

## 새로운 종양괴사 수용기와 관계된 단백질(nTRAF)의 클로닝에 관한 연구

치위생과  
전임강사 허 남 기

### I. 서 론

Tumor necrosis factor(종양괴사인자, TNF)가 초기에는 종양 억제를 유도하는 능력이 있으며 형질변환된 세포에 대해 세포독성반응을 일으키는 물질로 알려졌다<sup>1,2,3)</sup>. 그후 계속적인 연구에 의해 TNF는 면역반응, 항바이러스성 반응, 그리고 악액질과 같은 만성질환시 동반되는 대사변화를 촉진한다는 것이 밝혀졌다<sup>1,2)</sup>. 또한 TNF는 비인슐린의존성 당뇨(non-insulin dependent diabetes mellitus)환자에서 인슐린에 대한 저항성을 증가시키며<sup>4)</sup>, 관절염과 같은 조직파괴를 일으키는 염증성 반응을 촉진하는 것으로 보고되었다<sup>1,2,3)</sup>. 한편 감염 진행시에 TNF가 과도히 생성되면 패혈성 속(septic shock), 장기 부전 (organ failure), 그리고 사망을 일으키기도 한다<sup>5,6)</sup>. 그러나 섬유아세포(fibroblast)에 대한 TNF의 성장촉진효과<sup>7,8)</sup>, acute phase protein의 합성과 관련된 간에서의 동화능<sup>9)</sup>, angiogenesis 유도능<sup>10)</sup> 등은 TNF가 조직의 재생에 있어서도 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 이에 TNF에 의한 종양치료의 잠재적인 가능성을 증가시키며, 병리학적인 부작용을 최소로 하기 위하여 TNF의 작용기전에 대하여 명확히 규명할 필요가 있다고 사료된다.

Tumor necrosis factor는 주로 활성화된 대식세포에서 생성되는 cytokine으로, 다양한 생물학적인 효과를 발휘하는 물질인데 내독소성 속, 염증발현기능, 면역조절기능, 증식기능, 세포독성능 그리고 항바이러스능 등을 소유하고 있다<sup>11)</sup>. TNF 매개에 의한 이러한 다양한 반응은 세포에 존재하는 수용기와 TNF의 상호작용에

의해 일어난다<sup>12)</sup>. 현재 분자량이 약55kDa (TNFR-1)인 것과 75 kDa (TNFR-2)인 2개의 서로 다른 종류의 TNF 수용기가 존재하며 이들 수용기의 TNF 반응에 대한 신호전달경로가 독립적임이 알려졌고, 또한 이들의 수용기가 행하는 역할에 대해서는 수용기-특이 agonist 항체를 사용하여 연구되었다<sup>12,13)</sup>. TNFR-1은 세포독성에 대한 신호전달을 주로 매개하며, 세포종류에 따라서 기타 여러 가지의 TNF 활성을 매개하기도 한다. TNFR-2에 의한 신호전달은 임파구성 세포에서 관찰되는데, 흉선세포와 설치류의 세포독성 T 세포주인 CT6의 증식을 촉진시키며<sup>14)</sup>, 인간의 단구세포 (mononuclear cell)의 TNF-의존성 증식반응에도 관여한다<sup>15)</sup>. 또한 TNF-R2는 granulocyte / macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)를 유도하며<sup>16)</sup>, 초기의 조혈과정을 억제한다<sup>17)</sup>.

이들 두개의 TNF 수용기는 하나의 커다란 TNF 수용기 superfamily의 구성원으로, 현재까지 이 family에는 TNFR-RP, CD30, CD40, NGFR, TNFR-1, TNFR-2, PV-T2, PV-A53R, 4-1BB, OX40, Fas 그리고 CD27 등 모두 12개가 알려져 있다<sup>18)</sup>. 이 family에 속하는 수용기는 모두 세포의 부분에 특이하게 반복되는 cysteine-rich domain을 간직하고 있다. 아울러 이들 수용기의 ligand에 해당되는 cytokine도 역시 TNF-related cytokine ligand의 family를 형성하고 있고, 현재까지 TNF $\alpha$ , LT $\alpha$ , LT $\beta$ , FasL, CD40L, CD30L, CD27L 그리고 4-1BBL 등과 같은 8개의 구성원이 알려져 있다<sup>18)</sup>.

