

## Ras에 의해 암화된 세포에서 dynamin-2의 발현 촉진

유 지 윤\*

경상대학교 자연과학대학 미생물학전공/생명과학연구원

Received November 28, 2006 / Accepted January 5, 2007

**Up-regulation of dynamin-2 gene expression in Ras-transformed cells.** Jiyun Yoo\*. *Department of Microbiology/Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea* – Dynamin plays a key role in the scission event common to various types of endocytosis. It has been previously reported that the SH3 domain-mediated association of Grb2 with dynamin-2 was dominantly found in Ras transformed cells. However, whether this association results from the increased expression of dynamin-2 and Grb2 in Ras transformed cells or not is still unknown. So in this study we first analyzed the expression levels of dynamin-2 and Grb2 and found that the expression of dynamin-2 protein was dramatically increased in Ras-transformed NIH3T3 (NIH3T3(Ras)) cells. Furthermore competitive PCR data revealed that the mRNA transcripts for dynamin-2 were increased about 100-fold in NIH3T3(Ras) compared to those of NIH3T3 cells. However, the protein level and mRNA transcript of Grb2 were not changed in these two cells. We also examined promoter activity of dynamin-2 in NIH3T3(Ras) cells and suggest the existence of Ras-responsive sequence in promoter region -300 to -200.

**Key words** – dynamin-2, Grb2, NIH3T3(Ras), NIH3T3, endocytosis

### 서 론

Dynamin은 약 100-kD의 단백질로 크게 1, 2, 3 세 가지 type으로 알려져 있다. 이 단백질에 관한 연구는 주로 처음 알려진 dynamin-1에 국한되어 진행되어 왔으나[1], 최근에는 dynamin-2에 관한 연구들도 활발히 진행 중이다. Dynamin-1은 신경세포의 신경 연결 부위에서 신경 전달 vesicle의 형성에 관여하는 것으로 알려져 있으며, dynamin-2는 모든 조직 내에서 발현되며, dynamin-3는 생식 기관 조직에서 국한적으로 발현되는 것으로 알려져 있다 [4,21,22]. Dynamin 단백질은 크게 GTPase domain, Pleckstrin Homologous (PH) domain, Coiled Coil (CC) domain, GTPase Effector Domain (GED), Proline Rich Domain (PRD)으로 구성되어 있다[5,6,8,27]. 이러한 dynamin은 endocytosis의 vesicle 형성에 관여하며, 최근의 보고에 의하면 세포내 골지체의 vesicle에서도 분포함으로써 vesicle trafficking을 도와주는 역할을 한다고 보고되었다[11,13,16,17]. Dynamin은 SH3 domain을 갖는 PLC $\gamma$ , PI3K의 p85 subunit 등 여러 종류의 신호 전달 단백질들과 결합한다는 것이 알려져 있는데[15,19], 이러한 결과는 dynamin이 신호 전달 과정과 endocytosis 과정을 연결하는 역할을 담당할 수 있음을 암시하고 있다. 또한 dynamin-2의 경우 Ras에 의해 암화된 NIH3T3(Ras) 세포에서 Ras 신호 전달 단백질인 Grb2와의

binding이 확인되었는데[28] 이는 dynamin-2가 Ras 신호 전달 과정에서 중요한 기능을 할 것임을 예상할 수 있다.

Ras는 대표적인 small GTP-결합 단백질이며 세포의 성장과 분화과정에 필수적인 신호전달 물질로서, 특히 암의 발생과 밀접한 관련이 있음은 잘 알려진 사실이다[12,23,29]. 이전의 보고에 의하면 Ras가 과발현된 NIH3T3 세포는 암화가 촉진되며[9], HaCaT 세포의 이동을 촉진시킨다[2]. Ras의 신호 전달을 위해서는 먼저 Grb2 (Growth factor receptor bound protein-2)라는 매개 단백질의 SH2 domain 부위가 외부 신호의 자극에 의해 활성화된 수용체의 인산화된 타이로신기에 결합하고 Grb2의 SH3 domain 부위는 mSos의 프롤린이 많은 부위에 결합하여 Grb2-mSos복합체를 형성함으로써 Ras를 활성화 시킨다고 알려져 있다[25].

