건선 환자에서 이차원 전기영동을 이용한 표피단백의 분석

연세대학교 대학원

의 학 과

이 동 훈

건선 환자에서 이차원 전기영동을 이용한 표피단백의 분석

지도 박 윤 기 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 동 훈

이동훈의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 모든 방면에 끊임없는 격려와 세심한 배려로 지도해 주신 은사 박윤기 교수님께 깊은 감사를 드리며, 또한 많은 관심과 조언으로 격려해 주신 이광훈 교수님과 오상환 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한, 연구 진행에 많은 도움을 주신 임상의학 연구센터의 장남수 선생, 권오규 선생께도 깊은 감사를 드립니다.

끝으로 무한한 사랑과 관심으로 곁에서 지켜봐 주신 부모님과 아내에게 감사와 이 기쁨을 드립니다.

저 자 씀

목 차

표 목 차

그 림 목 차

국문요약

건선 환자에서 이차원 전기영동을 이용한 표피단백의 분석

건선은 은백색의 인설을 동반한 판을 나타내는 흔한 피부질환으로 대개 악화와 호전이 반복되어 만성 경과를 보이는 원인 미상의 질환이다. 현재 유전적 요인 외에 개인의 생활과 환경적 요인이 유발인자로 작용하며 면역학적 요인에 의하여 각질형성세포의 증식이 일어나는 것으로 해석하고 있지만 병인에 대한 광범위한 연구에도 불구하고 아직 완전히 밝혀져 있지 않다.

최근 이러한 임상적 문제점의 해결 방안으로 단백을 양적, 질적으로 측정하는 학문인 프로티오믹스가 대두되고 있으며, 이에 필요한 고해상도 이차원 전기영동과 mass spectrometry 등의 방법이 개발되어 이용되고 있다.

본 연구에서는 건선 환자의 피부병변에 특이한 표피단백을 관찰하기위해 건선 환자 병변부위 표피로부터 이차원 전기영동을 이용하여 프로티옴 지도를 얻어 건선 환자 정상피부와 단백질의 차이를 비교하였다.

건선 환자 정상피부와 병변부위 표피의 이차원 전기영동 결과 증가되거나 감소한 15개의 단백 스폿들이 관찰되었다. 5명 (100%) 의 모든 건선 환자의 정상피부에 비해 병변부위 표피에서 증가되는 각각 6.8 kDa/ 7.3, 6.9 kDa/6.9, 7.3 kDa/7.8, 8.8 kDa/6.6, 11.5 kDa/6.7, 11.6 kDa/6.9, 13.1 kDa/5.9, 13.2 kDa/6.1, 13.8 kDa/5.6, 15.2 kDa/5.9, 48.3 kDa/4.8, 49.7 kDa/4.8, 49.9 kDa/4.9, 29.7 kDa/7.3의 분자량/등전점을 가지는 14개의 단백 스폿을 관찰하였다. 또한 건선 환자의 정상피부에 비해 병변부위 표피에서 분자량 70.9 kDa과 5.3의 등전점을 갖는 단백 스폿이 4명 (80%) 에서 감소되는 것을 관찰하였다.

본 연구를 통해 건선 환자의 표피에서 여러 단백 스폿의 변화를 관찰하였으며 이러한 결과를 건선의 병인규명, 치료에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 건선, 프로티오믹스, 표피단백, 이차원 전기영동

건선 환자에서 이차원 전기영동을 이용한 표피단백의 분석

<지도 박 윤 기 교수>

연세대학교 대학원 의학과

이 동 훈

Ⅰ. 서 론

건선 (psoriasis) 은 은백색의 인설 및 판을 특징으로 하며, 악화와 호전이 반복되는 원인미상의 만성 재발성 피부질환이다.[1] 세계적으로 전 인구의 약 1-2%에서 발생되며, 국내에서는 피부과 외래환자의 약 1-3%를 차지하는 것으로 보고되었다.[2] 건선은 종족, 지역, 환경 등의 인자에 따라 발생빈도나 임상증상에 차이가 많고[3] 어느 연령에서나 발병이 가능하나 20대에 가장 흔하다. 건선의 경과는 다양하나 이환된 환자는 호전과 악화를 되풀이하면서 지속되어 심리적 부담을 갖게 된다.

건선의 조직학적 검사에서 비정상적인 각질형성세포의 분화와 증식 그리고 피부에 염증세포의 침윤을 관찰할 수 있다. 가장 중요한 병인으로 생각되는 각질형성세포의 증식은 세포 주기 기간이 짧아져 있고, 성장 가능 세포중 growth fraction이 증가되어 있으며 일정표피 면적당 증식 세포 수 자체가 정상보다 두배로 증가하는 proliferative cell volume이 증가되어 있다.[4] 면역학적 측면에서는 피부에 T 보조세포가 주로 침윤하게 되며 항원과 연관없이 물리적, 화학적 자극이나 자외선 등이 각질세포를 활성화시키거나 피부에 있는 어떤 항원이 항원 전달 세포에 인식되면 T 보조세포에 항원이 전달된 후 활성화 된 T 보조세포가 interleukin (IL)-2, IL-6, IL-8, IL-12, tumor necrosis factor와 같은 사이토카인을 분비하며 이러한 사이토

카인들이 세포증식에 관여한다.[5-7]

최근 인간 게놈 서열 해독 (human genome sequencing projects) 이 완성되어 감에 따라 인간 유전체의 기능을 분석하는 기능적 유전체 시대 (functional genomic era) 를 맞이하고 있다. 이에 따라 유전자의 기능을 밝히는 데에 가장 적합한 프로티오믹스 (proteomics) 에 대한 연구가 활발히 시도되고 있다.

프로티오믹스는 이차원 전기영동 (two-dimensional electrophoresis (2-DE)) 을 이용하여 단백을 분석하고 이를 여러가지 분석 도구들을 이용하여 단백을 감정하는 일련의 과정을 거치는데, 전기영동의 결과 얻어진 프로티옴 지도는 matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS) 또는 electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) 등을 이용하여 분석할 수 있다.[8-10] 이차원 전기영동은 25년 전 O'Farrell[11]에 의해 처음 기술된 방법으로 단백혼합물을 등전점 (isoelectric point) 과 분자량에 의해 분리하여 단백을 양적과 질적으로 동시에 분석하는 기술이다. 최근에는 고해상도 이차원 polyacrylamide gel 전기영동 (high resolution 2D-PAGE) 이 단백의 구성을 분석하는 정형화된 방법으로 사용되고 있으며, 전기영동의 결과를 스캐닝한 후 이미지 분석을 하고 이러한 전기영동의 결과에서 자동적으로 단백을 규명하는 새로운 방법들이 소개되고 있다.[12-13] 이러한 프로티오믹스는 특정한 질환에 의해 단백이 세포 내에서 변형되는 과정을 알 수 있어 치료 약물의 새로운 표적을 규명하고, 조기 진단의 생화학적 표지자 (biomarker) 를 발견하며, 치료의 효과 및 독성을 파악하고, 환자 개개인에 특이한 치료법 개발을 위해 이용되고 있다.