TNF 수용기 superfamily의 신호전달은 각각의 수용기에 해당되는 ligand가 trimer의 형태로 결합하여 기시된다<sup>11,18)</sup>. 수용기의 세포내 domain의 복합체 형성이 세포내 신호전달경로에 관여하는 인자를 활성화시키기 위한 3차원적인 epitope의 구성을 유도한다는 것이 알려졌다<sup>14)</sup>. 비록 몇몇의 second messenger system이 TNF의 신호전달에 관여하는 것으로 알려졌지만, 아직까지 수용기에 어떠한 물질이 결합되는 지는 밝혀지지 않고 있는 실정이다. TNF receptor superfamily에 해당하는 어떠한 수용기도 이들 자체의 세포질내 부위에 어떠한 유사성도 갖고 있지 않기 때문에 이들은 서로 다른 활성 신호전달 경로가 있을 것이며<sup>19)</sup>, 예외로는 TNFR-1과 FAS 수용기의 세포질내 부위의 아미노산 배열에 약간의 유사성이 있는데, 이 부위가 양쪽 수용기에 의해 매개되는 apoptosis(programmed cell death)성 세포치사과정을 기시하는 것으로 알려졌다<sup>20)</sup>. TNF 수용기 superfamily의 세포질내에 어떠한 촉매작용 부위가 있는 지는 발견되지 않았으며, 다른 단백질과는 유사성이 없는 것으로 보고되었다<sup>21,22)</sup>.

현재 TNF 및 이와 관련된 cytokine의 작용에 따른 수용기의 활성화 후 세포내 신호전달 기전에 대한 것은 해결되어야 할 과제로 남아 있다. 최근에 Rothe 등 (1994)<sup>23)</sup>은 yeast two hybrid system과 glutathione S transferase (GST)-TNFR-2 IC (intracellular domain) 융합 단백질을 이용하여 TNFR-2와 상호결합하는 두개의 단백질을 클로닝하였다. 즉, TNF receptor associated

factor 1과 2이다 (TRAF-1, TRAF-2). 또한, Hu 등(1994)<sup>24)</sup>은 CD40과 결합하는 TRAF-3을 클로닝하였다. 이들 단백질의 특징은 카복실 말단기에 보존된 “TRAF domain” 이 존재하고, 이 부위가 TNFR의 intracellular domain과 결합하여 TNF 수용기의 신호전달에 관여한다고 하였다. 본 실험에서는 Expression sequence tag(EST)를 이용하여 카복실 말단기에 “TRAF domain” 을 간직한 새로운 단백질을 클로닝하여 이의 특징을 밝히고자 하였다.

## II. 실험재료와 방법

### 1. nTRAF의 클로닝

Gene Bank 상의 EST를 이용하여 TRAF domain이 있는 유전자를 선택하여 Northern blot을 통해 많이 발현되는 세포주인 HeLa 세포주의 cDNA library (Clontech)를 검색하여 전체 길이의 새로운 nTRAF를 클로닝하여 DNA 염기서열을 밝혔다. 클로닝된 DNA 염기서열로부터 아미노산을 추론하였다.

### 2. 사용 세포주 및 세포주 배양

nTRAF의 mRNA가 발현되는 양상을 알기 위하여 Northern blot을 시행하였다. 세포주로는 promyelocytic leukemia 세포주인 HL60, cervical tumor인 HeLa cell, chronic myelogenous leukemia 세포주인 K-562, lymphoblastic leukemia 세포주인 MOLT-4, Burkitt's lymphoma 세포주인 Raji, colorectal adenocarcinoma 세포주인 SW480, lung carcinoma 세포주인 A549 그리고 melanoma 세포주인 G361 등을 사용하였다. 각 세포의 배양은 fetal calf serum이 5%가 함유된 RPMI 배양액에서 5%의 이산화탄소가 존재하는 탄산가스 부란기에서 배양시켰다.

