

Peptidylarginine Deiminase and Citrullination: Potential Therapeutic Targets for Inflammatory Diseases

Byungki Jang and Sung Jae Shin*

Department of Microbiology and Institute for Immunology and Immunological Diseases, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

The multiple post-translational modifications of proteins display specific gain- or loss-of-function under normal and abnormal conditions. These modifications are precisely regulated by post-translational modification enzymes. The altered molecular status perturbs the pattern of gene expression and decides on a direction to signal transduction cascades as well as intrinsic properties of the proteins. Ultimately, it strictly maintains intracellular environment or results in disease manifestations. Recently, it has become that enzyme-dependent modification of arginine residue to citrulline exerts an important role in the induction of autoimmunity including rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, and cancer. The modification of arginine residue to citrulline on proteins is called 'citrullination' or 'deimination' and is regulated by the calcium-dependent enzyme peptidylarginine deiminase (PAD). Now many effective PAD inhibitors (for example, Cl-amidine) have developed that ameliorates disease phenotypes. In this review, we discuss crucial roles of PAD enzyme and citrullination, the effectiveness of PAD inhibitors, and the implication in pathology.

Key Words: Peptidylarginine deiminase, Cl-amidine, Autoimmunity, Citrullination

서론

최근 10년 이상의 연구에서 단백질 번역 후 변형(post-translational modification)의 한 종류로 단백질의 아르기닌(arginine) 잔기가 시트룰린(citrulline)으로 변형되는 시트룰린화(citrullination 또는 deimination)와 이 과정을 매개하는 peptidylarginine deiminase (PAD) 효소가 다양한 면역질환 및 퇴행성 신경질환의 병리학적 특징에 관여하는 것으로 제시되고 있다. 또한 PAD 억제제의 개발과 이를 이용한 면역질환유발 동물 모델에서의 치료 효과 검증 연구는 PAD 억제제가 치료 전략으로 응용될 수 있음을 제

시하였다. 본 논문에서는 다양한 면역질환에서 PAD, 시트룰린화된 단백질 그리고 PAD 억제제의 역할과 효과에 대해 알아보고 다양한 염증질환에 이용될 수 있는지에 대해 논하고자 한다.

1. Peptidylarginine deiminase (PAD)

최근 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 다발성 경화증(multiple sclerosis) 그리고 암(cancer)과 같은 자가면역질환에서 공통적으로 PAD (EC 3.5.3.15) 효소와 이 효소의 활성화에 의해 특이적으로 변형된 시트룰린화된 단백질(citrullinated proteins 또는 deiminated proteins)의 과발현 및 축적이 보고되었다 (1~5). 시트룰린(citrulline)은 비필

Received: July 12, 2013/ Revised: July 25, 2013/ Accepted: August 2, 2013

*Corresponding author: Sung Jae Shin. Department of Microbiology and Institute of Immunology and Immunological Diseases, Yonsei University College of Medicine, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea.

Phone: +82-2-2228-1813, Fax: +82-2-392-9310, e-mail: sjshin@yuhs.ac

**This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (NRF-2013R1A1A2009822).

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

수 아미노산으로, DNA로부터 만들어지는 20개의 필수 아미노산과 달리 RNA 전사체나 DNA codon은 발견되지 않고 있다. 일반적으로 시트룰린은 nitric oxide synthase (NOS)가 아르기닌(arginine; free form)을 이용해 nitric oxide (NO) 합성 시 부가산물로 생성된다고 잘 알려져 있다. 그러나 1939년 Fearon의 연구에서 알부민(albumin), 피브린(fibrin), 글루텐(gluten) 등의 단백질 서열에 시트룰린이 포함되어 있다는 것을 밝혔고 (6), 단백질 내 시트룰린의 존재는 번역 후 변형(post-translational modification)에 의해 생성될 것으로 추측되었다. 1977년 Rogers의 연구에서 칼슘 의존적으로 단백질의 아르기닌을 시트룰린으로 바꾸는 효소를 찾게 되었고 (7), 이후 여러 연구자들에 의

해 protein-arginyl deiminase 또는 peptidylarginine deiminase로 명명되었다.

PAD는 세균에서부터 척추동물에 이르기까지 폭넓게 존재하는 것으로 알려져 있으며, 비척추동물과 척추동물 사이에 homology는 높지 않는 것으로 보고되었다. 현재까지 세균에서 PAD 활성도를 가지고 있는 것은 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) PAD (PPAD)가 알려져 있으나 사람이나 마우스의 PAD와 달리 칼슘 의존적이지 않고 단백질의 아르기닌 잔기뿐만 아니라 단일 아르기닌 아미노산을 시트룰린으로 변형시킨다고 보고되었다 (1). 현재 포유동물인 사람, 마우스, 랫드에서 5개의 PAD isoform (PAD1-4, 6)이 동정되었으며, 이들 isoform은

