

P2X₂ Receptor Activation Potentiates PC12 Cell Differentiation Induced by ACAP in Acidic Environments

Myung-Hoon Lee¹, Jin Sik Nam², Hye-Myung Ryu³, Min Yoo⁴ and Moon-Hee Lee^{5,†}

¹The Advanced Medical Technology Center for Diagnosis and Prediction, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 700-422, Korea.

²Department of Food&Nutrition and Food Analysis Research Center, Suwon Women's College, Kyonggi 445-895, Korea.

³Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Kyungpook National University Hospital, Daeg. 700-721, Korea. ⁴Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea.

⁵Department of Biochemistry and Cell Biology, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 700-422, Korea

P2X receptors are membrane-bound ion channels that conduct Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ in response to ATP and its analogs. There are seven subunits identified so far (P2X₁-P2X₇). P2X₂ receptors are known to be expressed in a wide range of organs including brains and adrenal glands. PC12 cells are originated from adrenal gland and differentiated by nerve growth factor or pituitary adenylate cyclase activating poly peptide (PACAP). Previous studies indicate that P2X₂ receptor activation in PC12 cells couples to Ca²⁺-dependent release of catecholamine and ATP. It is known that acidic pH potentiates ATP currents at P2X₂ receptors. This leads to a hypothesis that P2X₂ receptors may play an important role in PC12 cell differentiation, one of the characteristics of which is neurite outgrowth, induced by the hormones under lower pH. In the present study, we isolated several clones which potentiate neurite outgrowth by PACAP in acidic pH (6.8), but not in alkaline pH (7.6). RT-PCR and electrophysiology data indicate that these clones express only functional P2X₂ receptors in the absence or presence of PACAP for 3 days. Potentiation of neurite outgrowth resulted from PACAP (100 nM) in acidic pH is inhibited by the two P2X receptor antagonists, suramin and PPADS (100 μM each), and exogenous expression of ATP-binding mutant P2X₂ receptor subunit (P2X₂[K69A]). However, acid sensing ion channels (ASICs) are not involved in PACAP-induced neurite outgrowth potentiation in lower pH since treatments of an inhibitor of ASICs, amiloride (10 μM), did not give any effects to neurite extension. The vesicular proton pump (H⁺-ATPase) inhibitor, bafilomycin (100 nM), reduced neurite extension indicating that ATP release resulted from P2X₂ receptor activation in PC12 cells is needed for neurite outgrowth. These were confirmed by activation of mitogen activated protein kinases, such as ERKs and p38. These results suggest roles of ATP and P2X₂ receptors in hormone-induced cell differentiation or neuronal synaptogenesis in local acidic environments.

Key Words: P2X₂, acidic pH, Differentiation

서 론

P2X 수용체는 ATP나 그 analog에 의해 개방되어 세포 밖의 Na⁺, K⁺ 또는 Ca²⁺을 세포안으로 전달하는 2개의

막관통 영역을 가진 membrane-bound ion channels이다. 지금까지 7개의 subunit (P2X₁-P2X₇)이 밝혀져 있으며 3개의 같거나 다른 subunit이 연결되어 완성된 homomeric/heteromeric channel을 형성하는 것으로 알려져 있다 (North, 2002).

P2X₂ 수용체는 뇌와 부신 등에 광범위하게 분포하고 있으며 신속한 시냅스 신호전달 및 시냅스전부 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Virginio et al., 1999; Edwards et al., 1992; Evans et al., 1992; Gu and MacDermott, 1997; Khakh and Henderson, 1998 and 2000). P2X₂

*논문 접수: 2007년 8월 31일

수정재접수: 2007년 9월 15일

†이문희, (우) 700-422 대구광역시 중구 동인동2가 101번지, 경북대학교 의과대학 생화학과

Tel: 82-53-420-4820, Fax: 82-53-421-4974

e-mail: moonhee@knu.ac.kr

수용체의 특징은 다른 P2X 수용체와는 달리 낮은 pH에서 활성이 증폭되며 (Ding and Sachs, 1999; King et al., 1997; Stoop et al., 1997; Wildman et al., 1998), 이 특징은 염증에 의한 통증 자극 및 전달에 직접적으로 관여한다는 보고가 있다 (Gever et al., 2006; McGaraughty et al., 2003).

PC12 세포는 부신에서 발생되었으며 nerve growth factor (NGF)나 pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)에 의해 분화되며 이것의 가장 잘 알려진 특징은 신경돌기의 형성이다. 이 현상은 위의 호르몬들에 의한 p38 및 extracellular signal regulated kinase (ERK) 등의 mitogen activated protein kinase (MAPK) 인산화와 직접적으로 관련된 것으로 알려져 있다 (Ravni et al., 2006).

PC12 세포에는 ATP 수용체가 존재하며, clone마다 조금씩의 차이는 있지만 P2X₂ 수용체가 가장 많이 발현되고 기능을 하는 것으로 알려져 있다 (Nakazawa et al., 1990 and 1991; Inoue et al., 1989; Fabbro et al., 2004). 또한 ATP와 catecholamine 등의 신경전달물질이 Ca²⁺ 의존적인 exocytosis를 통해서 방출되는 것으로 알려져 있다 (Fabbro et al., 2004; Burgoyne et al., 2001).

본 연구는 PACAP에 의한 PC12 cell 분화가 약산성 pH (6.8)에서 어떻게 달라지고 이것이 ATP 방출로 인한 P2X₂ 수용체의 활성화와 어떤 연관 관계를 지니는지, 그리고 MAPK를 경유하는 신호전달경로와 연관이 있는지에 대해서 알아보하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

Rat pheochromocytoma 세포주 (PC12 세포)는 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 배양하였다. P2X₂[K69A]의 cDNA transfection은 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, San Diego, CA)을 사용하였으며 Spelta et al., (2003)의 방법에 따랐다. 약산성 pH에서 분화 실험을 하는 동안에 다른 ion channel 즉, voltage-gated Ca²⁺ channel 또는 transient receptor potential channel의 활성화를 막기 위하여 그들의 저해제인 10 mM lanthanum과 10 µM gadolinium을 사용하였고 (Biagi and Enyeart, 1991; Runnels et al., 2001), ATP에 의한 P2Y 수용체 활성화에 의한 실험적 오류를 막기 위하여 20 µM 2-APB (Kito and Suzuki, 2003)를 사용하였다. 실험에 사용된 시약들은 Sigma, Cell signaling 등에서 구입하였다.

