

생명현상 및 기능연구

Thrombopoietin의 분자적 인식기작 및 기능조절
연구

(Molecular Recognition and Functional Regulation
of Thrombopoietin)

생명공학연구소

과학기술부

제 출 문

과 학 기 술 부 장 관 귀 하

본 보고서를 “생명현상 및 기능연구사업”에 관한 과제 (세부과제 “Thrombopoietin의 분자적 인식기능 및 기능조절 연구”의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 7. 30

주관연구기관명 : 생명공학연구소

주관연구책임자 : 홍 효 정

연 구 원 : 유 명 희

류 성 언

박 흥 록

송 진 수

요 약 문

I. 제 목

Thrombopoietin의 분자적 인식기작 및 기능조절 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

Thrombopoietin (TPO)은 1994년에 처음 알려진 혈소판생성촉진인자로서, 거핵구(megakaryocyte)의 크기와 수를 증가시키고 혈소판의 생성을 촉진한다. TPO의 생체기능 조절은 활성이 있는 형태의 TPO ligand와 수용체 c-Mpl의 상호작용을 통해 이루어진다. TPO 분자는 332개 아미노산으로 구성되어있는 당단백질이며, 간에서 합성되어 혈장으로 분비된다. TPO는 153-154 아미노산잔기 위치를 중심으로 2개의 domain으로 나눌 수 있는데, N-terminal domain (N-domain)은 EPO (erythropoietin) 과 아미노산서열에서 약 50% 유사성을 나타내고 포유동물간에도 서열이 보존되어 있으며 receptor binding 및 activity를 담당하는 것으로 알려졌다. C-terminal domain (C-domain)은 6개의 N-linked glycosylation site이 있어 단백질구조의 안정성이나 circulating 과정에서의 half life를 증가시키는 역할을 할것으로 추정되는데, N-domain 자체가 개의 S-S bond를 지니고 있는 비교적 stable한 구조임을 고려할 때, C-domain의 정확한 기능은 구조의 안정화보다는 혈장내에서의 수명이나 N-domain의 기능조절에 관여할 가능성이 있다. TPO 수용체는 oncogene 산물인 c-Mpl로서 human growth hormone나 EPO의 수용체와 마찬가지로 activation시 homodimerization되는 것으로 생각되고 있다. 그러나 TPO 분자가 어떻게 수용체와 상호작용을 하는지에 대한 분자적기작은 아직까지 연구되지 않았다. 따라서 본 연구를 통해 TPO의 기능에 관한 분자적 인식 기작의 이해가 가능해지면 TPO 또는 유도체를 사용한 thrombopoiesis의 효과적인 조절이 가능하게 될 것이다.

III. 내용 및 범위

- TPO의 구조-기능 관계 연구
- TPO-수용체 상호작용의 생화학적 특성연구

IV. 연구개발 결과

1. TPO의 활성부위 특성 및 구조 연구

TPO의 3차구조를 설계하고, 이 분자모델을 바탕으로, TPO를 alanine scanning mutagenesis 및 N-glycosylation 시킨 후, 변이된 TPO의 활성을 측정한 결과, TPO의 수용체결합에 중요한 아미노산들을 밝혔다. Arg10, Lys14, Pro42, Glu50, Lys138이 중요한 결합부위를 형성함을 알았으며, helix D와 loop AB가 하나의 결합부위를 이루고, helix A가 또 하나의 결합부위를 형성한다는 것을 밝혔다. 그러나 helix C 부위는 수용체결합에 관여하지 않음을 확인하였다. 이 결과는 TPO가 사람 성장호르몬이나 erythropoietin과는 다른 수용체 인식기작을 갖는다는 것을 증명하는 것으로서 TPO-수용체 상호작용의 분자적 인식기작의 이해에 대한 기초를 제공하였다고 생각된다

2. TPO-수용체 상호작용의 생화학적 특성연구

TPO와 soluble TPO수용체를 발현하는 세포주를 제조하여 대량생산하고 정제한 후, 이들사이의 binding kinetics를 연구하고자 하였다. 이 data는 기능이 개량된 TPO의 생물리화학적 특성을 비교하기 위하여 필요하다. 또한 TPO 수용체를 이용한 분석연구를 수행하기 위하여 soluble 수용체를 생산하고 그 항체를 생산하였다. 현재 TPO-수용체 interaction을 분석 중에 있다.

3. TPO의 기능 개량 연구

TPO의 활성이 증진되거나 in vivo half life가 증가된 TPO를 개발하기 위하여 TPO의 3차구조 모델에 근거하여 TPO 분자를 변이시킨 후 그 in vitro 생물활성을 측정하였다. 지금까지 활성이 있는 mutants들을 몇 개 선발하였고, 현재 이들의 대량생산 세포주를 제조하고 있다. 앞으로 정제한 후 동물실험 model을 이용하여 그 in vivo activity를 측정할 계획이다. 기대한 바대로 in vivo활성이 높은 mutant가

개발되면 특허를 출원할 계획이다.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구결과는 TPO 단백질의 기능 조절요인을 보다 더 정확히 규명하는데 활용할 것이다. 본 연구에서는 TPO의 기능적 분석을 위해 TPO의 활성을 측정할수 있는 *in vitro* assay system을 확립하였고 이를 이용한 여러 변이 TPO들의 분석을 통하여 활성에 영향을 미치는 부위에 대한 정보를 얻을수 있었다. 이는 TPO의 활성에는 영향을 주지 않으면서 안정성을 증진시키는데 기여하는 변이를 유도하거나 TPO의 활성 자체를 높일 수 있는 변이를 유도하고 분석하는데 이용될 수 있을 것이다.

본 연구에서 얻어진 TPO-N의 삼차원 구조 model을 통해 TPO의 수용체인 c-mpl과 상호작용을 할 가능성이 있는 residue들을 예측할 수 있었고 이는 TPO-N의 alanine scanning mutagenesis에 의해 얻어진 결과와 일치하였다. 따라서 TPO-N의 삼차구조 model은 비교적 높은 정확도를 갖고 있음을 알 수 있으며 이 model을 사용하여 결정된 receptor binding region 및 structure의 유지에 중요한 부분들을 target 으로 하여 TPO의 receptor binding affinity 및 stability를 높이는 디자인을 할 수 있을 것이다. 본 연구를 통하여 얻어진 TPO-N의 삼차구조 model은 TPO의 receptor activation mechanism에 관한 정보 뿐만 아니라 TPO의 stability 및 구조적 특성에 관한 정보도 제공하며 추후의 계속연구를 통한 TPO의 결정학적 삼차구조 규명에 있어서 chain tracing 및 model building에 중요한 guidance로 역할을 할 것이다.

한편 본 연구에서는 TPO의 수용체를 대장균에서 inclusion body 형태로 대량생산하고 redox buffer system을 사용한 refolding을 시도하여 folding된 단백질을 얻어서 TPO와 결합함을 확인하였고 이어서 이에 대한 항체를 제조하여 native TPO 수용체에 결합함을 확인하였다. 또한 본 연구에서는 TPO와 TPO 수용체의 dimer를 동물세포에서 발현 및 대량생산하였다. 이들과 TPO 수용체에 대한 항체는 TPO-수용체의 상호작용의 생화학적 연구와 유도체들의 activity screening등의 여러 가지 목적으로 사용될 수 있을 것이다.

본 연구에서 TPO의 in vivo half life를 증가시키기 위하여 수용체 결합부위가 아닌 영역을 N-glycosylation시켜 TPO의 기능을 개량하기 위한 연구는 차세대 TPO의 개발을 위한 중요한 전략을 제시한다. 앞으로 이 연구를 계속 수행하여 기능이 개선된 TPO를 개발할 계획이다.

Summary

I. Title

Molecular Recognition and Functional Regulation of Thrombopoietin

II. Objective of project

Thrombopoietin (TPO)1 is a cytokine which specifically stimulates the proliferation and differentiation of megakaryocytes and thus leads to the production of platelets in vitro and in vivo. TPO exerts its action by binding to a specific cell surface receptor encoded by the proto-oncogene *c-mpl*. The human TPO cDNA encodes 353 amino acids including a 21 amino acid signal peptide. The human TPO protein can be divided into an amino-terminal domain of 153 amino acids and a carboxy-terminal domain of 179 amino acids containing six potential N-linked glycosylation sites. The amino-terminal domain itself can stimulate human megakaryopoiesis in vitro and is highly conserved among mouse, rat, dog, pig and human, while the carboxy-terminal domain is not required for the binding of its receptor and displays a wide species divergence. Sequence analysis showed that the amino-terminal domain of TPO has a homology with erythropoietin which is a member of four-helix-bundle cytokine family, but its structure has not been determined either by X-ray diffraction or by NMR. Ligand-induced receptor oligomerization is widely believed to initiate signal transduction for all the cytokine receptors. Some members of this receptor family, such as the human growth hormone (hGH) receptor and EPO receptor, seem to be homodimerized upon ligand stimulation with each of the two different domains of the cytokine molecule bound to each receptor molecule. In case of the TPO receptor, *c-Mpl*, the extracellular domain has the two cytokine receptor modules and the activation may also occurs through receptor homodimerization. However, the precise mechanism and the structural information about how TPO molecule interacts with the receptor molecules is not known. In this study, we have identified functionally important regions of TPO. This information is essential for the understanding of the ligand-receptor interaction mechanism

as well as for the development of the therapeutically useful molecules through the design of the TPO variants with improved functions.

