

결핵균 튜베르쿨린 PPD 및 38-kDa 항원에 의한 사람 말초혈액 단핵구의 전염증성 사이토카인 생성에 대한 Toll-like Receptor 의존도 비교 분석

충남대학교 의과대학 미생물학교실¹, 건양대학교 의과대학 미생물학교실²

정섫별^{1,3} · 이지숙^{2,3} · 양철수¹ · 송창화¹ · 이길수¹ · 김화중¹ · 박정규¹ · 백태현² · 조은경^{1*}

Differential Roles of Toll-like Receptor (TLR) 2 and 4 between PPD- and 38-kDa-induced Proinflammatory Cytokine Productions in Human Monocytes

Saet-Byel Jung¹, Ji-Sook Lee², Chul-Su Yang¹, Chang-Hwa Song¹, Kil-Soo Lee¹,
Hwa-Jung Kim¹, Jeong-Kyu Park¹, Tae-Hyun Paik² and Eun-Kyeong Jo^{1*}

¹Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University, 6 Munhwa-dong,
Jung-gu, Daejeon 301-747, Korea; ²Department of Microbiology, College of Medicine,
Konyang University, 685 Gasooon-dong, Seo-gu, Daejeon 302-718, Korea

Received : February 26, 2007

Accepted : March 20, 2007

In this study, we investigated the role of toll-like receptor (TLR) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways involved in the tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6 expression after stimulation with purified protein derivatives (PPD) or native 38-kDa protein antigen (Ag) of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in human primary monocytes. Both PPD and 38-kDa Ag significantly induced TNF- α and IL-6 in human primary monocytes. MAPK [extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 and p38] are rapidly phosphorylated in human monocytes stimulated with the PPD or 38-kDa Ag. Both p38 and ERK 1/2 activation are essential for PPD- or 38-kDa-induced TNF- α and IL-6 production. The inhibition of TLR2 and TLR4 by specific antibodies significantly abrogated the 38-kDa-induced secretion of TNF- α and IL-6, whereas blockade of TLR2, but not TLR4, was responsible for the PPD-induced TNF- α and IL-6 production in human monocytes. Collectively, these data suggest that the PPD and 38-kDa Ag differentially interact with TLR2 and TLR4, which in turn mediate an essential role for the early inflammatory immune responses during human tuberculosis.

Key Words: PPD antigen, 38-kDa antigen, Monocyte, TNF- α , IL-6, MAPK, *Mycobacterium tuberculosis*

서 론

결핵균에 의해 분비되는 단백항원은 숙주면역반응의 표적

³These two authors contributed equally to this work

*교신저자: 조은경. 301-747, 대전광역시 중구 문화1동 6번지,
충남대학교 의과대학 미생물학교실
Phone: 042-580-8243, Fax: 042-585-3686,
e-mail: hayoungj@cnu.ac.kr

**이 논문은 2006년도 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원
(A060312) 및 2004년도 한국학술 진흥재단의 지원 (KRF-2004-
041-E00125)에 의하여 이루어진 것임.

으로 오랫동안 백신 및 진단법 개발을 위한 유용한 재료가 되어 왔다 (3). 결핵균 튜베르쿨린 purified protein derivatives (PPD) 항원은 튜베르쿨린 피부반응 검사나 결핵면역 연구에 세계적으로 널리 이용되는 항원이다. 결핵의 유병율이 낮은 지역에서는 PPD 항원에 의한 지연형 과민반응의 정도가 피부검사에 의한 진단적 의미를 나타내기도 한다 (3,4). 그 밖에 PPD 항원은 획득면역의 주된 세포인 항원 감각 T 세포에 의한 감마 인터페론의 생성에도 기여하며 전혈검사 (whole-blood assay)를 이용하여 PPD 항원에 의한 사이토카인 유도 능력을 측정한 결과, 자극 초기에 매우 강력한 전염증성 사이

토카인 [tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β] 및 항염증성 사이토카인 (IL-10) 발현을 유도하였다 (36).

결핵균의 다양한 단백항원 성분 중 38-kDa 지질당단백질 (lipoglycoprotein)은 결핵균 배양액 내에 풍부하게 분비되며 (16) 인산염 수송단백질 (PstS-1)로 잘 알려져 있다 (9). 동물 모델에서 인형결핵균이나 우형결핵균 감염 후 강한 세포면역 반응을 유도할 수 있는 단백질로 보고되었다 (4). 한편 38-kDa 단백항원은 높은 혈청학적 반응성을 나타내어 활동성 결핵의 초기 단계 혹은 잠복감염과 연관성이 높다고 하며 (1,6) 현재까지 결핵의 혈청학적 진단을 위해 가장 많이 이용되어 온 항원 중 하나이다. 38-kDa 지질당단백질 항원의 T 세포 에피토프를 발현하는 DNA 백신을 주사한 마우스 실험에서 높은 세포독성 및 Th1 면역반응이 유도되었다고 한다 (13). 이와 같이 38-kDa 항원은 결핵항원의 세포면역 및 체액면역반응에 대한 광범위한 연구에 유용하게 사용되어 왔으나 현재까지 38-kDa 항원에 의해 유도되는 면역반응의 신호전달기전에 대한 연구는 매우 미흡하다.

결핵 감염 시 TNF- α 가 항결핵 방어면역에 중요한 역할을 한다고 하는 증거는 동물 실험 및 사람 결핵발병과정에서 보고된 바 있다 (14,24). 그럼에도 불구하고 TNF- α 는 결핵과 관련된 조직괴사 및 임상적 증상 등 중요한 전염증성 반응의 주된 매개자 역할을 한다 (34). 따라서 결핵에 대한 성공적인 방어면역의 유도는 Th1 면역반응의 핵심적인 역할을 하는 감마 인터페론의 생성과, 지나친 조직의 손상이 아닌 적절한 수준의 염증반응 간의 균형에 달려있다고 해도 과언이 아니다.

포유동물의 패턴인식수용체인 Toll-like receptor (TLR)에 리간드 (ligand)가 결합하면 하위경로에서 myeloid differentiation factor 88 (MyD88), tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6가 활성화되고, 궁극적으로 nuclear factor-kappaB (NF- κ B)의 핵 내 이동이 이루어진다. 기타 하위경로로는 대표적인 단백질 인산화효소인 mitogen-activated protein kinases (MAPK) 및 phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)가 TLR 신호전달과정에서 활성화되는 것으로 보고되었다. 이는 결과적으로 병원체에 대한 선천면역반응에 매우 중요한 각종 단백질들, 특히 전염증성 사이토카인, 케모카인, costimulatory molecules 및 inducible nitric oxide synthase 등의 발현을 유도하게 된다 (28).

이전 연구에 의하면 MAPK 활성화는 결핵균에 의해 유도되는 TNF- α , IL-1 β 및 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 등의 생성에 필수적인 것으로 보고되었다. 또한 사람 단핵세포 유래 대식세포에서 MAPK 활성화에 의해 *M. avium*의 세포 내 생존이 감소되어 MAPK 경로가 항결핵 방어에 중요함을 알 수 있다 (5). 따라서 개개의 결핵항원 성분

에 대한 사이토카인 반응의 특이성 및 세포 내 정보전달기전에 대한 면밀한 분석은 결핵의 숙주 방어 및 병인 기전 연구에 기반이 되는 매우 중요한 기초자료가 된다 (19).

