

## 신경세포 분화에서 세포주기 조절인자로서의 NELL2 유전자의 역할

울산대학교 의과대학 소아과학교실

정미림 · 오연미 · 박우생 · 박상규

### NELL2 gene as regulator of cell cycle in neuron differentiation

Mi Rim Joung, M.D., Yeon Mi Oh, M.D. Woo Saeng Park, M.D. and Sang Kyu Park, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Ulsan University Hospital, Ulsan, Korea

**Purpose :** Because NELL2 expression is strictly restricted only in neurons in developing and post-differentiated neural tissues, it is thought to be involved in the neuronal differentiation during development and in the maintenance of neuronal physiology in the post-differentiated neurons. In this study, we examined whether NELL2 is involved in the regulation of cell cycle and apoptosis in the hippocampal neuroprogenitor HiB5 cells.

**Methods :** Effects of NELL2 on the cultured HiB5 cell numbers, DNA fragmentation, and proteins involved in the regulation of the cell cycle were measured.

**Results :** NELL2 induced a decrease in cell numbers and an increase in G1 phase arrest. Moreover, transfection of NELL2 resulted in an increase of DNA fragmentation that shows an evidence of apoptosis. Contents of proteins involved in the regulation of cell cycle were also changed by transfection of NELL2 expression vectors.

**Conclusion :** This study suggests that NELL2 plays an important role in the regulation of cell cycle and apoptosis of neurons. (Korean J Pediatr 2006;49:1100-1105)

**Key Words :** NELL2, Cell cycle, Neuron differentiation

### 서 론

포유 동물의 뇌는 발생 과정의 결정적인 시기에 생식소 스테로이드 호르몬 분비에 의해 기능적, 구조적인 변화가 나타난다. 에스트로겐은 포유동물에서 중추 신경계의 발생과 분화에 관여하며, 태아 시기의 신경 형성과 출생 직후 시기의 연결생성(synaptogenesis) 그리고 성숙기의 연결재형성에 영향을 준다<sup>1, 2)</sup>. 포유 동물의 뇌에서 성분화의 조절을 담당하는 유전자를 찾기 위하여, 출생 직후 에스트로겐을 다량으로 투여한 흰쥐 모델(estrogen-sterilized rat, ESR)에서 적절한 시상하부의 mRNA를 이용하여 수행한 differential display PCR(DD-PCR)에 의해 확인된 에스트로겐 의존적 유전자들 중의 하나인 NELL2 유전

자는 6개의 표피성장인자 유사반복영역(epidermal growth factor-like repeat domain)을 가지고 있다<sup>3)</sup>. 표피성장인자 유사영역을 가진 신경조직특이단백(neural tissue-specific protein, nel)은 닭배아에서 최초로 발견되었는데 nel mRNA는 배아 시기에는 모든 조직에서 발현되지만, 분화 이후에는 뇌에서만 제한적으로 발현된다<sup>4)</sup>. 인간에서는 NELL1과 NELL2의 nel 유사유전자가 발견되었고, 이중 NELL2가 닭의 nel과 더욱 유사하며 인간과 흰 쥐 같은 포유류에서 출생 이후에 신경 조직에 특이적으로 발현된다는 것이 보고되었다<sup>5)</sup>. Oyasu 등<sup>6)</sup>은 NELL2 단백질이 해마, 대뇌피질, 후각망울(olfactory bulb), 시상하부 등의 일정한 지역에서 신경세포에 특이적으로 발현함으로 신경 기능에 중요한 역할을 한다고 주장하였다. Kim 등<sup>7)</sup>이 흰쥐의 뇌에서 발생 단계에 따른 NELL2 mRNA의 발현 변화를 관찰한 결과, NELL2 mRNA는 배아 10일 부터 발현되기 시작하여 출생 직전까지 점진적으로 증가되다가 출생 후 4일 이후에는 급격히 감소하였으나 생후부터 성체가 되어서까지 비교적 높은 수준으로 유지되는 것을 확인하였다. 이는 NELL2가 성체가 된 이후에도 신경세포의 성숙 및 분화 작용에 관여하기 때문으로 생각된다. NELL2 mRNA는 배아 12일에 척수, 교뇌, 연수의 뇌실구역 등

접수: 2006년 7월 21일, 승인: 2006년 8월 30일

본 연구과제는 2002년도 대한소아과학회 삼아학술상 연구비지원에 의해 수행되었음.

