

프로테오믹스 기법을 이용한 백혈병 세포 표지 단백질 발굴

아주대학교 의과대학 중앙혈액내과학교실, ¹성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 혈액종양내과

박정일 · 김형일 · 이현우 · 강석윤 · 장준호 · 박준성 · 최진혁 · 임호영¹ · 김호철

Identification of Leukemia Surface Proteins Using a Proteomic Technique

Jung Il Park, M.D., Hyoung Il Kim, M.D., Hyun Woo Lee, M.D., Seok Yun Kang, M.D., Jun Ho Jang, M.D., Joon Seong Park, M.D., Jin Hyuk Choi, M.D., Ho Yeong Lim, M.D.¹ and Hugh Chul Kim, M.D.

Department of Hematology-Oncology, Ajou University School of Medicine, Suwon, ¹Division of Hematology-Oncology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: Numerous cell surface proteins of leukemia cells such as CD33 and CD52 have been identified as diagnostic and therapeutic targets. Thus the profiling of the cell surface proteome and proteins restricted to specific leukemia(s) can provide a way to identify novel targets for leukemia diagnosis and therapy. However, there is a lack of data pertaining to the comprehensive analysis of surface membrane proteins because there are few effective strategies for profiling surface membrane proteomes.

Methods: We report on the application of quantitative proteomic techniques that incorporate affinity-capture and purification on monomeric avidin columns to identify all biotinylated cell surface proteins from leukemia cell lines.

Results: An analysis of a subset of biotinylated proteins among the different human leukemia cell lines using matrix-assisted laser desorption ionization and tandem mass spectrometry identified, among others, some widely expressed proteins in leukemia cells, such as CD11a, CD11c, CD18, CD31, CD44, and CD147, as well as a set of proteins identified as chaperone proteins, including HSP90, GRP78, GRP75, HSP70, HSP60 and protein disulfide isomerases. On the basis of their known functional roles, several of these proteins may participate in the progression of leukemogenesis and should be considered as potential markers of leukemia.

Conclusion: Comprehensive profiling of the leukemia cell surface proteome provides an effective approach for the identification of commonly occurring proteins as well as proteins with restricted expression patterns to a specific cell line. (*Korean J Hematol* 2006;41:272-281.)

Key Words: Proteomic technique, Surface membrane proteome, Biotinylated protein

접수 : 2006년 8월 8일, 수정 : 2006년 9월 7일

승인 : 2006년 10월 16일

교신저자 : 장준호, 경기도 수원시 영통구 원천동 산5번지
☎ 443-721, 아주대학교 의과대학 부속병원 중앙
혈액내과

Tel: 031-219-5989, Fax: 031-219-5983

E-mail: jangjh@ajou.ac.kr

이 보고서는 2005년도 재단법인 구원장학재단 지원에 의해
서 연구되었음.

Correspondence to : Joon-Ho Jang

Department of Hematology-Oncology, Ajou University Hospital
San 5, Wonchon-dong, Yeongtong-gu, Suwon 443-721, Korea
Tel: +82-31-219-5989, Fax: +82-31-219-5983

E-mail: jangjh@ajou.ac.kr

서 론

백혈병은 골수 또는 혈액에서 발생하는 악성 종양으로 미성숙 혈액세포의 조절되지 않는 증식이 특징이다. 백혈병은 미국기준으로 2003년 한해 30,600명 발생했으며, 21,900명이 사망하였다. 소아 백혈병의 사망률이 최근 30년간 62%로 지속적인 감소를 보임에도 불구하고 백혈병은 20세 이하 사망원인 1위이다.¹⁾ 다른 고형암과 마찬가지로 백혈병 세포 표지 단백질은 진단과 치료에 있어 대단히 중요하다. 최근 이러한 세포 표지 단백질을 대상으로 다양한 표적치료가 시도되고 있는데, 예를 들면, alemtuzumab은 항CD52 단클론항체로 최근 미국 식약청으로부터 fludarabine 불응성 만성림프구성백혈병 치료제로 허가되었다. 이 항체는 B 세포, T 세포, 그리고 단핵구의 세포 표면에 높은 발현을 보이는 항원인 CD52와 결합하여, 항체의존 세포 매개 세포독성, 보체활성화 및 직접 세포고사를 통해 세포를 사멸시킨다.²⁾

Gemtuzumab ozogamicin은 항CD33 단클론항체로 강력한 세포독성물질인 calicheamicin의 반합성 유도체와 공유결합 형태로 존재한다.³⁾ CD33 항원은 분자량 67-kD의 당화 세포막 단백질로 조혈모세포, 집락형성세포를 포함한 성숙 및 미성숙 골수세포와 적혈구 및 거핵세포의 전구체의 세포막에 존재하며,⁴⁾ 또한 대부분의 급성골수성백혈병 및 골수이형성증후군 환자의 백혈병모세포에도 존재한다. CD33은 조혈계를 제외한 세포에는 거의 발현되지 않기 때문에, 백혈병 치료에 있어 단클론항체를 이용한 표적치료의 대상이 되어 왔다. 단클론항체에 결합된 CD33은 정상 및 백혈병 골수 세포의 증식을 억제한다. 방사성 동위 항CD33 단클론항체는 빠르게 말초혈액과 골수에 포화되며,⁵⁾ 이러한 CD33의 특성은 단클론항체를 이용한 표적치료에 매우 적합하다.

세포 표지 단백질이 특정 백혈병 세포에서만 발현하거나, 단백질 변형이 특정 백혈병 세포에서만 일어날 때, 단클론항체나 백신 등의 다양한 형태의 면역치료의 대상이 될 수 있고, 이러한 특정 백혈병 세포의 표지 단백질을 발굴을 통해 백혈병 진단 및 치료의 새로운 표적 개발이 가능하게 된다.

