

Go α 의 과잉발현에 의한 신경돌기의 성장억제

길성호, 김범준, 이영돈, 서해영

아주대학교 의과대학 해부학교실

〈 초 록 〉

G-단백질은 신경전달물질과 호르몬에 의해서 생성되는 세포신호전달을 중개하는 단백질중의 하나로 잘 알려져 있다. 그 중 Go는 뇌조직에 많은 양이 존재하지만, 그 정확한 기능에 대해서는 아직까지 잘 알려지지 않고 있다. 특히 Go는 신경세포의 성장원추(growth cone)의 세포막에서 많이 발현되기 때문에 Go의 활성화는 신경축삭의 성장조절에 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

본 연구에서는 신경축삭의 성장과정에서 Go의 역할을 규명하고자 Go 단백질의 α 소단위체(α)를 신경모세포종 세포주의 하나인 F11 세포에 과잉발현시킨 후 dibutyryl cAMP로 세포분화를 유도하였을 때 α 가 신경돌기(neurite)의 성장에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

F11세포에 대한 dibutyryl cAMP의 분화유도 효과를 신경돌기의 길이측정을 통해 조사한 결과, 신경돌기의 길이는 dibutyryl cAMP의 농도가 0.1 mM에 이를 때까지 급격히 증가하다가 이후 완만한 증가양상을 보였으며 0.5 mM의 농도에 이르면 세포의 분화가 완전히 일어나 전형적인 신경세포의 특징을 나타내었다. α 가 과잉발현된 F11세포에서 분화유도에 의해 형성된 신경돌기의 길이는 $38.9 \pm 12.5 \mu\text{m}$ 로 대조군의 $172.3 \pm 25.9 \mu\text{m}$ 에 비해 77.4% 감소한 반면 세포당 형성된 신경돌기의 수는 5.6 ± 0.4 개로 대조군의 2.5 ± 0.2 개에 비해 2.2배 증가하였다.

이러한 결과는 α 가 신경세포의 분화과정에 있어서 축삭의 지속적인 성장을 억제하는 단계에 관여할 가능성이 높음을 보여주었다.

찾아보기 낱말 : F11 세포, 신경돌기, cAMP, G-단백질

서 론

G-단백질은 α , β , γ 의 3개의 소단위체로 구성되어 있다. 이중 소단위체는 현재까지 16종류가 알려져 있으며(Birnbaumer, 1992), 이들은 모두 동일한 $\beta\gamma$ 복합체와 결합한다. 호르몬이나 신경전달물질이 G-단백질과 연결된 수용체와 결합하면, G-단백질의 α 소단위체는 $\beta\gamma$ 로부터 떨어져 나와 adenylyl cyclase나 phospholipase C 활성화에 영향을 주어 세포내 2차 신호전달 물질(secondary messenger)의 양을 변화시킨다. 뇌조직에 매우 풍부한 것으로 알려진 Go는 다른 종류의 G-단백질과는 달리, 이와 연관된 2차 신호전달물질이 아직 밝혀지지 않은 상태이며, 세포내에서 어떠한 기능을 갖고 있는지도 분명하지 않다. 다만 Go는 Gi와 마찬가지로 PTX(pertussis toxin)에 대해 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다(Birnbaumer 등, 1991). 즉, 신경세포에 있어서 신경전달물질이 해당 수용체와 결합하면 세포막의 이온투과성이 변하게 되며 이는 PTX에 의해 억제되므로 이러한 과정이 Go에 의해 조절될 것으로 예상하고 있을 뿐이다(Moises 등, 1994).

G-단백질은 동일한 $\beta\gamma$ 를 공유하고 있기 때문에 수용체와 G-단백질의 상호작용에 특이성을 부여하는 것은 α 라고 할 수 있다. 그러나 최근에 α 뿐만 아니라 $\beta\gamma$ 에 의해서도 세포내 신호전달과정이 활성화된다는 보고가 있어(Clapham, 1996) G-단백질이 이중적인 작용방식을 가지고 있을 것으로 예상된다. 즉 α 를 활성화시키는데 필요한 농도보다 훨씬 높은 농도의 리간드가 존재하게 되면 G-단백질로부터 유리되어 나온 $\beta\gamma$ 는 phospholipase C나 adenylyl cyclase를 활성화시킬 수 있다. Phospholipase C는 phospholipid를 1,4,5-inositol triphosphate와 diacylglycerol로 분해하는데 이들은 세포내에서 2차 신호물질로 작용하여 미토콘드리아 및 세포질세망에 저장되어 있는 칼슘을 세포질로 분비하게 함으로써 protein kinase C 등을 활성화시킨다. 또한 adenylyl cyclase가 활성화 되면 세포내의 cAMP의 농도가 증가하며 이는 결과적으로 protein kinase A를 활성화시킨다. 아직 신경세포에서는 확인되지 않았지만 $\beta\gamma$ 는 ras의 GTP 치환인자인 sos를 활성화시킴으로써 ras를 활성화시키고 이는 다시 MAPK(mitogen activated protein kinase)를 활성화시킨다는 보고도 있다(Lopez-

Ilasaca 등, 1997). 신경전달물질이 신경영양인자로서 작용한다는 점이 알려지면서 opioid, carbacol 등과 같은 신경전달물질이 metabotropic receptor와 결합하면 Go가 활성화된다는 사실이 전기생리학적 연구를 통해 보고된 바 있는데 (Kleuss 등, 1991) 이러한 결과는 Go가 신경축삭의 성장을 조절할 것이라는 가능성을 간접적으로 보여주는 것이다. 또한 Go를 중심으로 하는 신호전달경로 사이의 상호작용(cross talk)에 관한 연구는 신경축삭의 성장에 있어서 성장원추(growth cone)의 형성과 이동을 이해하는데 중요할 것으로 생각된다.

