

## 아토피피부염 환자에서 프로테오믹스 기법을 이용한 혈청 자가항체와 반응하는 각질형성세포 단백의 발굴

오상호<sup>1</sup> · 정지인<sup>1</sup> · 이주희<sup>1</sup> · 하문경<sup>2,3</sup> · 이광훈<sup>1,2,3</sup>

연세대학교 의과대학 피부과학교실<sup>1</sup>, 피부생물학연구소<sup>2</sup>, 두뇌한국21 의과학사업단<sup>3</sup>

### Detection of Protein of Keratinocyte Reacting with Autoantibodies in Sera of Atopic Dermatitis Patients by Proteomics

Sang Ho Oh<sup>1</sup>, Jeanne Jung<sup>1</sup>, Ju Hee Lee<sup>1</sup>, Moon Kyung Ha<sup>2,3</sup>, and Kwang Hoon Lee<sup>1,2,3</sup>

Department of Dermatology<sup>1</sup>, Cutaneous Biology Research Institute<sup>2</sup> and Brain Korea 21 Project for Medical Science<sup>3</sup> Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Until now, the pathogenesis of atopic dermatitis has been explained by immunologic and environmental factors. Recently, autoimmunity theory emerged as a mechanism in pathogenesis of atopic dermatitis and many autoantigens have been discovered. IgE mediated hypersensitivity to autoantigen is thought to be an important aggravating factor for atopic dermatitis. In this paper, we would like to find out autoantigens in the epidermis that reacts with autoantibody in the sera of atopic dermatitis patients through proteomics and identify its characteristics and relationship. According to Hanifin and Rajka's classification, we collected 48 atopic dermatitis patients and 5 normal patients sera and performed ELISA to verify the existence of IgE and IgG autoantibody against proteins of cultured keratinocytes. As a result, in the group of atopic patient the titer of the IgE autoantibody was slightly higher. We sorted out serums which showed higher values in ELISA test and performed immunoblot against keratinocyte protein. Keratinocyte proteins of 45-65 kd that didn't react with sera of normal control reacted with IgE autoantibody in the patient group. Variable molecular size proteins of keratinocyte reacted with IgG antibody in sera of both patients and controls. To verify the 45-65 kd keratinocyte protein spot, we performed a 2-dimensional immunoblot using cultured keratinocyte protein. Through 2-dimensional immunoblot, we confirmed the site of the protein spot and found the protein by separating the site in the electrophoresis gel. Keratinocyte antigens which reacted with serum IgE autoantibody of atopic dermatitis patients were to be ATP synthase beta chain (56 kd, PI 5.3) and heat shock protein 60 (60 kd, PI 5.7). In this study, we observed the existence of autoantibodies to proteins of cultured keratinocytes in the sera of atopic dermatitis patients and identified autoantigens. These results will be used as fundamental data in understanding the pathogenesis of atopic dermatitis.

**Key words:** Atopic dermatitis, Proteomics, Autoantibody, ATP synthase, Heat shock protein 60

저자연락처 : 이 광 훈, (120-752) 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 피부과학교실,

Tel: 02) 361-5720 / Fax: 02) 393-9157 / E-mail: kwanglee@yumc.yonsei.ac.kr

\* 본 논문은 2003년도 연세대학교 두뇌한국21 의과학사업단과 산업체 대응자금(한국 후지사와 약품)에 의하여 지원되었음.

## 서 론

아토피피부염(atopic dermatitis)은 심한 소양증과 특징적인 피부 소견을 보이는 만성, 재발성, 염증성 질환으로 보고에 따라 많은 차이가 있으나 유소아기에 약 9-12%에서 발생한다<sup>1-3</sup>. 최근 들어 사회의 공업화, 산업화에 따른 환경 오염, 생활 습관의 변화, 유전적 영향 등에 의해 아토피피부염의 발병률이 점차 증가되는 추세를 보이고 있다<sup>4,5</sup>. 현재까지 아토피피부염의 병인으로는 유전적 배경과 면역학적 기전, 환경적 요인 등의 다양한 인자가 복합되어 있는 것으로 생각하고 있다<sup>6,7</sup>. 유전적 소인, Th1/Th2 세포간의 불균형, 랑게르하스세포 자극 증가, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 등의 사이토카인 체계 이상, 프로스타글란딘 대사 장애, 각질 세포의 내인적 이상, 호산구의 세포고사(apoptosis) 저연, 표피 지방 대사의 장애, 초항원의 역할 등이 병인과 관련이 있는 것으로 알려져 있지만 주된 발병 기전이 무엇인지는 아직 밝혀져 있지 않다<sup>8-12</sup>.

최근 자가항원에 대한 자가면역설 등이 아토피피부염의 병인으로 대두되면서<sup>13</sup> 지난 10년 동안 분자 생물학적인 방법으로 IgE에 반응하는 여러 가지 자가항원이 알려졌고 이러한 자가항원에 대한 IgE 매개성 과민반응이 아토피피부염을 일으키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다<sup>14,15</sup>. 아토피피부염의 자가 면역 발병 기전으로 두 가지가 제시되었는데, 하나는 자가 항원이 작용세포에 붙어있는 IgE 자가 항체에 교차결합을 하여 염증매개 물질을 분비함으로써 즉시형 반응을 일으킨다는 것이다. 또 다른 기전은 자가항원에 대한 IgE의 발생이 자가반응성 T세포를 자극하여 사이토카인을 분비하고 지연형 면역반응이 나타난다는 것이다<sup>15</sup>. 이러한 자가항체는 환경적인 외부 항원이 없을 때라도 아토피피부염을 만성적으로 지속시키게 된다.

1990년대 이후 환경 알레르겐에 대한 cDNA 염기서열을 알게되고 cloning 함으로써 항원의 분자구조에까지 연구의 영역이 미치게 되었고 그 결과 환경 내 항원과 사람의 단백질 사이에 구조적으로나 기능적으로 많은 유사성이 확인되었다. 자작나무의 꽃가루에 들어있는 프로필린과 사람의 프로필린은 구조가 유사하여 항체의 교차반응을 일으킬 가능성이 제시되었다<sup>16</sup>. 진균의 일종인 *Aspergillus fumigatus*의 Manganese superoxide dismutase와 ribosomal P-2 protein에 대한 피부반응 검사에 양성을 보인 환자들이 사람의 동일물질에 대해서도 체액, 세포성 면역반응을 보이는 것을 확인하였다<sup>17,18</sup>. 연구보고에 의하면 아토피피부염의 환자에서 항핵 항체를 검출하였는데 양성률이 25-35%를 차지하는 것으로 나타났다. 항핵항체는 여성에서 양성률이 높았고 주로

speckled, 또는 homogeneous 형태가 많은 것으로 알려져 있다<sup>19,20</sup>. 또 다른 자가항체로 핵단백질인 dense fine speckles 70 kd항원(DFS 70)에 대한 자가항체가 아토피피부염 환자의 30%에서 관찰되었다<sup>21</sup>. 사람 각질형성세포의 세포질에 존재하는 아토피피부염의 5가지 자가항원으로 *Hom s 1-5* 가 있는데 특히 *Hom s 1*에 대한 IgE 자가항체는 아토피피부염 환자에서만 존재하고 만성 두드러기, 전신성 홍반성 루푸스나 건강한 대조군 환자에서는 발견되지 않았다<sup>22,23</sup>.