하지만 현재까지 이러한 세포 표지 단백질 발굴을 위한 다양한 방법들이 시도되었으나 방법의 한계 때문에 표지 단백질 발굴이 용이하지 않았다.^{6,7)} 최근 *Helicobacter pylori*⁸⁾ 및 다양한 암세포를 대상으로 바이오틴

을 부착하여 mass spectrometry를 통한 세포 표지 단백질을 발굴하는 방법이 개발되었고, 많은 수의 chaperone 단백질이 암세포의 표면에 존재한다는 사실이 밝혀졌다.⁹⁾

아비딘과 바이오틴의 높은 친화력을 이용한 칼럼은 다양한 면역학, 조직생화학, 동소보합결합 및 친화성 크로마토그래피 등 다양한 분야에 널리 사용되고 있다.^{10,11)} 바이오틴은 동위원소와 결합하여 일반적인 방법으로 발굴하기 어려운 물질을 발굴하는 데 사용되는데 항체나 수용체 리간드 등이 바이오틴과 결합되면 바이오틴화된 세포, 조직 및 단백질을 아비딘 칼럼을 통해 분리할 수 있다. 바이오틴화된 물질은 아비딘이나 스트렙타비딘과 결합하면 비가역적으로 서로 분리되지 않으나 변형된 아비딘을 이용하면 바이오틴과 아비딘의 결합이 가역적으로 되어 복합물에서부터 바이오틴화된 물질을 순수 분리할 수 있다. 저자 등은 이 실험에서 프로테오믹스 기법을 이용하여 다양한 백혈병 세포주의 세포 표지 단백질을 순수 분리하였고, 2D-PAGE를 통해 얻어진 이차원 젤에서 바이오틴화된 단백질을 대량으로 발굴하여 비교 평가할 수 있는 방법을 확립하였기에 이에 보고하는 바이다.

대상 및 방법

1. 재료

RPMI 1640 (containing L-glutamine), Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS), 우태아혈청, 그리고 페니실린/스트렙토마이신은 Invitrogen (Carlsbad, CA)에서 구입하였고, ImmunoPure Immobilized Monomeric Avidin과 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin은 Pierce (Rockford, IL)에서 구입하였다. D-Biotin은 US Biologicals (Cleveland, OH), Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex와 ECL (Enhanced Chemiluminescence) kits는 Amersham Biosciences (Arlington Heights, IL), Immobilon-P PVDF (polyvinylidene difluoride) membranes은 Millipore Corp. (Bedford, MA), Urea, ammonium persulfate, piperazine diacrylamide과 acrylamide 등은 Bio-Rad (Rockville Centre, NY)로부터 구입하였다. 이차원 전기영동에 사용하는 acrylamide는 Serva (Crescent Chemical, Hauppauge, NY), carrier ampholytes (both pH 4~8 and pH 3.5~10)와 Nonidet P-40는 Gallard/Schlessinger (Carle Place, NY)로부터, 항CD38과 항Hsp70 단클론항체는 Abcam (Cambridge, MA), calnexin에 대한 마우스 단클론항체는 Affinity

BioReagents (Golden, CO), HRP-conjugated 항마우스 IgG는 Amersham Biosciences (Arlington Heights, IL)에서 각각 구입하였다.

2. 세포배양

비부착 백혈병 세포주인 Sup B-15 (급성B림프구성 백혈병), CEM/C2 (급성T림프구성백혈병), KG1 (급성 골수성백혈병), U937 (급성단핵구성백혈병), HL-60 (급성전골수성백혈병), 그리고 K562 (적혈구성백혈병) 등은 10% 우태아혈청, 100units/mL penicillin 및 100units/mL streptomycin를 포함한 RPMI 1640 medium에 배양하여, 37°C, 6% CO₂ 배양기에 배양하였다.

3. 세포 표지 단백질의 바이오틴화

225cm² 조직 배양 플라스크에서 배양된 세포는 원심 분리(1,000×g, 10분, 4°C) 후 RPMI-1640 (혈청 및 단백질 비첨가)로 3차례 세척하였다. 세포는 바이오틴화를 위하여 0.5mg/mL Sulfo-NHS-LC-Biotin을 포함한 RPMI-1640 (without added serum or protein)에 2.5×10⁷ 세포/mL씩 혼합하여 37°C 배양기에서 10분간 배양하였다. 불필요한 바이오틴화를 막기 위해 Tris-HCL (pH 7.5)를 첨가하여 최종 농도를 50mM으로 하였다. 바이오틴화 후 세포는 다시 3차례 PBS로 세척하였고 원심분리하여 얻은 pellet은 2% NP-40를 첨가한 PBS에 용해하였고, 바이오틴화된 단백질을 용이하게 하기 위하여 2초간 sonication을 시행하였다. 세포면에 존재하는 세포 표지 단백질을 선택적으로 바이오틴화하기 위하여는 세포막 비투과성 바이오틴이 필요한데, Sulfo-NHS-LC (long chain) 바이오틴은 수용성으로 세포막의 소수성 지질 이중막을 통과하지 못한다. 따라서 저자 등은 sulfo-NHS-LC 바이오틴을 이 실험에 사용하였다.

4. 바이오틴화된 세포 표지 단백질의 순수 분리

백혈병세포주의 용해된 세포 표지 단백질은 다음의 과정과 같이 ImmunoPure Immobilized Monomeric 아비딘 칼럼(Pierce, Rockford, IL)을 통해 순수분리하였다. 즉, 2.5mL Immobilized Monomeric 아비딘 칼럼을 먼저 PBS로 3회 세척하였고, 칼럼은 내부의 물질과 바이오틴의 불필요한 비가역적 결합을 막기 위해 2mM D-biotin을 포함한 PBS로 세척하였다. 가역적 바이오틴 결합 위치에 느슨하게 붙어있는 바이오틴을 제거하기 위해 0.1M glycine (pH 2.8) 12mL를 사용하였고, 이후 칼럼은 다시 10차례 PBS로 세척하였다. Sonication을 시

행한 바이오틴화된 세포 표지 단백질 용해액은 다시 원심분리(14,000rpm, 20분, 4°C)를 통해 상층액을 분리하였다. 이 상층액을 Immobilized Monomeric 아비딘 칼럼에 3차례 반복 통과시킨 후 1% NP-40를 포함한 PBS로 3차례 세척하였다. 아비딘 칼럼에 부착된 바이오틴화된 세포 표지 단백질은 5mM D-biotin이 포함된 1% NP-40 PBS를 통해 추출하였다. 바이오틴화된 단백질을 포함한 용액은 Centricon YM-3 칼럼(Millipore Corp, Bedford, MA)을 이용하여 원심분리하여 농축하였다.

