

의학 석사학위 논문

PKA 인산화에 의한
NeuroD/BETA2의 발현 조절

아주대학교 대학원

의학과

신영국

PKA 인산화에 의한
NeuroD/BETA2의 발현 조절

지도교수 이 영 돈

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2005년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

신 영 국

신영국의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 이 영 돈 인

심사위원 서 해 영 인

심사위원 이 수 환 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2004년 12월 22일

PKA 인산화에 의한 NeuroD/BETA2의 발현 조절

bHLH 전사인자들에 대한 post-translational level에서의 조절은 인산화에 의해서 영향을 받을 수 있다. CaMKII에 의해 Ser336에서 인산화된 NeuroD/BETA2는 신경세포의 수상돌기 형성에 영향을 미친다. NeuroD/BETA2가 huntingtin(htt) 단백질과 결합하게 되면 MLK2에 의해 인산화되어 기능이 증가된다는 보고도 있다. 따라서 bHLH 전사인자 중 class B family에 속하는 NeuroD/BETA2의 조절 역시 인산화에 의해 영향을 받을 것이다. 이러한 NeuroD/BETA2 인산화의 영향을 연구하기 위하여 본 연구에서는 NeuroD/BETA2에 관여하는 인산화 효소와 인산화 위치를 찾고자 하였다.

293T 세포에서 NeuroD/BETA2를 발현시킨 후 PKA를 활성화 시켰을 때, NeuroD/BETA2의 발현양은 증가하였으며 PKA와 NeuroD/BETA2의 *in vitro* kinase assay 결과 PKA가 NeuroD/BETA2를 N-말단 쪽에서 인산화 시키는 것이 확인 되었다. 생물정보 데이터베이스들을 이용하여 NeuroD/BETA2의 인산화 위치를 예측하였을 때, N-말단으로부터 아미노산 서열 91번째의 threonine에서 PKA에 의한 인산화가 일어날 것으로 예상된다.

핵심어 : bHLH, NeuroD/BETA2, 인산화, 인산화 효소, PKA

차 례

국문요약	i
차례	ii
그림차례	iii
표차례	iv
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
A. 실험재료	5
B. 실험방법	6
1. 벡터 제작	6
2. 세포 배양 및 형질전환	8
3. 단백질 획득	9
4. Western 분석	10
5. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	10
6. GST-NeuroD 융합단백질을 이용한 in vitro kinase assay	11
7. NeuroD/BETA2의 인산화 위치 예측	12
III. 결과	13
A. NeuroD/BETA2의 발현 확인	13
B. PKA 활성화에 의한 NeuroD/BETA2의 발현 조절	13
C. NeuroD/BETA2의 인산화 확인	25
1. PKA에 의한 NeuroD/BETA2의 인산화	25
2. NeuroD/BETA2의 인산화 위치 예측	26
IV. 고찰	28
V. 결론	32
참고문헌	33
영문요약	38

LIST OF FIGURES

Fig 1. Cascade of neuronal bHLH regulators	2
Fig 2. Expression Vectors of NeuroD/BETA2	6
Fig 3. Expression vectors of GST-NeuroD fusion proteins	7
Fig 4. Expression of pcf-NeuroD and pcf-NeuroD-N233	13
Fig 5. Regulation of NeuroD expression by forskolin in 293T cells	15
Fig 6. Regulation of NeuroD expression by forskolin in cytosol	16
Fig 7. Regulation of NeuroD expression by forskolin in Nucleus	17
Fig 8. Post-translational regulation of NeuroD/BETA2 expression by forskolin in 293T cell	19
Fig 9. Post-translational regulation of NeuroD/BETA2 expression by forskolin in cytosol	20
Fig 10. Post-translational regulation of NeuroD/BETA2 expression by forskolin in nucleus	21
Fig 11. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of NeuroD and NeuroD-N233	22
Fig 12. Effect of inhibition of the ERK on activation of PKA	23
Fig 13. Expression of endogenous NeuroD/BETA2 in min cel.	24
Fig 14. NeuroD/BETA2 was phosphorylated by PKA in N-terminal region	25

LIST OF TABLES

Table 1. Types of bHLH transcription factors	1
Table 2. Prediction of NeuroD/BETA2 phosphrylation site by Netphos server	26
Table 3. Prediction of NeuroD/BETA2 phosphorylation site by Scansite motif scanner and Prosite server	27

I. 서 론

Basic helix-loop-helix(bHLH) 전사인자(transcription factor)들은 세포 분화과정에서 매우 중요한 역할을 수행하며, 세포의 운명을 결정하는 것으로 알려져 있다(Jan and Jan, 1993). 이 전사인자들은 근육세포의 형성과정(Weintraub et al., 1991; Edmondond and Olson, 1993; Olson and Klein, 1994), 성 결정과정(Caudy et al., 1988), 조혈세포의 형성과정(Mellentin et al., 1989), 그리고 신경 형성과정(Guillemot et al., 1993) 등에서 순차적 또는 상호 보완적인 작용을 나타낸다(Kageyama et al., 1997). achate-scute (ac-sc)라 불리는 bHLH 전사인자 복합체는 초파리(Drosophila)의 신경세포 분화과정에 있어서 신경세포의 운명을 결정하여 상피세포로 분화할 세포를 신경세포로 전환시키는 잠재력을 제공하는 것으로 알려져 있다(Jan and Jan, 1994). 그러나 척추동물의 신경 형성과정은 초파리에 대한 연구에 비해 알려진 바가 많지 않다. 포유동물이나 개구리(Xenopus)의 경우 초파리의 ac-sc 유전자와 동일한 유전자로 MASH-1 또는 XASH-1로 알려졌으나, 이 경우에는 신경세포로의 전환을 결정하기보다는 아직 알려져 있지 않은 또 다른 종류의 인자에 의해 세포의 운명이 결정된 다음에 세포를 분화시키는 기능을 보인다(Guillemot et al., 1993). 이처럼 다양한 기능을 나타내는 bHLH인자들은 DNA 결합능력, 단백질 구조 및 조직 분포에 따라 크게

Table 1. Types of bHLH transcription factors.

	Expression	Dimer formation	Remark
Class A	Common tissues	Homodimer or heterodimer	
Class B	Tissue specific	Heterodimer with class A	
Class C	Most of cells or some tissues limitly	Heterodimer with class A or Class B	Leucine zipper motif

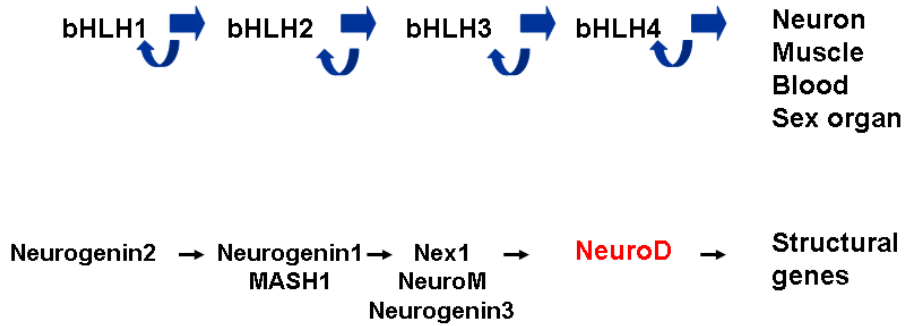


Fig 1. Cascade of neuronal bHLH regulators.

class A, class B 및 class C의 3그룹으로 분류한다. Class A에 속하는 인자들은 homodimer 또는 heterodimer를 형성, 대부분의 조직에서 발현되며, class B에 속하는 인자들은 homodimer로는 거의 나타나지 않으면서 (Lassar et al., 1991), class A에 속하는 인자들과 heterodimer를 형성하여 조직 특이적으로 발현되는 특징을 가지고 있다(Murr et al., 1989). Class C에 속하는 인자들은 leucine zipper motif를 가지며(Landschulz et al., 1988), 대부분의 세포에서 발현되거나 일정한 조직에서만 제한되어 발현되고(Luscher and Eisenmann, 1990), Class A나 Class B에 속하는 인자들과 heterodimer를 이루는 특징을 가지고 있다(Table 1).

NeuroD 또는 BETA2(β -cell E-box transactivator 2)는 bHLH그룹 중 class B family에 속하는 전사인자로 class A family에 속하는 초파리의 daughterless 또는 E12/E47과 heterodimer를 이루는데, 이 성질을 이용하여 yeast two hybrid system을 통하여 서로 다른 연구팀에서 클로닝되었다. NeuroD/BETA2는 생쥐와 개구리의 배자에 분포하고 있는 신경세포에서 일시적으로 발현되며(Fig 1), 발생중인 개구리 배자의 외배엽에 국부적으로 발현시켰을 경우 상피세포로 분화될 세포가 신경세포의 성질을 갖도록 운명을 전환시키는 능력을 나타낸다(Lee et al., 1995). 비슷한 시기에 NeuroD/BETA2 유전자는 인슐린을 분비하는 췌장암세포(insulinoma)로부터 β -cell specific transactivator로서 분리되었는데, NeuroD/BETA2 유전자에

대한 Northern 분석을 통하여 이 유전자의 전사체는 약 2.6 kilobase의 크기로 생쥐의 뇌, 췌장의 β -세포 및 장내분비세포에 발현되고 있음이 알려졌다(Naya et. al., 1995). 요컨대, NeuroD/BETA2는 다른 class의 bHLH 전사인자와 결합하여 신경 세포 분화를 유도하거나(Fig 2) 인슐린 생성의 전사활성인자로 작용한다(Huang. H. P. et. al., 2000)

bHLH 전사인자의 활성은 세포에 내재한 신호전달경로에 따라 달라진다. 예를 들면 NeuroD/BEAT2는 인산화효소인 GSK3 β 에 의하여 억제되는 반면에 Xath5는 notch에 의하여 억제된다. 즉 망막의 형성시 bHLH 전사인자의 활성은 post-translational level에서 변화하며 그 결과 서로 다른 유형의 신경세포가 생성된다는 보고가 있다(Moore et al., 2002).

NeuroD/Beta2와 유사한 bHLH전사인자인 MyoD의 경우 protein kinase C (PKC)에 의해 인산화되는 위치 중 하나인 Thr115에서 돌연변이를 일으키면 쥐의 fibroblast와 사람의 rhabdomyosarcoma 세포의 기능을 증진시킨다는 보고가 있으며 (Liu et al., 1998), Myogenin의 경우 다른 인산화효소인 CaMKII (Calcium/Calmodulin-defendent Kinase II)에 의하여 인산화 되면 발생중인 쥐의 myotube에서 nAChR 유전자의 발현에 관여한다는 보고가 있다(Tang et al., 2004). 이러한 결과에서 보면 bHLH 전사인자의 post-translation level에서의 활성 조절에 있어서 인산화에 따른 영향이 있을 수 있음을 예상할 수 있으며, NeuroD/BETA2 역시 인산화에 의해 영향 받을 수 있음을 시사한다.

