천식 및 알레르기 제 28 권 제 3 호
Vol. 28, No. 3, Sep., 2008

□원 저□

기관지천식과 관련된 기도상피세포 자가항원의 단백체 분석: 세포배양 분획을 활용한 표적단백질의 규명 방법

아주대학교 의과대학 [1]알레르기-류마티스 내과, [2]내분비연구실

이혜아[1] · 이연정[2] · 권 별[1] · 최길순[1] · 박한정[1] · 예영민[1] · 박해심[1] · 강 엽[2] · 남동호[1]

Proteomic Analysis of Airway Epithelial Cell Autoantigens Associated with Bronchial Asthma: Target Protein Identification Using Cultured Cell Fractionation Method

Hye-Ah Lee[1], Yeon-Jeong Lee[2], Byul Kwon[1], Gil-Soon Choi[1], Han-Jung Park[1], Young-Min Ye[1], Hae-Sim Park[1], Yup Kang[2] and Dong-Ho Nahm[1]

[1]Department of Allergy and Rheumatology, [2]The Laboratory of Endocrinology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea.

Background: Involvement of the autoimmune mechanism has been suggested for the pathogenesis of bronchial asthma and several autoantigens which are associated with bronchial asthma have been identified.
Objective: To identify novel asthma-associated autoantigens by proteomic analysis of proteins which are extracted by the cultured cell fractionation method according to the physical affinity of airway epithelial cells (A549) to the culture matrix.
Method: Autoantigens were screened with serum samples from patients with severe asthma and the target autoantigens were identified by mass spectrometry.
Result: Cultured A549 cells were differentially fractionated into easily detachable floating cell fraction and firmly attached cell fraction. Easily detachable cell fraction containing senescent cell and necrotic cell debris had many detectable asthma-related autoantigens when screened by immunoblot analysis using IgG antibodies from patients with severe asthma. In mass spectrometry analysis of 95-kDa autoantigen, ailpha-actin 4 was identified as a new airway epithelial autoantigen which was recognized by IgG autoantibody from a patient with severe asthma. This was reconfirmed by using specific antibody.
Conclusion: Proteomic analysis of the airway epithelial cells using the differential fractionation method according to the physical characteristics of cultured airway epithelial cells may be a novel method for the identification of additional asthma- related autoantigens. **(Korean J Asthma Allergy Clin Immunol 2008;28:192-198)**

Key words: Asthma, Proteomics, Mass spectrometry, Autoantibodies, Autoantigens

서 론

질병과 관련된 기초를 밝히는데 있어서 유전자에 대한 연구뿐만 아니라, 새로운 단백질 분석 방법을 이용하여 유전자에 의해 발현되는 단백질을 분석하고 이의 생물학적인 기능을 밝히려는 시도들이 계속되고 있다. 최근, 세포 또는 조직 내에 복잡하게 섞여 혼합물의 형태로 존재하는 단백질들을 분리해내어 총체적으로 분석하려고 시도하는 학문이 태동되어 "단백체학(proteomics)"이라고 불리는 새로운 학문분야가 탄생하게 되었다.[1)] 이러한 단백체학의 탄생에는 혼합된 단백질들을 분리할 수 있는 전기영동법(특히 2-dimensional electrophoresis 법)과 함께 질량분석기를 이용한 미세한 양의 단백질을 정확하게 동정(identification)해내는 방법의 개발이라는 2가지 측면의 기술적인 발전이 중요한 역할을 하였다.[1)] 이중에서 질량분석기를 이용한 단백질 동정은 단백체학의 가장 핵심적인 부분이라고 판단된다.[1)]

최근, 기관지천식의 병인기전을 밝히기 위해서, 천식환자들의 혈액 검체 혹은 천식반응을 유도한 동물의 기도 조직을 단백체기법으로 분석한 연구결과들이 시도되고 있다.[2,3)] 저자들은 '성인 천식 환자들 중에서 비알레르기성 천식 혹은 중증천식 환자들의 일부는 기관지상피세포에 대한 자가면역

이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단 연구비(KRF-2007-521-E00059)의 지원으로 수행됨. 이 논문은 또한 2003년 아주대학교 대학원 의학과 연구비의 지원으로 수행됨.
책임저자 : 남동호, 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지
아주대학교 의과대학 알레르기-류마티스 내과, 우: 442-721
Tel: 031) 219-5152, Fax: 031) 219-5154
E-mail: dhnahm@ajou.ac.kr
투고일: 2008년 6월 25일, 심사일: 2008년 8월 1일
게재확정일: 2008년 8월 15일

