



### 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



**저작자표시.** 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



**비영리.** 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



**변경금지.** 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

**저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.**

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학 석사학위 논문

베체트병 마우스 모델의 증상에 관련된  
Qa-2 유전자 발현에 관한 연구

아주대학교 대학원

의학과

이미영

베체트병 마우스 모델의 증상에 관련된  
Qa-2 유전자 발현에 관한 연구

지도교수 손 성 향

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2007년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

이 미 영

이미영의 이학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 손 성 향 인

심 사 위 원 이 은 소 인

심 사 위 원 박 선 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2006년 12월 21일

## 베체트병 마우스 모델의 증상에 관련된 Qa-2 유전자 발현에 관한 연구

베체트병은 만성 염증질환으로 재발성 구강 궤양, 외음부 궤양, 피부 및 안 증상 등이 특징인 질병이다. 베체트병은 여러 증상들이 동시에 발병하거나 초기 피부점막증상이 호전과 악화를 거듭하다 관절 증상, 안 증상, 신경계 증상까지 발전할 수 있다. 특히 안 증상은 대표적인 베체트병 주 증상으로 실명이라는 심각한 후유증을 초래할 수 있다. 이러한 심각한 증상의 변화를 예측할 수 있는 방법으로, 본 연구에서는 베체트병 마우스모델에서 관여하는 Qa-2 유전자의 발현을 알아보고 이를 조절하여 보고자 하였다. mouse의 Qa-2 유전자와 사람의 HLA-G 유전자는 서로 유사한 구조와 기능을 하고 있는데, 이들은 NK cell과 T cell cytolysis의 inhibitor로써, 임신 동안에 발현되어 임신을 유지하도록 하고, NK cytolysis에 저항하여 trophoblast를 보호하고, 염증반응 시에 조직보호기능이 있는 분자로서 역할을 하기도 한다.

이와 같은 보고를 바탕으로, 만성염증 질병인 베체트병에서 Qa-2 유전자 발현의 연관성을 밝혀 보고자 하였다. Herpes simplex virus로 유도한 베체트 병 마우스 모델에서 Qa-2 유전자의 발현 양상을 증상 별로 알아보고, Qa-2 유전자를 siRNA를 이용하여 knockdown 시킴으로써 베체트병 증상에 어떠한 변화를 나타내는지 관찰하였다. 따라서 베체트병에서 Qa-2 유전자의 역할을 확인함과 동시에 Qa-2 유전자 발현 조절을 통한 베체트병 증상의 변화도 관찰하였다. 마우스는 피부점막 증상만 보이는 군, 안 증상을 보이는 군, 무증상 군(BD asymptomatic)을 대상으로 하였다. 각 증상 군의 말초혈액 단핵구(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)에서 FACS analysis를 실시하여 각 증상 군 간의 Qa-2 유전자 발현의 차이를 확인하

였다. 그 결과 무증상 군과 피부점막 증상만 보이는 군은 거의 동일한 수준이었고 그에 비해 안 증상을 보이는 군에서 Qa-2 유전자 발현이 낮았고, 전체 말초혈액 단핵구 중에서도 granulocyte에서 발현이 낮게 나타났다. 그 발현의 차이가 증상의 변화와 관련이 있는지 알아보기 위한 방법으로 Qa-2 유전자에 대한 siRNA를 베체트병 마우스 모델에 주입하여 Qa-2 발현을 저해한 후, 이를 FACS analysis, RT-PCR을 통하여 확인하였다. 그 결과 베체트병 마우스에 glucose, leader peptide siRNA를 처리한 군에 비교해 보았을 때 Qa-2 siRNA를 주입한 군에서 Qa-2 유전자 발현이 저해되었음을 확인하였다. 이에 따라 Qa-2 siRNA를 주입한 군에서 여섯 마리 중 두 마리는 눈 증상이 악화되고, 또 다른 한 마리는 피부점막 증상에서 관절증상을 나타내는 증상변화를 관찰함으로써 Qa-2 유전자의 발현이 감소되어짐에 따라 증상이 악화됨을 확인하였다. 이와 반대로 Qa-2 DNA vector를 베체트병 마우스에 처리하였더니 Qa-2 유전자 발현이 증가되어지는 것을 관찰하였고, 이들 마우스에서는 IFN- $\gamma$ 의 발현이 감소되어지는 것을 확인하였다. 따라서 면역관용 기능을 담당하는 Qa-2의 발현이 베체트병 증상의 악화와 호전에 영향을 끼치는 요소로 작용할 가능성이 있으며 Qa-2 유전자 발현의 조절이 베체트병의 치료법 중의 하나로 이용되지 않을까 예상하여 볼 수 있었다.

---

핵심어 : 베체트병, HLA-G, 마우스 모델, Qa-2, siRNA

## 차 례

국문요약 .....	i
차례 .....	iii
그림 차례 .....	v
표 차례 .....	vii
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
A. 베체트 병 마우스 모델 .....	4
B. 실험군 분류 .....	4
C. FACS analysis .....	4
D. Qa-2 siRNA 제작 .....	5
E. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) .....	6
F. PBMC에 Qa-2 siRNA transfection .....	7
G. 마우스에 Qa-2 siRNA 혈관 주사 .....	8
H. BD 마우스의 spleen에서 Real-Time PCR .....	8
I. Qa-2 DNA 벡터 제작 .....	9
III. 결과 .....	10
A. BD 마우스 PBMC에서 Qa-2의 발현 양상 .....	10
B. PBMC에 siRNA transfection 후 RT-PCR 결과 .....	13
C. BD 마우스에 Qa-2 siRNA 주사에 의한 Qa-2 발현 분석 .....	15
D. siRNA 주사에 의한 BD 마우스에 증상 변화 .....	18
E. siRNA를 주사한 BD 마우스에서 IFN- $\gamma$ 발현 .....	23
F. 정상마우스에 Qa-2 DNA 벡터 주사 후 FACS analysis 결과 .....	26
IV. 고찰 .....	31

V. 결론 .....	35
참고문헌 .....	36
ABSTRACT .....	40



## 그림 차례

Fig. 1. Qa-2 positive PBMCs in Normal control, BD asymptomatic, and BD-symptomatic mice: FACS analysis. ....	11
Fig. 2. Qa-2 positive PBMCs in Normal control, BD-asymptomatic, BD-skin, and BD eye mice: FACS analysis. ....	12
Fig. 3. Qa-2 siRNA reduced Qa-2 mRNA levels in PBMC of normal mice. ....	14
Fig. 4. Knockdown of Qa-2 by 1 time intravenous injection of siRNA into BD mice. ....	16
Fig. 5. Knockdown of Qa-2 by 4 times intravenous injection of siRNA into BD mice. ....	17
Fig. 6. The change of symptoms after Qa-2 siRNA-injection into BD mice. ....	19
Fig. 7. The change of disease index scores in Qa-2 siRNA-injected BD mice. ....	22
Fig. 8. Comparison of IFN $\gamma$ mRNA in the spleens of glucose, leader peptide siRNA, and Qa-2 siRNA-injected BD mice by RT-PCR. ....	24

Fig. 9. Comparison of IFN $\gamma$ mRNA in the spleens of glucose, leader peptide siRNA, and Qa-2 siRNA-injected BD mice by Real-Time PCR. ....	25
Fig. 10. Expression of Qa-2 protein in the macrophage of Qa-2 vector injected normal mice by FACS analysis. ....	27
Fig. 11. Expression of Qa-2 protein in splenocyte of Qa-2 vector injected normal mice by FACS analysis. ....	28
Fig. 12. Expression of Qa-2 and IFN-gamma protein in the macrophage of Qa-2 vector injected BD mice by FACS analysis. ....	30

## 표 차례

Table 1. Qa-2 siRNA sequences. ....	5
Table 2. RT-PCR primers and sequences. ....	7
Table 3. The change of symptoms after Qa-2 siRNA injection into BD mice. ....	20

## I. 서 론

A nonclassical HLA class I molecule인 HLA-G는 MHC에 면역관용을 가지는 항원으로써 임신 동안에 태반에 발현되어 임신을 유지하도록 하고(Ellis 등,1986; Kovats 등,1990; McMaster 등,1995) 일부는 흉선내피세포에서 발현되어진다(Crisa 등,1997; Mallet 등, 1999). 심장 이식 시에도 발현이 되어져 조직 거부 반응을 일으키는 것을 억제하는 기능을 하며(N. Lila 등, 2000), 눈 조직에서도 발현된다(Ishitani A 등, 1992; Stroynowski I 등, 1996). HLA-G는 NK cell과 T cell cytotoxicity의 inhibitor로써 NK cell surface에 있는 killer cell inhibitory receptor KIR2DL4의 ligand로 작용하며, membrane bound form HLA-G1, -G2, -G3, -G4와 soluble form HLA-G5, -G6, -G7이 있다(B. Riteau 등, 2001 ; S.Rajagopalan 등 , 1999 ; A. Dorling 등, 2000). NK cytotoxicity에 저항하여 trophoblast를 보호하고, malignancies와 organ transplantation 시에도 발현한다(carosella ED, 2000; Lila N 등, 2000). 그리고 염증반응 시에 조직보호기능이 있는 분자로서 역할을 하며, 최근 연구에서는 아토피나 건선 질환과 같은 만성적, 재발성 염증 질환에서 발현되어 조직을 보호하는 기능을 한다(S. Aractingi 등, 2001 ; Khosrotehrani, K 등, 2001). Human cytomegalovirus에 감염된 환자에서 만성적 자연 유산이 자주 일어나는데 그 환자에서는 HLA-G의 발현이 낮게 나타났다. 이는 HLA-G의 세포내 이동이 HCMV에 의하여 차단되었으며 감염으로 인해 증가한 glycoprotein에 의하여 HLA-G surface expression이 down modulation되었다(Jun Y 등,2000). 또한 HLA-G는 IL-10에 의하여 발현이 증가되고, T helper cytokine balance에 영향을 주어 HLA-G의 농도가 낮아지면 Th1 type cytokine의 발현이 증가한다(T. Kanai 등, 2001).

