

MITF (microphthalmia-associated transcription factor)가 멜라닌세포의 가지돌기 형성에 미치는 영향

조인숙¹, 손경철², 김창덕², 이영호¹

¹충남대학교 의과대학 해부학교실, ²충남대학교 의과대학 피부과학교실

(2016년 3월 11일 접수, 2016년 3월 22일 수정접수, 2016년 3월 23일 게재승인, Published Online 30 March 2016)

간추림 : Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 basic-loop-helix leucine zipper family 중의 하나인 중요한 조절인자로서 멜라닌세포에서 멜라닌 형성에 관여한다. MITF는 MITF-M, MITF-A, MITF-B, MITF-C, MITF-H 및 MITF-J 등이 아형이 존재한다. MITF-M은 피부의 멜라닌세포에서 발현되며 멜라닌을 만들어내는 데 관여한다. 이전의 연구에서 MITF-A, MITF-C, MITF-H 및 MITF-J가 표피에서 발현됨을 확인하였다. 본 연구에서는 멜라닌세포에서 발현되는 MITF 아형을 확인하고 이들의 멜라닌 형성 이외의 역할을 확인하고자 하였다. MITF-M과 MITF-A가 일차멜라닌세포 및 SK-MEL-24 흑색종 암세포에서 발현됨을 확인하였다. SK-MEL-24 흑색종 암세포에 과발현시킨 결과 세포의 멜라노솜의 이동통로가 되는 가지돌기의 길이가 MITF-M 과발현 시 주로 증가하였으며, MITF-A 과발현 시는 주로 가지돌기의 수가 유의하게 증가하였다. 가지돌기의 액틴 중합반응에 관여하는 물질 중에 하나인 Rac1이 MITF 과발현세포에서 증가하였다. 결론적으로 멜라닌세포에서 MITF-M과 MITF-A는 Rac1 신호를 경유하여 가지돌기 형성을 증가시킴을 확인하였다.

찾아보기 낱말 : MITF, 멜라닌세포, 가지돌기

서 론

MITF는 microphthalmia-associated transcription factor의 약자로 여러 조직에서 발현되며 basic helix-loop-helix leucine zipper (b-HLH-Zip) 전사인자이다[1-3]. MITF는 분화된 멜라닌세포에서 멜라닌 생성에 필수적인 효소를 조절함으로써 멜라닌세포자극호르몬(α -MSH)의 분화 효과를 매개한다[4-6].

MITF 유전자는 최소 9개의 뚜렷한 엑손 단위(exon unit)로 구성되어 있으며, 각각의 MITF 아형의 첫 번째 엑손만

다르며 그 이후의 2~9번째 엑손들은 같은 구조를 가지고 있다. 이 첫 번째 엑손의 promotor에 따라 기능에 차이를 나타낸다[7].

MITF 아형은 사람에게 발견되었고 아형에는 MITF-A, MITF-B, MITF-C, MITF-D, MITF-E, MITF-H, MITF-M, 그리고 MITF-J가 있으며, 처음에 밝혀진 MITF 아형 중 MITF-M이 멜라닌세포에 특정하게 발현한다고 알려져 있으며 419개의 아미노산으로 이루어져 있다[8]. MITF-M mRNA는 멜라닌세포와 흑색종에만 전적으로 발현되며 멜라닌세포의 분화를 위한 핵심 조절유전자이다[9].

MITF-A는 골격근에서 상대적으로 높게 발현이 된다고 알려져 있으며 근육발생 단계에서 MITF가 관련 있다는 연구 결과가 발표되었으며, MITF-A는 근육대롱(myotube) 형성에 필수적이다[10]. 또한 MITF-A 활성화는 멜라닌세포의 분화과정에서 다양한 시점에서 필요하지만 제브라피시에서 멜라닌줄기세포의 형성에는 필수적이진 않다고 알

*이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. NRF-2015R1D1A1A01060018).
저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.
저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.
교신저자 : 이영호(충남대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : yhlee@cnu.ac.kr

려져 있다[11,12].

