

***Mycobacterium tuberculosis*-induced Expression of Interleukin-1 Beta is Mediated Via Protein Kinase C Signaling Pathway**

**Jang-Eun Cho, Kyunghong Lee, SinJee Son, Sangjung Park,
Hyeyoung Lee and Yoon Suk Kim[†]**

*Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences,
Yonsei University, Wonju 220-710, Korea*

Interleukin-1 β (IL-1 β) is one of the key proinflammatory cytokines and it plays an important role for the anti-mycobacterial host defense mechanisms. In this study, we examined *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-stimulated induction of IL-1 β and evaluated the associated signal transduction pathways. In PMA-differentiated THP-1 cells, MTB infection increased mRNA expression of IL-1 β in a dose-dependent manner. The expression of IL-1 β mRNA began to be induced at 1.5 h after infection, and induced expression of IL-1 β was retained for 48 h after MTB infection. The increase in expression of IL-1 β caused by MTB was reduced in cells treated with Ro-31-8425 (an inhibitor of PKC α , β I, β II, γ , and ϵ) or PD98059 (an inhibitor of MEK1), meanwhile, pre-treatment with Gö6976 (an inhibitor of Ca²⁺-dependent PKC α and PKC β I) or Rottlerin (an inhibitor of PKC δ) has no effect on MTB-induced expression of IL-1 β mRNA. These results show that the expression of IL-1 β mRNA caused by MTB may be mediated via MEK1 and PKC isoforms including PKC β II, PKC γ , or PKC ϵ . Further studies are required to determine whether other PKC isoforms (PKC η , θ , ξ , and λ), except PKC δ , PKC α , and PKC β I, are also involved in IL-1 β mRNA expression after mycobacterial infection.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, Interleukin-1 β , Protein Kinase C

현재 전 세계 인구의 3분의 1에 해당하는 약 20억 명이 결핵균에 잠복감염상태이다. 또한 매년 800~1,000만 명이 새로운 결핵환자로 진단되고 있으며, 해마다 약 300만 명 가량은 결핵에 의해 사망하고 있다 (World Health Organization, 2007). 최근 항결핵약제 내성을 획득한 약제내성 결핵균 (Drug resistant MTB) 감염 증가로 결핵치료에 심각한 문제가 야기되고 있는 실정이다 (Matteelli et al., 2007).

대식세포 내로 결핵균이 감염되면 대식세포는 방어 기전으로 여러 종류의 사이토카인을 발현 및 분비한다 (Majumder et al., 2008). 이렇게 발현된 사이토카인에 의해 대식세포는 자가활성되어 reactive nitrogen intermediate (RNI), nitric oxide (NO), O₂⁻ 등을 분비, 세포 내에 기생하

는 병원균을 제거한다 (Chan et al., 1992; Macnicking et al., 1997). 또한 분비된 사이토카인은 다른 면역세포의 활성화 및 이동 등에 관여하여 각종 세포매개성 면역반응에 영향을 미친다 (Cooper and Khader, 2008) 결핵균 감염 단핵구 및 대식세포에서 발현되는 proinflammatory 사이토카인으로는 Interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor (TNF), IL-12, IL-18, interferon- γ (IFN- γ) 등이 보고되어 있다.

이중에 IL-1 β 는 결핵을 비롯한 염증질환 및 감염질환에 대한 숙주반응에 중요하다고 알려진 사이토카인으로 (Dinarello, 2005) 활동성 폐결핵환자의 대식세포에서 IL-1 β mRNA가 증가됨이 보고된 바 있다 (Tsao et al., 1999). 또한 대식세포에 결핵균 감염 시, TLR (Toll-like receptors) 과 NLR (NOD-like receptors)을 통해 결핵균이 인지되고, 세포 내 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 등을 포함한 신호전달과정을 통해 IL-1 β 의 전사가 감작됨이 보고된 바 있다 (Kleinnijenhuis et al., 2009).