5. 2-D PAGE와 western blotting

바이오틴화된 단백질은 2-D PAGE를 통해 분석하였다. 단백질은 8M urea, 2% pH 3.5~10 carrier ampholytes, 2% β-mercaptoethanol, 2% NP-40와 10mM PMSF이 포함된 용해 완충액에 용해하였다. Isoelectric focusing은 실온에서 pH 4~8 carrier ampholyte를 이용한 튜브 겔을 통해 13,200 볼트-시간으로 시행하였다. 일차 전기영동 겔은 다시 10% glycerol을 포함한 125mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 1% dithiothreitol과 bromophenol blue 등을 포함한 이차 전기영동 샘플 완충액과 평형을 이루게 한 후 cassette에 투여되었다. 이차원 분리는 7~14% polyacrylamide gradient SDS 겔과 샘플을 염색액이 겔의 반대편에 이를 때까지 전기영동을 시행하였다. 일부 겔은 분석을 위해 silver 염색을 시행한 후 디지털화하였고, 다른 겔은 용해된 단백질을 Immobilon-P PVDF membrane으로 이동시켰다. 염색하지 않은 membrane은 하이브리드 형성을 위해 1.8% nonfat dry milk와 0.1% Tween 20을 포함하는 Tris buffered saline (TBS)로 구성된 차단 완충액에 2시간 동안 반응시킨 후, 3차례 PBS로 세척하고 1 : 400으로 희석된 horseradish peroxidase 결합 바이오틴-스트렙타비딘 복합체와 실온에서 40분간 반응시켰다. Membrane은 다시 5차례 0.1% Tween 20을 포함한 TBS로 세척하고, 2초간 ECL (Enhanced Chemiluminescence)과 반응시킨 후 XAR-5 X-ray 필름으로 감광시켰다. X-ray 필름과 silver 염색된 겔과의 직접 비교를 시행하였다.

6. 겔의 효소분해와 mass spectrometry

이차원 전기영동을 통해 얻은 단백질은 0.02% sodium thiosulfate에 2분, 0.1% silver nitrate에 40분, 그리고 0.014% formaldehyde와 2% sodium carbonate 혼합물에 반응시키는 silver 염색을 시행하였다. 분석을 원하는 단백질은 이차원 겔로부터 추출하여 흥미로운 단

백질은 15mM potassium ferricyanide과 50mM sodium thiosulfate에 5분간 탈염색을 시행하였다.¹²⁾

식염수로 3차례 세척 후 젤 조각을 100% acetonitrile에 5분간 넣어 탈수시키고, 30분간 진공 원심분리를 이용하여 건조시켰다. 효소 분해는 200mM ammonium bicarbonate에 포함된 trypsin (Promega) 100ng으로 시행하였다. 효소분해를 37°C에서 18시간 동안 시행한 후 분해된 펩타이드는 60% acetonitrile 50 μ L/1% trifluoroacetic acid 혼합물에서 2차례 추출하였다. 진공 원심분리내에서 acetonitrile의 제거 후에 펩타이드는 pipette tip (C18, Millipore, Bedford, MA)을 사용하여 농축시켰다.

펩타이드 혼합물은 Amersham Biosciences (Arlington Heights, IL)사의 MALDI-TOF Pro Version 2.0 mass spectrometer 혹은 LC/MS/MS Q-TOF micro (MicroMass, Manchester, UK)를 통해 분석하였다. 펩타이드 혼합물은 acetonitrile을 포함하는 1% trifluoroacetic acid (샘플 0.5 μ L: matrix 0.5 μ L) 안의 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma)의 포화용액을 사용하여 분석한다.

펩타이드는 분자량 800~3,000 Da. MALDI-TOF MS 범위가 선택되어 trypsin에 의해 분해된 물질의 분자량에 따라 펩타이드 mass fingerprint를 생성한다. 분석 전에 알려진 trypsin 분해 펩타이드의 NCBI database를 이용하여 기계를 보정하였다. LC/MS/MS tandem spectra

는 자동화된 MS에서 MS/MS로의 switching mode를 m/z -의존collision offset values 값을 사용하였다. 두 차례 혹은 세 차례 충전된 이온을 선택하여 분획하였고, collision gas로는 아르곤을 사용하였다. 획득한 spectra는 ProteinLynx global server를 이용한 SwissProt protein sequence data base를 사용하여 분석하였다.

결 과

1. 세포 표지 단백질의 바이오틴화

이 실험에서 포괄적인 세포 표지 단백질 발굴에 사용된 방법은 intact한 세포의 표지 단백질을 선택적 바이오틴화하는 방법이다. 2-D PAGE와 PVDF membrane으로의 단백질 이동을 통해 바이오틴화한 단백질을 스트렙타비딘과 horseradish peroxidase 복합체와의 하이브리드 형성을 통해 가시화하였다. 단백질의 바이오틴화는 N-hydroxysuccinimide (NHS) ester를 이용하여 단백질 lysine기의 ϵ -amino group을 통해 이루어진다.

Fig. 1A는 급성단핵구성백혈병 세포주 U937의 세포 표지 단백질만을 선택적으로 바이오틴화한 후 western blotting으로 바이오틴화한 단백질의 이차원 분포를 보여준다. 이 단백질 분포 양상은 바이오틴화하지 않은 세포의 전체 단백질을 silver 염색법으로 이차원 젤로 나타낸 Fig. 1B와 비교해 볼 때 단백질의 분포 양상이 확연히 다를 수 있다.

