

## 아토피피부염 환자에서 인터루킨-12에 의한 CD4+ T 세포 단백 변화에 관한 프로테옴 분석

이효연<sup>1</sup> · 이주희<sup>2</sup> · 이광훈<sup>1,2,3</sup>

연세대학교 의과대학 두뇌한국 21 의과학사업단<sup>1</sup>, 피부과학교실<sup>2</sup>, 피부생물학연구소<sup>3</sup>

### Proteomic Approach to CD4+ T Cell Differentiation Protein by Interleukin-12 in Patients with Atopic Dermatitis

Hyo Youn Lee<sup>1</sup>, Ju Hee Lee<sup>2</sup>, and Kwang Hoon Lee<sup>1,2,3</sup>

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

The pathogenesis of atopic dermatitis is based on an inflammatory mechanism involving type 2 cytokines such as interleukin (IL)-4 and IL-13. CD4+ T cells in atopic dermatitis express predominantly T helper (Th)2 phenotype and they down-regulates IL-12R $\beta$ 2. IL-12 is a major cytokine in the differentiation of naive CD4+ T cells into Th1 cells. This mechanism is closely related with the expression of IL-12R $\beta$ 2. However, it remains unclear that IL-12 signaling mechanism in polarized Th2 cells. The aim of this study was to identify IL-12 responsiveness in CD4+ T cells of patients with atopic dermatitis using a proteomic tools. CD4+ T cells isolated from peripheral blood of patients with atopic dermatitis were treated with neutralizing anti-IL-4 antibody (200 ng/ml) and IL-12 (2 ng/ml) and parallel cultures of untreated cells were also prepared. On day 3, surface phenotype change was examined using IL-12R $\beta$ 2 antibody by FACS analysis and separate CD4+ T cells by two-dimensional electrophoresis (2-DE). About 1500 protein spots were detected in the 2-DE gels by modified silver staining. Several areas of the 2-DE map exhibited quantitative and qualitative changes after IL-12 treatment. Several regions including actins showed variations according to the samples. A group of three spots detected in the area of pI 6.0 - 10.0 with molecular weight about 40 kDa. In addition, decreased or increased spots were observed in the regions of pI 6.5 - 7.0 with molecular weight about 20 kDa. The identification of these spots must be established in further study in order to find targets regulated by IL-12 in CD4+ T cells of atopic patients.

**Key words :** Atopic dermatitis, Proteomics, CD4+ T cells, Interleukin-12

\* 본 논문은 2002년도 연세대학교 두뇌한국21 의과학사업단과 산업체 대응자료(아벤티스파마)에 의하여 지원되었음.

저자연락처 : 이광훈, (120-752) 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 피부과학교실

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

## 서 론

아토피피부염은 유소아에서 발생하여 나이에 따라 특징적인 임상양상이 변하며 재발되는 혼한 만성 염증성 질환이다<sup>1,2</sup>. 아토피피부염의 발병에는 유전적인 소인, 환경적 요인과 면역학적 이상 등 여러 인자가 복합적으로 작용하는 것으로 보고되고 있으나 아직까지 정확한 병인과 병태 생리는 완전히 이해되고 있지 않다<sup>2,4</sup>.

급성기의 아토피피부염 환자의 말초혈액과 피부 병변에는 IgE의 수준이 높아져 있고, interleukin (IL)-4, IL-13 등의 type 2 면역반응에 관여하는 사이토카인과 그 수용체의 발현, 그러한 사이토카인을 생산해내는 T 세포가 증가되어 있으며 interferon (IFN)- $\gamma$ 를 생산하는 T 세포는 감소되어 있다<sup>5-7</sup>. 이렇게 아토피피부염에서 type 2 면역반응이 우세하게 나타나는 데에는 여러 가지 요인이 관여한다. IL-4 수용체 유전자의 다형성 (polymorphism), signal transducers and activators of transcription (STAT)-6 유전자의 다형성 등 유전적인 원인과 항원 노출 시 존재하는 사이토카인이나 항원전달 세포의 종류 등이 원인이 되는 인자로 보고되고 있다<sup>1,8</sup>. CD2 수용체의 낮은 발현과, CD2 의존적인 IL-12 자극에 대한 낮은 감수성 때문에 T helper 세포 (Th)1의 면역반응이 유도되지 못해서 Th1과 Th2의 비율의 균형이 깨지게 되는 결과를 초래하게 된다는 보고도 있다<sup>9,10</sup>. 여러 원인들 중 T 세포의 조절장애와 이에 따른 사이토카인의 불균형 등 세포성 면역의 이상이 아토피피부염이 발병하게 되는 중요한 병리학적 인자로 생각되어 지고 있는데, 만성 아토피피부염 환자의 피부병변에서는 IL-4와 IL-13의 발현이 줄어들어 있고 Th1 세포로의 분화에 중요한 역할을 하는 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 와 IL-12의 발현이 증가되어 있는 것이 관찰되기 때문이다<sup>11,12</sup>. 이에는 각질형성세포로부터 분비되는 chemokine과 수지상세포에 의해 생산되는 IL-12가 만성 피부병변으로 유입된 T 세포의 Th1 세포로의 전환에 기여하는 것으로 생각되어지고 있으나, 이미 Th2 세포로 분화가 이루어진 경우에의 IL-12 신호전달 기전에 대해서는 아직 논란이 되고 있다.

CD4+ T 세포는 그들이 분비하는 사이토카인에 따라 Th1과 Th2로 분류되고, 분비하는 사이토카인은 다른 Th 세포군에 대해 길항작용을 한다<sup>13</sup>. Naive CD4+ T 세포에서 Th1 세포로의 분화는 활성화된 단핵구와 수지상세포에 의해 생산되는 IL-12에 의해서 유도되어 IFN- $\gamma$  생산 등의 type 1 반응이 일어난다. 또한 IL-12는 NK 세포를 활성화시키고 세포독성 T 세포의 분화를 유도하는 등 초기 항 염증성 사이토카인으로 세포성 면역에서 중요한 역할을 담당한다<sup>14</sup>. 사이토카인에 의한 자극은 그 수용체의 효과적인 발현조절이 신호

