

FK506에 의한 Jurkat 세포자멸사 유전자 발현분석

한일병원 외과, ¹식품의약품안전청, ²전남대학교 의과대학 외과학교실

장태영 · 이재숙¹ · 우고운 · 김현철 · 이호균² · 정상영²

Apoptosis Gene Expression Pattern Analysis of Jurkat Cells Treated with FK506

Tae Young Jang, M.D., Jae Sook Lee, M.D.¹, Go Woon Woo, M.D., Hyun Chul Kim, M.D.,
Ho Kyun Lee, M.D.², Sang Young Chung, M.D.²

Department of Surgery, Hanil Hospital, ¹Korea Food & Drug Administration, Seoul,

²Department of Surgery, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Purpose: FK506 (tacrolimus) is a widely used immunosuppressive agent in the treatment of various medical conditions, including autoimmune disease, bone marrow and organ transplantations. Previously FK506 was known to cause apoptotic death of human Jurkat T cells.

Methods: The current study was designed to analyze the gene expression pattern of Jurkat T cells after FK506 application by using cDNA microarray. Treatment of Jurkat T cells with FK506 resulted in a decrease of cell viability in a time- and dose-dependent manner. Next, total RNA of Jurkat T cells was extracted by using TRIzol reagent and used to carry out a confirmation test for the purity and integrity of total RNA.

Results: Gene expression levels related to apoptosis and cell cycle process were mainly focused to analyze in FK506-treated Jurkat T cells. According to the inhibition of calcineurin activity, MARCKS in PKC substrates and Sp3 transcription factor was markedly increased in FK506-treated cells. Also, cell cycle control gene Id1 and Id3 were induced in expression from FK506-treated Jurkat T cells. However, FK506 decreased the expression of Src homology 2, G protein, and MEK 2 genes in bioactive peptide induced signaling pathway. It also reduced the expression level of the insulin receptor, DRPLA and Bai1-associated protein 2 genes, which are involved in the regulation of cell motility and morphology control.

Conclusion: The author will continue to pursue the exact functional roles of genes that are markedly changed in expression by FK506 in human Jurkat T cells in vitro and in vivo experimental models. (J Korean Surg Soc 2009;77:225-237)

Key Words: Tacrolimus, Gene expression, Apoptosis, Jurkat cell

중심 단어: 타크로리무스, 유전자 발현, 세포자멸사, Jurkat 세포

서 론

FK506 (tacrolimus)은 토양 진균류인 *Streptomyces tsuku-*

책임저자: 정상영, 광주시 동구 학1동 8번지
☎ 501-746, 전남대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 062-220-6456, Fax: 062-227-1635
E-mail: sycpvt@jnu.ac.kr

접수일 : 2009년 3월 31일, 게재승인일 : 2009년 7월 21일

baensis에서 분리된 macrolide 계통의 항생제와 유사한 구조를 가지고 있으며 1982년 일본에서 처음 개발되어 1990년 간이식에 처음으로 사용된 후 현재는 신장, 췌장, 폐 및 골수 이식 등 전반적인 기관 이식 수술 후에 급성 거부 반응을 억제하는데 매우 효과적인 면역 억제제로 널리 사용되고 있다.(1) FK506의 효과는 세포내 calcineurin과 calcium에 의한 신호전달 과정을 저해하여 일차적으로 T세포를 억제하는데 관여한다. 이는 FK506이 세포질 내에 존재하는

FK506 수용체인 FK506-binding proteins (FKBPs)과 결합하여 heterodimeric 복합체를 형성하여 calcineurin의 활성을 억제하고 calcineurin에 의해 촉진되는 일련의 과정을 억제함으로써 이루어진다.(2,3) FK506은 칼슘 및 칼모둘린 의존성 serine/threonine 단백질산화 효소인 calcineurin의 활성화를 억제하여 nuclear factor of activated T cells (NFATs)의 탈인산화를 억제함으로써 NFATs에 의한 각종 염증 유발성 사이토카인의 전사를 억제하고 T 림프구 활성화를 억제하여 면역 기능을 저해하는 것으로 알려져 있다.(4) 그러나 FK506의 장기적인 사용은 심혈관 질환, 신장 기능의 저하와 신경독성과 같은 부작용을 일으키며 특히 FK506에 의한 당뇨병의 발병이 흔하게 발생하는 것으로 알려졌다.(5,6)

본 연구에서는 사람 Jurkat T 세포를 대상으로 FK506에 의한 세포독성과 관련하여 cDNA microarray 분석을 통하여 세포자멸사와 관련된 유전자의 발현 양상 및 생물학적 경로(biological pathway) 등을 분석함으로써 면역 억제제인 FK506의 분자 생물학적 기반을 제공하고자 하였다. 그 결과 FK506은 사람 Jurkat T세포에서 세포자멸사, 세포주기 조절에 관련된 유전자들의 발현이 증가 또는 감소하였고 thrombin, bradykinin 및 angiotensin II와 같은 bioactive peptide에 의한 MAP kinase 관련 유전자, insulin 및 dentatorubral-pallidoluysian atrophy 신호전달 관련 유전자의 발현 감소 등 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

방 법

1) 재료

(1) 세포주: 사람 T 림프구 세포주인 Jurkat 세포는 한국세포주 은행(KNCC, 서울대학교)으로부터 구입하여 계대 배양하면서 실험을 실시하였다.

(2) 시약 및 기기: 실험에 필요한 RPMI 1640, 항생제 및 우태아 혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA) 제품을, 배양용기(24-well plate와 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 TRIzol은 Invitrogen사(Calsbed, CA, USA)에서 구입하였다.

2) 방법

(1) 세포주 배양 및 시약 처리: 세포는 CO₂ 세포 배양기(3

7°C, 5% CO₂)에서 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지로 배양하였으며, 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 지수기(Log Phase)에 있는 세포에 FK506을 처리한 후 세포 독성 현상과 Microarray를 위한 실험을 수행하였다. FK506은 10 mM 농도로 DMSO에 녹여 -20°C에 보관하였고, RPMI 1640 배지에 희석하여 사용하였다.

(2) 세포생존율 측정: 세포의 생존율은 MTT 분석법으로 측정하였다. 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1×10^5 /ml)를 1 ml씩 분주하여 3시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정화시킨 후 FK506을 1.25~40 μ M/ml의 다양한 농도로 처리하였다. MTT 용액(5 mg/ml; phosphate buffered saline, PBS; pH7.4)은 각각의 배양세포에 배양액의 1/10을 첨가하여 4시간 반응 후 well-plate를 1,500 rpm으로 15분 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 바닥에 부착된 불용성의 보라색 formazan을 완전히 건조한 후 1 ml의 DMSO (Dimethyl sulfide)용액으로 충분히 용해한 다음, 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 545 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정상 대조군의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

(3) 세포내 총 RNA 추출: 세포를 10 cm dish에 2×10^6 /10 ml의 농도로 분주하여 3시간 안정화하고 10 및 20 μ M/ml 농도의 FK506을 각각 48시간 처리하여 15 ml conical 튜브에 옮겨서 1,200 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 1 ml의 TRIzol로 세포를 용해하였고 제조사의 기술된 내용에 의거하여 total RNA를 추출하였다. 얻어진 상층액과 동일한 양의 isopropanol을 첨가하여 혼합하고 -20°C에서 12시간 반응시켜 14,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 침전물을 70% 에탄올에 세척하여 자연 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH8.0, 1 mM EDTA, pH8.0)을 가하여 RNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 Spectrophotometer (Beckman사)로 optical density (OD)값 측정하여 RNA를 정량하였다. 추출된 RNA 표본의 순도는 EtBr이 포함된 1.5%의 formamide-agarose gel을 이용하여 전기영동하고 UV 시스템을 이용하여 확인하였다.