Protein Kinase C (PKC) family는 serine-threonine kinases로 mitogen과 같은 다양한 자극에 의해 활성화되고 세

*접수일: 2010년 6월 13일 / 수정일: 2010년 6월 18일
채택일: 2010년 6월 21일

[†]Corresponding author: Yoon Suk Kim, Department of Biomedical Laboratory Science College of Health Sciences, Yonsei University Wonju 220-710, Korea.

Tel: +82-33-760-2860, Fax: +82-33-760-2195
e-mail: yoonsukkim@yonsei.ac.kr

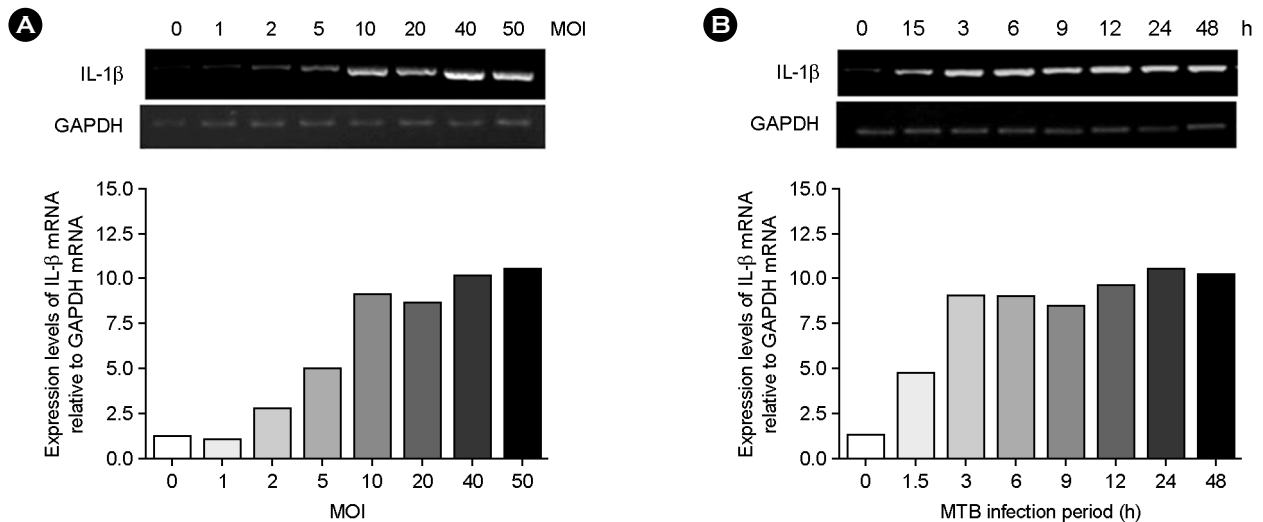


Fig. 1. Infection with MTB enhances expression of IL-1 β in a dose-dependent manner and induces IL-1 β expression at the early stage of infection. **A:** THP-1 cells were treated with 100 nM PMA for 48 h, and infected with the indicated concentrations (0, 1, 2, 5, 10, 20, 40 or 50 MOI) of MTB for 6 h. **B:** Differentiated THP-1 cells were incubated in the presence of MTB for the indicated times (0, 1.5, 3, 6, 9, 12, 24 or 48 h). Total RNA was extracted and cDNA was prepared. PCR analysis was performed using IL-1 β -specific primers. The PCR products were resolved by 1.5% agarose gel (upper panel) to detect IL-1 β . GAPDH was used as an internal control. Densitometric analysis was performed (lower panel). Data are presented as the expression levels of IL-1 β mRNA relative to GAPDH mRNA (The expression level of IL-1 β relative to GAPDH in the absence of mycobacterial infection was set to 1.0).

포증식 (proliferation), 분화 (differentiation) 및 세포 사멸 (apoptosis) 같은 다양한 세포반응에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Battaini, 2001; Nishizuka, 2001). PKC는 domain의 구조에 따라서 classical PKCs (α , β 1, β 2, γ), novel PKCs (δ , ϵ , η , θ), atypical PKCs (ξ , λ)의 3개의 subfamily로 나뉜다. Classical PKCs가 활성화되기 위해서는 칼슘 (Ca^{2+})과 인지질 (phospholipid)이 필요하고, novel PKCs는 인지질에 의해서 활성화되며, atypical PKCs는 칼슘과 인지질에 상관없이 독립적으로 활성화된다고 알려져 있다 (Brodie and Blumberg, 2003). 최근 결핵균 감염 시 대식세포에서 여러 PKC isoform들이 활성화된다는 사실이 보고되고 있다 (Chaurasiya and Srivastava, 2008).