1953년에 Francis Crick이 DNA 이중 나선구조를 발견한 이래 유전체 서열의 해독(genome sequencing)은 의학적 발전에 막대한 변화를 줄 것으로 믿었으나, 복잡하고 다양한 생물학적 변화를 이해하기에는 DNA만으로는 미흡하여 mRNA 표현을 분석하는 transcriptomics와 단백 분석에 대한 통합적 접근을 위한 프로테오믹스(proteomics)로 발전하게 되었다<sup>24</sup>. DNA는 단백에 비해 분석이 쉽고, 합성 및 증폭이 용이하며 결과 분석에 대한 효과적인 software가 존재하므로 각광을 받아왔으나, mRNA, 단백의 기능과는 관련성이 결여되어 있고, 중요기능을 하는 단백이 극소량의 mRNA에서 코드화되며, 단백의 활성도는 전사 후 변형(post-transcriptional modification) 등 여러 과정에 의해 조절된다는 단점으로 유전자의 실제 표현과 단백의 기능을 알아내는 데 제한이 된다<sup>25-27</sup>. 이에 따라 Wilkins 등은 1996년에 '계놈(genome)'에 대한 새로운 개념으로 '프로테옴(proteome)'이란 단어를 사용하였으며, 생물학적 변화를 규명하기 위해 유전자의 발현을 단백을 이용하여 양적으로 측정하는 학문인 프로테오믹스가 발달하게 되었다<sup>28,29</sup>.

프로테오믹스는 이차원 전기영동(two dimensional (2-D) gel electrophoresis), 영상 분석(image analysis), mass spectrometry, 아미노산 서열 분석(amino acid sequencing), bioinformatics를 기초로 하는데 이를 방법으로 복합된 단백질에서 소량의 단백을 빠르게 분리하여 그 중 관심있는 단백만을 추출하여 통합적인 특성을 규명할 수 있다<sup>30-32</sup>. 이는 genomics에 보조적 역할을 하여 질환의 병인을 알아내고, 유전자의 기능을 규명함으로써 질병의 진단 및 치료제 개발에 이용할 수 있다<sup>33,34</sup>. 따라서 다양한 병인과 증상을 보이는 아토피피부염에서도 프로테오믹스 기법을 이용하면 아토피피부염의 병인규명에 도움이 될 것으로 생각된다.

현재까지 아토피피부염 환자에서 여러 가지 자가항원들이 밝혀졌지만 이들의 정확한 관련성과 치료까지 이를 활용하기에는 부족한 점이 많다. 따라서 본 연구에서는 아토피피부염을 비롯한 알레르기질환에서 많이 적용되지 않은 프로테오믹스란 새로운 연구 방법을 이용해 각질형성세포 단백에 대한 자가항체가 아토피피부염 환자의 혈청 내에 존재하

는지 관찰하고 그 항원을 규명함으로써 아토피피부염의 병인을 이해하는데 기초 자료를 제공하고자 한다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

연세대학교 의과대학 세브란스병원 알레르기 특수 진료소 및 피부과에 내원하여 임상적으로 Hanifin 및 Rajka의 기준<sup>35</sup>에 의해 아토피피부염으로 진단된 48명의 환자들을 대상으로 하였다. 아토피피부염 및 다른 알레르기성 질환의 과거력이나 가족력을 동반하지 않고 임상적으로 아토피피부염의 증거가 없는 정상인 5명을 정상 대조군으로 하였다.

아토피피부염 환자로부터 일반 혈액검사, 혈청 총 IgE치, 호산구수 등을 시행하였으며, 과거력 및 치료 병력을 의무기록을 통해 후향적으로 조사하였다. 아토피피부염 및 정상 대조군 환자에서 10 mL의 혈액을 채취하여 15 mL의 시험관에 끓긴 후, 상온에서 6시간 이상 방치하여 응고시키고 250 × g로 10분간 원침하여 혈청을 분리한 후 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 동결보관하였다. 피부 조직생검을 통해 얻어진 피부를 4°C dispase 용액에 24시간 방치하고 수술용 가위를 이용하여 일부 진피층을 제거한 뒤 PBS용액으로 씻어내었다. 0.025% trypsin 용액에 37°C에서 10분간 방치하고 수술용 가위로 표피만 얇게 떼어낸 뒤 insulin, hydrocortisone, ethanolamine, phosphoethanolamine, bovine hypothalamic extract 등이 포함된 MCDB153 (Kyokuto, Tokyo, Japan) 배지에 10일간 배양하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

아토피피부염 환자의 혈청중 배양된 각질형성세포 단백에 대한 자가항체가 포함된 혈청을 선별하기 위하여 ELISA를 시행하였다. 바닥이 편평한 폴리스티렌 microtiter plate의 각 well에 배양된 각질형성세포 단백질 1 µg씩을 넣고 각질형성세포에 대한 IgE, IgG 자가항체를 검출하기 위해 각각 1 : 2, 1 : 20으로 희석된 아토피피부염 환자의 혈청과 정상 대조군의 혈청 100 µL를 각 well에 넣고 37°C에서 한시간 반응시켰다. 이후 HBSS로 3회 세척한 peroxidase-conjugated goat anti-human IgE (Biosource, Camarillo, CA, USA)와 peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Biosource)를 5% 송아지 혈청이 함유된 HBSS로 1 : 1,000 희석시킨 용액과 실온에서 1시간 반응시켰다. HBSS로 3회 세척 후 상온의 암실에서 기질과 반응시켰다. 기질은 100 mg의 tetramethylbenzi-

dine (Sigma, St. Louis, MO, USA) 을 10 mL의 아세톤에 섞어 원액으로 만들며, 사용직전 원액 100 µL를 증류수 10 mL에 넣고 30% 과산화수소 1 µL를 넣고 잘 혼합한 다음 100 µL씩을 각 well에 넣었다. 8N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 µL씩을 떨어뜨려 반응을 중지시키고, ELISA reader (Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA, USA)로 450 nm에서 판독하였다.

