

생쥐 수지상세포에서 발현하는 CD11c 프로모터의 규명

김봉기 · 김정식 · 박정규*

서울대학교 의과대학 미생물학교실, 바이오이종장기 개발 사업단, 중앙면역의과학센터, 장기이식연구소

Characterization of the CD11c Promoter Which Is Expressed in the Mouse Dendritic Cells

[Immune Network 2008;8(4):137-142]

Bongi Kim, Jung-Sik Kim and Chung-Gyu Park*

Department of Microbiology and Immunology, Cancer Research Institute, Tumor Immunity Medical Research Center, Transplantation Research Institute, Xenotransplantation Research Center, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: CD11c, also known as integrin alpha x, is one of the optimum markers of dendritic cells. However, the regulation of the CD11c expression in mouse has not been identified yet. In this study, in order to analyze the regulation of CD11c expression, the promoter of CD11c was cloned and characterized. **Methods:** To identify the promoter portion, various sizes of what are considered to be CD11c promoter fragments was amplified by polymerase chain reaction (PCR), using mouse genomic DNA as a template. After sequence was obtained, these fragments were transfected into various cell lines including mouse dendritic cell lines such as JAWSII and DC2.4 and L929 as control cell line.. The promoter activity of three promoter fragments was measured and compared by luciferase activity in the transfected cells. **Results:** Three clones with size of 1kb, 3kb and 6kb were obtained from mouse genomic DNA. Flow cytometry analysis of JAWSII cells revealed that 52% of the cells expressed CD11c, which was confirmed by RT-PCR analysis. On the contrary, L929 and DC 2.4 cells did not express CD11c. The CD11c+ JAWSII cells were enriched from 52% to 90% with cell sorter. The comparative luciferase activity analysis demonstrated that the region responsible for tissue specific expression was contained within -3 kb and the clone with size of 3 kb particularly showed higher luciferase activity than 6 kb and 1 kb clones. **Conclusion:** The CD11c promoter region containing the region responsible for tissue specificity was successfully cloned and -3 kb region showed the highest activity.

서론

CD11c는 150KDa의 크기를 가지고 있으며, Integrin CD18 family 중 하나로 다른 CD11a (LFA-1), CD11b (MAC-1), 그리고 CD11d(αD)와 마찬가지로 CD11c/CD18의 형태로 이질이합체(heterodimer) 형태를 이루고 있다(1-3). 또한 아미노산의 서열, 리간드의 분포(ligand profile)면에서 보면, CD11b 와 매우 유사하다(4). 보체 리셉터4 (complement receptor 4)로 알려져 있는 CD11c는 iC3b-옵소닌 분자들(opsonized particles)의 포식작용에 관여하고(5), 보체(complement) 없이도 박테리아나 라텍스 구슬(latex bead)을 포식할 수 있게 해주는 것으로 알려져 있다(6). 사람의 CD11c는 주로 단핵구(monocytes)의 원형질막(plasma membrane), 대식세포(macrophage), 자연살해세포(Natural killer cell), 그리고 대부분의 수지상세포(dendritic cell)에서 발현되는 것으로 알려져 있지만(7), 생쥐의 경우 거의 수지상세포에서만 발현되어 수지상세포의 가장 좋은 표지자(Marker)로 알려져 있다(8-10). 또한, 사람의 CD11c는 프로모터를 비롯한 여러 전사조절인자들이 1990년대부터 알려져 왔다(11-14).

수지상세포(Dendritic cell)는 전문 항원제시 세포로서(Professional antigen presenting cell), 림프기관이나 조직의 주변부에 위치하면서 면역반응의 시작과 조절에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되어져 왔다(15). 이러한 생체내의 면역세포와 수지상세포의 기능적 관계를 이해하기 위한 방법 중의 한가지는 생체 내에서 수지상세포를 제거하고 수지상세포와 관여하는 림프구의 기능을 관찰하는 방법이 있다. 따라서 최근에는 생쥐에서 수지상세포의 표지자(Marker)로 알려진 CD11c 의 프로모터 부분과 디프테리아 독소 리셉터(diphtheria toxin receptor)를 이용하여 수지상세포를 제거 할 수 있는 생쥐가 개발되기도 하였다(16). 그러나, 이때 만들어진 프로모터부위는 사람의

Received on October 7, 2008. Revised on October 20, 2008. Accepted on October 24, 2008.

