

F9 기형암종 세포의 분화에 따른 small GTP-binding protein 변화

박혜성 · 이준승 · 김규원* · 허규정

이화여자대학교 생물학과, *부산대학교 분자생물학과

세포분화에 따른 Small GTP-binding protein의 역할을 밝히기 위하여 Retinoic acid (RA)와 dibutyryl cyclic AMP(dbcAMP)로 분화를 유도한 F9 기형암종세포의 형태적인 변화와 함께 Small GTP-binding protein의 분포를 조사하였다. RA와 dbcAMP를 처리한 세포는 분화유도 5일경(초기 분화 단계)에 분명한 세포의 경계를 보이기 시작하여 7일경(분화 후기 단계)에는 거의 모든 세포가 둥근 분화된 형태로 전환되었다. 이 분화과정 동안 세포막에는 많은 microvilli와 lamellopodia 같은 구조물이 나타났다. 아울러 초기 분화 단계에 많은 량의 laminin이 발현되었으며 분화 후기에 microtubule의 재분포가 관찰되었다. 세 종류의 Small GTP-binding protein(25, 23, 21 KD)이 F9 세포의 막성분과 세포질에서 관찰되었으며 분화가 진행됨에 따라서 세 단백질 모두 증가되는 양상을 보였다. 이러한 결과는 Small GTP-binding protein이 F9 세포의 분화에 특별한 기능을 가지고 있음을 시사해 주고 있다.

KEY WORDS: Small GTP-binding proteins. F9 teratocarcinoma stem cell. Differentiation, Retinoic Acid.

세포의 증식과 분화에 관여하는 신호전달기작에는 두 종류의 GTP-binding protein들이 알려져 있다. 한 종류는 세포막의 호르몬 수용체와 작용하여 세포밖의 신호를 세포내 2차 messenger 생산과정으로 연결하는 transducer 기능을 가진 heterotrimeric GTP-binding protein이다. 이 단백질은 α , β 및 γ subunit로 구성되어 있으며, α -subunit는 32-52 kD 정도이며 GTP 결합부위와 GTPase 활성을 가진 부위를 포함하고 있다(Gilman, 1984). 이러한 GTP-binding protein으로는 adenylate cyclase의 활성을 조절하는 Gs, Gi 및 transducin 등이 알려져 있다(Ito *et al.*, 1986; Strittmatter *et al.*, 1990). 다른 한 종류의 GTP-binding protein은 역시 GTP-결합부위와 GTPase 활성을 가지

고 있으며 분자량이 20-30 kD 정도의 small GTP-binding protein이다(Bos, 1988; Downward, 1990; Hall, 1990). 이러한 small GTP-binding protein을 *ras*-superfamily라 부르며(Downward, 1990), 40가지 이상의 단백질이 유전자 수준에서 밝혀져 있다(Hall, 1990).

ras-superfamily는 염기배열의 유사성에 따라 *ras*, *rho*, *rab* 및 *arf* subfamily로 나눈다(Downward, 1990). *ras* subfamily는 세포의 분화 및 증식에 관계되는 자극을 수용체로부터 받아 세포내의 여러가지 생리적인 반응을 일으키는 단백질(effector molecule)로 연결하는데 관여한다(Hall, 1990; Downward, 1990). 한편 *rab* 및 *arf* 계열의 단백질은 세포내 여러 소기관 사이의 vesicle transport 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다(Balch, 1990; Serafini *et al.*, 1991; Kahn *et al.*,

본 연구는 교육부 기초과학 육성 연구비의 지원에 의해 수행되었음.

1991). *rho* 계열의 단백질은 항체를 이용한 실험에서 stress fiber 및 focal adhesion에 존재함이 밝혀졌으며(Ridley and Hall, 1992; Ridley et al., 1992) actin filament에 의한 세포의 형태적인 변화와 세포밖의 extracellular matrix(ECM)에 의한 신호전달 기작에 관여하는 것으로 알려져 있다. 한편 embryonal carcinoma(EC) 세포는 기형암종(teratocarcinoma)에서 얻어진 stem 세포로서 배양과정에서 자발적인 분화를 일으키지 않기 때문에 초기 발생과정의 여러 가지 변화를 연구하는 데 있어서 좋은 연구모델로 이용되고 있다(Martin and Timpl, 1989). 특히 생쥐의 EC 세포주인 F9 세포주는 retinoic acid를 처리하면 primitive endoderm과 유사하게 분화가 되고(Strickland and Mahdavi, 1978). 또 retinoic acid와 dibutyryl cAMP (dbcAMP)를 같이 처리하면 parietal endoderm과 유사한 형태로 분화가 일어나며 이 과정에서 laminin, entactin 및 proteoglycan과 같은 ECM을 구성하는 성분들이 다량 합성되어 분비된다는 것이 알려져 있다(Strickland and Mahdavi, 1978; Lee et al., 1990).