### 3. Northern Blot 분석

배양이 끝난 각 세포주에서 RNA 추출은 guanidium thiocyanate 방법을 이용하였다 (Chonezynski와 Sacchi, 1987)<sup>25)</sup>. 이후 수집하여 수세한 각 세포를 1ml의 guanidium-thiocyanate 용액 (4M guanidium thiocyanate, 0.1M Tris-Cl, pH 7.5, 1.5%  $\beta$ -mercaptoethanol)을 첨가하고 가볍게 흔들어 주어 세포가 바닥에서 분리되면 원심분리관에 옮겨 sodium lauryl sarcosinate를 최종농도가 0.5%이 되

도록 첨가했다. 5,000g에서 원심분리한 상청액에 2M sodium acetate (pH 5.5) 0.5 ml, 1M acetic acid 0.8 ml를 첨가하고 차가운 ethanol 7.5 ml을 잘 섞으면서 첨가한 후, -20℃에서 2시간 보관하고 그후 원심분리하여 RNA를 침전시키고, 그 침전물은 5ml의 guanidine-HCl 용액(8M guanidine-HCl, 0.1M sodium acetate, pH7.0, 1% β-mercaptoethanol, 20mM EDTA)으로 용해시켰다. 여기에 차게한 ethanol을 2.5 ml를 첨가하고 -20℃에서 2시간 보관하고 난 후 다시 원심분리하여 RNA를 침전시킨 후 20mM EDTA(pH8.0) 5ml을 넣고 완전히 진동시켜 섞고나서, 2.5ml의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)을 넣고 가볍게 흔들어 준 후 얼음에서 보관하고, 10,000g, 4℃에서 20분간 원심분리하여 상청액을 DEPC 처리한 새로운 원심분리관에 옮겼다. 이후 상청액과 동일한 부피의 isopropanol을 첨가하여 -20℃에서 1시간 이상 방치하고 10,000g, 4℃에서 20분간 원심분리한 후 상청액을 버리고 침전된 RNA를 DEPC 처리된 증류수에 녹이고 oligo(dT) cellulose bead를 이용하여 poly(A)+ RNA를 분리했다. 결합 완충용액으로 3회 수세하고 elution시켜 -70℃에서 보관했다. 이후 Northern blot 분석은 통상적인 방법에 따랐다<sup>26)</sup>. 각 poly(A)+ RNA 1 μg을 0.6M formaldehyde가 포함된 1.2% agarose gel(완충용액: 20mM 3-[N-morpholino]propanesulfonic acid [MOPS], 5mM sodium acetate, 1 mM EDTA)에서 전기영동 후 10X SSC에서 nitrocellulose membrane에 옮겨 TE(pH 8.0) 완충용액에서 수세하고 공기 중에서 건조한 후 90초간 자외선에서 자가융합시켰다. 68℃에서 2시간동안 0.236 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2, 7% SDS, 1% BSA, 1mM EDTA가 함유된 용액에서 전교잡반응(prehybridization)을 시켰다. 그후 같은 완충용액에서 10ng/ml 농도로 방사선 동위원소 (dCTP-<sup>32</sup>P)가 표지된 nTRAF를 첨가하여 1시간 동안 교잡반응(hybridization)을 시행하였다. 교잡반응이 끝난 nitrocellulose membrane을 68℃에서 1X SSC, 0.1% SDS와 0.1X SSC, 0.1% SDS가 함유된 세척용액으로 수세한 후 건조한 다음, 자기방사선법(autoradiography)을 사용하기 위하여 Kodak XRA 필름에 노출시킨 후, -70℃에서 약 3일동안 보관하였다. 그후 X선 자동현상기를 이용하여 필름을 현상하였다.

