결핵균 30kDa 항원 자극에 의한 대식세포의 NF-κB 활성화와 Cytokine 생성 유도에서 Toll-like Receptor 2 의 역할

결핵균 30kDa 항원 자극에 의한 대식세포의 NF-κB 활성화와 Cytokine 생성 유도에서 Toll-like Receptor 2 의 역할

연세대학교 대학원
의과학과
안 혜 정

결핵균 30kDa 항원 자극에 의한 대식세포의 NF-κB 활성화와 Cytokine 생성 유도에서 Toll-like Receptor 2 의 역할

지도교수 최 인 홍

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2006 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

안 혜 정

안혜정의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인
심사위원_____인
심사위원_____인

연세대학교 대학원

2006 년 6 월 일

감사의 글

공부에 대한 서투른 열정과 욕심으로 시작한 실험실 생활이 드디어 작은 결실을 맺게 되었습니다. 처음 파이펫을 잡고 식은 땀을 흘리며 논문공부와 실험으로 어느새 2 년이 훌쩍 지나서, 왠지 아쉽기도 하고 뿌듯하기도 하는 마음이 듭니다. 항상 지켜봐 주시고 많은 가르침을 주셨던 사랑하는 최인홍 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 신전수 선생님, 이재면 선생님, 조상래 선생님, 이원영 선생님과 이봉기 선생님, 김종선 선생님, 박전한 선생님, 김세종 선생님. 선생님들이 계셨기에 많은 가르침을 얻었습니다. 그리고 저의 자문 선생님이신 환한 미소의 조성애 선생님과 영동 세브란스 병리학 교실의 홍순원 선생님께도 멀리 신촌까지 와 주신 것 감사합니다. 또한 멀리 대전에서 항원을 보내주신 건양대 미생물학교실 박태현 선생님과 이지숙 선생님, 이정림 선생님께도 감사를 드립니다. 영문요약본을 수정해준 함승완 오빠에게도 감사드립니다.

함께 많은 시간과 노력을 도와주신 이정기 선생님, 김일휘 선생님, 고시환 선생님, 조성규 선생님, 안근재 선생님, 김지수 선생님, 조장은 선생님, 김영미 선생님 모두 감사합니다.

그리고 어리 버리했던 제게 실험과 실험실의 모든 것을 가르쳐 주신 양은정 선생님께 이 영광을 가장 먼저 돌리고 싶습니다. 미국으로 공부하러 가는 나의 다이머 진민, 형란언니, 수정언니, 은계언니, 은숙&

수인 언니, 주호 선생님, 주영오빠, 미화, 샛별이, 영주, 우리 파트 새 식구 정신선생님과 원미, 지금은 없지만 늘 휴게실에서 함께 했던 정화와 민정. 모두 소중한 미생물학 교실의 추억이 될 것입니다. 마지막으로 항상 버팀목이 되 주시는 주님과 사랑하는 우리 어머니, 아버지, 언니, 동생, 작년에 먼저 하늘나라에 갔지만 항상 함께 하는 우리 쫑국이, 없이는 침대에 갈 수 없는 귀여운 쫑민이가 있기에 저는 행복합니다. 이제 겨우 학문에 발을 들여놓은 초보로 미생물학교실에서의 모든 것이 밑거름이 되어 더욱 발전하는 혜정이가 되겠습니다.

저자씀

차 례

국문요약 1

Ⅰ. 서론 4

II. 재료 및 방법 5

1. 세포주 배양 7

2. 유세포분석 8

3. 효소결합흡착검사 9

4. Transient transfection 및 reporter gene assay 10

5. 항-TLR 항체 억제 실험 11

6. Western blotting 11

III. 결과 13

1. 사람 대식세포주 THP-1 에서 TLR 분자의 발현 13

2. 사람 대식세포주 THP-1 에서

결핵균 항원에 의한 cytokine 생성 15

3. 사람 대식세포주 THP-1 에서 결핵균 30kDa 항원 자극에 따른

cytokine 생성 17

4. 결핵균 30kDa 항원이

MAP kinase 활성화에 미치는 영향 18

5. TLR2/4 transfactant 세포에서

정제 결핵균 항원들에 의한 NF-κB 활성화 20

6. 정제 결핵균 30kDa 항원 자극에 의한 NF-κB 활성화에서

항-TLR2 항체의 효과 23

IV. 고찰 25

V. 결론 29

참고문헌 30

영문요약 38

그림 차례

그림 1. 사람 대식세포주 THP-1 에서 TLR 분자의 발현 14

그림 2. 사람 대식세포주 THP-1 에서
결핵균 항원들에 의한 cytokine 생성..... 16

그림 3. 사람 대식세포주에서 결핵균 30kDa 항원 자극에 따른
cytokine 생성..... 17

그림 4. 결핵균 30kDa 항원 자극에 의한 대식세포에서의
MAP kinase 활성화..... 19

그림 5. 결핵균 30kDa 항원 자극에 의한 TLR2 transfactant 세포의
MAP kinase 활성화..... 19

그림 6. TLR2 transfactant 세포에서 정제 결핵균 항원들에 의한
NF-κB 활성화..... 21

그림 7. TLR4 transfactant 세포에서 정제 결핵균 항원들에 의한
NF-κB 활성화..... 22

그림 8. TLR2 transfactant 세포에서 결핵균 30kDa 항원 자극에 의한 NF-κB 활성화에 대한 항-TLR2 항체의 억제효과 24

국문요약

결핵균 30kDa 항원 자극에 의한 대식세포의 NF-κB 활성화와 Cytokine 생성 유도에서 Toll-like Receptor 2 의 역할

결핵균은 세포 내 기생세균으로 숙주의 대식세포에 의해서 파괴되지 않고 만성감염을 유발한다. 즉 흡입에 의해서 체내로 들어가 폐에서 대식세포에 탐식된 후 생존, 증식하여서 결국 폐에 감염원을 생성하기 때문에 대식세포의 반응을 연구하는 것이 결핵균에 대한 면역반응을 이해하는데 몹시 중요하다. 대식세포는 선천면역반응에 우선 관여하는데 대식세포의 수용체 중 Toll-like receptor(TLR)는 미생물에서 존재하는 PAMP(pattern-recognition molecular pattern)를 인지하여 병원체와 자신을 구별한다. TLR ligand 중 특히 그람 음성균 박테리아의 세포벽 성분의 lipopolysaccharide(LPS)와 그람 양성균의 lipoteichoic acid(LTA)가 대표적인 PAMP 로서 각각 TLR2 와 TLR4 와 반응한다. 결핵균 항원도 TLR 을 통하여 면역세포를 활성화시킨다는 보고가 있지만 현재까지 TLR 과 연관된 연구는 결핵균 다당류 항원 (예; lipoarabinomannan)으로 제한되어 있었다. 그러므로 본 연구에서는 결핵균

단백 항원 중에서 TLR 을 자극하는 항원이 있는지를 사람 대식세포주와 TLR2/4 transfectant cell 에서 관찰하였다.

본 실험에서는 총 9 종류의 결핵균 단백항원을 사용하였다. 10, 22, 30, 38 kDa 항원은 정제된 항원이며, 6, 16, 19, 38, Ag85A 는 재조합항원이었다. 사람 대식세포주인 THP-1 세포를 대상으로 TLR 분자의 발현과 cytokine 생성의 변화를 확인하였을 때, 재조합항원에서는 19kDa 을 제외한 6, 16, 38, Ag85A 항원은 cytokine 생성을 강하게 유도하였다. 또한 정제항원 중에서는 30kDa 항원이 대식세포에서 TNF-α 와 IL-6 의 생성을 가장 강하게 유도하였다. 이상 9 종류의 항원 중 단백 생성 과정에서 포함된 LPS 에 의한 영향을 배제하기 위하여 정제항원만을 중심으로 이후 연구를 진행하였다.

