

The Effect of Alpha Subunit of Go on Cell Growth

Jung Hee Won and Sung-Ho Ghil[†]

Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

Heterotrimeric GTP binding proteins (G proteins) mediate signals generated by neurotransmitters and hormones. Among G proteins, Go is found in a large quantity in brain and growth cone membranes of neurons. In spite of its abundance in neurons, the role of Go is not fully understood. In our previous study, we identified promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) as an interacting partner of alpha subunit of Go (Go α) and confirmed their interaction employing several biochemical assays. To date, it is reported that PLZF functioned as a cell growth suppressor and a transcription repressor. To determine effect of Go α and PLZF interaction on the cellular function of PLZF, we performed luciferase reporter gene assay and BrdU incorporation assay. Co-expression of Go α and PLZF synergistically increased the effect of PLZF alone. These results suggest that Go α may act as cellular activator of PLZF. This novel feature of Go may provide insights into understanding diverse role of Go-coupled receptor as well as its cellular actions.

Key Words: G-proteins, PLZF, Growth suppression, Cyclin A

서 론

Heterotrimeric GTP 결합단백질 (G-단백질)은 α , β , γ 라는 세 종류의 소단위체로 구성되어 있으며 신경전달물질 또는 호르몬 등과 같은 세포 외부의 신호를 세포 내부로 전달하는 핵심적인 단백질로 알려져 있다 (Gilman, 1987; Neer and Clapham, 1988). G-단백질은 세포막의 G-protein-coupled receptor (GPCR)와 연결되어 있어 세포 외부신호가 GPCR로 전달되어 활성화되면 G-단백질 내의 GDP가 GTP로 치환되고 α 소단위체로부터 $\beta\gamma$ 소단위체가 유리되어 각각의 효과자 (effectors)에 영향을 미친다. 이후, G-단백질이 활성을 마치게 되면, α 소단위체에 결합되어 있는 GTP의 마지막 인산기가 분해되어 GDP가 되면서 G-단백질은 다시 불활성화된 상태로 변화하여 또 다른 활성화 신호를 기다리게 된다.

G-단백질은 α 소단위체의 특성에 따라 그 특성이 결정되며 크게 Gs, Gi, 그리고 Gq 등으로 분류할 수 있다. 본 연구의 주제가 되는 Go는 유전자의 서열상 Gi와 유사하기 때문에 Gi의 한 종류로 분류된다. Go는 뇌조직에서 발현되는 G-단백질 중 그 양이 가장 많고 (Huff et al., 1985), 특히 신경세포의 성장원추 (growth cone)에서 그 발현량이 매우 높다

(Strittmatter et al., 1990). 또한 몇몇 연구자들에 의해 신경세포의 분화과정에 Go가 중요한 역할을 수행할 것이라는 결과가 보고 되었다. 예를 들면, 신경모세포종 (neuroblastoma)에서 Go의 α 소단위체 (Go α)의 발현은 신경돌기의 성장을 조절하였으며, 이는 PKA와 CREB의 신호전달기작을 조절함으로써 가능하였다 (Ghil et al., 2000). 트롬빈, 세로토닌 및 도파민은 GPCR에 작용하여 Go를 활성화 시키며, 신경세포의 신경돌기 성장을 조절하였다 (Haydon et al., 1984; Lankford et al., 1988; Rodrigues et al., 1990; Suidan et al., 1992). Go의 GTPase 활성을 증가시키는 GAP-43는 PC12 세포에서 신경성장인자에 의해서 유도된 신경돌기의 성장을 증가시켰다 (Yankner et al., 1990). PC12 세포에 Go α 의 활성화된 형태의 돌연변이 플라스미드를 발현시켰을 경우, 신경돌기의 평균적인 길이의 증감 없이 신경돌기들의 숫자가 증가하였다 (Strittmatter et al., 1994). 또한 Go가 결여된 생쥐를 대상으로 실시한 동물행동학적 검사에서는 운동능력, 냄새를 감지하는 능력, 시각의 형성, 성적 행동유발 등에 상당한 저하를 보였다 (Jiang et al., 1998; Tanaka et al., 1999; Luo et al., 2002). 이상과 같은 보고에서 Go는 신경세포 및 뇌의 발생에 핵심적인 역할을 수행한다는 것을 알 수 있으나, 아직까지 신경세포 및 뇌조직에서의 정확한 기능이나 신호전달 메커니즘 등은 명확하지 않다.

