

흰쥐 췌장 선세포에서  
 $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 세포 내  
칼슘 oscillation 조절 기전

연세대학교 대학원

의과학 사업단

정 선 아

흰쥐 췌장 선세포에서  
 $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 세포 내  
칼슘 oscillation 조절 기전

지도교수 서정택

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함


2001년 12월 일


연세대학교 대학원


의과학 사업단

정 선 아

# 정선아의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 서 정택 

심사위원 이승익 

심사위원 김혜영 

연세대학교 대학원

2001년 12월 일

## 감사의 글

지난 2년 간의 실험실 생활을 돌이켜보면 아쉬운 마음 뿐이지만 막상 논문을 완성하고 나니 또 한번의 고비를 무사히 넘긴것 같아 기쁩니다.

먼저 말 많고 철없던 저를 이렇게 성숙하고 조용한(?) 학생으로 만들어주시고 항상 귀엽게 봐주신 이승일 교수님을 비롯하여 구강생물학교실의 여러 교수님들과 선생님들께 감사드리고 싶습니다.

또한 제가 실험하는데 있어 많은 조언을 해주셨던 김혜영 교수님, 이민구 교수님과 늘 제 부탁을 주저않고 들어주셨던 의대 약리학 교실의 여러 선생님들께 정말 감사드립니다.

실수도 많고 여러모로 부족한 저에게 질책 한번 안주시고 언제나 웃는 얼굴로 대해주시고 믿어주신 서정택 교수님께 너무 감사드립니다. 너무나 좋은 분의 지도를 받으면서 겸손함을 배우게 되었습니다.

그리고 거의 매일 제 손에서 찌소리 한번 못내보고 죽어간 불쌍한 쥐들에게도 미안한 마음을 전하고 싶습니다. 이 한 문장으로나마 저의 죄가 좀 가벼워진다면 제 마음도 편하겠지요...

마지막으로 사랑하는 저희 가족이 없었다면 힘든 대학원 생활을 버티지 못했을 것입니다. 특히 항상 아이 같은 저를 걱정해주셨던 어머니께 정말 감사드립니다.

2001년 12월

저자 씀

# 차 례

그림차례 .....	6
국문요약 .....	7
I. 서론 .....	10
II. 재료 및 실험방법 .....	17
1. 재료 .....	17
2. 실험 방법 .....	18
가. 웨장 선세포의 분리 .....	18
나. 세포 내 fura-2 측정 .....	19
다. 세포 내 칼슘 농도의 측정 .....	19
라. 골격 근육세포에서의 마이크로솜 분리 .....	20
마. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 을 이용한 SERCA 활성 측정 .....	21
바. 통계처리 .....	21
III. 결과 .....	22
1. $\text{AlF}_4^-$ 와 CCK에 의한 칼슘 oscillation 특징과 세포 외부 칼슘에 대한 의존성 .....	22
2. CCE channel 봉쇄가 $\text{AlF}_4^-$ 와 CCK에 의한 칼슘 oscillation 양상에 미치는 영향 .....	24
3. $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation 유발기전 .....	24
4. $\text{Ca}^{2+}$ ATPase 활성에 대한 $\text{AlF}_4^-$ 의 효과 .....	26
5. SERCA를 부분적으로 억제할 때 CCK에 의해 유도되는 칼슘 oscillation의 특징 .....	32
IV. 고찰 .....	37
V. 결론 .....	46
참고문헌 .....	49
영문요약 .....	57

## 그림 차례

Fig. 1 Role of $\text{AlF}_4^-$ in the activation of heterotrimeric G-protein .....	15
Fig. 2 Extracellular $\text{Ca}^{2+}$ dependency of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations .....	23
Fig. 3 Effect of genistein on $\text{AlF}_4^-$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations ....	25
Fig. 4 Effects of caffeine and thapsigargin on $\text{AlF}_4^-$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations .....	27
Fig. 5 Effect of $\text{Ca}^{2+}$ influx on initiation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations by $\text{AlF}_4^-$ .....	28
Fig. 6 The amount of $\text{Ca}^{2+}$ stored in $\text{Ca}^{2+}$ pool during $\text{AlF}_4^-$ and CCK stimulation .....	30
Fig. 7 Calcium transport activity in isolated microsomes .....	31
Fig. 8 Effect of $\text{AlF}_4^-$ on plasma membrane $\text{Ca}^{2+}$ ATPase (PMCA) activity .....	33
Fig. 9 Effect of thapsigargin on CCK-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations .....	36
Fig. 10 Schematic diagram of $\text{AlF}_4^-$ -induced regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations .....	45

## 흰쥐 췌장 선세포에서 $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 세포 내 칼슘 oscillation 조절 기전

Aluminum fluoride ( $\text{AlF}_4^-$ )는 비특이적인 G-단백 활성화제로서 세포 내 칼슘신호 전달기전에 관여하는 것으로 알려져 있다. 흰쥐 췌장 선세포에서는 저농도의  $\text{AlF}_4^-$ 가 칼슘 oscillation을 유발하는데 cholecystikinin (CCK)과 같은 호르몬이나 신경전달물질과는 달리 oscillation이 세포 외부의 칼슘에 매우 의존적인 것을 확인하였다. 그러므로 본 연구에서는  $\text{AlF}_4^-$ 와 CCK에 의한 칼슘 oscillation 특징을 비교, 분석하고  $\text{AlF}_4^-$ 가 세포 내 어떤 경로를 거쳐 칼슘 조절 기전에 관여하는지를 밝히고자 하였다. 세포는 흰쥐의 췌장으로부터 collagenase digestion 과정을 통해 얻었으며, 칼슘 농도에 민감하게 반응하는 형광물질인 fura-2를 이용하여 세포 내 칼슘의 농도를 측정하였다.  $\text{AlF}_4^-$ 와 CCK를 단일 세포에 처리한 결과 동일한 형태의 칼슘 oscillation을 일으켰으나 그 특징에는 몇 가지 차이점이 있었다. 그 중 lag time은 CCK의 경우  $3.8 \pm 0.4$  분,  $\text{AlF}_4^-$ 가  $16.6 \pm 1.9$  분이었고 amplitude는 CCK는  $149.2 \pm 29.3$  nM,  $\text{AlF}_4^-$ 는  $83.5 \pm 10.5$  nM로  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation이 CCK에 비해 lag time이 길고 amplitude가 작으며 세포 외부의 칼슘을 제거하였을 때 바로 정지하는 양상을 나타내었다. 또한  $\text{IP}_3$  수용체 봉쇄제인 caffeine과 capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry

(CCE) channel 봉쇄제인 genistein에 의해 oscillation이 바로 정지하는 것으로 보아  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation에 소포체의  $\text{IP}_3$  수용체를 통한 칼슘 유출과 CCE channel을 통한 칼슘 유입이 필요한 것을 확인하였다. 그러나 세포 외부 칼슘이 없어도  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation이 유발되는 것으로 보아 CCE channel로부터 유입된 칼슘이 직접적으로 oscillation을 유발하지 않음을 알 수 있었고, thapsigargin을 이용하여 칼슘 저장고의 크기를 측정한 결과  $\text{AlF}_4^-$ 는 CCK에 비해 칼슘 저장고의 크기가 훨씬 줄어들었음을 확인하였다. 이는  $\text{AlF}_4^-$ 가 칼슘을 소포체 안으로 유입시키는 sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA)를 억제할 수 있다는 가능성을 내포하는 것이다. 이를 토대로  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 을 이용하여 실험한 결과 칼슘 oscillation을 유발하는 농도의  $\text{AlF}_4^-$ 는 SERCA를  $21 \pm 3.8\%$  억제하며 SERCA 억제 정도는  $\text{AlF}_4^-$ 의 농도에 비례하였다. 또한  $\text{AlF}_4^-$ 는 plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (PMCA)도 부분적으로 억제하였지만 대조군에 비해 활성이 높게 유지되었으므로 PMCA의 기능에는 큰 영향이 없는 것으로 확인되었다.

이상의 결과를 토대로  $\text{AlF}_4^-$ 는 G-단백을 활성화시켜  $\text{IP}_3$  수용체를 통한 칼슘 oscillation을 유발하며 한편으로는 소포체의  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase를 부분적으로 억제하여 칼슘 저장고를 점차적으로 고갈시켜 CCE channel을 활성화시킴을 확인하였다.  $\text{AlF}_4^-$ 의 이러한 작용은 지금까지 연구된 다른 칼슘 oscillation 기전과는 많은 차이를 갖는 것으로서 칼슘 oscillation의 발생 기전에 SERCA 및 CCE channel이 중요하게 작용함을 보여주는 결과로 생각된다.



---

핵심되는 말 :  $\text{AlF}_4^-$ , 칼슘 oscillation, 칼슘 유입, SERCA, 췌장 선세포

# 흰쥐 췌장 선세포에서 $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 세포 내 칼슘 oscillation 조절 기전

<지도교수 서정택>

연세대학교 대학원 의과학 사업단

정 선 아

## I. 서론

칼슘이온 ( $\text{Ca}^{2+}$ )은 세균에서부터 고등동물에 이르기까지 널리 이용되는 중요한 세포 내 신호 전달 물질로 알려지고 있으며 유전자 발현, 수정, 근육의 수축, 신경전달물질의 유리, 세포 증식, 사멸과 같은 다양한 생리적 반응을 조절한다.<sup>1</sup> 칼슘은 다른 신호 전달 물질과는 달리 대사과정을 거치지 않기 때문에 칼슘 저장고나 세포 외부로부터 유입된 칼슘이 신호 전달에 참여하게 된다. 정상시의 세포 내 칼슘 농도는 약 100 nM 이하를 유지하고 있는데 세포가 호르몬이나 신경전달물질 등에 의해 자극을 받게 되

면 칼슘은 1  $\mu\text{M}$  수준까지 증가하게 된다. 이와 같이 작은 농도의 칼슘 변화가 다양한 반응을 일으키는 이유는 세포 내에 칼슘 의존적인 여러 종류의 단백질이 존재하고 이들의 활성화로 인해 생리적인 반응이 나타나기 때문이다. 하지만 칼슘이 증가되는 기전은 세포에 따라 다를 수 있는데, 흥분성 세포의 경우 생리적인 자극을 받게 되면 주로 세포 막에 존재하는 칼슘 통로를 통해 칼슘이 유입되어 세포 내부의 칼슘 증가를 일으키는 반면,<sup>2</sup> 비흥분성 세포에서의 칼슘 증가는 주로 칼슘 저장고인 소포체 (endoplasmic reticulum, ER)로부터의 칼슘 유출에 의한다.<sup>3</sup>

즉 신경세포, 근육세포와 같은 흥분성 세포에서는 세포막이 탈분극될 때 열리는 전압 의존성 칼슘 통로 (voltage-operated channel) 또는 수용체 의존성 칼슘 통로 (receptor-operated channel)에 의해 칼슘이 세포 외부로부터 들어오는데, 이들은 짧은 시간 안에 많은 양의 칼슘이 유입되는 특징이 있다.<sup>4</sup> 반면 혈액세포, 외분비 세포와 같은 비흥분성 세포의 경우 inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) receptor를 통해 칼슘 저장고로부터 칼슘이 유리되고 이로 인해 저장고가 고갈되면 capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry channel (CCE channel)을 통해 칼슘이 세포 외부에서 들어오는 것으로 알려져 있다.<sup>5</sup>

췌장 선세포 (pancreatic acinar cells)는 비흥분성인 외분비 선세포로서 구조적으로 명확한 극성을 갖고 있는 세포이다. 또한 세포 내 칼슘을 증가시키는 cholecystokinin (CCK), acetylcholine (ACh)과 같은 호르몬이나 신경전달물질에 대한 수용체를 갖고 있으며 칼슘의 증가가 도관 (lumen) 내 효소원 과립 (zymogen granules)의 분비에 중요한 역할을 하기 때문에 칼슘과 관련된 연구에 유용한 모델이 되고 있다.<sup>6</sup>

CCK나 ACh에 의해 수용체가 활성화되면 세포막에 존재하는 G-단백을 거쳐 세포 내 신호 전달 체계를 통해  $IP_3$ 가 생성되는데 이것이 칼슘 저장고인 소포체 막의  $IP_3$  수용체와 결합하면 그로부터 칼슘이 세포질 내로 유리된다. 소포체는 주로 세포의 기저부위 (basal part)에 밀집되어 있으나 효소원 과립이 고농도로 존재하는 첨단부위 (apical part)까지 뻗어 있으므로 칼슘은 그곳에서 부분적으로 증가하여 효소원 과립의 유출을 일으킨다.<sup>7</sup>

