

인체 B-림프구 세포에서 Ikaros 인산화가 면역세포증식에 미치는 역할 연구

김민영*, 김성진, 남선영, 김지영, 김차순, 정미선, 김희선, 표석능¹, 양광희[†], 진영우
한국수력원자력(주) 방사선보건연구원, 성균관대학교 약학대학 세포 면역학실¹
E-mail: ykhee@khnp.co.kr

중심어 : 저선량방사선, 세포증식, Ikaros, 인산화

서론

이전 연구결과에서 저선량방사선에 의해 면역세포인 B-림프구 (IM-9 세포주)의 세포증식이 촉진되었으며 이때 림프구 분화 및 발달, 증식에 중요한 조절인자인 Ikaros 단백질이 인산화됨과 동시에 Ikaros의 DNA 결합 활성능력은 감소하여 표적유전자의 발현을 유도할 수 있다는 결과를 유추할 수 있었다. 이를 바탕으로 본 연구에서는 세포증식에 영향을 미치는 Ikaros가 어떠한 잔기에서 인산화가 일어나며 이때 세포내 Ikaros 단백질의 위치이동의 변화를 확인하고자 한다. 이러한 결과를 바탕으로 저선량 방사선에 의한 Ikaros의 인산화가 세포증식에 영향을 주는 주요역할을 검증하고자 한다.

재료 및 방법

세포배양 : 인체 면역세포의 방사선에 대한 반응도 및 관련단백질의 활성변화를 관찰하기 위해 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 사람 293T 세포를 분양받아 실험에 이용하였다.

방사선 조사 : 감마선 발생장치 (¹³⁷Cs, 0.8 Gy/min, IBL 437N)를 이용하여 0.05 Gy의 선량을 각 실험군에 조사하였다.

세포생존율 측정: 세포를 96 well plate에 well 당 4×10⁴ 개로 분주하고 방사선 조사 후 MTT assay로 세포생존율을 확인하였다.

면역 형광법 (Immunofluorescence)

Ikaros의 항체와 FITC-conjugated 2차 항체를 이용하여 Ikaros를 형광염색하고 DNA는 DAPI 염색방법을 이용하였다.

단백질 전기영동 (Western blot) : 단백질의 SDS-PAGE는 Laemmli (1970)의 방법을 이용하였다.

Site directed mutagenesis : Primer를 design한 후 site-directed mutagenesis를 위한 PCR을 하였다. PCR 생성물에 DpnI 제한효소를 처리한 후 효율이 좋은 competent cell에 형질전환하였다. colony 생성여부를 확인하여 DNA purify를 하고 염기서열 분석을 하였다

결과

1. Ikaros의 인산화 (serine/threonine) 위치 확인

The oligonucleotides used in the study to create site-

Mutant	Amino acid at position	Primer sequences
M3456(P2)	S304A S306A S310A T311A	5'-GCG TCC CCG GCC AAC GCC TGC CAA GAC GCC GCG GAC -3'
M2456(P3)	S302A S306A S310A T311A	5'-GCG GCC CCG AGC AAC GCC TGC CAA GAC GCC GCG GAC -3'
M2356(P4)	S302A S304A S310A T311A	5'-GCG GCC CCG GCC AAC AGC TGC CAA GAC GCC GCG GAC -3'
M2346(P5)	S302A S304A S306A T311A	5'-GCG GCC CCG GCC AAC GCC TGC CAA GAC TCC GCG GAC -3'
M2345(P6)	S302A S304A S306A S310A	5'-GCG GCC CCG GCC AAC GCC TGC CAA GAC TCC GCG GAC -3'
M2(P3456)	S302A	5'-C TCG GAG CGG GAG GCG GCC CCG AGC AAC AGC TGC CAA G -3'
M3(P2456)	S304A	5'-CG GAG CGG GAG GCG TCC CCG GCC AAC AGC TGC CAA GAC -3'
M4(P2356)	S306A	5'-CG GAG CGG GAG GCG TCC CCG AGC AAC GCC TGC CAA GAC -3'
M34(P256)	S304A S306A	5'-CG GAG CGG GAG GCG TCC CCG GCC AAC GCC TGC CAA GAC -3'

directed mutants of serine/threonine-rich conserved region of Ikaros

Fig. 1. Primer sequences represented here are for forward primers. The reverse complementary sequence of the forward primer is reverse primer sequence for the respective mutants. The bold faced three bases represent the site of mutation

Ikaros는 저선량방사선에 의해 serine/threonine rich region에서 인산화가 일어나며 이때 세포증식이 유도된다는 것을 이전 연구에서 확인하였다. 본 연구에서는 Ikaros의 인산화 부위를 알아보기 위해 Ikaros의 serine /threonine rich region (S/TRR)으로 알려진 exon7의 아미노산 300-313 중 인산화 부위 가능성이 있는 S302, S304, S306, S310, T311을 선정하였다 (Dovat S et.al, 2005). 각각의 인산화 부위만 활성을 갖는 돌연변이체를 primer를 이용하여 site mutagenesis 방법으로 제작하였다 (Fig. 1). 각각의 construct는 염기서열을 분석하여 construct가 제대로 완성되었음을 확인하였다.

