

NIH3T3와 NIH3T3(ras) 세포에서 Dynamin II 발현 및 형태적 비교

이철우[†], 김수관[†], 최정윤¹, 최백동¹, 배춘식², 정순정¹, 정문진^{1,*}
조선대학교 치과대학 구강외과학교실, ¹구강조직학교실,
²전남대학교 수의과대학 및 생물공학연구소

Dynamin II Expression and Morphological Comparison of NIH3T3 and NIH3T3 (ras) Cells

Chul-Woo Lee[†], Su-Gwan Kim[†], Jeong-Yun Choi¹, Baik-Dong Choi¹,
Chun-Sik Bae², Soon-Jeong Jeong¹ and Moon-Jin Jeong^{1,*}

Department of Oral & Maxillofacial Surgery,

¹Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University,

²College of Veterinary Medicine, Biotechnology Research Institute,

Chonnam National University, Gwangju, Korea

(Received July 21, 2005; Accepted August 23, 2005)

ABSTRACT

It has been known that ras signaling transduction leads to cell proliferation and migration including various adaptor molecules. Dynamin protein has been implicated in the formation of nascent vesicles in both the endocytic and secretory pathways. Dynamin was classified into three isoforms: dynamin I is only expressed in neuronal tissue, dynamin II is expressed ubiquitously in all tissue but that of dynamin III is confined to testis. We have reported in previous study that Grb2, binding to ras, was associated with dynamin II in NIH3T3 cells. Therefore we have tried to identify the relative expression of dynamin II according to overexpressed ras protein in ras oncogene transfected cells (NIH3T3 (ras)). For the detection of differential expression of dynamin II, we have used immunofluorescent staining and western blot methods in NIH3T3 and NIH3T3 (ras) cells. Next we have described the morphological differences between NIH3T3 and NIH3T3 (ras) cells using SEM and TEM. From these experiments dynamin II was highly expressed in NIH3T3 (ras) cells. NIH3T3 cells was transformed to more spindle shape with many cell process by transfection of ras oncogene. Moreover dynamin II was more concentrated in endocytotic membrane of the NIH3T3 (ras) cells compared to that of NIH3T3 cells. The present results suggested that dynamin II may involve the intermediate messenger in Ras signaling transduction pathway.

Key words : Dynamin II, NIH3T3, NIH3T3 (ras), ras

[†] These two authors equally contributed to this work.

*Correspondence should be addressed to Dr. Moon-Jin Jeong, Department of Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University, Gwangju, 501-759, Korea. Ph.: (062) 230-6895, FAX: (062) 224-3706, E-mail: mjjeong@chosun.ac.kr

서 론

세포의 이동을 조절하는 단백질들 중 암세포에서 특징적으로 발현되는 몇 가지 주요 신호전달분자들인 ras, rac, rho 등의 단백질에 대한 신호전달기작은 이미 잘 알려져 있으며, 암세포로의 전이에도 커다란 영향을 끼치는 것으로 보고되었다(Wang & Moran, 1996; Huff et al., 1997; Li et al., 1997). 이 단백질 중 ras는 세포내의 신호전달과정에서 세포의 성장 및 분화 과정에 필수적이며, Grb2 (Growth factor receptor bound protein-2)라는 매개 단백질의 SH2 부위가 외부 신호의 자극에 활성화된 수용체의 인산화된 타이로신기에 결합하고 SH3 부위는 mSos의 프로린이 많은 부위에 결합하여 Grb2-mSos 복합체를 형성함으로써 ras를 활성화 시킨다고 알려져 있다(Vojtek & Der, 1998).

Dynamin은 약 100 kD의 단백질로 크게 I, II, III 세 가지 type으로 알려져 있다. 이 단백질에 관한 연구는 주로 처음 알려진 dynamin I에 국한되어 진행되어 왔으나(Artalejo et al., 1997), 최근에는 부분적으로 dynamin II에 관한 연구들이 시작되고 있는 실정이다. Dynamin I은 신경세포의 신경 연결 부위에서 신경 전달 vesicle의 형성에 관여하는 것으로 알려져 있으며, dynamin II는 모든 조직 내에서 발현되며, dynamin III는 생식 기관 조직에서 국한적으로 발현되는 것으로 알려져 있다(Cook et al., 1994; Sontag et al., 1994; Shupliakov et al., 1997). Dynamin 단백질은 크게 GTPase, Plecstrin Homologous (PH), Coiled Coil (CC), GTPase Effector Domain (GED), Proline Rich Domain (PRD)으로 구성되어 있다(Downing et al., 1994; Gibson et al., 1994; Warnock et al., 1995; Grabs et al., 1997). 이러한 dynamin은 endocytosis의 vesicle 형성에 관여하며, 최근의 보고에 의하면 세포내 골지체의 vesicle에서도 분포함으로써 vesicle trafficking을 도와주는 역할을 한다고 보고되었다(Obar et al., 1990; Herskovits et al., 1993; Noda et al., 1993; Kessels & Qualmann 2004).

