK2-RAB 은 라이소좀을 분해가 아닌 분비성 라이소좀으로 유도하여 분비를 유도함. 세포내로 이입될 때 신경세포의 수용체 (LAG3, TLR2, HSPG, Na+/K+ATPase 등)에 의해 조절될 수 있음.

표 4. 알려진 파킨슨병 면역치료법	표 4.	알려진	파킨슨병	면역치료법
---------------------	------	-----	------	-------

Name	FDA Status (Phase)	
ABBV-0805	1	Passive
Affitope PD01A, PD03A	2	Active
LU AF82422	1	Passive
MEDI1341	1	Passive
Prasinezumab	2	Passive
UCB7853	1	Passive

Name	FDA Status (Phase)	
AKST4290	2	Antagonist of the G protein-coupled C-C chemokine receptor type 3 (CCR3)
AVP-923	3	Receptor-related Mixture of dextromethorphan and quinidine
Ambroxol	2	GBA1 activity
Anle138b (diphenyl pyrazole)	1	Inhibitor of protein aggregation
Atomoxetine	1	Norepinephrine uptake inhibitor
BIIB094	1	LRRK2 anti-oligonucleotide
BIIB118	1	Inhibitor of Casein kinase 1 delta and epsilon
Blarcamesine	1	Mixed ligand for sigma1/muscarinic receptors
CDNF	1/2	Other
CNM-Au8	2	Metals, Other
CST-2032	2	Other Neurotransmitters
CVN424	2	Other Neurotransmitters
Clenbuterol	2	Clenbuterol, a β2-adrenergic receptor agonist
DNL151	1	Inflammation, Other
Deferiprone	2/3	Metals
Dipraglurant	2/3	NMDA antagonists (Amantadine)
Exenatide	3	GLP-1
Inzomelid	1	NLRP3 inhibitor
Kynmobi	Approved	Dopamine receptor agonist

# 표 5. 면역치료법 외 알려진 파킨슨병 치료법

Liraglutide	2	GLP-1
LTI-291	2	Activator of glucocerebrosidase (GCase)
Levodopa	Approved	Other Neurotransmitters
NPT520-34	1	Antagonist of TLR2
MSK-DA01	1	Other Neurotransmitters, Other
Nabilone	2	Other Neurotransmitters
Nasal Insulin	2	Amyloid-Related, Other
Nilotinib	2	Other
Nicotinamide Riboside	2	Other
Doginhan	1/2	Block translocation of alpha-synuclein
rosipiien	1/2	mRNA
PR001	1/2	mRNA GBA-related
PR001 Rasagiline	1/2 1/2 Approved	mRNA GBA-related Selective MAOB inhibitor
PR001 Rasagiline Safinamide	1/2 1/2 Approved Approved	mRNA GBA-related Selective MAOB inhibitor MAOB inhibitor
PR001 Rasagiline Safinamide Saracatinib	1/2 1/2 Approved 1	mRNA GBA-related Selective MAOB inhibitor MAOB inhibitor Inhibitor of the Src/abl family of kinases
PR001 Rasagiline Safinamide Saracatinib Sargramostim	1/2 1/2 Approved 1 1	mRNA GBA-related Selective MAOB inhibitor MAOB inhibitor Inhibitor of the Src/abl family of kinases Inflammation, Other, Unknown
PR001 Rasagiline Safinamide Saracatinib Sargramostim Semaglutide	1/2 1/2 Approved Approved 1 1 2	mRNA GBA-related Selective MAOB inhibitor MAOB inhibitor Inhibitor of the Src/abl family of kinases Inflammation, Other, Unknown GLP-1
PR001 Rasagiline Safinamide Saracatinib Sargramostim Semaglutide UCB0599	1/21/2ApprovedApproved1122	mRNA GBA-related Selective MAOB inhibitor MAOB inhibitor Inhibitor of the Src/abl family of kinases Inflammation, Other, Unknown GLP-1 Alpha-synuclein aggregation inhibitor

# **2장** TNF-α 에 의한 알파-시뉴클린 응집체의 세포간 전이 조절

# 실험재료 및 방법

# 실험재료 및 방법

# 실험재료

실험에서 사용한 항체는 아래 표에 기재함.

# 표 6. 실험에서 사용된 항체

Name of Antibody	Manufacturer	Catalog #	Dilution used
Mouse monoclonal	BD Biosciences	Cat#610787	1:1500 (WB)
anti-a-synuclein			1:250 (ELISA)
(Syn-1)			
Rabbit polyclonal	Cell Signaling	Cat#2642	1:10 (Immuno-
anti-a-synuclein	Tech		EM)
Rabbit monoclonal	Abcam	Cat#ab51253	1:500 (IHC)
anti-phospho-α-			
synuclein (EP1536Y)		_	
Rabbit polyclonal	Abcam,	Cat#ab59264	1:500 (IHC)
anti-a-synuclein			
(phosphor 129)			
antibody			
Mouse monoclonal	Abcam	Cat#ab25630	1:10 (Immuno-
anti-LAMP1			EM)
Rabbit polyclonal	Abcam	Cat#ab24170	1:1000 (WB)
anti-Lamp1			
Mouse monoclonal	<b>BD</b> Biosciences	Cat#556019	1:10 (Immuno-
anti-CD63			EM)
Mouse monoclonal	Abcam	Cat#ab6313	1:1000 (WB)
anti-Cathepsin D			
Mouse monoclonal	Abcam	Cat#GT1032	1:1000 (IF)
anti-p21		·	
Polyclonal anti-	Sigma-Aldrich,	Cat#G7652	1:50 (Immuno-
mouse IgG gold			EM)
secondary antibody		_	
Polyclonal anti-rabbit	Sigma-Aldrich,	Cat#G7277	1:50 (Immuno-
IgG gold secondary			EM)
antibody			

HRP-anti-Rabbit	Bio-Rad	Cat#170-6515	1:200 (IHC)
secondary antibody			
HRP-anti-mouse	Bio-Rad	Cat#170-6516	1:3000 (WB)
secondary antibody			

### 세포배양

SH-SY5Y human neuroblastoma 세포는 이전 연구에서 기술한대로 배 양 및 분화됨[226]. *RAB27a* 유전자 제거는 제조사의 지침에 따라 세포를 *RAB27a* shRNA (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dalla, TX, sc-41834-SH)에 형질 도입함.

# Dual-cell BiFC시스템을 이용한 세포간 전파 실험

Dual cell BiFC 공동배양실험은 이전에 기술한 대로 진행됨 [226]. 미세아 교세포로부터 얻은 조건배지는 V1S, SV2 공동 배양에 처리하고 이틀 더 배양함. 염증인자처리실험을 위해 V1S, SV2 공동 배양 조건에서 각 염증 인자를 24시간 동안 처리하고 총 3일 배양하여 분석함. 현미경분석은 다섯 개의 영역이 무작위로 선택되었으며, 각 영역에서 최소 100개의 세포를 분 석함. 사용된 재조합 염증인자들은 아래에 기재함.

### 표 7. 실험에서 사용된 재조합 염증인자들

Name of protein	Manufacturer	Catalog #
Human IL-1β	Prospec	Cat#CYT208
Human IL-2	Prospec	Cat#CYT209

Human IL-4	Prospec	Cat#CYT211
Human IL-5	Prospec	Cat#CYT213
Human IL-6	Prospec	Cat#CHM231
Human IL-8	Prospec	Cat#CHM231
Human IL-10	Prospec	Cat#CYT500
Human IL-12	Prospec	Cat#CYT-101
Human IL-17	Prospec	Cat#CYT250,
Human IFN-α	Prospec	Cat#CYT-520
Human IFN-β	Prospec	Cat#CYT-236
Human IFN-γ	Prospec	Cat#CYT-206
Human TNF-α	Prospec	Cat#CYT223

# Primary 미세아교세포 준비

Primary 미세아교세포는 이전에 보고한대로 배양함[7]. 1일된 신생아 C57BL/6 마우스의 대뇌 피질을 37 ° C에서 트립신-EDTA로 분해시켜 primary 미세아교세포를 생성함. 다음으로 세포를 DNase 1(Roche, Basel, Switzerland, #11284932001)를 처리한 후 500 x g에서 5 분 동 안 원심 분리하고 10% fetal bovine serum (FBS)가 포함된 DMEM/F12 미디아로 re-suspend함. poly-D-lysine-코팅된 플레이트에 세포를 플레 이팅 한 후 37 ° C에서 배양배지 DMEM/F12/10% FBS 안에서 배양함. 3-4일마다 새로운 배지로 교체하였고, 10일째에 미세아교세포는 플레이 트를 쳐서 떼어냄. 원심분리하여 수집한 미세아교세포는 poly-D-lysine-코팅된 플레이트에 깔아 실험에 사용됨.

### Primary 피질 신경세포 준비

Primary 대뇌 피질 신경세포는 이전연구에서 기술한 것과 같이 준비함 [227]. 임신한 C57BL/6 마우스 또는 Sprague Dawley Rat의 배아 16일 차 (E16) 배아에서 해부된 대뇌 피질을 파파인 용액(HBSS containing 10 U/ml papain, 0.2 mg/ml cysteine, 0.5 mm EDTA, 1 mm CaCl<sub>2</sub>, 0.003N NaOH)에서 20분동안 인큐베이션함 다음으로 DNase I (Roche, #11284932001)을 첨가한 후 파이펫팅을 통해 물리적으로 조직을 분해 시킴. 그 후, 원심분리를 통해 세포를 얻고, Poly-D-lysine/laminin-코팅 된 플레이트 또는 poly-D-lysine/Matrigel-코팅 (1:100; BD Biosciences, San Diego, CA, USA) 커버슬립에 세포를 플레이팅함. 3일 마다 새로운 배지로 교환하며 세포를 배양, 유지함.

### 조건 배지 준비

Primary 미세아교세포는 실험 전날 60-mm 배양접시에 플레이팅함. 다음 날, vehicle (DMSO) 또는 LPS (100 ng/ml)를 전사인자 억제제 (1 μM) 와 함께 1시간동안 처리함. 그 후, 미세아교세포를 새로운 배지로 린스 한 후, 새로운 미디아에서 4시간동안 배양함. 사용한 전사인자 억제제와 LPS 억제제는 다음과 같음; NF-κB 억제제 (Bay 11-7085; Tocris, Ellisville, MI, #S7352), AP-1 억제제 (SR 11302; Tocris, #2476), LPS 억제제 (Polymyxin B; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA #81334).

### Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, NRW, Germany, #74106)를 사용하 여 primary미세아교세포와 primary신경세포에서 RNA를 분리함. cDNA 의 합성은 iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, #1708891)를 사용함. iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, #172-5121)와 적절한 primers를 사용하여 타겟하는 유전자를 증 폭시킴. 사용된 primer 정보는 아래 표 8에 기재함. CFX Connect Realtime PCR system (Bio-Rad, #1855201)을 사용하였고, 마우스 샘플의 thermocycling program은 95° C, 30초, 40 cycles of 95° C, 5초, 58° C, 30초, 2<sup>-ΔΔCT</sup>을 이용하여 상대적인 mRNA 레벨을 측정, 계산함. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase를 사용하여 모든 ΔCτ values (GAPDH)

표	8.	실험	에서	사	용된	프리	႞႞႖	머
---	----	----	----	---	----	----	-----	---

Gene		Sequence of Primer	Application
Mouse TNF	Forward	CCTCTTCTCATTCCTGCTTGTGG	qRT-PCR
	Reverse	GGTGGTTTGTGAGTGTGAGGG	_
Mouse	Forward	CCCGTGGACAGTGAGCAGTT	qRT-PCR
CDKN1A	Reverse	CCAGACGAAGTTGCCCTCCAG	_
Mouse TP53	Forward	GTGCTCACCCTGGCTAAAGT	qRT-PCR
	Reverse	AGGAGGATGAGGGCCTGA AT	_
Mouse JAK1	Forward	CGTCAA ACCTGTGTCTCG CT	qRT-PCR
	Reverse	CCCCCAAAGTCTACGCTGTT	_
Mouse	Forward	GATCGCTTGCCCAACTCTTG	qRT-PCR
STAT1;	Reverse	ACTGTGACATCCTTGGGCTG	_

Mouse	Forward	ACTGCACCCAAACCGAAGTC	qRT-PCR
GROα	Reverse	TTTCTGAACCAAGGGAGCTTC A	
Mouse IL-6	Forward	GCCAGAGTCCTTCAGAGAGATACA	qRT-PCR
	Reverse	TGTTAGGAGAGCATTGGA	-
		AATTGGG	
Mouse IL-1 $\alpha$	Forward	GCACTTGGGAGCCCTTTCAT	qRT-PCR
	Reverse	ACAGCTTTAAGGACGGGAGG	
Mouse	Forward	AGAAGGTCGTGAAGCAGGCATC	qRT-PCR
GAPDH	Reverse	CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG	-

### Western blotting

Western blotting은 이전에 기술한 것과 같이 진행함[7]. Amersham Imager 600 (GE Healthcare)와 Multi Gauge (v3.0) software를 사용 하였고, 이미지 획득과 정량화를 위해 Fujifilm을 사용함.

### Senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) 활성

β-galactosidase 기질인 C12FDG를 사용하여 SA-β-gal의 활성을 측정 함. Poly-D-lysine (0.1 mg/ml; Sigma-Aldrich, #P7280), Matrigel (1:100; BD Biosciences) 로 코팅된 커버슬립에 primary 신경세포를 플 레이팅 한 후, 다음 날 1 시간동안 37 ° C에서 bafilomycin A1 (0.1 nM) 을 처리함. 그 후, 2 시간동안 37 ° C에서 33 mM C12FDG을 처리함.

### 면역 형광 염색

면역형광실험의 자세한 기법은 이전 연구에 기술하였고, 실험에 사용된 항 체 정보는 표 6에 기재함[226]. 유리 슬라이드에 세포를 올리고 면역 염색 하였고, 카운트염색으로 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen, Carlsbad, CA, D1306)를 사용함. Prolong Gold Antifade Reagent (P36930, Invitrogen)을 사용하여 마운팅함. 이미지 캡쳐를 위 해서 Zeiss LSM 700 confocal laser-scanning 현미경이 사용됨.

### 사용동물

B6;129S-Tnftm1Gkl/J 마우스는 Jackson 실험실 (Bar Harbor, ME, USA, #003008)로부터 구매한 후 서울대의 표준화된 환경조건에서 사육 함. 또한 모든 마우스는 동물 시설에서 최소 1주일 동안 적응 후 실험을 진 행함.

# 재조합 알파-시뉴클린<sup>V40G</sup> multimer 생성

재조합 인간 알파-시뉴클린<sup>V40G</sup>는 이전에 기술한 것과 같이 준비함 [152]. 파이브릴을 만들기 위해서 알파 -시뉴클린(200 μM in PBS)은 37°C, 1,050 rpm의 일정한 shaking에서 9일동안 인큐베이션함.

# 알파-시뉴클린<sup>V40G</sup> multimer stereotaxic 주입

10주령의 수컷 C57BL/6 마우스에 알파-시뉴클린<sup>v40G</sup> multimer 또는 완 충 식염수(PBS; vehicle control)을 intrastriatal 주입함. 마우스는 ketamine hydrochloride, xylazine hydrochloride (3.5:1, 2.5 μl/g)을 이용하여 마취됨. 30 G 바늘을 이용하여, PBS, 알파-시뉴클린<sup>v40G</sup> multimer (6 μg)을 볼륨 2 μl안에 포함하여 stereotaxic 주입함. 오른쪽 striatum (anterior/posterior, 1.0 mm; medial/lateral, 1.5 mm; dorsal/ventral, 3.0 mm) at a rate of 0.5 μl/min.

### 마우스로부터 샘플 획득

1.2% Avertin (0.23 ml/g)를 이용하여 주입 20주 후 마우스를 마취함. 다 음 식염수로 경심관류 한 다음, 차가운 4% paraformaldehyde (PFA) 로 관류하여 고정시킴. 뇌를 해부하고 최소 48 시간동안 4° C에서 4% PFA 를 이용하여 고정시킴. 고정 후 뇌는 PBS를 이용하여 워시하였고, freefloating slices 방식으로 (40 μm의 두께) Vibratome (Leica Biosystems, Germany, VT1000S)을 이용하여 자름.

### 신경병리학적 분석 및 면역조직화학

Vibratome을 이용해 Free-floating방식으로 얻은 뇌 조각(두께: 40 µm) 4% BSA, 0.1% Triton X-100 가 포함된 PBS (PBST) 로 블라킹함. 다 음으로 하루동안 1차 항체와 4° C에서 인큐베이션시킴. 다음날, PBST로 워시 후, 2차항체와 반응시키고, avidin-biotin-peroxidase complex (ABC Elite kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, #PK6200)을 이용하여 염색된 정도를 검출함. 3,3-diaminobenzidine (DAB)을 사용하여 염색하였고, 이미지는 ZEISS AX10 microscope (Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 얻음. 광학밀도분석은 ImageJ (NIH) 를 사용하여 면역반응이 일어난 정도를 측정함.

### RNA실험

RNeasy Mini Kit를 사용하여 RNA(Qiagen)를 추출함. QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit를 사용하여 libraries (Lexogen, Inc., Greenland, NH, USA)를 준비함. NextSeq 500 sequencing system에 서 cDNA는 75-bp 단일 말단 판독으로 시퀸싱됨(Illumina, Inc., San Diego, CA, USA).

# RNA 시퀀싱 (RNAseq)

RNA sequencing을 위해 TopHat2 (version 2.1.1)을 사용함. HTSeq 을 이용하여 데이터를 분석함. DESeq2 는 differentially expressed genes (DEGs; fold change > 1.3, p-value < 0.05, version 1.24.0)를 분석하 기위해 사용됨 [228]. ClueGO, Cytoscape plug-in으로 gene ontology (GO) enrichment analysis 분석함 [229]. GSEA Java program GSEA 4.1.0 은 gene set enrichment analysis (GSEA) (Broad Institute, University of California San Diego)분석함. DAVID datasets (version 6.8)을 이용하여, DEGs의 GO enrichment와 Kyoto Encyclopedia of Genes, Genomes (KEGG) pathway 를 분석함[230].

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Sandwich ELISAs의 자세한 실험 방법은 이전연구에서 자세히 기술함 [231]. 알파-시뉴클린 단량체는 실험 직전 필터하여 준비하고 표준물로써 사용함. 실험에 사용된 항체 정보는 표 6에 기술함. TNF-α의 Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA Kit (SMTA00B; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였고 제조사의 지시에 따라 실험을 진행 함.

#### Correlative light electron microscopy (CLEM)

35-mm 유리 배양 접시에 V1S와 SV2 세포가 50%-60%까지 찰 때까지 배양함. Confocal 현미경을 이용하여 세포의 이미지를 얻음 (LSM780; Zeiss). 2% paraformaldehyde (EM grade; Carl EMS) 및 2.5% glutaraldehvde를 포함한 sodium cacodvlate buffe를 이용하여 세 포를 고정시킴. 워시후에, 세포는 1.5% potassium ferrocyanide을 함유한 2% osmium tetroxide (OsO4)에서 1시간동안 4 °C 후 고정하고, 일련 의 에탄올 (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%)을 각 10분씩 해서 탈수 시킴. 관심 대상은 세포가 포함된 샘플 표면에 숫자와 문자를 기입하여 구 별할 수 있게 하였음. 식별된 샘플을 블록(UC7; Leica Microsystems)평 면에 수평으로 60nm 슬라이스로 절단하고, 시편 마운팅한 후, 2% uranvl acetate (10 분), lead citrate (10 minutes) (5 minutes)으로 이중 염색 함. 다음으로 잘린 부분을 120 kV Talos L120C 투과 전자 현미경을 이용 하여 분석함(ThermoFisher, Waltham, MA).