이전의 연구에서 이미 dynamin-2가 Ras에 의해 암화된 NIH3T3(Ras) 세포에서 Ras 신호 전달 단백질인 Grb2와의 결합이 확인되었는데[28], 본 연구에서는 이 두 단백질의 결합이 각각의 단백질 양의 증가에서 유래하는지 확인하기 위하여 이들의 발현을 비교해 보았다. 그 결과 dynamin-2 단백질의 경우 정상인 NIH3T3 세포에 비해 NIH3T3(Ras) 세포에서 발현이 증가한 반면, Grb2 단백질은 두 세포에서 발현의 차이를 볼 수 없었다. 또한 competitive RT-PCR을 이용하여 mRNA의 양을 측정할 결과 dynamin-2의 mRNA가 NIH3T3 세포에 비해 NIH3T3(Ras) 세포에서 약 100배 증가하였음을 확인하였고, promoter 분석을 통해 start codon으로부터 200-bp와 300-bp upstream이 dynamin-2의 promoter activity를 결정하는 부분임을 확인하였다.

\*Corresponding author

Tel : +82-55-751-5947, Fax : +82-55-759-5199

E-mail : yooj@gnu.ac.kr

## 재료 및 방법

### 세포배양

NIH3T3와 Ras oncogene이 과발현되도록 transfection하여 제작한 NIH3T3(Ras) 세포를 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 10% FBS, penicillin G, streptomycin sulfate, amphotericin B, 2-mercaptoethanol)을 이용하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 키웠다.

### Western blot analysis

Dynamin-2와 Grb2 단백질의 발현을 확인하기 위해, NIH3T3와 NIH3T3(Ras) 세포를 사용하였다. NIH3T3와 NIH3T3(Ras) 세포를 10 cm dish에 분주하여 배양하고 scraper를 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)와 섞은 후 4°C에서 1시간동안 용해시켰다. 용해된 세포를 원심분리 (13,000 rpm, Eppendorf centrifuge, 20 min) 한 후 상층액을 취하였다. SDS-polyacrylamide gels에 전기영동 하여 nitrocellulose filters (Amersham)로 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk (PBST)로 incubation 한 후, 1차 항체로 dynamin-2 (Upstate Biotechnology Inc.)와 Grb2 (Upstate Biotechnology Inc.)를 이용하였고, 2차 항체로는 HRP-conjugated antibody (Upstate Biotechnology Inc.)를 사용하여 ECL kit (Amersham)로 단백질의 발현을 확인하였다.

### 공초점레이저현미경분석

6 well에 cover slip을 넣고 5x10<sup>4</sup>개의 NIH3T3, NIH3T3(Ras) 세포를 분주하여 24시간 배양하였다. 배양된 세포를 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-2로 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-2 단백질의 위치를 확인 관찰하고, SCANware 5.0 (LEICA, Inc.) program을 사용하여 사진을 얻은 후, Adobe Photoshop software (Adobe Photosystems, Inc.)로 분석하였다.

### RNA 추출 및 정량

전체 RNA는 NIH3T3 세포와 NIH3T3(Ras) 세포로부터 acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 방

법을 이용하여 분리하였다[3]. 분리한 RNA는 A<sub>260</sub>을 측정하여 정량하였다.

### RT-PCR

10 µg의 분리한 RNA를 65°C에서 5분간 반응 후, 50 unit의 moloney murine leukemia virus reverse transcriptase를 이용하여 reverse transcription을 수행하였고, dynamin-2와 Grb2특이적인 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. Dynamin-2에 대한 forward primer로 5'-CCACTGGACAACCTC AAGAT-3', reverse primer로 5'-GGTGCTGAGAAGGAGG ATGT-3'을 사용하였고 (dynamin-2 fragment, 725 bp), Grb2에 대한 forward primer로 5'-GAAGCCATCGCCAAATAG A-3', reverse primer로 5'-TTAGACGTTCCGGTTCACGG-3'을 사용하였다 (Grb2 fragment, 651 bp). PCR 반응은 시료들을 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C, 30초; 55°C, 30초; 72°C, 1분 30초의 과정을 35회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 5분간 처리하였다. PCR 결과물은 1.5% agarose gel에 전기영동과 EtBr 염색으로 확인하였다.

