

주골반 신경절에서
Protein Kinase C에 의한
흥분성 **GABA_A** 수용체의 조절

연세대학교 대학원

의 학 과

최 윤 중

주골반 신경절에서
Protein Kinase C에 의한
흥분성 **GABA_A** 수용체의 조절

지도 공 인 덕 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함
이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2006년 7월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

최 윤 중

최윤종의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2006년 7월 일

감사의 글

드디어 학위과정이 끝나갑니다. 돌이켜보면 시간적여유와 심적인 여유 없이 매우 바쁘게 병원을 오갔던 소화기 내과 전임의 시절에 석사과정을 마쳤던 것이 지금의 나를 있게 한 발판이었다고 생각합니다. 당시 박사과정 진학을 고민하던 중 소화기내과 백순구 선생님과 같이 연구 상의차 생리학교실의 공인덕 선생님과 동석을 하게 된 후 박사과정 진학을 결심하게 되었던 일이 생각납니다. 막연히 이런 날이 오게 될까 하는 생각을 시작할 때는 많이 해보았습니다. 그러나 많은 분들의 도움으로 여기까지 오게 되었습니다. 특히나 나의 박사학위에 대한 동기부여를 해주시고, 연구에 대한 포괄적인 지도편달을 아끼지 않으신 공인덕 지도교수님께 제일 큰 감사를 드립니다. 학기 중 학교 밖에 있는 대학원생들을 일일이 챙기시며 독려해주시고, 강의시간 중에도 많은 관심을 표하며, 아낌없는 조언을 해주신 정성우 선생님께도 감사드립니다. 자상하시고 항상 남들을 편하게 배려해주시며, 왠지 힘든 일로 기대면 다 받아주실 것 같은 이중우 선생님께도 감사의 뜻을 전하고 싶습니다. 본인의 논문에 많은 자문과 지도를 해주신 정신과학 교실 박기창 선생님과 생화학교실 예병일 선생님께도 감사를 드립니다. 특히 실질적인 도움을 너무나 많이 준 생리학 교실의 곽은정 선생님을 비롯한 여러 조교 선생님들께도 감사를 드립니다. 담낭암 투병 중으로 힘든 상황에서도 많은 사랑과 관심어린 애정을 표해주시는 아버지께 감사드립니다. 아버지 병구환으로 힘든 나날을 보내고 계실 어머니께도 위로의 말과 함께 감사드립니다. 우리 부부와 아이들에게 항상 관심과 사랑을 표해주시는 장인, 장모님께도 감사를 드립니다. 이제는 제법 의젓해진 내 귀여운 두 아들 지웅이, 지성이와 이 기쁨을 함께 하고 싶습니다. 마지막으로 나를 항상 곁에서 도와주면서 정말로 내가 힘들 때 진심어린 걱정과 위로를 해주곤 하는 아내 연현주에게 깊은 애정을 표하면서 이 논문에 결혼 10주년 기념의 의미를 특별히 더하고 싶습니다.

2006년 7월 여름날 밤 저자 씀

차 례

표 차례	iii
그림 차례	iv
국문요약	v
제1장. 서론	1
제2장. 재료 및 방법	7
2.1. 실험동물	7
2.2. 실험 용액 및 약물	7
2.2.1. 실험 용액	7
2.2.2. 약물	7
2.3. 단일 신경세포 분리 및 유지	8
2.4. 전기생리학적 실험	8
2.5. 역전사 중합 연쇄반응(RT-PCR)	9
2.6. 표본제작 및 면역조직화학 염색	10
2.7. 자료분석	11
제3장. 결과	18
3.1. 주골반절에서 세포 종류에 따른 $GABA_A$ 수용체 발현	18
3.2. $GABA_A$ 수용체 소단위들의 분자생물학적 동정	18
3.3. $GABA$ 전류의 농도 반응관계	18
3.4. Protein kinase C에 의한 $GABA_A$ 수용체 조절	19
3.5. $GABA_A$ 수용체 조절에 관여하는 Protein kinase C 아형의 확인	20
3.6. Adenylyl cyclase와 protein kinase A에 의한 $GABA_A$ 수용체 조절	20

제4장. 고찰	32
4.1. 주골반절 신경세포에 발현된 GABA_A 수용체의 특성	32
4.2. Protein kinase 에 의한 GABA_A 수용체의 조절	34
제5장. 결론	36
참고문헌	37
영문초록	44

표 차 례

표 1. 골반장기에 분포하는 자율신경의 생리적 기능	6
표 2. $GABA_A$ 및 $GABA_C$ 수용체 아형의 역전사 중합 연쇄반응에 사용된 primer들	· 15
표 3. PKC isoform의 역전사 중합 연쇄반응에 사용된 primer들	17

그림 차례

그림 1. 수컷 흰쥐 주골반 신경절(major pelvic ganglion)의 해부학적 위치	12
그림 2. 주골반 신경절로부터 분리된 신경세포들의 광학현미경적 소견	13
그림 3. 막전압 고정법에 의한 전류측정 장치의 모식도	14
그림 4. 주골반절에서 GABA _A 수용체와 tyrosine hydroxylase의 면역조직화학염색	22
그림 5. MPG에 발현된 GABA _A 수용체 소단위의 분자생물학적 동정	23
그림 6. GABA 전류의 농도-반응 관계(concentration-response relationship)	24
그림 7. Gramicidin perforated patch 하에서 Protein kinase C에 의한 GABA _A 수용체의 조절	25
그림 8. Whole-cell patch 하에서 Protein kinase C에 의한 GABA _A 수용체의 조절	26
그림 9. Protein kinase C에 의한 GABA _A 수용체의 조절 요약	27
그림 10. 비정형(atypical) PKC (αPKC) 활성제가 GABA _A 수용체에 미치는 영향 ..	28
그림 11. MPG에 발현된 αPKC isoform의 분자생물학적 동정	29
그림 12. Adenylyl cyclase가 GABA _A 수용체의 활성화에 미치는 영향	30
그림 13. PKA 억제제 및 forskolin이 GABA _A 수용체에 미치는 영향	31

국문요약

주골반 신경절에서 PKC에 의한 흥분성 GABA_A 수용체의 조절

주골반 신경절(MPG)은 방광, 전립선 및 음경 등과 같은 비뇨생식계 기관과 일부 장(bowel)을 지배하며(Langworthy, 1965; Dail 등, 1975; Keast, 1991; De Groat 및 Booth, 1993), 배뇨(micturition)나 발기(erection)와 같은 자율신경 반사를 조절한다(Zoubek 등, 1993). 골반 장기에 분포하는 자율신경계의 활성화는 매우 다양한 생리적 기능을 담당한다. GABA(γ -aminobutyric acid)는 중추 신경계에서 주된 억제성 신경전달물질의 하나로 알려져 있으며, GABA 수용체는 몇 가지 표현제나 길항제들의 효과와 작용기전에 따라 3가지 아형(subtype)이 보고되고 있다(Barnard 등, 1998; Lu 등, 1999). GABA_A 수용체의 활성화는 Cl⁻의 세포막 투과도를 증가시킨다. 대부분의 신경세포에서 이들 음이온들의 유입은 세포막 전압을 과분극(hyperpolarization) 시킨다(Farrant 및 Nusser, 2005). 본 실험에서는 주골반 신경절 세포에 GABA_A 수용체가 존재하는지의 유무와 존재한다면 그 GABA_A 수용체의 아형 및 기능을 확인하고, protein kinase C에 의한 수용체 조절의 특성의 일부를 규명해보고자 하였다.

주골반 신경절에서 GABA_A 수용체는 주로 교감신경에만 발현되어 있었으며, 막전압의 탈분극을 유도하는 흥분성 효과를 나타내었다. 면역염색결과 GABA_A 수용체를 구성하는 $\beta 2$ 혹은 $\beta 3$ subunits가 주로 교감신경에서 확인되었고, RT-PCR 결과 $\alpha 1$ 을 제외한 $\alpha 2-6$ 아형과 $\beta 2$, $\gamma 1$ 및 $\gamma 2$ 가 확인되었으나, GABA_C 수용체를 구성하는 ρ subunit는 검출되지 않았다. 주골반 신경의 교감신경에 존재하는 GABA_A 수용체는 PKC activator들에 의해서 활성화되었고, 억제제들에 의해서는 억제되었는데, 이들의 효과는 세포내 칼슘이온과 무관하게 이루어졌다. 한편 diacylglycerol(DAG)의 세포투과형 유도체인 1, 2-oleoylacetylgllycerol(OAG)에 의한 GABA_A 수용체의 활성화도는 변함이 없어서 이 과정에 관여하는 PKC는 비정형

(atypical) PKC(α PKC)임을 알 수 있었고, 이를 RT-PCR을 통해 재확인할 수 있었다.

GABA 유발 전류가 adenylyl cyclase(AC)-PKA의 activator에 의해서 증가하고, 억제제에 의해 감소하여 GABA_A 수용체가 AC-PKA에 의해서도 조절받음을 확인하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 주골반 신경절의 교감신경세포에서 확인된 흥분성 GABA_A 수용체는 PKC에 의해 더욱 강력히 활성화되며, 여러 아형 중 비정형 PKC가 관여한다. 이와 같은 효과는 교감신경 말단에서의 noradrenaline의 분비를 조절하여 더욱 효과적인 기능을 담당하고 이는 장(bowel) 운동, 배뇨 및 발기 등과 같은 최종 복강장기의 활성도를 조절하는 주요 인자가 될 수 있으리라 여겨진다.

핵심되는 말: GABA_A 수용체, Protein kinase C, Protein kinase A, Major pelvic ganglia

주골반 신경절에서 흥분성 GABA_A 수용체의 조절

<지도 공 인 덕 교수>

연세대학교 대학원 의학과

최 윤 중

제1장 서론

GABA(γ -aminobutyric acid)는 중추 신경계에서 주된 억제성 신경전달물질의 하나로 알려져 있으며, GABA 수용체는 몇 가지 효현제나 길항제들의 효과와 작용기전에 따라 3가지 아형(subtype)이 보고되고 있다(Barnard 등, 1998; Lu 등, 1999). GABA 수용체는 ionotropic 수용체인 GABA_A 및 GABA_C 수용체와 GTP-binding protein과 연결된 metabotropic 수용체인 GABA_B 수용체로 크게 나누어진다. GABA_A 수용체의 활성화는 Cl⁻ 혹은 HCO₃⁻ 이온의 세포막 투과도를 증가시킨다. 대부분의 신경세포에서 이들 음이온들의 유입은 세포막 전압을 과분극(hyperpolarization) 시킨다(Farrant 및 Nusser, 2005). GABA_A 수용체는 니코틴성 acetylcholine(ACh) 수용체, glycine 수용체 및 5-hydroxytryptamine type 3(5-HT₃) 수용체와 같이 다섯 개의 소단위(subunit)로 구성된 오합체 구조(pentameric structure)의 cystine-loop ligand-gated 이온통로이다(Lester 등, 2004; Farrant 및 Nusser, 2005). GABA_A 수용체는 4 종류의 서로 다른 소단위(α , β , γ 및 δ)가 많이 알려져 있지만(Macdonald 및 Olsen, 1994), 최근에는 두 개의 새로운 소단위(ϵ 및 π)가 보고 되기도 하였다(Davies 등, 1997; Hedblom 및 Kirkness, 1997). GABA 수용체를 구성하고 있는 소단위들도 benzodiazepine이나 barbiturate와 같은 조절자(modulator)들에 대한 민감도나 반응 정도에 따라 더 세분화 되는데 α 는 6종류($\alpha 1$ - $\alpha 6$), β 는 3종류($\beta 1$ - $\beta 3$), 그리고 γ 의 경우 역시 3종류($\gamma 1$ - $\gamma 3$)의 아형이 알려져

있다. 또한 **GABA** 수용체 전류는 임상적으로 사용되는 약물에 따라 차이가 있는데, **barbiturates**, **benzodiazepine**, **neurosteroid** 그리고 **imidazopyridines**과 같은 약물들에 의해 증가되며, 반대로 β -**carboline**과 **zinc**와 같은 **modulator**에 의해서는 억제되는 상반된 반응을 보인다(Smart 등, 1991; Macdonald 및 Olsen, 1994).