본 연구는 신경축삭의 형성과 성장에 관여하는 신호전달경로를 밝히기 위한 기본실험으로서 Go 단백질의 α 소단위체(Go α)를 F11세포에 인위적으로 과잉발현시켰을 경우, cAMP에 의해 F11세포가 신경세포로 분화되는 과정에서 신경돌기(neurite)의 형성이 어떠한 영향을 받는지를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용한 세포는 F11 세포로서 뒤뿌리신경절세포와 신경모세포종인 N18TG-2 세포를 융합시켜 얻은 것이다. 세포배양에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 0.25% trypsin-EDTA는 Gibco-BRL (Grand Island, N.Y, USA), fetal bovine serum (FBS)은 HyClone (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. α 발현에 사용한 벡터는 pRC/CMV (Invitrogen, De Schelp, Netherlands)에 α 의 cDNA를 연결한 것으로 (pRC/CMV- α) 미국 Mount Sinai 의과대학의 Iyengar 박사로부터 제공받았다 (Kroll 등, 1992). pEGFP는 Clontech (Palo Alto, CA, USA), FuGENE6 transfection kit는 Boehringer Mannheim(Mannheim, Germany), N⁶, 2'-o-Dibutyryladenine 3', 5'-cyclic monophosphate (dibutyryl cAMP)는 Sigma (St. Louis, MO, USA), anti-Go α 단세포군 항체는 NEN (Boston, MA, USA), 그리고 Texas red가 부착된 anti-mouse IgG와 avidin biotin-peroxidase complex (ABC)는 Vector (Burlingame, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 연구방법

1) F11세포의 배양 및 분화 유도

F11세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS와 100 units/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM에서 배양하였으며, 3, 4일에 한번씩 Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 씻어낸 후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 사용하여 세포를 배양용기의 바닥으로부터 분리시킨 다음 계대배양 하였다. F11세포를 신경세포로 분화시키기 위해서는 1% FBS가 포함된 DMEM에 dibutyryl cAMP를 농도를 달리하여 첨가하였다.

2) F11세포에서 α 의 발현

F11세포의 수를 4×10^4 이 되도록 35 mm 배양용기에 분주하고 18~24시간 후에 혈청이 들어있지 않은 DMEM 97 μ l에 FuGENE6 transfection reagent 3 μ l와 DNA를 혼합하여 5분간 상온에서 방치한 후 세포가 있는 배양용기에 혼합하여 transfection을 시행하였다. 이때 α 가 transfection된 세포를 확인하기 위해 α 발현벡터와 함께 표지물질로서 green fluorescence protein (GFP)을 발현하는 pEGFP를 3:1의 농도비율로 동시에 transfection시켰다. 다음날 HBSS로 세포를 세척한 후, dibutyryl cAMP를 처리하여 세포의 분화를 유도한 후 형광현미경하에서 관찰하였다.

3) 신경돌기 성장의 측정

신경돌기의 길이를 측정하기 위해서는 GFP를 발현하는 세포를 형광현미경으로 확인하고 현미경상을 Quanticell software (Applied Imaging International, Sunderland, U.K)를 이용하여 컴퓨터에 입력시킨 후 Designer 4.0 software를 이용하여 각각의 세포에서 가장 긴 신경돌기의 길이를 측정하였다. 신경돌기의 수의 측정을 위해서는 형광현미경법 대신 anti- α 항체를 이용한 ABC 면역염색을 시행하였고 여기에서 얻어진 현미경상을 위와 동일한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 분석하였다.

4) α 의 면역조직화학염색

슬라이드 위에서 배양된 세포를 0.05 M phosphate-buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4; PBS)로 세척하고 4% paraformaldehyde로 고정된 후 10% normal goat serum을 30분간 처리하여 항체의 비특이적인 반응을 제거하였다. Anti- α 항체를 1:250으로 희석하여 4°C에서 12~16시간 반응시키고 PBS로 3번 세척한 다음 이차항체로서 1:250으로 희석한 biotinylated anti-mouse IgG를 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 세포를 PBS로 세척한 다음 상온에서 30분간 ABC 희석액으로 처리하고 0.05% diaminobenzidine과 0.003% H₂O₂로 3~8분간 발색시켰다. α 에 대한 면역형광염색은 세포를 일차항체로 처리한 후 이차항체로서 Texas-red가 부착된 anti-mouse IgG를 1:150으로 희석하여 사용하였다.

