

Na,K-ATPase와 IgE-Dependent Histamine Releasing Factor의 결합에 영향을 미치는 Protein Kinase C Isotype에 관한 연구

손원주 · 이경림*
이화여자대학교 약학대학

PKC Isotype that Affects the Interaction of HRF with Na,K-ATPase. Sohn, Wern-Joo and Kyunglim Lee*. College of Pharmacy, Ewha Woman's University, Seoul 120-750, Korea – IgE-dependent histamine releasing factor (HRF), previously known as P23/P21 or translationally controlled tumor protein (TCTP), induces the degranulation of histamine in mast cell and basophil. Yeast two hybrid results showed that HRF interacts with the alpha subunit of Na,K-ATPase, suggesting that HRF is a regulator for governing the activity of Na,K-ATPase. In this study, we examined the interaction of HRF and Na,K-ATPase after treatments of various PKC isotype inhibitors. Membrane fractionation, pull-down assay and immunoprecipitation results showed that PKC α , PKC β , PKC δ subunits are involved in the phosphorylation of HRF. However, these results did not correlate with the results of histamine release assay since histamine release assay results suggested that some PKC isotype inhibitors induced the histamine release in RBL-2H3 cell.

Key words: HRF, Na,K-ATPase, PKC α , PKC β , PKC δ

IgE-dependent Histamine releasing factor(HRF)는 translationally controlled tumor protein(TCTP) 혹은 P23 또는 P21으로 불리는 house keeping protein으로써[4] isoelectric point는 4.9이고 분자량은 24 KDa인 산성의 polypeptide이다[6]. 이후 MacDonald et al.은 1995년 atopic 환자의 lymphocytes와 allergy 환자의 biological fluids에서 HRF를 분리, 정제하고 이 HRF가 이미 growth-related protein이라고 알려진 P23/P21 혹은 TCTP와 동일한 단백질이라는 것을 밝혀내었다[11]. 또, 처음 P21이 IgE-dependent histamine releasing factor로 알려졌을 때에는 human basophil 세포에서 IgE가 존재할 때에만 항원에 대한 반응으로 HRF가 histamine을 분비하도록 하는 것으로 알려졌으나[2, 9, 10, 14] 현재로서는 IgE에 상관없이 HRF가 basophils에서 histamine, IL-4, IL-14의 분비를 조절하는 것이 관찰되어 IgE가 아닌 특정한 receptor에 결합하는 것이 아닌가하는 가능성이 제기 되고 있다[17].

본 실험실에서는 yeast two hybrid screening을 통해 Na,K-ATPase에 결합하는 단백질로 HRF를 동정한 바 있어 [18] Na,K-ATPase activity 조절 단백질로서의 HRF의 역할을 생각할 수 있었다. 왜냐하면 IgE-dependent histamine의 분비는 Na-Ca-exchanger inhibitor인 5-(N-N-examethylene)amiloride나 5-(N-4-cholrobenzyl)-2'-4'-dimethylbenzamil을 처리할 경우에는 억제되는 반면[16] voltage-operated Ca²⁺

channel antagonist인 verapamil이나 nifedipine 처리시에는 영향을 받지 않는다는 보고가 있었으며[1,15,13], 또한 RBL-2H3 세포에 ouabain과 같은 Na,K-ATPase 저해제를 처리했을 때 histamine 분비가 증가되었다는 사실[5]로 미루어보아 HRF가 Na,K-ATPase에 결합하여 Na,K-ATPase의 작용을 억제함으로써 histamine분비에 관여하지 않을까 예상할 수 있었다. 그러나 HRF가 histamine을 분비하도록 하는 그 signaling pathway에 관해서는 아직 자세히 밝혀진 바가 없다. 다만 human basophils에서 human recombinant histamine releasing factor(HrHRF)에 의한 histamine 분비와 IgE에 의한 histamine 분비에 영향을 주면서, 이들 두 signal을 구분짓는 약물로 rottlerin을 찾아낸 사실[3]을 미루어볼 때 HRF는 IgE와는 별도의 signaling pathway를 가지는 것으로 생각되고 있다. 이와 더불어, HRF는 Ca²⁺ binding protein이고, HRF를 첨가하면 세포내 Ca²⁺ 농도가 증가되면서 histamine 분비가 촉진된다는 보고[8]와 calcineurin inhibitor인 cyclosporine A나 FK506을 처리하면 histamine, serotonin, beta-hexosaminidase와 같은 mediator의 Fcepsilon RI-mediated exocytosis가 저해된다는 사실[7]도 HRF의 인산화/탈인산화에 calcineurin이 관여한다는 예상을 뒷받침한다. 한편 약물을 전처리한 RBL-2H3 세포에서 HRF가 membrane으로 translocation되는 양이 변화하는지 membrane fractionation을 통해 살펴보고 동시에 Cos-7 cell에 HRF를 transfection하여 약물을 전처리한 후 immunoprecipitation을 수행하여 *in vivo*에서도 *in vitro*와 같은 결과를 보이는지 관찰하고 HRF 인산화/탈인산화에 따른 Na,K-ATPase와의 결합여부도 관찰하였다.

