

# T-세포 항원 수용체 매개 신호전달 조절자로서 돼지 CD45RO 구조특성

채한화<sup>1</sup>, 임다정<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>국립축산과학원 동물유전체과, 전남대학교 약학대학, <sup>2</sup>국립축산과학원 동물유전체과

## Key Structural Features of PigCD45RO as an Essential Regulator of T-cell Antigen Receptor Signaling

Han-Ha Chai<sup>1</sup>, Dajeong Lim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Animal Genomics and Bioinformatics Division, National Institute of Animal Science and Collage of Pharmacy, Chonnam National University

<sup>2</sup>Animal Genomics and Bioinformatics Division, National Institute of Animal Science

**요약** 백혈구 공통 항원인 돼지 CD45는 PTPRC 유전자에 암호화 되어 있으며, CD45엑손의 선택적 스플라이싱에 따라 다른 T-세포에서 발현되는 티로신 인산분해효소이다. CD45는 기질인 TCR의 CD3 $\zeta$  사슬, Lck, Fyn, Zap-70 kinase의 인산화된 티로신에서 인산을 분해하여 T-세포 항원 수용체(TCR) 매개 신호전달을 조절한다. CD45의 조절이 상은 많은 면역 질환과 관련이 있어서, CD45는 면역약물 개발에 표적이 되어왔다. TCR 신호전달의 조절효과를 가진 주요 구조적 특징을 특성화하기 위해, 사람의 알려진 CD45 구조를 템플릿으로 적용하여 돼지 CD45RO(가장 작은 CD45 isoform)의 단백질 구조와 예측된 돼지 CD45RO 모델구조에 CD3 $\zeta$  사슬의 ITAM(REEpYDV)를 도킹하여 CD45RO/ITAM 펩타이드 결합구조를 예측하였다. 돼지 CD45RO의 구조적 특징은 세포외영역의 구조건고성과 세포질 내 티로신 인산분해효소 도메인의 KNRV와 PTP signature 기능모티프(두 기능 모티프는 ITAM 펩타이드 결합부위의 좁은 입구로 역할)에 있었다. 주요 구조특성은 돼지 CD45RO-ITAM 펩타이드 결합구조 안정성과 결합친화력을 조절하면서 기질 선택성에 영향을 준다. 돼지 CD45RO의 구조적 특성은 T-세포에 특이적인 면역 조절제를 탐색하는 데에 적용될 것이다.

**Abstract** Pig CD45, the leukocyte common antigen, is encoded by the PTPRC gene and CD45 is a T cell-type specific tyrosine phosphatase with alternative splicing of its exons. The CD45 is a coordinated regulator of T cell antigen receptor (TCR) signal transduction achieved by dephosphorylating the phosphotyrosine of its substances, including CD3 $\zeta$  chain of TCR, Lck, Fyn, and Zap-70 kinase. A dysregulation of CD45 is associated with a multitude of immune disease and has been a target for immuno-drug discovery. To characterize its key structural features with the effects of regulating TCR signaling, this study predicted the unknown structure of pig CD45RO (the smallest isoform) and the complex structure bound to the ITAM (REEpYDV) of CD3 $\zeta$  chain via homology modeling and docking the peptide, based on the known human CD45 structures. These features were integrated into the structural plasticity of extracellular domains and functional KNRV and PTP signature motifs (the role of a narrow entrance into ITAM binding site) of the tyrosine phosphatase domains in a cytoplasmic region from pig CD45RO. This contributes to the selective recognition of phosphotyrosine from its substrates by adjusting the structural stability and binding affinity of the complex. The characterized features of pigCD45RO can be applied in virtual screening of the T-cell specific immunomodulator.

**Keywords** : CD45RO, Tyrosine Phosphatase, T-cell Antigen Receptor, Signaling Transduction, Regulator

\*Corresponding Author : Dajeong Lim(National Institute of Animal Science)

email: hanha@korea.kr

Received July 31, 2019

Accepted September 6, 2019

Revised August 21, 2019

Published September 30, 2019

## 1. 서론

신호전달은 특정수용체에 리간드가 결합한 후에 일어나는 세포내 생화학적 반응이며, 가장 정교한 신호전달은 면역반응이다. 면역반응에서 신호전달을 시작하는 항원수용체(TCR 또는 BCR)는 막단백질(integral membrane protein)로 존재한다. 항원수용체가 세포외영역에서 수용성의 리간드(항원 등)를 인식하거나 혹은 항원제시세포에 부착된 주요조직복합체(MHC)에 결합된 항원펩타이드를 인식하면, 항원 리간드 결합으로 유도되는 항원수용체의 입체구조 변화가 일어난다. T-림프구 항원수용체(TCR)가 활성화되면, TCR 구조에서 항원결합부위는  $\alpha$ 와  $\beta$  사슬이지만 매우 짧은 세포질 내 tail로 신호전달 기능이 없어서, TCR는 CD3의  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  사슬과 신호전달 복합체를 이루게 된다. 동시에, 항원수용체와 공동수용체(CD4, CD8)간의 교차결합(cross-linking)을 통해 군집(clustering)을 형성하여 신호전달을 시작한다 [1]. 신호전달의 시작단계에서 항원수용체의 세포질부위 또는 어댑터 단백질의 티로신, 세린, 트레오닌 잔기에 인산기가 효과적으로 결합이 된다. 특히, 림프구의 초기 신호전달에 있어, Src 그룹의 티로신인산화효소(Lck, Fyn, ZAP-70 등)에 의해 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(Immunoreceptor tyrosine-based activating motif, ITAM)에 있는 특정의 티로신잔기에 인산기가 결합된다. ITAM은 20-25개 아미노산서열에 두 개의 YxxL/I 서열을 갖고 있어서, 신호전달동안 ITAM내에서 티로신잔기에 인산화 되어 활성이 유지된다. 최종적으로 인산화된 단백질은 핵 내로 이동하여 특정한 유전자 위에 결합함으로써 유전자 발현을 조절하는 nuclear factor를 활성화 시키게 된다. nuclear factor에 의한 negative-신호전달이 활성화되면 일부의 면역수용체는 세포반응을 억제하는 데, 티로신인산분해효소(CD45, CD148, Lyp/Pep)는 신호전달 억제와 관련된 면역수용체 티로신 기반 억제 모티프(Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM)내 VL/IxpyxxL서열의 인산화된 티로신잔기(pY)에서 인산기를 분해(Y)하여 ITIM-기반 면역반응 억제 신호전달을 조절한다. 림프구 내 항원수용체의 신호전달은 대부분 티로신인산화/탈인산화 가역반응으로 조절이 된다.

백혈구 공통 항원(leukocyte common antigen, LCA)인 CD45는 Ly-5, T200, B200 유전자 명칭으로도 알려져 있다. CD45는 모든 핵이 있는 조혈모세포에서 발현된다. 림프구의 표면에 존재하는 수용체티로신인산

분해효소(Receptor tyrosine phosphatase, RPTP)로서, T-림프구와 B-림프구의 항원수용체로부터 초기 신호전달에 관여하며, T-세포의 분화, 성숙 및 활성화와 apoptosis에도 작용한다. CD45는 림프구 항원수용체 매개 신호전달의 초기단계에서 Src계열의 티로신인산화효소(T-세포내 Lck, Fyn, ZAP-70과 B-세포내 Lyn, Fyn, Blk, Syk)와 상호 작용을 하지만, CD45에 의한 T-세포 신호전달의 조절은 B-세포에서 작용하는 것보다 더 효과적이다[2]. CD45는 기질단백질인 Lck와 Fyn의 비활성과 구조에 있는 C-terminal에 위치한 negative-조절부위에서 인산화된 티로신(Lck의 pY505, Fyn의 pY528)에서 인산기를 분해하여 Lck와 Fyn이 활성화된 입체구조를 갖도록 도와줘서, TCR-매개 신호전달을 통해 T-세포를 활성화한다. 반면에, CD45는 Lck, Fyn의 활성화구조에 존재하는 인산화된 티로신잔기(Lck의 pY394, Fyn의 pY417)에서 인산을 제거하여 신호전달을 억제하는 데도 관여한다[3-4]. 신호전달을 억제하는 CD45와 달리, Csk(C-src kinase) 티로신인산화효소는 Lck의 Y394와 Fyn의 Y417에서 티로신을 인산화하여 CD45와 반대작용으로 TCR 신호전달의 활성화를 유지시킨다. 이와 같이, TCR 매개 신호전달의 시작단계는 CD45와 Csk에 의해 티로신 인산화/탈인산화 가역반응으로 조절된다. CD45에 의한 TCR 매개 신호전달의 시작 단계를 Fig. 1에서 나타내었다.