*책임저자. Tel: 82-2-740-8308; Fax: 82-2-743-0881; E-mail: chgpark@snu.ac.kr

이 논문은 서울대학교병원 일반연구비 지원(04-2003-018-0)에 의해 이루어진 것임.

Keywords: dendritic cells, CD11c, promoter

CD11c 프로모터와 genomic DNA hybridization에 의하여 얻어진 것으로서, 정확한 프로모터 부위는 알려지지 않았다(17).

따라서, 본 연구에서는 CD11c 발현의 조절 기전을 파악하고 수지상세포에만 특이하게 발현시킬 수 있는 construct의 제작을 위해 생쥐 수지상세포의 표지자(marker)로 알려진 CD11c 프로모터 부위를 마우스 genomic DNA에서 중합효소연쇄반응(PCR)을 통해 클로닝하고 프로모터 활성을 측정하였다. 그 결과 CD11c protein이 만들어지는 시작점에서 -3 kb까지의 부위에서 수지상세포 특이 활성화가 나타남을 알 수 있었다.

재료 및 방법

세포 배양

생쥐 수지상세포주인 JAWSII (ATCC - CRL 11904) 세포주는 20% fetal bovine serum (FBS, Gibco/BRL, USA), 4 mM L-glutamine, 50 µg/ml gentamycin (Invitrogen, USA), 그리고 5 ng/ml의 Mouse granulocyte macrophage stimulating factor (Peprotech, USA)가 포함된 alpha Minimum Essential medium (alpha-MEM, Gibco/BRL, USA)를 이용하여 배양하였다. 또 다른 생쥐 수지상세포주 DC 2,4는 Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Gibco/BRL, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco/BRL, USA), non-essential amino acids, β-mercaptoethanol, HPES, gentamycin을 혼합한 배지를 사용하여 배양하였다. 생쥐 섬유모세포인 L929 (ATCC-CCL1) 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco/BRL, USA)에 RPMI 배지와 같은 첨가물을 혼합하여 배양하였다. 모든 배양조건은 37°C, 5% CO₂ 상태에서 배양하였다.

유세포 분석(Flow cytometry)

FITC로 표지된 항체는 BD biosciences에서 구입하였다. 항체는 FITC conjugated CD11c (HL3)와 동형대조군(Isotype control)으로는 anti rat IgG1 κ 항체를 구입하여 사용하였다.

배양된 세포를 모은 후에 0.5% bovine serum albumin이 포함된 phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 9 mM CaCl₂ · 2H₂O, 5 mM MgCl₂ · 6H₂O, pH 7.4)에 2번 Wash하고 유세포 분석을 위한 준비를 하였으며 비특이적 Fc receptor 결합을 막기 위해 마우스 FcR 항체인 2.4G2를 5 × 10⁵ 세포에 처리하고, FITC로 표지된 anti CD11c 항체를 처리하였다.

유세포 분석을 위한 장비는 FACScan (BD bioscience, USA)를 이용하여 측정하였다. 또한 1 × 10⁷ 세포를 anti CD11c 항체로 표지하고, JSAN cell sorter (JSAN, JAPAN)를 이용하여 90% 이상 발현하는 부위를 분리하였다.

Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

배양된 세포를 수거하여 세포 수를 측정하고 2 × 10⁶ 세포를 이

용하여 전체 RNA를 RNeasy prep kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 분리하였다. 분리방법은 제조사 manual에 따라 수행하였다. 분리된 전체 RNA는 UV-spectrophotometer를 이용하여 양과 순도를 측정하였다. 분리된 전체 RNA는 Accupower[®] RT/PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 이용하여 원하는 cDNA를 합성하였다. 이렇게 합성한 cDNA에 Table 1에 표시된 RT primer와 β-actin primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. cDNA없이 β-actin primer를 넣어 PCR한 것은 음성대조군(Negative control)으로 사용하였다.

생쥐 genomic DNA 추출

C57BL/6 생쥐의 꼬리 끝을 10~20 mm 정도 자른 후, 100 ug/ml Proteinase K (Promega, USA)가 포함된 Tail lysis buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl) 200 µl에 넣고 55°C에서 12시간 진탕 배양 후, Phenol-chloroform extraction 후 에탄올 침전법으로 genomic DNA를 침전시키고, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer에 녹인 후, UV 흡광도를 통해서 양을 결정하였다.

