

Analysis of the Effects of Overexpression of Specific Phospholipid Binding Proteins on Cellular Morphological Changes in HEK293T Cells

Yong-Woo Jun¹, Jin-A Lee^{2*} and Deok-Jin Jang^{1*}

¹Department of Ecological Science, College of Ecology and Environment, Kyungpook National University, 2559, Gyeongsang-daero, Sangju-si, Gyeongsangbuk-do 37224, Korea

²Department of Biological Science and Biotechnology, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, 1646, Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon 34054, Korea

Received March 11, 2016/ Revised July 10, 2016/Accepted July 17, 2016

The plasma membrane plays a crucial role in relaying signals from the outside environment to the inside of the cells. In eukaryotic cells, the inner leaflets of the plasma membrane are composed mostly of phospholipids, including phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), and phosphatidylinositides (PIs). In this study, we tried to analyze the morphological changes induced by EGFP-fused membrane binding proteins, which are targeted to the plasma membrane via specific phospholipids binding. As a result, we found that overexpression of EGFP-P4M-SidM, a specific PI4P binding protein, or EGFP alone, did not induce any morphological changes. On the other hand, overexpression of EGFP-PLC δ 1(PH), which is a specific PI(4,5)P₂ binding protein, EGFP-AKT1(PH) which binds to PI(3,4,5)P₃, or EGFP-OSH2(PH) \times 2 which binds to PI4P and PI(4,5)P₂, could induce the filopodia and lamellipodia formation as well as cell shrinkage. Overexpression of Lact-C2-EGFP which is a specific PS-binding probe, EGFP fused *Aplysia* phosphodiesterase 4 (ApPDE4) long-form (L(N20)-EGFP) which is localized to the plasma membrane via hydrophobic interaction, or EGFP fused *Aplysia* PDE4 short-form (S(N-UCR1-2)-EGFP) which is localized to the plasma membrane via electrostatic interaction, could induce cell shrinkage, but not filopodia or lamellipodia formation. Taken together, our data support that the different phospholipid bindings in the plasma membrane could induce different characteristic morphological changes. Thus, we can analyze, characterize, and classify the cellular morphological changes induced by the various phospholipid binding proteins.

Key words : Cellular morphology, HEK293, Phosphoinositide, Phospholipid, Plasma membrane

서론

원형질막은 세포를 주위환경으로부터 보호하고 격리하여 정보를 교환하는 중요한 기능을 수행한다. 이러한 원형질막 이중층에는 다양한 지질들이 포함되어 있다. 주요 막지질로는 포스포글리세리드(Phosphoglyceride), 스펅고리피드(Sphingolipid), 콜레스테롤(Cholesterol, Ch)으로 나뉜다[2]. 진핵세포의 원형질막 바깥층과 안쪽층의 인지질 성분들이 서로 다른 구성요소로 이루어져 있는데, 안쪽층에 존재하는 지질 구성성분으로 크게 포스파티딜에탄올아민(Phosphatidylethanolamine, PE), 포스파티딜세린(Phosphatidylserine, PS),

포스파티딜이노시타이드(Phosphatidylinositide, PI)로 이루어져 있다. 이러한 지질 구성 성분들은 특정 단백질과 결합하여 원형질막의 내막으로 위치되도록 도와주는 역할을 한다[3]. 예를 들어, Phospholipase C δ 1 (PLC δ 1)의 Pleckstrin homology (PH) domain은 원형질막의 내막에 존재하는 PI(4,5)P₂와 결합하여 원형질막으로 위치하고[3], 또한 Serine-threonine protein AKT1의 PH domain은 PI(3,4,5)P₃에 결합하여 원형질막으로 위치한다[5]. 게다가 PI4P결합에 의해서도 원형질막으로 위치 될 수 있으며[7], PIs를 제외하고도 다른 인지질 구성성분인 PS에 결합하여 원형질막에 위치하는 단백질도 있다[17]. 이는 세포내 존재하는 막중 가장 음성을 띠는 지질층이며, 정전기적으로 양성을 띠는 단백질들이 정전기적인 힘을 통해 원형질막에 위치하기도 한다[11, 14]. 또한, 소수성결합에 의해서도 원형질막에 위치될 수 있다[11]. 이처럼 인지질에 결합하는 단백질들이 다양한 기전에 의해 원형질막에 위치 될 수 있다.

