

해마 신경 선조 세포에서
immediate early gene pip92의
신경계 분화에서의 발현 경로

연세대학교 대학원

의과학과

박정범

해마 신경 선조 세포에서
immediate early gene pip92의
신경계 분화에서의 발현 경로

지도 백 자 현 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2003 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

박 정 범

박정범의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2003 년 월 일

감사의 글

27년의 삶동안 제게 많은 힘과 용기를 준 돌아가신 할머니와 언제나 우리 가족을 위해 애쓰시는 아버지, 어머니, 이젠 집안의 가장으로 노력하는 형, 형수님에게 먼저 고마움을 전합니다. 또한 나의 귀엽고 사랑스런 이쁜 조카들, 소정아, 민기.

석사과정동안 많은 지도와 관심을 가져주신 정광철 교수님께 깊이 감사드립니다. 또한, 바쁘신 와중에도 귀중한 시간을 내주시어 논문에 대한 충고를 해 주신 백자현 교수님, 박수철 교수님께도 감사드립니다. 그밖에도 지난 2년 반 동안의 석사시절 동안 많은 가르침을 주신 모든 교수님들에게도 감사의 마음을 전합니다.

항상 실험실에서 저와 함께 고민해주고 격려 해 주었던, 영규형, 지영이 누나, 은진이 누나, 세정아, 경하, 재은아에게 감사의 마음을 전합니다. 실험실 동생들인, 신애, 지원이, 은주, 은정, 이제 새로 대학원 생활을 시작할 현정, 현진에게도 앞으로의 미래에 보다 좋은 일들만이 생기기를 바랍니다. 또 이서울 선생님, 이진우 선생님, 정연이 누나, 정태형, 임종수 선생님, 지훈이형, 임주원 선생님, 지혜 누나, 진아, 형진이, 친구들, 기한이, 진환이, 성재, 미연이, 나의 입학 동기인 완이, 지연이, 그리고 주영 감자, 생물학과 친구들에게도 감사의 마음을 전합니다.

언제나 편안한 나의 소중한 친구들, 경희, 주광이, 장선이, 영종이, 명혁이, 기동이, 수련이, 지혜, 혜연이, 홍래, 수원고 친구들, 건대 친구들, 동대 친구들 모두 너무 고맙고, 감사하게 생각하고 있다.

이밖에도 저를 아는 모든 분들께 이제까지의 제 삶에 영향을 준 것에 대해서 깊은 감사의 마음을 전하며 항상 건강하시고 웃음을 잃지 않으시길 바랍니다.

다시 한번 이제까지의 제 삶에 저의 정신적 지주였던 아버지와 어머니, 또한 형에게 머리 숙여 감사의 마음을 전하며 이 글을 마칩니다.

목 차

| | |
|---|----|
| 국문요약 | 1 |
| I. 서 론 | 3 |
| II. 재료 및 방법 | 6 |
| 1. 쥐 해마 신경 세포 배양 | 6 |
| 2. Transfection | 6 |
| 3. 면역침전과 Western blot 분석 | 7 |
| 4. Glutathione-S-Transferase(GST) Pull down assay | 7 |
| 5. Chloramphenicol Acetyl Transferase(CAT) assay | 8 |
| 6. In vitro kinase assay | 8 |
| III. 결 과 | 10 |
| 1. H19-7 세포에서 bFGF에 의한 세포내 Rho family GTPase의 유도 | 10 |
| 2. bFGF에 의한 ERK, JNK, p38 kinase 활성화도 분석 | 11 |
| 3. Rho family GTPase에 의한 pip92 promoter 활성화도 분석 | 12 |
| 4. Rac1과 MAP kinase의 활성화 경로 분석 | 14 |
| 5. p21-activated kinase1 (Pak1)의 Elk-1 조절 | 16 |
| 6. Rac1에 의한 pip92 deletion promoter 활성화도 분석 | 17 |
| IV. 고 찰 | 19 |
| V. 결 론 | 23 |
| 참고문헌 | 24 |
| 영문초록 | 27 |

그림 차례

| | |
|--|----|
| 그림 1. bFGF 처리에 의한 Rho family GTPase 단백질 활성화 유도 | 11 |
| 그림 2. bFGF에 의한 ERK, JNK, p38 kinase 활성화도 분석 | 12 |
| 그림3. bFGF에 의한 pip92 발현 유도에 미치는 Rho, Rac1, Cdc42의 영향 | 14 |
| 그림 4. Rac1과 MAP kinase의 활성화 경로 분석 | 15 |
| 그림 5. In vitro kinase assay를 통한 Pak1의 Elk-1 인산화 | 16 |
| 그림 6. Rac1에 의한 pip92 deletion promoter의 활성화도 분석 | 18 |
| 그림 7. FGF에 의한 pip92 의 발현 모식도 | 22 |

국문요약

해마 신경 선조 세포에서 immediate early gene pip92의 신경계 분화에서의 발현 경로

Immediate early gene pip92는 세포 성장, 분화, 사멸 동안에 serum, FGF, phobol ester, NGF 등에 의해 빠르고 일시적으로 발현된다. Anisomycin에 의한 세포 사멸 유도시, pip92 발현은 JNK와 p38 kinase 활성화에 의해 promoter 내의 SRE 부위에 Ets와 CArG-like 결합하는, 전사조절단백 Elk-1의 활성화를 통해 매개된다. 또한, 신경세포에서 분화 유도인자인 bFGF에 의해 신경세포가 분화할 때 pip92는 Raf 활성화에 의해 ERK 의존적 또는 비의존적 신호전달을 거쳐 유도된다. 이런 pip92 활성화 경로와는 다르게 이 유전자의 암호화 단백질 기능에 대해서는 아직 잘 알려지지 않았다.

Rho family GTPases (Rho, Rac1, Cdc42)는 세포 모양 형성과 세포 운동성에 밀접한 연관이 있다. 이들 중, Rac1과 Cdc42는 많은 신경 세포 또는 조직에서 신경 돌기 형성에 관련되어 있고, downstream effector인 p21-activated kinase1 (Pak1)이 직접적으로 관여한다. 본 연구에서는 흰쥐 태아 해마에서 유래된 H19-7 세포에서 bFGF에 의한 분화 시 pip92 발현 유도에 Rho family GTPase가 관여하는지 여부를 조사하고 그 하부 신호전달 기전과 신경 세포 분화동안의 Rho family GTPases 의 기능적 역할을 조사하였다.