책임저자: 박상규, 울산대학교 의과대학 소아과학교실

Correspondence: Sang Kyu Park, M.D.

Tel: 052)250-7002 Fax: 052)250-7006

E-mail: sang@uuh.ulsan.kr

주로 분화가 일어나는 부위에 집중적으로 발현하였다. 성체에서는 띠 덮개(tenia tecta), 배모양 피질(piriform cortex), 해마, 치아이랑(dentate gyrus), 소뇌피질, 불분명핵(ambiguous nucleus), 아래올리브핵(inferior olivary nucleus) 등의 신경조직에서 높게 발현되었으며 세포적 관점에서도 신경세포에서만 발현됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 종합하여 보았을 때 NELL2는 뇌에서 신경 세포의 분화에 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 세울 수 있다.

신경세포 분화는 일정 수준에서의 세포자멸사가 동반되고, 세포주기에 있어서는 G1기의 정지가 일어날 때 이루어지는 것으로 생각된다. 세포가 G1기의 정지가 일어날 것인지 또는 G1기에서 S기로 이행하여 증식을 할 것인지는 Rb 단백질의 인산화와 밀접한 관계가 있다. 정상적으로 저 인산화 Rb 단백질은 S기 진입에 필요한 유전자들의 전사 조절에 중요한 역할을 하는 E2F 전사인자와 결합하여 E2F의 기능을 억제함으로써 세포주기를 G1기에 정지시키며<sup>8,9)</sup>, cyclin-CDK(cyclin-dependent kinase) 복합체에 의해서 Rb 단백질이 인산화 되면 Rb 단백질은 G1기 정지 기능을 상실하게 된다. 즉 cyclin D/CDK4 복합체가 Rb 단백질을 인산화 시키고, 뒤이어 cyclin E-CDK2 복합체가 계속해서 Rb 단백질을 인산화시킴으로써 Rb 단백질이 억제하고 있던 E2F가 유리되어 활성화되면 S기에 필요한 여러 단백질(dihydrofolate reductase, thymidine kinase, cdc6, DNA pol $\alpha$ )을 위한 유전자의 전사를 활성화시키며 G2기 및 M기를 거쳐 세포 분열이 이루어진다<sup>9,10)</sup>.

한편 p21, p16 등이 Rb 단백질과 E2F의 결합을 조절하여 CDK의 활성을 억제하는 억제인자로 작용한다. 또한 중앙 억제 유전자인 p53은 DNA의 손상으로 발현되어 CDK 억제인자인 p21을 증가시킴으로써 세포주기의 진행을 억제한다<sup>11)</sup>. 이 논문에서는 신경세포 분화에 있어 NELL2가 세포 주기에 어떤 영향을 미치는지에 대해 규명하고자 세포 주기 관련 단백질로 잘 알려져 있는 Rb 단백질, p53 등으로 연구하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포 배양과 전달감염(transfection)

해마 모세포주인 HiB5세포주를 10% 우태아혈청(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 100 U/mL의 페니실린(Gibco BRL), 100 U/mL의 스트렙토마이신(Gibco BRL)이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 33°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 세포를 전달감염하기 하루 전날 6 well plate에 2 mL( $1 \times 10^5$  cell/mL)씩 넣어 배양하였다. 포유동물 발현매개체인 pcDNA zeo3.1에 NELL2, 표피성장인자 유사반복영역 중 3개의 Ca<sup>2+</sup>를 제거한 돌연변이주(NELL2  $\Delta$ EGF-Ca<sup>2+</sup>)와 6개의 표피성장인자 유사반복 영역 모두를 제거한 돌연변이주(NELL2  $\Delta$ EGF)를 각각 lipofectamine과 무혈청배양액으로 상온에서 15분간 반응시킨 뒤 세포에 골고루 떨어뜨려주었다. 전달감염 5시간 후 배양액을

제거시킨 뒤 정상 배양액으로 바꾸어 주었다.

### 2. 세포수 측정

세포를 trypsin-EDTA로 떼어내어 원심 분리한 다음 상층액을 제거하고 새로운 배양액을 넣어준 후 세포를 잘 풀어 준 다음 10  $\mu$ L를 혈구계(Hemocytometer)로 세포수를 계산하였다.