원형질막으로 위치하는 특정 단백질은 세포의 형태적인 모양변화를 유발한다고 알려져 있다[10]. 그 중에서도 주로 연구가 수행된 것은 PI(4,5)P₂와 PI(3,4,5)P₃이다. PI결합에 대한 이전 보고에 따르면 PI(4,5)P₂와 PI(3,4,5)P₃는 세포의 액틴

*Corresponding authors

Tel : +82-54-530-1213, Fax : +82-54-530-1218

E-mail : jangdj@knu.ac.kr (Deok-Jin Jang)

Tel : +82-42-629-8785, Fax : +82-42-629-8789

E-mail : mailto:leeja@hnu.kr (Jin-A Lee)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

필라멘트(Actin filament)의 형성 및 조립을 조절한다고 보고 되어 있다. PI(4,5)P₂는 Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP)과 actin-related protein 2/3 (Arp2/3)에 결합을 해서 이들의 활성을 향상시켜 액틴중합화를 향상시킬 수 있다[15]. 또한, PI(4,5)P₂는 Gelsolin 또는 ADF/Cofilin in actin depolymerizing factor에 결합해 이들의 활성을 줄임으로써 액틴탈중합화(Actin depolymerization)를 억제하여 액틴중합화를 향상시킬 수도 있다[13]. 반면에 PI(3,4,5)P₃는 작은 GTPases의 Rho family 단백질의 활성을 통하여 액틴세포골격을 자극하거나 액틴필라멘트의 구조를 조립 및 조절하게 된다. 즉 PI(4,5)P₂와 PI(3,4,5)P₃는 액틴필라멘트에 관련된 연결단백질의 활성 및 불활성을 통하여 액틴필라멘트의 형성을 자극 및 유도하고 세포골격과 원형질막의 상호작용에 매개하는 단백질로써 작용한다고 보고되어 있다[8]. 따라서, 원형질막에 PI(4,5)P₂와 PI(3,4,5)P₃의 양이 증가하면 액틴필라멘트의 조립이 유도되고, 반대로 PI(4,5)P₂와 PI(3,4,5)P₃가 억제되면 액틴골격의 손실을 유도하게 된다.

본 연구에서는 원형질막의 인지질 구성요소 중 PS, PI4P, PI(4,5)P₂ 혹은 PI(3,4,5)P₃와 선택적으로 결합하여 원형질막으로 위치하는 단백질들과 소수성 또는 정전기적인 상호작용에 의해 원형질막에 위치하는 단백질을 세포내에 과발현시켜 세포의 형태적 모양변화를 관찰하였다. 본 연구를 통해 특정 인지질과 결합하여 원형질막으로 위치하는 단백질들이 고유의 세포 모양변화를 유발할 수 있음을 알게 되었다.

재료 및 방법

시약처리 방법

Antimycin A, Phosphate-buffered saline (PBS), Rapamycin, Wortmannin은 Sigma (St. Louis, Mo, USA)사에서 구입하였다. Antimycin A의 처리 농도는 PBS에 200 nM로 녹여 40분간 처리하였고, Rapamycin은 세포배양 MEDIA에 1 μM으로 녹여 1분간 처리했고, Wortmannin은 DMEM에 200 nM으로 녹여 40분간 처리하여 사용하였다.

실험에 사용한 DNA 정보

List of DNA and Addgene accession numbers (Table 1).

세포 배양 및 DNA transfection

HEK293T 세포는 10% Fetal bovine serum (FBS) + 1% Penicillin/streptomycin + DMEM 배양액에서 37°C (w/ 5% CO₂) 세포 배양기를 이용해 배양하였다. DNA transfection은 Invitrogen (1600 Faraday Avenue, PO Box 6482, Carlsbad, California 92008, USA)사에서 제공되는 설명서를 기반으로 수행되었고, Transfection 후 다음날에 Carl Zeiss (Carl-Zeiss-Strasse 22, 73447 Oberkochen, Germany)사의 Zeiss LSM 700 laser scanning confocal microscope을 이용하여 GFP excitation (488 그리고 508-543 nm)과 GFP emission (500-550 nm) 필터로 설정 후 ZEN software로 영상을 획득하였다.