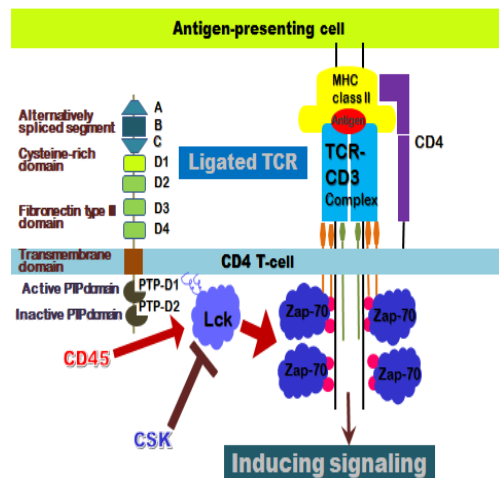


Fig. 1. Inducing ligated T-cell receptor signaling by CD45

공동수용체인 CD4가 TCR와 함께 MHC-항원에 대해 cap을 이루면, T-림프구 항원수용체와 공동수용체로

부터 오는 신호는 T-세포활성에 시너지 효과를 낸다. 공동수용체 CD4의 세포질 부위에 결합하는 Lck는 CD3 $\zeta$  사슬(CD247)의 ITAM(Fig. 1에서 분홍색 원으로 표기) 내 티로신을 인산화하고, 인산화된 ITAM을 인지하고 결합한 Zap-70(분자량이 70kD인 CD3 $\zeta$  사슬 연합 티로신 인산화효소)은 Lck에 의해 인산화로 활성화된다. 이때, Lck와 활성화된 Zap-70은 연합하여 효과적으로 T-세포 신호전달을 활성화할 수 있다[5-6]. 이는 T-세포 시냅스(T-림프구 항원수용체, 항원펩이드가 결합된 MHC 복합체, 공동수용체 CD4, 그리고 CD3)형성으로 Lck는 ZAP-70에 근접한 거리에 위치할 수 있었기 때문이다. T-세포에서만 생성되는 ZAP-70은 T-세포를 활성화하는 데 필수적이며, PLC- $\gamma$ (Phospholipase- $\gamma$ )를 활성화하여 이어지는 일련의 반응을 유도한다. 이후 NF- $\kappa$ B, AP-1 등의 전사인자는 유전자 발현패턴을 바꿔 T-세포 분열, 증식 및 효과 T-세포 분화로 이어진다. 과발현된 T-세포 내에서는 CD45에 의한 JAK/STATs 신호전달이 억제되어 PIAS family(Protein inhibitors of activated STATs, PIAS1, PIAS2, PIAS3, PIAS4) regulator에 의해 유전자의 발현변화를 가져오고 T-세포 분화도 종결된다. TCR 매개 신호전달 단계에서 CD45의 기질(substrate)단백질은 Src그룹에 속하는 티로신인산화효소인 Lck, Fyn외에 TCR 항원수용체의 CD3 $\zeta$  사슬(CD247), Ska66, JAK그룹인산화효소(Janus kinases, JAKs), Dap12와 Pag/Cbp도 존재한다. 만일 CD45에 의한 림프구 항원수용체(TCR, BCR)에 매개적 신호전달이 오류가 생겼을 때, 면역결핍부터 자가면역질환까지 다양한 면역질환의 원인이 되기 때문에 CD45는 면역치료제 개발의 목표단백질로 연구되고 있다[7-12].

CD45는 세포외영역(N-terminal A, B, C domains from alternative spliced 4, 5, 6 exons, cysteine-rich domain, and FN3 domains), 세포막에 존재하는 영역(transmembrane region), 세포내 티로신인산분해도메인(PTP domains)로 구성되어 있다(Fig. 1). 인간 CD45는 엑손이 35개이며 유전자의 위치는 1번 염색체 1q31-1q32에 존재하지만, 돼지의 CD45는 엑손이 32개이고, 유전자의 위치는 10번 염색체(21482984-21601627)에 존재한다. 특히, 엑손 4, 5, 6에서 CD45mRNA의 선택적 스플라이싱으로 인하여 세포외 도메인의 6종류 isoforms(CD45RO, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RAB, CD45RABC의 단일항체로 인식되는)로 발현된다[13]. CD45 isoforms의 다양성은 세포외 영역의 N-terminal부터 선택적 스플라이싱 엑손에만 한정되어

어있고, 4, 5, 6 엑손 영역은 random coil 구조내 세린과 트레오닌이 풍부하여 O-linked glycosylation이 일어난다. 게다가, 세포외 FN3 domains내 아스파라긴 잔기에서 N-linked glycosylation도 일어난다. CD45의 선택적 스플라이싱에 의한 isoforms 다양성에 따라, 세포외 도메인들에서 글리코실화(N-linked and O-linked glycosylation)가 다르게 일어나서 당쇄결합량도 달라지고(분자량이 180-240kD), 세포외 도메인의 구조 유동성(structural's flexibility)도 달라진다. CD45에 당이 많이 결합될수록, TCR-CD3 복합체와 'close contact' 하는 데에 입체적 방해가 생겨 신호전달이 약해진다[14]. 예를 들어 선택적 스플라이싱에 의해 엑손 4, 5, 6 영역이 없는 CD45RO 단일항체에 인식되는 isoform(세포외 도메인에 cysteine-rich domain과 FN3 domains만 있음)인 경우에는 분자량이 180kD이며, 아스파라긴 잔기에 N-linked glycosylation만 존재한다. 이와 반대로, 가장 큰 세포외 도메인을 가진 CD45RABC 단일항체에 인식되는 isoform은 N- and O-linked glycosylations로 분자량이 240kD까지 증가한다[15]. CD45mRNA의 선택적 스플라이싱과 연관된 중요한 특징으로서, isoform에 따라 T-세포에서 제한적으로 발현된다. 특이적 항원을 만나지 못한 미경험 T-세포는 주로 CD45RA 단일항체에 인식되는 isoform를 발현하는 데, 이것은 세포외 영역에서 T-세포 항원수용체와 CD4 공동수용체에 'close contact' 하는데 입체적 방해로 약한 신호를 Zap-70에 전달된다. 반면, T-세포 항원수용체가 항원특이성을 획득한 활성 T-세포와 기억 T-세포에서는 CD45RO 단일항체에 인식되는 isoform이 많이 발현된다. CD45RO 단일항체에 인식되는 isoform에는 엑손 4, 5, 6에 의해 암호화된 서열이 없기 때문에 T-세포 항원수용체 및 CD4 공동수용체가 MHCII-항원에 대한 cap을 이루는 데에 입체적 방해(steric hindrance)없이 'close contact'로 강한신호를 Zap-70에 전달한다. Murine thymoma 세포주에서 MHCII-항원-TCR 상호작용으로 유도된 IL-2의 분비량을 비교한 연구[16]에 따르면, CD45RO > CD45RC > CD45ABC 단일항체에 인식되는 isoforms 순서로 많이 발현이 된다. T-세포의 성숙과 활성화과정에서 발현되는 CD45의 isoform에 따라 미경험 T-세포와 활성 T-세포 및 기억 T-세포를 구별할 수 있기 때문에, CD45RA와 CD45RO 단일항체에 인식되는 CD45 isoforms들은 셀렉틴(CD62L), CCR7과 함께 T-세포 표지자로서 기능을 한다. CD45 isoforms의 구조적 특징이 림프구의 신호전달 조절과

연관되어 있고, 이는 외부항원에 대한 면역방어에도 직접적 영향을 준다. 본 연구에서는 돼지 CD45RO 단일항체에 인식되는 isoform(이하 CD45RO) 단백질 구조로부터 T-림프구 항원수용체 매개 신호전달 활성화와 연관된 기능모티프를 발굴하여 CD45에 선택적으로 작용할 수 있는 길항제 또는 억제제를 개발하고자 할 때, allosteric site로 작용 가능한 영역을 제안하고자 한다. 이러한 기능모티프 정보는 CD45의 기질단백질과 유사한 모방체 이외에 다양한 형태를 갖는 면역조절 후보물질의 가상탐색(knowledge-based virtual screening in silico)에 적용될 수 있다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 돼지 CD45RO의 단백질 3차-구조 예측

실험적 방법(X-ray, NMR 등)으로 결정된 CD45의 단백질 구조는 PDB(Protein data bank)에서 6개 구조가 존재한다. 이 중에서 인간 CD45의 세포외 도메인(cysteine-rich domain과 FN3 domains) 구조(PDB ID: 5FMV, 5FN6, 5FN7)와 세포질 내 티로신인산분해효소 도메인(PTP domains)구조 (PDB ID: 1YGR, 1YGU)가 있다[17-18]. 현재 돼지 CD45의 단백질 3차-구조가 알려져 있지 않지만, 돼지와 인간의 CD45 단백질 서열 유사성이 65%이상으로 높기 때문에, 실험적으로 구조가 결정된 인간 CD45의 구조를 주형(template)로 하여, Fig. 2와 같은 순서로 Homology modeling을 수행하였다.

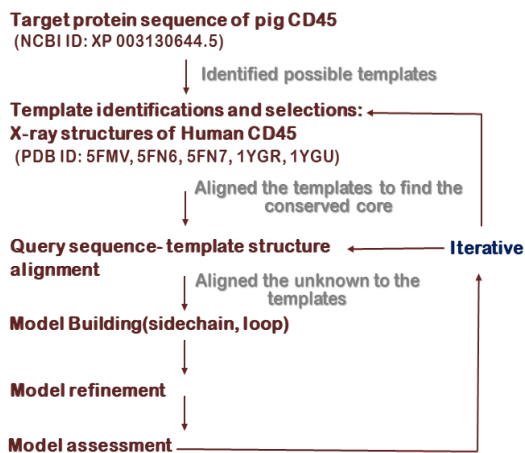


Fig. 2 The homology modeling process of pig CD45RO

알려진 인간 CD45 단백질구조(template)에 예측하고자 하는 돼지 CD45RO의 단백질 서열(query protein)을 sequence-structure alignment를 하였다. alignment 결과를 바탕으로 하여, 잘 보존된 영역에서는 인간 CD45 구조와 매우 유사하게 돼지 CD45RO 구조가 예측되었다. 돼지 CD45RO 구조 모델 내 각 원자들간의 거리와 결합각, 비틀림각 등의 정보를 template structure(인간 CD45)의 X-ray구조로부터 threading하여 아미노산 잔기의 원자위치좌표가 상대적으로 결정되었다. 또한, 인간과 돼지 CD45RO에서 보존되지 않은 영역(세포외 도메인 중 cysteine-rich domain과 세포내 PTP-D2의 긴 acidic loop와 basic loop 영역)에서는 loop search와 model refinement과정을 진행 후, 모델구조를 최적화하였다. 최적화된 돼지 CD45RO 구조모델을 유사한 분자크기를 갖는 실험적으로 결정된 인간 CD45도 포함된 다른 단백질구조들과 비교하여 평가하였다. 최종적으로, 돼지 CD45RO의 세포외영역(cysteine-rich domain D1 and FN3 domain D2-D4: Pro179-Ser429 residues)과 세포내 티로신 인산분해 도메인(PTP domains of PTP-D1 and PTP-D2: residues Lys481- Pro1086) 3차-구조를 각각 예측하였다.

### 2.2 돼지 CD45RO의 세포외 도메인에서 글리코실화

돼지 CD45RO의 세포외도메인에 존재하는 N-linked glycosylation site를 GPP(<http://comp.chem.nottingham.ac.uk/glyco/>)[19], GlycoMine<sup>STRUCT</sup>([http://glycomine.erc.monash.edu/Lab/Glycomine\\_struct/](http://glycomine.erc.monash.edu/Lab/Glycomine_struct/))[20]방법으로 구조모델에서 Asn-x-Ser/Thr motif를 탐색하였다. 탐색된 N-linked glycosylation site 중에서 인간 CD45의 X-ray로 결정된 구조(PDB ID: 5FMV)에 돼지 CD45RO 구조모델을 정렬(structural alignment)하여 동일하게 접치는 N-linked glycosylation site를 선별하였다. 돼지 CD45RO구조모델내 FN3 도메인(D2-D4)에서 5개 N-linked glycosylation site(Asn236, Asn294, Asn326, Asn346, Asn414)에 N-acetyl-glucosamine를 이용하여 반복적으로 글리코실화 하였다.

