



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#) 

치의학석사 학위논문

구강악안면 기형 원인 돌연변이와 그
단백질의 합성 후 수식사이의
상관관계에 대한 생물정보학적인 연구

2013년 2월

서울대학교 대학원

치의학과

노 은 광

구강악안면 기형 원인 돌연변이와 그
단백질의 합성 후 수식사이의
상관관계에 대한 생물정보학적인 연구

지도교수 류 현 모

이 논문을 치의학석사학위논문으로 제출함

2012년 10월

서울대학교 대학원

치 의 학 과

노 은 광

노은광의 석사학위논문을 인준함

2012년 11월

위 원 장 _____ (인)

부 위 원 장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국문초록

생명 현상은 복잡한 생화학 반응에 의해 유지된다. 이러한 반응을 수행하는 주체는 단백질인데, 단백질은 다양한 조절 기전에 의해 그 구조와 기능이 변화한다. 번역 후 수식 과정은 이들 중 하나로, 단백질의 특정 아미노산 서열에 작용기를 공유결합적으로 연결시켜 단백질의 기능 및 다른 구성요소와의 상호작용을 변화시킨다.

번역 후 수식과정에는 인산화, 당화, palmitoylation, 이성질화, 알킬화, 아세틸화 등이 있으며 이들 과정은 각각 세포의 분열이나 생존에 관련해서 중요한 의미를 지니고 있으며 이러한 수식과정들 매개하는 효소들은 신약 개발의 주된 표적으로 주목을 받고 있다.

이와 같은 수식과정 중에서 S-nitrosylation 및 SUMOylation 은 각각 특정 단백질에 nitric oxide 와 SUMO protein을 공유결합적으로 부착하는 과정으로서 방법론적인 문제로 인하여 그 중요성에도 불구하고 비교적 덜 주목을 받고 있고 특히 구강악안면 영역의 발육 부전과 관련해서는 관련 연구가 거의 없다.

이번 연구에서 구강악안면 영역의 발육 이상을 번역 후 수식과정인 S-nitrosylation 과 SUMOylation 의 측면에서 고찰하기로 한다. 발육 이상과 관련이 있다고 보고된 유전자가 암호화하는 단백질의 잠재적 S-nitrosylation 및 SUMOylation을 생물정보학적인 기법으로 예측해보았다. 대표적인 구강악안면 영역의 발육 이상으로는 법랑질 형성 부전, 상아질 형성 부전, 무치증, Apert 증후군, Crouzon 증후군, 쇄골두개 형성이상, Treacher-Collins 증후군, 외배엽 형성이상, 그리고 구개열을 선정하였다.

각 질환과 관련 있는 유전자들을 phenomicDB을 통해 검색하였으며 총 92개의 유전자가 선발되었다.이들이 암호화 하는 단백질의 아미노산 서열은 Uniprot 으로부터 얻었으며 이를

공개적으로 사용 가능한 S-nitrosylation site 및 SUMOylation site를 예측해주는 program을 이용하여 잠재적인 modification site를 추정하였다. 그 결과 63개의 단백질이 최소한 한 곳 이상에서 수식이 됨을 확인하였다. 이들 중에는 Msx-1, DLX-3, SMAD4와 같이 발생과정에 중요한 역할을 수행하는 유전자도 있었으며 문헌 검색 결과 실제로 이들이 프로그램으로 예측된 site에서 수식이 일어나며 이로 인해 단백질의 기능의 변화가 일어남을 확인하였다. 이는 앞으로 구강악안면 영역의 발생과정을 이해하는 데 있어서 S-nitrosylation 과 SUMOylation이 중요한 단서를 제공할 수 있을 가능성을 보여준다.

주요어: Post-translational modification, S-nitrosylation, SUMOylation, bioinformatics

학 번: 2009-22674

목차

1. 도 입.....	5
2. 실험 방법 및 재료.....	7
2-1. 유전 질환 설정.....	7
2-2. 각 유전 질환별 관련 유전자 선발.....	7
2-3. Potential translational modification site 예측.....	7
3. 결 과.....	8
4. 고 찰.....	13
4-1. SUMOylation.....	13
4-2. S-nitrosylation.....	14
4-3. 구강악안면 기형과의 관계.....	14
4-3-1. SMAD4.....	15
4-3-2. DLX3.....	15
4-3-3. Msx-1.....	16
4-4. 전망.....	15
참고문헌.....	21
Abstract.....	25

표 목차

[표 1].....	9
[표 2].....	13
[표 3].....	19

그림 목차

[그림 1].....	14
-------------	----

1. 도입

1950년대 왓슨과 크릭을 필두로 한 여러 분야의 과학자들의 노력으로 현대 분자 생물학은 눈부신 발전을 이룩해왔다. 분자생물학은 말 그대로 생명 현상을 분자적인 시각으로 바라보는 생물학의 방법론 중 하나이다. 수십 년간 개개 생명 현상에 대한 수많은 이론들이 명멸해갔지만, 그 중에서도 크릭이 1958년에 처음 언급한 Central dogma¹ 는 분자 생물학에 있어서 확고부동한 위치를 차지하고 있다. 비록 Howard Temin 과 David Baltimore 이 발견한 reverse transcription² 과 Prusiner 의 prion³ 등의 예외적인 사례가 있지만 그럼에도 central dogma 는 여전히 생명현상을 이해하는 데 있어서 큰 사고의 틀을 형성하고 있다.