결과 및 고찰

특정 인지질에 결합하는 단백질들의 세포내 위치 및 ATP 합성 억제제인 Antimycin A 처리에 의한 세포내 단백질 위치 변화

원형질막의 내층에 존재하는 인지질과 결합하여 세포의 원형질막에 위치되는 단백질들의 과발현이 세포의 형태적 변화를 유도하는 효과를 알아보기 위하여, 원형질막에 존재하면서 인지질에 결합한다고 알려진 단백질들을 HEK293T 세포에 과발현시켰다(Fig. 1A). OSH2(PH)x2는 PI4P와 PI(4,5)P₂에 결합하고[16], PLCδ1(PH)는 PI(4,5)P₂에만 결합하고, AKT1(PH)는 PI(3,4,5)P₃ 그리고 P4M-SidM은 PI4P에 특정적으로 결합한다고 보고되고 있다[6, 7, 17]. 또한, Lact-C2는 PS에 결합하여 원형질막으로 위치되는 것으로 보고되었다[17]. 군소의 PDE4 long-form의 N말단 20개의 아미노산으로 이루어진 ApPDE4 L(N20)은 소수성 상호작용에 의해 원형질막으로 위치되고, ApPDE4 short-form (ApPDE4 S(N-UCR1- 2))은 정전기적 상호작용에 의해서 원형질막으로 위치된다고 보고되었다[11]. 본 연구에서는 이러한 인지질에 결합하여 원형질막에 위치되는 단백질들을 살아있는 세포내에서 과발현 시켰을 때 유도되는 세포의 형태적 변화에 영향을 있는지 확인하

Table 1. Summary of DNA characteristics

DNA list	Mechanism of plasma membrane targeting	Source
GFP-P4M-SidM	PI4P binding	Addgene (Plasmid #51469)
OSH2(PH)x2	PI4P, PI(4,5)P ₂ binding	from Tamas Balla[1]
EGFP-PLCδ1(PH)	PI(4,5)P ₂ binding	from Bong-Kiun Kaang[12]
EGFP-AKT1(PH)	PI(3,4,5)P ₃ binding	Addgene (Plasmid #21218)
Lact-C2-EGFP	PS binding	Addgene (Plasmid #22852)
ApPDE4 L(N20)-EGFP	Hydrophobic interaction	From Deok-Jin Jang[9, 11]
ApPDE4 S(N-UCR1-2)	Electrostatic interaction	From Deok-Jin Jang[9, 11]