(4) Microarray용 RNA 순도 측정: 얻어진 총 RNA의 cDNA microarray 적합성 여부를 확인하기 위하여 국내의 GenomicTree사에 분석 의뢰하였다. GenomicTree사의 분석 기준은 migration, peak pattern, 28s/18s ribosomal RNA의 비율 및 OD260/230비율을 고려하여 평가하여 RIN (RNA Integrity Number) 값을 결정한다. RNA의 quality는 통계적인 수치로 1~10의 범위를 가지며 고순도의 시료를 요구하는 DNA

Table 1. RNA purification for microarray

Sample	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	OD _{260/230}	Total (μg)	Ratio (28s/18s)	RIN*
Jurkat Con-48h	2.5062	1.94	120.2976	2.0	9.9
Jurkat F10-48h	2.2160	2.30	106.3680	2.0	9.9
Jurkat F20-48h	1.7765	2.04	85.2720	1.9	10.0

*RIN = RNA integrity number.

microarray analysis를 위한 권장 값은 7 이상이 요구된다. 본 실험에서 얻어진 RNA의 순도는 10에 근접하여 다음 분석에 적합함을 확인하였다(Table 1).

(5) cDNA microarray method: Agilent's Human whole genome 4×44K glass slide cDNA microarrays를 이용하여 분석하였다. FK506 10 μM 과 20 μM 농도의 실험군은 Cy5로 표지하여 각각 Cy3로 표지된 대조군과 비교하여 다음의 과정을 거쳐 분석하였다.

① 증폭 및 라벨링: Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit PLUS를 이용하여 증폭 및 라벨링 과정을 수행하였다.

② Microarray hybridization: Agilent's Gene Expression Hybridization Kit를 이용하여 수행하였다.

③ Microarray wash: Agilent's Gene Expression Wash Buffer Kit를 이용하였다.

④ Scan and image analysis: Agilent's DNA microarray scanner 및 Feature Extraction Software를 이용하였다.

(6) Data Analysis: Agilent's GeneSpring Software를 이용하여 normalization, clustering 및 filtering하여 2배 이상의 증감을 보이는 유의한 유전자를 선별하였고 이들 유전자의 기능을 웹사이트의 DAVID's program을 이용하여 biological function을 분석하였다.

결 과

1) FK506이 Jurkat 세포의 생존율에 미치는 영향

Jurkat 세포에 대한 면역억제제 FK506의 독성을 조사하기 위하여 FK506을 다양한 농도로 96시간 처리한 후 세포 생존율을 MTT 방법으로 분석하였다. Jurkat 세포에 10 μM 농도의 FK506을 72시간 처리시 62.5%, 20 μM 농도에서는 45.7%, 30 μM 농도에서는 33.5% 및 40 μM 농도에서는 18.8%의 세포생존율을 나타내었다. 또한 Jurkat 세포에 1.25 μM 농도의 FK506을 96시간 처리 시 세포생존율은 91.7%, 2.5 μM 농도에서는 84.3%, 5 μM 농도에서는 72.9%, 10 μM

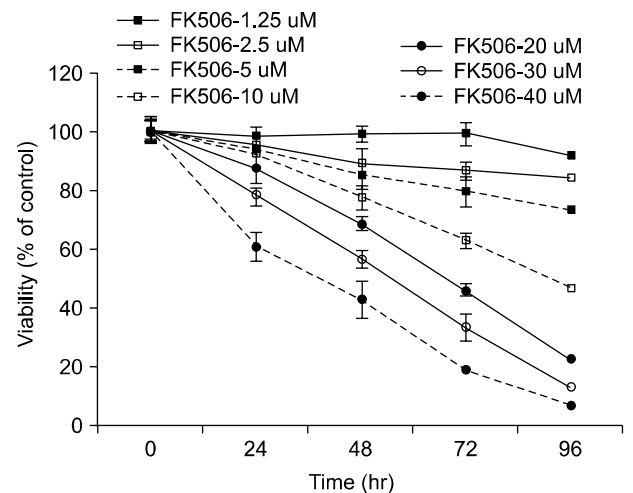


Fig. 1. FK506 decreased the viability of Jurkat cells in dose- and time-dependent manners. Cells were treated with various concentration of FK506 for 96 hours, then cell viability was measured by MTT assay after FK506 treatment. Data represent the mean \pm standard deviation (SD) of triplicates.

농도에서는 46.2%, 20 μM 농도에서는 22.4%, 30 μM 농도에서는 12.9% 및 40 μM 농도에서는 6.6%의 세포생존율을 보였다. 이상의 결과 Jurkat 세포에서 FK506에 의한 세포 독성은 농도 및 시간 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

2) FK506 처리 후 Jurkat 세포에서 total RNA 추출 및 Scatter와 MA plot 분석

총 RNA의 integrity는 EtBr이 함유된 1.5% formamide-agarose gel로 확인하였으며, Agilent's 2100 Bioanalyzer System을 이용하여 total RNA의 quality 및 integrity를 재확인하였다.

분산그래프에서는 chip 상의 모든 spots들을 표시한 것으로 Cy3-channel (가로축)과 Cy5-channel (세로축)에서 각 signal intensity값을 나타낸다. 가운데 사선은 각 channel에서 같은 signal intensity 값을 가진 probe들이 분포하고 있는 것을 나타낸다. 그래프 상에서 점선 밖의 spot은 2배 이상 발현량의 증가 혹은 감소를, 점선 안쪽은 2배 이하 발현량의

증가 또는 감소를 나타낸 것으로 microarray chip data에서 취하지 않고 버린다(Fig. 2A). 또한 MA plot은 대조군에 대한 각 실험군 유전자 발현의 변이에 대한 각 channel의 signal intensity의 평균값과 ratio (R/G : $R = \text{Cy5 signal} - \text{background}$, $G = \text{Cy3 signal} - \text{background}$) 값 사이의 상관관계를 보여주는 그림으로 가로축은 $A = (R + G)/2$, 세로축은 $M = (R/G)$ 값을 나타낸다. 가운데 선($M=1$)은 $R=G$ 선을 표시한 것이며, $M=2$ 선은 G 값 보다 R 값이 2배 높은 값을 가진 probe들이 분포하고 있는 것을 나타낸 것이고, 그 이상의 spots는 2배 이상 높은 signal intensity 값을 가진 probe들의 분포를 나타내고 있으며, 아래 $M=0.5$ 선은 반대의 경우를 나타낸다(Fig. 2B).

3) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 유전자 발현양에 따른 데이터 분석

데이터 분석을 위하여 chip의 데이터들은 global normalization한 후 각 유전자들의 발현양을 분석하였다. 대조군 유전자 발현양을 1로 하여 실험군의 상대적 발현양을 나타내어 2배 이상 증감한 유전자들만 데이터로 나타내었다. 전체적으로 각 cDNA microarray에서 증가된 background의 signal을 제거한 결과 29,163의 real gene을 얻었고, chip분석 결과 값으로 이용할 수 없는 bad spots를 제거하고 대조군과 비교하여 $10 \mu\text{M}$ 농도의 FK506 처리군은 28,881개, $20 \mu\text{M}$ 농도의 FK506 처리군은 27,756개의 유전자가 chip분석 결과 값으로 유의하게 나타났다. 이 중에서 대조군과 비교하여 2배 이상 증가 또는 감소된 유전자를 선별하여 hierarchical clustering하여 TreeView 프로그램으로 dendrogram을 그렸다. 발현양 증가는 적색, 발현양 감소는 녹색으로 표

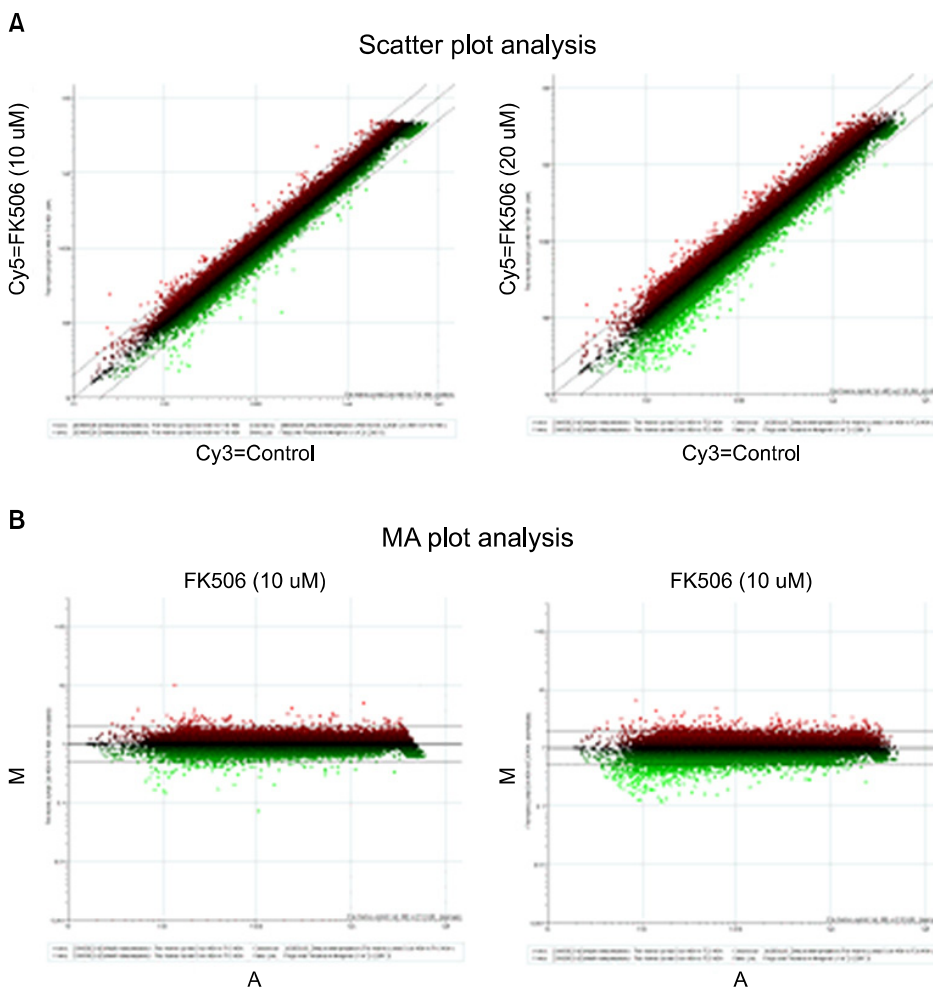


Fig. 2. Modulation of gene expression following FK506-treated Jurkat cells. Total RNA was prepared from Jurkat using TRIzol as described by manufacturer. (A) Scatter plot analysis. The x and y axes represent Cy3 (Control) and Cy5 (FK506 $10 \mu\text{M}$ or $20 \mu\text{M}$) signal intensity values, respectively. These represent up-regulated (upper lines; red spots) or down-regulated (under lines; green spots) genes. (B) MA plot analysis. The x and y axes represent A ($(R+G)/2$) and M (R/G) signal intensity values. The R and G represent Cy5-background and Cy3-background signal intensity, respectively. These represent up-regulated (upper lines; red spots) or down-regulated (under lines; green spots) genes.

Genetree for >2x fold-changed genes in 1 of 2 arrays

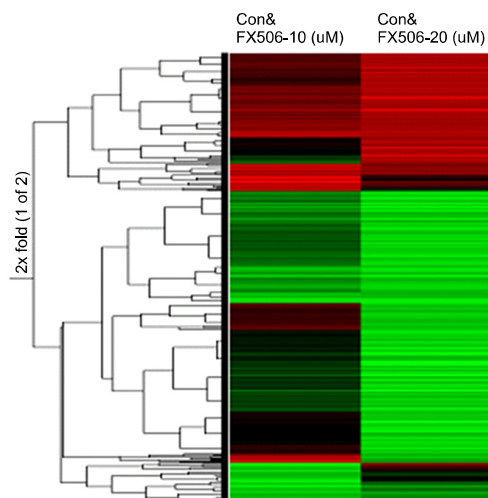


Fig. 3. Cluster image showing the different classes of total gene expression profiles.

시하였으며 chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다(Fig. 3).

4) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 발현 증가된 유전자의 biological processing 분류

대조군과 비교하여 10 μ M 농도의 FK506 처리한 실험군에서 2배 이상 증가한 유전자는 308개중 223개였으며 20 μ M 농도의 FK506을 처리한 실험군과 비교시 2배 이상 증가한 유전자는 289개중 202개였다. 이들 유전자는 각각 GenBank를 통해 확인하였으며, FK506 처리에 의해 2배 이상 증가한 총 348개중 251개의 유전자는 DAVID's Bioinformatics Resource Analysis를 통해 분석하였으며, Functional gene ontology에 따라 182개의 유전자를 총 58종류의 다양한 biological processing과 관련하여 포로 분류하였다(Table 2).

