

Characterization of Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Macrophages Infected with *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Korea Patients

Jung-hwan Lee¹, Yun-Ji Lim¹, Ji-Ae Choi¹, Ji-Ye Han¹, Sung Hee Cho¹,
Sung-Man Oh¹ and Chang-Hwa Song^{1,2,3*}

¹Department of Microbiology and ²Infection Signaling Network Research Center, and ³Research Institute for Medical Sciences, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Apoptosis is an important host defense mechanism against mycobacterial infection. Recent reports suggest that links between apoptosis and endoplasmic reticulum (ER) stress are critical for the regulation of mycobacterial survival; however, the exact regulatory mechanisms are not well known. In this study, we isolated 20 *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) clinical strains from Korean patients and examined ER stress-mediated apoptosis in Mtb-infected macrophages. Most Mtb strains increased the rates of apoptosis and production of ER stress-sensing molecules in mouse macrophages, similar to Mtb H37Rv infection. Moreover, the intracellular survival of Mtb clinical isolates in macrophages was similar to that of H37Rv. Our data suggest that infection with Mtb downregulated MCP-1 and MCPIP. The regulation of MCPIP may decrease ROS production, leading to a reduction in ER stress-mediated apoptosis.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, ER stress, MCPIP

INTRODUCTION

결핵은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*: Mtb)에 의하여 발생하는 감염성 질환으로 (1), World Health Organization (WHO)의 2014년 자료에 의하면 2013년 한해 동안 900백 만명의 신규 환자가 발생하고 150만명이 결핵으로 사망하였으며, 다재내성 결핵, 광범위 약제내성 결핵이 증가 되는 추세이다 (2). 이미 여러 효과적인 항결핵제들이 사용되고 또한 새로운 신약개발이 이루어지고 있음에도 불구하고 결핵의 정확한 병인 기전은 여전히 불분명하다.

최근 결핵균을 포함하는 여러 병원성 세균들이 숙주세포의 세포자멸사를 조절함으로써 세균의 생존에 유리한 환경을 조성한다는 보고가 있다 (3). 예를 들면, *Neisseria meningitidis*는 외막단백질 PorB를 통해 cytochrome c (CytC)의 방출을 억제해 내인성 세포자멸사 경로를 차단한다 (4). *Salmonella Enterica*와 *Anaplasma phagocytophilum*는 phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) 경로를 활성화하여 숙주세포의 생존을 연장시키고 (5, 6), *Bartonella henselae*, *Ehrlichia chaffeensis* 그리고 *Rickettsia rickettsii*는 nuclear factor kappa B (NF-κB) 경로의 활성을 통해 CytC 방출을 억제하여 세포의 세포자멸사를 억제시킨다 (7~9).

Received: May 30, 2015/ Revised: June 25, 2015/ Accepted: June 27, 2015

*Corresponding author: Dr. Chang-Hwa Song. Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University, 6 Munhwa-dong, Junggu, Daejeon 301-747, Korea.

Phone: +82-42-580-8245, Fax: +82-42-585-3686, e-mail: songch@cnu.ac.kr

**This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry Education (2013R1A1A2009736).

©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/>).

*Shigella flexneri*는 단백질 MxiE를 분비하여 caspase-3를 비활성화시킴으로 세포자멸사를 억제한다 (10). 결핵에서도 병원성 결핵균은 비병원성 결핵균에 비하여 세포자멸사를 감소시키고 괴사를 증가시킨다 (11, 12). 이와 같이 병원성 세균에 의한 숙주세포의 세포자멸사 조절 기전 연구는 세균 감염 질환의 병인을 규명하는데 매우 중요하다.

과도한 미접힘 단백질(unfolded protein) 축적, 칼슘 항상성 붕괴 등의 원인으로 소포체(endoplasmic reticulum: ER) 스트레스가 유발되면 미접힘 단백질 반응(unfolded protein response; UPR)이 작동한다. UPR은 크게 protein kinase rna (PKR)-like ER kinase (PERK), inositol requiring (IRE)1, activation transcription factor (ATF)6의 세 가지 주된 단백질에 의해 수행되어 소포체에 발생한 스트레스를 제거하지만, 과도하거나 지속적인 소포체 스트레스는 세포자멸사를 유도한다 (13). IRE1의 과발현은 tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF)2와 apoptosis signal-regulating kinase (ASK)1의 복합체를 형성해 c-Jun N-terminal kinase (JNK)의 활성을 가져오게 되는데, JNK는 Bcl-2 family의 조절을 통해 세포자멸사를 초래한다 (14, 15). B-cell lymphoma (Bcl) -2에 의해 매개되는 소포체의 칼슘 방출은 미토콘드리아의 막투과성에 영향을 주어 CytC의 방출을 가져와 세포자멸사를 유도한다 (16, 17). 특히 C/EBP homologous protein (CHOP)에 의해 유도되는 growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD)34는 protein phosphatase (PP)1과 상호작용해 eukaryotic initiation factor (eIF2) α 의 탈인산화를 유도하여 UPR 관련 유전자의 전사를 억제시키고, 이로 인하여 미접힘 단백질이 축적되고 결국 세포자멸사를 일으킨다 (18). 이러한 소포체 스트레스 매개성 세포자멸사는 당뇨, 알츠하이머병, 그리고 여러 감염성 질환과도 관계가 있다 (19). 감염성 질환을 일으키는 세균 *Shigella dysenteriae*의 독소 Stxs와 *Listeria monocytogenes*의 독소 LLO를 세포에 처리하였을 때 미접힘 단백질 축적으로 인한 소포체 스트레스 매개성 세포자멸사가 각각 보고되었다 (20, 21). 또한, 바이러스 감염 시에도 바이러스가 숙주세포 내에서 유전자를 합성하고 단백질을 생성하는 과정에서 미접힘 단백질을 증가시켜 소포체 스트레스 매개성 세포자멸사가 발생하는데 (13), *Japanese encephalitis virus*는 감염 시 eIF2 α 의 인산화로 유도된 ATF4는 CHOP이나 GADD34 생성을 자극시켜 세포자멸사를 가져온다 (22). 이처럼 세균이나 바이러스 감염

에 의해 발생하는 소포체 스트레스 반응은 세포의 죽음을 조절하는데 크게 영향을 미친다.

병원성 결핵균 H37Rv는 큰포식세포에 감염 시 CHOP의 발현을 유도하는 소포체 스트레스 매개성 세포자멸사를 일으킨다 (23). 결핵균으로부터 생성되는 early secreted antigen 6 kDa (ESAT-6) 항원과, heparin-binding haemagglutinin antigen (HBHA) 항원은 세포질 내 칼슘과 활성산소를 증가시켜 소포체 스트레스 매개성 세포자멸사를 일으키고 (14, 24), 결핵균 항원 38-kDa는 toll-like receptor (TLR)-mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로를 통하여 유도된 monocyte chemotactic protein (MCP)-1-induced protein (MCP-1)가 활성산소를 발생시켜 소포체 스트레스에 의한 세포자멸사를 초래한다 (25). 이런 보고들로부터 결핵균 감염 시 소포체 스트레스 발생으로 유도되는 세포의 세포자멸사 조절이 결핵균의 생존에 매우 밀접하게 관련되어 있다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서는 아직까지 불분명하게 제시된 결핵균의 감염에 의해 조절되는 숙주세포의 세포자멸사 기전에 대해 세포 소기관 중 하나인 소포체의 기능에 관련하여 결핵의 병인 기전을 설명하고자 하였다. 이를 위해 최근 국내에서 발명한 유전자형이 다른 20가지의 임상분리 결핵균주를 대상으로 소포체 스트레스 반응에 의해 유도되는 세포자멸사의 특성을 파악하여 상호간의 상관관계를 밝혀 결핵의 발병 원인을 규명하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

