

세포내 알칼리화에 따른 비정상 구조
CFTR의 세포막 발현 증가

연세대학교 대학원

의과학과

남궁완

세포내 알칼리화에 따른 비정상 구조
CFTR의 세포막 발현 증가

지도 이 민 구 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2005년 12 월

연세대학교 대학원

의과학과

남궁완

남궁완의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2005 년 12 월

감사의 글

약리학교실에 들어온지 벌써 5년이라는 시간이 흘렀습니다. 그 동안 참 많은 일이 있었고, 소중한 분들과의 만남을 통해 좋은 인연을 맺을 수 있었던 뜻 깊은 시간이었습니다. 무엇보다 이 글을 통해서 석사과정부터 지금까지 저를 지도해주신 이민구 교수님께 감사의 마음을 전하고 싶습니다. 처음부터 저와의 인연을 소중하게 생각해 주셨고, 저에게 지식이나 기술뿐만 아니라 과학자로서의 사고 방식과 마음가짐을 가르쳐 주신 점 깊이 감사드립니다. 늘 지켜봐 주시고 많은 격려와 큰 도움을 주신 김경환 교수님께 진심으로 감사드립니다. 따뜻한 미소로 반겨주시고 많은 도움주신 김혜영 교수님, 보다 좋은 연구를 위해 많은 조언 해주신 안영수 교수님, 저희에게 많은 배려를 해주신 김동구 교수님, 열정적인 연구자의 모습을 보여주신 장정원 교수님께 진심으로 감사드립니다.

저에게 많은 격려와 관심 가져주신 윤주현 교수님, 열정적으로 실험하시는 모습이 참 좋았던 김경섭 교수님, 학위 논문을 꼼꼼히 검토해 주신 김종선 교수님께 보다 좋은 논문이 될 수 있도록 도와 주셔서 진심으로 감사드립니다. 그리고 그동안 어려운 일을 많이 도와주셨던 안덕선 교수님께 감사드립니다.

즐겁고 힘들었던 시간을 늘 함께한 실험실 식구들 저에게는 참 든든한 동반자였습니다. 따뜻한 마음을 가진 지현이, 착실하고 든든한 민재, 큰형님 같은 이성희 선생님, 독실한 백만돌이 요셉, 마음 넓고 성격 좋은 정남이, 기분 좋게 만드는 준오, 성실하고 믿음직한 재석이, 성격 좋은 정수 모두 감사합니다.

신영이랑 다현이를 많이 챙겨준 지혜누나, 오랜 시간 함께해서 즐거웠던 장원이형, 지훈이형, 진우형, 정연누나, 정혜연 선생님, 인숙누나, 형진이, 지하, 정호 그리고 약리학교실 식구들 모두 감사드립니다. 곧 새색시가 되는 예쁜 선혜누나 그리고 교실 살림을 잘 맡아주신 임종수 선생님께 감사드립니다.

힘들고 지칠 때 위로가 되어준 내 소중한 친구 정현이, 오균이, 영조, 재하, 원정이, 윤정이, 현정이, 은미, 지이, 성목이, 준영이, 영재, 세웅이, 모두에게 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

지금까지 저를 키워주시고 늘 마음속의 큰 나무가 되어주시는 부모님 진심으로 감사드립니다. 많이 걱정해주시고 늘 관심 가져주신 장인, 장모님 진심으로 감사드립니다. 늘 함께해준 우리 누나 그리고 동생 정화 또 듬직한 매형 귀여운 혜원이와 찬희, 유쾌한 처제 그리고 착한 처남 모두 고맙고 사랑합니다. 항상 제 편이 되어주고 많은 것을 인내하며 저를 위해 봉사해준 사랑하는 아내와 예쁘고 귀엽고 사랑스러운 우리 딸 다현이에게 사랑과 감사의 마음을 전합니다.

차 례

그림 및 표 차례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 실험 재료 및 관류액	7
2. 세포 배양 및 Transfection	7
3. Cl 이온의 세포막 투과도 측정	8
4. 세포내 pH 측정	9
5. Western blot	9
6. N-glycosidase 처리	10
7. Patch-clamp technique을 이용한 CFTR의 Cl ⁻ 전류 측정	10
8. 골지체 pH 측정	11
9. Proteasome 활성 측정	11
10. Real Time PCR	12
11. in vivo 동물 실험	12
12. 생쥐 소변의 HCO ₃ ⁻ 양 측정 및 pH 측정	13
13. Short-circuit current 측정	13
14. 면역형광염색	14
III. 결과	15
1. 세포내 알칼리화에 따른 CFPAC-1 세포의 Cl ⁻ /NO ₃ ⁻ exchange 활성 변화	15
2. 세포내 알칼리화에 따른 CFPAC-1 세포의 내강막 Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ exchange 활성 변화	16
3. 세포내 알칼리화에 따른 Wild type과 ΔF508-CFTR 단백질의 발현량 변화	18
4. 세포내 알칼리화에 따른 Wild type과 ΔF508-CFTR의 Cl ⁻ 전류 변화	19

5. 알칼리성 배양액과 Bafilomycin A에 의한 세포질 및 골지체의 pH 변화	21
6. 시간에 따른 알칼리성 배양액과 Bafilomycin A에 의한 세포질 및 골지체의 pH 변화 및 $\Delta F508$ -CFTR 단백질의 발현 조절	22
7. 세포내 알칼리화에 따른 molecular chaperone과 ubiquitination된 단백질의 변화	23
8. 세포내 알칼리화에 따른 프로테아좀 활성 변화	24
9. 세포내 알칼리화에 따른 WT과 $\Delta F508$ -CFTR의 mRNA 발현량 변화	25
10. NaHCO_3 섭취에 따른 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐 소변의 pH 및 HCO_3^- 농도의 변화	26
11. 대사성 알칼리 혈증 유도 따른 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐의 생존율 및 CFTR 의존적인 Cl^- 전류 변화	27
12. $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐의 대장에서 CFTR 단백질의 발현	28
IV. 고찰	30
V. 결론	34
참고문헌	35
영문요약	40

그림 차례

그림 1. CFTR 단백질의 세포막 발현 및 분해 과정	5
그림 2. CFPAC-1 세포에서 $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ exchange 활성 측정	16
그림 3. CFPAC-1 세포의 내강막 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange 활성 측정	17
그림 4. 세포내 알칼리화에 의한 Wild type과 ΔF508 -CFTR 단백질 발현 변화	19
그림 5. 세포내 알칼리화에 따른 CFTR의 Cl^- current 변화	20
그림 6. 골지체 및 세포질의 pH 측정	21
그림 7. 시간에 따른 세포내 알칼리화에 의한 세포질 및 골지체의 pH 변화 및 ΔF508 -CFTR 단백질의 발현 변화	22
그림 8. 세포내 알칼리화에 따른 molecular chaperone의 발현량 변화와 ubiquitination된 단백질의 변화	23
그림 9. 세포내 알칼리화에 따른 프로테아좀 활성 변화 측정	24
그림 10. 세포내 알칼리화에 따른 CFTR 유전자의 발현 변화	25
그림 11. NaHCO_3 섭취에 따른 생쥐 소변의 pH 및 HCO_3^- 농도의 변화	26
그림 12. 대사성 알칼리 혈증 유도 따른 ΔF508 동형 집합체 생쥐의 생존율 및 소장에서의 CFTR 의존적인 Cl^- 전류 측정	28
그림 13. 생쥐의 대장에서 CFTR 단백질의 발현 변화	29

세포내 알칼리화에 따른 비정상 구조 CFTR의 세포막 발현 증가

낭포성 섬유증 (cystic fibrosis)은 백인에서 가장 흔한 생명을 제한하는 상염색체 열성 유전병으로 세계적으로 약 6 만여 명이 이 질병을 앓고 있다. 낭포성 섬유증을 가진 사람들은 주로 세균 감염에 의한 폐질환으로 대부분 30~40 세에 생을 마감하며, 지금까지 수많은 학자들이 이 질환을 치료하기 위해 유전자 치료 등의 다양한 시도를 했지만 아직까지 치료가 어려운 실정이다. 이 질환의 원인은 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)의 유전변이에 의한 기능 상실이며, 이러한 CFTR의 유전자 변이는 낭포성 섬유증과 기관지확장증 및 만성 췌장염 등의 호흡기 및 소화기 질병을 유발하며, 최근 한국인에서도 CFTR의 유전자 변이가 기관지확장증 및 만성 췌장염 질환과 관련 있음이 밝혀졌다. 백인에서 가장 흔한 유전자 변이는 CFTR의 508 번째 phenylalanine이 결실된 형태의 CFTR ($\Delta F508$ -CFTR)을 가지는 것이다. 새로 합성된 $\Delta F508$ -CFTR은 비정상 구조를 이루기 때문에 100 %가 Endoplasmic reticulum (ER) quality control system에 의해서 분해되어 세포막으로 이동하지 못해서 질병을 유발시킨다.

새로 합성된 모든 $\Delta F508$ -CFTR 및 일부 WT-CFTR은 ER에서 ER 내강 및 세포질에 존재하는 다양한 molecular chaperone과 결합하게 된다. 모든 $\Delta F508$ -CFTR과 일부 WT-CFTR은 molecular chaperone과 여러 단백질과의 상호작용에 의해서 ubiquitination된 후 ER translocon pore를 통해 밖으로 나와 26S 프로테아좀에 의해 분해되는 과정을 거치게 된다. 이때 일부 CFTR 단백질은 pre-Golgi intermediate나 cis-Golgi element까지는 이동을 하며, chaperone과 KDEL 수용체 등에 의해서 다시 ER로 역수송된 후 분해된다. cis-Golgi까지 이동한 $\Delta F508$ -CFTR의 ER로의 역수송에 가장 주된 역할을 하는 것은 골지체의 pH이다. 본 실험에서는 세포내 알칼리화가 이루어지면 골지체의 pH가 상승하게 되어 이로

인해 COPI vesicle에 의한 골지체에서 ER로의 역수송이 억제될 것이고 KDEL 수용체에 의한 ER로의 역수송 역시 억제되는 효과가 있을 것으로 가정하고, 세포내 알칼리화에 따른 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현에 대한 연구를 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 세포질 및 골지체의 알칼리화는 CHO 세포 및 CFPAC-1 세포에서 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현을 증가시키고 CFTR의 Cl^- channel 기능을 회복시켰다. 그리고 세포질 및 골지체의 알칼리화는 CFTR 단백질의 발현에 영향을 주는 molecular chaperon의 발현량, 단백질의 ubiquitination 정도 그리고 프로테아좀의 활성화에는 영향을 미치지 않았으며, CFTR 유전자의 발현을 약간 감소시키는 경향이 있었을 뿐 증가시키지 않았다. 또한 이러한 현상이 *in vivo*에서도 일어나는지 확인하기 위하여 homozygous $\Delta F508$ 생쥐에 2% sucrose와 280mM $NaHCO_3$ 를 포함하는 물을 먹여 가벼운 대사성 알칼리 혈증을 유도한 경우 생후 4 개월간의 생존율이 크게 증가하였다. 그리고 $NaHCO_3$ 를 섭취시킨 Homozygous $\Delta F508$ 생쥐의 소장 내장막에서 CFTR 의존적인 I_{sc} 가 크게 증가하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 세포질 및 골지체의 알칼리화는 결과적으로 $\Delta F508$ -CFTR이 ER quality control system을 벗어날 수 있게 해주어 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현을 돕는 역할을 함을 알 수 있었으며, *in vivo* model에서도 이러한 현상이 일어남을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 결과를 바탕으로 Vacuolar H^+ -ATPase 특이적인 억제제를 사용한 골지체의 알칼리화를 통해서 $\Delta F508$ -CFTR이 ER quality control system을 벗어날 수 있게 해주는 것은 $\Delta F508$ -CFTR로 인한 낭포성 섬유증 치료에 새로운 방법이 될 수 있을 것이다.