실험 결과 bFGF에 의한 pip92의 유도는 Rac1의 활성화를 통해 이루어지며, MAPK superfamily 중 JNK의 upstream에 위치하는

MEKK의 kinase 활성도를 없앤 돌연변이 발현 벡터를 transient transfection 시켰을 때 Rac1의 활성화가 감소되어지는 것으로 보아 JNK가 Rac1의 활성화에 상부에 위치하고 있음을 확인할 수 있었다. 이런 JNK-Rac1 활성화에 의한 pip92 유전자 발현에는 Rac1의 downstream에 위치한 Pak1 활성화를 수반하며 활성화된 Pak1은 전사조절 단백질 Elk1을 직접적으로 인산화 하여 활성화 된 Elk1이 pip92 promoter의 Ets 부위에 결합하여 pip92를 유도하게 된다. 이러한 결과들을 종합해보면 bFGF에 의해 JNK, Rac1, Pak1등이 연속적으로 활성화 되고 활성화된 Pak1에 의해 Elk1이 직접 인산화 되어, pip92의 발현이 유도되고, 이런 Rac1 활성화가 해마 신경세포주의 신경계 분화에 중요한 역할을 수행함을 알 수 있다.

핵심되는 말 : pip92, Rac1, JNK, H19-7 cells, Elk-1

해마 신경 선조 세포에서 immediate early gene pip92의
신경계 분화에서의 발현 경로

<지도교수 백 자 현 >

연세대학교 대학원 의과학과

박 정 범

I. 서 론

신호 전달은 외부로부터 다양한 자극이 세포내의 반응을 일으키도록 하는 일련의 과정이다. 이러한 신호 전달중 MAP kinases는 세포 성장, 세포 사멸, 분화 등, 다양한 세포 반응들에서 중요한 전달자로서의 역할을 수행하는 것으로 알려져 있고, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 kinase 등으로 구성되어¹. 이런 MAP kinase 들은 외부 신호가 세포 표면에서부터 세포핵까지 가는 과정에서 연속적인 단백질의 활성화를 거쳐 신호가 전달 되는데 중요한 역할을 하고 있다². 성장 인자 등과 같은 외부 자극에 의해 일시적으로 세포막의 Ras가 GTP-Ras의 활성화된 형태로 변환되고 이것이 Raf를 활성화 시켜 MAP kinases의 upstream에 위치하는, MEK, MAP kinase 등이 연속적으로 된다. ^{1,3}.

한편 Ras에서 MAP kinases로 가는 과정중에 Rho-GTPases가 관여되어 있다^{4,5}. Rho-GTPases 는 Rho, Rac1, Cdc42로 이루어져 있는데, 이는 여러 동물세포에서 세포 운동성 조절과 세포 형태 생성에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려졌다. 그 중 RhoA는 세포 부착과 수축에 관여하고⁶, Rac1은 lamellipodia 형성에, Cdc42는 filopodia 형성에 관여한다⁷. 또한 신경세포에서, RhoA의 경우 신경 돌기 형성을 억제하고, 이와 반대로 Rac1과 Cdc42는 신경돌기 형성을 촉진하는 것으로 알려졌다⁸. 또한 Rac1과 Cdc42의 downstream에는 활성화된 Rac1과 Cdc42에 의해 활성화 되는 serine/threonine kinase인 p21-activated kinase1 (Pak1)이 있다. Pak1 또한 신경 세포에서 신경 돌기 형성에 많은 역할을 하고 있다⁹.

일반적으로 immediate early gene (IEG)은 성장인자 처리에 의해 1-2시간 안에 전사가 빠르고 일시적으로 유도되어지며, 새로운 단백질 합성에 관계없이 일어나는 현상을 보인다. 이런 IEG 전사는 전사 억제제 cycloheximide 처리에 의해서 발현이 크게 증가되는 특징이 있으며 IEG에 의해서 전사조절 단백질 외에 다양한 기능을 가진 많은 다른 종류의 단백질 등이 암호화 된다¹⁰. IEG인 pip92 (Chx1 또는 ETR101로도 불림)는 serum, EGF, NGF, PDGF, FGF, TPA¹¹, insulin¹², anisomycin¹³, NMDA¹⁴ 등에 의해 빠르고 일시적으로 유도되어지며, 신경 세포 분화¹⁵와 신경 세포 사멸시¹³에 유도됨이 알려졌다. Pip92는 반감기가 짧고 proline-rich 단백을 암호화 하지만 단백질 기능에 대해서는 자세히 알려져 있지 않다¹¹.

Pip92의 promoter에는 -1280 bp 부위에 serum response factor (SRF)와 Ets 부위의 전사조절인자의 일종인, ternary complex factor (TCF)를 인식하는 serum response element (SRE)가 주요 전사 조절

요소로 되어 있으며^{13,15}, 비슷한 promoter 구조를 갖고 있는 c-fos의 경우 Elk1이 ERK에 의해 인산화 되면 이어서 TCF계의 구성원으로서 활성화 된 SRF, SRE와 3차적 복합체를 연속적으로 형성한다고 알려져 있다^{16,17}.

세포 사멸시의 pip92의 유도는 anisomycin에 의해 JNK와 p38 kinase의 활성화를 거쳐 유도됨이 밝혀진 바 있으며, 이런 JNK와 p38 또한 Elk1의 인산화를 통해 pip92 유도를 이루어 냈음이 알려졌다¹³. FGF에 의한 신경세포 분화시에도 ERK에 의존적인 경로와 비의존적 경로에 의해서 Elk1을 인산화 되고 이 과정을 통해 pip92 발현이 이루어진다.¹⁵.

본 연구에서는 bFGF에 의한 pip92 발현 및 신경 세포 분화시 Rho family의 활성화 여부와 downstream effector에 위치하는 물질을 찾고자 하였다. 연구 결과, 흰쥐 태아 해마에서 유래된 H19-7 세포에서 분화유도인자 bFGF를 처리해주면 JNK-Rac1-Pak1-Elk1의 연속적인 활성화가 일어났으며, 이를 통하여 Rac1이 pip92 발현에 관여하고 있음을 알 수 있었다.

II. 재료 및 방법

1. 쥐 해마 신경 세포 배양

흰쥐 태아에서 유래된 해마신경배양 세포주 (H19-7)는 33°C에서 기능적으로 활성이 유지되고 39°C에서는 활성이 억제되는 온도에 민감한 SV-40 T antigen을 발현하는 retroviral vector를 세포 내 transduction 함으로써 만들었다. H19-7 세포주는 T-antigen 기능이 활성화되는 33°C에서는 EGF에 대해 반응하여 세포 성장이 이루어지며, T-antigen 기능이 비활성화되는 39°C에서는 FGF에 대해 반응하여 신경선조 세포에서 신경세포로 분화하는 특성을 갖는다. 분화하지 않고 분열 성장하는 세포는 10% FBS와 50 μ M/ml streptomycin, 50 U/ml penicilin을 포함하는 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)에 200 μ g/ml geneticin (Life Technologies Inc. Grand Island, NY, USA)을 selective antibiotics로 사용하였다. 세포를 분화시키기 위해서는 2 mM의 glutamine이 포함된 N₂ 배지에 48시간 배양하여 준 후 10 ng/ml의 bFGF를 처리해준다.

