

HL-60 세포주에서 myeloblastin mRNA 발현의 하향조절

이대희

고신대학교 의과대학 약리학교실

Down-regulation of a Serine Proteinase Myeloblastin mRNA in HL-60 cells

Dae-Heui Lee

Department of Pharmacology, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background : Recent clinical studies have shown that a high proportion of patients with acute promyelocytic leukemia (APL) achieves complete remission after treatment with all-trans retinoic acid (ATRA). However, most patients who receive continuous treatment with ATRA relapse and develop ATRA-resistant leukemia. In this study, the author investigated the strategies to overcome ATRA resistance of acute promyelocytic leukemia (APL) cells by inducing the differentiation of dendritic cells (DCs) from human leukemic cell lines for the development of adoptive immunotherapy. Myeloblastin (mbn) was used as one of the indicators of differentiation in this study.

Methods : To study the biochemical and enzymatic characteristics of the human myeloblastin the enzyme was extracted from human leukocytes and purified by a combination of Ultrogel AcA 54 and Bio-Rex 70 chromatographies. To evaluate the mbn protein expression in cells, anti-mbn antibody was prepared by two-step procedure including ammonium sulfate precipitation and DEAE-cellulose ion exchange chromatography. HL-60 cell differentiation was induced by the addition of all-trans retinoic acid (ATRA), dimethyl sulfoxide (DMSO), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), cholecalcitriol (VD) to the media for 6 days and the expression of mbn mRNA and mbn protein were determined by RT-PCR method and ELISA, respectively.

HL-60 cells, K-562 cells, NC-37 and RPMI 7666 cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum for 7 days, with various agents or ligands such as calcium ionophore (CI), Flt3-ligand (FL) and PMA to generate dendritic cells from the cell lines. A portion of each cell lines was harvested and the rest of them was cultured in the new RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, with Flt3-ligand for 7 days more. RNA was extracted and gene expression from each cell lines was determined by RT-PCR method. The morphology of the cells was evaluated from cytospin slide preparations with Wright's stain.

Results : 3.8 mg of proteinase-3 was isolated from 67 mg of leukocyte extract. 6 g of anti-mbn polyclonal antibody was raised. PMA induced a significant inhibition of mbn mRNA expression in HL-60 cells. The cells exposed to ATRA or DMSO or VD show a little change in the mbn mRNA expression. Thus the terminal differentiation of HL-60 cells and K-562 cells by ATRA, DMSO, VD, and hemin was incomplete and a large fraction of the cells was in undifferentiated or premature states. The promyelocytic leukemic cell line HL-60, B lymphoblast cell lines RPMI 7666 and NC-37 could be induced to dendritic cells in vitro. Treatment of HL-60 with PMA resulted in the expression of myeloid-related DC phenotypes, while treatment of RPMI 7666 with FL and treatment of NC-37 with PMA and FL lead to the expression of lymphoid-related DC phenotypes.

Conclusion : In conclusion, myeloid-related DC phenotypes and lymphoid-related DC phenotypes can be generated from HL-60, NC-37 and RPMI 7666 cell lines, respectively. These DC phenotypes can potentially be used as a cellular leukemia vaccine in vivo or to generate antileukemic T cells in vitro for adoptive immunotherapy.

Key words : ATRA-resistant leukemia, Adoptive immunotherapy, Dendritic cells(DCs), HL-60 cells, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)

교신저자 : 이 대 희

주소 : 606-702, 부산광역시 서구 암남동 34번지
고신대학교 의과대학 약리학교실
Tel : (051)990-6493 Fax : (051)990-3081
E-mail : dhlee@ns.kosinmed.or.kr

이 연구를 위하여 고신대학교 의과대학으로부터 연구비의 일부를 지원 받았습니다.

서 론

사람의 백혈병 치료에 있어서 전통적인 항암제 사용에 따른 부작용을 감소시키고 보다 효율적인 치료법을 개발하기 위한 연구의 일환으로 1988년에서 1990년에 걸쳐 Huang¹⁾ 등과 Castaigne²⁾ 등은 중국과 프랑스에서 각각 행한 임상 시험에서 all-trans retinoic acid (ATRA)가 acute promyelocytic leukemia의 완해를 유도하는 효과가 있다는 결과를 보고했다. 그러나 1993년 Warrell³⁾ 등은 ATRA로 지속적인 치료를 받던 대부분의 환자들에게서 acute promyelocytic leukemia가 재발되었으며 ATRA에 저항성인 백혈병으로 발전했다고 보고했다.

Myeloblastin (mbn)은 1989년 Bories⁴⁾ 등이 명명한 새로운 serine protease로서 이 유전자에 대한 antisense oligodeoxynucleotide를 사용해서 myeloblastin의 발현을 억제한 결과 사람의 acute promyelocytic leukemia 세포에서 기원한 HL-60 세포의 증식이 억제되면서 이들 세포의 분화가 유도되었다고 보고했다. Borrow⁵⁾ 등과 de The⁶⁾ 등은 acute promyelocytic leukemia 세포의 retinoic acid receptor- α (RAR- α) 유전자의 첫번째 intron부분에서 DNA의 재배열이 일어나고, 이러한 DNA의 재배열에 의해서 RAR- α 에 대한 비정상적인 mRNA가 발현되게 된다고 Miller⁷⁾ 등, Chomienne⁸⁾ 등과 Longo⁹⁾ 등은 보고했다.

Labhaye¹⁰⁾ 등은 HL-60 세포에서 retinoic acid가 myeloblastin의 발현을 억제하며, Spector¹¹⁾ 등은 HL-60 세포에서 retinoic acid가 myeloblastin의 발현을 억제하고 그에 따라 myeloblastin의 기질인 28-kDa heat shock protein(hsp28)의 양이 증가해서 HL-60 세포의 granulocyte로의 분화가 유도된다고 보고했다.

인체내에서 다양한 생리학적 또는 병리학적인 과정에 관여하는 proteinase-3 (PR-3, EC 3.4.21.76)는 사람 중성구의 azurophil granule에 있는 elastase (HLE, EC 3.4.21.37)와 cathepsin G (Cat G, EC 3.4.21.20)와는 다른 제 3의 중성 serine proteinase이다. 이 효소는 Baggiolini¹²⁾ 등에 의해 처음으로 보고되었고 Kao¹³⁾ 등에 의해 사람 중성구로부터 분리된 후 proteinase-3로 명명되었으며 Bories⁴⁾ 등은 이 효소의 mRNA를 HL-60 세포에서 분리한 후 이 염기 서열에서 유추한 아미노산 서열을 가진 단

백질을 myeloblastin이라고 명명해서 결국 proteinase-3와 myeloblastin이 동일한 단백질임이 밝혀졌다.

본연구는 크게 두 단계로 나누어서 순차적으로 진행하였다. 먼저 백혈병성 세포의 분화 정도를 측정하기 위한 척도로서 분화 유도된 백혈병성 세포 내 myeloblastin 단백질의 표현을 보기 위하여 사람의 전혈에서 myeloblastin과 동일한 단백질로 밝혀진 PR-3를 분리해서 가토에 접중하여 항 PR-3 항체를 분리하고 두 번째 단계로서 HL-60 세포에 대해서 all-trans-retinoic acid (ATRA), dimethylsulfoxide (DMSO), phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA)로 완해(comptet remission)를 유도하고 이때 관해(remission) 정도를 측정하기 위하여 myeloblastin mRNA와 myeloblastin의 발현을 검사 하였다.

