

Go α 를 영구적으로 발현하는 세포에서의 신경돌기 성장 억제

길 성 호, 서 해 영*

아주대학교 의과대학 해부학교실

〈 초 록 〉

G 단백질은 신경전달물질과 호르몬에 의해서 발생하는 신호를 세포내부로 증대하는 신호전달물질이다. G 단백질 중 Go는 뇌조직의 막에 상당량 발현되는 단백질이지만, 아직까지 그 기능이 정확히 알려져 있지 않다.

본 연구팀은 선행연구에서 Go의 α 소단위체인 α_0 를 신경모세포종인 F11세포에 일시적으로 과발현시키면, 신경돌기의 형성에 큰 영향이 있음을 보고한바 있다. 본 연구에서는 이러한 변화가 유전자의 일시적 과발현에 의해서 생기는 비특이적 현상인지, 아니면 α_0 에 의해서 일어나는 특이적 현상인지를 규명하기 위하여 F11 세포에 α_0 를 영구적으로 발현하는 세포를 제작한 후, α_0 가 지속적으로 발현될 때 신경세포의 분화과정에서의 변화를 조사하였다.

α_0 의 야생형과 돌연변이형을 지속적으로 발현하는 F11 세포를 모두 제작하였다. 각 세포에 dibutyryl cAMP를 처리한 후 신경돌기의 길이를 측정하였다. 정상적인 F11 세포의 경우, 신경돌기의 길이는 $57.9 \pm 7.0 \mu\text{m}$ 이었으며, 야생형과 돌연변이 α_0 가 지속적으로 발현된 세포의 경우, 신경돌기의 길이는 각각 $34.4 \pm 5.1 \mu\text{m}$ 와 $30.5 \pm 3.6 \mu\text{m}$ 이었다. 이는 정상 F11 세포에 비하여 각각 40.6%, 47.3% 감소한 것으로서, α_0 가 지속적으로 발현되는 경우에, 일시 과발현되는 경우와 마찬가지로 신경세포의 분화과정 중 특히 신경돌기의 형성과정을 조절한다는 사실을 의미한다. 나아가 두 가지 다른 접근법에 의하여 동일한 결과를 얻었으므로 신경돌기 형성과정의 변화는 α_0 에 특이적으로 일어남을 알 수 있었다.

찾아보기 낱말 : F11 세포, 신경돌기, cAMP, G-단백질

서 론

G-단백질은 신경전달물질이나 호르몬에 의해서 생성되는 다양한 신호를 증대하는 역할을 하며, α , β , γ 소단위체(subunit)로 구성된 삼량체(heterotrimer) 구조를 갖고 있다. 호르몬이나 신경전달물질이 수용체와 결합하면, 그와 연결된 G-단백질의 삼량체 구조가 분해되면서 α 소단위체가 $\beta\gamma$ 복합체로부터 유리된다. 이때 α 소단위체에 결합되어 있던 GDP가 GTP로 치환되어 α 소단위체는 활성을 띠게 된다. α 소단위체의 GTP는 GDP와 인산으로 분해되면서 α 소단위체가 다시 불활성화되면 $\alpha\beta\gamma$ 삼량체 구조가 복원되고 다른 신호에 대비하게 된다(Conklin과 Bourne 등, 1993).

G 단백질 중에 Gs의 α 소단위체인 α_s 는 adenylyl cyclase (AC)의 활성을 증가시키며, Gi 단백질의 α_i 는 AC의 활성을 감소시킴으로써 세포내의 cAMP의 농도를 조절하게 된다(Brinbaumer 등, 1991; Neer, 1995). α 소단위체에서 유리된 $\beta\gamma$ 복합체는 phospholipase C를 활성화 시키고 Ras, mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성을 조절한다(Clapham,

1996; Lopez-Illasaca 등, 1997). Go의 α 소단위체인 α_0 는 α_i 와 구조적으로 매우 유사하여 α_0 와 α_i 는 같은 그룹으로 분류되고 있다. 하지만 α_0 는 AC의 활성에 전혀 영향을 주지 않는 등 그 기능에 대해서는 거의 알려지지 않고 있다.

