

수상돌기세포에서 결핵균 항원자극에 따른
Mitogen-Activated Protein Kinase 와 **Toll-
like Receptor 2/4** 에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학과

이진민

수상돌기세포에서 결핵균 항원자극에 따른
Mitogen-Activated Protein Kinase 와 **Toll-
like Receptor 2/4** 에 미치는 영향

지도교수 최 인 홍

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2005 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

이 진 민

이진민의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

감사의 글

그 동안 도움을 주신 모든 분들께 진심으로 감사를 드립니다. 부족한 저에게 한결 같은 격려와 관심으로 이끌어주시고 연구자로서의 덕목과 자세를 가르쳐 주신 최인홍 교수님께 크나 큰 감사를 드립니다. 바쁘신 와중에도 많은 조언과 격려로 부족한 논문을 지도해주신 신전수 교수님, 이종은 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 본 연구를 수행하는데 있어 많은 도움을 주시고 연구자의 모범을 보여주신 이정림 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 항상 자상한 배려와 관심으로 지켜봐 주시는 미생물학교실의 여러 교수님들께도 깊은 감사를 드립니다.

언제나 실험실 생활에서 아낌없는 충고로 저의 힘이 되어 준 우리 실험실의 이정기 선생님, 양은정 선생님께 진심으로 감사를 드립니다. 항상 함께 한 안혜정 선생님께도 감사를 드립니다. 그동안 옆에서 한결같이 많은 도움을 주신 김일휘 선생님, 김영미 선생님께도 감사를 드립니다. 관심과 우정으로 지켜봐 주신 김형란 선생님, 최수정 선생님, 이정화 선생님, 외 여러 미생물학교실 선생님들께도 감사를 드립니다.

끝으로 제가 여기까지 오는 동안 한결 같은 사랑으로 저를 키워주시고 이끌어 주신 저희 부모님께 크나 큰 사랑과 깊은 감사를 드리며, 이 기쁨을 함께 하고 싶습니다.

저자 씀

약어 목록

<i>Abbreviation</i>	<i>Full name</i>
AraLAM	non-mannose-capped lipoarabinomannan
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LAM	lipoarabinomannan
LPS	lipopolysaccharide
ManLAM	mannose-capped lipoarabinomannan
MAPK	mitogen activated protein kinase
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor

국문요약

수상돌기세포에서 결핵균 항원자극에 따른 Mitogen-Activated Protein Kinase 와 Toll-like Receptor 2/4 에 미치는 영향

결핵균에 감염 되면, 결핵균은 포식된 대식세포 안에서 살아 남는다. 이렇게 감염된 대식세포의 포식소체에서 분비되는 결핵균 단백질은 감염 부위로 모여 드는 단핵구 및 수상돌기세포와 같은 항원전달세포와 반응하여 결핵균 감염에 대한 면역반응이 진행되고, 나아가서 질병의 상태도 결정짓는다. 만성 결핵 감염의 예방 및 치료를 위해 새로운 면역요법 개발의 필요성이 대두되면서, 결핵균 감염의 전파를 제한시키는 수상돌기세포의 역할이 강조되고 있다. 수상돌기세포가 결핵균에 대한 선천면역과 적응면역을 유도하는 숙주의 주요 세포이고, 수상돌기세포의 성숙과정이 TLR 을 매개로 일어남이 보고되어 있다. 즉 결핵균 항원이 TLR 을 통해 수상돌기세포 성숙에 영향을 미치고, 나아가 싸이토카인 등을 분비함으로써 적응면역에 관여하는 T 세포에 영향을 미쳐 최종적으로 결핵균에 대한 적응면역 양상을 결정하리라고 생각된다. 그러므로 본 연구에서는 결핵균 항원에 대한 TLR 반응을 조사하여 결핵균 감염에서 수상돌기세포의 역할을 파악하고자 한다.

건강인의 말초혈액 단핵구로부터 유래한 수상돌기세포를 결핵균 항원으로 자극하여 수상돌기세포의 성숙과정에 따른 표현형 특성 및 TLR 분자의 발현을 관찰하고 싸이토카인 생성과 MAP kinase 활성화를 관찰하였다. 건강인의 말초혈액 단핵구에서 유래한 미성숙 수상돌기세포의 표면 분자 발현 분석 결과 CD14 분자의 발현이 소실된 반면 HLA-DR, CD80, CD86, CD54 분자들이 발현되어 수상돌기세포로 분화되었음을 확인하였다. 미성숙 수상돌기세포를 지다당류(lipopolysaccharide: LPS)로 자극하면 CD83, HLA-DR, CD86 의 발현이 증가하여 성숙한 수상돌기세포의 표현형이 유도되었다. TLR2 와 TLR4 의 발현은 단핵구, 미성숙 수상돌기세포, LPS 로 자극

한 성숙 수상돌기세포에서 모두 중간 정도로 발현하였다. 다른 TLR 리간드 (ligand)나 결핵균 단백질 항원으로 자극하였을 때는 표면 분자의 발현에 큰 차이가 없었다. 다양한 결핵균 항원으로 수상돌기세포를 자극하였을 때, 전반적으로 사이토카인 생성을 크게 유도하지 못하였으며 특히 AraLAM 항원 자극이 사이토카인을 가장 적게 유도하였고 JNK와 ERK 활성화가 억제되었다. 반면, p38 MAP kinase는 AraLAM 항원 자극에 의해 활성화되었다. 30 kDa 단백질 항원 자극에 의해서 IL-12p40가 생성되었으며, JNK와 p38 MAP kinase도 활성화되었다. 합성한 결핵균 단백질 항원 중에서는 16 kDa 단백질 항원에 의해 사이토카인 생성이 크게 유도되고 MAP kinase도 강하게 활성화되었다.

결핵균 AraLAM 항원을 말초혈액 단핵구 유래의 수상돌기세포에 전처리하였을 경우, 이후의 LPS에 의한 성숙에 변화가 일어나 CD83과 CD86 발현이 감소하는 등 덜 성숙된 표현형을 나타냈다. 또한 AraLAM 항원을 전처리하였을 경우 LPS에 의한 수상돌기세포에서 IL-6, IL-12p40, TNF의 사이토카인 생성이 억제되었다. MAP kinase 활성화는 AraLAM 전처리에 의해 p38 MAP kinase 활성화가 억제되었으나 다른 MAP kinase의 경우에는 큰 변화가 없었다.

이러한 연구결과를 토대로 본 연구에서는 결핵균 항원에 장기간 노출되는 경우 미성숙 수상돌기세포에서 성숙화 과정이 제대로 작동하지 않고, 그 결과 염증성 사이토카인이 제대로 생성되지 않으며 이러한 과정이 TLR 분자와의 상호작용과, p38 MAP kinase와 연관성이 있을 가능성을 제시한다. 이러한 기전을 통해 결과적으로 결핵균이 숙주의 병원체 감염에 대한 면역 방어기전을 억제할 가능성이 있는 것으로 생각된다.

핵심되는 말: 수상돌기세포, 결핵균 항원, Toll-like receptor, MAP kinase, 사이토카인

수상돌기세포에서 결핵균 항원자극에 따른 Mitogen-Activated Protein Kinase와 Toll-like Receptor 2/4 에 미치는 영향

< 지도교수 최 인 흥 >

연세대학교 대학원 의과학과

이 진 민

I. 서 론

결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)은 현재도 누균가를 감염시키고 있으며, 전세계 인구의 3분의 1이 결핵균과 접촉한다¹. 이들 중 대부분은 발병하지 않고 약 10% 정도만이 결핵(tuberculosis) 증상을 보인다. 2002년 한 해 동안 결핵으로 인해 약 200만 명이 사망했으며 지난 한 세기 동안에는 약 1억 명이 사망하였다^{1,2}. 결핵균은 세포 내 기생균으로 숙주(host)의 단핵세포(mononuclear cell) 안에서 생존, 증식할 수 있다. 결핵균은 공기 흡입에 의해 인체로 들어가 폐에서 주요 표적세포인 폐포 대식세포(macrophage)에 의해 탐식된 후 증식하여 폐포벽에 감염원을 형성한다. 결핵균으로 인한 감염을 숙주가 조절하고 해결하기 위한 방안 중 하나가 대식세포 안에 생존하고 있는 감염원을 격리시키는 것이며, 결핵균에 의한 감염을 조절하는데 관여하는 요소로 IFN, IL-12, IL-23, TNF, lymphotoxin, CD40, nitric oxide(NO) 등의 몇 가지 요소가 밝혀져 있다³⁻¹¹. Mycobacteria는 대식세포에 의해 제거되는 것에 저항하기 위해 진화적으로 도피 기전(evasion mechanism)을 더욱 정교히 발전시켜 왔다¹². 숙주는 감염을 조절하기 위해서 선천면역반응(innate immune system)과 적응면역반응(adaptive immune system)을 모두 필요로 하

며, 적응면역반응이 일어나기 위해서는 항원전달세포(antigen presenting cells: APC)와 T세포가 특정한 싸이토카인(cytokine), 키모카인(chemokine)과 함께 작용해야만 한다는 것이 밝혀졌다¹³. 최근 Toll-like receptor(TLR) family가 알려지면서 결핵균 감염원이 어떻게 숙주에 인지되고 선천면역에 관계하는 면역세포를 활성화시켜 선천면역반응과 적응면역반응을 연결시키는가에 대한 실마리를 제공해 주고 있다¹⁴.

수상돌기세포(dendritic cell: DC)는 전문적인 항원전달세포(professional APC)로 미성숙 상태에서 말초 조직에 위치하고 있다. 수상돌기세포는 외부 항원을 MHC class II 분자 또는 CD1a와 같은 non-classical MHC-like 분자와 더불어 전달하며 이차 림프조직으로 이동하여 휴지 상태(quiescent)의 슷(naïve), 기억(memory) T 세포를 활성화시킨다¹⁵. 미성숙(immature) 수상돌기세포는 결핵균의 lipoarabinomannan (LAM)을 세포 내로 이동시켜 CD1b 전달경로를 통해 LAM에 특이적으로 반응하는 T 세포에 전달한다¹⁶. 많은 연구 결과들은 수상돌기세포가 그 성숙 정도에 따라, 또는 전구세포의 종류에 따라 다양하고 특이적인 표현형 및 특성을 가지게 된다고 보고하고 있다. 수상돌기세포는 전구세포의 종류에 따라 크게 myeloid 유래와 lymphoid 유래로 나뉜다. Common myeloid progenitors(CMP)로부터 분화한 Langerhans DC, interstitial DC의 두 미성숙 수상돌기세포 subset과 두 종류의 전수상돌기세포(pre-DC) subset 중 하나인 단핵구는 myeloid 유래의 세포에 속하며, common lymphoid progenitors(CLP)로부터 분화한 lymphoid 유래 subset은 전수상돌기세포 subset 중 IFN을 잘 생성하는 특징을 가진 세포로 알려진 plasmacytoid cell subset을 포함한다^{15,17,18}. 미성숙 수상돌기세포는 여러 조직을 돌며 병원체나 감염된 세포를 탐식하기 위한 감시작용을 하는데^{19,20}, 이 과정에서 염증반응물질 또는 병원체와 미성숙 수상돌기세포간의 상호작용의 결과로 미성숙 수상돌기세포의 세포표면 분자들의 발현이 변화되고 성숙화가 진행된다. 림프절로 이동한 수상돌기세포는 T 세포와 반응하여 완전하게 성숙함으로써 기억 T 세포의 증식 및 작동(effector) T 세포의 분화

를 유도하여 말초조직에서 병원체에 대한 방어 반응을 시작하게 된다²¹⁻²³. 만성 감염증에서는 이러한 성숙화 과정이 붕괴되어 조직에 분포한 수상돌기세포가 상대적으로 결핍되어 있으며 림프절의 T 세포의 활성화를 지속시킨다.

수상돌기세포의 *in vitro* 연구는 말초혈액 단핵구를 GM-CSF와 IL-4가 있는 상태에서 배양하여 수상돌기세포를 얻는 방법이 개발된 이후 활발하게 진행 될 수 있었다²⁴⁻²⁷. 이렇게 얻어진 수상돌기세포는 상대적으로 미성숙한 상태이며, 식균 작용(endocytosis)을 잘 하고 MHC class II 분자, CD83 분자와 동시자극분자인 CD80 그리고 CD86 을 적게 발현하고 있다²⁸. TNF- α , CD40 리간드, LPS에 의해 수상돌기세포가 성숙되면 항원을 잡는(capture) 능력이 줄어들고 동시자극분자(costimulatory molecule)와 부착분자(adhesion molecule)의 발현이 증가한다^{29,30}. 수상돌기세포의 성숙을 나타내는 것과 유사한 이러한 변화는 마이코플라즈마, 바이러스, 세포내 세균, 기생충 등으로 감염을 시켰을 때에도 관찰되었다³¹⁻³³.

고등 생물체에서 침입한 병원체에 대한 방어는 선천면역반응과 적응면역반응의 크게 두 가지 형태로 나뉜다. 선천면역반응은 다양한 병원체의 초기 감염에 대항하여 대식세포와 호중구(neutrophil) 등의 세포가 병원체를 탐식하는, 상대적으로 비특이적인 면역반응이며 주로 병원체에 대해 독성을 띠는 염증 분자(inflammatory molecule)가 직접 또는 간접적으로 작용한다. 반면 적응면역반응은 보다 늦게 일어나지만 T 세포와 항체가 특이성을 가지고 관여한다. 이들 두 가지 형태의 면역반응이 서로 호환적으로 작용하여 병원체에 대한 방어라는 그들의 임무를 수행하게 된다³⁴.