세포와 결핵균의 배양

마우스 유래 큰포식세포주 Raw264.7은 10% FBS와 penicillin (Lonza, Walkersville, MA, USA), streptomycin (Lonza, Walkersville, MA, USA)이 포함된 DMEM (Lonza, Walkersville, MA, USA)으로 배양하였다. H37Rv (ATCC 27294), 임상분리 결핵균주는 10% OADC (oleic acid, albumin, dextrose, catalase), 5% glycerol, 0.05% Tween-80이 포함된 Middlebrook 7H9 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) 액체배지에서 배양한 후, 균체를 수집하였다. 결핵균은 큰포식세포에 multiplication of infection (MOI)이 1:1이 되도록 하여 3시간 동안 감염시키고, 인산염완충용액으로 2회 세척하였다. 적정 시간 동안 배양시킨 후(37°C, 5% CO₂), 세포 또는 상층액을 수집하여 실험에 사용하였다.

세포 내 결핵균 생존능 측정

결핵균을 감염시킨 Raw264.7를 적정 시간 동안 배양한 후 500 μ l의 멸균 증류수를 첨가하여 결핵균의 방출을 유도했다. 10% OADC, 5% glycerol, 0.05% Tween-80, 100 μ g/ml amphotericin B (Sigma, St Louis, MO, USA)가 포함된 Middlebrook 7H10 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) 고체배지에 접종하여 배양시킨 후 집락수를 관찰하여 결핵균의 생존능을 측정하였다.

Western Blot analysis

결핵균을 감염시킨 큰포식세포를 수집한 뒤, 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 2 mM sodium fluoride, 2 mM EDTA, 0.1% SDS and protein inhibitor cocktail이 포함된 radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer를 가하여 용해하였다. 이후 12% SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) gel 상에서 전기영동을 수행하고 polyvinyl difluoride (PVDF) membrane에 전이하였다. 이후 5% non-fat skim milk가 포함된 tris-buffered saline tween (TBS-T; 20 mM tris, 137 mM sodium chloride, 0.1% tween-20, pH 8.0)으로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다.

1차 항체는 CHOP (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), binding immunoglobulin protein (Bip; Cell Signaling), p-eIF2 α (Cell Signaling), p-SAPK/JNK (Cell Signaling), p-extracellular signal-regulated kinase (Erk)1/2 (Cell Signaling), p-p38 MAPK (Cell Signaling), caspase-3 (Cell Signaling), MCPIP (Santa Cruz, Dallas, TX, USA) 그리고 β -actin (Santa Cruz)을 각각 1:1,000으로 희석하여 사용하였으며, 2차 항체는 horseradish peroxidase (HRP)가 표지된 anti-rabbit IgG (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) 항체 또는 anti-mouse IgG (Calbiochem, San Diego, CA, USA) 항체를 사용하였다. 단백질을 발현 때는 ECL (Millipore, Billerica, MA, USA) 용액으로 X-ray 필름에 감광시켜 검출하였다. 소포체 스트레스 반응에 대한 양성 대조군은 500 ng/ml의 tunicamycin (TM; Sigma, St Louis, MO, USA)을 6시간 처리하였으며 MAPK 경로에 대한 양성 대조군은 500 ng/ml의 lipopolysaccharide (LPS; InvitroGen, San Diego, CA, USA)를 1시간 처리 후 사용하였다.

세포 내 활성산소의 생성 측정

결핵균을 감염시킨 큰포식세포를 수집하고, 20 μ M의

dihydroethidium (DHE)에 30분 동안 염색한 이후 FACS Canto II system (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 양성 대조군에는 10 mM의 H₂O₂를 30분 처리하여 사용하였다.

Cell death 분석

세포자멸사는 결핵균을 감염시킨 큰포식세포를 수집하여 10 μ g/ml의 propidium iodide (PI; Sigma, St Louis, MO, USA)로 10분간 염색 후 FACS Canto II system (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 양성 대조군에는 500 nM의 staurosporine (STS; Sigma, St Louis, MO, USA)을 처리하였다. 괴사는 결핵균을 감염시킨 macrophage의 상층액을 수집하여 lactate dehydrogenase (LDH) release assay kit (Roche, Mannheim, BY, Germany)를 넣고 배양 후 분광광도계로 측정하였다.

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

결핵균을 감염시킨 큰포식세포의 배양액을 원심 분리 후 상층액을 수집하여 TNF- α , interleukin (IL)-6, MCP-1 ELISA kit (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

통계학적 처리

모든 실험은 독립적으로 3번씩 반복하였으며, 실험을 통해 얻어진 결과들은 평균 및 표준오차로 나타내었다. 통계적 유의성은 Bonferroni's one-way ANOVA 방법을 이용하여 검증하였다. *p* 값이 0.05 이하를 나타내는 경우 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