CCK, ACh와 같이 췌장 선세포에 작용하는 분비촉진제 (secretagogues)에 대한 수용체는 모두 G-단백과 연결되어 있는데 이것은  $\alpha, \beta, \gamma$  세 개의 subunit으로 구성되어 있다. 그 중  $\alpha$  subunit은 또 다시 네 개의 family로 나뉘게 되는데  $G_q, G_s, G_i/G_o$  그리고  $G_{12}$ 가 그것이다.<sup>8</sup> 칼슘에 의한 소화 효소 분비에 관여하는 G-단백은  $G_q$  단백질이라 알려지고 있지만 최근에는  $G_s$  단백질도 경우에 따라 이 과정에 참여하는 것으로 보고되고 있다.<sup>9</sup> 현재까지 흰쥐 췌장 선세포에서는 CCK에 의한 칼슘 증가 기전이 가장 광범위하게 연구되고 있는 분야인데 그 반응은 CCK 수용체 활성화,  $G_q$  단백질 활성화의 순서대로 이루어진다. 특히  $G_q$  단백질은  $\alpha$  subunit에 GTP가 결합하고  $\beta\gamma$  subunit으로부터  $\alpha$  subunit이 떨어져나가면서 활성화되어 phospholipase  $C_\beta$  ( $PLC_\beta$ )를 활성화시킨다.  $PLC_\beta$ 는 세포막 성분 중의 하나인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ( $PIP_2$ )로부터  $IP_3$ 와 diacylglycerol (DAG)을 생성시킨다. 그 중 DAG은 protein kinase C (PKC)를 활성화시켜 세포 내 여러 단백질들을 인산화하여 활성화 또는 불활성화시키고  $IP_3$ 는 소포체 막에 존재하는  $IP_3$  수용체와 결합하여 그로부터 칼슘을 유리시킨다.<sup>10</sup> CCK와 같은 호르몬이 저농도로 존재할 때에는 칼슘 oscillation이라고 하는 칼슘의 반복적인 spike를 일으키는데 그 형태는 효

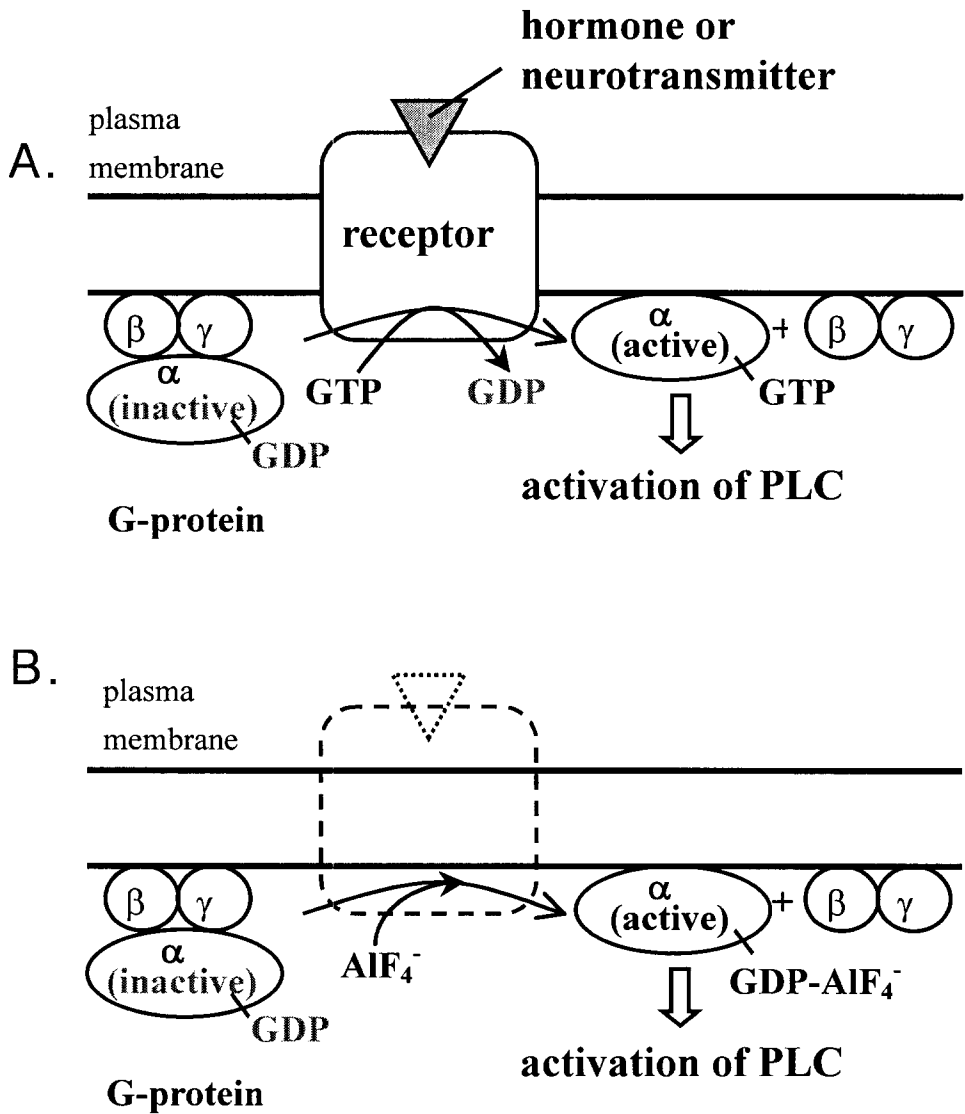
현재의 농도나 종류에 따라 다양하다. 췌장 선세포의 경우 저농도의 ACh는 칼슘 농도가 상승한 상태에서 빠른 peak를 보이는 sinusoidal oscillation을 일으키는 반면 저농도의 CCK는 안정된 상태에서의 주기적인 peak를 보이는 transient oscillation을 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>11</sup>

하지만 세포 내 증가된 칼슘은 곧 소포체의 sarco-endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase (SERCA)나 세포막의 plasma membrane  $Ca^{2+}$  ATPase (PMCA),  $Na^+-Ca^{2+}$  exchanger를 통해 저장고안으로 유입되거나 세포 밖으로 빠져나가게 된다.<sup>12</sup> 이러한 상태가 지속되면 세포 내 저장고는 점차 고갈되므로 세포 외부로부터의 칼슘 유입이 필요하게 된다. 이에 대해 1986년 Putney는 칼슘 저장고가 고갈됨에 따라 세포막에 존재하는 CCE channel을 통해 칼슘이 유입된다는 ‘capacitative model’을 제시하였고,<sup>13</sup> 이후 여러 실험을 통해 증명되었으며 현재는  $I_{CRAC}$  ( $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  current) 또는 SOC (store-operated  $Ca^{2+}$  channel)라고도 불린다. 하지만 세포 내 저장고가 고갈되었다는 정보가 어떻게 세포막에 있는 channel까지 전달되는지에 대해서는 아직 정확하게 밝혀지지 않고 있다. 다만 cGMP나<sup>14,15</sup>  $Ca^{2+}$  influx factor (CIF)가<sup>16</sup> 이차 전령체로 작용한다는 이론과 저장고와 CCE channel이 가까운 위치에서 상호작용한다는 ‘conformational coupling model’<sup>17</sup> 등이 제기되어 왔지만 정확히 구명되지 않은 상태이다. 이 문제들에 대해서 아직 논란의 여지가 많은 것은 사실이지만 대부분의 비흥분성 세포에서 CCE channel은 외부로부터 칼슘을 보충시키는 거의 유일한 통로로 인식되고 있다. 그러나 최근 human embryonic kidney cell line이나 smooth muscle cell과 같은 일부 세포에서 칼슘 저장고의 고갈과는 상관없이 자극이나 효현제에 의해 칼슘 유입이

이루어지는 non-capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry channel (non-CCE channel)이 존재한다고 보고되었으며,<sup>18,19</sup> 또한 mouse의 췌장 선세포에서는 지금까지 알려진 CCE channel과는 다른 특성을 갖는 CCE channel이 존재함이 밝혀졌다.<sup>20</sup> 하지만 아직 이들의 정확한 조절 기전은 알려진 바 없으며 일반적인 CCE channel과 비교했을 때 몇 가지의 차이점을 가진다고 보고되었다. 예를 들면 일반적인 CCE channel의 경우  $\text{Mn}^{2+}$ 은 통과할 수 있으나  $\text{Sr}^{2+}$ 은 통과할 수 없고 저농도 (1-10  $\mu\text{M}$ )의  $\text{Gd}^{3+}$ 에 의해 봉쇄되지만, non-CCE channel은 그 반대의 경우로  $\text{Sr}^{2+}$ 은 통과할 수 있으나  $\text{Mn}^{2+}$ 은 통과하지 못하고 고농도 (100  $\mu\text{M}$ )의  $\text{Gd}^{3+}$ 에 의해 봉쇄된다.<sup>18</sup> 또한 mouse 췌장 선세포의 CCE channel은 대부분의 양이온 ( $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ )에 의해 봉쇄되지 않으므로 일반적인 CCE channel이나 non-CCE channel과 다른 특성을 갖는다고 알려지고 있다.<sup>20</sup>

Aluminum fluoride ( $\text{AlF}_4^-$ )는 세포 내에서 G-단백을 활성화시키는 화합물로 알려져 있다.  $\text{AlF}_4^-$ 는 불활성 상태인 G-단백의  $\alpha$  subunit에 결합하여  $\text{G}\alpha\cdot\text{GDP}\cdot\text{AlF}_4^-$  복합체를 형성하는데 이것이 GTP를 가진 활성화된 G-단백의 유사물질로 작용하므로  $\alpha$  subunit으로부터  $\beta\gamma$  subunit이 떨어지게 된다 (Fig. 1).<sup>21</sup> 또한 이 화합물은  $\alpha$  subunit이 갖고 있는 GTPase나 GTPase 활성 단백질 (GTPase activating proteins)을 활성화시키는 능력이 GTP보다 강하기 때문에 다른 효현제가 존재할 때 G-단백의 반응 속도를 향상시킨다.<sup>22</sup> 그러므로  $\text{AlF}_4^-$ 는 G-단백 활성화와 관련된 여러 신호 전달 체계를 밝히는 연구에서 아주 효과적으로 사용되고 있는 약물이라 할 수 있다.

칼슘과 관련하여서는 흰쥐 췌장 선세포에서 저농도의  $\text{AlF}_4^-$ 가  $\text{IP}_3$  생성



**Fig. 1 Role of  $\text{AlF}_4^-$  in the activation of heterotrimeric G-protein**

A: Hormones or neurotransmitters binding to specific receptors on plasma membrane cause activation of G-protein. B: However,  $\text{AlF}_4^-$  can activate G-protein by forming a  $\text{G}\alpha \cdot \text{GDP} \cdot \text{AlF}_4^-$  complex without stimulus.

PLC, phospholipase C

을 통해 칼슘 oscillation을 유발하지만, CCK나 ACh의 경우 세포 외부의 칼슘을 제거하여도 oscillation이 일정시간 이상 지속되는 반면  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 oscillation은 세포 외부의 칼슘을 제거하면 바로 정지하는 특징을 갖는다고 Yule 등이 보고한 바 있는데,<sup>23</sup> 이것은  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation이 CCK나 ACh에 의한 칼슘 oscillation에 비해 세포 외부 칼슘에 훨씬 더 의존적인 또 다른 기전을 활성화시키기 때문이라고 생각된다. 이에 대해서는 여러 가지 가능성이 제시될 수 있는데  $\text{AlF}_4^-$ 가 다른 종류의 G-단백을 활성화시키거나 혹은 소포체가 아닌 세포막의 칼슘 통로를 통해 직접 칼슘 oscillation을 유발시킬 가능성도 있다. 하지만 흰쥐 췌장 선세포의 경우 이에 대한 자세한 기전이 연구된 바가 없다.

그러므로 이를 확인하기 위해 본 연구에서는 흰쥐 췌장 선세포에서  $\text{AlF}_4^-$ 와 그 기전이 명확하게 알려진 CCK에 의한 칼슘 oscillation 특징을 비교, 분석하고 더 나아가  $\text{AlF}_4^-$ 가 어떤 기전을 통해 세포 외부 칼슘에 의존적인 칼슘 oscillation을 유발하는지를 확인하고자 하였다.



## II. 재료 및 실험방법

### 1. 재료

실험동물로는 체중 200-300 g Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다.

Aluminum chloride, gadolinium chloride, 2,5-di-t-butyl-hydroquinone (tBHQ), genistein, cholecystokinin (CCK), collagenase (type IV), soybean trypsin inhibitor (SBTI), leupeptin, aprotinin 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Sodium fluoride는 Fluka (Buchs, Switzerland)에서, 그리고 thapsigargin, fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2/AM) 등은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA), 그리고 bovine serum albumin (BSA), pyruvic acid 등은 Amresco (Solon, OH, USA)에서 구입하였다. SERCA 활성 측정을 위한  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 은 NEN Life Science Products (Boston, MA, USA)에서 구입하였다.

췌장 선세포를 분리하는데 사용한 용액은 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), 11.1 mM D-glucose, 0.1 % BSA, 0.1 % pyruvic acid, 0.012 % SBTI가 포함된 용액으로 100 %  $\text{O}_2$ 로 포화시켜 37 °C 상태로 사용하였다. Collagenase digestion 과정에 사용한 용액은 위와 같은 구성에 100 U/ml collagenase를 첨가하였다.