베체트병은 만성 염증질환으로 재발성 구강 궤양, 외음부 궤양, 피부 및 안 증상 등이 특징인 질병이다. 베체트병은 여러 증상들이 동시에 발병하

거나 초기 피부점막증상이 호전과 악화를 거듭하다 관절 증상, 신경계 증상, 안 증상으로 단계적으로 발전할 수 있다(D.H. Verity 등, 2003 ; R.Rajendram 등, 2003). 특히 안 증상은 대표적인 베체트병 주 증상으로 실명이라는 심각한 후유증을 초래할 수 있다(Bang 등, 1998; Lee, 2001). 베체트병의 병인론은 명백하게 밝혀지진 않았지만 바이러스에 의한 감염설이 주요인으로 여겨진다(Lee 등, 1996, Bang 등 1996). 이후 Herpes Simplex virus(HSV)를 ICR 마우스에 접종하여 베체트마우스 모델이 만들어졌다(Shon 등, 1998). HSV 접종 후 마우스에서 구강 궤양, 성기 궤양, 피부 궤양, 안 증상, 소화기계 궤양 뿐 만 아니라 관절 증상, 신경계 증상 등이 나타났고, 이 증상들이 베체트 환자의 증상과 유사하게 나타났다(Kim 등, 1998).

T 림프구의 면역학적 이상과 관련해 Th1/Th2 균형과 더불어 cytokine에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 대표적인 Th1 cytokine인 IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12의 존재가 증명되고 질병의 활성도와 비례하는 것으로 보아 이 질환은 Th1 pattern의 질환이라고 할 수 있다(Rassanito MA 등, 1999; Hamzaoui K 등, 2002). HSV 접종을 한 베체트병 유사 증상 ICR 마우스는 Th1 cytokine인 IFN- $\gamma$ 의 발현은 높고, Th2 cytokine인 IL-4와 IL-10은 낮게 발현되었다. 따라서 Th1 cytokine pattern이 강하게 잘 나타남을 관찰하였다(Shon 등, 2001).

그리고 안 증상, 관절 증상, 신경계 증상을 가지고 있는 베체트 환자에서 HLA-G gene 3741\_3754 14base pair의 mutation이 정상인에 비하여 2.7배 정도 자주 일어나고, 베체트 환자에서 HLA-G의 낮은 발현이 이 mutation과 관련이 있음이 보고되어졌다(Park KS 등, 2006).

따라서 본 연구에서는 이 Qa-2 유전자 발현과 베체트병의 연관성을 밝혀보고자 하였다. 여기서 Qa-2는 HLA-G와 기능적으로 homolog한 마우스의 유전자로써 이 유전자의 발현을 베체트 마우스 모델에서 증상 별로 확인하고, small interfering RNA(siRNA)와 DNA vector를 이용하여 조절하여 보고자 하였다. 그리고 유전자 조절이 베체트병 마우스 모델에서 증상변화에

어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

## II. 재료 및 방법

### A. 베체트병 마우스 모델

생후 4~5주 된 ICR 마우스(Korea laboratory Animal Research Center) 수컷의 귓볼을 바늘로 긁어 상처를 입힌 후 베체트병의 원인으로 작용하는 herpes simplex virus-1 (HSV-1)  $1 \times 10^6$  pfu/ml을 투입하였다. 바이러스는 10일 간격을 두고 두 번 접종을 하고 그 후 16주 동안 마우스들을 관찰하였다. 마우스들은 20°C ~ 22°C의 일정한 공간에서 오전 8시부터 12시간 동안 빛을 주며 관찰하고 먹이와 물은 자유로이 접근할 수 있도록 하였다.

### B. 실험군 분류

일본 베체트병 연구회의 개정된 기준에 따라(Mizushima 등, 1998), 피부 증상과 안 증상을 제외한 한개 이상의 타 증상이 나타난 피부 증상 군, 안 증상을 포함하고 한 개 이상의 타 증상이 나타난 안 증상 군, 그리고 HSV 접종 후 16주 동안 증상 없이 건강한 무증상 군(BD asymptomatic) 마우스로 분류하였다.

### C. FACS analysis

말초혈액에서 PBMC를 얻은 후  $1 \times 10^6$ /well이 되게 tube에 분주하였다. FITC labeled anti-Qa-2 antibody(eBioscience, USA, San Diego)를 사용하여 30분 동안 4°C에서 반응시켰다. 세포를 750rpm으로 5분 동안 2번 원심 분리하여 PBS로 세척하였다. 세포에 PBS 200 $\mu$ l를 넣고 flow cytometry로 control에 비교하여 stain되는 정도를 퍼센트로 보았다. 전체 PBMC에서 lymphocyte와 granulocyte는 FACS 분석 시 forward scatter와 side scatter

에 따른 cell size와 cell granularity로 구분되어지는 각각의 cell population을 나누어 분석하였다.

#### D. Qa-2 siRNA 제작

siRNA는 21 base pair의 fragment를 이용하고, sequence는 상업적으로 공급 가능한 회사(Dharmacon, Ltd.)에 위탁 합성하여 사용하였다. Qa-2 protein은 Q region에 있는 Q6, Q7, Q8, Q9 4개의 gene으로 되어있고, exon 1은 leader peptide, exon 2는 alpha 1 domain, exon 3는 alpha 2 domain, exon 4는 alpha 3 domain, exon 5는 transmembrane domain, exon 6,7,8은 cytoplasmic domain으로 encode 한다. Q6, Q7, Q8, Q9 네 개의 gene은 모두 마우스 lymphocytes에서 transcribe 되는 것으로 보고되었으며, Q7과 Q9은 마우스 embryo에서 transcribe 된다고 보고되어진다. Qa-2 siRNA target sequence는 Q9 안에서 exon 1 (leader peptide), exon 4 (alpha 3 domain), exon 5 (transmembrane domain), exon 6,7,8 (cytoplasmic domain)에 각각 한 곳씩 정하여 합성하고 이것을 혼합하여 마우스에 투여하였다. siRNA sequence는 표 1과 같다.

**Table 1. Qa-2 siRNA sequences.**

Domain	Sequences
α3	5'-AGGUCUUAUGGUGCUGUCAUU-3' (sense) 3'-UUUCCAGAAUACCACGACAGU-5' (antisense)
Transmembrane	5'-UGUGAUGAAUAGGAGGUGAUU-3' (sense) 3'-UUACACUACUUAUCCUCCACU-5' (antisense)
Cytoplasmic membrane	5'-UAGAGCUCUGAUAGAUCUCUU-3' (sense) 3'-UUAUCUCGAGACUAUCUAGAG-5' (antisense)
Leader peptide	5'-CAACACUCGCAAUAUU-3' (sense) 3'-GUUGUGAGCGACGUUAUAA-5' (antisense)



## E. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

마우스로부터 얻은 혈액 단핵구에서 TRIzol reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 TRIzol method로 RNA를 추출하였다. TRIzol에 cell을 풀어준 뒤 실온에서 10분간 방치하였고, TRIzol의 0.2 volume에 해당하는 chloroform을 첨가한 다음 5분 뒤 4°C 12000g에서 15분간 원심 분리하였다. 상층부를 분리해서 멸균된 tube에 옮겨놓고 동량의 isopropyl alcohol를 넣어 다시 원심 분리하여 RNA pellet을 얻었다. RNA pellet을 75% 에탄올로 washing한 다음, 실온에서 말린 뒤 멸균된 tube에 옮겨놓고 멸균된 3차 증류수에 녹였다. pellet이 완전히 녹을 때 까지 얼음에 방치한 후 UV/Visible Spectrophotometer(Pharmacia biotech, San Diego, CA)를 이용하여 optical density(OD) 260nm에서 RNA를 정량하였다. RNA는 Superscript first-strand synthesis system for RT-PCR(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. Total RNA 1 $\mu$ g과 DNase I amplification grade (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 각각 1 $\mu$ l씩 혼합한 다음 15분간 실온에 두었다. 25mM EDTA 1 $\mu$ l 첨가 후 60 ~ 65°C에서 10분간 반응시킨 후 4°C에서 반응을 멈추었다. Oligo (dT)와 10mM dNTP mix를 각각 1 $\mu$ l씩 첨가해 다시 65°C에서 5분간 반응시켰고, 즉시 4°C에서 반응을 멈추었다. 최종 반응액에 10X RT buffer 2 $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 $\mu$ l, 0.1 M DTT 2 $\mu$ l, RnaseOUT<sup>TM</sup> recombinant inhibitor 1 $\mu$ l를 혼합한 다음 42°C에서 2분간 반응시켰다. Superscript<sup>TM</sup> II RT(reverse transcriptase) 1 $\mu$ l를 첨가한 다음 42°C에서 50분간 반응시켰다. 70°C에서 15분간 두면서 반응을 정지시키고, RNase H 1 $\mu$ l를 37°C 20분간 반응시켜서 cDNA로 합성되지 않은 RNA를 제거하였다. PCR Supermix(22 mM Tris-HCl, 55mM KCl, 1.65 mM MgCl<sub>2</sub>, 220 uM dATP, 220 uM dTTP, 220 uM dCTP, 22 U recombinant Taq DNA polymerase/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 200nM primer solution과

0.8 $\mu$ l template DNA solution을 혼합한 다음 원심 분리하여 minicycler(MJ research, Watertown, MA)에서 반응시켰다. (94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분, 30회 증폭). 6X loading dye(BPB)와 증폭된 DNA solution 5 $\mu$ l를 혼합한 후 2% agarose gel에서 전기영동 (100V, 20분)하였고, ethidium bromide로 염색한 다음 UV로 관찰하였다. 본 실험에서 사용한 oligonucleotide primer는 표2와 같다.