#### 2) SDS PAGE와 면역 블롯법

배양된 각질형성세포를 EDTA/BSA로 분리 수집한 후 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 및 1% Triton-X 등이 함유된 완충액으로 얼음 속에서 30분간 반응시켜 용해시켰다. 4°C, 10,000 × g에서 30분간 원침시킨 후 상청액을 수집하여 동량의 젤전기영동 시료 완충액과 혼합한 다음, 10% polyacrylamide 구배젤에 넣고, 60 mA의 일정한 전류하에서 45-90분간 전기영동을 시행하였다. 젤을 분리하여 나이트로 셀룰로스 용지 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 전기영동적으로 전이시켰다. 블롯된 나이트로 셀룰로스 용지를 0.05% Tween 20-PBS로 3회 세척한 후 3% BSA를 작용시켜 비결합 부위를 차단시켰다. 상기의 ELISA 검사에서 높은 수치를 보인 아토피피부염 환자의 혈청을 정상인 혈청과 함께 실온에서 2시간 반응시킨 후 T-PBS로 세척하고 IgE와 IgG검출을 위해 각각 peroxidase-conjugated goat anti-human IgE (Biosource)와 peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Biosource)를 2시간 반응시켰다. 다시 0.05% T-PBS로 세척 후 diaminobenzidine (Sigma)을 섞은 용액에 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 µL를 넣어 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 PBS로 세척하여 각질형성세포 단백에 대한 반응을 관찰하였다.

#### 3) 시료 용해 및 재수화 (rehydration)

수집한 표피 100 µg을 pH 8.0의 1M Tris, 0.3% sodium dodecyl sulfate (SDS), 3% dithiothreitol이 함유된 용해 완충액 50 µL와 섞은 후 95°C에서 5분간 가열하였다. 전체시료를 5 M urea, 2 M thiourea, 2 mM tributyl phosphine, 2% 3-[3-cholamidopropyl] dimethylammonio]-1-propane-sulfonate, 0.2% carrier ampholyte, 40 mM Tris, 0.002% bromophenol blue dye 등이 함유된 젤 전기영동 시료 완충액 400 µL로 희석한 후, 20°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 수집하였다. 재수화 tray에 젤 전기영동 시료 완충액으로 희석하여 원심분리한 시료 400 µL를 넣고, 17 cm의 pH 4-7 non-linear immobilized pH gradient (IPG) strip (Amersham Pharmacia Biotech)을 공기방울이 생기지 않게 설치하고 24시간 방치하여 재수화시켰다.

#### 4) 이차원 젤 전기영동

재수화시킨 IPG strip은 IPG-phor (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 저전압으로부터 고전압에서 적절한 시간 처리하여 등전화 (isoelectric focusing: IEF) 시켰다. IEF 후에 IPG strip은 3.6 g의 urea, 2% SDS, 5M Tris 2 mL, 50% glycerol 4 mL, 25% acrylamide 1 mL, 200 mM TBP 250  $\mu$ L가 함유된 동질 완충액에서 25분간 동질화 (equilibration) 시켰다.

Polyacrylamide gel 제작을 위하여 1.875 M Tris buffer가 함유된 9% 완충액 40 mL와 40% stock acrylamide 45 mL, 중류수 115 mL를 혼합하고, 16% buffer 40 mL, 40% stock acrylamide 80 mL, 50% glycerol 80 mL를 혼합하였다. 12% polyacrylamide gel (21 cm  $\times$  21 cm  $\times$  1.5 mm)에 0.5% agarose, 0.001% bromophenol blue dye가 함유된 agarose 완충액을 넣고 IPG strip을 embedding시킨 후에 24.8 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS가 포함된 cathode running buffer를 넣었다. SDS-PAGE는 3 mA/gel의 전류로 2시간 prerun한 후, 15 mA/gel의 일정한 전류하에서 전기영동을 시행하였다.

#### 5) 이차원 면역블롯 및 단백 스팍 분리

전기영동이 끝난 젤을 나이트로 셀룰로스 용지 (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 500 mA 전류로 2시간 동안 semi-dry transfer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 전이시킨 다음 아토피피부염 환자의 혈청을 이용해 이차원 면역블롯을 시행하였다. 각질형성세포 단백에 대한 각 아토피피부염 환자 혈청의 이차원 면역블롯에서 유사한 양상을 보이는 단백 스팍만을 깨끗한 면도날을 이용하여 깨끗하게 잘라내고 50 mM ammonium bicarbonate 용액에서 5분간 그리고 아세토나이트릴을 이용하여 탈수시킨 후 스피드백 증발기에서 완전히 건조시켰다. 0.1  $\mu$ g의 트립신이 함유된 25 mM ammonium bicarbonate 용액에서 37°C, 16시간 처리를 한 후 트립틱 펫타이드를 여러 번 용출시키고 스피드백 증발기에서 완전히 건조시켰다.

#### 6) 질량분석기를 이용한 펫타이드 지문 획득

나이트로셀룰로오스가 함유된 포화된  $\alpha$ -CHCA ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)를 매트릭스로 이용하여 가검물과 섞어 Maldi plate에 점적 후 상온에서 완전히 건조시킨 다음 Maldi-Reflectron Tof (Micromass, Manchester, UK)를 이용하여 평균 40 - 50개별적인 레이저 샷으로 질량 스펙트럼을 얻었고, 내부 표준물질로서 소의 트립신 자가분해 펫타이드 피크 (m/z 842.50과 2211.10)를 이용하여 조정하였다.

#### 7) 펫타이드 지문을 이용한 정보검색

펫타이드 질량은 NCBI의 검색 알고리즘인 University of California San Francisco (UCSF)에서 제공되는 MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>)을 이용하여 정보검색을 시행하였으며 오차 한계 50 ppm을 사용하였다.

### 결 과

#### 1. 아토피피부염 환자의 임상양상 및 혈액학적 검사 소견

아토피피부염 환자는 남자 31명, 여자 17명으로 총 48명의 평균연령은 17.6세였고, 평균 유병기간은 10.9년이었다. 환자들의 평균 총 혈청 IgE 수치는 1639 U/mL였다. 평균 호산구수는 470/ $\mu$ L로 검사를 시행한 17명에서 증가된 양상을 보였다. 환자에서 시도된 치료법은 11명에서는 cyclosporine으로, 9명에서는 topical tacrolimus로 치료하였고 4명에서 집먼지 진드기에 대한 탈감작 치료를 시행하였다.

#### 2. 아토피피부염 환자의 혈청에서 배양된 각질형성세포 단백에 대한 IgE, IgG 자가항체의 검출빈도

각질형성세포 단백에 대한 ELISA 검사 결과, 아토피피부염 환자 혈청의 평균 흡광도는 IgE, IgG가 각각 0.035  $\pm$  0.036, 0.058  $\pm$  0.053으로 나타났고, 정상 대조군 혈청의 평균 흡광도는 IgE, IgG가 각각 0.020  $\pm$  0.01, 0.051  $\pm$  0.025로 나타났다. 아토피피부염 환자군에서 각질형성세포 단백에 대한 IgE 자가항체의 수치가 약간 높은 양상을 보였고 IgG 자가항체는 큰 차이를 보이지 않았다.