세포 내 칼슘 측정을 위해 사용한  $\text{HCO}_3^-$ 를 포함한 표준용액 조성은 110 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM HEPES-Na, 5 mM HEPES, 10 mM D-glucose이었으며  $\text{Ca}^{2+}$ -free용액의 경우  $\text{CaCl}_2$  대신 1 mM ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)를 첨가하였다.  $\text{HCO}_3^-$ 를 포함하지 않은 용액의 경우는 135 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM HEPES-Na, 5 mM HEPES, 10 mM D-glucose를 사용하였다.

마이크로솜 (microsome) 분리를 위해서 사용된 저장 (hypotonic) 용액의 조성은 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM DTT, 0.03 % SBTI, 100  $\mu\text{M}$  phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, 4  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin이었으며 SERCA 활성 측정에 사용된 용액은 20 mM MOPS, 80 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  EGTA를 첨가한 후 KOH로 pH 7로 적정하였다.

## 2. 실험방법

### 가. 췌장 선세포의 분리

200-300 g Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 diethyl ether로 마취시켜 경추탈골로 희생시킨 후 즉시 췌장을 적출, 지방조직을 제거하여 BSA가 포함된 용액에 넣고 가위로 최대한 잘게 잘랐다. 이것을 37 °C의 100 U/ml collagenase가 포함된 용액이 들어있는 시험관에 넣은 후 3분간 세게 흔들면서 세포를 분리시켰다. Collagenase를 제거하기 위해 BSA가 포

함된 용액으로 씻어준 후 nylon mesh로 걸러주어 큰 조직과 관세포 (ductal cells)를 제거하였다. 다시 같은 용액으로 2회 씻어준 후 얻어진 세포들을 5 ml의 용액에 넣어 산소를 공급해주었다.

#### 나. 세포 내 fura-2 측정

칼슘 농도 변화에 민감하게 반응하는 형광물질인 fura-2/AM을 1 ml의 세포를 포함하고 있는 용액에 최종 농도가 2  $\mu\text{M}$ 이 되도록 넣고 실온에서 50분 동안 산소를 제공하면서 기다렸다. 세포 내로 들어간 fura-2/AM은 esterase에 의해 분해되어 세포막을 통과하지 못하는 fura-2 형태로 축적 되는데, fura-2의 세포 내 축적이 끝나면 BSA를 포함한 용액으로 세포를 씻어 실험에 사용하였다.

#### 다. 세포 내 칼슘 농도의 측정

세포에 자극을 가하고 이에 대한 반응을 측정하기 위해 perfusion system을 사용하였다. Perfusion chamber 내 용적은 1.5 ml로서, 세포 내 칼슘 농도를 측정하기 위하여 50  $\mu\text{l}$ 의 세포를 포함한 용액을 perfusion chamber 내 glass coverslip 위에 올려놓고 세포가 부착될 때까지 기다렸다. 세포가 coverslip에 부착되면 spectrofluorometer (PTI, NJ, USA)와 연결된 역상현미경 (inverted microscope; Nikon, Japan) 위에 고정시키고 유동펌프를 사용하여 분당 2 ml의 속도로 용액을 관류하였다. 측정된 세포 내 칼슘 농도의 변화는 personal computer에 연결하여 연속적으로 기록하였다. 한편 실험 중 관류 용액 내  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  농도를 유지하기 위하여 95 %  $\text{O}_2$ , 5 %  $\text{CO}_2$ 를 계속해서 제공하고 관류액의 온도를

일정하게 유지하기 위하여 관류관 (perifusion line) 주위로 37 °C의 물이 순환되도록 water jacket을 설치하였다.

Excitation 파장은 칼슘과 fura-2가 결합하였을 때의 파장 340 nm와 결합하지 않았을 때의 파장 380 nm를 사용하고 두 파장에서의 형광 강도 비율 ( $F_{340}/F_{380}$ )을 이용하여 세포 내 칼슘 농도를 측정하고 fura-2의 emission 파장은 510 nm가 되도록 하였다.  $F_{340}/F_{380}$ 의 비는 다음과 같은 공식을 이용하여 세포 내 칼슘 농도로 환산하였다.<sup>24</sup>

$$[Ca^{2+}]_i = K_d [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)] F_0 / F_s$$

R은 세포에서 측정된 형광 강도 비율 (fluorescence ratio)이고  $R_{max}$ 와  $R_{min}$ 은 세포 내 칼슘이 최대, 최저로 존재할 때 두 파장의 비율이며  $K_d$ 는 형광물질과 측정이온 결합체 해리상수 (effective dissociation constant)로 fura-2는 칼슘에 대해 224 nM의 값을 갖는다.  $F_0$ 는 칼슘이 없을 때,  $F_s$ 는 칼슘이 포화되었을 때 380 nm에서의 파장강도를 의미한다. 세포 내 칼슘 농도를 최대로 포화시키기 위하여 25  $\mu$ M ionomycin 을 처리하고, 칼슘을 완전히 제거하기 위해서는 표준용액에 칼슘을 제거하고 pH 8.5에서 10 mM EGTA를 첨가하였다.

#### 라. 골격 근육세포에서의 마이크로솜 분리

흰쥐의 넓적다리 근육을 떼어 phosphate buffered saline (PBS)에 바로 넣어 가위로 조직을 잘게 잘랐다. 조직 양의 5배의 저장 용액을 넣은 다음 액체질소를 이용하여 순간적으로 얼려서 녹을 때까지 기다렸다. 이 조직을 차갑게 유지시킨 상태에서 2 ml씩 취하여 homogenizer (Polytron PT3000; Brinkmann, NY, USA)를 이용하여 12,000 rpm에서 1분간 조직

을 갈아낸 다음 0.5 M sucrose가 포함된 Tris-HCl (pH 7.5) 용액을 동량 섞고 같은 방법으로 다시 한번 갈아내었다. 4 °C에서 10,000 rpm으로 20분간 원심분리 한 후에 상층액을 모은 다음 100 mM KCl , 1 mM ethylenediamine- tetraacetic acid (EDTA)를 천천히 넣고 살살 흔들어 주었다. 이것을 다시 4 °C에서 38,000 rpm으로 90분간 원심분리 한 후 침전물에 칼슘이 포함된 Tris-HCl (pH 7.5) 용액을 넣어주고 이것을 sarco-endoplasmic reticulum이 포함되어 있는 마이크로솜으로 사용하였다.

#### 마. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 을 이용한 SERCA 활성 측정

SERCA의  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  섭취율을 측정하기 위해 Zhong 등<sup>25</sup>의 방법대로 MOPS (pH 7)가 포함된 반응 용액에 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 마이크로솜을 넣어 약물을 전처리하였다. 여기에 5 mM potassium oxalate, 3 mM ATP를 첨가하여 37 °C에서 반응을 시작하여 0, 2, 4, 6, 8분마다 일정량을 취하여 2 mM  $\text{LaCl}_3$ 가 포함된 용액으로 반응을 정지시켰다. 이것을 millipore filter (0.45  $\mu\text{m}$ )로 여과하여  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 의 양을 liquid scintillation spectrometer (LS5000TA; Beckman, USA)로 측정하였다.

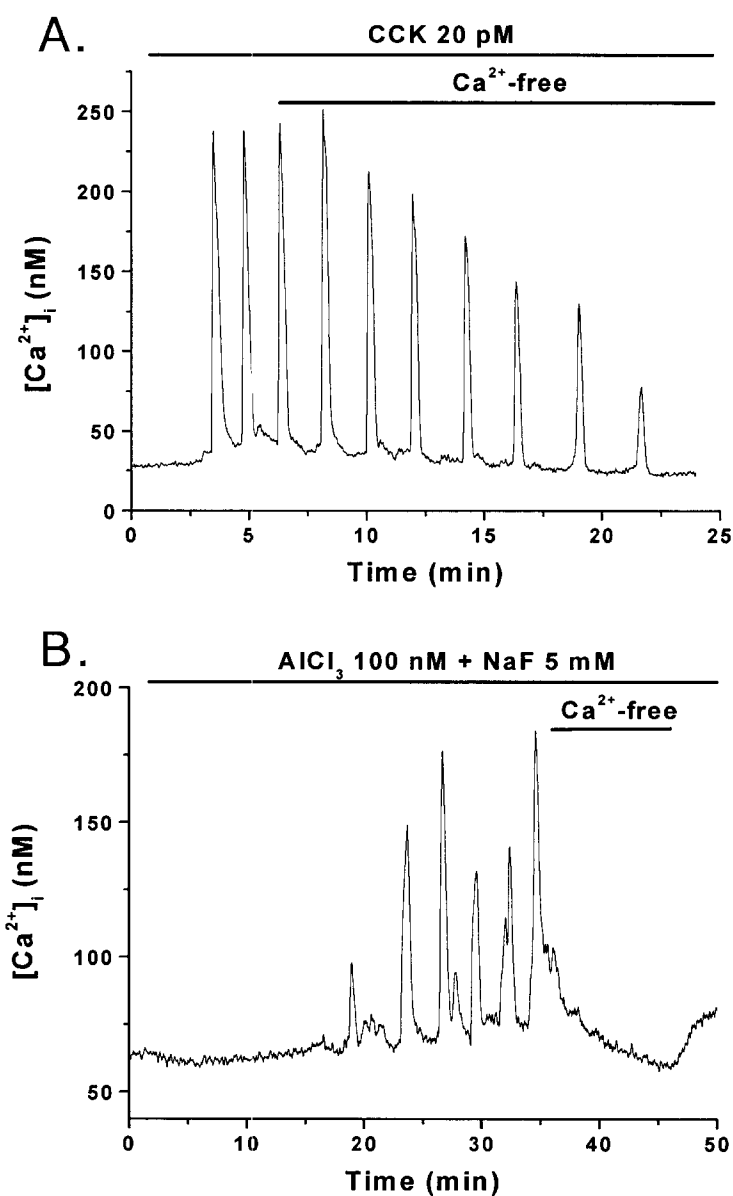
#### 바. 통계처리

CCK와  $\text{AlF}_4^-$ 로 세포를 자극하였을 때의 칼슘 저장능력과 PMCA 활성을 비교하기 위해 student *t*-test를 수행하였다.

### III. 결과

#### 1. $\text{AlF}_4^-$ 와 CCK에 의한 칼슘 oscillation 특징과 세포 외부 칼슘에 대한 의존성

$\text{AlF}_4^-$ 는 NaF와  $\text{AlCl}_3$ 를 함께 처리하여  $\text{AlF}_4^-$  화합물이 형성되도록 하였다. CCK 20 pM과 NaF 5 mM +  $\text{AlCl}_3$  100 nM을 단일 세포에 처리한 결과 동일한 형태의 칼슘 oscillation을 일으켰으나 그 특징에는 몇 가지 차이점이 있었다 (Fig. 2). 우선 약물 투여 후 반응이 나타나기까지의 lag time은 CCK는  $3.8 \pm 0.4$ 분 ( $n=5$ ),  $\text{AlF}_4^-$ 는  $16.6 \pm 1.9$ 분 ( $n=5$ )으로 CCK에 의한 oscillation이  $\text{AlF}_4^-$ 보다 훨씬 빠르게 나타났다. Oscillation 중 칼슘 농도의 증가폭을 나타내는 amplitude는 CCK는  $149.2 \pm 29.3$  nM ( $n=10$ ),  $\text{AlF}_4^-$ 는  $83.5 \pm 10.5$  nM ( $n=10$ )로 CCK가 더 큰 칼슘 oscillation을 유발하는 것으로 확인되었다. 약물 처리 후 칼슘 oscillation이 일어나기 전까지의 칼슘 농도는 CCK의 경우 변화하지 않았으나  $\text{AlF}_4^-$ 의 경우에는  $16 \pm 4$  nM ( $n=4$ )이 증가하였다. 칼슘 oscillation이 일어나는 중에 세포 외부의 칼슘을 완전히 제거하면 CCK의 경우 oscillation이 일정 시간 지속되어 칼슘 제거 후 평균  $5.4 \pm 0.6$  회 ( $n=5$ )의 peak를 보이는 반면  $\text{AlF}_4^-$ 는 대부분의 경우 칼슘을 제거하자마자 oscillation이 정지하여  $0.6 \pm 0.2$  회 ( $n=5$ )의 peak를 보였다. 이상의 결과로  $\text{AlF}_4^-$ 와 CCK에 의한 칼슘 oscillation은 lag time이나 peak의 크기 등에서 차이를 나타내며 특히  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation이 CCK보다 세포 외부 칼슘의



**Fig. 2 Extracellular Ca<sup>2+</sup> dependency of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations**

A: CCK-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations continued for several minutes in the absence of external Ca<sup>2+</sup> (n=3). B: After stimulation with 5 mM NaF + 100 nM AlCl<sub>3</sub>, removal of external Ca<sup>2+</sup> rapidly attenuated the oscillations (n=4).

유입에 더 크게 의존함을 확인하였다.

