

Toll-like receptor 9-매개에 의한 matrix metalloproteinase-9 발현에서 NFκB의 역할

이상훈 · 진병로 · 백석환*

영남대학교 의과대학 치과학교실, *생화학 · 분자생물학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:636-642)

ROLE OF NFκB IN TOLL-LIKE RECEPTOR 9-MEDIATED MATRIX METALLOPROTEINASE-9 EXPRESSION

Sang-Hoon Lee, Byung-Rho Chin, Suk-Hwan Baek*

Department of Dentistry and *Biochemistry & Molecular Biology, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

Background: CpG DNA plays an important role in immune cell function. This study examined whether the temporal control of toll-like receptor (TLR)9 by CpG DNA can regulate the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9).

Methods and materials: Macrophages were cultured in the presence of 10% FBS. For the various MMP genes analysis, RT-PCR and real-time PCR were performed. In addition, zymography assay performed for the MMP activity. The phosphorylation assay did for the ERK1/2 and NFκB activation, and luciferase promoter assay was for the NFκB activity.

Results: CpG DNA induced the mRNA expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-13, but not of MMP-7, MMP-8, and MMP-12, in a time-dependent manner. Especially, the mRNA expression of MMP-9 was strongly induced by CpG DNA using real-time RT-PCR. The TLR9 inhibitor, chloroquine, suppressed CpG DNA-induced MMP-9 expression and its activity. Moreover, CpG DNA induced the phosphorylation of ERK and the inhibition of ERK by U0126 suppressed CpG DNA-induced MMP-9 expression and its activity. CpG DNA stimulated IκB-α degradation and luciferase activity. In addition, pretreatment of SN-50, the inhibitor of NFκB, strongly blocked the CpG DNA-induced MMP-9 expression and activity.

Conclusion: These observations suggest that CpG DNA may play important roles in the activation of macrophages by regulating the production of MMP-9 via the sequential TLR9-ERK-NFκB signaling pathway.

Key words: Toll-like receptor, Matrix metalloproteinase, NFκB

I. 서 론

선천성 면역을 담당하는 세포는 pattern-recognition receptor (PRR)라 불리는 수용체를 이용하여 감염체를 감지하고 분류한다. PRR은 병원균에서 생성되는 물질들과 결합하는데 가장 많이 연구된 것은 toll-like receptor (TLR)이며, 이는 현재 사람에게서 10종류가 알려져 있다¹⁾. TLR은 세포표면에서 발현되어 세포외 병원균에서 생성된 특정 물질인 lipopolysaccharide (LPS)나 lipopeptides와 작용하기도 하지만, 선천성 면역 담당세포 자체

에서 생성된 물질을 감지하기도 한다²⁾. TLR 중, TLR9은 비메틸화 형태의 CpG deoxynucleotide (CpG DNA)를 감지한다³⁾. CpG는 대부분의 박테리아나 바이러스 게놈에서는 비메틸화 형태가 보편적이지만, 척추동물 게놈에서는 비메틸화가 억제되고 대신 메틸화 형태로 존재한다⁴⁾. 엔도솜 (endosome)에 위치하는 TLR9의 특징은 침입한 박테리아나 바이러스의 핵산을 효과적으로 감지하고, 자신의 DNA 내에 존재하는 CpG motif에 의해 발생하는 사고도 방지한다⁵⁾.

TLR9은 여러 종류의 면역 담당 세포중에서 B 임파구와 특화된 수지상 세포에서 주로 발현되지만, 활성화된 호중구나 폐상피세포에서도 발현된다⁶⁾. 그러나 면역을 담당하는 이외의 세포에서 TLR9 발현의 생물학적 중요성은 아직 밝혀지지 않았다. TLR9 자극으로 활성화된 면역세포는 보조 단백질 발현을 증진시키고, 세포사멸에 저항성을 나타내며, 케모카인 수용체를 조절할 뿐만 아니라, 케모카인과 사이토카인의 분비를 일으키기도 한다⁷⁾. CpG DNA에 의한 면역세포의 자극은 내면

백 석 환

705-717 대구광역시 남구 대명5동 317-1

영남대학교 의과대학 생화학 · 분자생물학교실

Suk-Hwan Baek

Dept. of Biochemistry & Molecular Biology, College of Medicine, Yeungnam Univ.

317-1, Daemyeong 5-dong, Nam-gu, Daegu, 705-717, Korea

Tel: 82-53-620-4523 Fax: 82-53-620-8032

E-mail: sbaek@med.yu.ac.kr

* This work was supported by the Korean Science and Engineering Foundation via the Aging-associated Vascular Research Center at Yeungnam University (R13-2005-005-02001-0 (2007)).

화 (internalization)를 필요로 하며 자발적으로 일어나며, 엔도솜 속으로 내면화된 CpG motif는 TLR9과 반응한 후, 어댑터 단백질 Myd88와 신속하게 결합하며, interleukin-1 receptor-associated kinase-1 (IRAK1), interferon regulatory-7 (IRF7) 및 tumor necrosis factor- α receptor activated factor-6 (TRAF6)의 활성화 및 결합을 유도한다⁸⁹⁾.

