

사람 망막아중에 발견된 퓨린성
수용체의 특성

연세대학교 대학원
의 학 과
김 윤 희

사람 망막아종에 발현된 퓨린성
수용체의 특성

지도 이 종 혁 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2004년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 윤 희

김윤희의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004년 12월 일

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 끝까지 이끌어 주신 이종혁 교수님, 이 논문이 완성되기까지 지도편달을 아끼지 않으신 라상훈 교수님과 공인덕 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 바쁘신 가운데 신경 써 주시고 깊은 관심을 가지고 조언해 주신 최중환 교수님과 고창만 교수님께도 감사드립니다.

저의 논문의 완성되기까지 많은 도움을 주신 김대란 선생님이하 생리학 교실원들과 안과학 의국원들에게도 감사를 드립니다.

저의 삶을 이끌어 주시고 중심을 잡아주시는 하나님과 저를 나아서 잘 키워주시고 아직도 염려해주시고 애정을 주시는 저의 부모님, 딸처럼 아껴주시고 일하는 며느리 물심양면으로 도와주시는 시부모님, 함께 있음에 기쁨을 느끼게 해주는 남편, 너무도 소중한 우리 딸 주희와 함께 기쁨을 나누고 싶습니다.

2004년 12월

저자 씀

차 례

그림 차례	iii
표 차례	iv
국문요약	v
제1장. 서론	1
1.1 퓨린성 수용체의 일반적 특성	3
1.2. 눈(eye) 영역에서의 퓨린성 수용체의 의의	5
1.3. 망막아종의 특성	7
1.4. 연구목적	9
제2장. 재료 및 방법	10
2.1. 모델 세포주 및 배양	10
2.2. 실험용액 및 약물	10
2.2.1. 실험용액	10
2.2.2. 약물	10
2.3. 세포내 칼슘이온농도 ($[Ca^{2+}]_i$) 측정	11
2.4. 역전사 연쇄 증합반응(RT-PCR)	12
2.5. Western blot analysis	15
2.6. 결과 및 자료분석	15
제3장. 결과	17
3.1. ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화	17
3.2. 퓨린성 수용체 효현제에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화	26
3.3. 퓨린성 수용체 차단제의 효과	30

3.4. RT-PCR 방법을 이용한 수용체의 분자생물학적 규명	33
3.5. Western blot 방법을 이용한 퓨린성 수용체 단백질 규명	37
제4장. 고찰	39
제5장. 결론	44
참고문헌	46
영문요약	61

그림 차례

그림 1. 세포내 칼슘이온농도 이미징 측정을 위한 장치 및 모식도	16
그림 2. WERI-Rb-1 세포들의 형광현미경적 소견 ($\times 200$)	4
그림 3. ATP 농도에 따른 세포내 칼슘이온농도 변화	20
그림 4. ATP 반복투여에 따른 세포내 칼슘이온농도 변화	21
그림 5. 세포외 칼슘이 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과	22
그림 6. Thapsigargin (TG)이 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과	23
그림 7. U-73122가 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과	24
그림 8. 2-APB가 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과	25
그림 9. 퓨린성 수용체 효현제들의 농도 반응 비교	27
그림 10. P2Y ₁ 및 P2X 퓨린성 수용체 효현제에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화의 비교	28
그림 11. BzATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화의 비교	29
그림 12. MRS 2179가 2MeS-ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과	31
그림 13. MRS 2179가 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과	32
그림 14. 망막아중 세포에서 발견되는 P2Y 퓨린성 수용체의 분자생물학적 규명	34
그림 15. 망막아중 세포에서 발견되는 IP ₃ 수용체의 분자생물학적 규명	36
그림 16. 망막아중 세포에서 발견되는 퓨린성 수용체 단백질의 분자생물학적 규명	38

표 차례

표 1. 역전사 연쇄 중합반응(RT-PCR)에 사용된 퓨린성 수용체 primer	13
표 2. 역전사 연쇄 중합반응(RT-PCR)에 사용된 IP ₃ 수용체 primer	14

국 문 요 약

사람 망막아중에 발현된 퓨린성 수용체의 특성

ATP(adenosine 5'-triphosphate)는 세포내에서 일차적인 에너지원으로 이용될 뿐만 아니라 세포외에도 미량 존재하며 세포내 다양한 생리적 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다. 세포외액의 ATP와 같은 adenine 뉴클레오티드 및 adenosine의 작용은 세포외막에 존재하는 수용체를 매개로 이루어지는데, 이러한 수용체를 퓨린성 수용체(purinergic receptor)라 하며, 크게 P1과 P2 수용체로 구분한다. 퓨린성 수용체는 정상적으로 세포의 발달, 증식, 분화, 세포사멸 등의 세포주기 신호전달 과정에 밀접한 관련을 갖고 있으며, 종이나 세포에 따라 수용체의 발현 및 생리적 특성이 다양한 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 소아의 망막에서 치명적인 암을 유발시키는 사람 망막아중 세포를 대상으로 퓨린성 수용체의 특성과 그 생리적 기전의 일부를 규명하고자 하였다. 퓨린성 수용체의 활성화 여부를 확인하기 위해서 망막아중 세포주의 하나인 WERI-Rb-1 세포를 대상으로 칼슘 이미징(imaging) 기법을 이용하여 세포내 칼슘농도 ($[Ca^{2+}]_i$)를 측정하였으며, 망막아중 세포막에 발현된 퓨린성 수용체의 아형을 관찰하기 위해 역전사 연쇄 중합반응 (RT-PCR)과 Western blot 방법을 이용하였다. 본 연구를 통해 규명된 주요 결과는 다음과 같다.

칼슘 이미징 실험에서 10 μ M의 ATP를 투여하였을 때 대부분의 망막아중 세포에서 (80% 이상) 현저한, 일과성 $[Ca^{2+}]_i$ 증가를 보였으며 (n=46), 이와 같은 변화는 농도의존적으로 나타났다. 퓨린성 수용체의 활성화에 따른 $[Ca^{2+}]_i$ 증가는 세포외 칼슘이 제거된 조건에서도 $90.7 \pm 1.0\%$ 이상 유지되었다 (n=48). 역전사 연쇄 중합반응 (RT-PCR)을 관찰한 결과 망막아중 세포에서 P2Y_{1,2,4,6,8,11,12} 아형의 퓨린성 수용체를 코딩하는 mRNA들이 확인되었다. 퓨린성 수용체 각 아형의 활성화를 확인하기 위해 효현제 및 차단제를 사용한 결

과, P2Y₁ 수용체 효현제 (2MeS-ATP, 1 μ M)에 의한 세포내 칼슘농도 증가는 ATP (10 μ M)에 의한 [Ca²⁺]_i의 85.9 \pm 3.1%에 이르나 P2Y₁의 선택적 차단제인 MRS 2179 (30 μ M) 투여시 대부분 (86.3 \pm 2.3%)이 억제되었다 (n=76). 그러나 P2Y_{2,4,6} 효현제인 UTP (100 μ M)에 의한 [Ca²⁺]_i에는 거의 변화가 없었다. P2Y₁₁ 수용체 아형의 효현제인 BzATP (100 μ M)에 의한 [Ca²⁺]_i은 대조군의 31.2 \pm 3.7%에 해당하였다. 한편, phospholipase C (PLC) 차단제 (U-73122, 1 μ M) 및 Ca²⁺-ATPase 차단제 (thapsigargin, 1 μ M)에 의해서는 각각 대조군의 10.4 \pm 1.8% (n=55), 8.1 \pm 0.9% (n=52)로 대부분 억제되었다. 반면에, PLC 차단제인 U-73122의 유사체 (isoform)인 U-73343 (1 μ M) 투여시에는 세포내 칼슘농도의 억제가 유의하게 관찰되지 않았다 (n=69). RT-PCR에서 IP₃₋₁, IP₃₋₂ 수용체 아형의 mRNA가 확인되었으며, IP₃ 수용체 차단제인 2-APB (20 μ M)는 ATP에 의한 세포내 칼슘농도의 증가를 92.5 \pm 1.3% 억제하였다 (n=71). 마지막으로 퓨린성 수용체 단백질을 확인하기 위한 Western blot 방법을 통해 P2Y₁ 수용체 단백질의 발현을 확인하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 망막아종 세포에는 P2Y₁ 수용체가 주로 발현되어 있으며, 이 수용체의 세포내 신호전달 기전은 PLC 경로를 통한 세포내 저장소로부터 칼슘동원에 관여하는 것으로 나타났다. 퓨린성 수용체를 통한 세포내 칼슘동원 기전은 사람 망막아종 세포의 분화와 성숙에 필수적인 과정으로 사료된다. 본 연구의 결과는 사람에서 망막아종의 발생과정에 퓨린성 수용체가 관여하는 기전에 대한 이해의 폭을 넓히는 중요한 기초정보로 활용할 수 있을 것으로 본다.

핵심되는 말: 망막아종 세포, 퓨린성 수용체, 칼슘이온농도, 칼슘 이미징,

사람 망막아종에 발현된 퓨린성 수용체의 특성

<지도 이 종 혁 교수>

연세대학교 대학원 의학과

김 윤 희

제 1장 서론

ATP (adenosine 5'-triphosphate)는 세포내에서 일차적인 에너지원으로 이용될 뿐만 아니라 세포외에도 미량 존재하며 세포내 다양한 생리적 기능에 관여하는 것으로 잘 알려져 있다. 세포외액의 ATP와 같은 adenine 뉴클레오티드 및 adenosine의 작용은 세포외막에 존재하는 수용체를 매개로 이루어지는데, 이러한 수용체를 퓨린성 수용체 (purinergic receptor)라 한다. 이는 여러 가지 효현제 (agonist)의 효과 및 길항제 (antagonist)의 선택성 등을 기준으로 크게 P1과 P2 수용체로 구분한다. Adenosine과 AMP (adenosine monophosphate)의 작용이 우세한 P1수용체는 다시 A₁, A₂, A₃로, ADP와 ATP의 작용이 우세한 P2 수용체는 리간드-의존성 (ligand-gated) 이온채널인 P2X와 G-단백과 연결된 P2Y로 나누어진다 (Burnstock, 1990). 일반적으로 세포외액에서의 퓨린 뉴클레오티드와 뉴클레오시드는 포유동물의 뇌, 뼈, 태반, 골격근, 폐, 비장, 신장, 심장, 눈 등과 같은 조직에 광범위하게 분포하고 있다 (Fries 등, 2004a,b). 이 분자들은 퓨린성 수용체를 통해 중추신경 및 말초신경계에서의 신경전달 (neurotransmitter) 혹은 신경조절 (modulators)(Ralevic 및 Burnstock, 1998; Newman, 2003), 골격근에서 아세틸콜린의 작용 강화 (Akasu 등, 1981), 심근 (Burnstock 및 Meghji, 1983; Olsson 및 Pearson, 1990), 수뇨관 (Kong, 1993), 자궁 (Lee 등, 1994), 혈관 (Lee 등, 2000) 등의 평활근의 수축이나 이완, 호르몬, 신경전달물질 및 사이토카인 (cytokine) 분비

(Fries 등, 2004b) 등과 같은 생리적 기능을 조절한다. 또한 세포막의 투과도 변화 (Pannicke 등, 2001), 세포내 신호전달 조절을 통한 세포의 성장, 분화, 증식, 사멸 등의 기전을 매개하고 (Cha 등, 2000; Fries 등, 2004b), 면역계 질환, 염증, 통증, 신경퇴행성 질환, 골다공증 등에서 다양한 병리적 기전에도 관여 한다 (Fries 등, 2004b). 또한 퓨린과 피리미딘은 암이나 허혈성 손상, 약물 및 방사선 독성, 외상성 조직 손상, 뼈의 재흡수, 스트레스 및 출혈성 쇼크 등과 같은 병태생리적 상황에서 보호기전을 활성화시키는데도 관여하는 것으로 (Abbracchio 및 Burnstock, 1998) 알려져 있다.

현재까지 눈의 조직에 분포되어 있는 퓨린성 수용체를 규명하기 위한 많은 연구가 진행되어 왔다. 소 (Peterson 등 1997; Shahidullah 및 Wilson, 1997; Srinivas 등, 1998; Cha 등, 2000), 토끼 (Jumblatt 및 Jumblatt, 1998; Hosoya 등, 1999; Kimura 등, 1999; Sugamoto 등, 1999; Murakami 등, 2000a,b; Shiue 등, 2000; Li 등, 2001b; Meyer 등, 2001; Cowlen 등, 2003), 쥐 (Fujihara 등, 2001; Wheeler-Schilling 등, 2001; Fries 등, 2004), 원숭이 (Cowlen 등, 2003), 사람 (Sullivan 등, 1997; Jumblatt 및 Jumblatt, 1998; Collison 및 Duncan, 2001; Mundasad 등, 2001; Bringmann 등, 2002)을 대상으로 눈의 구조 및 기능에 관련된 여러 세포나 조직에서 퓨린성 수용체가 널리 분포되어 있음이 확인되었고, 그 분포양상은 종(species)과 부위에 따라 다양한 것으로 보고되었다 (Pintor, 1998; Cowlen 등, 2003). 또한 안과영역에서의 퓨린성 수용체의 임상적용 가능성에 대해서도 많은 연구가 이루어져, 현재 안구건조증이나 일부 망막박리 치료제로서의 효용성도 입증되고 있다 (Peterson 등, 1997; Murakami 등 2000a,b; Mundasad 등, 2001; Cowlen 등, 2003). 그러나 눈 조직에서 발견되는 퓨린성 수용체의 다양한 분포에도 불구하고 일부 수용체 아형의 발현특성 및 기능적 특성에 관해서만 잘 알려져 있을 뿐이며, 병태생리학적 기전에 관련된 퓨린성 수용체의 조절특성에 대해서는 충분한 연구가 이루어지지 않아 지속적인 연구의 필요성이 제기되고 있다.

1.1. 퓨린성 수용체의 일반적 특성

퓨린성 수용체가 규명된 이래로 다양한 퓨린 수용체 아형들을 클로닝(cloning)하고 그 특성을 규명한 결과, ATP를 포함한 뉴클레오티드들은 세포의 신호전달 과정에 필수적인 분자 (molecules)임이 밝혀졌다 (Brake 및 Julius, 1996). 특히, P2 수용체는 다양한 세포에 광범위하게 분포하고 있는 세포의 뉴클레오티드의 작용을 매개하며, 여기에는 리간드-의존성 (ligand-gated) P2X 수용체와 G-단백 연결 P2Y 수용체가 포함된다. 수용체 활성화에 따른 신호전달은 직접적으로 이온채널에 영향을 주거나 (P2X) guanine nucleotide binding protein (G-단백)을 매개로 (P2Y) 활성화된다. 현재까지 포유류에서 cloning된 P2X 수용체 아형은 최소 8개 이상이며 (P2X₁₋₈), P2Y 수용체에도 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ 등의 아형들이 보고되어 있다 (Ralevic 및 Burnstock, 1998; Fries 등, 2004).

P2X 수용체는 세포내에 C와 N-terminal이 위치하고 세포밖에 긴 loop를 가진 two-transmembrane (2TMs) receptor이다 (Wheeler-Schilling 등, 2001). P2X₂, P2X₄, P2X₆ 수용체 아형들은 신경과 감각조직에 가장 일반적으로 발현되어 있다 (Burnstock, 1996; 1997; North 및 Brannard, 1997). P2X 수용체를 통한 신호전달은 10ms 이내의 신속한 시간 내에 세포막을 통과하여 이동하는 비선택적 양이온들 (Na⁺, K⁺, Ca²⁺)에 의해 매개된다. 특히 세포막을 통한 칼슘유입은 세포내 칼슘이온농도 증가의 중요한 자원이 되어 직접 세포막의 탈분극을 일으킬 뿐만 아니라 (Bean, 1992; DUBYAK 및 el-Moatassim, 1993), 막전압 의존성 Ca²⁺ 채널을 활성화시켜 이차적으로 칼슘유입 및 세포내 소포체 (endoplasmic reticulum, ER)로부터의 칼슘유리를 촉진한다. P2X 수용체에 의한 신호전달은 세포막이나 세포질내에서 second messenger의 생성이나 확산과정이 필요 없어 매우 신속하게 이루어지므로 신경전달이나 근수축 과정에서 매우 중요한 역할을 한다 (Kügelgen 및 Wetter, 2000).