2. Transfection

Transfection은 LipofecAMINE Plus reagent kit (Invitrogen)를 이용하였다. 혈청이 들어 있지 않은 배양액에 각각의 플라스미드 DNA를 넣고, Plus 시약을 첨가하여 실온에서 15분 배양한다. 이 배양된 DNA 용액을 H19-7세포에 넣어 3시간동안 배양한 후 혈청이 들어있

는 정상 배양액을 첨가하여 24시간동안 배양한다.

3. 면역침전과 Western blot 분석

H19-7 세포주를 배양한 후 phosphate-buffered saline으로 세척하였다. 그 후 1 mM PMSF, 50 µg aprotinin, 50 µM leupeptin, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄를 첨가한 RIPA lysis buffer로 세포액을 추출하였다. 단백질을 Bradford법을 이용, 정량하였고 동량의 단백질에 항체를 넣어 4°C에서 overnight 반응시키고 10% Protein-A bead (Amersham Pharmacia Biotech, UK)를 30 µl 넣어 4°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 bead를 RIPA lysis buffer로 충분히 씻어준 후 전기 영동을 통해 단백질을 분리하고, nitrocellulose membrane에 단백질을 이동시킨다. 5% non-fat dry milk에 membrane을 1시간 동안 반응시켜 비특이적인 단백질의 결합을 배제시킨 후 확인하고자 하는 1차항체를 4°C에서 overnight 반응시킨다. Tris-buffered saline (0.1% tween20)으로 세척한 후 1차 항체의 유래 종에 따라 발색반응을 일으키는 효소가 부착되어 있는 적절한 2차 항체를 4°C에서 2시간 동안 반응시키고 Tris-buffered saline (0.1% Tween20)으로 세척하였다. 발색반응은 Enhanced Chemiluminescence kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK)을 이용한 후, X-ray 필름에 노출하여 확인하였다.

4. Glutathione-S-Transferase(GST) Pull down assay

효소와 기질의 결합 원리를 이용하여 glutathione bead에 GST를 결합시킨 후 glutathione을 처리하여 GST를 순수하게 농축, 분리 해 낼 수 있다. RhoA는 Rho kinase와, Rac1과 Cdc42는 Pak1에 결합하

여 downstream cascade 활성이 일어난다. Rho kinase의 Rho binding domain (RBD)과 Pak1의 Rac1과 Cdc42가 결합하는 부위의 cDNA를 GST 발현 벡터에 subcloning하여 GST-fusion construct를 만든 후, bacteria에 IPTG 유도를 통해 GST-fusion 단백을 얻어, glutathione bead와 binding buffer (25 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM DTT, 30 mM MgCl₂, 40 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40)를 섞어 4°C에서 30분 간 반응시킨 후 cell lysate를 넣어 4°C에서 1시간 동안 결합 시킨다. 이를 첫 번째 wash buffer (25 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM DTT, 30 mM MgCl₂, 40 mM NaCl, 1% Nonidet P-40)로 세척 한 후, 두 번째 wash buffer (25 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM DTT, 30 mM MgCl₂, 40 mM NaCl)로 충분히 세척한 후 Western blot을 수행하였다.

5. Chloramphenicol Acetyl Transferase(CAT) assay

Bacterial enzyme인 Chloramphenicol acetyl transferase(CAT)는 유전자에 측정하고자 하는 유전자의 promoter를 fusion 시켜 발현 벡터를 구축하고, transient transfection에 의해 mammalian 세포에서 벡터를 발현 시켜 일정시간 경과 후 세포를 lysis 하여, CAT antibody가 coating 된 plate에 세포 적출물을 배양시켜, ELISA를 통해 CAT 효소의 활성도를 간접적으로 타겟 유전자 promoter의 활성도를 측정하는 방식이다. CAT 활성도는 Roche Molecular Biochemicals의 CAT assay kit 및 그 protocol을 이용하여 측정하였다.

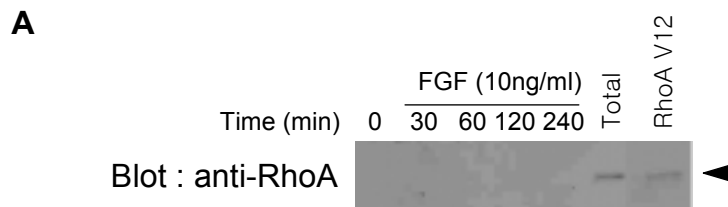
6. *In vitro* kinase assay

전사조절인자 Elk1이 활성화 되기 위해 필요한 단백 인산화를 측정하기 위해 in vitro 상에서 인산화 효소를 면역침전법을 이용, 모은 후 기질을 [γ - 32 P]ATP과 혼합하여 배양시키면, 기질이 인산화 되어 autoradiograph로 인산화 여부를 알 수 있다. 이런 원리를 이용하여, Pak1에 의한 Elk1 활성화를 알아보기 위해 in vitro kinase 분석법을 수행하였다. transfection 또는 분화조건에서 시약 처리 한 후 일정시간 배양한 다음 단백을 추출하였다. 세포를 차가운 phosphate-buffered saline(PBS) 용액으로 씻은 후 buffer A (20 mM Tris, pH 7.9, 137 mM NaCl, 5 mM Na₂EDTA, 2 mM EDTA, 1.0% Triton X-100, 0.1 mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin)를 넣고 얼음위에서 10분간 방치하였다. 그리고 4°C에서 13,000 rpm 조건으로 15분간 원심 분리한 후 상등액을 얻어 BIo-Rad protein assay kit를 사용하여 단백 정량을 하였다. 이후 anti-Pak1 항체를 4°C에서 Protein A-sepharose bead (Pharmacia)와 2시간 결합시킨 후, 200-300 μ g 단백을 포함하는 세포 추출물을 혼합하여 4°C에서 overnight 반응시킨 후, 씻어 주었다. 면역침전물을 recombinant GST-Elk1와 혼합하여 반응 용액 (20 mM HEPES, pH 7.4, 0.2 mM sodium orthovanadate, 2 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 10 μ Ci[γ - 32 P]ATP, 10 μ M ATP)에서 30°C에서 30분간 배양하고 5X SDS-PAGE sample buffer를 첨가하여 인산화 반응을 중지시킨 후, 단백을 SDS-PAGE로 분리하고 인산화된 기질을 autoradiography로 측정하였다.