본 실험은 *ras* superfamily에 속하는 small GTP-binding protein들이 세포의 분화와 관계되는 지를 밝히기 위하여 F9 세포에 retinoic acid와 dbcAMP를 처리하여 분화를 유도하고 분화과정 동안에 일어나는 형태적인 변화와 함께 small GTP-binding protein들의 변화를 추적하였다.

재료 및 방법

실험재료

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), calf serum 및 항생물질은 Gibco Laboratories로부터 구입하였으며, [α -³²P] GTP는 New England Nuclear에서, anti-laminin, anti-tubulin 및 FITC-로 표지된

이차항체는 Behringer-Mannheim에서 구입하였다. All trans-retinoic acid, dibutyryl cAMP 및 그 밖의 시약은 Sigma에서 구입하였다.

F9 cell의 배양 및 분화유도

F9 cell은 Japanese Cancer Research Resources Bank(JCRB)로 부터 분양받아서 젤라틴으로 코팅된 배양용기에 10% calf serum 및 penicillin(100 unit/ml)과 streptomycin(100 unit/ml)이 들어 있는 DMEM배지로 배양하였다. F9 세포를 새로운 용기에 옮긴 다음, 24시간 후 1 μ M all trans-retinoic acid, 0.5 mM dbcAMP 및 0.25 mM theophylline을 포함한 배지로 바꾼 다음, 매 2일마다 배지를 교환해 주면서 분화를 유도하였다.

Scanning Electron Microscopy

F9 세포를 젤라틴으로 코팅한 coverglass 위에서 배양한 다음, 분화를 유도하고 시간 별로 회수하여 2% glutaraldehyde로 2시간 동안 고정하였다. 고정한 세포는 다시 1% osmium tetroxide용액으로 재고정한 다음 alcohol gradient를 이용하여 탈수하고 critical point dryer를 이용하여 말렸다. 말린 세포는 ion sputter를 사용하여 gold coating을 하고 Hitachi S-450 scanning electron microscope로 관찰하였다.

Immunofluorescence Microscopy

Coverglass에 배양한 세포를 메타놀:초산 혼합액(20:1)으로 실온에서 15분 동안 고정시키고, 0.05% Tween 20-phosphate buffered saline(PBS)로 씻었다. 씻은 세포를 0.05% Tween 20-PBS 용액으로 희석한 1차 항체로 37°C에서 한 시간 동안 처리하고, Tween 20-PBS용액으로 두번 세척하였다. 이 세포를 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG용액에 37°C 한시간 처리한 후, Tween 20-PBS로 두번 세척하고 Na₂CO₃-NaHCO₃-glycerol

buffer(pH 9.5)를 한 방울 처리한 다음 형광현미경으로 관찰하였다.

GTP-binding protein의 규명

GTP-binding protein의 규명은 Lapetina 등(1987)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 배양용기에서 자라는 세포를 Hank's balanced buffer solution(HBBS)으로 씻고, 4 mM EDTA가 포함된 HBBS용액으로 회수하였다. 700 g로 원심분리하여 얻은 세포를 HBBS용액에 다시 현탁시키고 glass homogenizer로 파쇄한 다음 2,000 g에서 30초간 원심분리하여 분해되지 않은 세포의 핵을 제거하고 12,000 g에서 5분동안 원심분리하여 상등액은 세포질로, 침전물은 막성분으로 각각 사용하였다. 분리한 세포질과 막성분을 단백질 정량(Lowry *et al.*, 1951)하여 같은 양을 sodium dodecyl sulfate가 포함된 10% polyacrylamide gel에 전기영동을 한 후(Laemmli, 1970) nitrocellulose paper로 옮겼다(Towbin *et al.*, 1979). Nitrocellulose paper는 1 μ Ci/ml(α -³²P)GTP가 첨가된 용액(50 mM Tris/HCl, 0.3% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA pH 7.5)에 넣어 25°C에서 두 시간 반응시키고 같은 용액으로 30분씩 3번 씻고 완전히 말린 다음 X-ray film에 노출시킨 다음 3-5일 후 현상하였다.