MAP kinase 활성화를 관찰한 결과 정제 30kDa 항원은 ERK 의 활성화를 강하게 유도하였고, 정제 30kDa 항원이 대식세포를 자극하는 기전을 파악하기 위하여 TLR2 또는 TLR4 transfectant HEK293 세포를 대상으로 NF-κB 활성화를 측정하였다. 그 결과 정제 30kDa 항원 자극에 의하여 TLR2 transfectant cell 에서만 NF-κB 활성화가 강하게 관찰되었고 TLR4 transfectant cell 에서는 관찰되지 않았다. TLR2 transfectant cell 에서 유도된 NF-κB 활성화는 항-TLR2 항체에 의하여 억제되었다.

이상의 결과를 통하여 결핵균 30kDa 항원이 TLR2 를 자극함으로써 대식세포의 활성화를 유도하여 IL-6 및 TNF-α 를 생성시키는 것으로

추정되었다. 본 연구에서는 결핵균 단백항원 중에서도 TLR2 와 반응하는 분자가 있음을 밝혔으며 이는 30kDa 항원이 결핵균 감염 시 인체의 면역반응을 조절할 가능성을 제시한다.

핵심되는 말: 대식세포, 결핵균, 30kDa 항원, Toll-like receptor 2, cytokine, NF-κB

결핵균 30kDa 항원 자극에 의한
대식세포의 NF-κB 활성화와 Cytokine 생성 유도에서
Toll-like Receptor 2 의 역할

<지도교수 최 인 홍>

연세대학교 대학원 의과학과

안 혜 정

Ⅰ. 서론

대식세포는 인체 내에 들어온 병원균에 대한 면역방어에 가장 먼저 참여하는 세포로서 특히 세균성 병원균에 대한 일차적인 면역 장벽이다 [1]. 결핵균은 세포 내 기생균으로 숙주의 단핵세포에 탐식된 후 증식하여 폐포벽에 감염원을 형성한다. 결핵균으로 인한 감염을 숙주가 방어하기 위해 선천면역반응과 적응면역반응이 필요하게 되는데 [2], 선천면역에 관여하는 mammalian Toll-like receptor(TLR) 분자가 세균과 세균산물을 인지함으로써 선천면역을 작동시킨다. TLR members 중 TLR2/4 는

다양한 세균산물인 그람 음성세균의 지질다당류(lipopolysaccharide), 지질단백(lipoprotein), mycobacterial glycolipid lipoarabinomannan(LAM), 펩티도글리칸, zymosan 등을 인지하여 면역세포 활성화를 조절하게 된다[3].

LPS 경우 TLR4 와 결합하면 pro-inflammatory cytokine 생성을 유도하고 anti-apoptotic gene 의 발현을 유도하는 전사인자인 NF(nuclear factor)-κB 가 활성화된다[4]. 또한 세균 지질단백(bacterial lipoprotein)은 TLR2 와 결합하여 NF-κB 를 활성화하는 것으로 알려져 있는데 사람 대식세포주인 THP-1 세포에서 LPS 보다 TNF-α와 IL-6 생성을 증가시키는 것으로 보고되어 TLR2 의 중요성을 강조하였다 [28]. 또 다른 TLR2 의 배위자는 그람 양성 세균 세포벽의 lipoteichoic acid (LTA)이다 [33]. 최근 *Staphylococcus aureus* LTA 가 TLR2 를 통하여 단핵세포를 자극하여 TNF-α 를 생성하고, 펩티도글리칸 과 공동작용을 일으켜 rat 에서 패혈성 쇼크와 여러 장기를 손상시킨다는 보고가 있었고, pneumococcal LTA 도 패혈성 쇼크를 유발한다고 보고되었다[5].

사람 말초혈액의 단핵구에서 IFN-γ 와 M-CSF 에 의해서 TLR2/4 의 발현이 증가되고 마우스 대식세포에서는 IL-2, IL-15, IL-1β, TNF-α 에 의해서 TLR2 의 발현이 증가된다는 것이 확인되었다[6]. 현재까지 TLR2 와 관련된 결핵균 항원으로는 LAM 이 가장 많은 연구가 되었는데, LAM 에는 slow growing mycobacteria 세포벽에서 관찰되는 mannosylated lipoglycan 인 ManLAM, phosphoinositide motif 를 가진 PILAM, 그리고 rapid growing mycobacteria 에서 주된 세포벽 성분이며 capping 되지

않은 AraLAM 이 알려져 있다 [8-10]. 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포나 복강대식세포에서는 LPS, LAM, STF, PIM 등에 의해서 NF-κB, AP-1, MAP (mitogen-activated protein) kinase 가 활성화되고 TNF-α 가 생성되며 사람 alveolar macrophage 에서는 LPS 에 의해서 TNF-α 및 chemokine 이 생성되지만 TLR2 agonist 에 의해서는 MIP-1β 만이 분비된다고 보고되었다 [11]. LAM 외 결핵균에서 분비되는 19kDa 지질단백은 TLR2 의 발현을 증가시키고, TLR2 와 결합하여 TNF-α 나 NO 를 분비하여 대식세포 내 세균 성장을 억제하는 반면, class II MHC 분자 발현을 저하시켜서 CD4+ T cell 에 결핵균 항원 인식 정도를 감소시켜서 결핵균이 숙주의 면역 반응을 회피하도록 한다 [7].

30kDa 결핵균 항원은 IL-12 또는 IL-18 등의 cytokine 을 유도하는데 결핵에 감염된 환자에서는 30kDa 항원에 대한 반응이 저하되어 있다가 결핵 치료 후에는 정상으로 회복된다 [26,27]. 사람 단핵구를 30kDa 항원으로 자극하면 TNF-α 를 생성하는데 이는 항산균 육아종(mycobacterial granuloma)의 형성에 중요한 역할을 하고 대식세포 활성화 인자로 작용하여 결핵균을 포함한 세균 성장을 저해하기 때문에 30kDa 항원(Ag85B)이 면역력을 보완하는 기능이 있는 것으로 제시되었다 [12].

본 연구에서는 결핵균 단백질 항원 중에서 대식세포를 활성화시키는 항원이 어떠한 것인지 확인하고 이들 항원의 대식세포 활성화 기전을 파악하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 세포주 배양

사람 대식세포주인 THP-1 은 American Type Culture Collection 에서 분양 받았다. 세포배양 배지는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum: FBS, Jeil Biotechservices Inc., Daegu, Korea)이 포함된 RPMI 1640 배지(0.1M sodium pyruvate, 2mM penicillin, 50μg/mL streptomycin ; Life technologies 포함)이며 5% CO_2, 37 ℃ incubator 에서 배양하였다. 대식세포로 분화시키기 위해 100ng/mL 의 PMA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 24 시간 처리한 후 혈청이 없는 RPMI 1640 배지로 2 번 세척하고 혈청을 줄인(serum-depleted, 5% FBS)배지에서 24 시간 더 배양한 후 사용하였다.

TLR2.4 transfectant cell 로는 human embryonic kidney (HEK) 293 cell 에 사람 TLR2 (HEK/TLR2/CD14), TLR4(HEK/TLR4/CD14/MD-2) 유전자를 transfection 한 세포(Invivogen, San Diego, CA)를 구입하여 사용하였다. HEK293-TLR2/4 transfectant cell 배지로는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 blasticidin (10μg/mL), normocin (100μg/mL), 10% 우태아혈청을 첨가하여 사용하였다.