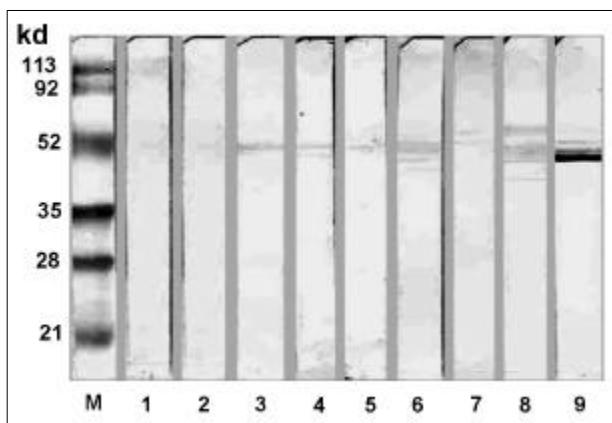
정상 대조군의 IgE, IgG 흡광도 평균치에 표준편차 3배수를 더한 값인 각각 0.050, 0.126 이상인 경우를 아토피피부염 환자 혈청내에 IgE, IgG 자가항체가 존재하는 것으로 판정 기준을 정했을 때, 아토피피부염 환자 중 각각 7명 (14.6%)이 정상 대조군에 비해 높은 흡광도를 보였다 (Table 1). 각질형성세포에 대한 IgE 자가항체가 발견된 환자 7명은 모두 항히스타민제와 스테로이드로 치료하던 환자였으며 면역조절요법은 시행하지 않았다. 또한 이들은 IgE 자가항체가 검출되지 않은 환자와 비교해볼 때, 임상양상과 혈액학적 검사 소견상 차이가 없었으며 IgE 자가항체의 유무와 총 혈청 IgE 수치 및 집먼지 진드기, 각종 음식물 항원에 대한 혈청 특이 IgE 수치와도 관련성이 없었다.

#### 3. 배양된 각질형성세포 단백에 대한 IgE, IgG 자가항체의 면역블롯 검사소견

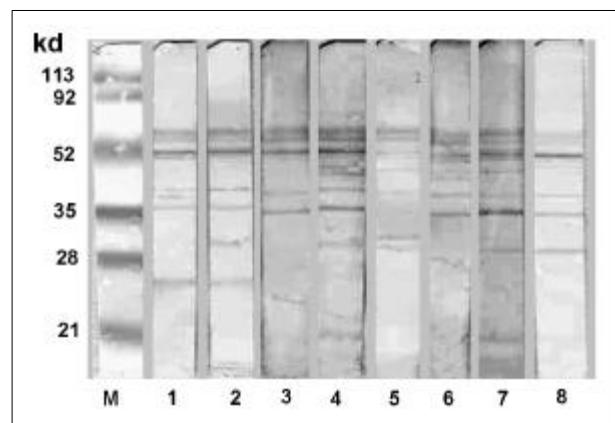
아토피피부염 환자 혈청이 배양된 각질형성세포의 어떤

**Table 1.** Frequency of IgE and IgG Autoantibodies to Protein of Cultured Keratinocytes in Sera of Atopic Dermatitis Patients

Group	Number of Samples	Frequency of IgE against Keratinocyte Antigens (%)	Frequency of IgG against Keratinocyte Antigens (%)	Frequency of concurrent Presence of IgE and IgG against Keratinocyte Antigens (%)
Control	5	0 (0)	0 (0)	0(0)
Atopic dermatitis patients	48	7 (14.6)	7 (14.6)	5(10.4)



**Fig. 1.** Western blot analysis of 7 different atopic dermatitis patient sera and 2 normal control sera for detection of IgE autoantibody to protein of cultured keratinocyte. M: marker, 1,2: normal control sera, 3-9: atopic dermatitis patient sera shown higher values in ELISA test.



**Fig. 2.** Western blot analysis of 7 different atopic dermatitis patient sera and 1 normal control serum for detection of IgG autoantibody to protein of cultured keratinocyte. M: marker, 1: normal control serum, 2-8: atopic dermatitis patient sera shown higher values in ELISA test.

단백과 반응하는지를 알아보기 위하여 배양된 각질형성세포를 이용하여 젤 전기영동을 시행하고 정상 대조군과 ELISA 검사에서 흡광도가 높게 나온 아토피피부염 환자의 혈청을 이용하여 면역블록을 시행하였다. 아토피피부염 환자에서 배양된 각질형성세포 단백질에 대한 IgE 자가항체를 확인한 결과, 정상 대조군에서는 나타나지 않는 42-62 kd 사이의 단백 스팟이 나타났다(Fig. 1). 각질형성세포 단백질에 대한 IgG 자가항체를 확인한 결과, 정상 대조군과 아토피피부염 환자간에 유사한 단백 스팟이 나타났다(Fig. 2).

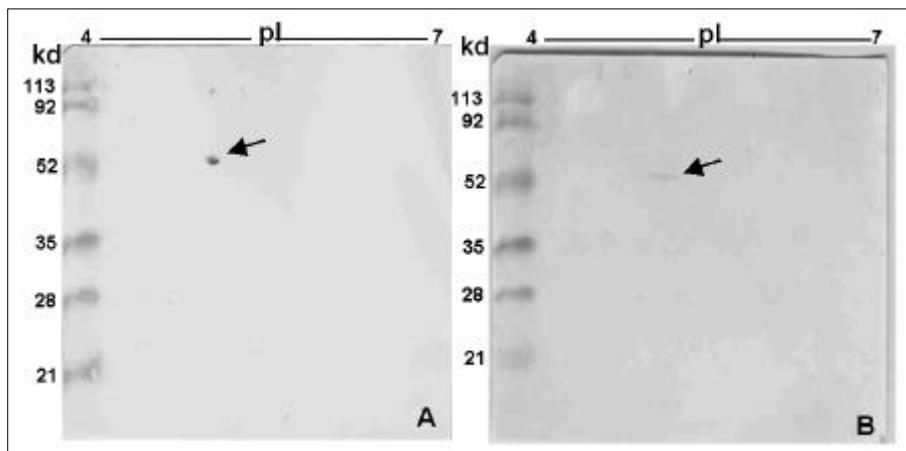
#### 4. 각질형성세포 단백에 대한 IgE 자가항체의 이차원 면역블록 검사소견

각질형성세포 단백에 대한 IgE 자가항체를 검출하기 위한 면역블록에서 정상 대조군에서는 나타나지 않고 아토피피부염 환자군에서만 관찰되는 단백을 규명하기 위해 이차원 면역블록을 시행하였다. 각질형성세포 단백을 이차원 전기영동을 시행하고 아토피피부염 환자 혈청으로 이차원 면역블록을 시행한 결과, 앞의 결과와 같이 정상 대조군에서는 반