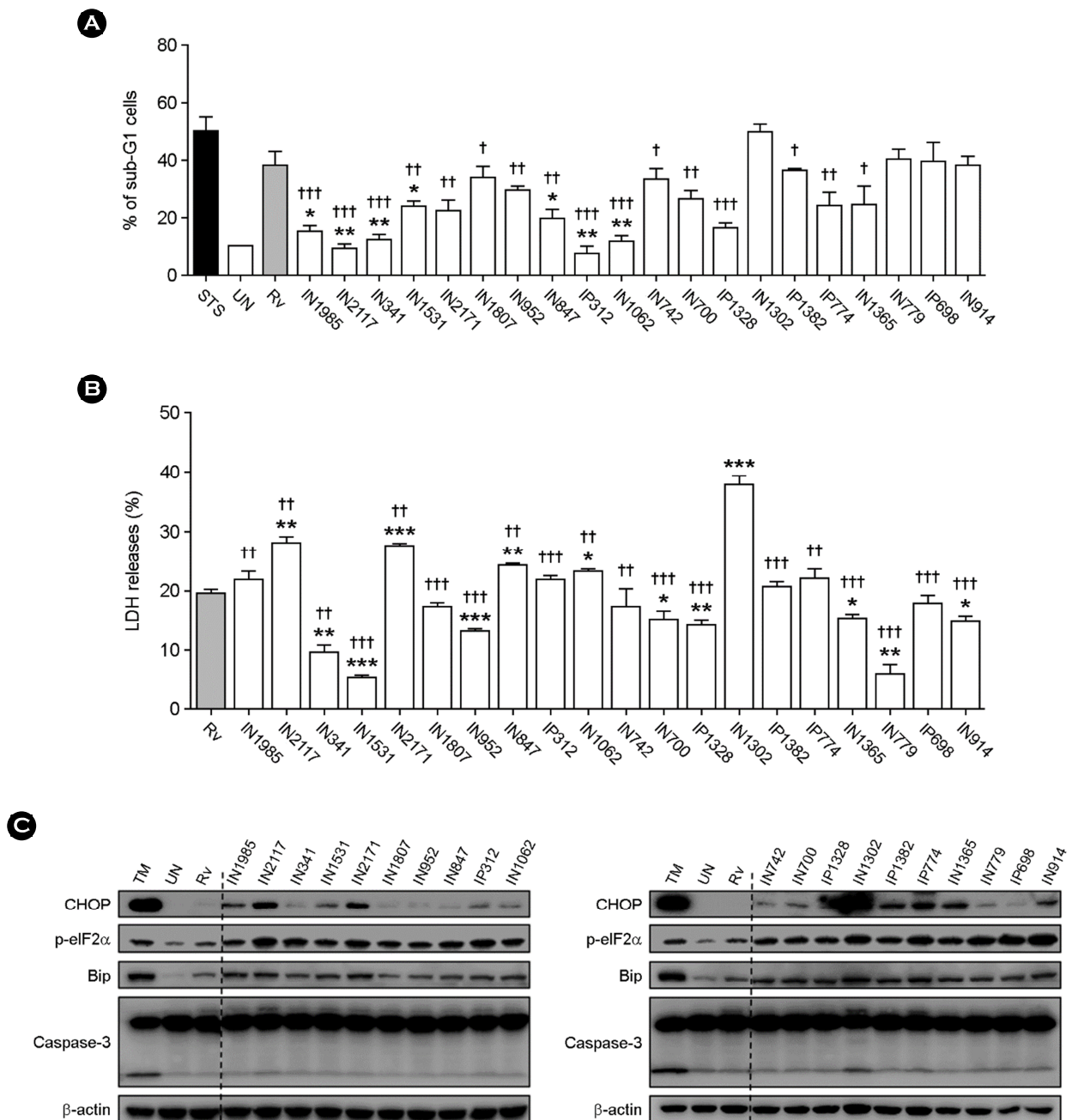
RESULTS

임상분리 결핵균주로 감염시킨 마우스 큰포식세포의 세포자멸사 유도도 and 소포체 스트레스 반응의 상관관계

본 연구에서는 국내 결핵 환자들에서 수집한 임상분리 결핵균주들 중 유전형이 서로 다른 20가지의 임상분리 결핵균주 감염 시 유도되는 세포자멸사와 소포체 스트레스 유도능을 각각 비교하였다(Fig. 1). 세포자멸사의 유도 여부는 각각의 sub-G1기의 변화를 관찰하여 결정하였다. 임상분리 결핵균주 IN1985, IN2117, IN341, IN1531, IN847, IP312, IN1062로 감염시킨 Raw264.7 세포로부터 유도된 세포자멸사는 약 10~20%로 H37Rv로 감염시킨 세포에서

발생되는 세포자멸사 비율($37.7 \pm 8.4\%$)에 비하여 유의하게 낮았고 그 외 임상분리 결핵균주들에 의해 유도된 세포자멸사는 H37Rv로 감염시킨 경우와 유사하였다(Fig. 1A). Caspase-3의 활성을 비교 분석한 결과에서도 대부분의 임상분리 균주들로 감염시킨 세포에서 H37Rv로 감염시킨 세포와 유사하게 증가하였다(Fig. 1C). 특이적으로

IN1302로 감염시킨 세포의 세포자멸사 유도는 $49.3 \pm 4.6\%$ 로 임상분리 결핵균주 중 가장 높았고 caspase-3 활성 역시 가장 증가하였다. 결핵균 감염에 의해 유도된 괴사는 세포 배양액의 LDH의 방출량을 측정하여 분석하였다. 임상분리 결핵균주 IN2117, IN2171, IN847, IN1062로 각각 감염시킨 세포의 괴사 비율은 약 23~27%로 H37Rv로 감



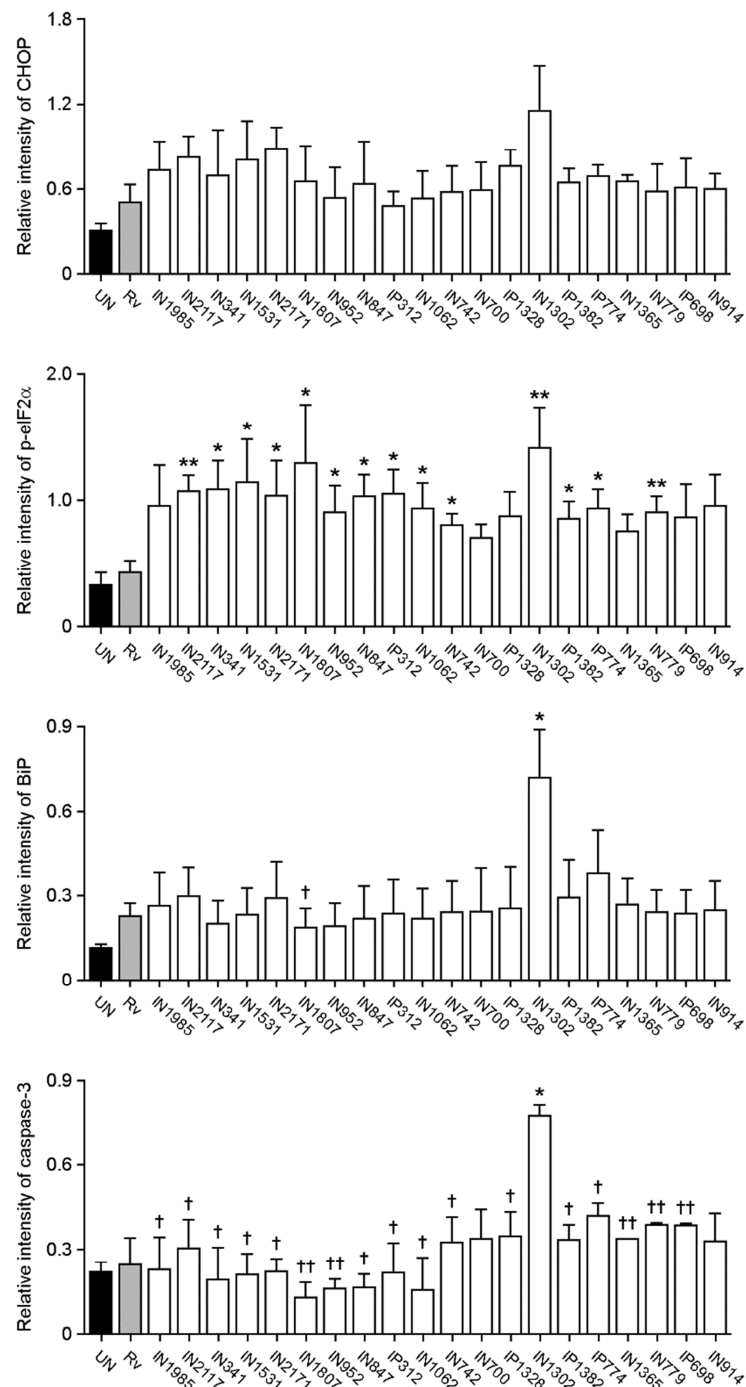


Figure 1. Induced apoptosis and endoplasmic reticulum (ER) stress activation by clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Raw264.7 cells were infected with H37Rv and 20 clinical isolates of Mtb (multiplicity of infection; MOI=1) for 3 h, and incubated for an additional 24 h. (A) The percentage of sub-G1 cells was measured using flow cytometry for the detection of apoptosis. Stimulation by 500 nM staurosporine (STS) for 6 h was used as a positive control. (B) Necrosis was assessed by assaying lactate dehydrogenase (LDH) release from culture supernatants. (C) Western blotting was performed using antibodies against C/EBP homologous protein (CHOP), phospho-eukaryotic initiation factor (eIF2) α , binding immunoglobulin protein (Bip), caspase-3, and β -actin. As a positive control, cells were treated with 500 ng/ml tunicamycin (TM) for 6 h. The densitometry values for each protein were normalized to the β -actin level, and compared to cells infected with H37Rv. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$. †Indicates statistically significant differences, compared to cells infected with the clinical isolate, IN1302. † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$; and ††† $p < 0.001$. The data are representative of at least three independent experiments. Bars represent the means \pm SD.

