

97-NF-04-07-A-01

GOVP 12000268

CD4에 의해 발현되는 유전자의 탐색
및 조절기능 분석

CD4 responsive genes and
its regulation mechanisms

삼성생명과학연구소

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ CD4에 의해 발현되는 유전자의 탐색 및 조절기능 분석에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

1999 . 6 . 3

주관연구기관명 : 삼성생명과학연구소

주관연구책임자 : 김 영 준

요 약 문

I. 제 목

CD4에 의해 발현되는 유전자의 탐색 및 조절기능 분석에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

바이러스나 세균의 감염시 인체 방어를 위한 면역작용은 T 세포, B 세포 및 대식세포들이 중요한 역할을 하고 있다. 특히 이러한 면역세포들은 외부로부터 침입한 이 물질에 의한 자극이 있을 때 자신만의 독특한 일련의 유전자들을 발현하게 된다. 이렇게 유도된 유전자들은 면역반응의 특성을 결정 짓는 중요한 요소가 된다. 그러므로 각각의 면역세포에서 자극하는 항원의 종류에 따라 차별적으로 유도되는 유전자군의 종류를 밝히는 것이 면역 작용의 발생기전과 그 특이성을 규명하는 데 필히 요구되고 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

면역세포 활성화시 유도되는 유전자군을 탐색하고 그 기능을 규명함으로써 면역 반응에 중요하게 관여하고 있는 유전자군을 확보하고자 하였다. 또한 체계적인 유전자 탐색을 통하여 다수의 새로운 면역유전자 소재들을 개발하여 국내 연구진들과 공

유함으로써 효과적인 유전체 연구 목표를 달성하고자 하였다. 이를 위해 면역세포중 중요한 역할을 담당하고 있는 T 세포와 대식세포에서 각각 CD4 활성화 및 LPS 자극 시 유도되는 유전자군을 differential display (DD-RTPCR) 방법과 subtractive library 제조 방법을 사용하여 찾아내고자 하였다. 또한 일부 얻어진 유전자들의 면역학적 기능을 분석하여 바이러스나 박테리아 감염시 진행되는 면역반응의 기전을 밝히고 본 과제의 유전자탐색 방법의 효율성을 검증하고자 하였다.

IV. 연구개발결과

본 과제 수행을 통하여 다음과 같은 성과를 이루었다. 첫째, 유전체 분석 기술 정립 면에서 CD4와 LPS 활성화 조건을 확립하고 기존의 차등 유전자 탐색법을 개량하고 복합화한 실험방법을 정립한 점과, 둘째로, 유용한 면역 특이 유전자 확보 면에서 LPS에 의해 유도되는 50여종 이상의 유전자를 확보한 점과, 셋째로, 면역특이 유전자의 기능분석 면에서도 해당 유전자의 발현조절 기전 규명 및 상호작용 관계에 있는 유전자를 발견한 점 등이 대표적인 성과이다.

V. 연구개발 결과의 활용계획

당초 유전체 연구사업의 일환으로 계획했던 바와 같이 50여종 이상 다수 확보한 면역세포 유전자들을 국내 연구진과 공유하여 공동연구를 추진하고, 특히 이중에서 일차적인 기능 분석결과 새로운 면역 기능을 가지는 유전자로 밝혀진 유전자들에 대해서는 연구 결과를 정리하여 국제 논문에 발표하고 더 나아가 이들 유전자들을 활용하여 면역세포의 기능을 조절할 수 있는 방법을 개발하고자 한다.

S U M M A R Y

Title

CD4 responsive genes and its regulation mechanisms.

In response to viral and bacterial infection, various immune cells are activated to protect human body. During the process, a series of immune cell-specific genes are turned on, and the activities of these genes are responsible for the distinct immune reactions. Therefore, in order to elucidate the mechanism by which each immune cell triggers the defensive reactions against the infectious organism, we searched for the immune cell-specific genes that are induced during the infection. To this end, we examined the differentially expressed genes of the CD4⁺ T cells upon CD4 crosslinking with the use of differential display and subtractive library construction. In addition to this, we also searched for the genes which are differentially expressed in macrophage upon stimulation with LPS. From these experiments, we obtained more than hundreds of candidate clones from each screen and performed northern blot analysis and sequence determination for all of them. These extensive analysis of the candidate clones identified more than 50 genes that are differentially regulated by the LPS stimulation.

The functional analysis of a novel gene, which was identified as a LPS-inducible gene, revealed that it has a sequence homology to cyclin and splicing factors. In order to elucidate the regulatory mechanism that governs the expression of the novel LPS-responsive gene, we analyzed the effect of various kinase inhibitors on transcriptional activation of the gene. These lines of study demonstrated that we have identified a novel gene which plays an important role in LPS response.

C O N T E N T S

Section 1. Introduction-----	7
Part 1 Purpose of Research-----	7
Part 2 Necessity of Research-----	7
Part 3 Area of Research-----	10
Section 2. State of Art-----	13
Part 1 The function of CD4 in immune response-----	13
Part 2 The function of CD4 as a receptor for HIV-----	13
Part 3 Transcriptional factors induced by LPS-----	15
Section 3. Research Content and Results-----	17
Part 1 Methods-----	17
Part 2 Subject of Research-----	23
Part 3 Results-----	26
Section 4. Achievement and Expectation-----	49
Part 1 Screen for genes induced by CD4 activation-----	49
Part 2 Isolation of primary T cells-----	49
Part 3 Isolation of genes induced by LPS-----	49
Part 4 Functional analysis of the immune-specific genes-----	50
Section 5. Application of the Research Products-----	51
Section 6. References-----	53

목 차

제 1 장 서론-----	7
제 1 절 연구개발의 목적-----	7
제 2 절 연구개발의 필요성-----	7
제 3 절 연구개발의 범위-----	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황-----	13
제 1 절 면역 조절자로서의 CD4의 기능-----	13
제 2 절 HIV receptor로서의 CD4의 기능-----	13
제 3 절 LPS에 의해 유도되는 전사 활성화 인자-----	15
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과-----	17
제 1 절 연구방법-----	17
제 2 절 연구내용-----	23
제 3 절 연구결과-----	26
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도-----	49
제 1 절 T 세포주에서 CD4에 의해 발현되는 유전자 탐색-----	49
제 2 절 차등 발현 유전자 탐색을 위한 primary T 세포 분리-----	49
제 3 절 LPS에 의해 조절되는 유전자 확보-----	49
제 4 절 유전자 기능 분석-----	50
제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	51
제 6 장 참고문헌-----	53

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구의 목적은 세균이나 바이러스의 감염시 활성화되는 면역세포의 기능에 중요한 역할을 하고 있는 유전자들을 찾아내어 면역반응의 주요 기전을 밝히는 계기를 마련하고자 하는 데 있다. 이러한 연구를 바탕으로 새로운 항바이러스제 및 항생제 개발의 학문적 기반을 마련하고자 한다. 이러한 목적의 일환으로, T cell의 activation 및 HIV pathogenesis에 관여하는 CD4의 기능을 분석하기 위하여 CD4 활성화시 유도되는 유전자들을 탐색하고자 하였다. 또한, 세균감염시 어떻게 LPS를 인지한 신호가 대식세포로 전달되어 패혈증의 원인이 되는 다양한 유전자들의 발현을 활성화시키는 지, 그 신호전달체계 (signal transduction pathway)를 밝혀 내기 위하여 대식세포에서 LPS 신호에 의해 차등 발현되는 유전자들을 찾고자 하였다. 이와 더불어 새로이 발견된 면역 특이 유전자의 기능을 분석함으로써 LPS 등 감염시 생겨나는 외부자극이 면역세포를 활성화시키는 기전을 이해하고자 하였다. 또한 이렇게 확보된 면역 특이 유전자들을 국내 면역학 연구진에게 공개하여 연구결과의 효과적인 활용을 도모하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

바이러스나 세균의 감염시 인체 방어를 위한 면역작용은 T 세포, B 세포 및 대식세포들이 중요한 역할을 하고 있다. 특히 이러한 면역세포들은 외부로부터 침입한 이 물질에 의한 자극이 있을 때 자신만의 독특한 일련의 유전자들을 발현하게 된다. 이렇게 유도된 유전자들은 면역반응의 특성을 결정 짓는 중요한 요소가 된다. 그

리므로 각각의 면역세포에서 자극하는 항원의 종류에 따라 차별적으로 유도되는 유전자군의 종류를 밝히는 것이 면역 작용의 발생기전과 그 특이성을 규명하는 데 필히 요구되고 있다.

1. T 면역세포에 특이적 유전자에 대한 연구의 필요성

세포면역에 관여하는 T 림프세포는 크게 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포로 나뉜다. T 세포는 다른 세포표면에 있는 MHC (major histocompatibility complex)와 결합하고 있는 항원을 TCR (T cell receptor)로 인식하면서 반응하는데, 이때 CD4 나 CD8은 TCR의 co-receptor로 MHC를 동시에 인식하여 T 세포 반응을 크게 증가시킨다. CD4는 또한 AIDS (후천성 면역 결핍증)을 일으키는 HIV (human immunodeficiency virus)의 primary receptor 이다.

CD4+ T 세포는 항체 형성과 inflammation에 관여하는 helper로서 면역기능의 조절에 중요한 역할을 담당한다. 또한, HIV 감염에 의한 CD4+ T 세포의 감소는 후천성 면역 결핍증을 일으키고, CD4+ T 세포는 장기 이식 시에 거부 반응이나 류마치스성 관절염 등의 질병과도 연관 관계를 가진다고 알려져 있다. 이러한 CD4+ T 세포의 반응에 CD4는 중요한 위치를 차지하고 있다. CD4의 T 면역세포에 있어서의 조절 메커니즘의 연구는 면역기능 조절 뿐 아니라 HIV의 pathogenesis의 병리학적인 의미로서도 매우 중요한 분야이다.

그러나 CD4의 coreceptor로서의 기능은 많이 연구되어 왔으나 CD4의 독자적인 기능의 연구는 아직도 미흡한 상황이다. HIV pathogenesis와 CD4의 관계를 연구하는 과정에도 CD4가 TCR과 연관되지 않은 독립적인 신호를 발생 전달하는 과정이 있음이 조금씩 밝혀지고 있을 뿐이다. CD4의 기능을 연구하기 위해서 CD4 stimulation 후 induce 되는 유전자를 밝혀내고 그 조절 기능을 연구하는 것이 현재의 시급한 과제라 할 수 있다.

2. LPS에 의해 유도되는 대식세포 특이 유전자에 대한 연구

인체에 있어, 세균이나 바이러스의 감염에 의한 면역체계의 초기 반응기작을

밝혀 내고, 이 기작에 관여하는 주요 유전자들을 찾아내어 응용함으로써, 면역기능의 회복 및 증진을 통한 질병의 퇴치 방법을 개발을 위한 학문적 근본을 마련하려는 것이 본 연구과제의 목표이다. 그람 음성세균의 병리학적 효과는 미생물 외벽의 중요 구성 요소인 지질다당류 (LPS) 를 숙주세포가 어떻게 인식하는가에 의존된다. 대식세포는 LPS인식의 중요 목표물중의 하나로, 특히 LPS에 의한 활성화는 세포의 다양한 반응들을 유도하게 된다. IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β 등의 cytokine 생성, Nitric Oxide Synthase의 상승, cytokine 능력의 현격한 발달 등으로 대표되는 일련의 변화는 인체의 기초면역체계에 매우 중요한 역할을 차지한다. 또 대식세포는 차세대 항암제 Taxol에 의해서도 LPS에 의해 일어나는 일련의 반응들을 보이므로 두 제제에 대한 신호전달체계는 공유되어 있는 것으로 사료된다.