### III. 실험결과

#### 1. nTRAF의 특징

nTRAF는 새로운 단백질로 분자량이 약 53 kD이며, 470개의 아미노산으로 구

성되어 있었다. 또한 TRAF-2와 TRAF-3에 존재하는 RING finger domain이 있으며, cyteine과 histidine이 풍부한 7개의 반복되는 zinc finger domain으로 구성되어 있었다. 그러나 TRAF-3에서 존재하는 isoleucine zipper는 존재하지 않았다. 전반적 구조는 TRAF-2와 유사하며, TRAF domain 간의 유사성은 40-50%를 나타내었다 (Fig. 1)

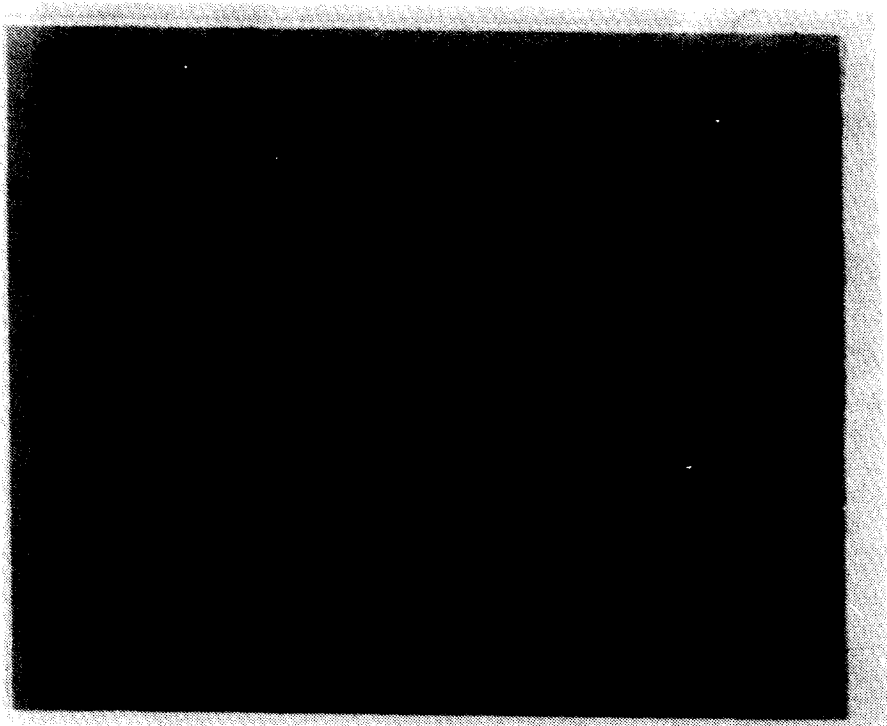


Fig. 1. Diagrams of four TRAF family members

## 2. Northern Blot 결과

사람의 각종 암세포주에서 nTRAF의 mRNA의 발현을 검색한 결과, 2.5kb 정도의 크기를 가진 mRNA가 promyelocytic leukemia 세포주인 HL60에서 극소량으로 발현되는 것 이외에는 모든 세포주에서 골고루 발현되었다. 특히 Burkitt's lymphoma 세포주인 Raji 세포와 chronic myelogenous leukemia 세포주인 K-562 세포주에서 다량으로 발현되었다 (Fig. 2).

