

Rat의 후근 신경절 세포에서의 Rab11-FIP3 단백질 발현 저해가 TRPV1 채널의 세포막으로의 이동에 미치는 영향

김미란¹ · 이순열^{2*}

¹(주)바이오니아, ²한경대학교 생명공학과

Received : July 16, 2012 / Revised : August 14, 2012 / Accepted : August 15, 2012

Effect of Inhibited Rab11-FIP3 Expression on Membrane Trafficking of TRPV1 in Dorsal Root Ganglion of Rat. Kim, Miran¹ and Soon-Youl Lee^{2*}. ¹Bioneer Corporation, Daejeon 306-220, Korea, ²Department of Biotechnology, Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea - Not much is known about the membrane trafficking of TRPV1, a key player in pain transduction. Rab11-FIP3, which plays a role in various intracellular transportation pathways, has been reported to interact with TRPV1. In this study, in order to examine the role of Rab11-FIP3 in the membrane trafficking of TRPV1, Rab11-FIP3 expression in dorsal root ganglion (DRG) was inhibited using a siRNA technique. Transportation of TRPV1 to membranes was found to decrease when Rab11-FIP3 expression was inhibited, consistent with the results obtained with TRPV1-transfected HEK cells. Taken together, these results indicate that Rab11-FIP3 plays a role in the membrane trafficking of TRPV1.

Keywords: TRPV1, Rab11-FIP3, small interfering RNA (siRNA), membrane trafficking, dorsal root ganglion (DRG)

고추의 매운맛을 나타내게 하는 성분인 캡사이신의 수용체이며 통증 신호전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 캡사이신 채널 TRPV1은 TRP (transient receptor potential) family에 속해 있는 비선택적 양이온 채널로서 캡사이신, 산 또는 열에 의하여 활성화되면 양이온이 세포 내에 유입되어 막전압을 형성하고 자극이 신경계에 전달되어 통증을 유발하는 중요한 채널로 알려져 있다[3, 5, 14]. TRPV1이 기능을 못하는 mouse는 유해한 자극에 반응을 하지 못한다는 결과로부터 TRPV1이 통증 발현에 중추적인 기능을 한다고 알려진[4] 이후 TRPV1 antagonists를 이용하여 진통제 개발을 위한 임상 시험까지 많은 연구가 진행되었다[for review, 6]. TRPV1 채널의 활성 조절에 관한 기작은 인산화/탈인산화를 포함하여 많은 연구가 진행되었으나[20, 13] 막 수송 기전에 관해서는 아직 알려져 있는 것이 많지 않다. TRPV1이 phorbol ester나 metabotropic glutamate 수용체에 의하여 활성화된 PKC의 신호에 의해 적어도 부분적으로 SNARE에 의존하는 세포외배출(exocytosis) 된다는 것이 보고되었고[13] Phosphoinositide 3-kinase가 TRPV1에 결합하여 NGF에 의해 활성화된 TRPV1의 세포막 수송에 관여한다고 보고된 정도이다[16].

그러나 같은 transient receptor potential (TRP) 그룹인

TRPV5, 6의 막 수송에 Rab11이 관여한다는 결과가 보고되었는데[18] Rab11은 모든 조직 내에 어디나 존재하는 작은 GTPase로서 세포 내 재활용 부위(endocytic recycling compartment)에서 세포막으로의 단백질 수송 및 트랜스-골지 체계 사이의 수송을 조절하는 역할을 한다고 알려져 있다[2, for review, 10]. 본 연구진은 HEK293 세포에 TRPV1을 상시 발현시킨 세포주에서 TRPV1이 Rab11과 결합하는 Rab11-family interaction protein 3 (Rab11-FIP3)과 특이적으로 결합한다는 연구 결과를 최근 보고하였다[11, 12].