III. 결 과

1. H19-7 세포에서 bFGF에 의한 세포내 Rho family GTPase의 활성화 유도

FGF에 의한 Rho family 단백질의 활성화 유무를 알아보기 위해 H19-7 세포를 N2 분화조건 배지에 2일 동안 배양한 후 10 ng/ml bFGF를 일정 시간 간격으로 처리하여 세포 적출물을 얻은 후 동량의 세포 적출물로 GST pull down 분석법을 수행하여 활성화 정도를 분석하였다. 활성화된 RhoA의 결합 기질로는 GST-Rho binding domain (RBD), Rac1과 Cdc42의 경우에는 downstream effector인 GST-Pak1을 이용, pull down 분석법을 시행하였다. 그 결과 RhoA의 경우 H19-7 세포의 분화조건에서는 활성화되지 않음을 확인 하였고 (그림 1A), Rac1의 경우는 2시간부터 점차 증가하여 4시간에서 대조군에 비해 두배 가량 증가 하였다 (그림 1B). Cdc42는 대조군에 비해 유의있는 증가를 관찰하지 못했다 (그림1C). 이 결과를 통해 bFGF에 의해 Rac1 단백질의 활성화가 이루어짐을 알 수 있었다.



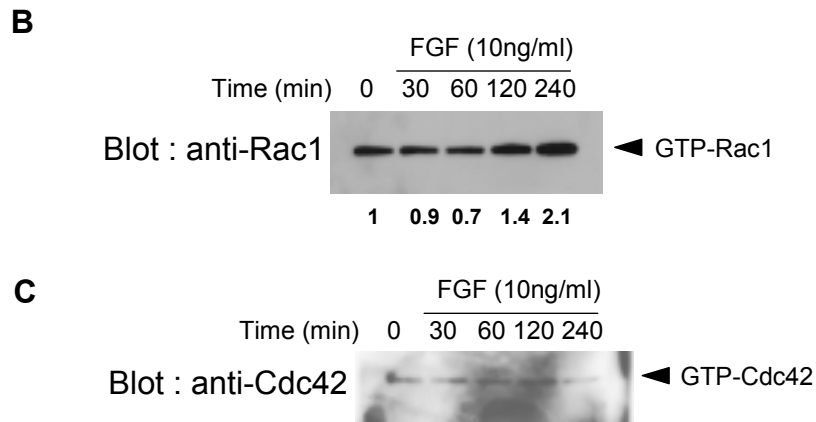


그림 1. bFGF 처리에 의한 Rho family GTPase 단백질 활성화 유도.

H19-7 세포를 2일간 N2 분화조건 배지에서 배양후 bFGF 10ng/ml을 시간별로 처리하여 세포 적출물을 얻은 후, GST-Pak1 (B, C) 또는 GST-RBD (A)를 먼저 GST-glutathione 4 bead에 붙인 후 세포적출물을 첨가하여 pull down 분석법을 수행하였다.

2. bFGF에 의한 ERK, JNK, p38 kinase 활성화 분석

bFGF에 의한 MAP kinase의 활성화 여부를 알아보기 위해 H19-7 세포에 10 ng/ml bFGF를 처리하고 각각의 활성화된 MAP kinase 항체를 이용 Western blot 분석을 시행하였다. 그 결과 bFGF에 의해 p38 kinase는 인산화 되지 않지만 (그림 2), ERK는 bFGF 처리 후 15분에서 가장 많이 활성화 되었으며 JNK는 15분에서 최대, 이후 1시간까지 활성화 되었다. 이 결과를 통해 bFGF는 MAP kinase 구성원 중 p38 kinase을 제외한 ERK와 JNK를 활성화 시킴을 관찰하였다.

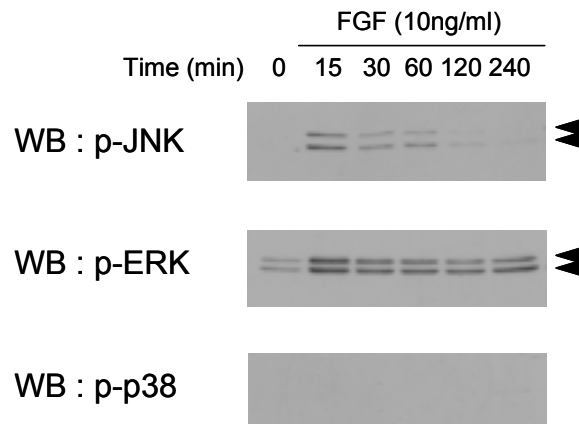


그림 2. bFGF에 의한 ERK, JNK, p38 kinase 활성화 분석.

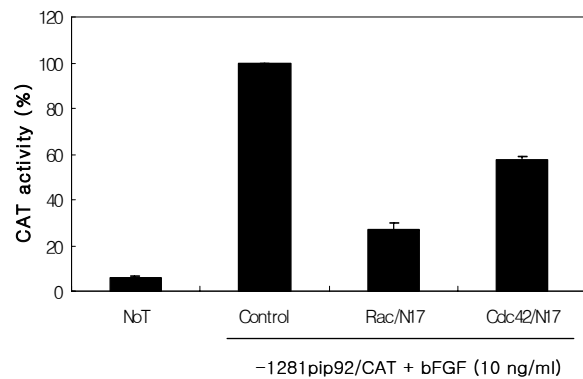
H19-7 세포에 N2 분화조건 배양액에 2일간 배양후 10 ng/ml bFGF를 처리하고 30 μ g 세포 적출 단백질을 12% gel의 SDS-PAGE에 의해 분리하였다. phospho-ERK, phospho-JNK, phospho-p38 kinase 항체를 이용하여 Western 분석을 실시하였다.

3. Rho family GTPase에 의한 pip92 promoter 활성화 분석

선행 연구에 의해 H19-7 세포주에서 bFGF 처리에 의해 IEG pip92가 발현되고 그 발현 기전에는 MEK-ERK 경로와 MEK-ERK 외에 Raf 하부에 위치하지만 그 신호가 다른 경로를 통해 전달되는 경로 존재를 확인하였다¹⁵. 본 연구에서는 bFGF에 의한 pip92 유도시 Rho family GTPase 활성화 효과를 알아보기 위해 -1281 bp의 pip92 promoter가 reporter CAT에 fusion된 construct와, 항상 활성화 또는 비활성화 된 Rac1과 Cdc42를 각각 돌연변이 단백을 암호화하는 발현 벡터와 co-transfection하거나, bFGF (10 ng/ml)만을 처리한 대조군

세포와 비교하여 CAT 활성도를 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 항시 비활성화 된 Rac1 (N17)을 처리한 세포에서의 CAT 활성도는 대조군에 비해 75% 정도 감소하고, Cdc42 (N17)는 40% 정도 감소하였다 (그림 3A), 반대로 항시 활성화된 Rac1 (V12)을 처리한 세포의 CAT 활성도는 대조군에 비해 3.5배 증가가, Cdc42 (V12)는 2배 정도 증가를 하였다 (그림 3B). 이 결과를 통해서, pip92 발현에 Rho family 중 Rac1과 Cdc42 활성화를 통해 이루어짐을 알 수 있었다.

