Laboratory Investigation

U343 교종 세포주에서 GFAP와 Fascin과의 상호작용

연세대학교 의과대학 뇌연구소 신경외과학교실,[1] 강원대학교 의과대학 신경외과학교실[2]
김동석[1] · 박승우[2] · 김태곤[1] · 이규성[1] · 최중언[1]

The Interaction between GFAP and Fascin in U343 Glioma Cell Line

Dong-Seok Kim, M.D.,[1] Seung-Woo Park, M.D.,[2] Tae-Gon Kim, M.D.,[1]
Kyu-Seung Lee, M.D.,[1] Joong-Uhn Choi, M.D.[1]
Department of Neurosurgery,[1] Brain Research Institute, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea
Department of Neurosurgery,[2] Kangwon National University College of Medicine, Chuncheon, Korea

Objective : Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a 50kDa intermediate filament protein that acts as a specific marker for glial cell differentiation. And GFAP has a role in maintaining cytoskeletal architecture and shape. We hypothesize that GFAP supports cytoskeletal integrity in glial cells by key interactions with intermidiate filament associated protein(IFAP). Our study aims to characterize this interaction between these molecules in detail and determine its physiological relevance in glial cells.

Methods : To isolate IFAP that bind to GFAP, we screened a human fetal brain cDNA library using the yeast two-hybrid assay. The interaction screen resulted in a number of positive interacting clones which were subjected to DNA sequence analysis and their identities were determined by Gen Bank Basic Local Alignment Search Tool(BLAST) searching.

Results : One of the GFAP-binding proteins isolated encodes an actin-bundling protein called fascin. Fascin is a well-characterized protein that functions to organize filamentous actin into packed bundles. We confirmed the GFAP-fascin interaction by coimmunoprecipitation analyses in the U343 glioma cell line. Immunolocalization studies demonstrated GFAP and fascin colocalized in normal astrocytes, glioma cell lines, and glioma tumour specimens. Furthermore, ultrastructural electron microscopy data demonstrated an association between GFAP and fascin. Specifically, there was colocalization within astrocytic processes and cellular protrusions.

Conclusion : The colocalization of GFAP and fascin suggests that this interaction is important in glial cell architecture and stability. Additional studies are underway to evaluate the function and importance of this interaction in glial cells.

KEY WORDS : Glial fibrillary acidic protein (GFAP) · Glioma · Fascin.

서 론

교종은 중추 신경계에서 가장 흔한 종양중의 하나이다. 교종의 65%이상은 악성이고 현재의 치료 방법으로는 완치가 어려운 질환이다. 치료 실패의 가장 중요한 원인은 종양의 침윤성 때문이다[3]. 부분적으로 종양의 침윤성에 밀접한 관계가 있는 것이 세포의 골격을 이루고 있는 구조 단백질이다[13]. 구조 단백질은 세포의 형태와 구조를 결정하는데 중요한 역할을 한다. 세포의 구조 단백질 중 가장 대표적인 것은 고등 동물의 모든 세포에서 발견되는 8~10nm의 intermediate filament (IF)인데 세포가 분화하고 성숙함에 따라 각기 다른 특성과 기능을 가지게 된다. IF는 조직과 세포의 기능에 따라 각기 다른 특이성을 가지게 된다. 이런 IF의 특이성은 세포의 특별한 기능에 중요한 역할을 하게 된다. 중추 신경계의 교세포에서는 glial fibrillary acidic protein(GFAP)와 vimentin 같은 일련의 IF가 세포의 형태를 유지하기 위해 핵막과 세포막 사이에서 기계적 지지를 하는 중요 구조 단백질들이다[7,8]. 특히 GFAP는 신경 교세포에 특이성을 가지는 50kDa의 섬유성 세포내 단백질 중의 하나이다[9,14]. 최근 GFAP 유전자를 가지고 있지 않은 GFAP-/-mice가 많이 보고되었는데[10,19,24,25] GFAP의 knockout는 신경 세포의 기능 이상, 신경 세포의 수초화(myel-ination) 이상, 혈관-뇌 장벽(BBB, blood-brain barrier) 장애를 유발한다[6,21,24,28]. 이와 같이 GFAP가 핵막과 세포막 사이에 기계적 지지로 교세포의

• Received : October 2, 2003 • Accepted : November 25, 2003
• Address for reprints : Joong-Uhn Choi, M.D., Department of Neurosurgery, Brain Research Institute, Yonsei University College of Medicine, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel : 02)361-5633, Fax : 02)393-9979
E-mail : juchoi@yumc.yonsei.ac.kr

세포 골격을 유지하는 것은 알려져 있지만 단순히 하나의 구조 단백질만으로 교세포의 세포 골격 유지가 가능할 것으로 생각되지 않는다. 세포 형태의 유지에는 GFAP외 다양한 IF, actin 등 여러 세포 골격에 관계하는 단백질간의 상호 관계를 통하여 이루어질 것으로 추정된다.