### Generation of the competitive PCR fragments (MIMICS)

Dynamin-2와 Grb2 각각의 PCR fragment 보다 조금 작은 DNA competitor fragments를 PCR MIMIC™ construction kit (Clontech)을 이용하여 만들었다. Dynamin-2의 competitor를 만들기 위하여 v-erbB fragment (Clontech)를 template로 사용하였으며, forward primer로 5'-CCACTGGACA ACCTCAAGATCAAGTTTCGTGAGAGCTGATTG-3' reverse primer로 5'-GGTGCTGAGAAGGAGGATGTTTGAGTCCA TGGGGAGCTTT-3'을 사용하여 476 bp의 competitor를 얻게 되었다. 동일한 방법으로 Grb2 특이적 primer를 이용하여 595 bp의 Grb2 competitor를 얻었다. 얻어진 DNA는 gel purification 후 정량하여 1,000 attomole/ul로 만들어 보관하였다.

### Promoter analysis

Mouse genome으로부터 dynamin-2의 promoter 부위 3,000bp를 cloning하여 pCAT-Basic vector에 옮겼으며 (pCAT2-3000), sequencing 하고 PCR을 이용하여 여러 종류의 deletion mutants (pCAT2-2000, pCAT2-1000, pCAT2-500, pCAT2-400, pCAT2-300, pCAT2-200, pCAT2-100)를 제작하였다. Promoter activity를 측정하기 위해서 CAT assay를 수행하였다. CAT assay를 수행하기 위한 cell extracts를 만들기 위해 각각의 deletion mutant로 transfection한 세포들을 150 ul의 0.25 M Tris/HCl (pH 7.9)에 녹이고 3번의 freeze-thaw cycle을 반복하고 4°C에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 사용하였다. CAT activity를 측정하기 위해 100 ul의 cell ex-

tract를 acetyl-CoA, [ $^{14}$ C]chloramphenicol과 섞은 후 37°C에서 2시간 반응 후 ethyl acetate로 extraction하고 vacuum desiccator로 말렸다. 준비된 시료를 20  $\mu$ l의 ethyl acetate로 녹이고 TLC를 전개하여 acetylation된 chloramphenicol과 acetylation 되지 않은 chloramphenicol을 분리하였다. Chloramphenicol의 acetylation 정도는 PhosphoImager를 이용하여 정량하였다. 각 실험에서 transfection efficiency를 보정해 주기위해 pCMV- $\beta$ gal vector를 함께 transfection하였으며,  $\beta$ -galactosidase activity를 측정하여 보정하였다.  $\beta$ -galactosidase activity는 10  $\mu$ l의 cell extract를 2.5 mM의 chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG)와 1.25 mM의 MgCl<sub>2</sub>와 섞고 37°C에서 1시간 반응 후 574 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.

## 결 과

### Ras에 의해 암화된 NIH3T3 세포에서 dynamin-2 단백질의 발현 증가 및 분포 변화

정상적인 NIH3T3 세포에 비해 Ras에 의해 암화 (transformation)된 세포 (NIH3T3(Ras))에서 dynamin-2는 Ras 신호 전달 단백질인 Grb2와의 상호작용이 증가하였다[15]. 하지만 dynamin-2와 Grb2의 발현 자체가 증가한 것인지, 아니면 이들 두 단백질간의 상호작용만이 증가한 것인지는 현재까지 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 이들 세포에서 두 단백질의 발현을 먼저 관찰하였다. 정상적인 NIH3T3 세포와 Ras에 의해 암화된 NIH3T3(Ras) 세포에서 이들 단백질의 발현을 생화학적인 방법인 western blot으로 확인한 결과 Grb2의 경우 발현의 차이를 볼 수 없는 반면 dynamin-2는 NIH3T3(Ras) 세포에서 그 발현이 현저히 증가함을 확인하였다 (Fig. 1A). 공초점 레이저현미경을 통해 관찰된 dynamin-2는 NIH3T3 세포에서 세포질 내에 전반적으로 분포하고 있었으며, 특히 핵 주변에서 그 발현이 세포질에 집중되

어 있음이 확인되었다 (Fig. 1B, left panel). 반면, NIH3T3 (Ras) 세포에서는 NIH3T3 세포에 비하여 발현이 증가되었음을 볼 수 있었으며, 세포질 가운데 특히 세포막 쪽에 그 발현이 집중되어 있음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1B, right panel).