### 3. DNA 분절검사(fragmentation assay)

먼저 각 well의 상층액을 15 mL 튜브에 옮겨 두고, well에 부착된 세포는 trypsin-EDTA로 떼어낸 다음 배양액을 2 mL 넣은 후 상층액을 담아 두었던 튜브에 넣었다.  $1 \times 10^6$ /mL 세포를 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 2회 원심 세척하고 상층액을 완전히 제거한 후 여기에 400  $\mu$ L의 용해 완충액(lysis buffer, [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2% SDS])과 단백질분해효소 K(proteinase K, 100-200  $\mu$ g/mL)를 같이 넣은 후 56°C에서 하룻밤 배양하였다.

다음날 RNase 20  $\mu$ L(10 mg/mL)를 넣고 혼합한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 8 M K-acetate 75  $\mu$ L와 chloroform 400  $\mu$ L를 넣고 잘 섞어 얼음 위에 10분간 방치한 후에 4°C에서 20분간 원심 침전시켰다. 상층액에 1 mL의 95% 알코올을 넣은 후 -20°C에서 하룻밤 배양하였다. 다음날 30분간 원심 분리한 후 70% 알코올로 2번 씻은 후 건조시키고 적당량의 DNA rehydration 용액으로 녹였다. 이렇게 추출한 genomic DNA를 ethidium bromide를 포함한 1% agarose gel에 전기 영동시켰다.

### 4. DNA양 측정

10% 우태아혈청이 첨가된 DMEM 배양액에  $1 \times 10^5$  cell/mL로 세포를 부유시킨 후 PBS (1200 rpm, 5분)로 세척한 다음 70% 알코올 1 mL에 4°C에서 하룻밤 동안 고정시켰다. 다음날 PBS 3 mL을 더 넣고 원심 분리한 후 propidium iodide (PI 400 mg/mL) 50  $\mu$ L, RNase A(1 mg/mL) 50  $\mu$ L, Triton X-100(10%) 1  $\mu$ L를 넣은 후 상온에서 30분간 반응시켰다. 염색된 시료는 FACScan(Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA)으로 DNA의 양을 측정하였다.

### 5. Western blot 분석

전기 영동으로 단백질을 분리한 gel은 0.037% SDS, 20% methanol, 192 mM glycine을 첨가한 25 mM Tris-HCl 완충 용액(pH 8.3)으로 미리 적신 gel과 같은 크기의 nitrocellulose (NC) 막으로 옮기고 0.05% Tween 20, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4-8.0)으로 구성된 Tris-buffered saline/Tween 20(TBS-T)로 5분씩 세 번 세척한 뒤 비특이적 흡착 반응을 방지하기 위해 blocking reagent(amersham bioscience)로 1시간 동안 반응시켰다. 항체는 1:2,000으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 enhanced chemiluminescent

(ECL) western blotting detection reagents(amersham pharmacia biotech, England)로 막에 부착된 단백을 엑스선 필름상에 감광하여 확인하였다. 사용한 일차 항체들은 다음과 같다 (E2F-1: mouse monoclonal, 1:1,000, KH-95 clone, Santa Cruz Co., USA; Rb: rabbit polyclonal, 1:1,000, M-153, clone, Santa Cruz Co., USA; P53: mouse monoclonal, 1:2,000, Do-1 clone, Santa Cruz Co., USA; Cyclin D: mouse monoclonal, 1:1,000, 32B1-3 clone, Santa Cruz Co., USA;  $\beta$ -tubulin: mouse monoclonal, 1:20,000, Sigma, USA).

6. 면역세포화학(Immunocytochemistry)

1) 고정

세포를 슬라이드 글라스에 떨어뜨린 후 차가운 PBS로 세포를 씻은 다음에 30분간 2% paraformaldehyde와 0.1% triton X-100으로 고정하였다.

2) 면역염색

4°C의 PBS로 5분간 2회 씻은 후 슬라이드에 1차 항체를 4°C에서 1시간 동안 반응시키고, 4°C의 PBS로 5분간 2회 씻는다. 다시 2차 항체를 1시간 동안 반응시킨 후 4°C의 PBS로 5분간 2회 씻은 다음에 면역현미경으로 관찰하였다.

