

## Putative proinflammatory cytokine유전자의 발현양상과 수용체 분자의 cloning

전북대학교 치과대학 치과약리학교실\*, 구강미생물학교실\*\*,  
치주과학교실\*\*\* 및 치의학 연구소

오귀옥\* · 송요한\*\* · 서영석\* · 이동환\* · 문대희\* · 김형섭\*\*\*

### I. 서 론

염증과 창상치유는 매우 여러 종류의 세포들이 관여하는 복잡한 과정으로서, 다양한 세포들간에 기능이 서로 조화된다는 것은 세포들간의 communication에 여러 종류의 cytokine들이 관여한다는 것을 반영한다. 이러한 cytokine을 chemokine 혹은 intercrine이라 일컬으며, 유사한 여러 chemokine 유전자는 아마도 동일 유전자를 조상으로 하여 발생한 것으로 유추되고, 이들이 상호간 기능적 network를 이루고 있는 것으로 생각되어 진다. 즉, 염증 및 치유과정을 조화롭게 매개하기 위하여 각각의 인자들은 multiple function(pleiotropism)을 보유할 수밖에 없다<sup>1)</sup>.

Chemokine은 처음 나타나는 2개의 cysteine이 하나의 아미노산에 의해 서로 떨어져 있는 이른바 C-X-C chemokine subfamily와 cysteine 두개가 바로 인접해 있는 C-C chemokine subfamily로 나눌 수 있다<sup>2)</sup>. C-X-C subfamily의 chemokine들은 주로 human chromosome 4에 위치하며 이에 속하는 것으로는 interleukin 8(IL-8), GRO(MIP-2), platelet-derived growth factor 4(PDGF-4), IP-10,  $\beta$ -thromboglobulin

( $\beta$ -TG) 등을 들 수 있다. C-C subfamily의 chemokine들은 주로 human chromosome 17에 위치하며 이에 속하는 것으로는 macrophage chemotactic and activating factor(MCAF), LD-78(MIP-1 $\alpha$ ), ACT-2(MIP-1 $\beta$ ), RANTES, I-309 등을 들 수 있다.

이 모든 분자들은 8-10kD의 분자량이 매우 작은 분비성 단백질로서 구조적으로 상호 유사성을 가지며, 이들 chemokine 중 몇 가지는 매우 다양한 세포에서 생산되는데 반하여 다른 것들은 매우 제한된 발현양상을 나타낸다. 예를 들어, IL-8을 monocyte/macrophage, T 세포, 섬유아세포, endothelial cell, keratinocytes, neutrophils, hepatocytes, 및 chondrocytes에서 생산되는데 반하여, PDGF-4는 혈소판에서만 국한되어 생산된다<sup>3)</sup>. 대부분의 chemokine들은 활성화 자극에 의하여 세포에서 생산되지만, RANTES의 발현은 특별한 T세포의 자극시 오히려 억제됨을 나타내어<sup>4)</sup> chemokine마다 각 세포에서 발현하는데 있어 서로 다른 자극을 필요로 하는 것으로 생각되어 졌다.

이러한 chemokine들의 수용체에 대하여는 알려진 사실이 거의 없으나, IL-8수용체(IL-8R)가 최근 사람의 neutrophil에서 cloning되어

\* 본 논문은 1993년도 교육부 학술연구 조성비(기초의학분야) 지원 계획에 의하여 이루어진 것임.

primary sequence 분석된 결과에 의하면, IL-8R는 G-protein coupled “seven-pass” receptor supergene family의 일원일 것으로 추정되었다<sup>5, 6)</sup>. IL-8에 의한 세포반응이 pertussis toxin에 의하여 억제되는 것으로서 G-protein이 IL-8 signaling에 관여함이 입증되었다<sup>3)</sup>. 또한 IL-8에 의하여 neutrophil 세포막에 대한 GTP결합이 증가한다는 사실도 Kupper 등(1992)<sup>7)</sup>에 의하여 보고되었다. Oppenheim 등(1991)<sup>3)</sup>의 보고에 의하면 여러 chemokine superfamily 중에서 IL-8R에 대한 IL-8의 결합을 경쟁적으로 억제한 것은 7개의 test chemokine 중 GRO 및 MIP-2에 불과하다고 하여, chemokine들에 각각 specific한 고유의 수용체가 존재할 것으로 추정되었다. IL-8R이외의 다른 chemokine 수용체들도 IL-8R와 마찬가지로 G-protein coupled seven-pass receptor의 구조를 지닐 것으로 생각되는데 그 이유는 IL-8과 여러 chemokine들의 생물학적 활성이 유사하므로 neutrophil 세포막에 대한 GTP-binding을 이들도 역시 증가시키리라 추측되기 때문이다<sup>7)</sup>. Chemokine superfamily는 아니지만 전형적인 neutrophil chemoattractants인 C5a, platelet activating factor(PAF), 및 formyl-Met-Leu-Phe(fMLP)의 이미 cloning된 수용체 또한 IL-8R와 구조적 유사성을 나타낸 것으로 보고되었다<sup>5, 6)</sup>. 본 연구실에서는 최근에 새로운 C-C chemokine superfamily의 일원인 MIP-1 $\alpha$  및 MIP-1 $\beta$ 의 수용체에 관한 연구를 시행하는 과정에서, MIP-1 $\alpha$ -R가 murine macrophage cell line인 RAW264.7, murine cytolytic T cell line인 CTLL-R8과 CTLL-2 cell에서 600-4000개/cell 정도 발현되며, 수용체에 대한 친화도는  $K_d$ 값이  $0.9 - 1.5 \times 10^{-9}$ M인 것을 관찰하였으므로<sup>8)</sup> murine MIP-1 $\alpha$ -R 유전자를 cloning하여, 나아가 이들의 다양한 생물학적 활성의 기전과 두 분자사이의 antagonism<sup>9, 10, 11)</sup> 기전을 밝힐 목적으로 시행되었다. 또한 최근 C-C chemokine subfamily의 하나로서, 국소염증반응<sup>12)</sup>, prostaglandin과 무관한 발열반응<sup>13, 14)</sup>, 창상 치유작용<sup>15)</sup>, 조혈세포에 대한 조절기능<sup>9, 16, 17)</sup> 등이 밝혀진바 있는 MIP-1 $\alpha$ 와 MIP-1 $\beta$ 의 각종 혈액세포에서의 유전자 발현양