흥미롭게도 Go는 성장원뿔(growth cone)의 막을 이루고 있는 단백질중의 하나이며(Strittmatter 등, 1990), 뇌조직 막성분의 0.5% 정도에 해당하는 높은 비율을 차지하고 있다(Huff 등, 1985). 이와 관련하여 Go가 신경세포에서 신경돌기의 형성과정에 관여할 것이라는 증거들이 보고 되었다. 1) Go와 Gi의 활성제인 mastoparan을 닭의 배아(embryo) 교감 신경세포에 처리하면, 성장원뿔이 위축(collapse)되고, 이러한 작용은 Gi와 Go의 억제제인 pertussis toxin (PTX)에 의해서 방지된다(Igarashi 등, 1993). 2) Go와 Gi를 활성화시키는 신경전달물질인 세로토닌과 도파민은 성장원뿔의 운동성을 억제한다(Haydon 등, 1984; Lankford 등, 1988; Rodrigues와 Dowling, 1990). 3) Go의 GTPase 활성을 증가시키는 것으로 알려진 GAP43는 PC12 세포에서 신경성장인자에 의한 신경돌기의 성장을 더욱 증가시켰다(Yankner 등, 1990). 4) 이러한 현상은, GAP43에 대한 항체를 세포내부에 미세주사했을 때 관찰되지 않았다(Shea와 Benowitz, 1995). 본 연구팀은 선행

* 교신저자: Tel: 031-219-5033, Fax: 031-219-5039;
hysuh@madang.ajou.ac.kr

연구에서 신경모세포종인 F11 세포에 α 를 일시적으로 과발현시켰을 때, 신경돌기의 성장이 감소함을 관찰한 바 있다 (Ghil 등, 1998; Ghil 등, 2000).

F11 세포는 신경모세포종 (neuroblastoma)인 N18TG-2와 뒤뿌리신경절세포 (dorsal root ganglionic cells)를 융합시켜 얻은 세포로서, cAMP 혹은 prostaglandin에 의해서 신경세포로 분화된다. F11 세포에는 통증을 전달하는 것으로 알려진 bradykinin의 수용체가 발견되며 (Francel 등, 1987), N, L형 칼슘채널과 아편 (opioid) 수용체가 존재한다 (Fan 등, 1992; Cruciani 등, 1993). F11 세포에 아편계 약제를 처리하면 N형-전압의존성 칼슘채널이 억제되는데, 이 과정을 Go가 매개한다고 보고된 바 있다 (Nah, 1995). 이처럼 F11 세포는 아편 수용체와 칼슘채널이 기능적으로 연결되어 있어, 그 두 가지 단백질을 연결시키는 매개자로 여겨지는 Go를 연구할 수 있는 좋은 시스템이다. 따라서 본 연구에서는 선행연구에서 α 에 의해 나타난 결과가 α 에 특이적인 현상이며 유전자의 일시적 과발현에 의한 세포의 비특이적 반응이 아님을 확인하고자 하였다. 이를 위하여 본 연구에서는 α 를 안정적, 영구적으로 발현하는 F11 세포를 제작하고, 신경세포로 분화하도록 하였을 때, 신경돌기의 형성에 α 가 미치는 영향에 있어서, α 의 지속적인 발현과 일시적인 발현이 동일한 결과를 보임을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

F11 세포는 뒤뿌리신경절세포와 신경모세포종인 NT18TG-2 세포를 융합시켜 제작되었으며, M. Fishman 박사 (Harvard University, U.S.A.)로부터 제공받았다. 세포배양에 사용된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), HBSS (Hank's balanced salt solution), G418, Penicillin-Streptomycin은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, U.S.A.), FBS는 Hyclone (Logan, UT, U.S.A.)에서 구입하였다. α 발현백터는 R. Iyengar 박사 (Mt. Sinai School of Medicine, U.S.A.)로부터 제공받아 사용하였다. 그리고 α 다세포군 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A.), Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate는 Pierce (Rochford, IL, U.S.A.)에서 구입하였으며, 나머지 재료들은 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다.

2. 연구방법

1) F11 세포의 배양 및 분화유도

F11 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS와 100 units/

ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM에서 배양하였으며, 3, 4일에 한번씩 HBSS로 씻어낸 후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 사용하여 세포를 배양용기의 바닥으로부터 분리시킨 다음 계대배양하였다. F11 세포를 신경세포로 분화시키기 위해서는 0.5% FBS가 포함된 DMEM에 0.5 mM dibutyl cAMP (db-cAMP)를 첨가하여 위와 동일한 배양조건에서 4일 동안 배양하였다.

