# **Jurkat T** 세포주에서 **Inhibitory Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor** 과발현에 의한 **Activation Induced Cell Death** 억제에 관여하는 단백 규명

연세대학교 대학원

의과학사업단

장 미 정

# **Jurkat T** 세포주에서 **Inhibitory Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor** 과발현에 의한 **Activation Induced Cell Death** 억제에 관여하는 단백 규명

지도교수 김 종 선

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

**2001** 년 **12** 월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

장 미 정

장미정의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

**2001** 년 **12** 월 일

# 감사의 글

날씨가 참 추워진걸 보면 겨울이 오긴 왔나봅니다. 어느덧 제가 미생물학교실에서 실험을 시작한 후로 2 번의 겨울이 지나가고 있습니다. 결코 짧지 않은 2 년의 시간동안 제게 과학을 하는 사람으로서 알아야 할, 그리고 해야 할 여러 가지를 가르쳐주신 김종선 교수님께 진심으로 감사드립니다. 교실에 있는 동안 실험하는 사람의 태도 뿐만 아니라 기본적인 소양까지도 잘 지도해 주셨던 박전한 교수님과 부족한 점이 많은 논문이지만 정성스럽게 심사해주시고 많은 격려와 용기를 주신 정현철 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 어머니같은 따뜻함으로 잘 감싸주셨던 박현주 선생님과 보이지 않는 곳에서 물신양면으로 지도해 주셨던 미생물학교실의 여러 교수님들께도 감사의 마음을 전합니다. 얼마 되진 않지만 한결같은 사랑으로 저를 지도 해 주셨던 김윤택 교수님께도 감사드립니다.

제가 처음 미생물학교실에 들어와서 실험에 대한 열정과 지칠 줄 모르는 인내를 가르쳐주신 박상면 선생님, 실험하는데 필요한 추진력을 가르쳐주신 최용준 선생님께도 고마움을 전합니다. 이제는 졸업해서 어엿한 사회인이 된 류정민 선생님과 언니같은 따뜻한 배려로 신경 써 주셨던 최윤희 선생님, 남다른 관심으로 저를 도와주셨던 정한영 선생님, 실험에 필요한 많은 정보를 나누어 주셨던 고시환 선생님, 할아버지 같은 따뜻함으로 대해주셨던 김일휘 선생님, 엄마처럼 잘 챙겨주셨던 최유정 선생님, 다투기도 많이 했지만 여러모로 많은 도움을 준 류현정 선생님, 넉넉함과 즐거움을 나누어준 조성규 선생님과 유영건 선생님, 같은 분야를 공부하는 사람으로서 많은 의지가 되어준 김지수 선생님, 여린 마음으로 꿋꿋하게 열심히 실험하며 의지가 되어준 최경선 선생님, 그 외에도 보이지 않게 많은 도움을 주신 미생물학교실 여러 선생님들께도 고마움을 전합니다.

항상 변함없는 따뜻함과 여유로움을 나누어준 정연 언니, 이제는 실험하는 틀을 잡아가는 야무진 형란이, 그리고 막내같은 귀여움으로 실험의 맛을 알아가는 이쁜이 은주.....모두 정말 고맙습니다.

제게 언니처럼 충고해주고 믿어주고 의지가 되어 준 이쁜 친구 우민이, 제 꿈을 펼치려고 노력하는 정아, 이제는 이쁜 애기엄마가 된 한순이, 잊지 않고 전화해서 힘을 주던 미연이, 가장 힘든 시기를 겪고 있으면서도 저에게 가장 큰 힘이 되어 주셨고 저의 믿음이 되어 주셨던 일한 오빠, 항상 마음에 따뜻함을 주는 지형 오빠, 경일 선배, 승철 선배, 같은 일을 하는 사람으로서 저를 잘 이해해준 홍이, 준영이, 현주 그리고.....여러 선후배, 동기들에게도 감사의 마음을 전합니다.

무엇보다도 저를 이만큼 키워주시고 제가 이 길을 걸어가게끔 아낌없는 사랑과 변치않는 믿음을 주셨던 부모님께 깊은 감사의 마음과 함께 사랑함을 전합니다. 부모님 못지않은 사랑과 믿음을 주셨던 외삼촌과 외숙모, 세심한 것까지 두루두루 신경써 주신 고모부와 고모, 그리고 모든 가족들께도 깊은 감사를 드립니다. 언니 때문에 항상 뒷전이지만 그런 언니를 믿고 따라주는 속깊은 동생 미영이와 군대에서 열심히 훈련받고 있을 막내 선태에게도 고마움을 전합니다.

미생물학 교실에 들어와서 '진리가 너희를 자유케 하리라' 라는 글을 처음 보았을 때 마음에 새겼던 것처럼 모든 분들의 감사함도 오래도록 함께 간직하겠습니다.

장 미 정

# 차 례

그림 및 표 차례

국문 요약 ..... 1

I. 서 론 ..... 3

II. 재료 및 방법 ..... 7

1. 세포주 배양 ..... 7
2. 시약 및 항체 ..... 7
3. Expression plasmid 제조와 stable transfection ..... 8
4. CD8KIR 융합 단백질의 세포 외 표현 분석 ..... 8
5. Stable transfectant 들의 세포 내 FasL 발현 분석 ... 9
6. FasL promoter reporter assay ..... 9
7. 자극 유도 ..... 10
8. 세포 고사 측정 ..... 11
9. 면역침전 ..... 11
10. Western blot ..... 11

III. 결 과 ..... 13

1. CD8 과 KIR 융합 construct 들을 안정하게 발현하는 Jurkat T 세포주의 확립 ..... 13
2. CD8KIR 에 의한 Jurkat T 세포 AICD 의 억제 효과 ..... 16

3. CD8-KIR 융합 단백질에 의한 Jurkat T 세포 FasL 유도의 억제 효과 ..... 20
4. CD8KIR 융합 단백질들이 Jurkat T 세포에서 Trail 발현에 미치는 영향 ..... 24
5. KIR cytoplasmic tail 의 membrane proximal 부위에 결합하는 표적 물질로서의 protein kinase C ..... 26

IV. 고 찰 ..... 29

V. 결 론 ..... 34

참고문헌 ..... 36
영문요약 ..... 42

# 그 림 차 례

그림 1. CD8-KIR 융합 단백질을 발현하는 Jurkat T 세포의 제조 .. 14

그림 2. KIR 를 과발현시킨 Jurkat T 세포에서 PHA 에 의해 유도되는 AICD 억제효과 ..... 18

그림 3. KIR 를 과발현시킨 Jurkat T 세포에서 PMA/ionomycin 에 의해 유도되는 AICD 억제효과 ..... 19

그림 4. Jurkat T 세포에서 KIR 에 의한 FasL 발현 유도의 억제 효과 ..... 22

그림 5. KIR 를 과발현시킨 Jurkat T 세포에서 FasL promoter reporter assay ..... 23

그림 6. CD8-KIR 융합 단백질들을 과발현시킨 Jurkat T 세포에서의 TRAIL 발현 ..... 25

그림 7. CD8KIR 융합 단백질을 과발현시킨 Jurkat T 세포에서 PKC 와의 상호작용에 의한 면역침전 ..... 28

그림 8. Jurkat T 세포에서 KIR 의 anti-apoptotic activity 에 대한 putative model ..... 31

국 문 요 약

# Jurkat T 세포주에서 Inhibitory Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor 과발현에 의한 Activation Induced Cell Death 억제에 관여하는 단백 규명

Killer cell Ig-like receptor (KIR)는 자연살 세포의 표면에 발현되어 표적 세포의 MHC class I 단백질을 인식, 살상 기능을 억제함으로써 자연살 세포에 표적 특이성을 부여하는 중요한 비활성화 수용체이다. KIR는 자연살 세포 뿐만 아니라 일부 $CD8^+$ T 세포에도 발현되는 것으로 알려져 있다. 흥미롭게도 T 세포에서 KIR의 발현은 주로 $CD8^+$ memory 형질의 T 세포에서 관찰되고 있으며, 최근의 연구 결과는 KIR 형질전환 생쥐에서 $CD8^+$ memory type T 세포가 크게 증가되어 있으며, 이들 세포가 T 세포 activation-induced cell death (AICD)에 저항성을 보인다는 것이 보고되었다. 이는 T 세포가 활성화된 후 AICD를 피해 memory 세포로 전환하는 과정에서 KIR 분자가 중요한 역할을 할 것임을 시사하는 연구 결과로써, 지금까지 알려진 기능 외에 아직 알려지지 않은 새로운 기전을 통해 KIR가 활성화된 T 세포의 생존에 관여함을 추정할 수 있다. 따라서 T 세포에서 KIR의 면역학적 기능을 더 잘 이해하기 위해서 KIR가 AICD를 억제하는 기전에 대한 구체적인 연구가 필요하였다.

본 연구에서는 KIR 발현 Jurkat T 세포주를 확립하고 phytohemagglutinin (PHA) 또는 PMA/ionomycin 처리에 의한 활성화 자극을 주었을 때, KIR 발현에 의한 Jurkat T 세포에서의 AICD 변화와 그 기전을 규명하고자 하였다. 실험 결과 KIR 발현 Jurkat T 세포는 대조군에 비해, PHA 그리고 PMA/ionomycin에 의해 유도된 AICD에 저항

성을 보였으며, 이는 활성화 자극 후에 FasL 발현의 억제에 의해 수행되는 것으로 나타났다. 그리고 CD8 α와 KIR cytoplasmic tail의 융합 단백질를 표현하는 Jurkat 세포주를 이용한 실험 결과 KIR cytoplasmic tail의 membrane-proximal 20개의 아미노산 서열이 KIR에 의한 Jurkat의 AICD 억제에 관여함을 증명하였다. 마지막으로 KIR의 membrane-proximal 20개의 아미노산 서열에 protein kinase C (PKC)에 의해 인산화될 수 있는 serine기가 포함되어 있다는 사실에 착안하여, 활성화 자극 전후의 KIR의 cytoplasmic tail과 PKC의 결합 여부를 확인하여 보았다. 면역침전 실험 결과 KIR의 cytoplasmic tail 부위는 PKC α 그리고 θ와 활성화 자극 전후에 지속적으로 결합하고 있음을 확인하였다. 이러한 결과들은 KIR의 membrane-proximal 부위에 PKC를 결합함으로써 가용 PKC의 양을 줄이거나 더 나아가 불활성화시킴으로써 활성화된 T 세포가 AICD에 저항성을 가지게 될 수 있음을 시사한다.

본 연구 결과를 통해, T 세포 AICD 억제에 있어서 KIR의 작용 기전을 이해하는데 도움을 주었으며, 앞으로 KIR와 PKC의 상호 작용에 대한 보다 구체적인 연구가 필요하다.