전달 및 작용체계에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. IL-12의 생물학적 효과는, 지속적으로 발현되어 있는 IL-12R $\beta$ 1과 외부의 자극에 의해서 매우 정교하게 조절되는 IL-12R $\beta$ 2, 두개로 구성된 수용체를 통해서 일어나는데 naive T 세포가 Th2 경로가 아닌 Th1 세포로 분화되는 경로로 들어갈 때 두개의 사슬이 강한 결합력으로 이량체가 형성되고 IL-12에 대한 반응이 시작된다<sup>15,16</sup>. 이는 사이토카인 수용체 외에 STAT-4와 T-box 전사조절인자 (T-bet)의 발현과 Th2 세포 특정 전사조절인자 GATA 3의 down-regulation, suppressor of cytokine signaling (SOCS) 분자를 통한 음성 피드백에 의한 조절 등 IL-12의 자극에 의한 T 세포의 분화에 영향을 미치는 데는 여러 경로가 복합적으로 작용하므로 한가지의 경로의 연구만으로는 활성화 기전을 규명하기는 어렵다<sup>17</sup>. 따라서 어떤 한 상태에서 변화한 단백질을 동시에 분석하는 수단으로 프로테오믹스 (proteomics) 기법이 유용할 것으로 생각된다.

프로테오믹스는 유전자가 만들어 내는 단백의 생물학적 과정을 발현, 번역 후 수정 (posttranslational modification), 단백간의 상호작용에 초점을 두고 연구하는 분야이다. 프로테옴 연구기법을 이용하면 단백들의 발현을 종합적이고 정량적으로 측정할 수 있기 때문에 빠른 시간 내에 특정 단백의 존재나 그 양을 파악할 수 있어 특정 질환에 의해 변화되는 단백의 관찰이 가능하다<sup>18</sup>. 이를 통해 질병의 진행과정을 총괄적으로 이해할 수 있어 질병의 진단 및 치료에 유용하게 응용될 수 있으며, 임상에서 각종 암, 감염성 질환, 신경질환 및 노화의 연구에 프로테옴 기법이 널리 사용되고 있다<sup>19-21</sup>.

단백체 분석은 1970년대에 개발된 2 차원 전기영동 법을 이용하여 크기와 전하로 단백을 젤 위에 스폟으로 분리한 다음, 질량분석기 (mass spectrometry: MS)을 이용한 단백 스폟의 펩타이드 분석과 데이터베이스에서의 검색을 통해 단백을 동정하는 과정을 거친다. 단백의 용해도를 향상시키는 기술과 immobilized pH gradient (IPG) 기법이 발전됨으로써 단백의 분리능이 좋아졌고 재현성 있는 결과를 얻을 수 있게 되었을 뿐만 아니라, 여기에 matrix assisted laser desorption ionization/time of flight (MALDI-TOF)와 electrospray ionization (ESI) MS를 통한 질량 분석 기술이 접목됨으로써 단백의 기능을 분석하는 것이 용이해졌다<sup>22,23</sup>. 이와 더불어 인간의 유전자 서열이 데이터 베이스화 되어 사용이 가능해지면서 대량 발굴 탐색이 가능하게 되었다.

알레르기질환의 발병기전을 연구함에 있어서 면역세포의 기전을 이해하는 것은 진단과 치료에 유용하게 쓰일 수 있다. Th1과 Th2 세포의 유전자 발현에 있어서의 차이점을

oligonucleotide microarrays를 이용한 mRNA 수준에서의 연구는 활발히 진행되고 있고, 분화에 관련된 세포막 표식자나 신호전달 기전에 관련된 세포질 내 분자에 대한 연구 또한 활발하다<sup>24,25</sup>. 그러나 면역세포에 대해서 프로테옴기법을 이용한 연구는 아직 많지 않은 상태로 인간 Th 세포를 단백질 수준에서 분석한 연구는 시작 단계에 있다. 1984년에 murine T, B 세포를 mitogen으로 활성화시킨 후 단백 발현 변화를 이차원 전기영동법을 이용하여 연구된 것이 보고되었고, 2000년에는 Jurkat T 세포주의 프로테옴 분석에 대한 표준 데이터베이스가 구축되기 시작하였다<sup>26,27</sup>. 이 세포주에 대한 정보는 T 세포 수용체를 통한 신호전달에 대한 연구에 널리 사용될 수는 있으나 Th1/Th2 분화에 대한 연구에는 일차배양 (primary) T 세포가 요구된다는 단점이 있다<sup>28,29</sup>. 인간 일차배양 T 보조 세포의 프로테옴에 대한 연구도 현재 진행되고 있고 동정된 단백에 대한 정보는 SWISS-PROT과 NCBI protein 데이터베이스에서 검색이 가능하나 일차배양 세포를 이용하는 실험에의 여러 가지 한계로 인해 질병과 직접적으로 연관된 T 세포의 프로테옴 연구는 아직 미미한 상태이다.

본 연구에서는 Th2 형이 우세하며 IL-12R $\beta$ 2 발현이 저하되어 있는 아토피피부염을 가진 환자에서 분리한 CD4+ T 세포에서 프로테옴 연구기법을 이용하여 IL-12에 의해 조절되는 단백 스폿을 분석함으로써 아토피피부염의 병인기전에서 CD4+ T 세포에 대한 IL-12의 역할에 관한 기초 자료로 활용하고자 한다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

연세대학교 의과대학 부속 세브란스병원 알레르기 특수 진료소 및 피부과에 내원하여 Hanifin 및 Rajka<sup>30</sup>의 기준에 의해 아토피피부염으로 진단된 5명의 환자들을 대상으로 하였다. 아토피피부염 환자에서 피부염이 있는 상태에서 20 ml의 혈액을 채취하여 Heparin으로 처리하고 동량의 Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 넣고 700 g에서 15분간 원심 분리한 후 중층의 세포를 취하여 말초혈액 단핵세포를 분리한 후, 실험에 사용하기 전까지 질소탱크에서 동결 보관하였다.

### 2. 연구방법

#### 1) 말초혈액 CD4+ T 세포의 분리

아토피피부염을 가진 환자의 말초혈액으로부터 CD4+ isolation kit (Miltenyi Biotech, Aunurn, CA, USA)을 이용해

서 negative selection으로 CD4+ T 세포를 분리하였다. 분리하여 보관한 단핵구를 5% bovine serum albumin (BSA), 2 mM EDTA를 함유하는 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)로 3회 반복 세척한 다음 hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였다.

