

세포 이동에서 PI3K 억제제인 LY294002의 효과

김원범 · 전택중[†]

조선대학교 글로벌바이오융합학과, BK21 FOUR 노인성 질환 제어 기술 교육 연구단

Effect of a PI3K inhibitor LY294002 on cell migration

Wonbum Kim, and Taeck Joong Jeon[†]

Department of Integrative Biological Sciences & BK21 FOUR Educational Research Group for Age-associated Disorder Control Technology, Chosun University

Abstract

Cell migration is essential for diverse cellular processes including wound healing, immune response, development, and cancer metastasis. Pi3-kinase (PI3K) is a key regulator for actin cytoskeleton and phosphorylates phosphatidylinositol (4,5)-diphosphate (PIP2) to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3). High levels of PIP3 by PI3Ks are associated with increased levels of F-actin and pseudopod extension at the leading edge of migrating cells such as neutrophils and *Dictyostelium*. LY294002 is a well-known PI3K specific inhibitor. Here, we investigated the effect of LY294002 on cell migration. First, we evaluated the appropriate concentration of dimethyl sulfoxide (DMSO) for using as a solvent for LY294002. DMSO is a highly polar organic reagent and one of the most common solvent for organic and inorganic chemicals. Cell morphology and cell migration were unaffected at the concentrations less than 0.1 % DMSO. Therefore, stock solution of LY294002 was prepared so that the final concentration of DMSO was 0.1 % or less when treated. When cells were treated with LY294002, cell migration was increased in a concentration-dependent manner. The maximum speed was detected in the presence of 30 μ M LY294002. These results suggest that PI3Ks play a inhibitory role in regulating cell migration in our experimental conditions.

Keyword: Cell migration, PI3K, LY294002, *Dictyostelium*

(Received September 26, 2022; Revised September 27, 2022; Accepted September 29, 2022)

1. 서론

세포 이동은 배아 발달, 상처 치유, 염증 반응, 암 종양의 침습 및 전이를 포함한 많은 생물학적

및 병리학적 과정에 관여한다^{[1][2][4]}. 세포가 주화성 인자에 반응하여 일정한 방향으로 이동하기 위해서는 세포골격과 세포 내부 신호전달 물질들의 비대칭적 배열에 의한 세포 극성화가 일어나야 한다. 세포 밖의 외부 주화성 인자는 세포막에 위치하는 G-protein-coupled-receptors (GPCRs)에 의해 감

[†] Corresponding author: tjeon@chosun.ac.kr

지된다. 주화성 이동을 하는 동안, 세포는 세포골격을 조절하는 단백질들의 비대칭적 분포로 인해 가늘고 긴 모양이 된다. 이러한 세포는 극성을 갖게 되고, 방향성을 감지하는 시스템을 통하여 세포가 주화성 인자를 향하게 되고 농도 차에 따라 이동한다^[5]. 세포 이동 시 앞쪽 부분에서는 액틴 중합이 일어나고, 뒤쪽에서는 미오신 중합이 일어난다고 알려져 있다^[6].

*Dictyostelium*에서 주화성 이동을 하는 과정으로 주화성 인자인 cAMP (cyclic AMP)에 반응하는 많은 신호전달 경로가 알려져 있다. cAMP는 세포막의 G-protein coupled receptor인 cAR1 수용체에 의해 인지되어 G-protein 해체를 유도하며, G α 와 G $\beta\gamma$ -dimer로 분리된다. 이 중 G β 는 Ras family protein의 도움으로 인해 phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks)를 활성화시킨다. 활성화된 PI3Ks에 의해 세포막 안에서 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)는 phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3)로 합성되고, 반대로 phosphatase and tensin homolog (PTEN)에 의해 PIP3가 PIP2로 분해된다. 주화성 인자에 반응하여 빠르게 PI3Ks는 세포 앞쪽에 PTEN은 세포의 뒤쪽과 옆쪽에 위치한다. 세포에 주화성 인자와 같은 외부 자극이 주어졌을 때, PI3Ks와 PTEN의 비대칭적 배열에 의해 세포 앞쪽에 PIP3가 축적하게 된다^{[7][2][9]}. PIP3는 PH-domain을 가진 단백질들에 의해 인식된다. CRAC, PhdA, Akt/Pkb와 같은 PH-domain containing 단백질들은 자극이 없을 때는 세포질에 고르게 분포하고 있지만 자극이 주어지면 축적된 PIP3를 감지하여 세포 앞쪽에 비대칭적으로 재배열하게 된다. 이러한 단백질은 최종적으로 액틴 세포골격 조절을 통해 세포이동에 영향을 미친다. PI3Ks가 결핍된 호중구는 야생형 세포보다 느리게 움직이지만 *Dictyostelium*의 *pi3k* knockout 세포는 주화성 이동에서 방향감지에 결함을 나타낸다.