### Ras에 의해 암화된 NIH3T3 세포에서 dynamin-2 RNA의 발현 증가

NIH3T3(Ras) 세포에서 dynamin-2 단백질의 발현 증가가 dynamin-2 mRNA의 발현 증가로부터 유래하는지 확인하기 위하여 competitive RT-PCR을 수행하였다. 이를 위해 NIH3T3 세포와 NIH3T3(Ras) 세포로부터 추출한 0.5  $\mu$ g의 RNA를 주형으로 하여 cDNA를 합성하고, 다양한 농도의 internal standard (재료 및 방법 참고)와 함께 PCR을 수행하였다. 그 결과 NIH3T3 세포에서는 0.002 attomole의 internal standard와 함께 PCR을 수행하였을 때 dynamin-2 PCR 산물 (725-bp)과 internal standard PCR 산물 (476-bp)의 양이 거의 비슷하였으나, NIH3T3(Ras) 세포에서는 0.2 attomole의 internal standard와 함께 PCR을 수행하였을 때 두 산물의 양이 비슷함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 dynamin-2의 mRNA 양이 NIH3T3 세포에 비해 NIH3T3(Ras) 세포에서 약 100배 증가하였음을 의미하는 것이다.

이에 반해 Grb2의 경우 동일한 실험을 두 세포에서 수행한 결과, 두 세포에서 모두 20 attomole의 internal standard와 함께 PCR을 수행하였을 때 Grb2 PCR 산물 (653-bp)과 internal standard PCR 산물 (595-bp)의 양이 비슷하였다 (Fig. 3). 이는 Grb2의 경우 단백질뿐만 아니라 (Fig. 1) mRNA의 양도 두 세포사이에 변화가 없음을 의미하는 것이다.

### Ras에 의해 암화된 NIH3T3 세포에서 dynamin-2 promoter activity의 변화

NIH3T3(Ras) 세포에서 dynamin-2 mRNA의 발현이 증가

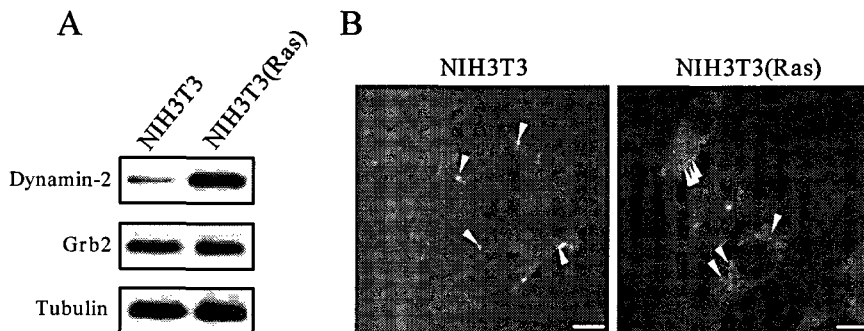


Fig. 1. Protein expression of dynamin-2 and Grb2 in NIH3T3 and NIH3T3(Ras) cells. (A) Protein extracts from NIH3T3 and NIH3T3(Ras) cells were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblot analyses with antibodies for dynamin-2, Grb2, and tubulin. (B) Localization of dynamin-2 in NIH3T3 and NIH3T3(Ras) cells were observed by confocal laser scanning microscope. Scale bar = 5  $\mu$ m.

함을 확인하였으므로 어떠한 전사인자가 dynamin-2 유전자 발현에 중요한 역할을 하는지 알아보려고 dynamin-2의 promoter를 pCAT-Basic vector에 cloning한 후, 여러 종류의 5'-deletion mutants를 제작하고 이들의 promoter activity (CAT activity)를 NIH3T3(Ras) 세포에서 확인하였다 (Fig. 4A). 각각의 deletion mutant에 대한 promoter activity를 정

량해본 결과 start codon (AUG)로부터 300-bp upstream을 이상을 포함하고 있는 construct들 (pCAT2-300, pCAT2-400, pCAT2-500, pCAT2-1000, pCAT2-2000, pCAT2-3000)은 모두 상당한 활성을 나타내고 있으나 200-bp만을 가지고 있는 construct (pCAT2-200)의 경우 그 활성이 현저히 감소함을 볼 수 있었다 (Fig. 4B). 이러한 결과는 start codon으로부터