결 과

1. Dibutyryl cAMP에 의한 F11세포의 분화유도

본 연구에서는 F11세포의 분화를 유도하기 위하여 cAMP의 유사물질인 dibutyryl cAMP를 사용하였는데 이는 cAMP와는 달리 세포내 침투가 용이하고, 세포질에서 분해가 잘 되지 않는 장점을 갖고 있다. Dibutyryl cAMP가 세포분화에 미치는 효과와 분화유도에 적합한 dibutyryl cAMP의 농도를 결정하기 위해 배양액내 dibutyryl cAMP의 농도를 변화시키면

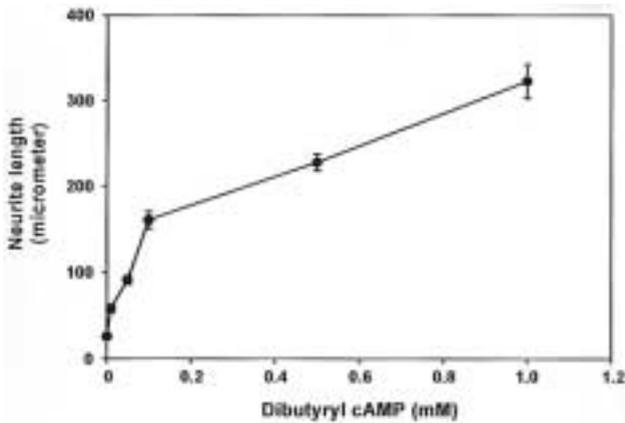


Fig. 1. Effect of dibutyryl cAMP on neurite outgrowth of F11 cells.

서 세포에서 형성되는 신경돌기 길이를 측정, 비교하였다(Fig. 1). Dibutyryl cAMP를 처리하지 않았을 경우 신경돌기는 거의 형성되지 않았고(Fig. 2A) 신경돌기의 길이는 dibutyryl cAMP의 농도가 0.1mM에 이를 때까지 급격히 증가하다가 이후 완만하게 증가하는 양상을 나타내었다. 0.5 mM의 dibutyryl cAMP 농도에서 세포분화는 거의 완전히 일어나 전형적인 신경세포의 특징을 나타내었다(Fig. 2B). 이 결과를 토대로 본 실험에서는 0.5 mM 농도의 dibutyryl cAMP를 사용하여 F11세포의 분화를 유도하였다.

2. αo 의 발현이 F11세포의 분화에 미치는 영향

F11세포에서 αo 발현벡터의 transfection이 올바르게 이루어졌는지를 확인하기 위해 αo 발현벡터(pRC/CMV- αo)와 함께 transfection marker로서 GFP를 발현하는 벡터(pEGFP)를 동시에 transfection 시켰다. 본 실험에서는 pEGFP와 pRC/CMV- αo 를 1:3의 비율로 사용하였는데 이는 pEGFP의 농도가 pRC/CMV- αo 보다 훨씬 낮은 조건이라야 GFP를 발현하는 모든 세포가 αo 를 발현할 가능성이 높아지기 때문이다.

이러한 조건으로 transfection한 후, αo 에 대한 항체를 사용하여 면역형광염색을 시행한 결과, GFP에 의해 녹색의 형광을 띠고 있는 세포들은 αo 를 함께 발현하고 있음을 확인하였다(Fig. 3A, B).

αo 의 발현이 세포의 분화과정에서 신경돌기의 형성에 미치는 영향을 조사하기 위해 pEGFP와 pRC/CMV- αo 가 transfection된 세포를 0.5 mM dibutyryl cAMP로 처리하고 4일 후 형광현미경으로 관찰하였다. pEGFP만을 transfection하고 분화를 유도했을 경우 세포들의 신경돌기는 매우 길게 형성되었지만(Fig. 4A) pEGFP와 pRC/CMV- αo 를 동시에 transfection시키고 분화를 유도했을 경우는 신경돌기 형성이 뚜렷하지 않았다(Fig. 4B). 또한 F11세포의 분화에 따른 신경돌기 형성을 ABC 방법을 이용한 면역세포화학적 염색을 통해 관찰한 결과, αo 를 transfection하지 않은 대조군의 세포에서는 세포당 2~3개의 신경돌기가 길게 형성되었으나(Fig. 5A), αo 를 transfection한 세포에서는 신경돌기가 매우 짧아진 반면 돌기의 수는 증가한 양상을 나타내었다(Fig. 5B). 이러한 차이를 정량적으로 측정한 결과, αo 가 발현된 세포의 신경돌기 길이는 $38.9 \pm 12.5 \mu\text{m}$ 로 대조군 세포의 $172.3 \pm 25.9 \mu\text{m}$ 에 비해 77.4%의 감소를 보였으며, 신경돌기의 수는 αo 가 발현된 세포의 경우는 5.6 ± 0.4 개로 대조군 세포의 2.5 ± 0.2 개에 비해 2.2배 증가하였다(Fig. 6).

고 찰

Go는 뇌조직에 상당량 존재하는 G-단백질로서 신경세포 분화과정에서 축삭의 형성과 성장에 관여하는 것으로 알려져 왔다(Strittmatter 등, 1990). 본 실험은 축삭의 형성과정에 있어서 Go에 의한 신호전달경로를 연구하기 위한 일차적 실험으로 배양신경세포에서 $\text{Go}\alpha$ 의 과발현이 신경돌기(neurite)의 형성에 미치는 영향을 조사하였다.

