creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

이학석사 학위논문

단핵구와 대식세포에서 motilin receptor의 발현과 기능에 대한 연구

Expression and function of motilin receptor in monocytes and macrophages

2022년 8월

서울대학교 대학원

자연과학대학 생명과학부 생명과학전공

이 승 아

단핵구와 대식세포에서 motilin receptor의 발현과 기능에 대한 연구

Expression and function of motilin receptor in monocytes and macrophages

지도교수 허 원 기

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함
2022년 8월

서울대학교 대학원
생명과학부
이 승 아

이승아의 이학석사 학위논문을 인준함
2022년 8월

위 원 장 최 희 정 (인)

부위원장 허 원 기 (인)

위 원 박 상 현 (인)

초 록

G protein-coupled receptor (GPCR)의 일종인 motilin receptor (MLNR)는 소장에서 발현되는 펩타이드 호르몬인 motilin에 대한 수용체로, 장에서 평활근의 수축에 관여한다고 알려져 있으며 소화계에서의 위장 운동 및 내분비계에 대한 연구가 주로 진행되었다. 그러나 MLNR은 소장뿐만 아니라 중추신경계, 내분비계, 골수와 림프조직에서도 발현되기 때문에 MLNR이 각 기관에서 다양한 역할을 가질 것이라 예측해볼 수 있다.

MLNR이 실제로 가장 많이 발현되는 기관인 위장관(gastrointestinal tract)은 음식물에 대한 소화뿐만 아니라 외부 물질에 대한 방어작용을 수행하는 면역기관으로서의 역할을 갖는다. 또한 위장관에는 가장 많은 수의 대식세포들이 존재하는 장소로, 면역세포들에 의한 복잡한 상호작용이 일어난다고 알려져 있다.

본 연구에서는 MLNR이 위장관, 골수, 그리고 단핵구 세포주 THP-1 cell에서 발현된다는 사실을 통해 단핵구 및 대식세포에서 MLNR의 발현과 기능에 대해 탐구하고자 하였다. Motilin은 MLNR을 통해 Gq/11을 주로 활성화시키는 것으로 알려져 있었지만, BRET을 이용한 Gα activation assay를 통해 Gq/11뿐만 아니라 Gi/o family, 특히 GoA/oB, Gz도 활성화시키는 것을 알 수 있었다. MLNR을 활성화시키는 것으로 알려진 다른 erythromycin 계열 항생제들과 MLNR selective agonist인 camicinal도 motilin과 같은 Gα activation 활성을 보였다. 반면, MLNR selective antagonist로 알려진 MA-2029는 motilin, camicinal, erythromycin에 의한 G protein 활성화는 억제시켰으나, azithromycin에 의한 Gz, G11 활성화는 부분저해했으며, roxithromycin에 의한 Gq, G11, Gz 활성화는 전혀 저해하지 못하였다.

단핵구 상태인 THP-1 세포주에 PMA를 처리하여 대식세포로 분화시키면, MLNR의 mRNA 발현량이 증가하였다. 그리고, motilin 및 다른 MLNR 리간드들을 PMA에 함께 처리하였을 때 M0 대식세포로의 분화

가 더 강하게 유도되는 것을 CD163, CD204, TIM-3 발현 증가로 확인하였다. PMA에 의한 THP-1 대식세포 분화는 MAPK 경로 저해제인 U0126에 의해 완전히 저해되었으므로 MAPK 활성이 대식세포 분화에 중요함을 알 수 있었다. Motilin과 PMA의 동시처리는 PMA 단독처리에 비해 ERK 인산화를 유의하게 증가시켰다. 이는 motilin이 ERK 활성화를 증가시킴으로써 THP-1 대식세포 분화를 증가시킨다는 것을 의미한다.

M0 대식세포를 M2 대식세포로 분화시킬 때 motilin을 IL-4, IL-13과 함께 처리하면 염증억제 M2 대식세포로의 분화가 유의하게 증가함을 CD206, CD163, fibronectin, IL-10 발현량을 통해 확인하였다. Motilin은 LPS에 의한 염증유발 M1 대식세포로의 분화에는 영향을 주지 않았다. Motilin에 의한 M2 대식세포 분화 표지 단백질 CD206, CD163, fibronectin, IL-10 mRNA의 증가는 MLNR antagonist MA-2029에 의해 모두 저해되었으나, Gi inhibitor인 pertussis toxin은 fibronectin과 IL-10 발현만을, Gq inhibitor인 YM-254890은 CD206 발현만을 억제하였다.

STAT-6의 활성화가 M2 대식세포로의 분화에 중요하다는 것이 알려져 있는데 motilin 동시처리는 IL-4와 IL-13만 처리한 군에 비해 유의하게 STAT-6 인산화를 증가시켰다. 이는 motilin이 STAT-6 인산화를 증가시킴으로써 M2 대식세포 분화에 기여함을 의미한다. 본 연구의 결과는, MLNR이 macrophage로 분화할 때 발현량이 증가하며 M0으로의 분화, M2로의 분화를 증가시킴으로써 위장관에서 염증억제반응에 관여할 것이라는 가능성을 제시한다. GPCR을 하나의 역할이나 질병에 국한하지 않고 다양한 분야에서 그 발현과 기능에 대해 연구한다면, 질병치료제의 표적을 확장시키고 GPCR 표적 약물의 작용 기전에 대한 이해를 높일 수 있다.

주요어 : GPCR, MLNR, BRET, G protein, monocyte, macrophage
학 번 : 2020-21891

목 차

초 록 ····· i

목 차 ····· ii

표 및 그림 목차 ····· iii

줄임말 정리 ····· iv

제 1 장 서론 ····· 1

1. 면역학적 관점에서의 GPCR ····· 1

2. 대식세포의 분화 ····· 2

3. 연구의 목적 및 의의 ····· 3

제 2 장 재료 및 방법 ····· 5

제 3 장 결과 ····· 13

Part Ⅰ. MLNR의 다양한 리간드에 의한 G protein 신호전달 기전 규명 ····· 13

Part Ⅱ. 단핵구에서 대식세포로의 분화에서 MLNR이 미치는 영향에 대한 연구 ····· 22

Part Ⅲ. M0 대식세포에서 M1 또는 M2로의 분화 과정에 motilin이 미치는 영향에 대한 연구 ····· 29

Part Ⅳ. MLNR 특이적 M2 분화에 대한 효과 검증 및 이에 관여하는 G protein 경로 분석 ····· 36

제 4 장 논의 ····· 43

참고문헌 ····· 49

Abstract ····· 54

표 목 차

표 1. 본 연구에서 사용한 플라스미드 목록 ····· 11

표 2. 본 연구에서 사용한 plasmid 목록 ····· 12

표 3. 그림 2B의 데이터에 대해 logEC50를 통계 처리한 결과 ····· 18

그 림 목 차

그림 1. BRET assay를 통한 MLNR-motilin의 G protein 활성 (dissociation) 분석 ····· 15

그림 2. BRET assay를 통한 MLNR 리간드들의 G protein 활성 (dissociation) 분석 ····· 17

그림 3. Antagonist MA-2029에 의한 G protein 활성 억제 분석 ····· 20

그림 4. 단핵구에서 대식세포로의 분화에 PMA와 MLNR의 리간드가 미치는 영향 ····· 24

그림 5. MEK inhibitor U0126의 대식세포 분화 억제 효과와 PMA와 motilin에 의한 ERK1/2 phosphorylation ····· 27

그림 6. M0 대식세포에서 M1으로의 분화와 motilin이 미치는 영향 ·· 30

그림 7. M0 대식세포에서 M2로의 분화와 motilin이 미치는 영향 ····· 32

그림 8. M2 분화 조건에서 STAT6 phosphorylation 관찰 ····· 35

그림 9. MLNR antagonist, Gi · Gq inhibitor가 M2 분화에 미치는 영향 확인 및 MLNR 특이적 M2 분화현상에 대한 규명 ····· 39

그림 10. 대식세포 분화과정 및 motilin이 분화에 미치는 영향 요약 · 42

줄임말 정리

BRET	Bioluminescence resonance energy transfer
BSA	Bovine serum albumin
CD206	Cluster of differentiation 206
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10
EC50	Half-maximal effective concentration
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Emax	Maximal effect at high drug concentration
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
GPCR	G protein-coupled receptor
HBSS	Hanks balanced salts solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
JAK/STAT	Janus kinase-signal transducer and activator of transcription
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
PCR	Polymerase chain reaction
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
Rluc	Renilla luciferase
TIM-3	T cell immunoglobulin and mucin domain-containing-3
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
VC	C-terminal fragment of Venus

제 1 장 서론

1. 면역학적 관점에서의 GPCR

G protein-coupled receptor (GPCR)은 7개의 transmembrane 구조를 가진 세포막 수용체로, 세포 외부의 호르몬, 신경전달물질, 이온, 빛, 냄새, 펩타이드 등의 다양한 외부 자극을 인식하여 세포의 내부로 신호를 전달하는 기능을 한다 (Bjarnadóttir, *et al.*, 2006). 현재 인간에게서 발현하는 GPCR은 약 800 여 종 이상이 발견되었고, GPCR 활성화에 따른 하위 신호전달 기전과 체내 생리작용의 연관성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 또한 GPCR의 기능 제어를 통한 질병 치료를 목적으로 다양한 의약품의 표적으로써 연구되고 있다 (Chan, *et al.*, 2019).

면역시스템에서 GPCR은 특히 백혈구와 같은 면역세포의 기능을 시·공간적 측면에서 조절하는 역할을 한다는 것이 알려져 있다. 대부분의 동물 조직에서 백혈구는 한 종류 이상의 GPCR을 발현하며, 세포 외부의 다양한 chemokine이나 chemoattractant를 감지하여 백혈구의 움직임을 조절하거나 염증반응과 같은 면역 작용에 영향을 미친다. 이에 따라, 면역세포에서 내생적으로 발현하고 있는 GPCR에 대한 면역 작용 측면의 연구가 활발히 진행되고 있으며, 당뇨, 동맥 경화증(atherosclerosis), 또는 크론병(Crohn's disease)이나 궤양성 대장염(ulcerative colitis)과 같은 만성 염증 질환 등에 대한 질병 치료제의 표적으로써 주목받고 있다. 특히, 대식세포(macrophage, MΦ)에서도 다양한 종류의 GPCR이 발현되고 있고, 이 GPCR이 대식세포의 분화를 조절하기도 하며 염증성 사이토카인의 분비 등 대식세포의 기능에 영향을 미친다는 것이 밝혀진 바 있다 (Hilger *et al.*, 2018).

2. 대식세포 분화

대식세포는 선천성 면역시스템을 구성하는 백혈구의 일종으로, 단핵구(monocyte)의 분화과정을 거쳐 생성되며, 생리학적 그리고 병리학적 조건에 따라 다양한 면역반응과정에 참여한다. 감염 등으로 인한 염증 작용 과정에서 혈액의 단핵구 세포들이 조직으로 모여들어 대식세포로 분화하며 면역기능이 활성화된다. 대식세포는 높은 가소성(plasticity)을 가져, 외부 환경으로부터 오는 자극에 따라 다양한 표현형(phenotype)으로 분화한다는 것이 알려져 있다. 대식세포의 분화에 대한 전통적인 관점에서는, 감염 등에 의해 염증반응을 일으키는 M1 타입(pro-inflammatory, classically activated MΦ)과 이러한 염증반응을 중단시키는 항염증성의 M2 타입(anti-inflammatory, alternatively activated MΦ)으로 크게 이분화하여 구분해왔다 (Genin, *et al.*, 2015; Mosser & Justin, 2008).

그러나 현재는 단순한 이분법적 분류보다는 대식세포는 스펙트럼과 같이 연속적인 형질을 갖는다는 관점이 주를 이룬다. 특히 항염증반응에 관여하는 M2 타입 대식세포에 대해서, 과도한 염증반응을 막기 위한 항염증 사이토카인의 분비나 물질대사 관여, 세포 파편 제거 등의 항상성 조절 기능 또는 조직을 재생하는 기능 등 다양한 생리적 역할이 보고됨에 따라, 분화 메커니즘과 표현형에 따른 기능 등 연구의 범위가 확장되고 있다. 이처럼 대식세포는 주변 환경의 신호물질에 따라 각기 다른 방향으로 분화하여 염증반응을 조절하는데, 주로 LPS (lipopolysaccharide) 또는 IFN-γ (interferon gamma)에 의해 M1 세포로 분화하고, IL-4, IL-13 자극에 의해 M2 세포로 분화한다. M1 세포는 TNF-α, CXCL10, IL-1β, IL-6과 같은 염증반응을 일으키는 사이토카인 유전자의 발현이 증가하는 반면, M2 세포는 CD206, CD163, fibronectin, IL-10과 같은 유전자의 발현이 증가하며 항염증 사이토카인의 분비 등이 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 유전자들이 대식세포 분화의 방향과 종류를 가리키는 표지로 사용되고 있다 (Mosser & Justin, 2008).

3. 연구의 목적 및 의의

본 연구의 연구대상인 motilin receptor (MLNR, MTLR, GPR38)는 class A GPCR로, 소장 등의 내분비세포에서 motilin이라는 펩타이드 리간드와 결합하여 위장의(gastrointestinal) 평활근(smooth muscle) 세포의 수축을 일으켜 위장 내 물질을 배출(gastric emptying)하는 기능을 수행한다고 알려져 있다. MLNR은 소화기관에서 위장 운동과 같은 기능적 측면에 집중되어, 주로 위 마비와 같은 소화계 질환에 대한 치료제의 표적으로 연구되어 왔다 (Sanger & Furness, 2016).

MLNR은 소화기관뿐만 아니라 뇌를 포함한 중추신경계, 내분비계, 골수와 림프조직 등 다양한 기관과 조직에서 발현되고 있다. 중추신경계의 세포들에서도 MLNR이 발현되며, 뇌에서 motilin이 신경전달물질처럼 작용하여 신경계를 통해 위장 운동을 조절한다는 사실도 밝혀져 있다. Motilin을 해마(hippocampus)나 편도체(amygdala)에 투여했을 때, 장의 운동이 촉진되었다는 연구결과도 보고된 바 있다 (Feng, *et al.*, 2007). 리간드인 motilin은 소장에서 생성되지만, 그 수용체인 MLNR은 다양한 기관과 조직에서 발현되기 때문에 각각의 장소에서 생리적 기능을 수행할 수 있다. 그러나 현재까지 대부분의 motilin과 MLNR에 대한 연구는 위장관의 운동이나, 허기(hunger) 조절과 같은 소화와 관련된 신경계 활동에 중점을 두고 진행되어 왔다 (Deloose, *et al.* 2019).

본 연구에서는 실제로 MLNR이 가장 많이 발현되는 장에 대해서 소화기능을 수행할 뿐만 아니라 면역반응이 활발히 일어나는 장소라는 사실에 초점을 맞추어, 면역학적 기능 측면에서 접근해보고자 하였다. 위장관(gastrointestinal tract, GI tract)에는 수천 종류의 박테리아 등으로 이루어진 장내 미생물군(gut microbiota)이 존재하며, 다양한 종류의 면역 세포들이 복합한 상호작용을 이루고 있는, 물질대사 및 면역 건강을 수행하는 기관이다. 면역학 관점에서 위장관은 인간의 발달과정, 생장, 섭식 활동에 따른 위 내용물의 변화, 그리고 질병 등에 의해서 세포 간 상호작용이 끊임없이 변화하기 때문에 높은 유동성과 복잡성을 갖는다. 특히, 위장관에는 인체에서 가장 많은 수의 대식세포가 존재하며, 대식세포가

위장관의 다양한 생리작용에 기여한다는 것이 잘 알려져 있다. 대식세포는 인체의 건강상태, 발달, 질병 등에 의하여 다양한 표현형을 보이며, 신경 전달을 통한 소화 운동의 조절과 인체 내 미생물생태계(microbiome)의 상호작용에 영향을 미친다 (Cipriani, *et al.*, 2016).

따라서 본 연구에서는 기존에 알려진 소화 운동이나 허기 조절 등과 관련된 기능 외에도, MLNR이 단핵구 및 대식세포에서도 발현한다는 사실을 환기하여 MLNR의 알려지지 않은 면역학적 역할을 탐구하고자 한다. 주로 소화 기능에 대해 이루어졌던 이전 연구의 틀에서 벗어나, 선천성 면역에 관여하는 세포 중 특히 장내 염증반응을 주도하는 대식세포에서 MLNR의 기능에 대해 연구하고자 한다.

본 연구에서는 내생적으로 MLNR을 발현하는 인간 단핵구 세포주 THP-1을 활용하여, 단핵구와 대식세포에서 MLNR의 발현량이 어떤 차이를 보이는지와 MLNR의 리간드인 motilin을 처리하였을 때 대식세포의 분화가 유도되는지를 탐구해고자 한다. 또한 MLNR이 motilin 자극에 의해 활성화되었을 때 어떠한 G protein을 활성화시키는지를 직접적으로 확인하고자 한다. 대식세포의 분화와 MLNR의 기능에 대한 연구는 면역시스템에서 GPCR의 역할에 대한 이해의 폭을 넓히고, 더 나아가 면역질환 치료제 개발의 토대를 쌓을 수 있을 것이라 기대할 수 있다.

제 2 장 재료 및 방법

1. Cell lines and culture condition

Human embryonic kidney 293A 세포 (HEK293A)와 Human acute monocytic leukemia 세포 (THP-1)는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구매하였다.

HEK293A 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM /HIGH glucose, Hyclone)에 FBS 10% (Hyclone)와 penicilin -streptomycin 100 U/ml (Hyclone)을 첨가하여 humidified incubator (37 ℃, 5% CO_2)에서 배양했다.

THP-1 세포는 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640, Hyclone)에 FBS 10 %, penicilin-streptomycin 100 U/ml을 첨가하여 humidified incubator (37 ℃, 5% CO_2)에서 배양했다.

2. Plasmids and constructs

BRET assay (TRUPATH)에서 사용한 MLNR을 발현하는 플라스미드는 Lambda integrase/exisionase (Elpis Bio, #EBT-3043)를 사용하여 두 개의 플라스미드, pcDNA-DEST-VC155와 pENTR-FLAG-MLNRx를 이용하여 LR recombination 기법으로 클로닝하였다. TRUPATH assay에 사용된 플라스미드는 Addgene (#1000000163)에서 구매하였고, 본 연구에서 사용한 플라스미드 목록은 표 1과 같다.