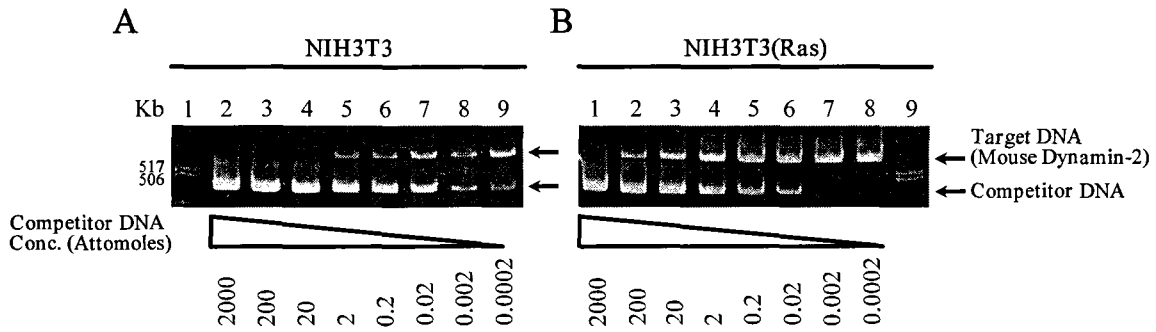


Fig. 2. Quantitative competitive RT-PCR for dynamin-2 mRNA in NIH3T3 and NIH3T3(Ras) cells. Representative quantitative RT-PCR gels for dynamin-2 in NIH3T3 (A) and NIH3T3(Ras) (B) cells.

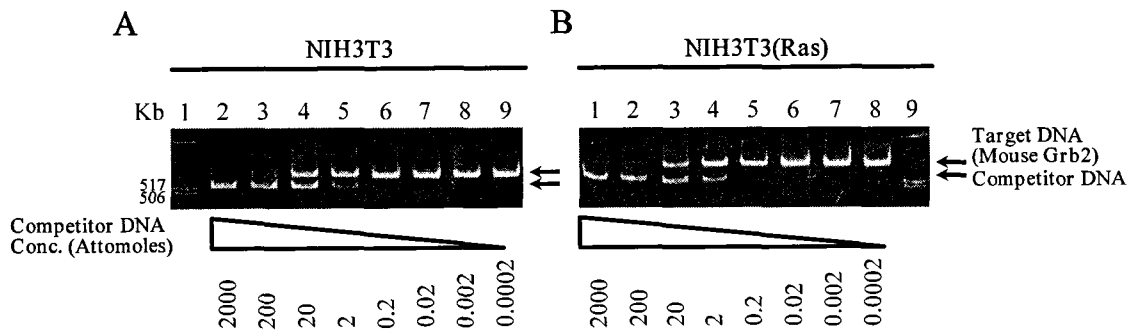


Fig. 3. Quantitative competitive RT-PCR for Grb2 mRNA in NIH3T3 and NIH3T3(Ras) cells. Representative quantitative RT-PCR gels for Grb2 in NIH3T3 (A) and NIH3T3(Ras) (B) cells.

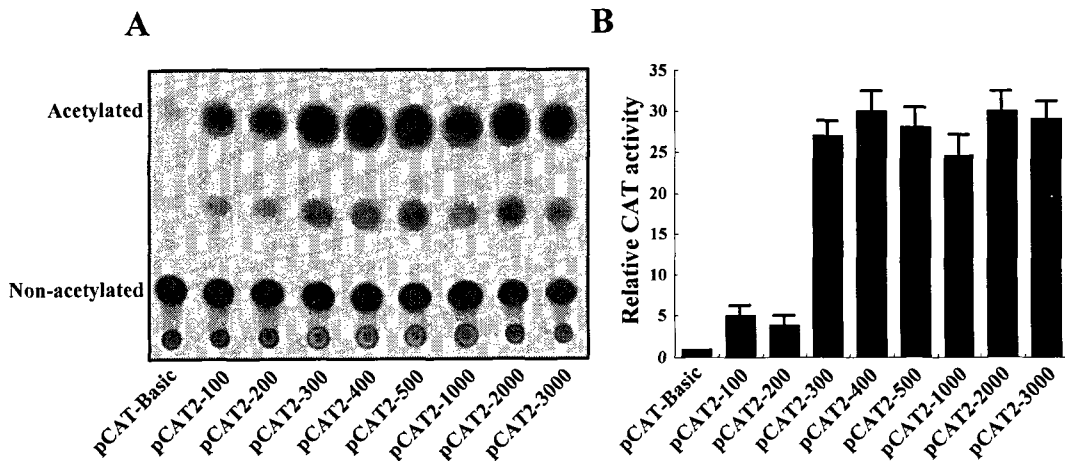


Fig. 4. Dynamin-2 promoter activities in NIH3T3(Ras) cells. (A) Deletion constructs of dynamin-2 promoter were transiently co-transfected with  $\beta$ -galactosidase expression plasmid, pCMV- $\beta$ gal, in NIH3T3(Ras) cells and measured CAT activities. (B) Quantitation of CAT activities.