예로 GFAP와 다른 구조 단백질 중의 하나인 intermidiate filament associated protein (IFAP)가 서로 결합된 plectin은 처음 쥐의 C6 별세포종 세포주에서 발견된 300kDa의 단백질인데 plectin의 NH2-terminal은 actin binding domain을 통해서 actin과 결합하고 carboxy terminal은 인산화 되면서 GFAP와 붙어있다[26,33]. 쥐에서 이러한 neurofilament IF와 actin MF를 연결하는 연결 단백질인 plectin의 결손은 감각 신경 퇴행과 dystonia musculorum phenotype을 초래한다[2,30]. IF의 하나인 GFAP도 마찬가지로 어떤 IFAP와의 상호 관계를 통해 actin microfilament와 microtubule 등과 작용하고 세포골격의 기계적인 안정성과 역동적 행태에도 중요한 역할을 할 것으로 추정된다[33].

본 연구자는 교세포에 특이성을 가지고 있는 핵심 구조 단백질의 하나인 GFAP도 마찬가지로 어떤 IFAP와의 상호 관계를 통해 actin microfilament와 microtubule 등과 작용하여 세포골격의 기계적인 안정성과 역동적 행태에 어떤 역할을 할 것으로 가정하고 GFAP와 서로 상호 작용하는 IFAP를 찾고자 하였으며 Yeast Two-Hybrid assay를 이용한 Library Screen의 방법으로 GFAP와 상호 작용하는 actin-binding 단백질인 fascin을 확인하여 보고하는 바이다.

대상 및 방법

Yeast Two-Hybrid Assay를 이용한 Library Screen

Full length GFAP cDNA 조각을 EcoRI와 SacI로 절단하여 GFAP의 head 부위를 포함하는 223 bp의 GFAP 조각 (GFAPN)을 얻고 HA tag와 GAL4 DNA binding domain (DBD) vector을 포함하는 pGBT9에 삽입하여 GFAPN-pGBT9를 얻는다.

GFAPN-pGBT9를 LiOAc method로 HF7C yeast에 감염시켜 26kDa의 HA-GFAPN-GAL4 DBD 합성 단백질 발현을 western blot analysis로 확인한다. GFAPN을 매개로 two hybrid assay를 통해 human fetal brain cDNA library (Clontech)에서 구분하였다. 즉 GFAPN 미끼로 하는 bait library와 GFAPN 와 상호 작용을 할 것으로 생각되는 prey library를 HF7C yeast에 동시에 감염시킨 후 tryptophan, leucine, histidine이 없는 배지에 5mM 3-amino- 1,2,4-triazole 합성 glucose를 공급하여 GFAPN 미끼로 하는 bait library와 GFAPN 와 상호 작용을 할 것으로 생각되는 prey library가 동시에 안정적으로 감염된 균주를 선택 배양하였다. 선택 배양된 것을 확인하기 위해 배양된 균주를 X-gel로 filter lift assay를 하고 β-galactosidase activity 측정하였다. 선택 배양된 yeast에서 DNA를 추출하고 상호 작용하는 단백질을 encoding하는 plasmid를 선택하기 위해 MH6 cell에 electroporate한다. 균주를 분리하고 sequencing을 시행하여 Genbank로부터 모든 gene 순서와 비교하였다.

교종 세포주와 감염

모든 실험에는 인체 U343 교종 세포주를 이용하였다. U343 교종 세포주를 10% fetal bovine serum(Biowhitaker)와 고농도의 glucose를 가진 modified Eagle medium(MEM)에서 5%의 이산화탄소를 함유하는 섭씨 37도의 배양기내에서 무균 배양하였다. 일시적 감염은 Fugene (Roche) reagent을 이용하였다. 인위적으로 fascin을 발현시키고 이를 확인하기 위해 표시 유전자 (myc)를 포함하는 fascin-myc fusion gene을 포함하는 plasmid인 쥐의 fascin cDNA expression construct (pcDNA3.1-myc-fascin)을 U343 교종 세포주에 감염시켰다. pcDNA3.1^{+}- myc-fascin는 Pierre McCrea (University of Texas, MD Anderson Cancer Center)로부터 기증 받았다. pcDNA3.1-myc-fascin는 C-terminal myc epitope tag에 murine fascin cDNA 전체 길이가 결합된 단백질을 생산할 수 있도록 고안되어 있다.

Western blotting

세포를 바이러스에 감염시킨 후 원하는 시간에 세포를 PBS로 두 차례 씻어 준 후 얼음 위에서 용해액을 이용하여 전체 세포를 용해시킨다. 섭씨 4도에서 15000rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층부의 soluble fraction과 침전된 insoluble fraction을 얻는다. 단백질의 농도는 BCA assay에 의해 결정되었고 각각 20μg의 단백질을 10% SDS-PAG에서 전기 영동하고 semidry electro transfer의 방법으로 nitrocellulose membrane에 옮겼다. Fascin을 확인하기 위한 항체로는 monoclonal α-fascin antibody(55kDa, Dako, California, USA)를 이용하였고 GFAP를 확인하기 위한 항체는 monoclonal α-GFAP antibody (50kDa, Dako, California, USA)를 이용하였다. 결과는 ECL (enhanced chemiluminescence detection system, Amersham, USA)로 확인하고 dosimetry로 상대적 발현 정도를 측정 비교하였다.

