

# Toll-Like Receptor 2 매개 Dual-Specificity Phosphatase 4 발현에서 Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2와 활성산소의 역할

김소연, 백석환

영남대학교 의과대학 생화학·분자생물학교실

## Role of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Reactive Oxygen Species in Toll-Like Receptor 2-Mediated Dual-Specificity Phosphatase 4 Expression

So-Yeon Kim, Suk-Hwan Baek

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

**Background:** Toll-like receptors (TLRs) are well-known pattern recognition receptors. Among the 13 TLRs, TLR2 is the most known receptor for immune response. It activates mitogen-activated protein kinases (MAPKs), which are counterbalanced by MAPK phosphatases [MKPs or dual-specificity phosphatases (DUSPs)]. However, the regulatory mechanism of DUSPs is still unclear. In this study, the effect of a TLR2 ligand (TLR2L, Pam3CSK4) on DUSP4 expression in Raw264.7 cells was demonstrated.

**Methods:** A Raw264.7 mouse macrophage cell line was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 g/mL streptomycin) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. TLR2L (Pam3CSK4)-mediated DUSP4 expressions were confirmed with RT-PCR and western blot analysis. In addition, the detection of reactive oxygen species (ROS) was measured with lucigenin assay.

**Results:** Pam3CSK4 induced the expression of DUSP1, 2, 4, 5 and 16. The DUSP4 expression was also increased by TLR4 and 9 agonists (lipopolysaccharide and CpG ODN, respectively). Pam3CSK4 also induced ERK1/2 phosphorylation and ROS production, and the Pam3CSK4-induced DUSP4 expression was decreased by ERK1/2 (U0126) and ROS (DPI) inhibitors. U0126 suppressed the ROS production by Pam3CSK4.

**Conclusion:** Pam3CSK4-mediated DUSP4 expression is regulated by ERK1/2 and ROS. This finding suggests the physiological importance of DUSP4 in TLR2-mediated immune response.

**Key Words:** Toll-like receptor, Dual-specificity phosphatase, ERK1/2, Reactive oxygen species

## 서론

선천성 면역을 담당하는 세포는 pattern-recognition receptor (PRR)로 알려진 수용체를 이용하여 침범한 병원체를 감지하고 분류한다. 병원균 생성 산물과 결합하는 PRR 중에서 가장

Received: January 2, 2013, Revised: February 4, 2013,  
Accepted: March 8, 2013

Corresponding Author: Suk-Hwan Baek, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Aging-Associated Vascular Disease Research Center, 210 Main Building, College of Medicine, Yeungnam University, 170 Hyeonchung-ro, Nam-gu, Daegu 705-703, Korea  
Tel: 82-53-620-4523; Fax: 82-53-623-8032  
E-mail: sbaek@med.yu.ac.kr

잘 알려진 것은 toll-like receptor (TLR)이며, 현재 13종류가 알려져 있다.<sup>1</sup> TLR은 잘 보존된 공통적인 분자구조를 가지고 있으며, TLR 발현은 수지상 세포와 단핵구 또는 대식세포에서 가장 잘 발달되어 있고, 상피세포에서도 발현하고 있다.<sup>2,3</sup> TLR 작용은 리간드에 의해서 개시되는데 TLR의 종류에 따라 그 종류가 다르다.<sup>4</sup> TLR 작용은 면역반응 뿐만 아니라, 박테리아 감염과 패혈증 유도에도 깊이 관여하고 있다.<sup>5</sup>

13종류의 TLR 중에서 TLR2는 면역반응과 더불어 급성 염증반응에서 중요한 역할을 담당하고 있다.<sup>6</sup> TLR2 리간드로는 다양한 종류가 밝혀졌는데, 지단백질(lipoprotein), heat-killed *Listeria Monocytogenes* (HKLM) 및 합성 펩타이드 Pam3CSK4 등이다. TLR2 작용은 다른 종류의 TLR과 heter-

odimer를 형성하여 개시하는데, 박테리아에서 만들어진 지 단백질은 TLR6와 협력하고, mycobacteria에서 만들어진 지 단백질은 TLR1과 협력한다.<sup>7</sup> TLR2 신호전달 과정에서 중요한 단백질은 TLR 어댑터인 myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)과 MyD88 adaptor-like (Mal)이다. 두 단백질은 리간드에 의해 개시된 TLR2 신호를 세포 내부로 전달해 주는 핵심 역할을 담당하고 있다. TLR2 신호가 MyD88과 Mal 단백질에 전달되면 신호는 다시 IL-1R associated kinase (IRAK)와 tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)를 통하여 전사인자인 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)로 전달되어 염증면역 반응을 조절하는 다양한 유전자 발현을 증가시킨다.<sup>8</sup> 그러나 TLR2의 작용 기전이 활발하게 연구 되었음에도 불구하고, 아직도 TLR2가 활성화 되었을 때 조절되는 유전자의 종류는 완벽하게 밝혀지지 않고 있다.