GABA_B 수용체는 **G**-단백질과 연결된 **metabotropic** 수용체로서, **K⁺** 통로를 활성화시키거나, 막전압 의존적 칼슘 통로를 억제한다(Bowery 등, 2002; Harayama 등, 1998). **GABA_B** 수용체는 **adenylyl cyclase(AC)**의 활성을 조절하는 것이 잘 알려져 있으며(Knight 및 Bowery, 1996; Kubota 등, 2003), 일부 세포에서는 **PKC** 활성을 조절하기도 한다(Taniyama 등, 1992). **GABA_B** 수용체는 **G**-단백질을 통해 **forskolin**에 의한 **AC**의 활성화를 억제하여 세포내 **cAMP** 농도를 떨어뜨리는 것이 잘 알려져 있다(Bowery 등, 2002; Knight 및 Bowery, 1996). 이와 반대로 **GABA_B** 수용체 활성은 뇌 slice에서 **Gs** 단백질과 연결된 β -아드레날린성 수용체 활성화에 의해 **cAMP** 생성을 촉진시키기도 하였다(Enna, 1997). 또한 쥐의 후각 팽대부(olfactory bulb)에서 **GABA_B** 수용체는 **AC**의 활성을 증가시켰는데, 흥미롭게도 이러한 효과는 **PTX**에 의해 차단되어, **Gs** 단백질이 아닌 **G_{i/o}** 단백질에 의해 일어남을 보여주었다(Olianas 및 Onali, 1999).

다른 **ionotropic GABA** 수용체인 **GABA_C** 수용체는 **p subunit(p1-p3)**이 포함된 **Cl⁻** 통로이다(Ogurusu 및 Shingai, 1996; Barnard 등, 1998). **GABA_C** 수용체는 단일 채널(single channel) conductance가 **GABA_A** 수용체보다 작으며, **bicuculline**에 의해 억제되지 않고, **barbiturates**, **benzodiazepines**, 혹은 **neuroactive steroid**에 의해 조절되지 않는 특성을 지닌다(Dong 등, 1994; Bormann 및 Feigenspan, 1995; Akasu 등, 1999).

골반얼기(pelvic plexus)에는 장하부(lower bowel) 및 비뇨생식계(urogenital system)를 비롯한 여러 골반장기를 지배하는 자율신경이 분포한다. 골반 자율신경절(pelvic autonomic ganglia)은 척수와 말초 기관들 간의 구심성(efferent) 및 원심성(afferent) 신호들을 전달함으로써 비뇨생식계를 비롯한 골반 장기의 기능유지에 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 특히 남성의 경우에는 자율신경조절에 대한 의존도가 높다고 알려져 있는데, 질환이나 외상으로 인해 비슷한 정도의 자율신경

손상이 있다 하더라도 남성에서는 생식기능 저하가 쉽게 초래되는 반면 여성에서는 임신 및 출산에 지장을 주지 않을 가능성이 높다고 알려져 있다(Dail, 1996). 골반 자율신경절 해부 및 조직학적 특징은 종(species)에 따라 많은 차이가 있으나, 대부분의 종에서는 작게 서로 연결되어진 신경절들이 복잡한 망 구조를 띠고 있다(Bradley 등, 1974; Jänig 및 McLachlan, 1987). 하지만 쥐에서는 그 구조가 비교적 단순하여 여러 자율신경세포들이 하나의 큰 신경절을 이루고 있는데, 수컷 쥐의 경우 이를 주골반 신경절(major pelvic ganglion, 이하 MPG)이라 하고 암컷의 경우에는 자궁경관 신경절(paracervical ganglion) 혹은 Frankenhauser 신경절이라 한다(Langworthy, 1965). MPG는 하복신경(hypogastric nerve)으로부터 내려온 교감신경과 골반신경(pelvic nerve)으로부터 온 부교감신경이 모두 존재한다. 하복신경은 척수의 상측 요수(rostral lumbar)에서 기시한 구심성 성분의 교감신경 섬유와 하장간막 신경절(inferior mesenteric ganglia) 및 교감 신경절(sympathetic chain)으로부터 오는 원심성 섬유가 함께 포함되어있다(de Groat 및 Booth, 1993). 이와 같이 교감신경과 부교감신경이 같은 신경절 캡슐내에 존재하는 형태는 다른 자율 신경절에서는 찾아볼 수 없는 매우 독특한 형태이다(Dail, 1996; Keast, 1995; Keast, 1999).

MPG는 방광, 전립선 및 음경등과 같은 비뇨 생식계 기관과 일부의 장(bowel)을 지배하며(Langworthy, 1965; Dail 등, 1975; Keast, 1991; De Groat 및 Booth, 1993), 배뇨(micturition)나 발기(erection)와 같은 자율신경 반사를 조절한다(Zoubek 등, 1993). 골반 장기에 분포하는 자율신경계의 활성화는 매우 다양한 생리적 기능을 담당한다(표 1 참조). 나아가 방광출구 폐쇄(bladder outlet obstruction)나 발기 부전(erection dysfunction)과 같은 병적 상태에서 MPG의 형태적 및 기능적인 변화가 보고된 바 있다(Mills 등, 1992). 따라서 골반 장기의 자율신경계 조절에 관한 생리적 혹은 병태 생리적 연구에 있어서 MPG는 유용한 모델이라 할 수 있다(Keast, 1999).

포유류의 중추 신경계에서 주된 억제성 신경전달물질의 하나인 GABA는 골반 자율 신경에서도 중요한 역할을 한다(Maggi 등, 1983). 선행 연구들에 따르면 GABA 합성 효소인 L-glutamate decarboxylase(GAD)가 쥐의 MPG와 상장간막 신

경절(superior mesenteric ganglion)에 존재하며, MPG 신경세포에 GABA 결합부위(binding site)가 존재함이 보고되었다(de Groat, 1970; Kusunoki 등, 1984). 기능적 연구에서 GABA는 MPG로 가는 절전신경을 자극하였을 때 나타나는 방광수축을 억제하였으며, 흰쥐 MPG에 GABA를 포함한 신경세포들이 존재하며, 골반신경을 자극하였을 경우 GABA가 유리된다(de Groat, 1970; Kusunoki 등, 1984). 고양이 방광의 골반신경절에서 GABA는 막전압의 탈분극과, 탈분극 이후에 과분극이 따라 일어나는 biphasic한 반응을 보이며, 이러한 반응은 Cl⁻ 이온의 conductance가 변하여 일어난다(Mayer 등, 1983). Akasu 등(1999)의 실험에서 MPG에서 GABA는 GABA_A 수용체 활성화를 통한 초기 탈분극과 이어서 GABA_C 수용체 활성화에 의한 느린 탈분극 및 과분극을 일으키는 biphasic한 반응을 보임을 보고하였다. 최근에 Kong 등(2001)은 MPG의 교감 신경세포에 선택적으로 GABA_A 수용체가 발현되어 있으며, 활성화 되면 중추신경계에서와는 달리 탈분극을 일으킴을 보고하였다.

GABA_A 수용체는 다섯 개의 소단위로 구성되며 서로 다른 약리적 반응을 보인다. GABA_A 수용체는 소단위 구성의 다양한 조합이 가능하기 때문에 native 조직에서 GABA_A 수용체는 매우 다양하게 존재할 수 있다. 본 연구에서 MPG에는 여러 GABA_A 수용체 소단위들이 발현되어 있었다. 선행 연구들에서 MPG 내에 GABA 합성 효소 및 GABA 함유 신경들이 존재하며, 기능적인 실험에서 GABA의 역할이 보고되었지만 MPG의 연접전 신경을 자극하거나 반사활동(reflex activity)이 증가되었을 때 내인성(endogenous) 기전으로 GABA가 유리되는지에 대한 실험 적인 증거는 부족하며, MPG를 비롯한 자율 신경계에서 GABA_A 수용체 소단위 구성에 관한 연구는 거의 수행되지 않았다. GABA_A 수용체는 그 소단위 구성에 따라 protein kinase와 같은 세포내 조절자(modulator)에 의해 다양하게 조절된다.

Protein Kinase C (PKC)에 의한 GABA_A 수용체의 인산화는 불안, 알코올중독, 간질 등의 조절에 중요하게 관여한다(Hodge 등, 2002). PKC는 세포내의 신호전달 물질로 신호전달 과정에 중요한 역할을 담당하여 세포증식, 분열, 세포자멸사 등에 밀접히 관여하는 것으로 알려져있다. 이는 세 가지로 나뉘는데, 정형

PKC(conventional PKC; α , β I/ β II, γ), 신형 PKC(novel PKC; δ , ϵ , η , θ), 비정형 PKC(atypical PKC; ζ , ι / λ)이다. 각각은 활성화되기 위해 요구하는 물질과 상동성 등으로 분류되는데, 정형 PKC는 diacylglycerol, phosphatidylserin, Ca^{2+} 에 의해 활성화되고, 신형 PKC는 Ca^{2+} 에 의해서는 활성화되지 않으며, 비정형 PKC는 phosphatidylserin에 의해서만 활성화된다.

아직 $GABA_A$ 수용체의 기능을 조절하는 PKC의 역할은 명확히 밝혀지지 않았으나 몇 가지 *in vitro* 선행된 연구는 조절기작을 추측할 수 있는 근거를 제공한다. *Xenopus* 난모세포(oocyte)와 배아신경(embryonic neuron)에서 활성화된 PKC가 해독후 변화(posttranslational modification)에 관여하여 $GABA_A$ 수용체를 억제시켰다(Chapell 등, 1998; Herring 등, 2005; Kittler 등, 2000). 그러나 반대되는 경우도 있는데 해마신경(hippocampal neuron)에서 PKC의 활성화에 의해 $GABA_A$ 수용체의 기능이 증가하는 것이 관찰되었고(Poisbeau 등, 1999), 생쥐의 척수(spinal cord)에서는 $GABA_A$ 수용체의 기능에 영향을 미치지 않는 것이 보고되었다(Ticku 및 Mehta, 1990). 이러한 PKC에 의한 $GABA_A$ 수용체의 다양한 조절 양상은 다른 $GABA_A$ 수용체의 소단위 구성과 관여하는 PKC의 아형들이 다르기 때문일 것으로 추측된다.

그러므로 MPG에 존재하는 $GABA_A$ 수용체의 소단위 확인과 조절자에 의한 조절의 규명은 $GABA_A$ 수용체가 자율신경계에 미치는 영향에 대한 유용한 정보를 제공할 것이다. 따라서 본 연구에서는 MPG에서 $GABA_A$ 수용체의 발현을 확인하고, PKC에 의한 이들 수용체의 세포내 조절 기전의 일부를 규명하고자 하였다.

표1. 골반장기에 분포하는 자율신경의 생리적 기능

<i>Tissue</i>	<i>Nerve supply</i>	<i>Effect</i>
<i>Lower Urinary Tract</i>		
- Bladder detrusor (body)	Parasympathetic	Contraction
- Bladder trigone (base)	Parasympathetic	Relaxation
	Sympathetic	Contraction
- Urethra/sphincter	Parasympathetic	Relaxation
	Sympathetic	Contraction
<i>Large Intestine</i>		
- Muscle (non-sphincter)	Parasympathetic	Contraction
- Muscle (sphincter)	Parasympathetic	Relaxation
	Sympathetic	Contraction
- Enteric ganglia	Parasympathetic	Excitation
	Sympathetic	Inhibition
- Blood vessels	Parasympathetic	Dilation
	Sympathetic	Constriction
<i>Reproductive System</i>		
- Smooth muscle ^a	Sympathetic	Contraction
- Smooth muscle ^b	Parasympathetic	Relaxation (non-pregnant)
	Sympathetic	Contraction (non-pregnant) or Relaxation (pregnant)
- Glands	Parasympathetic	Secretion
- Erectile tissue	Parasympathetic	Relaxation/vasodilation/erection
	Sympathetic	Contraction (prevents erection)

^a Vas deference, prostate gland, seminal vesicle

^b uterus, oviducts, vagina

adopted from McLachlan (1995)

제2장 재료 및 방법

2.1. 실험 동물

실험동물로는 180-200 gm 내외의 수컷 쥐(Sprague-Dawley rat)를 사용하였다.

