



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

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

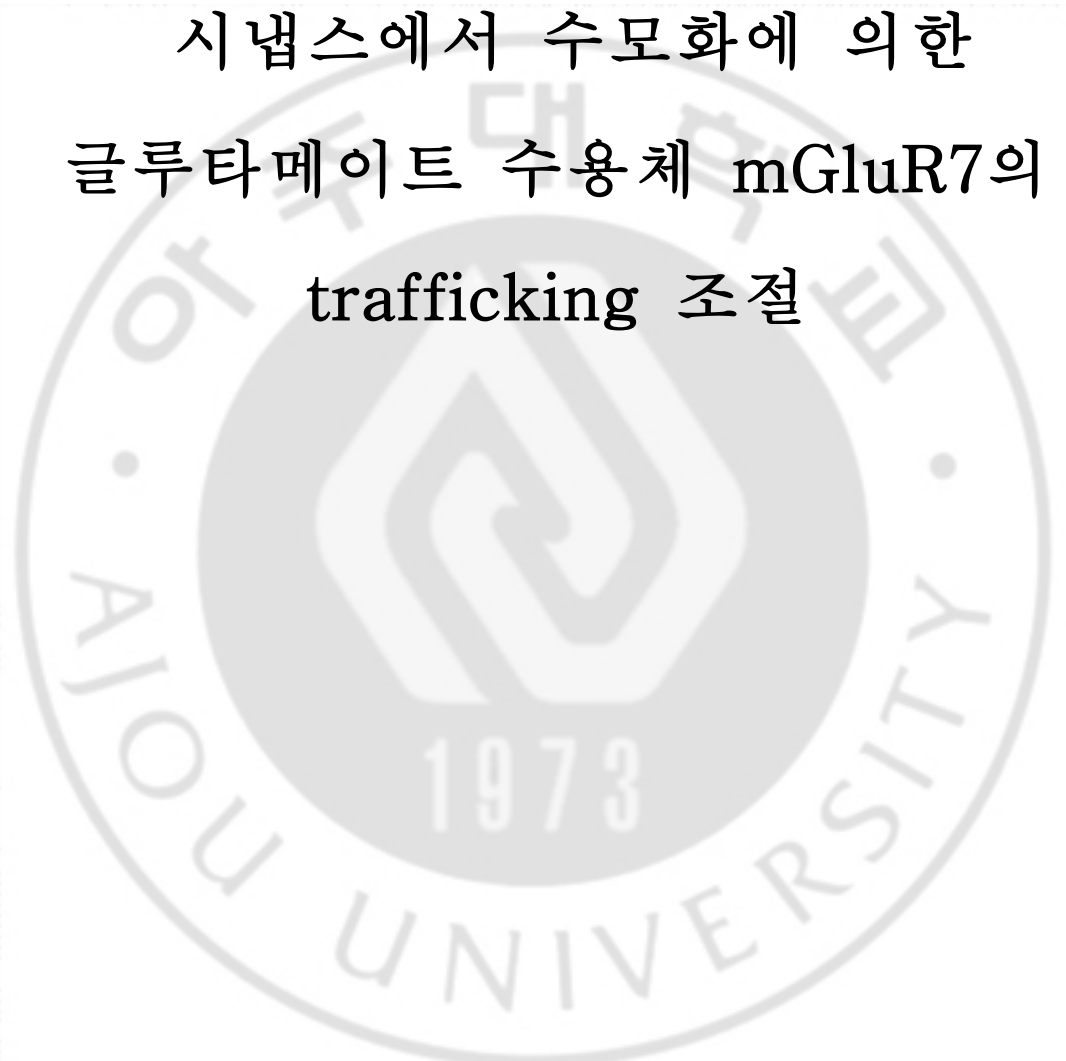
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학 석사학위 논문

시냅스에서 수모화에 의한  
글루타메이트 수용체 mGluR7의  
trafficking 조절



아주대학교 대학원

의생명과학과/신경과학전공

최 지 희

시냅스에서 수모화에 의한  
글루타메이트 수용체 mGluR7의  
trafficking 조절


지도교수 서 영 호

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함.

2014년 7월

최지희의 이학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 서영호 인 

심사위원 조은혜 인 

심사위원 이상윤 인 

아주대학교 대학원

2014년 6월 16일

## 시냅스에서 수모화에 의한 글루타메이트 수용체 mGluR7의 trafficking 조절

수모화 (SUMOylation) 반응은 단백질의 기능을 조절하여 생물체의 기능을 다양화시키는 전사 후 변형 (post-translational modification)의 한 종류로 수모(SUMO) 단백질이 기질 단백질에 결합하여 수모화 반응이 일어난 기질 단백질의 기능을 변화시키는 역할을 한다. 시냅스에서 수모화 반응이 일어나게 되면 시냅스 형성, axonal mRNA 수송, 이온채널 활성화도, 수용체의 세포내 유입이 조절된다. 시냅스에서 수모화 반응에 의해 수용체가 조절하여 시냅스를 조절한다는 보고가 많이 있지만 특히 최근에 흥분성 시냅스를 조절하는 수용체인 metabotropic glutamate receptor 7 (mGluR7) 수용체의 수모화 반응에 대한 연구가 진행되고 있다. 이전 보고들에 의하면 mGluR7 수용체의 수모화 반응은 mGluR7 C-말단의 라이신 889잔기에서 일어난다고 밝혀졌다. 하지만 *in vivo* 상태에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 일어나는 것의 여부는 아직 불분명한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 full-length mGluR7 수용체를 과발현시킨 HEK293T 세포에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 일어나는지에 대한 여부를 확인하고 뉴런세포에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응을 확인하고자 하였다. 먼저 full-length mGluR7 수용체의 수모화 반응을 확인하기 위해 HEK293T 세포에 수모 단백질과 full-length mGluR7 수용체를 같이 형질주입하여 면역침강법과 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 그 결과 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 일어나는 것을 발견하였다. 이와 함께 mGluR7 수용체가 SUMO-1 및 SUMO-2/3에 의해 수모화 반응이 일

어나는 것을 확인하였다. 또한 신경세포와 대뇌조직에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 일어나는지 확인하기 위해 면역침강법과 웨스턴 블로팅을 수행하여 mGluR7 수용체의 수모화 반응을 확인하였다. 또한, mGluR7 수용체의 수모화 반응의 역할을 조사하기 위하여 신경세포에 mGluR group III 수용체의 agonist인 L-AP4를 처리하여 mGluR7 수용체의 수모화 반응의 변화를 확인하였다. 그 결과 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 L-AP4에 의해 감소되는 것을 발견하였다. 이와 함께 신경세포에 mGluR7 과 mGluR7K889R을 과발현시킨 다음 L-AP4를 처리하여 탈수모화 반응을 유도한 후, 공초점 형광현미경을 통하여 mGluR7 수용체의 trafficking의 변화를 관찰하였다. 그 결과, L-AP4에 의해 mGluR7 수용체가 세포내로 유입되는 양이 증가하는 것을 발견하였다. 또한, mGluR7 수용체 수모화 반응이 mGluR7 수용체의 trafficking을 조절하는 인산화 반응과 관련이 있는지를 확인하기 위하여, mGluR7을 과발현시킨 HEK293T 세포에 PMA 약물을 이용해 인산화 반응을 활성화시킨 후 mGluR7 수용체의 수모화 반응의 변화를 조사하였다. 그 결과, mGluR7 수용체의 인산화 반응을 유도했을 때 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 증가하는 것을 발견하여 mGluR7 수용체의 인산화 반응이 mGluR7 수용체의 수모화 반응을 유도하는 것을 관찰하였다.

이러한 결과로, mGluR7 수용체의 수모화 반응이 mGluR7 수용체의 trafficking을 조절하는 것을 확인하였다.