2. 방법

1) RT-PCR

RNA는 10⁶ 세포로부터 RNeasy kit (Qiagen, West Sussex, UK)를 사용하여 분리하였으며 모든 실험 방법은 제작자의 프로토콜을 따랐다. First-strand cDNA는 5 µg total RNA로부터 oligo(dT) primer와 Superscript II First Strand Synthesis (Invitrogen, Paisley, UK)을 사용하여 만들었다. Primer sequence는 P2X₁ (508) F: 5'-CAGAAAGGAAAGC-CCAAGGTATTC-3', B: 5'-TGACGACGGTTTGTCCCATTC-3'; P2X₂ (785) F: 5'-GTGACTACCTCAAGCATTG-3' B: 5'-CTGTTGGGAAGGCTCAGGGAC-3'; P2X₃ (534) F: 5'-GG-ACATAAAGAGGTGCCGCTTC-3' B: 5'-AACACTGGGTTGGTTGACGCAG-3'; P2X₄ (553) F: 5'-GGAACATCCTCCCAACATCAC-3' B: 5'-TTCATCTCCCCGAAAGACC-3'; P2X₅ (869) F: 5'-TGTCACGCTGGGGAGTCTGTTGTAG-3' B: 5'-TTGCTATTCTGCTTCTGCCAC-3' P2X₆ (228) F: 5'-AGAGTAGTGCTGTGCCAGGAAAC-3' B: 5'-CCTCAAA-GTCCCCTCCAGTCATAG-3'; P2X₇ (468) F: 5'-AATGAGTCCCTGTTCCCTGGCTAC-3' B: 5'-CAGTTCCAAGAAGTCCGTCTGG-3'; β-actin (241) F: 5'-GGCTCTCTCCAGCCTTCTTCTTG-3' B: 5'-CACAGAGTACTTGCCTCAGGAGG-3'을 사용하였다. PCR 반응은 1 µL cDNA, 1 µL forward primer (10 pmol), 1 µL reverse primer (10 pmol), 25 µL 2 × Readymix PCR master mix (ABgene) 및 22 µL H₂O을 혼합하여 94°C에서 60초, 55°C에서 30초, 72°C에서 45초로 35회 반복하였다.

2) 전기 생리

Whole-cell recording은 PC12 세포 및 transfectants를 이용하여 20~22°C에서 실시하였다. 전위는 -60 mV로 유지하였고 세포외용액은 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 11.1 mM Glucose (pH 7.4)를, 세포내용액은 145 mM CsCl, 5 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA), 10 mM HEPES (pH 7.4)를 사용하였다. 모든 용액은 pH 7.3, 300~315 mOsm/L를 유지하였다. ATP 및 유도체들은 RSC 200 system (Biological Science Instruments, Grenoble, France)을 사용하여 1초 동안 세포에 첨가하였다 (Jiang et al., 2001).

3) PC12 세포 분화 및 MAPK 활성화

PC12 세포 분화에 대한 지표로 신경돌기의 형성을 관찰하였으며 세포의 직경이 15 µm 이상 되고 신경돌기를

가진 세포만을 분화된 것으로 간주하였다. MAPK 활성화는 인산화되는 ERK와 P38을 Western blotting으로 확인하였다.

세포는 1 mL의 용해액 (12 mM deoxychloric acid, 150 mM NaCl, 5 mM Tris-EDTA, pH 7.4, 0.1% NP-40, 0.1% Triton X-100)을 사용하여 용해하였으며 용해물은 13000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만 취하였다. Lowry 방법을 이용하여 단백질 정량을 한 다음 (Lowry et al., 1951), 50 mg 단백질을 SDS-PAGE를 사용하여 분리하였다 (10% polyacrylamide gel, 150 V, 2시간). 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane (pore size: 0.2 μ m, Millipore)으로 전이하였다 (100 V, 2시간). Membranes은 5% semi skimmed milk가 함유된 TTBS buffer에서 최소 30분간 blocking하였다. 5% semi skimmed milk를 포함하는 TTBS buffer에 1/2000으로 희석한 1차 항체를 4°C에서 밤새 처리한 후에 TTBS

를 사용하여 20분 동안 3번 세척하였다. Peroxidase가 결합된 anti-rabbit IgG 항체를 5% semi skimmed milk를 포함하는 TTBS buffer에 1/2000로 희석하여 사용하였고, 3시간 동안 상온에서 반응한 다음 ECL kit (Amersham, UK)로 발광하여 X-ray 필름에서 30초 동안 둔 뒤에 인화하였다.

4) 면역화학 및 confocal microscopy

포를 Zamponi's solution (15 mL Picric acid, 5.5 mL formaldehyde (36.5% in stock, Sigma, Poole, UK), 80 mL PBS)를 사용하여 고정한 후에 2% tritonX-100이 함유된 PBS를 사용하여 투과하였다. 5% goat serum을 함유한 PBS를 사용하여 30분 동안 blocking한 후에 Anti-P2X₂ 항체 (1/1,000, Alomone Lab, Israel)와 Anti-P2X₄ 항체 (1/1,000, Alomone Lab, Israel)를 각각 처리하여 4°C에서 밤새 반응하였다. Alexa 568 또는 Alexa 488이 결합된 Anti-rabbit