*Corresponding author
Tel: 82-2-3277-3024, Fax: 82-2-3277-2851
E-mail: klyoon@ewha.ac.kr

재료 및 방법

Cell culture 및 약물의 전처리

세포내 HRF의 움직임을 추적하기 위하여 HRF를 많이 만들어 내며 histamine을 분비할 수 있는 RBL-2H3 세포주를 실험에 이용하였다. RBL-2H3 cell은 15% fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin, 100 units/mL streptomycin을 첨가한 MEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 키우며 2~3일에 한번씩 10⁶ cells/mL로 분주하였다. 실험에 들어가기 직전에는 분주 후 18시간 이내에 80~90% 정도 자라도록 분주한 후 12시간동안 0.5% fetal bovine serum 농도의 배지에서 배양하여 serum starvation을 실시하였다. 그 후 각 약물마다 3개씩의 petri dish에 Table 1과 같이 적정시간 동안 처리하였다. 즉, 세포의 sensitization을 위해 IgE를 전처리하였으며 PKC를 활성화하기 위해 PMA를 사용하였다. 특정 PKC isotypes의 활성을 저해하기 위해 Go6976, Bisindolylmaleimide I, safangol, Rottlerin을 처리하였다. PMA는 단시간 처리할 때는 PKC를 활성화하지만 6시간 정도 처리하면 PKC의 활성을 오히려 저해하므로 전체 PKC의 활성을 저해하기 위해 PMA를 오래 처리한 것(PMA(L))과 staurosporine을 처리하여 비교하였다.

Cos-7 세포주는 다른 세포주에 비해 Na,K-ATPase를 많이 발현하고 있으므로 Na,K-ATPase와의 상호작용하는 단백질의 추적이 용의하다. Cos-7 세포주는 10% fetal bovine serum(FBS), 100 units/mL penicillin, 100 units/mL streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 키우며 2~3일에 한번씩 10⁶ cells/mL로 분주하였다. 실험에 들어가기 직전에는 분주 후 18시간 이내에 80~90% 정도 자라도록 분주한 후 세포내 기본적인 PKC의 활성을 낮추어 주기 위하여 12시간 동안 0.5% fetal bovine serum 농도의 배지에서 배양하여 serum starvation을 실시하였다. 그 후 RBL-2H3 cell의 경우와 마찬가지로 필요한 약물을 Table 1와 같은 농도로 적정시간 동안 처리하였다.

Pull-Down Assay를 이용한 Na,K-ATPase의 세 번째 cytosolic loop과 HRF의 상호작용 확인

pRSET-B vector에 subcloning된 Na-pump $\alpha 1L3$ 를 expression strain인 BL21(lamda DE3)pLysS에 transformation 하였다. 50 $\mu\text{g/mL}$ ampicillin과 34 $\mu\text{g/mL}$ chloramphenicol을 포함하는 LB plate에서 자란 colony를 액상의 배지 5 mL에 접종하고 37°C에서 16시간 배양한 후 이를 50배 희석하여 OD₆₀₀가 0.6~0.8 사이가 되었을 때 IPTG 1 mM에서 3시간 동안 유도한 후 5,000 rpm, 5분간 원심분리하여 회수하였다. 이 pellet을 얼음에서 식혀가며 10초동안 200-300 W로 6~7회 sonication하여 세포를 깨뜨렸다. 이후 Ni²⁺ column을 이용하여 $\alpha 1L3$ 단백질을 정제하고 Bradford법으로 정량였다. 동시에 resin을 charge buffer로 charge 한 뒤 binding buffer(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl)에 배양하여 equilibrate하였다. RBL-2H3는 약물을 전처리한 후 차가운 PBS 8 mL으로 두 번 세척한 뒤 5 mM의 EDTA가 첨가된 PBS 1 mL/dish를 가하여 rubber policeman으로 cells을 회수하였다. 15,000 rpm에서 30초간 원심분리하여 얻은 RBL-2H3 cell pellet에 .1% Triton X-100이 포함된 hypotonic lysis buffer(20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5 $\mu\text{g/mL}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g/mL}$ leupeptin, 1 μM benzamidine)를 200 μL 씩 가하여 얼음 위에서 1시간동안 swelling 하였다. 이때 15분마다 강하게 vortexing 하여 cell을 깨뜨렸다. 이렇게 깨어진 cell lysate는 12,000 rpm에서 10분동안 원심분리하여 그 상등액을 취해 단백질 농도를 정량하였다. 앞에서 정량한, 정제된 $\alpha 1L3$ 단백질 150 μg 을 RBL-2H3 cell extract 600 μg 과 섞어 2 시간동안 4°C 조건에서 천천히 진탕하며 방치하였다. 이후 equilibrate 된 slurry 상태의 Ni²⁺-charged agarose bead를 50% slurry로서 200 μL 첨가하고 binding buffer 0.5 mL을 더하여 4°C에서 천천히 진탕하며 12시간 이상 방치하였다. Agarose bead의 Ni²⁺에 $\alpha 1L3$ -HRF가 결합한 뒤 11,000 rpm에서 4°C를 유지하며 3분동안 원심분리하여 단백질이 결합한 beads를 pellet으로 떨어뜨렸다. 상등액을 조

Table 1. The concentrations of variable drugs used in this work.