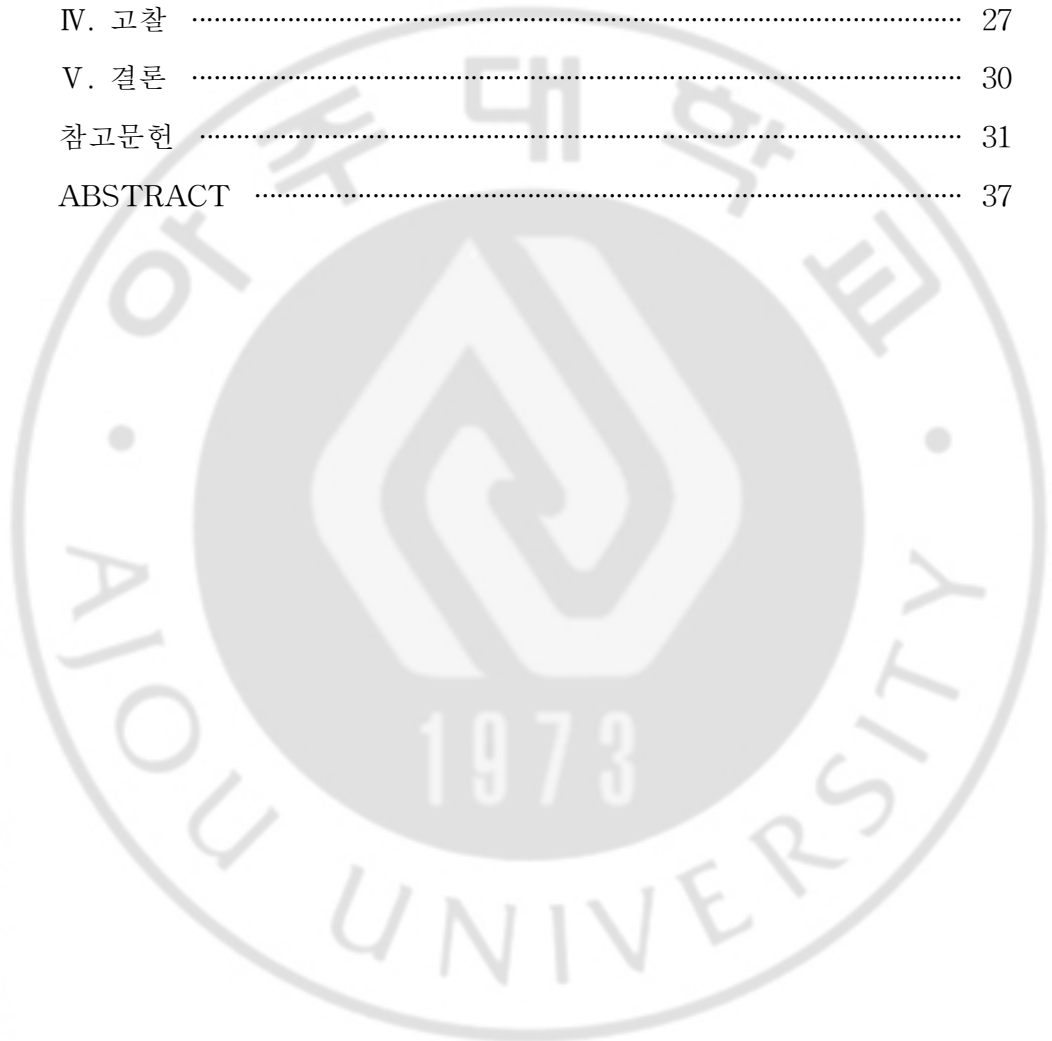
---

핵심어: 수모 단백질; 수모화 반응; mGluR7 수용체; 전사 후 변형 과정

# 차 례

국문요약 .....	i
차례 .....	iii
그림 차례 .....	v
약어 .....	vi
I. 서론 .....	1
A. 신경세포 .....	1
B. 글루타메이트 수용체 .....	1
C. mGluR7 수용체 .....	2
D. 전사 후 변형과정 .....	3
E. 수모화 반응 .....	4
F. 실험 목적 .....	5
II. 재료 및 방법 .....	8
A. 시약및 항체 .....	8
B. 세포 배양 .....	8
C. 형질주입 .....	9
D. 면역 침강법 .....	9
E. 웨스턴 블로팅 .....	10
F. Internalization assay .....	11
III. 결과 .....	12
A. mGluR7 수용체 C-말단의 라이신 889잔기에서 수모화 반응이 일어남 .....	12
B. SENP-1 에 의한 mGluR7 수용체의 수모화 반응 억제 .....	16
C. 대뇌조직에서 일어나는 mGluR7 수용체의 수모화 반응 .....	18

D. L-AP4 에 의해 유도되는 mGluR7 수용체의 탈수모화 반응 .....	20
E. mGluR7 수용체의 탈수모화 반응에 의한 trafficking 조절 ...	23
F. mGluR7 수용체의 인산화 반응과 수모화 반응 .....	25
IV. 고찰 .....	27
V. 결론 .....	30
참고문헌 .....	31
ABSTRACT .....	37





## 그림 차례

그림. 1. 수모화 반응 경로 .....	6
그림. 2. mGluR7 수용체를 과발현시킨 HEK293T 세포에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응은 mGluR7 C-말단의 라이신 889잔기에서 일어남 .....	12
그림. 3. mGluR7 수용체를 과발현시킨 HEK293T 세포에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응은 SUMO-1과 SUMO-2/3에 의해 일어남 .....	13
그림. 4. mGluR7 수용체를 과발현시킨 HEK293T 세포에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 SENP-1에 의해 감소됨 .....	15
그림. 5. 대뇌조직에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응은 NEM이 존재할 때 일어남 .....	17
그림. 6. 신경세포에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응은 L-AP4에 의해 감소됨 .....	19
그림. 7. 신경세포에서 mGluR7의 수용체가 mGluR7의 수용체의 탈수모화 반응에 의해 세포내로 유입되는 양이 증가됨 .....	21
그림. 8. mGluR7 수용체를 과발현시킨 HEK293T 세포에서 mGluR7 수용체가 PMA에 의해 증가됨 .....	23

## 약 어

mGluR7: metabotropic glutamate receptor 7

mGluR7K889R: a mutant lacking the SUMOylation consensus lysine

GluR6: kainate receptor 6

SUMO: small ubiquitin-like modifier

SEN1: sentrin/small ubiquitin-like modifier-specific protease

SEN1C603S: inactive point mutant SEN1 C603S

Ubc9: ubiquitin-conjugating 9

NEM: N-ethylmaleimide

# I. 서 론

## A. 신경세포(neuron)

신경세포는 신경계를 이루는 기본적 단위이며 뉴런이라고 불린다. 동물의 두뇌에는 약 100억개의 신경세포가 존재하는 것으로 알려져 있으며 신경세포는 다른 세포와는 다르게 신경세포들이 서로 연결되어 있다. 이 부분을 시냅스라고 부르며 신경세포는 시냅스를 통해 전기적, 화학적으로 신경전달물질을 전달함으로써 신호를 전달한다.

신경세포는 신경세포체, 축삭, 수상돌기로 구성되어 있다. 그 중 신경세포체에는 핵이 존재하며 축삭은 신호를 전달하는 기능을 수행하고 수상돌기는 축삭으로부터 전달된 신호를 받아들이는 기능을 한다. 또한 두개 이상의 신경세포가 서로 연결어 있는데 이 부분에서 전 시냅스의 축삭으로부터 방출된 신경전달물질이 후 시냅스로 받아들여 신호가 전달된다. 이 부분을 synapse cleft라고 부른다. 동물의 두뇌에는 수많은 신경이 존재하는데 역할과 형태에 따라 다양하다. 이러한 이유로 동물의 두뇌에 존재하는 신경의 돌연변이가 생기게 되면 기억과 학습에 문제가 발생하는 등 다양한 신경-정신병적 질병이 야기된다.

## B. 글루타메이트 수용체

글루타메이트 수용체 (glutamate receptor)는 신경세포의 막에 존재하는 transmembrane 수용체이며 신경조직에서 중요한 신경전달물질인 글루타메이트가 결합하여 시냅스의 기능을 조절하는 수용체이다. 글루타메이트

는 모든 글루타메이트 수용체에 결합하지만 다른 화학물질이 결합하게 되어 글루타메이트 수용체의 기능을 조절한다. 이러한 화학물질에 따라 글루타메이트 수용체는 통로형 글루탐산 수용체 (ionotropic glutamate receptor)와 대사형 글루탐산수용체 (metabotropic glutamate receptor)로 나누어진다. 먼저 통로형 글루탐산 수용체는 리간드-연관 이온 통로 (ligand-gated ion channel)이며 글루타메이트의 결합으로 인해 양이온 통로를 개폐하여 빠르게 신호를 전달하는 역할을 한다. 통로형 글루탐산 수용체는 글루타메이트뿐만 아니라 NMDA, AMPA, Kainate 에 의해 기능이 조절된다. 통로형 글루탐산 수용체의 종류에는 NMDA, AMPA, Kainate 수용체 등이 있다. 또 다른 글루타메이트 수용체인 대사형 글루탐산 수용체는 G protein-coupled 수용체이다. 대사형 글루탐산 수용체는 글루타메이트 뿐만아니라 무스카린성 아세틸콜린, 아드레날린 등에 의해 G 단백질과 공역하여 이노시폴린 지질대사회전의 촉진이나 고리형 AMP생산을 제어하는데 관여한다. 그리고 글루탐산 수용체는 8종류로 나뉘며 약리학적 특성이나 제2전령계에 따라 3개의 그룹으로 크게 구분한다. 이러한 글루타메이트 수용체는 감각신호전달이나 중추시냅스가소성에 중요한 역할을 한다.

### C. mGluR7 수용체

mGluR7 수용체는 대사형 글루탐산 수용체의 3개의 그룹중 그룹3에 포함된 수용체 중 하나이다. mGluR7 수용체는 주로 전 시냅스에 존재하며, mGluR7 수용체는 활성화되어 G 단백질을 과 결합한 후 phospholipase C를 통하여 PKC의존적으로 P/Q type voltage sensitive calcium 채널을

억제하여 시냅스를 조절하는 데에 관여한다. mGluR7 수용체의 C-말단에는 다른 단백질이 결합할 수 있는 많은 부분이 존재하고 있는데 특히 최근, 이러한 부분에 단백질들이 결합하여 신호전달을 조절하는 기전에 대해 다양한 연구가 진행되고 있다. 특히, PICK1 (protein interacting with C kinase 1) 단백질은 PKC $\alpha$ 와 결합하는 단백질로써 mGluR7 수용체에 결합한다고 알려져 있다 (Oussama 등, 2000; Kumlesh 등, 2001). 또한 최근에는 mGluR7 수용체 C-말단 라이신 889잔기에 수모 단백질이 결합하는 부위가 존재한다는 것이 보고되었다 (Zhongshu Tang 등, 2005; Kevin 등, 2011). 이전의 보고를 통해서 mGluR7 수용체가 변형되는 것을 확인할 수 있다. 또한 mGluR7 수용체는 시냅스의 기능, 가소성, 학습과 기억을 담당하는 역할을 하여 다양한 신경-정신병적 질환에서 중요한 기능을 담당한다고 알려져 있다.