Table 2. Two-fold increase of biological processes

Term	Gene number	%	Term	Gene number	%
Positive regulation of programmed cell death	7	2.79	DNA repair	7	2.79
Amine biosynthetic process	4	1.59	Establishment of tissue polarity	2	0.80
Cellular macromolecule metabolic process	51	20.32	Translational initiation	4	1.59
Cellular localization	17	6.77	Regulation of locomotion	4	1.59
Positive regulation of microtubule polymerization	2	0.80	Chromatin assembly	5	1.99
Cell morphogenesis	12	4.78	Somatic muscle development	2	0.80
Cellular biosynthetic process	21	8.37	Regulation of biological quality	18	7.17
Cellular developmental process	32	12.75	Biological regulation	74	29.48
Basic amino acid transport	2	0.80	Multicellular organismal development	38	15.14
Chromatin assembly or disassembly	5	1.99	Protein-DNA complex assembly	8	3.19
Establishment and/or maintenance of chromatin architecture	10	3.98	Macromolecular complex assembly	18	7.17
Primary metabolic process	119	47.41	Vasculature development	6	2.39
Cellular metabolic process	113	45.02	mRNA metabolic process	9	3.59
Nucleic acid metabolic process	58	23.11	DNA metabolic process	22	8.76
Monocyte differentiation	2	0.80	Regulation of cellular component organization and biogenesis	4	1.59
Interphase of mitotic cell cycle	4	1.59	B cell activation	4	1.59
Regulation of biosynthetic process	6	2.39	Coenzyme metabolic process	6	2.39
Cofactor metabolic process	7	2.79	Cell differentiation	32	12.75
Vasculogenesis	3	1.20	Organelle organization and biogenesis	24	9.56
Cellular structure morphogenesis	12	4.78	Regulation of biological process	66	26.29
Cellular component assembly	18	7.17	Regulation of cell size	6	2.39
Macromolecule metabolic process	106	42.23	Anatomical structure morphogenesis	24	9.56
Developmental process	52	20.72	Chromosome organization and biogenesis	11	4.38
Blood vessel development	6	2.39	Cell growth	6	2.39
Interphase	5	1.99	Nitrogen compound biosynthetic process	5	1.99
Metabolic process	126	50.20	Cellular component organization and biogenesis	54	21.51
Multicellular organismal process	53	21.12	Establishment of cellular localization	17	6.77
Blood vessel morphogenesis	6	2.39	Cellular protein metabolic process	50	19.92
Regulated secretory pathway	4	1.59	G1/S transition of mitotic cell cycle	3	1.20

5) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 세포자멸사 촉진 유전자의 발현 변화

cDNA microarray chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다. 세포고사의 양성 제어(positive regulation of programmed cell death) 유전자 중 FK506처리에 의해 Jurkat 세포에서 2배 이상 증가한 유전자들을 Table 3에 나타내었다. FK506에 의해 증가한 유전자는 7개였으며 이 중 Transglutaminase 2와 Natural cytotoxicity triggering receptor 1은 FK506 처리 농도에 의존적으로 발현이 증가하였다(Table 3).

6) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 G1/S transition of mitotic cell cycle 관련 유전자의 발현 변화

cDNA microarray chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다. 세포의 주기와 관련된 G1/S transition of mitotic cell cycle 유전자중 FK506 처리에 의해 Jurkat 세포에서 2배 이상 증가한 유전자들을 Table 4에 나타내었다. FK506에 의해 증가한 유전자는 3개였으며 이들 유전자는 FK506 처리 농도에 의존적으로 발현이 증가하였다(Table 4).

7) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 발현 감소된 유전자의 biological processing 분류

대조군과 비교하여 10 μ M 농도의 FK506 처리한 실험군

에서 2배 이상 감소한 유전자는 713개 중 598개였으며 20 μ M 농도의 FK506을 처리한 실험군과 비교 시 2배 이상 증가한 유전자는 397개 중 337개였다. 이들 유전자는 각각 GenBank를 통해 확인하였으며, FK506 처리에 의해 2배 이상 감소한 총 744개의 유전자중 618개의 유전자는 DAVID's Bioinformatics Resource Analysis를 통해 분석하였으며, Functional gene oncology에 따라 443개의 유전자를 다양한 biological processing과 관련하여 포로 분류하였다(Table 5).

8) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 cell cycle process 관련 유전자의 발현 변화

cDNA microarray chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다. 세포의 주기와 관련된 cell cycle process 유전자중 FK506 처리에 의해 Jurkat 세포에서 2배 이상 감소한 유전자들을 Table 6에 나타내었다. FK506에 의해 감소한 유전자는 32개였으며 이들 유전자는 FK506 처리 농도에 의존적으로 발현이 감소하였다(Table 6).

9) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 cell death 관련 유전자의 발현 변화

cDNA microarray chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다. 세포의 사멸과 관련된 cell death 유전자중 FK506 처리에 의해 Jurkat 세포에서 2배 이상 감소한 유전자들을 Table 7에 나타내었다.

Table 3. Two-fold positive regulation of programmed cell death (7 Genes)

GENBANK	DAVID gene name	FK506 10 μ M	FK506 20 μ M
NM_198951	Transglutaminase 2	1.39	2.03
NM_138818	Chromosome 9 open reading frame 65	2.99	1.81
NM_002167	Inhibitor of DNA binding 3	4.92	1.10
NM_004064	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, kip1)	1.44	2.03
NM_005157	V-Abl leukemia viral oncogene homolog 1	1.02	2.34
BC051787	Nacht, leucine rich repeat and PYD (pyrin domain) containing 1	2.29	1.09
NM_004829	Natural cytotoxicity triggering receptor 1	1.48	2.04

Table 4. Two-fold G1/S transition of mitotic cell cycle (3 Genes)

GENBANK	DAVID gene name	FK506 10 μ M	FK506 20 μ M
NM_000944	Protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform (Calcineurin A alpha)	1.48	2.16
NM_005504	Branched chain aminotransferase 1, cytosolic	1.23	2.03
NM_004064	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, kip1)	1.44	2.03

Table 5. Negative two-fold regulated biological process

Term	Gene number	%
Carbohydrate metabolic process	27	4.37
Multicellular organismal development	79	12.78
Mitochondrion organization and biogenesis	7	1.13
Hexose catabolic process	6	0.97
Ras protein signal transduction	14	2.27
Cell cycle phase	16	2.59
Biopolymer methylation	4	0.65
Organelle organization and biogenesis	43	6.96
Cell cycle process	33	5.34
Biopolymer modification	88	14.24
Secretory pathway	12	1.94
Cellular process	398	64.40
Regulation of apoptosis	24	3.88
Regulation of progression through cell cycle	22	3.56
Regulation of a molecular function	23	3.72
Carboxylic acid metabolic process	24	3.88
Cellular component organization and biogenesis	105	16.99
Cyclic nucleotide metabolic process	5	0.81
Protein amino acid phosphorylation	28	4.53
Regulation of developmental process	14	2.27
Protein modification process	81	13.11
Cell development	46	7.44
Protein complex assembly	14	2.27
Cellular protein metabolic process	117	18.93
Cell death	32	5.18
System development	65	10.52
Cellular macromolecule metabolic process	118	19.09
Protein transport	28	4.53
Histone modification	6	0.97
Biopolymer metabolic process	176	28.48
Covalent chromatin modification	6	0.97
Chromatin modification	12	1.94
Cellular lipid metabolic process	25	4.05
Protein ubiquitination	7	1.13
Cholesterol metabolic process	6	0.97
Apoptosis	30	4.85
Metabolic process	287	46.44
Primary metabolic process	265	42.88
Macromolecule localization	36	5.83
Cellular metabolic process	258	41.75
Glycerophospholipid metabolic process	6	0.97
Protein localization	33	5.34
Intracellular transport	31	5.02
Secretion	17	2.75
Protein autoprocesing	5	0.81
Protein processing	7	1.13
Post-translational protein modification	65	10.52
Glycolysis	6	0.97
Developmental process	119	19.26
Nervous system development	36	5.83
Intracellular protein transport	20	3.24

