

## Identification of N-terminal amino acids of ApPDE4 involved in targeting to plasma membrane and cellular morphological change by expression of N-terminal peptide

Kun-Hyung Kim<sup>1</sup>, Yong-Woo Jun<sup>1</sup>, Jin-A Lee<sup>2,★</sup> and Deok-Jin Jang<sup>1,★</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Biology, College of Ecology and Environment, Kyungpook National University

<sup>2</sup>Department of Biological Science and Biotechnology, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University

(Received January 11, 2013; Revised February 5, 2013; Accepted February 5, 2013)

### 원형질막 타기팅에 필요한 ApPDE4의 N-말단의 아미노산 서열 분석 및 발현에 의한 형태적 변화

김건형<sup>1</sup> · 전용우<sup>1</sup> · 이진아<sup>2,★</sup> · 장덕진<sup>1,★</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 생태환경대학 생물응용전공, <sup>2</sup>한남대학교 생명나노과학대학 생명시스템학과  
(2013. 1. 11. 접수, 2013. 2. 5. 수정, 2013. 2. 5. 승인)

**Abstract:** PDE plays an important role in cAMP-mediated cellular signaling within the cells. The proper targeting of each PDE is mediated by unique N-terminal of each PDE isoform. It has been recently reported that supershort-, short- and long-forms of PDE4 in *Aplysia* were cloned in *Aplysia*. Long-form of ApPDE4 was localized at plasma membrane and presynaptic terminal in *Aplysia* sensory neurons. However, it remains elusive which part of ApPDE4 is minimal region for the proper targeting and what are the effects on the cell functions. Here, we identified that N-terminal 13 amino acids of ApPDE4 long-form is minimal regions for the plasma membrane targeting. In addition, overexpression of ApPDE4(N20)-mRFP could induce morphological changes in HEK293T cells. Interestingly, mRFP-PLC $\delta$ 1(PH), which selectively binds to PI4,5P<sub>2</sub>, could induce morphological changes in similar with that by ApPDE4(N20)-mRFP. These results suggested that binding of ApPDE4(N20) to lipids including PI4,5P<sub>2</sub> might be responsible for targeting of ApPDE4 to plasma membrane and morphological changes in HEK293T cells.

**요 약:** Phosphodiesterase (PDE)는 세포내의 cAMP를 분해하는 효소로 세포의 신호 전달에 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려져 왔다. 각각의 PDE들은 N-말단의 서열을 통해 세포 내 특정 부위로 이동되어 기능을 수행한다. 이전의 연구를 통해 바다달팽이인 *군소*에서 새롭게 클로닝된 ApPDE4 long-form이 원형질막과 시냅스전 뉴런의 말단에 발현됨을 확인하였다. 그러나, 현재까지 이러한 세포내 작용부위의 이동, 즉 타기팅(targeting)에 필요한 최소부위가 어디인지, 이러한 타기팅이 세포에 미치는 영향은 무엇인지는 보고되지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 이를 알아보기 위해 첫째, 원형질막으로 타기팅에 필

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)54-530-1213, +82-(0)42-629-8785 Fax : +82-(0)54-530-1218, +82-(0)42-629-8789

E-mail : jangdj@knu.ac.kr, leeja@hnu.kr

요한 최소부위를 알아 보고자 하였다. 이를 위해 다양한 결실돌연변이체를 제작하고, 이들의 이동과 분포를 확인한 결과, N-말단 13개의 아미노산만으로도 원형질막으로 타겟팅에 충분하다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, ApPDE4 N-말단의 20개 아미노산을 mRFP에 융합해서 만든 ApPDE4(N20)-mRFP를 HEK293T 세포에 과발현시킨 결과, 기포(bleb)가 생성되는 세포의 비정상적인 형태 변화가 관찰 되었다. 이러한 형태적 변화는 ApPDE4가 원형질막으로 타겟팅되는 것과 관련이 있었다. 대표적인 인지질의 하나인 PI4,5P<sub>2</sub>에 선택적으로 결합함으로써 원형질막으로 타겟팅되는 단백질인 mRFP-PLCδ1(PH)의 과발현도 ApPDE4(N20)-mRFP와 비슷한 세포의 형태적 변화가 유도됨을 확인할 수 있었다. ApPDE4의 N-말단은 PI4,5P<sub>2</sub>와 같은 인지질과의 결합으로 원형질막으로 타겟팅될 수 있고, 형태적 변화를 유도하는 가능성을 제시한다.

