



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학 석사학위 논문

CD4⁺ T 세포에서 TIM-3 발현

유도에 관여하는 *TIM-3* 5'
말단의 중간 상동 염기서열

아주대학교 대학원

의생명과학과/분자의학전공

Kuniharu Komori

CD4+ T 세포에서 TIM-3 발현
유도에 관여하는 *TIM-3* 5'
말단의 중간 상동 염기서열

지도교수 박 선

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함.

2013년 2월

아주대학교 대학원

의생명과학과/분자의학전공

Kuniharu Komori

Kuniharu Komori 의 이학 석사학위
논문을 인준함.

심사위원장 김 경 민 인

심사위원 권 명 희 인

심사위원 박 선 인

아주대학교 대학원

2012년 12월 23일

CD4+ T 세포에서 TIM-3 발현 유도에 관여하는 TIM-3 5' 말단의 중간 상동 염기서열

The T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3 (TIM-3)는 Th1의 세포표면에서 처음 발견되었고, T 세포의 면역반응을 억제하는 조절인자로 알려져 왔다. 하지만 TIM-3의 발현 조절 기작에 대해서는 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 CD4+ T 세포에서 TIM-3 유전자 발현을 조절하는 enhancer를 조사하기 위해 먼저 TIM-3를 발현한다고 알려진 사람, 생쥐 그리고 소에서 TIM-3 유전자의 5' upstream 부분 (-70 Kb)의 염기서열을 분석하여 상동성이 80% 이상인 네 군데의 CNS -29 (-29602 bp ~ -30324 bp), CNS -53 (-53882 bp ~ -53934 bp), CNS -56 (-56508 bp ~ -57191 bp) 그리고 CNS -63 (-63360 bp ~ -63467 bp) 부분을 확인하였다. 그리고 Jurkat T 세포에서 TIM-3의 발현을 유도하는 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 ionomycin 자극으로 인한 T 세포의 활성화에 따른 히스톤 메틸화 상태와 정상 세포에서 TIM-3 발현 유무에 따른 히스톤 메틸화 상태를 ChIP assay를 통해 분석하였다. CNS -63에서 H3K4 dimethylation (전사활성에 관여)이 관찰되었고, H3K9 trimethylation (전사 억제에 관여)의 변화는 관찰되지 않았다. CNS -63의 enhancer activity를 luciferase reporter assay를 통해 분석하였다. T3U290 (CNS -63)에 의한 luciferase 활성이 T3U(290)과 자

극이 없을 때 유사하게 나타났으며 PMA와 ionomycin에 의한 자극이 있을 때 luciferase 활성이 1.45배 증가하였다. CNS -63의 NF- κ B 결합 예상 부위를 변이 시킨 T3U290 (Mut 2)에 의한 luciferase 활성이 PMA와 ionomycin에 의한 자극이 있을 때 T3U290 (CNS -63)보다 감소하였다. 이러한 결과로 보았을 때 CNS -63이 활성 자극에 의한 CD4⁺ T 세포에서 TIM-3 발현 증가에 관련 될 것이고 본 연구의 결과는 TIM-3 발현 조절을 이해하는데 중요한 기초를 제공할 것이다.

핵심어 : TIM-3, Histone H3 methylation, Transcription regulation



차 례

국문요약	i
차례	iii
그림차례	v
표 차례	vi
<hr/>	
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
A. Conserved sequence (CNS) 분석	5
B. 세포배양	5
C. Naive CD4 ⁺ T 세포와 CD4 ⁺ T 세포의 분리	5
D. Flow cytometry	6
E. CD4 ⁺ T 세포 활성화	7
F. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay	7
G. Luciferase reporter vector 제작	8
H. Luciferase repotor assay	9
III. 결과	12
A. TIM-3 유전자 5' upstream region의 conserved sequence	12
B. CD4 ⁺ T 세포에서 히스톤 H3의 메틸화 분석	12
C. TIM-3 유전자 5' 말단의 CNS enhancer 역할 분석	18

IV. 고찰 23

V. 결론 26

참고문헌 27

ABSTRACT 34



그림 차례

Fig. 1. Histone H3 methylation status in the <i>TIM-3</i> regulatory region in Jurkat T cells.	15
Fig. 2. Histone H3 methylation status in the <i>TIM-3</i> regulatory region in stimulated human peripheral blood CD4 ⁺ T cells.	16
Fig. 3. Histone H3 methylation status in the <i>TIM-3</i> regulatory region in human cord blood naive CD4 ⁺ T cells.	17
Fig. 4. Enhancer activity of <i>TIM-3</i> 5' upstream CNSs.	20
Fig. 5. Reduced enhancer activity of <i>TIM-3</i> CNS -63 with mutation of putative NF- κ B binding element.	22

표 차례

Table. 1. Primers for chromatin immunoprecipitation.	10
Table. 2. Primers for NF- κ B binding site mutation.	11
Table. 3. Identification of the conserved sequences in <i>TIM-3</i> upstream region.	14



I. 서론

T cell immunoglobulin and mucin domain containing molecule 3 (TIM-3)는 알러지, 천식, 이식면역관용 (transplant tolerance), 자가면역질환 그리고 바이러스 감염에 대한 면역반응을 조절하는 분자로서 알려졌다 (Gordon 등, 2010). 이러한 TIM-3는 T 세포 표면에서 발현되는 당단백질인 TIM family의 한 종류로서 네 가지 도메인으로 이루어져 있다 즉, 리간드와 직접 결합을 하는 N 말단의 Immunoglobulin(Ig)-like domain, O-glycosylation과 N-glycosylation 부위를 가지고 있는 mucin domain, transmembrane domain, tyrosin 인산화 잔기를 가지는 cytoplasmic domain으로 구성되어 있다 (Kuchroo 등, 2006).

TIM-3가 발현되는 세포를 살펴보면 TIM-3는 CD4⁺ T 세포 중 Th1 세포에서 발현되나 Th2 세포에서는 발현되지 않는다. 이러한 특성을 이용해 TIM-3는 Th1과 Th2 세포를 구별하는데 중요한 분자로서 알려져 왔다 (Sabsros 등, 2003). 이 후 염증을 유발하는 Th17 세포와 CD8⁺ T 세포에서도 TIM-3의 발현이 관찰되었다 (Nakae 등, 2007). 현재는 TIM-3의 발현은 후천적 면역 반응에 관여하는 세포에 제한되지 않고 선천적 면역 반응에 관여하는 NK 세포, 대식세포, 호중구, 비만세포에서도 발현 된다고 알려지면서 (Lichtenthaler 등, 2007; Wang 등, 2007) TIM-3가 후천적 면역반응과 선천적 면역반응 모두에 연관된다고 보고되고 있다.

TIM-3는 리간드와 결합하여 발현 세포에 신호를 보낼 것으로 믿어지고 있다. 현재까지 TIM-3의 리간드로는 galectin-9 (Gal-9)과 phosphatidylserine (PtdSer)이 보고되었다. Gal-9은 TIM-3와 결합하여 세포내 Ca⁺⁺ 이온의 증가를 가져 왔으며 CD4 + T 세포의 세포사를 유도

하였다 (Kuchroo 등, 2006). PtdSer과 TIM-3의 결합으로 인한 신호전달에 관련된 내용은 아직 잘 알려지지 않았으나, PtdSer이 TIM-3와 결합하여 세포사가 유도된 세포의 포식 작용을 증가 시킨다고 보고되었다 (DeKruyff 등, 2010).

TIM-3의 기능으로 CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포의 기능 억제가 다양한 연구를 통해서 증명되어 있다. 자가 면역 T 세포에 의한 질환 중 하나인 다발성 경화증 모델 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE) 생쥐에 TIM-3에 특이적인 항체를 투여하였을 때 증세가 더욱 악화되었다 (Monney 등, 2002). TIM-3-Ig 재조합 단백질을 생쥐에 투여하였을 때 Th1 세포의 분화와 Th1 세포가 생성하는 사이토카인인 IFN- γ 및 IL-2의 생산이 증가되는 것이 관찰 되었으며 TIM-3-Ig 재조합 단백질의 투여가 생쥐에서 이중 항원에 대한 면역관용 유도를 차단하였다 (Sabatos 등, 2003). 생쥐에 Gal-9을 투여하였을 때 IFN- γ 를 생성하는 T 세포의 선택적 감소를 일으켰으며 T 세포에 의한 자가 면역 질환을 개선하였다 (Zhu 등, 2005). 면역과민 반응을 가지는 생쥐에 TIM-3에 특이적인 항체를 투여하였을 때 Th2 세포의 면역반응의 저하와 Th1 세포의 면역반응 증가를 통하여 면역 과민반응의 증상이 감소되었다 (Kearley 등, 2007). A형 인플루엔자 바이러스 (influenza A virus)를 감염시킨 생쥐에 TIM-3-Ig 재조합 단백질을 투여하여 TIM-3와 Gal9의 결합을 차단하였을 때 바이러스에 특이적인 CD8⁺ T 세포의 면역반응이 향상되었다 (Shalini 등, 2011). 궤양성 대장염 (ulcerative colitis) 모델 생쥐에 TIM-3에 특이적인 항체 또는 재조합 Gal-9을 투여하였을 때 T 세포 subset들의 균형을 다르게 만들어 증세를 더욱 악화시켰다 (Fengmin Shi 등, 2012). 이러한 것을 보았을 때 TIM-3가 T 세포의 면역반응에 있어서 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다.