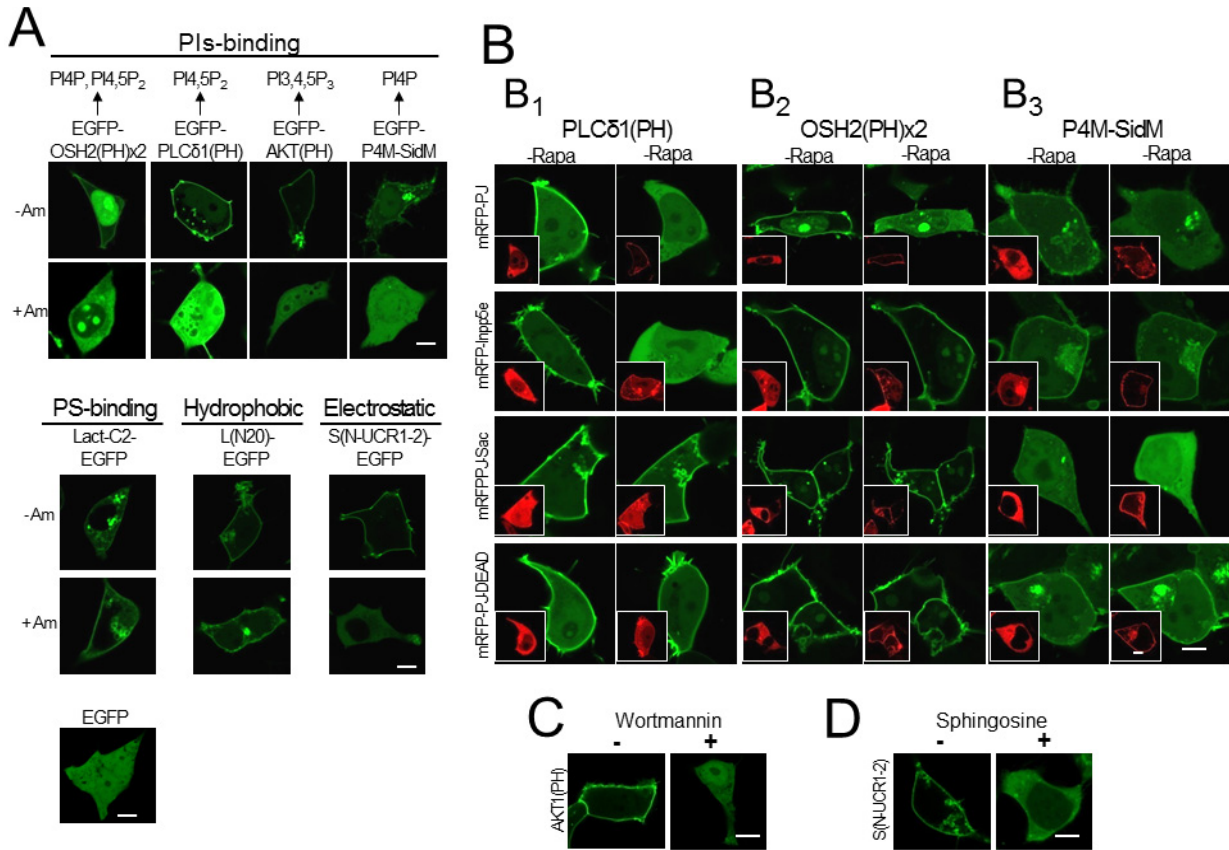


Fig. 1. Dissection of molecular mechanism of the plasma membrane targeting of GFP-fused proteins. (A) Plasma membrane localization of GFP-fused proteins and effects of PI depletion by antimycin A treatment on the targeting. Various GFP-fused proteins are expressed in HEK293T cells. Images are acquired before and after 200 nM antimycin A (Am) treatment for 40min. Scale bar, 20 μ m. (B) Plasma membrane localization of EGFP-OSH2(PH)x2, EGFP-PLC δ 1(PH) or EGFP-P4M-SidM is changed by the depletion of PIs by the pseudojanin (PJ) system. EGFP-OSH2(PH)x2, EGFP-PLC δ 1(PH) or EGFP-P4M-SidM was co-expressed with Lyn11-FRB and mRFP-FKBP-PJ/Inpp5e/PJ-Sac/PJ-DAED in HEK293T cell. (C) Plasma membrane localization of EGFP-AKT1(PH) is changed by wortmannin, a PI3K inhibitor treatment. Scale bar, 20 μ m. (D) Plasma membrane localization of S(N-UCR1-2)-EGFP is changed by treatment with sphingosine, one of the basic lipids. Images obtained at X 40 magnifications. Scale bar, 20 μ m.

고자 하였다.

이를 위해 실험에 사용한 단백질들의 원형질막 위치 매커니즘이 보고된 것과 일치하는지 확인하기 위해 ATP 합성을 억제하는 약물인 Antimycin A (Am)을 처리해 보았다. 일반적으로 원형질막의 Phosphatidylinositide (PIs)는 다양한 인산화 효소에 의해서 인산화된 형태이다. 즉 ATP를 사용하여 PI의 Inositol ring에 효소에 의해서 인산화가 되어 PIs가 된다. 원형질막에 위치하는 PIs를 제거하기 위하여 ATP 합성을 억제하는 약물인 Am을 처리하면, PIs결합에 의해 원형질막으로 위치하는 EGFP-OSH2x2(PH), EGFP-PLC δ 1(PH), EGFP-AKT1(PH), EGFP-P4M-SidM 그리고 정전기적 상호작용에 의해서 원형질막으로 위치하는 S(N-UCR1-2)-EGFP은 원형질막에서 세포질로 단백질의 위치가 바뀌는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 이와는 대조적으로, PS와 결합하는 Lact-C2-EGFP와 소수성 상호작용에 의해서 원형질막으로 위치하는

ApPDE4 L(N20)-EGFP은 Am을 처리하여도 원형질막의 단백질 위치에는 변화가 없었다(Fig. 1A).

원형질막에 위치되는 단백질들이 어떤 PIs와 결합하여 원형질막으로 위치되는지 확인하기 위해, Pseudojanin (PJ) system을 이용하였다. PJ system은 FKBP12-rapamycin binding (FRB) domain과 FK506-binding protein (FKBP)의 상호작용을 기반으로 Rapamycin이 존재할 때, FRB domain과 FKBP 단백질이 서로 결합하는 특성을 가지고 있다[4]. 이를 응용하여, 원형질막의 특정 PI를 제거할 수 있다. PI의 Inositol ring의 탄소 5번째 인산기를 제거할 수 있는 Inpp5e와, PI의 Inositol ring의 탄소 4번째의 인산기를 제거할 수 있는 PJ-Sac과, PI의 Inositol ring의 탄소 4, 5번째의 인산기를 제거할 수 있는 PJ와, 마지막으로 인산기를 제거할 수 없는 Negative control인 PJ-DEAD construct를 사용하여 직접적으로 원형질막의 특정 PI를 제거하였을 때 EGFP-OSH2(PH)x2와 EGFP-