2) Western 분석

단백질은 sample buffer (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 0.001% pyronin Y)를 첨가하고, 끓인 후, electrophoresis buffer (183.8 mM glycine, 119 mM Tris, 0.2% SDS)에서 100~150 volt로 1~2시간 전기영동하였다. gel상의 단백질을 Immobilon-P Teflon membrane으로 옮겨주기 위하여 transfer buffer (25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 15% methanol)에서 70 volt로 1시간 transfer하였다. 10% BSA로 membrane의 비특이적 결합을 제거한 후, α 다세포항체 (1 : 1000)를 상온에서 2시간 반응시킨 후, TTBS (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 10분씩 3번 씻어준 후, HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1 : 10000)와 상온에서 1시간 동안 반응시키고, Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate를 사용하여 효소의 활성을 필름에 감광시켜 측정하였다.

3) α 가 영구적으로 발현되는 F11 세포의 제작

F11 세포의 수를 4×10^5 이 되도록 100 mm 배양용기에 분주하고 18~24시간 후에 약 70~80% confluent하게 되면, Calcium-phosphate 방법을 사용하여 transfection하였다. 간략히 정리하면, α^{wt} 과 α^{Q205L} 의 DNA를 각각 10 mg을 2 M CaCl₂ 62 μ l와 함께 혼합한 후, 동량의 2X HBS (50 mM Hepes pH 7.1, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄)를 섞어주었다. 이 DNA 용액을 30분간 상온에 방치하고, 세포배양액에 넣어 반응시켰다. 4시간 후, 배양액을 제거하고, 15% glycerol로 1분간 반응시키고, HBSS로 두 번 씻어준 후, 배양액을 첨가하였다. 다음날 배양액에 600 μ g/ml의 G418을 처리하고 약 7일 후에, G418이 포함되어 있는 배양액에서 살아남은 세포만을 선택, 배양하여 α 가 영구적으로 발현되는 F11 세포의 클론을 얻었다.

4) 신경돌기 성장의 측정

신경돌기의 길이를 측정하기 위해서 광학현미경을 통해서 보여지는 상을 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.

결 과

1. Go α 를 영구적으로 발현하는 세포의 제작

본 연구에서는 αo 를 영구적으로 발현하는 F11 세포를 제작하기 위하여, αo 의 발현벡터들을 ($\alpha\text{o}^{\text{wt}}$, $\alpha\text{o}^{\text{Q205L}}$) 공여받아 사용하였다(Kroll 등, 1992). 본 연구에서 사용된 αo 의 발현 벡터들은 두가지이다. 하나는 αo 의 야생형 ($\alpha\text{o}^{\text{wt}}$)이 삽입되어 있는 벡터이며, 다른 하나는 αo 야생형 아미노산 서열 중 205번째 아미노산인 glutamine이 leucine으로 치환된 형태의 돌연변이다 ($\alpha\text{o}^{\text{Q205L}}$) (Fig. 1A). 이 과정에서 205번째 아미노산에 해당되는 DNA의 염기서열이 A에서 T로 치환되면서 $\alpha\text{o}^{\text{wt}}$ 에는 없었던 제한효소인 DraII가 인식하는 부위가 새로이 생성된다. 그 결과 이 돌연변이는 G 단백질 고유의 기능인 GTPase의 활성이 사라지게 되어 G $\beta\gamma$ 와 결합하지 않기 때문에 constitutively active한 것으로 알려져 있다. 야생형과 돌연변이형을 확인하기 위하여 각각의 DNA를 DraII 제한효소로 절단하고 agarose gel로 전기영동 한 결과 약 700 bp 정