TIM-3의 기능에 비해 TIM-3의 발현 조절 기작에 대해서는 알려진 바가 많지 않다. TIM-3를 발현하지 않는 murine naive T cell을 분리하여 Th1 세포로 분화를 유도하였을 때 Th1 세포에서 특이적으로 작용하는 Tbet에 의해 TIM-3 발현이 증가하였다 (Anderson 등, 2010). TGF-beta에 의해 활성화된 비만세포에서 TIM-3 발현이 증가하였고 (Wiener Z 등 2007; SJ Yoon 등 2011), 대식세포에서는 IL-4/STAT-6 신호전달에 의해 TIM-3 발현이 증가하였다 (Jie Zhao 등 2009)는 연구들이 보고되어진다.

유전자 발현 조절에 중요한 염기서열은 유전자의 5 말단과 3 말단 각각에서 ~50 kb이내에서 관찰 된다 (Maria Shnyreva 등 2004). 이러한 전사 조절 DNA 부분의 동정에는 1) DNase I에 대한 민감성 분석 (Li Q 등 2002), 2) 중간 염기서열의 상동성 분석 (Pennacchio LA와 Rubin EM 2003), 3) 히스톤 단백질의 아세틸화와 메틸화 분석 (Raghavendra PB 등 2007), 4) reporter 유전자의 발현 조절 분석이 이용되어왔다 (Shnyreva M 등 2004). 히스톤 8량체 (histone octamer)가 결합되어 있는 DNA는 전사인자가 결합하여 히스톤 8량체를 밀쳐놓은 DNA에 비해 DNase I에 의해 잘 잘리는 민감성이 떨어지므로 DNase I에 대한 민감성이 높은 부분은 유전자 전사 조절부분으로 알려졌다 (Kim KY 등 1995). 한편 단백질을 암호화하지 않은 DNA 부분에서 중간 염기서열 상동성이 높은 부분 (conserved non-coding sequences; CNS)이 드문드문 관찰되는데 이러한 CNS가 유전자 발현 조절에 관여하는 부분으로 밝혀지고 있다 (Pennacchio LA와 Rubin EM 2001). 사람과 생쥐의 BTK 유전자에서 발견된 CNS 중 하나가 BTK 유전자의 발현을 조절하였으며 (Oeltjen JC 등 1997), IL-4/IL-13/IL-5 유전자 100 kb를 중간 비교하여 발견한 90개 CNS 중 사람과 생쥐에서 80% 상동성을 보이며 IL-4와 IL-13 유전자 사이에 위치한 401 bp 길이의 CNS-1 (Loots GG 등 2000)이 비만세포와

Th2 세포에서 관찰한 DNase I에 민감한 부분과 일치하였으며 (Takemoto N 등 1998), Th2 세포에서 IL-4와 IL-13의 발현 조절에 중요하였다 (Mohrs M 등 2001). 또한 유전자 발현 조절 부분에서 히스톤의 아세틸화와 메틸화가 유전자 전사와 밀접하게 조절되는 것이 관찰되었는데, IL-4, IL-5, IL-13을 많이 생산하는 Th2 세포의 IL-4/IL-13/IL-5 유전자 발현 조절 DNA에서 전사활성과 관련된 히스톤 H3K9의 아세틸화기들이 유전자를 발현하지 않는 naive T 세포에 비해 현저히 증가한 것이 관찰되었다 (Raghavendra PB 등 2007). 반면, Th2 세포에서 발현되지 않는 IFN-gamma 유전자의 경우 Th2 세포로 분화하는 과정에서 전사 억제와 관련한 H3K9과 H3K27의 삼중 메틸화가 IFN-gamma 조절 DNA에서 증가하는 것이 관찰되었다 (Ni Z 등 2008). 이러한 방법으로 유전자 발현 조절에 관여할 가능성이 있는 DNA 부분이 동정되면 이를 reporter 유전자 발현 vector에 삽입한 후 세포에 이입하여 reporter 유전자의 발현을 분석함으로써 실제로 유전자 발현 조절 기능이 있는지를 판단할 수 있는데 이러한 바업으로 IFN-gamma 유전자의 CNS-1 (-6 kb부분)과 CNS-2 (+18 kb부분)가 유전자 발현 조절 기능이 있다는 것을 보고하였다 (Shnyreva M 등 2004). 본 연구에서는 이러한 접근법 중 유전자 중간 염기서열의 상동성 분석과 히스톤 단백질의 메틸화 분석 그리고 reporter 유전자의 발현 조절 분석을 사용하여 CD4+ T 세포에서 TIM-3 유전자 발현 조절에 관여하는 DNA 부분을 TIM-3 유전자 5' 말단 상부에서 찾아가 하였다.

II. 재료 및 방법

A. Conserved sequence (CNS) 분석

TIM-3 유전자 5' 말단 상부 DNA에서 조절 유전자 DNA 부분을 예측하고자 종간 상동성이 높은 염기서열 부분을 탐색하였다. 미국 유전자은행 (NCBI genebank)에 등록된 사람, 생쥐 그리고 소의 TIM-3 유전자에서 전사개시시점 기준 -1 bp ~ -70 kb 부분을 blast엔진을 이용하여 분석하였다. 분석된 CNS의 위치에 따라 CNS를 명명 하였다.

B. 세포배양

Jurkat T 세포와 인간 말초 혈액에서 분리한 CD4⁺ T 세포의 배양에 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)과 penicillin-streptomycin (각각 100 U/ml, 100 µg/ml, Gibco)이 함유된 RPMI 1640 (Gibco)을 사용하고 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

C. Naive CD4⁺ T 세포와 CD4⁺ T 세포의 분리

Naive CD4⁺ T 세포는 Naive CD4⁺ T cell Isolation Kit II, Human (Miltenyi Biotec)를 사용하여 체대혈에서 분리 하였고, CD4⁺ T 세포는 anti-CD4 magnetic bead (Miltenyi Biotec)를 사용하여 인간 말초 혈액에서 분리하였다.

먼저 naive CD4⁺ T 세포의 분리를 위해 Ficoll (GE Healthcare)을 이용하여 체대혈에서 단핵세포 (mononuclear cell)를 분리한 후 EDTA가 함유된 인산완충식염수 (PBS pH 7.2, 2 mM EDTA)로 혈소판을 제거하였다. 세척된 세포에 적혈구 용해액 (RBC Lysis buffer pH 7.3, 0.15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA)을 넣어 부유한 후 실온에서 10

분간 정치한 뒤에 PBS로 세척하여 적혈구를 제거한 후 우혈청 알부민 (BSA)이 함유된 PBS (0.5% BSA / PBS pH 7.2, 2 mM EDTA)로 부유하였다. 여기에 naive CD4⁺ T cell biotin-antibody cocktail을 첨가하여 4°C에서 10 분간 정치한 후 0.5% BSA / PBS를 사용하여 세척하였다. 세척한 세포를 0.5% BSA / PBS로 부유한 후 anti-biotin microbead를 첨가하고 4 °C에서 15 분간 정치한 다음 자기장을 이용하여 biotin이 결합된 세포를 naive CD4⁺ T 세포와 분리하였다. 분리된 naive CD4⁺ T 세포의 순도는 유세포분석기 (flow cytometer)를 이용하여 분석하였다.

성인의 말초혈액에서 CD4⁺ T 세포의 분리는 anti-CD4 magnetic bead를 이용하였다. 앞서 기술한 방법과 유사하게 말초혈액에서 단핵세포 (Peripheral blood mononuclear cell)를 분리한 후 Fc 수용체 차단제 (Eioscience)를 첨가하여 4°C에서 20 분간 정치하였다. 여기에 anti-CD4 magnetic bead를 첨가하여 4°C에서 15 분간 정치한 후 0.5% BSA / PBS로 세척한 뒤 자기장을 이용하여 CD4⁺ T 세포를 분리하였으며, 분리된 CD4⁺ T 세포의 순도는 유세포분석기를 이용하여 분석하였다.

D. Flow cytometry

분리한 세포의 순도를 분석하기 위해 세포 부유액에 Fc 수용체 차단제 (Eioscience)를 첨가하여 4°C에서 20 분간 정치한 후 FITC가 결합된 anti-CD4 항체, APC가 결합된 anti-CD45RA 항체, PE-Cy7이 결합된 anti-CD3 항체를 첨가하여 4°C에서 30 분간 정치하였다. 그 후 0.5% BSA / PBS로 2 회 세척 후 flow cytometer (BD FACS CantoII)로 분석하였다. 유사한 방법으로 TIM-3 발현을 분석하였으며 이에는 APC가 결합된 anti-TIM-3 항체가 이용되었다.