PLC δ 1(PH)와 EGFP-AKT(PH)와 EGFP-P4M-SidM의 단백질 위치 변화를 확인하였다(Fig. 1B). EGFP-PLC δ 1(PH)는 원형질막의 PI(4,5)P₂와 선택적으로 결합하여 원형질막으로 위치된다고 보고되어 있는데, 본 실험의 결과와 마찬가지로 원형질막의 PI(4,5)P₂의 5번째 인산기를 제거할 수 있는 Inpp5e와 5번째 인산기와 4번째 인산기도 같이 제거할 수 있는 PJ를 이용하였을 때, 원형질막에 위치하고 있는 EGFP-PLC δ 1(PH)의 단백질 위치가 Rapamycin처리에 의해 사라지는 것을 확인하였다(Fig. 1B₁). PI4P만의 결합으로 원형질막에 위치된다고 보고된 EGFP-P4M-SidM은 원형질막의 PI4P를 제거할 수 있는 PJ-Sac와 PJ가 발현된 경우에, 원형질막에 위치하고 있는 EGFP-P4M-SidM의 단백질 위치가 Rapamycin처리에 의해 사라지는 것을 확인하였다(Fig. 1B₃). 반면에, PI4P와 PI(4,5)P₂결합에 의해 원형질막에 위치된다고 알려진 EGFP-OSH2(PH)x2는 PJ로 PI4P와 PI(4,5)P₂를 함께 제거하였을 경우에만 단백질의 원형질막 위치가 사라지는 것을 확인했다(Fig. 1B₂).

PI(3,4,5)P₃와 결합하여 원형질막으로 위치된다고 보고된 EGFP-AKT1(PH)는 세포내 PI(4,5)P₂의 3번째 링구조에 인산화를 유도하여 PI(3,4,5)P₃를 만들어내는 PI3 kinase를 억제하는 약물인 Wortmannin을 처리한 조건에서 원형질막에 위치하고 있는 단백질이 사라지는 것을 확인하였다(Fig. 1C). S(N-UCR1-2)-GFP는 세포막의 정전기적인 특성을 산성에서 염기성으로 바꿀 수 있는 Sphingosine을 처리해 준 결과 막에 위치하는 단백질이 사라지는 것으로 보아(Fig. 1D), 본 연구실의 이전 연구에서 발견한 S(N-UCR1-2)-EGFP의 단백질 위치 메커니즘이 특정 PIs의 결합에 의한 것이 아니라 정전기적 상호작용에 의해서 위치된다고 이루어진다는 사실과 부합하였다[11]. 따라서, 종합해보면 EGFP-OSH2(PH)x2는 원형질막에 위치하는데 PI4P, PI(4,5)P₂가 모두 중요하고, EGFP-PLC δ 1(PH)는 PI(4,5)P₂가 중요하고, EGFP-AKT1(PH)는 PI(3,4,5)P₃가 중요하고, EGFP-P4M-SidM는 PI4P가 중요함을 확인할 수 있었다.

인지질에 결합하는 단백질의 과발현에 의한 세포의 형태적 변화

인지질에 결합하여 원형질막에 위치되는 단백질들의 과발현이 세포의 어떤 형태적 변화를 유도하는지 확인하기 위해서 HEK293T 세포에 이들을 과발현시키고 장시간(24시간 이상) 배양한 후 세포 모양을 관찰하였다(Fig. 2A). Fig. 1A에서 보이는 세포와는 다르게 특정 단백질이 발현된 세포에서 발현시간이 장기화 되어, 과발현되는 정도가 높아질수록 특정 세포의 형태적 변화가 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 예를 들어 EGFP-PLC δ 1(PH)와 EGFP-AKT1(PH)가 발현된 세포에서는 가장자리 부분에 모양이 약간 부푸는 것과 얇은 가시 모양을 형성하는 것으로 관찰되었고, Lact-C2-EGFP는 세포모

양이 줄어들면서 돌기모양을 형성하는 것으로 관찰되었다. 이러한 세포의 모양변화가 세포사멸과정의 Artifact으로 Lamellipodia나 Filopodia 처럼 보이게 하는 것이 아닌지 확인하기 위해, 세포사멸을 세포를 확인할 수 있는 Annexin V staining 실험을 진행하였다(data not shown). Annexin V 염색 실험은 세포사멸이 진행된 세포를 구별시켜주는 방법으로 세포사멸이 진행되었을 때 원형질막 내층에 존재하는 PS가 외층으로 노출되면서 이를 염색시키는 원리이다. 실험결과로 세포의 형태적 변화가 유도된 세포에서는 Annexin V의 염색이 되지 않았다. 즉, 세포사멸에 의한 모양변화가 아니라 특정 단백질의 과발현이 살아있는 세포에서 세포의 형태적 변화를 유발하는 것으로 확인이 되었다.