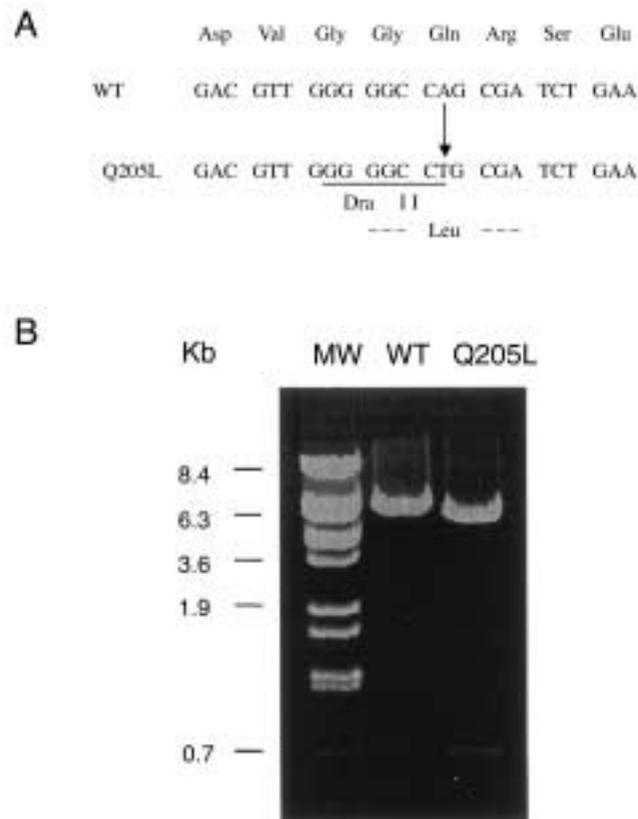


Fig. 1. Comparison of $\alpha\text{o}^{\text{wt}}$ and $\alpha\text{o}^{\text{Q205L}}$. Substitution of A to T introduced a novel DraII restriction enzyme site, resulting in conversion of glutamine to leucine in the mutant (A). Confirmation of a DraII restriction enzyme site in the mutant by agarose gel electrophoresis (B). Lane 1, $\alpha\text{o}^{\text{wt}}$; lane 2, $\alpha\text{o}^{\text{Q205L}}$.

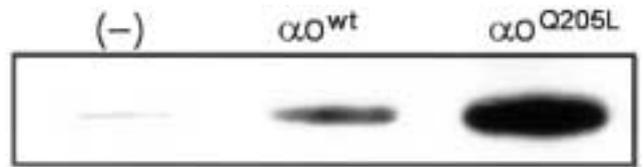


Fig. 2. Construction of αo expressing cells. F11 cells were transfected with $\alpha\text{o}^{\text{wt}}$ and $\alpha\text{o}^{\text{Q205L}}$ and selected in the presence of G418. High expression of $\alpha\text{o}^{\text{wt}}$ and $\alpha\text{o}^{\text{Q205L}}$ were confirmed by Western analysis.

도의 $\alpha\text{o}^{\text{wt}}$ 에는 보이지 않는 band가 나타나는 것을 관찰하였다 (Fig. 1B).

αo 를 영구적으로 발현하는 세포를 제작하기 위하여 600 $\mu\text{g/ml}$ 의 G418을 배양액에 처리하여, 이 약물의 존재하에서 성장할 수 있는 클론을 선택하였다. 이렇게 얻어진 클론 중에서 αo 를 정상보다 많이 발현하는 클론을 선택하기 위하여, 각각의 세포 추출물을 얻어 αo 에 특이적인 다세포항체를 사용하여 Western 분석을 하였다 (Fig. 2). $\alpha\text{o}^{\text{wt}}$ 또는 $\alpha\text{o}^{\text{Q205L}}$ 발현하는 여러 개의 클론 중 정상 F11에 비하여 발현량이 높은 한 개의 클론을 각각 선택하여 다음 실험에 사용하였다.