E. CD4⁺ T 세포 활성화

TIM-3의 발현을 유도하기 위해 인간 말초혈액에서 분리한 CD4⁺ T 세포를 anti-human CD3 antibody (BD pharmingen) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 anti-human CD28 antibody (BD pharmingen) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 자극하였다. T 세포활성을 돕기 위해 Mitomycin C를 처리하여 세포사멸을 유도한 자가 말초혈액단핵구 (PBMC)를 1 : 5 비율로 첨가하였다. 배양 5일째 Recombinant mIL-2 (Pierce endogen) 20 U/ml이 함유된 새 배지로 옮겨 2 일 더 배양하였다. 이렇게 준비된 세포에서 살아있는 세포의 분리는 Lympholyte-M (Cedarlane)를 이용하여 수행하였다.

F. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

TIM-3 유전자의 중간 상동 염기서열부분에서 히스톤 H3의 메틸화 정도 분석을 위하여 ChIP을 수행하였다. 분석하고자 하는 세포에 1% formaldehyde (Sigma)를 처리한 후 실온에서 10 분간 반응시키고 0.125 M의 glycine을 처리한 후 실온에서 5 분간 반응시켜 DNA와 히스톤의 결합을 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS로 2 회 세척 후 SDS lysis buffer (10 mM pH 7.4 Tris-Cl, 3 mM MgCl₂, 0.5% NP-40, 10 mM NaCl)로 용해 한 후 초음파분쇄기 (Sonic & Materials Inc.)를 사용하여 300 ~ 600 bp 크기로 DNA를 절단시켰다. 이를 13000 rpm 4°C 15 분간 원심분리 하여 얻어진 상층액에 protein A agarose / salmon sperm DNA (Milipore)를 첨가하여 4°C에서 1 시간 결합시켜 protein A agarose에 비특이적으로 결합하는 DNA-단백질 복합체를 하였다. 그 다음 3000 rpm 4°C 3분간 원심분리 하여 얻어진 상층액에 Histone H3 Lysine 4 dimethylation (H3K4me₂)-specific antibody (Milipore)와 Histone H3 Lysine 9 trimethylation (H3K9me₃)-specific antibody (Abcam) 또는

polyclonal rabbit IgG를 2 μ g씩 첨가하여 4°C에서 16 시간 결합시켰다. 여기에 protein A agarose / salmon sperm DNA를 첨가하여 4°C에서 1 시간 결합시킨 후 3000 rpm 4°C 3 분간 원심분리하여 항체와 결합한 침사를 얻었다. 이 후 침사세척을 위해 저염 세척액 (0.1% SDS, 1% Tritone X-100, 2 mM EDTA, 20 mM pH 8.1 Tris-Cl, 150 mM NaCl), 고염 세척액 (0.1% SDS, 1% Tritone X-100, 2 mM EDTA, 20 mM pH 8.1 Tris-Cl, 500 mM NaCl), LiCl 함유 세척액 (0.25 M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxycholic acid, 10 mM pH 8.1 Tris-Cl, 1 mM EDTA), TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA)가 순차적으로 사용되었다. 세척한 침사에 SDS ChIP elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃)를 첨가하여 protein A agarose에 결합되어 있는 DNA-히스톤 복합체를 분리 한 후 200 mM NaCl을 첨가하여 65 °C에서 4 시간 정치함으로써 DNA를 히스톤에서 분리하였다. 여기에 RNase A (Fermentas)을 1 μ g 첨가하여 37 °C 30 분간 정치하고 proteinase K (Cosmo)를 2 μ g 첨가하여 45 °C 1 시간 정치 후 phenol/chloroform을 첨가한 후 13000 rpm 15 분간 원심분리하여 DNA를 분리 정제하였다. 분리된 DNA에서 각 *TIM-3* CNS DNA 양을 정량적으로 분석하기 위해 특이적으로 제작한 primer (Table 1)를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다.

G. Luciferase reporter vector 제작

TIM-3 발현에 중요할 것이라고 여겨지는 CNS가 실질적으로 유전자 발현을 조절 하는지를 조사하기 위해서 luciferase reporter vector를 제작을 하였다. Jurkat T 세포에서 genomic DNA를 추출하여 각 CNS 부위에 특이적인 primer (Table 1)를 사용하여 PCR 기법으로 각 CNS 부위를 증폭 한 후 TA cloning vector (Promega)에 삽입하고 염기서열을

확인하였다. 제한효소를 사용하여 자른 CNS를 TIM-3 promoter -144 bp ~ +144 bp가 포함된 T3U(290) vector (SJ Yoon, 석사학위)의 5'말단에 삽입하여 제작한 vector를 T3U290 (CNS -29), T3U290 (CNS -53), T3U290 (CNS -56), T3U290 (CNS -63) 이라 명명하였다.

CNS -63에 위치한 전사인자 결합예측염기서열을 Transcription Element Search System (TESS)로 분석하였다. 분석 결과 발견된 NF- κ B 결합 서열에 변이를 준 luciferase reporter vector를 제작하고자 T3U290 (CNS -63) vector를 주형으로 사용하고 각 NF- κ B 결합 서열에 변이를 준 primer (Table 2)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA를 TA cloning vector에 삽입 한 후 염기서열을 확인하였으며 확인된 DNA는 제한효소를 사용하여 T3U(290) vector에 삽입하였고 T3U290 (Mut 1), T3U290 (Mut 2), T3U290 (Mut D)로 각각 명명하였다.

H. Luciferase reporter assay

제작한 luciferase reporter vector와 Jukat T 세포를 이용하여 luciferase reporter assay를 수행하였다. Electroporator (NanoEnTek)와 Neon 100 μ l kit (Invitrogen)을 사용하여 electroporation 기법으로 Jukat T 세포 (1×10^6 cells)에 vector (5 μ g)를 이입하였다. DNA 이입 효율을 보정하고자 pEGFP-N1 plasmid (GenBank Accession # U55762)를 vector의 1/10 농도로 첨가하였다. 이입한 후 24 시간 쯤 PMA / ionomycin (50 ng/ml, 0.5 μ M)을 첨가 후 4 시간 배양하였다. 이후 일부 세포를 취해 GFP 발현 빈도를 flow cytometry로 측정하여 DNA 이입 효율을 분석하였으며, 남은 세포에서 세포용해액을 얻은 후 여기에 luciferin (Promega)을 넣어 Luminometer (Turner Design)를 이용하여 luciferase 활성 정도를 측정하였다.

Table. 1. Primers for chromatin immunoprecipitation.

primer	Nucleotide sequence (5'-3')
T3U(-29626 ~ -29852) F	CAATTAGGACACACAAGGCAGCATC
T3U(-29626 ~ -29852) R	GAGATTTCAAAGCACCTGGAACG
T3U(-29766 ~ -30011) F	GCTTCTGAATGAGGCAAATCATCAG
T3U(-29766 ~ -30011) R	GAGCCCTGGGAGTATAAAACGAGAAG
T3U(-29910 ~ -30145) F	CTTGCTTGGTGGGGTCGGTATTC
T3U(-29910 ~ -30145) R	CTTATCATCCGCCCTTTGGAAAGTC
T3U(-29986 ~ -30226) F	CTTCTCGTTTTATACTCCCAGGGCTC
T3U(-29986 ~ -30226) R	CAAGAAGGCTTAGCTCCCAAGCCTC
T3U(-30121 ~ -30336) F	GACTTTCCAAAGGGCGGATGATAAG
T3U(-30121 ~ -30336) R	GGTCTGTGTCCATAGGTTCTTGATAGTC
T3U(-53859 ~ -54082) F	CATTCCAGACTTCAGCACTGGGCTG
T3U(-53859 ~ -54082) R	CTTGGAAGGTACTTCCACCTCGATG
T3U(-56502 ~ -56730) F	CTCTACTGGTGGCCTCAGGAGATAGAC
T3U(-56502 ~ -56730) R	GTTTGCCAAGGGGAGAGGTCG
T3U(-56670 ~ -56871) F	GGGAAGCAGTCTCGTGAGCTCTAG
T3U(-56670 ~ -56871) R	GGGAGAGGTGATTGATGTACACAACC
T3U(-56767 ~ -57005) F	GGTTGGGCCAGAACCATGACG
T3U(-56767 ~ -57005) R	CACAGCTACTCTTCAATGAGTGCGTTC
T3U(-56958 ~ -57198) F	CAGGTCCCCCATGGAGGTTTTG
T3U(-56958 ~ -57198) R	GATGCGCACAGGTCACAAAGGAC
T3U(-63345 ~ -63544) F	CAGCCCAGGGGAGCATTGTGAG
T3U(-63345 ~ -63544) R	CAGGTTGGCTTCCTGAAGTCCTAG

Table. 2. Primers for NF- κ B binding site mutation

primer	Nucleotide sequence (5'-3')
CNS -63 1.8 F	CATACGCTCTCCATCAAAACAAAACG
CNS -63 mut 1 F	GGTGGGTATGTAAACATACCATACACAGC
CNS -63 mut 1 R	GTATGTTTACATACCCACCCTCACATCC
CNS -63 mut 2 F	GCTGTTTACAGACCCTGGCCTAAAATAC
CNS -63 mut 2 R	CAGGGTCAGTAAACAGCCTGTACATGC
CNS -63 1.8 R	CAGCAAATGACCATATTCAAGCATAAGG



III. 결 과

A. TIM-3 유전자 5' upstream region의 conserved sequence 분석

TIM-3를 발현한다고 알려진 사람, 생쥐 그리고 소의 TIM-3 유전자 5' 말단의 DNA -1 bp부터 -70 kb까지의 염기서열을 비교하여 종간의 상동성이 80% 이상 나타나는 부분을 동정하였고 (Table. 3), 상동성이 높게 나타난 부분을 전사 개시 점을 기준으로 한 위치에 따라 각각 CNS -29 (-29602 bp ~ -30324 bp, 723 bp), CNS -53 (-53882 bp ~ -53934 bp, 53 bp), CNS -56 (-56508 bp ~ -57191 bp, 684 bp), CNS -63 (-63360 bp ~ -63467 bp, 108 bp)으로 명명하였다 (Fig. 1, A).