**Key words:** PDE4, membrane targeting, PI4,5P<sub>2</sub>

## 1. 서 론

Phosphodiesterase (PDE)는 세포내에서 cAMP를 분해하는 효소로, 세포의 중요한 신호경로인 cAMP 신호전달경로에서 중요한 역할을 수행하고 있다. PDE는 현재까지 포유류에서 21 개의 유전자가 알려져 있고, 기질의 종류와 결합성에 따라 PDE1-11로 나뉘어져 있다.<sup>1</sup> 예를 들어 PDE4, 7, 8은 기질로 cAMP 만을 선택적으로 사용하고, PDE5, 6, 9의 경우는 cGMP만을 선택적으로 사용한다.<sup>2</sup> 나머지 PDE들은 cAMP와 cGMP를 모두 기질로 이용한다.

PDE4는 A, B, C, D 등 4 개의 isoform으로 구별되며, 약 20 개의 변이체가 선택적 접합과정을 통해 만들어진다고 알려져 있다.<sup>3</sup> 이들의 분자 구조를 살펴보면, 특이한 N-말단, UCR1 (upstream conserved region 1), UCR2, PDE 활성 부위로 구분된다. Long-form의 경우는 독특한 구조로 특이적 N-말단과 UCR1, UCR2, PDE 활성 부위를 모두 포함하고, short-form의 경우는 특이적 N-말단과 UCR2, PDE 활성 부위를, supershort-form의 경우는 특이적 N-말단과 PDE 활성 부위만을 포함한다.<sup>4</sup> 이전의 연구를 통해 바다 달팽이인 *Aplysia*에서 세 종류의 PDE4 (supershort-form, short-form, long-form)를 클로닝하였다.<sup>5,6</sup> 흥미롭게도 이러한 다양한 PDE4 isoform들은 세포 내 특정 부위로 타겟팅되어 기능을 수행한다고 알려져 있다. 예를 들면, PDE4의 UCR2는 myomegalin, Disc1과 결합해서 골지체나 미토콘드리아에서 기능을 한다고 알려져 있다.<sup>7,8</sup> 많은 경우에 세포 내 특정 부위로의 타겟팅은 N-말단이 특정 단백질과의 상호작용을 통해 이루어진다고 알려져 있다. 예를 들어, PDE4A/5와 PDE4D4의 N-말단에는 아미노산인 프로린이 풍부한

(proline-rich) 서열을 갖고 있어 Lyn/Fyn/Src과 같은 tyrosine kinase와의 결합을 통해 원형질막으로 타겟팅한다.<sup>9-11</sup> 또한, PDE4D5의 N-말단은 β-arrestin이나 RACK1과 결합을 한다고 알려져 있다.<sup>12,13</sup>

이처럼 N-말단이 특정 단백질뿐 아니라 막과의 직접적인 결합을 해서 세포 내 특정 부위로 이동되는 PDE4는 포유류에서는 유일하게 PDE4A1가 알려져 있다. 뇌에 많이 발현되는 PDE4A1의 경우는 N-말단의 25개 아미노산이 막에 직접 결합을 해서 골지체에 위치한다고 보고되었다.<sup>14</sup> 다른 연구에서는 N-말단에는 helix-1과 helix-2로 불리는 두 개의 다른 부위가 골지체로 이동하는 것에 관여한다고 보고하고 있다.<sup>15</sup> Helix-1은 막에 결합하거나, 이동성 골지체(Trans-Golgi network, TGN)로 타겟팅 하는데 관여하고, helix-2는 TAPAS-1으로 불리며, 칼슘과 막에 결합을 한다고 보고하고 있다.<sup>16</sup> 또한, 최근에 본 연구자에 의해 바다 달팽이인 *Aplysia*에서 클로닝된 ApPDE4 long-form의 경우도 N-말단의 20 개 아미노산 만으로도 원형질막으로의 이동과 시냅스전 뉴런의 말단에서의 발현에 충분하다는 것을 보고 하였고, 이러한 타겟팅에 막지질과의 결합이 관여할 가능성을 보고하였다.<sup>5</sup> 그러나, 아직 이러한 막으로의 타겟팅에 필요한 최소부위와 기능적 부위는 어디인지, 타겟팅되는 분자적 기전은 아직 알려져 있지 않다.

