

HeLa세포에서 IgE-dependent Histamine-releasing Factor의 인산화가 Na,K-ATPase의 활성화에 미치는 영향

김정아 · 하헌주 · 이경림*
이화여자대학교 약학대학

Studies on the Effect of the Phosphorylated IgE-Dependent Histamine-Releasing Factor on Na,K-ATPase Activity in HeLa Cell. Kim, Jung-A, Hunjoo Ha, and Kyunglim Lee*. College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea – IgE-dependent histamine-releasing factor (HRF) is found extracellularly to regulate the degranulation process of histamine in mast cells and basophils and known to play a predominant role in the pathogenesis of chronic allergic disease. HRF has been also identified in the intracellular region of the cell. Previously, we reported that HRF interacts with the 3rd cytoplasmic domain of the alpha subunit of Na,K ATPase and inhibits Na,K-ATPase activity. The predicated phosphorylation site in HRF by PKC was mapped to one serine residues (S98) by the computer analysis. In this study, we identified that S98 residue of HRF was phosphorylated using anti-HRFpS98 antibody which specifically recognizes the phosphorylated serine residue of HRF and HRFS98A mutant construct. We also performed $^{86}\text{Rb}^+$ -uptake assay to understand the role of HRF wild-type and HRFS98A mutants on the regulation of Na,K-ATPase activity. Dephosphorylation of HRF at serine 98 residue recovers slightly the inhibitory function of HRF, suggesting that phosphorylated HRF at serine 98 may not suppress the Na,K-ATPase activity.

Key words: Histamine-releasing factor, phosphorylation, Na,K-ATPase

Histamine-releasing factor는 히스타민 유리 활성 (histamine-releasing activity)을 갖고 있다. HRF는 활성화된 면역 세포의 생성물로, 호염기구(basophils), 비만세포(mast cells)와 상호작용하여 히스타민 유리를 유발하는 물질로 정의되었으며, 그 후 두 가지 종류로 분류되었다. 한 가지는 히스타민 유리 시 세포 표면의 immunoglobulin E(IgE)를 필요로 하며, 다른 하나는 IgE에 비존존적으로 작용한다. 이중 IgE-dependent histamine-releasing factor(HRF)는 항원 없이 호염기구로부터 히스타민 유리를 촉발하여, 후기 알러지성 염증 반응(late-phase allergic inflammation reaction: LPR)의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다.

HRF는 translationally controlled tumor protein(TCTP)이라고도 불리는 house keeping gene이다[3, 4]. 1995년 MacDonald 등은 아토피 환자의 림프세포와 알레르기 환자의 생체액에서 HRF를 분리, 정제하고 이 HRF가 이미 성장 관련 단백질인 TCTP와 동일한 단백질이라는 것을 밝혔다[15]. 일반적으로 알려진 HRF의 기능은 히스타민 유리기능인데, IgE에 상관없이 HRF가 호염기구(basophil)에서 히스타민, interleukin(IL)-4, IL-13의 분비를 조절하는 것이 관찰되어[20] HRF가 IgE가 아닌 특이적 수용체에 결합하여 기

능한다는 가능성이 제시되고 있다[1, 13, 14, 19]. 또 HRF의 다른 기능으로 칼슘결합 단백질로서의 기능[12, 18], 세포성장과 관련한 tubulin 결합단백질로서의 기능[6], 말라리아 치료제인 artemisinin의 타겟으로서의 기능[2], 금속 항상성[21]과 세포내 신호전달[17] 관여 molecule로서의 기능 등이 알려져 있다.

본 실험실에서는 yeast two-hybrid assay를 통해 HRF가 Na,K-ATPase의 세포내부로 노출된 도메인중 3번째 루프와 결합함을 동정하였고[10], RBL-2H3 세포에 Na,K-ATPase 저해제로 알려져 있는 ouabain을 처리했을 때 히스타민 분비가 증가되었다는 사실로 미루어[7] Na,K-ATPase가 HRF의 세포내 수용체이라고 생각하였다. Na,K-ATPase에 저해제인 ouabain을 처리하면, 활성화된 Src에 의해 epithelial growth factor receptor(EGFR)가 transactivation되고[8, 9] 그 결과 reactive oxygen species (ROS) 생성과 함께 Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase(MAPK) 경로를 통해 p42/44 MAPK(Erk1/2)가 활성화된다[16, 23, 24]. 이 현상은 세포밖에 존재하는 Ca^{2+} 에 의존적으로 나타나는데, HRF 또한 Ca^{2+} 결합단백질로 알려져 있으므로 ouabain과 비슷한 신호전달을 거칠 것으로 예상하였다[12].