NeuroD/BETA2의 경우 myogenin과 마찬가지로 CaMKII에 의하여 Ser336을 포함한 위치에서 인산화 되며, 이 경우 신경세포의 가지돌기의 형성에 영향을 준다는 최근의 보고가 있다(Gaudilliere et al., 2004). 또한 NeuroD/BETA2는 HAP1(huntingtin-associated protein 1)과의 상호작용을 통해 huntingtin(htt) 단백질과 결합할 수 있으며 이들과 결합된 NeuroD/BETA2는 MLK2(mixed-lineage kinase 2)에 의해 인산화되면서 NeuroD/BETA2의 활성이 증가된다는 보고도 있다(Marcora et al., 2003).

이상에서 NeuroD/BETA2가 post-translational level에서 여러 인산화 효소에 의한 인산화를 통하여 활성을 조절 받고 있다고 생각되며, 이러한 인산화가 NeuroD/BETA2의 기능에 미치는 영향을 규명하기 위하여, 우선 NeuroD/BETA2를 인산화 시키는 효소와 인산화 위치를 밝힐 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 NeuroD/BETA2를 인산화시키는 효소와 인산화 위치에 대하여 조사하였다.

II. 재료 및 방법

A. 실험재료

본 실험에 사용한 pcDNA3.1은 Invitrogen (Carlsbad, CA, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. pGEM-T-easy는 Promega (San Luis Obispo, CA, U.S.A)에서 구입하여 사용하였으며, pGEX-2T, Sepharose 4B, reduced glutathione 및 *E.coli* BL21은 Pharmacia (Uppsala, Sweden)에서 구입하여 사용하였고, DNA 제한효소와 T4-DNA ligase는 New England Biolabs (Massachusetts, MA, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. [α -³²P]dATP 및 [γ -³²P]ATP는 NEN (Massachusetts, MA, U.S.A)에서 dibutyl cAMP 및 forskolin, PD98059, purified PKA Ca, protease inhibitor, 그리고 Flag에 대한 항체는 Sigma (Missouri, MO, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. NeuroD에 대한 항체는 SantaCruz(Snataacruz, CA, U.S.A)에서 구입하여 사용하였고, 이차 항체로 사용한 anti-mouse IgG- HRP, anti-rabbit IgG-HRP, anti-Goat IgG-HRP는 Zymed Inc (San Francisco, CA, U.S.A)로부터 구입하여 사용하였다. ECL kit는 Amersham-pharmacia(Illinois, IL, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 Hank's balanced salt solution (HBSS)은 Gibco-BRL (Maryland, MD, U.S.A)에서, fetal bovine serum (FBS)은 HyClone (Utah, UT, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.

B. 실험 방법

1. 벡터 제작

(A) Flag-NeuroD 발현 벡터

NeuroD/BETA2의 cDNA(Genebank Accession Number : U24679)가 들어 있는 pGEM-BETA2 플라스미드로부터 NeuroD/BETA2 단백질의 합성이 시작되는 위치인 염기서열 79번째부터 3' UTR을 일부 포함하게 되는 염기서열 2069번째까지의 절편을 PCR 방법을 통하여 얻어내었다. 이 때 PCR에 사용된 primer에는 5' 말단에는 BamHI 절단 서열을, 3' 말단에는 EcoRI 절단 서열을 넣어 합성하였다. 이 절편을 pGEM-T-easy 벡터에 넣은 뒤 서열을 분석하여 돌연변이 여부를 판단하였다.

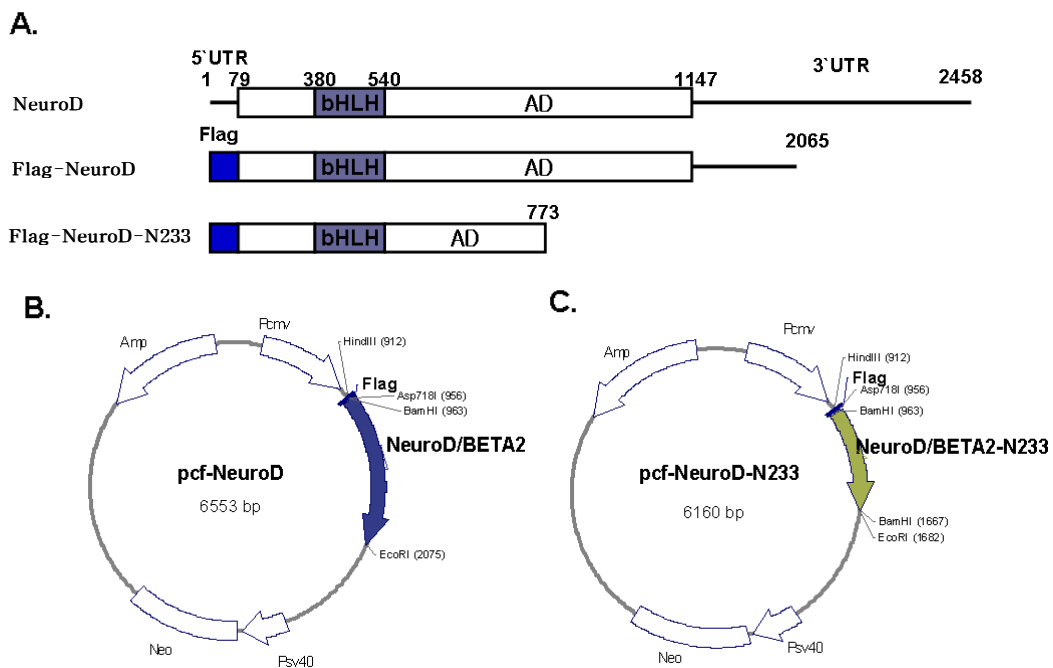


Fig 2. Expression Vectors of NeuroD/BETA2. Schematic diagram of Flag-NeuroD/BETA2 and Flag-NeuroD/BETA2-N233 (A). Map of pcf-NeuroD (B) and pcf-NeuroD-N233 (C).

완성된 pGEM-T-easy-NeuroD/BETA2로부터 BamHI과 EcoRI를 이용하여 절편을 얻은 후 이것을 pcDNA3.1-Flag B 벡터의 BamHI~EcoRI 절편과 치환하였다(pcf-NeuroD, Fig 2-A, 2-B). pcDNA3.1-Flag B 벡터는 pcDNA3.1의 HindIII~ASP718 절편이 합성된 Flag으로 치환된 벡터로 프레임의 조절을 위해 A, B, C의 3가지 종류를 제작하였다. 완성된 벡터에서 항원결정기로 작용하는 Flag은 NeuroD/BETA2의 N-말단에 표지되었다 (Fig 2-B). NeuroD/BETA2의 truncated 돌연변이인 NeuroD/BETA2-N233의 경우, pcHA-NeuroD-N233으로부터 PCR 방법을 통하여 DNA 절편을 얻었다. 얻어진 절편을 pGEM-T-easy 벡터에 삽입하여 서열을 분석, 돌연변이 여부를 확인한 후 BamHI을 이용하여 NeuroD/BETA2-N233 DNA 절편을 얻었고, 이 절편을 pcDNA3.1-Flag B의 BamHI 절단 위치에 삽입하였다(pcf-NeuroD-N233, Fig 2-A, 2-C).

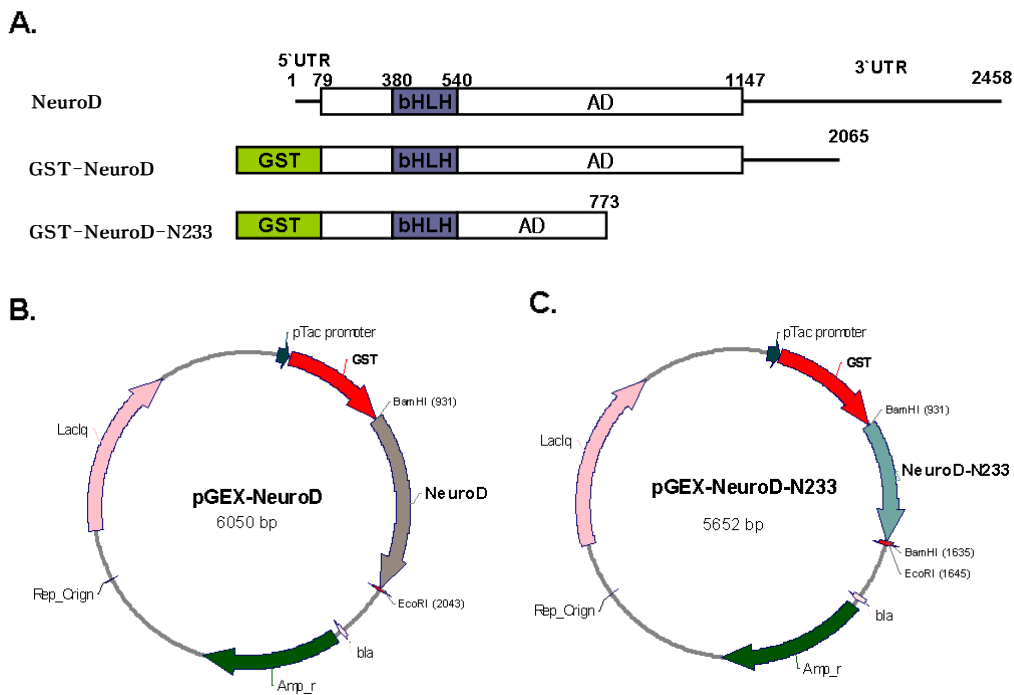


Fig 3. Expression vectors of GST-NeuroD fusion proteins. Schematic diagram of GST-NeuroD fusion proteins (A). Map of pGEX-NeuroD (B) and pGEX-NeuroD-N233 (C).

(B) GST 융합 단백질 발현 벡터

앞에서 서술한 과정에서 만들어진 pGEM-T-easy-NeuroD/BETA2로부터, BamHI과 EcoRI를 이용하여 얻은 절편을 pGEX-2T의 BamHI~EcoRI 절편과 치환하여 GST-NeuroD/BETA2 융합 단백질을 발현하는 벡터를 만들었다(pGEX-NeuroD, Fig 2-A, 2-B). NeuroD/BETA2-N233의 경우, pGEM-T-easy-NeuroD/BETA2-N233으로부터 BamHI를 이용하여 절편을 얻어 pGEX-2T의 BamHI 절단 위치에 삽입하였다(pGEX-NeuroD-N233, Fig 3-A, 3-C).

2. 세포 배양 및 형질전환

(A) 세포 배양

293T 세포와 MIN 세포는 10%의 FBS와 1%의 Penicillin-Streptomycin이 들어간 DMEM에서 배양되었다. 293T는 1:9의 비율로 2일마다, MIN 세포는 1:3의 비율로 4일마다 한번씩 계대배양을 해주었다.

(B) CaPO₄ 방법을 이용한 형질전환

293T 세포의 형질전환에는 CaPO₄ 방법(Grahm과 van der Eb, 1973)을 이용하였다. 형질전환하기 16시간 전에 3~4×10⁶ cells/100mm dish가 되도록 준비하였다. 100mm dish 당 500μl의 0.25M CaCl₂용액에 8~12μg의 DNA를 섞어 주었고, 여기에 500μl의 HEPES-buffered saline (16.4 mg/ml NaCl, 11.9 mg/ml HEPES, 0.21 mg/ml Na₂HPO₄)를 섞어준 다음 실온에서 15~20분간 방치하여 CaPO₄ 침전이 생기도록 하였다. 침전이 생긴 용액을 세포가 준비되어 있는 dish에 넣어 배양액과 섞어준 다음 24시간동안 배양하였고, 이후 100mm dish 당 10개의 60mm dish로 분주한다음 24시간후 사용하였다.