약 물	stock	처리농도	처리시간	목 적
IgE	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.2 $\mu\text{g/mL}$	15 min	sensitization
phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	300 μM	20 nM	6 hours	PKC depletion
phorbol 12-myristate 13-acetate :treated for 6hours (PMA(L))	300 μM	50 nM	15 min	PKC activation
Go6976	10 μM	100 nM	15 min	cPKC inhibition
Bisindolylmaleimide I	0.1 mM	150 nM	15 min	cPKC inhibition
Safingol	1 mM	10 μM	15 min	PKCalpha inhibition
Rottlerin	5 mM	0.5 μM	15 min	PKCdelta inhibition
Cyclosporine A	0.83 mM	1 μM	15 min	calcineurine inhibition
Okadaic acid	30 μM	100 nM	15 min	protein phosphatase inhibition
staurosporine	1 mM	1 μM	15 min	PKC inhibition

심스럽게 털어 제거하고 4°C를 유지하며 1 mL의 binding buffer를 가하고 beads를 부드럽게 씻어낸 후 11,000 rpm으로 3분간 원심분리하였다. 이러한 세척과정을 한번 더 반복한 뒤 이번에는 1 mL의 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)으로 beads를 2회 세척하였다. 11,000 rpm으로 4°C의 조건에서 3분간 원심분리한 최종 pellet에 2X sample buffer 60 µL를 가하여 vortexing하여 재현탁한 후 100°C에서 5분간 끓였다. 15,000 rpm에서 30초동안 spin-down하고 상등액만을 12% SDS-PAGE gel에 모두 주입하여 Western blotting을 실시하였다. 이때 polyclonal anti-HRF antibody를 사용했으며, 따로 α 1L3만을 결합시킨 경우와 RBL-2H3 cell extract만을 결합시킨 경우도 함께 pull-down 과정을 거쳐 coomassie blue staining으로 bead의 결합정도를 알아보았다.

인산화된 HRF의 Membrane translocation

Growth media에서 키운 80-90% confluency의 RBL-2H3 cell line을 serum starvation 한 후 serum-free MEM 배지에 녹인 IgE 0.2 µg/mL을 1시간 동안 처리하여 sensitization 하고, Table 1과 같이 처리하였다. 이후 대조군인 아무것도 처리하지 않은 dish와 함께 차가운 PBS로 2회 세척한 후 차가운 PBS/EDTA(5 mM EDTA) 1 mL/dish를 가하고 얼음 위에서 5분간 방치한 후 rubber policeman을 사용하여 dish 바닥에 붙어있는 cell을 긁어내었다. 이후 12,000 rpm에서 10초간 원심분리하여 여액은 제거하고 cell pellet만을 얻었다. 이 pellet을 hypotonic lysis buffer(20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin, 1 µM benzamidin)에 현탁시켜 30분간 swelling 하였다. 이 현탁액을 motor-driven conical Teflon pestle로 10,000 rpm에서 천천히 10회 homogenization하고 1분간 얼음에 방치하는 과정을 3회 반복하였다. 이 lysate을 Pyrex #7727-07 glass homogenizer로 옮겨 다시 10회 homogenization 하였다. 완전히 깨어진 cell lysate는 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 cell debris와 nuclei를 떨어뜨린 후 상등액만을 조심스럽게 취하고 이를 다시 4°C, 17,000 rpm에서 90분간 원심분리하여 cytosolic fraction과 membrane fraction을 각각 supernatant와 투명하고 작은 pellet으로 분리하였다. Cytosolic fraction인 상등액은 따로 취하여 단백질 농도를 Bradford법으로 정량한 후 -70°C에 보관하고 pellet은 차가운 hypotonic lysis buffer로 2회 세척한 후 1% Triton X-100이 포함된 hypotonic lysis buffer를 가해 얼음상에서 15분 동안, 5분마다 강하게 vortexing하여 최대한 재현탁시켰다. 이것을 다시 4°C, 17,000 rpm에서 90분간 원심분리하여 1% Triton X-100 soluble fraction(membrane fraction)을 상등액으로 얻고 단백질 농도는 Bradford법으로 정량하였다. 동량의 단백질을 12% SDS-PAGE gel에 주입하고 단백질을 분리한 후에 nitrocellulose membrane에 400 mA에서 2시간 동안

transfer하고 anti-HRF antibody, anti-phospho-HRF antibody로 검출하였다.

Immunoprecipitation을 이용한 Na,K-ATPase와 HRF의 상호작용 확인

Cos-7 cell line을 10% fetal bovine serum(FBS), 100 units/mL penicilin, 100 units/mL streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 키우며 2-3일에 한번씩 10⁶ cells/mL로 분주하였다. 실험에 들어가기 직전에는 분주 후 18시간 이내에 80~90% 정도 자라도록 분주한 후 Lipofectamine Reagent(GibcoBRL)를 이용하여 해당 protocol에 따라 transfection 하였다. 즉, N-terminus hemagglutinine(HA) tagged rat HRF DNA(8 µg/100 mm dish)를 아무것도 첨가하지 않은 DMEM 배지 0.8 mL/100 mm dish에 가한 것과, Lipofectamine reagent(6 µL/100 mm dish)를 DMEM 배지 0.8 mL/100 mm dish에 가한 것을 혼합하여 여러번 pipetting하여 잘 섞이도록 하고 DMEM 배지 6.4 mL/100 mm dish를 첨가하여 희석한 후 상온에서 15~45분간 방치하였다. 방치하는 동안 Cos-7 cell은 아무것도 첨가하지 않은 DMEM 배지로 닦아내어 transfection을 방해할 수 있는 antibiotics와 FBS를 제거하였다. 상온에서 방치한 transfection reagent는 곧바로 세포 위에 가하여 배양기에서 3~5시간 배양하였다. 이후 세포 위에 가하였던 용액은 aspiration하여 완전히 제거하고 신선한 배지로 바꾸어 24시간 동안 배양하여 단백질이 발현되도록 하였다.