Matrix metalloproteinase (MMP)는 젤라틴이나 콜라겐과 같은 세포외기질을 분해하는 중요한 효소로서 질병과 건강상태의 균형을 유지하는 역할을 한다. MMP는 gelatinase, collagenase, stromelysin 및 막결합성 MMP군으로 분류한다⁹⁰⁾. 다양한 종류의 MMP 중, MMP-2와 MMP-9은 gelatinase군으로서 MMP-2는 다양한 종류의 세포에서 항시 발견되어 lamin과 type IV collagen을 분해하는 역할을 하는 반면, MMP-9은 각종 염증성 자극에 의해 유도되고 기저막 성분을 분해한다¹¹⁾. 특히, MMP-9 발현은 염증반응 매개체에 의해 증가함으로써 염증성 질환과 밀접한 관계가 있음을 증명하고 있다.

현재까지 밝혀진 CpG DNA의 MMP 발현 기전에 관한 연구는 충분히 되어 있지 않지만, TLR9 활성화물질이 MMP 활성을 증진시킴으로써 세포침투를 조절한다는 보고와 CpG가 전사인자를 활용하여 MMP-9 유전자 발현과 세포이동을 조절한다는 것을 보고하였다¹²⁾. 최근에는 CpG에 의한 TLR9 활성화는 Akt 활성을 유도하고 TNF- α 를 생성하여 MMP-9 발현을 조절한다는 보고가 있었지만⁹⁾ 아직도 CpG DNA에 의한 MMP 조절에 관한 정확한 작용기전과 그 중요성에 대한 해석은 부족한 상태이다. 그러므로 본 연구에서는 CpG DNA 자극에 의한 MMP-9 발현조절을 야기하는 TLR9의 구체적인 작용기전을 검토하고 이들 활성을 매개하는 신호전달 단백질의 종류와 작용을 연구하였다.

II. 실험 재료 및 방법

A. 실험 재료

RPMI-1640, Opti-MEM, penicilline-streptomycine, trypsin-EDTA, lipofectamine 2000, 세포배양용 혈청 및 reverse transcriptase-PCR kit은 Gibco BRL 사 (Grand Island, NY, 미국)로부터, SYBR Green I은 Roche Applied Science 사 (Indianapolis, IN, 미국)로부터, CpG dinucleotide (5'-TCCATGACGTTCCCTGATGCT-3)와 각종 primer 합성은 GenoTech 사 (대전, 한국)에 의뢰하여 합성하였으며, TLR9 저해제인 chloroquine, NF- κ B 저해제인 SN-50와 zymography 실험을 위한 젤라틴은 Sigma 사 (St. Louis, MI, 미국)로부터, MEK-ERK 저해제인 U0126은 BioMol 사 (Plymouth Meeting, PA, 미국)로부터 구입하여 사용하였다. MMP-9 항체와 peroxidase가 부착된 토끼 Ig 항체와 쥐 Ig 항체는 Santa-Cruz 사 (Santa-Cruz, CA, 미국)로부터, ERK, phospho ERK, I κ B와 NF- κ B 항체는 Cell Signaling 사 (Beverly, MA, 미국)로부터 구입하였다.

B. 실험 방법

세포배양과 CpG DNA 처리

세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA)로부터 구입한 대식세포주 Raw264.7를 10% fetal calf serum과 1% penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI-1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 배양된 세포는 약 24 시간 간격으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 합성된 CpG DNA는 특신이 없는 물에 녹여 농도별로 세포에 직접 처리하였다.

Western Blot 분석

시료를 처리한 세포에서 세포질 분획을 얻고, 전기 영동하여 분리한 단백질은 니트로 셀룰로스 막으로 20% 메탄올, 25 mM Tris 및 192 mM glycine 완충액 하에서 transfer 탱크 장치를 이용하여 이동하였다. 단백질이 이동된 니트로 셀룰로오스 막은 Ponceau 용액으로 이동의 유무를 확인한 후 5% blocking 용액 (non-fat milk)을 사용하여 30분간 실온에서 반응하였다. 반응 후 완충액으로 1,000배 희석한 각종 항체와 단백질이 이동된 니트로 셀룰로스 막을 4시간 이상 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Tris-Tween buffered saline (TTBS)으로 5분 간격으로 6회 세척하고, 계속하여 horse radish peroxidase가 부착된 이차항체인 토끼 또는 쥐 IgG 항체와 2시간 반응시키고 TTBS로 6회 세척하였다. 증류수로 세척하고 enhanced chemiluminescence 용액으로 1분간 반응하고 필름에 감광하여 나타난 띠의 두께를 비교하여 단백질 발현 유무 또는 발현 정도를 확인하였다.

ERK와 NF- κ B 단백질의 활성화

CpG DNA를 적정시간 처리한 세포는 수확하여 세포질을 분리하고 전기영동을 한 후 니트로 셀룰로오스 막으로 단백질을 이동시켰다. ERK의 활성화는 인산화된 ERK 단백질만을 인지할 수 있는 항체를 사용하여 Western blot을 수행하여 확인하였다. ERK의 단백질 발현정도는 인산화 된 것과 인산화 되지 않은 ERK 모두를 인지할 수 있는 항체를 사용하여 확인하였다. NF- κ B 활성화는 저해 단백질인 I κ B- α 의 분해를 Western blot을 수행하여 확인하였다.