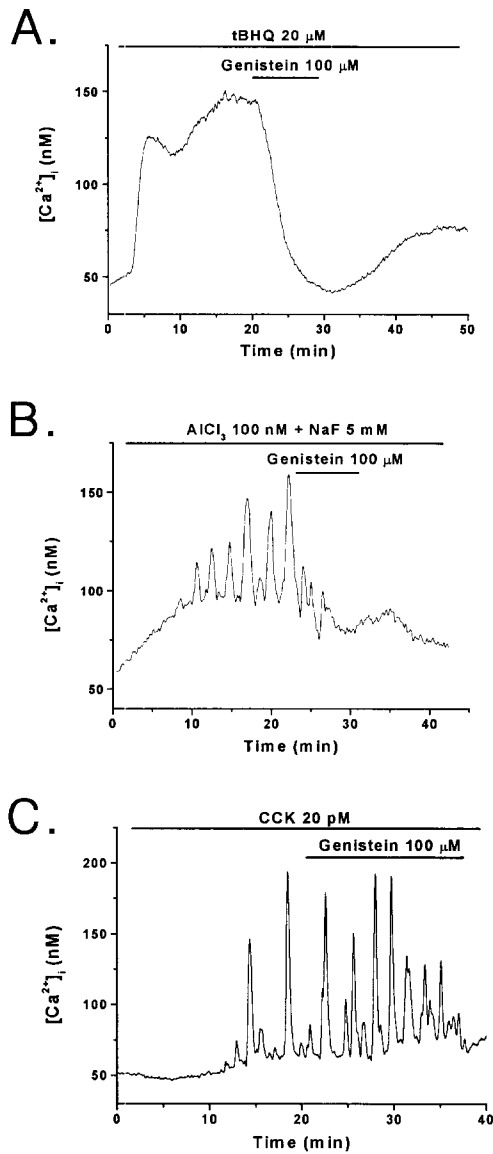
## 2. CCE channel 봉쇄가 $\text{AlF}_4^-$ 와 CCK에 의한 칼슘 oscillation 양상에 미치는 영향

$\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation 유지에 중요한 역할을 하는 칼슘 유입이 CCE channel을 통해 일어나는지 확인하기 위해 CCE channel을 봉쇄하는 genistein을 사용하였다. 먼저 genistein이 흰쥐 췌장 선세포에서 얼마나 효과적으로 작용하는지 알아보았다. SERCA pump 억제제인 tBHQ 20  $\mu\text{M}$ 을 처리하여 칼슘 저장고를 완전히 비워 CCE channel이 최고로 활성화되었을 때 genistein을 투여한 경우 외부로부터의 칼슘 유입이 완전히 억제되어 세포 내 칼슘 농도가 급격히 감소하였다 ( $n=3$ ). CCK와  $\text{AlF}_4^-$ 로 칼슘 oscillation을 유도한 상태에서 genistein 100  $\mu\text{M}$ 을 처리하면 CCK의 경우 oscillation이 10분 이상 지속된 반면  $\text{AlF}_4^-$ 의 경우에는 oscillation이 바로 정지하였다 ( $n=3$ , Fig. 3). 이러한 결과는  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 oscillation이 CCE channel을 통한 칼슘 유입에 크게 의존적임을 보여준다.

## 3. $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation 유발기전

CCE channel을 통한 칼슘 유입이  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation에 중요하게 작용하므로 첫째로  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 oscillation이 세포막을 통해 직접 일어나는지를 확인하였다. 이를 위해 CCE channel은 봉쇄하지 않고 소포체의  $\text{IP}_3$  수용체를 봉쇄하는 caffeine을 사용하였는데,  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘





**Fig. 3** Effect of genistein on  $AlF_4^-$ -induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations

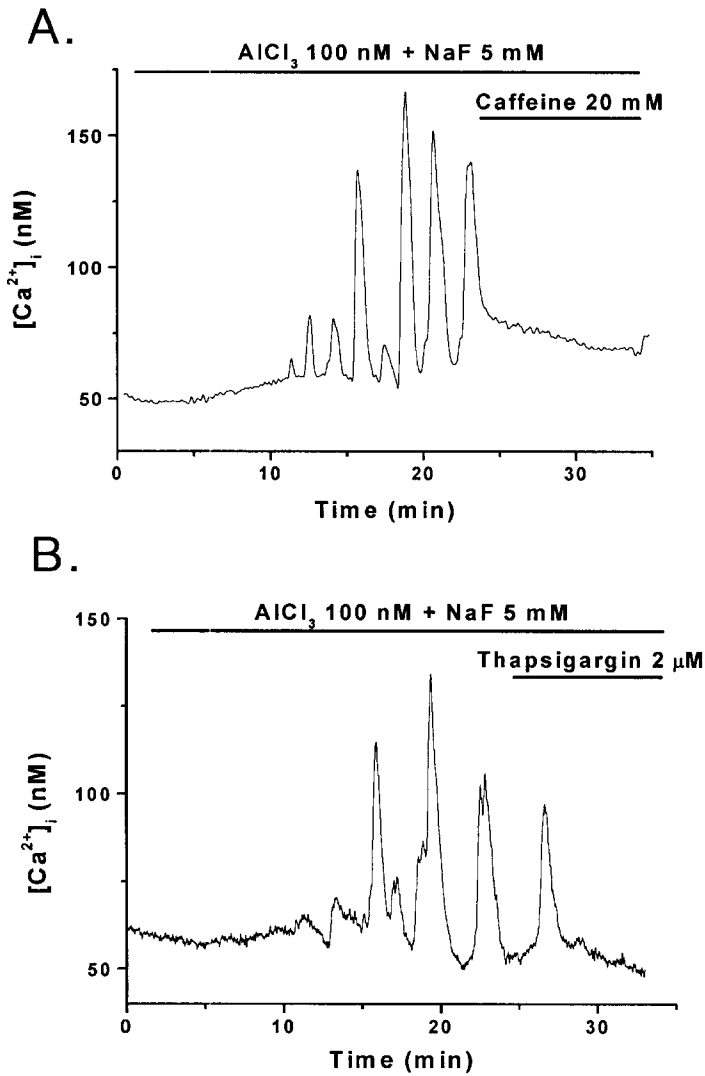
A: tBHQ-induced  $Ca^{2+}$  influx was completely inhibited by genistein, indicating that genistein inhibited CCE channel in rat pancreatic acinar cells. B and C: Inhibition of  $Ca^{2+}$  influx by genistein attenuated  $AlF_4^-$ -induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations (B), but not CCK-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations (C).

oscillation 중에 caffeine 20 mM을 투여하였을 경우 oscillation이 바로 정지하였다 (n=4). 이 결과는 oscillation이 세포막이 아닌 세포 내부에 존재하는 소포체로부터 일어나는 것임을 의미한다 (Fig. 4-A). 또한  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation 중에 thapsigargin 2  $\mu\text{M}$ 을 사용하여 소포체의 칼슘을 고갈시키면 세포 외부에 칼슘이 존재하여도 더 이상 oscillation이 지속되지 않는 것으로 보아 (n=4),  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation은 소포체에서 일어나는 것임을 확인해주는 결과라 할 수 있다 (Fig. 4-B).

둘째, Fig.2의 결과에서  $\text{AlF}_4^-$ 가 내부의 칼슘 농도를 약간 증가시키므로  $\text{AlF}_4^-$ 가 먼저 CCE channel을 통해 외부로부터 칼슘을 유입시켜 세포 내 칼슘 증가를 일으키고 그것이 소포체의  $\text{IP}_3$  수용체를 통한 oscillation을 야기하는지를 확인하고자 하였다. 세포 외부로부터의 칼슘 유입을 막기 위해 처음부터 세포 외부의 칼슘을 모두 제거해주고  $\text{AlF}_4^-$ 를 투여하였는데 이때 2-3 회의 peak가 유발되었으며 (n=4) 이는 외부로부터의 칼슘 유입이 oscillation을 직접 일으키지 않음을 보여준다 (Fig. 5).

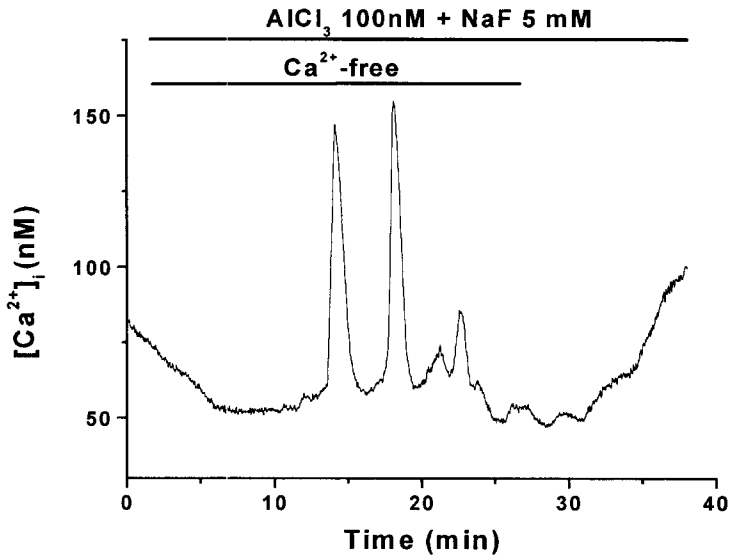
#### 4. $\text{Ca}^{2+}$ ATPase 활성에 대한 $\text{AlF}_4^-$ 의 효과

$\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation은 세포막에서 일어나거나 외부 칼슘의 유입에 의해 유발되는 것이 아니므로  $\text{AlF}_4^-$ 가 소포체의 칼슘 저장 능력을 감소시켜 결과적으로 외부 칼슘에 의존적인 양상을 보일 가능성이 있다고 생각되었다. Fig. 2에서도 알 수 있듯이  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation 크기는 대부분의 경우 CCK보다 작게 나타났기 때문에, 소포체 즉 저장고 내의 칼슘 농도의 차이가 이러한 oscillation 크기의 차이를 보이는 것인지



**Fig. 4** Effects of caffeine and thapsigargin on  $AlF_4^-$ -induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations

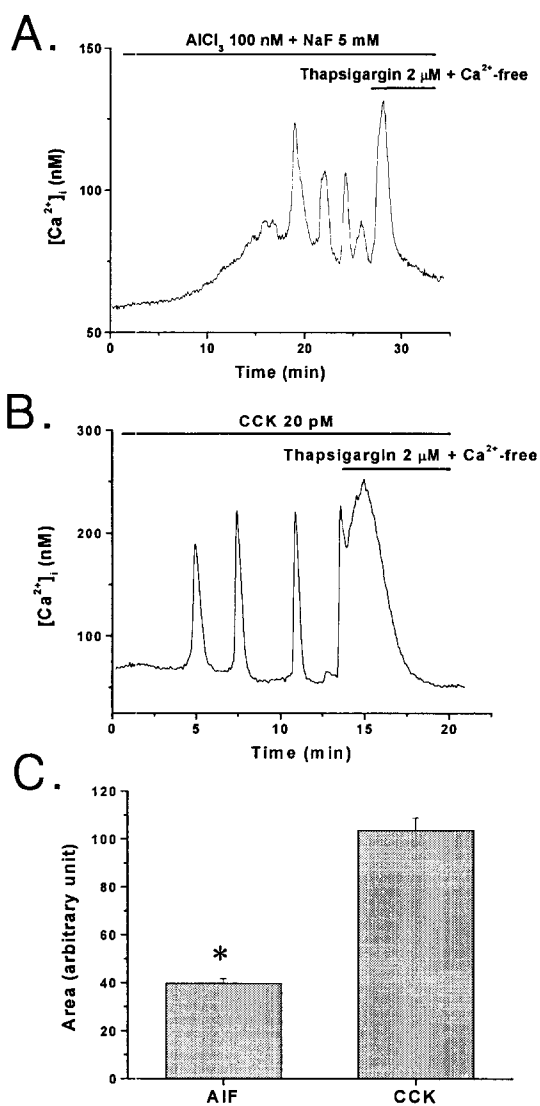
A and B: Caffeine (20 mM) and thapsigargin (2  $\mu$ M) inhibited  $AlF_4^-$ -induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations. Each trace is representative of 4 separate experiments.



**Fig. 5** Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  influx on initiation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations by  $\text{AlF}_4^-$ .  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations by  $\text{AlF}_4^-$  were initiated in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Each trace is representative of 4 separate experiments.

를 확인하고자 하였다.  $\text{AlF}_4^-$ 와 CCK로 칼슘 oscillation을 유발한 다음 외부 칼슘을 제거하면서 동시에 thapsigargin을 처리해주면 칼슘의 유입 없이 소포체에 저장되어 있던 칼슘만 빠져나오기 때문에 저장되어 있던 칼슘의 양을 측정할 수 있다. 유출된 칼슘의 양은 thapsigargin 처리 시간동안 변화한 칼슘의 농도를 상대적인 크기로 계산하여 측정하였다. 그 결과 CCK 20 pM과  $\text{AlF}_4^-$  (NaF 5 mM +  $\text{AlCl}_3$  100 nM)로 자극하는 동안 측정된 세포 내 칼슘 저장고의 크기는 각각  $103.7 \pm 5.2$  (n=10),  $39.6 \pm 1.9$  (n=10)로  $\text{AlF}_4^-$ 로 자극한 세포의 칼슘 저장 능력이 많이 감소되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 6).

