

인체 악성 신경교종에서 Nedd5 발현
양상의 분석

연세대학교 대학원

의 학 과

서 의 교

인체 악성 신경교종에서 Nedd5 발현
양상의 분석

연세대학교 대학원

의 학 과

서 의 교

인체 악성 신경교종에서 Nedd5 발현
양상의 분석

지도 최 중 언 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2004년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

서 의 교

서의교의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004년 6월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 세심한 배려와 격려로 이끌어 주신 최중언 교수님께 무한한 감사를 드립니다. 연구 과정 내내 애정과 관심으로 이끌어 주시고 정성어린 지도와 충고를 해주신 김동석 교수님께 감사를 드립니다. 논문 심사중 많은 조언과 가르침으로 방향을 잡아주신 안영수 교수님, 최영철 교수님께 감사를 드립니다.

본 논문에 대한 지도뿐 만 아니라 신경외과의로써의 자질과 술기를 익히는데 큰 가르침을 주신 이규성 교수님께 무한한 감사를 드립니다. 아울러 저를 신경외과학의 세계로 첫걸음을 내닫게 해주신 연세대학교 의과대학 신경외과학교실에 감사를 드립니다.

항상 사랑과 관심으로 학문의 성장을 지켜봐주시고 후원해 주셨으며, 당신께서 직접 신경외과 환자로서 의사로서의 환자에 대한 자세를 일깨워 주셨던 아버님과 어머님께 머리 숙여 감사를 드립니다.

끝으로 힘들었던 수련 과정부터 지금까지 묵묵히 믿고 따라주는 사랑하는 아내 해운이와, 어린시절 아버지로서 함께 해주지 못해서 항상 미안하던, 바르게 자라주어 고마운 장혁이와 지수에게 이 논문과 함께 사랑과 감사를 보냅니다. 감사합니다

저자 씬

차 례

국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 세포배양	6
2. 항체	6
3. Western blot	7
4. Aphidicolin을 이용한 세포주기의 동시화 및 세포주기분석	8
5. 세포면역 염색	8
III. 결과	10
1. 인체 뇌조직과 뇌종양에서의 septin 발현양상	10
2. 세포주기에 따른 Nedd5 발현양상	14
3. 세포주기에 따른 Nedd5의 세포내 분포변화	16
IV. 고찰	20
V. 결론	24
참고문헌	25
영문요약	32

그림 차례

Figure 1. Molecular weight determinations of the septins in human brain tumors.	11
Figure 2. Expression of human septins in human brain tumor cell lines and primary human fibroblasts.	12
Figure 3. Expression of Nedd5 and G-septin in brain tissues and brain tumor samples.	13
Figure 4. Cell synchronization of U373 cells using aphidicolin.	15
Figure 5. Nedd5 expression after removal of aphidicolin in synchronized U373 malignant glioma cells.	16
Figure 6. Subcellular localization of endogenous Nedd5 in SF-188 malignant glioma cell (A,B,C) and primary fibroblast (D,E,F).	18
Figure 7. Changes in the subcellular localization of endogenous Nedd5 according to cell cycle	19

인체 악성 신경교종에서 Nedd5 발현 양상의 분석

Septin은 cytokinesis 과정에서 중요한 역할을 하는 GTPase의 일원이다. septin의 일종인 Nedd5의 유전자는 41.5-kDa GTPase를 유도하고 *Sacchomyces*와 *Drosophila* septin유전자와 비슷하게 cytokinesis과정에 꼭 필요하다. 본 연구에서 인체의 8가지 Septin (AL110, CDC10, CDCrel-1, G-septin, H5C, KIAA0128, α -MSF, Nedd5)이 정상뇌조직과 신경교종과 수모세포종에서 어떻게 발현되는지와 신경교종에서 Nedd5가 각각 세포주기에 따른 발현정도를 알아보려고 하였다.

각각의 septin은 정상인체 뇌조직과 뇌종양에서 아주 다양하게 발현되었다. G-septin은 신경교종에서는 발현되지 않았고 수모세포종에서 발현되었다. Nedd5는 aphidicolin으로 세포를 동시화시킨 신경교종에서 세포주기 G2-M에서 최대로 발현되었다.

Nedd5는 actin filament와 중첩되어 과립모양이나 짧은 선형모양의 구조를 나타내었고 대부분은 핵 주위에서 비정형적인 모양의 면역 반응성을 나타내었다. 그러나 세포질 분열이 진행되는 초기에는 Nedd5가 분열 중인 두 세포 사이의 세포질 (cleavage furrow)에서 강하게 발현되고 일부의 세포막의 가장 자리에서 강한 발현을 보였으며 세포질 분열이 거의 끝나는 시점에는 분열 중인 두 세포의 actin base contractile ring 인접에 섬유 형태로 강하게 발현되었고 세포질에서의 발현은 현저히 줄어들었다.

본 연구는 정상 뇌조직과 신경교종에서 septin의 일종인 Nedd5가 세포주기에 따라 다양하게 발현되고, G2-M기에 최대한으로 발현되고 actin과 연관을 가지고 발현되었다. 이런 결과는 Nedd5가 세포분열 과정을 조절하고 세포골격을 유지하는데 중요한 역할을 한다는 것을 알려준다.

핵심되는 말 : Nedd5. septin. 뇌종양. 신경교종. actin. cytokinesis.
GTPase

인체 악성 신경교종에서 Nedd5 발현 양상의 분석

<지도교수 최 중 언>

연세대학교 대학원 의학과

서 의 교

I. 서론

세포 분열은 고도의 정밀을 요하는 세포 성장의 한 과정으로 각 단계에서의 사소한 이상도 세포 사망이나 암을 유발 할 수 있다. 세포 분열의 마지막 단계는 세포질과 유전물질이 정확하게 두 개의 딸 세포로 나누어지는 세포질 분열 (cytokinesis)이다. Septin은 세포질 분열 과정에서 중요한 역할을 하는 GTPase의 일원이다. 이러한 septin은 세포 분열중인 효모 (yeast, *Saccharomyces cerevisiae*)에서 처음 발견되었고 다른 균류 (fungus)나 동물에게서도 발견되었다¹⁻⁴. 효모에서 septin은 세포 분열의 시작인 bud의 형성에서 bud neck 바로 아래에서 bud의 방향성을 결정하고 세포 분열의 마지막 단계인 세포질 분열 때에는 두개의 딸 세포가 서로 분리하기 위해 형성되는 actin contractile ring 바로 아래에서 submembranous ring을 형성하여 세포질 분열의 마지막 단계에도 관계하며 두 개의 딸 세포에 세포질 및 유전체 등이 정확한 양분될 때까지 세포 분열을 촉진하거나 늦추어 주는 역할을 함으로 세포 분열을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려졌다⁵⁻⁷.

이런 효모에서의 septin은 모두 CDC3p, CDC10p, CDC11p, CDC12p 등 4개의 상동체가 알려져 있다. 효모의 배양에서 저체온을 유도하면 이런 septin 유전자에 이상이 유발되는데 4개의 septin 중 하나에서의 염색체 이상도 mother-bud 사이의 hetero-oligomeric filament의 형성에 이상이 생기고 불완전한 세포 분열로 인해 bud가 길어지거나 세포질 분열이 이루

어지지 않아 다핵 세포가 생기며 궁극적으로는 세포 사멸을 유도하게 된다⁸.

초파리 (*Drosophila melanogaster*)에서도 septin 상동체(homologue)를 전사하는 Pnut 유전자가 발견됨으로써 세포분열과정에서 septin이 필요하다는 것이 알려졌다⁹. 실험적으로 효모의 septin과 마찬가지로 초파리의 septin으로 알려진 Pnut, Sep1, Sep2 등은 7 nm 길이의 hetero-oligomeric filament를 형성하고 이런 septin 복합체는 분열하는 세포의 갈라지는 부분(cleavage furrow)에서 많이 축적되어 있는 것이 밝혀졌다⁹. 효모의 septin에 유전자 이상이 있을 때와 같이 초파리에서 Pnut 유전자에 변이가 있는 경우 세포질 분열에 이상이 생기고 유충으로의 변태과정(larval development)에서 효모의 다핵 세포와 비슷한 형태로 imaginal disc에서 다핵 syncytia가 형성된다^{1,10}.