이전에 수행된 본 연구자의 선행연구에서 Go α 는 PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger)와 상호작용함을 yeast two hybrid 기법을 사용하여 동정하였고, 몇몇 생화학적 기법을 사용하여 이들의 결합을 재차 확인하였다 (Ghil, 2004). PLZF

*논문 접수: 2006년 10월 12일

수정재접수: 2006년 11월 25일

[†]교신저자: 길성호, (우) 442-760 경기도 수원시 영통구 이의동, 경기대학교 생물학과

Tel: 031-249-9646, Fax: 031-249-9646

e-mail: shghil@kyonggi.ac.kr

는 673개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 염기서열 특이적 전사인자로서 C말단에 아홉 개의 C₂-H₂ zinc finger 도메인을 가지고 있다 (Chen et al., 1993; Chen et al., 1994; He et al., 1998). N말단에 위치해 있는 POZ 도메인은 PLZF의 이형 및 동형결합을 매개할 뿐만 아니라 N-CoR, SMRT, Sin3A, histone deacetylases 등의 corepressor와 함께 상호작용하여 표적유전자인 cyclin A2와 interleukin-3 receptor α chain (IL3R α) 등의 유전자 발현을 억제한다고 알려져 있다 (Lin et al., 1998; Wong and Privalsky, 1998). 특히, cyclin A2는 세포 내에서 세포주기를 회전시켜 세포의 성장을 촉진시키는 단백질로 알려져 있기 때문에 PLZF의 과발현은 정상적인 cyclin A2의 발현을 막고, 세포의 성장을 억제한다 (Yeyati et al., 1999).

본 연구에서는 Go α 와 PLZF의 상호작용이 세포 내 신호 전달에 미치는 영향을 연구하고자 하였다. 특히, Go α 의 효과자로서 PLZF가 작용할 가능성을 조사하고자 하였다. PLZF는 몇몇 알려진 유전자의 발현을 억제하기 때문에, Go α 의 발현에 의해 PLZF의 활성이 증가하는지에 대한 여부를 유전자의 발현을 확인함으로써 조사하였다. 또한 PLZF는 대표적인 세포성장억제 인자로 작용하기 때문에 Go α 에 의한 PLZF의 활성의 증가여부는 세포성장억제를 관찰함으로써 확인하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Go α 의 야생형 (pRC/CMV-Go α^{wt}) (GenBank accession number: M17526) 플라스미드는 R. Iyengar (Mt. Sinai School of Medicine, NY)로부터, FLAG epitope이 연결되어 있는 PLZF (FLAG-PLZF) 발현플라스미드 (pRSV-FLAG-PLZF) (GenBank accession number: NM_006006)와 IL3R α -tk-Luc 플라스미드는 고려대학교 김익영 박사로부터, 그리고 HA epitope이 연결되어 있는 type II angiotensin receptor (HA-AT2R) 발현플라스미드 (pcHA-AT2R)는 UMR cDNA resource center로부터 제공받았다. pEGFP 발현플라스미드는 Clontech (Palo Alto, CA), Go α 의 항체는 Santacruz biotechnology (Santacruz, CA), HA의 항체는 Roche (Mannheim, Germany), FLAG의 항체와 BrdU의 항체는 Sigma-Aldrich (St.Louis, MO), GFP 항체는 molecular probe (Invitrogen, Carlsbad, CA), Luciferase Assay system은 Promega (Madison, MI), 그리고 Protein A sepharose CL-4B bead는 Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양 및 transfection

293T 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS와 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM에서

배양하였으며, 3, 4일에 한번씩 HBSS로 씻어낸 후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 사용하여 세포를 배양용기의 바닥으로부터 분리시킨 다음 계대배양하였다. Transfection 실험을 위해 293T 세포를 배양용기에 적당량 분주한 후, 18~24시간 후에 약 70~80% confluent하게 되면, calcium-phosphate 방법을 사용하여 transfection하였다. 간략히 설명하면, 적당량의 발현플라스미드를 2 M CaCl₂ 62 μ l와 함께 혼합한 후, 동량의 2X HBS (50 mM Hepes pH 7.1, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄)를 섞어주었다. 이 DNA 용액을 30분간 상온에 방치한 후, 세포배양액과 혼합하여 반응시켰다. Transfection 후, 40시간 후에 세포를 사용하여 다양한 실험에 사용하였다.

3. Luciferase Assay

293T 세포를 6 well 배양용기에 3 \times 10⁵/well이 되게 분주한 후, calcium phosphate 방법으로 Luciferase reporter gene (IL3R α -tk-luc과 cyclinA2-Luc)과 발현플라스미드들을 함께 발현시켰다. Transfection의 효율을 측정하기 위하여 transfection시 β -galactosidase (β -gal) 발현플라스미드인 pCMV- β -gal을 함께 발현시켰다. 24시간 후에 배양액을 0.5% FBS가 포함된 배지로 교환 해주고 16시간 후에 Luciferase Assay system을 사용하여 luciferase의 활성 정도를 측정하였다.