기전이 발병기전에 관여할 것이다.'라는 가설을 가지고 천식 환자들의 혈청 내에 존재하는 IgG 항체와 반응하는 기도 상피세포 자가항원단백질을 단백체학적인 분석법으로 규명하고자 시도한 결과 싸이토케라틴 18 단백질[4]과 alpha-enolase[5] 단백질이 천식과 연관된 자가항원 단백임을 규명하여 보고한 바 있다. 또한 저자들의 연구 이전에도 beta-2 adrenergic receptor,[6] vasoactive intestinal peptide[7]가 기관지 천식과 관련된 자가항원으로 규명되어 보고된 바 있었다. 하지만, 이러한 천식과 연관된 자가항원들의 규명들만으로는 실제로 일부 기관지천식 환자들의 천식 병인기전에 자가면역반응이 관여한다고 증명하기에는 논리적으로 아직 부족한 상태이다. 또한 실제로 천식의 발병에 더 중요한 역할을 하는 아직 밝혀내지 못한 또 다른 추가적인 자가항원들이 다수 존재할 가능성이 있다고 판단된다.

이에 저자들은 본 연구에서 동일한 기도상피세포(A549 세포주)로부터 단백질을 추출할 경우에도, 배양 시 사용되는 접시의 플라스틱 표면에 대한 물리적인 부착 강도에 따라서 배양된 기도상피세포를 분획할 경우, 배양된 전체 기도상피세포로부터 단백질을 추출하는 것에 비해서 천식과 관련된 자가항원을 규명하는데 있어서 유리한 점이 있다는 점을 발견하여, 새로운 천식관련 자가항원 단백질을 규명하기 위해서 본 연구를 수행하게 되었다. 즉, 기도상피세포를 세포배양 플라스틱 접시의 표면을 모두 덮을 정도로 과배양한 후에 물리적인 부착강도가 약한 노후한 세포와 플라스틱 표면에 강하게 부착되어 자라는 젊은 기도상피세포의 분획을 따로 분리하여 단백질을 추출하여 두 가지 배양세포 분획들 사이에 자가항원의 분포의 차이를 확인함으로써 천식과 관련된 새로운 기도상피세포 자가항원을 규명하고자 시도하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

대학병원의 외래 또는 응급실로 내원하는 기관지 천식으로 진단 받은 환자들을 연구 대상으로 하였다(Table 1). 본 연구에 포함된 천식환자들은 기관지천식에 합당한 전형적인 임상병력을 가졌으며, mL 당 8 mg 미만의 메타콜린의 흡입 후 FEV_1의 20% 감소를 보이거나 또는 기관지 확장제의 흡입 후 기저치에 비해 12% 이상(그리고 200 mL 이상) 의 FEV_1의 증가를 나타낸 경우만을 대상으로 하였다. 모든 기관지천식 환자는 50종의 흔한 알레르겐(Bencard Co. Brentford, UK)을 이용한 피부단자시험을 시행하였다. 검사 결과 하나 이상의 흡입성 알레르겐에 대하여 평균 팽진의 크기가 3 mm 이상인 경우를 아토피성 천식으로 분류하였다.

또한 천식의 임상적인 중증도 분류 시 중증 천식의 기준은 최근에 발표된 유럽의 다기관 공동연구에서 사용한 기준을 이용하여 환자의 병력 및 투약 기록상 최근 1년간 흡입스테로이드제와 장시간 지속형 기관제확장제를 포함한 천식치료약물로 지속적인 약물치료를 받았음에도 천식의 급성악화로 응급실을 방문하거나 병원에 입원하여 스테로이드 정맥 주사 치료를 받은 경험이 있는 환자들로 정의하였다.[5] 최근 1년간 지속적 또는 간헐적으로 천식 치료를 받아왔으나, 심한 천식 악화를 경험하지 않은 천식 환자를 중등증 천식으로 정의하였으며, 최근 1년간 간헐적인 천식 증상이 있었으나 지속적인 약물 치료가 필요하지 않았던 환자들을 경증 천식으로 정의하였다.

본 연구에서는 중증천식과 관련된 새로운 기도상피세포

Table 1. Characteristics of study subjects

	No.	Sex	Age	Atopy	FEV_1
Healthy control	1	M	24	N.D	102
Mild asthma	2	F	45	+	64
	3	M	19	+	96
	4	M	19	+	73
	5	M	30	+	100.3
	6	M	22	+	87.8
Severe asthma	7	F	46	+	72.8
	8	F	58	−	46.7
	9	M	34	+	41.9
	10	F	40	+	76.3
	11	F	64	−	77
	12	F	70	−	81.5
	13	F	47	−	81
	14	M	20	−	56.8

N.D = not determined.

자가항원 단백질의 규명을 위해서 1명의 정상 대조군과 5명의 경증 천식과 8명의 중증 천식 환자들로부터 채취한 혈청 검체 들을 사용하였다. 본 연구는 저자들이 소속된 기관의 연구윤리위원회의 승인을 받았으며, 연구에 참여한 대상자들로부터 연구목적의 혈액 채취를 설명한 후에 서면으로 동의를 얻었다.