한편, P2Y 수용체는 heterotrimeric G-단백과의 상호작용에 의해 다양한 세포내 신호전달을 활성화시키는 seven-transmembrane (7TMs) 수용체의 상과 (superfamily)에 속한다 (Ralevic 및 Burnstock, 1998; Fries 등, 2004). P2Y 수용체

아형들 중 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ 수용체는 사람에게서 클로닝되어 왔고 기능적으로 활성화된 형태라고 알려져 있다 (Ralevic 및 Burnstock, 1998; Sak 및 Webb, 2002; Abbracchio 등, 2003). 이들 수용체들은 뉴클레오티드의 선택성에 따라 크게 3개의 범주로 나눌 수 있는데, P2Y₁은 아데닌 뉴클레오티드 (adenine nucleotide)에 의해서만 활성화되고, P2Y₆ 수용체는 유리딘 뉴클레오티드 (uridine nucleotide)에 의해서, P2Y_{2,4}는 아데닌과 유리딘 모두에 의해 활성화된다 (North 및 Barnard, 1997; Communi 등, 1997; Webb 등, 1998). P2Y_{11,12,13,14} 수용체들은 최근에 알려진 아형들로 그 분포와 기능적 특성들에 대해서는 다른 수용체 아형들에 비해 알려진 바가 적다 (Fries 등, 2004). P2Y 퓨린성 수용체에 의한 세포내 신호전달 기전은 기본적으로 P2Y 퓨린성 수용체는 모두 phospholipase C (PLC) 활성화 - inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) 생성 - 세포내 칼슘동원의 과정으로 이어지는 PLC-IP₃ 경로와 연관된다 (Harden 등, 1995; Schachter 등, 1996). 이렇게 동원된 세포내 칼슘에 의해 직접적으로 세포기능이 조절된다 (Kügelgen 및 Wetter, 2000). 또 다른 경로로는 AC를 경유하는 기전이 알려져 있다 (Ralevic 및 Burnstock, 1998). 현재 기능적으로 활성화된 형태로 알려진 P2Y 수용체들 중 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ 수용체 아형들은 PLC 경로를 활성화시켜 IP₃를 생성함으로써 세포내 칼슘저장소로부터 칼슘을 동원하는 기전에 관여하고 (Chen 등 1995). P2Y₁₁은 PLC경로와 adenylyl cyclase (AC) 기전을 모두 활성화시키는 것으로 알려져 있다 (Communi 등, 1997).

P2Y₁ 수용체는 모든 종 (species)에서 adenine 뉴클레오티드에 선택적인 수용체로, 심장, 골격근, 대동맥 혈관내피, 췌장, 비장, 뇌, 척수 등에서 P2Y₁ 수용체 mRNA가 발현되어 있다 (Ayyanathan 등, 1996; Janssens 등, 1996; Leon 등 1996; Palmer 등, 1998). 이 수용체는 ADP, ATP, 2-methylthio-ADP (2MeS-ADP), 2MeS-ATP 등에 의해 활성화되나 UTP, UDP에 의해서는 반응하지 않는다 (Ralevic 및 Burnstock, 1998; Kügelgen 및 Wetter, 2000). P2Y₁ 수용체의 기능은 평활근, 내피, 신경조직을 포함한 다양한 조직에서 근 이완과 endothelium-derived relaxing factor (EDRF) 및 프로스타글란딘 유리, 혈소판 응집 등에 관여한다 (Leon 등, 1996; Jin 및 Kunapuli, 1998; Fabre 등, 1999).

P2Y₂ 수용체는 세포의 뉴클레오티드 효현제인 ATP와 UTP에 유사한 친화력 (affinity)을 가진 수용체로 (Ralevic 및 Burnstock, 1998) 상피세포, 신경세포, 신경교세포, 뼈세포, 내피세포 등에 광범위하게 분포한다 (Burnstock 및 Williams, 2000). P2Y₂ 수용체는 두 가지 G-단백을 경유하는 세포내 신호전달을 통해 다양한 종 (species)의 다양한 세포에서 광범위한 생리적 기전에 관여한다 (Dubyak 및 el-Moatassim, 1993; Pintor, 1998; Cowlen 등, 2003).

P2Y₄는 Uracil 뉴클레오티드에 선택성이 높은 수용체로 (Communi 등, 1995), P2Y₄는 UTP에 의한 효현효과가 ATP의 50배가 넘으며, 사람의 태반, 폐, 혈관 평활근 조직 등에 분포되어 있다 (Communi 등, 1995; Nguyen 등, 1995; Nicholas 등, 1996;). 반면, P2Y₆ 수용체는 뉴클레오시드 diphosphate에 친화력이 높은 수용체로, UDP에 대한 효현반응이 UTP의 100배 이상에 달하고 (Nicholas 등, 1996), 사람의 폐, 심장, 대동맥, 소화관, 비장, 태반, 흉선 및 뇌 등에 널리 분포되어 있다고 (Kügelgen 및 Wetter, 2000) 알려져 있다.

P2Y₁₁ 수용체는 태반, 신장, 비장, 면역세포, 특히 임파구에 분포되어 있음이 알려졌다 (Communi 등 1997; Zambon 등, 2001; Conigrave 등 2001; Torres 등, 2002), P2Y₁₂ 수용체는 혈소판 응집과정에서 중요한 역할을 하며 뇌에서도 발견되었다 (Nicholas, 2001). P2Y₁₃ 아형은 P2Y₁₂와 매우 유사한 구조를 이루고 있으며 여러 내부장기와 뇌에 분포되어 있음이 알려졌다 (Wittenberger 등, 2001; Communi 등 2001; Zhang 등, 2002). P2Y₁₄ 수용체는 uridine diphosphate (UDP)-glucose와 UDP-galactose를 리간드로 가지며 (Freeman 등, 2001; Abbracchio 등, 2003), 다양한 내부 장기와 뇌에서 규명되었고 면역계의 기능에 관련되는 것으로 보고되어 있다 (Charlton 등, 1997; Chambers 등, 2000; Freeman 등, 2001).

1.2. 눈(eye) 영역에서의 퓨린성 수용체의 의의

근자에 이르러 다양한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드들이 일부 안과질환의 치료에 유용함이 알려지면서 퓨린성 수용체에 대한 관심이 높아져 가고 있다

(Pintor 1998). 특히, 눈조직에 대한 ATP와 UTP의 정상적·병리적 영향은 P2Y 수용체가 관여되는 것으로 밝혀져 눈을 구성하는 다양한 조직의 세포를 대상으로 퓨린성 수용체의 발현 양상 및 기능적 특성을 규명하는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 사람의 렌즈세포에서 P2Y 수용체는 칼슘을 유리시키고 (Collison 및 Duncan, 2001), 소의 각막세포에서 수분을 이동시킬 뿐만 아니라 (Srinivas 등, 1998; 2002), ATP는 쥐의 홍채내에서 노아드레날린 (noradrenalin)의 유리속도를 조절하고 (Fuder 및 Muth, 1993) 개구리 망막의 광수용체 (photoreceptor)에서 빛에 대한 민감성을 조절하는 것으로 (Sato 및 Kawamura, 1997) 보고되었다. 또한 퓨린수용체는 어린쥐에서 망막의 발달과 재생을 촉진하고 (Stellwagen 등 1999), 배아기 닭의 망막 (embryonic chick retina)에서 ATP와 UTP는 세포내 저장소로부터 칼슘을 유리시키는 것으로 (Sugioka 등, 1996) 알려져 있다. 눈의 구조 및 기능에 관련된 조직에 따라 그 발현양상이 다양하지만 눈조직에 광범위하게 발현되어 있는 퓨린성 수용체 아형들은 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ 등이다 (Jumblatt 및 Jumblatt, 1998; Pintor, 1999; Kimura 등, 1999; Hosoya 등, 1999; Murakami 등, 2000a, b; Shiue 등, 2000; Pannicke 등, 2001; Cowlen 등, 2003; Fries 등, 2004a,b). 이 중에서도 최근에 안과영역에서 관심이 부각되고 있는 것은 P2Y₂ 수용체 아형이다. 각막 상피와 내피 (Srinivas 등, 1998; Kimura 등, 1999; Cha 등, 2000; Yang 등, 2000), 결막 상피 (Jumblatt 및 Jumblatt, 1998; Hosoya 등, 1999; Shiue 등, 2000; Li 등, 2001b), 모양체 상피 (Wax 등, 1993; Shahidullah 및 Wilson, 1997), 뮐러 세포 (Müller cell)(Liu 및 Wakakura, 1998; Bringmann 등, 2002; Fries 등, 2004a,b), 망막 색소 상피 (Sullivan 등, 1997), 신경절 세포 (Wheeler-Schilling 등, 2001), 상맥락막 (suprachoroid)(Sugamoto 등, 1999), 렌즈 상피세포 (Collison 및 Duncan, 2001)등에 분포하고 있는 P2Y₂ 수용체는 발현조직의 특성에 따라 다양한 생리적 기능 조절에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 눈의 질병모델에서의 P2Y₂ 수용체는 결막 상피를 통한 Cl⁻이온과 수분의 이동 및 결막 술잔세포 (goblet cell)로부터 점액분비를 자극하기 때문에 안구건조증의 치료에 유용한 것으로 밝혀졌으며(Murakami 등 2000a,b), INS365는 합성 P2Y₂ 수용체 효현제로 안구건조증 환자들을 위한 새로운 치료약으로 주목받고 있다 (Mundasad 등, 2001). 뿐만 아니

라 퓨린성 수용체는 망막하 수분재흡수 기전에 관여하여, 망막박리의 치료에도 효과적인 것으로 알려져있는데, 그 기전은 망막 색소 상피의 fluid pump를 활성화시키기 때문인 것으로 추측하고 있다 (Peterson 등, 1997). INS 37217는 망막박리 치료약으로 개발된 P2Y₂ 수용체 효현제로, 망막하 공간내 수분축적으로 인한 망막박리의 치료제로 현재 임상적용 가능성에 관한 연구가 진행되고 있다 (Cowlen 등 2003). 그 외 최근들어 P2Y₁ 수용에 의해서도 일부 눈의 조직에서 세포내 칼슘동원 (James 및 Butt, 2001)이나 [Ca²⁺]_i wave (Li 등, 2001a) 등의 조절이 이루어지는 것이 밝혀져 눈의 생리적 기능에 관여하는 P2Y₁ 퓨린성 수용체에 대한 관심이 높아져 가고 있다.

1.3. 망막아종의 특성

망막아종 (retinoblastoma)은 소아들에게서 가장 흔히 발생하는 안구내 악성 종양으로 미국에서 출생 20,000명당 1명의 빈도로 발생하고 (McFall 등, 1977; Pendergrass 및 Davis, 1980; Mahony 등, 1990) 망막아종으로 진단받는 평균 연령은 생후 24개월이다 (Francois 등, 1975). 망막아종은 광수용체 (photoreceptors), 신경세포 (neurons), 및 신경 교세포 (glia)로 분화할 수 있는 다능성 망막 전구세포 (multipotent retinal precursor)에서 기원하며 (Ohnishi, 1977; Hirooka 등, 2001), 배아 (germ)나 체세포 (somatic cell)에서 염색체 13번의 q14번 영역 (region)의 돌연변이에 의해 (Yunis 및 Ramsay, 1978; Sparkes 등, 1983) 줄기세포로부터 신경세포와 신경교 선조세포 (neuronal and glial progenies)로 분화하는 대신 악성 표현형 (malignant phenotype)을 획득하게 되면서 종양세포로 발달하게 된다 (Ohnishi, 1977; Kyritsis 등, 1984; Perentes 등, 1987).

망막아종 세포는 소량의 세포질과 과염색성 (hyperchromatic)의 큰 핵으로 이루어진 직경 7 μ m 정도의 작고 둥근 형태학적 특징을 가진 미분화 세포이며 (McFall 등, 1978), 현재 WERI-Rb-1과 Y-79의 두 가지 세포주가 확립되어 있다. 세포 배양시 망막아종은 부유 상태로 자라며, 배양하였을 때 음이온을 띠는 기질에 잘 부착하는 다른 악성종양 세포들과는 달리 polyornithine이 처리된 양이온을 띠

플라스크에 두면 바닥에 단층 (monolayer)으로 부착하는 특성을 보이므로 망막아종은 특이한 전하를 띤 막 (charged membrane)을 가지고 있는 것으로 보이며 (McFall 등, 1977), 부착된 세포는 형태학적 변화가 일어나면서 분화가 이루어지는 것으로 알려져 있다 (McFall 등, 1978). 분화된 망막세포에는 로제트(rosette)가 나타나며 전자현미경적 소견상 망막아종 세포의 표면에는 수포 (blebs), 라멜리포뎀 (lamellipodia)과 같은 피막돌기, 그리고 미세섬모 (microvilli)들이 붙어있어 다른 신생세포들과 구분된다 (McFall 등, 1978).

망막아종세포는 망막 전구세포 (retinal precursor cell)의 성장과 분화를 규명하기 위한 모델로 널리 이용되어져 왔다 (Herman 등, 1989; Tombran-Tink 및 Johnson, 1989; Barnes 및 Haynes, 1992; Gomez 등, 1993a; Gomez 등, 1993b; Gallie 등, 1999; Siegal, 1999; Hirooka 등, 2001; Bertolesi 등, 2003). 다양한 포유동물 세포에서 일반적으로 세포내 칼슘이온농도의 변화는 세포의 발달적 주기 (orderly progression of the cell cycle)와 증식 및 성장을 조절하는데 중요하며 (Ciapa 등, 1994; Berridge 등, 1998; Guo 등, 1998; Pearson 등, 2002), 망막아종 세포내 칼슘조절 역시 세포의 분화와 관련하여 매우 중요한 기전으로 탐색되어 왔다. 지금까지 알려진 망막아종 세포내 칼슘조절은 대부분 낮은 전압 의존성 (low voltage activated) 이온채널을 통한 칼슘유입에 의한 기전으로 (Barnes 및 Haynes, 1992; Gomez 등, 1993a; Wong, 1995; Hirooka 등, 2001; Bertolesi 등, 2003), 특히 $\alpha 1G$ 와 $\alpha 1H$ 아형의 T-형 칼슘 채널의 발현이 중요한 것으로 알려져 왔다 (Hirooka 등, 2001; Bertolesi 등, 2003). 그러나 다른 포유류의 망막세포들에서 규명된 바와 같이 수용체를 매개한 구체적인 칼슘조절 특성이나 신호전달 기전에 관한 연구는 보고되어 있지 않다. 따라서 망막아종은 망막세포와 동일한 줄기세포로부터 기원되며 (Ohnishi, 1977; Kyritsis 등, 1984; Perentes 등, 1987) 사람 망막에서 퓨린성 수용체 (Sullivan 등, 1997)와 사람 망막아종 세포에서 콜린성 수용체가 규명된 점 (Rah, 2004), 그리고 미분화된 세포로서의 망막아종의 특성을 고려해 볼 때 망막아종 세포에도 칼슘조절을 매개하는 퓨린성 수용체가 발현되어 있을 것으로 추측된다. 그러나 지금까지 망막아종 세포에서 퓨린성 수용체의 발현여부 및 그 기능적 특이성은 확인된 바 없다.

1.4. 연구목적

이상의 문헌고찰을 통해 사람 조직에 분포되어 있는 퓨린성 수용체의 아형들에 관해서는 이미 잘 알려져 있으나, 이들 아형들은 종 (species)은 물론 동일 개체내에서도 세포에 따라 발현양상이 매우 다양하게 나타남을 알 수 있다. 그러므로 같은 조직이라 하더라도 정상세포와 병태생리적 변화가 있는 세포간에도 퓨린성 수용체의 발현 및 기능적 특성은 다를 것으로 예측해 볼 수 있다. 따라서 본 연구에서는 망막아종 (retinoblastoma) 세포를 대상으로 여기에 발현되어 있을 것으로 예상되는 퓨린성 수용체의 발현특성을 규명하고 이를 통하여 미분화된 망막 세포에서 P2 퓨린성 신호전달의 기전을 탐색해 보고자 하였다.