클로닝(Cloning)

생쥐 genomic DNA 100 ng을 주형 DNA로 사용하여 Table 1에 나와있는 Primer를 사용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행하여 CD11c 프로모터 예상부위를 증폭하였다. PCR에 사용된 내열성 taq polymerase는 Han-pfu (Genenmed, Korea)를 사용하였고, 반응에 사용된 시약은 모두 제조사에서 제공된 시약을 사용하였다. PCR 반응의 조건은 94°C에서 3분으로 먼저 predenaturation 시키고 94°C에서 1분 동안 denaturation, 각 primer의 melting temperature (T_m)에 따라 54~60°C에서 1분 동안 annealing, 그리고 72°C에서 3분 동안 elongation하는 조건으로 35사이클을 수행한 후, 72°C에서 10분 동안 post elongation 과정을 수행하였다. 이렇게 얻어진 각각의 산물(product)을 제한효소 Mlu I과 Xho I을 이용하여 luciferase reporter vector인 pGL3 vector (Promega, USA)에 클

Table 1. Primer list used in cloning. The restriction enzyme site for cloning was indicated as bold characters

Primer	Sequence
1 kb forward MluI	5' CGACGCGTTT GCTGGCTGCTGCTATC3'
3 kb forward MluI	5' CGACGCGT AAGCAAAGACTCAGAAAAC3'
6 kb forward MluI	5' CGACGCGT ATCTGCAGAATTCGCCTTGCG3'
Reverse XhoI	5'CCGCT CGAG ATGACTGGAGAACAGAAG3'
CD11c RT forward	5'GCTGCTGCCACCAACCCCTTGGT3'
CD11c RT reverse	5'CATCTTGCCGAGCTCCACTTTG3'
β-actin forward	5'GTGGGCCGCTCTAGGCACCA3'
β-actin reverse	5'CTCTTGTATGTCACGCACGATTT3'

로닝 하였다. Transfection을 위하여 클로닝된 각각의 산물을 EndoFree[®] Plasmid Maxi kit (Qiagen, Germany)을 이용해 추출하였다.

Transfection

TransIT-TKO[®] transfection reagent (Mirus, USA)를 사용하여 Transfection을 수행하였다. 24 well plate에 50~60%의 confluency로 세포를 배양한 후 serum free DMEM으로 씻어내어 serum을 제거하였다. 각각의 Transfection reagents/DNA complex를 4 μ l: 2 μ g의 비율이 되도록 serum free DMEM 150 μ l에 각각의 plasmid DNA를 equal molar ratio로 섞은 후 세포에 적용하기 전에 상온에서 20분간 유지시켜 complex가 이루어지도록 하였다. 37°C, 5% CO₂에서 4시간 배양 후에 250 μ l의 complete 배지를 넣고 24시간 동안 동일 조건에서 배양한 후에 luciferase 발현 정도를 측정하였다.

Luciferase reporter assay

활성화된 luciferase는 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega, USA)을 이용하여 측정하였고, 제조사의 Manual에 나온 실험 방법으로 실험 하였다. 준비 방법을 간단히 기술하면, 24 well에서 배양된 세포를 침부된 lysis buffer를 처리하여 세포용해액(cell lysate)를 얻은 후 96 well plate에 20 μ l씩 분주한 후, 100 μ l substrate 처리 하여 luciferase 활성을 측정하였

다. 측정장비는 Victor 3 plate reader (Perkin Elmer, USA)를 이용하였고, 측정 조건은 substrate 처리하고 2초 후에 측정을 시작하여 10초간 측정하였다.

결 과

CD11c 프로모터 예상부위의 클로닝

CD11c 예상부위를 클로닝하기 위해 C57BL/6 생쥐의 꼬리에서 Tail lysis 방법으로 genomic DNA를 추출하였다. PCR 방법으로 증폭하기 위해 National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) 웹사이트의 생쥐유전자은행

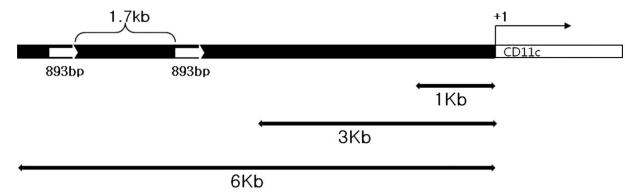


Figure 1. Schematic representation of the CD11c promoter construct. White arrows represent repeated sequence. 1.7 kb spanning region was identified between two white arrows. 1 kb, 3 kb, and 6 kb of tentative promoter region were cloned by using PCR amplification from mouse genomic DNA.