본 연구에서는 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; sigma)로 분화시켜 대식세포화한 THP-1 세포에 결핵균 감염 시 proinflammatory 사이토카인 중 하나인 IL-1 β 의 발현양상을 결핵균 감염 후 시간 별로 확인하였으며, 이미 보고된 ERK, p38이외의 신호전달물질이 결핵균 감염에 의한 IL-1 β 발현에 관여하는지, PKC를 주표적으로 하여 연구하였다.

먼저 THP-1 세포를 PMA로 48시간 분화시키고, 결핵균으로 4~6시간 감염 후 RPMI 1640배지 (Hyclone, USA)로 3번 세척하여 감염되지 않은 결핵균을 제거하였다. Trizol (Invitrogen, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하

였고, cDNA 제조를 위해 2 μ g RNA, random hexamer (Invitrogen), 200 unit의 Murine Molony Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT; Invitrogen)을 사용하여 37 $^{\circ}$ C에서 50분, 70 $^{\circ}$ C에서 15분 반응시켰다. 그 이후에 제조한 cDNA를 주형 (template)으로 하여 0.2 units의 *Taq* polymerase (Cosmogentech, Korea)와 IL-1 β 특이적 primer (sense 5'-AGCCATGGCAGAAGTACCT-3', antisense 5'-CAGCTCTCTTTAGGAAGACA-3'), 또는 GAPDH 특이적 primer (sense 5'-CGGGAAGCTTGTGATCAATGG-3', antisense 5'-GGCAGTGATGGCATGGACTG-3')를 internal control로 사용하여 PCR (94 $^{\circ}$ C for 30s, 55 $^{\circ}$ C for 30s, 72 $^{\circ}$ C for 30s, 22~25 cycles)을 실시하여 IL-1 β mRNA의 발현을 확인하였다. IL-1 β 의 mRNA 발현은 결핵균 감염에 의해 농도의존적으로 증가됨을 확인하였다. 결핵균을 10 MOI (Multiplicity of Infection)로 감염시켰을 때 IL-1 β mRNA의 발현이 미감염 시 보다 9배 정도 증가하였고 20, 40, 50 MOI로 감염 시에도 IL-1 β mRNA 발현 정도가 유지됨을 확인하였다 (Fig. 1A). 또한 결핵균을 여러 시간 별로 (0, 1.5, 3, 6, 9, 12, 24, 48 h) 감염시킨 후, IL-1 β mRNA 발현을 semi-quantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR)로 확인한 결과 IL-1 β 의 발현은 감염초기 (감염 후 1.5시간)부터 증가되었고 이러한 증가가 감염 후 48시간까지 지속됨을 관찰하였다 (Fig. 1B).