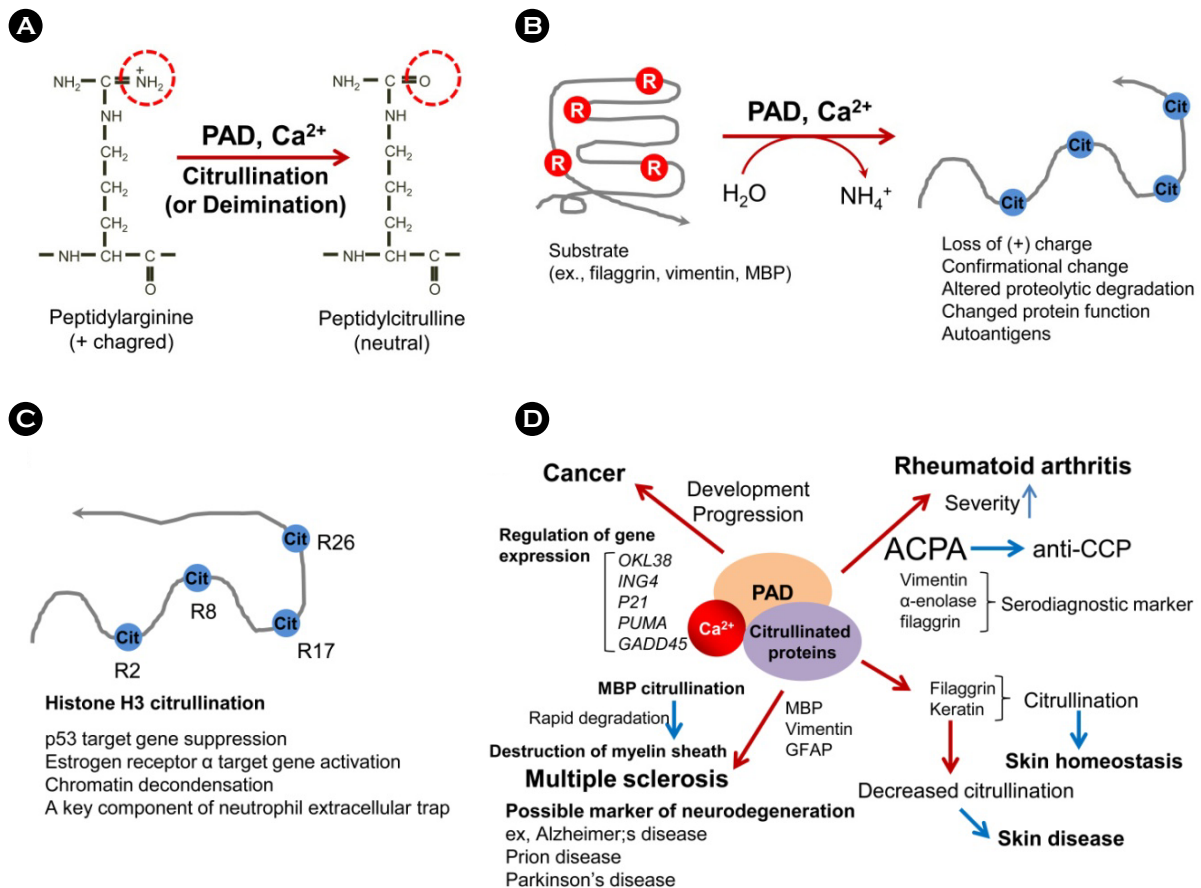


Figure 1. Peptidylarginine deiminase (PAD) and citrullination. (A) The conversion of peptidylarginine to peptidylcitrulline is a posttranslational process driven by peptidylarginine deiminase (PAD) in a calcium (Ca^{2+}) dependent manner. Ca^{2+} is an essential cofactor for the activation of PAD, effective Ca^{2+} concentration is approximately 100-fold higher than physiological cytosolic Ca^{2+} concentration. (B) Citrullination loss of target positive charge, alters protein structure and susceptibility of protease, changes natural functions, and become autoantigen. (C) Histone citrullination is involved in chromatin decondensation and formation of neutrophil extracellular traps. Citrullinated histones regulate gene transcription including p53- and estrogen receptor α -targeted. (D) PAD and citrullinated proteins are implicated in human diseases including cancer, rheumatoid arthritis, skin physiology, and neurodegeneration.

약 74~78 kDa의 크기로 70~95%의 homology를 갖고, 모든 isoform은 칼슘에 의해 활성을 갖는 것으로 확인되었다 (1). 특이하게도 *in vitro* 연구에서 PAD는 1~2.5 mM의 고농도 칼슘에 의해 최고 활성을 나타내며, 세포수준에서 일반적으로 100 nM 정도인 세포질 칼슘 농도가 약 100배 증가할 때 활성을 나타낸다고 알려지고 있다 (8). PAD의 기질은 아르기닌이 포함된 최소 펩타이드 분자이며, NOS와 달리 아르기닌 단일 분자를 시트룰린으로 변형시키지는 못한다. 즉, PAD는 고농도의 칼슘 이온 의존적으로 활성화되어 기질 단백질 서열 중 아르기닌 잔기를 시트룰린으로 변형시키는 효소로써 부가산물로 암모니아가 생성되며(Fig. 1A), 이 효소에 의해 번역 후 변형된 형태인 시트룰린화된 단백질은 (+) charge를 잃게 되어 등전점(isoelectric point) 값의 변화, 변형된 아르기닌 잔기 하나당 1 Da 분자량 증가, 단백질 구조 변화, 그에 따른 단백질-단백질 결합 등 고유의 성질이 다양하게 변화된다(Fig. 1B) (1).