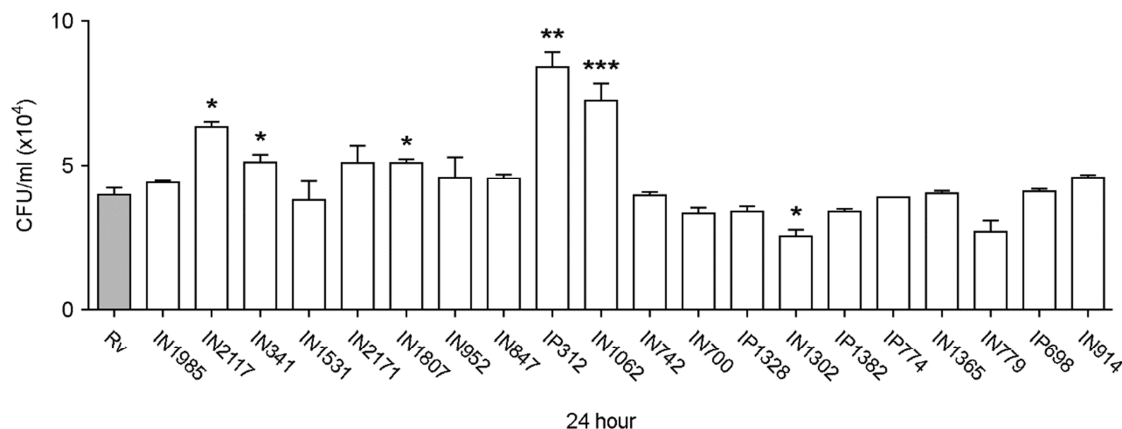


Figure 2. Intracellular survival of Mtb isolates in Raw264.7 cells. Colony-forming unit (CFU) assays were performed to measure the intracellular survival of H37Rv and 20 clinical isolates of Mtb in Raw264.7 cells. Statistical differences in Mtb survival, compared to H37Rv, were calculated using a one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$. $N \geq 3$. Bars represent the means \pm SD.

염시킨 세포($19.4 \pm 1.3\%$)에 비하여 유의하게 증가하였고, 대부분의 임상분리 결핵균주의 감염세포는 괴사 유도가 H37Rv로 감염시킨 세포와 유사하였다(Fig. 1B). 또한, IN1302를 제외한 임상분리 결핵균주들의 감염세포에서 CHOP과 Bip의 소포체 스트레스 센서 분자의 생성이 H37Rv의 감염세포와 유사하게 낮았다. 세포자멸사 정도가 특이적으로 높았던 IN1302 감염세포의 소포체 스트레스 분자의 발현은 임상분리 결핵균주 중 가장 높았다(Fig. 1C). 이 결과로부터 대부분 임상분리 결핵균주의 감염 시 큰포식세포의 소포체 스트레스 유도성 세포자멸사가 낮게 조절됨으로써 결핵이 발병되는 것이라고 추정할 수 있었다.

임상분리 결핵균주로 감염시킨 마우스 큰포식세포에서 결핵균의 세포 내 생존능력

결핵균 감염 시 숙주에서 발생하는 큰포식세포의 세포자멸사가 결핵균의 생존능을 감소시킨다는 보고 (26)를 바탕으로 임상분리 결핵균주로 감염시킨 큰포식세포의 세포자멸사 비율과 결핵균의 생존능력은 반비례 할 것이라 가정하였다. 결핵균 감염 후 24시간 후 큰포식세포로부터 생존하는 세포 내 결핵균을 측정된 결과, IN1302를 제외한 모든 임상분리 결핵균주의 세포 내 생존 집락수는 H37Rv의 생존 집락수와 유사하거나 더욱 높게 관찰되었다. 특히 IP312는 8.4×10^4 , IN1062는 7.2×10^4 의

생존 집락수를 보였는데 3.9×10^4 의 생존 집락수를 보인 H37Rv보다 약 2배 정도 증가하였다. 이와 달리 다른 임상분리 결핵균주에 비하여 높은 세포자멸사 유도를 보인 IN1302는 유일하게 세포 내 생존률이 H37Rv와 비교하여 유의하게 낮았다(Fig. 2).

임상분리 결핵균주 감염에 의한 염증성 사이토카인 생성

소포체 스트레스를 일으키는 원인으로는 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6)의 과잉 생성이 알려져 있기 때문에 (27) 결핵균 감염 시 유도되는 대표적인 염증성 사이토카인의 생성과 소포체 스트레스 유도와의 상관관계를 조사하였다. 소포체 스트레스 유도와 세포자멸사의 비율이 다른 임상분리 결핵균주들로 감염시킨 세포에 비하여 특이적으로 높았던 IN1302 감염세포의 경우, 생성된 염증성 사이토카인은 각각 TNF- α 는 455.5 ± 40.3 pg/ml, IL-6는 452.7 ± 113.8 pg/ml, 그리고 MCP-1은 452.2 ± 26.5 pg/ml로 H37Rv를 감염시킨 경우(TNF- α , 274.2 ± 97.8 pg/ml; IL-6, 35.3 ± 51.7 pg/ml; MCP-1, 152.4 ± 29.7 pg/ml)와 IN1302 감염세포를 제외한 대부분의 임상분리 균주에 비하여 유의하게 높았다. 또한 H37Rv 감염세포보다 괴사 비율이 높았던 임상분리 결핵균 IN2117, IN2171, IP312의 감염세포에서는 염증 반응과 관련 깊은 TNF- α 의 생성이 H37Rv 감염세포에 비하여 높았다. 대부분의 임상분리 결핵균주 감