### 통계처리

GraphPad Prism 9.0.2 이 실험군들간의 통계적 유의미를 확인하기위해 사용됨. 사용한 통계처리방식은 아래와 같음. Two-tailed unpaired Student's t-test, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post-hoc test, Tukey's post-hoc test, two-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test, Tukey's post-hoc test (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

### 데이터 접근

RNAseq 관련 raw 시퀀싱 데이터는 National Center Biotechnology Information의 BioProjects PRJNA797925에 저장함.

## 윤리 관련

모든 동물 연구는 서울대학교 동물연구소 동물관리 위원회의 승인하에 진행됨 (IACUC SNU-171207-2-5, SNU-190721).

# 결과

## 활성화된 미세아교세포에서 분비되는 알파-시뉴클린의 전파를 조절 하는 가용성 인자들

확성화된 미세아교세포의 알파-시뉴클린 전파에 대한 영향을 알아보기 위하여, 미세아교세포에 LPS (MgCM-LPS) 또는 DMEM (MgCMcontrol)을 처리하여 얻은 조건배지를 Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)시스템에 처리하였다. 이 BiFC 시스템에서는 알 파-시뉴클린의 세포간 전파를 재결합된 Venus형광을 통해서 측정할 수 있다[226]. MgCM-control과 비교했을 때 MgCM-LPS 처리군에서 BiFC-positive 세포가 상당히 증가했음을 확인할 수 있었고, 이는 알파-시뉴클린의 전파가 증가 했다는것을 의미한다 (그림 5A, B). 이뿐만 아니 라 MgCM-LPS를 처리한 primary 신경세포에서 알파-시뉴클린의 분비 가 증가됨을 확인했다 (그림 5C). 이러한 결과는 활성화된 미세아교세포에 서 분비된 어떤 인자가 알파-시뉴클린의 분비를 증가시키고 이를 통해 알 파-시뉴클린의 전파가 증가되었음을 시사한다.

다음으로, 알파-시뉴클린 전파에 관여하는 인자를 찾고자 다양한 전사 억제제를 사용하여 조건 배지를 얻었다. 전사 억제제로는 Bay 11-7085 (NF-κB 전사억제제), SR 11302 (activator protein-1 (AP-1)전사억 제제) 가 사용되었다. 미세아교세포에 DMEM (MgCM-control), LPS (MgCM-LPS) 또는 LPS 와 전사 억제제 (MgCM-LPS+전사억제제)를 처리하여 조건 배지를 얻은 후에 BiFC 시스템에 처리하여 확인하였다. MgCM-LPS+SR을 처리한 실험군에서 MgCM-LPS에 의해 증가한 알파 -시뉴클린 전파가 감소됨을 확인하였다 (그림 6A, B). 이러한 결과는 전파 를 증가시키는 가용성 인자가 AP-1에 관여하는 인자임을 보여준다. 예상 했던 것과 같이 LPS 억제제로 알려진 Polymyxin B (PMX)를 처리하였을 때에 LPS에 의한 미세아교세포가 분비하는 가용성 인자의 효과가 없어지 는 것으로 보아 실험이 잘 진행됬음을 확인하였다.

이어, AP-1에 의해 발현이 조절되는 분비인자를 문헌조사를 통해 IL-1β, -2, -4, -5, -6, -7, -10, -12, -17, interferon (IFN)-α, -β, γ, TNF-α를 찾았고 이를 잠재적 후보로 선정하였다 [232-238]. 그 다 음 이들을 각각 BiFC 시스템에 처리하여 알파-시뉴클린 전파를 증가시키 는 인자를 스크리닝 하였고, TNF-α가 가장 두드러진 효과를 나타냄을 확 인하였다 (그림 7A). LPS를 처리한 미세아교세포로부터 분비되는 TNFα의 양을 확인하기 위해 미세아교세포의 배지를 모아 ELISA를 수행하였다. LPS처리군(MgCM-LPS)에서 TNF-α의 양이 증가했으며, 이는 LPS에 의해 미세아교세포에서 TNF-α의 분비가 증가했음을 시사한다 (그림 7B).

#### TNF-α 의 알파-시뉴클린 전파와 분비 증가

TNF-α를 BiFC 시스템에 직접 처리하여 알파-시뉴클린의 전파의 TNF-α 효과를 확인하였다. 그림 8에서 보듯이, BiFC-positive cell 이 TNF-α 처리에 의해 증가하였으며, 이는 TNF-α처리 농도에 따라 증가하 는 것을 확인하였다 (그림 8A, B). 이러한 결과는 TNF-α가 알파-시뉴클 린의 전파를 증가시켰음을 의미한다. 알파-시뉴클린의 전파에 있어서 TNF-α의 효과를 한 번 더 확인하기 위하여 wild type(WT) 미세아교세 포와 (TNF-α +/+) TNF-α유전자가 제거된 미세아교세포 (TNF-α-/-)에 LPS 또는 vehicle을 처리한 후 조건 배지를 얻었다. 그 다음 각 각의 조건배지를 BiFC 시스템에 처리한 후 알파-시뉴클린의 전파 변화를 확인 하였다. TNF-α유전자 제거 미세아교세포로부터 얻은 조건배지를 처리한 실험군에서 BiFC(+)cell 이 감소되는 것을 확인했으며(그림 9A, B) 이는 TNF-α가 미세아교세포가 유도하는 전파증가활성에서의 역할을 한다는 것을 시사한다.

*In vivo*에서 TNF-α의 알파-시뉴클린의 전파 증가를 확인하기 위해 다 음과 같은 실험이 진행되었다[239].

미리 형성된 알파-시뉴클린<sup>WT</sup> 파이브릴보다 알파-시뉴클린 <sup>V40G</sup>multimer에 의한 알파-시뉴클린 병리현상이 더 강하다는 본 연구진의 이전 연구결과에 따라 알파-시뉴클린<sup>V40G</sup>multimer을 마우스모델에 주입 하였다. TNF-α +/+ (WT)쥐와 TNF-α -/- 쥐의 striatum에 PBS 또 는 알파-시뉴클린<sup>V40G</sup>multimer 주입하였다. 주입 20주 후 뇌조각에 인산 화된 알파-시뉴클린(pS129)항체를 이용하여 면역조직병리학적 분석을 진행하였다.

이전 연구에서와 같이, 다양한 뇌지역에서 알파-시뉴클린<sup>V40G</sup>multimer 을 주입한 WT 쥐에서 pS129 항체에 대한 면역반응이 증가하였고 (Motor cortex, Cingulate cortex, Rhinal cortex, Amygdala), 반면에 WT 쥐에 vehicle을 주입한 뇌에서의 pS129 면역활성은 거의 없음을 확인하였다 (그림 10A-E). TNF-α유전자제거 쥐 (TNF-α -/-)의 경우, 알파-시 뉴클린<sup>V40G</sup>multimer을 주입했을 때 WT (TNF-α +/+)에 비해 pS129가 급격히 감소함을 확인하였다. (그림 10A-E). 이러한 *in vitro, in vivo*에 서의 결과를 바탕으로 TNF-α가 알파-시뉴클린 전파를 촉진한다는 것을 알 수 있다.

다음으로, TNF-α의 알파-시뉴클린 분비에서의 효과를 알아보기 위해, 다음 실험을 진행하였다. Primary 신경세포에 TNF-α를 농도별로 처리한 후 알파-시뉴클린의 변화를 살펴보았다. TNF-α처리에 의해 세포에서의 알파-시뉴클린의 양과 배지에서의 양 모두 농도에 따라 증가함을 확인하였 다 (그림 11A-D). 또, WT (TNF-α +/+) 미세아교세포에 LPS를 처리 하여 얻은 배지를 primary 신경세포에 처리한 후 primary 신경세포의 배 지를 모아 알파-시뉴클린의 농도를 ELISA를 통해 확인하였다. TNF-α 유전자제거(TNF-α -/-) 미세아교세포로부터 얻은 배지를 처리한 실험 군에서 알파-시뉴클린의 분비가 감소됨을 확인하였다 (그림 11E). 이러 한 결과는 미세아교세포로부터의 분비된 TNF-α가 신경세포에서의 알파 -시뉴클린의 분비를 증가시키고, 세포간 전이를 증가시킬 수 있음을 시사 한다.

#### TNF-α 에 의해 유도되는 신경노화

신경세포에서 TNF-α가 알파-시뉴클린의 분비를 증가시키는 메카니즘 에 대한 통찰력을 얻고자, Vehicle과 TNF-α를 신경세포에 처리한 후

transcriptome 분석을 하였다. Unannotated, duplicated 유전자를 제거한 후에, 24,424개의 유전자가 확인되었다. 유전자들의 발현 정도에 따라 (fold change >1.3, corrected p-values <0.05), 118개의 유전자를 DEG(differentially expressed genes) 로 확인하였다 (그림 12A, 추가 정보 표 11). DEG들은 Gene Ontology (GO), functional enrichment, Kyoto Encyclopedia of Genes Genomes (KEGG) 분석에 따르면, 세포 노화, 세포 사멸 및 항원 처리 및 표시, Toll-like 수용체 신호반응과 같은 면역반응에 관련이 있었다 (그림 12B, C). Functional enrichment 분석과 마찬가지로 Gene set enrichment analysis (GSEA) 데이터는 DEG들이 p53-의존적 세포노화와 밀접히 관련이 있음을 보여준다 (그림 12D). 이 와 더불어 22개의 DEG들은 JAK-STAT 노화경로에 관여한다는 것을 확 인하였다 (그림 13A-C).

이러한 transcriptome 분석결과들을 한 번 더 확인하고자, JAK-STAT 에 관여하는 노화관련 유전자들의 발현을 quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR)로 확인하였다.

P21, p53, JAK1, STAT1의 발현이 TNF-α처리에 의하여 유의미하게 증가됨을 확인하였다 (그림 13D-G).

다음으로, 실험적으로 TNF-α가 신경세포노화를 유도하는 것을 확인하 기 위하여, primary 신경세포에 TNF-α를 처리하고 신경노화 마커들의 변 화를 확인해보았다.

노화 세포는 형태학적 변화, 염색질의 리모델링, 대사 재프로그래밍 및

p21CIP1/WAF1의 변화, 염증 사이토 카인의 분비, senescenceassociated β-galactosidase (SA-β-gal) 활성, 텔로미어의 손상과 같 은 특징을 가지며 이러한 것을 senescence-associated secretory phenotype (SASP)를 획득했다고 표현한다. [240]. 텔로미어는 게놈의 불안정성을 막는 데 중요한 선형 염색체의 끝에 존재하는 보호구조로써 텔 로미어는 세포 복제의 결과로 짧아진다고 알려져 있다[241]. 이전 연구결 과에서 백혈구, 글리아 세포의 텔로미어는 나이가 들수록 짧아지는 반면 신 경세포의 텔로미어가 평생 동안 안정적으로 유지되는 것을 확인하였다 [242]. 즉 신경세포에서 세포노화 마커로 텔로미어의 손상은 확인하기 어 려우므로 primary 신경세포에 TNF-α를 처리한 후 p21CIP/WAF1 발현, senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) 활성, SASP관 런 유전자의 발현을 노화 마커로 확인하였다.

TNF-α를 처리한 primary 신경세포에서, 핵으로의 p21CIP/WAF1발 현이 증가된 것을 확인하였다 (그림 14A, B). 이는 전형적인 노화된 post-mitotic 신경세포의 특징인 핵으로의 p21CIP1/WAF1의 이동 및 발 현과 일치하는 결과이다[243]. 또 다른 노화 마커인 SA-β-gal activity 는 형광 SA-β-gal의 기질인 5-dodecanoylaminofluorescein di-β-D-galactopyranoside (C12FDG)의 형광세기를 측정함으로써 알아보았 다. C12FDG의 형광세기가 vehicle을 처리한 신경세포에서 보다 TNF-α 를 처리한 신경세포에서 유의미하게 증가함을 확인했다(그림 14C, D).

TNF-α 처리는 SASP 유전자인 GROα, IL-6, IL 1α의 발현을 증가시

켰다 (그림. 14E-G). 즉, 이러한 결과들로부터 TNF-α는 신경세포에서 세포노화를 유도한다는 것을 알 수 있다.

p21CIP/WAF1관련 노화가 TNF-α가 유도하는 알파-시뉴클린의 분비 에도 영향이 있는지 살펴보기 위해 다음과 같은 실험이 진행되었다. Primary 신경세포에 TNF-α를 처리하고, UC2288을 처리하여 알파-시 뉴클린의 변화를 살펴보았다. Primary 신경세포에서 TNF-α처리에 의해 세포 내 알파-시뉴클린과 알파-시뉴클린 분비 모두 증가하였지만, UC2288에 의해 증가한 세포 내 알파-시뉴클린의 변화는 없었다 (그림 15A-C). 반면에 알파-시뉴클린의 분비는 TNF-α에 의해 증가된 것이 UC2288처리에 의해 감소됨을 확인함으로써, TNF-α가 신경세포에서 p21CIP/WAF1관련 노화에 의해 알파-시뉴클린의 분비를 증가시킨다는 것을 알 수 있었다 (그림 15D).

#### TNF-α 는 라이소좀 세포외 배출을 통해 SASP를 유도

라이소좀 세포외 배출이 TNF-α가 유도하는 알파-시뉴클린의 분비에 어떤 역할을 하는지 조사했다. Vacuolin-1을 통해 신경세포에서 라이소좀 세포외 배출을 억제했을 때, TNF-α가 유도하는 세포 내 알파-시뉴클린의 양은 변화가 없었지만 알파-시뉴클린의 분비는 감소했음을 확인했다 (그 림 16A-D).

SASP는 aging과 같은 스트레스 조건에서 세포 외 환경과의 의사소통을 위해 풍부한 secretome을 생성하는 비세포자율적 능력을 반영한다 [244].

라이소좀 세포외 배출은 노화 관련 세포내 신호전달과 상호작용하는 것 으로 알려진 비전통적인 세포외 배출 경로 중 하나이며, 여러 SASP를 분비 하는 것으로 방법으로 알려져 있다 [245, 246]. 이러한 이전 연구결과를 바탕으로 라이소좀 세포외 배출의 관련성을 확인하고자 배지에서 라이소좀 효소의 하나인 β-hexosaminidase의 분비를 측정하였다. TNF-α처리는 또한 β-hexosaminidase의 분비도 증가시키고 이는 vacuolin-1 처리에 의해 감소하였다 (그림 16E). 이뿐만 아니라 TNF-α에 의해 증가한 βhexosaminidase의 분비는 p21CIP/WAF1의 억제제인 UC2288 처리에 의해 감소되었다(그림 16F).

이러한 결과들은 TNF-α가 노화관련 알파-시뉴클린의 분비를 라이소 좀 세포외 분비를 통해 증가시킨다는 것을 시사한다.

라이소좀의 세포외 배출이 알파-시뉴클린의 분비에 중요한 역할을 하는 것을 확인하고자, BiFC system에서 알파-시뉴클린 응집체의 위치를 확인 하였다[226]. BiFC 형광은 라이소좀 멤브레인 단백질인, LAMP1과 함께 위치하고 있었고 (그림 17A), 이것은 알파-시뉴클린이 분비되기 위하여 라이소좀으로 이동한다는 것을 의미한다. 이러한 라이소좀 내 위치를 다시 한번 확인하고자, correlative light-electron microscopy (CLEM)을 이 용하여 BiFC 형광이 multilamellar, electron-dense 구조에 존재함을 확 인하였다 (그림 17B). 더 나아가 immuno-electron 현미경 결과는 알파-시뉴클린 positive vesicle이 라이소좀 마커인 CD63와 LAMP1과 immunoreactive가 있음을 보여준다. (그림 17C).

다음으로 라이소좀 세포외 배출이 될 때 라이소좀 관련 기관과 plasma membrane의 결합을 조절하는 human *RAB27a를 knock-down*하여 알 파-시뉴클린의 변화를 확인하였다. shRNA를 사용은 *RAB27a*의 발현을 55% 감소시켰으며 (그림 18A, B) 이러한 조건에서 알파-시뉴클린의 세 포 내 양은 증가하였지만 알파-시뉴클린의 분비는 감소함을 확인하였다 (그림 18C-E). 즉 이러한 결과를 통해 라이소좀 세포외 배출이 알파-시 뉴클린의 분비와 관련이 있음을 다시한번 확인하였다.

# 그림



그림 5. 활성화된 미세아교세포의 세포간 알파-시뉴클린 전파에 미치는 영 향 (A) LPS에 의해 활성화된 미세아교세포에서 얻은 배지를 BiFC 시스템 에 처리함. 화살표는 BiFC-positive puncta를 가진 세포를 표기함. 눈금막 대: 10 μm (B) 그림 (A)의 BiFC-positive puncta 세포를 백분율로 정량 화함. (C) ELISA 실험방법으로 신경세포로부터 분비되는 알파-시뉴클린 의 양을 정량화함. (A-B) 김창연박사님에 의해 수행됨.



그림 6. 전사 인자 억제제의 알파-시뉴클린 전파 에서의 영향 (A) MgCM 을 BiFC 시스템에 처리함. 화살표는 BiFC-positive puncta를 표기. 눈금 막대: 20 μm (B) 그림 (A)의 BiFC-positive 세포를 백분율로 정량화함.



그림 7. 염증 인자의 알파-시뉴클린 전파 증가 효과 (A) 염증인자 (50 ng/ml)을 BiFC 시스템에 처리하고 알파-시뉴클린 전파를 증가시키는 인 자를 빨간색으로 표시함. (B) LPS 또는 vehicle처리한 미세아교세포로부 터 분비되는 TNF-α의 양을 ELISA로 정량함.



그림 8. TNF-α 의 알파-시뉴클린 전파 조절 (A) 알파-시뉴클린의 세포 간 전파에 대한 TNF-α의 효과. 알파-시뉴클린 응집체는 화살표로 표시 됨. TNF-α 처리농도: 50 ng/ml, 눈금막대: 20 μm (B) BiFC-positive 세포를 상대 백분율로 정량화함.



그림 9. TNF-α 유전자 제거의 알파-시뉴클린 전파 감소효과 (A) WT (TNF-α+/+) 또는 TNF-α 유전자제거 (TNF-α-/-) 미세아교세포에 LPS 또는 DMSO를 처리하여 배지를 얻은 후 알파-시뉴클린 응집체의 전 파에서의 효과를 확인. 알파-시뉴클린 응집체는 화살표로 표시됨. 눈금막 대: 20 μm. (B) 그림 (A)에서의 BiFC-positive 세포가 백분율로 정량화 됨.





그림 11. 신경세포에서 알파-시뉴클린 축적과 분비에 대한 TNF-α 효과 (A) TNF-α 처리농도에 따른 Triton X-100 soluble, insoluble 에서의 알파-시뉴클린 western blot이미지. 이미지의 오른쪽에 정량화된 영역을 표시. (B-C) 그림 (A)에서의 정량화 값. (B) Tx-sol 은 그림 (A)에서 화 살표로 표시된 곳이 정량화됨. (C) Tx-insol 은 그림 (A)에서의 선으로 표시된 영역을 포함하여 정량화함. (D) 분비된 알파-시뉴클린의 양은 ELISA로 측정됨. (E) Primary 신경세포에 두가지 배지를 처리했을 때 primary 신경세포에서 분비되는 알파-시뉴클린의 값을 ELISA로 측정함. (두가지 배지: TNF-α WT (TNF-α +/+)미세아교세포 또는 TNF-α 유 전자제거 (TNF-α -/-) 미세아교세포에 LPS또는 vehicle을 처리한 배 지).