결핵균 단백항원으로는 정제된 10kDa, 22kDa, 30kDa, 38kDa 항원과 합성된 6kDa, 16kDa, 19kDa, 38kDa, Ag85A 항원을 사용하였다. *Salmonella minnesota* 에서 분리한 50ng/mL 의 LPS(lipopolysaccharide; 지다당류, Sigma, St. Louis, MO, USA)와 *Bacillus subtillis* 에서 분리한 10μg/mL 의 LTA(lipoteichoic acid, Sigma, St. Louis, MO, USA) 는 각각 TLR4 와 TLR2 자극하기 위한 positive control 로 사용하였다. 대식세포에 각 항원을 첨가한 후 48 시간을 배양하였다.

2. 유세포 분석

분화된 THP-1 세포와 분화시키지 않은 THP-1 세포를 인산완충액으로 2 회 세척한 후 세포표면에 FITC-TLR4 (clone HTA125 ; Santa Cruz) 및 PE-TLR2 (clone TL2.1 ; Santa Cruz) 단클론항체 (20μL/1 $\times 10^6$ cell)로 얼음에서 30 분간 반응시켜서 직접형광염색을 하였다. FacsCalibur(BD Bioscience)를 사용하여 분석하였으며 총 20,000 개의 세포 중 큰 과립세포군을 선택(gating)하여서 WinMDI 2.8(Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, CA, USA)을 이용하여 결과를 해석하였다.

3. 효소결합면역흡착검사

대식세포 배양액에 포함된 TNF-α 또는 IL-6 를 측정하기 위해서 효소결합면역흡착검사를 수행하였다. 항-cytokine 포획항체(capture antibody, BD sciences)를 coating buffer(0.1M carbonate, pH 9.5)에 250 배 희석하여 microtiter plate(Costar, Acton, MA, USA)에 분주하고 4°C 에서 하룻밤 동안 부착시킨 후, 0.05% tween20 이 함유된 인산완충액으로 3 회 세척하여 과잉 포획항체를 제거하고 10% 소혈청알부민이 포함된 인산완충액으로 차단시켰다. 10% 소혈청알부민-인산완충액으로 2 배로 희석시킨 세포배양액은 포획항체가 부착된 평판의 각 well 에 분주한 후 37°C 에서 2 시간 반응시킨 후 0.05% Tween 20 이 함유된 인산완충액으로 5 회 세척하였다. 검출항체에 biotin 이 부착된 항-사람 IL-6 항체 또는 항-TNF 항체와 효소 시약인 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated streptavidin (1:1 의 비율)로 10% 소혈청알부민-인산완충액으로 250 배 희석하여 각 well 에 첨가한 후 37°C 에서 1 시간 반응시켰다. 그 후 0.05% Tween 20 이 함유된 인산완충액으로 7 회 세척한 후에 기질용액인 tetramethylbenzidine (TMB)와 hydrogen peroxide 의 혼합액을 각 well 에 첨가한 후에 어두운 상온에서 20 분 간 반응시키면 푸른 색의 발색반응을 보였는데, 이를 2N H_2SO_4 용액으로 정지시켜서 노란색을 나타낸다. 발색도는 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450nm 파장에서 측정하였다. 분비된 cytokine 의 양은 사람의 재조합형 IL-6, TNF-α 의 표준곡선으로부터 유추하여 계산하였다.

4. Transient transfection 및 reporter gene assay

HEK293-TLR2 transfactant cell 을 2×10^5 세포/ well 로 12 well plate 에 나눈 후 FuGENE^{TM} 6 를 사용하였다. Transfection 에 사용된 NF-κB promoter construct 는 (wt)3-Luc+(Promega, Madison, WI, USA)이며 빈 promoter construct 는 pGL3-minIL6P(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. 100μl 의 serum free media 에 FuGENE^{TM}6 reagent 와 DNA 를 넣어 실온에서 30 분간 반응시킨 후 세포가 함유된 plate 에 첨가하고 3 시간 후에 10% FBS-DMEM 배지를 첨가하여 37℃, 5% CO_2 하에서 배양하였다. 16-18 시간 후에 항원들을 5 시간 동안 처리한 후 luciferase assay 를 수행하였다. Transfected cell 을 200μl 의 reporter lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA)로 용해시킨 후, 13,000 rpm 에서 10 분간 원심 분리하여 상청액만을 얻었다. Luciferase activity 는 각 세포 용해액의 β-gal activity 를 이용하여 보정하였다. β-gal assay 를 위해서 상청액 50μL 에 142.5μL 의 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.4), 55μL 의 O-nitrophenyl beta-D-galactopyranoside (ONPG) solution (Sigma), 0.1M $MgCl_2$ 와 5M β-mercaptoethonal 로 구성된 2.5μL 의 $MgCl_2$ 용액을 첨가하여 37°C 에서 발색이 일어날 때까지 반응시킨 후 405nm 에서 흡광도를 측정하였다.

5. TLR 항체 억제 실험

HEK293-TRL2 transfactant cell 을 이용한 reporter gene assay 에서 항-TLR2 차단항체(TLR2.1, Biolegend, San Diego, CA, USA)의 영향을 관찰하였다. 항-TLR2 차단항체 또는 마우스 IgG2a 동형대조군(Biolegend, San Diego, CA, USA)를 각각 10 μg/mL 의 농도로 1 시간 37 °C 에서 전처리한 후 30kDa 항원을 첨가하여 5 시간 더 배양한 후 세포를 reporter lysis buffer 로 용해시키고 원심 분리한 후 luciferase activity 를 β-gal activity 를 사용하여 보정하였다.

6. Western blotting

사람 대식세포주인 THP-1 과 HEK293-TLR2 transfactant 세포에 15, 30, 40 분간 결핵균 항원 자극을 준 후 MAP kinase 인산화를 측정하였다. 인산완충액으로 세척한 세포를 NP-40 lysis buffer(protease inhibitor 가 포함된 25mM Tris-HCl, 137mM NaCl, 3mM KCl, 1%NP-40)로 깨서 13,000rpm 에서 15 분간 원심 분리하여 상청액의 단백을 얻었다. 단백의 농도는 Bradford protein assay(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 정량하였고 총단백에서 40-50μg 을 취하여 12% SDS-PAGE 를 통하여 전기 영동하였다. 그 후 nitrocellulose membrane(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 옮겨서 5% 탈지분유로

실온에서 2 시간 동안 차단시킨 후 0.05% tween-20 이 함유된 인산완충액으로 2 분 세척하였다. 항-MAP kinase 항체 중에 항-phospho-ERK 다클론항체(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 사용하여 5% 탈지분유에 1:1,000 의 비율로 항체를 붙여서 4°C 하룻밤 동안 반응시켰다. 그 후 0.05% tween-20 이 함유된 인산완충액으로 5 분씩 3 회 세척한 후에 5% 탈지분유에 1: 5,000 의 비율로 희석한 이차항체인 HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research, Baltimore, MD, USA)와 4°C 에서 1 시간 동안 반응시키고 PBST 로 10 분간 3 회 세척한 후 west save(Lab Frontier, Seoul, Korea)를 사용하여 발광반응을 측정하여 x-ray film 에 노출시켜서 현상하였다.