Central dogma 는 유전 정보의 흐름의 방향을 제시한다. 유전 정보의 최종 종착역은 단백질이고 이 단백질이 실제 생명 현상, 다시 말해 생화학적인 반응을 매개한다. 결국 기능적 관점에서 보면 생명 현상의 주역이 되는 것은 단백질이라는 말이다. 단백질은 크게 두 가지 측면에서 조절된다.

첫 번째로는 합성의 조절이다. 단백질은 DNA에서 전사된 mRNA 를 일련의 번역 과정을 거쳐 만들어진다. 전사와 번역과정을 촉진시키거나 억제시킴으로써 단백질의 양을 조절하여 궁극적으로 이들이 매개하는 화학반응의 속도를 조절할 수 있다.

두 번째로는 질적인 조절이다. 번역된 단백질은 그 자체로서 기능하는 경우도 있으나, 대개는 번역 후 수식과정 (post-translational modification) 을 통해 그 활성이 정교하게 조절된다. 단백질에는 여러 가지 functional group 이 존재하고 이 부분에 다양한 chemical group 을 covalent 하게 연결하여 그 단백질의 구조, 즉 기능을 변화시킬 수 있다.

PTM 은 전사나 번역과정의 조절보다는 비교적 늦게 주목을 받았으며 여전히 지금도 활발한 연구가 이루어지고 있는 분야이기도 하다. 현재 다양한 번역 후 수식과정이 보고되어 있다. (인산화, 당화, palmitoylation, 이황화결합 형성, 아세틸화, 알킬화 등) 각각의 수식과정은 단백질의 구조와 활성을 변화시키며 특히 세포의 분열과 생존을 결정하는 중요한 신호 전달 체계를 이루고 있는 구성 요소들 에서 이와 같은 수식과정이 시간적, 공간적으로 정교하게 조절되고 있다.

이 중에서 SUMOylation 및 S-nitrosylation 은 비교적 최근에 주목을 받은 수식과정이다. SUMOylation 은 단백질의 lysine 잔기에 SUMO (small ubiquitin modifier) 라는 작은 polypeptide 를 부착하여 단백질의 구조 혹은 다른 구성요소의 상호작용을 조절하고⁴ S-nitrosylation 은 단백질의 cysteine 잔기에 nitric oxide 를 부착하는 과정⁵으로서 두 과정 모두 표적 단백질의 구조와 다른 단백질과의 상호 작용 양상을 크게 변화시키며, 심혈관 질환⁶, 각종 퇴행성 질환⁷, 그리고 암⁸과도 관련이 있음이 보고되고 있다. 그럼에도 불구하고 이 두 가지 수식과정은 기술적인 문제로 인하여 그 중요성에도 불구하고 비교적 덜 주목을 받아왔으며, 구강악안면 영역의 질환과 관련해서는 거의 연구가 전무한 상황이다.

Human Genome Project 이후로 생물학 관련 정보의 양은 폭발적으로 늘고 있고, 이들 정보들을 다루는 도구들도 꾸준히 발전하고 있다. 번역 후 수식과정에 대한 연구결과가 축적되면서, 이미 알려진 modification site 의 아미노산 서열의 유사성을 이용해 수식과정이 일어날 만한 site 를 예측해주는 소프트웨어들도 공개되었고 개량을 거듭하고 있다.⁹

본 연구에서는 공개적으로 사용 가능한 프로그램인 SUMO-sp 와 GPS-SNO 를 이용하여 인간의 구강악안면부 발육 부전과 관련 있는 단백질들의 SUMOylation 및 S-nitrosylation 이 유력한 site 를 발굴했다. 이를 통해 구강악안면부 단백질들의 기능 및 질병과의

연관성을 번역 후 수식과정의 측면에서 재조명해보는 기회를 가져보기로 한다.

2. 실험 방법 및 재료

2-1. 유전 질환 설정

구강악안면 질환 중 상대적으로 연구가 많이 되어 있고, 상대적으로 유전적인 요인이 강하게 작용하는 질병을 선발하였다. 법랑질 형성 부전, 상아질 형성 부전, 무치증, Apert 증후군, Crouzon 증후군, 쇠골두개 형성이상, Treacher-Collins 증후군, 외배엽 형성이상, 그리고 구개열이 선택되었다.

2-2. 각 유전 질환별 관련 유전자 선발

상기된 질병 명을 key-word 로 이용하여 phenomic DB (<http://www.phenomicdb.de/>)에서 검색을 실시하였다. Phenomic DB 는 2004 년 Weiss 와 동료들에 의해 구축되었는데, 당시 개별적으로 존재하던 알려진 생물 종별 표현형에 관여하는 유전자들의 데이터 베이스 (OMIM, MGI, WormBase, FlyBase 등) 을 하나로 통합하였다.¹⁰ 검색된 유전자에 해당하는 protein sequence 는 Uniprot 에서 gene symbol 을 입력하여 얻었다.