*Dictyostelium*은 세포 이동, 세포 분열 및 다세포 발달 과정과 같은 세포 과정을 연구하기에 좋은 모델 생물이다. *Dictyostelium*은 지난 40년 동안 주화성 이동(화학적 유인물질에 의한 방향성 세포 이동)의 강력한 모델 시스템으로 사용되고 있다.

*Dictyostelium*은 박테리아를 먹고 사는 자유 생활 토양 아메바이다. 박테리아에 의해 분비되는 엽산에 대한 주화성 이동은 대식세포나 호중구와 매우 유사하다^{[3][4]}. 기아 상태에서 *Dictyostelium*은 cAMP를 분비하고 주화성 이동을 통해 중앙으로 응집 이동하여 최종적으로 자실체를 형성하는 체계적인 다세포 발달 과정을 가진다^[3].

Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 주로 세포를 보관하기 위한 Stock을 만들거나, 화합물의 용매로 주로 쓰이는 물질이다. *Dictyostelium* 세포에 5% DMSO가 처리되었을 때, 세포가 둥근 모양이 되었으며, DMSO가 제거된 후 20분 만에 세포의 운동성이 회복했다고 보고되었다^[10]. 이러한 DMSO는 *Dictyostelium*에 독성을 가지고 있으며 세포 이동에 영향을 준다. 본 연구에서는 DMSO를 LY294002 용액을 만들기 위한 용매로 사용하기 위하여, 먼저 독성을 나타내며 세포이동에 영향을 미치는 DMSO의 농도를 확인하였다. LY294002는 잘 알려진 PI3K 특이적 억제제이다. 우리는 세포 이동에서 PI3K의 역할을 이해하기 위하여 LY294002를 농도 별로 처리 후 세포이동에 미치는 영향을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 세포 배양 및 시약

*Dictyostelium*의 야생형 세포주인 KAx3 (DBS0236487)를 22 °C의 HL5 배지에서 무균배양했다. DMSO는 Duchefa Biochemie (CAS No. 67-68-5)에서 LY294002는 Invitrogene (#PHZ1144)에서 구입하였다. LY294002는 DMSO에 50 mM stock 용액을 준비하였으며 DMSO의 최종 농도가 0.1 % 이하가 되도록 처리하였다.

2.2 무작위 이동 실험

무작위이동 실험은 Litschko et al., (2018)^[11]에서 발표한 방법을 따라 실험하였다. 무작위 이동 실험은 100 mm 세포 배양 접시에서 완전히 성장한 세포를 모아 24-well plate에 연속 희석법을 사용하여 희석하였다. 부착한 세포를 다음 날 Development

buffer (DB; 5 mM Na₂HPO₄, 5 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂ and 1 mM CaCl₂)를 사용하여 3번 씻어준 후, 3시간 동안 DB에서 배양하였다. LY204002를 각 농도별로 30분 동안 처리하였으며, 이후 카메라 (DS-Fil, Nikon)가 장착된 도립현미경 (IX71; Olympus)을 사용하여 30분 동안 1분 간격으로 무작위 세포 이동을 촬영하였다.

2.3 무작위 이동 분석

무작위 세포이동을 촬영한 동영상의 마지막 10분 동안의 세포이동을 분석하였다^[12]. 1분 간격으로 이동한 세포를 ImageJ (National Institutes of Health) 프로그램을 이용하여 Tracking하였으며 'chemotaxis and migration tool'을 이용하여 세포가 이동한 trajectory와 이동 속도를 계산하였다. 'Trajectory speed'는 세포가 이동한 총 거리를 시간으로 나눈 값이다. 각 실험은 세 번 이상 반복하였으며 평균값과 표준편차 값을 그래프로 나타내었다.