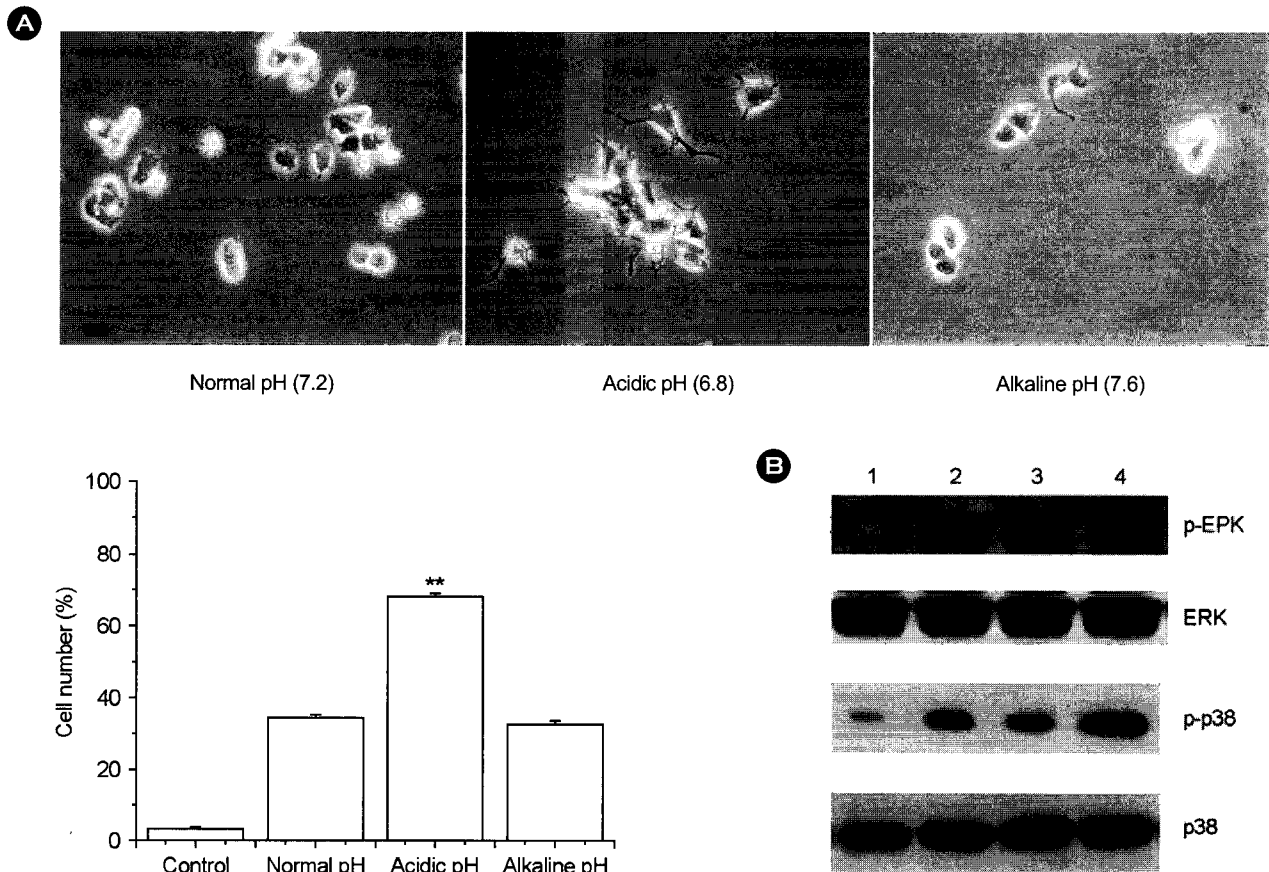


Fig. 1. PC12 cell differentiation in the presence of 100 nM PACAP in the different pH (normal, 7.2; acidic, 6.8; alkaline, 7.6) for 1 day **(A)**. Cells having neurite outgrowth in random position were counted (n=30; A bar, 10 μ m). "Control" in the graph means undifferentiated PC12 cells. Significance was tested with student t-test. $P < 0.01$ compared with cells in the normal pH (7.2). **(B)** Levels of p-ERK and p-p38 by western blotting. Cells were extracted 2 hr after 100 nM PACAP were exposed in the different pH (Lane 1, undifferentiated; Lane 2, PACAP-induced differentiation in pH 7.2; Lane 3, in pH 7.6; Lane 4, in pH 6.8). Total 100 μ g proteins were loaded in each lane. The blots were representatives of three independent experiments.

IgG 항체 (1/1,000, Dakco, Denmark)를 실온에서 2시간 처리한 후 세포를 mounting하였다. 염색한 세포는 confocal laser microscope (Nikon Microscope)와 형광현미경 (Axio-cam)을 사용하여 사진을 찍었다. 형광을 감지하기 위해서 시료를 488 및 568 nm에서 여기한 후에 488 및 560 nm 이상에서 관찰하였다. Pinhole은 1 μm 보다 얇은 section 이 적용될 수 있도록 조절하였다.

결 과

1. 약산성 pH에서 분화가 활성화되는 PC12 세포의 분리
PC12 세포를 100 nM PACAP를 포함한 정상 (pH 7.2),

약산성 (6.8) 또는 약알칼리성 (7.6) DMEM 배지에서 하루 동안 분화를 유도한 후 현미경에서 관찰하였다. 약알칼리성 배지에서는 PACAP에 의한 신경돌기 형성 정도의 차이가 없으나 약산성 배지에서는 신경돌기의 형성이 현저한 clone을 몇 개 확인할 수 있었다. 하지만 PACAP를 배지에 넣어주지 않은 경우에는 신경돌기의 형성이 차이는 없었다 (결과 미포함). 이 clone들을 분리하여 DMEM 배지에서 배양하여 본 실험을 진행하였으며 각기 다른 pH 하에서 분화를 유도한 후 무작위로 신경돌기의 형성이 발견된 세포의 수를 측정하였다. Fig. 1에서 보인 바와 같이, 약산성 배지에서는 신경돌기가 형성된 세포수가 증가하였으나 약알칼리성 배지에서는 그렇지 않았다 (Fig. 1A).