2.2. 실험용액 및 약물

2.2.1. 실험 용액

전기생리 실험 및 칼슘 측정에 사용된 세포 외 관류액의 조성(mM)은 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES 그리고 10 glucose (pH 7.4)으로 하여 실험하였다. GABA 활성화 전류 측정 시 사용된 전극 내 용액의 조성(mM)은 120 CsCl, 20 TEA-Cl, 11 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl₂, 그리고 2 MgCl₂ (pH 7.2)으로 하였다. 단, gramicidin-perforated patch를 위한 전극 내 용액의 조성(mM)은 140 KCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 0.5 CaCl₂, 5 NaCl (pH 7.2)으로 하였으며, 전극 내 용액에는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 높은 농도로 녹인 gramicidin(gramicidin D)을 최종 농도가 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 첨가하여 사용하였다. 약물의 투여는 perfusion valve control system(VC-6M, Warner Instruments, CT, USA)을 이용하였으며, 약물이 나오는 관 끝을 신경세포의 100 μm 이내에 위치하도록 하여 중력에 의해 세포에 가해지도록 하였다.

2.2.2. 약물

Collagenase type D와 trypsin은 Boehringer Mannheim Biochemicals

(Indianapolis, IN, USA)로부터 구입하였으며, GABA, muscimol, forskolin 등은 Tocris(Tocris Cookson Inc., Bristol, UK)로부터 구입하였다. Calbiochem Co.(San Diego, CA, USA)으로부터 SQ22536, mirystoylated PKA 억제제, PDBu, PMA, 4 α -phorbol, GF-109203X, Calpostin C, OAG 등을 구입하였고 gramicidin, DNase type I 등과 세포 배양과 관계된 모든 배지 및 약물은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

2.3. 단일 신경세포 분리 및 유지

수컷 쥐(180 ~ 200 gm)를 pentobarbital sodium(50 mg/kg, *i.p.*)으로 마취시킨 뒤, 개복하여 전립선의 외측에 위치한 MPG를 적출하고(그림 1 참조), 이를 차가운(4°C) Hanks' balanced salt 용액으로 옮겼다. 수초를 벗기고 작은 틈새를 낸 후, 이를 0.7 mg/ml collagenase(type D), 0.1 mg/ml trypsin과 0.1 mg/ml의 DNase type I이 들어있는 10 ml의 modified Earle's balanced salt 용액(EBSS, pH 7.4)에서 1시간 동안 배양(35°C)하였다(Zhu 등, 1995). 이때 EBSS에는 3.6 g/L의 glucose와 10 mM의 HEPES를 포함시켰다. 배양 후 신경세포들을 배양용기에 넣어 흔들어 분리한 뒤 원심 분리하였다. 분리된 신경세포들을 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin이 포함된 MEM에 재부유시킨 뒤, poly-L-lysine으로 코팅되어 있는 cover glass(직경 12 mm)에 plating 하였다. 이를 37°C 세포 배양기(humidified incubator; 95% air-5% CO₂)에서 배양하였으며, 분리한 후 12시간 이내에 실험에 사용하였다. 분리된 세포들의 광학현미경적 소견은 그림 2에 나타내었다.

2.4. 전기생리학적 실험

전기생리적 실험은 EPC9 혹은 EPC7(Instrutech Corp., NY, USA) patch clamp 증폭기(amplifier)를 사용하여 전형적인 whole-cell patch clamp 방법으로 측정하였

다(Hamill 등, 1981). 측정 전극은 borosilicate glass capillary(외경; 1.65 mm, 내경; 1.2 mm, Corning 7052, Garner Glass Co., Claremont, CA, USA)를 P-97 Flaming-Brown micropipette puller(Sutter Instrument Co.)로 제작하여 사용하였다. 전극은 Sylgard 184(Dow Corning, Midland, MI, USA)로 코팅하였으며, 전극 내부에 용액을 채웠을 때 저항이 1.5~2.5 M Ω 이 되는 것을 사용하였다. 세포가 붙어 있는 cover glass를 도립현미경(inverted microscope) 위에 올려놓고, 세포 외액을 중력에 의해 1~2 ml/min 속도로 관류시켰다. 막전압 고정법(voltage-clamping method)으로 측정 시 세포막 용량(membrane capacitance)과 직렬저항(series resistance)은 80% 이상 보정하였으며, 실험 시 sampling rate 은 1 kHz, low-pass 필터는 2 kHz(-3dB; 8-pole Bessel filter)로 하여 기록하였다. 실험결과는 Pulse/Pulsefit(v8.50)(Heka Elektronik, Lambrecht, Germany) 혹은 pClamp6(Axon Instrument, USA) 소프트웨어를 통해 IBM 컴퓨터에 저장하여 분석하였다. 모든 실험은 실온(21~24 $^{\circ}$ C)에서 시행하였으며, 본 실험에 사용된 전류 측정 장치는 그림 3에 도식적으로 나타내었다.

2.5. 역전사 중합 연쇄 반응(RT-PCR)

Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 추출 방법을 이용하여 MPG 신경세포들로부터 total RNA를 분리하였다(Chomczynski 및 Sacchi, 1987). 먼저 세포를 guanidinium thiocyanate buffer로 용해시킨 다음 페놀(phenol) 및 클로로포름(chloroform)을 가하여 얼음 위에서 15분 이상 세워두었다. 이를 4 $^{\circ}$ C에서 10,000xg로 20분간 원심분리하여 상층액만을 조심스럽게 취하였다. 이 상층액은 동량의 isopropanol과 섞은 다음 -70 $^{\circ}$ C에서 1시간 이상 세워 두어 RNA를 침전시켰다. 다시 4 $^{\circ}$ C에서 10,000xg로 20분간 원심분리하여 RNA pellet을 얻었으며, 이를 75% ethanol로 씻어낸 후 원심분리하여 RNA sample을 얻었다.

cDNA의 합성을 위해 2 μ g RNA와 0.5 μ g random hexamer를 먼저 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시키고, 200 units의 murine leukemia virus reverse

transcriptase(Promega Corporation, Madison, WI, USA), 25 nmoles의 dNTP, 20 units의 RNase inhibitor(Promega) 등을 혼합하여(25 μ l) 37°C에서 1 시간 반응시켰다. PCR은 여러 GABA_A 수용체 아형(subunit)에 대한 primer들과 atypical PKC isoform에 대한 primer를 이용하여 이루어졌으며, 이들의 염기서열은 표 2와 3에 요약하였다. PCR 반응액(50 μ l)에는 합성된 cDNA, 각각의 primer(10 pmoles), 1.25 units의 AmpliTaq polymerase(Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), 10 nmoles의 dNTP등을 혼합하여, 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분으로 35 cycle 동안 반응시켰다. PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.1% agarose gel에 전기영동하여 관찰하였다.

2.6. 표본제작 및 면역조직화학 염색

MPG 표본 제작을 위해, 흰쥐를 ether로 마취 후, 깊은 마취 상태에서 왼쪽 심실을 통해 0.9% NaCl을 포함하는 0.1 M 인산염완충액(PBS; pH 7.4, 37°C)을 관류하여 혈액을 제거하였고, 이어서 4% paraformaldehyde로 관류, 고정하였다. 관류고정을 마친 다음 면역조직화학 염색을 위해 MPG 표본을 적출하여 동일한 고정액으로 4°C에서 16-20시간 동안 후고정하였다. 이후 표본을 25% sucrose 용액(in 0.1 M PBS)에 16시간 동안 침투시키고 -70°C isopentan으로 동결시켜, 동결절편기(Reichert-Jung, Germany)를 이용하여 25 μ m 두께의 절편을 제작하였다. 면역염색의 모든 과정은 자유부유법으로 시행하였다. 우선 동결 절편을 3% 과산화수소에 20분간 처리한 후 0.1 M PBS로 세 번 수세하였고, 이차항체에 대한 비특이적 반응을 제거하기 위하여 5% normal horse serum으로 두 시간 동안 처리하였다. 이어서 항 GABA_A β 2/3(1 : 250; Upstate, USA)을 실온에서 overnight 처리하였고 0.1% Triton X-100을 포함하는 0.1 M PBS(PBST)로 네 차례 수세한 후 biotinylated mouse IgG(Vectastain Elite Kit, Vector Labs, USA)로 한 시간 동안 반응시켰다. 항체 흡착을 마친 표본은 PBST로 수세한 후 avidin-biotin peroxidase complex(Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, USA)에 한 시간 동안 반응시켰다.

다. 면역반응을 마친 조직을 PBS로 수세한 후 0.01% H₂O₂를 포함하는 0.05% Ni-DAB(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 발색시켰으며 cresyl violet으로 대조염색을 시행한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

2.7. 자료 분석

모든 결과는 평균±표준오차로 나타내었고, 통계적인 의의는 분산분석(ANOVA)을 사용하였으며, 각 군 간의 차이를 위해서 Tukey 방법을 사용하여 사후검정하였다. 두 군 간의 차이 혹은 약물 처치 전후의 차이에 대한 검정은 각각 독립적 t-검정(unpaired t-test)과 짝비교 t-검정(paired t-test)으로 확인하였다. 이때 p값은 0.05이하일 때 유의한 차이가 있다고 간주하였다. 측정된 전류 크기는 Pulse/Pulsefit 소프트웨어(Heka Elektronik)를 이용하여 계산하였으며, 선형회귀 방정식, 농도-반응 곡선(concentration-response curve)의 EC₅₀ 혹은 IC₅₀, 그리고 Hill slope는 Prism 3.0 software(GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 구하였다.

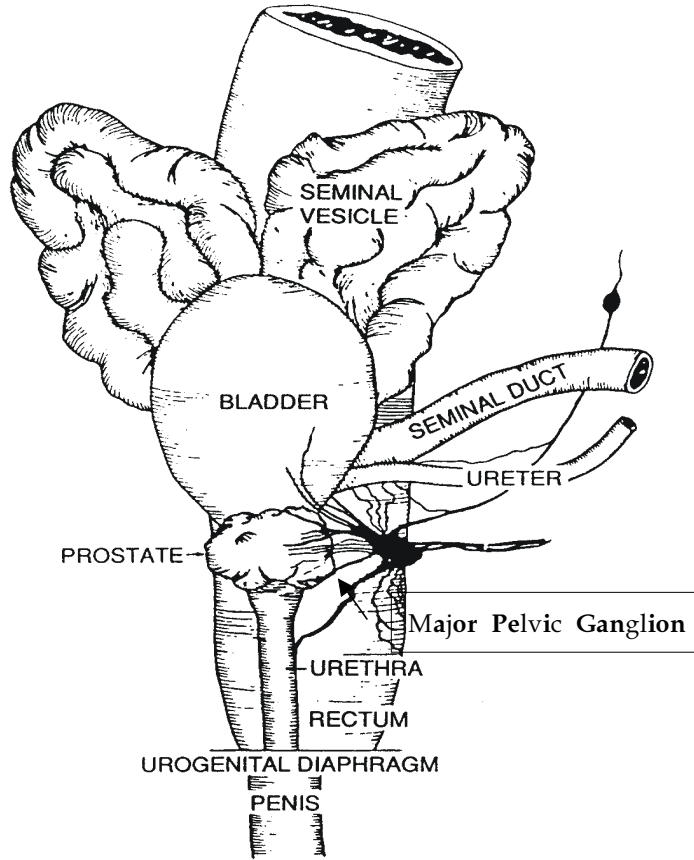


그림 1. 수컷 흰쥐 주골반 신경절(major pelvic ganglion)의 해부학적 위치

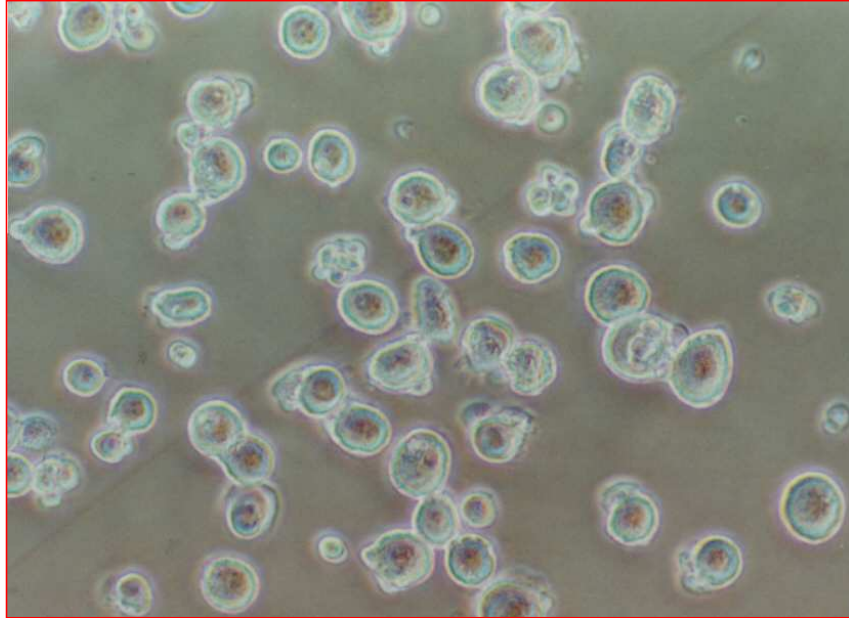


그림 2. 주골반 신경절로부터 분리된 신경세포들의 광학현미경적 소견 (x200)