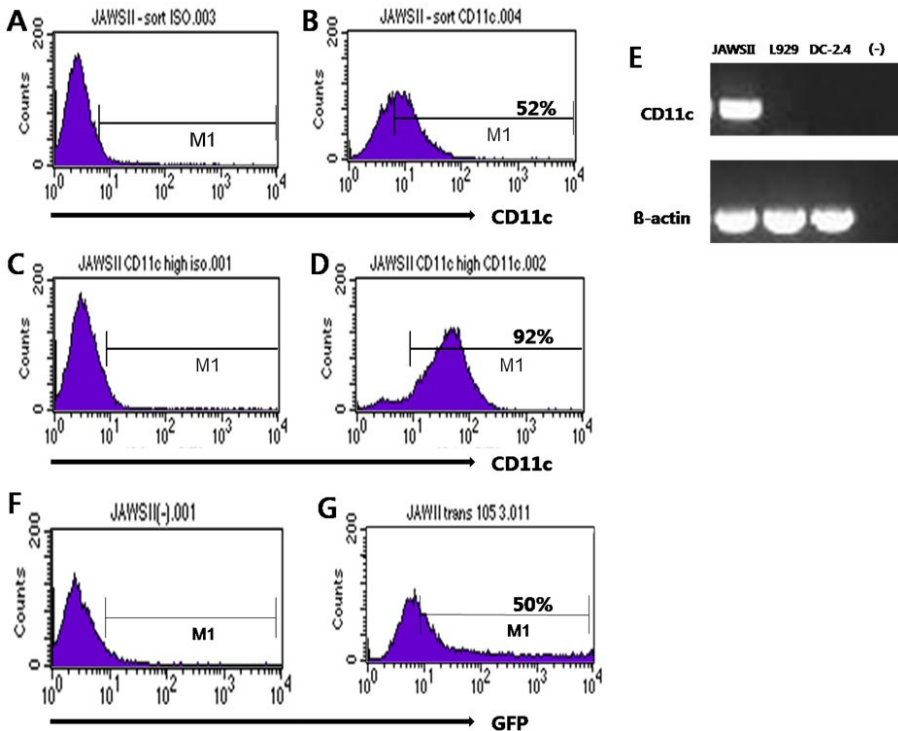


Figure 2. CD11c and GFP expression of JAWSII cells. Flow cytometry analysis for surface expression of CD11c on unsorted JAWSII cell (A, B) and CD11c+ enriched cells by cell sorter (C, D). E, CD11c mRNA expression was assessed by RT PCR. Total RNA was isolated from cultured cells (2×10^5) then reverse-transcribed and amplified in the presence of CD11c primer. (-) represents negative control. beta-actin expression was used as positive control and for normalization (E). GFP expression was detected in untransfected (F) and transfected cell (G) by flow cytometry.

(Mouse gene bank)에서 CD11c 예상부위를 검색하여 이곳의 정보를 바탕으로 Primer를 제작하여(Table 1) 증폭시켰다. 이렇게 얻어진 1 Kb, 3 Kb, 6 Kb의 fragment를 각각 pGL3 vector에 클로닝 하였다(pluc1, pluc3, pluc6) (Fig. 1) (재료 및 방법 참고).

JAWSII, L929, 그리고 DC2.4 세포의 CD11c 발현

생쥐 미성숙 수지상세포주인 JAWSII의 경우 전체 세포의 50~60%가 CD11c를 발현하고 있었다. FACS Sorter (JSAN, Japan)를 이용하여 CD11c 양성 세포를 90% 이상 높일 수 있었다(Fig. 2A-D). 또한, RT-PCR을 통해서 CD11c의 mRNA 발현을 확인한 결과, 생쥐 섬유모세포주 L929 세포와 생쥐 수지상세포주 DC2.4 에서는 CD11c의 mRNA 발현이 없는 반면에 JAWSII에서는 mRNA 발현이 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2E). 이는 유세포 분석을 통해서 DC2.4와 L929에서 CD11c가 거의 발현되지 않음을 확인하였다(Fig. 3). 특히 DC2.4의 경우 JAWSII와 마찬가지로 생쥐의 수지상세포주임에도 불구하고 CD11c의 발현이 나타나지 않았다.

