췌장 내강막 Na^+/H^+ exchanger 3 단백의 발현 조절

연세대학교 대학원

의과학사업단

이 진 아

췌장 내강막 Na^+/H^+ exchanger 3 단백의 발현 조절

지도교수 이 민 구

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2001년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

이 진 아

이진아 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2001년 12월 3일

감사의 글

떨리는 마음으로 처음 실험을 하였던 때가 어제와 같은데 벌써 그동안의 과정을 정리하게 되었습니다. 아쉬운 마음 가득하나 도와주신 여러 분들을 생각하니 앞으로 한 걸음 내딛을 용기가 납니다. 공부할 수 있도록 길을 열어 주시고 늘 가까이에서 도와 주신 사랑하는 하나님과 주님께 진심으로 감사 드립니다.

진리를 탐구하는 것이 얼마나 가치 있고 소중한 일인지 가르쳐 주시며 언제나 넓은 마음으로 이해해 주시고 도와주신 이민구 선생님께 깊은 감사 드립니다. 연구의 기틀을 마련해 주신 김경환 선생님과 세심한 충고와 관심을 기울여 주신 안덕선 선생님께 감사 드립니다. 올바른 연구를 할 수 있도록 끊임없이 이끌어 주신 안영수 선생님, 김동구 선생님, 장정원 선생님, 김혜영 선생님, 정광철 선생님, 유경자 선생님, 서정택 선생님께도 감사 드립니다.

어려운 일이 있어도 이겨낼 수 있었던 것은 함께 하는 우인 오빠, 주영 언니, 완 오빠, 원선 언니, 지현이가 있었기 때문입니다. 정말 모두들 고맙습니다. 또한 언제나 힘이 되어 주신 약리학 교실 언니, 오빠들께도 깊은 감사 드립니다. 기대어 쉴 수 있도록 언제나 힘이 되어 주신 현미 언니, 선정 언니, 대선 언니 고맙습니다.

세상에서 가장 사랑하는 어머니, 아버지 그리고 하규와 더불어 작은 기쁨을 나누고 싶습니다.

2001. 12.

목차

그림 차례

국문요약

췌장 내강막 Na^+/H^+ exchanger 3 단백의 발현 조절

중탄산염 (bicarbonate, HCO_3^-)은 췌액과 호흡기 점액의 산도 및 점도를 유지하는데 있어 중요한 역할을 하는 성분으로, HCO_3^- 수송 이상은 만성췌장염, 만성폐쇄성폐질환 등과 관련되어 있다. 췌장 내강으로의 HCO_3^- 분비에는 CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), 음이온 교환기 (AE, Cl^-/HCO_3^- exchanger), 그리고 NHE3 (Na^+/H^+ exchanger 3) 이온수송단백이 관여한다. CFTR은 HCO_3^-를 분비하는 AE 기능을 촉진하고 HCO_3^-를 흡수하는 NHE3 기능을 조절함으로 내강막에서의 HCO_3^- 수송에 중심 역할을 하고 있다.

본 연구실은 선행 실험을 통하여 CFTR과 NHE3가 PDZ (PSD 95/DLG/ZO1) domain을 갖는 연결단백을 통하여 상호작용을 하고 있으며, 특히 CFTR이 존재할 경우 NHE3의 상피 내강막 발현이 증가하는 것을 발견하였다. 그러나 그 발현의 증가 기전에 대하여는 아직 보고된 바 없다. 본 연구에서는 유전적 손상으로 CFTR을 발현하지 못하는 CFPAC 상피세포에 CFTR을 갖고 있는 adenoviral vector (AdCFTR)를 transfection 하여 CFTR이 어떠한 기전을 통하여 NHE3 단백 발현을 조절하는지 밝히고자 하였다.

RT-PCR을 수행한 결과 CFTR과 상호작용을 한다고 알려진 연결단백인 EBP50 (ERM-binding phophoprotein 50), E3KARP (NHE3 Kinase A Regulatory Protein), CAP70 (CFTR Associated Protein 70)이 CFPAC 세포에 존재함을 알 수 있었다. 상피세포 극성을 유지시킬 수 있는 투과성 막 (permeable membrane support)에 세포를 배양한 후 세포 내 pH를 재는 실험을 통하여 내강막에 존재하는 NHE3 활성을 측정한 결과 CFTR이 존재할 경우 그 활성이 약 39% 증가함을 알 수 있었고, 이 결과는 이전 생체 내 (*in vivo*) 결과와 일치하였다. Northern blot을 수행한 결과 CFTR은 NHE3의 mRNA 발현에 영향을 주지 않았다. 그러나 면역형광염색을 통하여 CFTR과 NHE3 발

현 양상을 확인한 결과 CFTR이 발현한 세포에서 NHE3의 상피 내강막 발현이 증가한 것을 알 수 있었다.

이상의 결과 CFTR은 mRNA 수준이 아닌 단백 발현 수준에서 NHE3를 조절함을 알 수 있었다. CFTR은 NHE3와 단백 복합체를 형성함으로서 내강막으로 NHE3의 이동을 증가시키거나 NHE3의 안정성을 증가시켜 NHE3의 상피 내강막 발현을 증가시킬 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : Na^+/H^+ exchanger 3, bicarbonate, CFTR, protein interaction

췌장 내강막 Na^+/H^+ exchanger 3 단백의 발현 조절

<지도교수 이민구>
연세대학교 대학원 의과학사업단
이 진 아

Ⅰ. 서 론

CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)은 ATP-binding cassette (ABC) 수송단백에 속하는 단백으로 cAMP 의존성 Cl^- 통로 기능을 갖고 있다.[1] CFTR은 Cl^- 통로로서의 역할 뿐 아니라, 막 전도도 (membrane conductance)를 조절하며 여러 이온수송단백과 상호작용을 한다. 외향성 Cl^- 통로 (ORCC, outwardly rectifying chloride channel), 상피 Na^+ 통로 (ENaC, amiloride-sensitive epithelial sodium channel),[2] 신장 외수질 K^+ 통로 (ROMK, renal outer-medullary potassium channel),[3] 음이온 교환기 (AE, Cl^-/HCO_3^- exchanger)[4,5] 등을 포함하는 다른 이온수송단백을 조절한다고 보고되었다. 이런 상호작용에 포함된 기전은 알려져 있지 않으나 CFTR과 다른 이온수송단백 사이에 직접적인 관련이 있거나 간접적으로 다른 단백과의 상호작용이 있을 수 있다.