핵심되는 말 : CFTR, $NaHCO_3$, 골지체, ER, 알칼리화

세포내 알칼리화에 따른 비정상 구조 CFTR의 세포막 발현 증가

<지도교수 이민구>

연세대학교 대학원 의과학과

남궁완

I. 서론

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)는 cAMP 의존적인 Cl^- 통로로 다양한 단백질과의 상호작용을 통해 호흡기와 위장의 상피세포에서 HCO_3^- 분비 및 상피세포 분비액의 분비 조절에 중요한 역할을 하고 있다. 하지만 유전변이에 의해 CFTR의 기능이 상실되면 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis)을 유발시킨다. 세계적으로 약 6 만여 명이 이 질병을 앓고 있으며, 낭포성 섬유증을 가진 사람들은 주로 세균 감염에 의한 폐질환으로 대부분 30~40 세에 생을 마감하게 된다.^{1,2} 이러한 CFTR의 유전자 변이는 낭포성 섬유증과 기관지확장증 및 만성 췌장염 등의 호흡기 및 소화기 질병을 유발하며, 최근 한국인에서도 CFTR의 유전자 변이가 기관지확장증 및 만성 췌장염 질환과 관련 있음이 밝혀졌다.³ 백인에서 가장 흔한 유전변이는 CFTR의 508 번째 phenylalanine 이 결실된 형태의 CFTR (ΔF508 -CFTR)을 가지는 것이다. 이 ΔF508 -CFTR은 정상적인 CFTR의 Cl^- 통로 기능은 가지고 있지만, 새로

합성된 $\Delta F508$ -CFTR이 비정상 구조를 이루기 때문에 100%가 Endoplasmic reticulum (ER) quality control system에 의해서 분해되어 세포막으로 이동하지 못하게 되어 질병이 유발된다.⁴

지금까지 알려진 CFTR의 분해 과정은 다음과 같다. 그림 1에서 처럼 새로 합성된 모든 $\Delta F508$ -CFTR 및 일부 WT-CFTR은 ER에서 ER 내강 및 세포질에 존재하는 다양한 molecular chaperone과 결합하게 된다. 대표적으로 calnexin, Hsc70, Hsp40, Hsp70, Hsp90 등의 chaperone들이 CFTR과 결합한다고 알려져 있다.⁵⁻⁸ 이들 대부분의 molecular chaperone을 세포에 과발현 시킬 경우 CFTR 단백질의 발현양이 급격하게 줄어든다. 모든 $\Delta F508$ -CFTR과 일부 WT-CFTR은 molecular chaperone과 여러 단백질과의 상호작용에 의해서 ubiquitination된 후 ER translocon pore를 통해 밖으로 나와 26S 프로테아좀에 의해 분해되는 과정을 거치게 된다.⁸ 이때 대부분의 CFTR 단백질은 ERAD에 의해 ER에서 분해되지만, 일부 CFTR 단백질은 pre-Golgi intermediate나 cis-Golgi element까지는 이동을 하며,⁹ chaperone과 KDEL 수용체 등에 의해서 다시 ER로 역수송된 후 분해된다. cis-Golgi까지 이동한 $\Delta F508$ -CFTR의 ER로의 역수송에 가장 주된 역할을 하는 것은 골지체의 pH이다. 골지체의 pH는 Vacuolar H⁺-ATPase에 의해서 pH 6.3정도의 산성을 유지하게 되며, 이러한 산성 환경에서는 $\Delta F508$ -CFTR-chaperone 복합체와 KDEL 수용체와 결합력이 강하게 되어 KDEL 수용체와 복합체를 구성해 다시 ER로 역수송된 후 프로테아좀에 의해 분해되게 된다.^{10,11} 골지체에서 ER로의 역수송은 COPI vesicle에 의해서 이루어 지는데 이때 골지체의 산성 pH가 COPI vesicle 형성에 중요한 역할을 한다. 산성 pH에서 COPI vesicle은 잘 형성 되지만, pH가 알칼리화 되면 COPI vesicle의 형성이 잘 이루어 지지 않는다.¹²

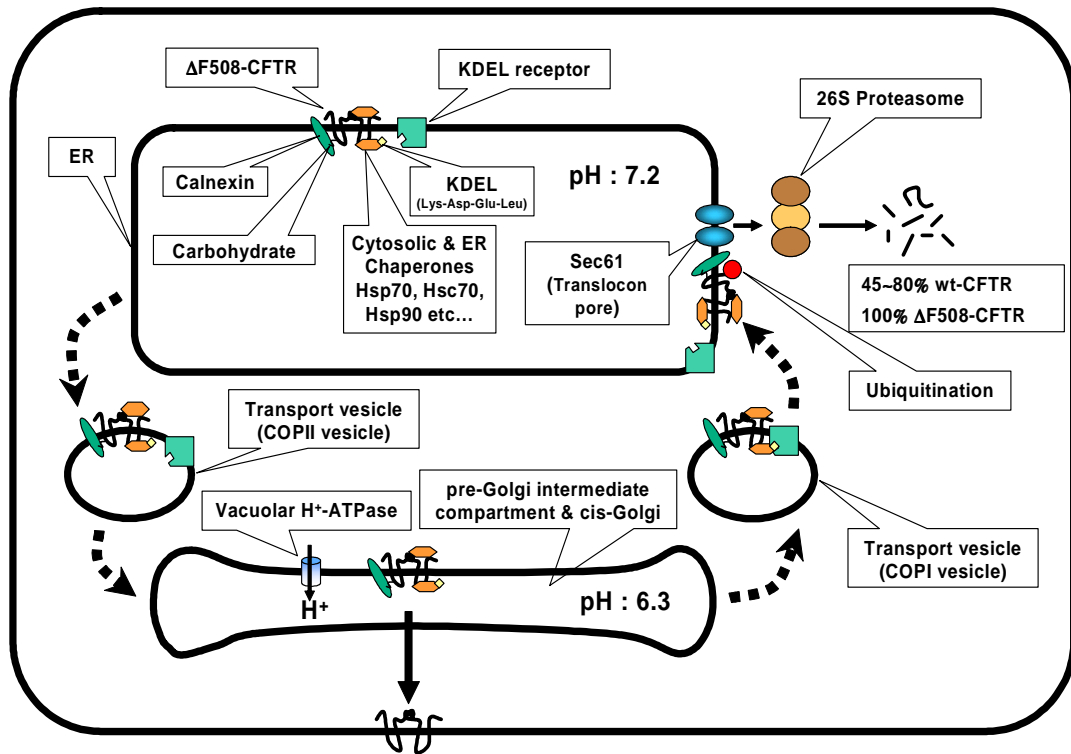


그림 1. CFTR 단백질의 세포막 발현 및 분해 과정

지금까지 낭포성 섬유증의 치료를 위해 많은 연구가 진행되어 왔으며, 현재 세포 차원에서 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현을 증가시키는 세 가지 방법이 알려져 있다. 첫째 glycerol 등의 chemical chaperone을 세포에 처리해서 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현을 증가시키는 방법,¹³ 둘째 30 °C 이하의 온도에서 세포를 배양하는 방법,¹⁴ 셋째 thapsigargin을 이용해 ER calcium pump를 억제하여 ER chaperone의 기능을 막는 것이 그 것이다.¹⁵ 하지만 이들 방법은 세포 차원에서는 효과가 있으나 실제 환자의 치료에 적용하기에는 여러 가지 제약이 따르고 있다.

본 실험에서는 세포내 알칼리화가 이루어지면 골지체의 pH가 상승하게 되어 이로 인해 COPI vesicle에 의한 골지체에서 ER로의 역수송이 억제되고 KDEL 수용체에 의한 ER로의 역수송 역시 억제되는 효과가 있을 것으로 가정하였다. 이와 같은 가정 하에 세포내 알칼리화가 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현에 어떠한 영향을 미치는지에 대한

연구를 수행하였다. $\Delta F508$ -CFTR을 발현하는 세포주로 사람의 췌장 선세포에서 유래된 CFPAC-1을 사용하였으며, WT과 $\Delta F508$ -CFTR을 과발현 시키기 위해서 CFTR을 발현하지 않는 CHO 세포에 pCMV vector를 이용해서 CFTR 유전자 도입을 수행하였다. CFTR 단백질 발현은 CFTR 특이적인 M3A7 항체를 이용하였으며, 골지체의 pH 변화를 측정하기 위해서 pH indicator 역할을 하는 YFP에 Golgi residential sequence가 붙은 chimeric 단백질을 발현시키는 pEYFP-Golgi plasmid를 사용하였다. 세포내 알칼리화에 의한 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현 현상이 *in vivo*에서도 일어나는지 확인하기 위해서 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐에 280 mM NaHCO_3 를 함유하는 음료수를 먹여 가벼운 알칼리 혈증을 유발시켰다.¹⁶

세포내 알칼리화는 세포 수준에서 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현을 증가시키고 CFTR의 Cl^- 통로 기능을 회복시켰다. 하지만 CFTR 단백질의 발현에 영향을 주는 molecular chaperon의 발현량, 단백질의 ubiquitination 정도 그리고 프로테아좀의 활성에는 영향을 미치지 않았다. 또한 이러한 현상이 *in vivo*에서도 일어나는지 확인한 결과 2% sucrose와 280 mM NaHCO_3 를 포함하는 물을 먹여 가벼운 알칼리 혈증을 유도한 결과 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐의 생후 4 개월간의 생존율이 크게 증가하였다. 그리고 NaHCO_3 를 섭취시킨 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐의 소장 내강막에서 CFTR 의존적인 I_{sc} 가 Wild Type 생쥐 측정값의 약 21% 정도로 나타나 CFTR의 기능이 일부 회복되었음을 관찰하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 세포질 및 골지체의 알칼리화는 결과적으로 ER로의 역수송 억제를 통해 $\Delta F508$ -CFTR이 ER quality control system을 벗어날 수 있게 해주었으며, 이를 통해 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현을 돕는 기능을 함을 알 수 있었으며, *in vivo* model에서도 이러한 현상이 일어남을 확인할 수 있었다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 관류액

N-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium bromide (MQAE), Pluronic 그리고 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF-AM)은 Molecular Probes (Eugene, OR)로부터 구입하였다. CFTR 특이적인 M3A7과 24-1 일차항체는 각각 Upstate (Lake Placid, NY)와 R&D system (Minneapolis, MN)에서 구입하였다. Hsp70과 Hsc70에 특이적인 일차항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)로부터 구입하였다. Bafilomycin A1은 Alexis (San Diego, CA)에서 구입하였으며, 그 외의 시약은 Sigma (St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하였다. 기본 관류액은 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 D-Glucose 그리고 10 mM HEPES로 구성되어 있으며, pH는 NaOH를 사용하여 7.4로 맞추었다. HCO₃⁻ 관류액은 120 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 D-Glucose, 5 HEPES 그리고 25 mM NaHCO₃로 구성되어 있으며, pH는 7.4로 맞추었다. Cl⁻-free HCO₃⁻ 관류액은 120 Na⁺-gluconate, 5 K⁺-gluconate, 1 MgSO₄, 1 hemicalcium cyclamate, 10 D-Glucose, 5 HEPES 그리고 25 mM NaHCO₃로 구성되어 있으며, pH는 7.4로 맞추었다.

2. 세포 배양 및 Transfection

CFPAC-1 및 CHO-K1 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 각각 IMDM과 RPMI 1640 배양액에 10% FBS와 penicillin (50 units/ml)/ streptomycin (50ug/ml)을 첨가한 후 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. CFPAC-1 세

포주는 배양 후 trypsin/EDTA를 사용해서 세포를 분리하였고 3×10^5 cells/cm²로 Transwell-Clear Pol membrane (0.4 μ m pore diameter, Costar)을 사용해서 만든 permeable supporter 위에서 4~5 일 정도 키워서 단일층으로 tight junction을 이루는 기능적으로 분화된 취장 관세포로 배양하였다. WT-CFTR과 Δ F508-CFTR의 발현은 CHO 세포에 WT-CFTR과 Δ F508-CFTR 유전자를 포함하고 있는 pCMV plasmid를 LipofectAMINE Reagent (Life Technologies)를 이용해 transfection 하였고, transfection 후 24~48 시간 동안 배양한 후 실험하였다. Δ F508-CFTR 유전자를 포함하고 있는 pCMV plasmid는 PCR mutagenesis 방법으로 만들어 졌으며, 사용한 primer는 다음과 같다. sense: 5'-CCATTAAAGAAAATA TCA TTG GTG TTT CCT ATG ATG AATATA G-3', antisense: 5'-CTA TAT TCA TCA TAG GAA ACA CCA ATG ATA TTT TCT TTA ATG G-3'.

3. Cl 이온의 세포막 투과도 측정

cAMP 의존적인 Cl 이온의 세포막 투과는 주로 CFTR에 의한 것으로 Cl⁻ quenching 형광 dye인 MQAE에 의해 측정되었다. 우선 Δ F508-CFTR을 발현하는 CFPAC-1 세포를 coverslip 위에서 48 시간 동안 배양한 후 상온에서 40 μ M Cl⁻ quenching dye인 MQAE를 포함하는 PBS에서 30분간 배양 후 다시 ice 위에서 40분간 배양한다. MQAE dye가 loading된 세포를 관류 chamber에 장착한 후 excitation 350 nm와 emission 455 nm에서 나오는 MQAE 형광 변화를 측정한다. Cl⁻ 분비 측정 원리는 다음과 같다. 약 145 mM Cl⁻가 포함된 관류액을 흘려주다가 0 mM Cl⁻와 145 mM의 NO₃⁻가 포함된 관류액 흘려주면, 세포내에 있는 Cl⁻가 세포 밖으로 분비되게 되고 분비된 Cl⁻ 대신 NO₃⁻가 세포내로 들어감으로써 보다 빠르게 Cl⁻의 이동을 측정할 수 있었다.