JAWSII, L929, 그리고 DC2.4 세포의 transfection

클로닝된 프로모터 예상부위인, pluc1, pluc3, pluc6의 프로모터 활성은 각각 상대적인 luciferase의 활성으로 확인하였다. Luciferase의 활성을 측정하기 위하여 JAWSII 세포주에 프로모터 예상부위와 Renilla luciferase reporter vector (pRLbasic vector, promega, USA)를 내부대조군(internal control)으로 하여 동시에 transfection을 수행 하였다.

음성 대조군(negative control)으로는 클로닝이 되어 있지 않은 pGL3 vector와 양성 대조군(positive control)으로 c-Jun 프로모터를 cloning한 pcJun 클론을 사용하였다. Transfection시 리포솜(Liposome)을 이용한 방법과 전기천공법(electroporation)은 DNA를 효과적으로 세포내부로 전달하지 못하였다(데이터 제시하지 않음). Trans-IT TKO (Mirus)제품과 EGFP DNA를 이용하여 JAWSII 세포에서 약 50%의 transfection 효율을 보였다(Fig. 2F, G). L929세포와 DC 2.4 세포도 또한 JAWSII 세포

와 동일한 방법으로 transfection을 하였고, JAWSII 세포 보다 더 높은 transfection 효율을 나타냄을 알 수 있었다(데이터는 제시하지 않음).

프로모터 예상부위의 Luciferase reporter assay

프로모터 활성을 측정하기 위하여 transfection된 세포를 1xPassive lysis buffer (Promega, USA)를 이용하여 용해 시키고, luciferase 활성을 측정한 결과, CD11c를 발현하는 수지상세포주인 JAWSII 세포에서 pluc 1 과 pluc 3에서 활성이 높음을 알 수 있었다. 특히 JAWSII 세포에서는 pluc 3가 pGL3에 비해 17배 높은 활성을 나타내고 있었으며, DC2.4세포와 L929 세포에서는 pluc 6가 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 4). 그러나 같은 수지상세포이지만, DC 2.4세포는 CD11c의 발현이 수지상세포가 아닌 L929세포와 동일하게 mRNA나 단백질 수준에서 나타나지 않고 있었고(Fig. 2, 3), 프로모터 활성 또한 DC2.4세

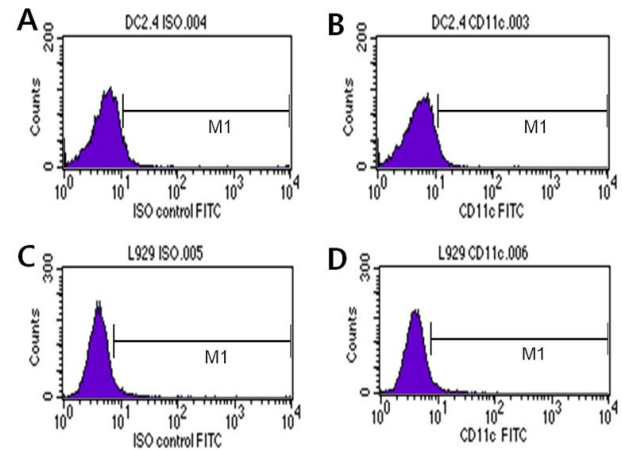


Figure 3. Expression of CD11c in DC2.4 (A, B) and L929 (C, D). Cells were stained with rat anti-mouse CD11c-FITC antibody to detect expression of CD11c on each cell lines. A rat IgG1k isotype-FITC was used as isotype-matched control. There was no increase in expression of CD11c on both DC2.4 and L929.

