



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](#)

이학석사학위 논문

TCR 자극에 의한 T 림프구의
Mind bomb-1 전사 조절 기전에
대한 연구

Study on the regulation of Mind bomb-1
Transcription level in T lymphocyte
Induced by TCR stimulation

2014년 2월

서울대학교 대학원

생명과학부

김주연

TCR 자극에 의한 T 림프구의
Mind bomb-1 전사 조절 기전에
대한 연구

Study on the regulation of Mind bomb-1
Transcription level in T lymphocyte
Induced by TCR stimulation

지도교수 공 영 윤

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함
2013년 12월

서울대학교 대학원
생명과학부
김 주 연

김주연의 석사학위논문을 인준함
2013년 12월

위 원 장 안 광 석 (인)
부 위 원 장 공 영 윤 (인)
위 원 이 원 재 (인)

Study on the regulation of Mind bomb-1
Transcription level in T lymphocyte
Induced by TCR stimulation

Advisor: Young-Yun Kong

A dissertation submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of
Master OF SCIENCE

School of Biological Sciences
The Graduate School
Seoul National University

By

Joo-Yeon Kim

December 2013

Approved by thesis Committee

I. 국문초록 (Abstract in Korean)

TCR 자극에 의한 T 림프구의 Mind bomb-1 전사 조절 기전에 대한 연구

김 주 연

생명과학부

서울대학교 대학원 자연과학대학

Mib1 은 Notch ligand 의 endocytosis 를 조절하는 E3 ubiquitin ligase 로 Notch 신호 전달의 상위 조절자이다. Notch 는 인접한 두 세포가 주고받는 신호로 다양한 세포들의 운명을 결정하며 특히 발생과정과 세포 분화, 조직 형성에 중요한 역할을 가지고 있다. 면역시스템과 관련하여 Notch 신호는 T 림프구의 발생 과정에서 가장 먼저 그 역할이 밝혀졌다. T 림프구의 분화와 기능에 대한 연구는 주로 수지상 세포가 전달하는 Notch 신호가 어떻게 T 림프구에 영향을 미치는가에 초점이 맞춰지고 있다. 수지상 세포에서 발현되는 Mib1 이 Notch ligand 를 조절하여 T 림프구의 분화에 영향을 미친다는 것이 최근 보고되었다. 하지만 T 림프구에서 전달되는 Notch 신호를 조절하는 Mib1 의 기능에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다. T 림프구에 TCR 자극이 주어지는 경우 Notch ligand 와 receptor 가 발현되는

이전의 연구를 바탕으로 본 연구에서는 *Mib1^{fl/fl}* 마우스를 이용하여 Anti-CD3 와 Anti-CD28 을 통한 TCR 자극 시 T 림프구에서 발현되는 Mib1 에 대한 연구를 진행하였다. 또한 TCR 자극이 주어지는 경우 Mib1 의 발현이 어떠한 기작을 통하여 이루어지는 지를 알아보기 위해서 Mib1 의 촉진제 부위를 조사하였다. 촉진제 부위에 존재하는 다양한 전사 인자 결합 부위 중 NF- κ B 와 NFAT 에 주목하여 각 억제제를 처리한 경우 Mib1 의 발현 양이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 위치지정 돌연변이를 이용하여 NF- κ B 와 NFAT 결합 부위를 특이적으로 변형시킨 벡터를 제작한 뒤, 발광 효소 활성화 실험을 통해 특정 부위에 NF- κ B 와 NFAT 가 전사 인자로서 기능한다는 것을 확인하였다. 이러한 사실들을 바탕으로 Mib1 은 T 림프구에서 TCR 자극에 의해 발현되며 NF- κ B 와 NFAT 가 이를 조절한다는 것을 밝혀내었다.

핵심어: Mind bomb-1, CD4 T 림프구, CD8 T 림프구, 전사 인자, NF- κ B, NFAT,

학번: 2012-20301

II. 목 차 (TABLE OF CONTENTS)

	Page
I. 국 문 초 록 (Abstract in Korean) -----	i
II. 목 차 (Table of Contents) -----	iii
III. 서 문 (Introduction) -----	1
IV. 실험 재료 및 방법-----	5
IV-1. Mice -----	5
IV-2. T lymphocyte preparation -----	5
IV-3. Cell culture -----	6
IV-4. Site directed mutagenesis -----	7
IV-5. Transfection- -----	8
IV-6. Luciferase assay -----	9
IV-7. Chromatin Immunoprecipitation -----	9
IV-8. Western blotting -----	11
IV-9. Quantitative real-time PCR -----	12
V. 결 과 (Results) -----	13
V-1. TCR 자극에 의해 T 림프구에서 Mib1 과 Notch 신호 관련 유전자들이 발현된다. -----	13
V-2. NF- κ B와 NFAT 억제제는 Mib1의 발현을	

감소시킨다. -----	17
V-3. Mib1의 촉진제 부위에 NF- κ B와 NFAT 결합 부위가 존재한다. -----	21
V-4. Mib1 촉진제에서의 NF- κ B와 NFAT 결합 저해는 Mib1의 전사를 감소시킨다. -----	25
V-5. NF- κ B 과발현은 Mib1 유전자의 전사를 증가시킨다. -----	29
VI. 고찰 (Discussion) -----	33
VII. 참고 문헌 (References) -----	40
VIII. 영문 초록 (Abstract in English) -----	43

III. 서 문 (Introduction)

Mind bomb-1 (Mib1)은 세 개의 RING domain 구조를 갖는 E3 ubiquitin ligase로 Notch ligand와 결합하여 ligand의 endocytosis를 조절하는 역할을 가지고 있다. Mib1의 기능은 zebrafish의 loss of function 실험을 통해 Notch 신호 전달과의 연관성이 밝혀졌다. (Schier et al., 1996) 그 이후 유전자 결손 마우스의 형질 분석을 통해 Mib1이 Notch ligand들의 ubiquitination을 유도하여 endocytosis를 일으킨다는 것이 알려져 있다. (Itoh et al., 2003)

Notch 신호 전달은 인접한 두 세포에서 각각 발현되는 ligand, receptor를 통해 이루어지며, 발달과정에서의 세포 운명 결정 (cell fate decision)에 영향을 미친다고 보고 되어있다. (Crowe et al., 1998) 포유동물에서, Notch ligand는 다섯 개의 jagged-1(Jag1), jag2, Delta-like ligand-1(Dll1), Delta3, Delta4로 알려져 있으며, receptor는 네 개의 Notch1, Notch2, Notch3, Notch4로 구분되어져 있다. Ligand와 결합을 이룬 Notch receptor는 세 번의 cleavage를 통해 NICD(Notch intracellular domain)로 잘려지게 된다. NICD는 핵으로 이동하여 RBP-J κ 와 함께 전사인자로서 작용하여 *Hes*, *Hey*와 같은 특정 유전자를 발현시킨다. (Yuan et al., 2010) 이러한 Notch 신호전달의 과정 중에서 Notch ligand를 endocytosis시키는 Mib1은 ligand의 종류와는 상관없이 Notch 신호전달의 상위 조절자로서 기능한다는 것이 보고되어있

다. (Koo et al., 2005)

Notch 신호전달은 발달과정에서의 세포 운명 결정에 관한 기능 이외에도 면역 반응에서의 다양한 기능들이 보고 되어있다. 대표적인 항원 전달 세포인 수지상 세포에서는 Notch ligand 인 Jag1과 Dll4가 발현되고 있다. 수지상 세포에서 Jag1이 발현되는 경우 CD4 T 림프구는 IL-4, IL-5, IL-13을 주로 발현하는 Type 2 도움 T 림프구(T helper cell 2)로 분화한다. 이와는 반대로 수지상 세포에서 Dll4가 발현되는 경우에는 IFN- γ (Interferon γ) 를 분비하는 Th1 (T helper cell 1)로 분화된다. (Amsen et al., 2004) 이외에도 수지상 세포와 T 림프구에 존재하는 Notch 신호가 실제로 CD4 T 림프구의 분화에 영향을 미치게 된다는 것을 밝히기 위해 *CD4 Cre; RBP-J κ ^{fl/fl}* 를 이용한 실험이 진행되었다. *CD4 Cre* 형질전환 마우스를 이용해 RBP-J κ 를 제거하여 CD4 T 림프구만을 TCR 자극을 주어 배양한 경우 Th2 분화로의 결함이 발견되었다. (Tanigaki et al., 2004)

최근의 연구들에 의하면, 수지상 세포에서뿐만 아니라 T 림프구에서도 Notch ligand가 발현되며 T 림프구간의 Notch 신호 전달이 이루어진다는 것이 알려져 있다. (Palaga et al., 2003) Anti-CD3와 Anti-CD28 으로 TCR 자극을 주어 미접촉 T 림프구를 배양하는 경우, NICD가 발현되는 것이 보고되었다. 또한 T 림프구의 세포 분화에 Notch 신호가

작용한다는 사실을 Notch receptor의 cleavage를 억제하는 GSI (gamma secretase inhibitor)를 처리하여 알아보았는데, 억제제를 처리하게 되면 처리하지 않은 대조군에 비해 세포 분화가 감소되는 것이 보고되었다. CD8 T 림프구의 기능에도 Notch 신호 전달이 관여할 것이라는 연구가 진행되었는데, TCR 자극을 주며 CD8 T 림프구를 배양하는 경우 GSI(gamma secretase inhibitor)를 처리하였을 때에만 세포 독성 물질인 퍼포린(perforin)과 그랜자임(granzyme)을 내는 CD8 T 림프구가 감소되는 현상이 보고되었다. 실제적으로 감염된 세포들을 어느 정도의 효율로 제거할 수 있는지를 나타내주는 세포독성검사(cytotoxicity test)를 시행하였을 때에도 Notch 신호가 제거된 경우 세포독성능력이 감소되는 것을 발견하였다. (Cho et al., 2009) 휴먼모델에서도 마우스모델과 비슷한 현상이 발견되었는데, TCR 자극을 주며 CD8 T 림프구를 배양할 때, GSI를 처리한 경우에만 인터페론 감마(interferon γ)를 발현하는 CD8 T 림프구와 그랜자임을 내는 CD8 T 림프구가 감소하는 현상을 나타내었다. (Kuijk et al., 2013)