### 2.3 돼지 CD45RO와 CD3ζ사슬의 ITAM 상호작용 분석

돼지 CD45RO의 세포질내 티로신인산분해효소 도메인(PTP domains: PTP-D1 and PTP-D2)은 세포외 영

역보다 더 잘 보존이 되어 있다(인간과 비교하였을 때 세포의 영역과 세포막 영역에서는 38.1% 서열상동성을 갖지만, 세포질내 도메인은 86.5%로 단백질 서열이 동일함). 특히, 티로신인산분해효소로 활성을 가진 PTP-D1 도메인(pig CD45RO의 PTP-D1: Ile489-Glu775 residues)은 인간(human CD45의 PTP-D1: Ile633-Glu919 residues)과 93%의 단백질 서열상동성을 갖는다. 반면에, 티로신인산분해 활성을 갖고 있지 않는 PTP-D2(pig CD45RO의 PTP-D2: Val776-Ala1162 residues) 도메인 경우에는 인간(human CD45의 PTP-D2: Val920-Ser1306 residues)과 81.7% 단백질 서열이 일치한다. Fig. 3과 같이, 다른 종 인 인간 CD45의 세포내 PTP-D1과 PTP-D2 도메인과 높은 단백질 서열 동일성에도 불구하고, 동일 종 돼지 CD45RO의 PTP-D1과 PTP-D2 도메인 간의 아미노산서열을 비교하였을 때, 상동성은 25.1%로 매우 낮다. 그러나, 인간과 돼지 CD45의 세포내 PTP-D1과 PTP-D2 도메인의 3차-구조는 매우 잘 보존되어 있다(Backbone 구조정렬 하였을 때 1.7Å 차이만 존재함). CD3 $\zeta$ 사슬의 ITAM(QQQNQQLpYNELNLGR**REEpYDV**LDKRRG)에서 2번째 인산화된 티로신(pYxxI/I)서열이 포함된 REEpYDV펩타이드를 돼지CD45RO의 티로신인산분해 활성이 있는 PTP-D1 도메인에 docking하여 CD45RO와 CD3 $\zeta$ 사슬(CD247)내 ITAM간의 상호작용을 하는 작용점(결합부위에서 15Å)의 특성을 분석하였다. 돼지 CD45RO구조모델내 PTP-D1에 docking동안, 인간 CD45의 PTP domains-REEpYDV 결합구조(PDB ID: 1YGR)에서 REEpYDV펩타이드 위치를 시작점으로 설정하여 CDOCKER 프로그램(CHARMm-based docking method)으로 flexible ligand docking 하였다. 이번

연구에서 수행한 돼지 CD45RO 구조예측(Homology modeling), 글리코실화(N-linked glycosylation), 티로신인산분해활성도메인(PTP-D1)에 CD3 $\zeta$ 사슬(CD247)내 ITAM 모방체(REE**pYDV**) docking 연구는 Discovery studio 소프트웨어 2017R2버전에서 생체내 환경과 같은 pH7.4인 CHARMm force field[21]를 적용하여 MODELLER[22], CDOCKER[23] 프로그램을 사용하여 연구를 진행하였다.

### 3. 결과 및 고찰

CD45는 수용체티로신인산분해효소(RPTP)로 림프구 항원수용체(TCR and BCR) 표면에 발현이 된다. 1개 림프구 표면에는 3개 이상 RPTP가 발현되어 림프구 항원 수용체(TCR, BCR)로부터 신호전달에 관여한다[24-27]. T-림프구의 항원수용체(TCR)는 리간드(항원)가 결합하지 않은 상태에서도 신호전달분자들의 ‘close contact’ 통해 활성화될 수 있는 데, 신호전달의 시작단계는 Csk와 CD45에 의한 Lck의 ITAM(DENE**pY**TAR와 TEGQ**pY**QPQ)티로신인산화/탈인산화 가역적 반응에 의해 조절된다(Fig. 1). 만일 T-세포에 CD45가 결실된다면, TCR의 신호전달은 활성화되지 않는다[14,28]. CD45의 구조적 특징은 림프구 항원수용체의 신호전달에 직접적으로 영향을 주는 중요한 인자로 작용한다. CD45의 세포의 도메인 내에서 선택적 스플라이싱에 따른 isoforms 구조와 글리코실화 정도에 따라 입체적 방해(steric hindrance)로 인하여 TCR로 ‘close contact’ 통해 전달되는 신호의 강도(signal strength)가 달라진다. 또한, CD45는 세포내 2개 PTP 도메인(PTP-D1과

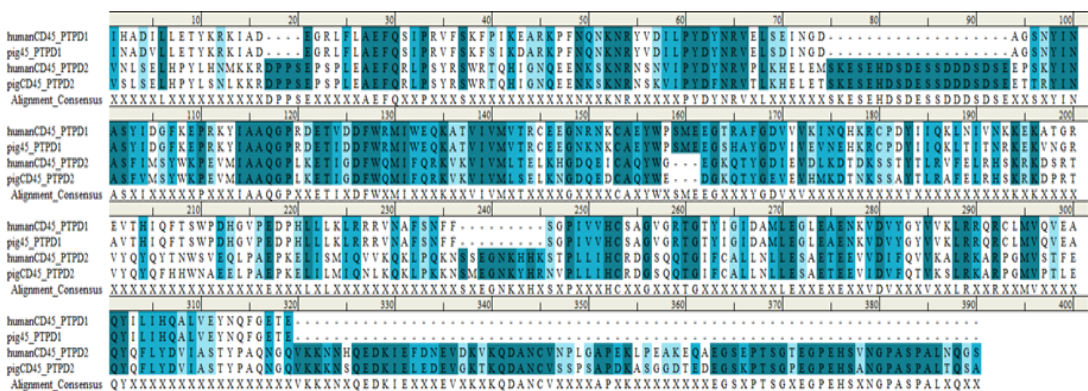


Fig. 3. The sequence alignment of the CD45 PTP domains



PTP-D2)을 가지고 있는 데, PTP-D1은 직접적으로 기질단백질(Lck, Fyn, TCR의 CD3 $\zeta$ 사슬, Zap-70)의 ITAMs에서 인산화된 티로신(pY)의 인산을 분해(Y)하는데에 관여하지만, PTP-D2는 기질단백질 TCR의 CD3 $\zeta$ 사슬(CD247)과 CD45의 결합을 매개하거나 CD45자체의 PTP-D1 구조 안정성에 영향을 준다[29-30]. 부가적으로 CD45 세포내·외에서 도메인-도메인간의 상호작용이 강할수록, cysteine-rich domain(D1)내 cysteine 잔기간의 이황화결합(disulfide bond)이 많을수록, CD45구조의 유동성은 적어진다. CD45의 세포내·외 도메인의 구조적 유동성이 적어지면, 상대적으로 CD45의 구조적 견고성(structural plasticity)이 커지고, TCR로 'close contact'에서 CD45의 구조가 잘 유지되어 신호 전달에 도움이 된다. 이번 연구에서는 CD45의 구조적 특징을 고려하여 6개 CD45 isoforms중에서 가장 구조적 견고성이 크고, 활성화 T-세포에서 많이 발현되는 CD45RO 구조를 예측하였다. 특히, 돼지 CD45는 CD25, CD11b, SWC1, SWCT7, MHCII와 함께  $\gamma\delta$ T-세포표지자[31-33]로서 항원 유도 T-림프구와 B-림프구 항원수용체를 활성화[34]하고, 돼지 썩코바이러스(Porcine circovirus type 2, PCV-2)백신에 대한 면역반응[35], 아프리카 돼지 열병 바이러스(African swine fever virus, ASFV) 감염된 세포마커(CD45, CD163, CD203a, CD16, CD14)[36]와 연관된 것으로 알려져 있지만, 현재 돼지 CD45기능과 연관된 구조특성은 잘 알려져 있지 않다. 본 연구를 통하여 돼지 CD45RO 예측된 구조로부터 티로신인산분해효소 기능과 연관된 모티프, 구조적 견고성과 관련된 도메인-도메인 상호작용 영역, 기질단백질의 ITAMs 결합부위 특징에 대한 insight를 제공하고자 한다.

### 3.1 돼지 CD45RO의 단백질 구조 특성: 견고성

NCBI에 등록된 돼지 CD45 아미노산 서열(NCBI ID: XP\_003130644.5)을 Promal3D(multiple protein structure-based alignment[37])적용하여 인간 CD45의 X-ray 구조(PDB ID: 5FMV, 5FN6, 5FN7, 1YGR, 1YGU)에 multiple alignment하여 돼지 CD45에 보존되어 있는 도메인내 서열정보를 먼저 분석하였다. 돼지 CD45의 아미노산 서열로부터 세포외 영역에 존재하는 cysteine-rich domain(D1: Pro86-Pro140), 3개 FN3 domains(D2: Pro141-Thr243, D3: Gln252-Thr336, D4: Arg345-Ser429), 세포막에 존재하는 영역(TM: Tyr430-Pro488), 세포내 티로신 인산분

해 활성화도메인(PTP-D1: Ile489-Glu775, PTP-D2: Val776-Pro1086)으로 CD45RO isoform 전체도메인 배열을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이 domain 구조 및 배열정보를 활용하여 Modeller 프로그램으로 Homology modeling을 수행하여 인간 CD45 template structures와 돼지 CD45RO query sequence간의 다중정렬결과, 보존된 영역에서 아미노산잔기의 위치좌표가 threading되어 인간 CD45 template structures의 3차-구조 기본 특성이 돼지 CD45RO 구조모델에 반영되었다. 반면에, 인간의 CD45 template에 보존되지 않은 세포의 도메인 cysteine-rich domain D1(Pro86-Pro139), 세포내 PTP-D2 도메인에 존재하는 긴 loop(acidic loop: Ser850-Glu869와 basic loop: Lys1007-Arg1017)는 loop search와 model refinement과정을 추가적으로 진행하였다.