5개의 PAD isoform은 조직 및 세포 특이적으로 발현한다고 알려져 있다(Table 1) (1). PAD1은 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)과 EST (expressed sequence tag) 결과에 의해 대부분의 조직에서 검출되나 단백질은 주로 피부의 표피(epidermis)와 자궁(uterus)에서 발현하는 것으로 알려져 있다. 케라틴 형성 세포(keratinocytes)의 말단분화(terminal differentiation) 시, 케라틴 K1과 K10 그리고 filaggrin 단백질이 시트룰린화 된다고 알려져 있고 시트룰린화에 의해 케라틴 세포골격의 유연성(flexibility)이 감소하며, 표피의

각질화에 관여하는 것으로 알려져 있다. PAD2는 대부분의 모든 조직(예를 들어 뇌, 근육, 비장, 골수 그리고 피부)에서 발현하며, 퇴행성 신경질환의 뇌조직에서 발현이 증가하고 이에 따라 시트룰린화된 glial fibrillary acidic protein나 myelin basic protein (MBP)과 같은 뇌조직 단백질이 과 축적된다. PAD3는 PAD1과 PAD2와 마찬가지로 표피와 모낭(hair follicles)에서 주로 발현하며, S100A3와 케라틴 단백질을 시트룰린화 시킨다 (9~11). 특이하게도 PAD4는 nuclear localization signal 서열을 가지고 있어 핵(nucleus)에서도 발현하며 (12), 히스톤(histone) 단백질의 아르기닌 또는 단일메틸화된(monomethylated) 아르기닌의 시트룰린화를 통해 다양한 단백질들, 특히 p53에 의해 조절되는 단백질들의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있어 다양한 암세포에서 전사조절인자로써 많은 연구가 되고 있다 (13~17). 또한 PAD4는 히스톤 단백질의 decondensation과 neutrophil extracellular formation (NET) 형성에 중요한 역할을 하며, 항박테리아 선천 면역에 중요한 역할을 한다고 보고되었다 (18, 19). 최근에는 PAD2 또한 핵에서 발현하며 히스톤 H3의 Arg26의 시트룰린화를 통해 염색질(chromatin)의 decondensation과 estrogen receptor α 에 의해 조절되는 유전자의 활성을 유도한다고 알려졌다(Fig. 1C) (20). 마지막으로 PAD6는 생식세포에서 발현하며, 난모세포(oocyte)의 세포골격 형성과 암컷의 생식에 관여한다고 알려져 있다 (21, 22).

2. PAD, 시트룰린화 그리고 자가면역질환

PAD와 시트룰린화된 단백질은 다양한 질환, 예를 들어

Table 1. Peptidylarginine deiminase: protein expression and related diseases.

PAD type	Expression: protein	Disease	Target
PAD1	Epidermis, anagen hair follicle, keratinocytes, arrector pili muscles, sweat glands	Skin disorders	Keratins
PAD2	Epidermis, keratinocytes, arrector pili muscles, sweat glands, lung bronchoalveolar lavages (BAL), lymphocytes, macrophages, monocytes, neutrophils, oligodendrocytes, Schwann cells	Alzheimer's disease, Creutzfeldt-Jakob disease, multiple sclerosis, glaucoma, rheumatoid arthritis, Paget's disease Experimental autoimmune encephalomyelitis	Histone H3, vimentin, enolase, myelin basic protein, glial fibrillary acidic protein, tubulin
PAD3	Epidermis, anagen hair follicle, hair cuticle, keratinocytes, neutrophils, Schwann cells	Skin disorders	Keratins, S100A3
PAD4	Lung BAL, bone marrow, CD34+ cells, granulocytes, HL-60, lymphocytes, macrophages, monocytes	Apoptosis, cancer, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis	Histone H3/H4, OKL38
PAD6	Embryo, oocyte	Rheumatoid arthritis	Unknown

퇴행성 신경질환인 크로이츠펔트-야콥 질환(Creutzfeldt-Jakob disease), 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease) 그리고 다발성 경화증부터 염증반응 상태인 류마티스 관절염, 피부건선(psoriasis), 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease) 그리고 종양(cancer) 등의 세포와 조직에서 과발현 및 축적됨으로써 질환의 진행을 가속, 유도 및 악화시키는 인자로 생각되고 있다. 반면 피부조직에서 케라틴 단백질의 시트룰린화는 수분 유지 및 각질 형성에 필요하며, 시트룰린화된 형태의 감소는 피부질환과 연관이 있음이 밝혀졌다(Fig. 1D) (2, 23~28).