제 2장 재료 및 방법

2.1. 모델 세포주 및 배양

본 연구에서 사용한 망막아종은 백인 여성 (Caucasian female)의 눈에서 분리한 WERI-Rb-1 세포를 ATCC (American Type Culture Collection, HTB-169)로부터 분양받아 사용하였다. WERI-Rb-1 세포는 Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (Cambrex, Walkersville, MD, USA)에 10% 우 태아혈청 (fetal bovine serum, FBS) 및 100,000 unit/L penicillin, 100 mg/L streptomycin (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 배지에서 배양하였다. 세포주는 ATCC의 프로토콜에 따라 3~4일 간격으로 배지를 갈아주었고 7일을 주기로 계대배양 하였다.

2.2. 실험용액 및 약물

2.2.1. 실험용액

칼슘 이미징 실험을 위한 세포외 관류액 (external solution; PSS)의 조성(mM)은 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES 그리고 10 glucose (pH 7.4)이었다. 실험시에는 모든 약물을 약 2 ml/min의 속도로 독립현미경 위에 설치된 챔버에 관류시켜 실험하였다.

2.2.2. 약물

우 태아혈청 (FBS) 및 antimycotic-antibiotics는 GibcoBRL로부터, Fluo-3/AM은 Molecular probes (Eugene, OR, USA)로부터 각각 구입하였고, RPMI는 Cambrex

사로부터 구입하였다. 또한 adenosine 5'-triphosphate (ATP), uridine 5'-triphosphate (UTP), 2-methylthioadenosine 5'-triphosphate (2MeS-ATP), 2'-3'-O-(4-benzoyl)-benzoyl-ATP (BzATP), $\alpha\beta$ -methylene ATP ($\alpha\beta$ -MeATP), MRS 2179, 2-APB, thapsigargin은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터, U-73122는 Tocris (Ellisville, MO, USA)사로부터, U-73343은 Calbiochem (Darmstadt, Germany, Cat. No 662041)사로부터 구입하였다. Fluo-3/AM과 U-73122, U-73343, thapsigargin은 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹여 사용하였고 그 외의 모든 시약은 삼차증류수에 녹여 사용하였다.

2.3. 세포내 칼슘이온농도($[Ca^{2+}]_i$) 측정

세포내 칼슘이온농도 ($[Ca^{2+}]_i$)의 변화를 측정하기 위해 형광이미지 시스템 (fluorescence imaging system)을 사용하였으며 그 방법은 동일한 세포에서 칼슘이온농도를 측정한 Rah (2004)의 방법을 참조하였다. 먼저 세포배양액 1 ml에 Fluo-3 /AM 5 μ M 농도를 첨가한 후 1분간 초음파 처리 (sonication) 후 여기에 망막아종 세포가 붙어있는 coverslip을 넣은 다음 37°C 세포 배양기 (humidified CO₂ incubator, 95% air 5% CO₂)에서 1시간 부하시킨다. 부하가 끝나면 세포외 관류액으로 2회 세척하여 세포외액의 잔여 Fluo-3/AM을 충분히 제거한 다음 독립현미경 (IX51, Olympus, Japan)위의 관류 챔버 (Warner Instrument, Hamden, CT, USA)에 올려놓고 관류액 (normal PSS)을 중력에 의해 2 ml/min 속도로 20분 이상 관류시켜 충분한 탈에스테르화 (deesterification)가 되도록 하였다.

형광이미지는 75-W Xenon lamp로부터 나오는 광원 (light source) 중 Fluo-3AM에 적합한 488 nm (F_{488}) 파장으로 여기 (excitation)시켰을 때 530 nm의 파장에서 방출 (emission)되는 형광 세기를 CCD 카메라 (cooled charge-coupled device camera, Cascade, Roper, USA)가 증폭시켜 이미지로 나타내었는데(그림 1), 이때 얻어지는 형광이미지는 약물투여시는 0.1 Hz의 빈도로 30초간 측정하였으며 세척동안에는 0.03 Hz의 빈도로 측정하여 광원으로 인한 세포손상을 최소화

하였다. 세포내 칼슘이온농도는 자극을 주기 전 Fluo-3/AM 부하로 인한 기본 형광값 (F_0)에서 약물을 투여하였을 때 변화되는 형광값 (F)의 비율로 측정하였으며 F/F_0 값이 세포내 칼슘이온농도의 변화를 반영하도록 하였다. 세포마다 Fluo-3에 부하되는 정도에 차이가 있어, 본 연구에서는 F_0 값이 1,000이상으로 충분히 잘 부하된 세포에서 얻은 값만을 포함시켰다.

측정한 형광이미지는 소프트웨어 패키지인 MetaFluor 6.1 (Universal Imaging Corporation, USA)로 기록한 뒤, 단일세포의 F/F_0 값을 평균내어 자료를 분석하였으며, 이들 형광 (F/F_0)값의 최대 (peak)치를 비교하여 분석하였다.

2.4. 역전사 연쇄 중합반응 (RT-PCR)

먼저 guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 추출 방법을 사용하여 WERI-Rb-1 세포들로부터 전체 RNA를 분리하였다 (Chomczynski 및 Sacchi, 1987). 즉, 세포를 guanidinium thiocyanate buffer로 lysis 시킨 다음 phenol 및 chloroform을 가하여 얼음 위에서 15분 이상 보관하였다. 이를 4°C에서 10,000 x g로 20분간 원심 분리하여 상층액을 조심스럽게 취하였다. 이 상층액을 동량의 isopropanol과 섞은 다음 -70 °C에서 1시간 이상 RNA를 침전시켰다. 다시 4°C에서 10,000 Xg로 20분간 원심 분리하여 RNA pellet을 얻었으며, 이를 다시 75% ethanol로 씻어낸 후 원심 분리하여 RNA 시료를 얻었다.

cDNA의 합성은 2 μ g RNA와 0.5 μ g random hexamer를 먼저 70 °C에서 5분간 반응시키고, reverse transcriptase 200 units, dNTP 25 nmoles, RNase inhibitor 20 units 등이 포함되게 하여 37 °C에서 1시간 반응시킴으로써 이루어졌다. 이어 PCR은 여러 퓨린성 수용체 및 IP₃ 수용체에 대한 시발체 (primer)를 이용하여 이루어졌으며, 이들의 염기서열은 표 1과 표 2에 각각 요약하였다. PCR 반응액에는 합성된 cDNA 0.05 μ g, 각각의 primer pair (10 pmoles), 1.25 units의 AmpliTaq DNA polimerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), 10 nmoles의 dNTP 등이 포함되게 하여, 94 °C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분으로 35 cycle 동안

반응시켰다. PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.1% agarose gel에 전기영동하여 U.V.하에서 관찰하였다.

표 1. 역전사 연쇄 증합반응 (RT-PCR)에 사용된 퓨린성 수용체 primer

P2Y Rs subtype	Gene Accession Number	Sequences	Product size (bp)
P2Y ₁	NM_002563	F 5'-CCA CGT ATC AGG TGA CAA GA-3' R 5'-TGA GGG TCA TGT CTT CAC TC-3'	168
P2Y ₂	BC012104	F 5'-GCT CTA CTT TGT CAC CAC CA-3' R 5'-GAG CAC GTA ACA GAC AAG GA-3'	157
P2Y ₄	NM_00256	F 5'-CCT ATG GCT CTT CAT CTT CC-3' R 5'-CAC TGC AGT AGA GGT TCC AA-3'	200
P2Y ₅	NM_00576	F 5'-TGC TAT GGC TCT TCC TCA GT-3' R 5'-ACT CCC AAG CTT GTT AGC TC-3'	182
P2Y ₆	NM_176798	F 5'-CCA CAT GAG CTC CTA CAG AA-3' R 5'-GAG GGA TCT TAA CTC CAT GC-3'	178
P2Y ₈	NM_17812	F 5'-GCT GAT ACA GAA GCA TCC AG-3' R 5'-TCC TCT GAC TCA AGC TCT CA-3'	178
P2Y ₁₀	NM_01449	F 5'-GCT AAG CTC CAG GGT AAT GT-3' R 5'-GGG TAC ATG CTT CCT ATT CC-3'	181
P2Y ₁₁	BC00987	F 5'-TAT GTG CCC TAC CAC ATC AT-3' R 5'-CCA TGT AGA GTA GAG GGT GGA-3'	187
P2Y ₁₂	NM_17687	F 5'-GTA AGA ACG AGG GGT GTA GG-3' R 5'-AGC AGT GCA GTC AAA GAC AT-3'	156

F: Forward ; R: Reverse

표 2. 역전사 연쇄 중합반응 (RT-PCR)에 사용된 IP₃ 수용체 primer

IP ₃ Rs subtype	Gene Accession Number	Sequences	Product size (bp)
IP ₃₋₁	NM_002222	F 5'-GCA GAA GCA GAT TGG CTA TG-3' R 5'-GTC TCA ATC AGG ATG TCA GC-3'	261
IP ₃₋₂	NM_002223	F 5'-CAA GAA GTT CAG AGA CTG CC-3' R 5'-ACG CAT GGC ATT CTT CTC CA-3'	295
IP ₃₋₃	NM_002224	F 5'-GAT GTG GTG TTG CTG CAG AA-3' R 5'-TTG TTG CTC TTC ATG TGC AG-3'	137

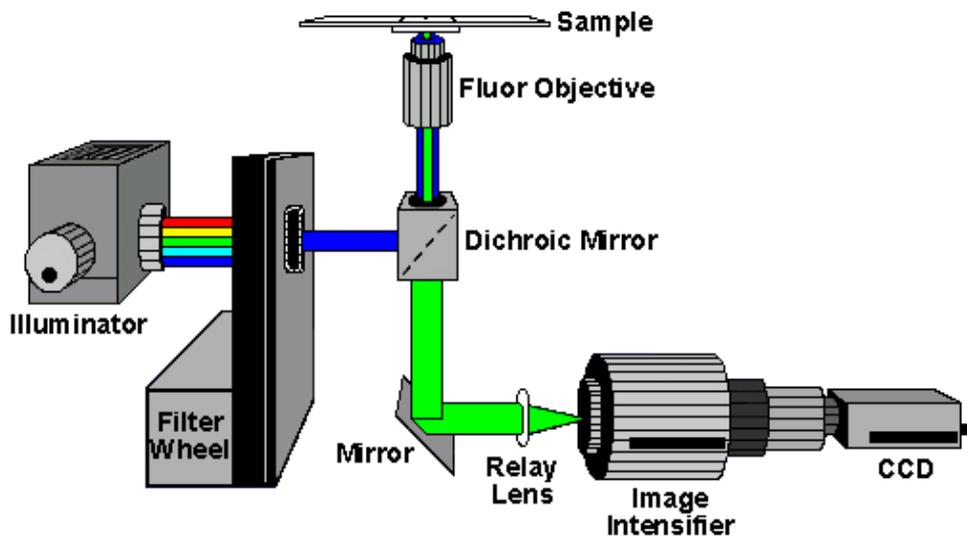
F: Forward ; R: Reverse

2.5. Western blot analysis

WERI-Rb-1 세포막에 발현된 P2Y₁, P2Y₂ 퓨린성 수용체 단백을 확인하기 위하여 각각의 항체 (Abcam, UK)를 이용하여 immunoblot을 시행하였다. 0.5% trypsin-EDTA로 5×10^6 의 세포를 분리하여 PBS 용액으로 세척하고, $1,000 \times g$ 에서 10분간 원침한 후 0.5 ml modified radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, aprotinin 1 $\mu g/ml$, leupeptin 1 $\mu g/ml$, pepstatin 1 $\mu g/ml$)로 부유시키고 얼음 속에서 homogenize하여 30분간 보관한 후 4°C, $12,000 \times g$ 에서 원침하고 상층액을 취하여 총 단백을 분리하였다. Bradford 방법으로 단백 농도를 측정된 후, 50 μg 의 단백을 취하여 SDS-PAGE를 시행하고 polyvinylidene fluoride membrane (Pall, MI, USA)에 옮긴 후, 면역염색을 시행하였다. 5% skim milk가 포함된 TBST (0.05% Tween-20) 용액으로 실온에서 1시간 동안 blocking한 후 P2Y₁, P2Y₂ (diluted to 1:500 in TBST) 각각의 항체를 가하여 2시간 동안 흔들면서 반응시키고 TBST로 15분씩 3회 세척한 후 2차 항체 (horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG)로 1시간 동안 반응시키고 세척한 후, ECL™ (Amersham biosciences, NJ, USA) 용액을 사용하여 X-ray film에 감광하였다.

2.6. 결과 및 자료분석

결과는 평균 (Mean)과 표준오차 (SEM)로 나타내었으며, 통계적인 의미는 unpaired t-검정과 분산분석 (one-way ANOVA)으로 검증하여, p값이 0.05 이하일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다. 결과에서 제시한 그림에서 실험횟수는 N으로, 세포 수는 n으로 표기하였다.



Inverted microscope configured for fluorescence ratio imaging.

그림 1. 세포내 칼슘이온농도 이미징 측정을 위한 장치 및 모식도. Illuminator에서 나오는 광원 중 filter를 통과한 488nm의 파장이 dichroic mirror에서 반사되어 sample을 excitation시키면 사방으로 형광이 emission되며 이 중 530nm 파장에 해당하는 형광이 relay lens와 증폭기 (image intensifier)를 통과하면서 CCD camera에 포착되고 이것이 컴퓨터의 하드 디스크에 저장된다.

제3장 결과

3.1. ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화

Fluo-3/AM으로 부하된 WERI-Rb-1 세포들은 ATP($10 \mu\text{M}$) 투여시 대부분의 세포들 (80% 이상)에서 일시적인 세포내 칼슘이온농도의 증가가 뚜렷이 관찰되었으며 (그림 2), 평균 F/F_0 의 값은 7.1 ± 0.2 ($N=5$, $n=52$) 이었다 (그림 3A). ATP에 의한 세포내 칼슘이온은 농도의존적으로 증가하였으며 (그림 3B), 일정한 시간 간격으로 ATP를 반복 투여했을 때 그림 4에서 보이는 바와 같이 그 효과가 일부 감소하는 경향은 있었으나 통계적으로 유의할 만한 수준은 아니어서 ($F=0.612$, $p=0.55$), 동일 세포들에 대한 ATP 투여의 효과가 탈감작(desensitization)없이 반복적으로 재현됨을 알 수 있었다.

ATP 투여 후 일시적 세포내 칼슘이온농도 증가가 세포의 칼슘유입 때문인지, 세포내 칼슘저장소로부터의 유리인지를 알아보기 위하여 세포의 칼슘을 제거한 Ca^{2+} -free (0 Ca^{2+}) 관류액을 3분간 전처치한 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 변화를 관찰하였다 (그림 5A). 실험결과 세포의 칼슘이 제거된 조건에서도 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 증가는 대조군의 $90.7 \pm 1.0\%$ 이상 유지되었으며 ($n=48$), 약간의 형광값이 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다 (그림 5B). 또한 그림 4에서 제시한 바와 같이 ATP 반복투여에 의한 자연적인 반응감소 수준과 유사하였으므로 세포의 칼슘이 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도에는 영향을 미치지 않은 것으로 보인다.

다음으로는 ER막의 Ca^{2+} -ATPase 차단제인 thapsigargin (TG) $1 \mu\text{M}$ 을 투여하여 세포내 칼슘저장소를 고갈시킨 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 변화를 관찰하였다. TG 투여 후 급격한 세포내 칼슘이온농도의 증가가 있었으며 1분 전후로 최고값에 도달하였으며 이후 약 8분에 걸쳐 서서히 감소되어 TG 투여 이전 수준에서 비교적 일정한 값을 유지하였다. TG 전처치 후 이와 같은 시점에서 다시 ATP를 투여하였을 때 그림 6A 및 7B에 나타난 바와 같이 세포내 칼슘이온농도의 증가는 처음 대조군 값의 $8.1 \pm 0.9\%$ 로 대부분의 효과가 억제되는 것을 관찰할

수 있었다 ($p < .001$, $n = 52$).