단핵구 중 CD4+ T 세포는 hapten-antibody cocktail (anti-CD8, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD56)과 anti-hapten microbeads와 반응시킨 다음 MidiMACS system (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA)을 이용하여 컬럼에 붙지 않고 흘러나오는 세포분획을 회수함으로써 분리하였다. 말초혈액에서 분리한 단핵구를 30  $\mu$ m nylon mesh에 통과시켜 죽은 세포와 불순물을 제거한 다음 완충용액 PBS/5% BSA/2 mM EDTA로 세척하였다. 세포 10<sup>7</sup>당 80  $\mu$ l의 완충용액을 가하여 세포를 부유시킨 다음, 세포 10<sup>7</sup>당 20  $\mu$ l의 hapten-antibody cocktail을 첨가하여 10분간 4°C에서 반응시킨 후 2회 세척하고, 20  $\mu$ l의 anti-hapten microbeads를 첨가하여 4°C에서 15분간 반응시키고 2회 세척하였다. 세포를 배양하는 동안 MidiMACS 자석에 LS 컬럼을 끼운 다음 5 ml의 완충용액으로 세척하여 준비하고, 세포를 500  $\mu$ l의 완충용액에 다시 부유시켜 컬럼에 넣고 10 ml의 완충용액으로 컬럼을 씻어 붙지 않고 흘러나오는 세포를 받아서 분리하였다. 분리된 CD4+ T 세포의 순수도는 FACStar를 이용하여 분석하였다. 이들 세포를 CD4-FITC (Becton Dickinson, San Lose, CA, USA)로 염색하고 이 세포를 정량하기 위해서 동일 세포군을 mouse IgG1으로 염색한 후 비교, 분석하였다. 분리하는 과정에서 최소한의 자극만을 주기 위하여 CD4 microbead를 이용한 positive selection 방법을 사용하지 않고 hapten-antibody cocktail과 반응시킨 후 negative selection을 통해 얻었으며 CD4-FITC 항체를 이용하여 염색하여 분석한 결과 분리한 CD4+ T 세포는 93% 이상의 순수도를 보였다.

#### 2) CD4+ T 세포의 배양

아토피피부염을 가진 환자 환자에서 분리한 CD4+ T 세포를 T cell을 활성화시키고 증식시키는 물질로 잘 알려진 10 ng/ml의 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma, St. Louis, MO, USA), 100 ng/ml ionomycin (Sigma), 2 ng/ml의 recombinant human IL-12p70 (Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA)와 200 ng/ml neutralizing anti-IL-4 antibody (Pharmingen)가 포함되어 있는 RPMI 1640 (10% FBS, 2 mM L-glutamine, 50 M 2-mercaptopethanol (2-ME), 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate, 5  $\mu$ g/ml Funision)에서 배양한 것과 배지 단독으로 배양한 대조군 세포를 준비하고 3일째 FACStar를 통해 R-phycoerythrin (R-PE)-conjugated rat

anti-human IL-12R $\beta$ 2 antibody (Pharmingen)를 이용하여 발현을 분석하였다.

### 3) CD4+ T 세포의 이차원 전기영동

CD4+ T 세포에 IL-12를 처리한 세포와 대조군 세포를 준비한 후 이차원 전기영동을 시행하였다. 세포를 pH 8.0, 1 M Tris, 0.3% sodium dodecyl sulfate (SDS), 3% dithiothreitol, 1 mM phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF)가 함유된 용해 완충액 50  $\mu$ l와 섞은 후 95°C에서 5분간 가열하였다. 전체시료를 7 M urea, 2 M thiourea, 2 mM tributyl phosphine (TBP), 4% 3-[3-cholamidopropyl] dimethylammonio]-1-propane-sulfonate (CHAPS), 0.5% carrier ampholytes, 40 mM Tris, 0.002% bromophenol blue dye가 함유된 젤 전기영동 시료 완충액 400  $\mu$ l로 희석한 후 sonicator를 사용하여 세포를 잘 깨고 endonuclease 150 U/ml을 넣어서 실온에서 25분 둔 다음 이 시료를 20°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 상층액을 수집하였다. 재수화 틀에 준비한 시료를 넣고 18 cm의 pH 3-10 non-linear (NL) IPG 스트립(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)을 젤 면이 닿도록 하여 놓고 24시간 방치하여 재수화시켰다. IPG-phor (Amer sham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 총 100,000 vhr로 등전화(isoelectric focusing: IEF) 시킨 스트립을 3.6 g의 urea, 2% SDS, 5 M Tris 2 ml, 50% glycerol 4 ml, 25% acrylamide 1 ml, 200 mM TBP 250  $\mu$ l가 함유된 동질 완충액에서 25 분간 동질화(equilibration) 시키고 10-16% gradient polyacrylamide gel (1.875 M Tris buffer, 40% acrylamide stock solution, 증류수)에서 이차원 전기영동을 시행하였다.

이차원 전기영동을 실시한 젤은 modified silver 염색 방법을 이용하여 스폷을 가시화 하였다<sup>31</sup>. 먼저, acetic acid 50 ml, methanol 200 ml, 증류수 250 ml로 15 분씩 두 차례 고정 시킨 후, methanol 150 ml, 5% sodium thiosulfate 20 ml, sodium acetate 34 g, 증류수 330 ml로 30 분간 감작 시켰다. 10 분간 3번 세척한 후, 2.5% silver nitrate로 염색한 후 다시 1 분씩 두 차례 세척하였다. 세척한 젤을 sodium carbonate 12.5g, formaldehyde 200  $\mu$ l, 증류수 500 ml로 발색시키고, EDTA 7.3g, 증류수 500 ml로 발색을 중단시킨 후, 증류수 500 ml로 5분씩 3차례 세척하였다.

### 4) 프로테옴 지도의 비교 분석

염색이 끝난 후 아토피피부염 환자의 IL-12 처리 전후의 CD4+ T 세포의 이차원 전기영동 젤을 GS-800 Calibrated Imaging Densitometer (Bio-Rad, Mnich, Germany)를 이용하

여 스캐닝한 후 PDQuest<sup>®</sup> 이미지분석 소프트웨어 (Bio-Rad)를 사용하여 단백의 스폷 양상을 비교 분석하고 프로테옴 지도를 얻었다.

민감도, 최소 peak, 크기 척도를 조절하여 스폷을 찾아낸 다음 edit spot tool을 이용하여 젤 간의 비교를 통해 스폷의 첨가와 삭제과정을 거쳤다. 모든 젤을 하나의 matchset으로 만들어 IL-12 처리 전과 처리 후를 각각 replicate군으로 지정하고 statistical analysis sets을 만들어 각 군간의 스폷을 정량적, 정성적으로 비교, 분석한 후 각 군에서 reference 젤을 지정하여 matchset을 각각 만들고 high-level matchset으로 지정한 다음 각각의 젤에서 스폷의 양상을 확인하였다.