II. 재 료 및 방 법

1. 재 료

1) 시약 및 기기

Ultrogel AcA 54는 LKB사(Uppsala, Sweden), Bio-Rex 70, mercaptoethanol, acrylamide, Bis-acrylamide, ammonium persulfate는 BioRad사(Hercules, Calif. USA), Tris base, sodium acetate, aminophenylmercuric acetate (APMA), bovine serum albumine (BSA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ethylene glycol-bis (β -amino ethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), Brij 35, n-succinyl-ala-ala-ala-p-nitroanilide (SANA), n-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide (SAPNA), sodium dodecyl sulfate (SDS), phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA), Hemin, all-trans-retinoic acid (ATRA), dimethylsulfoxide (DMSO), cholecalciferol, N-acetyl-L-cysteine (NAC), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), di-isopropyl fluorophosphate (DFP) E-64 (trans-epoxysuccinyl-L-leucylamino(4-guanidino)-butane), ammonium sulfate, leupeptin (acetyl-leu-leu-arg-al), pepstatin A (isovaleryl-val-val-sta-la-sta), 1,10-phenanthroline, soybean trypsin inhibitor, Elastin-congo

red, Ficoll, Hypaque, Biotinylated Goat Anti-Rabbit Ig G 그리고 ExtrAvidin-Peroxidase는 Sigma사(St. Louis, Mo. USA), complete Freund's adjuvant과 incomplete Freund's adjuvant는 DIFCO Lab사(Detroit MI. USA), RPMI 1640 media는 Gibco BRL사(Grand Island, NY, USA), fetal bovine serum(FBS)은 Trace사(Australia), Trireagent는 Molecular Research Center사(Cincinnati, OH. USA), RNAzol B는 Tel-test사(Friendswood, Tx. USA), reverse transcription kit, agarose는 Promega사(Madison WI. USA), Accupower PCR premix, RT/PCR premix, RT premix, 100 bp ladder DNA size marker는 Bioneer (Korea)사 제품을 사용하였고 그외 모든 시약은 특급을 사용하였다. oligodT, PCR primer는 Bioneer (Korea)사에 합성을 의뢰하였다. PCR thermocycler는 Perkin-Elmer사(Norwalk CT. USA)의 GeneAmp PCR System 2400과 9600을 polyacrylamide gel용 전기영동 장치, Polaroid 사진기는 Hoefer사(Germany) 제품을 agarose gel용 전기영동 장치는 Owl사(USA) 제품과 Embi Tec사(USA) Run-One-System제품을 UV transilluminator는 UVP사(USA) 제품을 사용하였다. ELISA용 multiscaner (Multiskan MCC/340)는 Flow Lab사(Switzerland) 제품을 사용하였고 화상분석 software 및 관련 장비인 Bio-1D와 Bio-Print는 Vilber Loumat사(Marne la Vallee Cedex 1 France) 제품을 사용하였으며 투석용 막(Spectrapor dialysis membrane)은 Spectramedical사(Houston, Tx. USA) 제품을 초 여과막(PM 10 concentration membrane)은 Amicon사(Beverly, MA. USA) 제품을 사용하였다. 그 외 tube, pipette, tips, petridish 등과 같은 Plastic 제품들은 멸균된 일회용품을 사용하였고, 증류수와 재사용 초자기구들은 121℃에서 20분 동안 고압증기 멸균하여 사용하였다.

Table 1. A list of differentiation inducers

Inducer	Brief description
Tretinoin(ATRA)	Drug for differentiation therapy
DMSO	Polar-planar compound
PMA	Analog of DAG

2) 세포주

HL-60 세포주는 한국세포주은행(Korea)으로부터 분양받았다. 사람의 전혈은 고신의료원 혈액은행에서 공급받았으며 백혈병환자의 말초혈은 환자의 동의하에서 고신대학교 부속 복음병원(Korea) 내과 및 소아과에 입원한 환자에서 채혈하였다.

3) Oligonucleotides

oligonucleotides는 사람에서 발현되는 proteinase-3 myeloblastin의 mRNA 서열에서 278 bp의 PCR product에 해당하는 primer(AGATCGTGGGCGGCACGAG/ATGTCGTTTCAGTTTGTCT)를 설계하였다.

oligonucleotide는 TE buffer를 사용하여 100 pmole/ μ L 되게 녹인 다음 -20℃에 보관해 두었고 필요할 때마다 적당량을 12.5 pmole/ μ L 되게 희석하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) Proteinase-3의 분리 및 정제

(1) Leukocyte extract

전혈을 22℃에서 200g 속도로 30 분간 원심 분리하여 백혈구 층을 얻는다. 여기서 분리된 백혈구 층을 1.5 M NaCl과 50 mM CaCl₂를 포함하고 pH 7.3으로 조절된 50 mM Tris-HCl 용액 내에서 세포 분쇄기(polytron ; Kinematica CH-6010, Kriens-Luzern, Brikmann사)를 이용하여 최대속도에서 15 초 동안 3 회 분쇄한 후, 30,000g 속도로 60 분간 원심 침전시켜서 상층액을 백혈구 추출물(leukocyte extract)로 사용하였다.

(2) Ultrogel AcA-54 gel filtration column chromatography

crude extract를 Tris-HCl 용액(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.1% Brij 35, pH 7.3)하에서 2.5 x 100 cm 길이의 Ultrogel AcA-54 column chromatography를 시행하였다. 이때 실험온도는 4℃를 유지하였다. 8 mL을 1분획으로 하며 각 분획을 Elastin-congo red,

n-succinyl-ala-ala-ala-p-nitroanilide (SANA), n-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide (SAPNA), denatured type I collagen (gelatin)과 incubation 시켜서 그 결과 degradation된 product에 대한 흡광도를 측정해서 proteinase-3 activity가 있는 분획만 모아서 같은 부피의 50 mM sodium acetate 용액(50 mM sodium acetate, 2 mM CaCl_2 , 0.1% Brij 35)에 1:1로 희석시킨 후 다음 정제과정에 사용하였다.

(3) Bio-Rex 70 Ion exchange chromatography

Column의 matrix를 상기의 50 mM sodium acetate 용액으로 평형시킨 다음 상기의 시료를 column에 통과시킨 후 sodium acetate 농도를 0.05 M에서 0.7 M까지 linear gradient로 chromatography를 시행해서 1 tube당 7 mL씩 모은 각각의 분획에 대한 proteinase-3 activity를 확인해서 분획 별로 모아서 PM 10 membrane으로 농축시킨 후 실험에 사용하였다.

(4) SDS-PAGE를 이용한 분자량 결정

시료 내에 있는 단백질을 침전시켜서 침전물을 SDS-PAGE용 sample buffer에 녹여서 전기영동한 후 분자량을 결정하였다.

(5) 기질 특이성 검사

Elastin-congo red, n-succinyl-ala-ala-ala-p-nitroanilide (SANA), n-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide (SAPNA), denatured type I collagen(gelatin)을 사용해서 시료와 incubation시킨 후 그 결과 분해산물에 대한 흡광도를 측정해서 기질 특이성을 검사하였다.

(6) 효소 활성도 억제 시험

정제된 효소 10 μg 에 최종 농도가 22 μM 이 되도록 di-isopropyl fluorophosphate (DFP)를, 최종 농도가 10 mg/mL이 되도록 soybean trypsin inhibitor를, 그리고 최종 농도가 10 mM이 되도록 phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), leupeptin (acetyl-leu-leu-arg-al), N-acetyl-L-cysteine (NAC), 1,10-phenanthroline, pepstatin A (isovaleryl-val-val-sta-ala-sta), E-64 (trans-epoxysuccinyl-L-leucylamino(4-guanidino)-butane)를 각각 넣고 37°C에

서 1 시간 반응시킨 다음 gelatin과 21 시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 SDS-PAGE로 기질의 분해 정도를 측정하는데 있어서 반응 산물을 control과 비교해서 효소 활성도 억제를 측정하였다.