LPS에 대한 대식세포의 과잉반응은 치명적인 endotoxic shock을 일으키게 되지만, 어떠한 신호전달체계를 거치는지는 알려져 있지 않다. 고열과 다른 비정상적인 신체반응의 이상으로 대표되는 endotoxic shock은 중환자실에서도 가장 높은 사망률을 차지하는 것 중의 하나이고 그 비율은 점점 올라가고 있다. 항생요법의 발달에도 불구하고 그람음성패혈증은 과거 10년간 무려 열배가 증가하였다. Endotoxic shock에 의한 사망률은 95% 까지 이르며 미국에서 만도 매년 15만 명의 사망자가 생긴다. 이러한 높은 사망률을 감안할 때, 이에 대한 연구는 매우 중요하다 하겠다.

Endotoxic shock 에 대한 분자학적 수준에서의 이해야말로 이 치명적인 증상의 새로운 치료법 개발에 결정적인 도움이 될 것이지만 광범위한 노력에도 불구하고 패혈증과 endotoxic shock의 효과적인 치료는 요원한 시점이다. 따라서 세균감염에 따라 유도되어지는 신호전달체계에 관련된 유전자(들)를 동정, 분리하고, 그 조절기전을 규명하는 것이 병원균에 대한 면역 반응의 이해와 방어기작을 밝히는 데 결정적인 기여를 할 것이다.

제 3 절 연구개발의 범위

현대의학에서 장기이식시 발생하는 거부반응에 대한 대책 마련이 시급하다. 또한 HIV 감염시 일어나는 CD4+ T 세포의 감소에 따른 면역력 저하나 세균 감염시 LPS에 의해 발생하는 패혈증 등에 대한 치료법 개발도 절실한 단계이다. 하지만 이러한 면역작용에서 중요한 역할을 담당하는 CD4+ T 세포와 대식 세포의 유전자 활성화 기전에 대한 분자생물학적 연구는 아직 미흡한 편이다. 따라서 본 과제에서는 CD4+ T 세포 및 대식 세포에서 특이하게 발현되는 유전자군을 찾아냄으로서 면역세포의 활성화 작용에 관여하는 유전자들의 기능 규명을 가능하게 하고, 이를 이용한 면역기능 조절 및 항바이러스, 항세균 치료법 개발에 기여하고자 한다. 또한 체계적인 유전자 탐색을 통하여 다수의 새로운 면역유전자 소재들을 개발하여 국내 연구진들과 공유함으로써 효과적인 유전체 연구 목표를 달성하고자 하였다. 이를 위해 면역세포중 중요한 역할을 담당하고 있는 T 세포와 대식세포에서 각각 CD4 활성화 및 LPS 자극시 유도되는 유전자군을 differential display (DD-RT-PCR) 방법과 subtractive library 제조 방법을 사용하여 찾아내고자 하였다. 또한 일부 얻어진 유전자들의 면역학적 기능을 분석하여 바이러스나 박테리아 감염시 진행되는 면역반응의 기전을 밝히고 본 과제의 유전자탐색 방법의 효율성을 검증하고자 하였다. 따라서 다음 4 개의 세부 목표를 정하여 주로 각각의 면역 특이세포가 활성화되었을 때 차등 발현되는 유전자들을 찾기 위한 탐색 방법 확립에 노력하였다.

1. T 세포주에서 CD4에 의해 조절되는 유전자 탐색

CD4의 기능은 ligand 종류에 따라 다르다. 현재 알려진 CD4 ligand는 4 종류로서, MHC, HIV gp120, IL-16 그리고 아직 그 기능이 확실하지 않은 gp17이라는 단백질이다. 위의 3개의 ligand는 T 면역세포의 CD4와 반응시 매우 다른 세포반응을 유도한다. T세포의 CD4가 단독적으로 MHC와 반응할 경우 세포는 비 활성화 상태로 진행되는 것으로 보여진다. 또한 HIV gp120와 반응할 경우나 CD4 항체로 cross-linking하는 경우 세포는 apoptosis로 진행하는 경향이 많아진다. IL-16은

CD4와 반응하여 T 세포의 chemotactic 이동을 촉진시킨다. 이러한 다양한 반응을 볼 때, CD4를 활성화시키는 방법에 따라 발현되는 유전자 또한 다르리라 추정할 수 있다.

위의 여러 다른 ligand의 반응은 크게 두 가지로 대별할 수 있다. CD4가 ligand와 접촉을 하지만 세포내 합입이 되지 않고 접촉면에 붙어서 신호를 주는 경우 (CD4를 가진 T 세포와 MHC를 가진 antigen presenting 세포와 만나는 경우) 와, CD4가 ligand를 만나 aggregation되고 세포내로 합입되는 경우이다. HIV의 감염이나 IL-16와 반응시에는 CD4가 ligand를 만나 aggregation되고 세포내로 합입되는 경우로 세포는 chemotactic 이동이나 apoptosis로 진행하는 경향을 띠게된다. 이러한 과정에서 일어나는 유전자 활성화를 조사하기 위하여 CD4 항체를 이용한 CD4 stimulation 후 subtraction library를 만들어 유전자 탐색을 하고자 하였다.

T 세포의 반응의 연구에 대부분의 경우 T 세포주를 사용하지만, 실제 생체 내에서의 T세포의 기능 연구를 위해서는 primary blood에서 추출한 T 세포의 반응을 또한 살펴 볼 필요가 있다. primary T 세포를 사용하여 CD4에 의해 조절되는 유전자 확보를 위하여 PCR-based subtractive cDNA library 테크닉을 이용하여 library를 구축하고자 한다. 이를 위하여 Primary T세포를 혈액으로부터 순수 분리하는 방법을 확립하고자 하였다.

2. LPS에 의해 조절되는 유전자군 탐색

패혈증의 원인인 LPS 과민반응의 기작을 연구하기 위해 LPS로 자극할 경우 발생하는 대식세포 내의 유전자 발현 변화를 조사하고자 하였다. 이를 위해 LPS 처리 전후의 대식세포에서 mRNA를 추출하여 Subtractive library를 만들고 이들 유전자의 발현 형태를 Northern 분석으로 결정하고 그 염기서열을 결정하여 LPS에 특이하게 반응하는 대식세포의 유전자군을 찾고자 하였다.

3. 유전자의 기능연구.

이상의 방법으로 각각의 면역세포에 대한 subtractive library가 성공적으로

제조되면 각각의 clone에 대한 염기서열 순서를 결정하고 그들에 대한 유사 유전자를 computer를 이용한 database 탐색을 통하여 찾아내 그 유전자의 기능을 밝히고자 하였다. 또한 이들 유전자의 발현 형태를 Northern 분석을 이용하여 조사하고자 하였다. 새로이 밝혀낸 유전자가 면역세포내에서 LPS의 신호를 전달하는 과정에서 어떠한 위치를 차지하고 있는 가를 알아내기 위해 각각의 신호전달체계에 특이한 protein kinase나 phosphatase의 inhibitor 등을 사용하여 이들 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 이러한 면역특이 유전자들과 횡적으로 작용하는 유전자들을 찾아내고 그 상호작용 관계를 밝히고자 하였으며 이러한 결과를 종합하여 이들 유전자의 기능이 면역 반응에 미치는 영향을 밝히고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 면역 조절자로서의 CD4의 기능

T 세포에서 CD4의 역할은 주로 cytoplasmic region과 결합되어 있는 p56lck라는 tyrosine phosphokinase를 통해서 일어난다. T 세포가 MHC와 결합되면 CD4에 붙어 있던 lck가 TCR의 ARAN (antigen recognition activation motif)을 phosphorylation 시키면서 일련의 T 세포의 activation이 시작하게 된다. 실제로 anti-CD4 antibody를 사용하여 CD4가 MHC와 결합하는 것을 방해하면 CD4+ T 세포의 기능이 급격히 억제된다. 이러한 이유로 장기이식시 거부 반응을 막기 위해 anti-CD4 antibody를 사용하는 임상 실험에 대한 노력이 진행 중이다. 그러나 이러한 임상적 연구는 CD4의 coreceptor로서의 기능 억제로 인해 CD4+ T 세포 기능의 축소하는 면만 본 것에 불과하다. 최근의 HIV pathogenesis와 CD4의 관계를 연구하는 과정에서 CD4가 TCR과 연관되지 않은 독립적인 신호를 발생 전달하는 과정이 있음이 밝혀지고 있다. 즉 항체를 사용하는 임상 치료의 기술적인 문제를 배제하고라도 항체의 CD4와의 반응이 면역억제라는 이상의 신호를 생성하고 전반적인 면역 기능 조절에 문제를 동반할 수 있다는 것이다. CD4의 자세한 조절 기능의 이해는 보다 효과적인 CD4의 임상적용을 위해서 매우 중요하다 하겠다. 그러나 CD4 활성화에 의하여 유도되는 T 세포의 분자 유전학적인 변이에 대해서는 많이 알려지지 않고 있다.

제 2 절 HIV receptor로서의 CD4의 기능

CD4는 HIV의 primary receptor로서 최근에 밝혀진 coreceptor와 더불어 HIV가 면역세포 침투 시 사용한다. 그러나 CD4는 단순히 receptor로서 HIV의 세포 침투 단계에만 기여하는 거 뿐 아니라 HIV의 증식과 AIDS의 병리현상을 일으키는 데 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 그러므로 T 세포의 CD4 기능을 HIV 증식과 AIDS와의 관

계 두 면에 대하여 각각 살펴보겠다.

1. HIV 증식 단계

HIV는 활성화되지 않은 세포에서는 증식할 수 없다. 대부분의 T 세포는 resting stage에 있기 때문에 HIV가 침투하여도 증식할 수 없다. 그러나 HIV가 T 세포 감염시 virion 표면에 있는 많은 숫자의 envelope protein이 CD4와 동시에 반응함으로써 CD4의 aggregation (CD4 crosslinking 으로 칭함) 시키고, CD4 crosslinking 은 p56lck의 activation을 일으키며 세포를 활성화하는 것으로 보인다. 현재 여기에 관한 연구가 여러 연구실에서 진행되고 있으나 생화학적인 조절기작에 주로 연구가 진행되고 있으며 분자 생물학적인 연구는 미흡한 실정이다.

2. AIDS와의 관계

AIDS환자의 CD4 T 세포의 감소에 대한 하나의 메커니즘으로 CD4 T 세포의 apoptosis를 들고 있다. 이는 HIV 감염환자이면서 아직 AIDS 증세가 나타나지 않은 사람들의 CD4 T 세포가 감염되지 않은 정상인 보다 apoptosis가 훨씬 더 많이 일어난다는 결과에 근거한다. 또한 peripheral blood T 세포를 gp120 HIV envelope protein으로 CD4를 crosslinking하여 pre-sensitized된 T 세포는 apoptosis에 의한 cell death가 매우 잘 일어난다는 보고가 많이 있다. 마지막으로 AIDS 환자에 있어 T 세포의 숫적 감소는 HIV에 의한 T 세포의 직접적인 cell killing에 소울 수 있는 것보다 많다는 것이 T 세포 감소가 HIV 바이러스의 직접적인 cell killing이라기보다는 CD4 pre-sensitized T 세포의 apoptosis에 의한 간접적인 결과임을 제시하는 이유의 하나이다. HIV에 감염되어 있는 환자의 혈청에 gp120이 많이 있는 것을 감안한다면 AIDS의 발병 과정에서 미치는 CD4와 apoptosis의 연관 관계를 같이 조사하고 나아가 임상 처방에 적용하는 것이 중요한 과제중의 하나이다. 그러나 현재의 연구는 현상의 보고만을 하고 있을 뿐 그 메커니즘은 전혀 설명하고 있지 못하다.