Rab11이 단백질 수송에 관여하기 때문에 TRPV1이 Rab11-FIP3과 결합한다는 결과로부터 Rab11-FIP3이 TRPV1의 막 수송에 역할을 할 것이라는 가정을 할 수 있다. 본 연구에서는 Rab11-FIP3가 TRPV1의 막 수송에 관여하는지를 이제까지 사용하였던 TRPV1을 HEK293 세포에 발현한 세포주가 아닌 *Rattus norvegicus* (Sprague Dawley 신생 랫드)의 후근 신경절 세포 (dorsal root ganglion, DRG)를 분리, 배양하여 실험을 수행하였다. DRG에서 상시 발현되는 Rab11-FIP3의 유전자 발현을 siRNA를 이용한 발현 저해 기법으로 저해하고 TRPV1의 세포막으로의 이동을 조사하였다. 실험 결과 rat의 후근 신경절 세포에서의 Rab11-FIP3 단백질 발현 저해는 TRPV1 채널의 세포막으로의 이동을 의미 있는 만큼 감소시킨다는 것을 면역형광법을 이용하여 확인하였다.

세포배양의 기본적인 배지로는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen, USA)을 사용하였고, HEK293T

*Corresponding author

Tel: +82-31-670-5333; Fax: +82-31-670-5333,
E-mail: sylee@hknu.ac.kr

세포 배양 시에는 10% (V/V) fetal bovine serum (TerraCell, Canada), 1%(V/V) Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, USA) 그리고 3.7 g/L의 NaHCO₃가 첨가된 DMEM 배지를 사용하였다. 기타 일반적인 시약은 Sigma에서 구입하여 사용하였다. rat TRPV1의 C말단 부위를 rabbit에 주입하여 rat TRPV1에 대한 항혈청(anti-ratTRPV1)을 취하였고, 인간 Rab11-FIP3의 C말단을 mouse에 주입하여 인간 Rab11-FIP3 (anti-hRab11-FIP3) 항혈청을 획득하였다[11, 12]. 일반적인 벡터 형질전환은 Invitrogen (USA) 사의 Lipofectamine PLUS reagent를 사용하여 제조사가 추천하는 방법으로 HEK293T 세포에 수행하였다. siRNA 도입은 6-well plate에서 5시간 배양한 rat 후근신경절(DRG) 신경세포에 oligofectamine (Invitrogen, USA)을 이용하여 제조사의 프로토콜을 바탕으로 수행하였다. 간단히 기술하면 혈청과 항생제가 들어가지 않은 DMEM 145 μ L에 rat Rab11-FIP3 siRNA 20 μ M stock을 40 μ L씩 첨가하여 희석시켰다. 다른 tube에는 11 μ L의 DMEM에 oligofectamin 4 μ L를 희석하고 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 다음으로 siRNA 희석물과 oligofectamine 희석물을 섞은 뒤 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응시키는 동안 5시간 배양한 rat 후근신경절 신경세포의 배지를 DMEM 800 μ L로 교체하였다. siRNA-oligofectamine 용액을 각 well에 조심스럽게 첨가해 준 뒤 37°C, 5% CO₂ 조건에서 54시간 배양하였다. 실험에 쓰인 rat Rab11-FIP3 siRNA 서열은 표 1에 나타내었다. Total RNA는 Superscript first strand synthesis system for RT-PCR kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 반정량적 reverse transcriptional PCR을 실시하였다. total RNA에서 만들어진 cDNA를 예상되는 rat Rab11-FIP3 (Genbank No: RGD1308952)서열을 바탕으로 primer를 제작하여 25-30 cycles로 PCR을 실시하였다. Western blot 분석은 일반적으로 사용되는 방법을 사용하였다[15]. SDS-PAGE 시에는 8~15% 용해겔을 사용하였고 1차 항체로는 anti-rat TRPV1과 anti-human Rab11-FIP3 (anti-hRab11-FIP3)을 사용하였고 각각에 해당하는 2차 항체를 처리한 후 마지막으로 ECL western blotting 분석 시스템(GE health care, UK)을 이용하여 결과를 확인하였다.

면역화학방법은 일반적으로 사용되는 방법으로 수행하였는데[12] mounting된 시료에 사용한 1차 항체는 mouse anti-hRab11-FIP3를 1:50으로, rabbit anti-TRPV1은 1:100의 비율로 희석하여 사용하였다. 2차 항체로는 Cy3-conjugated goat anti-mouse (Pierce, USA)를 1:50, Alexa fluor488-conjugated goat anti rabbit (Invitrogen, USA)을 1:150의 비율로 희석하여 사용하였다. 대비염색으로는 세포의 핵을 염색시키는 DAPI solution (Pierce, USA)을 10분 동안 처리하였다. 완성된 시료는 Nikon C1si 레이저 공초점 현미경을 이용하여 관찰하였다.