본 연구에 사용된 F11세포는 뒤뿌리신경절과 신경모세포

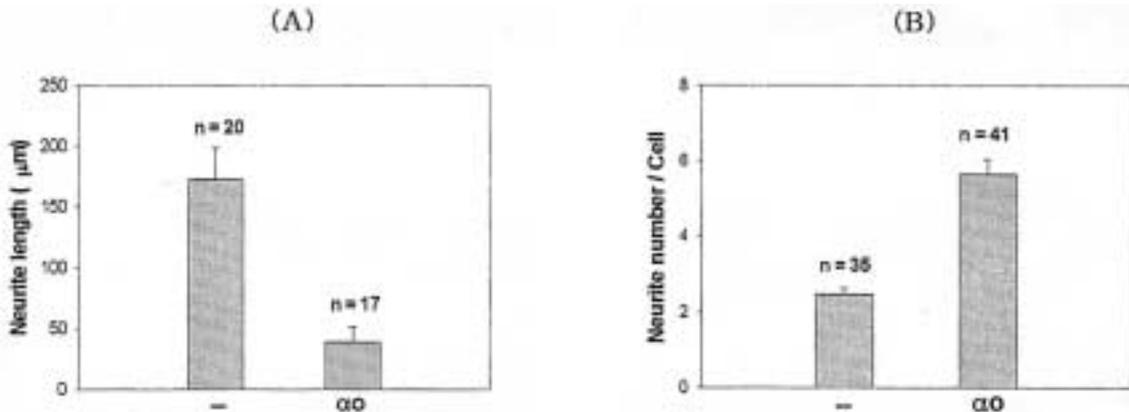


Fig. 6. Measurement of neurite length (A) and neurite number per cell (B) in overexpressing F11 cells.

중이 융합된 세포주로, bradykinin, prostaglandin 수용체 (Francel 등, 1987a), L형과 N형 전압의존성 칼슘채널 (Boland 와 Dingledine, 1990) 및 μ , δ 형 opioid 수용체 등을 갖고 있다 (Cruciani 등, 1993; Francel 등, 1987b; Fan 등, 1992). F11세포를 opioid로 처리하면 Go의 작용을 통해 N형 칼슘채널의 기능이 억제되고 이 과정은 PTX (pertussis toxin)에 민감하다고 알려져 있다 (Nah, 1995). 이는 F11세포가 감각신경세포의 특성을 지니고 있음을 보여주는 것으로 Go가 신경축삭 형성에 미치는 영향을 조사하고자 하는 본 연구의 목적에 적합한 세포로 판단되었다.

본 실험에서 F11세포의 분화는 cAMP 유사물질인 dibutyryl cAMP에 의해 농도의존적으로 일어났으며 dibutyryl cAMP의 농도가 0.5 mM에 이르게 되면 형태적으로 거의 완전한 신경세포의 특징을 나타내었다.

F11 세포를 일시적으로 transfection시키면 일반적으로 10~20% 정도의 세포만이 transfection되므로 이들을 선별할 수 있는 방법이 요구된다. 이를 위해 본 연구에서는 αo 와 GFP (green fluorescence protein) DNA를 동시에 transfection시키는 방법과 αo 에 대한 항체를 이용한 면역조직화화법을 함께 사용하였다. 면역조직화화법은 세포를 고정하므로 죽은 세포만을 관찰할 수 밖에 없으나 세포의 형태를 상세히 관찰할 수 있다는 장점을 갖는다. 반면 GFP를 이용하는 경우는 형광이 약한 신경돌기를 상세히 관찰하는데 어려움은 있으나 살아있는 상태의 세포를 관찰할 수 있다는 장점을 갖고 있다. 또한 본 실험에서는 GFP 발현벡터보다 3배 높은 양의 αo 발현벡터를 사용하여 co-transfection을 시행한 결과, GFP가 발현되지 않는 일부 세포에서 αo 가 발현되었지만 GFP를 발현하는 모든 세포에서는 αo 가 발현되어 본 연구에 cotransfection 방법을 적용하는데 아무런 문제가 없음을 확인하였다. 이에 따라 본 연구에서 세포의 분화 유무를 확인하기 위해서는 GFP를 co-transfection시키는 방법, 그리고 신경돌기의 수를 측정하기 위해서는 면역조직화화염색법을 이용하였다. 본 연구결과에 의하면 αo 를 과잉발현시키면 F11세포의 신경돌기의 길이는 짧아진 반면 세포당 형성된 신경돌기의 수는 증가하였다. 이는 cAMP에 의해서 신경돌기가 형성될 수 있는 잠재력은 증가되지만 신경돌기의 길이성장은 αo 에 의해 억제되기 때문인 것으로 생각된다.

성장하는 축삭의 첨단부인 성장원추 (growth cone)는 축삭이 뻗어나가는 방향과 길이성장을 결정한다. 축삭이 표적세포와 접촉하여 신경연접을 형성하게 되면 성장원추는 위축되고 축삭의 성장이 정지된다. 이러한 과정에 성장원추의 세포막 단백질인 GAP (growth associated protein)-43이 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Strittmatter 등, 1991). Go는 성장원추의 세포막 단백질의 약 5% 정도로 많은 양이 존재하며 (Strittmatter 등, 1990), G-단백질과 결합하는 GDP가 GTP로 치환되는 속도는 GAP-43에 의해서 증가한다 (Strittmatter

등, 1990, 1994). 이러한 연구결과는 Go가 축삭형성과정에서 성장원추의 위축에 중요하게 관여할 것이라는 가능성을 높여 주고 있다.