제 3 절 LPS에 의해 유도되는 전사활성화 인자

LPS에 의한 유전자 발현조절은 주로 전사단계를 조절함으로써 이루어 진다. 따라서 LPS에 의해 유도되는 유전자의 promoter 구조와 여기에 작용하는 전사조절자의 발견이 LPS에 의한 면역반응 메커니즘 규명에 매우 중요하게 되었다. 최근 분자생물학적 접근들이 시도되면서 LPS와 결합하는 여러 목표물 중 CD14과 LPS binding protein(LBP)이 밝혀졌는데, CD14은 LPS에 의한 대식세포의 일련의 반응에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 55kDa의 당단백질로 단핵구와 대식세포의 표면에 만들어지는 CD14은 glycoposphatidylinositol (GPI)기에 의해 고정된다. LBP는 Serum에 0.5 μ g/ml 보다 적게 존재 하나 LPS에 의한 순간반응으로 50 μ g/ml까지 상승하는데, 60kDa의 당단백질로 hepatocyte에서 50kDa의 polypeptide로 생성되며 Lipid A와의 결합 부위가 있다. 기존의 모델은 LPS와 LBP가 결합한 후 co-receptor로서 작용하는 CD14과 아직 동정되지 않은 단백질들과 결합하여 CD14을 표면에 갖는 대식세포로 하여금 cytokine을 배출하게 하는 등 일련의 반응을 일으키는 것으로 되어 있지만, 어떻게 해서 LPS로부터 오는 신호가 목표 유전자들에게 전달되어 전사를 일으키게되는지는 알려져 있지 않다. 물론 신호전달체계에 관련된 유전자(들)을 동정하는 것이 전달 기작을 밝히는 데 결정적인 도움이 될 것이다. 이 목표를 달성하기 위해서 본 연구진은 LPS로 인해서 활성화되는 대식세포내의 유전자 탐색에 관심을 기울여 왔다.

대식세포내에서 LPS에 의해 조절되는 대표적인 유전자로서 Rantes가 많이 연구되어 왔는데, Rantes는 C-C chemokine subfamily 이며, CD8 T lymphocyte에서 처음 발견되었다. 이와 같이 acute phase와 chronic phase의 inflammation에 관여하는 Rantes는 mouse의 경우 약 8 kDa 단백질로 인간과 약 85%의 상동성을 나타내며, 염색체 11 번에 위치한 약 4.5kb의 단일유전자로 3 부분의 exon으로 구성되어 있다. 1040 bp로 구성된 mouse Rantes의 전사조절부위에는 NF- κ B, IFN regulatory factor-1 등 다수의 유전자 조절요소가 존재한다. 이러한 Rantes 유전자가 LPS에 의해 immediate early manner로 직접적으로 활성화되기 위해서는 기존에 알려진 유전자 조절요소가

가동이 되는지 혹은 지금까지는 알려지지 않은 기작을 통해서 활성화되는지를 연구하던 중, Rantes 유전자 전사조절부위의 새로운 LPS responsive element (LRE) motif가 존재하는 것을 확인하였다. 바이러스 또한 숙주의 방어체계가 대응해야할 적이고 보면, 바이러스에 의한 신호전달경로와 LPS에 의한 그것엔 공통점이 있으리라는 가설이 가능한데, 실제 LRE와 Newcastle Disease Virus (NDV) Response Element (NRE)에 많은 중복이 있음이 밝혀져 있다 (7). LRE, NRE와 결합하는 단백질(들)이 무엇이며 그 기전은 어떻게 되는지 등은 앞으로 연구해야할 과제이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구방법

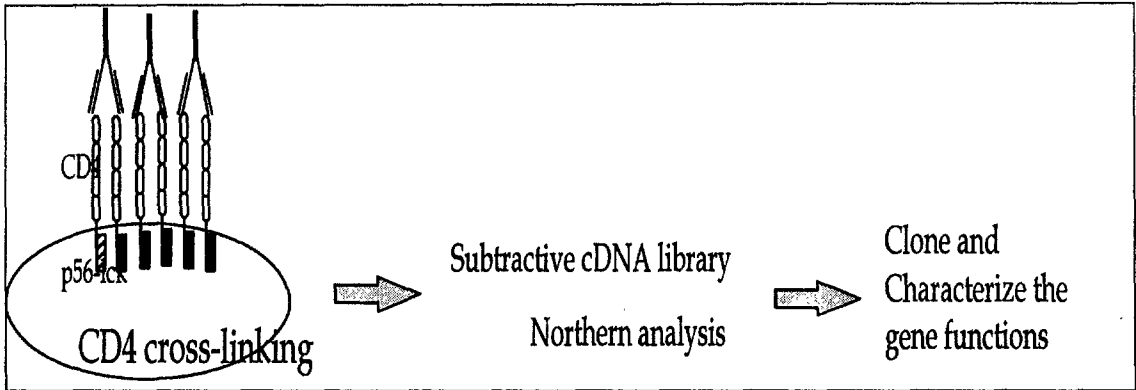
1. 면역세포 활성화

가. CD4+ T 세포의 활성화

CD4에 의해 발현되는 유전자를 찾기 위해 T세포주와 CD4의 monoclonal antibody, anti-mouse IgG antibody를 사용하여, CD4를 cross-linking함으로써 CD4를 활성화 시켰다 (그림 1 참조). 기존에 CD4가 활성화되면 세포내 lck tyrosine kinase의 tyrosine 위치의 인산화가 증가됨이 알려져 있으므로 CD4의 활성화여부는 Western blot 방법을 이용하여 lck 단백질의 tyrosine 인산화의 증가여부로 CD4의 활성화 조건을 확립하였다.

나. LPS에 의한 대식세포의 활성화

LPS에 의한 대식세포의 활성화는 기존에 LPS에 의해 그 발현이 증가된다고 알려진 *crg2* 라는 유전자의 발현 증가여부를 Northern blot 방법을 이용하여 조사함으로써 그 활성화 조건을 확립하였다. 최종 실험에 사용한 LPS 처리 조건은 다음과 같다. mouse 대식세포 유사세포인 RAW 264.7과 LPS nonresponding cell line인 10-9 cell을 다음의 조건에서 배양한다. RAW 264.7 cell은 fetal bovine serum 10%를 포함한 RPMI 1640 media에 배양한다. 이 때 1% penicillin과 streptomycin등 2 종류의 항생물질과 glutamine 1%를 첨가한다. 10-9 cell은 20% L929 cell culture의 상청액을 20%로 첨가된 DMEM media에 20% fetal bovine serum과 1% penicillin, streptomycin, glutamine을 첨가한 medium에서 각각 37°C, 5% CO₂에서 배양한다. cell에 LPS 자극을 주기 위하여, cell이 배양 flask의 약 70% 정도 배양되었을 때 bovine fetal serum이 결여된 media로 2 시간 배양한 후에 1µg/ml 농도의 LPS와 10µg/ml cyclohexamide를 첨가해서 2시간 배양한다.



(그림 1) CD4 T 세포의 crosslinking

2. 인간 혈액으로부터 자장을 이용한 CD4+ T 세포의 분리

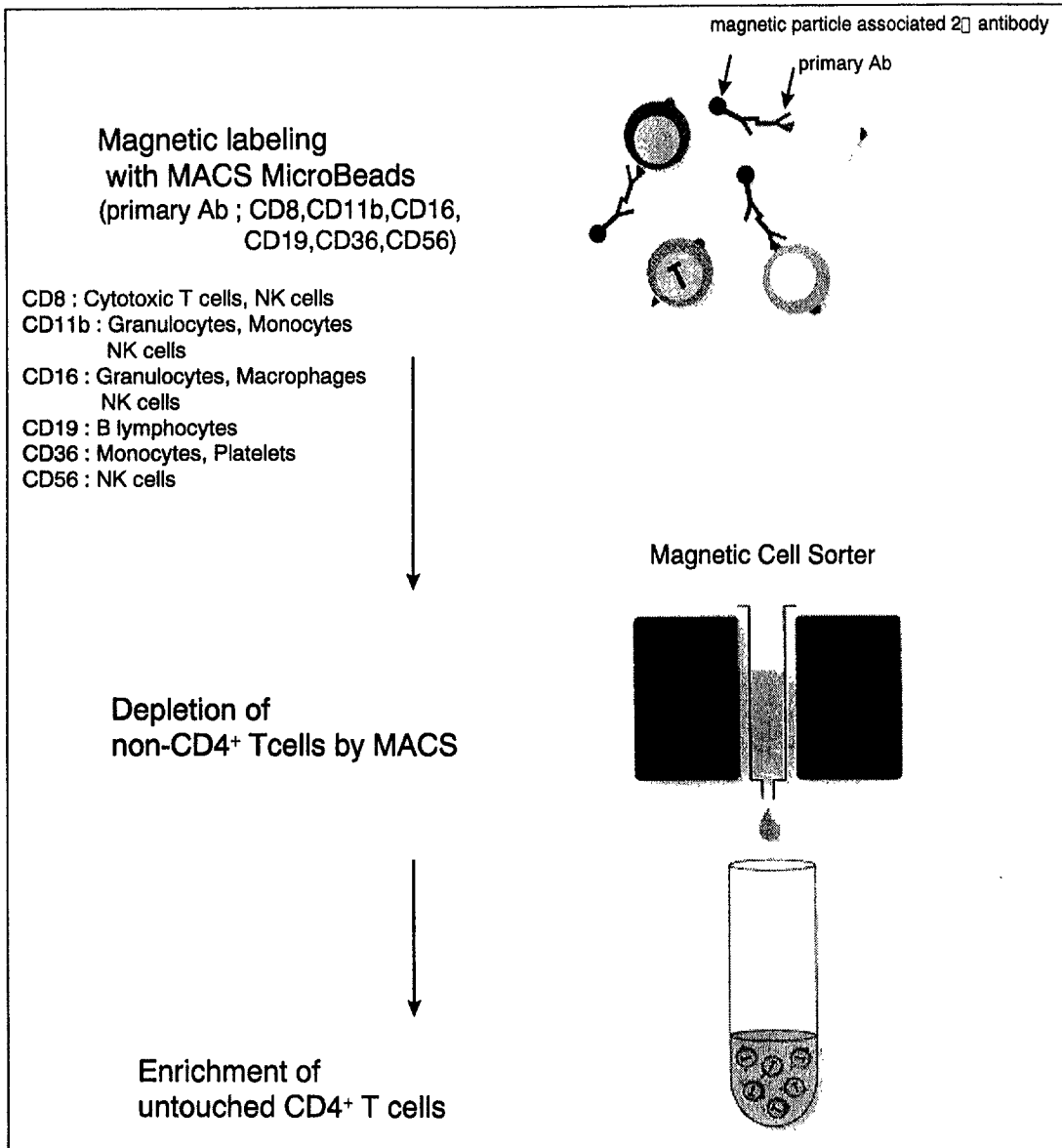
신선한 인간 혈액으로부터 Ficoll Hypaque density gradient 방법을 이용하여 말초혈 단핵세포(PBMC : peripheral blood mononuclear cell) 를 분리하였다. 이후 Non-CD4+T 세포 (B 세포, monocyte, NK 세포, cytotoxic T 세포, dendritic 세포, erythroid 세포, platelet, basophile) 는 CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 과 CD56 이 포함된 Ab 와 결합된후 자석이 결합된 2차 antibody를 이용하여 제거되었다 (그림 2). 그 후 분리된 CD4+T 세포는 유세포 분석기를 이용하여 그 순수도를 측정하였다.