RT-PCR과 real-time RT-PCR

세포를 배양하고 CpG DNA 또는 저해제와 함께 처리한 세포를 수확하고 2% bovine serum albumin이 포함된 완충액으로 세척하고 RNA 추출 용액 (4 M guanidium thiocyanate, 0.5% sarcosyl, 25 mM sodium citrate, 0.1 M 2-mercaptoethanol)으로 mRNA를 얻었다. Reverse transcriptase 반응은 분리한 mRNA를 사용하여 RT-PCR kit를 이용하였으며 역전사 시켜 cDNA를 얻었다. PCR은 주형으로 사용하는 시료 cDNA를 94°C에서 1분 동안 변성시키고 각 유전자에 대한 2개의 primer를 혼합하여 60°C에서 25 cycle을 반복하여 얻은 PCR 산물을 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel 전기영동으로 분리, 확인하였다. PCR 산물은

β -actin을 대조군으로 사용하였다. Real-time PCR은 SYBR Green I의 활성을 LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands)를 이용하여 실시간으로 확인하였다. 반응 혼합액은 cDNA 주형 5 μ l, 2개의 primer 각각 0.5 μ l, SYBR Green I master mixture 1 μ l, 25mM MgCl₂ 1.2 μ l, H₂O 1.8 μ l 를 포함하였다. 실시간 PCR 조건은 95°C에서 10분간 반응하고, 95°C에서 10초간 denaturation, 63°C에서 5초간 annealing, 72°C에서 5초간 extension 조건으로 45 cycle를 반복하여 얻은 PCR 산물을 Roche Diagnostics Light-Cycler 소프트웨어로 분석하였으며, 정량치는 β -actin으로 보정하여 나타내었다.

DNA Transfection 및 NF κ B Promoter 활성 측정

대식 세포를 배양접시에 일정 수 나누어 배양하고 luciferase를 발현하는 DNA가 결합되어 있으며, NF κ B 프로모터 DNA를 함유하는 매개체 DNA와 Lipopectamine 2000을 섞어서 혈청이 포함되지 않은 Opti-MEM 배지에 희석하여 20분간 실온에서 반응시킨다. 20분 후 천천히 한 방울씩 세포에 첨가하고 계속하여 18시간 반응시킨다. 18시간 후 10% 세포배양용 혈청이 포함된 Opti-MEM 배지로 교체하고 계속하여 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 배지를 다시 교체하고 시료로 자극한 후 수확하였다. 수확한 세포는 완충액을 사용하여 세포질 분획을 얻었으며, luciferase 활성은 luminometer를 사용하여 기질과 반응하여 측정하였다.

III. 결 과

(1) CpG DNA에 의한 MMP 종류의 mRNA 발현변화

배양한 대식세포에 1 μ M CpG DNA를 30분, 1, 2, 4, 6, 시간 각각 처리한 후, RT-PCR을 이용하여 여러 종류의 MMP mRNA 발현 변화를 검토하였다. 그 결과, MMP-7, MMP-8과 MMP-12의 mRNA 변화는 관찰할 수 없었으나 MMP-2, MMP-9과 MMP-13의 mRNA 발현은 30분부터 증가하기 시작하여 처리 4시간에서 최대의 발현을 나타내고 이후부터 다시 서서히 감소하였다 (Fig. 1A). RT-PCR 방법에서 mRNA 발현이 증가된 MMP-9 mRNA 변화는 real-time RT-PCR을 이용하여 정량적으로 재확인하였다. 그 결과, RT-PCR 결과와 유사하게 시간에 따라 점차 증가하고 4시간에서 최대로 발현이 증가하였으며 이후 감소하였다 (Fig. 1B).

(2) CpG에 의한 MMP-9 단백질발현과 활성변화

CpG DNA 처리에 따라 MMP-9 mRNA 발현이 증가하였으므로 MMP-9 항체를 사용하여 세포에서 발현되는 단백질 발현량을 Western blot 방법으로 확인하였다. 배양된 대식세포에 1 μ M CpG DNA를 시간별로 처리한 후, conditioned media를 일부 취하여 MMP-9 발현 양을 측정하였다. 대조군 세포 배양액의 MMP-9 발현은 아주 미미하였으나 CpG DNA을 처리한 세포는 6시간

처리한 세포부터 증가하고 12시간 또는 24시간 처리한 세포도 점차 증가하였다 (Fig. 2A). 같은 조건으로 배양한 세포에서 zymography 방법으로 MMP-9 효소 활성을 측정하였다. CpG DNA 시간 처리에 따른 MMP-9 활성도 시간-의존적으로 증가하였다 (Fig. 2A). CpG DNA처리 농도에 따른 MMP-9 발현과 활성 변화도 검토하였다. MMP-9의 발현과 활성은 대조군에서는 아주 약하였으나 CpG DNA 처리에 따라 농도-의존적으로 증가하였다 (Fig. 2B). 그러므로 다음 실험부터는 CpG DNA 농도는 1 μ M로, 처리시간은 24시간으로 고정하였다.