상과 활성화 자극에 의한 유전자 발현의 변화를 관찰하여, 염증 및 창상치유의 communication network에서 이들 chemokine들이 어떠한 기능적 역할을 하는지도 아울러 밝히고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포배양

Cytolytic T cell line인 CTLL-R8은 fetal calf serum(FCS) 10%, penicillin 100U/ml, streptomycin 100 $\mu$ g/ml이 포함된 RPMI 1640(Gibco)에서 배양하였고, 자극은 concanavalin A (Con A, Sigma) 5 $\mu$ g/ml로 12시간 시행하였다. Helper T cell line인 Hut78과 Jurkat, helper T cell hybridoma인 2B4.11도 CTLL-R8과 동일조건에서 배양 하였고, 자극도 동일 방법으로 시행하였다. B cell line인 230과 WR19M.1은 위와 동일 조건으로 배양하였으며, 자극은 lipopolysaccharide(LPS from E. coli 0127 B8 ; Sigma) 1 $\mu$ g/ml로 12시간 시행하였다. Macrophage cell line RAW264.7은 fetal calf serum 및 항생제가 위와 동일한 조건으로 포함된 Dulbecco's modified eagle medium(Gibco)에서 배양하였고, 자극은 LPS 1 $\mu$ g/ml로 12시간 시행하였다.

### 2. Northern Blotting

#### RNA 추출

CTLL-R8, HuT 78, Jurkat, 2B4.11, 230, WR 19M.1 및 RAW 264.7 cell 각각 자극하지 않는 세포와 자극한 세포를  $10^7$  cell씩 모아 RNA 추출에 이용하였다. RNA추출은 Chomczyski와 Sacchi(1987)<sup>18)</sup>의 guanidium thiocyanate 추출 방법을 사용하였으며 RNA추출에 사용된 모든 용액은 diethylpyrocarbonate(DEPC)로 처리한 증류수도 준비하였다. Cell을 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후  $10^6$  cell당 1 ml의 solution D(4M guanidium thiocyanate, 25mM sodium citrate pH 8.0, 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol)를 첨가하였다. 50 $\mu$ l의 2M sodium acetate, pH 4.0, 500 $\mu$ l의 phenol,

100μl의 chloroform-isoamylalcohol 혼합물(49 : 1)등을 연속적으로 첨가하여 혼합한 후 10초동안 강하게 진탕하고 15분동안 얼음에 놓아둔 후, 4°C에서 10,000g로 20분간 원심분리하였다. 수용액총을 다른 microtube에 옮긴 후 500μl의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 1시간 이상 놓아둠으로써 RNA를 침전시켰다. 4°C에서 10,000g로 20분간 원심분리한 후 침전물을 300μl의 0.1U/ml RNasin이 포함된 중류수에 녹이고, 20μl의 3M sodium acetate, pH 5.2와 900μl의 100% ethanol을 첨가하여 -20°C에서 하루동안 놓아두었다. 4°C에서 10,000g로 15분간 원심분리하여 얻어진 RNA침전물을 70% ethanol로 1회 세척한 후 진공 건조시켜 RNasin 0.1U/ml가 포함된 중류수 20μl에 용해시켰다.

#### 전기영동 및 blotting

RNA에 formaldehyde, formamide, MOPS를 혼합하여 55°C에서 15분간 denature시킨 다음, loading buffer를 혼합하여 1.4% agarose/formaldehyde gel에서 1×MOPS buffer(0.04M morpho-linopropanesulfonic acid, pH 7.0, 50 mM sodium acetate, 5mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 전기영동하였다. 이 gel을 중류수로 짧은 시간동안 세척한 후 20×SSC(3M NaCl, 0.3M sodium citrate, pH 7.0)에 30분간 soaking하여 Hybond N<sup>+</sup> membrane(Amersham)에 capillary transfer blotting 한 다음 membrane을 2×SSC로 세척하여 공기중에 건조시켜 80°C에서 2시간 구웠다<sup>19)</sup>.