#### **D. 전사 후 변형과정(Post-translational modification)**

전사 후 변형과정은 단백질이 일차적으로 합성된 후 화학적 그룹이나 지질, 당, polypeptide등이 일차 단백질에 붙어 변형되는 과정으로 기질 단백질을 변형시켜 단백질의 기능을 조절하는 것이다. 전사 후 변형과정이 일어나게 되면 단백질의 구조, 분포, 안정화, 기능을 조절할 뿐만 아니라 세포내의 신호전달 등을 조절한다. 전사 후 변형과정은 대표적으로 인산화 반응 (phosphorylation), 유비퀴틴화 반응 (ubiquitination), 수모화 반응 (sumoylation), 아세틸화 반응 (acetylation), poly(ADP-ribosyl)ation (PARylation)등이 알려져 있다. 특히 최근에는 전사 후 변형과정 중 하나인 수모화 반응의 중요성이 부각되고 있다 (Zhongshu Tang 등, 2005;

Kevin 등, 2011).

전사 후 변형과정은 단백질이 일차적으로 합성된 이후 기질 단백질을 변형시키는 과정으로 단백질의 기능을 조절하는 중요한 과정이다.

### E. 수모화 반응(SUMOylation)

수모화 반응은 전사 후 변형과정 중 하나이며 97개의 아미노산으로 이루어진 수모 단백질 (SUMO, small ubiquitin-related modifier)의 카르복실기 말단과 기질 단백질의 라이신 잔기에 이소펩타이드 결합이 형성되는 과정이다.

수모화 반응은 E1, E2, E3 효소에 의해 수모 단백질의 카르복실기 말단과 기질 단백질의 라이신 아미노산에 이소 펩타이드 결합이 형성되어 결합하는 과정이다 (그림 1). 이와 같은 수모화 반응이 생체 내에 일어나게 되면 단백질의 이동, 염색체의 기능 및 segregation을 조절, DNA 수리, 전사 능의 변화, 단백질간의 결합을 조절하거나, 세포내 단백질의 위치를 변화시키고 단백질을 활성화시키는 등 단백질을 다양하게 조절하는 것으로 알려졌다 (Gareau 와 Lima, 2010). 특히 최근, 글루타메이트 수용체가 수모화 반응에 의해 시냅스의 기능이 조절되는 것으로 보고되었다 (Martin 등, 2007; Wilkinson 등, 2010). 글루타메이트 수용체 중 하나인 mGluR7 수용체는 mGluR7 C-말단에 수모 단백질이 결합할 수 있는 부위가 존재하는 것이 보고되었고 (Wilkinson 등, 2010), 수모화는 시냅스를 조절하는 중요한 방법으로 대두되고 있다.

## F. 실험 목적

mGluR7 수용체는 흥분성 시냅스를 조절하는 글루타메이트 수용체 중 하나로 다양한 신경-정신병적 질병에 중요한 역할을 할뿐만 아니라 시냅스의 기능을 조절하여 학습과 기억에 중요한 역할을 한다. 이러한 mGluR7 수용체의 trafficking이 어떻게 조절되는지를 규명한다면 mGluR7 수용체로 인한 시냅스의 기능을 조절하는데 중요한 역할을 할 것이라고 판단되어 연구를 진행하였다. 글루타메이트 수용체를 조절하는 방법인 전사 후 변형과정으로 조절되는 과정에 관하여 연구를 진행하였다. 전사 후 변형과정은 생물체가 유전자의 기능을 다양화하기 위하여 전사된 후 단백질의 변형화를 통하여 단백질의 기능을 조절하는데, 글루타메이트 수용체가 전사 후 변형과정인 인산화/탈인산화 반응 뿐만 아니라 유비퀴틴화 반응, 수모화 반응, 팔미토산화 반응, 당류화 반응이 일어나 시냅스의 기능을 조절하는 것이 보고되었다. mGluR7 수용체의 trafficking을 조절하는 기전에는 전사 후 변형과정 중 하나인 인산화 반응 (phosphorylation)이 관여한다고 보고되었고 (Suh 등, 2008), 최근들어, 시냅스의 기능이 조절되는 기전으로 글루타메이트 수용체의 수모화 반응 (SUMOylation)에 관한 연구가 진행되고 있다 (Martin 과 Nishimune , 2007; K.A.Wikinson 등, 2008).

수모화 반응이란 수모 단백질이 기질 단백질에 결합하여 수모화된 단백질의 기능을 변화시키는 것으로 단백질이 수모화가 일어나면 세포내의 localization에 변화가 일어나거나 결합하는 단백질이 변화가 일어난다. 또한, 전사인자가 수모화가 일어나면 DNA 결합 능에 변화가 오거나 전사능에 변화가 유도되는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 이유로 생물체의 뇌에서 단백질의 수모화가 일어나면 뇌의 기능에도 변화를 줄 가능성이

있기 때문에 실험을 진행하였다.

글루타메이트 수용체인 mGluR7 수용체는 이전의 많은 보고에 의해 mGluR7 수용체 C-말단에 수모화 consensus motif를 갖고 있다는 것이 보고 되었으며 (Martin 과 Nishimune, 2007; K.A.Wikinson 등, 2008), 수모화 반응은 mGluR7 수용체의 기능을 변화시켜 우울증, 간질, 주의력 결핍장애등을 유발할 가능성이 있다고 판단하였다. mGluR7 수용체의 수모화 반응과 관련하여 연구를 진행한다면 관련 질환의 기전을 이해하는데 도움이 될 수 있을 것이라 기대되어 mGluR7 수용체의 수모화에 대한 연구를 진행하였다.



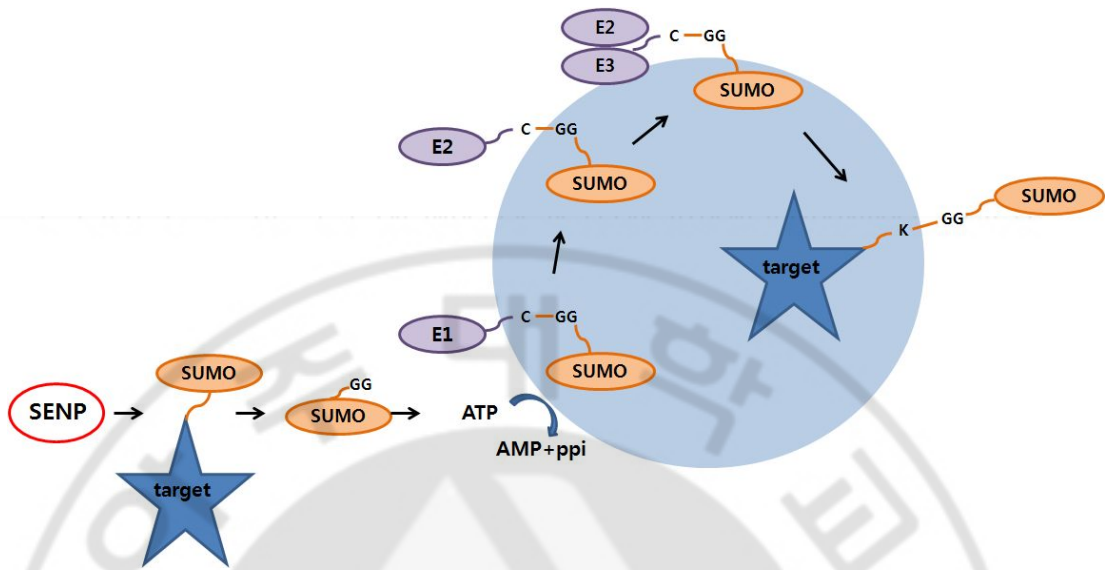


그림. 1. 수모화 반응 경로

(1) 수모화 반응이 일어나는데 필요한 수모 단백질을 얻기 위해 수모화되어 있던 수모 단백질은 SENP에 의해 잘려 glycine-glycine기가 노출이 되면서 활성화된다. (2) 활성화된 수모는 ATP 의존적으로 E1 효소와 thioester결합을 형성하면서 일어난다. (3) 활성화된 수모 단백질은 E2 conjugating 효소로 전달된다. (4) 전달된 수모는 E3효소를 통해 기질 단백질에 전달된다. (5) 수모화는 다시 SENP 효소에 의해 가역적으로 탈수모화가 일어나게 된다.