Transfection한 Cos-7 세포주를 24시간동안 배양한 후 0.5% FBS가 들어있는 DMEM 배지에서 16시간 동안 serum starvation을 실시했다. 이후 DMEM 배지에 희석한 적정 농도의 약물들을 각각 4개 dish씩 처리하고 차가운 PBS 6 mL로 2회 세척하였다. 남은 PBS가 없도록 깨끗이 제거한 후 차가운 lysis buffer(20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% Sodium deoxycholate, Complete mini protease inhibitor cocktail)를 dish 당 500 µL씩 가하여 세포를 적셔준 후 rubber policeman으로 긁어내어 1.5 mL tube에 모은 후 얼음 위에서 15분간 방치하였다. 이 현탁액을 차갑게 식힌 Pyrex #7727-07 glass homogenizer에 옮겨 세포가 완전히 깨져 현탁될 때까지 얼음상에서 천천히 갈아주었다. Lysate는 4°C, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액은 Bradford 법으로 정량한 후 100 µg씩 저장한 후 나머지 용액으로 각 sample의 단백질 양을 일정하게 4.94 mg으로 맞추어 주었다. 그리고 monoclonal anti-Hemagglutinin(HA) Ab를 tube당 최종 2~10 µg/mL의 농도가 되도록 가한 후 저온실의 진탕기 위에서 12시간 이상 방치하였다. 이후 protein A agarose bead suspension (50% v/v in lysis buffer) 200 µL을 각 tube마다 가하여 다

시 rocker 위에서 3시간 동안 배양하였다. Bead pellet은 4°C, 10,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 얻고 이것을 500 µL의 차가운 PBS로 재빨리 3회 세척하였다. 이때 bead pellet은 가볍게 두드려 풀어주었다. 마지막으로 4°C, 10,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 pellet에 4X SDS gel-loading buffer을 25 µL씩 가하여 강하게 vortexing하여 섞어준 후 4분 동안 끓였다. 15,000 rpm에서 1분간 spin-down 한 후 상등액만을 건져 lysate 100 µg과 함께 12% SDS-PAGE를 수행하였다. 다시 transfer하여 anti-Na,K-ATPase α1 antibody, anti-HA antibody로 각각 검출하였다.

Histamine release assay를 이용한 HRF의 형태별 histamine 분비

RBL-2H3 세포주를 24 well plate에 18시간 지나면 80% confluency에 도달하도록 분주한 후 37°C, 5% CO₂의 incubator에서 배양하였다. 14시간 동안 0.5% FBS 농도의 MEM 배지에서 굵긴 다음 1X Histamine releasing buffer로 깨끗이 3회 세척한 후 1X Histamine releasing buffer 1 mL에 녹인 약물을 적정시간 동안 처리하였다. 이후 well당 1 mL의 상등액만을 조심스럽게 1.5 mL tube에 수거한 후 곧바로 -20°C에서 얼렸다. 얼린 samples는 약 보름동안 안정한 후 histamine release assay를 행하였다.

결과 및 고찰

Pull-down Assay를 이용한 Na,K-ATPase의 세 번째 cytosolic loop과 HRF의 상호작용 확인

Affinity chromatography의 방법은 Western blotting에서 불특정한 단백질 밴드가 많이 나타나고 실험의 규모가 커지는 단점이 있어 이와 유사한 방법으로 Ni²⁺ charged agarose bead에 정제된 α1L3 단백질을 150 µg을 결합시키고 여기에 RBL-2H3 cell extract 600 µg 더하여 실험하였다. 대조군으로 bead에 α1L3만을 결합시킨 것과 RBL-2H3 cell extract만을 결합시킨 것을 비교하였다(Fig. 1A). 실험결과, Fig. 1A에서 보이는 것과 같이 bead에 단백질이 매우 잘 결합했으며 불특정한 단백질 밴드도 거의 없음을 알 수 있었다. 또, Go6976, safinol, rottlerin, okadaic acid를 처리한 RBL-2H3를 사용한 경우에서 HRF의 결합이 증가하였으나 cyclosporine A의 경우에는 그 결합이 감소하였다(Fig. 1B).