ATP에 의한 세포내 칼슘동원 기전을 확인하고자 PLC경로 차단제인 U-73122 ($1 \mu\text{M}$)를 사용하여 대조군과 비교하였다. 그림 7A와 A'에서 볼 수 있듯이 U-73122를 3분 동안 전처리 후 ATP에 의한 세포내 칼슘반응은 대조군의 $10.4 \pm 1.8\%$ 에 지나지 않아 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 증가가 U-73122에 의해 대부분 억제됨을 알 수 있었다($p < .001$, $n = 55$). 반면, U-73122의 유사체(isoform)인 U-73343 ($1 \mu\text{M}$)를 동일시간 전처리한 후 ATP를 투여한 후에는 세포내 칼슘이온농도는 대조군과 유사하게 증가하여 (그림 7B), ATP에 의한 칼슘반응과 U-73343 전처리 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 형광 평균값 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (그림 7B'). 또한 ER 막에 존재하는 세포막 투과성 IP_3 수용체 차단제인 2-APB ($20 \mu\text{M}$)를 5분 동안 전처리한 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 변화를 관찰한 결과 2-APB는 ATP에 의한 세포내 칼슘농도의 대부분 ($92.5 \pm 1.3\%$)을 억제하였고 (그림 8A), ATP에 의한 칼슘반응과 2-APB 전처리 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 형광 평균값 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 있었다 (그림 8B). 따라서 이와 같은 결과들을 종합해 볼 때 ATP에 의한 퓨린성 수용체 활성화의 주요 기전은 PLC 경로의 활성화를 통한 세포내 칼슘저장소로부터의 칼슘동원임을 시사한다 하겠다.

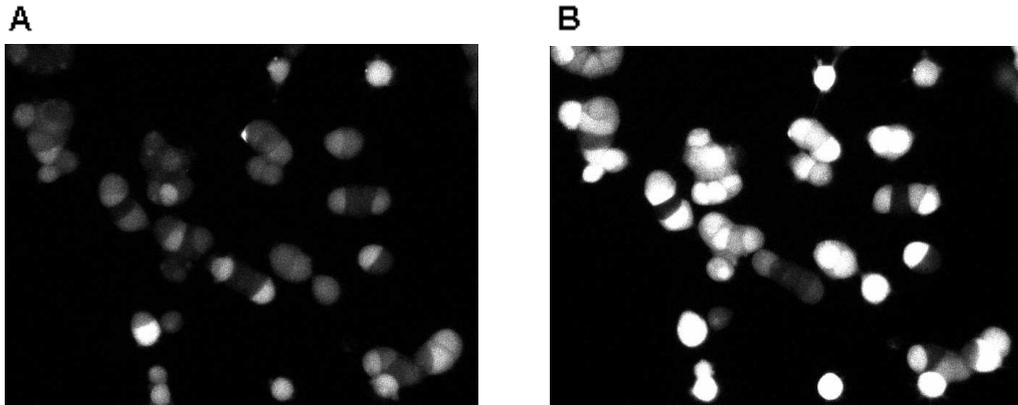


그림 2. WERI-Rb-1 세포들의 형광현미경적 소견 ($\times 200$) A는 fluo-3 세포부하로 인한 기본 형광값을 (F_0), B는 약물투여에 의해 변화된 최대 형광값을 (F) 이미지로 나타낸 것이다.

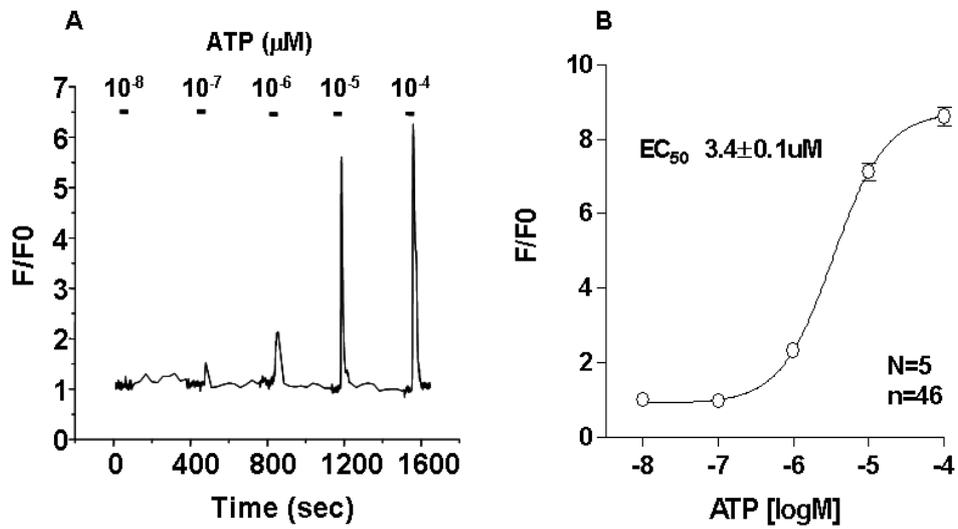


그림 3. ATP 농도에 따른 세포내 칼슘이온농도 변화. 그림 A는 형광물질인 Fluo-3/AM을 세포내로 부하한 후 ($5 \mu\text{M}$) ATP를 각 농도 (단위는 몰랄농도임)별로 30 초간 투여 하였을 때 세포내 칼슘이온농도의 변화를 기록한 것이다. ATP 투여 농도에 따른 세포내 최고 형광값 (F/F_0)의 변화양상은 B와 같으며, WERI-Rb-1 세포에서 나타난 ATP에 대한 EC_{50} 는 $3.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ 로 나타났다. (F_0 =fluo-3 세포부하로 인한 기본 형광값, F =약물투여에 의해 변화된 형광값, N=실험횟수, n=대상 세포 수, 굵은 실선=ATP 투여 기간, 30s)

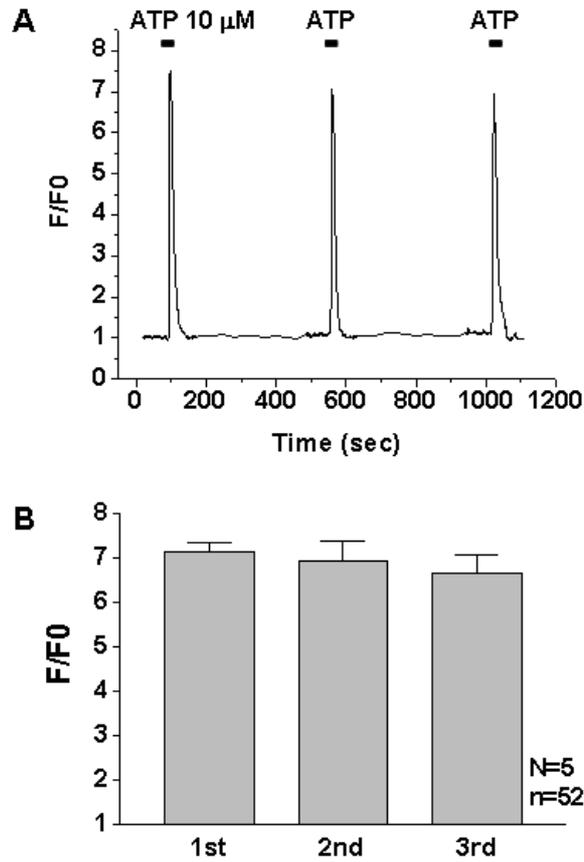


그림 4. ATP 반복투여에 따른 세포내 칼슘이온농도 변화. 그림 A는 ATP (10 μ M)를 7분 간격으로 30초간 반복투여 하였을 때 세포내 칼슘이온농도의 변화를 기록한 것이다. 최고 평균 형광값 (F/F_0)은 첫 번째 투여시 7.1 ± 0.2 , 두 번째 투여시 6.9 ± 0.4 , 세 번째 투여시 6.6 ± 0.5 로 측정되었으며, 세 평균값은 통계적으로 유의한 차이가 없으므로 나타났다 ($F=0.612$, $p=0.55$)(B). (F_0 =fluo-3 세포부하로 인한 기본 형광값, F =약물투여에 의해 변화된 형광값, 1st: 첫 번째 ATP 투여시 반응, 2nd: 두 번째 반복 투여시 반응, 3rd: 세 번째 반복 투여시 반응, N=실험횟수, n=대상 세포 수, 굵은 실선=ATP 투여 기간)

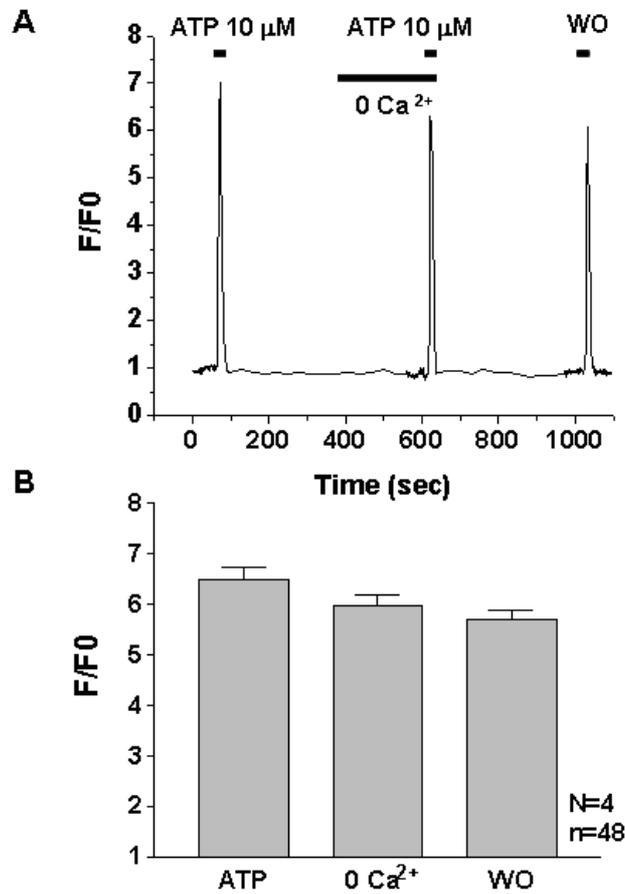


그림 5. 세포의 칼슘이 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과. 세포의 칼슘을 제거한 0 Ca²⁺ 관류액을 3분간 전처리한 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 변화를 관찰하였다 (A). 실험결과 0 Ca²⁺ 조건에서 ATP를 투여하였을 때 약간의 형광값이 감소하였으나 대조군과의 통계적 유의성은 없었다(B). (F0=fluo-3 세포부하로 인한 기본 형광값, F=약물투여에 의해 변화된 형광값, WO=wash out, N=실험횟수, n=대상 세포 수, 굵은 실선=약물 투여 기간)

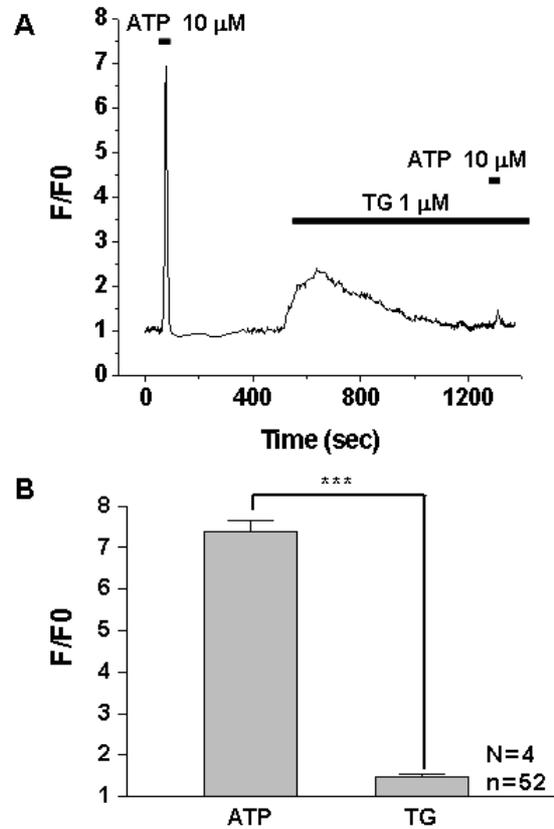


그림 6. Thapsigargin (TG)이 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과. TG 1 μ M (Ca^{2+} -ATPase 차단제)을 전처리 하였을 때 세포내 칼슘이온농도의 변화양상과 ATP에 의한 칼슘이온농도 변화를 관찰하였다. TG 투여 후 1분 전후로 최고 값에 도달하며 이후 약 8분에 걸쳐 서서히 초기수준으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 이 때 ATP를 투여하면 세포내 칼슘이온농도의 증가가 대조군의 $8.06 \pm 0.9\%$ 로 TG에 의해 대부분의 칼슘반응이 억제됨을 보여준다 (A). 그림 B는 대조군과 TG 전처리 후 칼슘의 최고 형광값의 평균간에 통계적으로 유의한 차이가 있음을 나타내었다. (F_0 =fluo-3 세포부하로 인한 기본 형광값, F =약물투여에 의해 변화된 형광값, n=대상 세포 수, N=실험횟수, 굵은 실선=약물 투여 기간, *** $p < .001$)

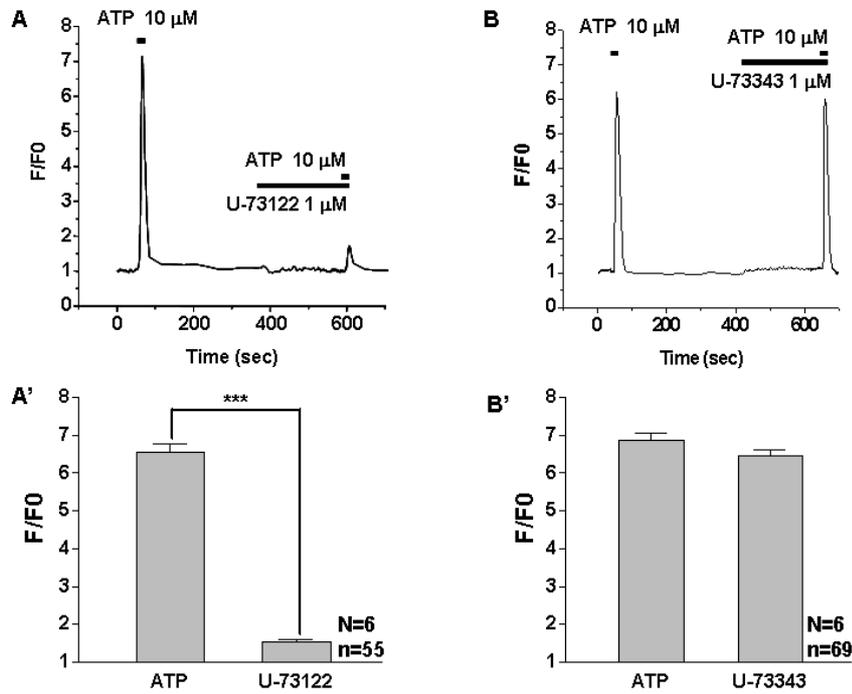


그림 7. U-73122가 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과. U-73122 (1 μM)을 3분 동안 전처리한 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 변화를 관찰하였다. 그 결과 세포내 칼슘반응은 대조군의 ATP에 의한 세포내 칼슘반응 최고값의 $10.4 \pm 1.8\%$ 로 감소하여 U-73122에 의해 대부분이 억제됨을 확인할 수 있었으며(A) ATP에 의한 칼슘반응과 U-73122 전처리 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 형광 평균값 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 있었다 (A'). 반면, U-73122의 유사체 (isofrom)인 U-73343 (1 μM)를 동일시간 전처리한 후 ATP를 투여한 후에는 세포내 칼슘이온농도는 대조군과 유사하게 증가하여 (B), ATP에 의한 칼슘반응과 U-73343 전처리 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 형광 평균값 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (B'). (F0=fluo-3 세포부하로 인한 기본 형광값, F=약물투여에 의해 변화된 형광값, N=실험횟수, n=대상 세포 수, 굵은 실선=약물 투여 기간, *** p<.001)