## II. 재료 및 방법

### A. 시약 및 항체

L-AP4 (group III mGluR-specific agonist) 는 tocris에서 구입하였다. Anti-mGluR7a antibody는 Upstate Biotechnology에서 구입하였다. rabbit mGluR7 Ser-862 phosphorylation-specific antibody 는 이전에 보고된 방법을 이용하여 사용하였다 (Suh 등, 2008). Mouse anti-myc (9E10) 과 mouse anti-tubulin 은 Sigma에서 구입하였고, rabbit anti-myc과 rabbit anti-SUMO-1 및 SUMO-2/3 는 cell signaling 에서 구입하였다. 그리고 anti - SUMO-1 (mouse monoclonal 21C7)은 Developmental Studies Hybridoma Bank에서 구입하였다. mouse anti-HA antibody는 Covance에서 구입하였다. protease inhibitor mixture는 Roche Applied Science에서 구입하였다. BCA protein assay reagent 는 Pierce에서 구입하였다. chemiluminescence substrate는 Thermo에서 구입하였다.

### B. 세포 배양

HEK293T 세포는 10% fetal bovine serum (FBS; HyClone)과 1 % L-glutamine 이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; sigma) 로 배양하였다. Primary hippocampal 신경세포와 cortical 신경 세포는 임신 18일된 Sprague-Dawley (SD) rat 의 embryos 에서 얻었다. 신경세포 배양은 임신 18일 된 SD rats에서 얻은 embryo 의 hippocampus 와 cortex 를 사용하였다. hippocampus 와 cortex 를

dissection한 후, trypsin 을 15 분 동안 처리하여 기계적인 dissociation 하였다. 그리고 L-glutamine 과 B-27 supplement (Invitrogen) 이 첨가된 Neurobasal medium (Invitrogen)에서 DIV14까지 키워 DIV13-15에 사용하였다.

### C. 형질주입

HEK293T 세포는 60 mm dish에 80 % 차도록 배양 한 후 lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 제품 설명서에 따라 myc-mGluR7a, myc-mGluR7K889R, HA-SUMO-1, SUMO-2/3, Ubc9을 형질주입 하여 과발현 시켰다. 혈청이 들어 있지 않은 배지를 이용하여 DNA와 lipofectamine 2000을 각각 다른 튜브에 넣어 5분간 인큐베이션 하였다. 각각의 튜브를 합쳐 20분 동안 인큐베이션 하여 잘 섞은 후 세포 배양된 60 mm dish에 넣어 36시간 동안 형질주입 하여 발현 시켰다.

### D. 면역침강법

세포는 1X PBS로 배지를 세척하여 제거하고 1% TX, 0.1 % SDS TNE버퍼를 이용하여 용해하였다. 용해액을 sepharose CL4B 를 이용하여 4 °C에서 1 시간 동안 pre-clearing 한 후, 상층액을 얻어 정량을 하였다. 동일한 양의 단백질에 0.5~1 ug의 mouse anti-myc (9E10) antibody, rabbit anti-mGluR7a, mouse monoclonal anti-SUMO-1

(21C7) antibody 를 넣어 4 °C에서 1 시간 동안 incubation 하였다. 그 후, 20 µl 의 protein G-agarose beads (Ge healthcare), protein A-agarose beads (Sigma) 을 넣어 4 °C에서 3시간 동안 incubation 하였다. 용해버퍼를 이용하여 4°C에서 3000 RPM으로 1분동안 bead를 다룬시켜 3번 세척하였다. 세척 후 2X 샘플버퍼를 넣어 37 °C에 20분, 80 °C에서 3분 동안 incubation하였다.

#### E. 웨스턴 블로팅

쥐의 대뇌조직 또는 세포를 용해버퍼 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, protease inhibitor mixture, 20 mM NEM)으로 용해한 후, 4 °C에서 30분 동안 incubation한다. 용해액을 16,000 g에 원심분리하여 상층액을 얻었다. 그 후 BCA protein assay reagent를 이용하여 단백질의 양을 정량하였다. 단백질은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)을 이용해 분리한 후, polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes으로 옮겼다. 그 후, mouse anti-myc (9E10), rabbit anti-myc, rabbit anti-SUMO-1 and SUMO-2/3, mouse monoclonal anti-SUMO-1, mouse anti- HA, rabbit anti-mGluR7a, mGluR7 Ser-862 phosphorylation-specific antibody, mouse anti-tubulin을 4 °C에서 한밤 동안 incubation 했다. 그리고 membrane을 TBS-T buffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % Tween-20 으로 세척 한 후, peroxidase-conjugated secondary antibodies에 incubation한 다음, chemiluminescence substrate를 사용하여 band를 확인 하였다.

## F. Internalization assay

형질주입된 primary hippocampal 신경세포에 mouse anti-myc (9E10) antibody로 labeling하고 37 °C에서 15분동안 incubation 하였다. 신경세포를 4 % PFA/4 % sucrose로 고정한 후 Alexa-Fluor 568 goat anti-mouse IgG antibody로 30분간 염색하였다. 신경세포를 0.25 % Triton X-100/PBS로 permeabilization한 후 10 % Normal Goat Serum으로 1시간 blocking한 후 Alexa-Fluor 488 goat anti-mouse IgG antibody로 30분간 염색하였다. 신경세포를 mounting한 후 공초점 형광현미경을 이용하여 세포내로 유입된 수용체의 양을 확인하였다.

### Ⅲ. 결과

#### A. mGluR7 수용체 C-말단의 라이신 889잔기에서 수모화가 일어남

이전 보고에서, mGluR7 수용체의 수모화가 mGluR7 C-말단의 라이신 889잔기에서 일어난다는 것이 보고되었다. 수모화 반응은 수모화된 단백질의 기능을 변화시키는 역할을 함으로 글루타메이트 수용체인 mGluR7 수용체의 수모화가 일어나게 되어 mGluR7 수용체의 trafficking 이 조절되는지 조사하였다. 먼저, mGluR7 수용체의 수모화 반응이 일어나는지를 확인하기 위해서, HEK293T 세포에 mGluR7, mGluR7K889R, SUMO-1, SUMO-2/3, E2 enzyme인 Ubc9를 같이 형질주입 하였다. 각각의 발현을 쉽게 확인하기 위해서, 클로닝을 하여 mGluR7과 mGluR7K889R 에 myc tag을 달아서 myc-mGluR7, myc-mGluR7K889R 을 제작하였고, SUMO-1과 SUMO-2/3에 HA tag을 달아서 HA-SUMO-1과 HA-SUMO-2/3을 제작하였고, FLAG tag을 달아서 FLAG-SENP1과 FLAG-SENP1을 제작하였다. 또한 mGluR7 수용체 C-말단의 라이신 889잔기에서 수모화가 일어나는 부위를 site-directed mutagenesis 방법으로 클로닝하여 수모화가 될 수 없는 돌연변이인 mGluR7K889R 돌연변이를 만들어 함께 형질주입 하였다. 형질주입 된 세포를 면역침강법과 웨스턴 블로팅을 수행하여 mGluR7의 수모화 여부를 조사하였다. 그 결과 mGluR7 수용체의 수모화가 mGluR7, SUMO, Ubc9 이 함께 형질주입 되었을 때 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 일어나는 것을 확인하였다. 반면 돌연변이인 mGluR7K889R에서는 mGluR7 수용체의 수모화가 일어나지 않았다 (그림2).

수모 단백질은 서열 유사성에 따라 SUMO-1과 SUMO-2/3 단백질로

나누어지는데 어떤 종류의 수모 단백질에 의해 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 일어나는지에 대해 조사하기 위해서, mGluR7을 과발현시킨 HEK293T 세포를 면역침강법과 웨스턴 블로팅을 수행하여 조사하였다. 실험을 통해 확인해본 결과, mGluR7 수용체의 수모화 반응이 SUMO-1 과 SUMO-2/3 단백질에 의해 일어나는 것을 확인하였다(그림 2, 3).



myc-mGluR7	+	+	-	-	-
myc-mGluR7 K889R	-	-	+	-	-
myc-GluR6	-	-	-	+	+
HA-SUMO3	-	+	+	-	+
Ubc9	-	+	+	-	+

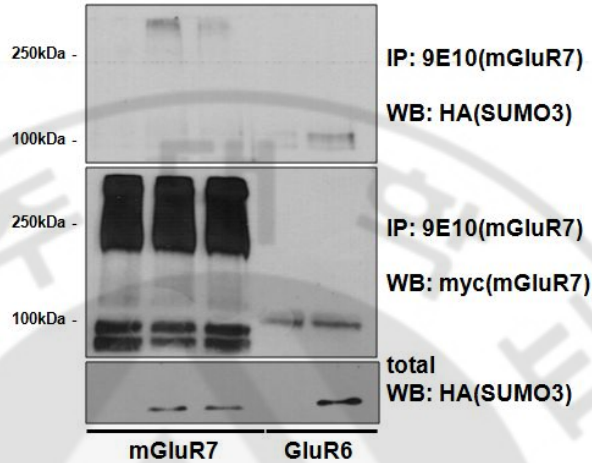


그림. 2. mGluR7 수용체를 과발현시킨 HEK293T 세포에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응은 mGluR7-말단의 라이신 889잔기에서 일어남.