본 연구에서 저자들은 결핵균 배양액으로부터 38-kDa 지질당단백질 항원을 고유한 방법으로 분리하였으며 분리 정제된 38-kDa 항원 및 Denmark의 Statens Serum institut로부터 구입한 PPD 항원을 이용하여 사람단핵세포를 자극하고 항원에 의한 MAPK 신호전달경로의 활성화 및 전염증성 사이토카인 발현에 대한 MAPK의 기능을 분석하였다. 그 결과 PPD 및 38-kDa 항원은 ERK 1/2 및 p38 MAPK의 인산화를 유도하였으며 전염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 분비를 유도하였다. 두 항원에 의한 사이토카인 분비에는 ERK와 p38 MAPK가 모두 공히 중요한 역할을 하였다. 그러나 38-kDa 항원에 의한 전염증성 사이토카인의 발현은 TLR2 및 4 수용체가 모두 관여하는 반면, PPD 항원에 의한 경우에는 TLR2 수용체만이 관여하는 것을 알 수 있었다.

재료 및 방법

1. 결핵균 배양 및 38-kDa 항원의 분리 정제

1) 결핵균 배양

M. tuberculosis H37Rv (ATCC 27294)를 Sauton 합성배지에 서 6주간 표면 배양하여 수집된 배양여액을 15,000 x g에서 1시간 원심분리하고, 0.22 μ m membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA)로 여과멸균을 실시한 후 38-kDa 항원 정제에 사용하였다.

2) 38-kDa 항원의 분리 정제

38-kDa 항원의 분리 정제는 이 등의 보고를 참조하였다 (2). 38-kDa 항원은 배양여액으로부터 황산암모늄 염석 (ammonium sulfate precipitation), low pressure chromatography (LP)와 fast protein liquid chromatography (FPLC) 시스템 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용한 anion-exchange chromatography와 hydrophobic interaction chromatography (HIC)로 정제하였으며, 항원의 확인은 SDS-PAGE와 38-kDa 토끼 항혈청을 이용한 면역확산법을 병용하여 실시하였다.

여과멸균된 배양여액을 20 mM Tris-HCl, pH 8.3/0.02% Na₃N₃/1 mM EDTA로 2.5배 희석한 후 Macro-Prep High Q (Bio-Rad)가 충전된 컬럼 (2.5 cm \times 20 cm)에 5 ml/min의 속도로 가하여 단백질을 흡착시켰다. 흡착된 단백질은 100 mM NaCl이 포함된 20 mM Tris-HCl, pH 8.3/0.02% Na₃N₃/1 mM EDTA로 용출시킨 후에 Amicon Ultra-15 [molecular weight cutoff (MWCO) 5,000; Millipore]을 이용한 초미세여과법 (ultrafiltration)으로 농축한 후 40~70% 황산암모늄 염석을 실시하였다. 40~70% 황산암모늄 염석으로 얻은 단백질은

1.8 M 황산암모늄이 포함된 100 mM sodium phosphate, pH 6.8/0.02% Na₃/1 mM EDTA에 용해시킨 후 LP 시스템을 이용한 hydrophobic interaction chromatography를 실시하였다. 용해된 단백질은 Macro-Prep Methyl HIC (Bio-Rad)가 충전된 컬럼 (1.5 cm × 10 cm)에 3 ml/min의 속도로 가하여 단백질을 흡착시켰다. 흡착된 단백질은 1.2 M 황산암모늄이 포함된 100 mM sodium phosphate, pH 6.8/0.02% Na₃/1 mM EDTA로 세척한 후에 1.4 M 황산암모늄이 포함된 100 mM sodium phosphate, pH 6.8/0.02% Na₃/1 mM EDTA로 단백질을 용출하여 38-kDa 항원 양성분획을 취하였다. 38-kDa 항원 양성분획은 모두 수집하여 Amicon Ultra-15로 농축시킨 후에 20 mM Tris-HCl, pH 8.3/0.02% Na₃/1 mM EDTA로 4°C에서 3일간 투석하였다. 투석된 38-kDa 항원 양성분획은 0.22 µm membrane filter (Millipore)로 여과한 후 FPLC를 이용한 anion-exchange chromatography로 최종 정제를 실시하였다. 즉 UNO Q6 컬럼 (Bio-Rad) (1.2 cm × 5.3 cm)에 38-kDa 항원 양성분획을 1 ml/min의 속도로 가하여 단백질을 흡착시킨 후에 20 mM NaCl이 포함된 20 mM Tris-HCl, pH 8.3/0.02% Na₃/1 mM EDTA를 가하여 38-kDa 항원을 선택적으로 용출시킴으로써 정제하였다.

최종적으로 얻은 38-kDa 항원은 인산완충액 (phosphate buffered saline)으로 4°C에서 3일간 투석하였고, 내독소 제거 컬럼 (Endotoxin Removing Gel; Pierce, Rockford, Ill, USA)을 통과시켜 0.22 µm membrane filter (Millipore)로 여과결균 후 사용하였다.

3) 38-kDa 토끼 항혈청 (rabbit 38-kDa antiserum)의 제조

Freund's complete adjuvant (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)와 동량으로 혼합된 38-kDa 항원 (0.5 mg/rabbit)을 체중 2.5 kg 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼 (다물사이언스, 대전)에게 근육 접종하였고, 추가 접종은 4주 간격으로 3회 실시하였다. 추가 접종 시에는 38-kDa 항원 (0.5 mg/rabbit)을 Freund's incomplete adjuvant (Sigma-Aldrich)와 동량으로 혼합하여 근육 주사하였다. 마지막 추가 접종 2주 후에 부분 채혈을 실시하여 면역확산법으로 항체가를 확인한 후에 전혈을 실시하여 혈청을 분리하였다.

4) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 및 단백질 농도의 확인

항원은 Novex mini cell (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 precast gradient Bis-Tris gel (Novex 4~12%; Invitrogen)에서 SDS-PAGE에 의해 분석하였고, 전기영동 후 Coomassie blue 염색을 실시하여 38-kDa 항원을 관찰하였다. 단백질 농도는 bicinchoninic acid assay (Pierce)로 측정하였다.

2. 결핵균 PPD 항원

결핵균 PPD 항원은 Statens Serum institut (Copenhagen, Denmark)에서 구입하여 사용하였다.

3. 말초혈액 단핵구 (monocyte)의 준비

건강인 공혈자로부터 정맥혈을 제공받아 Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich)을 이용한 밀도구배 원심분리로 말초혈액단핵세포 (peripheral blood mononuclear cells)를 수집하였다. 수집한 말초혈액단핵세포는 RPMI 1640 배지로 2×10^6 /ml의 농도로 부유시켜 37°C, 5% CO₂ 조건에서 1시간 동안 24 well culture plate에 부착시켰다. 부착되지 않은 상층액은 제거하고 plate에 부착되어 있는 단핵구만 취하여 실험에 사용하였으며 분리된 단핵구의 순도는 항 CD14 항체를 이용한 유세포 측정에 의해 95% 이상임을 확인하였다. 결핵균 항원에 의한 사이토카인 반응이 lipopolysaccharide (LPS) 오염에 의한 것이 아님을 확인하기 위해 모든 실험 조건에서 LPS를 억제하는 polymyxin B (10 µg/ml)이 함유된 배지를 사용하였다.

4. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 억제제 및 toll like receptor (TLR) 항체의 전처리

MEK 활성의 특이 억제제인 PD98059와 U0126, p38 MAPK 경로의 특이 억제제인 SB203580은 Calbiochem (San Diego, CA, USA)사에서 구입하여 사용하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich)는 억제제의 용해제 대조군으로 0.1% (vol/vol)의 농도로 배양액에 첨가하였다. 말초혈액 단핵구를 PBS로 세척한 다음, 결핵균 감염 30 내지 45분 전, MAPK 억제제가 포함된 완전 RPMI 1640 배지로 교환하였다. 단핵구의 생존율이 억제제의 첨가에 의해 영향을 받지 않는지 여부는 Trypan blue 염색에 의해 확인하였다. 마우스 항 사람 TLR2 단일클론항체 (clone TL2.1; IgG2a, κ) 및 마우스 항 사람 TLR4 단일클론항체 (clone HTA125; IgG2a, κ)는 eBioscience (San Diego, CA, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 이들 중화항체는 항원 자극 전 실온에서 30분간 전처리하여 TLR 신호전달경로 분석 실험에 사용하였다. 또한 동종 isotype 대조항체 및 FITC가 결합된 항 사람 CD14 항체 역시 eBioscience사로부터 구입하여 사용하였다. MAPK 경로 활성 분석을 위한 항 p38-, 항 phospho-p38-, 항 ERK1/2- 및 항 phospho-ERK1/2 항체는 모두 New England Biolabs (Beverly, MA, USA)사의 제품을 구입하여 사용하였다.

5. Western analysis를 이용한 MAPK 인산화 정도 분석

MAPK 인산화 정도 분석은 이전 논문에 보고된 바와 같

이 (33) western analysis 방법을 이용하여 분석하였다. 약술하면, 각 조건에서 배양된 세포 (well 당 4×10^5)를 수집하여, protease inhibitor가 포함되어 있는 sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% bromophenol blue)에 가한 후 초음파기 (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CA, USA)를 이용하여 40초간 sonication을 실시하였다. 이후 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포 추출액을 수집하고 단백질 양을 정량한 후 SDS가 포함된 10% polyacrylamide gel상에서 전기영동하였다. 전기영동 직후 nitrocellulose membrane으로 blotting한 후 5% skim milk가 들어있는 Tris-buffered saline Tween (TBST)로 1시간 동안 상온에서 blocking하였다. 1차 항체 반응을 위해 항 p38-, 항 phospho-p38-, 항 ERK1/2- 및 항 phospho-ERK1/2 항체 (New England Biolabs)를 구입하여 사용하였다. 1차 항체 반응은 각각의 항체를 4°C에서 18시간 동안 반응시켰으며 2차 항체 반응은 peroxidase가 표지된 anti-rabbit IgG 항체 (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Germany)를 37°C에서 1시간 반응하였다. 단백질 발현 밴드의 검출은 detection reagent인 ECL (Amersham-Pharmacia)용액으로 상온에서 1분간 반응시킨 후 X-ray 필름에 감광시켜 원하는 band를 확인하였다.

6. ELISA를 이용한 사이토카인의 측정

각 결핵항원으로 자극한 후 18시간 동안 배양된 세포배양 상층액을 원심분리하여 얻은 다음 TNF- α 및 IL-6 ELISA set (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 이용하

여 상층액 속의 사이토카인을 측정하였다.

7. 통계학적 처리

실험결과는 평균 표준 오차로 나타냈으며 통계적 유의성은 SPSS 통계 프로그램 (version 11.5, Chicago, IL, USA)으로 student's T-test에 의해 검증하였으며 p 값이 0.05 이하를 보이는 경우 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

결 과

1. 결핵균 배양액으로부터 38-kDa 지질당단백질 항원의 분리 정제

여과멸균한 배양액을 20 mM Tris-HCl, pH 8.3/0.02% NaN_3 /1 mM EDTA로 2.5배 희석하여 low pressure chromatography (LP) 시스템을 이용한 anion-exchange chromatography로 1차 분리 정제를 실시한 결과 38-kDa 항원은 0~100 mM NaCl이 포함된 20 mM Tris-HCl, pH 8.3/0.02% NaN_3 /1 mM EDTA에서 용출되었다. 100 mM NaCl 농도에서 용출된 분획들은 모아 초미세여과법으로 농축하여 황산암모늄 염색으로 2차 분리 정제를 실시하였고, 그 결과 38-kDa 항원은 60~70% 황산암모늄에 주로 포함되어 있었다. 60~70% 황산암모늄 염색 분획은 1.8 M 황산암모늄이 포함된 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8/0.02% NaN_3 /1 mM EDTA에 부유하여 LP 시스템을 이용한 hydrophobic interaction chromatography (HIC)로 3차 분리 정제를 시도하였고, 그 결과 38-kDa 항원은 1.2 M

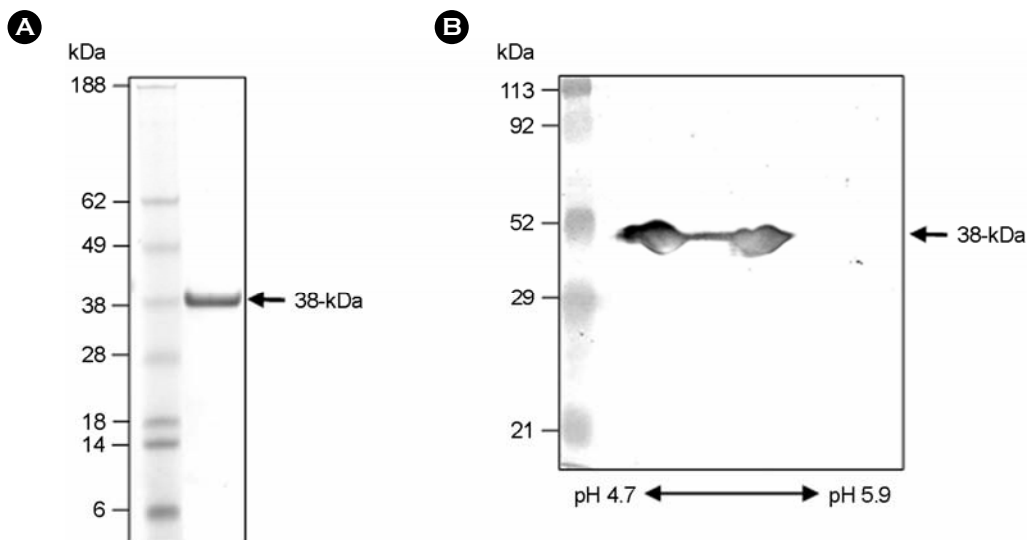


Figure 1. SDS-PAGE analysis of purified 38-kDa antigen (Ag) of *M. tuberculosis* culture filtrate. (A) The 38-kDa Ag was purified from unheated culture filtrate of *M. tuberculosis* H37Rv by ammonium sulfate precipitation and hydrophobic interaction chromatography, and anion exchange chromatography. The antigen was separated by SDS-PAGE and then analyzed by Coomassie blue staining. (B) Purified 38-kDa Ag separated by IEF on pH 4.7~5.9 IPG strip in the first dimension and 12% SDS-PAGE in the second dimension. The second dimension gel was blotted onto nitrocellulose and immunoblotted with rabbit anti-38 kDa polyclonal antibody.