2-3. Potential translational modification site 예측

다수의 소프트웨어들이 개발되었고 이 중에 GPS-SNO 및 SUMO-sp 를 이용하기로 한다. 이 두 소프트웨어는 기존에 알려진 SUMOylation 및 S-nitrosylation이 되는 개별 단백질들의 아미노산 서열을 data base로 저장하고 입력한 peptide sequence 와의 유사성을 이용하여 유력한 modification site 를 예측한다.⁹ 즉 유사한 서열일수록 유사한 구조일 가능성이 높고 그 결과 유사한 생화학적 특징을 보일 것이라는 전제를 기본으로 하고 있다. Threshold 는 high, medium, low 이렇게 3가지 단계로 설정할 수 있는데 threshold level 이 높아짐에 따라 accuracy, sensitivity 및 specificity 가 증가한다. 본 연구에서는 high threshold 로 설정하여 검색을 실시하였다.

3. 결과

Database (PhenomicDB)에서 검색 결과 총 92개의 유전자가 선발되었으며 이들이 암호화하는 단백질 서열을 프로그램을 이용하여 예측한 결과 총 63 종의 유전자가 이들이 암호화하는 단백질에 최소 한 곳 이상의 아미노산 잔기에서 SUMOylation 이나 S-nitrosylation 이 일어남을 확인했다. 48개의 유전자가 암호화하는 단백질의 잠재적인 SUMOylation site 가 예측되었으며 S-nitrosylation의 경우 39개의 유전자가 잠재적인 전사 후 번역과정이 일어날 수 있는 아미노산 서열을 보유하고 있음을 확인했다.

표 1을 보면 수식이 일어나는 단백질들은 대부분 전사 및 신호 전달, 분비 단백질, 그리고 막단백질에서 일어남을 확인할 수 있다. 그러나 발생 과정에 대한 대부분의 연구가 세포간, 그리고 세포 내의 신호 전달에 집중되어 있음을 상기한다면 이는 당연한 귀결이다.

예측된 site 중 실제로 수식과정이 일어남을 확인한 몇 가지 사례가 있다. SMAD4¹¹, DLX3¹², SnoN¹³ 그리고 Msh homeobox 1

protein¹⁴ 이 그 예이다. 4종의 단백질 모두 예측한 site 와 실험적으로 확인한 site가 일치하였다. 그러나 SMAD4 의 경우 실험적으로 113번과 159번의 lysine 잔기에서 SUMOylation 이 일어남을 확인하였으나 프로그램에서는 159만이 예측되었으며 rat의 TGF- β receptor type I 의 389번 lysine 잔기에도 SUMOylation 이 일어난다고 보고되었으나¹⁵ 본 연구에서는 389 번 잔기를 예측하지 못했다. 이는 실험적으로 확인된 modification site의 서열 정보와의 유사성을 이용하여 예측하는 알고리즘의 한계로 생각되며, 추후 추가적인 연구 결과가 축적되면 예측의 specificity 와 sensitivity 또한 증가할 것이라 여겨진다.

S-nitrosylation 의 경우 치아 및 구강악안면 발육과 관련된 단백질들의 modification 은 현재까지는 극소수이다. 그러나 CLIC4 와 같이 TGF- β pathway 를 조절하는 인자들의 S-nitrosylation 이 보고되어 있고¹⁶, 현재 S-nitrosylation 의 연구가 심혈관계 질환에 관련한 유전자에 초점이 맞춰져 있는데다가 S-nitrosylation 은 세포내에서 광범위하게 일어나는 현상이므로¹⁷ 추가적인 연구에 의해서 이들 사이의 관련성이 밝혀질 가능성이 더 크다고 볼 수 있다.

종류	개수
전사 및 신호 전달	20
분비 단백질	17
막단백질	13
cytoplasmic enzyme	5
cytoskeleton	2
unknown	6

[표 1] 수식이 일어난 단백질의 기능 및 위치별 분류

Amelogenesis imperfecta	SUMOylation site	SNO site
tuftelin1	K75,K309	C109
follistatin		C302
dentin sialophosphoprotein	K324	C8
WD repeat domain 72	K1030	C67,C90,C99,C310,C1041
Metal transporter CNNM4	K356,K505,K630	
FAM83H	K137,K976,K1179	
laminin, alpha 3	K730,K851,K2238,K2919	C992,C998,C1168,C2460,C2895,C3150,C3330
kallikrein-related peptidase 4		C56,C167
matrix metalloproteinase 20		C100,C483
DLX3	K83,K112	
Dentinogenesis imperfecta		
ameloblastin	K175	
secreted phosphoprotein 1	K70	
collagn, type I, alpha 1	K54, K286, K352, K448, K826	
collagen, typeI, alpha 2	K198, K264, K738, K747	
dentin sialophosphoprotein	K324	C8
FK506 binding protein 10, 65 kDa		C167
peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)		C202
Apert syndrome		
dystrophin	K487, K1072, K1116, K1204, K1237, K1516, K1708, K1713, K1721, K1808, K1848, K2033, K2589, K2602, K2852	C10, C650, C873, C1040, C1892, C3153
interferon, gamma	K60, K97	
tuberous sclerosis 1	K421, K1118	C1000
tuberous sclerosis 2	K698, K1111, K1165	C329, C519, C1026
noggin		C4