Sanchez 등에 의하면 erythrocytes, liver, non-differentiated keratinocytes, melanoma, hepatoblastoma, glioma 세포에서 HRF는 3개의 isoform으로 나타나는데 이들은 모두 비슷한 분자량을 가지고 있지만 각기 다른 등전

*Corresponding author

Tel: 82-2-3277-3024, Fax: 82-2-3277-2851

E-mail: klyoon@ewha.ac.kr

점(isoelectric point)을 보이므로 HRF의 인산화 가능성을 예상할 수 있다[18]. Na,K-ATPase α subunit에는 cation, ATP, cardiac glycosides 등이 결합하는 부위가 많고[5, 11, 22], 특히 세 번째 세포내 도메인은 가장 큰 루프로서 hinge 부분을 특징적으로 가지고 있어 이 부분의 protein kinase에 의한 조절기전이 가능할 것으로 예상된다. 그러므로 본 논문에서는 HRF와 Na,K-ATPase의 상호작용 기전으로 HRF의 인산화가 관여할 것으로 예상하고 컴퓨터 분석 프로그램으로 PKC에 의해 인산화될 것으로 예상되는 HRF의 98번 serine 잔기를 분자량과 구조는 비슷하나 PKC에 의해 인산화되지 않는 alanine 잔기로 치환한 HRF의 mutant constructs로 실험하였다. 즉, HRF의 인산화/탈인산화가 Na,K-ATPase와의 결합정도나 활성에 변화를 줄 것으로 예상하여 point mutant constructs를 제조하였으며, 인산화된 98번 serine 잔기를 특이적으로 인식하는 항체를 제작하여 endogenous HRF의 인산화 정도를 살펴보았으며, $^{86}\text{Rb}^+$ -uptake assay를 실시하여 Na,K-ATPase의 활성변화를 살펴 보았다.

재료 및 방법

세포배양

HeLa 세포를 10% fetal bovine serum(FBS), 100 units/ml penicillin, 100 units/ml streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ incubator 에서 10⁶ cells/ml로 분주해 주었다. Transient transfection시에는 transfection 당일 70-80% confluence가 되도록 실험 전날 100 mm dish나 적당한 well plate에 세포를 분주한 후, Lipofectamine PLUS reagent kit을 이용하여 transfection 시켰다. Ouabain을 처리할 때는 DMEM 배지에서 자란 HeLa 세포를 serum free DMEM 배지로 갈아주어 24 hr serum starvation을 시켰다. 여기에 DMSO에 녹인 ouabain을 최종 농도 1.0×10⁻⁷, 5×10⁻⁶, 1.0×10⁻⁴ M이 되게 첨가하고 10분간 처리하였다.

Site-directed mutagenesis

Mutation은 Stratagene의 mutagenesis kit을 이용하여 시행하였는데 먼저 insert가 들어있는 dsDNA vector와 mutation을 가지고 있는 두 개의 oligonucleotide(sense: 5' CAAAGACTACATGAAAGCACTCAAGGG 3', 5' antisense CCCTTGAGTGCTTTCATGTAGTCTTTG 3')를 가지고 pfu DNA polymerase로 PCR을 해서 nick이 있는 mutated plasmid를 만들었다. 그 product를 DpnI endonuclease(target sequence: 5'-Gm6ATG-3')로 37°C에서 1시간 동안 처리하였다. 원하는 mutation을 가진 nicked vector DNA를 Epicurian Coli XLI-Blue supercompetent cells에 transformation한 후 다시 DNA를 얻었다. 이 DNA를 GFP primer(antisense primer)와 함께 이화여대 세포신호전달연구센터에 automatic

sequencing을 의뢰하여 point mutation이 되었는지 확인하였다.