멜라닌세포는 신경능선에서 유래된 멜라닌세포로부터 파생되어 피부 표피에서 이동하여 분화되며 멜라닌세포 가지돌기의 복잡한 네트워크를 통하여 각질세포 주변으로 멜라노솜이 이동한다[13,14]. 따라서 멜라닌세포의 가지돌기의 길이와 수는 멜라닌세포의 활성 및 피부 색에 영향을 미친다. 몇몇의 성장인자와 호르몬은 멜라닌세포 가지돌기 형성에 관련되어 있는데 예를 들면 endothelin-1 (ET-1), stem cell factor (SCF), basic fibroblast growth factor (bFGF), 그리고 melanocyte stimulating hormone (α -MSH)이 있다 [15,16].

Rho family of GTP-binding protein은 모든 세포의 유형에서 세포골격 조직에 중요한 역할을 하며 그 외에도 세포극성을 조절하며 세포부착과 세포 주기 조절, 세포자살, 세포 외 유출 등 다양한 기능을 가지고 있다고 알려져 있다. RhoA, Rac1, Cdc42를 포함한 Rho family GTPases는 가지돌기 형성에 핵심적인 역할을 한다[17-19]. 이 중 Rac1이 활성화되면 액틴 중합(actin polymerization)을 통하여 가지돌기가 길어지고 연장되는 데 기여한다고 알려져 있다 [20-22].

본 연구에서는 다양한 세포주에서의 MITF 아형별 발현 양상을 확인하고 흑색종세포를 이용하여 MITF-M과 MITF-A를 과발현시켜 그 영향을 확인하고 Rac1의 발현을 관찰하여 멜라닌세포의 가지돌기 형성에 MITF가 관여하는 것을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

사람의 무흑색소성 흑색종세포주인 SK-MEL-24, SK-MEL-28, HM3KO 및 MNT-1 세포주들은 사람의 피부 종양에서 파생된 세포 중 하나로 충남대학교 의과대학 피부과학교실에서 분양받아 사용하였다. 그 외 진피유두(der-

mal papilla)세포와 바깥뿌리집(outer root sheath)세포, 멜라닌세포, 각질세포, 섬유모세포, 그리고 흑색종세포주도 충남대학교 의과대학 피부과학교실에서 분양받아 사용하였다.

10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, Rockvilli, USA)를 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Welgene, Daejeon, Korea)으로 계대배양 및 유지되었고, 배양기의 온도는 37°C로 유지하였다.

2. RNA 추출

SK-MEL-24 세포에 MITF-M 및 MITF-A adenovirus를 각각 0.5%로 48시간 처리 후 세포를 1.5 mL tube에 넣고 RNA isolation reagent (TRI-REAGENT)를 500 μ L 넣고 3~5분간 반응시킨 후 100 μ L의 chloroform을 첨가하여 충분히 섞어준 후 13,000 g, 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 약 300 μ L의 상층액을 취하여 새로운 tube에 옮기고 동량의 isopropanol을 넣어주었다. 상온에서 5분간 처리한 후 13,000 g, 4°C에서 10분간 원심분리하고 tube의 바닥에 얻어진 pellet에 75% ethanol을 500 μ L씩 넣었다. 13,000 g에 2분간 원심분리하여 75% ethanol을 제거하고 최종적으로 RNA를 얻었다. DEPC (diethylpyrocarbonate)가 처리된 증류수에 녹여 UV spectrophotometer로 RNA를 정량하였다.

3. RT-PCR

RNA (3 μ g)를 80°C에서 3분간 가열하여 변성시킨 후 5X buffer, dNTP, oligo-dT, reverse transcriptase와 RNase inhibitor를 첨가하여 총 30 μ L가 되게 한 후 42°C에서 1시간 30분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

Primer에 따라 MITF-M, MITF-A 및 MITF-H는 PCR 조건을 94°C에서 3분, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 8분으로 30회 반복 수행하였고, MITF-C, MITF-J의 PCR 조건은 94°C에서 3분, 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 8분으로 30회 반복하여 수행하였다. 각각