형질전환 48시간 후 post-translational level을 관찰하기 위하여, 단백질을 세포로부터 얻기 전 cycloheximide를 100 μ g/ml의 농도로 처리하였다. ERK의 활성을 억제하기 위해 일부는 cycloheximide처리와 동시에 PD98059를 30 μ M의 농도로 처리하였다. 10분 후 다시 forskolin (30 μ M) 또는 dibutiryl cAMP (1mM)을 처리하고, 처리 시간 별로 단백질을 얻어 내었다.

3. 단백질 획득

(A) 전체 단백질

세포를 RIPA용액 (150mM Sodium chloride, 1% NP-40, 0.1% SDS, 50mM, Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% sodium deoxycholate), protease inhibitor)과 섞고 26 guage의 주사바늘에 수회 통과시켜 세포를 터뜨렸다. 이후 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하였다. 이후 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm으로 10분간 원심분리하고, 상층액을 전체 단백질 용액으로 사용하였다.

(B) 세포질과 핵 분획

세포를 TD용액(25mM Tris(pH 8.0), 2mM MgCl₂, 0.5mM DTT, protease inhibitor)에 섞은 후, 상온에서 5분 방치하고, 1% NP-40을 첨가하여 세포를 터뜨렸다. 원심분리를 한 후 상층액을 세포질 용액으로 사용하였다. 침전물을 BL용액(400mM LiCl, 10mM Tris(pH 8.0), 0.5mM DTT, protease inhibitor)에 섞은 후 12,000rpm으로 2분간 원심분리하여 상층액으로부터 핵단백질을 얻어내었다.

4. Western 분석

포유동물 발현벡터(pcDNA3.1)에 삽입되어 있는 NeuroD/BETA2 유전자(pcf-NeuroD)와 truncated NeuroD/BETA2 유전자(pcf-NeuroD-N233)를 293T 세포에 형질전환시킨 후 37°C에서 48시간동안 배양하였다. 이후 앞에서 서술한 단백질 회수 방법으로 전체 단백질 또는 세포질과 핵분획의 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질을 정량한 다음 단백질에 sample 용액(0.0625M Tris-HCl(pH 6.8), 1% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol)을 넣고 끓인 후, 8~10%의 SDS-PAGE를 이용하여 100 volt로 1~2시간 전기영동을 실행하여 분리하였다. gel상의 단백질을 transfer 용액(25mM Tris-base, 192mM glycine)에서 10 volt에서 2시간 전기영동하여 PVDF membrane으로 옮겨주었다. 5% Skim milk로 비특이적 결합을 제거한 후 membrane을 일차항체(mouse anti-Flag antibody 또는 rabbit anti-NeuroD antibody)로 상온에서 2시간 반응시켰다. T-TBS (20mM Tris(pH 7.5), 150mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 상온에서 15분씩 3번 씻어준 후, membrane에 이차항체(anti-mouse IgG-HRP 또는 anti-rabbit IgG-HRP)와 상온에서 1시간 동안 반응시키고, 이차항체에 결합된 기질의 활성을 Super Signal substrate(PIERCE, Illinois, U.S.A)를 사용하여 측정하였다.

5. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Rat insulin promoter enhancer 3(pRIPE3)에서 E-box를 포함하는 부분인 -125~-86bp에 해당하는 oligonucleotide를 Klenow fragment와 [α -³²P]dATP를 포함하고 있는 dNTP 혼합액과 상온에서 30분간 반응시켜 동위원소를 표지하였다(Naya *et al.*, 1995). Lane당 10mM Tris(pH 7.4), 50mM NaCl, 1mM DTT, 5% glycerol, 0.5 μ g poly deoxyionosinic-

deoxycytidylic acid(poly dI-dC) 및 3×10^4 cpm [α - 32 P]-oligonucleotide를 포함하는 반응액에 293T세포의 핵분획으로부터 얻어진 단백질을 $4\mu\text{g}$ 넣어주고 상온에서 30분간 반응시켰다. 반응 후에 이를 4% polyacrylamide (24 : 1) gel에서 1~2시간 전기영동한 후 건조기를 이용하여 gel을 건조시키고 X-ray 필름에 노출하여 조사하였다.

6. GST-NeuroD 융합단백질을 이용한 in vitro kinase assay

GST-NeuroD융합 벡터가 도입된 대장균 BL21을 Terrific Broth 배지에 접종하여 37°C 에서 배양하였다. O.D_{600} 에서 수치가 0.5~2.0이 되었을 때, IPTG를 첨가하고 30°C 에서 4시간동안 배양하여 GST-NeuroD 융합 단백질의 발현을 최대화 시켰다. 대장균을 1% TritonX-100이 들어있는 PBS에서 초음파기로 분쇄하여 상층액을 얻었다. 이를 Glutathion Sepharose 4B (beads)와 상온에서 반응시키고, bead에 결합한 상태로 세척하여 결합하지 않은 물질을 제거시켰다. 여기에 환원된 glutathion을 흘려주어 bead로부터 GST-NeuroD 융합단백질을 분리하였다.

분리된 융합단백질은 반응용액(20mM MOPS (pH 7.2), 2mM EGTA, 10mM MgCl_2 , 1mM DTT, 0.1mM Na_3VO_4)에서 [32 P] γ ATP, 인산화효소와 함께 30°C 에서 반응시켰다. 반응 후 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 FLA-3000(Fuji film, Japan)을 이용하여 조사하였다.

7. NeuroD/BETA2의 인산화 위치 예측

NeuroD/BETA2의 인산화 위치를 예측하기 위해 다음의 3가지 생물 정보 데이터베이스를 이용하였다.

- CBS prediction server
(<http://www.cbs.dtu.dk/service>, Nilolaj et.al., 1999)
- PROSITE
(<http://www.us.expasy.org/prosite>, Laurent *et.al.*, 2002)
- Scansite motif Scanner
(http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml, Alexandre et.al., 2002)

III. 결 과

A. NeuroD/BETA2의 발현 확인

pcf-NeuroD와 pcf-NeuroD-N233이 정상적으로 NeuroD/BETA2와 NeuroD/BETA2-N233을 발현하는지 확인하기 위하여 293T 세포에 형질전환시킨 후 western 분석을 실행하였다. Western 분석 결과 NeuroD/BETA2와 NeuroD/BETA2-N233 모두 발현을 확인하였다(Fig 4).

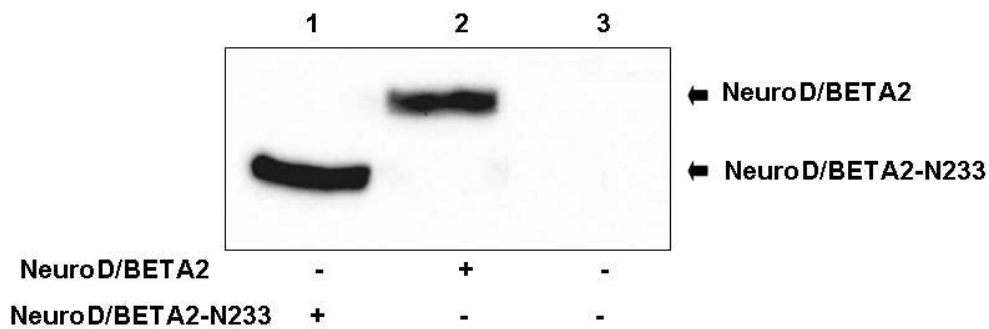


Fig 4. Expression of pcf-NeuroD and pcf-NeuroD-N233. pcf-NeuroD and pcf-NeuroD-N233 were transfected in 293T cells. After 48hr, Whole cell lysate were prepared in RIPA buffer. 30ug of proteins were subject to western analysis (anti-Flag antibody 1:1000, sigma). NeuroD-N233(lane 1), NeuroD (lane 2), total lysate of untransfected 293Tcells (lane 3).

B. PKA 활성화에 의한 NeuroD/BETA2의 발현 조절

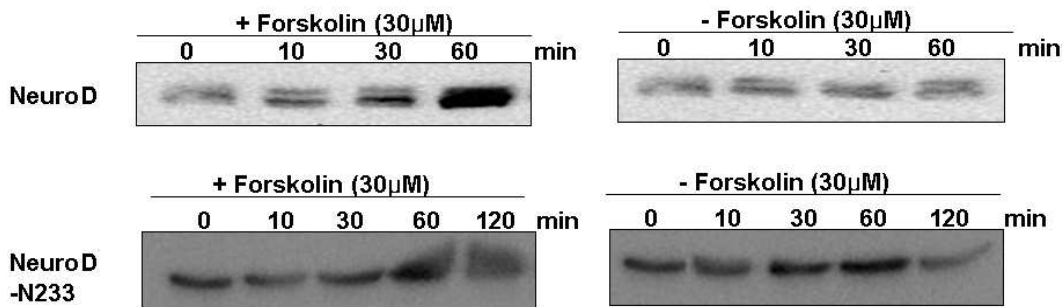
293T 세포는 사람의 배아기의 신장 세포에서 유래한 것으로 세포 자체에서 분비되는 NeuroD/BETA2가 존재하지 않는다. 본 연구에서는 이 세포에 NeuroD/BETA2를 과발현시켜 발현양상을 관찰하는데 이용하였다. Forskolin은

PKA의 활성인자로 사용하였다.

293T 세포에 NeuroD/BETA2와 NeuroD/BETA2의 N-말단으로부터 아미노산 서열 233번째까지만 존재하는 돌연변이인 NeuroD/BETA2-N233을 과발현 시킨 후, forskolin을 처리하고, 처리 시간에 따른 NeuroD/BETA2의 발현 양상을 관찰하였다. NeuroD/BETA2의 발현은 Forskolin 처리 후 30분이 경과하였을 때부터 증가하기 시작하여 1시간에 도달하였을 때는 처리하지 않은 그룹과 비교하여 급격한 증가가 관찰되었다. 그러나 NeuroD/BETA2-N233의 경우에는 forskolin을 처리한 것과 처리하지 않은 것 모두에서 큰 영향을 받지 않았다 (Fig 5). 같은 조건에서 핵과 세포질로 분획을 얻은 후, 각각에 대한 forskolin 처리 후의 발현 양상을 관찰하였다. 세포질과 세포핵 모두에서 forskolin을 처리한 이후 NeuroD/BETA2의 발현이 증가되었다(Fig 6, 7). NeuroD/BETA2-N233의 경우에는 NeuroD/BETA2와 같은 현격한 증가는 관찰되지 않았다(Fig 6, 7). 이상의 결과에서 forskolin에 의해서 PKA가 활성화 되었을 때, NeuroD/BETA2의 발현을 증가시키는 것으로 판단된다.