3. Quantitative PCR

qPCR 실험을 진행할 세포 샘플에 대하여 RNeasy mini kit (Qiagen, #74104)를 사용하여 RNA를 추출한 후 500 ng RNA에 DNase I (Sigma Aldrich, #AMPD1-1KT)을 처리하여 DNA를 분해시켰다. Reverta Ace® qPCR RT Kit (Toyobo, #FSQ-101)을 사용하여 cDNA를 합성한 뒤,

cDNA를 SYBR Green qPCR master mix (Bioline, #BIO-94020)에 희석하여 96-well optical reaction plate (Thermo Fisher Scientific, #N8010560)에서 반응시켰다. 이때 사용한 primer 목록은 표 2와 같다. Applied Biosystems QuantStudio3 장비를 이용하여 qPCR 반응을 진행하였고, RPS9 유전자를 endogenous control로 사용하였다. 모든 데이터 처리는 GraphPad Prism 5.0을 사용하였다.

4. BRET (Bioluminescence resonance energy transfer) assay

BRET assay를 수행하기 위해 transfection 24 h 전에 6-well culture plate (SPL, #30006)에 HEK293A 세포주 4.5×10^5 cells/well을 준비하였다. Opti-MEM (Gibco)에 pcDNA-FLAG-MLNRx, pcDNA-GNA-Rluc8, pcDNA-GNB, pcDNA-GNG-GFP2 플라스미드를 각각 50 ng 씩 희석하고, PEImax (Polysciences, #24765-100)를 사용하여 transfection 하였다. 이때 각각의 Gα 종류에 따라, Gβ, Gγ를 논문에서 권장한 조합으로 사용하였다. Transfection 24 h 후 EDTA 20 mM (Amresco)와 BSA 0.1% (SERVA Electrophoresis)를 첨가한 DPBS (Hyclone)로 세포를 떼어낸 후 원심분리하여 용액을 제거하고, FBS 10%를 첨가한 DMEM (without phenol red, Gibco)에 세포 샘플을 풀어준 후 flat-bottom 96-well culture cell plate (Costar, white, #3917)로 옮겨 배양하였다. Transfection 48 h 후, culture media를 제거하고, HEPES 20 mM (Gibco)를 첨가한 HBSS (Welgene)에 coelenterazine 400a 5 μM (Nanolight, #340-5)와 리간드를 처리하여 incubator에서 5분간 Rluc8을 활성화 시켰다. Antagonist를 사용하는 경우에는, coelenterazine 400a와 리간드를 처리하기 30 min 전에 antagonist를 처리하였다. Berthold technologies Tristar^{2}S LB 942 장비를 사용하여 Rluc8을 410 nm, GFP2는 515 nm 파장에서 형광값을 측정하였고, 모든 샘플은 triplicate로 수행하였다. 모든 데이터 처리는 GraphPad Prism 5.0을 사용하였다.

5. Macrophage differentiation

단핵구 상태의 THP-1 세포를 M0 대식세포로 분화시키기 위해서, 12-well culture plate (SPL, #30012)에 THP-1 4×10^5 cells/well을 준비하고, 다양한 농도의 Phorbol-12-myristate-13-acetate, (PMA, Sigma Aldrich, #16561-29-8)를 처리하여 7일간 배양하였다.

THP-1을 M1 또는 M2 대식세포로 분화시키기 위해, 6-well culture plate (Corning, #3506)에 THP-1 8×10^5 cells/well을 준비하여 100 nM PMA를 처리하고 24 h 동안 배양하여 먼저 M0 대식세포로 분화시켰다. 이때 M0에서 M1으로 분화시킬 때에는 Lipopolysaccharide (Sigma)를 1, 10, 또는 100 ng/ml 되도록 처리하여 24 h 동안 배양하였다. M0에서 M2로 분화시킬 때에는 culture media를 새로 갈아준 뒤, IL-4 (R&D systems)와 IL-13 (Peprotech)을 각각 20 ng/ml 되도록 처리하여 72 h 동안 배양하였다.

각 분화 단계에 미치는 motilin의 영향을 확인하고자 할 때에는 각각의 사이토카인에 motilin 10 nM (Tocris)을 추가로 처리하였다. motilin에 의한 효과가 MLNR에 의한 현상임을 검증하기 위한 실험에서는 MLNR의 selective antagonist MA-2029 (Tocris) 10 μM을, Gi 또는 Gq protein 의존적인 현상임을 확인하기 위해서는 pertussis toxin 100 ng/ml (PTX, Tocris) 또는 YM-254890 (Adipogen) 1 μM을 사이토카인 및 motilin을 처리하기 30 min 전에 처리하였다.

6. Western blot analysis

THP-1 세포주에서 PMA에 의한 대식세포 분화과정에서 ERK의 활성화와, IL-4, IL-13에 의한 M2 분화과정에서 STAT6의 활성화의 상관관계를 확인하기 위한 Western blot을 수행하였다.

단핵구 상태의 THP-1 세포에서 PMA 단독 처리와 PMA와 motilin 동시 처리에 의한 ERK phosphorylation을 관찰하기 위해, FBS 10%가 첨가된 RMPI media에서 배양하던 THP-1 세포를 FBS가 없는 RPMI media에서 24 h 동안 배양한 후, 12-well culture plate에 well 당 4×10^5

cells/ml을 준비하여 주어진 시간 조건에 따라 최종 농도가 PMA 12.5 nM, motilin 10 nM이 되도록 처리하였다.

M0에서 M2로의 분화 단계에서 IL-4, IL-13 처리 조건과 motilin을 추가하여 동시 처리한 조건에서 STAT6 phosphorylation을 관찰하기 위해, 6-well culture plate에 THP-1 8×10^5 cells/well을 준비하여 100 nM PMA를 처리하여 24 h 동안 배양하여 먼저 M0 대식세포로 분화시켰다. FBS가 없는 RPMI media에서 24 h 동안 추가로 배양한 후, 주어진 시간 조건에 따라 최종 농도가 IL-4 20 ng/ml, IL-13 20 ng/ml, motilin 10 nM이 되도록 처리하였다.

반응을 끝낸 세포 샘플은 500 xg로 4 ℃에서 5 min 동안 원심분리한 후, media를 제거한 pellet에 protease inhibitor (leupeptin, pepstatin, benzamidine, PMSF) 와 phosphatase inhibitor (NaF, $Na_4P_2O_7$, Nappi, β-glycerophosphate)를 추가한 cell lysis buffer (RIPA buffer; Tris-HCl (pH 7.4), NaCl, Triton X, NP40, EDTA, sodium deoxycholate)를 처리하여 30 min 동안 ice에 두었다. 세포 샘플을 14,000 rpm으로 4 ℃에서 10 min 동안 원심 분리한 후, 상층액을 SDS sample loading buffer (Tris-HCl (pH 6.8), Glycerol, SDS, Bromophenol blue, DTT)에 희석하여 95 ℃에서 5 min 동안 가열하였다. 이때 sample buffer를 넣지 않은 샘플을 Bradford를 사용하여 정량하였다.

SDS-PAGE gel (running gel 10%, stacking gel 5% acrylamide)에서 단백질 샘플을 분리한 후, Nitrocellulose membrane으로 옮겼다. Skim milk 5%를 넣은 TBST buffer를 처리하여 상온(RT)에서 1 h 동안 blocking 후, 각 실험에 해당하는 antibody를 처리하고 (primary antibody overnight, 4 ℃/ secondary antibody 1 h, RT) EZ-Western Lumi Femto Kit (Dogen, #DG-WF200)을 사용하여 관찰하였다.

Western blot 결과는 Image J 프로그램을 이용하여 band intensity를 측정하였고, GraphPad Prism 5.0을 이용하여 데이터 처리하였다.

7. FACS (Fluorescence-activated cell sorting)

FACS로 THP-1의 M2 분화과정에서 M2 표지 유전자인 CD206의 세포 표면 발현량을 측정하였다. THP-1 세포를 M2 대식세포로 분화시키기 위해, 6-well culture plate에 THP-1 8×10^5 cells/well을 준비하여 100 nM PMA를 처리하여 24 h 동안 배양하여 먼저 M0 대식세포로 분화시킨 뒤 fresh media로 교체하였다. IL-4와 IL-13을 각 20 ng/ml 되도록 단독으로 또는 motilin 10 nM과 함께 처리하여 72 h 동안 배양하여 M2로 분화시켰다. M2로 분화한 세포들은 5 mM EDTA를 첨가한 DPBS로 ice에서 40 min 동안 incubation 한 후, cell lifter (SPL, #90040)를 이용하여 떼어낸 후, 500 xg로 4 ℃에서 5 min 동안 원심분리하였다. FBS 2%, sodium azide 0.5%를 첨가한 2 mM EDTA-DPBS (FACS buffer)에 Fc receptor blocking solution (Biolegend, #422302)을 첨가하여 4 ℃에서 20 min 동안 처리하였다. round-bottom 96-well cell culture plate에 3×10^5 cells/well로 샘플을 분주한 후 500 xg에서 4 ℃에서 4 min 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 FACS buffer에 antibody를 처리하였다. (primary antibody 30 min, 4 ℃/ secondary antibody 30 min, 4 ℃) antibody 처리와 wash 후에는, 500 ul FACS buffer로 세포를 풀어준 뒤 5 ml round tube (SPL, #40205)로 옮겨 BD FACS CantoⅡ를 사용하여 APC 형광값을 측정하였다. 데이터 처리는 GraphPad Prism 5.0을 이용하였다.

8. CCK-8 assay

CCK-8 assay를 통해 THP-1 세포를 M2로 분화시킬 때, motilin과 MA-2029, PTX, YM-254890의 처리가 cell viability에 영향을 미치는지 확인하고자 하였다. THP-1 4×10^5 cells/ml을 flat-bottom 96-well plate (SPL, #30096)에 준비하여 100 nM PMA를 처리하여 24 h 동안 배양하여 먼저 M0 대식세포로 분화시켰다. fresh media로 교체한 후, IL-4와 IL-13을 각 20 ng/ml 되도록 단독으로 또는 motilin 10 nM과 함께 처리하여 72 h 동안 배양하여 M2로 분화시켰다. CCK-8 solution (Dojindo,

#CK04-13/3000T)를 첨가하여 2 h 동안 incubator에서 staining한 후, Multilabel plate reader (EnVision) 장비로 450 nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였다. 데이터 처리는 GraphPad Prism 5.0을 이용하였다.

9. Antibodies

Western blot을 다음과 같은 antibody를 사용하여 수행하였다.

p-ERK: Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E), Rabbit mAb (Cell signaling technology (CST), #4370)

t-ERK: p44/42 MAPK (Erk1/2), Rabbit mAb (CST, #9102)

p-STAT6: Phospho-Stat6 (Tyr641) (D8S9Y), Rabbit mAb (CST, #56554)

STAT6: Stat6 (D3H4), Rabbit mAb (CST, #5397)

β-actin: Anti-β-Actin Antibody (C4) HRP, Mouse mAb (Santa cruz, #sc-47778 HRP)

Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in goat (Sigma Aldrich, #A9169)

FACS를 다음과 같은 antibody를 사용하여 수행하였다.

CD206 antibody: Purified Mouse Anti-Human CD206, Clone 19.2 (BD Biosciences, #555953)

IgG antibody: Purified Mouse IgG1, κ Isotype Control, Clone MOPC-21 (RUO) (BD Biosciences, #555746)

Anti-mouge IgG-APC antibody: Mouse F(ab)2 IgG (H+L) APC-conjugated Antibody (R&D systems, #F0101B)

표 1. 본 연구에서 사용한 플라스미드 목록

Plasmids
pcDNA3.1-DEST-VC155
pENTR-FLAG-MLNRx
pcDNA3.1-FLAG-MLNRx-VC155
pcDNA5/FRT/TO-GAlphai1-RLuc8
pcDNA5/FRT/TO-GAlphai2-RLuc8
pcDNA5/FRT/TO-GAlphai3-RLuc8
pcDNA5/FRT/TO-GAlphaoA-RLuc8
pcDNA5/FRT/TO-GAlphaoB-RLuc8
pcDNA5/FRT/TO-GAlphaz-RLuc8
pcDNA5/FRT/TO-GAlphaGustducin-RLuc8
pcDNA5/FRT/TO-GAlphasS-RLuc8
pcDNA5/FRT/TO-GAlphasL-RLuc8
pcDNA5/FRT/TO-GAlphaQ-RLuc8
pcDNA5/FRT/TO-GAlpha11-RLuc8
pcDNA5/FRT/TO-GAlpha12-RLuc8
pcDNA5/FRT/TO-GAlpha13-RLuc8
pcDNA5/FRT/TO-GAlpha15-RLuc8
pcDNA3.1-Beta1
pcDNA3.1-Beta3
pcDNA3.1-GGamma1-GFP2
pcDNA3.1-GGamma8-GFP2
pcDNA3.1-GGamma9-GFP2
pcDNA3.1-GGamma13-GFP2

표 2. 본 연구에서 사용한 primer 목록

Primers	Sequence (5' to 3')
RPS9-qP-F	GTCTCGACCAAGAGCTGAAGCT
RPS9-qP-R	GGTCCTTCTCATCAAGCGTCAG
CD163-qP-F	CCAGAAGGAACTTGTAGCCACAG
CD163-qP-R	CAGGCACCAAGCGTTTTGAGCT
CD204-qP-F	GCACAAGGCAGCTCACTTTGG
CD204-qP-R	GTGCAAGTGACTCCAGCATCTTC
TIM3-qP-F	CCGGATCCAAATCCCAGGCATA
TIM3-qP-R	GGTGGTAAGCATCCTTGGAAAGG
TNFα-qP-F	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG
TNFα-qP-R	ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC
CXCL10-qP-F	GGTGAGAAGAGATGTCTGAATCC
CXCL10-qP-R	GTCCATCCTTGGAAGCACTGCA
CD206-qP-F3	TCCAGAGGGATGCTCTGACCA
CD206-qP-R3	AAGCCGATCCACAATTCGTCA
Fibronectin-qP-F	ACAACACCGAGGTGACTGAGAC
Fibronectin-qP-R	GGACACAACGATGCTTCCTGAG
IL10-qP-F3	CATCGATTTCTTCCCTGTGAA
IL10-qP-R3	TCTTGGAGCTTATTAAAGGCATTC
MLNR-qP-F2	AACACGGAAGATTCGCGGAT
MLNR-qP-R2	TTAAAGGCCGCCGCTCTGTA

제 3 장 결과

Part Ⅰ. MLNR의 다양한 리간드에 의한 G protein 신호전달 기전 규명

소장에서 발현하는 펩타이드 호르몬인 motilin에 더해, MLNR은 임상시험 단계에 있는 저분자 물질 camicinal과 macrolide 계열의 항생물질인 erythromycin과 azithromycin, roxithromycin을 모두 agonist로 갖는다고 알려져 있다. 본 연구에서는 이러한 정보를 바탕으로, MLNR에 대한 다양한 리간드들에 대해 G protein 수준에서의 신호전달에 대해 알아보고자 하였다.

선행 연구에서는 MLNR은 주로 Gi/o과 Gq/11 family를 활성화시킨다고 알려져 있으며, G13을 통해 하위 신호전달 기전을 활성화시킨다는 간접적인 연구결과도 보고되었다. 이것을 BRET을 통해, MLNR의 리간드에 의한 각 종류의 G protein 활성을 측정하고, 다양한 리간드들 사이에서도 동일하게 일어나는 현상인지를 비교해보고자 하였다. 본 연구에서는 TRUPATH platform을 활용하여, MLNR을 과발현한 세포에서 총 14종의 Gα에 대한 활성 여부를 확인하였다. 또한 MLNR selective antagonist MA-2029가 MLNR의 리간드에 의한 G protein 활성을 동일한 수준으로 억제할 수 있는지를 확인하고자 하였다.

1.1. BRET assay를 이용한 motilin의 G protein 활성화 분석

BRET assay는 두 단백질의 거리가 10 nm 이내로 가까워지면 빛 에너지의 donor인 luminescence protein이 방출하는 빛 에너지가 acceptor인 fluorescence protein에게 전달되므로, 각각의 파장대에 대한 빛 에너지를 측정함으로써 donor와 acceptor에 연결된 단백질들의 물리적 상호작용을 측정하는 기법이다. 본 연구에서는 BRET2 assay를 기반으로 한

TRUPATH platform을 활용하였고, Gα-소단위체와 Gβɣ-결합체가 분리되면서 G protein이 활성화되는 정도를 측정하였다 (그림 1A).

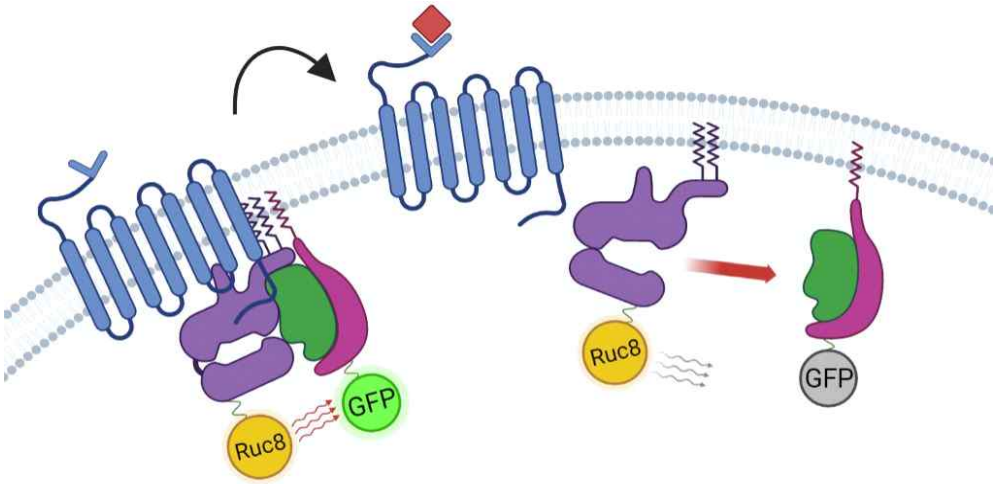
HEK293A 세포주에서 MLNR, Gα-Rluc8, Gβ, Gɣ-GFP2를 각각 발현하는 총 4 개의 플라스미드를 transfection system으로 도입하고 48 h 후에 Rluc8의 substrate, coelenterazine 400a와 리간드를 처리하여, Rluc8과 GFP2에 대한 형광값을 410 nm, 515 nm에서 각각 측정하였다 (그림 1A). 각 파장대에서 측정한 RLU (Relatvie Light Unit) 값을 이용하여 다음 식에 따라 ΔBRET 값을 계산하였다.

$$BRET\ ratio\ =\ \frac{RLU\ of\ fluoresence\ protein\ (GFP2)}{RLU\ of\ luminescence\ protein\ (Rluc8)}$$

$$\Delta BRET\ ratio\ =\ (BRET\ of\ ligand-treated)\ -\ (BRET\ of\ vehicle-treated)$$

그 결과, MLNR을 일시적으로 과발현한 HEK293A 세포에서 motilin에 의한 Gi/o, Gq/11 family 활성을 관찰하였다 (그림 1B). 반면, negative control로 사용된 MLNR 플라스미드를 transfection 하지 않은 세포에서는 motilin에 의한 G protein 활성화가 일어나지 않았다 (data not shown). 이러한 결과는 이전에 알려진 바와 같이 Gi/o와 Gq/11 family에 대해 MLNR이 활성을 갖는 것을 확인하였고, 추가적으로 Gi/o family에서는 특히 oA, Z 소단위체에 대하여 높은 활성을 가지며, Gq/11 family에서는 구조적으로 차이가 있는 15를 제외한 Q, 11 소단위체만 높은 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 이전에 보고된 바 있었던 G13의 활성은 관찰되지 않았다.