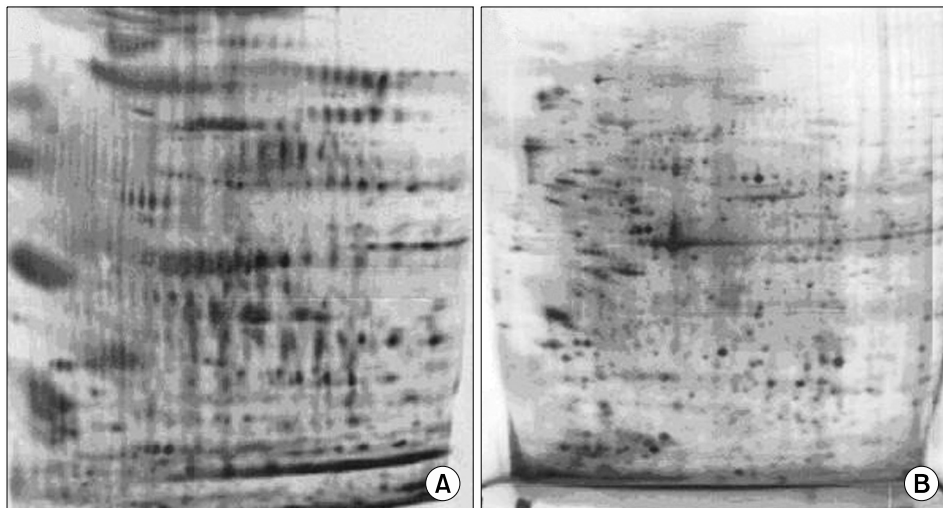


Fig. 1. Visualization of biotinylated surface proteins in U937 acute monoblastic leukemia cells. (A) Detection of biotinylated surface proteins of U937 cells. Surface proteins of intact U937 cells were biotinylated, solubilized, resolved by 2-D PAGE, and then transferred to PDVF membranes. They were visualized by hybridization with streptavidin-HRP complex. Interestingly, a lot of proteins were detected, which were not present in the 2-D gels of same whole cell lysates shown in (B). (B) 2-D PAGE analysis of U937 cellular proteins. Proteins of U937 cells were solubilized and resolved by 2-D PAGE using IPG in the first dimension.

Fig. 1A에서 용해된 바이오틴화한 단백질은 띠의 형태로 나타나기도 하는데, 이는 하나의 단백질이 당화, 인산화, 황화 등 전사 후 변형이 일어난 것으로 생각된다. 몇몇 단백질의 양상은 Fig. 1B의 silver 염색에서와 Fig. 1A의 바이오틴화한 양상이 유사한 경우도 있지만, 대

부분의 바이오틴화 단백질은 세포 전체 단백질을 용해한 Fig. 1B의 양상과 일치점이 없음을 알 수 있다. 이 점은 저자 등이 세포 표지 단백질의 바이오틴화 과정을 통해 세포에 미세용량 존재하는 세포 표지 단백질을 선택적으로 분리하였다 할 수 있다.

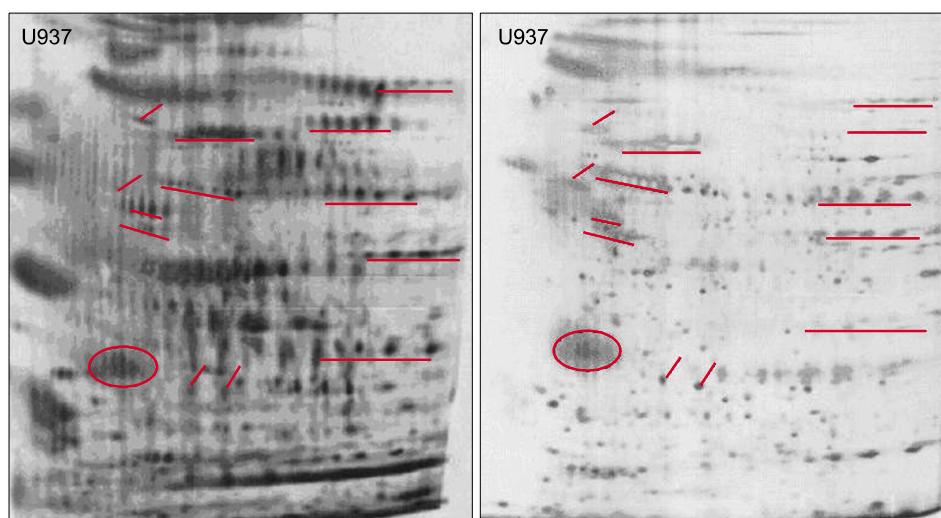


Fig. 2. Similarity of U937 cell line biotinylation patterns as visualized by hybridization and silver-stained images of the same monomeric avidin column eluate. Surface proteins of U937 cells were biotinylated and purified as described in "Experimental procedure". Following solubilization, the proteins were resolved by 2D PAGE using carrier ampholytes (pI 4 to 8) in the first dimension, then visualized either by mass spectrometry-compatible silver staining or hybridization with streptavidin-HRP complex, as described in "Experimental procedures". Solid lines point to biotinylated proteins that were identified by mass spectrometry. Interestingly, the patterns visualized by silver stain and hybridization appear to be virtually identical.