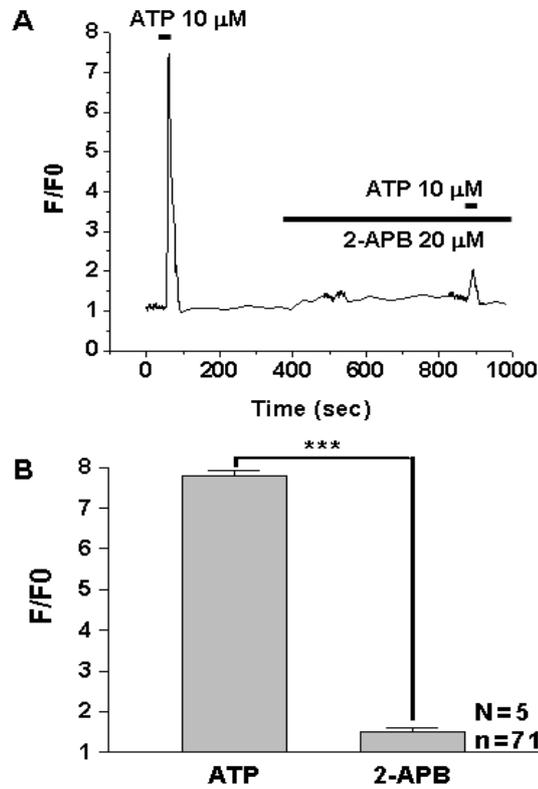


그림 8. 2-APB가 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과. 세포막 투과성 IP₃ 수용체 차단제인 2-APB (20 μ M)를 5분 동안 전처리한 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 변화를 관찰하였다. 2-APB는 ATP에 의한 세포내 칼슘농도의 대부분 (92.5 \pm 1.3%)을 억제하였고 (A), ATP에 의한 칼슘반응과 2-APB 전처리 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 형광 평균값 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 있었다 (B). (F₀=fluo-3 세포부하로 인한 기본 형광값, F=약물투여에 의해 변화된 형광값, N=실험횟수, n=대상 세포 수, 굵은 실선=약물 투여 기간, *** p<.001)

3.2. 퓨린성 수용체 효현제에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화

퓨린성 수용체들 중 세포내 칼슘이온농도에 영향을 미치는 아형을 규명하기 위해 먼저 P2Y 수용체 효현제들이 $[Ca^{2+}]_i$ 에 미치는 효과를 10^{-8} M 부터 10^{-4} M 까지 농도별로 비교해 보았다 (그림 9). 그 결과, 비선택적 P2Y 수용체 효현제인 ATP ($EC_{50} = 3.4 \pm 0.1 \mu M$)와 P2Y₁ 수용체 효현제인 2MeS-ATP ($EC_{50} = 0.4 \pm 0.01 \mu M$)에 의해서는 농도의존적으로 세포내 칼슘이온농도가 증가하였다. 그러나 P2X 수용체 효현제인 $\alpha\beta$ -MeATP (100 μM)과 P2Y_{2,4,6} 효현제로 알려진 UTP (100 μM)에 의해서는 유의한 변화를 관찰할 수 없었다. 또한 세포외액의 칼슘이온 유무에 상관없이 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 증가가 나타나며, 대표적 P2X 효현제인 $\alpha\beta$ -MeATP (100 μM) 투여시에도 변화가 없는 것으로 보아 (그림 10) WERI-Rb-1 세포에서는 P2X 수용체가 기능하고 있지 않음을 예측해 볼 수 있다. 또한 P2X₇ 및 P2Y₁₁ 수용체 아형의 효현제인 BzATP (100 μM)에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 은 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 $31.2 \pm 1.2\%$ 에 해당하였으며 (그림 11A), BzATP에 의한 세포질내 칼슘이온농도의 증가는 Ca^{2+} -free 조건에서도 유사하게 관찰되어 P2Y₁₁ 수용체를 매개로 효과를 보인 것으로 생각된다 (그림 11B).

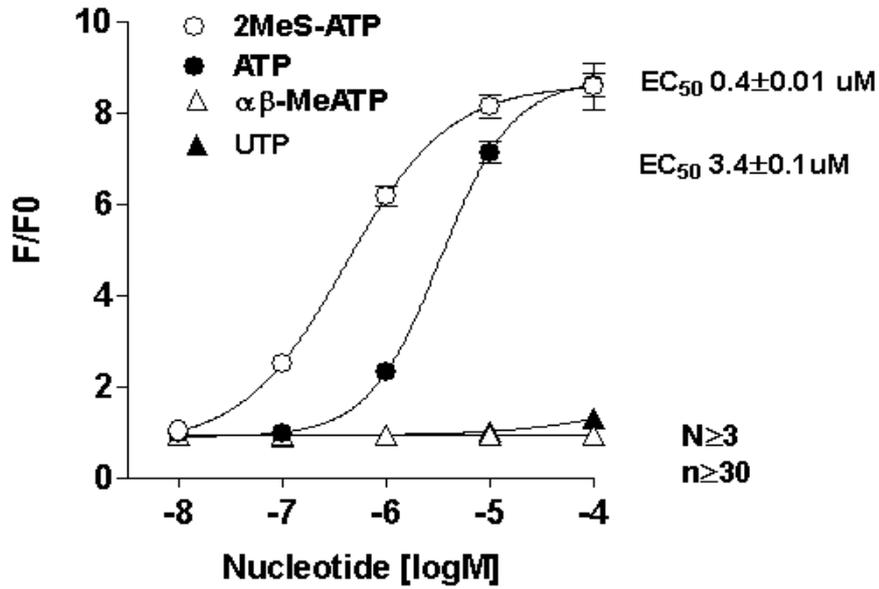


그림 9. 퓨린성 수용체 효현제들의 농도 반응 비교. P2Y 수용체 효현제들이 세포 내 칼슘이온농도에 미치는 효과를 10^{-8} M 부터 10^{-4} M 까지 농도별로 비교해 본 결과, 비선택적 P2Y 수용체 효현제인 ATP의 EC_{50} 는 $3.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ 이었고, P2Y₁ 수용체 효현제인 2MeS-ATP의 EC_{50} 농도는 $0.4 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 로 나타났다. 그러나 P2X 수용체 효현제인 $\alpha\beta$ -MeATP ($100 \mu\text{M}$)과 P2Y_{2,4,6} 효현제로 알려진 UTP ($100 \mu\text{M}$)는 세포내 칼슘이온농도에 유의한 변화를 일으키지 않았다. (F_0 =fluo-3 세포부하로 인한 기본 형광값, F =약물투여에 의해 변화된 형광값, N=실험횟수, n=대상 세포 수)

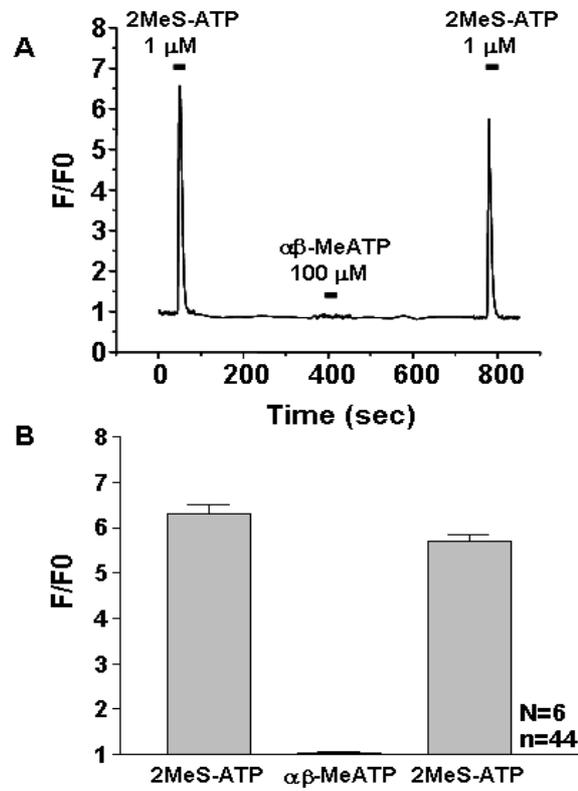


그림 10. P2Y₁ 및 P2X 퓨린성 수용체 효현제에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화의 비교. 2MeS-ATP (1 μ M) 투여시 일시적 세포내 칼슘이온농도 증가는 $\alpha\beta$ -MeATP (100 μ M) 투여시에는 나타나지 않았다 (A). 2MeS-ATP 재 투여시 초기 반응과 유사하게 세포내 칼슘이온농도의 증가가 관찰되었다. (B). (F_0 =fluo-3 세포부하로 인한 기본형광값, F =약물투여에 의해 변화된 형광값, N=실험횟수, n=대상 세포 수, 굵은 실선=약물 투여 기간)

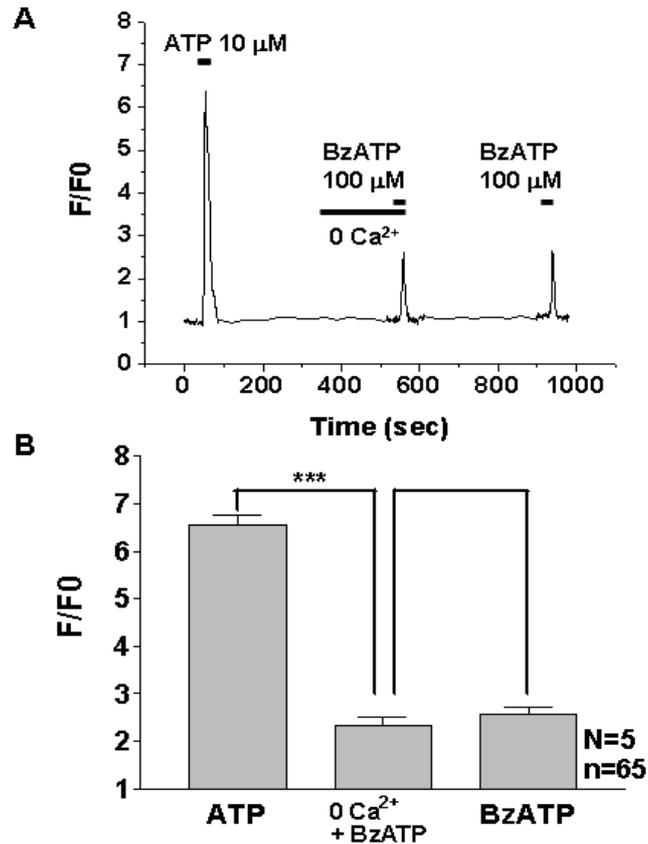


그림 11. BzATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화의 비교. P2Y₁₁ 수용체 아형의 효현제인 BzATP (100 μ M)에 의한 [Ca²⁺]_i 은 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 31.2 \pm 3.7%에 해당하였다 (A). BzATP에 의한 세포질내 칼슘이온농도의 증가는 Ca²⁺ free (0 Ca²⁺)조건에서도 유사하게 관찰되었으며, Ca²⁺ 유무에 따른 세포내 칼슘농도 변화에는 유의한 차이가 없었다 (B). (F0=fluo-3 세포부하로 인한 기본 형광값, F=약물투여에 의해 변화된 형광값, N=실험횟수, n=대상 세포 수, 굵은 실선=약물 투여 기간)

3.3. 퓨린성 수용체 차단제의 효과

퓨린성 수용체 중 어떠한 아형들이 세포내 칼슘조절에 주로 관여하는지를 알아보기 위하여 선택성이 있는 퓨린성 차단제에 의한 효과를 세포내 칼슘반응으로 비교, 관찰하였다. MRS 2179는 선택적 P2Y₁ 퓨린성 수용체에 차단제로 잘 알려져 있으며, 본 실험에서는 30 μ M을 사용하였다. P2Y₁ 수용체 효현제인 2MeS-ATP (1 μ M)에 의한 일시적 $[Ca^{2+}]_i$ 증가는 MRS 2179를 전처리후에는 그 반응이 대부분 ($86.3 \pm 2.3\%$) 억제되었으며 (그림 12), 이와 같은 특징은 ATP에 의한 세포내 칼슘 반응에서도 유사하게 나타났다 (그림 13). 한편 본 실험에 사용된 퓨린성 수용체 차단제인 MRS 2179는 그 자체로는 세포내 칼슘이온농도에 직접적인 영향을 주지 않았다.

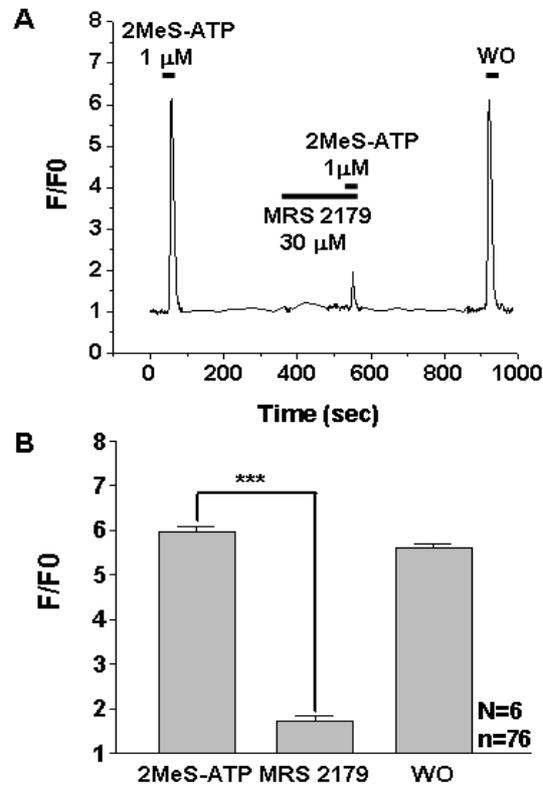


그림 12. MRS 2179가 2MeS-ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과. P2Y₁ 수용체 효현제인 2MeS-ATP (1 μ M)에 의한 일시적 [Ca²⁺]_i 증가는 MRS 2179 (30 μ M)를 2분 30초 동안 전처리후에는 그 반응이 대부분 (86.3 \pm 2.3%) 억제 되었으며 세척후에는 초기값과 유사하게 회복되었다 (A). MRS 2179 전처리 전과 후의 2MeS-ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도에는 유의한 차이가 있었다(B). (F₀=fluo-3 세포부하로 인한 기본 형광값, F=약물투여에 의해 변화된 형광값, WO=wash out, n=대상 세포 수, N=실험횟수, 굵은 실선=약물 투여 기간, *** p<.001)