현재까지 여러 종류의 리간드들이 G-단백질과 연결된 수용체와 결합하면 성장원추와 축삭의 성장에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. 5-HT는 신경돌기의 성장속도를 감소시키며 (Haydon 등, 1984), dopamine은 망막의 수평세포에서 diacylglycerol과 PKC의 작용을 통해 신경돌기의 성장을 억제하며 (Lankford 등, 1988; Rodrigues와 Dowling, 1990) thrombin은 G-단백질과 연결된 수용체에 작용하여 neuroblastoma 세포의 신경돌기 성장을 억제한다 (Suidan 등, 1992). 또한 발생중인 닭의 뇌 추출물이나 쥐 중추신경계의 수초단백질 혹은 Go, Gi의 활성을 증가시키는 mastoparan을 각각 닭의 뒤 뿌리신경절세포에 처리하면 성장원추가 소실되는데 (Higashijima 등, 1990) 이 경우 배양세포를 PTX로 전처리하면 이러한 효과는 감소된다 (Igarashi 등, 1993).

그러나 이와는 상반된 연구결과도 많이 보고되어 있다. Pheochromocytoma 세포인 PC12의 경우, 신경돌기의 형성은 신경영양인자 (neurotrophic factor)보다 NCAM (neural cell adhesion molecule)과 N-cadherin에 의해 더 빨리 유도되는데 이 현상은 PTX에 의해서 억제된다 (Doherty 등, 1991). 또한 Go를 활성화시킴으로써 축삭의 형성을 조절하는 것으로 알려져 있는 GAP-43를 과잉발현시켰을 때, 신경돌기는 신경성장인자에 의한 것보다 더 잘 형성되었으며 (Yankner 등, 1990), NB2a/d1 neuroblastoma 세포를 항GAP-43항체로 처리하면 신경돌기의 성장이 억제된다 (Shea 등, 1991). 이처럼 Go가 신경축삭의 성장에 관여하고 있다는 사실은 명백하지만 신경축삭의 형성을 억제 또는 유도시키는데 관해서는 연구자에 따라 서로 상이한 결과를 보이고 있다. 이는 아마도 그들이 사용한 신경세포의 분화 조건이 다르고, 세포에 따라 분화에 관여하는 신호전달경로가 다르기 때문이라고 생각된다.

본 연구에서 신경세포의 분화를 유도하기 위해 사용한 cAMP는 세포내에서 PKA를 활성화시킨다고 알려져 있다. 장의 신경절세포를 8-bromo-cAMP 또는 dibutyryl cAMP로 처리하면 신경돌기의 성장이 증가하면서 동시에 MAP (microtubule association protein) 2와 α -tubulin의 mRNA가 증가하였다. 이러한 현상은 PKA의 억제제에 의하여 감소하는데 이는 cAMP에 의하여 활성화된 PKA가 신경돌기의 성장과정에 관여함을 간접적으로 보여주는 것이다 (Simeone 등, 1994).

신경세포의 분화를 유도하는 물질로는 cAMP 외에 NGF, retinoic acid 등이 있다. NGF는 신경세포의 분화과정에서 수용체 tyrosine kinase를 통해 Ras, MAPK (mitogen activated protein kinase)를 경유하는 신호전달경로를 거치는 반면, cAMP는 cAMP-의존성 protein kinase, 즉 PKA를 거쳐 신호가 전달된다고 알려져 있다. 아직까지 cAMP가 신경축삭의 성장을 유도하는 기작은 완전히 밝혀지지 않았지만, 이것 역

시 MAPK를 통한 신호전달경로를 거치며 이 과정에 분자량이 작은 GTP결합 단백질인 Rap1과 serine/threonine kinase인 B-Raf가 관여할 것으로 추측되고 있다 (Vossler 등, 1997). cAMP는 신경세포에 있어서 MAPK의 활성을 증가시키지만 비신경세포에서는 반대로 그 활성을 감소시키는데 (Burgering 등, 1993; Yao 등, 1998) 이러한 결과는 cAMP와 MAPK의 cross talk가 세포내 생리적 환경에 따라 달라질 수 있음을 의미한다. 또한 MAPK는 전압의존성 칼슘채널을 통해서 들어온 칼슘이온에 의하여 활성화되기도 하며 이 과정은 Src에 의해 증대되는 것으로 보고되어 있다 (Rosen 등, 1994; Rusanescu 등, 1995). 결국 여러 신호전달경로를 거쳐 활성화된 MAPK는 축삭말단에서 NCAM을 인산화시켜 신경연접의 가소성 (synaptic plasticity)을 유도하거나, 혹은 세포핵으로 이동하여 CREB (cAMP response elements binding protein)을 비롯한 여러 전사인자 (transcription factor)들을 인산화시킴으로써 유전자발현을 변화시켜 신경축삭의 성장이 조절되는 것으로 생각할 수 있다 (Kornhauser와 Greenberg 1997; Bito 등, 1997).

아직 신경세포에서는 확인되지 않았지만 근육세포의 L형 전압의존성 칼슘채널은 PKA에 의해 활성화되면서 세포내 칼슘이온 농도가 높아진다 (Rohrkasten 등, 1988). 이러한 점에서 본다면 cAMP는 직접적으로는 PKA를 통하여, 간접적으로는 칼슘채널이나 MAPK를 경유하는 신호전달경로를 통하여 신경축삭의 형성을 유도할 가능성도 있다. 따라서 α 에 의한 신경돌기의 성장억제는 α 가 cAMP가 관여하는 여러 신호전달 경로 중 일부를 방해함으로써 일어나는 것으로 생각되며, 실제로 α 에 의해 위에서 언급한 신호전달체계가 어떻게 변화하는지를 확인하는 것이 중요할 것이다.