선천면역반응에서 숙주에는 존재하지 않지만 미생물 병원체들 사이에서는 공통적으로 보존되어 있는 특이적인 성분인 pathogen-associated molecular patterns(PAMPs) 라고 알려진 motif를 수상돌기세포 같은 선천면역에 관여하는 세포(innate immune cell)가 pattern recognition receptor(PRR)를 통해 인식한다. 이러한 PRR 중 TLR family는 처음에 초파리 *Drosophila* 에서

알려졌으며, 포유류에는 현재까지 적어도 13 종류, 사람에서는 10 종류가 밝혀져 있다. TLR은 고등 생물체에서 PAMP를 인식하여 적응면역반응이 일어나게끔 유인하며, 수상돌기세포, 대식세포, 비만세포(mast cell), 호중구, 내피세포(endothelial cell) 등 선천면역에 관계하는 다양한 세포에 널리 발현되고 있다³⁵. TLR family는 특징적으로 세포외 영역에 leucine-rich repeats(LRR)을 가지고 있고 세포질 내에 IL-1 receptor family와 유사한 Toll/IL-1 receptor(TIR) domain을 가지고 있다. TLR family의 대부분은 adaptor protein인 MyD88을 사용하여 표적이 되는 유전자에 신호를 전달하는데, MAP kinase 경로 등을 통해 NF- κ B를 활성화시키거나 IL-1, IL-18 같은 경로를 통해 빠르게 숙주방어기전을 활성화 시킨다^{14,34}. TLR이 자극을 받으면 MyD88이 IL-1 receptor associated kinase(IRAK)를 수용체 쪽으로 모아서 IRAK이 인산화 되면서 TNF receptor associated factor(TRAF) 6와 결합하여 NF- κ B와 JNK등이 활성화 된다^{36,37}. MyD88 knockout mice는 다양한 TLR ligand들에 대해 NF- κ B와 JNK를 잘 활성화시키지 못하고 TNF- α 와 IL-12를 잘 분비하지 못하며, 몇 가지 병원체에 대한 숙주의 저항성이 크게 감소된다³⁸⁻⁴⁹.

각각의 TLR은 병원체의 서로 다른 분자구조를 인식한다. TLR5와 TLR9을 제외하면 한 TLR에 여러 종류의 리간드가 알려졌는데, 특히 TLR2는 그람양성세균, 펩티도글리칸(peptidoglycan), 내독소(endotoxin), 결핵균 LAM 등의 다양한 미생물 배위자와 결합하며^{36,37,43}, TLR4는 그람음성세균의 지다당류(lipopolysaccharide: LPS)와 결합한다⁴⁴⁻⁴⁶. 그 중에서 수상돌기세포의 성숙을 유도하는 리간드는 LPS, CpG DNA, 지질단백(lipoprotein), 세포벽 산물 등으로 알려져 있다⁴⁷⁻⁴⁹.

결핵균의 세포벽과 분비되는 물질인 19 kDa 지질단백, lipomannan, mannosylated phosphatidylinositol 등은 TLR2를 통해 대식세포와 수상돌기세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있으나⁵⁰⁻⁵⁵, 결핵균이 인지되는데 있어서 다른 TLR이나 PRR의 역할을 배제할 수는 없다. 기존의 연구에서 TLR2, TLR4, TLR6가 결핵균 감염에 대한 초기의 숙주 면역반응에서 거의 역할을

하지 않는다는 것이 보여졌으나⁵⁶⁻⁵⁹, TLR2⁶⁰와 TLR4⁵⁶는 감염의 만성적인 상태를 조절하는 데는 필요할 것이라 생각되고 있다. 이러한 연구결과는 TLR2, TLR4, TLR6의 부분적인 과잉(redundancy)과 결핵균에 의해 유도되는 세포의 인식에 다른 TLR이 관여할 수 있다는 가능성을 제시하고 있다⁶¹.

초기에 TLR은 Th1 반응을 유도하는데 중요할 것이라고 생각되었으며, MyD88 knockout mice가 Th1 반응에 선택적인 결함을 보였으므로⁶²⁻⁶⁶ 모든 TLR이 우선적으로 Th2 반응이 아닌 Th1 반응을 매개한다고 생각되었다. 하지만 최근 들어 특정 TLR 리간드는 Th2 반응 또한 매개할 것이라는 증거가 많이 밝혀지고 있다. *E. coli* LPS와 편모단위단백(flagellin)은 강한 Th1 반응을 유도하고⁶⁷, MyD88 knockout mice의 수상돌기세포는 IL-10 생성능력이 저하되어 있었다⁶⁸. 반면 pam3cys와 주혈흡충 알 항원(schistosome egg antigens : SEA)은 Th2 반응을 유도하였으며 이때 ERK 활성화가 관련됨이 보고되었다³⁵. 그의 여러 연구들에서 TLR2를 통한 신호전달이 Th2나 T regulatory 반응을 유도할 가능성을 암시하고 있다⁶⁹⁻⁷³.

그러므로 본 연구에서는 사람의 말초혈액에서 유래한 수상돌기세포의 성숙에 따른 TLR 발현을 측정하고, 결핵균 항원 자극에 의한 수상돌기세포의 표현형 변화 및 사이토카인 분비와 MAP kinase 활성화를 관찰하여 결핵균 감염에서 수상돌기세포에서의 TLR을 통한 면역 조절 기능을 관찰하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 수상돌기세포 배양

건강한 성인의 말초혈액으로부터 Ficoll-Paque (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) 원심분리 방법으로 단핵세포를 분리하였다. 분리된 단핵세포는 MACS CD14(+) microbeads (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA)와 섞어 20 분간 얼음에서 반응시킨 후 20 배 부피의 2 mM EDTA, 5% 소혈청 알부민(bovine serum albumin: BSA)이 함유된 인산완충용액(phosphate buffered saline: PBS)으로 세척하여 자기장에 걸려있는 MACS 컬럼을 통과시켜 컬럼에 붙은 CD14 양성인 단핵구를 분리하였다. 수상돌기세포를 유도하기 위해 분리된 CD14 양성세포를 2%의 우태아혈청(fetal bovine serum: FBS, Jeil Biotech Services Inc., Daegu, Korea)이 함유된 RPMI 배양액에 3×10^6 cells/mL 또는 1×10^6 cells/mL 의 농도로 부유시킨 후 6 well 또는 24 well plate (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)에 분주한 뒤 37°C CO₂ 배양기에서 1-2 시간 두어 단핵구를 plate 바닥에 붙였다. 이후 RPMI 배지로 바닥에 붙지 않은 세포를 세척, 제거하고 plate 바닥에 붙어 있는 단핵구는 10%의 우태아혈청과 800 U/mL GM-CSF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)와 500 U/mL IL-4 (Endogen, Rockford, IL, USA)가 함유된 RPMI 배양액에서 4 일간 배양하여 미성숙 수상돌기세포로 유도하였다.

배양 4 일째의 미성숙 수상돌기세포에 50 ng/mL 의 *Salmonella minnesota* 에서 분리한 LPS (lipopolysaccharide: 지다당류, Sigma, St. Louis, MO, USA), 10 µg/mL 의 AraLAM, ManLAM 항원, 10 kDa, 22 kDa, 30 kDa, 38 kDa 의 단백질 항원과 합성된 6 kDa, 16 kDa, 19 kDa, 38 kDa 의 단백질 항원과 Ag85A 항원의 결핵균 항원을 각각 첨가하고 48 시간 배양하여 수상돌기세포의 성숙화 및 활성화를 유도한 이후 배양액만을 걸어서 사용하였다. 또는

배양 4 일째의 미성숙 수상돌기세포의 배양액을 기존의 것에서 1%의 우태아혈청과 80 U/mL 의 GM-CSF, 50 U/mL 의 IL-4 가 함유된 RPMI 배양액으로 바꾸어서 18 시간 동안 배양한 후 50 ng/mL 의 LPS, 10 µg/mL 의 AraLAM, ManLAM 항원, 10 kDa, 22 kDa, 30 kDa, 38 kDa 의 단백질 항원과 합성된 6 kDa, 16 kDa, 19 kDa, 38 kDa 의 단백질 항원과 Ag85A 항원의 결핵균 항원을 각각 첨가하여 30 분간 자극시킨 후 세포만을 거둬서 세포로부터 단백을 추출해 사용하였다.

2. 유세포 분석

건강인의 말초혈액 단핵구에서 유래한 미성숙 수상돌기세포 및 LPS 또는 결핵균 항원으로 48 시간 자극한 수상돌기세포를 인산완충액으로 2 회 세척한 후 FITC 또는 PE 로 표지된 여러 표면분자들의 단클론항체로 얼음에서 30 분간 반응시켜 직접형광염색하였다. 인산완충액으로 세척하여 세포에 염색되지 않은 과잉의 단클론항체를 제거한 후 FacsCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용하여 세포표면 분자의 발현을 측정하였다. 단클론항체로는 항 FITC-HLA-DR, FITC-CD80, FITC-CD83, FITC-CD64, PE-CD86, PE-CD32 (이상 Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), PE-CD54 (Phamingen, San Diego, CA, USA)등을 사용하였다. 모든 실험에서 각각의 단클론항체에 대하여 FITC-mIgG2a 또는 PE-mIgG1 (Beckman Coulter)을 동형 대조군으로 사용하였다. 유세포 분석시 총 20,000 개의 세포 중 큰 과립세포 군을 선택(gating)하여 WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, CA, USA)을 이용하여 결과를 분석하였다.

3. 싸이토카인 효소결합면역흡착검사 (ELISA)

건강인의 말초혈액 단핵구에서 유래한 미성숙 수상돌기세포, 결핵균 항원으로 48 시간 자극한 수상돌기세포의 배양액에 포함된 IL-6, IL-12p40,

TNF, IL-10 을 측정하기 위해 일반적인 효소결합면역흡착검사를 수행하였다. 항 싸이토카인 포획항체(capture antibody, BD Biosciences)를 coating buffer (0.1 M carbonate, pH 9.5)에 250 배 희석하여 96 well EIA/RIA plate (Costar, Acton, MA, USA)에 분주하고 4°C 에서 하룻밤 동안 부착시킨 후, 과잉의 포획항체를 0.05%의 tween-20 (Sigma) 이 함유된 인산완충액(PBST)으로 세척하고 10% 우태아혈청이 함유된 인산완충액으로 37°C 에서 1 시간 동안 차단시켰다. 10% 우태아혈청이 함유된 인산완충액으로 5 배 희석시킨 수상돌기세포 배양액을 포획항체가 부착된 plate 의 각 well 에 분주하고 37°C 에서 2 시간 배양한 후 PBST 로 세척한다. 검출항체에 biotin 이 부착된 항 사람 IL-6 (또는 IL-12p40, TNF 및 IL-10) 항체와 효소 시약인 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin 을 각각 10% 우태아혈청이 함유된 인산완충액으로 250 배나 500 배 희석한 것을 1:1 의 비율로 섞어서 각 well 에 분주하고 37°C 에서 1 시간 반응시킨 후 PBST 로 세척하였다. 기질용액인 tetramethylbenzidine(TMB)와 hydrogen peroxide 의 혼합액을 각 well 에 첨가하고 어두운 상온에서 20-30 분간 반응시켜 발색시킨 후 2 N 또는 2.5 N H₂SO₄ 용액으로 발색반응을 정지시키고, microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm 파장에서 발색도를 측정하였다. 분비된 싸이토카인의 양은 사람의 재조합형 IL-6, IL-12p40, TNF, IL-10 (BD Biosciences)의 표준곡선으로부터 유추하여 계산하였다.

4. Western blotting

건강인의 말초혈액 단핵구에서 유래한 수상돌기세포에 30 분 간 결핵균 항원자극을 준 후 MAP kinase 인산화 변화를 보기 위해 Western blotting 을 시행하였다.

단백질을 얻기 위해 미성숙 수상돌기세포와 30 분간 결핵균 항원자극을 준 수상돌기세포를 인산완충액으로 세척한 후 세포를 용해시키는 lysis

buffer (protease inhibitor 가 포함된 25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1% NP-40)로 용해하여 12,000 rpm 에서 10 분간 원침하여 상청액을 얻어 단백을 분리하였다. 단백질 농도는 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 정량하였다. 총 단백질에서 40 μ g 의 농도를 취하여 13.5% SDS-PAGE 를 통하여 단백을 분리하였다. 전기영동 후 nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 옮기고 5%의 탈지분유와 0.1%의 tween-20 이 함유된 트리스완충액(tris buffered saline: TBS)으로 실온에서 1 시간 동안 차단 후 0.1% tween-20 이 함유된 트리스완충액(TBST)으로 5 분간 세척하였다. 그 후 항 MAP kinase 항체를 5%의 소혈청알부민이 함유된 TBST 에 1000 배 희석하여 4°C 에서 하룻밤동안 반응시켰다. MAP kinase 항체로는 항 ERK 다클론 항체, 항 phospho-ERK 다클론 항체, 항 p38 MAPK 다클론 항체, 항 phospho-p38 MAPK 다클론 항체, 항 JNK/SAPK 다클론 항체, 항 phospho-SAPK/JNK 다클론 항체 (이상 Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 사용하였다. TBST 로 5 분씩 3 회 세척한 후 HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Reseach, Baltimore, MD, USA)로 실온에서 1 시간동안 반응시키고 TBST 로 10 분간 3 회 세척하여 west save (Lab Frontier, Seoul, Korea)를 사용하여 발광 반응을 측정하였다.