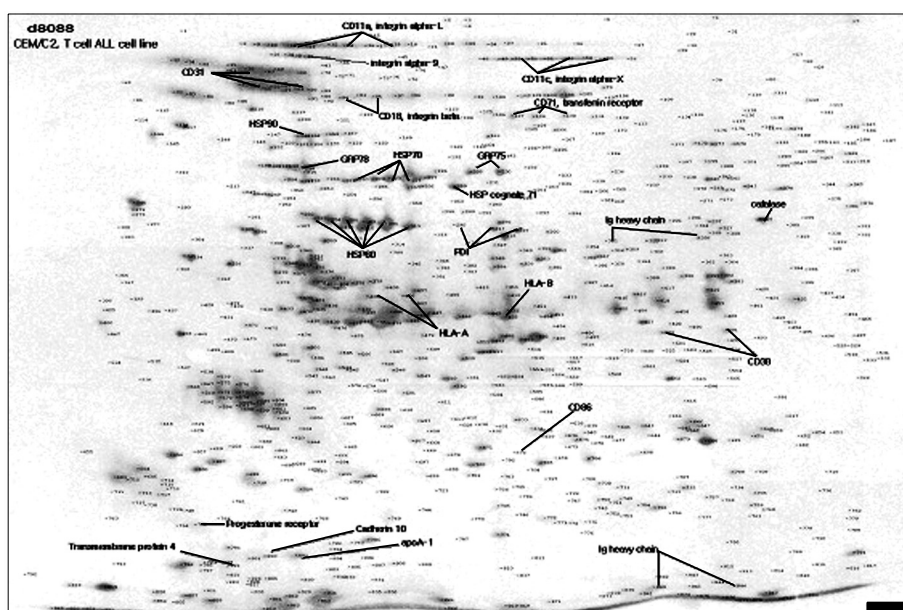


Fig. 3. Identification of surface membrane proteins isolated from CEM/C2. Purified surface membrane proteins of CEM/C2, resolved by 2-D PAGE and visualized by mass spectrometry-compatible silver-stain, were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. Some of the identified proteins are marked and named with solid lines.

2. 바이오틴화 세포 표지 단백질의 순수분리

세포 표지 단백질은 다른 세포 단백질에 비해 미량 존재하므로, 바이오틴화한 후 가시화하여 발굴하기 위해서는 농축 과정이 필요하다. 칼럼에서 추출된 용해

액은 약 400배 농축된 후, 일부는 2-D PAGE와 silver 염색을 통해 가시화되고, 일부는 PVDF membrane으로 이동시킨다. 단백질이 이동된 PVDF membrane은 streptavidin/horseradish peroxidase와 하이브리드 형성 후 ECL 시약으로 가시화한다. 칼럼으로부터 추출된 바이

Table 1. Identified CD antigens and other surface membrane proteins from six human leukemia cell lines

	Ptoteins	Gene symbol	Geneindex number	K562	KG1	Sup-B15	U937	HL-60	CEM/C2
1	MHC class I antigen HLA-A	HLA-A	1245460	Present	MS	MS	Present	Present	Present
2	HLA-DRB1	HLA-DRB1	44885270	Present	Present	Present	Absent	Absent	Present
3	Integrin alpha-L	ITGAL	4504757	MS	MS	MS	Absent	Present	Present
4	Integrin alpha-X	ITGAX	4504765	MS	MS	MS	Absent	Present	Present
5	Integrin beta-1	ITGB1	4504767	Present	Present	MS	Present	Present	Present
6	Integrin beta-2	ITGB2	14780741	Present	Present	MS	Present	Present	Present
7	GRP78	HSPA5	14916999	MS	MS	MS	MS	MS	Present
8	CD31 antigen	PECAM1	4505707	MS	Present	MS	Present	Present	Present
9	Transferrin receptor protein 1	TFRC	13630783	MS	Present	MS	MS	MS	Present
10	CD38 antigen (p45)	CD38	4502665	MS	Present	Present	Present	MS	Present
11	Cadherin 10, type 2	CDH10	16306530	Absent	Present	Present	Absent	Absent	Present
12	CD86 antigen	CD86	5901920	Present	Present	MS	Present	Present	Present
13	Neural cell adhesion molecule 1	NCAM1	41281937	Present	Present	Present	Present	Present	Present
14	T-cell activation antigen CD26	DPP4	18765694	Present	Present	Present	Present	Present	Present
15	T cell receptor beta chain	TRB	1806102	Absent	Present	Absent	Absent	Absent	Present
16	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90B	6680307	MS	MS	Present	MS	MS	Present
17	Protein disulfide isomerase A3	PDIA3	2507460	MS	MS	MS	Present	Present	Present
18	Catalase	CAT	4557014	Present	Present	Present	MS	Present	Present
19	protein disulfide isomerase (PDI)	P4HB	1085373	Present	Present	MS	MS	MS	Present
20	60 kDa heat shock protein	HSPD1	129379	MS	MS	MS	MS	MS	Present
21	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	1708307	MS	MS	MS	MS	Present	Present
22	GRP75	HSPA9B	21264428	MS	MS	MS	MS	Present	Present
23	CD45 antigen	CD45	18641362	Present	MS	Present	Present	Present	Present
24	CD147 antigen	CD147	31076333	Present	Absent	MS	Present	Absent	Present
25	CD106 antigen	CD106	4507875	Absent	Present	MS	Present	Absent	Present
26	CD11b	CD11B	1708572	Present	MS	MS	Present	Present	Present
27	CD18 antigen	CD18	4557886	Present	Present	Present	Absent	Absent	Present
28	CD44 antigen	CD44	950420	Present	Absent	Present	MS	Present	Present
29	Calnexin	CANX	10716563	Present	Present	Present	Present	Present	Present

Abbreviation: MS, Matched spot.

오틴화 단백질의 이차원 silver 염색 양상과 PVDF membrane 필름의 양상이 거의 일치하는 것은 아비딘 칼럼을 사용하여 추출한 단백질이 바이오틴화하였다는 것을 의미한다. Fig. 2에서는 하이브리드 형성 후 가시화된 U937 세포주의 바이오틴화 단백질의 분포 양상이 같은 아비딘 칼럼을 통한 이차원 젤의 silver 염색 단백질 분포 양상과 거의 일치함을 보여준다.

3. 바이오틴화 세포 표지 단백질의 발굴

Immobilized monomeric 아비딘 칼럼을 통해 추출한 바이오틴화 단백질을 발굴하기 위해 2-D PAGE 및 mass spectrometry 분석이 가능한 변형된 silver 염색을 사용하였다. Silver 염색된 젤 중 하나는 PVDF membrane에 단백질을 이동시키고 streptavidin/horseradish peroxidase 복합체와 하이브리드 형성으로 가시화하여 바이오틴화한 단백질을 이차원 젤과 비교 추출하였다. 추출한 단백질은 trypsin으로 용해하여 만든 펩타이드를 MALDI-TOF mass spectrometry 혹은 LC/MS/MS로 분석하였다.