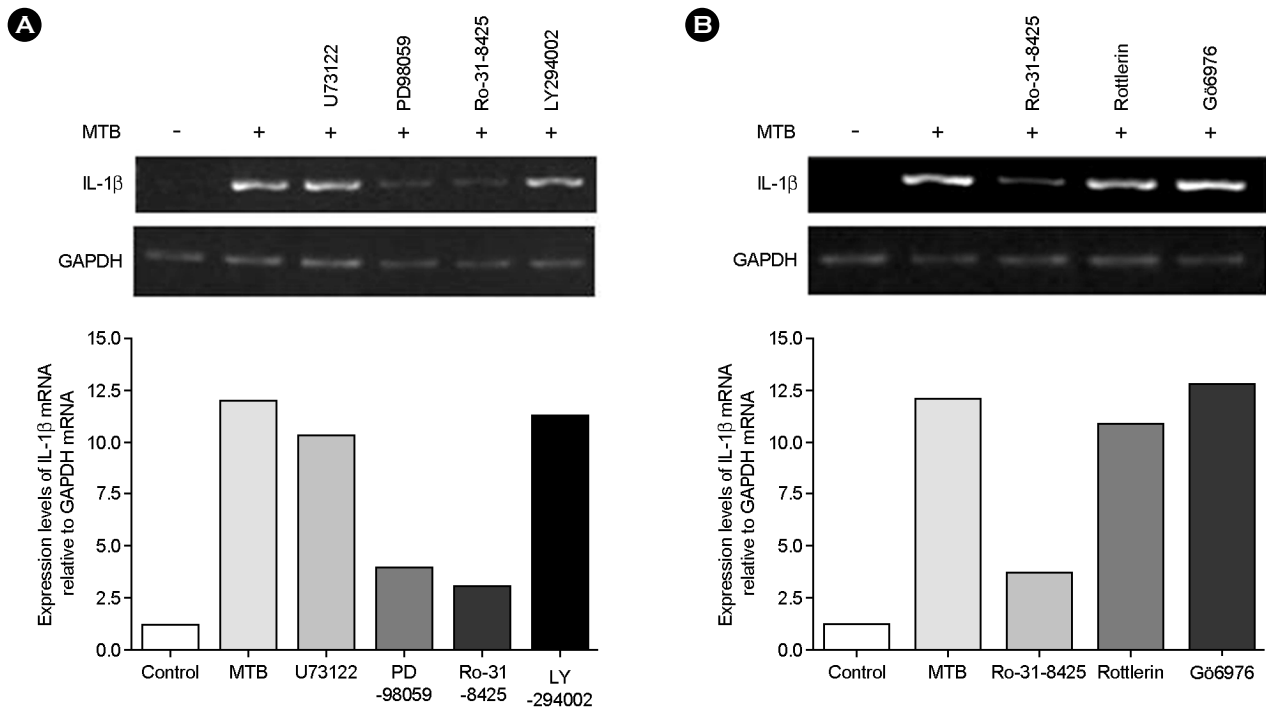


Fig. 2. MTB-induced expression of IL-1 β is mediated via PKC signaling pathway. **A:** PMA-treated THP-1 cells were pre-incubated with the inhibitors U73122 (50 ng/ml), PD98059 (50 μ M), Ro-31-8425 (50 nM) or Ly294002 (10 μ M) for 45 min, followed by mycobacterial infection (10 MOI) for 4 h. **B:** Differentiated THP-1 cells were pre-treated with PKC specific inhibitors (50 nM Ro-31-8425, 40 μ M Rottlerin or 1 μ M Gö6976) for 45 min, followed by mycobacterial infection (10 MOI) for 4 h. cDNA was prepared from total RNA extracted from treated cells. PCR analysis was performed using IL-1 β -specific primers. PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel (upper panel) to detect IL-1 β expression. GAPDH was used as an internal control. Densitometric analysis was performed (lower panel). Data are presented as the expression levels of IL-1 β mRNA relative to GAPDH mRNA (The level of IL-1 β relative to GAPDH in the absence of mycobacterial infection was set to 1.0).

다음으로는 결핵균 감염에 의한 IL-1 β 발현에 관여하는 신호전달과정을 각종 신호전달물질에 대한 특이억제제를 이용하여 조사하였다. PMA로 분화시킨 THP-1 세포에 각종 신호전달물질에 대한 특이억제제로 결핵균 감염 45분 전에 처리한 후 결핵균을 10 MOI로 4시간 동안 감염시켰다. 이 후 RNA 추출, cDNA 제조, PCR를 통해 IL-1 β 발현을 확인하였다. Fig. 2A에서 관찰되듯이, U73122 (PLC 특이억제제; Cayman, USA) 또는 Ly294002 (PI3-kinase 특이억제제; Calbiochem, USA) 처리는 결핵균 감염에 의한 IL-1 β 의 mRNA의 발현에 아무런 영향을 미치지 않았다. 반면 PD98059 (MEK1 특이억제제; Calbiochem)와 Ro-31-8425 (PKC α , PKC β I, PKC β II, PKC γ , PKC ϵ 특이억제제; Calbiochem)를 처리하였을 때는 결핵균 감염에 의한 IL-1 β mRNA 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다. 따라서 결핵균 감염이 IL-1 β 의 mRNA 발현을 감작할 때, 이전보고와 같이 ERK 신호전달과정이 관여함을 확인할 수 있었고, 새로이 PKC관련 신호전달경로를 통해서도 IL-1 β mRNA 발현이 유도됨을 확인할 수 있었다. 추가적으로