CFTR과 다른 세포막 단백의 상호작용에는 EBP50 (ERM-binding phophoprotein 50)가 관여한다. EBP50는 NHE3의 cAMP 의존적 억제에 관련된 조절 인자로 알려진 연결단백으로,[6,7,8] 상호작용하는 단백의 C-말단부와 결합하는 2개의 PDZ domain을 갖고 있다.[9,10] PDZ1 domain을 통하여 EBP50는 CFTR과 결합할 수 있고,[11,12,13] PDZ2 domain에 Yes-associated protein 65

등과 같은 단백이 결합하여[14] CFTR은 거대분자 복합체 안에 존재하게 된다. 복합체 안에서의 단백-단백 상호작용으로 CFTR은 다른 이온수송단백의 기능을 조절할 수 있으며, CFTR의 Cl^- 통로 기능 또한 조절 받게 된다. PDZ-domain을 갖고 있는 EBP50가 CFTR의 C-말단에 결합함으로서 이온통로 기능을 조절할 수 있음이 보고되었고,[15] 폐 점막하 선 세포인 Calu-3에서 CFTR의 Cl^- 통로 기능이 protein kinase A anchoring 단백에 기능적으로 연결되어 있음이 보고되었다.[16,17] 또한 CFTR 개폐에 관련된 CFTR의 세포질 N-말단부는[18] syntaxin 1A와 상호작용하며 이러한 상호작용은 CFTR 의존적인 Cl^- 이동을 억제하며[19] *Xenopus oocytes* 에서는 CFTR의 세포막으로의 이동을 억제한다는[20] 보고가 있다.

췌장은 매 식사 때마다 많은 양의 중탄산염 (bicarbonate, HCO_3^-)이 함유된 췌액을 분비한다. 대부분의 췌액과 HCO_3^-는 관세포로부터 나오는데, 전체 췌장 조직의 5%를 차지하는 관세포는 선세포를 위한 구조적 토대를 제공하고, 소화효소의 통로로서 작용한다. 분비된 HCO_3^-는 십이지장에서 산을 중화하고, 내부 췌장 관에서 소화효소를 불활성 상태로 유지한다. 특히 HCO_3^-는 생물학적 pH 완충제로서 작용하며 단백과 이온의 용해도에 영향을 주는 중요 성분이기 때문에 HCO_3^- 분비조절에 관한 연구와 관심이 최근 집중되고 있다. HCO_3^- 수송 이상은 췌장 기능 이상과 관련이 깊다. HCO_3^- 분비가 감소되면 췌액은 산성이 되어 mucin을 침전시키고, 침전된 mucin에 세균이 결합함으로서 세균 감염이 증가하게 된다. 또한 응고된 점액에 의해 도관 구조가 막히게 되고 이에 따른 반복적인 염증과 조직의 섬유화가 일어난다. 관세포의 HCO_3^- 분비 이상은 CFTR 에 변이가 일어난 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis) 환자에서 흔히 볼 수 있다.[21]

췌장 내강으로의 HCO_3^- 분비에는 CFTR, AE, 그리고 NHE3 이온수송단백이 관여하는데, 이들 이온수송단백의 상호작용은 식사 후의 자극상태와 공복시의 기초상태로 나누어 설명할 수 있다. 식사 자극상태에서 VIP와 secretin이 분비되면 세포 내 cAMP가 증가하고, 그로 인해 활성화된 CFTR은 HCO_3^-분비를 증가시키는 AE를 활성화시키고[4,5] 동시에 HCO_3^-를 소모하는

NHE3는 억제하여[22] 췌장은 결국 알칼리성 췌액을 생성한다. 반면 기초 상태에서 인산화가 안 된 CFTR은 Na^+ 의존적으로 HCO_3^-를 소모하는 NHE3를 억제하지 않는다. 그로 인해 내강의 HCO_3^-는 $HCO_3^- + H^+ \rightarrow CO_2 + H_2O$로 소모되어 췌장은 적은 양의 산성 췌액을 생성하게 된다. 이런 기전으로 기초 상태에서 불필요한 췌액 분비가 일어나지 않게 되는 것이다.

CFTR이 급성적 및 만성적인 기전으로 NHE3 활성을 조절한다는 것은[22] 선행된 실험을 통하여 보고한 바 있다. CFTR은 cAMP 의존적인 기전을 통하여 NHE3 활성의 억제를 증가시킬 수 있는데 이러한 조절은 CFTR과 NHE3가 EBP50 라는 연결단백에 결합함으로 이루어진다. CFTR과 NHE3와 함께 췌관 내강막쪽에 발현하는 EBP50는 두 개의 PDZ domain과 ERM (ezrin/ radixin/ moesin) domain을 갖는 연결단백이다. CFTR은 PDZ1에 결합하고,[12] NHE3는 PDZ2에 결합함으로[23] CFTR-EBP50-NHE3 complex가 형성되고 이러한 complex는 cAMP에 의한 NHE3 활성의 억제를 증가시킨다.[22]

또한 CFTR은 NHE3 발현에 영향을 준다.[22] 내강막에서 Na^+ 의존적인 세포내 pH 증가를 측정한 결과 CFTR 유전자에 손상이 있는 ΔF/ΔF 생쥐 (Knock-in type으로서 CFTR이 손상된 ΔF508 생쥐)의 NHE3 기능이 정상 (wild type) 생쥐보다 상당히 낮음을 확인할 수 있었다. Western blot과 confocal images로 NHE3 발현 수준을 분석한 결과 ΔF/ΔF 생쥐 췌관의 내강막 NHE3 단백 발현이 정상에 비해 감소되어 있었다. 이러한 결과를 통해 CFTR이 NHE3 발현에 영향을 줌을 확인할 수 있었다. 그러나 어떤 기전을 통하여 어떠한 수준에서 CFTR이 NHE3 발현을 조절하는지는 아직 보고된 바 없다.