Ouabain-sensitive $^{86}\text{Rb}^+$ -uptake assay

24 well plate에 HeLa 세포를 4.0×10⁴가 되게 분주한 후 10% FBS, DMEM 배지에서 배양하고 다음날 mutant HRF DNA를 transfection 시켰다. 18-24시간이 지난 후 배지를 serum-free DMEM 배지로 바꿔주어 2-3시간 serum starvation시키고 나서 KRP 용액(25 mM Hepes, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgSO₄, 1.4 mM CaCl₂, 2.5 mM glucose, 0.1% BSA, pH 7.4)로 2회 세척 후, ouabain과 furosemide를 각각 100 μM 로 가하고 37°C에서 15분간 배양시켰다. 여기에 $^{86}\text{Rb}^+$ 을 최종농도 2 $\mu\text{Ci/ml}$ 로 하여 상온에서 15분간 배양하였다. 즉시 차가운 KRP 용액으로 3회 세척 후, lysis 용액(50 mM NaOH, 1% Triton X-100) 200 μl 를 가하였다. 5분 뒤 이 중 100 μl 를 취하여 1 ml LSC-cocktail 용액과 잘 혼합한 후, β -counting을 하였다. Cell 수에 의한 오차를 줄이기 위해서 $^{86}\text{Rb}^+$ 만 처리하지 않고 다른 과정은 똑같이 행한 샘플을 따로 만들어서 well 당 단백질 농도를 Lowry assay법으로 정량하여 보정하였다.

Western blotting

HeLa 세포에 제조한 mutant HRF DNA를 transfection시키고 18-24시간이 지난 후 ice-cold PBS로 2회 세척하고 ice-cold lysis buffer(20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 2 mM Na₃V0₄, 1 mM NaF, 1% Nonidet P-40, 0.5% Sodium deoxycholate, Complete mini protease inhibitor cocktail)를 dish 당 200 μl 씩 가하고 얼음 위에서 15분간 방치하였다. 이 세포 현탁액을 차갑게 식힌 Pyrex #7727-07 glass homogenizer에 옮겨 세포가 완전히 용해되어 현탁 될때까지 얼음 상에서 천천히 갈아주었다. 현탁액은 4°C, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 최종적으로 얻어진 상층액을 SDS-PAGE 분석에 사용하였다. Blot은 nitrocellulose(NC) membrane에 4°C, 400 mAmp에서 2-3시간 동안 옮긴 후, NC membrane을 1시간 동안 blocking solution(3% milk in PBS)으로 처리하고 3차 증류수로 5분씩 3회 세척한 후, 1% milk가 들어 있는 PBS 용액에 녹인 1차 항체로 overnight으로 4°C 에서 incubation한 후, PBS 10 ml로 membrane을 5분간 3회 세척하였다. 이후 horseradish peroxidase (HRP)-linked anti-rabbit IgG 항체 혹은 HRP-linked anti-mouse IgG 항체로 1시간 동안 처리하였다. 다시 3차 증류수 10 ml로 5분씩 2회, PBS로 3분간 1회 세척한 후 chemiluminescence reagent(ECL or ECL plus)를 처리하여 LAS-1000으로 촬영하였다.

결과 및 고찰

HRF 아미노산 정보 분석

본 연구실에서는 HRF가 Na,K-ATPase와 상호작용하여 그 활성을 부분적으로 저해 한다는 결과를 최근에 발표하였다. HRF와 Na,K-ATPase간의 상호작용 기전을 알아보기 위하여, 우선 HRF의 아미노산 정보를 컴퓨터 분석(<http://us.expasy.org/>)을 통해 살펴본 결과 HRF의 인산화가 가능한 곳으로 98번 serine 잔기가 protein kinase C(PKC)에 의해 인산화되고, 그 외에 casein kinase II에 의해 3곳이 인산화 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이는 HRF의 인산화 혹은 탈인산화가 Na,K-ATPase와의 상호작용에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 기대되며, 그 인산화 역할은 PKC가 수행 할 것으로 예상된다고 할 수 있다.