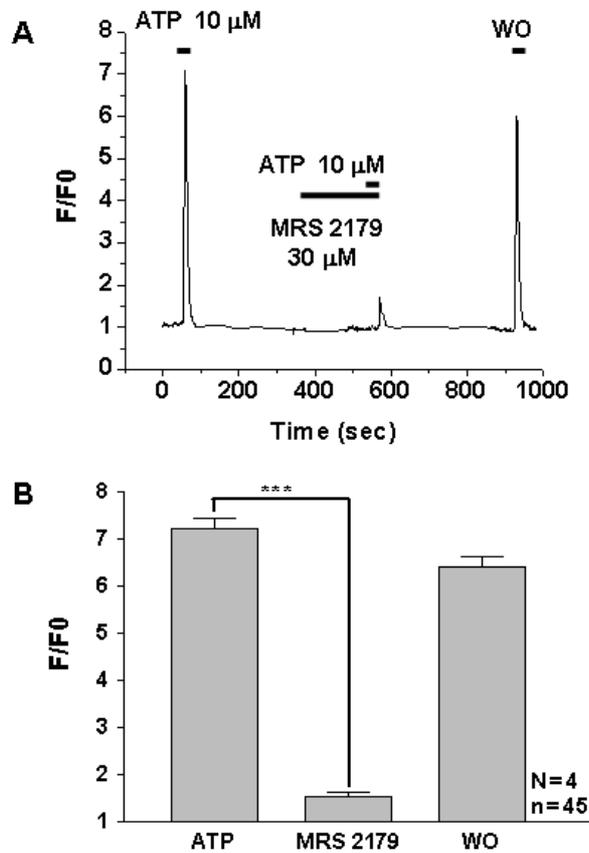
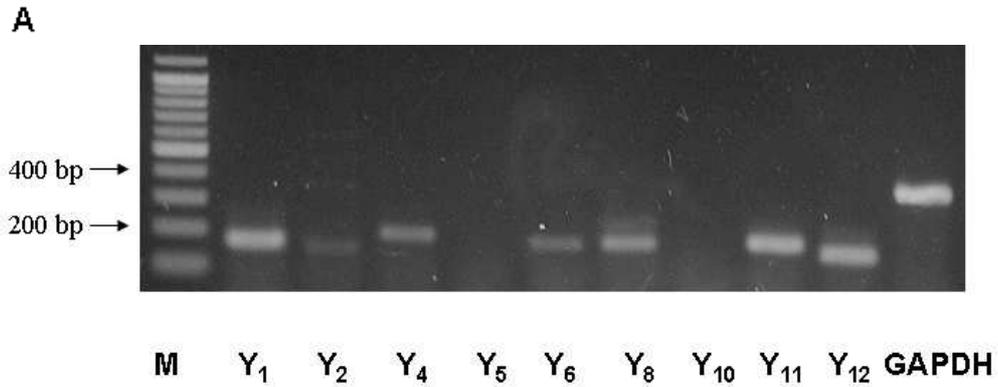


그림 13. MRS 2179가 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화에 미치는 효과. 비선택적 P2Y 수용체 효현제인 ATP (10 μ M)에 의한 일시적 $[Ca^{2+}]_i$ 증가는 MRS 2179 (30 μ M)를 2분 30초 동안 전처리후에는 그 반응이 대부분 ($92.5 \pm 1.6\%$) 억제되었으며 세척후에는 초기값과 유사하게 회복되었다 (A). MRS 2179 전처리 전과 후의 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도에는 유의한 차이가 있었다 (B). (F_0 =fluo-3 세포부하로 인한 기본 형광값, F =약물투여에 의해 변화된 형광값, WO=wash out, n=대상 세포 수, N=실험횟수, 굵은 실선=약물 투여 기간, *** $p < .001$)

3.4. RT-PCR 방법을 이용한 수용체의 분자생물학적 규명

1) 퓨린성 수용체

약물학적 방법을 통해 망막아중 세포에서 세포내 신호전달 기전이 주로 P2Y 퓨린성 수용체에 의해 이루어지고 있음을 확인한 후, WERI-Rb-1 세포막에 발현되어 있는 P2Y 수용체 아형을 규명하기 위해 망막아중 세포로부터 RNA를 분리한 다음, 특정 아형에 선택적인 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. 그림 14에서 나타난 바와 같이, 퓨린성 수용체 아형들 중 포유동물에 일반적으로 발현되어 있는 것으로 잘 알려진 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂ 수용체 mRNA가 모두 망막아중 세포에 발현되어 있음을 알 수 있었다. 그 외에도 특이하게 P2Y₈ 수용체 mRNA가 발현되었다.



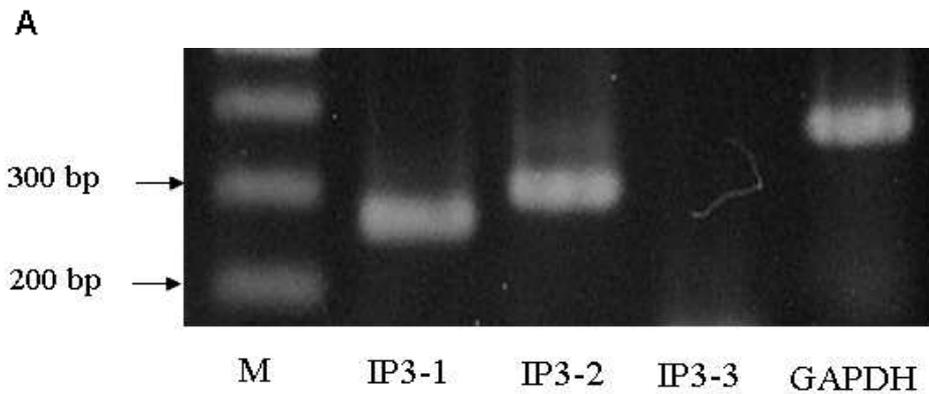
B

P2Y ₁	: 168 bp
P2Y ₂	: 157 bp
P2Y ₄	: 200 bp
P2Y ₅	: 182 bp
P2Y ₆	: 178 bp
P2Y ₈	: 178 bp
P2Y ₁₀	: 181 bp
P2Y ₁₁	: 187 bp
P2Y ₁₂	: 156 bp

그림 14. 망막아중 세포에서 발현되는 P2Y 퓨린성 수용체의 분자생물학적 규명. 사람 망막아중 세포에서 발현되는 P2Y 퓨린성 수용체의 아형들을 확인하기 위해 망막아중 세포들로부터 RNA를 분리한 다음 특정 아형에 선택적인 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다 (표1 및 방법 참조). 대조군으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였으며 (A), B는 아형별 예상되는 증폭산물의 크기 (bp)를 나타내었다. M은 DNA size marker임.

2) IP₃ 수용체

망막아중 세포의 소포체에서 발현되는 IP₃ 수용체 아형을 확인하기 위해 망막아중 세포로부터 RNA를 분리한 다음, 특정 아형에 선택적인 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. 그림 15에서 나타난 바와 같이, IP₃ 수용체 아형들 중 IP₃₋₁, IP₃₋₂ 수용체 mRNA가 망막아중 세포에 발현되어 있음을 알 수 있었다 (그림 15).



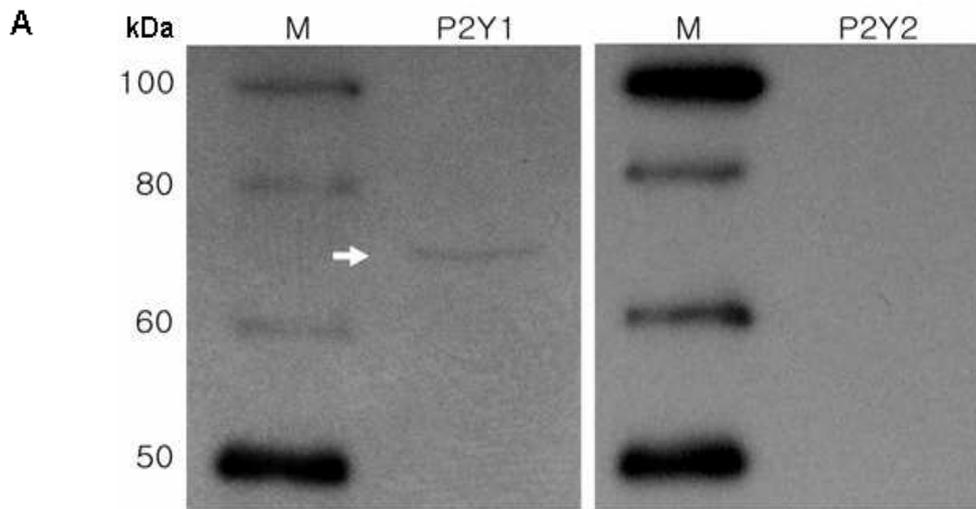
B

IP₃₋₁ : 261 bp
 IP₃₋₂ : 295 bp
 IP₃₋₃ : 137 bp

그림 15. 망막아종 세포에서 발현되는 IP₃ 수용체의 분자생물학적 규명. 사람 망막아종 세포에서 발현되는 IP₃ 수용체의 아형들을 확인하기 위해 망막아종 세포들로부터 RNA를 분리한 다음 특정 아형에 선택적인 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다 (표2 및 방법 참조). 대조군으로 glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였으며 (A), B는 아형별 예상되는 증폭산물의 크기 (bp)를 나타내었다. M은 DNA size marker임.

3.5. Western blot 방법을 이용한 퓨린성 수용체 단백질 규명

사람 망막아중 세포에 발현된 P2Y₁, P2Y₂ 퓨린성 수용체 단백질을 확인하기 위해 WERI-Rb-1 세포들로부터 단백질을 분리한 다음 P2Y₁, P2Y₂ 수용체 아형에 대한 항체 (antobody)를 이용하여 Western blotting을 실시하였다. 그 결과 P2Y₁ 수용체 단백질 band가 확인되었으나 P2Y₂ 수용체 단백질은 발현되지 않았다 (그림 16).



B

M : West-View™ western size marker
(Elpis-Biotech Inc., Taejeon, Korea)

P2Y₁ : anti-P2Y₁ antibody
(1:500 ; Abcam, Cambridge, UK)

P2Y₂ : anti-P2Y₂ antibody
(1:500 ; Abcam, Cambridge, UK)

그림 16. 망막아종 세포에서 발현되는 퓨린성 수용체 단백질의 분자생물학적 규명. 사람 망막아종 세포에서 P2Y₁, P2Y₂ 퓨린성 수용체 단백질을 확인하기 위해 WERI-Rb-1 세포로부터 단백질을 분리한 다음 각각의 아형에 대한 항체를 이용하여 Western blotting을 실시한 결과 P2Y₁ 수용체 단백질이 확인되었다 (A). B는 각 아형에 사용된 항체의 종류와 protein size marker임.

제4장 고찰

본 연구에서는 세포내 칼슘이온 측정법과 분자 생물학적 방법을 이용하여 망막아중 세포주의 하나인 WERI-Rb-1 세포에 발현된 퓨린성 수용체의 특성을 확인하였다.

먼저 약리학적 방법을 이용한 칼슘 이미징 실험 결과 미분화된 망막아중 세포에서 ATP 투여에 따른 일시적인 세포내 칼슘이온농도의 증가가 관찰되었는데, 이러한 칼슘증가는 세포외 칼슘이온을 제거한 상태에서도 유사하게 관찰되어, 퓨린성 수용체에 의한 칼슘이온 조절은 주로 G-단백을 매개로 세포내 신호전달에 관여하는 P2Y 수용체에 의한 것임을 알 수 있었다. 특히 ATP 투여시 세포내 칼슘이온 농도의 증가는 약 30초 이내에 모두 회복되는 것에서 알 수 있듯이 그 반응이 매우 일시적이었다. 이와 같은 칼슘농도의 일과성 반응은 동일 세포주에서 무스카린성 수용체에 의한 세포내 칼슘반응을 확인한 Rah (2004)의 연구에서도 동일하게 나타난 특징이다. 이에 관련된 기전으로는 무스카린성 수용체에 의한 신호전달 메커니즘에서와 같이 퓨린성 수용체의 탈감작화 (desensitization)와 퓨린성 수용체에 의해 동원될 수 있는 칼슘 pool의 제한성 등으로 생각해 볼 수 있겠다. 그 이유로 본 실험에서도 ATP를 반복 투여할 때는 투여 시간 간격 (time interval)이 매우 중요하였는데, 연속 투여시 적어도 5분 이상의 회복기간이 필요하였다. 즉, 투여 시간 간격이 5분 이내일 때는 간격이 짧으면 짧을수록 칼슘증가가 감소하였다 (결과에 나타내지 않았음). P2Y 퓨린성 수용체 중 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, 및 P2Y₆는 PLC 경로를 통한 IP₃의 생성에 의해 칼슘조절에 관여하는데, 이 과정이 일시적인 것으로 알려져 있어 (Tobin 등, 1992; Willars 등, 1998; Fraeyman 등, 2004), 본 실험의 경우에도 이와 관련성이 있을 것으로 추측할 수 있다. ATP에 의한 일과성 칼슘반응이 나타나는 기전으로 생각해 볼 수 있는 또 다른 이유는 망막아중 세포내 칼슘 pool에 관한 것으로, ATP 투여 후 세포내 칼슘반응이 신속하고 일시적으로 나타나며, thapsigargin에 의한 칼슘증가 반응이 비교적 빠르게 이루어지고 회복되는 것으로 보아 퓨린성 수용체에 의해 동원될 수 있는 칼슘 pool이 그다지 크

지 않을 가능성도 배제할 수 없다. 또한 ER을 포함한 exchange pump의 활성화된 정도에 의해서도 Ca^{2+} 조절의 속도 등이 영향을 받을 수 있을 것으로 생각된다.

망막아중 세포에 분포된 퓨린성 수용체의 아형을 알아보기 위해 분자생물학적 방법과 약리학적 방법을 이용하여 확인하고자 하였다. 먼저, RT-PCR 결과에서 망막아중 세포막에는 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₈, P2Y₁₁, P2Y₁₂ 아형의 퓨린성 수용체들의 mRNA가 검출되었다. 이들 퓨린성 수용체들은 대부분 사람을 비롯하여 포유동물 조직에서 널리 분포하며 기능적으로 활성화되어 있는 아형들이다 (Ralevic 및 Burnstock, 1998; Sak 및 Webb, 2002; Abbracchio 등, 2003; Fries 등, 2004). 수용체의 mRNA 발현이 실제로 단백질 수준에서도 발현되는지를 확인한 결과, P2Y₁ 수용체 아형 단백질이 발현되어 있음을 알 수 있었다. 특이한 결과로는 망막아중에 P2Y₈의 mRNA에 발현되어 있다는 점이다. P2Y₈ 수용체는 선행연구에서 미분화된 HL60 (human leukemia) 세포를 제외하고는 사람조직에서 보고되지 않은 아형이다 (Adrian 등, 2000). 본 연구에서는 이들의 특성 및 기능적 관련성을 확인할 수 없었으나, 추후 미분화 및 분화 종양세포에서 P2Y₈ 수용체가 신호전달 기전에 관여하는지에 관한 심층연구가 필요하다고 본다. 한편, 퓨린성 수용체들의 효현제와 차단제를 이용한 약리학적 실험결과에서 P2Y₁과 P2Y₁₁ 수용체 효현제에 의한 일과성 칼슘반응이 관찰되었다는 점과 P2Y_{2,4,6} 효현제로 알려진 UTP에 의해서는 세포내 칼슘이온농도의 변화를 관찰할 수 없었던 점, 그리고 망막아중 세포에서 세포내 칼슘증가를 일으키는 2종류의 퓨린성 수용체 효현제 중 P2Y₁ 수용체 효현제에 의한 칼슘이온농도 변화값이 P2Y₁₁ 수용체 효현제에 의한 것보다 유의하게 클 뿐만 아니라 ATP에 의한 세포내 칼슘반응이 선택적 P2Y₁ 수용체 차단제에 의해 대부분 억제되었다는 점 등으로 미루어 볼 때, 퓨린성 수용체에 의한 칼슘 증가에 주로 P2Y₁ 수용체가 직접적으로 관련된 것으로 보인다. 따라서 본 실험에서 사용한 분자생물학적 방법과 약리학적 방법을 이용한 실험결과 퓨린성 수용체의 활성화에 따른 칼슘증가는 PLC를 매개하는 P2Y₁과 P2Y₁₁이 관여하나, P2Y₁의 수용체 mRNA 뿐만 아니라 기능적 수준의 단백질이 세포막에 발현되어 있고, 이에 대한 선택적 차단제의 효과가 크다는 점에서 주로 P2Y₁에 의한 반응이 현저함을 예상할 수 있다. 흥미롭게도 이러한 결과는 망막을 비롯한 다양