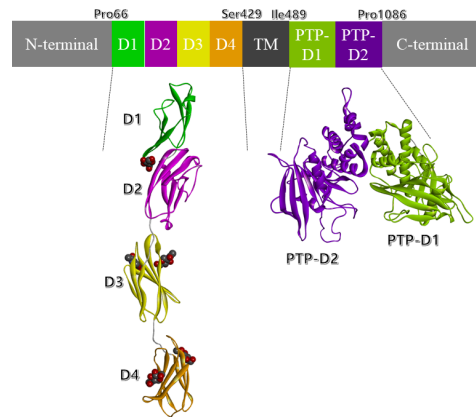


Fig. 4. Schematic representation of the pig CD45RO structure model

세포내 PTP-D2의 긴 acidic loop와 basic loop는 PTP-D1도메인과의 직접적인 상호작용을 하지 않지만, PTP-D1과 PTP-D2 도메인간의 서로 존재하는 방향에 영향을 줘서 PTP-D1에 기질의 ITAM이 docking 하는데 steric effect를 제공하기 때문에 loop refinement 과정이 필요하였다. 세포내 PTP-D2 도메인 내 loop refinement 과정으로 긴 loop의 conformer를 결정한 후, 돼지 CD45RO 구조모델의 backbone 구조를 유지하면서 아미노산잔기의 side-chain을 최적화하기 위해, CHARMM force field (pH7.4)하에서 side-chain refinement과정을 더 진행하였다. 돼지 CD45RO 구조모델의 quality를 Modeller 프로그램의 DOPE score[38]와 Profiles-3D score[39]로 평가하여 최적화된 구조모델

을 선택하였다. DOPE score는 돼지 CD45RO의 예측된 구조모델들에서 각 conformer의 구조적 안정성(structural stability)을 상대적 conformational energy로 측정하는 것으로 DOPE score값이 적을수록, 더 안정한 conformer의 구조모델이라 할 수 있다. 또 다른 구조모델의 선택기준인 Profiles-3D score인 경우에는 DOPE score와 다르게 생체내 환경을 고려하여 아미노산 잔기의 물리화학적 성질이 주위 환경에 부합되는지에 대한 score이다. 예를 들어, 물에 노출된 단백질의 표면에 소수성을 띄는 아미노산 잔기가 존재하는 경우에는 소수성-소수성 잔기들의 응집(agggregation)에 따라 물 분자들을 밀어내면서 H-bond의 재배열등과 같은 불안정한 효과를 가지게 되어 Profiles-3D score 값은 줄어든다. 따라서 Profiles-3D score값이 클수록, 환경에 잘 부합되게 아미노산 잔기가 존재하여 구조적 안정성을 가지게 된다. 최적화된 돼지 CD45RO 구조모델은 세포막에 존재하는 영역(실험적으로 구조가 결정되지 않는 TM: Tyr430- Pro488)을 제외한 세포외 영역(D1-D4: Pro66-Ser429)의 ECD model1과 세포내 영역(PTP-D1-PTP-D2: Lys481- Pro1086)의 PTP model2로 각각 예측되었다(Fig. 4). 돼지 CD45RO 구조모델의 DOPE와 Profile score값은 인간 CD45의 X-ray구조 template structure(PDB ID : 5FMV, 5FN6, 5FN7, 1YGR, 1YGU)와 비교하여 분석한 결과를 Table 1에 요약하였다.

Ramachandran plot를 통하여 돼지 CD45RO 최종 모델(ECD model1, PTP model2)의 모든 아미노산에서 펩타이드 결합의 이면각(phi and psi torsion angles)

분포를 고려하여 전체적인 모델의 geometric 그리고 stereochemical quality를 평가한 결과, 인간 CD45의 X-ray 구조보다 돼지 CD45RO 모델 구조(ECD model1 and PTP model2)가 더 안정적인 conformer로 예측되었다. Ramachandran plot에서 예측된 돼지 CD45 모델구조의 세포외도메인(ECD model1) 92.8%에 해당하는 잔기들이 favoured region에 위치하였고, 4개 (Phe82, Ile89, Lys90, Ser134)잔기들이 outlier로 존재하였다. 돼지 CD45의 세포 내 티로신 인산분해 활성화 도메인의 모델구조(PTP model2)는 89.2%에 해당하는 잔기들이 favoured region에 위치한 반면에, template 구조인 인간 CD45의 X-ray구조(PDB ID: 1YGR, 1YGU)는 같은 영역에서 79.7%만 위치하였고, outlier도 돼지 CD45 모델구조보다 더 많이 존재하였다. 이때, 돼지 CD45의 PTP model2에서는 10개 아미노산 잔기 (Val662, Asp792, Leu847, Asp858, Asp863, Lys968, Glu985, Lys1014, Arg1026, Met1010)들이 outlier로서 disallowed region에 위치하였다. Ramachandran plot과 다양한 아미노산잔기(Molprobit and Clash score[40])와 전체구조(DOPE score, Profile-3D)단위의 돼지 CD45RO 모델구조 검증과정에서 scoring 점수가 단백질의 크기에 의존할 수 있기 때문에, 인간 CD45 구조를 포함하여 PDB내 실험적으로 결정된 유사한 크기를 갖는 다른 단백질들과도 비교하여 모델구조의 타당성을 확인하였다 (Table 1, Fig. 5).

돼지 CD45의 세포외 영역(D1-D4) interface 구조적 견고성은 Cys-Cys 잔기간의 이황화 결합 (Cys115-Cys172),

Table 1. Estimating the quality of pig CD45RO model structures

Structure assessment	Pig CD45 ECD model1	Pig CD45 PTP model2	5fmv (ECD)	5fn7 (ECD)	5fn6 (ECD)	1ygr (PTP)	1ygu (PTP)
DOPE score	-33455	-145648	-70088	-35039	-25464	-126071	-128107
Profile-3D	153	526	295	162	115	492	504
Molprobit score	1.63	2.09	1.91	1.42	2.26	3.71	3.72
Clash score	3.21	1.22	3.09	3.57	5.33	43.58	45.71
Ramachandran favored	92.82%	89.24%	96.69%	97.35%	95.16%	79.70%	79.79%
Ramachandran outliners	2.76%	2.32%	6.21%	0.00%	0.40%	5.80%	5.07%
Rotamer outliners	1.21%	7.86%	0.00%	1.56%	6.87%	13.23%	12.74%

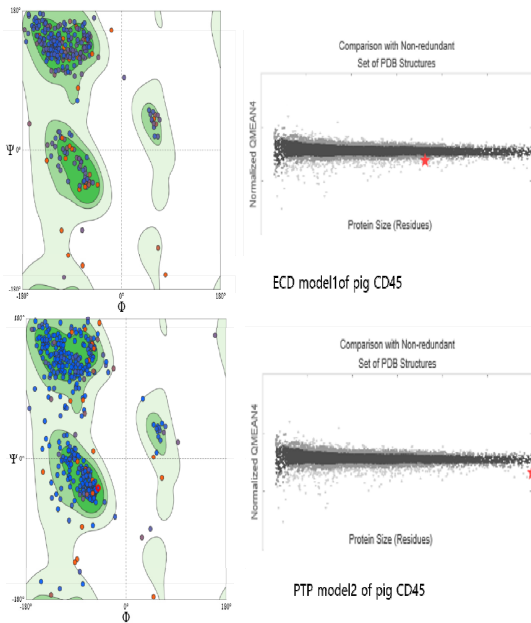


Fig. 5. A structural analysis of pig CD45 models by Ramachandran plot

5개 N-linked glycosylation(Asn236, Asn294, Asn326, Asn346, Asn414), D1-D4간의 소수성 상호작용(D1-D2: Tyr79, Tyr229, Phe234, Phe170 와 D3-D4:  $\pi$ - $\pi$  stacking

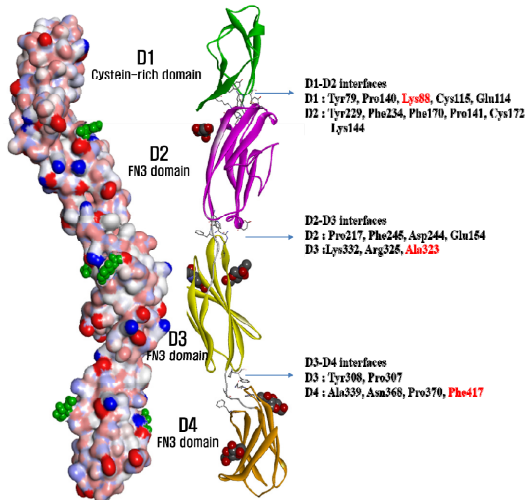


Fig. 6. The structural rigidity of pig CD45 extracellular domain(D1-D4)

interaction Tyr308, Pro370)을 Glu114-Lys144간의 염다리(salt bridge)로 고정되어 유지된다. Fig. 6과 같이, 도메인 인접영역은 Pro잔기(Pro140, Pro141, Pro217, Pro307, Pro370)가 많고, 간격이 좁아서 도메인영역의 회전에도 입체적 방해(steric hindrance)를 받는다. 실제로, 인간 CD45의 X-ray 구조(PDB: 5FMV)도 세포외도메인 간의 회전할 수 있는 자유도(rotational free)는 5°보다 더 적다.

### 3.2 돼지 CD45RO 단백질의 기능 모티프 발굴

돼지 CD45의 세포질영역은 PTP-D1도메인과 짧은 linker, PTP-D2도메인으로 구성되어 있다. 이는 CD45의 6개 isoforms은 세포질 영역에서 동일한 PTP 도메인 구조를 갖는다. 즉, CD45RO와 CD45RABC의 세포질 영역만 고려한다면, 동일한 PTP 도메인 구조를 가지며, 신호전달 세기도 같다. 반면에, T-세포의 표지자로서 항원특이성을 획득한 활성화 T-세포와 미경험 T-세포에서 제한적 발현되는 CD45 isoforms은 세포외 영역인 ECD도메인의 구조(엑손 4, 5, 6 선택적 스플라이싱에 의존)에 따라 결정된다. 티로신인산분해 활성화도메인 PTP-D1과 티로신인산분해 활성이 없는 PTP-D2간에 짧은 linker(Gly772-Glu775)로 연결된 PTP 도메인 구조는 CD45만의 특성이자, CD45처럼 수용체티로신인산분해효소에 속하는 CD148도 1개 티로신인산분해활성도메인 PTP-D1만 존재한다. 만일 CD148의 PTP-D1이 이중체 구조(homodimer)를 가지게 되면, 티로신인산분해효소 활성이 사라진다[41]. 또한, 세포질 내 PTP-D1내에 있는 wedge 영역(Fig. 7.) 매개 CD45가 이중체 구조로 되더라도, CD148처럼 활성이 사라져서 림프구 항원 수용체(TCR, BCR)의 초기 신호전달이 활성화 되지 않는다. 이는 CD45 기질단백질인 Lck의 pY505에서 Y505로 인산기가 분해되지 않아서 Lck가 비활성화된 구조로 유지되기 때문이다. CD45의 PTP-D2는 티로신인산분해 활성이 없지만, PTP-D2가 Lck 비활성 구조의 kinase domain과 결합[42]하여, PTP-D1이 티로신인산분해의 기능을 수행할 수 있도록 도와주는 역할을 한다. Lck처럼 CD45의 PTP-D2는 다른 Src그룹 Fyn인산화효소도 유사하게 결합을 하여 활성화(Fyn의 pY528을 Y528로 인산분해)한다. CD45는 Csk와 친화력이 Lck보다 감소하지만, Csk에 의해 CD45의 PTP-D2내 긴 acidic loop의 Ser잔기 인산화는 PTP-D1의 티로신인산분해 활성을 증가시킨다[43].