따라서, 본 연구에서는 ApPDE4 long-form의 원형질막과 세포 내 다른 막성기관으로 타겟팅에 필요한 최소 부위를 찾고자 했다. 이를 위해 결실돌연변이 (deletion mutant)를 제작하여 조사한 결과 N-말단에 존재하는 13 개의 아미노산만으로도 충분히 원형질막으로 타겟팅 됨을 알 수 있었다. 또한, ApPDE4 N-말단을 HEK293T 세포에서 과발현시켰을 때 세포의 비

정상적인 형태적 변화를 유도하며, 이러한 형태적 변화가 원형질막으로의 타겟팅과 관련이 있었다. 또한, PI4,5P<sub>2</sub>에 결합한다고 알려진 mRFP-PLCδ1(PH)를 발현시킨 결과 비슷한 결과가 유도되는 것으로 보아, ApPDE4가 원형질막으로 타겟팅 되는것은 이 인지질과의 결합 때문일 것으로 가정해 볼 수 있다. 이러한 연구는 세포 내 원형질막 및 막성소기관으로의 단백질 타겟팅 연구와 이로 인한 세포의 형태변화 연구에 흥미로운 단서를 제공할 수 있을 것이다.

## 2. 재료 및 실험 방법

### 2.1. DNA 제작

이전에 보고한 pcDNA3.1-ApPDE4(N20)-EGFP를 *Xba*I/*Apa*I으로 절단하고, mRFP-*Xba*I-S/mRFP-*Apa*I-A 프라이머를 이용해 PCR을 통해 얻은 mRFP를 *Xba*I/*Apa*I으로 절단하고 삽입하여 pcDNA3.1-ApPDE4(N20)-mRFP를 제작하였다.<sup>5</sup> 다른 결실돌연변이는 다음과 같은 프라이머들을 이용해 각각 PCR을 수행하였다(Table 1): pcDNA3.1-ApPDE4(N16)-mRFP, ApPDE4-D3-S/ApPDE4(N16)-*Xba*I-A; pcDNA3.1-ApPDE4(N13)-mRFP, ApPDE4-D3-S/ApPDE4(N13)-*Xba*I-A; pcDNA3.1-ApPDE4(N10)-mRFP, ApPDE4-D3-S/ApPDE4(N10)-*Xba*I-A; pcDNA3.1-ApPDE4(N4/20)-mRFP, ApPDE4(N4)-D3-S/ApPDE4(N20)-*Xba*I-A. 이렇게 얻은 PCR 결과물들을 *Hind*III/*Xba*I으로 절단하고, pcDNA3.1-hCERT(PH)-mRFP를 *Hind*III/*Xba*I으로 절단하여 삽입하였다. 점돌연변이 중 pcDNA3.1-ApPDE4(N20,C3S)-mRFP, pcDNA3.1-ApPDE4(N20,C14,15S)-mRFP, pcDNA3.1-ApPDE4(N20,C3,14,15S)-mRFP의 경우는 이전의 연구에서 사용했던 pcDNA3.1-ApPDE4(N20, C3S)-EGFP, pcDNA3.1-ApPDE4(N20,C14,15S)-EGFP, pcDNA3.1-ApPDE4(N20,C3,14,15S)-EGFP를 *Xba*I/*Apa*I으로 절단하고, pcDNA3.1-ApPDE4(N20,C3S)-mRFP를 *Xba*I/

*Apa*I로 절단한 부위에 삽입함으로써 제조하였다. 다른 점돌연변이들은 각각의 점돌연변이를 유도하는 프라이머들을 이용해 재조합 PCR을 수행해서 PCR 결과물을 얻은 후 *Hind*III/*Xba*I으로 절단하고, pcDNA3.1-hCERT(PH)-mRFP를 *Hind*III/*Xba*I 부위에 삽입함으로써 제조하였다.

### 2.2. 세포 배양 및 DNA transfection

HEK293T 세포는 10% FBS+Penicillin/streptomycin + DMEM 배양액에서 37 °C (w/ 5% CO<sub>2</sub>) 세포 배양기를 이용해 배양하였다. DNA transfection을 위해 HEK cell을 4 well chamber로 옮기고 Ca<sup>2+</sup>-phosphate 방법을 이용해 transfection을 수행하고 다음날, 공초점 현미경(Carl Zeiss)을 이용해 영상을 획득하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. ApPDE4의 원형질막으로 타겟팅에 관여하는 N-말단 아미노산서열 분석 및 동정

바다달팽이인 군소(Aplysia)에서 클로닝된 ApPDE4는 N-말단의 20 개의 아미노산이 원형질막과 세포 내 막성기관으로 타겟팅에 관여한다는 것을 최근의 연구를 통해 보고하였다.<sup>5</sup> 그러나, 원형질막 타겟팅에 필요한 최소부위와, 각각의 아미노산들의 기능, 그리고 이것들의 발현이 세포에 미치는 영향에 대해서는 알려진 바가 없다.