Crouzon syndrome

establishment of cohesion 1 homolog 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	K424	
fibroblast growth factor receptor 1	K160	C101,C603,C725
fibroblast growth factor receptor 2	K161,K199	C606,C728
fibroblast growth factor receptor 3	K464	C11,C109,C597,C719

Cleidocranial dysplasia

msh homeobox 2	K105	
runt-related transcription factor 2		C13

Mandibulofacial dysostosis

Treacher Collins-Franceschetti syndrome 1	K126,K600,K755,K758, K1414,K1439	C644,C1012
--	-------------------------------------	------------

Anodontia

paired box 9		C52
inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma		C162,C232

CLP

PHD finger protein 8	K297,K977	
SATB homeobox 2	K175,K744	
interferon regulatory factor 6		C327
midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	K564	C33,C142,C305,C375
methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)	K414,K468,K544,K584	
5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	K902	C120,C400

poliovirus receptor-related 1 (herpesvirus entry mediator C)	K190	
SIX homeobox 3	K236	
bone morphogenetic protein 4		C450
transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha)	K10	C243
wingless-type MMTV integration site family, member 7A	K197	
tumor protein p63	K676	C8,C312
β 1,3-galactosyltransferase-like protein	K33,K37,K103,K205, K218	
empty spiracles homeobox 2		C9
epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	K52	
eyes absent homolog 1 (Drosophila)	K43,K147,K460	C495,C537
fibroblast growth factor 8 (androgen-induced)	K163	
forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	K19	
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4	K158	C205,C930,C1179,C20 66,C2150
gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, β 3		C24
Anosmin-1	K550	
TGFBIR		C71
chromodomain helicase DNA binding protein 7	K662,K812,K928,K11 70,K1201,K1457,K15 69,K1865,K2204,K22 15,K2388,K2722	C1716
retinoblastoma 1	K202,K462,K537,K74 5,K925,K928	C553
sonic hedgehog	K87,K186	
bone morphogenetic protein receptor, type IA	K102,K531	C67,C492
cullin 4B	K55,K536,K634,K733 ,K740	
zinc finger E-box binding homeobox 2		C539,C1081
cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	K96,K482	C215
SMAD4	K159	C443

Hypohidrotic ectodermal dysplasia

EDAR-associated death domain	K53,K205	
inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma	K264,K277,K285	C131,C347,C417

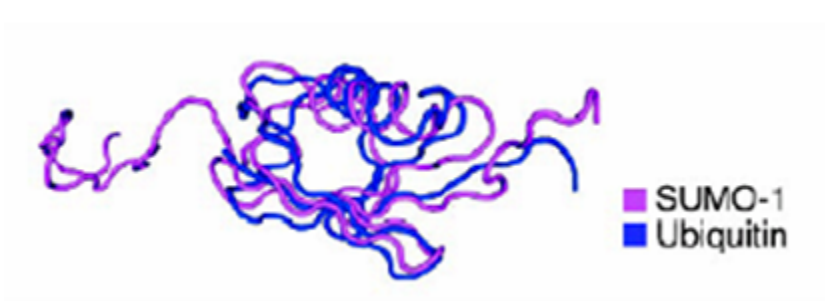
[표 2] GPS-SNO 및 SUMOsp 로 예측한 modification site

4. 고찰

4-1. SUMOylation

SUMO (Small Ubiquitin-like modifier) (그림 1) 는 그 이름이 의미하는 것처럼 ubiquitin 과 구조가 매우 유사한 12kDa 의 크기의 작은 단백질이다.¹⁸ Ubiquitin 과 마찬가지로 특정 lysine 잔기에 부착한다는 점은 같으나, ubiquitin 은 단백질의 분해를 촉진하는 반면, SUMOylation 은 단백질의 기능에 변화를 가져온다. 즉 특정 단백질이 SUMOylation 되면 나타나게 되는 변화는 크게 3가지로 요약할 수 있다. 첫째로 단백질의 원래의 binding site 를 가리게 되어 단백질과 기질과의 결합이 차단된다. 둘째로 단백질과 SUMO 와의 결합으로 새로운 기질과의 결합이 가능하게 된다. 셋째로 SUMO 와의 결합으로 단백질의 구조가 변화하게 된다.⁴ SUMOylation 되는 단백질은 주로 전사인자¹⁹, chromosome remodeling²⁰, DNA repair enzyme²¹, 신호전달 과정²² 등 세포의 분열과 성장에 매우 중요한 부분을 담당하는 부분들이다. 또한 최근의 연구에 의하면 SUMOylation 은 암²³, Huntington's disease

와 같은 퇴행성 신경질환²⁴ 및 심장질환²⁵ 과도 관련이 있다고 알려져 있다.