본 연구에서는 CFTR이 어떠한 기전을 통하여 NHE3 단백의 발현을 조절하는지 밝히고자 하였으며 이러한 연구를 통하여 CFTR이 전반적인 췌액 조절과 세포 기능 조절에 어떠한 역할을 하는지 그 의의를 찾고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 세포 배양 및 Transfection

사용한 세포주는 CFPAC으로서 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 10% fetal bovine serum, penicillin (50 units/ml) /streptomycin (50 μg/ml)이 첨가된 IMDM에서 유지하였다. CFTR을 갖고 있는 adenoviral vector를 이용하여 transfection 한 후 2 3일 후 실험하였다.

2. 역전사 중합효소 연쇄반응

CFPAC 세포주에서 guanidinium thiocyanate phenol-chloroform (Trizol; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 이 RNA로부터 random hexa-primer와 RNase H⁻-reverse transcriptase (Gibco BRL)를 이용하여 cDNA를 제작하였으며, 이를 다시 primer와 Taq DNA polymerase (AmpliTaq Gold, Perkin-elmer, Norwalk, CT, USA)를 이용하여 증폭하였다. 사용한 primer의 염기서열과 예상 PCR product의 크기는 다음과 같다.

hNHE3, 5` primer: GGC CGC GCT TTC GAC CAC ATC CTC TC,
3`primer: GAC CCG CGG CGC TCT CCC TCA G,
PCR product: 224 bp (GenBank Accession No. U28043)

hNHE3, 5` primer: GGA GCG TGC CCA GAA GCG GAG AAA CAG C,
3`primer: GGA AGG GCA TCA GGC GGC GGA AGG T,
PCR product: 365 bp (GenBank Accession No. U28043)

EBP50(NHERF1), 5` primer: CTA AGC CAG GCC AGT TCA TCC GAG CAG T, 3`primer: TGG GGT CAG AGG AGG AGG AGG AGG TAG A,
PCR product: 447 bp (GenBank Accession No. AF036241)

E3KAP(NHERF2), 5` primer: CAC TGG CCA GAA GGA TGT CAA TG, 3`primer: AGC CGG GCC TCG TCC TCC TGT G,
PCR product: 273 bp (GenBank Accession No. AF035771)
hCAP70(PDZK1), 5` primer: GCC CCG GCT CTG CTA TCT CGT, 3`primer: AAT TCG GGG CTG GTG GGG TAA C,
PCR product: 334 bp (GenBank Accession No. AF012281)
β-actin, 5` primer: TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA,
3`primer : TCT CAG CTG TGG TGG TGA AG
PCR product: 392 bp (GenBank Accession No. E00829)

3. 세포 내 pH 측정

세포의 극성을 유지시키기 위해 투과성 막 (permeable membrane support)에 2일 이상 배양한 후 관류 chamber에 membrane을 조립한 다음 pH 측정용 형광물질인 BCECF (1 μM BCECF/AM)를 10분간 loading 하였다. 현미경 (×200)하에서 측정 부위를 결정한 다음 excitation 파장 490 nm와 440 nm에서 나오는 형광을 emission 파장 510 nm에서 photon counter (PTI Delta Ram, NJ, USA)로 측정하였으며 490/440 nm의 형광비 (flourescence ratio)를 산출하였다. 실험 후 pH를 6.4 - 7.6으로 맞춘 145 mM KCl, 10 mM Hepes, 5 μM nigericin 용액을 이용한 calibration을 실시하여 490/440 nm의 형광비를 실제 pH 값으로 환산하였다.

사용한 membrane chamber는 내강막과 측저막의 관류액을 차별적으로 흘려 줄 수 있도록 설계하여 내강막의 NHE3 기능만을 측정하였다. NHE3 기능은 Na^+ 의존적인 세포 내 pH 변동 기울기로 측정하였다. Na^+ 함유용액을 관류시키면 세포 내부로 Na^+가 들어오면서 H^+를 세포외부로 배출시켜 세포의 pH가 올라간다. 이 원리를 이용하여 HCO_3^-를 함유하고 있지 않은 관류액에서 Na^+의 농도를 0 mM로부터 145 mM로 높일 때의 pH 증가 기울기로 NHE의 활성도를 측정하였다.

본 실험에 이용한 표준용액의 조성 (mM)은 140 NaCl, 5 KCl, 1 $MgCl_2$,

1 $CaCl_2$, 10 glucose, 10 HEPES (pH 7.4) 이었으며 Na^+-배제 용액은 Na^+ 이온을 N-methyl-D-glucamine$^+$ (NMG^+) 이온으로 대체하여 만들었다.

4. Northern blot

Guanidinium thiocyanate phenol-chloroform (Trizol; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 총 RNA를 분리한 후 260 ㎚에서의 흡광도로 RNA 양을 측정하였다. 총 RNA 20 ㎍을 1% agarose gel (1.85% formaldehyde 포함)에서 전기영동 한 후, gel 속의 RNA를 모세관 이동 방법으로 Hybond TM - N^+ 막으로 옮기고, 이 막을 ready prime 방법으로 α-[^{32}P] dCTP를 cDNA fragments에 표지 시킨 probe와 65℃에서 16 시간 동안 hybridization (5 × Denhard solution, 6 × SSPE, 0.5% SDS, 50% deionized formamide) 시켰다. 막을 동일 온도에서 세척 용액Ⅰ (2 × SSPE, 0.1% SDS), 세척 용액Ⅱ (1 × SSPE, 0.1% SDS)로 각각 두 번씩 세척하고 이 막을 wrap으로 싼 후, intensifying screen과 X-ray film을 사용하여 -70℃에서 2-3일간 감광 시키고 현상하였다.