Table 1. List of primer sequences used in RT-PCR

Gene		Primer sequence
MITF-M	Forward primer	5'-ACCTTCTCTTTGCCAGTCCA-3'
	Reverse primer	5'-CGGATATAGTCCACGGATGC-3'
MITF-A	Forward primer	5'-TGAAGAGCCCAAACCTATTACGA-3'
MITF-C	Forward primer	5'-CTTCAGTGGTTTTCCACGAGCT-3'
MITF-H	Forward primer	5'-GGAGGCGCTTAGAGTTCAGATG-3'
MITF-J	Forward primer	5'-CTCTCCATGAGTCTGAGCATCTAA-3'
MITF-A, C, H, J	Reverse primer	5'-GATCAATCAAGTTTTCCGAGACAG-3'

MITF 아형의 primer는 Table 1에 자세히 기재되어 있다. 증폭된 PCR 산물을 1% agarose gel에 전기영동시킨 후, 밴드를 관찰하였다.

4. Western blot

세포를 단백질분해효소 억제제 [20 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL pepstatin A, 10 µg/mL chymostatin, 2 µg/mL aprotinin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]를 포함한 immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1% NP-40)를 사용하여 용해시킨 후 피펫으로 강하게 풀어준 뒤 그 추출액을 원심분리기에 13,000 g에 15분간 분리한 뒤 총 단백질을 Bradford protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

Sample을 10, 15% SDS-polyacrylamide gels에 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 후 PVDF cell membrane에 transfer buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM glycine, 20% methanol, pH 8.3)를 사용하여 transfer하였다. Transfer가 끝난 후 membrane을 5% skim milk (0.05% TBST, Tween 20)를 사용하여 1시간 동안 blocking하였다.

Blocking이 끝난 후 1차 항체를 4°C에서 overnight을 하였다. 1차 항체 반응이 끝난 후 membrane을 TBST(0.05% TBST, Tween20)에 10분간 3회 씻어준 후 2차 항체를 상온에 1시간 동안 반응시켰으며, 반응이 끝난 후 membrane을 TBST(0.05% TBST, Tween20)에 10분간 3회 세척하였다. 세척이 끝난 후 ECL (Enhanced Chemiluminescence)을 사용하여 발색 반응을 유도한 후 X-ray film에 감광하여 결과를 분석하였다.

다음과 같이 1차 항체를 본 연구에 사용하였다 : MITF (Milipore, Darmstadt, Germany), Flag (Sigma, St. Louis, USA), Rac1 (Santa Cruz, CA, USA), phospho-Rac1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

5. Phalloidin 염색

SK-MEL-24 세포를 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)로 두 번 세척하고 3.7% formaldehyde solution에 상온에 10분 동안 고정시켰다. 고정 후 다시 PBS로 두 번 세척하고 0.1% Triton X-100에 3~5분 가량 방치하고 PBS로 2회 세척 후 Alexa Fluor 488® phalloidin (Life technologies, Carlsbad, CA, USA)을 PBS에 희석하여 어두운 곳에서 30분간 반응시키고 형광현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로 형태를 관찰하였다.

6. 수상돌기 길이 측정

정상대조군과 실험군(MITF 과발현군)을 각각 무작위로 10장씩 찍은 후 Image J 프로그램을 사용하여 분화된 세포 수 및 가지돌기의 길이를 각각 측정하여 평균을 구하였다.

7. 통계분석

정상대조군과 실험군(MITF 과발현군) 간의 가지돌기 길이 차이 및 단백질의 발현 차이를 *t*-test로 분석하였으며, 통계적 유의성은 P값이 0.05 미만일 때를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 정상세포 별 MITF 아형의 발현 양상

역전사증합효소연쇄반응을 통해서 다양한 세포주에서 MITF-M, MITF-A, MITF-C, MITF-H 및 MITF-J 아형의 발현 양상을 확인하였다. 그 결과 진피 유두(dermal papilla) 세포와 바깥뿌리집(outer root sheath)세포에서는 MITF-A와 MITF-H가 발현되는 것을 확인하였고, 멜라닌세포에서는 MITF-A, MITF-H, MITF-M 그중 MITF-M이 강하게 발현되는 것을 확인하였다. 각질세포에서는 MITF-A와 -H의 발현을 확인하였고, 섬유아세포에서는 MITF-A만 발현하는 것을 확인하였다(Fig. 1).