Ⅲ. 결과

1. 사람 대식세포주 THP-1 에서 TLR 분자의 발현

THP-1 세포는 단핵세포에서 유래된 세포이기 때문에 대식세포로 분화시키기 위하여 PMA 를 처리한 후 사용하였다. 단핵세포 상태의 THP-1 세포와 대식세포로 분화시킨 THP-1 세포 표면의 TLR2/4 분자 발현을 비교하였다. 그 결과 PMA 로 분화시킨 THP-1 세포에서 TLR2/4 분자가 더 많이 발현하였다 (그림 1). 이후의 실험에서는 PMA 처리한 후 대식세포로 분화된 THP-1 세포를 사용하였다.

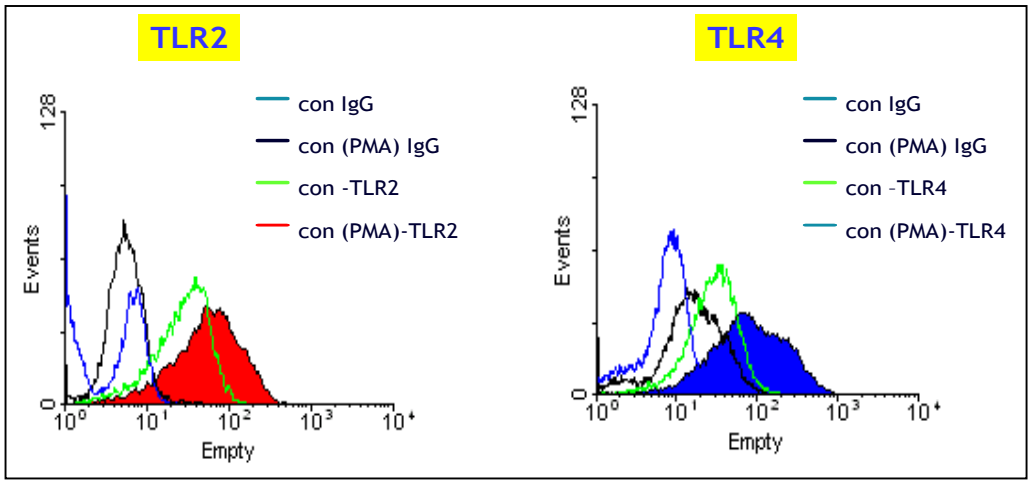

그림 1. 사람 대식세포주 THP-1 세포에서 TLR 분자의 발현.

THP-1 세포와 PMA 자극으로 대식세포로 분화된 THP-1 세포에서 TLR2/4 분자의 발현을 측정하였다. 100ng/mL 의 PMA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 24 시간 처리하였으며 항-TLR2 항체와 항-TLR4 항체(20μl/1×10^6 cell)를 사용하여 직접 형광 염색한 후 총 20,000 개의 세포를 분석하였다. mIgG 는 동형 대조군이다. 총 3 번의 결과에서 동일한 결과를 얻었으며 위 그림은 대표적인 결과다.

2. 사람 대식세포주 THP-1 에서 결핵균 항원에 의한 cytokine 생성

결핵균 항원으로 자극된 대식세포에서 cytokine 생성을 비교하기 위하여 THP-1 세포를 9 종류의 결핵균 항원(정제항원 10, 22, 30, 38kDa 와 재조합항원 6, 16, 19, 38, Ag85A)으로 자극하였다. 그 결과 결핵균 정제항원 중에서는 30kDa 항원만이 TNF-α 생성을 유도하였다. 재조합항원의 경우 19kDa 을 제외한 4 종류의 항원이 TNF-α 생성을 유도하였다. 그러나 대장균에서 생성된 재조합단백의 경우 LPS 의 영향을 배제할 수 없다고 판단되어 이후의 실험에서는 정제항원을 중심으로 진행하였다. IL-12 는 정제항원과 재조합 항원 모두에서 유도되지 않았다.

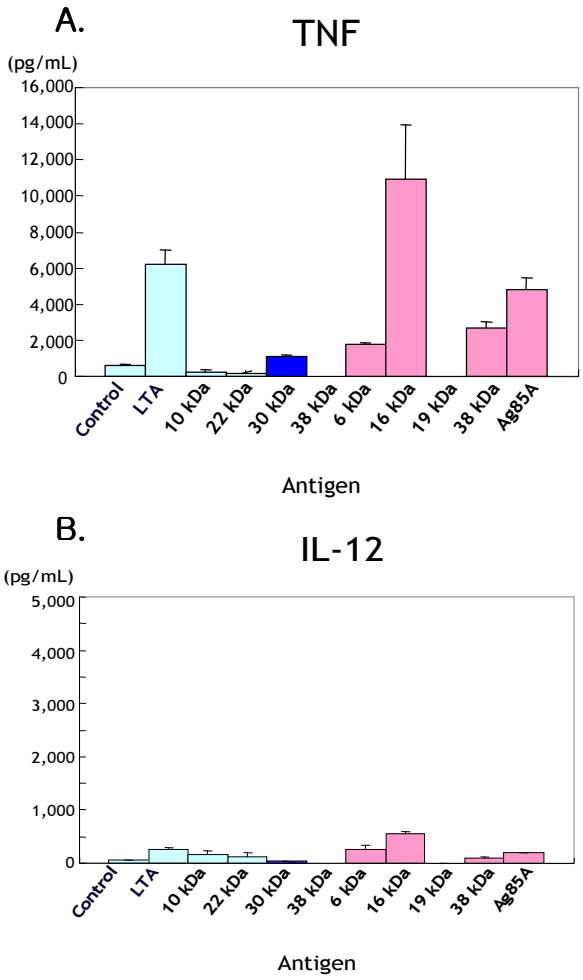

그림 2. 사람 대식세포주 THP-1 에서 결핵균 항원에 의한 cytokine 생성.

THP-1 세포를 결핵균 정제항원(10, 22, 30, 38kDa)과 재조합항원(6,16,19,38, Ag85A)을 10μg/mL 첨가하여 48 시간 배양한 후 상청액에서 TNF-α와 IL-12 를 측정하였다. 10μg/mL 의 LTA 는 positive control 로 사용하였다. Cytokine 의 양은 ELISA 방법으로 측정하였으며 총 3 번 반복한 결과의 평균값을 나타낸다.

3. 사람 대식세포주 THP-1 에서 결핵균 30kDa 항원 자극에 따른 cytokine 생성

THP-1 세포의 cytokine 생성 실험에서 사용한 4 종류의 정제 결핵균 항원 중에서 유일하게 THP-1 세포를 자극한 30kDa 항원을 대상으로 항원 농도에 따른 cytokine 생성의 변화를 관찰하였다. ELISA 를 통하여 THP-1 세포 배양 상청액의 cytokine 생성을 측정한 결과, 항원 양이 증가함에 따라 TNF-α 와 IL-6 의 생성이 증가하였다.

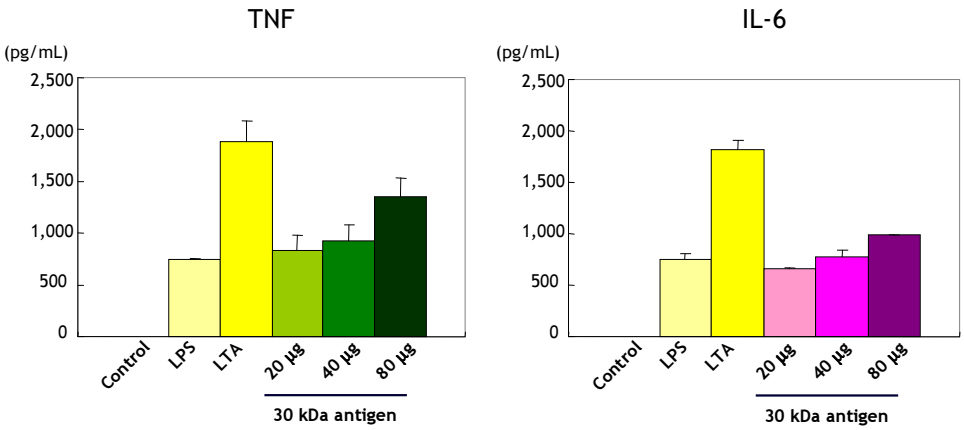

그림 3. 결핵균 30kDa 항원 양에 따른 cytokine 생성 변화.