### 5) MALDI-MS 분석

PDQuest를 이용하여 이미지 분석을 하여 의미 있게 증가하거나 감소, 없어지거나 새로 생긴 단백 스폷을 찾아낸 후 젤을 잘라내어 e-tube에 옮겼다. Silver nitrate로 염색이 되어 있기 때문에 먼저 30 mM potassium ferricyanide, 100 mM sodium thiosulfate를 1:1 비율로 섞어서 염색된 silver를 추출해내고 증류수로 여러 번 세척하였다. 200 mM ammonium bicarbonate를 첨가하여 20분 동안 vortexing하고 100% acetonitrile (ACN)으로 젤 조각이 불투명하게 변할 때 까지 탈수 시켰다. 56°C에서 30분 동안 10 mM DTT/25 mM ammonium bicarbonate로 환원시킨 다음 상층액을 버리고 55 mM iodoacetamide로 알킬화(alkylation)하였다. 상층액을 제거한 후 100 mM ammonium bicarbonate로 5분 동안 vortexing하면서 젤 조각을 세척하고 100% acetonitrile로 탈수 시켰다. 이렇게 준비한 젤 조각에 100-400 ng/ $\mu$ l의 trypsin을 넣고 20  $\mu$ l의 25 mM ammonium bicarbonate를 넣은 다음 37 °C에서 16시간동안 펩타이드를 추출해냈다. 펩타이드가 추출된 상층액을 다른 e-tube에 옮기고 젤조각에 50 mM ammonium bicarbonate와 100% acetonitrile로 반복하여 펩타이드를 추출해낸 다음 다른 튜브에 옮겨 놓았던 펩타이드 추출 용액과 합치고 SpeedVac system을 이용하여 10  $\mu$ l 정도 남을 때까지 건조 시켰다. 이렇게 추출한 펩타이드는 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)가 포함된 50% ACN/0.1% TFA와 잘 섞어 MALDI plate에 잘 loading하고 펩타이드 스펙트라를 얻었다. 경우에 따라서는 C18 ZipTip (Millipore, Bedford, MA, USA)을 이용하여 시료 정제 과정을 거친 후 분석하였다. 이렇게 얻어진 스펙트라는 Peptident (<http://expasy.proteome.org.au/tools/peptident.html>)나 MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>)과 같은 데이터베이스를 검색하여 단백동정을 시행하였다.

## 결과

### 1. 아토피피부염 환자에서 IL-12에 의한 CD4+ T 세포 표면 IL-12R $\beta$ 2의 발현 변화

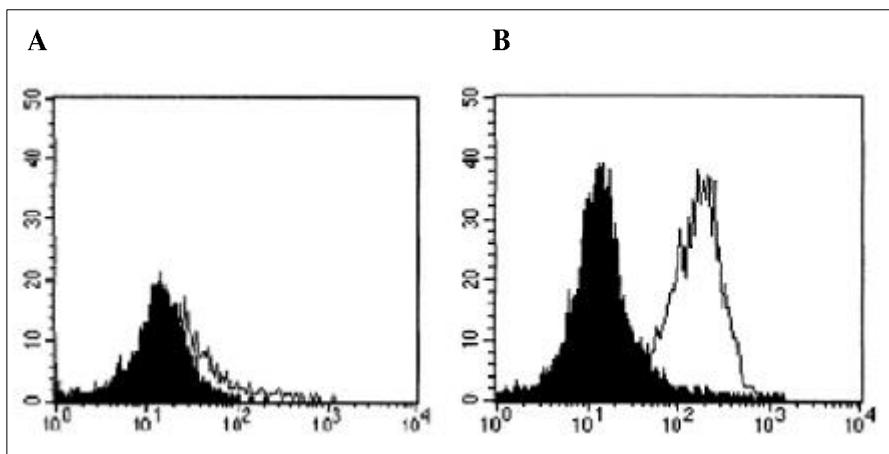
아토피피부염을 가진 환자의 말초혈액에서 분리한 CD4+ T 세포의 IL-12 처치에 따른 IL-12R $\beta$ 2의 발현을 FACStar를 이용하여 분석하였다. 72시간 배양한 후 관찰한 결과 배지단독 처리군 (Fig. 1A)에 비해 10 ng/ml PMA, 100 ng/ml ionomycin, 2 ng/ml recombinant IL-12p70, 200 ng/ml neutralizing anti-IL-4 antibody를 첨가하여 T 세포를 활성화시켜 배양한 군 (Fig. 1B)에서 IL-12R $\beta$ 2 발현이 증가된 것을 관찰하였다. 뿐만 아니라 각각 72, 96, 120시간 처리한 결과 배양시간의 증가에 따라 IL-12R $\beta$ 2 발현이 지속되는 것이 관찰되었다 (Fig. 2).

### 2. 아토피피부염 환자 말초혈액 CD4+ T 세포의 이차원 전기영동 소견

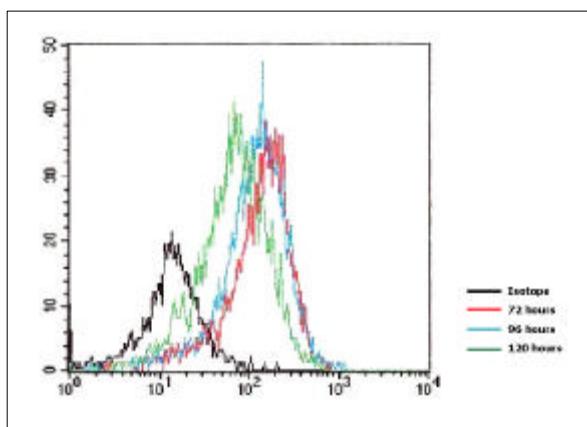
PDQuest® 이미지 분석 소프트웨어 (Bio-Rad)를 사용하여 아토피피부염 환자의 말초혈액 CD4+ T 세포의 단백 스폿 양상을 분석하였다. Silver nitrate로 염색한 경우 약 1500 개의 단백 스폿들이 가시화되었다 (Fig. 3). 여러 구획에서 개인차를 관찰할 수 있었는데 액틴 패턴에 있어서 다양성을 보였으며 (Fig. 4), 분자량이 약 40 kDa이고 pI가 6.0 - 10 부분 (Fig. 5A)과 분자량이 약 20 kDa이고 pI가 6.5 - 7.0인 구획에서 다양성이 많이 관찰되었다 (Fig. 5B).

