creative commons

COMMONS DEED

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000276205

2014년도 8월
석사학위논문

Functional Analysis of Human Neuregulin 2 on Stress Granule Formation

조 선 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

김 진 아

Functional Analysis of Human Neuregulin 2 on Stress Granule Formation

Stress Granule 형성에 관여하는 Neuregulin 2 의
기능에 관한 연구

2014 년 8 월 25 일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

김 진 아

dCollection @ chosun

Functional Analysis of Human Neuregulin 2 on Stress Granule Formation

지도교수 온탁범

이 논문을 이학석사학위 신청 논문으로 제출함

2014 년 5월

조 선 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

김 진 아

Collection @ chosun

김진아의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 장인엽 (인)

위 원 조선대학교 교 수 유호진 (인)

위 원 조선대학교 조교수 온탁범 (인)

2014 년 5 월

조선대학교 대학원

dCollection @ chosun

CONTENTS

List of Figures 1
Abstract 2
국문초록.....3
I. Introduction.....4
II. Materials and Methods.....9
II-1. 세포배양, RNA interference 와 약물처리 9
II-2. Antibodies.....9
II-3. Immunofluorescence microscopy 10
II-4. Western blot analysis 11
II-5. MTT assay 11
II-6. qRT-PCR.....11
II-7. Polysome profiles 12
III. Results.....13
III-1. Neuregulin2 는 SG assembly 에 관여한다.....13
III-2. NRG2 는 stress 에 따라 translation 을 조절한다.....21
III-3. NRG2 는 세포의 survival 에 영향을 미친다 26
IV. Discussion 29
V. References 31
VI. 감사의 글.....35

dCollection @ chosun

List of Figures

Figure 1. Depletion of NRG2 inhibits SG formation.....14

Figure 2. NRG2 is co-locolized with SG components.....17

Figure 3. NRG2 is SG components.....19

Figure 4. Knockdown of NRG2 inhibits stress-induced polysome disassembly.....22

Figure 5. Knockdown of NRG2 inhibits stress-induced translation.....24

Figure 6. NRG2 affects cell survival.....27

dCollection @ chosun

Abstract

Functional Analysis of Human Neuregulin 2 on Stress Granule Formation

JIN-Ah KIM

Advisor : Assistant Prof. Takbum Ohn, Ph.D.

Department of medical science,

Graduate school of Chosun University

Stress granules (SGs) are cytoplasmic foci that rapidly aggregate in cells exposed to environmental stress including heat shock, oxidative stress, hyperosmolarity, viral infection, and UV irradiation. SG contains nontranslating mRNAs, translation initiation factors, and many specific RNA-binding proteins affecting mRNA function. In addition, several signaling proteins are aggregated to SGs and/or influence their formation. SG also interact with P-bodies, another cytoplasmic mRNP granules including non-translating mRNA, translation repressors, and mRNA decay machinery.

The Neuregulins(NRGs) are a family of epidermal growth factors (EGF) that interact receptor tyrosine kinases of the ErbB. The neuregulins are encoded by four genes (NRG1-NRG4). NRG2 was identified mostly in the nervous system. Through activate with EGF-receptors, NRG2 induce the growth and differentiation of epithelial, neuronal, glial and other cells.

In this study reveal that knockdown of NRG2 prevents sodium arsenite-induced stress granule assembly and modulates translation.

dCollection @ chosun

국문초록

Stress Granule 형성에 관여하는 Neuregulin 2 의 기능에 관한 연구

Stress granule (SG) 은 세포가 여러 스트레스(heat shock, oxidative stress, hyperosmolarity, viral infection, UV irradiation, 등)에 노출되었을 때 빠르게 응집하는 cytoplasmic foci 이다. SG 는 nontranslating mRNA, translation initiation factors, specific RNA-binding proteins affecting mRNA function 을 가지고 있다. 게다가 SG 에는 여러 가지 signaling proteins 가 모여있으며 그들의 formation 에 영향을 준다.

SG 는 P-bodies(PB) 와 상호작용을 하는데 이는 또 다른 cytoplasmic mRNP granules 이며 nontranslating mRNA, translation repressors, mRNA decay machinery 를 포함한다.

Neuregulin (NRG) 은 epidermal growth factor(EGF) 의 구성원이며 ErbB 의 tyrosine kinases receptor 와 상호작용한다. NRG 는 네가지 유전자에(NRG1-NRG4) 에 의해 인코딩 된다. NRG genes 중 하나인 NRG2 는 대부분 신경계에서 확인된다. NRG2 는 EGF-receptors 를 통해 epithelial, neuronal, glial, other cells 의 성장과 분화를 유도한다.

이 논문에서는 NRG2 knockdown (KD) 는 sodium arsenite-induced stress granule assembly 를 억제하며 translation 을 조절한다는 것을 연구하였다.

dCollection @ chosun

I. Introduction

Stress granules (SGs)은 먼저 eukaryotic initiation factor (eIF2α) 의 stress 유도 인산화에 대한 반응으로 cytoplasmic, non-membranous, phase-dense 구조로 알려져있다[1]. 스트레스 반응의 주요 기능은 polysome disassembly 에 의한 단백질 번역중지이며, SG 는 mRNA triage 과정을 통해 세포에서 translational reprograming 을 가능하게 한다[2]. 다양한 스트레스는 serine/threonine kinases 들을 활성화하여 eIF2α 의 51 번 serine 을 인산화시킴으로써 단백질 번역을 중단시킨다[3-8]. 스트레스 활성화 Kinase 들은 다음을 포함한다. (i) HRI (heme-regulated initiation factor 2α kinases) [9]; (ii) PKR (protein kinase RNA-acivated); (iii) PERK (PKR-like endoplamic reticulum (ER) kinase); (iv) GCN2 (general control nonderepressible 2). Phosphorylation of eIF2α (p-eIF2α) 는 translation initiation 할 때 필요한 $tRNA_i^{MET}$/GTP ternary complex 를 거의 완전하게 감소시킨다[10,11]. Ternary complex 가 없는 경우, capped mRNAs 의 5' 끝에서 만들어지는 48S complex 형성이 중단되고, translation 이 멈추며 noncanonical 48S complex 는 60S ribosomal subunit 을 장착할 수 없다[10]. Elongation 이 손상되지 않았을 때 translating ribosomes 는 polysomes 로 되고 그들은 SG 에서 assembly 할 수 있는 messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) 로 바뀐다[12]. eIF4A 를 대상으로 약이나 지질 매개자들은 p-eIF2α 에 상관하지 않고 translation initiation 을

dCollection @ chosun

억제하고 p-eIF2α-dependent SG 에 없는 eIF2/5 개시 인자들을 포함하여 SG assembly 를 시작한다[13,14]. 다른 단백질(Ras-Gap Binding protein 3 (G3BP), T-cell internal antigen 1 (TIA-a)) 와 post-translational modifications 는 SG 에서 만들어지기 위해 translationally stalled mRNPs 에 대해 요구되어 진다. 그러므로 SG assembly 는 translationally stalled mRNPs 가 필요하지만 translational arrest 에 대해 필수적이지는 않고 스트레스의 어떠한 유형이나 SG-assembly factors 의 knockdown(KD) 에 의해 깨질 수 있다[15,16].