사람 대식세포주 THP-1 을 5% FBS-RPMI1640 로 배지를 갈아준 후 결핵균 30kDa 항원을 20, 40, 80μg/mL 로 자극하여 48 시간 배양한 후의 배양액의 cytokine 양을 ELISA 로 측정하였다. 양성 대조군으로 LPS(50ng/mL) 또는 LTA (10μg/ml)를 사용하였다. 총 3 회의 동일한 실험을 반복하여 평균값과 표준오차를 표시하였다.

4. 결핵균 30kDa 항원이 MAP kinase 활성화에 미치는 영향

사람 단핵세포주 THP-1 에서 ERK(extracellular signal-regulated kinase)의 인산화가 일어나는 지를 확인하기 위해 항-phospho-ERK 항체를 이용하여 western blotting 을 실시하였다. ERK 활성화의 control level 을 줄이기 위해 THP-1 세포를 0.5% FBS 로 이틀동안 fasting 한 후에 FBS 가 포함되지 않은 RPMI1640 배지로 2 시간을 더 배양한 후 항원 자극하였다. LPS, LTA 및 30kDa 항원을 처리한 후 15, 30, 40 분 후 총 단백을 얻었다. ERK 활성화를 측정한 결과 30kDa 항원 자극 40 분 후 THP-1 세포의 ERK 인산화가 증가되었다 (그림 4)

HEK293-TLR2 transfactant 세포주에서도 ERK 의 인산화를 western blotting 을 통하여 측정하였는데 30kDa 항원을 처리한 15 분 후에 ERK 의 인산화가 증가하였다가 30 분에 감소되었다. (그림 5)

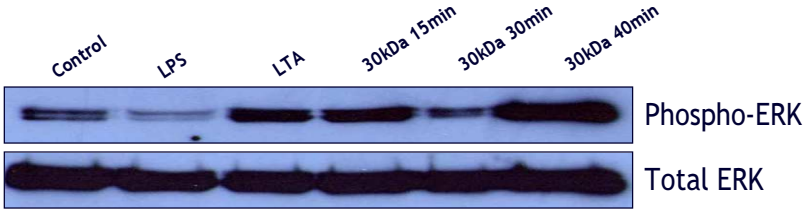

그림 4. 결핵균 30kDa 항원 자극에 의한 대식세포에서의 MAP kinase 활성화

사람 단핵 세포주 THP-1 을 0.5% FBS-RPMI1640 로 이틀 동안 배양한 후 FBS 가 포함되지 않은 RPMI1640 배지로 2 시간을 배양하고 항원 자극하였다. 정제 결핵균 항원을 15 분, 30 분, 40 분 간격으로 처리한 후 총 단백을 분리하였다. ERK 에 대한 인산화 특이 항체로 사용하고 동량의 단백 검출을 확인하기 위하여 ERK 특이항체로 western blot 을 수행하였다. 양성 대조군으로 50ng/mL 의 LPS 와 10μg/mL 의 LTA 를 사용하였다. 총 3 번의 실험을 실시하여 유사한 결과를 얻었으며 위 결과는 대표적인 결과이다.

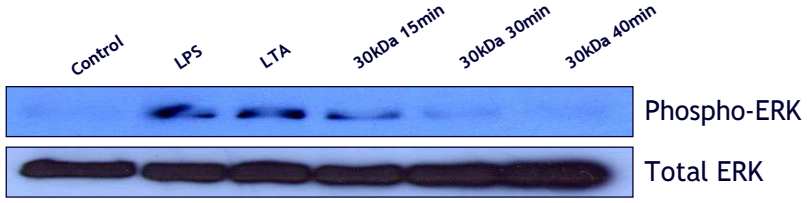

그림 5. 결핵균 30kDa 항원 자극에 의한 TLR2 transfactant 세포의 MAP kinase 활성화.

HEK293-TLR2 transfactant 세포주를 0.5% FBS-RPMI1640 배지로 이틀 동안 배양한 후 FBS 가 포함되지 않은 RPMI1640 배지로 2 시간을 배양하고 항원 자극하였다. 정제 결핵균 항원을 15 분, 30 분, 40 분 간격으로 처리한 후 총 단백을 분리하였다. ERK 에 대한 인산화 특이 항체로 사용하고 동량의 단백 검출을 확인하기 위하여 ERK 특이항체로 western blot 을 수행하였다. 양성 대조군으로 50ng/mL 의 LPS 와 10μg/mL 의 LTA 를 사용하였다. 총 3 번의 실험을 실시하여 유사한 결과를 얻었으며 위 결과는 대표적인 결과이다.

5. TLR2/4 transfactant 세포에서 정제 결핵균 항원들에 의한 NF-κB 활성화

HEK293-TLR2 transfactant 세포에서 결핵균 항원들에 의한 NF-κB 의 활성화를 측정하기 위해 NF-κB promoter activity 를 측정하는 reporter gene assay 를 수행하였다. NF-κB vector construct 를 HEK 293-TLR2 transfactant 세포에 transient transfection 시킨 후, 결핵균 정제항원 10, 22, 30, 38kDa 항원을 10μg/mL 농도로 자극한 5 시간 후 luciferase activity 를 측정하였다. 그 결과 30kDa 항원 자극에 의하여 NF-κB 활성화가 관찰되었다. 즉 luciferase activity 가 TLR2 를 자극하는 양성대조군인 LTA 의 70%정도로 일어났으며 나머지 결핵균 정제항원들은 NF-κB 활성화를 유도하지 않았다(그림 6).

HEK293-TLR4 transfactant 세포주에서 동일한 reporter gene assay 를 수행한 결과 TLR4 를 자극하는 양성대조군인 LPS 를 제외하고는 정제항원 모두 NF-κB 활성화를 유발하지 않았다(그림 7).

이를 통하여 결핵균 30kDa 항원은 TLR4 가 아닌 TLR2 를 통하여 NF-κB 활성화를 유도함을 알 수 있었다.

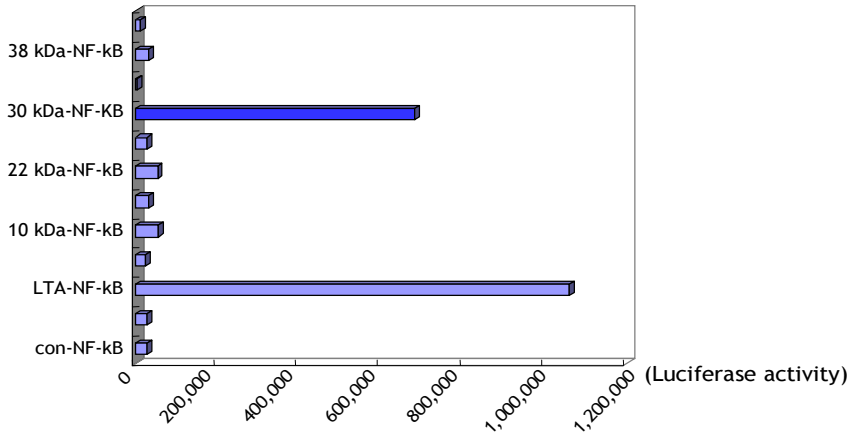

그림 6. TLR2 transfactant 세포에서 정제 결핵균 항원들에 의한 NF-κB 활성화

결핵균 정제항원에 의한 NF-κB promoter activity 를 측정하기 위해 HEK293-TLR2 transfactant 세포에 NF-κB promoter construct 를 transient transfection 시킨 24 시간 후 10ug/mL 의 결핵균 항원(10, 22, 30, 38kDa)을 처리한 후 luciferase activity 를 측정하였다. LTA 는 양성 대조군으로 사용하였다. 세포 용해액의 β-gal activity 를 기준으로 보정하고 독립적으로 3 회의 실험을 시행하여 그 평균값과 표준오차를 얻었다.