С





그림 12. TNF-α 에 의해 유도된 신경노화 (A) TNF-α 또는 vehicle 처 리에 의해 (그룹당 5) upregulation (fold change >1.3) 또는 downregulation (fold change<0.3) 되는 DEG의 발현 (log2 read count number)을 보여주는 heat map. (B) TNF-α를 처리한 신경세포의 118개 의 common DEG의 상위 12 enriched KEGG pathway. (C) Enriched GO terms의 network. 각 term 은 통계적으로 Benjamini-Hochberg correction<0.05 유의미함. 각 노드(색으로 표시된 원)은 유의미하게 enriched된 parent GO term을 나타냄; 가장자리는 용어들 사이에 겹치는 유전자를 표시; 노드의 크기는 enriched 유전자의 수를 나타냄. (D) Vehicle 또는 TNF-α 처리한 신경세포에서의 DEG의 enrichment plot (FDR q-value <0.005). 샘플 준비 외에 (A-D) RNAseq분석은 배은진 박사님에 의해 수행됨.





그림 13. TNF-α 에 의해 유도된 JAK-STAT 노화경로에 관여하는 22 DEG (A) JAK-STAT 관련 노화 pathway에 관여하는 22개의 DEG의 발현정도를 나타내는 heat map. (B) STRING를 사용하여 JAK-STAT 관련 노화 pathway에 관여하는 22개의 DEG의 network에서 높은 상호작 용을 하는 protein을 표시함. (C) JAK-STAT 노화 pathway에 관련 22DEG의 log2 fold change값을 heap map으로 나타냄 (D-G) CDKN1A (D), TP53 (E) JAK1 (F), STAT1 (G)의 발현증가를 RTqPCR로 확인함. (A-C) RNAseq분석은 배은진박사님에 의해 수행됨.



그림 14. TNF-α 에 의해 유도되는 신경세포에서의 노화특징 (A) TNFα 또는 vehicle을 처리한 primary 신경세포에서의 p21 면역형광이미지. (B) 그림 (A)에서 핵에서의 p21 형광을 정량화함. (C) SA-β-gal의 축 적은 C12FDG 염색을 통하여 확인함. DAPI: 파랑; 핵염색, 눈금막대: 20 μm. (D) 그림 (C)에서의 C12FDG를 정량화함 (E-G) SASP 유전자로 알 려진 GROα(E), IL-6 (F), IL-1α(G)를 RT-qPCR로 확인함.



그림 15. p21억제에 의한 TNF-α 유도 알파-시뉴클린의 분비 감소 (A) TNF-α 와 UC2288 유무에 따른 Triton X-100 soluble, insoluble 에서 의 알파-시뉴클린 western blot이미지. 이미지의 오른쪽에 정량화된 영역 을 표시. (B-C) 그림 (A)에서의 정량화 값. (B) Tx-sol 은 그림 (A)에서 화살표로 표시된 곳이 정량화됨. (C) Tx-insol 은 그림 (A)에서의 선으로 표시된 영역을 포함하여 정량화함. (D) 분비된 알파-시뉴클린의 양은 ELISA로 측정됨.



그림 16. 라이소좀 세포외 분비 억제는 TNF-α 유도 알파-시뉴클린의분 비를 감소 (A) TNF-α와 vacuolin-1 유무에 따른 Triton X-100 soluble, insoluble 에서의 알파-시뉴클린 western blot이미지. 이미지의 오른쪽에 정량화된 영역을 표시. (B-C) 그림 (A)에서의 정량화 값. (B) Tx-sol 은 그림 (A)에서 화살표로 표시된 곳이 정량화됨. (C) Tx-insol 은 그림 (A)에서의 선으로 표시된 영역을 포함하여 정량화함. (D) 분비된 알파-시뉴클린의 양은 ELISA로 측정됨. (E, F) TNF-α에 의한 βhexosaminidase 분비에 있어서 vacuolin-1과 UC2288의 효과.



그림 17. 라이소좀 내에 위치하는 알파-시뉴클린 응접체 (A) BiFCpositive 알파-시뉴클린 응접체; 초록, LAMP1: 빨강, 핵: 파랑, 눈금막대: 20 μm. 위 그림에서 1,2 지역이 아래에 확대된 이미지로 표시됨. (B) CLEM을 이용하여 BiFC-positive한 구조를 분석함. 아래그림 iv,vi 는 위 그림 (I, ii, iii)에의 BiFC puncta (1,2)의 확대. 눈금막대: 4 μm. v는 iv의 확대, vii는 vi의 확대. (C) 면역전자현미경으로 라이소좀과 같은 구조에 알 파-시뉴클린응집체 확인. 파란색 화살표: 알파-시뉴클린, 빨간색 화살표: CD63 (위 사진), LAMP1 (아래 사진), 눈금막대: 200 nm. (A) 배은진박 사님에 의해 수행됨. (B-C) 정민교박사님에 의해 수행됨.



그림 18. 알파-시뉴클린 분비에 대한 RAB27a 유전자 제거영향 (A) RAB27a 유전자 제거효율. (B) 그림 (A)에서의 RAB 27a을 정량화함 (C) Tx-sol, Tx-insol 에서의 알파-시뉴클린 western blot 이미지. (D) Tx-insol 에서의 Rab27a 가 정량화되었고, 정량화된 부분은 그림 (C)에서 오른쪽에 표시함. (E) 배지안의 분비된 알파-시뉴클린의 양은 ELISA 로 확인함 (반복실험=3). (A-E) 배은진박사님에 의해 수행됨.

고찰

염증은 단백질 응집 및 전파에 중요한 조절인자이다. 본 연구에서는 염증성 사이토카인인 TNF-α가 *in vitro*와 *in vivo* 모두에서 세포 간 전파를 증가시킨다는 것을 확인했다. 신경세포에서 TNF-α는 세포노화와 SASP의 획득을 유도했다. 또 SASP의 일환으로, 알파-시뉴클린의 분비는 노화된 신경세포에서 증가하며 이는 라이소좀의 세포외 배출에 의해 매개된다는 것을 확인하였다. 종합하면, 이러한 결과는 신경세포의 노화 유도 및 SASP 획득을 통한 파킨슨병의 발병 기전에 대해 TNF-α의 관련성을 설명하고 SASP의 라이소좀 세포외 배출과 알파-시뉴클린의 분비 및 전파에 기여하는 증거를 제공한다.

이전의 병리학 연구에서 신경 퇴행성 질환에서의 신경세포와 신경아교세포에서 세포 노화의 증거가 보고되었다 [28]. 증가한 SA-βgal 활성, p53 및 DNA 손상 반응(DDR) 신호를 포함한 세포 노화 특징이 AD 및 PD 뇌에서 확인되었다 [28]. 또한 뇌 조각 측정을 통해 특발성 PD 환자 및 허혈성 뇌졸중 기증자의 뇌에 p21CIP/WAF1이 축적되어 있는 것을 확인했다. 이러한 결과는 뇌에서 세포 노화가 신경퇴행성 질환의 발병에 중요한 역할을 할 수 있다는 가능성을 제시한다.

노화 세포의 분자적 특징 중 하나는 SASP 단백질의 상향 조절이다. Senescence-messaging secretome 이라고도 알려진 SASP는 자가분비 및 측분비 신호를 통해 세포간 상호작용을 향상시켜 조직 미세환경을 변화시킨다 [247]. 특발성 파킨슨병 환자의 뇌에서 SASP 증가한다는 보고가 확인되었다 [30]. 본 연구는 TNF-α에 노출된 신경세포에서

노화특징과 알파-시뉴클린의 분비가 SASP를 통해 증가되는 것을 확인했고, 이는 알파-시뉴클린이 신경염증 미세환경에 반응하는 SASP로서의 역할을 한다는 것을 시사한다.

SASP가 노화과정을 조절하는 핵심 요소로 간주되지만, SASP의 분비에 관한 메커니즘을 잘 알려져 있지 않다. 신호 서열이 없는 일부 SASP는 분비 경로, 재활용 경로 및 비고전적 분비 경로를 포함한 다양한 분비 경로를 통해 방출될 수 있다고 알려져 있다 [248-250]. TNF-α는 식세포 컵을 통해 방출되고[251], IL-6 는 재활용 엔도좀을 통해 분비되며[249] IL-1, IL-18 을 포함한 일부 SASP는 분비성 라이소좀에 존재하고 라이소좀의 세포 외 배출을 통해 분비된다고 알려져 있다[252].

또 다른 주요 SASP 인자인 고이동성 그룹 상자 1(HMGB1)은 엔도라이소좀 관련 소기관에서도 발견된다는 점을 감안할 때, 라이소좀 매개 분비 경로는 SASP의 분비를 위한 주요 경로일 수 있음을 시사한다[253]. 이것은 알파-시뉴클린이 LAMP1/CD63-positive 소기관에 존재하며 *RAB27a* 매개 라이소좀 세포외 분비를 통해 분비된다는 본 연구의 결과와 일치한다.

이러한 결과와 마찬가지로, 이전 연구에서는 신경세포에서 라이소좀의 세포외 배출의 결함이 알파-시뉴클린의 분비를 손상시켰다는 점을 확인했다 [254]. 종합하면, 이러한 결과들은 알파-시뉴클린 응집체를 포함한 SASP의 분비가 라이소좀의 세포외 배출을 통해 이루어진다는 가능성을 뒷받침한다.

라이소좀의 세포외 배출를 통해 분비되는 병원성 단백질 응접체의 또 다른 예는 라이소좀 유전자 네트워크에서 마스터 유전자인 TFEB (전사 인자 EB)에 의한 TRPML1(뮤코리핀 TRP 양이온 채널 1) 의존적 방식으로 조절되는 과정에 절단된 돌연변이 형태의 타우 단백질이다 [255]. 이것은 라이소좀의 세포외 배출이 타우 단백질의 분비 (아마도 전파)도 매개함을 시사한다. 이것과 일치하여, 본 연구는 노화 신경세포에서 알파-시뉴클린의 분비 증가뿐만 아니라 TFEB의 상향조절을 확인했다 (추가정보 표 11). 더 나아가, TNF-α가 유도하는 알파-시뉴클린의 분비 증가는 라이소좀의 세포외 배출의 유전적 또는 약리학적 차단에 의해 억제됨을 확인했다.

따라서 이전 및 현재 연구 결과를 기반으로 라이소좀의 세포외 분비가 병리단백질의 분비 및 세포간 전파에 대한 중추적 메커니즘이 될 수 있음을 제안한다.

여러 연구에서 염증 네트워크의 활성화가 세포 노화의 개시, 증폭 및 유지에 기여한다고 제안해 왔다 [256]. 염증 네트워크의 중심 조절자 및 속도 제한 성분으로 간주되는 IL-6은 종양 유전자 유발 노화를 매개하는 것으로 알려져 있고[257], 케모카인 수용체인 CXCR2를 통한 신호 전달은 p14 및 p15, p53/p21와 같은 노화 이펙터를 활성화하여 세포 노화를 향상시킨다고 알려져 왔다[256]. 이뿐만 아니라 IL-1β 는 연골 세포 및 성상 세포에서 p16INK4a 발현을 상향 조절하여 세포 노화를 유도한다 [258, 259]. TNF-α 또한 장기간 노출 또는 과발현 했을 때, 섬유아세포,

혹색종 세포 및 조혈 세포를 포함한 다양한 세포 유형에서 세포 노화를 유도한다고 알려져 있다[260-262]. 본 연구의 TNF-α에 노출된 신경세포가 여러 노화특징들을 가진다는 결과는 이전결과와 일치하며, 따라서 본 연구를 통해 염증인자가 세포 노화를 유도한다는 것을 확인했다. 또한 노화 세포는 IL-6, IL-8 및 CCL 계열 단백질과 같은 염증 유발 신호를 생성한다고 알려져 있다[263]. 따라서 염증과 세포 노화는 서로 영향을 주며 질병 발병을 촉진하는 미세 환경을 조성할 수 있다. 이러한 발견에 기초하여 신경아교세포의 염증, 신경 노화 및 알파-시뉴클린의 응집이 파킨슨병 병인을 기인하는 미세 환경을 생성하기 위해 서로 상호 작용한다는 모델을 제안했다. 신경계에서 소교세포의 염증 활성화는 TNF-α의 생산을 증가시키고, 그것은 노화를 유도하는 것을 확인했다. 또 노화 신경세포는 알파-시뉴클린 응집체를 분비하며 라이소좀의 세포외 배출을 통하여 SASP를 활성화시킨다는 것을 확인했다.

이것은 또한 인접 신경세포로의 알파-시뉴클린 전파를 유도한다. 분비된 알파-시뉴클린은 차례로 소교세포와 성상교세포를 활성화시키고 염증 반응을 지속시킨다. 따라서 염증과 알파-시뉴클린의 응집은 피드포워드(feed-forward) 주기에서 서로를 촉진하며, 신경 노화는 신경아교염증과 신경 세포를 연결하는 중추적 매개체가 될 수 있음을 시사한다.

결론적으로, TNF-α는 신경세포의 노화를 유도하고 신경세포에서 라이소좀 세포외 배출을 통한 알파-시뉴클린 분비 및 SASP 분비를

증가시켜, 알파-시뉴클린의 세포간 전파를 증가시킨다는 것을 본 연구를 통해 확인하였다.

이러한 발견은 파킨슨병의 발병 진행에서 신경 염증과 단백질 응집 사이의 상호 작용을 설명하는 메커니즘에 대한 중요한 통찰력을 제공한다.

# 3*3*}

알파-시뉴클린 응집체을 치료 타겟으로 하는 파킨슨병 수동면역 치료법
# 실험재료 및 방법

### 실험재료 및 방법

실험재료

표 9. 실험에서 사용된 항체정보

Name of Antibody	Manufacturer	Catalog #	Dilution used
Mouse monoclonal anti-α-synuclein	BD Biosciences	Cat#610787	1:1500 (WB) 1:250
(Syn-1)			(ELISA)
Rabbit polyclonal	Cell Signaling	Cat#2642	1:10
anti-a-synuclein	Tech		(Immuno- EM)
Rabbit monoclonal	Abcam	Cat#ab51253	1:500 (IHC)
anti-phospho-a-			
synuclein (EP1536Y)			
Rabbit monoclonal	Cell Signaling	Cat#74184	1:1500
anti-a-synuclein	Tech		(ELISA)
(biotinylated)			
Rabbit polyclonal	Abcam,	Cat#ab59264	1:500 (IHC)
anti-a-synuclein			
(phosphor 129)			
antibody			
Mouse monoclonal	BioLegend	Cat#SIG-	1 µg ml <sup>-1</sup> (Dot
anti-amyloid beta		39320	blotting)
(6E10)			
Mouse monoclonal	Invitrogen	Cat#	1 µg ml <sup>-1</sup> (Dot
anti-Tau (Tau-5)		AHB0042	blotting)
Mouse monoclonal	Merck Sigma	Cat#MAB377	1:1,000 (IHC)
anti-NeuN antibody			
Rabbit polyclonal	Abcam	Cat#ab7260	1:500 (IHC)
anti-GFAP antibody			
Polyclonal anti-Iba-1	Wako	Cat#019-	1:200 (IHC)
antibody		19741	
Rabbit polyclonal to	Abcam	Cat#ab9722	1:200 (IHC)
IL-1 beta			

Polyclonal anti-	Sigma-Aldrich,	Cat#G7652	1:50
mouse IgG gold			(Immuno-
secondary antibody			EM)
Polyclonal anti-rabbit	Sigma-Aldrich,	Cat#G7277	1:50
IgG gold secondary			(Immuno-
antibody			EM)
Alexa fluor 488-anti-	Jackson	Cat#115-545-	1:200 (IF)
mouse secondary	Immunoresearch	062	
antibody	Laboratories		
HRP-anti-Rabbit	Bio-Rad	Cat#170-6515	1:200 (IHC)
secondary antibody			
HRP-anti-mouse	Bio-Rad	Cat#170-6516	1:3000 (WB)
secondary antibody			

#### 항체생성

항체 생성을 위해 전체길이의 알파-시뉴클린 파이브릴과, C-말단 절단알 파-시뉴클린 파이브릴을 마우스에 면역접종한 후 항체를 생성하는 B세포 를 분리함. B cell 과 myeloma cell을 융합하여 hybridoma를 만든 후 HAT media를 사용하여 hybridoma를 선택함. Hybridoma cell을 10% FBS가 포함된 RPMI 1650 배지 (#11875101, Thermo Fisher)에서 배 양함. Bovine IgG 오염을 방지하기 위해 Hybridoma-SFM 배지 (#12045076, Thermo Fisher)으로 배양배지를 바꿔 줌. 배양 후 상층액 을 모은 후 원심분리 (2500 x g, 5분, 4°C) 해줌. 0.2 μm 필터 한 후 protein A column을 이용하여 항체를 정제함.

#### 세포배양

BV-2 미세아교세포는 37°C in a humidified 5% CO2에서 배양했고, 이

틀 마다 계대 배양함. 배지조건은 10% 소태아혈청과 penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 units/ml )이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 사용. Dual cell BiFC 공동배양 실험 은 이전에 기술한 대로 진행됨 [226]. V1S, SV2 세포는 각 230,000 개의 세포가 공동 배양되어 실험에 사용됨.

#### 재조합 알파-시뉴클린 정제

알파-시뉴클린 단백질은 Escherichia coli BL21 (DE3) (#RH217; RBC Korea, Seoul, Korea)을 이용하여 발현시킴. 배양 배지의 600nm 에서의 흡광도가 (OD600) 0.6 도달한 후 0.1 mM IPTG(β-티오갈락토피라노사 이드)를 3시간동안 37° C에서 처리하여 알파-시뉴클린의 발현을 유도함. 펠렛화 한 세포를 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)에서 resuspend한 후, 소니케이션하고, 20 분동안 100° C에서 끓임. 그리고 10,000 x g에서 10분간 원심분리함. 이온교환 크로마토그래피와 Superdex-200 젤 여과 크로마토그래피를 이용하여 알파-시뉴클린을 정 제함. 그 후 알파-시뉴클린은 동결 건조하여 보관함. 동결 건조한 알파-시 뉴클린을 다시 녹여 사용할 때에는 PBS (PBS; #CAP08-050; GenDEPOT, Katy, TX, USA)로 재구성하고, 단량체 준비는 100,000 MWCO centrifugal device (Pall, NY, USA)를 이용하여 필터함.

#### 알파-시뉴클린 파이브릴화

Thermomixer C (#5382000015, Eppendorf, Hamburg, Germany)을 사용하여 알파-시뉴클린 단량체(200 μm in PBS) 가 37 °C, 1,050 r.p.m의 일정한 shaking조건에서 9일동안 인큐베이션됨.

#### Mutagenesis

QuikChange Site-Directed Mutagenesis 키트(#200522; Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 사용하여, 인간 야생 알파-시뉴클린에 C-말단절 단 알파-시뉴클린(1-119)를 도입함 (α-syn/pDualGC). 사용한 프라이 머는 다음과 같음. Primer pair: 5' -ATT CTG GAA GAT ATG CCT GTG GAT TAA GAC AAT GAG GCT TAT GAA ATG CC-3' (sense), 5' -GGC ATT TCA TAA GCC TCA TTG TCT TAA TCC ACA GGC ATA TCT TCC AGA AT-3(antisense).

#### Dot blot

니트로셀룰로오스 멤브레인에 알파-시뉴클린 단량체 (M)와 다량체파이블 릴 (F) 단백질을 50 ng 부터 1/2 희석하여 고정시킴. 철저하게 말린 후, 0.05% Tween-20 이 포함된 PBS (PBST) 로 린스 후에, 5% 스킴밀크 용액으로 상온에서 30분동안 블라킹함. PBST로 린스 후, 정해진 항체를 24시간동안 붙여줌. 다음날 PBST로 워시 한 후, horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-mouse 항체 (#170-6516; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 1:3,000으로 희석하고 (희석용액: PBST containing 5% skim milk) 1시간동안 상온에서 반응시킴. 워시 후, 멤브 레인을 ECL 용액 (#RPN2232; GE Healthcare)과 반응시킴. 각 이미지 는 GE Healthcare Amersham Imager 600와 Multi Gauge (v.3.0) software (Fujifilm, Akishima, Tokyo, Japan)를 통해 얻음.