따라서, 이를 조사하기 위해 우선 ApPDE4 N-말단을 mRFP와 융합시켜 HEK293T 세포에서 과발현시켰다. ApPDE4(N20)-mRFP의 발현초기에는 이전의 연구 결과에서처럼 원형질막과 세포내 막성 소기관으로 타겟팅 되는 것을 확인하였다(Fig. 1). 그 다음으로, 다양한 결손부위 돌연변이체를 만들어, 원형질막 타겟팅의 최소부위를 찾아 보았다. 이를 위해 N-말단의 20 개의 아미노산 중에 C-말단쪽에서 각각 4 개, 7 개,

Table 1. List of oligonucleotides and their sequences

Name	Sequence
ApPDE4-D3-S	5-GCTCTAGAGACGTGGTCAACCTTCAG-3
ApPDE4(N20)- <i>Xba</i> I-A	5-GCTCTAGATTGTTCTTCTTCCATACA-3
ApPDE4(N16)- <i>Xba</i> I-A	5-GCTCTAGACATACAGCAGCTTATCCA-3
ApPDE4(N13)- <i>Xba</i> I-A	5-GCTCTAGAGCTTATCCAGTGTCTAAT-3
ApPDE4(N10)- <i>Xba</i> I-A	5-GCT CTAGAGTGTCTAATAGCGGGAAG-3
ApPDE4(N4)-D3-S	5-CGCCCA AGCTTGCCACCATGTTGCTTCCCGCTATTAGA-3
mRFP- <i>Xba</i> I-S	5-GCTCTAGAATGGCCCTCCTCCGAGGAC-3
mRFP- <i>Apa</i> I-A	5-CGTAGGGCCCTTAGGCGCCGGTGGAGTG-3

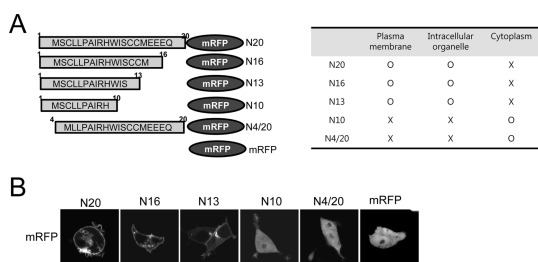


Fig. 1. Expression pattern of various deletion mutants of ApPDE4 (N20) and their effects on cell morphology in HEK293T cells. (A) Schematic diagrams (left) and summary of cellular localization of ApPDE4 deletion mutants (left) in HEK293T cells. Amino acid sequences of each mutant construct are represented within the box. (B) Expression pattern of mRFP fused to various ApPDE4 deletion mutants in HEK293T cells. Each mutant construct was transfected in HEK293T cells. N20, ApPDE4(N20)-mRFP; N16, ApPDE4(N16)-mRFP; N13, ApPDE4(N13)-mRFP; N10, ApPDE4(N10)-mRFP; N4/20, ApPDE4(N4/20)-mRFP. Scale bar, 20 μm.

10 개의 아미노산을 제거한 ApPDE4(N16)-mRFP, ApPDE4(N13)-mRFP, ApPDE4(N10)-mRFP를 제작하였다(Fig. 1A). 또한, N-말단 쪽에서 3 개를 제거한 N4/20도 제작했다(Fig. 1A). 이들을 ApPDE4(N20)-mRFP와 마찬가지로 각각 mRFP와 융합하여 HEK293T 세포에 발현시켰다. 그 결과 ApPDE4(N16)-mRFP와 ApPDE4(N13)-mRFP의 경우는 ApPDE4(N20)-mRFP와 비슷하게 원형질막으로 타겟팅 됨을 확인 하였다(Fig. 1B). 그러나, 3 개의 아미노산을 더 줄인 N10의 경우는 세포막으로 타겟팅 되는 성질을 잃어버리고, mRFP와 비슷한 발현 패턴을 보였다.

다음으로, N-말단 펩타이드에서 아미노산의 역할을 조사하기 위해 N20에서 N-말단쪽 3 개의 아미노산을 제거한 ApPDE4(N4/20)-mRFP를 제작해 세포에서 발현을 시켰다. 그 결과, 원형질막으로 타겟팅되는 성질을 잃고 세포질에 전반적으로 확산되어 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 1B). N-말단 펩타이드에서 N-말단 쪽은 3 개의 아미노산만을 줄여도 mRFP와 유사한 발현 패턴이 나타나는 것으로 보아, 이 부위가 막 타겟팅에 중요한 역할을 수행함을 알 수 있었다. 또한 결실돌연변이를 이용한 실험 결과, ApPDE4 N-말단의 13 개의 아미노산이 원형질막으로 타겟팅에 필요한 최소 부위임을 알게 되었다.