4. 세포내 pH 측정

세포를 cover slip과 permeable supporter 위에서 배양한 뒤 pH 측정용 형광물질인 BCECF/AM이 4 μM 함유된 PBS에서 10분간 loading한 후 관류 chamber에 장착했다. 세포를 관류 chamber에 장착한 후 HCO_3^- 가 존재하는 관류액에서 excitation 477 nm 및 442 nm와 emission 510 nm에서 BCECF의 형광의 비율을 관측하여 세포내 pH 변화를 측정하였다. $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange 활성 측정은 다음과 같은 방법으로 이루어 졌다. 내강막과 측저막의 관류액을 차별적으로 흘려 줄 수 있게 만들어져 있는 chamber의 측저막 쪽에는 0 mM Cl^- 가 포함된 HCO_3^- 관류액으로 흘려주었다. 그리고 내강막 쪽에는 130mM Cl^- 가 포함된 HCO_3^- 관류액을 흘려 주다가 0 mM Cl^- 가 포함된 HCO_3^- 관류액으로 흘려주면, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger를 통해서 세포내의 Cl^- 가 내강막쪽 관류액으로 나오고, 내강막쪽 관류액에 있는 HCO_3^- 는 세포내로 들어가서 세포내 pH를 증가시키게 된다. 따라서 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성은 단위시간에 증가되는 세포내 pH 변화로 측정할 수 있었다.

5. Western blot

세포를 Phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 세 번 씻은 후 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, complete protease inhibitor mixture (Roche Applied Science, Mannheim, Germany))를 넣고 얼음 위에서 10분간 반응시켰다. 10분 후 sample을 얻어서 sonication한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 13000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액을 분리하고 Bio-Rad assay kit을 사용하여 단백질을 정량하였다. 50~120 μg 의 단백질을 6% acrylamide gel에서 전기 영동하여 분리한 후 nitrocellulose 막으로 전이했다. 단백질이 전이된 nitrocellulose 막을 3% non-fat milk, 0.1% Tween 20이 함유된 PBS로 상온에서 한 시간 동안 blocking한 후

각 단백질에 특이적인 일차항체를 이용하여 4 °C에서 12시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 증류수를 이용하여 두 번 씻고 이차항체를 이용하여 상온에서 한 시간 동안 반응시켰다. 한 시간 후 0.05 % Tween 20이 함유된 PBS로 10분간 씻어준 뒤 ECL solution kit를 사용하여 현상하였다.

6. N-glycosidase 처리

CFTR은 N-linked glycosylation된 단백질이기 때문에 N-glycosidase를 처리하면 N-linked carbohydrates가 분리된다. CFTR의 N-linked carbohydrates를 분해하기 위해서 N-glycosidase F (New England Biolabs)를 이용하였다.^{17,18} 먼저 CFTR을 발현시킨 CHO 세포에서 lysis buffer로 단백질을 분리한 후 5 % SDS와 1% β -mercaptoethanol을 포함하는 buffer로 만들어 37 °C에서 10 분간 배양해서 단백질의 삼차 구조를 풀었다. 그 후 N-glycosidase를 넣어 37 °C에서 2 시간 동안의 배양을 통해 N-linked carbohydrates 분해하였다.

7. Patch-clamp technique을 이용한 CFTR의 Cl⁻ 전류 측정

CHO 세포에 Wild type과 Δ F508-CFTR을 transfection한 후 5% CO₂ incubator에서 24 시간 배양한 뒤 2% CO₂ incubator에서 12~18 시간 동안 배양한 세포를 trypsin/EDTA를 이용해서 단위 세포 상태로 분리한 후 patch-clamp 관류 chamber에 세포를 고정시킨 후 whole cell patch-clamp technique을 사용해서 CFTR의 Cl⁻ 전류를 측정하였다. pipette 용액은 145 mM KCl, 5 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 0.4 mM CaCl₂, 2 mM Mg-ATP, 10 mM HEPES로 구성되었으며, pH는 7.4로 조정하였다. Bath 용액은 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 10 mM HEPES로 구성되었

으며, pH는 7.4로 조정하였다. 모든 실험은 22~25 °C에서 진행되었으며, pipette의 저항은 3~5 MΩ 이었다. CFTR 특이적인 Cl⁻ 전류는 5 μM forskolin과 100 μM IBMX 자극에 의해 생성된 전류를 통하여 측정하였다. Holding potential은 -30 mV이었으며, Cl⁻ 전류는 AxoScope 8.1 system과 Digidata 1322A AC/DC 변환기에 의해서 기록되었다.

8. 골지체 pH 측정

골지체의 pH는 pEYFP-Golgi Vector (BD Biosciences, CA)를 이용하여 측정하였다. pEYFP-Golgi Vector는 pH 변화에 따라 형광이 변하는 YFP와 골지체에 상주하는 단백질 일부가 결합된 단백질을 발현하며, 이를 통해 골지체 특이적인 pH를 측정할 수 있게 해준다. CHO 세포에 pEYFP-Golgi Vector를 발현시킨 뒤 Zeiss LSM510 confocal 형광 현미경을 이용해 골지체에 발현하고 있는 YFP를 excitation 480 nm에서 그리고 emission 530 nm에서 형광을 측정한다. confocal 형광현미경에 장착된 세포에 중성 배양액과 염기성 배양액을 차례로 흘려주면서 형광을 측정하였고, 145 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 μM nigericin 그리고 5 μM monensin로 구성된 pH 5.1, 5.8, 6.5 그리고 7.2의 pH 적정 용액을 흘려 주어 측정한 형광을 기준으로 형광 정도를 pH로 변환시켜 골지체의 pH를 측정하였다.

9. 프로테아좀 활성 측정

프로테아좀의 활성을 측정하기 위해서 Ub^{G76V}-GFP를^{19,20} 사용하였다. Ub^{G76V}-GFP는 프로테아좀의 기질로 작용하는데 프로테아좀의 기능이 억제되면 GFP의 형광이 증가하게 된다. 이를 이용하여 프로테아좀의 활성 정도를 측정할 수 있었다. 우선 CHO 세포에 Ub^{G76V}-GFP를 발현시킨 후 세포를 2% CO₂ incubator에서 배양하거나 bafilomycin A를 처리한 경우

5% CO₂ incubator에서 배양했을 때 각각의 GFP의 형광을 Zeiss LSM510 confocal 형광 현미경을 사용해서 측정하였다. GFP 형광은 excitation 480 nm에서 그리고 emission 510 nm에서 측정하였다.

10. Real Time PCR

CHO 세포에 Wild type과 ΔF508-CFTR 유전자를 발현시킨 뒤 24 시간 뒤에 2% CO₂ incubator와 5% CO₂ incubator에서 12 시간 동안 배양했다. 그 후 세포를 PBS로 두 번 씻은 뒤 Trizol (Invitrogen, CA)을 사용하여 total RNA를 추출 하고 random hexa-primer 와 Oligo-dT primer를 사용하여 RNase H-reverse transcriptase (Invitrogen, CA) 역전사효소로 역전사를 수행하여 cDNA를 합성했다. 합성된 cDNA를 template로 하여 QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, CA, USA)와 Rotor Gene 2072D (Corbett Research, Australia) Real Time PCR 기계를 사용하여 Real Time PCR을 수행하였다. β-actin mRNA 발현 정도를 Internal control로 사용하였다. 사용한 primer의 염기서열 및 PCR 산물의 크기는 다음과 같다. CFTR, sense: 5'-GCT TCT TTG GTT GTG CTG TGG C-3', antisense: 5'-AGT GTC GGC TAC TCC CAC GTA AAT G-3' (150 bp); β-actin, sense: 5'-GAC CCA GAT CAT GTT TGA GAC C-3', antisense: 5'-CTC GTA GAT GGG CAC AGT GTG-3' (145 bp).

11. in vivo 동물 실험

Homozygous ΔF508 생쥐에 가벼운 대사성 알칼리 혈증을 유도하기 위해서 2% sucrose와 280 mM NaHCO₃를¹⁶ 포함하는 물 이외에 다른 물은 주지 않았다. NaHCO₃를 포함하는 물을 제외한 나머지 고형 음식물은 표준 음식을 먹도록 하였다. 본 실험에서는 수돗물을 먹인 군, 2%

sucrose를 포함하는 물을 먹인 군, 2% sucrose와 0.9% NaCl을 포함하는 물을 먹인 군 그리고 2% sucrose와 280mM NaHCO₃를 포함하는 물을 먹인 군으로 나누어 생후 4 개월간의 생존율을 관찰하였다. 그리고 생후 4 개월까지 생존한 생쥐의 소장 (십이지장 부위)을 적출하여 10 μM forskolin과 100 μM IBMX 자극에 의한 CFTR 의존적인 short circuit current (I_{sc})를 측정하였다.

12. 생쥐 소변의 HCO₃⁻양 측정 및 pH 측정

CO₂, HCO₃⁻ SIGMA Diagnostics Kit (132-A)를 사용해서 소변 속에 함유된 HCO₃⁻양을 측정하였다. CO₂ sample start reagen를 37 °C로 만든 후 spectrophotometer를 340 nm로 맞추어 37 °C로 유지시킨다. CO₂ sample start reagen 1 ml을 tube에 넣고 생쥐로부터 소변 5 μl를 얻어 즉시 넣어 잘 섞은 뒤 37 °C에서 5분간 배양한다. 배양 후 340 nm에서 spectrophotometer를 이용해서 O.D. 값을 얻었고 20, 40, 42, 44, 46, 48 mM NaHCO₃를 이용해서 HCO₃⁻에 대한 standard를 잡아 생쥐 소변에 함유된 HCO₃⁻ 농도를 측정하였다. 그리고 생쥐 소변의 pH 측정은 생쥐의 소변을 받은 즉시 Glass Micro-pH Combination Electrode (9802BN, Thermo electron co., MA)를 이용해서 측정하였다.

13. Short-circuit current 측정

생쥐를 밤 동안 물을 제외한 먹이를 일절 주지 않은 다음 생쥐의 소장 (십이지장 부위)을 적출하였다. 적출한 소장을 Classic Tissue Ussing Chamber (Warner instruments, Handen, CT)에 장착한 다음 37 °C를 유지하는 25 mM NaHCO₃가 함유된 관류액에서 10~20 분간 안정화시킨 다음 10 μM forskolin과 100 μM IBMX를 넣어 cAMP 자극을 유도해 CFTR 의존적인 short circuit current (I_{sc})를 측정하였다. 이 때 소장

조직은 0 mV로 전압을 고정하였고 변화하는 전류는 PowerLab data acquisition system (AD Instruments)을 이용하여 측정하였다.

14. 면역형광염색

생쥐의 대장 조직을 OCT compound를 이용해서 액체 질소로 얼려 -70℃에 보관한 후 micro tome을 이용해서 조직을 4 μm 두께로 잘라서 slide glass에 붙였다. 조직을 -20℃ methanol로 10분간 고정하고 permeabilization을 시킨 후 PBS로 두 번 세척한 다음 blocking 용액 (5% goat serum, 1% bovine serum albumin, 0.1% gelatin in PBS)으로 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후 조직을 PBS로 두 번 세척한 후 CFTR 특이적 일차항체 (24-1)를 blocking 용액에 1:100으로 희석한 뒤 90분 동안 상온에서 배양하였다. 배양한 다음 PBS로 조직을 세 번 세척하고 이차항체를 1:100으로 blocking 용액에 희석해서 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 그 다음 PBS로 세 번 세척한 뒤 물기를 잘 제거한 후 Mounting media로 cover slip을 조직이 붙어 있는 slide glass에 고정시켜 밤새 건조시킨 다음 Zeiss LSM510 confocal 형광현미경으로 관찰하였다.

Ⅲ. 결과

1. 세포내 알칼리화에 따른 CFPAC-1 세포의 $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ exchange 활성 변화

$\Delta\text{F508-CFTR}$ 을 발현하는 사람의 췌장 관세포주인 CFPAC-1세포를 이용하여 세포내 알칼리화에 따른 CFPAC-1 세포의 Cl^- 통로의 활성 변화를 Cl^- quenching dye인 MQAE를 사용하여 측정하였다. CFPAC-1 세포를 알칼리화 시키기 위해서 2% CO_2 incubator에서 12 시간 배양하였다. CFPAC-1 세포의 경우 2% CO_2 incubator에서 배양하면 세포내 pH가 7.15 ± 0.11 에서 7.66 ± 0.06 으로 상승하게 된다. 그리고 골지체의 pH는 약 6.2 정도로 산성을 유지하는데 이는 Vacuolar H^+ -ATPase가 골지체에 많이 존재하기 때문이다. 따라서 골지체만의 pH를 올리기 위해 5% CO_2 incubator에서 Vacuolar H^+ -ATPase 억제제인 bafilomycin A를²¹ 12 시간 동안 처리하였다. 그 후 MQAE dye를 세포에 loading한 뒤 CFTR 의존적인 Cl^- 통로의 활성 변화를 측정하기 위해서 5 μM forskolin과 100 μM IBMX로 세포를 자극한 후에 세포내 cAMP 증가에 의한 $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ exchange 활성 변화를 측정하였다. 그림 2에서 알 수 있듯이 CFPAC-1 세포를 2% CO_2 incubator에서 배양한 결과 5% CO_2 incubator에서 배양한 세포보다 $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ exchange 활성이 크게 증가되었다. bafilomycin A를 처리한 세포의 경우 넣어준 bafilomycin A의 용량에 비례하여 $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ exchange 활성이 증가하였다.