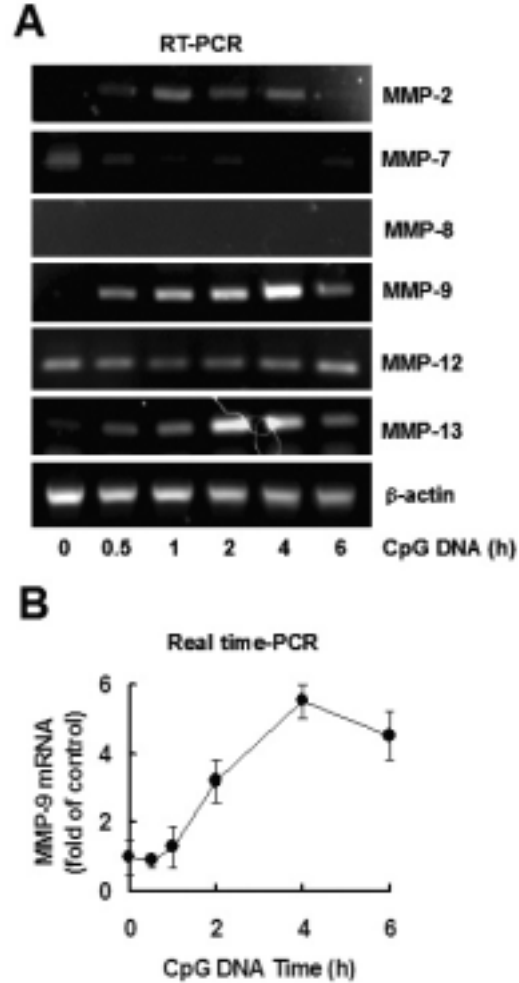


Fig. 1. Effect of CpG DNA in mRNA expression of various MMPs of macrophages. A, Following overnight serum starvation, cells were treated with 1 μ M of CpG DNA for the indicated times and total RNA was isolated from cells and then subjected to RT-PCR using specific primer. B, Cells were treated with 1 μ M of CpG DNA for the indicated times and total RNA was isolated from cells and then subjected to real-time RT-PCR using MMP-9 primer. Real-time PCR was performed by SYBR Green I using LightCycler 1.5.

(3) CpG-작용 MMP-9 발현에서 TLR9의 효과

CpG DNA 처리에 의해 증가하는 MMP-9 발현과 활성이 TLR9 수용체 매개로 이루어짐을 증명하기 위하여 CpG DNA와 TLR9 결합을 방해하는 물질인 chloroquine을 세포에 1, 3, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도별로 전 처리하였다. Chloroquine만 처리한 세포는 별다른 영향이 없었다. 그러나 chloroquine을 전 처리한 세포는 CpG DNA에 의해 유도된 단백질 발현과 활성을 chloroquine 농도-의존적으로 급격히 감소시켰으며, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 chloroquine 전 처리는 90% 이상 MMP-9 발현과 활성을 억제하였다 (Fig. 3).

(4) MMP-9 발현조절에서 ERK1/2 활성의 영향

CpG DNA에 의한 MMP-9 발현에 미치는 ERK1/2 활성의 영향을 검토하였다. CpG DNA 처리는 세포의 ERK1/2 인산화에 따른 활성화를 유도하였다. ERK1/2 인산화는 20분부터 증가하기 시작하여 30분과 50분 사이에서 최대 효과를 나타내고 시간에 따라 다시 감소하였으며, 70분 이후는 대조군과 비슷한 수준으로 회복하였다. 전체 ERK1/2의 발현은 CpG DNA 처리에 의해 영향이 없었다 (Fig. 4A). CpG DNA에 의한 MMP-9 발현 증가가 ERK1/2 인산화 매개로 이루어지는 것을 확인하기 위하여 MEK-ERK1/2 전달과정 저해제인 U0126을 사용하여 검토하였

다. ERK1/2 활성 저해제를 30분간 전 처리하고 CpG DNA를 연속적으로 처리한 다음, MMP-9 발현을 측정하였다. 그 결과, ERK1/2 저해제는 농도-의존적으로 CpG DNA의 자극으로 발현되는 MMP-9 양을 감소시켰으나 대조군으로 사용한 β -actin의 발현 변화에는 영향이 없었다 (Fig. 4B). 한편, ERK1/2 저해제 작용은 MMP-9 활성에도 유사한 효과를 나타내었다 (Fig. 4C).

(5) ERK1/2와 TLR9간의 상관성

CpG DNA가 결합하는 TLR9과 ERK1/2간의 상관성을 검토하였다. CpG DNA와 TLR9간의 결합을 방해하는 chloroquine은 CpG DNA에 의해 증가된 ERK1/2의 인산화를 강력하게 억제하였으나 ERK1/2 전체 발현변화에는 영향이 없었다 (Fig. 4D).