2. 흑색종세포에서 MITF 아형의 발현 양상

RT-PCR을 통해서 흑색종세포주에서 각각의 MITF 아형의 발현 양상을 확인하였다. 그 결과 SK-MEL-24, SK-MEL-28, HM3KO 및 MNT-1 세포 등 모든 흑색종세포에서 MITF-M과 MITF-A가 발현되는 것을 확인하였고, MITF-M이 현저히 많이 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 1).

3. MITF 과발현에 의한 SK-MEL-24 흑색종세포의 형태 변화

SK-MEL-24 흑색종 세포에 MITF-M과 MITF-A adenovirus를 사용하여 과발현시키고 5일 후 현미경으로 관찰하였을 때 MITF-M과 MITF-A의 과발현에 의해 가지돌기의 형태의 변화를 확인하였다(Fig. 2).

실험군 MITF-M은 대조군에 비해 분화된 세포의 수도 많을 뿐만 아니라 가지돌기의 길이가 2~3배 이상 길어진

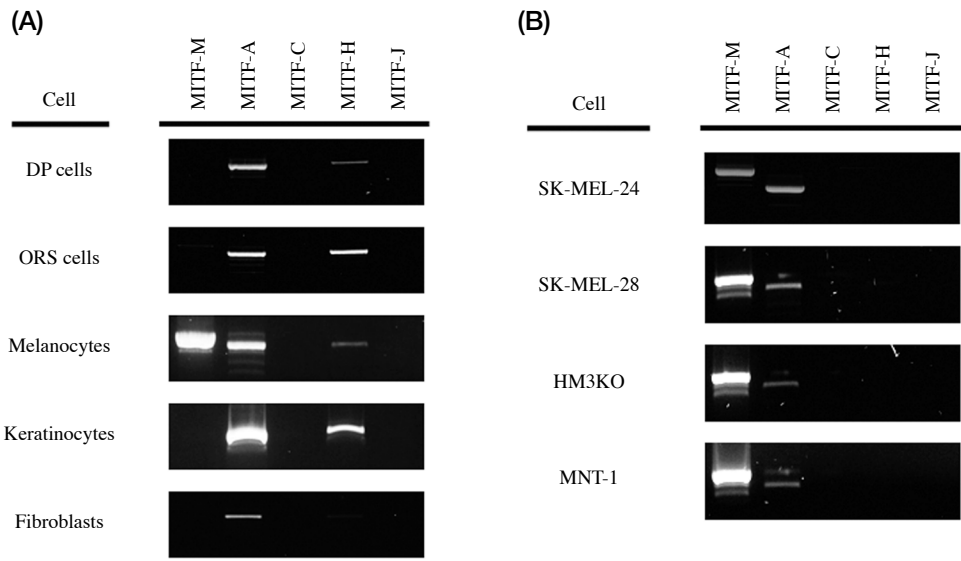


Fig. 1. Gene expression of MITF isoforms in various cells. (A) MITF isoforms expression in normal cells, DP cells (dermal papilla cells of hair follicle), ORS cells (outer root sheath cells of hair follicle), melanocytes, keratinocytes, and fibroblast. (B) MITF isoforms expression in melanoma cell lines, SK-MEL-24, SK-MEL-28, HM3KO, and MNT-1 cells.