#### Sandwich ELISA

96-well 플레이트에 3A9, 9B11, 11F11, 11F4를 캡쳐 항체로써 코팅 완 충액 (50 mM carbonate buffer, pH 9.6)에 4°C 24시간 인큐베이션함. 다음날 플레이트를 PBST로 4회 워시한 후, SuperBlock T20 PBS blocking buffer (#37516; Thermo Fisher)으로 2시간 상온에서 천천히 shaking하며 blocking함. 표준물과 샘플을 준비하는데, 표준물로 사용되는 재조합 알파-시뉴클린은 사용직전 새롭게 준비하고, 원하는 농도로 희석하 여 준비함. 알파-시뉴클린 단량체의 경우 100,000 MWCO centrifugal device (UFC510024; Millipore)로 사용직전 필터함. 샘플과 표준물을 플 레이트의 각 웰에 로딩한 후, 2.5시간 상온에서 shaking하며 인큐베이션함. PBST로 4회 워시 후에, 바이오틴-검출항체(500 ng/ml)를 1% bovine serum albumen (BSA) in PBST에 희석하여 로딩한 후 2시간 인큐베이 션함. 다시 PBST 4회 워시 후, avidin-conjugated peroxidase (#E2886, ExtrAvidin; Sigma-Aldrich)를 1% BSA in PBST에 1:5,000희석하여 로딩 후에 1시간 상온에서 반응시킴. 4회 PBST 워시 후, 100 µl의 substrate 용액 (3, 3',5'-tetramethylbenzidine [TMB],

#T4444; Sigma-Aldrich)을 각 웰에 로딩 한 후, 빛을 차단하고 10분동 안 반응시킴. 10분 후 50 μl of 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 이용하여 반응을 정지시킨 후 에 450 nm spectrophotometer (BioTeK, VT, USA)를 이용하여 흡광도 측정.

#### 알파-시뉴클린 응집체 유입실험

실험 전날, BV-2 미세아교세포를 35-mm 배양접시에 플레이팅함. 알파-시뉴클린 파이브릴 (0.4 µM)을 소니케이션 한 후, 항체(5 µg/ml) mouse IgG 또는 각 알파-시뉴클린 항체와 함께 상온에서 5분 반응시킴. 준비된 세포는 serum-free배지로 워시 후, 미리 반응시킨 파이브릴-항체 복합체 를 처리한 후 10분 동안 37° C에서 세포로의 유입을 유도함.

#### 세포에서 단백질 추출

세포는 추출 용액(1% Triton X-100, 1% [v/v] protease inhibitor cocktail [Sigma-Aldrich; #P8465] in PBS)을 통해 용해됨. 용해된 세 포를 16,000 g에서 10분동안 원심분리시킴. 불가용 Triton X-100 fraction (pellet)은 1X Laemmli sample buffer 로 re-suspend하고 소 니케이션함.

#### Dual-cell BiFC시스템을 이용한 세포간 전파 실험

Poly-L-lysine 코팅된 커버슬립에서 세포를 배양하고 4%

paraformaldehyde (PFA)가 포함된 PBS를 이용하여 세포를 고정시킴. 0.1% Triton X-100를 함유한 PBS로 세포를 투과시킴. Prolong Gold Antifade Reagent (#P36931; Invitrogen)를 이용하여 세포를 마운팅한 후, 핵은 TOPRO-3 iodide (#T3605; Invitrogen)를 사용하여 염색하고 이미지 획득 및 분석을 위해 GE Healthcare InCell 2200 Analyzer를 사 용함. 각 슬라이드에서 20개의 영역이 무작위로 선택되었으며, 각 영역에서 최소 1500개의 세포가 분석됨.

#### Western blotting

Western blotting은 이전에 기술한 것과 같이 진행함[7]. Using an Amersham Imager 600 (GE Healthcare)와 Multi Gauge (v3.0) software를 사용하였고, 이미지 획득과 정량화를 위해 Fujifilm을 사용함.

#### 동물모델 및 수동면역 방법

형질전환 마우스 (mThy1-α-syn Tg, Line61)는 murine Thy1 promoter를 가진 full-length 인간 알파-시뉴클린은 과발현하는 모델을 사용함. 총 36마리의 알파-시뉴클린 형질전화 마우스와 6마리의 일반 마 우스가 사용됨. 사용된 모든 마우스의 나이는 3개월령의 수컷을 사용함. 마 우스는 3개월동안 일주일에 한번 항체 (10 mg/kg)를 복강 내 주사함(n = 5-6 mice per group). 말초지역은 제거한 후 뇌의 반구를 시상적으로 나 움. 면역조직 화학 분석을 위해, 오른쪽 반구는 4% 파라포름 알데하이드에 서 후고정함. 모든 동물은 음식과 음료의 공금하에 12시간동안 명암 주기 를 유지함. 동물 사육, 관리 및 조직 처리는 University of California San Diego (UCSD)에서 담당했으며, UCSD의 동물 대상 위원회는 모든 연구 를 승인하였고 실험동물의 관리 및 사용에 대한 국립 보건원 지침에 따라 수행됨.

#### 면역조직화학분석

Vibratome을 이용해 free-floating방식으로 얻은 뇌 조각(두께: 40 μm) 4% BSA, 0.1% Triton X-100을 포함하는 PBS (PBST) 로 블라킹함. 다 음으로 하룻동안 1차항체와 4° C에서 인큐베이션시킴. 다음날, PBST로 워시후, 2차항체와 반응시키고, avidin-biotin-peroxidase complex (ABC Elite kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, #PK6200)을 이용하여 염색된 정도를 검출함. 3,3-diaminobenzidine (DAB)을 사용하여 염색하였고, 이미지는 ZEISS AX10 microscope (Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 얻음. 광학밀도분석은 ImageJ (NIH) 를 사용하여 면역반응이 일어난 정도를 측정함.

#### 통계처리

GraphPad Prism 7.04을 통해 통계적 유의미를 확인함. 사용한 통계처리 방식은 아래와 같음. Two-tailed unpaired Student's t-test, one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc test

## 결과

#### 응집체 특이 알파-시뉴클린 항체 생성

나는 알파-시뉴클린 응집체에만 특이적으로 결합하는 항체를 만들기 위하여 C57BL/6 마우스에 전체 길이의 알파-시뉴클린과 C-말단 절단된 알파-시뉴클린 피브릴을 주사하였다 (그림 19A). 두 파이브릴 모두 전형적인 아밀로이드 파이브릴의 구조를 가지고 있었다 (그림 19B). 이로부터 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3의 isotype을 가진 13개의 항체를 얻었다 (표 10).

생성된 항체들의 알파-시뉴클린 응집체에 대한 특이성을 확인하기 위하여 dot blot을 진행하였다. 니트로셀룰로오스 멤브레인에 알파-시뉴클린 단량체(M)와 파이브릴(F)을 50 ng 부터 1/2로 희석하여 고정시켰다. 생성된 13개의 항체 중 4개의 항체가 알파-시뉴클린 파이브릴에만 특이적으로 결합한다는 사실을 확인했다 (그림 20A, B).

알파-시뉴클린 응집체에 대한 특이성 외에 안정성, 용해성을 고려하여 3A9, 9B11, 11F11이 다음 실험들을 위해 선택되었고, 11F4는 선택된 응집체 특이 항체와의 비교를 위해 선택되었다 (그림 20A, B). 본 연구에서 11F4는 알파-시뉴클린의 형태에 상관없이, 단량체, multimer, 파이브릴을 포함한 다양한 형태에 결합하는 pan-항체로써 사용되었다.

다음으로 enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)을 통해 선택된 항체들의 응집체 특이성을 한 번 더 확인하였다. 선택된 각 항체들을 캡쳐 항체로써 사용하였고, 바이오틴화된 7B7 항체는 검출 항체로써 사용하였다. 11F4는 단량체(M), 파이브릴(F) 모두를 인식하는

반면에, 3A9, 9B11, 11F11은 파이브릴에만 인식한다는 것을 확인했다 (그림 21A).

다른 퇴행성 신경질환 단백질 (타우, 아밀로이드 베타) 과의 교차 반응성을 dot blot을 통해 확인하였다. 11F4를 포함한 선택된 모든 항체가 알파-시뉴클린에만 특이적으로 결합한다는 것을 확인했다 (그림 22A, B).

종합해보면, 두가지 항원 (전체길이 알파-시뉴클린파이브릴, C-말단이 잘린 알파-시뉴클린 파이브릴)을 사용하여, 총 3가지의 알파-시뉴클린 응집체 특이적 항체 (3A9, 9B11, 11F11)를 생성하였다.

# 응집체 특이적 항체의 세포외 알파-시뉴클린 응집체의 제거 향상과 세포간 전파 차단효과

세포 외 알파-시뉴클린 응접체는 세포 내로 유입되고 라이소좀에 의해 분해될 수 있는데, 이전 연구에 따르면 미세아교세포는 세포 분해에 가장 효과적인 세포 종류이다[2, 184, 264]. 그림 23을 보면, 항체가 작용하는 작용기전은 두가지가 있다. 항체는 세포 외 알파-시뉴클린 응접체의 미세아교세포로의 유입을 증가시키고, 신경세포간 전파를 막는다고 알려져 있다[184].

따라서 선택된 항체들이 위와 같은 메커니즘으로 작용하는지를 조사하기 위하여, 먼저, 0.4 μM의 파이브릴과 control IgG 또는 선택된 항체를 5분동안 상온에서 반응시켰다. 그리고 파이브릴-항체복합체를 BV-2 미세아교세포에 처리한 후 10분동안 37°C에서 반응시켰다. 다른 두 응집체 특이적 항체에 비해 9B11 항체는 유의미하게 알파-시뉴클린의 응집체를 BV-2 세포로의 유입을 증가시켰다 (그림 24A, B). Western blotting 분석은 세포 전체를 용해해서 얻은 결과이기 때문에 세포로의 유입이 아닌 세포표면에 붙어있는 알파-시뉴클린 파이브릴 양까지 측정됐을 가능성이 있다. 이러한 가능성을 제거하기 위해, 세포 표면을 산성용액으로 세척한 후 confocal microscopy로 세포의 이미지를 분석하였다. 그림 24에서의 결과와 마찬가지로 9B11에서 알파-시뉴클린 응집체의 유입이 증가함을 확인하였다 (그림 25A, B).

또, 항체는 신경 세포 사이에서 알파-시뉴클린의 응접체 전파를 막는다고 알려져 있다 [189, 226]. 이전연구에서는 dual-cell bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 시스템을 이용하여 항체의 알파-시뉴클린 응접체 전파 억제를 확인하였다[226]. Dual-cell BiFC 시스템은 V1S, SV2 두가지 세포주로 구성이 되어 알파-시뉴클린의 전파를 형광 puncta를 통해 측정할 수 있는 방법이다. 따라서 이 시스템을 이용하여 항체의 세포간 알파-시뉴클린 전파 억제효과를 확인하고자 하였고, 11F4를 포함한 응접체 특이적 항체 모두 BiFC-positive cell은 감소시키는 효과를 확인하였다 (그림 26A, B).

## 응집체 특이적 항체 수동면역의 알파-시뉴클린 응집, 신경퇴화, 신경아교증, 신경염증에서의 효과

항체들의 수동 면역 효과를 확인하기 위하여, murine Thy-1 promoter

를 가진 full-length 인간 알파-시뉴클린을 과발현하는 형질전환 마우스 (mThy1-α-syn Tg, Line61)를 사용하였다. 이전 연구에서, 이 모델에서 ventral mesencephalon/substantia nigra, striatum, cortex, frontal cortex, hippocampus에서 병리적 특징인 인산화된 알파-시뉴클린 (pS129)의 증가를 확인하였다[265]. 반면에 thalamus, cerebellum, olfactory bulb에서의 pS129의 양은 WT 마우스와 비슷함을 확인하였다 [266]. WT과 Tg에서 pS129의 양은 hippocampus와 cortex에서 가장 두드러진 차이를 보였기 때문에 항체들의 효과를 두 지역에서 확인해보았 다.

먼저 항체들의 알파-시뉴클린의 축적에서의 효과를 확인하기 위하여 알 파-시뉴클린 형질전환 마우스에 응집체 특이적 항체인 3A9, 9B11, 11F11과 pan-항체인 11F4를 복강 내 투여하고, 인산화된 알파-시뉴클 린(pS129, phosphor-α-synuclein)과 전체 알파-시뉴클린(total αsynuclein)을 면역조직화학적 분석을 통해 확인하였다 (그림 27, 28).

항체들의 수동면역을 한 결과, parietal cortex에서 pS129 알파-시뉴클린의 양이 가장 두드러지게 감소했으며 (그림 27A, C), prefrontal cortex에서는 통계적으로 유의미하지는 않지만 감소하는 경향성을 확인하였다 (그림 27A, B). 비슷한 경향이 hippocampus에서도 확인되었으며 CA1 지역에서는 11F11이, CA3지역에서는 3A9과 11F4가 유의미하게 감소시키는것을 확인하였다 (그림 27A, D, E).

전체 알파-시뉴클린의 경우, 알파-시뉴클린의 축적이 prefrontal 105

cortex, parietal cortex, hippocampus의 CA1, CA3에서 모두 감소하는 것을 확인하였다. 특히 9B11, 11F11,11F4가 3A9에 비해 두드러진 효과를 갖는 것을 확인하였다 (그림 28A-E).

Biochemical method인 western blotting과 dot blot을 이용하여 앞선 결과를 한 번 더 검증하였다. 항체들을 처리한 뇌 조직을 이용하여 western blotting을 한 결과, 11F11을 처리한 실험군이 통계적으로 유의미한 감소를 보였고, 나머지 항체들에서도 감소하는 경향을 확인했다 (그림 29A, B).

각 뇌 조직에서의 파이브릴 형태의 알파-시뉴클린 양을 분석하기 위하여 파이브릴 형태에 특이적인 항체인 FILA-4를 이용하여[267] 각 항체를 처리한 마우스의 뇌 조직을 dot blot을 통해 분석하였다. 모든 항체를 처리한 실험군에서 감소함을 확인하였으며, 3A9처리 그룹은 통계적으로 유의미하게 감소시키는것을 확인하였다 (그림 30A, B).

다음으로 항체 수동면역의 신경퇴화, 신경아교증, 신경염증에서의 효과를 확인하고자 하였다. 이전 연구에서 확인된것과 마찬가지로 [266], 본 연구에서 사용한 형질전환 마우스 모델은 hippocampus CA1지역에서 신경세포의 소실을 보였다 (그림 31A,C). NeuN 항체를 이용하여 신경세포의 소실을 확인하였는데, 11F4를 포함한 응집체 특이적 항체들을 수동 면역했을 때 신경세포의 소실이 억제되었다는 것을 알 수 있었다 (그림 31A-C).

다음으로 신경아교증을 ionized calcium binding adaptor molecule 1(Iba1)과 glial fibrillary acidic protein (GFAP)항체를 이용하여 확인하였다 (그림 32, 33). Parietal cortex와 hippocampus에서 성상교세포증이 항체처리 그룹에서 모두 감소함을 확인하였고 (그림 32A-C), 이와 유사하게 prefrontal cortex와 hippocampus에서의 미세아교세포증도 항체 처리그룹들에서 모두 감소함을 확인하였다(그림 31A-C). 이러한 효과는 hippocampus지역보다 prefrontal cortex지역에서 더 두드러진 효과를 보였다 (그림 33A-C).

마지막으로 염증반응을 확인하기 위하여, 대표적인 염증 사이토카인인 IL-1β 분석하였다. IgG 처리그룹과 비교하여 항체처리그룹에서 유의미하게 염증반응이 감소됨을 확인했다 (그림 34A, B)

결론적으로, 본 연구에서는 알파-시뉴클린 응집체 특이적인 항체를 개발하였고, 개발한 항체의 효능을 *in vitro*와 *in vivo* 모두에서 확인하였다.

개발한 응집체 특이적 항체는 pan-항체와 비슷한 효능을 보였으며, 이러한 비교, 분석을 통해 효과적인 면역치료법으로써의 통찰력을 제공한다.

## 그림







WT α-synuclein C-tern (1-140) α-syn

C-terminal truncated α-synuclein (1-119)

그림 19. 알파-시뉴클린 항체 개발을 위해 사용된 두가지 종류의 알파-시 뉴클린 (A) 항체 생성을 위해 사용된 두가지 항원. WT α-synuclein: 전 체길이의 알파-시뉴클린(아미노산 1-140), C-terminal truncated αsynuclein: C-말단이 절단된 알파-시뉴클린(아미노산 1-119) (B) 그림 (A)로부터 만들어진 파이브릴의 미세구조.

Α				В		
					Clone name	Preference
M	1				1E4	M< <f< td=""></f<>
۲Į	154	148	253		1H8	M< <f< td=""></f<>
[	124		213		2E3	M<< <f< td=""></f<>
M					3A9	M<< <f< td=""></f<>
F	349	3D3	463		3D3	M< <f< td=""></f<>
м	1		111		4G3	M< <f< td=""></f<>
F		111			5A7	M< <f< td=""></f<>
	5A7	6F7	7B7		6F7	M< <f< td=""></f<>
м	-	· • •			7B7	M=F
F	111	114	111		9B11	M<< <f< td=""></f<>
[	9B11	10F10	11F4		10F10	M <f< td=""></f<>
					11F4	M <f< td=""></f<>
٢	11F11				11F11	M<< <f< td=""></f<>

그림 20. 알파-시뉴클린 응집체에 대한 항체의 특이성 (dot blot) (A) 알 파-시뉴클린 monomer (M) 또는 fibril (F)에 대한 항체의 특이성. (B) 그림 (A) 에서의 알파-시뉴클린 파이브릴(F)에 대한 특이성. M 대비 F에 대한 결합은 '<'의 개수로 표현함. M<<<F은 파이브릴 특이적 항체로 다 음 실험들을 위해 선택됨.

Name of clone	Antigen	Isotype	
	for immunization		
1E4	Full-length a-syn aggregates	IgG1	
1H8	C-terminal truncated a-syn	IgG1	
	aggregates		
2E3	C-terminal truncated a-syn	IgG2a	
	aggregates		
3A9	C-terminal truncated a-syn	IgG2b	
	aggregates		
3D3	C-terminal truncated a-syn	IgG2a	
	aggregates		
4G3	C-terminal truncated a-syn	IgG1	
	aggregates		
5A7	Full-length a-syn aggregates	IgG1	
6F7	C-terminal truncated a-syn	IgG1	
	aggregates		
7B7	C-terminal truncated a-syn	IgG2b	
	aggregates		
9B11	Full-length a-syn aggregates	IgG3	
10F10	C-terminal truncated a-syn	IgG2a	
	aggregates		
11F4	Full-length a-syn aggregates	IgG2a	
11F11	C-terminal truncated a-syn	IgG2b	
	aggregates		



그림 21. 알파-시뉴클린 응집체에 대한 항체의 특이성 (ELISA) (A) 알파 -시뉴클린 monomer (M) 또는 fibril (F)에 대한 항체의 특이성을 sandwich ELISA를 통해 측정함.



그림 22. 다른 퇴행성 신경 질환 관련 단백질과의 교차 반응성. (A) 각단백 질에 대한 positive controls 항체를 통해 실험의 신빙성을 높임. Syn-1: 알파-시뉴클린, Tau5: 타우, 6E10: 아밀로이드-베타42. (B) 각 단백질 의 monomer와 fibril을 니트로셀룰로오스 멤브레인에. 50 ng 부터 1/2 희 석하여 고정시킴.