최근에 본 연구팀에 의해 ras 신호전달체계에 위치한 Grb2와 dynamin II가 결합하는 것이 규명되어, 본 연구에서는 ras 단백질의 발현에 따른 dynamin II의

연관성 있는 발현을 확인하고자 하였으며, ras 단백질이 과발현되는 세포 (NIH3T3 (ras))와 NIH3T3 세포의 형태적인 차이를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

NIH3T3와 ras oncogen이 과발현되도록 transfection 하여 제작한 NIH3T3 (ras) 세포를 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 10% FBS, penicillinG, streptomycin sulfate, amphotericin B, 2-mercaptoethanol)을 이용하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 키웠다.

2. Western blot

Dynamin II 단백질의 세포내 발현을 확인하기 위해, NIH3T3와 NIH3T3 (ras) 세포를 사용하였다. NIH3T3와 NIH3T3 (ras) 세포를 10 cm dish에 분주하여 배양하였다. 48~72시간 사이에 세포를 scrapper를 이용하여 모은 뒤 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin)에 2시간 용해시켰다. 용해된 세포를 원심분리 (13,000 rpm, Eppendorf centrifuge, 20 min) 한 후 상층액을 취하였다. SDS-polyacrylamide gels에 전기영동하여 nitrocellulose filters (Amersham)로 transfer 하였다. Membrane은 5% skim milk (PBST)로 incubation 한 후, 1차 항체로 dynamin II (Hudy2, Upstate Biotechnology Inc.)를 이용하였고, 2차 항체로는 HRP-conjugated antibody (Upstate Biotechnology Inc.)를 사용하여 ECL kit (Amersham)로 단백질의 발현을 확인하였다.

3. 공초점레이저현미경분석

6 well에 cover slip을 넣고 5×10^4 개의 NIH3T3, NIH3T3 (ras) 세포를 분주하여 24시간 배양하였다. 배양된 세포를 고정하고 4% paraformaldehyde (4°C, phosphate buffer, pH 7.2)에 10분간 고정하였다. 고정된 세포를 0.1% Triton X-100으로 5분간 처리한 후,

비특이적 항체의 반응을 억제하기 위하여 10% BSA (PBS)로 10분간 처리하였다. Anti-mouse dynamin II 로 일차항체로 처리한 후 anti-mouse FITC-conjugated IgG로 2차 항체를 1시간 반응시켰다. 반응을 마친 세포는 cold PBS로 수세한 후 Fluorescent Mounting Medium(DAKO)을 사용하여 포매 하였다. 준비된 시료는 confocal laser scanning microscope (TCS400, LEICA, Inc.)를 사용하여, 각 세포내 dynamin II 단백질의 위치를 확인 관찰하고, SCANware 5.0 (LEICA, Inc.) program을 사용하여 사진을 얻은 후, Adobe Photoshop software (Adobe Photosystems, Inc.)로 분석하였다.

4. 투과 및 주사전자현미경분석

NIH3T3와 NIH3T3 (ras)의 미세구조적 및 형태적 차이를 분석하기 위하여 고배율의 투과전자현미경과 주사전자현미경을 이용하여 확인하였다. 세포를 DMEM(10%FBS)에서 배양한 후, 6 well에 cover slip을 넣어 5×10^4 개의 세포를 분주하여 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde (4°C, phosphate buffer, pH 7.2)에 1시간 고정 한 후, Sorenson's phosphate buffer (4°C, pH 7.2)로 10분씩 3회 세척한 후, 1% OsO₄ (4°C, phosphate buffer, pH 7.2)로 2시간 후고정 하였다. 이어서 동일 완충용액을 사용하여 충분히 세척하여 에탄올 농도상승 순으로 탈수하였다. 탈수를 마친 세포는 propylene oxide로 치환하여 Epon 혼합액 (Polyscience)에 포매한 뒤, 진공건조오븐 (Yamato, Japan)에서 60°C로 48시간 중합하였다. 포매한 시료는 ultramicrotome (LKB Co., Sweden)으로 준 초박절편을 제작하여 1% toluidine blue (1% borax)로 염색하였다. 이어서 초박절편을 제작하여 copper 그리드에 부착시킨 다음, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEM 100 CX-II형 투과전자현미경으로 80 kV에서 관찰하였다.