특정단백질의 과발현에 의해 세포의 형태적 모양 변화를 더 자세히 관찰하기 위해서 Confocal laser scanning microscopy을 통하여 세포를 촬영하였다(Fig. 2B). 실험의 대조군으로 EGFP가 발현된 세포는 발현 후에 특정한 모양변화가 나타나지 않았다. EGFP와 비슷하게 PI4P와 결합하여 원형질막으로 위치되는 EGFP-P4M-SidM의 과발현도 세포의 모양 변화를 유발하지 않았다. 반면, PI(4,5)P₂와 결합하여 원형질막으로 위치하는 EGFP-PLC δ 1(PH), PI(3,4,5)P₃와 결합하여 원형질막으로 위치하는 AKT1(PH)-EGFP, PI4P와 PI(4,5)P₂에 결합하여 원형질막으로 위치하는 OSH2(PH)x2-EGFP의 세포내 과발현은 세포의 크기가 줄어드는 세포수축 현상과 함께 Lamellipodia (화살촉)와 Filopodia (화살표)모양으로 보이는 모양 변화가 유발되었다. 반면에, PS와 선택적으로 결합하여 원형질막으로 위치하는 Lact-C2-EGFP, 원형질막의 소수성 상호작용에 의해 원형질막으로 위치하는 L(N20)-EGFP, 그리고 원형질막의 정전기적 상호작용에 의해 원형질막으로 위치하는 S(N-UCR1-2)-EGFP의 세포내 과발현은 세포의 형태가 줄어드는 현상과 이를 통해 나타나는 부분적인 돌기가 형성되는 것을 확인하였다. 시간이 지남에 따라 세포의 본래의 모양을 잃고 작고 둥글게 변하여 돌기부분에 분절이 일어나는 세포사멸과 비슷한 형태적 변화가 일어나는 것을 확인하였다. 그러나, 이들 세포에서 Lamellipodia와 Filopodia로 보이는 모양 변화는 나타나지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 인지질에 결합하여 원형질막으로 위치되는 단백질의 과발현은 세포의 특정 모양연구 결과 특히 PI(4,5)P₂ 또는 PI(3,4,5)P₃와 결합하여 원형질막으로 위치되는 세포에서는 Lamellipodia와 Filopodia가 형성되는 세포 모양과 일치했고, 원형질막으로 위치하는 단백질의 과발현이 결합하고 있던 인지질의 고유의 기능을 저해시킴으로써 세포의 형태변화를 유도하였다. 이전 연구를 통해 PI(4,5)P₂와 PI(3,4,5)P₃는 세포의 액틴필라멘트의 형성 및 조립을 조절한다고 보고되어 있는데, 이와 결합하는 단백질의 과발현이 Actin polymerization과 관련되어 있는 Lamellipodia와 Filopodia가 형성된다는 사실은 매우 흥미로운 연구 결과이다.