결 과

Small GTP-binding protein이 세포의 분화와 관련이 있는 지를 밝히기 위하여 F9 teratocarcinoma 세포주를 모델로 하여 retinoic acid(RA)와 dbcAMP를 처리하여 parietal endoderm으로 분화를 유도한 후 분화단계에 따른 small GTP-binding protein의 발현정도 와 분포를 (α -³²P)GTP를 이용하여 추적하였다.

먼저 RA와 dbcAMP를 처리했을때 세포의 분화가 정상적으로 일어나며 또 small GTP-

binding protein을 추적할 적절한 분화단계를 설정하기 위하여 분화유도 물질을 처리한 다음 시간별로 세포의 형태적 변화를 관찰하였다. Fig. 1은 분화단계에 따른 세포모양의 변화를 광학현미경으로 추적한 결과인데 분화를 유도하지 않은 세포는 단세포의 경우 배양용기에 평평하게 붙어서 불규칙하고 다양한 형태로 자라지만, 여러 세포가 접하고 있는 부위(Fig. 1 A)는 세포간의 경계가 뚜렷하지 않고 배양시간이 오래 경과하면 겹쳐서(pile-up) 자라는 전형적인 암세포의 특성을 보였다. 그러나 RA와 dbcAMP를 처리한 세포는 3일째 부터 세포의 경계가 분명해지기 시작하여 분화유도 5일째에는 세포가 모여있는 곳은 세포간 간격이 넓어지며 부분적으로 세포의 모양이 둥글게 변하기 시작하고 전체적으로 Fig. 1C의 분화된 형태로 이행되는 과정의 세포들이 관찰되었다(Fig. 1B). 분화유도 7일경에는 대부분의 세포가 구형으로 변했으며, 서로 인접해 있는 세포는 돌기모양의 구조로 연결되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1C). 즉 광학현미경으로 F9 세포주의 분화과정을 추적한 실험에서 분화단계에 따른 형태적인 변화가 크게 나타남을 관찰할 수 있었다.

이러한 세포의 형태적인 변화는 세포내 cytoskeleton의 재배열을 수반하는 것이 일반적인데 anti-tubulin 항체를 이용하여 microtubule의 분포를 분화유도 전의 세포와 분화를 유도한 세포에서 비교하여 보았다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 분화를 유도하지 않은 세포(Fig. 2A)는 핵을 제외한 세포 전체에 걸쳐서 microtubule이 복잡한 그물모양의 분포로 나타났지만, 분화유도를 하고 7일 정도 된 세포(Fig. 2B)에서는 세포질 전체에서 강한 염색이 나타났으며 서로 인접한 세포주변에는 돌기 모양의 구조물에 의하여 연결된 것을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. 분화유도를 하지 않은 세포에서는 핵부위가 염색되지 않았는데 완전히 분화가 된 세포에서는 세포전체가 염색된 현상은 분화과정에서 세포의 두께가 두꺼워져서 핵이 microtubule로 둘러 쌓였기 때문이라고 추측할 수 있다.