Dual-specificity phosphatase (DUSP)는 세포 내 각종 기질의 serine/threonine 또는 tyrosine 잔기의 탈인산화를 일으키는 단백질 군이다. DUSP는 현재 25종이 알려져 있으며, 모든 DUSP는 활성 부위를 구성하는 세 아미노산, 즉 aspartic acid, cysteine 및 arginin과 함께 phosphatase domain을 함유하고 있다. DUSP 일부는 kinase-interacting motif로 알려진 domain을 함유하여 MAPK의 common domain (CD)와 작용하기도 한다.<sup>9</sup> 면역세포의 기능에서 DUSP의 역할은 조건에 따라서 약간 상반된 보고를 하고 있다. 예를 들면, DUSP1은 염증성 cytokine 생성에서 negative regulator로 작용하는 반면,<sup>10</sup> DUSP2는 관절염 모델을 이용한 자가면역 반응에서 positive regulator로 작용하고 있다.<sup>11</sup> 염증성 cytokine 생성을 조절하는 DUSP10의 역할은 innate immune cell에서는 negative regulator로 작용하지만,<sup>12</sup> CD4 T-cell에서는 positive regulator로 작용한다.<sup>13</sup> DUSP 결핍 세포에서 변화된 cytokine 생성은 증가한 MAPK 활성화와 관련이 있으며, 전사인자인 activator protein 1 (AP-1), Ets-like protein 1 (Elk1)과 밀접하다는 것이 보고되었다.<sup>14</sup> DUSP를 조절하는 다른 전사인자는 p53도 알려졌다.<sup>15</sup> 현재 DUSP 발현을 유도하는 인자는 epidermal growth factor (EGF)와 lipopolysaccharide (LPS)로 일부만이 알려져 있다.<sup>16-18</sup>

DUSP와 TLR간의 상관성에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았고 특히 TLR2와 관련한 DUSP 연구는 전혀 보고되지 않았다. 그러므로 TLR2를 매개로 특정 DUSP 발현을 조절하는 인자를 찾는 것과 면역 반응을 연결하는 연구는 매우 중요한 의미를 가질 것으로 생각한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

대식세포인 Raw264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)사에서 구입하였으며, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)을 포함하는 세포 배양에 관한 시약들은 Life Technologies (Grand Island, NY, USA) 사로부터 구입하였다. Fetal Bovine Serum (FBS)는 Thermo Scientific HyClone (Logan, UT, USA)사로부터, Escherichia coli LPS (0111:B4)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하였다. Phosphorothioated unmethylated endotoxin-free CpG ODN (B-class, TCCATGACGTTCTG-ATGCT)는 Genotech (Daejeon, South Korea)에서 합성하였으며, Pam3CSK4는 InvivoGen (San Diego, CA, USA)사로부터 구입하였다. DUSP4 항체는 Santa-Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사로부터, p-ERK1/2, ERK1/2 항체는 Cell signaling Technology (Beverly, MA, USA)사로부터 구입하였다. U0126, SB203580, SP600125, 그리고 ROS 저해제는 Merck/Calbiochem (Darmstadt, Germany)사에서 구입하였다.

### 2. Total RNA 분리와 RT-PCR

Pam3CSK4 또는 저해제와 함께 처리한 세포를 수확하고 2% bovine serum albumin (BSA)이 포함된 완충액으로 세척하고 RNA 추출 용액 (4 M guanidium thiocyanate, 0.5% sarcosyl, 25 mM sodium citrate, 0.1 M 2-mercaptoethanol)으로 세포를 용해하였다. 용해된 세포에 sodium acetate, water-saturated phenol 및 chloroform을 순서대로 첨가하고 잘 섞은 다음, 4°C에서 10분간 방치하였다. 원심 분리하여 상층액을 취하고 에탄올 침전으로 RNA를 얻었다. 분리한 total RNA를 RT-PCR kit를 이용하여 cDNA를 얻었다. cDNA를 94°C에서 1분 동안 변성시키고, 각 유전자에 대한 2개의 primer를 혼합하여 60°C에서 25 cycle을 반복하였다. PCR 산물을 SYBR Green이 포함된 1.5% agarose gel 전기영동으로 분리, 확인하였다.