비슷하게 선충류의 하나인 *Caenorhabditis elegans*에서도 UNC-59, UNC-61등 효모 septin과 비슷한 상동체가 발견되었는데 이런 UNC-59, UNC-61에서의 변이는 *Caenorhabditis elegans*의 세포 분열 과정에서 배아기이후의 이상(postembryonic defect)을 유발한다¹¹.

이상의 여러 보고는 septin이 세포 분열 과정을 조절하고 세포 골격(cytoskeletal structure)을 유지하는데 중요한 역할을 하며, 이는 단순한 세포 분열을 하는 효모뿐 아니라 비교적 복잡한 세포 분열을 하는 초파리^{1,10}, 선충류^{11,12} 등의 세포 분열과정에 필요하다는 것을 보여 주었다.

그러나 포유 동물의 세포 분열은 위의 생체와는 다르게 아주 복잡한 세포 분열과정을 거치기 때문에 septin이 포유 동물에서는 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각하여 많은 연구가 되지 않았다. 하지만 최근 random sequence strategies, subtractive screens 등의 방법으로 포유 동물에서도 Nedd5^{4,5}, mCDC10¹³, KIAA0128¹⁴, KIAA0202^{15,16}, Diff6^{17,18}, hCDCrel-1/PNUTL1¹⁶, α -MSF (eSEP)^{19,20}, G-septin²¹, KIAA0991, H5^{22,23} 등 적어도 10여개 이상의 septin 상동체가 알려졌다. 이들 포유 동물에서의 septin 상동체는 모두 30-80 kDa의 크기로 41%-76% 정도 같은 아미노산 서열을 가지고 있으며 구조적으로GTP-binding domain, N-terminus, coiled-coil motif를 가지는carboxyl terminus로 구성되어 효모, 초파리, 선충류에서의 septin과 같은 구조로 GTPase의 모든 기본 구조를 가지고

있다⁴.

기존에 알려진 septin의 기능을 고려하면 세포 분열의 기전이 서로 다르다고 하여도 세포질 분열의 마지막 기전인 actin contractile ring에 의한 마지막 분리라는 공통점은 변화가 없다. 물론 고등동물에서 septin과 상호작용하는 actin, Sec6/8 complex, syntaxin-1, phosphoinositides (PIP2/3), anillin, CDC10, Parkin (E3 Ub protein ligase), Borg3 (CDC42 adaptor) 등의 여러 가지 기능 단백질들이 발견되어 septin은 세포 분열과의 연관성이외에도 다양한 기능이 있을 것으로 생각된다^{1,4,9,24,25}.

본 연구는 인체 악성 신경 교종에서 Nedd5를 포함한 인체 septin의 역할을 좀더 이해하기 위해서 여러 종류의 교종 세포주와 인체에서 수술 중 직접 채취한 여러 가지의 악성도를 가진 신경 교종에서 septin의 발현 양상을 확인하고, 교종 세포주의 세포 주기를 동시화하여 세포 주기에 따른 septin의 발현 양상을 비교하며, 교종 세포 내에서의 septin의 발현 양상을 관찰하여 Nedd5가 인체 악성 교종에서 악성도와 관계를 규명하고 궁극적으로는 종양의 성장과 증식과의 관계를 규명하여 Nedd5가 현재까지는 치료가 어려운 악성 신경 교종의 유전자 치료를 위한 표적 유전자가 될 수 있을 것인지 확인하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양

U138, U251, SF-126, SF-188, SF-539 등의 인체 악성 신경 교종 세포주는 Dolores Dougherty교수(The Brain Tumor Research Center, University of California San Francisco, San Francisco, USA)로부터 기증 받았고²⁶⁻²⁸, U343 정상세포종주, U373, U87 악성교종 세포주는 Bengt Westermark교수(University Hospital, University of Uppsala, Uppsala, Sweden) 교수로부터 기증 받았다²⁹⁻³². 모든 교종 세포주는 2.5 X 10⁵의 세포를 10 cm²의 배양 접시에서 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 1% 항생제, 항진균제의 혼합체(Cellgro™, Mediatech, Molecular research laboratories, Herndon, VA), 고농도의 glucose등을 가진 modified eagle's medium (MEM, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 5%의 이산화탄소를 함유하는 섭씨 37도의 배양기내에서 무균 배양하였다.

2. 항체

인체의 8가지 septin (AL110, CDC10, CDCrel-1, G-septin, H5C, KIAA0128, α -MSF and human Nedd5)에 대한 항체는 William Trimble 교수(The hospital for sick children, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada)로부터 기증 받았다³³⁻³⁷. AL110, CDC10, CDCrel-1, G-septin, H5C, KIAA0128, α -MSF, human Nedd5에 대한 항체의 특이성에 대해서는 이미 많은 보고가 있다^{12,33-36,38}. 이번 연구에 사용된 모든 septin 항체들은 rabbit을 이용하여 만들었으며 예비 실험에서 상호 교차 반응을 나오지 않는다는 것을 확인하였고 Western blot에서 anti α -MSF를 제외한 각각의 항체는 예상되는 molecular weight의 single band로 발견할 수 있었다.

Actin을 세포 염색하기 위해서 polymeric and monomeric actin과만 결합하는 Phalloidin-TRITC (Sigma chemical Company, St Louis, Mo)를 50 μ g

/ PBS 1 ml의 농도로 사용하였다. 세포 염색을 위한 시료로 fluorescein bothiocyanate (FITC)-labelled goat antibodies를 1:75 희석하여 사용하였다.

3. Western blots

인체로부터의 정상 뇌조직에 대한 단백질은 연세대학교 세브란스 병원에서 뇌질환을 치료하기 위한 목적의 수술 중 채취하였다. 이런 표본 사용은 병원윤리위원회의 승인을 얻었다.

모든 조직은 수술 직후 액화질소로 얼린 후 영하 70도에서 보관하고 실험시 같은 조건에서 단백질을 추출하였다. 교종 세포주로부터의 단백질은 10 cm직경의 배양 접시에서 50%의 밀도로 종양 세포를 48시간 이상 배양 후 채취하였다. 간단히 기술하면 세포를 phosphate buffered saline (PBS PH 7.2)으로 두 차례 씻어 준 후 얼음 위에서 용해액 [120mM NaCl, 0.5% Nonidet, P-40(NP-40), 50mM Tris-HCl (PH 8.0)]을 이용하여 전체 세포를 용해시켰다. 용해된 전체 세포 용액을 섭씨 4도에서 15,000rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층부의 soluble fraction과 침전된 insoluble fraction을 얻었다. 단백질의 농도는 BCA assay에 의해 결정되었고¹², 각각 20 μ g의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel에서 80V, 120분 동안 전기영동하고³⁹, semidry electro transfer (0.8mA/cm²)의 방법으로 nitrocellulose membrane에 옮겼다. 0.1% Tween-20 를 가진 PBS 에 5% skim milk를 섞은 용액에서 membrane을 1시간 동안 상온에서 반응시켜 비특이성 반응을 차단시켰다. 일차 및 2차 항체를 차단용액에서 1시간 동안 상온에서 배양하였다. Western blot하기 위해 이차 항체로 goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase(HRP)-conjugate (Bio-Rad, Hercules, CA)를 1:8000으로 희석하여 사용하였다. 2차 항체로 goat anti-rabbit 항체를 1:5000 - 8000의 농도로 사용하였으며 결과는 chemoluminescence (ECL enhanced chemiluminescence detection system, Amersham, Oakville, Canada)로 확인하고 densitometry로 상대적 발현 정도를 정량 분석 하였다.

4. Aphidicolin을 이용한 세포 주기의 동시화 및 세포 주기 분석

세포 주기를 동시화 하기 위해 aphidicolin (Wako pure chemical Co, Osaka, Japan)을 사용하였다. 저농도의 aphidicolin($1.25\mu\text{g}/\text{ml}$)은 mitochondria에서 DNA 합성이나 RNA, 단백질, 핵산 전구물질 합성이나 다른 주 대사 경로에는 영향을 미치지 않고, 단지 선택적으로 DNA 합성만 방해함으로써 eukaryotic cell의 성장을 방해한다⁴⁰.