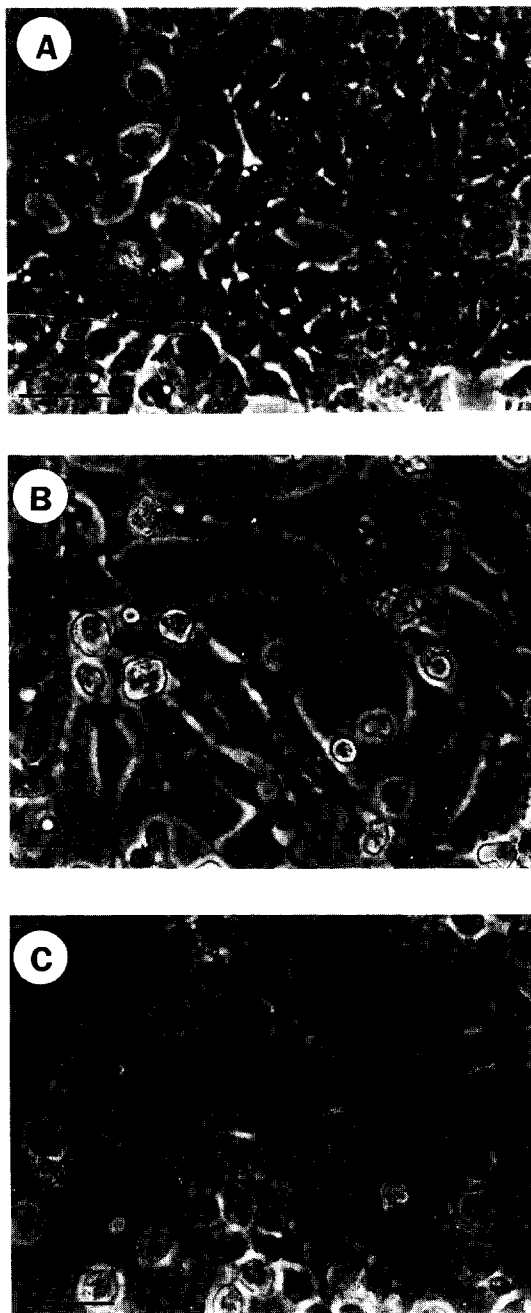


Fig. 1. Morphological changes of F9 cells which were induced differentiation with retinoic acid and dbcAMP. A, undifferentiated cells; B, F9 cells exposed to retinoic acid and dbcAMP for 5 days; C, F9 cells exposed to retinoic acid and dbcAMP for 7 days.

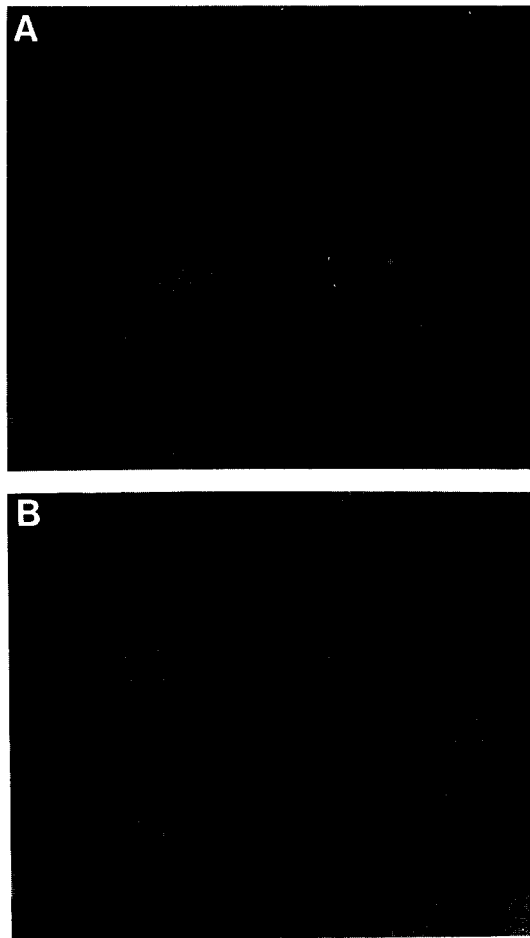
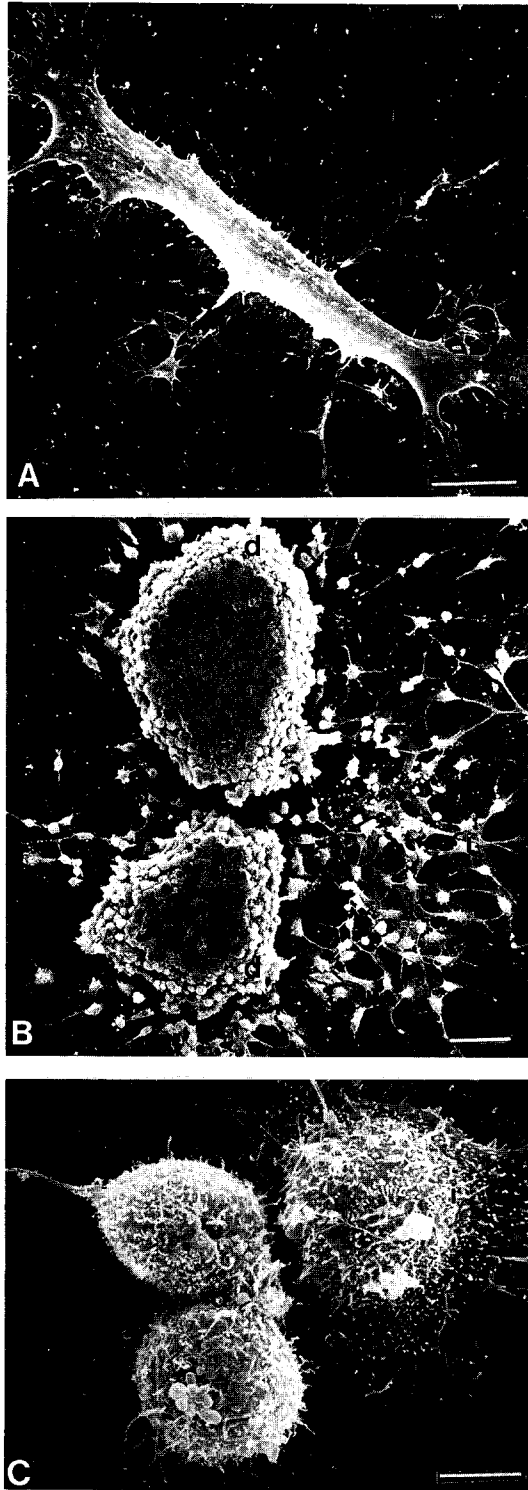


