Jurkat T 백혈병 세포주에서 Protein Kinase C에 의한 Inhibitory Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) 표현 조절 기전의 규명

연세대학교 대학원
의과학 사업단
김 은 주

Jurkat T 백혈병 세포주에서 Protein Kinase C에 의한 Inhibitory Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) 표현 조절 기전의 규명

지도 김 종 선 부교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 은 주

김은주의 석사 학위 논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

차 례

국 문 요 약 7

Ⅰ. 서 론 10

Ⅱ. 재료 및 방법 17

1. 세포 배양 및 시약 17

2. KIR3DL1 표현 플라즈미드의 제조와 이를 표현하는 세포 클론의 확립 .18

3. Jurkat T 세포의 자극 19

4. 유세포 분석 20

5. Western blotting 20

6. 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR) 21

7. 면역침전 (immunoprecipitation) 22

8. PKC의 효소 활성 측정 23

9. 재조합 KIR의 세포 내 단백의 *In vitro* 인산화 24

Ⅲ. 결 과 25

1. CD8-KIR 융합 단백질들을 안정하게 표현하는 Jurkat T 세포주의 확립 ...25

2. Jurkat T 세포에서 PMA에 의한 KIR 표현 증가 27

3. Jurkat T 세포에서 항 CD3 항체에 의한 KIR 표현 증가.....30
4. 각종 CD8-KIR 융합 단백질들을 표현하는 Jurkat T 세포주에서 PMA에 의한 KIR 표현 양상.....31
5. PKC의 저해제 처리에 의한 KIR 세포 표면 표현 양상 변화.....33
6. Conventional PKC와 novel PKC에 의한 Jurkat T 세포에서 KIR의 표현 조절 차이.....36
7. KIR cytoplasmic tail을 인산화시키는 PKCα, PKCδ.....39
8. 지속적인 PMA 처리에 의한 PKCα와 PKCδ의 양상 변화.....41
9. Proteasome 저해제와 okadaic acid 처리에 의한 KIR 표현 감소.....43

Ⅳ. 고 찰 45

Ⅴ. 결 론 51

참 고 문 헌 54

Abstract.....62

그 림 차 례

그림 1. CD8-KIR 융합 단백질을 표현하는 Jurkat T 세포.....20

그림 2. Jurkat T 세포에서 지속적인 PMA 처리에 의한 KIR3DL1 표현 증가.....22

그림 3. Jurkat T 세포에서 PMA 처리에 의한 KIR 표현 증가.....23

그림 4. 항 CD3 항체에 의한 TCR cross-linking이 KIR 표현에 미치는 영향.....24

그림 5. 각종 CD8-KIR 융합 단백질을 표현하는 Jurkat T 세포에서 PMA 자극에 의한 KIR 표현 양상.....26

그림 6. PKC 저해제 처리에 의한 KIR의 표현 양상 변화.....29

그림 7. PKC 저해제 처리에 의한 KIR의 표면 표현과 전체 단백질 양의 변화 31

그림 8. 시간에 따른 PKC 저해제 처리에 의한 KIR의 세포 표면 표현과 전체 단백질 양의 변화.....32

그림 9. PKCα, PKCδ에 의한 KIR cytoplasmic tail의 인산화.....34

그림 10. 지속적인 PMA 처리에 의한 PKCα의 감소.....36

그림 11. Proteasome 저해제와 okadaic acid 처리에 따른 KIR 표현 양상 변화 38

국 문 요 약

Jurkat T 백혈병 세포주에서 Protein Kinase C에 의한 Inhibitory Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) 표현 조절 기전의 규명

Human T cell에서 표현하는 Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR)는 $CD8^+$ T 세포 중에 활성화된 세포나 기억 세포에 주로 표현되어 있다. 그러나 T 세포에서 KIR의 구체적인 기능과 이의 표현 정도를 결정하는 기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않고 있다. 최근의 연구 결과에 의하면, T 세포에서 표현되고 있는 KIR 역시 Natural Killer (NK) 세포에서와 유사하게 T 세포의 살상 능력을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 KIR의 표현 기전에 대한 최근의 연구 결과에 의하면, TCR를 통한 세포 활성화 과정 중에 이의 세포 표면 표현이 증가하는 반면 KIR의 cross-linking에 의해 그의 세포 표면의 표현이 감소한다는 보고가 있다. 이는 평상시 정상 세포에서 표현하는 MHC class Ⅰ에 KIR가 결합함으로써 T 세포의 기능을 억제하지 않을 정도로 KIR의 표현 정도가 감소해 있다가, 그 T 세포가 제대로 된 기능을 수행하는 즉, T 세포의 활성

화 신호가 오면 과활성화 되는 것을 억제하기 위해서 KIR의 표현이 증가할 것이라는 논리로 T 세포에서의 KIR의 기능과 그의 조절 기전을 설명할 수 있다.

KIR^+ T 세포가 인체 면역 조절 기전에 중요 기능을 수행할 것이라는 가능성과 중요성이 크게 부각됨에 따라 KIR의 표현 조절 기전을 구체적으로 규명해볼 필요가 있다. 흥미롭게도 T 세포의 여러 수용체들 (CD3γ, CD4/8, CTLA-4)의 down-regulation에 Protein Kinase C (PKC)가 관여한다고 알려져 있는데 이와 유사하게 KIR의 internalization에도 PKC가 관여할 가능성에 대해 생각할 수 있다.

본 연구에서는 KIR의 표현을 조절하는 중요 분자와 이러한 효과를 가지도록 하는 KIR의 중요 부위들을 제시하여 KIR가 어떠한 기전으로 조절되는지를 규명하고자 하였다. 실험 결과 KIR 표현 Jurkat T 세포는 대조군에 비해, PMA에 의한 자극으로 KIR의 표현이 현저하게 증가하였으며, 이는 PMA에 의해 활성화되는 PKC가 KIR의 표현에 영향을 미치는 것을 시사하는 결과이다. 실제로 CD8α와 KIR cytoplasmic tail의 융합 단백질을 표현하는 Jurkat T 세포주를 이용한 실험 결과 KIR cytoplasmic tail의 두 번째 PKC 결합 부위가 KIR의 표현을 조절할 가능성이 있음을 알아내었다. 또한 *In*

vitro kinase assay로 PKC가 KIR cytoplasmic tail을 인산화시킴을 확인하였다. 마지막으로 conventional PKC isoform과 novel PKC isoform 저해제를 처리하였을 때 KIR 표현이 다른 양상을 보였으며, PKCα와 PKCδ를 선택하여 PMA 처리 후 전체 단백질 양과 활성을 확인해본 결과 PKCα의 전체 단백질 양과 활성은 점차 감소하였고 반면 PKCδ의 경우 전체 단백질 양과 활성은 감소하지 않았다. 이는 PKCα와 PKCδ가 서로 다른 시점 혹은 서로 다른 부위에 서로 다른 기전으로 작용하여 KIR의 세포 외 표현을 조절함을 시사하는 결과이다. 예를 들면 PKCα는 KIR의 표현을 감소시키는 방향, 즉 degradation에 관여할 가능성, PKCδ는 KIR의 표현을 증가시키는 방향, 즉 trafficking에 관여할 가능성을 생각할 수 있다.

본 연구 결과를 통해, Jurkat T 세포주에서 KIR의 표현 기전을 이해하는데 도움을 주었으며, 앞으로 PKC가 KIR의 표현을 조절하는 기전과 여기에 관여하는 단백들에 대한 보다 구체적인 연구가 필요하다.

핵심 되는 말: killer cell Ig-like receptor, Jurkat T 세포, protein kinase C, protein expression

Jurkat T 백혈병 세포주에서 Protein Kinase C에 의한 Inhibitory Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) 표현 조절 기전의 규명

< 지도교수 **김 종 선**>

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 은 주

Ⅰ. 서 론

최근의 연구 결과에 의해, 자연살 (Natural killer; NK) 세포와 일부 T 세포에 존재하는 많은 수의 Class I 주요 조직 적합체 (Major histocompatibility complex; MHC) 특이 억제성 수용체 (inhibitory NK cell receptor; Inhibitory NKR)가 밝혀졌는데, T 세포 수용체 (T cell receptor; TCR)와 달리 이 수용체는 비교적

제한적인 다양성을 보이며, 활성화 신호가 아닌 억제 신호를 전달한다[1-3]. 이 수용체는 NK 세포에서 처음으로 밝혀졌는데, NK 세포가 정상 세포는 공격하지 않고, 종양 세포나 바이러스가 감염된 세포만을 선택적으로 살상하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다[4]. NK 세포가 정상과 비정상 세포를 구별할 수 있는 능력은 억제성 수용체와 정상 세포에 존재하는 MHC 분자간의 반응에 의해 좌우되는데, 이러한 반응은 정상 세포에서 NK 세포의 세포 독성능을 억제하고, MHC 분자의 표현이 부족한 경우인 바이러스 감염 세포나 종양 세포에서는 NK 세포에 의한 세포 독성에 민감하도록 작용한다[5].

인간에서 알려진 MHC Class I 특이 억제성 수용체, 즉 Inhibitory NKR에는 두 가지 서로 다른 분자 군이 알려져 있는데, 첫째가 Immunoglobulin (Ig) superfamily에 속하는 군으로서 세포 외 부위에 두 개 또는 세 개의 Ig-like domain을 가지며, 각각 특정 MHC 분자를 인지한다[5]. 이들 중에서 p58 KIR (Killer cell Ig-like receptor)는 HLA-C를 인식하며 p70 KIR는 HLA-B를, p140 KIR는 일부 HLA-A를 인식한다. 두 번째 군은 백서의 MHC class I 특이 수용체인 Ly49A와 유사한 구조를 가지고 제이형 막단백에 속하는 C-type lectin family군으로, CD94가 있으며 NKG2A와 공유 결합으로 연결되어 있는데[6],

최근의 연구 결과에 의하면, CD94/NKG2A의 특이 ligand는 비정형 HLA class I 분자인 HLA-E임이 밝혀졌다[7,8].

인간의 KIR, CD94/NKG2A 그리고 백서의 Ly49 분자들은 구조적 상이성에도 불구하고 동일한 기전에 의해 NK 세포와 T 세포의 활성을 억제하는데, 이는 이들 분자들의 cytoplasmic domain내에 ITIM (Immune-receptor tyrosine-based inhibition motif) (I/VxYxxL/V)이 공통적으로 존재하기 때문에 가능하다. ITIM의 tyrosine기가 인산화되면 SHP-1이 결합하게 되어 억제기능을 수행한다고 생각되나, 자세한 일련의 생화학적 과정은 아직 일부만 밝혀진 상태이다[9-14]. KIR, Ly49 그리고 CD94/NKG2A 수용체는 세포 독성능의 억제 작용뿐 아니라 T 세포와 NK 세포의 cytokine 생성도 억제하는 것으로 밝혀졌다[15-17]. 그리고 KIR의 cytoplasmic tail이 인산화되면 PI3-kinase가 결합하여 antiapoptotic protein을 활성화시킴으로써 T 세포와 NK 세포의 survival에도 영향을 미친다는 최근의 연구 보고가 있다[18].

지금까지 알려진 Class I MHC 특이 억제성 수용체들은 일부 T 세포에서도 표현되며, 이들 T 세포는 주로 $CD8^+$ subset이다. KIR^+ T 세포에 표현되는 marker들을 분석한 결과, CD28은 표현되지 않으며, CD18, CD29, CD57 그리고

CD45RO의 표현이 높은 것으로 알려져 있다. 이러한 KIR^+ T 세포의 특성은 memory T 세포의 형질을 전형적으로 보여주는데, KIR^+ T 세포가 흉선이나 제대혈액에서는 발견되지 않는다는 점과 일치하며 이들 T 세포가 *in vivo* 활성화 과정을 겪었음을 말해준다[19].