Classical PKC isotypes 중 PKC alpha는 저해되었을 때 (safingol 처리) HRF의 Na,K-ATPase로의 결합이 증가하였으므로 HRF의 인산화에 관여하는 것으로 보인다. Bisindolylmaleimide I 150 nM에서는 PKC beta1, beta2가 억제되는데 이 경우 HRF band가 흐려졌으므로 HRF의 인산화에 관여하지 않는 것으로 나타났다. Phosphatase의 경우 okadaic acid로 PP1, PP2A를 억제했을 때 α1L3에 결합한

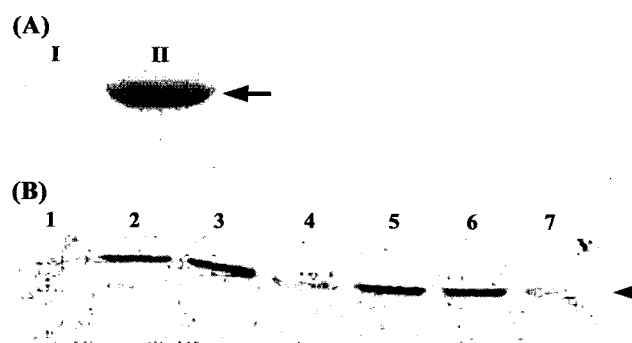


Fig. 1. Pull-down assay. (A) His-tagged α1L3 was successfully captured in Ni²⁺ charged agarose bead by incubating the proteins with Ni²⁺ charged agarose beads and then detected by Coomassie blue staining. No other band except His-tagged α1L3 was detected. I: RBL-2H3 extract only, II: α1L3 only. Arrow indicates His-tagged α1L3 (55KDa). (B) Interaction of HRF and Na,K-ATPase α1L3 domain was confirmed by pull-down assay and Western blotting using polyclonal anti-HRF antibody. His-tagged α1L3 was immobilized on Ni²⁺ charged bead and incubated with RBL-2H3 cell lysates. The bound proteins were eluted by boiling and visualized using Western blot analysis. The levels of bound HRF were significantly high in lane 2, 3, 5 and lane 6. Variable drugs were treated to RBL-2H3 cells. 1: No treat, 2: Go6976, 3: Safingol, 4: Bis I, 5: Rott, 6: OkA, 7: CsA. Arrow heads indicates HRF.

HRF가 증가하여, HRF의 탈인산화에 일단 PP1, PP2A는 관여하지 않음을 알 수 있었다. PP2B의 선택적인 저해제인 cyclosporine A를 처리했을 때에는 HRF의 탈인산화가 저해되어 HRF의 검출이 감소하였다. 즉 PP2B가 HRF의 탈인산화에 관여하며 탈인산화된 HRF가 Na,K-ATPase α1L3에 상호작용한다고 할 수 있다.

인산화된 HRF의 membrane translocation

세포질에 존재하는 HRF가 인산화/탈인산화될 수 있고 Na,K-ATPase와 결합할 수 있다면 인산화 혹은 탈인산화되어 Na,K-ATPase에 결합되어 있는 HRF는 세포질 뿐만 아니라 세포막에서도 검출될 것이다. 즉 세포질에서 세포막으로 HRF의 이동이 관찰될 것이므로 약물처리한 RBL-2H3 세포주에서 인산화된 HRF의 이동을 확인하였다. 이 실험에서는 PKCs 활성을 억제시키는 staurosporine과, 앞의 pull-down assay에서 HRF에 작용할 것으로 유추된 cPKC, PKC delta isotype을 각각 억제시키는 Go6976, Rottlerin을 사용하였다. 각 시료마다 IgE 0.2 µg/mL이 전처리되었고 대조군으로 IgE만을 처리한 dish를 이용하였다. Cytosolic fraction에서는 인산화된 HRF나 전체 HRF의 양에서 큰 차이가 없었으나(결과 미제시) membrane fraction에서는 staurosporine과 PKC inhibitors의 사용에 의해 전체 HRF의 분포가 증가하였으며(Fig. 2B) 인산화된 HRF의 양은 감소하였다(Fig. 2A).

Fig. 2C에서는 단순히 어떤 PKC isotype이 관여할 것

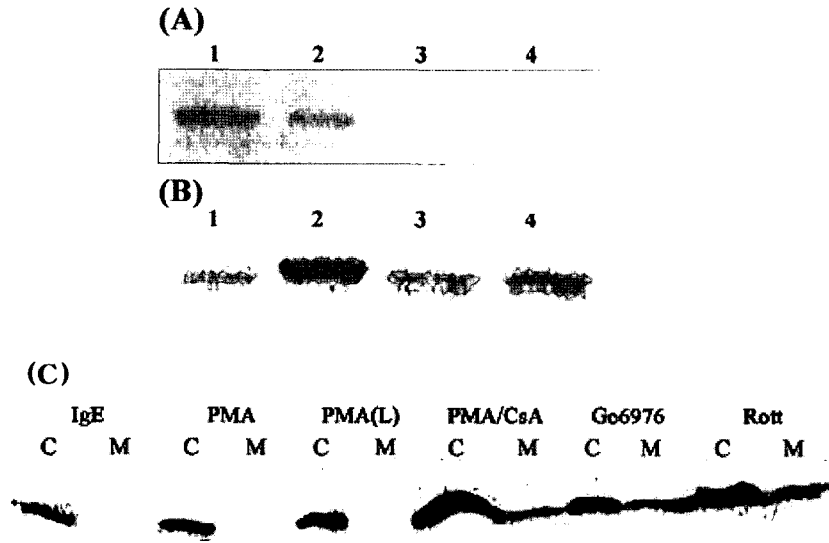


Fig. 2. Subcellular fractionation of RBL-2H3 cells treated with several drugs. RBL-2H3 cells were treated with indicated drugs and lysed with hypotonic buffer. Whole cell lysate was divided into cytosolic and membrane fraction by ultra-centrifugation at 17,000 rpm. HRFs in each fraction were visualized by Western blotting analysis. (A) Some phosphorylated HRFs were translocated to the membrane fraction. (B) HRFs from membrane fraction of RBL-2H3 cells were detected by anti-HRF antibodies. (C) Some HRF proteins were translocated to the membrane fraction. C: cytosolic fraction, M: membrane fraction, 1: No treat, 2: STS, 3: Go6976, 4: Rott.