HEK293T 세포에 myc-mGluR7, myc-mGluR7K889R (수모화 반응이 일어나는 라이신잔기가 결핍된 돌연변이), myc-GluR6, HA-SUMO-2/3, Ubc9을 같이 형질주입 시켰다. 1 % TX, 0.1 % SDS TNE 버퍼로 용해하여 4 °C에서 30분 동안 incubation 한 후 4 °C를 유지하여 16,000 g 로 15분 동안 원심분리하였다. 그리고 myc 항체로 면역침강 방법을 수행하여 HA 항체로 웨스턴 블로팅을 수행하여 mGluR7 수용체가 수모화 반응이 일어나는지 여부를 확인하였다.



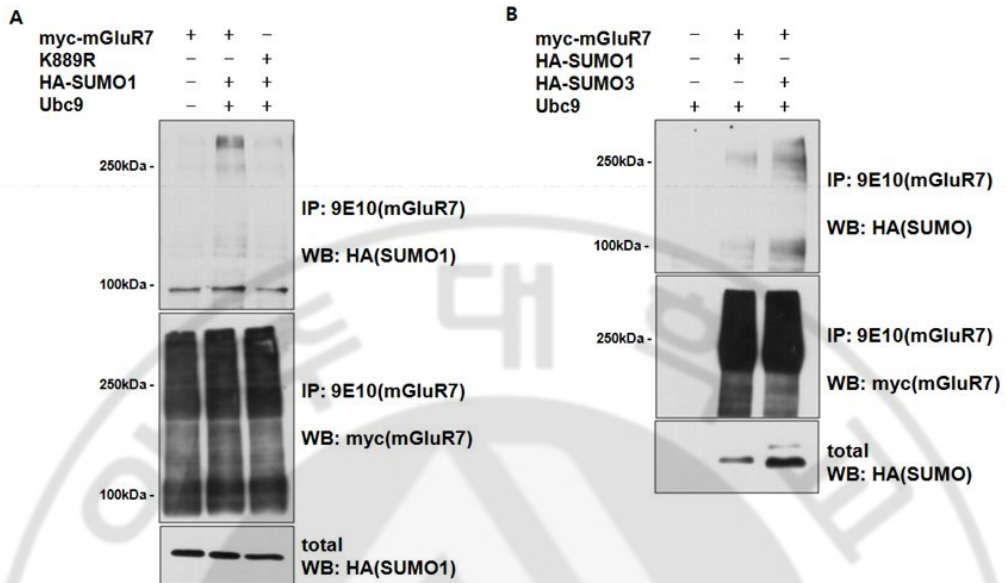


그림. 3. mGluR7 수용체를 과발현시킨 HEK293T 세포에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응은 SUMO-1과 SUMO-2/3에 의해 일어남.

SUMO-1, SUMO-2/3 단백질에 의한 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 일어나는지를 조사하기 위해서 HEK293T 세포에 myc-mGluR7, myc-mGluR7K889R, HA-SUMO-1, HA-SUMO-2/3, Ubc9을 같이 형질 주입 시켰다. 1 % TX, 0.1 % SDS TNE 버퍼로 용해하여 4 °C에서 30분 동안 incubation 한 후 4 °C를 유지하여 16,000 g 로 15분동안 원심분리하였다. 그리고 myc 항체로 면역침강 방법을 수행하여 HA 항체로 웨스턴 블로팅을 수행하여 mGluR7 수용체가 수모화 반응이 일어나는지 여부를 확인하였다.

## B. SENP-1에 의한 mGluR7 수용체의 수모화 반응 억제

수모화 반응이 일어나는데 필요한 수모 단백질은 새로 합성을 하거나 수모화되어 있는 수모 단백질을 기질 단백질로부터 가져와야 한다. 기질 단백질로부터 수모를 가져오기 위해서, 수모 단백질과 기질 단백질 사이의 isopeptide 결합을 절단해야 하는데 이 때 SENP라는 절단효소가 필요하다. mGluR7 수용체의 수모화 반응이 일어나는지 재확인 하기 위해서, 절단효소인 SENP로 인해 탈수모화 (deSUMOylation)반응이 일어나는지 조사했다. HEK293T 세포에 수모화 반응이 일어날 수 있도록 mGluR7을 형질주입하고 또한, SENP을 함께 형질주입하여 수모화된 mGluR7 수용체가 SENP에 의해 탈수모화 반응이 일어나는지를 관찰하였다. 그 결과, 절단효소인 SENP에 의해 mGluR7 수용체가 탈수모화 반응이 일어나는 것을 관찰하였다. 또한, SENP가 절단효소의 역할을 할 수 없도록 클로닝하여 제작한 catalytic inactive domain (SENPC603S) 돌연변이를 제작하여 확인했을 때, SENP에 의한 mGluR7 수용체의 탈수모화 반응과 비교하여 SENPC603S에 의한 mGluR7 수용체의 탈수모화 반응이 억제 되는 것을 확인하였다. 그림 4의 실험을 통해, mGluR7 수용체의 수모화 반응이 일어나는 것을 명확히 확인하였다.

myc-mGluR7	-	+	+	+	+
HA-SUMO3	+	-	+	+	+
Ubc9	-	-	+	+	+
FLAG-SENP1	-	-	-	+	-
FLAG-SENPC603S	-	-	-	-	+

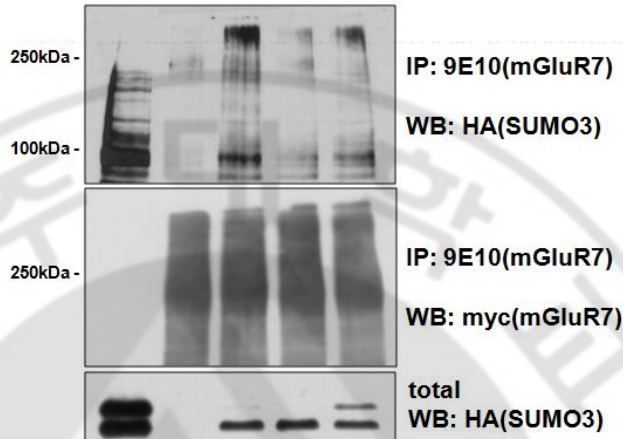


그림. 4. mGluR7 수용체를 과발현시킨 HEK293T 세포에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 SENP-1에 의해 감소됨.

mGluR7 수용체의 수모화 반응이 SENP (SUMO-specific protease)에 의해서 감소되는지 여부를 조사하기 위하여 HEK293T 세포에 myc-mGluR7, myc-mGluR7K889R, HA-SUMO-2/3, Ubc9, FLAG-SENP1, FLAG-SENPC603S (catalytic inactive domain)를 같이 형질주입 시켰다. 1 % TX, 0.1 % SDS TNE 버퍼로 용해하여 4 °C에서 30분동안 incubation 한 후 4 °C를 유지하여 16,000 g 로 15분동안 원심분리하였다. 그리고 myc 항체로 면역침강 방법을 수행하여 HA 항체로 웨스턴 블로팅을 수행하여 mGluR7 수용체가 수모화 반응이 일어나는지 여부를 확인하였다.

### C. 대뇌조직에서 일어나는 mGluR7 수용체의 수모화 반응

mGluR7 수용체가 과발현된 HEK293T 세포에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 mGluR7 C-말단의 라이신 889잔기에서 일어나는 것을 확인하였으므로, mGluR7 수용체의 trafficking이 수모화 반응에 의해 조절되는 가능성을 확인하는 실험을 진행하였다. 먼저, mGluR7 수용체가 과발현시킨 조건이 아닌 신경세포에서 endogenous mGluR7 수용체가 수모화 반응이 일어나는지 조사하기 위해 쥐의 대뇌를 추출하여 1 % TX, 0.1 % SDS TNE버퍼로 대뇌조직을 용해하여 용해액을 얻었다. 그 후 용해액을 이용하여 면역침강법과 웨스턴블로팅을 통하여 확인해본 결과, 대뇌조직에서도 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 일어난다는 것을 확인 하였다 (그림 5). 또한, cysteine isopeptidase inhibitor로써 SENP의 역할을 억제하는 물질인 NEM을 lysis buffer에 첨가하여 면역침강법과 웨스턴블로팅 수행하였다. 그 결과, NEM이 첨가된 용해버퍼로 용해했을때 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 확인되었지만 NEM이 첨가되지 않은 용해버퍼로 용해했을때에는 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 확인되지 않았다. mGluR7 수용체의 수모화 반응은 NEM이 있을 때 일어나는 것을 확인할 수 있었다(그림 5 B).

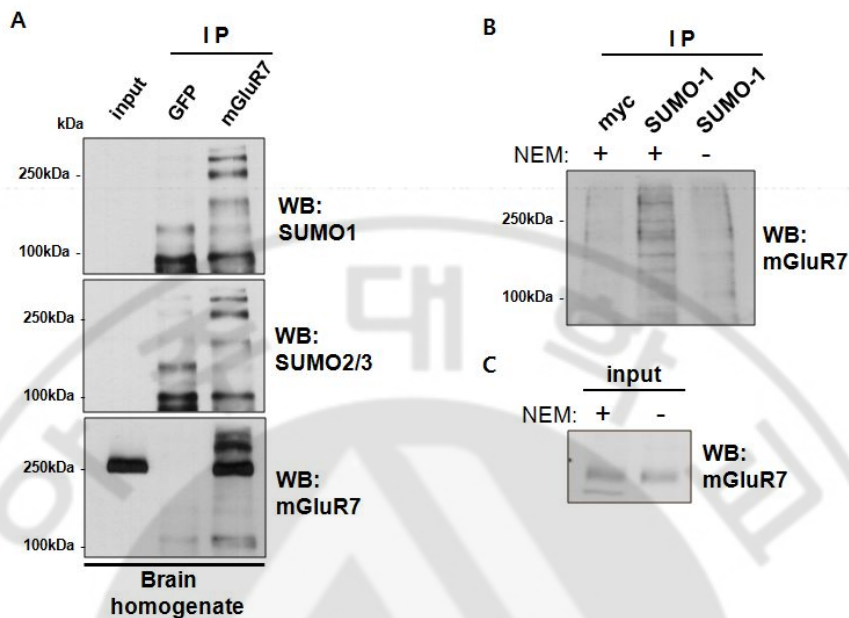


그림. 5. 대뇌조직에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응은 NEM이 존재할 때 일어남.