Fig. 2. Changes of microtubules in F9 cells after treatment of retinoic acid and dbcAMP. A, undifferentiated F9 cells; B, fully differentiated F9 cells.

실제 분화가 진행되면서 세포의 두께가 두꺼워지는 지, 또 분화단계에 따른 형태적인 변화를 더 깊이 있게 추적하기 위하여 각 분화단계의 세포를 주사전자현미경으로 관찰하였다. Fig. 3이 그 결과인데 분화를 유도하지 않은 세포중 단세포로 떨어져 있을 경우는 배양용기에 편편하게 붙어서 다양한 모양을 나타내고 많은 microspike 또는 lamellopodia 같은 구조물이 발달해 있으며 세포표면은 전반적으로 매끈한 형태를 보였다(Fig. 3A). RA와 dbcAMP를 처리한 지 5일 정도된 세포(Fig. 3B)는 완전히 분화된 세포(Fig. 3C)로 이행되는 중간형태



(Fig. 3B의 i부위)가 많이 관찰되었으며 세포가 겹쳐서 자라는 부위는 측면쪽에 있는 세포(Fig. 3B의 d부위)가 다른 부위보다 빨리 둥근 모양으로 바뀌지만 상층부 세포는(Fig. 3B의 u부위) 미분화세포에 가까운 형태를 보였다. 분화유도 후 7일이 경과한 세포(Fig. 3C)는 구형의 모양을 띠면서 세포막에는 많은 microvilli가 관찰되었다. 그리고 세포가 분화됨에 따라 두께가 두꺼워지는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3A와 C를 비교). 이러한 주사전자현미경의 결과는 앞에서 관찰한 microtule의 분포가 세포의 두께가 두꺼워진 때문에 나타나는 현상이며 완전 분화된 세포에서 관찰되는 microvilli형태의 막구조물은 microtubule에 의해 형성된 cilia와 다른 구조임을 말해준다. 그리고 RA와 dbcAMP에 의해 유도되는 F9 세포의 형태적인 분화에 수반하여 발현이 촉진되어 분비량이 증가한다고 알려진 (Lee *et al.*, 1990) laminin의 합성정도를 anti-laminin 항체를 이용한 면역형광현미경으로 추적하였다. Fig. 4와 같이 분화를 유도하지 않은 세포(Fig. 4A)에서도 laminin의 발현은 어느 정도 관찰이 되지만 대부분의 형광은 핵의 바깥쪽에 점모양으로 나는 것으로 보아 분비과정 중 세포내 소기관(endoplasmic reticulum 혹은 Golgi)에 있는 것으로 보인다. 그러나 분화유도 5일째 세포는 발현정도도 훨씬 증가했을 뿐 아니라 핵을 제외한 세포 전체에서 강하게 염색되는 것으로 보아 대부분 분비된 것으로 보인다. 그리고 이러한 laminin의 발현은 분화유도 7일경의 세포에서도 관찰되지만 전체적인 염색의 강도는 5일경 보다 낮게 나타났다. 이러한 결과는 F9 세포를 RA와 dbcAMP로 분화를 유도하였을 때 parietal endoderm 세포로 분화가 진행되는데 이 과정에서 이미 밝혀진 대로 laminin 발현이 증가되며, 또 이의 분비도 증가되면서 세

Fig. 3. Scanning Electron Micrographs of F9 cells which were induced differentiation with retinoic acid and dbcAMP. A, undifferentiated F9 cells; B, F9 cells exposed to retinoic acid and dbcAMP for 5 days; C, F9 cells exposed to retinoic acid and dbcAMP for 7 days.