Cycloheximide는 진핵생물의 리보솜에 특이적으로 작용하여 번역(translation)을 억제, 단백질의 합성을 막는 것으로 알려져 있다. PKA 활성화가 post-translational level에서 NeuroD/BETA2의 기능에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 293T 세포에서 NeuroD/BETA2와 NeuroD/BETA2-N233을 과발현 시키고 forskolin을 처리하기 전에 cycloheximide를 일괄적으로 15분간 처리해 주었다. 여기서 얻은 단백질로부터 western blot 분석을 수행하여 NeuroD/BETA2 단백질 양의 변화를 관찰하였다. forskolin을 처리하지 않은 경우에 시간이 지남에 따라 NeuroD/BETA2의 양이 감소하였으나, forskolin을 처리한 경우에는 보다 더 감소의 폭이 적었다. 다시 말해, PKA가 활성화 되었을 경우 NeuroD/BETA2의 안정성이 증가하였다 NeuroD/BETA2-N233의 경우 NeuroD/BETA2보다 더욱 안정한 상태로 관찰 되었으나, forskolin을 처리한 경우와 처리하지 않은 경우에서 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig 8).

A.



B.

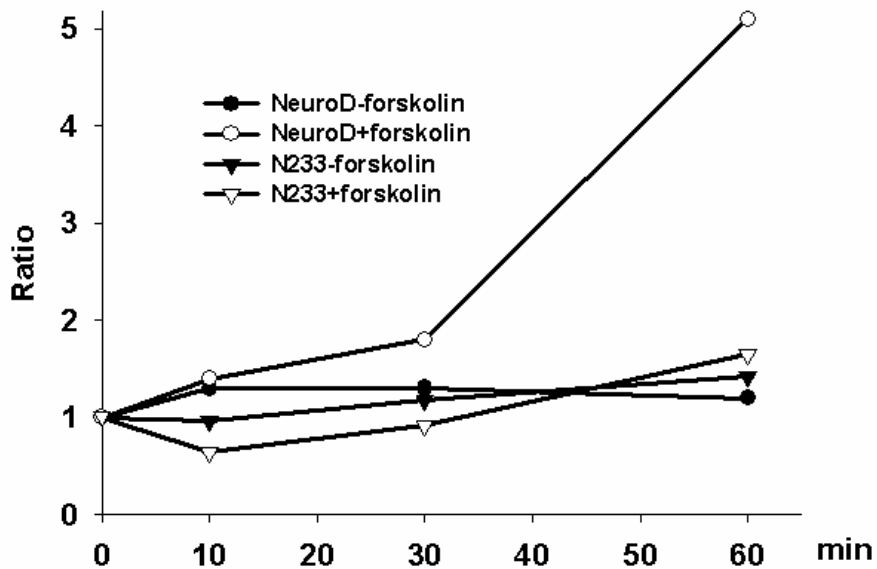


Fig 5. Regulation of NeuroD expression by forskolin in 293T cells. The cells were incubated in the presence of forskolin to activate PKA. Whole cell lysate were prepared in RIPA buffer. 30ug of proteins were subject to western analysis (anti-Flag antibody 1:1000, sigma). Expression of NeuroD was increased by forskolin, but NeuroD-N233 was not (A). Quantification results of western blot analysis (b).

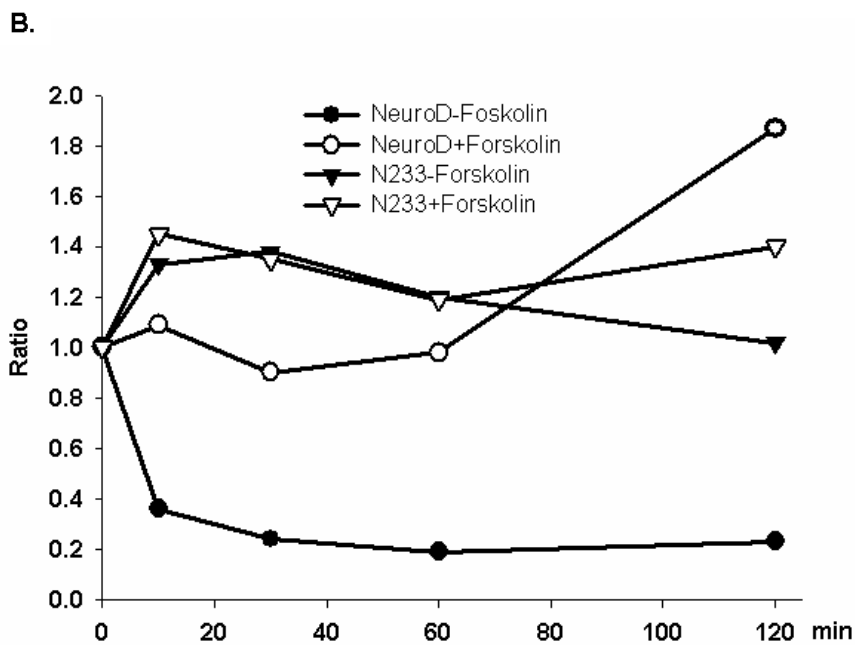
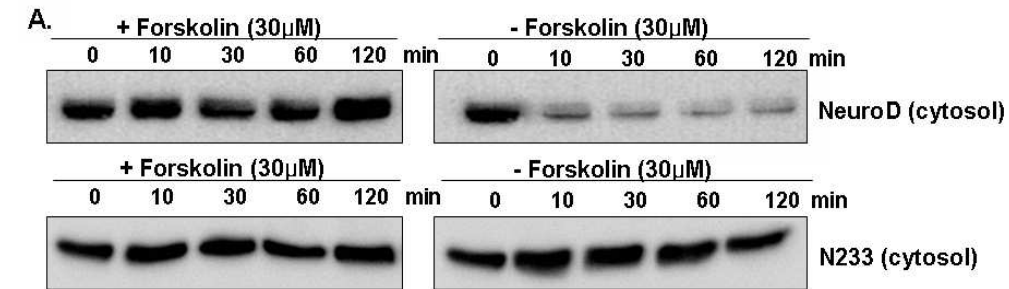
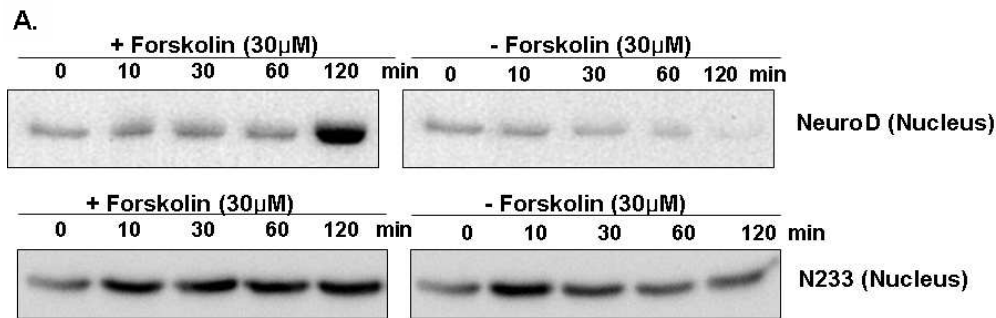


Fig 6. Regulation of NeuroD expression by forskolin in cytosol. The cells were incubated in presence forskolin to activate PKA. Cytosol fraction was prepared in TD buffer. 30 ug of proteins were subjected to western analysis (anti-Flag antibody 1:1000, sigma). In Cytosol, expression level of NeuroD increased by forskolin but NeuroD-N233 was not. Western blot analysis (A) and quantification data of western blot (B).



B.

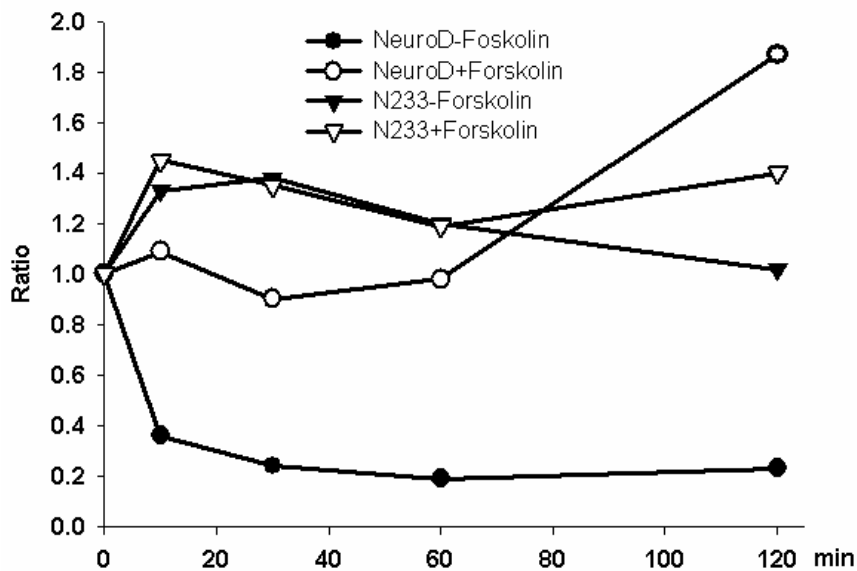


Fig 7. Regulation of NeuroD expression by forskolin in Nucleus. The cells were incubated in presence forskolin to activate PKA. Nucleus fraction was prepared in BL buffer. 30 ug of proteins were subjected to western analysis (anti-Flag antibody 1:1000, sigma). In Nucleus, expression level of NeuroD increased by forskolin but NeuroD-N233 was not. Western blot analysis (A) and quantification data of western blot (B)

같은 조건에서 핵과 세포질 분획의 단백질을 얻어 western blot를 수행하여 NeuroD/BETA2와 NeuroD/BETA2-N233의 양 변화를 관찰하였을 때, 핵과 세포질에서 모두 forskolin을 처리했을 경우 NeuroD/BETA2 단백질 양의 변화가 처리하지 않았을 경우보다 안정적이었다(Fig 9, 10). NeuroD/BETA2-N233의 경우 핵에서는 큰 차이가 없었으나, 세포질에서는 forskolin을 처리했을 경우 더 안정한 변화를 보였다(Fig 9, 10). 따라서 PKA가 활성화 되었을 때 관찰되는 NeuroD/BETA2의 발현증가는 post-translational level에서의 NeuroD/BETA2에 대한 조절이 일정부분 영향을 미친다고 생각된다.

PKA가 활성화 되었을 때 NeuroD/BETA2의 기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 NeuroD/BETA2와 NeuroD/BETA2-N233을 과발현시킨 293T 세포에서 PKA를 활성화 시킨 후, 핵 분획 단백질을 얻어서 RIPE3 (Rat Insulin Promoter)와의 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 수행하였다. 결과에서 PKA가 활성화 되었을 경우 NeuroD/BETA2와 NeuroD/BETA2-N233의 RIPE3 DNA 결합능력이 증가했다(Fig 11).