자가면역질환 중 하나인 류마티스성 관절염에서 PAD2와 PAD4 그리고 시트룰린화된 단백질의 축적은 관절낭액(synovial fluids)과 관절조직에서 관찰된다 (3~5). 흥미로운 것은 PAD에 의해 시트룰린화된 단백질들이 자가항원으로 인식되어 다양한 자가항체들(ACPA; antibodies to citrullinated protein antigens)이 생성된다는 것이다. 현재 혈장 또는 혈청에서 anti-CCP (cyclic citrulline peptide) ELISA 테스트를 통한 ACPA의 검출은 강력하고 유용한 진단 마커로써 사용되고 있다 (25). ACPA는 류마티스성 관절염 환자에서 60~80% 비율로 검출되며, 질환 특이성은 최대 98%에 이르고, 비질환 환자에서는 약 2% 정도로 상대적으로 낮은 것으로 보고되고 있다. 또한 ACPA 양성 환자의 경우 질환의 정도가 더 심각하게 나타나며, 질환 증상 수년 전부터 이 항체가 검출되는 것으로 나타나 발병 가능성까지 예측 가능한 것으로 보고되었다 (25). 최근 보고에 의하면 anti-citrullinated vimentin antibody는 osteoclastogenesis와 뼈 손실을 유도한다고 보고되었다 (29).

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*)는 구강에서 주로 발견되는 그람 음성균으로써 만성 치주염 발병과 밀접한 연관이 있다. 초기에 *P. gingivalis*에서 발현하는 PPAD는 46 kDa의 크기를 가진 단백질로 구강염에서 독성 인자(virulence factor)로 발견되었는데, 그 이유는 이 효소에 의해 부가적으로 생성되는 암모니아는 구강 내의 산성조건에 구강균을 보호하는 역할을 할 뿐만 아니라 호중구의 기능을 막는 것으로 알려져 있다 (30). 펩타이드 서열 중 아르기닌 잔기뿐만 아니라 단일 아르기닌 아미노산을 시트룰린으로 변형시키고, pH 7.5~8.0에서 최상의 효소 활성을 보이며, 단일 아르기닌 보다 아르기닌 잔기를 가진 펩타이드를 시트룰린화 시키는 속도가 더 빠르다고 보고되었다 (31). 그러나 사람과 마우스의 PAD와 달리

PPAD는 칼슘을 보조인자로 필요로 하지 않는다 (1).

특이하게도 *P. gingivalis*와 달리 *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nucleatum*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius* 등과 같은 구강균에서는 시트룰린화된 단백질들이 검출되지 않는다 (32). 흥미롭게도 류마티스 관절염 환자에서 잘 알려진 ACPA 중 α -enolase의 N 말단 부위가 시트룰린화된 형태인 CEP-1 (citrullinated enolase peptide-1)은 *P. gingivalis*의 CEP-1과 82% 정도의 서열 유사성을 보이고, 정제된 사람 CEP-1 항체에 의해 *P. gingivalis*의 CEP-1이 검출된다. 덧붙여 *P. gingivalis*의 단백질들이 평상시에도 PPAD에 의해 시트룰린화되어 있으며, PPAD는 사람의 fibrinogen, α -enolase 그리고 vimentin과 같은 단백질 또한 시트룰린화 시킨다 (31, 32). 따라서 *P. gingivalis*에 존재하는 시트룰린화된 단백질과 PPAD에 의한 숙주 단백질의 시트룰린화는 자가항원의 형태로 류마티스 관절염에서 자가 면역 반응을 일으키는 하나의 작용 기작으로 생각되고 있다.

퇴행성신경질환이자 T 세포에 의해 매개될 것으로 알려진 다발성 경화증에서 신경을 둘러싸고 있는 미엘린 수초(myelin sheath)를 구성하는 단백질인 MBP를 PAD가 전체 중 45%를 시트룰린화시키고, 급성 형태인 Marburg 질환에서는 80~90%까지 시트룰린화된다고 보고되었다 (2). 6개의 아르기닌 잔기가 시트룰린화된 MBP는 이 단백질을 분해하는 효소인 cathepsin D에 의한 민감성이 증가하여 4배 정도 빠른 속도로 분해되며, 18개의 아르기닌 잔기가 시트룰린화된 MBP는 45배 정도 빠르게 분해되어 결국 미엘린 수초 형성을 제대로 못하는 것으로 제시되고 있다.

다양한 암세포 또는 암조직, 예를 들어 유방암(breast cancer), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 간세포암(hepatocellular carcinoma), 폐 선암(lung adenocarcinoma) 등에서 과발현된 PAD2 또는 PAD4가 관찰되고 (5), 종양 억제 유전자인 *OKL38*, *ING4* 그리고 *p53*에 의해 조절되는 *p21*, *GADD45*, *PUMA* 등의 유전자가 PAD4에 의해 억제됨이 밝혀졌다 (13~17). 특히 이러한 억제 기작은 PAD4에 의한 히스톤 단백질, 특히 히스톤 H3와 H4의 N 말단 위치의 아르기닌 잔기의 시트룰린화에 의한 것으로 밝혀졌고(Fig. 1C), Cl-amidine 또는 F-amidine과 같은