5. 면역형광염색

CFTR이 NHE3 발현에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위해 세포를 투과성 막에 배양하여 극성이 유지되도록 한 뒤 methanol (0.5 ml, 10분, -20 ℃)로 처리하여 고정하고 permeabilization을 시켰다. Phosphate-buffered saline (PBS)으로 두 번 세척한 다음 blocking 용액 (5% goat serum, 1% bovine serum albumin, 0.1% gelatin in PBS, 상온)에 1시간 동안 처치하였다. 다시 membrane을 PBS로 두 번 세척한 후 NHE3의 특이적 일차항체 (Dr. O. Moe 제공 , University of Texas Southwestern)를 blocking 용액에 1:100 희석한 용액으로 90분 동안 처리하였다. 다시 PBS로 세 번 세척한 후 이차항체 (anti-rabbit goat lgG tagged with Rodamine Red-X; Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA)를 1:100 희석 용액으로 1시간 처리하였다. PBS로 세 번 세척한 후 CFTR 특이 일차항체를 blocking 용액에 1:100

희석한 용액으로 90분 동안 처리하였다. 다시 PBS로 세 번 세척 후 이차항체 (anti-mouse goat lgG tagged with Fluorescein; Jackson Laboratories, West Grove, PA)를 1:100 희석 용액으로 1시간 처리하였다. Mounting media로 cover slip을 슬라이드에 고정시켜 밤새 건조시킨 다음 confocal microscope (MRC-1000; Bio-rad, Hercules, CA, USA)로 형광을 관찰하였다.

Ⅲ. 결 과

1. NHE3와 연결단백에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응

CFPAC 세포에서 β-actin primer를 이용하여 RT-PCR을 한 결과 392bp의 band가 나온 것으로 보아 cDNA가 genomic DNA 오염 없이 만들어 졌음을 확인하였다. (그림 1).

NHE3의 mRNA가 CFPAC 세포에 존재하는지 알아보기 위해 2개의 서로 다른 primer로 PCR을 수행한 결과 NHE3의 mRNA가 발현함을 알 수 있었고 RT-PCR 산물을 염기서열분석으로 확인하였다.

CFTR과 상호 작용한다고 알려진 PDZ domain을 갖는 연결단백의 primer를 이용하여 PCR을 한 결과 CFPAC 세포에 EBP50 (NHERF1), E3KARP (NHE3 Kinase A Regulatory Protein, NHERF2), CAP70 (CFTR Associated Protein 70)의 mRNA가 발현함을 알 수 있었다.

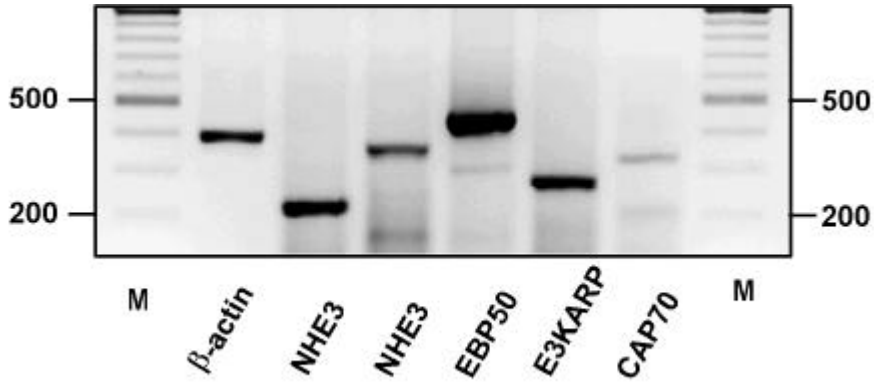

그림 1. CFPAC 세포에서 NHE3 primer와 연결단백 primer를 이용한 역전사 중합효소 연쇄반응. CFPAC세포로부터 mRNA를 추출하여 서로 다른 두 개의 NHE3 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 NHE3 mRNA 발현을 확인할 수 있었고, PDZ domain을 갖는 연결단백의 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 이 세포에 EBP50, E3KARP, CAP70의 mRNA 발현을 관찰할 수 있었다. M:DNA molecuar maker (100 bp ladder)

2. CFTR과 NHE3의 기능적 상호작용

CFTR발현이 NHE3 기능에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위해 세포 내

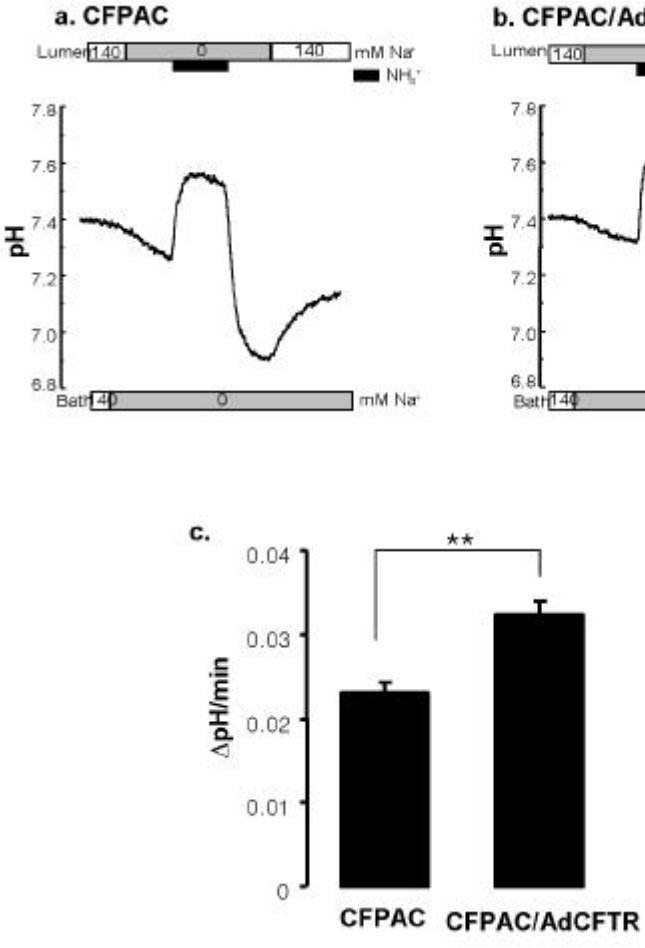

그림 2. CFTR 발현에 의한 NHE3 기능의 항진. CFPAC 세포와 AdCFTR을 transfection 한 CFPAC 세포를 산성화 시켜 내강막에 Na^+ 의존적인 세포내 pH 회복을 측정하였다. 내강막 NHE3 기능은 CFTR이 없는 CFPAC (a)에 비해 CFTR이 있는 CFPAC/AdCFTR (b)에서 항진되었다. 통계 처리한 결과 (c) CFTR이 존재할 때 내강막 NHE 활성이 39% 증가함을 관찰 할 수 있었다. **, $p < 0.01$

pH측정 실험(n=34)을 수행하였다 (그림 2).