분리한 후근신경절 신경세포에서 TRPV1이 발현됨을 확인하고(data not shown) 분리한 후근신경절 신경세포에

Rab11-FIP3의 발현을 저해할 siRNA 형질주입하였다. siRNA는 Thermo Fisher Scientific (USA)의 Dharmacon siRNA technology에서 제공하는 추천 siRNA 4종류를 사용하였다. Rab11-FIP3의 발현 저해 여부를 mRNA 수준에서 알아보기 위하여 전체 RNA를 추출하여 Rab11-FIP3 특이 프라이머를 이용한 반정량적 reverse transcriptional PCR 방법으로 mRNA 세포 내 농도를 조사하였다. PCR 결과, 3종류의(#1, 2, 3) siRNA에 대하여 Rab11-FIP3 mRNA 세포 내 농도가 현저히 감소한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 그 중 siRNA 3번을 처리한 신경세포에서 Rab11-FIP3의 mRNA 농도가 가장 많이 감소하였으므로 이 후 실험에서는 siRNA 3번으로 실험을 수행하였다.

mRNA 수준에서 농도가 감소하는 것을 확인한 후 웨스턴 블로팅으로 Rab11-FIP3 단백질 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 후근신경절 신경세포의 용해물의 웨스턴 블로팅 결과를 보면 siRNA를 처리하지 않은 대조군보다 siRNA 3번을 처리한 것이 Rab11-FIP3 발현량이 줄어든 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 웨스턴 블로팅의 결과는 Scion image (Scion cooperaton, USA) 프로그램을 이용하여 정량하였고

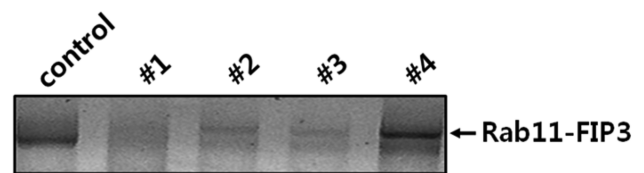


Fig. 1. Rat Rab11-FIP3 mRNA is knocked down by siRNA. Semiquantitative PCR using the cell lysates of control DRG and DRG transfected with different kinds of siRNAs. Control, PCR performed with DRG not any siRNA was introduced; #1~#4, PCR performed with DRG 4 different siRNAs were introduced.

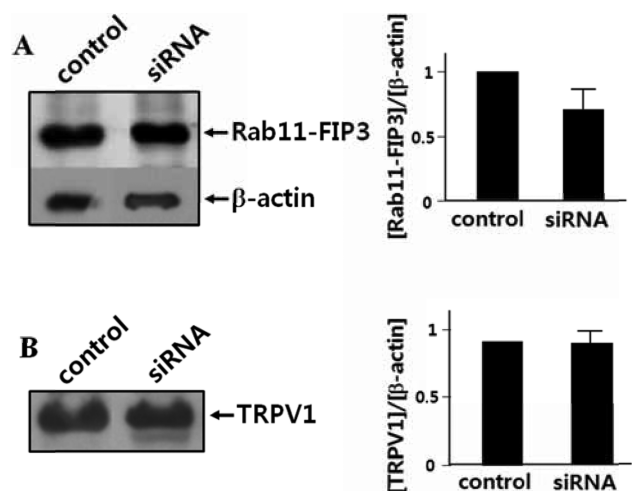


Fig. 2. Protein expression of Rab11-FIP3 and TRPV1 in the DRG neuron cell lysate transfected with Rab11-FIP3 siRNA. (A) Western blotting with anti-Rab11-FIP3, as an internal control, β -actin was used. (B) Western blotting with anti-TRPV1 of total cell lysate.

Table 1. Rat Rab11-FIP3 targeted siRNA candidate sequences.

#	siRNA sense sequence	siRNA antisense sequence
1	UCAAACAGGACAACCGUAA	UUACGGUUGUCCUGUUUGAAU
2	AGAAGAGCAUUGAGAUCGA	UCGAUCUCAAAUGCUCUUCUUU
3	GCCAGUGCCAUAAACAGAU	AUCUGUUUAUGGCACUGGCUU
4	CCGCAAGCAGCUAGAACAU	AUGUUCUAGCUGCUUGCGGUU

내부 기준 단백질인 β -actin의 발현량을 기준으로 하여 Rab11-FIP3 단백질 발현양을 비교하였다. siRNA 3번을 처리한 경우 단백질 발현이 약 30% 정도 감소한 것을 알 수 있었다(Fig. 2A).