본 연구실에서 밝힌 면역과 관련한 Mib1의 기능은 T 림프구와 marginal zone B 림프구의 발달과정 중 Mib1이 Notch 신호를 조절한다는 내용이다. (Song et al., 2008) 또한 수지상 세포에서 Mib1을 제거하였을 때, T 림프구의 Type 2 도움 T림프구로의 분화에 결함이 생긴다는 것을 밝혀내었다. (Jeong et al., 2012)

이번 연구에서는 TCR자극을 받은 경우 T 림프구에서 Notch 신호전달이 이루어진다는 이전 연구들의 결과를 바탕으로 TCR 자극 시 형성되는 Notch 신호가 Mib1을 통해 이루어지는 것인지를 추가적으로 밝히고자 하였다. 또한 TCR 자극 시 T 림프구의 Mib1 발현이 증가하는 경우, 이러한 Mib1발현이 어떠한 전사 인자를 통해 조절되는 것인지를 확인하였다. 후속 연구인 Lck Cre; Mib1f/f 마우스의 분석을 하기에 앞서 Mib1 발현을 관찰하기 위해 대조군 마우스인 Mib1f/f 의 마우스를 본 연구에 이용하였다.

IV. 실험 재료 및 방법 (Materials and Methods)

IV-1. Mice

Mib1 유전자의 양쪽에 loxP 부위를 가지고 있는 *Mib1^{fl/fl}* 마우스는 본 연구실에서 이전에 제작되었다. (Koo et al., 2007) 실험에 사용할 *Mib1^{fl/fl}* 마우스를 얻어내기 위해서 7주 이상의 성별이 다른 *Mib1^{fl/fl}* 마우스를 교배하였다. 태어난 마우스들은 3주에 암, 수를 구분하여 분리 후 다시 사육되었다. 실험에 사용한 마우스는 8주에서 12주 사이의 *Mib1^{fl/fl}* 마우스이다. 모든 마우스는 B6와의 Backcross가 10번 이상 행해졌다. 모든 마우스는 서울대학교의 동물관리 시설의 무균관리실(120704-2-1)에서 사육되었다.

IV-2. T lymphocyte preparation

T 림프구를 얻어내기 위해, CO₂ 과호흡을 통하여 8주 이상의 *Mib1^{fl/fl}* 마우스의 안락사를 진행하였다. 마우스 복부의 피부를 벗겨내어 양 유선 조직에서의 림프절을 2개 얻어내었다. 마우스의 피부를 머리 위까지 벗겨내어 겨드랑이에서 4개의 림프절을 추가적으로 얻어내었으며, 침샘에서 6개 림프절을 적출해내었다. 복강을 열어 장내에 존재하는 1개의 림프절을 얻는 과정을 진행하였다. 총 13개의 림프절을 갈아 림프구만을 얻어내기 위해 림프절을 cell strainer(40 μ m)에 넣은 뒤 petri dish에서 10ml 주사기 밀대로 갈아 림프구로 만들어내었다. 림프구를 15ml의

튜브에 옮긴 후 적혈구를 제거하기 위해서 적혈구 용균 버퍼(NH_4Cl 0.16M, 1M Tris-HCl pH7.5)에서 5분간 inverting 을 진행하였다. 미접촉 CD4 T 림프구와 미접촉 CD8 T 림프구 이외의 다른 종류의 세포를 제거하기 위해서(B220, CD11b, CD11c, CD25, Gr1, DX5, Ter119)-Biotin Ab (Biolegend)으로 30분간 염색하였다. 한 번의 PBS 세척 후, negative sorting을 위해 Streptavidin coated magnetic beads(invitrogen)를 넣은 뒤 20분 동안 4°C에서 Inverting 을 진행하였다. 자석에 15ml 튜브를 꽂은 뒤 5분 후, bead가 들어가지 않도록 림프구가 섞여있는 용액을 다른 튜브에 옮긴다.

IV-3. cell culture

마우스에서 얻어낸 T 림프구에 TCR 자극을 주기 위해서 37°C에서 1시간 동안 IgG($10\ \mu\text{g/ml}$, Biolegend)와 anti-CD3($10\ \mu\text{g/ml}$, Biolegend)를 coating시킨 96well plate를 이용하였다. CD4, CD8 T 림프구를 $2-4 \times 10^6\text{cells/ml}$ 로 각 실험에 적합한 시간 동안 10%의 FBS와 antibiotics, 2-mercaptoethanol이 섞인 complete RPMI media에서 배양시켰다. Anti-CD28($1\ \mu\text{g/ml}$, Biolegend)은 anti-CD3가 coating된 well에 soluble한 상태로 처리해주었으며, inhibitor 실험에서 Erk inhibitor는 $30\ \mu\text{M}$, JNK inhibitor, IKK inhibitor, Cyclosporin A는 각각 $10\ \mu\text{M}$ 의 농도로 T 림프구를 배양시켰다.

EL4 cell line(한국세포주 은행)은 $1 \times 10^6\text{cells/ml}$ 이상의 비율이 되지

않도록 subculture하며, 10% FBS, antibiotics, 2-mercaptoethanol이 섞인 complete RPMI media에서 배양하였다.

IV-4. Site directed mutagenesis

Mind-bomb1의 promoter에 존재하는 NF- κ B, NFAT binding site의 염기서열을 변화시키기 위해서 위치지정 돌연변이 (site directed mutagenesis) 를 시행하였다. Mind-bomb1 promoter 뒤에 luciferase reporter gene이 존재하는 vector를 template로 사용하여 PCR을 시행하였다. 염기서열을 바꾸기 위한 PCR 조건으로는 95°C 2분, 95°C 30초, 55°C 20초, 72°C 3분 (25 cycle), 72°C 3분의 조건이며, distilled water 37.75 μ l, DMSO 2 μ l, dNTP(10mM) 1.25 μ l, Primer(10pmol) 2 μ l, Pfu forte(enzymatics) 1 μ l, Pfu forte buffer 5 μ l, template 15ng을 반응시켰다. Mutagenesis가 이루어지지 않은 template를 제거하기 위해, methylation 된 DNA를 자르는 DpnI enzyme을 PCR product에 37°C에서 1시간동안 처리하였다. NF- κ B, NFAT mutagenesis에 사용한 각각의 primer의 염기 서열 정보는 다음과 같다.

NF- κ B forward

5' CCGTCGCTGTAGCCCGGCCAAAATATCCGGGGCAAGCGGCAGAG 3'

NF- κ B reverse

5' CTCTGCCGCTTGCCCCGGATATTTTGGCCGGGCTACAGCGACGG 3'

NFAT forward

5' CCCTATTCCCGCTCTCGTTGCCTAAGAAGCCTAAAAGAGTGTG 3'

NFAT reverse

5' CACACTCTTTTAGGCTTCTTAGGCAACGAGAGCGGGAATAGGG 3'

IV-5. Transfection

Luciferase assay를 진행하기 위해서, B6 마우스에서 spleen을 적출하여 strainer에서 갈아 splenocyte를 얻어내었다. 적혈구 영균 버퍼를 이용하여 RBC를 모두 제거한 뒤, PBS로 두 번 세척을 행하였다. 배양한 EL4 cell도 PBS 로 두 번 세척한 뒤, cell counting을 하여 하나의 조건당 두 well에 5×10^6 cells/well의 조건으로 배양할 수 있도록 각각의 cell들을 준비했다.

준비한 cell들을 5×10^6 cells/ 100μ l가 되도록 T buffer (Invitrogen)로 resuspension했다. Mind-bomb1 promoter vector는 5×10^6 cell에 15μ g으로, β -gal vector는 5×10^6 cell에 5μ g이 되도록 cell이 resuspension되어 있는 T buffer와 섞었다. 37°C 에서 한 시간 동안 anti-CD3로 coating한 24 well plate에 한 well당 RPMI media 1ml씩 넣는다. 100μ l의 gold tip(Invitrogen)으로 5×10^6 cell을 취한 뒤 EL4 cell은 1080v 50ms 1pulse의 조건으로, splenocyte는 1400v 30ms 2pulse의 조건으로 microporator (Neon MP-100, Invitrogen)를 이용하여 형질삽입(transfection)을 시행하였다. microporator에서 100

μ l gold tip을 이용해 형질삽입이 된 cell들은 각 well에 넣어졌으며, inhibitor 실험 시 각각의 inhibitor를 넣어 배양시켰다. Inhibitor를 넣은 뒤 한 시간 후, anti-CD28를 처리하였다.

IV-6. luciferase assay

Luciferase reporter gene이 포함된 Mind-bomb1 promoter를 형질삽입한 cell들을 24 시간 동안 배양한 후 얻어내었다. Cell을 PBS로 한 번 세척 한 뒤, 1.5ml safeseal microcentrifuge tubes에 cell들을 옮겨 passive lysis buffer 150 μ l 로 resuspension 하였다. 상온에서 20분 동안 두고 13000rpm 으로 15분 동안 침전시켰다. 상층액만 얻어내어 96 well white plate와 96 well에 한 well당 70 μ l 씩 넣었다. 96 well white plate에는 luciferase substrate를 70 μ l씩 넣고, 96 well plate 에는 β -gal substrate를 70 μ l 씩 넣었다. 발광효소 활성화 (Luciferase activity)를 측정하기 위해 microplate luminometer에 96 well white plate를 넣어 신호를 측정하였다. β -gal activity를 측정하기 위해 Elisa reader를 이용하여 450nm 에서의 값을 읽어내었다.