#### Northern hybridization

준비된 membrane을 sealabe bag에 넣고 prehybridization용액에 (5×SSPE, 5×Denhart's solution, 0.5% SDS, 0.1mg/ml Salmon Sperm DNA)으로 65°C에서 1시간동안 반응시킨 후 Multiprimer DNA labelling kit(Amersham)와 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP(Amersham)를 사용하여 만든 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  또는  $\beta$ -actin cDNA의 radioactive probe를 최종농도 hybridization용액 ml당  $4 \times 10^5$ cpm되는 양을 100°C에서 5분간 denature시켰다. Denature시킨 probe를 hybridization solution에 첨가하여 65°C에서 진탕

액을 제거한 후, membrane을 제조회사의 설명서에 따라 세척하여 -80°C에서 X-Omat AR film(KODAK)에 3일 동안 감광시켰다.

#### 3. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 이용한 putative chemokine receptor cDNA의 identification

##### Poly(A)<sup>+</sup> selection

준비된 CTLL-R8과 HL-60, RAW 264.7 세포로부터 guanidium thiocyanate 추출방법 18)을 사용하여 RNA를 추출하였다. 즉, 10<sup>7</sup> cell당 1ml의 4M guanidium thiocyanate/25mM sodium citrate pH 4.0/0.5% sarcosyl/0.1M 2-mercaptoethanol용액을 첨가하여 잘 용해시킨 후 50μl의 2M sodium acetate, pH 4.0, 500μl의 phenol, 100μl의 chloroform-isoamylalcohol 혼합물(49 : 1)등을 계속적으로 첨가하여 RNA를 추출한 다음 300μl의 0.1U/ml RNasin에 용해하여 ethanol 침전 및 70% ethanol wash하여 진공 건조시켰다. 이 RNA를 RNasin water에 용해시켜 poly(A)<sup>+</sup> RNA selection에 이용하였다. NaOH 용액 및 중류수로 세척한 후 loading buffer로 equilibration시킨 oligo(dT) cellulose column에 -70°C로 10분간 denature시킨 RNA sample을 loading한 후 2mM EDTA/0.1% SDS 용액으로 용출시켜 얻은 sodium acetate를 0.3 M되게 참가하고 ethanol 침전시켰다. 4°C에서 14,000g로 20분간 원심분리하여 침전된 RNA를 건조시킨 다음 RNasin 0.5U/ml에 용해시켰다.

##### Reverse transcription(cDNA 합성)

hIL-8R의 transmembrane region 6(TM6)와 TM7의 염기배열에 해당하는 27-mer 및 36-mer oligonucleotides를 합성하여, RAW264.7 mRNA에 대한 RT의 primer로 사용하였다. Oligonucleotides의 염기서열은 다음과 같다.

##### Oligomer-IL-8R-A

5'-CATCTTCGCCGTCGTACTCATCTT-3'

##### Oligomer-IL-8R-B

5'-AAGTTTGCCCAATGAGGGCGTAG-3'

## # PCR cycling

1	3 cycles	94°C- 1min	37°C-1min	72°C-1min
2	15 cycles	94°C- 1min	50°C-1min	72°C-1min
3	15 cycles	94°C- 1min	50°C-1min	72°C-2min
4	1 cycle	72°C-10min		

## PCR amplification

RT reaction이 끝난 혼합물에 10μl의 10× buffer, 10μl의 2mM dNTP, template oligomers, 0.5μl의 5u/μl Ampli Taq, 그리고 중류 수를 총부피 100μl되게 첨가하여 다음의 조건으로 반응시켰다.

## Subcloning과 DNA sequencing

3.5% PAGE로 gel purify한 RT-PCR product를 T4 ligase를 이용하여 20°C로 밤새 배양함으로써 pGEM3 vector에 삽입하고 E. coli transformation 직전에 65°C로 15분간 ligase inactivation시켰다. CaCl<sub>2</sub> 처리된 competent E. coli에 transfromation한 다음 ampicillin plate에서 positive clone들을 선택하여 sequence 분석에 이용하였다. USB sequenass V. 2.0 sequencing kit와 α-<sup>35</sup>S dATP를 이용하여 dideoxy chain termination 방법<sup>20)</sup>에 따라 염기서열을 결정하였다. 즉, DNA 3μg을 denature하여 M 13-40 sequencing primer와 annealing 시킨 다음, labeled ATP와 sequenase를 넣고 섞은 후 각 nucleotide mix에 나누어 넣고 37°C에서 5분간 반응시켰다. 이 반응물에 stop solution을 넣고 반응을 종료시켰다. 이 반응물 3μl를 8M urea-7% acrylamide gel에서 전기영동한 후 autoradiography하여 염기서열을 분석하였다.