따라서 CD45의 PTP-D2는 PTP-D1 티로신인산분해 활성을 조절한다. PTP-D1과 PTP-D2간의 짧은 interdomain linker달리, PTP-D2 내 긴 acidic loop(Ser850-Glu869)와 basic loop (Lys1007-Arg1017)는 동일하게 PTP-D1 작용점 방향으로 위치해 있고, 긴 loop에 따라 산성, 염기성 잔기들이 존재한다(Fig. 7.). 2개 긴 loop의 charge basis는 쉽게 PTP-D1 작용점에 기질단백질의 인산화된 티로신(pY)이 위치하게 유도한다. 게다가, Csk에 의한 acidic loop내 Ser잔기(Ser857, Ser860, Ser861, Ser865)가 인산화 되면, PTP-D1의 anti-Csk 활성이 증가하게 된다.

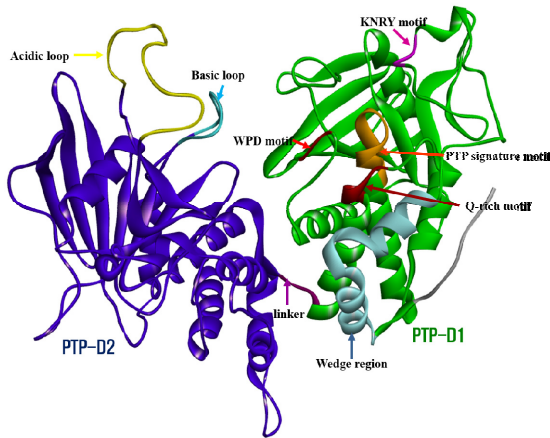


Fig. 7. Functional motifs in PTP domains from pig CD45

돼지 CD45의 티로신인산분해효소로 기능을 하는 세포질 내 활성도메인은 PTP-D1(Ile489-Glu775)이고, PTP-D1의 작용점은 Wedge region(Asp492-Ser515), KNRV motif(Lys536-Tyr539), WPD motif(Trp675-Asp677), PTP signature motif(Val707-Gly717)로 구성된 cavity이다(Fig. 7). 돼지 PTP-D1도메인의 작용점에서 기질의 티로신인산분해에 관여하는 3개 key residues(Asp677 in WPD motif 와 Cys709, Arg715 in PTP signature motif) 산화환원반응이 Fig. 8과 같이 일어나서 최종적으로 기질의 티로신잔기와 인산음이온(phosphate)이 생성된다. Cys709의 thiol그룹은 nucleophile로 존재하고, Arg715의 side chain은 phosphor-enzyme intermediate (thiophosphate)의 음전하를 안정화시키고 Asp677은 산으로 작용하여 proton을 leaving 기질-phenolic oxygen의 음전하를 중화(OH-leaving group)시키는 역할을 한다. Asp677은 기질이 결합하였을 때는 close conformer로 존재하였다가 인산이 분해되면, open

conformer로 바뀐다. phosphor-enzyme intermediate는 Q-loop근처에 있는 물에 의해 가수분해되어 티로신인산분해반응은 종료된다. 특히, 3개 key residues에서 Cys709잔기가 다른 아미노산으로 치환이 되면 PTP의 활성은 완전히 사라진다. 3개 key residues는 38개 티로신인산분해[44] 효소의 동일한 기능 모티프(WPD motif, PTP signature motif)내에 존재하며, 인간부터 설치류까지 척추동물에도 잘 보존이 되어 있다. CD45의 티로신인산분해활성이 없는 PTP-D2(Val776-Pro1086)에서 3개 key residues는 Glu984, Cys1025, Gln1031로 치환되어 있고, 인간 CD45의 PTP-D2도 동일하게 치환되었다(Fig. 3.).

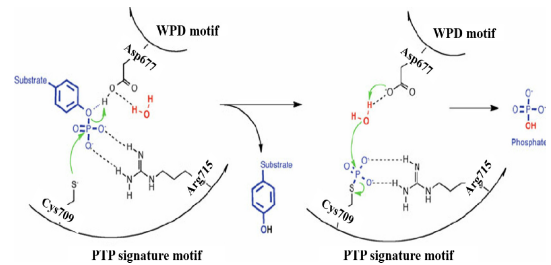


Fig. 8. Common Protein tyrosine phosphatase catalytic mechanism[45]

TCR 신호전달 초기 단계(Fig. 1)에서 TCR-CD3 복합체의 세포질 영역 내 CD3 $\zeta$ 사슬(CD247)은 CD45의 중요한 기질이다. CD3 $\zeta$ 사슬(CD247)은 3개 ITAMs이 있고, 각 ITAM내 2개 YxxL/I 기능서열의 티로신이 인산화(pYxxL/I) 되면 TCR은 활성화된다. CD3 $\zeta$ 사슬의 3개 ITAM(ITAM-1, ITAM-2, ITAM-3)중 세포막에 근접해 있는 ITAM-1의 인산화된 티로신 기능서열(REEpYDV)을 돼지 CD45의 PTP 도메인에 docking하였다. docking 결과, 돼지 CD45의 PTP-D1에 결합된 CD3 $\zeta$ 사슬의 ITAM-1 기능서열(REEpYDV)의 인산화된 티로신(pY)은 3개 key residues(Cys709, Arg715, Asp677)에 위치하였다. ITAM-1의 인산화된 펩타이드 작용점(결합부위에서 15Å)에 KNRV motif의 Tyr539, Asp541과 소수성 pocket Val540, Ile542, Ala711, Val713, Q-rich motif의 Gln753, Gln757이 상호작용에 관여한다(Fig. 9).

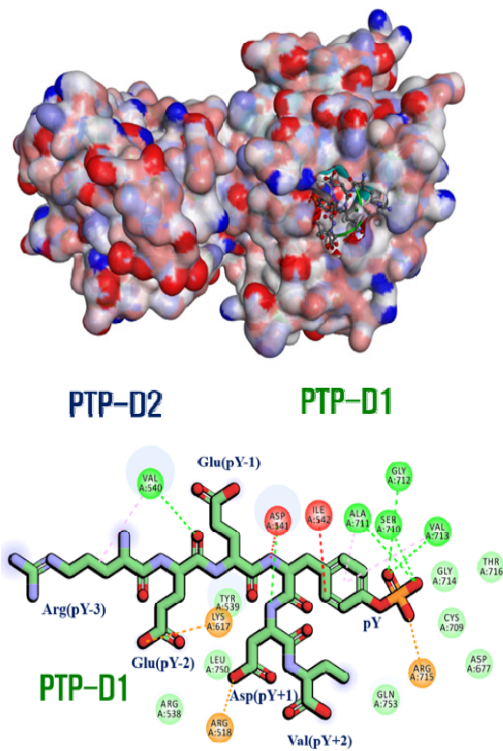


Fig. 9. Structure of CD45 PTP-D1 bound to ITAM-1 phosphopeptide(REEpYDV) of CD3ξchain.

ITAM-1기능서열(REEpYDV)의 N-terminal Arg(pY-3)은 CD45의 Val540과 상호작용을 하지만, 물에 노출되어져 있고, 산성잔기 Glu(pY-2)은 CD45의 염기성잔기 Arg538, Lys617와 Val540, Tyr539와 상호작용을 한다. Glu(pY-1) side-chain은 CD45의 작용점 보다는 물에 노출이 되어 있어서 pY-1위치에서는 친수성을 갖는 아미노산 잔기 (Glu, Asp, Gln 등)가 더 선택적일 것이다. 인산화된 티로신(pY)는 3개 key residues(Cys709,

Arg715, Asp677), Ile542, Ala711, Gly712, Val713, Gly714, Thr716으로 구성된 pocket에 위치한다. Asp(pY+1)의 backbone은 Asp541과 수소결합을 하고, Arg518과 산-염기반응을 한다. Val(pY+2)의 side chain이 짧아서 작용점 내 다른 잔기들과 직접적인 상호작용을 하지 않는다.

돼지 CD45가 CD3ξ사슬(CD247)의 ITAM-1 인산화된 펩타이드(REEpYDV)에서 인산분해로 T-세포 면역반응을 억제하여 조절하는 데 PTP 도메인 3차-구조의 안정성이 중요하지 또는 ITAM 기능 서열에 대한 선택성이 있는 지를 확인하기 위하여, I) CD45 작용점의 잔기들과 II) REEpYDV서열에서 인산화된 티로신(pY)제외하고 Ala으로 mutation 하였다. 돼지 CD45-REEpYDV 복합체 구조 안정성 변이효과 Eq. (1)와

$$\Delta\Delta G_{alamut} = \Delta G_{folding}^{(alamutant)} - \Delta G_{folding}^{(WT)} \quad (1)$$

$$\Delta G_{folding} = \Delta G_{folded} - \Delta G_{unfolded}$$

돼지 CD45 작용점 내 아미노산 잔기와 REEpYDV간의 결합력변화 Eq.(2)로 변이효과를 예측하였다.

$$\Delta\Delta G_{alamut} = \Delta G_{bind}^{(alamutant)} - \Delta G_{bind}^{(WT)} \quad (2)$$

$$AB \leftrightarrow A + B \quad \Delta G_{bind} = \Delta G_{AB} - \Delta G_{A-B separated}$$

위의 식에 따라, 2개 변이효과는 변이전-후 에너지 (kcal/mol)의 차이로 나타내었다. 돼지 CD45 작용점 내 Arg518, Lys617, Asp541, Tyr539, His678, Arg715 잔기는 ITAM-1 인산화된 펩타이드(REEpYDV)간의 결합구조 안정성과 결합력에 모두 중요하게 영향을 주었지만, 변이효과는 복합체 구조 안정성이 결합력보다 훨씬 더 컸다(Figure 10).