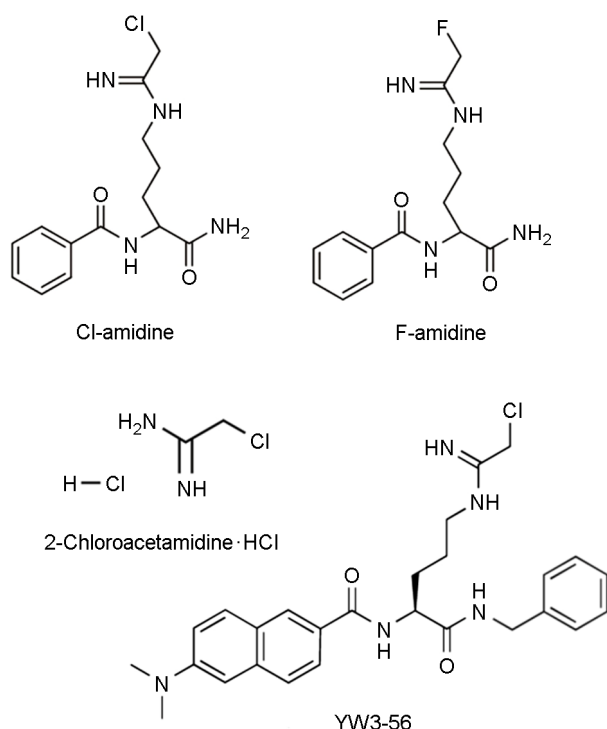


Figure 2. Structures of Cl- and F-amidine, 2-Chloroacetamidinium, and YW3-56. Each PAD inhibitors irreversibly inactivates PAD enzymes via the specific modification of Cys645, an active site residue that is critical for catalysis.

PAD 억제제 처리를 통해 이들 유전자의 발현 증가가 관찰되었다. 이는 PAD 활성 억제제가 암 치료 전략으로 응용될 가능성을 제시한다.

3. PAD 억제제의 응용

최근까지 PAD 억제제의 발굴 또는 개발을 통해 다양한 화합물이 PAD 억제제로 보고되었고(Fig. 2), 다양한 면역반응유도 실험동물모델을 통한 연구에서 PAD 억제 효과의 유효성에 대한 증거들이 제시되었다(Table 2) (33~37).

1) Cl-amidine

Cl-amidine [N-[(1S)-1-(aminocarbonyl)-4-[(2-chloro-1-iminoethyl)amino]butyl]-benzamide]은 pan-PAD 억제제로 PAD 단백질의 활성 부위인 Cys645에 결합하여 비가역적인 불활성화를 유도한다. 콜라겐(collagen)유도 관절염 마우스 모델에서 Cl-amidine의 처리는 활막(synovial membrane)과 혈청 내의 시트룰린화 수준을 감소시키고, 질병활성도(clinical disease activity)를 50% 수준까지 낮추

며, IgG2a형 anti-mouse type II collagen antibody를 유의성 있게 떨어뜨리는 것으로 보고되었다 (36). 이를 통해 염증 증성 관절염에서 PAD가 치료 타겟이 될 가능성이 제시되었다.

염증성장질환(inflammatory bowel disease)인 대장염(colitis)에서 PAD2와 PAD4의 발현이 마우스와 사람의 면역세포에서 유의하게 증가함이 밝혀졌다 (27). Dextran sulfate sodium (DSS)으로 유도된 colitis 마우스 모델에서 Cl-amidine의 투여는 DSS에 의해 줄어든 대장 길이를 회복하였으며, 증가된 백혈구의 숫자를 낮추고, 면역세포의 세포사멸(apoptosis)을 통해 colitis 증상을 억제한다고 보고되었다. 최근에는 New Zealand mixed 2328 (NZM) 마우스를 이용한 루푸스(lupus) 모델에서 Cl-amidine 투여에 의해 NET 형성을 억제하고 혈액 내의 자가항체와 보체(complement)의 수준을 낮추는 것으로 나타났다 (37). 더욱이 Cl-amidine은 골수유래 상피 전구세포의 분화를 증가시키고 내피세포 의존성 혈관 확장(endothelium-dependent vasorelaxation)을 개선시켰다. 또한 광화학적 손상 유발에 의한 동맥 혈전증(arterial thrombosis)이 늦춰짐이 확인되었다.

2) 2-Chloroacetamidinium

다발성 경화증은 성인에게 가장 흔한 탈수초성 질환으로, 질병완화 치료제로 베타 인터페론(beta interferon), 글라티라머 아세테이트(glatiramer acetate), 핀골리모드(fingolimod) 그리고 미토산트론(mitoxantrone) 등의 면역조절제가 도입되었으나 아직까지 질환을 완치할 수 있는 방법은 없다 (38). PAD에 의한 시트룰린화된 MBP의 발견과 질환에서의 역할이 밝혀짐에 따라 PAD 억제제를 질병 완화에 이용하려는 연구가 시도되었다. 다발성 경화증 동물 모델인 ND4 마우스(70 copies of the cDNA for DM20, a myelin phospholipid)에서 2-chloroacetamidinium (2-CA; PAD 활성 부위 Cys645 결합)의 처리는 ND4 마우스의 질병양상을 감소시켰다 (34). 또한 myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35-55 peptide로 유도한 만성재발성 MOG-EAE (EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis) 모델에서 2-CA는 척수(spinal cord)와 뇌 조직에서 PAD 활성 감소와 함께 척수의 CD3⁺ T 세포 증가를 억제하였다. 이는 PAD 억제제가 자가면역질환의 한 종류인 다발성 경화증의 치료 전략에 이용될 수 있음을 제시한다.

