[UCI]I804:24011-200000237399

2009년 2월
박사학위논문

NIH3T3세포 이동과정에서 Dynamin Ⅱ의 기능

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 상 렬

2009년 2월 석사학위논문 Povidone-IodineNIH3T3세포 이동과정에서 Dynamin II의 기능 김 상 렬

NIH3T3세포 이동과정에서 Dynamin Ⅱ의 기능

The function of Dynamin II in NIH3T3 cell migration

2009년 2월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 상 렬

NIH3T3세포 이동과정에서 Dynamin Ⅱ의 기능

지도교수 김 학 균

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2008년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 상 렬

김상렬의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 김 홍 중 인

위 원 단국대학교 교 수 김 철 환 인

위 원 조선대학교 교 수 김 수 관 인

위 원 조선대학교 교 수 정 문 진 인

위 원 조선대학교 교 수 김 학 균 인

2008년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT ····· iii

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 실험재료 및 방법 ····· 3
1. 세포배양 ····· 3
2. PDGF, Cytochalasin D 처리 ····· 3
3. 총 단백질 추출 ····· 3
4. 면역 침강법과 단백질 검출 ····· 4
5. 공초점레이저주사현미경 관찰 ····· 5
6. 통계분석 ····· 5

Ⅲ. 실험 결과 ····· 7
1. NIH3T3 및 NIH3T3(Ras) 세포에서 Dynamin II와 Myosin II의 PI3K 및 FAK과의 연관성 ····· 7
2. Actin 억제제를 처리한 NIH3T3 세포에서 Dynamin II와 Myosin II의 결합감소 ····· 7

Ⅳ. 총괄 및 결론 ····· 9

국문초록 ····· 12
참고문헌 ····· 14
사진부도 설명 ····· 19
사진부도 ····· 21

도 목 차

Fig. 1. Western blot of PI3K-p85 subunit and FAK-125, after immunoprecipitation (IP) of Dynamin II and Myosin II antibodies in NIH3T3 and Ras transformed NIH3T3 [NIH3T3(Ras)] cell lines ····· 21

Fig. 2. Subcellular localization of Dynamin II-paxillin complex ····· 22

Fig. 3. Co-localization of Dynamin II and F-actin ····· 22

Fig. 4. Western blotting of Dynamin II binding to Myosin II in NIH3T3 cells is treat with platelet-derived growth factor(PDGF), cytochalasin D ····· 23

ABSTRACT

The function of Dynamin II in NIH3T3 cell migration

Kim, Sang-Yeol
Advisor : Prof. Kim, Hak-Kyun, DDS, Ph.D.
Department of Dentistry,
Graduate School of Chosun University

Dynamin has been reported the responsibility to formation of nascent vesicle in the endocytic and secretory pathways. Previously study, we shown in the Ras transformed NIH3T3 cells that Dynamin II acts as an intermediate messenger in the Ras signal transduction pathway leading to membrane ruffling and cell migration. Also, the platelet-derived growth factor treatment induced Dynamin II interacted with Myosin II in NIH3T3 cells. However, these results were not enough the evidence for relating to between Dynamin II and Ras signal transduction pathway leading to membrane ruffling and cell migration. Therefore, immunoprecipitation was carried out to identify the potential relationship between Dynamin II interacted with Myosin II and other Ras signaling molecule relating of cell migration such as PI3K and FAK. Our result ㄴ showed that the Dynamin II association with Myosin II as a signaling molecule involved in NIH3T3 cell migration through the Ras/PI3K signaling pathway and this is association with p85 subunit of PI3K. Also, FAK is highly expressed with Myosin II in NIH3T3 (Ras) compared with NIH3T3 cells and lower

expressed with Dynamin II. Confocal microscopy also showed the co-localization between Dynamin II and paxillin by PDGF stimulation in NIH3T3 cells. Also, Dynamin II was co-localized with actin filament in immunofluorescence results. After stimulated or not PDGF and treatment of actin inhibitor such as cytochalasin D in NIH3T3 cells have shown that Dynamin II with Myosin II complex inhibited binding to the actin. This result suggest that Dynamin II was localized in focal adhesion when triggered cell migration and bind to actin filament component.

Key Words: Dynamin II, Myosin II, Ras signal, cell migration, platelet-derived growth factor (PDGF), NIH3T3 cells

I. 서 론

Dynamin은 GTPase 단백질로서 세포내이입시 소포의 절단과, caveolae의 세포내 이동 및 골지체에서의 단백질 이동과 관련된 다양한 소포체의 budding 과정에 기여한다고 알려져 있다(1). 하지만 최근 여러 가지 연구를 통해 Dynamin II 가 세포 내 이입 기능 외에 actin의 운동원, 세포질분열(cytokinesis), 중심체응집(centrosome cohesion), MAP kinase 신호전달 그리고 면역에 관련된 시냅스에서의 신호전달을 조절하는 능력을 가지는 것으로 밝혀졌다(2-7). Dynamin II는 GTPase 영역, PH(pleckstrin homology) 영역, GTPase 단백질과의 결합능을 높이기 위한 GED(GTPase effector) 영역이 있고 C-말단에는 SH3영역을 가지는 수많은 다른 단백질들과 결합하기 위한 PRD(proline/arginine-rich) 영역으로 이루어져 있다(3).