### 3. SDS-polyacrylamide gel 전기영동과 Western Blot

세포를 배양접시에 동일한 수로 나누고 Pam3CSK4 또는 저해제와 함께 처리한 후, 세포를 냉각된 PBS으로 세척하고

1,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포를 수확하였다. 수확한 세포는 각종 단백질 분해효소 저해제가 함유된 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40)을 첨가하여 섞고 얼음에 30분간 방치한 다음, 10,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 세포질 분획을 확보하였다. 세포질 분획의 단백질은 Bradford 시약을 사용하여 정량하였다. 단백질 50  $\mu$ g을 8% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리하였다. 전기영동하여 분리한 단백질을 20% 메탄올, 25 mM Tris 및 192 mM glycine 완충액 하에서 니트로 셀룰로스 막으로 이동시켰다. 니트로 셀룰로스 막은 Ponceau S 용액으로 이동의 유무를 확인한 후 5% blocking 용액(non-fat milk)을 사용하여 30분간 실온에서 반응하였다. 1,000배 희석한 각종 항체와 단백질이 이동된 니트로 셀룰로스 막을 4시간 이상 반응시켰다. 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 반응시키고 단백질의 발현을 LAS 3000 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)으로 확인하였다.

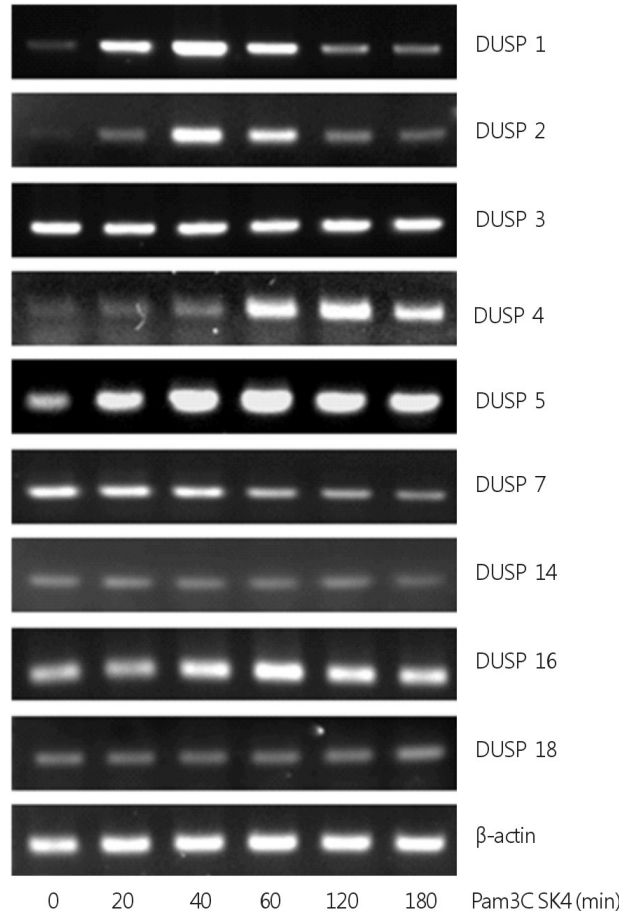
#### 4. Lucigenin assay

세포를 96-well plate에서 배양하고 저해제를 1시간 전 처리한 후, PBS에 현탁한 다음 100  $\mu$ M 농도의 lucigenin과 200  $\mu$ M 농도의 NADPH를 섞어 CO<sub>2</sub> 배양기에서 반응시켰다. 세포에 Pam3CSK4를 처리하고 lucigenin 산화에 의해 발생하는 빛을 luminometer로 10분 간격으로 200분 동안 측정하였다.