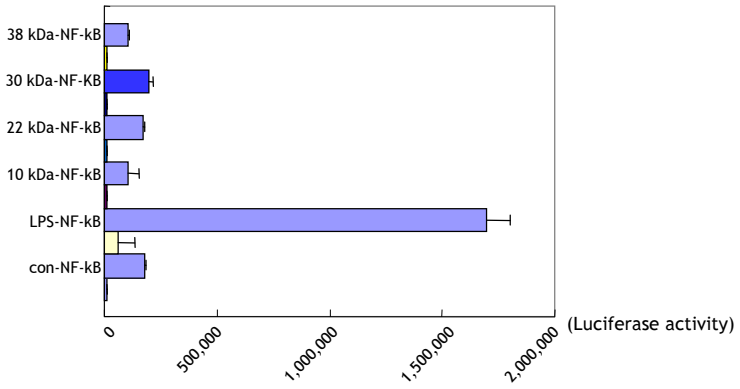

그림 7. TLR4 transfactant 세포에서 정제 결핵균 항원들에 의한 NF-κB 활성화.

결핵균 정제항원에 의한 NF-κB promoter activity 를 측정하기 위해 HEK293-TLR4 transfactant 세포에 NF-κB promoter construct 를 transient transfection 시킨 24 시간 후 10ug/mL 의 결핵균 항원(10, 22, 30, 38kDa)을 처리한 후 luciferase activity 를 측정하였다. LPS 는 양성 대조군으로 사용하였다. 세포 용해액의 β-gal activity 를 기준으로 보정하고 독립적으로 3 회의 실험을 시행하여 그 평균값과 표준오차를 얻었다.

6. 결핵균 30kDa 항원 자극에 의한 NF-κB 활성화에서 항-TLR2 항체의 효과

30kDa 항원이 HEK293-TLR2 transfectant 세포주에서 NF-κB 의 활성화를 나타낸 것을 관찰하여 30kDa 항원이 TLR2 와 반응하는 것을 확인하기 위하여 항-TLR2 항체로 30kDa 항원의 TLR2 결합을 억제시키는 실험을 수행하였다. NF-κB vector construct 를 HEK 293-TLR2 transfactant 세포에 transient transfection 시킨 24 시간 후 10μg/mL 의 항 TLR2 차단 항체를 배지에 포함시켜서 1 시간 반 배양하였다. 그 후 결핵균 30kDa 항원 5μg/mL 을 처리하고 5 시간 후에 luciferase activity 를 측정하였다. 그 결과 항-TLR2 항체를 전처리하지 않은 군에 비하여 항-TLR2 항체를 처리한 군에서 luciferase activity 가 70% 정도 감소하였다. 이 결과로 30kDa 항원이 TLR2 특이적으로 반응함을 확인하였다.

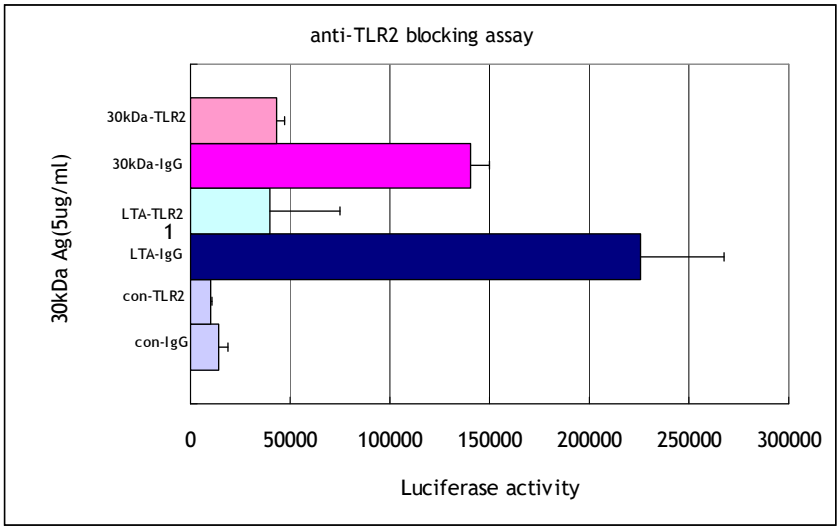

그림 8. TLR2 transfactant 세포에서 결핵균 30kDa 항원 자극에 의한 NF-κB 활성화에 대한 항-TLR2 항체의 억제효과

NF-κB vector construct 를 HEK 293-TLR2 transfactant 세포에 transient transfection 시킨 24 시간 후 10μg/mL 의 항 TLR2 차단 항체를 배지에 포함시켜서 1 시간 배양하였다. 그 후 결핵균 30kDa 항원 5μg/mL 을 처리하고 5 시간 후에 luciferase activity 를 측정하였다. 실험군의 세포 용해액에 β-gal activity 를 기준으로 보정하고 독립적으로 3 회의 실험을 시행하여 그 평균값과 표준오차를 나타내었다.

Ⅳ. 고찰

대식세포는 체내에 들어온 병원균에 대해 가장 먼저 면역반응을 유발하는 면역세포로서 선천면역을 담당한다. 활성화된 대식세포는 다양한 세포독성 단백을 분비하고 병원균, 바이러스 감염 세포, 암 세포, 세포 내 세균을 제거하며, MHC class II 분자를 다량 발현하여 효과적인 항원전달세포 역할을 한다 [14,22-24]. 대식세포에서 IL-12 생성을 유도하는 LPS 는 그람 음성세균 지다당류로서 TLR4 를 통해서 대식세포를 활성화시키며 항상균 세포벽 glycolipid 인 lipoarabinomannan(LAM)과 mannosylated phosphatidylinositol (PIM)은 TLR2 를 통하여 대식세포를 활성화시킨다 [11]. 최근 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 LPS, LAM, STF, PIM 등에 의해서 NF-κB, AP1 및 MAP kinase 가 급속하게 활성화한다는 보고가 있다 [15]. 항산균 성분 중 TLR 배위자로 가장 잘 알려진 분자는 19kDa 지질단백으로 숙주 세포의 apoptosis 를 유도하고 nitric oxide 를 생성하여 항산균을 포함한 미생물에 대한 면역반응을 증가시키는 반면 MHC class II molecule 의 down-regulation 을 유도하기 때문에 항원전달을 감소시킨다. 항산균 19kDa 지질단백은 사람 대식세포주 THP-1 에서 IL-12p40 를 더 많이 유도하는 반면 20kDa 및 38kDa 단백항원은 사람 단핵세포에서 TNF 와 IL-6 을 생성을 유도한다 [21].