같은 방법으로 정상 뇌조직과 교종에서 fascin의 발현을 측정하였다. 이를 위해 우리는 간질 환자의 수술 중 채집한 정상 뇌 조직과 여러 가지 악성도를 가진 신경 교종을 수술 중 채취하여 영하

```
1    mtangtaeav qiqfglincg nkyltaeafg fkvnasassl kkkqiwtleq ppdeagsaav
61   clrshlgryl aadkdgnvtc erevpgpdcr flivahddgr wslqseahrr yfggtedrls
121  cfaqtvspae kwsvhiamhp qvniysvtrk ryahlsarpa deiavdrdvp wgvdslitla
181  fqdqrysvqt adhrflrhdg rlvarpepat gytlefrsgk vafrdcegry lapsgpsgtl
241  kagkatkvgk delfaleqsc aqvvlqaane rnvstrqgmd lsanqdeetd qetfqleidr
301  dtkkcafrth tgkywtltat ggvqstassk nascyfdiew rdrritlras ngkfvtskkn
361  gqlaasveta gdselflmkl inrpiivfrg ehgfigcrkv tgtldanrss ydvfqlefnd
421  gaynikdstg kywtvgsdsa vtssgdtpvd fffefcdynk vaikvggryl kgdhagvlka
481  saetvdpasl wey
```

Fig. 1. Amino acid sequences of fascin, interacting with glial fibrillary acidic protein, This sequence is confirmed using GenBank Basic Local Alignment Search Tool sequencing assay. Fascin localized to human chromosome 7p22 and is predicted to encode a 493-amino-acid product with a molecular mass of approximately 55kDa.

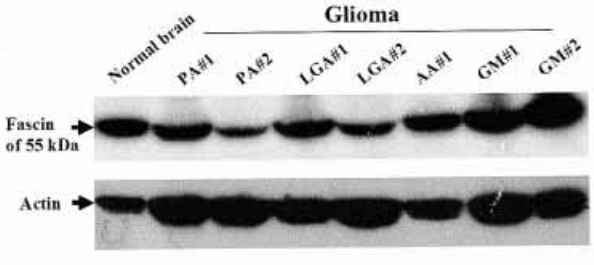

Fig. 2. Western Blotting showing expression of fascin in normal brain tissue and several gliomas. Normal brain tissue is obtained from the temporal lobe during temporal lobectomy for epilepsy surgery. Fascin levels are upregulated in glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma, whereas it remained down regulated in pilocytic astrocytomas and low grade astrocytomas. (PA ; Pilocytic astrocytoma, LGA ; Low grade astrocytoma, AA ; Anaplastic astrocytoma, GM ; Glioblastoma multiforme).

70도의 냉동고에 보관하였다가 일정 시간 후 같은 조건 하에서 0.5% NP-40 lysis buffer로 단백질을 추출한 후 Western blot을 시행하고 fascin의 발현 정도를 dosimetry를 이용하여 상대적인 발현 정도를 비교하였다.

면역 침전 (immunoprecipitation, IP)

면역 침전은 GFAP polyclonal antibody (Dako, California, USA)를 이용하였다. 세포를 TritonX, NaCl, EDTA, Tris를 포함한 완충제로 용해시키고 20분간 원심 분리하였다. GFAP antibody를 용해액에 넣고 섭씨 4도에서 하루 밤을 숙성시킨 후 protein A-sepharose resin (Sigma)를 넣어 GFAP antibody와 GFAP 간의 복합체와 결합 하도록 하였다.

항체-단백질간 복합체가 결합된 protein A-sepharose resin을 세척하고 Laemmli sample buffer에서 끓임으로 resin으로부터 항체-단백질간 복합체를 분리해 내었다. 항체-단백질간 복합체는 10% SDS-PAG에서 전기 영동하고 Immobilon-P membrane에 옮긴 후 anti-myc monoclonal antibody(UBI)를 이용한 Western blot으로 확인하였다. Blot의 결과는 ECL(enhanced chemilumin-escence detection system, Amersham)로 확인하였다.

형태학적 검사 : 면역 세포 염색 및 전자 현미경 검사

U343 교종 세포주를 50%의 밀도로 10mm의 둥근 유리 coverslip에 직접 배양한 후 phosphate buffer system(PBS)를 세척 후 섭씨 영하 20도로 냉각한 methanol로 10분간 고정한 후 투과액으로 처치하고 PBS로 다시 3차례 세척한다. 비특이적 반응을 막기 위해 PBS내에 0.5% basal serum albumin로 전처치 후 약 2시간 α-GFAP polyclonal 항체(DAKO) 또는 α-fascin monoclonal 항체(DAKO)로 각각 반응시켰다.

fascin의 형광 염색을 위한 2차 항체로 Rhodamine이 결합된 anti-mouse antibody, GFAP의 형광 염색을 위한 2차 항체로 Fluorescein Isothiocyanate(FITC)가 결합된 anti-rabbit antibody를 이용하였다. 면역 세포 염색은 Zeiss confocal microscope을 이용하여 관찰하였다. 좀 더 미세한 세포내 GFAP와 이와 상호 작용을 하는 IFAP를 확인하기 위해 GFAP 항체에 5nm의 gold particle을 부착하고 fascin 항체에는 10nm의 gold particle을 부착하여 scanning 전자 현미경으로 관찰하였다.