다른 PKC isoform의 억제제인 Rottlerin (PKC δ 특이 억제제; Calbiochem)과 Gö6976 (Ca²⁺-dependent isoenzymes PKC α , PKC β I 특이억제제; Tocris Bioscience, USA) 처리한 결과, 이는 결핵균 감염에 의한 IL-1 β mRNA 발현유도에 거의 영향을 주지 않음을 확인하였다 (Fig 2B). 종합하면, 결핵균 감염이 IL-1 β 의 mRNA 발현을 유도할 때 PKC isoform들 중 1) PKC α , PKC β I, PKC δ 등은 관여하지 않으며, 2) PKC β II, PKC γ , PKC ϵ 중에 일부, 또는 전부가 관여하는 것으로 해석할 수 있다. 또한 현재의 결과로는 그 밖의 PKC isoform (η , θ , ξ , λ)들의 관여여부는 확인할 수 없다.

따라서 결핵균 감염 시 유도되는 IL-1 β 의 발현에 관여하는 PKC 신호전달과정을 보다 세밀하게 규명하고 더 나아가 PKC 상·하위 신호전달기전에 대한 연구가 추가적으로 필요하리라 사료된다. 이와 같이 결핵균에 의한 싸이토카인 발현에 관련된 신호전달에 대한 연구는 결핵의 병인기전 및 그에 대한 대식세포의 방어기전을 이해하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

REFERENCES

- Battaini F. Protein kinase C isoforms as therapeutic targets in nervous system disease states. *Pharmacol Res.* 2001. 44: 353-361.
- Brodie C, Blumberg PM. Regulation of cell apoptosis by protein kinase C delta. *Apoptosis* 2003. 8: 19-27.
- Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med.* 1992. 175: 1111-1122.
- Chaurasiya SK, Srivastava KK. Differential regulation of protein kinase C isoforms of macrophages by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Mol Cell Biochem.* 2008. 318: 167-174.
- Cooper AM, Khader SA. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunol Rev.* 2008. 226: 191-204.
- Dinarello CA. Interleukin-1 beta. *Crit Care Med.* 2005. 33: S460-S462.
- Kleinnijenhuis J, Joosten LA, van de Veerdonk FL, Savage N, van Crevel R, Kullberg BJ, van der Ven A, Ottenhoff TH, Dinarello CA, van der Meer JW, Netea MG. Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1beta production by *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol.* 2009. 39: 1914-1922.
- Macnicking JD, North RJ, Lacourse R, Mudgett JS, Shah KS, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997. 94: 5243-5248.
- Matteelli A, Migliori GB, Cirillo D, Centis R, Girard E, Raviglione M. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007. 5: 857-871.
- Majumder N, Bhattacharjee S, Bhattacharyya (Majumdar) S, Dey R, Guha P, Pal NK, Majumdar S. Restoration of impaired free radical generation and proinflammatory cytokines by MCP-1 in mycobacterial pathogenesis. *Scand J Immunol.* 2008. 67: 329-339.
- Nishizuka Y. The protein kinase C family and lipid mediators for transmembrane signaling and cell regulation. *Alcohol. Clin Exp Res.* 2001. 25: 3S-7S.
- Tsao TC, Hong J, Huang C, Yang P, Liao SK, Chang KS. Increased TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 levels in the bronchoalveolar lavage fluid with upregulation of their mRNA in macrophages lavaged from patients from active pulmonary tuberculosis. *Tuber Lung Dis.* 1999. 79: 279-285.
- World Health Organization. WHO report 2007: Global tuberculosis control; surveillance, planning, financing. Geneva: WHO 2007, 277.