

Staurosporine Induces ROS-Mediated Process Formation in Human Gingival Fibroblasts and Rat Cortical Astrocytes

Han Gil Lee^{1†}, Du Sik Kim^{1‡}, Seong Ah Moon¹, Jeong Wan Kang^{2*}, and Jeong Taeg Seo^{1**}

¹Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry, Seoul 120-752, Korea

²Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Yonsei University College of Dentistry, Seoul 120-752, Korea

(received February 25, 2015; revised March 15, 2015; accepted March 16, 2015)

In the present study, we investigated the effect of staurosporine on the formation of cellular processes in human gingival fibroblasts and rat astrocytes. Staurosporine caused a rapid induction of process formation in human gingival fibroblasts and rat astrocytes in a concentration dependent manner. The process formation of human gingival fibroblasts and rat astrocytes was prevented by the pretreatment with N-acetylcysteine, suggesting that staurosporine-induced ROS production was responsible for the process formation. Colchicine, a microtubule depolymerizing agent, inhibited the staurosporine-induced process formation, whereas cytochalasin D, an actin filament breakdown agent, failed to suppress the formation of cellular processes. This result indicated that polymerization of microtubule, and not actin filament, was responsible for the formation of cellular processes induced by staurosporine. In support of this hypothesis, Western blot analysis was conducted using anti-tubulin antibody, and the results showed that the amount of polymerized microtubule was increased by the treatment with staurosporine while that of

depolymerized beta-tubulin in soluble fraction was decreased. These results indicate that staurosporine induces ROS-mediated, microtubule-dependent formation of cellular processes in human gingival fibroblasts and rat astrocytes.

Key words: staurosporine, microtubule, human gingival fibroblasts, rat astrocytes

서론

Staurosporine은 비특이적 광범위 단백질인산화효소 (protein kinase) 억제제로서 농도에 따라 protein kinase C, protein kinase A, protein kinase G, myosin light chain kinase, calmodulin-dependent kinase 등 다양한 단백질인산화효소를 봉쇄한다. 또한 staurosporine은 단백질인산화효소 억제 목적 외에도 대표적인 아포토시스(apoptosis) 유발 약물로 널리 사용되고 있다. 이에 관여하는 기전으로는 caspase-3 활성화, 미토콘드리아로부터 cytochrome c 유리, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성, 세포내 칼슘 증가, 아포토시스 유발인자(apoptosis inducing factor, AIF) 등이 알려져 있다[1-3].

그러나 단백질인산화효소 봉쇄작용 및 아포토시스 유발 작용과는 별도로 staurosporine은 척수신경절세포[4], PC12 세포[5], SH-SY5Y 세포[6,7], RGC-5 망막신경절 세포[8], HN33 세포[9] 등 다양한 세포에서 신경돌기 성장을 유도하는 강력한 신경분화 유도물질이라고 보고되었으며, 배아줄기세포에서도 staurosporine이 신경돌기를 길게 형성하고 신경네트워크를 형성하는 것으로 밝혀졌다[10].

*Correspondence to: Jeong Wan Kang, Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Yonsei University College of Dentistry, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel.: +82-2-2228-3131, E-mail: jeongwan@yuhs.ac

**Correspondence to: Jeong Taeg Seo, Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel.: +82-2-2228-3054, E-mail: jeong@yuhs.ac

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.

Staurosporine에 의해 유도되는 신경세포 분화는 신경성장 인자(nerve growth factor, NGF)에 의한 신경세포 분화와는 달리 Raf-MEK-ERK로 이어지는 MAPK 신호계와는 상관 없이 일어나며 매우 빠른 신경돌기 성장을 보인다. Staurosporine이 신경세포를 분화시키는 기전은 아직까지 확실하게 밝혀져 있지 않으나, 최근 staurosporine에 의한 활성산소종의 생성이 PC12 세포 분화 및 신경돌기 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다[11].