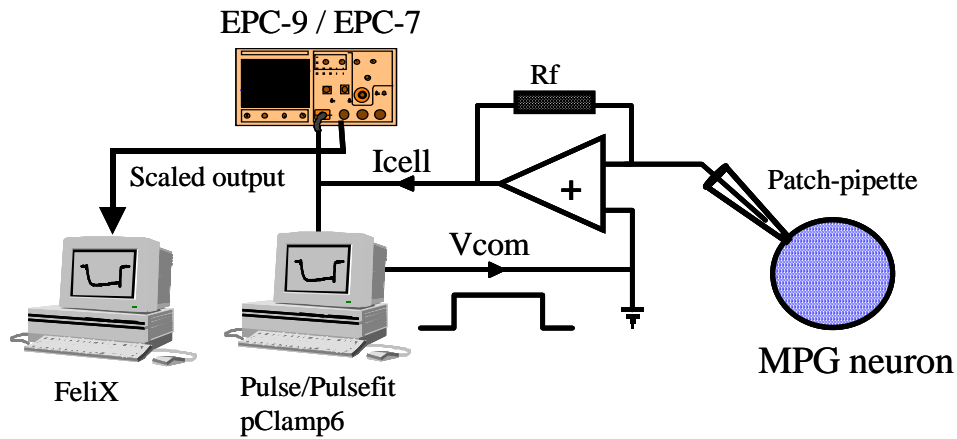


그림 3. 막전압 고정법에 의한 이온 전류 측정 장치의 모식도. 패치 클램프 전용소프트웨어(Pulse/Pulsefit 혹은 pClamp6)를 이용하여 만든 전압 프로토콜로 고정하고자 하는 전압(V_{com})을 A/D converter(EPC-9 혹은 digidata 1200)를 거쳐 아날로그 신호로 바꾸어 패치 전극(patch pipette)을 통하여 전달하고 세포막에 존재하는 이온통로의 활성정도에 따라 변화하는 전압을 고정하기 위해 증폭기(EPC-9 혹은 EPC-7)를 통하여 흘려주는 전류(I_{cell})을 다시 디지털로 전환하여 컴퓨터에 저장한다. 이때 EPC7 증폭기를 이용한 경우에는 전류를 다른 컴퓨터로 연결하여(scaled output), FeliX 소프트웨어 상에서 구현하였다.

표 2. GABA_A 및 GABA_C 수용체 아형의 역전사 연쇄증합반응에 사용된 primer들

Primer	Sequence (5' to 3')	Position	Size (bp)	GeneBank Accession #
α1	Sense	CAA GCC CGT GAT GAA GAA AAG	46-68	300 L08490
	Antisense	GTG GAA AAA TGT ATC TGG AGT C	441-420	
α2	Sense	CAG CAT TAC TAC TGA AGT CTT C	132-150	399 L08491
	Antisense	TAA GAG ACT TCC GAG GTC G	530-512	
α3	Sense	TTT CTC CTC TCT GCT TCG GG	115-134	340 L08492
	Antisense	AAG CCC AGG TCG CAG TCG GTT CT	454-434	
α4	Sense	CCC TCT CCT CGC ACC CTG	14-31	342 NM-080587
	Antisense	ATC AGA AAC GGG TCC AAA GC	355-336	
α5	Sense	CAA GAA GGC CTT GGA AGC AGC TAA	1351-1374	348 NM-017295
	Antisense	GGT TTC CTG TCT TAC TTT GGA GAG	1698-1675	
α6	Sense	AAG CCC CCG GTA GCA AAG TCA AAA	1396-1419	390 L08495
	Antisense	TAA CGC AGG AAA ATG GAA AAT AAC C	1785-1761	
β1	Sense	TCT CTC TTT TCC TGT GAT GGT TGC	113-136	432 NM-012956
	Antisense	GTG ATC CGT AGT CCA TAG AGA ACA GT	544-519	
β2	Sense	TGG GGT GCT TTG TCT TTG TCT TTA	1005-1028	360 NM-012957
	Antisense	TCA GGC GAC TTT TCT TTT GTG	1364-1344	
β3	Sense	GGC TTT TCG GCA TCT TCT CG	93-112	417 NM-017065
	Antisense	CAT CAG GGT GGA GGC GGA	509-492	
γ1	Sense	CAG AGA CAG GAA GCT GAA AAG CAA A	1197-1221	361 NM-080586
	Antisense	CGA AGT GAT TAT ATT GGA CTA AGC C	1557-1533	
γ2S	Sense	AAG AAA AAC CCT GCC CCT ACA ATT	1158-1177	337 L08497
	Antisense	TTC GTG AGA TTC AGC GAA TAA GAC	1494-1471	
γ2L	Sense	CIT CIT CGG ATG TTT TCC TTC AAG	1328-1351	391 BC031762
	Antisense	CAT AGG GTA TTA GAT CGT TGG ACT	1718-1695	
γ3	Sense	CGA ATA AGC CIT CAA GCA CCC TCT	1201-1224	331 NM-024370
	Antisense	CIT CTG TCA TCC TTC AGA GCA GCA	1531-1508	

Primer	Sequence (5' to 3')	Position	Size (bp)	GeneBank Accession #
δ	Sense	ATG GAC TAA TGG AGG GCT ACG C	183-204	313 NM_017289
	Antisense	TCG GGC TGT AGG CGG ATA AG	495-476	
ε	Sense	GCA AGA TGC TCA CTC CAC ATG CTC	2049-2072	385 NM_023091
	Antisense	TGT GGC CAT GGT GAG CAC AGA AC	2433-2416	
$\rho 1$	Sense	TCT CAC GGC TTC TCG GGA GAA CTG	72-95	586 NM_017291
	Antisense	CTG TAC CCG CAA CAT GAC GTT GTC	657-634	
$\rho 2$	Sense	TGC CTG TTG CGT CAT AGA CGT TTG	141-164	522 NM_017292
	Antisense	TGG CCA TCG GGA AAC ACT CGC AGC	662-639	
$\rho 3$	Sense	TGG TTG GCC TTC TTC ACC TAC ACC	211-234	560 NM_138897
	Antisense	GTG TCC AGA GGA AAC CTG CTG AAG	770-747	

표 3. PKC 아형의 역전사 연쇄중합반응에 사용된 primer들

Primer	Sequence (5' to 3')	Position	Size (bp)	GeneBank Accession #
PKC ξ	Sense	CGATGGGGTGGATGGGATCAAAA	852-874	681 NM 022507
	Antisense	GTATTCATGTCAGGGTTGTCTG	1511-1532	
PKC μ	Sense	GCTTTCTGTGATCACTGTGG	1063-1082	1341 XM 234108
	Antisense	AATTCCAAACCTGTCCAGAAC	2384-2403	
PKC λ	Sense	GCTTATGTTTGAGATGATGGCGG	1505-1523	197 XM 342223
	Antisense	TGACAACCCAATCGTTCCTTTG	1680-1701	

제3장 결 과

3.1. 주골반절에서 세포 종류에 따른 $GABA_A$ 수용체 발현

$GABA_A$ 수용체가 MPG 신경세포에 존재하는 것을 면역조직화학 혹은 형광염색을 통해 확인하였다. MPG에서 $GABA_A$ 수용체에 대한 면역 반응성 (immunoreactivity; IR)을 보이는 세포가 존재하였다(그림 4). 세포 종류에 따른 $GABA$ 수용체 발현을 알아보기 위하여 교감 신경세포 marker인 tyrosine hydroxylase (TH)와 $GABA_A$ 수용체 $\beta 2/3$ ($GABA_A R \beta 2/3$) 소단위(subunit)를 동시에 염색하였다. $GABA_A$ 수용체는 주로 TH에 양성인 세포에서 발현되어있었다(그림 4). $GABA_A R$ -IR를 가지는 92% 세포에서 TH-IR가 함께 관찰되었으며, 일부의 세포(8%)에서는 TH-IR가 없었다. 전체 MPG 세포에서 $GABA_A R$ -IR와 TH-IR 모두 양성인 세포는 21%, $GABA_A R$ -IR만 양성인 세포는 2% 그리고 TH-IR에만 양성인 세포는 3%였다. 따라서 $GABA_A R$ 는 주로 TH에 염색되는 교감 신경세포에 존재함을 알 수 있었다.

3.2. $GABA_A$ 수용체 소단위들의 분자생물학적 동정

MPG 신경세포에서 발현되는 $GABA_A$ 및 $GABA_C$ 수용체 소단위(subunit)를 확인하기 위해, MPG로부터 mRNA를 분리한 다음 특정 수용체에 선택적인 primer(표 2)를 이용하여 역전사 연쇄중합반응을 실시하였다. 그림 5에 보듯이 $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 2$, $\gamma 1$ 및 $\gamma 2S$ 의 mRNA가 많이 발현 되었으며, $\alpha 2$, $\alpha 5$, 및 $\gamma 2L$ 역시 발현되었다. 하지만 $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 3$, δ , ϵ 및 $\rho 1-3$ 의 mRNA는 발현되지 않았다.

3.3. GABA 전류의 농도 반응관계

GABA 전류는 세포 내외의 대칭적 Cl⁻ 농도경사([Cl⁻]_i = 146 mM; [Cl⁻]_o = 148 mM; E_{Cl⁻} = -0.34 mV)에서 기록하였다. 이러한 조건하에서 세포외액에 1 μM의 GABA에 의해 내향성 전류가 관찰되기 시작했으며, GABA 농도가 증가할수록 내향성 전류가 더욱 커지는 농도의존적 반응을 나타내었다(그림 6A). 가한 GABA의 농도 범위는 0.1 μM에서 300 μM였다. GABA 전류는 낮은 농도에서는 내향성 전류의 활성화가 느리고, 탈감작(desensitization)이 잘 일어나지 않았으나, 높은 농도로 갈수록 빠른 활성화와 탈감작을 보였다(그림 6A). GABA에 의한 내향성 전류는 100 μM 이상에서 포화(saturation)되었으며, EC₅₀는 7.3 μM, Hill's slope은 1.4±0.1였다(그림 6B).