조직 배양 접시에 5×10^5 U373 악성교종 세포를 얇게 배포하고 24시간 후 성장 배지에 aphidicolin ($1.25\mu\text{g}/\text{ml}$)를 추가하였다. 15시간 후 성장배지로 3번 세포를 씻고 9시간 동안 cell cycle이 진행되도록 한 후 다시 성장 배지에 aphidicolin ($1.25\mu\text{g}/\text{ml}$)를 추가하였다. 이런 과정을 2번 반복하였다. 완전한 1번의 세포주기가 지날 것으로 생각되는 48시간 동안 6시간 간격으로 세포를 얻고 flow cytometry로 세포 주기 동시화를 확인하였다.

세포 주기 분석을 위해 1% trypsin으로 세포를 분리하여 PBS로 세척하고 냉각된 80% ethanol을 섞어 고정한 후 섭씨 영하 4도에서 보관하다가 같은 조건에서 DNAase-inactivated RNases A ($1 \text{ mg}/\text{ml}$)와 propidium iodide (PI; Sigma, Deisenhofen, Germany) $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 용액에 실온에서 30분 이상 암소에서 반응시켜 염색체를 염색하였다. PI에 염색된 세포는 mesh capped tube로 여과시킨 후 Becton-Dickinson FACSscan (Cell fit software Becton Dickenson, Heidelberg, Germany)으로 분석하였다. 각각의 실험은 1×10^4 의 세포를 분석하였으며 각각 3번의 실험을 되풀이하여 세포 주기를 측정하였다.

5. 세포 면역 염색

U373 교종 세포주를 50%의 밀도로 10mm의 둥근 유리 coverslip에 직접 배양한 후 PBS로 세척 후 40분간 4% 파라포름알데하이드로 고정한다. 고정된 세포는 PBS로 씻고 0.02% Triton X-100으로 PBS에서 2분간 투과시킨 다음, PBS에 0.5% bovine serum albumin을 섞어 1시간 동안 반응시켜 비특이성 반응을 차단시킨 후 1시간 동안 상온에서 anti-Nedd5 polyclonal antibody (1:1000)로 배양하였다. 형광 염색을 위한 2차 항체로

rhodamine 또는 FITC가 결합된 anti-rabbit antibody를 이용하였고 actin 염색을 위해 phalloidin-TRITC (Sigma, St Louis, MO, USA)이 사용되었고 4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)를 1 μ g/ml의 농도로 핵을 염색시켰다. 세포 면역 염색은 cool snap camera가 장착된 Leica epifluorescence microscope이나 Leica confocal laser-scanning microscope으로 관찰한다.

III. 결과

1. 인체 뇌조직과 뇌종양에서의 septin 발현 양상

본 연구에서 정상 뇌조직과 종양조직에서 검사한 8가지의 septin은 membranous (insoluble) 과 cytosolic (soluble) fraction 모두에서 발현이 관찰되었으나 주로 soluble fraction에서 많이 발현되어 이후의 모든 Western blot은 cytosolic (soluble) fraction에서 시행하였다. α -MSF을 제외한 7 종류의 septin은 단일 띠로 35 - 65 kDa의 범위 안에서 관찰되었다 (Fig. 1). Anti α -MSF 항체로 적어도 4개의 isoform의 human α -MSF가 있음을 관찰할 수 있었으며 그들의 분자량은 44 - 55 kDa 정도였다 (Fig. 1).

G-septin을 제외하고 다른 cytosolic septin들의 발현 양상은 여러 종류의 종양 세포주에서의 발현과 큰 차이가 없었다(Fig. 2). G-septin은 검사한 모든 수모세포종 세포주와 수술 중 채취한 수모세포종 시료에서는 높게 발현되었고 정상 뇌조직에서도 발현되었으나 일부 교모 세포종을 제외한 악성 교종 시료와 교종 세포주에서는 발현되지 않았다 (Fig. 2, Fig. 3).

Nedd5는 저등급 성상세포종, 역형성 성상세포종, 교모세포종, 수모세포종 등 다양한 뇌종양뿐 아니라 정상 뇌조직에서 다양한 정도로 발현되었다 (Fig. 3). Densitometry를 이용하여 그 발현 정도를 비교해 보았을 때 정상 뇌조직인 전두엽, 측두엽 및 소뇌에서의 발현은 성상세포종에서 보다 발현 정도가 낮은 것을 알 수 있었다. 또한 교모 세포종에서의 Nedd5의 발현은 저등급 성상세포종보다 훨씬 그 정도가 높게 나타났다(Fig. 3).

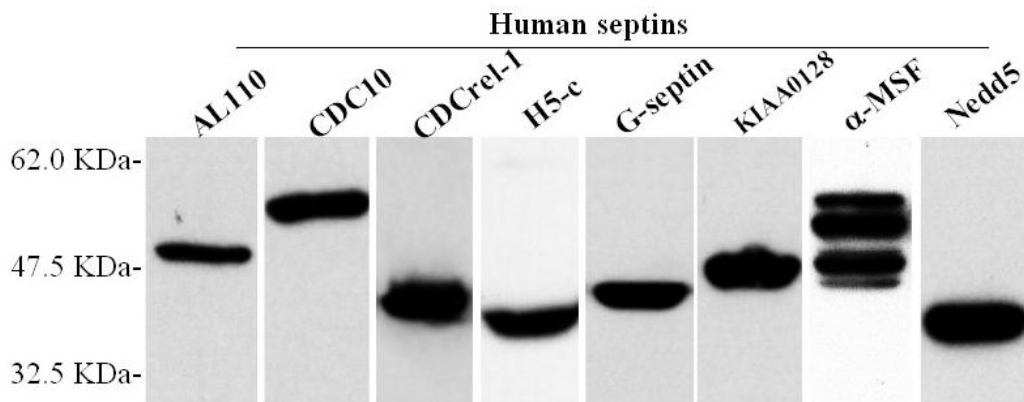


Figure 1. Molecular weight determinations of the septins in human brain tumors. The molecular weights of the various septins range from 40 to 62 kDa. The molecular weight of G-septin was measured in a medulloblastoma cell line.

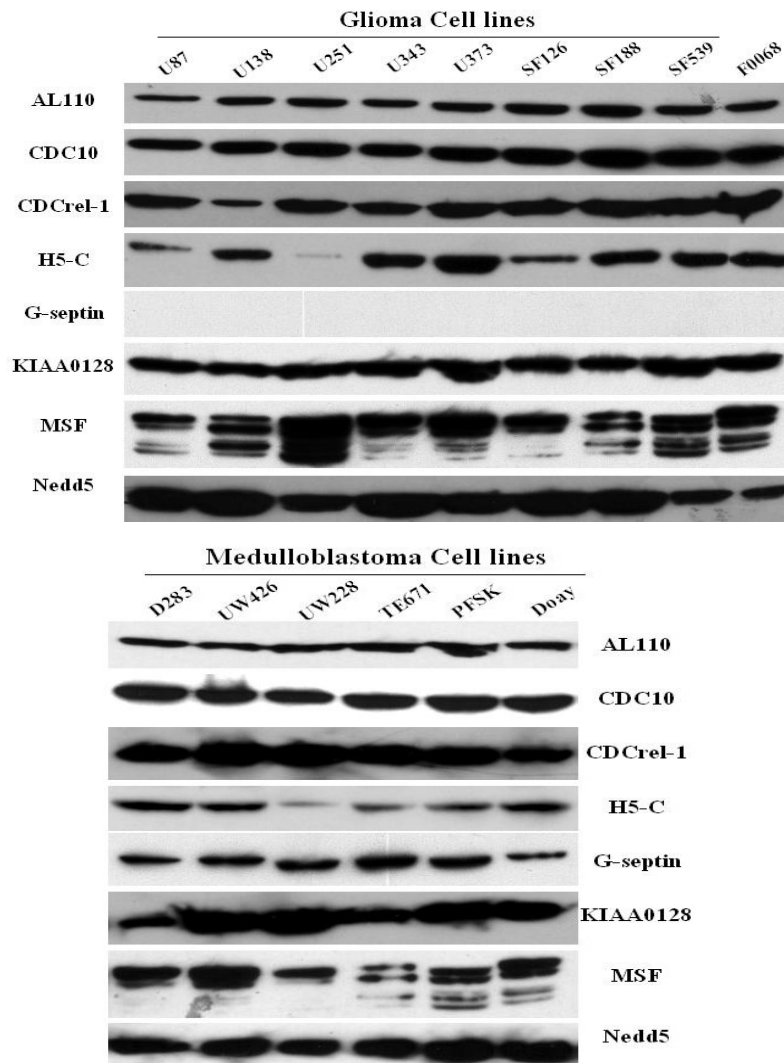


Figure 2. Expression of human septins in human brain tumor cell lines and primary human fibroblasts. G-septin was not expressed in astrocytoma cell lines and primary human fibroblasts (F0068), but was expressed by all medulloblastoma cell lines. There were no visible differences between the expression of septins except G-septin among the different cell lines. At least four isoforms of α -MSF were observed in most of the cell lines.