2) Proteinase-3에 대한 polyclonal antibody 생산

(1) Immunization of rabbits

상기의 정제된 proteinase-3 10 μg 을 같은 부피의 complete Freund's adjuvant에 유화(emulsification)시켜서 가토의 복부에 2 주 간격으로 4 회 피내 주사하였다. 4 회 접종 후 1 개월 후에 proteinase-3 10 μg 을 같은 부피의 incomplete Freund's adjuvant에 유화(emulsification)시켜서 가토의 복부에 추가접종(booster injection)을 하고 추가접종(booster injection) 후 10 일 후에 이들 가토를 ether로 전신 마취시킨 다음 경부 절개 후 경동맥을 통해서 각각의 가토에서 20~30 mL의 혈액을 채취하여 실온에서 1 시간, 4°C에서 하룻밤을 방치한 뒤 4°C에서 원심 분리해서 그 상층액을 취하여 33% ammonium sulfate로 침전시켰다. 이 침전물을 면역 글로불린으로 간주하여 소량의 BBS(Borate buffered saline, pH8.2)로 녹인 다음 4°C에서 BBS에 투석하여 평형에 도달시킨 후 다음 실험에 사용될 때까지 -20°C에 보관하였다.

(2) DEAE - cellulose ion exchange column을 통한 항 PR-3 다가 항체의 분리

상기에서 얻어진 면역 글로불린을 10 mM phosphate buffer (pH 8.0)에 투석한 후 5 mL 을 취하여 DEAE-cellulose ion exchange column에 주입하여 10 mM phosphate buffer (pH 8.0)로부터 300 mM phosphate buffer (pH 5.4)까지의 선형 농도 구배를 시행하였다. 이들 분획은 280 nm에서 흡광도를 읽었고 특이성있게 분리된 항 PR-3 다가 항체를 함유한 분획만을 모아서 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 방법에 의해 확인한 다음 100 mM borate buffer (0.5 M NaCl 함유)에 투석하여 냉동 보관하였다.

3) ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

정제된 proteinase-3를 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.4)으로 0.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 의 농도로 희석시킨 후 96-well microtiter plate에 100 μL 씩 넣고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 방치해서 각 well에 proteinase-3를 coating시킨 후 여분의 proteinase-3를 충분히 씻어 낸 다음 proteinase-3의 nonspecific binding site를 5% skim milk로 blocking하였다. 여분의 skim milk를 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.4)으로 충분히 씻은 후 DEAE-cellulose ion exchange chromatography에서 얻은 Ig G 분획을 각 peak를 선정하여 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.4)으로 0.87 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 의 농도로 희석시킨 것을 각 well에 100 μL 씩 넣고 실온에서 1 시간 동안 반응시킨 다음 proteinase-3와 결합하지 않은 Ig G를 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.4)으로 충분히 씻은 후 biotinylated goat anti-rabbit Ig G와 실온에서 1 시간 동안 반응시킨 다음 Ig G와 결합하지 않은 biotinylated goat anti-rabbit Ig G를 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.4)으로 충분히 씻은 후 ExtrAvidin-Peroxidase를 각 well에 100 μL 씩 넣고 실온에서 1 시간 동안 반응시킨 다음 Biotinylated Goat Anti-Rabbit Ig G와 결합하지 않은 ExtrAvidin-Peroxidase를 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.4)으로 충분히 씻은 후 peroxidase substrate solution을 넣고 실온에서 30 분 간 발색시킨 후 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

4) 혈구세포의 total RNA 분리 및 분석

(1) Trireagent BD 용액을 사용한 혈구세포의 total RNA 분리

정상인과 백혈병 환자의 전혈에서 Ficoll-Hypaque density gradient 방법으로 백혈구 층만 분리한 후 total RNA와 단백질을 분리하기 위하여 Trireagent BD 용액을 사용하였다. microcentrifuge tube에 세포 5×10^5 당 1 mL의 Trireagent BD 용액을 첨가한 다음 pipeting해서 충분히 균질화시켰다. 여기에 균질액의 0.2 배량의 chloroform을 첨가한 다음 vortex mixer로 15초간 격렬하게 혼합하였다. microcentrifuge tube에 담긴 혼합액을 얼음위에 5분간 방치하였다. 이것을 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 다음 상층액을 새로운 microcentrifuge

tube에 옮기고 여기에 0.5 mL의 isopropanol을 첨가한 다음 얼음에 15분간 방치하였다(아래의 interphase와 organic phase는 단백질을 분리하기 위하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관한다). 이를 4 $^{\circ}\text{C}$ 15,000 rpm에서 8분간 원심분리하여 RNA 침전물을 회수하였다. RNA 침전물은 75% ethanol 1 mL로서 한번 씻어준 다음 DEPC로 처리한 증류수를 넣고 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 열처리하여 완전히 녹였다. 분리된 total RNA는 spectrophotometer로 농도를 측정한 다음 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

(2) Trireagent BD 용액을 사용한 혈구세포의 단백질 분리

Trireagent BD 용액을 사용한 혈구세포의 total RNA 분리과정에서 수용액 층을 분리하고 남은 interphase와 organic phase 0.75 mL당 1.5 mL의 isopropanol을 넣고 상온에 10분간 방치한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 단백질 침전물을 회수하였다. 이 침전물에 95% ethanol에 녹인 0.3 M guanidine hydrochloride 용액 2 mL을 넣고 상온에 20분간 방치한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 3 회 씻어낸 후 100% ethanol 2 mL을 넣고 상온에 20분간 방치한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전물을 10분간 공기 주에 말리고 1% SDS 용액을 넣고 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 열처리하여 완전히 녹인 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 새로운 microcentrifuge tube에 옮겨서 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

(3) RNAzol B 용액을 사용한 혈구세포의 total RNA 분리

배양한 혈구세포주에서 total RNA를 분리하기 위하여 RNAzol B 용액을 사용하였다. microcentrifuge tube에 세포 5×10^5 당 1 mL의 RNAzol B 용액을 첨가한 다음 pipeting해서 충분히 균질화시켰다. 여기에 균질액의 0.1 배량의 chloroform을 첨가한 다음 vortex mixer로 15초간 격렬하게 혼합하였다. microcentrifuge tube에 담긴 혼합액을 얼음위에 5분간 방치하였다. 이것을 13,000 rpm에서 15분간 원심분리한 다음 상층액을 새로운 microcentrifuge tube에 옮겼다. 여기에 동량의 Isopropanol을 첨가한 다음 얼음에 15분간 방치하였다. 이를 4 $^{\circ}\text{C}$ 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 RNA 침전물을 회수하였다. RNA 침전물은 75% ethanol 1 mL로서 한번 씻

어준 다음 DEPC로 처리한 증류수를 넣고 60°C에서 5분 간 열처리하여 완전히 녹였다. 분리된 total RNA는 spectrophotometer로 농도를 측정한 다음 -70°C에 보관하였다.

(4) 역전사(Reverse transcription)

Total RNA 4 µg에 대하여 4 µL의 5X RT buffer, 1 µL의 oligo(dT) (100 pmol/µL), 4 µL의 10mM dNTP, 0.1 µL의 RNase inhibitor (40 units/µL), 1 µL의 MmLV reverse transcriptase(200 units/µL)를 혼합하고 전체부피 20 µL 되게 DEPC-DW를 첨가하였다. 이를 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성하였고, 계속해서 94°C에서 3분간 처리하여 MmLV reverse transcriptase를 불활성화시켰다.

(5) Polymerase chain reaction

Polymerase chain reaction (PCR)용 tube에 template를 0.1 ~ 1 µg (또는 RT 결과물 1 µL), sense 및 antisense primer를 각각 12.5 pmol씩, 10mM dNTPs를 1 µL, Taq polymerase 10X buffer를 2 µL, Taq DNA polymerase를 1 unit 분주하여 반응액의 전체 부피가 20 µL 되도록 멸균수를 첨가하였다. Accupower PCR premix를 사용할 때는 tube에 template를 0.1 ~ 1 µg (또는 RT 결과물 1 µL), sense 및 antisense primer를 각각 12.5 pmol씩, 그리고 premix의 반응 부피에 따라 전체 부피가 20 µL 또는 50 µL 되도록 멸균수를 첨가하였다. 반응은 94°C에서 30초간, 60°C에서 1분간, 72°C에서 1분간 35회 반복 수행하였고, 반응전후로 각각 94°C에서 5분간 pre-denaturation과 72°C에서 2분간 post-extension을 실시하였다. 반응이 끝난 PCR 결과물 20 µL에 6X loading buffer 4 µL를 첨가한 다음 7 µL을 취하여 1% 또는 2.5% agarose gel에 전기영동 시켰다. 전기영동이 끝난 gel은 0.5 µg/mL의 EtBr 용액에 20분간 침지시켜 염색한 다음 UV transilluminator 위에서 DNA band를 확인하고, 필요에 따라 Polaroid 사진촬영을 하거나 Bio-ID와 Bio-Print를 사용하여 결과를 보존하였다.