200-bp와 300-bp upstream 사이에 dynamin-2의 promoter activity를 결정하는 중요한 전사인자들의 결합 위치가 존재함을 의미하는 것이다.

## 고찰

Dynamin은 endocytosis 과정의 마지막 부분에서 endocytic vesicle을 membrane으로부터 분리하는데 중요한 역할을 하는 단백질이다. Dynamin 단백질의 한 family인 dynamin-2는 모든 조직에서 광범위하게 발현되며, SH3 domain을 갖는 PLC $\gamma$ , PI3K의 p85 subunit등 여러 종류의 신호 전달 단백질들과 binding한다는 것이 알려져 있으며[15,19] 특히 암의 발생에 중요한 역할을 하는 Ras의 신호 전달 단백질인 Grb2와의 binding이 알려지면서[28] 새로운 신호 전달 단백질로의 가능성이 제기 되었다.

Grb2는 ligand에 의해 활성화된 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)과 Ras의 activator인 SOS를 연결시켜주는 단백질로 Ras의 활성화에 중요한 역할을 하는 단백질이다. 하지만 현재까지 dynamin과 Grb2의 결합이 Ras의 신호 전달 과정에서 어떠한 역할을 하는지는 잘 알려져 있지 않다. Grb2와 상호작용 한다고 알려진 dynamin-2의 Proline Rich Domain (PRD)은 microtubules과도 상호작용 한다는 것이 알려져 있는데[20] 이러한 결과는 세포의 표면에서 ligand의 결합에 의해 시작된 수용체의 신호를 dynamin과 Grb2와의 결합이 microtubules로 연결시켜주는 역할을 할 수 있음을 의미한다. 다른 한편으로, 신호 전달 과정에서 endocytosis는 신호 전달의 종결과정에 중요하므로 Grb2와의 상호작용을 통해 dynamin-2가 Ras의 신호 전달을 종결하기 위해 수용체의 endocytosis를 유도할 수도 있을 것이다[24,26].

Ras는 대표적인 small GTP 결합 단백질이며 세포의 성장과 분화과정에 필수적인 신호전달 물질로서, 특히 암의 발생과 밀접한 관련이 있음은 잘 알려진 사실이다[12,23,29]. 이전의 보고에 의하면 Ras가 과발현된 NIH3T3 세포는 암화가 촉진되며[9], HaCaT 세포의 이동을 촉진시킨다[2]. 암세포들은 정상적인 세포보다 세포 활성이 강하여 형태학적으로 세포성 돌기, 라멜라충판 등이 두드러지게 나타나며, 미세구조적으로도 세포막을 시작으로 endocytosis가 정상적인 세포에 비하여 현저하게 많이 일어난다고 보고되어 있다. 이러한 세포학적인 특징으로 미루어볼 때 암세포는 정상세포에 비해 비특이적인 세포 이동의 기회가 많음을 알 수 있다. Dynamin은 이동 중인 세포의 filopodia부위에서 actin과 함께 분포하며[7,18], trans-Golgi network에서 vesicle을 이동하는데 관여한다고 보고되었다[10,14]. Endocytosis 과정에 dynamin이 관여하는 것은 이미 정론화 되어 있지만, dynamin이 단지 endocytosis 기능만을 수행하는 단백질인가에 대해서는 아직 논란의 대상이 되고 있는 실정이다. 이러한

연구 결과들을 종합해 보면 dynamin-2가 NIH3T3(Ras) 세포에서 증가한다는 본 연구 결과는 dynamin-2가 endocytosis 뿐만 아니라 세포의 다른 활성 (세포이동, vesicle 이동 등)에도 관여할 것임을 예측하게 한다.