P-bodies (processing bodies, PB) 는 cytoplasmic granules 로 단배질 번역이 멈춘 mRNAs 의 한 부분에서 응집하고 그러므로 mRNA repression 과 mRNA decay 를 바꿀 수 있는 mRNA storage 의 한 부분으로써 정의 될 수 있다[17-19]. 세포질에서 PB 의 움직임은, 그들의 숫자는 증가하지만 그들의 이동은 감소를 따르는, microtubules' depolymerization 에 의존한다[20,21]. 신경세포에서 PB 는 'neuronal granules' 로 알려져 있으며, 그들이 neuronal plasticity 에 영향을 미칠 수 있는 시냅스 근처 수상돌기에 localize 된다[22,23]. Neuronal granules 는 ribosomal subunits, mRNA, translation 개시인자 (eIF4E, eIF2α 포함), mRNA 기능을 조절하는 단백질을 가진다. 특히 활성화된 자극을 필요로 하는 시냅스에 mRNA 가 도착할 때까지 translation 은 중지된다[24].

P-body (PB) 에 보존된 핵심 구성요소의 결합은 translation 의 억제, 응집, 저장, PB 에서 mRNA 의 degradation 에 대해 결정적이다. PB 는

Collection @ chosun

multicomponent complexes 이며 Lsm1p-7- complex (sm-like protein), Dhh1p/Rck 그리고 Pat1p (putative anion transporter) 을 포함하는 몇몇 decapping activators 가 들어있다[25-27]. Lsm 1p-7 는 여전히 불분명하다 - 비록 Lsm 특징이 translational repressors 그룹으로 분류되더라도 그것은 PB 형성을 촉진하고 viral transcripts translation 을 유도하는데 필요하다. Dhh1p/Rck 및 Pat1p 또한 mRNA translation 의 억제와 PB 에 대한 억제된 mRNA collection 의 도움에 관여하는 것으로 밝혀졌다[28]. 게다가 PB 는 다음을 포함한다: (i) Decapping, deadenylation 과 decapping proteins Dcp1p, Dcp2p 같은 5′-3′ degradation 그리고 5′-3′ exonuclease 에 대해 반응하기 위한 RNA 분해효소[29,30]; (ii) Translational 억제자 (CPEB; Y-box proteins); (iii) Translation elongation 요소(eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF3, eIF2 and 4E-T); and (iv) the 40S ribosomal subunits. 그러나 PB 의 다른 핵심 요소는 mRNA decapping EDC3p 의 enhancer 그리고 the deadenylase complex CCR4p/ POP2p/NOT1p-5p 를 포함한다.

성장인자와 그들의 receptor 는 세포의 생존, 증식, 분화, 이동을 조절한다. Neuregulins (NRGs) 는 성장과 분화 요소의 구성원이며 epidermal growth factor (EGF) 와 관련이 있다. NRGs receptor 는 EGF receptor 인 ErbB2, ErbB3, ErbB4 를 포함하는 tyrosine kinase transmembrane receptor 의 ErbB 구성원이다. ErbB receptor 와 상호작용을 통해 NRGs 는 epithelial, neuronal, glial 이나 다른 종류의 세포의 성장과

Collection @ chosun

분화를 유도한다[31]. 특히 NRG-ErbB signaling pathways 는 슈반세포의 증식과 분화 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 연구되었다[32-35].

NRG 구성원은 네 개의 유전자 (NRG1, NRG2, NRG3, NRG4) 의 alternative splicing 을 통해 발생하는 다수의 glycoproteins 을 포함한다. 이들 단백질은 다수의 인식 단백질 도메인의 유사한 mosaic-like 구조를 갖는다. 이 구성원의 원형 멤버인 NRG1 은 독립적 슈반세포 유사분열 물질이며[36,37], ErbB2[38,39] 의 activator 및 신경근 접합부의 아세틸콜린 수용체의 합성 유도 물질로 확인되었다[40]. NRG1 유전자는 alternative splicing 과 특이 프로모터 사용에 의해 생성되는 15 개의 다른 결합 형태를 발생시킨다. 최근에 NRG1 과 관련된 단백질을 코딩하는 다수의 유전자가 확인되었다. 이들 유전자 NRG2 (Don1 및 NTAK 으로 확인)[41-44], NRG3[45], NRG4[46] 는 NRG1 으로부터 뉴클레오티드 databases 를 검색하거나 low-stringency hybridization 및 PCR 을 하기 위해 시퀀스를 사용하면서 발견되었다.

네개의 NRG 유전자들에서 비록 모든 구성원이 EGF 에 대해 50 개 아미노산 부위와 유사한 관계를 가지고 있지만 NRG1 과 NRG2 가 가장 가깝게 관련되어있다[38,41-44]. NRG1 - NRG4 의 EGF-like 도메인은 40-48% 정도 유사하다. 유사성이 낮음에도 불구하고 모든 NRG EGF-like 도메인은 ErbB3 또는 ErbB4 와 결합한다[47]. NRG1, NRG2 각각의 EGF-like 도메인은 특이 수용체 결합 친화도를 나타내는 alternative exon 사용에서 발생하는 두 가지 이형 α 및 β 을 가진다.

Collection @ chosun

NRG2 는 신경계 발달을 통해 발현되었고 또한 배아 심장, 폐, 방광에서도 발견하였다[41,42]. 그러나 성체 뇌에서 NRG2 의 발현은 소뇌(granule cells and purkinje cells), 치상회(granule cells), 후각 신경구(granule cells), 세구역으로 제한된다[41-43]. 성체에서 NRG2 의 제한된 발현 패턴은 각 유전자에 대한 구체적인 생물학적 역할을 제안하면서 NRG1 과 실질적으로 다르다. 한편, 타겟세포에서 NRG2 의 영향은 ErbB3 혹은 ErbB4 receptor 에 직접 결합하여 매개되거나 co-receptor 로서 다른 ErbB receptor 에 recruit 하여 매개 된다.