유전적 손상으로 CFTR을 발현하지 못하는 CFPAC 상피세포에 CFTR 유전자를 갖고 있는 adenoviral vector (AdCFTR)를 세포에 transfection하여 NHE3 기능에 대한 CFTR의 영향을 실험하였다. 내강막에 발현하는 NHE3의 기능 연구를 위해서는 상피세포의 특성인 극성 유지가 필수적이다. 이를 위해 세포를 투과성 막에 배양하고 NHE3 기능 측정 시에도 내강막과 측저막의 관류액을 차별적으로 흘려줄 수 있는 membrane chamber를 사용하였다. 내강과 측저막 관류액의 Na^+ 농도를 145 mM에서 0 mM로 낮추고 NH_4Cl를 첨가하면 NHE 기능을 정지시킨 상태에서 세포를 산성화시킬 수 있다. 이 상태에서 내강쪽 관류액을 140 mM의 Na^+이 들어간 표준 관류액으로 바꾸었을 때 Na^+ 의존적으로 세포 내 pH가 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 CFPAC 세포의 내강막에서 NHE3가 기능함을 시사한다. CFPAC의 내강막이 140mM Na^+에 노출되면 0.023 pH units/min 속도로 세포 내 pH가 회복되었다. CFTR을 transfection 하였을 때 Na^+ 의존적인 세포 내 pH 회복은 0.032 pH units/min로 39% 증가됨을 알 수 있었다. CFTR이 존재할 때 내강막 NHE3 기능 항진은 이전 생체 내 (*in vivo*) 결과와 일치하였다.

3. NHE3 mRNA의 발현

CFTR이 mRNA 수준에서 NHE3 발현을 조절하는지 알아보기 위해 Northern blot을 수행하였다 (그림 3). CFPAC 세포에서 hNHE3 primer를 이용하여 얻어진 633 bp의 RT-PCR 산물을 probe로 하여 Northern hybridization을 한 결과 이 세포에 9.5 kb의 NHE3 유전자의 transcript를 발견할 수 있었다. 그러나 기능적 CFTR 유전자를 갖는 세포 (AdCFTR을 tranfection 한 세포)에서 NHE3 mRNA의 증가는 보이지 않았다. 이러한 결과를 볼 때 CFTR은 NHE3를 전사 수준에서 조절하지 않음을 알 수 있었다.

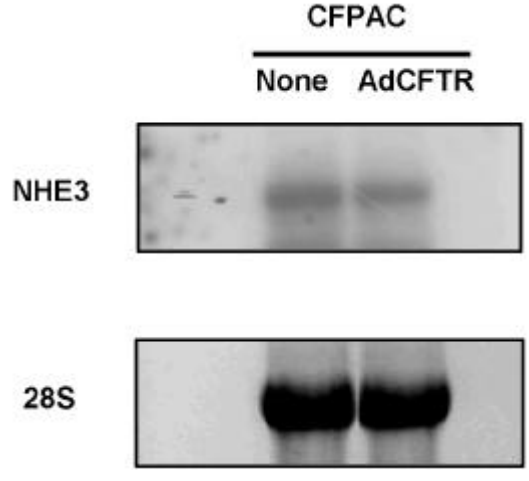

그림 3. CFPAC세포에서 NHE3 mRNA의 Northern hybridization. 각 lane**마다** 20μg RNA**를 이용하였고** 28S rRNA**를 대조군으로 사용하였다**. AdCFTR**을** transfection **한 경우에** NHE3 mRNA**의 발현 증가는 나타나지 않았다**.

4. 면역형광염색

CFTR**이** NHE3 **발현에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위해** CFTR**을** transfection **한** CFPAC **세포를 투과성 막에 배양하여 극성을 유지하도록 한 뒤 면역형광염색을 하였다** (**그림** 4).

NHE3**가 내강막에 발현함을 알 수 있었고**, CFTR**이 발현한 세포에서** NHE3**의 상피 내강막 발현이 증가한 것을 알 수 있었다. 이상의 결과** CFTR **은 단백 발현 수준에서** NHE3**의 발현을 조절함을 알 수 있었다**.