따라서 환자의 표피를 대상으로 프로티오믹스 기법을 이용하여 질병의 진행과정에서 표현되는 단백에 대한 분석을 시행하는 것은 다양한 증상을 보이는 건선에서 정확한 병인의 이해 및 적절한 치료를 위해 도움이 될 것으로 생각한다.

본 연구에서는 건선 환자 병변부위의 표피를 이용하여 이차원 전기영동을 이용한 프로티옴 지도를 얻어 건선 환자 정상피부와의 차이를 분석함으로써 건선에

특이한 단백질을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 대상

연세대학교 의과대학 부속 세브란스병원 피부과에 내원하여 임상적으로 건선으로 진단된 5명의 환자들을 대상으로 하였다. 건선 환자로부터 일반혈액검사, 일반화학검사 등을 시행하였으며, 과거력 및 치료 병력을 의무 기록을 통해 조사하였다.

건선 환자에서 홍반을 동반한 은백색 인설이 있는 병변부위와 병변에서 1 cm 떨어진 정상피부에서 각각 2 ㎝ × 2 ㎝ 크기의 피부 조직을 국소마취하에 표재성 혈관총 (superficial plexus) 에서 출혈이 일어나는 깊이까지 shaving biopsy를 시행하였다. 이 깊이에서 진피의 균일한 백색의 절단면을 관찰할 수 있었다. 수술용 가위를 이용하여 일부 진피층을 제거한뒤 피부절편을 만들어 10 mM EDTA용액을 가하여 37 ℃에서 4 시간 방치한 후 forcep과 scalpel로 표피를 분리하였다. 분리된 표피를 연삭기 (grinder) 를 이용하여 미세하게 분쇄시킨 후 250 × g으로 10 분간 원침하여 분리한 다음 실험에 사용하기 전까지 –70 ℃에 동결 보관하였다.

2. 시료 용해 및 재수화 (rehydration)

수집한 표피 120 μg을 pH 8.0의 1 M Tris, 0.3% sodium dodecyl sulfate (SDS) , 3% dithiothreitol이 함유된 용해 완충액 50 μℓ와 섞은 후 95 ℃에서 5 분간 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 ℃, 12,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 상층액을 수집하였

다. 재수화 tray에 젤 전기영동 시료 완충액으로 희석하여 원심분리한 시료 400 μℓ을 넣고, 17 cm의 pH 3-10 non-linear immobilized pH gradient (IPG) strip (Amersham Phamarcia Biotech, Piscataway, NJ, USA) 을 공기방울이 생기지 않게 설치하고 24 시간 방치하여 재수화시켰다.

3. 이차원 전기영동

재수화시킨 IPG strip은 IPG-phor (Amersham Phamarcia Biotech) 를 이용하여 저전압으로부터 고전압에서 적절한 시간 처리하여 등전화 (isoelectric focusing:IEF) 시켰다. IEF후에 IPG strip은 3.6 g의 urea, 2% SDS, 5 M Tris 2 ㎖, 50% glycerol 4 ㎖, 25% acrylamide 1 ㎖, 200 mM MTBP 250 μℓ가 함유된 동질 완충액에서 25 분간 동질화 (equilibration) 시켰다.

Polyacrylamide gel 제작을 위하여 1.875 M Tris buffer가 함유된 9% 완충액 40 ㎖와 40% stock acrylamide 45 ㎖, 증류수 115 ㎖를 혼합하고, 16% buffer 40 ㎖, 40% stock acrylamide 80 ㎖, 50% glycerol 80 ㎖를 혼합하였다. 이렇게 제작된 9-16% gradient polyacrylamide gel (21 cm × 21 cm × 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 ㎃/gel의 전류로 2 시간 prerun한 후, 15 ㎃/gel의 일정한 전류하에서 전기영동을 시행하였다.

4. Silver stains

전기영동을 시행한 polyacrylamide gel을 modified silver stain 방법을 이용하여 염색하였다. 먼저 acetic acid 50 ㎖, methanol 200 ㎖, 증류수 250 ㎖로 15 분씩 두 번 고정시킨 후, methanol 150 ㎖, 5% sodium thiosulfate 20 ㎖, sodium acetate 34 g, 증류수 330 ㎖로 30 분간 감작시켰다. 10 분간 3번 세척한 후, 2.5% silver nitrate 50 ㎖와 증

류수 450 ㎖를 가한 다음, 다시 1 분씩 두 번 세척하였다. 세척한 gel을 sodium carbonate 12.5 g, formaldehyde 200 ㎕, 증류수 500 ㎖로 발색시키고, EDTA 7.3 g, 증류수 500 ㎖로 발색을 중단시킨 후, 증류수 500 ㎖로 5 분씩 세 번 세척하였다.

5. 프로티옴 지도의 비교 분석

염색이 끝난 후 건선 환자 정상피부 및 병변부위 표피단백의 이차원 전기영동 젤을 탈색과정을 거치지 않고 GS-800 Calibrated Imaging Densitometer (BIO-RAD, Münich, Germany) 를 이용하여 스캐닝한 후 데이터화하였다. PDQuest (BIO-RAD) 를 사용하여 단백 스폿을 양적으로 측정하여 각 군의 프로티옴 지도를 얻었다.

건선 환자 정상피부 및 병변부위군을 비교한 후, Student's t-test 를 이용하여 통계학적으로 의미있게 증가하거나, 감소한 단백 성분의 등전점 (pI) 과 분자량 (molecular weight, M.W.) 을 비교, 분석하였다. p값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결　　과

1. 건선 환자의 임상양상 및 혈액학적 검사 소견

건선 환자는 남자 3명, 여자 2명으로 총 5명의 평균연령은 31세였고, 평균 유병기간은 3.4년 이었다. 환자의 임상형은 모두 판상형이었으며, 피부의 국소적 손상부위에 동일한 질병이 생기는 Koebner 현상은 3명에서 나타났다. 일반 혈액 검사, 일반 화학 검사는 모두 정상소견을 보였다 (표 1).