B. CD4+ T 세포에서 히스톤 H3의 메틸화 분석

다음으로 종간의 상동성이 높게 나타난 네 군데의 CNS에서 전사활성과 관련 있는 히스톤 H3 K4 dimethylation (H3K4me2)은 유전자의 전사 활성과 관련되고, 반대로 히스톤 H3 K9 trimethylation (H3K9me3)은 유전자의 전사 억제와 관련된다 (Lee 등, 2004; Schoenborn 등, 2007). 본 실험에서 CD4+ T 세포에 TIM-3 유전자 5' 말단 부분의 CNS -29, CNS -53, CNS -56 그리고 CNS -63의 히스톤 메틸화 정도를 알아보기 위해 먼저 인간 CD4+ T 세포주인 Jurkat T 세포에서 ChIP을 수행하였다.

Jurkat T 세포는 TIM-3 mRNA를 소량으로 발현하며 활성 자극에 의해 TIM-3 mRNA 발현이 증가된다 (Lee J 등 2011). 그러므로 PMA와 ionomycin으로 세포에 활성 자극을 가하고 자극 전 후의 H3K4me2과 H3K9me3의 수준을 분석하였다. 그 결과 PMA와 Ionomycin 자극에 상관 없이 CNS -63에서 H3K4me2가 관찰되었으나 (Fig. 1, B), 모든 CNS에서 H3K9me3 정도가 매우 낮게 관찰 되었다 (Fig. 1, C). 이러한 결과가 정

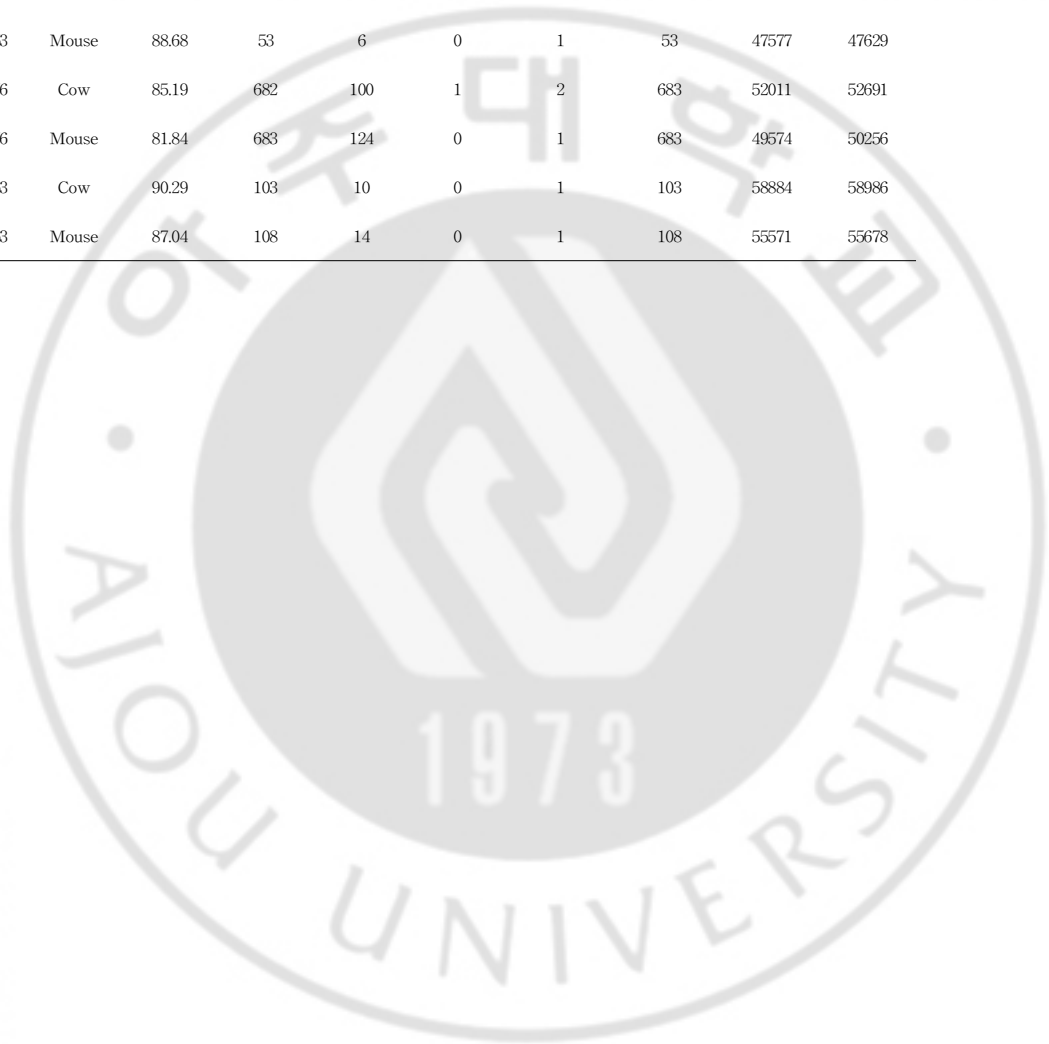
상 사람 CD4⁺ T 세포에서 재현되는지 살펴보고자 한다.

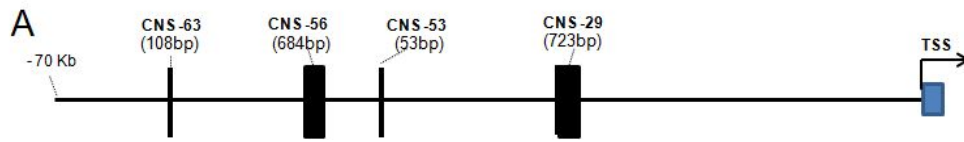
성인 말초혈액에서 분리한 CD4⁺ T 세포에 활성화 자극을 가하여 TIM-3 발현을 유도한 후 각 CNS에서 H3K4me2와 H3K9me3의 수준을 분석하였다. 분리된 CD4⁺ T 세포의 순수도는 90% 이상이었으며 활성화된 TIM-3의 발현이 보이지 않으나 (Fig. 2 A) 활성화 후 거의 모든 세포에서 TIM-3가 발현됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2 B). 활성화 CD4⁺ T 세포의 각 TIM-3 CNS 부분의 히스톤 메틸화 정도를 분석한 결과 CNS -63에서 H3K4me2이 관찰되었으며 (Fig. 2 C), 분석한 모든 CNS에서 H3K9me3 정도가 매우 낮게 관찰되었다 (Fig. 2 D).

다음으로 TIM-3를 발현하지 않는 naive CD4⁺ T 세포에서 각 TIM-3 CNS의 히스톤 메틸화 정도를 분석하였다. 체대혈에서 분리한 naive CD4⁺ T 세포의 순수도는 97% 이상이었으며 (Fig. 3 A) TIM-3 발현이 관찰되지 않았다 (Fig. 3 B). Naive CD4⁺ T 세포에서 각 CNS 부분의 히스톤 메틸화를 분석한 결과 Jurkat T 세포와 활성화 CD4⁺ T 세포에서와 같이 CNS -63의 H3K4me2가 관찰되나 (Fig. 3 C) 분석한 모든 CNS에서 H3K9me3 정도가 매우 낮게 관찰되었다 (Fig. 3 D). 이러한 결과로 보았을 때 CNS -63의 히스톤 H3K4 이중메틸화 상태는 TIM-3 발현과 상관성 없이 CD4⁺ T 세포에 관찰되며 이전 연구 결과를 근거로 CNS -63에서 열린 구조의 염색체 구조를 예측 할 수 있으므로 전사인자의 결합이 용이 할 것으로 예측 하였다.

Table. 3. Identification of the conserved sequences in *TIM-3* upstream region.