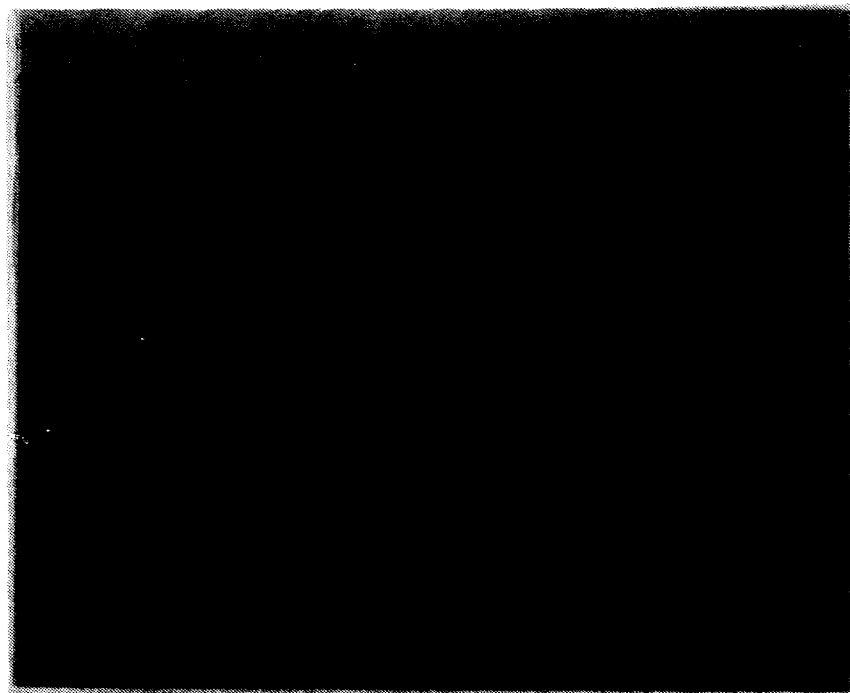


Fig. 2. Northern Blot analysis of nTRAF

#### IV. 고 찰

TNF 작용의 첫번째 단계는 특이수용기와의 결합이다. 현재 두개의 명확한 TNF 수용기가 밝혀져 있다. 하나는 type 1 TNF receptor (TNFR-1)이며 다른 하나는 type 2 TNF receptor (TNFR-2)이다<sup>27,28)</sup>. 이들 수용기는 여러 세포반응을 촉진시킨다<sup>29)</sup>, 내재적인 tyrosine kinase 활성은 소유하고 있지 않으며, 신호가 세포내로 전달되어 여러 반응을 일으킬 수 있는 어떠한 motif도 소유하고 있지 않다. 이러한 tyrosine kinase 능력이 없는 수용기는 신호전달체계의 상호관계를 매개하는 부단백질과 결합해야 세포내에서 여러 가지의 생물학적인 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.

TNFR-1-IC (TNF receptor-1 intracytoplasmic domain)에서 85개의 아미노산을 삭제시킨 돌연변이 실험에 의하여 apoptosis 신호전달에 필수적인 세포질내 부위를 알 수 있는데 이 부위를 death domain이라고 하며, 돌연변이에 따라 수용

기의 항바이러스 능력과 nitric oxide synthetase의 합성능을 이루는 신호전달경로가 파괴됨을 보고하였다<sup>30)</sup>. 자가반응 T-세포의 음성적 선택에 관여하는 FAS 항원도 역시 세포의 프로그램된 치사에 관련된 신호전달과정에 관여한다<sup>20)</sup>. TNFR-1의 death domain과 유사성이 있는 부위가 FAS 항원의 세포질내 부위(FAS-IC)에도 존재한다<sup>10)</sup>. Apoptosis의 정확한 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않고 있다. Cytokine의 작용과 그 전달과정에 대한 중요성과 함께 이러한 과정에 부수되는 세포내 death domain을 규명하고, 이에 따라 TNFR-1이 어떻게 이들의 신호를 전달하는지 이해하는 것이 중요하다. TNF 수용기의 세포질내 부위와 연관된 단백질(TNFRcyt-AP와 FAScyt-AP이라고 명명; TNF receptor cytoplasmic domain-associated protein, FAS cytoplasmic domain-associated protein)이 TNF에 대한 세포의 반응과 신호전달과정에 있어서 매우 중요한 역할을 하기 때문에 이들을 클로닝하며 규명하는 일은 필수적이라 할 수 있다.

TRAF-2는 아미노 말단부위에 RING finger sequence motif를 간직하고 있다. 이러한 cysteine-rich 단백질 motif는 단백질-DNA 그리고 단백질-RNA 상호작용에 관여하는 다른 zinc finger motif와 관련이 있는 것으로 알려져 있다<sup>31)</sup>. RING finger 부위는 RING finger 한 분자당 두 분자의  $Zn^{2+}$ 와 결합한다. 즉,  $Zn^{2+}$  이 보존된 cysteine과 histidine이 결합하여 물질을 안정성이 있게 하는데 관여한다<sup>32)</sup>. RING finger family에 속하는 물질은 DNA-결합 단백질로서 전사 조절, DNA 복구, DNA 재조합에 연관되어 있으며<sup>31)</sup>, 또한 RING finger family는 몇몇의 oncoprotein을 소유하고 있고, 이 family에 속하는 많은 물질이 세포의 성장, 분화, 그리고 발달에 관여한다. nTRAF에서 RING finger motif의 존재는 다음과 같은 가능성을 시사한다. 즉, nTRAF는 세포질내 전사물질의 새로운 군에 속하여, 핵속으로 직접 신호전달경로에 관여하는 STAT 단백질군에 해당되는 것으로 사료된다.