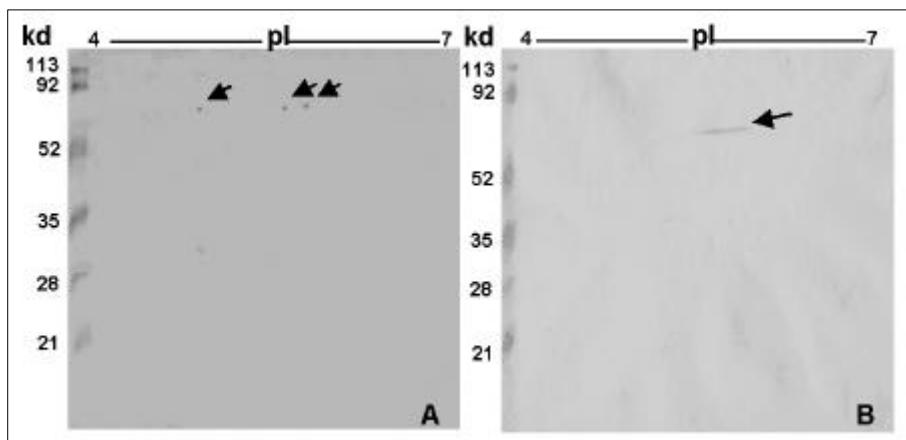
응하지 않는 단백 스팟이 관찰되었다. 이 중 두 명의 환자군에서는 분자량 52 - 60 kd, 등전점 5 - 6 가량의 유사한 단백 스팟이 나타났고 (Fig. 3), 또 다른 두명의 환자군에서 분자량 55 - 65 kd, 등전점 5.5 - 6의 유사한 단백 스팟이 관찰되었다 (Fig. 4).

#### 5. 아토피피부염 환자 혈청과 반응하는 각질형성세포 단백의 분리 및 분석 결과

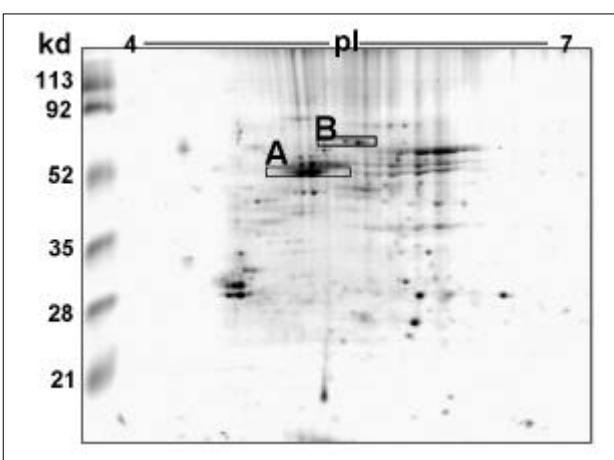
아토피피부염 환자의 혈청과 각질형성세포 단백 간의 반응으로 여러 단백 스팟이 나타났지만 이중 환자들에서 유사하게 나타나는 단백 스팟을 동정하기로 하였다. 배양된 각질형성세포 단백의 프로테옴 지도에서 해당되는 스팟 (Fig. 5)을 잘라낸 후 질량 분석기를 이용하여 펩타이드 지문을 얻어내었다. NCBI 검색 알고리즘인 UCSF에서 제공되는 MS-Fit를 이용하여 획득한 펩타이드 지문에 대해 정보검색을 하였다. 하나의 단백 스팟은 56 kd, 등전점 5.3의 ATP synthase beta chain으로 동정되었고 총 30개의 펩타이드 중 16개가 30 ppm 내에서 일치하였고, 34%의 높은 서열 적용 범위를



**Fig. 3.** On 2-D immunoblotting, protein spot in the range of 52-60 kd and pl 5-6 reacted with IgE autoantibody of two atopic dermatitis patient sera. A, B: atopic dermatitis patient serum (respectively '8' patient of Fig. 1. and '9' patient of Fig. 1).



**Fig. 4.** On 2-D immunoblotting, protein spot in the range of 55-65 kd and pl 5.5-6 reacted with IgE autoantibody of two atopic dermatitis patient sera. A, B: atopic dermatitis patient serum (respectively '3' patient of Fig. 1, and '4' patient of Fig. 1).



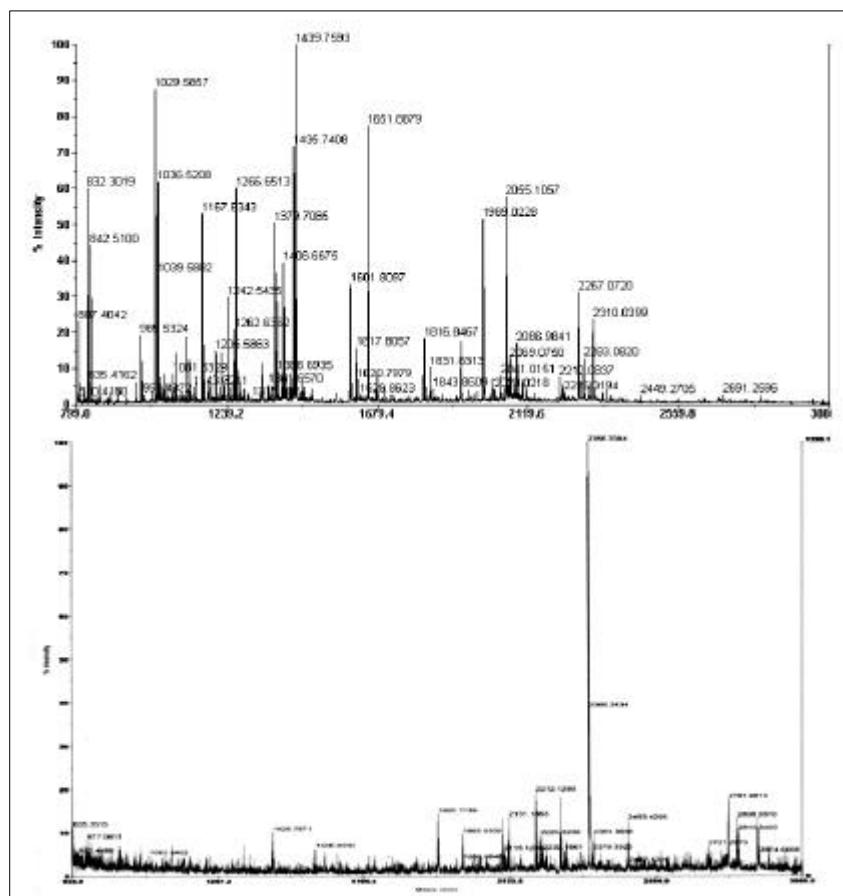
**Fig. 5.** 2-D gel electrophoresis of cultured keratinocytes after isoelectric focusing on an 17-cm, pH 4-7, non-linear immobilized pH gradient strip. A: protein spot in the range of 52-60 kd and pl 5-6, B: protein spot in the range of 55-65 kd and pl 5.5-6.