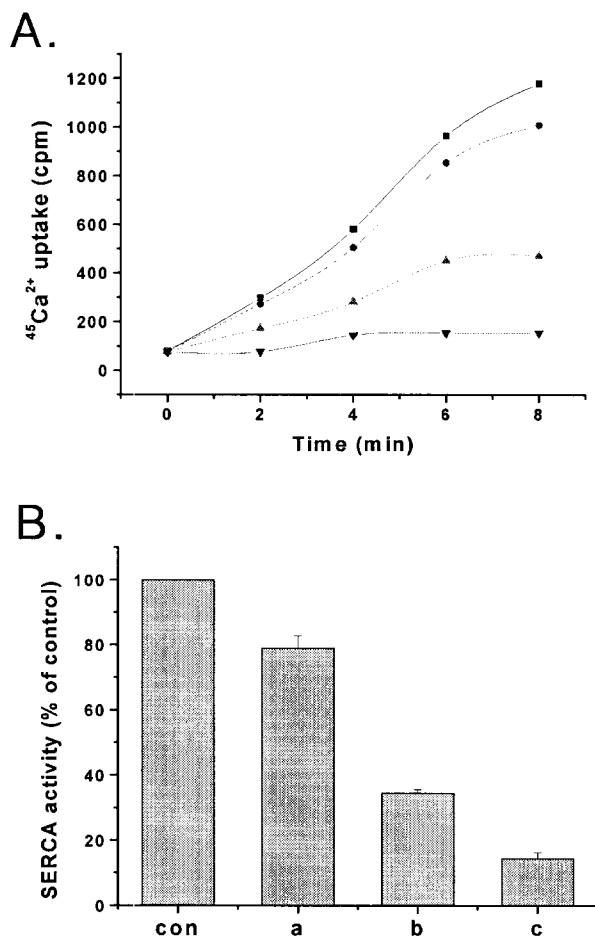
$\text{AlF}_4^-$ 를 투여한 경우 저장고의 칼슘 농도가 감소하는 것이 칼슘을 다시 저장고 안으로 유입시키는 SERCA의 활성이 감소되어 나타나는 현상인지를 확인하기 위해 흰쥐의 골격 근육세포로부터 분리한 마이크로솜에 존재하는 SERCA가  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 을 섭취하는 능력을 측정하고  $\text{AlF}_4^-$ 가 이에 미치는 영향을 알아보았다. Fig. 7-A에서  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  섭취율은 마이크로솜으로 유입된  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 의 농도를 scintillation counter를 이용하여 측정하고 counts per minute (cpm) 값으로 나타내었다. Fig. 7-B에서 SERCA 활성능은 대조군에 대한 실험군의 cpm값을 비율 (%)로 나타내었다.  $\text{AlF}_4^-$  처리군의 경우 NaF 5 mM과  $\text{AlCl}_3$ 를 저농도 (100 nM)와 고농도 (50  $\mu\text{M}$ )로 전처리하여 SERCA에 대한 억제 효과를 보았다. 그 결과 칼슘 oscillation을 유도하는 농도인 NaF 5 mM +  $\text{AlCl}_3$  100 nM 은 SERCA를  $21 \pm 3.8$  % (n=5) 억제하고 고농도인 NaF 5 mM +  $\text{AlCl}_3$  50  $\mu\text{M}$ 은  $65.5 \pm 1.2$  % (n=5) 억제하여  $\text{AlCl}_3$ 의 농도에 비례하여 억제효과를 갖는 것으로 확인하였다. SERCA를 특이적으로 억제하는 약물로 알려져 있는 thapsigargin



**Fig. 6 The amount of  $\text{Ca}^{2+}$  stored in  $\text{Ca}^{2+}$  pool during  $\text{AlF}_4^-$  and CCK stimulation**

A and B: Thapsigargin (2  $\mu\text{M}$ ) was added during  $\text{AlF}_4^-$ -or CCK-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . C: The amount of  $\text{Ca}^{2+}$  released from the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pool during  $\text{AlF}_4^-$  and CCK stimulation (n=10).

\*.  $P < 0.05$



**Fig. 7 Calcium transport activity in isolated microsomes**

$^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake was initiated by addition of ATP. A and B: Time course of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in each experiment and effects of  $\text{AlF}_4^-$  on the activity of SERCA. The microsomes were preincubated with each concentration of NaF +  $\text{AlCl}_3$  for 10 minutes.; control (■, con), 5 mM NaF + 100 nM  $\text{AlCl}_3$  (●, a), 5 mM NaF + 50  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (▲, b), 2  $\mu\text{M}$  thapsigargin (▼, c).

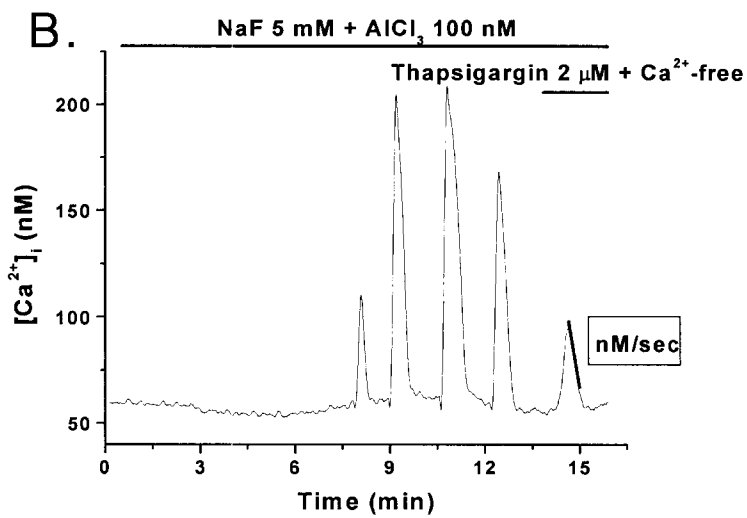
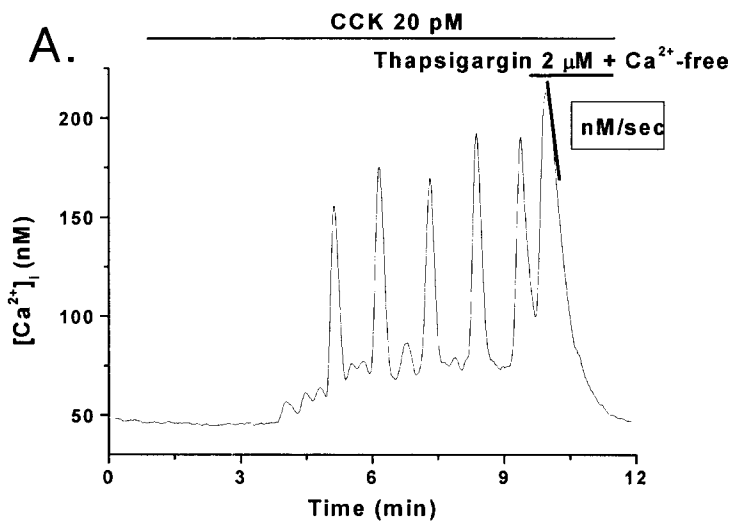
2  $\mu\text{M}$ 을 처리한 경우에는  $85.5 \pm 1.9 \%$  ( $n=5$ )의 억제 효과를 보였다.

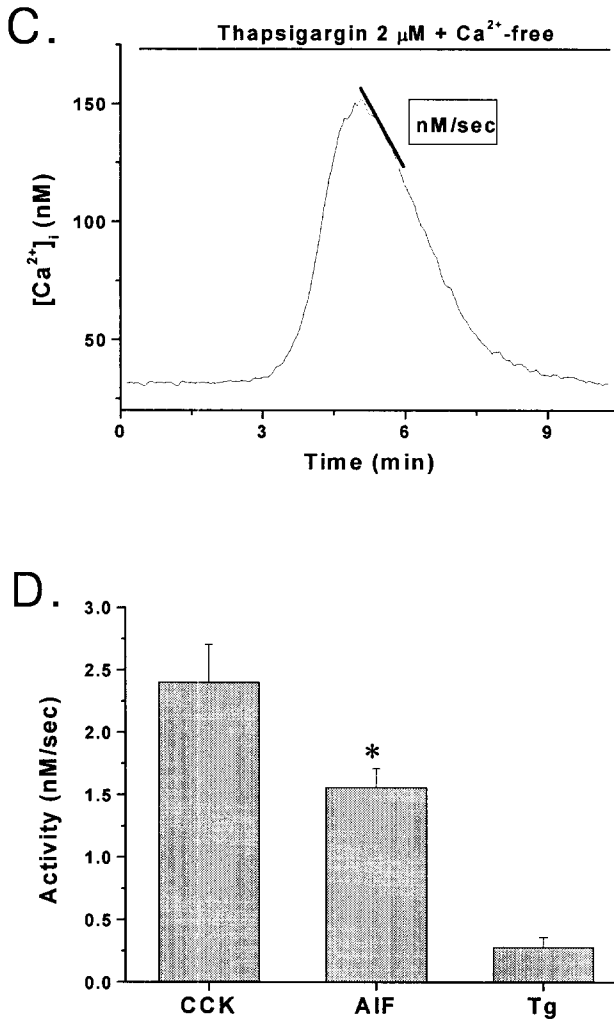
또한 세포막에 존재하는 PMCA도 SERCA와 같은 형태의 P-type  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase이므로  $\text{AlF}_4^-$ 가 PMCA에도 영향을 미치는가를 확인하였다. CCK와  $\text{AlF}_4^-$ 로 oscillation을 유도한 다음 외부 칼슘을 제거하는 동시에 thapsigargin을 처리하여 SERCA를 억제하면 세포 내 증가된 칼슘은 PMCA를 통해서만 빠져나가게 된다. 이 때 칼슘이 빠져나가는 속도를 시간 당 농도 변화율 ( $\text{nM}/\text{sec}$ )로 측정하였다 (Fig. 8). 그 결과 외부 자극 없이 thapsigargin만 처리한 군의 경우 평균  $0.3 \pm 0.1 \text{ nM}/\text{sec}$  ( $n=4$ )의 속도를 보였으며 CCK는  $2.4 \pm 0.3 \text{ nM}/\text{sec}$  ( $n=4$ ),  $\text{AlF}_4^-$ 는  $1.6 \pm 0.2 \text{ nM}/\text{sec}$  ( $n=4$ )로  $\text{AlF}_4^-$ 는 thapsigargin 처리군 보다 PMCA 활성이 약 7 배 증가하였지만 CCK에 비해서는 낮게 나타났다.

## 5. SERCA를 부분적으로 억제할 때 CCK에 의해 유도되는 칼슘 oscillation의 특징

SERCA의 부분적인 억제가 칼슘 oscillation을 세포 외부 칼슘에 의존적이 되도록 하는지 확인하기 위하여 낮은 농도의 thapsigargin을 세포에 전처리하여 SERCA를 부분적으로 억제한 상태에서 CCK로 칼슘 oscillation을 유도한 후 세포 외부 칼슘에 얼마나 의존적인지 확인하였다. SERCA의 활성을 부분적으로 억제하는 thapsigargin 1 nM을 처리한 후 CCK 20 pM로 세포를 자극하고 외부 칼슘을 제거하였을 때  $1.7 \pm 0.3$  회 ( $n=5$ )의 peak가 나타났다 (Fig. 9). 이는 thapsigargin을 처리하지 않은 상태에서 CCK에 의한 oscillation 중에 칼슘을 제거한 경우 나타나는





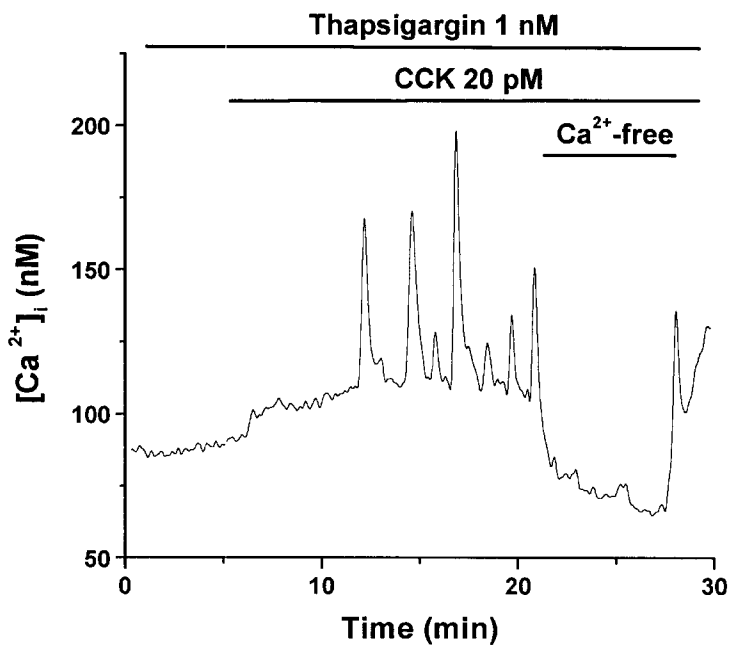


**Fig. 8 Effect of AIF<sub>4</sub><sup>-</sup> on plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase (PMCA) activity**

A, B and C: To measure the PMCA activity, AIF<sub>4</sub><sup>-</sup>- and CCK- stimulated cells were treated with thapsigargin in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> and the rate of decrease in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was calculated. D: Activity was displayed as Ca<sup>2+</sup> efflux rate (nM/sec; n=4). \*: P < 0.05

Tg, thapsigargin

peak 수 ( $5.4 \pm 0.6$  회) 보다 훨씬 적으며 오히려  $\text{AlF}_4^-$ 의 경우 ( $0.6 \pm 0.2$  회)와 비슷한 결과이다. 결론적으로 SERCA를 부분적으로 억제한 경우 CCK에 의한 칼슘 oscillation이 세포 외부 칼슘에 의존적인 것으로 나타나  $\text{AlF}_4^-$ 의 oscillation과 같은 양상을 보이고 있음을 확인하였다.