IV-7. Chromatin Immunoprecipitation

IgG와 anti-CD3가 각각 coating된 24 well의 plate에 5×10^6 의 EL4 cell을 2ml의 media에서 각 조건당 두 well씩 24시간 배양시켰다. 15ml의 tube에 cell을 건어낸 뒤 37%의 formaldehyde (sigma)를 550

μ l씩 넣고 9ml의 RPMI complete media를 넣었다. 상온에서 10분간 두고 1200rpm 5m 4°C의 조건으로 침전시켰다. 상층액은 버리고 protease inhibitor(Millipore)가 첨가된 PBS로 세척을 시행하였다. 각 샘플에 500 μ l의 용균 버퍼를 넣은 뒤, 30%의 amplitude로 30-40번동안 sonication을 진행하였다. 13000rpm 10m 4°C의 조건으로 침전시킨 뒤, 상층액만을 모아 실험에 사용하였다.

1.5ml 튜브의 샘플에 Protein G Agarose bead를 넣고 한 시간 동안 preclearing을 진행하였다. 4000rpm 1m 4°C에서 침전시킨 뒤, 상층액만을 모아 1 μ g의 IgG와 2 μ g의 p50(abcam), NFAT(abcam)항체를 inverting하며 overnight으로 두었다. 한 시간 동안 protein G agarose bead를 넣어 4°C에서 inverting을 시행하였다. 이후 low salt 버퍼, high salt 버퍼, LiCl 버퍼, TE 버퍼의 순서대로 bead 세척을 진행하였다. Bead에 결합되어 있는 단백질과 DNA를 복합체를 떨어뜨리기 위해서 Elution buffer(20% SDS, 1M NaHCO₃ in distilled water)를 준비하여 모든 샘플에 처리하였다. 단백질과 결합되어 있는 DNA를 떨어뜨리기 위한 단계에서는 NaCl을 넣고 65°C에서 5시간 동안 둔 뒤, RNase A를 처리하고 0.5M EDTA, 1M Tris-HCl, proteinase K 를 넣은 후, 45°C에서 2시간 동안 두었다. DNA 를 추출하는 과정은 phenol chloroform 과 chloroform을 이용하여 진행하였다.

NF- κ B와 NFAT 결합 부위를 증폭시키기 위해 PCR을 이용하였으며

(94°C 1m, 55°C 1m, 72°C 1m), primer는 다음과 같다.

NF- κ B forward

5' GGAGAGCGAGGTTTGCTG 3'

NF- κ B reverse

5' GTCCACGAGCAGCCTTTC 3'

NFAT forward

5' ATATGCCCTATTCCCGCTCT 3'

NFAT reverse

5' GGAAATGGGGCTAAAGGAAG 3'

IV-8. Western blotting

배양한 T 림프구를 Proteinase inhibitor (0.1mM NaVO₄, 0.1mM DTT, 2 μ g/mL aprotinin, leupeptin, pepstaitin)가 첨가된 용균 버퍼 (150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 2mM EDTA, Sterile solution) (RIPA buffer, biosessang, lot#R0211823J) 에 넣은 뒤, 액체 질소와 상온의 물에 교대로 넣는 작업을 다섯 번 반복하였다. 13000rpm 15m 4°C의 조건으로 침전시킨 후 상층액 만을 모아 Bradford assay 로 단백질 농도를 측정하였다. 10~20 μ g의 단백질을 10% 의 SDS-polyacrylamide gel 에 로딩한 후 단백질을 분리한 뒤 1시간 30분 동안 300 mA로 Polyvinylidene difluoride membrane에 transfer를 시행하였다. 5%

skim milk 로 3시간 동안 상온에서 blocking을 진행하였으며 membrane을 각각의 일차 항체들과 4 ° C overnight 동안 반응시켰다. 상온에서 1시간 동안 peroxidase-conjugated 이차항체와 반응을 시켰으며 West-zol plus (intron)로 검출하였다.

IV-9. Quantitative real-time PCR

Rneasy micro kit(Quiagen)을 이용하여 배양한 T 림프구에서 mRNA를 추출하였다. 1 μ g의 mRNA에 oligo-dT primer와 역전사효소 (Promega, Madison, WI)를 첨가하여 PCR을 통해 cDNA로 변환하였다. 준비된 cDNA를 SYBR green PCR kit(Quiagen)를 사용하여 qRT-PCR을 진행하였다. β -actin을 기준으로 각각의 mRNA 발현 레벨을 normalization하였으며 각각의 primer 염기서열 정보는 다음과 같다.;

Actin forward

5' TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT 3'

Actin reverse

5' CCTAGAAGCACTTGCGGTGCACGATG 3'

Mib1 forward

5' CCTACGACCTGCGTATCCTG 3'

Mib1 reverse

5' ACCTTTCCTCTACGCCATT 3'

V. 결과 (Results)

V-1. TCR 자극에 의해 T 림프구에서 Mib1 과 Notch 신호 관련 유전자들이 발현된다.

Mib1^{ff} 마우스에서 얻어낸 Naïve CD4 T 림프구와 CD8 T 림프구에서 Mind-Bomb1 유전자가 발현되는지를 확인해 보았다.

본 연구실에서는 *Mib1^{ff}* 마우스의 수지상 세포에서 Mib1과 Notch ligand가 발현되고 있다는 사실을 보고하였다. 수지상 세포에서의 Mib1의 역할을 알아보기 위해 *Mx-1 Cre* 형질 전환 마우스와 *Mib1^{ff}* 를 교배하여 수지상 세포에서 Mib1을 제거하였다. Mib1이 제거된 수지상 세포와 *Mib1^{ff}* 의 CD4 T cell을 함께 배양한 경우 CD4 T 림프구가 Type 2 도움 T 림프구로 분화되는 것에 문제가 발생한다는 사실을 알아내었다. (Jeong et al., 2012) T 림프구에서도 수지상 세포와 마찬가지로 Notch ligand인 Delta1, Jagged1, Jagged2 이 T 림프구에서 발현되고 있다는 사실이 알려져 있다. (Singh et al., 2000), (Hoyne et al., 2000), (Kuroda et al., 2003) CD4 T 림프구에서 TCR 자극을 통해 Notch intracellular domain (NICD)가 증가한다는 사실이 보고되었다. (Adler et al., 2003) 또한 CD8 T 림프구에서도 마찬가지로 TCR자극을 주었을 때 Notch intracellular domain (NICD)가 증가하며, Notch receptor cleavage를 억제하는 GSI(Gamma secretase inhibitor)를 처리하였을 때에는 NICD의 증가가 일어나지 않는다는 사실이 잘 알려

져 있다. (Cho et al., 2009) CD4 T 림프구에서의 Notch 신호전달에 대한 역할을 알아보기 위해서 Notch ligand와 결합하여 Notch ligand의 Endocytosis를 유도하는 Mib1의 발현을 알아보았다. Naïve CD4, CD8 T 림프구에 anti-CD3 와 anti-CD28을 통한 TCR 자극이 주어졌을 때 Mib1 발현의 증가가 일어나는가를 밝히기 위해 Western Blotting과 quantitative real-time RT-PCR을 진행하였다. 그 결과, CD4 T 림프구와 CD8 T 림프구에서 TCR 자극이 지속됨에 따라 Mib1의 단백질 양이 증가한다는 것을 알아내었다. (Figure 1A) 단백질 양과 비교해 보았을 때, mRNA의 양은 TCR 자극이 주어진 이후, 18시간이 지난 시점에서 가장 많은 발현이 이루어짐을 알아내었다. (Figure 1B)

Mib1과 결합하는 Notch ligand의 발현 양을 quantitative real-time RT-PCR로 분석한 결과, Jagged2이 Naïve T 림프구에 TCR 자극을 주기 이전부터 발현되고 있음을 알 수 있었다. (Figure 1C)