과거 SG 와 PB 의 형성에 중요한 역할을 하는 유전자들을 스크리닝 하는 과정에서 NRG2 가 siRNA 에 의해 knockdown 되었을때, oxidative stress 에 반응한 SG 형성이 심각하게 손상된다는 사실을 알아낸바 있다. 본 논문에서는 NRG2 가 SG assembly 와 translation 에 어떠한 영향을 끼치는지 알아보고자 세포에 NRG2 knockdown (KD) 을 유도하여 연구하였다. 그와 함께 translation initiation 에 관련된 단백질들의 변화와 세포의 생존율은 어떻게 되는지 알아보았다.

dCollection @ chosun

II. Materials and Methods

II-1. 세포배양, RNA interference (RNAi) 와 약물처리

U2OS, HeLa cells을 10% FBS (inactivated fetal bovine serum) 와 1% penicillin/streptomycin을 포함하는 DMEM (WellGene)에 배양했고, 이 cell들을 37℃ 5% CO_2 로 유지되는 incubation 에서 배양하였다. NRG2 를 depletion 하기 위해 U2OS cell에 NRG2 siRNA(siNRG2-1, GGAACAGCCCUUAGUCUUU; siNRG2-2, GGUCGGGUGGCGUUGGUAA) 와 siCONT (D0, GCAUUCACUUGGAUGGUAA; GFP, GGCUACGUCCAGGAGCGCACC)를 Lipofectamin2000과 혼합하여 처리하였다. 약 48 시간이 지나고 siRNA를 한번 더 처리한 후 약 90시간 이상 이르게 하였다. SG, PB assembly 를 보기 위해 transfection 후 Sodium arsenite 0.2 mM로 30분, 1시간 처리하였고 cell viabillity를 보기 위해 sodium arsenite 0.5 mM 1시간-4시간 처리하였다.

II-2. Antibodies

Western blot 과 immunocytochemistry 를 하기 위해 Rabbit anti-Neuregulin2 (Millipore), rabbit anti-phospho_mTOR (cell signal), mouse anti-p70S6K (Santa cruz), rabbit anti-phospho_p70S6K (Cell signal), mouse anti-βactin (Abcam), rabbit anti-eIf2a (Santa cruz), rabbit anti-phospho_eIf2a (Biomol), rabbit anti-phospho_S6 (Cell signal), rabbit anti-

dCollection @ chosun

4EBP1 (Cell signal), rabbit anti-phospho_4EBP1 (Cell signal), Goat anti-eIf3η (Santa Cruz), Goat TIA (Santa cruz), rabbit anti-DDX6(RCK) (Santa cruz) 를 사용하였다.

II-3. Immunofluorescence microscopy

Cover slip에 키운 세포에 스트레스 유도화합물 처리 후 1x PBS로 2번 washing 후, 4% PFA (paraformaldehyde)로 15분간 고정시킨 뒤, 차가운 메탄올로 5분간 permeabilize 하게한다. 그 후 1시간-1시간 30분 정도 5% normal horse serum 과 0.02% sodium azide가 포함된 PBS로 실온에서 blocking을 하였다. 1차 antibody를 blocking solution에 희석(eIF3b 1:500, TIA 1:500, G3BP 1:400, Rck 1:400, NRG2 1:600) 하여 실온에 약 1시간-1시간 30분 두었고 그 후, 1x PBS/0.02% sodium azide로 5분간 3번씩 씻어주었다. 2차 antibody 또한 blocking solution에 희석 (AF488 1:500, cy3 1:400, cy5 1:400) 하였으며 1차 antibody와 마찬가지로 실온에 약 1시간-1시간 30분 두고 1x PBS/0.02% sodium azide 로 5분간 3번씩 씻어준 후에 slide glass 에 mounting solution을 이용해 mounting 하였다. 형광 현미경Nikon Eclipse 80Ti microscope (Nikon) 로 cells 을 관찰, DS-Ri1 digital camera로 cells의 사진을 찍었으며 Adobe Photoshop (CS5) 로 정리하였다.

dCollection @ chosun

II-4. Western blot analysis

Cells을 RIPA buffer 80~100 ul 로 extract 한뒤 BCA assay reagent 로 protein 정량 하였다. 추출한 단백질을 SDS-PAGE gel 에서 분리되고 PVDF membrane 으로 transfer 하였다. Membrane은 5% normal horse serum 과 0.1% sodium azide가 포함된 PBS로 실온에서 blocking을 하였고 blocking solution에 희석된1차 antibody는 4℃ 에서 overnight 하였다. 그 후 TBS-T로 10분간 3번 washing 한 뒤 TBS-T에 희석된 2차 antibody를 약 1시간-1시간 30분 반응시킨 후 detection 하였다.

II-5. MTT assay

세포를 96well plate에 키워 sodium aresite 처리한 뒤에 1x PBS 로 washing 한 후 한 well당 MTT solution 0.5 μg 씩 media 180ul에 (final volume 200ul) 첨가한 후, 37℃ 5% CO_2 로 유지되는 배양기 안에서 2~4 hr 배양하였다. Incubation이 끝나면 media를 확실히 제거한 후 DMSO를 넣어 여러번 섞어준 후, ELISA reader를 사용하여 wave length 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

II-6. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA량은 2 ug 으로 trizol을 첨가하여 추출하였다. cDNA 를

dCollection @ chosun

합성하기 위해 Oligo-dT (Bioneer) 와 total RNA 2 ug , dNTP mix (Solis BioDyne), reverse transcriptase (Thermo scientific), RNase inhibitor (Thermo scientific), reaction buffer (Thermo scientific) 을 사용하였다. cDNA 합성 후 qRT-PCR (Applied Biosystems Inc.)을 SYBR mix (Agilent technologies) 를 사용하여 SYBR green 방법을 바탕으로 실행하였고 GAPDH 를 control 로 하였다.

Primer: NRG2-FW, GACGCTGGGGAGTATGTCTG; NRG2-RV, AGGACTTGGCTGTCTCGTTG; GAPDH-FW, TGACATCAAGAAGGTGGTGA; GAPDH-RV,TCCACCACCCTGTTGCTGTA.

II-7. Polysome profiling analysis.