### 결 과

#### 1. TLR2 리간드 Pam3CSK4에 의한 각종 DUSP mRNA 발현 변화

Pam3CSK4는 TLR2 리간드로 잘 알려져 있다. 대식세포인 Raw264.7에 Pam3CSK4 100 ng/mL을 20분부터 3시간까지 시간 변화를 주어 처리하였다. Pam3CSK4는 DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP5 및 DUSP16의 유전자 발현을 증가시켰다. DUSP1, 2 및 5의 유전자 유도는 20분부터 나타났으며, DUSP4와 16은 40분부터 나타났다. 그러나 DUSP3, 14 및 18 유전자 발현에서는 영향이 없었으며 DUSP7은 오히려 감소하였다 (Fig. 1). Pam3CSK4에 유도되는 DUSP 중에서 단백질 발현

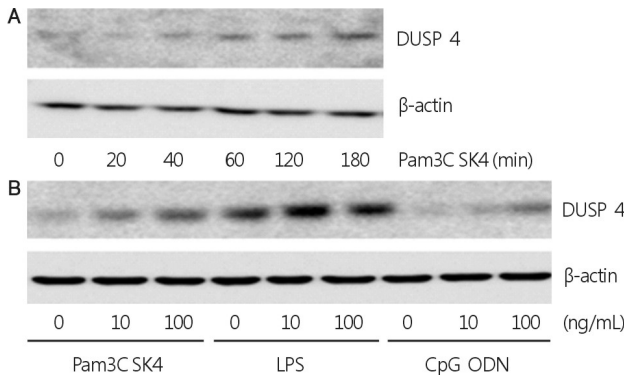


**Fig. 1.** Expression pattern of various DUSPs mRNA by Pam3CSK4. Raw264.7 cells were treated with Pam3CSK4 (100 ng/mL) for the times indicated. Various DUSP mRNAs were determined by RT-PCR and normalized to a  $\beta$ -actin control.

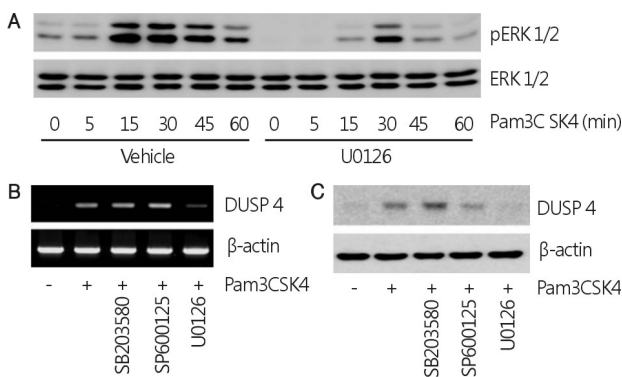
양상을 조사하기 위하여 상품으로 판매하고 있는 항체를 구입하여 western blot으로 예비실험을 수행하였으나, DUSP4의 단백질 발현만 확인 할 수 있었다. 따라서 향후 연구에서는 DUSP4에 초점을 맞추었다.

#### 2. TLR 리간드에 의한 DUSP4 단백질 발현 변화

Pam3CSK4를 대식세포에 시간 별로 처리한 후 cell lysates를 얻어 DUSP4 항체를 사용하여 단백질 발현을 확인하였다. DUSP4 단백질 발현은 비교적 빠르게 나타났으며, Pam3CSK4를 처리한 90분부터 안정적으로 증가하였다(Fig. 2A). 다른 TLR 리간드의 효과를 검토하기 위하여 TLR4 리간드 LPS와 TLR9 리간드 CpG ODN의 효과를 비교하였다. Pam3CSK4에 의한 DUSP4 단백질 발현은 농도 의존적으로 증가하였으나, LPS를 처리하였을 때 보다 낮고 CpG ODN을 처리하였



**Fig. 2.** Induction of DUSP4 protein by various TLR ligands. (A) Raw264.7 cells were treated with Pam3CSK4 (100 ng/mL) for the times indicated. DUSP4 protein expression was determined by western blotting using DUSP4 antibody. (B) Raw264.7 cells were treated with Pam3CSK4, LPS, or CpG ODN for 3 h. DUSP4 protein expression was determined by western blotting using DUSP4 antibody.