5) 세포주 배양

(1) 세포주 1차 배양

한국세포주은행으로부터 분양받은 HL-60, NC-37, RPMI 7666 동결세포주 앰플에서 DMSO (dimethylsulfoxide)를 제거하기 위하여 15 mL 튜브에 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640을 10mL 정도 넣은 다음 앰플 속의 세포부유액(1-1.5 mL)을 옮겼다. 1,000 rpm (200-400g)에서 3분간 원심분리해서 상층액을 제거한 후, 약 5 mL의 배지에 cell pellet을 부유시켰다. 배양용 플라스크(T-25cm²)에 세포부유액(cell suspension)을 옮겼다. 5%의 CO₂와 95%의 공기가 공급되는 37°C의 배양기에서 2주 동안 1차 배양을 했다. 세포가 충분히 자랐을 때에 T-75cm²플라스크에 옮겼다. 배지는 3-4 일에 한번씩 80%를 교체했다.

(2) ATRA, DMSO, PMA에 의한 Proteinase-3 (Myeloblastin)의 표현 억제를 관찰하기 위한 HL-60 세포주의 배양

1차 배양된 HL-60 세포의 생육성을 0.2% Trypan Blue 염색으로 검사한 후 10% FBS와 2 g/L의 NaHCO₃가 첨가된 RPMI 1640 배지에 ATRA, DMSO, PMA의 최종 농도가 각각 1 µM, 140 µM, 200 ng/mL 되도록 분화유도제를 넣고 2×10^6 세포수/mL 농도의 HL-60 세포를 배양용 플라스크(T-25cm²)를 사용하여 5%의 CO₂와 95%의 공기가 공급되는 37°C의 배양기에서 2시간, 4시간, 10시간, 16 시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 동안 각각 배양한 후 세포를 모아서 -70°C에 보관하였다.

III. 결 과

1. Proteinase-3의 분리 및 정제

1) Ultrogel AcA 54 chromatography에 의한 proteinase-3의 일차 분리

백혈구 추출물에 대한 Ultrogel AcA 54 size exclusion chromatography를 시행해서 얻은 chromatogram은 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 8 mL을 1분획으로 하였으며 각 분

획을 elastin-congo red, n-succinyl-ala-ala-ala-p-nitroanilide(SANA), n-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide(SAPNA)와 incubation시켜서 생성된 product에 대한 흡광도를 측정해서 얻은 각각의 기질에 대한 효소 활성도는 Fig. 2와 같고 이들 각각의 효소가 서로 상승적으로 작용하여 denatured type I collagen (gelatin)을 분해한 활성을 관찰하기 위하여 반응 산물을 SDS-PAGE에 의하여 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 2에서 elastin-congo red와 SANA 그리고 SAPNA 모두에 대해서 활성이 높은 분획은 61번에서 67번 분획에 걸쳐 나타났으며, 24번~29번 분획과 45번~53번 분획에서 elastin-congo red에 대해서만 활성을 나타내는 효소가 있었다. Fig. 3에서는 전반적으로 모든 분획들에서 강력한 gelatin 분해 활성을 나타내었으며 23번~30번 분획에서는 분자량 약 68 kDa의 hemoglobin으로 추정되는 band가 보였고 45번~53번 분획은 gelatin 분해 활성이 다소 낮았다.

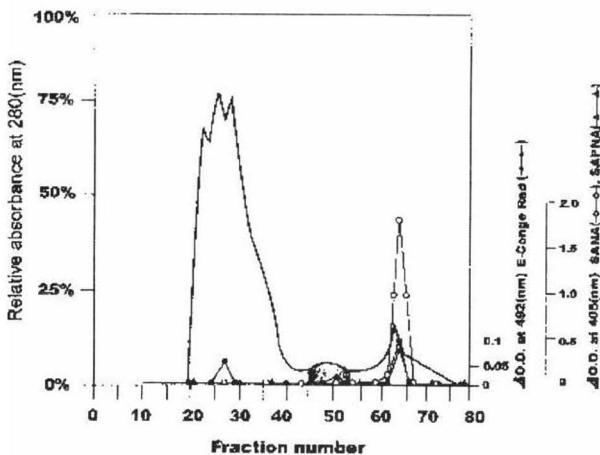


Fig. 2. Purification of proteinase-3 by Ultrogel AcA 54 chromatography.

The column (2.5 x 100 cm) was equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.3, containing 0.15 M of NaCl, 5 mM CaCl₂ and 0.1% Brij 35. The sample from leukocyte extract was applied and 8mL of fractions were collected at a flow rate of 8 mL/ 5 min. All chromatographic procedures were performed at 4°C. — : protein profile.

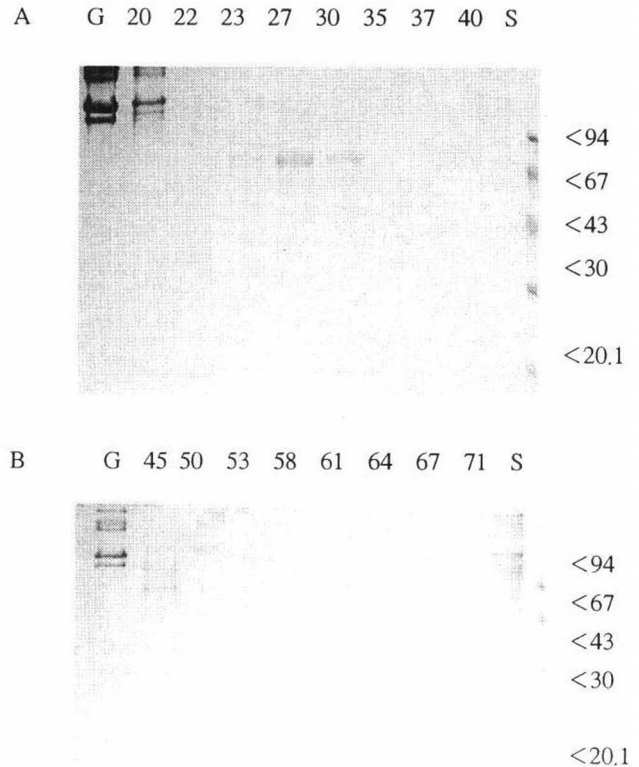


Fig. 3. SDS-PAGE of fractions isolated by Ultrogel AcA 54 chromatography. Lanes of the fraction 20-71: 60 μ g of denatured

type I collagen were incubated with 70 μ L of aliquots of sample isolated by Ultrogel AcA 54 chromatography for 17 h at 25°C.

Reaction products were separated on 10% polyacrylamide gel (panels A and B). Lane G: denatured type I collagen; lane S, molecular mass markers were run on a separate tract of the same gel and are indicated.

2) Bio-Rex 70 ion exchange chromatography에 의한 proteinase-3의 분리

다음 정제 과정으로서 Bio-Rex 70 ion exchange chromatography를 수행해서 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. gradient를 시작한 후 2번에서 5번 분획까지 hemoglobin을 포함한 상당량의 단백질이 분리되어 나온 후 sodium acetate 농도 0.3~0.45 M 사이에서 myeloblastin이 유출되어 나왔다. 20번~22번 분획은 cathepsin G였다.