Table 2. Potent PAD inhibitors and *in vivo* test

Inhibitor	IC ₅₀	<i>In vitro</i> and Animal models	Effects and Outcomes
Cl-amidine	5.9 ± 0.3 μM	Collagen-induced arthritis	Reduced total synovial and serum citrullination Low histological score and complement C3 deposition Decreased IgG reactivity
		New Zealand mixed 2328 model of murine lupus	Inhibition of NET formation Reduced circulating autoantibodies and complement levels Increased differentiation capacity of bone marrow endothelial progenitor cells Improved endothelium-dependent vasorelaxation Delayed time to arterial thrombosis
		DSS-induced colitis	Reduced the clinical signs and symptoms of colitis without toxic side effects Apoptosis of inflammatory cells
F-amidine	21.6 ± 2.1 μM	HL-60, MCF7, and HT-29 cancer cell lines	Decreased cell viability
2-CA	14.4 mM	ND4 mice model of multiple sclerosis	Dramatic attenuation of disease phenotype at any stage Reduced PAD activity and citrullination Suppression of T cell autoreactivity, clearing brain and spinal cord infiltrates
YW3-56	1~5 μM	Xenograft tumor model	Cancer growth inhibition
		U2OS cell line	Activation of tumor suppression genes Inhibition of cancer cell growth Regulation of mTORC1 activity through SESN2/DDIT induction Regulation of autophagy flux by inhibiting autophagic vesicle breakdown by lysosomes

IC₅₀ is the concentration of the inhibitor that yields half-maximal activity. IC₅₀ values were determined by recombinant PAD enzymes in the presence of calcium and BAEE substrate (33~35).

3) YW3-56

최근 제시된 PAD 억제제인 YW3-56은 암세포에서 효과적으로 PAD 활성을 저해할 뿐 아니라 암세포의 성장을 억제하는 것으로 보고되었다 (35). 골육종(osteosarcoma) 세포에서 YW3-56은 세포주기와 세포사멸 관련 유전자 및 p53관련 유전자의 발현을 조절하는 것으로 나타났고 mammalian target of rapamycin (mTOR) 신호전달 상위 억제 인자인 *SESN2*와 *DDIT4* 유전자의 발현을 유도하여 mTOR complex 1 활성을 억제한다. 뿐만 아니라 YW3-56은 autophagy 형성을 유도하며, xenograft tumor 모델에서 히스톤 탈아세틸화 효소(histone deacetylase) 억제제인 SAHA (vorinostat)와 비슷한 수준으로 암조직 증가를 억제하는 것으로 나타났다.

결론

PAD의 5가지 종류는 대부분의 조직이나 세포에 존재하며 피부 항상성 유지, 미엘린 수초 형성, 전사인자조절 등 다양한 역할을 수행한다. 현재까지 많은 보고에서 면역질환발생 시 PAD의 과발현 또는 과활성에 의해 여러 기질 단백질을 시트룰린화 시켜 궁극적으로 질병의 진행 속도와 증상을 심각하게 하는 것으로 여겨지고 있다. 면역체계에서 대식세포(macrophages), 호중구(neutrophils), 수지상 세포(dendritic cells) 그리고 비만세포(mast cells)에서 PAD2와 PAD4의 발현이 보고되어 있다 (1, 39). 대식세포(Raw264.7 세포주)에서 PAD2의 과발현은 lipopolysaccharide에 의해 유도된 cyclooxygenase-2의 발현과 NF-κB의 활성을 낮추는 것으로 보고되었다 (40). 세포막 발현 단백질인 Toll-like receptor (TLR)는 병원성 인자 또는

변형된 자가 단백질에 의해 자극되어 다양한 세포 내 신호 전달을 유도하는 수용체로서 (41), 시트룰린화된 fibrinogen은 대식세포의 TLR4와 Fcγ 수용체를 통한 tumor necrosis factor 생성을 자극하는 것으로 알려졌다 (42). 호중구는 선천 면역 반응에 중요한 역할을 담당하는 세포로서 (43), 외부 침입 병원성 인자에 대해 빠르게 대응하여 NET 형성 시 PAD4가 중요한 매개 인자임이 밝혀졌다 (19). 과도한 염증반응이 일어날 때 PAD가 증상 완화 또는 억제에 효과를 나타낼 수 있다는 것은 류마티스성 관절염, 낭창, 루푸스, 다발성 경화증, 그리고 암발생 동물 모델에서 PAD 억제제의 사용으로 증명되었다 (27, 34~37). 이러한 연구 결과를 토대로 기존에 연구된 질환 이외의 다양한 면역질환에서 PAD가 연관되어 있을 가능성이 높을 것으로 추측된다.