4. BrdU incorporation assay

293T 세포를 콜라겐으로 coating한 coverslip에 5 \times 10⁵이 되게 분주한 후, calcium-phosphate 방법으로 각각의 발현플라스미드를 일시적으로 발현을 시켰다. pEGFP 발현플라스미드는 GFP (Green Fluorescent Protein)를 발현하는 플라스미드으로써 transfection의 표식자로 사용하기 위해 다른 발현플라스미드들과 함께 발현시켰다. 40시간 후, 배양액에 Bromodeoxyuridine (BrdU)을 10 μ M 농도로 4~5시간 처리하고 PBS (10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)로 두 번 수세하여 4% paraformaldehyde로 고정하였다. 고정이 끝난 세포들은 BrdU 항체와 GFP 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 실시한 후, 형광현미경으로 관찰하였다.

5. Co-immunoprecipitation

293T 세포를 100 mm 배양용기에 1.5 \times 10⁶ 세포수가 되도록 분주한 후, HA-AT2R (10 μ g), Go α (3 μ g), 그리고 FLAG-PLZF (10 μ g)의 발현플라스미드들을 함께 발현시켰다. 40시간 후, 세포들을 수거하여 PBTX (1% TritonX-100이 첨가된 PBS)로 세포 추출액을 분리한 후 20 μ l의 Protein A-Sepharose CL-4B beads (10% slurry)을 혼합하여 4°C에서 1시간 동안 preclearing을 하였다. Preclearing이 끝난 세포 추출액에 1 μ l의 Go α 항체를 혼합하여 37°C에서 4시간 반응시킨 후, beads를 첨가하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝

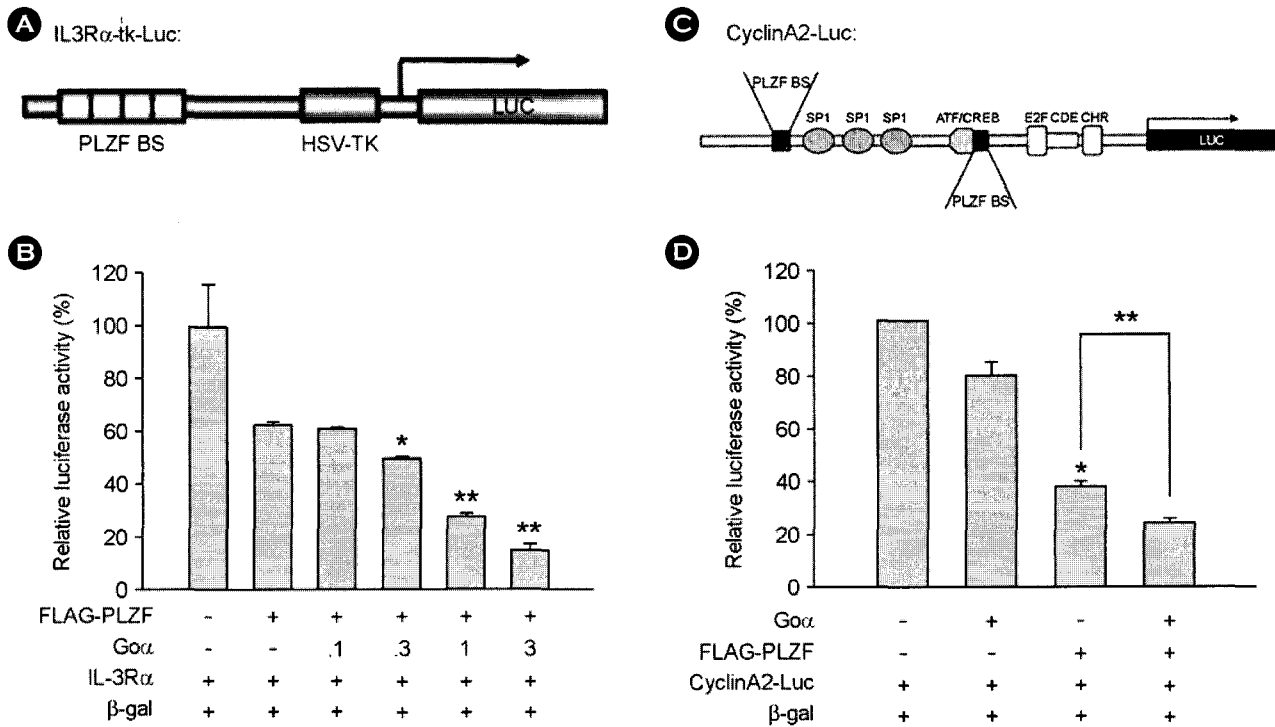


Fig. 1. Effect of Go α expression on PLZF-mediated gene transcription. Schematic representation of the luciferase reporter plasmid, IL3R α -tk-Luc (A). 293T cells were transfected with the expression plasmids for indicated amount of wild type of Go α , FLAG-PLZF (1 μ g), IL3R-tk-Luc (0.3 μ g), and β -gal (0.3 μ g). Then, the extracts were subjected to the luciferase reporter gene assay. The transfection efficiency was adjusted with β -galactosidase activity. Data are shown as the average \pm S.E. of at least three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ compared to control (B). Schematic representation of the luciferase reporter plasmid, CyclinA2-Luc (C). 293T cells were transfected with the expression plasmids for wild type of Go α (0.3 μ g), FLAG-PLZF (0.01 μ g), cyclinA2-Luc (0.3 μ g), and β -gal (0.3 μ g), as indicated. Data are shown as the average \pm S.E. of at least three independent experiments. *, $P < 0.001$ compared to control; **, $P < 0.05$ (D).

난 번역복합체를 PBTX로 5회 수세하고 SDS loading dye를 첨가하여 전기영동 한 후, HA 및 FLAG 항체를 사용하여 Western 분석하였다.

결 과

1. Go α 와 PLZF의 상호작용이 PLZF의 전사활성에 미치는 영향

Go α 와 PLZF의 상호작용이 갖는 생리학적 의미를 분석하기 위해, 먼저 PLZF가 Go α 의 하위신호전달 효과자 (downstream effector)로 작용할 가능성에 대해 조사하였다. PLZF는 IL3R α 와 cyclin A2를 포함한 여러 대상 유전자들의 프로모터에 결합하여 전사를 억제한다. 이와 같은 PLZF의 전사억제 활성화에 Go α 와 PLZF의 상호작용이 미치는 영향을 분석하고자 luciferase reporter assay를 수행하였다. Reporter 플라스미드로는 IL3R α -tk-Luc을 사용하였다. 이 플라스미드는 4개의 PLZF 결합부위를 갖는 IL3R α 유전자의 프로모터를 포함하며, luciferase 유전자의 상위부분에는 Herpes simplex virus (HSV)로부터 유래한 thymidine kinase (TK)의 유전자가 일부 포함되어 유전자의 발현을 촉진시킨다 (Hoatlin et al., 1999;

Kang et al., 2003) (Fig. 1A). 293T 세포에 IL3R α -tk-Luc을 Go α 와 FLAG-PLZF와 함께 발현시키고 그 추출액을 사용하여 luciferase의 활성을 측정하였다. 그 결과, PLZF의 단독발현에 의해 증가된 luciferase의 발현감소는 Go α 의 발현량이 증가할수록 더욱 증가되었다 (Fig. 1B). 다음은, Go α 의 발현에 의해 PLZF의 표적유전자인 cyclin A2의 발현 역시 영향을 받는지를 조사하였다. Reporter 플라스미드는 cyclin A2의 유전자의 프로모터에 luciferase 유전자가 연결된 형태이며 (Fig. 1C), 293T 세포에 Go α , FLAG-PLZF와 함께 발현시켜 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과, PLZF에 의해 매개된 전사활성억제가 Go α 의 발현에 의해 더욱 증가됨을 관찰하였다 (Fig. 1D). 이와 같은 결과를 통해 Go α 의 발현은 PLZF의 세포 내 기능인 전사억제작용을 배가시킴을 알 수 있었으며, 이러한 사실은 PLZF가 Go α 의 하위신호전달 효과자로 작용할 가능성을 강력히 시사한다.