단백질의 성질을 분석해주는 DNASTAR의 protean 프로그램을 이용해 ApPDE4 N-말단의 서열을 분석해 보면 막통과 부위는 존재하지 않으며 대신 N말단의

아미노산 4-13번(MSCL<sub>4</sub>LPAIRHWIS<sub>13</sub>CCM)은 양친매성 부위임을 확인할 수 있었다. 이러한 사실은 N-말단이 막의 지질과 결합해서 원형질막으로 타기팅 될 수 있을 가능성을 제시한다. 이는 N13이 원형질막 타겟팅에 최소 부위임을 보여주는 결과와도 일치하는 것을 알 수 있다.

### 3.2. ApPDE4(N20)의 점 돌연변이를 이용한 세포 내 원형질막 타겟팅에 관여하는 아미노산 특성 분석

다음으로 N20으로 다양한 점돌연변이를 도입하고 세포 내 타겟팅에 중요한 아미노산 성질을 분석하고자 하였다. 아미노산 시스테인(cysteine)은 결과지에 존재하는 -SH기에 palmitate기가 결합하거나 이황화 결합을 할 수 있는 등 다양한 변형이 가능하여, 세포 내에서 여러 기능을 수행하는 아미노산으로 알려져 있다. 이전의 연구에서 이를 테스트하기 위해 N-말단에 존재하는 3 개의 시스테인 자리를 순차적으로 세린(serine)으로 치환한 돌연변이들을(C3S, C14,15S, C3,14,15S) 만들어 세포 내 타겟팅을 조사하여 보고 하였다.<sup>5</sup> 본 연구에서는 이들을 포함해 좀더 많은 돌연변이체를 제작하고(C3S, C14,15S, C3,14S, C3,15S, C3,14,15S), 이들의 세포내 위치를 조사하였다(Fig. 2A). ApPDE4(N20,C3S)-mRFP의 경우는 ApPDE4(N20)-mRFP와 마찬가지로 원형질막으로 타겟팅 됨을 알 수 있었다(Fig. 2B). 반면에 ApPDE4(N20,C14,15S)-mRFP의 경우는 원형질막에는 타겟팅 되지 않고 세포 내 막성 기관에 타겟팅 됨을 알게 되었다. 이전의 연구를 통해 이것이 이동성 골지체(Trans-Golgi Network, TGN)인

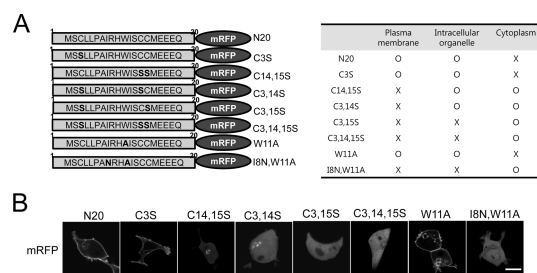


Fig. 2. Expression pattern of various point mutants of ApPDE4(N20) and their effects on cell morphology in HEK293T cells. (A) Schematic diagrams (left) and summary of cellular localization of each ApPDE4 (N20) mutants (right) in HEK293T cells (right). Amino acid sequences of each mutant construct are represented within the box. (B) Expression pattern of mRFP fused to various ApPDE4(N20) mutants in HEK293T cells. Each mutant construct was transfected in HEK293T cells. Scale bar, 20 μm.

을 알 수 있었다.<sup>5</sup> ApPDE4(N20,C3,14S)-mRFP의 경우도 ApPDE4(N20,C14,15S)-mRFP와 비슷하게 원형질막으로 타겟팅되지 않고 세포 내 막성기관에 타겟팅됨을 확인 하였다(Fig. 2B). 반면, ApPDE4(N20,C3,15S)-mRFP와 ApPDE4(N20,(C3,14,15S)-mRFP의 경우는 세포막으로 타겟팅되는 성질을 잃고 mRFP와 유사한 발현패턴을 보였다(Fig. 2B).