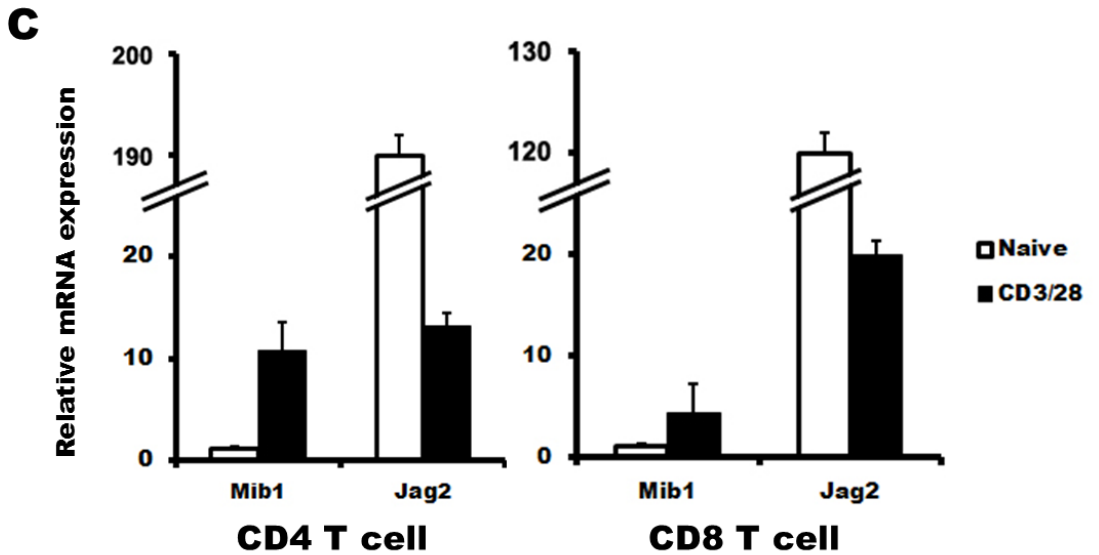
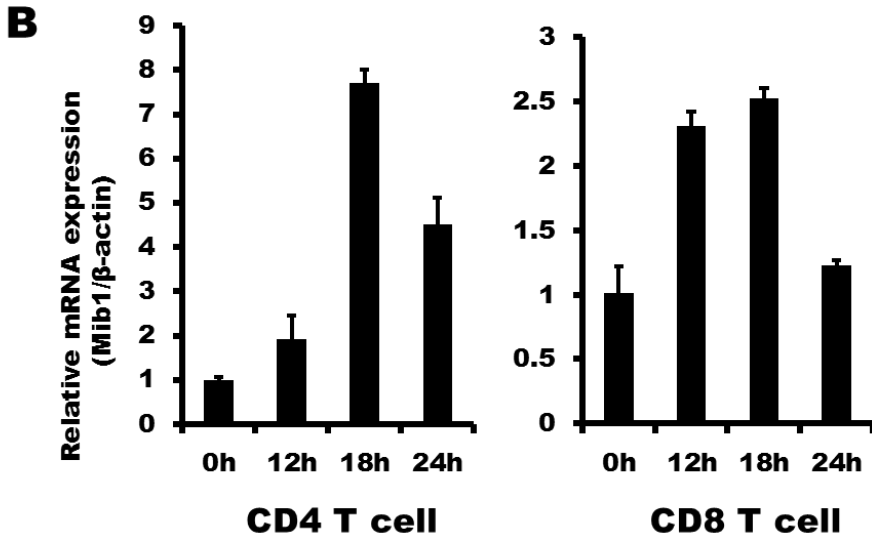
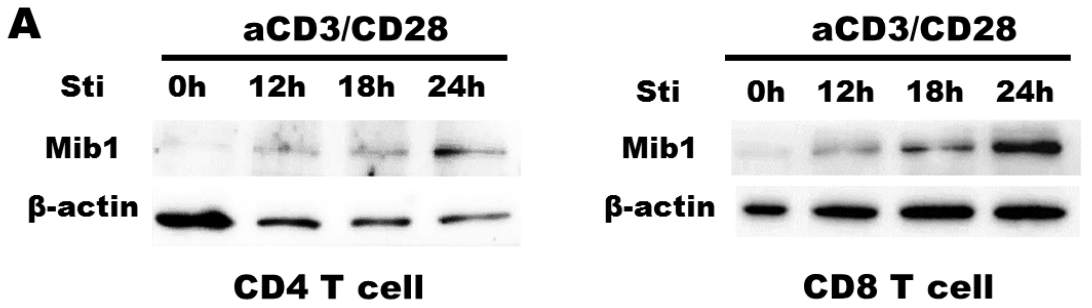


Figure 1. *Mib1^{eff}* 마우스의 T 림프구에서 Mib1의 발현이 시간에 따라 증가하였다.

(A) 미접촉 CD4 T 림프구와 CD8 T 림프구를 anti-CD3와 anti-CD28으로 TCR 자극을 주었을 때, Mib1의 발현을 Western blotting을 통해 확인하였다. Mib1이 시간에 따라 증가하는 현상을 나타내며 24시간이 지났을 때 Mib1 단백질의 발현 양이 가장 높은 것을 알 수 있다.

(B) (A)에서와 같은 실험 조건으로 수행하였다. mRNA의 발현 양이 시간에 따라 증가하며 18시간이 지났을 때 Mib1의 mRNA 발현 양이 가장 높다. (n=3)

(C) (A)에서와 같은 실험 조건으로 수행하였다. TCR 자극을 24시간 동안 준 뒤, 미접촉 T 림프구의 Mib1 mRNA 발현 양을 기준으로 하여 Jag2의 발현 양을 비교하였다.

V-2. NF- κ B와 NFAT 억제제는 Mib1의 발현을 감소시킨다.

CD4 T 림프구와 CD8 T 림프구에서 Mib1의 발현이 어떠한 기작을 통해 이루어지는가를 확인해 보기 위해 다양한 억제제를 사용하여 Mib1의 발현 양을 비교해 보는 실험을 진행하였다.

TCR 자극이 주어지는 경우 T 림프구 유전자들의 발현은 다양한 전사 인자들에 의해 조절된다. 먼저 보고자 하는 전사 인자들을 선택하기 위해, TCR 자극에 의해 발현되는 대표적 유전자인 Interleukin 2 (IL-2)와 관련된 전사 인자들을 조사하였다. TCR 자극이 주어지는 경우, 비활성 NF- κ B와 결합하고 있던 비활성 I κ B에 I κ B 키나아제가 작용하여 인산화가 진행된다. 인산화에 의해, I κ B는 NF- κ B와 분리되며, 분리된 활성 NF- κ B는 T 림프구의 IL-2 전사 인자로서 역할을 하게 된다. (Gerondakis and Siebenlist, 2010) 이와 마찬가지로 NF- κ B와 함께 TCR 자극에 의해 T 림프구에서 활성화 되는 대표적인 전사 인자로는 ERK, JNK, NFAT가 있다.

네 가지 전사 인자들을 억제시키는 각각의 억제제가 Mib1의 발현에 어떠한 영향을 주는 지 알아보기 위해 anti-CD3와 anti-CD28를 사용하여 TCR 자극을 주는 CD4 T 림프구와 CD8 T 림프 배양에 함께 처리해 보았다. 24시간 동안 배양한 이후, quantitative real-time RT-PCR를 이용하여 Mib1의 발현 양을 알아본 결과, ERK 억제제와 JNK 억제제는 CD4 T 림프구와 CD8 T 림프구의 Mib1 발현에 크게 영향을 주지 않는다는 것을 알아내었다. 반면 NF- κ B의 억제제인 IKK 억제제와

NFAT의 억제제인 Cyclosporin A (Cys A) 를 처리하여 배양한 경우 Mib1의 발현 양이 크게 감소하는 것을 알 수 있었다. 두 억제제의 시너지 효과를 검증하기 위해서 두 억제제를 함께 처리한 배양에서의 Mib1의 발현 양을 측정하였지만, 두 억제제를 함께 처리하더라도 하나의 억제제 만을 처리한 수준의 감소만 이루어진다는 것을 확인할 수 있었다. (Figure 2A)

NF- κ B와 NFAT가 실제로 Mib1의 전사 인자로 작용하며 각각의 억제제를 처리한 경우 Mib1의 발현이 감소하는 것을 검증하기 위해 Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)을 시행하였다. 그 결과, TCR 자극을 준 경우 Mib1의 전사에 p50과 NFAT가 각각 영향을 미친다는 것을 알 수 있었으며, 억제제를 처리한 경우에는 두 전사 인자가 Mib1의 유전자에 결합하지 못하며 Mib1의 발현을 이루어내지 못한다는 사실을 알아내었다. (Figure 2B)

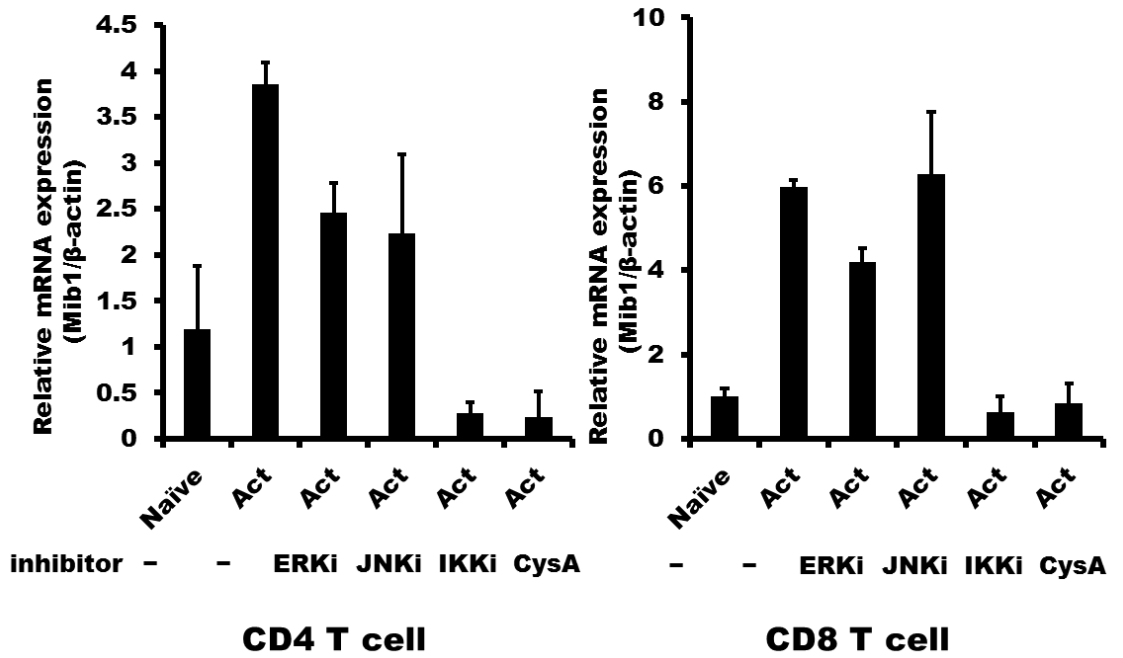
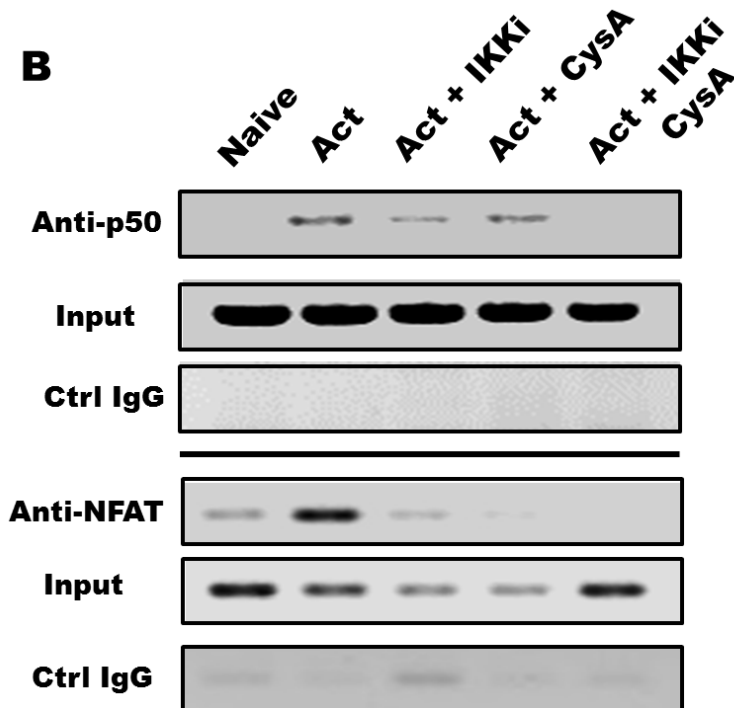
A**B**