또한 정상적인 공여자의 KIR^+ T 세포들은 한가지 또는 두 가지 만의 TCR Vβ쇄를 가지며, 각각의 Vβ쇄는 동일한 gene-rearrangement를 보이는데, 이는 이들 T 세포가 oligoclonal 또는 monoclonal expansion한 것으로 보인다. 흥미롭게도 이들 KIR^+ T 세포가 자가 항원에 대한 면역 관용과 항종양 효과를 수행할 가능성을 제시하는 연구 결과가 최근에 보고되었다. Albi등은[20] HLA class I-mismatched bone marrow transplantation (BMT)를 시행한 환자가운데서 graft-versus-host disease (GVHD)를 보이지 않고 면역 억제제를 투여하지 않은 환자의 말초 혈액에서 KIR^+ T 세포가 점진적으로 증가하며, 이들 KIR^+ T 세포는 graft-versus-leukemia (GVL) 효과를 보임을 보고하였다. 그리고 autoreactive KIR^+ T 세포에서 자가 면역 반응의 억제와 동시에 cross-reactive foreign antigen에 대한 면역 반응을 효과적으로 수행한다는 연구 보고도 있다[21]. 바이러스 질환에서는 HIV 감염 환자에서 KIR^+ T 세포가 높은 빈도로 관찰되며, KIR^+ T 세포는 KIR

분자에 HIV 항원을 표현하는 자기 lymphoblastoid cell에 대해 반응하지 않고 단클론 항체로 KIR 분자를 차단하였을 때 억제 효과가 소실됨을 보았는데 이는 이들 T 세포가 anergy를 보이는 것이 아니라 KIR/MHC 반응에 의해 억제되고 있음을 보여 준다[22]. 그리고 T 세포에서 KIR 분자의 기능이 단순하지 않고 다른 기능을 수행할 가능성이 다른 연구자들에 의해 제시되고 있으며[23,24], KIR 표현의 조절을 통해 allograft rejection 반응의 조절이나 GVHD의 억제에 이용하고자 하는 연구가 진행되고 있다[25]. 또한 T 세포 lymphoproliferative disease와 melanoma, renal carcinoma와 같은 종양 조직 주위의 림프구군, 그리고 HIV-1 감염 초기에 증가하는 clonally activated T 세포에서 KIR 표현의 증가가 보고되었다[3,26-28]. 이들 보고는 인체 내 종양 발생이나 바이러스 감염 또는 골수 이식 시 이식 세포가 생착되는 과정에서, KIR^+ T 세포가 면역 조절자로서의 중요한 역할을 수행할 가능성을 제시하고 있다.

Hideo등은 KIR를 통한 신호 전달이 activation induced cell death (AICD)에 관여할 수 있음을 시사하는 연구 결과를 발표하였는데[29], 이들의 연구 논문에 의하면 NK 세포와 일부의 세포 독성 T 세포에서 표현되며 억제 신호를 전달하는 KIR 분자가 지금까지 알려진 것과 다른 신호 전달 과정에도

관여하며, 그 과정은 FasL와 TRAIL을 매개로 하는 T 세포 AICD와 연관되어 있음을 밝히고 있다. 최근에는 이러한 신호 전달 경로의 중간 단계에 작용하는 PKC에 대한 많은 연구 보고가 있으며[30-36], 특히 KIR에 의하여 FasL 표현을 저해하여 AICD 억제 효과를 가져오며, 여기에 PKC가 관여할 것이라는 최근 연구 보고가 있다[37].

KIR^+ T 세포가 인체 면역 조절 기전에 있어서 중요 기능을 수행할 것이라는 가능성과 중요성이 부각되자, T 세포에서 KIR 분자의 표현의 인위적인 유도나, T 세포 분화 과정에서의 KIR 표현이 시작되고 조절되는 기전에 관해 많은 연구가 이루어 졌다. 예전의 연구 결과를 보면, IL-15이나 TGF-β, 그리고 IL-10 등이 CD94/NKG2A의 표현 정도를 조절할 것이라고 보고되어 있다[3,38]. 또한 T 세포에서 KIR 표현의 조절은 TCR rearrangement가 끝난 후에 결정되고[39], NK 세포에서 KIR를 표현하는 클론은 DNA methylation에 의해 결정된다는 내용도 보고된 바 있다[40]. 최근의 연구 결과에 의하면, TCR를 통한 세포 활성화 과정 중에 이의 세포 표면 표현이 증가하는 반면, KIR의 cross-linking에 의해 그의 세포 표면의 표현이 감소한다는 보고가 있다[41]. 이는 평상시 정상 세포에서 표현하는 MHC class Ⅰ에 KIR가 결합함으로써 T 세포의

기능을 억제하지 않을 정도로 KIR의 표현 정도가 감소해 있다가, 그 T 세포가 제대로 된 기능을 수행하는 즉, T 세포의 활성화 신호가 오면 과활성화 되는 것을 억제하기 위해서 KIR의 표현이 증가할 것이다라는 논리로 T 세포에서의 KIR의 기능과 그의 조절 기전을 설명할 수 있다. 하지만 실제로 KIR의 표현이 구체적으로 어떠한 기전에 의해서 이루어지는지에 대해서는 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 KIR^+ T 세포가 인체 면역 조절 기전에 중요 기능을 수행할 것이라는 가능성과 중요성이 크게 부각됨에 따라 KIR의 표현 조절 기전을 좀 더 구체적으로 알아보고자 하였다. 흥미롭게도 T 세포의 여러 수용체들 (CD3γ, CD4/8, CTLA-4)의 down-regulation에 PKC가 관여한다고[42-45] 알려져 있는데 이와 유사하게 KIR의 internalization에도 PKC가 관여할 가능성을 우선적으로 규명해 보고자 하였다. 또한 KIR의 표현을 조절하는 중요 분자와 이러한 효과를 가지도록 하는 KIR의 중요 부위들을 제시하여 KIR가 어떠한 기전으로 조절되는지를 분자 레벨에서 규명하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 세포 배양 및 시약

인간 T 세포 백혈병 세포인 Jurkat 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였으며 10% 열처리 우태아 혈청과 2 mM의 L-glutamine, 100 U/ml의 penicillin 그리고 100 μg/ml streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지에서 배양하여 실험에 사용하였다. 항 CD8 단클론 항체와 항 CD3 단클론 항체는 각각 OKT8 그리고 OKT3 하이브리도마 세포주로부터 protein A-Sepharose column을 이용하여 분리하였다. 항 KIR3DL1 단클론 항체 (DX9)는 BD PharMingen (San Diego, CA, USA)에서, 백서 기원의 항 CD8 단클론 항체 (H-169)는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서, 토끼의 항 CD8 단클론 항체는 Southern Biotechnology (Birmingham, AL, USA)에서, PKCα, PKCδ 단클론 항체는 Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA)에서 구입하였다. 염소의 항백서 IgG 항체 (goat anti-mouse IgG Ab; GAM), phytohemagglutinin (PHA), phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), 그리고 protein A는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Ionomycin, Gö6976, PD98059, Rottlerin, Lactacystin,

MG132, Okadaic acid, Cycloheximide, 그리고 Sodium orthovanadate는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

2. KIR3DL1 표현 플라즈미드의 제조와 이를 표현하는 세포 클론의 확립

pcDNA-NKB1은 세포 외 부위에 3개의 Ig-like domains을 갖는 Ig superfamily인 KIR3DL1 (p70 inhibitory killer cell Ig-like receptor, NKB1)의 전체 protein-coding region을 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)에 의하여 pMET7-NKB1로부터[46] 증폭시킨 후 pcDNA3.1 (Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA)의 EcoRI/BamHI sites에 삽입하여 제작하였다. pMET7은 simian virus 40 (SV40) early promoter와 R segment, human T-cell leukemia virus type 1의 U5 sequence (R-U5')로 구성되어 효율적인 mammalian cDNA 표현 system인 SR alpha 표현 벡터의 파생 벡터이다. pcDNA-CD8T는 CD8α쇄의 세포 외 부위와 세포막 부위의 염기서열 (CD8T)을 pMV7F1.2-CD8 플라즈미드로부터[47] PCR로 증폭하고 pcDNA3.1의 XbaI/EcoRI 부위로 삽입하였다. pMV7F1.2-CD8 플라즈미드는 Rockefeller 대학교 박채규 박사로부터 받아 실험에 사용하였다. CD8α쇄의 세포 외 부위와 세포막 부위 그리고 KIR3DL1의 세포 내 부위의 일부 또는 전체를

포함하는 융합 단백질의 재조합 플라즈미드 (pCD8KIR, pCD8KIRΔI, pCD8KIRΔII, CD8KIRΔIII)의 세포 내 부위의 염기서열은 그림 1과 같으며 각각은 pMET7-NKB1로부터 PCR로 세포 내 부위를 전부 또는 일부만 증폭한 후, pCD8T 플라즈미드의 EcoRI/BamHI 부위에 삽입하였다. 각각의 플라즈미드 10 μg을 1 x 10^7개의 Jurkat 세포와 혼합한 후 electroporator (BRL) (Gaithersburg, MD, USA)에서 500 μF/300 V 조건하에 transfection 시켰다. 각각의 transfectant는 2주 동안 1 mg/ml의 neomycin (G418) (Duchefa) (Haarlem, Netherlands)을 함유하는 배지에서 배양하여, neomycin (G418)에 저항성을 보이는 클론들을 최소 3개 이상 선택하고 유세포 분석과 western blot으로 융합 단백의 세포 표면 표현과 단백질 발현을 확인하였다.

3. Jurkat T 세포의 자극

Jurkat T 세포는 5 x 10^5 cells/ml의 농도로 100 ng/ml 또는 500 ng/ml의 PMA로 처리하여 protein kinase C (PKC)를 활성화 시키거나, 5 μg/ml의 OKT3 mAb로 T 세포 수용체를 cross-linking하여 자극하였다. 직접적인 T 세포 수용체의 cross-linking을 유도하기 위하여 phosphate-buffered saline (PBS)에 녹인 protein A (1

μg/ml)를 4°C에서 overnight coating하고 OKT3 mAb (5 μg/ml)로 실온에서 4시간 동안 처리한 6-well cell culture plate에 Jurkat 클론 (5 x 10^5 cells/ml)을 분주한 후, 37℃ 세포배양기에서 배양하였다.

4. 유세포 분석

여러 가지 KIR3DL1 세포 내 부위의 일부 또는 전체를 표현하는 5 x 10^5 개의 Jurkat 클론 세포를 2% Bovine serum albumin (BSA)를 함유한 PBS에서 3 μg의 DX9 (KIR3DL1의 경우) 또는 OKT8 (CD8-KIR 융합 단백질의 경우)로 4°C에서 30분간 처리하고, 0.1% BSA 함유 PBS로 3회 세척한 후, FITC-conjugated Goat anti-mouse-IgG (Becton Dickinson Biosciences) (Lincoln Park, NJ, USA)로 염색하여, FACScan (Becton Dickinson Biosciences)로 형광 강도를 측정하고 결과는 Win-MDI 프로그램 (Joseph Trotter)으로 분석하였다.