3. 결과

*Dictyostelium*에 PI3K 억제제인 LY294002를 처리하여 세포의 이동성을 조사하기 위하여 화합물의 대표적인 용매인 DMSO의 효과를 먼저 알아보았다. 세포에 DMSO의 최종 농도가 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%가 되도록 처리한 후 세포의 이동성을 분석하였다. 아무것도 처리되지 않은 Control 세포는 평균 2-3 $\mu\text{m}/\text{min}$ 의 속도를 보였으며, 0.05%와 0.1%의 농도에서는 세포 이동 속도가 Control과 큰 차이를 보이지 않았다. 하지만 그보다 높은 농도인 0.25%에서는 Control보다 이동성이 유의미하게 감소하였으며 0.5% DMSO에서는 거의 움직이지 않았다(그림 1). 이 결과는 0.1% 이하의 DMSO 농도에서는 세포의 이동성이 영향을 받지 않지만 그 이상의 농도에서는 세포이동이 영향을 받는다는 것을 나타내 준다. DMSO를 용매로 할 경우, DMSO의 최종 농도가 0.1% 이하가 되도록 화합물 용액을 준비하여 실험해야 한다는 것을 시사해 준다.

LY294002가 세포이동에 미치는 영향을 조사하기

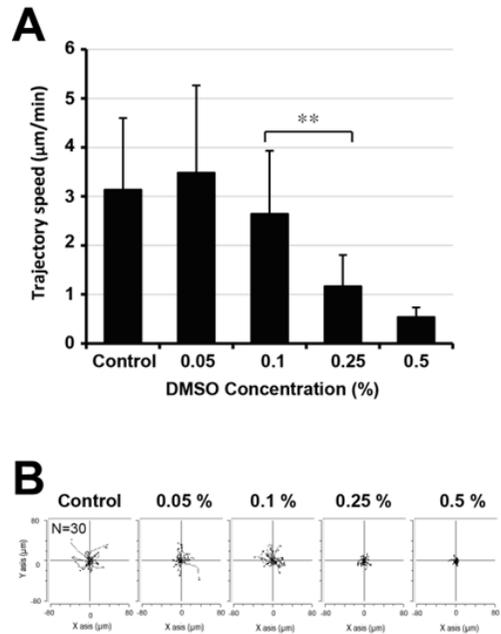


그림 1. DMSO 농도에 따른 세포 이동성

(A) 다양한 농도에서 DMSO를 처리 후, Wild-type KAx3 세포의 이동 속도 분석. DMSO를 그래프에 적혀있는 농도로 30분 동안 처리 후, 10분간의 세포이동 속도를 정량화하였다. (B) Wild-type KAx3 세포의 DMSO 농도별 세포 이동 궤적. 30 마리의 세포를 분석하였으며 10분 동안 세포가 이동한 궤적을 표시하였다. 데이터는 \pm S.E.M을 의미한다. 세 번의 독립적인 실험에서 얻은 결과를 통계적 분석하여 Student's t-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 을 사용하여 표시하였다.

위하여 LY294002를 5 μM 부터 15 μM , 30 μM , 50 μM 로 30분 동안 처리하였다. 이후 30분 동안 세포 이동을 촬영 분석하였다. 아무것도 처리하지 않은 Control 세포는 2-3 $\mu\text{m}/\text{min}$ 속도로 이동하였고, LY294002를 처리하였을 때 30 μM 까지 농도 의존적으로 비례하여 이동 속도가 증가했다. 30 μM 의 LY294002가 처리되었을 때 이동 속도가 6-7 $\mu\text{m}/\text{min}$ 로 가장 증가하였다. 하지만 50 μM LY294002를 처리하였을 때는 30 μM 처리하였을 때 보다는 감소한 이동 속도를 보였다(그림 2). 이러한 결과는 PI3K 억제제인 LY294002에 의해 세포 이동이 증가함을 보여 주는 것이다. 또한 PI3K가 LY294002에 의해 억제되면 세포의 이동성이 증가

한다는 것을 나타내는 결과로서 PI3K는 본 실험 조건에서는 세포이동성을 억제하는 역할을 한다는 것을 나타내준다.