보였다 (Fig. 6A). 또 다른 하나의 단백 스팟은 60 kd, 등전점

5.7의 heat shock protein 60으로 동정되었고 총 28개의 펩타이드 중 11개가 30 ppm내에서 일치하였고 39%의 높은 서열 적용 범위를 보였다 (Fig. 6B).

## 고 찰

아토피피부염은 주로 유소아기에 나타나기 시작하여 성인기까지 지속되는 만성 질환으로 그 유병률이 매우 높다. 아토피피부염의 여러가지 병인들이 제시되고 있는데 그 중심한 아토피피부염 환자에서 즉시형 피부 반응이 유발되고 이러한 피부 반응이 혈청으로 수동적으로 전달될 수 있다고 보고되면서, IgE 자가반응성이 심한 만성 아토피피부염 환자에서 중요한 병인으로 작용할 것이란 개념이 생기게 되었다<sup>36</sup>. 이후 여러가지 환경 알레르겐이 사람의 단백과 유사한 구조와 면역성을 지니는 것으로 나타났고 심하고 만성적인 아토피피부염 환자에서 다양한 단백에 대한 IgE 자가항체가 존재하는 것이 밝혀졌다<sup>16,17</sup>. 현재까지 알려진 아토피피부염의 자가항원은 세포 내 단백으로 손상되지 않은 세포 내에



**Fig. 6.** Peptide fingerprinting obtained by mass spectrometry of protein spots that showed a strong positive reaction to IgE autoantibody in sera of atopic dermatitis patients. A: The peaks shown on the peptide fingerprint correspond to ATP synthase beta chain, B: The peaks shown on the peptide fingerprint correspond to heat shock protein 60.

서는 체액성 면역의 공격대상이 되지 않는 것이 원칙이다. 즉 어떤 자극에 의해 유발된 세포 파괴로 인해 혈중으로 분비되거나 세포 표면으로 노출되는 항원에 대해 자가 항체가 발생하는 것으로 생각되어진다<sup>33</sup>. 자가항체는 아토피피부염 발생의 직접적인 원인은 아니지만 자가 항원에 의해 비정상적인 면역반응을 유발시켜 만성적인 아토피피부염을 만들어내는데 역할을 하게된다<sup>37</sup>. 자가항원에 대한 IgE의 존재는 심한 증상과 연관되며 흡입 항원에 노출이 많아지는 계절에 그 양이 증가되는 경향이 있다. 또한 항체는 혈청 전기영동을 시행하였을 때 인간의 항원에 반응할 뿐만 아니라 이와 비슷한 구조를 가진 꽃가루나 진균항원 등과도 반응한다. 즉 이런 환경 항원에 대해 친화성이 큰 것을 볼 때 이들 항체는 본래 환경항원에 대한 방어로 생산되어 자가 항원을 공격하게 되는 것으로 생각된다<sup>38</sup>.

유전자와 단백의 이해에 대한 새로운 방법으로 프로테오믹스가 최근 대두되고 있으며, 이를 이용하여 여러 질환의 병인 규명과 진단, 치료에 유용한 생화학적 표지자를 알 수 있게 되었다<sup>33</sup>. 아토피피부염의 연구에서 프로테오믹스가 널

리 적용된 바가 적으며 아토피피부염의 IgE 자가항체를 찾아내기 위한 방법으로도 사용된 예가 없다. 현재까지 아토피피부염 환자에서 자가항체를 찾는 방법으로는 환경 알레르겐의 cDNA를 cloning하여 환자의 혈청 IgE에 반응하는 자가항원을 규명하는 것이었다. 이를 통해 발견된 주요 자가항원은 *Hom s 1*~5번까지로 *Hom s 1*은 피부에 주로 분포하는 항원이고 특히 표피에 분포하는 것으로 되어있으며 식도 편평세포암 환자의 cytotoxic T 세포에 의해 인식되는 SART-1과 유사한 구조를 가지는 것으로 알려져 있다. *Hom s 1*은 분자량이 125 kd으로 알려져 있고 유전자 재조합된 단백은 73 kd이며 재조합 된 단백에 대한 자가항체가 반응하는 조직내 단백질은 55 kd인 것으로 알려져 있다<sup>22</sup>. 아토피피부염에서는 *Hom s 1*에 대한 IgE 자가항체가 피부에 염증반응을 유발시키는 역할을 할 것으로 생각되고 있다<sup>22</sup>. *Hom s 2*는 세포내 단백의 핵내로 이동에 관계하는 cotranscriptional factor로 작용하고 human nascent polypeptide-associated complex ( $\alpha$ -NAC)로 불리운다. 이는 진균, 식물, 동물, 세균의  $\alpha$ -NAC와 구조가 유사하며<sup>23</sup> 아토피피부염 환자의 말초혈액

단핵구를 증식을 유발하는 것이 밝혀져 아토피피부염의 만성적인 피부증상을 만들어 내는데 *Hom s 2*가 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다<sup>39</sup>. *Hom s 5*는 사람의 cyto-keratin type II로 나타났으며 아직까지 연관성은 많이 밝혀지지 않은 상태이다<sup>23</sup>. 이와 같이 아토피피부염과 연관된 다양한 자가항원이 밝혀지고 있으며 많은 연구가 진행되고 있다.

각질형성세포에 대한 IgE 자가항체가 검출된 7명의 환자에서 임상 양상, 일반 검사 소견, IgE 수치, RAST 소견 등에서 자가항체 미검출 환자에 비해 특이한 차이점은 관찰되지 않았다. 그러나 실험대상 환자와 자가항체 검출 환자의 수가 너무 적어, 본 연구의 결과만으로 속단하기는 어려우며 향후 좀더 많은 환자군을 대상으로 이에 대한 평가가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구를 통해 밝혀진 아토피피부염 환자의 혈청 IgE에 대한 각질형성세포의 자가항원은 ATP synthase beta chain과 heat shock protein (HSP) 60으로 모든 아토피피부염 환자의 혈청에서 이에 대한 IgE 자가항체가 발견되지는 않았지만 일부 환자들에서 공통적으로 발견되었다. ATP synthase는 동, 식물 등 모든 개체에서 에너지를 생성하는데 필수적인 효소로써 보통 미토콘드리아에 많이 존재하고 산화적 인산화 과정을 통해 ATP를 합성하게 된다. ATP synthase의 기본적 구조는 membranous F0 (ab2c10-14)와 membrane-extrinsic F1 ( $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ )으로 구성되고 효소의 촉매작용을 하는 catalytic core는  $\alpha\beta\gamma$ 로 구성된다. 특히  $\beta$  chain이 ATP와 ADP의 결합부위가 되고 ATP의 합성과 분해에 있어 촉매작용을 하는 부위이다<sup>40,41</sup>. 최근 예후가 좋지 않은 간암에서 면역치료를 시도할만한 종양 항원을 찾기 위해 프로테오믹스 기법으로 간암환자에서 간암세포에 대한 자가항체를 조사한 결과 8가지 항원에 대한 자가항체가 발견되었는데 그 중에 하나의 항원이 ATP synthase beta chain이었다<sup>42</sup>. 이외에 ATP synthase가 자가항원으로 발견된 질환은 없었으며 아토피피부염에서도 관련성이 발견된 보고는 없다.