Dynamin II의 세포내 분포를 확인하기 위하여 초박절편을 니켈그리드에 부착시키고 Sodium m-periodate (포화, 10 min)로 unmasking하였다. 1차 항체는 면역형광법에서 사용한 항체를 이용하였고, 2차 항체는 Goat-anti-mouse IgG (15 nm gold, Sigma, 1 : 100)을

사용하여 uranyl acetate로 염색하여 관찰하였다.

각 세포는 3차원적 형태적인 차이를 관찰하기 위하여 4% glutaraldehyde (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2) 용액에 2시간 고정하였다. 동일 완충용액으로 여러 번 수세한 다음, 증류수로 5분간 수세하고, 에탄올 농도 순으로 탈수한 뒤, Hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma)로 건조시킨 후, Polaron Sputter Coater (Bio-Rad)로 gold plasma를 피복 하였다. 완성된 시료는 JEOL 840A형 주사전자현미경으로 15 kV에서 관찰 및 촬영하였다.

결 과

1. NIH3T3 세포와 NIH3T3 (ras) 세포내 dynamin II의 분포 및 발현

공초점레이저현미경을 이용하여 관찰된 dynamin II는 NIH3T3 세포에서 세포질내에 전반적으로 분포하고 있었으나, 핵주변의 세포질에 집중되어 있음이 확인되었다 (Fig. 1a). 반면, NIH3T3 (ras) 세포에서는 세포질의 전반에 걸쳐 분포되었으나, 세포질에서 세포막 쪽에 집중되어 있음이 관찰되었으며 (Fig. 1b), NIH3T3 세포에 비하여 발현이 많이 되는 것을 알 수 있었다. 두 세포에서 발현되는 dynamin II의 단백질 양을 비교하고자 생화학적인 방법인 western blot을 시행한 결과 100 kD의 dynamin II가 NIH3T3 (left lane) 세포에서보다 ras 단백질이 과발현되는 NIH3T3 (ras) (right lane) 세포에서 다량으로 발현됨이 확인되었다 (Fig. 1c). 또한, NIH3T3 (ras) 세포와 NIH3T3 세포에서 정확한 dynamin II의 기능적인 위치를 확인하기 위하여 colloidal gold를 반응시킨 결과, NIH3T3 세포에 비하여 (data not shown) NIH3T3 (ras) 세포의 endocytosis가 일어나는 부위에서 많이 관찰되었다 (Fig. 1d).

2. NIH3T3 세포와 NIH3T3 (ras) 세포의 형태학적 차이

NIH3T3 세포는 일반적으로 원주형이었으며, 세포는 단층을 이루고 있었고, 세포사이에서는 contact inhibition이 관찰되었다 (Fig. 2a). 고배율의 주사전자현미