**Fig. 9** Effect of thapsigargin on CCK-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations

Partial inhibition of SERCA by 1 nM thapsigargin made the CCK-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations more dependent on extracellular  $Ca^{2+}$ .

## IV. 고찰

세포 내에 NaF와  $AlCl_3$ 가 함께 존재할 때  $AlF_4^-$  화합물을 형성하며 여러 종류의 G-단백 -특히  $G_s$  와  $G_i$  단백질- 과 튜블린, 액틴, transducin 등을 활성화시키는데 이러한 효과는 GDP, ADP와 같은 nucleotide diphosphates와 결합하였을 때에만 나타나는 것으로 알려져 있다.<sup>26,27,28</sup> 특히  $AlF_4^-$ 는 비특이적으로 G-단백과 연결된 세포 내 신호 전달 기전을 활성화시키므로 G-단백과 관련된 연구에 광범위하게 사용되고 있는 약물이다. 본 연구에서도  $AlF_4^-$ 가 흰쥐 췌장 선세포에서 CCK에 의해 유도되는 형태의 칼슘oscillation을 나타냄을 확인하였으나  $AlF_4^-$ 에 의한 oscillation은 CCK나 ACh에 의한 oscillation과는 달리 세포 외부 칼슘이 oscillation을 지속시키는데 매우 중요하게 작용한다는 것을 알게 되었다. 이러한 사실에 대해서는 이미 보고된 바가 있지만<sup>23</sup> 어떠한 기전에 의해 이런 특징을 갖는지는 알려지지 않고 있다. 다만 세포 내에서의  $AlF_4^-$ 의 역할이 다양하고 세포 내 신호 전달에 관여하는 인자들과 상호 작용을 하기 때문에 지금까지 알려진 칼슘 신호 전달 기전과 다를 것이라는 추측을 하였고, 기전이 비교적 명확하게 알려지고 있는 CCK와의 비교 연구를 통해 이를 밝히고자 하였다.

현재 흰쥐 췌장 선세포에는 칼슘 저장고가 고갈될 때 열리는 CCE channel만이 존재한다고 알려져 있는데 이는 여러 종류의 양이온 ( $Gd^{3+}$ ,  $La^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ )이나 비특이적인 양이온 통로 봉쇄제인 flufenamic acid, 그리고 tyrosine kinase 억제제인 genistein 등에 의해 봉쇄된다.<sup>29</sup> 그 중

genistein은 췌장 선세포를 비롯한 다른 많은 세포에서 CCE channel을 통한 칼슘 유입을 억제하는 효과를 가지는 것으로 확인되었다.<sup>30,31</sup> 본 실험에서도 SERCA 억제제인 tBHQ를 이용하여 칼슘 저장고를 비운 다음 CCE channel이 활성화된 상태에서 genistein을 투여한 경우 외부 칼슘의 유입이 즉시 억제되어 흰쥐 췌장 선세포에서도 genistein이 CCE channel을 봉쇄함을 확인하였다.  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation중에 genistein을 처리하였을 때도 외부 칼슘을 제거했을 때와 마찬가지로 칼슘 oscillation이 빠르게 멈추는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 이로써  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation 중에 일어나는 칼슘 유입은 CCE channel을 통해 이루어지는 것을 확인하였다.

$\text{AlF}_4^-$ 에 의한 oscillation이 CCK에 의한 oscillation에 비해 외부 칼슘에 의존적인 것에 대해 다음과 같은 네 가지 설명이 가능한데 첫째,  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 oscillation이 세포막의 CCE channel을 통해 일어나거나 둘째, CCE channel로 유입된 칼슘이 소포체에서의 칼슘 oscillation을 유도하거나 셋째,  $\text{AlF}_4^-$ 가 SERCA를 억제하여 소포체의 칼슘 저장 능력을 감소시키거나 혹은 세포막에 존재하는 PMCA를 활성화시킬 것이라는 가능성을 추측할 수 있었다.

지금까지 대부분의 칼슘 oscillation은 소포체의  $\text{IP}_3$  수용체를 통해 일어나는 것으로 알려지고 있으나 소포체 내 칼슘이 고갈되는 경우 세포막을 통해 직접 oscillation이 일어나는데 이는 caffeine이나 thapsigargin에 의해 억제되지 않는 특징을 나타낸다고 보고된 바 있다.<sup>32,33</sup> 또한 기니아피그의 근육세포에서  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation이 소포체와 무관하게 세포막을 통해 직접 일어난다는 보고가 있으므로,<sup>34</sup> 흰쥐 췌장선 세포에서도

$\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation이 세포막에서 직접 일어날 가능성을 caffeine과 thapsigargin을 이용하여 확인하였다. 특히 caffeine은 고농도 일 경우  $\text{IP}_3$  수용체와<sup>35</sup>  $\text{IP}_3$  생성을 억제하며,<sup>36</sup> 췌장 선세포에서 CCK나 ACh에 의한 칼슘 oscillation을 억제한다고 알려져 있다.<sup>37,38</sup> 만약  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation이 세포막을 통해 직접 일어난다면 caffeine이나 thapsigargin과 무관하게 oscillation이 지속되어야 하는데, Fig. 4의 결과 이들 약물에 의해 oscillation이 바로 정지하였고 이러한 결과로  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation이 세포막이 아닌 소포체의  $\text{IP}_3$  수용체를 통해 이루어진다는 것을 알 수 있었다. 이는 이전에 보고된 내용과 다른 결과를 보였는데 Himpens 등<sup>34</sup>이 실험에 이용한 세포가 기니아피그의 근육세포로서 전기적으로 흥분성 세포이며 또한 칼슘 oscillation이 voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel을 통하여 일어나므로 비흥분성 세포인 흰쥐 췌장 선세포와는 다른 반응을 보인 것이라 생각된다.

또한  $\text{AlF}_4^-$ 는 oscillation을 일으키기 전에 세포 내의 칼슘을 어느 정도 증가시키는데 이는  $\text{AlF}_4^-$ 가 CCE channel을 통해 일차적으로 칼슘을 증가시키고 증가된 칼슘이  $\text{IP}_3$  수용체를 자극하여 지속적으로 oscillation을 일으킬 수 있는 가능성도 생각해 볼 수 있다. 이러한 현상에 대해서는 이미 많은 보고가 되어 있는데, 그 중 처음에 증가된 작은 농도의 칼슘이  $\text{IP}_3$  수용체의 기능을 촉진시켜 소포체로부터의 칼슘을 유리시킨다는  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (CICR) 이론이 가장 대표적이다.<sup>39,40</sup> 하지만 실험 결과 외부 칼슘이 전혀 없어도  $\text{AlF}_4^-$ 는 두 세 번의 peak를 일으키는 것으로 보아 칼슘의 유입이 oscillation을 유발하는 것이 아님을 확인하였다.

마지막으로  $\text{AlF}_4^-$ 가 SERCA에 직접 혹은 간접적으로 작용하여 저장고

의 칼슘 농도를 감소시킬 가능성을 확인하였다.  $\text{AlF}_4^-$ 로 자극받은 세포의 칼슘 저장고의 크기가 감소하였는지 확인하기 위해 CCK와  $\text{AlF}_4^-$ 로 칼슘 oscillation을 유발하고 SERCA를 억제하는 thapsigargin을 사용하여 저장된 칼슘을 유리시킨 후 유리된 칼슘의 양을 비교하였다. 그 결과 예상대로 CCK에 비해  $\text{AlF}_4^-$  처리 세포의 경우 저장고의 크기가 훨씬 감소되어 있음을 확인하였다. 이러한 결과는  $\text{AlF}_4^-$ 가 SERCA를 부분적으로 억제하기 때문일 것이라는 가능성을 내포하고 있다. 때문에  $\text{AlF}_4^-$ 가 SERCA를 억제하는지를 확인하기 위해 세포로부터 소포체를 포함하고 있는 마이크로솜을 분리하였다. 분리하는 과정에서 췌장 선세포가 아닌 골격 근육세포를 사용한 이유는 소화 기능을 갖는 췌장 선세포의 경우 여러 단백질을 분해할 수 있는 trypsin과 같은 소화 효소를 대량 함유하고 있어 마이크로솜 분리에 많은 어려움이 있기 때문이다. 반면 골격 근육세포는 마이크로솜 분리가 용이하며 여러 종류의 SERCA 아형 (isoform) 중에 췌장 선세포와 같은 아형을 갖는 것으로 알려져 있으므로<sup>41,42</sup> 이에 존재하는 SERCA의 활성을 보았다.  $\text{AlF}_4^-$ 를 10분간 전처리한 군의 경우 SERCA를 억제하는 효과를 보였는데, 이는 처리한  $\text{AlCl}_3$ 의 농도에 따라 다르게 나타났다.  $\text{AlF}_4^-$ 의 이러한 기능은 이미 다른 세포에서 증명된 바가 있고 NaF 보다는  $\text{AlCl}_3$ 의 농도에 크게 의존적이지만  $\text{AlCl}_3$  단독으로는 억제효과가 없다고 보고되었다.<sup>28</sup> 이 실험 결과에서도 칼슘 oscillation을 유발하는 농도 (NaF 5 mM +  $\text{AlCl}_3$  100 nM)에서는 대조군에 비해 SERCA를 약 20% 억제하는 반면 고농도 (NaF 5 mM +  $\text{AlCl}_3$  50  $\mu\text{M}$ )에서는 50% 이상 억제하는 것으로 보아  $\text{AlF}_4^-$ 가 SERCA를 직접 억제함을 확인하였다. SERCA는 P-type의  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase로서  $\text{AlF}_4^-$ 는 주로 이러한 P-type pump를 억제하는 것으로



알려져 있으며 작용 기전은 G-단백을 활성화시키는 기전과 유사하다. 즉  $\text{AlF}_4^-$ 와 ADP가 결합하여  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase와 복합체를 형성하면 inorganic phosphate (Pi)의 유사체로 작용하여  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase를 불활성화시키는 것으로 보고되었다.<sup>43,44</sup> 한편 마이크로솜에 칼슘 oscillation을 일으키는 농도인 NaF 5 mM +  $\text{AlCl}_3$  100 nM을 20분 이상 전처리할 경우 그 억제효과가 훨씬 더 증가하는 것으로 나타났다. 이것은  $\text{AlF}_4^-$ 가 농도와 처리 시간에 비례하여 SERCA를 억제한다는 것을 입증해준다.

일반적으로는 CCK에 의해 칼슘이 소포체로부터 유출되면 소포체 막에 존재하는 SERCA가 대부분의 칼슘을 다시 안으로 유입시키기 때문에 oscillation이 지속된다고 알려져 있다.<sup>6,45</sup> 이러한 기전은 ‘one-pool model’이라는 가설을 통해 설명되었는데,  $\text{IP}_3$ 에 의해 소포체로부터 빠져나가는 칼슘이 증가하게 되면 이것이 CICR 이론에 따라 더 많은 칼슘의 유출을 일으키고 세포 내 칼슘 농도가 너무 높아지면 다시  $\text{IP}_3$  수용체를 억제하여 소포체로 칼슘을 유입시킨다는 것이다.<sup>46</sup> 물론 oscillation중에 소포체로부터 나온 칼슘의 일부는 세포 외부로 나가지만 대부분의 증가된 칼슘은 SERCA에 의해 저장고로 다시 들어가므로, oscillation이 유지되는데에는 SERCA의 기능이 필수적이라 할 수 있겠다. 이렇듯 칼슘 oscillation 중에 미치는 SERCA의 영향은 이전에도 보고된 바 있는데 그 중 1993년 Petersen 등은 SERCA의 활성 정도에 따라 oscillation의 유형이 달라짐을 보고하였다.<sup>47</sup> 그러므로 본 실험결과에서도  $\text{AlF}_4^-$ 에 의해 SERCA가 부분적으로 억제될 경우에 증가된 칼슘이 세포 외부로 더 많이 빠져 나가게 되면 그 결과 소포체의 칼슘 저장 능력이 감소되고 CCE channel을 통한 칼슘 유입이 좀 더 중요하게 작용한 것으로 결론지을 수 있다.