2. 기도상피세포의 배양

사람의 기도상피 세포 중 최근에 가장 많이 사용되는 A549 세포주를 ATCC (American Type Culture Collection; VA, USA)로부터 구입하여 권장방법에 따라 배양하였다.

3. 배양접시에 대한 부착강도에 따른 기도상피세포의 분획 및 단백질 추출

배양된 기도상피세포들을 배양접시에 대한 부착강도에 따라 2개의 배양 세포 분획으로 분획하였다. 기도상피세포를 세포배양 접시의 거의 모든 표면을 덮을 정도로 과배양한 후에 물리적인 부착강도가 약한 노후한 세포의 분획과 플라스틱 표면에 강하게 부착되어 자라는 젊은 기도상피세포의 분획을 따로 분리하여 단백질을 추출하였다. 즉, 100 mm 직경의 원형 플라스틱 배양접시 표면의 90% 이상이 배양된 부착세포들로 덮히도록 배양한 후, 기존에 존재하는 배양액의 배지를 먼저 제거한 이후에, 첫번째 세척과정에서 인산화완충식염수(PBS) 3 mL를 처리하여 떨어져 나오는 세포들이 포함된 세척액을 수거하여 원심분리 한 후 세포의 pellet를 채취하여 분획(이하에서 washing pellet, WP로 약함)을 얻었다. 이후 다시 PBS로 2회 정도 세척한 후에 배양접시 당 3 mL의 PBS를 넣고 부착된 세포들을 플라스틱 scrapper로 긁어서 모은 이후 원심분리하여 이를 부착세포 분획(adherent cell pellet, ACP로 약함)을 얻었다. ACP 분획의 경우, 10 mM Tris/HCl, pH 7.2, 0.1% SDS, 158 mM NaCl, 10 mM DTT를 함유하는 용해 완충액을 첨가하여 용해시킨 후 원심분리하여 상층액을 분리하여 aliquot한 후에 −20°C에 보관하였다. 한편, WP 분획의 경우 사멸된 세포로부터 유출된 고농도의 핵산으로 인한 단백질 분석의 어려움을 극복하기 위해서 WP의 용량과 동일한 양의 2X sample buffer를 첨가한 후에 30 gage needle이 부착된 0.5 mL 주사기로 여러 번 흡인과 배출을 반복하여 물리적으로 파쇄하여 전기영동 분석 시 용의하도록 처리한 후에 aliquot하여 −20°C에서 보관하였다.

4. 전기영동 및 단백질 염색 및 분석

각각의 다른 방식으로 수거한 2종류의 기도상피세포분획 추출한 단백질들을 불연속적 황산도데실나트륨/ 폴리아크릴아마이드젤 전기영동법을(SDS-PAGE)으로 분리하였다. 전기영동 후 분리된 단백질과 단백질 마커 일부를 잘라 Coomassie blue 염색용액으로 염색하였다. 나머지 젤에 포함된 단백질을 polyvinylidine difluoride (PVDF; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)막으로 전위시켰다. 전위된 PVDF 막의 일부분을 잘라 Coomassie blue 염색용액으로 염색하였다. 또 나머지 PVDF 막은 immunoblot 분석을 위해서 사용하였다.

5. Immunoblot 분석 및 천식과 관련된 표적 자가항원 단백질 검색

기관지천식 환자들의 혈액 안에 존재하는 자가항체와 반응하는 자가면역반응의 표적항원 단백질의 위치를 확인하기 위해서 상기의 방법으로 추출한 2종류 분획의 기도상피세포 추출 단백질을 이용하여 immunoblot 분석을 시행하였다. 먼저 기도상피세포 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후 PVDF막으로 전위 시킨 후에 나머지 막의 비특이적인 반응을 줄이기 위해 PVDF 막을 먼저 20% 탈지분유, 10% 소혈청 및 0.1% Tween 20이 포함된 Tris buffered saline (TBS)과 4°C에서 16시간 이상 반응시켰다. 세척 후, PVDF 막을 3～4 mm 넓이로 자른 후 각각의 스트립을 동일한 완충용액에 1 : 100 (v/v) 희석한 혈청과 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. 세척 후, 상기 막을 알칼리 포스파타아제가 부착된 염소 항 사람 IgG항체(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)와 실온에서 2시간 동안 배양했다. 최종 세척 후, 상기 막을 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate/ nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) 용액으로 발색하였다. 중증 천식환자들의 혈청과 정상 대조군 또는 경증 천식 환자군의 혈청 검체들에 존재하는 IgG 자가항체들에 의해서 인지되는 기도상피세포 자가항원 단백질들의 양상(pattern)을 비교 분석하여 중증 천식과 연관된 표적자가항원 단백질을 검색하고 표적 단백질을 선별하였다.