Staurosporine은 신경세포뿐 아니라 신경교세포(astrocyte)에서도 신경 돌기와 비슷한 형태의 가늘고 긴 돌기를 형성하는 것으로 알려져 있다[12]. 신경교세포는 다양한 자극에 의해 활성화되는 경우 돌기를 가진 별 모양으로 형태가 변화하며, 이러한 형태 변화는 뇌의 발생과 세포의 이동 과정에 중요한 역할을 한다. 이와 같이 staurosporine은 신경세포와 신경교세포에서 빠른 속도로 세포의 돌기를 형성하기 때문에 빠르게 세포 분화와 돌기형성을 유발하는 물질로서 연구가 많이 진행되고 있다.

Staurosporine에 의해 세포가 가늘고 길어지는 현상, 즉 세포돌기가 형성되는 현상이 최근 HeLa 세포와 흰쥐의 3Y1 섬유세포에서도 관찰되었다[13]. 세포에서 돌기의 형성은 형태적 역동성에 관여하며 세포의 분화, 이동, 생리적 기능조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 사람 치은에서 분리한 섬유세포(fibroblasts)와 생쥐 뇌에서 분리한 신경교세포를 이용하여 staurosporine이 돌기를 형성하는지 확인하고, 이 과정에 활성산소종 및 세포골격(cytoskeleton)의 관여 여부를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, trypsin-EDTA는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. 그 외 staurosporine, N-acetylcysteine (NAC), 항-베타튜불린 항체, colchicine, cytochalasin D 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다.

세포배양

신경교세포는 태어난 후 12-24시간이 지난 흰쥐의 뇌에서 분리하였다. 흰쥐 대뇌 피질을 분리한 후 조직을 잘게 썰어 기계적으로 분리한 후 세포를 60-mm 배양접시에 넣고 세포배양기에서 2-3 주 동안 유지하였다. 배양액은 2 mM glutamine, 25 mM glucose, 100 µg/ml penicillin, 25

ng/ml streptomycin, 10% FBS가 포함된 MEM 용액을 사용하였다. 배양액은 3일 마다 교체하였다.

사람의 치은섬유세포는 100-mm 배양접시에서 항생제와 10% FBS가 포함된 DMEM 용액에서 배양하여 사용하였다.

세포돌기 생성 확인

Staurosporine에 의해 세포돌기가 생성된 경우 세포돌기 길이의 합이 세포 총 길이의 1/2을 초과한 경우 유효한 세포돌기로 간주하였다. 유효한 세포돌기를 생성한 세포의 숫자를 전체 세포 숫자에 대한 비율로 표시하였다. 세포돌기의 길이는 Imagepro 프로그램을 사용하여 측정하였다.

미세소관(microtubule) 중합반응 확인

세포를 자극한 후 미세소관 안정 용액(90 mM MES (pH 6.7), 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 10% glycerol)으로 씻고 triton X-100 용해 용액(90 mM MES, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 10% glycerol, 10 µM taxol, 0.1% Triton X-100, protease inhibitors, 1 mM Na₃VO₄)으로 세포를 용해시켰다. 얻어진 단백질을 12,000g로 10분 간 원심분리하고 상층액을 분리하였다. 가라 앉은 침전물(pellet)은 2% SDS 용해 용액(50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 2% SDS, protease inhibitor, 1 mM Na₃VO₄)에서 10분 간 100°C로 가열하고 얻어진 단백질은 항-베타튜불린 항체를 이용하여 Western blot을 시행하였다.

결 과

치은섬유세포 및 신경교세포에서 staurosporine에 의한 세포돌기 형성

Staurosporine이 세포의 돌기 형성에 미치는 영향을 사람의 치은섬유세포와 흰쥐의 신경교세포에서 확인하였다. Staurosporine을 투여하기 전 두 종류의 세포 모두에서 돌기 형태는 적은 수의 세포에서만 관찰이 되었다(치은섬유세포; 7.1 ± 1.2 %, 신경교세포; 1.2 ± 0.2 %)

Staurosporine 50 nM, 100 nM을 치은섬유세포에 3 시간 동안 처리한 후 세포의 형태 변화를 확인한 결과 그림 1A에서 보는 바와 같이 staurosporine에 의해 세포질에서 신경돌기와 유사한 형태를 갖는 긴 돌기가 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 세포 돌기는 staurosporine의 농도가 증가함에 따라 더 빨리 형성되었는데, 그림 1B에서와 같이 50 nM에서는 76 ± 7.4 %의