## III. 결과 및 고찰

Resting 상태에서 MIP-1α의 유전자발현을 나타낸 세포는 CTLR-R8, RAW264.7, 230, 2B4, 11, WR19M.1등이었으나 그 발현정도는 대부분 매우 미약한 것이었다. Macrophage cell line인 RAW264.7과 WR19M.1 및 B cell line인 230은 LPS로 활성화시킨 경우 강한 유전자 발현 유도가 나타났으나, CTL line인 CTLR-R8의 경우 Con A 자극시 오히려 message가 downregula-

tion되었으며, T helper hybridoma인 2B4.11은 약간 upregulation되었고, Hut78 및 Jurkat과 같은 T helper cell line은 resting 및 활성화된 세포 모두 MIP-1α의 유전자 발현이 전혀 없었다 (Fig. 1).

Macrophage에서 MIP-1α 유전자가 발현되는 것은 이미 여러차례 보고가 있었던바<sup>22,21)</sup> 본 실험에서 사용한 두가지 cell line에서도 동일한 양상을 보였다. Kwon 등(1989)<sup>21)</sup>의 결과에 의하면 RAW264.7 cell에서 LPS 자극에 의하여 30분내에 발현 유도되며, 면역 억제제인 cyclosporin A에 의하여 MIP-1α 발현이 억제되지 않아 T임파구에서와는 대조되는 결과를 나타내었었다. 한편, 본 실험에서 사용한 B cell line인 230은 MIP-1α 유전자를 발현하였고 LPS에 의해 현저하게 upregulation되었으나 Kwon 등(1989)<sup>21)</sup>의 결과에서는 B cell line인 K46에서 RNA가 측정되지 않았다. 또한 본 실험에서 이용한 대부분의 T helper cell에서는 message가 매우 미약하거나 측정되지 않았고, Con A 자극으로도 증가하지 않았으나, Kwon 등(1989)<sup>21)</sup>의 실험결과에 의하면 ConA 혹은 anti-TCR mAb로 자극한 T helper cell line L2에서 MIP-1α의 강하게 유도 발현되어, 동일 subset의 cell도 cell line에 따라 상이한 반응을 보였다. 흥미로운 결과로서, Kwon 등(1989)<sup>21)</sup>의 보고에 의하면 CTL인 L3도 ConA 혹은 anti-TCR mAb 자극에 의하여 MIP-1α 유전자의 발현이 유도되었으나, 본 실험의 CTLR-R8 cell은 반대로 ConA 자극에 의하여 downregulation됨을 보였다. 이러한 결과와 비슷한 조절 양상은 T 세포로부터 RANTES의 발현이 자극에 의하여 억제된다고 한 Schall 등(1988)<sup>4)</sup>의 보고에서도 볼 수 있으나, *in vivo*에서 이러한 downregulation현상이 어떠한 의미를 갖는지는 정확히 알려진 바 없다. Cloned cell외에도

Fig. 1. MIP-1 $\alpha$  gene expression in various blood cells. CTL line CTLL-R8, HTL line Hut78 and Jurkat, HTL hybridoma 2B4.11 were stimulated with Con A 5 $\mu$ g/ml for 12 hours. Macrophage cell line RAW264.7 and WR19M.1, B cell line 230 were stimulated with LPS 1 $\mu$ g/ml for 12 hours. Total cytoplasmic RNA (20 $\mu$ g) was fractionated and subjected to Northern blot analysis.

MIP-1 $\alpha$ 는 mouse splenocyte에서 anti-TCR mAb 자극시에 발현이 유도되는 것으로 알려졌으며 thymoma cell line인 EL-4나 NK cell line인 LGL에서는 MIP-1 $\alpha$  mRNA가 측정되지 않았었다<sup>21)</sup>. 이러한 mRNA 발현은 대개 자극 후 30분에 시작되어 6시간에 peak에 도달하며 24시간 이상 지속되는 것으로 나타났으며 그 kinetics는 IFN- $\gamma$ 의 그것과 매우 유사했다. MIP-1 $\beta$ 의 경우도 MIP-1 $\alpha$ 보다는 약하지만 전체적으로 발현 양상이 유사하게 나타났으며(Fig. 2), Fig. 3에서 관찰 할 수 있듯이 세포간 actin유전자 발현정도가 약간씩 상이하기는 하나 resting과 자극받은 동일 세포간에는 거의 유사하였으므로 MIP-1 $\alpha$ 와 - $\beta$ 발현 결과를 비교 하는데는 문제시 되지 않았다.

Murine MIP-1 $\alpha$ 와 - $\beta$ 는 C-C subfamily에 속하는 chemokine으로서 MIP-1 $\alpha$ 와 - $\beta$ 의 혼합물에 대하여 human neutrophil은 화학주성을