### 3. IL-12 처치에 따른 아토피피부염 환자 CD4+ T 세포의 이차원 전기영동 소견

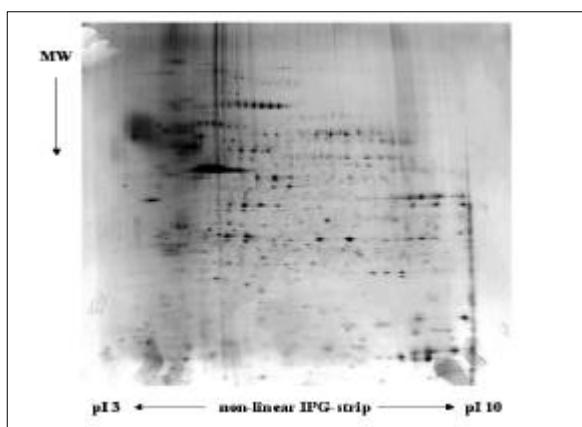
IL-12를 처리한 군과 처리하지 않은 군을 하나의 matchset



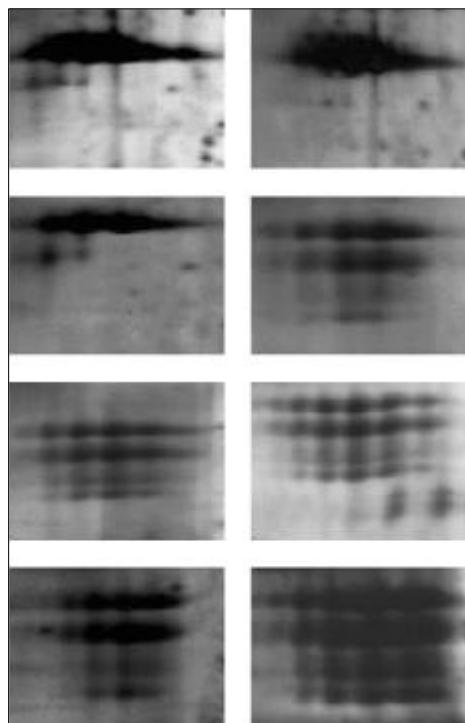
**Fig. 1.** The expression of IL-12R $\beta$ 2 in CD4+ T cell of patients with atopic dermatitis by FACS analysis. The cells were cultured for 72 hours with media only(A) or with treatment of PMA, ionomycin, recombinant human IL-12p70, neutralizing anti-IL-4 antibody for 72 hrs (B). They were stained with R-phycocerythrin (R-PE)-conjugated rat anti-human IL-12R $\beta$ 2 antibody and analyzed by FACStar. Expression of IL-12R $\beta$ 2 was increased in the group treated with IL-12 (solid histograms: isotype control antibody, outlined histograms: IL-12R $\beta$ 2 antibody).



**Fig. 2.** Changes of the expression of IL-12R $\beta$ 2 in CD4+ T cell after treatment with IL-12. IL-12 was treated in 72, 96 and 120 hours. Expression of IL-12R $\beta$ 2 in CD4+ T cell was increased in 72 and 96 hours, and it was slightly decreased in 120 hours.



**Fig. 3.** The result of 2D-electrophoresis of peripheral CD 4+ T cell of patients with atopic dermatitis. About 1,500 protein spots were seen after staining with Silver nitrate. Multiple changes of protein spots were seen after treatment of IL-12.

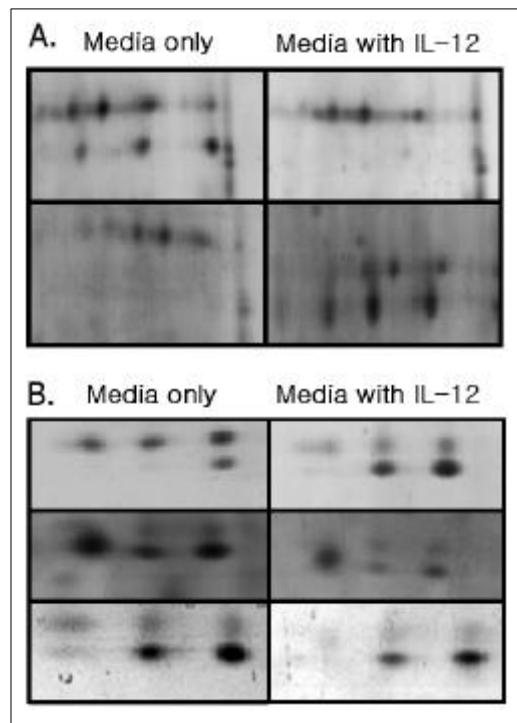


**Fig. 4.** The actin patterns of peripheral CD4+ T cell of patients with atopic dermatitis. The patterns show variability according to the samples. Also, the actin patterns show differences between before and after IL-12 treatment.

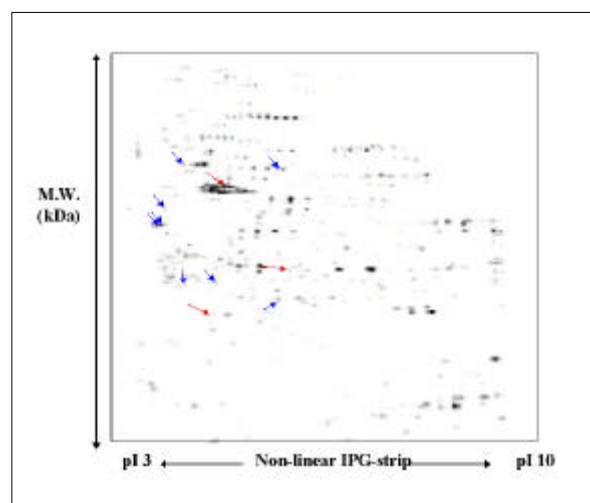
범주에 두 다음 replicate group으로 지정하여 각 군을 비교 분석하고 각각의 군의 matchset을 다시 high-level matchset에 적용시켜 각각의 젤을 분석하였다.