**Table 2. RT-PCR primers and sequences**

Qa-2 primer	- Sense : 5' -AGG TCT TAT GGT GCT GTC AC-3'
	- Anti sense : 5'-TGT GTA ATT CTG CTC CTT CC-3'
$\beta$ -actin primer	- Sense : 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'
	- Anti sense : 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACA GTCCG-3'
IFN- $\gamma$ primer	- Sense : 5'-AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AGC TTG TAC CTT TAC TTC ACT G-3'
	- Anti sense : 5'-GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG-3'

## F. PBMC에 Qa-2 siRNA transfection

5~6주 된 정상 ICR 마우스에서 말초혈액을 채취하여 3  $\mu$ l의 oligofectamin과 200 nmole Qa-2 siRNA를 DMEM media로 총 부피 200  $\mu$ l로의 mixture를 만들었다. 이 용액을 분리된 말초혈액 세포에 처리하고 24시간 동안 1% 항생제와 10% FBS가 포함 된 DMEM media에서 배양하였다. 24시간 반응 후 Qa-2 유전자 발현을 Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 수행하여 확인하였다.

## G. 마우스에 Qa-2 siRNA 혈관 주사

Qa-2 siRNA는  $\alpha 3$  domain, cytoplasmic domain, transmembrane domain을 동일한 양으로 혼합하여 500 nmole의 농도로 사용되었으며 5% glucose 용액을 이용하여 200  $\mu\text{l}$ 를 만들어 마우스 꼬리에 주사하였다. Qa-2 siRNA는 3일 간격으로 4회 주사한 후, 마지막 주사 후 이틀 뒤에 마우스 증상 변화를 사진촬영하고, 마우스를 sacrifice하여 말초혈액을 분리하여 FACS로 측정하였다. 대조군으로는 마우스에 5% glucose 용액만 200  $\mu\text{l}$  주사한 군과 Qa-2 유전자 저해 능력이 떨어지는 leader peptide domain을 500 nmole의 200  $\mu\text{l}$ 를 동일하게 주사하였다. 마우스에 직접 siRNA를 주사 시에 각각 마우스 한 마리당 1.5  $\mu\text{l}$ 의 transfection reagent를 사용하였고, 대조군에도 동일하게 처리하였다.

## H. BD 마우스의 spleen에서 Real-Time PCR

Real-time PCR은 BD mouse의 spleen을 분리하여 얻은 RNA를 이용하여 앞의 기술한 방법에서와 같이 cDNA를 합성하였다. 각각의 그룹에서 IFN- $\gamma$ 의 발현을 Real-time PCR로 확인하여 보았다. 합성된 cDNA template 0.5  $\mu\text{l}$ (10 ng/ $\mu\text{l}$ )에 IFN- $\gamma$  primer 0.8  $\mu\text{l}$  (표2 참조)를 넣고 2X SYBR I mixture 10  $\mu\text{l}$  를 더해준 후 D.W 8.7  $\mu\text{l}$ 를 넣어준 후 total volume 20  $\mu\text{l}$ 를 만들어 준 다음 ABI 7900 HT를 이용하여 real-time PCR 하였다. PCR 조건은 denature 95°C에 30초, annealing 온도 55°C 30초, extension 72°C 30초, 40회 증폭하여 실험하였다.

## I. Qa-2 DNA 벡터 제작

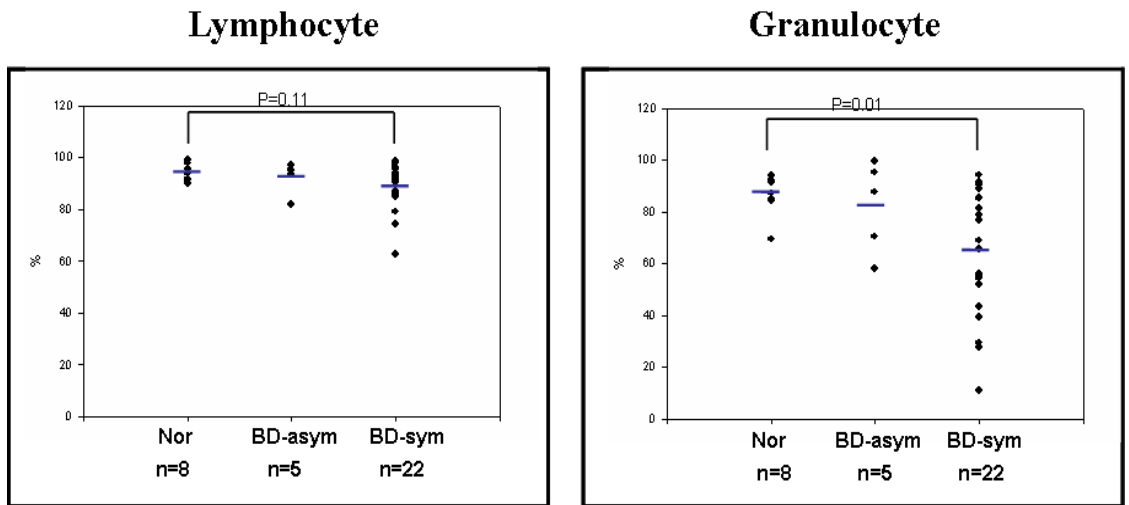
Qa-2 vector 제작에 필요한 cDNA를 합성하기 위해 정상마우스로부터 얻은 혈액 단핵구에서 cDNA를 합성하였다(앞의 기술 참조). 사용된 primer는 cloning을 위해 sense에 *Bam*H I, antisense에 *Eco*R I의 enzyme digestion site를 넣어 합성하였다. sense 5'-CGG GAT CCC GAT GGC TCT AAC AAT GCT GC-3', Anti sense : 5'-CGG AAT TCC GCT TCG TGTGAA AGT ATG GAG-3'. Cloning에 사용된 PCR product는 1.5% agarose gel로 size를 확인하고 gel band를 오려낸 후. 이것을 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)를 사용하여 증폭된 유전자를 정제하였다. 정제한 유전자를 pGEM-T Easy vector에 cloning한 후 T7과 SP6 primer를 이용하여 삽입된 target sequence를 확인하였다. Sequence를 확인 한 다음 pGEM-T Easy vector에 삽입된 Qa-2 gene을 *Bam*H I, *Eco*R I으로 잘라서 이것을 pcDNA3.1에 cloning 하였다. pcDNA3.1에 cloning 후 확인은 *Bam*H I, *Eco*R I으로 잘라서 vector와 target gene의 size를 분석 하였으며, T7 primer를 이용하여 sequence를 확인하였다. 그 후 정상 마우스에 벡터를 처리하지 않은 마우스, pc DNA 3.1 벡터, Qa-2 gene을 넣어 제작한 pcDNA 3.1 Qa-2 vector를 복강주사로 50 $\mu$ g을 transfection reagent 3 $\mu$ l와 함께 1회 주사하였다. 주사 후 72시간 경과한 다음 macrophage와 splenocyte에서 FACS analysis하여 Qa-2 발현을 확인하였다.

### Ⅲ. 결 과

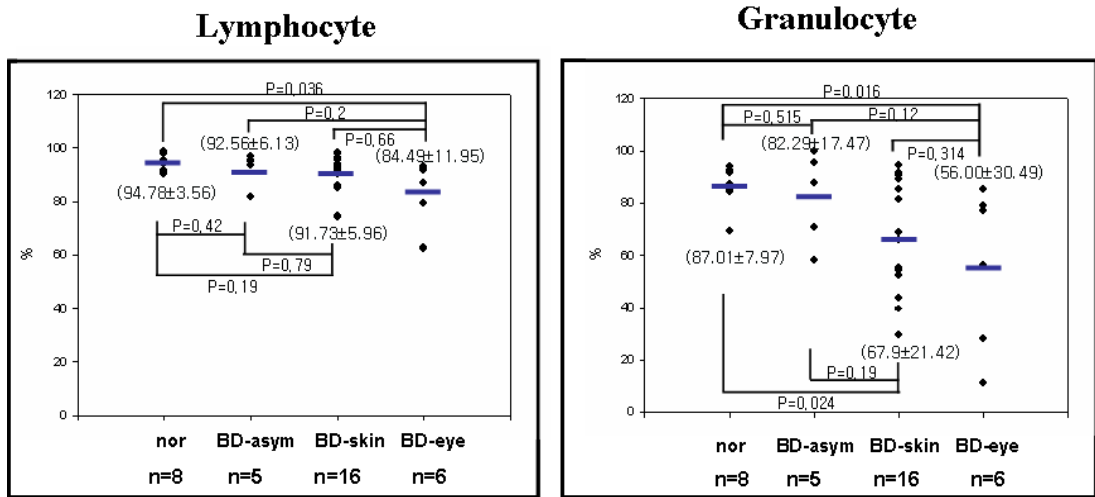
#### A. BD 마우스 PBMC에서 Qa-2의 발현 양상

정상 마우스, 무증상 군(BD asymptomatic:바이러스 injection후 건강한 마우스), BD 마우스 간에 Qa-2 level을 비교하였다. 무 증상 군과 BD 사이에 통계적 유의성은 없었으나, 무증상군보다 BD에서 Qa-2 level이 낮았다. PBMC를 FACS stain후 lymphocyte에서는 그룹 간 발현이 차이가 없었고, lymphocyte를 제외한 granulocyte에서는 무증상 군보다 BD에서 Qa-2 level이 낮게 나타남으로써 정상 마우스 군과 비교하였을 때 발현의 차이가 있었다(그림 1,  $p=0.01$ ).