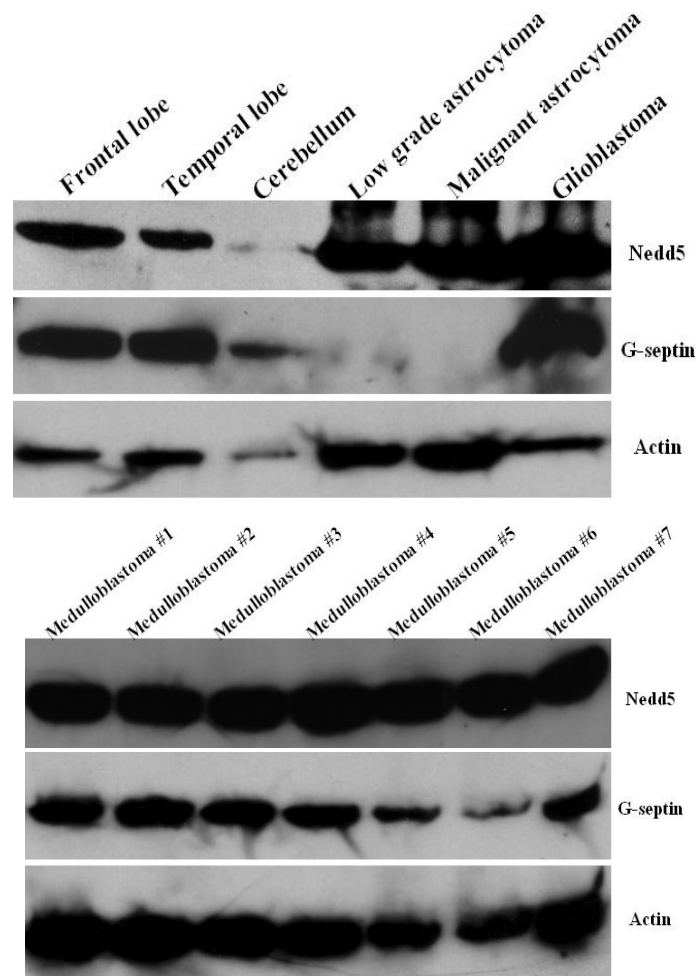
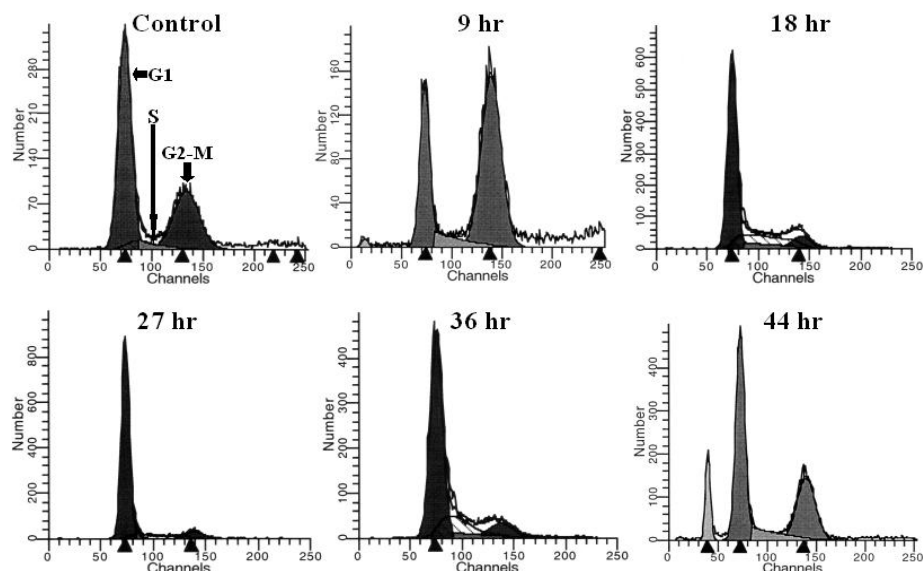


Figure 3. Expression of Nedd5 and G-septin in brain tissues and brain tumor samples. Nedd5 is variably expressed in SDS-soluble fractions of normal brain tissues (frontal lobe, temporal lobe, and cerebellum), three astrocytomas of different histopathological grade, and seven medulloblastoma samples. Nedd5 expression in astrocytomas is greater than that in normal brain tissues. Nedd5 expression in glioblastoma is greater than that in low-grade astrocytoma. G-septin is also expressed in all samples except low-grade and malignant astrocytoma

2. 세포 주기에 따른 Nedd5 발현 양상

Aphidicolin을 이용한 세포 주기 동시화에서 aphidicolin은 75%이상의 U373 약성 교종 세포를 세포 주기의 G2-M phase 상태에서 더 이상 세포 분열이 진행되지 않도록 할 수 있음을 확인하였다 (Fig. 4). Aphidicolin으로 G2-M phase 상태에서 세포 분열이 정지되었던 세포는 세포 배양액에서 aphidicolin을 제거한 후 18시간 후에 G1 phase로 진행하고 36, 44 시간이 경과하면 대조군과 비슷한 정도의 세포 주기를 보였다 (Fig. 4).

Aphidicolin을 처치하지 않은 세포를 대조군으로 하여 actin의 발현과 Nedd5의 발현을 알아보고 그 발현 비율을 기준으로 세포 주기를 동시화시킨 U373 약성 교종 세포주에서 aphidicolin을 세포 배양액에서 제거한 후 각 시간대별로 actin과 Nedd5 발현의 비율을 분석하였다(Fig. 5). 75% 이상의 세포가 G2-M phase에 있을 것으로 생각되는 aphidicolin 제거 후 6, 12 시간에서 그 비율이 각각 4.51과 1.93으로 최대를 보여 Nedd5가 그 시간대에어 최대로 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 5). 80 - 90%의 세포가 G1 phase에 있을 것으로 생각되는 aphidicolin 제거 후 18, 27 시간에 Nedd5 발현이 상대적으로 가장 적었다 (Fig. 5). Aphidicolin 제거 후 42, 48시간에는 대조군과 비슷한 정도의 Nedd5 발현이 관찰되었다(Fig. 5).



Time after removal of aphidicolin(Hours)	Cell cycle(% of cell population)		
	G0/G1	S	G2-M
9	20.10	3.05	76.85
18	71.90	10.21	17.89
27	88.68	5.04	6.28
36	65.69	19.04	15.27
44	61.39	7.59	31.01
control	66.60	7.04	27.35

Figure 4. Cell synchronization of U373 cells using aphidicolin. Flow cytometry showed that aphidicolin caused over 75% of the cells to arrest in G2-M. Most of the cells arrested in G2-M phase by aphidicolin were then able to enter G1 phase 18 hours after removal of aphidicolin. Cell cycle returned to normal state 36 to 44 hours after removal of aphidicolin. DNA content was analyzed on a Becton Dickinson FACScan. Percent cell cycle phase was determined using Cell Fit software. Data were collected from at least 10,000 cells.