3. 유세포분석

유세포 분석은 argon-ion laser 488 nm 의 파장을 갖는 FACS Vantage (Becton-Dickinson, FACS Division, San Jose, CA) 에 의해 실행되었으며, 자료들은 Cellquest system (Becton-Dickinson, FACS Division, San Jose, CA)에 의해 분석 될 것이다.

4. DD PCR

Differential Display-PCR 방법은 조건이 다른 상태하의 세포나 조직에서 발현하고 있는 mRNA의 차이를 찾아내는 방법이다. 본 실험에서는 CD4를 활성화시킨 세포주와 대조 세포주에서 그 발현에 차이를 보이는 유전자를 찾고자 하였다. 각각의 세포주의 total mRNA로부터 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 만들고 poly A tail 과 결합하는 anchor primer와 임의의 primer를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. 증폭된 PCR products를 6% polyacrylamide gel 에 전기 영동한 후 건조하여 X-ray film 에 감광하였다. 이 후 대조군에 비하여 그 발현에 차이를 보이는 PCR 단편을 찾아내고 그 단편을 다시 증폭시켜 northern 분석을 위한 probe로 사용하여 CD4 반응 여부를 규명하였다.



(그림 2) 인간 혈액으로부터 자장을 이용한 CD4⁺ T 세포의 분리

5. PCR based Subtractive Library 제조

PCR based subtractive cDNA cloning은 서로 다른 조건하의 세포로부터 다르게 발현되는 유전자를 찾는 방법중의 하나다. Macrophage에서 LPS반응 유전자를 분리할 경우, LPS가 처리된 세포를 tracer 세포라 하고 대조 세포를 driver 세포라 할 수 있다. 이 후 각 세포로부터 mRNA를 분리하고 cDNA를 만든 후에 32P로 표지된 tracer 세포의 cDNA에 biotinylated dUTP로 표지된 driver 세포의 cDNA를 과량 가한 후 hybridization 하게 되면 양쪽 세포에 동일하게 분포하는 cDNA는 tracer 와 driver의 cDNA와 hybrids를 형성하는 반면에 tracer 세포에 과량으로 존재하는 cDNA는 그 자체로 hybrids를 형성한다. 따라서 과량의 driver hybrids와 tracer 및 driver 사이의 hybrids를 streptavidin magnetic bead를 이용하여 subtraction 단계에서 제거하면 tracer세포에서 과량으로 존재하는 cDNA가 농축되게 된다. 이 과정을 반복함으로써 LPS에 반응하는 유전자를 얻을 수 있다.

6. Reverse Northern을 이용한 colony hybridization

Subtractive library에서 얻어진 유전자 모두가 positive clone은 아니다. 따라서 이러한 false positive clone들을 제거하기 위해 reverse northern blot 방법을 이용하였다. 각각의 subtractive library cDNA를 PCR cloning vector를 이용하여 cloning 하고 E. coli competent cell에 transformation 시킨다. Transformed E. coli 들을 IPTG-X gal plate에 spreading 한 후 cDNA가 들어간 균주만 선택하여 agar plate 위의 nitrocellulose에 spotting을 하였다. 이 후 약 12시간이 경과한 후 이 membrane을 CD4가 활성화된 세포주의 mRNA로부터 얻은 cDNA와 대조 세포주의 cDNA를 probe로 이용하여 colony hybridization을 한다.

7. Northern blot 분석

CD4 stimulation후 여러 시간에 따라 acid-phenol 방법으로 RNA를 추출하여

정량한 후 formaldehyde agarose 전기영동에 의해 RNA를 분석하여 nylon membrane에 transfer하였다. 이러한 blot은 위의 여러 방법으로 밝혀진 다르게 발현되는 유전자를 probe으로 사용 northern 분석을 하였다. DD-PCR에서 다르게 발현되는 유전자는 gel에서 DNA를 추출한 후 같은 primer를 써서 증폭하였으며, PCR-based subtractive cDNA library에서 다르게 발현되는 각각의 클론은 PCR에 의해 증폭하고 증폭된 DNA fragment를 직접 random priming방법으로 probe을 합성 분석하였다.

8. 염기서열 결정 및 Database 탐색

Subtraction 방법을 이용하여 얻어진 clone들은 automatic DNA sequencer (Perkin Elmer, ABI 310)를 이용하여 그 염기 서열을 결정하였다. 그 염기 서열은 NCBI의 BLAST program을 이용하여 분석하였다.

제 2 절 연구내용

1. 면역세포 활성화 조건 확립

세균이나 바이러스의 감염시 발생하는 신호에 의해 면역세포들이 활성화되고 새로운 형태의 유전자 발현이 유도되는 변화 과정을 규명하고자 하였다. 우선 세포주를 이용하여 감염현상을 재현하기 위하여 T 세포에서는 CD4 antibody를 이용하여 CD4 crosslinking을 함으로써 T 세포 활성화를 유도하고자 하였으며 대식세포에서는 패혈증의 원인인 세균의 LPS를 처리하여 유도되는 유전자 발현의 변화를 조사하고자 하였다. 각각의 면역세포의 활성화를 알아보기 위해서 CD4+ T cell의 경우에는 이미 알려진 Lck의 phosphorylation 정도를 조사하였고 대식세포의 경우에는 crg2 유전자의 발현을 northern blot analysis 를 통하여 조사하였다. 따라서 다음 두 주제에 대하여 각각 실험을 진행하였다.

가. CD4+ T 세포의 활성화

나. LPS에 의한 대식세포 활성화

2. 자장을 이용한 Primary CD4+ T 세포의 분리

면역세포에서 얻어 낸 세포주를 이용한 실험은 실제 인체내의 면역세포와는 다른 생리적 성격을 가질 가능성이 있다. 그러므로 인체에서 바로 분리한 면역세포를 이용하여 그 유전자 발현의 변이를 조사하는 것이 중요하나 순수한 형태로 특정한 면역세포를 분리하는 것이 쉽지 않다. 그러므로 본 과제가 성공적으로 종료되었을 때 후속 연구의 바탕을 마련하고자 primary 면역세포를 순수 분리하는 방법을 확보하고자 하였다. 이를 위하여 CD4 T cell에만 한정적으로 발현하는 항원을 인식하는 항체를 자석으로 표지한 항체를 이용하여 CD4 T cell을 순수 분리하는 방법을 사용하였다. 또한 이렇게 분리된 세포의 순수도를 검증할 수 있도록 유세포 분리기를 활용하는 방법을 확립하였다. 따라서 다음 두 주제의 실험을 수행하였다.

- 가. Magnetic으로 표지된 항체를 이용하여 CD4+ T 세포 추출
- 나. 유세포 분리기를 이용한 CD4+ T 세포 순수도 검측

3. CD4+ T 세포의 활성화에 의해 조절되는 유전자 탐색

면역세포 활성화시 차등 발현되는 유전자들을 효과적으로 탐색하기 위하여 DD-PCR을 이용한 방법과 subtractive library를 제조하는 방법 모두를 병행하여 사용하였다. 특히 각각의 방법에서 false positive를 제거하기 위해 reverse colony hybridization을 수행하는 방법을 도입하여 사용하였다. 이러한 실험 도중 specific한 유전자의 증폭을 확인하기 위해 검증에 주력하였으며 그 결과로 얻어진 후보 유전자 모두를 각각 Northern blot analysis로 검증하는 과정을 거쳤다. 이를 위해 다음의 주제로 대변되는 실험들을 수행하였다.

- 가. DD-PCR에 의한 발현 유전자 탐색
- 나. PCR-based subtractive cDNA library 제조 조건 확립
- 다. reverse colony hybridization방법 검증을 통한 탐색방법의 효율성 개선
- 라. 차등 발현되는 유전자 탐색을 위한 northern analysis

4. LPS 처리시 발현이 유도되는 유전자 탐색

면역 특이 유전자군의 탐색을 성공적으로 수행하기 위해 연구 대상을 T cell에만 국한시키지 않고 다른 종류의 면역세포로 확대하였다. 특히 세균 감염시 발생하는 LPS 신호는 패혈증의 주요 원인이 되므로 LPS에 의해 유도되는 대식세포의 유전자를 밝혀내는 것이 패혈증 기전 연구뿐 아니라 이를 활용한 치료방법 개발을 위한 연구에도 필수적으로 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 subtractive library 제조를 통하여 LPS에 의해 유도되는 유전자들을 찾아 그 기능을 분석하는 다음과 같은 주제의 실험을 진행하였다.

- 가. LPS 처리 조건 확립

- 나. Subtractive Library 제조
- 다. 후보 유전자 염기배열 순서 결정
- 라. Database 검색을 통한 후보 유전자의 기능 유추
- 마. Northern 분석을 이용한 후보 유전자의 발현 형태 조사

5. LSG1 유전자의 기능 분석

LPS에 의해 유도되는 유전자 탐색연구를 통하여 새로운 유전자를 찾아내어 LSG1 (LPS stimulating gene 1) 이라 명명하였다. 이 유전자의 면역 특이적 기능을 규명하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

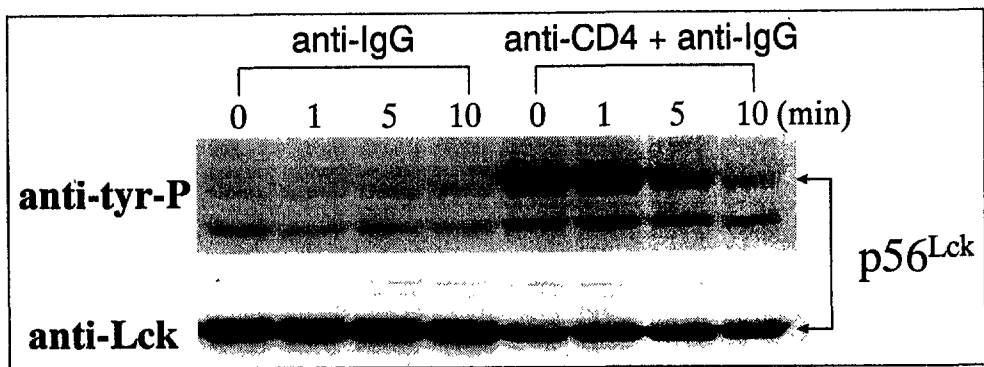
- 가. LSG1 유전자의 full length cDNA cloning
- 나. LSG1 유전자의 유사유전자 탐색을 위한 database 검색
- 다. LSG1의 발생 특이적 발현 형태
- 라. LSG1의 발현 kinetics
- 마. LSG1 발현 유도에 관련하는 kinase pathway 탐색
- 바. Cell cycle profile of LSG1

제 3 절 연구결과

1. 면역세포 활성화 조건 확립

가. CD4+ T 세포의 활성화

CD4에 의해 발현되는 유전자를 찾기 위해 T세포주(CEM-T4)를 이용하여 CD4를 cross-linking함으로써 CD4를 활성화시켰다. 기존에 CD4가 활성화되면 세포내 lck tyrosine kinase의 tyrosine 위치의 인산화가 증가됨이 알려져 있으므로 CD4의 활성화는 lck 단백질의 tyrosine 인산화여부를 western blot 방법을 이용하여 조사함으로써 알 수있다. 아래 그림 3에서 보는 바와 같이 anti-CD4 antibody를 이용하여 CD4를 활성화시키면 1분 이내에 lck 단백질의 tyrosine 인산화가 대조군에 비하여 현저하게 증가되고 이후 서서히 감소하고 있음을 관찰 할 수 있었다. 따라서 이 결과로부터 CD4+ T 세포의 활성화 조건이 확립되었음을 알 수 있었다.