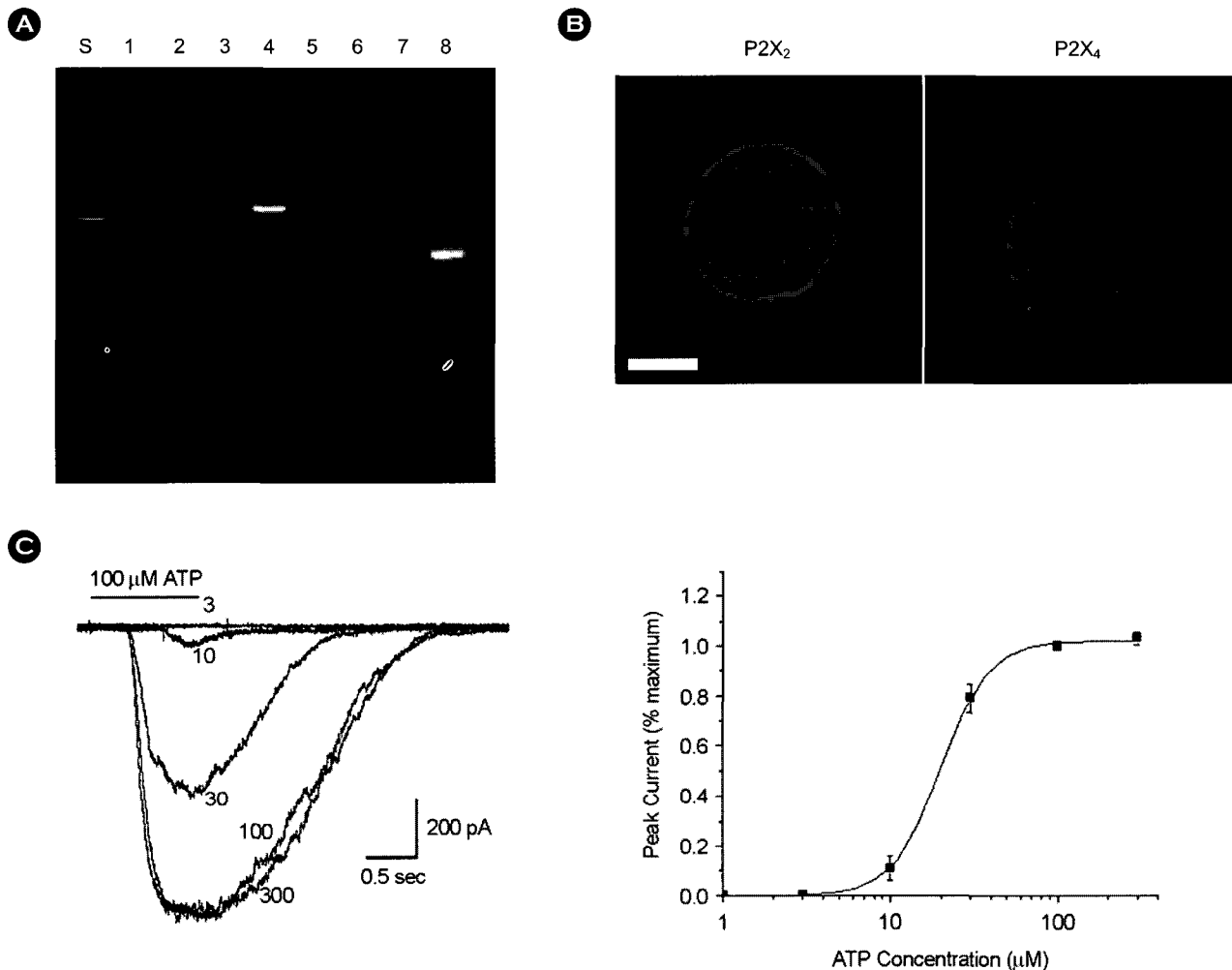


Fig. 2. P2X₂ receptor characterization in PC12 cells. (A) RT-PCR data demonstrate that P2X₂ and P2X₄ subunits are expressed in PC12 cells which potentiate neurite outgrowth in acidic pH (S, 100 base pair size marker; Lane 1, P2X₁; Lane 2, P2X₂; Lane 3, P2X₃; Lane 4, P2X₄; Lane 5, P2X₅; Lane 6, P2X₆; Lane 7, P2X₇; Lane 8, β -actin). (B) Expression of P2X₂ and P2X₄ receptor proteins in undifferentiated PC12 cells. P2X₂ receptors are membrane-expressed, but P2X₄ remains in the cytoplasm (A bar, 10 mm). (C) Elicited ATP currents in PC12 cells in a concentration-dependent manner. Sigmoidal curves were fitted to the data using an equation derived from a conventional concentration-response relationship (Tallarida and Jacob (1979): $(I_{\text{max}} - I)/I_{\text{max}} = 1/(1+(K/A)^n)$, where K is the dissociation constant, A is a concentration of agonists and n is the Hill coefficient). Four cells were examined. Holding potential was -60 mV. Bars mean SEM.

MAPK 활성화를 통해 약산성 배지에서 신경돌기의 형성을 확인하였고, 약산성 pH에서 MAPK인 ERK 및 p38 kinase의 인산화가 증가하였다 (Fig. 1B). 이 세포들을 배양하여 다음 실험을 계속 진행하였다.

2. PC12 세포에서 P2X 수용체 특성 규명

Fig. 2A에서와 같이 PC12 세포에서 P2X₂와 P2X₄ subunit이 mRNA로 발현됨을 확인하였으며, 면역 염색 결과에서 P2X₂ 수용체는 세포막에서 발현되나 P2X₄ 수용체는 세포질에 머무는 것을 확인하였다. 세포막에 발현하는 P2X₂ 수용체의 기능이 있는지 확인하기 위하여 전기 생리 실험을 실시하였다. PC12 세포를 holding potential -60 mV에서 voltage-clamp를 한 후에 100 μM ATP에 1초 동안 노출하여 활성도와 민감도가 서서히 떨어지는 ATP 전류를 확인하였다 (Fig. 2C). 이 전류는 ATP 농도에 의존적이며 ($EC_{50} = 11.5 \pm 1.5 \mu M$, Hill coefficient = 2.5), P2X 수용체 길항제인 suramin과 PPADS에 의해서 저해되었다 (suramin의 경우, $IC_{50} = 5.3 \pm 0.8 \mu M$; PPADS의 경우, $IC_{50} = 3.7 \pm 0.7 \mu M$). P2X 수용체 subunit의 특성을 파악하기 위하여 여러 가지 nucleotide와 ATP 유도체를 첨부하였다 (North 2002). 다른 nucleotide (ADP, GTP, UTP)와 ATP 유도체인 αβ-methylene ATP (αβmeATP)와 βγ-methylene ATP (βγmeATP)는 PC12 세포에서 전류를 유도하지 못하였으나 2-meSATP와 ATP_γS는 ATP만큼 전류를 유도하였다 (Fig. 3A, B, C). P2X₂ 수용체의 선택적인 agonist인 bzATP는 약한 전류를 야기했으며, P2X₄ 수용체의 전류를 유발시킨다고 알려진 ivermectin은 효과적이지 않았다. 이러한 전기 생리 결과는 PACAP으로 인한 3일 동안의 분화 후에도 변하지 않았다 (Fig. 3A, B, C). 이 실험 결과로 P2X₂ 수용체만이 발현되어 활성을 가진다는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 P2X₄ 수용체는 세포내 원형질에 머무는 것으로 결론지었다.

3. P2X₂ 수용체 활성화에 의한 약산성 pH에서의 신경돌기의 형성 유도

약산성 pH에서의 PACAP에 의해 유도되는 신경돌기의 형성이 P2X₂ 수용체 활성화에 의한 것임을 확인하기 위하여, P2X₂ 수용체의 antagonist인 suramin과 PPADS 존재 하에서 분화를 유도하여 세포수를 점검하였다. 보통 또는 약산성 환경 모두에서 PACAP에 의해 신경돌기가 형성된 세포수는 현저히 감소하였다 (Fig. 4A).