2. 건선 환자의 정상피부와 병변부위 표피단백의 이차원 전기영동 비교 소견

건선 환자 병변부위 표피단백의 이차원 전기영동을 시행한 후 PDQuest의 Student's t-test로 분석한 결과, 총 15개의 단백 스폿이 건선 환자의 정상피부에 비해 의미있게 증가 또는 감소되었다 (그림 1, 2)(표 2). 분자량/등전점이 각각 6.8 kDa/7.3 (A), 6.9 kDa/6.9 (B), 7.3 kDa/7.8 (C), 8.8 kDa/6.6 (D), 11.5 kDa/6.7 (E), 11.6 kDa/6.9 (F), 13.1 kDa/5.9 (G), 13.2 kDa/6.1 (H), 13.8 kDa/5.6 (I), 15.2 kDa/5.9 (J), 48.3 kDa/4.8 (K), 49.7 kDa/4.8 (L), 49.9 kDa/4.9 (M), 29.7 kDa/7.3 (N) 을 갖는 14개의 단백 스폿은 5명 (100%) 의 건선 환자 모두 정상피부에 비해 병변부위의 표피에서 증가하는 소견을 보였고 (그림 3,4,5), 분자량 70.9 kDa과 5.3의 등전점을 갖는 단백 스폿 (O) 은 4명 (80%) 의 건선 환자 병변부위에서 감소를 보였다 (그림 6). 각질형성세포의 프로티옴 지도와 비교하였을 때[14-19] 분자량 11.5 kDa과 등전점 6.7을 가지는 단백 스폿 (E) 의 경우 psoriasin에 해당되며, 분자량 48.3 kDa과 등전점 4.8을 가지는 단백 스폿 (K) 의 경우 keratin 16에 해당된다. 반면에 분자량 66.8 kDa과 7.9의 등전점을 가지는 keratin 1과 분자량 54.9 kDa과 5.0의 등전점을 가지는 keratin 10에 해당하는 단백 스폿은 건선 환자의 정상피부와 병변부위의 표피에서 의미있는 변화를 관찰할 수 없었다.

표 1. 건선 환자의 임상양상과 혈액학적 검사 소견

환자	성별/나이	유병기간 (년)	임상형	조직검사부위	Koebner 현상	일반혈액검사	일반화학검사
1	여/34	2	판상형	하지	있음	정상	정상
2	남/22	2	판상형	상지	있음	정상	정상
3	남/61	2	판상형	등	없음	정상	정상
4	여/22	10	판상형	하지	있음	정상	정상
5	남/14	1	판상형	하지	없음	정상	정상

표 2. 건선 환자의 정상피부와 병변부위 표피단백의 이차원 전기영동 비교 소견

단백 스폿	분자량 (kDa)	등전점 (pI)	변화를 보인 환자수 (%)	변화*
A	6.8	7.3	5 (100)	증가
B	6.9	6.9	5 (100)	증가
C	7.3	7.8	5 (100)	증가
D	8.8	6.6	5 (100)	증가
E	11.5	6.7	5 (100)	증가
F	11.6	6.9	5 (100)	증가
G	13.1	5.9	5 (100)	증가
H	13.2	6.1	5 (100)	증가
I	13.8	5.6	5 (100)	증가
J	15.2	5.9	5 (100)	증가
K	48.3	4.8	5 (100)	증가
L	49.7	4.8	5 (100)	증가
M	49.9	4.9	5 (100)	증가
N	29.7	7.3	5 (100)	증가
O	70.9	5.3	4 (80)	감소

*감소, 증가는 건선 환자의 정상피부에 비해 병변부위 표피에서 감소, 증가되었음을 의미함.

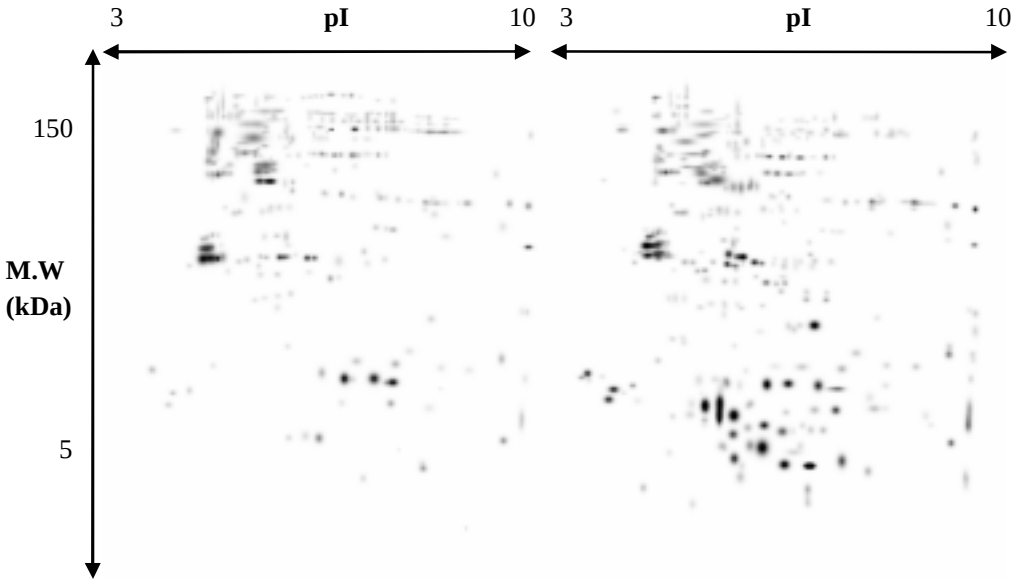

그림 1. 건선 환자의 정상피부와 병변부위 표피단백의 이차원 전기영동 소견. 건선 환자의 정상피부와 병변부위에서 수집한 표피를 용해 및 재수화과정을 거쳐 고해상도 이차원 전기영동을 시행하였으며 그 결과를 스캐닝한 후 이미지 분석하였다. M.W: molecular weight