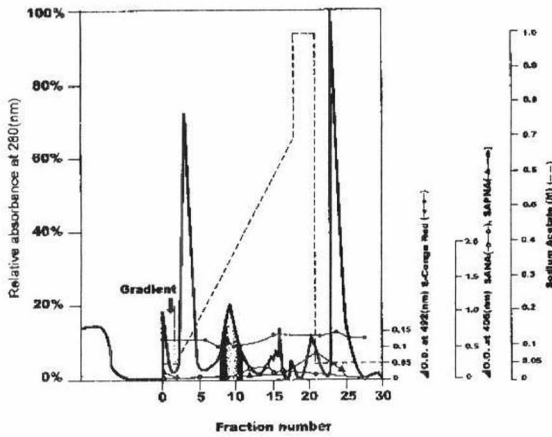


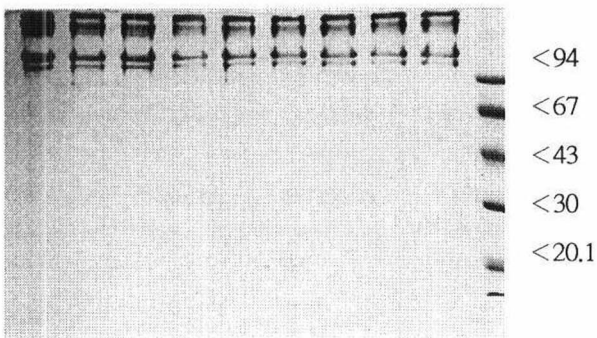
Fig. 4. Purification of proteinase-3 by Bio-Rex 70 ion exchange chromatography. The column (2.5 x 100 cm) was equilibrated with 50 mM sodium acetate containing 2 mM CaCl₂ and 0.1% Brij 35.

After sample (the proteinase-3 enzyme partially purified by gel chromatography on Ultrogel AcA 54) was applied, the column was washed with the same buffer until the absorbance reached base-line.

Elution was performed at pH 7.4 with linear gradient of sodium acetate from 0.05 M to 0.7 M. 7 mL fractions were collected at a flow rate of 7 mL/5 min.

Bio-Rex 70 ion exchange chromatography에 의해 분리한 proteinase-3의 gelatin에 대한 효소 활성도를 SDS-PAGE에 의하여 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 8번~11번 분획에서 proteinase-3에 의해 분자량 124 kDa과 112 kDa의 gelatin이 분해되었으며 이것은 Fig. 4에서 SANA나 SAPNA에 대한 활성은 없고 elastin-congo red에 대해서만 활성을 나타내는 분획과 일치한다. 이 8번~11번 분획을 모아서 농축시킨후의 총 부피는 3.8 mL이었고 protein 농도는 1.0 mg/mL으로서 3.8 mg의 효소를 얻었다.

G 0 2 4 6 7 8 9 10 S



G 11 13 15 16 21 24 25 27 S

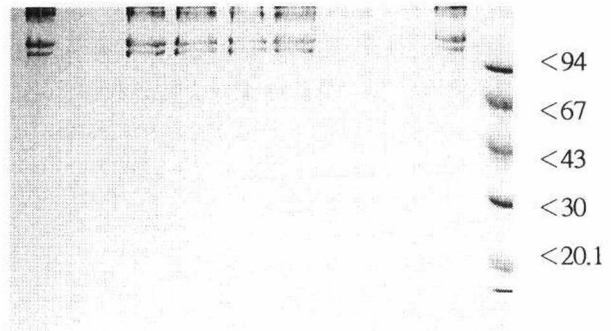


Fig. 5. Enzyme activity of fractions isolated by Bio-Rex 70 ion exchange chromatography. Lanes of the fraction 0-27: 60 μ g of denatured type I collagen were incubated with 70 μ L of aliquots of sample isolated by Bio-Rex 70 ion exchange chromatography for 17 h at 37°C. Reaction products were separated on 10% SDS- polyacrylamide gel (panels A and B). Lane G: denatured type I collagen; lane S, molecular mass markers were run on a separate tract of the same gel and are indicated.

3) Proteinase-3의 분자량 측정과 활성도 억제 검사

정제된 효소를 SDS-PAGE한 결과 Fig. 6의 lane 1에서와 같이 29 kDa의 단일 band를 확인할 수 있었다. 이 효소를 denatured type I collagen (gelatin)과 반응시켜 효소 활성도를 시험한 결과 lane 3에서와 같이 분자량 124 kDa과 112 kDa의 gelatin이 분해되어 작은 분자량의 분해 산물이 나타났다.

정제된 proteinase-3 10 μ g에 최종 농도가 10 mM이 되도록 phenylmethansulfonyl fluororide (PMSF) (lane 3)를, 최종 농도가 22 μ M이 되도록 di-isopropyl fluorophosphate (DFP) (lane 4)를, 최종 농도가 10 mM이 되도록 E-64 (trans-epoxysuccinyl-L-eucylamino(4-guanidino)-butane) (lane 5)를, 최종 농도가 10 mM이 되도록 leupeptin (acetyl-leu-leu-arg-al) (lane 6)를, 최종 농도가 10 mM이 되도록 pepstatin A (isovaleryl-val-val-sta-ala-sta) (lane 7)를, 최종 농도가 10 mM이 되도록 1,10-phenanthroline (lane 8)을, 최종 농도가 10 mM이 되도록 soybean trypsin inhibitor (lane 9)를, 그리고 최종 농도가 10 mM이 되도록 N-acetyl-L-cysteine (NAC) (lane 10)을 각각 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 gelatin과 21 시간 동안 37°C 에서 반응시킨 후 SDS-PAGE로 기질의 분

해 정도를 control (lane 3)과 비교해본 결과 phenylmethansulfonyl fluororide (PMSF) (lane 4) 그리고 di-isopropyl fluorophosphate (DFP) (lane 5)에 의해서 효소의 활성이 억제되었고 그 중에서 phenylmethansulfonyl fluororide (PMSF) (lane 4)에 의한 억제가 가장 강하였다.

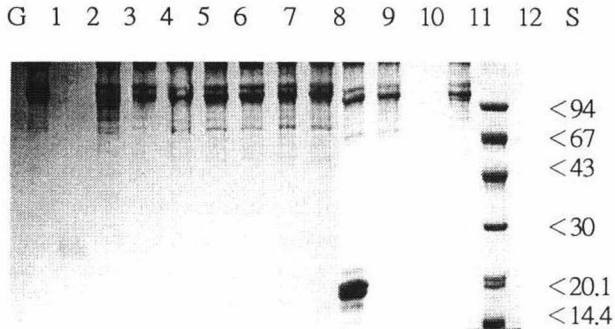


Fig. 6. Analysis of purified enzyme and Inhibition of proteinase-3 (myeloblastin) by proteinase inhibitors. Lane G: 120 μ g of denatured type I collagen; lane 1: 200 μ g of proteinase-3; lane 11: 60 μ g of purified Elastase; lane 2: 120 μ g of denatured type I collagen was incubated with 10 μ g of proteinase-3 for 21 h at 37°C; lane 12: 120 μ g of denatured type I collagen was incubated with 10 μ g of proteinase-3 for 21 h at 37°C; lane 3~10: 120 μ g of denatured type I collagen was incubated with 10 μ g of proteinase-3 in the presence of 10 mM phenylmethansulfonyl fluororide (PMSF) (lane 3), 22 μ M di-isopropyl fluorophosphate (DFP) (lane 4), 10 mM E-64(trans-epoxysuccinyl-L-leucylamino(4-guanidino)-butane) (lane 5), 10 mg/mL leupeptin(acetyl-leu-leu-arg-al) (lane 6), 10 mM pepstatin A (isovaleryl-val-val-sta-ala-sta) (lane 7), 10 mM 1,10-phenanthroline(lane 8), 10 mg/mL soybean trypsin inhibitor (lane 9), 10 mM N-acetyl-L-cysteine (NAC) (lane 10), respectively, for 21 h at 37°C. Reaction products were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Lane S: molecular mass markers

2. Proteinase-3에 대한 polyclonal antibody 생합성

1) Immunization of rabbits

proteinase-3를 접종한 3 마리의 가토(체중 3.0~4.5 kg)로부터 60 mL의 혈액을 채취하여 실온에서 1 시간, 4°C에서 하룻밤을 방치한 뒤 4°C에서 원심 분리해서 그 상

층액을 취하여 33% ammonium sulfate로 침전시켰다. 이 침전물을 면역 글로불린으로 간주하여 50 mL의 BBS (Borate buffered saline, pH8.2)로 녹인 다음 4°C에서 BBS에 투석하여 평형시킨 후 다음 실험에 사용될 때까지 -20°C에 보관 했다.