결 과

GFAP와 상호 작용하는 IFAP의 발견 : Fascin

Two hybrid assay에서 GFAP의 head 부위를 포함하는 GFAP 조각 (GFAPN)과 서로 상호 작용하는 protein은 모두 13개가 있었다. 이들의 단백질 염기 순서를 확인하고 각각의 염기 서열을 GenBank Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)와 비교해 보았을 때 fascin이라는 actin-binding 단백질을 encode하는 유전자를 분리할 수 있었다 (Fig. 1).

정상 뇌조직과 교종에서의 Fascin 발현

Fascin은 검사한 모든 조직에서 발현되었으나 종양의 악성도에 따라 발현되는 정도에 차이가 있음을 확인하였다. 털모양세포 별세포종(pilocytic astrocytoma)와 저등급 별세포종(low grade astrocytoma)에서는 정상 뇌조직에 비해 fascin이 적게 발현된 반면 역형성 별세포종(anaplastic astrocytoma)와 교모 세포종(glioblastoma multiforme)에서는 강하게 발현하였다 (Fig. 2).

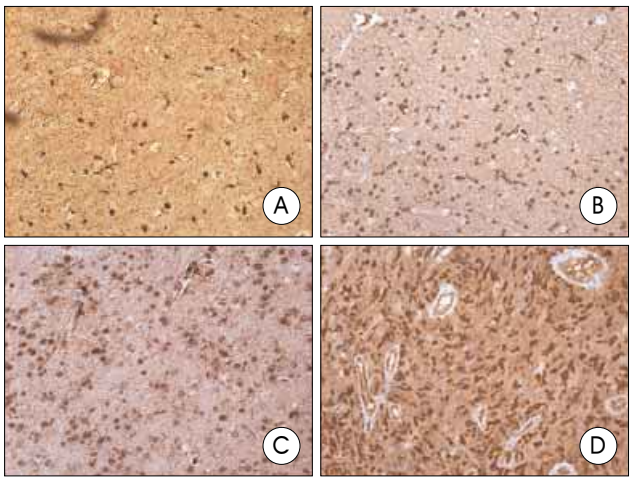

Fig. 3. Immunohistological expression of −fascin in normal brain tissue and different invasive gliomas (X 100). Note the cytoplasmic immunostainings of −fascin in anaplastic astrocytoma (panel C) and glioblastoma multiforme (panel D) are much stronger that those in normal brain tissue (panel A) and low grade astrocytoma (panel B).

이런 양상은 같은 환자의 파라핀 조직을 면역 염색한 검사에서도 같은 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 3).

Fascin과 GFAP와의 상관 관계

U343 교종 세포주에 pcDNA3.1^{+}−myc−fascin를 일시적으로 감염시켜 48시간 배양 후 세포를 용해하였으며 기술한 방법으로 전체 단백질을 soluble과 insoluble fraction으로 구분하였다. α−GFAP polyclonal antibody를 이용하여 면역 침전시키고 anti−

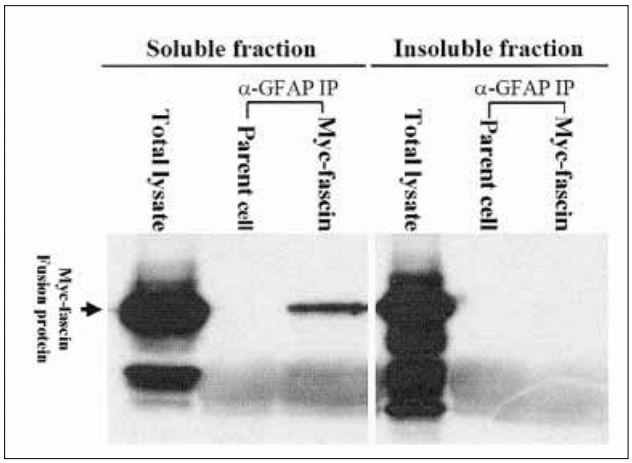

Fig. 4. Immunoprecipitation using anti glial fibrillary acidic protein antibody in U343 glioma cell line. Co−immunoprecipitation analyses demonstrates that GFAP and fascin are present in the same immune complex in soluble fraction of U343 glioma cells transfected with pcDNA3.1−myc−fascin. Anti−GFAP immunoprecipitations are performed on both soluble (1% tritonX−100) cell fractions (the left panel: lanes 1−3) and insoluble (4% SDS) (the right panel: lanes 1−3). Myc−fascin is detected by anti−myc tag western blotting.