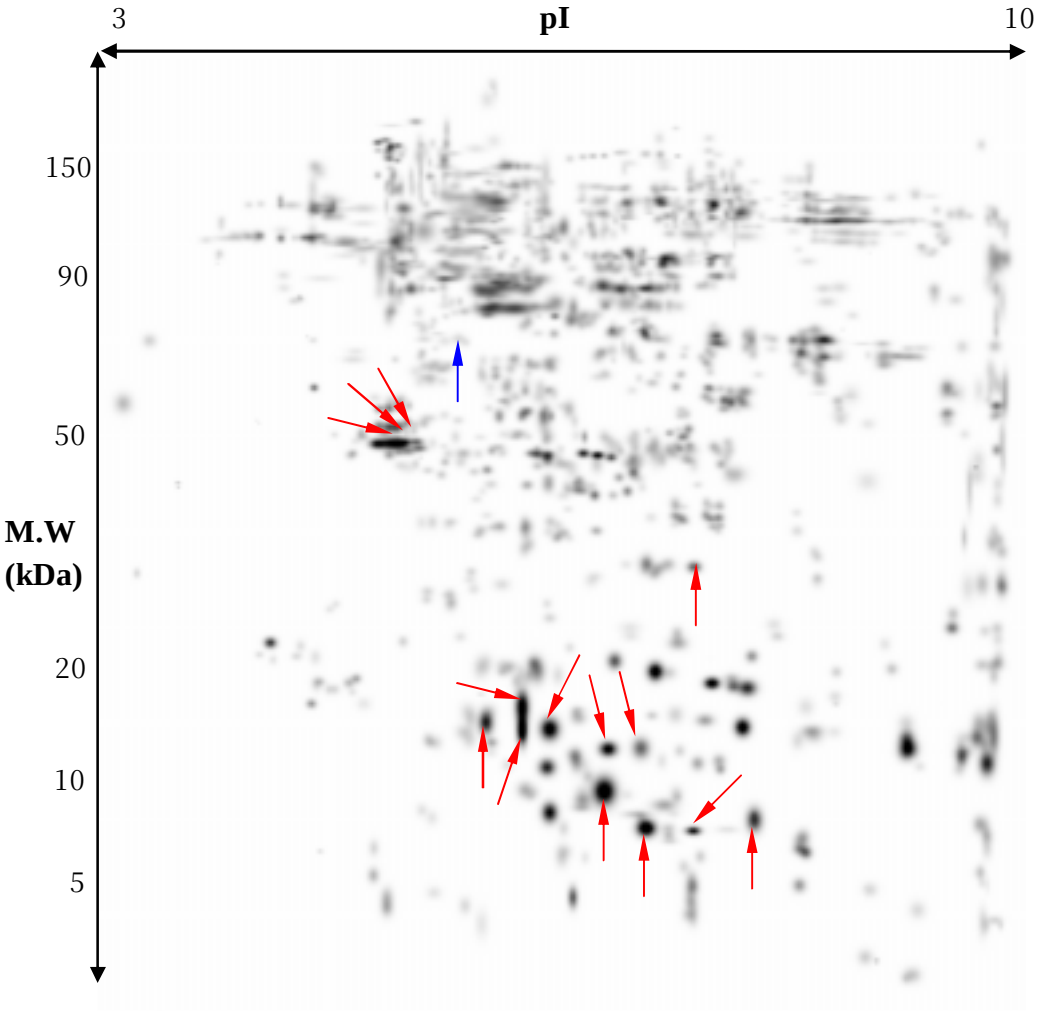

그림 2. 건선 환자의 정상피부와 병변부위 표피단백의 large gel 이차원 전기영동 비교 소견. 건선 환자의 정상피부와 병변부위에서 수집한 표피를 용해 및 재수화과정을 거쳐 고해상도 이차원 전기영동을 시행하였으며 그 결과를 스캐닝한 후 이미지 분석하였다. 총 15개의 단백 스폿의 변화가 관찰되고 있다. 건선 환자의 정상피부에 비해 건선 환자의 병변부위 표피에서 증가되어 있는 단백 스폿을 붉은 색으로, 감소되어 있는 단백 스폿을 푸른 색으로 표시하였다.