나타내며<sup>12)</sup>, neutrophil은 이 두 분자에 의하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생산하고 lysosomal enzyme을 유리하며<sup>22)</sup>, neutrophil의 침윤이 일어난다고 Wolpe 등(1988)<sup>12)</sup>은 보고하였다. 또한 이들은 prostaglandin과 무관한 pyrogen임이 밝혀졌고<sup>13)</sup> 섬유아세포와 macrophage로부터 IL-1, IL-6 및 TNF와 같은 다른 기염증성(proinflammatory) cytokine을 유도한다고 Sherry와 Cerami(1991)<sup>23)</sup>는 보고하였다. 또 다른 target으로는 조혈세포로서 분화정도에 따라 다양한 효과를 나타냄이 알려졌다<sup>9, 16, 17)</sup>. 또한 MIP-1 $\alpha$ 는 anti-CD3 mAb로 활성화 시킨 T임파구의 세포성장과 IL-2 생산을 억제하고, CD4, CD8분자의 발현을 downregulation하는 면역억제 기능<sup>24)</sup>을 가지며, MIP-1 $\alpha$ 와 - $\beta$ 에 반응하여 CD4 $^{+}$  및 CD8 $^{+}$  T 임파구가 서로 상이하게 화학주성을 나타낸다고 Taub 등(1993)<sup>25)</sup>은 보고하였다. 또 다른 면역 조절기능의 하나로서 MIP-derived

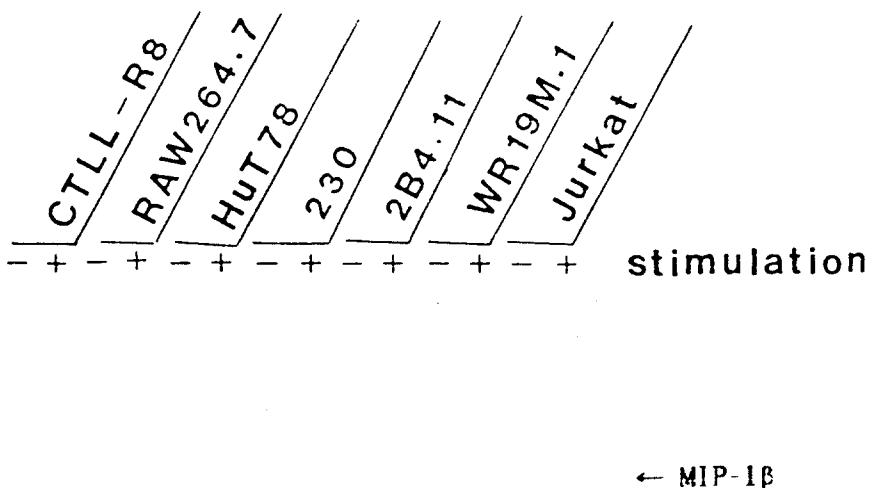


Fig. 2. MIP-1 $\beta$  gene expression in various blood cells.

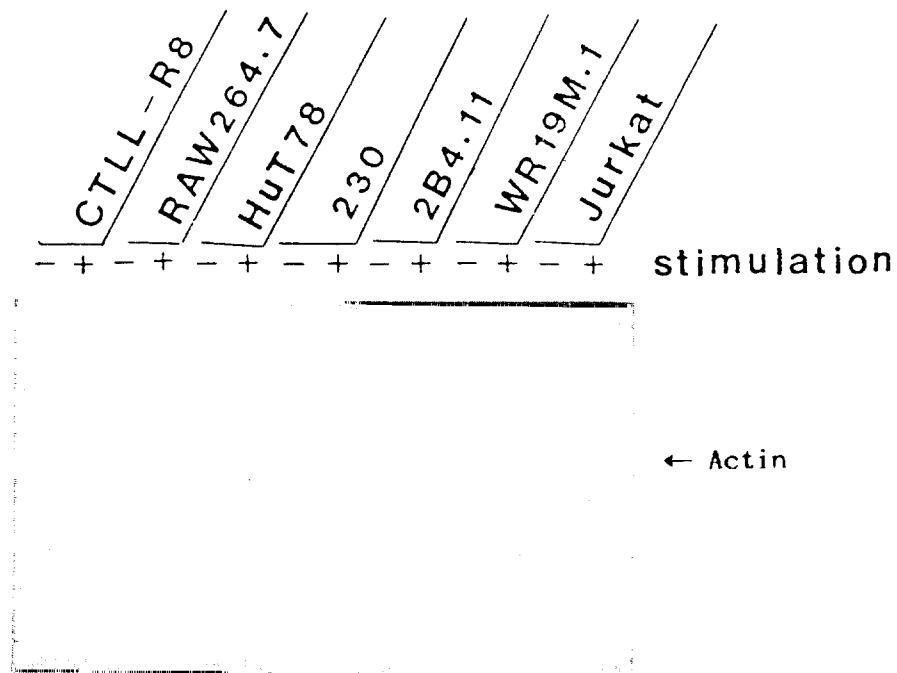


Fig. 3. Actin gene expression in various blood cells.



peptide가 MHC class II분자에 결합하여 항원의 결합을 방해함으로써 T 임파구의 항원 인지기능을 떨어뜨려 면역억제기능을 나타낸다는 사실이 Harris등(1993)<sup>26)</sup>에 의하여 보고된바 있다. 이러한 다양한 생물학적 기능과 세포에서의 발현 특성과의 직접적인 상관 관계를 짓기는 현재로서는 어려우나 특정 subset의 세포에서 특이한 자극에 의하여 upregulation 혹은 down-regulation되는 기전을 확실히 규명함으로서 기능을 밝히고 이를 의학적으로 응용하는데 지름길이 될 수 있으리라 사료된다.

mMIP-1 $\alpha$ -R 또는 이와 유사한 novel chemokine 수용체를 cloning하기 위하여 hIL-8-R의 염기서열을 이용해서 conserved sequencd oligomer를 합성하고 이들 primer로한 RT-PCR을 시행하였다. 이때 사용한 cell은 수용체 binding assay<sup>8)</sup>에서 MIP-1 $\alpha$ -R 수용체 존재가 이미 밝혀졌던 murine macrophge cell line인 RAW164.7을 이용하였다. CTLL-R8 세포에 대한 동일 실험도 병행하였으나 RAW264.7 cell에서만 RT-PCR product를 얻었다.