---

핵심되는 말 : **Killer cell Ig-like receptor, Activation induced cell death, Jurkat T 세포, Protein kinase C**

# Jurkat T 세포주에서 Inhibitory Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor 과발현에 의한 Activation Induced Cell Death 억제에 관여하는 단백 규명

< 지도교수 김 종 선 >

연세대학교 대학원 의과학사업단

장 미 정

## Ⅰ. 서 론

Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR)는 자연살 세포의 표면에 발현되어 표적 세포의 MHC class I 단백질을 인식하여 자연살 세포의 살상 기능을 억제함으로써 자연살 세포에 표적 특이성을 부여하는 중요한 비활성화 수용체이다.[1,2] KIR는 주로 자연살 세포의 표면에 발현이 되긴 하지만, T 세포 중의 일부에도 발현되며 자연살 세포의 살상 기능 뿐만 아니라 T 세포의 세포 독성능과 사이토카인 분비와 같은 면역 반응도 억제함이 알려져 있다.

자연살 세포에서, KIR는 class I MHC 단백질을 선택적으로 인식하여 세포 독성능을 억제함으로써 자가면역관용(self-tolerance)에 기여하고,[3] 바이러스 감염이나 악성형질 변이에 의한 세포 표면 HLA class I 발현이 결여된 세포들을 비자기(missing

self)로 인식하도록 해준다. KIR의 extracellular 부위는 두 개 또는 세 개의 immunoglobulin-related 부위들로 구성되어 있으며 이들은 표적 세포에 발현된 MHC class I 단백질을 인식하며, cytoplasmic tail은 두 개의 immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM)들을 함유하며 자연살 세포의 살상 기능을 억제하는 신호 전달을 매개한다. 반면, ITIM motif가 결여된 짧은 cytoplasmic tail을 가진 KIR 분자의 isoform들은 adaptor 분자인 DAP12와의 연계를 통하여 활성화 수용체로 작용한다.[4] T 세포에서도 이들 수용체들은 TCR/CD3 복합체를 통하여 전달되는 활성화 신호를 조절하여 자연살 세포에서와 비슷한 기능을 수행할 것이라고 알려지고 있으나,[5-7] T 세포에서 KIR 발현의 면역학적 기능은 자연살 세포에서의 경우와 비교하여 잘 밝혀져 있지 않다.

KIR는 $CD8^+$ T 림프구에 많이 분포하고 있으며, T 림프구에서 KIR의 발현은 분화된 memory 표현형을 가진 세포에 제한되어 관찰되고 있다.[8-12] KIR가 항원에 이미 노출된 T 세포들에서 주로 발견되는 것으로 보아,[8] T 세포가 생체 내(*in vivo*)의 면역반응을 통하여 활성화되는 과정에서 선택적으로 KIR가 유도되거나, 그 과정에서 $KIR^+$ $CD8^+$ T 세포가 선택적으로 증식할 것으로 추측되고 있다. T 세포에서 KIR의 발현은 주로 $CD8^+$ memory T 세포에서 관찰된다는 사실이 이러한 예상을 뒷받침하고 있다.[8] 또한 T 세포에서 발현되는 KIR는 세포 독성능의 억제 작용 뿐 아니라 T 세포의 사이토카인 생성도 억제하는 것으로 밝혀졌다.[5,6, 13-17] 최근에는 KIR를 통한 새로운 신호 전달의 가능성을 보여주는 몇몇 연구 보고가 나오고 있으며,[9,18] 특히 암 항원을 인식하는 $KIR^+$ cytotoxic T lymphocyte (CTL) clone들의 활성이 KIR에 의해서 억제된다는 보고도 있다.[19-21]

KIR의 발현이 T 세포에서 어떻게 조절되어 T 세포의 면역 반응을 조절하는지에 대해서는 아직 잘 밝혀져 있지 않다. 하지만 KIR의 발현이 주로 memory $CD8^+$ T 세포에서 나타난다는 사실과 T 세포에서 KIR의 발현이 TCR의 자극을 통하여 매개되

self)로 인식하도록 해준다. KIR의 extracellular 부위는 두 개 또는 세 개의 immunoglobulin-related 부위들로 구성되어 있으며 이들은 표적 세포에 발현된 MHC class I 단백질을 인식하며, cytoplasmic tail은 두 개의 immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM)들을 함유하며 자연살 세포의 살상 기능을 억제하는 신호 전달을 매개한다. 반면, ITIM motif가 결여된 짧은 cytoplasmic tail을 가진 KIR 분자의 isoform들은 adaptor 분자인 DAP12와의 연계를 통하여 활성화 수용체로 작용한다.[4] T 세포에서도 이들 수용체들은 TCR/CD3 복합체를 통하여 전달되는 활성화 신호를 조절하여 자연살 세포에서와 비슷한 기능을 수행할 것이라고 알려지고 있으나,[5-7] T 세포에서 KIR 발현의 면역학적 기능은 자연살 세포에서의 경우와 비교하여 잘 밝혀져 있지 않다.

KIR는 $CD8^+$ T 림프구에 많이 분포하고 있으며, T 림프구에서 KIR의 발현은 분화된 memory 표현형을 가진 세포에 제한되어 관찰되고 있다.[8-12] KIR가 항원에 이미 노출된 T 세포들에서 주로 발견되는 것으로 보아,[8] T 세포가 생체 내(*in vivo*)의 면역반응을 통하여 활성화되는 과정에서 선택적으로 KIR가 유도되거나, 그 과정에서 $KIR^+$ $CD8^+$ T 세포가 선택적으로 증식할 것으로 추측되고 있다. T 세포에서 KIR의 발현은 주로 $CD8^+$ memory T 세포에서 관찰된다는 사실이 이러한 예상을 뒷받침하고 있다.[8] 또한 T 세포에서 발현되는 KIR는 세포 독성능의 억제 작용 뿐 아니라 T 세포의 사이토카인 생성도 억제하는 것으로 밝혀졌다.[5,6, 13-17] 최근에는 KIR를 통한 새로운 신호 전달의 가능성을 보여주는 몇몇 연구 보고가 나오고 있으며,[9,18] 특히 암 항원을 인식하는 $KIR^+$ cytotoxic T lymphocyte (CTL) clone들의 활성이 KIR에 의해서 억제된다는 보고도 있다.[19-21]

KIR의 발현이 T 세포에서 어떻게 조절되어 T 세포의 면역 반응을 조절하는지에 대해서는 아직 잘 밝혀져 있지 않다. 하지만 KIR의 발현이 주로 memory $CD8^+$ T 세포에서 나타난다는 사실과 T 세포에서 KIR의 발현이 TCR의 자극을 통하여 매개되

는 activation-induced cell death (AICD)에 대한 저항성과 연관이 있음을 시사하는 연구 결과로 볼 때,[22] T 세포에서의 KIR의 발현은 memory 형질로의 변이와 관련이 있을 것으로 사료된다. 이와 관련하여 Hideo등은 KIR를 통한 신호 전달이 AICD에 관여할 수 있음을 시사하는 연구 결과를 발표하였는 데,[23] 이들의 연구 논문에 의하면 자연살 세포와 일부의 세포 독성 T 세포에서 발현되며 억제 신호를 전달하는 KIR 분자가 지금까지 알려진 것과 다른 신호 전달 과정에도 관여하며, 그 과정은 FasL와 TRAIL을 매개로 하는 T 세포 AICD와 연관되어 있을 것임을 밝히고 있다.

T 세포에서의 AICD는 T 세포의 표면에 T 세포 수용체에 의하여 유도되는 FasL와 그의 수용체인 Fas (CD95)의 결합에 의해 매개된다.[24] 항 CD3 항체나 PMA/ionomycin으로 T 세포를 자극하였을 때, 이미 활성화된 T 세포는 세포 고사를 유발하는데, 이것은 FasL의 up-regulation에 의해 자극된 T 세포에서 autocrine Fas-FasL loop의 활성화가 일어나 결국은 T 세포의 suicide나 fratricide가 유도된다.[25-27] T 세포에서 FasL의 발현은 PKC의 활성화 물질인 phorbol ester (PMA)와 $Ca^{2+}$ ionophore인 ionomycin에 의해서도 유도된다.[28,29] 최근에는 이러한 신호 전달 경로의 중간 단계에 작용하는 PKC에 대한 많은 연구 보고가 있으며,[30-36] 특히 여러 PKC의 isoform 중에서 PKC θ가 T 세포의 AICD에 직접적으로 연관되어 있다는 연구 보고가 있다.[31]

본 연구에서는 KIR 발현 Jurkat T 세포주를 실험 모델로 하여, T 세포의 AICD 조절에서 KIR 분자의 역할을 규명하고, 이에 대한 신호 전달 기전을 밝히고자 하였다. 특히 KIR의 신호 전달 기전에 중요한 부위를 찾고 KIR의 cytoplasmic tail에 결합하는 신호 전달 물질을 찾아냄으로써 AICD 억제 기전을 알아보고자 하였다. 실험 결과, CD8 α와 KIR cytoplasmic tail의 융합 단백질(CD8KIR)을 안정하게 발현하는 Jurkat T 세포는 대조군인 CD8T를 발현하는 Jurkat T 세포에 비해, PHA 그리고 PMA/ionomycin에 의해 유도된 AICD에 저항성을 보였으며, 이는 활성화 자극 후에 FasL 발현의 억제에 의한 것으로 생각되었다. 흥미롭게도 KIR cytoplasmic tail의

membrane-proximal 부위만을 가진 CD8KIRΔII를 발현하는 Jurkat T 세포에서도 AICD에 저항성을 보이는 것을 관찰함으로써 KIR cytoplasmic tail의 membrane-proximal 20개의 아미노산 서열이 KIR에 의한 Jurkat의 AICD 억제에 관여함을 증명하였다. 면역침전 결과 KIR의 cytoplasmic tail 부위에서 PKC α 그리고 θ가 활성화 자극과 관계없이 지속적으로 결합하고 있음을 확인하였다. 이러한 결과들은 KIR의 membrane-proximal 부위에 PKC가 결합됨으로써 가용 PKC의 양을 줄이거나 더 나아가 불활성화시킴으로써 활성화된 T 세포가 AICD에 저항성을 가지게 될 수 있을 것으로 여겨진다.

# Ⅱ. 재료 및 방법

## 1. 세포주 배양

Jurkat human acute lymphocytic leukaemia cell 은 ATCC 로부터 구입하여, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin (Life Technologies, Grand Island, NY)가 함유된 RPMI 1640 (Media Tech, West Chester, PA)에 10%(v/v) 우태아 혈청(fetal bovine serum, Gibco BRL, Grand Island, NY)을 첨가하여 37℃의 5% $CO_2$ 배양기에서 배양하였다.