이전의 연구에서 이미 dynamin-2가 Ras에 의해 암화된 NIH3T3(Ras) 세포에서 Ras 신호 전달 단백질인 Grb2와의 결합이 확인되었는데[28], 본 연구에서는 이 두 단백질간의 결합이 각각의 단백질 양의 증가에서 유래하는지 확인하기 위하여 이들의 발현을 비교해 보았다. 그 결과 dynamin-2의 경우 mRNA가 NIH3T3 세포에 비해 NIH3T3(Ras) 세포에서 약 100배 증가하였음을 확인하였고 단백질 발현 또한 증가하였음을 볼 수 있었으나, Grb2는 두 세포에서 mRNA와 단백질 발현의 차이를 볼 수 없었다. 또한 NIH3T3(Ras) 세포에서 dynamin-2의 promoter 분석을 수행하였으며, 그 결과 start codon으로부터 200-bp부터 300-bp upstream부위가 dynamin-2의 promoter 활성을 결정하는 부분임을 확인하였다. 현재는 어떠한 전사인자가 dynamin-2의 promoter 활성을 조절하게 되는지 자세히 연구하고 있다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 NIH3T3 세포에 비해 NIH3T3(Ras) 세포에서 dynamin-2의 발현이 현저히 증가하였음을 볼 수 있었고, 이 증가한 dynamin-2는 Grb2와 결합하므로 Ras 신호 전달 과정에 관여하거나 암세포의 이동 혹은 endocytosis의 증가를 유발할 것으로 예측할 수 있다.

## 요약

Dynamin은 여러 종류의 endocytosis 과정에서 최종적으로 endocytic vesicle을 membrane으로부터 분리하는데 중요한 역할을 하는 단백질이다. 이전의 보고에 의하면 dynamin-2는 Ras에 의해 암화된 세포에서 Ras signal의 신호 전달 단백질인 Grb2의 SH3 domain과 결합한다고 알려져 있다. 하지만 정상적인 세포 (NIH3T3)에 비해 Ras에 의해 암화된 세포 (NIH3T3(Ras))에서 이들 단백질의 발현이 높아지는지에 대해서는 아직 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 먼저 NIH3T3 세포와 NIH3T3(Ras) 세포에서 dynamin-2와 Grb2의 단백질 발현을 보았는데, dynamin-2의 경우 NIH3T3 세포에 비해 NIH3T3(Ras) 세포에서 그 발현이 현저히 증가함을 볼 수 있었지만 Grb2의 경우 두 세포에서 발현의 차이를 관찰할 수 없었다. Competitive PCR을 이용하여 mRNA의 발현정도를 확인하였을 때, 단백질 발현 정도와 마찬가지로 dynamin-2의 경우 NIH3T3(Ras) 세포에서 약 100배의 증가를 확인하였지만 Grb2의 경우 차이를 볼 수 없었다. Dynamin-2의 promoter 활성을 NIH3T3(Ras) 세포에서 관찰한 결과 start codon으로부터 300 bp에서 200 bp upstream에 dynamin-2의 promoter 활성을 조절하는 부위가 존재함을 확인할 수 있었다.