(그림 3) lck 및 phosphotyrosine antibody를 이용한 western 분석

나. 세포 표면 단백질의 변화 추적

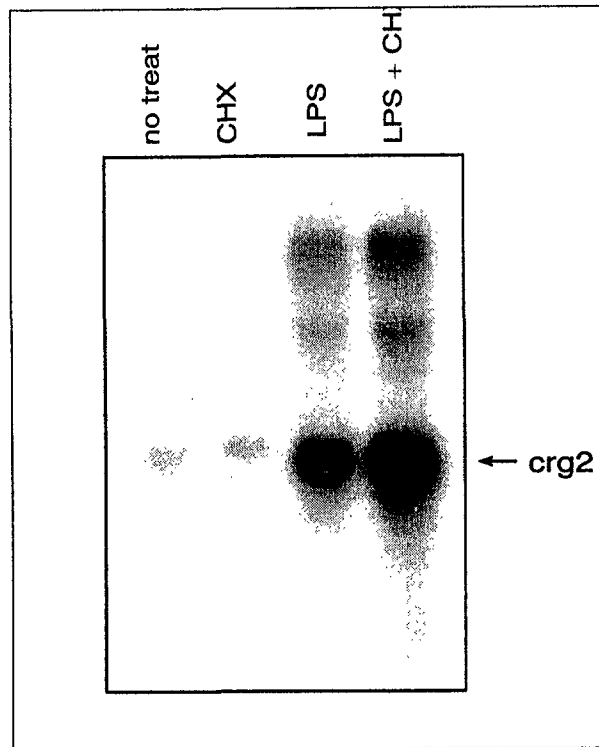
T 세포가 활성화되면 세포면에 위치하는 여러 단백질분자의 표현이 달라지게 되는데, 특히 CD4의 자극후 integrin 의 일종인 VLA-4의 발현이 현저히 감소함을 볼 수 있었다. 그러나 여러 다른 세포면 단백질의 (예, CD45, CD71, CD95 등) 변화는 관찰할 수 없었다.

다. LPS에 의한 대식세포 활성화

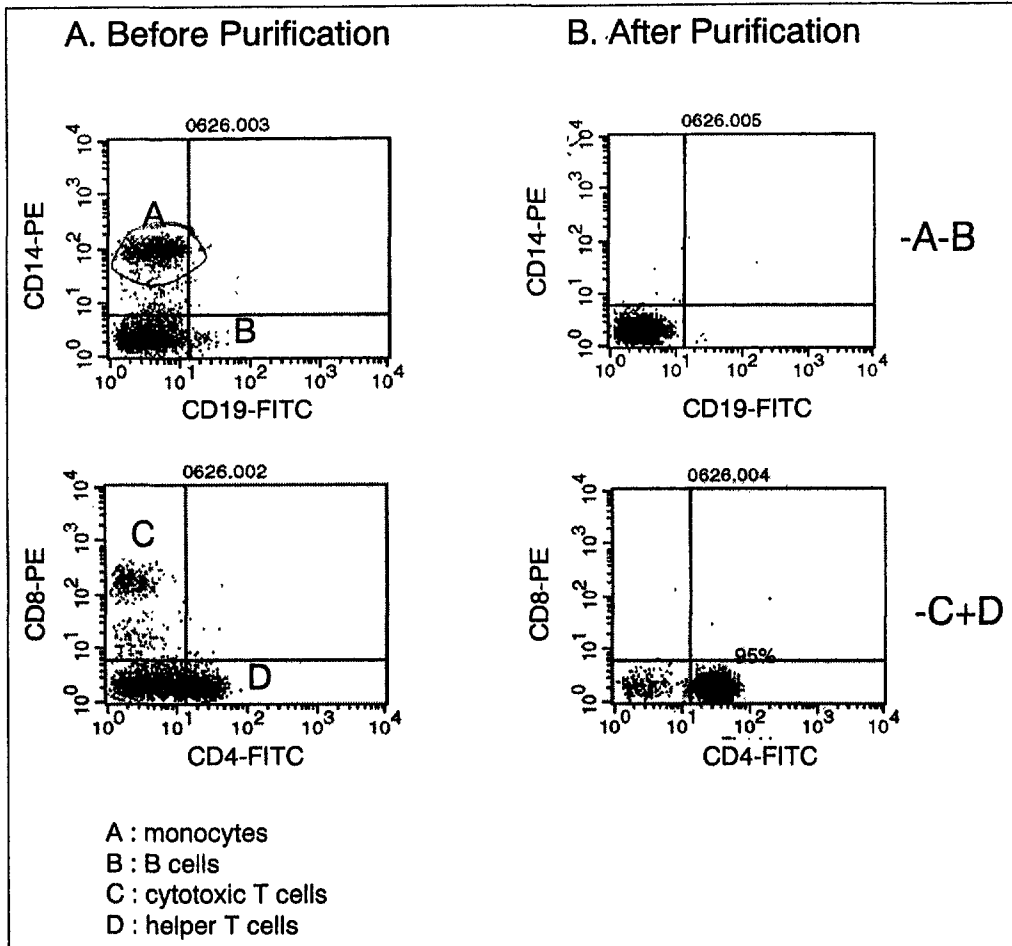
LPS에 의한 대식세포의 활성화는 기존에 LPS에 의해 발현이 증가된다고 알려진 *crg2* 라는 유전자의 발현 증가 여부로 활성화 조건을 확립하였다. RAW264.7 이라는 대식세포 세포주를 이용하여 LPS를 처리하고 4시간이 경과한 후에 total RNA를 분리하였다 이 후 northern blot 방법을 이용하여 *crg2* 유전자의 발현을 측정하였다. 아래 그림 4에서 보는 바와 같이 *crg2* 유전자의 발현이 대조군에 비해 현저하게 증가되어 있음을 관찰할 수 있었다. 또한 본 실험에서는 초기 단백질의 합성 없이도 LPS에 의하여 유도되는 초기반응 유전자를 찾기 위하여 cycloheximide(CHX)라는 단백질 합성 저해제를 함께 사용하였다.

2. 인간 혈액으로부터 자장을 이용한 CD4+ T 세포의 분리 및 순수도 검증

신선한 인간 혈액으로부터 Ficoll Hypaque density gradient 방법을 이용하여 말초혈 단핵세포(PBMC)를 분리한 후 자장을 이용하여 CD4+T 세포를 분리하였다. 이후 분리된 CD4+T 세포는 유세포 분석기를 이용하여 그 순수도를 측정하였다. 아래 그림 4에서 보는 바와 같이 신선한 인간 혈액으로부터 분리된 말초혈 단핵세포(PBMC)의 조성을 보면 monocyte가 40 %, B 세포가 3 %, cytotoxic T 세포가 14%, CD4+ T 세포가 31%로 구성되어 있음을 알 수 있다. 이 후 자장을 이용하여 CD4+T 세포를 분리했을 경우에 90%이상의 세포가 CD4+ T세포임을 확인할 수 있었다 (그림 5).



(그림 4) *crg2* 유전자를 이용한 northern 분석



(그림 5) CD4⁺ T 세포의 분리 및 FACS를 이용한 순수도 검증

3. CD4+ T 세포의 활성화에 의해 조절되는 유전자 탐색

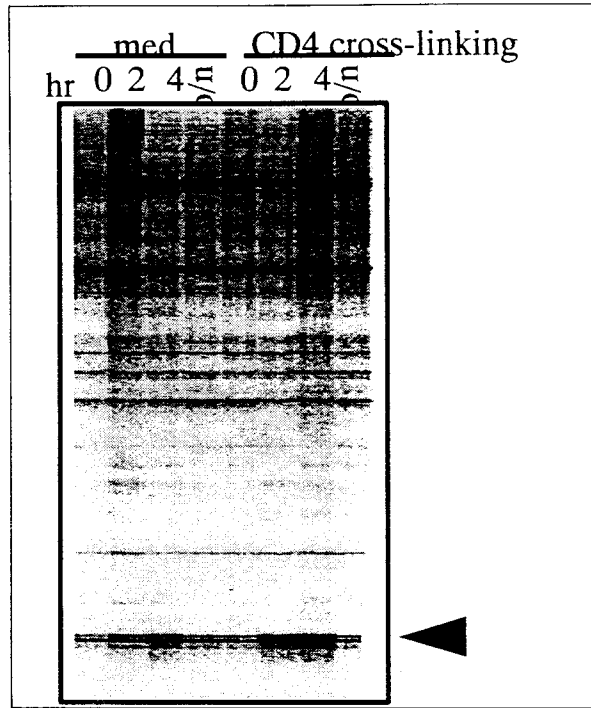
가. DD-PCR에 의한 발현 유전자 탐색

DD-PCR에 의한 발현 유전자의 탐색을 위해 T 세포주의 CD4를 활성화시킨 후 3시간 및 6시간이 경과한 후의 RNA를 사용하였다. 이 후 그림 6에서 보여졌듯이 DD-PCR법에 의하여 대조군에 비하여 CD4를 활성화시킨 경우에 더 많이 발현되는 clone들을 선택하였다. 아래 표에 보는 바와 같이 CD4의 활성화에 의해 발현이 유도되는 55개의 clone들을 획득할 수 있었으며, 또한, CD4의 활성화에 의해 발현이 억제되는 5개의 clone도 분리할 수 있었다. 이 각각의 후보 유전자를 이용하여 동위원소로 표지한 후, 각각의 northern blot을 수행하였다. 한번에 2개 또는 3개의 표지 probe를 사용하였다. 그러나 결과에서 보는 것처럼 CD4 자극 후 현저하게 차이를 보이는 유전자를 찾을 수 없었다 (그림 7).

나. PCR-based subtractive cDNA library 제조 조건 확립

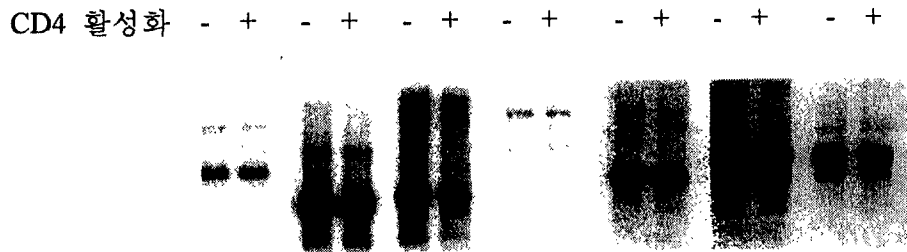
PCR-based subtractive cDNA library를 제조하기 위하여 T 세포주의 CD4를 활성화시킨 후 4시간이 경과한 후의 RNA를 사용하였으며, 이로부터 cDNA를 만든 후에 subtraction을 수행하였다. 기존에 최적의 subtraction을 위해서는 가하는 driver의 양과 hybridization시간을 곱한 값($R0t$)이 1000이상이어야 함이 알려져 있었기 때문에 본 실험에서는 그 조건을 충족하고자 하였다. 아래 그림 8에서 보는 바와 3차에 걸친 subtraction이 수행되었으며 2차 및 3차의 경우는 $R0t$ 값이 1000 이상이 되도록 하였다.

1차 subtraction시에는 약 200 ($R0t$) 정도의 과다한 driver cDNA를 이용하여 tracer cDNA를 처리한 결과 95% 이상의 tracer cDNA를 제거할 수 있었다. 여기서 subtraction이 되지 않고 남은 tracer cDNA를 PCR로 증폭하여 약 2000 ($R0t$) 정도의 과다한 driver cDNA로 2차 subtraction을 한 결과 99%의 1차 subtracted tracer cDNA를 제거할 수 있었다. 여기서 다시 한번 subtraction 되지 않고 남은 tracer cDNA를 PCR로 증폭하여 2500 ($R0t$) 이상의 driver cDNA로 3차 subtraction을 수행하였다.