7. 통계분석

통계적 비교는 one-way ANOVA(Bonferroni test)로 하였으며 통계적 유의성은  $P < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. HiB5 세포에 대한 NELL2의 효과

pcDNA와 NELL2, NELL2의 EGF domain 중 3개의  $Ca^{2+}$

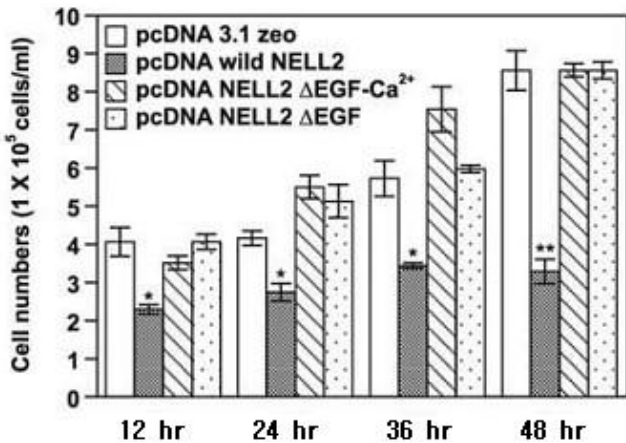


Fig. 1. Effect of NELL2 on the cultured HiB5 cell numbers. Cells were transfected with indicated vectors, and cell numbers were counted after indicated period of incubation time. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  (n=6).

결합부위를 뺀 돌연변이주(NELL2  $\Delta$ EGF- $Ca^{2+}$ )와 EGF domain 6개를 모두 뺀 돌연변이주(NELL2  $\Delta$ EGF)를 각각 전달 감염 시킨 후 배양하였을 때 세포수가 배양 12시간, 24시간, 36시간, 48시간 후 모두 NELL2가 들어간 군에서 다른 세 군보다 의미가 있게 세포 수가 적었다(Fig. 1).

2. DNA분절검사

HiB5세포에 NELL2를 전달감염시킨 후 배양하여 발생된 세포자멸사된 세포의 DNA분절 검사상 염색질의 고차구조가 50-300 Kb로 잘려지고 이어서 핵속핵산분해효소(endonuclease)에 의해서 180-200 bp 크기의 뉴클레오솜(nucleosome)단위로 잘려진 DNA가 그 크기 간격으로 전기 영동 후 사다리 모양의 띠를 형성하였다(Fig. 2).

3. PI 염색에 의한 세포주기 분석

PI 염색으로 DNA 양을 측정하여 세포주기를 확인해 보았다. 세포의 배가 시간을 고려하여 12시간, 24시간, 36시간, 48시간으로 실험하였다. 12시간과 36시간 사이에 큰 변화는 없었고, 48시간에는 NELL2를 넣은 군에서 G<sub>1</sub>가 72.5%로 G<sub>1</sub> 정지가 증가되는 것을 확인하였다(Table 1).

4. 세포주기 조절에 관여하는 단백질에 대한 NELL2의 효과

Fig. 3에서 보면 p53, Rb 단백질, E2F-1(KH-95)의 발현은 NELL2를 전달감염시킨 군에서 다른 세 군보다 증가하였으나 cyclin D의 발현은 NELL2가 들어간 군에서 다른 세 군보다 감소하였다.

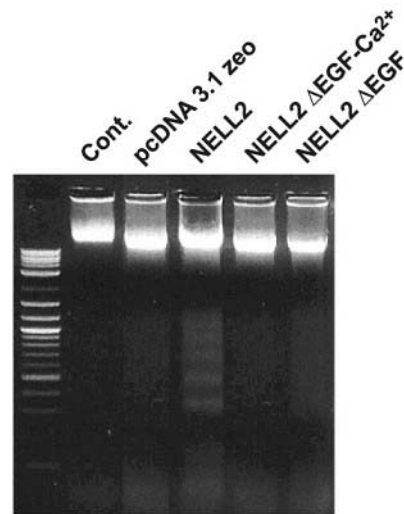
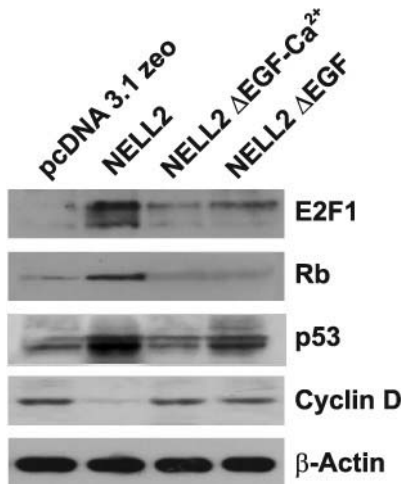