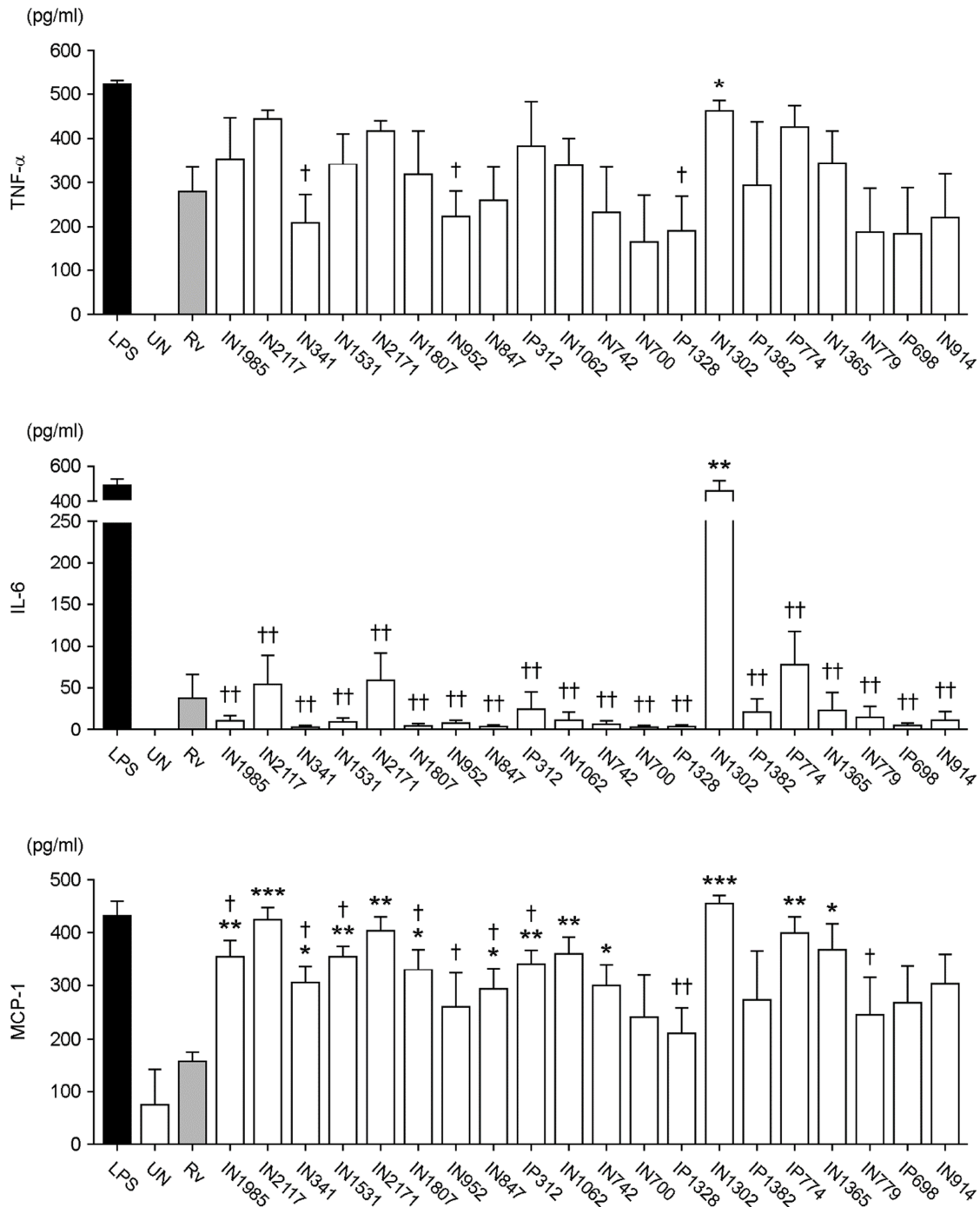
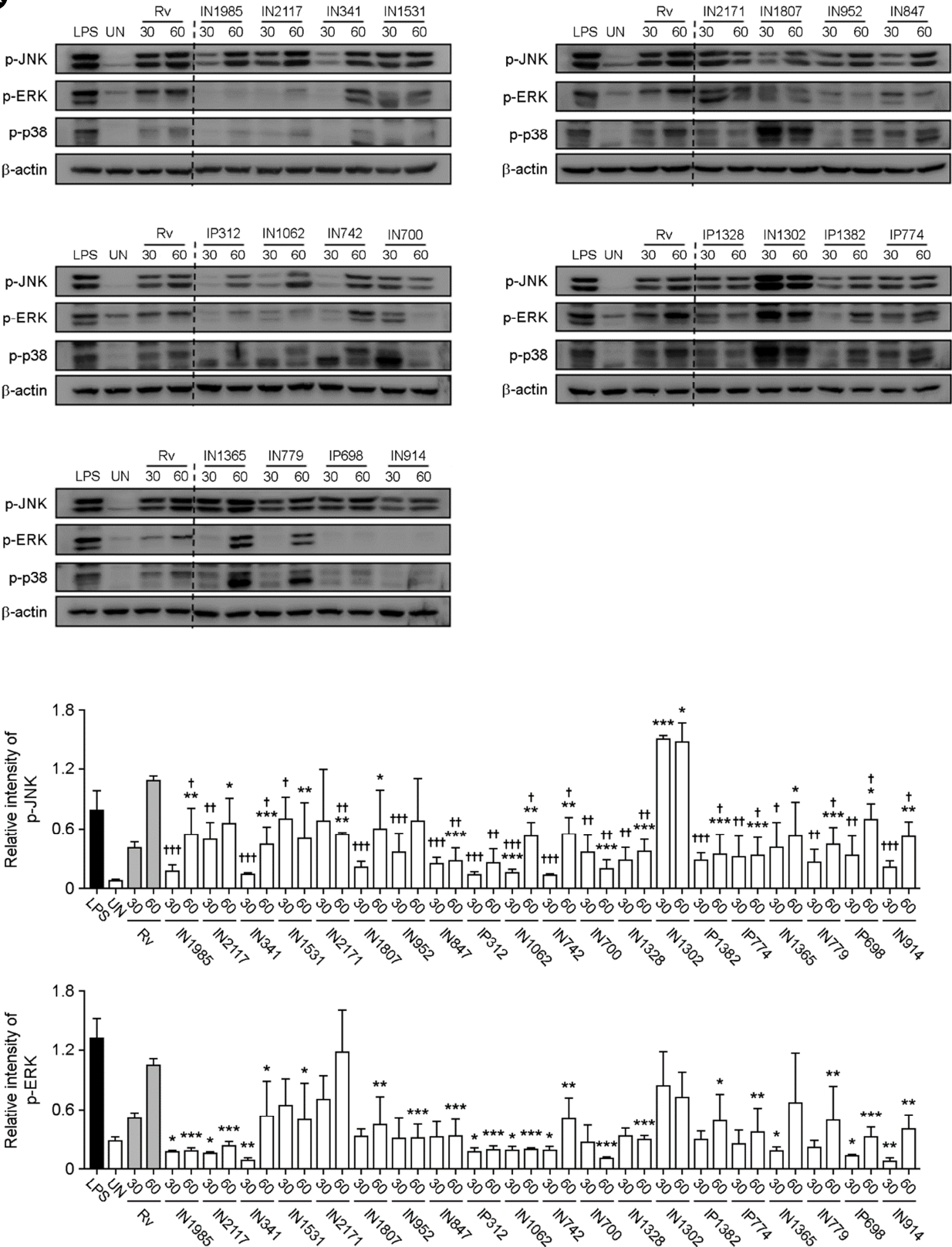


Figure 3. The production of proinflammatory cytokines by Raw264.7 cells infected with clinical isolates of Mtb. Raw264.7 cells were infected with H37Rv and clinical isolates of Mtb at a ratio of 1:1. Twenty-four hours after infection, supernatants were collected and subjected to ELISAs for tumor necrosis factor (TNF)- α , monocyte chemoattractant protein (MCP-1), and interleukin (IL)-6. As a positive control, cells were treated with 500 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) for 24 h. *Indicates significant differences compared to cells infected with H37Rv. $^*p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; and $^{***}p < 0.001$. †Indicates significant differences compared to cells infected with the clinical isolate, IN1302. $^{\dagger}p < 0.05$ and $^{\dagger\dagger}p < 0.01$. $N \geq 3$. Bars represent the means \pm SD.