2. Go α 와 PLZF의 상호작용에 의한 293T 세포의 세포성 장억제

지금까지 보고된 PLZF의 세포 내 기능 중 하나는 세포성 장억제를 유도한다는 것이다. 이러한 현상은 cyclin A2 유전

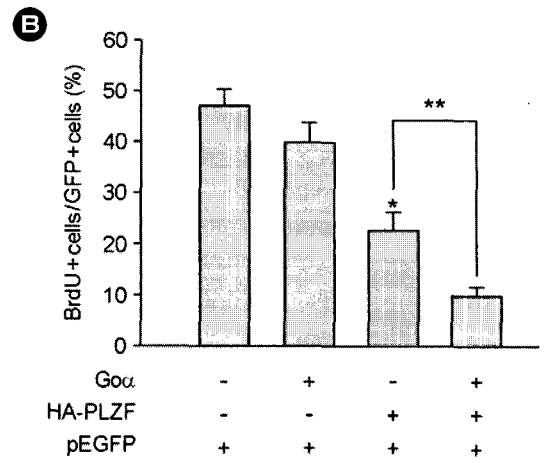
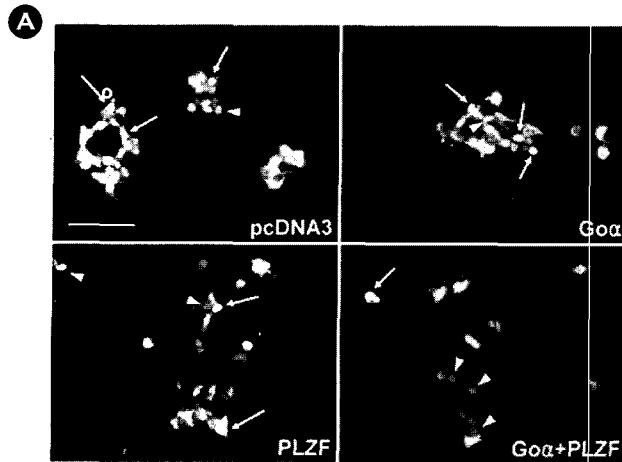


Fig. 2. Effect of Go α expression on growth suppression. 293T cells were transfected with expression plasmids for empty vector (pcDNA3), wild type of Go α (1 μ g), HA-PLZF (3 μ g), and pEGFP (0.5 μ g), as indicated. Then the cells were pulsed with BrdU and labeled with antibody against BrdU and GFP. Green and red fluorescence represented GFP and BrdU-positive cell, respectively. GFP⁺/BrdU⁺ (arrow); GFP⁺/BrdU⁻ (arrow head). Scale bar: 100 μ m (A). The extent of BrdU incorporation was assessed in the GFP-positive cells. Data are shown as the average \pm S.E. of at least three independent experiments. *, $P < 0.001$ compared to control. **, $P < 0.01$ (B).

자의 프로모터에 PLZF가 직접 결합하여 유전자의 전사를 억제하고 그로 인해 세포주기가 정상적으로 회전하지 못하기 때문에 가능하다 (Yeyati et al., 1999). Fig. 1에서 Go α 의 발현에 의해 cyclin A2의 전사가 감소하는 결과를 보았다. 이러한 현상이 실제 세포에서 세포성장억제현상으로 이어지는지를 확인하기 위하여, BrdU-incorporation 분석을 실시하였다. 293T 세포에 Go α 와 PLZF를 각각 또는 함께 발현시켰다. 이때 transfection된 세포만을 선별하기 위해 표식자로서 pEGFP를 모든 조건에서 함께 발현시켰다 (Fig. 2A). 대조군 및 Go α 가 단독발현된 경우 각각 47.1%와 39.8%의 세포에서 BrdU-양성 반응을 보였다. 그에 비해, PLZF가 단독발현된 경우에는 22.5%의 세포에서 양성반응을 보였으며, Go α 와 PLZF가 함께 발현된 경우, 양성반응을 보이는 세포의 수는 현저히 감소하여 9.7%의 세포만이 양성반응을 보였다 (Fig. 2B). 이와 같은 결과를 통해 PLZF는 단독발현만으로도 세포의 성장을 억제할 수 있으며, 이러한 현상은 Go α 의 추가 발현에 의해 현저한 증가를 보임을 알 수 있다.

3. 안지오텐신 신호전달에서 Go와 PLZF의 관련성

최근 yeast two hybrid screening을 통해서 PLZF와 Go α -coupled GPCR의 일종인 typeII angiotensin receptor (AT2R)의 C-말단이 결합할 가능성이 제시되었다 (senbonmatsu et al., 2003). 그 보고에 의하면, 안지오텐신II의 자극에 의해서 AT2R의 내재화가 증가하며, PLZF의 핵으로의 전위되는 것이 관찰되었다. 또한 핵 내에서는 표적유전자인 p85 α PI3K의 유전자의 발현을 증가시켰으며, 이는 하위신호전달자로 작용하는 여러 단백질의 합성을 증가시켰다. 특히 이러한 AT2R과 PLZF의 신호전달은 Go α 의 억제자인 PTX에 의해