그리고 BD mouse 중에서 피부병변을 나타내는 피부 증상 군과 피부 증상과 함께 눈 증상까지 나타내는 안 증상 군 간의 Qa-2 level을 비교하였다. 먼저 lymphocyte에서는 정상마우스와 무증상 군, 피부 증상 군 마우스에 비하여 안 증상 군 마우스에서 Qa-2 발현이 낮았다. 그리고 정상마우스에 비하여 안 증상 군 마우스에서 Qa-2 발현이 낮은 것은 통계학적으로 유의하다. granulocyte에서는 정상마우스와 무증상 군 마우스에 비해 피부 증상 군과 안 증상 군 마우스에서 Qa-2 발현이 낮았다. 특히 피부 증상 군에 비하여 안 증상 군 마우스에서 Qa-2 발현이 더욱 낮은 것을 확인하였다. 그리고 정상마우스에 비하여 피부 점막 증상 군과 안 증상 군 마우스에서 Qa-2 발현이 낮은 것은 통계학적으로 유의하다(그림2).



**Fig. 1. Qa-2 positive PBMCs in Normal control, BD-asymptomatic, and BD-symptomatic mice: FACS analysis. In granulocytes, Qa-2 levels were lower in BD-symptomatic mice than in normal control mice( $p=0.01$ ).**

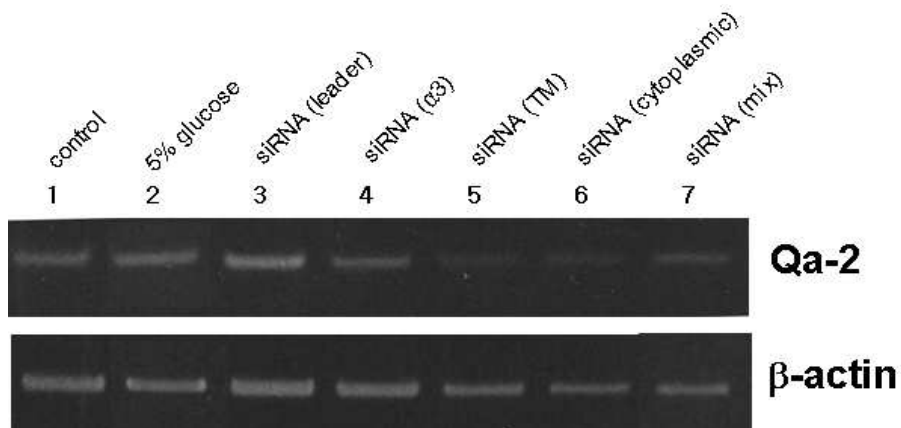


**Fig. 2. Qa-2 positive PBMCs in Normal control, BD-asymptomatic, BD-skin, and BD-eye mice: FACS analysis. Qa-2 levels were lower in BD-eye (eye involvement) than BD-skin (mucocutaneous involvement) in PBMC of BD mice compare to normal healthy mice.**

## B. PBMC에 siRNA transfection후 RT-PCR결과

그림3에서는 보는 바와 같이 Lane 1은 control, lane 2는 5% glucose, lane 3은 leader peptide 200nmole, lane 4는  $\alpha 3$  domain 200nmole, lane 5는 transmembrane domain 200nmole, lane 6은 cytoplasmic domain 200nmole, lane 7은 leader peptide domain과  $\alpha 3$  domain, transmembrane domain 그리고 cytoplasmic domain을 동일한 양으로 섞어서 200nmole을 PBMC에 각각 처리하고 24시간 후에 RT-PCR한다. 그 결과, Qa-2 유전자의  $\alpha 3$  domain와 transmembrane domain, cytoplasmic domain에 대해 각각 siRNA가 Qa-2 발현을 저해하였으며, leader peptide domain에 대한 siRNA는 Qa-2 발현을 거의 저해하지 못하였다.





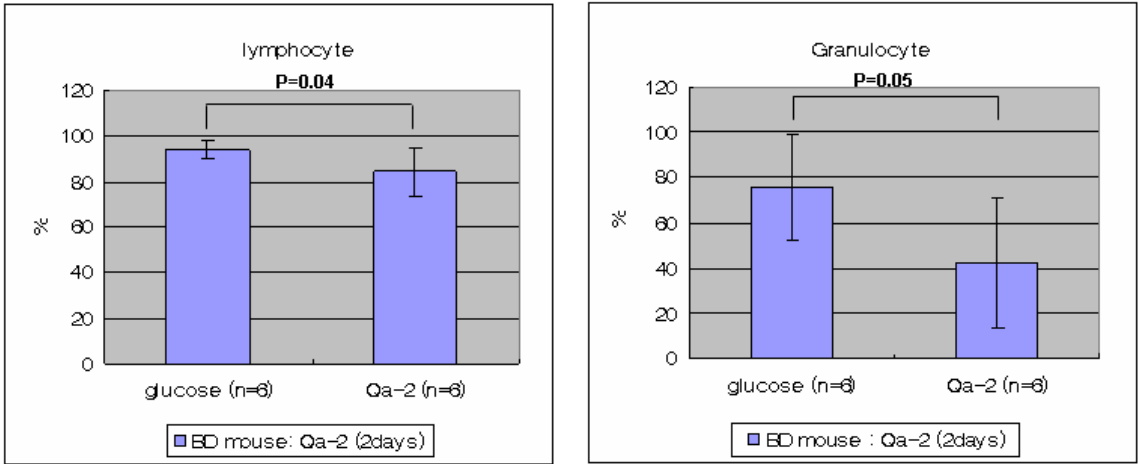
1. Control- no treated
2. 5% glucose treated
3. Leader peptide 200 nmole
4. α3 domain 200 nmole
5. Transmembrane domain 200 nmole
6. Cytoplasmic domain 200 nmole
7. Mix 200 nmole (leader peptide + α3 domain+ TM domain + cytoplasmic domain)

**Fig. 3. Qa-2 siRNA reduced Qa-2 mRNA levels in PBMCs of normal mice.** PBMCs isolated from mice were transfected with Qa-2 siRNAs with different domains. Expression of Qa-2 was determined by Reverse Transcriptase-PCR. Lane 3 (leader peptide); Qa-2 level showed not decrease. Lanes 4,5,6 (α3 domain, TM domain, cytoplasmic domain); siRNA effectively reduced Qa-2 mRNA levels, Lane 7 (mix); Qa-2 level showed decrease.

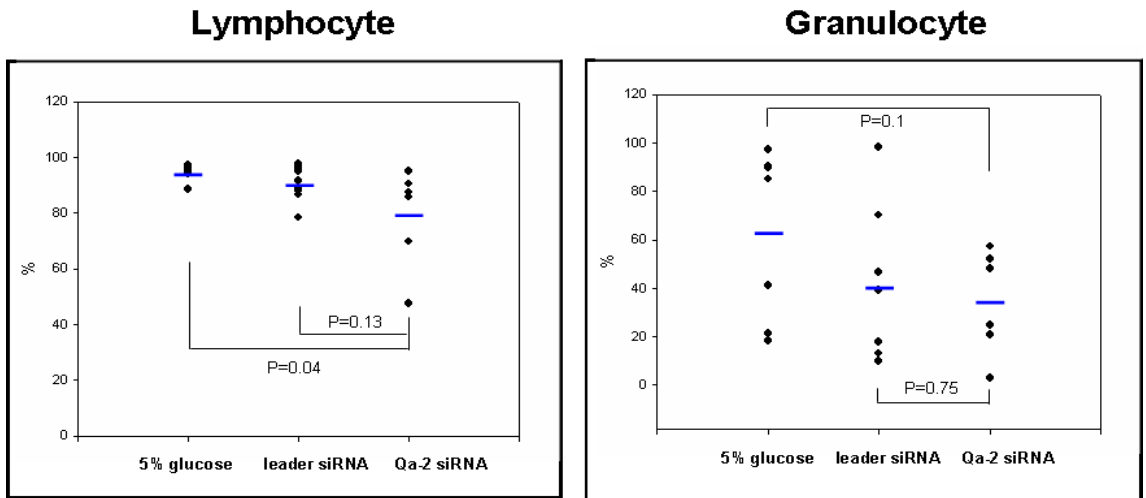
## C. BD 마우스에 Qa-2 siRNA 주사에 의한 Qa-2 발현 분석

BD mouse에 5% glucose(siRNA mix solution), Qa-2 siRNA 500nmole을 1회 정맥 주사한 후, 48시간 경과 한 다음 PBMC에서 analysis 하였다. Glucose 처리군에 비하여 Qa-2 siRNA 주사한 그룹에서 lymphocyte와 granulocyte에서 모두 Qa-2 발현이 저해되는 것을 확인하였다. P값은 lymphocyte에서는 0.04, granulocyte에서는 0.05로 통계학적으로 유의하다(그림4).

BD mouse에 5% glucose(siRNA mix solution) 또는 leader peptide domain siRNA와 Qa-2 siRNA mixture을 각각 500 nmole를 3일 간격으로 4회 주사 후 PBMC에서 FACS로 확인하였다. glucose를 처리한 군에 비교하여 Qa-2 siRNA를 주사한 군에서 lymphocyte와 granulocyte 모두에서 Qa-2 발현이 저해되는 경향을 확인하였다. P값은 lymphocyte에서는 0.04, granulocyte에서는 0.1로 통계학적으로 유의하다(그림5).