2) DEAE-cellulose ion exchange column을 통한 항 PR-3 다가항체 의 분리

상기에서 얻어진 면역 글로불린을 10 mM phosphate buffer (pH 8.0) 2 liter에 4회 투석한 후 5 mL 을 취하여 DEAE-cellulose ion exchange column에 주입하여 10 mM phosphate buffer (pH 8.0)로부터 300 mM phosphate buffer (pH 5.4)까지의 선형 농도 구배를 시행해서 Fig. 7 과 같은 결과를 얻었다. 이들 각각의 분획에 대하여 ELISA 방법에 의해 확인한 결과 pH gradient가 끝날 무렵인 300 mM phosphate buffer (pH 5.4)상에서 항 PR-3 다가항체(anti-PR-3 polyclonal antibody)가 유출되어 나왔다. 각각의 분획에서 유출된 단백질의 profile에 대한 SDS-PAGE결과는 Fig. 8과 같다.

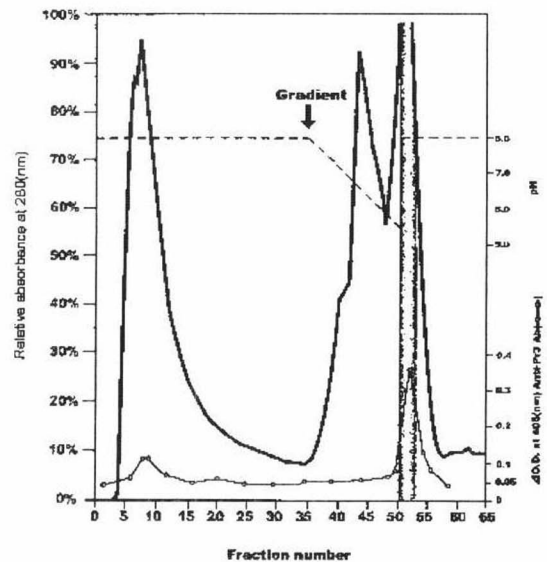


Fig. 7. Purification of anti-PR-3 antibody by DEAE-cellulose ion exchange chromatography.

The column was equilibrated with 10mM phosphate (pH 8.0). After sample(rabbit immunoglobulins) was applied, the column was washed with the same buffer until the absorbance reached base-line.

pH and concentration gradient [10mM phosphate (pH 8.0) to

0.3 M phosphate (pH 5.4)] was started. 1.2 mL of eluent was collected in each fractions at flow rate of 1.2 mL/ 5 min. : protein profile, : titer of mmunoglobulin G measured by ELISA .

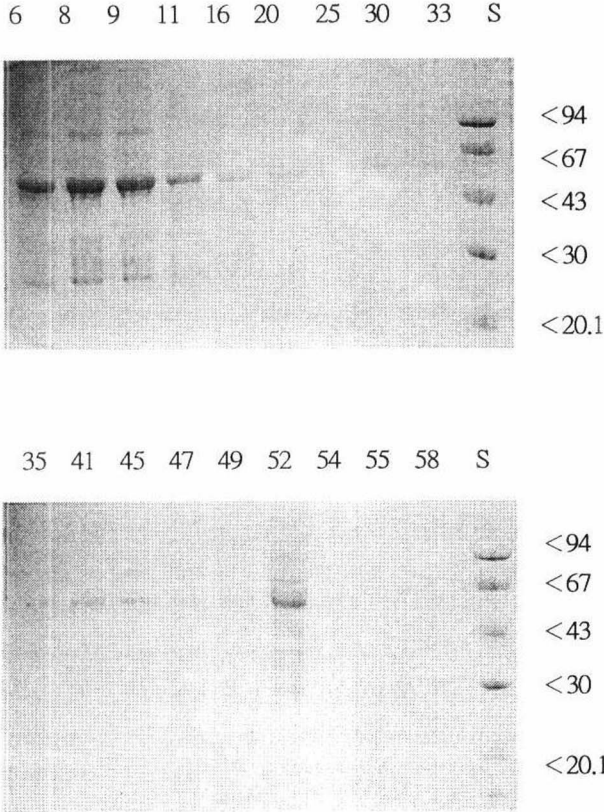


Fig. 8. SDS-PAGE of fractions isolated by DEAE-cellulose ion exchange chromatography. Lanes 6~58: 100 μ L of each fractions was precipitated by 50% acetone-50% methanol solution. The precipitate were suspended in sample buffer and applied on the gel. Lane S: molecular mass markers

3. 정상인과 백혈병 환자의 백혈구에서 myeloblastin mRNA 발현의 검사

정상인과 백혈병 환자의 말초혈 백혈구에서 myeloblastin mRNA의 발현을 검사해서 Fig. 9와 같은 결과를 얻었다. 급성 myelocytic leukemia과 multiple myeloma로 진단된 백혈병성 세포에서만 myeloblastin mRNA의 발현이 관찰되었다.

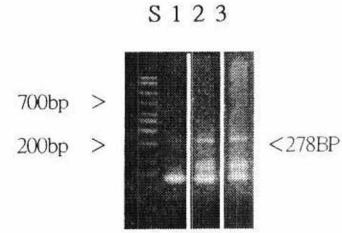


Fig. 9. Agarose gel electrophoresis of the PCR products (278 bp) of myeloblastin cDNA.

Lane S: 50-2,000 bp DNA ladder; lane 1: human normal leukocyte; lane 2: human acute myelocytic leukemic cell; lane 3: human multiple myeloma cell.

4. HL-60 세포에서 분화유도제에 의한 myeloblastin mRNA와 myeloblastin 발현의조절

1차 배양된 HL-60 세포의 생육성을 0.2% Trypan Blue 염색으로 검사한 후 10% FBS와 ATRA, DMSO, PMA가 각각 첨가된 RPMI 1640 배지에서 2시간, 4시간, 10시간, 16 시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 동안 각각 배양한 후 세포에서 myeloblastin mRNA와 myeloblastin 발현의 증감을 측정한 결과 ATRA에 의한 myeloblastin mRNA 발현의 하루 중의 변화는 투약 후 4시간이 경과해서부터 16시간이 될 때까지는 발현이 억제 되었지만 그 이후 24 시간까지는 다시 myeloblastin mRNA 발현이 증가하는 양상을 보였고 6일 동안의 변화는 투약 후 1일이 경과할 때까지 myeloblastin mRNA 발현이 다소 증가하는 양상을 보이다가 그 이후 3일이 경과할 때까지 발현이 감소되었으나 다시 3일 이후부터 6일째까지는 발현이 증가되어서 전체적인 경과를 살펴보면 실제 ATRA에 의한 myeloblastin mRNA 발현의 억제는 불완전하였고 myeloblastin 발현의 증감에도 영향을 미치지 못하였다. (Fig. 10, 11)

DMSO에 의한 myeloblastin mRNA 발현의 6일 동안의 변화는 투약 후 3일이 경과할 때까지 myeloblastin mRNA 발현이 오히려 증가하는 양상을 보이다가 그 이후 6일이 경과할 때까지 발현이 감소되었으나 전체적인 경과를 살펴보면 실제 DMSO에 의해 myeloblastin mRNA 발현은 다소 증가되었으며 myeloblastin 발현의 증감에는 영향을 미치지 못하였다. (Fig. 12)