Sucrose gradient centrifugation 하기 위해 polysome profiling buffer (20mM HEPES (pH 7.6), 125mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 2mM DTT, DEPC water) 를 사용하여 control 과 NRG2 KD 후 stress 처리 된 U2OS 세포를 lysate 하였다. 추출물을 10 분간 얼음 안에 둔 후, 13000 rpm 에서 10 분간 원심분리 하였다. 그 결과로 얻은 supernatant 를 17.5~50% sucrose gradient 에 loading 하였고 ultra-centrifuge (Beckman)에서 SW41-Ti rotor 를 사용하여 35000 rpm 에서 2.5 시간동안 실행하였다. 그 후 gradient 를 fraction collector (Brandel) 을 사용하여 fraction 하였다.

dCollection @ chosun

III. Results

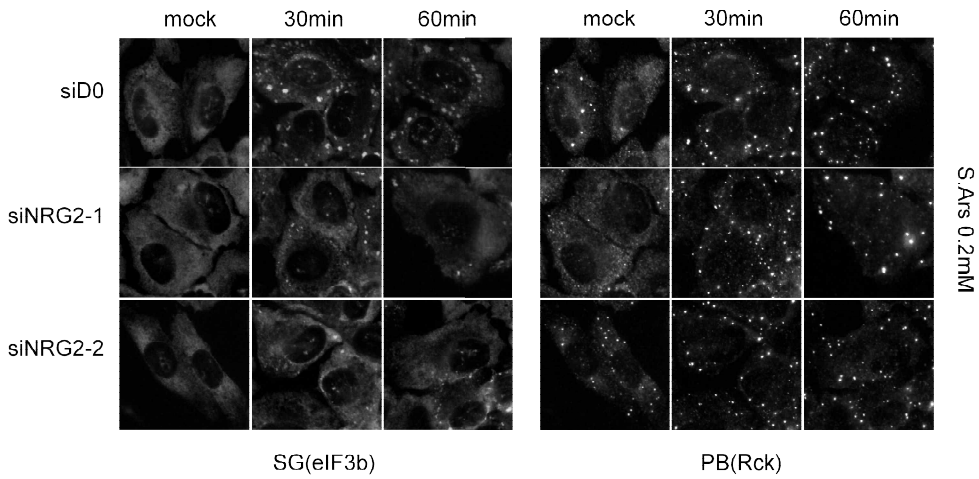
III-1. Neuregulin 2 (NRG2) 는 SG assembly 에 관여한다.

NRG2가 SG assembly에 관여하는 것을 알아보기 위해 NRG2의 siRNA를 제작하였다. NRG2를 targeting 하는 두개의 다른 siRNAs (siNRG2-1, siNRG2-2) 를 통해 U2OS cells 에서 sodium arsenite로 유도된 SG assembly가 매우 억제 되어 있는 것을 발견하였다 (Figure 1A). 이것을 antibody eIF3b (SG marker) 로 확인하였고 NRG2 knockdown으로는 Processing bodies (PB marker; Rck) 에는 영향이 크게 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다. NRG2의 knockdown 효율은 western blot analysis 와 real-time PCR 로 확인하였다 (Figure 1B, 1C). Figure 1D 는 siCONT과 siNRG2 (siNRG2-1, siNRG2-2) 의 SG를 포함하는 cell 수를 counting하여 그래프로 나타낸 것이다.

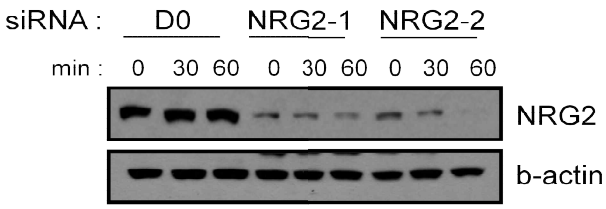
NRG2가 SG assembly에 관여하며 SG의 components 임을 U2OS, HeLa cells 에서 sodium arsenite 처리 후 NRG2 가 eIf3b (SG components) 와 co-localize됨으로써 알 수있다(Figure 2A, 2B). 또다른 SG components 인 TIA, G3BP 와 co-localize 되는 것을 U2OS, HeLa cells 에서 확인하였다 (Figure 3A, 3B).

dCollection @ chosun

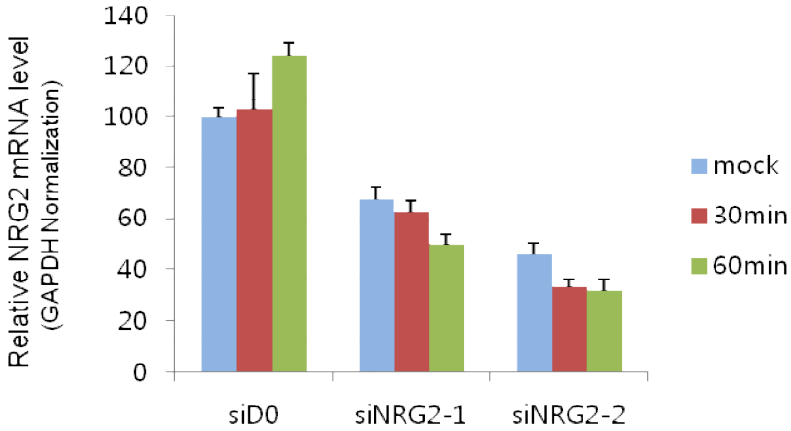
A.



B.

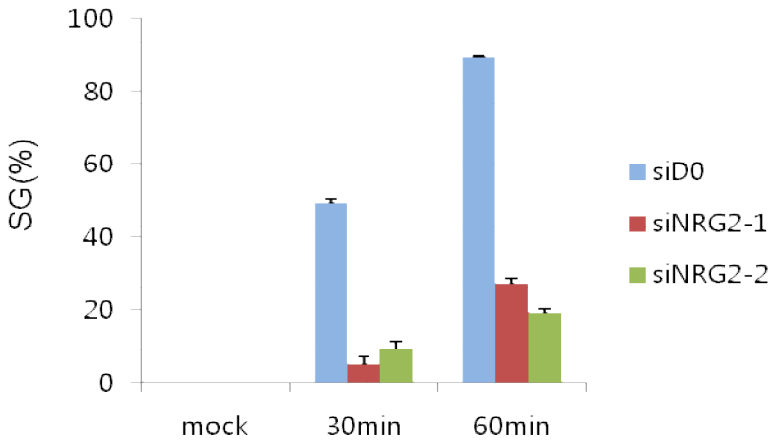


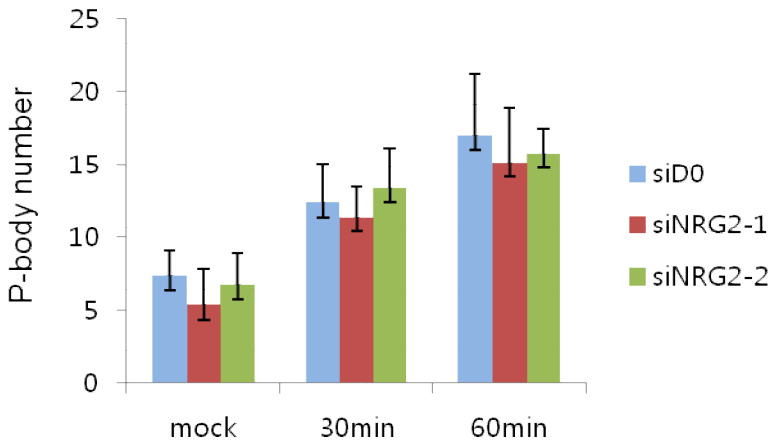
C.



dCollection @ chosun

D.