한 눈조직에서 관찰한 퓨린성 수용체의 발현특징과 뚜렷한 차이를 보인다. 선행연구에서 퓨린성 수용체는 정상적인 눈에서 뿐만 아니라 병태생리적 변화가 온 눈조직에서도 여러 신호전달 경로에 영향을 미치는데, 이와 같은 다양한 생리적 기능조절에 주로 관여하는 퓨린성 수용체는 P2Y₂인 것으로 (Jumblatt 및 Jumblatt, 1998; Pintor, 1999; Kimura 등, 1999; Hosoya 등, 1999; Murakami 등, 2000a, b; Shiuie 등, 2000; Cowlen 등, 2003) 알려져 있기 때문이다. 눈의 각막 상피와 내피 (Srinivas 등, 1998; Kimura 등, 1999; Cha 등, 2000; Yang 등, 2000), 결막 상피 (Jumblatt 및 Jumblatt, 1998; Hosoya 등, 1999; Shiuie 등, 2000; Li 등, 2001), 모양체 상피 (Wax 등, 1993; Shahidullah 및 Wilson, 1997; Cowlen 등, 2003), 망막의 뮐러 세포 (Müller cell)(Liu 및 Wakakura, 1998; Bringmann 등, 2002), 색소 상피 (Sullivan 등, 1997; Cowlen 등, 2003)와 신경절 세포 (Cowlen 등, 2003), 상맥락막 (suprachoroid) (Sugamoto 등, 1999), 렌즈 상피세포 (Collison 및 Duncan, 2001), 눈꺼풀과 홍채 (Cowlen 등, 2003) 등에서 P2Y₂ 수용체가 발현되어 있음이 확인된 바 있다. 또한 P2Y₂ 수용체 효현제인 UTP를 통해 이 수용체에 의한 눈에서의 생리적 기능조절이 일부 규명되었는데, UTP 투여시 토끼의 각막상피 (rabbit corneal epithelium)에서 칼슘동원 기전이 활성화되고 (Kimura 등, 1999), 토끼의 색소 결막 (rabbit pigmented conjunctiva)에서 Cl⁻와 수분 분비가 촉진되며 (Hosoya 등, 1999; Shiuie 등, 2000), 토끼와 사람의 결막에서 점액분비가 조절될 뿐만 아니라 (Jumblatt 및 Jumblatt, 1998), 농도의존적으로 눈물 및 점액과 유사한 당단백의 분비가 증가하였다고 (Murakami 등, 2000a, b) 보고한 예가 해당된다. 이처럼 지금까지 대부분의 눈의 세포들에서 우세하게 발현되어 있으면서 다양한 기전에 관여하는 것으로 알려진 P2Y₂ 수용체는 망막아중에서는 확인할 수 없어, 망막 관련 조직에서 일부 병적기전의 발생과정에서는 P2Y₂ 보다는 P2Y₁ 수용체가 더 의의를 갖는 것으로 보인다. 이것은 현재 안과영역에서 퓨린성 수용체의 임상적 적용분야가 주로 P2Y₂ 수용체에 집중되어 있는 것을 감안할 때, 앞으로 퓨린성 수용체를 목표 (target)로 한 안과질환의 치료범위의 확대가능성을 의미한다 하겠다. 그 이유로 앞서 진술한 바와 같이, P2Y₂ 수용체는 다양한 눈조직에 분포되어 있음이 규명되었으나, 망막조직에서 확인된 P2Y 퓨린성 수용체의 발현 혹은 기능적 특성에

대한 여전히 제한되어 있다 (Fries 등, 2004). 또한 일부 보고에서 눈에 분포하는 P2Y₁ 퓨린성 수용체가 쥐의 망막조직 (retinal slices)의 뿔러세포에서 Ca²⁺ wave를 일으키며(Li 등, 2001a), 발달중의 닭 배아 (developing chick embryo)에서 MAP kinase 신호전달과 DNA 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있으나(Sanches 등, 2002), 사람망막을 대상으로 퓨린성 수용체를 탐색한 연구는 정상적인 망막상피세포 (Sullivan 등, 1997)와 뿔러 세포 (Bringmann 등, 2002) 등에서 P2Y₂ 수용체가 발현되어 있음이 보고되어 있을 뿐이며, 또한 P2Y₂ 수용체가 분포하고 있는 눈의 조직은 다양하나 조직학적 분포 특성으로 볼 때 P2Y₂ 퓨린성 수용체는 대체로 상피조직에서 수분이나 이온의 이동기전에 중요한 역할을 담당하고 있음을 알 수 있다. 따라서, 상피조직 이외의 눈조직과, 병적 상황이 초래된 눈조직에서의 퓨린성 수용체의 발현양상과 생리적 조절기전은 다른 특성을 나타낼 것이라는 추측이 가능하고, 본 연구에서 규명된 P2Y₁ 수용체의 발현 및 세포내 신호전달 특성은 이러한 관점에서 퓨린성 수용체에 대한 추후연구의 필요성과 퓨린성 수용체의 임상적용 범위 확대의 가능성을 높여준다고 할 수 있을 것이다. 또한 망막전구세포 (retinal precursor cell) 모델로 연구되어 온 망막아종 세포에서 이루어지는 신호전달 기전은 다양한 세포군으로 이루어진 망막의 정상 생리와 병태 생리 기전을 설명하는 기초지식이 될 수도 있다.

P2Y 퓨린성 수용체의 작용기전은 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁ 의 활성화를 통한 PLC-IP₃ 경로와 (Harden 등, 1995; Schachter 등, 1996) AC 억제기전 (Ralevic 및 Burnstock, 1998) 등이 알려져 있는데, 본 연구에서는 퓨린성 수용체의 세포내 칼슘동원 기전과 관련하여, 세포외 칼슘이온을 제거한 상태에서도 ATP에 의한 세포내 칼슘반응이 감소하지 않았고 PLC 경로 차단제인 U-73122와 IP₃ 수용체 차단제인 2-APB 전처치가 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 증가를 현저하게 억제하는 것으로 보아 대부분의 기전은 PLC-IP₃ 경로를 경유할 것으로 생각된다. 이러한 결과는 동일 세포주에서 콜린성 수용체에 의한 칼슘조절 기전과는 다소 차이를 보이는데, Rah (2004)는 망막아종 세포에서의 칼슘조절은 세포내 칼슘 저장소로부터의 유리 뿐만 아니라 세포막을 통한 칼슘유입 기전에 의해서도 일부 조절된다고 하였다. 이처럼 동일한 칼슘조절 기능에 관여하고 있을지라도 수용체

마다 조절 메커니즘이 약간씩 차이가 있음을 알 수 있고, 이러한 차이로 인해 세포 고유기능에 특징적인 방식으로 신호전달 과정이 전개되는 것으로 보인다.

이상의 결과에서 병태생리적 변화가 초래된 미분화 망막세포에 발현된 퓨린성 수용체는 세포내 칼슘이온농도를 조절하여 세포의 증식과 분화를 촉진하고 이를 통해 세포의 발달과 성숙에 관여할 것으로 추측되는데 이와 관련된 구체적인 연구는 앞으로 활발히 진행될 것으로 사료된다

제5장 결론

사람의 망막아중 세포에 존재하는 퓨린성 수용체의 특성 및 의의를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대부분의 세포에서 ATP 투여시 현저한 일과성 $[Ca^{2+}]_i$ 증가를 보였으며, 이와 같은 변화는 Ca^{2+} -free 조건에서도 세포외 칼슘이 제거된 조건에서도 $90.7 \pm 1.0\%$ 이상 유지되었다(n=48).
2. Phospholipase C (PLC) 차단제 (U-73122, $1 \mu M$) 및 Ca^{2+} -ATPase 차단제 (thapsigargin, $1 \mu M$)에 의해서는 각각 대조군의 $10.4 \pm 1.8\%$ (n=55), $8.1 \pm 0.9\%$ (n=52)로 대부분 억제되었으나 PLC 차단제인 U-73122의 유사체(isoform)인 U-73343 ($1 \mu M$) 투여시에는 세포내 칼슘농도의 억제가 유의하게 관찰되지 않았다 (n=69).
3. 역전사 연쇄 중합반응(RT-PCR)을 관찰한 결과 망막아중 세포에서 $P2Y_{1,2,4,6,8,11,12}$ 아형의 퓨린성 수용체를 코딩하는 mRNA들이 확인되었으나, ATP에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가는 $P2Y_1$ 차단제 (MRS 2179, $30 \mu M$)에 의해 대부분 ($92.5 \pm 1.6\%$) 억제되었다.
4. $P2Y_1$ 수용체 효현제에 의해 일시적으로 증가한 세포내 칼슘이온농도는 $P2Y_{11}$ 수용체 효현제에 의해서도 일부 반응을 보였으나 $P2Y_{2,4,6}$ 수용체 효현제인 UTP 투여후에는 반응이 나타나지 않았다.
5. ER막의 IP_3 수용체 차단제인 2-APB ($20 \mu M$)는 ATP에 의한 세포내 칼슘 농도를 $92.5 \pm 1.3\%$ 억제하였고 (n=71), RT-PCR에서 IP_{3-1} , IP_{3-2} 수용체 아형의 mRNA가 확인되었다.
6. 퓨린성 수용체 단백질을 확인하기 위한 Western blot 방법을 통해 $P2Y_1$ 수용체 단백질의 발현을 확인하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 망막아중 세포에서 ATP에 의한 세포내 Ca^{2+} 증

가는 주로 P2Y₁ 퓨린성 수용체 아형이 활성화되어 PLC 경로를 통해 세포내 칼슘 저장소로부터 Ca²⁺을 동원하는 것으로 판단된다. 이러한 조절기전을 통해 망막아종에서 퓨린수용체의 활성화는 세포의 증식, 분화, 성숙 및 세포사멸 등에 관여하는 것으로 사료되며 본 연구의 결과는 비신경 조직에서 퓨린성 수용체에 대한 이해의 폭을 넓히는 중요한 기초정보로 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 특징적으로 나타난 P2Y₈ 수용체 아형 mRNA의 발현과 관련하여, 이 수용체가 단백질 수준에서도 발현되는지와, 신호전달 과정에서 기능적 특성을 갖는지에 대한 추후연구를 제안하는 바이다. 아울러, 망막아종 세포에서 P2Y₁ 수용체와 함께 세포내 칼슘동원에 관여하는 P2Y₁₁ 수용체 아형의 신호전달 기전 확인 및 임상적용 가능성에 대한 심층연구도 필요한 것으로 보인다.

참고문헌

- Abbracchio MP, Burnstock G. Purinergic signaling: Pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 1998;78:113-145.
- Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, et al. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:52-55.
- Adrian K, Bernhard MK, Breitingner HG, Ogilve A. Expression of purinergic receptors (ionotropic P2X₁₋₇ and metabotropic P2Y₁₋₁₁) during myeloid differentiation of HL60 cells. *Biochim Biophys Acta* 2000;1492:127-138.
- Akasu T, Hirai K, Koketsu K. Increase of acetylcholine-receptor sensitivity by adenosine triphosphate: a novel action of ATP on ACh-sensitivity. *Br J Pharmacol* 1981;74:505-507.
- Ayyanathan K, Webbs TE, Sandhu AK, Athwal RS, Barnard EA, Kunapuli SP. Cloning and chromosomal localization of the human P2Y₁ purinoceptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;218:783-788.
- Barnes S, Haynes LW. Low-voltage-activated calcium channels in human retinoblastoma. *Brain Res* 1992;598:19-22.
- Bean BP. Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:87-90.

- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp p. Calcium—a life and death signal. *Nature* 1998;395:645–648.
- Bertolesi GE, Jollimore CAB, Shi C, Elbaum L, Denovan-Wright EM, Barnes S, Kelly MM. Regulation of $\alpha 1G$ T-type calcium channel gene(CACNA1G) expression during neuronal differentiation. *European J Neurosci* 2003;17:1802–1810.
- Brake AJ, Julius D. Signaling by extracellular nucleotides. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:519–541.
- Bringmann A, Pannicke T, Weick M, Biedermann B, Uhlmann S, Kohen L, et al. Activation of P2Y receptors stimulates potassium and cation currents in acutely isolated human Müller(glial) cells. *Glia* 2002;37:139–152.
- Burnstock G, Meghji P. The effect of adenyly compounds on the rat heart. *Br J Pharmacol*. 1983;79:211–8.
- Burnstock G. Overview: purinergic mechanism. *Ann NY Acad Sci* 1990; 603:1–17.
- Burnstock G. Introduction: Purinergic transmission, semin, *Neurosci* 1996;8:171–174.
- Burnstock G. The past, present, and future of purine nucleotides as signaling molecules. *Neuropharmacology* 1997;36:1127–1139.
- Burnstock G, Williams M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:862–869.

- Cha SH, Hahn TW, Sekine T, Lee KH, Endou H. Purinoceptor-mediated calcium mobilization and cellular proliferation in cultured bovine corneal endothelial cells. *Jpn J Pharmacol* 2000;82:181-187.
- Chambers JK, Macdonald LE, Sarau HM, Ames RS, Freeman K, Foley JJ, et al. A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem* 2000;275:10767-10771.
- Charlton ME, Williams AS, Fogliano M, Sweetnam PM, Duman RS. The isolation and characterization of a novel G protein-coupled receptor regulated by immunologic challenge. *Brain Res* 1997;764:141-148.
- Chen ZP, Levy A, Lightman SL. Nucleotides as extracellular signalling molecules. *J Neuroendocrinol* 1995;7:83-96.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
- Ciapa B, Pesando D, Wilding M, Whitaker M. Cell-cycle calcium transients driven by cyclic changes in inositol triphosphate levels. *Nature* 1994;368:875-878.
- Cowlen MS, Zhang VZ, Warnock L, Moyer CF, Peterson WM, Yerxa BR. (2003). Localization of ocular P2Y₂ receptor gene expression by in situ hybridization. *Exp Eye Res* 2003;77:77-84.
- Collison DJ, Duncan G. Regional differences in functional receptor distribution

- and calcium mobilization in the intact human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2355-2363.
- Communi D, Piroton S, Parmentier M, Boeynaems JM. Cloning, and functional expression of a human uridine nucleotide receptor. *J Biol Chem* 1995;270:30849-30852.
- Communi D, Govaerts C, Parmentier M, Boeynaems JM. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1997;272:31969-31973.
- Communi D, Gonzalez NS, Dethoux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M, et al. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem* 2001;276:41479-41485.
- Conigrave AD, Fernando, KC, Gu B, Tasevski V, Zhang W, Luttrell BM, et al. P2Y(11) receptor expression by human lymphocytes: evidence for two cAMP-linked purinoceptors. *Eur J Pharmacol* 2001;426: 157-163.
- Dubyak GR, el-Moatassim C. Signal transduction via P2 purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 1993;265:C577-C606.
- Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, et al. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficit mice. *Nat Med* 1999;5:1199-1202.
- Fraeyman N, van Emmelo J, Paulssen RH, Vermis K. Desensitization of muscarinic receptors. *Receptors Channels* 2004;10:1-10.