A



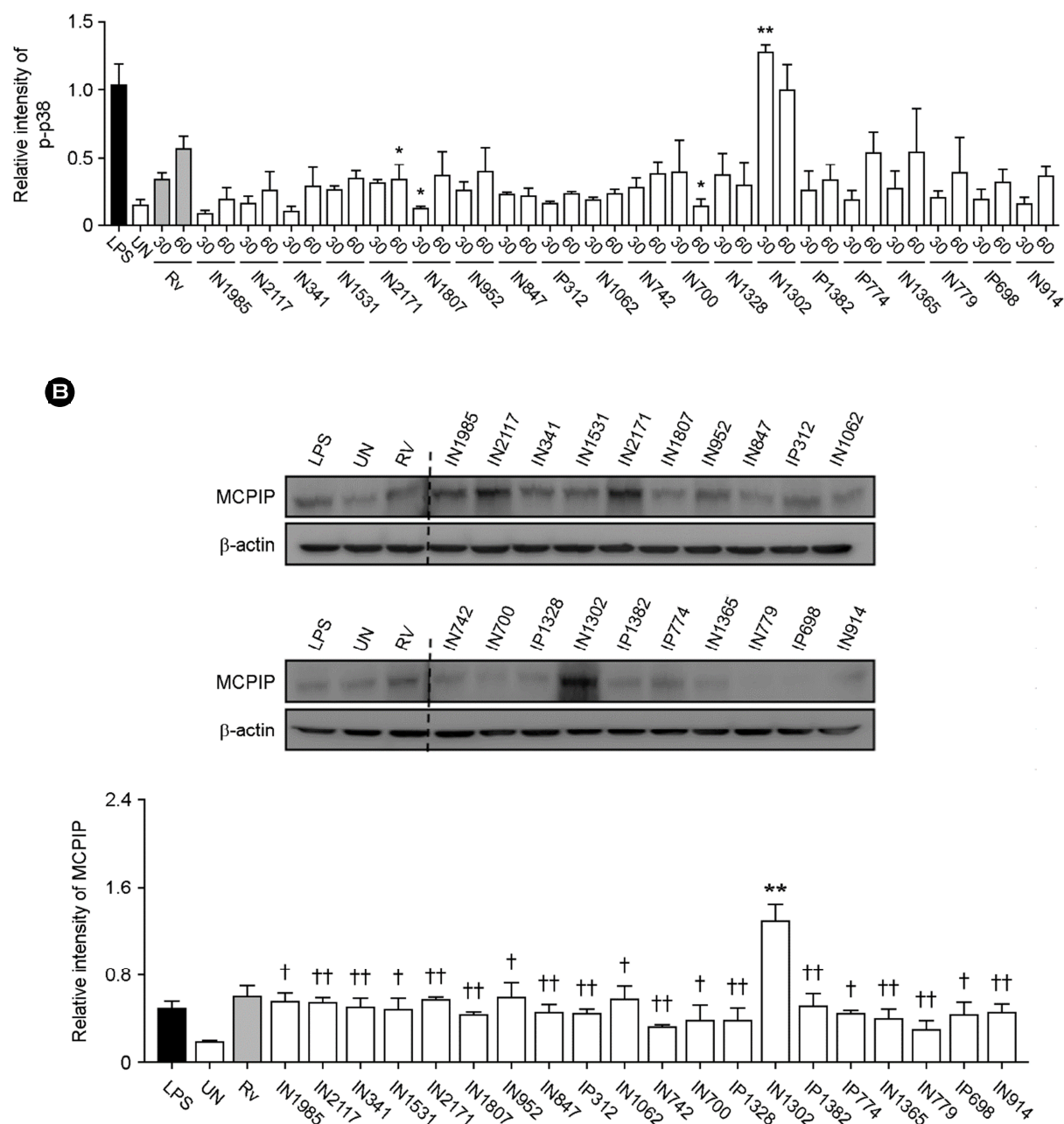


Figure 4. The expression of MCP-induced protein (MCPIP) through the mitogen-activated protein kinase pathway during Mtb infection. Raw264.7 cells were infected with clinical Mtb isolates for 30 or 60 min, and then subjected to Western blot analyses targeting (A) phospho-c-Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), and p38, or (B) MCPIP. Treatment with 500 ng/ml LPS for 1 h was used as a positive control. The densitometry values for each protein were normalized to the β -actin level. *Indicates significant differences compared to cells infected with H37Rv. ** $p < 0.01$. †Indicates significant differences compared to cells infected with the clinical isolate, IN1302. ‡ $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$. The data are representative of at least three independent experiments. Bars represent the means \pm SD.

염세포에서 염증 반응을 개시하는 중요한 요소인 MCP-1의 생성은 H37Rv 감염세포에 비해 유의하게 증가하였지

만, IN1302 감염세포에 비하여 유의하게 감소되었다(Fig 3). 이 결과는 결핵균 감염 시 발생하는 염증성 사이토카

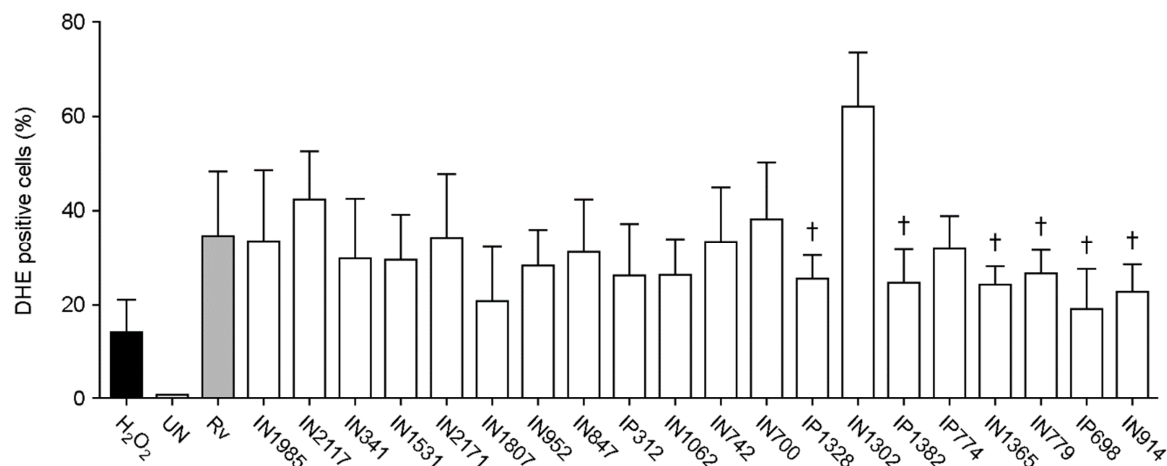


Figure 5. ROS synthesis in Raw264.7 cells infected with 1 of 20 clinical isolates of Mtb. Raw264.7 cells were incubated for 3 h with H37Rv or clinical Mtb isolates, and then cultured for 24 h in DMEM. For the analysis of intracellular ROS production, cells were incubated with dihydroethidium (20 μ M) for 30 min and then analyzed by flow cytometry. H₂O₂ (10 mM, 30 min) was used as a positive control. Statistical differences between the Mtb- and H37Rv-infected cells were examined using a one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. $^{\dagger}p < 0.05$. $N \geq 3$. Bars represent the means \pm SD.

인의 생성과 세포 스트레스 반응이 복잡하게 연결되어 있다는 것을 나타낸다.