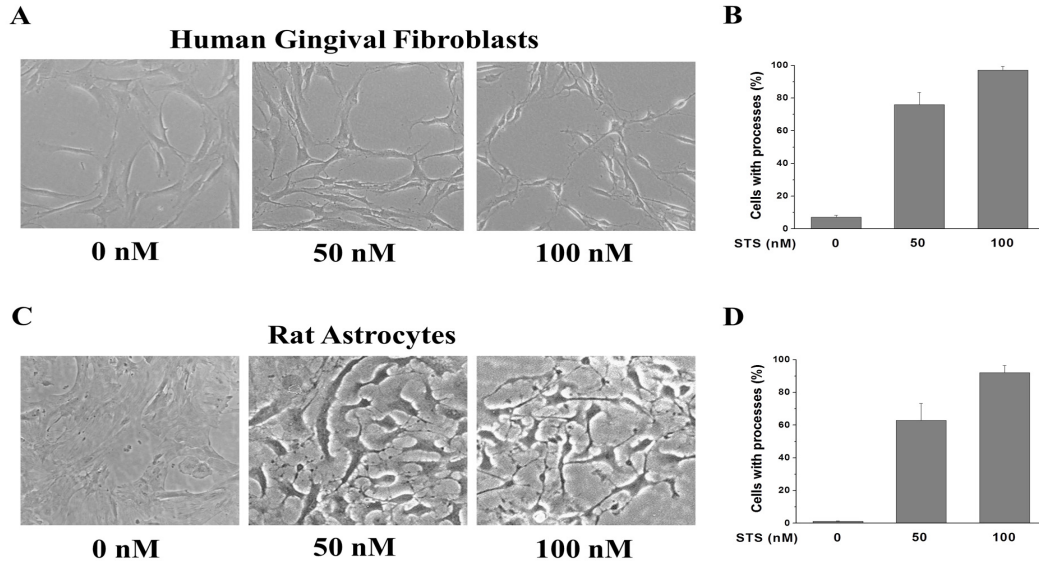


Fig. 1. staurosporine caused a rapid induction of process formation in human gingival fibroblasts and rat astrocytes. (A and C) Photomicrographs of human gingival fibroblasts (A) and rat astrocytes (C) incubated with indicated concentrations of staurosporine for 3 h. The image in each panel is representative of 4 independent experiments. (B and D) Cells with the processes of which the total length was greater than 1/2 of the cell length were counted and the percentage of process-bearing cells was determined. Results are presented as mean \pm S.E.M. of 4 independent experiments; at least 50 cells/condition were analyzed in each experiment. STS: staurosporine.