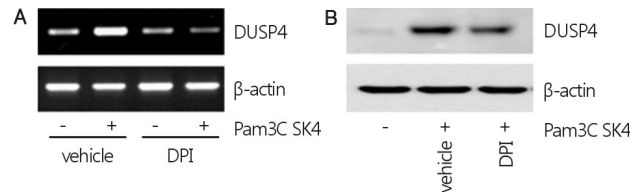


**Fig. 3.** Role of ERK1/2 in Pam3CSK4-induced DUSP4 expression. (A) Raw264.7 cells were pretreated with U0126 (1  $\mu$ M) and stimulated with vehicle or Pam3CSK4 (100 ng/mL) for the times indicated. ERK1/2 phosphorylation was determined by western blotting using phospho-ERK1/2 antibody and normalized to ERK1/2 total protein. (B) The cells were pretreated with each MAPKs inhibitor and stimulated with Pam3CSK4 (100 ng/mL). DUSP4 mRNA was determined by RT-PCR and normalized to a  $\beta$ -actin control. (C) DUSP4 protein expression was determined by western blotting using DUSP4 antibody.

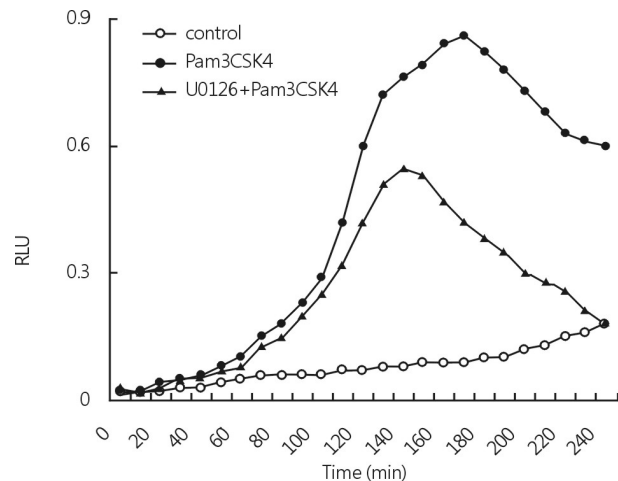
을 때보다 강하게 나타났다(Fig. 2B).

### 3. ERK1/2에 의한 DUSP4 발현 조절

DUSP는 MAPK의 반대 작용 파트너이지만, 또한 MAPK 활성화에 의해 조절된다는 것이 보고되었다.<sup>9</sup> 그러므로 TLR2 리간드에 의한 DUSP4 발현에 MAPK가 관여 하는지 MAPK 저해제(U0126)를 사용하여 확인하였다. 먼저, Pam3CSK4에 의해 ERK1/2의 인산화는 증가하였으며, U0126 전 처리에



**Fig. 4.** Effect of DPI on Pam3CSK4-induced DUSP4 expression. Raw264.7 cells were pretreated with DPI (50 nM) and stimulated with Pam3CSK4 (100 ng/mL). (A) DUSP4 mRNA was determined by RT-PCR and normalized to a  $\beta$ -actin control. (B) DUSP4 protein expression was determined by western blotting using DUSP4 antibody.



**Fig. 5.** Role of ERK1/2 in Pam3CSK4-induced ROS generation. Raw264.7 cells were pretreated with U0126 (1  $\mu$ M). The cells were changed into PBS containing lucigenin and NADPH, and then treated with vehicle or Pam3CSK4 (100 ng/mL). Chemiluminescence was measured in RLU every 10 min over a period of 240 min.

의해서는 인산화가 감소되었다(Fig. 3A). Pam3CSK4는 DUSP4 유전자 발현을 재현성 있게 증가시켰으며, ERK1/2 저해제인 U0126를 전처리 하였을 때는 감소되었다. 그러나, p38 MAPK와 JNK 저해제(SB203580, SP600125)에 의해서는 영향이 없었다. ERK1/2에 의한 DUSP4 발현 변화는 유전자와 단백질 모두 동일하게 나타났다(Fig. 3B, 3C). 이와 같은 결과는 Pam3 CSK4의 TLR2 활성화는 ERK1/2의 인산화를 자극하고 자극된 ERK1/2 활성화는 특정 전사인자를 통하여 DUSP4 유전자 및 단백질 발현을 유도하지만, 다른 종류의 MAPK는 관여하지 않음을 알 수 있다.