A



B

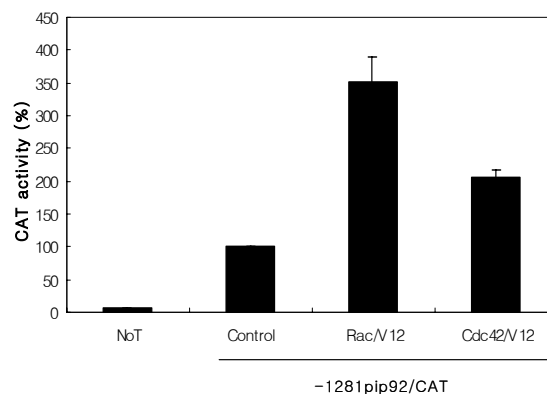


그림3. bFGF에 의한 pip92 발현 유도에 미치는 Rho, Rac, Cdc42의 영향.

H19-7 세포에 각각 1 μ g pip92 promoter plasmid DNA와 1 μ g의 Rac1, Cdc42의 항시 활성화 또는 비활성화 된 construct를 각각 co-transfection 하여 분화조건인 N2 배지에서 하루 배양 후 (B)에는 bFGF를 10ng/ml의 농도로 1시간 처리하여 CAT 활성을 분석하였다. -1281pip92/CAT promoter의 CAT 활성 농도를 100% 기준으로 하여 각각의 CAT 활성농도를 % 평균값으로 나타내었다.

4. Rac1과 MAP kinase의 활성화 경로 분석

Rac1에 의한 pip92 발현경로를 분석하기 위해 Rac1의 항시 비활성화된 Rac1 (N17)과 항시 활성화된 Rac1 (V12)을 transient transfection 하여 bFGF (10 ng/ml) 처리 하거나 처리하지 않은 것과 비교하여 ERK와 JNK의 활성화 여부를 보았다. 먼저 돌연변이 단백질 발현 Rac1에 대해 활성화된 ERK와 JNK의 봉쇄 및 활성화에 변화가 없음을 관찰할 수 있었다 (그림 4A). 또한 ERK의 chemical inhibitor인 U0126 (10 nM)과 JNK upstream인 MEKK의 활성을 없앤 돌연변이 MEKK 발현 벡터를 처리하여 bFGF (10 ng/ml) 처리 4시간 후에 대조군과 비교하여 GST-Pak1 pull down assay를 통해 GTP-Rac1 활성화를 확인한 결과 돌연변이 MEKK단 발현 시 Rac1이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 4B). 이 결과를 통해 bFGF의 신호는 JNK을 거쳐 Rac1 활성화를 유발함을 확인 할 수 있었다.

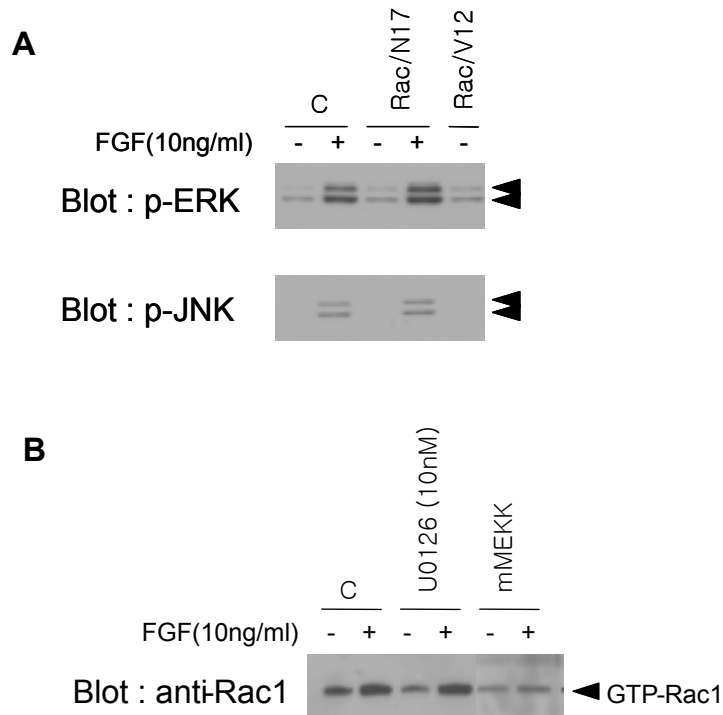


그림 4. Rac1과 MAP kinase의 활성화 경로 분석

H19-7 세포에 2 μ g의 항시 비활성화된 Rac1 (N17)과 항시 활성화된 Rac1 (V12) 발현벡터를 transient transfection하여 24시간 후 N2 분화조건 배지에서 24시간 배양한 다음 15분간 bFGF (10 ng/ml)을 처리한 것과 처리하지 않은 것을 anti-phospho ERK와 anti-phospho JNK로 Western blot을 통해 분석하였다 (A). 세포를 N2 분화 조건 배지에서 48시간 배양후 U0126 (10 nM)과 bFGF (10 ng/ml) 처리하였고, 4 μ g의 항시 비활성화된 MEKK 발현벡터를 처리하여 N2 분화 조건 배지에서 24시간 배양 후 bFGF (10 ng/ml)를 4시간 처리 하여 세포 적출물을 GTP-Pak1으로 pull down assay를 수행하였다. 활성화된 Rac1은 항체를 이용, Western blot을 통해 확인하였다 (B).

5. p21-activated kinase1 (Pak1)의 Elk-1 조절

bFGF에 의해서 pip92가 발현될 때 pip92 promoter의 upstream -1281 bp에 위치한 Ets 결합자리에 전사조절인자 Elk1의 활성화에 의해 결합이 수반됨을 확인한 바 있다¹⁵. 이런 선행 결과를 바탕으로, 현재까지 얻은 bFGF에 의한 JNK-Rac1-Pak1 활성화 경로 하부에 Elk1이 활성화 되는 지 여부를 알아보기 위해, 분화 조건에서 10 ng/ml bFGF 을 처리 후 세포 적출물을 Pak1 항체를 이용하여 면역 침전하고, 기질로 GST-Elk1을 이용하여 in vitro kinase assay를 수행하였다 (그림 5). 실험 결과 Rac1이 활성화되는 bFGF 처리 후 4시간에서 Pak1에서 Elk1이 강하게 인산화 되는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 JNK-Rac1-Pak1으로 신호전달 후 활성화된 Pak1이 직접적 Elk1을 인산화 함으로써 pip92 유도가 이루어질 수 있음을 보여준다.