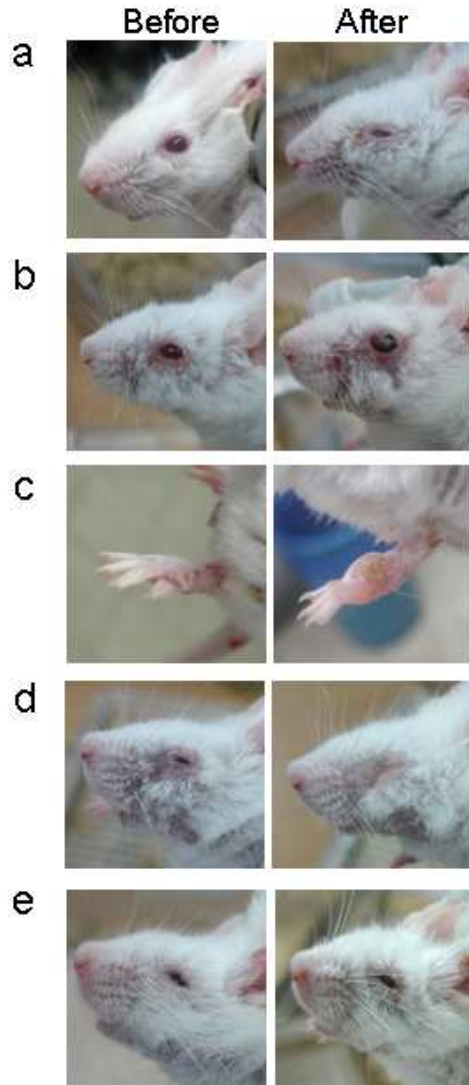
**Fig. 4. Knockdown of Qa-2 by intravenous injection of siRNA into BD mice (500 nmol/mouse, 1 time) (2 days later).** BD mice were injected 1 time with glucose or Qa-2 siRNA, and their PBMCs were analyzed 2 days later by flow cytometry. Qa-2 siRNA effectively reduced Qa-2 levels in lymphocytes and granulocytes of BD mice.



**Fig. 5.** Knock down of Qa-2 by intravenous injection of siRNA into BD mice (500 nmol/mouse, 4 times with 3-day intervals). Qa-2 siRNA decreased the number of Qa-2 positive lymphocytes and granulocytes in BD mice.

## D. siRNA 주사에 의한 BD 마우스의 증상 변화

BD 마우스에 대조군(glucose)과 leader peptide domain siRNA, Qa-2 siRNA를 500 nmole의 농도로 각각 3일 간격으로 4회 주사 한 다음 각 그룹 간의 마우스 증상변화를 관찰하였다. Qa-2 siRNA를 주사한 마우스 6 마리 중 2 마리는 안 증상이 악화되었고 1 마리는 피부점막 증상에서 관절증상이 나타났다. leader peptide siRNA를 주사한 그룹에서는 6 마리 중 1 마리만 안 증상이 악화됨을 보았고, glucose를 주사한 그룹에서는 7 마리의 마우스 모두가 증상 변화를 나타내지 않았다 (그림 6, 표 3).



**Fig. 6. The change of symptoms after Qa-2 siRNA injection into BD mice.** Photographs of mice before and after Qa-2 siRNA injection. Qa-2 siRNA was injected intravenously 4 times with 3 day-intervals into BD mice. The condition of BD mice deteriorated following treatment with Qa-2 siRNA. Deterioration occurred in 3 of 6 BD mice, involving eye symptoms and arthritis(a,b,c). The deterioration of BD mice occurred 1 of 6 mice with leader peptide domain siRNA(d), and not changed all of them with 5% glucose(e).

**Table 3. The change of symptoms after Qa-2 siRNA injection into BD mice**

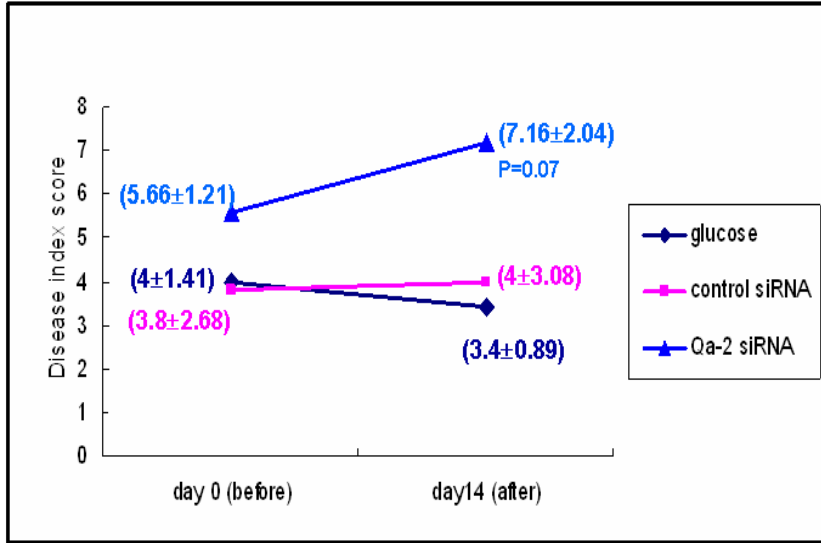
siRNA	Deteriorated number	Change of symptoms
Qa-2(mix)	3/6	Eye symptom deteriorated (n=2, a, b) arthritis (n=1, c)
Leader peptide	1/6	Eye symptom (n=1, d)
Glucose	0/7	None (e)

The condition of BD mice deteriorated following treatment with Qa-2 siRNA. Qa-2 siRNA was injected intravenously 4 times with 3 day-intervals into BD mice. Deterioration occurred in 3 of 6 BD mice, involving eye symptoms and arthritis.

각 그룹의 마우스의 증상 변화를 International Society for Behcet's Disease(ICBD)의 개정된 Behcet's disease current activity form 2006를 참고하여 점수를 매겨 도표로 나타내었다.

그 결과 glucose를 주사 한 그룹에서는 질병 점수가 4에서 3.4로, leader peptide siRNA를 준 그룹에서는 3.8에서 4로 변화가 거의 없었고, Qa-2 siRNA를 준 그룹에서는 5.66에서 7.16으로 증가하였다. P값은 0.07로 나타남으로써 통계적으로는 의미가 없었다. Qa-2 siRNA를 준 그룹에서 질병점수가 높아졌고 이는 증상의 악화와도 관련이 있음을 확인하였다(그림 7).

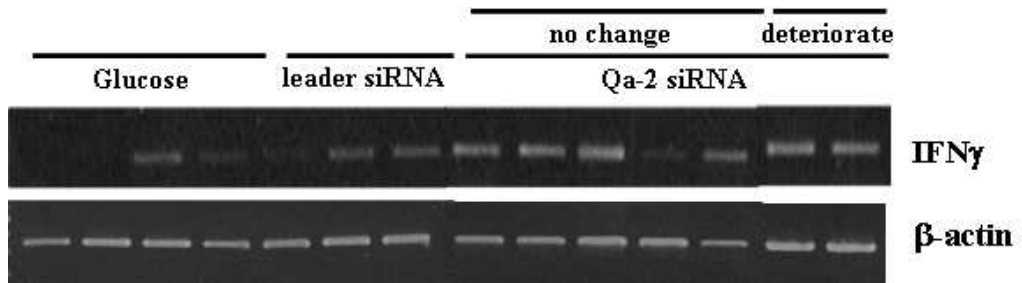




**Fig. 7. The change of disease index scores in Qa-2 siRNA-injected BD mice.** BD mice were injected intravenously 4 times at 3 day-intervals with 5% glucose (control), leader peptide siRNA, or Qa-2 siRNA. Qa-2 siRNA injected BD mice increased disease index score. disease index score was followed by Patients Index Score, Behcet's disease current activity form 2006, ICBD.

## E. siRNA를 주사한 BD 마우스에서 IFN- $\gamma$ 발현

BD 마우스에 5% glucose(siRNA mix solution), leader peptide domain siRNA 500 nmole, Qa-2 siRNA 500 nmole을 3일 간격으로 4회 꼬리 정맥 주사한 후, 48시간 경과 한 다음에 마우스의 spleen에서 RT-PCR하였다. 그 결과 Qa-2 siRNA를 주사한 그룹에서 IFN- $\gamma$ 의 발현이 증가되어졌다. Qa-2 siRNA를 주사한 그룹 중 증상이 악화된 마우스와 증상변화가 없는 마우스에서의 IFN- $\gamma$  mRNA의 발현에는 차이가 없었다(그림 8, 9).



**Fig. 8.** Comparison of IFN- $\gamma$  mRNA in the spleens of glucose, leader peptide siRNA-injected, and Qa-2 siRNA-injected BD mice by RT-PCR. IFN- $\gamma$  mRNA expressions were increased in the Qa-2 siRNA-injected group. The expression level of IFN- $\gamma$  mRNA was not different between the "deteriorate" group and the "no change" group.