### 4. 활성산소에 의한 DUSP4 발현 조절

다음은 활성산소에 의한 DUSP4 발현 조절 유무를 확인하기 위하여 활성산소를 생성하는 효소인 NADPH oxidase 저

해제(DPI)를 전 처리하였다. DPI 전 처리는 Pam3CSK4에 의해 유도한 DUSP4 mRNA 발현과 단백질 발현도 억제하였다 (Fig. 4A, 4B). 이와 같은 결과는 Pam3CSK4 처리에 의해 생성된 활성산소가 DUSP4 발현을 조절한다는 것을 의미한다. 위에서 언급한 ERK1/2 활성과 활성산소간의 상관성을 규명하기 위하여 Pam3CSK4에 의한 활성산소 생성 변화를 lucigenin assay로 측정하였다. 대식세포에서 Pam3CSK4는 전형적인 양상을 나타내면서 활성산소를 생성하였다. 그러나 U0126을 전 처리 하였을 때는 Pam3CSK4에 의한 활성산소를 억제하였다(Fig. 5). 이와 같은 결과는 Pam3CSK4에 의해 증가한 ERK1/2 활성은 활성산소 생성을 야기하고, 이를 통하여 DUSP4 발현을 조절할 것으로 생각된다.

## 고 찰

TLR은 면역세포의 선천성 또는 획득성 면역반응을 조절하는 핵심 수용체이다. TLR의 적절한 활성화는 바이러스나 박테리아가 침범하였을 때 세포의 방어 작용을 나타내는 중요한 수용체이지만, 과도한 활성화는 오히려 염증반응을 일으키는 요인이 된다.<sup>19</sup> TLR2 자극을 시작으로 염증반응이 진행되면 수많은 신호전달 단백질이 관여한다. 대표적인 단백질은 MyD88과 TIR domain-containing adaptor protein (TRIF)이고, 순차적으로 TRAF6, transforming-growth-factor- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1), I kappa B kinase (IKK) 및 NF- $\kappa$ B 복합체를 경유하여 다양한 염증 매개체를 생성한다.<sup>20</sup> TLR2 자극은 수많은 유전자 발현을 증가시키기도 하고 감소시키기도 한다. 예비 실험에서, 대식세포에 TLR2 리간드를 처리한 후 gene-chip array를 수행하였을 때 수천 종류의 유전자 변화를 확인하였다(Data not shown). 그 가운데 DUSP4가 있었으며, 실제로 다른 종류의 TLR 리간드도 유사한 효과를 나타냈다.

한편, TLR 자극으로 TRAF6 복합체와 TAK1 복합체를 경유한 신호는 IKK 복합체 대신 mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)를 활성화시키기도 한다. MAPK는 ERK1/2, p38 MAPK 및 JNK로 구분되는데, TLR 신호전달 과정에서는 ERK1/2의 작용이 매우 두드러지게 나타나고 있다.<sup>21</sup> 실제로 Pam3CSK4에 의한 ERK1/2의 인산화가 확인되었으며,<sup>22</sup> ERK1/2의 활성화는 세포 성장을 비롯한 세포의 핵심 기능을 조절하기도 한다. ERK 활성화는 threonine 및 tyrosine 잔기의 인산화를 통해 이루어진다. ERK1/2 인산화의 역동적 조절에는 RAF, MEK로 이어지는 인산화 효소 경로 외에, 탈인산화

효소(phosphatase)가 중심적 역할을 한다. ERK1/2 관련 탈인산화 효소로는 serine/threonine phosphatase 군에 속하는 PP1, PP2A, protein tyrosine phosphatase에 속하는 STEP, HePTP, PTP-SL, threonine 및 tyrosine 잔기에 대한 탈인산 작용을 지닌 dual-specificity protein phosphatase (DUSP) 군이 있다. 이 가운데 DUSP 1, 2, 4, 6, 7 및 9는 특히 ERK1/2에 대한 높은 결합력을 가지고 있다. 반대로 MAPK가 활성화 되면 DUSP의 전사를 활성화시키고 인산화를 시켜서 단백질의 안정성을 유지하게 된다.<sup>23</sup>