본 연구에서 밝혀진 HSP는 일종의 스트레스 단백으로 원핵세포에서부터 유핵세포까지 잘 유지되어 있고 외부의 스트레스에 대해 세포를 보호하고 세포 내 단백의 결합, folding, 이동에 관여하는 등 세포의 기능을 유지하는데 필수적이다<sup>43</sup>. 이는 heat 뿐만 아니라 산화 스트레스, 중금속, glucose 유사체, protein kinase C, 허혈, 세균감염, 바이러스 감염, 호르몬, 항생제, cytokine 등 다양한 자극에 의해 발현되게 된다<sup>44,45</sup>. 주로 세포질, mitochondria, endoplasmic reticulum, 핵 등 의 부위에 존재하고 분자량에 따라 다양한 종류로 나뉘어진다<sup>45</sup>. HSP60 family에는 포유류의 HSP60, 결핵의 mHSP65, chlamydia의 cHSP60, *E. coli*의 GroEL이 모두 포함된다. 이

들 간에는 계통학적으로 구조가 잘 유지되고 서로 유사한 측면이 있어 서로 면역학적으로 교차반응이 일어날 수 있다. 또한 다른 종류의 heat shock protein과도 교차반응이 발생할 수 있어 여러 가지 질환의 병인을 설명하는데 HSP가 중요한 위치를 차지하고 있다<sup>46</sup>. 특히 HSP60은 동맥경화증 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 세균 감염에 대한 숙주의 면역반응이 세균과 사람 HSP60 간의 유사성에 의해 혈관내피세포에 표현된 HSP60을 공격하여 동맥경화증이 유발된다는 것이다<sup>46,47</sup>. Chlamydia 감염 후에 발생하는 불임과 유산 역시 chlamydia의 cHSP60에 대한 면역반응과 사람의 HSP60이 교차반응을 일으켜 나타나는 것으로 설명되고 있다<sup>48,49</sup>. 전신성 홍반성 루푸스와 다른 류마티스 질환, 그레이브병, 하시모토 갑상선염 등 여러 자가면역질환에서도 HSP에 대한 자가항체가 발견되고 질환과의 관련성이 얘기되어지고 있다<sup>47,50</sup>. 또한 베체트병<sup>51</sup>, 건선, 지루성 피부염<sup>52</sup> 등 여러가지 염증성 피부질환에서 각질형성세포와 림프구에 HSP의 발현이 증가되며 이것이 병인으로 작용할 것이라고 생각되고 있다. 최근 한 보고에 따르면 아토피피부염 환자군이 접촉피부염 환자군과 정상 대조군에 비해 각질형성세포와 침윤된 림프구에서 HSP65, HSP72/73의 발현이 많고 증상이 심한 경우 발현이 더 증가된 것으로 나타났다<sup>53</sup>. 이렇게 증가된 HSP는 각질형성세포에서 cytokine의 생성을 자극하고 CD4+, CD8+ T 세포를 통해 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  등의 cytokine 생성을 자극하여 아토피피부염을 악화시키는 것으로 생각하고 있다<sup>55</sup>.

이와 같이 아토피피부염에서 HSP 자체가 아토피피부염을 악화시키는 요인으로 작용할 수 있고 본 연구에서 HSP60에 대한 IgE 자가항체가 발견된 것처럼 증가된 HSP가 혈중으로 유리된 뒤 이에 대해 IgE 자가항체가 형성되면 역시 아토피피부염이 만성적으로 지속되도록 할 수 있을 것으로 생각된다. 하지만 HSP에 대한 자가항체가 단지 증가된 HSP에 대해 이차적으로 형성된 것이고 아토피피부염의 병인과는 크게 상관성이 없을 수 있으므로 본 연구에서 발견된 자가항원과 아토피피부염과의 상관관계에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Kristal L, Klein PA. Atopic dermatitis in infants and children. Ped Dermatol 2000;17:877-95
- Larsen FS, Hanifin JM. Secular change in the occurrence of atopic dermatitis. Acta Dermatol Venereol(Stockh) 1992;176: 7-12