Fig. 4는 RT-PCR product로 얻어진 DNA의 전기영동 사진으로 5개의 DNA band(500, 400, 330, 200, 150 bp)가 나타났다. 각각 band를 gel purification하여 suncloning하고, 아미노산 서열을 분석한 결과 150bp크기의 cDNA의 경우 이미 밝혀졌던 hIL-8-R와 매우 homologous 한 것으로 나타났다(Fig. 5). C-X-C chemokine은 아니지만 IL-8과 생물학적 활성이 유사한 anaphylatoxin C5a<sup>27)</sup>, fMLP<sup>28)</sup>의 수용체와 IL-8-R 구조를 비교하여 보면, sequence 유사성이 높은 곳은 transmembrane spanning region이고 특히 TM2, TM6 및 TM7인 것으로 Neote등(1993)<sup>29)</sup>은 보고하였다. 이러한 TM region의 homology는 같은 C-C 혹은 C-X-C superfamily 사이에서 뚜렷한 것으로 알려져 있으므로,

Fig. 4. RT-PCR product of C-X-C cnemokine receptor related mRNAs. RNA was extracted from murine macrophage cell RAW264.7. Primers corresponding to conserved sequences of TM6 and TM7 region of hIL-8R were used as template. Arrow indicates partial length cDNA of putative mIL-8R.

hIL-8r : 5'-FLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQETCERRNNIGRALDATEILGFLHSCLNP-3'  
  
 mIL-8r : 5'-FLLCWLPYNLVLFDTLMRTKLIKETCERRDDIDKALNATEILGFLHSCLNP-3'

Fig. 5. Comparison of deduced amino acid sequences of human and putative mouse IL-8R.

RAW264.7 cell에서 얻어진 본 연구의 RT-PCR product가 hIL-8-Ra 구조일부 일 것으로 추측되었다.

한편, 본 실험수행중 다른 실험실에서 밝혀진 hMIP-1 $\alpha$ -R의 TM3 끝부분은 특히 highly conserved motif로서, hMIP-1 $\alpha$ -R/RANTES-R, HUMSTER, IL-8-R에서 모두 동일하여 수용체 기능에 필수적인 domain일 것으로 보고되었다<sup>29)</sup>. 또한 이 부분은 seven-pass superfamily의 수용체중에서 여러가지 superfamily를 가르게 되는 critical region일 것으로 생각되는데, 그 이유는 C5a나 fMLP와 같은 chemoattractant들은 이 region을 지니지 않은 것으로 보고되었기 때문이다<sup>29)</sup>. 따라서 앞으로 TM3 끝 부분을 이용하여 더 많은 종류의 chemokine 수용체를 cloning하는데 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

C-C chemokine인 hMIP-1 $\alpha$ -R과 아미노산 homology를 비교하면 C-X-C chemokine인 IL-8-R는 약 30%의 homology를 보이며<sup>5,6,29)</sup>, 또 다른 chemokine인 C5a, fMLP 수용체는 약 24%이하, 그외에도 neuropeptide Y수용체와 angiotensin II 수용체가 약 22%의 homology를 보였다고 보고하였다<sup>29)</sup>. 이러한 사실들은 chemokine 수용체, C5a, fMLP 수용체, neuropeptide Y수용체, 및 angiotensin II수용체가 common ancestral gene에서 유래할지도 모른다는 것을 시사하는 내용이며, neurotransmitter 수용체 subfamily와 같은 또 다른 seven-pass 수용체의 divergence와 매우 유사한 현상으로 보인다<sup>30)</sup>.

MIP-1 $\alpha$ 와 매우 유사한 MIP-1 $\beta$ 는 생물학적 활성에 있어 매우 흥미로운 특징을 나타내는데, hematopoietic stem cell의 성장억제효과를

MIP-1 $\alpha$ 는 가지고 있으나 MIP-1 $\beta$ 는 없으며, 비교적 maturity가 높은 progenitor cell에 대하여는 두 분자 모두 성장촉진효과를 나타낸다<sup>16)</sup>. 또한 MIP-1 $\alpha$ 의 성장억제효과는 MIP-1 $\beta$ 에 의하여 길항적으로 차단되는데<sup>9)</sup>, macrophage<sup>10)</sup>와 Neutrophil<sup>11)</sup>의 기능에 대한 두분자의 상호작용에서도 역시 antagism이 발견되었으며, 수용체 competition study에서 동일 수용체에 두분자가 경쟁적으로 결합할 수 있음이 본 연구실의 연구결과에서도 나타났었다<sup>31)</sup>.