- 활성 CD4에 의해 발현이 유도된 후보유전자
 - CD4 Ab결합 3hr 후: 20 개
 - CD4 Ab결합 6hr 후: 35 개
 -
- 활성 CD4에 의해 발현이 억제된 후보유전자
 - CD4 Ab결합 3hr 후: 2 개
 - CD4 Ab결합 6hr 후: 3 개

(그림 6) CD4 활성화된 T 세포에서 차등 발현되는 유전자를 찾기 위한 DD-PCR의 결과



(그림 7) DD-RTPCR screen에서 찾아낸 후보 유전자의 Northern 분석 결과
 각 lane의 왼쪽이 CD4 활성화 전 오른쪽이 활성화 후 세포에서 추출한 mRNA이다

3차 subtraction 시에는 2500 (Rot) 이상의 driver를 사용하였음에도 불구하고 40% 이상의 2차 subtracted tracer cDNA가 남아 있었다. 그러므로 이 사실은 3차 subtraction 후에 hybridization 방법으로 제거할 수 있는 대부분의 cDNA는 제거하였음을 보여 주고 있다 (그림 8).

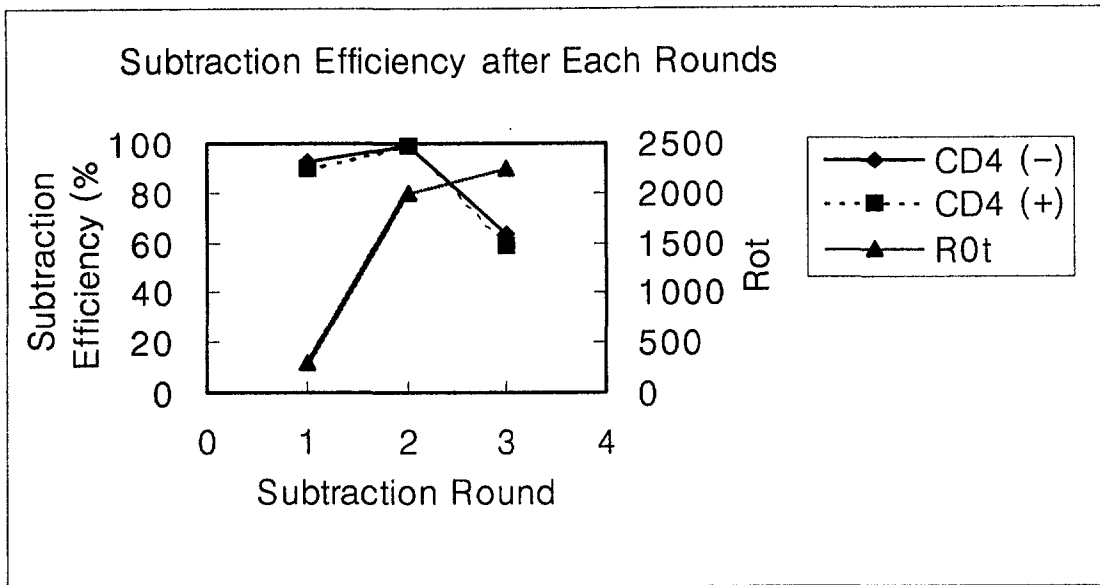
다. 차등 발현되는 유전자 탐색

제조한 subtractive cDNA library로부터 차등 발현되는 유전자를 탐색하기 위하여, 먼저 reverse colony blot 방법을 이용하여 false positive clone들을 제거하고자 하였다. subtractive library로부터 얻은 1000개의 clone들 중에서 colony hybridization을 통하여, 대조군이 아니라 CD4를 활성화시켰을 때 그 신호가 증가되는 100여개의 clone들을 선별하였다 (그림 9). 이 후 이 clone들의 염기 서열 분석 및 northern blot 분석 방법을 통하여 차등 발현여부를 규명하였다.

4. LPS에 처리시 발현이 유도되는 유전자 탐색

가. PCR-based subtractive Library 제조

LPS 처리시 발현이 유도되는 유전자 탐색을 위하여 대식세포 세포주에 LPS를 처리하고 4시간이 경과한 후의 RNA를 사용하였으며, 이로부터 cDNA를 만든 후에 subtraction을 수행하였다. 과량의 driver cDNA를 이용하여 5차에 걸친 subtraction을 수행하였으며 이 후 만들어진 subtracted library의 quality를 slot 및 northern blot 방법을 통하여 측정하였다(그림 10, 그림 11). 먼저 5차에 걸친 subtraction을 수행한 library cDNA와 subtraction 이 되지 않은 cDNA를 이용하여 slot blot을 만들고 GAPDH 및 *crg2* 유전자를 이용하여 hybridization을 수행하였다. 결과에서 보는 바와 같이 LPS 반응 유전자가 아닌 GAPDH의 경우에는 subtraction 후에 그 양이 현저하게 감소되어 있음을 관찰할 수 있었으며, LPS 반응 유전자로 알려진 *crg2*의 경우에는 subtraction 후에도 약 2.4배 증가된 상태로 그 유전자가 유지되어 있음을 관찰할 수 있었다. 또한 대조군 및 LPS를 처리한 군의 RNA를 사용하고 subtracted library의

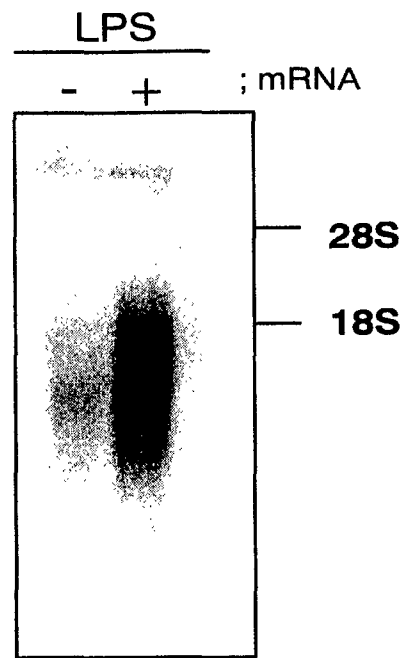


(그림 8) PCR-based subtractive cDNA library 제조 조건

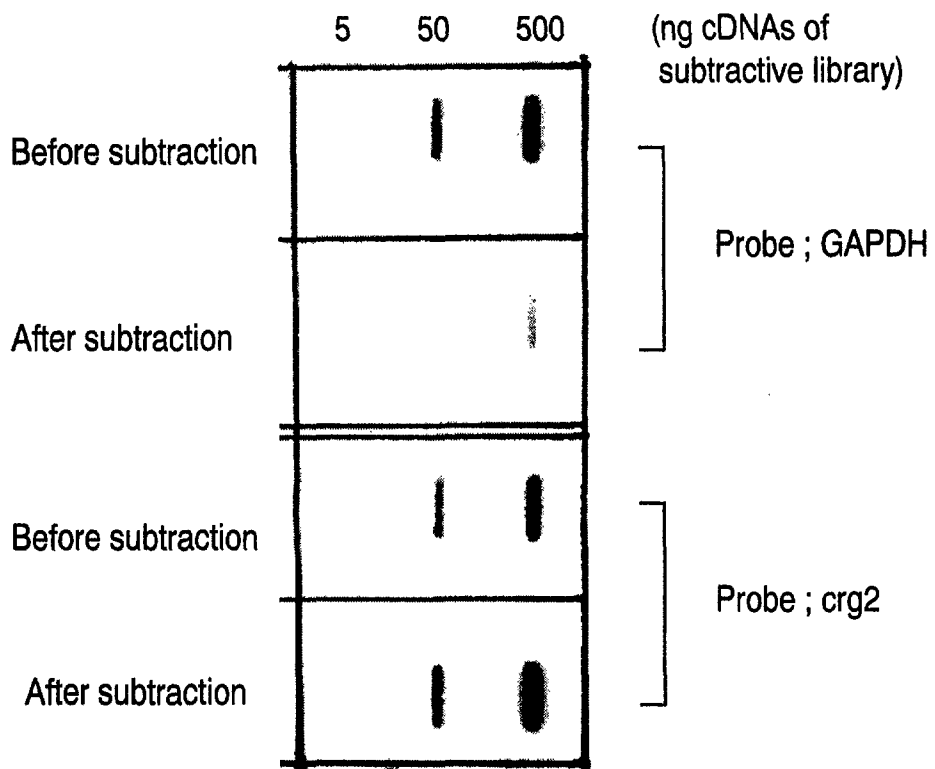


(그림 9) Reverse colony hybridization analysis.

Clones isolated by PCR-based subtractive cloning method were ligated with pKS-bluescript vector and 80 colonies were selected from control (A) and CD4 stimulated sample (B). Probes for reverse colony hybridization were prepared with total RNA from control or CD4 stimulated cells.



(그림 10) northern blot을 이용한 subtraction 효과 분석



(그림 11) slot 분석을 이용한 GAPDH 및 crg2 유전자 분석

cDNA를 probe로 하여 northern blot 분석을 한 결과, LPS를 처리한 군에서 현저하게 강한 신호를 관찰할 수 있었다. 따라서 이상의 결과로부터 subtraction이 잘 진행되었음을 확인할 수 있었다.

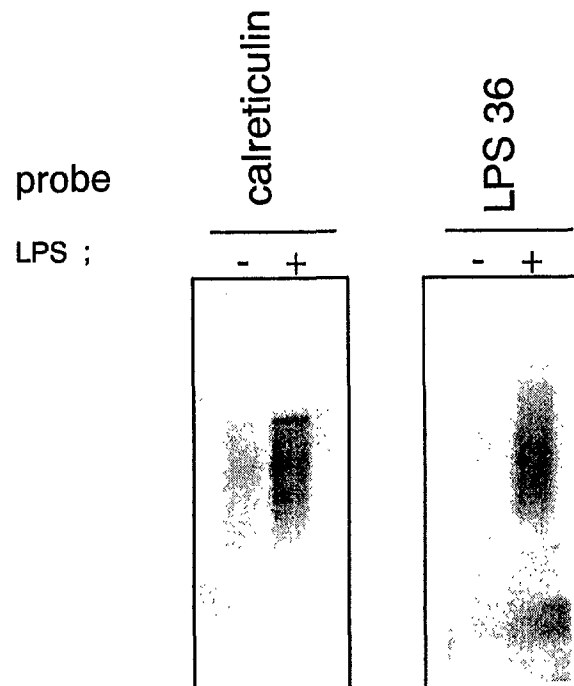
나. 후보 유전자 염기배열 순서 결정 및 Database 검색을 통한 후보 유전자의 기능 유추

5차의 subtraction 후에 얻어진 library로부터 얻어진 LPS 반응 후보유전자 100개를 선정하여 그 염기 배열 순서를 결정하였다. 이로부터 Database 검색을 통해 기존에 그 염기배열순서가 알려진 22개의 유전자와 알려지지 않은 37개의 유전자를 찾을 수 있었다. 위의 표에 정리된 것은 염기배열순서가 알려진 유전자를 그 기능에 맞추어 분류해 놓은 것이며 기존에 LPS 반응유전자로 알려진 것은 굵은 글씨로 표기하였다 (표 1).