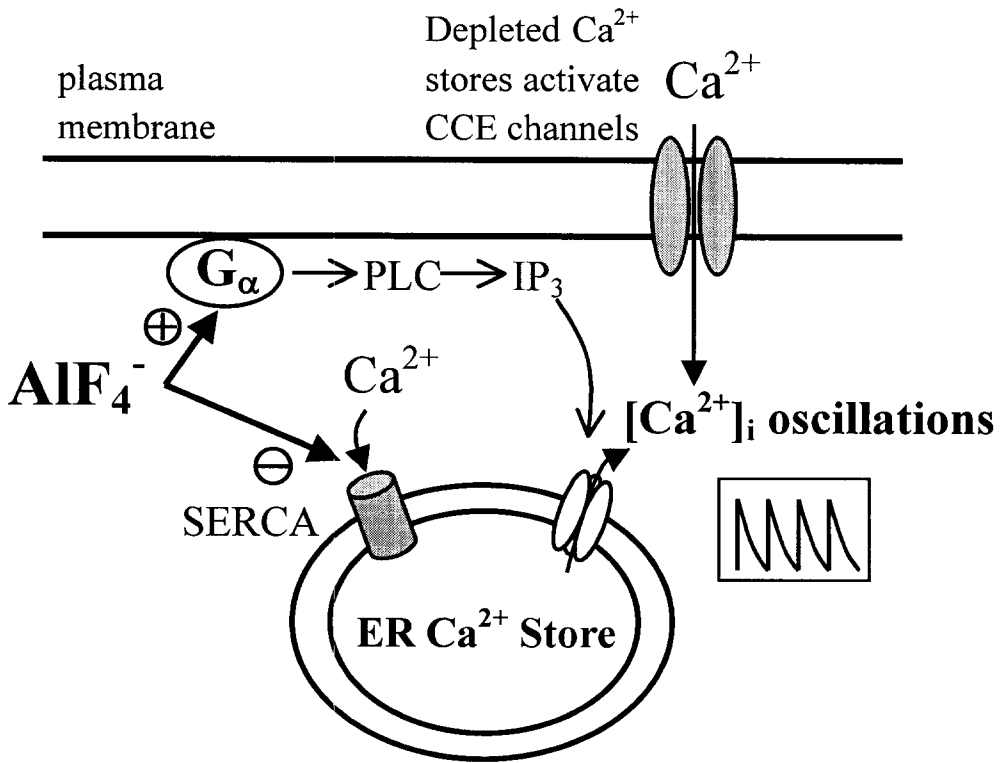
한편 세포막에 있는 PMCA는 세포 내 증가된 칼슘을 세포 밖으로 퍼내는 역할을 갖는 또 다른 P-type의  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase이다.  $\text{AlF}_4^-$ 는 PMCA를 포함한 P-type  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase를 조직 특이적으로 억제한다고 보고되었기 때문에<sup>44</sup> 흰쥐 췌장 선세포에서의 PMCA에 대한 효과를 알아보았다. 외부 칼슘이 없는 상태에서 SERCA를 완전히 억제하면 세포 내 증가된 칼슘이 PMCA를 통해서만 나가기 때문에 칼슘의 유출 속도로 PMCA의 활성을 측정할 수 있다. 일반적으로 G-단백을 활성화시키는 효현제가 있는 경우 PKC의 활성이 증가하며 이로 인해 PMCA의 활성이 증가되거나 그 발현이 촉진된다고 알려져 있다.<sup>48,49</sup> 특히 CCK에 의해 칼슘 농도가 증가될 때에는 PKC의 활성 뿐만 아니라 세포 내 증가된 칼슘으로 인해 PMCA의 활성이 훨씬 증가하여 내부의 칼슘을 밖으로 유출시킨다.<sup>50</sup> 그러므로 Fig. 8의 결과 thapsigargin만 처리한 경우에 비해 CCK나  $\text{AlF}_4^-$ 가 있는 경우 PMCA의 활성이 훨씬 증가한 것은 이와 같은 이유 때문이라고 할 수 있겠다. 하지만  $\text{AlF}_4^-$ 의 경우 CCK에 비해 PMCA의 활성이 약간 낮은데 이는  $\text{AlF}_4^-$ 가 직접적으로 PMCA를 억제하는 효과와 PKC에 의한 활성 효과가 복합적으로 작용하기 때문일 것이다. 하지만 대조군에 비해서는 그 증가폭이 훨씬 크므로 PMCA 자체를 억제한다고 하더라도 칼슘이 빠져나가는 데에는 큰 영향이 없을 것이라 생각된다.

이상의 결과로 저농도의  $\text{AlF}_4^-$ 는 G-단백을 활성화시켜 소포체로부터 칼슘 oscillation을 일으키지만 SERCA를 부분적으로 억제하여 칼슘 저장고를 점차 비우게 되므로 CCE channel을 통해 외부 칼슘의 유입이 증가되어 oscillation을 유지하게 된다는 것을 알게 되었다. 때문에 칼슘 oscillation이 일어나기 전 초기 상태에서는  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 SERCA 억제효

과가 미약하여 외부 칼슘에 큰 영향을 받지 않는 반면 처리 시간이 길어져 oscillation이 일어나는 상태에서는  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 SERCA 억제 효과가 더 커지므로 외부 칼슘의 유입이 절대적으로 필요하게 되는 것이다. 이러한 이론을 증명하기 위해 SERCA를 부분적으로 억제하였을 때 CCK에 의해 유도되는 칼슘 oscillation이 외부 칼슘의 영향을 받는지 확인하였다 (Fig. 9). 일반적으로 2  $\mu\text{M}$  thapsigargin은 SERCA를 완벽하게 억제하고 100 nM 이하의 저농도일 경우 SERCA를 부분적으로 억제한다고 알려져 있다.<sup>47</sup> 그러므로 본 실험에서도 저농도 (1 nM)의 thapsigargin을 세포에 처리하여 부분적으로 SERCA를 억제하였고 그 후 CCK에 의해 유도되는 oscillation이 외부의 칼슘에 매우 의존적임을 확인하였다. 이는  $\text{AlF}_4^-$ 와 같은 특징을 보이는 것으로서 지금까지의 가설을 뒷받침해주는 것이라 하겠다.

결론적으로  $\text{AlF}_4^-$ 는 세포 내에서 크게 두 부분에 영향을 미치는데 G-단백을 활성화시켜  $\text{IP}_3$  수용체를 통한 칼슘 oscillation을 유발하며 한편으로는 소포체의  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase를 부분적으로 억제하여 소포체의 칼슘 저장고를 점차적으로 고갈시킴을 알 수 있었다 (Fig. 10).  $\text{AlF}_4^-$ 의 이러한 작용이 바로 oscillation을 세포 외부 칼슘에 의존적인 형태로 만드는 것이라 해석된다. 세포 내에서 일어나는 칼슘 oscillation의 기전은 정확하게 밝혀진 바가 없지만 이를 유지하고 세포 내 칼슘 농도를 조절하는 데에 SERCA가 중요한 역할을 하고, 이것이 억제되었을 경우에는 그에 대한 보상 기전으로 세포막에 있는 CCE channel이나 PMCA의 활성이 변화함으로써 칼슘 농도의 항상성을 유지시킬 것으로 생각된다. 실험 결과에서도  $\text{AlF}_4^-$ 가 SERCA를 직접 억제하였으므로 세포 내부의 칼슘 농도를 유지하

기 위해서는 CCE channel을 통한 칼슘의 유입이 중요하게 작용하였음을 확인하였다. 그러므로 본 연구에서는 세포 내의 칼슘 농도를 유지하는 데에 SERCA가 중요하게 작용함을 확인하였고 이와 관련하여 칼슘 oscillation에서 이루어지는 SERCA의 기능에 대해 더 많은 연구가 필요할 것이라 생각된다.



**Fig. 10 Schematic diagram of  $\text{AIF}_4^-$ -induced regulation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations**

$\text{AIF}_4^-$  induces  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations by activating G-protein and inhibits SERCA activity partially. Therefore,  $\text{AIF}_4^-$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations are strongly dependent on  $\text{Ca}^{2+}$  influx due to the partial inhibition of SERCA activity.

## V. 결론

췌장선 세포막 수용체의 활성화로 G-단백이 활성화되면 칼슘 저장고인 소포체의  $IP_3$  수용체를 통해 칼슘 oscillation이 일어난다. 췌장 선세포에 직접 G-단백을 활성화시키는  $AlF_4^-$ 를 투여했을 경우 칼슘 oscillation을 일으키나 세포막 수용체 활성화에 의해 유발되는 칼슘 oscillation에 비해 외부 칼슘에 더 의존적인 특징을 보였다. 따라서  $AlF_4^-$ 에 의한 칼슘신호 조절기전이 CCK와 같은 수용체를 통한 칼슘신호 조절기전과는 다를 것이라 생각되어 이를 밝히기 위하여 여러 가지 실험을 수행하였고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포 외부의 칼슘을 제거하였을 때 CCK에 의한 칼슘 oscillation은 지속되는 반면  $AlF_4^-$ 에 의한 oscillation은 바로 정지하였다. 칼슘 oscillation이 시작하기까지의 lag time은 CCK는  $3.8 \pm 0.4$ 분,  $AlF_4^-$ 는  $16.6 \pm 1.9$ 분이었고 amplitude는 CCK는  $149.2 \pm 29.3$  nM,  $AlF_4^-$ 는  $83.5 \pm 10.5$  nM로 CCK가 더 큰 칼슘 oscillation을 유발하는 것으로 확인되었다.

2. CCK와  $AlF_4^-$ 로 자극하여 oscillation을 유도한 상태에서 CCE channel을 봉쇄하는 genistein 100  $\mu$ M을 같이 처리하면 CCK의 경우 oscillation이 10분 이상 지속된 반면  $AlF_4^-$ 의 경우에는 oscillation이 바로 정지하였으므로  $AlF_4^-$ 에 의한 oscillation을 지속시키기 위해서는 CCE

channel을 통한 칼슘의 유입이 필요함을 확인하였다.

3.  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation중에  $\text{IP}_3$  수용체 억제제인 caffeine 20 mM과 소포체의 칼슘을 고갈시키는 thapsigargin 2  $\mu\text{M}$ 을 투여하였을 경우 oscillation이 바로 정지하여  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 oscillation은 소포체의  $\text{IP}_3$  수용체를 통해 이루어짐을 확인하였다.

4.  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 증가를 막기 위해 처음부터 세포 외부의 칼슘을 모두 제거해주고  $\text{AlF}_4^-$ 를 투여하였을 때에도 2-3 회의 oscillation이 야기 되어 oscillation을 유발하는 데에는 외부 칼슘의 유입이 직접적으로 작용하지 않음을 확인하였다.

5. Thapsigargin을 이용하여 칼슘 저장고의 크기를 측정하였을 때 CCK는  $103.7 \pm 5.2$ ,  $\text{AlF}_4^-$ 는  $39.6 \pm 1.9$ 로,  $\text{AlF}_4^-$ 로 자극한 세포의 칼슘 저장 능력이 많이 감소되어 있음을 확인하였다.

6. 흰쥐 골격 근육세포로부터 마이크로솜을 분리하여  $\text{AlF}_4^-$ 의 SERCA에 대한 억제 효과를 확인한 결과 oscillation을 유도하는 NaF 5 mM +  $\text{AlCl}_3$  100 nM은 SERCA를  $21 \pm 3.8$  % 억제하고 고농도인 NaF 5 mM +  $\text{AlCl}_3$  50  $\mu\text{M}$ 은  $65.5 \pm 1.2$  % 억제하여  $\text{AlCl}_3$ 의 농도에 비례하여 억제 효과를 갖는 것으로 확인하였다. SERCA를 특이적으로 억제하는 약물로 알려져 있는 thapsigargin 2  $\mu\text{M}$ 을 처리한 경우에는  $85.5 \pm 1.9$  %의 억제 효과를 보였다.

7. 또 다른 P-type  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase인 PMCA에 대한  $\text{AlF}_4^-$ 의 효과를 알아보기 위해 PMCA를 통한 칼슘의 유출 속도를 확인한 결과 외부 자극 없이 thapsigargin만 처리한 군의 경우는 평균  $0.3 \pm 0.1$  nM/sec의 속도를 보였으며 CCK는  $2.4 \pm 0.3$  nM/sec,  $\text{AlF}_4^-$ 는  $1.6 \pm 0.2$  nM/sec로서  $\text{AlF}_4^-$ 는 대조군에 비해 PMCA 활성을 증가시켰으나 CCK와 비교하였을 때 PMCA 활성을 부분적으로 억제하였다.