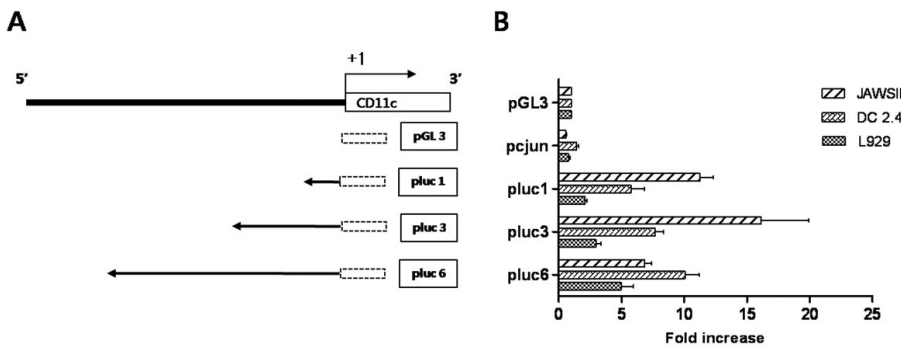


Figure 4. CD11c promoter activities in L929, DC2.4, and JAWSII. Schematic illustration of the promoter constructs used for transfection experiments. Dotted boxes represent a luciferase reporter vector, pGL3 (A). Luciferase reporter analysis of promoter constructs in L929, DC2.4, and JAWSII cells (B). Error bars represent the standard deviation from the mean of at least 3 independent experiments.

포가 L929세포보다 더 높은 활성을 나타내지만 비슷한 패턴으로 나타남을 알 수 있었다. 결과적으로 CD11c 유전자의 -3000-+1 부분이 프로모터의 활성화를 나타내었고 CD11c가 발현되는 세포에서 특이적인 활성화를 나타내었다.

고 찰

본 연구에서는 생쥐 수지상세포의 대표적인 표지자로 알려진 CD11c의 프로모터 부분으로 5'upstream 3 kb 부분을 클로닝하였고 이 부분이 CD11c 특이 활성화를 나타낸다는 사실을 보여 주었다.

전문 항원제시 세포로서, 수지상세포는 생체 내 면역활동의 시작이나 조절에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있다는 것은 잘 알려져 있는 사실이다. 더욱이, 생쥐에서는 CD11c가 거의 수지상세포에서만 발현하는 표지자이기 때문에, CD11c 유전자의 전사를 조절하는 프로모터를 활용하여, 수지상세포에서만 특이적으로 GFP와 같은 원하는 물질을 발현시킬 수 있었다(17).

하지만, 이렇게 만들어진 클론은 이미 알려져 있던 사람 CD11c 프로모터를 이용하여 생쥐 genomic DNA library와 hybridization을 통해 얻어진 것으로(17), 프로모터라기 보다는 프로모터가 포함된 5.5 kb의 크기를 가지는 CD11c 유전자의 5'부분이라고 말할 수 있다.

따라서, 프로모터 부위를 클로닝 하기 위하여, 생쥐의 유전자 은행에서 CD11c의 시작 Codon부터 역방향 다시 말해서, 5'방향으로 약 6 kb 크기의 단편을 증폭할 수 있도록 primer를 제작하였다. 상대적으로 3 kb 그리고 1 kb 크기의 단편을 증폭할 수 있는 primer도 같이 제작하였다. 이러한 primer를 이용하여, B57BL/6 생쥐의 꼬리에서 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 중합효소연쇄 반응을 통해 각각의 유전자 부위를 증폭할 수 있었다. 특히 6 kb 이미 발표된 5.5 kb의 크기를 포함하는 것으로서, 염기서열 분석을 통해서 3'방향으로 893 bp의 부분이 1.7 kb 간격을 두고 중복되어 있는 것을 발견 할 수 있었다(Fig. 1). 반복된 부분을 서열 상동성 검색(sequence homology search)을 해본 결과, 어떤 특이한 점도 발견하지 못했다(데이터는 제시하지 않음). 그러나, 이 부분이 포함된 6 kb 단편의 경우 다른 것보다 luciferase 활성이 약했기 때문에(Fig. 4), 아마도 중복된 서열부분이 CD11c의 발현에 어떤 조절기능을 할 수도 있을 것이라 추측할 수 있다.

수지상세포의 경우, DNA를 세포내로 전달시키는 방법인 Transfection이 매우 어려운 세포로 알려져 있다(18-24). 특히, 생쥐의 경우에는 CD11c가 수지상세포의 표지자로 알려져 있기 때문에, CD11c 프로모터 분석을 위해서는 반드시 수지상세포가 필요하다. 하지만, 사람의 경우에는 수지상세포를 비롯하여, 자연살해세포 또는 대식세포(Macrophage)에서도 CD11c가 발현하기 때문에 프로모터 분석을 위해서 굳이 transfection이 어려운 수지상세포를 사용하지 않아도 된다. 이러한 이유로 사람의

CD11c 프로모터 분석에는 보통 사람 대식세포주인 U937세포가 사용되어져 왔고, 전기천공법(electroporation)으로 효과적으로 transfection이 가능하다고 알려져 왔다(12). 이러한 이유가 상대적으로 생쥐의 CD11c 프로모터 분석에 관한 발표된 논문이 거의 없는 하나의 원인이 될 수 있을 것이다. 본 연구에서는 생쥐의 비성숙 수지상세포주인 JAWSII 세포가 사용되었다. JAWSII 세포 또한 Transfection이 어려운 세포로 알려져 있는데, TransIT-Tko (Mirus, USA)를 이용하여 JAWSII 세포에서 50%의 효율을 볼 수 있다고 발표되어졌다(25).