다음으로 ApPDE4 N-말단에 존재하는 트립토판(tryptophan)을 알라닌(alanine)으로 치환하였다(ApPDE4(N20,W11A)-mRFP). 트립토판의 경우도 링구조의 단백질 결사슬로 인해 단백질 상호작용이나 단백질-지질 상호작용에 관여한다고 알려져 있다. 그러나, 이 돌연변이의 경우는 ApPDE4(N20)-mRFP와 발현패턴에 차이가 없었다. 이 돌연변이에 8번째 이소루신(isoleucine, I)을 아스파라진(asparagines, N)으로 치환시킨 ApPDE4(N20,I8N,W11A)-mRFP를 발현시킨 결과와 mRFP와 유사한 발현패턴을 보였다.

점돌연변이를 이용한 실험 결과를 분석해 보면, N20, N20(C3S), N20(W11A)는 원형질막과 세포내 막성기관으로 타겟팅에 관여되며, N20(C14,15S), N20(C3,14S)는 원형질막 타겟팅 성질을 잃어버리지만, 세포 내 막성기관으로 타겟팅됨을 알 수 있었다. N20(C3,15S)와 N20(C3,14,15S)와 N20(I8N,W11A)는 mRFP와 비슷한 발현패턴을 보이는 것으로 보아, 막으로 타겟팅되는 성질을 잃는 것으로 판단되었다. 즉, ApPDE4 N-말단에는 막에 결합하는 부위와 특정막으로 타겟팅에 필요한 부위가 존재함을 알 수 있으며, N-말단 13 개의 아미노산 내에 이러한 부위가 존재한다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한, N-말단에 존재하는 각각의 아미노산들의 특정 서열들이 특정 막으로의 타겟팅에 중요하다는 사실을 확인할 수 있었다.

### 3.3. 세포내 ApPDE4 (N20)-mRFP 돌연변이체의 과발현 효과 분석

다음으로 ApPDE4(N20)-mRFP의 과발현이 세포에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위해 ApPDE4(N20)-mRFP를 HEK293T 세포에 과발현시키고 조사한 결과 흥미롭게도 시간이 지남에 따라 ApPDE4(N20)-mRFP가 발현된 세포의 형태가 현저하게 변함을 알 수 있었다(Fig. 3A). 세포의 크기가 줄어드는 수축(retraction)이 일어나며, 부분적으로 돌기(process)를 형성함을 알 수 있었다. 시간이 점점 지남에 따라 세포가 본래의 모양을 잃고 작고 둥글게 변하여 돌기 부분에 분절이 일어나는 세포사멸과 비슷한 형태적 변화가 일어남을

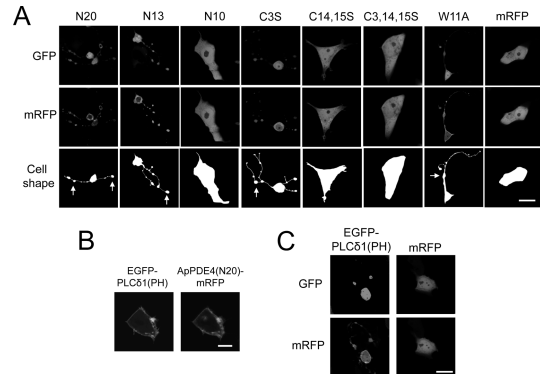


Fig. 3. Morphological change induced by expression of ApPDE4 mutants and PLC $\delta$ 1(PH). (A) Morphological change induced by various ApPDE4 N-terminal mutants. mRFP fused to various ApPDE4 N-terminal mutants was co-expressed with EGFP in HEK293T cells. As a control, mRFP was used. Cell shape (bottom figures) showed the representative cell morphology of corresponding mRFP/EGFP expressing cells. (B) Co-localization of EGFP-PLC $\delta$ 1(PH) with ApPDE4(N20)-mRFP in HEK293T cells. (C) Morphological change induced by mRFP-PLC $\delta$ 1(PH). mRFP-PLC $\delta$ 1(PH) was co-expressed with EGFP in HEK293T cells. As a control, mRFP was used. Scale bar, 20  $\mu$ m.

확인 하였다. 반면, 대조군으로 이용한 mRFP를 발현시킨 경우에 있어서는 세포질 전체에 발현이 되며 뚜렷한 세포의 형태적 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3A).

다음으로 앞선 실험에서 이용한 다양한 ApPDE4 돌연변이체를 발현시켰다. 원형질막으로 타겟팅되는 N16, N13, C3S, W11A의 경우는 발현된 세포에서 형태적 변화를 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 반면, 원형질막으로 타겟팅되지 않지만 세포 내 막성기관으로 타겟팅되는 C14,15S와 막으로 타겟팅되지 않는 C3,14,15S와 N10의 경우에는 발현된 세포에서 형태변화가 유도되지 않음을 알 수 있었다. 이를 통해, ApPDE4(N20)-mRFP의 발현에 의해 유도되는 세포의 형태변화는 원형질막 타겟팅과 연관이 있음을 알 수 있다.