Query (Human <i>TIM-3</i>)	Reference <i>Tim-3</i>	match%	match length	# of mismatch	gap openings	Query		Reference		e-value	bit score
						start	end	start	end		
CNS-29	Cow	92.59	715	53	0	9	723	18882	19596		
CNS-29	Mouse	91.29	723	63	0	1	723	13649	14371		
CNS-53	Cow	90.57	53	5	0	1	53	50527	50579		
CNS-53	Mouse	88.68	53	6	0	1	53	47577	47629		
CNS-56	Cow	85.19	682	100	1	2	683	52011	52691		
CNS-56	Mouse	81.84	683	124	0	1	683	49574	50256		
CNS-63	Cow	90.29	103	10	0	1	103	58884	58986		
CNS-63	Mouse	87.04	108	14	0	1	108	55571	55678		





B **Unstimulated** **Stimulated for 4h**

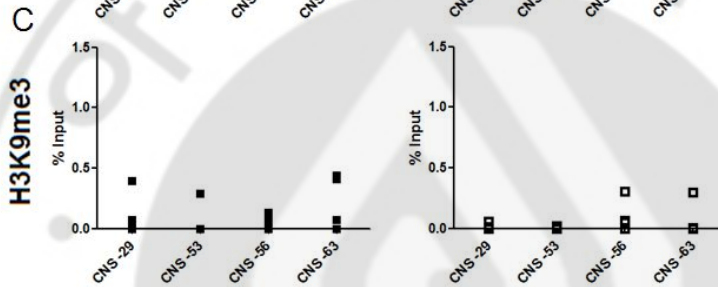
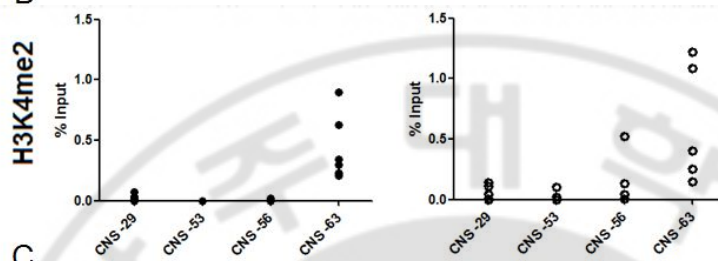


Fig. 1. Histone H3 methylation status in the *TIM-3* regulatory region in Jurkat T cells. Four sites of conserved sequences in *TIM-3* upstream region relative to the transcription start site are depicted (A). Jurkat T cells were stimulated with PMA (50 ng/ml) and Ionomycin (0.5 μ M) for 4 h and then subjected to chromatin immunoprecipitation using antibodies to H3K4me2 or H3K9me3. Immunoprecipitated DNA was amplified by real-time PCR (B, C).

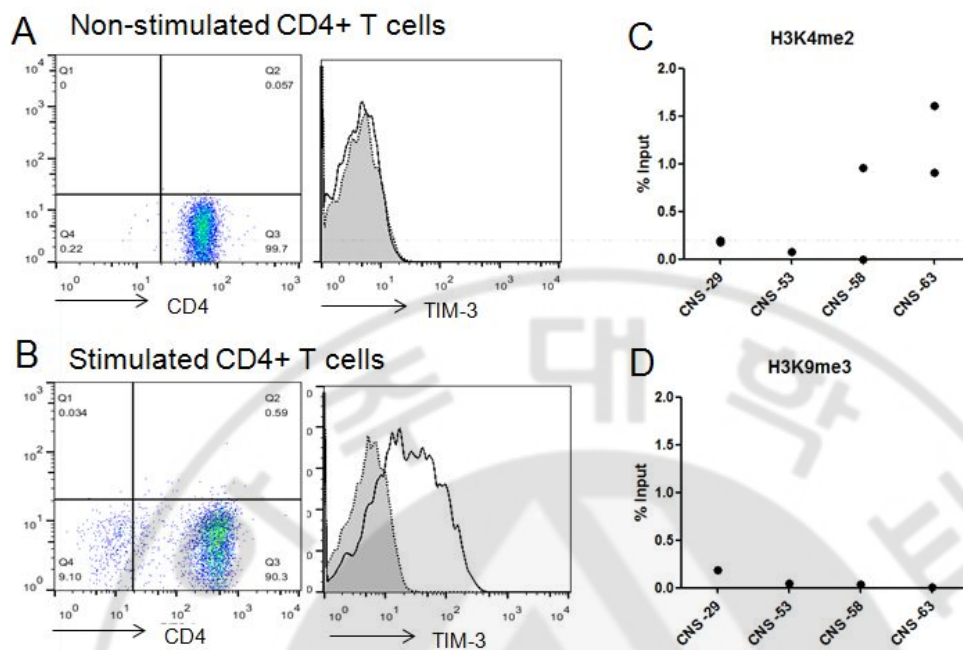


Fig. 2. Histone H3 methylation status in the *TIM-3* regulatory region in stimulated human peripheral blood CD4+ T cells. The purity of CD4+ T cells (left) and expression of TIM-3 (right) was analyzed by flow cytometry (A, B). CD4+ T cells were stimulated with Abs against CD3/CD28 described as in methods. Stimulated CD4+ T cells were subjected to chromatin immunoprecipitation using antibodies to H3K4me2 or H3K9me3. Immunoprecipitated DNA was amplified by real-time PCR (B, C).

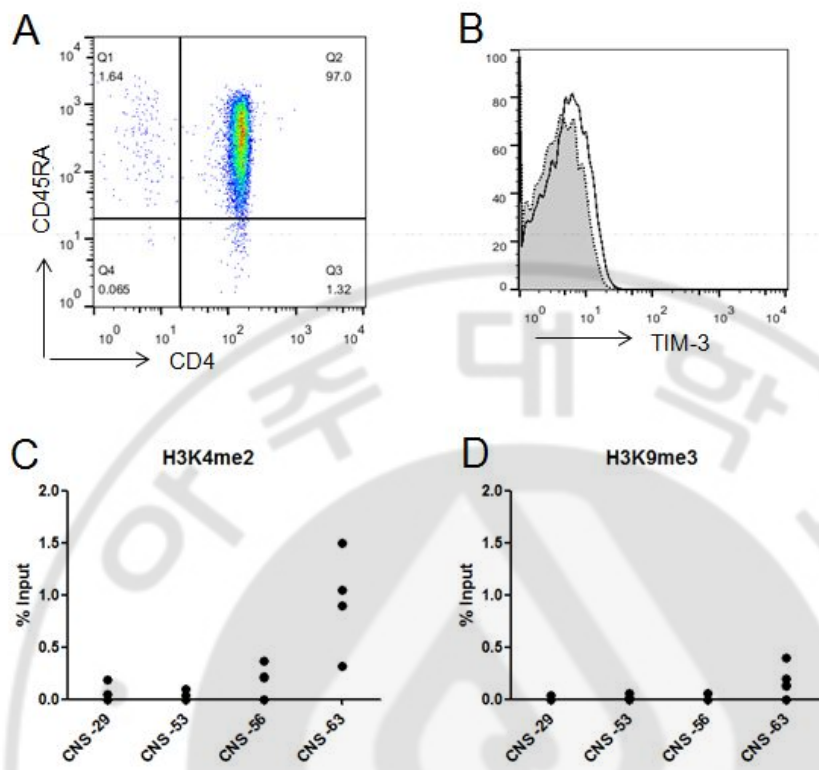


Fig. 3. Histone H3 methylation status in the *TIM-3* regulatory region in human cord blood naive CD4⁺ T cells. The purity of naive CD4⁺ T cells (A) and the expression of TIM-3 (B) was analyzed by flow cytometry. Naive CD4⁺ T cells subjected to chromatin immunoprecipitation using antibodies to H3K4me2, H3K9me3 was immunoprecipitated DNA amplified by real-time PCR (C, D).

C. TIM-3 유전자 5' 말단의 CNS enhancer 역할 분석

전사 활성화와 관련된 히스톤 메틸화가 CNS -63에서 관찰되었으므로 CNS -63의 enhancer activity를 분석하고자 luciferase reporter assay를 수행하였다. 먼저 이번 연구에서 TIM-3 minimal promoter로 밝혀진 TIM-3 promoter -144 bp ~ +144 bp를 포함하고 있는 T3U(290) luciferase vector에 각 CNS를 TIM-3 promoter 5' 말단에 삽입하여 luciferase vector를 제작하였다. (Fig. 4 A) 제작된 luciferase vector와 GFP 발현 vector를 Jurkat T 세포에 co-transfection하여 luciferase reporter assay를 수행하였다. 그 결과 활성 자극이 없는 조건에서 T3U290 (CNS -63)에 의한 luciferase 활성이 T3U(290)과 유사하게 관찰되었으나 PMA와 ionomycin의 의한 자극이 있을 때 약 1.45 배 증가하였다 ($P < 0.001$). T3U290 (CNS -29), T3U290 (CNS -53) 그리고 T3U290 (CNS -56)이 이입된 세포에서는 T3U(290)이 이입된 대조군에 비해 오히려 luciferase 활성이 감소하였다 (Fig. 4 B). 이러한 결과는 CNS -63이 CD4⁺ T 세포에서 TIM-3 발현을 증가시키는 활성 자극이 있을 때 enhancer로 작용하여 TIM-3 전사 활성을 유도할 가능성을 제시한다.