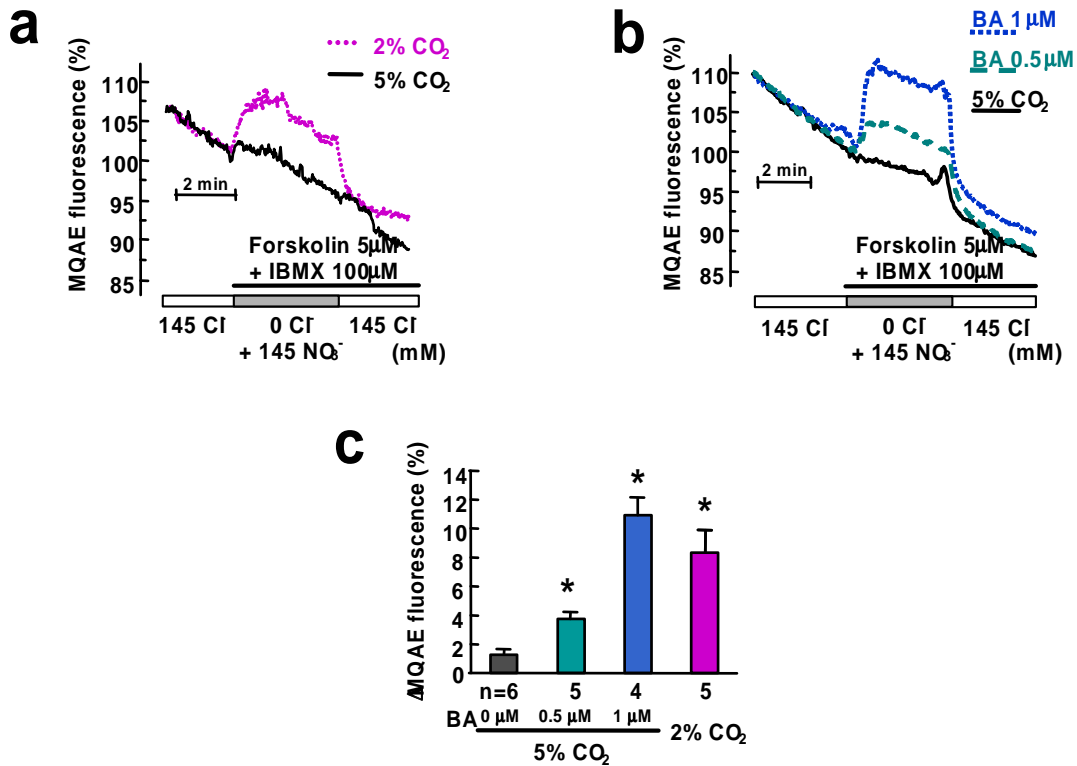


그림 2. CFPAC-1 세포에서 Cl⁻/NO₃⁻ exchange 활성 측정

cAMP 자극에 의한 Cl⁻/NO₃⁻ exchange 활성을 Cl⁻ quenching dye인 MQAE를 사용하여 측정하였다. a. CFPAC-1 세포를 2% CO₂ incubator에서 12 시간 배양한 후 cAMP 자극을 주어 Cl⁻/NO₃⁻ exchange 활성 변화를 측정하였다. b. Bafilomycin A를 12 시간 동안 처리한 후 cAMP 자극을 주어 Cl⁻/NO₃⁻ exchange 활성 변화를 측정하였다. c. cAMP 자극을 준 후 10 초 후에 증가된 MQAE 형광의 평균값. *p<0.05.

2. 세포내 알칼리화에 따른 CFPAC-1 세포의 내강막 Cl⁻/HCO₃⁻ exchange 활성 변화

세포막에 CFTR을 발현하는 세포의 경우 Forskolin을 처리해서 CFTR을 활성화 시키면 Cl⁻/HCO₃⁻ exchange 활성이 크게 증가한다.^{22,23} 세포내 알칼리화에 의해 CFPAC-1 세포에서 ΔF508-CFTR이 세포막으로 발현할 수 있는지 알아보기 위해 CFPAC-1 세포를 permeable supporter 위에서 배양해 분화시킨 뒤 pH dye인 BCECF를 이용하여 Cl⁻/HCO₃⁻ exchange 활성 정도를 측정하였다.²⁴ 분화된 CFPAC-1 세포를 2% CO₂ incubator에서

12 시간 배양한 후 BCECF dye를 loading한 뒤 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange 활성 변화를 측정하였다. 그림 3에서와 같이 mini ussing chamber system을 사용하여 CFPAC-1 세포 내강막의 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange를 측정한 결과 CFPAC-1 세포를 2% CO_2 incubator에서 배양하였을 때 5% CO_2 incubator에서 배양한 세포에서보다 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange 활성이 증가하였다.

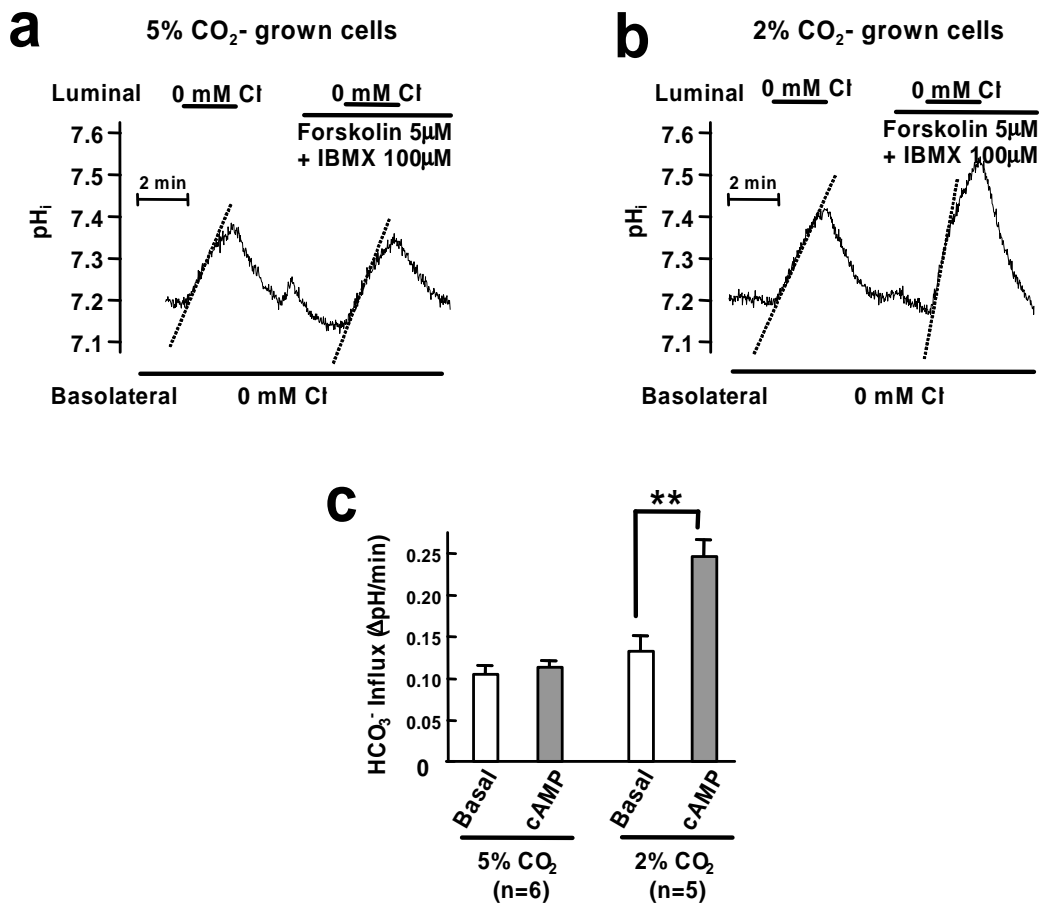


그림 3. CFPAC-1 세포의 내강막 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange 활성 측정

CFPAC-1 세포를 분화시킨 후 BCECF 형광 물질을 이용해서 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger에 의해 변하는 세포내 pH_i 를 측정하였다. a. 5% CO_2 incubator에서 12 시간 배양한 CFPAC-1 세포와 b. 2% CO_2 incubator에서 12 시간 동안 처리한 CFPAC-1 세포에 cAMP 자극을 주기 전과 준 후의 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange 활성 변화를 측정하였다. c. cAMP 자극을 주기 전과 준 후에 증가된 pH의 평균값. $**p < 0.01$.

3. 세포내 알칼리화에 따른 Wild type과 $\Delta F508$ -CFTR 단백질의 발현량 변화

Wild type(WT)-CFTR과 $\Delta F508$ -CFTR을 CHO 세포에 발현시킨 후 세포를 5% CO₂ incubator에서 배양한 것과 2% CO₂ incubator에서 배양한 것 그리고 Vacuolar H⁺-ATPase 억제제인 bafilomycin A를 처리한 군으로 분류한 후 CFTR 특이적인 일차항체 (M3A7)를 사용하여 CFTR 단백질의 발현 양상을 관찰하였다. CFTR은 그림 4a에서와 같이 3개의 band로 나타난다. 각각의 CFTR band는 glycosylation이 안된 band A, core glycosylation이 된 band B 그리고 mature complex glycosylation된 band C를 나타낸다. Band B는 ER에서 core glycosylation된 형태이고 band C는 ER을 벗어나 골지체에서 mature glycosylation 과정을 거친 형태의 것으로 세포막에 존재하는 CFTR 단백질로 간주할 수 있다.^{17,18} 그림 4a에서 처럼 WT-CFTR의 경우 bafilomycin A를 처리한 군과 2% CO₂ incubator에서 배양한 군에서 모두 band B가 증가하였다. 반면 $\Delta F508$ -CFTR의 경우 그림 4b에서 처럼 5% CO₂ incubator에서 배양한 것에서는 보이지 않던 mature glycosylation된 band C가 bafilomycin A를 처리한 군과 2% CO₂ incubator에서 배양한 군에서 관찰되었다. WT-CFTR에서 보이는 band C가 glycosylation에 의해 나타나는 것인지를 확인하기 위해 그림 4a에서 보듯이 N-glycosidase를 처리하였다.

N-glycosidase 처리에 의해 band B와 C가 사라졌고 band A만이 관찰되었다. 이는 band B와 C가 CFTR 단백질의 glycosylation된 형태라는 것을 의미한다. 그림 4b에서 보듯이 $\Delta F508$ -CFTR을 발현하는 CHO세포를 2% CO₂ incubator에서 배양한 후 cycloheximide (CHX)를 처리하면, 반감기가 짧은 band B는 빠르게 감소하며, 반감기가 긴 band C가 확연하게 구별되는 것을 확인할 수 있었다.

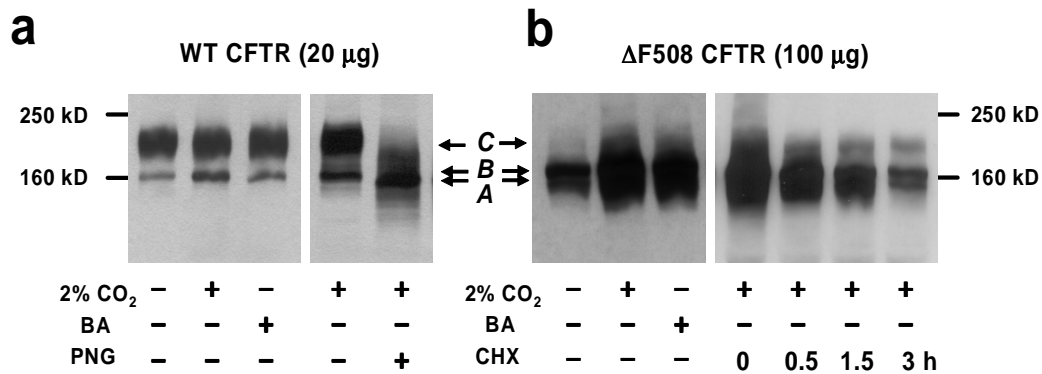


그림 4. 세포내 알칼리화에 의한 Wild type과 ΔF508-CFTR 단백질 발현 변화

a. Wild type(WT)-CFTR을 CHO 세포에 발현시킨 후 세포를 5% CO₂ incubator에서 배양한 것과 2% CO₂ incubator에서 배양한 것 그리고 bafilomycin A (BA)를 처리한 군으로 나누어 CFTR 단백질 발현 양상을 관찰하였다. Band C가 mature glycosylation된 CFTR인지 확인하기 위해서 Peptide:N-Glycosidase (PNG)를 처리해서 CFTR의 N-glycosylation을 제거하였다. b. ΔF508-CFTR을 CHO 세포에 발현시킨 후 세포를 5% CO₂ incubator에서 배양한 것과 2% CO₂ incubator에서 배양한 것 그리고 bafilomycin A (BA)를 처리한 군으로 나누어 CFTR 단백질 발현 양상을 관찰하였다. 또한 cycloheximide (CHX)를 처리하여 새로운 단백질 합성을 억제 한 후 시간에 따른 ΔF508-CFTR의 단백질 발현 변화를 관찰하였다.