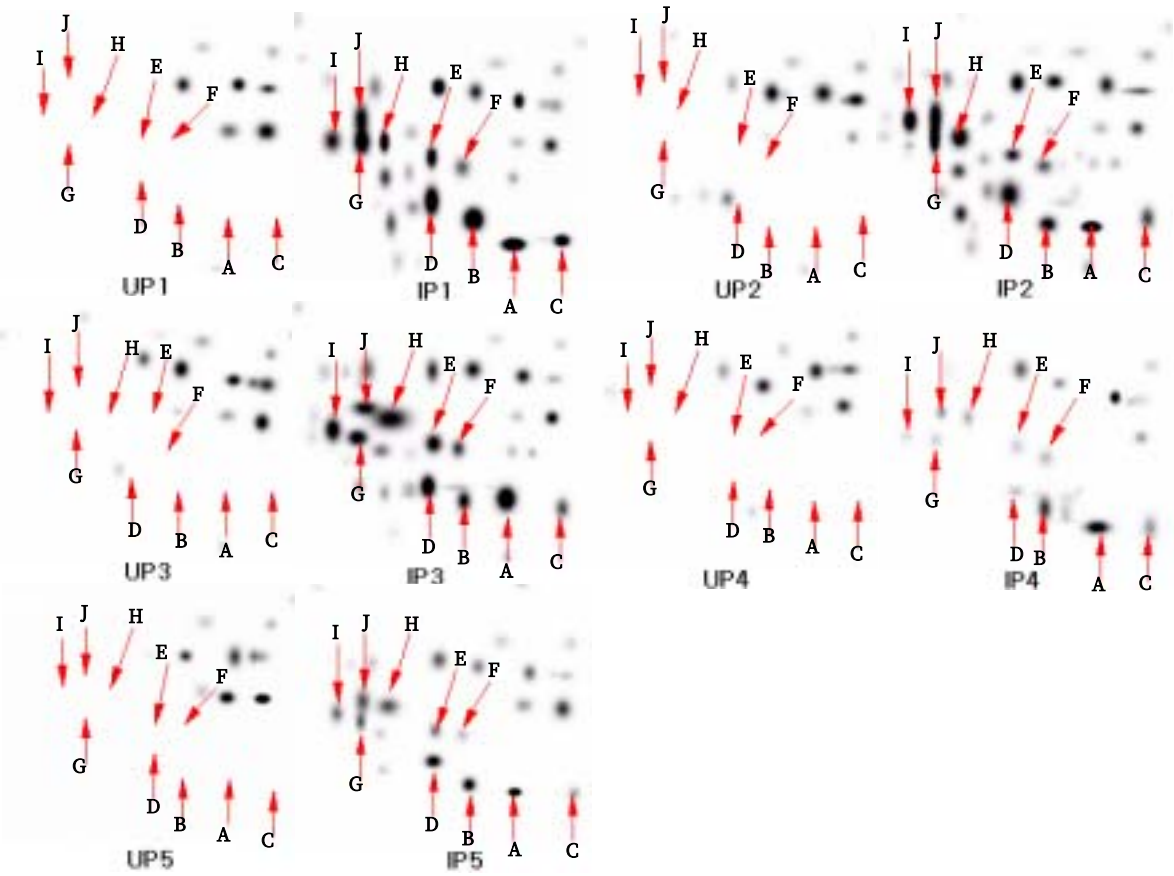

그림 3. 건선 환자의 정상피부와 병변부위 표피의 이차원 전기영동 단백 스폿 비교 소견Ⅰ. 건선 환자의 정상피부와 병변부위에서 수집한 표피를 용해 및 재수화 과정을 거쳐 고해상도 이차원 전기영동을 시행하였으며 그 결과를 스캐닝한 후 이미지 분석하였다. 분자량/등전점이 각각 6.8 kDa/7.3 (A), 6.9 kDa/6.9 (B), 7.3 kDa/7.8 (C), 8.8 kDa/6.6 (D), 11.5 kDa/6.7 (E), 11.6 kDa/6.9 (F), 13.1 kDa/5.9 (G), 13.2 kDa/6.1 (H), 13.8 kDa/5.6 (I), 15.2 kDa/5.9 (J) 를 가지는 단백 스폿이 5명의 모든 건선 환자의 병변부위 표피에서만 관찰되고 있다. 단백 스폿 E는 psoriasin에 해당된다. UP: 건선 환자의 정상피부, IP: 건선 환자의 병변부위

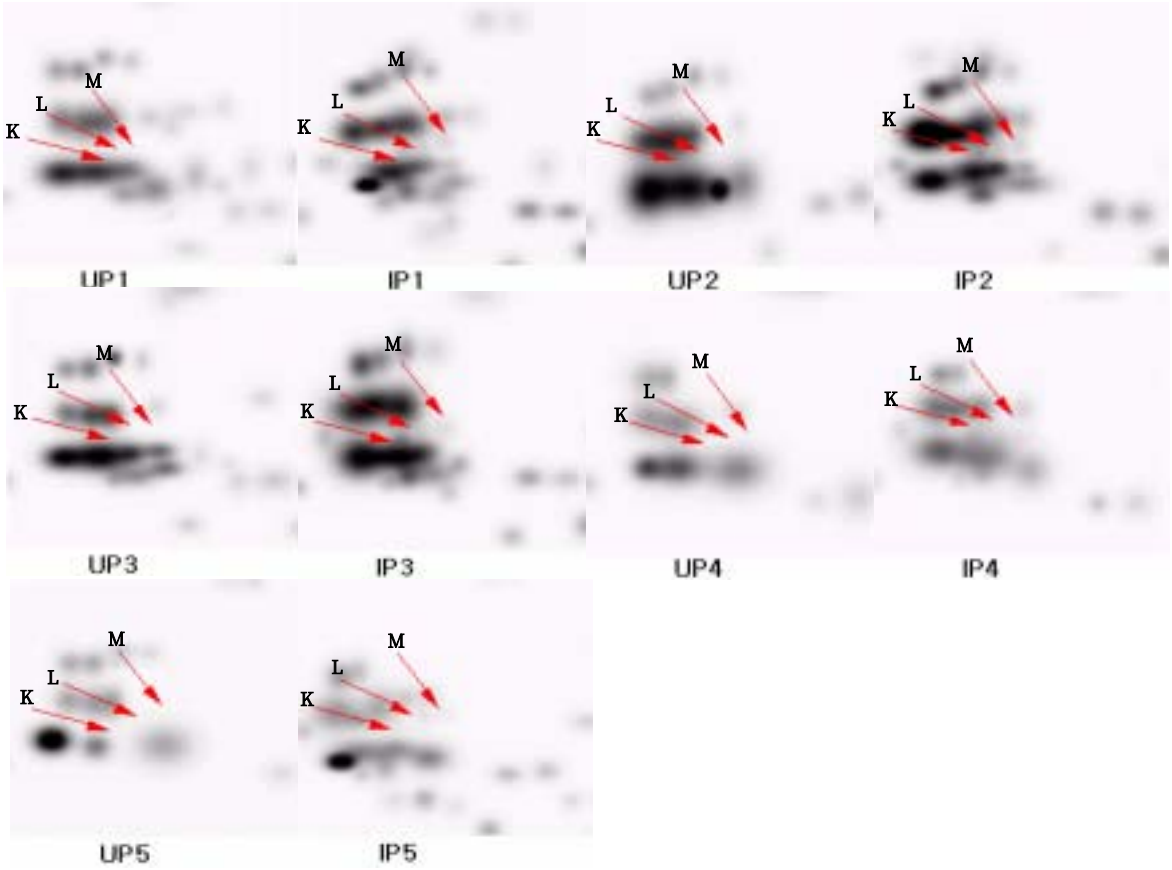

그림 4. 건선 환자의 정상피부와 병변부위 표피의 이차원 전기영동 단백 스폿 비교 소견Ⅱ. 건선 환자의 정상피부와 병변부위에서 수집한 표피를 용해 및 재수화 과정을 거쳐 고해상도 이차원 전기영동을 시행하였으며 그 결과를 스캐닝한 후 이미지 분석하였다. 분자량/등전점이 각각 48.5 kDa/4.8 (K), 49.7 kDa/4.8 (L), 9.9 kDa/4.9 (M) 을 가지는 단백 스폿이 5명의 모든 건선 환자의 병변부위 표피에서만 관찰되고 있다. 단백 스폿 K의 경우 keratin 16에 해당된다. UP: 건선 환자의 정상피부, IP: 건선 환자의 병변부위