돼지 CD45 작용점 내 Val540, Leu750, Ile542, Gly714, Gln753, Gln757, Arg538, Arg585는 ITAM-1 인산화된 펩타이드가 결합할 수 있는 pocket의 형태를 유지하는데 영향을 준다. 반면에 WPD motif의 Asp677은 결

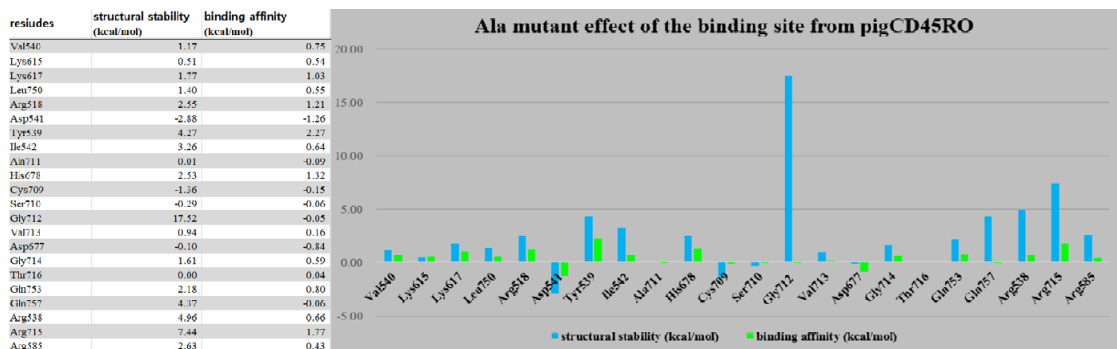


Fig. 10. The Ala mutation effect on PTP domains of pig CD45 and ITAM-1peptide (REEpYDV) complex

합구조의 안정성보다는 Cys709, Arg715와 함께 key residues로 기능이 더 중요하게 작용하여 결합력에 더 변이효과가 컸다. Asp677과 달리, Cys709의 nucleophile기능과 Arg715의 intermediate 안정화는 정확한 위치에서 작용하는 것이 중요하여 결합력 보다는 구조안정성에 훨씬 더 영향을 준다. 돼지 CD45의 KNRY motif(Lys536-Tyr539)와 PTP signature motif(Val707-Gly717)은 좁은 작용점입구로 작용하여 ITAM-1의 인산화된 티로신(pY)이 KNRY motif의 Tyr539와 PTP signature motif의 Arg715, Gly712, Cys709와 직접적인 상호작용을 할 수 있도록 한다. 특히, PTP signature motif의 Gly712Ala 변이는 ITAM-1 기능서열의 결합력 (-0.05kcal/mol)에는 거의 영향을 주지 않지만, side chain의 size효과에 따라 17.5kcal/mol만큼 결합구조의 불안정화(unstabilization) 되었다. ITAM-1 인산화된 펩타이드(REEpYDV)에서 Arg(pY-3), Glu(pY-1), Asp(pY+1)은 작용점의 surface와 바로 인접해 있어 결합력(0.65kcal/mol, 0.23kcal/mol, -0.52kcal/mol)보다 결합구조 안정성(0.91kcal/mol, 0.56kcal/mol, -1.11kcal/mol)에 더 Ala 변이효과를 가지며 이로 인하여, 돼지 CD45가 기질의 ITAM-1 기능 서열에 대한 선택성을 가지게 한다. 이는 실험적으로 관찰된 세 개 ITAM에 대한 CD45의 선택적인 패턴과 잘 일치한다[46].

### 3.3 돼지 CD45RO와 CD148간의 PTP도메인 비교

CD148도 CD45와 같은 수용체티로신인산분해효소(RPTP)로 CD45와 달리 PTP도메인은 PTP-D1(Lys1111-Tyr1403)만 있지만, CD45와 CD148의 PTP-D1은 동

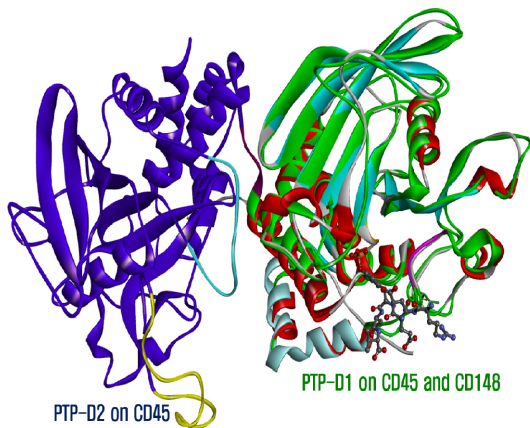


Fig. 11. The superimposed PTP domain between CD45 and CD148

일한  $\alpha/\beta$ 구조를 갖는다(Figure 11). CD148의 ITAM-1 인산화된 펩타이드(REEpYDV)를 인지하는 작용점은 Arg1162, Tyr1163, Asn1164, Asn1165, Val1166, Lys1240, Asp1297, His1298, Cys1331, Ser1332, Ala1333, Gly1334, Val1335, Gly1336, Arg1337, Thr1338, Leu1372, Gln1375로 구성되어 있다(Fig. 12).

CD45와 CD148 작용점의 잔기를 비교하면, Arg(pY-3)은 CD45의 Val540 대신에 CD148의 Asn1164와 수소성 상호작용을 한다. Asp(pY+1)의 backbone은 CD45의 Asp541과 수소결합을 하는 것과 같이 CD148의 Asn1165와 수소결합을 하고 Arg1162와 산-염기 반응을 한다. 인산화된 티로신(pY)는 CD148에서 3개 key residues(Cys1131, Arg1337, Asp1297)와 Val1166, Ala1333, Gly1334, Val1335, Gly1336, Thr1338로 구성된 pocket에 동일하게 위치한다(Fig. 9 and 12).

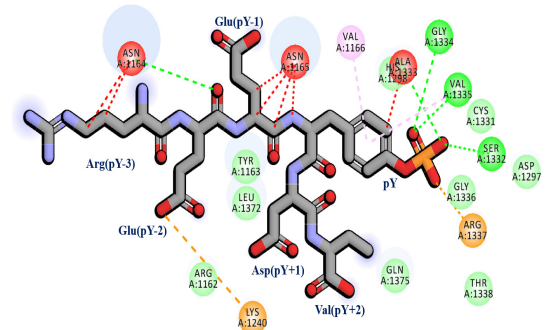


Fig. 12. Structure of CD148 PTP-D1 bound to ITAM-1 phosphopeptide(REEpYDV) of CD3 $\zeta$  chain.

돼지 CD148구조, CD148과 CD3 $\zeta$ chain(CD247)의 ITAM-1 인산화된 펩타이드(REEpYDV)결합구조는 실험적으로 결정되지 않았지만, 이번연구에서 인간 CD148의 X-ray 구조(PDB ID : 2NZ6 [47]) template를 기반으로 돼지 CD45와 같은 방법으로 구조 예측과 docking을 동일하게 수행하여 CD45와 CD148의 PTP 도메인을 비교하였다.

CD45는 대부분 조혈모세포에 발현되고 CD148은 혈소판에서 발현되지만 PTP-D1은 세포막에 인접하게 위치하여, 근처에 위치한 CD3 $\zeta$ 사슬(CD247)의 ITAM-1 인산화된 티로신(pY)부터 인산을 분해(Y)한다. 또한, CD148도 CD45의 기질 단백질(Src그룹에 속하는 티로신인산분해효소인 Lck, Zap-70 등)과 상호작용을 하여 T-세포 항원 수용체 ITAMs매개 Zap-70, LAT(Zap-70)의 기질로서 linker of activated T-cells)로부터 IL-2 분비로 T-세포 활성을 조절한다. 즉, CD45(PTPRC)와

CD148(PTPRJ)의 PTP 도메인은 T-세포 항원 수용체 매개 신호전달 시작단계에서 백혈구의 특이적인 티로신 인산화효소인 Lck을 활성화 하거나 억제하는 데 모두 관여한다(Fig. 13).

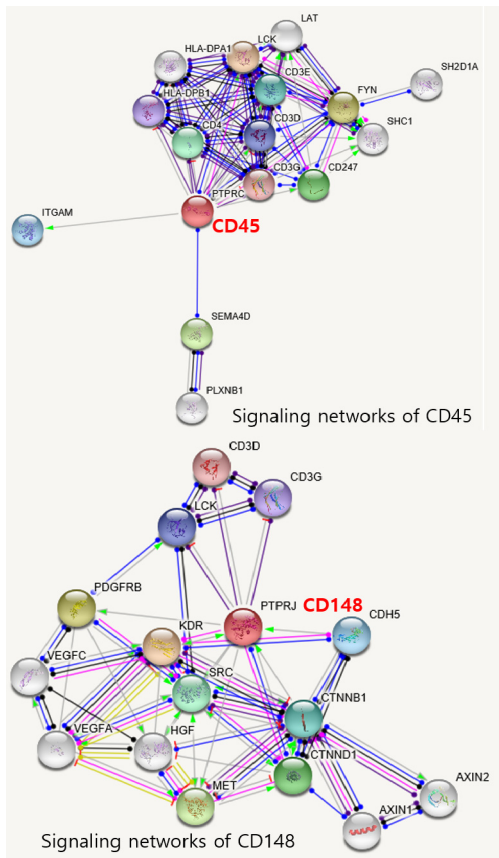


Fig. 13. Compared signaling networks of CD45 and CD148

이때, CD45는 T세포 항원 수용체(TCR)가 항원제시 세포의 MHCII-항원펩타이드(HLA-DPB1, HLA-DPA1)을 CD4 공동수용체와 같이 인식하여 TCR-CD3복합체의 신호전달에 관여하는  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ 사슬(CD3D, CD3E, CD3G, CD247)의 인산화된 티로신(CD3 $\zeta$ 사슬 ITAM)에서 인산분해기능으로, Src그룹 티로신인산화효소 Lck와 Fyn의 티로신인산화효소를 통한 T-세포 활성조절과 비임파성 조직에 발현되는 Plexin (PLXNB1)와 임파성 조직에 발현되는 CD72 수용체에 Semaphorin(SEMA4D)이 결합하여 세포-세포, 세포-기질 부착(Cell adhesion)을 통한 면역반응의 신호조절과 직접적으로 Integrin- $\alpha$  (ITGAM) 분비를 조절한다.