(6) MMP-9 발현조절에서 NFκB 활성의 영향

다음은 CpG DNA가 매개하는 MMP-9 발현과정에 참여하는 전사인자의 종류와 작용기전을 검토하였다. CpG DNA에 의한 전사인자 NFκB가 활성화되는가를 두 가지 방법으로 확인하였다. 하나는 NFκB와 결합한 상태로 작용하는 내재성 저해 단백질인 IκB- α 의 분해 정도를 항체를 사용하여 검토하였다. CpG DNA 처리는 IκB- α 의 단백을 20분부터 분해하기 시작하여 30분에서 최대효과를 나타내고 60분 이후에 원상으로 회복되었다. 그러나 IκB- α 와 결합되어 있는 NFκB 발현 변화는 관찰되지 않았으며 control로 사용한 β -actin의 단백질 변화도 관찰되지 않았다 (Fig. 5A). 다른 하나는 프로모터 활성 방법으로 확인하였다. CpG DNA 처리는 NFκB 프로모터 활성을 대변하는 luciferase 활

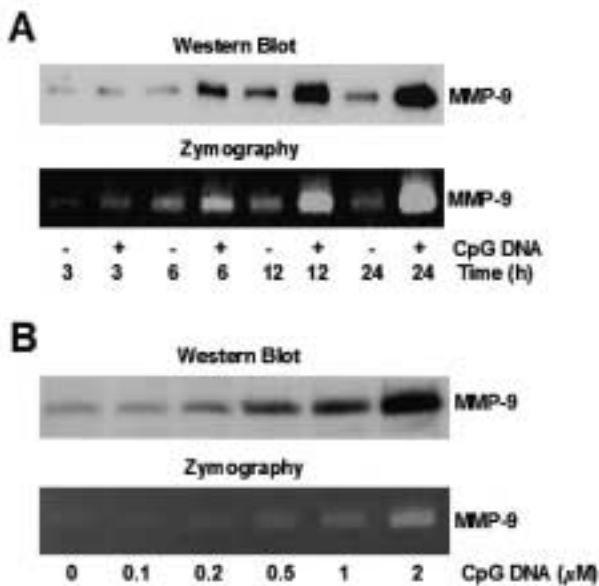


Fig. 2. Effect of CpG DNA in MMP-9 expression and activity of macrophages. Following overnight serum starvation, cells were treated with 1 μM of CpG DNA for the indicated times (A), or cells were treated with the indicated concentrations of CpG DNA for 24 hr (B). Conditioned media were collected and the expression and activity of MMP-9 were determined by Western blot or Zymography analysis, respectively.

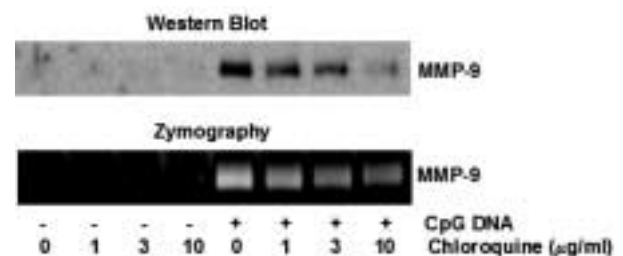


Fig. 3. TLR9 activation mediated CpG DNA-induced MMP-9 expression and activity. Cells were treated with 1 μM CpG DNA in the absence or presence of the indicated doses of chloroquine. After 24 hr, conditioned media were collected and analyzed for MMP-9 expression and activity using Western blot or Zymography.

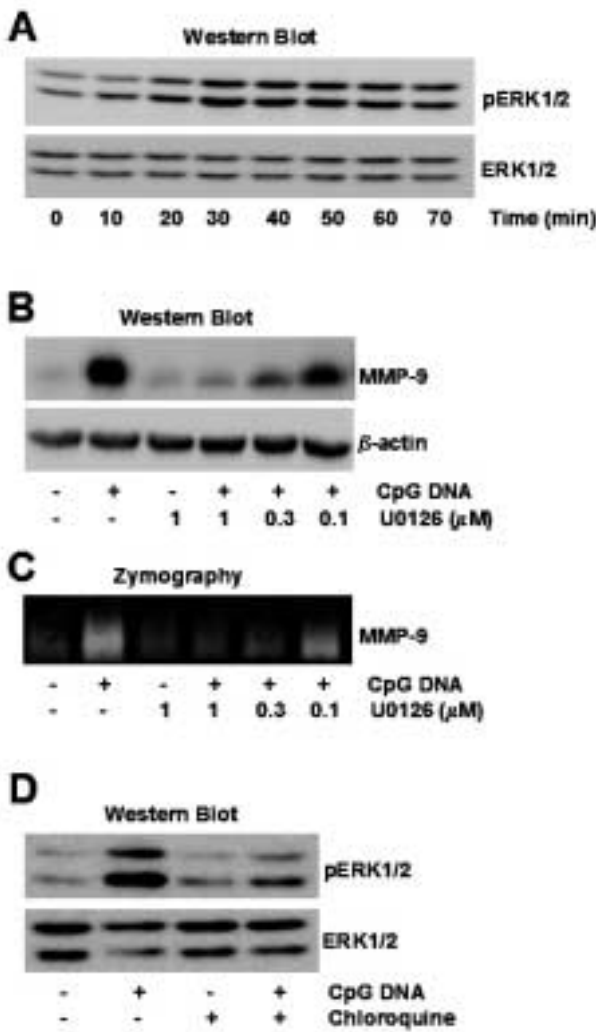


Fig. 4. CpG DNA phosphorylates ERK of macrophages. A, Cells were treated with 1 μM CpG DNA for the indicated times (0-70 min). To detect ERK phosphorylation, equal amounts of cell extracts were analyzed by Western blotting using phospho-specific ERK antibody. As a loading control, the same blots were reprobbed with anti-ERK antibody. B and C, Cells were treated with 1 μM CpG DNA in the absence or presence of indicated doses of U0126. After 24 hr, conditioned media were collected and analyzed for MMP-9 expression and activity using Western blot or Zymography. D, Cells were treated with 1 μM CpG DNA in the absence or presence of chloroquine for 30 min. To detect ERK phosphorylation, equal amounts of cell extracts were analyzed by Western blotting using phospho-specific ERK antibody. As a loading control, the same blots were reprobbed with anti-ERK antibody.