4. 세포내 알칼리화에 따른 Wild type과 ΔF508-CFTR의 Cl⁻ 전류 변화

WT과 ΔF508-CFTR을 CHO 세포에 발현시킨 후 세포를 2% CO₂ incubator에서 12 시간 배양한 뒤 whole cell patch clamp technique을 사용하여 CFTR의 Cl⁻ 전류를 측정하였다. CFTR의 Cl⁻ 전류는 forskolin과 IBMX에 의한 cAMP 자극에 의해 유도되었다. WT-CFTR의 경우 2% CO₂ incubator에서 배양하였을 때 5% CO₂ incubator에서 배양한 세포에서 보다 Cl⁻ 전류가 약간 증가하였다. ΔF508-CFTR의 경우 5% CO₂ incubator에서 배양하였을 때 나타나지 않았던 Cl⁻ 전류가 측정되었으며,

그림 5e에서 보듯이 CFTR 특이적인 직선형의 I/V curve를 나타냈다. 이는 CHO 세포에서 세포내 알칼리화를 통해 $\Delta F508$ -CFTR이 세포막에 발현하였음을 뜻한다.

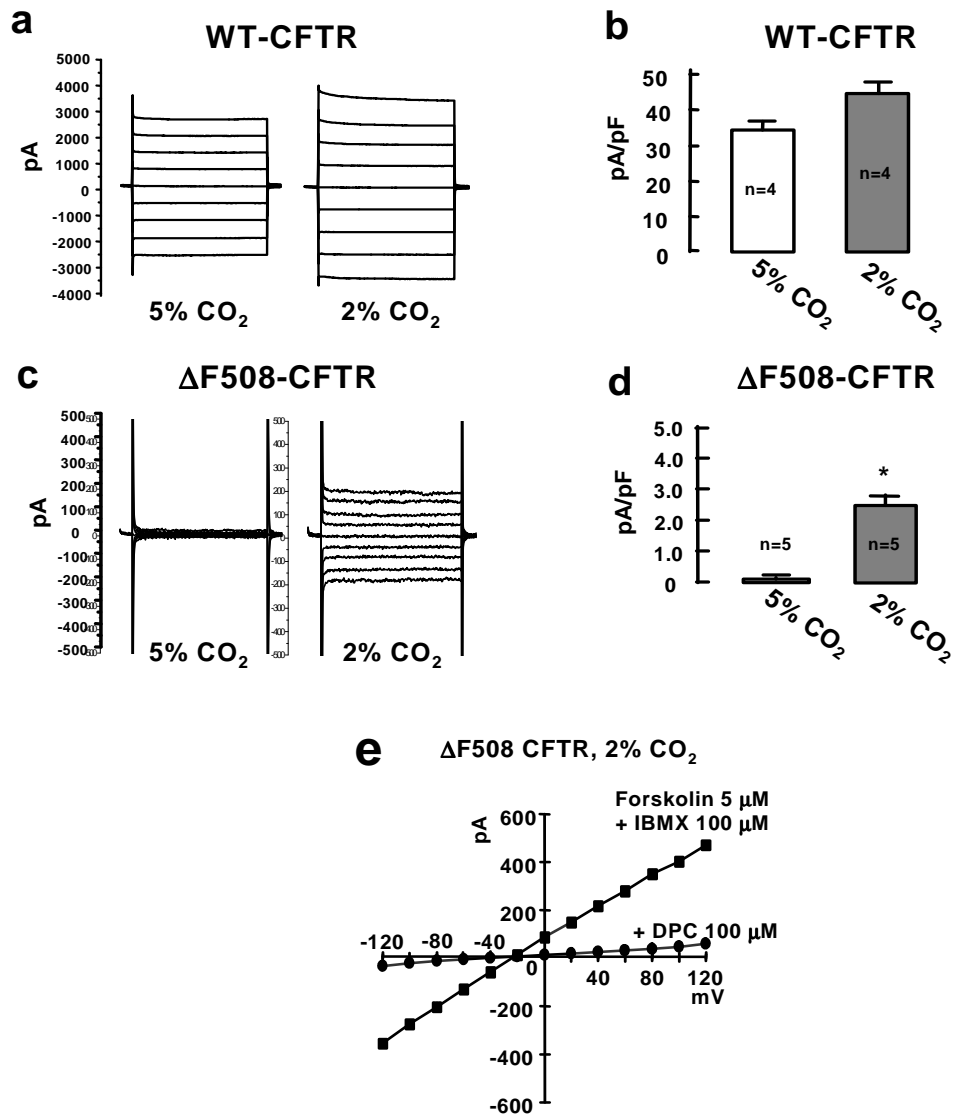


그림 5. 세포내 알칼리화에 따른 CFTR의 Cl⁻ current 변화

a. WT-CFTR과 c. $\Delta F508$ -CFTR을 CHO 세포에 발현시킨 후 세포를 2% CO₂ incubator에서 12 시간 배양한 뒤 whole cell patch clamp technique을 사용하여 forskolin 자극에 의한 CFTR의 Cl⁻ 전류를 측정하였다. b. WT-CFTR과 d. $\Delta F508$ -CFTR에 의한 전류를 세포 표면적 비로 나누어 도표화 하였다. e. $\Delta F508$ -CFTR을 발현하는 CHO 세포에서 CFTR Cl⁻ 통로의 I/V curve를 기록하였다. *p<0.05.

5. 알칼리성 배양액과 Bafilomycin A에 의한 세포질 및 골지체의 pH 변화

2% CO₂ incubator에서의 배양에 의한 배양액의 알칼리화와 bafilomycin A 처리에 의한 골지체와 세포질의 pH 변화를 BCECF dye와 pEYFP-Golgi plasmid를 사용하여 확인하였다. pEYFP-Golgi plasmid는 pH indicator 역할을 하는 YFP에 Golgi residential sequence가 붙은 chimeric 단백질을 발현시켜 골지체의 pH를 측정할 수 있게 한다. 그림 6에서 알 수 있듯이 골지체의 pH는 알칼리성 배양액과 bafilomycin A에 의해서 모두 pH 6.2에서 pH 7.0 근처로 상승하였지만, 세포질의 pH는 오직 알칼리성 배양액에 의해서만 증가하였고 bafilomycin A에 의해서는 pH 변화가 없었다.

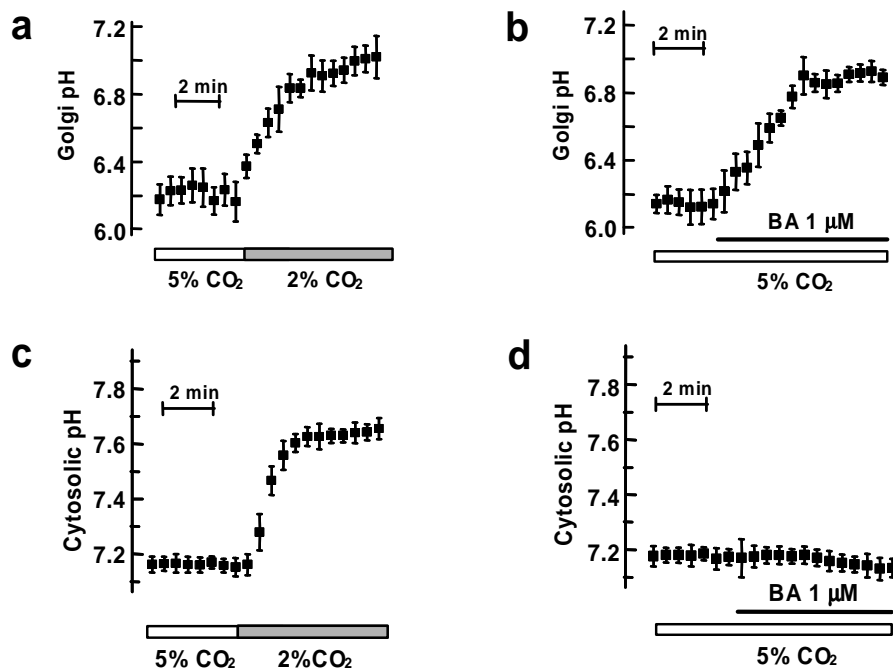


그림 6. 골지체 및 세포질의 pH 측정

a. CHO세포에 pEYFP-Golgi plasmid를 발현시킨 후 알칼리성 배양액과 b. bafilomycin A (BA)에 의한 골지체의 pH 변화를 측정하였다. c. CHO세포에서 BCECF 형광 물질을 사용해 알칼리성 배양액과 d. bafilomycin A에 의한 세포질의 pH 변화를 측정하였다

6. 시간에 따른 알칼리성 배양액과 Bafilomycin A에 의한 세포질 및 골지체의 pH 변화 및 $\Delta F508$ -CFTR 단백질의 발현 조절

CHO 세포에서 2% CO₂ incubator에서의 배양과 bafilomycin A 처리에 의한 시간에 따른 세포질의 pH 변화를 BCECF dye와 pEYFP-Golgi plasmid를 사용하여 측정하였다. 2% CO₂ incubator에서 배양할 경우 12 시간이 경과하여도 세포질의 pH는 그림 7a에서처럼 알칼리를 유지하고 있었다. 그리고 그림 7c,d에서처럼 골지체의 pH 역시 12 시간 경과 후에도 지속적으로 알칼리를 유지하고 있음을 확인하였다. $\Delta F508$ -CFTR을 발현하는 CHO 세포를 2% CO₂ incubator에서 배양할 경우 1시간 후부터 CFTR 발현량이 크게 증가하였으며, 12시간 후에도 발현량을 유지하였다.

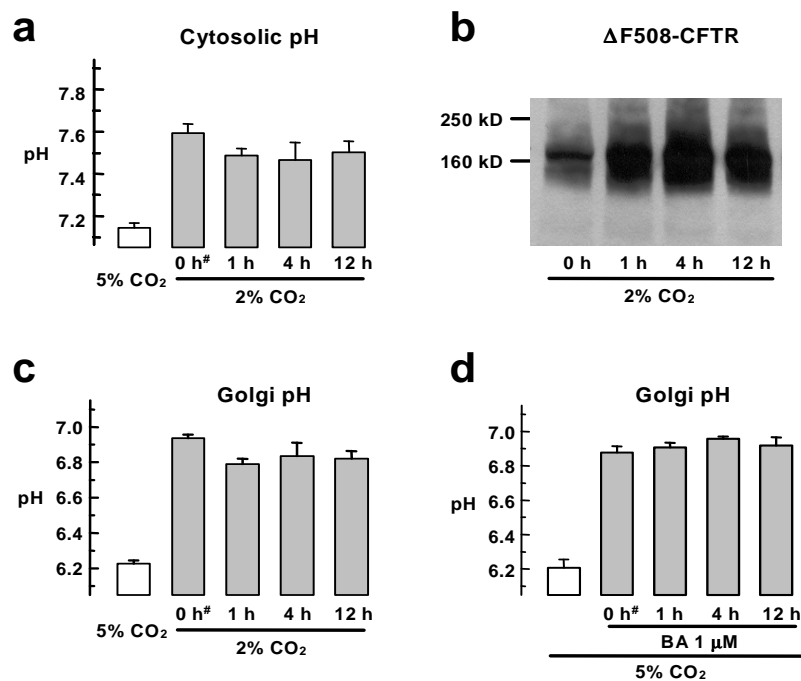


그림 7. 시간에 따른 세포내 알칼리화에 의한 세포질 및 골지체의 pH 변화 및 $\Delta F508$ -CFTR 단백질의 발현 변화

a. CHO 세포를 2% CO₂ incubator에서 지속적으로 배양하면서 BCECF를 사용하여 시간에 따른 세포질의 pH 변화를 측정하였다. b. $\Delta F508$ -CFTR을 발현하는 CHO 세포를 2% CO₂ incubator에서 지속적으로 배양하면서 시간에 따른 $\Delta F508$ -CFTR의 발현 변화를 관찰하였다. c,d. 2% CO₂ incubator에서의 배양과 bafilomycin A 처리한 후 시간에 따른 골지체의 pH 변화를 pEYFP-Golgi plasmid를 사용하여 측정하였다.