3.4. Protein kinase C에 의한 GABA_A 수용체 조절

MPG 세포에서 GABA 전류가 protien kinase C(PKC)에 의해 조절되는지를 PKC 활성화제 및 억제제를 사용하여 확인하였다. PKC는 모두 12 종류의 아형이 알려져 있으며 세포내 칼슘 의존적인 것과 비의존적인 것으로 나눌 수 있다. MPG 신경세포에서 PKC에 의한 GABA 전류가 세포내 칼슘 의존적인지 확인하기 위하여 세포내 환경이 유지되는 gramicidin perforated patch와 ruptured patch를 사용하여 세포내 칼슘을 치환한 상태에서 실험을 하였다. Gramicidin perforated patch 하에서 PKC 활성화제인 PDBu(100 nM)에 의해서 시간이 지날수록 GABA 전류가 증가하였으며(33.0 ± 9.4 %; n=5), PKC 억제제인 Calphostin C(2 μM)에 의해서는 26.7 ± 7.1 % 억제되었다(그림 7A 및 B). 세포내 칼슘을 제거하기 위해 높은 농도의 EGTA가 포함된 전극내 용액을 사용하여 whole-cell ruptured patch를 만들어 PKC 활성화제 및 억제제 효과를 관찰하였다. 세포내 칼슘을 제거한 상태에서도 동일하게 PKC 활성화제인 PDBu에 의해서는 GABA 전류가 증가(24.3 ± 4.4 %) 되었으며, 억제제인 Calphostin C에 의해서는 억제되었다(45.0 ± 11.3 %; 그림 8). 그림 9는 다른 종류의 PKC 활성화제 및 억제제에 의한 GABA 전류 활성도를 보여준다. GABA 전류는 PKC 활성화제인 PMA의 비활성 형태인 4α-phorbol에 의해서는 효과

가 없었으며(그림 9A, D), PKC 활성화제인 PMA에 의해서는 GABA 전류가 증가하였다(그림 9B, D). 또 다른 PKC 억제제인 GF109203X에 의해서는 GABA 전류가 억제되었다(그림 9C, D). 이는 MPG 신경세포에서 GABA 전류는 PKC 제제에 의해 증가 혹은 억제되는 것으로 보아 평상시 PKC가 어느 정도 활성화 되어 있으며, 칼슘 비의존적인 PKC에 의해 활성화됨을 알 수 있었다.

3.5. GABA_A 수용체 조절에 관여하는 Protein Kinase C 아형 (Subfamily)의 확인

GABA_A 수용체의 조절에 관여하는 칼슘 비의존적인 PKC의 아형을 확인하기 위해 conventional, novel PKC의 활성화제인 diacylglycerol(DAG)의 세포투과형 유도체인 OAG를 사용하였다. OAG에 의해 GABA 전류의 크기가 OAG를 처리하기 전과 비교하여 커지지 않았으며 이는 whole-cell ruptured patch와 gramicidin perforated patch 모두에서 동일하게 나타났다(그림 10). 칼슘 비의존적인 PKC 중 DAG에 의해 활성화되지 않는 atypical PKC(aPKC)의 아형의 발현을 확인하기 위해 역전사 연쇄중합반응을 수행한 결과 그림 11에서 보는바와 같이 주골반 신경절에서는 ζ 가 발현되는 것을 확인하였다.

3.6. Adenylyl cyclase와 protein kinase A에 의한 GABA_A 수용체 조절

MPG 세포에서 GABA 전류가 adenylyl cyclase(AC)-PKA에 의해 조절되는지를 확인하였다. 선택적 GABA_A 수용체 효현제인 muscimol(5 μ M)을 가하여 GABA_A 수용체 전류를 확인하였다. adenylyl cyclase(AC) 억제제인 SQ22536(200 μ M)을 처리한 후 muscimol에 의한 GABA_A 수용체 전류가 현저히 감소함을 관찰할 수 있었다(그림 12A, B). GABA_A 수용체에 PKA가 미치는 효과를 알아보기 위해서 세포막 투과가 가능한 myristoylated PKA inhibitor(PKAI; 100 nM)를 이용하였다.

PKAI 처치 후엔 **Muscimol**에 의해 유발된 전류는 현저히 감소하였다(그림 13A). **Forskolin(FSK)**은 **AC**를 활성화하여 세포내 **cAMP**의 농도를 증가시키며, 증가된 **cAMP**는 **PKA**를 활성화하여 다양한 생리적 기능을 수행한다. **AC** 활성화제인 **FSK**가 **GABA_A** 수용체에 영향을 주는지를 확인하였다. **Muscimol** 전류는 **FSK(1 μM)** 처치 후에 증가되는 것을 확인할 수 있었다(그림 13B). 이상의 결과에서 **MPG** 세포에서 **GABA_A** 수용체는 **AC-PKA**에 의해서도 조절됨을 알 수 있었다.

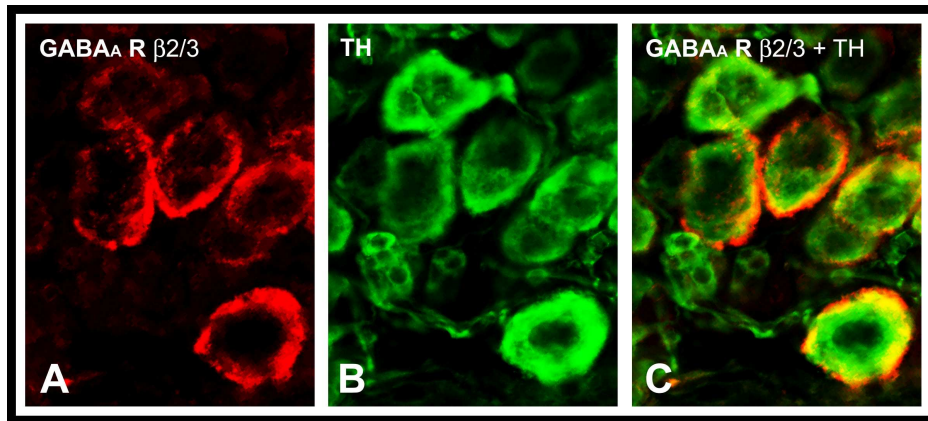


그림 4. 주골반절에서 **GABA_A** 수용체와 **tyrosine hydroxylase**의 면역조직화학 염색. **A.** **GABA_A** 수용체 β2/3 소단위(subunit)의 발현. **GABA_A** 수용체(붉은색)가 세포막에 염색되는 것을 보여준다. **B.** Tyrosine hydroxylase(TH) 염색. TH는 세포내에 염색(녹색)되는 것을 보여준다. **C.** **GABA_A** 수용체 β2/3 소단위와 TH의 double-labelling. TH와 **GABA_A** 수용체 β2/3는 동일 세포에서 염색됨을 보여준다. TH에 염색되는 작은 세포 즉 **small intense fluorescent(SIF)** 세포에는 **GABA_A** 수용체가 발현되지 않았다. 사진 배율은 400배.

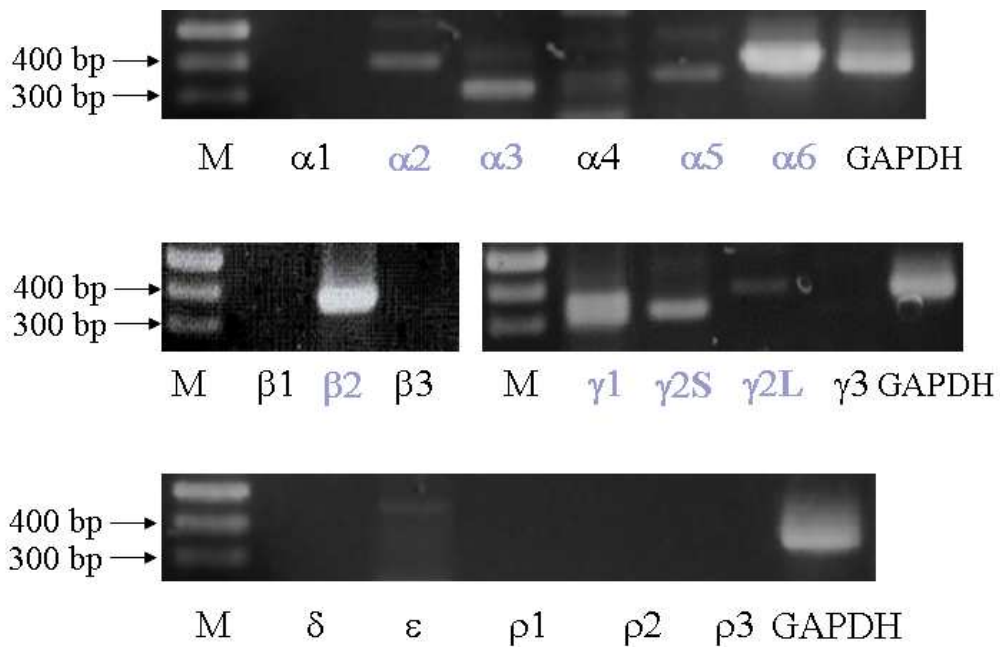


그림 5. MPG에 발현된 $GABA_A$ 수용체 소단위의 분자생물학적 동정. 주 골반절에 발현된 $GABA_A$ 수용체 소단위들을 확인하기 위해, 이들 조직으로부터 mRNA를 분리한 다음, 특정 소단위에 선택적인 primer를 이용하여 역전사 연쇄중합반응을 실시하였다. 대조군으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 사용하였으며, M은 DNA size marker임.

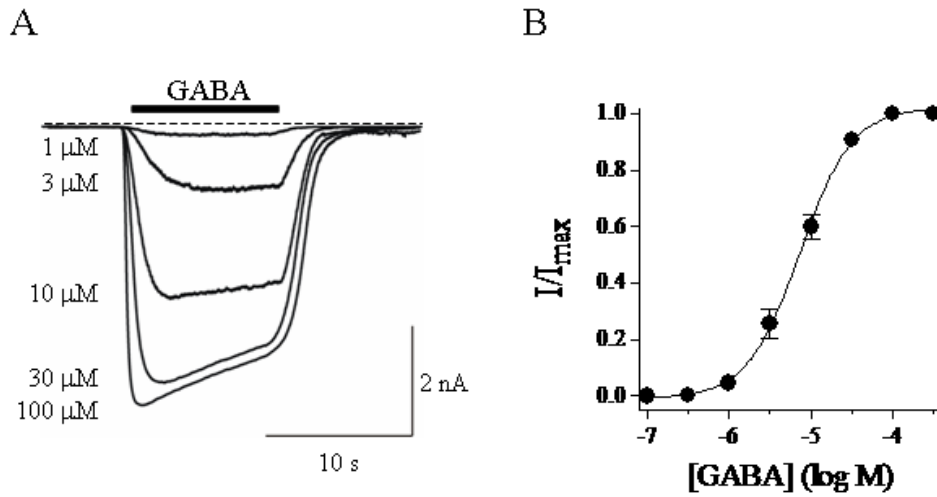


그림 6. GABA 전류의 농도-반응 관계(dose-response relationship). A. 막전압을 -80 mV에 고정한 상태에서 기록한 GABA 전류. 가한 GABA의 농도는 왼쪽에 제시되었으며 GABA를 관류시킨 시간은 검은 막대로 표시하였다. B. GABA 농도-반응 곡선. 모든 data는 포화농도(saturating concentration)에서 기록한 전류에 대한 표준화된 값을 취하였다. 모든 결과는 평균±표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 6례.