6. 표적 단백질들을 질량분석기를 이용하여 규명

중증 천식과 연관된 기도상피세포 자가항원 표적 단백질들을 상기에서 기술한 바와 같이 환자들의 혈액을 이용한 immunoblot 분석으로 선별한 이후에 중증 천식 환자들에서 더 많이 반응하는 표적 단백질들을 우선적으로 규명하고자 하였다. 단백질 규명을 위해서 먼저 immunoblot으로 검출된 기도상피세포 표적 단백질을 Coomassie blue로 염색된 SDS-PAGE 젤 상에서 해당 단백질의 위치를 정확하게 확인하고자 PVDF로 전위된 단백질을 Coomassie blue로 염색하여 immunoblot 분석과 동시에 비교하였다. 상기 방법으로 정확한 위치를 확인한 표적 단백질을 Coomassie blue로 염색된 SDS-PAGE 젤 상에서 1회용 면도날로 정확하게 잘라낸 후에 liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC-MS/ MS) 분석을 한국기초과학 연구소(대덕 연구단지)에 의뢰하였다.

7. 표적항원 단백에 대한 항체를 이용하여, 자가항체가 반응하는 기도상피세포의 단백의 일치 여부성 확인

질량분석기 분석을 통해서 규명된 중증천식 관련 표적 기도상피세포 항원 단백질이 실제로 중증 천식 환자들의 혈청 내 IgG 자가항체와 반응하는 자가항원인지를 재확인하기 위해서, 상업적으로 구입한 사람 알파-액티닌 4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)에 대한 항체를 이용하여 immunoblot 분석을 동시에 시행하여 일치 여부를 확인하였다.

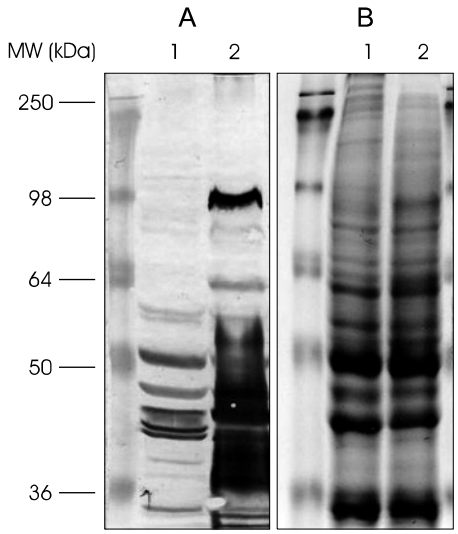

Fig. 1. Immunoblot analysis of airway epithelial cell autoantigens in the proteins extracted from adherent cultured cell fraction (lane 1) and proteins extracted from easily detachable cultured cell fraction (lane 2) using a serum sample from a patient with severe asthma (A). Staining of the proteins extracted from adherent cultured cell fraction (ACP fraction; lane 1) or proteins extracted from easily detachable cultured cell fraction (washing pellet: WP fraction; lane 2) separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (B).

결 과

1. IgG 자가 항체에 반응하는 표적 자가항원 단백질의 선별 및 선택

본 연구에서는 배양된 기도상피세포로부터 추출된 단백질을 항원으로 하여 표적항원에 대한 IgG 자가항체 검출 결과를 분석하였다. 1명의 중증천식 환자의 혈청을 가지고 예비실험으로 immunoblot을 실시한 결과, 사람 기도상피세포(A549) 단백질 중에서 배양접시에 대한 세포의 부착강도에 따라 세포의 단백질에 반응하는 IgG 자가항체 반응이 다르다는 것을 발견하게 되었다(Fig. 1). 즉, 노후되어 배양접시의 바닥 표면으로부터 잘 떨어지거나, 부유하고 있는 세포 분획(WP 분획)과 배양접시의 플라스틱 표면에 잘 부착된 상태로 자라는 젊은 세포 분획(ACP 분획)으로부터 추출된 단백질들을 immunoblot 분석 결과 상당히 다른 항원 인지 양상을 나타내는 것으로 관찰되었다(Fig. 1, 2). 즉, Fig. 2에서 lane 11과 lane 12에 해당하는 2명의 중증 천식환자의 혈청 검체 들의 경우 WP 분획 안에 IgG 항체와 반응하는 자가항원 단백질띠의 숫자가 더 많음을 확인할 수 있었으며, 특히 lane 12의 중