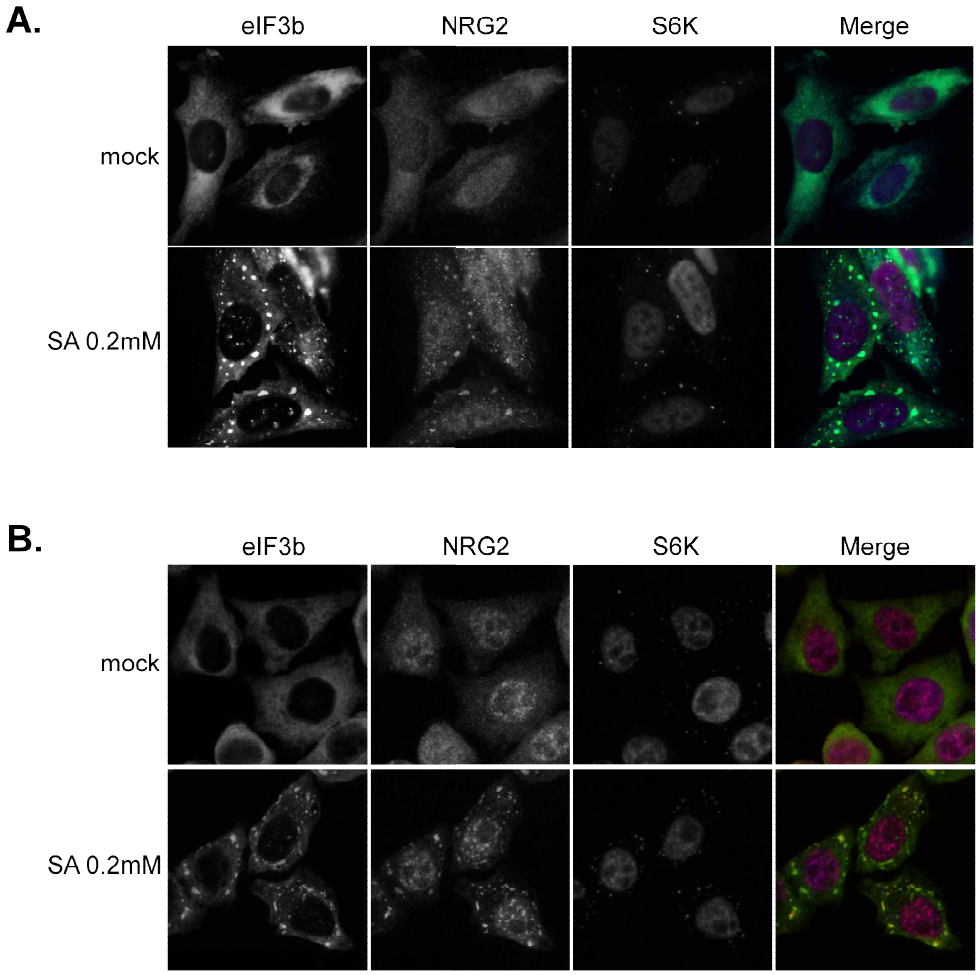


dCollection @ chosun

Figure 1. Depletion of NRG2 inhibits SG formation.

(A) U2OS cells were transfected with siD0, siNRG2 (siNRG2-1, siNRG2-2), then treated the sodium arsenite 0.2 mM for 30 min - 60 min before processing for immunofluorescence microscopy. Antibody reactive with eIF3b (SGs marker, left panels) and Rck (PBs marker, right panels). (B) Western blot analysis the knockdown efficiency of NRG2 in U2OS. (C) Knockdown efficiency of NRG2 was assessed using qRT-PCR in U2OS cells. (D) Graphical representation of SG assembly in U2OS cells transfected with siD0, siNRG2 (siNRG2-1, siNRG2-2) prior to treatment with 0.2 mM sodium arsenite for 30 and 60 min.

dCollection @ chosun

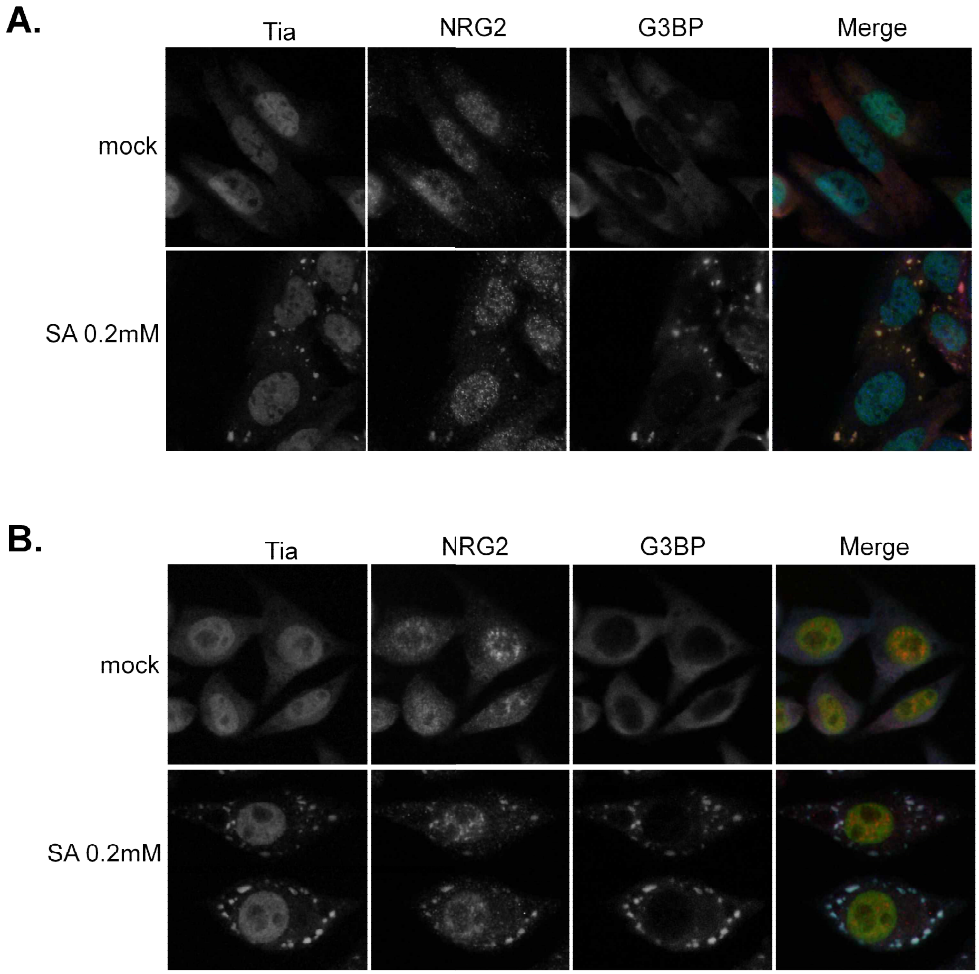


Collection @ chosun

Figure 2. NRG2 is co-localized with SG components.