[그림 1] SUMO-1 과 Ubiquitin 의 3차구조

4-2. S-Nitrosylation

S-nitrosylation 은 1992 년 albumin 에서 최초로 보고되었다.²⁶ 특정 cysteine 잔기의 thiol group 에 nitric oxide 를 공유결합적으로 연결시키는 과정으로 이 과정을 통해 세포의 활성을 변화시키게 된다. 현재 다양한 종류의 S-nitrosylation 된 단백질들이 보고되고 있다. G protein-coupled receptor, ion channel, protein kinase, cytokine receptor 등 신호 전달과 관련한 단백질들이 상당 부분을 차지하고 있다.²⁷⁻²⁹ S-nitrosylation 은 또한 다수의 질병과 연관되어 있음이 보고되고 있다. 이들 중에는 근육 질환, 심장 및 폐질환, 퇴행성 신경질환, 그리고 암등이 관련되어 있다.³⁰⁻³⁵

4-3. 구강악안면 기형과의 관계

프로그램으로 수식이 일어날 것으로 예측되는 단백질 중 실제로 SUMOylation 혹은 S-nitrosylation 이 일어남을 실험적으로 확인한 몇 가지 사례가 있다.

4-3-1. SMAD4

SMAD4 는 TGF- β signaling에 관여하는 단백질이다. TGF- β 와 이와 관련된 유전자들은 세포의 분열과 분화에 결정적인 영향을 미치는 인자들로 알려져 있고 이들은 또한 구개의 발생과도 밀접한 관련이 있다.³⁶ TGF- β 로부터 촉발된 신호는 하류의 일련의 단백질들의 상호작용을 통해 유전자 발현을 변화시키게 되는데, 이들 중 SMAD 는 이 과정을 매개하는데 있어서 매우 중요하다.³⁷ Lee 와 동료들은 SMAD4 의 113번과 159번의 lysine 잔기에 SUMOylation이 일어남을 실험적으로 확인했고, 이들이 modification 됨으로써 SMAD4 단백질이 핵 내로 위치를 옮겨 그 안에 있는 전사인자들과 상호작용하여 유전자 발현을 조절할 수 있음을 보여주었다.³⁸

4-3-2. DLX3

DLX3 는 Homeodomain transcription factor 로서 초파리의 Distal-less 단백질과 연관관계가 있다. 이 단백질은 전사 촉진자로 기능하여 피부 부위의 발생 관련 유전자들의 발현을 촉진시킨다. DLX3 유전자의 돌연변이는 인간의 경우 선천성 발육 장애를 일으킨다고 보고되어 있는데 구강악안면 부위에서는 Tricho-dentoosseous syndrome 및 taurodontia, 그리고 amelogenesis imperfecta 와도 관련되어 있다고 보고되었다.³⁹ Duverger 와 그의 동료들은 112번 자리의 lysine 잔기가

SUMOylation 됨을 하였으며 SUMOylation 이 DLX3 의 전사인자로서의 활성을 증가시킴을 발견했다.⁴⁰

4-3-3. Msx-1

Msx-1 은 Msx transcription factor 의 일원으로 다른 homeoprotein 들과 핵심 전사인자들과 상호작용하여 유전자의 발현을 억제한다.^{41,42} Msx-1 의 돌연변이는 무치증이나 구개열과 연관이 있음이 보고되었다,⁴¹ Gupta 와 동료들은 MSX-1 단백질의 9번과 127번 lysine 잔기에 SUMO-1 으로 modification 됨을 in vivo 에서 확인하였다.⁴² MSX-1 단백질은 단백질-단백질간 상호작용으로 전사를 억제하며, SUMO-1 의 haploinsufficiency 가 구개열을 일으키고 Pax9 과 Eya1 같이 구개 형성에 중요한 단백질들 역시 SUMOylation 된다는 것을 상기해본다면, 구개 발생과 관련한 악안면부 발생 과정에 관여하는 단백질의 SUMOylation에 대한 연구가 추가적으로 수행되어야 할 것이다.⁴³

4-4. 전망

본 연구에서 예측된 modification site 중 실제로 그 부분에 발생한 점 돌연변이가 기형과 연관이 있음을 보여준 사례가 있다. IKK β 라는 유전자가 바로 그것인데, 이 유전자가 암호화하는 단백질은 I κ B kinase complex의 구성요소인 NF- κ B essential modulator (이하 NEMO) 로 더 잘 알려져 있다. I κ B kinase complex 는 NF- κ B의 nuclear translocation 을 잡아두고 있는 I κ B 를 인산화시켜 염증 반응을 촉진한다.⁴⁴ I κ B kinase complex의 3가지 subunit 중 하나인 NEMO 는 자체적인 효소 활성은 없으나