## 2. 시약 및 항체

항 CD8 단클론 항체는 protein A sepharose column 을 이용하여 OKT 8 hybridoma 로부터 분리하여 사용하였다. Mouse 항 CD8 단클론 항체와 rabbit 항 CD8 다클론 항체(H-160), 항 TRAIL 항체, 항 α-Tubulin 항체는 Sourthern Biotechnology (Birmingham, AL) 와 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Pharmingen (San Diego, CA), Oncogene (Boston, MA)에서 각각 구입하여 실험에 사용하였다. Goat 항 mouse IgG (GAM) 항체는 Becton Dickinson (Lincoln Park, NJ)에서, phytohemagglutinin (PHA)은 Sigma (St. Louis, MO)로부터 구입하였다. Phorbol 12-myristrate 13-acetate (PMA)와 ionomycin 은 각각 Sigma 와 Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, CA)으로부터 구입하여 실험에 이용하였다.

### 3. Expression plasmid 제조와 stable transfection

CD8 α의 extracellular 부위와 transmembrane 부위, 그리고 KIR의 cytoplasmic tail의 융합 construct들(CD8KIR, CD8KIRΔI, CD8KIRΔII)은 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의하여 증폭된 KIR cytoplasmic tail sequence들을 pcDNA3.1 plasmid (Invitrogen, Carsbad, CA)에 클로닝하여 제조하였다. CD8KIR construct는 p70 KIR의 cytoplasmic tail (아미노산 361-444) 전체 sequence를 포함하고 있다. CD8KIR에 대한 대조군으로 p70 KIR의 cytoplasmic tail이 없는 CD8T construct를 만들었다. CD8KIRΔI construct는 p70 KIR의 cytoplasmic tail 전체 sequence에서 membrane-proximal 부위의 20개 아미노산이 제거되었고(아미노산 381-444), CD8KIRΔII construct는 p70 KIR의 cytoplasmic tail 중 membrane-proximal 부위의 37개 아미노산(아미노산 361-397)을 포함하고 있다(그림 1a). 모든 construct들의 sequence는 DNA sequencing에 의하여 확인하였다. 각 CD8KIR 융합 construct 10 μg을 $1x10^7$ Jurkat T 세포에 electroporator (BRL, Gaithersberg, MD)를 사용하여 500 μF/300 V의 조건에서 eletroporation 방법으로 도입시켰다.[37] 2주 동안 1 mg/ml geneticin (Duchefa, Haarlem, Netherlands)을 함유하는 RPMI 1640 배지로 selection하였다.[38] Geneticin으로 selection한 Jurkat clone들을 OKT8을 이용, FACS (Becton Dickinson, CA, USA) 분석으로 융합 단백질의 발현 정도를 조사하였다.

### 4. CD8KIR 융합 단백질의 세포 외 표현 분석

CD8T, CD8KIR, CD8KIRΔ I, CD8KIRΔ II construct들이 도입된 Jurkat transtectant들에서 이들 융합 단백질의 표현 여부를 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. Flow cytometry 분석을 하기 위해 $5\times10^5$ 세포/ml의 각 Jurkat transfectant들을 10% 우태아

혈청이 포함된 RPMI 1640에 부유시킨 후, OKT8을 첨가하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후, 인산 완충 식염액으로 2회 세척하였다. FITC가 부착된 goat anti-mouse IgG (Becton Dickinson) 항체를 첨가하고 빛을 차단한 상태로 4℃에서 30분간 반응시키고 인산 완충 식염액으로 세척한 다음 1% paraformaldehyde로 고정한 후, FACStar (Becton Dickinson)를 이용하여 형광 강도를 측정하고, 측정 결과는 Win-MDI 프로그램(Joseph Trotter)을 이용하여 분석하였다.

**5. Stable transfectant들의 세포 내 FasL 발현 분석**

각 stable transfectant들($5X10^5$ 세포/ml)을 protein transport inhibitor인 GolgiStop (Pharmingen)의 존재하에서[39] 3 μg/ml PHA로 4시간 동안 자극을 준 후 0.1% BSA (bovine serum albmin)이 포함된 차가운 인산 완충 식염액으로 세척한 다음, 4% paraformaldehyde을 함유하는 인산 완충 식염액으로 고정시켰다. 고정시킨 후, 0.1% saponin (Calbiochem.)과 0.5% BSA가 함유된 인산 완충 식염액으로 permeabilization시켰다. 세포를 0.1% BSA가 포함된 차가운 인산 완충 식염액으로 세척한 후, 5 μg/ml의 농도로 항 FasL 항체를 4°C에서 30분 동안 반응하여 부착시켰다. 세포를 다시 한번 0.1% BSA가 포함된 차가운 인산 완충 식염액으로 세척한 후, FITC가 부착된 goat anti-mouse IgG 항체를 4°C에서 30분 동안 반응시키고, 인산 완충 식염액으로 세척한 다음 1% paraformaldehyde로 고정한 후, FACStar를 이용하여 형광 강도를 측정하고, 측정 결과는 Win-MDI 프로그램을 이용하여 분석하였다.

**6. FasL promoter reporter assay**

Jurkat transfectant들($10^7$ 세포)에 BRL electroporator를 사용하여 40 μg의 FasL luciferase

reporter plasmid (pFasL-Luc)와 10 μg의 β-galactosidase control vector (pCMV-β)를 eletroporation (250 V, 960 μ F) 방법으로 도입시켰다. pFasL-Luc는 세종대학교 이미옥 박사로부터 받아 실험에 사용하였다. Transfection 24시간 후, transfected 세포들을 5 x $10^5$ 세포/well로 각각 분주하여 PHA나 PMA/ionomycin을 농도별로 8시간 동안 처리하였다. Transfected cell을 인산 완충 식염액으로 2번 세척한 다음, 100 μl 1x Reporter Lysis Buffer (Promega, Madison, WI)로 용해시킨 후, 세포용해액을 4°C에서 15,000 x g로 5분 동안 원심분리하였다. Luciferase assay를 위해서, 상층액 20 μl를 취하여 100 μl의 Luciferase Assay Reagent (Promega)와 섞은 후, luminometer를 사용하여 luciferase activity를 측정하였다. 각 실험군의 luciferase activity는 각 세포용해액의 β-gal activity를 이용하여 보정하였다. β-gal assay를 위해서, 상층액 50 μl를 취하여 60 mM $Na_2HCO_3$, 80 mM $NaH_2PO_4$, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 그리고 60 μg o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside이 함유된 50 μl의 assay buffer와 혼합하여 노란색으로 발색될 때까지 37°C에서 반응시켰다. Spectophotometer를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과값은 arbitrary β-gal unit당 arbitrary luciferase unit로서 표현하였다. 모든 실험은 매번 2쌍씩 세 번 이상 반복하여 수행하였다.

**7.** 자극 유도

AICD의 유도를 위하여, 5 x $10^5$ 세포 /ml의 각 Jurkat transfectant들에 PHA의 경우는 3 μg/ml의 농도로 12시간 동안, PMA/ionomycin의 경우는 각각 100 ng/ml, 1 μg/ml의 농도로 24시간 동안 처리하여 자극을 주었다. 자극 후에 promoter activity assay, apoptosis assay, immunoprecipitation, western blot 등을 수행하여 실험군간의 차이를 분석하였다.

**8.** 세포 고사 측정

5 x $10^5$ 세포/ml의 Jurkat transfectant들에 PHA 또는 PMA/ionomycin을 처리하고, Annexin V로 staining하여 세포 고사를 측정하였다.[40] Jurkat transfectant (5 x $10^5$ 세포/ml)들을 인산 완충 식염액으로 세척하고, FITC-conjugated Annexin V (Biosource International, Camarillo, CA) 50 μl로 제조사에서 제공한 방법에 따라 염색하였으며, 염색 즉시 FACScan Flow Cytometer (Becton Dickinson)로 분석하였다. 측정 결과는 Win-MDI 프로그램을 이용하여 분석하였다.

**9.** 면역침전

5 x $10^7$ 세포를 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.5 M PMSF, 50 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml leupeptin, 50 μg/ml pepstatin, 2 mM sodium orthovanadate, 0.4 mM EDTA, 10 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate)에 부유한 후 얼음에서 1시간 용해시켰다. 세포용해액을 Protein G(A)-agarose bead (Roche, Mannheim, Germany)로 preclearing하고, 13,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상층액에 10 μg/ml OKT8 항체를 첨가하고 rocking platform에서 1시간 반응시킨 다음, 50 μl Protein G(A)-agarose bead를 첨가하여 3시간 반응시켰다. 원심 분리하여 pellet을 모은 후, lysis buffer로 6회 세척하였다. 단백질은 1 x protein loading buffer를 첨가하여, 5분간 끓여 SDS PAGE로 분리한 후 western blot으로 분석하였다.

**10. Western blot**

각 Jurkat transfectant들에서 세포용해액을 추출하여 SDS-PAGE를 시행한 후 전기 영

동된 단백을 polyvinylidene difluoride membrane (Pierce, Rockford, IL)으로 전이시켜 PBST (인산 완충 식염액, 0.01% Tween 20)에 녹인 5% BSA를 사용하여 overnight blocking하고, 각각의 목적에 맞는 1차 항체를 붙인 후, HRP가 붙어 있는 2차 항체를 붙이고, chemiluminiscence western blotting detection system인 Super Signal (Pierce)을 이용하여 제조회사의 방법에 따라 시행하였다.

# Ⅲ. 결 과

## 1. CD8과 KIR 융합 construct들을 안정하게 발현하는 Jurkat T 세포주의 확립

CD8 α의 extracellular 부위와 transmembrane 부위, 그리고 p70 KIR의 cytoplasmic tail 부위를 융합한 DNA construct를 Jurkat T cell에 transfection하여 CD8KIR를 영구적으로 발현하는 stable cell line을 구축하였다. 더 나아가 KIR의 cytoplasmic tail 부위 중 어느 부위가 AICD 억제 기능에 중요한 부위인가를 규명하기 위하여, p70 KIR의 cytoplasmic tail 부위 중 membrane-proximal 부위의 20개의 아미노산이 제외된 CD8KIRΔ I construct, p70 KIR의 cytoplasmic tail 부위 중 2개의 ITIM motif가 제거되어 membrane-proximal 부위만이 남아있는 CD8KIRΔ II construct와, 대조군으로 CD8KIR의 cytoplasmic tail 부위가 없는 CD8T construct를 안정하게 발현하는 Jurkat stable cell line을 만들어 실험에 사용하였다(그림 1a).

CD8T, CD8KIR, CD8KIRΔ I, CD8KIRΔ II plasmid construct를 transfection하여 geneticin으로 selection한 Jurkat clone들을 OKT8을 이용, FACS staining하여 융합 단백질의 발현 정도를 조사하였다(그림 1b). 그림 1b에서 보여주듯이 각각의 clone들은 각각의 CD8-KIR 융합 단백질들을 안정하게 발현하고 있었다. 비록 각각의 clone들 사이에 CD8-KIR 융합 단백질들의 발현 정도가 차이가 있으나, KIR에 의한 효과를 관찰하기에 충분한 정도였다.