인지를 알아보기 위해 PMA를 15분, 6시간 처리한 것, PMA에 cyclosporine A를 첨가한 것, Go6976과 Rottlerin을 각각 처리한 것으로 나누어 실험하였다. 각 시료마다 IgE 0.2 µg/mL이 전처리되었고 대조군으로 IgE만을 처리한 dish를 이용하였다. Membrane으로 이동한 HRF가 소량일 수 있으므로 membrane fraction을 최대한 많이 이용하기 위해 (91.7 mg) cytosolic fraction(62.5 µg)과는 불가피하게 동량을 사용하지 못했다. 따라서 각 약물마다 cytosolic fraction 끼리, membrane fraction 끼리 나타난 band를 비교하였는데 IgE, PMA를 처리한 경우에는 HRF가 cytosol에만 있거나 membrane에는 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 2C). 즉 phosphorylated HRF는 cytosol에 존재하며 IgE에 의해 phosphorylation이 증가하지는 않았다. 따라서 Na,K-ATPase를 저해하는 상호작용은 할 수 없으며 histamine 분비도 basal level과 거의 비슷하게 나타날 것으로 생각되었다. 한편 PMA를 6시간 동안 처리하여 PKC를 모두 depletion한 경우에는 희미하게 membrane으로 이동한 HRF가 보였고 cyclosporin A로 PP2B를 억제한 경우 HRF의 탈인산화가 억제되어 membrane으로 이동하지 못할 것이라는 예상을 뒤집은 결과가 나타났다. Classical PKC group만을 억제하는 Go6976을 처리한 결과 membrane으로 이동한 HRF가 현저히 증가하여 PKC α, β, δ가 관여한다는 것을 알 수 있었다. Rottlerin의 경우 IgE와 구별되는 signal pathway를 보여주며 histamine 분비를 증가시킨다는 기존의 MacDonald *et al.*의 결과와 일치하는, membrane으로 이동한 HRF가 매우 많음을 보여주었다.

Immunoprecipitation을 이용한 Na,K-ATPase와 HRF의 상호작용 확인

HRF가 존재하지 않는 Cos-7 cell에 HA가 tagging되어 있는 HRF(Fig. 3A)를 transfection하여 다양하게 약물을 처리한 후 이 cell lysate에 anti-HA antibody를 첨가하고 protein A-agarose와 반응시켜 immunoprecipitation을 시도하였다. Polyclonal anti-Na,K-ATPase α1 antibody를 이용하여 western blotting을 시행한 결과 rottlerin과 okadaic acid를 처리한 lane에서 Na,K-ATPase를 확인할 수 있었다(Fig. 3B).

Histamine release assay를 이용한 HRF의 형태별 histamine 분비

HRF의 최종적인 effect는 histamine의 분비이므로 처리한 약물자체에 histamine 분비효과가 있는지를 검토하고 endogenous HRF의 인산화/탈인산화된 basal level이 변화했을 때 histamine의 기본적인 분비정도가 변화할 수 있는지를 알아보려고 한 것이었다. 24 well plate에서 serum starvation 후 90% confluency를 보일 때까지 자란 RBL-2H3 세포를 각 약물마다 3반복하여 IgE를 처리한 것과 처리하지 않은 것으로 나누어 anti-IgE 처리한 세포를 positive control로 하여 실험하였다. RBL-2H3 세포는 언제나 기본적인 histamine 분비를 일으키고 있으므로 약물처리에 따른 histamine releasing effect를 볼 수 있었다. Anti-IgE에 의해 확인한 histamine 분비가 관찰되었으며 모든 실험군은 IgE에 의해 sensitization 되었을 때 전체적으로 histamine 분비가 증가되