성을 농도-의존적으로 증가시켰다 (Fig. 5B). CpG DNA에 의해 증가한 NFκB 활성이 MMP-9 발현에 미치는 영향을 검토하였다. DNA와 결합하는 NFκB의 구조적 특징을 활용하여 개발된

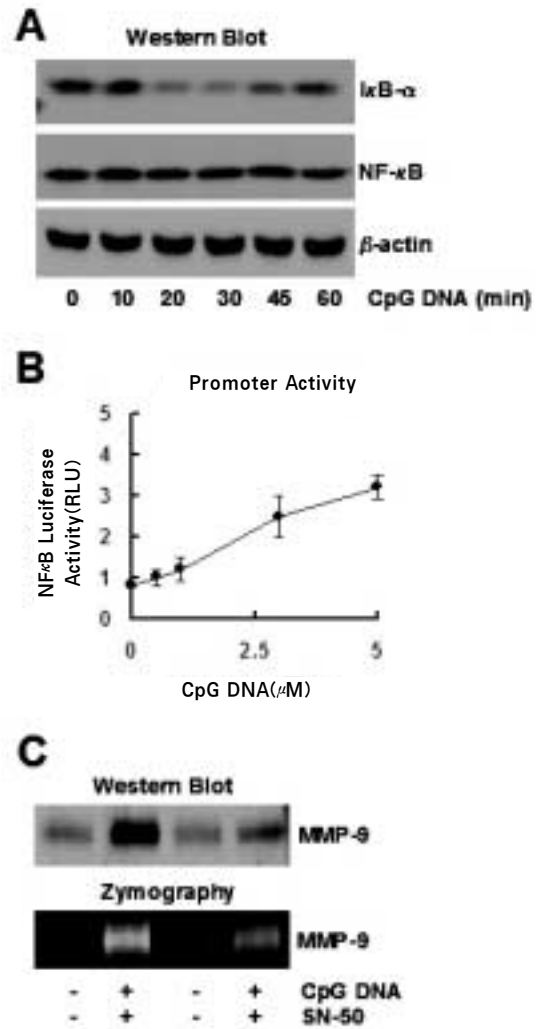


Fig. 5. NFκB is a transcription factor of CpG DNA response. A, Cells were treated with 1 μM CpG DNA for the indicated times (0-60 min). Whole cell lysates were used for the Western blot analysis of IκB-α, NFκB, and β-actin, as indicated. B, Cells were treated with promoter DNA of NFκB combined with Lipofectamine 2000. After 18 hr, cells were treated with CpG DNA at the indicated doses for 6 hr and then assayed luciferase activity using luminometer. C, Cells were pretreated with 10 ug/ml SN-50 for 1 hr and treated with 1 μM CpG DNA for 24 hr. After 24 hr, conditioned media were collected and analyzed for MMP-9 expression and activity using Western blot or Zymography.

펩타이드성 NFκB 저해제인 SN-50 전 처리는 CpG DNA가 유도한 MMP-9 발현 및 활성을 강력하게 억제하였다 (Fig. 5C).

IV. 고찰

박테리아 DNA는 면역증진효과를 가지는데 이러한 효과를 나타내기 위해서는 메틸화되지 않은 CpG DNA를 포함한 특별한 nucleotide sequence (뉴클레오티드 시퀀스)가 필요하다¹³⁾. 그러나 CpG DNA의 과다한 작용은 오히려 숙주에 해로운 염증반응을 비롯한 각종 반응을 초래한다¹⁴⁾. TLR9은 CpG DNA의 수용체로 밝혀졌으며, CpG DNA에 관한 많은 연구는 전사인자의 활성화를 유도하는 adaptor 단백질과 하위의 각종 인산화 효소에 중점을 두었다^{15,16)}. 비록 수많은 단백질들이 직접적 혹은 간접적으로 선천성 면역반응에 참여하지만 CpG DNA 매개로 이루어지는 MMP 발현에 관여하는 인산화 효소들의 특징적인 역할은 아직도 충분히 밝혀지지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 CpG DNA와 결합하는 TLR9 수용체 활성화로 인해 생성되는 MMP-9을 조절하는 새로운 인산화 효소 및 전사인자를 규명하고 서로 간의 상관성을 규명하였다.

CpG DNA에 의한 MMP 발현과 활성 조절은 MMP 종류에 따라서 다른 양상을 나타내었다. 가장 큰 특징은 젤라틴 분해 효소 군으로 잘 알려진 MMP-2와 MMP-9 mRNA 발현에 영향을 미치는 것이다. 반면 다른 종류의 그룹에 속하는 MMP-7, MMP-8 및 MMP-12 발현에는 전혀 영향이 없었다. 또 하나의 특징은 MMP-13 발현을 강하게 조절하는 것이다. 그러나 MMP-13에 관한 구체적인 연구는 더 이상 진행하지 못하였으나 CpG DNA에 의한 MMP 발현 조절은 여러 종류의 MMP를 통하여 조절함으로써 전체적인 세포의 염증반응을 제어할 것으로 생각한다.