PDQuest®(Bio-Rad)를 이용하여 이미지 분석결과 대조군에 비해 IL-12를 처리한 군에서 스폿의 증감과 한 군에서만 관찰되는 스폿을 관찰할 수 있었다. PDQuest®의 analysis set tool을 이용하여 IL-12의 처리 전과 처리 후를 정량적, 정성적으로 분석하였다. 정량적인 분석에서 줄어들거나 증가한 범위는 한쪽에 대한 다른 쪽의 양의 차이를 10배로 지정하여 분석하였다. 배지단독으로 배양한 세포에 비해 IL-12가 포함된 배지에서 배양한 세포에서 8개의 단백 스폿이 줄어든 것이 관찰되었고, IL-12 처리 시 3개의 단백 스폿이 증가된 것이 관찰되었다(Fig. 6).

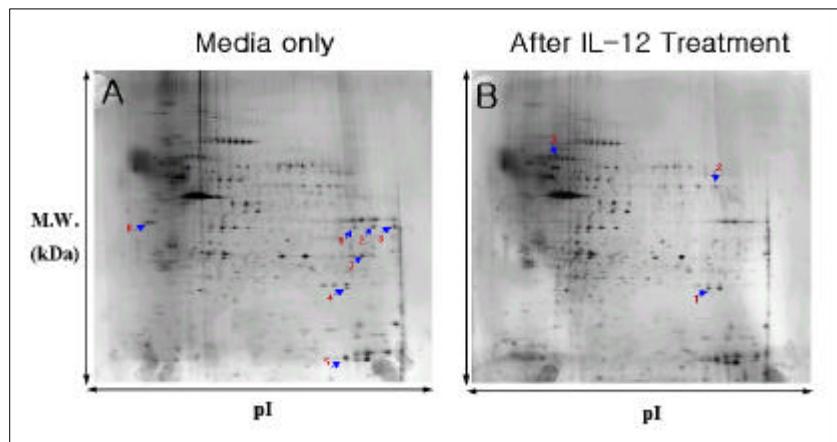
정성적인 분석에서는 처리 전 군에서만 관찰되는 스폿과 IL-12를 처리한 군에서만 관찰되는 스폿으로 나누어 분석하였다. 배지단독으로 배양한 CD4+ T 세포에서 관찰된 단백 스폿 중 7개의 단백 스폿이 IL-12가 포함된 배지에서 배양한 CD4+ T 세포에서는 관찰되지 않았다(Fig. 7A). 반면 배지단독으로 배양한 CD4+ T 세포에서는 관찰되지 않으나 IL-12를 처리한 세포에서만 단백 스폿 3개를 관찰하였다(Fig.



**Fig. 5.** Comparison of proteome map of peripheral CD4+ T cell of patients with atopic dermatitis. The CD4+ T cells from atopic dermatitis patients which were cultured for 72 hours with media only or with treatment of PMA, ionomycin, recombinant human IL-12p70, neutralizing anti-IL-4 antibody were electrophoresized. Most were 40 kDa, the pI was seen in variability between 6.0-10 (Fig. 5A), others were 20 kDa and the pI was between 6.5-7.0 (Fig. 5B).



**Fig. 6.** Quantitative analysis of the protein spot in the peripheral CD4+ T cell of atopic dermatitis patient treated IL-12. 8 protein spots (blue arrows) show that cells were decreased in the IL-12 treated group compared to the media only cultured group. 3 protein spots (red arrows) were increased in the group treated with IL-12.



**Fig. 7.** Qualitative analysis of the protein spot in the peripheral CD4+ T cell of atopic dermatitis patient treated IL-12. Among the protein spots that were only seen in the media only cultured CD 4+ T cell, 7 spots (Fig. 7A) were not seen the group cultured with IL-12. 3 Protein spots (Fig. 7B) were only seen the IL-12 treated group.

7B).

#### 4. CD4+ T 세포의 MALDI-MS 분석결과

Modified silver 염색법으로 가시화 시켰을 경우 크고 진한 스폿으로 보이는 단백 스폿만 질량분석기를 통한 동정이 가능하였다. Silver로 염색한 젤의 단백 스폿을 MALDI-MS로 분석이 가능하게 하려면 전체 시료에 존재하는 단백의 양이 400  $\mu\text{g}$  정도여야 한다. 그러나 본 연구에서 얻을 수 있는 각 샘플의 단백양은 약 80  $\mu\text{g}$ 으로 silver 를 이용하여 가시화 시켜 이미지 분석을 하는 것은 가능했으나 MALDI-MS 결과값을 얻기에는 부족함이 있었다. 액틴과 같은 단백 스폿만 동정이 가능하였다.

### 고 찰

아토피피부염에서 관찰할 수 있는 알러지성 염증반응이나 IgE 합성은 특정 알레르겐에 대한 Th2 세포에 의해 일어나는 면역반응이라고 알려져 있다<sup>1,2</sup>. IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인이 IFN- $\gamma$ 와 IL-12가 매개하는 type 1 면역반응에 대한 길항작용을 함으로써 Th2 군이 우세하게 되고 이것이 아토피피부염의 발병을 유발시킨다<sup>13</sup>.

IL-12는 IFN- $\gamma$  합성을 유도하고 Th1 세포로의 분화를 결정짓는 중요한 인자이다<sup>32</sup>. 인간 T 세포에서 Th1 세포의 표면에만 발현되는 표식자로 여겨지고 있는 IL-12R $\beta$ 2는 IL-12 신호전달 기전에 있어서 필수적인 분자이다. 아토피피부염을 가진 환자에서 분리한 T 세포의 표면에서는 IL-12R $\beta$ 2가 낮은 비율로 발현되어 있다는 보고와 IL-4의 길항작용에 의하여 IL-12 매개 면역반응이 저하되어 아토피피부염이 발생한다는 보고가 있어 아토피피부염의 발생기전에 IL-12가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다<sup>7</sup>.