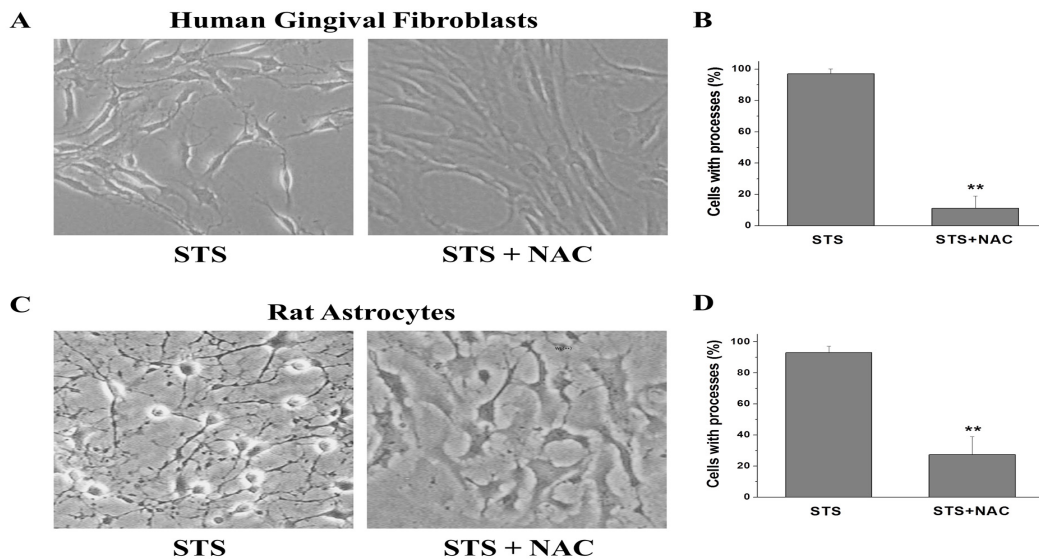


Fig. 2. ROS were involved in staurosporine-induced induction of process formation. (A and C) Photomicrographs of human gingival fibroblasts (A) and rat astrocytes (C) treated with 100 nM staurosporine for 3 h in the presence or absence of 10 mM NAC. The image in each panel is representative of 5 independent experiments. (B and D) Human gingival fibroblasts (B) and rat astrocytes (D) with cellular processes of which the total length was greater than 1/2 of the cell length were counted and the percentage of process-bearing cells was determined. Results are presented as mean \pm S.E.M. of 5 independent experiments; at least 70 cells/condition were analyzed in each experiment. Statistical analysis was performed using an unpaired Student's *t*-test. **Significant differences between the indicated groups ($P < 0.01$). STS: staurosporine, NAC: N-acetylcysteine.

세포에서 돌기가 형성되었고 100 nM에서는 97 ± 2.3 %의 세포에서 돌기가 형성되었다.

환취의 신경교세포에서도 staurosporine 50 nM, 100 nM에 의해 농도의존적으로 세포 돌기가 형성되어 50 nM에

서는 63 ± 10.3 %의 세포에서 돌기가 형성되었고 100 nM에서는 92 ± 4.5 %의 세포에서 돌기가 형성되었다.

활성산소종이 staurosporine에 의한 세포돌기 형성에 미치는 역할

PC12 세포에서 staurosporine에 의해 신경돌기가 생성될 때 활성산소종의 생성이 관여한다는 보고가 있으므로 그림 1에서 관찰된 결과가 활성산소종의 생성에 의한 것인지 확인하였다. 그림 2에서 보는 바와 같이 치은 섬유세포와 신경교세포에 staurosporine 100 nM을 3 시간 동안 처리하면 각각 97.1 ± 3.1 % 및 93.1 ± 4.2 %의 세포에서 돌기를 형성하였는데, 활성산소종을 제거하는 NAC을 10분 간 전처리하고 staurosporine을 투여한 경우 돌기가 형성된 세포가 각각 11.2 ± 7.8 % 및 27.4 ± 11.6 %로 감소하였다($p < 0.01$).

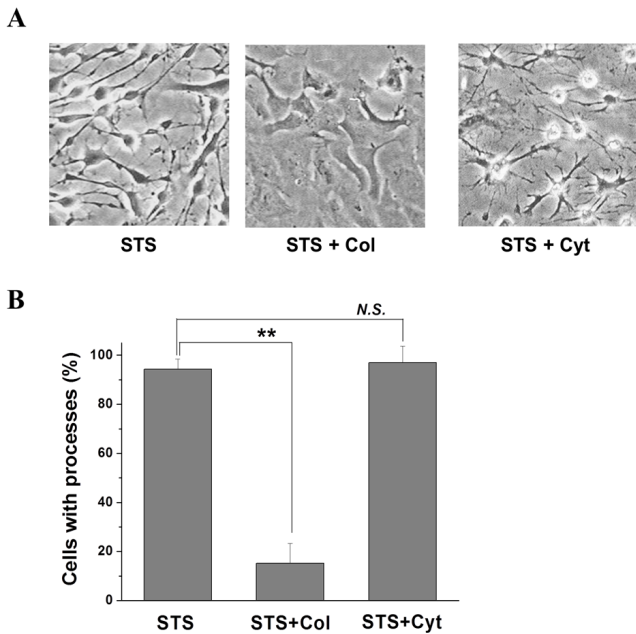


Fig. 3. Microtubule polymerization was responsible for the formation of cellular processes induced by staurosporine. (A) Photomicrographs of rat astrocytes treated with 100 nM staurosporine for 3 h in the presence or absence of 20 μM colchicine or 1 μM cytochalasin D. The image in each panel is representative of 4 independent experiments. (B) Cells with the processes of which the total length was greater than 1/2 of the cell length were counted and the percentage of process-bearing cells was determined. Results are presented as mean ± S.E.M. of 4 independent experiments; at least 40 cells/condition were analyzed in each experiment. Statistical analysis was performed using an unpaired Student's *t*-test. **Significant difference between the indicated groups ($P < 0.01$). N.S. indicates that there is no significant difference between the indicated groups ($P > 0.05$). STS: staurosporine, Col: colchicine, Cyt: cytochalasin D.