임상분리 결핵균주 감염 시 MCP-1의 발현

MAPK 경로는 MCP-1을 통하여 MCP-1을 유도하고 (28), MCP-1은 활성산소 생성의 증가를 가져와 세포 스트레스를 일으킨다고 알려져 있다 (29). 따라서 결핵균 감염 시 MAPK 경로와 MCP-1의 생성 유도와의 관계 및 활성산소의 생성도를 비교하였다. 임상분리 결핵균주 감염세포에서 MAPK 경로는 H37Rv 감염세포보다 낮거나 유사하게 증가하였으나, 예외적으로 MCP-1의 생성이 높았던 IN1302 감염세포에서 phospho-JNK, -ERK 그리고 -p38의 MAPK 경로의 활성화가 다른 임상분리 결핵균주 감염세포들에 비하여 증가되었다(Fig. 4A). 임상분리 결핵균주 감염세포들에서 MCP-1의 생성은 H37Rv 감염세포와 유사하게 증가되었다. 예외적으로 IN1302 감염세포의 경우, MCP-1 생성이 H37Rv 감염세포 보다 약 2배 증가하였다(Fig. 4B). 결핵균 감염에 의해 생성되는 활성산소의 양을 각각 비교해본 결과, 대부분의 임상분리 결핵균주 감염세포는 H37Rv 감염세포와 활성산소 생성이 유사하였다. 특이적으로 MCP-1의 생성을 높게 유도시킨 IN1302에 의해 감염된 세포는 다른 임상분리 결핵균주

감염세포들에 비하여 활성산소의 생성을 높게 유도하였다(Fig. 5). 이 결과들을 종합하면, IN1302의 경우를 제외한 대부분의 임상분리 결핵균주는 마우스 큰포식세포의 MAPK 경로를 조절하고 있었다. MCP-1의 생성 유도는 MCP-1 생성이 높았던 IN1302 균주를 제외하고 대부분 H37Rv와 유사한 정도가 생성되었고, 활성산소 또한 대부분의 임상분리 결핵균주 감염 시 H37Rv와 유사한 정도만 생성되고 있었다. 따라서 MCP-1과 활성산소의 생성은 서로 밀접한 관련이 있을 것이라 생각된다 (29, 30).

DISCUSSION

본 연구에서 IN1302를 제외한 대부분의 임상분리 결핵균주에 의하여 유도되는 세포자멸사 비율은 H37Rv로 감염시킨 세포와 유사하거나 더욱 낮았다(Fig. 1). 흥미롭게도 세포자멸사 비율이 H37Rv 감염세포와 유사하게 증가한 IN1302를 제외한 대부분의 임상분리 결핵균주로 감염시킨 세포들은 세포 스트레스 반응 또한 H37Rv 감염세포와 유사하게 유도되었는데, 이 결과들로부터 결핵균주들에 의한 세포의 죽음은 세포 스트레스 반응의 밀접한 관계가 있다고 생각할 수 있다. 일반적으로 결핵균은 숙주세포에 감염 시 외독소를 통하여 세포막과 미토콘드

리아에 손상을 입힌다. 표준형 결핵균은 병원성 H37Rv와 비병원성 H37Ra로 정의할 수 있다. 형태학적으로 병원성 H37Rv는 거친집락균주의 형태를 보이고 비병원성 H37Ra는 평활집락균주의 형태를 보인다. 또한 마우스 모델에서 병원성 H37Rv 감염 시 30~35일의 생존 일을 나타내는데, 반면 비병원성 H37Ra 감염 시에는 질환이 나타나지 않았다 (31). 비병원성 결핵균 H37Ra의 경우 숙주세포의 cyclooxygenase (COX)2 합성을 증가시켜 prostaglandin (PGE)₂를 유도하는데, PGE₂는 세포막과 미토콘드리아 내막의 손상을 수리하여 괴사를 억제한다. 하지만 병원성 결핵균 H37Rv의 경우 숙주세포에서 lipoxin (LX)A₄의 합성을 강하게 증가시켜 COX2의 합성을 방해해 PGE₂를 저해하고, 미토콘드리아에 손상을 입혀 괴사를 유도한다 (32, 33). 이처럼 병원성 결핵균 H37Rv는 비병원성 결핵균 H37Ra에 비하여 숙주세포의 세포자멸사를 억제시키고 괴사를 유도함으로써 세포 내 생존 전략으로 이용하는 것 같다.

IN1302를 제외한 대부분의 임상분리 결핵균주들과 H37Rv로 감염시킨 세포에서 소포체 스트레스 반응과 세포자멸사 유도가 낮은 이유는 유사한 정도의 병원성을 지니고 있기 때문일 것이라 생각한다. 괴사 비율과 TNF- α 의 생성이 높았던 IN2117, IN2171, IP312, IN1062의 경우, Raw264.7에 감염 시 세포 내 결핵균 생존능은 H37Rv보다 유의하게 증가하였다(Fig. 2). 이것은 결핵 환자의 육아종에서 TNF- α 의 생성이 과다하게 증가되어 있었고 (34), 결핵균 감염 시 TNF 생성을 유도해 숙주세포의 괴사를 일으켜 결핵균의 생존이나 새로운 조직으로의 감염을 일으킨다는 보고들과 일치한다 (35~37). 따라서 대부분의 임상분리 결핵균의 감염은 숙주세포의 세포자멸사를 회피하고 괴사를 유도함으로써 결핵균 생존에 유리하게 작용할 것이라고 생각한다.

MAPK에 의하여 유도되는 MCP-1은 일반적으로 cytokine의 역할이 잘 알려져 있었지만, 최근 CCR2와 결합을 통해 유전자 *zc3h12*의 전사를 조절한다고 밝혀졌다 (38, 39). 유전자 *zc3h12*는 MCPIP로 번역되며, MCPIP는 CCCH zinc-finger 단백질로 inducible nitric synthase (iNOS), NADPH oxidase를 생성하고 이는, 활성산소의 축적을 가져와 세포 내 산화스트레스 환경이 조성되어 자가포식작용, 소포체 스트레스를 유도하는 것으로 알려졌다 (40, 41). 본 연구에서 IN1302를 감염시킨 세포는 다른 결핵균주들을 감염시킨 세포에 비하여 MAPK 경로가 활성화되어 있었고

MCP-1의 생성도 의미있게 증가되어 있었다. 즉, MCP-1의 생성이 높으면 MCPIP 유도 역시 높아져 있었고 활성산소의 생성도 높아져 있었다(Fig. 4, 5). 이 결과로부터 IN1302로 감염시킨 세포는 MAPK 활성이 증가하여 MCP-1 생성을 유도시키고, MCP-1은 *zc3h12*의 전사를 증가시켜 생성된 MCPIP 단백질이 활성산소의 생성을 유도함으로써 소포체 내 단백질의 변성을 가져와 결국 소포체 스트레스 반응을 일으킨 것으로 생각한다. 이것은 MCPIP의 과발현 시 활성산소의 축적과 소포체 스트레스 반응을 증가시킨다는 보고 (40)와 심장근육모세포주 H9c2에서 MCP-1에 의한 MCPIP 생성이 산화환경과 소포체 스트레스를 유도해 세포자멸사를 일으킨다는 보고 (28)와 일치한다. 비록 대부분의 임상분리 결핵균주 감염세포들에서 MCP-1의 생성은 높아져 있었지만, IN1302를 제외한 대부분의 임상분리 결핵균주 감염세포들에서 MCPIP의 생성이 크게 유도되지는 않았다. MCPIP의 생성과 MCP-1의 생성이 일치하지 않은 대부분의 임상분리 결핵균주 감염의 경우에 대해서는 그 정확한 이유를 알 수 없지만 유비퀴틴에이션에 의한 MCPIP의 제거나 MCP-1의 충분하지 못한 생성과 같은 또 다른 원인이 있기 때문이라고 생각한다. 따라서 대부분의 임상분리 결핵균주에서 MCPIP의 생성억제가 소포체 스트레스 유도성 세포자멸사의 조절과 관련되어 있지만, IN1302의 경우 소포체 스트레스 반응의 유도 이외에 다른 기전이 결핵의 발병에 작용했을 것이다. 이번 연구에서 비록 그 원인을 다 규명하지는 못했지만 MCPIP에 의해 유도되는 숙주세포의 소포체 스트레스 반응과 결핵의 발병과는 상호 밀접한 연관이 있을 것으로 사료된다.