TRAF-1과 TRAF-2의 Northern Blot 분석에 의하면, 각각 약 2.1 kb와 2.2 kb의 크기이며, TRAF-2는 심장, 뇌, 비장, 폐, 간, 골격근, 신장, 정소 등 모든 조직에서 골고루 발현된다<sup>23)</sup>. 반면에 TRAF-1은 조직 특이성을 보이고 있는데, TRAF-1의 mRNA는 단지 비장, 폐, 그리고 정소에서만 발견된다<sup>23)</sup>. CD40의 신호전달물질로 알려진 TRAF-3의 mRNA는 CD40이 발현되는 B-세포주에서 특이적으로 발현된다<sup>24)</sup>. nTRAF에서는 크기가 약 2.5 kb되는 mRNA가 모든 세포주에서 골고루 나타나는 양상을 보였다. 특히 Raji 세포와 K-562와 같은 임파종, 백혈병과 같은 면역반응에 관여하는 세포주에서 많이 발현되는데, 이는 nTRAF가 이들 세포주에서 TNF 수용기의 신호전달체계에 관여하는 주요한 물질일 것으로 시사된다. 앞으로 일반 사람의 여러 조직과 장기가 얻어지는대로 Northern Blot을 시행하여 각 조직과 장기별로 nTRAF의 mRNA의 발현정도를 파악하게 되면 이 새로운 물질의 기능을 규명하는데 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

Cytokine은 세포분화 과정의 후반부에 발현되는 전사인자의 활성을 변환함으로써 유전자의 발현을 변화시키는 과정에 관여한다<sup>1)</sup>. TNF는 다양한 세포성, 바이

러스성 유전자의 발현을 조절하는 Rel군(핵전사인자 중의 하나)에 속하는 핵전사 물질인 NF- $\kappa$ B의 유도체로서 작용한다. 이러한 TNF는 2개의 서로 다른 세포 표면 수용기인 TNFR-1(약 55kD)과 TNFR-2(약 75kD)와 결합하여 매우 다양한 염증반응과 면역조절반응을 기시한다. 이들 2개의 TNF 수용기는 TNF에 의해 독립적으로 NF- $\kappa$ B의 활성을 매개하며<sup>11)</sup>, 최근에는 TNFR-2의 신호전달에 관여하는 2개의 신호전달물질이 클로닝되었다. 이들은 TRAF-1, TRAF-2이며 카복실 말단부위에 TRAF domain이라는 공유하는 부위가 있다<sup>23)</sup>. TRAF-2의 동질복합체와 TRAF-1, TRAF-2의 이질복합체는 TNFR-2의 세포내 부위와 결합하여 TNF의 신호전달과 NF- $\kappa$ B의 활성화에 관여한다. 또한 세번째 TRAF domain을 소유한 TRAF-3 [혹은 CD40bp, CRAF1, LAP1]<sup>24)</sup>은 또다른 TNF 수용기 superfamily중 하나인 CD40의 세포내 부위와 상호결합하여 NF- $\kappa$ B의 활성을 유도한다<sup>33)</sup>. TRAF 단백질이 TNF 수용기 superfamily에 속하는 구성군의 세포내 물질의 신호전달체계에 미치는 역할을 알기 위하여 TNFR-2와 CD40이 발현되는 세포에서 Rothe 등 (1995)<sup>17)</sup>은 TRAF-2를 과발현시켰을 때 TRAF-1이나 TRAF-3와는 달리 핵전사물질인 NF- $\kappa$ B가 활성화되었으며, 아미노산 말단부위의 RING finger 부분을 소유하지 않은 TRAF-2를 과발현시켰을 때에는 TNFR-2와 CD40의 신호가 전달되지 않는 것으로 보아 TRAF-2가 이들 수용기의 공통적인 신호전달물질이라는 것을 알았다. 본 실험을 통해 새로 클로닝한 nTRAF가 신호전달물질로 작용하는 지를 알기 위하여는 핵전사 물질인 NF- $\kappa$ B의 활성을 electoro-phoretic mobility shift assay를 통해 계속 연구해야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