III. Scope and contents

- Study on the structure-function relationship of TPO
- Study on molecular basis of the TPO-receptor interaction
- Study on the improvement of TPO

IV. Results

Thrombopoietin (TPO) is a megakaryocyte growth and differentiation factor. It consists of a characteristic two domain structure. The amino-terminal domain of TPO has a sequence homology with erythropoietin (EPO) and is required for the binding and activation of its receptor c-Mpl. To determine the functionally important regions interacting with its receptor, a series of site-directed mutants of TPO were constructed based on a three-dimensional model of the amino-terminal domain. Two strategies of mutagenesis were employed: 1) non-native N-linked glycosylation scan of 12 residues predicted to be on the surface, and 2) alanine replacement scan of mostly charged 44 amino acid residues. Each TPO mutein was transiently expressed in COS7 cell and the specific bioactivity of the TPO protein secreted into the culture medium was measured using a recombinant BaF3 cell line expressing human c-Mpl. Four alanine substitutions at Arg10, Pro42, Glu50 and Lys138 nearly or completely abolished the activity while the mutation at Arg14 slightly decreased the activity, suggesting that these residues are functionally important in interacting with its receptor. These residues mapped to helix A, loop AB and helix D. Sequence comparison between human TPO and other mammalian TPO showed that the identified residues are completely conserved among species. The identified functionally important residues and regions of TPO are analogous to those of human growth hormone (hGH) and EPO. The similarities of the 3 cytokines suggest that Lys138 of helix D and Pro42 and Glu50 of loop AB may constitute one binding region while Arg10 and Lys14 of helix A may constitute the other binding region to dimerize the receptors.

The full length of human *c-mpl* encodes 635 amino acids (Vigon *et al.* 1992). Mature protein of c-Mpl is composed of an extracellular domain of 463

amino acids, a transmembrane domain of 22 amino acids, and a cytoplasmic domain of 122 amino acids. The soluble extracellular domain was expressed in mammalian cells and shown to bind to its ligand (Lok *et al.* 1994). However, the level of expression is low, and the time to attain the high level expression from mammalian cells is long. Therefore, efficient production of the soluble receptor would provide an advantage to investigate the mechanism of the receptor–ligand interaction. In this study, we have expressed the extracellular domain of human c-Mpl (edMpl) in *Escherichia coli* by mutating the flanking nucleotides of the translation initiation codon of c-Mpl. The protein, although produced in an insoluble form, was refolded and purified to near homogeneity as a monomeric form. The soluble monomeric edMpl retained the binding activity to TPO, as shown by TPO–dependent cell proliferation assay, and the antisera raised against the soluble edMpl also bound specifically to native c-Mpl. The edMpl and the antisera will be useful in the study of the receptor–ligand interaction.

V. Plans for the usage of the results

The three dimensional model and mutational analysis of the receptor binding domain of TPO obtained by this study will aid in the understanding of the biological functions of TPO and in the design of the therapeutically useful TPO variants with improved functions for the treatment of diseases such as thrombopenia. From the model we were able to propose residues that have potential to be involved in the interaction with the TPO receptor, c-mpl and the prediction was consistent with the experimental results obtained an alanine scanning mutagenesis. We also overexpressed the cytokine receptor module I of the TPO receptor in the form of inclusion bodies in E.coli and performed refolding experiments. The overexpressed soluble TPO receptor can be used for the various studies including the activity screening of the TPO variants.

목 차

제 1 장 서론.....	13
제 2 장 국내외 기술개발현황.....	15
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	19
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	39
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	41
제 6 장 참고문헌	43

제 1 장 서론

○ 기술적 측면

Thrombopoietin (TPO)은 1994년에 처음 알려진 혈소판생성촉진인자로서, 거핵구(megakaryocyte)의 크기와 수를 증가시키고 혈소판의 생성을 촉진한다. TPO의 생체기능 조절은 활성이 있는 형태의 TPO ligand와 수용체 c-Mpl의 상호작용을 통해 이루어진다. TPO 분자는 332개 아미노산으로 구성되어있는 당단백질이며, 간에서 합성되어 혈장으로 분비된다. TPO는 153-154 아미노산잔기 위치를 중심으로 2개의 domain으로 나눌 수 있는데, N-terminal domain (N-domain)은 EPO (erythropoietin) 과 아미노산서열에서 약 50% 유사성을 나타내고 포유동물간에도 서열이 보존되어 있으며 receptor binding 및 activity를 담당하는 것으로 알려졌다. C-terminal domain (C-domain)은 6개의 N-linked glycosylation site이 있어 단백질구조의 안정성이나 circulating 과정에서의 half life를 증가시키는 역할을 할것으로 추정되는데, N-domain 자체가 개의 S-S bond를 지니고 있는 비교적 stable한 구조임을 고려할 때, C-domain의 정확한 기능은 구조의 안정화보다는 혈장내에서의 수명이나 N-domain의 기능조절에 관여할 가능성이 있다. TPO 수용체는 oncogene 산물인 c-Mpl로서 human growth hormone나 EPO의 수용체와 마찬가지로 activation시 homodimerization되는 것으로 생각되고 있다. 그러나 TPO 분자가 어떻게 수용체와 상호작용을 하는지에 대한 분자적기작은 아직까지 연구되지 않았다. 따라서 본 연구를 통해 TPO의 기능에 관한 분자적 인식 기작의 이해가 가능해지면 TPO 또는 유도체를 사용한 thrombopoiesis의 효과적인 조절이 가능하게 될 것이다.

○ 경제산업적 측면

TPO는 동물실험에서 항암제 투여 후 혈소판뿐만 아니라 적혈구의 생성도 촉진하였으며, 임상시험에서 항암요법 후 혈소판수 감소를 경감시키고 혈소판수혈 요구량도 줄일 수 있는 것으로 보고되었다. 혈소판감소증 치료에 대한 현재 국내의 잠정적 시장규모는 약 1000억원에 달하고 있고, 전세계적으로 각종 의료혜택의 증가와 평균수명의 연장 등으로 본태성 빈혈이나 다른 질환 및 치료에 의한 혈구감소증의 빈도는 날로 증가하는 추세에 있으므로, 효과적인 혈소판생성촉진제가 개발되면 향후 세계적으로 시장성이 매우 큰 신약이 될 것이다. 현재 TPO는 혈소판감소증치료제로서 임상시험단계에 있으므로 특허에 의해 그 개발이 봉쇄될 가능성이 있다. 그러나 본 연구에서 TPO의 작용기작에 대한 분자수준의 이해는 개량된 조절 촉진제의 개발과 새로운 특허의 취득을 가능하게 할 것이다.

○ 사회문화적 측면

현대사회에 들어서면서 사회경제적인 발전이 가속화 됨에 따라 환경오염이 점차 심각해지고 사람들은 다양한 발암물질에 노출되므로 암발생 빈도도 점차 증가되고 있다. 이러한 악성종양의 치료를 위하여 다양한 항암요법이 시행되고, 항암요법의 불가피한 부작용으로써 골수기능의 억제가 발생하게 된다. 항암요법의 발전이 평균생존율은 증가시켰지만 환자들은 골수기능의 억제로 인하여 심각한 감염증과 출혈등의 부작용에 의한 환자들의 사망을 피할 수 없게 되었다. 백혈구의 조혈촉진제가 개발되어 임상적으로 이용되고 있는 것과는 달리 혈소판의 경우는 전적으로 혈소판농축액에만 의존하고 있는 실정이다. 개량된 혈소판 조절인자의 개발은 조혈질환의 치료뿐만 아니라 면역관련 질환의 치료에 새 장을 열어 삶의 질을 높여 줄 수 있는 획기적인 성과가 될 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. Thrombopoietin (TPO)과 수용체

Leukemia 바이러스 (MPLV)의 oncogene인 v-mpl의 proto-oncogene c-mpl이 조혈 세포 성장인자 수용체의 한 member임이 밝혀진 후 (Vigon, I. et al., 1992) TPO가 c-Mpl의 리간드로서 거핵구를 증식시키고 혈소판으로 성숙시키는 인자임이 1994년 Nature지에 발표된 4편의 논문에 의하여 입증되었다. 즉, 미국 Sauvage등은 돼지 혈장으로 부터 c-Mpl에 결합하는 리간드를 분리하였고, 이 단백질의 아미노산서열을 이용하여 사람 태아간세포 cDNA library로 부터 cDNA를 클로닝하여 In vitro & vivo 활성을 검증한 결과 c-Mpl이 발현되는 Ba/F3-mpl 세포의 증식을 촉진시키고 생쥐에서 혈소판 수를 증가시킴을 확인하였다 (de Sauvage, F. J. et al., 1994).

미국의 Lok 등은 쥐의 c-Mpl 리간드를 클로닝하여 동일한 활성을 나타냄을 확인하였고 (Lok, S. et al., 1994) 프랑스의 Wendling등도 혈액속의 c-Mpl에 결합하는 단백질이 거핵구의 증식을 촉진시킴을 확인하였다 (Wendling, F. et al., 1994).

사람의 TPO수용체 유전자는 처음에 그 일부가 MPLV (myeloproliferative leukemia virus)의 외피단백질 유전자와 융합된 상태로 발견되어 (Souyri, M. et al., 1990) 염기서열을 분석한 결과 cytokine 수용체 superfamily의 한 member임이 알려지게 되었다. 그후 이 V-mpl 유전자와 유사한 사람 proto-oncogene인 c-mpl 유전자가 클로닝되었고 비장, 골수, 태아간에서만 발현되는 것으로 밝혀졌다 (Vigon, I. et al., 1992). C-Mpl은 Type I cytokine 수용체군의 구조적 특성을 지니고 cytoplasmic domain에는 kinase 활성이 없음이 보고되었다 (Skoda, R. C. et al., 1993).

TPO와 TPO 수용체의 crystal structure는 아직 보고되지 않았지만, TPO의 mutagenesis 및 mutant TPO의 활성을 측정한 결과에 의하여 TPO는 N-terminal domain의 Helix A의 부분과 LoopAB와 helix D의 부분의 두 영역이 각각 수용체와 결합하는 것으로 생각되고 있다 (Park et al., 1998).

2. Cytokine의 활성부위에 대한 Epitope Mapping

Cytokine의 epitope mapping 연구의 대표적인 예로는 Genentech의 James Wells 박사팀에서 시행한 HGH (human growth hormone) 및 그 수용체에 대한 alanine

scanning mutagenesis이다 (Cunningham, B. C. & Wells, J. A. 1989; Bass, S. H. et al., 1991).