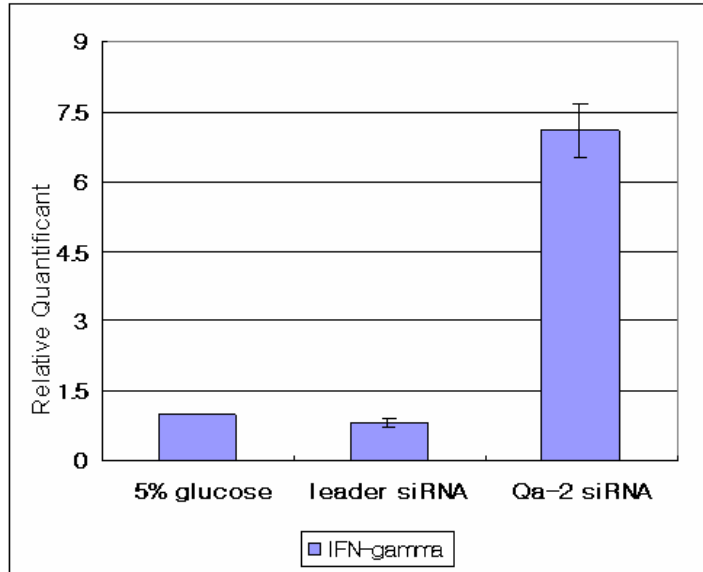
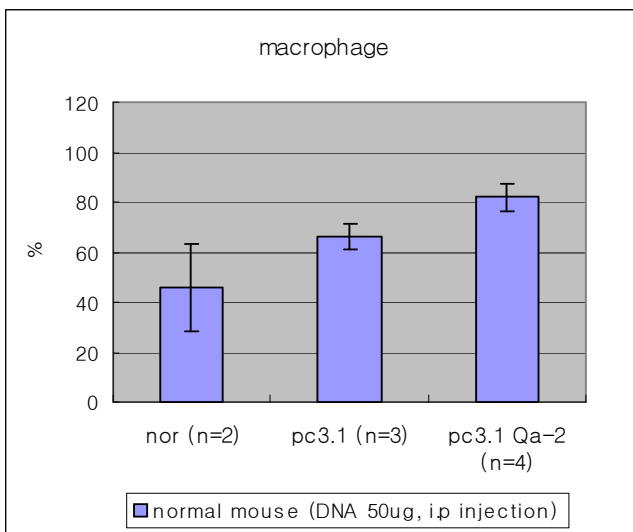
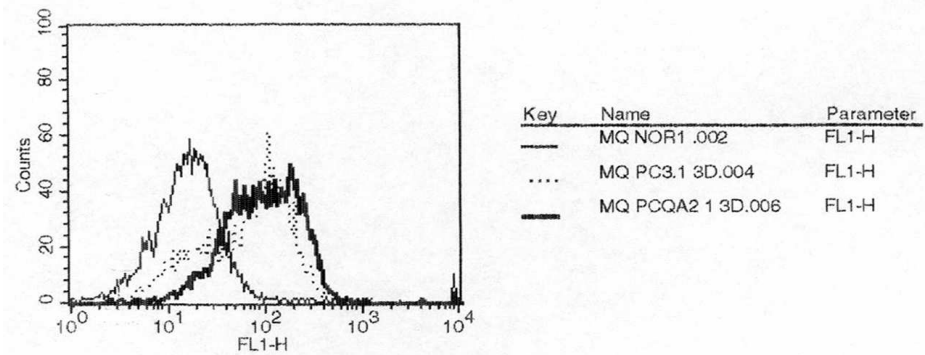


Fig. 9. Comparison of IFN- $\gamma$  mRNA in the spleen of glucose, leader peptide domain siRNA-injected, and Qa-2 siRNA-injected BD mice by Real-time PCR. IFN- $\gamma$  mRNA expression was increased in the Qa-2 siRNA-injected group.

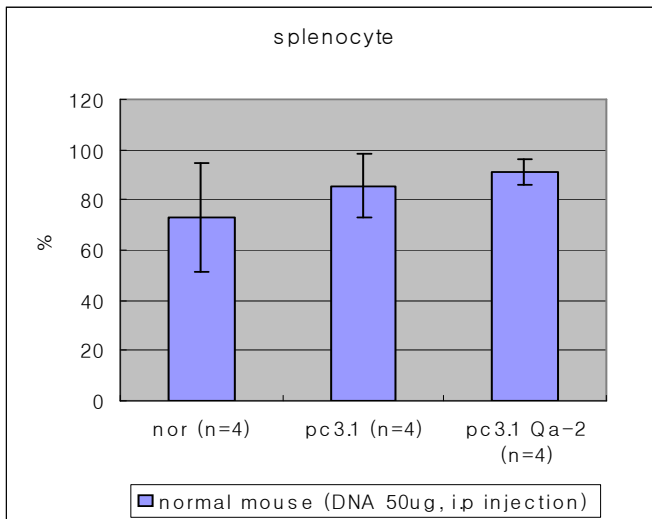
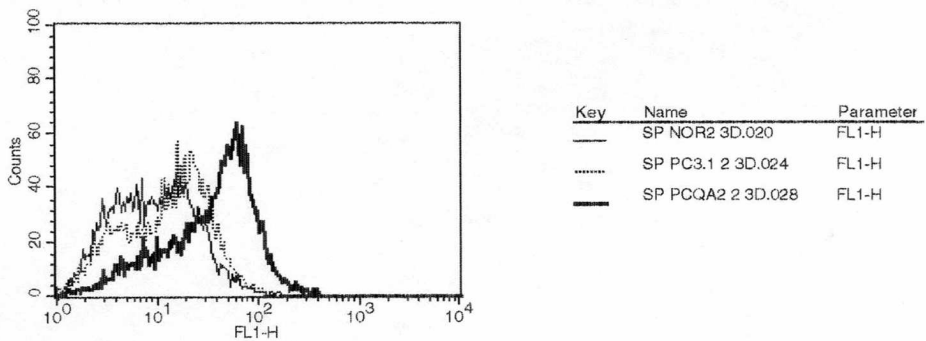
F. 정상 마우스에 Qa-2 DNA vector 주사 후, FACS

## analysis 결과

백터를 처리하지 않은 마우스와 pcDNA 3.1 백터를 주사한 마우스에 비교하여 pcDNA 3.1 Qa-2 vector를 주사한 마우스의 macrophage와 splenocyte 모두에서 Qa-2 발현이 증가되었다. 백터를 처리하지 않은 마우스에 비교하여 pcDNA 3.1 백터만 준 마우스에서도 Qa-2 발현이 약간 증가됨을 확인할 수 있었다(그림 10, 11).



**Fig. 10. Expression of Qa-2 protein in macrophage of Qa-2 vector injected normal mice by FACS analysis.** BD mice were injected intraperitoneally 1 time with pcDNA 3.1 or pcDNA 3.1 Qa-2 vector, and their macrophage were analyzed 3 days later flow cytometry. Qa-2 protein expression increased in the pcDNA 3.1 Qa-2 vector injected mice.



**Fig. 11. Expression of Qa-2 protein in splenocyte of Qa-2 vector injected normal mice by FACS analysis.** BD mice were injected intraperitoneally 1 time with pcDNA 3.1 or pcDNA 3.1 Qa-2 vector, and their splenocytes were analyzed 3 days later flow cytometry. Qa-2 protein expression increased in the pcDNA 3.1 Qa-2 vector injected mice.

BD 마우스에 pcDNA 3.1 vector와 pcDNA 3.1 Qa-2 vector를 50 $\mu$ g을 1회 복강주사한 후 4일 후 macrophage를 분리한 후 Qa-2와 IFN- $\gamma$ 의 발현을 FACS analysis로 확인하였다. pcDNA 3.1 vector를 준 마우스에서는 Qa-2 발현이 90%로 나타났고, pc3.1 Qa-2 vector를 준 마우스에서는 Qa-2 발현이 94.8%로 증가한 것을 보았다. 같은 마우스에서 pcDNA 3.1 vector를 준 마우스와 pcDNA 3.1 Qa-2 vector를 준 마우스에서 IFN- $\gamma$  발현이 각각 74%와 16%로 나타남으로써 pcDNA3.1 Qa-2 vector를 준 마우스에서 IFN- $\gamma$ 의 발현이 확연히 줄어든 것을 확인하였다. TNF- $\alpha$ 의 발현은 동일하게 98%로 발현이 되어 두 그룹간의 차이가 없었다(n=2),(그림 12).



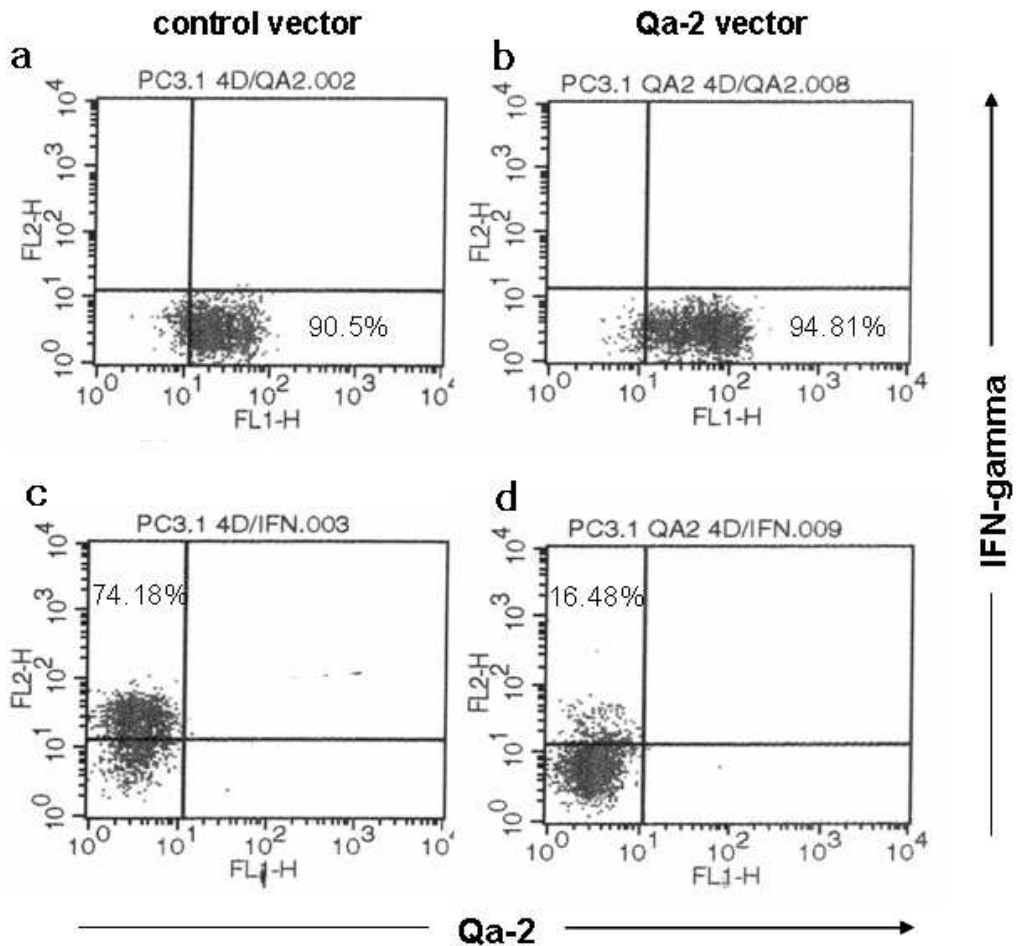


Fig. 12. Expression of Qa-2 and IFN-gamma protein in the macrophage of Qa-2 vector injected BD mice by FACS analysis. BD mice were injected intraperitoneally 1 time with pcDNA 3.1(a,c) or pcDNA 3.1 Qa-2 vector(b,d), and their macrophage were analyzed 4days later flow cytometry. Qa-2 protein expression increased in the Qa-2 vector injected mice. whereas IFN-gamma decreased in the Qa-2 vector injected mice.