3. Larsen FS. *Atopic dermatitis: a genetic-epidemiological study in a population-based twin sample.* J Am Acad Dermatol 1993;28:719-23
4. Taylor B, Wadsworth J, Wadsworth M, Peckham C. *Changes in the reported prevalence of childhood eczema since 1938-45 war.* Lancet 1984;2:1255-7
5. Wollenberg A, Kraft S, Oppel T, Bieber T. *Atopic dermatitis: pathogenetic mechanisms.* Clin Exp Dermatol 2000;25:530-4
6. Wollenberg A, Bieber T. *Atopic dermatitis: from genes to skin lesions.* Allergy 2000;55:205-13
7. Novak N, Bieber T. *The skin as a target for allergic diseases.* Allergy 2000;55:103-7
8. Kevin DC. *Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy.* J Invest Dermatol 1994;102:128-37
9. Coleman R, Trembath RC, Harper JI. *Genetic studies of atopy and atopic dermatitis.* Br J Dermatol 1997;136:1-5
10. Schaefer L, Kragballe K. *Abnormalities in epidermal lipid metabolism in patients with atopic dermatitis.* J Invest Dermatol 1991;96:10-5
11. Abeck D, Mempel M. *Staphylococcus aureus colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications.* Br J Dermatol 1998;139:13-6
12. Leung DYM, Sorter NA. *Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis.* J Am Acad Dermatol 2001;44: S1-12
13. Muro Y. *Autoantibodies in atopic dermatitis.* J Dermatol Sci 2001;25:171-8
14. Appenzeller U, Meyer C, Menz G, Blaser K, Crameri R. *IgE-mediated reactions to autoantigens in allergic diseases.* Int Arch Allergy Immunol 1999;118:193-6
15. Valenta R, Seiberler S, Natter S, et al. *Autoallergy: a pathogenetic factor in atopic dermatitis?* J Allergy Clin Immunol 2000;105:432-7
16. Valenta R, Duchene M, Pettenburger K, et al. *Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals.* Science 1991;253:557-60
17. Crameri R, Faith A, Hemmann S, et al. *Humoral and cell-mediated autoimmunity in allergy to Aspergillus fumigatus.* J Exp Med 1996;184:265-70
18. Mayer C, Appenzeller U, Seelbach H, et al. *Humoral and cell-mediated autoimmune reactions to human acidic ribosomal P2 protein in individuals sensitized to Aspergillus fumigatus P2 protein.* J Exp Med 1999;189:1507-12
19. Tada J, Toi Y, Yoshioka T, Fujiwara H, Arata J. *Antinuclear antibodies in patients with atopic dermatitis and severe facial lesions.* Dermatology 1994;189:38-40
20. Ohkouchi K, Mizutani H, Tanaka M, Takahashi M, Nakashima K, Shimizu M. *Anti-elongation factor-1a autoantibody in adult atopic dermatitis patients.* Int Immunol 1999;11:1635-40
21. Ochs RL, Muro Y, Si Y, Ge H, Chan EM, Tan EM. *Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions.* J Allergy Clin Immunol 2000; 105:1211-20
22. Valenta R, Natter S, Seiberler S, et al. *Molecular characterization of an autoallergen, Hom s 1, identified by serum IgE from atopic dermatitis patients.* J Invest Dermatol 1998; 111:1178-83
23. Natter S, Seiberler S, Hufnagl P, et al. *Isolation of cDNA clones coding for IgE autoantigens with serum IgE from atopic dermatitis patients.* FASEB J 1998;12:1559-69
24. Denis F. *Proteome in Perspective.* Clin Chem Lab Med 1998; 36:825-36
25. Anderson NL, Anderson NG. *Proteome and Proteomics : New technologies, new concepts and new word.* Electrophoresis 1998;19:1853-61
26. Anderson L, Seilhammer J. *A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver.* Electrophoresis 1997; 18:533-7
27. Dove A. *Proteomics: translating genomics into products?* Nature Biotechnol 1999;17:233-6
28. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, et al. *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it.* Biotechnol Genet Eng Rev 1995;13:19-50
29. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, et al. *From proteins to proteoms: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis.* Bio Technology 1996;14:61-5
30. O'Farrell PH. *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.* J Biol Chem 1975;250:4007-21
31. Scheele GA. *Two dimensional gel analysis of soluble proteins.* J Biol Chem 1975;250:5375-85
32. Gevaert K, Vanderkerckhove J. *Protein identification methods in proteomics.* Electrophoresis 2000;21:1145-54
33. Cunningham MJ. *Genomics and proteomics: the new millennium drug discovery and development.* J Pharmacol Toxicol Methods 2000;44:291-300
34. Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, et al. *Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities.* Lancet 2000;18: 1749-56
35. Hanifin JM, Rajka G. *Diagnostic features of atopic dermatitis.* Acta Derm Venereol(Stockh) 1980;S92:44-7
36. Hampton SF, Cooke RA. *The sensitivity of man to human dander, with particular reference to eczema (allergic dermatitis).* J Allergy 1941;13:63-76
37. Tan EM. *Autoantibodies as diagnostic markers and reporters on the nature of immunogenic autoantigens.* Immunologist 1999;7:85-92

38. Valenta R, Natter S, Seiberler S, et al. *Autoallergy: a pathogenetic factor in atopic dermatitis?* Curr Probl Dermatol 1999; 28:45-50
39. Mossabeb R, Seiberler S, Mittermann I, et al. *Characterization of a novel isoform of alpha-nascent polypeptide-associated complex as IgE-defined autoantigen.* J Invest Dermatol 2002; 119:820-9
40. Wilkens S, Zhou J, Nakayama R, Dunn SD, Capaldi RA. *Localization of the delta subunit in the Escherichia coli F(1)F(0)-ATPsynthase by immuno electron microscopy: the delta subunit binds on top of the F(1).* J Mol Biol 2000;295: 387-91
41. Dunn SD, McLachlin DT, Revington M. *The second stalk of Escherichia coli ATP synthase.* Biochim Biophys Acta 2000; 1458:356-63
42. Le Naour F, Brichory F, Misek DE, Brechot C, Hanash SM, Beretta L. *A distinct repertoire of autoantibodies in hepatocellular carcinoma identified by proteomic analysis.* Mol Cell Proteomics 2002;1:197-203
43. Hightower LE. *Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity.* Cell 1991;66:191-7
44. Welch WJ. *How cells respond to stress.* Sci Am 1993;268: 56-64
45. Kiang JG, Tsokos GC. *Heat shock protein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology.* Pharmacol Ther 1998; 80:183-201
46. Wick G, Perschinka H, Millonig G. *Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update.* Trends Immunol 2001;22:665-9
47. Wick G, Perschinka H, Xu Q. *Autoimmunity and atherosclerosis.* Am Heart J 1999;138:S444-9
48. Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS. *The role of heat shock proteins in reproduction.* Hum Reprod Update 2000;6:149-59
49. Witkin SS, Sultan KM, Neal GS, Jeremias J, Grifo JA, Rosenwaks Z. *Unsuspected Chlamydia trachomatis infection and in vitro fertilization outcome.* Am J Obstet Gynecol 1994; 171:1208-14
50. Ghoreishi M, Katayama I, Yokozeki H, Nishioka K. *Analysis of 70 kd heat shock protein (HSP70) expression in the lesional skin of lupus erythematosus (LE) and LE related diseases.* J Dermatol 1993;20:400-5
51. Pervin K, Childerstone A, Shinnick T, et al. *T cell epitope expression of mycobacterial and homologous human 65-kilodalton heat shock protein peptides in short term cell lines from patients with Behcets disease.* J Immunol 1993;151: 2273-82
52. Puig L, Fernandez-Figueras MT, Ferrandiz C, Ribera M, de Moragas JM. *Epidermal expression of 65 and 72 kd heat shock proteins in psoriasis and AIDS-associated psoriasisiform dermatitis.* J Am Acad Dermatol 1995;33:985-9
53. Ghoreishi M, Yokozeki H, Hua WM, Nishioka K. *Expression of 27 KD, 65 KD and 72/73 KD heat shock protein in atopic dermatitis: comparison with those in normal skin and contact dermatitis.* J Dermatol 2000;27:370-9
54. Marcatili A, Cipollaro de l'Ero G, Galdiero M, Folgore A, Petruillo G. *TNF-alpha, IL-1 alpha, IL-6 and ICAM-1 expression in human keratinocytes stimulated in vitro with Escherichia coli heat-shock proteins.* Microbiology 1997;143: 45-53
55. Griffiths CE, Voorhees JJ, Nickoloff BJ. *Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor.* J Am Acad Dermatol 1989;20:617-29