~1.4 M 황산암모늄이 포함된 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8/0.02% NaN₃/1 mM EDTA에서 용출되었다. 최종적으로 FPLC 시스템을 이용한 anion-exchange chromatography (UNO Q6)로 4차 분리 정제를 시도하였을 때 38-kDa 항원은 10~40 mM NaCl이 포함된 20 mM Tris-HCl, pH 8.3/0.02% NaN₃/1 mM EDTA에서 선택적으로 용출되었다. 위와 같은 분리 정제과정을 통하여 결핵균 5 L의 배양 여과액으로부터 1.8 mg의 38-kDa 항원을 회수할 수 있었다 (Fig. 1A). 정제된 38-kDa 항원은 anti-38-kDa 항체를 사용하여 이차원 western blot 분석으로 확인하였다 (Fig. 1B).

2. 결핵균 PPD 및 38-kDa 항원 자극에 의한 말초혈액 단핵구의 TNF- α 및 IL-6 분비능 측정

PPD 및 38-kDa 항원 처리 후 말초혈액 단핵구의 시간 경과에 따른 TNF- α 및 IL-6의 생성능을 비교하기 위하여 건강인 대조군의 말초혈액 단핵구를 분리한 후 PPD 및 38-kDa

항원을 각각 5 μ g/ml의 농도로 처리하였다. 각각 6, 18, 48 및 96시간 자극한 후 각 배양 상층액으로부터 사이토카인의 생성능은 Fig. 2와 같았다.

건강인의 말초혈액 단핵구를 분리하여 PPD 항원으로 자극 시 항원 처리 후 6시간의 TNF- α 농도 평균 및 표준편차는 301.0 \pm 127.8 pg/ml로 매우 높은 생성을 나타내었고, 18시간에서의 생성은 1213.3 \pm 96.1 pg/ml로 매우 높게 증가되었다. 이후 48 및 96시간에는 각각 445.0 \pm 141.9 pg/ml 및 237.6 \pm 50.2 pg/ml로 오히려 서서히 감소하는 양상을 나타냈다. 38-kDa 항원에 대하여 18시간에서의 TNF- α 농도 평균 및 표준편차는 716.7 \pm 60.0 pg/ml의 가장 높은 생성을 나타냈고, 이는 동일한 시간대의 PPD 항원 처리 시보다 낮은 양상이었다.

건강인의 말초혈액 단핵구를 분리하여 5 μ g/ml 최종 농도의 PPD 항원으로 자극 후 6, 18시간의 IL-6 농도 평균 및 표준편차는 각각 1353.4 \pm 56.1 pg/ml, 12915.8 \pm 1430.3 pg/ml로

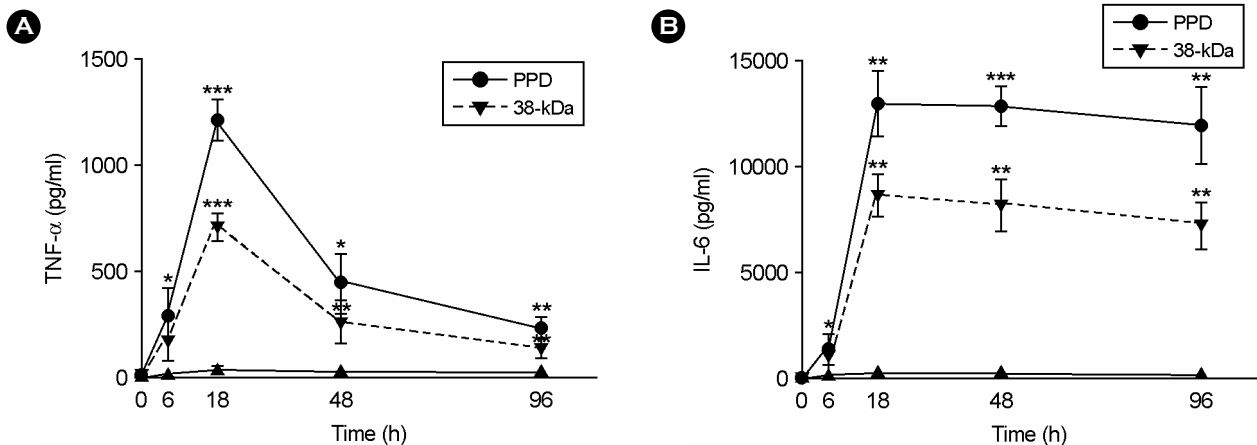


Figure 2. The PPD or 38-kDa Ag-induced TNF- α and IL-6 secretion in human monocytes. Human monocytes were stimulated with the PPD or 38-kDa Ag (5.0 μ g/ml, for each) for 0, 6, 18, 48, and 96 h. The TNF- α (A) and IL-6 (B) production were measured by ELISA. The cytokine synthesis by cells stimulated with the 38-kDa Ag was statistically compared with those by unstimulated control. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. The error bars indicate SD.

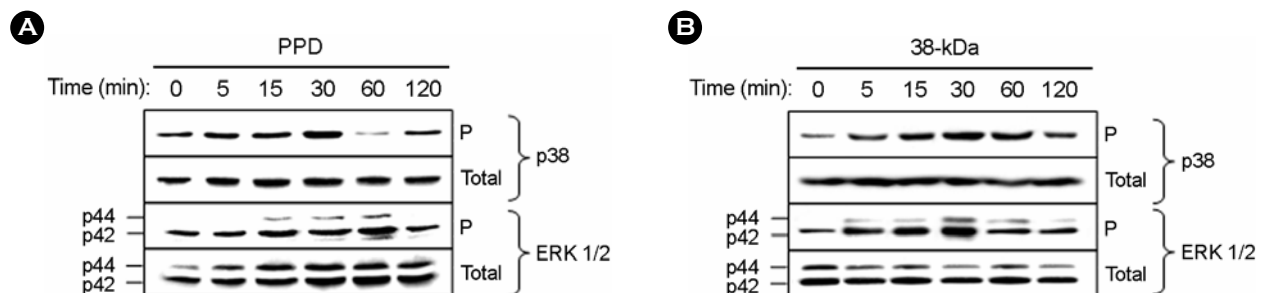


Figure 3. The PPD or 38-kDa Ag-induced MAPK activation from human monocytes. Human monocytes were stimulated with the PPD (A) or 38-kDa (B) Ag for the times indicated. The cells were lysed, and aliquots of the total cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted as described. The blots were incubated overnight with specific anti-phospho-ERK 1/2, anti-phospho-p38, or control Ab each for the unphosphorylated form, followed by appropriate peroxidase-coupled secondary reagents, and were visualized using ECL. Similar data were obtained in six independent experiments. P, phosphorylated form of Ab; total, total form of Ab.

로 유사한 생성 양상을 나타내었다. 이 후 96시간에서 887.9 ± 39.7 ng/ml의 가장 높은 생성을 확인하였다. 38-kDa 항원은 시간 경과에 따른 증가 정도가 PPD 항원과 같은 양상으로 자극 후 18시간에서 8610.5 ± 953.5 pg/ml의 가장 높은 생성을 나타내었으나, 그 생성량은 PPD 항원 처리 시보다 감소되었다.