Fig. 3은 급성T림프구성백혈병 세포주인 CEM/C2에서 발굴한 세포 표지 단백질들의 표현 양상을 보여준다. 여기에는 다양한 CD 항원, 수용체, 면역글로불린 그리고 chaperone 기능을 가지는 다양한 heat shock 단백질들과 PDI들을 보여준다. Table 1은 6종류의 세포주로부터 이 실험 방법으로 발굴한 CD 항원들과 주요 세포 표지 단백질들을 나열하였다.

또한 저자 등은 CD38 (Fig. 4), Hsp70 그리고 Calnexin (Fig. 5) 등이 세포 표면에 존재함을 증명하기 위해 각각의 단백질의 단클론항체를 이용하여 그들이 CEM/C2 세포주의 세포표면에서 바이오틴화하며, 그들의 분자량과 pI값과 일치하는 위치에서 존재함을 확인하였다.

고 찰

이 실험에서 저자 등은 백혈병 세포주의 세포 표지 단백질의 바이오틴화, 아비딘 칼럼을 이용한 순수분리, 2-D PAGE, 그리고 silver 염색 및 mass spectrometry를 이용한 포괄적인 발굴 등을 시도하였다. 단백질의 바이오틴화는 주로 바이오틴의 *N*-hydroxysuccinimide (NHS)이 lysine의 ϵ -amino group을 통해 일어나는데 세포 밖에서 lysine기와의 선택적 결합을 통해 바이오틴이 세포 내로 들어오는 것을 막을 수 있다. Sulfon-NHS-LC 바이오틴은 수용성으로 소수성의 지방 이중막을 통과하지 못하여, 세포 표지 단백질의 선택적 바

이오틴화를 가능하게 한다. 이러한 바이오틴화를 통해 과거에는 세포 내의 소포체 단백질이며, chaperone 역할을 한다고 생각되어졌었고, 최근 그 존재가 세포 표면 존재가 보고되고 있는 calnexin이 세포 표면에 존재함을 이 방법을 통해서도 확인하였다. 이 실험을 통해 저자 등은 잘 알려진 세포 표지 단백질인 CD 항원, 면역글로불린, 수용체 등과 아울러 heat shock proteins (HSPs)과 protein disulfide isomerases (PDIs) 등의 chaperone 역할을 수행하는 단백질의 세포 표면 존재를 확인할 수 있었다.

조혈모세포로부터 colony stimulating factor 등의 cytokine의 자극을 받은 혈액세포는 골수구성과 림프구성계로 성숙, 분화한다. 혈액계의 전구세포는 CD 항원이라 불리는 다양한 세포 표지 단백질을 표현하는데, 세포막에 존재하는 CD 항원은 세포-세포 상호작용, cytokine 수용체, 세포 신호전달, 이온 통로, 운반체, 효소, 면역글로불린, 유착물질 등의 다양한 작용을 수행한다.¹³⁾ 혈액계에서 분화하는 세포는 분화 과정에서 CD 항원이 변화한다. 예를 들어 골수성 조혈모세포는 CD34를 표현하는데, 분화하여 과립구가 되면 CD13과 CD33이 표현되며, CD34는 점차 사라지게 된다.¹⁴⁾ 성숙된 중성구는 CD11b, CD13과 CD15 등을 표현하며 CD33은 점차 사라진다. CD45는 tyrosine phosphatase로 leukocyte common antigen (LCA)으로 알려져 있고, 적혈구, 혈소판 및 그들의 전구체를 제외한 모든 조혈계 세포에 표현된다. 이 세포막 단백질은 T 세포와 B 세포의 활성화에 필수적이다. CD45 Knock-out 마우스는 thymocyte 발달이 안되며, 성숙 T 세포가 줄고, T 세포와 B세포의 항원-수용체 반응에 결함이 생긴다.¹⁵⁾ 이러한 CD 항원은 다양한 발달 시기에 따라 다양하게 표현되며, 발굴된 많은 CD 항원의 정확한 역할은 아직 밝혀지지 않았다. 과거 혈액학에서 사용하던 림프구의 형태학적 분류와는 달리 단클론항체는 림프구의 객관적이고 정확한 분석 및 성숙, 비성숙 림프구의 구별, 그리고 정상 및 악성 림프구의 구별을 가능하게 하였다. 하지만 현재 이러한 단클론항체를 이용한 분석방법은 주로 flow cytometry를 이용하는데, 단백질의 표현을 대량으로 동시에 분석하는 데 있어서는 이 방법은 비싸고 많은 시간 및 5~20 μ L 정도의 형광 항체(10~500 μ g/mL)를 필요로 하고, 또한 3~4개의 제한적인 세포 표지 단백질 분석만이 가능하다.¹⁶⁾ 저자 등은 이 연구에서 백혈병 세포주에서 CD 항원을 포함한 많은 세포 표지 단백질을 2-D PAGE를 통해 동시에 분석하였다. 따라서 프로테오믹스 기법을 이용한 세포 표지 단백질

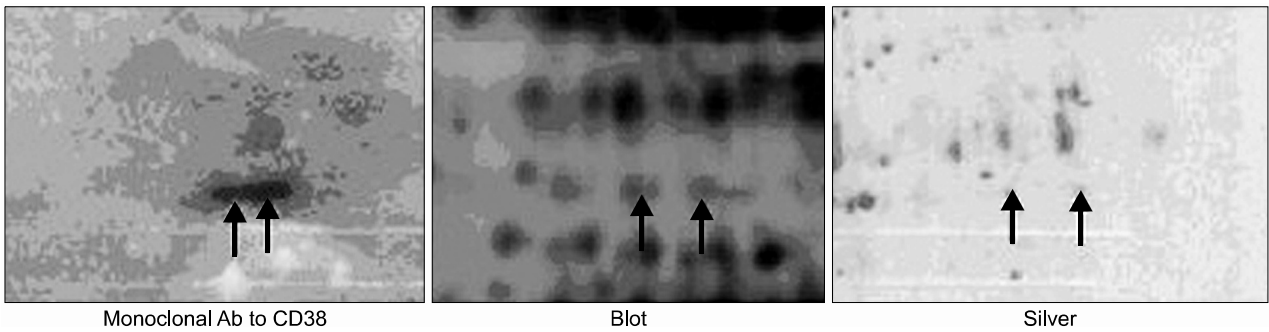


Fig. 4. CD 38 expressions on the cell surface of CEM/C2 leukemia cell line with monoclonal antibody to CD38. Following solubilization, the proteins were resolved by 2D PAGE using carrier ampholytes (pI 4 to 8) in the first dimension, then visualized either by mass spectrometry-compatible silver staining or hybridization with monoclonal antibody to CD38 or streptavidin-HRP complex. The spots visualized by silver stain and two western blots appear to be virtually identical.