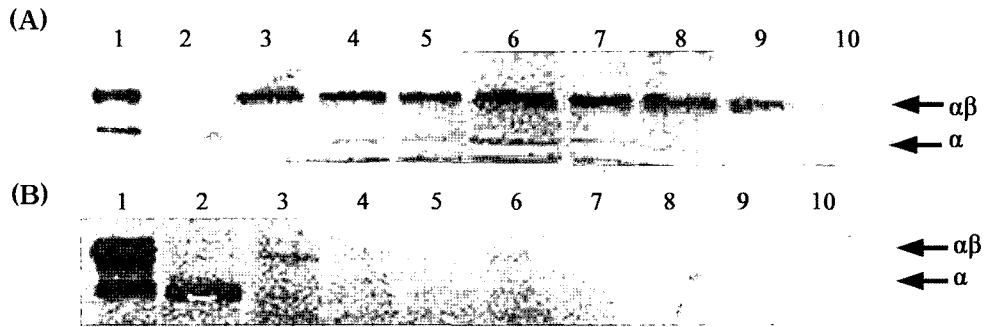


Fig. 3. Interaction of HRF and Na,K-ATPase confirmed by immunoprecipitation in Cos-7 cells. Cos-7 cells were transfected with recombinant Hemagglutinin tagged HRF constructs using Lipofectamine reagent. The HRF transfected Cos-7 cells were lysed in hypotonic buffer. Whole cell extracts were incubated with anti-Hemagglutinin antibody and protein A agarose bead suspension. The bound proteins were eluted by boiling with sample buffer and analyzed using anti-Na,K-ATPase antibody. (A) Na,K-ATPase was detected in crude extracts. (B) Immunoprecipitates were detected with anti-Na,K-ATPase antibody. 1: purified Na,K-ATPase, 2: Marker, 3: Mock, 4: Control, 5: PMA, 6: PMA (L), 7: Go6976, 8: Rott, 9: OkA, 10: CsA.

었다. 그러나 IgE를 처리한 경우만 살펴볼 때 HRF의 인산화는 확실히 histamine 분비를 감소시켜 주었다. 또한 IgE를 처리한 경우와 그렇지 않은 경우는 서로 매우 다른 양상을 나타내므로 HRF와 IgE는 서로 다른 pathway를 가진다는 가설을 다시 확인할 수 있었다. 게다가 protein kinase C(PKC)는 human basophils에서 IgE-mediated desensitization에는 그다지 영향을 미치지 않는다는 보고도 있어 HRF의 signaling은 IgE와 구별되며 PKC가 관련된다는 것을 뒷받침해준다[7]. PMA와 Go6976에 의해서는 분비가 저하되었는데 약물 자체에 의한 결과로 생각되었다. Rottlerin에 의해서는 별다른 차이가 없었다. PMA를 오래 처리하여 PKC를 완전히 depletion한 것은 control에 비해 48배나 증가된 분비 양상을 보였으며 PMA와 ionomycin이 함께 처리된 것도 이와 유사한 분비증가 현상을 나타내었다. 그러나 PMA와 cyclosporine A를 함께 처리한 것은 ionomycin을 처리한 것보다 분비가 감소되어 있는 것을 알 수 있었고 cyclosporine A만을 처리한 것은 PMA가 첨가된 경우보다 histamine이 더 많이 분비되었다. PP1, PP2A를 억제하는 okadaic acid를 처리한 것은 cyclosporine A보다 조금 더 증가된 histamine 분비정도를 보였다(Fig. 4). 이것은 지금까지 affinity chromatography와 pull-down assay, subcellular fractionation 그리고 immunoprecipitation에서 보아왔던 결과와는 일치하지 않는 결과들인데 이는 endogenous HRF에 의한 histamine 분비 양상이라기보다 처리된 약물자체가 일으키는 histamine 분비 결과라고 여겨졌다. 다만, human basophils에서 rottlerin은 자체로서 histamine 분비 효과가 없다고 알려져 있는데 이와 동일한 효과를 RBL-2H3 cell에서도 확인할 수 있었다. 또, Okadaic acid와 cyclosporine A의 경우를 비교할 때 PP2B가 억제된 경우 histamine 분비가 다소 감소했음을 알 수 있었다. 이는 억제된 PP2B가 HRF를 탈인산화를 방해하여 나타난 histamine 분비 저하 효과가 중첩되어 나타난 것으로 보인다. 따라서 이 실험에 더하여, 약물이 처

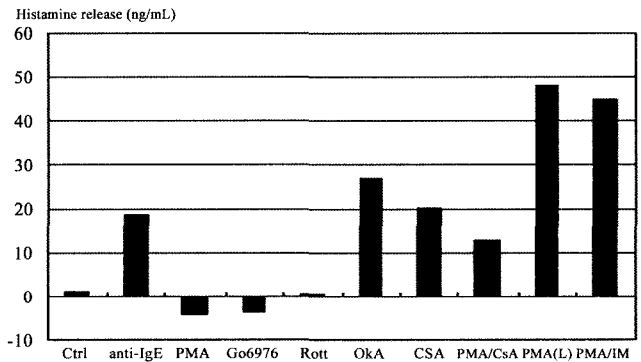


Fig. 4. Histamine release assay. RBL-2H3 cells cultured in 24 well plate were treated with the indicated drugs after serum starvation. The level of histamine in supernatants of drug treated cells were measured. RBL-2H3 cells treated indicated drugs without IgE showed that their spontaneous histamine releasing were effected by some drugs itself.

리된 cells에 외부에서 HRF를 가해주었을 때 histamine 분비가 어떻게 달라지는지를 함께 살펴보아야 약물에 의한 histamine 분비 효과를 배제하고 HRF에 의한 결과를 확인할 수 있을 것이다.