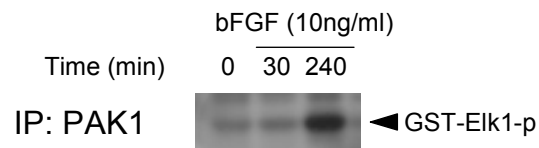


그림 5. In vitro kinase assay를 통한 Pak1의 Elk-1 인산화

H19-7 세포에 N2 분화 조건 배양액에서 2일간 배양 후 bFGF (10 ng/ml)을 시간대별로 처리하고 세포 적출물을 얻었다. Pak1항체를 Protein A-sepharose bead 붙인 후 세포 적출물을 넣어 면역 침전 시킨다. 이후 lysis buffer로 2번 씻은 후 kinase buffer를 이용하여 2번더 씻는다. 이를 kinase buffer 25 μ l, 25 μ g GST-Elk-1, 10 μ Ci [γ -³²P]ATP, 10 μ M ATP)를 섞어 30°C에서 30분간 배양 하고 SDS-PAGE로 분리하여 autoradiography를 실시 하였다.

6. Rac1에 의한 pip92 deletion promoter 활성화도 분석

bFGF에 의한 JNK-Rac1-Pak1-Elk1 활성화 결과를 바탕으로 활성화된 Elk1이 pip92 유도에 관여하는 전사조절 부위인 upstream Ets 부위에 결합하는지 여부를 조사하기 위해 SH-SY5Y human neuroblastoma에 2개의 Ets와 2개의 SRE, SP-1, CREB 결합부위가 존재하는 -1281pip92/CAT, Ets와 SRE가 제거된 -1111pip92/CAT, -287pip92/CAT, Ets, SRE, SP-1이 제거된 -159pip92/CAT, -89pip92/CAT의 pip92 deletion promoter에 CAT이 결합된 construct와 항시 활성화된 Rac1(V12) plasmid를 co-transfection 하여, pip92 promoter 활성도를 분석 하였다. 그 결과 Ets 부위와 SRE 부위를 가진 -1281pip92/CAT을 transient transfection 시켰을 때 Rac1에 의한 CAT 활성도가 현저히 증가했으나, -1281 bp에서 -1111 bp 사이의 promoter 부분을 제거한, -1111pip92/CAT, -287pip92/CAT, -159pip92/CAT, -87pip92/CAT의 promoter 활성도가 50% 이상 감소하였다. 이 결과를 통해 Rac1에 의한 pip92 유전자 발현에는 Elk1과 결합하는 Ets 부위와 SRF가 결합하는 SRE 부위를 포함하는 -1281 bp에서 -1111 bp 사이의 promoter 부분이 활성화 되어 pip92의 발현을 조절함을 알 수 있었다.

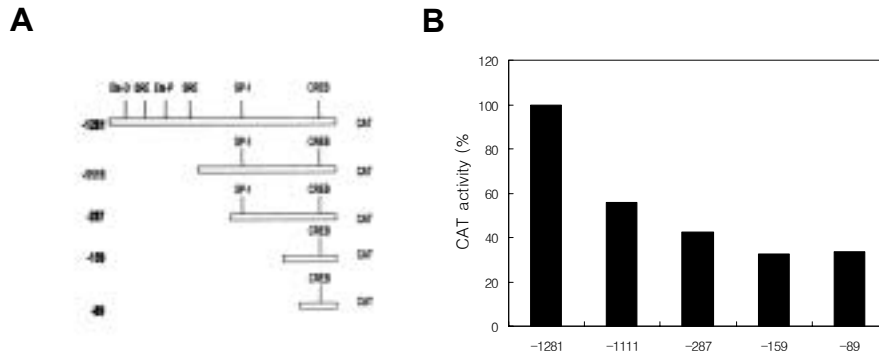


그림 6. Rac1에 의한 pip92 deletion promoter의 활성화 분석.

SH-SY5Y 세포에 각각 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 Rac1(V12) plasmid와 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 pip92 deletion promoter (-1281pip92/CAT, -1111pip92/CAT, -287pip92/CAT, -159pip92/CAT, -89pip92/CAT)을 transient co-transfection 한 후 CAT 활성을 분석하였다. 각각의 pip92 deletion promoter들에 대한 모식도 (A)와 -1281pip92/CAT promoter의 CAT 활성 농도를 100% 기준으로 하여 각각의 CAT 활성 농도를 % 평균값으로 나타내었다 (B).

IV. 고찰

본 연구에서는 흰쥐 태아에서 유래된 해마 신경 배양 세포주인 H19-7 세포에서 immediate early gene pip92의 분화시 발현경로에 관해 조사하였다. 기존에 알려진 해마 신경 줄기 세포주에서 bFGF 처리에 의한 신경계 분화 유도시 pip92 발현은, bFGF가 수용체에 결합하면서 활성화된 GTP-Ras를 통해 Raf가 활성화되고 MEK를 거쳐 MAP kinases인 ERK에 의해 Elk1이 인산화되고, 이것이 pip92 promoter에 결합하여 유전자 발현이 이루어지게 된다¹⁵. 이런 결과는 pip92의 promoter에 두 개의 Elk1이 결합하는 Ets 부위가 존재하여 이것이 pip92 전사에 필요 충분한 전사조절 자리임이 입증됨으로 증명되었다. 본 연구에서는 또다른 pip92 활성화 경로 대상으로 Rho GTPase를 pip92 promoter CAT-reporter를 이용, 확인하였다. 우선, H19-7 세포주에서 Rho family GTPase의 분화시 활성화 정도를 알아본 결과, RhoA는 분화조건에서 활성화 되지 않았고, Cdc42는 bFGF에 의해 유의있게 많이 증가하진 않는다. 이에 반해 Rac1이 bFGF에 의해 가장 높게 활성화 되었고, CAT-reporter에서도 pip92의 발현에 가장 크게 관여함을 보여준다. Cdc42의 경우, bFGF를 처리 하지 않은 세포에서도 일정한 활성화가 유지되므로 bFGF에 관계없이 일부가 pip92 발현에 관여 하고 있을 것으로 추정되어지며, pip92 발현에 기여하는 Cdc42의 역할에 대해서는 더 자세한 연구가 있어야 할 것이다 (그림 1, 3). 또한 Rac1의 downstream이며, serine/threonine kinase인, Pak1이 Elk1을 인산화함을 알아 냈다 (그림 5). Elk1이 인산화 되어 pip92 promoter의 조절부위 결합 또는 전사를 확인하기 위해 여러개