5. 항원 전처리 실험

배양 4 일째의 건강인의 말초혈액 단핵구에서 유래한 수상돌기세포에 10 μ g/mL 의 AraLAM, ManLAM 항원을 18 시간 동안 전처리 한 후 LPS 를 50 ng/mL 로 첨가하여 48 시간 동안 더 배양한 수상돌기세포를 유세포 분석을 통해 세포표면 분자들의 발현 양상의 변화를 관찰하고, 배양액을 모아 배양액에 분비된 싸이토카인을 효소면역흡착검사 (ELISA)로 측정하였다. 또는 결핵균 항원을 전처리한 수상돌기세포의 배양액을 1%의 우태아혈청과 80 U/mL 의 GM-CSF, 50 U/mL 의 IL-4 가 함유된 RPMI 배양액으로 바꾸어서

18 시간 동안 배양한 후 50 ng/mL 의 LPS 로 30 분 간 처리한 후 세포로부터 단백을 얻어 Western blotting 을 통해 MAP kinase 인산화 변화를 관찰하였다.

III. 결과

1. 건강인 말초혈액 단핵구로부터 수상돌기세포 배양 및 세포 표면 분자의 발현 확인

건강인의 말초혈액에서 단핵구의 표지분자인 CD14 를 발현하고 있는 세포를 분리하여 세포 표면 분자 발현을 유세포분석기로 분석한 결과, T 세포 표지분자인 CD3, B 세포 표지분자인 CD19 를 발현하고 있지 않고 단핵구 표지분자인 CD14 와 HLA-DR, CD64, CD32 를 발현하고 있음을 관찰하여 CD14 양성인 단핵구임을 확인하였다. TLR2 와 TLR4 분자의 경우 중간 정도로 발현하고 있음을 관찰하였다 (그림 1).

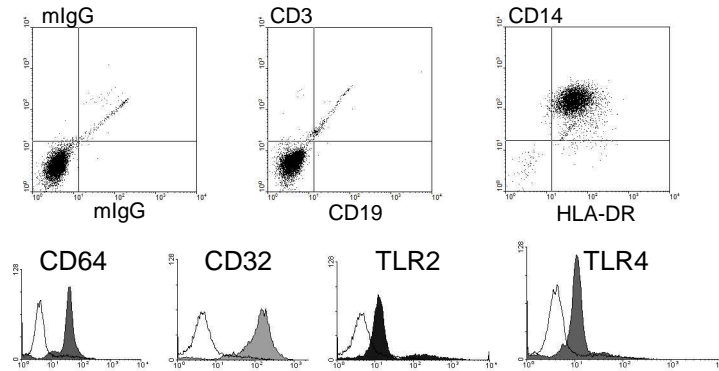


그림 1. 건강인 말초혈액에서 CD14 양성 단핵구의 분리. 건강인의 말초혈액 으로부터 단핵구 표지 분자인 CD14 를 발현하고 있는 세포를 분리한 후 표면 분자들과 TLR 분자의 발현을 유세포분석기를 통하여 분석하였다. mIgG 는 동형대조군으로 사용되었다. 실선의 histogram 은 동형대조군을 표시하며, 색깔 있는 histogram 은 각 세포 표면 분자의 발현을 표시한다. 총 4 명의 건강인의 말초혈액에서 분리한 CD14 양성 단핵구로 반복 실험하여 동일한 결과를 얻었으며, 위 그림은 그 중 대표적인 결과를 나타낸다.

건강인의 말초혈액에서 분리한 단핵구를 배양한 후 수상돌기세포로 분화되는지 확인하기 위하여 유세포 분석하였다. 그 결과 단핵구의 표지분자인 CD14의 발현이 소실되고 동시 자극 분자인 CD80과 CD86이 중간 정도로 발현하며 CD83은 발현되지 않고, 부착분자인 CD54가 높게 발현하고 있는 것으로 보아 분화된 세포가 미성숙 수상돌기세포임을 확인하였다(그림 2).

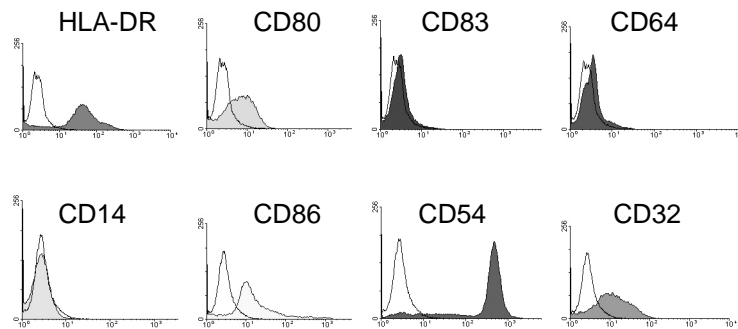
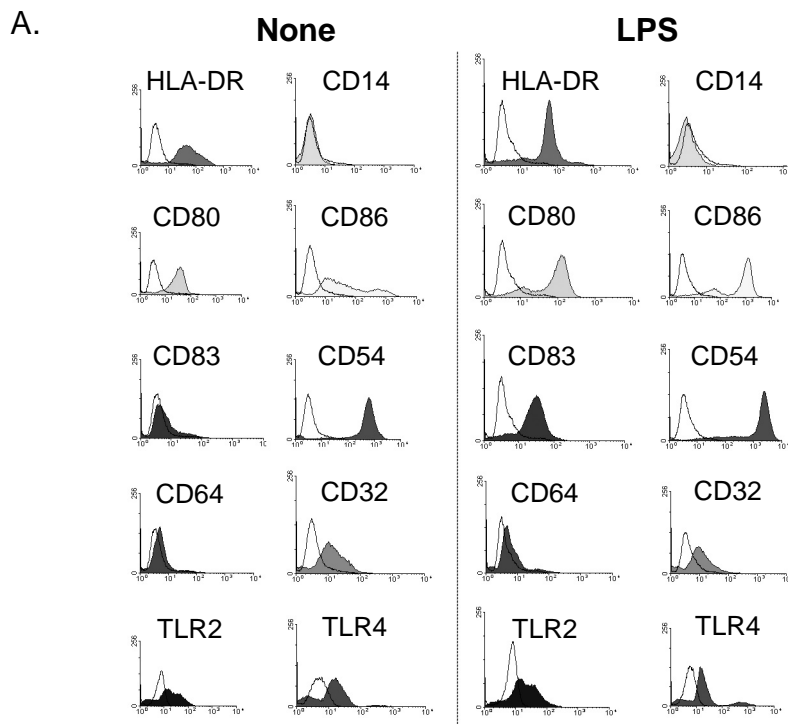


그림 2. 건강인 말초혈액 단핵구에서 유래한 미성숙 수상돌기세포의 세포 표면 분자 발현. 건강인 말초혈액으로부터 분리한 CD14 양성 단핵구를 GM-CSF와 IL-4가 함유된 배양액에서 4일간 배양한 후 세포 표면 분자들의 발현을 유세포 분석하였다. 실선의 histogram은 동형대조군을 표시하며, 색갈 있는 histogram은 각 세포 표면 분자의 발현을 표시한다. 총 3명의 건강인의 말초혈액에서 유래한 수상돌기세포로 반복 실험하여 동일한 결과를 얻었으며, 위 그림은 그 중 대표적인 결과를 나타낸다.

2. 결핵균 항원 및 TLR 리간드의 자극에 의한 수상돌기세포의 성숙도

미성숙 수상돌기세포의 성숙에 결핵균 항원이 미치는 영향을 알아보기 위해, 건강인의 말초혈액 단핵구에서 유래한 수상돌기세포에 LPS와 결핵균 항원으로 자극을 주어 세포 표면 분자의 발현을 관찰하였다. 알려진 TLR4의 리간드인 LPS로 자극을 주었을 때 성숙됨을 나타내는 CD83 분자의 발현이 증가하고 HLA-DR의 발현 또한 증가하여 LPS에 의한 자극이 수상돌기세포를 성숙시켰음을 관찰하였다 (그림 3A). 반면 결핵균 LAM 항원으로 자극을 주었을 경우 세포 표면 분자의 발현 정도에 큰 차이가 없어 수상돌기세포의 성숙을 크게 유도하지 못한 것으로 사료된다 (그림 3B). TLR2와 TLR4 분자의 발현 정도는 수상돌기세포의 성숙도에 따라 큰 차이를 관찰할 수 없었다 (그림 3A, B).



B.

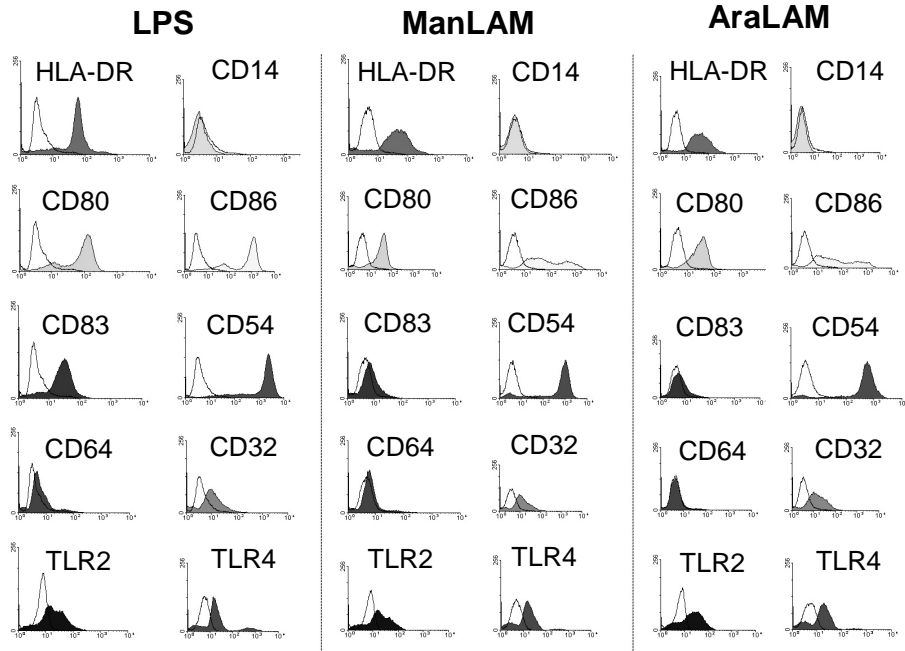


그림 3. LPS 및 결핵균 LAM 항원 자극에 의한 수상돌기세포의 성숙. (A) 건강인 말초혈액으로부터 분리한 CD14 양성 단핵구를 GM-CSF와 IL-4가 함유된 배양액에서 4일간 배양한 후 배양액만(None) 또는 50 ng/mL의 LPS(LPS)를 첨가하여 48시간 더 배양한 뒤 각각의 수상돌기세포의 표면 분자 발현을 유세포 분석하였다. (B) 건강인 말초혈액 단핵구 유래의 미성숙 수상돌기세포에 10 µg/mL의 결핵균 LAM 항원(ManLAM, AraLAM)을 각각 첨가하여 48시간 더 배양한 뒤 각각의 수상돌기세포의 표면 분자 발현을 유세포 분석하였다. LPS로 자극한 수상돌기세포는 양성대조군으로 사용되었다. 실선의 histogram은 동형대조군을 표시하며, 색깔 있는 histogram은 각 세포 표면 분자의 발현을 표시한다. 총 3명의 건강인의 말초혈액에서 유래한 수상돌기세포로 반복 실험하여 동일한 결과를 얻었으며, 위 그림은 그 중 대표적인 결과를 나타낸다.

TLR4의 리간드인 LPS 이외에 다른 TLR 리간드로도 수상돌기세포의 성숙이 유도되는지를 알아보기 위해 알려진 TLR의 리간드로서 TLR2의 리간드인 Pam3cys나 TLR3의 리간드인 poly(I:C)로 건강인 말초혈액 단핵구 유래의 수상돌기세포를 자극하였다. Pam3cys나 poly(I:C)로 자극을 주었을 때는 세포 표면 분자의 표현형에 큰 변화를 관찰할 수 없었다(그림 4).