세포골격은 동력 단백질인 Myosin II와 actin세사가 결합함으로써, 스트레스섬유와 국소부착반(focal adhesions) 형성에 필요한 세포 내부에서의 수축력을 일으키는 동적인 시스템이다(8, 9). 최근에는 Dynamin II와 Myosin II의 결합체가 Ras/Grb2와 PDGF 신호전달 과정에서 신호전달 분자로써 기능을 한다고 보고되었다(10). 세포이동 신호전달 과정에 관련된 단백질로는 phosphoinositide Kinase-3(PI3K), focal adhesion kinase(FAK) 그리고 paxillin 등이 있으며 이 단백질들은 SH2 또는 SH영역을 가지고 있어서 Dynamin II와 결합할 가능성이 있고 PI3K를 통한 신호전달은 세포이동과도 관련이 있다고 알려져 있다(11). PI3K는 촉매소단위 p110과 조절소단위인 p85로 이루어진 이형이합체이다(12). p85 조절소단위는 SH2/SH3 영역을 가지고 있어서 세포수용체에 있는 인산화된 tyrosine잔기 및 세포 내 다른 분자들과 결합하고 어떤 경우에는 촉매소단위의 결합 친화력을 변화시키기도 한다(13). 그리고 NIH3T3세포에서 PDGF 신호는 Rac분자를 통한 Ras신호전달과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(14).

Focal adhesion kinase(FAK)은 non-receptor protein tyrosine kinase로서 국소부착반에 위치하고(15) 세포의 생존, 주기과정과 운동신호 생성에 관련이 있는 것으로 알려져 있다(16). FAK 신호는 국소부착반의 생성 또는 소멸을 통해 세포이동을 조절하는 것으로 알려졌다(17, 18). FAK 단백질의 392번째 tyrosine 부분이 자극에 의해 인산화되면 SH2 영역이 만들어지는데 이것은 세포이동을 촉진하는 FAK 단백질의 기능에 필요하다(19). FAK은 세포 외 기질에 있는 인테그린(integrin)과 연결되어 있고 PDGF 자극에 의해 세포 이동을 촉발하는 내부 신호에도 연결되어 있다(20). Paxillin은 뼈대 역할을 하고 68-kDa의 크기를 가지는 국소부착 단백질로서 처음 알려졌는데 단백질 상호간의 결합을 매개하고, N-말단에 5개의 LD 모티프와 C-말단에 4 개의 LIM 영역 및 SH2와 SH3 영역에 결합할 수 있는 부위가 있다(21-23).

따라서 본 연구에서는 이전 연구에서 밝혀진 세포이동관련 단백질의 가능성을 지닌 Dynamin II의 구체적인 기능을 규명하고자 Dynamin II 와 PI3K, FAK, paxillin 그리고 F-actin과의 상호 연관성에 대해서 알아보고자 하였다.

Ⅱ. 실험 재료 및 방법

1. 세포배양

NIH3T3 세포와 H-Ras가 형질전환된 NIH3T3 세포는 10% 농도의 FBS(fetal bovine serum, FBS; Gibco-BRL, Grand Island, USA), penicillin G(100 U/ml), streptomycin sulfate (100 μg/ml), amphotericin B(0.25 μg/ml) 그리고 2-mercaptoethanol(50 μM)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)을 배양액으로 사용하였고, 5% 농도로 CO_2가 유지되는 배양기에서 배양하였다. H-Ras 가 형질전환된 NIH3T3 세포는 Dr. J. S. Gutkind (National Institutes of Health, Bethesda, USA)로부터 제공받아 사용하였다.

2. PDGF, Cytochalasin D 처리

NIH3T3세포는 6 well 또는 100 mm 배양접시에 미리 넣어둔 커버글래스 위에서 60 %까지 배양한 후 실험에 사용하였다. 24시간 후에 배양액을 새 DMEM 으로 바꾸고 18시간 동안 혈청이 없는 상태를 유지 하였다. 18시간 후, PDGF-BB(Sigma, St. Louis, USA), 100 nM cytohalasin D(Aldrich Chemical Company, Inc, Milwaukee, USA)를 37 ℃ 에서 30분간 각각 처리 하였다.

3. 총 단백질 추출

PDGF-BB, cytochalasin D를 처리한 세포를 원심분리를 통해 모은 후, phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4, and 1.4 mM KH_2PO_4, pH 7.4)으로 두 번 세척 하였다. PBS를 제거 한 후, 세포용해액(lysis buffer; 50 mM HEPES, pH 7.5, 10 % glycerol, 1 % Nonidet P-40, 0.5 mM EDTA, 5 mM Na_3VO_4, 10 mg/ml leupeptine

and aprotinin, 5 μg/ml pepstatin and 0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride) 1 ml을 넣고 세포를 파괴 하였다. 용해된 세포가 들어있는 용해질은 60분간 얼음 위에서 놓아둔 후 12,000 rpm 에서 10분간 원심분리하고 분리된 단백질이 포함된 상등액을 취하여 실험에 사용하였다.

4. 면역침강법과 단백질 검출

단백질 추출 후, 사용할 농도는 분석 kit(Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 결정하였다. 면역침강법에 사용할 protein G bead는 PBS를 이용하여 세번 세척하고 여기에 정량 한 총 단백질 500 μl 를 첨가하였다. 추출한 총 단백질과 protein G bead 는 DynaminII 항체(Hudy-2; Upstate Biotech, Lake Placid, USA) 또는 MyosinII 항체(hSM-V; Sigma)와4 ℃에서 2시간씩 각각 반응하였다. 반응 후, 단백질-bead-항체 복합체는 PBS로 세척하고, 10,000 g 에서 5분간 원심분리 하였다. 원심 분리 후 이 복합체는 1 X reducing sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) sample buffer를 넣고 5분간 가열하였고, 원심분리 후 상등액을 SDS polyacrylamide gel(15 %)에 전기영동 하였으며, nitrocellulose(NC) membranes(Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK)에 단백질을 옮겼다.