(a)

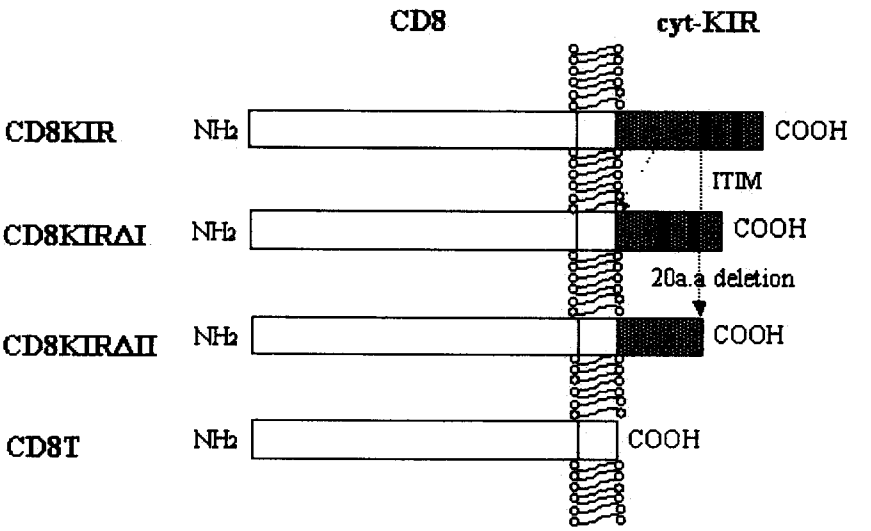
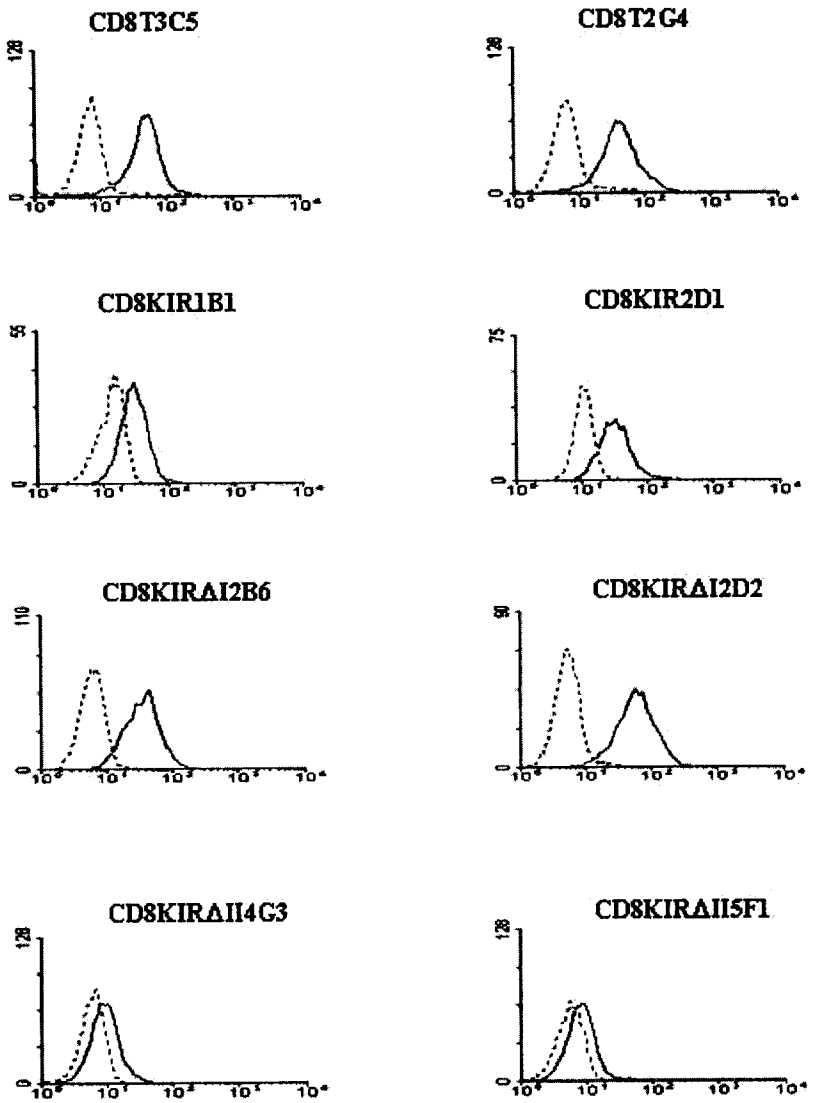



**그림 1. CD8-KIR 융합 단백질을 발현하는 Jurkat T 세포의 제조.**

(a) CD8 α의 extracellular 부위와 transmembrane 부위, 그리고 p70 KIR 의 cytoplasmic tail 부위를 융합한 construct들을 제조하였다.

(b) CD8-KIR 융합 construct를 transfection하여 geneticin으로 selection 한 Jurkat clone들을 OKT8, FITC-GAM 을 이용, FACS staining하여 융합 단백질의 발현 정도를 조사하였다. 점선은 FITC-GAM 만 반응시킨 세포의 background fluorescence를 나타낸 것이다.

(b)


CD8T3C5
CD8T2G4
CD8KIR1B1
CD8KIR2D1
CD8KIRΔI2B6
CD8KIRΔI2D2
CD8KIRΔII4G3
CD8KIRΔII5F1

## 2. CD8KIR에 의한 Jurkat T 세포 AICD의 억제 효과

각각의 CD8-KIR 융합 단백질들을 안정하게 발현하고 있는 Jurkat T 세포주들을 이용하여 T 세포에서 KIR cytoplasmic tail의 AICD 억제 효과를 조사하였다. 우선 T 세포의 AICD에 미치는 KIR cytoplasmic tail의 영향을 조사하였다. 이러한 연구는 KIR를 발현하는 T 세포가 AICD에 둔감하다는 기존에 이미 발표된 결과[22]에 기초하여 KIR의 어느 부위가 이러한 기능을 하는지를 규명하기 위해 고안되었다. AICD를 유도하기 위하여 각종 CD8-KIR 융합 단백질들을 발현하는 Jurkat T 세포주에 PHA 혹은 PMA와 calcium ionophore인 ionomycin을 함께 혼합한 용액을 이용하였다. PHA는 항 CD3 항체처럼 T 세포의 수용체와 cross-linking하여 AICD를 유도하는 효과를 가져오며, PMA와 ionomycin을 함께 혼합한 용액은 초기 신호 전달 경로를 bypass하여 중간 단계의 신호 전달 물질들을 자극하여 AICD를 유도하는 효과를 가져오는 것으로 알려져 있다.[41] 각종 CD8-KIR 융합 단백질을 발현하는 Jurkat T 세포주에 PHA를 이용하여 AICD를 유도했을 때, CD8KIR를 발현하는 세포주에서 AICD가 현저하게 줄어드는 것으로 나타났다(그림 2). 약 80%의 세포 고사가 유도되는 CD8T를 발현하는 Jurkat T 세포주에 비하여 CD8KIR를 발현하는 세포주에서는 약 40%의 세포 고사를 보임으로써 50% 이상 AICD가 억제되는 것을 확인하였다. 또한, CD8-KIR deletion mutant들에서는 KIR의 cytoplasmic tail 부위 중 2개의 ITIM motif가 제거되어 membrane-proximal 부위만이 남아있는 CD8KIRΔ II construct를 발현하는 Jurkat T 세포주에서 CD8KIR를 발현하는 세포주에서의 효과와 마찬가지로 약 40%의 AICD 억제 효과를 보였다. 이에 반해 membrane-proximal 부위가 제거된 CD8KIRΔ I은 AICD 억제 효과가 없었다. 이는 membrane-proximal 부위의 ~20개 아미노산 잔기가 AICD 억제에 중요한 역할을 할 것이라는 것을 시

사해 주고 있다.

T 세포의 활성화를 야기시켜 AICD를 유도하는 것으로 PHA에 반해 TCR을 통한 신호 전달 과정 중 초기 단계를 bypass하여 TCR ligation을 모방하는 효과를[38] 가져오는 PMA/ionomycin을 24시간동안 처리하여 AICD를 유도했을 때도, 마찬가지로 CD8KIR를 발현하는 세포주와 CD8KIRΔ II를 발현하는 Jurkat T 세포주에서 AICD가 현저하게 줄어드는 것을 관찰하였다(그림 3). PHA로 자극을 주었을 때와 마찬가지로 CD8KIR를 발현하는 세포주와 CD8KIRΔ II를 발현하는 Jurkat T 세포주 모두 50% 이상 AICD가 억제되는 것을 확인했다. 이러한 결과는 KIR가 T 세포의 AICD를 효과적으로 억제함을 의미하며 KIR의 membrane-proximal 부위가 T 세포의 AICD를 억제하는데 직접적으로 관여하는 부위임을 보여주는 결과이다. 또한 초기 신호 전달 과정을 bypass하는 PMA/ionomycin에 의한 AICD가 억제되는 것을 볼 때, 이러한 억제 효과는 초기 신호 전달 과정 아래 단계에서 일어나는 것임을 짐작할 수 있다. 즉 PMA에 의해 활성화되는 PKC 이하 분자들과 ionomycin에 의해 조절되는 calcium 관련 분자들의 관여 가능성을 시사하고 있다.

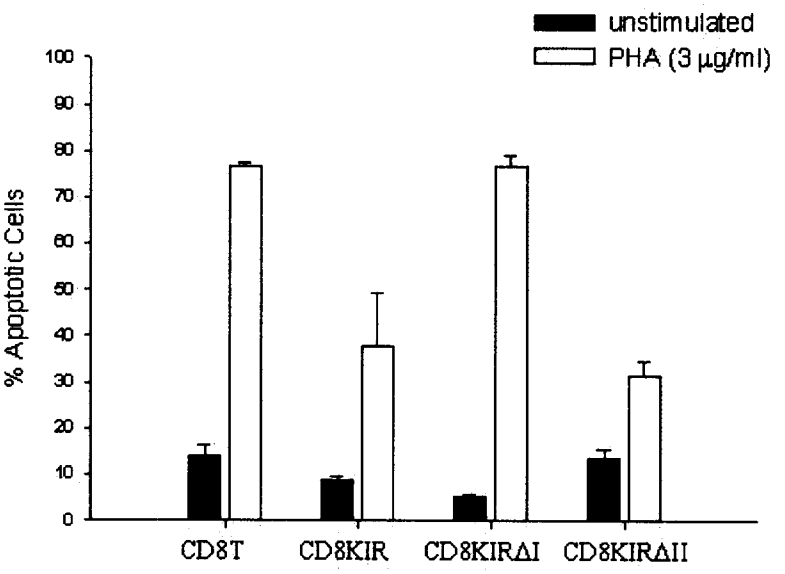



**그림 2. KIR를 과발현시킨 Jurkat T 세포에서 PHA에 의해 유도되는 AICD 억제 효과.**

AICD를 유도하기 위하여 각 Jurkat clone을 3 μg/ml PHA로 16 시간 처리한 후 FITC- conjugated Annexin V로 염색하였으며, 염색 즉시 FACScan Flow Cytometer로 분석하여 세포 고사를 측정하였다. 각 값은 triplicate로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표현하였다.