다양한 단백질과 상호작용하여 I κ B kinase complex의 활성을 조절한다.⁴⁵ I κ BKG 유전자의 돌연변이는 색소실조증⁴⁶, 제한성 외배엽 이형성증과⁴⁷ 관련되어 있음이 보고되어 있다. 417 번 cysteine 이 Phe 로 치환된 돌연변이가 제한성 외배엽 이형성증과 관련이 있으며 Cordier 와 동료들은 417 번 아미노산 잔기는 zinc finger motif 의 일부이고 417 번의 cys to phe 의 치환은 zinc finger motif 의 전반적인 골격에는 큰 영향을 주지는 않지만 점 돌연변이 결과 motif 내부의 아미노산 잔기들 간의 수소 결합을 약화시켜 열역학적인 구조적인 변동의 폭이 늘어남을 확인했다.⁴⁸ 그러나 이번 예측 결과를 보면 또 다른 가능성을 제시한다. Zinc finger motif 의 cysteine 은 histidine 과 함께 zinc²⁺ 와 배위결합을 이뤄 finger 구조의 안정성을 유지하는 데 있어 매우 중요한 부분이다. 본 연구에서 417번 cysteine 잔기는 S-nitrosylation 이 일어나는 이미 알려진 아미노산 서열과 상당히 유사한 서열을 보유하고 있어 S-nitrosylation 이 일어날 확률이 높다는 것을 확인했으며, nitric oxide 는 염증반응을 매개하는 NF- κ B 를 억제하여 항염 효과를 보임은 이미 알려져 있다.³² 또한 zinc finger motif 를 보유하고 있는 전사인자들 (Sp1, EGR-1 VDR, RXR)이 NO 의해 zinc finger 구조가 가역적으로 변형되어 DNA와의 binding이 저해된다는 것을 볼 때⁴⁹ NEMO역시 S-nitrosylation 에 의해 zinc finger 에 가역적인 구조 변화를 일으켜 NF- κ B pathway 와 관련된 인자들과의 상호 작용의 양상을 조절할 수 있다는 가능성을 제시할 수 있다. 이 부분을 암호화하는 코돈의 점 돌연변이가 일어나면 위와 같은 번역 후 수식 과정이 일어날 수 없으므로 신호전달 과정에 관여하는 인자들과 정상적인 상호작용을 할 수 없을 것이다. 결국 NEMO 의 zinc finger motif 의 S-nitrosylation 은 NEMO와 다른 관련 인자들 간의 상호작용을 조절하는 또 다른 메커니즘일 수 있다는 것을 시사하며, 항염과정에 관여하는 zinc finger motif

를 보유하는 Sp1 과 같은 전사인자들이 nitric oxide 에 의해 그 활성이 변한다는 점을 상기하면 그 가능성은 충분할 것이다.

조사 결과 상당한 비율의 단백질들이 적어도 한 곳 이상에서 SUMOylation 이나 S-nitrosylation 됨이 확인되었다. 다양한 종류의 단백질이 modification 되었지만 발생 과정의 cell signaling이나 cell cycle 에 관여하는 단백질들의 비중이 적지 않다는 점은 주목해 볼 만하다.

세포의 신호 전달은 주로 protein kinase 와 phosphatase, 그리고 단백질과 단백질 간의 상호작용에 의해 이루어진다고 알려져 있지만 최근 연구에서는 인산화 및 그 외의 post-translational modification 에 관여하는 여러 효소들이 S-nitrosylation 되어 이들의 활성이 향진되거나 억제된다는 사실이 밝혀지고 있다.⁵⁰

<u>변역 후 수식 과정</u>	<u>S-nitrosylated protein</u>	<u>효과</u>
인산화	ASK1	anti-apoptotic
	JNK	anti-apoptotic
	CDK5	수상돌기 발생 조절
	Akt	인슐린 신호 전달 억제
	GRK2	β2-AR 탈감작화 억제
	PKC	평활근 수축 억제
	EGFR	EGF 신호전달 억제
	PTEN	Akt 신호전달 촉진
아세틸화	HDAC2	전사 촉진
	SIRT1	전사 조절
	GAPDH	히스톤 아세틸화
메틸화	GAPDH	히스톤 메틸화 억제
Palmitoylation	GAP-43, SNAP-25	신경 성장 방추의 성장 조절
	Ha-Ras	GTP binding 감소, ERK1/2 활성화
	Caveolin	palmitoylation 억제
유비퀴틴화	Parkin (E3 ligase)	퇴행성 신경질환

	XIAP (E3 ligase)	caspase 분해 억제
	Bcl-2 (substrate)	anti-apoptotic
SUMOylation	Pias3 (SUMO E3 ligase)	SUMOylation 억제

[표 3] S-nitrosylation 에 의해 조절되는 번역 후 수식과정

번역 후 수식과정은 합성의 조절과 함께 단백질의 활성을 조절하는 중요한 조절기전이며 이들의 조절 과정이 질병과 밀접한 관련이 있다는 정황적인 근거가 많이 제시되고 있다. 예를 들어 S-nitrosylation 의 경우 대표적인 oncoprotein 인 Ras 의 118번 cysteine 잔기의 S-nitrosylation 이 종양의 성장을 개시하고 유지하는데 중요함을 mouse model 에서 실제로 확인하였고⁵¹ Cho 와 동료들은 Drp -1 단백질의 644번 cysteine 잔기의 S-nitrosylation 이 신경세포의 미토콘드리아의 분열을 유도하고 이것이 결국 신경세포의 손상을 가져온다는 점을 보여주었다. 반면 644번 cysteine 잔기를 alanine으로 치환하였을 경우 이와 같은 신경독성 효과는 크게 감소함 또한 보여주었다.⁵² 세포 내의 생화학 반응은 복잡하며 상호 연관되어 있고 기능이 중복되어 있는 경우가 많아 단일 염기 서열의 치환만으로는 질병과 같이 눈에 띄는 변화를 관찰하는 것은 매우 어려운 일임에도 불구하고 이와 같은 결과들이 관찰된다는 것은 세포 신호 전달 내에서 번역 후 수식 과정이 매우 중요하다는 점을 시사한다.