CD148의 세포외 영역 ECD도메인은 1개 mucin-like N-terminal region(80 residues)과 약 34개 N-linked glycosylated 8~10개의 FN3 domains로 구성이 되어 47~55nm의 길이[48]를 갖지만, CD45는 엑손 4, 5, 6의 선택적 스플라이싱에 따라 N-terminal A, B, C domains, 1개 cysteine-rich domain과 3개 FN3 domains로 28~50nm 길이를 가져서 CD148이 CD45보다 더 큰 ECD도메인을 갖고 있다. 상대적으로 CD148은 ECD 도메인의 구조 견고성이 CD45보다 줄어서, 세포질 내 CD3의  $\gamma$ ,  $\epsilon$  chain(CD3D, CD3G)의 ITAMs를 Lck, Zap-70(SRC)인산화효소가 인산화(pYxxL/I)하여 'close contact'인한 T-세포 신호전달 세기가 감소된다. CD148은 CD45처럼 T-세포 및 B-세포 항원수용체 (TCR, BCR) 매개 신호전달과 성장인자 수용체 (vascular endothelial growth factor VEGFA, VEGFC, platelet derived growth factor receptor beta PDGFRB) 기능 조절에도 관여한다. 특히, CD148에 의한 혈소판 유래 성장인자 PDGFR는 당뇨병 환자의 지연된 상처회복에 관여하고, 혈관내피성장인자 VEGFA는 혈액응고, 혈압조절에 작용한다. CD148은 CD45와 다르게 뼈 결손과 창상 회복을 위한 PDGFR과 VEGFA 매개 Chemotaxis (화학적 자극에 의한 세포의 방향성을 지닌 이동)와 Cell migration 신호전달 조절에도 직접적으로 작용하는 기능적 특징이 있다.

#### 4. 결론

돼지에서 CD45는 CD25, CD11b, SWC1, SWCT7, MHC-II와 함께  $\gamma\delta$ T-세포표지자로서, 돼지 썩코바이러스(Porcine circovirus type 2, PCV-2)백신에 대한 면역반응, 아프리카 돼지 열병바이러스(African swine fever virus, ASFV) 감염된 세포마커(CD45, CD163, CD203a, CD16, CD14)와 연관된 것으로 알려져 있다. 하지만, 현재 돼지 CD45의 수용체티로신인산분해효소로서 T-세포와 B-세포 항원수용체 매개 신호전달의 조절(가역적으로 활성화/억제 모두 작용)기능과 연관된 구조특성은 거의 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 외부 바이러스 항원을 인식한 활성 T-세포에서 많이 발현되는 돼지 CD45RO 단백질 구조 모델(ECD model1, PTP model2)로부터 기능과 직접적으로 연관되어 있는 세포외영역의 구조견고성, 세포질내 티로신 인산분해효소 작용점내 기능모티프(active site)의 크기와 깊이를 결정하



는 KNRY motif, PTP-signature motif), 항원 수용체 매개 신호전달의 시작단계에서 CD45의 기질 T-세포 항원수용체-CD3 $\zeta$  사슬(CD247)의 ITAM-1 펩타이드(REEpYDV) 선택성에 대한 새로운 insights를 제공하였다. 이러한 돼지 CD45RO 단백질 구조 기반 기능연관 정보는 mCD45RNA의 엑손 4, 5, 6의 선택적 스플라이싱에 따른 6개 CD45 isoforms 발현과 질병간의 감수성의 연구에 핵심정보로 적용될 것이다[2, 7]. 예를 들어, 인간 CD45의 엑손4에서 transitionally silent polymorphism, C77G는 CD45RO를 거의 생성할 수 없으며, 다발성 경화증, 자가면역간염, 전신성경화증, 랑게르한스 세포 조직구증, 혈구포식 림프조직구증, HIV 감염에 대한 감수성이 증가한다. 이와 반대로, 엑손6에서 A138G는 exon skipping을 자극하여 CD45RO의 발현량이 증가하는 데, B형 간염, 자가면역 갑상선 질환에 대해서는 보호효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. mCD45RNA의 선택적 스플라이싱에 대한 중요한 factor인 hnRNPLL (heterogeneous ribonucleoprotein)과 PSF(polypyridine tract binding protein-associated splicing factor)[49-50]도 CD45에 대한 원천적인 기능조절자로 연구대상이다. 잘 알려진 CD45에 의한 T-세포와 B-세포에서 항원수용체 매개 신호전달 조절 이외에도, 골수계 세포(호중구, 단핵구, 대식세포, 수지상세포, 비만세포)에서 MyD88 (myeloid differentiation primary response 88)-의 존적/비의존적 기작을 조절[51]하는 기능은 매우 흥미롭다. CD45는 외부미생물과 바이러스의 외부패턴인식수용체 Toll-like receptor(TLR1-TLR10, CD281-CD290)에서 TLR2(CD282)와 TLR9(CD289)의 MyD88-의존적 기작을 비활성화하여 IFN- $\beta$ 를 포함한 염증사이토카인 분비를 억제하지만, TLR3(CD283)와 TLR4(CD284) MyD88-비의존적 기작을 활성화하여 IFN- $\beta$ 분비를 증가한다. 향후, 돼지 CD45RO 구조모델로부터 RNA바이러스에 대한 TLR3, TLR7/8 (CD287/CD288), TLR9의 MyD88-의존적/비의존적 기작조절로 항바이러스 효과에 대한 연구를 진행 할 것이다. 더 나아가서, 돼지 집단 내 CD45에 존재하는 유전자 다형성(polymorphic variants), 품종별 유의적 아미노산변이(nSNP)와 바이러스(PCV2, ASFV등) 질환에 대한 감수성 또는 저항성, 면역질환 관련 효과를 구명하는 연구로 더 확대해 나갈 것이다. 또한, CD45의 기질단백질과 유사한 모방체 이외에 다양한 형태를 갖는 면역조절 후보물질의 가상탐색(knowledge-based virtual screening in silico)에도 적용할 것이다.

## Acknowledgments

본 성과물은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01268802, 돼지 CD 단백질질군 3차 구조와 기능간의 상관관계 분석으로 변이효과 예측)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

## References

- [1] J. A. Siller-Farfán, O. Dushek, "Molecular mechanisms of T-cell sensitivity to antigen", *Immunological Reviews*, vol. 285, no. 1, pp. 194-205, September, 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/imr.12690>
- [2] M. L. Hemiston, J. Zikherman, J. W. Zhu, "CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells", *Immunology Reviews*, vol. 228, no. 1, pp. 288-311, March, 2009.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00752.x>
- [3] T. Sasaki, J. Sasaki-Irie, J. M. Penninger, "New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphate CD45", *International Journal of Biochemistry & Cell biology*, vol. 33, no. 11, pp. 1041-1046, November, 2001.
- [4] J. D. Ashwell, U. D'Oro, "CD45 and Src-family kinases: and now for something completely different", *Immunology Today*, vol. 20, no. 9, pp. 412-416, September, 1999.
- [5] M. E. Call, J. R. Schnell, C. Xu, R. A. Lutz, J. J. Chou, K. W. Wucherpfennig, "The structure of the  $\zeta\zeta$  transmembrane dimer reveals features essential for its assembly with the T cell receptor", *Cell*, vol. 127, no. 2, pp. 355-368, October, 2006.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.044>
- [6] M. E. Call, K. W. Wucherpfennig, "Molecular mechanisms for the assembly of the T-cell receptor-CD3 complex", *Molecular Immunology*, vol. 40, no. 18, pp. 1295-1305, April, 2004.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.11.017>
- [7] E. Z. Tchilian, P. C. Beverley, "Altered CD45 expression and disease" *Trends in Immunology*, vol. 27, no. 3, pp. 146-153, March, 2006.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.01.001>
- [8] E. Z. Tchilian, P. C. Beverley, "CD45 in memory and disease.", *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, vol. 50, no. 2, pp. 85-93, 2002.
- [9] A. Rheinländer, B. Schraven, U. Bommhardt, "CD45 in human physiology and clinical medicine", *Immunology Letters*, vol. 196, pp. 22-32, April, 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.009>