## IV. 고 찰

베체트병은 만성염증질환으로 피부점막 증상, 관절 증상, 신경 증상, 안 증상 등으로 나타나고, 이러한 증상들이 동시다발적으로 나타나기도 한다. 베체트병이 심각해짐에 따라서 초기의 피부점막 증상과 함께 안 증상까지 나타나는데 안 증상은 실명이라는 심각한 결과를 초래하기도 한다. 본 연구에서는 염증반응에서 면역관용을 일으킴으로써 중요한 인자로 알려진 HLA-G 유전자가 베체트병의 마우스 모델에서 증상의 변화에 따라 유전자 발현의 차이가 있는지 알아보려고 하였다.

우리는 베체트병 마우스 모델을 이용하여 HLA-G와 기능적으로 homolog인 Qa-2 유전자 발현의 차이를 각각 정상 마우스 군, 무증상 군, 피부점막 증상 군, 안 증상 군으로 나누어 발현의 차이를 조사하였다. 그리고 Qa-2 유전자를 siRNA를 이용하여 발현을 조절하고 이에 따른 증상변화를 관찰하였다. 그 결과 증상 군에 따라 Qa-2 유전자의 발현 정도가 다르게 나타났다. Qa-2 유전자는 정상 마우스와 무증상 군에 비해 피부 점막 증상 군, 안 증상 군의 베체트병 마우스에서 보다 낮게 발현되었다. 그리고 피부점막 증상 군에 비교하여 안 증상 군에서 Qa-2 유전자가 더욱 낮게 발현됨을 확인하였다. 또한 전체 PBMC에서 lymphocyte보다는 granulocyte에서 발현의 차이가 더 나타난 것을 확인하였다. 정상마우스와 무증상 군 사이에서의 발현의 차이는 없었다.

증상이 각각 다른 베체트병 마우스의 PBMC에서 Qa-2 발현의 차이는 granulocyte에서 나타났으므로 HSV에 의하여 Qa-2의 발현이 granulocyte에서 차단이 되거나 cell surface의 발현을 저해시키는 요소가 있을 것이라 예상하여 볼 수 있었다. 또한 lymphocyte에서는 정상마우스와 BD 마우스간의 Qa-2 발현의 차이가 크지 않고, 개체들 간에도 큰 차이가 나타나지 않음을 알 수 있었다. 반면에 granulocyte에서는 마우스 개체마다 차이도 크고, 그룹간의 발현의 차이가 크게 나타남을 확인하였다. 따라서 베체트병 마우스에서

면역작용에 이상이 생길 경우 lymphocyte보다 granulocyte의 작용에 더 큰 변화가 일어남을 확인하였다. 이전의 보고에 의하면 정상인보다 베체트 환자에서 pathogen에 대하여 과민하게 반응하여 IFN- $\gamma$ 의 생산이 증가되어지고, 비정상적인 T lymphocyte의 활성이 일어난다고 보고되어졌다(Hirohata S 등, 1998). 우리의 실험 결과에서는 정상마우스에 비교하여 안 증상이 있는 베체트 마우스 그룹간의 Qa-2 유전자 발현의 차이가 lymphocyte와 granulocyte에서 있었고, 통계적으로 의미 있는 결과를 보았다(그림 2).

Qa-2 유전자를 저해시키기 위하여 Qa-2 유전자 각각의 domain에 맞는 sequence에 상보적인 siRNA를 제작하였다. In vitro에서 siRNA의 효능을 RT-PCR로 확인 한 결과  $\alpha 3$  domain, transmembrane domain, cytoplasmic domain siRNA는 Qa-2 발현을 저해시키는 능력이 효과적임을 확인하였으나 leader peptide domain은 저해능이 떨어지는 것을 확인하였다. 여기서 siRNA가 sequence에 맞게 상보적이라 하더라도 모두 똑같은 효과를 가지고 있지 않음을 확인하였다. 따라서 우리는 실험에서 저해 능력이 뛰어난  $\alpha 3$  domain, transmembrane domain, cytoplasmic domain을 동일한 양으로 섞어서 500 nmole의 농도로 마우스에 처리하였고, 저해능이 떨어지는 leader peptide siRNA는 대조군으로 500 nmole의 농도로 사용하였다.

In vivo에서 BD 마우스의 PBMC에서 날짜별로 siRNA의 효과 정도를 확인 하였을 때, Qa-2 siRNA를 1회 injection하고 이틀 뒤가 가장 효과적으로 Qa-2 유전자를 저해 시키는 것을 확인하였다(그림 4). 1회 injection하고 하루 뒤에는 Qa-2 발현이 낮아지지 않았고, 3일째에는 Qa-2 유전자 발현이 다시 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 siRNA가 이틀 후에 가장 효과적으로 작용함을 확인함으로써 siRNA로 인해 일시적으로 발현이 저해되었다가 시간이 지나면서 Qa-2 유전자 발현이 다시 회복되는 것을 예상하여 볼 수 있었다.

Qa-2 siRNA를 주사한 그룹에서 이틀 후에 효과적으로 Qa-2 유전자가 저해됨을 확인하였으며, 1회 처리 하였을 때 보다 지속적으로 4회 처리

하였을 때 더욱 Qa-2 발현이 감소되는 것을 확인하였다. Qa-2 siRNA로 인한 일시적인 저해를 지속적인 siRNA처리로 Qa-2 유전자가 저해되는 것이 유지되고 발현정도가 더욱 낮아지는 것을 확인하였다.

안 증상까지 동반한 마우스에서 면역관용에 관여하는 Qa-2 유전자가 낮게 발현됨을 확인함으로써 베체트병에서 심각한 증상의 마우스에서는 과도한 면역작용을 저해할 수 있는 이 유전자가 적게 발현됨을 확인하였다. 이 유전자들이 적게 발현됨으로써 이들의 NK cytotoxicity나 T cell의 증식을 inhibition하지 못하게 되고, Th1과 Th2의 균형 조절도 하지 못하게 될 것이라 예상한다. 또한 Qa-2 발현이 낮은 마우스에서는 Th1 cytokine(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )의 발현이 많아짐으로써 더욱 염증반응은 심해지고 이에 따른 안 증상과 관절증상을 동반할 것이라 예상해 볼 수 있다. 이를 확인하기 위한 실험으로 베체트 마우스 군에 대조군(glucose), leader peptide domain siRNA와 Qa-2 siRNA를 마우스에 주사하여 확인하였더니 Qa-2 siRNA를 주사한 그룹에서 효과적으로 Qa-2 유전자가 inhibition되었으며 IFN- $\gamma$ 의 발현은 증가한 것을 RT-PCR과 Real-Time PCR 결과로 확인할 수 있었다. 그리고 Qa-2 siRNA를 주사한 마우스 6 마리 중 2 마리는 안 증상이 악화되었고 1 마리는 피부점막 증상에서 관절증상이 나타났다. 대조군으로 사용된 leader peptide domain siRNA를 주사한 그룹에서는 6 마리 중 1 마리만 안 증상이 악화됨을 보았고, 또 다른 대조군 glucose를 주사한 그룹에서는 7 마리의 마우스 모두가 증상 변화를 보이지 않았다. 따라서 Qa-2 유전자가 발현이 낮추어 짐으로써 증상이 악화됨을 확인할 수 있었다. 그리고 면역관용의 중요한 인자로 작용하는 Qa-2 유전자가 저해됨으로써 마우스의 Th1 면역반응이 더 활발히 일어나게 됨을 확인하였다.

Qa-2 DNA vector를 제작하여 정상마우스와 베체트병 마우스에 처리하여 Qa-2 발현이 증가됨을 FACS analysis로 확인하였다. Qa-2 vector를 주사한 정상마우스에서는 macrophage와 splenocyte에서 Qa-2 발현이 증가되었다. Qa-2 vector를 주사한 베체트 마우스의 macrophage에서 Qa-2 발현

이 증가되어지고, 동일한 마우스에서 IFN- $\gamma$ 의 발현이 감소되어짐을 확인하였다. 그러므로 Qa-2 유전자 발현정도에 따라 IFN- $\gamma$ 의 발현에 관련이 있음을 확인하였고, Qa-2 발현이 낮아지게 되면 베체트병 마우스의 증상에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 따라서 실제 Th1 immune disease인 베체트질병에서 HLA-G를 이용하여 면역반응을 조절하고, 그에 따라 면역 억제하는 기능을 함으로써 질병의 악화를 낮추어 질병 치료에 이용할 수 있지 않을까 예상하여 본다.

## V. 결 론

베체트 마우스 모델을 이용하여 무증상 군, 피부점막 군, 안 증상 군의 마우스에서 각각 Qa-2 유전자의 발현정도를 알아보고, siRNA를 이용하여 발현을 낮추고, 증상변화를 관찰하였다.

FACS analysis 결과 정상마우스보다 베체트병 마우스의 PBMC에서 Qa-2 유전자가 낮게 발현되었고, 베체트병 마우스 중에는 피부점막 증상군보다 안 증상을 동반한 마우스에서 Qa-2 유전자가 더욱 낮게 발현되었다.

전체 PBMC 중 lymphocyte와 granulocyte에서 Qa-2 유전자 발현의 차이가 있었다(그림2).