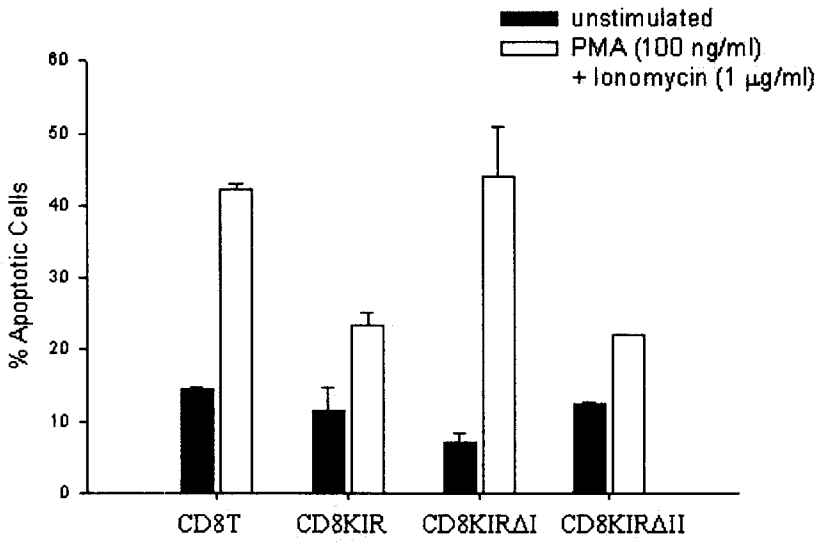



**그림 3. KIR를 과발현시킨 Jurkat T 세포에서 PMA/ionomycin에 의해 유도되는 AICD 억제 효과.**

AICD를 유도하기 위하여 각 CD8-KIR 융합 단백질을 발현하는 Jurkat clone을 100 ng/ml PMA와 1 μg/ml ionomycin을 혼합하여 24시간 처리한 후 FITC-conjugated Annexin V로 염색하였으며, 염색 즉시 FACScan Flow Cytometer로 분석하여 세포 고사를 측정하였다. 각 값은 triplicate로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표현하였다.

### 3. CD8-KIR 융합 단백질들에 의한 Jurkat T 세포에서 FasL 유도의 억제 효과

KIR의 cytoplasmic tail이 PHA 또는 PMA/ionomycin의 자극에 의해 AICD를 효과적으로 억제함을 보았기 때문에, KIR의 cytoplasmic tail에 의한 효과가 FasL 발현 유도에도 어떤 영향을 줄 수 있는지를 확인하고자 하였다. FasL의 경우 soluble FasL 형태로 분비가 될 수 있으므로[42] protein transport inhibitor인 GolgiStop을 처리하여 세포 내 FasL를 FACS staining하는 방법을 사용하였다.[39] PHA 처리 후에, CD8T, CD8KIRΔI을 표현하는 Jurkat T 세포주에 비하여 CD8KIR와 CD8KIRΔII를 표현하는 Jurkat T 세포주에서 약 50% 이상 세포 내 FasL 발현 유도가 억제되어 나타나는 것을 확인할 수 있었다(그림 4).

다음으로 KIR에 의한 Jurkat T 세포 FasL 유도의 억제 효과가 전사조절단계에서 일어나는 것인지를 확인하기 위하여, Jurkat stable transfectant들에서 FasL-luciferase promoter construct를 이용한 FasL promoter의 transcription activity를 측정하였다. PMA/ionomycin의 자극에 의해 유도되는 FasL-Luc reporter gene activity는 CD8KIR를 발현하는 Jurkat T 세포에서 억제되어, 대조군 세포주 CD8T에 비해 CD8KIR를 발현하는 T 세포주에서 5배 이상 전사 활성도가 떨어져 있음을 관찰할 수 있었다. CD8KIRΔII를 발현하는 Jurkat T 세포에서의 FasL-Luc reporter gene activity 역시 동일한 현상을 나타냄을 관찰하였다(그림 5). 이러한 결과는 KIR의 cytoplasmic tail이 T 세포의 AICD를 효과적으로 억제하는 기전은 FasL 발현의 유도를 전사조절단계에서부터 억제함으로써 이루어지는 현상임을 짐작할 수 있다. 특히 앞의 실험 결과에서도 알 수 있듯이, KIR의 membrane-proximal 부위를 발현하고 있는 Jurkat T 세포에서 AICD 억제 현상과 더불어 FasL 발현의 유도가 억제되어 나타나는 것으로 볼 때, KIR의 membrane-

proximal 부위에서 일어날 수 있는 새로운 신호 전달의 가능성을 확인해 볼 필요가 있었다.

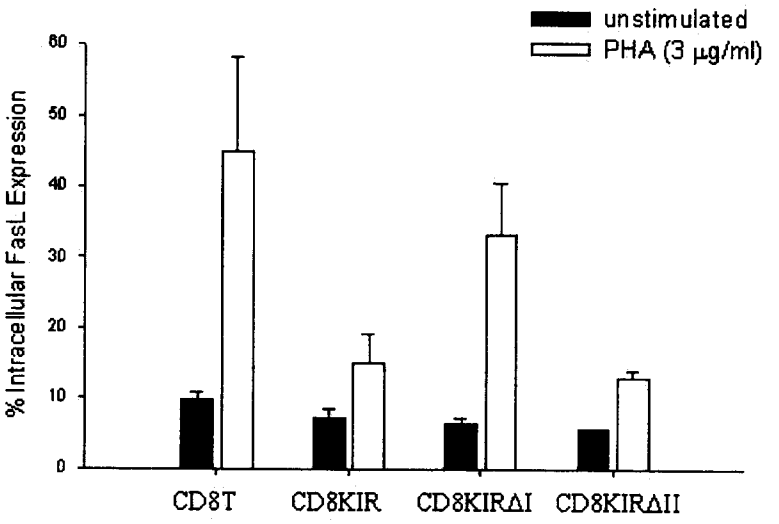



**그림 4. Jurkat T 세포에서 KIR에 의한 FasL 발현 유도의 억제 효과.**
FasL 발현 유도를 탐색하기 위하여 monesin-based protein transport inhibitor인 GolgiStop을 처리하여 세포 내 FasL를 FACS staining하는 방법을 사용하였다. 3 μg/ml PHA를 처리한 후 각 Jurkat clone의 세포 내 FasL 발현은 항 FasL 항체를 사용하여 결정하였다. 각 값은 triplicate로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표현하였다.

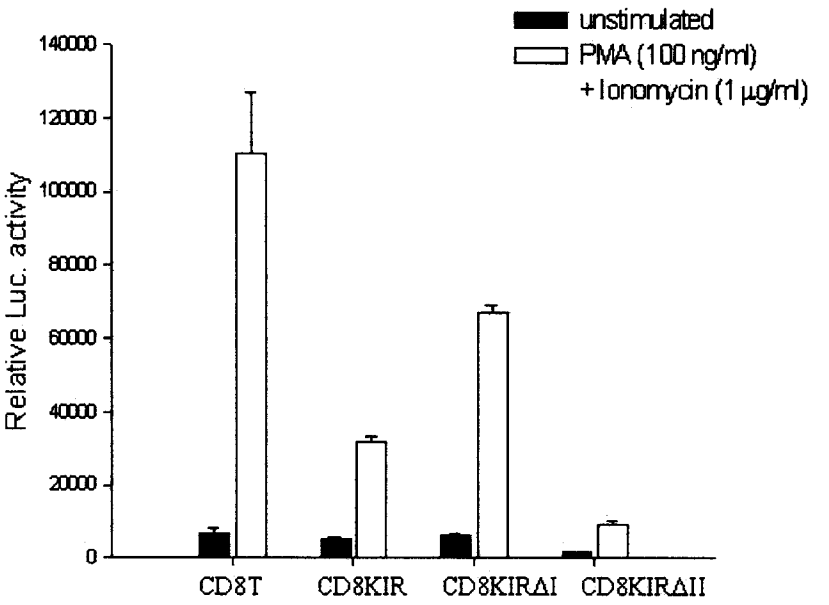



**그림 5. KIR를 과발현시킨 Jurkat T 세포의 FasL promoter reporter assay.**

KIR에 의한 Jurkat T 세포 FasL 유도의 억제 효과가 전사조절단계에서 일어나는 것인지를 확인하기 위하여, Jurkat stable transfectant들에서 FasL-luciferase promoter construct를 이용한 FasL promoter의 transcription activity를 측정하였다. Transfection 24시간 후, transfected 세포들을 PMA/ionomycin으로 8시간 동안 처리하였다. Transfected cell을 100 $\mu$l 1x reporter lysis buffer로 용해시킨 후, 세포용해액을 원심분리하였다. Luciferase assay를 위해서, 상층액 20 $\mu$l를 취하여 100 $\mu$l의 luciferase substrate와 섞은 후, luminometer를 사용하여 luciferase activity를 측정하였다. 각 실험군의 luciferase activity는 각 세포용해액의 $\beta$-gal activity를 이용하여 보정하였다. 결과값은 arbitrary $\beta$-gal unit당 arbitrary luciferase unit로서 표현하였다. 각 값은 triplicate로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표현하였다.

## 4. CD8KIR 융합 단백질들이 Jurkat T 세포에서 TRAIL 발현에 미치는 영향

NK 세포와 일부의 세포 독성 T 세포에서 발현되며 억제 신호를 전달하는 KIR 분자가 다른 신호 전달 과정에 관여하며, 그 과정은 FasL와 TRAIL을 수반 하는 세포 고사와 연관되어 있을 거라는 가능성이 제시되어 왔다.[23] 게다가 우리 Jurkat 세포주 체계하에서 CD8KIR의 발현이 FasL 유도를 억제하여 AICD를 저해하는 것으로 나타났기 때문에 다른 death 수용체의 발현에는 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 항 TRAIL 항체를 사용하여 각 Jurkat transfectant들에서 TRAIL 발현 양상을 보았다.