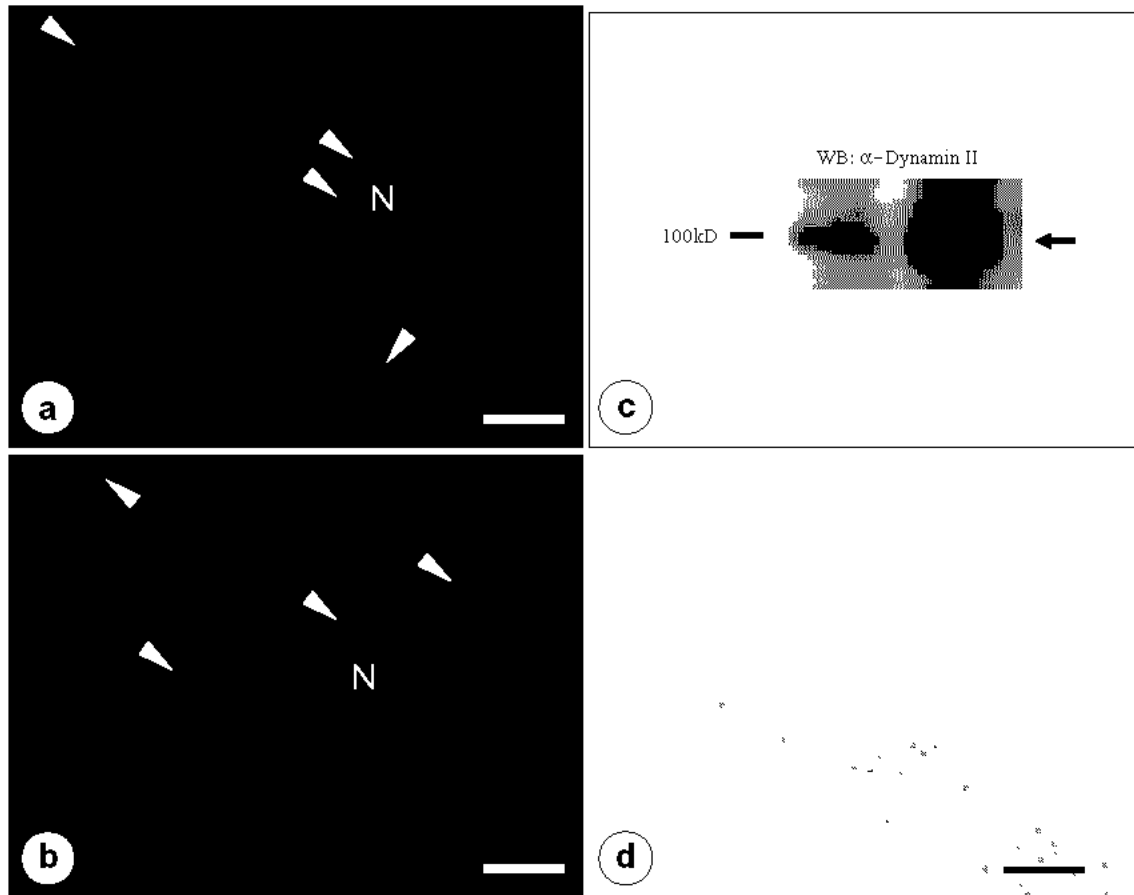


Fig. 1. a, b) The immunofluorescence staining of dynamin II in a) NIH3T3 and b) NIH3T3 (ras) cells. The cells that were labeled with monoclonal anti-dynamin2 antibody to label the endogenous dynamin II and observed by confocal laser scanning microscopy. Arrows indicate the localization of dynamin II. All scale bars indicate 5 μm . c) The expression of dynamin II in NIH3T3 (ras) (right lane) was largely expressed compared to that of NIH3T3 (left lane) by western blot. d) Colloidal golds were more observed in NIH3T3 (ras) cells with endocytotic invagination of the cell membrane. Scale bar is 0.2 μm .

경으로 관찰한 결과 NIH3T3 세포는 길게 신장된 세포질 돌기를 내고 있었고, 세포의 앞쪽이 뒤쪽보다 가는 유선형으로 확인되었다. 또한, 세포질의 표면은 매끈하였으며, 세포와 세포 사이에 가는 세포질돌기를 뻗고 있음이 관찰되었다 (Fig. 2b). 반면, NIH3T3 (ras) 세포는 일반적으로 암세포에서 관찰되는 균질의 형태를 이루고 있었으며, 이 세포들은 contact inhibition을 하지 않아 무리지어 증식화 되어 있었다 (Fig. 2c).

NIH3T3 (ras) 세포의 고배율의 관찰에서, 특히하게도 세포의 표면은 매우 거칠었으며, 대부분 짧고 가는

미세융모의 형태를 지닌 세포질 돌기로 덮혀 있었다. 기본적으로 세포와 세포사이는 세포질돌기에 의해 서로 연결되어 있었으나, 이들 돌기를 중심으로 작고 가는 세포질들에 의해서 NIH3T3 세포에 비하여 좀 더 밀착되어 있었다 (Fig. 2d). 또한, 형태적인 계측은 시행되지 못하였으나, 관찰된 동일 배율에서 세포의 크기를 비교하였을 때, NIH3T3 세포에 비하여 1.5배 정도의 크기를 지니고 있었고, 핵 또한 큰 것으로 확인되었다 (Figs. 2a-d). 투과전자현미경으로 관찰된 NIH3T3 (ras)의 세포질에는 다수의 공포들이 존재하고 있었으