**그림 23. 항체의 작용기전** 항체는 알파-시뉴클린 응집체의미세아교세포로 의 유입을 증가시키고, 신경세포간 알파-시뉴클린 응집체의전파를 억제.



그림 24. 항체 존재 시 BV-2 미세아교세포로의 알파-시뉴클린 유입증가 (A) 미세아교세포로 유입된 알파-시뉴클린의 western blot 대표이미지. (B) 유입된 알파-시뉴클린의 양은 β-actin으로 표준화하여 정량함.





그림 25. 산성 용액으로 세척 후, 항체 존재 시 BV-2 미세아교세포로의 알 파-시큐클린 유입 증가확인 (A) 산성용액으로 세척 후 BV-2세포로 유입 된 알파-시뉴클린 파이브릴의 면역형광 대표이미지. DAPI: 핵. 점선으로 표시된 박스이미지는 확대하여 close-up 패널로 표시함. 눈금막대: 20 µm. (B) 그림 (A)에서 유입된 알파-시뉴클린 파이브릴로부터의 형광 puncta를 정량화함. Puncta는 화살표로 표시함.





그림 26. 항체의 알파-시뉴클린응집체의 세포간 전파 억제 (A) 화살표는 BiFC (+) puncta를 나타냄. 위 패널의 박스부분은 아래 패널에 Close-up 으로 확대된 이미지를 나타냄. (B) 그림 (A) 에서의 BiFC-positive 세포 를 정량화하여 표시함.





그림 27. mThy-10-알파-시뉴클린 형질전환 마우스에서 수동 면역화는 알파-시뉴클린 응집을 감소 (phosphorylated-알파-시뉴클린) 3개월동 안, 응집체 특이적 항체와, pan-항체를 10 mg/kg, i.p. 매주 수동면역함. (A) Prefrontal cortex (Pfcx), parietal cortex (Pacx), hippocampus (HP; CA1, CA3) 영역을 phosphorylated-α-synuclein (pS129)으로 염색한 대표이미지. (B-E) 각 영역에서의 광학 밀도값이 정량화됨. prefrontal cortex (B), parietal cortex (C), hippocampal regions (D, E). 눈금자: 200 μm. (A-E) 김태경박사님에 의해 수행됨.





그림 28. mThy-10-알파-시뉴클린 형질전환 마우스에서 수동 면역화는 알파-시뉴클린 응집을 감소 (전체-알파-시뉴클린) 3개월동안, 응집체 특 이적 항체와, pan-항체를 10 mg/kg, i.p. 매주 수동면역함. (A) Prefrontal cortex (Pfcx), parietal cortex (Pacx), hippocampus (HP; CA1, CA3) 영역을 total-α-synuclein으로 염색한 대표이미지. (B-E) 각 영역에서의 광학 밀도값이 정량화됨. prefrontal cortex (B), parietal cortex (C), hippocampal regions (D, E). 눈금자: 200 μm. (A-E) 김태 경박사님에 의해 수행됨.



그림 29. 뇌 조직의 Western blotting (A) 각 항체를 수동면역한 뇌조직의 western blotting 대표 이미지. (B) 그림 (A)에서의 알파-시뉴클린의 양 을 β-actin으로 표준화하여 정량함.



그림 30. 뇌 조직의 Dot blotting (A) 표시된 각 항체로 면역대표이미지. FILA-4: 알파-시뉴클린 파이블릴 형태만 인식하는 항체 (B) 각 dot의 광 학 밀도값이 정량화됨.





그림 31. mThy-10-알파-시뉴클린 형질전환 마우스에서 수동 면역화는 알파-시뉴클린 신경 퇴화 감소 (A) Prefrontal cortex (Pfcx) 와 hippocampal area (HP) 에서의 mature neuron 염색 대표이미지. (B, C) 그림 (A)의 각 지역에서의 NeuN-면역양성 광학밀도 측정 (A-C) 김태경 박사님에 의해 수행됨.





그림 32. mThy-10-알파-시뉴클린 형질전환 마우스에서 수동 면역화는 성상교세포증을 감소 (A) Parietal cortex (Pacx) 와 hippocampal regions (HP) 에서의 성상교세포증 염색 대표이미지. (B, C) 그림 (A)의 각 지역에서의 GFAP-면역양성 광학밀도 측정. (A-C) 김태경박사님에 의해 수행됨.





그림 33. mThy-10-알파-시뉴클린 형질전환 마우스에서 수동 면역화는 알파-시뉴클린 미세아교세포증을 감소 (A) Prefrontal cortex (Pfcx) 와 hippocampus (HP) 에서의 미세아교세포증 염색 대표이미지. (B, C) 그림 (A)의 각 지역에서의 Iba-1-면역양성 광학 밀도 측정. (A-C) 김태경박 사님에 의해 수행됨.





그림 34. mThy-10-알파-시뉴클린 형질전환 마우스에서 수동 면역화는 알파-시뉴클린 염증을 감소 (A) Hippocampus (HP) 에서의 IL-1β 대표이미지. (B) 그림(A)에서의 IL-1β-면역양성 광학 밀도 측정. (A-B) 김태경박사님에 의해 수행됨.

## 고찰
본 연구에서는 C57BL/6 마우스에 전체길이 알파-시뉴클린 또는 C-말단 절단된 알파-시뉴클린 파이브릴을 면역 접종하여 응집체특이적 항체를 만들었다. 면역접종을 통하여 얻은 13종의 항체 중 4개의 항체 (2E3, 3A9, 9B11, 11F11)는 알파-시뉴클린 응집체에 특이적으로 결합하였다. 이 중 3가지 항체 (3A9, 9B11, 11F11)가 다음 실험을 위해 선택되었고, 이들은 다른 퇴행성뇌질환 관련 단백질 (아밀로이드 베타42, 타우)과 교차 반응성이 없음을 확인하였다. 또한 이 항체들은 신경 세포간 알파-시뉴클린 응집체의 전파를 효과적으로 감소시켰으며 9B11은 BV-2 미세아교세포에서 세포 외 알파-시뉴클린 응집체의 세포 내 유입을 증가시켰고, 이는 알파-시뉴클린 응집체의 분해가 증가했음을 의미한다.

이뿐만 아니라 *in vivo* 실험에서 수동면역을 통해 알파-시뉴클린의 축적이 감소하였으며 신경세포의 사멸을 막을 수 있었고, 성상아교증 및 미세아교증, 신경염증이 감소된 것을 확인하였다.

알파-시뉴클린 면역치료작용을 설명하는 항체의 기전은 두가지가 있다. 첫번째 기전은, 항체가 신경세포로부터 분비된 세포 외 알파-시뉴클린과 겹합하여 신경세포간 알파-시뉴클린의 전파를 막는다는 것이다 [189, 226, 268]. 두번째는, 항체는 미세아교세포로의 알파-시뉴클린의 세포 내 유입과 분해를 증가시켜 세포 외 알파-시뉴클린의 분해를 촉진한다는 것이다 [184]. Fcγ수용체는 알파-시뉴클린파이브릴-항체 복합체를 인식하여 Fcγ 가 매개하는 세포 내로의 유입을 증가시키고 이것은 기존의 전형적인 알파-시뉴클린 유입 경로보다 라이소좀으로의 빠른 이동을 유도한다고 알려져 있다 [184]. 전체 분해율은 세포 내로의 유입율과 세포 내에서의 분해율을 모두 고려하여 결정이 된다. 따라서 항체는 유입율 뿐만 아니라 세포 내에서의 분해율도 증가시켜 전체적인 분해율을 증가시킬 수 있다는 것을 의미한다.

이러한 메커니즘은 Gustafsson et al. [269]의 연구에서도 확인되었다. oligomer/protofibril 알파-시뉴클린 형태에 특이적인 mAb47 항체가 Fc 수용체를 통하여 세포 외 알파-시뉴클린의 유입을 증가시킨다는 것을 확인되었다. 본 연구에서 개발한 항체 중 하나인 9B11 또한 세포 외 알파-시뉴클린응집체의 미세아교세포로의 유입을 증가시킨다는 것을 확인했다.

항체의 세포간 전파 억제기전에 있어서도 본연구에서 개발한 응집체 특이적 항체들 모두 효과적으로 신경세포간 전파를 억제한다는 것을 확인하였다.

그러나 본연구의 결과는 두가지 작용기전에 있어, 항체들의 효능이 일치하지 않았다. 항체의 생물학적 기능은 항원과의 결합력뿐만 아니라 세포 타입에 따른 상호작용에 의해서도 결정이 된다. Fc 수용체는 신경세포와 미세아교세포에서 다르게 발현되고 [270], 따라서 이는 세포 타입에 따른 항체의 효능을 다르게 결정 할 수 있다.

미세아교세포를 이용한 세포 유입율에 대해서는 9B11의 효능이 가장 좋았다. 다른 응집체 특이적 항체들이 IgG2b인것에 반해 9B11은 IgG3 isotype을 가지고 있다. 아마도 isotype에 따른 항체와 미세아교세포

사이의 다른 상호작용이 효능의 차이를 만들었을 것이다.

미세아교세포와는 달리 신경세포간 알파-시뉴클린응집체의 전파 효과는 모든 항체에서 비슷했다. 항체들의 알파-시뉴클린 파이브릴에 대한 결합력이 비슷한데, 따라서 이러한 결과는 신경세포간 전파에 있어서 효율을 결정하는 것은 항체-항원과의 결합력이고, 미세아교세포에서의 분해는 항원-항체의 결합력뿐만 아니라 항체의 subtype에 의해서도 결정된다라는 것을 의미한다.

본 연구에서 응집체 특이적 항체를 만들기 위해, 전체길이 알파-시뉴클린 파이브릴과, C-말단 절단 알파-시뉴클린 파이브릴을 사용했다.

실제로 생성된 13종의 항체 중에 응집체 특이적 항체는 4종이었으며 이 중에 3종이 C-말단 절단 알파-시뉴클린 파이브릴에 의해 만들어진 것을 확인하였다. 이것은 C-말단 절단 알파-시뉴클린 파이브릴을 사용하는 것이 응집체 특이적 항체를 만드는데 더 효율적인 방법임을 의미한다.

Solid-state NMR, EM, atomic force microscopy 분석을 통하여 알파-시뉴클린 파이브릴의 코어 부분은 (residue 38-95) β-sheet rich 하고 파이브릴의 중간에 위치한다는 것을 확인하였다 [271, 272]. 코어 바깥의 C-말단 (residues 96-140) 부분은 알파-시뉴클린 파이브릴의 highly structured한 구조와는 다르게 flexible 하고 unfolded한 구조를 가진 것을 확인하였다. 이러한 C-말단의 구조는 알파-시뉴클린 단량체와의 구분이 쉽지 않고 따라서 C-말단부위를 절단한 알파-시뉴클린 파이브릴이 응집체-특이적 항체를 만드는 데에 더 효과적인

방법이 될 것이라고 생각했다.

이전에 많은 연구결과들이 알파-시뉴클린 수동면역의 효과를 확인했다[183-185, 189, 273]. 최근에는 파이브릴이나 프로토-파이브릴과 같은 구조 특이적인 항체가 병리적 특징을 더 효과적으로 완화한다는 보고가 되어짐에 따라 구조 특이적 항체의 효능에 대한 관심이 높아지고 있다 [6, 268, 274].

본 연구는 응집체-특이적 항체의 효능을 pan-항체의 효능과 비교/분석한 첫번째 연구이다.

*in vitro* 실험결과에서 신경세포간 알파-시뉴클린의 전파억제 효과가 비슷한 것을 확인했을 뿐 아니라 *in vivo* 마우스 모델에서 알파-시뉴클린의 응집, 미세아교세포증, 성상아교세포증, 염증반응, 신경세포의 소실 등 신경병리적 특징에 대해 두 항체의 효능이 비슷함을 확인하였다.

이것은 효과적인 수동 면역을 위해 항체가 알파-시뉴클린의 단량체를 인식하는 것보다 알파-시뉴클린 응집체 인식이 중요하다는 것을 의미한다. 응집체-특이적항체의 사용은 정상기능을 하는 알파-시뉴클린을 인식하지 않기 때문에 알파-시뉴클린의 정상 기능을 방해하지 않으면서 수동면역의 효과를 획득할 수 있는 장점이 있다.

따라서 본 연구는 응집체-특이적 항체를 사용하는 면역치료가 파킨슨병과 같은 알파-시뉴클린 관련 질병에 있어서 알파-시뉴클린 단백질의 정상기능을 방해해서 생길 수 있는 부작용을 초래하지 않기 때문에 면역치료법으로써 더 좋은 접근이 될 수 있음을 시사한다.

## **4장** 전체적인 고찰과 결론

본 연구에서는 파킨슨병에서 가장 두드러진 병리적 특징인 알파-시뉴클린 응집체의 전파 기전을 밝히고 이를 타겟으로 하는 면역 치료법을 제시하였다.

먼저, 단백질 응집 및 전파에 중요한 조절인자인 염증반응이 알파-시뉴클린 응집체의 전파에서의 역할을 확인하기 위하여 2장에서는 알파-시뉴클린 응집체 전파를 조절하는 염증인자를 찾았다. 활성화된 미세아교세포로부터 분비되는 TNF-α가 신경노화를 유도하고 노화신경세포의 SASP는 라이소좀 세포 외 배출 경로를 통해 알파-시뉴클린의 분비와 전파를 증가시킨다는 것을 확인했다. 또한 이렇게 분비된 알파-시뉴클린은 인접한 세포로의 전파뿐만 아니라, 신경교세포를 활성화시켜 염증반응을 매개한다는 메커니즘을 밝혔다. 3장에서는 알파-시뉴클린 응집체를 치료 타겟으로 제시하며, 응집체 특이적 항체를 개발하였고, 개발한 항체는 인접한 신경세포로의 알파-시뉴클린응집체 전파를 억제하며 면역치료법의 효능을 확인하였다(그림 35).

최근에 많은 연구들이 세포 노화가 신경퇴행성 뇌질환의 발병에 중요한 역할을 할 수 있다는 가능성을 제시한다. 또한 염증반응과 신경퇴행성질환의 상호작용에 대한 연구가 활발히 되어지고 있다.

최근 연구는 파킨슨병에서 가장 잘 알려진 위험유전자인 Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) 돌연변이 GS2019S 마우스에서 장내염증이

더 잘 유도되며, TLR2 발현 증가, TNF-α분비증가, 알파-시뉴클린 증가, 미세아교세포의 활성증가, 도파민성 신경세포의 소실 및 행동장애 등이 확인되었다. 마우스에 TNF-α항체를 투여했을 때에 이러한 증상들이 완화됨을 확인하였다[275]. 이러한 결과는 TNF-α가 장내염증을 조절하고 뇌에서의 병리현상에 중요한 역할을 하는 것을 의미한다.

이처럼 염증반응과 신경세포의 사멸의 메커니즘에 있어서 염증인자 TNF-α의 중요성은 본 연구에서 마찬가지로 확인이 되었다.

또 퇴행성신경질환에서 노화된 세포의 축적이 확인되고, 많은 노화증거들이 알츠하이머, 파킨슨병에서 확인되어지고 있다[35]. 따라서 알츠하이머와 파킨슨병에서 세포노화는 공통된 발병기전으로써 연구할 필요가 있다.

세포 노화가 신경퇴행성 질환에서 중요한 역할을 함에 따라 노화를 줄이는 것이 질병을 막는 방법이 될 수 있다. 최근에는 노화된 세포나 조직을 특이적으로 타겟하는 senotherapy가 제안되어지고 있다[276-278].

노화된 세포를 분해하였더니 마우스에서 수명이 연장되었고[279], 노화된 미세아교세포와 성상세포를 제거했더니 타우의 인산화 및 응집이 감소했으며 SASP 유전자의 발현이 감소하고, 기억 및 행동장애의 완화가 확인되었다[280]. 하지만 이러한 치료법 접근에 대한 연구는 거의 알츠하이머에서만 되어지고 있다. 따라서 파킨슨병은 공통된 병리적 특징을 가지고 있기 때문에 노화된 세포를 타겟으로 하는 치료법이

파킨슨병에서 새로운 치료 접근이 될 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서 밝힌 염증-노화-단백질 전파에 대한 작용기전은 다른 퇴행성 뇌질환에서의 작용기전 연구에 통찰력을 제공할 수 있을 것이다.

본 연구는 염증인자 중 하나가 관여하는 세포노화의 신경퇴행성 발병에 대한 메커니즘을 밝혔다는 데에서 의의가 있고, 항체개발에 있어서 응집체특이적 항체의 효능을 pan-항체와 비교/분석한 첫번째 연구이다.

Pan-항체와 비슷한 효능을 가진 응집체 특이적 항체의 사용은 정상 기능을 하는 알파-시뉴클린의 기능을 방해하지 않기 때문에 면역치료법에 있어 더 좋은 접근이 될 수 있음을 의미한다.



그림 35. 염중반응의 알파-시뉴클린 응집체 세포간 전이 중가 메커니즘과 면역 치료 타켓으로서의 알파-시뉴클린 응집체 활성화된 미세아교세포에 서 분비된 염증인자 TNF-α는 SASP를 유도하고 라이소좀의 세포 외 분비 를 통하여 알파-시뉴클린의 전파를 조절한다 (2장). 또, 신경세포로부터 분비된 알파-시뉴클린 응집체는 면역치료법의 타겟이 될 수 있다 (3장).

## 참고문헌

- Brundin, P. and R. Melki, *Prying into the Prion Hypothesis for Parkinson's Disease*. J Neurosci, 2017. 37(41): p. 9808-9818.
- Lee, H.-J., et al., Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular a-synuclein. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2008. 40(9): p. 1835-1849.
- Danzer, K.M., et al., Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. J Neurochem, 2009. 111(1): p. 192-203.
- Holmes, B.B., et al., Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(33): p. E3138-47.
- Hansen, C., et al., alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. J Clin Invest, 2011. 121(2): p. 715-25.
- Lindstrom, V., et al., Immunotherapy targeting alpha-synuclein protofibrils reduced pathology in (Thy-1)-h[A30P] alpha-synuclein mice. Neurobiol Dis, 2014. 69: p. 134-43.
- Lee, H.J., et al., *Clearance and deposition of extracellular alpha-synuclein aggregates in microglia*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. 372(3): p. 423-8.
- 8. Abounit, S., et al., *Tunneling nanotubes spread fibrillar alpha-synuclein by intercellular trafficking of lysosomes.* EMBO J, 2016. 35(19): p. 2120-2138.
- 9. Sacino, A.N., et al., Intramuscular injection of alpha-synuclein induces CNS alpha-synuclein pathology and a rapid-onset motor phenotype in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(29): p. 10732-7.
- 10. Nussbaum, R.L. and C.E. Ellis, *Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. N Engl J Med, 2003. 348(14): p. 1356-64.
- 11. Taylor, J.P., J. Hardy, and K.H. Fischbeck, *Toxic proteins in neurodegenerative disease*. Science, 2002. 296(5575): p. 1991-5.