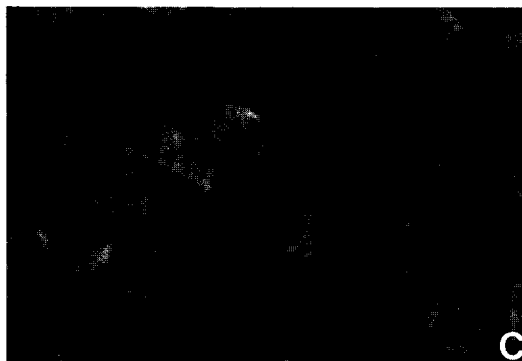
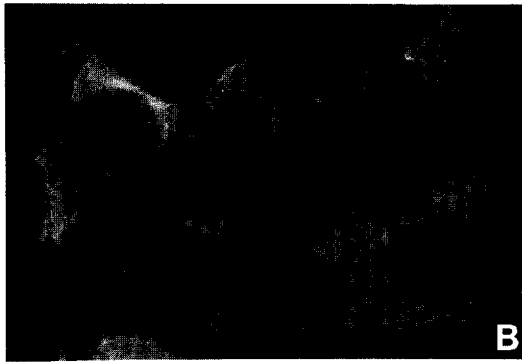


Fig. 4. Changes of laminin secretion by retinoic acid and dbcAMP. A, undifferentiated F9 cells; B, F9 cells exposed to retinoic acid and dbcAMP for 5 days; C, F9 cells exposed to retinoic acid and dbcAMP for 7 days.



A B

Fig. 5. Identification of small GTP-binding proteins in F9 cells. lane A: cytosolic fraction; lane B: microsomes.

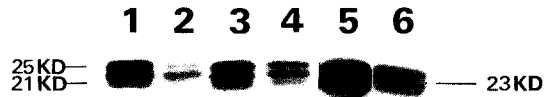


Fig. 6. Changes of small GTP-binding proteins during differentiation of F9 cells. lane 1, 2: undifferentiated cells; lane 3, 4: F9 cells exposed to retinoic acid and dbcAMP for 5 days; lane 5, 6: F9 cells exposed to retinoic acid and dbcAMP for 7 days; lane 1, 3, 5: microsomes; lane 2, 4, 6: cytosolic fraction.

포의 모양이 완전히 둥근 형태로 변화가 됨을 의미한다.

형태적인 관찰과 laminin 발현 실험을 통해 얻어진 바와 같이 형태적인 분화가 이행단계이며 laminin의 발현이 제일 높은 분화유도 5일째 세포와 또 완전히 분화된 형태의 7일째 세포를 이용하여 small GTP-binding protein들의 발현 정도 및 분포를 추적하였다. 먼저 발현정도를 추적하기에 앞서 F9 세포주에 존재하는 small GTP-binding protein을 조사하였는데(Fig. 5) F9 세포에는 막(lane A)과 세포질(lane B)에 거의 비슷한 양의 25, 23 및 21 kD 세 종류의 small GTP-binding protein이 존재하였다. 이 세 종류의 small GTP-binding protein의 발현 및 분포를 RA와 dbcAMP 처리후 5일 및 7일 경과한 세포의 막과 세포질에서 추적한 결과가 Fig. 6인데, 전체적인 small GTP-

binding protein의 양은 분화가 진행됨에 따라서 세포질(lane 2, 4, 6)과 세포막(lane 1, 3, 5)에서 증가되는 양상을 보였다. 막 성분에서는 분화유도 전의 세포(lane 1)에서 보다 분화유도 5일째(lane 3)에서 약간 증가되다가 7일째(lane 5)는 세 단백질 모두 두배 이상의 증가를 볼 수 있었다. 세포질에서는 분화유도전의 세포(lane 2) 보다 분화유도 5일째 세포(lane 4)에서 특히 25 kD 및 21 kD 단백질이 현저한 증가를 보였으며, 분화유도 7일째 세포(lane 6)에서는 세 단백질 모두가 증가됨을 알 수 있었다. 이상의 결과는 F9 세포는 3종류의 small GTP-binding protein을 가지고 있으며 RA와 dbcAMP 처리에 의해서 parietal endoderm 형태의 세포로 분화됨에 따라 small GTP-binding protein의 발현이 증가됨을 보여주며, 이러한 small GTP-binding protein이 분화과정에서 어떤 역할을 할 것임을 시사해준다.

고 찰

F9 embryonal carcinoma(EC) 세포를 retinoic acid와 dbcAMP를 이용하여 parietal endoderm과 유사한 세포로 분화 시키면서 분화과정동안의 형태적인 변화와 함께 small GTP-binding protein의 생성량과 이의 분포를 추적하였다.