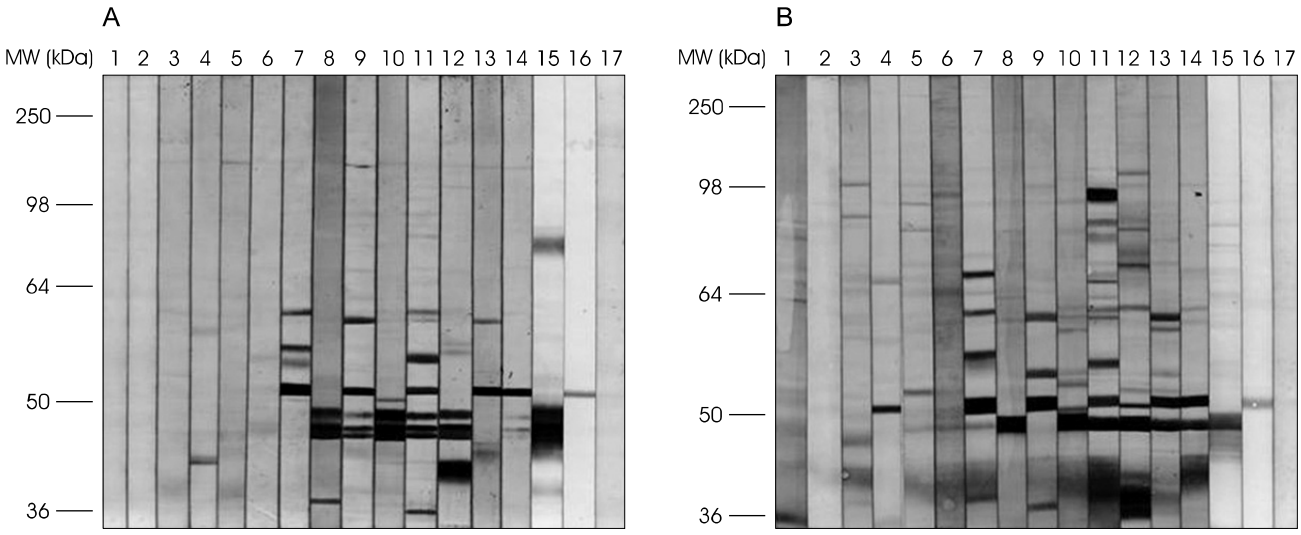

Fig. 2. Immunoblot analysis of airway epithelial proteins recognized by cicrulating IgG autoantibodies from healthy controls (lane 1), patients with mild asthma (lane 2-6), patients with severe asthma (lane 7-14), monoclonal antibody to cytokeratin 18 (lane 15), specific antibody to alpha-enolase (lane 16), and buffer only (lane 17) as a negative control. Results from two kinds of different fractions of cultured airway epithelial cells (A549), including adherent cell fraction (ACP fraction) (A) and easily detachable cell fraction (washing pellet: WP fraction) (B).

증천식 환자의 혈청 IgG 자가항체의 경우 WP 분획에 존재하는 알파-에놀레이즈 단백질 위치의 단백띠와 반응을 보이는 데에 비해서(Fig. 2B), ACP 분획의 경우 해당 위치에 반응 단백띠를 관찰할 수 없었다(Fig. 2A).

중증 천식과 연관된 표적 자가항원 단백질의 위치를 확인하기 위해서 WP 세포 분획 단백질을 항원으로 하여 1명의 정상 대조군과 5명의 경증 천식군, 8명의 중증 천식환자군 사이에서 그룹간의 자가항원 단백질과의 반응 양상을 선별 비교하여, 중증 천식 환자 1명(Fig. 2B, lane 11)의 혈청 IgG 항체와만 매우 강한 반응을 보이는 약 95-kDa의 분자량을 보이는 하나의 표적 자가항원 단백질을 선택하였다. 선택된 95-kDa 표적 자가항원은 배양용기 표면에 잘 붙어 자라는 젊은 기도상피세포 분획에 비해서 부유하거나 잘 떨어지는 노후한 세포들의 분획(WP 분획)내에 주로 존재하였다(Fig. 1, 2).

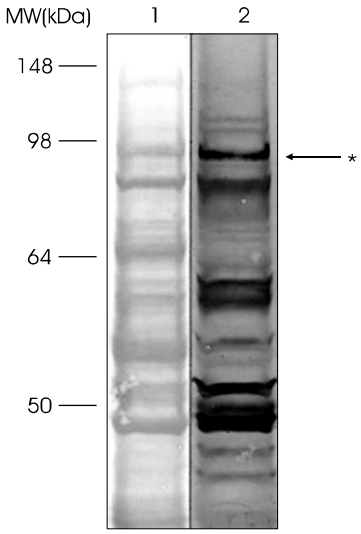

Fig. 3. Localization of target autoantigen recognized by IgG autoantibodies from a patient with severe asthma using immunoblot analysis (lane 2). Staining of proteins extracted from easily detachable cultured cell fraction of airway epithelial cells on polyvinylidine difluoride membrane (lane 1). *Arrow indicate an 95-kDa target autoantigen protein.