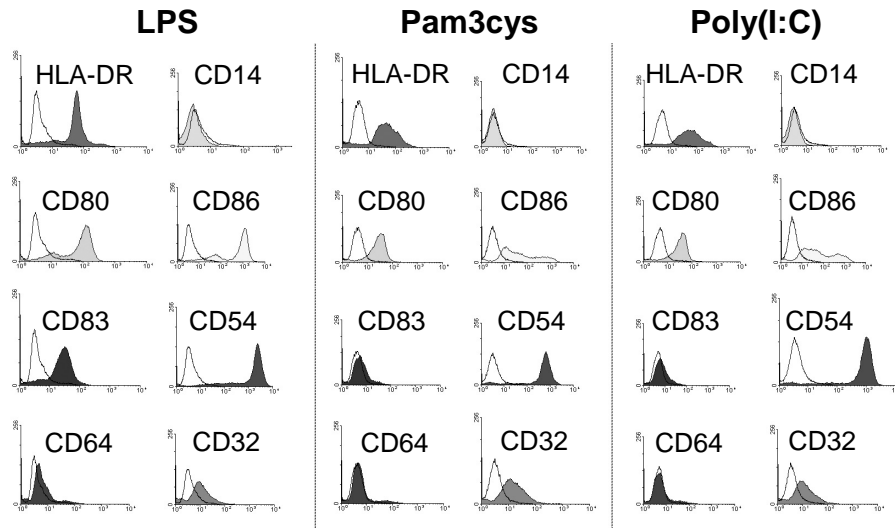


그림 4. TLR 리간드 자극에 의한 수상돌기세포의 성숙. 건강인 말초혈액으로부터 분리한 CD14 양성 단핵구를 GM-CSF와 IL-4가 함유된 배양액에서 4일간 배양한 후 미성숙 상태의 수상돌기세포에 20 µg/mL의 알려진 TLR2 리간드인 Pam3Cys, 50 µg/mL의 TLR3 리간드인 Poly(I:C), TLR4 리간드인 LPS 50 ng/mL를 첨가하여 48시간 더 배양한 뒤 각각 수상돌기세포의 표면 분자 발현을 유세포 분석하였다. 실선의 histogram은 동형대조군을 표시하며, 색깔 있는 histogram은 각 세포 표면 분자의 발현을 표시한다. 총 3명의 건강인의 말초혈액에서 유래한 수상돌기세포로 반복 실험하여 동일한 결과를 얻었으며, 위 그림은 그 중 대표적인 결과를 나타낸다.

결핵균 LAM 항원 이외에 결핵균으로부터 분리하여 정제한 결핵균의 여러 종류의 단백질 항원으로 자극을 주었을 때에도 수상돌기세포의 성숙을 크게 유도하지 못하였다 (그림 5).

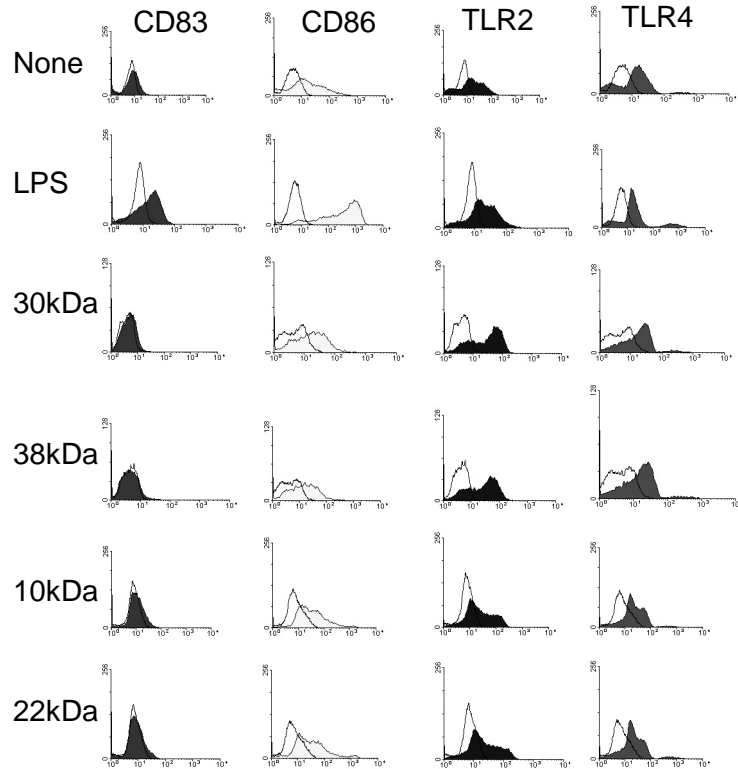


그림 5. 결핵균 단백질 항원 자극에 의한 수상돌기세포의 성숙. 건강인 말초혈액으로부터 분리한 CD14 양성 단백구를 GM-CSF와 IL-4가 함유된 배양액에서 4일간 배양한 후 배양액만(None) 또는 LPS 50 ng/mL(LPS), 결핵균 단백질 항원 각각 10 µg/mL(30 kDa, 38 kDa, 10 kDa, 22 kDa)을 첨가하여 48시간 더 배양한 뒤 각각 수상돌기세포의 표면 분자 발현을 유세포 분석하였다. LPS로 자극한 수상돌기세포는 양성대조군으로 사용되었다. 실선의 histogram은 동형대조군을 표시하며, 색깔 있는 histogram은 각 세포 표면 분자의 발현을 표시한다. 총 3명의 건강인의 말초혈액에서 유래한 수상돌기세

포로 반복 실험하여 동일한 결과를 얻었으며, 위 그림은 그 중 대표적인 결과를 나타낸다.

3. 결핵균 항원 자극에 의한 수상돌기세포의 싸이토카인 생성과 MAP kinase 활성화

결핵균 항원자극에 의해 수상돌기세포의 기능과 세포 내 신호전달에 미치는 영향을 알아보기 위하여 싸이토카인 생성과 MAP kinase 활성화를 관찰하였다. 건강인의 말초혈액 단핵구에서 유래한 수상돌기세포에 LPS와 결핵균 항원으로 자극을 주었을 때 수상돌기세포가 생성하는 싸이토카인의 분비 정도를 효소결합면역흡착검사(ELISA)를 통하여 관찰하였다. 알려진 TLR4의 리간드인 LPS로 자극을 주었을 때는 IL-6, IL-10, TNF의 생성이 자극을 주지 않은 경우에 비하여 모두 크게 증가하였으나 정제 결핵균 항원인 LAM 항원이나 단백질 항원(30 kDa, 38 kDa, 10 kDa, 22 kDa)으로 자극을 주었을 때는 전반적으로 싸이토카인의 생성이 유도되지 않았다. 특히 AraLAM 항원으로 자극하였을 때 싸이토카인 생성이 전혀 유도되지 않았거나 극히 낮았으며, 반면 30 kDa 단백질 항원으로 자극하였을 때는 IL-12p40의 생성이 유도되었다(그림 6). 합성 결핵균의 단백질 항원으로 자극을 주었을 때에는 IL-6의 생성이 6 kDa, 16 kDa, Ag85A 항원에 의해 크게 유도되었으며 특히 16 kDa 항원에 의해서는 IL-12p40과 TNF의 생성 또한 크게 증가하였다. 항염증성 싸이토카인으로 알려진 IL-10 또한 16 kDa 항원에 의해 생성이 크게 유도되었다(그림 7).

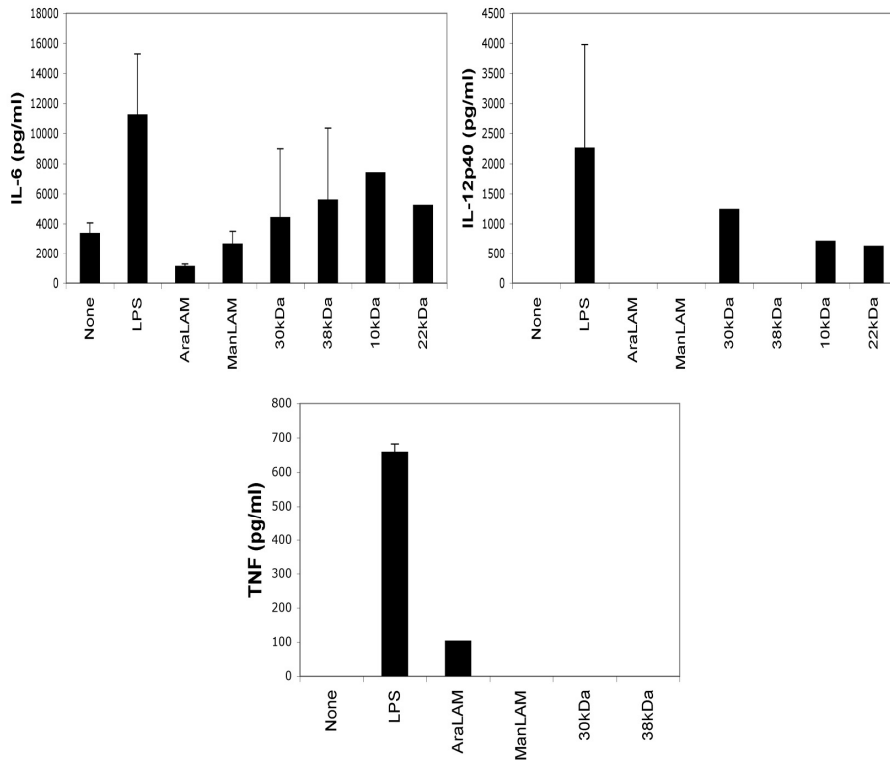


그림 6. 정제 결핵균 LAM 항원과 단백질 항원 자극에 의한 수상돌기세포의 사이토카인 생성 변화. 건강인 말초혈액으로부터 분리한 CD14 양성 단핵구를 GM-CSF와 IL-4가 함유된 배양액에서 4일간 배양하여 생성한 미성숙 수상돌기세포에 배양액만(None), 50 ng/mL LPS(LPS), 10 µg/mL의 정제 결핵균 LAM 항원(AraLAM, ManLAM), 10 µg/mL의 단백질 항원(30 kDa, 38 kDa, 10 kDa, 22 kDa)을 첨가하여 48시간 더 배양한 뒤 각각의 수상돌기세포의 사이토카인 생성을 효소결합면역흡착검사(ELISA)로 분석하였다. LPS로 자극한 수상돌기세포는 양성 대조군으로 사용되었다. 총 3명의 건강인의 말초혈액에서 유래한 수상돌기세포로 반복 실험하여 동일한 결과를 얻었으며, 위 그림은 3번 반복한 결과의 평균값을 나타낸다.

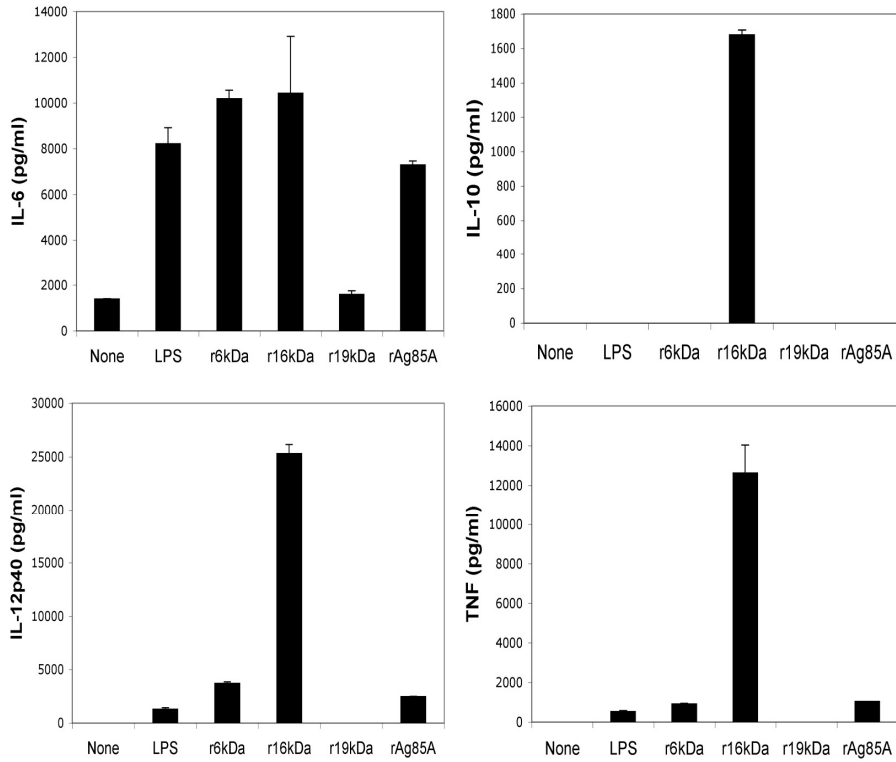


그림 7. 합성 결핵균 단백질 항원 자극에 의한 수상돌기세포의 사이토카인 생성 변화. 건강한 말초혈액으로부터 분리한 CD14 양성 단핵구를 GM-CSF와 IL-4가 함유된 배양액에서 4일간 배양하여 생성한 미성숙 수상돌기세포에 배양액만(None), 50 ng/mL LPS(LPS), 10 µg/mL의 합성 결핵균 단백질 항원(r6 kDa, r16 kDa, r19 kDa, rAg85A)을 첨가하여 48시간 더 배양한 뒤 각각의 수상돌기세포의 사이토카인 생성을 효소결합면역흡착검사(ELISA)로 분석하였다. LPS로 자극한 수상돌기세포는 양성 대조군으로 사용되었다. 총 3명의 건강한 말초혈액에서 유래한 수상돌기세포로 반복 실험하여 동일한 결과를 얻었으며, 위 그림은 그 중 대표적인 결과를 나타낸다.