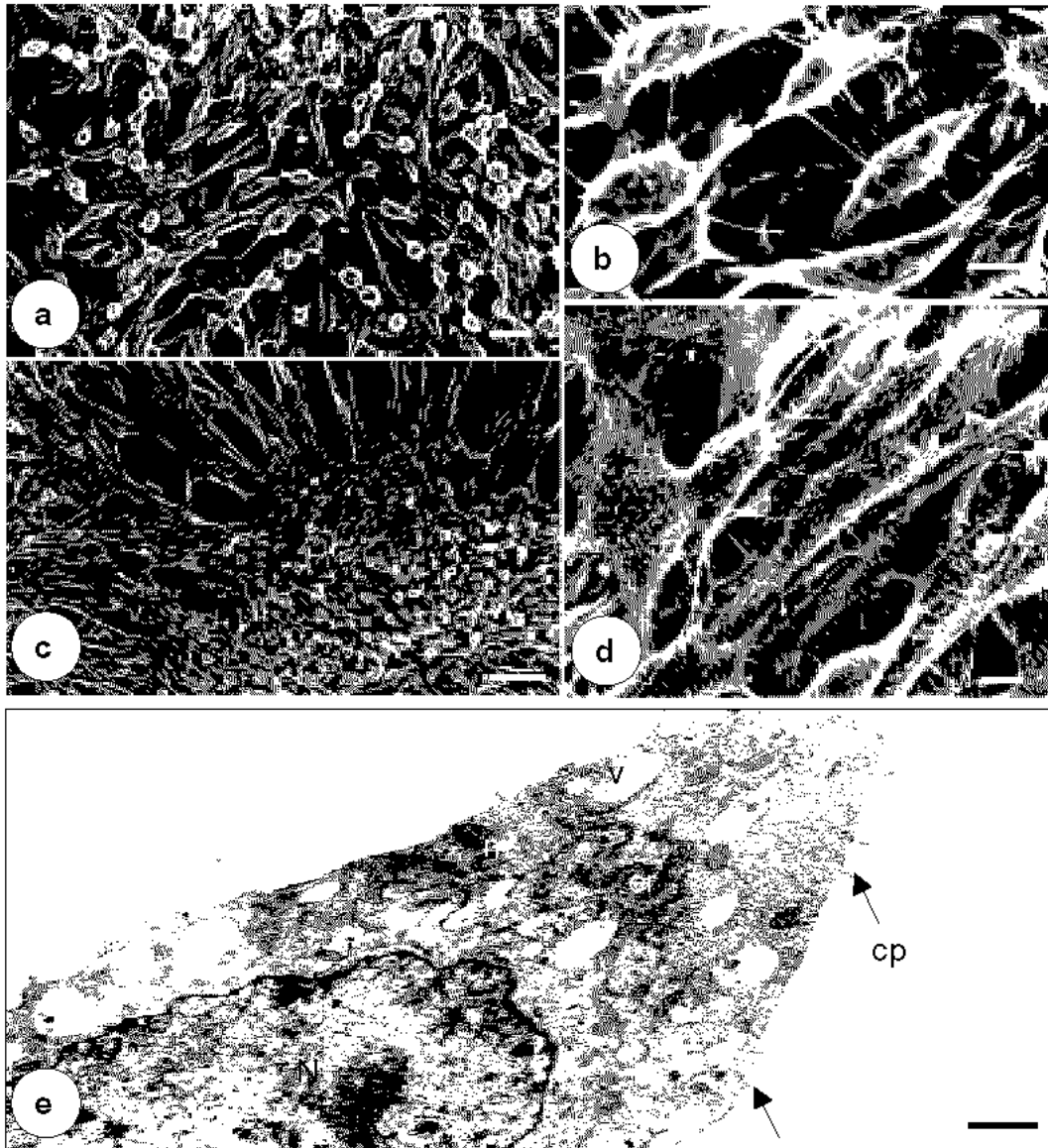


Fig. 2. SEM images of NIH3T3 and NIH3T3 (ras) cells. a) SEM image of NIH3T3 at low magnification. These cells are spindle shape and showed contact inhibition morphology. Scale bar is 10 μm . b) High magnification of SEM image of NIH3T3. These cells were contacted each other by long cell processes. Spindle type of these cells was similar to fibroblast cell morphology. Scale bar indicates 5 μm . c) SEM image of ras overexpressed NIH3T3 (ras) cells. Group pattern of these cells showed that stack forms such as cells of the tumor. The morphology of these cells was long and slender type. Scale bar is 50 μm . d) Striking change of these cells was numerous short cell process on their cell surface. Another feature of NIH3T3 (ras) cells was no contact inhibited morphology. However fibroblast-like shape was maintained almost observed cells. Scale bar indicates 5 μm . e) TEM images of NIH3T3 (ras) cells. NIH3T3 (ras) cells were spindle and elongated slender morphology, although morphological changes were various. This cell had numerous vacuoles (v) in the cytoplasm and showed numerous cytoplasmic process (cp, arrows) in its cell surface. Population pattern of hetero- and euchromatin in nucleus (N) showed that presenting in active state; m, mitochondria; er, endoplasmic reticulum. Scale bar indicates 1 μm .