단백질이 옮겨진 NC membrane은 PBS-T(phosphate-buffered saline-tween-20)에 5% 농도로 희석된 탈지분유 용액에 blocking 하였다. Blocking 후, 1차 항체로서 Dynamin II, PI3K-85(Upstate Biotech) 그리고 FAK-125 (Upstate Biotech) 항체를 18시간 동안 처리 하였다. 1차 항체 반응 후, horseradish peroxidase가 연결되어 있는 2차 항체(Upstate Biotech)를 1시간 동안 반응시키고, 단백질 밴드를 시각화시키기 위해 chemiluminescence (ECL) kit (Amersharm pharmacia Biotech)를 사용하였다. 나타난 단백질 밴드는 NIH Scion Image software(version 1.1; Scion, Frederick, USA)를 이용하여 정량화 하였다.

5. 공초점레이저주사현미경 관찰

PDGF를 처리한 NIH3T3 세포와 처리하지 않은 세포에서 Dynamin II 와 paxillin의 겹쳐진 위치(co-localization)를 보기 위해 Dynamin II 와 paxillin 항체(Transduction Laboratories, Lexington, USA)를 같이 사용하여 면역형광염색을 수행 하였다. Dynamin II 와 paxillian 단백질을 구별하기 위해 fluorescein이 연결된 goat anti-mouse IgG와 TRITC가 연결된 goat anti-mouse IgG 2차 항체(Biosource, Camarillo, USA)를 각각 사용하였다. 커버 글래스 위에서 자란 NIH3T3 세포는 PDGF 처리 후 PBS로 세척하고, 4 % paraformaldehyde를 이용해 37 ℃에서 20분 동안 고정과정을 거쳤으며, 0.1 % Triton X-100을 이용하여 permiabilization을 수행하였다. Permiabilization 후, PBS에 1.0 % 농도로 희석된 bovine serum albumin을 이용하여 blocking을 했고, 같은 용액에 Dynamin II와 paxillin 항체를 희석하여 37 ℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응 후, PBS로 세척하고 2차 항체를 처리 하였다.

F-actin 과 Dynamin II의 위치를 확인하기 위해 0.1% Triton X-100으로 5분간 permiabilization 하고, blocking 용액에 10분간 반응시킨 후 FITC-phalloidin(Aldrich Chemical Company, Inc)을 처리하였다. PBS를 이용해 세 번 세척하고 세포가 있는 커버 글래스에 Dynamin II 항체와 rhodamin이 연결된 2차 항체를 처리하였다. PBS로 세 번 세척하고, fluorescent mounting medium 을 이용해 커버 글래스에 mounting 하여, 공초점레이저주사현미경(TCS400; Leica, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였다. Mounting 후 나타난 상은 ScanWare 5.0 (Leica)를 이용하여 확인 하였고, Adobe Photoshop software (version 7.0, Adobe Photo Systems, Mountain View, USA) 소프트웨어를 이용하여 디지털화 하였다.

6. 통계분석

통계적 차이를 확인하기 위해 Origin version 7.5 statistical software

(Microcal Software, Northampton, USA)를 이용하여 t-test 또는 ANOVA 분석을 수행 하였다. $P<0.05$는 통계학적으로 유의적 차이가 있음을 의미한다.

Ⅲ. 실험 결과

1. *NIH3T3* 및 *NIH3T3(Ras)* 세포에서 *Dynamin II*와 *Myosin II*의 *PI3K* 및 *FAK*과의 연관성

신호전달 과정에서 PI3K 주변에서 일어나고 있는 Dynamin II와 Myosin II의 관계를 알아보기 위해 PI3K와 FAK에 대하여 면역침강법(immunoprecipitation, IP)을 이용한 면역단백질검출법을 수행하였다. IP결과 Dynamin II와 결합한 PI3K의 발현은 정상 NIH3T3 세포에서 보다 Ras가 과발현된 NIH3T3(Ras) 세포에서 좀 더 증가하였다(Fig. 1A). 하지만 Myosin II에 결합한 PI3K의 양은 NIH3T3 세포에서 보다 NIH3T3(Ras) 세포에서 크게 증가하였다(Fig. 1A). PI3K는 NIH3T3세포에서 Myosin II와 결합과 비교했을 때 Dynamin II의 결합이 더 증가되어 발현되었다(Fig. 1A). FAK은 Ras가 과발현된 NIH3T3(Ras) 세포에서 Myosin II와 결합할 때 발현이 높이 증가했지만, Dynamin II와 결합할 때는 그 발현 수준이 더 낮았다(Fig. 1B). 이것은 NIH3T3와 NIH3T3(Ras) 세포에서 Myosin II와 결합된 PI3K의 단백질발현 결과와 유사하였다(Fig. 1A).

2. *Actin* 억제제를 처리한 *NIH3T3* 세포에서 *Dynamin II*와 *Myosin II*의 결합감소

면역형광염색은 NIH3T3 세포에 PDGF자극을 주었을 경우 Dynmin II가 paxillian과 같은 위치에 존재하는지 여부를 알아보기 위해 수행 되었다(Fig. 2A2). PDGF를 처리하지 않은 NIH3T3 세포에서 Dynamin II 와 paxillian은 세포막 주변부를 따라 가장자리에 함께 위치 하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A2). 또한 PDGF를 처리하면 NIH3T3 세포가 운동성을 띠는 세포처럼 극성 모양으로 변화하는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 2B). 형태적인 변화로 인해 세포내 Dynamin II와 paxillin의 재 분포는 세포의 주름 잡힌 모서리 부

분으로 집중되었다(Fig. 2B).