(A) U2OS, (B) HeLa cells were treated with sodium arsenite 0.2 uM for 1 hour prior to processing for immunofluorescence microscopy. Antibody reactive eIF3b (SG marker)and S6K (PB marker).

dCollection @ chosun



Collection @ chosun

Figure 3. NRG2 is SG components.

(A) U2OS (upper panels), (B) HeLa cells (lower panels) were treated with sodium arsenite 0.2 uM for 1 hour prior to processing for immunofluorescence microscopy. Antibody reactive TIA, G3BP (SG components).

dCollection @ chosun

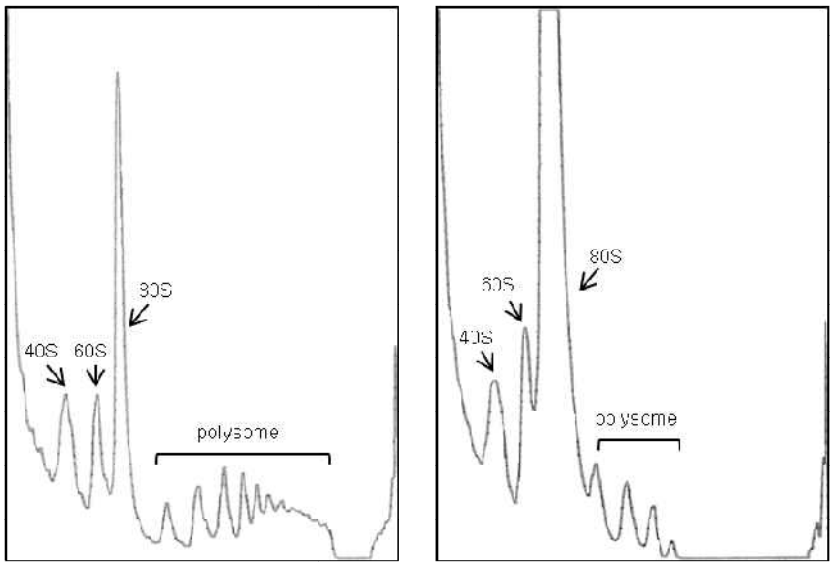
III-2. NRG2 는 stress 에 따라 translation 을 조절한다.

NRG2의 발현을 현저히 감소시킨 세포에서 Polysome profiles 를 비교하기 위해 sucrose gradient analysis 를 하였다. U2OS 세포에서 control (siD0) 와 NRG2 (siNRG2) 를 KD 하고 0.2 mM sodium arsenite 를 30분, 1시간 처리한 후 sucrose gradient fractionation 을 실행하였다. Control cells 에서 sodium arsenite 유도된 translational 억제는 polysomes 이 무너지고 monosomes 이 응집된 것을 볼 수 있다 (Figure 4A, right panel). NRG2 knockdown 으로는 polysome 에 어떠한 영향이 미치지 않은 것을 볼 수 있으나 (Figure 4B, left panel) sodium arsenite 유도된 polysomes 은 넓게 진행되가는 control 에 비해 비교적 앞쪽에서만 만들어지다 만 polysomes 을 볼 수 있고 monosomes 가 control 에 비해 많이 응집되어있는 것을 볼 수 있다(Figure 4B right panel). 그러므로 NRG2 는 sodium arsenite 처리된 세포에서 translation 에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

Translation 은 eIFs complex 의 조절에 의해 진행되는 여러가지 요소들 중 5'-terminal mRNA m7G cap 구조를 인식하는 eIF4E 가 있다. eIF4E 에 결합하는 단백질(eIF4E-binding protein (4EBPs))은 phosphorylation 에 의해 조절되는데 de-phosphorylation 되면 eIF4E 와 결합하여 cap 을 인식하지 못하고 translation 이 진행되지 않는다. 한편 Global translation 이 억제되는 가장 일반적인 메커니즘은 앞서 말했듯이 eIF2α 의 phosphorylation 되는 것이다. 이와 같은 사실을 western blot 으로 알아보았다(Figure 5).

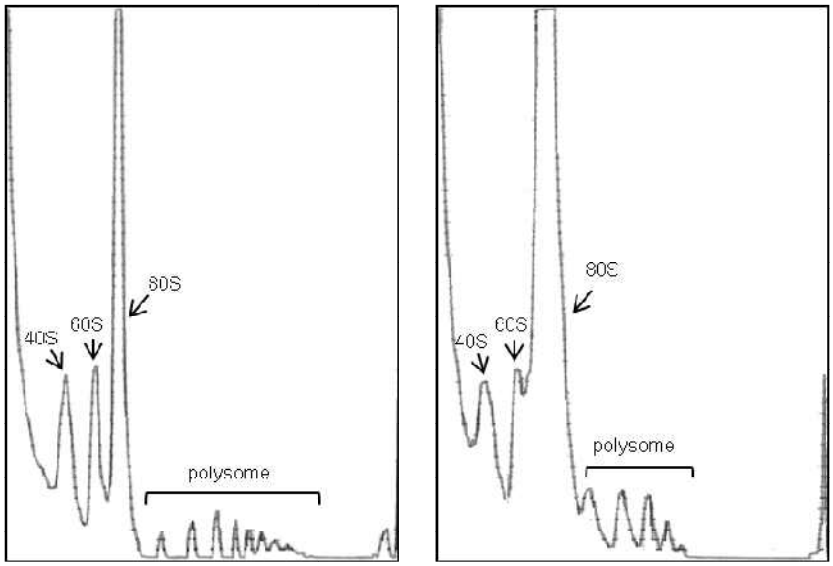
dCollection @ chosun

A.



CONT_mock CONT_SA 0.2mM

B.