Figure 2. NF- κ B와 NFAT 억제제를 사용한 경우 T 림프구에서 Mib1의 발현이 감소하였다.

(A) 미접촉 CD4 T 림프구와 CD8 T 림프구를 18시간 동안 TCR 자극을 주어 배양시킬 때, 각각의 억제제를 함께 처리하였다. IKKi와 Cys A를 처리하여 배양하는 경우 Mib1의 mRNA 발현 양이 증가하지 않는 것을 관찰하였다. (n=3)

(B) Mib1 촉진제의 전사인자가 NF- κ B와 NFAT인지를 알아보기 위해 EL4를 배양하여 ChIP을 수행하였다. TCR 자극을 주는 경우 NF- κ B와 NFAT가 Mib1 촉진제의 전사 인자로 작용하며, 각각의 억제제를 처리한 경우 전사인자로서의 기능을 수행하지 못하는 것을 알 수 있다. (n=2)

V-3. Mib1의 촉진제 부위에 NF- κ B와 NFAT 결합부위가 존재한다.

NF- κ B와 NFAT 억제제를 처리하여 CD4 T 림프구와 CD8 T 림프구를 배양하는 경우, Mib1의 발현 양이 감소했기 때문에, Mib1 촉진제 부위에 NF- κ B와 NFAT의 결합부위가 존재하는 지를 알아보았다.

Mib1 촉진제에 어떠한 전사 인자가 결합하는지를 알아보기 위해서, TF search(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)를 (Zhang et al., 2002) 이용하였다. Mib1 촉진제(18:10725202-10726546)의 유전자 정보를 입력하여 살펴본 결과, 5' UTR (untranslated region)에 NF- κ B의 결합 부위라고 추정되는 (putative binding site) 부위가 존재한다는 것을 알 수 있었다. (GGGGAGTCCG) 마찬가지로 NFAT와 결합할 가능성이 높은 부위 (Shin et al., 2007) 가 Mib1 촉진제의 5' UTR 에 존재한다는 것을 알 수 있었다. (TGGAAA)

두 전사 인자의 결합 부위가 존재하는 것을 알아내었기 때문에 이 결합 부위를 변형시키는 경우, 실제로 결합이 일어나지 않아 Mib1의 발현이 감소하는 지를 알아보기 위해서 우선적으로 결합 부위를 변형시키는 실험을 진행하였다. (Carter, 1986) pGL4.28 에 Mib1 촉진제를 삽입한 벡터에 NF- κ B 결합 부위만을 변형시키고(GGGGAGTCCG → AAAATATCCG, MT1), NFAT 결합 부위만을 변형시켰다(TGGAAA → TGCCTA, MT2). 또한 두 결합이 시너지한 효과를 나타내는지 알아

보는 실험을 진행하기 위해서 두 결합 부위를 함께 변형시킨 벡터를 제작하였다.(MT3) (Figure 3)

A

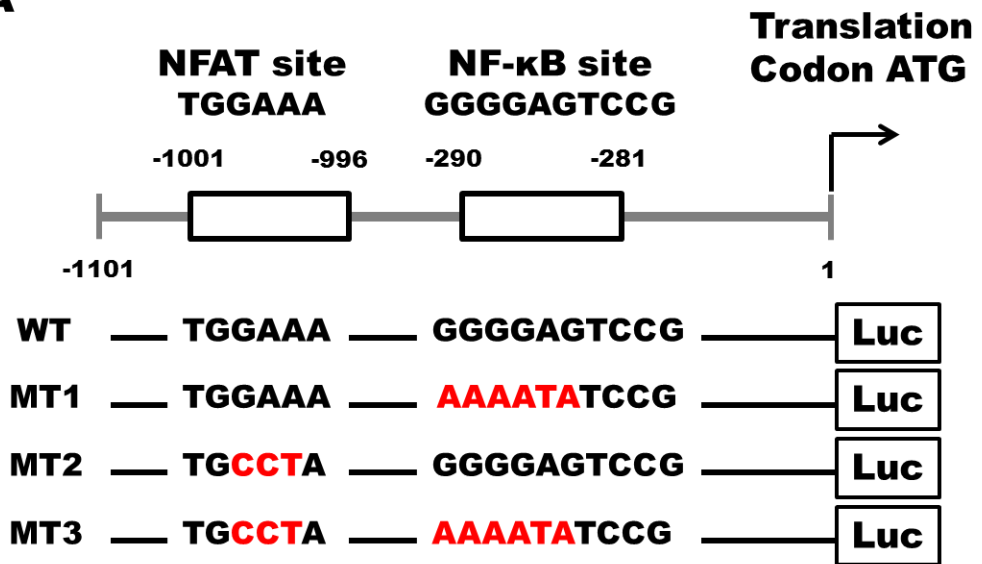


Figure 3. NF- κ B와 NFAT 결합 부위를 변형시킨 벡터를 제작하였다.

위치지정 돌연변이를 통해 Mib1 촉진제에 존재하는 NF- κ B와 NFAT 결합 부위를 변형시켰다.

V-4. Mib1 촉진제에서의 NF- κ B와 NFAT 결합 저해는 Mib1의 전사를 감소시킨다.

Mib1의 발현에 NF- κ B와 NFAT가 전사 인자로 작용할 수 있다는 결과를 확인했기 때문에, 실제로 Mib1의 촉진제 부위에서 NF- κ B와 NFAT가 전사 인자로 역할을 수행하는지를 발광 효소(luciferase)의 활성화를 통해 이를 알아보았다.

EL4 세포주와 B6 마우스의 Splenocyte를 각각 준비하고 Mib1 촉진제가 삽입된 벡터를 Microporator를 사용하여 형질주입 실험을 진행하였다. 형질 주입이 된 각 세포들을 anti-CD3와 anti-CD28를 통해 TCR 자극을 준 뒤 24시간 동안 배양한 경우, TCR 자극을 주지 않는 IgG 대조군과 비교하였을 때 발광 효소의 활성도가 높아진다는 것을 확인하였다. 이와는 달리, 앞서 사용한 IKK 억제제와 Cyclosporin A를 형질 주입을 한 뒤 함께 처리하여 배양한 경우에는 TCR 자극을 주었음에도 발광효소의 활성도가 IgG만을 처리하여 TCR 자극을 주지 않은 것과 비슷한 수준이라는 것을 확인할 수 있었다. (Figure 4A)

Mib1 촉진제 부위에 존재하는 NF- κ B와 NFAT 결합 부위를 변형시킨 벡터를 제작하였기 때문에 (Figure 3) 이를 이용하여 변형시킨 결합 부위에 특이적으로 NF- κ B와 NFAT 전사 인자들이 결합하는지를 알아보았다. EL4 세포주와 B6 마우스의 Splenocyte를 준비하고 IKK 억제제와 Cyclosporin A를 처리하여 알아본 실험과 마찬가지로 형질 주입

을 한 뒤, anti-CD3 와 anti-28을 이용하여 24시간 동안 TCR 자극을 주었다. 억제제 처리 실험을 바탕으로 예상한 것과 같이 EL4 세포주와 Splenocyte 에 NF- κ B와 NFAT 결합 부위가 변형된 벡터를 형질 주입한 경우, 발광 효소의 활성화가 TCR 자극을 주더라도 증가하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 IKK 억제제와 Cyclosporin A 모두를 처리하더라도 하나의 억제제만을 처리한 것과 같은 Mib1의 발현 양감을 보인 앞의 실험 (Figure 2) 과 같이 두 가지 결합 부위를 모두 변형시킨 벡터를 형질 삽입 했음에도 발광 효소의 활성화는 한 가지 결합 부위를 바꿔서 얻은 실험결과와 같다는 것을 알 수 있었다. (Figure 4B)