또한 다음으로 세포이동 시 나타나는 세포골격의 재구성에서 Dynamin II와 세포골격 단백질 중에 하나인 actin이 함께 위치하는지를 알아보기 위해 면역형광염색 실험을 수행하였다. 세포 전체에 걸쳐 잘 발달된 섬유성 actin을 관찰할 수 있었고(Fig. 3A), Dynamin II는 세포질에 골고루 분포하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3B). Dynamin II와 F-actin의 동일한 위치 분포는 겹친상에서 세포질 막의 가장자리에 나타나는 것을 알 수 있었다(Fig. 3C).

다음으로 Dynamin II 와 세포골격 단백질의 직접적인 관계를 알아보기 위해 NIH3T3 세포에 PDGF 와 cytochalasin D를 처리한 후 Myosin II 항체를 이용하여 IP 실험을 수행하였다(Fig. 4). PDGF 를 처리한 NIH3T3 세포에 Myosin II 항체를 이용하여 IP를 수행하고 Dynamin II 발현 정도를 확인한 결과 PDGF를 처리하지 않은 대조군에 비해 발현 양이 증가했음을 알 수 있었다. 하지만 cytochalasin D를 처리한 NIH3T3 세포에서 Dynamin II 발현 수준은 대조군 및 PDGF를 처리한 군에 비해 급속히 감소했음을 알 수 있었다. 또한 PDGF와 cytochalasin D를 같이 처리한 NIH3T3 세포는 cytochalasin D만 처리한 군에 비해 Dynamin II 발현 수준이 증가하는 결과를 나타냈다.

Ⅳ. 총괄 및 결론

앞선 연구에서 NIH3T3 세포 및 Ras가 형질전환 된 NIH3T3 세포를 이용한 Ras 신호전달 기전연구에서 Dynamin II의 중간 매개체 역할을 확인 하였으며, Ras 신호전달과정에서 Grb2, Dynamin II 그리고 Myosin II 등은 상호 연관에 의해 막의 주름형성과 세포이동에 관여하였다(10). 하지만 세포이동과 관련된 Ras 신호전달체계에서 다른 분자들과의 관계 규명이 필요하였다. 따라서, NIH3T3 세포에서 Ras 신호에 의해 세포이동과 골격형성에 관여하는 분자들과 Dynamin II와의 관계를 규명하고자 하였다.

Ras는 아래쪽 분자인 PI3K의 촉매소단위인 p110α에 GTP를 이용하여 직접적으로 결합한다고 알려져 있다(24). PI3K의 농도는 휴지기에 있는 세포에서는 낮게 나타나지만 PDGF(platelet derived growth factor) 같은 성장인자를 처리하면 증가하는 것으로 보고 되었다(25, 26). 중간엽세포에 PDGF-BB를 처리한 후 PI3K 억제제인 LY294002를 첨가하면 세포의 이동이 방해를 받는다고 알려졌다(27). 또한 Rakhit 등은 PDGF가 기도평활근세포(airway smooth muscle cells, ASMs)에서 Grb2 유도 단백질인 Gab1의 Gi-mediated tyrosine 인산화를 자극하고, 이러한 인산화는 Gab1-Grb2 결합과 PI3K1a가 연결되는데 필요하다고 발표 하였다. 그리고 PI3K가 다음 과정으로 Dynamin II와의 연결을 촉진할 이라고 언급 하였다(28). 본 연구의 IP 실험 결과, Dynamin II와 Myosin II는 PI3K의 p85 구조체와 연결되고, Ras/PI3K 신호 체계에 관련이 있을 것으로 나타났다. 따라서 Dynamin II는 Ras/PI3K 신호체계와 관련된 신호물질 임을 알 수 있었다.

다음으로 주목한 신호분자는 FAK(focal adhesion kinase)이다. 몇몇 연구그룹은 tyrosine이 인산화된 pp125FAK가 Grb2의 SH2영역에 직접적으로 결합하고 사람의 단핵구(monocyte)에서 이러한 결합체는 GTPase Dynamin과 연관이 있는 것으로 보고하였다(29). 섬유모세포에서 FAK의 tyrosine인산화

는 세포가 세포외기질에 부착하는데 필요하다고 알려져 있으며(30), 국소적 현상에 의해 증가된 표면 접촉이 FAK와 Myosin II 의존적 기작을 통해 국소 부착 및 수축을 조절함으로써 NIH3T3 세포이동을 유도할 것이라고 제안했다(31). 또한 FAK은 골격 또는 유도 기능을 가지고 있어서 PI3K와 같이 구조와 신호에 관련된 수 많은 분자들을 끌어 들이고 세포부착 변화와 actin 세포골격의 재 조합을 촉진시킨다(32). 이러한 여러 연구들을 바탕으로 우리는 신호전달 과정에서 FAK주변에서의 Dynamin II 또는 Myosin II와의 연관성을 조사하기 위하여 IP 방법을 통해 FAK의 발현 양상을 알아보았다.

최근에 한 연구 그룹은 A375와 MCF7과 같은 다양한 암세포에서 actin의 재구성은 FAK/PI3K/Rac-1 신호를 통해 이루어진다고 보고 하였다(33). 또 다른 연구 그룹은 nocodazole 처리 후 FAK 및 Dynamin에 의존한 국소부착반(focal adhesion)의 해체가 일어난다는 것을 보여 주었다. 또한 해체 동안 Dynamin과 FAK은 국소부착반에 함께 위치해 있었고, Dynamin의 억제는 세포이동 및 이동시 나타나는 세포의 국소부착반의 형태학적 변화를 방해 하였다(34). 따라서 선행된 연구들과 본 연구의 결과들로 Dynamin II가 세포이동을 위해 FAK 주변에 모이게 되어 신호분자로서 작용을 할 것이라는 것을 제시 할 수 있다.