HGH의 경우 3차구조가 밝혀지기 이전에, 수용체와 결합할 것으로 예측되는 세부위의 아미노산서열 (총 191위치 중 62곳)에 대해 하나씩 alanine으로 치환시키고 수용체에 대한 결합능력에 체계적으로 분석하여 epitope mapping에 성공하였다 (Cunningham, B. C. & Wells, J. A. 1989). HGH 수용체에 대해서도 총 238 residue 들 중 charged (49개), aromatic (9개), neighbor (26개) 잔기들에 대해 alanine scanning mutagenesis를 통해 HGH와 결합하는 부위를 규명하였으며 (Bass, S. H. et al., 1991), 이러한 결과들은 HGH-receptor 복합체의 X-ray 결정구조에 의해 확인되었다 (de Vos, A. M. et al., 1992). 한편 변이 HGH 단백질들을 이용하여 HGH-receptor 복합체의 자세한 3차구조 분석 이전에 HGH의 수용체에 대한 결합모드가 1:2 complex이고 high affinity 와 low affinity의 overlapping binding site이 존재함을 알 수 있었다 (Cunningham, B. C. et al., 1991).

상기의 scanning mutagenesis는 IL-8의 수용체 결합부위 mapping에도 성공적으로 사용되었다 (Hebert, C. A. et al., 1991).

3. 수용체-리간드 상호작용의 분자적 인식기작

특정 수용체에 결합하여 세포의 성장과 분화를 조절하는 성장인자들은 수용체와 결합할때 수용체를 oligomerization시켜 세포안으로 signal을 전달한다 (Cunningham, B. C. et al., 1991 ; Boulay, J. L. et al., 1992 ; McDonald, N. G. et al., 1993 ; Heldin, C.-H., 1995). 이때 성장인자들과 수용체간의 결합특성에 따라 수용체는 homo-oligomerization 또는 hetero-oligomerization을 한다. 대부분의 cytokine 수용체들은 (예, IL-3, GM-CSF, IL-5) hetero-oligomerization을 통해서 signal을 전달한다. 이 경우 signal을 전달하는 subunit은 그 자체로서는 cytokine ligand와는 결합할 수 없고 일반적으로 4-helix bundle을 기초로 한 topology를 갖고 있는 cytokine 분자들이 수용체의 ligand binding subunit에 결합한 후에야 이 complex와 결합하여 signal을 전달한다 (Miyajima, A. et al., 1992). 또한 어떤 경우는 여러가지 cytokine의 ligand binding subunit들이 하나의 공통된 signal transducing subunit을 공유하기도 한다. IL-6, leukemia inhibitory factor (LIF), IL-11, ciliary neurotrophic factor (CNTF) 등이 이 경우에 해당되며 공통된 signal transducer인 gp130 (Taga, T. et al., 1989 ; de Vos, A. M. et al., 1992 ; Bass, S. H. et al., 1991) 를 사용한다.

Growth factor, erythropoietin (EPO), prolactin, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) 등은 위와는 달리 homo-oligomerization에 의해 signal을 전달한다. 이들 cytokine receptor의 oligomerization에 의한 signal은 p48, STAT (signal transducers and activators of transcription), JAK kinase family (cytoplasmic protein-tyrosine kinase) 등의 기능에 의해서 nucleus로 전달된다 (Darnell, J. E. et al., 1994 ; Ziemiecki, A. et al., 1994).

성장인자, cytokine들과 수용체간의 연구는 일반적으로 한쪽 partner의 삼차구조 연구와 그 단백질의 site directed mutagenesis에 의해서 진행되어 왔다. 이런 방법으로 IL-2 (Zurawski, S. M. et al., 1992), IL-4 (Woldawer, A. et al., 1993), IFN β (Senda, T. et al., 1992) 등의 수용체 결합부위의 특성이 밝혀졌다. 그러나 1992년에 human growth hormone (HGH)과 수용체의 삼차구조 (de Vos, A. M. et al., 1992)가 X-ray 결정학에 의해 밝혀짐으로서 수용체와 리간드의 원자수준 상호작용의 직접적인 이해가 가능해졌다. HGH는 monomer로서 수용체의 homodimer와 결합되는데 monomer의 두 다른 부분이 수용체 homodimer의 equivalent한 부분에 결합하는 것을 밝혀서 단백질간 분자적 인식의 원자수준 이해에 획기적인 계기를 마련하였다. 또한 최근에 발표된 IFN γ 와 수용체 complex의 삼차구조 연구에 의해 (Walter, M. R. et al., 1995) 수용체의 aromatic residue들과 리간드의 charged residue들간의 상호작용, 그리고 서로 다른 charge를 가진 residue들 간의 상호작용이 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 TPO의 구조-기능 관계 연구

1-1. TPO의 site-directed mutagenesis 및 mutants의 활성 분석

TPO 의 수용체 결합부위 탐지를 위한 돌연변이 분석결과 helix D 의 Lys138 과 loop AB 의 Glu50, Pro42 가 하나의 수용체 결합부위를 형성하고 helix A 의 Arg10 과 Lys14가 수용체와 또 다른 결합부위를 형성할 것이라는 연구결과를 얻었다. 이 결과는 TPO-수용체의 상호작용이 성장호르몬이나 erythropoietin 같은 수용체의 단일중합 (homodimerization)을 유도하는 cytokine 들과 유사한 기작으로 일어날 수 있음을 시사한다.

본 연구에서는, 1 단계 연구과정에서 누락된 helix C 부위의 체계적인 변이를 통해 helix C 가 TPO 활성화에 영향을 주는 중요한 Domain 인지 를 규명하였다. 먼저 TPO 구조 모델을 바탕으로 helix C 의 표면에 위치할 것으로 예상되는 9개 아미노산 잔기(Ser87, Ser88, Gly91, Ser94, Gly95, Leu99, Leu101, Gly102, Ser106)의 alanine 치환을 재조합 PCR 방법으로 수행하였다. 또한 N-말단 부위에 존재하는 Asp8 을 alanine으로 치환하였다. 이 mutant들을 1단계에서 수행한 바와 같이 pcDNA의 HCMV 프로모터에 연결하여 발현플라스미드들을 제조한 후 COS7 세포주에서 48시간 동안 발현시켰다. 세포배양액으로 분비된 TPO의 양을 anti-human TPO polyclonal antibody를 이용한 sandwich ELISA에 의하여 정량한 후, 각 mutant TPO의 활성을 측정하기 위하여 BaF-mpl 세포를 이용한 in vitro cell proliferation assay를 실시하였다.

TPO mutant들 간의 100 ng/ml 의 농도에서의 세포증식에 대한 최대활성을 비교한 결과, Asp8의 변이만이 40% 정도의 활성감소를 보였고, helix C 부위의 변이는 아무런 감소효과를 보이지 않았다 (표 1).

표 1. 변이 TPO의 활성도

Domain	Mutein	Specific Activity (% wild type)	
N-terminal Helix A	D8A	61.8	
	R10A	11.3	
	K14A	78.9	
	R17A	99.7	
	D18A	107.8	
	H20A	108.7	
	H23A	103.1	
	R25A	96	
	Loop AB	P30A	102.4
		E31A	93.6
H33A		104.4	
P34A		106	
P36A		106.6	
T37A		106.2	
P38A		88.6	
P42A		6.6	
D45A		90.8	
F46A		24.9	
S47A		110.7	
E50A		0	
K52A		98.9	
Helix B	E56A	93.6	
	E57A	95.5	
	K59A	103.1	
	D62A	101.9	
	G65A	108.7	
	L69A	104.7	
	E72A	?a	
	G73A	106.7	
Loop BC	R78A	96.6	
Helix C	S87A	98.4	
	S88A	98.6	
	G91A	99.1	
	S94A	104	
	G95A	?	

	R98A	98.0
	L99A	105
	L101A	103.6
	G102A	100.2
	Q105A	94.0
	S106A	103.4
LoopCD	R117A	96.9
	H121A	102.2
	K122A	101.4
	D123A	90.9
Helix D	I127A	94.3
	F128A	8.6
	F131A	?a
	Q132A	94.6
	H133A	103.4
	R136A	97.5
	K138A	0
	R140A	90.1
	F141A	89.6

1-2. TPO의 구조-기능 관계 분석

위의 표 1에 나타난 바와 같이, loop AB의 Phe46이나 helix D의 Phe128의 alanine substitution mutant는 활성이 wild type TPO에 비하여 각각 24.9%와 8.6% 밖에 지나지 않으나, 이 잔기들은 TPO의 3차구조에서 helix의 안쪽에 위치하므로 수용체와의 결합에 관여하지 않고 TPO의 3차구조 형성에 영향을 미쳐 TPO의 활성이 저해되었을 것으로 추정된다. 따라서, helix A의 Asp8, Arg10, Lys14과, loopAB의 Pro42, Glu50 및 helix D의 Lys138이 항원결합에 중요한 아미노산 잔기들일 것으로 생각된다. 따라서 TPO는 성장 호르몬이나 erythropoietin과는 달리 helix C가 수용체와의 상호작용에 깊이 관여하지 않을 것으로 생각되며, N-말단 부위와 helix A가 수용체와의 결합에 한 부위를 형성하고 loopAB와 helix D가 또 다른 하나의 수용체 결합부위를 형성할 것으로 생각하고 있다 (그림 1).

표 1의 연구결과에서 보면, Glu50과 Lys138이 각각 alanine으로 치환된 경우 활성이 전혀 없는 것으로 나타났다. 그 원인으로는 이 잔기들이 수용체에 직접 결합하는 위치에 있으나 변이로 인하여 TPO가 수용체에 결합하지 못함으로써 활성을 나타내지 못하였다고 생각할 수 있다. 그러나 TPO의 3차구조를 보면, Glu50과 Lys138이 아주 가까이 위치하고 있어 salt bridge를 형성하고 있는데, 변이로 인하여 TPO의 3차구조가 불안정하여 활성을 잃었을 수도 있다고 해석할 수 있다. 따라서 Glu50과 Lys138의 두 아미노산 잔기들이 갖고 있는 전하가 수용체와의 결합에 중요한 역할을 하는지, 아니면 정전기적 인력에 의한 구조적 안정에 관여하는지 규명해 보고자 Glu50을 Lys50으로, Lys138을 Glu138로 바꾸어 정전기적 인력이 그대로 유지되는 변이 TPO를 제조하여 활성을 측정하였다. 이 변이 TPO의 활성은 정상 TPO에 비해 42% 정도의 활성만을 보여 주었다. 이처럼 활성이 복원된 것은 두 아미노산 잔기의 정전기적 인력이 TPO의 구조적인 안정을 유지 하는데 중요하다는 사실과 두 아미노산 잔기들이 각각 수용체와의 상호작용에 관여하고 있다고도 해석된다.