Anti-Phospho HRF(Ser 98) 항체 및 HRF S98A mutant 제작

PKC에 의한 HRF의 98 serine 잔기의 인산화 혹은 탈인산화가 Na,K-ATPase와의 상호작용에 있어서 어떠한 역할을 하는지 좀더 구체적으로 알아보기 위하여, 본 연구실에서는 HRF의 98번 serine 잔기가 인산화된 형태를 특이적으로 인식하는 항체(anti-Phospho HRF Ser 98)를 제작하여 endogenous HRF의 변화를 알아보기로 하였다. 우선 본 실험실에서 제작한 항체의 특이성 정도를 알아보기 위하여, 다양한 농도(1:1,000~1:10,000)로 희석된 항체를 항원과 반응 시켰다. 또한 그 반응의 특이성 정도를 알아보기 위하여, 세포내 PKC를 활성화 시켜주는 약물인 PMA를 처리하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이, 제작된 항체는 저 농도에서부터 고 농도까지 98번 serine 잔기가 인산화된 형태를 모두 잘 인식하고 있었으며, 특히 PMA를 처리하여 PKC를 활성화 시켜준 세포에서 더 진한 밴드를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

본 실험실에서는 또한 PKC에 의해 인산화될 것으로 추정되는 HRF의 98번 아미노산인 serine 잔기를 alanine으로 치환한 mutant constructs를 제조하여 항체의 특이성 정도를 재확인 하는 동시에, 그 발현 양상을 확인하였다. HRF의 98

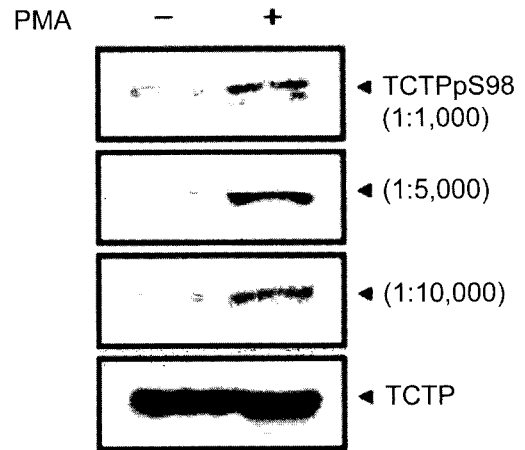


Fig. 2. Characterization of anti-HRFpS98 antibody. The rabbit anti-HRFpS98 antibody specifically detects phosphorylated serine 98 residue of HRF in a various diluted condition.

번 아미노산인 serine 잔기를 alanine으로 치환한 mutant constructs가 제대로 만들어 졌는지 확인하기 위해 mutant constructs를 HeLa 세포에 transient transfection 시켜 anti-Phospho HRF(Ser 98), anti-GFP, anti-HRF 항체로 확인한 결과, 예상되는 크기인 약 48 kDa에서 과발현되는 것을 확인 하였으며, 또한 HRF wild-type을 발현 시킨 세포에서만 anti-Phospho HRF(Ser 98) 항체에 의해 밴드가 관찰되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3).

⁸⁶Rb⁺-uptake assay

HeLa cell에서 wild-type HRF와 mutant HRF에 의해 유발된 Na,K-ATPase의 활성 저해 정도를 비교하기 위해 pEGFP/HRF wild-type과 mutant construct를 각각 transfection한 후 ⁸⁶Rb⁺-uptake assay를 시행하였다. β-counting의 결과, GFP empty vector의 cpm값을 100% 기준으로 하였을 때 HRF wild-type은 55.1%로 떨어진 반면 HRFS98A인 경우는 68% 정도로 cpm값이 약간 회복되는 것을 확인하였다(Fig. 4). Na,K-ATPase 활성 저해의 회복 정도가 control 수준 만큼으로 회복 되지 않은 것으로 미루어

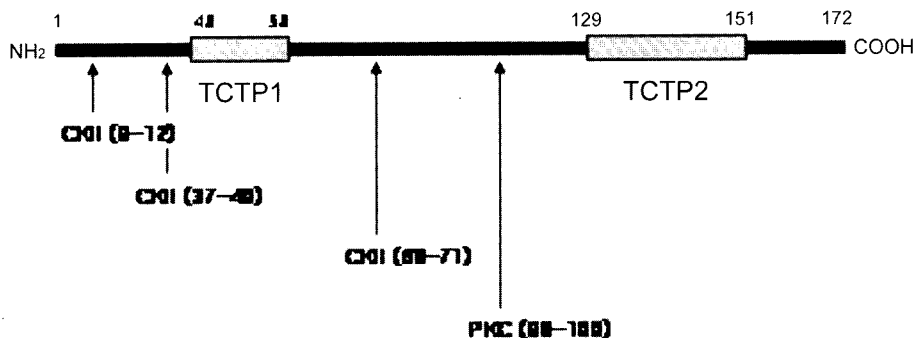


Fig. 1. Predicted phosphorylation sites of HRF. Three phosphorylation sites by casein kinase II (CKII) and one phosphorylation site by protein kinase C (PKC) were predicted in HRF.