F9 세포를 retinoic acid와 dbcAMP를 처리해서 분화를 유도하고 5일 정도 경과하면 laminin의 분비가 가장 많이 일어나면서 세포의 경계가 뚜렷해졌다(Fig. 1A). 그러나 이때 대부분의 세포는 미분화와 분화의 중간형태(분화 이행과정)를 보였으며 7일 이상 경과했을 때 전체 세포가 둥근 형태로 바뀌었다(Fig. 1C). 그리고 분화 이행과정의 세포(분화유도 5일째)를 초기분화단계, 그리고 7일 이후의 세포를 분화된 세포(또는 분화말기)로 구분해서 small-GTP binding protein의 변화를 추적하였다. 세종류(25, 23 및 21 kD)의 small GTP-binding protein이 F9 세포질과 막성분에서 관찰되었는

데(Fig. 5), 분화가 진행됨에 따라서 모두 세포질과 막에서 증가되는 양상을 보였지만 세포질에서는 분화초기에 특히 25 및 23 kD가 증가되었다가 분화된 세포에서는 21 kD의 증가가 나타났다. 이 결과는 이러한 단백질의 발현이 분화단계에 따라서 달라짐을 나타내며 막성분에서는 분화에 따라 전체적인 증가양상을 보이지만 단백질 종류의 구분은 어려웠는데 세포질과 비슷하리라고 생각된다. 대부분의 small GTP-binding protein은 막성분에 fatty acylation되어 있고(Lapetina & Reep, 1987), 세종류 단백질들의 분자량이 유사하기 때문에 세 단백질 모두의 양이 많을 때는 본 실험에서 사용한 방법으로 전체적인 증감은 구분할 수 있지만, 각 성분의 구분은 어려웠다. 그러나 전체 단백질에 비해 small GTP-binding protein의 양이 적은 세포질인 경우는 각 단백질간의 생성정도의 차이를 구분할 수 있었다. 따라서 세포질에서 분화단계에 따른 small GTP-binding protein의 증가도 이 양상과 같을 것으로 생각된다. 이러한 결과는 small GTP-binding protein이 세포분화와 관계가 있으며, 특히 F9 세포의 분화단계에 따라서 특별한 기능이 있음을 시사해 주고 있다.

현재까지 4종류의 small GTP-binding protein이 밝혀져 있으며(Downward, 1990) 최근에 와서 각 종류의 단백질의 기능이 하나씩 규명되고 있는데 *rab* 및 *arf* 계열의 단백질은 세포의 각 소기관 사이의 물질 이동에 관여한다고 알려져 있다(Balch, 1990; Serafini *et al.*, 1991; Kahn *et al.*, 1991). 분화유도 5일경에 laminin의 분비가 증가하고(Fig. 4), 또 F9 세포의 분화과정에 entactin 및 proteoglycan과 같은 여러 가지 ECM 구성성분의 분비가 증가한다고 알려져 있다(Lee *et al.*, 1990). 이런 결과와 연관시켜 보면, 본 실험에서 사용한 [α - 32 P] GTP를 이용한 방법으로는 각 small GTP-binding protein이 어느 계열의 단백질인지 식별할 수 없지만 laminin의 분비와 함께 증가하는 25 및 23 kD의 small GTP-binding protein은 세포내 물질 이동에 관여하는 *rab* 계열의 단백질일 것으로 추

측된다.

아울러 최근에 와서 *rho*나 *rac* 계열의 small GTP-binding protein은 focal adhesion 형성 및 actin filament 배열에 관여한다고 밝혀졌는데(Ridley *et al.*, 1992; Ridley and Hall, 1992). 이 과정에 laminin, fibronectin과 같은 ECM 단백질을 통한 신호가 세포막의 integrin을 통하여 전달되어 focal adhesion kinase(FAK)를 활성화시키고(Schaller *et al.*, 1992; Guan *et al.*, 1992) 세포의 형태적인 변화를 유도한다고 알려져 있다. 본 실험에 의하면 laminin 분비가 가장 많이 일어나는 5일 경부터 세포의 형태적인 변화가 일어나서 7일 이후에 완전히 분화된 형태로 됨을 관찰 할 수 있었다. 그리고 이 과정동안에 세포막에는 많은 microvilli가 나타났으며(Fig. 3), microtubule의 재배열이 관찰되었다(Fig. 2). Retinoic acid에 의한 세포의 형태적인 변화는 여러가지 유전자의 발현을 조절하는 과정을 거쳐서 일어나지만, 특히 laminin과 같은 ECM물질의 분비 증가가 중요한 요인이 된다(Lee *et al.*, 1992). 이는 F9 세포에 retinoic acid를 처리하지 않아도 laminin에 의해서 세포의 형태변화가 일어난다는 선행연구 결과가 뒷받침해주고 있다(Lee *et al.*, 1992). 그러므로 분화후기에 증가되는 small GTP-binding protein은 앞에서 언급한 바와 같이 이러한 laminin과 같은 ECM물질에 의해 세포의 형태변화에 관여하는 *rho* 계열의 단백질일 가능성이 높다.