이렇게 낮은 효율로 발현이 저해된 이유는 siRNA 도입의 효율이 매우 낮은 primary cell인 DRG를 사용한 때문으로 보인다. siRNA inhibition 방법은 유전자 발현저해에 널리 사용되는 방법으로 adherent 세포주에는 아주 높은 효율을 보이지만 primary cell 이나 non-adherent 세포주에는 낮은 효율을 보인다고 보고된 바 있다[19].

Rab11-FIP3의 발현 감소에 의하여 세포 내 TRPV1 단백질 발현에 어떠한 영향을 주는지 알아보았다. 그림 2B에서 보듯이 Rab11-FIP3의 저해는 세포 전체에 발현되는 TRPV1 단백질의 양에는 영향을 미치지 않았다. 그 다음 면역형광법을 이용하여 세포 내 TRPV1의 분포 성향을 알아보았다. 실험 결과 siRNA를 처리하지 않은 대조군에서는 TRPV1이 세포막 쪽에 분포를 더 많이 존재하고 있었다(Fig. 3A). 하지만 siRNA3를 첨가하여 Rab11-FIP3 발현을 저해하니 TRPV1은 세포막에 위치하는 양 보다는 세포질에 더 많이 존재하고 있는 것을 관찰하였다(Fig. 3B). 즉 Rab11-FIP3의 발현저해는 세포 내 TRPV1의 총량에 영향을 주지 않는 반면 TRPV1의 세포막으로의 막 수송에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 이는 최근 발표한 Rab11의 저해가 TRPV1의 세포막 수송에 저해가 된다는 보고[17]와 일맥상통하는 결과로 TRPV1의 세포막으로의 수송에 Rab11과 Rab11-FIP3가 관여한다는 결론을 내릴 수 있다.

선행연구에서 Rab11이 TRPV1과 직접적으로 결합하지는 않지만 Rab11의 발현 저해는 TRPV1의 막수송에 영향을 미치므로[17] TRPV1에 특이적으로 결합하는 Rab11-FIP3이 Rab11 사이에서 가교역할을 하며 TRPV1의 막수송에 Rab11, Rab11-FIP3 둘 다 관여하는 것으로 가정할 수 있다.

이러한 발견은 같은 family의 수용체라 하더라도 막 수송에 서로 다른 기전을 사용한다는 것을 시사하고 있다. 즉, 여러 종류의 Rab에 결합하는 FIP 들이 존재하여 서로 각각 다른 막 수송에 관여한다는 최근 연구 발표[9]를 지지하는 결과이다. 예를 들면 TRPV1과 TRPV2 각각의 막 수송에 서로 다른 Rab 단백질과 FIP가 사용될 수 있다는 것을 시사하고 있다. 이는 rat의 Rab11-FIP3가 TRPV1과 주로 세포막 부분에서 같은 곳에서 발현되지만 TRPV2와는 특이적으로 결합하지 않는다는 보고와 같은 맥락으로 볼 수 있다[12]. 나아가 TRP family인 TRPV5, 6에서는 막 수송에 Rab11이 직접 관여한다고 발표되었다[18]. 그 외 TRPV5의 경우는 N 말단이, TRPV4는 C 말단이 세포막으로의 수송에 중요하다고 최근 발표된 바 있다[8, 1]. TRPV4의 경우 endosomal recycling에 필요한 PACSIN3이 세포막으로의 이동에 필요하다고 발표되었다[7].

하지만 본 연구결과 TRPV1의 경우에는 특이적으로 결합하는 Rab11-FIP3과의 직접적인 상호작용과 나아가 Rab11과의 연합작용으로 TRPV1이 세포막으로 이동되는 것으로 보아 같은 family의 TRPV 채널이라도 세포막으로의 수송 기전은 서로 다를 수 있다고 결론지을 수 있다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a Research Grant from Hankyong National University in 2010.