2. 표적 자가항원 단백질을 질량분석기로 규명

상기한 중증 천식환자의 혈청을 이용한 immunoblot으로 검색되어 선택된 기도상피세포 표적 자가항원 단백질의 위치를 Coomassie blue로 염색된 SDS-PAGE 젤 상에서 정확하게 확

Table 2. Mass spectrometry analysis of the 95-kDa target protein

Matching peptide no.	Mass (M_r): measured	Mass (M_r): calculated	Peptide sequences
1	863.2462	863.4752	KALDFIASKG
2	1,198.2850	1,198.6234	RDLLLDPAWEKQ
3	1,214.3318	1,214.6659	KLASDLLEWIRR
4	1,254.2522	1,254.5979	RDYETATLSDIKA
5	1,298.2942	1,298.6619	RHRPELIEYDKL
6	1,351.2554	1,351.6190	KGISQEQMQEFRA
7	1,385.4094	1,385.7667	RVGWEQLLTTIART
8	1,420.3410	1,420.6986	KGYEEWLLNEIRR
9	1,428.3840	1,428.7572	RTINEVENQILTRD
10	1,536.3295	1,536.7671	RFAIQDISVEETSAKE
11	1,536.3576	1,536.7671	RFAIQDISVEETSAKE
12	1,652.4260	1,652.8410	KQLEAIDQLHLEYAKR+Pyro-glu (N-term Q)
13	1,669.3900	1,669.8675	KQLEAIDQLHLEYAKR
14	1,740.3666	1,740.8054	RETTDTDTADQVIASFKV
15	1,752.3208	1,752.8179	RKHEAFESDLAAHQDRV
16	1,791.3526	1,791.8501	RMAPYQGPDAVPGALDYKS
17	1,791.3790	1,791.8501	RMAPYQGPDAVPGALDYKS
18	1,815.3580	1,815.8672	KMLDAEDIVNTARPDEKA
19	1,902.4122	1,902.9323	RKDDPVTNLNNAFEVAEKY
20	1,902.4195	1,902.9323	RKDDPVTNLNNAFEVAEKY
21	1,918.4578	1,919.0000	KLSGSNPYTTVTPQIINSKW
22	1,918.4902	1,919.0000	KLSGSNPYTTVTPQIINSKW
23	1,926.4573	1,926.9720	RISIEMNGTLEDQLSHLKQ
24	1,998.3727	1,997.9265	KMVSDINNGWQHLEQAEKG
25	2,006.4235	2,006.9560	KAIMTYVSSFYHAFSGAQKA
26	2,059.3966	2,059.9520	KVLAVNQENEHLMEDYEKL
27	2,075.3674	2,075.9469	KVLAVNQENEHLMEDYEKL+Oxidation (M)
28	2,903.6281	2,904.3889	RVEQIAAIAQELNELDYYDSHNVNTRC

Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis of trypsin-digested peptides of 95-kDa autoantigen showed that the sequence and mass data of 28 peptide fragments matched human alpha-actinin 4, and the identified peptide sequences covered 40% of the total amino acid sequence of human alpha-actinin 4.

인하고자 PVDF로 전위된 단백질들을 일부는 직접 Coomassie blue로 염색하고, 일부는 중증천식 환자의 혈청을 이용하여 immunoblot 염색을 시행하여 전체 기도상피세포 단백질들 중에서 위치를 확인하였다(Fig. 3). 상기 방법으로 정확한 위치를 확인한 표적 단백질을 Coomassie blue로 염색된 SDS-PAGE 젤 상에서 1회용 면도날로 정확하게 잘라낸 후에 LC-MS/MS 분석을 한국기초과학 연구소에 의뢰하였다. 분석 결과, 검체 안에 존재하는 trypsin으로 분절된 peptide들의 질량과 서열을 분석하여 Mascot 프로그램으로 National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD)의 database와 비교 분석한 결과 사람 알파-액티닌 4 (alpha-actinin 4)로 규명되었으며, 분석된 펩타이드들의 질량과 서열이 전체 알파-액티닌 4의 아미노산 서열에 약 40%를 차지하는 높은 일치율을 보였다(Table 2).

3. 중증 천식관련 새로운 기도상피세포 자가항원의 재검증

상기 실험에서 immunoblot 분석으로 검색 선별하고, 질량분석기를 이용하여 규명한 중증천식 관련 자가항원 단백질이 사람 alpha-actinin 4 단백질인지를 재확인하기 위해서 상업적으로 구입한 염소 항 사람 알파-액티닌 4항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)의 반응과 중증 천식 환자의 IgG 항체와 반응하는 단백질이 정확하게 일치함을 immunoblot을 이용하여 재검증 할 수 있었다(Fig. 4).