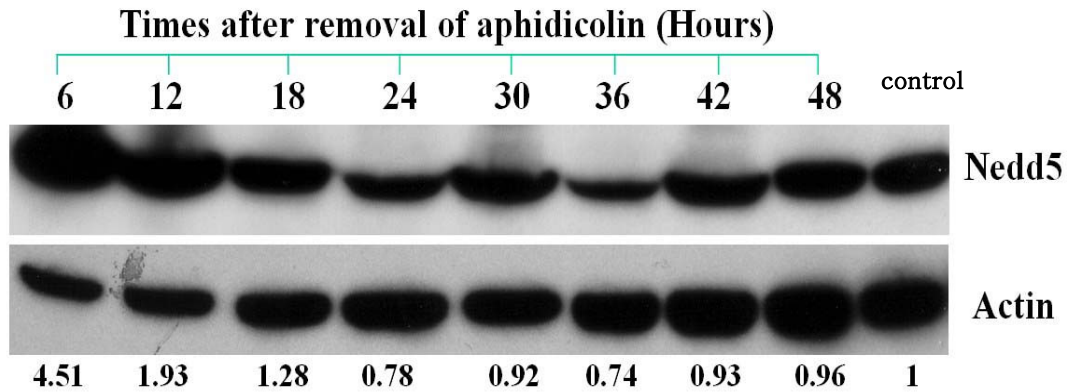


Figure 5. Nedd5 expression after removal of aphidicolin in synchronized U373 malignant glioma cells. Nedd5 expression is maximal at G2-M phase of synchronized U373 MG cells (6-12 hours after removal of aphidicolin). By Western analysis, Nedd5 expression diminishes in the time period 24-36 hours after removal of aphidicolin and then returned to basal (steady state) levels 42-48 hours after removal of aphidicolin.

3. 세포 주기에 따른 Nedd5의 세포 내 분포 변화

이중 면역 형광 분석으로 Nedd5의 세포 내 분포를 분석한 결과 Nedd5는 SF-188 약성 교종 세포주와 섬유 아세포 (fibroblast)의 interphase에서 세포질과 세포막내의 안의 actin filament와 밀접한 관계가 있는 것으로 생각 되고 actin 근처에서 짧은 선형이나 과립모양의 구조를 하고 있었다. (Fig. 6). Nedd5는 섬유아 세포의 filopodia, actin stress fiber, lamellipodia같은 actin을 가진 구조에서 특히 많이 발견되었다 (Fig. 6 D,E,F).

U373 약성 교종 세포주를 aphidicolin을 이용하여 세포 주기를 동시화 시키고 세포 분열 시기에 다른 Nedd5의 세포 내 분포의 양상이 관찰하였다. U373 약성 교종 세포주에서도 휴식기 (G1 pahse) 세포에서 SF-188 약성

교종 세포주와 섬유 아세포에서의 세포 내 분포 양상과 거의 같이 일부 Nedd5는 actin filament와 중첩되어 과립모양이나 짧은 선형모양의 구조를 나타내었고 대부분은 핵 주위에서 비정형적인 모양의 면역 반응성을 나타내었다 (Fig. 7 A,B,C). 그러나 세포질 분열이 진행되는 초기에는 Nedd5가 분열 중인 두 세포 사이의 세포질 (cleavage furrow)에서 강하게 발현되고 일부의 세포막의 가장 자리에서 강한 발현을 보였으며 (Fig. 7 D,E,F). 세포질 분열이 거의 끝나는 시점에는 분열 중인 두 세포의 actin base contractile ring 인접에 섬유 형태로 강하게 발현되었고 세포질에서의 발현은 현저히 줄어들었다 (Fig 7 H,I,J).

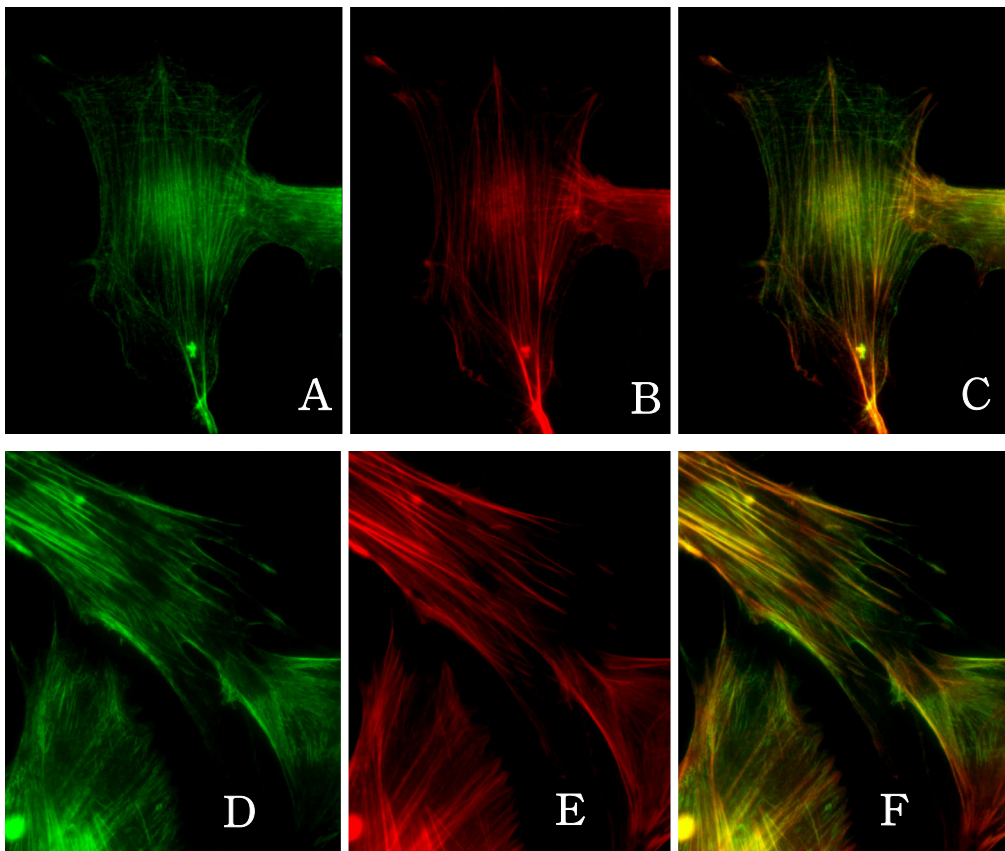


Figure 6. Subcellular localization of endogenous Nedd5 in SF-188 malignant glioma cell (A,B,C) and primary fibroblast (D,E,F). In interphase cells, most of the endogenous Nedd5 was found in short-linear structures localized close to actin filaments. However Nedd5 immunoreactivity also existed amorously in a perinuclear distribution. (A,D: Green = Nedd5; B,E: Red = actin; C,F: Merge image - Yellow = co-localization of actin and Nedd5). Confocal immunofluorescence microscopy, all x 250.