다음으로 P2X₂ 수용체의 비활성 변이체 (P2X₂[K69A],

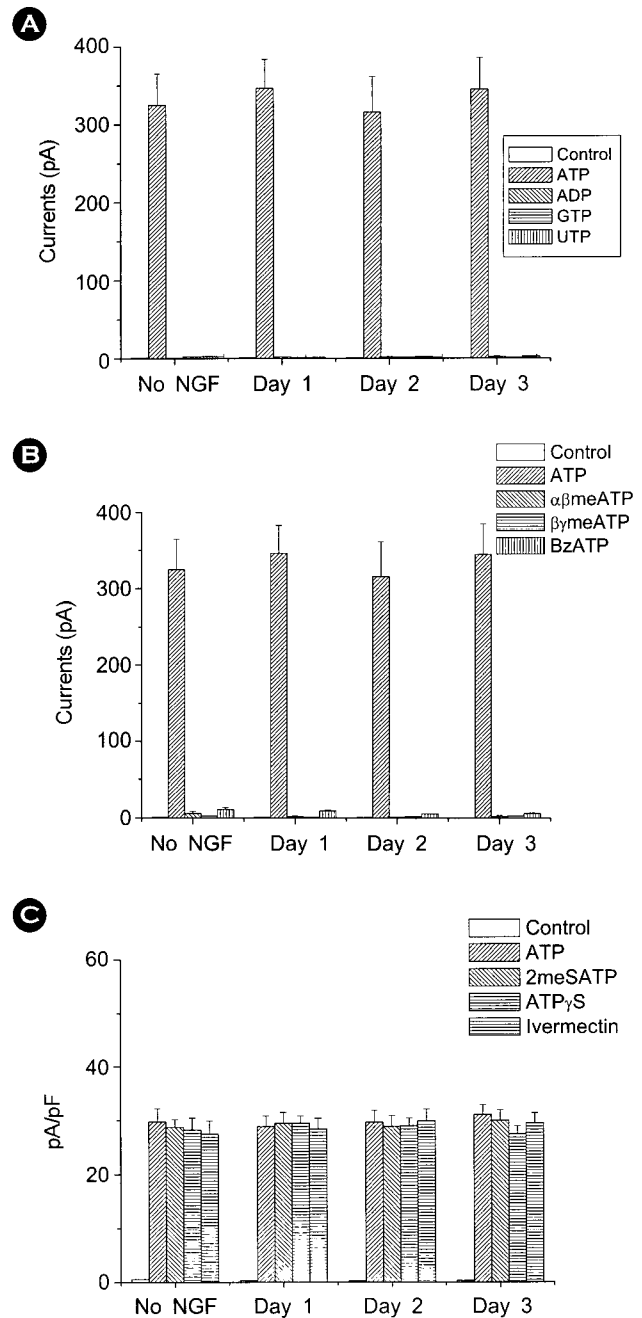


Fig. 3. Effects of differentiation for 3 days by PACAP on currents induced by nucleotides and ATP analogs (100 μM each) in PC12 cells. Holding potential was -60 mV. Bars mean SEM, n=3.

P2X₂ 수용체의 활성부위인 Lys69에 변이가 일어나면 ATP가 이 수용체에 결합하더라도 수용체는 열리지 않으며 이 subunit이 세 개의 subunit 중에 하나만이라도 들어가면 수용체 자체 기능이 사라짐; Jiang et al., 2000)를 발현 후에 PACAP 존재 하에서 1일 동안 분화한 후 신경돌기의 형성을 측정하였다. 예상했던 것과 같이 P2X₂ 변이단백질이 발현되어 PC12 세포의 PACAP에 의한 신경

고찰

돌기의 형성이 보통 또는 약산성 환경에서 억제됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 4B). MAPK의 활성화가 이것을 확인해 주었다 (Fig. 4A, B). 이 결과에서 P2X₂ 수용체가 약산성 환경에서 MAPK를 경유하는 신호전달경로를 통하여 PACAP에 의한 신경돌기 발현을 유도하는 것으로 예측할 수 있었다.

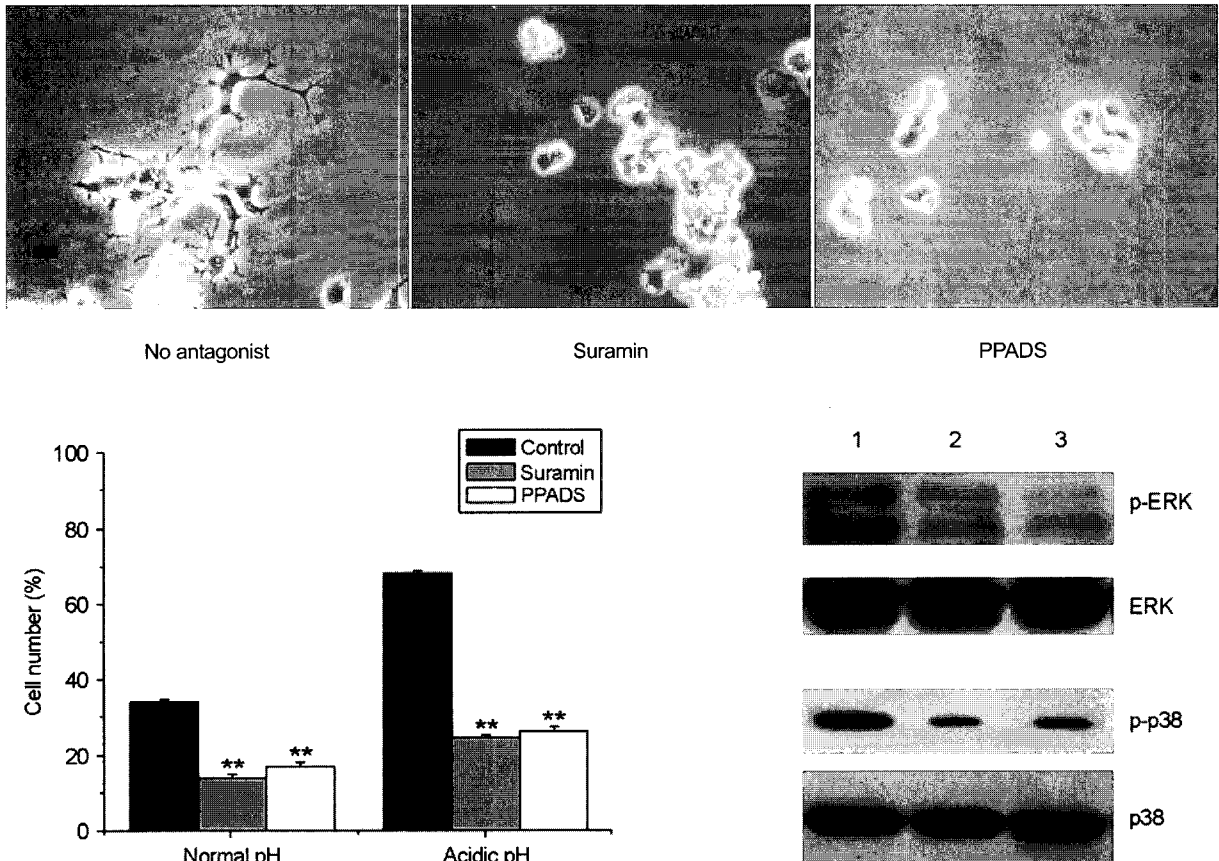
4. 약산성감지 ion channels 및 proton pump의 관련 가능성