쥐에서 얻은 대뇌조직을 1% TX, 0.1% SDS TNE 버퍼를 이용하여 용해하여 4°C에 30분동안 incubation 한 후 4°C를 유지하여 16,000 g 로 15분동안 원심분리하였다. 용해액을 얻어 mGluR7 항체로 면역침강법을 수행하여 SUMO-1, SUMO-2/3 항체로 웨스턴블로팅하였다 (A). 20uM NEM이 첨가된 1% TX, 0.1% SDS TNE로 용해하여 얻은 용해액을 SUMO-1 항체로 면역침강법을 수행하여 mGluR7 항체로 웨스턴 블로팅하였다 (B,C).

#### D. L-AP4 에 의해 유도되는 mGluR7 수용체의 탈수모화 반응

쥐의 대뇌에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 일어나는 것을 확인하였기 때문에, mGluR7 수용체의 수모화 반응의 역할을 조사하기 위해 연구를 진행하였다. mGluR7 수용체의 trafficking을 조절하는 기작을 확인하기 위해 쥐에서 얻은 신경세포에 mGluR7 수용체의 agonist인 L-AP4를 처리한 후 면역침강법과 웨스턴 블로팅을 수행하여 mGluR7 수용체의 수모화 반응을 관찰하였다. 그 결과, 신경세포에 400  $\mu$ M L-AP4를 처리하였을 때 mGluR7 수용체의 탈수모화 반응이 일어나는 것을 확인하였다 (그림 6). 또한 mGluR7 수용체의 trafficking에 조절하는 탈인산화 (dephosphorylation) 반응을 mGluR7 수용체의 수모화 반응과 같이 관찰하였을 때, 탈수모화 반응이 탈인산화 반응과 같이 일어나는 것을 발견하였다. 또한, 이전 보고에 의하면 mGluR7 수용체의 탈인산화 반응은 mGluR7 수용체를 세포내로 유입시킨다고 보고되어 (Suh 등, 2008), mGluR7 수용체의 수모화 반응과 인산화 반응이 같이 일어나 mGluR7 수용체의 trafficking을 조절할 것이라고 추측하였다.

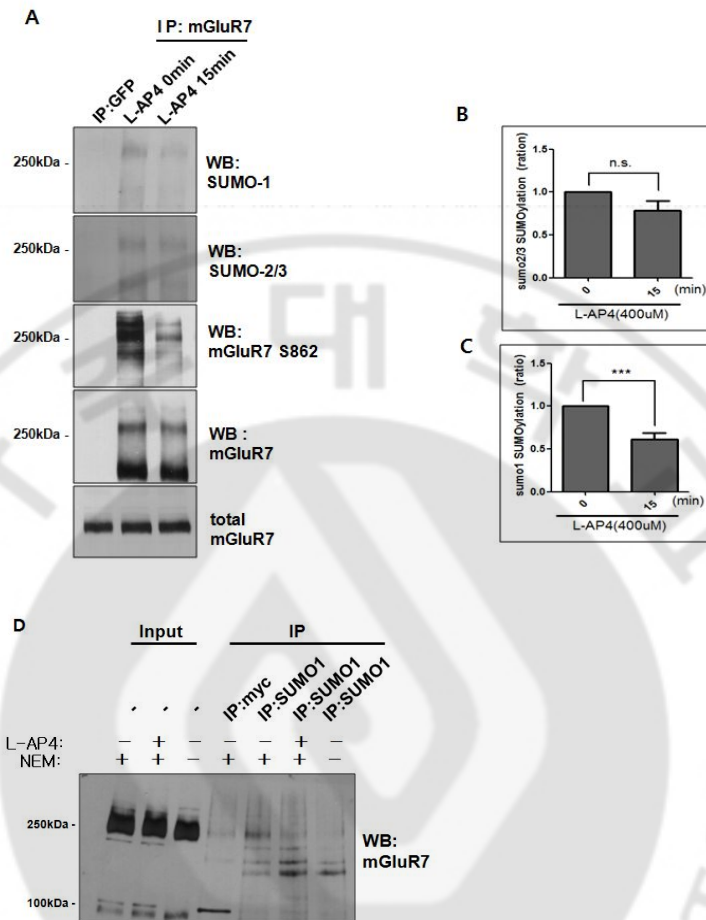


그림. 6. 신경세포에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응은 L-AP4에 의해 감소됨.

쥐에서 얻은 신경세포에 400uM L-AP4를 15분 동안 처리한 후 1 X PBS로 세척하여 실험을 수행하였다. 1 % TX, 0.1% SDS TNE 버퍼를 이용해 용해하여 4°C에 30분동안 incubation 한 후 4°C를 유지하여 16,000 g로 15분동안 원심분리하였다. 용해액을 얻어 mGluR7 항체로 면역침강법을 수행하여 SUMO-1, SUMO-2/3, mGluR7-S862, mGluR7 항체로 웨스턴 블로팅하였다 (A). (B,C) 그래프는 Graghpad 프로그램을 사용하여 나

타내었다. means  $\pm$  SEM; \*\*\* $p < 0.001$ , n.s indicated not significant. (D) 용해액을 얻어 SUMO-1 항체로 면역침강법을 수행하여 mGluR7 항체로 웨스턴 블로팅하였다.





## E. mGluR7 수용체의 탈수모화 반응에 의한 trafficking 조절

mGluR7 수용체는 L-AP4에 의하여 탈수모화 반응이 일어나는데, 탈수모화 반응이 mGluR7 수용체를 세포내로 유입시키는지 확인하였다. 먼저 mGluR7, mGluR7K889R를 과발현시킨 신경세포에 L-AP4를 처리한 후 internalization assay를 수행하여 공초점 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과, mGluR7 수용체가 과발현된 신경세포는 L-AP4에 의해 탈수모화 반응이 일어나 mGluR7 수용체가 세포내로 유입되는 양이 증가하였음을 확인하였다 (그림 7). 또한, mGluR7K889R 수용체가 과발현된 신경세포에서도 세포내로 유입되는 mGluR7 수용체의 양이 증가하는 것을 관찰하였다 (그림 7). 이러한 결과로 보아 mGluR7 수용체의 trafficking이 수모화 반응에 의해 조절되는 것을 확인할 수 있다.

**A**

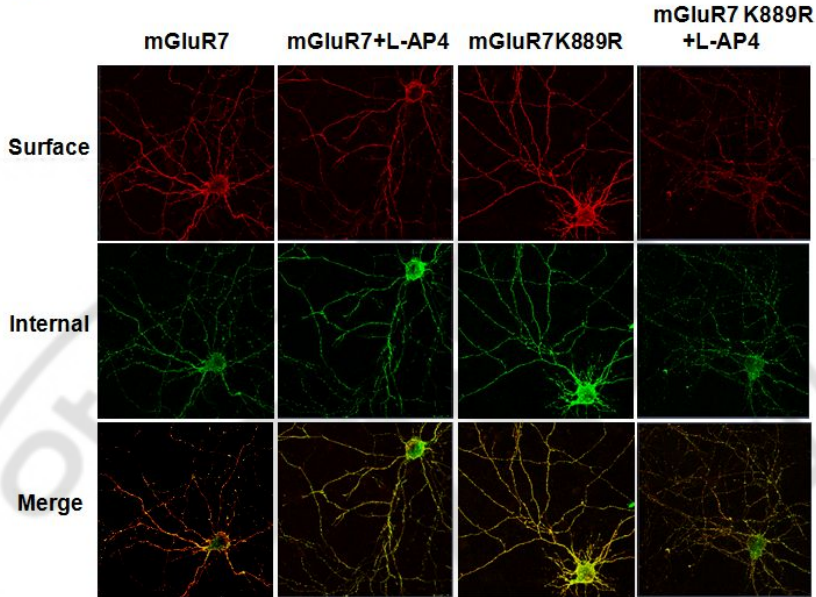


그림. 7. 신경세포에서 mGluR7 수용체가 mGluR7의 수용체의 탈수모화 반응에 의해 세포내로 유입되는 양이 증가함.

쥐에서 얻은 신경세포에 mGluR7을 과발현 시킨 후 endocytosis를 측정할수 있는 internalization assay를 수행하였다. 뉴런세포는 400uM L-AP4를 15분 동안 처리한조건, mGluR7-K889R를 과발현 시킨 조건 등, 각각의 조건에서 mGluR7수용체를 염색한 후 공초점 형광현미경(LSM 510)을 이용하여 실험하였다. red (빨강)는 신경세포의 표면에 있는 mGluR7수용체를 나타내고, green(녹색)은 뉴런세포의 표면에서 세포안으로 유입된 mGluR7수용체를 나타낸다.