본 연구에서는 항산균 단백항원 중 TLR 를 통하여 대식세포를 자극하는 분자를 검색하였다. 사람 대식세포 주인 THP-1 세포를 대상으로 결핵균 단백항원들에 대한 cytokine 생성을 관찰한 결과 정제 단백항원 중에서는 30kDa 항원이 TNF-α 생성을 유도하였으며 재조합항원 중에서는 6, 16, 38kDa 항원과 Ag85A 가 TNF-α 생성을 유도하였다. 재조합항원의 경우 대장균에서 생성하기 때문에 단백 분리 과정에서 포함될 수 있는 LPS 의 가능성을 배제하기가 용이하지 않았다. 그리하여 이후의 실험에서는 30kDa 항원을 중심으로 전개하였다.

TLR 의 신호전달과정에는 TIR domain 이 포함된 adaptor 단백이 필수적으로 작용하게 된다. 특히 TLR4 의 신호전달 과정의 주된 경로인 MyD88-dependent pathway 는 MyD88 과 Mal/TIRAP 이 TLR4-TIR domain 에 모여들고 그 결과 TRAF6 가 자극되어 NF-κB 와 mitogen-activated protein (MAP) kinase 를 통하여 TNF-α 같은 pro-inflammatory cytokine 을 유도한다 [16]. TLR2 신호전달 경로도 MyD88-dependent pathway 를 거치는 것으로 알려져 있다. NF-κB 는 iNOS 를 유도하는데 중요한 역할을 하며 [17] NF-κB 에 특정한 DNA-protein complex 이 TLR2 의 배위자인 LTA 자극에 의하여 활성화 되는데 이 과정이 wortmannin, LY294002, tyrphostin AG126, genistein, SB 203580 에 의해서 억제됨이 보고되어 있다 [18]. 그리고 LTA 에 의한 NF-κB 활성화가 Akt dominant negative mutant 와 그 inhibitor 에 의해서 억제되기 때문에 Akt 도 관여하는 것으로 제시되어 있다 [19].

본 연구에서 대식세포주인 THP-1 세포에서 결핵균 30kDa 항원으로 자극하였을 때 MAP kinase member 인 ERK 가 TLR2 의 배위자인 LTA 나 TLR4 의 배위자인 LPS 에 대한 반응만큼 강하게 활성화되는 것으로 보아 30kDa 항원도 대식세포를 통한 숙주의 면역반응을 관여하는 것으로 추정된다.

이러한 대식세포의 활성화가 TLR2 또는 TLR4 를 통하여 일어나는지 파악하기 위하여 본 연구에서는 HEK293-TLR2/4 transfactant 세포주를 사용하여 NF-κB 활성화를 측정하였다. 결과에서 제시한 것처럼 30kDa 항원만이 TLR2 transfectant 세포에서 NF-κB 활성화를 유도하였다. TLR4 transfactant 세포에서는 NF-κB 활성화가 전혀 유도되지 않는 것으로 보아 결핵균 30kDa 항원은 TLR4 와는 반응하지 않고 TLR2 를 자극하는 것으로 추정되었다. 더불어 항-TLR2 차단 항체를 사용하여 reporter gene assay 를 수행하였을 때 NF-κB 의 활성화가 현저히 억제되는 결과는 30kDa 항원이 TLR2 를 통한 대식세포 활성화를 강하게 제시한다고 생각한다.

결핵균 30kDa 항원은 Ag85 complex 로도 알려져 있는데 결핵균 배양액(culture filterate)에서 검출되는 단백으로 Ag85A, Ag85B, Ag85C 의 세가지 종류로 구분되고 [29], 결핵균이 아닌 모든 항산균에서 관찰된다. 일부 상이한 유전자 sequence 차이가 Ag85 gene family 가 조상의 유전자의 duplication 에 의해서 mycobacterial species 로 나누어지기 전에 생성된 것으로 보인다 [30]. 또한 Ag85A 는 *M.*

tuberculosis 나 *Mycobacterium leprae*[31], *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated mice[32] 에 감염된 후에 강력한 T 세포 증식과 IFN-γ 생성을 유도시키는 항원으로 보고되어 있고 그로 인하여 Ag85A 와 Ag85B 가 현재 결핵균의 subunit vaccine 의 가장 강력한 후보 분자로 제시되어 있다.

종합하여 본 연구에서 발견한 중요한 결과는 결핵균 30kDa 단백항원이 대식세포에서 ERK 의 활성화를 유도하고 TNF-α 및 IL-6 생성을 유도하는 과정에서 TLR2 와 반응할 가능성이다. 즉 결핵균 30kDa 가 TLR2 배위자로서 가능성을 제시하는 것이다. 현재 TLR2 의 배위자로 알려진 단백분자는 없기 때문에 더욱 중요한 발견이라고 생각하며 선천면역반응에서 미생물 단백분자의 중요성을 강조하는 결과를 제시한다.

Ⅴ. 결론

사람 대식세포 THP-1 세포에서 결핵균 30kDa 항원 자극에 의한 cytokine 생성과 NF-κB 활성화 및 TLR 분자와의 상호작용을 관찰하여 다음 결과를 얻었다.

1. THP-1 세포를 결핵균 정제항원(10,22,30,38kDa)과 결핵균 재조합항원(6,16,19, 38, Ag85A kDa)을 자극하였을 때 정제항원 중에서는 30kDa 항원이 TNF-α 생성을 강하게 유도하였다. 재조합항원에서는 19kDa 을 제외한 모든 항원에서 TNF-α 생성을 유도하였다.
2. THP-1 세포에서 결핵균 30kDa 항원 자극에 의한 ERK 의 활성화가 관찰되었다. TLR2 transfactant 세포주에서도 결핵균 30kDa 항원 자극에 의하여 ERK 의 활성화가 유도되었다.
3. TLR2 transfactant 세포주를 결핵균 정제항원(10, 22, 30, 38 kDa)으로 자극하였을 때 30kDa 항원에 의하여 NF-κB 활성화가 가장 강하게 유도되었다. 이 현상은 항-TLR2 항체에 의하여 억제되었다. TLR4 transfactant 세포주에서는 NF-κB 활성화를 유도한 결핵균 단백항원이 없었다.

이상의 결과로 결핵균 30kDa 항원은 TLR2 를 통하여 대식세포 활성화를 조절할 가능성을 제시한다.

Ⅵ. 참고문헌

1. Rosenberger CM, Brett Finlay BB. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signaling by bacterial pathogens. Nature Rev Mol Cell Biol 2003; 4: 385-396.

2. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. Tuberculosis (Edinburgh) 2004; 84: 93-101.

3. Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. The biology of Toll-like receptors. Cytokine Growth Factor Rev 2000; 11: 219-232.

4. Quesniaux V, Fremond C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yeremeev V, et al. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. Microbes Infect 2004; 6: 946-959.

5. Seung HH, Je JK, Michael M, Suzanne MM, Moon HN. Pneumococcal lipoteichoic acid(LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating toll-like receptor 2. Infect Immun 2003; 71: 5541-5548.

6. Matsuguchi T, Musikacharoen T, Ogawa T, Yoshikai Y. Gene expression of toll-like receptor 2, but not toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. J Immunol 2000; 165: 5767-5772.

7. 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.

8. Gilleron M, Himoudi N, Adam O, Constant P, Venisse A, Riviere M, et al. Mycobaterium smegmatis phosphoinositols-glyceroarabinomannans structure and localization of alkali-labile and alkali-stable phosphoinositides. J Biol Chem 1997; 292: 117-124.

9. Khoo KH, Dell A, Morris HR, Brennan PJ, Chatterjee D. Inositol phosphate capping of the non-reducing termini of lipoarabinomannan from rapidly growing strains of mycobacterium. J Biol Chem 1995; 270: 12380-12389.

10. Means TK, Lien E, Yoshimura A, Wang S, Goldernbock DT, Fenton MJ. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for toll-like receptors. J Immunol 1999; 163: 6738-6755.