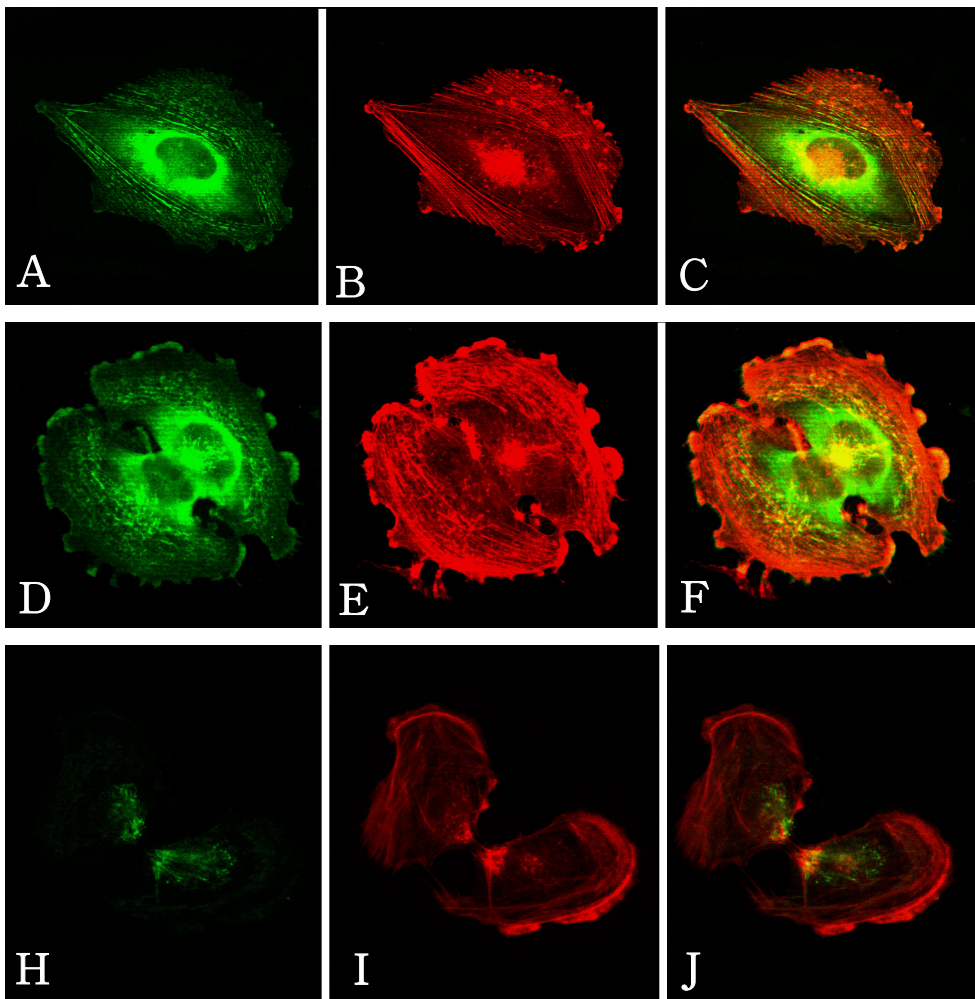


Figure 7. Changes in the subcellular localization of endogenous Nedd5 according to cell cycle (A,B,C - G1 phase; D,E,F - Early stage of mitotic phase; H,I,J - Late stage of mitotic phase). In mitosis of U373 malignant glioma cell, the Nedd5-containing filaments were in close apposition to the actin-based contractile ring, and amorphous Nedd5 proteins were strongly concentrated around the cleavage furrow between two daughter cells (A,D,H: Green = Nedd5; B,E,I: Red = actin; C,F,J: Merge image - Yellow = co-localization of actin and Nedd5). Confocal immunofluorescence microscopy, all x 250.

IV. 고찰

본 연구에서 저자들은 정상 뇌조직, 여러 종류의 악성도를 가진 교종, 수모세포종 등의 고형성 뇌종양 시료와 비생체에서 배양한 여러 종류의 교종 세포주에서 8가지 인체 septin (AL110, CDC10, CDC rel-1, G-septin, H5c, KIAA0128, α -MSF, Nedd5)의 발현에 대해서 조사하였다. 조사 결과 인체에서도 효모, 초파리, 선충류, 쥐 등에서의 septin류와 상동체를 이루는 다양한 septin 을 가지고 있으며 이들의 분자량은 기존에 알려진 것과 유사한 35-62 kDa에 해당한다는 것을 확인하였다. 인체 조직에서 여러 종류의 septin 상동체를 찾아냄으로써 효모, 초파리, 선충류에서 특징적으로 알려진 것과 유사하게 세포질 분열에서 septin의 역할을 이해하는데 도움이 될 수 있을 것으로 기대한다^{1,4,9,41}. 그러나 인체 조직에서 septin이 발현됨에도 이들의 정확한 기능은 아직 확실히 알려져 있지 않다. 일관되게 알려져 있는 septin의 기능은 세포의 기본 골격이 되는 actin과의 관계와 세포 분열에서 관여하는 것이다^{1,4,9,41,42}.

효모 septin은 세포 분열시 중요한 역할을 하는 세포골격의 구조로 추정되고, bud의 형성과 세포 분열의 마지막 단계까지 전 과정을 거쳐 bud neck 바로 아래에서 위치하는 것으로 알려졌다. 오늘날까지 단지 한 개의 포유동물 septin, Nedd5가 세포질 분열 과정에 역할을 한다고 알려져 있다⁴. 그래서 본 연구에서 가장 중점을 둔 것은 Nedd5인데 포유동물 septin 중의 하나인 mouse Nedd5 (mNedd5)는 처음 쥐의 뇌에서 발견되었는데 신경계 발생의 조절 유전자로 기능한다고 알려졌다. 쥐의 mNedd5 유전자는 효모와 초파리에서와 마찬가지로 세포질 분열에 꼭 필요한 41.5-kDa 크기의 GTPase합성하는 것으로 확인되었다^{4,18}. 그러나 mNedd5는 쥐의 중추 신경계뿐 아니라 HeLa, SiHa cell line에서도 발견되어 다른 기능을 가졌을 가능성도 있다. 쥐의 mNedd5와 같은 단백질 서열을 가진 human Nedd5는 포유동물의 다른 septin 과 단백질 서열에서 상당히 유사한 서열을 가지고 있으며 (homology), 기본적인 구조로 GTPase motif를 가지고 있다. Kinoshita 등은 mNedd5가 세포 분열의 anaphase에서 telophase 기간 동안 actin contractile ring 주변에 축적되고 마침내 분열하는 세포의 갈라지는 부분 (cleavage furrow)에 응축되어 있다는 것을 관찰

하고 쥐의 HeLa cell의 세포 분열 주기 중 late anaphase와 early telophase의 시기에 anti-Nedd5 antibody를 직접 주입하면 세포질 분열이 진행되지 않음을 확인하고 고등 동물에서의 세포 분열에도 septin이 관계한다는 것을 이를 확인하였다⁴. 또한 Kinoshita 등은 GTPS나 GTP binding activity가 없는 Nedd5 mutant를 주입하여 Nedd5의 기능을 억제함으로써 세포 분열의 interphase cell에서 두 세포에 정확한 유전자 분리를 위한 actin stress fiber가 없어서 세포 분열이 방해되는 것을 확인하였다⁴. 기존의 *Saccharomyces cerevisiae*에서 세포 주기 동시화를 이용한 Western blot 분석에서는 세포주기에 따라 개개의 septin의 발현은 별로 변화가 없었다. 그러나 다른 보고는 Nedd5 전사체와 단백질은 성장이 정지된 세포와 다른 조직과의 접촉이 금지된 세포에서 더 많이 존재한다고 보고하였다⁴. 또한 Rutka 등도 lovastatin과 nododazole을 이용한 세포 주기 동시화 실험에서 late G1에서 G2-M phase까지 Nedd5 전사체가 높다는 것과 S phase와 G2-M phase까지 Nedd5 발현이 증가되어 있음을 보고한 바 있다¹². 본 연구에서는 aphidicolin을 이용하여 세포 주기를 G2-M phase에 고정시켰을 때 Nedd5의 발현이 가장 강한 것을 확인하였다. 이런 결과는 교종의 세포 분열에 있어 Nedd5가 중요한 역할을 할 것이라는 것을 짐작하게 한다.

본 연구 중 Nedd5와 actin사이의 관계는 많은 점을 시사한다. 많은 고등 동물의 세포분열에 있어 actin은 효모, 초파리, 선충류의 세포 분열과 마찬가지로 중요한 역할을 한다. 이들의 세포 분열 마지막 단계에는 actin-based contractile ring이 생기고 이 것에 의해 두개의 세포가 완전히 분리된다⁴³⁻⁴⁵. 본 연구의 세포 면역 염색에서 Nedd5는 세포 주기와 밀접한 관계를 가지고 actin의 구조적 변화에 따라 현저한 변화를 보이는 것을 관찰하였다. 본 연구 결과를 토대로 생각하면 Nedd5는 actin filament보다는 짧지만 선형 구조를 하고 actin을 주형이나 뼈대로 사용하는 것으로 생각되지만 Lippincott 와 Li는 actinomyosin ring과 달리 septin 구조는 cytokinesis 과정 동안 압축되지 않는다고 하였다⁴⁶. Actin based contractile ring이 septin 형성에 뼈대로 작용하는지 아니면 발아하는 yeast에서처럼⁴⁷ 이미 만들어진 septin 뼈대에 actin based contractile ring이 달라붙는지 이들 관계에 대한 향후 더 연구가 필요할 것이다. 또 추후

다른 연구과제 중 하나는 septin이 다른 GTPase류와 기본적으로 같은 구조를 가지고 있다는 점을 고려하여 actin filament 근처에서 발견되는 짧은 선형 또는 과립 모양의 Nedd5와 핵 주위 세포질에 비정형적 분포하는 Nedd5의 서로 다른 구조의 상호 연관성에 관한 것이다.