A



B

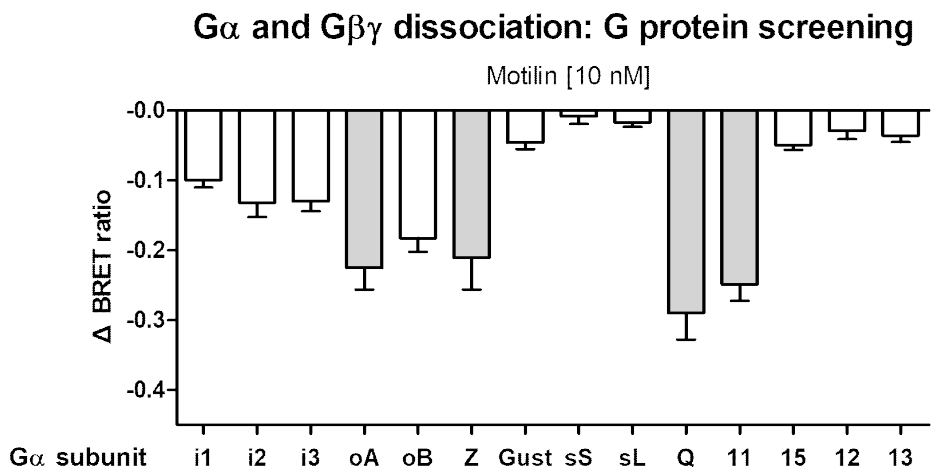


그림 1. BRET assay를 통한 MLNR-motilin의 G protein 활성 (dissociation) 분석

(A) BRET assay에 이용한 construct의 도식 표현 (BioRender 프로그램을 이용하여 그림)

(B) HEK293A 세포에 MLNR, Gα-Rluc8, Gβ, Gγ-GFP2를 transfection 하고 48 h 후, vehicle 또는 motilin 10 nM을 각각 처리하여 BRET으로 형광 단백질의 빛의 세기를 측정하고 ΔBRET으로 계산한 결과 (n=3)

1.2 MLNR의 다양한 리간드들에 의한 G protein 활성화 분석

Motilin 외에 MLNR의 리간드로 알려진 camicinal과 erythromycin, azithromycin, roxithromyin에 대하여도 MLNR 특이적인 G protein 활성을 갖는지 알아보고자 TRUPATH platform을 이용하여 위 실험들과 같은 조건에서 실험을 진행하였다. 네 가지 리간드 모두 motilin과 동일하게 Gi/o 그리고 Gq/11 family를 활성화시켰으며 G13의 활성은 관찰할 수 없었다 (그림 2A).

이때, Gi/o family에서 ΔBRET 값이 상대적으로 높았던 oA와 Z, 그리고 Q, 11 소단위체에 대하여, motilin과 다른 리간드들에 의한 용량-반응 관계(dose-response)를 알아보고자 하였다. 그 결과, 네 종류의 G protein에 대하여 MLNR의 리간드에 의한 Emax값에는 큰 차이가 나타나지 않았으나, EC50에는 큰 차이를 보였다 (그림 2B). G protein 활성에 대한 민감성(sensitivity)이 가장 큰 리간드는 motilin으로, camicinal과 erythromycin이 차례로 그 뒤를 이었다. Camicinal은 motilin 대비 약 100배, macrolide 계열 항생물질들은 대체로 motilin 대비 1,000배 이상 민감성이 낮았다.

네 개의 주요 G protein에 대하여 MLNR의 각 리간드들이 갖는 logEC50 값을 계산하면 표 3과 같다.

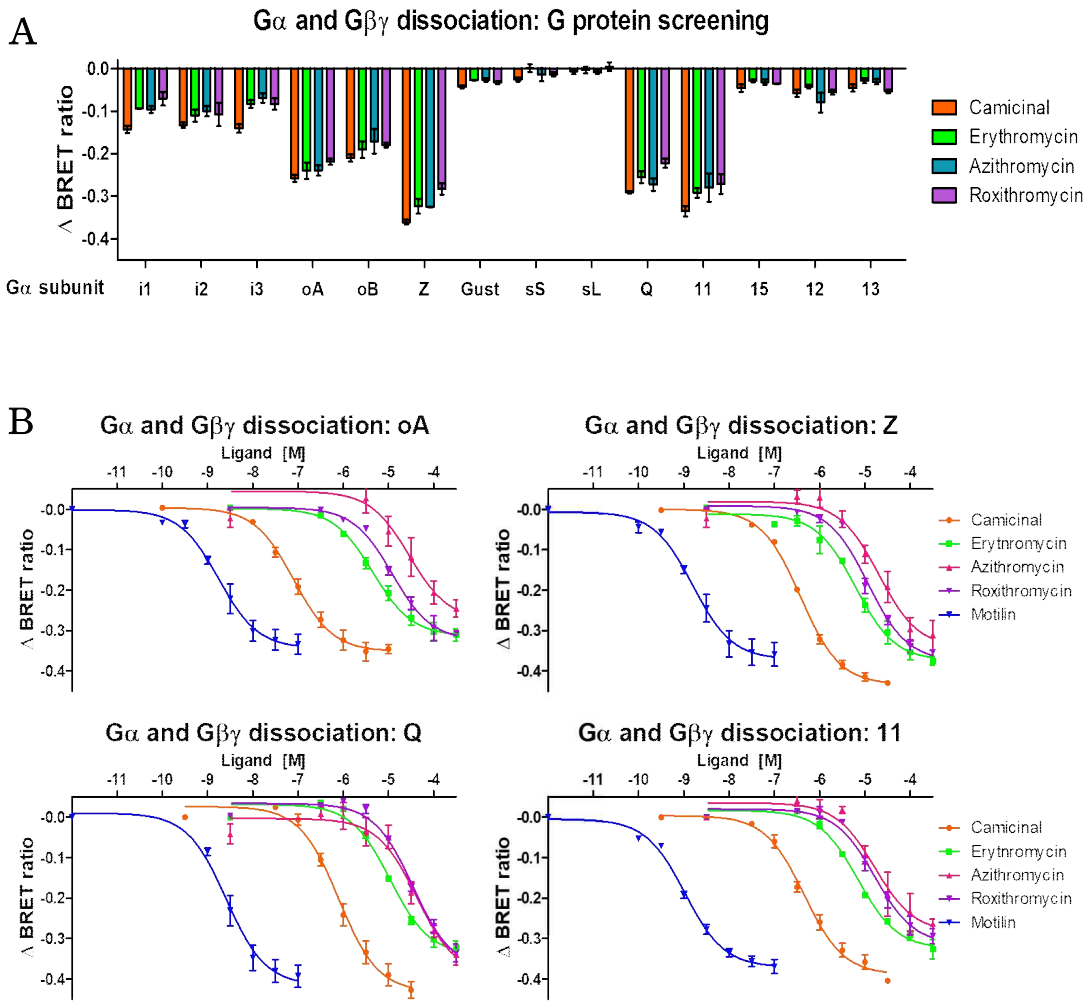


그림 2. BRET assay를 통한 MLNR 리간드들의 G protein 활성 (dissociation) 분석

(A) HEK293A 세포에 MLNR, Gα-Rluc8, Gβ, Gɣ-GFP2를 transfection 하고 48 h 후, camicinal 10 μM, erythromycin 100 μM, azithromycin 100 μM, roxithromycin 100 μM을 각각 처리하여 BRET으로 두 단백질 형광 세기를 측정하여 ΔBRET 값으로 표현한 결과 (n=3)

(B) 4 종류의 G protein에 대하여 위 (B)의 transfection 조건에서, 리간드마다 3 fold dilution하여 처리한 후 단백질 형광 세기를 측정하여 Δ BRET 값으로 표현한 결과 (n=3)

표 3. 그림 2B의 데이터에 대해 logEC50를 통계 처리한 결과

(motilin을 처리한 경우와 각각의 리간드를 처리한 경우에 대하여 unpaired two-tailed student's t-test, ***p<0.0005)

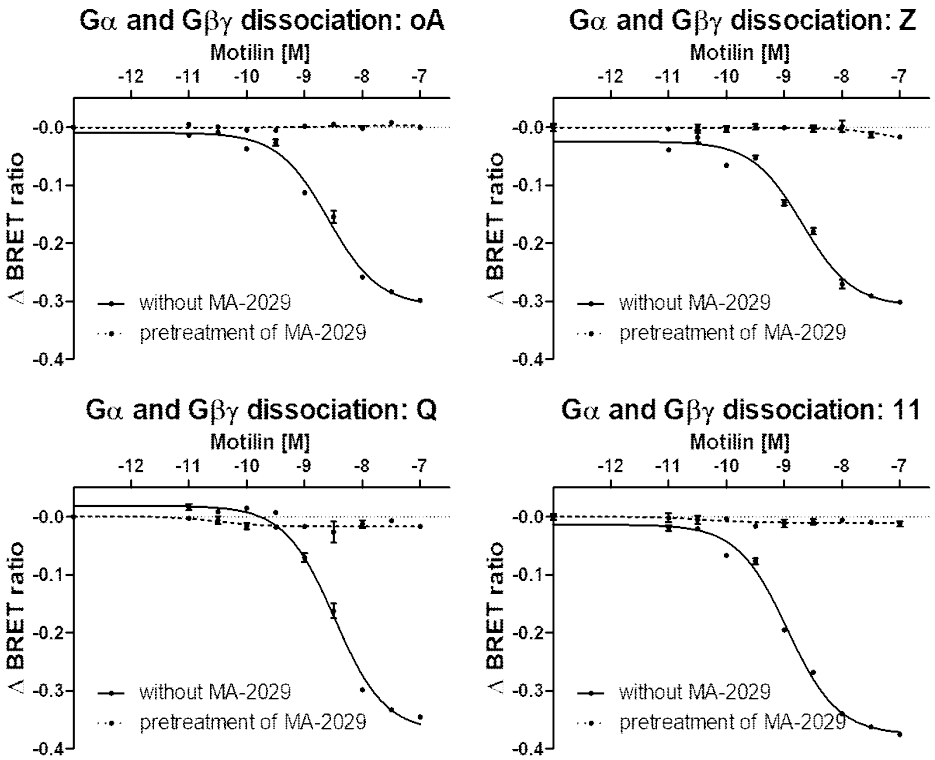
Ligand	Statistics	G protein			
		oA	Z	Q	11
Motilin	Mean±SEM	-8.734 ±0.07261	-8.786 ±0.04406	-8.577 ±0.0571	-8.975 ±0.01466
Camicinal	Mean±SEM	-6.587 ±0.06343	-6.420 ±0.02186	-6.09 ±0.06409	-6.334 ±0.06126
	P value	***	***	***	***
Erythromycin	Mean±SEM	-5.339 ±0.04203	-5.271 ±0.01386	-4.963 ±0.03342	-5.157 ±0.09198
	P value	***	***	***	***
Azithromycin	Mean±SEM	-4.593 ±0.25	-4.684 ±0.06963	-4.377 ±0.08665	-4.645 ±0.1975
	P value	***	***	***	***
Roxithromycin	Mean±SEM	-4.908 ±0.03356	-4.927 ±0.0545	-4.428 ±0.1206	-4.779 ±0.03855
	P value	***	***	***	***

1.3 MLNR selective antagonist인 MA-2029에 의한 G protein 활성 억제 분석

MLNR의 selective antagonist로는 porcine motilin (pMTL), GM-109, 그리고 MA-2029가 있다. 이 중, 가장 나중에 발견된 MLNR selective antagonist MA-2029는 타 antagonist에 비해 약 10 배 높은 motilin 기능 억제 효과가 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 motilin에 의한 효과들이 MLNR 의존적임을 확인하기 위하여 MA-2029를 사용하고자 하였고, MA-2029에 의해 motilin에 의한 주요 G protein 신호전달이 억제되는지를 TRUPATH platform을 통해 확인하였다. 또한 MLNR의 다른 리간드들의 G protein 활성도 MA-2029가 억제할 수 있는지를 추가로 확인하고자 하였다.

선행 연구들에서 사용하는 농도인 MA-2029 10 μM을 전처리한 조건에서, 4 종류의 G protein, oA, Z, Q, 11 소단위체에 대하여 확인해본 결과 motilin에 의한 dose-response가 완전히 저해되었다 (그림 3A). 그러나 MA-2029의 MLNR에 의한 G protein 억제 기능은 리간드마다 차이를 보였다 (그림 3B). Motilin과 camicinal, erythromycin에서는 네 종류의 G protein에 대해 활성이 완전히 저해되었다. 그러나, azithromycin의 경우 oA, Q 소단위체에 대한 활성은 MA-2029를 통해 완전히 저해되었으나, Z와 11에 대해서는 G protein 활성이 일부 남아있었다. 또한 roxithromycin을 처리한 조건에 대해서는 Z, Q, 11 소단위체에서 MA-2029에 의해 G protein 활성이 저해되지 않았으며, oA 소단위체에서만 약간의 저해 효과가 관찰되었다. 이를 통해, azithromycin과 roxithromycin에 대한 G protein 활성은 MA-2029로 완전히 저해할 수는 없음을 확인하였다.

A


Gα and Gβγ dissociation: oA
Gα and Gβγ dissociation: Z
Gα and Gβγ dissociation: Q
Gα and Gβγ dissociation: 11
Motilin [M]
-12 -11 -10 -9 -8 -7
Δ BRET ratio
-0.0 -0.1 -0.2 -0.3 -0.4
without MA-2029
pretreatment of MA-2029

B

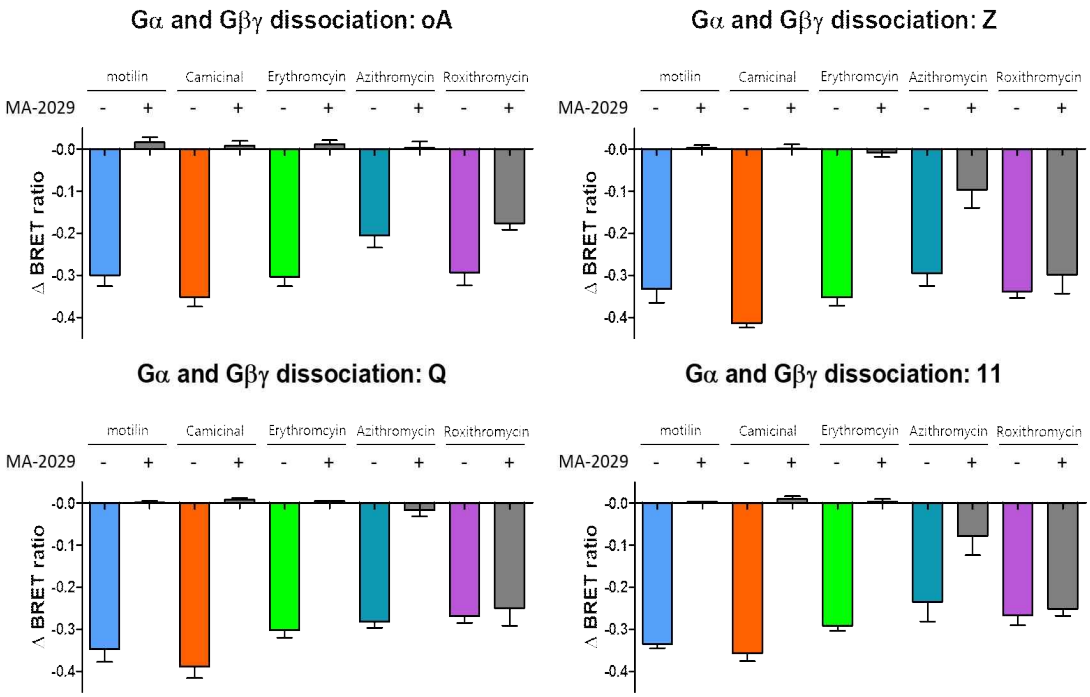

Gα and Gβγ dissociation: oA
Gα and Gβγ dissociation: Z
Gα and Gβγ dissociation: Q
Gα and Gβγ dissociation: 11
motilin
Camicinal
Erythromcyin
Azithromycin
Roxithromycin
MA-2029
- +
Δ BRET ratio
-0.0 -0.1 -0.2 -0.3 -0.4

그림 3. Antagonist MA-2029에 의한 G protein 활성 억제 분석

(A) HEK293A 세포에 MLNR, Gα-Rluc8, Gβ, Gɣ-GFP2를 transfection 하고 48 h 후, MA-2029 10 μM 또는 vehicle을 30 min 전처리한 후에 다양한 농도의 motilin을 처리하여 BRET으로 두 단백질의 형광 세기를 측정하여 ΔBRET 값으로 표현한 결과 (n=3)

(B) 위 (A)와 같은 transfection 조건에서, MA-2029 10 μM 또는 vehicle을 30 min 전처리한 후에 motilin 10 nM, camicinal 10 μM, erythromycin 100 μM, azithromycin 100 μM, roxithromycin 100 μM을 각각 처리한 조건에 대하여 ΔBRET 값으로 표현한 결과 (n=2)

Part 2. 단핵구에서 대식세포로의 분화에 MLNR이 미치는 영향에 대한 연구

대식세포 분화에 대한 연구 주제들은 크게 단핵구 세포에서 M0 대식세포로 분화할 때, 그리고 M0에서 M1 또는 M2 대식세포로 분화할 때로 나뉠 수 있다. 우선, 단핵구와 대식세포의 가장 기본적인 차이로, 단핵구는 대식세포 분화 이전의 전구체(precursor)이고 대식세포는 식세포(phagocyte)로 식균작용 등이 가능하다는 점이다. 따라서 대식세포로의 분화는 면역작용의 개시(initiation)과 관련이 깊으며, CD164, CD204, TIM-3 등의 다양한 종류의 세포 표면 수용체의 발현량이 증가한다고 알려져 있다.