Tumor necrosis factor 수용기의 세포내 신호전달경로에 관여하는 단백질인 TNF receptor-associated factor (TRAF)군에 속하는 새로운 물질을 클로닝하기 위하여 Expression sequence tag(EST)를 이용하여 470개의 아미노산과 분자량이 53 kD인 새로운 단백질인 nTRAF를 클로닝하였다.

1. nTRAF는 TRAF family에 속하는 새로운 단백질이다.
2. nTRAF의 아미노 말단부위에는 RING finger 부위와 7개의 반복되는 zinc finger motif를 가지고 있고, 카복실 말단부위에는 TRAF domain을 간직하였다.



3. nTRAF는 0.5 kb 정도의 크기를 가진 mRNA가 promyelocytic leukemia 세포주인 HL60에서 극소량으로 발현되는 것이외에는 모든 세포주에서 골고루 발현되었다. 특히 Burkitt's lymphoma 세포주인 Raji 세포와 chronic myelogenous leukemia 세포주인 K-562 세포주에서 다량으로 발현되었다.

## 참고문헌

1. Tracey, K.J. and Cerami, A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 317-343 (1993).
2. Vassalli, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 411-452 (1992).
3. Vilcek, J. and Lee, T.H. TNF: New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J. Biol. Chem.* 266: 7373-7386 (1991).
4. Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S. and Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-lined insulin resistance. *Science* 259: 87-91 (1993).
5. Brennan, F.M., Maini, R.N. and Feldmann, M. TNF- $\alpha$  : A pivotal role in rheumatoid arthritis. *Brit. J. Rheumatol.* 31: 293-298 (1992).
6. Tracey, K.T., Beutler, B., et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234: 470-474 (1986).
7. Sugarman, B., Aggarwal, B., Hass, P., Figari, I., Palladino, M.A. Jr. and Shepard, H.M. Recombinant human TNF: Effects on proliferation of normal and transformed cells. *Science* 230: 943-945 (1985).
8. Vilcek, J., Tsujimoto, M., Palombella, V.J., Kohase, M. and Le, J. Tumor necrosis factor: receptor binding and mitogenic action on fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 5:57-61 (1987).
9. Mackiewicz, A., Ganapathi, M.K., Schultz, D., Samols, D., Reese, J. and Kushner, I. Regulation of rabbit acute phase protein biosynthesis by monokines. *Biochem. J.* 253: 851-857 (1988).
10. Leibovich, S.J., Polverine, P.J., Shepard, H.M., Wiseman, D.M., Shively, V. and Nuseir, N. Macrophage-induced angiogenesis mediated by TNF- $\alpha$ . *Nature* 329: 630-632 (1987).
11. Tartaglia, L.A. and Goeddel, D.V. Two TNF receptors. *Immunol. Today* 13: 151-153 (1992).
12. Tartaglia, L.A., Weber, R.F., Figari, I.S., Reynolds, C., Palladino,