CpG DNA에 의한 대식세포 활성화는 여러 종류의 인산화 효소를 통하여 유도되기도 한다¹⁷⁾. 특히, MAPK 활성화는 대식세포를 자극하는 중요 인산화 효소로 알려져 있다¹⁸⁾. 특히 일부 보고에서는 MAPK 활성화 과정은 CpG DNA가 매개하는 세포 내 활성화에서 가장 필수적인 초기 인산화 효소라고 주장하기도 하였다¹⁹⁾. MAPK는 크게 ERK, p38 MAPK 및 JNK 3종류로 분류하고 있으며, 이 중에서 ERK는 MMP를 비롯한 다양한 세포기능을 조절하는 역할을 담당하고 있다²⁰⁾. 다른 한편에서는 p38 MAPK와 JNK 역할의 중요성도 제시되었지만, CpG DNA 작용으로 야기되는 MMP-9 발현에서 ERK 활성화의 역할에 관한 연구내용은 충분하지 못하였다. 그러나 본 연구 결과에서 CpG DNA는 TLR9 수용체와 결합하여 하위의 ERK를 인산화 시킴으로서 MMP-9 발현과 활성을 조절한다는 것을 보여주고 있다. 그러므로 최소한 ERK 활성화가 CpG DNA의 매개로 이루어지는 대식세포 활성화에서 중요한 역할을 담당한다는 것을 입증한 것이다. 또한 TLR9 수용체 자극은 하위에 존재하는 ERK 인산화를 일으켜 지속적인 신호전달 과정을 수행하고, 세포의 기질을 조절하는 MMP-9 생성을 조절할 것으로 추측하고 있다.

CpG DNA 매개로 이루어지는 대식세포 활성화 과정은 세포 내 pH-의존 단계가 필수적이며²¹⁾, endosome 산성화 과정은 TLR9 수용체 결합을 통한 CpG DNA 작용의 개시에서 중심되

는 과정이라고 생각하고 있다²²⁾. 본 연구에서도 CpG DNA-매개로 이루어지는 MMP-9 발현이 엔도솜 산성화 과정이 필수적임을 나타내고 있다. 즉, 엔도솜내에 pH를 증진시키는 chloroquine의 전 처리는 CpG DNA가 야기하는 MMP-9 생성을 강력하게 억제하였다. 더구나 TLR9 수용체 결합 방해는 CpG DNA의 ERK 인산화도 억제하고 따라서 MMP-9 생성도 억제하였다. 이러한 결과는 CpG DNA의 ERK 활성화는 MMP-9 생성에 필수적임을 의미하는 것이다.

만성염증의 지표는 염증반응을 담당하는 세포의 축적과 세포의 바탕질의 분해를 담당하는 효소의 증진이다²³⁾. 대식세포는 염증반응을 조절하는 대표적인 종류이고 활성화된 대식세포는 사이토카인과 같은 세포독성을 나타내는 물질을 방출하여 조직손상을 초래하거나 관절염이나 패혈증과 관련한 다양한 질환을 초래하기도 한다. 이와 같은 방식으로 조직이 손상될 때는 세포의 바탕질의 분해가 촉진되는데 가장 큰 공헌을 하는 것은 MMP이다²⁴⁾. 특히 MMP-2와 MMP-9은 대표적인 laminin과 type IV 콜라겐 분해효소로서 MMP-2가 항상 발현하고 있으면서 작용하는 반면, MMP-9은 TNF- α , IL 및 내독소 같은 염증성 매개체 자극으로 발현이 증가하는 MMP-이며 특정 전사인자에 의해서 조절된다²⁵⁾. 특히 대식세포에서 활성화된 MMP-9 발현은 plaque 손상 같은 급성 염증반응을 야기하고 사람 유전자 연구는 염증반응과 관련한 대식세포의 기능을 수행하는데 있어서 MMP-9이 가장 강력한 후보자라고 제시하였다¹¹⁾. 그러므로 본 연구에서 CpG DNA에 의한 대식세포의 MMP-9 발현 증가는 CpG DNA가 염증반응을 촉진시키는데 있어서 MMP-9이 아주 중요한 역할을 한다는 것을 시사하고 있다. 결과를 종합하였을 때, CpG DNA 자극은 대식세포에서 발현하고 있는 TLR9과 결합하고 하위의 ERK 인산화를 조장하며, 활성화된 ERK 인산화는 NF κ B 전사인자를 활용하여 MMP-9 발현을 촉진하여 대식세포의 염증반응을 조장할 것으로 생각한다.