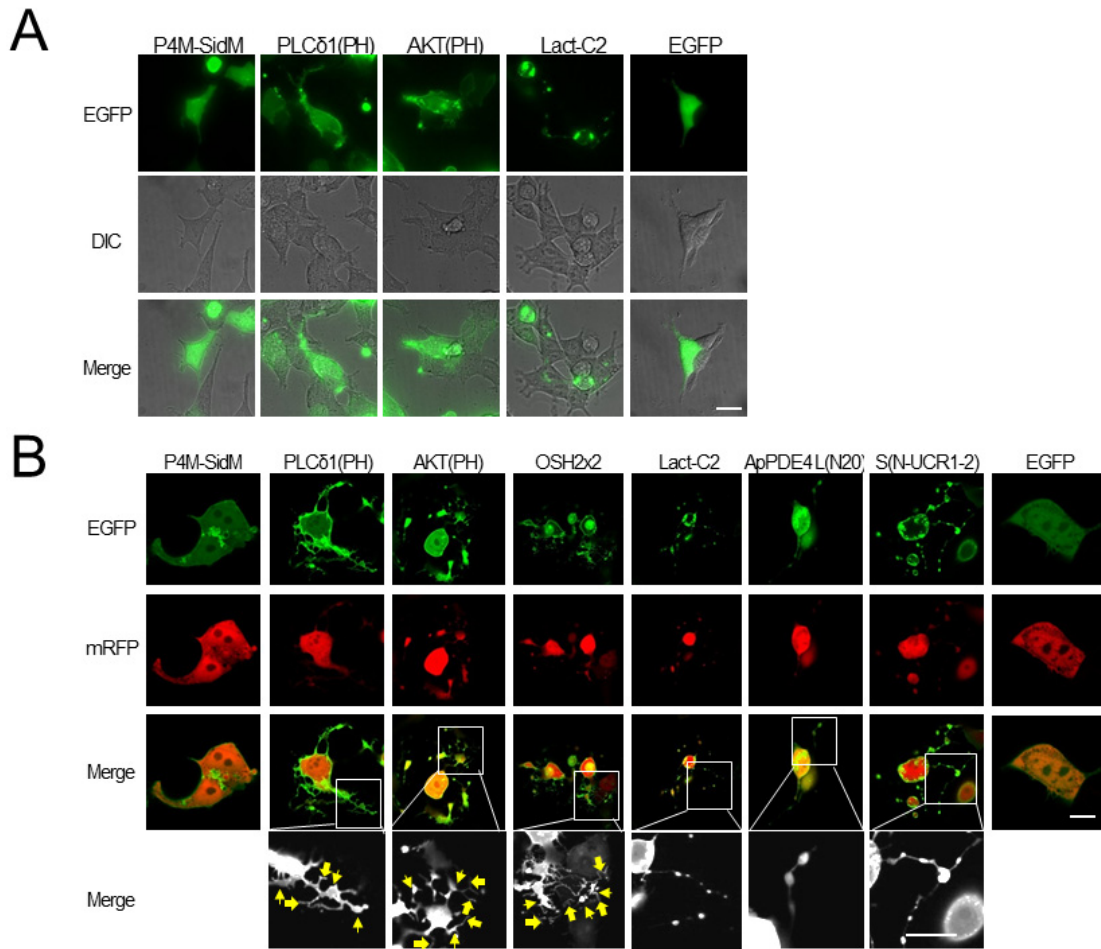


Fig. 2. Morphological changes induced by expression of various GFP-fused proteins. Fluorescent images (top panel), DIC images (middle panel), and merged images (bottom panel) of cell expressing EGFP-fused proteins (A). EGFP-fused proteins are expressed with mRFP in HEK293T cells (B). As a control, EGFP and mRFP are used. The confocal images show the representative cell morphology of the corresponding EGFP-fused proteins expressing cells. Except for EGFP-P4M-SidM or EGFP, the dramatic morphological changes are occurred in the expression of EGFP-PLCδ1(PH), EGFP-AKT1(PH), EGFP-OSH2 (PH)x2, Lact-C2-EGFP, L(N20)-EGFP and S(N-UCR1-2)-EGFP. Images obtained at X 40 magnifications. Scale bar, 20 μm. Higher magnification images clearly show the fine structure of cells. The yellow arrowheads indicate lamellipodia and the yellow arrows indicate filopodia. Images obtained at X 100 magnifications. Scale bar, 50 μm.

본 연구를 통해 PI(4,5)P₂ 또는 PI(3,4,5)P₃와 결합하여 원형질막으로 위치되는 단백질들의 과발현은 세포수축과 Lamellipodia와 Filopodia와 같은 모양변화를 유발하였고, PS와 소수성 또는 정전기적 상호작용에 의해서 원형질막으로 위치되는 단백질의 과발현은 세포수축과 돌기모양의 형성을 유발하였으나, Lamellipodia와 Filopodia와 같은 모양변화를 유발하지는 않았다. 본 연구를 통해 원형질막의 안쪽층으로 위치되는 단백질들의 막 결합특성에 따라 세포모양의 다른 변화를 분석할 수 있었다.

감사의 글

본 연구에서 이진아 박사의 연구는 한남대학교 2016년도

교비 연구비[Hannam Research Program (2016)]의 지원으로 수행되었습니다.

References

1. Balla, A., Kim, Y. J., Varnai, P., Szentpetery, Z., Knight, Z., Shokat, K. M. and Balla, T. 2008. Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 711-721.
2. Brown, R. E. 1998. Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J. Cell Sci.* **111**, 1-9.
3. Di Paolo, G. and De Camilli, P. 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651-