5. Western blotting

2 x 10^7개의 Jurkat 세포를 용해용 완충용액 (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 15 μg/ml leupeptin, 2 mM NaF, and

2 mM $NaVO_4$)로 4℃에서 1시간 처리하고 50 μg의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel에서 전기 영동한 후, polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (Pierce) (Rockford, IL, USA)으로 전이시켰다. 단백질이 전이된 PVDF membrane은 3% BSA과 0.01% Tween 20를 함유한 PBS (PBST)로 4℃에서 12시간 처리한 후, 1% BSA 함유 PBST로 희석한 1차 항체와 Horse radish peroxide가 붙어 있는 2차 항체로 처리하고, Super Signal chemiluminiscence western blotting system (Pierce)을 이용하여, autoradiogrphy를 시행하여 X-ray film에 신호를 감광 시켰다.

6. 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction; RT - PCR)

5 x 10^6 개의 Jurkat 세포로부터 세포 내 총 RNA를 RNeasy mini kit (Qiagen) (Santa Clarita, CA, USA)를 사용하여 추출하였다. 이중 5 μg의 RNA를 3 μg의 random hexamer와 함께 reverse transcriptase buffer (50 mM Tris-Cl pH8.3, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 0.5 mM dNTP)에 희석한 후, 200 unit의 M-MLV 역전사효소를 첨가하고 총 50 μl의 부피로 42℃에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 2.5 μl의 cDNA를 template로 하여 4 μl의 1.25 mM dNTP, 1.25 U의 Tag

polymerase, 그리고 증폭하고자 하는 유전자에 합당한 primer 조합을 10 pmole 씩 첨가하고 thermocylcler 9600 (Perkin Elmer) (Branchburg, NJ, USA)에서 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 중합효소 연쇄반응에 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다. 393U17 (5'-CCACTTCgTgCCggtCT-3')과 808L20 (5'-CTCTgAgAAgg-gCgAgTgAT-3')은 CD8 분자와 KIR3DL1의 융합 plasmid에 의한 세포 내 mRNA 표현을 검출하기 위해 사용하였으며, HGPRT-S (5'-ggTCAggCAgTATAATC-CAAAg-3')와 HGPRT-AS (5'-gTCAATAggACTCCAgATgTTTC-3')는 PCR의 대조 반응으로써 hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) mRNA를 증폭한다. 중합효소 연쇄반응은 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분의 조건으로 25 주기를 시행하였으며, 반응 산물은 agarose gel에서 전기 영동으로 확인하였다.

7. 면역침전 (immunoprecipitation)

2 x 10^7 개의 Jurkat 세포를 1 ml의 용해용 완충용액 (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 15 μg/ml leupeptin, 2 mM NaF, and 2 mM $NaVO_4$)에 분주한 후 4℃에서 1시간 처리하였으며, 3,000 rpm에서

15분, 그리고 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 상층액을 -70°C 냉동고에 보관하며 실험에 사용하였다. 면역침전을 위해 세포 용해액을 protein A/G-Sepharose (Pharmacia Biotech) (Uppsala, Sweden)로 1시간 동안 preclearing하였으며 그 후 항 PKCα 단클론 항체 (Transduction Laboratories) (Lexington KY, USA)와 항 PKCδ 단클론 항체 (Transduction Laboratories)로 4°C에서 1시간 반응시킨 후, protein A/G-Sepharose를 첨가하고 4시간 더 반응시켰다. 면역침전물은 용해용 완충용액으로 6회 세척하고 적정양의 효소 희석액 (0.1 mg/ml BSA, 0.05 % Triton X-100)에 희석하여 -70°C 냉동고에 보관하였다.

8. PKC의 효소 활성 측정

PKC의 효소 활성 측정은 SigmaTECT PKC assay system (Promega) (Madison, WI, USA)을 사용하여 시행하였다. 5 x 10^6 Jurkat 세포로부터 면역침전한 PKCα와 PKCδ를 총 25 μl의 부피로 kinase buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 0.25 mM EGTA, 0.4 mM $CaCl_2$, 1 mg/ml BSA, 0.1 mM ATP)에서 0.5 μCi [γ-^{32}P] ATP의 존재하에, 100 μM의 biotinylated PKC-selective synthetic peptide (NH_2-AAKIQASF-RGHMARKK-COOH)와 25°C에서 15분간 반응시켰으며, 3000 x g에서 5분간

원심분리하였다. 각 sample로부터 얻은 상층액 (10 μl)을 SAM2R Biotin capture membrane에 떨어뜨리고 2 M NaCl로 두 번 세척하고 1% phosphoric acid를 함유한 2 M NaCl로 네 번 세척하고 liquid scintillation counting으로 β선을 측정하였다.

9. 재조합 KIR의 세포 내 단백의 *In vitro* 인산화

Jurkat 세포로부터 면역침전한 PKCα와 δ를 총 25 μl의 부피로, 3 μg 재조합 KIR의 세포 내 단백과[48,49] 0.5 μCi [γ-^{32}P] ATP의 존재하에 kinase buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 0.25 mM EGTA, 0.4 mM $CaCl_2$, 1 mg/ml BSA, 0.1 mM ATP)에서 30분간 반응시켰으며 10 μl의 6 x SDS sample buffer를 첨가하고 5분간 끓여 반응을 정지 시키고, 이중 20 μl를 15 % SDS-PAGE gel에서 전기 영동하고 autoradiography를 시행하였다.

Ⅲ. 결 과

1. CD8 - KIR 융합 단백질들을 안정하게 표현하는 Jurkat T 세포주의 확립

KIR3DL1을 영구적으로 표현하는 stable cell line 이외에도 CD8α의 세포외 부위와 세포막 부위, 그리고 KIR3DL1의 세포 내 부위를 융합한 DNA construct를 Jurkat T cell에 transfection하여 CD8KIR를 영구적으로 표현하는 stable cell line과 KIR3DL1의 cytoplasmic tail 전체 부위가 제거된 CD8T, KIR3DL1의 cytoplasmic tail 부위의 membrane-proximal 부위 중 20개의 아미노산이 제외된 CD8KIRΔI, KIR3DL1의 cytoplasmic tail 부위 중 2개의 ITIM motif가 제거되어 membrane-proximal 부위만이 남아 있는 CD8KIRΔII를 표현하는 cell line[37], 나아가 KIR의 cytoplasmic tail 부위 중 어느 부위가 KIR 표현 조절에 중요한 부위인가를 규명하기 위하여 KIR3DL1의 cytoplasmic tail 부위 중 membrane-distal 부위의 1개의 ITIM motif와 1개의 PKC substrate site가 제거된 CD8KIRΔIII를 안정하게 표현하는 Jurkat stable cell line을 만들어 실험에 사용하였다 (그림 1A). 이들 KIR 표현 세포주들을 유세포 분석으로 분석해본 결과, 세포의 KIR 표현에 각각 상당한 차이가 있는 것으로 나타났다 (그림 1B).

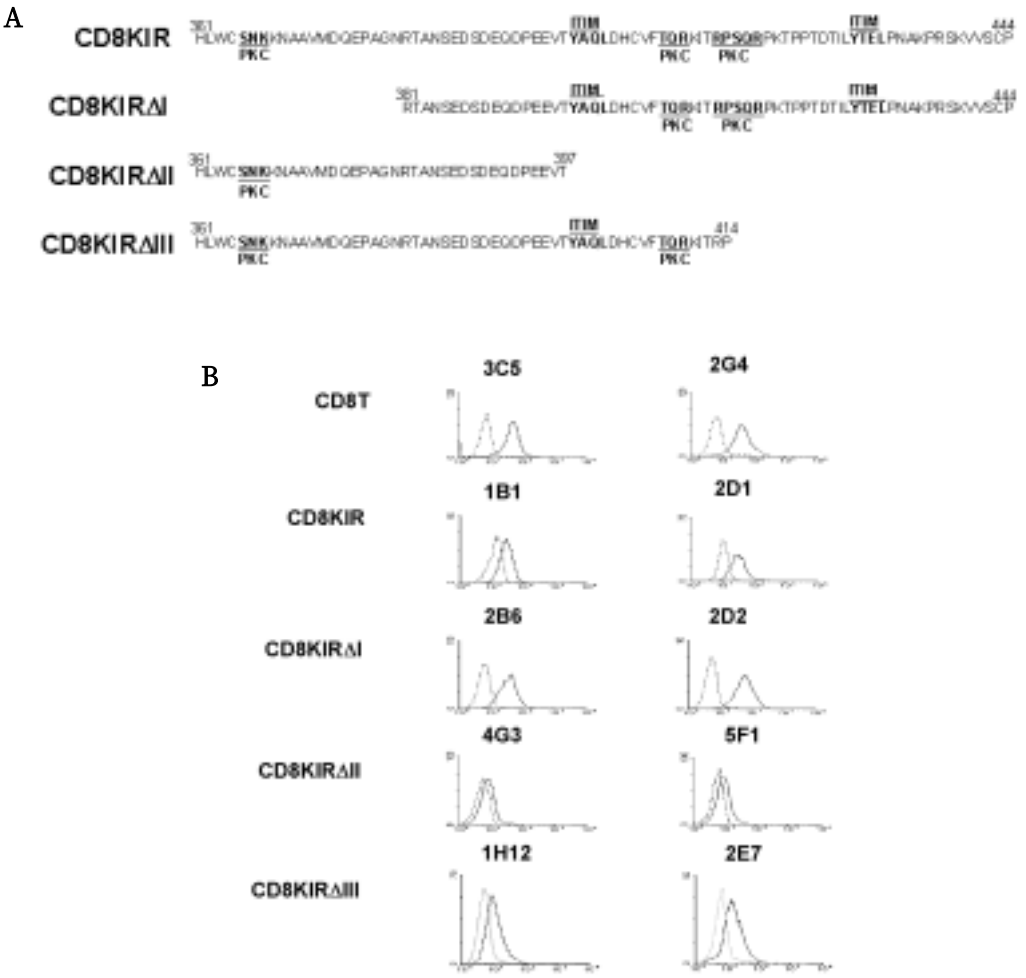

그림 1. CD8-KIR 융합 단백질을 표현하는 Jurkat T 세포. (A) CD8α쇄의 세포 외 부위와 세포막 부위, 그리고 KIR3DL1의 세포 내 부위의 전체 혹은 일부를 포함하는 플라즈미드의 세포 내 부위의 아미노산 서열. PKC 인산화 가능 부위는 밑 줄로, 그리고 ITIM motif는 위 줄로 표시하였다. (B) CD8-KIR 융합 construct를 transfection하여 neomycin (G418)으로 selection한 Jurkat clone들을 OKT8, FITC-GAM을 이용, FACS staining하여 융합 단백질의 표현 정도를 조사하였다. 점선은 FITC-GAM만 반응시킨 세포의 background fluorescence를 나타낸 것이다.