Fig. 2. The presence of oligonucleosomal DNA fragmentation was assessed by agarose gel electrophoresis. NELL2 induces oligonucleosomal DNA fragmentation in transfected Hib 5 cells.

**Table 1.** Summary of Flow Cytometry of HiB5 Cells Stained with Propidium Iodide(PI)

Time		% of cell		
		G1	S	G <sub>2</sub> /M
2 hr	HiB5+pcDNA	60.8	16.4	20.0
	HiB5+NELL2	58.8	17.0	21.6
	HiB5+NELL2 Δ EGF-Ca <sup>2+</sup>	61.4	17.7	17.1
	HiB5+NELL2 Δ EGF	61.7	18.6	14.9
24 hr	HiB5+pcDNA	65.5	19.6	12.0
	HiB5+NELL2	68.0	17.2	12.3
	HiB5+NELL2 Δ EGF-Ca <sup>2+</sup>	67.8	16.9	13.2
	HiB5+NELL2 Δ EGF	63.0	19.0	13.1
36 hr	HiB5+pcDNA	64.1	17.8	15.6
	HiB5+NELL2	69.0	16.4	12.1
	HiB5+NELL2 Δ EGF-Ca <sup>2+</sup>	63.0	19.3	15.8
	HiB5+NELL2 Δ EGF	59.3	23.0	16.7
48 hr	HiB5+pcDNA	57.2	17.8	22.9
	HiB5+NELL2	72.5	13.1	11.2
	HiB5+NELL2 Δ EGF-Ca <sup>2+</sup>	61.4	17.7	17.1
	HiB5+NELL2 Δ EGF	59.4	23.8	11.2



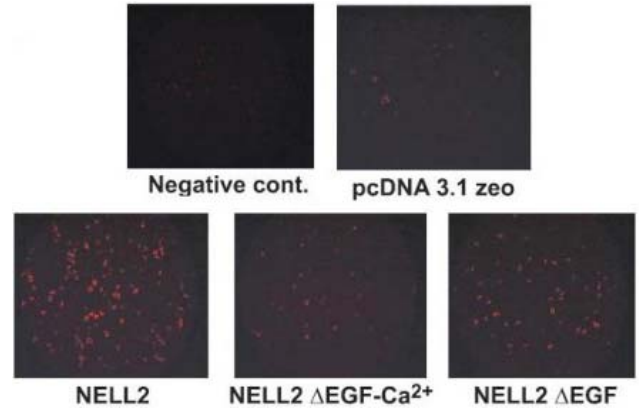
**Fig. 3.** Effect of NELL2 on proteins involved in cell cycle regulation. Western blot analysis of electrophoretically separated proteins from HiB5 cells transfected with indicated expression vectors. Total protein(40 μg) was loaded on each lane for Western blot. The expression of E2F1, Rb, p53 was higher and that of cyclin D was lower in NELL2 transfected HiB 5 cells.