약산성 pH에서 신경돌기의 확장이 약산성감지 ion channels (ASICs)이나 proton pump (H⁺-ATPase)에 의한 가능성에 대해서 ASICs의 저해제인 amiloride (10 μM, Lalo et al., 2007)와 proton pump의 저해제인 bafilomycin (100 nM, Keeling et al., 1997; Lalo et al., 2007)을 처리한 후 신경돌기의 형성을 조사해 보았다. Amiloride에 의한 신경돌기 확장의 억제는 관찰할 수 없었으나 bafilomycin에 의해서는 억제되었다 (Fig. 5). 이것을 MAPK 인산화에 대한 실험 결과로 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

국지적 약산성 환경은 면역반응 및 염증 그리고 통증 전달 등 세포의 기능 수행에 적지 않은 영향을 미친다. 예를 들어서 경동맥 소체의 사구체 세포들은 동맥의 O₂/CO₂ 압력을 감지하여 이것을 대뇌에 있는 respiratory center에 전달해준다. Rong 등의 연구자들은 형질전환 생쥐 연구를 통해서, ATP 방출을 통한 P2X₂ 수용체 활성화가 이런 신호전달에 필수적인 것으로 보고하였다 (Rong et al., 2003). 또한 Dorsal root ganglial neuron에서 발열 및 염증 등의 자극을 유도시켜 brain center에 전달하는데, ATP를 통한 P2X₂ 수용체 subunit의 역할 및 국지적 약산성 pH의 중요성은 이미 많은 연구에서 밝혀져 있다 (Gever et al., 2006; McGaraughty et al., 2003).

이전의 연구에서 밝혔듯이 ATP가 중추신경체에서 신속한 시냅스 신호전달에 관여하는 것이 알려져 있고, 또한 P2X₂ 수용체는 뇌의 거의 모든 부분에 있어서 발현되고 있으나 (Virginio et al., 1999; Edwards et al., 1992; Evans

A



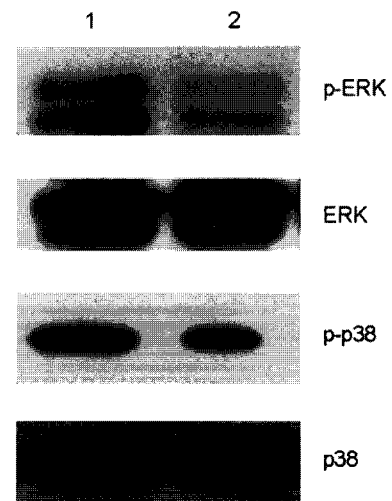
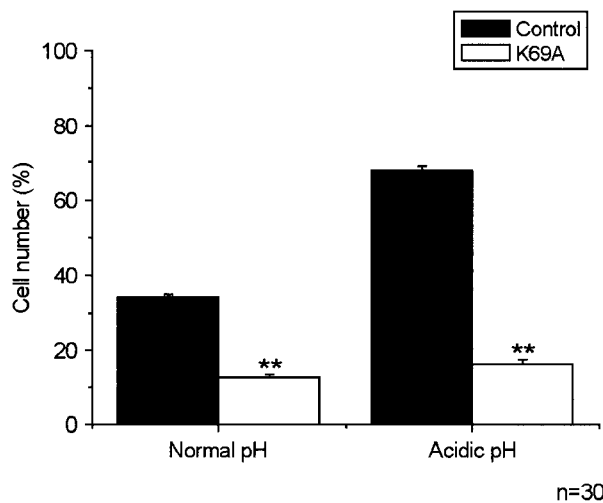
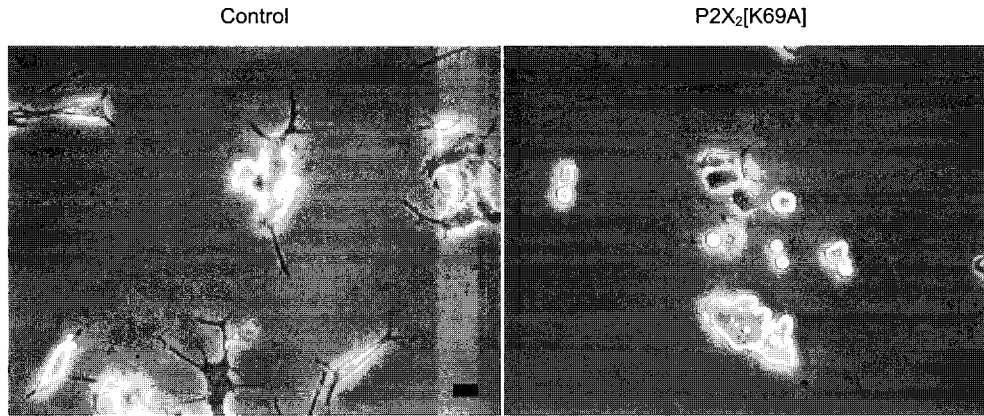
B

Fig. 4. (A) Effects of P2X receptor antagonists, suramin or PPADS (100 μ M each), on PACAP-induced neurite outgrowth in PC12 cells in acidic pH. Cells were exposed to PACAP along with suramin or PPADS for 1 day and cells having neuritis were counted ($n=30$ (upper and middle panel); A bar, 10 μ m). "Control" in the graph means the PC12 cells without antagonist treatment. Significance was investigated with student t-test. $P<0.01$ compared with cells under the no treatment in the same condition. Cells were added with PACAP plus suramin or PPADS for 2 hr and were extracted for western blotting to probe p-ERK and p-p38. Total 100 μ g proteins were loaded in each lane (Lane 1, not treated; Lane 2, 100 μ M suramin treated; Lane 3, 100 μ M PPADS treated). The blots were representatives of three independent experiments. **(B)** Effects of exogenous expression of dominant negative mutant P2X₂[K69A], on PACAP-induced neurite outgrowth in PC12 cells in acidic pH. Cells were exposed to PACAP for 1 day and cells having neurites were counted. ($n=30$ (upper and middle panel); A bar, 10 μ m). "Control" in the graph means untransfected PC12 cells. Significance was examined with student t-test. $P<0.01$ compared with untransfected cells in the same condition. Cells were added with PACAP extracted for western blotting to probe p-ERK and p-p38 in the presence of PACAP for 1 day. Total 100 μ g proteins were loaded in each lane (Lane 1, nontransfected; Lane 2, cDNAs encoding P2X₂[K69A] were transfected). The blots were representatives of three independent experiments.

et al., 1992; Gu and MacDermott, 1997; Khakh and Henderson, 1998 and 2000), 이 ion channel의 국지적 약산성 pH에서의 역할은 밝혀져 있지 않은 상태이다.