이러한 사실을 입증할만한 또다른 결과로서, hMIP-1 $\alpha$ -R cDNA를 transfection했던 fibroblast에 대하여 MIP-1 $\alpha$ 와 마찬가지로 MIP-1 $\beta$ 도 수용체에 결합을 하지만  $Ca^{++}$  signal(cellular response)은 MIP-1 $\beta$ 의 경우 매우 미약했던 것으로 나타나 두분자가 agonist/antagonist profile이 다르지만 동일 수용체에 작용한다는 것이 Neote등(1993)<sup>29)</sup>의 보고에 의해 밝혀졌다. 동일 실험에 의하면, IL-8과 같은 C-X-C chemokine은 hMIP-1 $\alpha$ -R에 결합하지 않았으나, RANTES와 같은 C-C chemokine은 binding과 함께 cellular response도 나타내었다. 이러한 MIP-1 $\alpha$ -R의 multiple ligand specificity와 함께 각 ligand의 다양한 agonist/antagonist profile은 MIP-1과 같은 chemokine이 매우 다양한 종류의 hematopoietic cell에 대하여 작용을 나타내는 것과도 부분적 관련이 있을 것으로 생각되어지며, 앞으로 mMIP-1 $\alpha$ -R의 full length cDNA sequence가 확인되는 대로 early signal transduction mechanism을 규명하게 되면, 면역, 혹은 염증과정에서 effector cell과 chemokine들과의 상호관계를 이해하는데 더욱 큰 도움을 줄 수 있으리라 사료된다.

## 참고문헌

1. Zipfel, P. F., Balke, J., Irving, S. G., Kelly, K., and Sienbenlist, U. : Mitogenic activation of human T cells induces two closely related genes which share structural similarities with a new family of secreted factors. *J. Immunol.* 142 : 1582, 1989.
2. Sager, R. : GRO as a cytokine. In Molecular and Cellular Biology of Cytokines, ed. J. J. Oppenheim et al., pp327-32, New York : Wiley-Liss. 1990.
3. Oppenheim, J. J., Zachariae, C. O. C., Mukaida, N., and Matsushima, K. : Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.* 9 : 617, 1991.
4. Schall, T. J., Jongstra, J., Dyer, B. J., Jorgensen, J., Clayberger, C., Davis, M. M., and Krensky, A. M. : A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J. Immunol.* 141 : 1018, 1988.
5. Holmes, W. E., Lee, J., Kuang, W. J., Rice, G. C., and Wood, W. I. : Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 253 : 1278, 1991.
6. Murphy, P. M., and Tiffany, H. L. : Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 253 : 280, 1991.
7. Kuppers, R. W., Dewald, B., Jakobs, K. H., Baggioolini, M., and Gierschik, P. : G-protein activation by intrleukin-8 and related cytokines in human neutrophil plasma membranes. *Biochem. J.* 282 : 429, 1992.
8. Oh, K. O., Zhou, Z., Kim, K. K., Samanta, H., Fraser, M., Kim, Y. J., Broxmeyer, H. E., and Kwon B. S. : Identification of cell surface receptors for murine macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ . *J. Immunol.* 147 : 2978, 1991.
9. Broxmeyer, H. E., Sherry, B., Cooper, S., Ruscetti, F. W., Williams, D. E., Arosio, P., Kwon, B. S. and Cerami, A. : Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  abrogates the capacity of MIP-1 $\alpha$  to suppress myeloid progenitor cell growth. *J. Immunol.* 147 : 2586, 1991.
10. Fahey III, T. J., Tracey, K. J., Tekamp-Olson, P., Cousens, L. S., Jones, W. G., Shires, G. T., Cerami, A., and Sherry, B. : Macrophage inflammatory protein-1 modulates macrophage function. *J. Immunol.* 148 : 2764, 1992.
11. Kim, P. W., Lim, J. D., Oh, K. O., and Kim, H. S. : Effect of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  on the antimicrobial action of polymorphonuclear leukocytes. *J. oral Biol.* 17 : 113, 1993.
12. Wolpe, S. D., Davatelas, G., Sherry, B., Beutler, B., Hesse, D. G., Nguyen, H. T., Moldawer, L. L., Nathan, C. F., Lowry, S. F., and Cerami, A. : Macrophage secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J. Exp. Med.* 167 : 570, 1988.
13. Davatelas, G., Wolpe, S. D., Sherry, B., Dwyer, J. M., Chicheportiche, R., and Cerami, A. : Macrophage inflammatory protein-1 : a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. *Science* 243 : 1066, 1989.
14. Minano, F. J., Sancibrian, M., Vicaino, M., Paez, X., Davatelas, G., Fahey, T., Sherry, B., Cerami, A., and Myers, R. D. : Macrophage inflammatory protein-1 : unique action on the hypothalamus to evoke fever. *Brain Res. Bull.* 24 : 849, 1990.
15. Fahey III, T. J., Sherry, B., Tracey, K. J., van Deventer, S., Jones II, W. G., Minei, J. P., Morgello, S., Shires, G. T., and Cerami, A. : Cytokine production in a model of wound healing : the appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF and IL-1. *Cytokine* 2 : 92, 1990.