선행 연구 중에서, erythromycin을 단독처리하거나 PMA와 함께 처리한 경우 단핵구에서 대식세포로의 분화가 증가했다는 결과가 보고되어있다. 1994년 Keicho 팀의 연구 논문을 참고하여 단핵구에서 대식세포의 분화에 MLNR의 리간드가 미치는 영향에 대해 연구하고자 하였다.

먼저, PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate)에 의해 단핵구인 상태인 THP-1 세포가 M0 대식세포로 분화하는 정도를 측정하기 위해 여러 유전자들 중, PMA의 농도에 따라 mRNA 발현량이 증가하는 유전자들을 후보로 설정하였다. 이때, PMA 처리에 의한 분화과정에서 MLNR의 mRNA 발현량을 함께 측정하였다.

MLNR의 리간드를 단독으로 처리하거나 PMA와 함께 처리한 조건에서, 대식세포 분화 표지 유전자들에 대해 qPCR을 진행하여, 분화 정도의 차이를 관찰하고자 하였다.

2.1 PMA에 의한 THP-1의 M0 대식세포로의 분화

면역세포의 분화실험에 주로 이용되는 THP-1 세포주는 PMA를 처리하면 suspension 상태인 단핵구에서 adherent cell 상태로 표현형이 변화하며 M0 대식세포로 분화한다. 리간드에 의한 분화 차이를 보기 이전에 우선 다양한 농도의 PMA를 처리한 뒤 관찰하여, 가장 높은 농도로

PMA를 처리한 세포들이 plate에 대부분 부착된 7일을 배양 기간으로 정하였다. PMA 또는 vehicle을 처리한 세포 샘플에서 RNA를 뽑아 cDNA를 합성하여 qPCR로 분화 표지 유전자들의 발현량의 변화를 관찰하였다 (그림 4A). 이중, CD163, CD204, TIM-3 유전자에서 PMA의 농도에 비례하여 mRNA 발현량이 증가한다는 것을 확인하였고 대식세포 분화 표지 유전자로 선택하여 이후 실험을 진행하였다. THP-1 세포에 PMA를 3.125 nM부터 50 nM까지 1/2배의 농도로 희석하여 처리하였을 때, 대식세포 분화 표지 유전자들은 농도에 비례하여 발현량이 증가하였으나 MLNR의 발현량은 낮은 농도의 PMA를 처리함에 따라 점차 증가하다가, 12.5 nM에서 vehicle 대비 약 14배 정도로 발현량이 최대가 되었고 이보다 높은 농도에서는 발현량이 감소하였다.

2.2 MLNR의 리간드가 M0 대식세포 분화에 미치는 영향

PMA를 처리하지 않고 motilin을 단독으로 7일간 처리하였을 때는 대식세포 분화 유전자가 유의미한 차이를 보이지 않았고, MLNR의 발현량이 최대가 되었던 PMA 12.5 nM에 motilin을 함께 처리하였을 때에는 PMA를 단독으로 처리한 경우보다 유의미하게 세 대식세포 분화 표지 유전자의 mRNA 발현량이 모두 증가하였다 (그림 4B).

이와 같이 MLNR의 다른 리간드들도 motilin처럼 PMA에 의한 대식세포의 분화를 강화시키는 효과를 보이는지 확인하기 위하여, THP-1에 서로 다른 MLNR 리간드를 각각 처리하여 동일한 배양 조건에서 qPCR 실험을 진행하였다. 먼저, motilin과 동일하게, camicinal 단독처리는 대식세포 분화에 영향을 미치지 않았으나 erythromycin과 roxithromycin은 CD163을, azithromycin은 세 유전자 모두의 mRNA 발현량을 증가시켰다 (그림 4C). PMA와 각 리간드를 동시에 처리한 경우에는, 네 종류의 리간드 모두, PMA와 함께 처리하였을 때 PMA 단독처리 조건보다 대식세포 분화 유전자의 발현량을 증가시켰다 (그림 4D).

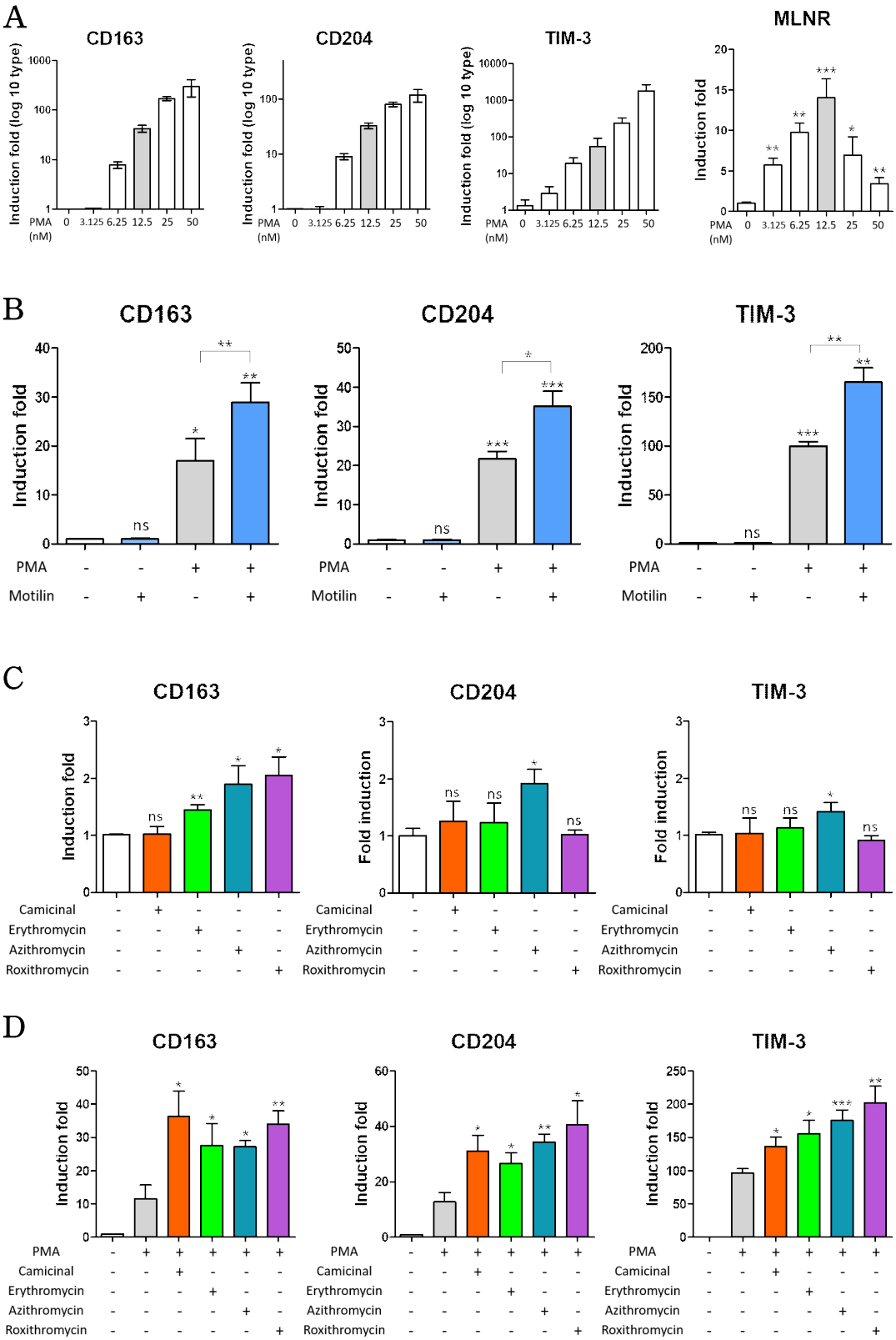

A
CD163
CD204
TIM-3
MLNR
Induction fold (log 10 type)
Induction fold
PMA (nM)
0 3.125 6.25 12.5 25 50
B
CD163
CD204
TIM-3
Induction fold
ns
PMA
Motilin
C
CD163
CD204
TIM-3
Induction fold
Fold induction
ns
Camicinal
Erythromycin
Azithromycin
Roxithromycin
D
CD163
CD204
TIM-3
Induction fold
PMA
Camicinal
Erythromycin
Azithromycin
Roxithromycin

그림 4. 단핵구에서 대식세포로의 분화에 PMA와 MLNR의 ligand가 미치는 영향

(A) THP-1 세포를 12-well plate에 well당 4×10^5 cells/ml으로 준비한 후, 다양한 농도의 PMA를 처리하여 7일간 배양하였다. 세포를 500 xg로 5분간 원심분리하여 RNA를 추출하고, cDNA를 합성하여 4가지 유전자에 대한 프라이머를 이용하여 qPCR을 진행하였다. CT값은 유전자 RPS9의 값으로 normalize 하였고, vehicle을 처리한 샘플에 대해서 normalization하고, GraphPad Prism 5.0을 통해 two tailed student t-test 분석을 진행한 결과 (n=4, PMA 처리하지 않은 조건에 대하여 *p<0.5, **p<0.05, ***p<0.005)

(B) THP-1 세포를 (A)와 같은 배양 조건에서 PMA 단독, motilin 10 nM 단독, PMA와 motilin 10 nM 동시 처리 조건에 대하여, (A)와 같은 방법으로 3가지 유전자에 대해 qPCR을 진행한 결과. (n=6, *p<0.5, **p<0.05, ***p<0.005)

(C) THP-1 세포를 (A)와 같은 배양 조건에서 camicinal 10 μM, erythromycin 100 μM, azithromycin 100 μM, roxithromycin 100 μM을 각각 처리한 조건에 대하여, qPCR을 진행한 결과. (n=4, PMA 처리하지 않은 조건에 대하여 *p<0.5, **p<0.05)

(D) THP-1 세포를 (A)와 같은 배양 조건에서 PMA 12.5 nM에 각각 camicinal 10 μM, erythromycin 100 μM, azithromycin 100 μM, roxithromycin 100 μM을 함께 처리한 조건에 대하여, qPCR을 진행한 결과. (n=4, PMA 단독 처리한 조건에 대하여 *p<0.5, **p<0.05, ***p<0.005)

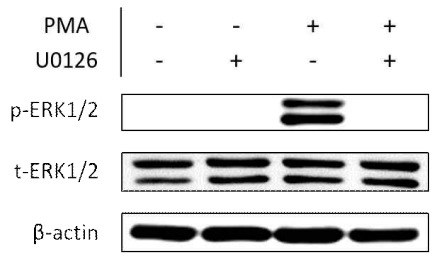
2.3 대식세포 분화와 ERK1/2 활성화의 연관성, PMA와 motilin에 의한 ERK1/2 phosphorylation에 대한 탐구

Extracellular signal-regulated kinase (ERK, also known as MAPK) 경로는 생장인자(growth factor) 또는 사이토카인 자극 등에 의하여 활성화되어, 세포 내 신호전달계를 통해 세포의 증식이나 분화, 생장 등의 다양한 생리적 기능을 매개한다. 이처럼, 단핵구의 대식세포 분화 과정에도 다양한 MAPK가 관여되어 있으며, M-CSF에 의해 대식세포로 분화하는 과정에 MAPK의 일종인 ERK가 관여한다는 결과가 보고된 바 있다. 또한, PMA 자극에 의해 ERK가 활성화되면 p21을 통해 세포 주기를 정지시키고(cell cycle arrest) 대식세포로의 분화를 유도한다는 간접적인 연구결과가 있다. 이러한 결과를 바탕으로, ERK의 활성화가 대식세포 분화에 직접적으로 관여하는지와, PMA와 motilin의 처리가 ERK 활성화에 미치는 영향에 대하여 탐구하고자 하였다.

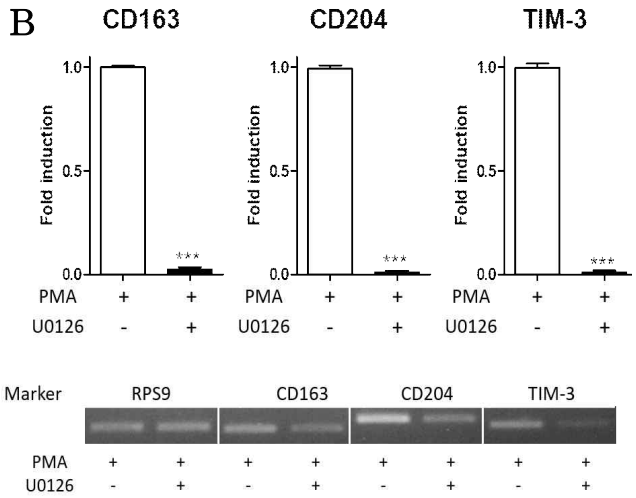
먼저, THP-1에 MEK 억제제인 U0126을 전처리한 경우, PMA에 의한 ERK phosphorylation이 완전히 억제된 것을 Western blot으로 확인하였다 (그림 5A). 단핵구가 대식세포가 분화하는 과정에서 ERK의 활성화가 필요함을 qPCR을 통해 확인하였다. MEK 억제제인 U0126을 전처리한 후, PMA를 처리하여 7일간 M0 대식세포로 분화시킨 경우에는 대식세포 표지 유전자, CD163, CD204, TIM-3의 발현량이 모두 급격히 감소함을 확인하였다 (그림 5B).

THP-1을 대식세포로 분화시킬 때, PMA를 단독으로 처리한 경우 그리고 PMA와 motilin을 함께 처리한 경우에 대하여, ERK1/2의 phosphorylation을 Western blot을 통해 관찰하였다. 그 결과, PMA 단독처리 조건보다 PMA에 motilin을 함께 처리한 조건에서 ERK 활성화가 증가함을 확인하였고, 이때 특히 ERK1보다 ERK2의 활성화가 더 강화되었다 (그림 5C, D). motilin을 단독처리한 경우에도 ERK의 활성화가 약하게 일어난 것을 확인하였다.

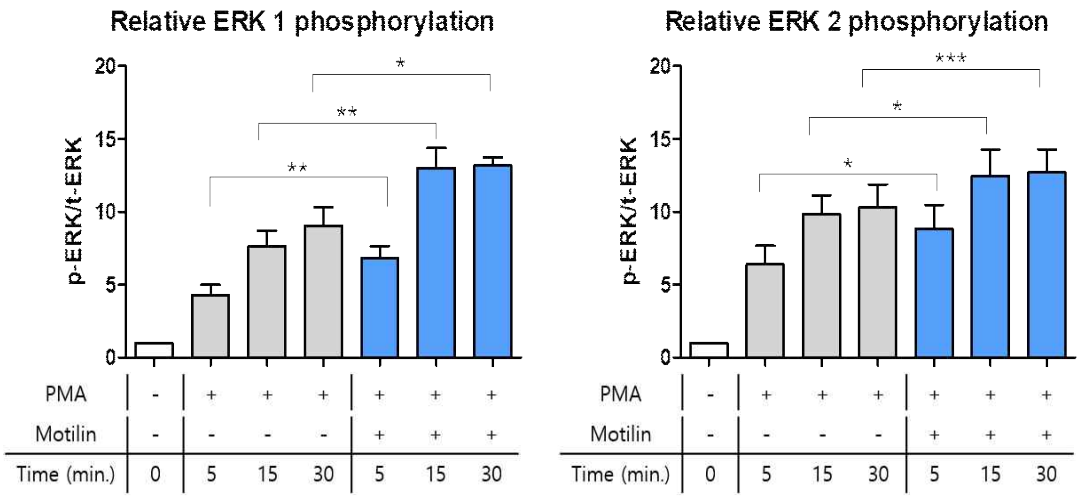
A


PMA - - + +
U0126 - + - +
p-ERK1/2
t-ERK1/2
β-actin

B


CD163
CD204
TIM-3
Fold induction
1.0
0.5
0.0
***
PMA + +
U0126 - +
Marker
RPS9
CD163
CD204
TIM-3
PMA + + + + + + + +
U0126 - + - + - + - +

C


Relative ERK 1 phosphorylation
Relative ERK 2 phosphorylation
p-ERK/t-ERK
20
15
10
5
0
*
**
***
PMA - + + + + + +
Motilin - - - - + + +
Time (min.) 0 5 15 30 5 15 30

D

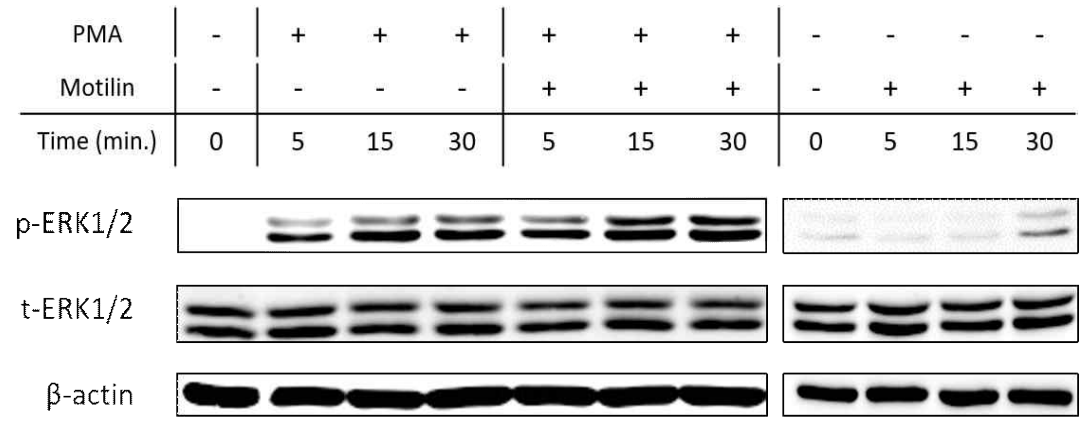

PMA - + + + + + + - - - -
Motilin - - - - + + + - + + +
Time (min.) 0 5 15 30 5 15 30 0 5 15 30
p-ERK1/2
t-ERK1/2
β-actin

그림 5. MEK inhibitor U0126의 대식세포 분화 억제 효과와 PMA와 motilin에 의한 ERK1/2 phosphorylation

(A) THP-1 세포에 U0126 10 μM 또는 vehicle을 30 min 전처리한 후, PMA 12.5 nM 또는 vehicle을 30 min 처리한 조건에서 Western blot으로 ERK phosphorylation을 관찰한 결과의 대표 사진

(B) THP-1 세포에 U0126 10 μM 또는 vehicle을 전처리한 후, PMA 12.5 nM을 7일간 처리하여 qPCR을 진행한 결과 (n=4, PMA 단독 처리한 조건에 대하여 ***$p<0.005$) 및 qPCR 반응 후 각각의 샘플을 2% agarose gel에 전기영동한 사진 (하단)

(C) THP-1 세포에 PMA 12.5 nM 단독, PMA와 motilin 10 nM 동시처리한 조건에서 독립적으로 수행한 Western blot 결과. ImageJ 프로그램으로 band intensity를 측정하고, t-ERK 로 normalization한 결과 (two-tailed student's t-test, n=4, *$p<0.5$, **$p<0.05$)

(C) THP-1 세포에 PMA 12.5 nM 단독처리, PMA와 motilin 10 nM 동시처리, motilin 단독처리한 조건에서 Western blot으로 ERK phosphorylation을 관찰한 결과의 대표 사진

Part 3. M0 대식세포에서 M1 또는 M2로의 분화 과정에 motilin이 미치는 영향에 대한 연구

대식세포는 LPS 또는 IFN-γ의 자극을 받으면 염증반응을 일으키는 M1 타입으로, IL-4와 IL-13의 자극을 받으면 염증반응을 억제하는 M2 타입으로 분화할 수 있다. 선행 연구들에서는 THP-1 세포주를 M0에서 M1 또는 M2로 분화시킬 때, 사이토카인의 종류와 농도, 배양 시간을 각자 다양하게 사용하며, M1과 M2에 대해 특이적인 분화 표지 유전자의 발현량을 비교하였다. 본 연구에서는 2015년 Genin 팀의 연구 논문을 기준으로 M1 타입으로는 TNF-α와 CXCL10, M2 타입으로는 CD206, CD163, Fibronectin, IL-10 유전자를 분화에 대한 기준으로 설정하여 연구를 진행하였다.