- [10] W. J. Hendriks, R. Pulido, "Protein tyrosine phosphates variants in human hereditary disorders and disease susceptibilities", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1832, no. 10, pp. 1673-1693, October, 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.022>
- [11] A. J. Hale, E. Ter Steege, J. den Hertog, "Recent advances in understanding the role of protein-tyrosine phosphatases in development and disease", *Developmental Biology*, vol. 428, no. 2, pp. 283-292, August, 2017.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.03.023>
- [12] R. Majeti, Z. Xu, T. G. Parslow, J. L. Olson, D. I. Daikh, N. Killen, A. Weiss, "An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity", *Cell*, vol. 103, no. 7, pp. 1059-1070, December, 2000.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00209-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00209-9)
- [13] V. Junghans, A. M. Santos, Y. Lui, S. J. Davis, P. Jönsson, "Dimensions and interactions of large T-cell surface proteins", *Frontiers in Immunology*, vol. 9, pp. 02215, September, 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02215>
- [14] M. L. Hermiston, Z. Xu, A. Weiss, "CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells", *Annual review of immunology*, vol. 21, pp. 107-137, December, 2003.  
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946>
- [15] J. Zikherman, A. Weiss, "Alternative splicing of CD45: the tip of the iceberg", *Immunity*, vol. 29, no. 6, pp. 839-841, December, 2008.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.12.005>
- [16] T. J. Novak, D. Farber, D. Leitenberg, S. C. Hong, P. Johnson, K. Bottomly, "Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition", *Immunity*, vol. 1, no. 2, pp. 109-119, May, 1994.
- [17] H. J. Nam, F. Poy, H. Saito, C. A. Frederick, "Structural basis for the function and regulation of the receptor protein tyrosine phosphatase CD45", *Journal of experimental medicine*, vol. 201, no. 3, pp. 441-452, February, 2005.  
DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20041890>
- [18] V. T. Chang, R. A. Fernandes, K. A. Ganzinger, S. F. Lee, C. Siebold, J. McColl, P. Jönsson, M. Palayret, K. Harlos, C. H. Coles, E. Y. Jones, Y. Lui, E. Huang, R. J. C. Gilbert, D. Klenerman, A. R. Aricescu, S. J. Davis, "Initiation of T cell signaling by CD45 segregation at close-contacts", *Nature immunology*, vol. 17, no. 5, pp. 574-582, May, 2016.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.3392>
- [19] S. E. Hamby, J. D. Hirst, "Prediction of glycosylation sites using random forests", *BMC bioinformatics*, vol. 9, pp.500, November, 2008.  
DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-500>
- [20] F. Li, C. Li, J. Revote, Y. Zhang, G. I. Webb, J. Li, J. Song, T. Lithgow, "GlycoMine<sup>struct</sup>: a new bioinformatics tool for highly accurate mapping of the human N-linked and O-linked glycoproteomes by incorporating structural features", *Scientific Report*, vol. 6, pp. 34595, October, 2016.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/srep34595>
- [21] S. Jo, X. Cheng, J. Lee, S. Kim, S. J. Park, D. S. Patel, A. H. Beaven, K. I. Lee, H. Rui, S. Park, H. S. Lee, B. Roux, A. D. Mackerell Jr, J. B. Klauda, Y. Qi, W. Im, "CHARMM-GUI 10 years for biomolecular modeling and simulation", *Journal of computational chemistry*, vol. 38, no. 15, pp. 1114-1124, June, 2017.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.24660>
- [22] M. Bertoni, F. Kiefer, M. Biasini, L. Bordoli, T. Schwede, "Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology", *Scientific Report*, vol.7, no. 1, pp. 10480, September, 2017.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>
- [23] G. Wu, D. H. Robertson, C. L. 3<sup>rd</sup> Brooks, M. Vieth, "Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CD0CER-A CHARMM-based MD docking algorithm", *Journal of Computational Chemistry*, vol. 24, no. 13, pp. 1549-1562, October, 2003.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.10306>
- [24] P. A. van der Merwe, S. P. Cordoba, "Late arrival: recruiting coreceptors to the T cell receptor complex", *Immunity*, vol. 34, no. 1, pp. 1-3, January, 2011.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.01.001>
- [25] L. V. Sibener, R. A. Fernandes, E. M. Kolawole, C. B. Carbone, F. Liu, D. McAfee, M. E. Birnbaum, X. Yang, L. F. Su, W. Yu, S. Dong, M. H. Gee, K. M. Jude, M. M. Davis, J. T. Groves, W. A. 3<sup>rd</sup> Goddard, J. R. Heath, B. D. Evavold, R. D. Vale, K. C. Garcia, "Isolation of a structural mechanism for uncoupling T cell receptor signaling from peptide-MHC binding", *Cell*, vol. 174, no. 3, pp. 672-687, July, 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.017>
- [26] Y. X. Tan, J. Zikherman, A. Weiss, "Novel tools to dissect the dynamic regulation of TCR signaling by the kinase Csk and the phosphatase CD45", *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, vol. 78, pp.131-139, October, 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.1101/sqb.2013.78.020347>
- [27] A. k. Chakraborty, A. Weiss, "Insights into the initiation of TCR signaling", *Nature Immunology*, vol. 15, no. 9, pp. 798-807, September, 2014.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.2940>
- [28] Q. Leupin, R. Zaru, T. Laroche, S. Müller, S. Valitutti, "Exclusion of CD45 form the T-cell receptor signaling area in antigen-stimulated T lymphocytes", *Current Biology*, vol. 10, no. 5, pp. 277-280, March, 2000.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00362-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00362-6)
- [29] N. Kashio, W. Matsumoto, S. Parker, D. M. Rothstein, "The second domain of the CD45 protein tyrosine

- phosphatase is critical for interleukin-2 secretion and substrate recruitment of TCR-zeta in vivo", *Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 50, pp. 33856-33863, December, 1998.  
DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33856>
- [30] Y. Wang, P. Johnson, "Expression of CD45 lacking the catalytic protein tyrosine phosphatase domain modulates Lck phosphorylation and T cell activation", *Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 14, pp. 14318-14324, April, 2005.  
DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M413265200>
- [31] K. Štěpánová, M.Šinkora, "The expression of CD25, CD11b, SWC1, SWC7, MHC-II and family of CD45 molecules can be used to characterize different stages of characterize different stages  $\gamma\delta$  T lymphocytes in pigs", *Developmental and comparative immunology*, vol. 36, no. 4, pp. 728-740, April, 2012.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.11.00>
- [32] W. Gerner, T. Käser, A. Saalmüller, "Porcine T lymphocytes and NK cells- An update", *Developmental and comparative immunology*, vol. 33, no. 3, pp. 310-320, March, 2009.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.06.003>
- [33] L. Piriou-Guzylack, H. Salmon, "Membrane markers of the immune cells in swine: an update", *Veterinary research*, vol. 39, no. 6, pp. 54. December, 2008.  
DOI: <https://doi.org/10.1051/vetres:2008030>
- [34] M. Sinkora, J. E. Butler, "Progress in the use of swine in developmental immunology of B and T lymphocytes", *Developmental and comparative immunology*, vol. 58, pp. 1-17, May, 2016.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.003>
- [35] Y. Chen, T. Song, Y. L. Xiao, X. Wan, L. Yang, J. Li, G. Zeng, P. Fang, Z. Z. Wang, R. Gao, "Enhancement of immune response of piglets to PCV-2" vaccine by porcine IL-2 and fusion IL-4/6 gene entrapped in chitosan nanoparticles", *Research in veterinary science*, vol. 117, pp. 224-232, April, 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.12.004>
- [36] P. Lithgow, H. Takamatsu, D. Werling, L. Dixon, D. Chapman, "Correlation of cell surface marker expression with African swine fever virus infection", *Veterinary microbiology*, vol. 168, no. 2, pp. 413-419, January, 2014.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.001>
- [37] J. Pei, B. H. Kim, N. V. Grishin, "PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments", *Nucleic acids research*, vol. 36, no. 7, pp. 2295-2300, April, 2008.  
DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn072>
- [38] M. Y. Shen, A. Sali, "Statistical potential for assessment and prediction of protein structures", *Protein science*, vol. 15, no. 11, pp. 2507-2524, November, 2006.  
DOI: <https://doi.org/10.1110/ps.062416606>
- [39] R. Lüthy, J. U. Bowie, D. Eisenberg, "Assessment of protein models with three-dimensional profiles", *Nature*, vol. 356, no. 6364, pp. 83-85, March, 1992.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/356083a0>
- [40] V. B. Chen, W. B. Arendall 3<sup>rd</sup>, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immomino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson, D. C. Richardson, "Molprobity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography", *Acta Crystallographica Section D Biological crystallography* Vol. 66, no. pt 1, pp. 12-21, January, 2010.  
DOI: <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>
- [41] G. Jiang, J. den Hertog, T. Hunter, "Receptor-like protein tyrosine phosphatase alpha homodimerizes on the cell surface", *Molecular and cellular biology*, Vol. 20, no. 16, pp.5917-5929, August, 2000.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/mcb.20.16.5917-5929.2000>
- [42] J. Felberg, D. C. Lefebvre, M. Lam, Y. Wang, D. H. Ng, D. Birkenhead, J. L. Cross, P. Johnson, "Subdomain X of the kinase domain of Lck binds CD45 and facilitates dephosphorylation", *Journal of biological chemistry*, Vol. 279, no. 5, pp. 3455-3462, January, 2004.  
DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M309537200>
- [43] Y. Wang, W. Guo, L. Liang, W. J. Esselman, "Phosphorylation of CD45 by casein kinase 2. modulation of activity and mutational analysis", *Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 11, pp. 7454-7461, March, 1999.  
DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.11.7454>
- [44] A. Alonso, J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, T. Mustelin, "Protein tyrosine phosphatases in the human genome", *Cell*, vol. 117, no. 6, pp. 699-711, June, 2004.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.018>
- [45] L. Tautz, D. A. Critton, S. Grotgut, "Protein tyrosine phosphatases: structure, function, and implication in human disease", *Methods in molecular biology*, vol. 1053, pp. 179-221, 2013.  
DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-562-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-562-0_13)
- [46] Z. Hegedűs, V. Chitu, G. K. Tóth, C. Finta, G. Váradi, I. Andó, E. Monostori, "Contribution of kinase and the CD45 phosphatase to the generation of tyrosine phosphorylation patterns in the T-cell receptor complex  $\zeta$  chain", *Immunology Letters*, Vol. 67, no. 1, pp. 31-39, March, 1999.
- [47] A. Z. Barr, E. Ugochukwu, W. H. Lee, O. N. King, P. Filippakopoulos, I. Alfano, P. Savitsky, N. A. Burgess-Brown, S. Müller, S. Knapp, "Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome", *Cell*, 2009, Vol. 136, no. 2, pp. 352-363.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.038>
- [48] S. P. Cordoba, K. Choudhuri, H. Zhang, M. Bridge, A. B. Basat, M. L. Dustin, P. A. van der Merwe, "The large ectodomains of CD45 and CD148 regulate their segregation from and inhibition of ligated T-cell

- receptor”, Blood, Vol. 121, no. 21, pp. 4295-4302. May, 2013  
DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-442251>
- [49] A. A. Melton, J. Jackson, J. Wang, K. W. Lynch, “Combinatorial control of signal-induced exon repression by hnRNPL and PSF”, Molecular and cellular biology, Vol. 27, no. 19, pp. 6972-6984. October, 2007  
DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.00419-07>
- [50] S. Oberdoerffer, L. F. Moita, D. Neems, R. P. Freitas, N. Hacohen, A. Rao, “Regulation of CD45 alternative splicing by heterogenous ribonucleoprotein, hnRNPLL”, Science, Vol. 321, no. 5889, pp. 686-691. August, 2008  
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1157610>
- [51] J. L. Cross, K. Kott, T. Miletic, P. Johnson, “CD45 regulates TLR-induced proinflammatory cytokine and IFN-beta secretion in dendritic cells”, Journal of immunology, Vol. 180, no. 12, pp. 8020-8029. June, 2008  
DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.12.8020>
- 

채 한 화(Han-Ha Chai)

[정회원]



• 2010년 11월 ~ 현재 : 농촌진흥청  
국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

동물 기능유전체, 화학-생명정보 응용연구(분자모델링)

---

임 다 정(Dajeong Lim)

[정회원]



• 2007년 11월 ~ 현재 : 농촌진흥청  
국립축산과학원 농업연구관

<관심분야>

가축 집단 유전체, 생명정보 적용 유전체 선발