Paxillin과 FAK같은 다영역접합 단백질(multi-domain adapter) 또는 뼈대 단백질은 보통 신호전달 분자들을 모음으로써 신호의 상호연결이나 통합을 위한 다리역할을 하는 것으로 알려졌다(23). 최근에는 paxillin 계통의 단백질들이 세포이동을 위한 인테그린 및 성장인자들의 신호 전달을 통합하는 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(23). 선행된 연구에서 우리는 PDGF 자극 후 NIH3T3 세포의 모양이 형태학 적으로 극성을 띠는 것을 관찰 하였는데, 이 시기에 Dynamin II와 Myosin II가 동일한 부위에 위치하는 것을 보고하였다(10). 또한 lysophosphatidic acid를 처리한 NIH3T3 세포에서 국소부착반과 스트레스 섬유의 표지 단백질들인 paxillin과 actin이 syndecan-4와 Dynamin II와 서로 함께 위치하고 있음을 밝혀냈다(35). Dynamin은 또한 성장인자가

처리된 섬유모세포(36) 및 대식세포(37)에서 actin이 풍부한 phagocytic cup의 피질막 주름 부위에 모여 있는 것으로 밝혀지기도 했다. 우리의 연구결과도 PDGF를 처리한 NIH3T3 세포에서 Dynamin II와 paxillin이 재 분배 되어 위치하는 것을 관찰 하였으며(Fig. 2), 또한 Dynamin II는 actin과도 함께 위치하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과들은 Dynamin II가 PDGF 자극에 의한 actin 세포골격 형성과 함께 세포이동 과정에서 Myosin II 뿐만 아니라 paxillin과도 연관이 있으며 결국은 Dynamin II가 세포골격 단백질의 조직화에 관련이 있다는 것을 시사한다.

따라서 actin 형성 억제제인 cytochalasin D를 처리한 후 Dynamin II와 세포골격 단백질들의 직접적인 연관성을 알아보았다. Cytochalasin은 진균류에서 발견되었고, actin세사의 가시모양 끝에 결합하여 필라멘트성 actin의 연결을 및 해체를 방해한다. 그 결과 actin세사는 붕괴하고 actin 중합이 억제된다(38). IP 실험결과로 Dynamin II와 Myosin II 복합체는 cytochalasin D와 PDGF를 처리한 NIH3T3 세포에서 actin세포골격의 형성 과정 동안 actin과 결합 할 수 있다는 것을 제시 하였다.

결론적으로 본 연구를 통하여 Dynamin II는 PDGF 자극에 의한 세포골격의 형성 시 actin과 결합하고 세포 이동을 야기하는 Ras 신호에서 PI3K와 FAK과 함께 신호분자로 작용한다는 것을 규명하였다.

국 문 초 록

*NIH3T3*세포 이동과정에서 *Dynamin II*의 기능

김 상 렬
조선대학교 대학원 치의학과
(지도교수: 김학균)

Dynamin은 세포내 이입과 분비과정에서 나타나는 신생소포의 형성을 담당하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에 앞서 수행한 연구에서 Ras 유전자를 과발현시켜 형질 전환된 NIH3T3 세포를 이용한 실험 결과, 세포막주름 및 세포이동과 관련된 Ras 신호전달 체계에서 Dynamin II가 중간 매개체 역할을 하는 것을 밝혔다. 또한 정상 NIH3T3 세포주에 혈소판유래성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)를 처리 했을 때 Dynamin II와 Myosin II의 결합을 유도한다는 것을 밝혀냈다. 하지만 이러한 결과들은 세포막주름이나 세포이동 시 Dynamin II 와 Ras 신호전달 체계 사이의 관계를 증명하기에는 부족하였다. 따라서, 본 연구에서는 Dynamin II와 Ras 신호전달 체계에서 세포이동과 관계가 있다고 알려진 PI3K, FAK, Paxillan 그리고 actin 세사와의 연관성을 밝히고자 하였다.

실험결과, Ras/PI3K 신호전달 체계를 통한 NIH3T3 세포의 이동에 Dynamin II와 Myosin II 결합이 신호물질로서 관여한다는 것을 알 수 있었다. 또한 FAK은 정상 NIH3T3 세포보다 Ras를 과 발현 시킨 NIH3T3 세포에서 Myosin II 과 함께 높은 수준으로 발현 하였으나 Dynamin II와는 낮은 수준으로 발현하였다. 공초점레이저주사현미경을 이용한 관찰에서는 PDGF 자극에 의해 NIH3T3 세포 내에서 Dynamin II와 Paxillin이 같이 위치한 부분을 볼 수 있

었다. 그리고 면역형광법을 이용한 실험에서는 Dynamin II 가 actin세사와 겹쳐져 위치한 부분을 관찰할 수 있었다. actin 억제 물질인 Cytochalasin D를 NIH3T3 세포에 사전 처리 한 후 PDGF를 처리하거나 하지 않은 실험에서는 Dynamin II와 Myosin II 결합체가 actin에 결합하는 것을 방해하는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과로 Dynamin II는 세포이동에 관여하는 단백질 및 운동단백질 등을 조절하는데 관여한다고 할 수 있다.