PMA/ionomycin을 3시간 동안 처리한 후 Jurkat stable transfectant들에서 TRAIL 발현 양상을 살펴보았는데, FasL 발현 때와는 달리 각 CD8-KIR 융합 단백질들을 발현하는 Jurkat transfectant들 사이에 TRAIL 발현 정도의 차이를 관찰할 수 없었다(그림 6). 이러한 결과는 KIR에 의한 AICD 억제 효과가 TRAIL을 통한 사멸 신호 전달 과정보다는 FasL를 통한 신호 전달 과정과 밀접한 관계가 있을 것이라는 것을 시사해 주고 있다.

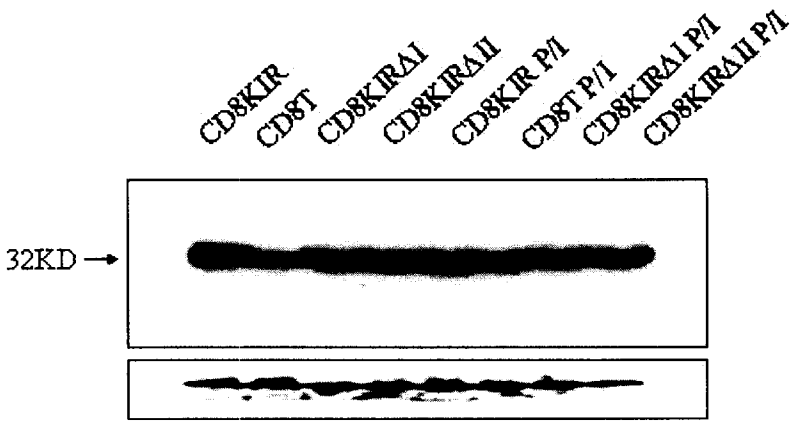



**그림 6 . CD8-KIR 융합 단백질들을 과발현시킨 Jurkat T 세포에서의 TRAIL 발현.**

Jurkat stable transfectant들에 100 ng/ml PMA와 1 μg/ml ionomycin을 혼합시킨 용액을 3시간 동안 처리한 후 lysis buffer로 용해시켜 western blot을 시행하였다. 각 Jurkat clone의 TRAIL발현은 항 TRAIL 항체를 사용하여 blotting하였다. 동일한 양의 단백질을 사용했음을 보이기 위해 항 α-Tubulin 항체를 사용하여 blotting하였다.

## 5. KIR cytoplasmic tail의 membrane proximal 부위에 결합하는 표적 물질로서의 protein kinase C

KIR를 안정하게 발현하는 Jurkat T 세포가 PMA/ionomycin의 처리에 의해 FasL 유도를 효과적으로 억제함으로써 AICD에 저항성을 가지게 된다는 우리의 결과는 KIR의 cytoplasmic tail를 통한 새로운 신호 전달 물질에 대한 탐색을 요구함과 동시에 PKC와 calcium이 FasL의 세포 표면 발현의 조절에 연관되어 있음을 강하게 시사한다. 최근에는 이러한 신호 전달 경로의 중간 단계에 작용하는 PKC에 대한 많은 연구들이 보고되고 있다.[30-36] PKC에는 여러 isoform들이 존재하는데, α, βI, βII, γ를 포함하는 classical PKC isoform들은 $Ca^{2+}$-dependent하고, diacylglycerol에 의하여 활성화되며, PMA와 같은 phorbol ester에 의해서도 활성화되는 것으로 알려져 있다. 또한 δ, ε, θ와 같은 novel PKC isoform들인 $Ca^{2+}$-independent isoform들이 있으며, 역시 diacylglycerol이나 PMA에 의해서 활성화된다. $Ca^{2+}$과 PMA에 민감하지 않은 atypical PKC isoform들은 ζ, λ이 있다.[29] 이들 PKC는 T 세포 신호 전달 과정에 중요한 역할을 하며, 특히 AICD 과정에서 FasL의 발현 유도와 연관되어 있음이 보고되고 있다.[30] 또한 여러 가지 PKC isoform들 사이에서 최근에 T 세포에서 그 역할이 부각되고 있는 PKC θ는 T 세포에서 주로 발현되고,[31] TCR/CD3에 의해 매개되는 신호 전달에 중요한 역할을 하며, TCR 복합체와 colocalization 되어 있음이 알려져 있는 중요한 PKC isoform이다.[32] 특히 PKC θ는 calcineurin과 더불어 T 세포의 AICD동안 FasL의 발현을 유도하고, 또한 T 세포의 survival signal도 매개한다고 알려져 있다.[33]

그림 3의 결과에서 KIR를 통한 신호 전달 과정이 초기 신호 전달 과정이 아닌 PKC와 $Ca^{2+}$ 신호 전달 과정 이하와 연관되어 있음을 시사했기 때문에 아래 단계에서 가장 표적이 될 수 있는 분자를 찾고자 하였다. 유력한 가용 분자로

서 PKC에 대해 생각하게 되었고, KIR와 결정적으로 PKC를 연결시켜주는 중요한 단서로 1995년 클로닝 된 p70 KIR의 cytoplasmic tail에 3개의 PKC 결합 부위(S/TXK/R, K/RXXS/T, K/RXS/T)가 존재함을 확인하였다.[43] 따라서 이러한 PKC가 KIR와 관련되어 있는지 알아보기 위하여 CD8KIR를 안정하게 발현하는 Jurkat T 세포에서 KIR cytoplasmic tail과 PKC가 결합하는지를 알아보기 위하여 면역침전 실험을 시행하였다(그림 7). 여러 가지 PKC isoform들 중 classical PKC isoform들에서 PKC α를, novel PKC isoform들에서 PKC θ를 먼저 실험에 이용하였다. 시간별로 0분, 5분, 10분, 30분간 PMA/ionomycin을 처리한 후 얻은 각각의 lysates를 OKT8 Ab로 면역침전하고 PKC Ab로 blotting한 결과 자극 전후 모두 CD8KIR에 PKC α와 θ가 지속적으로 결합하고 있다는 사실을 확인하였다(그림 7). PKC α, θ가 각각 어떻게 작용하여 신호가 전달되는지는 더 연구가 수행되어져야 할 것이다. 여러 가지 PKC isoform들을 모두 실험에 이용하여 KIR와의 상호 작용 여부를 확인해 보지는 못했지만 적어도 PKC α와 θ는 KIR에 의한 이러한 신호 전달 과정에 관여할 것으로 생각된다.

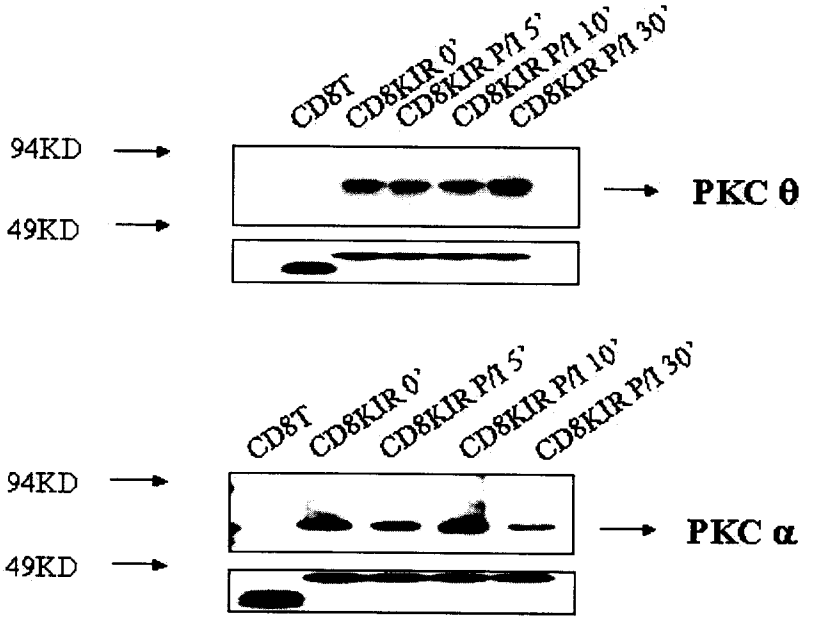



**그림 7. CD8KIR 융합 단백질을 과발현시킨 Jurkat T 세포에서 PKC와의 상호 작용에 의한 면역침전.**

CD8KIR를 안정하게 발현하는 Jurkat T 세포에서 KIR cytoplasmic tail과 PKC가 결합하는지를 알아보기 위하여 면역침전 실험을 시행하였다. 이때 항 CD8 항체를 사용하여 면역침전하고, 항 PKC α 항체와 항 PKC θ 항체를 이용하여 blotting하였다.

# Ⅳ. 고 찰

인체 내의 면역 반응이 일어난 후에, 활성화된 대부분의 T 세포는 acitivation-induced cell death (AICD)라는 과정을 통해 제거되며, 이로 인해 T 세포의 homeostasis가 유지되고 또한 자가 면역에 의한 숙주의 손상을 예방할 수 있다.[44] 또한 T 세포 hybridoma나 성숙한 정상 T 세포의 AICD 과정에는 Fas와 FasL의 상호 작용이 가장 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다.[25] 최근의 보고에 의하면 세포 독성 T 세포와 자연살 세포에서 FasL와 TRAIL은, 표적 세포의 세포 고사를 유발할 수 있으며, 이들 death 수용체들은 또한 과도 자극된 세포 독성 세포를 제거하는 과정인 AICD에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다.[23] 이러한 과정에서 KIR의 관련 여부에 대한 의문을 가지게 되었고, 특히 T 세포가 memory 형질을 보이며, clonal expansion한다는 보고를 기초로 Young등의 보고[45]에서도 언급되었듯이, 활성화된 T 세포의 AICD에 KIR가 중요한 역할을 할 것으로 예상되었기 때문에 이에 대한 검증이 필요하였다.

최근 우리 연구실의 연구 결과에 의하면 (Chwae et al, unpublished results), KIR 분자의 하나인 p70 NKB1을 Jurkat T 세포에 표현 시킨 stable transfectant를 제조, 활성화 자극을 주었을 때, KIR가 T 세포의 FasL 유도를 효과적으로 억제함으로써, 결과적으로 AICD 과정을 억제함을 관찰하였다. 이러한 KIR에 의한 AICD의 억제 기전은 KIR가 MHC 분자에 의해 교차 연결 되었을 때 일어나는 억제 기전과는 판이하게 다른 새로운 신호 전달 과정에 의한 것으로 추측하고 있다. 또한 KIR가 T세포의 AICD를 억제할 수 있다는 우리의 실험 결과를 뒷받침하는 논문이 최근에 Ugolini등에 의해 발표되었다.[22] Ugolini등은 KIR의 형질전환 생쥐에게서 얻은 T 세포를 이용한 실험을 통하여 KIR가 지금까지 알려진 것보다 훨씬 복잡한 기작으로 T 세포의 면역 반응에 관여할 것이라 보고하였다. 이들은 특히 KIR의 형질전환 생쥐에서

$CD8^+$ memory type T 세포가 크게 증가되어 있는 것을 관찰하였고, 이들 T 세포가 AICD에 저항성을 보이며, 따라서 KIR가 T 세포가 활성화 후 memory 형질로의 전환에 중요한 역할을 할 것이라고 주장하였다. 이러한 최근의 연구 결과를 바탕으로 본 연구에서는 구체적으로 KIR 분자의 어느 부위가 T 세포의 AICD를 억제하는지를 규명하고, KIR에 의한 T 세포의 AICD 억제 신호 전달 기전에 관여하는 신호 전달 분자를 찾아내어 어떤 경로로 신호가 전달되는지를 규명함으로써 KIR에 의한 T 세포 AICD 억제의 분자 기전 모델을 제시하였다(그림 8).