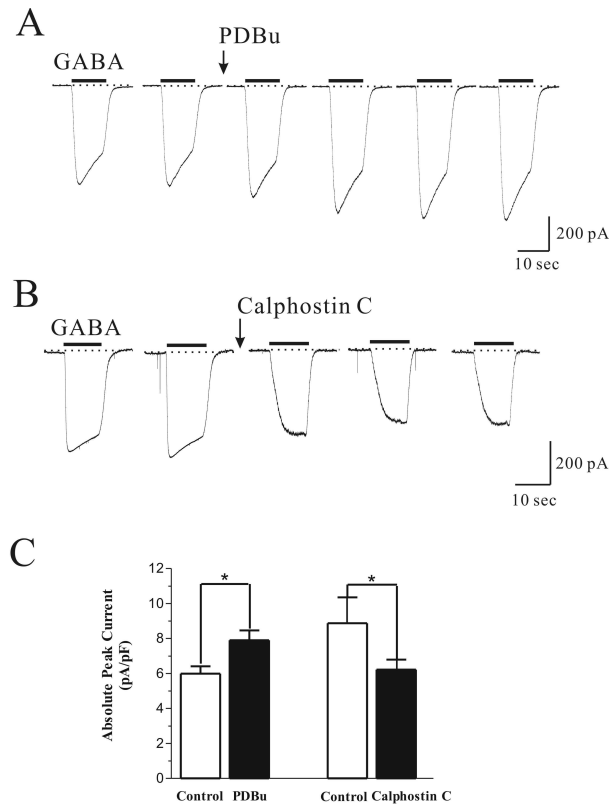


그림 7. Gramicidin perforated patch 하에서 protein kinase C에 의한 $GABA_A$ 수용체의 조절. A. PKC 활성화제인 PDBu(100 nM)가 $GABA_A$ 수용체 전류에 미치는 효과. B. PKC 억제제인 calphostin C(2 μ M)가 $GABA_A$ 수용체 전류에 미치는 효과. C. A와 B의 결과 요약. 모든 기록은 gramicidin-perforated patch 하에서 막전압을 -80 mV에 고정하여 실험하였으며, 전류의 측정은 5분마다 이루어졌다. 전류는 10 μ M GABA를 처치하여 유발하였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, C에서 전류의 크기는 세포막 용량(capacitance; pF)로 표준화하였다. 실험 레수는 6례. * $p < 0.05$

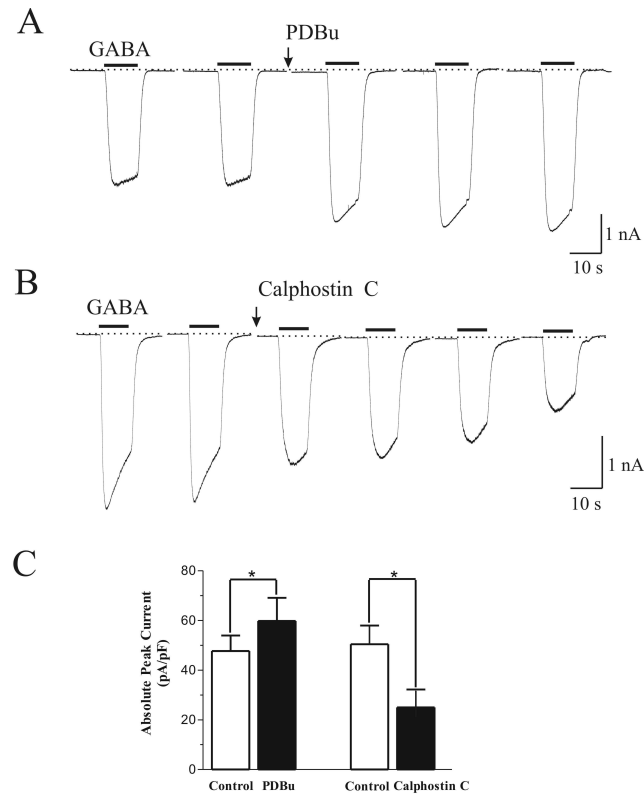


그림 8. Whole-cell patch 하에서 protein kinase C에 의한 GABA_A 수용체의 조절. A. PKC 활성화제인 PDBu(100 nM)가 GABA_A 수용체 전류에 미치는 효과. B. PKC 억제제인 calphostin C(2 μM)가 GABA_A 수용체 전류에 미치는 효과. C. A와 B의 결과 요약. 모든 기록은 whole-cell patch 하에서 세포내 칼슘을 EGTA로 제거한 상태에서 기록하였다. 전류는 막전압을 -80 mV에 고정하여 10 μM GABA에 가하여 기록하였으며, 전류의 측정은 5분마다 이루어졌다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었으며, C에서 전류의 크기는 세포막 용량(capacitance; pF)로 표준화하였다. 실험 레수는 6례. * p<0.05

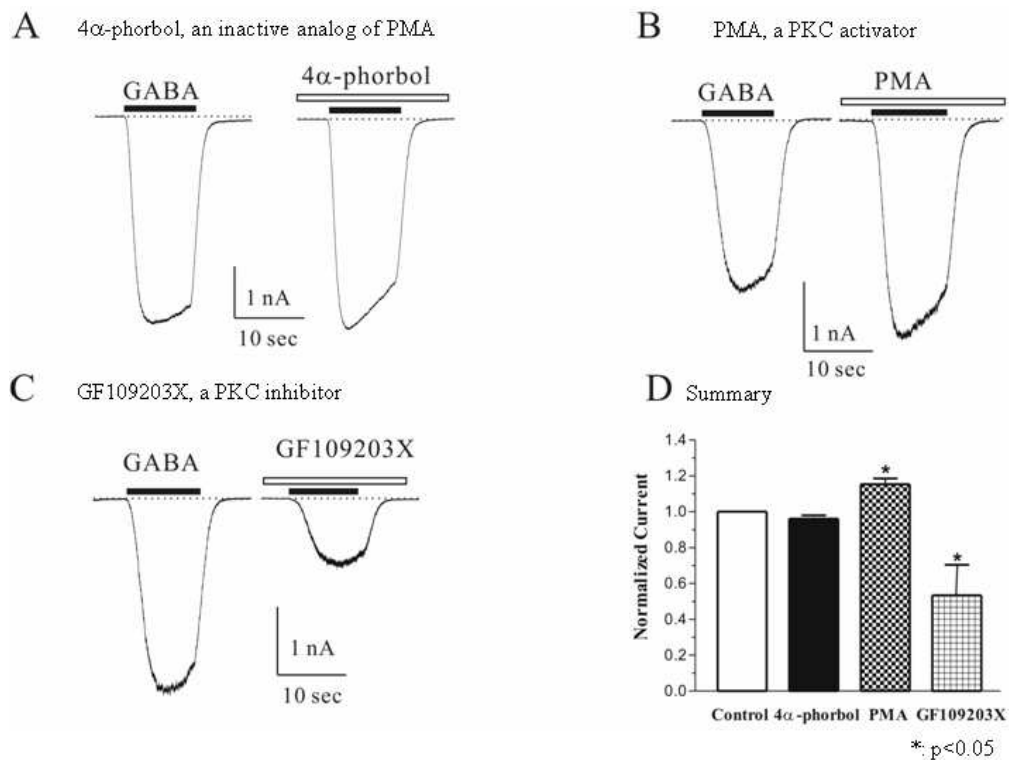


그림 9. Protein kinase C에 의한 GABA_A 수용체의 조절 요약. A. PKC 활성화제인 PMA의 비활성 약물인 4 α -phorbol(500 nM)가 GABA 전류에 미치는 영향. B. PKC 활성화제인 PMA(500 nM)에 의한 GABA 전류의 조절. C. PKC 억제제인 GF109203X(500 nM)가 GABA_A 수용체 전류에 미치는 효과. D. A-C의 결과 요약. 모든 기록은 whole-cell patch 하에서 세포내 칼슘을 EGTA로 제거한 상태에서 기록하였다. 전류는 막전압을 -80 mV에 고정하여 10 μ M GABA를 가하여 기록하였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 6례. * p<0.05

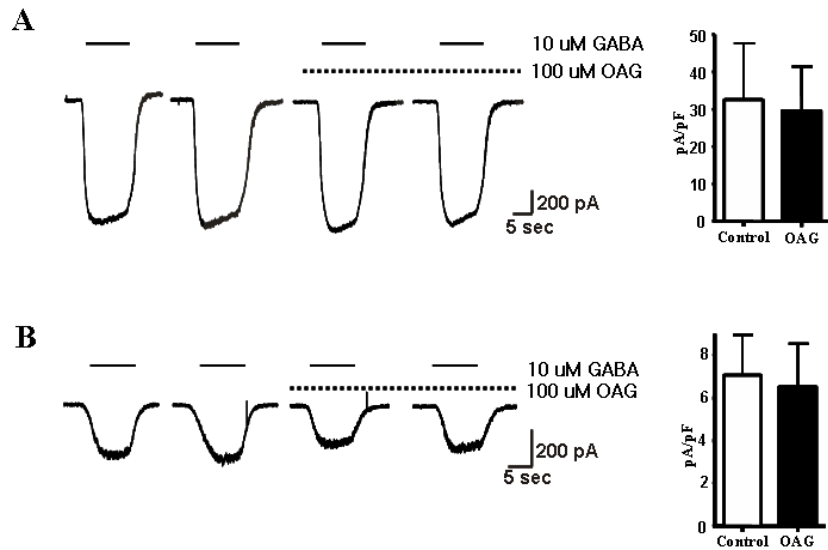


그림 10. 비정형(atypical) PKC(α PKC) 활성화제가 $GABA_A$ 수용체에 미치는 영향. A. Whole-cell patch 하에서 OAG(100 μ M)가 $GABA_A$ 수용체 전류에 미치는 효과. B. Gramicidin perforated patch 하에서 OAG가 $GABA_A$ 수용체에 미치는 효과. 전류는 막전압을 -80 mV에 고정하여 10 μ M GABA를 가하여 기록하였다. n=4.

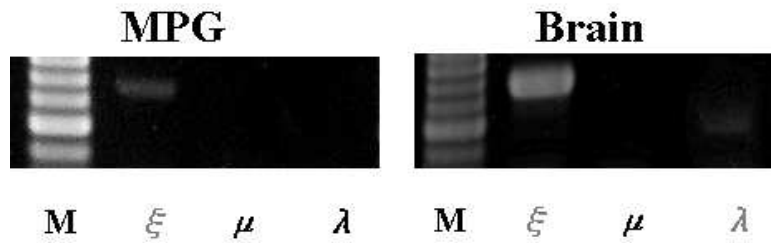


그림 11. MPG에 발현된 aPKC isoform의 분자생물학적 동정. 주골반절에서 발현된 aPKC의 아형을 확인하기 위해, 이들 조직으로부터 cDNA를 합성한 다음, 특정 아형에 선택적인 primer를 이용하여 증합효소 연쇄반응을 실시하였다. 대조군으로 흰쥐의 전체뇌를 대상으로 cDNA를 합성한 후 동일 조건에서 역전사 연쇄증합반응을 실시하였고, M은 DNA size marker임.

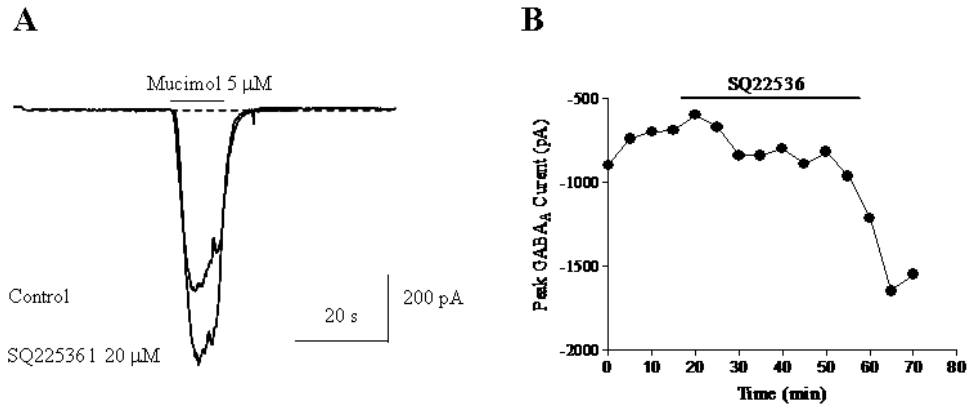


그림 12. Adenylyl cyclase가 GABA_A 수용체의 활성화에 미치는 영향. A 및 B. GABA_A 수용체 효현제인 muscimol(10 μ M)에 의한 세포내 칼슘 증가에 대한 AC 억제제인 SQ22536(200 μ M) 전처리 효과. 모든 기록은 whole-cell patch 하에서 세포내 칼슘을 EGTA로 완충한 상태에서 기록하였다. 전류는 막전압을 -80 mV에 고정하여 10 μ M muscimol을 가하여 기록하였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 실험 레수는 6례. * p<0.05

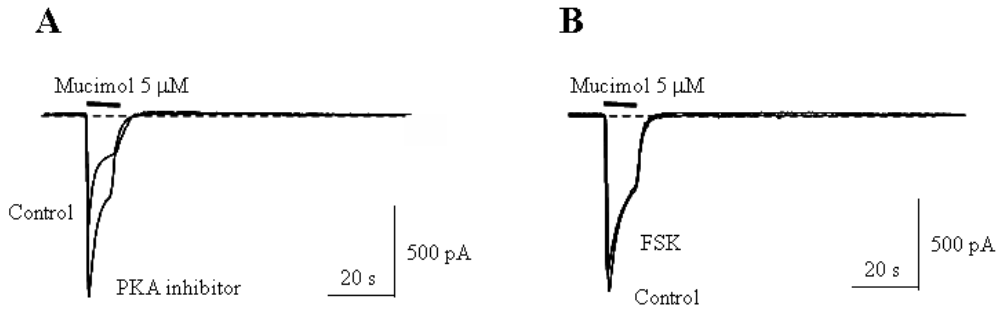


그림 13. PKA 억제제 및 forskolin이 $GABA_A$ 수용체에 미치는 영향. A. PKA 억제제(PKA inhibitor) 전처치 전후의 muscimol($10 \mu M$)에 의한 전류. B. AC 활성화제인 forskolin(FSK, $1 \mu M$)을 전처치한 후 muscimol에 의한 전류 크기의 변화.