참 고 문 헌

1. Jeong MJ, Yoo J, Lee SS, Lee KI, Cho A, Kwon BM, Moon MJ, Park YM, Han MY. Increased GTP-binding to dynamin II does not stimulate receptor-mediated endocytosis. 2001, Biochem Biophys Res Commun 27: 283(1):136-42.
2. Orth JD and McNiven MA. Dynamin at the actin - membrane interface. 2003, Curr Opin Cell Biol 15:31 - 39.
3. Schafer DA. Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. 2002, Curr Opin Cell Biol 14: 76 - 81.
4. Konopka CA, Schleede JB, SkopAR, BednarekSY. Dynamin and cyto-kinesis. 2006,Traffic7:239 - 247.
5. Thompson HM, Cao H, Chen J, Euteneuer U, McNiven MA. Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion 2004 Nat Cell Biol 6: 335 - 342.
6. Kranenburg O, Verlaan I, Moolenaar WH. Dynamin is required for the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase. 1999, J Biol Chem 274: 35301 - 35304.
7. Gomez TS, Hamann MJ, McCarney S, Savoy DN, Lubking CM, Heldebrant MP, Labno CM, McKean DJ, McNiven MA, Burkhardt JK, Billadeau DD. Dynamin2 regulates T cell activation by controlling actin polymerization at the immunological synapse. 2005, Nat Immunol 6: 261 - 270.
8. Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M, Zhong C. Focal adhesion assembly. 1997, Trends Cell Biol 7: 342 - 347.
9. Helfman DM, Levy ET, Berthier C, Shtutman M, Riveline D, Grosheva

I, Lachish-Zalait A, Elbaum M, Bershadsky AD. Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions. 1999, Mol Biol Cell 10: 3097 - 3112.

10. Jeong SJ, Kim SG, Yoo J, Han MY, Park JC, Kim HJ, Kang SS, Choi BD, Jeong MJ. Increased association of dynamin II with myosin II in ras transformed NIH3T3 cells. 2006, Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)38(8):556-562.
11. Welch HC, Coadwell WJ, Stephens LR, Hawkins PT. Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. FEBS Lett. 2003, 546: 93 - 97.
12. Jiménez C, Portela RA, Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Collard J, Serrano A, Martínez-A C, Avila J, Carrera AC. Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. 2000, J Cell Biol 151(2): 249-262.
13. Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, Stein R, Warne PH, Zvelebil MJ, Higashi K, Volinia S, Downward J, Waterfield MD. p110, a novel phosphoinositide 3- kinase in leukocytes. 1997, Proc Natl Acad Sci USA94(9):4330-4335.
14. Nobes CD and Hall A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPase regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. 1995, Cell 81: 53-62.
15. Rodriguez-Fernandez JL, Gomez M, Luque A, Hogg N, Sanchez-Madrid F, Cabanas C. The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes. 1999, Mol Biol Cell 10(6): 1891-1907.
16. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion

kinase. 1999, Prog Biophys Mol Biol 71: 435 - 478.

17. Richardson A and Parsons T. A mechanism for regulation of the adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. 1996, Nature 380(6574): 538-540.
18. Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. 2004, Nat Cell Biol 6(2): 154-161.
19. Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. 1994, Mol Cell Biol 14: 1680 - 1688.
20. Hauck CR, Hsia DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase facilitates platelet-derived growth factor-BB-stimulated ERK2 activation required for chemotaxis migration of vascular smooth muscle cells. 2000, J Biol Chem 275(52): 41092-41099.
21. Turner CE, Glenney JR Jr, Burridge K. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. 1990, J Cell Biol 111: 1059 - 1068.
22. Glenney JR Jr and Zokas L. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. 1989, J Cell Biol 108: 2401 - 2408
23. Brown MC and Turner CE. Paxillin: adapting to change. 2004 Physiol Rev 84: 1315-1339.
24. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. 1994, Nature 370(6490): 527-532.
25. Panayotou G and Waterfield MD. Phosphatidylinositol 3-kinase: a key enzyme in diverse signaling pathways. 1992, Trends Cell Biol 2: 358 -

360.

26. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. 1998, Annu Rev Biochem 67: 481 - 507.
27. Puglianiello A, Campagnolo L, Farini D, Cipollone D, Russo MA, Siracusa G. Expression and role of PDGF-BB and PDGFR-beta during testis morphogenesis in the mouse embryo. 2004, J Cell Sci 117(Pt 7): 1151-1160.
28. Rakhit S, Pyne S, PyneNJ. The platelet-derived growth factor receptor stimulation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase in airway smooth muscle involves a G-protein-mediated tyrosine phosphorylation of Gab1. 2000,MolPharmacol58(2):413-420.
29. Kharbanda S, Saleem A, Yuan Z, Emoto Y, Prasad KV, Kufe D. Stimulation of human monocytes with macrophage colony-stimulating factor induces a Grb2-mediated association of the focal adhesion kinase pp125FAK and dynamin. 1995, Proc Natl Acad Sci USA92(13) :6132-6136.
30. Burridge K, Turner CE, Romer LH. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. 1992 J Cell Biol 119: 893- 903.
31. Frey MT, TsaiI Y, Russell TP, Hanks SK, Wang YL. Cellular responses to substrate topography: role of myosin II and focal adhesion kinase. 2006, Biophys J. 90(10): 3774-3782.
32. Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. Nat Cell Biol. 2000 May; 2(5):249-256.
33. Kallergi G, Agelaki S, Markomanolaki H, Georgoulias V, Stournaras C. Activation of FAK/PI3K/Rac1 signaling controls actin reorganization

and inhibits cell motility in human cancer cells. 2007, Cell Physiol Biochem 20(6): 977-986.