- 657.
4. Dickson, E. J., Jensen, J. B. and Hille, B. 2014. Golgi and plasma membrane pools of PI(4)P contribute to plasma membrane PI(4,5)P₂ and maintenance of KCNQ2/3 ion channel current. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, E2281-2290.
 5. Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C. and Toker, A. 1997. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**, 665-668.
 6. Hammond, G. R., Fischer, M. J., Anderson, K. E., Holdich, J., Koteci, A., Balla, T. and Irvine, R. F. 2012. PI4P and PI(4,5)P₂ are essential but independent lipid determinants of membrane identity. *Science* **337**, 727-730.
 7. Hammond, G. R., Machner, M. P. and Balla, T. 2014. A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi. *J. Cell Biol.* **205**, 113-126.
 8. Hilpela, P., Vartiainen, M. K. and Lappalainen, P. 2004. Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P₂ and PI(3,4,5)P₃. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **282**, 117-163.
 9. Jang, D. J., Park, S. W., Lee, J. A., Lee, C., Chae, Y. S., Park, H., Kim, M. J., Choi, S. L., Lee, N., Kim, H. and Kaang, B. K. 2010. N termini of apPDE4 isoforms are responsible for targeting the isoforms to different cellular membranes. *Learn Mem.* **17**, 469-479.
 10. Kim, K. H., Jun, Y. W., Lee, J. A. and Jang, D. J. 2013. Identification of N-terminal amino acids of ApPDE4 involved in targeting to plasma membrane and cellular morphological change by expression of N-terminal peptide. *J. Anal. Sci. Technol.* **26**, 106-112.
 11. Kim, K. H., Jun, Y. W., Park, Y., Lee, J. A., Suh, B. C., Lim, C. S., Lee, Y. S., Kaang, B. K. and Jang, D. J. 2014. Intracellular membrane association of the Aplysia cAMP phosphodiesterase long and short forms via different targeting mechanisms. *J. Biol. Chem.* **289**, 25797-25811.
 12. Lee, S. H., Shim, J., Choi, S. L., Lee, N., Lee, C. H., Bailey, C. H., Kandel, E. R., Jang, D. J. and Kaang, B. K. 2012. Learning-related synaptic growth mediated by internalization of Aplysia cell adhesion molecule is controlled by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthetic pathway. *J. Neurosci.* **32**, 16296-16305.
 13. Logan, M. R. and Mandato, C. A. 2006. Regulation of the actin cytoskeleton by PIP₂ in cytokinesis. *Biol. Cell.* **98**, 377-388.
 14. McLaughlin, S. and Murray, D. 2005. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* **438**, 605-611.
 15. Rajput, C., Kini, V., Smith, M., Yazbeck, P., Chavez, A., Schmidt, T., Zhang, W., Knezevic, N., Komarova, Y. and Mehta, D. 2013. Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP)-mediated p120-catenin interaction with Arp2-Actin complex stabilizes endothelial adherens junctions. *J. Biol. Chem.* **288**, 4241-4250.
 16. Roy, A. and Levine, T. P. 2004. Multiple pools of phosphatidylinositol 4-phosphate detected using the pleckstrin homology domain of Osh2p. *J. Biol. Chem.* **279**, 44683-44689.
 17. Yeung, T., Gilbert, G. E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A. and Grinstein, S. 2008. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* **319**, 210-213.

초록 : 특정 인지질 결합 단백질의 과발현이 HEK293 세포모양에 미치는 영향 분석

전용우¹, 이진아^{2*}, 장덕진^{1*}

(¹경북대학교 생태환경대학 생태과학과, ²한남대학교 생명나노과학대학 생명시스템과학과)

진핵세포의 원형질막은 외부환경으로부터 세포를 격리하는 물리적인 장벽뿐만 아니라, 선택적 물질수송, 신호 전달 등 중요한 기능을 수행한다. 원형질막의 세포질쪽 지질층은 주로 Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylinositides (PIs) 등의 인지질로 구성되어 있는데, 다양한 단백질들이 이들과 직접 결합하거나 이들의 성질을 이용해 원형질막으로 위치된다. 본 연구에서는 원형질막의 안쪽 지질층에 존재하는 특정 인지질과 결합하여, 원형질막에 위치되는 단백질을 과발현시켰을 때 나타나는 세포의 모양변화를 분석하였다. 이를 위해 PS와 PI등과의 선택적 결합으로 원형질막에 위치하는 단백질들과 소수성 또는 정전기적 상호작용으로 원형질막으로 위치되는 단백질들을 HEK293T세포에 과발현시켜 보았다. 그 결과, 대조군으로 사용한 EGFP 단백질과 PI4P에 선택적으로 결합하는 EGFP-P4M-SidM 단백질의 발현은 세포의 모양변화를 유도하지 않았다. 반면, PI(4,5)P₂에 결합하는 EGFP-PLCδ1(PH), PI(3,4,5)P₃에 결합하는 EGFP-AKT1(PH), PI4P와 PI(4,5)P₂에 결합하는 OSH2(PH)x2-EGFP의 발현은 세포의 크기가 줄어드는 수축현상이 일어나면서, Lamellipodia나 Filopodia가 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 반면에, PS결합을 통해 원형질막에 위치되는 Lact-C2-EGFP과 소수성결합에 의해 원형질막에 위치되는 ApPDE4 long-form인 L(N20)-EGFP이나, 정전기적인 결합을 통해 원형질막으로 위치되는 ApPDE4 short-form인 S(N-UCR1-2)-EGFP 단백질의 경우는 세포의 크기가 줄어드는 수축현상은 일어나지만 Lamellipodia나 Filopodia와 같은 모양변화는 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해, 특정 인지질에 결합하여 원형질막에 위치되는 단백질들이 각각의 인지질 결합 특성에 따라 분류 가능한 세포의 모양변화가 일어남을 확인할 수 있었다.