본 연구 결과들을 종합하면, 국내에서 발병한 결핵 환자로부터 분리된 대부분의 임상분리 결핵균주는 소포체 스트레스 반응과 세포자멸사의 유도를 억제시키고 있으며 MCPIP의 생성에 의한 소포체 스트레스 반응 유도가 결핵의 병인에 기여했을 것이라고 생각할 수 있다.

REFERENCES

- 1) van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev 2002;15:294-309.
- 2) Zumla A, George A, Sharma V, Herbert RH, Baroness Masham of Ilton, Oxley A, et al. The WHO 2014 Global tuberculosis

- report--further to go. *Lancet Glob Health* 2015;3:e10-2.
- 3) Faherty CS, Maurelli AT. Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection. *Trends Microbiol* 2008;16:173-80.
 - 4) Massari P, King CA, Ho AY, Wetzler LM. Neisserial PorB is translocated to the mitochondria of HeLa cells infected with *Neisseria meningitidis* and protects cells from apoptosis. *Cell Microbiol* 2003;5:99-109.
 - 5) Knodler LA, Finlay BB, Steele-Mortimer O. The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *J Biol Chem* 2005;280:9058-64.
 - 6) Lee HC, Goodman JL. *Anaplasma phagocytophilum* causes global induction of antiapoptosis in human neutrophils. *Genomics* 2006;88:496-503.
 - 7) Schmid MC, Scheidegger F, Dehio M, Balmelle-Devaux N, Schulein R, Guye P, et al. A translocated bacterial protein protects vascular endothelial cells from apoptosis. *PLoS Pathog* 2006;2:e115.
 - 8) Joshi SG, Francis CW, Silverman DJ, Sahni SK. NF-kappaB activation suppresses host cell apoptosis during *Rickettsia rickettsii* infection via regulatory effects on intracellular localization or levels of apoptogenic and anti-apoptotic proteins. *FEMS Microbiol Lett* 2004;234:333-41.
 - 9) Zhang JZ, Sinha M, Luxon BA, Yu XJ. Survival strategy of obligately intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: novel modulation of immune response and host cell cycles. *Infect Immun* 2004;72:498-507.
 - 10) Clark CS, Maurelli AT. *Shigella flexneri* inhibits staurosporine-induced apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* 2007;75:2531-9.
 - 11) Divangahi M, Behar SM, Remold H. Dying to Live: How the Death Modality of the Infected Macrophage Affects Immunity to Tuberculosis. In: Divangahi M, editor. *The New Paradigm of Immunity to Tuberculosis*: Springer New York; 2013. p. 103-20.
 - 12) Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol* 2000;164:2016-20.
 - 13) Song CH. Endoplasmic Reticulum Stress Responses and Apoptosis. *J Bacteriol Virol* 2012;42:196-202.
 - 14) Choi HH, Shin DM, Kang G, Kim KH, Park JB, Hur GM, et al. Endoplasmic reticulum stress response is involved in *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6-mediated apoptosis. *FEBS Lett* 2010;584:2445-54.
 - 15) Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006;7:880-5.
 - 16) Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 2002;7:335-45.
 - 17) Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005;74:739-89.
 - 18) Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 2003;23:1292-303.
 - 19) Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Hellencourt C, Ravanan P. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci* 2014;8:213.
 - 20) Lee SY, Lee MS, Cherla RP, Tesh VL. Shiga toxin 1 induces apoptosis through the endoplasmic reticulum stress response in human monocytic cells. *Cell Microbiol* 2008;10:770-80.
 - 21) Pillich H, Loose M, Zimmer KP, Chakraborty T. Activation of the unfolded protein response by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* 2012;14:949-64.
 - 22) Su HL, Liao CL, Lin YL. *Japanese encephalitis virus* infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *J Virol* 2002;76:4162-71.
 - 23) Lim YJ, Choi JA, Choi HH, Cho SN, Kim HJ, Jo EK, et al. Endoplasmic reticulum stress pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 2011;6:e28531.
 - 24) Choi JA, Lim YJ, Cho SN, Lee JH, Jeong JA, Kim EJ, et al. Mycobacterial HBHA induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis through the generation of reactive oxygen species and cytosolic Ca²⁺ in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Cell Death Dis* 2013;4:e957.
 - 25) Lim YJ, Choi JA, Lee JH, Choi CH, Kim HJ, Song CH. *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa antigen induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via toll-like receptor 2/4. *Apoptosis* 2015;20:358-70.
 - 26) Lee J, Hartman M, Kornfeld H. Macrophage Apoptosis in Tuberculosis. *Yonsei Med J* 2009;50:1-11.
 - 27) Hao X, Yao A, Gong J, Zhu W, Li N, Li J. Berberine ameliorates pro-inflammatory cytokine-induced endoplasmic reticulum stress in human intestinal epithelial cells *in vitro*.

- Inflammation 2012;35:841-9.
- 28) Kolattukudy PE, Niu J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway. *Circ Res* 2012;110:174-89.
- 29) Younce C, Kolattukudy P. MCP-1 induced protein promotes adipogenesis via oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Cell Physiol Biochem* 2012;30:307-20.
- 30) Higa A, Chevet E. Redox signaling loops in the unfolded protein response. *Cell Signal* 2012;24:1548-55.
- 31) Ioeberger TR, Feng Y, Ganesula K, Chen X, Dobos KM, Fortune S, *et al.* Variation among Genome Sequences of H37Rv Strains of *Mycobacterium tuberculosis* from Multiple Laboratories. *J Bacteriol* 2010;192:3645-53.
- 32) Behar SM, Martin CJ, Booty MG, Nishimura T, Zhao X, Gan HX, *et al.* Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol* 2011;4:279-87.
- 33) Behar SM, Divangahi M, Remold HG. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol* 2010;8:668-74.
- 34) Bezuidenhout J, Roberts T, Muller L, van Helden P, Walzl G. Pleural tuberculosis in patients with early HIV infection is associated with increased TNF-alpha expression and necrosis in granulomas. *PLoS One* 2009;4:e4228.
- 35) Fratazzi C, Arbeit RD, Carini C, Remold HG. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J Immunol* 1997;158:4320-7.
- 36) Roca FJ, Ramakrishnan L. TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. *Cell* 2013;153:521-34.
- 37) Bocchino M, Galati D, Sanduzzi A, Colizzi V, Brunetti E, Mancino G. Role of mycobacteria-induced monocyte/macrophage apoptosis in the pathogenesis of human tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:375-83.
- 38) Werle M, Schmal U, Hanna K, Kreuzer J. MCP-1 induces activation of MAP-kinases ERK, JNK and p38 MAPK in human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2002;56:284-92.
- 39) Zhou L, Azfer A, Niu J, Graham S, Choudhury M, Adamski FM, *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction. *Circ Res* 2006;98:1177-85.
- 40) Younce CW, Kolattukudy PE. MCP-1 causes cardiomyoblast death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCP-IP. *Biochem J* 2010;426:43-53.
- 41) Bidzhekov K, Zernecke A, Weber C. MCP-1 induces a novel transcription factor with proapoptotic activity. *Circ Res* 2006;98:1107-9.