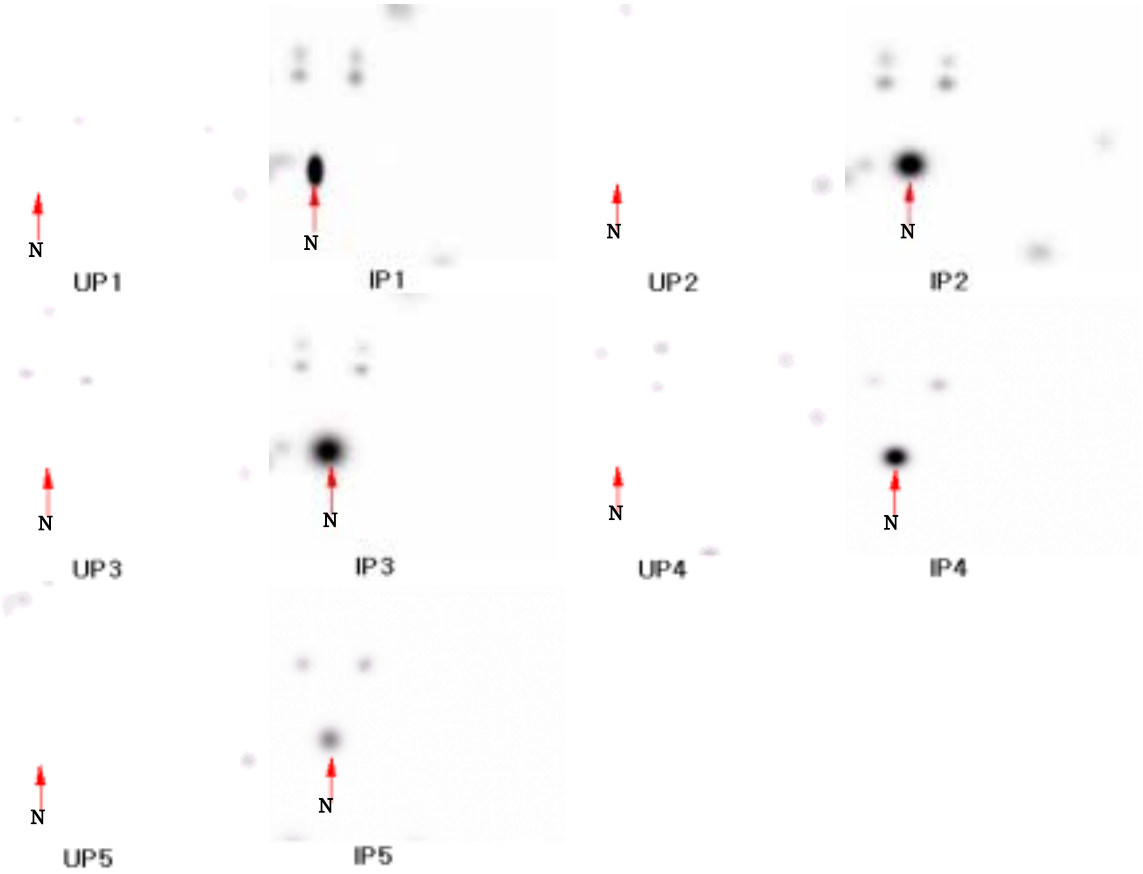

그림 5. 건선 환자의 정상피부와 병변부위 표피의 이차원 전기영동 단백 스폿 비교 소견III. 건선 환자의 정상피부와 병변부위에서 수집한 표피를 용해 및 재수화 과정을 거쳐 고해상도 이차원 전기영동을 시행하였으며 그 결과를 스캐닝한 후 이미지 분석하였다. 분자량 29.7 kDa과 7.3의 등전점을 가지는 단백 스폿 (N) 이 5명의 모든 건선 환자의 병변부위 표피에서만 관찰되고 있다. UP:건선 환자의 정상피부, IP: 건선 환자의 병변부위

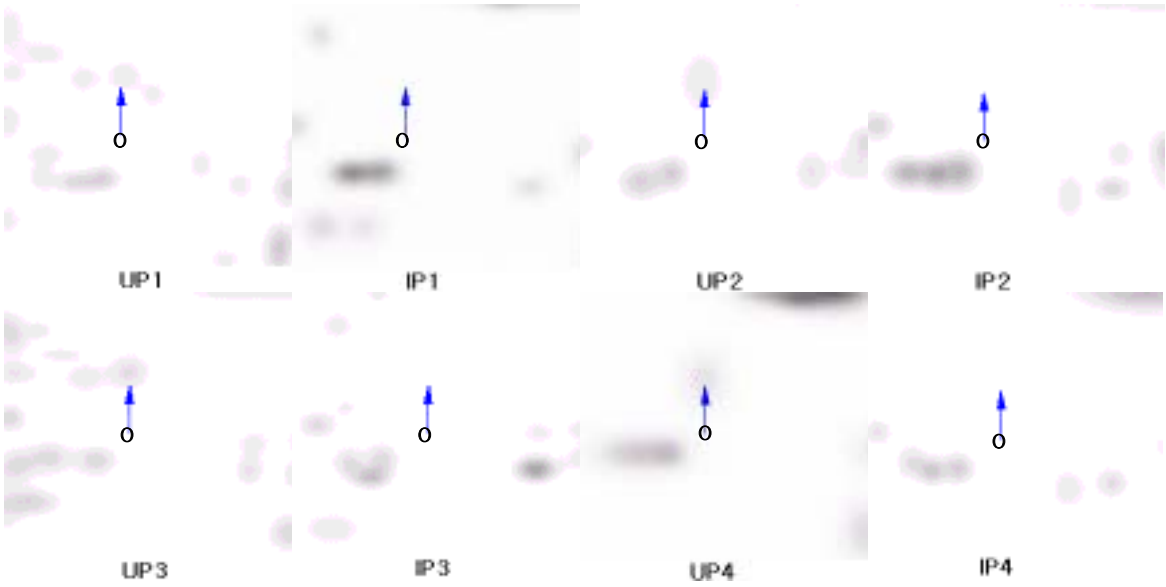

그림 6. 건선 환자의 정상피부와 병변부위 표피의 이차원 전기영동 단백 스폿 비교 소견Ⅳ. 건선 환자의 정상피부와 병변부위에서 수집한 표피를 용해 및 재수화 과정을 거쳐 고해상도 이차원 전기영동을 시행하였으며 그 결과를 스캐닝한 후 이미지 분석하였다. 분자량 70.9 kDa과 5.3의 등전점을 갖는 단백 스폿 (O) 이 4명 (80%) 의 건선 환자의 병변부위 표피에서는 관찰되고 있지 않다. UP:건선 환자의 정상피부, IP: 건선 환자의 병변부위

Ⅳ. 고 찰

유전자와 단백의 이해에 대한 새로운 방법으로 프로티오믹스가 최근 대두되고 있으며, 이를 이용하여 여러 질환의 병인 규명과 진단, 치료에 유용한 생화학적 표지자를 알 수 있게 되었다.[20] 건선 연구에서 아직 프로티오믹스가 적용된 바가 적으며, 따라서 본 연구에서는 고해상도 이차원 전기영동을 통해 얻은 프로티옴 지도를 이용하여 건선에 특이한 단백 스폿을 찾아내고자 하였다.