- 12. Bates, G., *Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease*. Lancet, 2003. 361(9369): p. 1642-4.
- Udan, M.L., et al., Toll-like receptors 2 and 4 mediate Abeta(1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. J Neurochem, 2008. 104(2): p. 524-33.
- Gao, H.M., et al., Neuroinflammation and alpha-synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. Environ Health Perspect, 2011. 119(6): p. 807-14.
- 15. Colonna, M. and Y. Wang, *TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis.* Nat Rev Neurosci, 2016. 17(4): p. 201-7.
- 16. Bradshaw, E.M., et al., *CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology.* Nat Neurosci, 2013. 16(7): p. 848-50.
- Bjorkqvist, M., et al., A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. J Exp Med, 2008. 205(8): p. 1869-77.
- Niemela, V., et al., Cerebrospinal fluid sCD27 levels indicate active T cellmediated inflammation in premanifest Huntington's disease. PLoS One, 2018. 13(2): p. e0193492.
- Kouli, A., et al., *Neuroinflammation and protein pathology in Parkinson's disease dementia*. Acta Neuropathol Commun, 2020. 8(1): p. 211.
- 20. Wang, Q., Y. Liu, and J. Zhou, *Neuroinflammation in Parkinson's disease* and its potential as therapeutic target. Transl Neurodegener, 2015. 4: p. 19.
- 21. von Herrmann, K.M., et al., *NLRP3 expression in mesencephalic neurons* and characterization of a rare *NLRP3* polymorphism associated with decreased risk of Parkinson's disease. NPJ Parkinsons Dis, 2018. 4: p. 24.
- Baker, D.J. and R.C. Petersen, *Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives.* J Clin Invest, 2018. 128(4): p. 1208-1216.
- Si, Z., L. Sun, and X. Wang, Evidence and perspectives of cell senescence in neurodegenerative diseases. Biomed Pharmacother, 2021. 137: p. 111327.

- 24. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. 8(9): p. 729-40.
- 25. Khosla, S., et al., *The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease*. Nat Rev Endocrinol, 2020. 16(5): p. 263-275.
- Hernandez-Segura, A., J. Nehme, and M. Demaria, *Hallmarks of Cellular Senescence*. Trends Cell Biol, 2018. 28(6): p. 436-453.
- 27. Howcroft, T.K., et al., *The role of inflammation in age-related disease*. Aging (Albany NY), 2013. 5(1): p. 84-93.
- Martinez-Cue, C. and N. Rueda, *Cellular Senescence in Neurodegenerative Diseases*. Front Cell Neurosci, 2020. 14: p. 16.
- van Dijk, K.D., et al., Changes in endolysosomal enzyme activities in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. Mov Disord, 2013. 28(6): p. 747-54.
- 30. Chinta, S.J., et al., Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. Cell Rep, 2018. 22(4): p. 930-940.
- Streit, W.J., et al., Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol, 2009. 118(4): p. 475-85.
- 32. Streit, W.J., et al., *Dystrophic microglia in the aging human brain*. Glia, 2004. 45(2): p. 208-12.
- 33. Baker, D.J., et al., *Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders*. Nature, 2011. 479(7372): p. 232-6.
- 34. Bhat, R., et al., *Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease*. PLoS One, 2012. 7(9): p. e45069.
- 35. He, N., et al., Amyloid-beta(1-42) oligomer accelerates senescence in adult hippocampal neural stem/progenitor cells via formylpeptide receptor 2. Cell Death Dis, 2013. 4: p. e924.
- Jankovic, J., *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008. 79(4): p. 368-76.
- 37. Braak, H., et al., Staging of brain pathology related to sporadic

Parkinson's disease. Neurobiol Aging, 2003. 24(2): p. 197-211.

- Reichmann, H., C. Schneider, and M. Lohle, Non-motor features of Parkinson's disease: depression and dementia. Parkinsonism Relat Disord, 2009. 15 Suppl 3: p. S87-92.
- Poewe, W., Non-motor symptoms in Parkinson's disease. Eur J Neurol, 2008. 15 Suppl 1: p. 14-20.
- 40. Schulz-Schaeffer, W.J., *The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia.* Acta Neuropathol, 2010. 120(2): p. 131-43.
- 41. La Vitola, P., et al., *Peripheral inflammation exacerbates alpha-synuclein toxicity and neuropathology in Parkinson's models*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2021. 47(1): p. 43-60.
- 42. Mehra, S., S. Sahay, and S.K. Maji, *alpha-Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis.* Biochim Biophys Acta Proteins Proteom, 2019. 1867(10): p. 890-908.
- 43. Spillantini, M.G., et al., *Alpha-synuclein in Lewy bodies*. Nature, 1997. 388(6645): p. 839-40.
- 44. Spillantini, M.G., et al., *Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies.* Neurosci Lett, 1998. 251(3): p. 205-8.
- 45. Goedert, M., et al., *100 years of Lewy pathology*. Nat Rev Neurol, 2013. 9(1): p. 13-24.
- Spillantini, M.G., et al., alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(11): p. 6469-73.
- 47. Wu, D.C., et al., Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. J Neurosci, 2002. 22(5): p. 1763-71.
- 48. Olanow, C.W., et al., *Temporal evolution of microglia and alpha-synuclein accumulation following foetal grafting in Parkinson's disease*. Brain, 2019. 142(6): p. 1690-1700.
- 49. Braak, H., et al., Stages in the development of Parkinson's disease-related

pathology. Cell Tissue Res, 2004. 318(1): p. 121-34.

- 50. Poewe, W., et al., *Parkinson disease*. Nat Rev Dis Primers, 2017. 3: p. 17013.
- 51. Bartels, T., J.G. Choi, and D.J. Selkoe, *alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation.* Nature, 2011. 477(7362): p. 107-10.
- 52. Baba, M., et al., Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Am J Pathol, 1998. 152(4): p. 879-84.
- 53. Fujiwara, H., et al., *alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions*. Nat Cell Biol, 2002. 4(2): p. 160-4.
- Barrett, P.J. and J. Timothy Greenamyre, *Post-translational modification of alpha-synuclein in Parkinson's disease*. Brain Res, 2015. 1628(Pt B): p. 247-253.
- 55. Schapira, A.H., et al., *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease*. J Neurochem, 1990. 54(3): p. 823-7.
- 56. Tanner, C.M., et al., *Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease*. Environ Health Perspect, 2011. 119(6): p. 866-72.
- Di Maio, R., et al., alpha-Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. Sci Transl Med, 2016. 8(342): p. 342ra78.
- Trist, B.G., D.J. Hare, and K.L. Double, Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. Aging Cell, 2019. 18(6): p. e13031.
- 59. Ferrer, I., et al., *Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical Parkinson disease.* J Neural Transm (Vienna), 2011. 118(5): p. 821-39.
- 60. Schapira, A.H., et al., *Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives.* Lancet, 2014. 384(9942): p. 545-55.
- 61. Block, M.L., L. Zecca, and J.S. Hong, *Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms*. Nat Rev Neurosci, 2007. 8(1): p.

57-69.

- 62. Loeffler, D.A., D.M. Camp, and S.B. Conant, *Complement activation in the Parkinson's disease substantia nigra: an immunocytochemical study.* J Neuroinflammation, 2006. 3: p. 29.
- 63. Dursun, E., et al., *The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease.* J Neuroimmunol, 2015. 283: p. 50-7.
- 64. Brodacki, B., et al., *Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism.* Neurosci Lett, 2008. 441(2): p. 158-62.
- 65. McGeer, P.L., et al., *Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains*. Neurology, 1988. 38(8): p. 1285-91.
- 66. He, Y., S. Appel, and W. Le, *Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum.* Brain Res, 2001. 909(1-2): p. 187-93.
- 67. Su, X., et al., Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. Neurobiol Aging, 2008. 29(11): p. 1690-701.
- 68. Verma, D.K., et al., *Alpha-Synuclein Preformed Fibrils Induce Cellular* Senescence in Parkinson's Disease Models. Cells, 2021. 10(7).
- Cherian, A. and K.P. Divya, *Genetics of Parkinson's disease*. Acta Neurol Belg, 2020. 120(6): p. 1297-1305.
- 70. Hardy, J., et al., *Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism*. Ann Neurol, 2006. 60(4): p. 389-98.
- 71. Simon-Sanchez, J., et al., *Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease*. Nat Genet, 2009. 41(12): p. 1308-12.
- 72. Maraganore, D.M., et al., *Collaborative analysis of alpha-synuclein gene* promoter variability and Parkinson disease. JAMA, 2006. 296(6): p. 661-70.
- 73. Kruger, R., et al., *Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease*. Nat Genet, 1998. 18(2): p. 106-8.

- Kiely, A.P., et al., alpha-Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? Acta Neuropathol, 2013. 125(5): p. 753-69.
- 75. Appel-Cresswell, S., et al., *Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease.* Mov Disord, 2013. 28(6): p. 811-3.
- 76. Polymeropoulos, M.H., et al., Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science, 1997. 276(5321): p. 2045-7.
- 77. Zarranz, J.J., et al., *The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia.* Ann Neurol, 2004. 55(2): p. 164-73.
- 78. Lesage, S., et al., *G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome*. Ann Neurol, 2013. 73(4): p. 459-71.
- 79. Kiely, A.P., et al., *Distinct clinical and neuropathological features of G51D SNCA mutation cases compared with SNCA duplication and H50Q mutation.* Mol Neurodegener, 2015. 10: p. 41.
- 80. Schiesling, C., et al., *Review: Familial Parkinson's disease--genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease.* Neuropathol Appl Neurobiol, 2008. 34(3): p. 255-71.
- 81. Conway, K.A., J.D. Harper, and P.T. Lansbury, *Accelerated in vitro fibril* formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. Nat Med, 1998. 4(11): p. 1318-20.
- Zhao, K., et al., Parkinson's disease associated mutation E46K of alphasynuclein triggers the formation of a distinct fibril structure. Nat Commun, 2020. 11(1): p. 2643.
- Miller, D.W., et al., *Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication*. Neurology, 2004. 62(10): p. 1835-8.
- 84. Ikeuchi, T., et al., *Patients homozygous and heterozygous for SNCA duplication in a family with parkinsonism and dementia.* Arch Neurol, 2008. 65(4): p. 514-9.
- 85. Olgiati, S., et al., Early-onset parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication: Clinical and genetic findings in a novel family.

Parkinsonism Relat Disord, 2015. 21(8): p. 981-6.

- Healy, D.G., et al., *Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study.* Lancet Neurol, 2008. 7(7): p. 583-90.
- 87. Paisan-Ruiz, C., et al., *Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease*. Neuron, 2004. 44(4): p. 595-600.
- 88. Zimprich, A., et al., *The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval.* Am J Hum Genet, 2004. 74(1): p. 11-9.
- 89. Smith, W.W., et al., *Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity*. Nat Neurosci, 2006. 9(10): p. 1231-3.
- 90. West, A.B., et al., *Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity.* Hum Mol Genet, 2007. 16(2): p. 223-32.
- 91. Yao, C., et al., LRRK2-mediated neurodegeneration and dysfunction of dopaminergic neurons in a Caenorhabditis elegans model of Parkinson's disease. Neurobiol Dis, 2010. 40(1): p. 73-81.
- 92. Melrose, H.L., et al., A comparative analysis of leucine-rich repeat kinase
  2 (Lrrk2) expression in mouse brain and Lewy body disease. Neuroscience,
  2007. 147(4): p. 1047-58.
- 93. Biskup, S., et al., *Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain.* Ann Neurol, 2006. 60(5): p. 557-69.
- 94. Zhu, X., et al., *LRRK2 in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies*. Mol Neurodegener, 2006. 1: p. 17.
- 95. Zimprich, A., et al., *A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease.* Am J Hum Genet, 2011. 89(1): p. 168-75.
- 96. Kumar, K.R., et al., *Frequency of the D620N mutation in VPS35 in Parkinson disease*. Arch Neurol, 2012. 69(10): p. 1360-4.
- 97. Miura, E., et al., VPS35 dysfunction impairs lysosomal degradation of alpha-synuclein and exacerbates neurotoxicity in a Drosophila model of Parkinson's disease. Neurobiol Dis, 2014. 71: p. 1-13.

- 98. Zavodszky, E., et al., *Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy*. Nat Commun, 2014. 5: p. 3828.
- 99. Clark, I.E., et al., *Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin.* Nature, 2006. 441(7097): p. 1162-6.
- 100. Kitada, T., et al., *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. Nature, 1998. 392(6676): p. 605-8.
- Schulte, C. and T. Gasser, Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression. Appl Clin Genet, 2011. 4: p. 67-80.
- 102. Valente, E.M., et al., *PINK1 mutations are associated with sporadic earlyonset parkinsonism.* Ann Neurol, 2004. 56(3): p. 336-41.
- 103. Valente, E.M., et al., *Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1*. Science, 2004. 304(5674): p. 1158-60.
- Youle, R.J. and D.P. Narendra, *Mechanisms of mitophagy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. 12(1): p. 9-14.
- 105. Bonifati, V., et al., *Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism.* Science, 2003. 299(5604): p. 256-9.
- 106. Bonifati, V., B.A. Oostra, and P. Heutink, *Linking DJ-1 to neurodegeneration offers novel insights for understanding the pathogenesis of Parkinson's disease*. J Mol Med (Berl), 2004. 82(3): p. 163-74.
- 107. Shendelman, S., et al., *DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation*. PLoS Biol, 2004. 2(11): p. e362.
- 108. International Parkinson Disease Genomics, C., et al., Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. Lancet, 2011. 377(9766): p. 641-9.
- 109. Pankratz, N., et al., *Meta-analysis of Parkinson's disease: identification of a novel locus, RIT2*. Ann Neurol, 2012. 71(3): p. 370-84.
- 110. Nalls, M.A., et al., Large-scale meta-analysis of genome-wide association

data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. Nat Genet, 2014. 46(9): p. 989-93.

- 111. Di Fonzo, A., et al., A common missense variant in the LRRK2 gene, Gly2385Arg, associated with Parkinson's disease risk in Taiwan. Neurogenetics, 2006. 7(3): p. 133-8.
- O'Regan, G., et al., *Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease*. J Parkinsons Dis, 2017. 7(3): p. 411-422.
- Sidransky, E., et al., *Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations* in Parkinson's disease. N Engl J Med, 2009. 361(17): p. 1651-61.
- 114. Sidransky, E. and G. Lopez, *The link between the GBA gene and parkinsonism*. Lancet Neurol, 2012. 11(11): p. 986-98.
- 115. Jakes, R., M.G. Spillantini, and M. Goedert, *Identification of two distinct synucleins from human brain.* FEBS Lett, 1994. 345(1): p. 27-32.
- 116. Burre, J., *The Synaptic Function of alpha-Synuclein*. J Parkinsons Dis, 2015. 5(4): p. 699-713.
- 117. Bussell, R., Jr. and D. Eliezer, A structural and functional role for 11-mer repeats in alpha-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. J Mol Biol, 2003. 329(4): p. 763-78.
- Davidson, W.S., et al., Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. J Biol Chem, 1998. 273(16): p. 9443-9.
- Ueda, K., et al., Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(23): p. 11282-6.
- Waxman, E.A., J.R. Mazzulli, and B.I. Giasson, *Characterization of hydrophobic residue requirements for alpha-synuclein fibrillization*. Biochemistry, 2009. 48(40): p. 9427-36.
- 121. Giasson, B.I., et al., A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. J Biol Chem, 2001. 276(4): p. 2380-6.
- 122. Oueslati, A., M. Fournier, and H.A. Lashuel, *Role of post-translational* modifications in modulating the structure, function and toxicity of alpha-

*synuclein: implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies.* Prog Brain Res, 2010. 183: p. 115-45.

- 123. Sato, H., T. Kato, and S. Arawaka, The role of Ser129 phosphorylation of alpha-synuclein in neurodegeneration of Parkinson's disease: a review of in vivo models. Rev Neurosci, 2013. 24(2): p. 115-23.
- 124. Burre, J., et al., *Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro.* Science, 2010. 329(5999): p. 1663-7.
- 125. Jensen, P.H., et al., alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. J Biol Chem, 1999. 274(36): p. 25481-9.
- 126. Breydo, L., J.W. Wu, and V.N. Uversky, *Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease*. Biochim Biophys Acta, 2012. 1822(2): p. 261-85.
- 127. Sorrentino, Z.A., et al., *Carboxy-terminal truncations of mouse alphasynuclein alter aggregation and prion-like seeding.* FEBS Lett, 2020. 594(8): p. 1271-1283.
- Kim, T.D., S.R. Paik, and C.H. Yang, *Structural and functional implications of C-terminal regions of alpha-synuclein*. Biochemistry, 2002. 41(46): p. 13782-90.
- 129. Cookson, M.R., *The biochemistry of Parkinson's disease*. Annu Rev Biochem, 2005. 74: p. 29-52.
- Clayton, D.F. and J.M. George, *The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease.* Trends Neurosci, 1998. 21(6): p. 249-54.
- 131. Murphy, D.D., et al., Synucleins are developmentally expressed, and alphasynuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. J Neurosci, 2000. 20(9): p. 3214-20.
- 132. Cabin, D.E., et al., Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. J Neurosci, 2002. 22(20): p. 8797-807.
- Alim, M.A., et al., *Tubulin seeds alpha-synuclein fibril formation*. J Biol Chem, 2002. 277(3): p. 2112-7.
- 134. Alim, M.A., et al., Demonstration of a role for alpha-synuclein as a

*functional microtubule-associated protein.* J Alzheimers Dis, 2004. 6(4): p. 435-42; discussion 443-9.

- 135. Uversky, V.N., *Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alphasynuclein aggregation.* J Neurochem, 2007. 103(1): p. 17-37.
- 136. Jensen, P.H., et al., Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. J Biol Chem, 1998. 273(41): p. 26292-4.
- 137. McLean, P.J., et al., Membrane association and protein conformation of alpha-synuclein in intact neurons. Effect of Parkinson's disease-linked mutations. J Biol Chem, 2000. 275(12): p. 8812-6.
- 138. Kim, T.D., et al., *Structural changes in alpha-synuclein affect its chaperone-like activity in vitro*. Protein Sci, 2000. 9(12): p. 2489-96.
- Rekas, A., et al., *The chaperone activity of alpha-synuclein: Utilizing deletion mutants to map its interaction with target proteins*. Proteins, 2012. 80(5): p. 1316-25.
- 140. Alza, N.P., et al., Lipids at the Crossroad of alpha-Synuclein Function and Dysfunction: Biological and Pathological Implications. Front Cell Neurosci, 2019. 13: p. 175.
- 141. Su, L.J., et al., Compounds from an unbiased chemical screen reverse both ER-to-Golgi trafficking defects and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease models. Dis Model Mech, 2010. 3(3-4): p. 194-208.
- 142. Cole, N.B., et al., Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. J Biol Chem, 2002. 277(8): p. 6344-52.
- 143. Jang, A., et al., Non-classical exocytosis of alpha-synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. J Neurochem, 2010. 113(5): p. 1263-74.
- 144. Lee, H.J., S. Patel, and S.J. Lee, *Intravesicular localization and exocytosis* of alpha-synuclein and its aggregates. J Neurosci, 2005. 25(25): p. 6016-24.
- 145. Omar M. A. El-Agnaf, S.A.S., Katerina E. Paleologou, Leanne J. Cooper, Nigel J. Fullwood, Mark J. Gibson, Martin D. Curran, Jennifer A.

Court,David M. A. Mann, Shu-ichi Ikeda, Mark R. Cookson, John Hardy, and David Allsop,  $\alpha$ -Synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. The FASEB Journal 2003.