3. 말초혈액 단핵구에 대한 결핵균 PPD 및 38-kDa 항원 자극 후 MAPK 활성화 분석

말초혈액 단핵구를 PPD 및 38-kDa 항원으로 5.0 μ g/ml 농도에서 5분부터 48시간까지 다양한 시간대로 자극한 후 MAPK 활성도를 인산화된 ERK 1/2 및 p38 MAPK에 대한 특이 항체를 이용하여 western analysis에 의해 확인하였다 (Fig. 3). 38-kDa 항원으로 자극한지 5분부터 단핵구에서 p38

MAPK의 활성화가 관찰되었으며 항원 자극 후 15분 내지 30분에 p38 MAPK 인산화의 정도가 가장 높았다. 말초혈액 단핵구 별로 약간의 차이는 있었으나, ERK 1/2의 인산화 최고치는 PPD 및 38-kDa 항원 자극 후 30분 내지 60분에 주로 관찰되었다. 대조군으로 단핵구를 1 μ g/ml 농도의 LPS로 자극하였으며 PPD 및 38-kDa 항원과 유사하거나 강한 signal 반응이 관찰되었다 (결과는 제시하지 않음).

4. MAPK 활성이 PPD 및 38-kDa 항원 자극에 의한 TNF- α 및 IL-6 생산에 미치는 영향

ERK 1/2 및 p38 MAPK 경로는 *M. tuberculosis* H37Rv에 의한 사이토카인 생성에 매우 중요한 역할을 담당하기 때문에 (34) 이들 신호전달경로의 활성이 결핵균 PPD 및 38-kDa 항원 자극에 의한 TNF- α 및 IL-6 생성에 어떤 역할을 하는

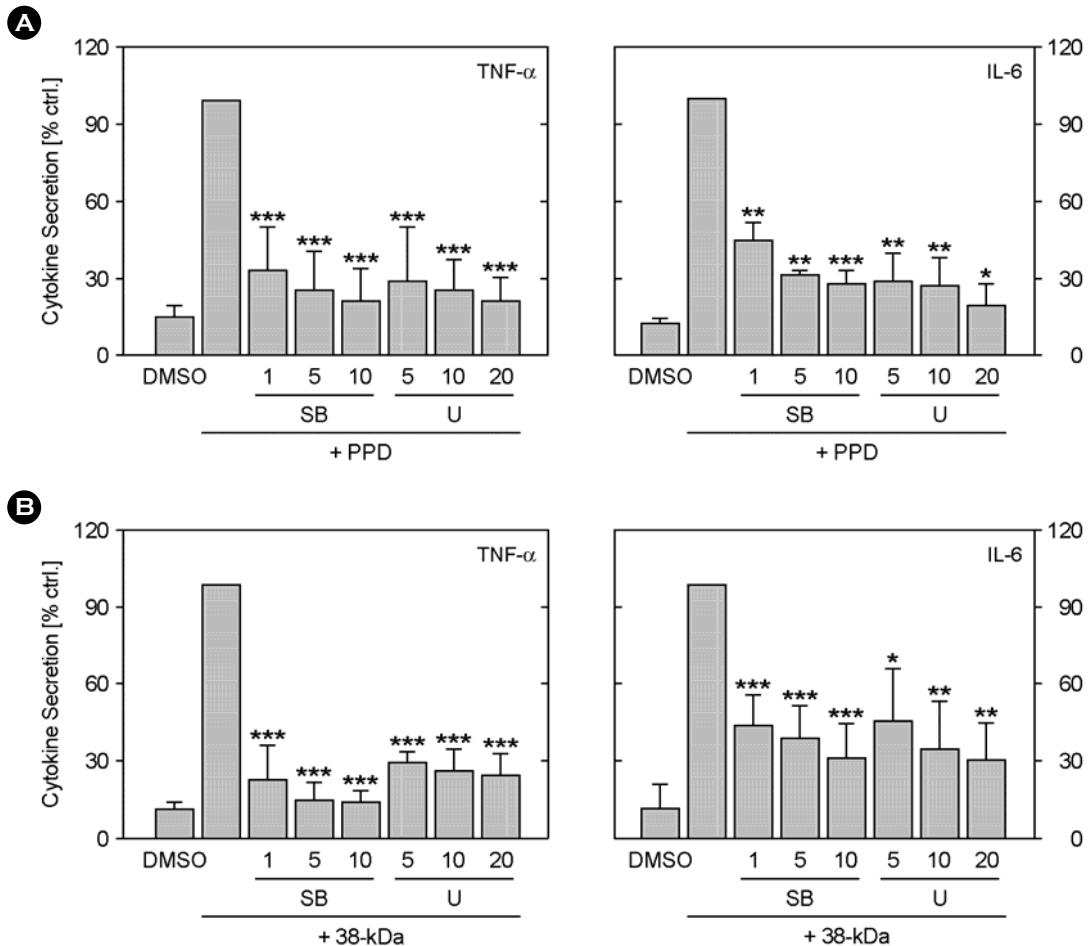


Figure 4. Effects of MEK or p38 MAPK inhibitors on the PPD or 38-kDa -mediated TNF- α - and IL-6 production. The MEK inhibitor (U0126) or p38 MAPK (SB203580) was added to monocytes at concentrations ranging from 5 to 20 μ M at 45 min before stimulation with the PPD (A) or 38-kDa Ag (B) of *M. tbc* (5.0 μ g/ml). The supernatants were harvested after 18 h for cytokine assessment using ELISA. Similar data were obtained in five independent experiments. The mean levels (plus standard errors of the mean) of TNF- α or IL-6 following stimulation with the PPD or 38-kDa Ag were set to 100, and the relative loss of cytokine production in the presence of inhibitor is shown. The solvent control was 0.1% DMSO. SB, SB203580; U, U0126.

지 조사하고자 하였다. 말초혈액 단핵구를 p38 MAPK에 대한 특이 억제제 (SB203580) 혹은 MEK 특이 억제제 (PD-98059 혹은 U0126)으로 45분간 전처리한 후 PPD 및 38-kDa 항원으로 자극하였다. U0126 및 PD98059는 DMSO 용매제 내에 최종 농도가 0.1%가 되도록 용해되어 있었기 때문에 이 농도의 DMSO를 대조군으로 사용하였다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 말초혈액 단핵구에 대한 U0126 전처리에 의해 PPD 혹은 38-kDa 항원 자극 후 TNF- α 생성이 매우 유의하게 감소되었다 ($p < 0.001$, for both antigens). 또한 p38 MAPK 억제제인 SB203580 전처리에 의해 PPD 혹은 38-kDa 항원 자극 후 TNF- α 생성이 매우 유의하게 감소하였다. 이와 유사하게 PPD 및 38-kDa 항원 자극에 의한 IL-6의 생성도 ERK 1/2 및 p38 MAPK 억제제의 전처리에 의해 매우 유의하게 감소되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4).