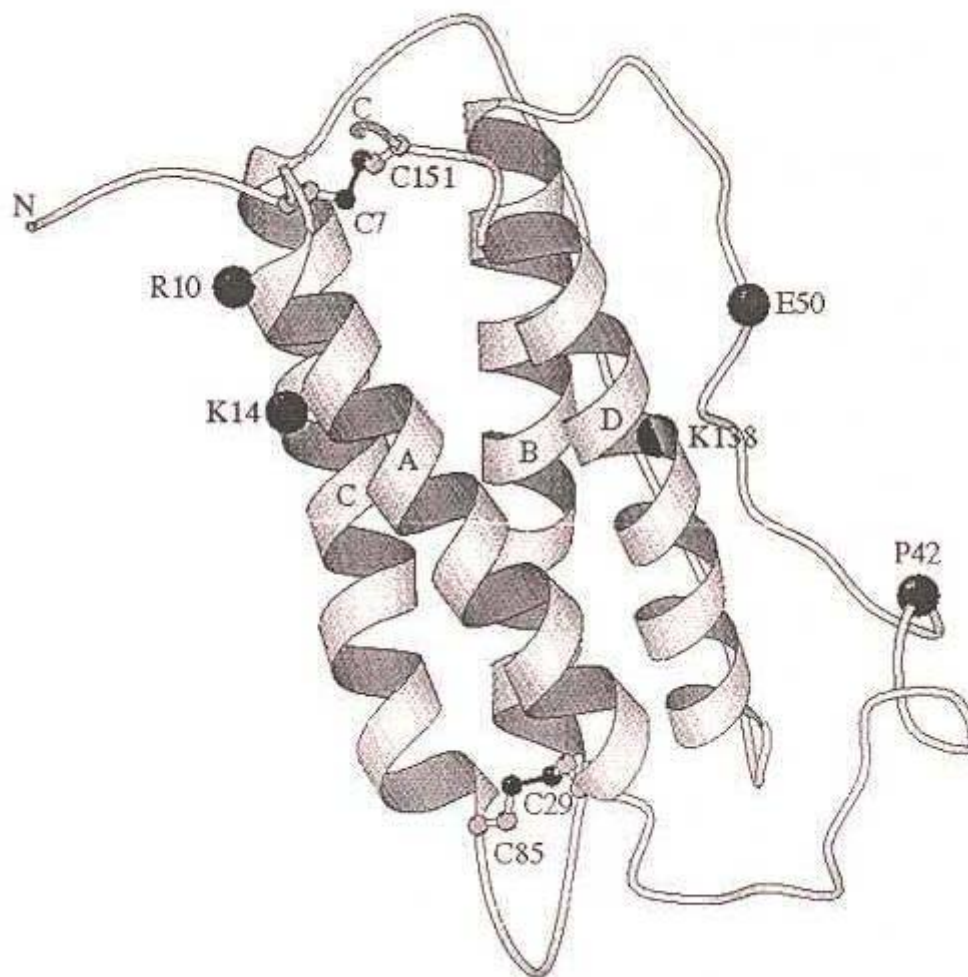


Fig. 1. Model of predicted three-dimensional structure of TPO showing a proposed functionally important region that encompasses Arg10 and Lys14 of helix A and another that encompasses Pro42 and Glu50 of loopAB and Lys138 of helix D.

제 2 절 TPO-수용체 상호작용의 생화학적 특성연구

2-1. TPO의 동물세포에서의 발현 및 정제

TPO의 대량생산 및 순수분리를 위해서 TPO를 안정하게 발현하는 세포주를 제조하였다. TPO의 cDNA를 pcDNA 발현벡터의 HindIII-EcoRV에 subcloning하여 이 벡터의 HCMV promoter에 연결되도록 하여 발현플라스미드 pcDNA-dhfr을 제조하였다 (그림 2). 이 DNA를DHFR mutant인 CHO 세포 DG44에 transfection하여 G418로 selection한 뒤 MTX를 이용해 유전자를 증폭하였다. 320 nM의 MTX로 증폭시킨 세포주 WT-11을 무혈청배지에서 배양한 후, 그배양액을 Phenyl-Sepharose column, Mono Q column, Superdex 75 column을 사용한 chromatography를 수행하여 TPO를 정제하였다 (그림 3).

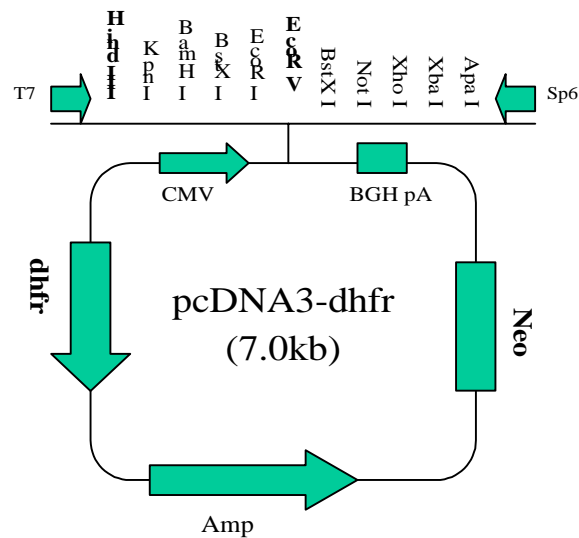


Fig. 2. Restriction map of expression plasmid cDNA3-dhfr-TPO. TPO cDNA is cloned between HindIII and EcoRV.

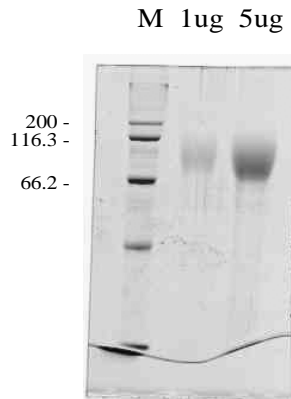


Fig. 3. SDS-PAGE of TPO purified

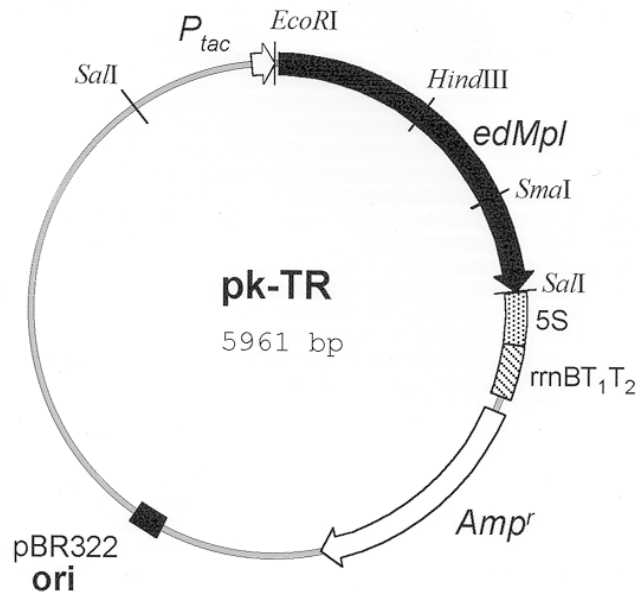
2-2. 수용성 TPO 수용체 (soluble receptor)의 제조 및 발현

TPO의 세포증식능력 (활성)은 수용체와의 결합력 (binding affinity) 및 수용체를 중합시키는 능력 (homodimerization)이 복합적으로 나타난 결과이다. 따라서 TPO-수용체의 상호작용을 보다 체계적으로 연구하기 위해서는 결합력과 중합력의 구분이 요구된다. TPO와 수용체간의 결합력에만 영향을 주는 아미노산들의 규명과 결합력을 비교하기 위해서는 TPO와 *in vitro*에서 결합할 수 있는 수용성 수용체의 제조가 필수적이다. Soluble receptor의 제조를 위해서 TPO 수용체의 세포밖 domain만을 PCR로 증폭한 뒤 이를 발현벡터에 삽입하여 monomer 형태로 대장균이나 동물세포에서 발현시키는 방법과 immunoglobulin의 Fc domain에 연결하여 dimer 형태로 발현시키는 방법이 시도되었다.

2-2-1. 대장균으로부터 TPO 수용체의 생산

대장균로부터 TPO에 대한 soluble receptor를 생산하는 것은 동물세포로부터 생산하는 것보다 훨씬 빠르고, 불용성 inclusion body 형태로 발현하여 다른 단백질로부터 쉽게 순수분리가 가능하다는 장점이 있다. 따라서 대장균에서 TPO 수용체를 발현시키기 위하여, TPO 수용체의 extracellular domain을 암호하는 cDNA를 pkk223-3 (Pharmacia)의 *tac* promoter에 연결시켜 발현플라스미드 pk-TR1을 제조하였다 (그림 4).

이 발현플라스미드로 *E. coli* XL1-blue를 형질전환시키고 OD600 이 0.8일 때 0.3 mM IPTG를 사용하여 37°C에서 3시간 동안 발현시켜 SDS-PAGE로 발현여부를 분석하였으나 그

A**B**

Upstream primer

R51: 5' -GCAGAATTC**ATG**AGCCAAGACTCAGAG-3'R52: 5' -GCAGAATTCTTATGAAAAGCCAAGACTCAGAG-3'
EcoRI

Downstream primer

R31: 5' -CACGTCGACTT**TAC**CAGGCGGTCTCGGTG-3'
SalI

Fig. 4. Construction of expression plasmid pK-TR1 and pK-TR2 (A) and the nucleotide sequences of the PCR primers (B). (A) Genes and *tac* promoter are indicated by thick arrows and the important restriction sites used in the construction are indicated. (B) The translation initiation and termination codons are represented by bold letters and the inserted oligonucleotides are underlined.