따라서 논문에서 제시한 방법으로 Transfection을 진행하였다.

JAWSII 세포는 유세포 분석 결과, 50~60%의 세포만이 CD11c를 발현하는 것으로 나타났다. cell sorter (JSAN, Japan)를 이용하여 CD11c 양성 세포를 90%이상 농축할 수 있었다. 이러한 차이는 RT-PCR법을 이용하여 mRNA 발현 수준에서도 차이가 남을 확인할 수 있었다(데이터는 제시하지 않음). 프로모터 활성 측정에는 CD11c 양성 세포가 90% 이상 포함된 JAWSII가 사용되었다. 또 다른 수지상세포주인 DC2.4 세포와 섬유 모 세포주인 L929세포는 JAWSII와 다르게 유세포 분석 결과 CD11c가 발현하지 않음을 볼 수 있었는데(Fig. 3), 모두 mRNA가 발현되지 않음을 RT-PCR을 통해 확인 할 수 있었다(Fig. 2). DC2.4는 myc과 raf를 coding하는 레트로바이러스를 골수세포(bone marrow cell)에 감염시켜 무한증식 할 수 있도록 만든 세포로서, 여러 수지상세포의 표현형을 나타낸다(26). 이러한 양상을 보이는 세포에서 luciferase 활성을 측정한 결과 DC2.4 세포와 L929세포의 경우, 비록 DC2.4의 활성이 L929세포보다는 높기는 하지만 모두 비슷한 패턴을 보이는 반면에, JAWSII의 경우에는 3 kb에서 가장 높은 활성을 보이고 6 kb는 상대적으로 낮은 활성을 보이고 있다(Fig. 4). 비록 양성 대조군으로 사용된 cJun프로모터 부분이 음성 대조군과 비슷하게 낮은 활성을 나타내지만, 이 프로모터가 CD11c와 다른 프로모터이며 실제로는 내부 대조군에 가까운 프로모터로 사용되었고, 더욱이 CD11c 프로모터예상부위의 활성이 이 값보다 훨씬 높은 값을 갖기 때문에, 데이터의 신뢰도에는 큰 문제가 없다고 할 수 있겠다(Fig. 4). 이상의 결과는, 생쥐의 CD11c프로모터가 시작 codon 부위에서부터 5'방향으로 3 kb의 크기를 갖는 부위에 위치한다는 것을 보여준다. 향후 3 kb 안에서 여러 가지 전사인자의 결합 부위를 찾는 연구를 통해 조직특이적 발현을 나타내는데 관여하는 인자를 확인할 수 있으며 클로닝 된 프로모터를 활용하면 수지상세포에 특이하게 발현되는 유전자를 삽입할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

DC2.4 세포를 제공해 주시고 많은 조언을 해주신 서울의대 이왕재 교수님께 감사 드립니다.