5. PPD 및 38-kDa 항원 자극 후 TNF- α 및 IL-6 발현에 대한 TLR2 및 4 의존도 분석

이전 연구에 의하면 *M. avium*에 의해 유도되는 ERK 1/2 및 p38 MAPK 활성화는 TLR2 신호전달에 의존하였다고 한다 (30). 따라서 저자들은 본 연구에서는 PPD 및 38-kDa 항원에 의한 MAPK 활성화에 TLR2 혹은 TLR4 수용체가 관여하는지 조사하고자 하였다. 이를 평가하기 위해 말초혈액 단핵구를 TLR2 혹은 TLR4에 대한 중화 기능을 갖는 단클론 항체 혹은 이에 대한 대조항체로 실온에서 30분간 전처리하고 항원 자극을 수행하였다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 38-kDa 항원에 의해 유도되는 TNF- α 의 생성은 항 TLR2 항체의 전처리에 의해 매우 현저하게 감소하였으나 (59.8%), 항 TLR4 항체의 전처리에 의해

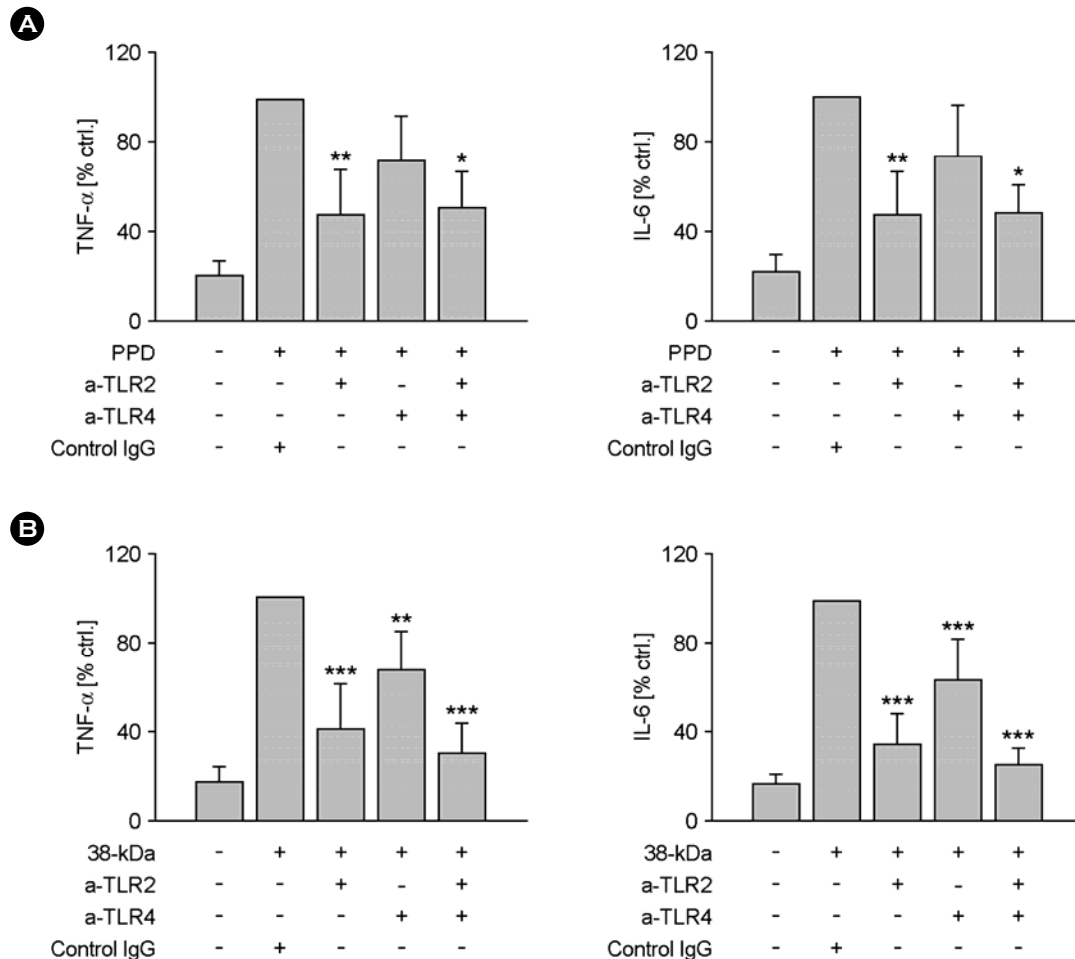


Figure 5. Effects of anti-TLR2 or anti-TLR4 mAbs on the PPD or 38-kDa-mediated TNF- α and IL-6 production. Human monocytes were preincubated with the indicated amounts of anti-TLR2, anti-TLR4, or isotype control Abs (1 μ g/ml) and challenged with the PPD (A) or 38-kDa (B) Ag subsequently for 30 minutes. The supernatants were harvested after 18 h for cytokine assessment using ELISA. Similar data were obtained in five independent experiments. The mean values (plus standard errors of the mean) of TNF- α or IL-6 following stimulation with the 38-kDa Ag were set to 100, and the relative loss of cytokine production in the presence of neutralizing Abs was shown. The solvent control was 0.1% DMSO.

서는 보다 약하게 감소하였다 (33.0%). TNF- α 생성의 경우와 마찬가지로 38-kDa 항원에 의한 IL-6 생성도 항 TLR4 항체의 전처리 (36.1%)에 비해 항 TLR2 항체의 전처리 (65.1%)에 의해 매우 현저하게 감소하였다. 이들 사이토카인의 발현은 대조항체의 전처리에 의해서는 유의한 감소나 증가를 나타내지 못하였다.

한편 PPD 항원에 의해 유도되는 TNF- α 및 IL-6 생성은 항 TLR2 항체의 전처리에 의해서 매우 유의하게 감소되었으나 ($p < 0.01$) 항 TLR4 항체의 전처리에 의해서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 38-kDa 항원에 의해 유도되는 전염증성 사이토카인의 발현이 주로 TLR2 경로를 경유하며 일부 TLR4를 경유하는 반면, PPD 항원에 의한 전염증성 사이토카인의 생성은 TLR2 경로에 의존하는 것으로 사료된다.

고 찰

대부분의 TLR 리간드는 감염이 발생되었다는 것을 알리는 미생물 성분들로 구성되어 있다 (18). TLR2 리간드는 세균의 지질단백질 (7), 펩티도글리칸 (33), 미코박테리아 지질당단백질 성분들 (22) 및 *Leptospira interrogans*와 *Prophyromonas gingivalis*의 LPS 성분 (17)으로 구성되어 있다. 세포 밖으로 분비되거나 혹은 세포벽과 관련된 미코박테리아 성분들 역시 특정 TLR 단백질의 활성화와 밀접한 연관이 있다 (29). 미코박테리아의 세포벽 지질당단백질, lipoarabinomannan 및 mannosylated phosphatidylinositol (PIM) 등은 TLR2를 경유하여 세포를 활성화시킨다 (14,21). 또한 결핵균의 초기 배양액 (short term culture filtrates; STF)도 주로 PIM을 함유한 물질로 TLR2 활성화자로 보고되었다 (21).

또 다른 패턴인식수용체인 TLR4의 리간드로서 외인성 인자인 그람음성균의 LPS (31) 이외에도 내인성 리간드인 fibronectin, heat shock proteins 및 hyaluronan oligosaccharides 등이 보고되었다 (24). 현재까지 결핵균의 TLR4 리간드 성분이 무엇인지 명확하고 보고되어 있지 못하나 최근 연구에 의하면 결핵균의 heat shock protein 65가 주로 TLR4를 경유함이 밝혀졌다 (8). 또한 우형결핵균인 BCG균 역시 TLR2 및 TLR4를 모두 경유하며 하위신호전달경로에서 MyD88과 같은 어댑터 분자를 통하여 케모카인인 CXCL8의 전사 및 활성을 유도한다 (15). 본 연구에서 결핵균 38-kDa 항원은 말초혈액 단핵구에서 주로 TLR2를 경유하여 MAPK 활성을 유도하였으나 부분적으로 TLR4 역시 MAPK 활성에 기여함을 알 수 있었다. 한편 PPD 항원에 의한 사이토카인의 활성화는 TLR2에 의해서 일어남을 알 수 있었으며 TLR4에 대한 중화항체를 사용한 경우 사이토카인의 변화를 관찰할 수 없

었다.