일련의 실험 결과에서 PKA가 활성화 되었을 때, NeuroD/BETA2의 발현과 DNA에 결합하는 능력이 증가되었고, 이러한 증가에는 post-translational level에서의 조절 역시 영향이 있음을 관찰하였다. PKA가 활성화 되었을 때, 또 다른 인산화 효소인 ERK가 NeuroD/BETA2의 post-translational level에서의 조절에 관여 하는지를 알아보았다. NeuroD/BETA2를 과발현 시킨 293T 세포에서 forskolin을 처리하기전 cycloheximide와 함께 ERK를 억제하는 것으로 알려진 PD98059를 15분간 처리하였다. PD98059를 이용하여 ERK의 활성을 억제 하였을 경우 1시간 후 NeuroD/BETA2 단백질양을 비교하였을 때 forskolin만을 처리하여 PKA 활성화 시켰을 때 보다 세포질에 남아있는 NeuroD/BETA2 단백질이 감소하였으나 forskolin과 PD98059를 모두 처리하지 않았을 경우보다는 증가하였다. 핵에서의 경우는 오히려 PD98059를 함께 처리하였을 때, 핵에 존재하는 NeuroD/BETA2

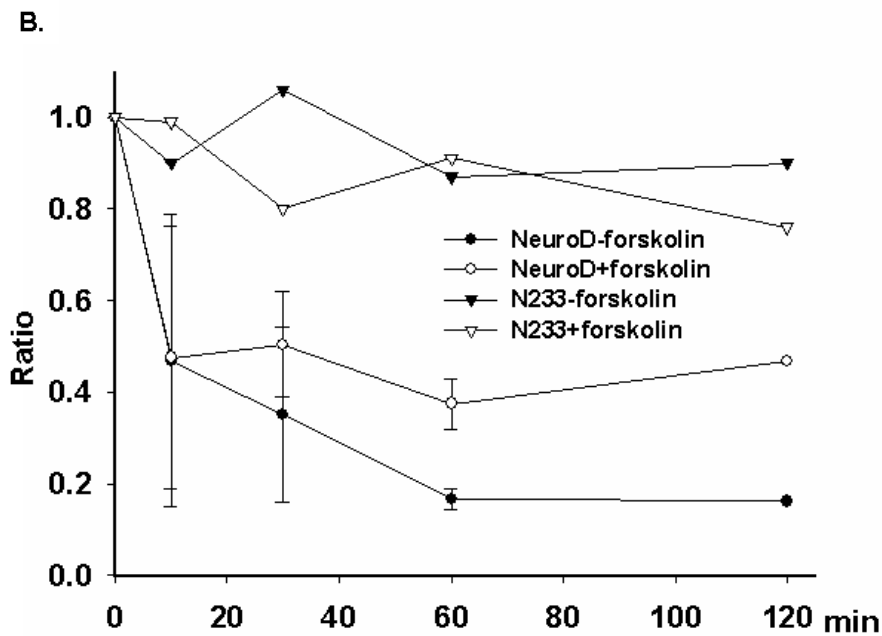
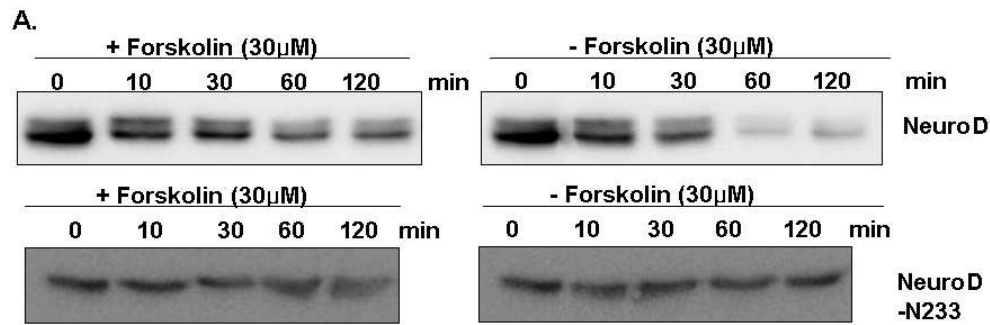


Fig 8. Post-translational regulation of NeuroD/BETA2 expression by forskolin in 293T cell. Stability of NeuroD/BETA2 was increased by forskolin, when translation was blocked by treatment of cycloheximide (100 μ g/ml), but stability of NeuroD/BETA2-N233 was not (A). Quantification results of western blot analysis showed that NeuroD/BETA2 was better stable than forskolin was treated than was not, after 1 hour (B). The results are means \pm SE from four independent experiments.

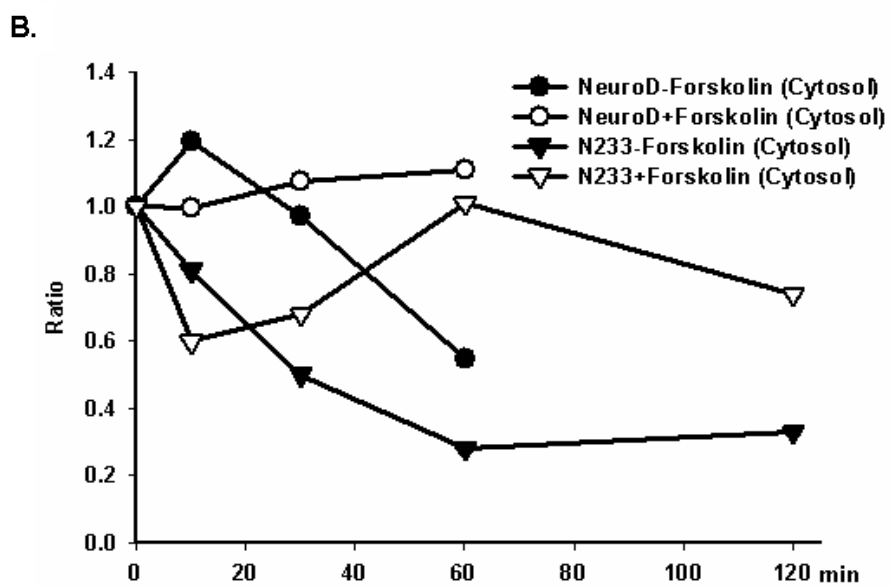
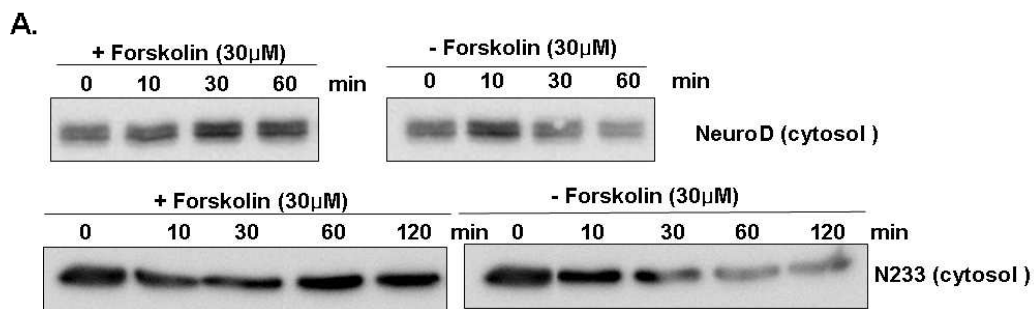


Fig 9. Post-translational regulation of NeuroD/BETA2 expression by forskolin in cytosol . When added forskolin, after 1 hour stability of NeuroD/BETA2 in cytosol was increased(A, upper). Stability of NeuroD/BETA2-N233 was increased in cytosol (A, lower). Quantified DATA of western blot analysis (B). The results are means±SE from two independent experiments.

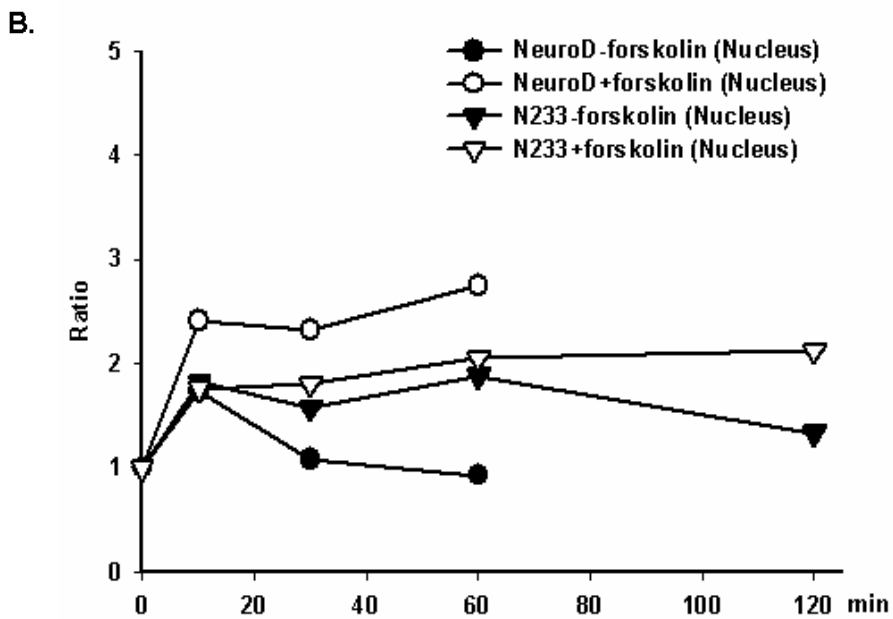
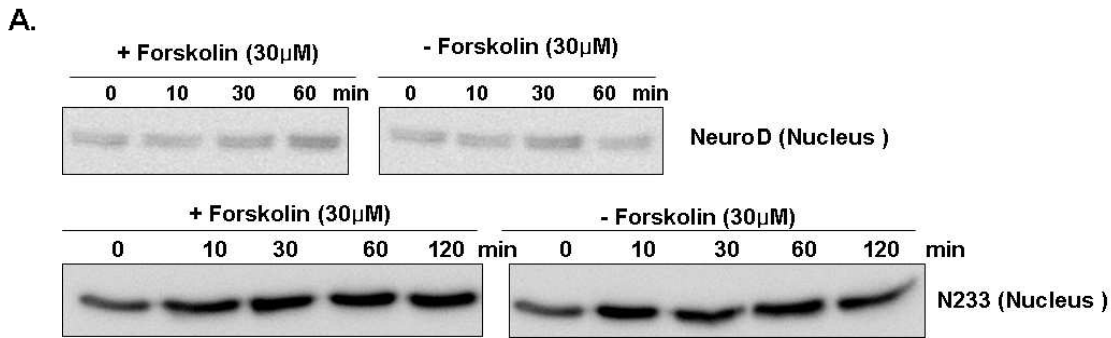


Fig 10. Post-translational regulation of NeuroD/BETA2 expression by forskolin in nucleus. When added forskolin, after 1 hour stability of NeuroD/ BETA2 in nucleus was increased (A, upper). The stability of NeuroD/BEAT2-N233 could be have no effect in nucleus (A, lower). Quantified DATA of western blot analysis (B). The results are means±SE from two independent experiments.

단백질이 더 증가하였다(Fig 12). 따라서 NeuroD/BETA2의 post-tranlational level에서의 조절은 ERK도 관여할 것으로 생각된다.