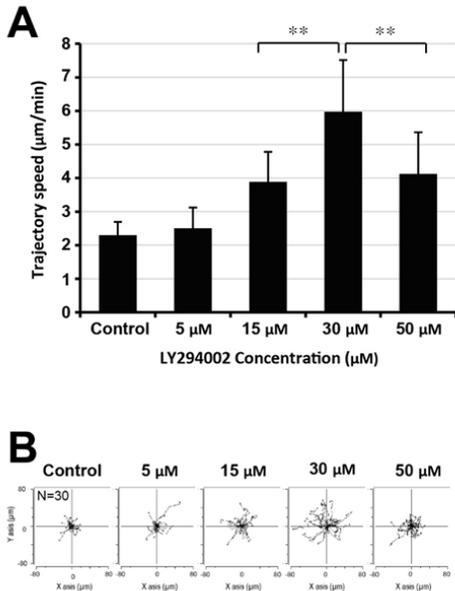


그림 2 LY294002 농도에 따른 세포 이동성

(A) Wild-type KAx3 세포의 LY294002 농도별 처리 시 세포 이동 속도의 정량적 분석. LY294002를 그래프에 적혀있는 농도로 30분 동안 처리 후, 10분간의 세포이동 속도를 측정하였다. (B) Wild-type KAx3 세포의 LY294002 농도별 세포 이동 궤적. 30마리의 세포를 분석하였으며 10분 동안 세포가 이동한 궤적을 표시하였다. 데이터는 \pm S.E.M을 의미한다. 세 번의 독립적인 실험에서 얻은 결과를 통계적 분석하여 Student's t-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 을 사용하여 표시하였다.

4. 고찰

본 실험에서는 다음과 같은 결과를 얻었다. DMSO의 농도는 0.1% 이하에서 세포의 이동성에 영향을 미치지 않는다. 0.1% 이하 농도의 DMSO가 처리되었을 때, 이동성과 세포의 모양이 아무것도 처리하지 않은 Control과 거의 같았다. 그와 다르게 0.25% 이상의 농도에서 세포 이동성이 떨어졌고, 0.5%에서는 완전히 이동성을 잃어버리는 모습을 보여주었다. LY294002를 세포에 처리하였을 때, 30 μ M까지 농도에 비례하여 세포의 이동 속도가

증가하였고, 30 μ M 농도에서 최대속도를 보였다. LY294002는 PI3K 억제제이다. 그리고 PI3Ks는 Chemotaxis에 중요한 역할을 한다고 보고되었다. LY294002가 처리되었을 때, Chemotaxis 능력이 저하되어 세포의 방향성과 이동 속도가 떨어진다고 보고되었다. *pi3k1/2* 결핍 세포는 주화성 세포이동을 하는 동안 방향성과 이동 속도가 감소하였다^[13]. 앞선 연구 결과들을 토대로 우리는 LY294002를 처리하였을 때, 세포의 무작위적인 이동성이 감소할 것으로 예상하였으나 예상과는 반대로 세포의 이동 속도가 증가하는 것으로 관찰되었다. 기존의 발표된 결과와 본 연구 결과의 차이가 발생한 이유는 다음과 같은 원인에 의해 초래된 것으로 추론된다.

각 연구에서 사용한 세포의 상태가 다르기 때문으로 생각된다. 기존의 주화성 이동 연구에서는 발생단계가 진행된 aggregation-competent 상태의 세포를 이용한 반면, 본 연구에서는 vegetative 상태의 세포를 사용하였다. *Dictyostelium*은 세포의 환경에 따라 다른 형태와 다른 신호전달 경로를 발현하게 된다. *Dictyostelium*의 생활사를 보면, 먹이가 풍부할 때에는 단세포 생활을 하다가 (vegetative state) 먹이가 부족하여 기아 상태에 빠지게 되면 다세포체가 되기 위한 발생 단계를 거치게 된다 (aggregation-competent state). 이때, 발생 단계 사이에서 세포 내의 신호전달을 위해 많은 유전자가 발현되며 세포 이동성에도 많은 변화가 일어난다.

본 연구 결과, LY294002를 처리했을 때 세포의 이동성이 증가한 이유 중의 하나는 세포 내 Ca^{2+} 의 증가에 의한 것일 수 있다. 일부 논문에서 정자에 LY294002를 처리하였을 때, 세포 내 Ca^{2+} 이 증가한다고 보고되었다^[16]. 또한, 심장 근육세포에서 LY294002는 Ca^{2+} 을 방출시켜 근 세포를 수축시킨다는 결과도 보고되었다^[18]. 또한, 비만 세포에서 LY294002로 인해 억제된 PI3K가 세포 내 Ca^{2+} 과 K^+ 에 관여하는 이온 채널의 활동을 조절한다고 보고된 바 있다^[15]. 이를 미루어 보았을 때 LY294002에 의한 세포 내 Ca^{2+} 의 변화가 세포 이동에 영향을 미쳤을 가능성이 있다. 세포의 발달 단계에 따른 LY294002와 PI3Ks의 역할과 Ca^{2+} 신호전달 경로와 세포이동의 연관성에 대한 추가적인 실험이 필요하다.