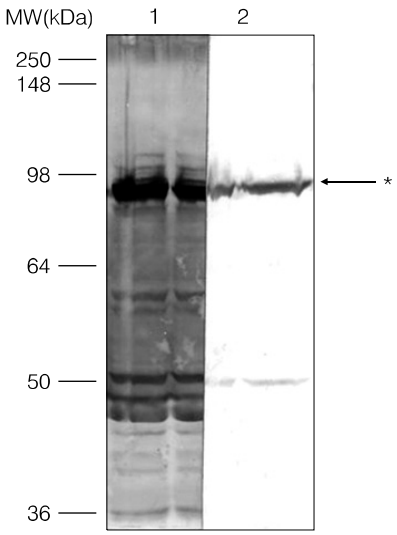

Fig. 4. Confirmation of new 95-kDa airway epithelial cell autoantigen as a alpha-actinin 4 by comparing the results of immunoblot analysis with a serum sample from a patient with severe asthma (lane 1) and specific antibody to human alpha- actinin 4 (lane 2) *Arrow indicate an alpha-actinin 4 protein localized by the specific antibody.

고 찰

본 연구에서 저자들은 천식과 관련된 자가항원 단백질의 단백체 분석 시에 배양용기 표면에 대한 부착력이라는 물리적인 특성을 이용하여 배양된 기도상피세포들을 분획하여 단백질을 추출하는 것이 천식과 관련된 새로운 표적자가항원 단백질들을 검색 및 선별하고, 또 규명하는 데에 도움이 될 수 있음을 보여 주었다.

특히, 본 연구에서 중증 천식 환자들의 혈청에 존재하는 IgG 자가항체는 주로 노후 되거나 배양액 중에 부유하여 세척액으로 쉽게 떨어져 나오는 세포분획에 존재하는 자가항원 단백질들과 반응함을 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과 기존에 배양된 세포 단백질을 분석하기 위해서 보편적으로 사용되어 온 배양액을 제거하고 죽거나 노화된 세포들을 인산화 완충식염수로 세척해낸 후에 주로 세포배양접시의 바닥에 부착되어있는 세포들을 물리적으로 분리하여 전체세포 단백질을 추출하는 기존의 방법과 비교하여, 단순히 기존의 배양액만을 제거하고, 기존에 세척 과정에서 버려지던 주로 노후 되거나 배양액 중에 부유하여 세척액으로 쉽게 떨어져 나오는 세포분획으로부터 추출된 단백질을 분석하는 것이 천식과 연관된 새로운 자가항원의 규명을 위해서 기술적으로 장점이 될 수 있음을 시사한다. 또한, 본 실험의 연구 결과는 사람 기관지천식 환자의 기관지 조직을 부검된 기도조직이나 혹은 기관지경을 이용하여 생검한 기도 조직을 병리조직학적으로 분석하였을 때에, 흔하게 관찰되는 기관지 상피세포의 탈락이 주로 기저세포가 아닌 그 상층부에 존재하는 상피세포층들이 탈락되는 현상과 논리적으로 연관성이 있을 가능성이 있으며, 이를 확인하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.[8)]

기존의 단백체분석 연구들은 세포에 발현되는 표적 단백질들을 분석하기 위해서 2-dimensional electrophoresis를 시행한 후 단백질을 분석하는 경우가 많았다. 하지만 이러한 방법을 이용하여 표적단백질을 규명하는데 있어서는 phosphorylation, glycosylation과 같은 post-translational modification 이 단백질에 일어났을 때, 구별하는데 어려움이 있으며,[9)] 표적 단백질의 분자량이 200-kDa 이상이거나 10-kDa 미만일 경우 정확한 분석이 이루어지지 못하는 중요한 한계점이 있었다. 또한 분석을 위해서 필요한 많은 시간과 노동에 비해 결과의 재현성이 부족하다는 점이 문제점이었다.[10,11)] 그러나, LC-MS/MS가 개발되면서 1차원 전기영동상에 특정 분자량의 위치에 존재하는 여러 가지 혼합된 단백질들 까지도 정확하게 각각의 단백질들을 정확하게 규명할 수 있게 되었다. 본 연구에서도 중증천식 환자의 혈청 IgG 항체와 반응하는 95-kDa 표

적 자가항원단백질을 immunoblot 분석과 1차원 전기영동(SDS-PAGE), 그리고 LC-MS/MS를 동시에 활용하여 알파-액티닌 4 단백질임을 규명하였다. 이는 이러한 단백체 분석 방법이 표적단백질을 규명하는 데 유용한 방법임을 재확인 시켜준다. 본 실험에서 1차원 전기영동 분석만으로 중증천식 환자의 혈청 IgG 항체와 반응하는 표적단백질의 위치가 상업적으로 구입한 알파-액티닌 4 단백질에 대한 항체가 인지하는 단백질과 일치함을 보여주어 재확인하였다. 하지만, 본 연구의 결과는 향후에 유전자 재조합법으로 생산된 사람 알파-액티닌 4 단백질을 이용하여 다수의 경증 및 중증 천식환자들의 혈청 검체 들을 이용하여 재확인하는 단계가 필요할 것으로 판단된다.