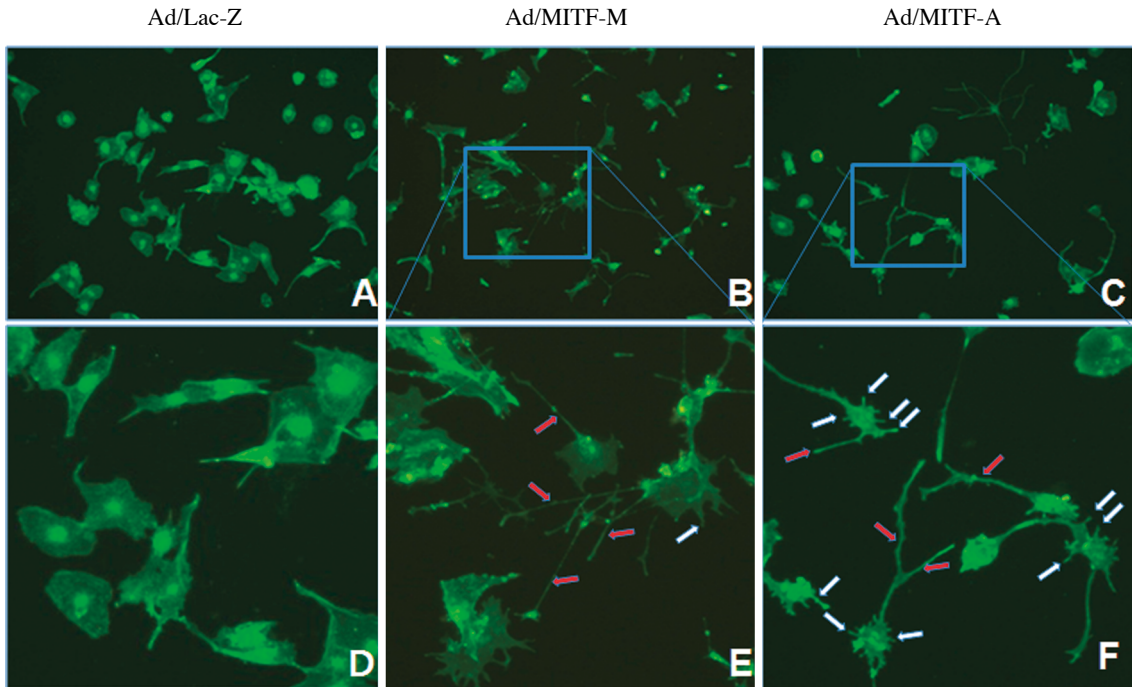


Fig. 2. The change of morphology of the MITF-overexpressed SK-MEL-24 melanoma cells. Number of the dendrites, mainly long (red arrows), are increased in the MITF-M-overexpressed SK-MEL-24 melanoma cells (B and E) compared to the Ad/Lac-Z control (A and D). Number of the dendrites, mainly short (white arrows), are increased in the MITF-A-overexpressed SK-MEL-24 melanoma cells (C and F) compared with the Ad/Lac-Z control (A and D). E and F, Magnified photographs of the rectangular region in the Fig. B and Fig. C, respectively. Original magnification, A-C, $\times 100$; D-F, $\times 400$.