11. Jones BW, Heldwein KA, Means TK, Saukkonen JJ, Fenton MJ. Differential roles of toll-like receptors in the elicitation of pro-inflammatory responses by macrophages. Rheum Dis 2001; 60: iii6-iii12.

12. Song CH, Kim HJ, Park JK, Lim JH, Kim UO, Kim JS, et al. Depressed interleukin -12, but not IL-18, production in response to a 30-32kDa mycobacterial antigen in patients with active pulmonary tuberculosis. Infect Immun 2000; 68 :4474-4484.

13. Lynn A, Zahra T, Htin A, Boom WH, Jerrold JE. Regulation of production of tumor necrosis factor α in monocytes stimulated by 30kDa antigen of *Mycobaterium tuberculosis*. Infect Immun 1995; 63: 3206-3208.

14. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Immnunology 5th ed. New York: W.H. Freeman; 2002. p24-56.

15. Jones BW, Means TK, Heldwein KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT, Fenton MJ. Different Toll-like receptor agonisits induce distinct macrophage response. J Leuko Biol 2001 ; 6 : 1036-1044.

16. Susu MZ, Shanta MZ, Anup D, Russell WC, David SS. Infect Immun 2005; 73: 2940-2950.

17. Kuo CT, Chiang LL, Lee CN, Lee CN, Yu MC, Bai KJ, Lee HM et al. induction of nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages by lipoteichoic acid from staphylococcus aureus : involvement of protein kinase C- and nuclear factor-κB-dependent mechanisms. J Biomed Sci 2003; 10:136.

18. Kengatharan M, De Kimpe SJ, Thiemermann C. Analysis of the signal transduction in the induction of nitric oxide synthase by lipoteichoic acid in macrophages. Br J Pharmacol 1996; 117: 1163.

19. Kao SJ, Lei HC, Kuo CT, Chang MS, Chen BC, Chang YC, Chiu WT, Lin CH. Lipoteichoic acid induces nuclear factor-κB activation and nitric oxide synthase expression via phosphatidylinositol 3-kinase, Akt and p38 MAPK in RAW264.7 macrophages. Immunology 2005; 115: 366-374.

20. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by mycobacterial lipoproteins through toll-like receptors. Science 1999; 285: 732-736.

21. Jung SB, Yang CS, Lee JS, Shin AR, Jung SS, Son JW, et al. the mycobacterial 38kDa glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokine through toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. Infect Immun 2006; 74: 2686-2696.

22. Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. Infect Immun 1996; 64 :683-690.

23. Jones BW, heldwein KA, Means TK, Saukkonen JJ, Fenton MJ, Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. Rheum Dis 2001 ; 60 :iii6-iii12.

24. Jones BW, Means TK, Heldwein KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT, et al. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. J Leukoc Biol 2001 ; 69: 1036-1044.

25. Stenger S, Modlin RL. Control of mycobacterium tuberculosis through mammalian toll-like receptors. Curr Opin Immunol 2002; 14 : 452-457.

26. Averill L, Toossi Z, Aung H, Boom WH, Ellner JJ. Regulation of production of tumor necrosis factor alpha in monocytes stimulated by the 30kDa antigen of mycobacterium tuberculosis. Infect Immun 1995; 63 : 3206-3208.

27. Uma Devi KR, Ramalingam B, Raja A. Antibody response to *mycobacterium tuberculosis* 30 and 16 kDa antigen in pulmonary tuberculosis with human immunodeficiency virus coinfection. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 46 :205-9.

28. Wang JH, Doyle M, Manning BJ, Wu QD, Blankson S, Redmond HP. Induction of bacterial lipoprotein tolerance is associated with

suppression of toll-like receptor 2 expression. J Biol Chem 2002; 277 :36068-360075.

29. Wiker, HG, Harboe M. The antigen 85 complex : a major secretion product of mycobacterium tuberculosis. Microbiol Rev 1992; 56: 648-661.

30. D'Souza S, Rosseels V, Romano M, Tanghe A, Denis O, Jurion F, et al. Mapping of murine Th1 helper T-cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from *mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 2003; 71 : 484-493.

31. Launois P, Deleys R, Niang MN, Drowart A, Andrien M, Dierekx P, Cartel JL et al. T-cell epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy. Infect Immun 1994; 62: 3679-3687.

32. Huygen K, Abramowiez D, Vandenbussche P, Jacobs F, Bruyn JD, Kentos A, et al. Spleen cell cytokine secretion in Mycobacterium bovis BCG-infected mice. Infect Immun 1992; 60: 2880-2886.

33. Hattar K, Grandel U, Moeller A, Fink L, Lglhaut J, Hartung T, et al. Lipoteichoic acid(LTA)-from staphylococcus aureus stimulates human neutrophil cytokine release by a CD14-dependent, TLR-independent mechanism : Autocrine role of TNF-α in mediating LTA-induced IL-8 generation. Crit Care Med 2006; 34: 835-841.

Abstract

Mycobacterium tuberculosis 30kDa antigen induces NF-kB activation and cytokine production by Toll-like receptor 2 in macrophages

Ahn Hae-Jeong

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Choi In-hong)

Mycobacterium tuberculosis, the causative agent of tuberculosis, is an intracellular bacterium that is capable of surviving and persisting within host mononuclear cells. Macrophage phagocytosis of *M. tuberculosis* bacilli is accompanied by activation of the transcription factor NF-κB, secretion of inflammatory mediators, release of the reactive nitrogen intermediate NO, and secretion of several chemokines. Mammalian Toll-like receptor (TLR) proteins have recently been shown to play important roles in

host cell response to bacteria and bacterial products *in vitro*. Mycobacterial products released as PIM, LM, LAM, lipoproteins and other mycobacterial factors may contribute to continued macrophage and dendritic cell(DC) activation through PRR such as TLRs and others. Several published reports have shown that the TLR2 and TLR4 proteins mediate cellular activation by a variety of bacterial products, including gram-negative bacterial lipopolysaccharide(LPS), the mycobacterial glycolipid lipoarabinomannan(LAM), bacteraial lipoproteins, peptidoglycan and zymosan. Up to the present, several mycobacterial antigens can achieve cellular activation through interaction with TLR2.

In this study, we used several mycobacterial antigens(purified 10, 22, 30, 38kDa, recombinant 6, 16, 19, 38kDa and Ag85A antigen). The characteristics of the human macrophage cell line THP-1 was investigated solely by stimulation with purified antigen in order to prevent LPS contamination of recombinant antigen in the process of protein synthesis. Purified mycobacterial antigen-induced TLR expression and cytokine production in human PMA-differentiated THP-1 macrophage cells, even without treatment with mycobacterial antigens, increased levels of TLR2 and TLR4 expression. We obtained evidence demonstrating that only 30 kDa antigen induces production of IL-6 or TNF-α in THP-1 macrophages cells.

We examined the influence of mycobacterial purified antigens on the MAP kinase signaling pathway in THP-1 cells and HEK293-TLR2/4 transfectant cells. When THP-1 cells were treated with 30kDa antigen, strong phosphorylation of ERK occurred. We

also found that the 30kDa antigen activated NF-κB in TLR2-transfected cells, not TLR4-transfected cells. Antibody blocking experiments revealed that the inhibition of anti-TLR2 to NF-κB activation in TLR2-transfactant cells.

These results indicate that TLR2 may act as an important receptor when stimulated with 30kDa antigen in macrophage infection.

Key Words : macrophage, *M. tuberculosis*, 30kDa antigen, Toll-like receptor 2, cytokine , NF-κB