- 146. Hansson, O., et al., Levels of cerebrospinal fluid α-synuclein oligomers are increased in Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies compared to Alzheimer's disease. Alzheimer's Research & Therapy, 2014. 6(25).
- 147. Park, M.J., et al., Elevated levels of alpha-synuclein oligomer in the cerebrospinal fluid of drug-naive patients with Parkinson's disease. J Clin Neurol, 2011. 7(4): p. 215-22.
- 148. Tokuda, T., et al., Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. Biochem Biophys Res Commun, 2006. 349(1): p. 162-6.
- 149. Desplatsa, P., et al., Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α-synuclein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. 106(31): p. 13010-13015.
- 150. Lee, S.J., et al., *Cell-to-cell transmission of non-prion protein aggregates*. Nat Rev Neurol, 2010. 6(12): p. 702-6.
- Lee, H.J., E.J. Bae, and S.J. Lee, *Extracellular alpha--synuclein-a novel* and crucial factor in Lewy body diseases. Nat Rev Neurol, 2014. 10(2): p. 92-8.
- 152. Bae, E.J., et al., *Lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal promotes seeding-capable oligomer formation and cell-to-cell transfer of alphasynuclein.* Antioxid Redox Signal, 2013. 18(7): p. 770-83.
- 153. Lee, H.J., et al., Autophagic failure promotes the exocytosis and intercellular transfer of alpha-synuclein. Exp Mol Med, 2013. 45: p. e22.
- 154. Emmanouilidou, E., et al., Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. J Neurosci, 2010. 30(20): p. 6838-51.
- 155. Alvarez-Erviti, L., et al., Lysosomal dysfunction increases exosomemediated alpha-synuclein release and transmission. Neurobiol Dis, 2011.

42(3): p. 360-7.

- 156. Bae, E.J. and S.J. Lee, *The LRRK2-RAB axis in regulation of vesicle trafficking and alpha-synuclein propagation*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020. 1866(3): p. 165632.
- 157. Recasens, A. and B. Dehay, *Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease*. Front Neuroanat, 2014. 8: p. 159.
- 158. Visanji, N.P., et al., *The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future*. Acta Neuropathol Commun, 2013. 1: p. 2.
- 159. Braak, H., et al., *Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease.* Neurology, 2005. 64(8): p. 1404-10.
- 160. Braak, H., Kelly Del Tredici, and R.A.I.V. Udo Rüb, Ernst N.H Jansen Steur, Eva Braak, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiology of Aging, 2003. 24(2): p. 197-211.
- Chu, Y., et al., Intrastriatal alpha-synuclein fibrils in monkeys: spreading, imaging and neuropathological changes. Brain, 2019. 142(11): p. 3565-3579.
- 162. Luk, K.C., et al., Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. J Exp Med, 2012. 209(5): p. 975-86.
- 163. Paumier, K.L., et al., Intrastriatal injection of pre-formed mouse alphasynuclein fibrils into rats triggers alpha-synuclein pathology and bilateral nigrostriatal degeneration. Neurobiol Dis, 2015. 82: p. 185-199.
- Zhang, B., et al., Stereotaxic Targeting of Alpha-Synuclein Pathology in Mouse Brain Using Preformed Fibrils. Methods Mol Biol, 2019. 1948: p. 45-57.
- 165. Mezias, C., et al., Neural connectivity predicts spreading of alphasynuclein pathology in fibril-injected mouse models: Involvement of retrograde and anterograde axonal propagation. Neurobiol Dis, 2020. 134: p. 104623.
- 166. Rey, N.L., et al., Widespread transneuronal propagation of alphasynucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease. J Exp Med, 2016. 213(9): p. 1759-78.

- 167. Fellner, L., et al., Toll-like receptor 4 is required for alpha-synuclein dependent activation of microglia and astroglia. Glia, 2013. 61(3): p. 349-60.
- 168. Stewart, C.R., et al., CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. Nat Immunol, 2010. 11(2): p. 155-61.
- 169. Zhang, W., et al., *Microglial PHOX and Mac-1 are essential to the enhanced dopaminergic neurodegeneration elicited by A30P and A53T mutant alpha-synuclein.* Glia, 2007. 55(11): p. 1178-88.
- 170. Kim, C., et al., *beta1-integrin-dependent migration of microglia in response to neuron-released alpha-synuclein.* Exp Mol Med, 2014. 46: p. e91.
- 171. Liu, H.Y., C.Y. Chen, and Y.P. Hsueh, *Innate immune responses regulate morphogenesis and degeneration: roles of Toll-like receptors and Sarm1 in neurons.* Neurosci Bull, 2014. 30(4): p. 645-54.
- 172. Mao, X., et al., *Pathological alpha-synuclein transmission initiated by* binding lymphocyte-activation gene 3. Science, 2016. 353(6307).
- 173. Urrea, L., et al., *The cellular prion protein (PrP(C)) as neuronal receptor for alpha-synuclein.* Prion, 2017. 11(4): p. 226-233.
- 174. Shrivastava, A.N., et al., alpha-synuclein assemblies sequester neuronal alpha3-Na+/K+-ATPase and impair Na+ gradient. EMBO J, 2015. 34(19): p. 2408-23.
- 175. Ihse, E., et al., Cellular internalization of alpha-synuclein aggregates by cell surface heparan sulfate depends on aggregate conformation and cell type. Sci Rep, 2017. 7(1): p. 9008.
- 176. Kim, C., et al., Immunotherapy targeting toll-like receptor 2 alleviates neurodegeneration in models of synucleinopathy by modulating alphasynuclein transmission and neuroinflammation. Mol Neurodegener, 2018. 13(1): p. 43.
- 177. Klein, A.D. and J.R. Mazzulli, *Is Parkinson's disease a lysosomal disorder?* Brain, 2018. 141(8): p. 2255-2262.
- 178. Bae, E.J., et al., LRRK2 kinase regulates alpha-synuclein propagation via

RAB35 phosphorylation. Nat Commun, 2018. 9(1): p. 3465.

- 179. Masliah, E., et al., *Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease*. Neuron, 2005. 46(6): p. 857-68.
- 180. Mandler, M., et al., Next-generation active immunization approach for synucleinopathies: implications for Parkinson's disease clinical trials. Acta Neuropathol, 2014. 127(6): p. 861-79.
- 181. Valera, E. and E. Masliah, *Immunotherapy for neurodegenerative diseases: focus on alpha-synucleinopathies*. Pharmacol Ther, 2013. 138(3): p. 311-22.
- 182. Lannfelt, L., N.R. Relkin, and E.R. Siemers, *Amyloid-ss-directed immunotherapy for Alzheimer's disease*. J Intern Med, 2014. 275(3): p. 284-95.
- 183. Masliah, E., et al., Passive immunization reduces behavioral and neuropathological deficits in an alpha-synuclein transgenic model of Lewy body disease. PLoS One, 2011. 6(4): p. e19338.
- 184. Bae, E.J., et al., Antibody-aided clearance of extracellular alpha-synuclein prevents cell-to-cell aggregate transmission. J Neurosci, 2012. 32(39): p. 13454-69.
- 185. Games, D., et al., Reducing C-terminal-truncated alpha-synuclein by immunotherapy attenuates neurodegeneration and propagation in Parkinson's disease-like models. J Neurosci, 2014. 34(28): p. 9441-54.
- 186. Shahaduzzaman, M., et al., Anti-human alpha-synuclein N-terminal peptide antibody protects against dopaminergic cell death and ameliorates behavioral deficits in an AAV-alpha-synuclein rat model of Parkinson's disease. PLoS One, 2015. 10(2): p. e0116841.
- 187. Fagerqvist, T., et al., Monoclonal antibodies selective for alpha-synuclein oligomers/protofibrils recognize brain pathology in Lewy body disorders and alpha-synuclein transgenic mice with the disease-causing A30P mutation. J Neurochem, 2013. 126(1): p. 131-44.
- 188. Spencer, B., et al., *ESCRT-mediated uptake and degradation of braintargeted alpha-synuclein single chain antibody attenuates neuronal degeneration in vivo*. Mol Ther, 2014. 22(10): p. 1753-67.

- 189. Tran, H.T., et al., *Alpha-synuclein immunotherapy blocks uptake and templated propagation of misfolded alpha-synuclein and neurodegeneration.* Cell Rep, 2014. 7(6): p. 2054-65.
- 190. Fahn, S., et al., Levodopa and the progression of Parkinson's disease. N Engl J Med, 2004. 351(24): p. 2498-508.
- 191. Rascol, O., M. Fabbri, and W. Poewe, Amantadine in the treatment of Parkinson's disease and other movement disorders. Lancet Neurol, 2021. 20(12): p. 1048-1056.
- 192. Yu, Q.S., et al., Synthesis of the Alzheimer drug Posiphen into its primary metabolic products (+)-N1-norPosiphen, (+)-N8-norPosiphen and (+)-N1, N8-bisnorPosiphen, their inhibition of amyloid precursor protein, alpha-Synuclein synthesis, interleukin-1beta release, and cholinergic action. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem, 2013. 12(2): p. 117-28.
- 193. Kuo, Y.M., et al., Translational inhibition of alpha-synuclein by Posiphen normalizes distal colon motility in transgenic Parkinson mice. Am J Neurodegener Dis, 2019. 8(1): p. 1-15.
- 194. Wegrzynowicz, M., et al., Depopulation of dense alpha-synuclein aggregates is associated with rescue of dopamine neuron dysfunction and death in a new Parkinson's disease model. Acta Neuropathol, 2019. 138(4): p. 575-595.
- 195. Price, D.L., et al., The small molecule alpha-synuclein misfolding inhibitor, NPT200-11, produces multiple benefits in an animal model of Parkinson's disease. Sci Rep, 2018. 8(1): p. 16165.
- 196. Daher, J.P., et al., Abrogation of alpha-synuclein-mediated dopaminergic neurodegeneration in LRRK2-deficient rats. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(25): p. 9289-94.
- 197. Daher, J.P., et al., Leucine-rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Pharmacological Inhibition Abates alpha-Synuclein Gene-induced Neurodegeneration. J Biol Chem, 2015. 290(32): p. 19433-44.
- 198. Zhao, H.T., et al., LRRK2 Antisense Oligonucleotides Ameliorate alpha-Synuclein Inclusion Formation in a Parkinson's Disease Mouse Model. Mol Ther Nucleic Acids, 2017. 8: p. 508-519.

- 199. Cullen, V., et al., Acid beta-glucosidase mutants linked to Gaucher disease, Parkinson disease, and Lewy body dementia alter alpha-synuclein processing. Ann Neurol, 2011. 69(6): p. 940-53.
- 200. Sardi, S.P., et al., CNS expression of glucocerebrosidase corrects alphasynuclein pathology and memory in a mouse model of Gaucher-related synucleinopathy. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(29): p. 12101-6.
- 201. Migdalska-Richards, A., et al., *Ambroxol effects in glucocerebrosidase and alpha-synuclein transgenic mice*. Ann Neurol, 2016. 80(5): p. 766-775.
- 202. Mullin, S., et al., Ambroxol for the Treatment of Patients With Parkinson Disease With and Without Glucocerebrosidase Gene Mutations: A Nonrandomized, Noncontrolled Trial. JAMA Neurol, 2020. 77(4): p. 427-434.
- 203. Carboni, E., et al., Deferiprone Rescues Behavioral Deficits Induced by Mild Iron Exposure in a Mouse Model of Alpha-Synuclein Aggregation. Neuromolecular Med, 2017. 19(2-3): p. 309-321.
- 204. Bertilsson, G., et al., *Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular* zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of Parkinson's disease. J Neurosci Res, 2008. 86(2): p. 326-38.
- 205. Cao, L., et al., A novel dual GLP-1 and GIP incretin receptor agonist is neuroprotective in a mouse model of Parkinson's disease by reducing chronic inflammation in the brain. Neuroreport, 2016. 27(6): p. 384-91.
- 206. Olney, N. and H. Rosen, AVP-923, a combination of dextromethorphan hydrobromide and quinidine sulfate for the treatment of pseudobulbar affect and neuropathic pain. IDrugs, 2010. 13(4): p. 254-65.
- 207. Khan, A., et al., *NPT520-34 improves neuropathology and motor deficits in a transgenic mouse model of Parkinson's disease.* Brain, 2021. 144(12): p. 3692-3709.
- 208. Singleton, A.B., et al., *alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease*. Science, 2003. 302(5646): p. 841.
- 209. Ostrerova-Golts, N., et al., *The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity.* J Neurosci, 2000. 20(16): p.

6048-54.

- 210. Kotzbauer, P.T., et al., Fibrillization of alpha-synuclein and tau in familial Parkinson's disease caused by the A53T alpha-synuclein mutation. Exp Neurol, 2004. 187(2): p. 279-88.
- 211. Nishikawa, K., et al., Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 304(1): p. 176-83.
- 212. Zimprich, A., et al., *Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant* parkinsonism with pleomorphic pathology. Neuron, 2004. 44(4): p. 601-7.
- 213. de Rus Jacquet, A., et al., *The LRRK2 G2019S mutation alters astrocyte-to*neuron communication via extracellular vesicles and induces neuron atrophy in a human iPSC-derived model of Parkinson's disease. Elife, 2021. 10.
- 214. Ramirez, A., et al., *Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase.* Nat Genet, 2006. 38(10): p. 1184-91.
- 215. Lautier, C., et al., *Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease*. Am J Hum Genet, 2008. 82(4): p. 822-33.
- 216. Strauss, K.M., et al., Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. Hum Mol Genet, 2005. 14(15): p. 2099-111.
- 217. Paisan-Ruiz, C., et al., *Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism*. Ann Neurol, 2009. 65(1): p. 19-23.
- 218. Larsen, K. and C. Bendixen, *Characterization of the porcine FBX07 gene:* the first step towards generation of a pig model for Parkinsonian pyramidal syndrome. Mol Biol Rep, 2012. 39(2): p. 1517-26.
- 219. Ding, Y., et al., Parkinson's Disease Causative Mutation in Vps35 Disturbs Tetherin Trafficking to Cell Surfaces and Facilitates Virus Spread. Cells, 2021. 10(4).
- 220. Mir, R., et al., *The Parkinson's disease VPS35[D620N] mutation enhances LRRK2-mediated Rab protein phosphorylation in mouse and human.*

Biochem J, 2018. 475(11): p. 1861-1883.

- 221. Chartier-Harlin, M.C., et al., *Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease*. Am J Hum Genet, 2011. 89(3): p. 398-406.
- 222. Olgiati, S., et al., DNAJC6 Mutations Associated With Early-Onset Parkinson's Disease. Ann Neurol, 2016. 79(2): p. 244-56.
- 223. Quadri, M., et al., *Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism.* Hum Mutat, 2013. 34(9): p. 1208-15.
- 224. Vilarino-Guell, C., et al., *DNAJC13 mutations in Parkinson disease*. Hum Mol Genet, 2014. 23(7): p. 1794-801.
- 225. Lesage, S., et al., Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy. Am J Hum Genet, 2016. 98(3): p. 500-513.
- 226. Bae, E.J., et al., *Glucocerebrosidase depletion enhances cell-to-cell* transmission of alpha-synuclein. Nat Commun, 2014. 5: p. 4755.
- 227. Lee, H.J., et al., *Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway.* J Neurosci, 2004. 24(8): p. 1888-96.
- 228. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change* and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol, 2014. 15(12): p. 550.
- 229. Bindea, G., et al., *ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks*. Bioinformatics, 2009. 25(8): p. 1091-3.
- 230. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.* Nat Protoc, 2009. 4(1): p. 44-57.
- Lee, H.J., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assays for alpha-synuclein with species and multimeric state specificities*. J Neurosci Methods, 2011. 199(2): p. 249-57.
- 232. Atsaves, V., et al., *AP-1 Transcription Factors as Regulators of Immune Responses in Cancer.* Cancers (Basel), 2019. 11(7).
- 233. Roman, J., et al., Transcriptional regulation of the human interleukin 1beta

*gene by fibronectin: role of protein kinase C and activator protein 1 (AP-1).* Cytokine, 2000. 12(11): p. 1581-96.

- 234. Ogawa, K., et al., *Transcriptional regulation of the IL-5 gene in peripheral T cells of asthmatic patients*. Clin Exp Immunol, 2002. 130(3): p. 475-83.
- 235. Schraml, B.U., et al., *The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation*. Nature, 2009. 460(7253): p. 405-9.
- 236. Zhu, C., et al., Characterization of an activation protein-1-binding site in the murine interleukin-12 p40 promoter. Demonstration of novel functional elements by a reductionist approach. J Biol Chem, 2001. 276(21): p. 18519-28.
- 237. Wang, Z.Y., et al., *Regulation of IL-10 gene expression in Th2 cells by Jun proteins*. J Immunol, 2005. 174(4): p. 2098-105.
- 238. Daman, A.W. and S.Z. Josefowicz, *Epigenetic and transcriptional control* of interferon-beta. J Exp Med, 2021. 218(9).
- 239. 김정태, 마우스에서 종양괴사인자- α가 알파 시뉴클린 단백질 전파에 미치는 영향, in Effect of inflammatory factor TNF-α on α-synuclein protein propagation in mice. 2022, 서울: 서울대학교 대학원: 서울.
- 240. Kumari, R. and P. Jat, *Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype.* Front Cell Dev Biol, 2021. 9: p. 645593.
- 241. Victorelli, S. and J.F. Passos, *Telomeres and Cell Senescence Size Matters Not*. EBioMedicine, 2017. 21: p. 14-20.
- 242. Tomita, K.I., et al., *Changes in telomere length with aging in human neurons and glial cells revealed by quantitative fluorescence in situ hybridization analysis.* Geriatr Gerontol Int, 2018. 18(10): p. 1507-1512.
- 243. Moreno-Blas, D., et al., *Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy*. Aging (Albany NY), 2019. 11(16): p. 6175-6198.
- 244. Birch, J. and J. Gil, *Senescence and the SASP: many therapeutic avenues*. Genes Dev, 2020. 34(23-24): p. 1565-1576.
- 245. Carmona-Gutierrez, D., et al., *The crucial impact of lysosomes in aging and longevity*. Ageing Res Rev, 2016. 32: p. 2-12.

- 246. Ge, W., et al., *The Roles of Lysosomes in Inflammation and Autoimmune Diseases*. Int Rev Immunol, 2015. 34(5): p. 415-31.
- 247. Herranz, N. and J. Gil, *Mechanisms and functions of cellular senescence*. J Clin Invest, 2018. 128(4): p. 1238-1246.
- 248. Murray, R.Z. and J.L. Stow, *Cytokine Secretion in Macrophages: SNAREs, Rabs, and Membrane Trafficking.* Front Immunol, 2014. 5: p. 538.
- 249. Manderson, A.P., et al., Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNFalpha. J Cell Biol, 2007. 178(1): p. 57-69.
- 250. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. Annu Rev Immunol, 2009. 27: p. 519-50.
- 251. Kay, J.G., et al., *Cytokine secretion via cholesterol-rich lipid raftassociated SNAREs at the phagocytic cup.* J Biol Chem, 2006. 281(17): p. 11949-54.
- 252. Carta, S., R. Lavieri, and A. Rubartelli, *Different Members of the IL-1 Family Come Out in Different Ways: DAMPs vs. Cytokines?* Front Immunol, 2013. 4: p. 123.
- 253. Gardella, S., et al., *The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway.* EMBO Rep, 2002. 3(10): p. 995-1001.
- 254. Tsunemi, T., et al., Increased Lysosomal Exocytosis Induced by Lysosomal Ca(2+) Channel Agonists Protects Human Dopaminergic Neurons from alpha-Synuclein Toxicity. J Neurosci, 2019. 39(29): p. 5760-5772.
- 255. Xu, Y., et al., *TFEB regulates lysosomal exocytosis of tau and its loss of function exacerbates tau pathology and spreading*. Mol Psychiatry, 2021. 26(10): p. 5925-5939.
- 256. Ren, J.L., et al., *Inflammatory signaling and cellular senescence*. Cell Signal, 2009. 21(3): p. 378-83.
- 257. Kuilman, T., et al., Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. Cell, 2008. 133(6): p. 1019-31.
- 258. Philipot, D., et al., *p16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and*

chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis. Arthritis Res Ther, 2014. 16(1): p. R58.