현재까지 가장 많이 보고된 결핵균 유래 TLR2 리간드는 19-kDa 지질단백질이다 (27). 결핵균 19-kDa 지질단백질이나 lipomannans (LM)은 대표적인 TLR2 리간드로서 대식세포에서 다양한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 19-kDa 지질단백질은 숙주세포의 세포고사를 유도하며 (27), MHC class II 분자의 발현을 억제하고, 마우스의 산화질소 생성을 증가시켜 결핵에 대한 방어에 기여함이 보고되었다 (7). 다양한 미코박테리아 유래의 LM 성분은 각 균종에 따라 마우스 대식세포에서 전염증성 사이토카인의 생성을 자극하거나 억제하는 것으로 나타났다. LM 성분은 TLR2 및 어댑터 분자인 MyD88을 경유하여 TNF- α 및 산화질소의 생성을 통해 대식세포의 활성을 유도하며 이는 TLR4 혹은 TLR6 경로와는 무관하였다 (32). 따라서 본 연구에서 PPD 항원 성분 중 LM 혹은 기타 TLR2를 자극하는 지질단백질성분이 있는지, 그리고 38-kDa 지질당단백질 항원의 어떤 구조적 모티프가 주로 TLR2 혹은 TLR4와 반응하는가에 대한 보다 면밀한 조사가 필요할 것으로 사료된다.

최근, 다양한 세포모델에서 다양한 자극에 의해 유도되는 염증성 사이토카인 발현의 세포 내 신호전달경로에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 MAPK 신호전달경로는 면역반응에 의해 매개되는 염증성 반응의 조절에 중요한 조절자이며 이러한 염증반응의 조절은 인간의 많은 질병과 관련성이 높기에 많은 연구가 집중되고 있다. 결핵균 자체로 단핵구를 처리했을 때 TNF- α 와 IL-6이 많이 분비되는 현상은 이미 본 논문의 저자들의 과거 연구에 의해 보고된 바 있다 (37). 또한 PPD 혹은 정제된 Ag85 complex, MTB12 항원에 의해 전염증성 사이토카인 분비가 증가됨이 보고되었다 (25, 26). 그러나 본 연구자들의 예비 실험에 의하면 결핵균 자체를 처리했을 때 정제된 항원들을 처리한 경우에 비해 매우 높은 양의 전염증성 사이토카인 분비가 일어남을 알 수 있었다 (결과는 제시하지 않음). 본 연구에서 PPD 및 38-kDa 항원은 공히 말초혈액 단핵구에서 MAPK 활성화 및 TNF- α 및 IL-6의 생성을 유도하였다. ERK 1/2 및 p38 MAPK의 특이적 억제제를 농도 별로 전처리한 후 각 항원을 자극한 결과 말초혈액 단핵구의 TNF- α 및 IL-6 생성은 매우 유의하게 감소하였다. 또한 38-kDa 항원에 비해 PPD 항원에 의한 TNF- α 및 IL-6의 생성이 유의하게 증가되어 있었으며 MAPK 활성화도 PPD 항원에 의한 자극이 38-kDa 항원에 의한 경우보다 강하게 나타나 사이토카인의 생성과 일치하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 ERK 1/2 및 p38 MAPK 경로가 PPD 및 38-kDa 항원에 의한 TNF- α 및 IL-6 생성에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다. 또한 PPD 항원이 38-kDa 항원에 비해 보다 강력한 MAPK 활성화자임을 알

수 있다. 그리고 38-kDa 항원에 의한 TNF- α 및 IL-6의 생성이 항-TLR2 혹은 항-TLR4 항체에 의해 모두 유의하게 감소되는 것으로 비추어 볼 때, 양쪽 신호전달경로 모두 전염증성 사이토카인의 발현에 기여함을 알 수 있다.

세포 내 MAPK 신호전달경로를 담당하는 단백질군은 다양한 면역반응에서 매우 필수적인 역할을 수행하며 (12) ERK, p38 MAPK 및 stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) 등의 인산화효소 단백질들로 구성되어 있다. 면역계에서 MAPK 활성화는 TNFRI 및 IL-1R, 패턴인식 수용체, 특히 TLR family 등과 같은 다양한 수용체의 자극에 의해 이루어진다 (35). MAPK 신호전달경로의 활성화는 IL-12 p40, TNF- α , IL-6 및 inducible nitric oxide synthase 등과 같이 미생물 감염 시 유리되는 중요한 방어물질의 생성과 깊은 연관이 있다 (11). 특히 p38 MAPK의 활성화는 수많은 사이토카인의 발현과 면역반응의 활성화에 매우 중요한 역할을 한다 (20). 본 연구는 정제된 결핵항원인 38-kDa 항원에 의해 유도되는 MAPK 활성화 및 전염증성 사이토카인의 생성에는 TLR2와 TLR4가 모두 관여한다는 기존의 보고를 확인하였으며 (23), PPD 항원의 경우 TLR2만을 경유한다는 사실을 새롭게 보고하고 있다.

결핵균 항원은 크게 세포벽항원과 분비항원으로 구분되며 특히 감염 후 세포 외로 분비되는 분비항원은 항결핵 백신 및 진단용 항원으로서의 가능성에 대해 많이 보고되었다 (3, 10). 38-kDa 항원은 사람 및 마우스 림프구에서 강력한 T 세포 면역원성이 보고된 바 있으며 (36), 또한 결핵 환자 및 건강한 대조군에서 38-kDa 단백질항원의 CD4+ T 세포를 자극하는 에피토프가 동정되었다 (36). Zhu 등 (38)은 C57BL/6 마우스를 대상으로 한 38-kDa 항원 DNA 백신 연구에서 병원성 결핵균에 대한 방어능을 보고하였다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 38-kDa 단백질항원은 인체결핵 및 동물모델에서 숙주면역반응 연구에 매우 유용한 후보 항원의 하나로 생각된다. 본 연구에서는 고유하고 독창적인 방법으로 결핵균 배양액으로부터 native 38-kDa 지질당단백질 항원을 정제 분리할 수 있었다. 38-kDa 항원은 유전자 전사 후 단백질 합성이 일어난 다음에도 다양한 modification에 의해 당질 및 지질 성분들이 결합되는 단백질항원이므로 기존의 대장균 내 유전자 재조합 기법에 의해서는 native protein과는 성상이 다른 단백질 합성이 이루어질 가능성이 높다. 본 연구의 독창적인 단백질 분리 기법으로 결핵균 배양액 5 리터로부터 1.8 mg의 비교적 높은 단백질 회수율을 얻었으며 앞으로 이 항원을 이용한 다양한 결핵 면역 연구에 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서 결핵균 배양액으로부터 분리 정제된 38-kDa 지질당단백질 및 PPD 항원에 의한 ERK 1/2 및 p38 MAPK