의 deletion pip92 promoter construct를 제작, 시험하였다. 그 결과 -1281 bp과 -1111 bp내의 pip92 promoter 부위로 Rac1의 활성화 신호가 전달된다. -1281 bp와 -1111 bp 사이에는 두 개의 Ets 부위와 1개의 CArG 부위로 이루어진 SRE 자리가 혈청에 의한 pip92 전사에 중요한 역할을 담당하는데 gel shift 분석에 의하여 Ets 부위는 Elk1/TCF와 결합하며 CArG 부위는 SRF와 결합한다고 알려졌다²⁴. 본 실험 결과, Pak1에 의한 Elk1 인산화는 Ets부위를 통하는 것으로 추정 되어지나 (그림 6), 그 외 SRF, 혹은 다른 알려져 있지 않은 전사조절 부위의 존재 여부도 더 조사해보아야 할 것이다. Rac1을 통한 pip92 유도에 MAP kinase 활성화 효과를 살펴보기 위해 bFGF에 의한 MAP kinase 활성화를 살펴보았다. 그 결과로 p38 kinase를 제외한 ERK와 JNK가 bFGF에 의해 활성화되었다 (그림 2). 기존실험에서 ERK는 분화시 pip92 유도에 관여하고, JNK와 p38 kinase는 anisomycin에 의한 세포 사멸시 pip92 유도에 관여하는 것으로 알려졌다^{13,15}. Rac1에 의한 pip92 유도에 관여하는 MAP kinase 활성화 효과를 확인하기 위해 항시 활성화 또는 비활성화된 Rac1 plasmid를 transient transfection 하여 phospho-ERK와 phospho-JNK를 확인하여 보면 (그림 4A), 활성화 또는 비활성화 Rac1 plasmid에 의해 MAP kinase 활성화에는 영향이 없고, ERK chemical inhibitor와, JNK upstream인 MEKK를 비활성화 시킨 mutant MEKK를 처리하여 Rac1의 활성화 영향을 확인한 결과로는 JNK inhibitor로서의 mutant MEKK에 의해 Rac1이 억제된 것으로 보아 JNK의 downstream에 Rac1의 발현이 조절된다는 것을 알게 되었다 (그림 4B). 이는 기존에 알려진 IL-1과 UV 자극으로 Rac1, Cdc42와 Pak1의 활성화에 의한 JNK, p38 kinase의 활성화⁴, Cdc42의 비활성화를

통한 Ras-MAPK의 억제²⁵ 등, 세포막 단백질로 빠른 활성화를 통한 신호전달을 유발하는 Rac1이, 핵단백이며 전사조절 인자를 인산화 하여 활성화 시키는 것으로 알려진 JNK 활성화 유도와는 반대되는 결과로서^{18,19}, 흰쥐 해마 신경 선조세포에서는 다른 양상을 보여주는 것이다.

Rho family GTPase (RhoA, Rac1, Cdc42)는 actin cytoskeleton을 조절하는 기능을 한다. 이것들은 세포 type에 따라 세포의 모양과 운동성에 관여하는 것으로 보고 되었다. Swiss 3T3 fibroblast에서 Rac1은 lamellipodia를, Cdc42는 filopodia의 형성을 유도하지만, RhoA는 세포 부착과 신축성에 관여하는 것으로 조사되었다^{6,7,20}. 이러한 Rho family GTPases의 GTP 결합된 활성화 형태는 많은 신호전달과정을 유발한다^{18,19}. 또한 신경세포에서, Rho family GTPases는 신경돌기 개시, 성장, 분기 그리고 spine 형성에 관여한다^{21,22,23}. 활성화된 RhoA는 신경돌기 발달을 억제하고, 활성화된 Rac1과 Cdc42는 신경돌기 형성에 중요한 역할을 수행한다. 또한 Rac1과 Cdc42의 downstream인 Pak1도 신경돌기 형성에 관여한다⁹. bFGF에 의한 Rac1과 Pak1의 활성화를 통한 신경 세포 분화시 pip92 발현이 신경 세포에 간접적 영향을 미칠것으로 예상되며, 이에 대한 연구가 진행 중 이다.

본 연구를 종합해 보면 bFGF에 의해 H19-7 세포 분화시 immediate early gene인 pip92이 발현될 때 MAP kinase 중의 JNK 활성화와 Rac1, Pak1 그리고 전사조절 인자 Elk-1이 관여하는 신호전달기전을 통해서 유도될 수 있음을 알 수 있었다 (그림 7).

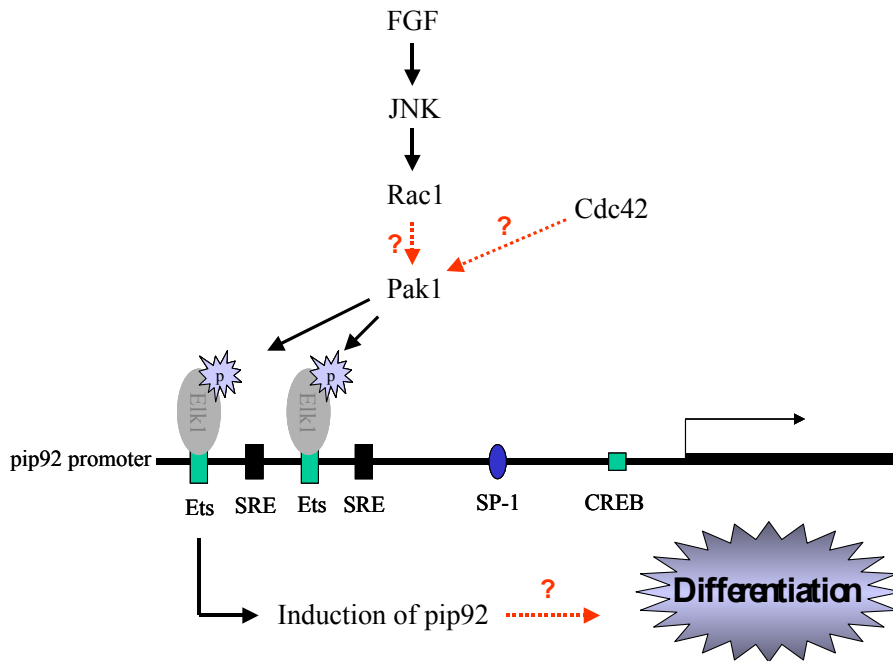


그림 7. FGF에 의한 pip92의 발현 모식도.

10 ng/ml bFGF를 처리하여 JNK와 Rac1 활성화 및 관계를 Western blot과 GST pull down assay를 이용하여 확인하였다. Rac1의 downstream effector인 Pak1이 Elk1에 작용하는지 알아보기 위해 kinase assay를 수행하였고, pip92의 Ets 유사배열이 발현에 중요한 역할을 한다는 것을 CAT assay를 통하여 알 수 있었으며, 신경 세포 분열에 관여할 것으로 추정된다.