Go-단백질의 α 는 G $\beta\gamma$ 와 heterotrimer를 형성한다. 최근 연구에 의하면 G $\beta\gamma$ 는 2차 신호전달물질로 작용하여 PLC나 adenylyl cyclase를 활성화시키는 것으로 알려져 있는데 (Birnbauer, 1992) PLC에 의해 생성되는 1,4,5-inositol triphosphate와 diacylglycerol은 세포질내 칼슘농도를 높여 PKC 등을 활성화시킨다. 또한 아직 신경세포에서는 확인되지 않았지만, G $\beta\gamma$ 는 ras의 GTP 치환인자인 sos를 통해 ras를 활성화시키고 그 결과 MAPK를 활성화시킬 수 있다고 보고된 바 있다 (van Biesen 등, 1995). 따라서 본 실험에서 얻은 결과는 과잉발현된 α 가 G $\beta\gamma$ 와 복합체를 형성함으로써 G $\beta\gamma$ 의 기능을 억제하여 나타날 수 있다는 것을 제시한다고 할 것이며, 이를 확인하기 위해서는 G $\beta\gamma$ 와 결합하는 능력을 상실한 돌연변이 α 또는 G $\beta\gamma$ 의 발현에 따른 축삭성장의 변화가 체계적으로 조사되어야 할 것이다.

Acknowledgement

본 연구는 아주대학교 뇌질환연구센터를 통한 한국과학재

단 우수연구센터 지원금(1998)에 의한 것이고, 아주대학교 대학원 의학과 연구비 수혜 과제 (1996)입니다.

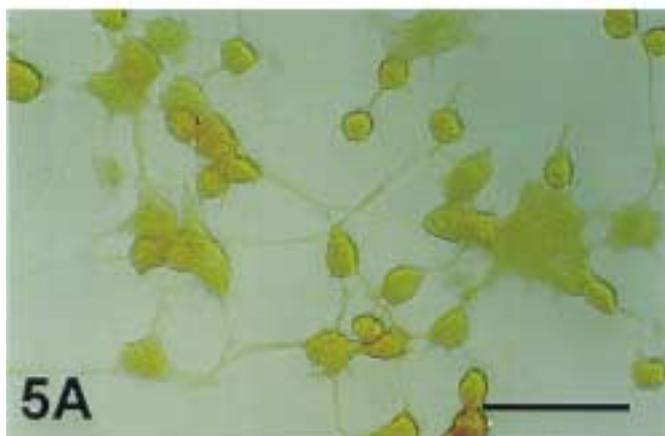
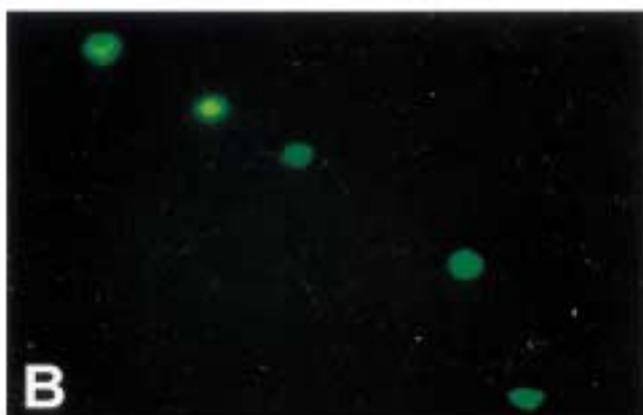
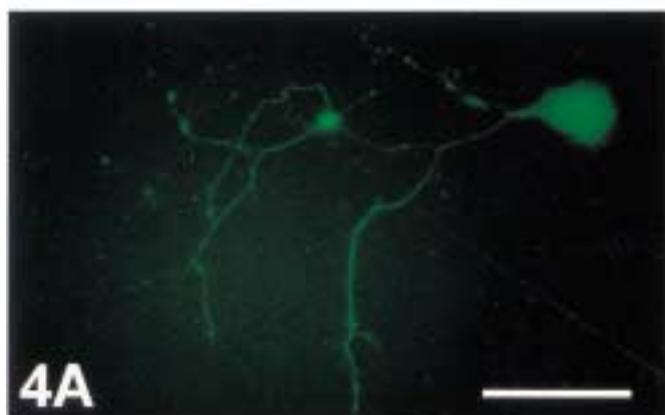
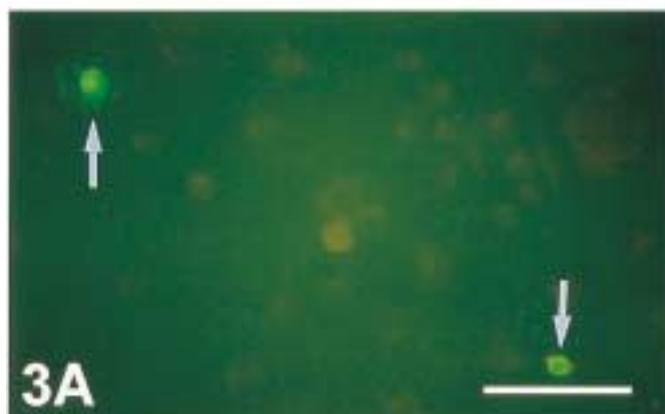
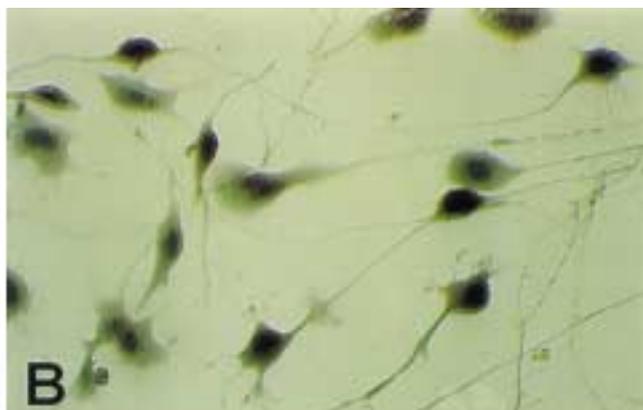
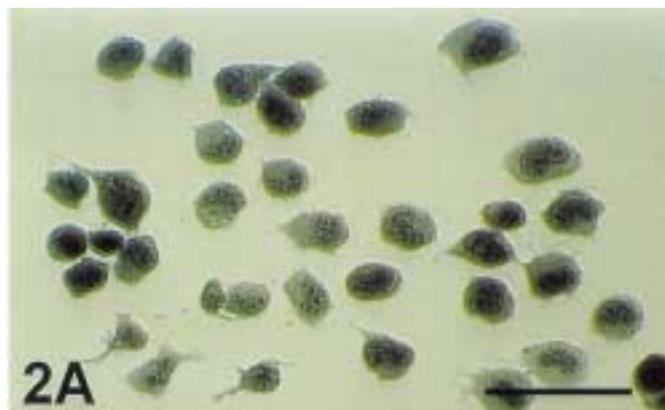
참 고 문 헌