- M.A., and Goeddel, D.V. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9292-9296 (1991).
13. Rothe, J., Gehr, G., Loetscher, H., and Lesslauer, W. Tumor necrosis factor receptors- structure and function. *Immunol. Res.* 11: 81-90 (1992).
  14. Tartaglia, L.A., Goeddel, D.V., Reynolds, C., Figari, I.S., Weber, R.F., Fendly, B.M., and Palladino, M.A. Stimulation of human T cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J. Immunol.* 151: 4637-4641 (1993).
  15. Gehr, G., Gentz, R., Brockhaus, M., Loetscher, H., and Lesslauer, W. Both tumor necrosis factor receptor types mediate proliferative signals in human mononuclear cell activation. *J. Immunol.* 149: 911-917 (1992).
  16. Vandenableele, P., Declercq, W., Vercammen, D., Van de Craen, M., Grooten, J., Loetscher, H., Brockhaus, M., Lesslauer, W., and Fiers, W. Functional characterization of the human tumor necrosis factor receptor p75 in a transfected rat/mouse T cell hybridoma. *J. Exp. Med.* 176: 1015-1024 (1992).
  17. Jacobsen, F.W., Rothe, M., Rusten, L., Goeddel, D.V., Smeland, E.B., Veiby, O.P., Slordal, L., and Jacobsen, S.E.W. Novel role of the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor: inhibition of early hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2245-2251 (1994).
  18. Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76: 959-962 (1994).
  19. Lewis, M., Tartaglia, L.A., Lee, A., Bennett, G.L., Rice, G.C., Wong, G.H.W., Chen, E.Y., and Goeddel, D.V. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is special specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2830-2834 (1991).
  20. Itoh, N., and Nagata, S. A novel protein domain required for apoptosis. *J. Biol. Chem.* 268: 10932-10937 (1993).
  21. Goodwin, R.G., Anderson, D., Jerzy, R., Davis, T., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Smith, C.A. Molecular cloning and expression of the type I and type II murine receptors for tumor necrosis factor. *Mol. Cell. Biol.* 11: 3020-3026 (1991).

22. Schall, T.J., Lewis, M., Koller, K.L., Lee, A., Rice, G.C., Wong, G.H.W., Gatanaga, T., Granger, G.A., Lentz, R., Raab, H., Kohr, W.J., and Goeddel, D.V. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61: 361-370 (1990).
23. Rothe, W. Wong, S.C., Henzel, W.J., Goeddel, D.V. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78: 681-692 (1994).
24. Hu, H.M., O'Rourke, K., Boguski, M.S., Dixit, V.M. A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J. Biol. Chem.* 269: 30069-30072 (1994).
25. Chonezynski, P., Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159 (1987).
26. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd. edition. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.* (1989).
27. Brockhaus, M., Schoenfeld, H-J., Schlaeger, E-J., Hunziker, W., Lesslauer, W. and Loetscher, H. Identification of two types of TNF receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3127-3131 (1990).
28. Hohmann, H-P, Remy, R., Brockhaus, M. and Van Loon, A.P.G.M. Two different cell types have different major receptors for human TNF. *J. Biol. Chem.* 264: 14927-14934 (1989).
29. Smith, C.A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M.P., Jerzy, R., Dower, S.K., Cosman, D., and Goodwin, R.G. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248: 1019-1023 (1990).
30. Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H.W., and Goeddel, D.V. A novel domain within the 55kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74: 845-853 (1993).
31. Freemont, P.S. The RING finger: a novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann. NY Acad. Sci.* 684: 174-192 (1993).
32. Schwabe, J.W.R., and Klug, A. Zinc mining for protein domains. *Nature Struct. Biol.* 1: 345-349 (1994).
33. Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.M., Goeddel, D.V. TRAF2-mediated activation of NF- $\kappa$ B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269:1424-1427 (1995).

## A study on the Cloning of a new member of tumor necrosis factor receptor-associated protein (nTRAF)

Huh, Nam-ki  
*Dept. of Dental Hygiene*  
*Kwangju Health College*

### > Abstract <

Several ring finger proteins that are associated with the cytoplasmic tails of members of tumor necrosis factor receptor(TNFR) superfamily have been identified. Because the TNFR-associated factors(TRAF) appear to be physically associated with the receptors, they are most likely to initiate receptor-mediated signaling. To date, three of such proteins are reported, named TRAF-1, TRAF-2 and TRAF-3(or CD40bp, CRAF-1, LAP-1). This study identified the fourth member of TRAF family called nTRAF from Expression sequence tag. The nTRAF which is composed of 470 amino acid is 40-50% similar to the other TRAF amino acid sequences. nTRAF contains a N-terminal ring finger domain and seven repeats of zinc finger motif, and a C-terminal TRAF domain, but does not contain isoleucine zipper domain. nTRAF-expressing mRNA is expressed ubiquitously in various cell lines, especially in Burkitt's lymphoma Raji, and chronic myelogenous leukemia K-562.