7. 세포내 알칼리화에 따른 molecular chaperone과 ubiquitination된 단백질의 변화

Hsp70과 Hsc70 등의 molecular chaperone과 ubiquitination의 조절은 CFTR의 분해 및 발현에 있어서 중요한 역할을 하고 있다고 알려져 있다. 따라서 세포내 알칼리화가 molecular chaperone과 ubiquitination에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서 Hsp70과 Hsc70 특이적인 일차항체와 ubiquitination된 단백질 특이적인 일차항체를 사용해서 단백질의 변화를 관찰하였다. 그림 8a에서 보듯이 CHO 세포를 2% CO₂ incubator에서 배양하거나 bafilomycin A를 처리하여도 세포내 Hsp70과 Hsc70의 발현량에는 변화가 없었다. ubiquitination된 단백질의 양상도 그림 7b에서 보듯이 세포를 2% CO₂ incubator에서 배양하거나 bafilomycin A를 처리하여도 아무런 변화를 보이지 않았다.

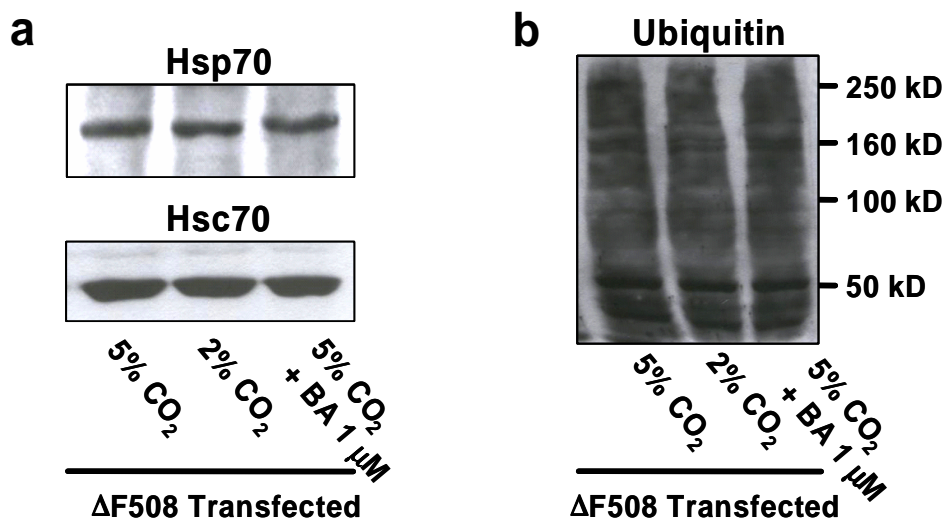


그림 8. 세포내 알칼리화에 따른 molecular chaperone의 발현량 변화와 ubiquitination된 단백질의 변화

a. CHO 세포를 2% CO₂ incubator에서 배양한 군과 bafilomycin A를 처리한 군에서 Hsp70과 Hsc70의 세포내 발현량 변화를 알아보기 위해 Hsp70과 Hsc70 특이적인 일차항체를 이용하여 western blot을 수행하였다. b. 또한 단백질의 ubiquitination 정도를 알아보기 위해서 ubiquitination된 단백질 특이적인 일차항체를 이용하여 western blot을 수행하였다.

8. 세포내 알칼리화에 따른 프로테아좀 활성 변화

F508-CFTR은 모두 ubiquitination된 후 프로테아좀에 의해서 분해된다. 따라서 세포내 알칼리화가 프로테아좀의 활성에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보기 위해서 Ub^{G76V}-GFP를¹⁷ 사용하였다. Ub^{G76V}-GFP는 프로테아좀의 기질로 작용하는데 프로테아좀의 기능이 억제되면 GFP의 형광이 증가하게 된다. Ub^{G76V}-GFP가 정상적으로 작용하는 관찰하기 위해서 프로테아좀 억제제인 lactacystin을 처리하였다. 그림9에서 알 수 있듯이 2% CO₂ incubator에서 배양하거나 bafilomycin A를 처리한 경우 5% CO₂ incubator에서 배양했을 때와 GFP의 형광 정도의 차이가 나타나지 않았다. 그리고 GFP 형광의 증가는 오직 그림 8b에서 보듯이 lactacystin을 넣어 프로테아좀 활성을 억제하였을 때만 나타났다.

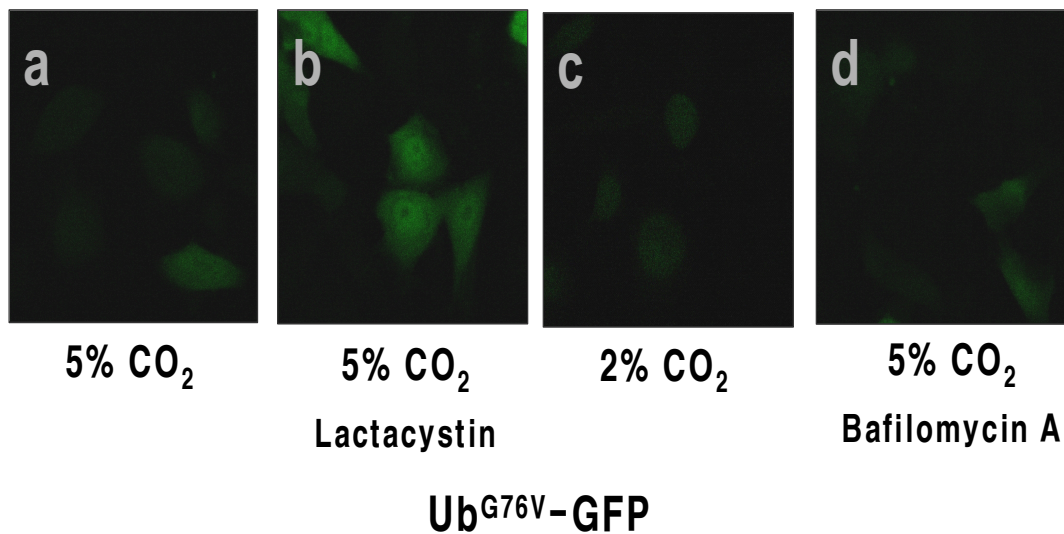


그림 9. 세포내 알칼리화에 따른 프로테아좀 활성 변화 측정

프로테아좀의 활성을 측정하기 위해 CHO 세포에 Ub^{G76V}-GFP를 발현시킨 후 a. 5% CO₂ incubator에서 배양한 군과 b. 프로테아좀 억제제인 lactacystin을 처리한 군, c. 2% CO₂ incubator에서 배양한 군 그리고 d. bafilomycin A를 처리한 군에서 confocal 현미경을 이용하여 동일조건에서 Ub^{G76V}-GFP의 형광을 측정하였다.

9. 세포내 알칼리화에 따른 WT과 Δ F508-CFTR의 mRNA 발현량 변화

세포내 알칼리화가 CFTR 유전자의 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위해서 Real-Time Polymerase Chain Reaction을 이용해서 WT과 Δ F508-CFTR의 mRNA 발현량의 변화를 살펴보았다. β -actin mRNA 발현 정도를 대조군으로 사용하였으며, 상대적인 CFTR mRNA 발현 정도를 β -actin mRNA 발현량으로 표준화하였다. 그림 10에서 보듯이 2% CO₂ incubator에서 세포를 배양한 경우 WT과 Δ F508-CFTR의 mRNA 발현 정도가 약간 감소하는 경향을 보였지만 통계적 의미는 없었다. 이로써 세포내 알칼리화에 의한 CFTR 단백질의 발현 증가가 CFTR 유전자의 발현 증가에 의한 것이 아니라는 것을 확인하였다.

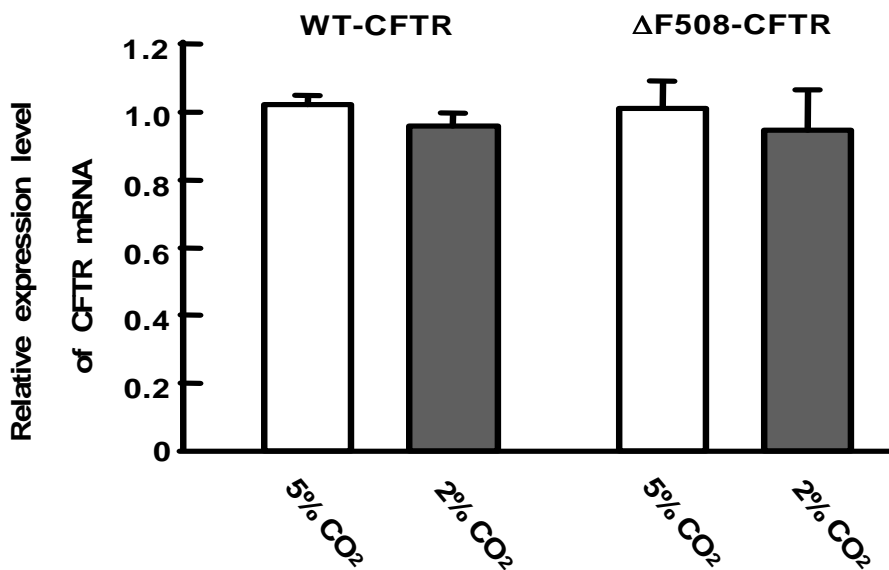


그림 10. 세포내 알칼리화에 따른 CFTR 유전자의 발현 변화

CHO 세포에 WT-CFTR과 Δ F508-CFTR 유전자를 발현시킨 후 각각 5% CO₂ incubator와 2% CO₂ incubator에서 12 시간 배양한 다음 cDNA 합성 후 WT과 Δ F508-CFTR 특이적인 primer를 사용하여 Real-Time PCR을 수행하였다. β -actin mRNA 발현량을 기준으로 CFTR mRNA의 발현량을 표준화하였다.

10. NaHCO₃ 섭취에 따른 ΔF508 동형 접합체 생쥐 소변의 pH 및 HCO₃⁻ 농도의 변화

*in vivo*에서도 세포단위에서 일어나는 세포내 알칼리화에 따른 ΔF508-CFTR의 세포막 발현이 일어나는지 확인하기 위해서 ΔF508 동형 접합체 생쥐에 가벼운 대사성 알칼리 혈증을 유도하기 위해 2% sucrose와 280 mM NaHCO₃를 포함하는 물을 식수 대신 먹였다.¹⁶ 대조군으로 수돗물을 먹인 군, 2% sucrose를 포함하는 물을 먹인 군, 2% sucrose와 0.9% NaCl을 포함하는 물을 먹인 군으로 나누어 실험하였다. 생쥐 소변의 pH 측정은 생쥐의 소변을 받은 즉시 Glass Micro-pH Combination Electrode (9802BN, Thermo electron co., MA)를 이용해서 측정하였다. 그리고 CO₂, HCO₃⁻ SIGMA Diagnostics Kit (132-A)를 사용해서 소변 속에 함유된 HCO₃⁻양을 측정하였다. 그 결과 그림 11에서 보듯이 NaHCO₃를 섭취시킨 군에서 pH와 HCO₃⁻ 농도가 다른 군에 비해 크게 증가하였다.

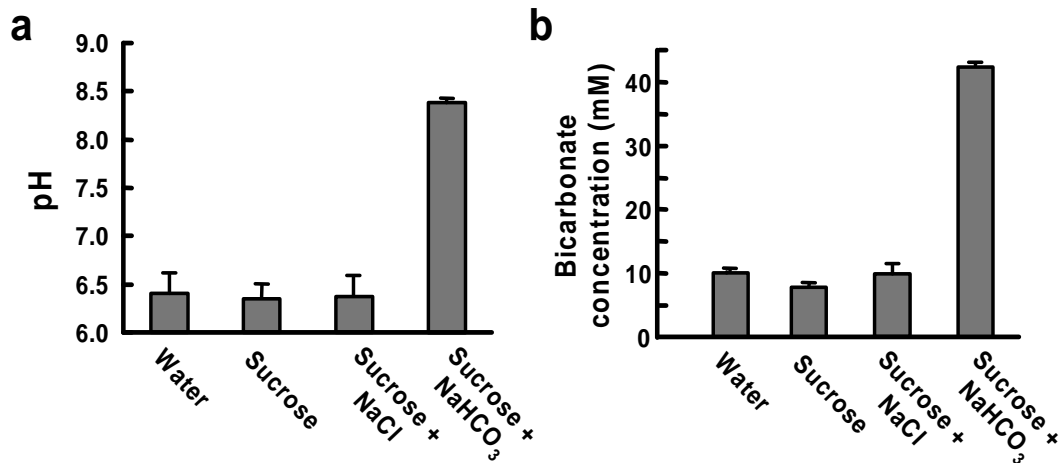


그림 11. NaHCO₃ 섭취에 따른 생쥐 소변의 pH 및 HCO₃⁻ 농도의 변화

a. 각 군 생쥐의 소변을 받은 즉시 Glass Micro-pH Combination Electrode를 이용해서 측정하였다. b. 각 군 생쥐의 소변을 받은 즉시 CO₂, HCO₃⁻ SIGMA Diagnostics Kit를 사용해서 소변 속에 함유된 HCO₃⁻양을 측정하였다.