제4장 고찰

4.1. 주골반절 신경세포에 발현된 GABA_A 수용체의 특성

GABA_A 수용체는 5-HT₃, glycine, 니코틴성 acetylcholine(ACh) 수용체들과 마찬가지로 5개의 소단위로 이루어진 오합체(pentamer) 구조의 이온통로이다. GABA는 중추신경계의 대표적인 억제성 신경전달물질로 알려져 있으나, 자율신경계에서는 세포의 탈분극을 유발하며(Adams 및 Brown, 1975), 이러한 탈분극은 GABA_A 수용체 차단제에 의해 소실됨이 보고되었다(de Groat 및 Booth, 1993). 최근에 MPG에 존재하는 교감 및 부교감 신경세포를 전기생리학적 및 신경화학적(neurochemical) 특성을 기준으로 구분하려는 시도가 되어져 왔다(Zhu 등, 1995). MPG 신경세포 종류에 따른 가장 큰 전기생리적 특징은 T-형 칼슘 전류의 존재 유무이다(Zhu 등, 1995; Zhu 및 Yakel, 1997). 또 GABA_A 수용체는 전기생리학적으로는 T-형 칼슘 전류가 있는 세포에서 주로 존재하며(Kong 등, 2001), 본 연구에서는 교감 신경 marker인 TH에 염색이 되는 92%의 세포에서 GABA_A 수용체 면역반응성(immunoreactivity)이 나타났다. 이상의 결과들은 MPG 신경세포에서 GABA_A 수용체는 주로 교감 신경절 세포에 발현되어있음을 시사한다. MPG에서 GABA 합성 효소 및 GABA를 함유한 신경세포의 존재(de Groat, 1970; Kusunoki 등, 1984) 그리고 GABA 결합부위가 존재함이 보고되었다(Kusunoki 등, 1984). 하지만 MPG에서 세포의 종류에 따른 GABA 수용체의 구성과 이들 수용체 조절에 관한 연구는 현재까지 알려진 바가 없었다. 본 연구의 결과로 볼 때 GABA 수용체는 MPG중에서 주로 교감신경세포에 존재하는 것으로 추측된다. 한편 GABA와 같은 오합체 구조의 5-HT₃ 수용체는 주로 부교감 신경세포에 발현되어 있으며(Cha 등, 2004), 니코틴성 ACh 수용체도 교감 및 부교감 신경에 따라 그 특징이 일부 다름이 알려졌다(Park 등, 2004). MPG는 다른 자율신경절과는 달리 교감 및 부교감 신경이 동일 신경절 내에 존재하는 독특한 자율신경절이다(Dail, 1996; Keast, 1999). 따라서 MPG에서 세포 종류에 따른 GABA_A 수용체 발현은 MPG에

서 GABA_A 수용체와 다른 수용체 간의 **cross-talk** 조절을 연구하는데 좋은 모델로 사용되고 있다.

MPG에서 GABA_A 수용체를 구성하는 소단위들의 mRNA는 $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 2$, $\gamma 1$ 및 $\gamma 2S$ 의 mRNA가 주로 발현 되었으며, $\alpha 2$, $\alpha 5$, 및 $\gamma 2L$ 역시 발현되었다. GABA_A 수용체는 많은 조합의 이종(**heterogeneity**)이 존재하며 많은 소단위들은 뇌의 부위에 따라 다른 분포를 한다(McKernan 및 Whiting, 1996; Sigel 및 Buhr, 1997). Native GABA_A 수용체에서 α 와 β 소단위들은 수용체 구조를 이루는데 필수적인 요소로 간주되며, 수용체의 생리적 특성은 각 소단위의 구성에 따라 다르게 나타난다. GABA_A 수용체는 **benzodiazepine**, **barbiturate**, **neurosteroid**, 항경련제 및 알콜 등과 같은 여러 약물들의 표적이 되며, 이러한 약물들의 효과는 GABA_A 수용체 소단위의 조합에 따라 다르게 나타난다. 이러한 GABA_A 수용체 소단위들은 조직이나 부위에 따라 다르며, 세포 종류에 따라 심지어 동일 종류의 세포에서도 다르게 나타날 수 있다. 비록 **native** GABA_A 수용체에서 $\alpha 1\beta 2$ (혹은 3) $\gamma 2$ 소단위의 조합이 가장 많이 존재하는 것으로 알려져 있지만 각각의 유전자의 고유 기능은 명확히 알려져 있지 않았다. MPG 신경세포에서 GABA 의 EC_{50} 값은 $7.3 \mu\text{M}$ 이었다. 유전자 재조합 실험에서 α , β , 및 γ **subunit**의 조합으로 된 GABA 수용체의 EC_{50} 범위는 $1\text{-}50 \mu\text{M}$ 이었으며, $\alpha\beta\epsilon$, $\alpha\beta\delta$ 혹은 $\alpha\beta$ **subunit**의 경우에는 이보다 낮은 EC_{50} 범위를 가진다고 알려져 있다(Angelotti 등, 1993; Saxena 및 Macdonald, 1994). 본 실험 결과에 따르면 MPG 신경세포는 α , β , 및 γ **subunit**으로 이루어진 GABA_A 수용체의 EC_{50} 값과 유사하였다. 또한 GABA_A 수용체 소단위 구성의 형태와 여러 조절자에 의한 조절에 관련된 연구들이 대부분 뇌를 비롯한 중추신경계에서 진행되었으며, 자율신경계를 비롯한 말초신경계에서는 연구가 미흡하였다. 따라서 비노 생식계 및 장하부의 자율신경 중추로 알려진 MPG의 교감신경에 GABA_A 수용체가 발현되어있으며, 발현된 수용체의 소단위들의 규명은 비노생식계 및 장하부에 작용하는 약물 혹은 GABA_A 수용체 조절자들이 자율 신경계에 미치는 영향을 이해하는데 중요한 기초를 제공할 것으로 사료된다.

4.2. Protein kinase에 의한 GABA_A 수용체의 조절

GABA_A 수용체의 소단위들은 PKC, PKA, Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase, 및 tyrosin kinase 등과 같은 protein kinase에 의해 인산화 되는 아미노산을 포함하고 있다(Song 및 Messing, 2005). PKC는 phospholipid -dependent serine-threonine kinase의 한 종류로 세포내 신호전달에 중요한 역할을 담당한다. 아홉 종류의 PKC 아형들이 알려져 있으며, 크게 세 그룹으로 구분된다. 첫 번째는 'conventional' PKC(cPKC; α , β , 및 γ)로 칼슘, phosphatidylserine(PS) 및 diacylglycerol(DAG)에 의해 활성화된다. 두 번째 그룹은 'novel' PKC(nPKC; δ , ϵ , η , 및 θ)로 PS 및 DAG에 의해 활성화 되나 칼슘에 의해서는 활성화되지 않는다. 마지막 그룹은 'atypical' PKC(aPKC; ζ 및 λ/ι)이다. 이들은 칼슘 및 DAG에 반응하지 않으며, 다른 지방 전달자(lipid messenger)에 의해 활성화된다. 본 연구에서 GABA_A 수용체는 PKC 활성화제에 의해 크게 그 기능이 커졌으며, 억제제에 의해서는 감소되는 조절 기전을 보여주었다. 이러한 PKC 활성화제 및 억제제에 의한 조절은 세포내 환경을 그대로 유지시킨 gramicidin perforated patch나 높은 농도의 EGTA를 포함한 whole-cell patch 하에서 동일하였다. 높은 EGTA를 사용하여 칼슘을 충분히 치환하였을 경우에도 PKC에 의한 조절이 남아있는 것으로 보아 MPG에서 GABA_A 수용체는 칼슘 비민감성 PKC 아형에 의해 조절 될 것으로 사료된다. 특별히 DAG의 세포투과형 유도체인 OAG에 의한 GABA 전류의 증감이 나타나지 않음으로 GABA 전류에 관여하는 PKC는 atypical PKC이고, 분자생물학적 동정으로 ζ 형의 PKC임을 확인하였다. 한편 쥐의 retina에서 ζ 형의 PKC는 GABA_C 수용체 ρ 소단위체의 인산화로 GABA current를 조절한다고(Croci 등, 2003) 보고되어 있으나 본 실험에서는 GABA_A를 매개로 그 효과가 확인되었다.

보고에 따르면 PKC에 의해 GABA_A 수용체의 소단위체가 인산화되는 위치가 *in vitro* 실험으로 밝혀졌는데, 그 위치는 β 1 소단위체의 Ser409(Moss 등, 1992)와 γ 2L 소단위체의 Ser327, Ser343(Whiting 등, 1990)가 GABA_A 수용체의 기능

에 중요하게 관여하는 것으로 보고되었다. 본 실험결과 MPG에는 $\beta 2$, $\gamma 1$ 및 $\gamma 2$ 소단위체가 주요하게 발현되는 양상이 역전사 중합 연쇄반응으로 확인되었고, 특히 γ 소단위체가 PKC에 의해 인산화되어 GABA_A 수용체의 기능 조절에 관여할 것으로 추측된다.

PKA 역시 GABA 전류의 조절에 관여한다고 보고되었는데 MPG에서는 PKC와는 반대되는 방향으로 PKA의 활성화와 억제제에 의해 조절되었다. 추후 연구에서 PKC에 의해 조절되는 GABA_A 수용체의 소단위체의 규명과 PKA의 조절관계를 밝혀야 할 것이다

제5장 결론

수컷 쥐 주골반 신경절 세포에 GABA_A 수용체의 아형 및 기능을 확인하고, PKC 에 의한 GABA 활성화 전류에 대한 조절의 특성을 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. GABA_A 수용체는 주로 교감신경에만 발현되어 있으며, 막전압의 탈분극을 유도하는 흥분성 효과를 나타내었다.
2. 면역염색결과 $\beta 2$ 혹은 $\beta 3$ subunits가 주로 교감신경에서 확인되었다.
3. RT-PCR 결과 $\alpha 1$ 을 제외한 $\alpha 2-6$ 아형과 $\beta 2$, $\gamma 1$ 및 $\gamma 2$ 가 확인되었으나, GABA_C 수용체를 구성하는 ρ subunit은 검출되지 않았다.
4. GABA_A 수용체는 PKC activator 들에 의해 증가되었고, inhibitor 들에 의해서는 억제되었다.
5. 칼슘에 의한 GABA_A 수용체의 증감 효과는 세포내 칼슘이온에 무관하게 이루어졌다.
6. GABA 에 의해 유도되는 전류는 OAG 에 의해 영향을 받지 않았는데 이는 주로 PKC 에 의한 조절이 비정형(atypical) PKC 에 이루어짐을 시사하며, 이를 PCR을 통해 재확인할 수 있었다.
7. PKA 의 활성화제에 의해 GABA_A 수용체에 의한 GABA 전류가 억제하였고, 억제제에 의해 증가하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 주골반 신경절의 교감신경세포에서 확인된 흥분성 GABA_A 수용체는 PKC 에 의해 더욱 강력히 활성화되며, 여러 아형중 비정형 PKC 가 관여한다. 이와 같은 효과는 교감신경 말단에서의 **noradrenaline**의 분비를 조절하여 더욱 효과적인 기능을 담당하고 이는 장(bowel) 운동, 배뇨 및 발기 등과 같은 최종 복강장기의 활성도를 조절하는 주요 인자가 될 수 있으리라 여겨진다.