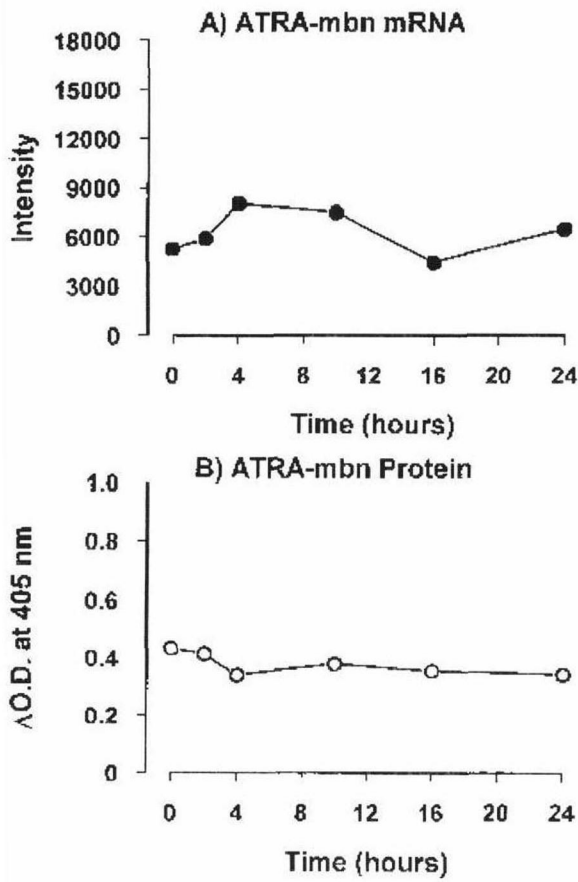


Fig. 10. Time course of myeloblastin mRNA and its protein expression in HL-60 cells treated with all-trans retinoic acid(ATRA) for one day.

PMA에 의한 myeloblastin mRNA 발현의 6일 동안의 변화는 투약 후 6일 동안 지속적으로 발현이 감소되었으며 투약 후 3일 이후부터는 감소되는 정도가 다소 완만해졌다. 그러나 myeloblastin 발현의 증감에는 영향을 미치지 못하였다.(Fig. 13)

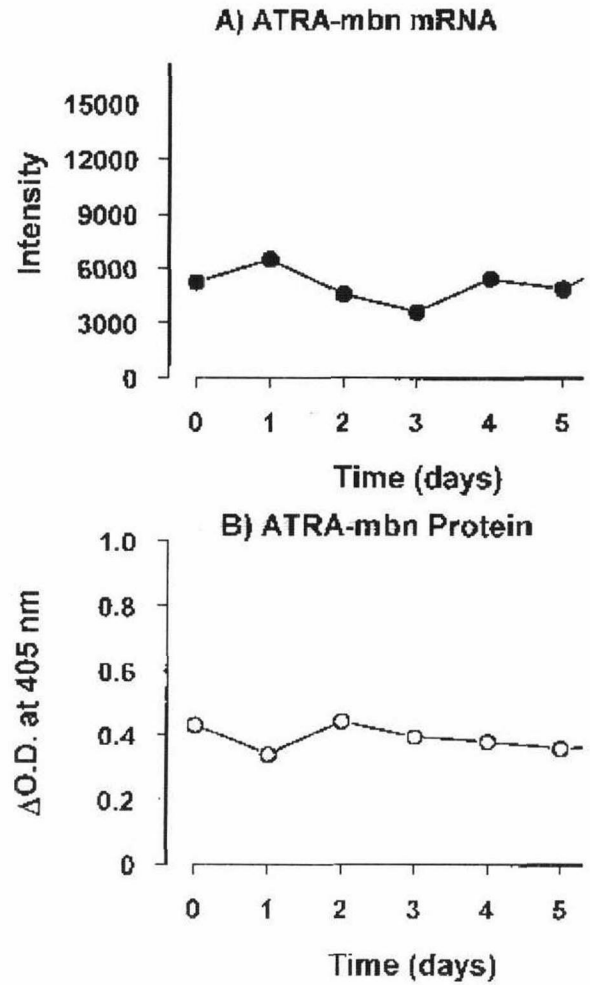


Fig. 11. Time course of myeloblastin mRNA and its protein expression in HL-60 cells treated with all-trans retinoic acid(ATRA) for 6 days.

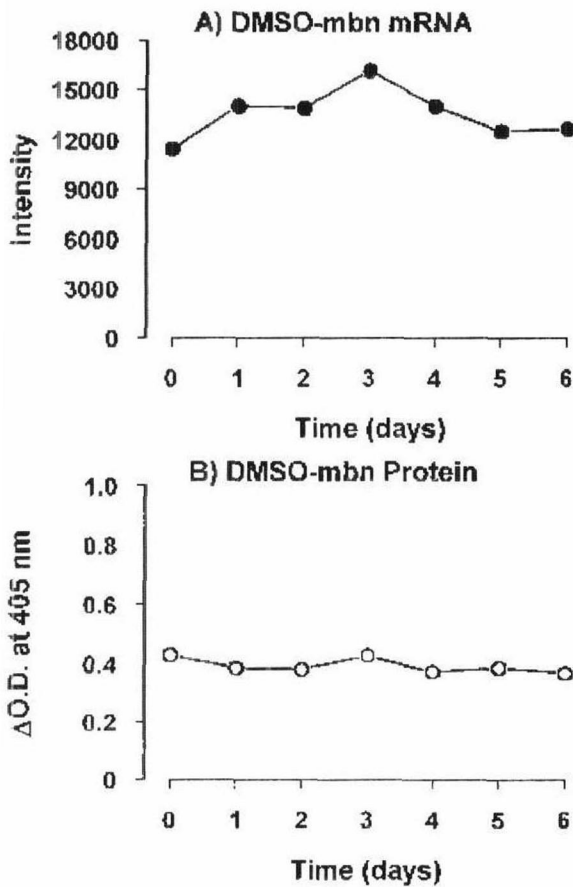


Fig. 12. Time course of myeloblastin mRNA and its protein expression in HL-60 cells treated with dimethylsulfoxide (DMSO) for 6 days.

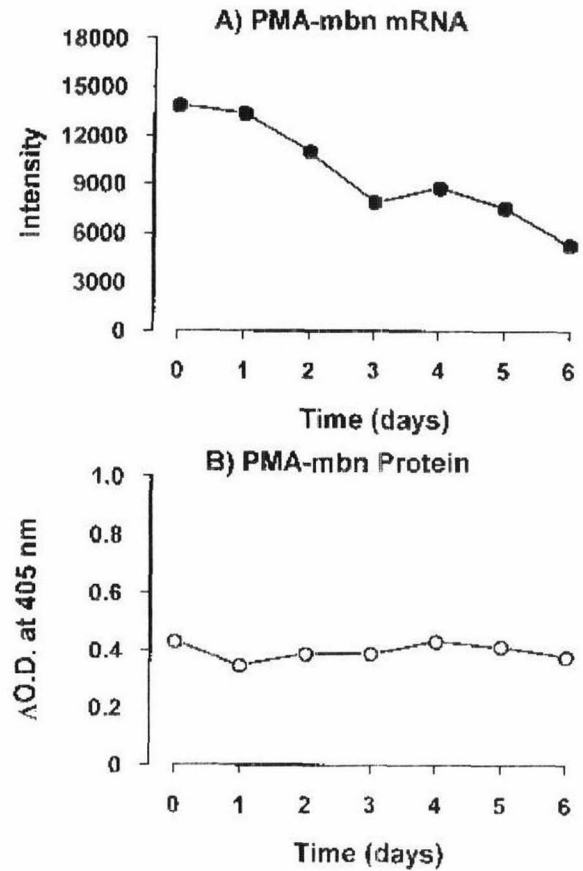


Fig. 13. Time course of myeloblastin mRNA and its protein expression in HL-60 cells treated with phorbol 12-myristate-13-acetate(PMA) for 6 days.