Staurosporine에 의한 세포돌기 형성에 미세소관의 합성이 미치는 영향

세포돌기 형성 과정에서 세포골격의 역할을 확인하기 위해 미세소관 합성을 억제하는 colchicine과 액틴(actin)을 깨는 cytochalasin D를 흰쥐의 신경교세포에 전처리하고 staurosporine의 효과를 확인하였다. 그림 3A와 B에서 보는 바와 같이 100 nM staurosporine을 3 시간 처리한 세포에서 세포 돌기가 94.3 ± 4.2 % 형성되었으나 20 μM colchicine을 10분 간 전처리하고 staurosporine을 투여한 세포는 돌기가 15.2 ± 8.1 %만 형성되어, colchicine이 staurosporine에 의한 돌기 형성을 효과적으로 봉쇄함을 확인할 수 있었다($p < 0.01$). 한편, 1 μM cytochalasin D를 10분 동안 전처리하고 100 nM staurosporine을 투여한 세포는 돌기가 97.0 ± 6.7 % 형성되어 100 nM staurosporine만을 처리한 세포와 큰 차이가 없었으며($p > 0.05$) 이러한 결과를 바탕으로 cytochalasin D는 staurosporine에 의한 돌기 형성을 억제하지 못함을 확인하였다. 그러나 cytochalasin D를 투여한 세포는 staurosporine만을 투여한 세포에 비해 돌기의 숫자가 더 많았으며 돌기의 모양이 매끄럽지 않고 가시처럼 뾰여 나온 형태적 특징을 보였다.

Staurosporine이 튜불린의 중합을 촉진하여 미세소관을 형성하는지 확인하기 위해 100 nM staurosporine을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포에서 중합된 상태의 튜불린 양의 차이를 항-베타튜불린 항체를 이용하여 확인하였다. 그림 4에서 보는 바와 같이 staurosporine을 처리한 세포를 원심분리하여 얻은 침전물에서의 튜불린 양이 staurosporine을 처리하지 않은 세포의 침전물에서 측정된 튜불린 양보다 많음을 확인하였는데, 이는 staurosporine에 의해 튜불린의 중합이 촉진되었음을 나타낸다. 세포에 20 μM colchicine을 전처

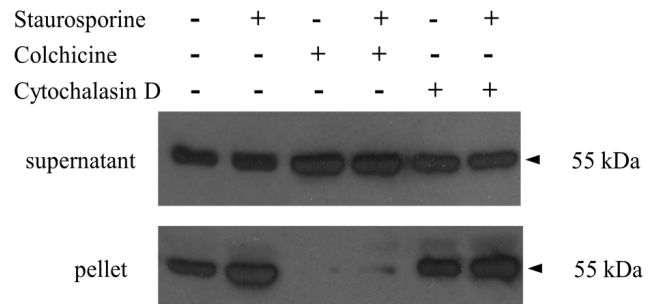


Fig. 4. Staurosporine induced polymerization of the microtubule network. Cells were stimulated with 100 nM staurosporine for 3 h in the presence or absence of 20 μM colchicine or 1 μM cytochalasin D. The cells were lysed and fractionated into soluble (supernatant) and polymerized (pellet) extracts, which were separated with SDS-PAGE, transferred, and probed with anti-β-tubulin antibody. The image in each panel is representative of three independent experiments.

리하는 경우 staurosporine 투여 여부와 상관없이 침전물에서 튜불린이 거의 측정되지 않았으며, 이와는 반대로 1 μM cytochalasin D는 침전물에서의 튜불린 양에 거의 영향을 주지 않았다. 따라서 staurosporine은 미세소관의 중합을 촉진하였으며 staurosporine에 의한 미세소관의 중합 촉진이 돌기 형성의 주요 기전임을 확인하였다.