- Birnbauer L, Perez-Reyes E, Bertrand P, Gudermann T, Wei XY, Kim H, Castellano A, Codina J : Molecular diversity and function of G proteins and calcium channels. *Biol Reprod* 44: 207-224, 1991.
- Birnbauer L : Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell* 71: 1069-1072, 1992.
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW : Ca²⁺-dependent regulation in neuronal gene expression. *Curr Opin Neurobiol* 7: 419-429, 1997.
- Boland LM, Dingleline R : Multiple components of both transient and sustained barium currents in a rat dorsal root ganglion cell line. *J Physiol (Lond)* 420: 223-245, 1990.
- Burgering BM, Pronk GJ, van Weeren PC, Chardin P, Bos JL : cAMP antagonizes p21^{ras}-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *EMBO J* 12: 4211-4220, 1993.
- Clapham DE : Intracellular signalling : More jobs for G $\beta\gamma$. *Curr Biol* 6: 814-816, 1996.
- Cruciani RA, Dvorkin B, Morris SA, Crain SM, Makman MH : Direct coupling of opioid receptors to both stimulatory and inhibitory guanine nucleotide-binding proteins in F-11 neuroblastoma-sensory neuron hybrid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3019-3023, 1993.
- Doherty P, Ashton SV, Moore SE, Walsh FS : Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca²⁺ channels. *Cell* 67: 21-33, 1991.
- Francel PC, Harris K, Smith M, Fishman MC, Dawson G, Miller RJJ : Neurochemical characteristics of a novel dorsal root ganglion X neuroblastoma hybrid cell line, F-11. *J Neurochem* 48: 1624-1631, 1987a.
- Francel PC, Miller RJ, Dawson G : Modulation of bradykinin-induced inositol trisphosphate release in a novel neuroblastoma x dorsal root ganglion sensory neuron cell line (F-11). *Neurochem* 48: 1632-1639, 1987b.
- Fan SF, Shen KF, Scheideler MA, Crain SM : F11 neuroblastoma x DRG neuron hybrid cells express inhibitory mu- and delta-opioid receptors which increase voltage-dependent K⁺ currents upon activation. *Brain Res* 590: 329-333, 1992.
- Haydon PG, McCobb DP, Kater SB : Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science* 226: 561-564, 1984.
- Higashijima T, Burnier J, Ross EM : Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. Mechanism and structural determinants of activity. *J Biol*