**5. 면역염색에 의한 p53에 대한 NELL2의 효과**

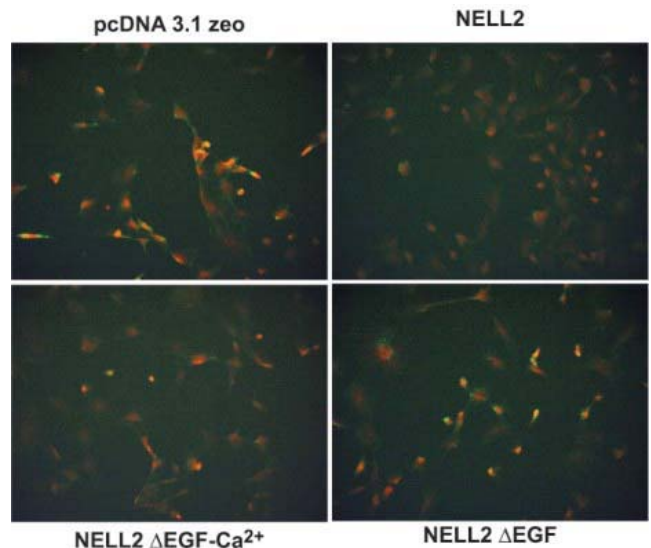
p53의 1차 항체를 처리하지 않은 대조군(Fig. 4A)과 비교한 결과, NELL2를 전달감염시킨 군(Fig. 4C)에서 다른 세 군들 보다 많은 양의 p53 단백질의 발현이 보였다.

**6. 면역염색에 의한 cyclin D에 대한 NELL2의 효과**

녹색의 cyclin D와 붉은색의 핵 염색으로 NELL2를 전달감염



**Fig. 4.** Effect of NELL2 on the p53 levels. Fluorescent microphotograph of acridine red stained control and cells transfected with indicated expression vectors. P53 expression was higher in NELL2 transfected HiB 5 cells.



**Fig. 5.** Effect of NELL2 on the cyclin D levels. Fluorescent immunocytochemistry of cyclin D from control and cells transfected with indicated expression vectors. Cyclin D expression was lower in NELL2 transfected HiB 5 cells.

시킨 군과 다른 실험 군들을 비교하였다. NELL2를 전달감염시킨 군(Fig. 5B)에서 녹색의 cyclin D의 발현양이 적음을 확인하였다.

**고 찰**

HiB5세포는 임신 16일째 쥐 배아의 해마 원기(anlagen)에서 유래한 체외 배양이 가능한 신경 선구세포주이다<sup>12)</sup>. HiB5세포는 32℃에서 미분화 상태로 지속적으로 성장을 하나 비 허용 온도(쥐의 체온; 39℃)에서는 분열을 멈추고 많은 세포가 세포자멸사 하는데, 이 중에 생존한 세포들은 신경세포로 분화를 한다. 또한 생존한 세포에 혈소판유도성장인자(platelet-derived growth

factor, PDGF)를 처리하면 신경 세포로의 분화가 매우 향진이 된다<sup>13, 14</sup>. HiB5세포에 pcDNA, NELL2, NELL2  $\Delta$ EGF-Ca<sup>2+</sup>, NELL2  $\Delta$ EGF를 각각 전달감염 시킨 후 배양하였을 때세포수가 배양 12시간, 24시간, 36시간, 48시간 후 모두 NELL2가 들어간 군에서 다른 세 군보다 의미가 있게 세포수가 적었다. 이는 HiB5세포에 NELL2를 전달감염을 시키면 세포 증식이 억제 가 됨을 알 수가 있다. 또한 세포자멸사에 의하여 세포 수가 증가하지 않는 것을 알기 위하여 DNA 분절검사를 시행하였다. 그 결과 HiB5세포에 NELL2를 전달감염시킨 세포에서 세포자멸사의 생화학적 변화로 생기는 DNA 분절을 확인하였다. NELL2가 신경 세포 분화를 유도한다면, 예정된 세포자멸사와 더불어 G<sub>1</sub>기의 정지 역시 확인되어야 한다. FACScan를 이용하여 DNA의 양을 측정 한 결과 NELL2를 전달감염시킨 군에서 48시간 지난 시점에서 G<sub>1</sub>기의 세포비율이 72.5%로 pcDNA를 전달 감염시킨 군의 57.2%보다 증가하였다. 이것은 세포주기에 있어 G<sub>1</sub>기에 머무르는 시간이 늘어났다고 생각할 수 있다. FACScan의 경우 20,000개의 세포들을 보통 읽는데, 그 중에서 각 세포 주기의 위치에 있는 세포의 DNA 양을 측정해 %로 나타내기 때문이다. 다세포생물의 세포 수 조절 방법에는 세포 증식, 세포의 노화, 세포의 죽음이 있고, 세포의 증식은 성장인자에 의해 조절되며 Rb 단백질이 관여한다. 저 인산화 Rb는 S주기 진입에 필요한 유전자들의 전사 조절에 중요한 역할을 하는 E2F와 결합하여 E2F의 기능을 억제함으로써 세포주기를 G<sub>1</sub>기에 정지시키는 핵심 물질로 알려져 있다<sup>8, 9</sup>. 세포 성장과 분열을 조절하는 세포 단백질인 E2F를 대상으로 한 연구에서 세포 분열의 시작은 E2F 단백질이 활성을 나타냄으로써 시작됨을 확인하였다<sup>15</sup>. E2F 단백질은 E2F-1부터 E2F-6의 6개의 전사인자로 구성되어 있는 세포 주기의 중요 조절자인데 세포 주기의 진행을 통하여 세포 증식을 조절하며 G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>기에서의 정체를 통하여 세포분화를 조절한다. 세포 증식과 세포 분화에 대한 E2F의 상반되는 작용은 핵안의 다양한 E2F의 양과 중앙억제 단백질인 Rb 단백질과의 복합체를 이루는 능력에 따라서 결정된다. 뇌의 분화와 관련되는 E2F의 발현양상은 심장, 간에서의 발현 양상과 다르다고 보고한 Kusek 등<sup>16</sup>은 신경 조직에서의 E2F의 발현 양상을 더 자세히 알아보기 위하여 생쥐 뇌의 발달과정에서의 E2F, Rb 단백질의 발현 양상과 배아암종세포주인 P19가 신경분화 할 때의 발현양상을 비교하였다<sup>17</sup>. 생쥐의 임신기간이 길어지고 성체가 될수록 점점 Rb단백의 발현이 증가하며 P19가 신경분화 할수록 Rb 단백질의 발현과 E2F중에서 E2F1(KH-95)이 증가하는 것을 관찰하였다.