참고문헌

1. Lanier LL, Arnaout MA, Schwarting R, Warner NL, Ross GD: p150/95, third member of the LFA-1/CR3 polypeptide family identified by anti-Leu M5 monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 15;713-718, 1985
2. Springer TA, Miller LJ, Anderson DC: p150,95, the third member of the Mac-1, LFA-1 human leukocyte adhesion glycoprotein family. *J Immunol* 136;240-245, 1986
3. Sanchez-Madrid F, Nagy JA, Robbins E, Simon P, Springer TA: A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J Exp Med* 158;1785-1803, 1983
4. Corbi AL, Miller LJ, O'Connor K, Larson RS, Springer TA: cDNA cloning and complete primary structure of the alpha subunit of a leukocyte adhesion glycoprotein, p150,95. *EMBO J* 6;4023-4028, 1987
5. Malhotra V, Hogg N, Sim RB: Ligand binding by the p150,95 antigen of U937 monocytic cells: properties in common with complement receptor type 3 (CR3). *Eur J Immunol* 16;1117-1123, 1986
6. Keizer GD, Te Velde AA, Schwarting R, Figdor CG, De Vries JE: Role of p150,95 in adhesion, migration, chemotaxis and phagocytosis of human monocytes. *Eur J Immunol* 17;1317-1322, 1987
7. Hogg N, Takacs L, Palmer DG, Selvendran Y, Allen C: The p150,95 molecule is a marker of human mononuclear phagocytes: comparison with expression of class II molecules. *Eur J Immunol* 16;240-248, 1986
8. Winkel K, Sotzik F, Vremec D, Cameron PU, Shortman K: CD4 and CD8 expression by human and mouse thymic dendritic cells. *Immunol Lett* 40;93-99, 1994
9. Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM: The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med* 171;1753-1771, 1990
10. Agger R, Crowley MT, Witmer-Pack MD: The surface of dendritic cells in the mouse as studied with monoclonal antibodies. *Int Rev Immunol* 6;89-101, 1990
11. Shelley CS, Teodoridis JM, Park H, Farokhzad OC, Böttiger EP, Arnaout MA: During differentiation of the monocytic cell line U937, Pur alpha mediates induction of the CD11c beta 2 integrin gene promoter. *J Immunol* 168;3887-3893, 2002
12. López-Cabrera M, Nueda A, Vara A, Garcia-Aguilar J, Tugores A, Corbi AL: Characterization of the p150,95 leukocyte integrin alpha subunit (CD11c) gene promoter. Identification of cis-acting elements. *J Biol Chem* 268;1187-1193, 1993
13. Lopez-Rodriguez C, Botella L, Corbi AL: CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) regulate the tissue specific activity of the CD11c integrin gene promoter through functional interactions with Sp1 proteins. *J Biol Chem* 272;29120-29126, 1997
14. Lopez-Rodriguez C, Corbi AL: PU.1 negatively regulates the CD11c integrin gene promoter through recognition of the major transcriptional start site. *Eur J Immunol* 27;1843-1847, 1997
15. Bell D, Young JW, Banchereau J: Dendritic cells. *Adv Immunol* 72;255-324, 1999
16. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR, Lang RA: In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17;211-220, 2002
17. Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K: Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 185;541-550, 1997
18. Arthur JF, Butterfield LH, Roth MD, Bui LA, Kiertscher SM, Lau R, Dubinett S, Glaspy J, McBride WH, Economou JS: A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther* 4;17-25, 1997
19. Diebold SS, Kursa M, Wagner E, Cotten M, Zenke M: Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells. *J Biol Chem* 274;19087-19094, 1999
20. Diebold SS, Lehmann H, Kursa M, Wagner E, Cotten M, Zenke M: Efficient gene delivery into human dendritic cells by adenovirus polyethylenimine and mannose polyethylenimine transfection. *Hum Gene Ther* 10;775-786, 1999
21. Strobel I, Berchtold S, Götze A, Schulze U, Schuler G, Steinkasserer A: Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes. *Gene Ther* 7;2028-2035, 2000
22. Irvine AS, Trinder PK, Loughton DL, Ketteringham H, McDermott RH, Reid SC, Haines AM, Amir A, Husain R, Doshi R, Young LS, Mountain A: Efficient nonviral transfection of dendritic cells and their use for in vivo immunization. *Nat Biotechnol* 18;1273-1278, 2000
23. Lohmann S, Galle K, Knop J, Enk AH: CD83+ human dendritic cells transfected with tumor peptide cDNA by electroporation induce specific T-cell responses: a potential tool for gene immunotherapy. *Cancer Gene Ther* 7;605-614, 2000
24. Van Tendeloo VF, Snoeck HW, Lardon F, Vanham GL, Nijs G, Lenjou M, Hendriks L, Van Broeckhoven C, Moulijn A, Rodrigus I, Verdonk P, Van Bockstaele DR, Berneman ZN: Nonviral transfection of distinct types of human dendritic cells: high-efficiency gene transfer by electroporation into hematopoietic progenitor- but not monocyte-derived dendritic cells. *Gene Ther* 5;700-707, 1998
25. Awasthi S, Cox RA: Transfection of murine dendritic cell line (JAWS II) by a nonviral transfection reagent. *Biotechniques* 35;600-602, 604, 2003
26. Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL: Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 158;2723-2730, 1997