PC12 세포의 분화를 유도하는 PACAP에 의한 하부 신호전달경로는 잘 알려져 있다. PACAP 수용체인 PAC-1 수용체가 활성화되면 phosphoinositide에 특이적인 phospholipase C가 활성화되며 하부신호전달을 통해서 세포내 Ca²⁺ 농도가 증가될 뿐만 아니라 MAPK인 ERK 및 p38

가 활성화되는 것으로 알려져 있다 (Ravni et al., 2006). 세포내 Ca²⁺ 농도의 증가는 소낭의 exocytosis를 야기하며 이 때 ATP가 방출되고 이것이 시냅스후부 세포에서 P2X₂ 수용체 활성화를 야기하는 것으로 알려져 있다 (Burgoyne et al., 2001). 그러므로 본 연구는 P2X₂ 수용체가 국지적인 약산성 pH에서 신경돌기 형성에 어떠한 영향을 미치는지, MAPK 활성화에 어떤 영향을 미치는지 알아보려고 수행되었다.

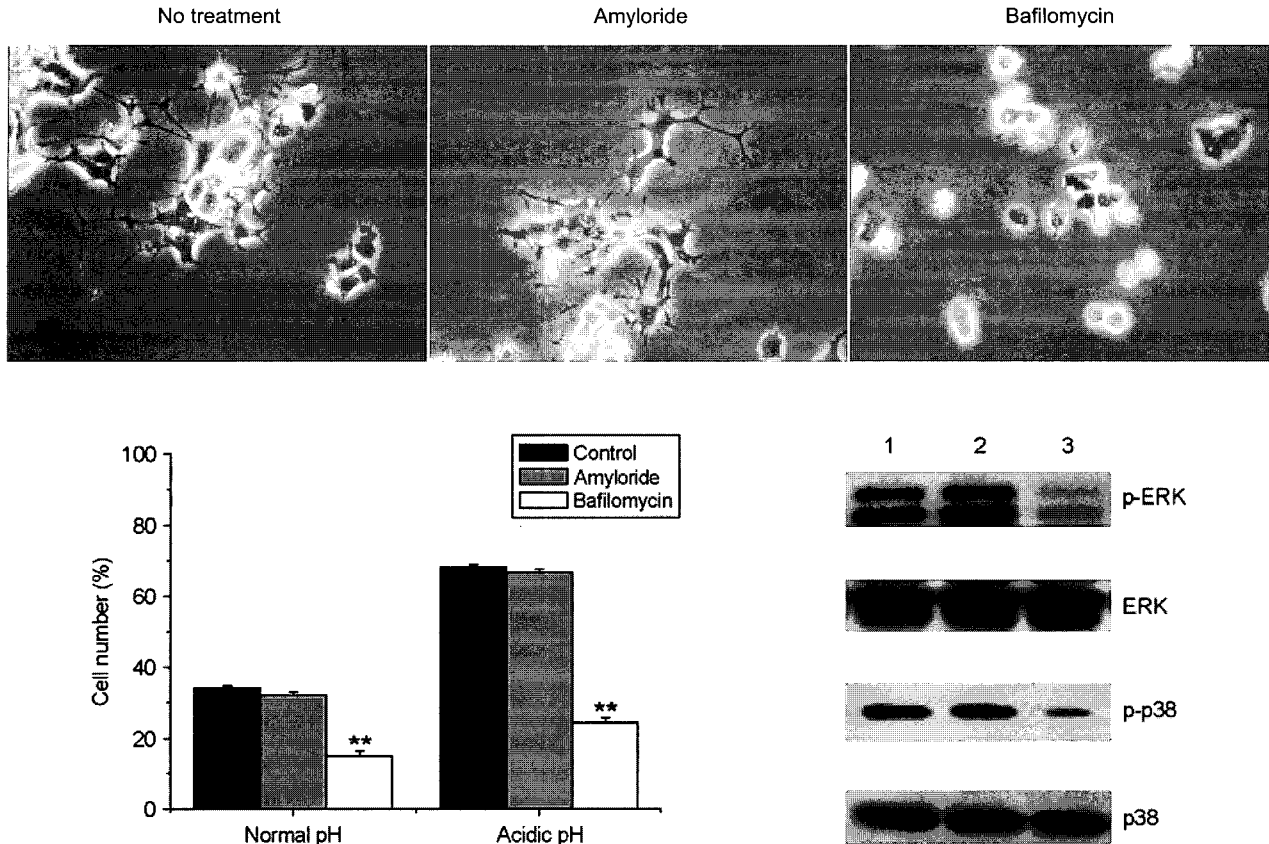


Fig. 5. Effects of inhibition of acid sensing ion channels (amyloride, 10 μ M) or vesicular H^+ -ATPase (Bafilomycin, 100 nM), on PACAP-induced neurite outgrowth in PC12 cells in acidic pH. Cells were exposed to PACAP along with suramin or PPADS for 1 day and cells having neuritis were counted ($n=30$ (upper and middle panel); A bar, 10 μ m). "Control" in the graph means the PC12 cells without treatment. Significance was tested with student t-test. $P<0.01$ compared with cells under the no treatment in the same condition (lower panel). Cells were added with PACAP plus bafilomycin or amyloride for 2 hr and were extracted for western blotting to probe p-ERK and p-p38. Total 100 μ g proteins were loaded in each lane (Lane 1, not treated; Lane 2, 10 μ M amyloride treated; Lane 3, 100 nM bafilomycin treated). The blots were representatives of three independent experiments.

먼저 우리는 PACAP 존재 하에서 약산성 pH가 신경돌기 확장을 유도시키는 clone을 분리하였고 이 clone이 $P2X_2$ 수용체만을 세포막에 활성화되어 발현하는 것을 확인하였다 (Figs. 1, 2, 3). 또한 이러한 신경돌기의 형성의 유도는 ATP에 의한 $P2X_2$ 수용체 활성화에 의한 것임을 $P2X$ 수용체 길항제인 suramin과 PPADS와 $P2X_2$ 수용체의 비활성 변이체인 $P2X_2[K69A]$ 를 통한 실험 결과로 확인하였다 (Fig. 4). 그러나 ASICs는 그 저해제인 amyloride의 처리로 신경돌기의 형성 유도를 저해할 수 없을 뿐 아니라 MAPK 활성화에 영향을 미치지 않은 것으로 보아 ASICs는 약산성 pH에서 신경돌기 확장에 관여되지 않은 것으로 사료된다 (Fig. 5).