건강인의 말초혈액 단핵구에서 유래한 수상돌기세포에 LPS 와 결핵균 항원으로 자극을 주었을 때 MAP kinase 활성화를 알아보기 위하여 LPS 와 정제 결핵균 LAM 항원, 단백질 항원과 합성한 결핵균 단백질 항원을 30 분간 처리 후 단백을 분리하여 Western blot 을 시행하였다. LPS 로 자극을 주었을 때는 ERK, JNK, p38 MAPK 가 모두 활성화되었다. 정제 결핵균 AraLAM 항원으로 자극하였을 때는 ERK 와 JNK 인산화가 아무것도 처리하지 않은 수상돌기세포에 비해 오히려 감소되었으며, p38 MAPK 인산화는 증가되었다 (그림 8). 정제 단백질 30 kDa 항원으로 자극하였을 때는 JNK 와 p38 MAPK 활성화가 일어남을 관찰할 수 있었으며 (그림 9), 합성 결핵균 단백질 항원의 경우 16 kDa 와 Ag85A 항원에 의해 JNK 와 p38 MAPK 가 활성화되었다 (그림 10).

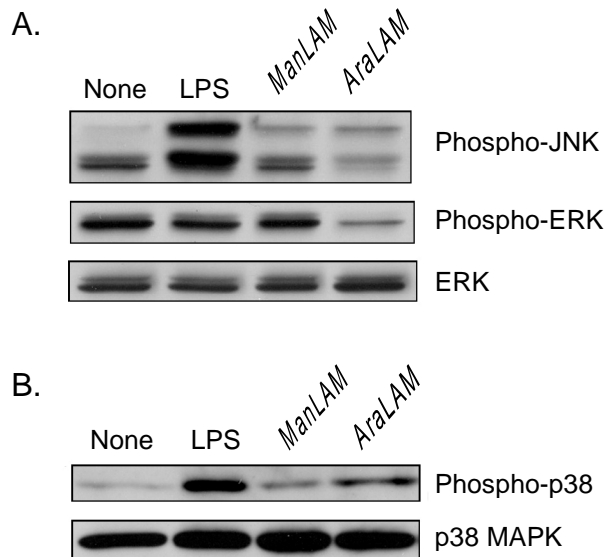


그림 8. 정제 결핵균 LAM 항원 자극에 의한 수상돌기세포에서의 MAP kinase 활성화. 건강인 말초혈액으로부터 유래한 미성숙 수상돌기세포를 1% FBS-RPMI 로 하룻밤 동안 fasting 시킨 후 배양액만(None), 50 ng/mL 의 LPS(LPS), 10 µg/mL 의 정제 결핵균 LAM 항원(ManLAM, AraLAM)으로 30

분 동안 처리, 단백질을 분리하여 (A) ERK, JNK, (B) p38 MAPK 각각에 대한 인산화 특이 항체로 Western blot 을 수행하였다. 동량의 단백질에서 검출한 것을 확인하기 위해 (A) ERK, (B) p38 MAPK 에 대한 특이 항체로 검출하였다. LPS 로 자극한 수상돌기세포는 양성대조군으로 사용되었다. 총 3 명의 건강인의 말초혈액에서 유래한 수상돌기세포로 반복 실험하여 동일한 결과를 얻었으며, 위 그림은 그 중 대표적인 결과를 나타낸다.

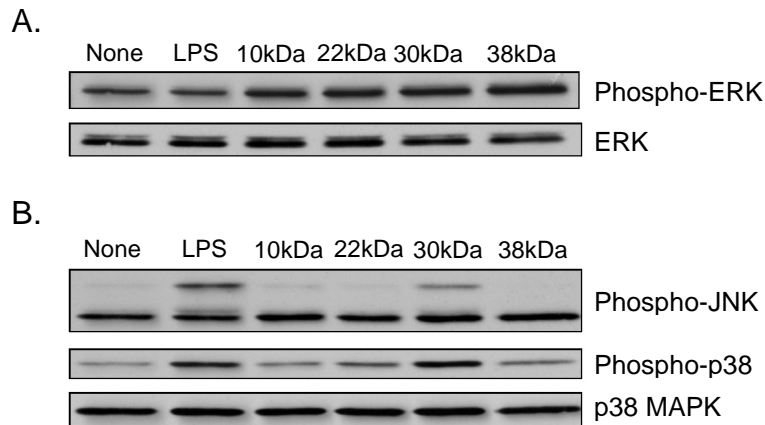


그림 9. 정제 결핵균 단백질 항원 자극에 의한 수상돌기세포에서의 MAP kinase 활성화. 건강인 말초혈액으로부터 유래한 미성숙 수상돌기세포를 1% FBS-RPMI 로 하룻밤 동안 fasting 시킨 후 배양액만(None), 50 ng/mL 의 LPS(LPS), 10 μ g/mL 의 정제 결핵균 단백질 항원(30k Da, 38 kDa, 10 kDa, 22 kDa)으로 30 분 동안 처리, 단백질을 분리하여 (A) ERK, (B) JNK, p38 MAPK 각각에 대한 인산화 특이 항체로 Western blot 을 수행하였다. 동량의 단백질에서 검출한 것을 확인하기 위해 (A) ERK, (B) p38 MAPK 에 대한 특이 항체로 검출하였다. LPS 로 자극한 수상돌기세포는 양성대조군으로 사용되었다. 총 3 명의 건강인의 말초혈액에서 유래한 수상돌기세포로 반복 실험하여 동일한 결과를 얻었으며, 위 그림은 그 중 대표적인 결과를 나타낸다.

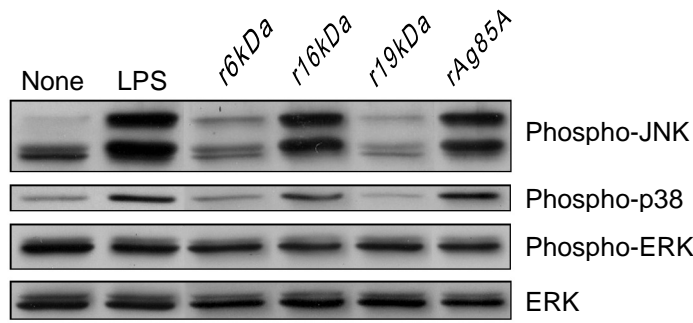


그림 10. 합성 결핵균 단백질 항원 자극에 의한 수상돌기세포에서의 MAP kinase 활성화. 건강인 말초혈액으로부터 유래한 미성숙 수상돌기세포를 1% FBS-RPMI 로 하룻밤 동안 fasting 시킨 후 배양액만(None), 50 ng/mL 의 LPS(LPS), 10 µg/mL 의 합성 결핵균 단백질 항원(r6 kDa, r16 kDa, r19 kDa, rAg85A)을 30 분 동안 처리한 후 단백질을 분리하여 ERK, JNK, p38 MAPK 각각에 대한 인산화 특이 항체로 Western blot 을 수행하였다. 동량의 단백질에서 검출한 것을 확인하기 위해 ERK, p38 MAPK 에 대한 특이 항체로 검출하였다. LPS 로 자극한 수상돌기세포는 양성대조군으로 사용되었다. 총 3 명의 건강인의 말초혈액에서 유래한 수상돌기세포로 반복 실험하여 동일한 결과를 얻었으며, 위 그림은 그 중 대표적인 결과를 나타낸다.

4. 결핵균 LAM 항원 전처리에 의한 수상돌기세포에서의 LPS 에 의해 유도되는 성숙에 미치는 영향

수상돌기세포가 결핵균에 의해 장기간 노출된 이후 LPS 에 의한 자극에 성숙과정에 있어 어떻게 반응하는지를 알아보기 위해 결핵균 항원 전처리 실험을 수행하였다. 건강인 말초혈액 단핵구로부터 유래한 미성숙 수상돌기세포에 결핵균 LAM 항원으로 18 시간 전처리한 후 LPS 로 48 시간 동안 자극하여, 결핵균 항원의 전처리가 LPS 에 의해서 유도되는 미성숙 수상

돌기세포의 성숙에 미치는 영향을 관찰하였다. LPS 단독으로 처리한 경우에 비해 결핵균 AraLAM 항원으로 전처리를 한 경우 동시발현분자인 CD86과 CD83의 발현이 감소하였다. 그 외 다른 세포표면 분자들의 발현 정도는 큰 차이가 없었다. ManLAM 항원으로 전처리를 한 경우에는 동시발현분자인 CD86과 CD83의 발현이 더 증가하는 양상을 보였다(그림 11).

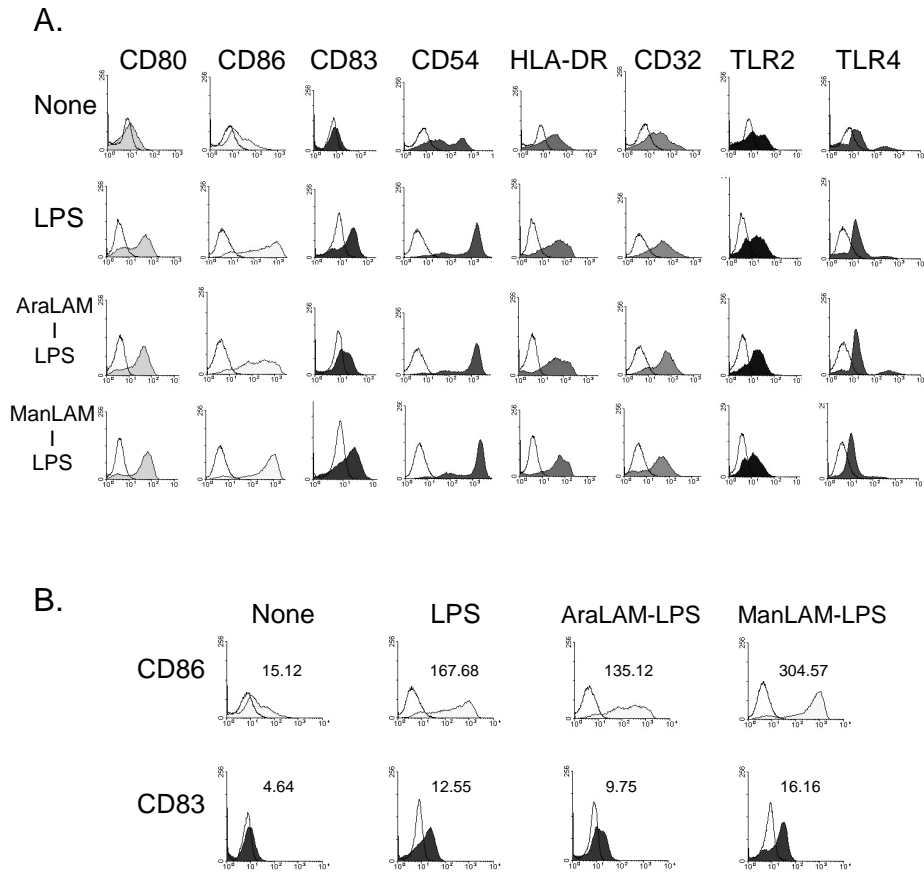


그림 11. 결핵균 LAM 항원 전처리가 수상돌기세포에서 LPS에 의해 유도되는 성숙에 미치는 영향. 건강인의 말초혈액 단핵구에서 유래한 미성숙 수상돌기세포에 결핵균 LAM 항원을 10 µg/mL으로 18시간 동안 처리한 후 50 ng/mL의 LPS를 첨가하여 48시간 동안 더 배양하였다. 그 후, 유세포 분석하여 세포 표면 분자들의 발현을 조사하였다. LPS로 자극한 수상돌기세포

는 대조군으로 사용되었다. 실선의 histogram 은 동형대조군을 표시하며, 색깔 있는 histogram 은 각 세포 표면 분자의 발현을 나타낸다. 총 3 명의 건강인의 말초혈액에서 유래한 수상돌기세포로 반복 실험하여 동일한 결과를 얻었으며, 위 그림은 그 중 대표적인 결과를 나타낸다.

5. 결핵균 LAM 항원 전처리가 수상돌기세포에서의 LPS 에 의해 유도되는 싸이토카인의 생성과 MAP kinase 활성화에 미치는 영향

결핵균 항원에 장기간 노출된 수상돌기세포가 이후의 LPS 자극이 있을 때 기능과 세포내 신호전달에 있어 어떻게 반응하는지 알아보기 위하여 다음과 같이 실험하였다. 건강인 말초혈액 단핵구로부터 유래한 미성숙 수상돌기세포에 결핵균 LAM 항원으로 18 시간 전처리한 후 LPS 를 첨가하여 48 시간 동안 더 배양하여 결핵균 항원의 전처리가 LPS 에 의해서 유도되는 미성숙 수상돌기세포의 싸이토카인 생성에 미치는 영향을 효소결합면역흡착검사를 통해 관찰하였다. 결핵균 AraLAM 항원으로 전처리 하였을 경우, LPS 에 의해 생성이 유도되는 싸이토카인인 IL-6, IL-12p40, TNF 가 감소되는 경향을 관찰할 수 있었다. 반면 ManLAM 항원으로 전처리 하였을 경우 LPS 에 의해 생성이 유도되는 싸이토카인의 생성이 유지되거나(IL-6, IL-12p40) 증가하였다(TNF) (그림 12).