비록 구강악안면부 영역에서는 이와 같이 수식과정의 변화와 질병 사이의 직접적인 인과관계를 보여준 보고는 없지만, 발생 과정은 기본적으로 수많은 signal cascade 로 이루어진 여러 단계를 거치는 복잡한 과정이므로 특정 점 돌연변이와 발육 이상 사이의 직접적인 상관관계를 기대하는 것은 무지에 기인한 기대일 것이다. TGF- β pathway 와 같이 이미 잘 알려진 pathway 도 그 세포 및 주변 환경의 상태, 즉 context 에 의해서 똑같은 자극이 정 반대의

반응을 이끌어내기도 한다.⁵³ 발생과 같이 복잡한 과정을 매개하는 신호전달 과정은 단순히 인산화의 연쇄에 의한 일방향이 아닌 다른 종류의 수식과정과 복잡하게 연결되어 있는 그물망과 같은 형태로 이해해야 할 것이다. 이를 이해하는 데 있어서 S-nitrosylation 과 SUMOylation 이 어떻게 기여하는지를 알아보는 것은 충분히 매력적인 주제이며, 이를 통해 발육 이상과 관련된 복잡한 생명 현상을 좀 더 잘 이해할 수 있으리라 기대한다.

참고문헌

1. Crick, F.H.C. On Protein Synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol. XII.* (1958) 139-163.
2. Baltimore, D. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature.* **226**, (1970) 1209 - 1211.
3. Prusiner, S.B. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, (1998) 13363 - 83.
4. Wilkinsin. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J.* **428**, (2012) 133 - 145
5. Anand, P. & Stamler, J.S. Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. *J. Mol. Med.* **90**, (2012) 233 - 244.
6. Zhang, Y.Q., Sarge, K.D. Sumoylation regulates lamin A function and is lost in lamin A mutants associated with familial cardiomyopathies. *J. Cell Biol.* **182**, (2008) 35 - 39.
7. Orr, H.T., Zoghbi, H.Y. Trinucleotide repeat disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* **30**, (2007) 575 - 621.
8. Kim, K.I., Baek, S.H. SUMOylation code in cancer development and metastasis. *Mol. Cell.* **2**, (2006) 247 - 253.
9. Xue, Y. *et al.* a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic Acids Res.* **33**, (2005) W184 - W187.
10. Kahraman, A. *et al.* PhenomicDB: a multi-species genotype/phenotype database for comparative phenomics. *BIOINFORMATICS.* **21**, (2005) 418 - 420.
11. Lee, S.W. *et al.* Sumoylation of Smad4, the Common Smad Mediator of Transforming Growth Factor- β Family Signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, (2003) 27853-27863.
12. Duverger, O. *et al.* SUMOylation of DLX3 by SUMO1 promotes its transcriptional activity. *J Cell Biochem.* **112**, (2011) 445-462.

13. Netherton, S. J. et al. Suppression of TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition like phenotype by a PIAS1 regulated sumoylation pathway in NMuMG epithelial cells. *PLoS ONE*. **5**, (2010) 1-15.
14. Gupta, V. & Bei, M. Modification of Msx1 by SUMO-1. *Biochem Biophys Res Commun*. **345**, (2006) 74 - 77.
15. Kang, J.S. et al. The type I TGF- β receptor is covalently modified and regulated by sumoylation. *Nat. Cell Biol.* **10**, (2008) 654-668.
16. Malik, M. et al. S-nitrosylation regulates nuclear translocation of chloride intracellular channel protein CLIC4. *J. Biol. Chem.* **285**, (2010) 23818-23828.
17. Benhar, M. et al. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **10**, (2009) 721-732.
18. Shen, Z. et al. UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics*. **36**, (1996) 271 - 279.
19. Ungureanu, D. et al. PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood*. **102**, (2003) 3311-3313.
20. Hari, K.L. et al. The Drosophila Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev*. **15**, (2011) 1334-1348.
21. Hardeland, U. et al. Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *EMBO J.* **21**, (2002) 1456-1464.
22. Desterro, J.M. et al. SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol. Cell*. **2**, (1998) 233-239.
23. Seeler, J.S. et al. SUMO, the three Rs and cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **313**, (2007) 49 - 71.
24. Walker, F.O. Huntington's disease. *Lancet*. **369**, (2007) 218 - 228.
25. Capell, B.C., Collins, F.S. Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat.Rev. Genet.* **7**, (2006) 940 - 952.
26. Stamler, J.S. et al. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, (1992) 444-448.