V. 결 론

bFGF를 해마 신경 선조 세포인 H19-7에 10 ng/ml 처리하여 세포 분화시 유도되는 immediate early gene pip92의 신호 변환 경로를 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Rho GTPase family인 Rac1을 transient transfection 하였을 때 pip92 promoter가 활성화 되었다.
2. bFGF를 처리 했을 때 pip92 단백 합성에 관여하는 Rac1 단백질 합성이 증가 하였다.
3. pip92 promoter 활성화에 관여하는 Rac1은 bFGF에 의한 JNK의 활성화에 의해 활성화 된다
4. Rac1에 의한 Elk1의 활성화는 Rac1의 downstream인 Pak1에 의해 인산화 되어 pip92 전사 활성화에 관여 된다.
5. Rac1에 의한 pip92 전사 활성화는 Elk1이 결합하는 Ets 부위와 SRF가 결합하는 SRE를 포함하는 전사조절부위가 요구됨을 알았다.

이러한 연구결과를 종합해 볼 때 H19-7 세포에서 bFGF에 의한 immediate early gene pip92의 유도는 JNK, Rac1와 Pak1, 전사조절인자 Elk1이 관여하는 신호변환경로를 통하여 유도됨을 알았다.

참고문헌

1. Schaeffer HJ, Weber MJ, Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* 1999 Apr;19(4):2435-44.
2. Hill CS, Treisman R, Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell.* 1995 Jan 27;80(2):199-211.
3. Marshall CJ, MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev.* 1994 Feb;4(1):82-9.
4. Zhang S, Han J, Sells MA, Chernoff J, Knaus UG, Ulevitch RJ, et al. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem.* 1995 Oct 13;270(41):23934-6.
5. Frost JA, Xu S, Hutchison MR, Marcus S, Cobb MH, Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Mol Cell Biol.* 1996 Jul;16(7):3707-13.
6. Ridley AJ, Hall A, The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 1992 Aug 7;70(3):389-99.
7. Nobes CD, Hall A, Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 1995 Apr 7;81(1):53-62.
8. Luo L, Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 2000 Dec;1(3):173-80.
9. Hayashi K, Ohshima T, Mikoshiba K, Pak1 is involved in dendrite initiation as a downstream effector of Rac1 in cortical neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2002 Aug;20(4):579-94.
10. Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT, Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:453-81.
11. Charles CH, Simske JS, O'Brien TP, Lau LF, Pip92: a short-lived, growth factor-inducible protein in BALB/c 3T3 and PC12 cells. *Mol*

- Cell Biol. 1990 Dec;10(12):6769-74.
12. Bortoff KD, Zhu CC, Hrywna Y, Messina JL, Insulin induction of pip 92, CL-6, and novel mRNAs in rat hepatoma cells. *Endocrine*. 1997 Oct;7(2):199-207.
 13. Chung KC, Kim SM, Rhang S, Lau LF, Gomes I, Ahn YS, Expression of immediate early gene pip92 during anisomycin-induced cell death is mediated by the JNK- and p38-dependent activation of Elk1. *Eur J Biochem*. 2000 Aug;267(15):4676-84.
 14. Chung KC, Shin SW, Yoo M, Lee MY, Lee HW, Choe BK, et al. A systemic administration of NMDA induces immediate early gene pip92 in the hippocampus. *J Neurochem*. 2000 Jul;75(1):9-17.
 15. Chung KC, Gomes I, Wang D, Lau LF, Rosner MR, Raf and fibroblast growth factor phosphorylate Elk1 and activate the serum response element of the immediate early gene pip92 by mitogen-activated protein kinase-independent as well as -dependent signaling pathways. *Mol Cell Biol*. 1998 Apr;18(4):2272-81.
 16. Dalton S, Treisman R, Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell*. 1992 Feb 7;68(3):597-612.
 17. Hipskind RA, Rao VN, Mueller CG, Reddy ES, Nordheim A, Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. *Nature*. 1991 Dec 19-26;354(6354):531-4.
 18. Denhardt DT, Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J*. 1996 Sep 15;318 (Pt 3):729-47.
 19. Lopez-Illasaca M, Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem Pharmacol*. 1998 Aug 1;56(3):269-77.
 20. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A, The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 1992 Aug 7;70(3):401-10.
 21. Threadgill R, Bobb K, Ghosh A, Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron*. 1997 Sep;19(3):625-34.
 22. Ruchhoeft ML, Ohnuma S, McNeill L, Holt CE, Harris WA, The neuronal architecture of *Xenopus* retinal ganglion cells is sculpted by

- rho-family GTPases in vivo. *J Neurosci.* 1999 Oct 1;19(19):8454-63.
23. Wong WT, Faulkner-Jones BE, Sanes JR, Wong RO, Rapid dendritic remodeling in the developing retina: dependence on neurotransmission and reciprocal regulation by Rac and Rho. *J Neurosci.* 2000 Jul 1;20(13):5024-36.
 24. Latinkic BV, Lau LF, Transcriptional activation of the immediate early gene *pip92* by serum growth factors requires both Ets and CArG-like elements. *J Biol Chem.* 1994 Sep 16;269(37):23163-70.
 25. Arozarena I, Matallanas D, Crespo P, Maintenance of CDC42 GDP-bound state by Rho-GDI inhibits MAP kinase activation by the exchange factor Ras-GRF. evidence for Ras-GRF function being inhibited by Cdc42-GDP but unaffected by CDC42-GTP. *J Biol Chem* 2001 Jun 15;276(24):21878-84

Abstract

Signal transduction pathway for induction of immediate early gene pip92 during the neuronal development in immortalized hippocampal progenitor cells

Park, Jung Bum

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Ja-Hyun Baik)

Immediate early gene pip92 is rapidly and transiently induced by serum, FGF, phorbol ester, and NGF during cell growth and differentiation as well as by various toxic stimuli during cell death. Although bFGF and active Raf were shown to activate the expression of pip92 via ERK-independent as well as -dependent signaling pathways, the functional role of pip92 has not been clarified yet. Rho family GTPases are known to be closely related to cell motility and the formation of cell shape. Among of them, the activation of Rac1 and Cdc42 contribute to the neurite outgrowth in many types of neuronal cells, and their downstream effector Pak1 is highly enriched in neurons. In the present, the

functional roles of Rho family GTPases has been investigated in the induction of IEG pip92 by FGF. Our data showed that the activation of Rac1 appears to be important for the expression of pip92 in response to bFGF. In addition, transient transfection of kinase-inactive MEKK significantly decreased the activation of Rac1 induced by FGF, whereas ERK inhibitor did not affect on Rac1. Furthermore, Elk1 was phosphorylated by active Pak1 induced by bFGF. These data suggest that the activation of JNK, but not ERK, is the upstream of Rac1, and Rac1-mediated active Pak1 directly phosphorylates Elk-1, which appears to be activation critical for pip92 induction and subsequent neuronal differentiation.

Key Words : pip92, Rac1, JNK, H19-7 cells, Elk-1