요 약

본 실험에서는 HRF가 다량 존재하는 RBL-2H3 세포주에 다양한 PKC isotype별 억제제를 처리하여 *in vitro*상에서 Na,K-ATPase $\alpha 1L3$ 를 이용한 pull-down assay와 RBL-2H3 세포를 이용한 membrane fractionation을 실시하였다. 그 결과 HRF는 *in vitro*에서 $\alpha 1L3$ 와 결합한다는 사실을 재확인할 수 있었고 실제 세포주 내에서 Na,K-ATPase와 결합한다는 것을 알 수 있었다. 사용한 약물로부터 PKC α , β , δ 뿐 아니라 protein phosphatase 2B(PP2B)도 HRF와 $\alpha 1L3$ 의 결합에 관여한다는 사실을 알 수 있었다. 또한 이들 PKC,

PP2B에 의해 인산화된 HRF 분자는 cytosolic fraction으로 이행할 수 있으며 이러한 결과는 탈인산화된 HRF가 Na,K-ATPase와 결합하여 Na,K-ATPase의 기능을 조절한다고 추정할 수 있다. 그러나 약물자체가 histamine 분비에 영향을 미칠 수 있으며 cytosolic HRF보다 exocytosis된 HRF가 histamine를 더 분비하도록 할 수 있으므로, 약물을 전처리 한 세포에 외부에서 HRF를 첨가하여 histamine이 유리되는 정도가 어떻게 변화하는지를 HRF를 가하지 않은 결과와 비교해야 할 것이다.

감사의 글

본 논문은 이화여자대학교 약학대학 약학연구소 연구비의 지원을 받았음.

REFERENCES

- Atkins, F., E. Middleton, D. Triggler, and G. Drzewiecki. 1981. Effects of calcium antagonists on human basophil histamine release. *J. Allergy Clin. Immunol.* **68**: 28.
- Beaven, M. A., and R. A. Baumgartner. 1996. Downstream signals initiated in mast cells by Fcepsilon RI and other receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 766-772.
- Bheekha-Escura, R., S. R. Chance, J. M. Langdon, D. W. Jr. MacGlashan, and S. M. MacDonald. 1999. Pharmacologic regulation of histamine release by the human recombinant histamine releasing factor. *J. Allergy Clin. Immunol.* **103**: 937-943.
- Chitpatima, S. T., S. Makrides, R. Bandyopadhyay, and G. Brawerman. 1988. Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucl. Acid Res.* **16**: 2350.
- Gentile, D. A. and D. P. Skoner. 1996. A role for the sodium, potassium adenosine triphosphatase (Na,K-ATPase) enzyme in degranulation of rat basophilic leukemia cells. *Clin. Exp. Allergy* **26**: 1449-1460.
- Hughes, G. J., S. Frutiger, N. Paquet, C. Pasquali, J. C. Sanchez, and A. Bairoch. 1993. Human liver protein map : a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes. *Electrophoresis* **18**: 150-155.
- Hultsch, T., P. Brand, S. Lohmann, J. Saloga, R. L. Kincaid., and J. Knop. 1998. Direct evidence that FK506 inhibition of Fcepsilon RI-mediated exocytosis from RBL mast cells involves calcineurin. *Arch. Dermatol. Res.* **290**: 258-263.
- Ludowyke, R. I., K. Kawasugi, and P. W. French. 1994. PMA and calcium ionophore induce myosin and F-actin rearrangement during histamine secretion from RBL-2H3 cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **29**: 354-365.
- MacDonald, S. M. 1997. Human recombinant histamine releasing factor. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **113**: 187-189.
- MacDonald, S. M., L. M. Lichtenstein, D. Proud, M. Plaut, R. M. Naclerio, D. W. MacGlashan, and A. Kagey-Sobotka. 1987. Studies of IgE-dependent histamine releasing factors : heterogeneity of IgE. *J. Immunol.* **139**: 506-512.
- MacDonald, S. M., T. Rafnar, J. Langdon, and L. M. Lichtenstein. 1995. Molecular identification of an IgE-dependent histamine releasing factor. *Science* **269**: 688-690.
- MacGlashan, D. Jr., K. Miura, and S. Lavens-Phillips. 2000. Pharmacology of IgE-mediated desensitization of human basophils : Effects of protein kinase C and Src-family kinase inhibitors. *Biochem Pharmacol.* **60**: 1717-1727.
- Miadonna, A., A. Tedeschi. and E. Leggiere. 1987. Effects of nifedipine on histamine release from human basophil leucocytes. *Allergy* **42**: 298-304.
- Sampson, H. A.; K. R. Broadbent, and J. Bernhisel-Broadbent. 1989. Spontaneous release of histamine from basophils and histamine releasing factor in patients with atopic dermatitis and food hypersensitivity. *N. Engl. J. Med.* **321**: 228-232.
- Sierchio, J., D. Ritchie, C. Bisshop, and R. Lapetola. 1983. Calcium channel blockers in immediate hypersensitivity. *Pharmacologist* **25**: 120.
- Smith, T. F., F. Sanchez-Legrand, and L. P. Mckean. 1992. Role of sodium in mediator release from human basophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**: 978-986.
- Wantke, F., D. W. MacGlashan, J. M. Langdon, and S. M. MacDonald. 1999. The human recombinant histamine releasing factor : functional evidence that it does not bind to the IgE molecule. *J. Allergy Clin. Immunol.* **103**: 642-648.
- Yoon, T., J. Jung, M. Kim, K. M. Lee, E. C. Choi, and K. Lee. 2000. Identification of the self-interaction of rat TCTP/IgE-dependent histamine-releasing factor using yeast two-hybrid system. *Arch. Biochem. Biophys.* **384**: 379-382.

(Received Aug. 8, 2005/Accepted Oct. 19, 2005)