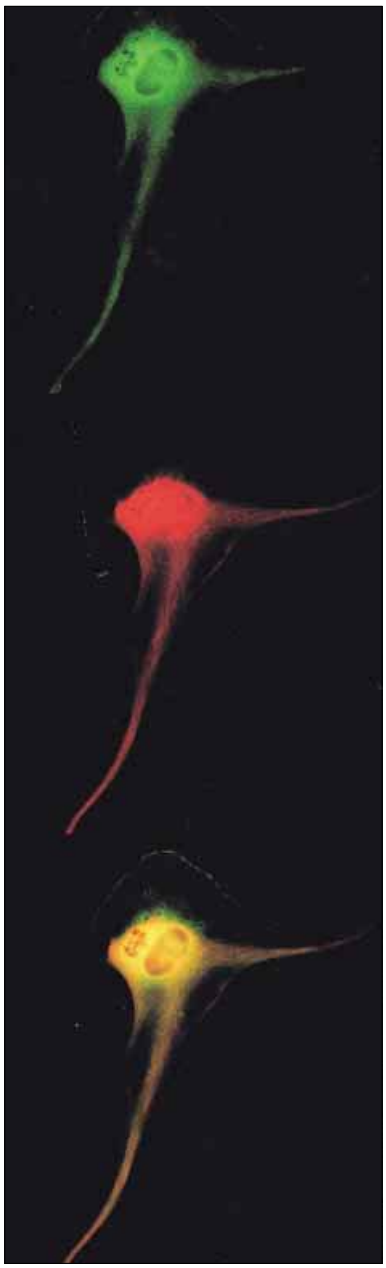

Fig. 5. Immunocytochemical stain using anti−GFAP antibody conjugate with Fluorescein Isothiocyanate and anti−fascin antibody conjugate with rhodomine. Glial fibrillary acidic protein and fascin are co−immunolocalized (yellow).

myc tag를 이용하여 Western blot을 시행하여 GFAP와 fascin은 동일 면역 복합체에서 발견되는 것을 확인하였다 (Fig. 4).

GFAP−fascin 면역복합체는 soluble fraction에서만 발견되었으며 대조군으로 이용된 pcDNA3.1^{+}−myc−fascin을 감염시키지 않았던 U343 교종 세포주와 insoluble fraction에서는 발견되지 않았다. 세포 내에서의 GFAP와 fascin사이의 상호 연관성을 확인하기 위해 GFAP와 fascin에 대한 이중 세포 면역염색을 하여 confocal microscopy으로 관찰한 결과 대부분의 fascin은 GFAP와 같은 위치에서 염색되는 것을 확인하였다 (Fig. 5). 특히 fascin은 U343 교종 세포주의 세포 돌기에 있는 GFAP와 밀접한 관계를 가지는 것처럼 보였다. 이런 관계를 보다 명확하게 확인하기 위해 gold particle을 이용한 scanning 전자 현미경 검사를 시행하였다. 검사 결과 GFAP는 세포 돌기를 포함한 세포질 전반에서 발견되는 반면 fascin은 주로 cellular process에서 발견되었다 (Fig . 6A). U343 교종 세포주의 cellular process를 고배율 전자 현미경로 관찰하였을 때 GFAP와 fascin은 물리적으로 결합된 상태로 존재하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6B).

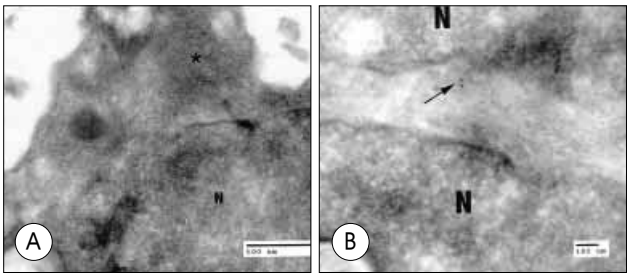

Fig. 6. Transmission electron microscopic findings on U343 glioma cell line using anti-GFAP antibody conjugate with 5nm gold particles and anti-fascin antibody conjugate with 10nm gold particles. GFAP is found on the whole cytoplasm (asterisk), while fascin is concentrated on the astrocytic process and co-localized with GFAP (Arrows indicate 10 nm gold particles specifically labeling fascin). Smaller dots (5 nm gold particles) represent GFAP labeling. N ; Nucleus