2. Jurkat T 세포에서 PMA에 의한 KIR 표현 증가

KIR3DL1과 각각의 CD8-KIR 융합 단백질들을 안정하게 표현하고 있는 Jurkat T 세포주들을 이용하여 T 세포에서 KIR 표현 조절에 미치는 PKC의 영향을 조사하였다. 이러한 연구는 T 세포의 여러 수용체들의 표현이 PKC에 영향을 받는다는 기존에 이미 발표된 연구에[42-45] 기초하여 KIR 표현에도 그러한 가능성을 생각하였고, 그렇다면 KIR의 어느 부위가 이러한 기능을 하는지를 규명하기 위해 고안되었다. PKC를 자극하기 위하여 KIR3DL1과 각종 CD8-KIR 융합 단백질들을 표현하는 Jurkat T 세포주에 PMA를 이용하였다. PMA는 보통 PKC의 activator로 사용한다. KIR3DL1를 표현하는 Jurkat T 세포주에 PMA를 overnight 처리하였을 때 KIR의 세포 표면 표현이 증가함을 확인하였다 (그림 2). 또한 CD8KIR 융합 단백질을 표현하는 Jurkat T 세포주와 대조군으로 CD8T 융합 단백질을 표현하는 Jurkat T 세포주에 PMA를 이용하여 시간별로 PKC에 자극을 주었을 때, CD8KIR를 표현하는 세포주에서 KIR의 세포 표면 표현 (그림 3A)과 전체 단백질 양이 현저히 증가함을 확인하였다 (그림 3B). 또한 protein synthesis inhibitor인 cycloheximide를 PMA와 함께 처리하였을 때 KIR의 세포 표면 표현이 증가하지 않음을 확인하였다 (그림 3C). 그러나 CD8KIR를

표현하는 세포주의 mRNA의 양은 변함이 없는 것으로 나타났다 (그림 3D). 실험에서처럼 인위적인 단백질 과발현 시스템을 사용하지 않은 실제 T 세포에서도 KIR mRNA양이 PMA 자극에 의해 영향을 받지 않는지는 아직 밝혀지지 않았다. 따라서 위의 결과는 적어도 KIR의 표현 조절이 post-translational 단계에서 조절됨을 보여주며, 본 실험 조건은 transcription level에서의 조절 기전을 배제한 상태에서 KIR의 표현 조절을 관찰할 수 있다는 장점이 있다.

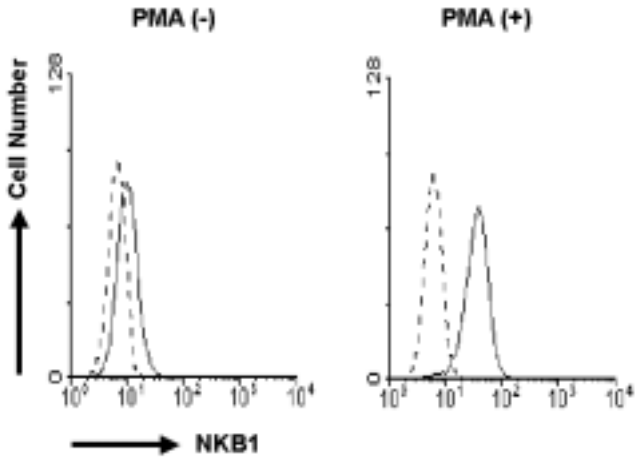

그림 2. Jurkat T 세포에서 지속적인 PMA 처리에 의한 KIR3DL1 표현 증가. KIR3DL1를 표현하는 Jurkat T 세포주에 100 ng/ml PMA를 overnight 처리한 후 NKB1과 FITC-GAM으로 염색하고 FACScan Flow Cytometry로 분석하여 KIR의 세포 표면 표현을 측정하였다.

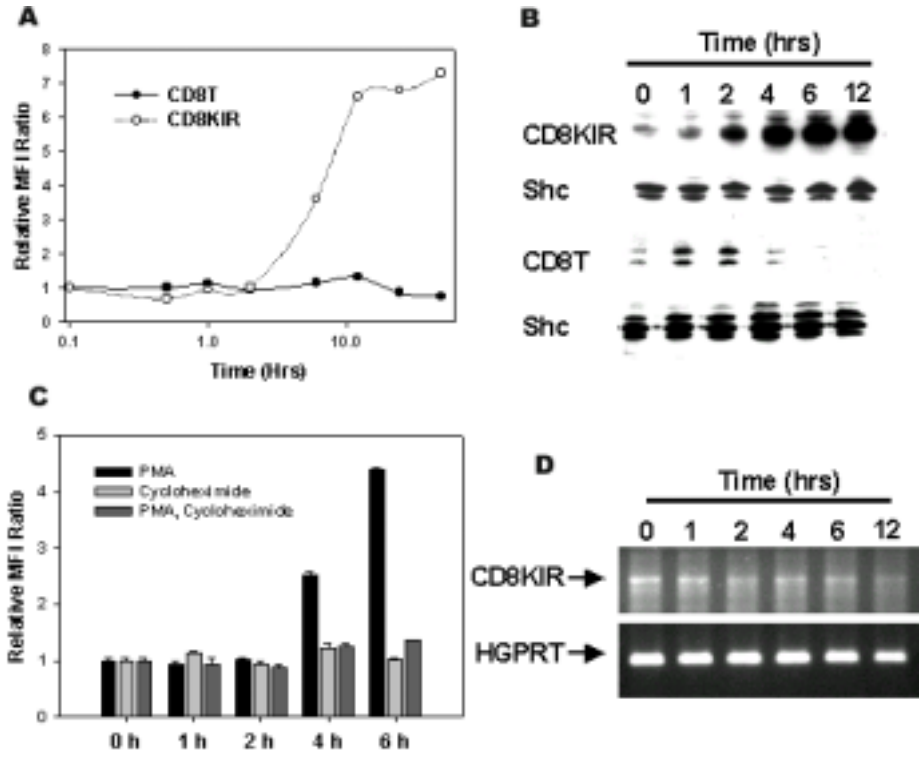

그림 3. **Jurkat T 세포에서 PMA 처리에 의한 KIR 표현 증가.** (A) PKC에 활성화 자극을 주기 위하여 100 ng/ml PMA로 시간별로 처리한 후 OKT8과 FITC-GAM으로 염색하였으며, 염색 즉시 FACScan Flow Cytometry로 분석하여 KIR의 세포 표면 표현을 측정하였다. (B) 100 ng/ml PMA로 시간별로 처리한 후 항 CD8 항체로 blotting하였다. 대조군으로 Shc을 사용하였다. (C) protein synthesis inhibitor인 cycloheximide 1 μg/ml 을 30분 전처리 하고 100 ng/ml PMA를 시간별로 처리한 후 KIR의 세포 표면 표현을 측정하였다. 각 값은 triplicate으로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표시하였다. (D) 100 ng/ml PMA로 시간별로 처리한 후 CD8KIR mRNA를 RT-PCR로 분석하였다. 대조군으로 HGPRT를 사용하였다.

3. Jurkat T 세포에서 항 CD3 항체에 의한 KIR 표현 증가

항 CD3 항체는 T 세포의 수용체와 cross-linking하여 T 세포의 활성화를 야기시킨다. CD8KIR 융합 단백질을 표현하는 Jurkat T 세포주와 대조군으로 CD8T 융합 단백질을 표현하는 Jurkat T 세포주에 항 CD3를 이용하여 시간별로 자극을 주었을 때, CD8KIR를 표현하는 세포주에서 KIR의 세포 표면 표현과 (그림 4A) 전체 단백질 양이 현저히 증가함을 확인하였다 (그림 4B). 이는 앞서 보고된 TCR를 통한 세포활성화 과정 중에 KIR의 세포 표면 표현이 증가한다는 내용과[22] 일치한다.

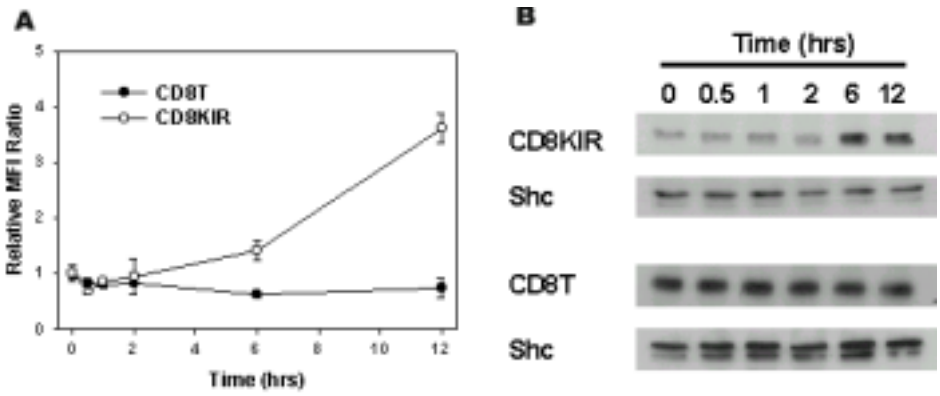

그림 4. 항 CD3 항체에 의한 TCR cross-linking이 KIR 표현에 미치는 영향. (A) 항 CD3 항체 5 μg/ml을 각 Jurkat clone에 시간별로 처리하고 KIR의 세포 표면 표현을 측정하였다. 각 값은 triplicate으로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표시하였다. (B) 항 CD3 항체 5 μg/ml을 각 Jurkat clone에 시간별로 처리하고 항 CD8 항체로 blotting을 시행하였다.

4. 각종 CD8-KIR 융합 단백질들을 표현하는 Jurkat T 세포주에서 PMA에 의한 KIR 표현 양상

각종 CD8-KIR 융합 단백질들을 표현하는 Jurkat T 세포주에 PMA를 overnight으로 처리하여 PKC에 자극을 주었을 때, CD8KIR를 표현하는 세포주에서 KIR의 세포 표면 표현이 현저히 증가하는 것으로 나타났다. 세포 표면 표현의 증가가 없는 CD8T를 표현하는 Jurkat T 세포주에 비하여 CD8KIR를 표현하는 세포주에서 5배 이상의 KIR 세포 표면 표현의 증가를 확인하였다. 또한, KIR deletion mutant들에서는 KIR의 cytoplasmic tail 부위의 membrane-proximal 부위의 20개의 아미노산이 제외된 CD8KIRΔI construct를 표현하는 Jurkat T 세포주에서 CD8KIR를 표현하는 세포주에서의 효과와 마찬가지로 KIR의 세포 표면 표현이 증가함을 확인하였고 membrane-distal 부위의 1개의 ITIM motif와 1개의 PKC substrate site가 제거된 CD8KIRΔIII construct를 표현하는 Jurkat T 세포주에서 KIR의 세포 표면 표현이 현저하게 증가함을 확인하였다. 이에 반해 2개의 ITIM motif가 제거되어 membrane-proximal 부위만이 남아 있는 CD8KIRΔII는 KIR의 세포 표면 표현 증가는 관찰되지 않았다. 이는 첫번째 ITIM motif와 인접해 있는 PKC substrate site

부위가 KIR의 표현 증가에 중요한 역할을 할 것이라는 것을 시사해 주고 있다 (그림 5).

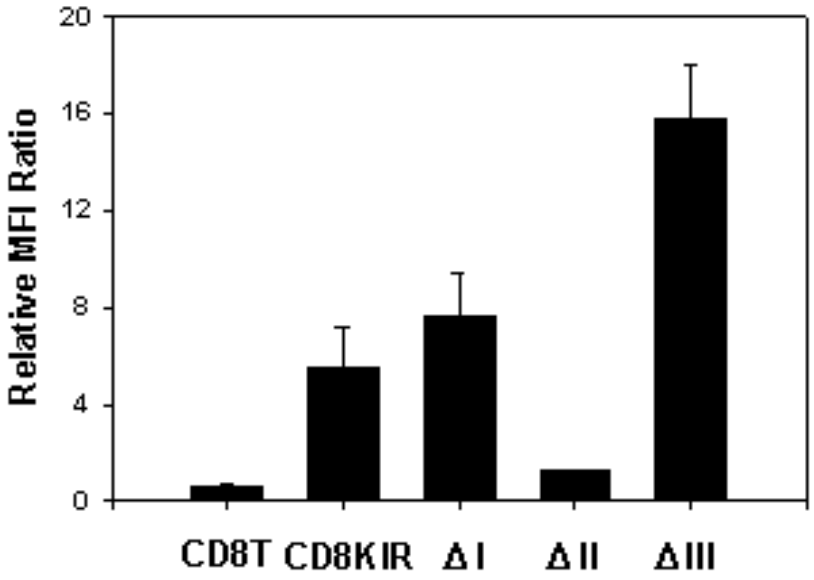

그림 5. 각종 CD8-KIR 융합 단백질을 표현하는 Jurkat T 세포에서 PMA 자극에 의한 KIR 표현 양상. CD8-KIR 융합 construct를 transfection하여 neomycin (G418)으로 selection한 Jurkat clone들에 PMA 100 ng/ml로 overnight 자극을 주고 세포 표면 표현을 측정하였다. 각 값은 triplicate으로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표시하였다.