THP-1 세포에 PMA를 처리하여 M0로 분화를 유도한 후, LPS를 처리하여 M1 또는 IL-4와 IL-13을 처리하여 M2 타입으로 대식세포를 분화시킬 때, motilin의 유무에 따른 M1과 M2 표지 유전자 발현량의 변화를 확인하고자 하였다. qPCR로 mRNA 발현량을 비교한 후, THP-1 세포에서 유의미하게 표면 발현량을 확인할 수 있는 유전자에 대해서 FACS로 표면 단백질 발현량을 확인하고자 하였다. 또한 각각의 분화 과정에서 MLNR의 mRNA 발현량도 비교하였다.

3.1 LPS에 의한 M1 분화와 motilin이 M1 분화에 미치는 영향

THP-1 세포에 100 nM PMA를 24 h 처리하여 M0 대식세포로 분화시킨 후, LPS를 1, 10, 100 ng/ml으로 희석하여 24 h 처리하여 M1으로 분화시켰고, qPCR을 통해 M1 분화 표지 유전자들에 대해 발현량을 확인하였다 (data now shown). 그 결과, TNF-α와 CXCL10이 LPS 농도에 비례하여 mRNA 발현량이 증가함을 확인하였다 (그림 6A). M0에서 M1으로 분화시키는 과정에서 LPS 100 ng/ml에 motilin 10 nM을 추가로 처리하였을 때에 유의미한 차이가 나타나지 않았으며 (그림 6B), M1으로의 분화 과정에서 MLNR의 발현량이 감소하였다 (그림 6C).

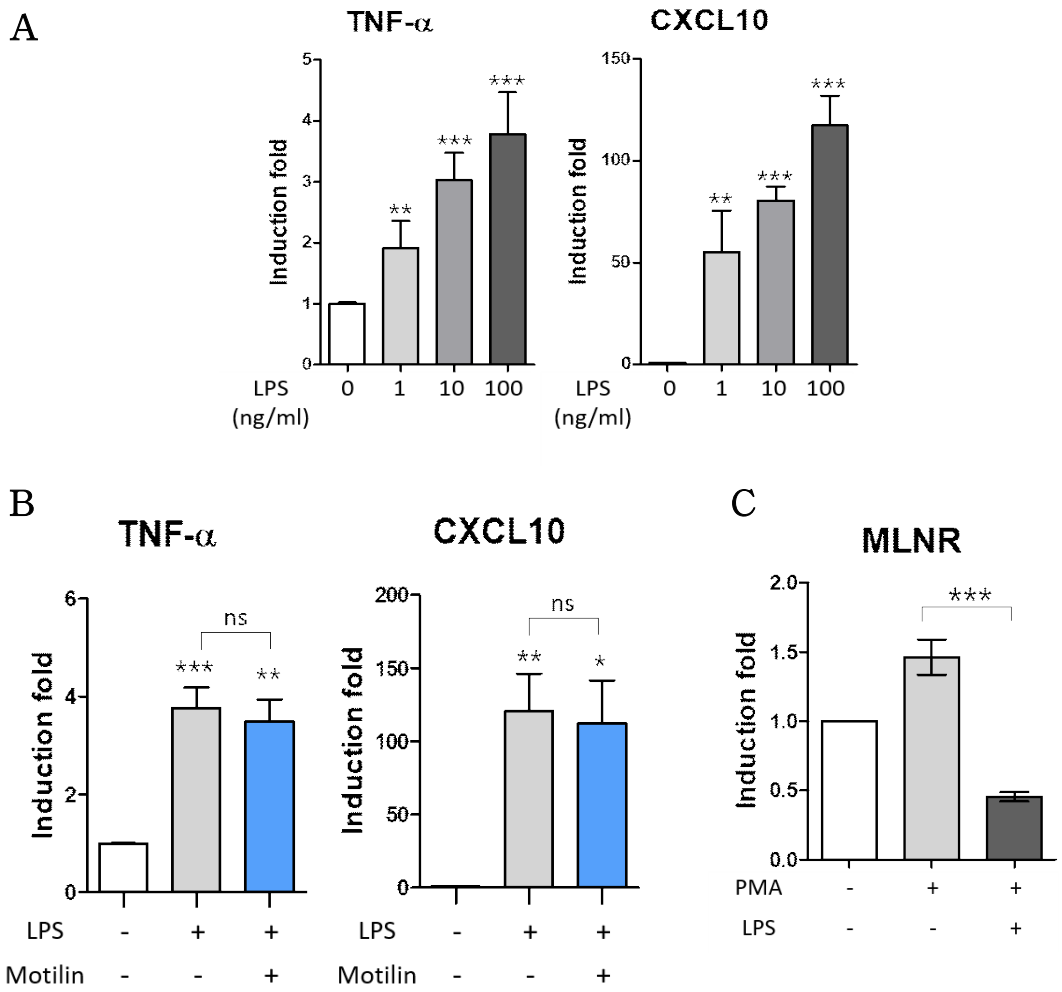


그림 6. M0 대식세포에서 M1으로의 분화와 motilin이 미치는 영향

(A) THP-1 세포에 PMA 100 nM을 24 h 처리하여 M0 대식세포로 분화시킨 뒤, LPS 1, 10, 100 ng/ml 씩 24 h 처리하여 M1으로 분화시킨 후 RNA를 추출하여 qPCR을 통해 mRNA 발현량을 측정한 결과 (n=4, two tailed student's t test, **p<0.005, ***p<0.0005)

(B) 위 (A)와 같은 조건으로 M0로 분화시킨 뒤, LPS 100 ng/ml 단독 또는 LPS에 motilin 10 nM을 추가로 처리한 조건에서 qPCR로 mRNA 발현량을 측정한 결과 (n=4, *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005)

(C) 분화시키지 않은 THP-1, 위 (A)와 같은 조건으로 M0로 분화시킨 뒤 LPS 100 ng/ml 또는 vehicle을 처리한 조건에 대하여 qPCR로 MLNR의 mRNA 발현량을 측정한 결과 (n=4, ***p<0.0005)

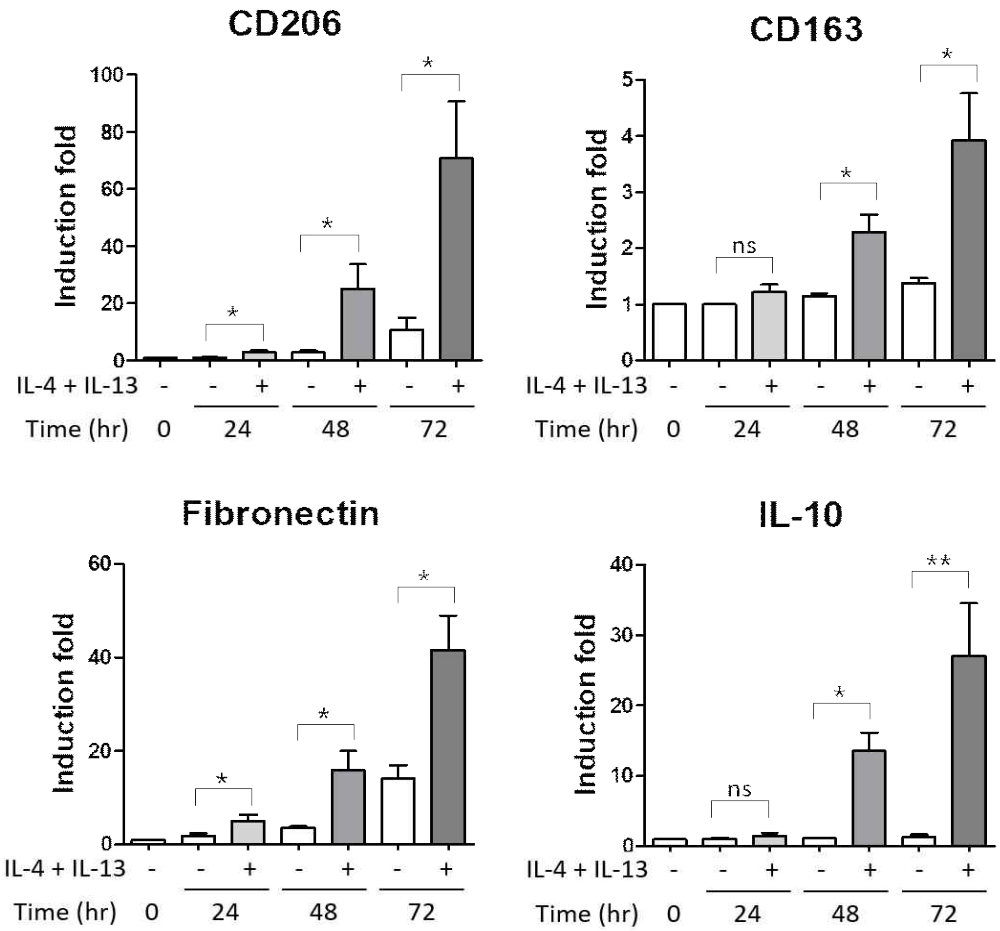
3.2 IL-4와 IL-13에 의한 M2 분화와 motilin이 M2 분화에 미치는 영향

THP-1 세포를 M0 대식세포로 분화시킨 후, IL-4 20 ng/ml과 IL-13 20 ng/ml 처리하여 각각 24 h, 48 h, 72 h 동안 배양하여 M2으로 분화시켰고, qPCR을 통해 M2 분화 표지 유전자들에 대해 발현량을 확인하였다. 그 결과, CD206, CD163, fibronecin, IL-10에서 처리 시간에 비례하여 mRNA 발현량이 증가함을 확인하였다 (그림 7A).

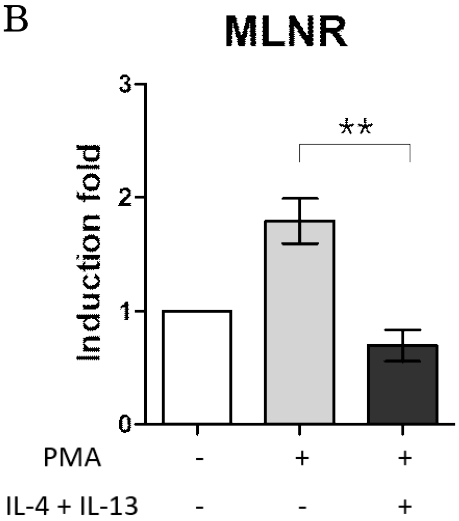
M0에서 M2로 분화시키는 과정에서 motilin 10 nM을 추가적으로 처리하였을 때에는, IL-4와 IL-13만 처리한 경우에 비해 네 가지 M2 분화 표지 유전자의 발현량이 모두 증가하였다 (그림 7B). 이때, 실제로 mRNA양의 증가가 단백질 발현의 증가로 연결되었는지를 확인하기 위하여, 세포 표면 발현 유전자인 CD206 유전자에 대하여 FACS를 통해 발현량을 측정하였다 (그림 7C). CD206 antibody를 사용한 샘플의 APC 형광값에서 IgG antibody를 사용한 샘플의 APC 값을 빼서 net MFI (mean fluorescence intensity)를 구하여 세포 표면 발현량을 구했다. 그 결과, M0 분화 후 72 h 동안 vehicle을 처리한 M0 샘플보다, IL-4, IL-13을 처리하여 분화시킨 M2 샘플과 IL-4, IL-13에 motilin 10 nM을 추가적으로 처리한 샘플에서 모두 CD206의 표면 발현량이 증가함을 확인하였다. 단, M0에서 M2로의 분화 조건에서 MLNR의 mRNA 발현량은 감소하였다 (data not shown).

이에 더해, M2 분화에 관여한다고 알려진 대표적인 세포 내 경로인 STAT6에 대한 활성을 확인해보고자 하였다. M0로 분화시킨 THP-1 세포에 IL-4, IL-13만을 처리한 조건과 motilin을 추가로 처리한 조건에 대하여 STAT6 활성화를 Western blot을 통해 확인하였다 (그림 8). 그 결과, motilin을 추가로 처리한 경우에 STAT6 phosphorylation이 증가함을 확인하였다.

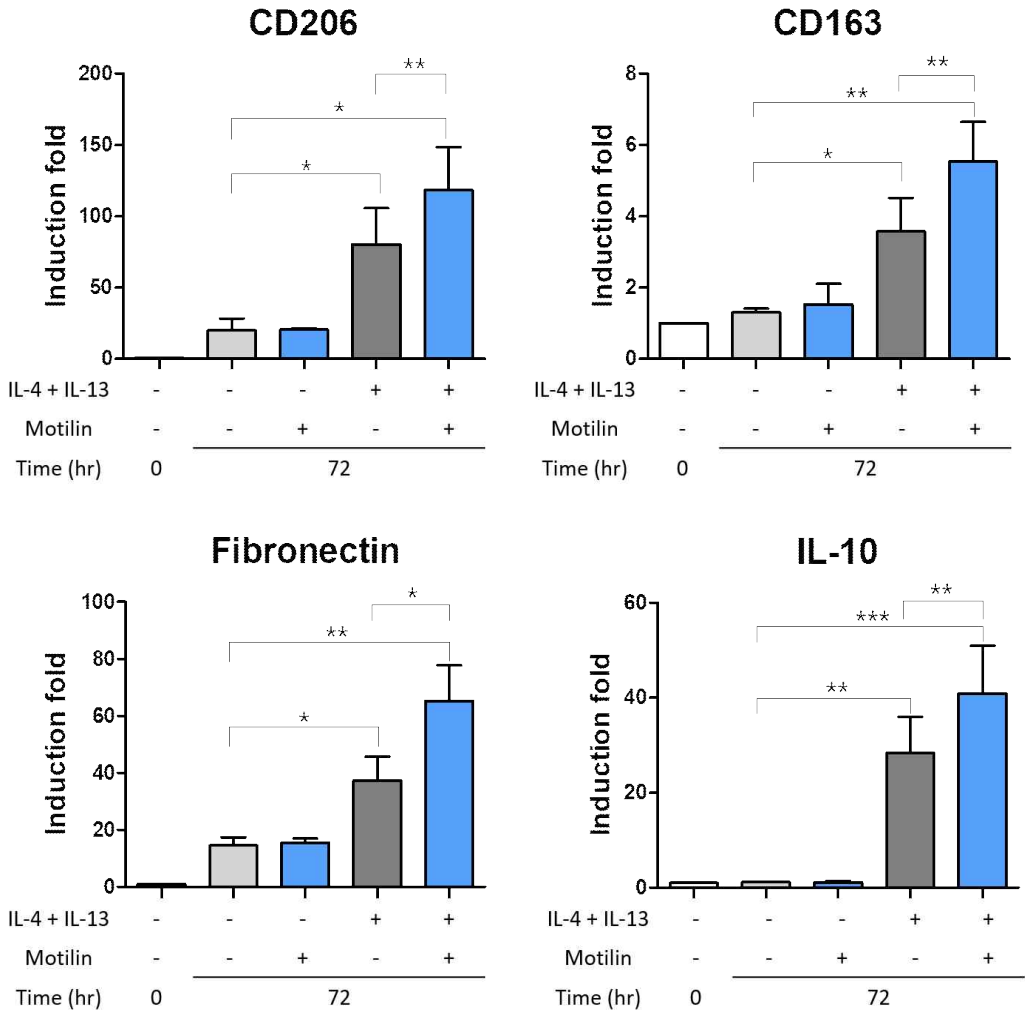
A


CD206
CD163
Fibronectin
IL-10
Induction fold
IL-4 + IL-13
Time (hr)
0
24
48
72
ns
*
**