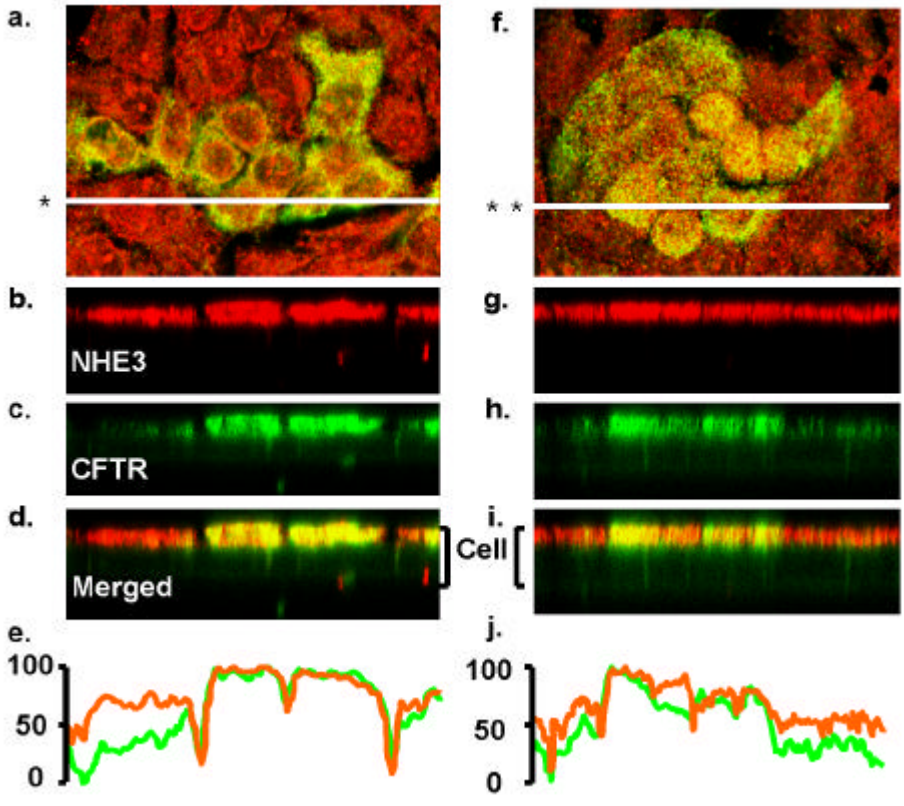

그림 4. CFTR이 transfection 된 CFPAC 세포에서의 CFTR, NHE3의 면역형광염색. 세포를 투과성 막에 배양한 후 anti-CFTR과 anti-NHE3 항체를 이용하여 NHE3는 붉은색, CFTR은 녹색으로 이중염색 하였다. (a), (f) CFTR이 transfection 된 CFPAC 세포에서 NHE3와 CFTR은 발현하였다. CFTR이 발현하는 곳을 찾아 *, **에서 Z 축으로 단층 촬영하여 confocal images를 얻었다. (b), (g) CFPAC 세포에서 NHE3는 내강막에 발현하였다. (c), (h) AdCFTR로 transfection시 CFTR은 상피 내강막에 발현하였다. (d), (i) CFTR과 NHE3 염색을 함께 나타낸 결과 두 단백이 같은 곳에서 발현함을 알 수 있었다. (e), (j) 염색 정도를 분석한 결과 CFTR이 발현한 세포에서 NHE3의 상피 내강막 발현이 증가함을 알 수 있었다. 염색 정도를 NHE3는 붉은색, CFTR은 녹색으로 표시하였다. (× 600)

IV. 고 찰

CFTR이 어떠한 기전으로 NHE3 단백의 발현을 조절하는지 알아보기 위하여 유전적 손상으로 CFTR을 발현하지 못하는 CFPAC 세포와 CFTR 유전자를 transfection 한 CFPAC 세포에서 NHE3 단백의 기능과 발현 정도를 알아보았다.

CFPAC 세포의 내강막에 NHE3가 발현함을 기능적, 분자생물학적 방법을 통해 확인할 수 있었다 (그림 1, 2, 3, 4.). NHE는 대사 과정동안 생성된 H^+ 이온을 세포 외부의 높은 Na^+ 이온을 이용하여 세포 밖으로 이동시키는 단백으로, 세포 내 pH 조절 뿐 아니라 세포용적 조절과 이온흡수에 있어 중요한 역할을 한다. NHE3는 특히 상피 내강막에 존재하며 HCO_3^- 재흡수 역할을 함으로 HCO_3^- 농도를 일정하게 유지하는 역할을 담당하고 있다.[2-4]

NHE3가 CFTR이 기능을 하는 폐와 췌장 상피 내강막에 같이 존재함은 생리학적으로 큰 의미를 가진다. 음식을 먹게되면 VIP와 secretin과 같은 호르몬이 유리되어 세포 내 cAMP가 증가하게 된다. 그로 인해 활성화된 CFTR은 CFTR-EBP50-NHE3 복합체 내에서 cAMP 의존적 NHE3 기능 억제를 증가시켜[22] HCO_3^-의 소모를 최대로 막으며, 동시에 HCO_3^-분비를 증가시키는 AE의 활성은 항진시킨다.[4,5] 이러한 결과 췌장은 많은 양의 알칼리성 췌액을 생성, 분비하게 된다. 반면 기초상태에서는 Na^+과 HCO_3^- 손실을 막기 위해서 이를 재 흡수하여야 하는데, 이때 내강막에 존재하는 NHE3가 주요 역할을 한다. 특히 기초상태에서 CFTR은 NHE3의 기능을 억제하지 않기 때문에 NHE3는 내강막에서 Na^+ 의존적으로 HCO_3^-를 소모하여 결국 적은 양의 산성 췌액이 생성된다.

상피세포 기원인 CFPAC 세포에 CFTR을 발현시킴으로 NHE3의 기능이 증가함을 관찰 할 수 있었고, 이는 이전 생체 내 결과와[22] 일치하였다 (그림 2). 이러한 기능 항진은 NHE3 단백 발현이 증가하기 때문인데, CFTR은

mRNA 수준과 단백 발현 수준에서 NHE3를 조절할 수 있다. CFTR 단백의 내강막 발현 부재로 바뀌어진 이온 조성과 막 전위에 대한 보상반응으로 유전자 수준에서 NHE3의 발현을 조절할 수 있다. 그러나 Northern blot을 수행한 결과 mRNA 수준에서 CFTR은 NHE3의 발현을 조절하지 않았다 (그림 3). 단백의 안정성이 증가되거나 내강막으로의 이동이 증가된다면 mRNA 수준에서의 증가 없이도 NHE3의 발현 증가는 가능하다. CFTR이 NHE3에 이러한 영향을 줄 수 있는지 알아보기 위해 극성을 유지하도록 세포를 배양한 후 면역형광염색을 통해 발현 양상을 확인하였다. 그 결과 CFTR이 발현한 세포에서 NHE3의 상피 내강막 발현이 증가한 것을 관찰할 수 있었다 (그림 4). 이러한 결과는 CFTR이 NHE3의 단백 안정화 혹은 내강막으로의 이동 증가에 기여할 것임을 시사한다. 여기에는 상피 내강막에 존재하는 연결단백이 (그림 1) 관련될 것으로 생각된다. WT-CFTR의 경우 EBP50와 같이 PDZ domain을 갖는 연결 단백과 상호작용 함으로 내강막에서 안정화되는데, CFTR-연결단백-NHE3로 이루어진 단백질 복합체 안에서 NHE3 단백의 안정성도 증가될 것으로 보인다.