5. PKC의 저해제 처리에 의한 KIR 세포 표면 표현 양상 변화

KIR를 안정하게 표현하는 Jurkat T 세포에 PMA를 처리하여 KIR의 표현이 증가한다는 결과는 KIR의 cytoplasmic tail를 통한 신호 전달 물질에 대한 탐색을 요구함과 동시에 PKC가 KIR의 세포 표면 표현의 조절에 연관되어 있음을 강하게 시사한다. 최근에는 이러한 신호 전달에 작용하는 PKC에 대한 많은 연구들이 보고되고 있다. PKC에는 여러 isoform들이 존재하는데, α, βⅠ, βⅡ, γ를 포함하는 conventional PKC isoform들은 Ca^{2+}-dependent하고, diacylglycerol에 의하여 활성화되며, PMA와 같은 phorbol ester에 의해서도 활성화되는 것으로 알려져 있다. 또한 γ, 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. 여러 가지 PKC isoform 중 KIR의 표현에 영향을 미치는 것이 어떤 것인지 알아보기 위해 각각 conventional PKC isoform에 대한 저해제인 Gö6976과 novel PKC isoform에 대한 저해제인 rottlerin을 농도별로 처리하였다. 결과 PMA에 의한 KIR 표현 증가가 두 가지 저해제, rottlerin, Gö6976에 의해 모두 감소함을 확인하였다 (그림 6A, B, C). 대조군으로 MAP kinase의 저해제인

PD98059를 농도별로 처리하여 PMA에 의한 KIR 표현 증가에 어떠한 저해 효과를 주지 않음을 확인하였고, 이는 PMA에 의한 자극이 PKC에만 한정되는 것을 보여준다 (그림 6D).

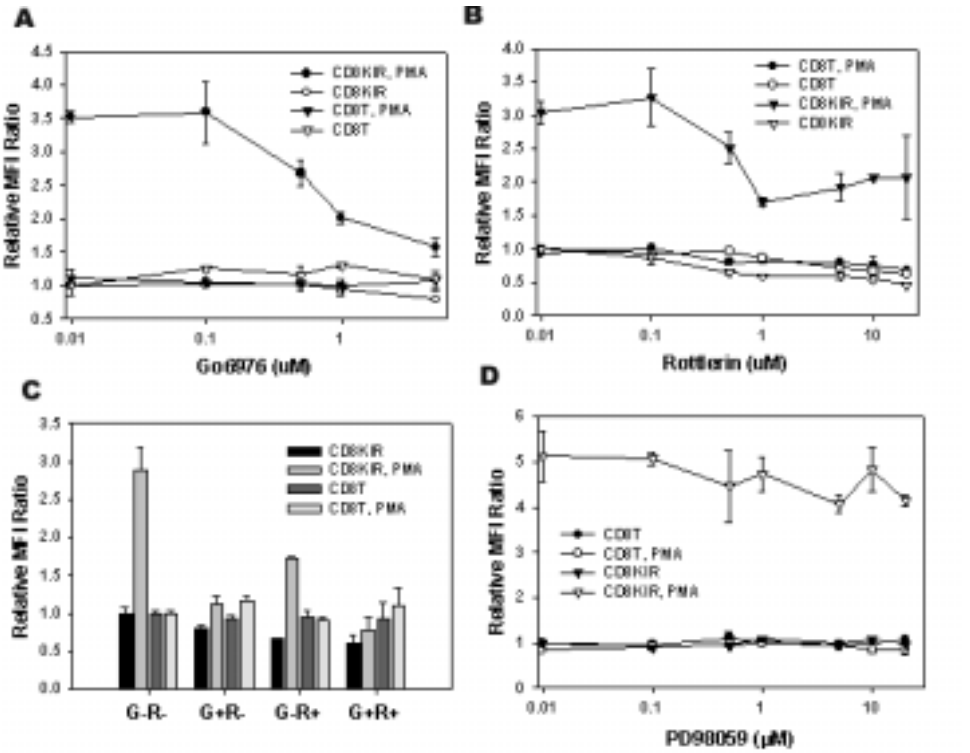

그림 6. **PKC 저해제 처리에 의한 KIR의 표현 양상 변화.** KIR 표현 조절이 PKC에 의한 것인지 알아보기 위하여, Jurkat transfectant들에 PKC의 저해제를 처리하였다. (A) conventional PKC isoform에 대한 저해제인 Gö6976을 농도별로 30분 전처리하고 100 ng/ml PMA를 처리하여 6시간 후, 세포 표면 표현을 측정하였다. 각 값은 triplicate으로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표시하였다. (B) novel PKC isoform에 대한 저해제인 rottlerin을 농도별로 30분 전처리하고 100 ng/ml PMA를 처리하여 6시간 후, 세포 표면 표현을 측정하였다. 각 값은 triplicate으로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표시하였다. (C) 1 μM Go6976, 1 μM rottlerin을 30분 전처리하고 100 ng/ml PMA를 6시간 동안 처리하여 세포 표면 표현을 측정하였다. 각 값은 triplicate으로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표시하였다. (D) 대조군으로 MAP kinase 저해제인 PD98059를 농도별로 처리하여 6시간 후, 세포 표면 표현을 측정하였다. 각 값은 triplicate으로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표시하였다.

6. Conventional PKC와 novel PKC에 의한 Jurkat T 세포에서 KIR의 표현 조절 차이

그림 5의 결과에서 KIR 세포 표면 표현이 conventional PKC와 novel PKC에 의해 영향을 받는 것을 확인하였고, 전체 단백질 양에는 어떠한 차이가 있는지 알아보고자 하였다. CD8KIR를 안정하게 표현하는 Jurkat T 세포에 PMA와 conventional PKC isoform에 대한 저해제인 Gö6976과 novel PKC isoform에 대한 저해제인 rottlerin을 overnight 처리하였다. Gö6976을 처리하였을 때 PMA에 의해 증가된 KIR의 세포 표면 표현과 전체 단백질 양이 감소함을 확인하였으나, 반면 rottlerin을 처리하여 novel PKC를 저해하였을 때 KIR의 세포 표면 표현은 감소하였으나 전체 단백질 양은 오히려 약간 증가하는 양상을 보였다 (그림 7).

또한 두 저해제와 PMA를 시간별로 처리하였을 때, Gö6976은 PMA에 의해 시간에 따라 증가하는 KIR의 세포 표면 표현과 전체 단백질 양을 모두 감소시켰으나, rottlerin을 처리하였을 때는 그림 6의 결과와 마찬가지로 전체 단백질 양에는 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 두 PKC isoform 모두 KIR의 표현에 영향을 미치나 각각 다른 기전으로 KIR의 표현을 조절하고

있음을 보여준다 (그림 8).

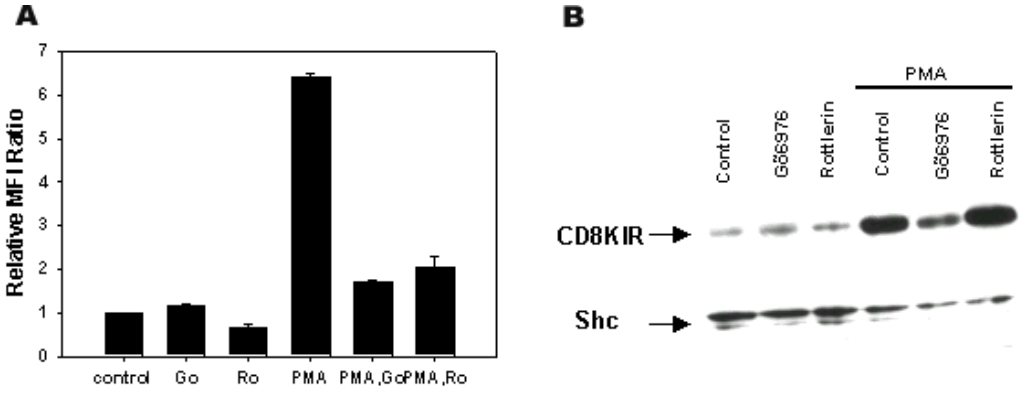

그림 7. PKC 저해제 처리에 의한 KIR의 표면 표현과 전체 단백질 양의 변화
(A) CD8KIR Jurkat transfectant에 1 μM Gö6976, 1 μM rottlerin을 30분 전처리하고 100 ng/ml PMA를 6시간 동안 처리하여 세포 표면 표현을 측정하였다. 각 값은 triplicate으로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표시하였다. (B) CD8KIR Jurkat transfectant에 1 μM Gö6976, 1 μM rottlerin을 30분 전처리하고 100 ng/ml PMA를 6시간 동안 처리하여 항 CD8 항체로 blotting하였다.

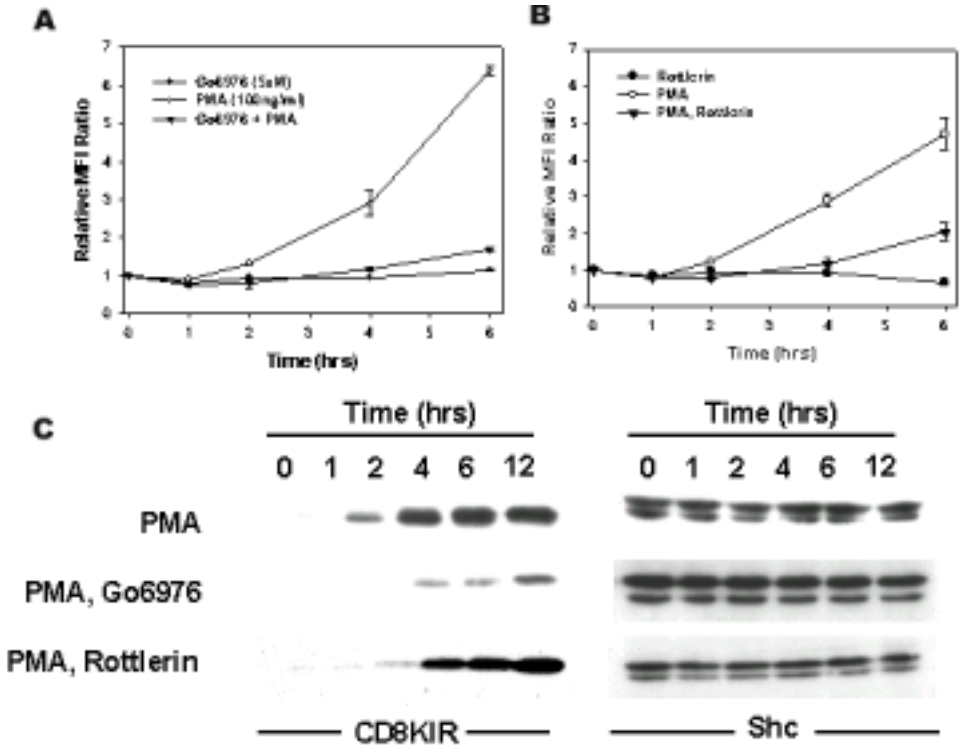

그림 8. 시간에 따른 PKC 저해제 처리에 의한 KIR의 세포 표면 표현과 전체 단백질 양의 변화. (A) CD8KIR Jurkat transfectant에 5 μM Gö6976을 30분 전처리하고 100 ng/ml PMA를 각각 시간별로 처리하여 세포 표면 표현을 측정하였다. 각 값은 triplicate으로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표시하였다. (B) CD8KIR Jurkat transfectant에 5 μM rottlerin을 30분 전처리하고 100 ng/ml PMA를 각각 시간별로 처리하여 세포 표면 표현을 측정하였다. 각 값은 triplicate으로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표시하였다. (C) CD8KIR Jurkat transfectant에 5 μM Gö6976, 5 μM rottlerin을 30분 전처리하고 100 ng/ml PMA를 각각 시간별로 처리하여 항 CD8 항체로 blotting하였다