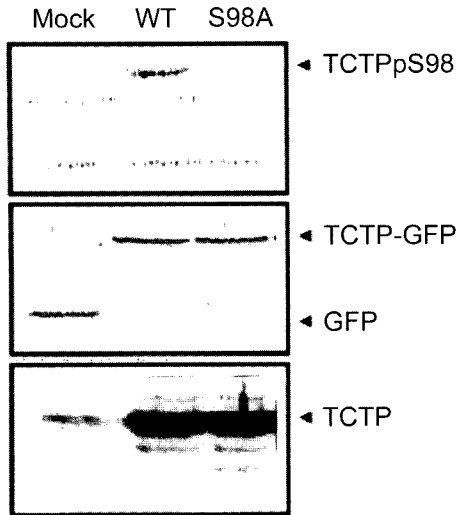


Fig. 3. Construction of HRF S98A mutant. Following transient transfection of HeLa cells with GFP, GFP-HRF, and GFP-HRF S98A, the total cell extracts (40 µg) were blotted sequentially with anti-HRFpS98, anti-GFP, and anti-HRF antibodies.

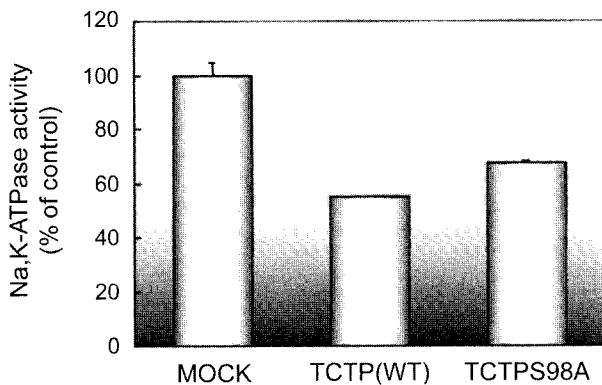


Fig. 4. $^{86}\text{Rb}^+$ -uptake assay. HeLa cells transiently transfected with GFP, GFP-HRF and GFP-HRF S98A were plated in 24-well plate at 0.4×10^5 cells/well. Following transfection, the cells were incubated with 1 mM ouabain and/or 0.1 mM furosemide for 15 min at room temperature. $2 \mu\text{Ci/ml}$ $^{86}\text{Rb}^+$ was added and $^{86}\text{Rb}^+$ uptake counted in triplicate. The bar graph shows the results of three independent experiments \pm S.E.

PKC에 의해 인산화되는 98 serine 잔기가 Na,K-ATPase 활성 저해에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

요 약

HRF는 Na,K-ATPase의 α subunit에 결합하여 이의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있으며, PKC에 의해 Ser98 잔기가 인산화 될 수 있다는 것을 anti-HRFpS98 항체와 HRF S98A mutant를 이용한 실험으로 확인할 수 있었다. 또한 $^{86}\text{Rb}^+$ -uptake assay 실험에서 HRF의 serine 98 잔기의 탈인산화는 Na,K-ATPase의 활성에 약간의 영향을 미치는 것으로 미루어 PKC에 의해 인산화되는 98 serine 잔기

가 Na,K-ATPase 활성 저해에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

감사의 글

본 논문은 이화여자대학교 약학대학 약학연구소 연구비의 지원을 받았음.