고 찰

세포의 구조 단백질은 세포의 형태와 구조뿐 아니라 세포의 이동에도 중요한 역할을 한다. 고등 동물의 모든 세포에서 발견되는 8~10nm의 IF는 조직과 세포의 기능에 따라 각기 다른 특이성을 가지게 된다[7,8]. 이런 IF의 특이성은 세포의 특별한 기능에 중요한 역할을 하는데 keratin과 neurofilament 같은 IF에 돌연변이가 생기면 각기 구강과 신경 근육계 질환을 유발하게 된다[2,30]. GFAP는 중추 신경계의 교세포에 특이성을 가지는 50kDa의 IF 중의 하나이다. GFAP의 아미노산 순서는 염색체 지도 연구를 통해 이미 알려져 있다. 이들 연구에서 GFAP gene 중 항상 일정하게 발견되는 것은 3.5kb의 standard form 또는 GFAP-alpha로 17번 염색체(17q21)에서 유래하는 큰 유전 인자 덩어리의 한 부분임이 확인되었다[4,27]. 이런 GFAP 유전자 결손은 다른 IF 결손에서와 비슷하게 교세포의 고유 기능인 신경 세포의 수초화 이상, 혈관-뇌 장벽 장애를 유발한다[6,21,24,28]. 기존의 IF에 대한 보고들은 GFAP와 같은 IF가 IFAP와의 상호 관계를 통해 그 기능을 수행하고 있음이 확인되었다. 즉, IFAP의 카르복시 단말기 (carboxyl terminal)는 인산화되면서 IF와 결합한다[26]. IF-IFAP 복합 단백질은 암모니아 단말기(NH2 terminal)로 actin-binding domain을 통하여 actin과 결합하여 actin bundle의 형성을 유도한다[11-16,22]. 예로 쥐에서 이러한 neurofilament IF와 actin MF를 연결하는 연결 단백질인 plectin의 결손은 감각 신경 퇴행과 dystonia musculorum phenotype을 초래한다[2,30]. 본 연구자는 IF의 하나인 GFAP도 마찬가지로 어떤 IFAP와의 상호 관계를 통해 actin microfilament와 microtubule 등과 작용하고 세포골격의 기계적인 안정성과 역동적 행태에도 중요한 역할을 할 것으로 추정하고 GFAP와 서로 상호 작용하는 IFAP를 찾고자 하였다. GFAP의 central alpha helical과 Rod domain 부분은 다른 IF들과 구조적으로 또는 생화학적으로 상당 부분 비슷하지만 인체 17번 염색체(17q21)의 일부인 3.5kb의 standard form에서 만들어진 GFAP 단백질은 다른 IF들과 전혀 다른 암모니아 단말기를 가지고 있다[4,18,27]. 본 연구자는 GFAP 암모니아 단말기의 특이성을 이용하면 GFAP에 특이적으로 반응하는 IFAP를 찾을 수 있을 것으로 생각하였다. 실제 본 연구에서 GFAP의 head 부위를 포함하는 GFAP 조각(GFAPN)을 이용한 two hybrid assay의 방법으로 GFAP와 서로 상호 작용하는 13개의 IFAP을 분리하였다. 이들의 아미노산 순서를 분석하고 GenBank에서 아미노산 순서를 비교하여 그 중 하나가 actin-binding 단백질인 fascin임을 확인하였다.

Fascin은 처음 성게의 수정되지 않은 알의 세포질에서 발견되었다. 성게의 알은 수정 후 이동성을 가지게 되는데, 이 때 이동을 위한 microvilli core와 filodopia 내의 microfilament에서 fascin이 집중적으로 발견되어 세포의 이동성에 관련 있을 것으로 추정되었다. Fascin은 actin 결합 단백질의 하나로 F-actin을 side-by-side로 연결하여 bundle을 만드는 역할을 하는데 Fascin은 구조적으로 하나의 분자가 두 개의 actin과 결합할 수 있도록 되어 있다[1,5,32]. 이런 fascin과 actin 결합은 fascin의 아미노 단말기에서의 인산화에 의해 조절되는데 이 중 주로 인산화되는 부위는 39번째 아미노산인 serine (ser-39)으로 ser-39는 모든 fascin에 존재하는 PKC consensus motif를 포함하고 있다. Ser-39가 인산화되면 actin과의 부착이 저해되고 actin 결합 또한 방해된다[23,31].

처음 fascin이 성게에서 발견된 후 쥐와 인체에서도 비슷한 아미노산 순서를 보이는 fascin 동일 단백질이 발견되었다. 인체의 fascin은 또 다른 actin 결합 단백질인 villin이나 fimbrin과는 전혀 다른 아미노산 순서를 보이는데 성게에서와 마찬가지로 세포의 역동성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 포유동물의 내피 세포에서 세포의 이동성과 밀접한 관계를 가지는 filodopia, microspike, microvilli등 actin stress fiber에서 집중적으로 발견되었다[23,31]. 실험적으로 이들을 과발현 시켰을 때 세포막의 융기가 생기고 세포간의 결합이 느슨해져 세포 이동이 용이해진다는 보고가 있다[20]. 임상적으로도 fascin은 유방암, 직장암, 피부암 등 악성 종양에서 과발현되는 것으로 보고되고 있다[11,12]. 본 연구에서는 정상 뇌조직과 여러 등급의 악성도를 가진 교종에서 조직 면역 염색과 Western blot의 방법으로 fascin의 발현 정도를 비교하였는데 악성도가 높을수록 fascin이 과발현되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

Fascin은 종양 세포뿐 아니라 내피 세포, APC (antigen presenting dendrite cell) 등 정상 세포에서도 높게 발현하는데 특히 신경 세포와 교세포에서 과발현하는 것으로 알려져 있다[11,12,20]. 알려진 바와 같이 GFAP는 교세포에 특이성을 가지는 중요한 구조