며, 주사전자현미경에서 관찰된 것과 동일하게 세포질에 비하여 커다란 핵을 지니고 있었다. 핵은 핵질 내에 전자밀도가 높은 이질염색질이 산재되어 있는 것으로 보아 활성이 강한 세포임이 사료되며, 핵 주변을 따라 rER의 구조가 산발적으로 관찰되었다. 또한, 핵의 위쪽 세포질에는 간상형의 미토콘드리아들이 관찰되었고, 세포질의 전반에 걸쳐 유리 리보솜들이 산재되어 있었다. 세포질의 표면은 작고 가는 미세융모의 형태를 지닌 세포질 돌기들로 거칠게 관찰되었다(Fig. 2e).

고 찰

Dynamin II는 endocytosis와 관련되어 모든 조직에서 광범위하게 발현되고, mCSF와 insulin으로 자극된 사람의 단핵구에서 Grb2와 결합한다고 알려져 있다(Ando et al., 1994; Cook et al., 1994; Sontag et al., 1994; Kharbanda et al., 1995). 또한, 본 연구팀의 이전 논문에서 dynamin II는 NIH3T3(ras) 세포에서 Grb2와 결합한다고 보고하였으며(Yoon et al., 1997), NIH3T3(ras) 세포에서 dynamin II(Fig. 1c)와 더불어 Grb2(data not shown)의 발현이 증가함을 관찰하였다. Grb2는 다양한 세포기능에 매우 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있다(Wang & Moran 1996; Yoon et al., 1997). 또한 Grb2는 RTK(the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase)를 연결해주는 역할을 함으로서 ras 단백질을 활성화 시켜 ras의 하위 신호전달 그룹인 kinase, ERK1, 2 등을 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Lowenstein et al., 1992). Ras 단백질은 monomeric GTPase의 커다란 superfamily에 속하며 두 개의 다른 subfamily인 rho와 rac을 포함하고 있다. Rho와 rac 단백질들은 세포표면의 수용체로부터 신호를 actin 세포골격으로 전달하고, rab family는 세포내 이동 vesicles의 운송을 조절하는데 관련되어 있다(Lowenstein et al., 1992; Li et al., 1997; Vojtek & Der 1998).

상피성장인자(EGF)의 자극에 의해 Grb2와 Sos1 복합체가 세포막 쪽으로 유입되면서 ras 신호전달이 일어나 세포질내 dynamin 단백질이 증가함으로써

endocytosis가 활성화되며(Vidal et al., 1998), ras oncogene이 과발현된 NIH3T3 세포는 contact inhibition이 소실되고 형태적인 변화가 일어난다(Crespo et al., 1995; Khosravi-Far et al., 1996). 따라서 이러한 결과를 미루어 보면, 본 연구에 사용된 NIH3T3(ras) 세포는 ras 단백질이 과발현됨으로써 ras 신호가 계속적으로 발현되어 contact inhibition이 소실되었으며, 외에도 다수의 미세세포돌기들과 endocytosis를 포함한 세포내 vesicle들이 관찰된 것으로 생각된다(Fig. 2a-e). 또한, dynamin II가 NIH3T3(ras) 세포의 세포막과 endocytosis가 일어나는 부분에서 집중되어 있는 것으로 보아(Figs. 1b, d), ras 단백질의 활성화와 더불어 dynamin II가 up-regulation된 것으로 사료된다.