또한 성체에서의 Rb 단백질의 발현이 높게 유지되는 것은 E2F1(KH-95)의 높은 발현과 상관 관계가 있었으며 E2F1(KH-95)는 말단 분화된 신경조직에서 전사를 억제하여 더 이상의 증식을 억제하고 세포자멸사를 유도하였다. 이상의 결과 E2F는 세포 증식에 없어서는 안되는 중요한 전사인자이나 이 중에 E2F1(KH-95)는 Rb 단백질과 같이 신경세포의 분화와 성숙에 중

요한 역할을 한다는 것을 알 수가 있다. NELL2에 의한 Rb 단백질, p53 단백질, E2F1(KH-95) 발현을 실험한 결과 Rb 단백질, p53 단백질의 발현이 NELL2를 전달감염시킨 군에서 증가하였고, E2F1(KH-95)의 발현 역시 증가됨이 보였다. 또한 p53의 증가를 면역염색으로도 확인을 하였다. Cyclin D는 CDK4와 복합체를 이루어 Rb 단백을 인산화시켜 분열촉진물질 반응세포를 S기로 진행하게 한다<sup>18</sup>. 본 실험에서는 cyclin D 단백질의 발현이 NELL2를 전달감염시킨 군에서 감소하였으며, 면역염색에서 NELL2를 전달감염시킨 군에서 녹색의 cyclin D의 발현양이 적음을 확인하였다. 이것은 세포주기에서 다음 단계로 넘어가지 못하고 정지되어 있음을 시사한다.

결과적으로 HiB5 세포에서 NELL2에 의하여 일정 수준에서의 세포자멸사가 동반되고 세포 주기에 있어 G<sub>1</sub>기의 정지가 일어나며 세포주기를 조절하는 단백질의 변화가 발생함을 확인하였다. 따라서 NELL2가 뇌에서 신경세포 분화에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

## 요 약

**목적 :** 신경세포 분화에 있어 NELL2가 세포 주기와 세포자멸사에 어떤 영향을 미치는지를 규명하고자 하였다.

**방법 :** HiB5 세포에 NELL2를 전달감염시켜 배양하여 세포 수를 측정하였다. 세포자멸사를 분석하기 위해 DNA 분절검사를 시행하였으며 PI염색으로 DNA양을 측정하였다. 세포주기의 조절에 관여하는 단백질에 대한 NELL2의 효과를 측정하기 위하여 Western blot과 면역염색을 시행하였다.