알파-액티닌은 세포 내 주요 골격단백질인 액틴에 부착하여 교차 결합하는 단백질로 이러한 구조 단백질의 결합은 stress fiber 형성, 세포 부착을 증진시키고 세포의 모양이나 운동성을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 수행할 것이라고 생각되며 관련 연구가 많이 이루어지고 있다.[12-14] 인간의 알파-액티닌 유전자는 4개가 존재하는 것으로 알려져 있으며, 알파-액티닌 2와 3의 경우 골격과 심장근육에 존재하며[15] 알파-액티닌 1과 4는 세포 내에서 넓게 퍼져서 발현된다. 알파-액티닌 4는 액틴과 stress fiber가 함께 위치하며, 세포질과 핵안에서 퍼져서 분포한다.[16] 현재까지 전신성 홍반성 낭창(SLE), 낭창성신염 같은 자가 면역 질환에 알파-액티닌 단백질에 대한 IgG 자가항체가 검출된다고 보고되어 있으며,[17] 알파-액티닌 4 단백질에 대한 자가항체가 검출되었다는 보고는 매우 드문 편이다. 향후에, 알파-액티닌 4에 대한 자가항체 반응의 기관지천식의 병인기전에서의 역할을 규명하기 위해서는 추가적으로 기능적인 실험이 필수적일 것으로 판단된다.

결 론

본 연구에서 저자들은 천식과 연관된 기도상피세포 단백질들을 규명하기 위한 단백체 분석에 있어서 배양된 기도상피세포의 물리적인 특성을 이용하여 분획하여 단백질을 추출하는 방법이 천식과 관련된 표적자가항원 단백질들을 검색 및 선별하고, 또 규명하는 데에 도움이 될 수 있음을 보여주었다. 기존의 다른 만성염증성 질환들에 대한 연구보고들에서 질병과 관련된 자가항원 단백질들이 다수 존재함이 잘 알려져 있다. 따라서 본 논문에서 저자들이 제시한 단백체 연구의 방법은 향후 아직까지 규명되지 못하였던 새로운 천식과 관련된 표적 자가항원 단백질들을 규명하는 데 도움이 되는 기초자료로 활용 될 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1) Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature 2003;422:198-207
2) Crameri R. The potential of proteomics and peptidomics for allergy and asthma research. Allergy 2005;60:1227-37
3) Lee SH, Rhim T, Choi YS, Min JW, Kim SH, Cho SY, et al. Complement C3a and C4a increased in plasma of patients with aspirin-induced asthma. Am J Respir Crit Care Med 2006;173:370-8
4) Nahm DH, Lee YE, Yim EJ, Park HS, Yim H, Kang Y, et al. Identification of cytokeratin 18 as a bronchial epitherial autoantigen associated with nonallergic asthma. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:1536-9
5) Nahm DH, Lee KH, Shin JY, Ye YM, Kang Y, Park HS. Identification of alpha-enolase as an autoantigen associated with severe asthma. J Allergy Clin Immunol 2006;118:376-81
6) Rottem M, Shoenfeld Y. Asthma as a paradigm for autoimmune disease. Int Arch Allergy Immunol 2003;132:210-4
7) Paul S, Said SI, Thompson AB, Volle DJ, Agrawal DK, Foda H, et al. Characterization of autoantibodies to vasoactive intestinal peptide in asthma. J Neuroimmunol 1989;23:133-42
8) Montefort S, Herbert CA, Robinson C, Holgate ST. The bronchial epithelium as a target for inflammatory attack in asthma. Clin Exp Allergy 1992;22:511-20
9) Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:9390-5
10) Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem 1980;105:361-3
11) Quadroni M, James P. Proteomics and automation. Electrophoresis 1999;20:664-77
12) Otey CA, Pavalko FM, Burridge K. An interaction between a-actinin and the beta1 integrin subunit in vitro. J Cell Biol 1990;111:721-9.
13) Gluck U, Ben-Ze'ev A. Modulation of alpha-actinin levels affects cell motility and confers tumorigenicity on 3T3 cells. J Cell Sci 1994;107:1773-82
14) Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ. Interaction of a-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via a-catenin. J Cell Biol 1995;130:67-77.
15) Beggs AH, Beggs AH, Byers TJ, Knoll JH, Boyce FM, Bruns GA, et al. Cloning and characterization of two human skeletal muscle a-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. J Biol Chem 1992;267:9281-8
16) Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H, et al. Actinin-4, a Novel actin-bunding protein associated with cell motility and cancer invasion. J Cell Biol 1998;140:1383-93
17) Renaudineau Y, Deocharan B, Jousse S, Renaudineau E, Putterman C, Youinou P. Anti-alpha-actinin antibodies: a new marker of lupus nephritis. Autoimmun Rev 2007;6:464-8