암세포들은 정상적인 세포에서보다 세포활성이 강하여 형태학적으로 세포성 돌기, 라멜라층판 등이 두드러지게 나타나며, 미세구조적으로도 세포막을 시작으로 endocytosis가 정상적인 세포에 비하여 현저하게 많이 일어나고, 세포골격성 단백질들의 증가를 동반한다고 보고되어있다. 따라서, 이러한 세포학적인 특징으로 미루어 암세포는 정상세포에 비해 비 특이적인 세포 이동의 기회가 많음을 알 수 있다. 여러 domain을 지닌 dynamin 단백질의 기능을 연구하기 위하여 많은 mutants를 이용한 연구들이 수행되었는데, 주로 GTPase domain부분을 mutation시킨 K44E, S45N과 최근에 본 연구자에 의해서 기능이 밝혀진 G38V 등이 있다(Jeong et al., 2001). 이러한 mutant들을 통한 연구들은 endocytotic vesicle의 형성이 dynamin의 GTP의 가수분해에 의해서라는 이론을 뒷받침하기에 충분하였으나, 최근에 발표된 mutant(K694A와 R725A)들에 대한 실험 결과들은 이러한 초기 이론에 의문을 제기하고 있다(Herskovits et al., 1993; Okamoto et al., 1997; Song et al., 2004). 이외에도 filopodia에서 actin이 분포하는 부위에 dynamin이 많이 분포하며(Gold et al., 1999; Schafer 2004), trans-Golgi network에서 vesicle을 이동하는데 관여한다고 보고되었다(Maier et al., 1996; Jones et al., 1998). 따라서, endocytosis에 dynamin이 관여하는 것은 정문화 되어가고 있지만, 단지 하나만의 기능을 수행하는 단백질인가에 대해서는 아직 논란의 대상이 되고 있는 실정이다. 이러한 연구 결과들을 종합해 보면 dynamin II가

NIH3T3 (ras) 세포에서 증가한다는 본 연구 결과는 dynamin II가 endocytosis 뿐만 아니라 세포의 다른 활성(세포이동, vesicle 이동 등)에도 관여할 것이라 볼 수 있다.

참 고 문 헌

- Ando A, Yonezawa K, Gout I, Nakata T, Ueda H, Hara K, Kitamura Y, Noda Y, Takenawa T, Hirokawa N, Waterfield MD, Kasuga M: A complex of GRB2 dynamin binds to tyrosine phosphorylated insulin receptor substrate 1 after insulin treatment. *EMBO J* 13 : 3033-3038, 1994.
- Artalejo CR, Lemmon MA, Schlessinger J, Palfrey HC: Specific role of the PH domain of dynamin 1 in the regulation of rapid endocytosis in adrenal chromaffin cells. *EMBO J* 16 : 1565-1574, 1997.
- Cook TA, Urrutia R, McNiven MA: Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci* 91 : 644-648, 1994.
- Crespo P, Mischak H, Gutkind JS: Overexpression of mammalian protein kinase C zeta does not affect the growth characteristics of NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 213(1) : 266-272, 1995.
- Downing AK, Driscoll PC, Gout I, Salim K, Zvelebil MJ, Waterfield MD: Three dimensional solution structure of the pleckstrin homology domain from dynamin. *Curr Biol* 4 : 884-891, 1994.
- Gibson TJ, Hyvonen M, Musacchio A, Saraste M, Birney E: PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci* 19(9) : 349-353, 1994.
- Gold ES, Underhill DM, Morrisette NS, Guo JB, McNiven MA, Aderem A: Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J Exp Med* 190 : 1849-1856, 1999.
- Grabs D, Slepnev VI, Songyang Z, David C, Lynch M, Cantley LC, De Camilli P: The SH3 domain of amphiphysin binds the proline rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J Biol Chem* 272 : 13419-13425, 1997.
- Jeong MJ, Yoo J, Lee SS, Lee KI, Cho A, Kwon BM, Moon MJ, Park YM, Han MY: Increase GTP binding to dynamin II does not stimulate receptor mediated endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 283 : 136-142, 2001.
- Jones SM, Howell KE, Henley JR, Cao H, McNiven MA: Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans Golgi network. *Science* 279 : 573-577, 1998.
- Herskovits JS, Shpetner HS, Burgess CC, Vallee RB: Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C terminal domain. *Proc Natl Acad Sci* 90 : 11468-11472, 1993.
- Huff SY, Quilliam LA, Cox AD, Der CJ: R. Ras is regulated by activators and effectors distinct from these control ras function. *Oncogene* 14 : 133-143, 1997.
- Kessels MM, Qualmann B: The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J Cell Sci* 117 : 3077-3086, 2004.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 6132-6136, 1995.
- Khosravi Far R, White MA, Westwick JK, Solski PA, Chrzanowska-Wodnicka M, Van Aelst L, Wigler MH, Der CJ: Oncogenic Ras activation of Raf/mitogen activated protein kinase independent pathways is sufficient to cause tumorigenic transformation. *Mol Cell Biol* 16(7) : 3923-3933, 1996.
- Li G, D'Souza Schorey C, Barboeri MA, Cooper JA, Stahl PD: Uncoupling of membrane ruffling and pinocytosis during ras signal transduction. *J Biol Chem* 272 : 10337-10340, 1997.
- Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J: The SH2 and SH3 domain containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70(3) : 431-442, 1992.
- Maier O, Knoblich M, Westermann P: Dynamin II binds to the trans Golgi network. *Biochem Biophys Res Commun* 223 : 229-233, 1996.
- Noda Y, Nakata T, Hirokawa N: Localization of dynamin : widespread distribution in mature neurons and association with membranous organelles. *Neuroscience* 55 : 113-127, 1993.
- Obar RA, Collins CA, Hammarback JA, Shpetner HS, Vallee RB: Molecular cloning of the microtubule associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP binding proteins. *Nature* 347 : 256