- 259. Shang, D., et al., Interleukin-Ibeta Drives Cellular Senescence of Rat Astrocytes Induced by Oligomerized Amyloid beta Peptide and Oxidative Stress. Front Neurol, 2020. 11: p. 929.
- 260. Mavrogonatou, E., A. Konstantinou, and D. Kletsas, *Long-term exposure* to TNF-alpha leads human skin fibroblasts to a p38 MAPK- and ROSmediated premature senescence. Biogerontology, 2018. 19(3-4): p. 237-249.
- 261. Tyciakova, S., et al., Overexpression of TNFalpha induces senescence, autophagy and mitochondrial dysfunctions in melanoma cells. BMC Cancer, 2021. 21(1): p. 507.
- 262. Beyne-Rauzy, O., et al., *Tumor necrosis factor alpha induces senescence and chromosomal instability in human leukemic cells*. Oncogene, 2004. 23(45): p. 7507-16.
- 263. Davalos, A.R., et al., *Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression*. Cancer Metastasis Rev, 2010. 29(2): p. 273-83.
- 264. Lee, H.-J., et al., *Clearance and deposition of extracellular alphasynuclein aggregates in microglia*. Biochem Biophys Res Commun, 2008b. 372(3): p. 423-8.
- 265. Rabl, R., et al., *Early start of progressive motor deficits in Line 61 alphasynuclein transgenic mice.* BMC Neurosci, 2017. 18(1): p. 22.
- 266. Chesselet, M.F., et al., *A progressive mouse model of Parkinson's disease: the Thy1-aSyn ("Line 61") mice*. Neurotherapeutics, 2012. 9(2): p. 297-314.
- 267. Paleologou, K.E., et al., *Detection of elevated levels of soluble alphasynuclein oligomers in post-mortem brain extracts from patients with dementia with Lewy bodies.* Brain, 2009. 132(Pt 4): p. 1093-101.
- 268. El-Agnaf, O., et al., *Differential effects of immunotherapy with antibodies* targeting alpha-synuclein oligomers and fibrils in a transgenic model of synucleinopathy. Neurobiol Dis, 2017. 104: p. 85-96.
- 269. Gustafsson, G., et al., Cellular Uptake of alpha-Synuclein Oligomer-Selective Antibodies is Enhanced by the Extracellular Presence of alpha-

Synuclein and Mediated via Fcgamma Receptors. Cell Mol Neurobiol, 2017. 37(1): p. 121-131.

- 270. Katsinelos, T., et al., The Role of Antibodies and Their Receptors in Protection Against Ordered Protein Assembly in Neurodegeneration. Front Immunol, 2019. 10: p. 1139.
- 271. Chen, M., et al., *Investigation of alpha-synuclein fibril structure by sitedirected spin labeling*. J Biol Chem, 2007. 282(34): p. 24970-9.
- 272. Heise, H., et al., Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length a-synuclein fibrils studied by solid-state NMR. PNAS, 2005. 102: p. 15871-15876.
- 273. Spencer, B., et al., Anti-alpha-synuclein immunotherapy reduces alphasynuclein propagation in the axon and degeneration in a combined viral vector and transgenic model of synucleinopathy. Acta Neuropathol Commun, 2017. 5(1): p. 7.
- 274. Henderson, M.X., et al., *Characterization of novel conformation-selective* alpha-synuclein antibodies as potential immunotherapeutic agents for Parkinson's disease. Neurobiol Dis, 2020. 136: p. 104712.
- 275. Lin, C.H., et al., *Mild Chronic Colitis Triggers Parkinsonism in LRRK2 Mutant Mice Through Activating TNF-alpha Pathway.* Mov Disord, 2021.
- 276. Kirkland, J.L. and T. Tchkonia, *Cellular Senescence: A Translational Perspective*. EBioMedicine, 2017. 21: p. 21-28.
- 277. Childs, B.G., et al., *Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing*. Nat Rev Drug Discov, 2017. 16(10): p. 718-735.
- 278. Kim, E.C. and J.R. Kim, *Senotherapeutics: emerging strategy for healthy aging and age-related disease*. BMB Rep, 2019. 52(1): p. 47-55.
- 279. Baker, D.J., et al., *Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan.* Nature, 2016. 530(7589): p. 184-9.
- 280. Bussian, T.J., et al., *Clearance of senescent glial cells prevents taudependent pathology and cognitive decline*. Nature, 2018. 562(7728): p. 578-582.

## Abstract

Studies on the role of TNF- $\alpha$  in propagation of alphasynuclein aggregates and immunotherapy targeting alpha-synuclein aggregates for Parkinson's disease

Minsun Choi

Major in Biomedical Sciences

Department of Biomedical Sciences

Seoul National University Graduate School

Cell-to-cell propagation of  $\alpha$ -synuclein has been proposed to be the underlying mechanism of progression of Parkinson's disease (PD). Previous studies have provided evidence for cell-to-cell propagation of  $\alpha$ -synuclein in cell lines, primary neurons, and animal model [2, 3].  $\alpha$ -synuclein can be taken up by neurons, undergone transport along axons, and finally transferred to another neuron. The previous studies showed that  $\alpha$ -synuclein aggregates spread via exocytosis and subsequent endocytosis [4-7], while another suggested that tunneling nanotubes were involved in the process [8]. Injection of pre-formed  $\alpha$ -synuclein fibrils into the striatum caused brainwide spread of  $\alpha$ -synuclein aggregates and induces dopaminergic neuronal death in the substantia nigra [9].

According to recent studies, inflammation appears to play the critical role in the propagation of  $\alpha$ -synuclein aggregates. However, the mechanism by which inflammation regulates propagation of  $\alpha$ -synuclein aggregate is unknown.

In this thesis, I explain how an inflammatory factor, TNF- $\alpha$ , regulates propagation of  $\alpha$ -synuclein aggregates and show the potential for an immunotherapy targeting  $\alpha$ -synuclein aggregates.

In chapter 1 of this thesis, I explained the background needed for the study.

In chapter 2, using *in vitro* cultures, I discovered that soluble factors produced by activated microglia increased cell-to-cell propagation of  $\alpha$ synuclein, and that TNF- $\alpha$  has the most powerful stimulatory effect among these soluble factors. TNF- $\alpha$  treatment to neurons activated senescenceassociated evidenced by transcriptome studies genes. as and immunoanalysis of senescent phenotypic marker proteins. Furthermore, neurons treated with TNF- $\alpha$  secreted more  $\alpha$ -synuclein than control through the senescence-associated secretory phenotype (SASP). I have shown that the SASP was mediated by lysosomal exocytosis by using vacuolin-1, a lysosomal exocytosis inhibitor, and RNAi against rab27a. The presence of  $\alpha$ -synuclein aggregates in electron-dense lysosome-like compartments was confirmed by using correlative light and electron microscopy as well as immunoelectron microscopy. This indicates that the secretion of  $\alpha$ -synuclein through SASP is mediated lysosomal exocytosis. Thus, TNF- $\alpha$  is the

primary inflammatory factor that drives cell-to-cell propagation of  $\alpha$ synuclein by boosting SASP and subsequent  $\alpha$ -synuclein release.

In chapter 3, I developed antibodies targeting  $\alpha$ -synuclein aggregates, since extracellular  $\alpha$ -synuclein aggregates, which have been regarded as the culprits that drive disease progression in Parkinson's disease.

These antibodies not only prevented the cell-to-cell propagation of  $\alpha$ synuclein by capturing the extracellular  $\alpha$ -synuclein aggregates but also promoted phagocytosis of extracellular  $\alpha$ -synuclein aggregates in microglia. Additionally, passive immunization with aggregate-specific antibodies greatly improved neuropathological phenotypes, such as synuclein aggregation, gliosis, inflammation, and neuronal death in  $\alpha$ -synuclein transgenic mouse model.

Finally, I conclude this thesis with an overall summary and discussion of my findings in chapter 4. From these findings, I propose the mechanism of  $\alpha$ -synuclein propagation and gain insights into the development of immunotherapy that could slow the progression of PD pathogenesis.

**Keyword:** Parkinson's disease, Protein aggregation, Neuroinflammation, microglia, Senescence, Immunotherapy

Student Number: 2016-2201
\*Part 2 of thesis was published in Experimental & Molecular Medicine, Jul
5 (2022) entitled "TNF-α promotes a-synuclein propagation through stimulation of senescence-associated lysosomal exocytosis"
\*\*Part 3 of thesis was published in Experimental Neurobiology (EN), Feb
28;31(1):29-41(2022) entitled "Conformation-specific antibodies targeting aggregated forms of α-synuclein block the propagation of synucleinopathy"

## Supplementary information

## 표 11. Differentially expressed genes (DEGs)

Entrez ID	genesymbol	baseMean	log2 FoldChange	lfcSE	pvalue	padj
692203	SNORD88B	69.07249	-24.2333	3.026687	1.17973E-15	4.63634E-13
63973	NEUROG2	9.700814	-1.85404	0.491228	0.000160457	0.015098805
3488	IGFBP5	20.60321	-1.52786	0.334286	4.86516E-06	0.000670188
56944	OLFML3	26.60472	-1.26763	0.286839	9.90165E-06	0.001236504
4239	MFAP4	54.51322	-0.9236	0.180746	3.2231E-07	5.52143E-05
9260	PDLIM7	68.51838	-0.82483	0.15934	2.25994E-07	4.02106E-05
1191	CLU	112.128	-0.732	0.118597	6.73652E-10	1.72055E-07
3671	ISLR	110.2298	-0.70894	0.120758	4.33783E-09	1.03504E-06
4237	MFAP2	132.8394	-0.62061	0.109763	1.56689E-08	3.52038E-06
10381	TUBB3	279.1793	-0.58427	0.070583	1.25503E-16	5.24052E-14
1281	COL3A1	128.5351	-0.56472	0.10687	1.2627E-07	2.34337E-05
158763	ARHGAP36	373.0038	-0.5538	0.060117	3.19972E-20	1.78144E-17
7431	VIM	360.31	-0.55308	0.062215	6.12282E-19	2.9219E-16
64943	NT5DC2	127.5383	-0.53172	0.107999	8.50602E-07	0.000129156
7846	TUBA1A	711.5104	-0.52464	0.042957	2.647E-34	2.7207E-31
1809	DPYSL3	227.17	-0.52379	0.075999	5.49941E-12	1.56347E-09
3959	LGALS3BP	167.0814	0.383907	0.099302	0.00011061	0.010709887
9520	NPEPPS	109.0519	0.411984	0.116145	0.000389441	0.031347641
1647	GADD45A	114.255	0.444658	0.11408	9.70794E-05	0.009550966
1592	CYP26A1	164.1793	0.446383	0.099685	7.53643E-06	0.000970618
11117	EMILIN1	107.5476	0.469916	0.126032	0.000192599	0.017714083
3301	DNAJA1	230.2171	0.481216	0.07455	1.08269E-10	2.95242E-08
7425	VGF	183.789	0.49803	0.088902	2.11903E-08	4.64171E-06
3956	LGALS1	1162.649	0.520731	0.070997	2.22548E-13	7.25289E-11
4081	MAB21L1	98.05077	0.580417	0.12424	2.98667E-06	0.000429116
1026	CDKN1A	307.8591	0.623353	0.065527	1.85353E-21	1.12577E-18
4673	NAP1L1	91.75325	0.637929	0.13249	1.47269E-06	0.000218646

(Log2 [fold change]  $\geq$  0.3, adjusted p < 0.05)

2879	GPX4	271.9388	0.644694	0.077609	9.81837E-17	4.23203E-14
3672	ITGA1	66.23745	0.657776	0.160953	4.37443E-05	0.004752121
1382	CRABP2	3950.209	0.662059	0.050682	5.3548E-39	7.15508E-36
5327	PLAT	345.4926	0.697478	0.063885	9.48572E-28	7.45577E-25
140606	SELM	124.1633	0.745315	0.11712	1.96997E-10	5.26456E-08
54674	LRRN3	48.3279	0.752938	0.197654	0.000139321	0.013392859
7157	TP53	54.72948	0.773804	0.180727	1.85545E-05	0.002194028
1113	CHGA	39.42116	0.79741	0.222545	0.00033949	0.02871054
9686	VGLL4	76.94432	0.797914	0.145979	4.60429E-08	8.9163E-06
2907	GRINA	70.64089	0.815382	0.157582	2.28708E-07	4.02106E-05
4256	MGP	38.22185	0.823794	0.227602	0.000295228	0.025450558
5979	RET	440.1319	0.828268	0.055619	3.72351E-50	7.10765E-47
5720	PSME1	124.0667	0.828608	0.110325	5.88411E-14	2.01599E-11
3107	HLA-C	43.72144	0.8649	0.214313	5.44446E-05	0.005728262
9518	GDF15	191.8001	0.940968	0.091395	7.37669E-25	5.47597E-22
148753	FAM163A	48.22715	1.024049	0.197133	2.0505E-07	3.70255E-05
6622	SNCA	7758.954	1.029442	0.043112	5.1355E-126	3.4311E-122
2335	FN1	136.181	1.047939	0.106838	1.03332E-22	6.57489E-20
4793	NFKBIB	25.61581	1.086976	0.28626	0.000146363	0.013969291
27233	SULT1C4	32.72069	1.122467	0.249276	6.70294E-06	0.000886779
6772	STAT1	22.31443	1.129734	0.309678	0.000264189	0.023533945
3572	IL6ST	30.72138	1.181798	0.262622	6.79571E-06	0.000890238
10801	SEPT9	153.3012	1.217733	0.102529	1.55872E-32	1.48769E-29
100874110	GLYCTK- AS1	35.8213	1.231643	0.253622	1.19653E-06	0.000179642
11182	SLC2A6	20.21265	1.278798	0.328111	9.72109E-05	0.009550966
3105	HLA-A	157.6995	1.302414	0.101621	1.32713E-37	1.6121E-34
7942	TFEB	23.1145	1.323486	0.310216	1.98713E-05	0.002329125
10318	TNIP1	54.73554	1.353175	0.190916	1.36252E-12	3.95783E-10
5721	PSME2	79.3488	1.409914	0.154282	6.32974E-20	3.38312E-17
2669	GEM	32.02186	1.445715	0.261434	3.2034E-08	6.48543E-06
9636	ISG15	71.83829	1.645858	0.198008	9.40402E-17	4.18855E-14
10133	OPTN	44.33032	1.670252	0.221006	4.10903E-14	1.48391E-11
3429	IFI27	12.60598	1.679296	0.463854	0.00029425	0.025450558

3726	JUNB	42.82846	1.696475	0.226862	7.5461E-14	2.52077E-11
8878	SQSTM1	146.6936	1.773672	0.114229	2.26747E-54	6.05958E-51
7980	TFPI2	16.01148	1.8381	0.392345	2.80093E-06	0.000411275
9308	CD83	8.105981	1.914151	0.537518	0.000369319	0.030275066
92610	TIFA	10.50784	1.917228	0.479752	6.43429E-05	0.006649779
6892	TAPBP	58.94462	1.93815	0.195156	3.04264E-23	2.03279E-20
64091	POPDC2	8.305981	1.958517	0.536257	0.000260003	0.023316486
629	CFB	11.50791	2.001504	0.465557	1.71443E-05	0.002045381
4794	NFKBIE	7.505569	2.001587	0.560159	0.000352581	0.029328588
4147	MATN2	9.906875	2.07555	0.506865	4.22393E-05	0.004626238
4502	MT2A	9.406944	2.079585	0.531612	9.1593E-05	0.009133327
1294	COL7A1	14.50976	2.129228	0.42858	6.76113E-07	0.000103842
10410	IFITM3	64.64847	2.208646	0.194282	6.01939E-30	5.02695E-27
567	B2M	280.4217	2.319822	0.085638	1.3339E-161	1.7824E-157
22822	PHLDA1	22.91822	2.377118	0.355472	2.27462E-11	6.33197E-09
91107	TRIM47	5.704676	2.41667	0.680412	0.000382641	0.031134094
684	BST2	41.22895	2.444423	0.263436	1.71066E-20	9.93818E-18
7127	TNFAIP2	7.906602	2.788197	0.622722	7.55458E-06	0.000970618
4792	NFKBIA	68.25666	2.872853	0.206875	7.60262E-44	1.26983E-40
6891	TAP2	4.403301	2.964964	0.829905	0.000353383	0.029328588
972	CD74	15.11272	2.980231	0.483012	6.82452E-10	1.72055E-07
8605	PLA2G4C	4.503782	3.001585	0.827062	0.000284286	0.025156455
55620	STAP2	4.803782	3.105855	0.825061	0.000166954	0.015600276
4791	NFKB2	36.82888	3.162737	0.318437	3.01978E-23	2.03279E-20
2537	IFI6	84.2599	3.376919	0.226261	2.27012E-50	5.05557E-47
79924	ADM2	5.904745	3.434471	0.807544	2.1094E-05	0.002450942
252995	FNDC5	29.22613	3.482744	0.384447	1.31537E-19	6.75999E-17
85004	RERG	6.205708	3.5126	0.802547	1.20425E-05	0.001466988
4880	NPPC	10.9099	3.659883	0.66504	3.72842E-08	7.32635E-06
6236	RRAD	8.207152	3.946417	0.781649	4.44507E-07	7.24329E-05
339398	LINGO4	9.509078	4.17157	0.773175	6.83797E-08	1.30527E-05
5971	RELB	25.92297	4.364955	0.50048	2.7445E-18	1.26455E-15
7185	TRAF1	2.001926	4.444273	1.212171	0.000246014	0.022211096
84676	TRIM63	2.001926	4.444273	1.212171	0.000246014	0.022211096

8995	TNFSF18	2.202407	4.581916	1.20748	0.000147876	0.014013614
51284	TLR7	2.402407	4.707351	1.19519	8.19657E-05	0.008360501
4050	LTB	2.602407	4.822745	1.185367	4.73033E-05	0.005016401
4940	OAS3	2.602407	4.822745	1.185367	4.73033E-05	0.005016401
7124	TNF	2.602407	4.822745	1.185367	4.73033E-05	0.005016401
602	BCL3	6.005227	4.826117	1.0628	5.60029E-06	0.000748311
148170	CDC42EP5	2.802407	4.929585	1.194538	3.6789E-05	0.004130883
3106	HLA-B	2.802889	4.929776	1.17895	2.89595E-05	0.003335831
10148	EBI3	3.603852	5.292393	1.156411	4.7267E-06	0.000657897
10272	FSTL3	114.2109	5.314509	0.296229	5.68938E-72	2.53405E-68
330	BIRC3	3.703852	5.331888	1.149434	3.50592E-06	0.000498362
7412	VCAM1	64.36334	5.491202	0.416434	1.05294E-39	1.56326E-36
4879	NPPB	24.71871	5.598293	0.720381	7.76886E-15	2.96593E-12
6890	TAP1	5.003852	5.765972	1.129625	3.31979E-07	5.54488E-05
9536	PTGES	5.305296	5.850309	1.119388	1.7289E-07	3.16461E-05
259307	IL4I1	6.405296	6.122181	1.101563	2.73317E-08	5.70635E-06
338440	ANO9	7.505778	6.350926	1.091822	5.99787E-09	1.40603E-06
8519	IFITM1	8.808666	6.581804	1.067956	7.13829E-10	1.76633E-07
29994	BAZ2B	14.61493	7.312244	1.016834	6.42299E-13	1.95055E-10
9235	IL32	243.1156	7.919782	0.461304	4.59091E-66	1.53359E-62
3383	ICAM1	23.82263	8.017148	0.977157	2.3142E-16	9.37043E-14
3604	TNFRSF9	33.33226	8.501731	0.952864	4.56735E-19	2.26033E-16
10537	UBD	136.4319	10.53492	0.916766	1.4575E-30	1.29834E-27
6347	CCL2	235.633	11.32327	0.914965	3.54125E-35	3.94318E-32