본 연구 결과는 septin은 세포 분열에서의 역할 외에 세포질 내에서 다른 기능이 있는 것으로 여겨진다. 다른 연구자에 따르면 Nedd5와 H5는 원형질막 부근에서 actin cytoskeleton과 함께 위치하는 선형의 형태로 존재하기도 하지만^{4,34} Surka 등은 α -MSF는 interphase 세포에서 Nedd5, actin based filament와 microtubule과 함께 위치한다고 보고하였다³³. 또한 CDCrel-1은 주로 뇌에서 발견되는 반면 Nedd5는 모든 장기에서 광범위하게 발견된다. Xue등은 G-septin mRNA(5.0 kilobases)가 뇌에서 많이 발견되지만 다른 조직에서는 발견되는 것을 관찰하고 G-septin은 neuron에서 type I cGMP dependent protein kinase (PKG) 가 조절하는 뇌에 특이적인 단백질이라고 보고하였다²¹. 본 연구에서도 G-septin은 신경세포로부터 기원하는 조직이나 세포에서만 발견되었다. 또 본 연구 결과 및 타 연구자의 보고에서처럼 Nedd5는 세포 분열과 밀접하게 관련이 있다고 확인되었으나 세포 분열을 하지 않는 인체 장기에서 폭넓게 발견된다^{4,48,49}. 이상과 같이 모든 포유동물 septin은 길이나 N-termini와 C-termini에 아주 다양한 변이체를 동반하나 나선형 구조는 공통으로 가지는 기본적으로는 GTPase류로 각 septin발현은 각 조직마다 발현이 다른데 이것은 개개의 septin이 단백질과 단백질의 상호작용에 관여하여 다르게 기능할 수 있음을 암시한다².

Septin의 또 다른 기능의 가능성에 대해서는 효모 septin의 연구에서도 단서를 찾을 수 있다. 효모 septin의 변이는 세포질 분열 실패로 생긴 다핵 세포뿐 만 아니라 발아지점의 선택이나 세포극성, 세포막 분할에 이상을 초래한다^{2,50-53}. 또 초파리의 septin인 sep1 은 이동하는 상피세포의 전면부에 축적되어 있다⁹. 본 연구 결과에서도 Nedd5가 세포의 이동성과 직접 관련이 있는 섬유아 세포의 filopodia, actin stress fiber, lamellipodia같은 actin을 가진 구조에서 특히 많이 발견되었다는 점이다. 이런 결과 등은 septin이 종양의 전이와도 일정한 관계가 있을 것임을 시사한다. 또한 포유동물 septin인 H5와 CDCrel-1의 복합체는 sec6/8 복합체¹³와 syntaxin-1³⁶과

상호 작용을 하여 포유동물의 세포막 융합 장치로서의 작용하기도 한다⁵³⁻⁵⁵. 또 다른 보고들은 포유동물 septin은 세포고사²², 백혈병발생, 암 발생⁵⁶⁻⁵⁸ 등과도 신경 세포의 퇴행성 변화에도 같은 세포내의 과정과도 관련이 있을 것으로 추정하고 있다.

본 연구에서 Nedd5는 교종에서 악성도에 따라 조금씩 발현 양상이 조금씩 달랐는데 이는 종양의 악성도와도 연관성을 시사하는 바이다.

아직 septin에 대한 전체적인 기능을 확인하지는 못하였지만 세포에서 다양하고 중요한 역할을 하는 단백질임은 분명하다. 본 실험 결과 정상세포종의 세포분열을 막는데 있어 인체 septin 하나인 Nedd5는 그 중요한 대상이 될 수 있다는 가능성을 확인하였다. Nedd5의 변이체가 신경교종에서 세포분열을 방해하는지에 대한 연구와 다양한 septin을 단독으로 아니면 조합해서 억제하면 정상세포종의 성장을 막을 수 있는지에 대한 앞으로의 연구가 기대된다.

V. 결론

1) 8가지 septin(AL110, CDC10, CDCrel-1, G-septin, H5C, KIAA0128, α -MSF, Nedd5)은 인체 정상뇌조직과 뇌종양에서 모두 발현되었다.

2) Nedd5는 인체 정상뇌조직과 신경교종에서 발현되고 교모세포종에서 발현이 저등급 정상세포종보다 훨씬 높게 나타났다.

3) 악성 신경교종에서 세포주기에 따른 Nedd5의 발현은 G2-M 기 가장 높게 나타났다. 세포내 분포의 변화는 휴지기에서는 세포질내에서 대부분 핵주위에서 비정형적인 모습을 나타내거나 actin filament와 중첩되어 과립모양이나 짧은 선형으로 나타났고 세포분열시 분열되는 세포질에서 강하게 발현되었다.

종합해보면 Nedd5는 신경교종에서 세포분열을 조절하는데 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있고, Nedd5의 발현을 억제함으로써 신경교종의 세포분열을 막을 수 있는 가능성을 제시한다.

참고문헌

1. Neufeld TP, Rubin GM. The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell* 1994;77(3):371-379.
2. Longtine MS, Demarini DJ, Valencik ML, Al-Awar OS, Fares H, Virgilio CD, et al. The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8(1):106-119.
3. Longtine MS, Fares H, Pringle JR. Role of the yeast Gin4p protein kinase in septin assembly and the relationship between septin assembly and septin function. *J Cell Biol* 1998;143(3):719-736.
4. Kinoshita M, Kumar S, Mizoguchi A, Ide C, Kinoshita A, Haraguchi T, et al. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev* 1997;11(12):1535-1547.
5. Haarer BK, Pringle JR. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Mol Cell Biol* 1987;7(10):3678-3687.
6. Kim HB, Haarer BK, Pringle JR. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. *J Cell Biol* 1991;112(4):535-544.
7. Lippincott J, Shannon KB, Shou W, Deshaies RJ, Li R. The Tem1 small GTPase controls actomyosin and septin dynamics during cytokinesis. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 7):1379-1386.
8. Sanders SL, Field CM. Cell division. Septins in common? *Curr Biol* 1994;4(10):907-910.
9. Fares H, Peifer M, Pringle JR. Localization and possible functions of *Drosophila* septins. *Mol Biol Cell* 1995;6(12):1843-1859.

10. Adam JC, Pringle JR, Peifer M. Evidence for functional differentiation among *Drosophila* septins in cytokinesis and cellularization. *Mol Biol Cell* 2000;11(9):3123-3135.
11. Nguyen TQ, Sawa H, Okano H, White JG. The *C. Elegans* septin genes, *unc-59* and *unc-61*, are required for normal postembryonic cytokinesis and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. *J Cell Sci* 2000;113 Pt 21:3825-3837.
12. Sakai K, Kurimoto M, Tsugu A, Hubbard SL, Trimble WS, Rutka JT. Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors. *J Neurooncol* 2002;57(3):169-177.
13. Hsu SC, Hazuka CD, Roth R, Foletti DL, Heuser J, Scheller RH. Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain *sec6/8* complex and septin filaments. *Neuron* 1998;20(6):1111-1122.
14. Borkhardt A, Teigler-Schlegel A, Fuchs U, Keller C, König M, Harbott J, et al. An *ins(X;11)(q24;q23)* fuses the MLL and the Septin 6/KIAA0128 gene in an infant with AML-M2. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32(1):82-88.
15. Yang T, Gao YK, Chen JY. KIAA0202, a human septin family member, interacting with hPFTAIRE1. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 2002;34(4):520-525.
16. Blaser S, Jersch K, Hainmann I, Wunderle D, Zgaga-Griesz A, Busse A, et al. Human septin-septin interaction: CDCrel-1 partners with KIAA0202. *FEBS Lett* 2002;519(1-3):169-172.
17. Kinoshita A, Kinoshita M, Akiyama H, Tomimoto H, Akiguchi I, Kumar S, et al. Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1998;153(5):1551-1560.
18. Xiong JW, Leahy A, Stuhlmann H. Retroviral promoter-trap insertion into a novel mammalian septin gene expressed during mouse neuronal development. *Mech Dev* 1999;86(1-2):183-191.