V. 결론

CpG DNA는 면역세포의 기능에서 중요한 역할을 담당한다. 이 논문은 CpG DNA의 toll-like receptor (TLR) 9 수용체의 조절을 통하여 matrix metalloproteinase-9 발현을 조절하는 것을 연구한 결과이다. CpG DNA는 MMP-2와 MMP-9을 비롯하여 MMP-13 mRNA 발현을 증가시켰으나, MMP-7, MMP-8과 MMP-12 mRNA에는 영향이 없었다. 특히 MMP-9 mRNA 변화를 real-time RT-PCR로 정량하였을 때 시간-의존적으로 증가하였다. 엔도솜이 산성화되는 것을 막는 저해제인 chloroquine은 CpG DNA가 유도한 MMP-9 발현과 활성을 강하게 억제하였다. CpG DNA는 ERK 인산화를 야기하고, ERK 인산화 저해제인 U0126 전 처리는 CpG DNA에 의한 MMP-9 발현과 활성을 억제하였다. CpG DNA는 전사인자 NF κ B 활성화의 지표인 I κ B- α 분해를 촉진하고 NF κ B 프로모터 활성을 증진시키고 증진된 NF κ B 활성화는 CpG DNA가 야기하는 MMP-9 발현을 조절하였다. 이와 같은 결과로부터 CpG DNA는 TLR9과 결합하고 하위의 신

호전달분자인 ERK 인산화를 야기하여 전사인자 NF- κ B를 통하여 MMP-9 발현과 활성을 조절하는 것으로 생각된다.

참고문헌

- Iwasaki A, Medzhitov R: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987-995.
- Medvedev AE, Sabroe I, Hasday JD, Vogel SN: Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. *J Endotoxin Res* 2006;12:133-150.
- Lim EJ, Lee SH, Lee JG, Chin BR, Bae YS, Kim JR, et al: Activation of toll-like receptor-9 induces matrix metalloproteinase-9 expression through Akt and tumor necrosis factor-alpha signaling. *FEBS Lett* 2006;580:4533-4538.
- McCoy SL, Kurtz SE, Hausman FA, Trune DR, Bennett RM, Hefeneider SH: Activation of RAW264.7 macrophages by bacterial DNA and lipopolysaccharide increases cell surface DNA binding and internalization. *J Biol Chem* 2004;279:17217-17223.
- Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R: Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 2006;7:49-56.
- O' Keffe M, Grumont RJ, Hochrein H, Fuchsberger M, Gugasyan R, Vreemec D, et al: Distinct roles for the NF- κ B1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. *Blood* 2005;106:3457-3464.
- Marschner A, Rothenfusser S, Hornung V, Prell D, Krug A, Kerkmann M, et al: CpG ODN enhance antigen-specific NKT cell activation via plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2005;35:2347-2357.
- Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, et al: Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:15416-15421.
- Takeshita F, Gursel I, Ishii KJ, Suzuki K, Gursel M, Klinman DM: Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin Immunol* 2004;16:17-22.
- Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F: Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev* 2007;87:69-98.
- Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW: Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2006;116:59-69.
- Ilvesaro JM, Merrell MA, Swain TM, Davidson J, Zayzafoon M, Harris KW, et al: Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro. *Prostate* 2007;67:774-781.
- Wilson HL, Dar A, Napper SK, Marianela Lopez A, Babiuk LA, Mutwiri GK: Immune mechanisms and therapeutic potential of CpG oligodeoxynucleotides. *Int Rev Immunol* 2006;25:183-213.
- Yi AK, Yoon H, Park JE, Kim BS, Kim HJ, Martinez-Hernandez A: CpG DNA-mediated induction of acute liver injury in D-galactosamine-sensitized mice: the mitochondrial apoptotic pathway-dependent death of hepatocytes. *J Biol Chem* 2006;281:15001-15012.
- Yi AK, Krieg AM: CpG DNA rescue from anti-IgM-induced WEHI-231 B lymphoma apoptosis via modulation of I kappa B alpha and I kappa B beta and sustained activation of nuclear factor-kappa B/c-Rel. *J Immunol* 1998;160:1240-1245.
- Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H: Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* 2000;192:595-600.
- Anderson KV: Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000;12:13-19.
- Demirjian L, Abboud RT, Li H, Duronio V: Acute effect of cigarette smoke on TNF-alpha release by macrophages mediated through the erk1/2 pathway. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:592-597.
- Krieg AM: CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-760.
- Zhu TN, He HJ, Kole S, D' Souza T, Agarwal R, Morin PJ, et al: Filamin a-mediated downregulation of the exchange factor Ras-GRF1 correlates with decreased matrix metalloproteinase-9 expression in human melanoma cells. *J Biol Chem* 2007;282:14816-14826.
- Rutz M, Metzger J, Gellert T, Luppa P, Lipford GB, Wagner H, et al: Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 2004;34:2541-2550.
- Jozsef L, Khreiss T, El Kebir D, Filep JG: Activation of TLR-9 induces IL-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. *J Immunol* 2006;176:1195-1202.
- Reif S, Somech R, Brazovski E, Reich R, Belson A, Konikoff FM, et al: Matrix metalloproteinases 2 and 9 are markers of inflammation but not of the degree of fibrosis in chronic hepatitis C. *Digestion* 2005;71:124-130.
- Nenan S, Boichot E, Lagente V, Bertrand CP: Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator?. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;1:167-172.
- Sanceau J, Boyd DD, Seiki M, Bauvois B: Interferons inhibit tumor necrosis factor-alpha-mediated matrix metalloproteinase-9 activation via interferon regulatory factor-1 binding competition with NF-kappa B. *J Biol Chem* 2002;277:35766-35775.