본 연구가 시작 되었을 때까지 memory 세포에서 KIR의 발현이 직접적으로 anti-apoptotic 역할을 하는지 여부는 밝혀지지 않았으나 mice에서 KIR와 기능적으로 동등한 Ly49 수용체는 NK clone들 개개의 selection과 survival에 연관되어 있을 것으로 여겨지고 있었다.[46] 또한 Hideo등은 p70을 표현하는 세포 독성 T 세포 clone에서 KIR를 통한 세포 고사 신호의 전달 가능성을 시사하는 결과를 발표하였다.[23] 이 결과는 NK 세포와 일부의 세포 독성 T 세포에서 발현되며 억제 신호를 전달하는 KIR 분자가 다른 신호 전달 과정에 관여하며, 그 과정은 FasL와 TRAIL을 수반하는 세포 고사와 연관되어 있을 것이라는 사실을 뒷받침하였다.

따라서 본 연구에서는 이와 같은 보고들을 바탕으로 KIR cytoplasmic tail이 AICD 억제 기전에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 CD8 α의 extracellular 부위, transmembrane 부위와 KIR의 cytoplasmic tail을 융합한 DNA construct를 Jurkat T cell leukemia cell line에 transfection한 stable cell line을 이용하여 실험을 수행하였다. 대조군으로 KIR cytoplasmic tail이 제거된 CD8T construct와 KIR cytoplasmic tail의 deletion construct (CD8KIRΔ I, CD8KIRΔ II)들을 영구적으로 표현하는 Jurkat stable cell line을 만들어 실험에 이용하였다. 먼저 CD8KIR를 표현하는 stable cell line들을 PHA, PMA/ionomycin으로 자극하여 AICD를 유도했을 때 CD8KIR에 의하여 AICD가 억제됨을 관찰하였다. 이러한 결과는 KIR를 통한 신호 전달이 초기 신호 전달 과정에

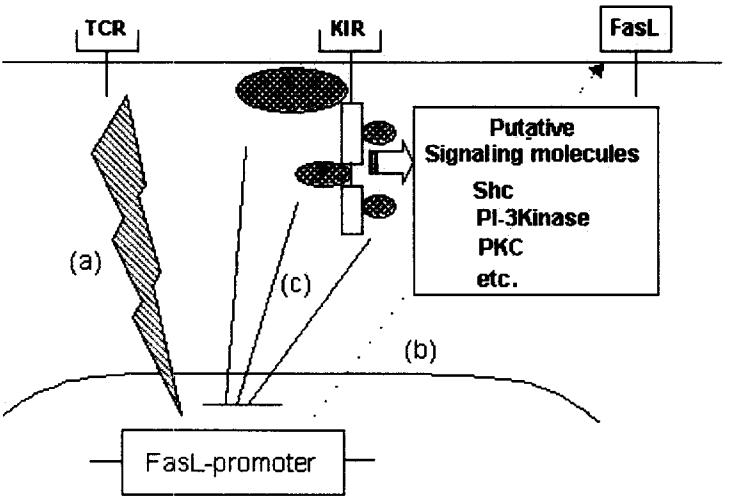



**Figure 8. Jurkat T 세포에서 KIR의 anti-apoptotic activity에 대한 putative model.**

(a) TCR/CD3를 통한 자극은 FasL의 발현을 유도하여 Fas-FasL 상호 작용에 의해 AICD에 이르도록 한다.

(b) KIR에 의해 전달되는 억제 신호는 FasL promoter activity를 감소시킨다.

(c) KIR에 의한 AICD 억제 효과는 PKC와 같은 putative 신호 전달 물질들에 의해서 매개된다.

서보다는 bypass 신호 전달 과정 이하에서 일어나는 것이라고 추측할 수 있다. 즉, 이 과정에서 주로 역할을 할 수 있는 PKC와 calcineurin이 Jurkat stable transfectant들에서 AICD의 조절에 관여할 것이라는 것을 시사한다. AICD 자극에 의해서 유도되는 FasL 발현 또한 CD8KIR를 표현하는 세포주에 비해 대조군으로 사용한 CD8T를 표현하는 세포주에서 높게 나타나는 것을 관찰하였다.

지금까지의 실험 결과는 KIR가 세포 고사 신호의 전달과 조절을 유도함을 보여주며, Fas/FasL system이 관여하는 세포 고사 상황에서 KIR 분자의 관여 가능성을 시사하고 있다. 그러므로 이 기전을 명확히 밝히기 위해, KIR 분자와 FasL, 그리고 AICD에 관여하는 다른 분자와의 관계를 증명하는 연구가 필요할 것으로 생각된다. 이미 보고된 바에 따르면, PKC가 calcineurin과 더불어 T 세포의 FasL의 발현 유도와 AICD를 조절하는데 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다.[47] 이것은 PKC와 FasL 발현과의 연관성, AICD와 관련지어 볼 때 KIR에 의한 효과가 PKC와 많은 상관 관계가 있을 것임을 생각할 수 있다.

KIR의 아미노산 서열 분석 결과 KIR cytoplasmic tail의 sequence상에는 3개의 PKC 결합 부위들이 존재하고, 각각 KIR cytoplasmic tail의 membrane-proximal 부위에 1개, ITIM motif들 사이에 2개의 PKC 결합 부위들이 있음을 확인하였다.[43] 여러 가지 CD8-KIR 융합 construct들을 만든 것도 이런 점을 고려한 결과이며, 이들은 각각 PKC 결합 부위들을 기준으로 하여 만들어진 deletion form들이다. 흥미롭게도, 이런 목적으로 만들어진 융합 construct들을 이용한 실험 결과들을 살펴보면, KIR에 의한 효과가 KIR cytoplasmic tail의 membrane-proximal 부위에서 일어나는 것임을 확인해 주고 있다. 즉, membrane-proximal 부위의 PKC 결합 부위들과의 관련 가능성을 예측할 수 있다. 면역침전 실험을 통하여 직접적으로 KIR와 PKC의 상호 작용을 확인한 결과, 서로 결합하는 것을 관찰할 수 있었다. 이번 실험에서는 여러 가지 PKC isoform들 중 classical PKC isoform들에서 PKC $\alpha$를, novel PKC isoform들에서 PKC

θ를 이용하여 실험을 수행하였다. 특이할 만한 점은 PKC의 결합이 자극을 주지 않았을 때와 주었을 때 모두 지속적으로 결합하고 있다는 것이다. 이들이 각각 어떤 다른 신호 전달 과정을 가지는지에 대해서는 보다 더 깊은 연구가 수행되어져야 할 것이다. 그러나 이 결과로 볼 때 여러 가지 PKC isoform들 중 적어도 PKC α와 θ는 KIR를 통한 신호 전달 과정에 관여함을 확인할 수 있었다. 또한 KIR cytoplasmic tail의 membrane-proximal 부위에 PKC가 결합됨으로써 가용 PKC의 양을 줄이거나 더 나아가 불활성화시킴으로써 활성화된 T 세포가 AICD에 저항성을 가지게 될 것이라 추측된다.

본 연구에서는 KIR와 PKC의 상호 작용을 시간별로 자극을 주어 결합하는 양상을 확인하는 실험까지 수행하였다. 앞으로 KIR의 여러 가지 construct들을 이용하여 PKC와의 결합여부를 확인하고 이러한 분자들을 통하여 어떠한 경로로 신호가 전달되는지에 관한 연구를 수행하려고 계획하고 있다.

결국 4개의 KIR 융합 construct들을 안정하게 발현하고 있는 Jurkat stable transfectant들을 이용하여 행해진 본 연구는 activation-induced KIR expressing T cell death에서 KIR에 의한 AICD 억제 효과와 이러한 효과를 가지도록 하는 KIR의 중요 부위들, 그리고 PKC의 관련성에 대하여 제시해 주었으며, PKC 이후의 신호 전달 경로에 대한 연구의 필요성을 제시하였다.

# V. 결 론

KIR 분자의 어느 부위가 T 세포 AICD를 억제하는지를 규명하고, KIR에 의한 T 세포의 AICD 억제 기작에 관여하는 신호 전달 분자를 찾아내어 어떤 경로로 AICD 억제 신호가 전달되는지를 규명함으로써 KIR에 의한 T 세포 AICD 억제의 분자 기전에 대하여 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 각종의 CD8-KIR 융합 단백질을 안정하게 발현하는 Jurkat T 세포주를 확립하여 PHA, PMA/ionomycin을 이용하여 AICD를 유도하였을 때, CD8KIR를 발현하는 세포주에서 AICD가 현저하게 줄어드는 것으로 나타났다. 또한, membrane-proximal 부위만이 남아있는 CD8KIRΔII construct를 발현하는 T 세포주에서도 AICD가 현저하게 줄어드는 것으로 나타나, 이 부위가 AICD 억제를 일으키는 부위임을 알 수 있다.
2. AICD가 유도된 후, FasL 발현 유도와 FasL promoter의 transcription activity는 CD8KIR와 CD8KIRΔII를 발현하는 Jurkat T 세포주에서 훨씬 억제되어 났다. 이러한 결과는 KIR의 cytoplasmic tail이 T 세포의 AICD를 효과적으로 억제하는 기전이 FasL 발현의 유도를 억제함으로써 이루어지는 현상임을 짐작할 수 있다. 특히 KIR의 membrane-proximal 부위를 발현하고 있는 Jurkat T 세포에서 FasL 발현 유도가 억제되어 나타나는 것으로 볼 때 이 부분이 이러한 효과를 나타내는데 중요한 부위임을 알 수 있다.
3. PMA/ionomycin 자극에 의한 Jurkat stable transfectant들의 TRAIL 발현 양상을 살펴보았는데, 각종 CD8-KIR 융합 단백질들을 안정하게 발현하는 Jurkat transfectant들 사이에 차이를 발견할 수 없어, KIR의 발현이 TRAIL의 발현에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