19. Strehl S, Borkhard A, Stany R, Fuchs UE, Konig M, Haas OA. The human LASP1 gene is fused to MLL in an acute myeloid leukemia with t(11;17)(q23;q21). *Oncogene* 2003;22(1):157-160.
20. Jackisch BO, Hausser H, Schaefer L, Kappler J, Muller HW, Kresse H. Alternative exon usage of rat septins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275(1):180-8.
21. Xue J, Wang X, Malladi CS, Kinoshita M, milburn PJ, Lengyel I, et al. Phosphorylation of a new brain-specific septin, G-septin, by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2000;275(14):10047-10056.
22. Larisch S, Yi YS, Lotan R, Kerner H, Eimerl S, Parks WT, et al. A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat Cell Biol* 2000;2(12):915-921.
23. Zhang J, Kong C, Xie H, McPherson PS, Grinstein S, Trimble WS. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr Biol* 1999;9(24):1458-1467.
24. Hime GR, Brill JA, Fuller MT. Assembly of ring canals in the male germ line from structural components of the contractile ring. *J Cell Sci* 1996;109(Pt 12):2779-2781.
25. Kinoshita M, Field CM, Coughlin ML, Straight AF, Mitchison TJ. Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev Cell* 2002;3(6):791-802.
26. Berens ME, Giblin JR, Dougherty DV, Hoifodt HK, Tveit K, Rosenblum ML. Comparison of in vitro cloning assays for drug sensitivity testing of human brain tumours. *Br J Neurosurg* 1988;2(2):227-234.
27. Doz F, Berens ME, Spencer DR, Dougherty DV, Rosenblum ML. Experimental basis for increasing the therapeutic index of carboplatin in brain tumor therapy by pretreatment with WR compounds. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991;28(4):308-310.

28. Doz F, Berens ME, Dougherty DV, Rosenblum ML. Comparison of the cytotoxic activities of cisplatin and carboplatin against glioma cell lines at pharmacologically relevant drug exposures. *J Neurooncol* 1991;11(1):27-35.
29. Westermark B, Heldin CH, Nister M. Platelet-derived growth factor in human glioma. *Glia* 1995;15(3):257-263.
30. Westermark B, Heldin CH. Platelet-derived growth factor. Structure, function and implications in normal and malignant cell growth. *Acta Oncol* 1993;32(2):101-105
31. Betsholtz C, Nister M, Rorsman F, Heldin CH, Westermark B. Structural and functional aspects of platelet-derived growth factor and its role in the pathogenesis of glioblastoma. *Mol Chem Neuropathol* 1989;10(1):27-36
32. Nister M, Libermann TA, Betsholtz C, Pettersson M, Heldin CH, Westermark B, et al. Expression of messenger RNAs for platelet-derived growth factor and transforming growth factor-alpha and their receptors in human malignant glioma cell lines. *Cancer Res* 1988;48(14):3910-3918.
33. Surka MC, Tsang CW, Trimble WS. The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. *Mol Biol Cell* 2002;13(10):3532-3545.
34. Xie H, Surka M, Howard J, Trimble WS. Characterization of the mammalian septin H5: distinct patterns of cytoskeletal and membrane association from other septin proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 1999;43(1):52-62.
35. Trimble WS. Septins: a highly conserved family of membrane - associated GTPases with functions in cell division and beyond. *J Membr Biol* 1999;169(2):75-81.
36. Beites CL, Xie H, Bowser R, Trimble WS. The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nat Neurosci* 1999;2(5):434-439.

37. Stewart BA, Mohtashami M, Rivlin P, Deitcher DL, Trimble WS, Boulianne GL. Dominant-negative NSF2 disrupts the structure and function of *Drosophila* neuromuscular synapses. *J Neurobiol* 2002 15;51(4):261-271.
38. Peng XR, Jia Z, Ware J, Trimble WS. The septin CDCrel-1 is dispensable for normal development and neurotransmitter release. *Mol Cell Biol* 2002;22(1):378-387.
39. Beites CL, Peng XR, Trimble WS. Expression and analysis of properties of septin CDCrel-1 in exocytosis. *Methods Enzymol* 2001;329:499-510.
40. Begemann M, Kashimawo SA, Choi YA, Kim S, Christiansen KM, Duigou G, et al. Inhibition of the growth of glioblastomas by CGP 41251, an inhibitor of protein kinase C, and by a phorbol ester tumor promoter. *Clin Cancer Res* 1996;2(6):1017-1030.
41. Flescher EG, Madden K, Snyder M. Components required for cytokinesis are important for bud site selection in yeast. *J Cell Biol* 1993;122(2):373-386.
42. Cid VJ, Adamikova L, Sanchez M, Molina M, Nombela C. Cell cycle control of septin ring dynamics in the budding yeast. *Microbiology* 2001;147(Pt 6):1437-1450.
43. Field CM, Kellogg D. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends Cell Biol* 1999;9(10):387-394.
44. Fishkind DJ, Wang WL. Orientation and three-dimensional organization of actin filaments in dividing cultured cells. *J Cell Biol* 1993;123(4):837-848.
45. Otto JJ, Schroeder TE. Association of actin and myosin in the contractile ring. *Ann N Y Acad Sci* 1990;582:179-184.
46. Lippincott J, Li R. Sequential assembly of myosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis. *J Cell Biol* 1998;140(2):355-366.

47. Bi E, Maddox P, Lew DJ, Salmon ED, McMillan JN, Yeh E, et al. Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *J Cell Biol* 1998;142(5):1301-1312.
48. Wakui M, Yamaguchi A, Sakurai D, Ogasawara K, Yokochi T, Tsuchiya N, et al. Genes highly expressed in the early phase of murine graft-versus-host reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282(1):200-206.
49. Crnogorac JT, Efthimiou E, Capelli P, Blaveri E, Baron A, Terris B, et al. Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. *Oncogene* 2001;20(50):7437-7446.
50. Barral Y, Mermall V, Mooseker MS, Snyder M. Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol Cell* 2000;5(5):841-851.
51. Gladfelter AS, Pringle JR, Lew DL. The septin cortex at the yeast mother-bud neck. *Curr Opin Microbiol* 2001;4(6):681-689.
52. Gladfelter AS, Bose I, Zyla TR, Bardes ES, Lew DJ. Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by CDC42p. *J Cell Biol* 2002;156(2):315-326.
53. Tachikawa H, Bloccher A, Tatchell K, Neiman AM. A Gip1p-Glc7p phosphatase complex regulates septin organization and spore wall formation. *J Cell Biol* 2001;155(5):797-808.
54. Jantsch-Plunger V, Glotzer M. Depletion of syntaxins in the early *Caenorhabditis elegans* embryo reveals a role for membrane fusion events in cytokinesis. *Curr Biol* 1999;9(14):738-745.
55. Assaad FF. Of weeds and men: what genomes teach us about plant cell biology. *Curr Opin Plant Biol* 2001;4(6):478-487.
56. Kalikin LM, Sims HL, Petty EM. Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics* 2000;63(2):165-172.

57. Russell SE, McIlhatton MA, Burrows JF, Donaghy PG, Chanduloy S, Petty EM, et al. Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer Res* 2000;60(17):4729-4734.
58. Osaka M, Rowley JD, Zeleznik-Le NZ. MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25). *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(11):6428-6433.

Abstract

Analysis of Nedd5 Expression in Human Malignant Glioma

Euikyo Seo

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Joong-Uhn Choi)

Septins are a highly conserved subfamily of GTPases that play an important role in the process of cytokinesis. Nedd5, one of 10 mammalian septins, encodes a 41.5-kDa GTPase similar to the essential *Saccharomyces* and *Drosophila* septins. To increase our understanding of the expression and localization of the different mammalian septins in human brain tumors, we used antibodies against AL110, CDC10, CDCrel-1, H5-C, KIAA0128, α -MSF, G-septin, and Nedd5 in Western blot analyses of astrocytomas and medulloblastomas. We then characterized the expression and the sub-cellular distribution of the Nedd5 protein in U373 malignant glioma cells synchronized with aphidicolin by immunofluorescence and FACS-analysis. We show variable levels and expression patterns of the different septins in brain tissue, brain tumor specimens, and human brain tumor cell lines. Nedd5 was abundantly expressed in all brain tumor samples and cell lines studied. G-septin was expressed in medulloblastoma specimens and cell lines, but not in astrocytoma specimens or cell lines. Nedd5 expression was cell cycle-related with maximal levels in G2-M. Immunocytochemical analysis showed endogenous Nedd5 within filamentous structures which co-localized with actin microfilaments, and as amorphous deposits in a perinuclear distribution in interphase cells.

During the mitosis, Nedd5 was concentrated at the cleavage furrow. These results suggest that septins are variably expressed in human brain tumors. Nedd5 is cell cycle-regulated, and plays an important role in cell division. This study suggest that Nedd5 may be a valuable new target for strategies aimed at inhibiting astrocytoma cell division.

Key Words : Actin; brain tumor; cytokinesis; glioma; GTPase; Nedd5; Septin