Table 5. Continued

Term	Gene number	%
Macromolecule metabolic process	231	37.38
Organic acid metabolic process	24	3.88
Protein metabolic process	126	20.39
Filopodium formation	3	0.49
Alcohol metabolic process	18	2.91
Protein modification by small protein conjugation	7	1.13
Cell differentiation	64	10.36
Secretion by cell	14	2.27
Death	32	5.18
Regulation of cell cycle	22	3.56
Establishment of protein localization	30	4.85
Morphogenesis of an epithelial sheet	2	0.32
Establishment and/or maintenance of chromatin architecture	16	2.59
Protein amino acid autophosphorylation	5	0.81
DNA packaging	16	2.59
Vesicle-mediated transport	26	4.21
Chromosome organization and biogenesis	18	2.91
Microspike biogenesis	3	0.49
Regulation of programmed cell death	24	3.88
Monosaccharide catabolic process	6	0.97
M phase	14	2.27
Double-strand break repair	4	0.65
Establishment of cellular localization	39	6.31
Glucose catabolic process	6	0.97
Phosphate metabolic process	40	6.47
Peptidyl-arginine methylation	2	0.32
Phosphorus metabolic process	40	6.47
Cell cycle	37	5.99
Sterol metabolic process	7	1.13
Cellular localization	40	6.47
Monosaccharide metabolic process	10	1.62
Detection of stimulus	6	0.97
Cellular developmental process	64	10.36
Peptidyl-arginine modification	2	0.32
Regulation of cell differentiation	10	1.62
Anatomical structure development	82	13.27

FK506에 의해 감소한 유전자는 33개였으며 이들 유전자는 FK506 처리 농도에 의존적으로 발현이 감소하였다(Table 7).

10) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 Calcineurin 관련 유전자의 발현 변화

cDNA microarray chip에 사용된 total gene들과 각 기능에 관련된 각각의 cluster를 모아서 분류하였다. 면역억제제 FK506은 세포내 NFAT의 인산화를 유지하여 세포의 증식을 억제하는 serine/threonine kinase의 일종인 calcineurin의

Table 6. Negative two-fold regulated cell cycle process (32 Genes)

GENBANK	DAVID gene name	FK506 10 μ M	FK506 20 μ M
NM_002634	Prohibitin	0.85	0.40
AF086214	Tumor necrosis factor superfamily member 8	0.45	1.13
NM_032271	TNF receptor-associated factor 7	0.88	0.42
AB209345	Atrophin 1	0.84	0.34
NM_002575	Serpin peptidase inhibitor, member 2	0.54	0.43
NM_138622	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	0.46	0.35
BC033331	Clusterin	0.37	0.25
NM_022086	Engulfment and cell motility 2	0.79	0.39
NM_015316	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 13B	0.60	0.39
NM_001455	Forkhead box O3A	0.87	0.22
NM_173824	Chromosome 3 open reading frame 38	0.81	0.47
NM_021209	Caspase recruitment domain family, member 12	0.76	0.49
BE930053	Annexin A1	0.80	0.39
NM_003901	Sphingosine-1-phosphate lyase 1	0.81	0.44
NM_002457	Mucin 2, intestinal/tracheal	0.95	0.47
NM_001737	Complement component 9	0.36	0.29
NM_003877	Suppressor of cytokine signaling 2	0.89	0.42
NM_020313	Cytokine induced apoptosis inhibitor 1	0.88	0.50
NM_032797	Hypothetical protein MGC13000	1.20	0.31
NM_000333	Ataxin 7	1.02	0.47
NM_014800	Engulfment and cell motility 1	0.74	0.42
NM_020397	Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase ID	0.81	0.32
NM_032375	AKT1 substrate 1 (Proline-rich)	0.87	0.24
NM_139015	DKFZP586C1324 protein	0.96	0.49
NM_006282	Serine/Threonine kinase 4	0.86	0.32
NM_002371	Mal, T-cell differentiation protein	0.33	0.26
NM_002312	Ligase IV, DNA, ATP-dependent	0.89	0.42
NM_014281	Fuse-binding protein-interaction repressor	2.23	0.44
AJ711693	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform	0.71	0.43
NM_006384	Calcium and integrin binding 1 (Calmyrin)	1.15	0.39
NM_004309	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	1.26	0.37
NM_012306	Fas apoptotic inhibitory molecule 2	0.89	0.42

억제제로 잘 알려져 있다. Jurkat 세포에서 myristoylated alanine-rich protein kinase c substrate (MARCKS) (NM_002356) 유전자는 10 μ M 농도의 FK506 처리 시 0.7배의 발현을 보였고, 20 μ M 농도의 FK506 처리 시에는 2.06배로 발현이 증가하였다. 또한, transcription factor sp3 (SP3) (NM_003111) 유전자는 10 μ M 농도의 FK506 처리 시 1.05배, 20 μ M 농도의 FK506 처리 시 2.04배로 FK506 농도 의존적으로 증가하였다. 이들은 DAVID's를 통한 분석 결과 Keratinocyte 분화와 관련된 유전자들임을 확인할 수 있었다(Table 8).

11) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 G0~S 전이 관련 유전자의 발현 변화

T세포 활성화와 증식에는 수많은 전사인자가 관련되어 있

는데 이중 G0에서 S기 1로의 전이에 관련된 전사인자인 Id의 발현을 조사하였다. cDNA microarray 분석 결과 FK506 처리시 Jurkat 세포에 3종류의 Ids중 Id 1과 Id 3의 발현 변화가 관찰되었다. Id 1 (NM_002165) 유전자는 10 μ M 농도의 FK506 처리시 2.41배, 20 μ M 농도의 FK506 처리시 3.07배 발현이 증가하였고, Id 3 (NM_002167) 유전자는 10 μ M 농도의 FK506 처리시 4.92배, 20 μ M 농도의 FK506 처리시 1.1배의 발현 증가를 보였다(Table 9).

12) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 signaling pathway 관련 유전자의 발현 변화

cDNA microarray 분석 결과 FK506 처리시 Jurkat 세포에서 thrombin, bradykinin 및 angiotensin II와 같은 bioactive

Table 7. Negative two-fold regulated cell death (33 Genes)

GENBANK	DAVID gene name	FK506 10 μ M	FK506 20 μ M
NM_001789	Cell division cycle 25A	0.85	0.49
NM_002634	Prohibitin	0.85	0.40
BC051317	Retinoblastoma binding protein 6	0.75	0.47
NM_004036	Adenylate cyclase 3	0.69	0.48
NM_006109	Protein arginine methyltransferase 5	0.87	0.43
NM_001722	Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D, 44 kDa	1.00	0.48
NM_022447	PAP associated domain containing 5	0.78	0.49
NM_015316	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 13B	0.60	0.39
NM_006429	Chaperonin containing tcp1, subunit 7 (ETA)	0.84	0.50
NM_005858	A kinase (PrkA) anchor protein 8	0.77	0.46
NM_017900	Aurora kinase A interacting protein 1	0.78	0.47
NM_183001	Shc (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	0.60	0.39
NM_002498	Nima (never in mitosis gene A)-related kinase 3	0.64	0.48
NM_015705	Run and Tbc1 domain containing 3	1.19	0.43
U73799	Dynactin 1 (p150, glued homolog, Drosophila)	0.27	1.52
NM_003443	Zinc finger and BTB domain containing 17	0.97	0.46
NM_176095	CDK5 regulatory subunit associated protein 3	0.51	0.35
NM_014268	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	0.74	0.34
NM_133378	Titin	0.41	0.75
NM_198219	Inhibitor of growth family, member 1	0.92	0.50
NM_003579	RAD54-like (<i>S. cerevisiae</i>)	0.70	0.50
NM_001896	Casein kinase 2, alpha prime polypeptide	0.59	0.37
NM_018560	Putative oxidoreductase	0.97	0.35
NM_175932	Proteasome (prosome, macropain) 26s subunit, non-ATPase, 13	0.81	0.44
BX648945	Sestrin 2	0.78	0.46
AJ711693	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform	0.71	0.43
BE019257	Cyclin D3	0.57	0.41
NM_006879	MDM2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	0.89	0.36
AK021983	SCC-112 protein	0.81	0.13
NM_172171	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CAM kinase) II gamma	0.68	0.45
NM_014751	Metastasis suppressor 1	0.41	0.77
NM_006337	Microspherule protein 1	0.84	0.44
NM_004442	Eph receptor B2	0.55	0.32

Table 8. Changes associated with calcineurin in keratinocyte differentiation by FK506

GENBANK	Name	FK506 10 μ M	FK506 20 μ M
NM_002356	Myristoylated alanine-rich protein kinase c substrate	0.70	2.06
NM_003111	Sp3 transcription factor	1.05	2.04

Table 9. Changes of Id proteins in regulating the G0-to-S transition of the cell cycle by FK506

GENBANK	Name	FK506 10 μ M	FK506 20 μ M
NM_002165	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	2.41	3.07
NM_002167	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	4.92	1.10

Table 10. Changes of bioactive peptide induced signaling pathway by FK506

GENBANK	Name	FK506 10 μ M	FK506 20 μ M
NM_002165	Mitogen-activated protein kinase kinase 2	1.27	0.37
BC063426	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11	0.43	0.43
NM_183001	Src homology 2 domain containing transforming protein 1	0.60	0.39

Table 11. Changes of gene associated with Diabetes and DRPLA pathway

GENBANK	Name	FK506 10 μ M	FK506 20 μ M
NM_000280	Insulin receptor	1.15	0.44
AB209345	Atrophin 1	0.84	0.34
NM_017450	Bai1-associated protein 2	0.65	0.30

peptide에 반응하는 signaling pathway에 관여된 유전자의 발현이 현저히 감소하였다. Mitogen-activated protein kinase kinase 2 (MAPKK) (NM_030662) 유전자는 10 μ M 농도의 FK506 처리시 1.27배 증가하였으나 20 μ M 농도의 FK506 처리시 0.37배로 발현이 감소하였고, Guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 11 (BC063426) 유전자는 10 μ M 농도의 FK506 처리시 0.43배로 발현이 감소하였으며, 20 μ M 농도의 FK506 처리시에도 동일한 발현 양상을 보였다. 또한 Shc (src homology 2 domain containing) transforming protein 1 (NM_183001) 유전자는 10 μ M 농도의 FK506 처리시 0.6배, 20 μ M 농도의 FK506 처리시 0.39배로 감소하였다(Table 10).

13) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 Diabetes와 DRPLA pathway 관련 유전자의 발현 변화

FK506 처리시 Jurkat 세포에서 당뇨병과 연관된 유전자의 발현을 cDNA microarray 분석결과를 통해 조사하였다. Jurkat 세포에서 insulin receptor (NM_000208) 유전자는 10 μ M 농도의 FK506 처리시 1.15배로 발현이 증가하였으며 20 μ M 농도의 FK506 처리시 0.44배로 발현이 감소하였다. 또한 Haw River syndrome (HRS)의 원인이 되는 atrophin 1 (AB209345) 유전자는 10 μ M 농도의 FK506 처리시 0.84배, 20 μ M 농도의 FK506 처리시 0.34배로 발현이 감소하였다. 세포의 mobility와 morphogenesis에 관련된 bai1-associated protein 2 (NM_017450) 유전자는 10 μ M 농도의 FK506 처리시 0.65배, 20 μ M 농도의 FK506 처리시 0.3배로 감소하였다(Table 11).

고찰

FK506은 calcineurin의 serine/threonine phosphatase 기능을 억제함으로써 cytokine의 전사활성에 관여하는 NFAT의 탈인산화를 억제하여 면역억제 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다. 면역 반응과 관련된 초기 유전자와 IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor 및 TNF- α 등의 cytokine이 FK506에 의해서 억제됨이 보고되었다.(7,8) 대부분은 FK506의 calcineurin 억제에 의한 전사 조절인자 NFAT의 억제와 관련된 cytokine의 발현 조절에 대한 연구가 진행되고 있고 FK506에 의한 세포사멸사와 관련된 유전자의 발현 및 기전에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 cDNA microarray 분석을 통하여 FK506에 의한 Jurkat 세포의 사멸에서 관련 유전자의 발현 양상을 조사하였다. FK506은 Jurkat 세포에서 농도와 시간 의존적인 세포 독성을 야기하였다. cDNA microarray 분석 결과 FK506에 의해 2배 이상 증가하는 유전자는 348개가 도출되었으며 이중 GenBank에서 확인이 가능한 251개의 유전자를 대상으로 DAVID's Bioinformatics Resource Analysis의 웹사이트에서 gene ontology를 분석하여 수많은 biological process에 관련된 유전자의 발현이 변화하였다.