4. KIR를 안정하게 발현하는 Jurkat T 세포를 PMA/Ionomycin 자극을 주어 immunoprecipitation 실험을 시행한 결과, KIR의 cytoplasmic tail 부위는 PKC α 그리고 θ와 활성화 자극 전후에 지속적으로 결합하고 있음을 확인하였다. 따라서 KIR cytoplasmic tail의 membrane-proximal 부위에 PKC가 결합함으로써 아직 밝혀지지 않은 기전으로 FasL의 발현을 억제하고 결과적으로 T 세포의 AICD를 억제하는 것으로 여겨진다

결국 4개의 CD8KIR 융합 construct들을 안정하게 발현하고 있는 Jurkat stable transfectant들을 이용하여 행해진 본 연구는 KIR에 의하여 FasL 발현을 저해하여 AICD 억제 효과를 가져오며, 특히 KIR cytoplasmic tail의 membrane-proximal 부위가 이러한 기능을 담당하고 있으며 여기에 PKC가 관여할 것이라고 사료된다. 이러한 결과는 memory T 세포 형성 및 유지에 KIR가 관여할 가능성을 뒷받침하는 것으로 이에 대한 분자 기전의 구체적인 이해는 자연살 세포 및 $KIR^+$ T 세포가 관여하는 세포성 면역 반응을 숙주에게 이로운 방향으로 조절할 수 있는 항 암 요법 및 면역 요법의 개발에 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

# 참 고 문 헌


1. Raulet DH, Held W. Natural killer cell receptors: the offs and ons of NK cell recognition. Cell 1995;82:697-700.

2. Phillips JH, Gumperz JE, Parham P, Lanier LL. Superantigen-dependant, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes. Science 1995;268:403-11.

3. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. Immunity 1997;7:739-51.

4. Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. Nature 1998;391:703-07.

5. Mingari MC, Vitale C, Cambiaggi A, Schiavetti F, Melioli G, Ferrini S, et al. Cytolytic T-lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity: expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production. Int Immunol 1995;7:697-703.

6. D'Andrea A, Chang C, Phillips JH, Lanier LL. Regulation of T cell lymphokine production by killer cell inhibitory receptor recognition of self HLA class I alleles. J Exp Med 1996;184:789-94.

7. Mullbacher A, Flynn K. Aspects of cytotoxic T cell memory. Immunol Rev 1996;150:113-27.

8. Mingari MC, Schiavetti F, Ponte M, Vitale C, Maggi E, Romagnani S, et al. Human $CD8^+$ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent

oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:12433-38.

9. Gumperz JE, Valiante NM, Parham P, Lanier LL, Tyan D. Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. J Exp Med 1996;183:1817-27.

10. Navarro F, Llano M, Bellon T, Colonna M, Geraghty DE, Lopez-Botet M. The ILT2 (LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. Eur J Immunol 1999;29:277-83.

11. Aramburu J, Balboa MA, Ramìrez A, Silva A, Acevedo F, Sanchez-Madrid F, et al. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor-/+ lymphocytes. Inhibition of the IL-2 dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. J Immunol 1990;144:3228-47.

12. Halary F, Peyrat MA, Champagne E, Lopez-Botet M, Moretta A, Moretta L, et al. Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. Eur J Immunol 1997;27:2812-21.

13. Mingari MC, Ponte M, Bertone S, Schiavetti F, Vitale C, Bellomo R, et al. HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:1172-7.

14. Andre P, Brunet C, Guia S, Gallais H, Sampol J, Vivier E, et al. Differential regulation of killer cell Ig-like receptors and CD94 lectin-like dimers on NK and T lymphocytes from HIV-1-infected individuals. Eur J Immunol 1999;29:1076-85.

15. Ferrini S, Cambiaggi A, Meazza R, Sforzini S, Marciano S, Mingari MC, et al. T cell

clones expressing the natural killer cell-related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotypic properties and p58 function. Eur J Immunol 1994;24:2294-8.

16. Battistini L, Borsellino G, Sawicki G, Poccia F, Salvetti M, Ristori G, et al. Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood T cells expressing NK cell receptors. J Immunol 1997;159:3723-30.

17. Bakker AB, Phillips JH, Figdor CG, Lanier LL. Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, T cells and antigen-specific CTL. J Immunol 1998;160:5239-45.

18. Lanier LL, Gumperz JE, Parham P, Melero I, Lopez-Botet M, Phillips JH. The NKB1 and HP-3E4 NK cell receptors are structurally distinct glycoproteins and independently recognize polymorphic HLA-B and HLA-C molecules. J Immunol 1995;154:3320-7.

19. Ikeda H, Lethé B, Lehmann F, Van Baren N, Baurain JF, De Smet C, et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. Immunity 1997;6:199-208.

20. Cambiaggi A, Darche S, Guia S, Kourilsky P, Abastado JP, Vivier E. Modulation of T-cell functions in KIR2DL3 (CD158b) transgenic mice. Blood 1999;94:2396-402.

21. Ugolini S, Vivier E. Regulation of T cell function by NK cell receptors for classical MHC class I molecules. Curr Opin Immunol 2000;12:295-300.

22. Ugolini S, Arpin C, Anfossi N, Walzer T, Cambiaggi A, Forster R, et al. Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory-phenotype $CD8^+$ T cells. Nat Immunol 2001;2:430-35.

23. Hideo N, Natsue Y, Masafumi T. Fas-independent apoptosis of T cells via killer cell inhibitory receptors. Int Immunol 1997;10: 85-90.

24. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of

immune responses [see comments]. Immunol Today 1995;16:569-74

25. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeeverri F, et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/FasL interactions mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. Nature 1995;373:441-4.

26. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T cell suicide mediated by APO-1 (Fas/CD95). Nature 1995;373:438-41.

27. Su MW, Walden PR, Eisen HN, Golan DE. Cognate peptide-induced destruction of $CD8^+$ cytotoxic T lymphocytes is due to fratricide. J Immunol 1993;151:658-67.

28. Norian LA, Latinis KM, Koretzky GA. A newly identified response element in the CD95 ligand promoter contributes to optimal inducibility in activated T lymphocytes. J Immunol 1998;161:1078-87

29. Latinis KM, Carr LL, Peterson EJ, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA. Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. J Immunol 1997;158:4602-11

30. Yahata T, Abe N, Yahata O, Ohmi Y, Ohta A,Iwakabe K et al. The essential role of phorbol ester-sensitive protein kinase C isoforms in activation-induced cell death of Th1 cells. Eur. J. Immunol. 1999;29:727-732

31. Baier G, Telford D, Giampa L, Coggeshall KM, Baier-Bitterlich G, Isakov N, et al. Molecular cloning and characterization of PKC θ, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cell. J Biol Chem 1993;268:4997-5004.

32. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 1990;250:1253-56.

33. Villalba M, Kasibhatla S, Genestier L, Mahboubi A, Green DR, Altman A. Protein kinase

C theta cooperates with calcineurin to induce Fas ligand expression during activation-induced T cell death. J Immunol 1999;163:5813-9.

34. Monks CR, Kupfer H, Tamir I, Barlow A, Kupfer A. Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. Nature 1997;385:83-6.

35. Bertolotto C, Maulon L, Filippa N, Baier G, Auberger P. Protein kinase C theta and epsilon promote T-cell survival by a rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD. J Biol Chem 2000;275:37246-50.

36. Villalba M, Bushway P, Altman A. Protein kinase c-theta mediates a selective T cell survival signal via phosphorylation of bad. J Immunol 2001;166:5955-63.

37. Wu J, Katzav S, Weiss A. A functional T-cell receptor signaling pathway is required for $p95^{vav}$ activity. Mol Cell Biol 1995;15:4337-46.

38. Audubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. Seletion of transfected mammalian cells. Current protocol in Molecular Biology, Massachusetts: John Wiley & Sons; 1993;1:P.9.5.1-9.5.19

39. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. J Immunol Methods 1993;159:197-207.

40. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin-V. J Immunol Methods 1995;184:39-51.

41. Weiss A, Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. Cell 1994;76:263-74.

42. Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Gamen S, Monleón I, Lasierra P, Larrad L, et al. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. J Immunol 1999;163:1274-81.

43. D'Andrea A, Chang C, Franz-Bacon K, McClanahan T, Phillips JH, Lanier LL. Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. J Immunol 1995;155:2306-10.

44. Russell JH. Activation-induced cell death of mature T cells in the regulation of immune response. Curr Opin Immunol 1995;7:382-8.

45. Young NT, Uhrberg M, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. Differential expression of leukocyte receptor complex-encoded Ig-like receptors correlates with the transition from effector to memory CTL. J Immunol 2001;166: 3933-41.

46. Lowin-Kropf B, Held W. Positive impact of inhibitory Ly49 receptor-MHC class I interaction on NK cell development. J Immunol 2000;165:91-5.

47. Villunger A, Ghaffari-Tabrizi N, Tinhofer I, Krumbock N, Bauer B, Schneider T, et al. Synergistic action of protein kinase C θ and calcineurin is sufficient for Fas ligand expression and induction of a crmA-sensitive apoptosis pathway in Jurkat T cells. Eur J Immunol 1999;29:3549-61.

**Abstract**

# Identification of proteins involved in the Activation-Induced Cell Death (AICD) Inhibition Mediated by Inhibitory Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) in Jurkat T cells.

**Mi Jung Chang**

***Brain Korea 21 Project for Medical Sciences***

***The Graduate School, Yonsei University***

**( Directed by Professor Jongsun Kim )**

Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) are expressed on NK cells and some $CD8^+$ T cells, and recognize polymorphic class I MHC molecules on target cells. $CD8^+$ T cells expressing KIRs exhibit the memory phenotype. Recent studies with KIR transgenic mice have shown that the engagement of KIRs selectively drives the *in vivo* accumulation of memory-phenotype $CD8^+$ T cells, and that KIR might play an important role in the survival of memory-phenotype $CD8^+$ T cells by protecting them from activation-induced cell death (AICD). However, molecular mechanism of the AICD inhibition mediated by KIR has not been revealed yet. To better understand the AICD inhibition mediated by KIR in T cells, a series of CD8-

KIR fusion constructs were stably transfected into Jurkat T cells and AICD of Jurkat transfectants were induced by phytohemagglutin (PHA) or PMA/ionomycin treatment. It was found that expression of KIR significantly inhibited the AICD by inhibiting the FasL expression in Jurkat T cells upon activation. It was also found that the membrane-proximal region (~20 amino acids) of KIR played a critical role in the AICD inhibition. Interestingly, the KIR-mediated AICD inhibition appeared to be accomplished by recruitment of protein kinase C to the membrane-proximal region of KIR. These results suggest that the sequestration and/or inactivation of PKC by the membrane-proximal region of KIR renders the activated T cells less sensitive to AICD.

**Key words : Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor, Activation induced cell death, Jurkat T cell, Protein kinase C**