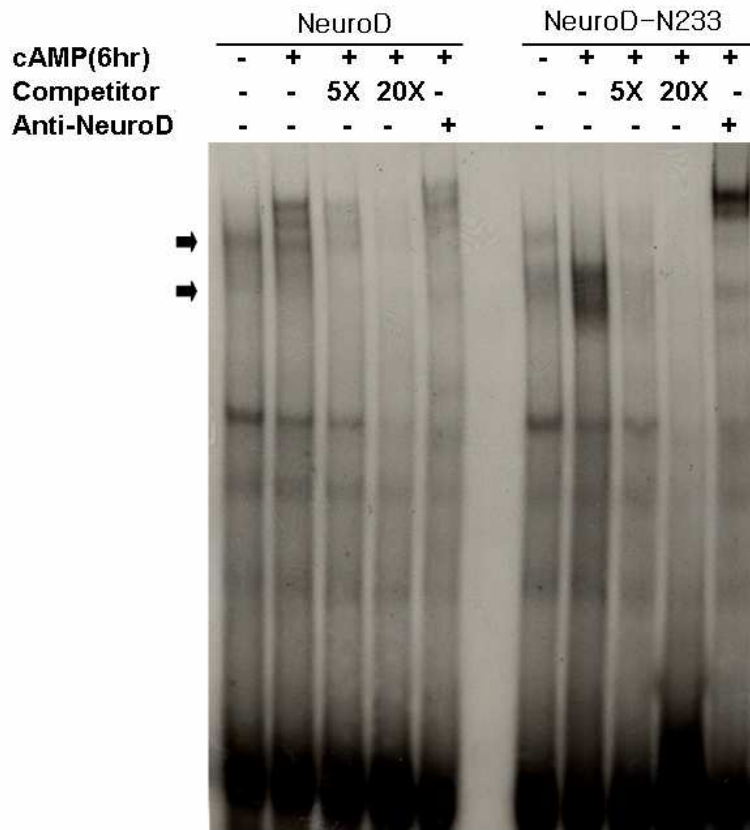


Fig 11. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of NeuroD and NeuroD-N233. In NeuroD and NeuroD-N233, activities of DNA binding was increased by PKA activation.

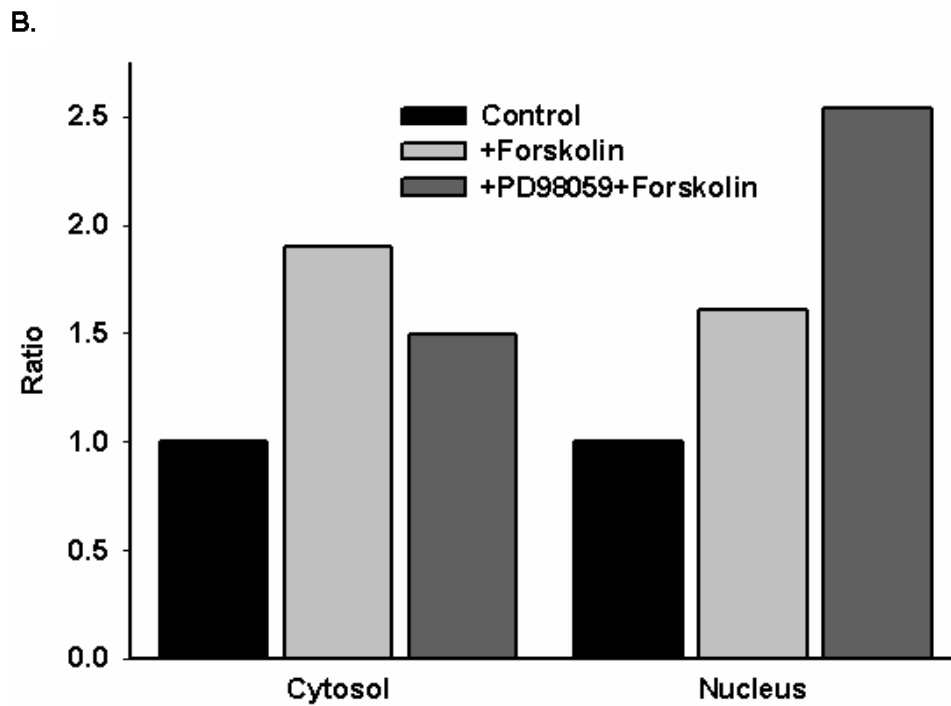
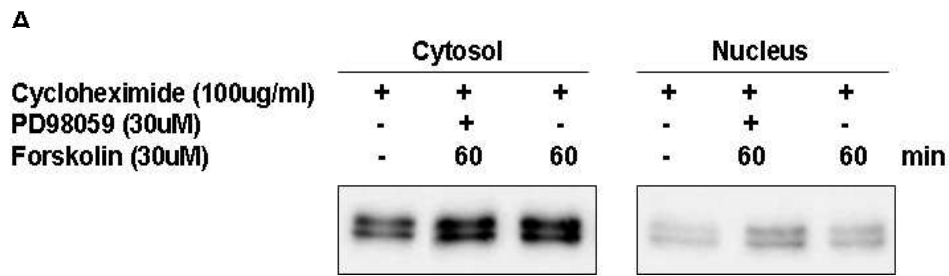


Fig 12. Effect of inhibition of the ERK on activation of PKA. 293T cells pretreated with PD98059 and/or cycloheximide during 15 minutes prior to forskolin treatment. Western blot analysis (A). Quantification data of western blot results. The results are mean±SE from two independent experiments.

NeuroD/BETA2가 세포 내에서 발현되는 MIN 세포의 경우에서도 cycloheximide를 처리하여 translation를 억제한 후, forskolin을 처리하면, 처리 30분 후부터 1시간까지 NeuroD/BETA2의 감소량이 처리하지 않은 경우보다 더 안정하였다 (Fig 13).

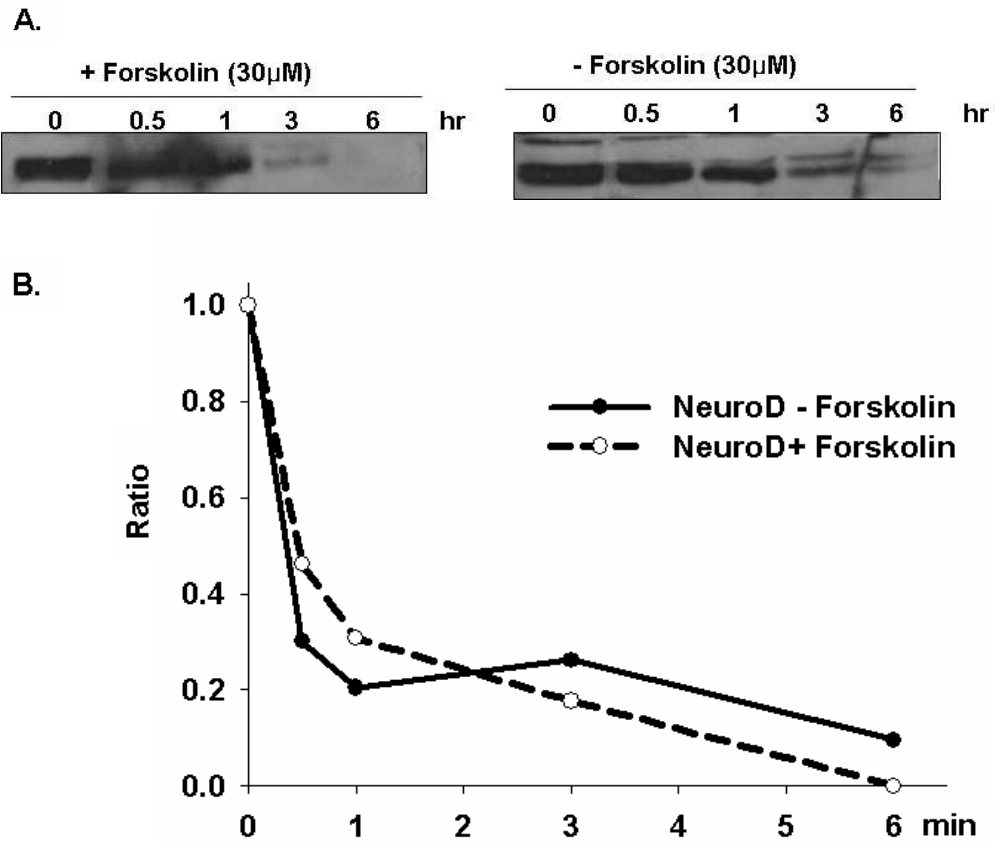


Fig 13. Expression of endogenous NeuroD/BETA2 in min cell. Western blot analysis(A). Quantification of western blot results (B).

C. NeuroD/BETA2의 인산화 확인

1. PKA에 의한 NeuroD/BETA2의 인산화

앞의 결과에서 NeuroD/BETA2는 PKA에 의해 post-translational level에서도 조절을 받으며, 그 조절은 PKA에 의한 인산화가 될 수 있다. 이를 확인하기 위하여 GST-NeuroD/BETA2 융합 단백질을 이용하여 PKA와의 *in vitro* kinase assay를 수행하였다. *E.coli* BL21을 형질전환시켜 얻어진 GST-NeuroD/BETA2 융합단백질의 발현 정도를 확인하기 위하여 autoradiograph를 수행하기 전, coomassie 염색을 수행하였다(Fig 14. A). PKA는 *in vitro* 상에서 NeuroD/BETA2를 인산화시키며, N-말단으로부터 아미노산 서열 233번째까지와의 사이에 NeuroD/BETA2가 인산화되는 위치가 있을 것으로 생각된다(Fig 14, B).

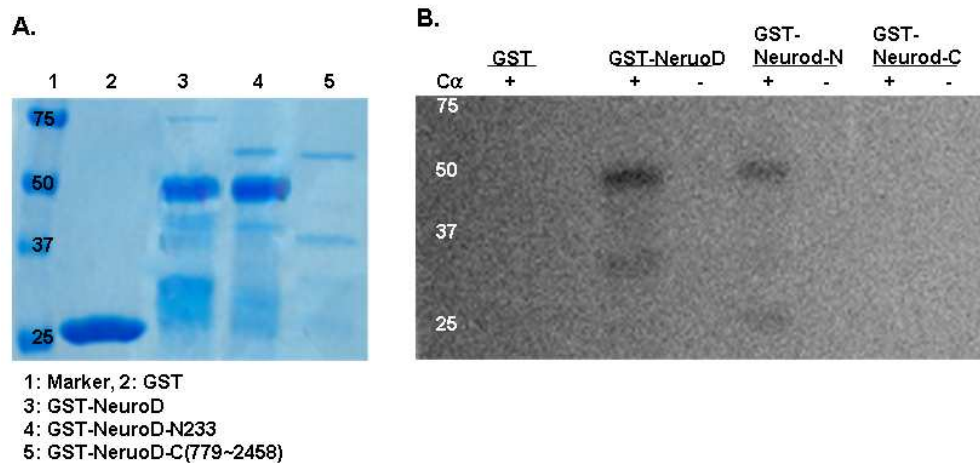


Figure 14. NeuroD/BETA2 was phosphorylated by PKA in N-terminal region.

GST-NeuroD and GST-NeuroD-N233 were made from hamster cDNA of NeuroD/BETA2(U24679, Fig 2). GST-NeuroD-C was mutant that was contain from 779th to 2458 bp of NeuroD/BETA2 cDNA. Results of Coomassie blue staining (A). Ca was catalytic subunit of PKA. Autoradiograph of *in vitro* kinase assay with PKA (B).