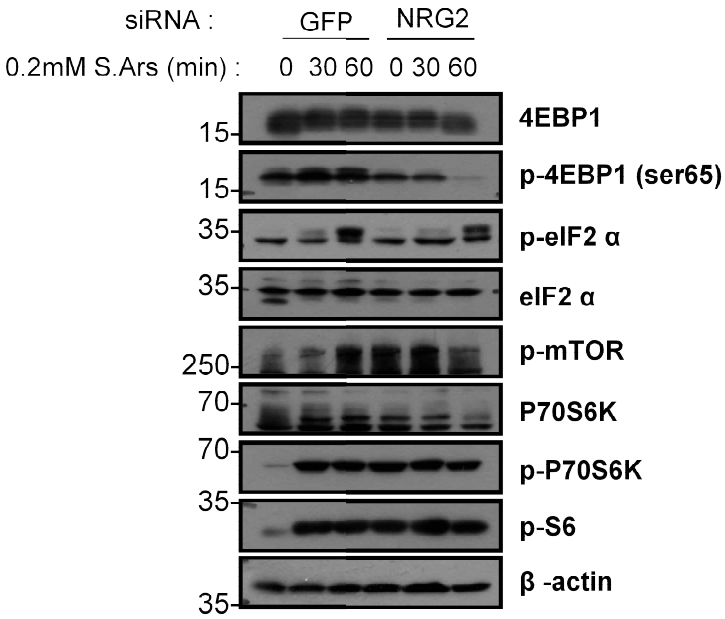
NRG2 KD_mock NRG2 KD_SA 0.2mM

dCollection @ chosun

Figure 4. knockdown of NRG2 inhibits stress-induced polysome disassembly.

U2OS cells were transfected with (A) control (CONT KD) or (B) NRG2-specific (NRG2 KD) siRNAs, then treated 0.2 mM sodium arsenite before sucrose gradient analysis. The peaks of 40S, 60S, 80S ribosomes and polysomes are indicated by arrows or bar.

dCollection @ chosun



Collection @ chosun

Figure 5. Knockdown of NRG2 inhibits stress-induced translation.

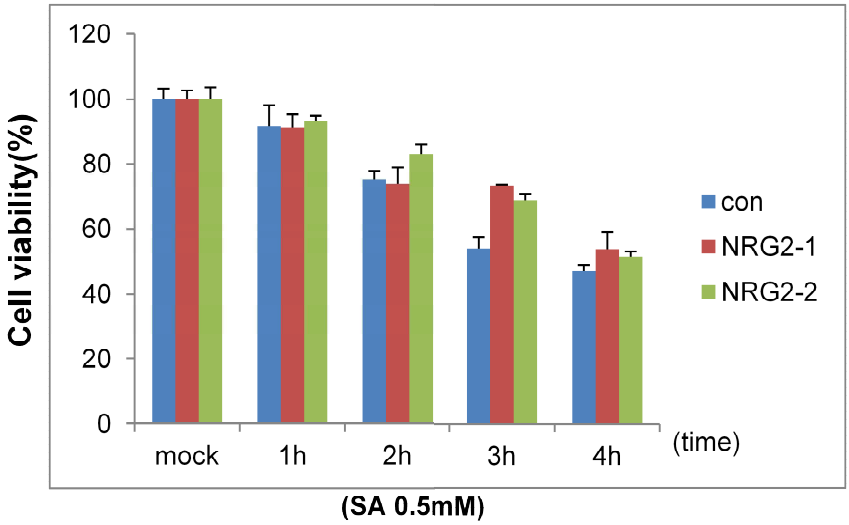
U2OS cells were transfected with control (CONT KD) or NRG2-specific (NRG2 KD) siRNAs, then treated 0.5 mM sodium arsenite for 30 min or 1 hour before western blot analysis. Antibodies reactive p-eIF2α, 4EBP1, p-4EBP1.

dCollection @ chosun

III-3. NRG2 는 세포생존 (cell survival) 에 영향을 미친다.

U2OS cell 에서 NRG2 knockdown 한 후에 0.5 mM sodium arsenite 를 4 시간 까지 처리한 후 MTT assay 를 통해 세포의 viability 을 알아보았다. NRG2 KD 세포에서 survival 은 control 세포에 비해 눈에 띄진 않지만 좀 더 높게 나타나는 것을 보았다(Figure 6).

dCollection @ chosun



Collection @ chosun

Figure 6. NRG2 affects cell survival.

Knockdown of NRG2 in U2OS cells were treated with 0.5 mM sodium arsenite for 1 ~ 4 hour, and their viabilities were determined by the MTT assay.

dCollection @ chosun

IV. Discussion

Neuregulins (NRGs) 는 성장과 분화 요소이며 그들의 receptor 를 통해 세포의 생존과 증식 등을 조절한다는 것을 앞서 언급하였다. 따라서 이러한 유전자를 억제시키게 되면 세포는 성장하는데 있어서 어려움을 겪게 되고 나아가 SG 와 관련 될 수 있음을 유추할 수 있었다.

Translation 의 조절은 eIF2α phosphorylation 이외에 mTOR pathway 도 관여한다. mTOR signaling 의 부재에서 translation 은 mTOR 타겟인 4EBP 와 S6K1 의 dephosphorylation 에 의해 억제된다. 이러한 사실을 토대로 mTOR signaling pathway 에 관여하는 protein level 를 분석해본 결과 몇몇 단백질은 기존에 알려진 바와 다르게 나타나는 것으로 보아 NRG2 가 translation 에 중요한 역할을 하는 mTOR signal pathway 와 관련하여 unknown pathway 가 존재할 것으로 사료된다.

세포의 생존력을 극적으로 알아보기 위해 세포에 높은 농도의 산화 스트레스에 노출 시켰더니 NRG2-depletion 된 세포에서 생존력이 control 보다 높게 나왔다. 이는, 일반적으로 세포가 스트레스에 노출되어 translation 이 억제되고 SG 가 형성되면 세포가 스스로 살아남기 위해 반응하는 하나의 pathway 라고 연구되었으나, NRG2 를 knockdown 시키면 세포가 스트레스에 노출되더라도 SG 은 형성되지는 않지만 translation 은 억제되고 MTT assay 분석을 통해 생존력이 높게 나오는 것을 보아 알려지지 않은 어떠한 mechanism 이 존재하는 것으로 사료된다.

dCollection @ chosun

현재까지 NRG 자체에 관해 연구된 바가 거의 없다. 본 논문은 NRG2가 stress granule 의 형성 뿐만 아니라 translation 에도 영향을 미칠 수 있다는 것을 밝혀내었다. 향후 더욱 상세한 스트레스반응 관련 NRG2의 작용기전을 연구함으로써 기존에 알려지지 않은 NRG2의 새로운 기능을 탐색할 수 있을 것으로 기대한다.

dCollection @ chosun

V. References

[1] Kedersha, N.L. et al. (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2a to the assembly of mammalian stress granules. J. Cell Biol. 147, 1431–1441.