7. KIR cytoplasmic tail을 인산화시키는 PKCα, PKCδ

PKC가 T 세포 신호 전달 과정에 중요한 역할을 하며, 특히 KIR의 표현에 영향을 미치는 유력한 가용분자로서 생각하게 되었고, KIR와 결정적으로 연결시켜주는 중요한 단서로 1995년 클로닝 된 KIR3DL1의 cytoplasmic tail에 3개의 PKC 결합 부위 (S/TXK/R, K/RXXS/T, K/RXS/T)가 존재함을 확인하였다. 따라서 이러한 PKC가 KIR와 관련되어 있는지 알아보기 위하여 CD8KIR를 안정하게 표현하는 Jurkat T 세포에서 KIR cytoplasmic tail을 PKC가 인산화시키는지를 알아보기 위한 *in vitro* kinase assay를 시행하였다. 여러 가지 isoform들 중 conventional PKC isoform들에서 PKCα를, novel PKC isoform들에서 PKCδ를 먼저 실험에 이용하였다. 면역침전한 PKC를 *in vitro*에서 recombinant KIR cytoplasmic tail과 반응시켰을 때 두 isoform 모두 KIR를 인산화시키고 있음을 확인하였다 (그림 9). 이는 실제 Jurkat T 세포에서도 PKC가 KIR의 cytoplasmic tail을 인산화시킬 수 있음을 시사해준다.

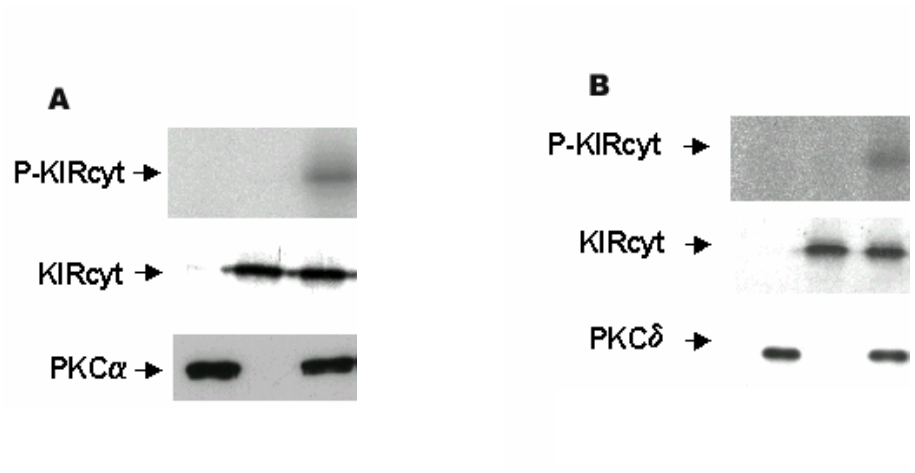

그림 9. PKCα(A), PKCδ(B)에 의한 KIR cytoplasmic tail의 인산화. PKC가 KIR cytoplasmic tail을 인산화시킬 수 있는지 알아보기 위하여 *in vitro* kinase assay를 수행하였다. 각각 2 x 10^7 Jurkat cell transfectants로부터 면역침전한 PKCα, PKCδ를 recombinant KIR cytoplasmic tail과 반응시켜 인산화되는지 확인하였다.

8. 지속적인 PMA 처리에 의한 PKCα와 PKCδ의 양상 변화

PKCα와 PKCδ 모두 KIR 표현을 다른 기전으로 조절하고 있음을 확인하였고 그렇다면 장기적인 PMA의 처리에 의해 PKC의 전체 단백질 양과 활성에 어떠한 변화가 있는지 알아보기 위해 western blotting과 *in vitro* kinase assay를 수행하였다 (그림 10). 그 결과 PKCα에 시간별로 PMA를 처리하였을 때 PKCα의 전체 단백질 양과 활성은 점차 감소하였고 12시간에 이르렀을 때 그것의 양과 활성 모두 현저히 감소함을 확인하였다. 반면 PKCδ의 경우, PMA를 지속적으로 처리함에도 불구하고 전체 단백질 양과 활성은 감소하지 않았다. 이는 KIR의 표현이 현저히 증가하는 12시간에 PKCα의 활성은 감소하고 PKCδ의 활성은 오히려 증가되는 것으로 보아 PKCα는 KIR의 표현을 감소시키는 방향, 즉 degradation에 관여할 가능성, PKCδ는 KIR의 표현을 증가시키는 방향, trafficking에 관여할 가능성을 생각할 수 있다.

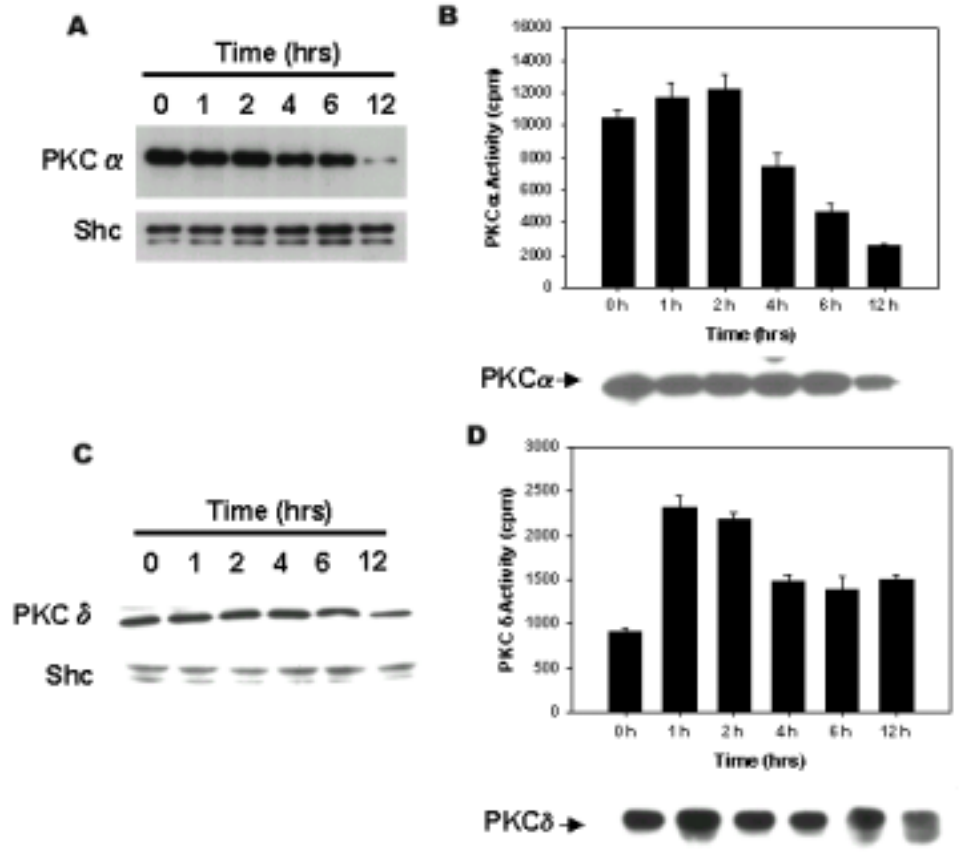

그림 10. 지속적인 PMA 처리에 의한 PKCα의 감소. (A) CD8KIR Jurkat transfectant에 100 ng/ml PMA를 시간별로 처리하고 항 PKCα 항체로 blotting하였다. (B) CD8KIR Jurkat transfectant에 100 ng/ml PMA를 시간별로 처리하고 항 PKCα 항체로 blotting하였다. (C) CD8KIR Jurkat transfectant에 100 ng/ml PMA를 시간별로 처리하고 항 PKCδ 항체로 blotting하였다. (D) CD8KIR Jurkat transfectant에 100 ng/ml PMA를 시간별로 처리하고 항 PKCδ 항체로 blotting하였다.

9. Proteasome 저해제와 okadaic acid 처리에 의한 KIR 표현 감소

PKC는 dephosphorylation 이후 일부 Ca^{2+}-activated neutral proteases (calpain)에 의해서도 degradation되지만 대부분 proteasome 경로에 의해 degradation 과정을 거친다[50,51]. PKC가 KIR의 표현에 직접적인 영향을 미친다면 PKC의 degradation을 저해했을 때 KIR의 표현에는 어떠한 변화가 있는지 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. CD8KIR를 안정하게 표현하는 Jurkat T 세포에 proteasome 저해제인 lactacystin (그림 11A)과 MG132 (그림 11B)를 농도별로 처리하였을 때 KIR의 세포 표면 표현이 감소함을 볼 수 있었다. 이는 KIR의 표현을 조절하는데 있어 감소시키는 쪽으로 PKCα가 주로 작용할 가능성을 보여준다.

Protein serine/threonine phosphatase 저해제인 okadaic acid를 처리하는 것은 PKC가 dephosphorylation되는 것을 막아 degradation 과정에 이르는 것을 저해하는 것인데, 이 결과 역시 KIR의 세포 표면 표현이 감소하고 있음을 보여준다 (그림 11C). 대조군으로 protein tyrosine phosphatase 저해제인 vanadate를 사용하였다 (그림 11D).