2. NeuroD/BETA2의 인산화 위치 예측

데이터베이스 조사를 통하여 인산화 위치를 예측해 보았을 때, 2개의 데이터베이스에서 NeuroD/BETA2의 91번째 Threonine에서 PKA에 의한 인산화가 일어날 수 있다는 결과를 나타내었다(표 1과 표 2). 이러한 예측 결과와 kinase assay 결과를 비교하여 볼 때 91번째 Threonine이 PKA에 의한 NeuroD/BETA2의 인산화가 일어날 가능성이 높은 위치로 예상된다.

Table 2. Prediction of NeuroD/BETA2 phosphorylation site by Netphos server.

MTKSYSEGLNGEPQPGPPSWTDECLSSQDEHEADKKEDELEAANNAEEDSLRNGGDEEDEDLEEDDEEEEDDQKP	80
KRRGPKKKKTKARLERFKLRRKAKARERNRHGLNAALDNLKRVPCYSKTQKLSKIETLRKAKNYIWALSEILRSGK	160
SPDLVSVFQTLCKGLSQPTTNLVAGCLQLNPR TFLPEQNPDPPHLP TASASFPVHPYSYQSPGLPSPPYGTMDSSHVFQ	240
VKPPPHAYSA TLEPFESPLTDCTSPSFDGFLSPPLS INGNFSFKHEPSAEFEKNYAFTHYPAATLAGPQSHGSI FSGA	320
TAPRCEIPIDNIMSFDSHSHHERVMSAQLNAIFHD	400
.....S.....S.....SS.....S.....	80
.....T.....S.....T.....S.....	160
.....T.....S.....T.....S.....	240
.....S.....S.....S.....S.....T.....	320
.....S.S.....	400

Serine predictions					Threonine predictions				
Name	Pos	Context	Score	Pred	Name	Pos	Context	Score	Pred
Sequence	4	-MTKSYSES	0.400	.	Sequence	2	---MTKSYS	0.065	.
Sequence	6	TKSYSEGL	0.904	+S*	Sequence	23	PPSWTDECL	0.037	.
Sequence	8	SYSEGLMG	0.351	.	Sequence	91	KKKMTKARL	0.143	.
Sequence	21	QGPPSWTDE	0.997	+S*	Sequence	133	CYSKTQKLS	0.270	.
Sequence	28	DECLSSQDE	0.992	+S*	Sequence	141	SKIETLR	0.884	+T*
Sequence	29	ECLSSQDE	0.936	+S*	Sequence	170	SFVQTLCKG	0.834	+T*
Sequence	52	AEEDSLRNG	0.755	+S*	Sequence	179	LSQPTTNLY	0.039	.
Sequence	131	VPCYSKTQK	0.008	.	Sequence	180	SQPTTNLY	0.103	.
Sequence	137	TQKLSKIET	0.994	+S*	Sequence	193	LNPRTFLPE	0.014	.
Sequence	153	IWALSEILR	0.009	.	Sequence	208	PHLPTASAS	0.025	.
Sequence	158	EILRSKSP	0.990	+S*	Sequence	232	PPVGTMDSS	0.520	+T*
Sequence	161	RSKSPDLY	0.242	.	Sequence	251	AVSATLEPF	0.105	.
Sequence	166	PDLVSFYQT	0.100	.	Sequence	261	ESPLTDCTS	0.114	.
Sequence	176	CKGLSQPTT	0.011	.	Sequence	264	LTDCTSPSF	0.054	.
Sequence	210	LPTASASFP	0.014	.	Sequence	299	NYAFTMHVP	0.022	.
Sequence	212	TASASFPVH	0.092	.	Sequence	306	YPAATLAGP	0.520	+T*
Sequence	219	VHPYSYQSP	0.241	.	Sequence	321	FSGATAPRC	0.020	.
Sequence	222	YSYQSPGLP	0.818	+S*					
Sequence	227	PGLPSPPYG	0.229	.					
Sequence	235	GTMDSSHVF	0.007	.					
Sequence	236	TMDSSHVFQ	0.503	+S*					
Sequence	249	PHAYSATLE	0.054	.					
Sequence	258	PFESPLTD	0.026	.					
Sequence	265	TDCTSPSFD	0.501	+S*					
Sequence	267	CTSPSFDGP	0.124	.					
Sequence	273	QGFLSPPLS	0.662	+S*					
Sequence	277	SPPLSINGN	0.262	.					
Sequence	283	NGNFSFKHE	0.982	+S*					
Sequence	289	KHEPSAEFE	0.974	+S*					
Sequence	312	AGPQSHGSI	0.146	.					
Sequence	315	QSHGSI FSG	0.185	.					
Sequence	318	GSIFSGATA	0.005	.					
Sequence	334	DNIMSFDSH	0.095	.					
Sequence	337	MSFDSHSHH	0.938	+S*					
Sequence	339	FDSSHHER	0.989	+S*					
Sequence	346	ERVMSAQLN	0.042	.					

Table 3. Prediction of NeuroD/BETA2 phosphorylation site by Scansite motif scanner and Prosite server.

	Scansite motif scanner	Prosite
PKA	T91 GPKKKKMTKARLERF	88-91 : KKmT
PKC	S315 AGPQSHGSIFSGATA	52 - 54: SIR
	S52 AMNAEEDSLRNGGDE	133 - 135: TqK
	S289 FSKHEPSAEFEKNY	141 - 143: TIR
	T141 QKLSKIETLRLAKNY	158 - 160: SgK 283 - 285: SfK
GSK3 β	S273 PSFDGPLSPPLSING	-
	T261 PFFESPLTDCTSPSF	
	S21 PQPQGPPSWTDECLS	
	S277 GPLSPPLSINGNFSF	
AMPK	-	-
CDK5	S227 YQSPGLSPPYGTMD	-
	S273 PSFDGPLSPPLSING	
	S161 EILRSGKSPDLVSFV	
ERK1	S273 PSFDGPLSPPLSING	-
	S227 YQSPGLSPPYGTMD	
	S277 GPLSPPLSINGNFSF	
	S265 SPLTDCTSPSFDGPL	
CaMKII	-	-

IV. 고 찰

단백질의 인산화 위치는 비교적 서열에 특이적이다. 인산화가 일어나는 곳은 인산화 효소에 따라 아미노산 서열 중 Serine이나 Threonine, 그리고 Tyrosine으로 한정되어 있다. 그러므로 발현 벡터에서 항원 결정기로 표지한 Flag과 NeuroD/BETA2 cDNA의 연결부분에서 위 세가지 아미노산 서열의 만들어지는 것을 배제하였다.

연구에 사용된 벡터의 염기서열을 기반으로 하여 얻어진 아미노산 서열을 이용하여 NeuroD/BETA2의 인산화 위치를 예측해 볼 수 있었다. NeuroD/BETA2 단백질은 15개의 Serine과 4개의 Threonine을 갖고 있었으며, 이 중 아미노산 서열 91번째에 위치하는 Threonine에서 PKA, 21번째에 위치하는 Serine에서 PKC, 그리고 52번째에 위치하는 Serine에서 GSK3B에 의한 인산화가 예상되었다(표 2과 표 3).

인산화 위치를 예상하는데 이용한 데이터베이스들이 사용하는 알고리즘은 크게 2개로 나눌 수 있다. 이를 대표하는 것이 Netphos와 PROSITE server로 전자는 신경망 알고리즘을 이용하여 보다 광범위한 범위에서 예측을 할 수 있으나, 간혹 잘못된 예측결과를 보여주는 경우가 있다. 후자의 경우 제한적인 모티프-(RK)X(2)(DE)X(3)Y 또는 (RK)X(3)(DE)X(2)Y (여기서 Y는 인산화 위치를 의미한다.) -를 이용하여 결과를 보여준다.

데이터베이스 조사를 통한 인산화 위치 예측에 있어서 가장 중요한 것은 예측된 결과를 100% 신뢰하지 말아야 한다는 것이다. 특히 하나의 데이터베이스만을 사용하고 신뢰하는 것은 큰 오류를 범할 수 있다 (Kim *et. al.*, 2002). 그러므로 본 연구에서는 3가지의 데이터베이스에서 예측한 결과를 종합하여 사용하였다.

Forskolin은 adenylylase로 세포에 처리하였을 경우 PKA를 활성화 시킨다. F11 세포에 NeuroD/BETA2를 과발현 시키고 forskolin을 처리하였을

때, neurite의 성장이 일어난다(Cho JH *et. al.* 2001). 이것은 forskolin의 처리에 의하여 NeuroD/BETA2가 조절을 받았음을 의미하며, 이 조절은 PKA에 의한 NeuroD/BETA2의 인산화를 포함할 수 있다고 생각되었다.

Forskolin을 이용하여 PKA를 활성화시켰을 때, 1시간후 NeuroD/BETA2의 발현이 증가하는 것을 관찰하였다. 또 핵과 세포질을 분리하여 관찰하였을 때도 유사한 결과를 얻었다. 전체 단백질의 발현양을 비교하였을 때와 달리 세포질 분획에서 forskolin을 처리하지 않았을 경우 NeuroD/BETA2의 발현 양이 매우 낮았으나, forskolin을 처리한 경우만을 생각해볼 때 forskolin에 의한 NeuroD/BETA2의 발현이 증가되고 있다고 판단된다. 따라서 PKA의 활성화가 NeuroD/BETA2의 발현이 증가하도록 조절하고 있을 것이라 생각된다. 한편 truncated 돌연변이인 NeuroD/BETA2-N233의 경우에는 NeuroD/BETA2보다 발현이 더 안정적이었고, forskolin에 의한 영향도 관찰되지 않았다. 이것은 NeuroD/BETA2의 발현 양상에 아미노산 서열 234번째부터 C-말단까지의 영역 역시 어떤 조절을 받고 있음을 의미한다고 생각된다.

Cycloheximide를 이용하여 NeuroD/BETA2의 전사를 억제한 후 PKA를 활성화 시켰을 경우 보존되는 NeuroD/BETA2 단백질의 양이 증가하였다. 그러므로 PKA 활성화에 영향에 의해 NeuroD/BETA2 단백질의 수명이 증가된다고 볼 수 있으며, 이것은 post-translational level에서의 조절이라는 설명이 가능하다. 또한 PKA가 직접적으로 NeuroD/BETA2를 조절할 수 있다는 가능성 역시 포함하고 있다. GST-NeuroD/BETA2 융합 단백질을 이용한 PKA catalytic subunit과의 In vitro kinase assay의 결과, NeuroD/BETA2는 N-말단으로부터 아미노산 서열 233번째 아미노산 까지에서 PKA에 의해 *in vitro*에서 인산화될 수 있다. 이상의 결과를 종합해 보면 PKA의 활성화에 의한 이러한 post-translational level에서의 NeuroD/BETA2의 조절은 PKA가 NeuroD/BETA2를 인산화 시킴으로써 이루어진다는 가설을 지지한다고 생각된다. 데이터베이스 조사를 통하여

예상한 PKA가 NeuroD/BETA2를 인산화시키는 위치는 N-말단으로부터 아미노산 서열 91번째에 위치하는 threonine이며, In vitro kinase assay 결과와 비교하였을 때 실제로 그 위치에서 인산화가 일어날 가능성은 매우 높다고 생각된다. 그러나 이를 확실시 하기 위해선 point-mutation 등의 추가적인 연구가 필요할 것이다.