ApPDE4의 N-말단은 어떻게 원형질막으로 타겟팅되는가? 막통과 부위를 가지지 않은 ApPDE4가 원형질막으로 타겟팅되는 것은 다양한 지질 성분과의 결합을 통해 이루어질 것으로 생각된다. 또한 이전의 연구에서 ApPDE4가 여러 종류의 막지질과 결합할 수 있음을 보고한 바 있다.<sup>5</sup> 흥미롭게도, 인지질들은 특정 세포소기관으로의 타겟팅을 위한 마커로 작용할 수 있다.<sup>17</sup> PI4P는 이동성 골지체의 마커로 작용되고, PI3P는 초기 엔도솜(early endosome)의 마커로, PI4,5P<sub>2</sub>

와 PI3,4,5P<sub>3</sub>는 원형질막으로의 마커로 작용해 다양한 종류의 단백질들이 이들 인지질과 결합해 세포 내 다양한 막으로 타겟팅된다. 그 예로, PLC $\delta$ 1의 PH domain은 PI4,5P<sub>2</sub>에 결합해 원형질막의 세포질 표면으로 타겟팅되는 것이 알려져 있다.<sup>17</sup> 따라서, 가정해 볼 수 있는 가설은 ApPDE4 N-말단이 PI4,5P<sub>2</sub>나 PI3,4,5P<sub>3</sub>에 결합해서 원형질막으로 타겟팅되는 것이다.

따라서, 본 연구에서는 PI4,5P<sub>2</sub>에 선택적으로 결합해 원형질막으로 타겟팅되는 PLC $\delta$ 1의 PH domain을 GFP 또는 mRFP에 융합하여, HEK293T 세포에 발현시켜 세포의 모양변화를 확인하였다. 우선, ApPDE4(N20)-mRFP와 GFP-PLC $\delta$ 1을 co-expression시킨 결과 이들이 HEK293T 세포의 원형질막에 함께 분포함(co-localization)을 알 수 있었다(Fig. 3B). ApPDE4(N20)-mRFP의 과발현이 어떻게 HEK293T 세포의 형태변화를 유도하는가? 왜 이러한 형태변화가 원형질막 타겟팅과 관련이 있는가? 지질결합으로 인한 막으로의 타겟팅이 세포의 모양변화에 관여하는가? 따라서, 다음으로 mRFP-PLC $\delta$ 1(PH)만을 과발현시켜 세포의 모양변화를 확인하였다. 그림 3D에서 확인할 수 있듯이 ApPDE4(N20)-mRFP에 의한 모양변화와 비슷한 양상으로 변화가 유도됨을 확인할 수 있었다.

PI4,5P<sub>2</sub>는 액틴 중합화(actin polymerization)에 관여한다고 알려져 있다.<sup>18</sup> PI4,5P<sub>2</sub>는 N-WASP(neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein)과 Arp2/3(actin-related protein 2/3)에 결합을 해서 이들의 활성을 향상시켜 액틴 중합화를 향상시킬 수 있다. 또한, PI4,5P<sub>2</sub>는 gelsolin 또는 cofilin/ADF (actin depolymerizing factor)에 결합해 이들의 활성을 줄임으로써 액틴 탈중합화(actin depolymerization)를 억제하여 역으로 액틴 중합화를 향상시킬 수도 있다. 따라서, 원형질막에 PI4,5P<sub>2</sub>의 양이 증가하면 포유류 세포에서 액틴 필라멘트의 조립(assembly)이 유도되고, PI4,5P<sub>2</sub>를 억제하면 액틴 골격의 결손을 유도한다. 따라서, 과발현된 ApPDE4(N20)-mRFP와 mRFP-PLC $\delta$ 1(PH)는 원형질막에서 PI4,5P<sub>2</sub>와 결합해, 이 인지질의 기능을 저해함으로써 세포의 형태 변화를 유도할 가능성이 있다. 따라서, 이러한 연구는 세포내 원형질막 및 막성소기관으로의 단백질 타겟팅 연구와 이로 인한 세포 내 형태변화 연구에 흥미로운 단서를 제공한다.