본 연구에서는 아토피피부염 환자의 IL-12에 의해 조절되는 CD4+ T 세포 단백변화를 찾고자 프로테옴 연구기법을 이용하여 관찰하였다. 말초혈액에서 분리한 naive T 세포를 인위적으로 Th2 클론으로 분화시킨 세포와 아토피피부염을 가진 환자에서 분리한 집먼지 진드기 특이성 Th2 세포를 Th1 클론으로 분화시키기 위한 IL-12가 포함된 배지조건에서 IL-12R $\beta$ 2의 발현이 72시간과 96시간 사이에서 관찰되는 것으로 보고된 바 있어, 본 실험에서는 각각 3, 4, 5일째 관찰하였다<sup>13</sup>. 아토피피부염 환자 IL-12R $\beta$ 2의 발현은 3일째 발현된 양상이 4, 5일에서도 비슷하게 지속되는 경향을 보였으며 이 실험에서는 발현이 관찰된 세포를 선택해서 이차원전기영동 실험을 시행하였다. 같은 조건에서 발현이 관찰되지 않는 세포도 있었는데 이와 같이 IL-12의 자극에 다른 양상을 보이는 것은 병의 경중도에 따른 Th1/Th2 세포의 비율이 달라서 자극에 대한 감수성이 다르다는 것을 원인으로 생각해 볼 수 있다. 그러나 Th2 쪽으로 분화가 일어난 세포에서 전혀 IL-12의 신호전달이 일어나지 않는다는 가설과, IL-12에 의해서 분화가 일어난 Th2 세포군이 쉽게 Th0/Th1의 표현형으로 바뀐다는 가설이 보고된 바가 있어서 본 연구의 결과만으로는 아토피피부염에서 분리한 T 세포에서 IL-12의 IL-12R $\beta$ 2의 발현증가에 영향을 미치고 이것이 Th1/Th2 비율을 바꾸는데 기여한다고 확정지을 수는 없을 것으로 보인다<sup>13</sup>. 또한 Th 세포의 분화 결정요인은 사이토카인 외에도 항원전달세포의 종류, 항원 유입경로, 동시자극에 의한 조절 등을 들 수 있기 때문에 CD4+ T 세포만을 분리하여 시행한 *in vitro* 실험환경에서는 자극원이 IL-12 밖에 없어 아토피피부염의 T 세포가 IL-12에 의해 반응을 하는지에 대해서는 확신할 수 없었다.

프로테오믹스는 질환과 연관시켜 병리기전의 이해, 질병 진단을 위한 표지자 발견, 치료에 대한 결과 예전 등에 유용

하게 응용될 수 있다 사이토카인이 아토피피부염에서 염증반응과 면역기작에 있어서의 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려진 사실이다. Th2 클론으로 분화가 일어난 세포에 대한 IL-12의 신호전달기전에 있어서는 아직도 논란이 계속되고 있어 이 연구에서는 IL-12에 의해 변화하는 단백 스폿을 관찰함으로써 이 사이토카인이 면역세포에 어떤 영향을 미치는지 알아보고 이를 통해 아토피피부염의 발병기전과의 연관성을 찾고자 하였다. 따라서 세포의 어떤 특정 단계에서의 단백을 동시에 분석하는 수단으로 유용하게 쓰이고 있는 프로테오믹스 연구 기법을 이용하여 아토피피부염 환자의 말초혈액 CD4+ T 세포의 IL-12에 의한 변화를 전반적으로 이해하는데 유용할 것으로 생각되어서 본 연구를 수행하였다.

아토피피부염 환자 말초혈액 CD4+ T 세포의 전기영동 결과 단백시료의 양이 적어 modified silver 염색법으로 가시화시킨 후 이미지 분석과 MALDI-MS를 이용한 펩타이드 분석을 같은 젤로 시행하였다. 인간 CD4+ T 세포에 대한 프로테옴 분석은 시작 단계로 약 91개의 단백질이 동정되어 있고 IFN- $\alpha$ 에 의해 조절되는 ubiquitin-conjugating 효소에 대한 보고도 있으나, 실험마다 시료를 준비하는 과정이나 젤 농도의 차이, 가시화 시키는 방법의 차이로 인해 문현마다 조금씩 다른 젤 이미지가 보고되고 있어 이를 표준지도로 이 실험의 결과와 비교할 수는 없었다<sup>33,34</sup>. 따라서 아토피피부염의 병리기전의 연구를 위한 기준이 되는 CD4+ T 세포 젤의 표준 지도를 얻는 작업이 우선되어야 할 것으로 보인다.

PDQuest<sup>®</sup>를 이용한 이미지 분석에서 각 샘플간의 다양성이 관찰되었는데 이는 병의 경중도에 따라 CD4+ T 세포에서 Th1과 Th2 세포가 차지하는 비율이 다르고 이는 IL-12에 의한 반응에도 차이를 가져와 단백 발현에 있어서도 영향을 미친 것으로 생각되어진다. 특히 액틴의 발현에 있어서 다양성을 보였는데 이는 히스타민이 단핵구 유래 수지상세포의 F-actin의 중합화 촉진에 영향을 미치므로 병의 경중도에 따라 세포의 이동에 관여하는 단백 발현에 차이가 보였다고 생각되어 진다. 따라서 앞으로 더 많은 수의 시료를 이용하여 전기영동하여 다양성이 관찰되는 구획의 관찰이 이루어져야 하고 이를 임상증상과 연관시키는 것이 필요하겠다. 그리고 다양성이 관찰되는 단백 스폿외에 IL-12에 의해 조절되는 단백스포트을 정확한 규명을 위해서 더 많은 환자들에서 전기영동한 결과와 비교해보는 것이 필요하겠다.

Silver nitrate를 이용한 modified silver 염색법은 MALDI-MS를 통한 펩타이드 분석이 가능하기 때문에 적은 시료를 가지고 실험하는 경우에 이미지분석과 펩타이드 분석을 동시에 같은 젤로 할 수 있다는 장점이 있으나 In-gel trypsin digestion하여 MALDI-MS를 이용하여 펩타이드 분석을 한

결과 크고 진하게 보이는 액틴이나 T 세포 수용체 beta chain 등의 스폿들만 동정이 가능하였다. 상대적으로 작거나 희미한 스폿의 경우 MALDI-MS를 통해 펩타이드 스펙트라는 얻을 수 있었으나 데이터베이스를 통한 검색결과 많은 양으로 존재하는 스폿을 제외하고는 peptide coverage 비율이 낮아서 단백을 동정하기에는 부족함이 있었다. 앞으로의 실험에서는 여러 젤로부터 공통되는 단백 스폿들을 모은 다음 MALDI-MS 분석을 시행한다면 더 나은 결과를 얻을 수 있을 것으로 보인다.