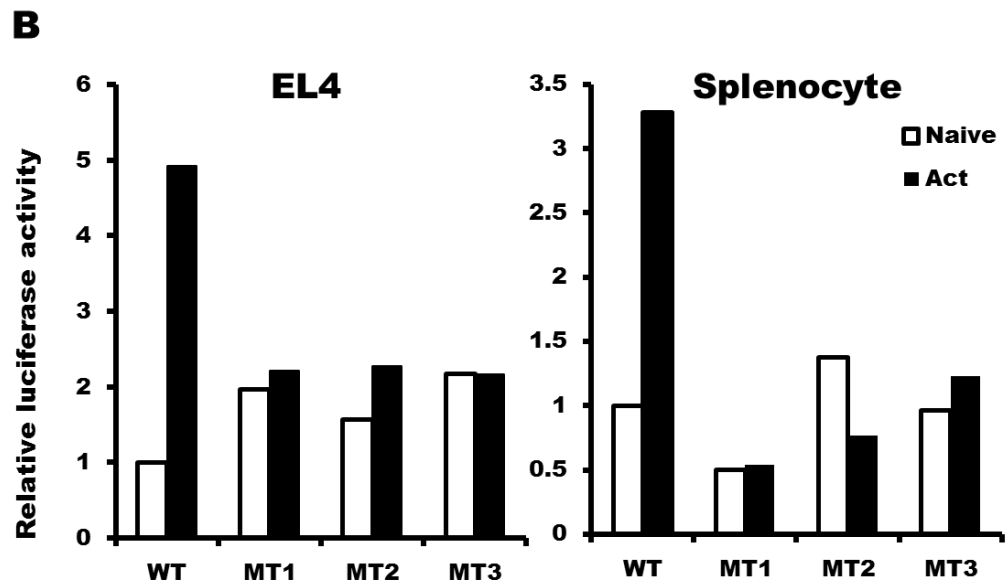
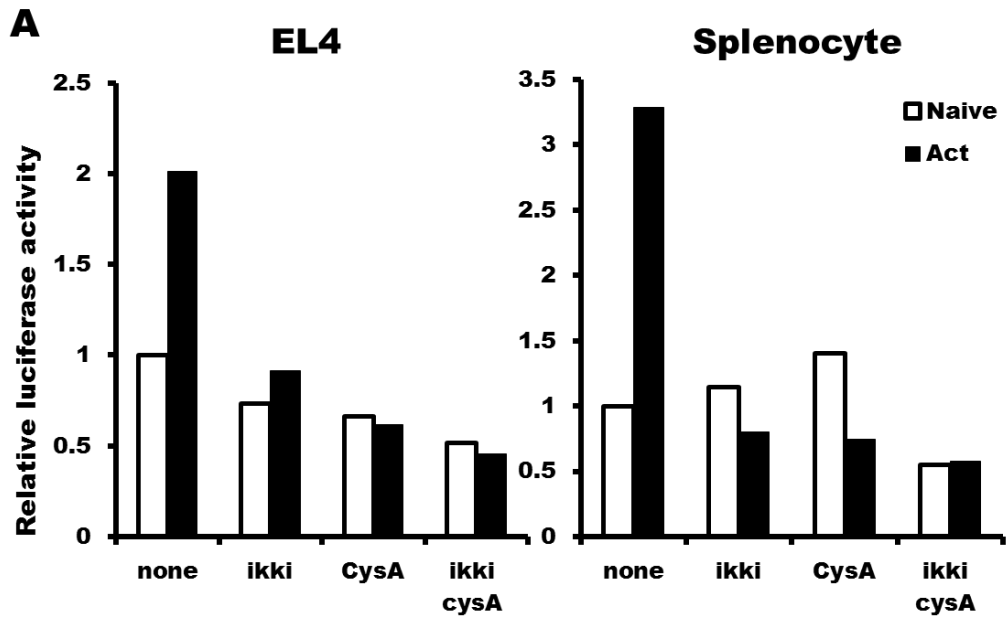


Figure 4. Mib1의 발현은 NF- κ B와 NFAT 전사 인자를 통해 이루어진다.

(A) Mib1 촉진제 부위를 삽입한 벡터를 이용하여 발광 효소 활성화 실험을 한 결과 억제제 IKKi, CysA 가 Mib1 발현을 억제시킨다. (n=2, representative data)

(B) Figure3에서 제작한 위치지정 돌연변이 벡터를 이용하여 Mib1 촉진제에서 NF- κ B 와 NFAT가 전사 인자로서 작용하는지를 알아보았다. 발광 효소 활성화가 위치지정 돌연변이 벡터를 형질 삽입한 경우 증가하지 않는 것을 확인하였다. (n=3, representative data)

V-5. NF- κ B 과발현은 Mib1 유전자의 전사를 증가시킨다.

NF- κ B 의 억제제인 IKK 억제제를 이용한 경우 Mib1 촉진제 부위의 발광 효소 활성화가 감소하는 것을 확인하였기 때문에, NF- κ B 를 과발현 시키는 경우에는 반대로 Mib1 유전자의 전사가 증가되는 지를 확인하였다.

NF- κ B는 p50 과 p65 의 두 가지 서브 유닛으로 이루어져 있다. (Handel et al., 1995) 두 서브 유닛은 함께 결합하여 NF- κ B로서의 기능을 수행하기 때문에 p50과 p65가 pcDNA3 에 각각 삽입된 벡터를 준비하였다. P50 과 p65 가 Mib1 의 전사 인자로 작용하는 것을 알아보는 실험을 하기에 앞서 두 벡터가 정상적으로 EL4 세포주에 형질삽입되는 것을 확인하기 위해, 형질 삽입 이후 Western Blotting을 시행하였다. (Figure 5A) 그 결과 두 벡터 모두 형질삽입 시 정상적으로 발현 양이 증가한다는 것을 알 수 있었다.

P50과 p65가 형질 삽입시 EL4 세포주에서 과발현되는 것을 확인하였기 때문에 이러한 과발현을 유도한 경우 실제로 Mib1 유전자의 전사가 증가하는 지를 확인하였다. EL4 세포주에 p50벡터와 Mib1 촉진제가 삽입된 벡터를 함께 형질 삽입하여 24시간 동안 배양을 시행하였다. 24시간 이후 발광 효소의 활성화를 알아본 결과 TCR 자극을 주게 되면 IgG만을 처리한 대조군에 비하여 활성화가 증가한다는 것을 알 수 있었

다. 또한 p65백터와 Mib1 백터를 함께 형질 삽입하는 경우에도 p50과 마찬가지로 24시간 배양 후, IgG 대조군에 비해 활성화가 증가한다는 것을 알 수 있었다.

P50, p65, Mib1 촉진제의 세 가지 백터를 모두 형질 삽입하는 경우에는 p50 과 p65 를 각각 형질 삽입한 것과 비교하였을 때, 발광 효소 활성화의 증가 량이 더 크다는 것을 알 수 있었다. 이는 p50 과 p65 를 모두 과발현 시킨 경우, NF- κ B 각각의 서브 유닛이 증가하여 NF- κ B 으로 작용할 수 있는 가능성이 높아졌기 때문에 이에 따라 발광 효소 활성화가 시너지한 효과에 의해 증가 되었다는 사실을 추측할 수 있다.

(Figure 5C)

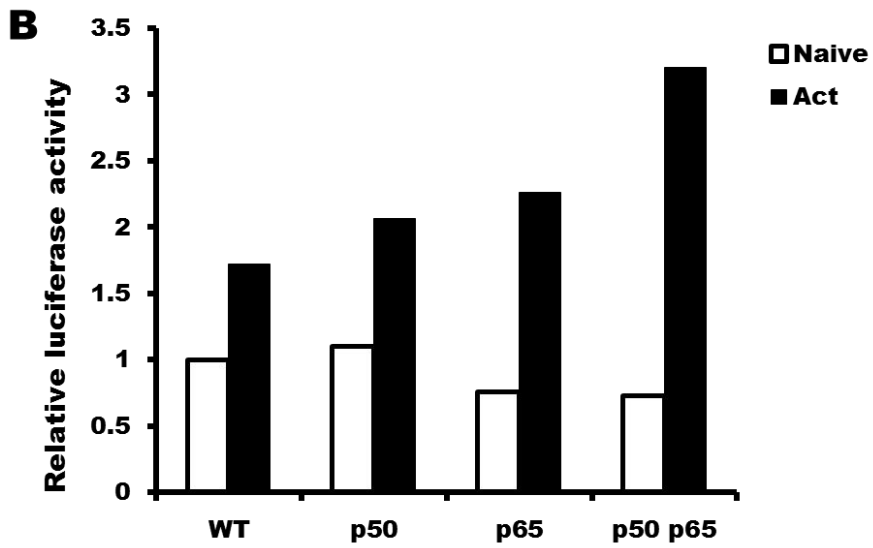
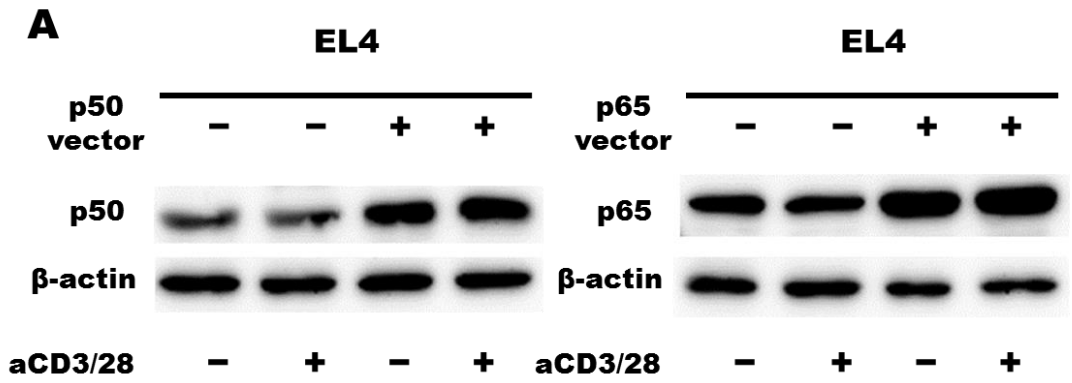


Figure 5. p50과 p65의 과발현은 Mib1 유전자의 전사를 증가시킨다.