**결과 :** NELL2를 전달감염시킨 군에서 세포수가 의미가 있게 적었고 DNA 분절검사에서도 세포자멸사를 확인하였으며 G<sub>1</sub> 정지가 증가하였다. Western blot과 면역염색결과 Rb단백, p53, E2F1(KH-95)이 NELL2를 전달감염시킨 군에서 증가하고 cyclin D가 NELL2를 전달감염시킨 군에서 감소하였다.

**결론 :** HiB5 세포에서 NELL2에 의하여 일정 수준에서의 세포자멸사가 동반되고 세포 주기에 있어 G<sub>1</sub>기의 정지가 일어나며 세포주기를 조절하는 단백질의 변화가 발생함을 확인하였다. 따라서 NELL2가 뇌에서 신경세포 분화에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Tobet SA, Basham ME, Baum MJ. Estrogen receptor immunoreactive neurons in the fetalferret forebrain. Brain Res Dev Brain Res 1993;72:167-80.
- 2) Naftolin F, Garcia-Segura LM, Keefe D, Leranthe C, Macluskys NJ, Brawer JR. Estrogen effects on the synaptology and neural membranes of the rat hypothalamic arcuate nucleus. Biol Reprod 1990;42:21-8.
- 3) Choi EJ, Ha CM, Choi J, Kang SS, Park SK, Choi WS, et

- al. Low-density cDNA array-coupled to PCR differential display identifies new estrogen-responsive genes during the postnatal differentiation of the rat hypothalamus. *Mol Brain Res* 2001;97:115-28.
- 4) Matsuhashi S, Noji S, Koyama E, Myokai F, Ohuchi H, Taniguchi S, et al. New gene, nel, encoding a M(r) 93K protein with EGF-like repeats is strongly expressed in neural tissues of early stage chick embryos. *Dev Dyn* 1995; 203:212-22.
  - 5) Watanabe TK, Katagiri T, Suzuki M, Shimizu F, Fujiwara T, Kanemoto N, et al. Cloning and characterization of two novel human cDNAs(NELL1 and NELL2) encoding proteins with six EGF-like repeats. *Genomics* 1996;38:273-6.
  - 6) Oyasu M, Kuroda S, Nakashita M, Fujimiya M, Kikkawa U, Saito N. Immunocytochemical localization of a neuron-specific thrombospondin-1-like protein, NELL2: light and electron microscopic studies in the rat brain. *Mol Brain Res* 2000;76:151-60.
  - 7) Kim H, Ha CM, Choi J, Choi E, Jeon J, Kim C, et al. Ontogeny and the possible function of a novel epidermal growth factor-like repeat domain-containing protein, NELL2, in the rat brain. *J Neurochem* 2002;83:1389-400.
  - 8) Zacksenhaus E, Bremner R, Phillips RA, Gallie BL. A bipartite nuclear localization signal in the retinoblastoma gene product and its importance for biological activity. *Mol Cell Biol* 1993;13:4588-99.
  - 9) Yee AS, Shih HH, Tevosian SG. New perspective on retinoblastoma family functions in differentiation. *Front Biosci* 1998;3:D532-D547.
  - 10) Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;91:2642-54.
  - 11) Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-7.
  - 12) Renfranz PJ, Cunningham MG, McKay RD. Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell* 1991; 66:713-29.
  - 13) Kwon YK. Expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA stimulated by basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in rat hippocampal cell line. *Mol Cells* 1997;7:320-5.
  - 14) Chung JJ, Cho S, Kwon WK, Kim D, Kim K. Activation of retinoic acid receptor  $\gamma$  induces proliferation of immortalized hippocampal progenitor cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;83:52-62.
  - 15) Morris L, Allen KE, La Thangue NB. Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nat Cell Biol* 2000;2:232-9.
  - 16) Kusek JC, Greene RM, Nugent P, Pisano MM. Expression of the E2F family of transcription factors during murine development. *Int J Dev Biol* 2000;44:267-77.
  - 17) Kusek JC, Greene RM, Pisano MM. Expression of the E2F and retinoblastoma families of proteins during neural differentiation. *Brain Res Bull* 2001;54:187-98.
  - 18) Dowdy SF, Hinds PW, Louis K, Reed SI, Arnold A, Weinberg RA. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human cyclins. *Cell* 1993;73:499-511.