의 활성화는 전염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 분비에 필수적인 기능을 하였다. 각 항원의 패턴인식수용체 의존도를 조사한 결과 38-kDa 항원에 의한 전염증성 사이토카인의 발현은 TLR2 및 4 수용체가 모두 관여하는 반면, PPD 항원에 의한 경우에는 TLR2 수용체만이 관여하는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) 백태현, 권혜숙, 이선, 이지숙, 조은경, 김화중, 이미리나, 유영춘, 박정규: 결핵균의 TSP 균체항원으로부터 특이항원의 분리 및 특성 분석. *J Bact Virol* **34**: 273-282, 2004.
- 2) 이지숙, 백태현, 유영춘, 이정림, 신아름, 송창화, 조은경, 김화중, 박정규: 결핵균 배양여과액으로부터 Ag85 Complex, 38-kDa 및 MTB12 항원의 분리 정제. *J Bact Virol* **36**: 211-221, 2006.
- 3) Andersen P: Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun* **62**: 2536-2544, 1994.
- 4) Andersen P: The T cell response to secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology* **191**: 537-547, 1994.
- 5) Blumenthal A, Ehlers S, Ernst M, Flad HD, Reiling N: Control of mycobacterial replication in human macrophages: roles of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *Infect Immun* **70**: 4961-4967, 2002.
- 6) Bothamley GH, Beck JS, Potts RC, Grange JM, Kardjito T, Ivanyi J: Specificity of antibodies and tuberculin response after occupational exposure to tuberculosis. *J Infect Dis* **166**: 182-186, 1992.
- 7) Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang R-B, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science* **285**: 732-736, 1999.
- 8) Bulut Y, Michelsen KS, Hayrapetian L, Naiki Y, Spallek R, Singh M, Arditi M: *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *J Biol Chem* **280**: 20961-20967, 2005.

- 9) **Chang Z, Choudhary A, Lathigra R, Quijcho FA:** The immunodominant 38-kDa lipoprotein antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a phosphate-binding protein. *J Biol Chem* **269**: 1956-1958, 1994.
- 10) **Collins HL, Kaufmann SH:** The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology* **103**: 1-9, 2001.
- 11) **Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L, Kim L:** Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. *Immunol Rev* **201**: 191-205, 2004.
- 12) **Dong C, Davis RJ, Flavell RA:** MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* **20**: 55-72, 2002.
- 13) **Fonseca DP, Benaissa-Trouw B, van Engelen M, Kraaijeveld CA, Snippe H, Verheul AF:** Induction of cell-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines encoding cytotoxic and helper T-cell epitopes of the 38-kilodalton protein. *Infect Immun* **69**: 4839-4845, 2001.
- 14) **Garcia I, Miyazaki Y, Marchal G, Lesslauer W, Vassalli P:** High sensitivity of transgenic mice expressing soluble TNFR1 fusion protein to mycobacterial infections: synergistic action of TNF- α and IFN- γ in the differentiation of protective granulomas. *Eur J Immunol* **27**: 3182-3190, 1997.
- 15) **Gilleron M, Quesniaux VF, Puzo G:** Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its implication in Toll-like receptor response. *J Biol Chem* **278**: 29880-29889, 2003.
- 16) **Harboe M:** The significance of proteins actively secreted by *Mycobacterium tuberculosis* in relation to immunity and complications of mycobacterial diseases. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **60**: 470-476, 1992.
- 17) **Harboe M, Wiker GH:** The 38 kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *J Infect Dis* **166**: 874-884, 1992.
- 18) **Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN:** Signaling by TLR2 versus TLR4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* **69**: 1477-1482, 2001.
- 19) **Janssens S, Beyaert R:** Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* **16**: 637-646, 2003.
- 20) **Jo EK, Park JK, Dockrell HM:** Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* **16**: 205-210, 2003.
- 21) **Johnson GL, Lapadat R:** Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**: 1911-1912, 2002.
- 22) **Jones BW, Heldwein KA, Means TK, Saukkonen JJ, Fenton MJ:** Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann Rheum Dis* **60** Suppl **3**: iii6-12, 2001.
- 23) **Jung SB, Yang CS, Lee JS, Shin AR, Jung SS, Son JW, Harding CV, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Song CH, Jo EK:** The mycobacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. *Infect Immun* **74**: 2686-2696, 2006.
- 24) **Keane J, Gershon S, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, Braun MM:** Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* **345**: 1098-1104, 2001.
- 25) **Lee JS, Son JW, Jung SB, Kwon YM, Yang CS, Oh JH, Song CH, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Jo EK:** Ex vivo responses for interferon- γ and proinflammatory cytokine secretion to low-molecular-weight antigen MTB12 of *Mycobacterium tuberculosis* during human tuberculosis. *Scand J Immunol* **64**: 145-154, 2006.
- 26) **Lee JS, Song CH, Lim JH, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Kim CH, Kong SJ, Shon MH, Jung SS, Jo EK:** The production of tumour necrosis factor- α is decreased in peripheral blood mononuclear cells from multidrug-resistant tuberculosis patients following stimulation with the 30-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol* **132**: 443-449, 2003.
- 27) **Lopez M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE:** The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J Immunol* **170**: 2409-2416, 2003.
- 28) **Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ:** The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**: 219-232, 2000.
- 29) **Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock D, Fenton M:** Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **163**: 3920-3927, 1999.
- 30) **Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B:** Defective

- LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**: 2085-2088, 1998.
- 31) **Quesniaux VJ, Nicolle DM, Torres D, Kremer L, Guerardel Y, Nigou J, Puzo G, Erard F, Ryffel B**: Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol* **172**: 4425-4434, 2004.
 - 32) **Rao K**: MAP kinase activation in macrophages. *J Leukoc Biol* **69**: 3-10, 2001.
 - 33) **Song CH, Lee JS, Lee SH, Lim K, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Jo EK**: Role of mitogen-activated protein kinase pathways in the production of tumor necrosis factor- α , interleukin-10, and monocyte chemoattractant protein-1 by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv-infected human monocytes. *J Clin Immunol* **23**: 194-201, 2003.
 - 34) **Tracey KJ, Cerami A**: Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* **45**: 491-503, 1994.
 - 35) **Underhill D, Ozinsky A, Smith K, Aderem A**: Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14459-14463, 1999.
 - 36) **Weir RE, Black GF, Dockrell HM, Floyd S, Fine PE, Chagulukula SD, Stenson S, King E, Nazareth B, Warndorff DK, Ngwira B, Crampin AC, Mwaungulu L, Sichali L, Jarman E, Donovan L, Blackwell JM**: Mycobacterial purified protein derivatives stimulate innate immunity: Malawians show enhanced tumor necrosis factor α , interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-10 responses compared to those of adolescents in the United Kingdom. *Infect Immun* **72**: 1807-1811, 2004.
 - 37) **Yang CS, Lee JS, Song CH, Hur GM, Lee SJ, Tanaka S, Akira S, Paik TH, Jo EK**: Protein kinase C ζ plays an essential role for *Mycobacterium tuberculosis*-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes/macrophages via Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol* **9**: 382-396, 2007.
 - 38) **Zhu X, Venkataprasad N, Thangaraj HS, Hill M, Singh M, Ivanyi J, Vordermeier HM**: Functions and specificity of T cells following nucleic acid vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* **158**: 5921-5926, 1997.
-