33. Kallergi G, Agelaki S, Markomanolaki H, Georgoulias V, Stournaras C. Activation of FAK/PI3K/Rac1 signaling controls actin reorganization and inhibits cell motility in human cancer cells. 2007, Cell Physiol Biochem 20(6): 977-986.
34. Ezratty EJ, Partridge MA, Gundersen GG. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. 2005, Nat Cell Biol 7(6):545-547.
35. Yoo J, Jeong MJ, Cho HJ, Oh ES, Han MY. Dynamin II interacts with syndecan-4, a regulator of focal adhesion and stress-fiber formation. 2005, Biochem Biophys Res Commun. 328(2): 424-431.
36. Cao H, Garcia F, McNiven MA. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. 1998, Mol Biol Cell 9: 2595 - 2609.
37. Gold ES, Underhill DM, Morrissette NS, GuoJ, McNiven MA, Aderem A. Dynamin2 is required for phagocytosis in macrophages. 1999, J Exp Med 190: 1849 - 1856.
38. Flanagan MD and Lin S. Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. 1980, J Biol Chem 255(3): 835-838.

사진부도 설명

Fig. 1 (A) Western blot of PI3K-p85 subunit, after immunoprecipitation (IP) of Dynamin II and MyosinII antibodies in NIH3T3 and Ras transformed NIH3T3 [NIH3T3(Ras)] cell lines. The histogram shows the intensity of PI3K-p85 subunit expression on DynaminII and MyosinII. The $*p<0.05$ versus 1 and 3; 1 and 3, NIH3T3cells; 2 and 4 NIH3T3(Ras) cells. (B) Westernblot (WB) of FAK-125, after immunoprecipitation (IP) of Dynamin II and Myosin II antibodies in NIH3T3 and [NIH3T3(Ras)] cell lines. The histogram shows the intensity of FAK-125 expression on Dynamin II and Myosin II. Data were represented as mean ± standard deviation of four separate cell preparations.

Fig. 2 Subcellular localization of Dynamin II-paxillin complex is increased and changed by treatment of PDGF at 30ng/ml. A-A2, resting cells; B-B2, PDGF stimulation for 30 min. Arrow heads indicate colocalization of Dynamin II and Paxillin. Scale bars, 5μm.

Fig. 3 Co-localization of Dynamin II and F-actin is restricted to narrow limits of rim in frontal and rear plasma membrane. A, FITC labeled phalloidin; B, rhodamin conjugated Dynamin II; C, merge image of A and B. Arrow heads indicate colocalization of Dynamin II and F-actin. Scale bars, 5μm.

Fig. 4 Immunoblotting of Dynamin II binding to Myosin II in NIH3T3 cells is treat with platelet-derived growth factor (PDGF), cytochalasin D. Lane 1, lysate of NIH3T3 cell; 2, stimulation of PDGF at 30ng/ml; 3, 100nM cytochalasin D; 4, PDGF plus cytochalasin D. The * $p<0.05$ versus 3 and 4.

사 진 부 도

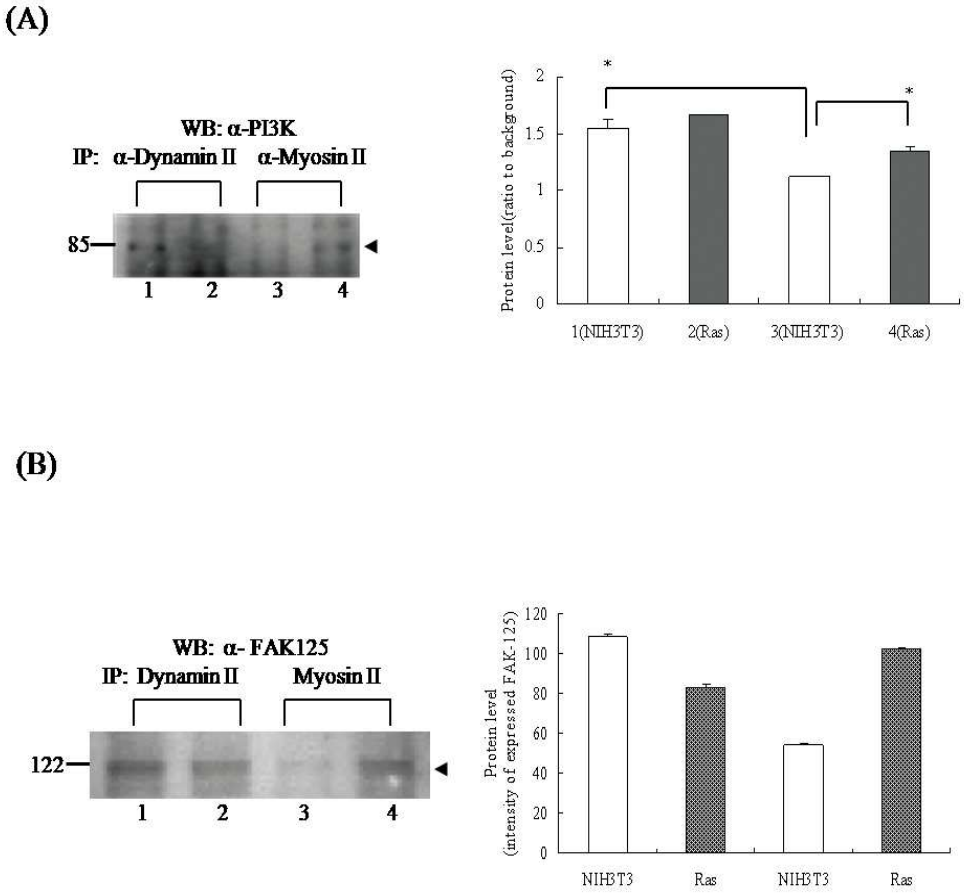

Figure 1. Western blot of PI3K-p85 subunit and FAK-125, after immunoprecipitation (IP) of Dynamin II and MyosinII antibodies in NIH3T3 and Ras transformed NIH3T3 [NIH3T3(Ras)] cell lines.