참고문헌

- Adams PR, Brown DA. Actions of gamma-aminobutyric acid on sympathetic ganglion cells. *J Physiol.* 1975;250(1):85-120.
- Akasu T, Munakata Y, Tsurusaki M, Hasuo H. Role of GABA_A and GABA_C receptors in the biphasic GABA responses in neurons of the rat major pelvic ganglia. *J Neurophysiol.* 1999;82(3):1489-1496.
- Angelotti TP, Macdonald RL. Assembly of GABAA receptor subunits: alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 1 gamma 2S subunits produce unique ion channels with dissimilar single-channel properties. *J Neurosci.* 1993;13(4):1429-40.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev.* 1998;50(2):291-313.
- Bradley WE, Timm GW, Scott FB. Innervation of the detrusor muscle and urethra. *Urol Clin North Am.* 1974;1(1):3-27.
- Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):247-264.
- Bormann J, Feigenspan A. GABA_C receptors. *Trends Neurosci.* 1995;18(12):515-519.
- Cha SK, Park KS, Jeong SW, Lee JW, Kong ID. Modulation of GABA-activated chloride currents by PKC and PKA in sympathetic neurons of male rat major pelvic ganglia. *Biophysical J Suppl.* 2004;1492-pos.

- Chapell R, Bueno OF, Alvarez-Hernandez X, Robinson LC, Leidenheimer NJ. Activation of protein kinase C induces gamma-aminobutyric acid type A receptor internalization in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1998;273:32595-32601
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.
- Croci C, Brandstatter JH, Enz R. ZIP3, a new splice variant of the PKC-zeta-interacting protein family, binds to GABA_c receptors, PKC-zeta, and Kv beta 2. *J Biol Chem*. 2003;278(8):6128-35.
- Dail WG, Evan AP, Eason HR: The major ganglion in the pelvic plexus of the male rat: a histochemical and ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 1975;159:49-62.
- Dail WG. The pelvic plexus: innervation of pelvic and extrapelvic visceral tissues. *Microsc Res Tech*. 1996;35(2):95-106.
- Davies PA, Kirkness EF, Hales TG. Modulation by general anaesthetics of rat GABA_A receptors comprised of alpha 1 beta 3 and beta 3 subunits expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Br J Pharmacol*. 1997;120(5):899-909.
- De Groat WC. The actions of gamma-aminobutyric acid and related amino acids on mammalian autonomic ganglia. *J Pharmacol Exp Ther*. 1970;172(2):384-396.
- De Groat WC and Booth AM. Neural control of penile erection, in *Nervous Control of the Urogenital System* (Maggi CA ed) *Harwood Academic Publishers, London*. 1993;467-524.
- Dong CJ, Werblin FS. Dopamine modulation of GABA_c receptor function in an

- isolated retinal neuron. *J Neurophysiol.* 1994;71(3):1258-1260.
- Enna SJ. GABA_B receptor agonists and antagonists: pharmacological properties and therapeutic possibilities. *Expert Opin Investig Drugs.* 1997;6(10):1319-1325.
- Farrant M, Nusser Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA_A receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(3):215-229.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 1981;391(2):85-100.
- Harayama N, Shibuya I, Tanaka K, Kabashima N, Ueta Y, Yamashita H. Inhibition of N- and P/Q-type calcium channels by postsynaptic GABA_B receptor activation in rat supraoptic neurones. *J Physiol.* 1998;509(2):371-383.
- Hedblom E, Kirkness EF. A novel class of GABA_A receptor subunit in tissues of the reproductive system. *J Biol Chem.* 1997;272(24):15346-15350.
- Herring D, Huang R, Singh M, Dillon GH, Leidenheimer NJ. PKC modulation of GABA_A receptor endocytosis and function is inhibited by mutation of a dileucine motif within the receptor beta 2. *Neuropharmacology* 2005;48:181-194
- Hodge CW, Raber J, McMahon T, Walter H, Sanchez-Perez AM, Olive MF, Mchmert K, Morrow AL, Messing RO. Decreased anxiety-like behavior reduced stress hormones, and neurosteroid supersensitivity in mice lacking protein kinase C. *J Clin Invest* 2002;110:1003-1010
- Janig W, McLachlan EM. Organization of lumbar spinal outflow to distal colon and pelvic organs. *Physiol Rev.* 1987;67(4):1332-1404.
- Keast JR: Patterns of co-existence of peptides and differences of nerve fibre types associated with noradrenergic and non-noradrenergic (putative cholinergic) neurons in the major pelvic ganglion of the male rat. *Cell Tissue*

- Res* 1991;266:405-415.
- Keast JR, Luckensmeyer GB, Schemann M. All pelvic neurons in male rats contain immunoreactivity for the synthetic enzymes of either noradrenaline or acetylcholine. *Neurosci Lett*. 1995;196(3):209-212.
- Keast JR. Unusual autonomic ganglia: connections, chemistry, and plasticity of pelvic ganglia. *Int Rev Cytol*. 1999;193:1-69.
- Kittler JT, Delmas P, Jovanovic JN, Brown DA, Smart TG, Moss SJ. Constitutive endocytosis of GABA_A receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2000;20:7972-7977
- Knight AR, Bowery NG. The pharmacology of adenylyl cyclase modulation by GABA_B receptors in rat brain slices. *Neuropharmacology*. 1996;35(6):703-712.
- Kong ID. 이온 채널(Ion channel) - 소화관 평활근에서 포타슘 채널의 역할. *The Korean Journal of Gastrointestinal Motility*. 2001. 70(1):67-69.
- Kubota H, Katsurabayashi S, Moorhouse AJ, Murakami N, Koga H, Akaike N. GABA_B receptor transduction mechanisms, and cross-talk between protein kinases A and C, in GABAergic terminals synapsing onto neurons of the rat nucleus basalis of Meynert. *J Physiol*. 2003;551(1):263-276.
- Kusunoki M, Taniyama K, Tanaka C. Neuronal GABA release and GABA inhibition of ACh release in guinea pig urinary bladder. *Am J Physiol*. 1984 ;246(4 Pt 2):R502-509.
- Langworthy OR. Review of psychiatric progress 1964. Neurophysiology, endocrinology and biochemistry. *Am J Psychiatry*. 1965;121:632-636
- Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF, Dougherty DA. Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci*. 2004 Jun;27(6):329-36.

- Lu J, Karadsheh M, Delpire E. Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J Neurobiol.* 1999;39(4):558-568.
- Macdonald RL and Olsen RW. GABA_A receptor channels. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17:569-602.
- Maggi CA, Santicioli P, Grimaldi G, Meli A. The effect of peripherally administered GABA on spontaneous contractions of rat urinary bladder in vivo. *Gen Pharmacol.* 1983;14(4):455-458.
- Mayer ML, Higashi H, Gallagher JP, Shinnick-Gallagher P. On the mechanism of action of GABA in pelvic vesical ganglia: biphasic responses evoked by two opposing actions on membrane conductance. *Brain Res.* 1983;260(2):233-248.
- McKernan RM, Whiting PJ. Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci.* 1996;19(4):139-143.
- Mills TM, Wiedmeier VT, Stopper VS. Androgen maintenance of erectile function in the rat penis. *Biol Reprod.* 1992;46(3):342-348.
- Moss SJ, Doherty CA, Haganir. Identification of the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylation sites within the major intracellular domains of the β 1, γ 2S and γ 2L subunits of the γ -aminobutyric acid type A receptor. *J. Biol. Chem.* 1992;267:14470-14476
- Ogurusu T, Shingai R. Cloning of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho 3 cDNA. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1305(1-2):15-18.
- Olianas MC, Onali P. Mediation by G protein beta gamma subunits of the opioid stimulation of adenylyl cyclase activity in rat olfactory bulb. *Biochem Pharmacol.* 1999;57(6):649-652.

- Park KS, Cha SK, Kim MJ, Kim DR, Jeong SW, Lee JW, Kong ID. An $\alpha 3\beta 4$ subunit combination acts as a major functional nicotinic acetylcholine receptor in male rat pelvic ganglion neurons. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.* 2006
- Poisbeau P, CHeney MC, Browning MD, Mody I. Modulation of synaptic GABA_A receptor function by PKA and PKC in adult hippocampal neurons. *J Neurosci* 1999;19:674-683
- Saxena NC, Macdonald RL. Assembly of GABA_A receptor subunits: role of the delta subunit. *J Neurosci.* 1994;14(11 Pt 2):7077-7086.
- Smart TG, Moss SJ, Xie X, Huganir RL. GABA_A receptors are differentially sensitive to zinc: dependence on subunit composition. *Br J Pharmacol.* 1991;103(4):1837-1839.
- Sigel E, Buhr A. The benzodiazepine binding site of GABA_A receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1997 Nov;18(11):425-9.
- Song M, Messing RO. Protein kinase C regulation of GABA_A receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(2):119-127.
- Taniyama K, Niwa M, Kataoka Y, Yamashita K. Activation of protein kinase C suppresses the gamma-aminobutyric acid B receptor-mediated inhibition of the vesicular release of noradrenaline and acetylcholine. *J Neurochem.* 1992;58(4):1239-1245.
- Ticku MK, Mehta AK. Gamma-aminobutyric acid A receptor desensitization in mice spinal cord cultured neurons: lack of involvement of protein kinases A and C. *Mol Pharmacol* 1990;38:719-724
- Whiting P, McKernan RM, Iversen LL. Another mechanism for creating diversity in γ -aminobutyric type A receptors: RNA splicing directs expression

of two forms of $\gamma 2$ subunit, one of which contains a protein kinase C phosphorylation site. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1990;87:9966-9970

Zhu Y, Zboran EL, Ikeda SR. Phenotype-specific expression of T-type calcium channels in neurons of the major pelvic ganglion of the adult male rat. *J Physiol.* 1995;489(Pt 2):363-375.

Zhu Y, Yakel JL. Modulation of Ca^{2+} currents by various G protein-coupled receptors in sympathetic neurons of male rat pelvic ganglia. *J Neurophysiol.* 1997;78(2):780-789.

Zoubek J, Somogyi GT, De Groat WC. A comparison of inhibitory effects of neuropeptide Y on rat urinary bladder, urethra, and vas deferens. *Am J Physiol.* 1993;265(3 Pt 2):R537-43.

ABSTRACT

Modulation of GABA_A receptor by Protein kinase C in MPG

Choi, Yeun Jong

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor In Deok Kong)

Activation of autonomic nervous system in various pelvic organ plays a role of various physiological functions. Major pelvic ganglia(MPG) is implicated in autonomic reflexes such as penile erection and micturition in urogenital system and in bowel.

γ -aminobutyric acid(GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system, and its actions are mediated by subtypes of GABA receptors, GABA_A, GABA_B, and GABA_C. GABA_A receptor consisting of α , β , γ and δ subunits is a heterooligomeric ligand-gated chloride channel. It is well known that the occupation of GABA_A receptor by GABA leads to hyperpolarize the membrane potential due to increasing in chloride conductances in many neuronal cells.

This study was performed to confirm which types of GABA_A receptors are expressed in the neurons of MPG and how protein kinase C(PKC) are involved in the regulation of GABA_A receptor function.

GABA_A receptors are expressed particular in sympathetic MPG neurons and one mediated made excitatory function in neuronal excitability. Immuno-staining studies revealed that major expression pattern of GABA_A

subunits was $\beta 2$ or $\beta 3$ in sympathetic neurons and RT-PCR showed expression of mRNA for $\alpha 2-6$, $\beta 2$, $\gamma 1$ and $\gamma 2$. However, mRNA of ρ subunit consisting of $GABA_C$ was not detected.

The GABA-induced inward current was increased by PKC activators in time-dependent manner and decreased by PKC inhibitors. These effects were not associated with intracellular Ca^{2+} and OAG, membrane permeable diacylglycerol (DAG) analogue. This result means that the subfamily of PKC participating in activation of $GABA_A$ receptor is atypical PKC (aPKC). ξ isoform of aPKC was detected by RT-PCR. Taking together, we suggests that excitable $GABA_A$ receptor in sympathetic MPG neuron seemed to be regulated by aPKC. On the other hands, the GABA-induced current was decreased by PKA activators and increased PKA inhibitors. These results suggest that $GABA_A$ receptor could be also modulated by adenylyl cyclase-PKA.

The regulatory roles of PKC on excitatory $GABA_A$ receptors in sympathetic neurons of MPG seemed to be an important factor to control the functional activity of various pelvic organs such as bowel movement, micturition and erection.

Key words : $GABA_A$ Receptor, Protein kinase C, Protein kinase A, Major pelvic ganglia