Calcineurin과 관련되어 도출된 유전자인 MARCKS는 합성 후 plasma membrane에 위치하며 actin filament와 cross-linking하는 단백질이다. MARCKS는 calcium-calmodulin과 결합하여 plasma membrane으로부터 이탈되어 F-actin의 cross-linking 활성을 억제하며, MARCKS 단백질은 calmodulin, actin, synapsin과 결합하여 cell motility, phagocytosis, membrane trafficking 및 mitogenesis를 조절한다. 또한 MARCKS는 세포내 calmodulin reservoir로서 작용하며 PKC에 의해 인산화 되면 calmodulin과의 결합력이 약화되어 calmodulin을 방출한다.(9) 또한, Sp3는 isoform 특이적으로 transcription weak activator 또는 repressor로 작용하는데 consensus GT-와 GC- boxes promoter element와 결합하고 Sp1의 C2H2-type zinc-finger 일원으로 핵내에 존재하며 대부분의

세포에서 발현 된다.(10) 이 단백질은 하나의 zinc finger DNA-binding domain과 여러 개의 transactivation domain을 가지고 있어 수많은 유전자의 발현을 촉진 또는 억제하는 bifunctional transcription factor로 작용 한다.(11,12) 최근 E2F 계통의 전사 조절인자가 retinoblastoma-tumor-suppressor 유전자 산물(pRB), cyclin과 cyclin dependent kinase (Cdk) 같은 cell-cycle progress에 관여하고 특히 E2F1은 DNA damage, repair, checkpoint activity 및 differentiation에 관여하는데 Sp3는 이들을 억제 한다.(13)

G0/S cell cycle transition과 관련되어 도출된 유전자인 Id helix-loop-helix (HLH) 단백질은 Id 1~Id 4까지 4종류가 알려져 있으며 일반적으로 세포성장의 양성조절자(positive regulator)와 세포분화의 음성 조절자(negative regulator)로 작용 한다.(14) 이들은 다른 종류의 HLH 전사조절인자를 억제하는 dominant negative antagonist로 작용하여 진행세포의 세포 분화에 관여한다. 또한, Id 단백질은 Cdk와 retinoblastoma protein (Rb)에 의해 조절되는 cell-cycle-regulatory pathway에 관여한다. 최근 Id 단백질은 세포외 신호에 반응하여 세포주기와 분화 관련 유전자 발현의 중요한 조절자로서 주목을 받고 있다. Id 1은 특정 세포의 증식시 발현되며 다른 HLH를 갖는 전사인자와 결합하여 DNA 결합을 억제하며 핵내에 존재하며 cell growth, senescence 및 differentiation에 중요한 역할을 한다. Id 3는 basic DNA-binding domain이 결합된 HLH 단백질로서 다른 HLH 전사조절 단백질과 반응하여 heterodimer를 형성한다. 특히 Id 3는 muscle creatin kinase E-box enhancer에 대한 E2A-containing 단백질 복합체의 결합을 저해하며, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)에 의해서 발현이 유도되어 핵내에 위치하고 lung, kidney와 adrenal gland에서 발현 된다.(15,16)

Jurkat 세포에서 FK506에 의한 세포사멸에서 cDNA microarray 분석 결과 2배 이상 발현이 감소된 744개 유전자 중에서 GenBank를 통해 확인 가능한 유전자 618개에 대한 gene ontology 분석 결과, 443개의 유전자를 biological process와 관련하여 분류하였다. 특히 function pathway와 관련하여 bioactive peptide에 의한 MAP kinase의 signaling pathway 및 diabetes/DRPLA pathway 관련 유전자의 발현이 감소되었다. Bioactive peptide에 의한 signaling pathway 유전자중 Mitogen-activated protein kinase kinase 2 (NM_030662) (MAPKK 2)는 MAP kinase kinase kinase (Raf 또는 MEKK1)에 의해서 인산화 된다. 이들의 결여는 cardiofaciocutaneous syndrome (CFC syndrome)의 원인이 되어 heart defect 및 men-

tal retardation이 된다. 또한, MAPKK2는 ERK1과 ERK2 MAP kinase를 활성화 하며, mitogen growth factor signal transduction에서 중요한 기능을 수행한다. 이 kinase의 억제 또는 degradation은 Yersinia 와 anthrax의 질병과 관련이 있다. Guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 11 (BC063426)은 다양한 transmembrane signaling system에서 modulator 또는 transducer이다. Alpha chain은 guanine nucleotide binding site를 가지고 있으며 phospholipase C의 activator로 작용한다.

Shc (src homology 2 domain containing) transforming protein 1 (NM_183001)은 활성화된 epidermal growth factor receptor에 의해서 인산화 되고, p45 Shc, p52 Shc 및 p66 Shc의 isoform이 존재하여 insulin, hydrogen peroxide 또는 UV에 의해서 인산화 된다. 이 단백질은 다양한 growth factor에 반응하며 인산화된 Trk receptor와 결합하며 Ras의 활성화에 관여한다. p66 Shc는 Ras의 활성화에는 관여하지 않으나 oxidative stress와 life span에 관련된 signal transduction pathway에 관계한다. 이 p66 Shc는 tumor suppressor p53의 downstream target으로서 intracellular oxidants, cytochrome c release와 apoptosis의 증가에 필요한 것으로 알려져 있다.

Diabetes 및 DRPLA pathway와 관련된 유전자인 Insulin receptor (NM_000208) 유전자 발현의 감소는 insulin 저항성에 의해 diabetes mellitus와 관련된다. Insulin receptor는 insulin과 반응하여 tyrosine-999 잔기가 autophosphorylated되며 IRS1과 PI3K를 포함한 downstream mediators와 receptor와 결합을 촉진하며 최종적으로 glucose uptake를 조절하는데 관여한다.

Atrophin 1 (AB209345) 발현의 감소는 Haw River syndrome (HRS)의 원인이 되며 HRS는 dominant neurodegenerative disease로서 huntington disease, spinocerebella atrophy와 dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA)를 일으키며 neuron의 소실과 관련된다. DRPLA (Atrophin 1)의 생물학적 기능은 정확하게 밝혀져 있지 않으나 세포자멸사와 관련하여 caspase-3의 기질인 nuclear repair 관련 단백질 PARP, DNA-dependent protein kinase 또는 U1-70 kDa로 절단되어 DNA degradation과 연관되어 있다.(17,18) DRPLA의 bipartite nuclear localization signal인 N-말단은 세포자멸사시 절단되어 제거되고 핵내에서 세포질로 이동하며 절단된 DRPLA 단백질은 세포자멸사를 유도하는 dominant negative effect를 갖는 것으로 보인다. 또한 DRPLA 단백질은 caspase protease의 기질인 nuclear lamins, actin, fodrin, actin-associated protein

또는 Gas2처럼 microfilament 구성물과 결합하여 세포 구조를 유지하는데 중요한 역할을 수행한다.(19-21)

Bai1-associated protein 2 (NM_017450) 유전자에 의해 생성된 단백질은 brain-specific angiogenesis inhibitor (BAI 1)-binding 단백질로 규명되었으며 또한 insulin receptor tyrosine kinase substrate로 작용하며 중추신경계에서 insulin, stress fiber 및 cytokine의 형성에 관여한다. BAI 1은 1,584 아마노산으로 구성된 adhesion-type G-protein coupled receptor (GPCR) family의 subgroup VII에 속하는 단백질로 cell-cell 또는 cell-matrix interaction에 관여하고 뇌에서 p53과 반응하여 angiogenesis의 neovascularization을 억제한다.(22-24) 그러나 BAI 1에 대한 ligand는 알려져 있지 않고 yeast two-hybrid screen에 의해서 ELMO 1과 결합하는 것으로 보고되었다. ELMO 1은 세포자멸사에 의한 세포를 engulfment하거나 degradation하는데 관여한다. 따라서 BAI 1의 발현감소 또는 기능이상은 apoptotic 세포의 uptake를 억제한다.(25) 뇌세포 이외의 세포에서 BAI 1의 발현은 human monocytes와 macrophages에서 microarray analyses에 의해 보고된 바 있다.(26)