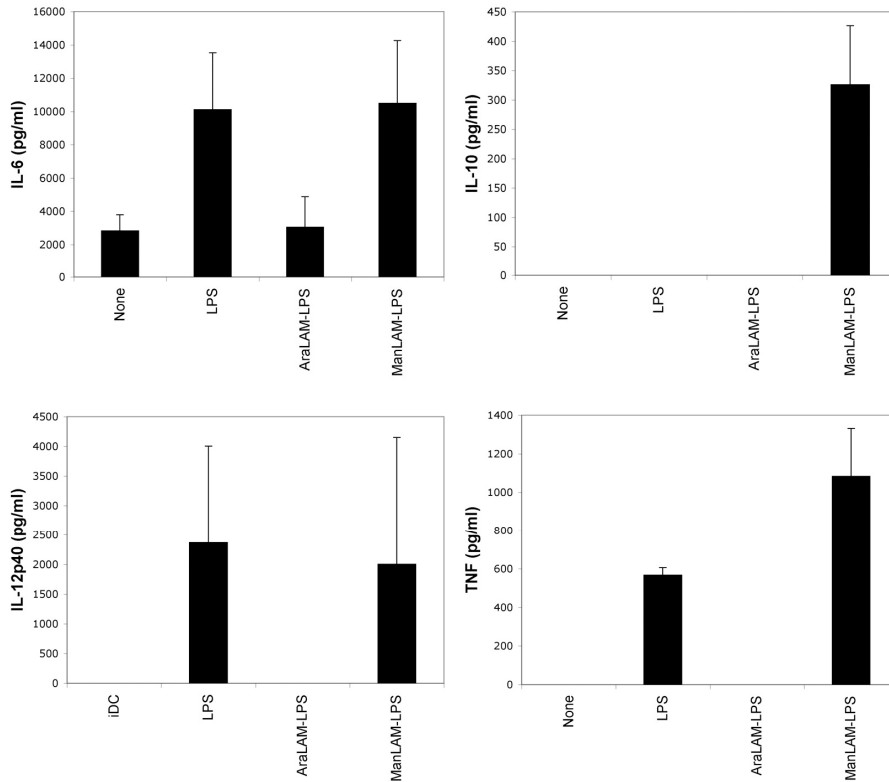


그림 12. 결핵균 LAM 항원 전처리에 의한 수상돌기세포에서 LPS 에 의해 유도되는 사이토카인 생성의 변화. 건강인의 말초혈액 단핵구에서 유래한 미성숙 수상돌기세포에 결핵균 LAM 항원을 10 $\mu\text{g/mL}$ 으로 18 시간 동안 처리한 후 50 ng/mL 의 LPS 를 첨가하여 48 시간 동안 더 배양하였다. 그 후, 효소 결합면역흡착검사를 통해 사이토카인의 생성을 측정하였다. LPS 로만 자극한 수상돌기세포는 대조군으로 사용되었다. 총 3 명의 건강인의 말초혈액에서 유래한 수상돌기세포로 반복 실험하여 동일한 결과를 얻었으며, 위 그림은 3 번 반복한 결과의 평균값을 나타낸다.

결핵균 LAM 항원 전처리가 수상돌기세포에서의 MAP kinase 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 건강인의 말초혈액 단핵구로부터 유래한 미성숙 수상돌기세포에 결핵균 LAM 항원으로 18 시간 전처리한 후 LPS

로 30 분간 자극한 다음 단백질을 분리하여 Western blot 을 시행하였다. AraLAM 항원으로 전처리한 경우 p38 MAPK 인산화가 LPS 단독으로 처리하였을 때보다 감소한 것을 관찰할 수 있었으며 ManLAM 항원으로 전처리한 경우 큰 변화를 관찰할 수 없었다 (그림 13).

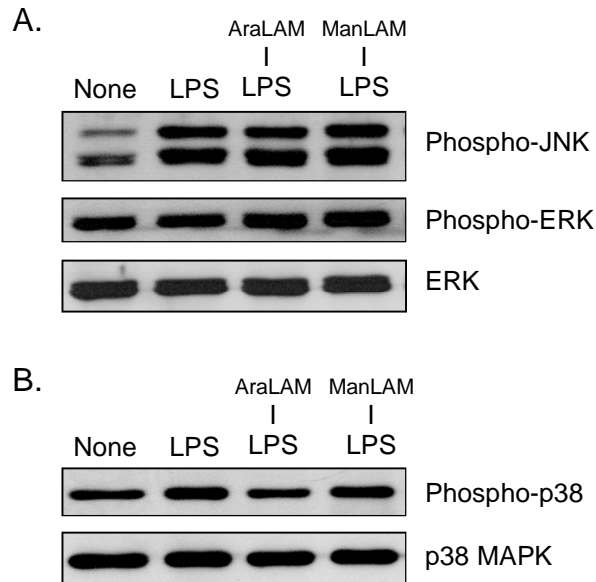


그림 13. 결핵균 LAM 항원 전처리가 수상돌기세포에서 LPS에 의해 유도되는 MAP kinase 활성화에 미치는 영향. 건강인의 말초혈액 단핵구에서 유래한 미성숙 수상돌기세포에 결핵균 LAM 항원을 10 µg/mL로 24 시간 동안 처리한 후 1% FBS-RPMI로 하룻밤 동안 fasting 시켰다. 그 후 50 ng/mL의 LPS로 30 분간 자극하여 단백질을 분리한 후 (A) ERK, JNK, (B) p38 MAPK에 대한 인산화 특이 항체로 Western blot을 수행하였다. 동량의 단백질을 확인하기 위한 internal control로 (A) ERK, (B) p38 MAPK에 대한 특이 항체로 Western blot을 수행하였다. LPS로 자극한 수상돌기세포는 대조군으로 사용되었다. 총 3명의 건강인의 말초혈액에서 유래한 수상돌기세포로 반복 실험하여 동일한 결과를 얻었으며, 위 그림은 그 중 대표적인 결과를 나타낸다.

IV. 고찰

수상돌기세포는 전문적인 항원전달세포로 그 성숙에 있어서 두 상태로 존재한다⁷⁴. 미성숙 상태에서 수상돌기세포는 온몸의 비림프기관에 퍼져 감시 역할을 하게 되며, 항원을 잡고 공정(*processing*)하여 이차 림프기관의 T-의존(T-dependent) 지역으로 이동하게 된다. 이러한 성숙화 과정 중에 미성숙 수상돌기세포는 항원을 잡는 능력을 잃게 되고 항원전달 기능과 동시자극 기능이 증가되는 성숙한 수상돌기세포가 되어서 이 지역을 순환하고 있는 T 세포를 활성화시킨다^{75,76}. 미성숙 수상돌기세포의 항원전달 능력을 연구하고, 다른 항원 전달 세포와 항원 전달 능력을 비교하고, 항원을 잡고 전달하는 능력을 조절하는 신호를 알아내기 위해서 *in vitro*에서 미성숙 수상돌기세포를 배양하는 방법을 정립하는 것이 중요하며, 최근 들어 GM-CSF와 IL-4 를 이용하여 사람의 말초혈액 단핵구로부터 미성숙 수상돌기세포를 생성하는 방법이 널리 사용되고 있다²⁴.

본 연구에서는 결핵균 항원이 숙주의 수상돌기세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 건강인 말초혈액에서 분리한 단핵구에서 수상돌기세포를 배양하였으며, 표현형을 통해 미성숙 수상돌기세포로 분화되었음을 확인하였다.

병원체 산물에 의해 수상돌기세포의 성숙화 과정이 유도되어 침입한 병원체에 대한 면역 반응이 일어난다. 세균 산물과 수상돌기세포와의 연관성에 대한 일련의 연구결과들은 병원체에서 유래한 LPS 및 살아있는 세균에 의해 수상돌기세포가 성숙되면서 MHC class II, CD80, CD40, CD54 및 CD58 등 다수의 세포 표면 분자들이 증가되는 반면, CD14, CD32 분자의 발현 및 세포 내 이입능력은 감소한다고 보고하고 있다²⁴.

결핵균의 세포벽은 숙주의 세포막과 특이적인 결합을 하는 다양한 지방 성분 및 당지질을 포함하고 있으며 이들 중 일부는 단핵구, 대식세포 및 수상돌기세포의 다양한 기능 및 표현형 특성을 억제하여 결핵균이 숙주

의 면역계를 피해 나갈 수 있게 한다^{77,78,79}. 결핵 항원 중 19 kDa 지질단백은 T세포 반응을 유도하는 항원 결정 인자로 알려져 있으며 IFN- γ , IL-4 및 IL-10 등의 사이토카인 생성을 유도하고⁸⁰, MHC class II 분자의 항원전달을 억제한다⁸¹. 지금까지의 *in vitro* 실험결과는 결핵균의 지질단백항원이 TLR2를 매개하여 세포 활성화, 결핵균 사멸 및 세포고사를 유도하는 것으로 보고하고 있다. PILAM 또는 AraLAM, 19 kDa 지질단백 항원이나 결핵균에서 분리되는 용해성 결핵 요소 (soluble tuberculosis factor: STF)에 포함된 6 kDa의 phosphatidylinositol dimannoside (PIM) 등도 TLR2를 통해 세포를 활성화시킨다⁸². 반면 TLR4 신호전달이 결여된 C3H/HeJ 마우스에 살아있는 결핵균을 감염시키면 대식세포가 동원되지 않고 결핵균에 대한 염증성 반응이 일어나지 않아 만성감염증으로 발전할 수 있다는 연구결과를 통해 TLR4 분자도 결핵 면역반응에 중요할 것으로 제시되었으나⁸³, 아직까지 결핵항원 중 어떤 성분이 TLR4와 반응하는지는 확실하지 않다. 이는 결핵균 항원이 TLR을 통해 숙주의 수상돌기세포 성숙화 및 항원전달 기능에 변화를 유발하여 숙주의 적응 면역 형태를 결정할 수 있음을 의미한다.

세포벽 당지질인 lipoarabinomannan (LAM)은 숙주의 면역 반응에 영향을 끼칠 수 있는 많은 결핵균 산물 중 하나이다. LAM은 만노스 (mannose)가 풍부한 핵심 다당질로 이루어져 있으며, 높게 지분쇄되어 있는 arabinofuranosyl 연쇄를 가지고 있다. 병원성의 *M. tuberculosis*와 *M. bovis* BCG로부터 분리한 LAM은 비병원성의 arabinofuranosyl 종말기가 만노스 잔기로 덮여 있는 반면(ManLAM), 빠르게 자라는 비병원성의 결핵균으로부터 분리한 LAM은 arabinofuranosyl 종말기가 만노스로 덮여있지 않다 (AraLAM)^{84,85}. 말단에 만노스 잔기가 존재하는지 아닌지가 LAM의 생물학적인 활성도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다⁸⁶.

본 연구에서는 알려진 TLR의 리간드 및 결핵균에서 분리한 LAM 항원이나 단백질 항원이 수상돌기세포의 성숙화에 관여하는지를 알아보고자 건강인 말초혈액 단핵구 유래의 미성숙 수상돌기세포를 알려진 TLR 리간드

및 결핵균 항원으로 자극하고 성숙화에 미치는 영향을 관찰하였다. 건강인 말초혈액 단핵구 유래의 미성숙 수상돌기세포는 TLR4의 리간드로 알려진 LPS에 의해 성숙화되었으나, TLR2의 리간드인 Pam3cys와 TLR3의 리간드인 poly(I:C)에 의해서는 LPS 만큼 강하게 성숙화를 유도하지 못함을 표현형을 통해 관찰할 수 있었다. 결핵균 세포벽의 주요 성분인 LAM 항원이나 단백질 항원으로 미성숙 수상돌기세포를 자극시켰을 경우 LPS로 자극한 것과 비교하였을 때 성숙화를 강하게 유도하지 못하였으며 TLR2와 TLR4 분자의 발현에도 자극 전과 후에 큰 변화가 없었다. 이러한 결과는 각각의 TLR 리간드나 결핵균 항원이 서로 다르게 수상돌기세포의 성숙화에 영향을 미치며, TLR 분자의 발현에는 큰 영향을 미치지 않음을 나타낸다.

TLR은 위험 신호의 인식과 수상돌기세포의 성숙화를 복잡한 다단계 신호전달을 시작함으로써 연결시킨다⁸⁷. TLR은 TLR-IL-1 receptor superfamily로써, 이들 모두는 세포질 내에 Toll-IL-1 receptor (TIR) 영역 (domain)을 가지고 있어서 TIR을 가지고 있는 접합기(adaptor) 분자인 MyD88, TIRAP, TRIF 그리고 TRAM을 불러온다. 이들 접합기 분자는 다른 신호 분자를 불러오게 되는데, 특히 IL-1 receptor-associated kinase complex (IRAK)이 여기에 해당한다. IRAK은 서로 다른 자극제에 따른 수상돌기세포의 성숙에 필요한 TRAF6 단백질을 활성화시킨다⁸⁸. 마우스에서 모든 TLR은 MyD88-IRAK-TRAF6 경로를 통해 신호 전달을 할 수 있는데, 그 결과 전사 인자인 NF- κ B와 mitogen-activated protein (MAP) kinase가 활성화되어 TNF- α , IL-1, IL-6 등의 유전자의 전사를 유도한다. 수상돌기세포의 성숙화는 수상돌기세포가 이후 이어지는 면역 반응의 유형을 결정짓는 사이토카인을 분비하게끔 유도한다. 유도되는 특정한 사이토카인 유형은 성숙화 자극제, 자극되는 수상돌기세포의 유형, 그리고 수상돌기세포의 기원에 따라 결정된다. *Listeria monocytogenes*는 골수성 수상돌기세포(myeloid DC, MDC)에 의한 IL-12의 생성을 유도하는 반면⁸⁹ cholera toxin은 IL-12를 생성하지 않는 성숙 수상돌기세포를 유도한다^{90,91}.