PAD에 의해 변형된 시트룰린화된 단백질들은 자가항원으로 인식되어 자가항체가 과도하게 생성되는 원인으로 알려져 있다. 몇몇 생화학적 연구를 통하여 filaggrin, enolase, S100A3와 같은 단백질들의 시트룰린화에 의한 기능 변화는 밝혀져 있으나 (11, 44, 45), 아직까지도 많은 기질 단백질들에 대한 기능 연구는 미흡하다. 최근 연구 보고에 따르면 PAD의 기질로 CXCL8, CXCL10 등 다양한 케모카인(chemokines)이 제시되었고 이들의 활성을 조절하여 급성 면역 반응을 조절할 것으로 생각된다 (46).

흥미롭게도 현재까지 PAD와 억제제에 관한 연구는 다양한 면역질환에서 공통적인 치료 전략으로 응용될 가능성을 보여주었다. 이것은 PAD와 시트룰린화된 단백질에 대해 연구되지 않은 많은 면역질환에서도 PAD 억제제가 효과를 나타낼 가능성이 높을 것임을 암시한다. 이와 더불어 면역세포 수준에서 PAD와 억제제에 대한 연구는 미미한 실정으로, 앞으로 PAD 역할 분석과 억제제 작용 기전에 관한 생화학적, 세포학적, 면역학적 연구는 면역질환 발생/진행/억제 기전의 한 축을 담당할 뿐만 아니라 치료적 목적에 적용할 수 있는 중요한 밑바탕이 될 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 2003;25:1106-18.
- 2) Moscarello MA, Mastronardi FG, Wood DD. The Role of Citrullinated Proteins Suggests a Novel Mechanism in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Neurochem Res* 2007;32:251-6.
- 3) Foulquier C, Sebbag M, Clavel C, Chapuy-Regaud S, Al Badine R, Méchin MC, *et al.* Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum* 2007;56:3541-53.
- 4) Chang X, Zhao Y, Sun S, Zhang Y, Zhu Y. The expression of PADI4 in synovium of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2009;29:1411-6.
- 5) Chang X, Han J, Pang L, Zhao Y, Yang Y, Shen Z. Increased PADI4 expression in blood and tissues of patients with malignant tumors. *BMC Cancer* 2009;9:40.
- 6) Fearon WR. The carbamido diacetyl reaction: a test for citrulline. *Biochem J* 1939;33:902-7.
- 7) Rogers GE, Taylor LD. The enzymic derivation of citrulline residues from arginine residues in situ during the biosynthesis of hair proteins that are cross-linked by isopeptide bonds. *Adv Exp Med Biol* 1977;86A:283-94.
- 8) Takahara H, Okamoto H, Sugawara K. Calcium-dependent properties of peptidylarginine deiminase from rabbit skeletal muscle. *Agric Biol Chem* 1986;50:2899-904.
- 9) Senshu T, Kan S, Ogawa H, Manabe M, Asaga H. Preferential deimination of keratin K1 and filaggrin during the terminal differentiation of human epidermis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;225:712-9.
- 10) Nachat R, Méchin MC, Takahara H, Chavanas S, Charveron M, Serre G, *et al.* Peptidylarginine deiminase isoforms 1-3 are expressed in the epidermis and involved in the deimination of K1 and filaggrin. *J Invest Dermatol* 2005;124:384-93.
- 11) Kizawa K, Takahara H, Troxler H, Kleinert P, Mochida U, Heizmann CW. Specific citrullination causes assembly of a globular S100A3 homotetramer: a putative Ca²⁺ modulator matures human hair cuticle. *J Biol Chem* 2008;283:5004-13.
- 12) Arita K, Hashimoto H, Shimizu T, Nakashima K, Yamada M, Sato M. Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:777-83.
- 13) Yao H, Li P, Venters BJ, Zheng S, Thompson PR, Pugh BF, *et al.* Histone Arg modifications and p53 regulate the expression of OKL38, a mediator of apoptosis. *J Biol Chem* 2008;283:20060-8.