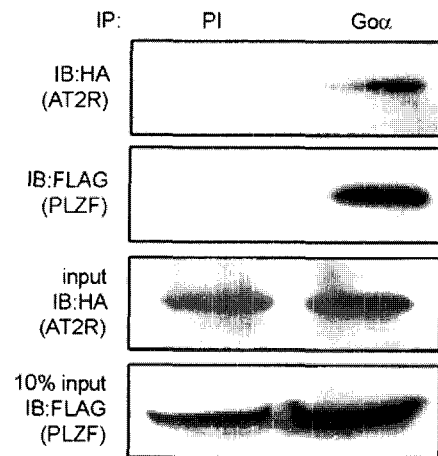


Fig. 3. Co-immunoprecipitation results showing complex between Go α , PLZF and AT2R. Five-hundred micrograms of extracts of 293T cells co-transfected with expression plasmids for wild type of Go α (3 μ g), FLAG-PLZF (10 μ g) and HA-AT2R (10 μ g) were immunoprecipitated with preimmune serum (PI) or Go α -antibody, as indicated. Immunoprecipitates were immunoblotted with antibody against HA or FLAG, as indicated. Input was loaded with 10% of 293T cell extracts used for immunoprecipitation.

서 완전히 억제되었으며, 이는 AT2R과 PLZF 사이에 Go 혹은 Gi가 관여할 가능성을 강력히 시사해 주고 있다. 또한 최근 몇몇 연구에서 안지오텐신의 처리에 의해 세포의 성장억제가 증가한다는 보고가 존재한다. 이들의 연구에 따르면, 생쥐의 뇌로부터 얻은 신경세포에 안지오텐신을 처리하면 MAPK가 활성화되어 세포의 성장이 억제되고 (Lu et al., 1996), CHO 세포와 평활근세포에서 AT2R이 발현되면 세포자살이 유도되었으며 (Miura and Karnik, 2000), 평활근세포에 안지오텐신을 처리하면 세포자살기작이 유도되었다 (Li et

al., 2006). 뿐만 아니라 신경모세포종에 안지오텐신을 처리하면 PKC α 를 억제하여 세포의 증식을 감소시켰으며 neurite outgrowth를 유도했다 (Beaudry et al., 2006). 따라서 안지오텐신의 이러한 세포성장억제현상이 AT2R-Go-PLZF사이의 상호작용에 의해 나타나는 현상임을 증명하기 위해서 co-immunoprecipitation 실험을 수행하였다. 293T 세포에 HA-AT2R, Go α 그리고 FLAG-PLZF 발현플라스미드를 함께 발현시킨 후, 추출물을 얻어 Go α 항체 또는 preimmune serum (PI)을 사용하여 immunoprecipitation을 한 후, HA 및 FLAG 항체를 사용하여 Western 분석하였다. 그 결과 Go α 의 면역복합체에 AT2R과 PLZF가 함께 존재함을 관찰하였다 (Fig. 3). 반면 PI의 면역복합체에는 어떤 단백질도 검출되지 않았다. 따라서 이와 같은 결과는 세포 내에서 AT2R-Go α -PLZF의 복합체를 형성할 가능성이 있음을 강력히 시사한다.

고 찰

최근 PLZF 단백질의 도메인에 대한 기능이 밝혀지면서 PLZF는 전사억제자로 작용하여 세포주기의 정지, 세포분화 및 세포자살을 유도한다는 것이 보고 되었다 (Shaknovich et al., 1998; Yeyati et al., 1999). 본 연구에서는 PLZF가 Go α 의 하위신호전달 효과자로서 역할을 수행하는지에 대해 알아보고자 하였다. 이를 위하여, Go α 의 발현에 의해서 PLZF의 주된 기능인 전사억제기능과 세포성장억제기능에 미치는 영향을 조사하였다. 결국, Go α 와 PLZF의 상호작용은 PLZF의 세포내 기능을 증가시키는 방향으로 작용하였으며, 이것은 PLZF가 Go α 의 하위신호전달 효과자로 작용함을 의미한다.