참고문헌

- [1] Jin T, Xu X, Fang J, Isik N, Yan J, Brzostowski JA, Hereld D. How human leukocytes track down and destroy pathogens: lessons learned from the model organism *Dictyostelium discoideum*. *Immunol Res*, Vol. 43, (1-3) pp. 118-27, 2009.
- [2] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, Vol. 302, pp 1704-1709, 2003.
- [3] Chisholm RL, Firtel RA. Insights into morphogenesis from a simple developmental system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Vol. 5, pp. 531. 2004
- [4] Lee MR, Jeon TJ. Cell migration: regulation of cytoskeleton by Rap1 in *Dictyostelium discoideum*. *J Microbiol*. Vol. 50, pp. 555-561. 2012
- [5] Zhang, P., Y. Wang, H. Sesaki, and M. Iijima. Proteomic identification of phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate - binding proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. Jun 29;107(26) pp. 11829-34. 2010.
- [6] Merlot S, Firtel RA. Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci*. Vol. Sep 1;116(Pt 17) pp. 3471-8. 2003
- [7] Kortholt A, van Haastert PJ. Highlighting the role of Ras and Rap during *Dictyostelium* chemotaxis. *Cell Signal*. Vol. Aug;20(8) pp. 1415-22. 2008
- [8] Sasaki AT, Firtel RA. Regulation of chemotaxis by the orchestrated activation of Ras, PI3K, and TOR. *Eur J Cell Biol*. Vol. Sep;85(9-10) pp. 873-95. 2006
- [9] Yumura S, Fukui Y. Filopodelike projections induced with dimethyl sulfoxide and their relevance to cellular polarity in *Dictyostelium*. *J Cell Biol*. Vol. Mar;96(3) pp. 857-65. 1983
- [10] Litschko C, Damiano-Guercio J, Brühmann S, Faix J. Analysis of Random Migration of *Dictyostelium* Amoeba in Confined and Unconfined Environments. *Methods Mol Biol*. Vol. 1749 pp. 341-350. 2018
- [11] Gao R, Zhao S, Jiang X, Sun Y, Zhao S, Gao J, Borleis J, Willard S, Tang M, Cai H, Kamimura Y, Huang Y, Jiang J, Huang Z, Mogilner A, Pan T, Devreotes PN, Zhao M. A large-scale screen reveals genes that mediate electrotaxis in *Dictyostelium discoideum*. *Sci Signal*. Vol. May 26;8(378): ra50. 2015
- [12] Nishio M, Watanabe K, Sasaki J, Taya C, Takasuga S, Iizuka R, Balla T, Yamazaki M, Watanabe H, Itoh R, Kuroda S, Horie Y, Förster I, Mak TW, Yonekawa H, Penninger JM, Kanaho Y, Suzuki A, Sasaki T. Control of cell polarity and motility by the PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase SHIP1. *Nat Cell Biol*. Vol. Jan;9(1) pp 36-44. 2007
- [13] Chisholm, R.L., and Firtel, R.A. Insights into morphogenesis from a simple developmental system. Vol. 5, pp. 531. 2004
- [14] Lam RS, Shumilina E, Matzner N, Zemtsova IM, Sobiesiak M, Lang C, Felder E, Diel P, Huber SM, Lang F. Phosphatidylinositol -3-kinase regulates mast cell ion channel activity. *Cell Physiol Biochem*. Vol. 22 (1-4) pp. 169-76. 2004
- [15] Nauc V, De Lamirande E, Leclerc P,

- Gagnon C. Inhibitors of phosphoinositide 3-kinase, LY294002 and wortmannin, affect sperm capacitation and associated phosphorylation of proteins differently: Ca^{2+} -dependent divergences. *J Androl.* Vol. Jul-Aug;25(4) pp. 573-85. 2004
- [16] Sun H, Oudit GY, Ramirez RJ, Costantini D, Backx PH. The phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002 enhances cardiac myocyte contractility via a direct inhibition of $I_{K,s}$ currents. *Cardiovasc Res.* Vol. Jun 1;62(3) pp. 509-20. 2004