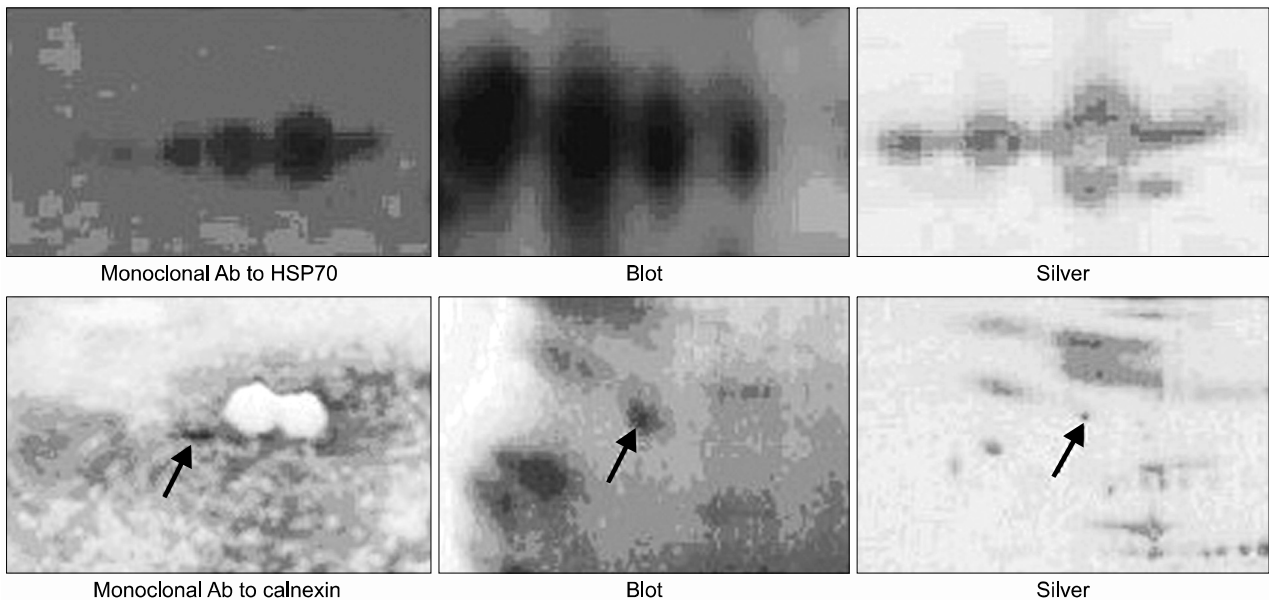


Fig. 5. HSP 70 and calnexin expressions on the cell surface of CEM/C2 leukemia cell line with monoclonal antibody to HSP70 and calnexin. Following solubilization, the proteins were resolved by 2D PAGE using carrier ampholytes (pI 4 to 8) in the first dimension, then visualized either by mass spectrometry-compatible silver staining or hybridization with monoclonal antibody to HSP70 and calnexin or streptavidin-HRP complex. The spots visualized by silver stain and two western blots appear to be virtually identical.

발굴이 백혈병 연구에 매우 유용한 정보를 줄 수 있다고 생각된다.

PDI는 다른 단백질군과 같이 용해성 단백질이고, 세포 표면에 표현되지 않는 것으로 생각되었으나, 최근 PDI가 세포 표면에 존재하며 다양한 역할을 가진다는 것이 보고되었다. 세포 표면의 thiol량은 림프구와 fibrosarcoma 세포에서 세포 표면의 PDI량과 밀접한 관계가 있고,¹⁷⁾ B 세포만성림프구성백혈병에서는 반대의 현상이 일어나는데 bacitracin 혹은 항PDI 항체를 사용하여 세포 표면의 PDI를 저하시키면 thiol량이 증가

한다.¹⁸⁾ 세포 밖의 thiol과 PDI와의 역할은 정확히 밝혀지지 않았으나, 림프구의 활성화와 백혈병 발생 시 세포 표면 thiol량이 증가하는 것은 중요한 의미를 갖는다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 이 실험에서도 다양한 PDI가 세포 표면에 발현함을 관찰하였다.

GRP78 (BiP)은 소포체의 chaperone으로서 복합 펩타이드의 형태학적 성숙에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이것은 단백질의 조기 굴곡을 방지하고, 에너지적으로 불안정한 펩타이드 구조를 안정화함으로써 단백질의 잘못된 굴곡을 방지한다.²⁰⁾ HSp70은 GRP78과 마

찬가지로 세포내 단백질로 생각되어져 왔으며, 단백질의 잘못된 굴곡을 방지하고 적절한 재굴곡을 도와주는 역할을 한다.²¹⁾ 최근 이러한 heat shock 단백질들과 수용체와의 상호관계가 밝혀짐으로써, heat shock 단백질의 세포 표면에서의 역할이 보고되고 있다. 암세포에서 발현한 Heat shock 단백질은 T세포의 $\alpha\beta$ 혹은 $\gamma\delta$ 수용체에 의해 인식되는데,²²⁾ Heat shock 단백질 Gp96와 toll like receptor (TLR) 2/4가 결합하면 NF κ B 유도 reporter 유전자와 미토젠, 그리고 스트레스 활성 단백질 키나제 등을 활성화시킨다.²³⁾ 덧붙여 HSP70은 IL-1 수용체 신호전달 체계를 활성화시키는데,²⁴⁾ 이와 같이 수용체와의 상관관계를 통해 heat shock 단백질의 세포 표지 단백질로서의 존재 및 새로운 역할들이 계속 밝혀지고 있다. 저자 등은 본 실험을 통해 GRP78, HSP90, HSP70 등 다양한 heat shock 단백질을 발굴하였고, 이러한 단백질의 이차 전기영동을 통한 젤 이미지 분석으로 heat shock 단백질의 질적 양적 분석을 가능하게 하였다.