FK506에 의한 Jurkat 세포의 사멸에서 cDNA microarray 분석 결과 고농도 및 장시간 처리시 세포자멸사 및 세포주기의 변화에 관련된 유전자의 발현이 증가 또는 감소되었고 특히 MARCKS가 증가하였고 전사조절인자 Sp3의 발현이 증가하였다. 또한 세포주기에서 G0~S주기로 전이하는데 관련된 전사조절 인자의 발현을 억제하는 Id 1과 Id 3의 발현이 증가하였다. 반면에 bioactive peptide (thrombin, bradykinin, angiotensin II)에 의한 신호경로에 관련된 Shc, MEK2 및 G protein α -11 유전자의 발현은 감소하였다. 또한 임상실험에서 FK506의 사용에 따른 부작용으로 보고된 diabetes와 관련된 유전자로는 insulin receptor와 neurodegeneration에 관련된 atrophin 1 및 세포의 운동성과 morphogenesis에 관련된 Bai 1-associated protein 2의 발현이 감소하였다. 따라서, 장기이식 및 자가 면역 치료에 적절한 농도 및 치료 기간의 조절 등 면역 억제제 FK506의 활용 및 작용 기전에 대한 분자 생물학적 기반을 제공할 수 있을 것이다.

결 론

사람 Jurkat 세포를 대상으로 FK506에 의한 세포독성과 관련하여 cDNA microarray 분석을 통하여 세포자멸사와 관련된 유전자의 발현 양상 및 생물학적 경로(biological path-

way) 등을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) FK506은 사람 T세포인 Jurkat 세포에 농도, 시간 의존적인 세포독성을 보였다.
- 2) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 2배 이상 증가된 183개의 유전자는 기능적 gene oncology에 따라 58종류로 소분류 하였다.
- 3) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 2배 이상 감소된 443개의 유전자는 기능적 gene oncology에 따라 87종류로 소분류 하였다.
- 4) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 calcineurin의 활성 억제와 관련된 MARCKS의 발현과 전사조절 인자인 Sp3 유전자의 발현은 증가하였다.
- 5) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 세포주기와 관련된 Id 1과 Id 3 유전자의 발현은 증가하였다.
- 6) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 bioactive peptide (thrombin, angiotensin II) 신호경로와 관련된 Src homology 2, G protein, MEK 2 유전자의 발현은 감소하였다.
- 7) FK506에 의한 Jurkat 세포 사멸에서 당뇨병 발병과 관련된 insulin receptor, DRPLA (Atrophin 1) 및 세포의 운동과 형태 유지에 관련된 Bai1-associated protein 2 유전자의 발현은 감소하였다.

FK506은 calcineurin의 활성 억제에 따른 NFAT의 활성을 억제뿐만 아니라 세포자멸사, 세포주기, 다양한 신호경로 및 임상실험에서 나타나는 당뇨병의 발현과 세포의 운동과 형태 유지에 관련된 유전자 발현이 감소되어 장기이식 및 자가 면역 치료에 적절한 농도 및 치료 기간의 조절 등 면역 억제제 FK506의 기전에 대한 분자 생물학적 기반을 제공할 수 있을 것이다.

REFERENCES

- 1) Pridohl O, Heinemann K, Hartwig T, Witzigmann H, Lamesch P, Fangmann J, et al. Low-dose immunosuppression with FK 506 and sirolimus after liver transplantation: 1-year results. Transplant Proc 2001;33:3229-31.
- 2) Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. Nature 1989;341:758-60.
- 3) Maki N, Sekiguchi F, Nishimaki J, Miwa K, Hayano T, Takahashi N, et al. Complementary DNA encoding the human T-cell FK506-binding protein, a peptidylprolyl cis-trans isomerase distinct from cyclophilin. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:5440-3.

- 4) Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994;369:756-8.
- 5) Bagnis C, Deray G, Dubois M, Adabra Y, Jacquiaud C, Jaudon MC, et al. Comparative acute nephrotoxicity of FK-506 and ciclosporin in an isolated in situ autoperfused rat kidney model. *Am J Nephrol* 1997;17:17-24.
- 6) Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr Opin Crit Care* 2001;7:384-9.
- 7) Weiss A, Wiskocil RL, Stobo JD. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol* 1984;133:123-8.
- 8) Reem GH, Cook LA, Vilcek J. Gamma interferon synthesis by human thymocytes and T lymphocytes inhibited by cyclosporin A. *Science* 1983;221:63-5.
- 9) Arbuzova A, Schmitz AA, Vergeres G. Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem J* 2002;362:1-12.
- 10) Hagen G, Muller S, Beato M, Suske G. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J* 1994;13:3843-51.
- 11) Ge Y, Jensen TL, Matherly LH, Taub JW. Physical and functional interactions between USF and Sp1 proteins regulate human deoxycytidine kinase promoter activity. *J Biol Chem* 2003;278:49901-10.
- 12) Ko JL, Liu HC, Loh HH. Role of an AP-2-like element in transcriptional regulation of mouse mu-opioid receptor gene. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;112:153-62.
- 13) Rotheneder H, Geymayer S, Haidweger E. Transcription factors of the Sp1 family: interaction with E2F and regulation of the murine thymidine kinase promoter. *J Mol Biol* 1999;293:1005-15.
- 14) Riechmann V, van Cruchten I, Sablitzky F. The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3. *Nucleic Acids Res* 1994;22:749-55.
- 15) Zebedee Z, Hara E. Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene* 2001;20:8317-25.
- 16) Yokota Y. Id and development. *Oncogene* 2001;20:8290-8.
- 17) Tewari M, Beidler DR, Dixit VM. CrmA-inhibitable cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1995;270:18738-41.
- 18) Casciola-Rosen LA, Anhalt GJ, Rosen A. DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J Exp Med* 1995;182:1625-34.
- 19) Lazebnik YA, Takahashi A, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, et al. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9042-6.
- 20) Mashima T, Naito M, Fujita N, Noguchi K, Tsuruo T. Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;217:1185-92.
- 21) Brancolini C, Benedetti M, Schneider C. Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO J* 1995;14:5179-90.
- 22) Nishimori H, Shiratsuchi T, Urano T, Kimura Y, Kiyono K, Tatsumi K, et al. A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene* 1997;15:2145-50.
- 23) Kaur B, Brat DJ, Devi NS, Van Meir EG. Vasclostatin, a proteolytic fragment of brain angiogenesis inhibitor 1, is an antiangiogenic and antitumorigenic factor. *Oncogene* 2005;24:3632-42.
- 24) Bjarnadottir TK, Fredriksson R, Hoglund PJ, Gloriam DE, Lagerstrom MC, Schioth HB. The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors. *Genomics* 2004;84:23-33.
- 25) Park D, Tosello-Trampont AC, Elliott MR, Lu M, Haney LB, Ma Z, et al. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* 2007;450:430-4.
- 26) Cho HJ, Shashkin P, Gleissner CA, Dunson D, Jain N, Lee JK, et al. Induction of dendritic cell-like phenotype in macrophages during foam cell formation. *Physiol Genomics* 2007;29:149-60.