B


MLNR
Induction fold
PMA
IL-4 + IL-13
**

C


CD206
CD163
Fibronectin
IL-10
Induction fold
IL-4 + IL-13
Motilin
Time (hr)
0
72

D

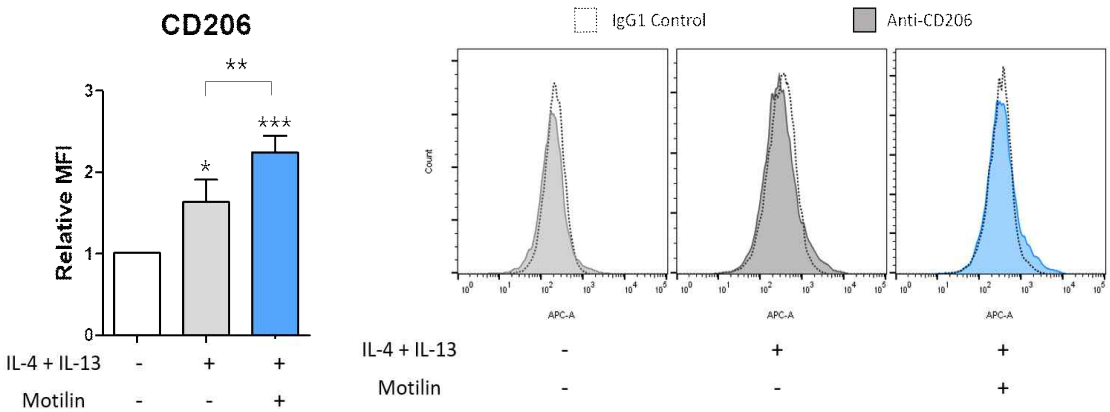

CD206
Relative MFI
IgG1 Control
Anti-CD206
Count
APC-A
IL-4 + IL-13
Motilin

그림 7. M0 대식세포에서 M2로의 분화와 motilin이 미치는 영향

(A) 6-well plate에 4×10^5 cells/ml의 THP-1 세포를 준비한 후 PMA 100 nM을 24 h 처리하여 M0 대식세포로 분화시킨 뒤, fresh media로 교체하였다. IL-4와 IL-13을 각 20 ng/ml 농도로 24, 48, 72 h 처리하여 M2으로 분화시킨 후 RNA를 추출하여 qPCR을 통해 mRNA 발현량을 측정한 결과 (n=4, two-tailed student's t-test, *p<0.05, **p<0.005)

(B) THP-1과, 위 (A)와 같은 조건으로 M0로 분화시킨 뒤, IL-4와 IL-13 각 20 ng/ml 또는 vehicle을 처리한 조건에서 qPCR로 MLNR의 mRNA 발현량을 측정한 결과 (n=4, **p<0.005)

(C) 위 (A)와 같은 M0 배양 조건에서 72 h 동안 M2로 분화시킬 때, motilin 10 nM 단독 처리, IL-4와 IL-13 각 20 ng/ml 처리, IL-4와 IL-13에 motilin 10 nM을 추가로 처리한 조건에 대하여 qPCR로 mRNA 발현량을 측정한 결과 (n=5, *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005)

(D) 위 (A)와 같은 배양 조건에서 M0로 분화시킨 후, vehicle 처리한 조건, IL-4와 IL-13 각 20 ng/ml 처리한 조건, IL-4와 IL-13에 motilin 10 nM을 추가로 처리한 조건에서 72 h 동안 분화시켰다. 각 샘플에 대하여 FACS를 통해 CD206의 세포 표면 단백질 발현량을 측정하여 net MFI 값을 M0 샘플에 대하여 normalization 하여 relative MFI로 나타낸 결과 (좌측, n=5, *p<0.05, **p<0.005,*** p<0.0005). APC 형광값에 다른 세포 수를 나타낸 히스토그램에서 점선은 control IgG antibody를, 실선의 색칠된 영역은 CD206 antibody를 나타냄 (우측)

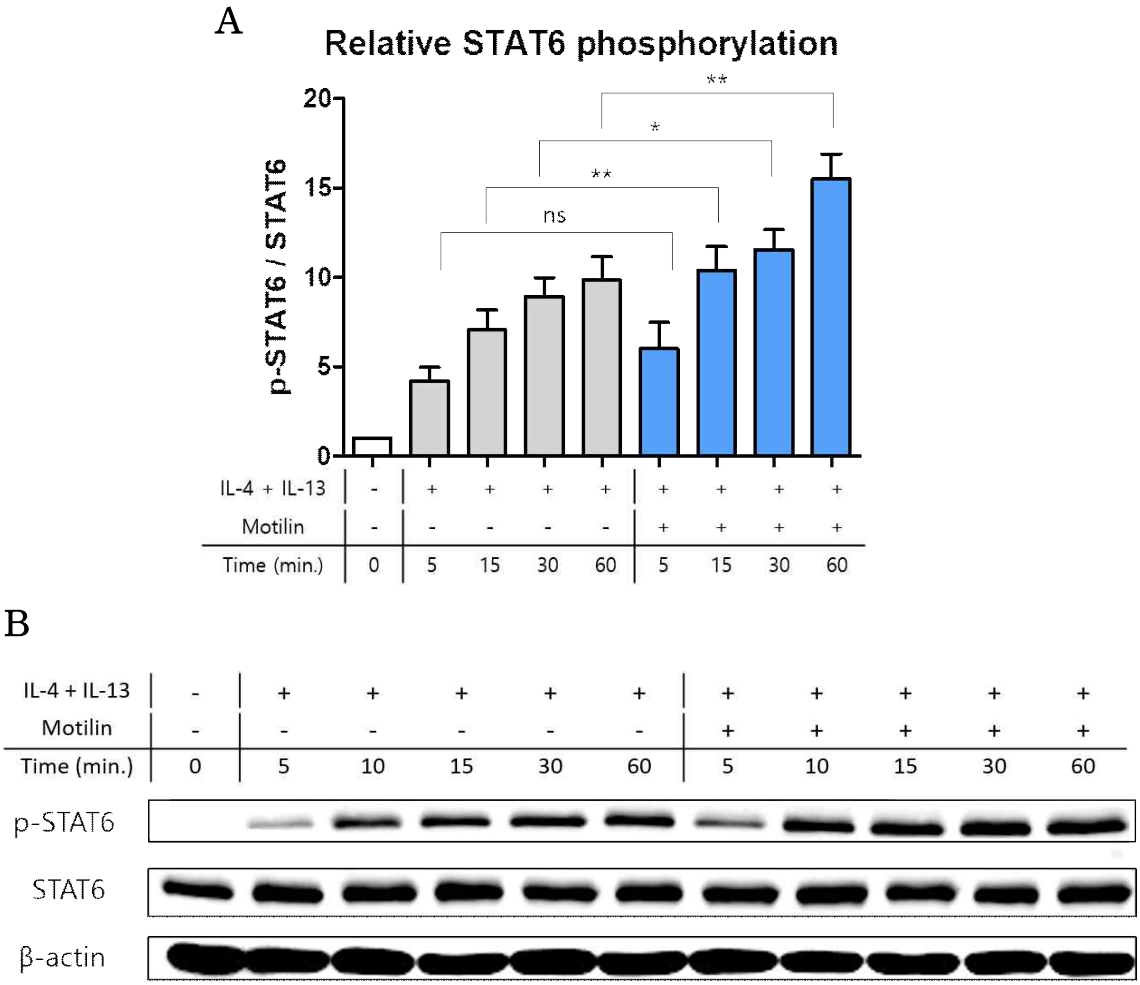


그림 8. M2 분화 조건에서 STAT6 phosphorylation 관찰

(A) THP-1 세포에 PMA 100 nM을 24 h 동안 처리하여 M0로 분화시킨 후, FBS가 없는 RPMI culture media로 교체하여 overnight으로 배양하였다. 0, 5, 15, 30, 60 min 동안 IL-4와 IL-13을 20 ng/ml씩 처리한 조건, IL-4, IL-13에 motilin 10 nM을 추가로 처리한 조건에 대하여 Western blot으로 STAT6 phosphorylation을 관찰한 결과. ImageJ 프로그램을 이용하여 band intensity를 측정하고, STAT6로 normalization 하여 데이터 처리한 결과 (n=4, two-tailed student's t-test, *$p<0.5$, **$p<0.05$)

(B) 위 (A)와 같은 방법으로 수행한 Western blot 결과의 대표 사진

Part 4. MLNR 특이적 M2 분화에 대한 효과 검증 및 이에 관여하는 G protein 경로 분석

앞서 확인한 M0 대식세포에서 IL-4, IL-13을 처리하여 M2로의 분화를 유도할 때 motilin을 추가 처리하면 M2 분화 표지 유전자의 발현량이 증가한다는 결과에 대하여, MLNR 특이적인 현상임을 검증하고자 한다. 그래서 본 파트에서는 MLNR antagonist MA-2029를 처리한 후 M2 분화실험을 재현하여 motilin에 의한 효과가 MLNR의 활성화에 의한 현상임을 확인하고자 하였다. 또한 GPCR에 의한 신호전달 경로의 가장 상위 단계에서 신호를 조절하는 G protein 수준에서, 어떤 G protein 경로를 통해 M2 분화 표지 유전자의 발현량을 증가시키는지 확인해보고자 하였다. Part Ⅰ.에서 확인한 대로, motilin에 의하여 활성화되는 Gi/o, Gq/11 family에 대하여 M2 분화에 MLNR이 미치는 영향을 확인하고자, Gi inhibitor, pertussis toxin (PTX)와 Gq inhibitor, YM-254890을 각각 처리하여 M2 분화실험을 수행하고자 하였다. 이때, 4가지 M2 분화 표지 유전자 CD206, CD163, fibronectin, IL-10에 대하여 qPCR을 통해 mRNA 발현량의 차이를 확인하고자 하였다.

각각의 inhibitor가 M2 분화 조건에서 세포의 viability에 부정적인 영향을 끼치는지, 그리고 각 inhibitor가 독립적으로 M2 분화에 영향을 미치는지를 먼저 확인해보고자 하였다.

4.1 M2 분화과정에서 inhibitor 처리가 cell viability와 분화 표지 유전자 발현에 미치는 영향 확인

Part I에서 BRET assay를 통해 확인하였을 때 MA-2029는 motilin의 G protein 활성을 10 nM 수준에서 억제할 수 있었다. 그러나 선행 연구들을 참고하였을 때 MA-2029를 10 μM 농도를 처리하는 것이 일반적이고, M2 대식세포 분화를 유도하는 실험에서는 BRET assay와는 다르게 장시간 배양하기 때문에 위와 같은 농도 조건을 설정하게 되었다. 이때, 먼저 MA-2029를 포함한 inhibitor의 처리가 cell viability에 부정적인 영

향을 미치는지를 확인하기 위하여 CCK-8 assay를 통해 M2 분화 조건에서 cell viability를 측정하였다 (그림 9A). CCK-8 assay는 CCK-8 solution을 처리하여 일정 시간 동안 세포를 배양했을 때, WST-8이 세포 내에서 생성된 dehydrogenase와 반응하는 원리를 이용하여 색의 변화를 측정하는 실험으로, 총 세포들 대비 살아있는 세포의 비율 흡광도 (OD) 값으로 측정하여 비교할 수 있다. 그 결과, M0로 분화시킨 THP-1 세포에 IL-4, IL-13을 처리하여 72 h 동안 M2로 분화시킨 조건과, IL-4, IL-13을 처리하기 30 min 전에 inhibitor MA-2029 10 μM, PTX 100 ng/ml, YM-254890 1 μM을 처리하여 분화시킨 경우에서 모두 유의미한 차이가 보이지 않아, inhibitor의 처리가 cell viability에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다. 또한, M0에서 M2로의 분화 과정에서 motilin을 추가로 처리한 경우와, IL-4, IL-13, motilin을 처리하기 전에 inhibitor를 각각 전처리한 경우에서도 cell viability의 유의미한 차이를 보이지 않았다.

또한, M2 표지 유전자인 CD206, CD163, fibronectin, 그리고 IL-10의 mRNA 발현량이 각각의 inhibitor의 처리에 영향을 받는지를 확인하고자 하였다. M0로 분화시킨 THP-1에 각각의 inhibitor를 처리한 후, IL-4와 IL-13를 처리하여 M2 세포로 분화시킨 후 RNA를 추출하여 qPCR 실험을 진행하였다 (그림 9B). 그 결과, 각 세포 샘플에 대하여 inhibitor의 처리 여부에 따른 유전자의 발현량 차이가 크게 나타나지 않았고, inhibitor를 전처리한 경우에도 M0 대식세포 대비 M2 표지 유전자가 유의미하게 증가하여, M2 분화에 각각의 inhibitor가 독립적으로 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다.

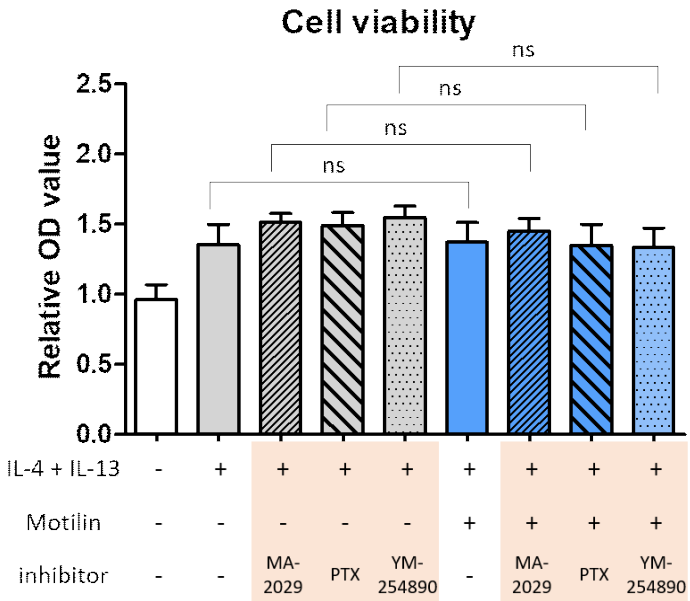
4.2 MLNR antagonist, Gi · Gq inhibitor가 motilin의 M2 분화 촉진 효과에 미치는 영향 확인

Part Ⅲ에서 진행한 실험과 같은 조건으로, THP-1 세포주를 M2로 분화시킬 때 motilin이 미치는 영향을 MA-2029, PTX, YM-254890이 억제할 수 있는지를 확인하고자 하였다. M0로 분화시킨 THP-1 세포에 먼저

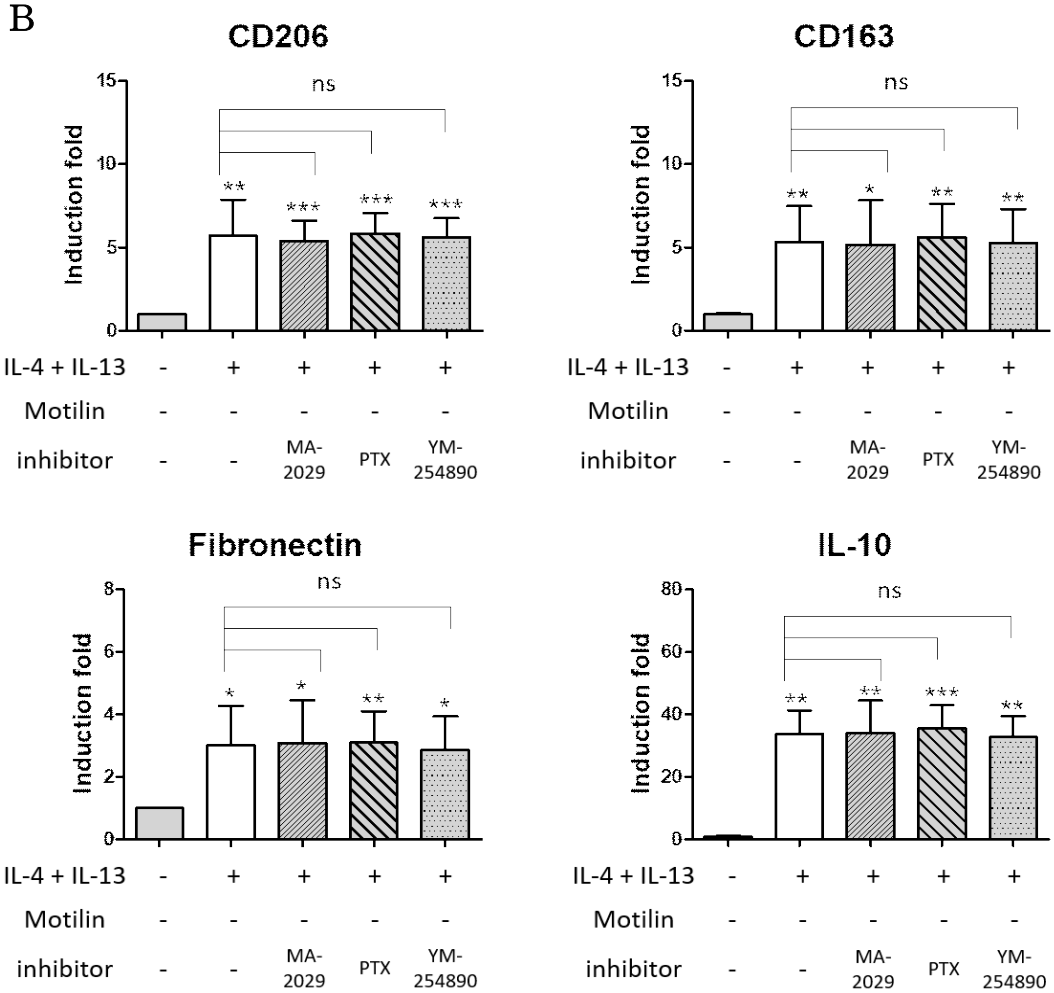
각각 MA-2029 10 μM, PTX 100 ng/ml, YM-254890 1 μM를 30 min 전처리하였고, IL-4, IL-13만 또는 IL-4, IL-13에 motilin 10 nM을 추가로 처리하여 72 h 배양하였다. 이 세포 샘플들로부터 RNA를 추출하고 cDNA를 합성하여 qPCR을 진행한 결과, 각각의 inhibitor 마다 motilin에 의한 효과를 저해하는 정도나, 영향을 미치는 유전자 종류가 다름을 확인하였다 (그림 9C).

우선, MA-2029 처리에 의해서는 세 유전자 모두 motilin에 의해 증가된 mRNA 발현량이 다시 감소하였고, 이를 통해 motilin 처리에 의한 M2 분화 촉진 효과가 MLNR 의존적임을 검증하였다. 반면, PTX를 전처리한 조건에서는 fibronectin과 IL-10의 발현량 증가만을 유의미하게 감소시켰고, YM-254890을 전처리한 조건에서는 CD206의 발현량만을 감소시켰다. 이를 통해, Gi/o 그리고 G q/11 family 모두 M2 표지 유전자의 발현에 관여하지만, 조절하는 유전자의 종류는 다르다는 것을 확인하였다. motilin의 경우, MLNR을 활성화시켜 그 하위의 Gi/o family를 통해 주로 fibronectin과 IL-10을, Gq/11 family를 통해 주로 CD206의 발현을 증가시켰을 것이라 추측해 볼 수 있다.