이러한 가능성을 확인하면서 CNS -63 염기서열 중 어느 염기서열이 enhancer 기능에 중요한가 분석하기 위해 CNS -63의 염기서열에서 전사 인자 결합 예측 DNA 부분을 Transcription Element Search System (TESS)을 사용하여 분석한 결과 하나의 AP-1 결합예상부위와 두 개의 NF- κ B 결합예상부위 그리고 하나의 C/EBP α 결합 예상부위를 발견하였다. (Fig. 5 A) NF- κ B 활성을 유도하는 PI3K의 활성이 TIM-3 발현 유도에 필요하다는 (Mujib S 등 2012) 이전 보고를 바탕으로 발견된 NF- κ B 결합 예상 부위를 특이적으로 변이 시킨 luciferase reporter vector를 제작하였다 (Fig 5 B). 제작된 luciferase vector와 GFP 발현

vector를 Jurkat T 세포에 co-transfection하여 luciferase reporter assay를 수행하였다. 그 결과 활성화 자극에 의해 luciferase 활성이 증가하는 조건에서 T3U290 (CNS -63)이 이입된 세포보다 T3U290 (Mut 2) vector가 이입된 세포에서 luciferase 활성이 감소하였다 (Fig. 5 C). 이러한 결과는 CNS -63이 CD4⁺ T 세포에서 활성화 자극에 대한 TIM-3 발현 유도 과정에서 enhancer로 작용할 가능성을 더욱 뒷받침하며 이 때 NF- κ B 결합 예상염기서열^{-63423 bp}GGGTAAATCCC^{-63433 bp}가 중요하게 작용할 것을 제시한다.



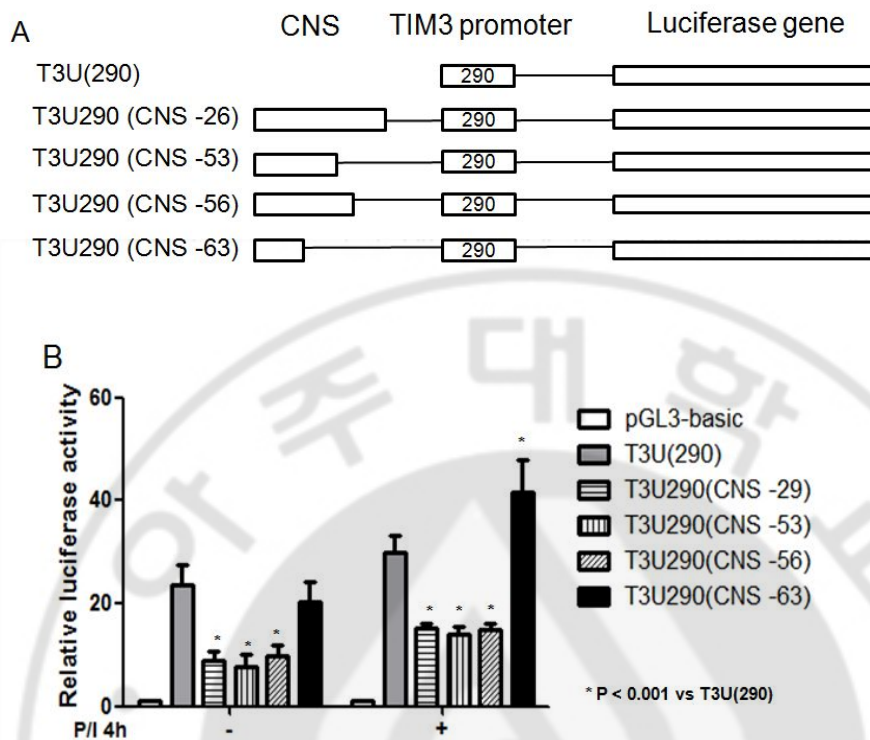
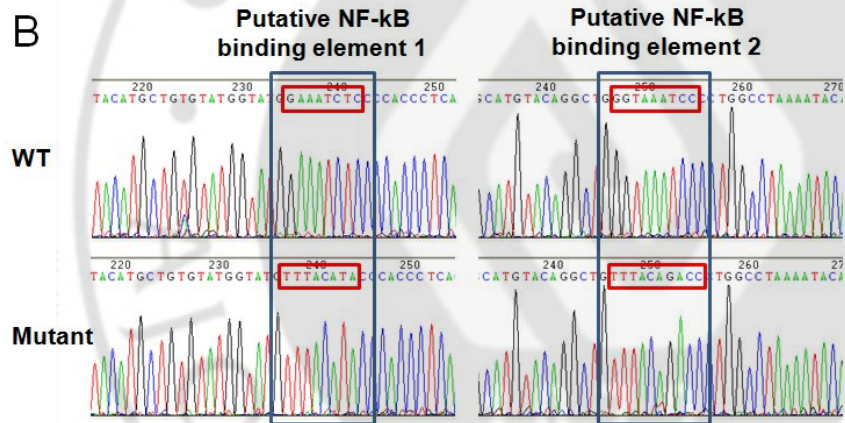
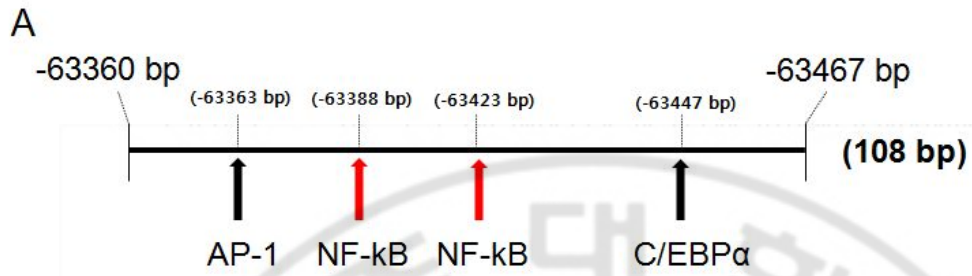


Fig. 4. Enhancer activity of *TIM-3* 5' upstream CNSs. Luciferase reporter vectors containing the indicated *TIM-3* CNS in the upstream of *TIM-3* promoter (A). Jurkat T cells were transfected with the indicated luciferase vectors together with pEGFP-N1 (1/10 of luciferase reporter vector) for determination of transfection efficiency and then stimulated with PMA / ionomycin for 4 h. At 28 h post transfection, luciferase activity was measured by luminometer and normalized to GFP expression level. Data are shown as the mean \pm standard deviation of two independent experiments done in triplication (B).



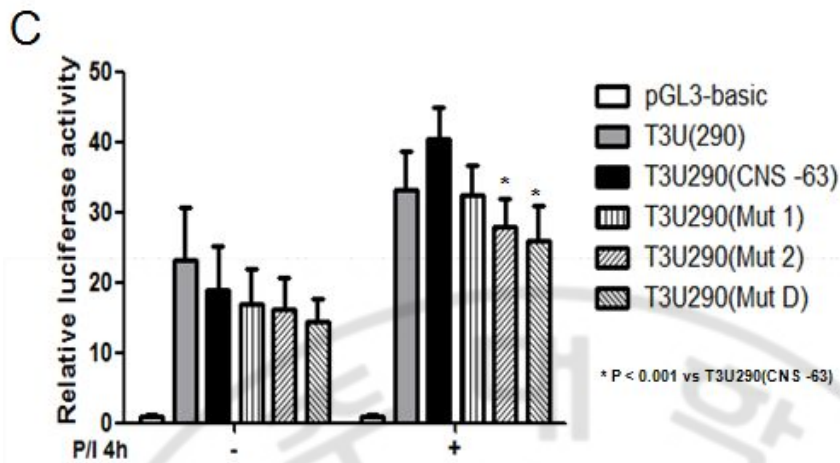


Fig. 5. Reduced enhancer activity of *TIM-3* CNS -63 with mutation of putative NF- κ B binding element. Location of putative transcription factor binding sites (A). Sequencing results showing mutation at putative NF- κ B binding elements in T3U290 (Mut 1), T3U290 (Mut 2) or T3U290 (Mut D) (B). Jurkat T cells were transfected with the indicated luciferase reporter vector together with pEGFP-N1 (1/10 of luciferase reporter vector) for determination of transfection efficiency and then stimulated with PMA / ionomycin for 4 h. At 28 h post transfection, luciferase activity was measured by luminometer and normalized to GFP expression level. Data are shown as the mean \pm standard deviation of two independent experiments done in triplicates.

IV. 고찰

T 세포에서 TIM-3 발현으로 인한 자가면역질환에 대한 연구가 최근에 많이 이루어지고 있으나 이러한 TIM-3의 발현 조절 기작에 대해서는 알려진 바가 많지 않다. 본 연구에서는 CD4⁺ T 세포에서 TIM-3 발현을 조절하는 중요한 enhancer를 찾는 연구를 진행하였다. 먼저 TIM-3를 발현하는 세 가지 종의 TIM-3 유전자 upstream -70 kb ~ -1 bp 부분에서 네 군데의 conserved non-coding sequence를 확인하였고 각 CNS 부분의 히스톤 메틸화 정도를 분석하였다. Jurkat T 세포에서 TIM-3 upstream conserved sequence의 히스톤 메틸화 상태를 ChIP assay로 분석한 결과 자극에 상관없이 CNS -63에서 전사 활성화에 관련되는 H3K4me2를 관찰하였고 모든 부위에서 전사 억제에 관련되는 H3K9me3은 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 보았을 때 CNS -63 부위가 TIM-3 발현 조절에 있어서 역할을 한다는 가능성을 제시할 수 있다.