고 찰

본 연구를 통해 기원이 서로 두 가지 세포, 즉 사람의 치은섬유세포와 흰쥐의 신경교세포에서 staurosporine이 길고 가는 세포돌기를 형성하는 것을 확인하였다. Staurosporine이 신경세포에서 세포의 분화와 신경 돌기의 성장을 유도한다는 것은 이미 잘 알려져 있으며 [14,15], 신경교세포에서도 staurosporine이 세포돌기를 형성한다는 것이 보고되었다[12]. 그러나 치은섬유세포에서 staurosporine이 세포돌기를 형성한다는 것은 아직까지 보고된 바가 없다. 최근 발표된 보고에 의하면 HeLa 세포와 3Y1 세포 등의 섬유세포에서 staurosporine이 매우 긴 세포돌기를 형성하며, 이러한 세포 돌기의 형성이 세포의 분화와 이동 과정에서 관찰된다고 하였다[13]. 따라서 치은섬유세포에서 세포돌기의 형성을 유도한다는 결과는 치은섬유세포의 분화 및 이동을 staurosporine이 촉진할 가능성이 있음을 보여준다.

신경세포의 경우 세포의 분화 및 신경돌기의 성장 과정에 ERK의 활성화가 관여하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 PC12 세포에서 신경세포 분화는 세포막 수용체에 신경성장인자가 작용함으로써 Ras가 활성화되고, 이어서 Raf-MEK-ERK 신호계가 순차적으로 활성화됨으로써 세포분화 및 신경세포돌기의 성장이 유발된다[16]. 그러나 staurosporine에 의한 신경세포의 분화 과정에는 ERK 신호계는 관여하지 않는 것으로 알려져 있으며, Jun NH2-terminal kinase (JNK) 활성화[14], galectin-3의 발현[17], 세포막을 통한 칼슘 유입[18] 등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 그런데 최근에서 활성화산소종의 생성이 staurosporine에 의한 PC12 세포 분화 및 신경돌기 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다[11]. 이에 치은섬유세포 및 신경교세포에서 staurosporine에 의해 돌기가 형성되는 과정에서도 활성화산소종이 중요한 역할을 하는지 확인한 결과, staurosporine에 의한 돌기 형성이 활성화산소종의 제거제인 NAC에 의해 억제되는 것이 확인되었다.

활성산소종은 세포 손상과 사멸을 유발하는 대표적인 물질로서, 산소를 이용해서 에너지를 생성하는 모든 생

명체의 미토콘드리아에서 호흡과정 중 부산물로 생성되는 superoxide 음이온(O_2^-), 과산화수소(H_2O_2), 하이드록시 라디칼(hydroxyl radical; OH) 등을 일컫는다. 이러한 활성화산소종은 반응성이 강하여 세포에 독작용을 나타내므로 세포 내에는 활성화산소종을 제거하는 다양한 효소계와 항산화물질이 존재하며, 이들 항산화 시스템을 이용하여 활성화산소종을 제거한다. 그러나 활성화산소종은 다양한 생리적 자극에 의해 생성되어 세포내 신호전달계를 활성화시킴으로써 세포의 분화 및 분열을 비롯하여 세포의 다양한 생리적 기능을 매개하는 것으로도 알려져 있다. Staurosporine이 치은섬유세포 및 신경교세포에서 어떤 기전을 통해 활성화산소종을 생성하는지는 아직 확실하게 밝혀져 있지 않다. PC12 세포의 경우 Rac1 활성화에 이은 NADPH oxidase 활성화로 활성화산소종이 생성되는 것이 보고되어 있지만[11], 치은섬유세포 및 신경교세포에서도 NADPH oxidase 활성화에 의해 활성화산소종이 생성되는지는 좀 더 세밀한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

활성산소종이 staurosporine에 의한 신경돌기 형성을 촉진하는 기전도 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않다. 활성화산소종이 tyrosine receptor kinase-A (TrkA)와 ERK를 인산화시킴으로써 신경세포 분화를 촉진하는 것이 알려져 있지만, staurosporine은 이들 신호인자를 활성화시키지 않는 것이 밝혀져 있으므로 staurosporine에 의한 신경돌기 형성 촉진 과정에 이들 인자는 관여하지 않는다. 그러나 세포 내에서 생성된 활성화산소종이 액틴 및 액틴 결합 단백질의 기능을 직접적으로 조절함으로써 신경돌기 성장을 촉진할 수 있다는 보고가 있으므로[19,20], staurosporine에 의한 활성화산소종 생성이 액틴이나 미세소관에 영향을 미쳐서 신경돌기를 생성할 가능성을 생각할 수 있다.