- 14) Li P, Yao H, Zhang Z, Li M, Luo Y, Thompson PR, *et al.* Regulation of p53 target gene expression by peptidylarginine deiminase 4. *Mol Cell Biol* 2008;28:4745-58.
- 15) Li P, Wang D, Yao H, Doret P, Hao G, Shen Q, *et al.* Coordination of PAD4 and HDAC2 in the regulation of p53-target gene expression. *Oncogene* 2010;29:3153-62.
- 16) Guo Q, Fast W. Citrullination of inhibitor of growth 4 (ING4) by peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) disrupts the interaction between ING4 and p53. *J Biol Chem* 2011;286:17069-78.
- 17) Tanikawa C, Espinosa M, Suzuki A, Masuda K, Yamamoto K, Tsuchiya E, *et al.* Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway. *Nat Commun* 2012;3:676.
- 18) Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, *et al.* Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* 2009;184:205-13.
- 19) Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 2010;207:1853-62.
- 20) Zhang X, Bolt M, Guertin MJ, Chen W, Zhang S, Cherrington BD, *et al.* Peptidylarginine deiminase 2-catalyzed histone H3 arginine 26 citrullination facilitates estrogen receptor α target gene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:13331-6.
- 21) Wright PW, Bolling LC, Calvert ME, Sarmiento OF, Berkeley EV, Shea MC, *et al.* ePAD, an oocyte and early embryo-abundant peptidylarginine deiminase-like protein that localizes to egg cytoplasmic sheets. *Dev Biol* 2003;256:73-88.
- 22) Yurttas P, Vitale AM, Fitzhenry RJ, Cohen-Gould L, Wu W, Gossen JA, *et al.* Role for PADI6 and the cytoplasmic lattices in ribosomal storage in oocytes and translational control in the early mouse embryo. *Development* 2008;135:2627-36.
- 23) Jang B, Jin JK, Jeon YC, Cho HJ, Ishigami A, Choi KC, *et al.* Involvement of peptidylarginine deiminase-mediated post-translational citrullination in pathogenesis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 2010;119:199-210.
- 24) Ishigami A, Ohsawa T, Hiratsuka M, Taguchi H, Kobayashi S, Saito Y, *et al.* Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 2005;80:120-8.
- 25) Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 2008;26:651-75.
- 26) Méchin MC, Sebbag M, Arnaud J, Nachat R, Foulquier C, Adoue V, *et al.* Update on peptidylarginine deiminases and deimination in skin physiology and severe human diseases. *Int J Cosmet Sci* 2007;29:147-68.
- 27) Chumanevich AA, Causey CP, Knuckley BA, Jones JE, Poudyal D, Chumanevich AP, *et al.* Suppression of colitis in mice by Cl-amidine: a novel peptidylarginine deiminase inhibitor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G929-38.
- 28) Slack JL, Causey CP, Thompson PR. Protein arginine deiminase 4: a target for an epigenetic cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:709-20.
- 29) Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, *et al.* Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest* 2012;122:1791-802.
- 30) McGraw WT, Potempa J, Farley D, Travis J. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from *Porphyromonas gingivalis*, peptidylarginine deiminase. *Infect Immun* 1999;67:3248-56.
- 31) Abdullah SN, Farmer EA, Spargo L, Logan R, Gully N. *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase substrate specificity. *Anaerobe* 2013;doi:10.1016/j.anaerobe.2013.07.001
- 32) Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, *et al.* Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:2662-72.
- 33) Luo Y, Arita K, Bhatia M, Knuckley B, Lee YH, Stallcup MR, *et al.* Thompson PR. Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: functional and structural characterization. *Biochemistry* 2006;45:11727-36.
- 34) Moscarello MA, Lei H, Mastronardi FG, Winer S, Tsui H, Li Z, *et al.* Inhibition of peptidyl-arginine deiminases reverses protein-hypercitrullination and disease in mouse models of multiple sclerosis. *Dis Model Mech* 2013;6:467-78.
- 35) Wang Y, Li P, Wang S, Hu J, Chen XA, Wu J, *et al.* Anticancer peptidylarginine deiminase (PAD) inhibitors regulate the autophagy flux and the mammalian target of rapamycin complex 1 activity. *J Biol Chem* 2012;287:25941-53.
- 36) Willis VC, Gizinski AM, Banda NK, Causey CP, Knuckley B, Cordova KN, *et al.* N- α -benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-

- L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2011;186:4396-404.
- 37) Knight JS, Zhao W, Luo W, Subramanian V, O'Dell AA, Yalavarthi S, *et al.* Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. *J Clin Invest* 2013;123:2981-93.
- 38) Meuth SG, Göbel K, Wiendl H. Immune therapy of multiple sclerosis--future strategies. *Immune therapy of multiple sclerosis--future strategies. Curr Pharm Des* 2012;18:4489-97.
- 39) Arandjelovic S, McKenney KR, Leming SS, Mowen KA. ATP induces protein arginine deiminase 2-dependent citrullination in mast cells through the P2X7 purinergic receptor. *J Immunol* 2012;189:4112-22.
- 40) Lee HJ, Joo M, Abdolrasulnia R, Young DG, Choi I, Ware LB, *et al.* Peptidylarginine deiminase 2 suppresses inhibitory $\{\kappa\}$ B kinase activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 2010;285:39655-62.
- 41) Yuk JM, Jo EK. Toll-like receptors and innate immunity. *J Bacteriol Virol* 2011;41:225-35.
- 42) Sokolove J, Zhao X, Chandra PE, Robinson WH. Immune complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fc γ receptor. *Arthritis Rheum* 2011;63:53-62.
- 43) Woo SY. Neutrophils in immunity. *J Bacteriol Virol* 2012;42:172-6.
- 44) Jang B, Jeon YC, Choi JK, Park M, Kim JI, Ishigami A, *et al.* Peptidylarginine deiminase modulates the physiological roles of enolase via citrullination: links between altered multifunction of enolase and neurodegenerative diseases. *Biochem J* 2012;445:183-92.
- 45) Hsu CY, Henry J, Raymond AA, Méchin MC, Pendaries V, Nassar D, *et al.* Deimination of human filaggrin-2 promotes its proteolysis by calpain 1. *J Biol Chem* 2011;286:23222-33.
- 46) Moelants EAV, Mortier A, Damme JV, Proost P, Loos T. Peptidylarginine deiminases: physiological function, interaction with chemokines and role in pathology. *Drug Discovery Today: Technologies* 2012;9:e261-80.
-