2. Go α 를 영구적으로 발현하는 세포의 분화

F11 세포의 분화를 유도하기 위해서 cAMP의 유사물질인 dibutyryl cAMP (db-cAMP)를 사용하였는데 이는 cAMP와는 달리 세포내로 침투가 용이하고, 세포질에서 분해되지 않는 특징을 가지고 있다. 대조군 세포와 영구적인 αo 의 발현에 의해서 얻어진 클론들을 각각 0.5 mM db-cAMP가 있는 조건에서 배양하여 신경세포로의 분화를 유도하고, 4일 후에 세포에서 나타나는 신경돌기의 길이를 측정하였다. 정상적인 F11 세포에서는 db-cAMP 처리 후, 신경돌기가 길게 형성되는 반면 (Fig. 3A), $\alpha\text{o}^{\text{wt}}$ (Fig. 3B) 또는 $\alpha\text{o}^{\text{Q205L}}$ (Fig. 3C)를 영구적으로 발현하는 세포는 신경돌기의 길이가 현저히 감소해 있는 것을 관찰하였다. 이를 정량적으로 분석한 결과, 정상적인 F11 세포의 신경돌기의 길이는 $57.9 \pm 7.0 \mu\text{m}$, $\alpha\text{o}^{\text{wt}}$ 또는 $\alpha\text{o}^{\text{Q205L}}$ 를 영구적으로 발현하는 세포의 신경돌기 길이는 각각 $34.4 \pm 5.1 \mu\text{m}$ 와 $30.5 \pm 3.6 \mu\text{m}$ 이었으며, 이는 대조군에 비하여 각각 40.6%, 47.3% 감소한 것이다 (Fig. 4; $p > 0.01$). 이로써 αo 를 안정적, 지속적으로 발현 시켰을 때에도 신경돌기의 길이가 짧아졌으며, 이때 야생형과 돌연변이형의 효과는 동일하였음을 확인할 수 있었다.

고 찰

Go는 뇌조직에 상당량 존재하는 단백질이며 (Sternweis와

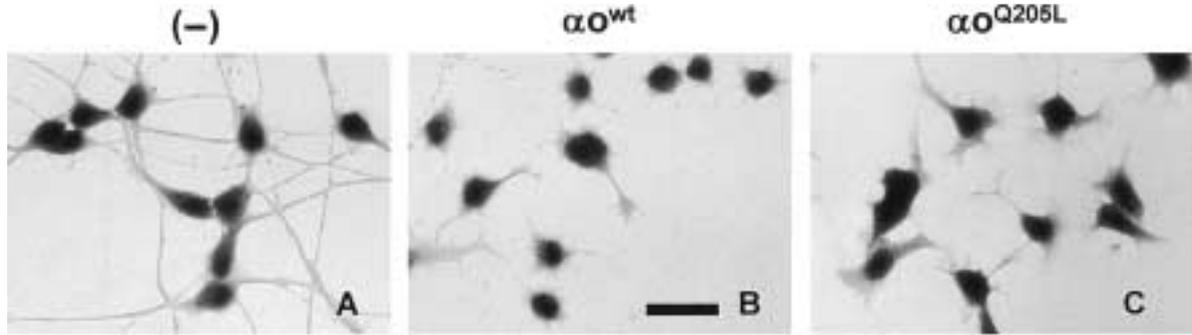


Fig. 3. Neurite outgrowth in αO^{wt} and αO^{Q205L} expressing cell lines. F11 cells (A) and αO^{wt} (B) and αO^{Q205L} (C) expressing cell lines were incubated with 0.5 mM db-cAMP in the presence of 0.5% serum for 4 days, Bar = 50 μ m.

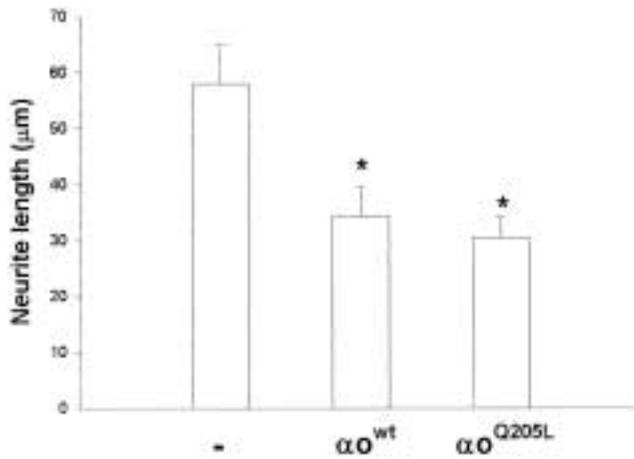


Fig. 4. The effect of αO on neurite outgrowth in F11 stable cell lines. The cells were differentiated with 0.5 mM db-cAMP for 4 days and neurite length was measured. The stable expression of αO^{wt} and αO^{Q205L} significantly reduced neurite length. Data are presented average \pm S.E. (* $p < 0.01$).