본 연구에서는 건강인 말초혈액 단핵구 유래의 미성숙 수상돌기세포를 정제하거나 합성 결핵균 항원으로 자극한 후, 각각의 자극에 따른 수상돌기세포의 싸이토카인 생성 유형과 MAP kinase 활성화를 알아보기 위하여 미성숙 수상돌기세포를 결핵균 항원으로 자극한 후 싸이토카인의 생성과 MAP kinase의 인산화 변화를 알아보았다. 정제 결핵균 LAM 항원 및 단백질 항원은 전반적으로 싸이토카인의 생성이 낮았으며 특히 AraLAM의 경우 현저하게 낮았다. AraLAM은 ERK와 JNK 활성화 또한 억제하는 것으로 확인되었다. 반면 p38 MAPK는 AraLAM 항원 자극에 의해 강하게 활성화가 유도되었다. 30 kDa 단백질 항원의 경우 IL-12p40의 생성을 유도하였으며, 이는 p38 MAPK와 JNK 인산화를 유도하는 결과와도 일치한다. 합성 결핵균 항원의 경우 16kDa 단백질 항원에 의해 싸이토카인 생성과 MAP kinase 활성화가 가장 강하게 유도되었다. 이러한 결과는 결핵균 항원에 따라 수상돌기세포의 싸이토카인 생성과 MAP kinase 활성화가 서로 다르게 일어난다는 것을 보여주며, 특히 AraLAM 항원의 경우 수상돌기세포의 싸이토카인 생성과 MAP kinase 활성화를 억제할 가능성을 제시하고 있다.

LPS에 의한 단핵구나 대식세포의 과도한 활성화는 사람과 실험 동물에서 높은 사망률을 보이는 내독소 쇼크(endotoxin shock)을 일으킨다. LPS에 먼저 노출이 되면 그 이후의 LPS에 대한 민감도가 감소되는데, 이를 LPS 관용(LPS tolerance)이라 한다^{92,93}. LPS에 의해 먼저 노출된 단핵구나 대식세포를 다시 LPS로 자극하면 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, 그리고 Jun B 유전자 발현이 소실되는 반면 IL-10, IL-1R 길항물질(antagonist), 그리고 TNFR2와 같은 유전자는 변함없이 발현되거나 발현이 증가한다⁹⁴. TLR4 외에도 다른 TLR/IL-1R superfamily와의 결합이 대식세포에서 이후에 일어나는 LPS 노출에 내성을 보이므로, 내독소 관용을 일으키는 것은 LPS에만 국한되어 있지 않다. LPS에 의해 유도되는 NK- κ B DNA 결합, JNK 활성화, 그리고 TNF- α 의 분비가 TLR2 를 통해 신호전달을 하는 마이코플라즈마 지질펩타이드인 macrophage-activation lipopeptide(MALP)-2 에 먼저 노출된 마우스 대식세포

에서 크게 억제되어 있는 것이 관찰되었다⁹³. 또한 다른 TLR2 리간드로 세균 산물인 lipoteichoic acid(LTA)로 먼저 대식세포를 자극한 경우 LPS에 의해 유도되는 TNF- α 의 생성이 억제되었다^{95,96}.

본 연구에서는 결핵균 LAM 항원으로 수상돌기세포를 전처리한 후, 이후의 LPS 자극에 대한 세포활성화를 알아보고자 결핵균 LAM 항원으로 수상돌기세포를 전처리한 이후 LPS로 자극하여 수상돌기세포 표면 분자의 발현과 싸이토카인 생성, MAP kinase 활성화를 관찰하였다. 특히 AraLAM의 경우 TLR2를 경유하여 신호전달이 이루어진다는 것이 알려져 있는 반면⁸² ManLAM은 어떤 TLR을 통해 신호전달이 이루어지는지 아직 잘 밝혀져 있지 않으므로, 이 두 종류의 LAM 항원에 대한 반응이 서로 다르게 나타날 것이라고 기대되었다. 수상돌기세포의 표면 분자 발현을 조사한 결과 AraLAM으로 먼저 처리한 경우 LPS에 의한 수상돌기세포의 성숙화가 감소되는 경향을 관찰할 수 있었으며, 싸이토카인 생성 또한 자극하지 않은 대조군과 같은 정도로 크게 감소되는 것을 관찰하였다. MAP kinase 활성화의 경우 p38 MAPK는 AraLAM으로 먼저 처리한 경우 인산화가 감소되는 것을 관찰하였으나, 다른 MAP kinase는 큰 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과들로 인해 TLR2를 통해 신호전달이 이루어진다고 알려진 AraLAM의 경우 LPS에 의한 이후의 자극을 억제하는 내성을 보인다고 생각된다. 하지만 AraLAM 전처리에 의한 수상돌기세포에서 성숙도를 나타내는 표면 분자들의 발현 감소와 싸이토카인 생성 저해가 AraLAM과 TLR 분자와의 상호 작용에 의한 것인지 아니면 IRAK-M⁹⁷ 등과 같은 다른 TLR 분자 신호전달 체계의 억제조절인자들을 활성화시킴으로써 이루어지는 것인지에 대해서는 더 연구가 이루어져야 할 것이다.

이상의 결과로 LAM 항원에 노출된 수상돌기세포는 이후 LPS에 의한 수상돌기세포의 성숙과 염증성 싸이토카인의 생성, p38 MAPK의 활성이 억제됨을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 결핵균 항원에 장기간 자극 받아 미성숙 수상돌기세포의 성숙화 과정이 제대로 작동하지 않으며, 이런 과정

이 TLR 분자와의 상호작용에 의한 결과일 가능성을 제시한다. 이를 통해 본 연구에서는 결핵균 항원이 숙주의 병원체 감염에 대한 면역 방어기전을 억제할 가능성이 있음을 시사한다.

V. 결론

건강인의 말초혈액 단핵구에서 배양한 수상돌기세포를 결핵균 항원으로 자극하여 수상돌기세포의 성숙과정에 따른 표현형 특성 및 기능과 세포 내 신호전달과정의 변화를 관찰하고, 그에 따른 TLR 분자의 발현에 미치는 영향을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 건강인의 말초혈액 단핵구에서 유래한 수상돌기세포의 표면 분자 발현을 분석한 결과 CD14 분자의 발현이 소실되고 HLA-DR, CD80, CD86, CD54 분자들이 발현되어 수상돌기세포로 분화되었음을 확인하였다.
2. 건강인의 말초혈액 단핵구에서 유래한 미성숙 수상돌기세포를 LPS 로 자극하면 HLA-DR, CD80, CD86, CD83 의 발현이 증가되어 성숙한 수상돌기세포의 표현형 특징을 보였다.
3. 건강인의 말초혈액 단핵구와 단핵구에서 유래한 미성숙 수상돌기세포, 그리고 미성숙 수상돌기세포를 LPS 나 결핵균 LAM 항원 및 단백질 항원으로 자극하였을 때 TLR2 와 TLR4 분자의 발현은 모두 중간 정도로 관찰되었다.
4. 결핵균 항원으로 건강인 말초혈액 단핵구 유래의 미성숙 수상돌기세포를 자극하였을 때 전반적으로 싸이토카인의 생성을 크게 유도하지는 못하였으며, 특히 AraLAM 항원의 경우 싸이토카인 생성을 가장 유도하지 못하였다. 반면 30 kDa 단백질 항원의 경우 IL-6 와 IL-12p40 의 생성을 유도하였다. 합성 결핵균 항원의 경우, 16 kDa 항원이 가장 강하게 싸이토카인 생성을 유도하였다.

5. 결핵균 항원으로 건강인 말초혈액 단핵구 유래의 미성숙 수상돌기세포를 자극하였을 때 MAP kinase 활성화 변화를 관찰한 결과, AraLAM 항원으로 자극한 경우 ERK 와 JNK 활성화가 억제된 반면 p38 MAPK 는 활성화가 유도되었다. 합성 결핵균 항원의 경우 16 kDa 항원과 Ag85A 항원에 의해 JNK 와 p38 MAPK 활성화가 유도되었다.

6. 결핵균 AraLAM 항원으로 먼저 처리한 미성숙 수상돌기세포의 경우, 이후의 LPS 자극에 의해 발현되는 성숙도를 나타내는 세포 표면 분자인 CD83 과 CD86 의 발현을 감소시키는 것이 관찰되었다.

7. 결핵균 AraLAM 항원으로 먼저 자극한 미성숙 수상돌기세포의 경우, 이후 LPS 자극에 의해 유도되는 싸이토카인 생성이 현저하게 감소되었으며 p38 MAPK 의 인산화도 감소되었다.

이상의 결과로 LAM 항원에 노출된 수상돌기세포는 이후 LPS 에 의한 수상돌기세포의 성숙과 염증성 시토카인의 생성, p38 MAPK 의 활성화가 억제됨을 확인하였다. 본 연구 결과는 폐결핵환자는 잠복 기간에 결핵균 항원에 장기간 자극 받아 미성숙 수상돌기세포의 성숙화 과정이 제대로 작동하지 않으며, 이런 과정이 TLR 분자와의 상호작용에 의한 결과일 가능성을 보이고, 결과적으로 숙주의 병원체 감염에 대한 면역 방어기전을 억제할 가능성이 있음을 제시한다.

VI. 참고문헌

1. World Health Organization. Tuberculosis. Fact sheet number 104. 2004
<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>.
2. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet* 2003;362:887-899.
3. Flynn JL, Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis, Edinburgh* 2004;84:93-101.
4. Cooper AM, Kipnis A, Turner J, Magram J, Ferrante J, Orme IM, Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J Immunol* 2002;168:1322-1327.
5. Ehlers S, Holscher C, Scheu S, Tertilt C, Hehlhans T, Suwinski J, Endres R, Pfeffer K. The lymphotoxin beta receptor is critically involved in controlling infections with the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 2003;170:5210-5218.
6. Holscher C, Atkinson RA, Arendse B, Brown N, Myburgh E, Alber G, Brombacher F. A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection. *J Immunol* 2001;167:6957-6966.
7. Lazarevic V, Myers AJ, Scanga CA, Flynn JL. CD40, but not CD40L, is required for the optimal priming of T cells and control of aerosol *M. tuberculosis* infection. *Immunity* 2003;19:823-835.

8. Roach DR, Briscoe H, Saunders B, France MP, Riminton S, Britton WJ. Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J Exp Med* 2001;193:239-246.
9. Roach DR, Briscoe H, Baumgart K, Rathjen DA, Britton WJ. Tumor necrosis factor (TNF) and a TNF-mimetic peptide modulate the granulomatous response to *Mycobacterium bovis* BCG infection in vivo. *Infect Immun* 1999;67:5473-5476.
10. Garcia I, Guler R, Vesin D, Olleros ML, Vassalli P, Chvatchko Y, Jacobs M, Ryffel B. Lethal *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin infection in nitric oxide synthase 2-deficient mice: cellmediated immunity requires nitric oxide synthase 2. *Lab Invest* 2000;80:1385-1397.
11. Jacobs M, Marino MW, Brown N, Abel B, Bekker LG, Quesniaux VJ, Fick L, Ryffel B. Correction of defective host response to *Mycobacterium bovis* BCG infection in TNF-deficient mice by bone marrow transplantation. *Lab Invest* 2000;80:901-914.
12. Flynn JL, Chan J. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr Opin Immunol* 2003;15:450-455.
13. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93-129.
14. Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003;15:5-11.
15. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252.

16. Prigozy TI, Sieling PA, Clemens D, Stewart PL, Porcelli SA, Brenner MB, et al. The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity* 1997;6:187-197.
17. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 2001;194:769-779.
18. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000;191:411-416.
19. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997;9:10-16.
20. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001;106:255-258.
21. Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001;106:263-266.
22. Lanzavecchia A, Sallusto F. The instructive role of dendritic cells on T cell response: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol* 2001;13:291-298.
23. Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte response: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 2000;290:92-97.
24. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage

colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-1118.

25. Zhou L-J, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2588-2592.
26. Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 1998;160:4587-4595.
27. Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol* 1997;27:431-441.
28. Reis e Sousa C, Sher A, Kaye P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr Opin Immunol* 1999;11:392-399.
29. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182:389-400.
30. Cella M., Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996;184:747-752.
31. Salio M, Cerundolo V, Lanzavecchia A. Dendritic cell maturation is

induced by mycoplasma infection but not by necrotic cells. Eur J Immunol 2000;30:705-708.

32. Kolb-Maurer A, Gentschev I, Fries HW, Fiedler F, Brocker EB, Kampgen E, Goebel W. *Listeria monocytogenes*-infected human dendritic cells: uptake and host cell response. Infect Immun 2000;68:3680-3688.
33. Marovich MA, McDowell MA, Thomas EK, Nutman TB. IL-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. J Immunol 2000;164:5858-5865.
34. Doherty TM, Arditi M. TB, or not TB: that is the question - does TLR signaling hold the answer? J Clin Invest 2004;14:1699-1703.
35. Pulendran B. Variagation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. J Immunol 2005;173: 2457-2465.
36. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. Mol Cell 1998;2:253-258.
37. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 1997;388:394-397.
38. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 2002;20:197-216.
39. Medzhitov R., Janeway Ca, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunol Rev 2000;173:89-97.

40. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-376.
41. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;2:675-680.
42. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499-511.
43. Heine H, Kirschning CJ, Lien E, Monks BG, Rothe M, Goldenbock DT. Cutting edge: cells that carry a null allele for Toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. *J Immunol* 1999;162:6971-6975.
44. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-2088.
45. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999;11:443-451.
46. Faure E, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ, et al. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through Toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000;275:11058-11063.
47. Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, et al. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of

Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin: involvement of Toll-like receptors. *Infect Immun* 2000;68:6883-6890.

48. Hertz CJ, Kiertcher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, et al. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 2001;166:2444-2450.
49. Bauer M, Redecke V, Ellwart JW, Scherer B, Kremer JP, Wagner H, et al. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol* 2001;166:5000-5007.
50. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999;285:736-739.
51. Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, et al. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 2001;291:1544-1547.
52. Underhill DM, Ozinsky A., Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14459-14463.
53. Gilleron M, Quesniaux VF, Puzo G. Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its implication in TLR response. *J Biol Chem* 2003;278:29880-29889.
54. Guerardel Y, Maes E, Briken V, Chirat F, Leroy Y, Loch C, et al. Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of

Mycobacterium kansasii: novel structural features and apoptosis-inducing properties. J Biol Chem 2003;278:36637-36651.

55. Quesniaux VJ, Nicolle DM, Torress D, Kremer L, Guerardel Y, Nigou J, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. J Immunol 2003;172:4425-4434.
56. Abel B, Thieblemont N, Quesniaux VJ, Brown N, Mpagi J, Miyake K, et al. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. J Immunol 2002;169:3155-3162.
57. Reiling N, Holscher C, Fehrenbach A, Kroger S, Kirschning CJ, Goyert S, et al. Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol 2002;169:3480-3484.
58. Sugawara I, Yamada H, Li C, Mizuno S, Takeuchi O, Akira S. Mycobacterial infection in TLR2 and TLR6 knockout mice. Microbiol Immunol 2003;47:327-336.
59. Heldwein KA, Liang MD, Anderesen TK, Thomas KE, Marty AM, Cuesta N, et al. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. J Leukoc Biol 2003;74:277-286.
60. Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ, Jacobs M, Allie N, Mpagi J, et al. Toll-like receptor 2 deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. Am J Pathol 2004;164:49-57.

61. Fremont CM, Yeremeev V, Nicolle DM, Jacobs M, Quesniaux VF, Ryffel B. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *J Clin Invest* 2004;114:1790-1799.
62. Kaisho T, Hoshino K, Iwabe T, Takeuchi O, Yasui T, Akira S. Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support Th2 cell differentiation. *Int Immunol* 2002;14:695-700.
63. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999;11:443-451.
64. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001;2:947-950.
65. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S, Takeda K, Akira S. Mycobacterial infection in MyD88-deficient mice. *Microbiol Immunol* 2003;47:841-847.
66. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science* 1999;285:732-736.
67. Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, et al. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 2003;171:4984-4989.

68. Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, et al. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:4733-4743.
69. Redecke V, Hacker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH, et al. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 2004;172:2739-2743.
70. Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 2001;276:37692-37699.
71. Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH, et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 2004;172:3712-3718.
72. Sing A, Rost D, Tvardocsia N, Roggenkamp A, Wiedemann A, Kirschning CJ, et al. Yersinia V-antigen exploits Toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med* 2002;196:1017-1024.
73. van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, et al. A novel host-parasite lipid cross-talk: schistosomal lysophosphatidylserine activates Toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 2002;277:48122-48129.
74. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity.

Annu Rev Immunol 1991;9:271-296.

75. Romani N, Schuler G. The immunologic properties of epidermal Langerhans cells as part of the dendritic cell system. Springer Semin Immunol 1992;13:265-279.
76. Austyn JM. Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. Semin Immunol 1992;4:227-236.
77. Nigou J, Zelle-Reiser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. J Immunol 2001;166:7477-7485.
78. Giuliani A, Prete SP, Graziani G, Aquino A, Balduzzi A, Sugita M, et al. Influence of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin on in vitro induction of CD1 molecules in human adherent mononuclear cells. Infect Immun 2001;69:7461-7470.
79. Stenger S, Niazi KR, Modlin RL. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol 1998;161:3582-3588.
80. Gehring AJ, Rojas RE, Canaday DH, Lakey DL, Harding CV, Boom WH. The *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc gamma R1 on human macrophages through Toll-like receptor 2. Infect Immun 2003;71:4487-4497.
81. Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, et al. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC

expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol 2001;167:910-918.

82. Jones BW, Means TK, Heldwein KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT, et al. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage response. J Leukoc Biol 2001;69:1036-1044.
83. Means TK, Jones BW, Schromm AB, Shurtleff BA, Smith JA, Keane J, et al. Differential effects of a Toll-like receptor agonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. J Immunol 2001;166:4074-4082.
84. Chatterjee D, Lowell K, Rivoire B, McNeil M, Brennan PJ. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains. J Biol Chem 1992;267:6234-6239.
85. Prinzis S, Chatterjee D, Brennan PJ. Structure and antigenicity of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. J Gen Microbiol 1993;139:2649-2658.
86. Bernardo J, Billingslea AM, Blumenthal RL, Seetoo KF, Simons ER, Fenton M. Differential response of human mononuclear phagocytes to mycobacterial lipoarabinomannans: Role of CD14 and mannose receptor. Infect Immun 1998;66:28-35.
87. Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. Curr Opin Immunol 2003;15:396-401.
88. Kobayashi T, Walsh PT, Walsh MC, Speirs KM, Chiffolleau E, King CG, et al. TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. Immunity 2003;19:353-363.

89. Kolb-Maurer A, Kammerer U, Maurer M, Gentshev I, Brocker EB, Rieckmann P, et al. Production of IL-12 and IL-18 in human dendritic cells upon infection by *Listeria monocytogenes*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;35:255-262.
90. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 2001;194:1823-1834.
91. Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N. Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol* 2005;25:87-98.
92. Ziegler-Heitbrock HW. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J Inflamm* 1995;45:13-26.
93. Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K, et al. Synergy and cross-tolerance between Toll-like receptor (TLR) 2- and 4-mediated signaling pathways. *J Immunol* 2000;165:7096-7101.
94. Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect* 2002;4:903-914.
95. Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schmann RR, Hartung T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 2001;166:5161-5167.
96. Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, et al. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor

(TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: Effects of TLR “homotolerance” versus “heterotolerance” on NF-kappaB signaling pathway components. J Immunol 2003;170:508-519.

97. Pathak SK, Basu S, Bhattacharyya A, Pathak S, Kundu M, Basu J. *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated IRAK-M induction negatively regulates Toll-like receptor-dependent interleukin-12p40 production in macrophages. J Biol Chem 2005

Abstract

Effect of mycobacterial antigens on Mitogen-Activated Protein Kinase signaling pathway and Toll-like Receptor 2/4 in dendritic cells

Jinmin Lee

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor In-Hong Choi)

Tuberculosis continues to cause mortality and morbidity throughout the world, and as a result, one-third of world population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Macrophages are the primary targets for *Mycobacterium tuberculosis*, and mycobacteria survive within phagosomes of the infected macrophages. Subsequent recruitment of cellular responses that restrict mycobacterial infections, is mediated by dendritic cells (DCs) which are differentiated from monocytes in the lesion of tuberculosis patients. *Mycobacterium tuberculosis* or its products induce an important maturation process during which the expression of cell surface molecules and the antigen presentation activity are changed, resulting in potent interaction with T cells to initiate the acquired immune response.

Immature dendritic cells are the immunological sensors that screen for pathogen entry using Toll-like receptors (TLRs), which are sentinel receptors capable of recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMP) in microbial components. TLRs relay information about the interacting pathogen to DCs through intracellular signaling cascade, thereby eliciting appropriate cellular process that leads to DC maturation and induction of inflammatory cytokines. Invading pathogens like *Mycobacterium tuberculosis* or its products are

recognized by Toll-like receptors, especially TLR2 expressed on the surface of DCs. However, the mechanism of how these TLR agonists modulate the protective immune mechanism against *M. tuberculosis* infection is uncertain. In this study, we examined whether mycobacterial antigens can induce phenotypic and functional changes associated with differentiation and maturation of monocyte-derived DCs (Mo-DCs), and TLR expressions on that process. Also we examined the influence of mycobacterial antigens on the MAP kinase signaling pathway in Mo-DCs.

To investigate the effects of mycobacterial antigens on DCs, we generated immature DCs from CD14 positive monocytes of healthy human donors cultured with GM-CSF and IL-4. Monocyte-derived DCs were confirmed of their states by surface marker expressions. With LPS treatment, Mo-DCs became express maturation markers, but mycobacterial antigens failed to induce maturation markers on immature Mo-DCs. TLR2 and TLR4 expression levels were similar in monocytes, immature DCs and mature DCs. After treatment with mycobacterial antigens, Mo-DCs poorly induced cytokine production, especially AraLAM. Immature DCs stimulated with mycobacterial AraLAM showed ERK and JNK inhibition, whereas p38 MAP kinase was activated. Immature Mo-DCs stimulated with purified 30kDa protein showed relatively high levels of cytokine production and JNK and p38 MAP kinase activation. Among recombinant antigens, recombinant 16kDa protein showed most potent induction of cytokine, and recombinant 16kDa protein and recombinant Ag85A both showed JNK and p38 MAP kinase activation. When immature Mo-DCs were pre-treated with mycobacterial AraLAM antigens, subsequent expressions of CD83 and CD86 by LPS was reduced. Also, AraLAM pre-treatment reduced LPS-induced massive cytokine production by DCs, and attenuated p38 MAP kinase phosphorylation by LPS.

These results suggest that mycobacterial LAM antigens interfere with the maturation process of Mo-DCs and therefore long term exposure of mycobacterial LAM antigens on Mo-DCs cause poor cytokine production and insufficient p38 MAPK activation. Thus, the immune system of tuberculosis patients might be

improperly operated against microbial infections after chronic stimulation by mycobacterial antigens.

Key words: dendritic cell, mycobacterial antigen, Toll-like receptor, MAP kinase, cytokine

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	8
1. 수상돌기세포 배양	8
2. 유세포 분석	9
3. 싸이토카인 효소결합면역흡착검사	9
4. Western blotting	10
5. 항원 전처리 실험	11
III. 결과	13
1. 건강인 말초혈액 단핵구로부터 수상돌기세포 배양 및 세포 표면 분자의 발현 확인	13
2. 결핵균 항원 및 TLR 리간드의 자극에 의한 수상돌기세포의 성숙도	15
3. 결핵균 항원 자극에 의한 수상돌기세포의 싸이토카인 생성과 MAP kinase 활성화	19
4. 결핵균 LAM 항원 전처리에 의한 수상돌기세포에서의 LPS 에 의해 유도되는 성숙에 미치는 영향	24
5. 결핵균 LAM 항원 전처리가 수상돌기세포에서의 LPS 에 의해 유도되는 싸이토카인의 생성과 MAP kinase 활성화에 미치는 영향	26

IV. 고찰	29
V. 결론	35
참고문헌	37
영문요약	51

그림 차례

그림 1. 건강인 말초혈액에서 CD14 양성 단핵구의 분리	13
그림 2. 건강인 말초혈액 단핵구에서 유래한 미성숙 수상돌기세포의 표면 분자 발현	14
그림 3. LPS 및 결핵균 LAM 항원 자극에 의한 수상돌기세포의 성숙과 TLR 분자의 발현	16
그림 4. TLR 리간드 자극에 의한 수상돌기세포의 성숙	17
그림 5. 결핵균 단백질 항원 자극에 의한 수상돌기세포의 성숙과 TLR 분자의 발현	18
그림 6. 정제 결핵균 LAM 항원과 단백질 항원 자극에 의한 수상돌기세포의 싸이토카인 생성 변화	20
그림 7. 합성 결핵균 단백질 항원 자극에 의한 수상돌기세포의 싸이토카인 생성 변화	21
그림 8. 정제 결핵균 LAM 항원 자극에 의한 수상돌기세포에서의 MAP kinase 활성화	22
그림 9. 정제 결핵균 단백질 항원 자극에 의한 수상돌기세포에서의 MAP kinase 활성화	23
그림 10. 합성 결핵균 단백질 항원 자극에 의한 수상돌기세포에서의 MAP kinase 활성화	24
그림 11. 결핵균 LAM 항원 전처리가 수상돌기세포에서 LPS에 의해 유도되는 성숙에 미치는 영향	25
그림 12. 결핵균 LAM 항원 전처리에 의한 수상돌기세포에서 LPS에 의해 유도되는 싸이토카인 생성의 변화	27
그림 13. 결핵균 LAM 항원 전처리가 수상돌기세포에서의 LPS에 의해 유도되는 MAP kinase 활성화에 미치는 영향	28

약어 목록

<i>Abbreviation</i>	<i>Full name</i>
AraLAM	non-mannose-capped lipoarabinomannan
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LAM	lipoarabinomannan
LPS	lipopolysaccharide
ManLAM	mannose-capped lipoarabinomannan
MAPK	mitogen activated protein kinase
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