- 261, 1990.
- Okamoto PM, Herskovits JS, Vallee RB: Role of the basic, proline rich region of Dynamin in Src Homology 3 domain binding and endocytosis. *J Biol Chem* 272 : 11629-11635, 1997.
- Schafer DA: Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin. *Traffic* 5 : 463-469, 2004.
- Shupliakov O, Low P, Grabs D, Gad H, Chen H, David C, Takei K, De Camilli P, Brodin L: Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin SH3 domain interactions. *Science* 276 : 259-263, 1997.
- Song BD, Yasar D, Schmid SL: An assembly incompetent mutant establishes a requirement for dynamin self assembly in clathrin mediated endocytosis in vivo. *Mol Biol Cell* 15 : 2243-2252, 2004.
- Sontag JM, Fykse EM, Ushkaryov Y, Liu JP, Robinson PJ, Sudhof TC: Differential expression and regulation of multiple dynamins. *J Biol Chem* 269 : 4547-4554, 1994.
- Vidal M, Montiel JL, Cussac D, Cornille F, Duchesne M, Parker F, Tocque B, Roques BP, Garbay C: Differential interactions of the growth factor receptor bound protein 2 N-SH3 domain with son of sevenless and dynamin. *J Biol Chem* 273 : 5343-5348, 1998.
- Vojtek AB, Der CJ: Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 273 : 19925-19928, 1998.
- Wang Z, Moran MF: Requirement for the adapter protein GRB2 in EGF receptor endocytosis. *Science* 272 : 1935-1939, 1996.
- Warnock DE, Terlecky LJ, Schmid SL: Dynamin GTPase is stimulated by crosslinking through the C terminal proline rich domain. *EMBO J* 14 : 1322-1328, 1995.
- Yoon SY, Koh WS, Lee KI, Park YM, Han MY: Dynamin II

associates with Grb2 SH3 domain in ras transformed NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 234 : 539-543, 1997.

<국문초록>

Ras 신호전달체계는 세포내 다양한 결합 분자들과 더불어 세포의 분열과 세포의 이동에 관여한다. Dynamin 단백질은 endocytosis와 분비과정에서 vesicle를 분리하는데 관여하는 것으로 알려져 있으며, 3가지 아형으로 구분된다. Dynamin I은 신경조직에서만 발현되고, dynamin II는 모든 조직에서 발현되지만 dynamin III는 정소를 포함한 생식기계에서만 발현된다. 선행된 연구에서 NIH3T3 세포를 이용하여 ras과발현 세포주를 만들었으며, dynamin II와 ras의 신호전달체계에 있는 Grb2가 결합한다는 것을 보고하였다. 따라서, 본 연구는 ras 단백질이 과발현되는 세포 (NIH3T3 (ras))와 대조세포인 NIH3T3의 형태학적인 차이점을 분석하고, 이 두 세포들에서 dynamin II 단백질의 발현의 차이를 비교하고자 하였다. Dynamin II의 발현차이를 분석하기 위해 형광염색을 하여 공초점 레이저현미경으로 세포내 분석을 하였으며, western blot을 시행하여 생화학적인 발현차이를 보았다. 또한, 두 세포의 미세구조적인 분석을 위하여 SEM과 TEM을 사용하였다. Dynamin II는 NIH3T3 (ras) 세포에서 발현이 증가하였으며, NIH3T3 세포에 비하여 좀더 방추형이었으며, 작은 세포질 돌기가 세포막을 따라 다수 신장되어있음이 관찰되었다. 또한, NIH3T3 (ras) 세포의 endocytotic vesicle이 형성되는 부위에서 dynamin II의 발현이 증가하였다. 이러한 결과로 dynamin II는 ras신호전달체계의 한 신호전달분자로서 작용을 할 것으로 사료된다.