A


Cell viability
Relative OD value
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
ns
ns
ns
IL-4 + IL-13 - + + + + + + + +
Motilin - - - - - + + + +
inhibitor - - MA-2029 PTX YM-254890 - MA-2029 PTX YM-254890

B


CD206
Induction fold
15
10
5
0
ns
**
***
***
***
IL-4 + IL-13 - + + + +
Motilin - - - - -
inhibitor - - MA-2029 PTX YM-254890
CD163
Induction fold
15
10
5
0
ns
**
*
**
**
IL-4 + IL-13 - + + + +
Motilin - - - - -
inhibitor - - MA-2029 PTX YM-254890
Fibronectin
Induction fold
8
6
4
2
0
ns
*
*
**
*
IL-4 + IL-13 - + + + +
Motilin - - - - -
inhibitor - - MA-2029 PTX YM-254890
IL-10
Induction fold
80
60
40
20
0
ns
**
**
***
**
IL-4 + IL-13 - + + + +
Motilin - - - - -
inhibitor - - MA-2029 PTX YM-254890

C

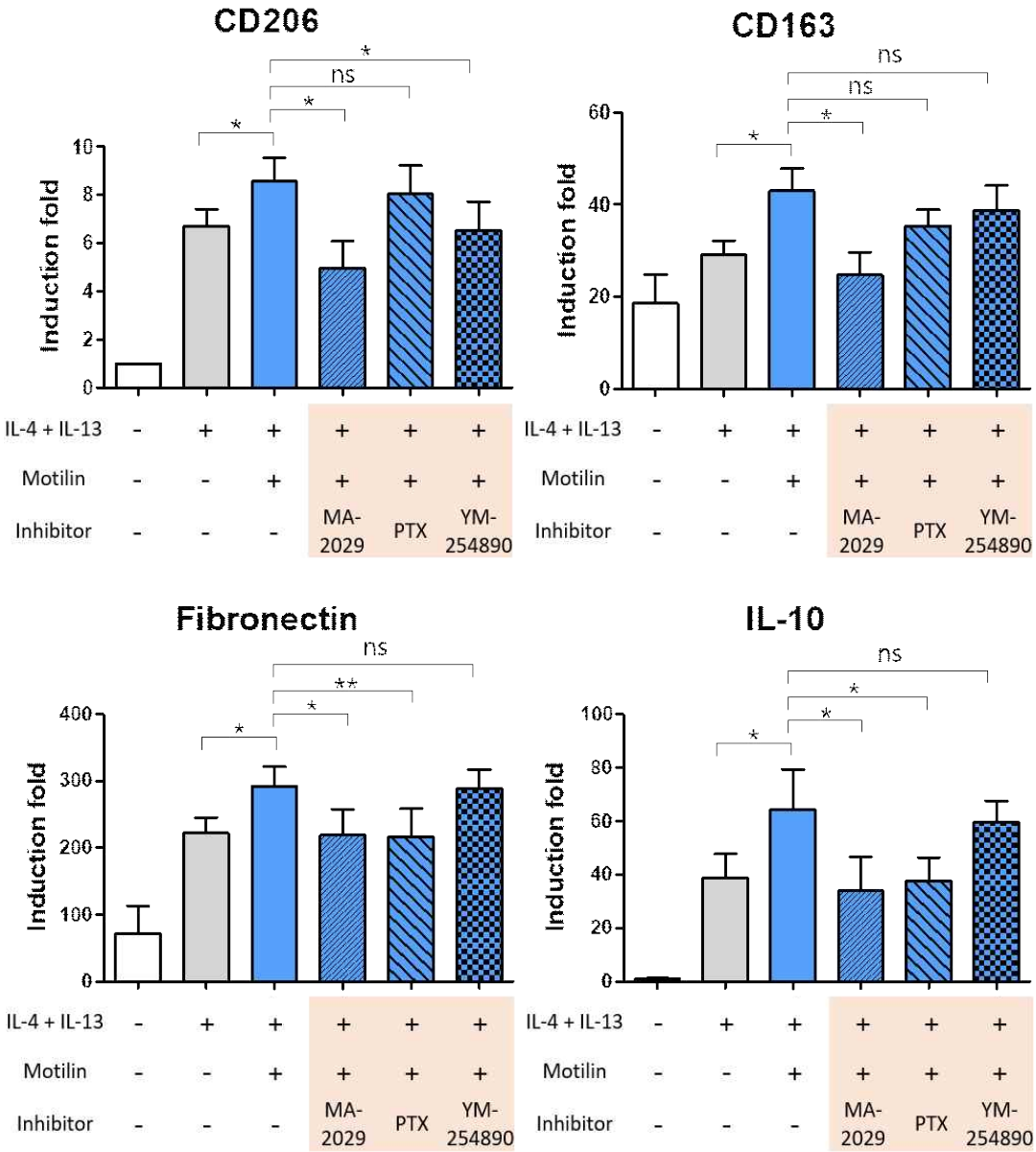

CD206
Induction fold
0
2
4
6
8
10
*
*
ns
*
IL-4 + IL-13 - + + + + +
Motilin - - + + + +
Inhibitor - - - MA-2029 PTX YM-254890
CD163
Induction fold
0
20
40
60
*
*
ns
ns
IL-4 + IL-13 - + + + + +
Motilin - - + + + +
Inhibitor - - - MA-2029 PTX YM-254890
Fibronectin
Induction fold
0
100
200
300
400
*
*
**
ns
IL-4 + IL-13 - + + + + +
Motilin - - + + + +
Inhibitor - - - MA-2029 PTX YM-254890
IL-10
Induction fold
0
20
40
60
80
100
*
*
*
ns
IL-4 + IL-13 - + + + + +
Motilin - - + + + +
Inhibitor - - - MA-2029 PTX YM-254890

그림 9. MLNR antagonist, Gi · Gq inhibitor가 M2 분화에 미치는 영향 확인 및 MLNR 특이적 M2 분화현상에 대한 규명

(A) 96-well plate에 THP-1 세포를 준비하여 PMA 100 nM을 24 h 처리하여 M0로 분화시킨 후, fresh media로 교체하였다. 각 세포 샘플에 대하여 vehicle, MA-2029 10 μM, PTX 100 ng/ml, YM-254890 1 μM을 30 min 전처리 후, IL-4와 IL-13을 각 20 ng/ml 농도로 처리하거나 motilin 10 nM을 추가로 처리하여 72 h 동안 M2로 분화시켰다. CCK-8 solution을 처리하고 2 h 동안 배양한 후, Envision 장비를 이용하여 450 nm 파장대에서 흡광도를 측정하였다. 각 세포 샘플의 OD 값에서 culture media의 OD 값을 뺀 후, M0 샘플에 대하여 normalization 하였다 (n=4)

(B) THP-1 세포에 PMA 100 nM을 24 h 처리하여 M0로 분화시킨 후, fresh media로 교체하였다. 각각 MA-2029 10 μM, PTX 100 ng/ml, YM-254890 1 μM을 30 min 전처리한 후, IL-4와 IL-13을 각각 20 ng/ml 농도로 72 h 처리하여 M2로 분화시켰다. 각각의 세포 샘플에 대하여 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 qPCR을 통해 mRNA 발현량을 측정한 결과 (n=4, two-tailed student's t-test, *$p<0.05$, **$p<0.005$, ***$p<0.0005$)

(C) 위 (B)와 같은 조건으로 THP-1을 M0로 분화시킨 뒤 fresh media로 교체하고 각각의 inhibitor를 30 min 전처리하였다. IL-4와 IL-13을 각 20 ng/ml 농도로 처리한 조건, 그리고 IL-4, IL-13에 motilin 10 nM을 추가로 처리한 조건으로 72 h 동안 배양하여 M2로 분화를 유도하였다. 각각의 세포 샘플에 대하여 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 qPCR을 통해 mRNA 발현량을 측정한 결과 (n=5, *$p<0.05$, **$p<0.005$)

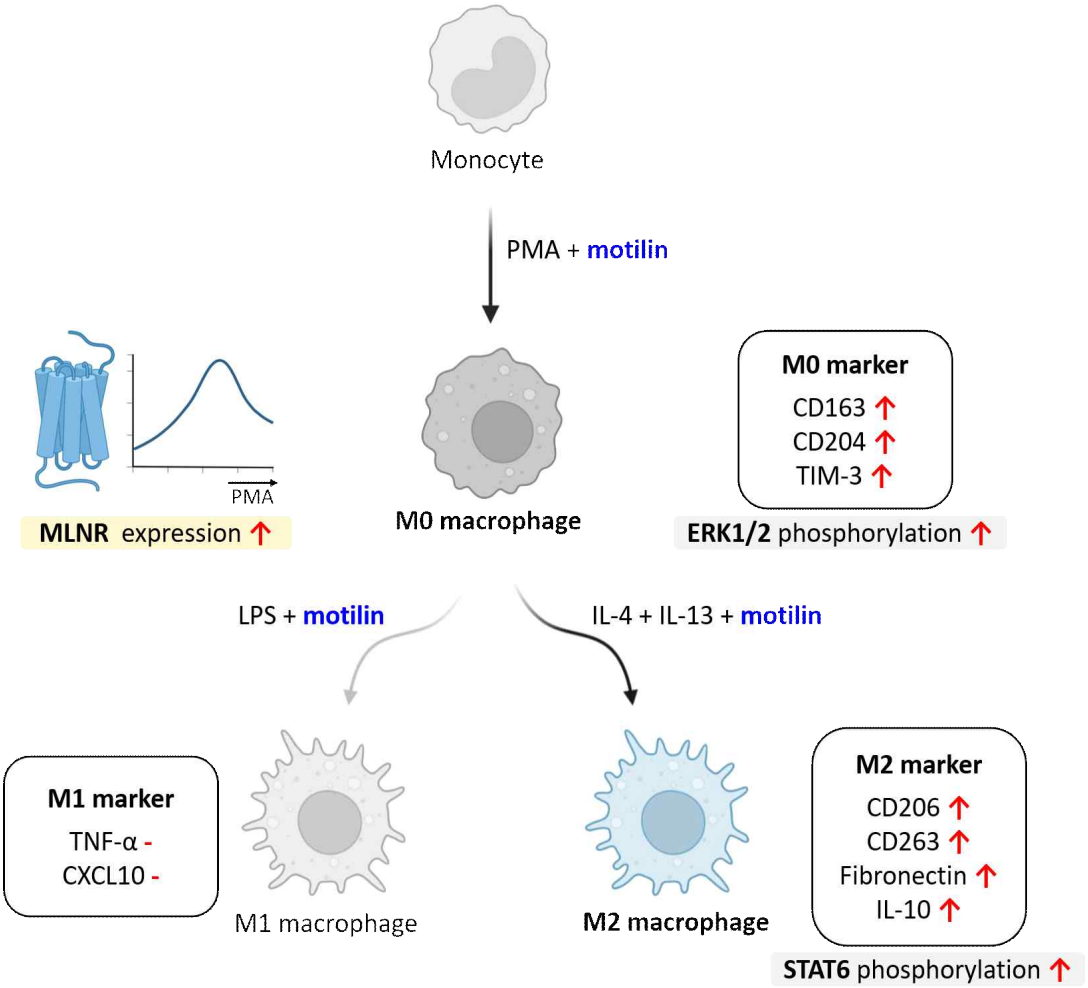


그림 10. 대식세포 분화과정 및 motilin이 분화에 미치는 영향 요약

THP-1 세포주에서 PMA에 의한 대식세포 분화과정에서 MLNR의 발현량이 증가하고, PMA와 motilin을 동시에 처리하였을 때 대식세포 분화가 강화되었으며 이때 ERK1/2 phosphorylation이 증가하였다. motilin은 LPS에 의한 M1 대식세포 분화에는 영향을 미치지 않은 반면, IL-4, IL-13에 의한 M2 대식세포 분화를 증가시켰으며 이때 STAT6 phosphorylation을 증가시켰다.

제 4 장 논의

GPCR은 FDA 승인을 받은 의약품 중에서 35% 이상의 높은 비중을 차지하고 있을 만큼 질병치료제의 표적으로써 활발히 연구되고 있다 (Chan *et al.*, 2019). 본 연구의 대상인 MLNR 역시 소화계 질환을 가진 환자들에게 위장 운동을 가능케하는 방법을 찾기 위한 방향으로 의약품 개발 연구가 진행되어왔다. MLNR은 위 경련이나 위 마비와 같은 질환에 대한 치료제 표적으로서 연구되고 있으며, MLNR에 대한 저분자 agonist camicinal은 위 마비와 같은 위장 질환 치료제로서 임상시험 단계에 놓여있다 (Sanger & Furness, 2016).

소장에서 발현하는 motilin은 그 이름을 통해 알 수 있듯이, 주로 평활근 세포에서 근수축을 일으키며 위장의 움직임 (gastric motility)에 중요한 기능을 하는 호르몬이다. motilin과 다르게, motilin에 대한 수용체인 MLNR은 위장관 외에 뇌와 같은 중추신경계, 내분비계, 골수, 림프조직 등의 다양한 장소와 세포에서 발현되고 있다. 그래서 과거에는 MLNR과 motilin의 기능에 대한 연구가 위장 운동에 초점을 맞추어 한정되었던 반면, 현재는 MLNR이 신경계를 통해 허기를 감지하고 인슐린 분비를 조절하는 등의 다양한 기능을 수행한다는 연구 결과들이 보고되고 있다.

따라서 이렇게 개발된 MLNR을 표적으로 하는 약물은 근수축뿐만 아니라 복합적인 기능을 수행할 수 있다. 특히, 대식세포 분화과정에서 MLNR의 발현량이 증가한다는 새로운 발견을 통해, 면역시스템에서 MLNR의 기능에 주목할 필요성이 높아졌다. 본 연구에서는 MLNR 리간드에 의한 G protein 활성을 확인한 뒤, 대식세포의 분화 조건에 대하여 motilin을 처리하였을 때 각각의 분화 표지 유전자 발현량 차이를 비교하였다. 이때, MLNR의 리간드가 단핵구에서 대식세포로의 분화에 영향을 미친다는 것과 motilin이 특정 G protein을 통해 M2 분화에 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

본 연구의 첫 번째 결과는 motilin, camicinal. macrolide 계열의 항생물질 등 MLNR의 리간드들이 모두 동일하게 MLNR 특이적으로 Gi/o, Gq/11을 활성화시킨다는 것이다. 본 연구에서 사용한 TRUPATH platform은 이형삼합체를 이루는 (heterotrimeric) G protein의 α 소단위체에 형광단백질 Rluc8, γ 소단위체에 GFP2가 연결된 construct를 사용하여, G protein의 활성화를 BRET assay를 통해 측정한다. 두 단백질 사이의 거리가 10 nm 이내로 가까워지면, 기질에 의해 활성화된 RLuc8 (energy donor, luminescent protein)로부터 방출된 빛 에너지가 GFP2 (energy acceptor, fluorescent protein)로 전달되기 때문에, 방출된 빛 에너지를 Rluc8과 GFP2의 파장대에서 측정함으로써 두 단백질의 물리적 근접성을 확인할 수 있다. 리간드에 의해 GPCR이 활성화되면 Gα와 Gβ-Gγ 단위체 사이의 거리가 멀어지며 BRET ratio (acceptor's wavelength/donor's wavelength)가 감소하게 된다. MLNR의 다양한 리간드를 처리한 결과, Gi/o와 Gq/11 family의 G protein을 주로 활성화시키는 것을 확인하였다. 그러나, 기존에 알려진 Gα13에 MLNR이 binding하거나 하위 신호전달 경로를 활성화시킨다는 선행 연구 결과와는 다르게, MLNR에 의한 G13의 직접적인 활성은 확인되지 않았다.

또한 본 연구에서 사용된 MLNR selective antagonist MA-2029는 MLNR 리간드에 의한 G protein 활성을 대부분 억제하였지만, aizthromycin과 roxithromycin의 G protein 활성을 일부만 억제하거나 거의 저해하지 못하였다. Azithromycin과 roxithromycin 모두 항생물질인 erythromycin으로부터 유래하였기 때문에 하위 신호전달 메커니즘에 차이가 없을 것이라 예상하였으나, 실제로는 MLNR inhibitor 처리에 대하여 특이점을 보였다. 이를 통해 roxithromycin에 대한 신호전달 등의 기능 연구에서는 MA-2029를 처리함이 적합하지 않다는 것을 확인할 수 있었고, 다양한 해석의 가능성을 남겼다. Selective antagonist로 MLNR에 의한 신호전달을 억제한 경우에도 G protein이 활성화되었으므로 MLNR 이외의 수용체에 결합하여 활성을 가질 수 있다는 가능성을 제시하며, 이에 대해서는 추가적인 검증이 필요하다.

본 연구의 두 번째 결과로, THP-1 세포주에 PMA를 처리하여 단핵구에서 대식세포로 분화를 유도하는 상황에서 MLNR의 발현량이 증가하며, 이때 motilin 또는 다른 MLNR의 리간드를 함께 처리하면 대식세포 분화가 더욱 촉진되었다 (그림 4). 선행 연구들에 따르면, 자료 수집이 완료된(profiled) 대부분의 GPCR은 단핵구에서 대식세포로 분화한 이후에 발현량이 감소하며, 발현량이 증가하는 GPCR의 예시로는 7개의 subfamily 정도가 알려져 있다. 또한, 15개의 GPCR은 서로 다른 cytokine을 처리하여 대식세포를 다양한 표현형으로 분화시켰을 때, 그 발현량이 달라진다고 보고된 바 있다 (Wang, *et al.*, 2019). MLNR에 대해서는 면역학적 관점에서 연구가 이루어지지 않았기 때문에, MLNR의 발현량이 대식세포로 분화함에 따라 증가한다는 사실은 대식세포의 면역작용 등에서 MLNR이 특정한 역할을 가질 수 있다는 것을 시사한다.

Erythromycin 유래 항생물질들이 motilin, camicinal에 대해 갖는 차이점은, PMA 없이 단독으로 처리하여도 대식세포로 분화가 유도된다는 점이다. 그러나 motilin 뿐만 아니라 camicinal과 macrolide 계열 항생물질을 각각 PMA와 함께 처리하면 대식세포로의 분화가 강화되었다. 이것이 MLNR 의존적인 현상임을 확인하기 위해서는 MLNR gene knockout 세포주를 활용하는 등에서 추가적인 확인이 필요하다. 체내에서 대식세포 분화 유도 상황과 면역작용 개시(initiation) 상황에서 MLNR의 리간드를 처리하였을 때 실제로 대식세포의 분화가 증가하는지를 *in vivo* 실험을 통해 검증하는 과정도 필요하다.