것을 확인하였다. 이 가지돌기를 F-actin 염색을 통해서 가지돌기의 길이와 모양을 자세히 관찰할 수 있었다. 그리고

MITF-A도 대조군인 Lac-Z와 비교해봤을 때 분화된 세포에서도 차이를 보였고 또한 MITF-M과는 달리 짧고 많은

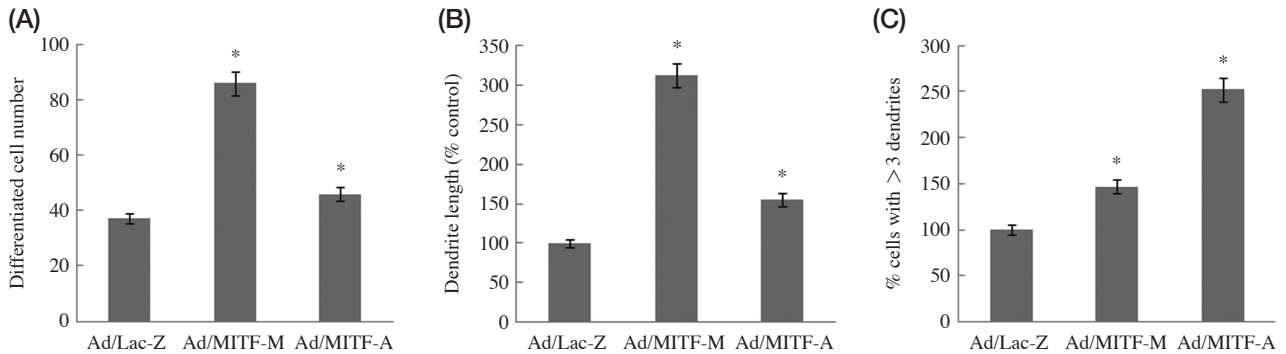


Fig. 3. The graphs for the morphometric analysis of Fig. 2 data. (A) Differential cell number in the control (Ad/Lac-Z), MITF-M-overexpressed cells (Ad/MITF-M), and MITF-A-overexpressed cells. (B) Dendritic length (% control) in the control, MITF-M-overexpressed cells, and MITF-A-overexpressed cells. (C) % cell with >3 dendrites in the control, MITF-M-overexpressed cells, and MITF-A-overexpressed cells. Results are expressed as the mean \pm SD of independent experiments (n=3). * Significantly different ($p < 0.05$) from the control.

가지돌기들이 증가되었다(Figs. 2, 3).

4. SK-MEL-24 흑색종 세포에서 MITF 과발현에 의한 Rac1의 발현 변화

SK-MEL-24 흑색종 세포에 각각 MITF-M과 MITF-A의 adenovirus를 사용하여 과발현시키고 2일 후 세포를 걷어 실험을 진행하였다. Western blot을 이용하여 Rac1 단백질의 발현 변화를 확인한 결과 total Rac1과 활성형인 phospho-Rac1이 MITF-M과 MITF-A를 과발현시킨 세포들에서 발현양이 증가하였다(Fig. 4).

고 찰

멜라닌세포는 신경능으로부터 파생되었고 신경세포와 가지돌기를 가지고 있는 형태학적인 유사점을 가지고 있다[13,14]. 멜라닌세포의 가지돌기를 통해 표피의 각질세포 주변으로 멜라닌 색소 합성에 중요한 특정 소기관인 멜라노솜을 이동시켜주는 중요한 역할을 한다[15]. 멜라닌 형성을 촉진하는 자극제로 알려진 α -MSH, NGF와 ET-1은 멜라닌 형성을 유도하고 하위 신호를 통해 가지돌기가 형성된다[16].

본 연구에서는 흑색종세포 가지돌기의 형성에 MITF의 역할을 연구하기 위해서 이를 과발현시켜 그 영향에 대해 연구하였다. 무흑색소성 흑색종세포인 SK-MEL-24에 MITF-M 및 MITF-A를 adenovirus를 이용하여 과발현시켜 형태학적 변화를 확인하였고, 그 변화를 살펴보면 가지돌기의 길이 및 형태가 MITF-M, MITF-A가 서로 각각 다른 유형의 변화가 나타남을 확인하였다.

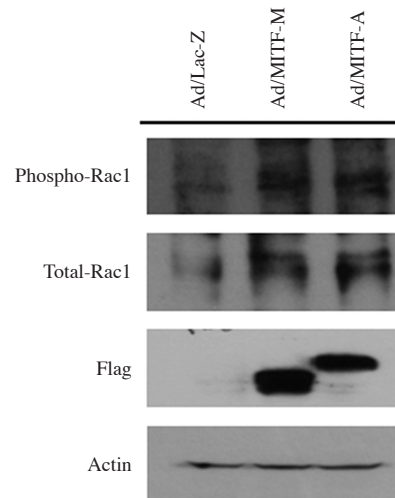


Fig. 4. Expression of total-Rac1 protein and phospho-Rac-1 protein, active form of Rac1, are increased in the MITF-M-overexpressed cells (Ad/MITF-M), and in the MITF-A-overexpressed cells (Ad/MITF-A) compared with the control (Ad/Lac-Z). The band of Flag shows that adenoviral vectors including MITF-M and MITF-A respectively are transfected well in each cells.