TIM-3를 발현하지 않는 naive CD4⁺ T 세포와 TIM-3를 발현하도록 유도한 CD4⁺ T 세포에서 각 CNS 부분의 히스톤 메틸화 정도를 분석한 결과 두 세포에서도 CNS -63의 H3K4me2를 관찰하였고 H3K9me3은 관찰되지 않았다. 이렇게 TIM-3를 발현을 하는 세포와 발현하지 않는 세포 모두에서 CNS 부위의 히스톤 메틸화 상태는 차이가 없는 것처럼 나타났다. 때문에 CNS -63이 TIM-3의 발현 조절에 있어서 연관성 TIM-3의 발현 유무와 상관없이 CNS -63의 히스톤 구조는 열려있다는 가능성을 제시 할 수 있다.

Luciferase reporter assay를 통한 실험에서 CNS -63을 TIM-3 promoter 앞부분에 enhancer로서 삽입한 vector를 이입한 Jurkat T 세포에서 PMA / Ionomycin 자극이 있을 때 TIM-3 promoter만 존재하는

vector를 이입한 Jurkat T 세포에서 보다 더 luciferase 활성이 증가하였고 다른 CNS -29, CNS -53, CNS -56이 삽입이 되었을 때 오히려 luciferase 활성이 감소하였다. 이러한 결과가 CNS -63가 자극이 있을 때 자극에 의해서 유도되는 전사 인자들의 결합으로 인해 enhancer로서 작용하여 TIM-3 발현을 조절할 것이라고 예상되었다. 그리고 CNS -63에서 확인한 두 군데의 NF- κ B 결합 예상 부위를 변이 시켜서 Jurkat T 세포에서 luciferase reporter assay를 실행한 결과 NF- κ B 결합 예상 부위를 변이시킨 T3U290 (Mut 2)을 이입한 세포에서 T3U290 (CNS -63)을 이입한 세포보다 자극이 있을 때 luciferase 활성이 의미 있게 감소하였다. 이러한 결과가 NF- κ B가 자극이 있을 때 CNS -63에 전사 인자로서 결합하여 TIM-3 유전자 발현을 조절할 수 있다는 가능성을 제시 할 수 있다. 다른 CNS -29, CNS -53, CNS -56은 종간의 높은 염기서열을 확인하였지만 히스톤 메틸화 상태는 큰 변화가 없었고 luciferase assay에서는 오히려 억제 효과가 있는 것처럼 나타났다. 이 결과만 가지고는 세 군데의 CNS 부위가 TIM-3 유전자 발현에 영향을 주는지는 알 수 없으나 여러 가능성은 제시 할 수 있다.

첫 번째로 본 실험에서는 CD4⁺ T 세포에서만 실험을 진행하였기 때문에 다른 세포에서는 다르게 작용을 할 수도 있을 것이다. TIM-3는 T 세포에서는 억제 분자로서 알려져 있으나 선천적 면역반응에 관여하는 세포들에서는 활성인자로서도 알려져 있다 (Song 등, 2011). 이렇듯 세포 간의 차이에 있어서 각 CNS 부위가 enhancer로서의 기능이 다르게 나타날 수도 있을 것이라는 가능성을 제시하고 여기에 대해서는 추가적인 실험을 진행을 해야 할 것이다.

두 번째로 본 실험에서 히스톤 메틸화 분석에 H3K4me2과 H3K9me3을 사용을 하였다. IFN- γ 를 발현하지 않는 Th2 세포로

분화가 일어나는 동안 IFN-gamma 유전자 부분의 히스톤 메틸화를 분석하였을 때 초기에 H3K9me3 수준이 증가하였고 시간이 지날수록 H3K9me3 수준이 감소하면서 H3K27me3 수준이 증가하였다 (Shaojing Chang 등, 2007). 이렇듯 T 세포에서 TIM-3 유전자 발현 조절 부위의 히스톤 메틸화는 H3K27me3이 관여할 수 고 있을 것이며 이것에 대한 추가 실험을 진행해야 할 것이다.

CNS -63의 NF-κB 결합예상부위의 11개의 염기서열이 TIM-3 발현 조절에 중요할 것이라는 결과를 얻었지만 이 실험 결과만을 가지고서는 확실한 결론을 내릴 수가 없다. 이 후 추가적인 실험으로 T 세포에서 NF-κB를 과 발현 하였을 때 나타나는 결과, 그리고 NF-κB를 억제 하였을 때 나타나는 결과를 확인을 해야 할 것이다.

종합적으로 각 CNS의 히스톤 메틸화 상태는 TIM-3 발현 조절과 직접적인 연관성을 보이지 않았지만 CNS -63는 자극이 존재 할 때 enhancer로서의 작용을 보였으며 NF-κB 결합 예상 염기서열 ⁻⁶³⁴²³GGGTAAATCCC⁻⁶³⁴³³가 TIM-3 발현 조절에 중요하게 작용할 것으로 생각되어지고, 이러한 결과는 TIM-3 발현 조절 기작을 이해하는데 중요한 기초가 될 것이다.

V. 결 론

TIM-3는 활성화된 T 세포 표면에 발현하는 당단백질로 T 세포의 증식, 면역기능을 억제한다. 하지만 TIM-3 유전자 발현 조절 기작에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 본 연구에서는 CD4⁺ T 세포에서 TIM-3의 발현을 조절하는 중요한 enhancer를 찾기 위한 연구를 하였다. 먼저 TIM-3 유전자 5' upstream -70 kb에서 세 종간의 상동성이 높게 나타나는 네 군데의 CNS 부위를 확인하였다. ChIP assay를 사용하여 Jurkat T 세포에서 PMA와 Ionomycin 자극에 의한 히스톤 H3 메틸화를 분석한 결과 CNS -63이 자극에 상관없이 H3K4me2이 관찰되었다. 인간 말초 혈액에서 CD4⁺ T세포를 분리하여 CD3/CD28 자극으로 활성화 시켜 TIM-3를 발현시키고, 체대혈에서 TIM-3를 발현하지 않는 naive CD4⁺ T 세포를 분리하여 TIM-3 발현 유무에 따른 두 세포간의 히스톤 H3 메틸화 정도를 ChIP assay 사용하여 분석한 결과 TIM-3의 발현 유무와 상관없이 CNS -63의 H3K4me2이 관찰되었다. T3U290 (CNS -63)에서 T3U(290)보다 PMA와 ionomycin 자극이 있을 때 luciferase 활성이 약 1.45 배 증가하였다. CNS -63의 NF- κ B 결합예상부위를 변이 시킨 T3U290 (Mut2)에서 T3U290 (CNS -63)보다 PMA와 ionomycin 자극이 있을 때 luciferase 활성이 감소하였다. 종합적으로 CNS -63 (-63360 bp ~ -63467 bp)이 활성 자극에 의한 CD4⁺ T 세포의 TIM-3 유전자 증가에 관여 할 것이다.

참고 문헌

1. Anderson AC, Lord GM, Dardalhon V, Lee DH, Sabatos-Peyton CA, Glimcher LH, Kuchroo VK: T-bet, a Th1 transcription factor regulates the expression of Tim-3. *Eur J Immunol* 40: 859-866, 2010
2. DeKruyff RH, Bu X, Ballesteros A, Santiago C, Chim YL, Lee HH, Karisola P, Pichavant M, Kaplan GG, Umetsu DT, Freeman GJ, Casasnovas JM: T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cell. *J Immunol* 184: 1918-1930, 2010
3. Encinas JS, Kuchoo VK: Mapping and identification of autoimmunity genes. *Curr Opin Immunol* 12: 691-697, 2000
4. Fengmin Shi, Xiaoqin Gu, Xingwei Jiang, Ping Zhou, Yan Xiao, Tingting Zhou, Guojiang Chen, Zhi Zhao, He Xiao, Chunmei Hou, Xinying Li, Xiaomei Yang, Renxi Wang, Jiannan Feng, Beifen Shen, Yan Li, Gencheng Han: Dysregulated Tim-3 expression and its correlation with imbalanced CD4 helper T cell function in ulcerative colitis. *Clinical Immunology* 145: 230 - 240, 2012)
5. Gordon J. Freeman, Jose M. Casasnovas, Dale T. Umetsu, Rosemarie H. DeKruyff : TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunological Reviews* 235: 172-189, 2010.
6. Jamie R Schoenborn, Michael O Dorschner, Masayuki Sekimata, Deanna M Santer, Maria Shnyreva, David R Fitzpatrick, John A Stamatoyannopoulos & Christopher B Wilson : Comprehensive

- epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon- γ . *Nat Immunol* 8: 732-42, 2007
7. Jenuwein T, Allis CD: Translating the histone code. *science* 293: 1074-1080, 2001
 8. Jenuwein T: Re-SET-ting hetrochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol* 11: 266-273, 2001
 31. Jie Zhao, Zhang Lei, Yanyan Liu, Bo Li, Liang Zhang, Haoshu Fang, Chuanwang Song, Xiaomei Wang, Gui-Mei Zhang, Zuo-Hua Feng and Bo Huang: Human Pregnancy Up-Regulates Tim-3 in Innate Immune Cells for Systemic Immunity. *J Immunol* 182: 6618-6624, 2009
 9. Jones PA, Taylor SM: Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20: 85-93, 1980
 10. Kasinsky HE, Lewis JD, Darks JB, Ausio J: Origin of H1 linker histone. *FASEB J* 15: 34-42, 2001
 11. Kearley J, McMillan SJ, Lloyd CM,: Th2-driven, allergen-induced airway inflammation is reduced after treatment with anti-Tim-3 antibody in vivo. *J Exp Med* 204: 1289-1294, 2007
 12. Kim KY, Kweon KR, Lee MS, Kwak ST, Kim KE, Hwang BD, Lim K: Reduced level of octamer binding transcription factor (Oct-1) is correlated with H2B histone gene repression during differentiation of HL-60 cells by all-trans retinoic acid. *Biochem*

Biophys Res Commun 15:616-24, 1995

13. Kuchroo VK, Meyers JH, Umetsu DT, DeKruyff RH: TIM family of genes in immunity and tolerance. *Adv Immunol* 91: 227-249. 2006
14. Lee CG, Sahoo A, Im SH: Epigenetic regulation of cytokine gene expression in T lymphocytes. *Yonsei Med J* 50: 322-330, 2009
15. Lee DU, Avni O, Chen L, Rao A: A distal enhancer in the interferon-gamma (IFN-gamma) locus revealed by genome sequence comparison. *J Biol Chem* 279: 4802-4810, 2004
16. Lee J, Su EW, Zhu C, Hainline S, Phuah J, Moroco JA, Smithgall TE, Kuchroo VK, Kane LP: Phosphotyrosine-dependent coupling of Tim-3 to T-cell receptor signaling pathways. *Mol Cell Biol* 31:3963-74, 2011
17. Lichtenthaler HK, Ac A, Mar다 MV, Kalina J, Urban O: Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. *Plant Physiol Biochem* 45: 577-588, 2007
18. Li E: Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3: 662-673, 2002
19. Li Q, Peterson KR, Fang X, Stamatoyannopoulos G: Locus control regions. *Blood* 100: 3077, 2002
20. Loots GG, Locksley RM, Blankespoor CM, Wang ZE, Miller W, Rubin EM, Frazer KA: Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons.

science 288:136, 2000

21. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ: Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251–260. 1997
22. Maria Shnyreva, William M. Weaver, Mathieu Blanchette, Scott L. Taylor, Martin Tompa, David R. Fitzpatrick, and Christopher B. Wilson: Evolutionarily conserved sequence elements that positively regulate IFN- γ expression in T cells. *PNAS* 101: 12622 - 12627, 2004
23. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH: Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 264: 1152–1156, 1994
24. Michelle K. Gleason, Todd R. Lenvik, Valarie McCullar, Martin Felices, M. Shea O'Brien, Sarah A. Cooley, Michael R. Verneris, Frank Cichocki, Carol J. Holman, Angela Panoskaltis-Mortari, Toshiro Niki, Mitsuomi Hirashima, Bruce R. Blazar, and Jeffrey S. Miller: Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood*. 119(13): 3064–3072, 2012
25. Mohrs M, Blankespoor CM, Wang ZE, Loots GG, Afzal V, Hadeiba H, Shinkai K, Rubin EM, Locksley RM: Deletion of a coordinate regulator of type 2 cytokine expression in mice. *Nat immunol* 2:842, 2001

26. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, Manning S, Greenfield EA, Coyle AJ, Sobel RA, Freeman GL, Kuchroo VK: Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 415: 536-541, 2002
27. Mujib S, Jones RB, Lo C, Aidarus N, Clayton K, Sakhdari A, Benko E, Kovacs C, Ostrowski MA: Antigen-independent induction of Tim-3 expression on human T cells by the common γ -chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 is associated with proliferation and is dependent on the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Immunol* 15:3745-56, 2012
28. Nakae S, Iwakura Y, Suto H, Galli SJ: Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J Leukoc Biol* 81: 1258-1268, 2007
29. Ni Z, Abou El Hassan M, Xu Z, Yu T, Bremner R: The chromatin-remodeling enzyme BRG1 coordinates CIITA induction through many interdependent distal enhancers. *Nat immunol* 18:723, 2008
30. Oeltjen JC, Malley TM, Muzny DM, Miller W, Gibbs RA, Belmont JW: Large-scale comparative sequence analysis of the human and murine Bruton's tyrosine kinase loci reveals conserved regulatory domains. *Genome Res* 7:315, 1997
31. Pennacchio LA, Rubin EM: Comparative genomic tools and databases: providing insights into the human genome. *J clin Invest*

111: 1099, 2003

32. Pennacchio LA, Rubin EM: Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences. *Nat Rev Genet* 2:100, 2001
33. Peterson CL, Laniel MA: Histone and histone modification. *Curr Biol* 14: R546-551, 2004
34. Raghavendra PB, Sreenivasan Y, Manna SK: Oleandrin induces apoptosis in human, but not in murine cells: dephosphorylation of Akt, expression of FasL, and alteration of membrane fluidity. *Mol Immunol* 44: 2292, 2007
35. Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, Schubart A, Sanchez-Fueyo A, Zheng XX, Coyle AJ, Strom TB, Freeman GJ, Kuchoo VK: Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol* 4: 1102-1110. 2003
36. Schoenborn JR, Dorschner MO, Sekimata M, Santer DM, Shnyreva M, Fitzpatrick DR, Stamatoyannopoulos JA, Wilson CB: Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma. *Nat Immunol* 8: 732-742, 2007
37. Shalini Sharma, Aarthi Sundararajan, Amol Suryawanshi, Naveen Kumar, Tamara Veiga-Parga, Vijay K. Kuchroo, Paul G. Thomas, Mark Y. Sangster, and Barry T. Rouse: T cell immunoglobulin and mucin protein-3 (Tim-3)/Galectin-9 interaction regulates influenza A virus-specific humoral and CD8 T-cell responses. *PNAS* 47: 19001-19006, 2011

38. Shnyreva M, Weaver WM, Blanchette M, Taylor SL, Tompa M, Fitzpatrick DR, Wilson CB: Evolutionarily conserved sequence element that positively regulate IFN-gamma expression in T cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12622-12627, 2004
39. Takemoto N, Koyano-Nakagawa N, Yokota T, Arai N, Miyatake S, Arai K: Th2-specific DNase I-hypersensitive sites in the murine IL-13 and IL-4 intergenic region. *Int immunol* 10:1981, 1998
40. Wang F, He W, Zhou H, Yuan J, Wu K, Xu L, Chen ZK: The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates CD8⁺ alloreactive T cell and prolongs survival of skin graft. *Cell Immunol* 250: 68-74, 2007
41. Yeong Wook Song, Churl Hyun Im, Jae Hee Park, Yun Jong Lee, Eun Young Lee, Eun Bong Lee, Kyungsook Park: T-cell immunoglobulin and mucin domain 3 genetic polymorphisms are associated with rheumatoid arthritis independent of a shared epitope status. *Human Immunology* 72: 652-655, 2011
42. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK: The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 6: 1245-1252, 2005
43. Zoltan Wiener, Barbara Kohalmi, Peter Pocza, Judit Jeager, Gergely Tolgyesi, Sara Toth, Eva Gorbe, Zoltan Papp and Andras Falus: TIM-3 Is Expressed in Melanoma Cells and Is Upregulated in TGF-Beta Stimulated Mast Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 127: 906 - 914, 2007

-ABSTRACT-

Upstream conserved sequence element that regulates TIM-3 induction in CD4⁺ T cells

Kuniharu Komori

Department of Biomedical Sciences,
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Sun Park)

The T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3 (TIM-3) was discovered in Th1 and has been known as a T cell regulatory molecule. TIM-3 expression is induced by T cell activation through mechanism not yet well-investigated. In the study, I wanted to find DNA region involved in regulation of TIM-3 transcription in human CD4⁺ T cells between -70 kbp to -1 bp from the TIM-3 transcription start site. Given that regulatory DNA regions show nucleotide sequence homology between species, four conserved non-coding sequences (CNS -29, CNS -53, CNS -56 and CNS -63) were analyzed by comparison human TIM-3 upstream DNA sequences with mouse and cow counterparts. Only at CNS -63, H3K4 dimethylation that is

associated with transcriptional activation was observed in Jurkat T cells and CD4⁺ T cells isolated from human blood. Further, CNS -63 increased luciferase reporter gene expression downstream of TIM-3 minimal promoter. Enhancer activity of CNS -63 was abrogated by mutation of putative NF- κ B binding sites between -63423 and -63433. These results indicate that *TIM-3* CNS -63 may regulate TIM-3 transcription in human CD4⁺ T cells.

Key words: TIM-3, Histone H3 methylation, Transcription regulation