본 실험을 통하여 F9 세포의 분화 단계에 따른 small GTP-binding protein들의 발현변화를 관찰하였고, 이 단백질들이 분화과정에 특별한 기능을 가지고 있음을 추측할 수 있지만 어느 단계에 어떠한 단백질이 관여하는 지는 앞으로 밝혀져야 할 과제로 생각된다.

인용문헌

- Balch, W.E. 1990. Small GTP-binding proteins in vesicular transport. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 473-477.
- Bos, J.L. 1988. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutation Res.* **195**: 255-271.
- Downward, J. 1990. The ras superfamily of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 469-472.
- Guan, J.L., J.E. Trevithick, and R. O. Hynes, 1991. Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation at a 120 kDa protein. *Cell Regul.* **2**: 951-964.
- Hall, A. 1990. The cellular function of small GTP-binding proteins. *Science* **249**: 635-649.
- Ito, H., T. Kazasa, S. Nagata, and T. Katada, 1986. Molecular cloning and sequence determination of cDNAs for α -subunits of guanine-binding proteins Gs, Gi and Go from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3776-3780.
- Kahn, R.A., F.G. Kern, J. Clark, E.P. Gilman, and C. Rulka, 1991. Human ADP-ribosylation factors. *J. Biol. Chem.* **266**: 2606-2614.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
- Lapetina, E.G., and B.R. Reep, 1981. Specific binding of [α -³²P] GTP to cytosolic and membrane-bound proteins of human platelets correlates with the activation of phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2261-2265.
- Lee, H.Y., K.C. Hur, and K.W. Kim, 1990. Expression of laminin during the differentiation of F9 teratocarcinoma stem cell. *Korean J. Zool.* **33**: 446-453.
- Lee, H.Y., K.J. Hur, and K.W. Kim, 1992. Role of extracellular matrix proteins on the differentiation of the F9 embryonal carcinoma cells. *Mol. Cells* **2**: 149-154.
- Martin, G.R. and Timple, R. 1987. Laminin and other basement membrane components. *Ann. Rev. Cell Biol.* **3**: 57-85.
- Ridley, A.J. and A. Hall, 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesion and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**: 387-399.
- Ridley, A.J., H.F. Paterson, C.L. Johnson, D. Diekmann, and A. Hall, 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**: 401-410.
- Schaller, M.D., C.A. Borgman, B.S. Cobb, R.R. Vines, A.V. Reynolds, and J. T. Parsons, 1992. pp125^{FAK}, a structurally distinctive protein tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5192-5196.
- Serafini, T., L. Orci, M. Amherdt, M. Brunner, R.A.

- Kahn, and J.E. Rothman, 1991. ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* **67**: 239-253.
- Strickland, S. and V. Mahdavi, 1978. The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* **15**: 393-403.
- Strittmatter, S. M. 1990. Go is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature* **344**: 836-841.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- (Accepted December 3, 1993)

Changes of the Small GTP-binding Proteins During Differentiation in the F9 Teratocarcinoma Stem Cells

Hye-Sung Park, June Seung Lee, Kyu-Won Kim* and Kyu Chung Hur (Department of Biology, Ewha Womans University, Seoul 120-750, *Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan 609-735 and the Cancer Research Center, Seoul 110-799)

To address possible roles of the small GTP-binding proteins in differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells, the distribution and amount of these proteins together with morphological changes of the cells were studied during the differentiation of F9 cells induced by retinoic acid and dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP). When monolayer cultures of F9 cells were induced to differentiate with retinoic acid and dbcAMP, the cells started to show distinctive cell boundaries in about 5 days (early differentiation stage) and reached fully differentiated shapes in about 7 days (late differentiation stage). During this differentiation process, membranes of the cells developed a large number of microvilli and lamellopodia. In addition, expression of laminin increased maximally in early stage, then microtubule rearrangement followed in late differentiation stage. Three classes of small GTP-binding proteins with sizes of 25, 23 and 21 kD were found in both microsomes and cytosols of F9 cells. These proteins increased along with progress of the differentiation. These results suggest that these small GTP-binding proteins likely have specific roles in the differentiation of F9 cells.