또, translation이 억제되었을 경우 PKA 활성화시 보존되는 NeuroD/BETA2 단백질의 양과 PKA 활성화에 의한 NeuroD/BETA2의 발현 증가량을 비교해보았을 때, PKA 활성화에 의한 영향은 post-translational level 뿐만이 아니라 DNA나 mRNA 수준에서의 조절에도 관여하고 있다고 생각된다.

PKA를 활성화 시키고 ERK의 활성을 억제하였을 때 세포질에서 NeuroD/BETA2 단백질의 수명은 PKA를 활성화 시킨 조건에서 보다 감소하고, 아무런 처리도 하지 않은 대조군보다는 증가하는 것으로 관찰되었다. 또 핵으로 이동하는 NeuroD/BETA2 단백질의 양이 ERK의 활성이 억제되었을 경우에 매우 증가하였다. 이러한 결과는 ERK가 NeuroD/BETA2에 대한 post-translational level에서의 조절에 관여하고 있으며, NeuroD/BETA2 단백질의 세포질로부터 핵으로의 이동을 억제하는 증거라고 생각된다. 그러나 ERK 역시 인산화를 통한 NeuroD/BETA2의 발현 조절에 관여할 것이라 생각된다.

NeuroD/BETA2의 activation domain 일부가 제거된 돌연변이인 NeuroD/BETA2-N233의 발현정도는 NeuroD/BETA2 보다 훨씬 높으며, 더 안정적이었다. 또 NeuroD/BETA2-N233의 발현이 NeuroD/BETA2에 비해 더 안정적인 것으로 보아, NeuroD/BETA2 단백질의 분해는 C-말단과 관련이 있을 것으로 생각되며 이에 대한 연구가 더 필요할 것이다.

MIN 세포에 내재하는 NeuroD/BETA2 단백질의 수명을 6시간까지 관찰하였을 때, PKA가 활성화되면 NeuroD/BETA2 단백질의 수명이 2시간까지는 증가하는 경향이 관찰되었으나 그 이후에는 오히려 감소하였다. 따라서 PKA 활성화에 의한 NeuroD/BETA2의 발현 조절은 비교적 짧은

시간에 이루어진다고 생각된다.

293T 세포를 이용한 연구에서 western 분석을 수행하였을 경우, NeuroD/BETA2는 2개의 밴드로 관찰되었다. 이것은 일차 항체로 NeuroD 항체를 이용하였을 경우에도 동일한 밴드 패턴을 보였다. 이러한 밴드 패턴은 phosphatase를 처리한 경우에도 변화하지 않았다. 또한 MIN 세포에 내재하는 NeuroD/BETA2에서 관찰되는 밴드 패턴과도 유사하였다. 따라서 이러한 밴드 패턴은 인산화에 의한 것은 아니라고 생각되며, 다른 post-translational level에서의 조절 기작에 의한 영향 등을 고려하여 더 연구가 이루어져야 할 것이다.

PKA 활성화에 의해 영향을 받는 또 다른 Serine/Threonine 인산화 효소인 GSK3 β 는 *Xenopus*의 신경 발생 과정에서 NeuroD/BETA2의 기능을 억제한다(Emilie *et. al.* 1998). 그러므로 GSK3 β 도 NeuroD/BETA2를 인산화시키는 것으로 예상된다. 이를 확인하기 위한 추가적인 연구를 할 필요가 있다.

V. 결 론

PKA가 활성화 되었을 때, NeuroD/BETA2의 발현 양은 증가한다. 이러한 증가는 NeuroD/BETA2의 발현 뿐만 아니라 발현 후 post-translation level에서의 NeuroD/BETA2 단백질의 안정성의 증가도 포함하고 있다. Translation을 억제한 후 PKA를 활성화 시키면 NeuroD/BETA2 단백질의 안정성은 증가되며, In vitro에서 PKA는 NeuroD/BETA2를 인산화 시킨다. 그러므로 post-translation level에서의 NeuroD/BETA2는 PKA에 의해 인산화되어 안정성이 증가되도록 조절을 받으며, N말단으로부터 아미노산 서열 91번째 위치의 threonine이 인산화 위치일 것으로 예상된다.

ERK의 경우 세포질에서 NeuroD/BETA2 단백질의 수명을 증가시키고 핵으로의 이동을 억제한다. PKA의 활성화에 의한 NeuroD/BETA2에 대한 post-translational level에서의 조절은 PKA 뿐만 아니라 PKA 신호 전달 경로에서 PKA의 아래에 위치하는 ERK를 포함한 다른 인산화 효소들로부터 복합적인 조절을 받는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Gattiker A, Gasteiger E, Bairoch A : ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Applied Bioinformatics* 1(2): 107-108, 2002
2. Gaudillie're B, Konishi Y, Iglesia N, Yao G, Bonni A : A CaMKII-NeuroD Signaling Pathway Specifies Dendritic Morphogenesis. *Neuron* 41: 229-241, 2004
3. Caudy M, Vassin H, Brand M, Tuma R, LY Jan and YN Jan : a Drosophila gene essential for both neurogenesisi and sex determination, has sequence similarities to myc and the acheate-scute complex. *Cell*, 55: 106-1067, 1988
4. Cho JH, Kwon IS, Ghil SH, Tasi MJ, Kim YS, Lee YD, Suh-Kim H : Overexpression of BETA2/NeuroD induces neurite outgrowth in F11 neuroblastoma cells. *J Neurochem* 77(1): 103-109, 2001
5. Marcus E, Kintner C, Harris W : The Role of GSK3 β in Regulating Neuronal Differentiation in *Xenopus laevis*. *Mol and Cell Neurosci*. 12: 269-280, 1998
6. Guillemot F, LC Lo and AL Joyner : Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in th developing nervous system. *Mech Dev*, 42: 171-185, 1993

7. Homayouni R, Curran T : Cortical development: Cdk5 gets into sticky situation. *Curr Biol*, 10: R331-334, 2000
8. Huang H P, El-Hodiri. HM, Chu K, Jamrich M and Tasi MJ : Regulation of the Pancreatic Islet-Specific Gene BETA2(neuroD) by Neurogenin 3. *Mol Cell Bio*, Vol. 20: 3292-3307, 2000
9. Jan YN and LY Jan : HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell*, 75: 827-830, 1993
10. Jan YN and LY Jan : Genetic control of cell fate specification in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Annu Rev Genet*, 28: 373-393, 1994
11. Kageyama, MI Mizuta, Y Skoyama, A Kohyama-Koganeya, K Akagawa, K Uyemura and K Ishii,: Differential expression of NeuroD in primary cultures of cerebral cortical neurons. *Exp Cell Res*, 236: 412-417, 1997
12. Kim HJ, Song EJ, Lee KJ : Proteomic analysis of protein phosphorylations in heat shock response and thermotolerance. *J Biol Chem*, 28: 23193-23207, 2002
13. Kim JW, Seghers V, Cho JH, Kang Y, Kim SY, Ryu Y, Baek K, Aguilar-Bryan L, Lee YD, Bryan J, Suh-Kim H: Transactivation of the mouse sulfonyleurea receptor I gene by NeuroD/BETA2. *Mol Endocrinol*, 16(5): 1097-1107, 2002

14. Landschulz WH, PE Johnson and T McKnight: The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240: 1759-1764, 1988
15. Lassar AB, RL Davis, WE Wright, T Kadesch, C Murre, Voronova, D Baltimore and H Weintraub: Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/47-like protein *in vivo*. *Cell*, 66: 305-315, 1991
16. Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Christian J, A Sigrist, Hofmann K and Bairoch A : The PROSITE database, its status in 2002. *Nuc Acids Res*, Vol. 30: 235- 238, 2002
17. Lee JE, S M Hollenberg, L Snider, D L Turner, N Lipnick and H Weintraub : Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science*, 268: 836-844, 1995
18. Luscher B and R N Eisenmann : A new light on Myc and Myb: Part I, Myc. *Genes & Dev*, 4: 2025-2035, 1990
19. Marcora E, Gowan K, Lee JE : Stimulation of NeuroD activity by huntingtin and huntingtin-associated proteins HAP1 and MLK2. *Proc Natl Acad Sci*, 100(16): 9578-83, 2003
20. Marcus EA, Kintner C, Harris W: The Role of GSK3 β in Regulating Neuronal Differentiation in *Xenopus Laevis*. *Mol Cell Neurosci* 12: 269-280, 1998

21. Mellentin, JD, Smith SD and Cleary ML: Lyl-1, a novel gene altered by chromosomal translocation in T cell leukemia, codes for a protein with a helix-loop-helix DNA binding motif. *Cell*, 53: 77-83, 1989
22. Miyata T, Maeda T, Lee JE: NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev* 13: 1647-521, 1999
23. Moore KB, Schneider ML, Vetter ML: Posttranslational mechanism control the timing of bHLH function and regulate retinal cell fate. *Neuron* 34(2):183-95, 2002
24. Murr C, PS McCaw, H Vaessin, M Caudy, LY Jan. YN Jan, CV Cabrera, JN Buskin, SD Hauschka, AB Lassar, H Weintraub and D Baltimore : Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, 58: 537-544, 1989
25. Blom N, Gammeltoft S and Brunak S : Sequence and Structure-based Prediction of Eukaryotic Protein Phosphorylation Sites. *J Mol Biol*, 294: 1351-1362, 1999
26. Olson EN and W H Klein: bHLH factors in muscle development: Dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Gens & Dev Biol*, 8: 1-8, 1994

27. Ratineau C, Petry MW, Mutoh H, Leiter AB: Cyclin D1 represses the basic helix-loop-helix transcription factor, BETA2/NeuroD. *J Biol Chem*, 277:8847-53, 2002

28. Ross CA, Pearlson GD: Schizophrenia, The heteromodal association neocortex and development: Potential for neurogenetic approach. *Trends Neurosci* 19: 171-176, 1996

29. Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell TK, Turner D, Hollenberg S, Zhuang Y and Lassar A : The MyoD gene family: Nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*, 251: 761-766, 1991

- ABSTRACT -

The regulation of expression level in NeuroD/BETA2 by PKA

Young Gook Shin

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Young Don Lee)

Post-translational regulation of bHLH transcription factors could be effected by phosphorylation, then NeuroD/BETA2 could be effected by phosphorylation too. NeuroD/BETA2 was phosphorylated at Ser336 by CaMKII, then formation of dendrite could be effected by phosphorylation of NeuroD/BETA2. NeuroD/BETA2 might be regulated by phosphorylation at post-translation level. For searching effect of phosphorylation of NeuroD/BETA2, We found kinase and phosphorylation site of NeuroD/BETA2.

Treatment of 293T cells with forskolin overexpressed NeuroD/BETA2, expression of NeuroD/BETA2 was increased. And NeuroD/BETA2 could be phosphorylate at N-terminous region by PKA. We predicted that phosphorylation site of NeuroD/BETA2 was at Thr91, using databases: Netphos, PROSITE and ScanProsite.

Key Words : NeuroD/BETA2, phosphorylation, kinase, protein stability