발현수준은 매우 낮았다 (그림 5). 대장균내 발현효율을 높여주기 위해 시작 codon ATG의 앞뒤에 약간의 변형을 시도하였다 (그림 4). 이 시도의 결과 발현효율이 약 15배 가량 증가하였으며, 발현된 단백질의 대부분은 불용성 inclusion body형태로 분리되었다 (그림 5).

Inclusion body의 대부분은 50-kDa의 수용체였으며 (80% of inclusion body), 수용체의 대부분은 disulfide bond로 연결된 multimer로 존재하였다. 이 단백질은 15개의 cysteine residue를 갖고있어 inter-disulfide bond를 통한 multimer가 가능하고 여러 가지 조합의 intra-disulfide bond가 가능하다. 따라서 denaturation시 reducing agent를 첨가하여 모든 disulfide bond를 끊어주고, glutathione redox-system을 이용해 refolding하였다. 이 과정에서 많은 부분이 aggregate형태로 소실되었으나 monomer형태의 수용체 비율이 훨씬 높아졌음을 확인하였다. 이들로부터 활성이 있는 수용체를 얻기위해 DEAE-Sephadex와 MonoQ ion-exchange column을 이용한 크로마토그래피를 수행하여 monomer만을 분리하였다 (그림 6).

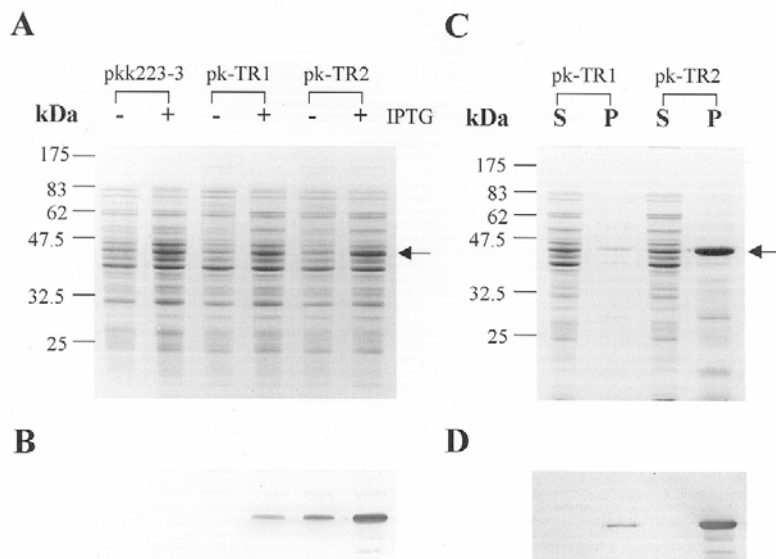


Fig. 5. Expression and intracellular location of the edMpl in *E. coli*. Total cell lysates of the induced (+) or uninduced (-) recombinant cells harboring pkk223-3, pk-TR1, or pk-TR2 were subjected to 12.5% SDS-PAGE with Coomassie Brilliant blue staining (A) and Western blot analysis using anti-edMpl sera (B). The soluble (S) and insoluble (P) fractions were recovered from the total protein extracts of the induced recombinant cells and subjected to 12.5% SDS-PAGE (C) and Western blot analysis (D). Arrows indicate the position of edMpl.

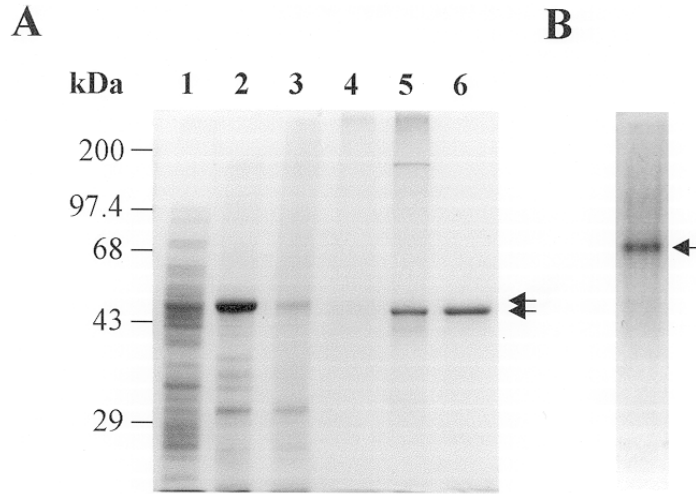


Fig. 6. Purification of the edMpl expressed in *E. coli*. (A) The reduced samples of total cellular proteins (lane 1), inclusion bodies (lane 2), and the soluble protein after refolding (lane 3), and the unreduced samples of the soluble protein after refolding (lane 4) and the monomer fractions after ion exchange chromatography on DEAE-Sephacel column (lane 5) followed by FPLC on Mono Q column (lane 6) were subjected to 10% SDS-PAGE. The reduced samples included β -mercaptoethanol in the SDS sample buffer, while the unreduced samples did not. Upper and lower arrows indicate the position of reduced and unreduced edMpl, respectively. (B) 10% native gel electrophoresis of edMpl monomer. Arrows indicate the position of edMpl.

2-2-2. 대장균으로부터 생산된 TPO 수용체의 TPO 결합능 분석

2-2-1에서 정제된 TPO 수용체의 TPO 결합능을 분석하기 위하여, TPO 수용체를 발현하고 있는 재조합 BaF3 세포주 BaF-mpl (Park et al., 1997)를 이용하여 TPO 수용체가 TPO-responsive proliferation을 저해하는지를 분석하였다. Negative control로서는 *E. coli*에서 생산 및 정제된 GST (Glutathione-S-transferase)를 사용하였다. 그 결과 TPO 수용체의 양이 증가함에 따라 TPO에 의한 BaF-mpl 세포 성

장의 저해가 증가함을 관찰하였다. 반면 GST는 TPO-responsive proliferation에 별 영향을 주지 않았다 (그림 7A). 따라서 대장균으로부터 생산된 TPO 수용체가 TPO에 대한 결합능을 나타냄을 확인하였다.

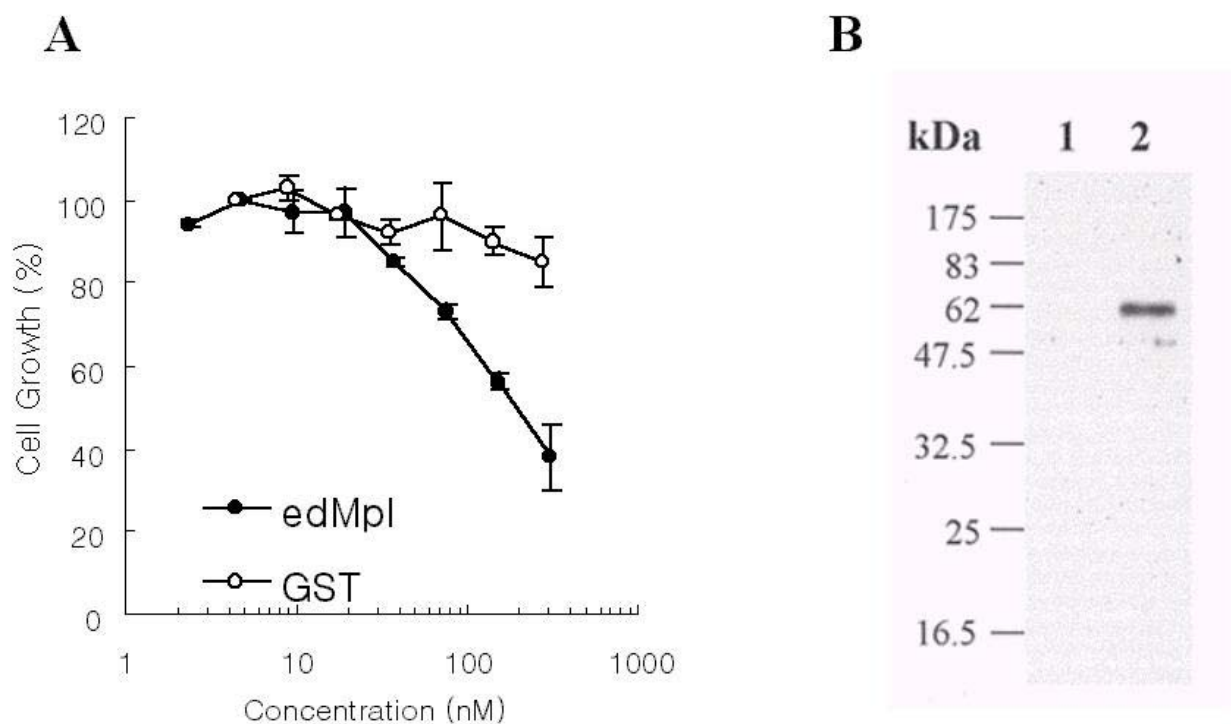


Fig. 7. **A**: TPO-dependent cell proliferation assay using soluble edMpl monomer. The indicated concentrations of soluble monomeric edMpl, or GST was added to 2×10^4 BaF3-mpl cells (100μ l) in the presence of TPO giving rise to half-maximal proliferation. After 36h of incubation, the cell growth was determined by MTT assay. The cell growth of each cell sample is expressed as a percentage of the growth of the control cell in the absence of edMpl or GST. Standard deviations are represented by error bars. **B**: Reactivity of the anti-edMpl sera to the soluble c-Mpl secreted by the COS7 cells that were transfected with expression plasmid pc-sR. The culture supernatant of untransfected (lane 1) or transfected (lane 2) COS7 cells was ten-fold concentrated and subjected to 12.5% SDS-PAGE and subsequent Western blot analysis using the anti-edMpl sera.

2-2-3. TPO 수용체에 대한 항체 제조

2-2-2에서 정제한 수용성 TPO 수용체 300 μg 을 Freund's complete adjuvant를 사용하여 토끼에 주사하였고, 2 주 간격으로 상기 TPO 수용체 200 μg 을 Freund's incomplete adjuvant를 사용하여 3회 주사하였다. 항체의 역가는 anti-rabbit HRP conjugate (1:1000, v/v)를 사용한 indirect ELISA에 의하여 확인하였다.