- Chem* 265: 14176–14186, 1990.
- Igarashi M, Strittmatter SM, Vartanian T, Fishman MC : Mediation by G proteins of signals that cause collapse of growth cones. *Science* 259: 77–79, 1993.
- Kleuss C, Hescheler J, Ewel C, Rosenthal W, Schultz G, Wittig B : Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature* 353: 43–48, 1991.
- Kornhauser JM, Greenberg ME : A kinase to remember: dual roles for MAP kinase in long-term memory. *Neuron* 18: 839–842, 1997.
- Kroll SD, Chen J, De Vivo M, Carty DJ, Buku A, Premont RT, Iyengar R : The Q205LGo- α subunit expressed in NIH-3T3 cells induces transformation. *J Biol Chem* 267: 23183–23188, 1992.
- Lankford KL, DeMello FG, Klein WL : D1-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons: evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2839–2843, 1988.
- Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R : Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 275: 394–397, 1997.
- Moises HC, Rusin KI, Macdonald RL : mu-Opioid receptor-mediated reduction of neuronal calcium current occurs via a G(o)-type GTP-binding protein. *J Neurosci* 14: 3842–3851, 1994.
- Nah SY : μ - and δ -opioid inhibit voltage-activated Ba²⁺ currents in DRG-neuroblastoma hybrid cell line, F11. *Exp Neurobiol* 4: 37–45, 1995.
- Rodrigues P dos S, Dowling JE : Dopamine induces neurite retraction in retinal horizontal cells via diacylglycerol and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9693–9697, 1990.
- Rohrkasten A, Meyer HE, Nastainczyk W, Sieber M, Hofmann F : cAMP-dependent protein kinase rapidly phosphorylates serine-687 of skeletal muscle receptor for calcium channel blockers. *J Biol Chem* 263: 15325–15329, 1988.
- Rosen LB, Ginty DD, Weber MJ, Greenberg ME : Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of ras. *Neuron* 12: 1207–1221, 1994.
- Rusanescu G, Qi H, Thomas SM, Brugge JS, Halegoua S : Calcium influx induces neurite growth through a Src-Ras signaling cascade. *Neuron* 15: 1415–1425, 1995.
- Shea TB, Perrone-Bizzozero NI, Beermann ML, Benowitz LI : Phospholipid-mediated delivery of anti-GAP-43 antibodies into neuroblastoma cells prevents neuritogenesis. *J Neurosci* 11: 1685–1690, 1991.
- Simeone DM, Romancuk G, Mulholland MW : Dual pathways regulate neurite outgrowth in enteric ganglia. *Am J Physiol* 267: G723–G729, 1994.
- Strittmatter SM, Valenzuela D, Kennedy TE, Neer EJ, Fishman MC : Go is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature* 344: 836–841, 1990.
- Strittmatter SM, Valenzuela D, Vartanian T, Sudo Y, Zuber MX, Fishman MC : Growth cone transduction: Go and GAP-43. *J Cell Sci Suppl* 15: 27–33, 1991.
- Strittmatter SM, Igarashi M, Fishman MC : GAP-43 amino terminal peptides modulate growth cone morphology and neurite outgrowth. *J Neurosci* 14: 5503–5513, 1994.
- Suidan HS, Stone SR, Hemmings BA, Monard D : Thrombin causes neurite retraction in neuronal cells through activation of cell surface receptors. *Neuron* 8: 363–375, 1992.
- van Biesen T, Hawes BE, Luttrell DK, Krueger KM, Touhara K, Porfiri E, Sakaue M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ : Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* 376: 781–784, 1995.
- Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, Stork PJ cAMP : cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89: 73–82, 1997.
- Yankner BA, Benowitz LI, Villa-Komaroff L, Neve RL : Transfection of PC12 cells with the human GAP-43 gene: effects on neurite outgrowth and regeneration. *Brain Res Mol Brain Res* 7: 39–44, 1990.
- Yao H, York RD, Misra-Press A, Carr DW, Stork PJ : The cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase (PKA) is required for the sustained activation of mitogen-activated kinases and gene expression by nerve growth factor. *J Biol Chem* 273: 8240–8247, 1998.

Legends for Figures

- Fig. 2.** Differentiation of F11 cells by dibutyryl cAMP. (A) F11 cells untreated with dibutyryl cAMP; (B) F11 cells treated with 0.5mM dibutyryl cAMP. Neurites are elongated in differentiated F11 cells. Bar = 50 μ m
- Fig. 3.** Co-localization of GFP and α o. (A) expression of GFP; (B) expression of α o. Arrows indicate the cells showing coexpression of GFP and α o. Bar = 50 μ m
- Fig. 4.** Inhibition of neurite outgrowth by Go. (A) pEGFP transfected F11 cells; (B) pEGFP and pRC/CMV- α o co-transfected F11 cells. A prominent inhibition of neurite growth is shown in o overexpressed F11 cells. Bar=50 μ m
- Fig. 5.** Immunocytochemistry of differentiated F11 cells using anti- α o antibody. (A) Untransfected F11 cells (control); (B) pRC/CMV- α o transfected F11 cells. Short and numerous neurites are noted in α o overexpressing F11 cells. Bar=50 μ m



— Abstract —

Inhibition of Neurite Outgrowth by Overexpression of Go α

Sung-Ho Ghil, Bum-Jun Kim, Young-Don Lee, Hae-Young Suh

Department of Anatomy, Ajou University, School of Medicine, Suwon 442-749, Korea

G proteins mediate signal transductions generated by neurotransmitters and hormones. Among G proteins, Go is found in a large quantity in brain, but its precise role in the nervous tissue is not fully understood. In addition, Go is one of the major proteins in growth cone membranes, which implies an important role of Go in the regulation of axon outgrowth.

In this study, we attempted to determine the role of Go in axon outgrowth. We overexpressed the α subunit of Go (α) in F11 neuroblastoma cells and examined the effect of α on the neurite outgrowth. In F11 cells, dibutyryl cAMP increased neurite outgrowth remarkably upto 0.1 mM in a concentration dependent manner, but in a less degree at higher concentration. In the presence of 0.5 mM dibutyryl cAMP, the differentiation of F11 cells was almost saturated and the cells exhibited a typical neuronal morphology. Overexpression of α caused a reduction of neurite outgrowth by 77.4% in length while increasing the number of neurites by 2.2 fold. The average neurite length was $38.9 \pm 12.5 \mu\text{m}$ in the α -overexpressing F11 cells but $172.3 \pm 25.9 \mu\text{m}$ in the untransfected cells. The total number of neurites per cell was 5.6 ± 0.4 in the α -overexpressing cells but 2.5 0.2 in the untransfected cells.

This result suggests that Go may play an important role in growth cone collapse during neuronal cell differentiation.

Key words : F11 cells, Neurite, cAMP, G proteins