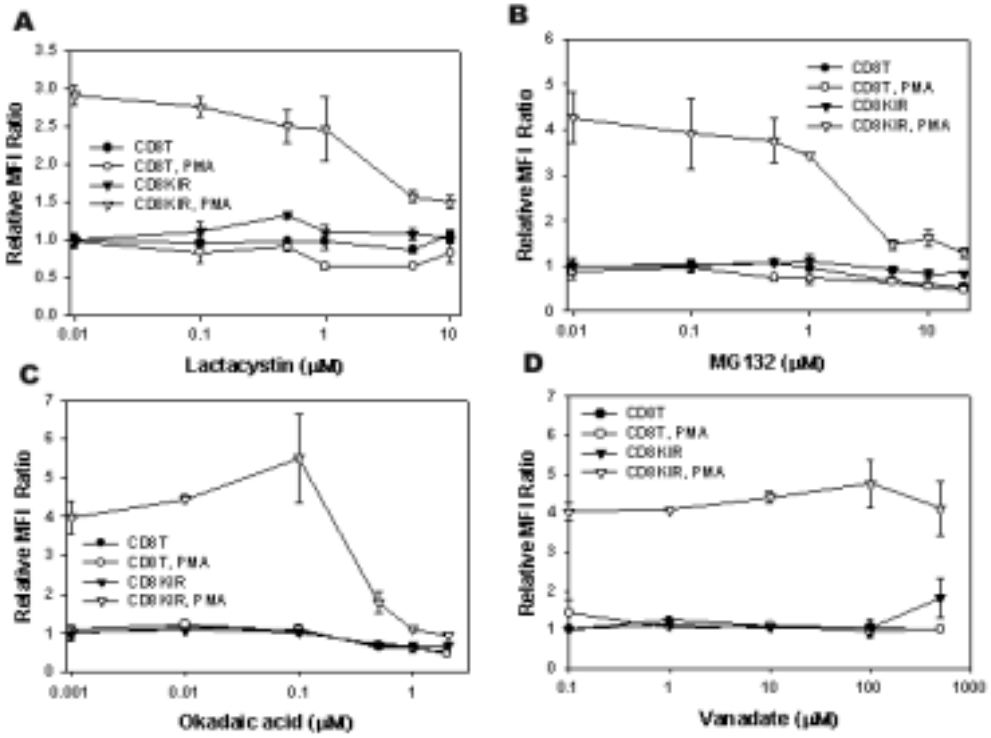

그림 11. Proteasome 저해제와 okadaic acid 처리에 따른 KIR 표현 양상 변화
(A) CD8KIR, CD8T Jurkat transfectant에 proteasome 저해제인 lactacystin을 각각 농도별로 30분 전처리하고 100 ng/ml PMA를 처리하여 6시간 후 세포 표면 표현을 측정하였다. 각 값은 triplicate으로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표시하였다. (B) CD8KIR, CD8T Jurkat transfectant에 proteasome 저해제인 MG132을 각각 농도별로 30분 전처리하고 100 ng/ml PMA를 처리하여 6시간 후 세포 표면 표현을 측정하였다. 각 값은 triplicate으로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표시하였다. (C) CD8KIR, CD8T Jurkat transfectant에 protein serine/threonine phosphatase 저해제인 okadaic acid를 각각 농도별로 30분 전처리하고 100 ng/ml PMA를 처리하여 6시간 후 세포 표면 표현을 측정하였다. 각 값은 triplicate으로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표시하였다. (D) CD8KIR, CD8T Jurkat transfectant에 protein tyrosine phosphatase 저해제인 vanadate을 각각 농도별로 30분 전처리하고 100 ng/ml PMA를 처리하여 6시간 후 세포 표면 표현을 측정하였다. 각 값은 triplicate으로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 표시하였다.

Ⅳ. 고 찰

T 세포에서 표현되고 있는 KIR는 NK 세포에서와 유사하게 T 세포의 살상 능력을 억제하는 역할을 할 것이라고 알려져 있다[15-17]. 최근에는 KIR가 T 세포의 FasL 유도를 효과적으로 억제함으로써, 결과적으로 AICD 과정을 억제한다는 내용도 보고된 바 있다[37]. Human T cell에서 표현되는 KIR는 $CD8^+$ T 세포 중에 활성화된 세포나 기억 세포에 주로 표현되어 있다고 알려져 있으나[19] 이의 표현이 구체적으로 어떻게 조절되는지에 대해서는 아직까지 잘 알려져 있지 않다. KIR의 표현 기전에 대한 최근의 연구 결과에 의하면, TCR를 통한 세포활성화 과정 중에 이의 세포 표면 표현이 증가하는 반면 KIR의 cross-linking에 의해 그의 세포 표면의 표현이 감소한다는 보고가 있다[22]. 이는 평상시 정상 세포에서 표현하는 MHC class Ⅰ에 KIR가 결합함으로써 T 세포의 기능을 억제하지 않을 정도로 KIR의 표현 정도가 감소해 있다가, 그 T 세포가 제대로 된 기능을 수행하는 즉, T 세포의 활성화 신호가 오면 과활성화 되는 것을 억제하기 위해서 KIR의 표현이 증가할 것이라는 논리로 T 세포에서의 KIR의 기능과 그의 조절 기전을 설명할 수 있다. KIR^+ T 세포가 인체 면역

조절 기전에 있어서 중요 기능을 수행할 것이라는 가능성과 중요성이 부각되자, T 세포에서 KIR 분자의 표현의 인위적인 유도나, T 세포 분화 과정에서의 KIR 표현이 시작되고 조절되는 기전에 관해 많은 연구가 이루어 졌다. 예전의 연구 결과를 보면, IL-15이나 TGF-β, 그리고 IL-10 등이 CD94/NKG2A의 표현 정도를 조절할 수 있는 것으로 보고되어 있다[3,38]. 또한 T 세포에서 KIR 표현의 조절은 TCR rearrangement가 끝난 후에 결정되고[39], NK 세포에서 KIR를 표현하는 클론은 DNA methylation에 의해 결정된다는 내용도 보고된 바 있다[40]. 하지만 실제로 KIR의 표현이 구체적으로 어떠한 기전에 의해서 이루어지는지에 대해서는 알려져 있지 않다. 흥미롭게도 T 세포의 여러 수용체들 (CD3γ, CD4/8, CTLA-4)의 down-regulation에 PKC가 관여한다고[42-45] 알려져 있는데 이와 유사하게 KIR의 internalization에도 PKC가 관여할 가능성에 대해 생각할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 T 세포에서 KIR가 인체 면역 조절 기전에 중요 기능을 수행할 것이라는 가능성과 중요성이 크게 부각됨에 따라 KIR의 표현 조절 기전을 연구해보고자 했다. KIR cytoplasmic tail이 KIR의 표현 조절에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, CD8α의 세포 외 부위, 세포막

부위와 KIR cytoplasmic tail을 융합한 DNA construct를 Jurkat T 백혈병 세포주에 transfection한 stable cell line을 이용하여 실험을 수행하였다. 대조군으로 KIR cytoplasmic tail이 제거된 CD8T construct와 KIR cytoplasmic tail의 deletion construct (CD8KIRΔⅠ, CD8KIRΔⅡ, CD8KIRΔⅢ)들을 영구적으로 표현하는 Jurkat stable cell line을 실험에 사용하였다[37]. 먼저 CD8KIR를 표현하는 stable cell line들을 PMA, 항 CD3 항체로 자극하였을 때, CDKIR, CD8KIRΔⅠ, CD8KIRΔⅢ를 표현하는 Jurkat stable cell line에서 KIR의 표현이 현저히 증가함을 확인하였다. PMA를 처리하여 KIR의 표현이 증가한다는 결과는 PKC가 KIR의 세포 표면 표현의 조절에 연관되어 있음을 강하게 시사한다.

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[46]. 흥미롭게도 융합 construct를 이용한 실험 결과들을 살펴 보면, KIR의 표현 조절이 KIR cytoplasmic tail의 중간에 위치하는 PKC 결합 부위와 관련될 가능성을 생각해 볼 수 있다. 따라서 여러 가지 PKC isoform 중 KIR의 표현에 영향을 미치는 것이 어떤 것인지 알아보기 위해 각각 conventional PKC

isoform에 대한 저해제인 Gö6976과 novel PKC isoform에 대한 저해제인 rottlerin을 농도별로 처리하였다. 결과 PMA에 의한 KIR 세포 표면 표현 증가는 두 가지 저해제, rottlerin, Gö6976에 의해 모두 감소함을 확인하였으나 전체 단백질 양은 Gö6976을 처리했을 때 감소한 반면, rottlerin을 처리했을 때는 변함이 없음을 확인했다. 이러한 결과는 두 PKC isoform 모두 KIR의 표현에 영향을 미치나 각각 다른 기전으로 KIR의 표현을 조절하고 있음을 보여준다.

본 실험에서는 여러 가지 PKC isoform들 중 conventional PKC isoform들에서 PKCα를, novel PKC isoform들에서 PKCδ를 이용하여 실험을 수행하였다. 면역침전한 각각의 PKC를 *in vitro*에서 recombinant KIR cytoplasmic tail과 반응시켰을 때 두 isoform 모두 인산화시키고 있음을 확인하였다. 이는 실제 Jurkat T 세포에서도 PKC가 KIR의 cytoplasmic tail을 인산화시킬 수 있음을 시사해준다.

여러 실험 결과에서 PKC가 KIR 표현에 영향을 미치나 isoform마다 다른 기전으로 KIR의 표현을 조절하고 있음을 확인할 수 있었다. 그러면 PMA 자극에 의해 KIR의 표현이 증가할 때, PKC의 전체 단백질 양과 활성은 어떠한 변화가 있는지 살펴보기 위해 western blotting과 kinase assay를 수행하였다. 그

결과 PKCα에 시간별로 PMA를 처리하였을 때 PKCα의 전체 단백질 양과 활성은 점차 감소하였고 12시간에 이르렀을 때 그것의 양과 활성 모두 현저히 감소함을 확인하였다. 반면 PKCδ의 경우, PMA를 지속적으로 처리함에도 불구하고 전체 단백질 양과 활성은 감소하지 않았다. 이는 KIR의 표현이 현저히 증가하는 12시간에 PKCα의 활성은 감소하고 PKCδ의 활성은 오히려 증가되는 것으로 보아 PKCα는 KIR의 표현을 감소시키는 방향, 즉 degradation에 관여할 가능성, PKCδ는 KIR의 표현을 증가시키는 방향, trafficking에 관여할 가능성을 생각할 수 있었다.

이 때 PKC가 KIR의 표현에 직접적인 영향을 미친다면 PKC의 degradation을 저해했을 때 KIR의 표현 양상이 어떻게 될지를 알아 보았다. PKC는 대부분 proteasome 경로에 의해 degradation 과정을 거친다는 보고를[50,51] 근거로 proteasome 저해제인 lactacystin과 MG132를 농도별로 처리하였는데, 이 때 KIR의 세포 표면 표현이 저해제 농도에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 이는 KIR의 표현을 조절하는데 있어 감소시키는 쪽으로 작용하는 PKCα가 주로 작용할 가능성을 생각할 수 있었다.

앞으로 KIR 표현 조절에 결정적인 분자인 PKC의 constant active form을

CD8KIR를 표현하는 Jurkat T 세포에 transfection하여 KIR의 표현을 살펴 보고, KIR 표현 조절에 중요한 motif라고 생각되는 PKC 결합 부위와 ITIM motif를 point mutation한 CD8KIR를 Jurkat T 세포에 transfection하여 KIR의 표현을 확인하는 연구를 수행할 필요가 있다.

결국 5개의 KIR 융합 construct들을 안정하게 표현하고 있는 Jurkat stable transfectant들을 이용하여 행해진 본 연구는 KIR의 표현이 PKC에 의해 조절되고 이러한 효과를 가지도록 하는 KIR의 중요 부위들을 제시해 주었으며, PKC가 어떠한 기전으로 KIR의 표현을 조절하는지에 대한 연구의 필요성을 제시하였다.

Ⅴ. 결 론

Jurkat T 백혈병 세포주에서 KIR 분자의 어느 부위가 KIR의 표현을 조절하는지를 규명하고, KIR 분자의 표현에 관여하는 분자를 찾아 내어 PKC에 의한 KIR의 표현 조절 기전에 대하여 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 각종의 CD8-KIR 융합 단백질을 안정하게 표현하는 Jurkat T 백혈병 세포주를 이용하여 PMA, 항 CD3 항체로 자극을 주었을 때, CD8KIR의 세포 표면 표현과 전체 단백질 양이 현저하게 늘어나는 것으로 나타났다. 또한 deletion mutant인 CD8KIRΔⅠ, CD8KIRΔⅢ의 세포 표면 표현이 현저하게 늘어나는 것으로 나타난 반면 CD8KIRΔⅡ의 표현에는 차이가 없었다. 따라서 CD8KIR, CDKIRΔⅠ, CD8KIRΔⅢ에 공통적으로 포함되어 있는 PKC 결합 부위가 KIR의 표현을 조절하는 부위임을 알 수 있다.
2. Conventional PKC isoform과 novel PKC isoform 저해제를 처리하였을 때 세포 표면 표현은 모두 감소하였으나, 전체 단백질 양은 conventional PKC 저해제 처리시 감소하는 것으로 나타났으나, novel PKC isoform 저해제를 처리했을

때 변함이 없이 나타났다. 이러한 결과는 두 PKC isoform 모두 KIR의 표현에 영향을 미치나 각각 다른 기전으로 KIR의 표현을 조절하고 있음을 보여준다.