[2] Anderson, P. et al. (2008) Stress granules: the Tao of RNA triage. Trends Biochem. Sci. 33, 141–150

[3] Harding, H. et al. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. Mol. Cell 6, 1099– 1108

[4] Harding, H.P. et al. (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. Mol. Cell 5, 897–904

[5] Srivastava, S.P. et al. (1998) Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA- dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 273, 2416–2423.

[6] Wek, S.A. et al. (1995) The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. Mol. Cell. Biol. 15, 4497–4506

[7] Lu, L. et al. (2001) Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. Mol. Cell. Biol. 21, 7971–7980.

[8] Ghisolfi, L. et al. (2012) Stress granules contribute to alpha-globin homeostasis in differentiating erythroid cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 420, 768–774.

[9] McEwen, E. et al. (2005) Heme-regulated inhibitor (HRI) kinase- mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2) inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. J. Biol. Chem. 280, 16925– 16933.

[10] Kedersha, N. et al. (2002) Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. Mol. Biol. Cell 13, 195–210.

[11] Kimball, S.R. et al. (2003) Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 284, C273–C284.

[12] Kedersha, N. et al. (2000) Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. J. Cell Biol. 151, 1257–1268.

dCollection @ chosun

[13] Bordeleau, M.E. et al. (2005) Stimulation of mammalian translation initiation factor eIF4A activity by a small molecule inhibitor of eukaryotic translation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 10460–10465.

[14] Dang, Y. et al. (2006) Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. J. Biol. Chem. 281, 32870–32878

[15] Ohn, T. et al. (2008) A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. Nat. Cell Biol. 10, 1224–1231.

[16] Buchan, J.R. et al. (2008) P bodies promote stress granule assembly in Saccharomyces cerevisiae. J. Cell Biol. 183, 441–455.

[17] Chan SP. et al. (2006) Slack FJ. microRNA-mediated silencing inside P-bodies. RNA Biol. 3, 97–100.

[18] Fillman C. et al. (2005) RNA decapping inside and outside of processing bodies. Curr Opin Cell Biol. 17, 326–331.

[19] Liu J. et al. (2005) A role for the P-body component GW182 in microRNA function. Nat Cell Biol. 7, 1261–1266.

[20] Aizer A. et al. (2008) Intracellular trafficking and dynamics of P bodies. Prion. 2, 131–134

[21] Loschi M. et al. (2009) Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics. J Cell Sci. 122, 3973–3982.

[22] Kosik KS. et al. (2002) The message and messenger: delivering RNA in neurons. Sci STKE. 126, pe16..

[23] Zeitelhofer M. et al. (2008) Perplexing bodies: The putative roles of P-bodies in neurons. RNA Biol. 5, 244–248.

[24] Huttelmaier S. et al. (2005) Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. Nature. 438, 512–515.

[25] Ingelfinger D. et al. (2002) The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. RNA. 8, 1489–1501.

[26] Lykke-Andersen J. (2002) Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. Mol Cell Biol. 22, 8114–8121.

[27] Sheth U, Parker R. (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur

dCollection @ chosun

in cytoplasmic processing bodies. Science. 300, 805–808.

[28] Coller J, Parker R. (2005) General translational repression by activators of mRNA decapping. Cell. 122, 875–886.

[29] Bashkirov VI. et al. (1997) A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. J Cell Biol. 136, 761–773.

[30] Zheng D. et al. (2008) Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. J Cell Biol . 182, 89–101.

[31] S. Burden, Y. Yarden. (1997) Neuregulins and their receptors: A versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis, Neuron. 18, 847-855, Review.

[32] Levi AD. et al. (1995) The influence of heregulins on human Schwann cell proliferation. J Neurosci. 15, 1329-40.

[33] Grispan JB. et al. (1996) Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins. J Neurosci. 16, 6107-18.

[34] Erickson SL. et al. (1997) ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice. Development. 124, 4999-5011.

[35] Riethmacher D. et al. (1997) Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. Nature. 389, 725-30.

[36] Goodearl, A. D. et al. (1993) Purification of multiple forms of glial growth factor. J. Biol. Chem. 268, 8095–18102.

[37] Marchionni, M. A. et al. (1993) Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. Nature. 362, 312–318..

[38] Holmes, W. E. et al. (1992) Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. Science. 256,1205–1210.

[39] Wen, D. et al. (1992) Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. Cell. 69,559–572.

[40] Falls, D. L. et al. (1993) ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. Cell. 72,801–815.

[41] Busfield, S. J. et al. (1997) Characterization of a neuregulin-related gene, *Don-1*, that is highly expressed in restricted regions of the cerebellum and hippocampus. Mol. Cell. Biol. 17,4007–4014.

dCollection @ chosun

[42] Carraway, K. L. et al. (1997) Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. Nature. 387,512–516.

[43] Chang, H. et al. (1997) Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. Nature. 387,509–512.

[44] Higashiyama, S. et al. (1997) A novel brain-derived member of the epidermal growth factor family that interacts with ErbB3 and ErbB4. J. Biochem. 122,675–680.

[45] Harari, D. et al. (1999) Neuregulin-4: a novel growth factor that acts throug the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. Oncogene. 18,2681–2689.

[46] Zhang, D. et al. (1997) Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94,9562–9567.

[47] Jones, J. et al. (1999) Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. FEBS Lett. 447,227–231.

dCollection @ chosun

VI. 감사의 글

시원하기도 하고 섭섭하기도 한 석사 졸업이 눈 앞으로 다가왔습니다. 처음 멋모르고 들어왔던 이곳에서 저를 끝까지 이끌어 주신 온탁범 교수님 늘 감사 드립니다. 교수님께서 저에 대해서 일러주신 말씀들 늘 가슴에 새기며 보다 나은 사람이 되도록 노력하겠습니다. 생물학과에 들어와 앞으로 가야 할 길을 잃고 헤맬 때 하나의 길을 열어주신 조광원 교수님께도 항상 감사 드립니다. 그리고 대학원에서 처음 만난 저를 많이 아껴주시고 많은 것을 알려주신 박라영 언니 정말 고맙습니다. 같은 실험실 식구도 아닌 저에게 늘 도움이 되어주셨던 김지호 선생님께도 고맙다는 말 전하고 싶습니다. 대학원에 와서 처음 알게 된 외국인 친구 아라빈스에게도 고마움을 느낍니다.

그리고 대학교 입학 때부터 지금까지 항상 옆에서 함께 해오면서 늘 제 힘이 되주었던 슬기, 주영이, 지예, 대학원에 들어와 더욱 친해진 수진이, 다혜, 혜림이, 은정이 에게도 늘 고맙다는 말 전하고 싶습니다.

마지막으로 부족한 저를 지켜봐 주시면서 항상 응원해주신 저에겐 늘 존경스러운 엄마, 아빠 정말 정말 감사하고 사랑합니다.

dCollection @ chosun