SK-MEL-24 세포에 MITF-M, -A를 과발현시킨 결과 세포의 형태가 변하는 것을 확인하였고, 대조군에 비해 가지돌기의 길이가 MITF-M에서는 전체적으로 길어질 뿐만 아니라 분화된 세포의 수 역시 증가하는 것을 확인하였고, 반면에 MITF-A는 MITF-M과 달리 셋 이상의 가지돌기의 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

MITF-M과 MITF-A 아형의 유전자에서 첫 번째 엑손을 제외하고 2~9 엑손이 동일하다고 하였는데 MITF-M과 MITF-A 유전자 서열을 정밀하게 서로 비교해보았을 때 엑손 6에 아미노산 6개가 MITF-M에는 있지만 MITF-A

에는 없는 것을 알 수 있었다. 또한 생쥐 MITF 엑손 6의 splicing variants에 따라 tyrosinase의 활성에 차이를 보인다는 연구가 있었다[23]. 이를 통해 보았을 때 MITF의 엑손 6의 아미노산 6개가 tyrosinase의 발현에 중요하다는 것을 확인하였으며 멜라닌세포의 가지돌기 형성에는 중요한 역할을 하지 않고 있음을 보여주고 있다. 그러나 사람에 대한 연구는 아직 알려진 바가 없어 이에 관련하여 MITF의 다양한 아형의 세포 기능 조절에 대해 자세한 연구가 필요할 것으로 보여진다.

MITF-M 및 MITF-A를 과발현시킨 후 가지돌기 형성과 관련된 Rho family GTPases 물질인 Rac1 단백질의 발현 정도를 각각 확인하였다. Rho family GTPases 유전자들은 가지돌기 형성에 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, Rac1은 가지돌기와 판돌기(lamellipodia) 형성을 촉진한다고 알려져 있다[24-27]. 본 연구의 결과는 MITF-M, MITF-A가 SK-MEL-24 세포에서 Rac1 단백질의 신호를 통하여 가지돌기가 증가함을 보여준다. Rac1이 멜라닌세포의 가지돌기를 증가시키는 데 관여하기는 하지만 MITF-M과 MITF-A가 각각 가지돌기의 수를 증가하거나 길이가 증가시키는 기전에 대한 자세한 연구가 필요하다.

결론적으로 MITF-M과 MITF-A가 멜라닌세포의 가지돌기 형성을 증가시킴을 확인하였다.

REFERENCES

- Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrimsson A, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*. 1993; 74:395-404.
- Widlund HR, Fisher DE. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene*. 2003; 22:3035-41.
- Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet*. 2004; 38, 365-411.
- Price ER, Horstmann MA, Wells AG, Weilbaecher KN, Takemoto CM, Landis MW, et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone signaling regulates expression of microphthalmia, a gene deficient in Waardenburg syndrome. *J Biol Chem*. 1988; 273: 33042-7.
- Bertolotto C, Abbe P, Timothy J, Bille HK, Fisher DE, Ortonne JP, et al. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol*. 1998; 142:827-35.
- Goding CR. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev*. 2000; 14:1712-28.
- Hershey CL, Fisher DE. Genomic analysis of the Microphthalmia locus and identification of the MITF-J/Mitf-J isoform. *Gene*. 2005; 347:73-82.
- Tachibana M. Cochlear Melanocytes and MITF Signaling. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2001; 6:95-8.
- Vachtenheim J, Novotna AH. Expression of genes for microphthalmia isoforms, Pax3 and MSG1, in human melanomas. *Cell Mol Biol*. 1999; 45:1075-82.
- Ooishi R, Shirai M, Funaba M, Murakami M. Microphthalmia-associated transcription factor is required for mature myotube formation. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1820:76-83.
- Lee SH, Lee JH, Lee JH, Kim DK. Involvement of MITF-A, an alternative isoform of mi transcription factor, on the expression of tryptase gene in human mast cells. *Exp Mol Med*. 2010; 42:366-75.
- Johnson SL, Nguyen AN, Lister JA. mitfa is required at multiple stages of melanocyte differentiation but not to establish the melanocyte stem cell. *Dev Biol*. 2011; 350:405-13.
- Dorsky RI, Moon RT, Raible DW. Environmental signals and cell fate specification in premigratory neural crest. *Bioassay*. 2000; 22:708-16.
- Jimbow K, Quevedo WC, Prota G, Fitzpatrick TB. Biology of melanocytes. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI. *Dermatology in general medicine*, 5th ed., New York: McGraw-Hill; 1999.
- Cardinali G, Ceccarelli S, Kovacs D, Aspite N, Lotti LV, Torrisi MR, et al. Keratinocyte growth factor promotes melanosome transfer to keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2005; 25:1190-9.
- Gilchrest BA, Park HY, Eller M, Yaar M. The photobiology of the tanning response. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP, editors. *The pigmentary system physiology and pathophysiology*. New York: Oxford University Press; 1998.
- Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*. 2007; 21:976-94.
- Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 1992; 70:389-99.
- Ridley AJ, Hall A. Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fiber formation: requirement for a tyrosine kinase. *EMBO J*. 1994; 13:2600-10.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane

- ruffling. *Cell*. 1992; 70:401-10.
21. Imokawa G. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res*. 2004; 17:96-110.
 22. Herlyn M, Mancianti ML, Jambrosic J, Bolen JB, Koprowski H. Regulatory factors that determine growth and phenotype of normal human melanocytes. *Exp Cell Res*. 1988; 179:322-31.
 23. Masaru M, Yasuhiro I, Masayuki F. Expression and transcriptional activity of alternative splice variants of Mitf exon 6. *Mol Cell Biochem*. 2007; 303:251-57.
 24. Scott G. Rac and rho: the story behind melanocyte dendrite formation. *Pigment Cell Res*. 2002; 15:322-30.
 25. Sander EE, Klooster JP, Delft S, Kammen RA, Collard JG. Rac downregulates Rho Activity: Reciprocal Balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol*. 1999; 147:1009-21.
 26. Jalink K, Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S, Moolenaar WH. Inhibition of lysophosphatidate and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTPbinding protein Rho. *J Cell Biol*. 1994; 126:801-10.
 27. Katoh H, Aoki J, Ichikawa A, Negishi M. RhoA-binding Kinase ROKa induces neurite retraction. *J Biol Chem*. 1998; 273:2489-92.

Effect of MITF-M and MITF-A Overexpression on the Dendritic Formation in Melanocytes

In Sook Jo¹, Kyung-Cheol Sohn², Chang Deok Kim², Young Ho Lee¹

¹*Department of Anatomy, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea*

²*Department of Dermatology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea*

Abstract : The microphthalmia-associated transcription factor (MITF), has been described as the master regulator of the basic helix-loop-helix leucine zipper family, involves melanogenesis in melanocytes. MITF consists of at least six isoforms, called MITF-M, MITF-A, MITF-B, MITF-C, MITF-H, and MITF-J. Previously, we found that not only MITF-M is expressed in the human hair follicle, but also MITF-A, MITF-C, MITF-H, and MITF-J isoforms are expressed in the skin. The aim of this study was to conform the MITF isoforms expressed in human skin, and investigate novel role of MITF isoforms in the melanocytes. Expression of MITF-M and MITF-A was found in primary melanocytes and the melanoma cell lines. Interestingly, when MITF-M and MITF-A were overexpressed in the SK-MEL-24 melanoma cells by adenoviral transfection, length of the dendrites, serves as the principal conduit for melanosomes transfer, was significantly increased in the MITF-M overexpressed cells compared with the control group, and number of the dendrites was significantly increased in the MITF-A overexpressed cells. A signal molecule involve in actin polymerization during dendrite formation, Rac1, was increased in the SK-MEL-24 melanoma cells treated with adenoviral MITF-M and MITF-A vectors. These results suggest that MITF-M and MITF-A induce dendrite formation via Rac1 signaling in the melanocytes.

Keywords : MITF, Melanocytes, Dendrites