좋은 해상도의 실험결과를 얻기 위해서 범위가 좁은 pH 범위의 IPG 스트립을 사용하는 방법이 있겠으나 표준 pH 범위 IPG (pH 3-10) 스트립에 loading하는 양의 2 - 3배가 요구되어 환자에서 얻을 수 있는 말초혈액 양의 한계 때문에 이 실험에서는 적용시키지 못하였다. 따라서 매우 복잡한 과정으로 이루어진 IL-12에 의한 신호전달 네트워크를 단백질 인산화 위치의 분석이라는 측면으로 범위를 좁혀서 단백의 인산화 경로를 추정해 보는 것이 사이토카인의 자극에 의한 신호전달 기작과 이에 따른 분화 양상을 연구하는데 유용할 것으로 보인다. 현재 인산화 된 단백을 분석하는 기술이 프로테오믹스 분야에서 활발히 진행되고 있는데 이는 전체단백에서 적은 양으로 존재하는 인산화 단백을 선택적으로 분석하는데 유용하게 쓰일 것으로 보이고 IL-12의 신호전달 기전을 연구하는 데에도 적용할 수 있을 것으로 보인다<sup>35</sup>. 이러한 적용에 앞서 아토피피부염 환자의 CD4+ T 세포의 표준 지도를 만들고 변화한 단백의 스폿이 다른 아토피 환자에도 적용시킬 수 있는 유용성이 있는 단백스포인가를 정확하게 알아보기 위하여 더 많은 전기영동결과를 얻어서 비교해서 확인해 보는 일이 뒤따라야 할 것이다. 그리고 MALDI-MS나 ESI-MS를 이용한 단백의 동정을 통해 세포 내에서의 기능을 규명하는 일이 필요할 것으로 판단된다. 이것은 앞으로 아토피피부염에서의 CD4+ T 세포의 면역반응 기전을 이해하는데 기초자료가 될 수 있을 것으로 아토피피부염의 병태생리를 이해하는데 도움이 될 것으로 보인다.

## 참 고 문 헌

1. Leung DYM. Pathogenesis of atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 1999;104:S99-108
2. Hanifin JM. Atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 1984; 73:211-26
3. Barnes KC. Evidence for common genetic elements in allergic disease. J Allergy Clin Immunol 2000;106:S192-S200
4. Leung DYM, Soter NA. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol 2001;44:

S1-12

5. Renz H, Jujo K, Bradley KL, et al. Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in AD and IL-4 receptor expression in AD and their modulation by interferon-gamma. *J Invest Dermatol* 1992;99:403-8
6. Gollob JA, Li J, Reinherz EL, Ritz J. CD2 regulates responsiveness of activated T cells to interleukin 12. *J Exp Med* 1995;182:721-31
7. Janeford CK, Jenmalm MC. PHA-induced IL-12R $\beta$ 2 mRNA expression in atopic and non-atopic children. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1493-1500
8. Leung DYM. Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:860-76
9. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Schopf E, et al. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 1998;19:359-61
10. Albanesi C, Scarponi C, Sebastiani S, et al. A cytokine to chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cells accumulation in chronic inflammatory skin diseases. *J Leukoc Biol* 2001;70:617-23
11. Smits HH, van Rietschoten JGI, Hilkens CMU, et al. IL-12-induced reversal of human Th2 cells is accompanied by full restoration of IL-12 responsiveness and loss of GATA-3 expression. *Eur J Immunol* 2001;31:1055-65
12. Nishihomori R, Ehrhardt RO, Strober W. T helper type 2 cell differentiation occurs in the presence of interleukin 12 receptor $\beta$ 2 chain expression and signaling. *J Exp Med* 2000;191:847-58
13. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-46
14. Lamont AG, Adorini L. IL-12: a key cytokine in immune regulation. *Immunol Today* 1996;17:214-17
15. Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, et al. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 1997;185:825-32
16. Rogge L, Papi A, Presky DH, et al. Antibodies to the IL-12 receptor $\beta$ 2 chain mark human Th1 but Th2 cells in vitro and in vivo. *J Immunol* 1999;162:3926-32
17. Kaplan MH, Wurster AL, Grusby MJ. A signal transducer and activator of transcription (Stat) 4-independent pathway for the development of T helper type 1 cells. *J Exp Med* 1998;188:1191-6
18. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000;405:837-46
19. Harris RA, Yang A, Stein RC, et al. Cluster analysis of an extensive human breast cancer cell line protein expression map database. *Proteomics* 2002;2:212-23
20. Greco A, Bienvenut W, Sanchez JC, et al. Identification of ribosomal-associated viral and cellular basic proteins during the course of infection with herpes simplex virus type 1. *Proteomics* 2001;1:545-9
21. Toda T. Proteomic and proteomics for the research on protein alterations in aging. *Ann NY Acad Sci* 2001;928:71-8
22. Leimgruber RM, Malone JP, Radabaugh MR, et al. Development of improved cell lysis, solubilization and imaging approaches for proteomic analyses. *Proteomics* 2002;2:135-44
23. Grg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000;21:1037-53
24. Rogge L, Bianchi E, Biffi M, et al. Transcript imaging of the development of human T helper cells using oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 2000;25:96-101
25. Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 2000;14:1693-711
26. Kettman J, Lefkovits I. Changes in the protein pattern of murine B cells after mitogenic stimulation. *Eur J Immunol* 1984;14:778-81
27. Frey JR, Fountoulakis M, Lefkovits I. Proteome analysis of activated murine B-lymphocytes. *Electrophoresis* 2000;21:3730-9
28. Kettman J, Lefkovits I. An attempt to assess the overall diversity of murine T cell using two-dimensional gel electrophoresis. *Eur J Immunol* 1984;14:769-77
29. Thiede B, Siejak F, Dimmler C, Jungblut P, Rudel T. A two dimensional electrophoresis database of a human Jurkat T-cell line. *Electrophoresis* 2000;21:2713-20
30. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Dermatol Venereol (Stockh)* 1980;92:s44-7
31. Yan JX, Wait Robin, Berkelman T, et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000;21:3666-72
32. Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10188-92
33. Nyman TA, Rosengren A, Syrakki S, et al. A proteome database of human primary T helper cells. *Electrophoresis* 2001;22:4375-82
34. Nyman TA, Matikainen S, Sareneva T, Julkunen I, Kalkkinen N. Proteome analysis reveals ubiquitin-conjugating enzymes to be a new family of interferon-regulated genes. *Eur J Biochem* 2000;267:4011-19
35. Uzel G, Frucht DM, Fleisher TA, Holland SM. Detection of intracellular phosphorylated STAT-4 by flow cytometry. *Clinic Immunol* 2001;100:270-76