REFERENCES

1. Becker, D., M. Müller, K. Leuner, and M. Jendrach. 2008. The C-terminal domain of TRPV4 is essential for plasma membrane localization. *Mol. Membr. Biol.* **25**: 139-151.
2. Bruce, E. A., P. Digard, and A. D. Stuart. 2010. The Rab11 pathway is required for influenza A virus budding and filament formation. *J. Virol.* **84**: 5848-5859.
3. Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, and D. Julius. 1997. The capsaicin receptor: a

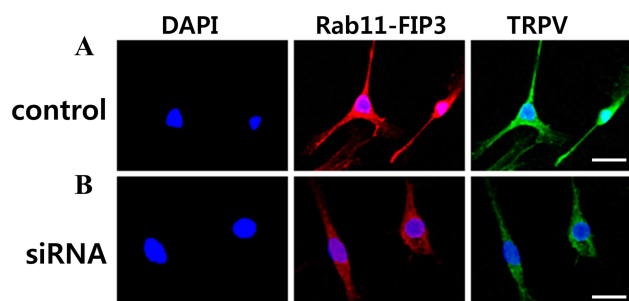


Fig. 3. Localization of Rab11-FIP3 and TRPV1 in Rab11-FIP3 siRNA-transfected DRG neuron. (A) control DRG neuron; (B) siRNA-transfected DRG neuron. DNA stained with DAPI (blue), Rab11-FIP3 (red), and TRPV1 (green). Bar represents 50 μ m throughout.

- heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816-824.
4. Caterina, M. J., A. Leffler, A. B. Malmberg, W. J. Martin, J. Trafton, K. R. Petersen-Zeit, M. Koltzenburg, A. I. Basbaum, and D. Julius. 2000. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**: 306-313.
 5. Caterina, M. J. and D. Julius. 2001. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**: 487-517.
 6. Cortright, D. N. and A. Szallasi. 2009. TRP channels and pain. *Curr. Pharm. Des.* **15**: 1736-1749.
 7. D'hoedt, D., G. Owsianik, J. Prenen, M. P. Cuajungco, C. Grimm, S. Heller, T. Voets, and B. Nilius. 2008. Stimulus-specific modulation of the cation channel TRPV4 by PACSIN 3. *J. Biol. Chem.* **283**: 6272-6280.
 8. de Groot, T., E. A. van der Hagen, S. Verkaart, V. A. te Boekhorst, R. J. Bindels, and J. G. Hoenderop. 2011. Role of the transient receptor potential vanilloid 5 (TRPV5) protein N terminus in channel activity, tetramerization, and trafficking. *J. Biol. Chem.* **286**: 32132-32139.
 9. Horgan, C. P. and M. W. McCaffrey. 2009. The dynamic Rab11-FIPs. *Biochem. Soc. Trans.* **37**: 1032-1036.
 10. Jing, J. and R. Prekeris. 2009. Polarized endocytic transport: the roles of Rab11 and Rab11-FIPs in regulating cell polarity. *Histol. Histopathol.* **24**: 1171-1180.
 11. Lee, S.-Y. 2005. Identification of a protein that interacts with the vanilloid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**: 1445-1451.
 12. Lee, S.-Y. and M. Kim. 2011. Specific interaction of rat vanilloid receptor, TRPV1 with Rab11-FIP3. *J. Korea Acad.-Indust. Coop. Soc.* **12**: 312-317.
 13. Morenilla-Palao, C., R. Planells-Cases, N. Garca-sanz, and A. Ferrer-Montiel. 2004. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J. Biol. Chem.* **279**: 25665-25672.
 14. Oh, U., S. W. Hwang, and D. Kim. 1996. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neuron. *J. Neurosci.* **16**: 1659-1667.
 15. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3.
 16. Stein, A. T., C. A. Ufret-Vincenty, L. Hua, L. F. Santana, and S. E. Gordon. 2006. Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* **128**: 509-522.
 17. Um, K., and S. -Y. Lee. 2011. Role of Rab11 on membrane trafficking of rat vanilloid receptor, TRPV1. *J. Korea Acad.-Indust. Coop. Soc.* **12**: 3096-3102.
 18. Van de Graaf, S. F., J. G. Hoenderop, and R. J. Bindels. 2006. Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. *Am. J. Renal Physiol.* **290**: F1295-F1302.
 19. Whitehead, K. A., R. Langer, and D. G. Anderson. 2009. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **8**: 129-138.
 20. Zhang, X., L. Li, and P. A. McNaughton. 2008. Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron* **59**: 450-461.