상기 항체의 특이성을 확인하기 위하여, TPO 수용체의 extracellular domain에 대한 cDNA를 pcDNA3의 HCMV 프로모터에 연결하여 제조한 발현플라스미드 pc-sR을 COS7 세포주에서 일시적으로 발현시킨 후 그 배양 상층액을 Western blotting 하고 상기의 토끼 혈청을 반응시켰다. 그 결과 TPO 수용체에 대한 antiserum은 TPO 수용체에만 특이하게 결합함을 확인하였다 (그림 7B).

이 결과는 대장균에서 제조된 TPO 수용체에 대한 anti-serum이 native TPO receptor에도 결합한다는 근거가 된다. 이 결과들을 토대로 anti-serum은 ELISA나 FACS, Immunoprecipitation 등의 앞으로 수행될 여러 실험에 유용하게 사용될 것으로 생각되어진다.

2-2-4. 동물세포에서의 TPO 수용체의 발현

현재까지 알려진 바로는 하나의 TPO가 두 개의 수용체와 결합할 것으로 추정된다. 따라서 결합력을 규명하기 위해서는 중합된 수용체를 사용해야 한다. 이를 위해 수용체의 extracellular domain을 linker를 통해 항체의 Fc domain에 융합시킨 발현벡터를 제조한 뒤 염기서열을 확인하였고, 수용성 수용체의 발현여부를 확인하기 위해 COS7 세포에서 일시적 발현을 시도하였다. 발현된 수용성 수용체의 양을 측정하기 위해 ELISA를 수행하였으나 측정하기 어려울 만큼 발현량이 적어 TPO와의 결합여부를 측정할 수 없었다. Fusion protein의 발현 및 secretion을 증가시키기 위해 수용체의 Leader sequence를 제거하고 CD5 leader로 교체하였으며, 혹시 intron 내의 enhancer sequence가 발현효율을 높일 수 있는지 시험해보기 위하여 intron이 들어있는 Fc domain 유전자를 사용하여 발현벡터를 제조하였다. 기존의 벡터와 새로 만든 벡터를 COS7 세포에서 발현시킨 결과 발현 양에는 별 차이가 없는 것으로 나타났으며, 대부분의 Fusion Protein들이 세포내부에 존재하고 있는 것이 Protein A Sepharose를 이용한 Immunoprecipitation과 Western blotting 방법으로 확인되었다.

따라서 발현세포주를 COS7에서 HEK293으로 바꾸고 이 세포주에 Fc-fused soluble receptor 발현벡터를 도입하여 G418 (550 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 selection 한 뒤 ELISA를 이용하여 soluble receptor가 발현되는 세포주들만을 골라 내었다. 이들 중 발현량이 가장 높은 두가지 세포주를 선택하여 soluble receptor 생산에 사용하였다.

Fc-fused soluble receptor를 안정하게 발현하는 HEK293 세포주를 serum이 있는 배지에서 50% 정도 confluent하게 배양한 뒤 serum이 없는 배지로 바꾸어서 일주일

간 더 배양하였고, 이러한 배지를 원심분리와 여과를 통해 정제한 후 Protein G-Sepharose column을 통해 순수 분리하였다 (그림 8).

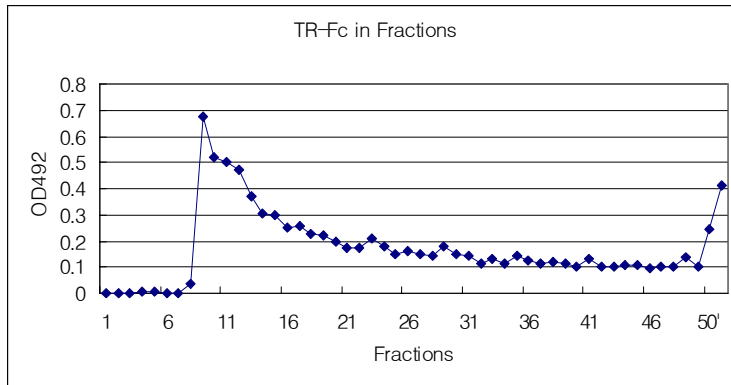


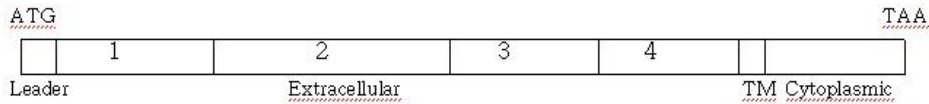
Fig. 8. Chromatography profile of TPO receptor purification

2-3. TPO 수용체의 TPO 결합부위 분석

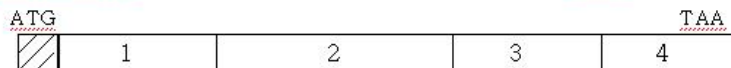
TPO 수용체의 extracellular region 은 4개의 immunoglobulin-like domain 으 로 이루어져 있고 첫 번째와 두 번째 domain, 그리고 세 번째, 네 번째 domain 들 이 두 개의 cytokine receptor module을 만들고 있다. 이들 중 어느 module이 실제 로 TPO에 결합하는지를 밝히는 것이 TPO 와 수용체 complex의 modelling 및 리간드 결합부위 분석에 필요한 전단계가 된다. TPO 와의 결합에 관여하는 module의 규명 을 위해 두가지 방식이 시도되었다. 첫 번째 방식은 각각의 cytokine receptor module이 deletion된 receptor 발현벡터를 제조하고 electroporation 을 이용해 BaF3 세포주에서 안정하게 발현시킨 뒤 TPO 에 의한 세포증식여부를 분석하였다. 각각 20개씩의 세포주를 얻어 분석해본 결과 어떤 세포주도 증식되지 않음을 볼수 있었다. 이는 각각의 module 만으로는 TPO 와 제대로 결합하지 못한다는 것을 의미 한다고 볼 수 있다. 두 번째 방식은 각각의 module이 결합된 soluble receptor (Fc-fused) 를 제조하여 COS7에서 발현시키고 ELISA를 이용해 TPO와의 결합여부를 분석하였다. 앞에서 논의한 바와 같이 두가지 module을 갖는 soluble receptor와 첫 번째 module이 결합된 soluble receptor는 ELISA 로 정량하기 어려울 만큼 발현 양이 적었으며, 두 번째 module 이 결합된 soluble receptor는 다량으로 발현되기

는 하였으나 TPO와의 결합능력을 보이지 못했다. 이러한 결과들은 각각의 module 만으로는 정상적인 receptor 구조를 어렵게 만드는 구조적 요인이 있을 것으로 추정된다.

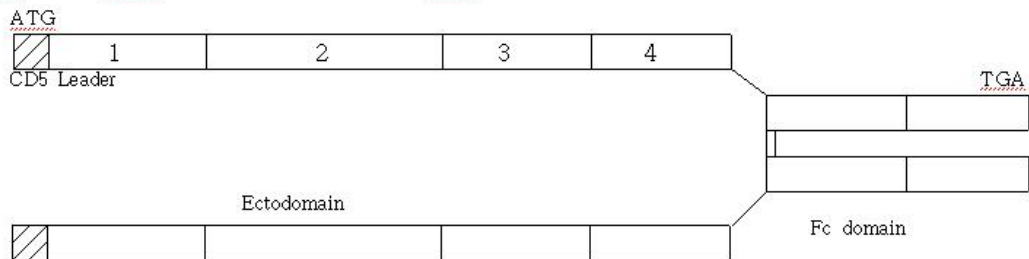
TPO Receptor



a. Extracellular domain of the receptor expressed in HEK293



b. Fc-fused TPO receptor expressed in HEK293



a. Extracellular domain of the receptor expressed in E. coli



2-4. TPO-수용체 complex의 모델링

A. TPO receptor 3,4 domain과 framework receptor (EPO receptor, HGH receptor) 의 sequence alignment

Program SARF2와 TOSS를 사용하여 TPO receptor 3,4 domain과 framework receptor들을 sequence align 한 결과 HGHR-B과 EPOR-B의 161Ca(82%)에 대하여 Sequence identity : 19%로서 align 되었다. HGHR-C와 EPOR-A의 156Ca(80%)에 대하여는 Sequence identity : 21%로서 align 되었다.

B. TPO receptor 3,4 domain과 TPO-N complex의 homology modelling

본 연구의 homology modeling 방법에 의한 TPO receptor는 각 각 7개의 anti-parallel β -Strand 가 3 domain(A: 6Q ~ 8F, B: 16T ~ 22Q, C: 32Y ~ 38C, C': 48E ~ 50C, E: 63P ~ 69H, F: 80I ~ 86T 그리고 G: 91V ~ 97S)과 4 domain(A: 112L ~ 116E, B: 121H ~ 125E, C: 137T ~ 145G, C': 152K ~ 156P, E: 162G ~ 165L, F: 172R ~ 181L 그리고 G: 197T ~ 200E)을 형성한다. Conserved WSXWS motif는 FG loop에 존재하며 binding interface에서는 멀리 떨어져 있다 (그림 9).