## 참고 문헌

1. Artalejo, C. R., M. A. Lemmon, J. Schlessinger and H. C. Palfrey. 1997. Specific role of the PH domain of dynamin-1 in the regulation of rapid endocytosis in adrenal chromaffin cells. *EMBO J.* **16**, 1565-1574.
2. Charvat, S., C. Le Griel, M. C. Chignol, D. Schmitt and M. Serres. 1999. Ras-transfection up-regulated HaCaT cell migration: inhibition by Marimastat. *Clin. Exp. Metastasis* **17**, 677-685.
3. Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**, 532-537.
4. Cook, T. A., R. Urrutia and M. A. McNiven. 1994. Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 644-648.
5. Downing, A. K., P. C. Driscoll, I. Gout, K. Salim, M. J. Zvelebil and M. D. Waterfield. 1994. Three-dimensional solution structure of the pleckstrin homology domain from dynamin. *Curr. Biol.* **4**, 884-891.
6. Gibson, T. J., M. Hyvonen, A. Musacchio, M. Saraste and E. Birney. 1994. PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 349-353.
7. Gold, E. S., D. M. Underhill, N. S. Morrissette, J. B. Guo, M. A. McNiven and A. Aderem. 1999. Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* **190**, 1849-1856.
8. Grabs, D., V. I. Slepnev, Z. Songyang, C. David, M. Lynch, L. C. Cantley and P. De Camilli. 1997. 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.
9. Greig, R. G., T. P. Koestler, D. L. Trainer, S. P. Corwin, L. Miles, T. Kline, R. Sweet, S. Yokoyama and G. Poste. 1985. Tumorigenic and metastatic properties of "normal" and ras-transfected NIH/3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3698-3701.
10. Jones, S. M., K. E. Howell, J. R. Henley, H. Cao and M. A. McNiven. 1998. Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *Science* **279**, 573-577.
11. Herskovits, J. S., H. S. Shpetner, C. C. Burgess and R. B. Vallee. 1993. Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11468-11472.
12. Kato, K., S. Horiuchi, A. Takahashi, Y. Ueoka, T. Arima, T. Matsuda, H. Kato, J. J. Nishida, Y. Nakabeppu and N. Wake. 2002. Contribution of estrogen receptor alpha to oncogenic K-Ras-mediated NIH3T3 cell transformation and its implication for escape from senescence by modulating the p53 pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 11217-11224.
13. Kessels, M. M. and B. Qualmann. 2004. The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **117**, 3077-3086.
14. Maier, O., M. Knoblich and P. Westermann. 1996. Dynamin II binds to the trans-Golgi network. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 229-233.
15. Miki, H., K. Miura, M. Koozi, T. Nakada, N. Hirokawa, S. Orita, K. Kaibuchi, Y. Takai and T. Takenawa. 1994. Association of Ash/Grb-2 with dynamin through the Src homology 3 domain. *J. Biol. Chem.* **269**, 5489-5492.
16. Noda, Y., T. Nakata and N. Hirokawa. 1993. Localization of dynamin : widespread distribution in mature neurons and association with membranous organelles. *Neuroscience* **55**, 113-127.
17. Obar, R. A., C. A. Collins, J. A. Hammarback, H. S. Shpetner and R. B. Vallee. 1990. Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. *Nature* **347**, 256-261.
18. Schafer, D. A. 2004. Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin. *Traffic* **5**, 463-469.
19. Seedorf, K., G. Kostks, R. Lammers, P. Bashkin, R. Daly, W. H. Burgess, A. M. Van der Bliek, J. Schlessinger and A. Ullrich. 1994. Dynamin binds to SH3 domains of phospholipase C gamma and GRB-2. *J. Biol. Chem.* **269**, 16009-16014.
20. Shpetner, H. S. and R. B. Vallee. 1992. Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. *Nature* **355**, 733-735.
21. Shupliakov, O., P. Low, D. Grabs, H. Gad, H. Chen, C. David, K. Takei, P. De Camilli and L. Brodin. 1997. Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* **276**, 259-263.
22. Sontag, J. M., E. M. Fykse, Y. Ushkaryov, J. P. Liu, P. J. Robinson and T. C. Sudhof. 1994. Differential expression and regulation of multiple dynamins. *J. Biol. Chem.* **269**, 4547-4554.
23. Stewart, S. and K. L. Guan. 2000. The dominant negative Ras mutant, N17Ras, can inhibit signaling independently of blocking Ras activation. *J. Biol. Chem.* **275**, 8854-8862.
24. Vidal, M., J. L. Montiel, D. Cussac, F. Cornille, M. Duchesne, F. Parker, B. Tocque, B. P. Roques and C. Garbay. 1998. Differential interactions of the growth factor receptor-bound protein 2 N-SH3 domain with son of sevenless and dynamin. Potential role in the Ras-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 5343-5348.
25. Vojtek, A. B. and C. J. Der. 1998. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 19925-19928.
26. Wang, Z. and M. F. Moran. 1996. Requirement for the adapter protein GRB2 in EGF receptor endocytosis. *Science* **272**, 1935-1939.
27. Warnock, D. E., L. J. Terlecky and S. L. Schmid. 1995. Dynamin GTPase is stimulated by crosslinking through the C-terminal proline-rich domain. *EMBO J.* **14**, 1322-1328.
28. Yoon, S. Y., W. S. Koh, K. I. Lee, Y. M. Park and M. Y. Han. 1997. Dynamin II associates with Grb2 SH3 domain in ras transformed NIH3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 539-543.
29. Young, T., F. Mei, J. Liu, R. C. Bast, A. Kurosky and X. Cheng. 2005. Proteomics analysis of H-RAS-mediated oncogenic transformation in a genetically defined human ovarian cancer model. *Oncogene* **24**, 6174-6184.