REFERENCES

1. Beaven, M.A. and R. A. Baumgartner. 1997. Downstream signals initiated in mast cells by Fc epsilon RI and other receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 766-772.
2. Bhisutthibhan, J., X. Q. Pan, P. A. Hossler, D. J. Walker, C. A. Yowell, J. Carlton, J. B. Dame, and S. R. Meshnick. 1998. The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *J. Biol. Chem.* **273**: 16192-16198.
3. Bohm, H., B. Gross, M. Gaestel, U. A. Bommer, G. Ryffel, and H. Bielka. 1991. The 5'-untranslated region of p23 mRNA from the Ehrlich ascites tumor is involved in translation control of the growth related protein p23. *Biomed. Biochim. Acta* **50**: 1193-1203.
4. Chitpatima, S. T., S. Markrides, R. Bandyopadhyay, and G. Brawerman. 1988. Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res.* **16**: 2350.
5. Forbush, B., 3rd, J. H. Kaplan, and J. F. Hoffman. 1978. Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na, K-ATPase. *Biochemistry* **17**: 3667-3676.
6. Gachet, Y., S. Tourner, M. Lee, A. Lazaris-Karatzas, T. Poulton, and U. A. Bommer. 1999. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J. Cell Sci.* **112(Pt 8)**: 1257-1271.
7. Gentile, D. A. and D. P. Skoner. 1996. A role for the sodium, potassium adenosine triphosphatase (Na⁺,K⁺ ATPase) enzyme in degranulation of rat basophilic leukaemia cells. *Clin. Exp. Allergy* **26**: 1449-1460.
8. Haas, M., A. Askari, and Z. Xie. 2000. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**: 27832-27837.
9. Haas, M., H. Wang, J. Tian, and Z. Xie. 2002. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **277**: 18694-18702.
10. Jung, J., M. Kim, M. J. Kim, J. Kim, J. Moon, J. S. Lim, M.

- Kim, and K. Lee. 2004. Translationally Controlled Tumor Protein Interacts with the Third Cytoplasmic Domain of Na,K-ATPase {alpha} Subunit and Inhibits the Pump Activity in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 49868-49875.
11. Kaplan, J. H., C. Gatto, J. P. Holden, and S. J. Thornewell. 1998. Structural changes associated with the coupling of ATP hydrolysis and cation transport by the Na pump. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **643**: 99-105.
 12. Kim, M., Y. Jung, K. Lee, and C. Kim. 2000. Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein. *Arch. Pharm. Res.* **23**: 633-636.
 13. MacDonald, S. M., L. M. Lichtenstein, D. Proud, M. Plaut, R. M. Naclerio, D. W. MacGlashan, and A. Kagey-Sobotka. 1987. Studies of IgE-dependent histamine releasing factors: heterogeneity of IgE. *J. Immunol.* **139**: 506-512.
 14. MacDonald, S. M. 1997. Human recombinant histamine-releasing factor. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **113**: 187-189.
 15. MacDonald, S. M., T. Rafnar, J. Langdon, and L. M. Lichtenstein. 1995. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* **269**: 688-690.
 16. Mohammadi, K., P. Kometiani, Z. Xie, and A. Askari. 2001. Role of protein kinase C in the signal pathways that link Na⁺/K⁺-ATPase to ERK1/2. *J. Biol. Chem.* **276**: 42050-42056.
 17. Nielsen, H. V., A. H. Johnsen, J. C. Sanchez, D. F. Hochstrasser, and P. O. Schiøtz. 1998. Identification of a basophil leukocyte interleukin-3-regulated protein that is identical to IgE-dependent histamine-releasing factor. *Allergy* **53**: 642-652.
 18. Sanchez, J. C., D. Schaller, F. Ravier, O. Golaz, S. Jaccoud, M. Belet, M. R. Wilkins, R. James, J. Deshusses, and D. Hochstrasser. 1997. Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes. *Electrophoresis* **18**: 150-155.
 19. Sampson, H. A., K. R. Broadbent, and J. Bernhisel-Broadbent. 1989. Spontaneous release of histamine from basophils and histamine-releasing factor in patients with atopic dermatitis and food hypersensitivity. *N. Engl. J. Med.* **321**: 228-232.
 20. Schroeder, J. T., L. M. Lichtenstein, and S. M. MacDonald. 1996. An immunoglobulin E-dependent recombinant histamine-releasing factor induces interleukin-4 secretion from human basophils. *J. Exp. Med.* **183**: 1265-1270.
 21. Sturzenbaum, S. R., P. Kille, and A. J. Morgan. 1998. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (HRF) in the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1398**: 294-304.
 22. Tamura, M., T. M. Harris, D. Phillips, I. A. Blair, Y. F. Wang, C. G. Hellerqvist, S. K. Larm, and T. Inagami. 1994. Identification of two cardiac glycosides as Na⁺-pump inhibitors in rat urine and diet. *J. Biol. Chem.* **269**: 11972-11979.
 23. Xie, Z. and A. Askari. 2002. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.* **269**: 2434-2439.
 24. Xie, Z. and T. Cai. 2003. Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol. Interv.* **3**: 157-168.

(Received Aug. 5, 2005/Accepted Sep. 12, 2005)