안지오텐신II는 renin/angiotensin system의 첫 번째 효과자로서 혈압과 체액의 항상성을 조절하며 고혈압, 심장 비대증, 그리고 국소빈혈을 포함한 심혈관계 질병에 중요한 역할을 한다. 안지오텐신 수용체는 포유류에서 AT1R과 AT2R의 두 종류가 동정되었다 (Sasaki et al., 1991; Murphy et al., 1991; Kambayashi et al., 1993; Mukoyama et al., 1993). AT2R의 발현양상은 AT1R과는 달리 세포의 성장, 발생, 분화 등에 관여한다. AT2R은 특히 발생과정 중에 그 발현량이 높으며, 성체에서는 심장, 뇌 등과 같은 기관에서 주로 발현된다 (Hein et al., 1998). AT2R이 활성화 되면 세포성장을 억제하며, 세포자살을 유도한다 (Matsubara et al., 1998). 게다가 AT2R은 신경분화 및 재생에서도 중요한 역할을 한다 (Stroth et al., 1998). 특히, AT2R은 Go α 와 coupling되어 있어, 해마신경세포와 몇몇의 다른 세포에서 PTX의 처리에 의해 AT2R의 효과가 방해 받는 것으로 알 수 있다 (Kang et al., 1994; Ozawa et al., 1996; Hayashida et al., 1996). 하지만 세포 내에서 AT2R의 하위신호전달기작은 아직 명확하게 알려지지 않고 있다. Senbonmatsu et al., 2003의 보고에서 처음으로 AT2R과 PLZF

의 관련성이 보고되었으며, 이들의 결합 역시 PTX에 의존적이었다. 그러나 이들의 결합에 Go 또는 Gi가 직접적으로 관여하는지에 대한 추가 연구는 아직 진행되지 못하였다. 본 연구에서 이를 확인한 결과, AT2R::Go::PLZF가 서로 상호작용을 하고 있는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 이로써 GPCR의 신호를 전사조절인자인 PLZF로 증계하는 역할을 Go가 담당하는 것을 알 수 있었다. 그러므로 Go는 AT2R의 자극에 의해 PLZF를 활성화 시킬 것이며 활성화된 PLZF는 하위 효과자들에 영향을 주거나 전사억제활성이 증가하여 여러 다른 유전자의 발현을 조절할 것이다.

이상의 결과들은 Go α 와 PLZF의 상호작용이 PLZF의 세포내 기능을 증가시키고, 이는 PLZF가 Go α 의 하위신호 전달자임을 시사한다. 또한 AT2R과 Go α , PLZF의 상호작용은 안지오텐신의 처리에 의한 세포성장억제에 대한 분자적 기작을 연구할 수 있는 토대를 제공한다. 본 연구 결과들은 Go α 에 의해 매개되는 새로운 신호전달기작의 가능성을 제시하였으며, 이를 토대로 GPCR 및 G-단백질의 새로운 기능을 확립할 수 있을 것이라 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2006년 과학기술부 뇌신경 생물학 사업단과 2006년 경기대학교 특성화사업 지원에 의해 수행되었음.

REFERENCES

- Beaudry H, Gendron L, Guimond MO, Payet MD, Gallo-Payet N. Involvement of protein kinase C alpha (PKC alpha) in the early action of angiotensin II type 2 (AT2) effects on neurite outgrowth in NG108-15 cells: AT2-receptor inhibits PKC alpha and p21ras activity. *Endocrinology* 2006. 147: 4263-4272.
- Bedecs K, Elbaz N, Sutren M, Masson M, Susini C, Strosberg AD, Nahmias C. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J.* 1997. 325: 449-454.
- Chen KS, DeLuca HF. Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim Biophys Acta.* 1994. 1219: 26-32.
- Chen Z, Brand NJ, Chen A, Chen SJ, Tong JH, Wang ZY, Waxman S, Zelent A. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J.* 1993. 12: 1161-1167.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. Interna-