3. 면역침전한 PKCα, PKCδ를 *in vitro*에서 recombinant KIR cytoplasmic tail과 반응시켰을 때 두 isoform 모두 KIR cytoplasmic tail을 인산화시키고 있는 것을 확인하였다. 이는 실제 Jurkat T 세포에서도 PKC가 KIR의 cytoplasmic tail을 인산화시킬 수 있는 것으로 여겨진다.

4. PKC가 isoform마다 다른 기전으로 KIR의 표현을 조절하고 있음을 확인할 수 있었는데, PKC의 전체 단백질 양과 활성을 확인해본 결과 PKCα의 전체 단백질 양과 활성은 점차 감소하였고 반면 PKCδ의 경우 전체 단백질 양과 활성은 감소하지 않았다. 이는 PKCα는 KIR의 표현을 감소시키는 방향, 즉 degradation에 관여할 가능성, PKCδ는 KIR의 표현을 증가시키는 방향, 즉 trafficking에 관여할 가능성을 생각할 수 있다.

결국 5개의 KIR 융합 construct들을 안정하게 표현하고 있는 Jurkat stable transfectant들을 이용하여 행해진 본 연구는 Jurkat T 세포에서 KIR의 표현은

PKC가 isoform마다 다른 기전으로 조절하며, 특히 KIR cytoplasmic tail의 뒷쪽에 위치한 PKC 결합 부위가 관여할 것이라고 사료된다. 이러한 결과는 바이러스 감염시나 종양 그리고 allograft에서 중요한 역할을 할 것으로 생각되어지는 KIR^+ T 세포의 기능에 대해 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료되며, 더 나아가 KIR^+ T 세포를 이용한 면역 요법에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Lanier LL. NK cell receptors. Annu Rev Immunol 1998;16:359-93
2. Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. Annu Rev Immunol 1999;17:875-904
3. Mingari MC, Moretta A, Moretta L. Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses. Immunol Today 1998;19:153-7
4. Moretta L, Ciccone E, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors. Adv Immunol 1994;55:341-80
5. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. Annu Rev Immunol 1996;14:619-48
6. Carretero M, Cantoni C, Bellon T, Bottino C, Biassoni R, Rodriguez A, et al. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. Eur J Immunol 1997;27:563-7
7. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. Nature 1998;391:795-9
8. Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, Lopez-Botet M, et al. HLA-E is

a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:5199-204

9. Burshtyn DN, Scharenberg AM, Wagtmann N, Rajagopalan S, Berrada K, Yi T, et al. Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. Immunity 1996;4:77-85

10. Burshtyn DN, Yang W, Yi T, Long EO. A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP-1. J Biol Chem 1997;272:13066-72

11. Binstadt BA, Brumbaugh KM, Dick CJ, Scharenberg AM, Williams BL, Colonna M, et al. Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. Immunity 1996;5:629-38.

12. Campbell KS, Dessing M, Lopez-Botet M, Cella M, Colonna M. Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. J Exp Med 1996;184:93-100

13. Fry AM, Lanier LL, Weiss A. Phosphotyrosines in the killer cell inhibitory receptor motif of NKB1 are required for negative signaling and for association with protein tyrosine phosphatase 1C. J Exp Med 1996;184:295-300

14. Olcese L, Lang P, Vely F, Cambiaggi A, Marguet D, Blery M, et al. Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. J Immunol 1996;156:4531-4

15. Perez-Villar JJ, Melero I, Rodriguez A, Carretero M, Aramburu J, Sivori S, et al. Functional ambivalence of the Kp43 (CD94) NK cell-associated surface antigen. J Immunol 1995;154:5779-88

16. 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.

17. 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.

18. Marti F, Xu CW, Selvakumar A, Brent R, Dupont B, King PD. LCK-phosphorylated human killer cell-inhibitory receptors recruit and activate phosphatidylinositol 3-kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:11810-5.

19. Cambiaggi A, Verthuy C, Naquet P, Romagne F, Ferrier P, Biassoni R, et al. Natural killer cell acceptance of H-2 mismatch bone marrow grafts in transgenic mice expressing HLA-Cw3 specific killer cell inhibitory receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:8088-92

20. Mingari MC, Ponte M, Cantoni C, Vitale C, Schiavetti F, Bertone S, et al. HLA-class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: molecular characterization, distribution in lymphoid tissues and co-expression by individual T

cells. Int Immunol 1997;9:485-91

21. Albi N, Ruggeri L, Aversa F, Merigiola C, Tosti A, Tognellini R, et al. Natural killer (NK)-cell function and antileukemic activity of a large population of CD3+/CD8+ T cells expressing NK receptors for major histocompatibility complex class I after "three-loci" HLA-incompatible bone marrow transplantation. Blood 1996;87:3993-4000

22. Huard B, Karlsson L. KIR expression on self-reactive CD8+ T cells is controlled by T-cell receptor engagement. Nature 2000;403:325-8.

23. De Maria A, Ferraris A, Guastella M, Pilia S, Cantoni C, Polero L, et al. Expression of HLA class I-specific inhibitory natural killer cell receptors in HIV-specific cytolytic T lymphocytes: impairment of specific cytolytic functions. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:10285-8.

24. 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.

25. Coles MC, McMahon CW, Takizawa H, Raulet DH. Memory CD8 T lymphocytes express inhibitory MHC-specific Ly49 receptors. Eur J Immunol 2000;30:236-44

26. Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. Nature 1995;373:444-8.

27. 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.

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

29. Nakajima H, Yamada N, Takiguchi M. Fas-independent apoptosis of T cells via killer cell inhibitory receptors. Int Immunol 1998;10:85-90

30. Yahata T, Abe N, Yahata C, 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;29:727-32.

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

32. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 1992;258:607-14.

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. Chwae YJ, Chang MJ, Park SM, Yoon H, Park HJ, Kim SJ, et al. Molecular Mechanism of the Activation-Induced Cell Death Inhibition Mediated by a p70 Inhibitory Killer Cell Ig-Like Receptor in Jurkat T Cells. J Immunol 2002;169:3726-35

38. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. Embo J 1998;17:1675-87

39. Vely F, Peyrat M, Couedel C, Morcet J, Halary F, Davodeau F, et al. Regulation of inhibitory and activating killer-cell Ig-like receptor expression occurs in T cells after termination of TCR rearrangements. J Immunol 2001;166:2487-94

40. Santourlidis S, Trompeter HI, Weinhold S, Eisermann B, Meyer KL, Wernet P, et al. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. J Immunol 2002;169:4253-61

41. Meazza R, Gaggero A, Neglia F, Basso S, Sforzini S, Pereno R, et al. Expression of two interleukin-15 mRNA isoforms in human tumors does not correlate with secretion: role of different signal peptides. Eur J Immunol 1997;27:1049-54

42. Schneider H, Martin M, Agarraberes FA, Yin L, Rapoport I, Kirchhausen T, et al. Cytolytic T lymphocyte-associated antigen-4 and the TCR zeta/CD3 complex, but not CD28, interact with clathrin adaptor complexes AP-1 and AP-2. J Immunol

1999;163:1868-79

43. Dietrich J, Kastrup J, Nielsen BL, Odum N, Geisler C. Regulation and function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. J Cell Biol 1997;138:271-81.

44. Dietrich J, Hou X, Wegener AM, Pedersen LO, Odum N, Geisler C. Molecular characterization of the di-leucine-based internalization motif of the T cell receptor. J Biol Chem 1996;271:11441-8

45. Backstrom BT, Rubin B, Peter A, Tiefenthaler G, Palmer E. T cell receptor alpha-chain tail is required for protein kinase C-mediated down-regulation, but not for signaling. Eur J Immunol 1997;27:1433-41

46. 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.

47. Lee SY, Park CG, Choi Y. T cell receptor-dependent cell death of T cell hybridomas mediated by the CD30 cytoplasmic domain in association with tumor necrosis factor receptor-associated factors. J Exp Med 1996;183:669-74.

48. Cho HI, Park CG, Kim J. Reconstitution of killer cell inhibitory receptor-mediated signal transduction machinery in a cell-free model system. Arch Biochem Biophys 1999;368:221-31.

49. Cho HI, Park CG, Kim J. The cytoplasmic tail of killer inhibitory receptor (KIR) associates with TCR zeta in a phosphorylation-dependent manner. Immunol Lett

1999;68:339-45.

50. Lu Z, Liu D, Hornia A, Devonish W, Pagano M, Foster DA. Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. Mol Cell Biol 1998;18:839-45

51. Lee HW, Smith L, Pettit GR, Smith JB. Bryostatin 1 and phorbol ester down-modulate protein kinase C-alpha and -epsilon via the ubiquitin/proteasome pathway in human fibroblasts. Mol Pharmacol 1997;51:439-47

Abstract

Inhibitory Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) expression in Jurkat T leukemia cells is regulated by Protein Kinase C Activation Pathway.

Eun Joo Kim

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jongsun Kim)

Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) are expressed on human NK cells and a subset of $CD8^+$ T cells, especially either on activated or memory phenotype T cells. Earlier studies have shown that KIR molecules expressed on T cells inhibit target cell cytolysis and cytokine release. Recently, it has been reported that KIR expression on T cells is dynamically regulated by TCR-mediated up-regulation and KIR-mediated down-

regulation. These results suggest that, in the absence of T-cell receptor (TCR) engagement, KIRs expressed on $CD8^+$ T cells are slowly down-regulated by KIR ligands expressed on antigen-presenting cells, and that the resulting expression level of KIR is no longer able to inhibit T-cell function. Whereas, TCR engagement activates T cells and re-induces functional level of KIR expression after ligand-induced down-regulation of KIR.

To better understand the immunological function of KIR in T cells, the regulatory mechanism of KIR expression in Jurkat T cells was investigated in this study. Interestingly, several receptors (CD3, CD4/8, CTLA-4) of T cells are known to be down-regulated by PKC. Since the cytoplasmic tail of KIR contains putative PKC phosphorylation sites, it is tempting to speculate that KIR expression might be also regulated by PKC.

As expected, KIR expression was strongly increased in the surface of Jurkat T cells after treatment of a potent PKC activator, phorbol myristate (PMA). Total cellular protein level of KIR was also increased after treatment of PMA. Analysis of Jurkat stable cell lines expressing CD8α and KIR3DL1 fusion proteins allowed to reveal that the second PKC substrate site of KIR cytoplasmic tail affect the expression of KIR. In support of this result, PKC appered to phosphorylate KIR cytoplasmic tail in *in vitro* kinase assay. In addition,

PMA-mediated KIR up-regulation was almost completely blocked when either a conventional PKC inhibitor, Gõ6976, or a novel PKC inhibitor, Rottlerin was treated in media. These results suggest that KIR expression is regulated by PKC activation pathway, which includes both conventional and novel PKCs family members. Interestingly, total protein level and activity of PKCα decreased after treatment of PMA, while total protein level and activity of PKCδ sustained. These results indicate that PKCα and PKCδ regulate KIR expression in T cells in a different manner. It seems likely that PKCα might decrease KIR expression by enhancing the degradation pathway, whereas PKCδ might increase KIR expression by affecting the trafficking pathway.

In conclusion, it is demonstrated that KIR expression in Jurkat T cells is regulated by PKC activation pathway. Further studies are necessary to better understand detailed molecular mechanism of the regulation of KIR expression. Particularly, it would be interesting to reveal which molecule(s) is involved in the regulation of KIR expression via PKC activation.

Key words: killer cell Ig-like receptor, Jurkat T cell, protein kinase C, protein expression