세포의 분화 및 이동 과정에 액틴이나 미세소관 같은 세포골격의 변화가 관여함은 이미 잘 알려져 있다 [21,22]. 예를 들어 Rac과 Cdc42의 활성화는 세포의 확장(spreading)과 이동에 관련된 lamellipodia 및 filopodia를 형성하고, 신경세포의 growth cone에서는 Rac과 Cdc42에 의해 액틴이 형성된다[23]. 또한 NIH 3T3 섬유세포의 경우 혈소판유래성장인자(PDGF) 또는 ROCK 봉쇄제에 의해 신경돌기와 비슷한 세포의 돌기가 형성되는 것으로 알려져 있는데, 이 과정에 미세소관이 관여하는 것으로 보고되었다[24].

본 연구에서는 staurosporine에 의한 세포돌기 형성을 미세소관 중합 억제제인 colchicine이 억제하지만, 액틴 섬유를 깨는 cytochalasin D는 세포돌기 형성을 억제하지 못하는 것을 보였다. 뿐만 아니라 항-베타튜불린 항체를

이용하여 staurosporine을 처리하기 전과 후에 중합된 상태의 튜블린 양의 변화를 관찰한 결과 staurosporine에 의해 튜블린의 중합이 촉진되었음을 확인하였다. 이와 같은 결과는 staurosporine에 의해 세포돌기가 형성되는 과정에 활성산소종과 미세소관 중합이 중요한 역할을 함을 보여주는 것으로서 향후 staurosporine이 어떻게 활성산소종을 생성하여 미세소관 중합을 촉진하는지 연구할 예정이다.