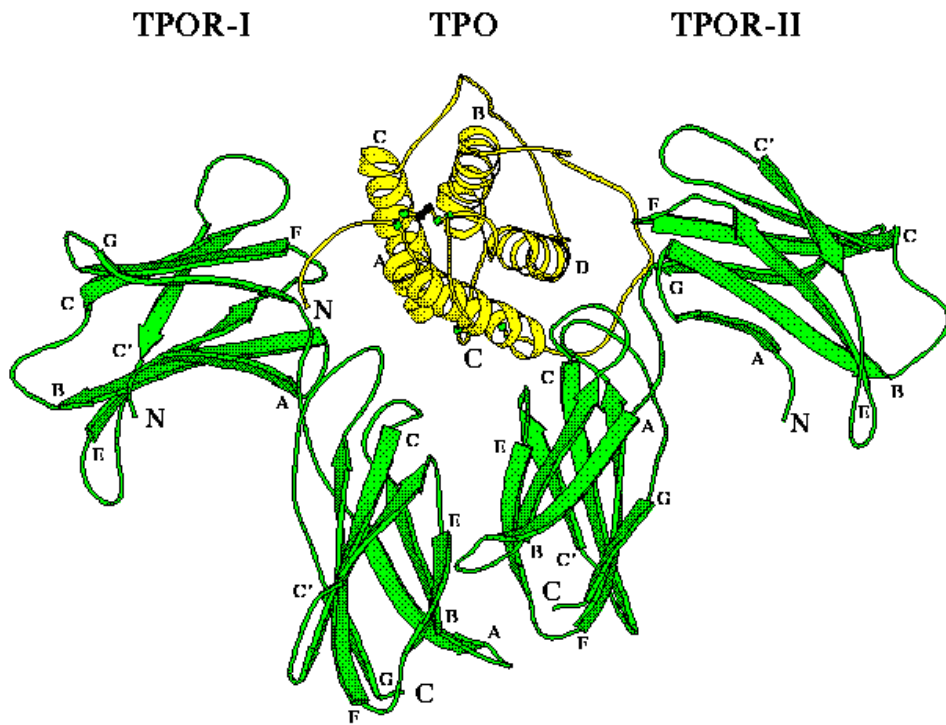


Fig. 9. Ribbon diagram of Thrombopoietin(TPO) : receptor(TPOR-3,4 domain) complex structure

본 TPO receptor modeling을 통하여 직접적인 결합에 관여한 residue들과 TPO ligand 자체의 구조적 안정성에 기여하는 residue들을 구분할 수 있었다. TPO ligand의 Asp-8은 Arg-154와 그리고 Lys-138과 Glu-50은 각 각 서로 salt bridge를 형성할 것이며, Pro-42는 AB loop의 안정한 folding 유지에 관여하고 있다. 이들 residue들 주위에는 ligand와 결합에 관여할 가능한 residue들을 축조된 receptor에서 찾아볼 수 없다. Phe-46, Phe-128 그리고 Phe-131은 TPO ligand 하단 부분에서 상호간에 확장된 aromatic 효과를 이루는 interaction을 이루고 있어 ligand

core 하단 부분의 구조적으로 안정한 상태를 유지시킨다. Table 2 에서 TPO ligand와 TPO receptor I, II 사이의 가능한 상호작용을 나타내었다. 두 지역의 interaction site들 중, 첫 번째 site는 ligand의 helix A와 receptor TPOR-I의 4 domain(FG, BC loop) 그리고 ligand의 helix C와 TPOR-I의 3 domain(AB, CC', EF loop)에서 상호작용이 가능하다. 그리고, 두 번째 site는 ligand의 helix D와 C가 TPOR-II의 4 domain(BC, FG loop) 지역에서 가능하다. 현재 model의 정확성을 높이기 위한 작업이 진행중에 있으며, ligand와 receptor간의 atomic level interaction을 연구 중에 있다.

Table 2. Possible interactions between TPO : Receptor Complex

TPO - TPOR I Interface		TPO - TPOR II Interface		TPOR I - TPOR II Interface	
TPO	TPOR I	TPO	TPOR II	TPOR I	TPOR II
NH1 Arg-10	O Thr-185	NH1 Arg-136	OE1 Gln-187	OE1 Glu-116	NZ Lys-152
NH2 Arg-10	OG1 Thr-185	NH1 Arg-140	OE1 Glu-136	OG1 Thr-164	NE2 His-121
NZ Lys-14	OH Tyr-186	NH2 Arg-140	OE2 Glu-136	NE2 His-121	O Leu-167
NH1 Arg-17	OE1 Glu-136	NE2 His-20	OD1 Asn-182	OG Ser-118	NH1 Arg-168
NH2 Arg-17	OE2 Glu-136	NE2 His-23	OG1 Thr-185		
OE1 Gln-92	NZ Lys-13	NH1 Arg-135	OE1 Gln-187		
OE1 Gln-105	NH1 Arg-41				
NH1 Arg-98	OG Ser-76				

제 3 절 TPO의 개량연구

TPO의 생물활성 역가가 더 높은 차세대 TPO를 개발하기 위하여 2가지 전략을 사용할 수 있다. 첫째, TPO의 *in vivo* half life를 증가시키기 위하여 수용체 결합 부위가 아닌 영역을 N-glycosylation시켜 발현시킨 후 그 *in vitro* 생물활성을 측정한다. *In vitro* 생물활성을 지닌 mutant를 동물세포인 CHO 세포에서 대량생산하여 동물실험을 통하여 그 *in vivo* 활성을 측정한다. 둘째, Affinity가 더 좋은 TPO를 개발하기 위하여 수용체결합부위의 아미노산잔기들을 변이시켜 그 *in vitro* activity가 높은 변이체들을 선별한 후 동물실험을 통하여 그 효능을 확인한다. TPO의 활성이 증진되거나 *in vivo* half life가 증가된 TPO를 개발하기 위하여 TPO의 3차구조 모델에 근거하여 TPO 분자의 N-terminal domain의 네 부위에 N-glycosylation 시킨 후 이 변이체를 M1, M2, M3, M4라 명명하였다. 이 변이체를 COS7 세포에서 발현시킨 후 그 *in vitro* 생물활성을 측정하였다. 그 결과, M1, M2, M3 변이체의 활성은 야생형의 TPO와 유사하였으나, M4 변이체의 활성은 나타나지 않았다 (그림 10)

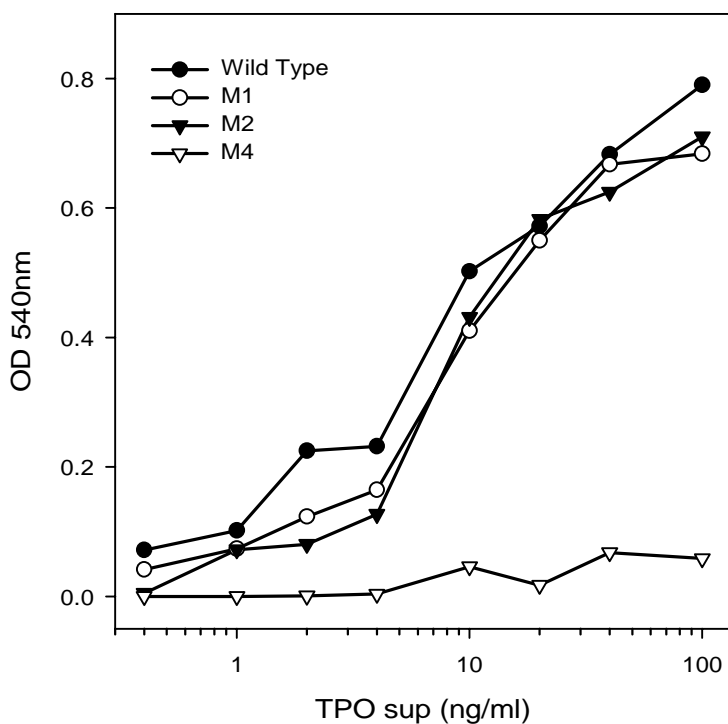


Fig. 10. In vitro proliferation assay of TPO variants

따라서 위 변이를 조합시킨 TPO 변이체 M1+M2와 M1+M2+M3를 제조하여 *in vitro* 활성을 분석한 결과 wild type TPO의 활성과 유사함을 확인하였다 (그림 11).

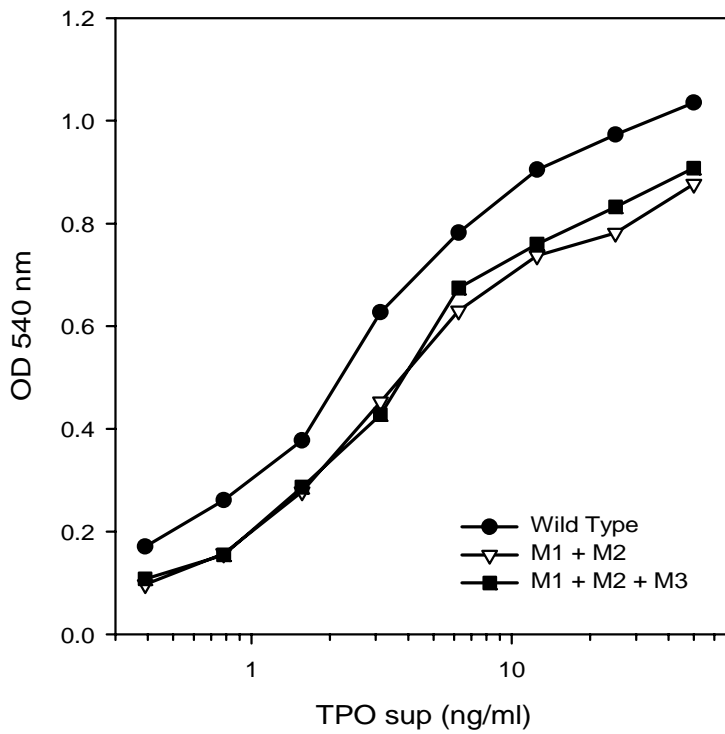


Fig. 11. In vitro proliferation assay of TPO variants

현재 이들의 대량생산 세포주를 제조하고 있다. 앞으로 정제된 후 동물실험 model 을 이용하여 그 *in vivo* activity를 측정할 계획이다. 기대한 바대로 *in vivo* 활성이 높은 mutant가 개발되면 특허를 출원할 계획이다.