단백질인 IF의 하나이며 fascin은 세포 골격의 중요한 또 하나의 축인 actin 결합 단백질로 상호 연관성이 있을 것으로 추정되어 왔다. 본 연구는 면역 침전의 방법으로 GFAP가 fascin이 서로 결합체를 형성하는 것을 확인하였다. 또한 면역 세포 염색, 전자 현미경의 방법으로 fascin이 GFAP와 밀접한 관계를 가지고 세포 돌기에 집중적으로 발현하는 것을 확인하였다. 이런 연구 결과들은 GFAP가 IFAP인 fascin과 결합하고 이들 복합 단백질이 actin bundling을 조절함으로써 교종의 침윤성에 영향을 줄 수 있을 것임을 암시한다. 그러나 세포내 구조 단백질들 간의 상호 작용 기전은 정확히 이해되지 않고 있다. 잘 알려진 바와 같이 교종의 악성도가 높을수록 GFAP의 발현은 줄어드는 것으로 알려져 있다.

특히 교모 세포종에서 GFAP는 거의 소실되어 있다고 알려진 반면 본 연구 결과 GFAP와 상호 작용을 하여 actin 결합에 관계할 것으로 생각되는 fascin은 과발현되어 있다. GFAP의 감소는 actin bundling의 감소를 유발하고 이는 세포간 결합에 관련이 있는 cytoplasmic processes의 변화를 초래하여 세포의 이동성과 투과성에도 영향을 줄 수 있을 것이다. 물론 다른 IF와 마찬가지로 GFAP도 한가지 형태로 존재하는 것이 아니고 assembled (filamentous) 형태와 disassembled (soluble) 상태 사이를 지속적으로 오가는 역동적인 단백질이기 때문에 이것의 발현 정도만으로 악성 정도, 환자의 예후를 짐작하는 것은 쉽지 않다. 본 연구 결과에서 보인 바와 같이 GFAP은 disassembled (soluble) 상태에서만 fascin과 상호 작용하였다.

GFAP의 assembled-disassembled 상태 사이의 변환에는 암모니아 단말기의 인산화가 중요한 역할을 한다[30]. GFAP의 암모니아 단말기에 있는 Serine과 threonine 부위는 인산화의 매개 역할을 하는데 CDC2 등의 serine/threonine protein kinases, protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), CaM kinase II, Rho-kinase 등에 의해 직간접적으로 조절을 받는다[17,29,34]. 본 연구 결과와 여러 보고들을 종합할 때 교세포에 특이성을 가지는 GFAP는 fascin과 같은 IFAP와의 결합을 통해 actin bundling을 조절하여 세포의 이동, 종양의 악성화에 관계하는 것으로 추정된다. 그러나 이러한 세포내 구조 단백질들 간의 상호 작용에는 많은 유전자와 효소들이 다양하게 작용하고 있어 이들 사이의 보다 광범위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서 GFAP의 head 부위를 포함하는 GFAP 조각(GFAPN)을 이용한 two hybrid assay의 방법으로 GFAP와 서로 상호 작용하는 actin-binding 단백질인 fascin을 확인하였다. 면역 침전의 방법으로 GFAP가 fascin이 서로 결합체를 형성하는 것을 확인하였다. 또한 면역 세포 염색, 전자 현미경의 방법으로 fascin이 GFAP와 밀접한 관계를 가지고 세포 돌기에 집중적으로 발현하는 것을 확인하였다. 이런 결과들은 GFAP가 IFAP인 fascin과 결합하고 이들 복합 단백질이 actin bundling을 조절함으로써 별세포의 구조적 안정성 뿐 아니라 교종의 침윤성에 영향을 줄 수 있을 것임을 암시하며 이런 유전자의 상호 연관성을 이용하여 교종의 유전자 치료에 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

• Acknowledgement
본 연구는 2003년 연세대학교 의과대학 장기해외연수 교수연구비 지원으로 이루어졌습니다.

References

1. Adams JC : Characterization of cell-matrix adhesion requirements for the formation of fascin microspikes. **Mol Biol Cell 8** : 2345-2363, 1997
2. Andra K, Lassmann H, Bittner R, Shorny S, Fassler R, Propst F, et al : Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. **Genes Dev 11** : 3143-3156, 1997
3. Berens ME, Rutka JT, Rosenblum ML : Brain tumor epidemiology, growth, and invasion. **Neurosurg Clin N Am 1** : 1-18, 1990
4. Brenner M, Lampel K, Nakatani Y, Mill J, Banner C, Mearow K, et al : Characterization of human cDNA and genomic clones for glial fibrillary acidic protein. **Brain Res Mol Brain Res 7** : 277-286, 1990
5. Cohan CS, Welnhofer EA, Zhao L, Matsumura F, Yamashiro S : Role of the actin bundling protein fascin in growth cone morphogenesis : localization in filopodia and lamellipodia. **Cell Motil Cytoskeleton 48** : 109-120, 2001
6. Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, et al : Intermediate filament protein partnership in astrocytes. **J Biol Chem 274** : 23996-24006, 1999
7. Fuchs E, Cleveland DW : A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. **Science 279** : 514-519, 1998
8. Fuchs E, Weber K : Intermediate filaments : structure, dynamics, function, and disease. **Annu Rev Biochem 63** : 345-382, 1994
9. Goldman RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM : The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. **J Cell Biol 134** : 971-983, 1996
10. Gomi H, Yokoyama T, Fujimoto K, Ikeda T, Katoh A, Itoh T, et al : Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. **Neuron 14** : 29-41, 1995
11. Grothey A, Hashizume R, Ji H, Tubb BE, Patrick CW Jr, Yu D, et al : C-erbB-2/ HER-2 upregulates fascin, an actin-bundling protein associated with cell motility, in human breast cancer cell lines. **Oncogene 19** : 4864-4875, 2000
12. Grothey A, Hashizume R, Sahin AA, McCrea PD : Fascin, an actin-bundling protein associated with cell motility, is upregulated in hormone receptor negative breast cancer. **Br J Cancer 83** : 870-873, 2000
13. Hatten ME, Liem RK, Mason CA : Weaver mouse cerebellar granule neurons fail to migrate on wild-type astroglial processes in vitro. **J Neurosci 6** : 2676-2683, 1986
14. Herrmann H, Aebi U : Intermediate filaments and their associates : multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. **Curr Opin Cell Biol 12** : 79-90, 2000
15. Inagaki M, Gonda Y, Nishizawa K, Kitamura S, Sato C, Ando S, et al : Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro

locate in a non-alpha-helical head domain. **J Biol Chem 265** : 4722-4729, 1990
16. Inagaki M, Nakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N : Glial fibrillary acidic protein : dynamic property and regulation by phosphorylation. **Brain Pathol 4** : 239-243, 1994
17. Kosako H, Amano M, Yanagida M, Tanabe K, Nishi Y, Kaibuchi K, et al : Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein at the same sites by cleavage furrow kinase and Rho-associated kinase. **J Biol Chem 272** : 10333-10336, 1997
18. Lalley PA, Davisson MT, Graves JA, O'Brien SJ, Roderick TH, Doolittle DP, et al : Report of the committee on comparative mapping. **Cytogenet Cell Genet 49** : 227-235, 1988
19. Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, et al : GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. **Neuron 17** : 607-615, 1996
20. Lin XH, Grako KA, Burg MA, Stallcup WB : NG2 proteoglycan and the actin-binding protein fascin define separate populations of actin-containing filopodia and lamellipodia during cell spreading and migration. **Mol Biol Cell 7** :1977-1993, 1996
21. McCall MA, Gregg RG, Behringer RR, Brenner M, Delaney CL, Galbreath EJ, et al : Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. **Proc Natl Acad Sci U S A 93** : 6361-6366, 1996
22. Nakamura Y, Takeda M, Aimoto S, Hojo H, Takao T, Shimonishi Y, et al : Assembly regulatory domain of glial fibrillary acidic protein. A single phosphorylation diminishes its assembly-accelerating property. **J Biol Chem 267** : 23269-23274, 1992
23. Ono S, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsudaira PT, Gnarra JR, Obinata T, et al : Identification of an actin binding region and a protein kinase C phosphorylation site on human fascin. **J Biol Chem 272** : 2527-2533, 1997
24. Pekny M, Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallen A, Perlmann T, et al : Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. **J Cell Biol 145** : 503-514, 1999
25. Pekny M, Leveen P, Pekna M, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, et al : Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. **Embo J 14** : 1590-1598, 1995
26. Pytela R, Wiche G : High molecular weight polypeptides (270,000-340,000) from cultured cells are related to hog brain microtubule-associated proteins but copurify with intermediate filaments. **Proc Natl Acad Sci U S A 77** : 4808-4812, 1980
27. Reeves SA, Helman LJ, Allison A, Israel MA : Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. **Proc Natl Acad Sci U S A 86** : 5178-5182, 1989
28. Shibuki K, Gomi H, Chen L, Bao S, Kim JJ, Wakatsuki H, et al : Deficient cerebellar long-term depression, impaired eyeblink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice. **Neuron 16** : 587-599, 1996
29. Sin WC, Chen XQ, Leung T, Lim L : RhoA-binding kinase alpha translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network. **Mol Cell Biol 18** : 6325-6339, 1998
30. Wiche G : Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. **J Cell Sci 111 (Pt 17)** : 2477-2486, 1998
31. Yamakita Y, Ono S, Matsumura F, Yamashiro S : Phosphorylation of human fascin inhibits its actin binding and bundling activities. **J Biol Chem 271** : 12632-12638, 1996
32. Yamashiro S, Yamakita Y, Ono S, Matsumura F : Fascin, an actin-bundling protein, induces membrane protrusions and increases cell motility of epithelial cells. **Mol Biol Cell 9** : 993-1006, 1998
33. Yang Y, Dowling J, Yu QC, Kouklis P, Cleveland DW, Fuchs E : An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. **Cell 86** : 655-665, 1996
34. Yasui Y, Amano M, Nagata K, Inagaki N, Nakamura H, Saya H, et al : Roles of Rho-associated kinase in cytokinesis ; mutations in Rho-associated kinase phosphorylation sites impair cytokinetic segregation of glial filaments. **J Cell Biol 143** : 1249-1258, 1998