(A) EL4 세포에 p50과 p65 벡터를 형질 주입한 경우, p50과 p65의 발현이 증가하였는지를 western blotting을 통해 알아보았다.

(B) Figure4와 같은 실험 방법으로, Mib1 촉진제가 삽입된 벡터와 p50, p65 벡터를 각각 형질 주입한 경우 Mib1의 전사가 증가하는 것을 관찰하였다.

VI. 고찰 (Discussion)

Notch 신호 전달은 인접한 두 세포에서 전달되는 신호로, 다양한 기관에서 세포의 운명 결정에 중요한 역할을 한다. 면역시스템과 관련하여 Notch 신호 전달은 T 림프구의 발달과 분화에 관한 다양한 사실들이 밝혀졌다.

면역시스템과 관련한 Notch 신호 전달은 T 림프구의 발달과정에서 그 기능이 가장 먼저 밝혀졌다. 골수에서 만들어진 T 림프구가 흉선으로 이동하여 성숙화 과정을 거치는 동안 Notch 신호 전달이 작용하고 있다. 선천적 면역 반응에서의 Notch 신호 전달의 역할은 대식세포 (macrophage)에서 알려져 있다. 대식세포는 다양한 Notch ligand와 receptor를 발현하고 있으며 휴면 대식세포에서는 특히 DLL4가 많이 발현되고 있다. 지질다당류 (lipopolysaccharide, LPS)에 의해 발현되는 DLL4는 대식세포에서 발현되는 Notch3 와 Notch 신호 전달을 주고받는다. 이를 통해 proinflammation이 발생하며 염증 관련 물질인 iNOX, PTX3, Id1이 발현된다. (Fung et al., 2007)

후천적 면역 반응에서의 Notch 신호 전달은 특히 수지상 세포와 T 림프구간에 발생하는 것으로 알려져 있다. Notch ligand를 발현하는 수지상 세포가 Notch receptor를 발현하는 CD4 T 림프구에 Notch 신호를 전달하는 경우 미접촉 CD4 T 림프구가 도움 T 세포로 분화되는 과정에 ligand의 종류에 따라 분화가 결정된다. 수지상 세포에서 Notch ligand인 Jagged를 발현하게 되면 CD4 T 림프구는 Type2 도움 T 림프구로

분화되며 Delta like ligand를 발현하는 경우에는 CD4 T 림프구가 Type1 도움 T 림프구로 분화된다. (Amsen et al., 2004)

후천적 면역 반응에서의 Notch 신호 전달은 주로 T 림프구에서 발현하는 Notch receptor에 주목하여 Notch 신호를 전달받았을 때 T 림프구가 어떠한 영향을 받게 되는지를 밝힌 연구 결과가 대부분이다. 하지만 최근의 연구 결과들을 종합해 보면 T 림프구에서도 Notch ligand가 발현되고 있으며 T 림프구간의 Notch 신호 전달에 의해 다양한 현상이 일어날 수 있음을 암시하고 있다.

ConA 로 TCR자극을 주면서 CD4 T 림프구와 CD8 T 림프구를 각각 배양하는 경우, Notch 신호 전달의 억제제인 IL-CHO 를 T 림프구의 배양액에 처리하였을 때 대조군에 비하여 세포 증식이 감소하는 현상을 밝힌 보고가 있다. 또한 CD4 T 림프구와 CD8 T 림프구에 PMA를 처리하여 배양한 경우, IFN- γ 를 발현하는 CD4 T 림프구와 CD8 T 림프구가 IL-CHO 처리시 감소하는 것을 보여주고 있다. (Palaga et al., 2003) Notch 신호 전달의 억제제인 GSI를 처리한 경우 CD4 T 림프구에서 CD25의 발현이 감소된 것을 관찰한 보고가 있다. IL-2는 T 림프구의 세포 증식에 작용하는 대표적인 물질로, CD25는 IL-2의 receptor이다. GSI를 처리한 경우 CD4 T 림프구의 CD25발현양이 감소하는 것과 동시에 세포 증식 또한 감소하는 것을 보고하였다. (Adler et al., 2003)

본 연구결과에서도 이러한 보고들과 마찬가지로 CD4 T 림프구와 CD8 T 림프구에 TCR 자극을 주면 Jagged2가 발현되는 것을 관찰할 수 있었으며 이를 통해 T 림프구가 Notch 신호를 줄 수 있는 Notch 전달자로서의 기능을 수행할 수 있음을 추측해볼 수 있다.

Notch 신호 전달의 상위 조절자인 Mib1은 Notch ligand의 endocytosis를 조절하는 E3 ubiquitin ligase로 알려져 있다. 본 연구실에서는 *Mib1^{fl/fl}* 마우스를 수지상 세포에서 제거하여 수지상 세포에서 Mib1의 기능을 밝힌바 있다. 수지상 세포에서 Mib1을 제거하면 CD4 T 림프구의 Type2 보조 T 세포의 분화가 억제됨을 보고하였다. (Jeong et al., 2012)

수지상 세포에서와 마찬가지로 T 림프구에서의 Mib1도 특정한 역할을 할 것 이라기대된다. TCR 자극이 주어진 후 시간에 따라 Mib1의 발현 양이 증가하기 때문에 T 림프구가 Notch 신호를 줄 수 있는 역할을 하는 경우 Mib1이 상위 조절자로서 역할을 할 것이라 추측된다.

이러한 예측을 바탕으로 *Mib1^{fl/fl}* 마우스를 이용하여 특정 Cre 형질 전환 마우스와 교배하였을 시, T 림프구에서 Notch 신호 전달을 막는 경우 다양한 표현형들이 나올 것이라 기대할 수 있다. 특히 T 림프구의 발달 과정 중 발현되는 촉진제인 Lck 촉진제를 이용한 *Lck-Cre* 형질전환

마우스 (Hennet et al., 1995) 를 *Mib1^{fl/fl}* 마우스와 교배하게 되면 CD4 T 림프구와 CD8 T 림프구 모두 Mib1을 제거할 수 있다. 마우스 모델을 통해 Mib1을 제거하여 실험을 하게 되는 경우 앞서 발표되었던 억제제를 사용한 실험보다 생리학적으로 더 정확한 실험들을 수행할 수 있을 것이라 기대된다.

Cre 형질 전환 마우스를 이용하여 Mib1을 제거한 모델을 통해 실험할 경우 기대할 수 있는 결과로는 세 가지 가능성이 있다. 첫 번째 가능성으로는 세포증식에 영향을 미칠 것이라는 기대이다. Notch 신호 전달 억제제를 사용한 경우 CD25의 발현이 감소하였으며, 세포 증식 또한 감소한 것을 알 수 있다. 또한 T 림프구에서 Notch 신호 전달이 사이클린 D3(Cyclin D3), CDK4, CDK6를 조절하며 Notch가 사이클린 D3 촉진제 활성화에 관여한다는 사실이 밝혀져 있다. 사이클린 D3와 CDK4, CDK6는 세포주기 중에서 G1기에 관여하는 물질들이기 때문에 Notch 신호가 G1/S에 영향을 주며 궁극적으로 T 림프구의 세포 증식과 관련되어 있다는 보고가 있다. (Joshi et al., 2009) 따라서 마우스 모델을 통해 Mib1을 제거하는 경우, 억제제를 이용하여 Notch 신호를 억제하였을 때와 마찬가지로 CD25의 발현이 줄어들면서 IL-2에 대한 반응이 감소될 수 있을 것이라 예상이 가능하다. 또한 세포증식에 관여하는 다양한 세포 주기 조절 단백질들의 감소가 세포 증식에 영향을 미쳐 대조군에 비하여 세포가 증식하는 횟수가 감소할 것이라는 기대가 가능하다.

두 번째 가능성으로는 CD8 T 림프구의 기능에 Notch 신호가 관여할 수도 있다는 생각이다. 마우스 CD8 T 림프구에 Notch 신호 전달 억제제인 GSI를 처리하는 경우 그랜자임과 퍼포린을 발현하는 CD8 T 림프구가 대조군에 비해 감소하는 것이 보고되었다. 세포독성 실험결과도 예상과 같이 세포독성 능력이 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있다. (Cho et al., 2009) 휴먼 CD8 T 림프구에 GSI를 처리하여 나타나는 현상을 관찰한 결과들도 보고되어 있는데, GSI처리시 세포독성물질 발현의 표지가 되는 CD107a와 그랜자임 발현 세포가 감소되는 현상이 나타나게 된다. (Kuijk et al., 2013) 이러한 사실들을 바탕으로 생각해 보았을 때, T 림프구에서 Mib1을 제거한 모델에서도 세포독성 능력을 나타내는 CD8 T 림프구의 감소가 있을 것이란 예상이 가능하다. CD8 T 림프구의 기능 중에서 기억 세포와 관련된 Notch 신호 전달의 역할은 effector memory T 림프구에서 나타난다. CD8 T 림프구가 제거된 마우스에서는 천식에 대한 알러지 반응이 감소하는 현상을 보인다. 이러한 경우 Notch1이 발현되고 있는 정상적인 effector memory T 림프구를 CD8 T 림프구를 제거한 마우스에 이식하였을 때 천식에 대한 알러지 반응이 증가하는 것을 관찰할 수 있다. 하지만 이러한 현상의 원인이 T 림프구의 기억 능력의 감소로 인한 것인지, 기억세포들의 세포 증식이 감소되는 것인지는 아직 밝혀진 바가 없다. 또한 기억세포의 두 그룹인 central memory T 세포와 effector memory T 세포의 분화과정에서의 차이가 어떠한 기작에 의해 일어나는 지도 아직까지 확실히 밝혀진 바가