## F. mGluR7 수용체의 인산화 반응과 수모화 반응

그림 6에서 확인한 바에 의하면 L-AP4에 의해 mGluR7 수용체가 탈수모화 반응과 탈인산화 반응이 같이 일어나는 것을 확인하였다. mGluR7의 탈수모화 반응과 탈인산화 반응의 연관성이 있다는 것을 예측하였다. mGluR7 수용체의 탈수모화 반응과 탈인산화 반응의 연관성을 확인하기 위해, HEK293T 세포에 mGluR7 수용체를 과발현 시킨 후, 인산화 반응의 활성자인 PMA를 처리하여 면역침강법과 웨스턴 블로팅 실험을 통해 mGluR7 수용체에서 발생하는 수모화 반응의 변화를 관찰하였다 (그림 8). 그 결과, PMA를 처리하여 인산화 반응을 유도하면 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 증가 하는 것을 발견하였다.

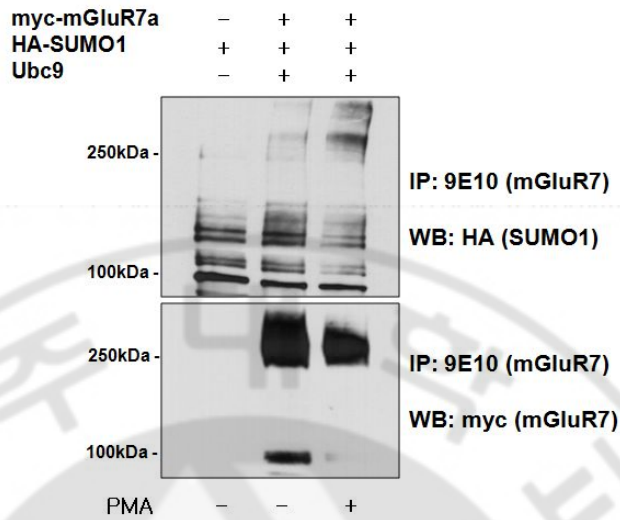


그림. 8. mGluR7 수용체를 과발현시킨 HEK293T 세포에서 mGluR7 수용체가 PMA에 의해 증가함

HEK293T 세포에 myc-mGluR7, HA-SUMO-2/3, Ubc9을 같이 형질주입시킨 후 1 uM PMA (phosphorylation activator)를 처리하였다. 1 % TX, 0.1 % SDS TNE 버퍼로 용해하여 4 °C에서 30분동안 incubation 한 후 4 °C를 유지하여 16,000 g 로 15분동안 원심분리하였다. 그리고 myc 항체로 면역침강 방법을 수행하여 HA 항체로 웨스턴 블로팅을 수행하여 mGluR7 수용체가 수모화 반응이 일어나는지 여부를 확인하였다.

## IV. 고찰

글루타메이스 수용체는 시냅스의 기능과 가소성 그리고 학습과 기억을 담당하는 역할을 하며 또한 신경-정신병적 질환에서 중요한 기능을 담당함이 알려져 있다. 이러한 다양한 기능을 조절하기 위하여 글루타메이트 수용체는 인산화/탈인산화 반응 뿐아니라 수모화 반응, 팔미토산화 반응, 당류화 반응 등과 같은 전사 후 변형과정을 통해 그 기능이 조절된다. 그 중 특히 최근에는 전사 후 변형과정을 통해 조절되는 기작의 하나인 수모화 반응이 시냅스의 기능을 조절한다고 보고되었다. 글루타메이트 수용체 중 하나인 Kainate 수용체 GluR6 수용체는 수모화 반응에 의해 GluR6 수용체의 trafficking이 조절된다고 보고되었고 (Stephane Martin<sup>1</sup> 등, 2007), 또한 수모화 반응의 타깃 단백질로 mGluR7 수용체도 알려지고 있다 (Zhongshu Tang 등, 2005; Kevin 등, 2011). 이전 보고에 의하여 mGluR7 수용체 C-말단의 라이신 889잔기에서 수모화 반응이 일어나는 것이 밝혀졌다 (Zhongshu Tang 등, 2005; Kevin 등, 2011). 따라서 수모화 반응에 의한 mGluR7 수용체의 trafficking이 조절될 수 있음을 예측할 수 있었고, mGluR7 수용체의 수모화 반응이 *in vitro assay* 를 통해 확인되었지만 *in vivo* 상태에서의 mGluR7 수용체가 수모화 반응 여부는 아직 불분명하여 본 연구를 진행하였다.

mGluR7 수용체의 수모화 반응을 확인하기 위하여 HEK293T 세포에 full-length mGluR7, SUMO, Ubc을 과발현 시킨 후, 면역침강법과 웨스턴 블로팅으로 mGluR7 수용체의 수모화 반응을 확인하였다. mGluR7 수용체의 수모화 반응은 mGluR7수용체 C-말단의 라이신 889잔기에서 일어났다. 또한, 수모화 반응의 과정에는 E1, E2, E3 가 필요한데, E2만 있을 때에도 수모화 반응이 일어나는 것을 확인하였다. 이 결과로 보아 수모화

반응이 일어나기 위해서는 E2가 특이적으로 작용하는 것을 알 수 있었다.

수모 단백질은 서열 유사성에 의해 SUMO-1과 SUMO-2/3 단백질로 나누어지는데, mGluR7 수용체의 수모화 반응은 SUMO-1과 SUMO-2/3 단백질 둘 모두에 의해 일어나는 것을 확인하였다. 또한 대뇌조직의 mGluR7 수용체에서도 SUMO-1과 SUMO-2/3 단백질에 의해 수모화 반응이 일어났다. 이러한 결과로 보아 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 시냅스에서 중요한 역할을 할 것으로 추측된다.

따라서, mGluR7 수용체의 역할을 확인하기 위해 mGluR7 수용체의 agonist 인 L-AP4를 처리하여 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 변화하는지를 관찰했다. SUMO-1 단백질에 의해 일어난 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 감소한 반면, SUMO-2/3 단백질에 의해 일어난 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 변화가 없음을 확인하였다. 또한, L-AP4에 의한 mGluR7의 탈수모화 반응이 mGluR7 수용체의 세포내 유입을 증가시켰다. 이는 수모화 반응이 mGluR7의 trafficking을 조절하는 것을 예측할 수 있다.

또한, mGluR7 수용체의 탈수모화 반응이 일어날 때, 탈인산화 반응도 일어나는 것을 관찰하였는데 (그림 6), 이는 mGluR7 수용체의 수모화 반응과 인산화 반응이 관련되어 있다고 추측되어 연구를 진행하였다. HEK293T 세포에 mGluR7을 과발현 시킨 후, 인산화 반응의 활성인자인 PMA를 처리하여 면연침강법과 웨스턴 블로팅으로 mGluR7의 수모화 반응을 확인하였을 때, mGluR7 수용체의 수모화 반응이 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과로 보아 인산화 반응에 의해 수모화 반응이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이전 보고들과 본 연구의 결과는 mGluR7의 수모화 반응이 mGluR7 수용체의 trafficking을 조절하는 것을 알 수 있었다. 그러나 최근 본 연구의 결과와는 달리 mGluR7 수용체는 수모화 반응

의 구성요소들이 결합함에도 불구하고 수모화 반응이 일어나지 않는다고 보고되었는데 (Wilkinson and Henley, 2011), 본 연구에서는 뉴런세포에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응이 확인되었고, mGluR7 수용체의 수모화 반응으로 인해 mGluR7 수용체의 trafficking이 조절되는 것도 확인되어서 mGluR7의 trafficking을 조절하는 하나의 방법으로 수모화 반응이 중요한 역할을 할 것이라고 생각된다.



## V. 결론

1. mGluR7 수용체가 과발현된 HEK293T 세포에서 mGluR7 수용체의 수모화 반응은 SUMO-1과 SUMO-2/3 단백질에 의해 mGluR7 C-말단의 라이신 889잔기에서 일어나는 것을 면역침강법과 웨스턴 블로팅을 통하여 확인하였다.
2. 쥐의 대뇌조직에서 mGluR7 수용체는 SUMO-1과 SUMO-2/3에 의해 수모화 반응이 일어났다.
3. 신경세포에 L-AP4를 처리하여 SUMO-1 및 SUMO-2/3 단백질에 의한 mGluR7 수용체의 수모화 반응 관찰하였을 때, SUMO-1에 의한 mGluR7 수용체의 수모화 반응은 탈수모화 반응이 유도되었지만, SUMO-2/3에 의한 mGluR7 수용체의 수모화 반응은 변화가 없었다.
4. 신경세포에서 mGluR7 수용체는 탈수모화 반응에 의하여 세포내로 유입이 증가한다.
5. mGluR7 수용체의 수모화 반응과 인산화 반응의 연관성을 조사하기 위해, mGluR7 수용체의 수모화 반응이 일어나도록 형질주입 한 후, 인산화 반응 활성인자인 PMA를 처리하였을 때, mGluR7 수용체의 수모화 반응이 증가하였다.