11. 대사성 알칼리 혈증 유도 따른 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐의 생존율 및 CFTR 의존적인 Cl^- 전류 변화

$\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐는 생후 2개월 안에 50%가 주로 장폐색에 의해서 사망하게 된다. 이는 $\Delta F508$ -CFTR이 구조이상으로 ER quality control system을 빠져나와 세포막에 발현하지 못해서 일어나는 현상이다. 세포내 알칼리화에 따른 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현이 *in vivo*에서 일어나는지 확인하기 위해 지속적으로 280 mM $NaHCO_3$ 를 포함하는 음료를 식수 대신 섭취시켜 가벼운 대사성 알칼리 혈증을 유발 시켰다. 만일 세포내 알칼리화가 생쥐의 $\Delta F508$ -CFTR을 세포막으로 발현시킬 수 있다면 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐의 생존율을 높일 수 있을 것이다. 본 실험에서는 수돗물을 먹인 군, 2% sucrose를 포함하는 물을 먹인 군, 2% sucrose와 0.9% NaCl을 포함하는 물을 먹인 군 그리고 2% sucrose와 280 mM $NaHCO_3$ 를 포함하는 물을 먹인 군으로 나누어 생후 4개월간의 생존율을 관찰하였다. 그리고 생후 4개월까지 생존한 생쥐의 소장(십이지장 부위)을 적출하여 forskolin과 IBMX에 의해 활성화되고 DPC에 의해 억제되는 CFTR 의존적인 short circuit current (I_{sc})를 측정하였다. 그림 12a에서 보듯이 2% sucrose와 280 mM $NaHCO_3$ 를 포함하는 물을 먹인 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐의 생존율이 다른 군에 비해 크게 증가하였다. 그리고 생쥐의 소장에서 CFTR 의존적인 I_{sc} 를 측정한 결과, 2% sucrose와 280 mM $NaHCO_3$ 를 포함하는 물을 먹인 군에서만 WT-CFTR을 발현하는 생쥐의 소장에서 측정된 CFTR 의존적 I_{sc} 의 약 21% 정도가 기록되었다. 이는 $\Delta F508$ -CFTR이 소장의 내강막에 발현하여 CFTR의 기능을 수행하고 있음을 의미하고 있다.

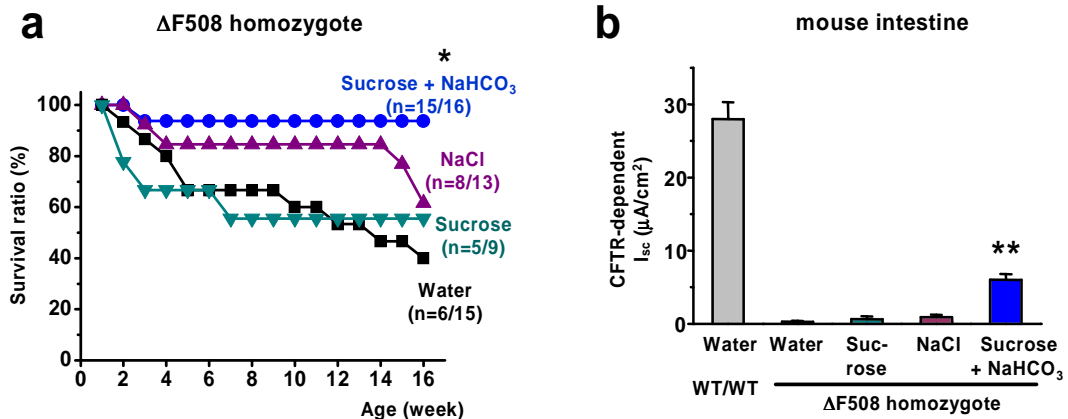


그림 12. 대사성 알칼리 혈증 유도 따른 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐의 생존율 및 소장에서의 CFTR 의존적인 Cl^- 전류 측정

a. $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐에 수돗물을 먹인 군, 2% sucrose를 포함하는 물을 먹인 군, 2% sucrose와 0.9% NaCl을 포함하는 물을 먹인 군 그리고 2% sucrose와 280 mM $NaHCO_3$ 를 포함하는 물을 먹인 군으로 나누어 생후 4개월간의 생존율을 관찰하였다. b. 각 군의 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐의 소장을 적출한 후 forskolin과 IBMX에 의해 활성화되고 DPC에 의해 억제되는 CFTR 의존적인 short circuit current (I_{sc})를 측정하였다. ** $p < 0.01$.

12. $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐의 대장에서 CFTR 단백질의 발현

WT-CFTR을 발현하는 생쥐의 대장과 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐에 수돗물을 먹인 군 그리고 2% sucrose와 280 mM $NaHCO_3$ 를 포함하는 물을 먹인 군에서 각각 대장을 적출한 후 생쥐의 대장 조직을 OCT compound를 이용해서 액체 질소로 얼려 $-70^\circ C$ 에 보관한 후 microtome을 이용해서 조직을 $4 \mu m$ 두께로 잘라서 slide glass에 붙인 뒤 CFTR 특이적인 일차항체 (24-1)를 이용하여 면역형광염색을 수행하였다. 그 결과 그림 13에서 화살표 표시한 부위에서 볼 수 있듯이 WT-CFTR을 발현하는 생쥐에서는 많은 양의 CFTR이 발현한 것을 알 수 있었으며, 수돗물을 먹인 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐에서는 발현하지 않는 CFTR이 $NaHCO_3$ 를 준 생쥐의 대장에서는 많은 양이 세포막에 발현하는 것을 확인하였다.

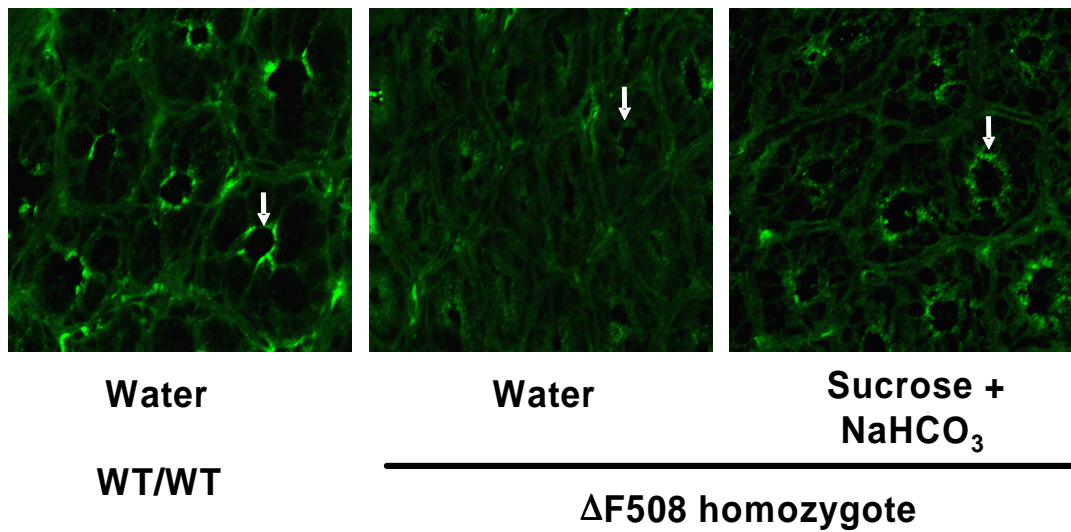


그림 13. 생쥐의 대장에서 CFTR 단백질의 발현 변화

WT-CFTR을 발현하는 생쥐의 대장과 ΔF508 동형 접합체 생쥐에 수돗물을 먹인 군 그리고 2% sucrose와 280 mM NaHCO₃를 포함하는 물을 먹인 군에서 각각 대장을 적출한 후 생쥐의 대장 조직을 OCT compound를 이용해서 액체 질소로 얼려 -70 °C에 보관한 후 조직을 4 μm 두께로 잘라서 slide glass에 붙인 뒤 CFTR 특이적인 일차 항체 (24-1)를 이용하여 면역형광염색을 수행하였다.

IV. 고찰

$\Delta F508$ -CFTR은 비정상 구조를 이루기 때문에 ER quality control system에 의해서 모두 분해된다. 이런 $\Delta F508$ -CFTR은 Cl^- 통로 기능을 가지고 있지만,²⁵ 세포막에 발현할 수 없기 때문에 낭포성 섬유증을 유발시킨다. 본 연구에서는 세포질 및 골지체의 pH를 알칼리화 시킬 경우 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현이 증가하는 것과 $\Delta F508$ -CFTR의 기능이 회복되는 것을 제시하였다. $\Delta F508$ -CFTR을 발현하는 CFPAC-1 세포와 CHO 세포를 알칼리성 배양액에서 배양하거나 bafilomycin A를 처리했을 경우 CFTR 의존적인 음이온 수송기능이 크게 증가하였다. 그리고 $\Delta F508$ -CFTR을 발현하는 CHO 세포를 2% CO_2 incubator에서 배양하거나 bafilomycin A를 처리해서 골지체의 pH를 알칼리화 했을 경우 세포막에 발현하고 있는 mature glycosylation된 형태의 CFTR인 band C CFTR이 관찰되었다. 이런 일련의 실험을 종합하여 볼 때 2% CO_2 incubator에서 배양하거나 bafilomycin A를 처리했을 때 나타난 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현 증가는 골지체 내강의 pH 증가가 가장 중요한 요인일 것이라는 것을 짐작할 수 있게 한다. 또한 본 연구에서 무엇보다 중요한 결과는 지속적으로 $NaHCO_3$ 를 섭취시킨 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐의 경우 생존율이 증가하고 소장에서 CFTR 의존적 I_{sc} 가 나타난 것이다.

ER에서 새로 합성된 단백질 중 많은 수가 정확한 구조를 이루지 못하기 때문에 비정상 단백질의 발현을 억제하는 ER quality control은 세포 기능의 정상화에 매우 중요한 역할을 하고 있다. 만일 유전자 변이에 의해 중요한 기능을 하는 단백질이 정상 구조를 이루지 못할 경우 낭포성 섬유증 (CFTR)뿐만 아니라 Class 2 가족성 고콜레스테롤혈증 (LDL receptor)이나 요붕증 (Aquaporin-2) 등과 같이

단백질이 ER에서 벗어날 수 없기 때문에 질병을 유발하기도 한다.^{26,27} 특히 CFTR의 경우 WT-CFTR도 ERAD에 의해서 45~80%가 분해될 정도로 발현 조절이 까다롭다. $\Delta F508$ -CFTR의 경우 대부분은 ER에서 ERAD에 의해 분해되지만 일부는 pre-Golgi intermediate와 cis-Golgi에서 발견되기도 한다. 하지만 Trans-Golgi Network (TGN)에서는 WT-CFTR과 달리 발견되지 않는다.⁹ 정확한 구조를 이루지 못한 단백질들은 골지체까지 오더라도 molecular chaperone, KDEL 수용체 등에 의해서 ER로 역수송되며, 골지체의 산성 pH는 COPI vesicle 형성을 돕고, KDEL과 KDEL 수용체의 결합력을 강화시켜 ER로의 역수송 촉진한다.^{11,12} 따라서 본 실험에서 세포질 또는 골지체의 pH를 높였을 때 비정상 구조 CFTR 단백질의 ER로의 역수송이 억제되었을 것이다.

그림 6에서 알 수 있듯이 2% CO₂ incubator에서 배양 하거나 bafilomycin A를 처리할 경우 골지체 내강의 pH는 알칼리성 배양액과 bafilomycin A에 의해서 모두 pH 6.2에서 pH 7.0 근처로 상승하지만, 세포질의 pH는 오직 알칼리성 배양액에 의해서만 증가하고 bafilomycin A에 의해서는 pH 변화가 없었다. 이러한 현상은 bafilomycin A가 골지체에 존재하는 Vacuolar H⁺-ATPase를 특이적으로 억제한다는 것을 의미하며, 2% CO₂ incubator에서의 배양이나 bafilomycin A 처리에 의해 공통적으로 골지체의 pH가 변한 것을 생각할 때 골지체의 pH 상승이 세포내 알칼리화에 의한 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다. 또한 bafilomycin A는 lysosome과 같이 내강이 산성을 띠는 세포내 소기관의 pH 역시 알칼리화시킬 수 있다. 특히 lysosome에 존재하는 여러 효소들은 산성에서 활성이 높는데 세포내 알칼리화에 의해 pH가 상승할 경우 분해효소 등의 활성이 떨어지게 된다. 하지만 CFTR의 경우 lysosome이 아닌 프로테아좀에 의해서 분해되기 때문에 크게 고려하지 않아도 될 것이다.