27. Hess, D. T. et al. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, (2005) 150 - 166.
28. Jaffrey, S. R. et al. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature Cell Biol.* **3**, (2001) 193 - 197.
29. Lane, P. et al. S-Nitrosylation is emerging as a specific and fundamental posttranslational protein modification: head-to-head comparison with O-phosphorylation. *Sci. STKE.* **86**, (2001) RE1.
30. Durham, W. J. et al. RyR1 S-nitrosylation underlies environmental heat stroke and sudden death in Y522S RyR1 knockin mice. *Cell* **133**, (2008) 53 - 65.
31. Bellinger, A. M. et al. Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nature Med.* **15**, (2009) 325 - 330.
32. Foster, M. W. et al. S-Nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol. Med.* **15**, (2009) 391 - 404.
33. Hare, J. M. & Stamler, J. S. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J. Clin. Invest.* **115**, (2005) 509 - 517.
34. Lim, K. H. et al. Tumour maintenance is mediated by eNOS. *Nature.* **452**, (2008) 646 - 649.
35. Uehara, T. et al. S-Nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature.* **441**, (2006) 513 - 517.
36. Zavadil, J. et al. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene.* **24**, (2005) 5764-5774.
37. Attisano, L., and Wrana, J. L. Signal transduction by the TGF- β superfamily. *Science.* **296**, (2002) 1646 - 164.
38. Lee, S.W. et al. Sumoylation of Smad4, the Common Smad Mediator of Transforming Growth Factor- β Family Signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, (2003) 27853-27863.
39. Dong, J. et al. DLX3 Mutation Associated With Autosomal Dominant Amelogenesis Imperfecta With Taurodontism. *Am J Med Genet A.* **133**, (2005) 138-141.
40. Duverger, O. SUMOylation of DLX3 by SUMO1 promotes its transcriptional activity. *J. Cell. Biochem.* **112**, (2011) 445-452.

41. Gill, G. Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, (2003) 108-113.
42. Gupta, V. and Bei, M. Modification of Msx1 by SUMO-1. *Biochem Biophys Res Commun.* **345**, (2006) 74-77.
43. Alkuraya, F. et al. SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate. *Science.* **313**, (2006) 1751.
44. Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci. STKE* 2006 (357)
45. Rothwarf D.M. et al. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature* **395**, (1998) 297 - 300.
46. Aradhya S. et al. A recurrent deletion in the ubiquitously expressed NEMO (IKK-gamma) gene accounts for the vast majority of incontinentia pigmenti mutations. *Hum. Mol. Genet.* **10**, (2001) 2171 - 2179.
47. Zonana, J. et al. A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO). *Am. J. Hum. Genet.* **67**, (2000) 1555-1562.
48. Cordier F et al. Solution structure of NEMO zinc finger and impact of an anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency-related point mutation. *J Mol. Biol.* (2008) **377**, 1419-1432.
49. Martinez-Ruiz A. et al. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovascular Research* **62**, (2004) 43-52.
50. Hess, D.T. and Stamler, J.S. Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J. Biol. Chem.* **287**, (2012) 4411-4418.
51. Lim, K.H. et al. Tumor maintenance is mediated by eNOS. *Nature.* **452**, (2008) 646-649.
52. Cho, D.H. et al. S-nitrosylation of Drp1 mediates β -amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science.* **324**, (2009) 102-105.
53. Massagué, J. TGF- β signaling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, (2012) 616-630.

Abstract

Bioinformatical studies in
relationship between causative
mutations of maxillofacial
developmental anomalies and
post-translational modifications
of its protein

Roh, Eunkwang

Department of Dentistry

School of Dentistry

Seoul National University

Life process is maintained by complex, intertwined biochemical reactions. The key player is a protein, whose structure and function is modulated by various regulatory mechanisms, such as post-translational modification, changing protein's function and its interaction with other components.

Post-translational modification includes: phosphorylation, glycosylation, palmitoylation, isomerization, alkylation, acetylation,

etc. These processes are related to cell proliferation and survival and have important implications for drug development.

Among these modifications, S-nitrosylation and SUMOylation - attachment of nitric oxide group and SUMO protein, respectively, received little attention despite of its clinical importance due to methodological hurdle. And scarce reports regarding to its relationship with maxillofacial developmental anomalies are available.

Here we present the new insights regarding to maxillofacial developmental anomalies in light of post-translational modification - S-nitrosylation and SUMOylation.

In this study, we predicted potential S-nitrosylation and SUMOylation site of proteins known involved in maxillofacial anomalies *in silico*. We choose 9 representative anomalies: amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta, anodontia, Apert syndrome, Crouzon syndrome, cleiocranial dysplasia, Treacher-Collins syndrome, ectodermal dysplasia, and cleft palate.

Total 93 related genes were searched and selected from phenomicDB and its amino acid sequence is retrieved from Uniprot. Then we predicted possible SNO and SUMO modification site using GPS-SNO and SUMO-sp software, respectively. As a result, 63 out 92 proteins confirmed to have at least one modification site. These include Msx-1, DLX3, and SMAD4 which are integral part of developmental pathway and their modification site verified experimentally.

This shows the possibility that S-nitrosylation and SUMOylation can provide important clues to understand the process of organogenesis in maxillofacial area.

Keywords: Post-translational modification, S-nitrosylation,
SUMOylation, bioinformatics

Student number; 2009-22674