## 참고문헌

1. Wilkinson KA, Henley JM: Analysis of metabotropic glutamate receptor 7 as a potential substrate for SUMOylation. *Neurosci Lett* 491: 181-186, 2011
2. Wilkinson KA, Nishimune A, Henley JM: Analysis of SUMO-1 modification of neuronal proteins containing consensus SUMOylation motifs. *Neurosci Lett* 436: 239-244, 2008
3. Martin S, Nishimune A, Mellor JR, Henley JM: SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature* 447: 321-325, 2007
4. Cimarosti H, Ashikaga E, Jaafari N, Dearden L, Rubin P, Wilkinson KA, Henley JM: Enhanced SUMOylation and SENP-1 protein levels following oxygen and glucose deprivation in neurones. *J Cereb Blood Flow Metab* 32: 17-22, 2012
5. Suh YH, Pelkey KA, Lavezzari G, Roche PA, Haganir RL, McBain CJ, Roche KW: Corequirement of PICK1 binding and PKC phosphorylation for stable surface expression of the metabotropic glutamate receptor mGluR7. *Neuron* 58: 736-748, 2008

6. Konopacki FA, Jaafari N, Rocca DL, Wilkinson KA, Chamberlain S, Rubin P, Kantamneni S, Mellor JR, Henley JM: Agonist-induced PKC phosphorylation regulates GluK2 SUMOylation and kainate receptor endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 19772-19777, 2011
7. Chamberlain SE, Gonzalez-Gonzalez IM, Wilkinson KA, Konopacki FA, Kantamneni S, Henley JM, Mellor JR: SUMOylation and phosphorylation of GluK2 regulate kainate receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 15: 845-852, 2012
8. Jaafari N, Konopacki FA, Owen TF, Kantamneni S, Rubin P, Craig TJ, Wilkinson KA, Henley JM: SUMOylation is required for glycine-induced increases in AMPA receptor surface expression (ChemLTP) in hippocampal neurons. *PLoS One* 8: e52345, 2013
9. Wilkinson KA, Henley JM: Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J* 428: 133-145, 2010
10. Enz R: Structure of metabotropic glutamate receptor C-terminal domains in contact with interacting proteins. *Front Mol Neurosci* 5: 52, 2012

11. Enz R: Metabotropic glutamate receptors and interacting proteins: evolving drug targets. *Curr Drug Targets* 13: 145–156, 2012
12. Dev KK, Nakanishi S, Henley JM: Regulation of mglu(7) receptors by proteins that interact with the intracellular C-terminus. *Trends Pharmacol Sci* 22: 355–361, 2001
13. Blackshaw LA, Page AJ, Young RL: Metabotropic glutamate receptors as novel therapeutic targets on visceral sensory pathways. *Front Neurosci* 5: 40, 2011
14. Dutting E, Schroder-Kress N, Sticht H, Enz R: SUMO E3 ligases are expressed in the retina and regulate SUMOylation of the metabotropic glutamate receptor 8b. *Biochem J* 435: 365–371, 2011
15. Tang Z, El Far O, Betz H, Scheschonka A: Pias1 interaction and sumoylation of metabotropic glutamate receptor 8. *J Biol Chem* 280: 38153–38159, 2005
16. Dias RB, Rombo DM, Ribeiro JA, Henley JM, Sebastiao AM: Adenosine: setting the stage for plasticity. *Trends Neurosci* 36: 248–257, 2013

17. Suh YH, Park JY, Park S, Jou I, Roche PA, Roche KW: Regulation of metabotropic glutamate receptor 7 (mGluR7) internalization and surface expression by Ser/Thr protein phosphatase 1. *J Biol Chem* 288: 7544-17551, 2013
18. Feligioni M, Nishimune A, Henley JM: Protein SUMOylation modulates calcium influx and glutamate release from presynaptic terminals. *Eur J Neurosci* 29: 1348-1356, 2009
19. Hannoun Z, Greenhough S, Jaffray E, Hay RT, Hay DC: Post-translational modification by SUMO. *Toxicology* 278: 288-293, 2010
20. Cimarosti H, Lindberg C, Bomholt SF, Ronn LC, Henley JM: Increased protein SUMOylation following focal cerebral ischemia. *Neuropharmacology* 54: 280-289, 2008
21. Drag M, Salvesen GS: DeSUMOylating enzymes--SENPs. *IUBMB Life* 60: 734-742, 2008
22. Obata S, Yuasa E, Seki D, Kitano T, Saitoh H: Molecular cloning and bacterial expression of the catalytic domain of the SENP1 gene of *Oryzias latipes*. *Biosci Biotechnol Biochem* 77: 1788-1791, 2013

23. Enz R: Structure of metabotropic glutamate receptor C-terminal domains in contact with interacting proteins. *Front Mol Neurosci* 5: 52, 2012
24. Loriol C, Khayachi A, Poupon G, Gwizdek C, Martin S: Activity-dependent regulation of the sumoylation machinery in rat hippocampal neurons. *Biol Cell* 105: 30-45, 2013
25. Kantamneni S, Wilkinson KA, Jaafari N, Ashikaga E, Rocca D, Rubin P, Jacobs SC, Nishimune A, Henley JM: Activity-dependent SUMOylation of the brain-specific scaffolding protein GISP. *Biochem Biophys Res Commun* 409: 657-662, 2011
26. Scheschonka A, Tang Z, Betz H: Sumoylation in neurons: nuclear and synaptic roles? *Trends Neurosci* 30: 85-91, 2007
27. Niedenthal R: Enhanced detection of in vivo SUMO conjugation by Ubc9 fusion-dependent sumoylation (UFDS). *Methods Mol Biol* 497: 63-79, 2009
28. Feligioni M, Nishimune A, Henley JM: Protein SUMOylation modulates calcium influx and glutamate release from presynaptic terminals. *Eur J Neurosci* 29: 1348-1356, 2009
29. Craig TJ, Jaafari N, Petrovic MM, Jacobs SC, Rubin PP,

Mellor JR, Henley JM: Homeostatic synaptic scaling is regulated by protein SUMOylation. *J Biol Chem* 287: 22781-22788, 2012

30. Cimarosti H, Ashikaga E, Jaafari N, Dearden L, Rubin P, Wilkinson KA, Henley JM: Enhanced SUMOylation and SENP-1 protein levels following oxygen and glucose deprivation in neurones. *J Cereb Blood Flow Metab* 32: 17-22, 2012
31. Yeh ET: SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. *J Biol Chem* 284: 8223-8227, 2009
32. Droscher M, Chaugule VK, Pichler A: SUMO rules: regulatory concepts and their implication in neurologic functions. *Neuromolecular Med* 15: 639-660, 2013
33. Flotho A, Melchior F: Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem* 82: 357-385, 2013
34. Wilkinson KA, Nakamura Y, Henley JM: Targets and consequences of protein SUMOylation in neurons. *Brain Res Rev* 64: 195-212, 2010

- ABSTRACT -

## Regulation of mGluR7 trafficking by SUMOylation in neurons

Ji-Hee Choi

Department of Neuroscience

The Graduates School, Ajou University

(Supervised by Suh YH, MD., Ph.D.)

Protein SUMOylation is a post-translational modification by which Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) proteins are covalently linked to the lysine residues of target proteins via an enzymatic cascade. It has been reported that SUMOylation of synaptic proteins plays important regulatory roles in synapse formation, axonal mRNA transport, channel activity, and receptor endocytosis. The metabotropic glutamate receptor type 7 (mGluR7), a presynaptic G protein-coupled receptor modulates excitatory neurotransmission and synaptic plasticity by inhibiting neurotransmitter release. mGluR7 at Lys889 has been proposed to be modified by SUMO proteins *in vitro* assays, and a consensus motif for SUMO conjugation is conserved in the C-terminus of mGluR7. However, a recent study has failed to demonstrate the SUMO conjugation of full-length mGluR7 in mammalian cells and neurons. Here we have explored whether mGluR7 is a target of

SUMOylation. Using biochemical approaches coupled with confocal imaging, we find that mGluR7 at Lys889, the sole SUMOylation site on the C-terminus of mGluR7 is a target of SUMO conjugation both by SUMO-1 and SUMO-2/3 in HEK293T cells. The SUMOylation of mGluR7 is prevented by SUMO-specific isopeptidase SENP-1. Furthermore, the SUMOylation of mGluR7 mediated by SUMO-1 and SUMO-2/3 is identified in primary cortical neurons. Of particular interest, treatment of mGluR7 with an agonist, L-AP4 leads to a profound decrease of SUMO-1 conjugation of mGluR7, whereas there is no change of agonist-induced SUMO-2/3 conjugation of mGluR7. In addition, we find that mutation of mGluR7 at Lys889 to Arg markedly increases mGluR7 internalization in hippocampal neurons. Overexpression of SENP-1 leads to increased internalization of mGluR7, whereas SENP-1 Cys603Ser, a catalytic inactive mutant has no effects, suggesting that endocytosis of mGluR7 is enhanced by reduced SUMO conjugation of mGluR7. Taken together, these data support a model in which SUMOylation of mGluR7 at Lys889 for stable surface expression of mGluR7 in neurons.

---

Key words : SUMO; SUMOylation; mGluR7; Post-translational  
modification