- tional union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000. 52: 415-472.
- Ghil SH, Kim BJ, Lee YD, Suh-Kim H. Neurite outgrowth induced by cyclic AMP can be modulated by the alpha subunit of Go. *J Neurochem.* 2000. 74: 151-158.
- Ghil SH. The alpha subunit of Go interacts with promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Exp Biomed Sci.* 2004. 10: 40-413.
- Gilman AG. G proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem.* 1987. 56: 615-649.
- Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJ. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 1991. 67: 1169-1179.
- Hayashida W, Horiuchi M, Dzau VJ. Intracellular third loop domain of angiotensin II type-2 receptor. Role in mediating signal transduction and cellular function. *J Biol Chem.* 1996. 271: 21985-21992.
- He LZ, Guidez F, Tribioli C, Peruzzi D, Ruthardt M, Zelent A, Pandolfi PP. Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet.* 1998. 18: 126-135.
- Hein L. Genetic deletion and overexpression of angiotensin II receptors. *J Mol Med.* 1998. 76: 756-763.
- Hoatlin ME, Zhi Y, Ball H, Silvey K, Melnick A, Stone S, Arai S, Hawe N, Owen G, Zelent A, Licht JD. A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi anemia group C protein and PLZF. *Blood* 1999. 94: 3737-347.
- Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T, Dzau VJ. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J Biol Chem.* 1997. 272: 19022-19006.
- Huff RM, Axton JM, Neer EJ. Physical and immunological characterization of a guanine nucleotide-binding protein purified from bovine cerebral cortex. *J Biol Chem.* 1985. 260: 10864-10871.
- Igarashi M, Strittmatter SM, Vartanian T, Fishman MC. Mediation by G proteins of signals that cause collapse of growth cones. *Science* 1993. 259: 77-79.
- Jiang M, Gold MS, Boulay G, Spicher K, Peyton M, Brabet P, Srinivasan Y, Rudolph U, Ellison G, Birnbaumer L. Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. 95: 3269-3274.
- Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem.* 1993. 268: 24543-24546.
- Kang J, Posner P, Summers C. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K⁺ currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am J Physiol.* 1994. 267: C1389-1397.
- Lankford KL, DeMello FG, Klein WL. D1-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons: evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988. 85: 4567-4571.
- Li JY, English MA, Ball HJ, Yeyati PL, Waxman S, Licht JD. Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem.* 1997. 272: 22447-2255.
- Li Y, Song YH, Mohler J, Delafontaine P. ANG II induces apoptosis of human vascular smooth muscle via extrinsic pathway involving inhibition of Akt phosphorylation and increased FasL expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006. 290: H2116-2123.
- Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH Jr, Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 1998. 391: 811-814.
- Lu D, Yang H, Raizada MK. Angiotensin II regulation of neuro-modulation: downstream signaling mechanism from activation of mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol.* 1996. 135: 1609-1617.
- Luo AH, Cannon EH, Wekesa KS, Lyman RF, Vandenberg JG, Anholt RR. Impaired olfactory behavior in mice deficient in the alpha subunit of G(o). *Brain Res.* 2002. 941: 62-71.
- Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res.* 1998. 83: 1182-1191.
- Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev.* 2003. 17: 71-97.
- Miura S, Zhang J, Karnik SS. Angiotensin II type 1 receptor-function affected by mutations in cytoplasmic loop CD. *FEBS Lett.* 2000. 470: 331-335.
- Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem.* 1993. 268: 24539-24542.
- Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angio-

- tensin II receptor. *Nature* 1991. 351: 233-236.
- Neer EJ, Clapham DE. Role of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* 1988. 333: 129-134.
- Ozawa Y, Suzuki Y, Murakami K, Miyazaki H. The angiotensin II type 2 receptor primarily inhibits cell growth via pertussis toxin-sensitive G proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996. 228: 328-333.
- Pines J, Hunter T. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* 1990. 346: 760-763.
- Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 2002. 415: 206-212.
- Rodrigues Pdos S, Dowling JE. Dopamine induces neurite retraction in retinal horizontal cells via diacylglycerol and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990. 87: 9693-9697.
- Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 1991. 351: 230-233.
- Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, Watanabe O, Price E Jr, Roberts RL, Imboden H, Fitzgerald TG, Gaffney FA, Inagami T. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J.* 2003. 22: 6471-6482.
- Shaknovich R, Yeyati PL, Ivins S, Melnick A, Lempert C, Waxman S, Zelent A, Licht JD. The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1998. 18: 5533-5545.
- Strittmatter SM, Valenzuela D, Kennedy TE, Neer EJ, Fishman MC. Go is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature* 1990. 344: 836-841.
- Stroth U, Meffert S, Gallinat S, Unger T. Angiotensin II and NGF differentially influence microtubule proteins in PC12W cells: role of the AT2 receptor. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998. 53: 187-195.
- Suidan HS, Stone SR, Hemmings BA, Monard D. Thrombin causes neurite retraction in neuronal cells through activation of cell surface receptors. *Neuron* 1992. 8: 363-375.
- Tanaka M, Treloar H, Kalb RG, Greer CA, Strittmatter SM. G(o) protein-dependent survival of primary accessory olfactory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. 96: 14106-14111.
- Wong CW, Privalsky ML. Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RARalpha, and BCL-6. *J Biol Chem.* 1998. 273: 27695-27702.
- Yankner BA, Benowitz LI, Villa-Komaroff L, Neve RL. Transfection of PC12 cells with the human GAP-43 gene: effects on neurite outgrowth and regeneration. *Brain Res Mol Brain Res.* 1990. 7: 39-44.
- Yeyati PL, Shaknovich R, Boterashvili S, Li J, Ball HJ, Waxman S, Nason-Burchenal K, Dmitrovsky E, Zelent A, Licht JD. Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene* 1999. 18: 925-934.