CFTR의 C-말단부가 단백의 대사 안정성 (metabolic stability)을 증가시킴으로 CFTR의 발현 수준을 결정하는 역할을 한다고 보고되었고,[25] PDZ domain과 상호작용을 하는 C-말단부의 3개의 아미노산이 내강막으로 CFTR을 극성화 (polarization) 하는데 필요하다고 보고되었다.[26] CFTR의 C-말단부는 EBP50 등과 같은 연결단백에 결합하는데, 이때 CFTR은 연결단백의 ERM domain을 통하여 F-actin과 같은 세포골격 (cytoskeleton)에 매이게 된다. 세포 골격과 안정한 구조를 이루게 됨으로 단백의 안정화가 이루어지며, 그로 인하여 극성발현이 유지될 것으로 생각된다. 이와 유사한 기전이 Na^+/K^+ ATPase의 극성 발현에 대하여 보고된 바 있다.[27,28,29] Na^+/K^+ ATPase는 골지 체 (Golgi Network)에서부터 내강막과 측저막으로 이동된다. 내강막으로 이동된 Na^+/K^+ ATPase는 세포내 이입 (endocytosis) 되거나 분해되는데 반해 측저막으로 이동된 Na^+/K^+ ATPase는 actin을 기본으로 한 세포골격과의 상호작용으로 유지되고 축적되게 된다. 이러한 기전으로 Na^+/K^+ ATPase

는 측저막에 극성을 유지하며 발현한다.

상피 내강막에서 PDZ domain과 PDZ-interacting domain 사이의 상호작용은 이온수송단백의 극성 발현과 단백 안정성에 중요할 뿐 아니라 상피세포 내강막에 3차원적 거대분자 신호 복합체를 구축함으로 다양한 신호 변화에 반응하여 효율적으로 세포 기능을 조절할 수 있게 한다. CFTR의 경우 거대분자 복합체 내에서 regulatory kinase인 protein kinase A, ezrin, phosphatases 등과 연결되며 기능적으로 상호작용 한다고 알려진 ORCC, ENaC, ROMK등의 단백과 함께 존재하게 된다.[30]

이상의 결과 CFTR은 mRNA 수준이 아닌 단백 발현 수준에서 NHE3를 조절함을 알 수 있었다. CFTR은 NHE3와 단백 복합체를 형성함으로서 내강막으로 NHE3의 이동을 증가시키거나 NHE3의 안정성을 증가시켜 NHE3의 상피 내강막 발현을 증가시킬 것으로 생각된다.

V. 결 론

CFTR이 NHE3의 발현을 어떤 수준에서 어떠한 기전을 통하여 조절하는지 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. NHE3 primer로 RT-PCR을 수행한 결과 CFPAC 세포에 NHE3 mRNA의 발현을 관찰할 수 있었다. 또한 연결 단백의 primer로 RT-PCR을 수행한 결과 CFPAC 세포에는 EBP50, E3KARP, CAP70의 mRNA가 발현하였다.
2. 세포 내 pH를 재는 실험을 통하여 상피 내강막에 존재하는 NHE3의 기능을 측정한 결과 CFTR이 존재할 때 NHE3 기능이 39% 항진됨을 알 수 있었다.
3. Nothern blot을 통해 NHE3의 mRNA 발현 정도를 분석한 결과 CFTR 유전자를 갖는 세포에서 NHE3의 mRNA의 증가는 보이지 않았다.
4. 면역형광염색을 통하여 단백 발현 수준에서 분석한 결과 CFTR을 가진 세포에서 상피 내강막의 NHE3의 발현이 증가함을 알 수 있었다.

이상의 결과 CFTR은 mRNA 수준이 아닌 단백 발현 수준에서 NHE3를 조절함을 알 수 있었다. CFTR은 NHE3와 단백 복합체를 형성함으로서 내강막으로 NHE3의 이동을 증가시키거나 NHE3의 안정성을 증가시켜 NHE3의 상피 내강막 발현을 증가시킬 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Pilewski JM, Frizzell A. Role of CFTR in airway disease. Physiol Rev 1999;79:S215-S255.
2. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. Science 1995;269:847-850.
3. Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. Physiol Rev 1999;79:S145-S166.
4. Lee MG, Wigley WC, Zeng W, Noel LE, Marino CR, Thomas PJ, et al. 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.
5. Lee MG, Choi JY, Luo X, Strickland E, Thomas PJ, 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.
6. Weinman EJ, Steplock D, Wang Y, Shenolikar S. Characterization of a protein cofactor that mediates protein kinase A regulation of the renal brush border membrane Na^+/H^+ exchanger. J Clin Invest 1995;95:2143-2149.
7. Yun CHC, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tsao S, Tse CM, et al. cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na^+/H^+ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. Proc Natl Acad Sci 1997;94:3010-3015.
8. Hall RA, Premont RT, Chow CW, Blitzer JT, Pitcher JA, Claing A, et al. The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na^+/H^+ exchanger regulatory factor to control Na^+/H^+ exchange. Nature (London) 1998;392:626-630.
9. Craven SE, Bredt DS. PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. Cell 1998;93:495-498.