이전 연구에서 PC12 세포는 ATP 등 자극에 의해서 ATP를 방출하는 것으로 알려져 있다. 이 방출은 Ca^{2+} 에 의한 exocytosis에 의한 것으로 사료된다. 이 연구에서

vesicular H^+ -ATPase의 저해제인 bafilomycin이 신경돌기의 형성을 저해하는 것으로 관찰되었다. 이는 bafilomycin이 ATP 등의 신경전달물질이 소낭에 흡수되는 것을 막아버림으로써 ATP 방출에 의한 시냅스후부 세포의 $P2X_2$ 수용체의 활성화를 저해하여 시냅스후부 세포의 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가를 억제하여 약산성 pH에 의한 분화를 둔화시킨 것으로 판단된다. 이것은 ERK 및 p38 활성화로 확인하였다.

본 연구에서 우리는 처음으로 신경 시냅스의 형성에 ATP와 약산성 pH의 역할을 보여주었다. Rat hippocampal neuron을 분리하거나 생체 실험이 이루어 진다면 위의 국지적 약산성 pH에 의한 신경돌기 확장과 ATP 및 $P2X_2$ 수용체에 의한 ATP 효과는 신경의 분화를 이해하는데 중요한 단서를 제공할 것이다.

REFERENCES

- Biagi BA, Enyeart JJ. Multiple calcium currents in a thyroid C-cell line: biophysical properties and pharmacology. *Am J Physiol.* 1991. 260: C1253-C1263.
- Burgoyne RD, Fisher RJ, Graham ME, Haynes LP, Morgan A. Control of membrane fusion dynamics during regulated exocytosis. *Biochem Soc Trans.* 2001. 29: 467-472.
- Ding S, Sachs F. Single channel properties of P2X₂ purinoceptors. *J Gen Physiol.* 1999. 113: 695-720.
- Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D. ATP receptor mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 1992. 359: 144-147.
- Evans RJ, Derkach V, Surprenant A. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 1992. 357: 503-505.
- Fabbro A, Skorinkin A, Grandolfo M, Nistri A, Giniatullin R. Quantal release of ATP from clusters of PC12 cells. *J Physiol.* 2004. 560: 505-517.
- Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* 2006. 452: 513-537.
- Gu JG, MacDermott AB. activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature* 1997. 389: 749-753.
- Hamilton SG, McMahon SB, Lewin GR. Selective activation of nociceptors by P2X receptor agonists in normal and inflamed rat skin. *J Physiol.* 2001. 534: 437-445.
- Inoue K, Nakazawa K, Fujimori K, Takanaka A. Extracellular adenosine 5'-triphosphate-evoked norepinephrine secretion not relating to voltage-gated Ca channels in pheochromocytoma PC12 cells. *Neurosci Lett.* 1989. 106: 294-299.
- Jiang LH, Rassendren F, Spelta V, Surprenant A, North RA. Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X(2) receptor. *J Biol Chem.* 2001. 276: 14902-14908.
- Jiang LH, Rassendren F, Surprenant A, North RA. Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem.* 2000. 275: 34190-34196.
- Keeling DJ, Herslof M, Ryberg B, Sjogren S, Solvell L. Vacuolar H(+)-ATPases. Targets for drug discovery? *Ann N Y Acad Sci.* 1997. 834: 600-608.
- Khakh BS, Henderson G. ATP receptor-mediated enhancement of fast excitatory neurotransmitter release in the brain. *Mol Pharmacol.* 1998. 54: 372-378.
- Khakh BS, Henderson G. Modulation of fast synaptic transmission by presynaptic ligand-gated cation channels. *J Auton Nerv Syst.* 2000. 81: 110-121.
- King BF, Wildman SS, Ziganshina LE, Pintor J, Burnstock G. Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X₂ receptor. *Br J Pharmacol.* 1997. 121: 1445-1453.
- Kito Y, Suzuki H. Electrophysiological properties of gastric pacemaker potentials. *J Smooth Muscle Res.* 2003. 39: 163-173.
- Lalo U, Pankratov Y, North RA, Verkhratsky A. Spontaneous autocrine release of protons activates ASIC-mediated currents in HEK293 cells. *J Cell Physiol.* 2007. 212: 473-480.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin-phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951. 193: 269-275.
- McGaraughty S, Wismer CT, Zhu CZ, Mikusa J, Honore P, Chu KL, Lee CH, Faltynek CR, Jarvis MF. Effects of A-317491, a novel and selective P2X₃/P2X_{2/3} receptor antagonist, on neuropathic, inflammatory and chemogenic nociception following intrathecal and intraplantar administration. *Br J Pharmacol.* 2003. 140: 1381-1388.
- Nakazawa K, Inoue K, Fujimori K, Takanaka A. ATP-activated single-channel currents recorded from cell-free patches of pheochromocytoma PC12 cells. *Neurosci Lett.* 1990. 119: 5-8.
- Nakazawa K, Inoue K, Fujimori K, Takanaka A. Effects of ATP antagonists on purinoceptor-operated inward currents in rat pheochromocytoma cells. *Pflugers Arch.* 1991. 418: 214-219.
- North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 2002. 82(4): 1013-1067.
- Ravni A, Bourgault S, Lebon A, Chan P, Galas L, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez B, Eiden LE, Vaudry D. The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. *J Neurochem.* 2006. 98: 321-329.
- Rong W, Gourine AV, Cockayne DA, Xiang Z, Ford AP, Spyer KM, Burnstock G. Pivotal role of nucleotide P2X₂ receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *J Neurosci.* 2003. 23: 11315-11321.
- Runnels LW, Yue L, Clapham DE. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* 2001. 291: 1043-1047.
- Spelta V, Jiang LH, Bailey RJ, Surprenant A, North RA. Interaction between cysteines introduced into each transmembrane domain of the rat P2X₂ receptor. *Br J Pharmacol.* 2003.

138: 131-136.

Stoop R, Surprenant A, North RA. Different sensitivities to pH of ATP-induced currents cloned P2X receptors. *J Neurophysiol.* 1997. 78: 1837-1840.

Tallarida RJ, Jacob LS. Kinetics of drug-receptor interaction: interpreting dose-response data. In the dose response relation in pharmacology. 1979. pp 49-84. Springer-Verlag, New York.

Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nature Neurosci.* 1999. 2: 315-322.

Wildman SS, King BF, Burnstock G. Zn²⁺ modulation of ATP-responses at recombinant P2X₂ receptors and its dependence on extracellular pH. *Br J Pharmacol.* 1998. 123: 1214-1220.