2. 면역세포에서 저선량방사선에 의한 Ikaros의 인산화 위치 확인

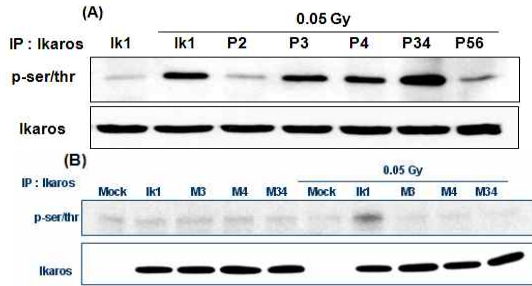


Fig. 2. Ikaros phosphorylation in 293T Ikaros null cells exposed to low dose γ -radiation sites were identified as two site M2456(P3), M2356(P4).

저선량방사선에 의해 인산화된 Ikaros의 인산화 부위를 알아보기 위해 (Fig. 1)에서 제작한 Ikaros mutant M3456(P2), M2456(P3), M2356(P4), M2346(P5), M2345(P6)를 Ikaros 없는 세포인 293T cell에 주입하여 확인하였다. 그 결과 S304(P3), S306(P4)이 Ikaros 인산화에 중요한 부위임을 확인하였다 (Fig. 2A). 이에 따라 S304, S306을 alanine으로 치환시켜 인산화가 일어나지 않는 M3(S304A), M4(S306A), M34(S304A/S306A)를 제작하여 Ikaros가 없는 293T 세포에 주입한 후 저선량방사선을 조사하였더니 Ikaros가 인산화되지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 2B).

3. 저선량방사선에 의한 Ikaros의 인산화가 세포 증식에 미치는 영향

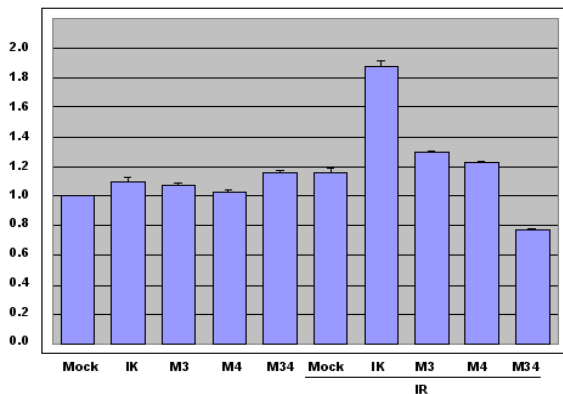


Fig. 3. Ikaros phosphorylation effects cell proliferation in 293T Ikaros null cells exposed to low dose γ -radiation (MTT assay).

Ikaros 인산화가 세포증식에 영향을 주는지 알아보기 위해 Ikaros 인산화 부위를 돌연변이 시킨 M3, M4, M34를 주입한 후 저선량방사선 (0.05Gy)에 의한 세포 생존률을 MTT assay를 이용하여 확인해 본 결과

Ikaros 인산화 부위를 돌연변이 시킨 M3, M4, M34는 세포생존률이 오히려 감소함을 통해 Ikaros의 인산화가 세포증식에 중요하게 작용함을 확인할 수 있었다 (Fig 3).

결론 및 고찰

Ikaros는 림프구 분화 및 발달, 증식에 중요한 조절인자로 알려져 있다. 이전 연구에서는 인체 면역세포의 하나인 B-림프구 (IM-9 세포주)가 저선량 방사선 (0.05 Gy)에 의해 세포증식 촉진효과가 나타나며 이때 Ikaros 단백질은 serine/threonine 잔기에서 인산화가 일어남을 확인하였다. 본 연구에서는 세포증식에 영향을 주는 Ikaros의 인산화가 일어나는 잔기를 알아보기 위해 Ikaros의 serine/threonine rich region (S/TRR) 중 가능성 있는 인산화 부위를 선정하여 각각의 인산화 부위만 활성을 갖는 돌연변이체를 제작하여 실험을 하였다 (Fig. 1). 또한 Ikaros mutant constructs 와 wild type Ikaros 1을 주입하여 저선량 방사선에 의한 인산화 정도를 확인한 결과, Ikaros 인산화 위치가 S304, S306임을 알 수 있었다 (Fig. 2A, B). 또한 기존 보고에 밝혔듯이 (방사선방어학회, 2008 추계) 저선량방사선에 의한 세포증식효과는 Ikaros 인산화에 의해 나타남을 확인하였다. 이에 Ikaros 인산화 mutant constructs를 주입하였을 때 세포증식효과가 감소함을 확인하였다 (Fig. 3).

따라서 세포증식에 중요한 조절인자인 Ikaros가 저선량방사선 (0.05 Gy)에 의해 특정잔기에 인산화되면 핵 내에서 세포질로 이동을 하며 (Data not shown) 세포질 내에 세포증식에 영향을 주는 다른 인자들의 결합 및 상호작용에 의해 세포증식이 촉진될 것이라 추정할 수 있다.

감사의 글

이 연구를 위해 지식경제부 (R-2006-1-043)와 한수원(주)(E09NS02)의 부분적 지원을 받았습니다.

참고 문헌

1. Phosphorylation controls Ikaros's ability to negatively regulate the G(1)-S transition. *Mol Cell Biol.* 24 (7):2797-807 2004
2. Recruitment of Ikaros to pericentromeric heterochromatin is regulated by phosphorylation. *J Biol Chem.* 28:283 (13):8291-300 2008
3. Transgenic expression of Helios in B lineage cells alters B cell properties and promotes lymphomagenesis. *J. Immunol* 15:175 (6):3508-15 2005