10. Sheng M, Pak DTS. Ligand-Gated Ion Channel Interactions with Cytoskeletal and Signaling Proteins. Annu Rev Physiol 2000; 62:755-778.
11. Wang SS, Raab RW, Schatz PJ, Guggino WB, Li M. Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). FEBS Lett 1998;427:103-108.
12. Short DB, Trotter KW, Reczek D, Kreda SM, Bretscher A, Boucher RC, et al. An Apical PDZ Protein Anchors the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to the Cytoskeleton. J Biol Chem 1998;273:19797-19801.
13. Hall RA, Ostedgaard LS, Premont RT, Blitzer JT, Rahman N, Welsh MJ, et al. C-terminal motif found in the 2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na^+/H^+ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins Randy. Proc Natl Acad Sci 1998;95:8496-8501.
14. Mohler PJ, Kreda SM, Boucher RC, Sudol M, Stutts MJ, Milgram SL. Yes-associated Protein 65 Localizes p62c-Yes to the Apical Compartment of Airway Epithelia by Association with EBP50. J Cell Biol 1999;147:879-890.
15. Raghuram V, Mak DOD, Foskett JK. Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. Proc Natl Acad Sci 2001;98:1300-1305.
16. Huang P, Trotter K, Boucher RC, Milgram SL, Stutts MJ. PKA holoenzyme is functionally coupled to CFTR by AKAPs. Am J Physiol 2000;278:C417-C422.
17. Sun F, Hug MJ, Bradbury NA, Frizzel RA. Protein Kinase A Associates with Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator via an Interaction with Ezrin. J Biol Chem 2000;275:14360-14366.
18. Naren AP, Cormet-Boyaka E, Fu J, Villain M, Blalock JE, Quick MW, et al. CFTR Chloride Channel Regulation by an Interdomain Interaction. Science 1999;286:544-548.
19. Naren AP, Nelson DJ, Xie WW, Jovov B, Pevsner J, Bennett MK, et

al. Regulation of CFTR chloride channels by syntaxin and Munc18 isoforms. Nature (London) 1997;390:302-305.

20. Peters KW, Qi J, Watkins SC, Frizzell RA. Syntaxin 1A inhibits regulated CFTR trafficking in xenopus oocytes. Am J Physiol 1999;277:C174-C180.
21. Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ, Muallem S. Aberrant CFTR-dependent HCO_3^- transport in mutations associated with cystic fibrosis. Nature 2001;410:94-97.
22. Ahn W, Kim KH, Lee JA, Kim JY, Choi JY, Moe OW, et al. Regulatory Interaction between the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator and HCO_3^- Salvage Mechanisms in Model Systems and the Mouse Pancreatic Duct. J Biol Chem 2001;276: 17236-17243.
23. Weinman EJ, Steplock D, Tate K, Hall RA, Spurney RF, Shenolikar S. Structure-function of Recombinant Na^+/H^+ Exchanger Regulatory Factor (NHE-RF). J Clin Invest 1998;101:2199-2206.
24. Lee MG, Ahn W, Choi JY, Luo X, Seo JT, Schultheis PJ, et al. Na^+-dependent transporters mediate HCO_3^- salvage across the luminal membrane of the main pancreatic duct. J Clin Invest 2000;105: 1651-1658.
25. Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, LuKacs GL. C-terminal Truncations Destabilize the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator without Impairing Its Biogenesis. J Biol Chem 1999;274:21873-21877.
26. Moyer BD, Denton J, Karlson KH, Reynolds D, Wang S, Mickle JE, et al. A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. J Clin Invest 1999;104:1353-1361.
27. Hammerton RW. Mechanism for regulating cell surface distribution of Na^+, K^+-ATPase in polarized epithelial cells. Science 1991;254:847-850.
28. Morrow JS, Cianci CD, Ardito T, Mann AS, Kashgarian M. Ankyrin links fodrin to the alpha subunit of Na^+ ,K^+-ATPase in Madin-Darby canine kidney cells and in intact renal tubule cells. J Cell Biol 1989;108:455-465.

29. Gut A, Balda MS, Matter K. The cytoplasmic domains of a ß1 integrin mediate polarization in Madin-Darby canine kidney cells by selective basolateral stabilization. J Biol Chem 1998;273:29381-29388.
30. Kunzelmann K. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its function in epithelial transport. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1999;137:1-70.

Abstract

Regulation of NHE3 (Na^+/H^+ exchanger 3) expression in the luminal membrane of the pancreatic duct

Jin Ah Lee

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The graduate school, Yonsei University

(Directed by Professor Min Goo Lee)

HCO_3^- is an important constituent of secreted fluids in maintaining the acidity and fluidity of pancreatic fluid. Therefore aberrant HCO_3^- transport can be related to chronic pancreatitis and other diseases of pancreas. Several transporters are involved in luminal HCO_3^- secretion in pancreas such as CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), AE (Cl^-/HCO_3^- exchanger), and NHE3 (Na^+/H^+ exchanger 3). CFTR supports AE activity and can also control HCO_3^- salvage mechanism NHE3. These findings mean that CFTR controls overall HCO_3^- homeostasis.

It is reported that CFTR interacts with NHE3 through the scaffolding proteins having PDZ (PSD 95/DLG/ZO1) domain and increases expression of NHE3 in the luminal membrane of the pancreatic duct. However, the precise mechanism is still not clear. In the present study the underlying molecular mechanisms how CFTR regulates the expression of NHE3 were investigated.

The role of CFTR was observed in CFTR-impaired CFPAC cells transfected with AdCFTR viruses. RT-PCR analysis revealed expression of mRNA for EBP50 (ERM-binding phophoprotein 50), E3KAP (NHE3 Kinase A Regulatory Protein), and CAP70 (CFTR Associated Protein 70) in CFPAC

cells which are known to interact with CFTR. In order to maintain the epithelial polarity, the cells were cultured on a permeable membrane support, then NHE3 activity was measured by recording pH_i in response to $[Na^+]$ changes. When the cells were transfected with CFTR, the luminal NHE3 activity was increased by about 39%, which was coincided with the previous *in vivo* results. Northern blotting revealed that CFTR did not affect the mRNA levels of NHE3. However, double-stained immunofluorescence study clearly showed that the luminal expression of CFTR was highly correlated with increased luminal NHE3 expression.

These results suggest that CFTR increases the luminal NHE3 expression possibly by either increasing the luminal sorting or protein stability of NHE3 in the luminal membrane.

Key Words : Na^+/H^+ exchanger 3, bicarbonate, CFTR, protein interaction