본 연구에서 건선 환자 정상피부의 전기영동 결과와 비교하여 볼 때 15개의 단백 스폿이 유의하게 변화되었다. 이 중 분자량 11.5과 등전점 6.7의 단백 스폿 (E)과 분자량 48.3 kDa, 등전점 4.8의 단백 스폿 (K) 은 각각 같은 분자량과 등전점을 가지는 psoriasin, keratin 16과 유사한 단백 스폿으로 생각되어지며, 확인을 위해 앞으로 mass spectrometry 등으로 단백의 분리 후 정확한 검증이 필요하리라 사료된다. Psoriasin은 염색체 1q21의 S100 gene cluster내에 위치하는 S100 gene family로 배양된 정상 표피와 악성변화를 보이는 각질형성세포, 악성변화를 보이는 유방 상피조직, 건선 등에서 발현된다.[21] 이 단백은 상피세포의 이상 분화와 연관되며 호중구와 CD4+ T 림프구에 대해 강력하고 선택적인 화학주성 인자로 잘 알려져 있어[22] 건선 표피에 호중구와 T 림프구의 침윤을 보이는 데 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 정상표피에서 기저세포층에는 K5와 K14가 합성되고[23] 기저상층부에는 K1과 K10이 합성되는데[24-26] 건선의 기저상층부에는 이른바 “증식연관 케라틴”인 K16이 표현된다.[27] 이러한 케라틴은 각질화동안 turnover가 증가된 결과이며[28] K1과 K10의 발현감소와 관련이 있다.[29] 본 연구에서 K1과 K10의 정상피부와 병변부위의 표피에서 차이는 관찰되지 않았으나 “증식연관 케라틴”인 K16으로 사료되는 단백 스폿이 병변부위 표피에서 증가되는 것을 관찰할 수 있었다.

현재까지 건선에서 각질형성세포만을 분리하여 이차원 전기영동을 시행하여 연

구한 논문이 일부 있으나[30,31] 건선의 병인에 각질형성세포의 증식과 분화에 관련된 단백뿐만 아니라 각질형성세포외의 표피를 이루는 세포와 많은 다른 인자가 병인에 관여할 것으로 생각되어 본 연구에서는 이차원 전기영동의 시료로 건선 환자의 표피 전체를 이용하였으며 기존 연구에 비해 단백 스폿의 차이가 있음을 확인하였다. 표피전층에 대한 표준 지도는 현재까지 작성된바 없으며 정상인의 표피에서 얻은 신뢰할 수 있는 프로티옴 지도의 작성이 건선 뿐만이 아니라 다른 다양한 피부질환과의 비교에도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 세포증식의 체계적인 연구에 도움이 되며 세포 분화의 여러단계에 대한 표피단백을 규명하는데 기여할 것으로 생각된다. 앞으로 더 많은 건선 환자들에서 전기영동 결과를 비교하고 증상의 정도와 치료유무에 따른 단백의 변화와 건선 이외의 다른 구진인설성 질환들과의 비교도 필요할 것으로 생각된다. 또한 유의하게 변화를 보였으나 아직 성분이나 이름이 알려지지 않은 스폿들에 대해서 electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) 또는 matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS) 등의 방법을 이용한 단백의 정확한 동정과, 나아가서 SWISS-PROT (Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland) 등을 이용한 단백의 기능, 구성, 변형, 서열 등 특성의 파악이 필요할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결　론

본 연구에서는 연세대학교 의과대학 세브란스병원 피부과에 내원한 5명의 건선환자를 대상으로 정상피부와 병변부위 표피의 이차원 전기영동 결과로 얻은 프로티옴 지도를 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다

1. 건선 환자의 정상피부에 비해 병변부위 표피에서 분자량/등전점이 각각 6.8 kDa/7.3, 6.9 kDa/6.9, 7.3 kDa/7.8, 8.8 kDa/6.6, 11.5 kDa/6.7, 11.6 kDa/6.9, 13.1 kDa/5.9, 13.2 kDa/6.1, 13.8 kDa/5.6, 15.2 kDa/5.9, 48.3 kDa/4.8, 49.7 kDa/4.8, 49.9 kDa/4.9, 29.7 kDa/7.3 을 가지는 14개의 단백 스폿이 5명의 모든 환자에서 증가되는 것을 관찰하였다. 이중 분자량 11.5 kDa과 6.7의 등전점을 가지는 단백 스폿 (E) 과 분자량 48.3 kDa과 4.8의 등전점을 가지는 단백 스폿 (K) 은 각각 psoriasin, k16과 유사한 단백 스폿으로 사료된다.

2. 건선 환자의 정상피부에 비해 병변부위 표피에서 분자량 70.9 kDa과 5.3의 등전점을 갖는 단백 스폿이 4명 (80%) 에서 감소되는 것을 관찰하였다.

본 연구를 통해 건선 환자의 표피에서 여러 단백 스폿의 변화를 관찰하였으며 이러한 결과를 건선의 병인규명, 치료에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Farber EM, Bright RD, Nall ML. Psoriasis. A questionnaire survey of 2,144 patients. Arch Dermatol 1968;98:248-59.
2. Park YK, Cho MY, Hann SK. Epidemiologic study on psoriasis. Ann Dermatol 1992;4:9-20.
3. Enno C, Wolfram S. Psoriaisis. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wloff K, et al, editors. Dermatology in general medicine. 4th ed. New York: McGraw-Hill Book; 1993. p. 489-514.
4. Ortonne JP. Aetiology and pathogenesis of psoriasis. Br J Dermatol 1996;135:1-5.
5. Vollmer S, Menssen A, Trommler P, Schendel D, Prinz JC. T lymphocytes derived from skin lesions of patients with psoriasis vulgaris express a novel cytokine pattern that is distinct from that of T helper type 1 and T helper type 2 cells. Eur J Immunol 1994;24:2377-82.
6. Schlaak JF, Buslau M, Jochum W, Hermann E, Girndt M, Gallati H, et al. T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. J Invest Dermatol 1994; 102:145-9.
7. Chang JC, Smith LR, Froning KJ, Schwabe BJ, Laxer JA, Caralli LL, et al. CD8+ T cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptor V beta 3 and/or V beta 13.1 genes. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:9282-6.
8. Anderson NG, Anderson NL. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present, and future. Electrophoresis 1996;17:443-53.
9. Anderson JS, Svensson B, Roepstorff P. Electrospray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: powerful analytical tools in recombinant protein chemistry. Nature Biotechnol 1996;14:449-57.
10. Figeys D, Gygi SP, Zhang Y, Watts J, Gu M, Aebersold R. Electrophoresis combined with novel mass spectrometry techniques: powerful tools for analysis of proteins and proteomes. Electrophoresis 1998;19:1811-8.

11. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 1975;250:4007-21.
12. Klose J. Large-gel 2D electrophoresis. Methods Mol Biol 2000;112:147-72.
13. Gevaert K, Vanderkerckhove J. Protein identification methods in proteomics. Electrophoresis 2000;21:1145-54.
14. Rasmussen HH, Van Damme J, Puype M, Gesser B, Celis JE, Vandekerckhove J. Microsequencing of proteins recorded in human two-dimensional gel protein databases. Electrophoresis 1991;12:873-82.
15. Bauw G, Rasmussen HH, van den Bulcke M, van Damme J, Puype M, Gesser B, et al. Two-dimensional gel electrophoresis, protein electroblotting and microsequencing: a direct link between proteins and genes. Electrophoresis 1990;11:528-36.
16. Celis JE, Gesser B, Rasmussen HH, Madsen P, Leffers H, Dejgaard K, et al. Comprehensive two-dimensional gel protein databases offer a global approach to the analysis of human cells: the transformed amnion cells (AMA) master database and its link to genome DNA sequence data. Electrophoresis 1990;11:989-1071.
17. Celis JE, Leffers H, Rasmussen HH, Madsen P, Honore B, Gesser B, et al. The master two-dimensional gel database of human AMA cell proteins: towards linking protein and genome sequence and mapping information (update 1991). Electrophoresis 1991;12:765-801.
18. Celis JE, Rasmussen HH, Madsen P, Leffers H, Honore B, Dejgaard K, et al. The human keratinocyte two-dimensional gel protein database (update 1992): towards an integrated approach to the study of cell proliferation, differentiation and skin diseases. Electrophoresis 1992;13:893-959.
19. Rasmussen HH, Van Damme J, Puype M, Gesser B, Celis JE, Vandekerckhove J. Microsequences of 145 proteins recorded in the two-dimensional gel protein database of normal human epidermal keratinocytes. Electrophoresis 1992;13:960-9.
20. Cunninghan MJ. Genomics and proteomics: the new millenium drug discovery and development. J Pharmacol Toxicol Methods 2000;44:291-300.

21. Watson PH, Leygue ER, Murphy LC. Psoriasin (S100A7). Int J Biochem Cell Biol 1998;30:567-71.
22. Jinquan T, Vorum H, Larsen CG, Madsen P, Rasmussen HH, Gesser B, et al. Psoriasin: a novel chemotactic protein. J Invest Dermatol 1996;107:5-10.
23 Sun TT, Eichner R, Schermer A, Cooper D, Nelson WG, Weiss RA. Classification, expression and possible mechanisms of evolution of mammalian keratins; an unifying model. In: Levine A, Topp W, Vande Wonde G, Watron JD, editors. Cancer cells: the transformed phenotype. 1st ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1984. p.169-76.
24. Eichner R, Bonitz P, Sun TT. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression. J Cell Biol 1984;98:1388-96.
25. Fuchs E, Green H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. Cell 1980;19:1033-42.
26. Kopan R, Traska G, Fuchs E. Retinoids as important regulators of terminal differentiation: examining keratin expression in individual epidermal cells at various stages of keratinization. J Cell Biol 1987;105:427-40.
27. Stoler A, Kopan R, Duvic M, Fuchs E. Use of monospecific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal epidermal differentiation. J Cell Biol 1988;107:427-46.
28. Hunter I, Skerrow D. The effect of increased tissue turnover on the keratinization of human epidermis. Biochim Biophys Acta 1981;674:155-9.
29. Weiss RA, Eichner R, Sun TT. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. J Cell Biol 1984;98:1397-406.
30. Celis JE, Cruger D, Kiil J, Dejgaard K, Lauridsen JB, Ratz GP, et al. A two-dimensional gel protein database of noncultured total normal human epidermal keratinocytes: identification of proteins strongly up-regulated in psoriatic epidermis. Electrophoresis

1990;11:242-54.

31. Easty DJ, Patel K, Otto WR, Dunn MJ, Kiil J, Evans DJ. A study of protein synthesis in cells cultured from involved psoriatic skin. Electrophoresis 1991;12:579-84.

Abstract

The analysis of epidermal proteins in patients with psoriasis by two-dimensional gel electrophoresis

Dong Hoon Lee

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Yoon-Kee Park)

Psoriasis is a common, chronic, recurrent, inflammatory disease of the skin characterized by circumscribed, erythematous, thick plaques covered by silvery white scales. Current knowledge of the disease points toward the individual lifestyle and environmental factors as the triggers for the onset of psoriasis besides the genetic background, giving rise to immune-related proliferation of the keratinocytes. Although many researchers are working hard on the topic, we are still in search of its exact pathophysiology.

Proteomics is a new emerging field of research for understanding cell physiology and pathophysiology of diseases, based on the protein measurement by high resolution two-dimensional gel electrophoresis followed by the protein identification and characterization by mass spectrometry.

In order to identify the specific epidermal proteins in patients with psoriasis, we compared the proteome maps obtained from uninvolved and involved psoriatic epidermis by isoelectric focusing in 3-10 non-linear immobilzed pH gradients strips and two-dimensional electrophoresis.

The significant differences in protein expressions between two groups were found as evidenced by many increased or decreased protein spots. We found that 15 spots showed changes in the involved psoriatic epidermis as compared to the uninvolved psoriatic epidermis. Protein spots with 6.8 kDa/pI 7.3, 6.9 kDa/pI 6.9, 7.3 kDa/pI 7.8, 8.8 kDa/pI 6.6,

11.5 kDa/pI 6.7, 11.6 kDa/pI 6.9, 13.1 kDa/pI 5.9, 13.2 kDa/pI 6.1, 13.8 kDa/pI 5.6, 15.2 kDa/pI 5.9, 48.3 kDa/pI 4.8, 49.7 kDa/pI 4.8, 49.9 kDa/pI 4.9, 29.7 kDa/pI 7.3 were increased in 100% of involved psoriatic epidermis and protein spot with 70.9 kDa/pI 5.3 decreased in 80% of involved psoriatic epidermis as compared to uninvolved psoriatic epidermis.

In conclusion, the significant changes in many protein spots were observed in involved psoriatic epidermis as compared to uninvolved psoriatic epidermis. The proteomics in psoriasis may be helpful for the understanding its pathophysiology and treatment.

Key Words : psoriasis, proteomics, epidermal proteins, two-dimensional electrophoresis