감사의 글

이 연구는 연세대학교 치과대학 2012학년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Ahlemeyer B, Kriegstein J. Retinoic acid reduces staurosporine-induced apoptotic damage in chick embryonic neurons by suppressing reactive oxygen species production. *Neurosci Lett*. 1998;246:93-96.
- Norberg E, Karlsson M, Korenovska O, Szydowski S, Silberberg G, Uhlén P, Orrenius S, Zhivotovsky B. Critical role for hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 in the AIF-mediated apoptosis. *EMBO J*. 2010;29:3869-3878. doi: 10.1038/emboj.2010.253.
- Seo SR, Seo JT. Calcium overload is essential for the acceleration of staurosporine-induced cell death following neuronal differentiation in PC12 cells. *Exp Mol Med*. 2009;41:269-276. doi:10.3858/emm.2009.41.4.030.
- Sano M, Iwanaga M, Fujisawa H, Nagahama M, Yamazaki Y. Staurosporine induces the outgrowth of neurites from the dorsal root ganglion of the chick embryo and PC12D cells. *Brain Res*. 1994;639:115-124.
- Hashimoto S, Hagino A. Staurosporine induced neurite outgrowth in PC12h cells. *Exp Cell Res*. 1989;184:351-359.
- Jalava A, Heikkilä J, Lintunen M, Akerman K, Pahlman S. Staurosporine induces a neuronal phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma cells that resembles that induced by the phorbol ester 12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate (TPA). *FEBS Lett*. 1992;300:114-118.
- Boix J, Llecha N, Yuste VJ, Comella JX. Characterization of the cell death process induced by staurosporine in human neuroblastoma cell lines. *Neuropharmacology*. 1997;36:811-821.
- Harper MM, Adamson L, Blits B, Bunge MB, Grozdanic SD, Sakaguchi DS. Brain-derived neurotrophic factor released from engineered mesenchymal stem cells attenuates glutamate- and hydrogen peroxide-mediated death of staurosporine-differentiated RGC-5 cells. *Exp Eye Res*. 2009;89:538-548. doi: 10.1016/j.exer.2009.05.013.
- Min JY, Park MH, Park MK, Park KW, Lee NW, Kim T, Kim HJ, Lee DH. Staurosporine induces neurite outgrowth through ROS generation in HN33 hippocampal cell lines. *J Neural Transm*. 2006;113:1821-1826. doi: 10.1007/s00702-006-0500-z.
- Schumacher A, Arnhold S, Addicks K, Doerfler W. Staurosporine is a potent activator of neuronal, glial, and "CNS stem cell-like" neurosphere differentiation in murine embryonic stem cells. *Mol Cell Neurosci*. 2003;23:669-680. doi:10.1016/S1044-7431(03)00170-2.
- Kim DS, An JM, Lee HG, Seo SR, Kim SS, Kim JY, Kang JW, Bae YS, Seo JT. Activation of Rac1-dependent redox signaling is critically involved in staurosporine-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Free Radic Res*. 2013;47:95-103. doi: 10.3109/10715762.2012.748193.
- Kwak YD, Choumkina E, Sugaya K. Amyloid precursor protein is involved in staurosporine induced glial differentiation of neural progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;344:431-437. doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.054.
- Kohno T, Ninomiya T, Kikuchi S, Konno T, Kojima T. Staurosporine Induces Formation of Two Types of Extra-Long Cell Protrusions: Actin-Based Filaments and Microtubule-Based Shafts. *Mol Pharmacol*. 2015; Feb 13. [Epub ahead of print]. doi: 10.1124/mol.114.096982.
- Yao R, Yoshihara M, Osada H. Specific activation of a c-Jun NH2-terminal kinase isoform and induction of neurite outgrowth in PC-12 cells by staurosporine. *J Biol Chem*. 1997;272:18261-18266.
- Kim YH, Chang Y, Jung JC. Staurosporine induces ganglion cell differentiation in part by stimulating urokinase-type plasminogen activator expression and activation in the developing chick retina. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;423:67-72. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.084.
- Vaudry D, Stork PJ, Lazarovici P, Eiden LE. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science*. 2002;296:1648-1649. doi: 10.1126/science.1071552.
- Kuklinski S, Vladimirova V, Waha A, Kamata H, Pesheva P, Probstmeier R. Expression of galectin-3 in neuronally differentiating PC12 cells is regulated both via Ras/MAPK-dependent and -independent signalling pathways. *J Neurochem*. 2003;87:1112-1124. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02060.x.
- Zhaleh H, Azadbakht M, Pour AB. Effects of extracellular calcium concentration on neurite outgrowth in PC12 cells by staurosporine. *Neurosci Lett*. 2011;498:1-5. doi:10.1016/j.neulet.2011.04.020.
- Moldovan L, Moldovan NI, Sohn RH, Parikh SA, Goldschmidt-Clermont PJ. Redox changes of cultured endothelial cells and actin dynamics. *Circ Res*. 2000;86:

- 549-557. doi: 10.1161/01.RES.86.5.549.
20. Moldovan L, Mythreye K, Goldschmidt-Clermont PJ, Satterwhite LL. Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1. *Cardiovasc Res.* 2006;71:236-246. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.05.003>.
 21. Stanley A, Thompson K, Hynes A, Brakebusch C, Quondamatteo F. NADPH oxidase complex-derived reactive oxygen species, the actin cytoskeleton, and Rho GTPases in cell migration. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20:2026-2042.
 22. Wu Q, Liu J, Fang A, Li R, Bai Y, Kriegstein AR, Wang X. The dynamics of neuronal migration. *Adv Exp Med Biol.* 2014;800:25-36. doi: 10.1007/978-94-007-7687-6_2.
 23. Meyer G, Feldman EL. Signaling mechanisms that regulate actin-based motility processes in the nervous system. *J Neurochem.* 2002;83:490-503. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01185.x.
 24. Scaife RM, Job D, Langdon WY. Rapid microtubule-dependent induction of neurite-like extensions in NIH 3T3 fibroblasts by inhibition of ROCK and Cbl. *Mol Biol Cell.* 2003;14:4605-4617. doi: 10.1091/mbc.E02-11-0739.