16. Broxmeyer, H. E., Sherry, B., Lu, L., Cooper, S., Oh, K. O., Tekamp-Olson, P., Kwon, B. S., and Cerami, A. : Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation in vitro by bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood* 76 : 1110, 1990.
17. Graham, G. J., Wright, E. G., Hewick, R., Wolpe, S. D., Wilkie, N. M., Donaldson, D., Lorimore, S., and Pragnell, I. B. : Identification and characterization of an inhibitor of haematopoietic stem cell proliferation. *Nature* 344 : 442, 1990.
18. Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-penol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156, 1987.
19. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. : Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
20. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. : DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5463, 1977.
21. Kwon, B. S., Kestler, D. P., Eshhar, Z., Oh, K. O., and Wakulchick, M. : Expression characteristics of two potential T cell mediator genes. *Cell. Immunol.* 121 : 414, 1989.
22. Wolpe, S. D. and Cerami, A. : Macrophage inflammatory protein-1 and 2 : members of a novel superfamily of cytokine. *FASEB J.* 3 : 2565, 1989.
23. Sherry, B. and Cerami, A. : Small cytokine superfamily. *Curr. Opinion Immunol.* 3 : 56, 1991.
24. Zhou, Z., Kim, Y. J., Pollok, K., Hurtado, J., Lee, J. K., Broxmeyer, H. E., and Kwon, B. S. : Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  rapidly its receptors and inhibits the anti-CD3mAb-mediated proliferation of T lymphocytes. *J. Immunol.* 151 : 4333, 1993.
25. Taub, D. D., Conlon, K., Lloyd, A. R., Oppenheim, J. J., and Kelvin, D. J. : Preferential migration of activated CD4 $^{+}$  and CD8 $^{+}$  T cells in response to MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ . *Science* 260 : 355, 1993.
26. Harris, P. E., Maffei, A., Liu, Z., Colovai, I., Reed, E. F., Inghirami, G., and Suciu-Fuca, N. : Naturally processed cytokine-derived peptide bound to HLA-class II molecules. *J. Immunol.* 151 : 5975, 1993.
27. Gerard, N. P. and Gerard, C. : The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* 349 : 614, 1991.
28. Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L., and Vignais, P. : The human N-formylpeptide receptor : characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G protein-coupled receptors. *Biochemistry* 29 : 11123, 1990.
29. Neote, K., DiGregorio, D., Mak, J. Y., Horuk, R., and Schall, T. : Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell* 72 : 415, 1993.
30. Dohlmam, H. G., Thorner, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. : Model systems for the study of seven transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 60 : 653, 1991.
31. Oh, K. O., Jeong, S. R., Yu, K. R., Oh, H. J., Lee, D. W., Lee, S. H., Kwak, Y. H., Kim, H. S., and Kwon, B. S. : Receptor binding characteristics of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  and -1 $\beta$ . *J. oral Biol.* 17 : 93, 1993.

—Abstract—

## GENE EXPRESSION CHARACTERISTICS OF PUTATIVE PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND RECEPTOR MOLECULE CLONING

Kwi-Ok Oh\*, Yo-Han Song\*\*, Young-Seok Seo\*, Dong-Whan Lee\*,  
Dae-Hee Moon\*, and Hyung-Seop Kim\*

*Dept. of Dental Pharmacology\*, Dept. of Oral Microbiology\*\*, and Dept. of Pharmacology\*,  
College of Dentistry, Chonbuk National University*

Cytokines expressed specifically in leukocytes subsets and in activated cells, which are involved in chemotaxis and activation of leukocytes, are recently defined as chemokines. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ ) and MIP-1 $\beta$  are members of C-C chemokine subfamily which produces wide immunomodulatory, proinflammatory, and hematopoietic modulatory actions.

We have studied their gene expression by using Northern blot analysis in various blood cells such as cytolytic T lymphocyte(CTL), helper T lymphocyte(HTL), macrophage, and B lymphocyte.

Resting CTL line CTLL-R8 expressed MIP-1 $\alpha$  mRNA which was downregulated by ConA stimulation. Both of resting and ConA stimulated HTL line Hut78 and Jurkat did not express MIP-1 $\alpha$  mRNA. There was detectable MIP-1 $\alpha$  transcript in HTL hybridoma 2B4.11 which was a little upstimulated by ConA stimulation. B cell line 230, and macrophage cell line RAW264.7 and WR19M.1 showed distinct MIP-1 $\alpha$  message which were induced after LPS stimulation. Expression pattern of MIP-1 $\beta$  in all cell lines or cell were almost identical to that of MIP-1 $\alpha$ .

Also strategies employed to identify and characterize the biological functions was preceded by receptor cloning to trace the shorcut to the final goal of cytokine research. For the cloning of MIP-1 $\alpha$  receptor(R), we used synthetic oligonucleotides of transmembrane(T) conserved sequences of already cloned human(h) IL-8-R, and performed reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) amplification using murine(m) macrophage cell line mRNA. Among 5RT-PCR products, we isolated a homologous cDNA with hIL-8-R which were shown to be putative mIL-8-R cDNA.