백혈병 세포 표지 단백질의 포괄적인 발굴 및 2D PAGE를 통한 젤 이미지의 비교 분석은 흔하게 존재하는 세포 표지 단백질뿐 아니라, 특정 세포주에만 존재하는 특정 단백질의 발굴을 가능하게 한다. 향후 이 방법을 통해 특정 세포 표지 단백질을 발굴하고, 궁극적으로 백혈병의 새로운 진단 및 치료법 개발이 가능할 것으로 생각된다.

요 약

배경: CD33, CD52 같은 백혈병 세포 표지 단백질은 진단과 치료의 표적이 되어왔다. 따라서 특정 백혈병 세포에 국한된 세포 표지 단백질의 포괄적인 발굴은 새로운 진단 및 치료법을 개발하는 데 매우 중요하다. 그러나 현재까지의 방법으로는 포괄적인 세포 표지 단백질의 발굴이 매우 제한적이다.

방법: 이 실험에서 저자 등은 세포 표지 단백질의 바이오틴화, 아비딘칼럼, 그리고 프로테오믹스 기법을 이용하여 백혈병 세포주의 표지 단백질을 발굴하였다.

결과: 바이오틴화한 백혈병 세포주의 세포 표지 단백질을 MALDI-TOF mass spectrometry를 이용하여 발굴한 결과 CD11a, CD11c, CD18, CD31, 그리고 CD105 등과 같은 잘 알려진 세포 표지 단백질과 함께 세포질 내에서 chaperone 역할을 하는 것으로 알려졌던 HSP-90, GRP78, GRP75, HSP70, HSP60, 그리고 protein disulfide isomerase 등을 발굴하였다. 단백질의 기존에 알

려진 역할과 더불어 일부 단백질은 백혈병 진행과정에도 참여하는 것으로 보고되고 있어, 백혈병 치료에 새로운 표적으로서의 가능성도 예측된다.

결론: 백혈병 세포 표지 단백질은 기존에 알려진 역할과 더불어 일부 단백질은 백혈병 진행과정에도 참여하는 것으로 보고되고 있으므로 이의 포괄적인 발굴과 이차원 젤의 비교는 백혈병의 새로운 진단 및 치료법 개발에 매우 효과적인 방법이라 확신한다.

참 고 문 헌

- 1) Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. CA Cancer J Clin 2003;53:5-26.
- 2) Dyer MJ, Hale G, Hayhoe FG, Waldmann H. Effects of CAMPATH-1 antibodies in vivo in patients with lymphoid malignancies: influence of antibody isotype. Blood 1989;73:1431-9.
- 3) Giles FJ. Gemtuzumab ozogamicin: promise and challenge in patients with acute myeloid leukemia. Expert Rev Anticancer Ther 2002;2:630-40.
- 4) Wellhausen SR, Peiper SC. CD33: biochemical and biological characterization and evaluation of clinical relevance. J Biol Regul Homeost Agents 2002;16:139-43.
- 5) Bernstein ID. CD33 as a target for selective ablation of acute myeloid leukemia. Clin Lymphoma 2002;2 Suppl 1:S9-S11.
- 6) Jacobson BS, Stolz DB, Schnitzer JE. Identification of endothelial cell-surface proteins as targets for diagnosis and treatment of disease. Nat Med 1996;2:482-4.
- 7) Harvey S, Zhang Y, Landry F, Miller C, Smith JW. Insights into a plasma membrane signature. Physiol Genomics 2001;5:129-36.
- 8) Sabarth N, Lamer S, Zimny-Arndt U, Jungblut PR, Meyer TF, Bumann D. Identification of surface proteins of *Helicobacter pylori* by selective biotinylation, affinity purification, and two-dimensional gel electrophoresis. J Biol Chem 2002;277:27896-902.
- 9) Jang JH, Hanash S. Profiling of the cell surface proteome. Proteomics 2003;3:1947-54.
- 10) Wilbur DS, Pathare PM, Hamlin DK, et al. Development of new biotin/streptavidin reagents for pretargeting. Biomol Eng 1999;16:113-8.
- 11) Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. Clin Chem 1991;37:625-36.
- 12) Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, Imai

- BS, Mische SM. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 1999;20:601-5.
- 13) Belov L, de la Vega O, dos Remedios CG, Mulligan SP, Christopherson RI. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *Cancer Res* 2001;61:4483-9.
- 14) Freedman AS. Cell surface antigens in leukemias and lymphomas. *Cancer Invest* 1996;14:252-76.
- 15) Kishihara K, Penninger J, Wallace VA, et al. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* 1993;74:143-56.
- 16) Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997;90:2863-92.
- 17) Jiang XM, Fitzgerald M, Grant CM, Hogg PJ. Redox control of exofacial protein thiols/disulfides by protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 1999;274:2416-23.
- 18) Tager M, Kroning H, Thiel U, Ansorge S. Membrane-bound protein disulfide isomerase (PDI) is involved in regulation of surface expression of thiols and drug sensitivity of B-CLL cells. *Exp Hematol* 1997;25:601-7.
- 19) Lawrence DA, Song R, Weber P. Surface thiols of human lymphocytes and their changes after in vitro and in vivo activation. *J Leukoc Biol* 1996;60:611-8.
- 20) Dill KA, Chan HS. From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol* 1997;4:10-9.
- 21) Ellis RJ. The general concept of molecular chaperones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1993;339:257-61.
- 22) Harada M, Kimura G, Nomoto K. Heat shock proteins and the antitumor T cell response. *Biotherapy* 1998;10:229-35.
- 23) Vabulas RM, Braedel S, Hilf N, et al. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem* 2002;277:20847-53.
- 24) Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 2002;277:15107-12.