제 4 장 연구목표 달성도 및 대외기여도

번호	세부연구개발목표	달성내용
1	TPO의 활성부위 특성 및 구조 연구	TPO의 3차구조를 설계하고, 이 분자모델을 바탕으로, TPO를 alanine scanning mutagenesis 및 N-glycosylation 시킨 후, 변이된 TPO의 활성을 측정하고, TPO의 수용체결합에 중요한 아미노산들을 밝혔다. Arg10, Lys14, Pro42, Glu50, Lys138이 중요한 결합부위를 형성함을 알았으며, helix D와 loop AB가 하나의 결합부위를 이루고, helix A가 또 하나의 결합부위를 형성한다는 것을 밝혔다. 그러나 helix C 부위는 수용체결합에 관여하지 않음을 확인하였다. 이 결과는 TPO가 사람 성장호르몬이나 erythropoietin과는 다른 수용체 인식기작을 갖는다는 것을 증명하는 것으로서 TPO-수용체 상호작용의 분자적 인식기작의 이해에 대한 기초를 제공하였다고 생각된다
2	TPO-수용체 상호작용의 생물리화학적 특성연구	TPO와 soluble TPO수용체를 발현하는 세포주를 제조하여 대량생산하고 정제한 후, 이들사이의 binding kinetics를 연구하고자 하였다. 이 data는 기능이 개량된 TPO의 생물리화학적 특성을 비교하기 위하여 필요하다. 또한 TPO 수용체를 이용한 분석연구를 수행하기 위하여 soluble 수용체를 생산하고 그 항체를 생산하였다. 현재 TPO-수용체 interaction을 분석 중에 있다.
3	TPO의 기능 개량 연구	TPOdml 활성이 증진되거나 in vivo half life가 증가된 TPO를 개발하기 위하여 TPO의 3차구조 모델에 근거하여 TPO 분자를 변이시킨 후 그 in vitro 생물활성을 측정하였다. 지금까지 활성이 있는 mutants들을 몇 개 선발하였고, 현재 이들의 대량생산 세포주를 제조하고 있다. 앞으로 정제한 후 동물실험 model을 이용하여 그 in vivo activity를 측정할 계획이다. 기대한 바대로 in vivo 활성이 높은 mutant가 개발되면 특허를 출원할 계획이다.

논문게재

1. H. Park, M.-H. Yu and H. J. Hong (1997) Development of an in vitro bioassay system for human thrombopoietin by constructing a recombinant cell line expressing human thrombopoietin receptor. *Mol. Cells* 7, 699-704.
2. H. Park, S. S. Park, E. H. Jin, J.-S. Song, S.-E. Ryu, M.-H. Yu and H. J. Hong (1998) Identification of functionally important residues of human thrombopoietin. *J. Biol. Chem.* 273: 256-261.
3. Song, J.-S., Park, H., Hong, H. J., Yu, M.-H. and Ryu S.-E.. (1998) Homology modeling of the receptor binding domain of human thrompoietin. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 12: 419-424
4. B. W. Sohn, S. J. Kim, H. Park, S. K. Park, S. C. Lee, H. J. Hong, Y. S. Park, and K. K. Lee (1999) Expression and characterization of bioactive human thrombopoietin in the milk of transgenic mice. *DNA Cell Biol.* 18: 845-852.
5. H. Park, H. Im, Y. J. Kang, M.-H. Yu and H. J. Hong (2000) Expression, purification and characterization of soluble human TPO receptor in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* in press.

학술회의 발표

구분	학술발표제목	발표자	발표장소	일시	주요내용
국외	Identification of functionally important residues of human thrombopoietin	H.Park S.S.Park E.H.Jin J.-S.Song S.-E.Ryu M.-H.Yu H.J.Hong	Keystone Symposia	January 10-15, 1998.	TPO의 3차구조를 설계하고, 이 분자모델을 바탕으로, TPO를 alanine scanning mutagenesis 및 N-glycosylation 시킨 후, 변이된 TPO의 활성을 측정 한 결과, TPO의 수용체결합에 중요한 아미노산들을 밝힘

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구결과는 TPO 단백질의 기능 조절요인을 보다 더 정확히 규명하는데 활용될 것이다. 본 연구에서는 TPO의 기능적 분석을 위해 TPO의 활성을 측정할 수 있는 *in vitro* assay system을 확립하였고 이를 이용한 여러 변이 TPO들의 분석을 통하여 활성에 영향을 미치는 부위에 대한 정보를 얻을 수 있었다. 이는 TPO의 활성에는 영향을 주지 않으면서 안정성을 증진시키는데 기여하는 변이를 유도하거나 TPO의 활성 자체를 높일 수 있는 변이를 유도하고 분석하는데 이용될 수 있을 것이다.

본 연구에서 얻어진 TPO-N의 삼차원 구조 model을 통해 TPO의 수용체인 c-mpl과 상호작용을 할 가능성이 있는 residue들을 예측할 수 있었고 이는 TPO-N의 alanine scanning mutagenesis에 의해 얻어진 결과와 일치하였다. 따라서 TPO-N의 삼차구조 model은 비교적 높은 정확도를 갖고 있음을 알 수 있으며 이 model을 사용하여 결정된 receptor binding region 및 structure의 유지에 중요한 부분들을 target으로 하여 TPO의 receptor binding affinity 및 stability를 높이는 디자인을 할 수 있을 것이다. 본 연구를 통하여 얻어진 TPO-N의 삼차구조 model은 TPO의 receptor activation mechanism에 관한 정보 뿐만 아니라 TPO의 stability 및 구조적 특성에 관한 정보도 제공하며 추후의 계속연구를 통한 TPO의 결정학적 삼차구조규명에 있어서 chain tracing 및 model building에 중요한 guidance로 역할을 할 것이다.

한편 본 연구에서는 TPO의 수용체를 대장균에서 inclusion body 형태로 대량생산하고 redox buffer system을 사용한 refolding을 시도하여 folding된 단백질을 얻어서 TPO와 결합함을 확인하였고 이어서 이에 대한 항체를 제조하여 native TPO 수용체에 결합함을 확인하였다. 또한 본 연구에서는 TPO와 TPO 수용체의 dimer를 동물세포에서 발현 및 대량생산하였다. 이들과 TPO 수용체에 대한 항체는 TPO-수용체의 상호작용의 생화학적 연구와 유도체들의 activity screening등의 여러 가지 목적으로 사용될 수 있을 것이다.

본 연구에서 TPO의 *in vivo* half life를 증가시키기 위하여 수용체 결합부위가 아닌 영역을 N-glycosylation시켜 TPO의 기능을 개량하기 위한 연구는 차세대 TPO의 개발을 위한 중요한 전략을 제시한다. 앞으로 이 연구를 계속 수행하여 기능이 개선된 TPO를 개발할 계획이다.

제 6 장 참고문헌

1. Gordon, M. S. & Hoffman, R. (1992) Growth factors affecting human thrombopoiesis: potential agents for the treatment of thrombocytopenia. *Blood* **80**, 302–307.
2. Shreiner, D. P., Weinberg, J. & Enoch, D. (1980) Plasma thrombopoietic activity in humans with normal and abnormal platelet counts. *Blood* **56**, 183–188.
3. Tsukada, J. *et al.* (1993) Synergism between serum factor(s) and erythropoietin in inducing murine megakaryocyte colony formation: the synergistic factor in serum is distinct from interleukin-11 and stem cell factor (c-kit ligand) *Blood* **81**, 866–867.
4. de Sauvage, F. J. *et al.* (1994) Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* **369**, 533–538.
5. Kaushansky, K. *et al.* (1994) Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* **369**, 568–571.
6. Wendling, F. *et al.* (1994) c-MPL ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* **369**, 571–574.
7. Vigon, I. *et al.* (1992) Molecular cloning and characterization of *MPL*, the human homolog of the *v-mpl* oncogene: Identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5640–5644.
8. Rozwarski, D. A. *et al.* (1994) Structural comparisons among the short-chain helical cytokines. *Structure* **2**, 159–173.
9. Sprang, S. R. and Bazan, J. F. (1993) Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 815–827.
10. Wada, T. *et al.* (1995) Characterization of the truncated thrombopoietin variants *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **213**, 1091–1098.
11. Komatsu, N. *et al.* (1996) Establishment and characterization of the thrombopoietin dependent megakaryocytic cell line, UT-7/TPO *Blood* **87**, 4552–4560.

12. Page, L. A. *et al.* (1996) A sensitive human cell line based bioassay for megakaryocyte growth and development factor or thrombopoietin *Cytokine* **8**, 66–69.
13. Vadhan–Raj, S. *et al.* (1997) Stimulation of megakaryocyte and platelet production by a single dose of recombinant human thrombopoietin in patients with cancer *Ann. Intern. Med.* **126**, 673–681.
14. Cwirla, S. E. *et al.* (1997) Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine *Science* **276**, 1696–1699.
15. Mignotte, V. *et al.* (1994) Structure and transcription of the human c-mpl gene (MPL) *Genomics* **20**, 5–12.
16. Mosmann, T. J. *et al.* (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63.
17. Sali, A. and Blundell, T. L. (1993) Comparative protein modeling by satisfaction of special restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815.
18. Brunger, A. T., Kuriyan, J. and Karplus, M. (1987) Crystallographic R-factor refinement by molecular dynamics. *Science* **235**, 458–460.
19. Morris, A. L., MacArther, M. W. and Thornton, J. M. (1992) Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* **12**, 345–364.
20. Nicholls, A., Sharp, K. and Honig, B. (1991) Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **11**, 281–296.
21. de Vos, A. M., Ultsch, M. and Kossiakof, A. A. (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* **255**, 306–312.
22. Elberg, G., Kelly, P. A., Djiane, J., Binder, L., Gertler, A. (1990) Mitogenic and binding properties of monoclonal antibodies to the prolactin receptor in Nb2 rat lymphoma cells. Selective enhancement by anti–mouse IgG. *J. Biol. Chem.* **265**, 14770–14776.
23. Fukunaga, R., Ishizaka–Ikeda, E., Nagata, S. (1990) Purification and characterization of the receptor for murine granulocyte colony–stimulating factor. *J. Biol. Chem.* **265**, 14008–14015.

24. Hibi, M. *et al.* (1990) Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* **63**, 1149–1157.
25. Robinson, R. C. *et al.* (1994) The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor: implications for receptor binding. *Cell* **77**, 1101–1116.
26. Watowich, S. S., Hilton, D. J., Lodish, H. F. (1994) Activation and inhibition of erythropoietin receptor function: role of receptor dimerization. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3535–3549.
27. Caravella, J. A., Lyne, P. D. and Richards, W. G. (1996) A partial model of the erythropoietin receptor complex. *Proteins* **24**, 394–401.
28. Kraulis, P. J. (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **24**, 946–950.