없다. 이는 effector memory T 세포에 Notch1이 발현된다는 사실을 바탕으로 Mib1 제거 마우스를 통해 기억 T 세포의 분화와 세포 증식에 대한 기작을 밝힐 수 있을 것이 기대할 수 있다. 세 번째 가능성은 T 림프구에서 발현하는 Mib1이 도움 T 림프구의 분화를 조절할 수 있다는 예측이다. 수지상 세포에서 발현되는 Notch ligand들이 T 림프구들의 분화를 결정지을 수 있다는 연구 결과를 토대로 본 연구실에서는 Mib1을 수지상 세포에서 제거한 마우스 모델을 이용하여 분화 결정 실험을 행한바 있다. 그 결과 Mib1이 도움 T 림프구의 분화 과정에 중요한 요인이 된다는 것을 밝히게 되었는데, CD4 T 림프구에서의 Mib1의 발현도 분화에 영향을 미칠 수 있을 것이라 생각한다. 이는 Notch가 CD4 T 림프구에서 GATA3의 발현에 영향을 미친다는 보고를 토대로 예측해 볼 수 있는데, GATA3는 Type 2 도움 T 림프구의 분화에 영향을 미치는 전사 인자로, Notch에 의해 GATA3의 발현이 조절되기 때문에 이러한 예상이 가능하다. (Fang et al., 2007)

종합해 보자면, Mib1은 T 림프구에서 발현되는 E3 ubiquitin ligase로 Notch ligand의 endocytosis를 조절한다. CD4 T 림프구와 CD8 T 림프구가 TCR 자극을 받은 경우 시간이 지남에 따라 Mib1의 발현양이 증가하게 된다. 이러한 Mib1의 발현은 NF- κ B와 NFAT 두 전사 인자에 의해 이루어진다. Mib1의 T 림프구에서의 역할은 아직까지 밝혀진 바가 없다. 본 연구실은 후속 연구로 Mib1을 *Lck-cre* 형질 전환 마우스와

함께 교배하여 T 림프구에서의 Mib1을 제거할 계획을 가지고 있으며 이를 통해 T 림프구에서의 Mib1 기능을 밝힐 수 있을 것이라 기대된다.

VII. 참고문헌 (References)

- Adler, S.H., Chiffolleau, E., Xu, L., Dalton, N.M., Burg, J.M., Wells, A.D., Wolfe, M.S., Turka, L.A., and Pear, W.S. (2003). Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression. *Journal of immunology* *171*, 2896-2903.
- Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T., and Flavell, R.A. (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* *117*, 515-526.
- Carter, P. (1986). Site-directed mutagenesis. *The Biochemical journal* *237*, 1-7.
- Cho, O.H., Shin, H.M., Miele, L., Golde, T.E., Fauq, A., Minter, L.M., and Osborne, B.A. (2009). Notch regulates cytolytic effector function in CD8+ T cells. *Journal of immunology* *182*, 3380-3389.
- Crowe, R., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Niswander, L. (1998). A new role for Notch and Delta in cell fate decisions: patterning the feather array. *Development* *125*, 767-775.
- Fang, T.C., Yashiro-Ohtani, Y., Del Bianco, C., Knoblock, D.M., Blacklow, S.C., and Pear, W.S. (2007). Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* *27*, 100-110.
- Fung, E., Tang, S.M., Canner, J.P., Morishige, K., Arboleda-Velasquez, J.F., Cardoso, A.A., Carlesso, N., Aster, J.C., and Aikawa, M. (2007). Delta-like 4 induces notch signaling in macrophages: implications for inflammation. *Circulation* *115*, 2948-2956.
- Gerondakis, S., and Siebenlist, U. (2010). Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *2*, a000182.
- Handel, M.L., McMorrow, L.B., and Gravallesse, E.M. (1995). Nuclear factor-kappa B in rheumatoid synovium. Localization of p50 and p65. *Arthritis and rheumatism* *38*, 1762-1770.
- Hennet, T., Hagen, F.K., Tabak, L.A., and Marth, J.D. (1995). T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 12070-12074.
- Hoyne, G.F., Le Roux, I., Corsin-Jimenez, M., Tan, K., Dunne, J., Forsyth,

L.M., Dallman, M.J., Owen, M.J., Ish-Horowicz, D., and Lamb, J.R. (2000). Serrate1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4(+) T cells. *International immunology* *12*, 177–185.

Itoh, M., Kim, C.H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y.J., Maust, D., Yeo, S.Y., Lorick, K., Wright, G.J., Ariza-McNaughton, L., *et al.* (2003). Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Developmental cell* *4*, 67–82.

Jeong, H.W., Kim, J.H., Kim, J.Y., Ha, S.J., and Kong, Y.Y. (2012). Mind bomb-1 in dendritic cells is specifically required for Notch-mediated T helper type 2 differentiation. *PloS one* *7*, e36359.

Joshi, I., Minter, L.M., Telfer, J., Demarest, R.M., Capobianco, A.J., Aster, J.C., Sicinski, P., Fauq, A., Golde, T.E., and Osborne, B.A. (2009). Notch signaling mediates G1/S cell-cycle progression in T cells via cyclin D3 and its dependent kinases. *Blood* *113*, 1689–1698.

Koo, B.K., Lim, H.S., Song, R., Yoon, M.J., Yoon, K.J., Moon, J.S., Kim, Y.W., Kwon, M.C., Yoo, K.W., Kong, M.P., *et al.* (2005). Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch. *Development* *132*, 3459–3470.

Kuijk, L.M., Verstege, M.I., Rekers, N.V., Bruijns, S.C., Hooijberg, E., Roep, B.O., de Gruijl, T.D., van Kooyk, Y., and Unger, W.W. (2013). Notch controls generation and function of human effector CD8+ T cells. *Blood* *121*, 2638–2646.

Kuroda, K., Han, H., Tani, S., Tanigaki, K., Tun, T., Furukawa, T., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Hamada, Y., Toyokuni, S., *et al.* (2003). Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* *18*, 301–312.

Palaga, T., Miele, L., Golde, T.E., and Osborne, B.A. (2003). TCR-mediated Notch signaling regulates proliferation and IFN-gamma production in peripheral T cells. *Journal of immunology* *171*, 3019–3024.

Schier, A.F., Neuhauss, S.C., Harvey, M., Malicki, J., Solnica-Krezel, L., Stainier, D.Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Stemple, D.L., Rangini, Z., *et al.* (1996). Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development* *123*, 165–178.

Shin, Y.H., Lee, G.W., Son, K.N., Lee, S.M., Kang, C.J., Kwon, B.S., and Kim, J. (2007). Promoter analysis of human CC chemokine CCL23 gene in U937 monocytoic cells. *Biochimica et biophysica acta* *1769*, 204–208.

Singh, N., Phillips, R.A., Iscove, N.N., and Egan, S.E. (2000). Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis. *Experimental hematology* *28*, 527–534.

Song, R., Kim, Y.W., Koo, B.K., Jeong, H.W., Yoon, M.J., Yoon, K.J., Jun, D.J., Im, S.K., Shin, J., Kong, M.P., *et al.* (2008). Mind bomb 1 in the lymphopoietic niches is essential for T and marginal zone B cell development. *The Journal of experimental medicine* *205*, 2525–2536.

Tanigaki, K., Tsuji, M., Yamamoto, N., Han, H., Tsukada, J., Inoue, H., Kubo, M., and Honjo, T. (2004). Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity* *20*, 611–622.

Yuan, J.S., Kousis, P.C., Suliman, S., Visan, I., and Guidos, C.J. (2010). Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annual review of immunology* *28*, 343–365.

Zhang, H., Ramanathan, Y., Soteropoulos, P., Recce, M.L., and Tolias, P.P. (2002). EZ-Retrieve: a web-server for batch retrieval of coordinate-specified human DNA sequences and underscoring putative transcription factor-binding sites. *Nucleic acids research* *30*, e121.

VIII. 영문초록 (Abstract in English)

Study on the regulation of Mind bomb-1 Transcription level in T lymphocyte Induced by TCR stimulation

Joo-Yeon Kim

School of Biological Sciences

The Graduate School

Seoul National University

Mind bomb-1 is E3 ubiquitin ligase, critical regulator of Notch signaling, that regulates endocytosis of Notch ligand. Notch signaling determines multiple cell-fate decisions, especially development, differentiation and tissue generation, through Notch signaling between adjacent cells. The study of Notch signaling how dendritic cell affects T lymphocyte differentiation has been studied extensively. In recently, it is reported that Mindbomb-1 expressed in dendritic cell regulates T lymphocyte differentiation. However, the role of mindbomb-1 in T lymphocyte has not been defined. In

this study, *Mib1*^{fl/fl} mice were used to gain T lymphocyte in order to looking for expression Mib1 in T lymphocyte. Expression of Mib1 in T lymphocyte is increased by TCR stimulation. Promoter of Mib1 gene was investigated to find the mechanism that control Mib1 expression. Furthermore, the NF- κ B and NFAT binding sites in promoters were suppressed by inhibitors and decreased Mind bomb-1 expression was detected. Through site-directed mutagenesis, the vectors were generated by mutating NF- κ B and NFAT binding sites and the role of NF- κ B and NFAT transcription factors were confirmed via luciferase activity. After inducing overexpression of p50 and p65 NF- κ B subunits, we found that NF- κ B directly regulates the E3 ubiquitin ligase Mib1 transcription. Based on the aforementioned findings, we found that Mib1 is induced by TCR signaling while NF- κ B and NFAT play a role as transcription factors.

Keywords: Mind bomb-1, CD4 T lymphocyte, CD8 T lymphocyte, transcription factor, NF- κ B, NFAT

Student number: 2012-20301