Robishaw, 1984), 신경세포의 분화과정에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 신경세포가 분화될 때 나타나는 형태학적인 변화중의 하나인 신경돌기의 형성에 있어서, αO 의 일시적인 과발현에 의해서 나타나는 선행연구 결과를 αO 를 영구적으로 발현시킨 세포에서 확인하였다. G 단백질을 영구적으로 발현하는 세포를 제작한 까닭은 G 단백질이 안정적, 지속적으로 발현되기 때문에, 일시적인 발현에 의한 세포의 비특이적 반응과 같은 인위적인 요소를 배제하기 위한 것이었다. 본 연구의 결과로서 αO 가 신경돌기 형성에 미치는 영향이 αO 에 의한 특이적 반응임을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 Go는 cAMP에 의한 분화를 억제하는 것으로 나타났다. cAMP는 PC12와 F11과 같은 신경모세포종에서 protein kinase A (PKA)를 활성화시킴으로써 신경돌기의 형성

을 촉진하는 것으로 알려졌다. PC12세포에서 PKA는 Extra-cellular-signal regulated kinase (Erk)의 활성을 증가시킴으로써 분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Vossler 등, 1997; York 등, 1998). 반면에 F11 세포에서는 Erk가 분화에 필수적인 요소가 아니며 PKA는 섬유모세포(fibroblast)와 유사하게 오히려 Erk의 활성을 억제한다(Burgering 등, 1993; Ghil 등, 2000). F11세포에서 cAMP가 분화를 촉진하는 것은 cAMP-responsive element binding protein (CREB)의 활성을 촉진하기 때문으로 알려져 있다(Ghil 등, 2000).

본 연구에서 사용된 αO^{Q205L} 은 αO^{wt} 의 아미노산중 205번째 아미노산인 glutamine을 leucine으로 치환한 형태의 돌연변이로서(Kroll 등, 1992), GTPase 활성이 결여되어 있어서 항상 활성을 띠고 있으며, G $\beta\gamma$ 와 결합하지 않는 상태로 존재한다. αO^{wt} 과 αO^{Q205L} 이 영구적으로 발현된 두 종류의 세포에서 신경돌기 형성이 억제되었다는 사실은 αO 가 $\beta\gamma$ 와 결합하여 삼량체 구조를 복원시켜 $\beta\gamma$ 의 기능을 억제함으로써 나타나는 간접적인 결과가 아님을 의미한다. 이와 같은 결과는 일시적으로 αO 를 발현시켰을 때, 신경돌기의 길이가 현저히 감소하는 선행연구에서와 일치한다(Ghil 등, 2000). 일반적으로 α 소단위체의 야생형과 $\beta\gamma$ 와 결합하지 못하는 돌연변이형은 다르게 작용하는 것으로 알려져 있다(Edamatsu 등, 1993; Antonelli 등, 2000; Ram 등, 2000). 하지만 본 연구에서와 같이 야생형과 돌연변이 형태의 α 소단위체가 동일한 기능을 갖는 경우도 일부 보고되어 있다. 3T3-L1 섬유모세포에서 αi^{wt} 과 αi^{Q205L} 은 모두 섬유아세포를 지방세포로 분화시키는 효과가 있으며(Su 등, 1993), F9 기형암세포종(teratocarcinoma)의 원시내배엽 형성이 αi^{wt} 과 αi^{Q205L} 에 의해서 동일하게 억제된다(Gao와 Malbon, 1996). 본 연구를 포함한 이러한 연구결과들은 G $\beta\gamma$ 의 기능과 무관하게 α 소단위체가 단독적인 기능을 지닌 것을 의미하며, 그런 차원에서 본 연구의 결과는 앞으로 알려지지 않은 αO 의 기능을 규명하는 중대한 발판이 되리라 여겨진다.