다. Northern 분석을 이용한 후보 유전자의 발현 형태 조사

기존에 LPS 반응유전자로 알려지지 않은 후보 유전자들은 northern 분석을 수행하였다. 아래 그림 12 에서 보는 바와 같이 caretulin과 그 기능이 보고되지 않은 유전자 LPS 36이 새로이 규명된 LPS 반응유전자들이며 그 외에는 LPS에 의해 그 발현이 증가되지 않았다. 이 결과들은 아래 그림에서 볼 수 있으며 나머지 후보 유전자들에 대해서도 northern 분석을 진행하였다.

1) 발현에 차이를 보이는 clones



2) 발현에 차이가 없는 clones

- Cyclophilin related protein
- Mouse Ia - associated invariant chain
- LPS 34

(그림 12) Northern 분석을 이용한 후보 유전자의 발현 형태

Sequenced clones	100		
Known clone	22	1) signal transduction related protein : I-kappa B alpha chain MARCKS-related protein pip92 2) transcription factor : LRG-21 Egr-1 3) enzyme : transketolase fructose-6-phosphate, 2-kinase aspartic protease-like protein cyclophilin-related protein 4) structural protein : gamma actin alpha - tubulin 5) ribosomal protein : ribosomal protein S6 ribosomal protein L5 6) others : Moloney murine leukemia virus ania-6 nucleolin poliovirus receptor homolog (MPH) interferon-induced Mx2, Mouse Ia-associated invariant chain calreticulin macrosialin B94	3 2 4 2 2 9
Unknown clone	37		

(표 1) subtractive library로부터 얻은 LPS 반응 후보유전자들

5. LPS에 의해 유도되는 유전자들 (LSG)의 기능 분석

가. LSG1 유전자의 full length cDNA cloning

LPS 처리시 대식세포 내에서 그 발현이 유도되는 유전자들 중 새로운 유전자들을 LPS stimulating gene (LSG)라 명명하고 그 중 LSG1 유전자에 기능을 집중 분석하였다. cDNA library screening은 RAPID-SCREEN cDNA library PANELS from fetal mouse (OriGene)을 사용하였으며 PCR-based subtractive cDNA cloning 방법을 통해서 얻은 clone에서 PCR primer를 이용하여 screening 하였다. 그 결과 2 개의 positive clone들을 찾아내었으며 이들 cDNA들의 염기배열 순서를 결정하였다. 그 결과 532 개의 아미노산으로 이루어진 새로운 단백질을 coding 하는 유전자임을 밝힐 수 있었다.

나. LSG1 유전자의 유사유전자 탐색을 위한 database 검색

LSG1 단백질이 가지고 있는 기능을 유추하기 위한 첫 단계로서 우선 그 단백질의 일차구조를 분석하였다. LSG1과 유사한 sequence를 가지는 유전자를 찾기 위해 BLAST computer program을 이용하여 지금까지 발표된 모든 유전자의 sequence와 비교 검색한 결과 LSG1은 N-terminal sequence가 cyclin과 homology를 보이고 C-terminal에 splicing factor들에서 주로 발견되는 RS-rich domain을 가지고 있었다. 이러한 사실은 LSG1의 기능이 cell cycle과 연관되어 RNA processing을 조절하는 기능을 가지고 있을 것이라는 사실을 암시하고 있다. 따라서 LSG1은 LPS에 의한 자극이 있을 때 세포주기에 따라 RNA splicing등을 조절하는 유전자 발현의 조절자 기능을 가지고 있으리라 생각된다.

다. LSG1의 발생 특이적 발현 형태

LSG1의 조직내 발현을 Multiple Tissue Northern Blot(Clonetech)을 이용하여 측정하였으나 어떠한 signal도 관찰할 수 없었다. 따라서 이 유전자는 heart,

brain, spleen, lung, liver, skeletal muscle, kidney, testis 등에서의 기본적인 발현은 미약하거나 거의 없는 것으로 생각된다. 그러나 특별한 경우 예를 들면 세균 감염등과 같은 특정 signal(ex, LPS)의해 발현이 증가되는 protein으로 생각된다.

라. LSG1의 발현 kinetics

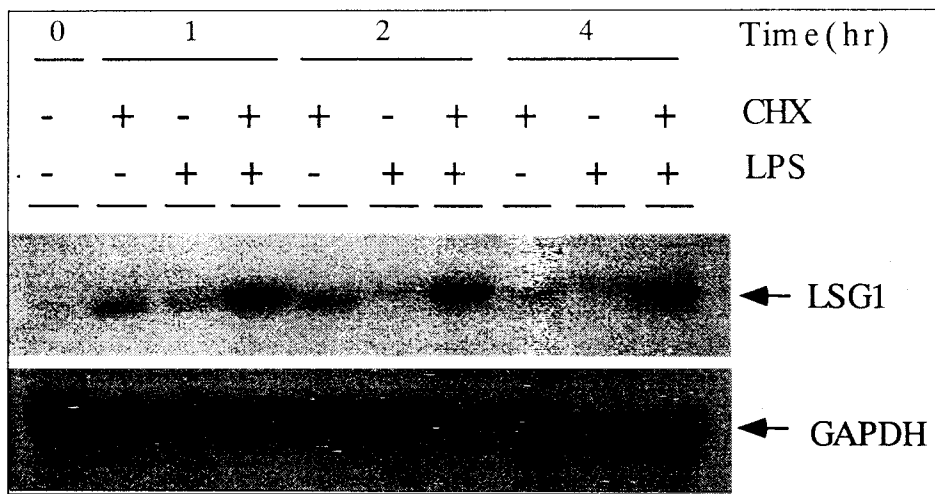
LSG1의 발현은 LPS만 단독으로 처리할 경우에 비해 CHX와 같이 처리할 경우, 그 발현이 현저하게 증가된다(LPS 처리 1시간인 경우 약 10배 이상 증가된 signal을 관찰 할 수있다). LPS 처리 1시간까지 증가된 그 발현은 2시간까지 계속 유지되다가 이 후 서서히 감소하는 profile을 관찰할 수 있었다. 그러나 LPS 단독으로 처리한 경우에는 detectable band를 관찰 할 수 없었다. CHX 단독으로 처리한 경우에도 약간의 증가를 관찰 할 수 있었으나 CHX 및 LPS를 공동으로 처리한 경우에 비해 현저하지 않았다 (그림 13).

마. LSG1 발현 유도에 관련하는 kinase pathway 탐색

LPS에 의해 유도되는 LSG1의 발현에 관여하는 Kinase pathway를 밝히기 위하여 각종 kinase inhibitor의 존재 하에 대식세포를 LPS로 활성화시킬 때 LSG1의 발현에 영향을 주는 kinase inhibitor의 종류가 무엇인지를 조사하였다.

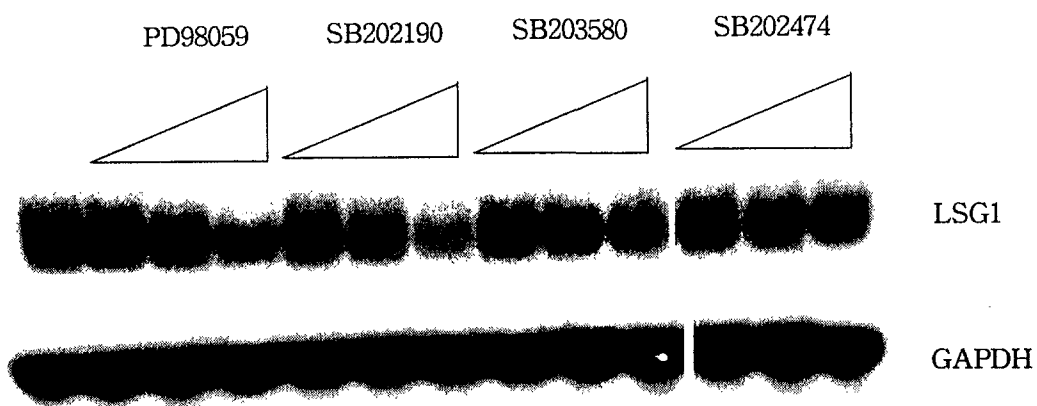
(1) The expression of LSG1 by MAPK pathway

LPS는 macrophage의 강력한 stimulator로서 cell surface receptor로 부터 다양한 signal 을 세포내로 전달하고 있음이 알려져 있다. 이 중 잘 알려진 signal pathway의 하나로 MAPK pathway가 있으며, LPS에 의해 생산되는 TNF-a나 IL-1b 도 이 pathway를 경유함이 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 MAPK family의 specific inhibitor를 이용하여 LSG1의 발현을 관찰하고자 하였다. 먼저 MAP kinase kinase(MEK) 인 PD98059를 처리했을 때 5uM의 농도에서 약 2배정도 그 발현을 억제하고 있으며, 이 값은 기존에 이 약물의 IC50가 10uM이므로 이 값과 유사한 결과를 나타내므로 LSG1의 발현은 MEK에 의해 조절되고 있음을 알 수 있다. 또한 MEK의 down



(그림 13) Fig. 1. Time kinetics of LSG1 in lipopolysaccharide(LPS)-treated RAW264.7 cells.

Total RNAs were isolated from cells treated with or without CHX(10ug/ml) and LPS(1ug/ml). CHX was pretreated for 30 min prior to addition of LPS. 30ug of total RNAs were used for each lane.



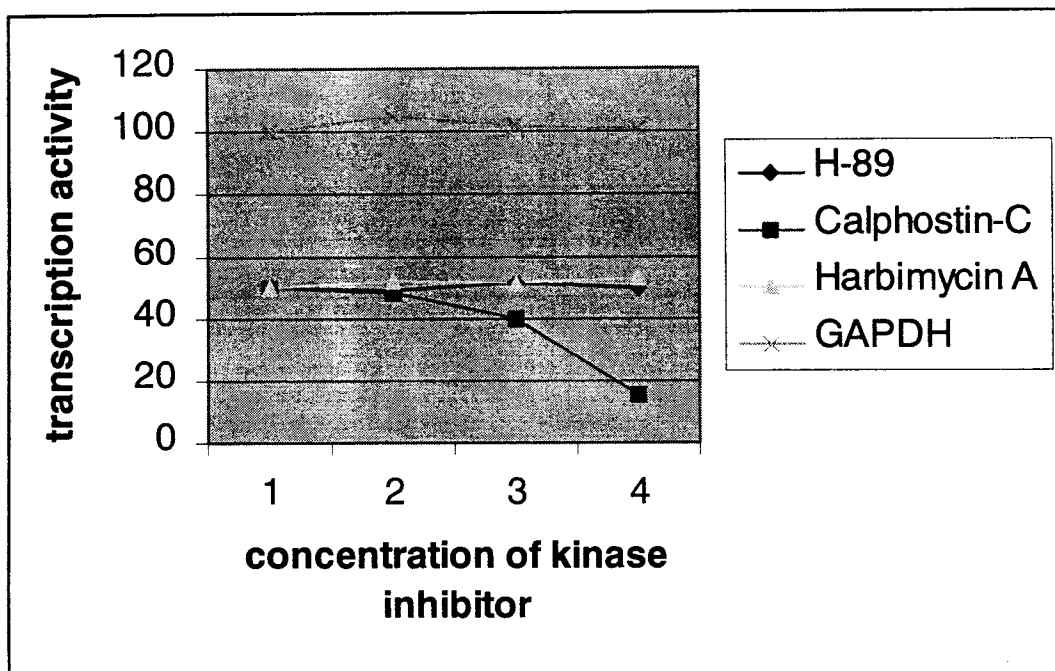
(그림 14) The effect of MAPK inhibitors in LSG1 expression.