MEK inhibitor U0126을 처리한 경우에 PMA에 의한 대식세포 분화가 억제되는 것을 통해, ERK와 대식세포 분화에 대한 연관성을 확인하였다. PMA를 단독으로 처리한 경우보다, motilin과 함께 처리하였을 때 THP-1 세포주에서 ERK1/2의 활성이 증가하는 것을 확인하였다 (그림 5). PMA를 처리하였을 때 MLNR의 발현량이 증가하기 때문에 이로 인한 feedback 작용으로 motilin에 의한 ERK phosphorylation이 증가한 것으로도 생각해볼 수 있다. PMA와 motilin 처리에 의한 ERK 활성의 증가가 어떤 메커니즘으로 작동되는 것인지는 추가적인 연구가 필요하다.

본 연구의 세 번째 결과는, 휴지기의 M0 대식세포에서 LPS를 처리하여 M1 세포로, IL-4와 IL-13을 처리하여 M2 세포로 분화시키는 과정에서 사이토카인과 motilin을 동시처리 하였을 때, M2 분화만을 증가시켰다 (그림 6, 7). THP-1 세포를 M0 대식세포로 분화시켰을 때 MLNR의 발현량이 증가했던 것에 비해, M1 또는 M2로 분화시킨 경우에는 MLNR의 발현량이 감소하였다. 발현량의 감소에도 불구하고, IL-4, IL-13에 motilin을 추가로 처리하였을 때, M2 분화 표지 유전자인 CD206, CD163, fibronectin, IL-10의 mRNA 발현량이 모두 증가함을 확인하였고, 이때 CD206은 세포 표면 발현량이 증가함을 FACS로도 확인하였다.

JAK/STAT 신호전달경로는 사이토카인 등 다양한 분자들의 신호전달을 매개하며, 대식세포의 재프로그래밍(reprogramming)에 관여한다고 알려져 있다 (Malyshev & Malyshev, 2015). 그 중, M2 분화과정에 관여한다고 알려진 대표적인 하위 신호전달 경로 STAT6에서, IL-4와 IL-13에 더해 motilin을 처리한 경우에 STAT6 phosphorylation이 증가함을 확인하였다 (그림 8). 이와 관련하여 M2 분화 촉진 효과가 또 다른 신호전달경로를 통해 이루어지는지 역시 추가적인 검증 및 실험이 필요하다.

M2 대식세포는 과도한 염증반응을 막고 세포의 항상성을 유지하며, 주변에 면역반응을 일으키고 남은 호중구 세포들(neutrophils) 또는 미생물의 파편 등을 포식하여 제거하며, 상처를 회복시키는 중요한 역할을 수행한다 (Mosser & Justin, 2008). 따라서, motilin이 면역기능 조절제로써 사용될 수 있는지 확인하려면, *in vivo* 실험에서 IL-4, IL-13과 함께 motilin을 처리하여 생리적 기능을 관찰하는 실험이 필요하다. 또한, motilin과 같은 종류의 G protein을 활성화시키는 다른 MLNR 리간드에 대하여도 M2 분화를 촉진하는 기능이 있는지도 연구가 필요하다. 실제 azithromycin은 LPS 자극에 대하여 항염증 사이토카인을 분비한다는 연구 결과가 보고되었는데, 이와 같은 항생제 물질의 처리가 항염증반응에 대한 유전자를 증가시키는지, 그리고 이 리간드들의 효과가 MLNR에 의존적인 것인지를 추가로 확인해 볼 예정이다.

본 연구의 네 번째 결과로, M0 대식세포에서 M2로의 분화실험 조건에서 MA-2029를 전처리하면 motilin에 의한 M2 분화 촉진 효과가 억제되었고 이를 통해 motilin의 M2 분화에 대한 효과가 MLNR 특이적인 현상임을 검증하였다 (그림 9). 또한 MLNR에 의해 대표적으로 활성화되는 Gi/o 그리고 Gq/11 family에 대한 억제제 PTX와 YM-254890을 각각 처리하였을 때에도 일부 유전자에서 motilin에 의한 M2 분화 효과가 저해됨을 확인하였다. 이때, 각 inhibitor 처리에 의해 영향을 받는 유전자의 종류가 다르게 나타났다. PTX에 의해 조절 받은 fibronectin과 IL-10은 Gi/o family를 통해, YM-254890에 의해 조절 받은 CD206은 Gq/11 family에 의해 발현량이 조절되는 유전자라고 볼 수 있다. 이를 통해 motilin에 의해 활성화된 각각의 G protein 경로가 서로 다른 항염증 관련 유전자의 발현을 조절하며 M2 분화를 촉진함을 확인하였다.

motilin과 동일한 G protein 활성 패턴을 보였던 MLNR의 다른 리간드들에 대해서도, MLNR을 활성화시켜 G protein 경로를 통해 M2 분화를 촉진할 수 있을 것이라 예측할 수 있다. 또한 Gi/o 또는 Gq/11을 주로 활성화시키는 다른 종류의 GPCR에 대해서도, M2 분화과정에서 항염증 반응 관련 유전자의 발현량을 증가시키는지 확인해봄으로써, 대식세포 분화 및 염증반응에 관여하는 유전자들이 어떤 G protein 경로에 의해 매개되는지 조사할 수 있다. M1 또는 M2 분화와 관련된 유전자들의 발현을 조절하는 G protein 경로에 대한 연구를 통하여, 면역세포에서 발현하는 다양한 종류의 GPCR에서 그 기능을 예측해볼 수 있으며. 연구의 방향을 효율적으로 설정할 수 있다는 장점을 가져올 것이다.

MLNR은 대표적인 동물 실험 모델인 mouse 또는 rat 등의 설치류(rodent)에서는 pseudo-gene으로 남아 발현을 못 하거나 제 기능을 못하는 경우가 많다. *in vivo* 실험을 통하여 위장 운동과 같은 특정 장기에서의 MLNR의 기능을 확인하려면 rabbit, dog, pig 등의 좀 더 복잡한 동물 모델 실험을 활용해야 하며, 또한 각 동물의 MLNR이 활성화시키는 신호전달 기전이 인간의 것과 다를 수 있다는 문제점을 갖는다. 그리

고 본 연구에서 주로 사용한 급성 단핵구성 림프구 THP-1 세포주 외에는 내생적으로 MLNR을 발현하는 세포주가 거의 없다. 따라서, 면역학적 관점에서 MLNR의 발현과 기능에 대해 연구하려면, 인간 peripheral blood mononuclear cell (PBMC)과 같은 인체 유래물을 통한 연구가 MLNR의 생리적 기능을 이해하는데 도움을 줄 수 있을 것이다. PMA 등의 자극을 받지 않은 단핵구 상태의 THP-1 세포주에서는 MLNR의 발현량이 다소 낮았지만, PMA를 처리하여 대식세포로 분화시키는 과정에서는 mRNA 발현량이 증가하였다. 이 THP-1 세포주 실험 결과를 바탕으로, 실제 PBMC에서 추출한 다양한 면역세포들에서 MLNR의 발현량이 어떻게 차이를 보이는지, 그리고 motilin이 대식세포 분화에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 연구해볼 필요가 있으며, 면역계에서 MLNR 및 motilin의 역할과 기능에 대한 연구의 토대를 쌓을 수 있다. 또한, 이렇게 motilin 처리를 통해 MLNR을 활성화시켰을 때 M0 또는 M2 대식세포로의 분화를 증가시켰다는 결과를 바탕으로, 대식세포의 대표적인 기능인 식균작용 등에 대한 연구를 통해 선천성 면역시스템에서 MLNR의 기능과 효과를 밝혀나간다면 면역질환치료제 연구로 이어질 수 있다. 본 연구의 결과인 MLNR의 대식세포에서의 발현량 증가와, 대식세포 분화 유도와 관련된 기능들은 MLNR을 표적으로 하는 질병치료제 연구에 대해 새로운 아이디어를 환기시키고 연구의 범위를 확장시키며, MLNR에 대하여 기존에 연구된 결과나 개발 중인 약물들에 대하여 새로운 관점을 제공할 것이다.

참 고 문 헌

Bjarnadóttir, T. K., Gloriam, D. E., Hellstrand, S. H., *et al.* (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*, 88(3), 263-273.

Hilger, D., Masureel, M., & Kobilka, B. K. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature structural & molecular biology*, 25(1), 4-12.

Hauser, A. S., Chavali, S., Masuho, I., Jahn, L. J., Martemyanov, K. A., Gloriam, D. E., & Babu, M. M. (2018). Pharmacogenomics of GPCR drug targets. Cell, 172(1-2), 41-54.

Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., *et al.* (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC cancer*, 15(1), 1-14.

Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews immunology*, 8(12), 958-969.

Wang, X., Iyer, A., Lyons, A. B., *et al.* (2019). Emerging roles for G-protein coupled receptors in development and activation of macrophages. *Frontiers in Immunology*, 2031.

Feng, X., Peeters, T. L., & Tang, M. (2007). Motilin activates neurons in the rat amygdala and increases gastric motility. *Peptides*, 28(3), 625-631.

Deloose, E., Verbeure, W., Depoortere, I., *et al.* (2019). Motilin: from gastric motility stimulation to hunger signalling. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(4), 238-250.

Cipriani, G., Gibbons, S. J., Kashyap, P. C., *et al.* (2016). Intrinsic gastrointestinal macrophages: their phenotype and role in gastrointestinal motility. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 2(2), 120-130.

Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). The molecular basis of G protein-coupled receptor activation. *Annual review of biochemistry*, 87, 897-919.

Chan, H. S., Li, Y., Dahoun, T., *et al.* (2019). New binding sites, new opportunities for GPCR drug discovery. *Trends in biochemical sciences*, 44(4), 312-330.

Sanger, G. J., & Furness, J. B. (2016). Ghrelin and motilin receptors as drug targets for gastrointestinal disorders. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13(1), 38-48.

Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. International immunopharmacology, 23(1), 37-45.

Forrester, M. A., Wassall, H. J., Hall, L. S., *et al.*. (2018). Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cellular immunology*, 332, 58-76.

Ma, W., Liu, Y., Ellison, N., *et al.* (2013). Induction of CXC chemokine receptor type 7 (CXCR7) switches stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling and phagocytic activity in macrophages linked to atherosclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(22), 15481-15494.

Huang, J., Zhou, H., Mahavadi, S., *et al.* (2005). Signaling pathways mediating gastrointestinal smooth muscle contraction and MLC20 phosphorylation by motilin receptors. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(1), G23-G31.

Malyshev, I., & Malyshev, Y. (2015). Current concept and update of the macrophage plasticity concept: intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage "switch" phenotype. *BioMed research international*, *2015*.

Richter, E., Ventz, K., Harms, M., *et al.* (2016). Induction of macrophage function in human THP-1 cells is associated with rewiring of MAPK signaling and activation of MAP3K7 (TAK1) protein kinase. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 21.

Kitazawa, T., & Kaiya, H. (2021). Motilin comparative study: structure, distribution, receptors, and gastrointestinal motility. *Frontiers in Endocrinology*, 938.

Sudo, H., Yoshida, S., Ozaki, K. I., *et al.* (2008). Oral administration of MA-2029, a novel selective and competitive motilin receptor antagonist, inhibits motilin-induced intestinal contractions and visceral pain in rabbits. *European journal of pharmacology*, 581(3), 296-305.

Li, H., Yang, L., Jin, Y., *et al.* (2021). Roles of Endothelial Motilin Receptor and Its Signal Transduction Pathway in Motilin-Induced Left Gastric Artery Relaxation in Dogs. F*rontiers in physiology*, 1876.

Keshari, R. S., Verma, A., Barthwal, M. K., *et al.* (2013). Reactive oxygen species induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA induced NETs release from human neutrophils. *Journal of cellular biochemistry*, 114(3), 532-540.

Chen, S., So, E. C., Strome, S. E., *et al.* (2015). Impact of detachment methods on M2 macrophage phenotype and function. *Journal of immunological methods*, 426, 56-61.

Rahal, O. M., Wolfe, A. R., Mandal, P. K., *et al.* (2018). Blocking interleukin (IL) 4-and IL13-mediated phosphorylation of STAT6 (Tyr641) decreases M2 polarization of macrophages and protects against macrophage-mediated radioresistance of inflammatory breast cancer. I*nternational Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 100(4), 1034-1043.

Jiang, H., Harris, M. B., & Rothman, P. (2000). IL-4/IL-13 signaling beyond Jak/Stat. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(6), 1063-1070.

Melhem, H., Kaya, B., Ayata, C. K., *et al.* (2019). Metabolite-sensing G protein-coupled receptors connect the diet-microbiota-metabolites axis to inflammatory bowel disease. *Cells*, 8(5), 450.

Mangmool, S., & Kurose, H. (2011). Gi/o protein-dependent and-independent actions of pertussis toxin (PTX). *Toxins*, 3(7), 884-899.

Lomovskaya, Y. V., Kobyakova, M. I., Senotov, A. S., *et al.* (2022). Macrophage-like THP-1 Cells Derived from High-Density Cell Culture Are Resistant to TRAIL-Induced Cell Death via Down-Regulation of Death-Receptors DR4 and DR5. *Biomolecules*, 12(2), 150.

Olsen, R. H., DiBerto, J. F., English, J. G., *et al.* (2020). TRUPATH, an open-source biosensor platform for interrogating the GPCR transducerome. *Nature chemical biology*, 16(8), 841-849.

Zhang, B., Kopper, T. J., Liu, X., *et al.* (2019). Macrolide derivatives reduce proinflammatory macrophage activation and macrophage mediated neurotoxicity. *CNS neuroscience & therapeutics*, 25(5), 591-600.

Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., *et al.* (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS one*, 5(1), e8668.

Orekhov, A. N., Orekhova, V. A., Nikiforov, N. G., *et al.* (2019). Monocyte differentiation and macrophage polarization. *Vessel Plus*, 3, 10.

Tedesco, S., De Majo, F., Kim, J., *et al.* (2018). Convenience versus biological significance: are PMA-differentiated THP-1 cells a reliable substitute for blood-derived macrophages when studying in vitro polarization?. *Frontiers in pharmacology*, 9, 71.

Huang, N. N., Becker, S., Boularan, C., *et al.* (2014). Canonical and noncanonical g-protein signaling helps coordinate actin dynamics to promote macrophage phagocytosis of zymosan. *Molecular and cellular biology*, 34(22), 4186-4199.

Atri, C., Guerfali, F. Z., & Laouini, D. (2018). Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1801.

Wang, L. X., Zhang, S. X., Wu, H. J., *et al.* (2019). M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *Journal of leukocyte biology*, 106(2), 345-358.

Keicho, N., Kudho, S., Yotsumoto, H., *et al.* (1994). Erythromycin promotes monocyte to macrophage differentiation. *The Journal of antibiotics*, 47(1), 80-89.

Mizuno, N., & Itoh, H. (2009). Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *Neurosignals*, 17(1), 42-54.

Italiani, P., & Boraschi, D. (2014). From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in immunology*, 5, 514.

Tarique, A. A., Logan, J., Thomas, E., *et al.* (2015). Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 53(5), 676-688.

Abstract

Seung-ah Lee
School of Biological Sciences
The Graduate School
Seoul National University

Motilin receptor (MLNR) is a member of G protein-coupled receptors that binds motilin, an endogenous peptide-hormone mainly expressed in the small intestine. It is known to be involved in the contraction of smooth muscle in the intestine and research on digestive or endocrine systems has been mainly conducted. However, since MLNR is expressed not only in the small intestine, but also in the central nervous system, endocrine system, bone marrow and lymphoid tissue, it can be predicted that MLNR will have various roles in each organ.

In fact, the gastrointestinal tract (GI tract), the organ where MLNR is expressed the most, has a role as an immune organ as well as a digestive organ that acts as an immune system to defend against foreign substances. It is also known that the GI is the place where the largest number of macrophages reside, and complex interactions between immune cells occur. In this study, the expression level and function of MLNR in monocytes and macrophages were tried to be explored based on the fact that MLNR is expressed in the GI tract, bone marrow, and monocytes called THP-1 cell line. Motilin was known to mainly activate Gq/11 family through MLNR, but it as found that not only Gq/11 but also the Gi/o family, especially GoA/oB and Gz, were activated through Gα activation assay using

BRET. Other erythromycin-derived antibiotics known to activate MLNR and camicinal, an MLNR selective agonist, also showed the same Gα activation activity as motilin. On the other hand, MA-2029, known as a MLNR selective antagonist, inhibited the G protein activation by motilin, camicinal, and erythromycin, but partially inhibited Gz and G11 activation by azithromycin, and could not inhibit Gq, G11, Gz activation by roxithromycin at all.

When monocytic THP-1 cells were treated with PMA to be differentiated into macrophages, the mRNA expression level of MLNR was increased. In addition, differentiation into M0 macrophages was more strongly induced when motilin and other MLNR ligands were co-treated with PMA as CD163, CD204, and TIM-3 expression increased. THP-1 macrophage differentiation by PMA was completely inhibited by U0126, a MEK inhibitor, suggesting that MAPK activity is important for macrophage differentiation. Simultaneous treatment of motilin and PMA significantly increased ERK phosphorylation compared to treatment of PMA alone. This could mean that motilin increases THP-1 macrophage differentiation by increasing ERK activation.

When M0 macrophages were differentiated into M2 macrophages, the differentiation into anti-inflammatory M2 macrophages was significantly increased by co-treatment of IL-4, IL-13 and motilin as confirmed by M2 markers, CD206, CD163, fibronectin, and IL-10. However, Motilin did not affect LPS-induced differentiation into M1 macrophages. Motilin-induced increases in mRNA of M2 differentiation markers, CD206, CD163, fibronectin, and IL-10, were completely inhibited by the MLNR antagonist MA-2029. However, pertussis toxin, a Gi inhibitor, inhibited only fibronectin and IL-10 expression, and YM-254890, a Gq inhibitor, only inhibited CD206 expression.

It is well-known that activation of STAT-6 is important for differentiation into M2 macrophages, and co-treatment with motilin significantly increased STAT-6 phosphorylation compared to one treated with IL-4 and IL-13 alone. This could mean that motilin contributes to M2 macrophage differentiation by increasing STAT-6 phosphorylation. The results of this study suggest that the expression level of MLNR increases when it differentiates from monocytes into macrophages, and it may be involved in the anti-inflammatory response in the GI tract by increasing the differentiation into M0 and M2. If expression and function of GPCRs are studied in various fields beyond the limited point of view, the target of disease treatment agents can be expanded and the understanding of the mechanism of action of GPCR-targeted drugs can be improved.

Keywords : GPCR, MLNR, BRET, G protein, monocyte, macrophage
Student Number : 2020-21891