αO 가 결여된(knockout) 생쥐는 현재까지 두 연구팀에 의

하여 독립적으로 제작되었다. α 가 결여된 생쥐는 생존률이 매우 낮으며, 통각과민 (hyperalgesia), 활동항진 (hyperactivity), 심한 운동장애를 보인다 (Jiang 등, 1998). 생화학적으로는 AC 활성화에는 변화가 없었으며 (Valenzuela 등, 1997), α 소단위체의 결여로 인해서 유리상태의 $\beta\gamma$ 복합체의 양이 증가하지도 않았다 (Jiang 등, 1998). 그것은 α 소단위체의 감소에 맞추어 α 와 삼량체를 이루는 $\beta\gamma$ 의 발현량 자체가 감소하였기 때문으로 추정된다 (Mende 등, 1998). α 가 결여된 생쥐에서 muscarinic 수용체가 칼슘채널의 활성을 조절하는 현상은 사라졌다 (Valenzuela 등, 1997). 그 결과 α 가 muscarinic 수용체에서 오는 신호를 L형 칼슘채널로 연결시키는 매개자 역할을 한다는 새로운 사실이 밝혀지기도 하였다. Go는 망막에 존재하는 바깥핵층 이극 (ON bipolar) 세포에서 mGluR6 수용체에서 오는 신호를 매개하는 것으로 알려져 있다. α 가 결여된 생쥐의 경우 망막전위도를 측정하였을 때 A-wave는 정상이었으나 B-wave가 손실된 것으로 나타났다 (Dhingra 등, 2000). 하지만 α 가 결여된 생쥐에서 이러한 현상을 설명할 수 있는 구조적 변이는 현재까지 보고되지 않고 있다. 본 연구에서 밝힌 바와 같이 Go가 신경세포의 분화와 신경돌기의 형성을 조절한다는 사실은, Go가 결여된 생쥐에서 아직 알려지지 않은 신경계의 구조적 결함을 면밀히 조사할 필요가 있음을 의미한다.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by KRF (#1998-019-F00002) to HSK and YK; by Brain Science and Engineering Research Program, and Life Phenomena and Function Group Program of Korean MOST to HSK; by KOSEF through BDRC at Ajou Univ. to HSK.

참 고 문 헌

- Antonelli V, Bernasconi F, Wong YH, Vallar L : Activation of B-Raf and regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the G(o) alpha chain, *Mol Biol Cell* 11: 1129-1142, 2000.
- Burgering BM, Pronk GJ, van Weeren PC, Chardin P, Bos JL : cAMP antagonizes p21ras-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor, *EMBO J* 12: 4211-4220, 1993.
- Birnbaumer 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.
- Clapham DE : Intracellular signaling: more jobs for G $\beta\gamma$, *Curr Biol* 1: 814-816, 1996.
- Conklin BR, Bourne HR : Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors, *Cell* 73: 631-641, 1993.
- 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.
- Dhingra A, Lyubarsky A, Jiang M, Pugh EN Jr, Birnbaumer L, Sterling P, Vardi N : The light response of ON bipolar neurons requires G[alpha]o, *J Neurosci* 20: 9053-8, 2000.
- Edamatsu K, Sumita M, Hirota S, Hirai M : Transient absorption due to self-trapped excitons in NaBr and NaI, *Phys Rev B Condens Matter* 47: 6747-6750, 1993.
- 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.
- Francel PC, Harris K, Smith M, Fishman MC, Dawson G, Miller RJ : Neurochemical characteristics of a novel dorsal root ganglion X neuroblastoma hybrid cell line, F-11, *J Neurochem* 48: 1624-1631, 1987.
- Gao P, Malbon CC : Differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells to primitive endoderm is regulated by the Gialpha2/Gsalpha axis via phospholipase C and not adenylylcyclase, *J Biol Chem* 271: 30692-30698, 1996.
- Ghil SH, Kim BJ, Lee YD, Suh-Kim HY : Inhibition of neurite outgrowth by overexpression of Go, *The Korean J Anat* 31: 937-944, 1998.
- Ghil SH, Kim BJ, Lee YD, Suh-Kim HY : Neurite outgrowth induced by cAMP can be modulated by the alpha subunit of Go, *J Neurochem* 74: 151-158, 2000.
- Haydon PG, McCobb DP, Kater SB : Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons, *Science* 226: 561-564, 1984.
- Huff RM, Axton JM, Neer EJ : Physical and immunological characterization of a guanine nucleotide-binding protein purified from bovine cerebral cortex, *J Biol Chem* 260: 10864-10871, 1985.
- 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.
- Jiang M, Gold MS, Boulay G, Spicher K, Peyton M, Brabet P, Srinivasan Y, Rudolph U, Ellison G, Birnbaumer L : Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go, *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3269-3274, 1998.
- Kroll SD, Chen J, De Vivo M, Carty D, Buku A, Premont RT, Iyengar R : The Q205LGo-alpha 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.
- Mende U, Zagrovic B, Cohen A, Li Y, Valenzuela D, Fishman MC, Neer EJ : Effect of deletion of the major brain G-protein alpha subunit (alpha (o)) on coordination of G-protein subunits and on adenylyl cyclase activity, *J Neurosci Res* 54: 263-272, 1998.
- Nah SY : mu- and delta-opioid inhibit voltage-activated Ba²⁺ currents in DRG-neuroblastoma hybrid cell line, F11. *Exp Neurobiol* 4: 37-45, 1995.
- Neer EJ : Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals, *Cell* 80: 249-57, 1995.
- Ram PT, Horvath CM, Iyengar R : Stat3-mediated transformation of NIH-3T3 cells by the constitutively active Q205L Galphao protein, *Science* 287: 142-144, 2000.
- Rodrigues PS, Dowling J : Dopamine induces neurite retraction in retinal horizontal cells via diacylglycerol and protein kinase C, *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9693-9697, 1990.
- Shea TB, Benowitz LI : Inhibition of neurite outgrowth following intracellular delivery of anti-GAP-43 antibodies depends upon culture conditions and method of neurite induction, *Neurosci Res* 41: 347-354, 1995.
- Sternweis PC, Robishaw JD : Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain, *J Biol Chem* 259: 13806-13813, 1984.
- 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.
- Su HL, Malbon CC, Wang HY : Increased expression of Gi alpha 2 in mouse embryo stem cells promotes terminal differentiation to adipocytes, *Am J Physiol* 265: C1729-1735, 1993.
- Valenzuela D, Han X, Mende U, Fankhauser C, Mashimo H, Huang P, Pfeffer J, Neer EJ, Fishman MC : G alpha(o) is necessary for muscarinic regulation of Ca²⁺ channels in mouse heart, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1727-1732, 1997.
- Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, Stork PJ : 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.
- York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW, Stork PJ : Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor, *Nature* 392: 553-554, 1998.