RAW264.7 cells were pretreated with the indicated MAPK inhibitors and CHX for 1 hour, then stimulated with LPS for 1 hour. Total RNAs were prepared and runned on 1% agarose gel. 30ug of total RNAs were used for each lane.

stream kinase인 p38, p38b kinase inhibitor인 SB202190을 처리했을 때 2uM의 농도에서 약2배 정도 발현을 저해함을 알 수 있었고, p38 kinase의 specific inhibitor인 SB203580을 처리했을 경우 20uM의 고농도에서도 큰 저해능을 관찰할 수 없었다. 따라서 LSG1의 발현은 MEK및 p38b kinase를 통해서 발현이 조절되고 있음을 알 수 있다 (그림 14).

(2) The expression of LSG1 in PKA, PKC, Tyrosine kinase pathway.

LPS를 통해 전달되는 signal pathway에서 잘 알려진 kinase 로는 PKA, PKC, 그리고 Tyrosine kinase 등이 있다. 따라서 LSG1의 발현에 있어서 이 들 kinase의 역할을 규명하고자 하였다. 먼저 Protein Kinase C의 specific inhibitor인 Calphostin-C를 처리했을때 0.1uM의 농도에서 그 발현이 현저하게 저해됨을 관찰 할 수 있었으며 이 결과는 이 약물의 IC50값 (50nM)과 잘 일치하고 있다. 또한 Protein Kinase A의 specific inhibitor인 H-89 를 처리했을 때 10uM의 농도에서 약 50%의 발현저해능을 관찰 할 수 있었다. 이 결과는 Calphostin-C를 처리했을때와 비교해 볼 때 그 inhibition능이 크지 않았다. 따라서 LSG1의 발현은 protein kinase c pathway를 통해 조절되고 있음을 알 수 있다. 한편, LPS를 처리한 후에 관찰되는 특징증의 하나는 세포내 단백질의 tyrosine phosphorylation이며, 많은 LPS response gene이 이 phosphorylation을 억제할 경우, 그 발현이 저해됨을 관찰해 왔다. 따라서 LSG1의 발현이 tyrosine kinase 에 의해 제어되고 있는 지를 알아보기 위하여 tyrosine kinase 의 specific inhibitor인 Herbimycin A를 처리하여 그 발현을 조사했다. 결과에서 보는 바와 같이 흥미롭게도 LSG1의 발현은 2uM의 고농도에서도 저해되지 않았다. 따라서 LSG1의 발현은 많은 LPS response gene 과 달리 tyrosine kinase independent pathway를 통해 조절되고 있음을 알 수 있다 (그림 15).



(그림 15) The effect of protein kinase A, C and tyrosine kinase inhibitor in LSG1 expression. 각각의 Kinase inhibitor의 농도를 증가시켰을 때 발현되는 LSG1의 level을 Northern blot으로 측정한 결과 Calpostin-C 만이 LSG1의 발현을 억제하는 사실을 알 수있다. Northern analysis의 control로 각 GAPDH 의 발현을 동시에 조사하였다. (RAW264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of Kinase inhibitors and CHX for 1hr, then stimulated with LPS for 1hr. Total RNAs were prepared and run on 1% agarose gel. 30ug of total RNAs were used for each lane.)

바. Cell cycle profile of LSG1

LSG1 protein은 n-terminal에 모든 cyclin protein 에서 발견되는 cyclin-box domain을 가지고 있어 먼저 이 단백질이 세포 주기 의존적으로 발현되는가를 관찰하고자 하였다. 세포주는 NIH3T3를 사용하였으며 96시간 동안의 serum deprivation 후에 5% calf serum으로 cell proliferation을 stimulation시켰다. 시간은 3시간 간격으로 24시간까지 측정하였다. 결과는 이 시간동안에 band를 관찰 할 수 없었으며 어떠한 stimulation도 없었다. 대조군으로는 LPS와 CHX가 처리된 RAW264.7 cell 의 total RNA를 사용하였다.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절. T 세포주에서 CD4 에 의해 발현되는 유전자 탐색

내용	최종 목표달성도
1. CD4에 의한 세포의 활성화 조건 확립	100%
2. DD PCR 을 이용한 차등 증폭된 PCR 절편 탐색	100%
3. 차등 증폭된 60 종의 DD PCR 절편 발현형태 Northern 확인	100%
4. PCR-based Subtractive Library 제조	100%
5. reverse colony hybridization으로 차등 발현후보 유전자확보	100%
6. 차등발현 후보 유전자군 발현형태 조사	100%
7. 차등 발현 후보 유전자군의 염기배열 순서 결정	100%

제 2 절. 차등 발현 유전자 탐색을 위한 primary T 세포 분리

내용	최종 목표달성도
1. 자성 세포분리기를 이용한 Primary T 세포 분리법 개발	100%
2. 유세포분리기를 이용한 Primary T 세포의 순수분리 확인	100%
3. Primary T 세포 활성화 조건 확립	100%

제 3 절. LPS에 의해 조절되는 유전자 확보

내용	최종 목표달성도
1. LPS 처리 조건 및 대식세포 활성화 조건 확립	100%

2. LPS 처리 대식세포의 Subtractive Library 제조	100%
3. 100개의 Subtractive Library clone 염기배열 순서 결정	100%
4. subtractive clone의 유사 유전자 DATABASE 탐색	100%
5. subtractive clone의 발현형태 Northern 확인	100%

제 4 절. 유전자 기능 분석

내용	최종 목표달성도
1. Northern으로 확인된 LPS 유도 차등발현 유전자 (LSG1) cloning	100%
2. LPS 유도 차등발현 유전자 (LSG1)의 full sequence 결정	100%
3. LSG1 유전자의 sequence motif 탐색	100%
4. LSG1 유전자의 항체 제조	100%
5. LSG1 유전자 발현 조절 기전 연구-각종 kinase의 영향조사	100%
6. LSG1의 cyclin box와 작용하는 cdk 탐색 연구	80%

이상의 연구를 통하여 본 과제 의 최종 목표인 다수의 면역세포 특이 유전자군의 확보를 성공적으로 이룰 수 있었고 그 중 일부 유전자에 대해서는 상당량의 기능연구를 수행하여 면역 조절기전의 새로운 사실을 밝혀내는 계기가 되었다. 또한 이러한 연구 과정을 통하여 수립한 subtractive library 제조 및 reverse colony hybridization의 접목방법은 차등 발현되는 유전자 탐색의 specificity를 증가시켜 줄 수 있는 새로운 시도로서 유사한 연구에 많은 도움이 되리라 생각한다. 이와 더불어 본 과제에서 찾아낸 다수의 면역 특이 유전자들은 국내 면역학 연구진 모두에게 도움이 될 수 있는 소재가 될 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

인체 및 모든 생명체의 발생과 분화 뿐만 아니라 노화, 발암, 질병의 생성과 이를 퇴치하기 위한 항암 및 면역기능 등 모두에 있어서 그 진행과정은 특정한 유전자 발현의 조절을 통하여 이루어지고 있다. 따라서 인체의 정상적인 발달을 위해서는 정교한 유전자 발현의 조절이 요구된다. 이에 대한 결함이 초래하는 다양한 질병을 치료 예방하기 위한 방편으로 유전자 전사조절에 대한 기작을 이해하고 그 응용기술의 개발이 필요한 것이다. 또한 세균, 바이러스 또는 발암물질 등의 외부자극에 의하여 세포내에서의 유전자 발현이 바람직하지 못한 방향으로 진행될 경우 이를 억제하기 위한 수단으로도 인위적인 유전자 발현 조절 기술이 매우 유용할 것이다.

현재 이를 위해 외부자극에서 부터 궁극적으로 핵내의 유전자 발현 조절 기구 에까지 그 신호를 전달하는 체계(signal transduction pathway)를 조절함으로써 유해한 외부 자극에 대한 방어나 치료 방법을 개발하려는 것이 대부분의 신약개발사업의 주요 목표가 되고 있다. 이러한 노력의 결과로 일부 성공사례가 발표되고 있으나 신호전달체계가 가지는 그 효과의 다양성(pleiotropic effect)과, 체계의 중복성(redundancy) 등의 이유 때문에 특정 목표를 대상(target)으로 작용하는 신약을 개발하기가 어려웠다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 극복하기 위한 한 방법으로 면역 세포내에서 감염에 의한 신호전달체계의 집중적 조명을 통해 유해한 외부자극에 의해 유도되는 유전자군을 발굴하여 면역 특이적 유전자 연구소재를 확보함으로써 이들 유전자들을 대상으로 하는 전사활성화 체계의 제어하는 방법연구의 기초가 되려는데 있다.

그러므로 본 과제 수행을 통하여 발굴해낸 면역특이 유전자들을 유전체연구사업 목적에 부흥하도록 관심 있는 국내 면역학 연구진들에게 공개하여 지속적인 연구가 가능하도록 할 계획이다. 특히 LSG1과 같이 새로이 발견된 면역 특이 유전자들은 박테리아 감염시 유도되는 패혈증의 기전 규명에 커다란 도움이 될 것이다. LSG1 유전자는 cyclin box와 RS-rich domain을 가지고 있으므로 대식세포의 LPS 신호에 의한

유전자 발현 유도에 있어서 주된 조절자의 역할을 할 가능성이 매우 크다. 따라서 LSG1의 Cyclin 또는 LSG1과 작용하는 kinase의 기능을 제어함으로써 면역반응을 조절할 수 있는 방법의 성공 가능성이 크며, 면역제어제의 개발연구를 위한 기초연구로서의 LSG1에 대한 지속적인 연구가 앞으로 필요한 상태이다.

제 6 장 참고문헌

1. Association of tyrosine kinase p56lck with CD4 inhibits the induction of growth through the ab T cell receptor. Lori Haughn, Sophie Gratton, et al. 1992. Nature, 358: 328-331
2. LFA-1-mediated antigen-independent T cell adhesion is regulated by CD4 and p56-lck tyrosine kinase. Fabienne Mazerolles, Christiane Barbat, et al. 1994. J. Immunology. 152: 5670-5679.
3. Control of memory CD4 T cell activation: MHC class II molecules on APCs and CD4 ligation inhibit memory but not naive CD4 T cells. Donna L. Farber, Mohammad Luqman, et al. 1995. Immunity, 2: 249-259
4. Differential functional effects of a humanized anti-CD4 antibody on resting and activated human T cells. S. J. Brett, W. Rowan, et al. 1997. Immunology, 91: 346-353.
5. Fas (CD95) expression and death-mediating function are induced by CD4 cross-linking on CD4+ T cells. Julie Desbarats, John H. Freed, et al. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 11014-11018.
6. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 tat and gp120. Michael O. Westendorf, Rainer Frank, et al. 1995. Nature, 375: 497-500.
7. Celada A. and Nathan, C. 1994. Macrophage activation revisited. Immunol. today. 15(3)100
8. Elenkov, I.J., Hasko, G., Kovacs, K.J., Vizi, E.S. 1995 Modulation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by selective alpha and beta-adrenergic drugs in mice. J. Neuroimmunol. 61(2): 123-31
9. Write, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science 249:1431.

10. Hailman et al. 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J. Exp. Med.* 179:269.
11. Subversion of the immune system by pathogens. P. Murrack and J. Kappler. 1994. *Cell*. vol. 76: 323-332.
12. Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of LPS and soluble CD14. E. Hailman, et al. 1996. *J. Immunol.* 156: 4384-4390.
13. Lipopolysaccharide induction of THP-1 cells activates binding of c-Jun, Ets, and Egr-1 to the tissue factor promoter. E.R. Group and M. Donovan-Peluso. 1996. *J. Biol. Chem.* vol. 271: 12423-12430.