$\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐는 생후 2개월 안에 주로 장폐색에 의해서

50%가 사망하게 된다. 본 실험에서 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐에 지속적으로 280 mM NaHCO_3 를 포함하는 음료를 식수 대신 섭취시켜 가벼운 대사성 알칼리 혈증을 유발 시킨 결과 생존율이 크게 증가하였다. 또한 0.9% NaCl 을 섭취시킨 군에서도 초반 생존율이 크게 증가하는 현상이 관찰되었다. 앞서 말한바와 같이 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐는 주로 장폐색에 의해서 사망하게 되는데, NaHCO_3 나 NaCl 을 섭취시킨 경우 많은 양의 물을 먹기 때문에 장폐색을 완화시키는 역할을 할 수 있으며, 0.9% NaCl 을 섭취시킨 군에서 초반 생존율이 크게 증가한 것은 이런 이유일 가능성이 크다. 1주일간 NaHCO_3 를 먹인 $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐 동맥 혈액의 pH는 7.41 ± 0.01 에서 7.51 ± 0.02 ($n=4$)로 약간 증가하는데 이러한 혈액의 pH 증가는 $\Delta F508$ -CFTR의 발현에 일부 도움을 줄 수 있을 것이다. 낭포성 섬유증에 있어서 TGN의 과산화는 undersialylation 결핍과 *P. aureosanus*의 결합 증가에 의한 폐질환 발생에 원인이 된다는 보고가 있는데,²⁸ NaHCO_3 를 섭취시켜 가벼운 대사성 알칼리 혈증을 유발하면 TGN의 과산화를 억제해 *P. aureosanus*의 결합에 의한 염증 발생을 줄일 수 있을 것이다. 또한 CFTR은 상피세포의 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange를 통한 HCO_3^- 분비에 중요한 역할을 하고 있으며, 낭포성 섬유증에서는 HCO_3^- 분비 결핍이 발생해 증상을 악화시킨다.²⁹⁻³¹ 따라서 본 실험에서처럼 많은 양의 NaHCO_3 를 섭취시킨 경우 상피세포의 HCO_3^- 분비를 보다 원활하게 해서 HCO_3^- 분비 결핍에 의한 증상 완화에 도움이 될 수도 있을 것이다.

본 연구에서는 골지체 내강을 포함하는 세포내 알칼리화에 의한 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현 증가와 CFTR의 기능 회복을 보여. $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현을 증가시키는 새로운 방법을 소개할 수 있었다. 지금까지 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현을 증가시키는 세 가지 방법이 알려져 있다. 첫째 glycerol 등의 chemical chaperone을 세포에 처리해서 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현을 증가시키는 방법,¹³ 둘째 30 °C 이하의 저온에서 세포를

배양하는 방법,¹⁴ 셋째 thapsigargin을 이용해 ER calcium pump를 억제하여 ER chaperone의 기능을 막는 것이 그 것이다.¹⁵ 하지만 이들 방법은 세포 차원에서는 효과가 있으나 실제 환자의 치료에 적용하기에는 여러 가지 제약이 따르고 있다. 위 실험결과에는 없지만 본 실험에서 $\Delta F508$ -CFTR을 발현하는 CHO세포를 27 °C의 알칼리성 배양액에 배양했을 때 중성에서 배양한 세포에서 보다 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현 (band C)이 증가하는 것을 확인하였다. $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현을 증가시키는 각각의 방법은 사람에 적용하기에는 여러 제약이 따르지만 적절한 조합과 보다 좋은 방법적 개선을 통한 조건을 찾는다면 앞으로 좋은 결과가 있을 것으로 예상된다.

V. 결론

본 연구에서는 세포내 알칼리화가 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포질 및 골지체의 알칼리화는 CHO 세포 및 CFPAC-1 세포에서 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현을 증가시키고 CFTR의 Cl^- channel 기능을 회복시킨다.
2. 세포질 및 골지체의 알칼리화는 CFTR 단백질의 발현에 영향을 주는 molecular chaperon의 발현량, 단백질의 ubiquitination 정도 그리고 프로테아좀의 활성화에는 영향을 미치지 않는다.
3. 세포질 및 골지체의 알칼리화는 CFTR 유전자의 발현을 약간 감소시키는 경향이 있었을 뿐 증가시키지 않는다.
4. $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐에 $NaHCO_3$ 를 섭취시켜 가벼운 대사성 알칼리 혈증을 유도한 경우 생후 4 개월간의 생존율이 크게 증가한다.
5. $\Delta F508$ 동형 접합체 생쥐에 $NaHCO_3$ 를 섭취시켜 가벼운 대사성 알칼리 혈증을 유도하면, 소장 CFTR 의존적인 I_{sc} 가 Wild Type 생쥐의 약 21% 정도로 그 기능을 회복한다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 세포질 및 골지체의 알칼리화는 결과적으로 $\Delta F508$ -CFTR이 ER quality control system을 벗어날 수 있게 해주어 $\Delta F508$ -CFTR의 세포막 발현을 돕는 역할을 함을 알 수 있으며, *in vivo* model에서도 이러한 현상이 일어남을 확인할 수 있다. 또한 이러한 결과를 바탕으로 Vacuolar H^+ -ATPase 특이적인 억제제를 사용한 골지체의 알칼리화를 통해서 $\Delta F508$ -CFTR이 ER quality control system을 벗어날 수 있게 해준다면 $\Delta F508$ -CFTR로 인한 낭포성 섬유증 치료에 새로운 방법이 될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2003;361:681-689.
2. Gibson LR, Burns LJ, and Ramsey WB. Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(8):918-951.
3. Lee JH, Choi JH, Namkung W, Hanrahan JW, Chang J, Song SY, Park SW, Kim DS, Yoon JH, Suh Y, Jang IJ, Nam JH, Kim SJ, Cho MO, Lee JE, Kim KH, Lee MG. A haplotype-based molecular analysis of CFTR mutations associated with respiratory and pancreatic diseases. *Hum Mol Genet*. 2003;12:2321-233.
4. Ward, CL., Omura, S., and Kopito RR. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*. 1995;83:121-127.
5. Meacham CG, Patterson C, Zhang W, Younger JM and Cyr MD. The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *NATURE CELL BIOLOGY* 2001;3:100-105.
6. Okiyoneda T, Harada K, Takeya M, Yamahira K, Wada I, Shuto T, Suico AM, Hashimoto Y, and Kai H. Δ F508 CFTR Pool in the Endoplasmic Reticulum Is Increased by Calnexin Overexpression. *Molecular Biology of the Cell*. 2004;15:563-574
7. Youker TR, Walsh P, Beilharz T, Lithgow T, and Brodsky LJ. Distinct Roles for the Hsp40 and Hsp90 Molecular Chaperones during Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Degradation in Yeast *Mol Biol Cell*. 2004;15(11):4787-4797.

8. Xiong X, Chong E, and Skach RW. Evidence That Endoplasmic Reticulum (ER)-associated Degradation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is Linked to Retrograde Translocation from the ER Membrane. *J. Biol. Chem.* 1999;274:2616-2624.
9. Lars E and Ari H. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:181-191.
10. Wilson, DW., Lewis, MJ., and Pelham, HR. pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J. Biol. Chem.* 1993;268:7465-7468.
11. Duden R. ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function. *Molecular Membrane Biology*, 2003;20:197-/207.
12. Palokangas H, Ying M, Vaananen K, and Saraste J. Retrograde Transport from the Pre-Golgi Intermediate Compartment and the Golgi Complex Is Affected by the Vacuolar H1-ATPase Inhibitor Bafilomycin A1. *Molecular Biology of the Cell.* 1998;8:3561-3578.
13. Sato S, Ward LC, Krouse EM, Wine JJ, and Kopito RR. Glycerol Reverses the Misfolding Phenotype of the Most Common Cystic Fibrosis Mutation. *J. Biol. Chem.* 1996;271:635-638.
14. Brown CR, Hong-Brown QL, and Welch JW. Correcting Temperature-sensitive Protein Folding Defects. *J. Clin. Invest.* 1997;99:1432-1444.
15. Egan ME, Glockner-Pagel J, Ambrose C, Cahill PA, Pappoe L, Balamuth N, Cho E, Canny S, Wagner CA, Geibel J, Caplan. Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of Delta F508-CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cell. *Nat Med.* 2002;8:485-492.

16. Carsten A. Wagner, Karin E. Finberg, Paul A. Stehberger, Richard P. Lifton, Gerhard H. Giebisch, Peter S. Aronson, and John P. Geibel. Regulation of the expression of the Cl⁻/anion exchanger pendrin in mouse kidney by acid-base status. *Kidney International*. 2002;62:2109-2117.
17. O'Riordan CR, Lachapelle AL, Marshall J, Higgins EA, Cheng SH. Characterization of the oligosaccharide structures associated with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Glycobiology*. 2000 10:1225-1233.
18. Scanlin FT and Glick CM. Glycosylation and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Respir Res* 2001;2:276-279
19. Dantuma NP, Lindsten K, Glas R, Jellne M, Masucci MG. Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. *Nat Biotechnol*. 2000;18:538-543.
20. Lindsten K, Femke SM, Verhoef L, Fischer DF, Leeuwen FW, Hol EM, Masucci MG, and Dantuma NP. Mutant ubiquitin found in neurodegenerative disorders is a ubiquitin fusion degradation substrate that blocks proteasomal degradation. *J Cell Biol*. 2002;157(3):417-427.
21. Palokangas H, Kalervo MY and Saraste J. Retrograde Transport from the Pre-Golgi Intermediate Compartment and the Golgi Complex Is Affected by the Vacuolar H⁺-ATPase Inhibitor Bafilomycin A1. *Molecular Biology of the Cell*. 1998; 8:3561-3578.
22. Lee, M. G., Wigley, W. C., Zeng, W., Noel, L. E., Marino, C. R., Thomas, P. J., and Muallem, S. Regulation of Cl⁻/HCO₃⁻ Exchange by Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

- Expressed in NIH 3T3 and HEK 293 Cells *J. Biol. Chem.* 1999;274:3414-3421.
23. Lee, M. G., Choi, J. Y., Luo, X., Strickland, E., Thomas, P. J., and Muallem, S. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Regulates Luminal Cl/HCO₃ Exchange in Mouse Submandibular and Pancreatic Ducts. *J. Biol. Chem.* 1999;274:14670-14677.
24. Namkung, W., Lee, J.A., Ahn, W., Han, W., Kwon, S.W., Ahn, D.S., Kim, K.H., and Lee, M.G. Ca²⁺ activates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator- and Cl⁻-dependent HCO₃⁻ transport in pancreatic duct cells. *J. Biol. Chem.* 2003;278:200-207.
25. Pasyk AE and Foskett JK. Mutant(Δ F508) Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Cl⁻ Channel Is Functional When Retained in Endoplasmic Reticulum of Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 1995;270:12347-12350.
26. Jorgensen MM, Bross P, Gregersen N. Protein quality control in the endoplasmic reticulum *APMIS Suppl.* 2003;(109):86-91.
27. Cobbold C, Monaco PA, Sivaprasadarao A and Ponnambalam S. Aberrant trafficking of transmembrane proteins in human disease. *Trends Cell Biol.* 2003 ;13(12):639-647.
28. Poschet, J.F, Boucher, J.C, Tattersson, L., Skidmore, J., Dyke, R.W., and Deretic, V. Molecular basis for defective glycosylation and Pseudomonas pathogenesis in cystic fibrosis lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98:13972-13977.

29. Choi, J.Y., Muallem, D., Kiselyov, K., Lee, M.G., Thomas, P.J., and Muallem, S. Aberrant CFTR-dependent HCO_3^- transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature*. 2001;410:94-41097.
30. Ko, S. B., Zeng, W., Dorwart, M. R., Luo, X., Kim, K. H., Millen, L., Goto, H., Naruse, S., Soyombo, A., Thomas, P. J. & Muallem S. Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nat. Cell Biol.* 2004;6:343-350.
31. Wine, J. J. Rules of conduct for the cystic fibrosis anion channel. *Nat. Med.* 2003;9:827-828.

Abstract

Intracellular Alkalinization Increases the Membrane Expression of Misfolded CFTR

Wan NAMKUNG

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Min Goo LEE)

The most common form of the disease-causing cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mutation, $\Delta F508$, leads to a misfolded protein which undergoes endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation (ERAD). Retrieval of misfolded protein from cis-Golgi or pre-Golgi intermediate compartments is a critical factor in ER retention and ERAD of $\Delta F508$ CFTR protein. Therefore, the inhibition of retrograde Golgi-to-ER traffic by the alkalinization of Golgi lumen may permit functional $\Delta F508$ protein to reach the cell surface. We examined the effects of alkaline treatments on the misfolded CFTR-induced defects in cells and in mice with $\Delta F508$ CFTR. In CFPAC-1 cells which endogenously express $\Delta F508$ CFTR and CHO cells in which $\Delta F508$ CFTR is heterologously expressed, intracellular alkalinization by reducing CO_2 concentrations in the CO_2 -incubation chamber or the intra-Golgi alkalinization by bafilomycin

Al treatments increased the membrane expression of $\Delta F508$ CFTR and CFTR-dependent anion transport. Of note, chronic administration of the weak base NaHCO_3 increased the long term survival of homozygous $\Delta F508$ CFTR mice and induced CFTR-dependent short circuit currents in the intestinal epithelium. The above results imply that the escape of ERAD by alkalization of Golgi or pre-Golgi intermediate compartments can be a potential therapeutic target for misfolded CFTR-associated diseases.

Key Words : CFTR, NaHCO_3 , Golgi, ER, Alkalization