— Abstract —

Inhibition of Neurite Outgrowth by Stably Expressed $G\alpha$ in F11 Cells

Sung-Ho Ghil, Haeyoung Suh-Kim

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

Heterotrimeric G proteins mediate signals generated by neurotransmitters and hormones. Among G proteins, $G\alpha$ is found in a large quantity in brain and growth cone membranes of neurons. In spite of its abundance in neurons, the role of $G\alpha$ is not fully understood.

In the previous study, we showed that transient expression of the α subunit of $G\alpha$ ($\alpha\alpha$) modulated neurite outgrowth in F11 cells. It is possible that transient transfection may cause transient accumulation of the protein, which itself may alter differentiation process in non-specific manner. In this study, we determined that modulation of neurite outgrowth by $\alpha\alpha$ was specific by evaluating the effect of $\alpha\alpha$ in stably transformed F11 cells.

F11 cells stably expressing the wild type $\alpha\alpha$ ($\alpha\alpha^{wt}$) and a constitutively active form of $\alpha\alpha$ ($\alpha\alpha^{Q205L}$) were established. In normal F11 cells and $\alpha\alpha$ -stable cell lines, the neurite length was measured in the presence of dibutyryl cAMP. In normal F11 cells, the average length of neurites was $57.9 \pm 7.0 \mu\text{m}$. In $\alpha\alpha^{wt}$ - and $\alpha\alpha^{Q205L}$ -expressing cells, the average length were $34.4 \pm 5.1 \mu\text{m}$ and $30.5 \pm 3.6 \mu\text{m}$, respectively. Thus, stable expression of $\alpha\alpha^{wt}$ and $\alpha\alpha^{Q205L}$ caused a decrease in neurite outgrowth by 40.6%, 47.3% respectively. This result indicates that modulation of neurite by $\alpha\alpha$ was specific to the function of $\alpha\alpha$ but not due to accumulation of exogenous proteins.

Key words : F11 cells, Neurite outgrowth, cAMP, G protein