#### 4. 결 론

본 연구를 통해, ApPDE4의 N-말단 13 개의 아미노

산이 원형질막으로 타겟팅되기 위한 최소 부위임을 확인하였다. 또한, ApPDE4 N-말단의 원형질막으로 타겟팅은 HEK293T 세포에서 세포사멸과는 다른 세포의 형태적 변화를 유도함을 확인 하였다. 인지질의 하나인 PI4,5P<sub>2</sub>에 선택적으로 결합하여 원형질막으로 타겟팅되는 mRFP-PLC $\delta$ 1(PH)의 과발현도 ApPDE4(N20)-mRFP와 비슷하게 세포의 모양변화가 유도됨을 확인함으로써, ApPDE4의 N-말단은 PI4,5P<sub>2</sub>와 결합으로 원형질막에 타겟팅되며, 이를 통해 세포의 형태적 변화를 유도할 수 있을 가능성을 확인할 수 있었다.

#### 감사의 글

이 연구는 한남대학교 2012년도 교비 연구비[Hannam Research Program(2012)]의 지원으로 수행되었습니다.

#### 참고문헌

1. M. Conti and J. Beavo, *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 481-511 (2007).
2. S. L. Jin, S. L. Ding and S. C. Lin, *Chang Gung Med. J.*, **35**(3), 197-210 (2012).
3. M. D. Houslay, G. S. Baillie and D. H. Maurice, *Circ. Res.*, **100**(7), 950-966 (2007).
4. M. D. Houslay and D. R. Adams, *Biochem J.*, **370**(Pt 1), 1-18 (2003).
5. D. J. Jang, S. W. Park, J. A. Lee, C. Lee, Y. S. Chae, H. Park, M. J. Kim, S. L. Choi, N. Lee, H. Kim and B. K. Kaang, *Learn Mem.*, **17**(9), 469-479 (2010).
6. D. J. Jang, J. A. Lee, Y. S. Chae and B. K. Kaang, *Mol Cells*, **31**(2), 175-180 (2011).
7. I. Verde, G. Pahlke, M. Salanova, G. Zhang, S. Wang, D. Coletti, J. Onuffer, S. L. Jin and M. Conti, *J. Biol. Chem.*, **276**(14), 11189-11198 (2001).
8. J. K. Millar, B. S. Pickard, S. Mackie, R. James, S. Christie, S. R. Buchanan, M. P. Malloy, J. E. Chubb, E. Huston, G. S. Baillie, P. A. Thomson, E. V. Hill, N. J. Brandon, J. C. Rain, L. M. Camargo, P. J. Whiting, M. D. Houslay, D. H. Blackwood, W. J. Muir and D. J. Porteous, *Science*, **310**(5751), 1187-1191 (2005).
9. I. McPhee, S. J. Yarwood, G. Scotland, E. Huston, M. B. Beard, A. H. Ross, E. S. Houslay and M. D. Houslay, *J. Biol. Chem.*, **274**(17), 11796-11810 (1999).
10. M. B. Beard, E. Huston, L. Campbell, I. Gall, I. McPhee,

- S. Yarwood, G. Scotland and M. D. Houslay, *Cell. Signal.*, **14**(5), 453-465 (2002).
11. M. B. Beard, J. C. O'Connell, G. B. Bolger and M. D. Houslay, *FEBS Lett.*, **460**(1), 173-177 (1999).
12. G. B. Bolger, A. McCahill, E. Huston, Y. F. Cheung, T. McSorley, G. S. Baillie and M. D. Houslay, *J. Biol. Chem.*, **278**(49), 49230-49238 (2003).
13. G. B. Bolger, A. McCahill, S. J. Yarwood, M. R. Steele, J. Warwicker and M. D. Houslay, *BMC Biochem*, **3**, 24 (2002).
14. Y. Shakur, J. G. Pryde and M. D. Houslay, *Biochem J.*, **292**(Pt 3), 677-686 (1993).
15. K. J. Smith, G. Scotland, J. Beattie, I. P. Trayer and M. D. Houslay, *J. Biol. Chem.*, **271**(28), 16703-16711 (1996).
16. G. S. Baillie, E. Huston, G. Scotland, M. Hodgkin, I. Gall, A. H. Peden, C. MacKenzie, E. S. Houslay, R. Currie, T. R. Pettitt, A. R. Walmsley, M. J. Wakelam, J. Warwicker and M. D. Houslay, *J. Biol. Chem.*, **277**(31), 28298-28309 (2002).
17. G. Di Paolo and P. De Camilli, *Nature*, **443**(7112), 651-657 (2006).
18. M. R. Logan and C. A. Mandato, *Biol. Cell.*, **98**(6), 377-388 (2006).