8. Thapsigargin 1 nM을 세포에 전처리하여 SERCA를 부분적으로 억제된 상태에서 CCK로 oscillation을 유도하면 외부 칼슘을 제거하였을 때  $1.7 \pm 0.23$  회의 peak가 나타나 SERCA를 억제하지 않은 경우 ( $5.4 \pm 0.6$  회)에 비해 CCK에 의한 칼슘 oscillation이 외부 칼슘에 의존적인 것을 확인하였다.

이상의 실험을 통해 흰쥐 췌장 선세포에서  $\text{AlF}_4^-$ 는 G-단백을 활성화시켜  $\text{IP}_3$  수용체를 통한 칼슘 oscillation을 유발하며, 한편으로는 SERCA를 부분적으로 억제하여 소포체의 칼슘 저장고를 점차적으로 고갈시켜 CCE channel을 통한 칼슘의 유입을 증가시켰다. 따라서  $\text{AlF}_4^-$ 에 의한 칼슘 oscillation은 처음에는  $\text{IP}_3$  수용체를 통해 세포 내부 칼슘 저장고에서 유발되지만 점차 칼슘 저장고가 고갈되고 이로 인해 세포 외부로부터의 칼슘 유입이 oscillation 유지에 중요한 역할을 하게 되는 것으로 생각된다.



## 참고문헌

1. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 1995;80:259–268.
2. Heidelberger R, Heinemann C, Neher E, Matthews G. Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 1994;371:513–515.
3. Tse FW and Tse A. Regulation of exocytosis via release of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores. *Bioessays* 1999;21:861–865.
4. Berridge MJ. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 1997;499:291–306.
5. Putney JW and Bird GJ. The signal for capacitative calcium entry. *Cell* 1993;75:199–201.
6. Tsunoda Y, Stuenkel EL, Williams JA. Oscillatory mode of calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol* 1990;258:C147–C155.
7. Peterson OH, Burdakov D, Tepikin AV. Polarity in intracellular calcium signaling. *Bioessays* 1999;21:851–860.
8. Morris AJ, Malbon CC. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 1999;79:1373–1414.
9. Williams JA. Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin—regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol* 2001;63:77–

97.

10. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989;341:197–205.
11. Berridge MJ. Calcium oscillations. *J Biol Chem* 1990;265:9583–9586.
12. Shuttleworth TJ. What drives calcium entry during  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations?—challenging the capacitative model. *Cell Calcium* 1999;25:237–246.
13. Putney JW. A model for receptor–regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986;7:1–12.
14. Bahnson TD, Pandol SJ, Dionne VE. Cyclic GMP modulates depletion–activated  $Ca^{2+}$  entry in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 1993;268:10808–10812.
15. Xu X, Star RA, Tortorici G, Muallem S. Depletion of intracellular  $Ca^{2+}$  stores activates nitric–oxide synthase to generate cGMP and regulate  $Ca^{2+}$  influx. *J Biol Chem* 1994;269:12645–12653.
16. Randriamampita C and Tsien RY. Emptying of intracellular  $Ca^{2+}$  stores releases a novel small messenger that stimulates  $Ca^{2+}$  influx. *Nature* 1993;364:809–814.
17. Berridge MJ. Capacitative calcium entry. *Biochem J* 1995;312:1–11.
18. Broad LM, Cannon TR, Taylor CW. A non–capacitative pathway activated by arachidonic acid is the major  $Ca^{2+}$  entry mechanism in

- rat A7r5 smooth muscle cells stimulated with low concentrations of vasopressin. *J Physiol* 1999;517:121–134.
19. Mignen O and Shuttleworth TJ. IARC, a novel arachidonate-regulated, noncapacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry channel. *J Biol Chem* 2000;275:9114–9119.
20. Krause E, Pfeiffer F, Schmid A, Schulz I. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium conducting nonselective cation current in mouse pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 1996;271:32523–32528.
21. Bigay J, Deterre P, Pfister C, Chabre M. Fluoride complexes of aluminium or beryllium act on G-proteins as reversibly bound analogues of the gamma phosphate of GTP. *EMBO J* 1987;6:2907–2913.
22. Chen Y and Penington NJ. Competition between internal  $\text{AlF}_4^-$  and receptor-mediated stimulation of dorsal raphe neuron G-proteins coupled to calcium current inhibition. *Am Physiol Soc* 2000;1273–1282.
23. Yule DI and Williams JA. Mastoparan induces oscillations of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in rat pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;177:159–165.
24. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440–3450.

25. Zhong L and Inesi G. Role of the S3 stalk segment in the thapsigargin concentration dependence of sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase inhibition. *J Biol Chem* 1998;273:12994–12998.
26. Carlier MF, Didry D, Melki R, Chabre M, Pantaloni D. Stabilization of microtubules by inorganic phosphate and its structural analogues, the fluoride complexes of aluminum and beryllium. *Biochemistry* 1988;27:3555–3559.
27. Combeau C and Calier MF. Probing the mechanism of ATP hydrolysis on F-actin using vanadate and the structural analogs of phosphate  $\text{BeF}^{-3}$  and  $\text{AlF}^{-4}$ . *J Biol Chem* 1988;263:17429–17436.
28. Troullier A, Girardet JL, Dupont Y. Fluoroaluminate complexes are bifunctional analogues of phosphate in sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *J Biol Chem* 1992;267:22821–22829.
29. Camello C, Pariente JA, Salido GM, Camello PJ. Sequential activation of different  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathways upon cholinergic stimulation in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol* 1999;516:399–408.
30. Pfeiffer F, Schmid A, Schulz I. Capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  influx and a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent nonselective cation pathway are discriminated by genistein in mouse pancreatic acinar cell. *Pflugers Arch* 1995;430:916–922.

31. Xu X, Kitamura K, Lau KS, Muallem S, Miller RT. Differential regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  influx by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 1995;270:29169-29175.
32. Foskett JK and Wong D. Calcium oscillations in parotid acinar cells induced by microsomal  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibition. *Am J Physiol* 1992;262:C656-C663.
33. Foskett JK and Wong D.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  influx underlies agonist- and thapsigargin-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations in salivary acinar cells. *J Biol Chem* 1994;269:31525-31532.
34. Himpens B, Missiaen L, Droogmans G, Casteels R.  $\text{AlF}_4^-$  induces  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in guinea-pig ileal smooth muscle. *Pflugers Arch* 1991;417:645-650.
35. Parker I and Ivorra I. Caffeine inhibits inositol triphosphate-mediated liberation of intracellular calcium in *Xenopus* oocytes. *J physiol* 1991;433:229-240.
36. Toescu EC, O'Neill SC, Petersen OH, Eisner DA. Caffeine inhibits the agonist-evoked cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  signal in mouse pancreatic acinar cells by blocking inositol triphosphate production. *J Biol Chem* 1992;267:23467-23470.
37. Osipchuk YV, Wakui M, Yule DI, Gallacher DV, Petersen OH. Cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations evoked by receptor stimulation, G-protein activation, internal application of inositol triphosphate or

- Ca<sup>2+</sup>: simultaneous microfluorimetry and Ca<sup>2+</sup> dependent Cl<sup>-</sup> current recording in single pancreatic acinar cells. *EMBO J* 1990;9:697-704.
38. Wakui M, Kase H, Petersen OH. Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> signals evoked by activation of cholecystinin receptors: Ca<sup>2+</sup>-dependent current recording in internally perfused pancreatic acinar cells. *J Membr Biol* 1991;124:179-187.
39. Friel DD and Tsien RW. Phase-dependent contributions from Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup> release to caffeine-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* 1992;8:1109-1125.
40. Nathanson MH, Padfield PJ, O'Sullivan AJ, Burgstahler AD, Jamieson JD. Mechanism of Ca<sup>2+</sup> wave propagation in pancreatic acinar cell. *J Biol Chem* 1992;267:18118-18121.
41. Lee MG, Xu X, Zeng W, Diaz J, Kuo TH, Wuytack F, Racymaekers L, Muallem S. Polarized expression of Ca<sup>2+</sup> pumps in pancreatic and salivary gland cells. *J Biol Chem* 1997;272:15771-15776.
42. Misquitta CM, Mack DP, Grover AK. Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> (SERCA)-pump: link to heart beats and calcium waves. *Cell Calcium* 1999;25:277-290.
43. Missiaen L, Wuytack F, Smedt H, Vrolix M, Casteels R. AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> reversibly inhibits 'P'-type cation-transport ATPases, possibly by interacting with the phosphate-binding site of the ATPase.

Biochem J 1988;253:827–833.

44. Missiaen L, Wuytack F, Smedt H, Amant F, Casteels R.  $\text{AlF}_4^-$ -induced inhibition of the ATPase activity, the  $\text{Ca}^{2+}$ -transport activity and the phosphoprotein-intermediate formation of plasma-membrane and endo(sarco)plasmic-reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPases in different tissues. Biochem J 1989;261:655–660.
45. Yule DI, Lawrie AM, Gallacher DV. Acetylcholine and cholecystokinin induce different patterns of oscillating calcium signals in pancreatic acinar cells. Cell Calcium 1991;12:145–151.
46. Berridge MJ. Inositol triphosphate and calcium signalling. Nature 1993;361:315–325.
47. Petersen Carl CH, Petersen OH, Berridge MJ. The role of endoplasmic reticulum calcium pumps during cytosolic calcium spiking in pancreatic acinar cells. J Biol Chem 1993;268:22262–22264.
48. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. Nature 1988;334:661–665.
49. Zylinska L, Guerini D, Gromadzinska E, Lachowicz L. Protein kinases A and C phosphorylate purified  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from rat cortex, cerebellum and hippocampus. Biochim Biophys Acta 1998;1448:99–108.
50. Muallem S, Pandol SJ, Beeker TG. Calcium mobilizing hormones

activate the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump of pancreatic acinar cells.  
J Membr Biol 1988;106:57–69.



Abstract

**The mechanism of  $\text{AlF}_4^-$ -induced  
regulation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations  
in rat pancreatic acinar cells**

Seon Ah Chong

*Brain Korea 21 Project for Medical Sciences*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by professor Jeong Taeg Seo)

Aluminum fluoride ( $\text{AlF}_4^-$ ), a non-specific G-protein activator, is known to activate intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. Previous reports have shown that, in rat pancreatic acinar cells,  $\text{AlF}_4^-$  induces baseline spike type of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations, the typical pattern of cholecystokinin (CCK)-evoked  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations. However, there is a big difference between  $\text{AlF}_4^-$ - and CCK-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations: *i.e.*  $\text{AlF}_4^-$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations are strongly dependent on extracellular

$\text{Ca}^{2+}$  whereas CCK-evoked  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations primarily depend on  $\text{Ca}^{2+}$  stored in  $\text{IP}_3$ -sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  pools. Therefore, in the present study, I have examined the signaling pathway involved in the generation of  $\text{AlF}_4^-$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations. Pancreatic acinar cells were isolated from Sprague-Dawley rats, and changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  were determined using spectrofluorometry in fura-2 loaded single acinar cells.

$\text{AlF}_4^-$  induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations with longer latency and smaller amplitude compared with CCK-evoked  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations. The oscillations stopped rapidly by the removal of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  or by the addition of caffeine, an  $\text{IP}_3$  receptor inhibitor, and genistein, an inhibitor of capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry (CCE) channels. These results suggested that maintenance of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations by  $\text{AlF}_4^-$  required both  $\text{Ca}^{2+}$  entry through CCE channels and  $\text{Ca}^{2+}$  release from  $\text{IP}_3$ -sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  pools. However, the initiation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations was entirely dependent on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pools because  $\text{AlF}_4^-$  generated short-lived  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  spikes even in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Measurement of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx into the isolated microsome has revealed that  $\text{AlF}_4^-$  directly inhibits sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA) dose-dependently. In addition to this, the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  stored in the  $\text{IP}_3$ -sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  pools was shown to be reduced during the stimulation of acinar cells with  $\text{AlF}_4^-$ .  $\text{AlF}_4^-$  inhibited the activity of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$

ATPase (PMCA) partially but the activity of PMCA during  $\text{AlF}_4^-$  stimulation was higher than that of unstimulated cells. Therefore, the strong dependency of  $\text{AlF}_4^-$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations on extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is probably due to the partial inhibition of SERCA. This was supported by the observation that the partial inhibition of SERCA activity by low concentration of thapsigargin, a SERCA inhibitor, made the CCK-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations more extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent.

In conclusion,  $\text{Ca}^{2+}$  entry through CCE channels plays a critical role in the maintenance of  $\text{AlF}_4^-$ -evoked  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations. The partial inhibition of SERCA activity by  $\text{AlF}_4^-$  may be responsible for the reduced role of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pools and the increased role of  $\text{Ca}^{2+}$  influx in the  $\text{AlF}_4^-$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations. Our data highlight the importance of SERCA in the maintenance of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations in the physiological state.

---

Key Words :  $\text{AlF}_4^-$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations,  $\text{Ca}^{2+}$  influx, SERCA, pancreatic acinar cells