특히 베체트병 마우스의 granulocyte에서 Qa-2 유전자 발현이 낮았으며, 피부점막 증상 마우스보다 안 증상을 동반한 마우스의 granulocyte에서 Qa-2 유전자 발현이 더욱 낮게 발현되었다.

Qa-2 siRNA를 이용하여 in vitro, in vivo에서 모두 효과적으로 Qa-2 유전자 발현을 억제시켰다. 베체트병 마우스 모델에서 Qa-2 siRNA를 주사한 그룹에서는 효과적으로 Qa-2 발현이 억제되어지고, IFN- $\gamma$ 의 발현이 증가되어짐을 RT-PCR, Real-Time PCR 결과로 확인하였다. 그리고 glucose를 주사한 그룹에서는 7 마리 모두 증상의 변화가 없었고, leader peptide domain siRNA를 주사한 그룹은 총 6 마리 중 1 마리가 안 증상이 악화되었고, Qa-2 siRNA를 주사한 그룹에서는 총 6 마리 중 3 마리가 증상이 악화되었는데 2 마리는 안 증상이 악화되었고, 1 마리는 피부점막 증상에서 관절 증상이 발병했다.

Qa-2 DNA vector를 이용하여 베체트 마우스에서 Qa-2 발현이 증가됨을 FACS analysis로 확인하였고, Qa-2 발현이 증가된 마우스에서 IFN- $\gamma$ 의 발현은 감소되어짐을 확인하였다. 그러므로 Qa-2 유전자 발현정도에 따라 IFN- $\gamma$ 의 발현에 관련이 있음을 확인하였고, 베체트병 마우스의 증상의 영향을 미치는 것을 확인하였다.

## 참 고 문 헌

1. Aractingi S, Briand N, Le Danff C, Viguier M, Bachelez H, Michel L, Dubertret L, Carosella ED, HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells?, *Am. J. Pathol.* 159, pp. 71 - 77, 2001
2. Bainbridge DR, Ellis SA, Sargent IL, HLA-G suppresses proliferation of CD4+ T lymphocytes, *J. Reprod. Immunol.* 48, pp. 17 - 26, 2000
3. Bang D, Choi HJ, Lee S, Shon S, Herpes simplex virus detection by polymerase chain reaction in genital ulcer of patients with Behcet's disease, Tunis, *Revue du Rheumatism* 63:532, 1996
4. Cabestre FA, Lefebvre S, Moreau P, Rouas-Friess N, Dausset J, Carosella ED, Paul P, HLA-G expression: immune privilege for tumour cells?, *Semin. Cancer Biol.* 9, pp. 27 - 36, 1999
5. Dorling A, Monk N, Lechler R., HLA-G inhibits the transendothelial migration of human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 30 , pp. 586-593, 2000
6. E.D. Carosella., fetomaternal tolerance .*C R Acad Sci III.* Aug;323(8):675-80, 2000
7. Flynn MA, Casey DG, Todryk SM, Mahon BP, Efficient delivery of small interfering RNA for inhibition of IL-12p40 expression in vivo. *Journal of inflammation*, I :4, 2004
8. Frassanito MA, Dammacco R, Cafforio P, Dammacco F, Th1 polarization of the immune response in Behcet's disease: a putative pathogenetic role of interleukin-12. *Arthritis Rheum* 42, pp1067-1974, 1999

9. Fons P, Chabot S, Cartwright JE, Lenfant F, L'Faqihi F, Giustiniani J, Herault JP, Gueguen G, Bono F, Savi P, Aguerre-Girr M, Fournel S, Malecaze F, Bensussan A, Plouet J, Le Bouteiller P, Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cell, *Blood*. Oct 15;108(8):2608-15, 200, Epub Jun 29, 2006
10. Hamzaoui K, Hamzaoui A, Guemira F, Bessioud M, Hamza M, Ayed K, cytokine profile in Behcet's disease patients. *Scand eumatol* 31, pp 10, 2002
11. Hirohata S, Hashimoto T, Abnormal T cell responses to bacterial superantigens in Behcet's disease. *Clin Exp Immunol*. 112:317-24, 1998
12. Ishitani A, Geraghty DE, Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structure resembling both class I and class II antigens: *Proc Natl Acad Sci USA* 89, pp. 3947, 1992
13. Jun Y, Kim E, Jin M, Sung HC, Han H, Geraghty DE, Ahn K, human cytomegalovirus gene products US3 and US6 down-regulate trophoblast class I MHC molecules. *The journal of immunology* 164, pp. 805-811, 2000
14. Khosrotehrani K, Le Danff C, Reynaud-Mendel B, Dubertret L, Carosella ED, Aractingi S, HLA-G expression in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol*, Sep;117(3):750-2, 2001
15. Kanai T, Fujii T, Unno N, Yamashita T, Hyodo H, Miki A, Hamai Y, Kozuma S, Taketani Y, Human leukocyte antigen-G-expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood. *Am. J. Reprod. Immunol*. 45, pp. 94 - 99, 2001



16. Kim VN, RNA interference in functional genomics and medicine, *J Korean med sci*; 18:309–18, 2003.
17. Lila N, Carpentier A, Amrein C, Khalil-Daher I, Dausset J, Carosella ED, Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet* 355, pp. 2138, 2000
18. Lee E-S, Lee S, Bang D, Shon S, Herpes simplex virus detection by polymerase chain reaction in intestinal ulcer of patients with Behcet's disease, *Tunis, Revue du Rheumatism* 63:531, 1996
19. Marchal-Bras-Goncalves R, Rouas-Freiss N, Connan F, Choppin J, Dausset J, Carosella ED, Kirszenbaum M, Guillet J, A soluble HLA-G protein that inhibits natural-killer-cell-mediated cytotoxicity. *Transplant. Proc.* 33, pp. 2355 - 2359, 2001
20. N. Lila et al., Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet* 355 (2000), p. 2138
21. Park KS, Nam JH, Lee ES, Choi JS, Bang D, Lee S, Increased risk of human leukocyte antigen-G gene variants in Behcet's disease, *Clin Exp Rheumatol*, Sep-Oct;24 Suppl 42(5):S126-S127, 2006
22. Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, Paul P, Dausset J, Carosella ED, HLA-G2, -G3 and -G4 isoforms expressed as nonmature cell-surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J. Immunol.* 166, pp.5018 - 50265), 2001
23. Riteau B, Menier C, Khalil-Daher I, Sedlik C, Dausset J, Rouas-Freiss N, Carosella ED, HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. *J. Reprod.Immunol.* 43, pp. 203 - 211, 1999

24. Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED, Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, pp. 11520 - 11525, 1997
  
25. Rajendram R, Rao NA, Molecular mechanism in Behcet's disease, *Br J Ophthalmol* 87, pp. 1199 - 1200, 2003
  
26. Sohn S, Lee ES, Kwon HJ, Lee SI, Bang D, Lee S, expression of Th2 cytokines decreases the development of and improves Behcet's Disease-like symptoms induced by herpes simplex virus in mice. *J Infect Dis* 183, pp. 1180-1186, 2001
  
27. Stephan N Wagner, Vera Rebmann, Christoph P Willers, Hans Grosse-Wilde and Manfred Goos, Expression analysis of classic and nonclassic HLA molecules before interferon- $\alpha$ -2b treatment of melanoma. *Lancet* 356, pp. 220 - 221, 2000
  
28. S. Rajagopalan and E.O. Long , A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J. Exp. Med.* 189, pp. 1093 - 1099, 1999
  
29. Stroynowski I, Tabaczewski P, Multiple products of class I b Qa-2 genes: which ones are functional?: *Res Immunol* 147, pp. 290, 1996
  
30. Verity DH, Wallace GR, Vaughan RW, Stanford MR, Behcet's disease: from Hippocrates to the third millennium, *Br J Ophthalmol* 87, pp. 1175 - 1183, 20

- ABSTRACT -

**The Role of Qa-2, the Functional Homolog of  
HLA-G, in a Mouse Model of Behcet's Disease  
Induced by HSV Inoculation**

MI YOUNG LEE

Department of Medical Sciences  
The Graduate School, Ajou University

(Supervised Associate Professor Seonghyang Sohn)

HLA-G (human leukocyte antigen-G) is a nonclassical class I MHC molecule. HLA-G interacts with different natural killer (NK) cell receptors and is able to inhibit NK and T-cell cytotoxicity, as well as T-cell proliferation. An HLA-G 3741\_3754 14-base pair insertion allele was significantly more frequent in Behcet's disease (BD), with ocular, arthritis, and CNS symptoms, than in controls. The insertion was related to lower serum levels of HLA-G. Individuals homozygous for the insertion allele (3741\_3754\*ins14/\* found to have a ins14 genotype) were 2.7-times greater risk of BD than controls. Thus, it has been suggested that the HLA-G allelic variant is one of the genetic risk factors for BD. In this study, reduced levels of Qa-2, a murine nonclassical class I MHC molecule and a possible functional homolog of HLA-G, was associated

with various BD-like symptoms in mice, and siRNA (small interfering RNA) treatment was used to inhibit Qa-2 RNA expression in order to detect changes in symptoms according to Qa-2 levels. RNA interference (RNAi) has exploded as a new approach to manipulate gene expression in mammalian systems. Qa-2 levels in granulocytes were lower in BD mice than in normal controls and lower in BD mice with ocular symptoms than those without ocular symptoms. Silencing Qa-2 by intravenous injection of siRNA (500 nmol/mouse, 4 times with 3-day intervals) specifically reduced Qa-2 levels and resulted in BD progression, with the development of symptoms, including ocular symptoms and arthritis. We demonstrated that this approach could be extended to the in vivo mouse model by showing that silencing Qa-2 results in deteriorated conditions in BD mice.

---

key words: Behcet's disease, HLA-G, Qa-2 ,siRNA