IV. 고 찰

본 연구에서 세포의 분화 정도를 측정하는 지표로 사용된 proteinase-3 (myeloblastin)는 in vitro에서 elastin을 포함한 여러 구조를 형성하는 단백질을 분해하며 여러 중성구 기원의 생리학 및 병리학적 사건에 관여하는 것으로 추정된다^{14,15)}. 그러나 Sturrock 등은¹⁶⁾ PR-3 mRNA는 골수에서의 조혈(hematopoiesis) 과정 중 promyelocytic이나 myelocytic stage의 초기 분화 과정에서만 발현된다고 보고했다. 급성골수구성백혈병(AML) 환자와 다발성골수종(MM) 환자 그리고 정상인의 말초 혈액에서 mbn mRNA의 발현을 검사한 결과 급성골수구성

백혈병(AML) 환자와 다발성골수종(MM) 환자의 말초혈액혈구에서만 mbn mRNA가 발현되는 것(Fig. 9)으로 미루어 보아서 mbn은 혈구세포가 말초혈에 도달하기 전에 단백질 합성은 완료되고 정상인의 말초혈구세포에서는 mbn 유전자의 전사는 일어나지 않았다는 것을 시사한다. 이것은 말초혈에서 과립백혈구의 반감기가 약 6-7시간이고 이들 과립백혈구의 단백질 합성이 거의 일어나지 않는다는 보고와 일치하는 결과이다.^{17,18)} 그러므로 mbn mRNA의 발현을 혈구세포의 분화 정도를 측정하는 지표로 쓸 수 있을 것으로 생각되며 Fig. 10-13에서 관찰되는 바와 같이 세포 내 mbn mRNA 발현의 변화에 비해서 mbn 단백질 량의 변화가 거의 없었다.

이 들 세포에 사용된 유도분화제는 HL-60가 성숙한 세포로 분화되는 정도와 mbn mRNA 발현의 조절을 관찰하기 위하여 현재 임상에서 분화유도요법제로 사용되고 있는 ATRA, 동결방지제(cryoprotective compound)이며 세포막의 유동성을 증가시키고 주로 과립구(granulocyte)로 분화시키는 DMSO, 그리고 DAG 유사체(analogs)인 PMA를 사용하였다.(Table 1)

HL-60 세포에서 ATRA, DMSO, PMA에 의한 mbn mRNA 발현의 조절에 있어서 PMA를 제외한 ATRA와 DMSO에 의한 mbn mRNA 발현의 억제는 불완전하였으며 이것은 이전의 임상 보고에서와 같이 ATRA로 백혈병 환자를 지속적으로 치료할 경우 ATRA에 저항성인 백혈병 세포가 환자의 말초혈에 잔존할 수 있다는 것을 의미한다.

HL-60 세포가 diacylglycerol (DAG)과 유사한 구조를 가지고 실제 protein kinase C (PKC)를 활성화시키는 PMA¹⁹⁾에 의해서 mbn mRNA의 발현이 억제되는 것으로 미루어 보아 receptor tyrosine kinase 중에서도 PLC- γ 에 의해 생성되는 transducer 중에 protein kinase C (PKC)를 기질로 하는 diacylglycerol (DAG)의 활성화에 의한 신호전달경로가 분화 유도에 가장 중요한 요소를 구성할 것으로 예상된다.

V. 결 론

HL-60 세포가 diacylglycerol (DAG)과 유사한 구조를

가지고 실제 protein kinase C (PKC)를 활성화시키는 PMA¹⁹⁾에 의해서 mbn의 발현이 억제되는 것으로 미루어 보아 receptor tyrosine kinase 중에서도 PLC- γ 에 의해 생성되는 transducer 중에 protein kinase C (PKC)를 기질로 하는 diacylglycerol (DAG)의 활성화에 의한 신호전달경로가 분화 유도에 가장 중요한 요소를 구성할 것으로 예상된다.

HL-60 세포에서 ATRA, DMSO, PMA에 의한 mbn mRNA 발현의 조절에 있어서 PMA를 제외한 ATRA와 DMSO에 의한 mbn mRNA 발현의 억제는 불완전하였으며 이것은 이전의 임상 보고에서와 같이 ATRA로 백혈병 환자를 지속적으로 치료할 경우 ATRA에 저항성인 백혈병 세포가 환자의 말초혈에 잔존할 수 있다는 것을 의미한다.

급성골수구성백혈병(AML) 환자와 다발성골수종(MM) 환자 그리고 정상인의 말초 혈액에서 mbn mRNA의 발현을 검사한 결과 급성골수구성백혈병(AML) 환자와 다발성골수종(MM) 환자의 말초혈액혈구에서만 mbn mRNA가 발현되었다. 그러므로 mbn mRNA의 발현에 대한 RT-PCR 결과는 완해가 유도된 백혈병 환자의 치료 및 관리를 하는데 있어서 매우 유용한 진단적 가치를 지닐 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Gu LJ, Wang ZY: Use of all-trans-retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72: 567-572, 1988
2. Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Ballerini P, Berger R, Fenaux P, Degos R: All-trans-retinoic acid as a differential therapy for acute promyelocytic leukemia. I. clinical results. *Blood* 76: 1704-1709, 1990
3. Wairell RP Jr, de The H, Wang ZY, Degos L: Acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 329: 177, 1993
4. Bories D, Raynal MC, Solomon DH, Darzynkiewicz Z and Cayre YE: Down-regulation of a serine protease, Myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Cell* 59: 959-968, 1989
5. Borrow J, Goddard AD, Sheer D and Solomon D: Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia break point cluster region on chromosome 17. *Science* 249 : 1577-1580, 1990
6. de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L and Dejean A: The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukemia

- fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347: 558-561, 1990
7. Miller WH Jr, Warrel RP Jr, Frankel SR, Jakubowski A, Gabrilove JL, Muindi J and Dmitrovsky E: Novel retinoic acid receptor- α transcripts in acute promyelocytic leukemia responsive to all-trans-retinoic acid. *J Natl Cancer Inst* 82: 1932-1933, 1990
8. Chomienne C, Ballerini P, Balitrand N, et al.: The retinoic acid receptor α gene is rearranged in retinoic acid-sensitive promyelocytic leukemias. *Leukemia* 4: 802-807, 1990
9. Longo L, Pandolfi PP, Biondi A, Rambaldi A, Mencarelli A, Coco FL, Diverio D, Pegoraro L, Avanzi G, Tabilio A, Zangrilli D, Alcalay M, Donti E, Grignani F and Pelicci G: Rearrangement and Aberrant expression of the retinoic acid receptor α gene in acute promyelocytic leukemias. *J Exp Med* 172: 1571-1575, 1990
10. Labbaye C, Zhang J, Casanova JL, Lanotte M, Teng J, Miller WH Jr and Cury YE: Regulation of myeloblastin messenger RNA expression in treated with all-trans-retinoic acid. *Blood* 81: 475-481, 1993
11. Spector NL, Hardy L, Ryan C, Miller WH Jr and Luedke E: 28-kDa mammalian heat shock protein, a novel substrate of a growth regulatory protease involved in differentiation of human leukemia cells. *J Biol Chem* 270: 1003-1006, 1995
12. Baggiolini M, Bretz U, Dewald B and Feigenson ME: The polymorphonuclear leukocyte. *Agents Actions* 8: 3-11, 1978
13. Kao RC, Wehner NG, Skubitz KM, Gray BH and Hoidal JR: Proteinase 3: A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *J Clin Invest* 82: 1963-1973, 1988
14. Hart DM: Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90: 3245, 1997
15. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245, 1998
16. Sturrock AB, Franklin KF, Rao G, Marshall BC, Rebentisch MB, Lemons RS, Hoidal JR: Structure, chromosomal assignment, and expression of the gene for proteinase-3. The Wegener's granulomatosis autoantigen. *J Biol Chem* 267: 21193-21199, 1992
17. Fawcett DW: A Text Book of Histology (ed 12). New York, NY, Chapman & Hall, 1994
18. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ: Hematology (ed 5). New York, NY, McGraw-Hill, 1995
19. Nield J, Kuhn L, Vandenbark G: Phorbol diester receptor copurified with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:36, 1983