- Francois J, Matton MT, DeBie S, Tanaka Y, Vandenbulcke D. Genesis and genetics of retinoblastoma. *Ophthalmologica* 1975;170:405-425.
- Freeman K, Tsui P, Moore D, Emson, PC, Vawter L, Naheed S, et al. Cloning, pharmacology, and tissue distribution of G-protein-coupled receptor GPR105(KIAA0001) rodent orthologs. *Genomics*. 2001;78:124-128.
- Fries JE, Wheeler-Schilling TH, Guenther E, Kohler K. Expression of P2Y1, P2Y2, P2Y4, and P2Y6 receptor subtypes in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004a;45:3410-3414.
- Fries JE, Wheeler-Schilling TH, Kohler K, Guenther E. Distribution of metabotropic P2Y receptors in the rat retina: a single cell RT-PCR study. *Mol Brain Res* 2004b;130:1-6.
- Fuder H, Muth U. ATP and endogenous agonists inhibit evoked [3H]-noradrenalin release in rat iris via A1 and P2y-like purinoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993;348:352-357.
- Fujihara T, Murakami T, Fujita H, Nakamura M, Nakata K. Improvement of corneal barrier function by the P2Y(2) agonist INS365 in a rat dry eye model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:96-100.
- Gallie BL, Campbell C, Devlin H, Duckett A, Squire JA. Developmental basis of retinal-specific induction of cancer by RB mutation. *Cancer Res* 1999;59:1731s-1735s.
- Gomez MP, Waloga G, Nasi AE. Electrical properties of Y-79 cells, a

- multipotent line of human retinoblastoma. *J Neurophysiol* 1993a;70:1476-1486.
- Gomez MP, Waloga G, Nasi AE. Induction of voltage-dependent sodium channels by in vitro differentiation of human retinoblastoma cells. *J Physiol* 1993b;70:1487-1496.
- Guo W, Kamiya K, Kodama I, Toyama J. Cell cycle-related changes in the voltage-gated Ca^{2+} currents in cultured newborn rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1095-1103.
- Harden TK, Boyer JL, Nicholas RA. P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1995;35:541-79.
- Herman MM, Perentes E, Katsetos CD, Darcel F, Frankfurter A, Collins VP, et al. Neuroblastic differentiation potential of the human retinoblastoma cell lines Y-79 and WERI-Rb 1 maintained in an organ culture system. *Am J Pathol* 1989;134:115-132.
- Hirooka K, Bertolesi GE, Kelly MEM, Denovan-Wright EM, Sun X, Hamid J, et al. T-type calcium channel $\alpha 1G$ and $\alpha 1H$ subunits in human retinoblastoma cells and their loss after differentiation. *J Neurophysiol* 2001;88:196-205.
- Hosoya K, Ueda H, Kim KJ, Lee VH. Nucleotide stimulation of Cl^- secretion in the pigmented rabbit conjunctiva. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:53-59.
- James G, Butt AM. Changes in P2Y and P2X purinoceptors in reactive glia

- following axonal degeneration in the rat optic nerve. *Neurosci Lett* 2001;312:33-36.
- Janssens R, Communi D, Piroton S, Samson M, Parmentier M, Boeynaems JM. Cloning and tissue distribution of the human P2Y₁ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;221:588-593.
- Jin JG, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8070-8074.
- Jumblatt JE, Jumblatt MM. Regulation of ocular mucin secretion by P2Y₂ nucleotide receptors in rabbit and human conjunctiva. *Exp Eye Res* 1998;67:341-346.
- Kimura K, Nishimura T, Satoh Y. Effect of ATP and its analogues on [Ca²⁺]_i dynamics in the rabbit corneal epithelium. *Arch Histol Cytol* 1999;62:129-138.
- Kyritsis AP, Tsokos M, Triche TJ, Chader GJ. Retinoblastoma -origin from a primitive neuroectodermal tumor cell? *Nature(Lond.)* 1984;307:471-473.
- Kong ID. *Studies on the characteristics of purinoceptor in ureteral smooth muscle. Doctoral dissertation.* Seoul, Yonsei Univ; 1993.
- Kügelgen IV, Wetter, A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn-Schmiedelberg's Arch Pharmacol* 2000;362:310-323.
- Lee BS, Chung HS, Park KS, Kong ID, Jeong SW, Lee JW. Vascular reactivity

- by purinoceptor activation in rat inferior vena cava. *Korean Cir J* 2000;30:1156-1164.
- Lee JW, Kong ID, Chun SJ, Park KS, Lee JM. Studies on the characteristics of the purinoceptors in the uterine smooth muscle. *The New Medical Journal* 1994;37:37-43.
- Leon C, Vial C, Cazenave JP, Gachet C. Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y₁ purinoceptor. *Gene* 1996;171:295-297.
- Liu Y, Wakakura M. P1-/P2-purinergic receptors on cultured rabbit retinal müller cells. *Jpn J Ophthalmol* 1998;42:33-40.
- Li Y, Holtzclaw LA, Russell JT. Muller cell Ca²⁺ waves evoked by purinergic receptor agonists in slices of rat retina. *J Neurophysiol* 2001a;85:986-994.
- Li Y, Kuang K, Yerxa B, Wen Q, Rosskothan H, Fischbarg J. Rabbit conjunctival epithelium transports fluid, and P2Y₂ receptor agonists stimulate Cl⁻ and fluid secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001b;281:C595-C602.
- Mahoney MC, Burnett WS, Majerovics A, Tanenbaum H. The epidemiology of ophthalmic malignancies in New York State. *Ophthalmol* 1990;97:1143-1147.
- McFall RC, Sery TW, Makadon M. Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma. *Cancer Res* 1977;37:1003-1010.
- McFall RC, Nagy RM, Nagle BT, McGreevy LM. Scanning electron microscopic

- observation of two retinoblastoma cell lines. *Cancer Res* 1978;38: 2827-2835.
- Meyer CH, Hotta K, Peterson WM, Toth CA, Jaffe GJ. Effect of INS37217, a P2Y(2) receptor agonist, on experimental retinal detachment and electroretinogram in adult rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 ;43:3567-74.
- Mundasad MV, Novack GD, Allgood VE, Evans RM, Gorden JC, Yerxa BR. Ocular safety of INS365 ophthalmic solution, a P2Y2 agonist, in healthy subjects. *J Ocul Pharmacol Ther* 2001;17:173-179.
- Murakami T, Fujihara T, Nakamura M, Nakata K. P2Y(2) receptor stimulation increases tear fluid secretion in rabbits. *Curr Eye Res* 2000a;21:782-787.
- Murakami T, Fujihara T, Nakamura M, Nakata K. P2Y2 receptor stimulation increases mucin-like glycoprotein secretion from rabbit conjunctival goblet cells in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000b;41:S457 Abstract nr 2423.
- Newman EA. Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci* 2003;23:1659-1666.
- Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP-and UTP-specific receptor. *Mol Pharmacol* 1996;50:224-229.
- Nicholas RA. Identification of the P2Y(12) receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides. *Mol Pharmacol*

2001;60:416-420.

Nguyen T, Erb T, Weisman GA, Marchese A, Heng HH, Garrad RC, et al. Cloning, expression, and chromosomal localization of the human uridine nucleotide receptor gene. *J Biol Chem* 1995;270:30845-30848.

North RA, Barnard EA. Nucleotide receptors. *Curr Opin Neurobiol* 1997;7:346-457.

Ohmasa M, Saito T. Muscarinic calcium mobilization in the regenerating retina of adult newt. *Dev Brain Res* 2003;145:61-69.

Ohnishi Y. The histogenesis of retinoblastoma. An electron microscope analysis of rosette. *Ophthalmologica* 1977;174:129-136.

Olsson RA, Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev.* 1990;70:761-845.

Palmer RK, Boyer JL, Schachter JB, Nicholas RA, Harden TK. Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol* 1998;54:1118-1123.

Pannicke T, Weick M, Uckermann O, Wheeler-Schilling T, Fries JE, Reichel MB, et al. Electrophysiological alterations and upregulation of ATP receptors in retinal glial muller cells from rats infected with the Borna disease virus. *Glia* 2001;35:213-223.

Pearson R, Catsicas M, Becker D, Mobbs P. Purinergic and muscarinic

- modulation of the cell cycle and calcium signaling in the chick retinal ventricular zone. *J Neurosci* 2002;22:7569-7579.
- Pendergrass TW, Davis S. Incidence of retinoblastoma in the United States. *Arch Ophthalmol* 1980;98:1204-1210.
- Perentes E, Herbort CP, Rubinstein LJ, Herman MM, Uffer S, Donoso LA, et al. Immunohistochemical characterization of human retinoblastomas in situ with multiple markers. *Am J Ophthalmol* 1987;103:647-658.
- Peterson WM, Meggyesy C, Yu K, Miller SS. Extracellular ATP activates calcium signaling, ion, and fluid transport in retinal pigment epithelium. *J Neurosci* 1997;17:2324-2337.
- Pintor J. Purinergic signaling in the eye. In: Burnstock G, Sillito AM, eds. *The autonomic nervous system*. London: Harwood Academic Publisher; 1998;171-210.
- Rah SH. *Characteristics of cholinergic receptors expressed in human retinoblastoma*. Doctoral dissertation. Seoul, Yonsei Univ; 2004.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998;50:413-492.
- Sak K, Webb TE. A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and their pharmacology. *Arch Biochem Biophys* 2002;397:131-136.
- Sato N, Kawamura S. Molecular mechanism of S-modulin action: binding target

- and effect of ATP. *J Biochem (Tokyo)* 1997;122:1139-1145.
- Sanches G, de Alencar LS, Ventura AL. ATP induces proliferation of retinal cells in culture via activation of PKC and extracellular signal-regulated cascade. *Int J Dev Neurosci* 2002;20:21-27.
- Sato N, Kawamura S. Molecular mechanism of S-modulin action: binding target and effect of ATP. *J Biochem (Tokyo)* 1997;122:1139-1145.
- Schachter, JB, Li Q, Boyer JL, Nicholas RA, Harden TK. Second messenger cascade specificity and pharmacological selectivity of the human P2Y₁-purinoceptor. *Br J Pharmacol* 1996;118:167-73.
- Shahidullah M, Wilson WS. Mobilisation of intracellular calcium by P2Y₂ receptors in cultured, non-transformed bovine ciliary epithelial cells. *Curr Eye Res* 1997;16:1006-1016.
- Shiue MH, Kulkarni AA, Gukasvan HJ, Swisher JB, Kim KJ, Lee VH. Pharmacological modulation of fluid secretion in the pigmented rabbit conjunctiva. *Life Sci* 2000;66:PL105-PL111.
- Siegal G. The golden age of retinal cell culture. *Mol Vision* 1999;5: 4.
- Sparkes RS, Murphree AL, Lingua RW, Sparkes MC, Field LL, Funderburk SJ, et al. Gene for hereditary retinoblastoma assigned to chromosome 13 by linkage to esterase D. *Science Wash DC* 1983;219:971-973.

- Srinivas SP, Yeh JC, Ong A, Bonanno JA. Ca²⁺ mobilization in bovine corneal endothelial cells by P2 purinergic receptors. *Curr Eye Res* 1998;17:994-1004.
- Srinivas SP, Ong A, Goon L, Goon L, Bonanno JA. Lysosomal Ca(2+) stores in bovine corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2341-2350.
- Stellwagen D, Shatz CJ, Feller MB. Dynamics of retinal waves are controlled by cyclic AMP. *Neuron* 1999;24:673-685.
- Sugamoto Y, Hirai K, Tokoro T. P2Y2 receptor elevates intracellular calcium concentration in rabbit eye suprachoroid *J Med Dent Sci* 1999;46:83-92.
- Sugioka M, Fukuda Y, Yamashita M. Ca²⁺ responses to ATP via purinoceptors in the early embryonic chick retina. *J Physiol* 1996;493:855-863.
- Sullivan DM, Erb L, Anglade E, Weisman GA, Turner JT, Csaky KG. Identification and characterization of P2Y₂ nucleotide receptors in human retinal pigment epithelial cells. *J Neurosci Res* 1997;49:43-52.
- Tobin AB, Lambert DG, Nahorski SR. Rapid desensitization of muscarinic m3 receptor-stimulated polyphosphoinositide responses. *Mol Pharmacol* 1992;42:1042-1048,
- Tombran-Tink J, Johnson LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:1700-1706.
- Torres B, Zambon AC, Insel PA. P2Y11 receptors activate adenylyl cyclase and

- contribute to nucleotide-promoted cAMP formation in MDCK-D(1) cells: a mechanism for nucleotide-mediated autocrine-paracrine regulation. *J Biol Chem* 2002;277:7761-7765.
- Wax M, Sanghavi DM, Lee CH, Kapadia M. Purinergic receptors in ocular ciliary epithelial cells. *Exp Eye Res* 1993;57:89-95.
- Webb TE, Henderson DJ, Roberts JA, Barnard EA. Molecular cloning and characterization of the rat P2Y4 receptor. *J Neurochem* 1998;71:1348-1357.
- Wheeler-Schilling TH, Marquardt K, Kohler K, Guenther E, Jabs R. Purinergic receptors in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:S457 Abstract nr 4148.
- Willars GB, McArdle CA, Nahorski SR. Acute desensitization of phospholipase C-coupled muscarinic M3 receptors but not gonadotropin-releasing hormone receptors co-expressed in alpha T3-1 cells: implications for mechanisms of rapid desensitization. *Biochem J* 1998;333:301-308.
- Wittenberger T, Schaller HC, Hellebrand S. An expressed sequence tag(EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors. *J Mol Biol* 2001;307:799-813.
- Wong ROL. Cholinergic regulation of $[Ca^{2+}]_i$ during cell division and differentiation in the mammalian retina. *J Neurosci.* 1995;15: 2696-2706.
- Yang H, Reinach PS, Koniarek JP, Wang Z, Iserovich P, Fischbarg J. Fluid transport by cultured corneal epithelial cell layers. *Br J Ophthalmol*

2000;84:199-204.

Yunis J, Ramsay N. Retinoblastoma and sub-band deletion on chromosome. *Am J Dis Child* 1978;13:161-163.

Zambon AC, Brunton LL, Barrett KE, Hughes RJ, Torres B, Insel PA. Cloning, expression, signaling mechanism, and membrane targeting of P2Y(11) receptors in Madin Darby canine kidney cells. *Mol Pharmacol* 2001;60:26-35.

Zhang FL, et al. Identification and characterization of a novel G α phai-coupled ADP receptor from human and mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:705-713.

ABSTRACT

Characteristics of Purinergic Receptor Expressed in Human Retinoblastoma

Yoon Hee Kim

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jong Hyuck Lee)

ATP (adenosine 5'-triphosphate) is the essential energy source in the cell. It is also well known that ATP plays significant roles in the various physiological functions being present outside the cell. This role of ATP is actually mediated by the purinergic receptor. Expression profiles and physiological characteristics of the purinergic receptor vary according to the species and the cell types. Therefore, this study was performed to clarify the characteristics of purinergic receptor and a part of its physiological mechanisms especially in the human retinoblastoma. To achieve this goal, we performed two series of experiments in the WERI-Rb-1 cell, one of retinoblastoma cell lines. Firstly, intracellular $[Ca^{2+}]_i$ transient was measured by using Ca^{2+} imaging technique to clarify the active involvement of purinergic receptor. Secondly, subtypes of purinergic receptor were pursued by using RT-PCR and western blot. Results were as follows;

1. 10 μ M ATP elicited strong but transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ higher

than 80% in the WERI-Rb-1 cells (n=46) in a concentration-dependent manner. This $[Ca^{2+}]_i$ increase was well maintained by higher than 90.7±1.0 % after external Ca^{2+} -depletion (n=48). In the WERI-Rb-1 cells, mRNAs for purinergic P2Y_{1,2,4,6,8,11,12} subtypes were identified by using RT-PCR and P2Y₁ receptor protein was also identified by using western blot.

2. P2Y₁ agonist (2MeS-ATP, 1 μM) also increased $[Ca^{2+}]_i$ up to 85.3±3.1 % of 10 μM ATP-induced response and P2Y₁ selective blocker (MRS 2179, 30 μM) suppressed almost of this response (86.3±2.3%). However, P2Y_{2,4,6} agonist (UTP, 100 μM) elicited no response in $[Ca^{2+}]_i$ and P2Y₁₁ agonist (BzATP, 100 μM) increased $[Ca^{2+}]_i$ only by 31.2±3.7% of ATP effect.

3. Phospholipase C inhibitor (U-73122, 1 μM) modestly suppressed the 10 μM ATP-induced response eliciting 10.4±1.8% increase in $[Ca^{2+}]_i$ (n=55), while its isoform (U-73343, 1 μM) had no suppression (n=69). Ca^{2+} -ATPase inhibitor (thapsigargin, 1 μM) also elicited a modest suppression on the ATP-induced response eliciting 8.1±0.9% increase in $[Ca^{2+}]_i$ (n=52).

4. IP₃ receptor blocker (2-APB, 20 μM) suppressed the 10 μM ATP-induced response by 92.5±1.3% (n=71) and, interestingly, IP₃ receptor subtypes of IP₃₋₁ and IP₃₋₂ were actually identified by RT-PCR.

All these results together indicate that P2Y₁ purinergic receptor is mainly expressed in retinoblastoma cell, which activates Ca^{2+} release from internal Ca^{2+} storage sites via the PLC-mediated pathway. Therefore, it is concluded that this purinergic receptor-mediated Ca^{2+} mobilization works as an essential mechanism involved in the differentiation and maturation of retinoblastoma cells.

Key words: retinoblastoma, purinergic receptor, intracellular Ca^{2+} ,
 Ca^{2+} imaging