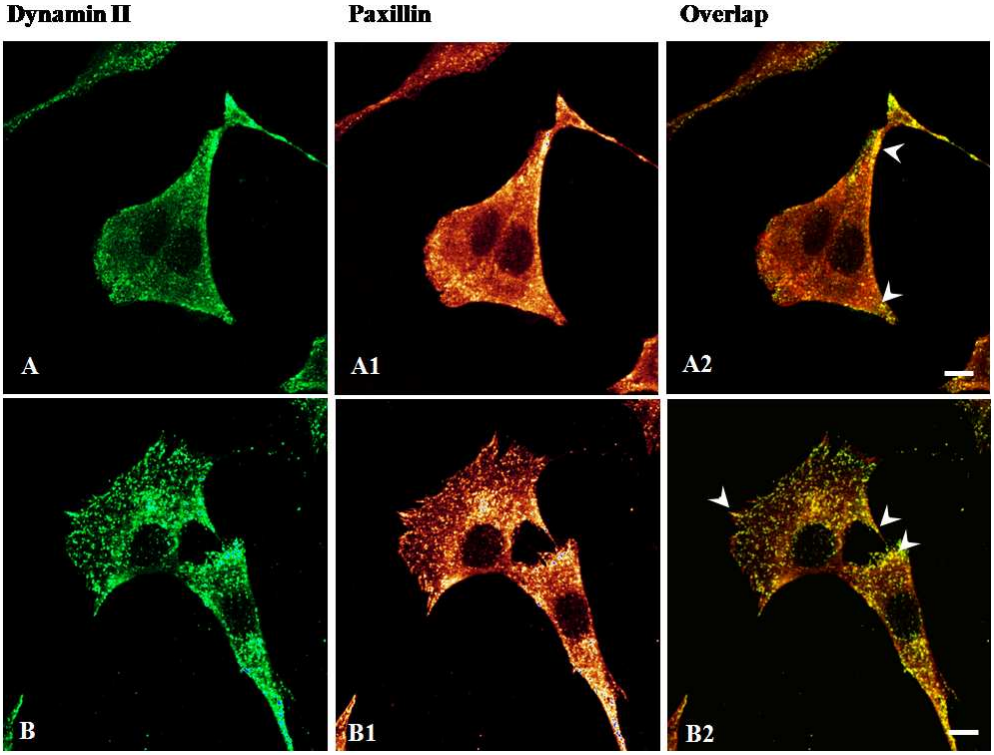

Figure 2. Subcellular localization of Dynamin II-paxillin complex.

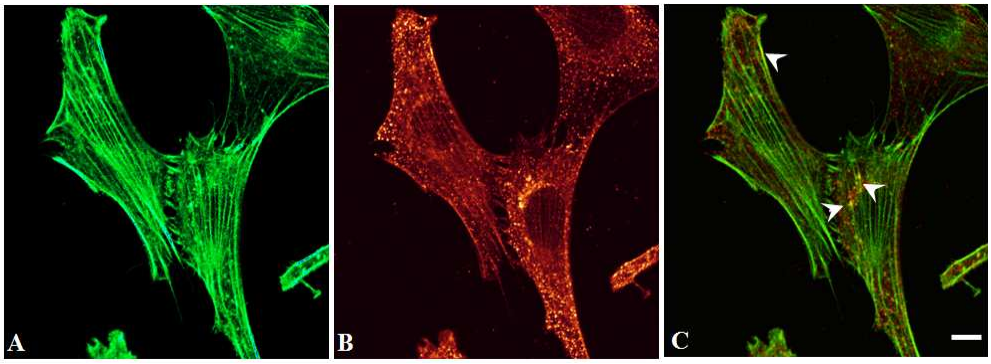

Figure 3. Co-localization of Dynamin II and F-actin.

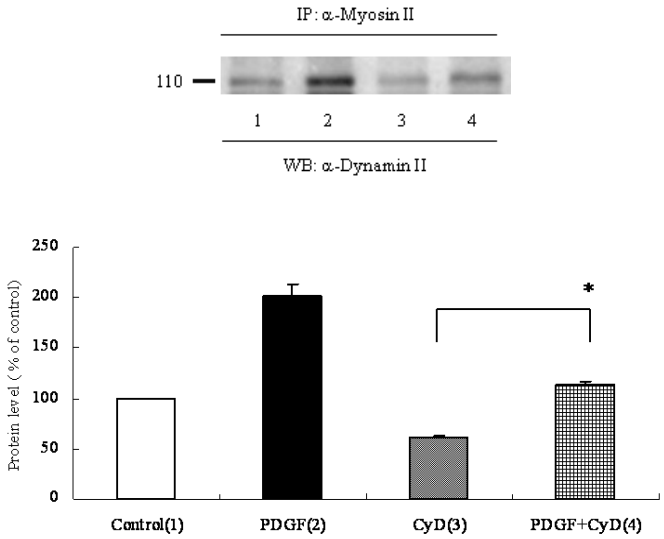

Figure 4. Western blotting of Dynamin II binding to Myosin II in NIH3T3 cells is treat with platelet-derived growth factor (PDGF), cytochalasin D.

저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20067372	과 정	박사
성 명	한글 : 김상렬 한문 : 金相烈 영문 Kim Sang-Yeol				
주 소	충북 음성군 금왕급 무극리 514-9 금왕제일치과의원				
연락처	E-mail : omfsurg@hanmail.net				
논문 제목	한글: NIH3T3세포 이동과정에서 Dynamin II의 기능				
	영문: The function of Dynamin II in NIH3T3 cell migration				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포・전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송・출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대( )

2009년 2월

저작자: 김 상 렬 (인)

조선대학교 총장 귀하