그러므로 ERK1/2 음성조절자인 DUSP의 작용 가능성이 충분히 예상되지만, 어떻게 조절하는가에 관한 보고는 아직까지 이루어지지 않았다. DUSP4 발현을 조절하는 ERK1/2의 작용 가능성은 이전의 보고에서 예상되었다. 즉, DUSP4의 인산화를 유도하는 대표적인 기작은 MAPK/ERK kinase (MEK)-의존적인 방법에 의한 것으로서 ERK의 tyrosine 361, tyrosine 363, serine 390, 그리고 serine 395잔기 의존적으로 일어나게 된다. 이렇게 됨으로써 DUSP4 단백질은 파괴되지 않고 일정하게 유지 된다.<sup>24</sup> 본 연구에서 ERK1/2 저해제인 U0126은 Pam3CSK4에 의해 증가한 DUSP4 발현을 억제하였다. 이와 같은 결과는 TLR2 자극으로 증가한 ERK1/2 활성은 세포주기와 전사인자 활성을 조절하는 한편, DUSP4 발현도 조절하여 과도하게 활성화되는 ERK1/2의 음성조절자(negative regulator)로서 역할을 담당할 것으로 생각한다.

최근 염증을 비롯한 다양한 세포 반응에서 DUSP4에 의한 신호조절이 매우 중요한 과정으로 인식되고 있다. 즉, DUSP4는 급성 폐 손상에서 초기 염증을 조절하고,<sup>25</sup> DUSP4의 억제 는 B-cell 의존성 또는 T-cell 의존성 반응을 손상시키기도 한다.<sup>26</sup> DUSP4는 패혈증에서 염증반응을 조절하고,<sup>27</sup> glioma cell의 growth를 억제하여 암세포 기능에도 관여할 것으로 추측된다.<sup>28</sup> 그러나 TLR 반응에서 DUSP4의 역할은 보고된 적 없다. 그러므로 본 연구 결과는 DUSP4가 TLR 신호전달 과정에서 아주 중요한 역할을 담당할 가능성을 제시하고 있다. 향후 TLR2에 의해 야기되는 다양한 염증 면역 반응에서 각종 유전자 발현에 관여하는 DUSP4의 역할 규명이 필요하다. TLR2 신호 전달 과정에서 DUSP의 역할은 DUSP4에만 국한되지 않을 것으로 생각한다. 그 이유는 TLR2 자극은 DUSP1, DUSP2, DUSP5 및 DUSP16의 유전자 발현도 증가시켰다. 현재 DUSP 각각의 기능이 아주 체계적으로 구분되지는 않았으나, 분명히 특별한 작용 기전이 존재할 것으로 추측한다.

우리는 DUSP4 발현을 조절하는 새로운 인자로서 활성산

소의 중요성을 확인하였다. TLR2 자극은 활성산소를 생성함과 더불어 DUSP4 발현도 증가시키는데, 활성산소 생성 차단은 DUSP4 발현도 차단되었다. 이와 같은 결과는 DUSP4 발현 과정에서 활성산소가 참여한다는 증거이다. DUSP4 발현에서 활성산소의 역할에 관한 증거는 glutathione peroxidase-1의 작용으로 간접적으로 시사되었으나,<sup>29</sup> 우리의 결과는 활성산소의 직접적인 참여를 증명하였다. 활성산소를 생성하는 효소로서 NADPH oxidase (Nox) 참여 가능성이 매우 높을 것으로 생각한다. 이유는 활성산소 생성 저해제인 DPI는 Nox 저해제이기 때문이다. 현재 Nox는 6종류가 밝혀졌으나, 대식세포에서 Nox는 주로 Nox-1과 Nox-2의 역할이 중요할 것으로 추측된다. 실제로 대식세포에서 Nox-1은 Pam3CSK4에 의해 유도된다는 것이 밝혀졌으며,<sup>30</sup> Nox-2의 역할도 이미 보고 되었다.<sup>31</sup> 그러나 어떠한 종류가 보다 더 특이적으로 작용하는가에 관한 연구는 더 진행되어야 한다.

본 연구를 종합해보면, 대식세포에서 Pam3CSK4는 ERK1/2 인산화를 통하여 활성산소 생성을 유도하였다. 활성산소 생성은 Nox가 관여할 것으로 추측되며, 생성된 활성산소는 DUSP4 발현을 조절하여 TLR2 신호전달 과정에서 DUSP4는 ERK1/2의 음성조절자의 역할을 담당할 것으로 생각한다.

## 감사의 글

본 논문은 2010년도 재단법인 천마의학 연구재단 지원에 의하여 이루어 졌음.

## 참고문헌

- Bhattacharya D, Yusuf N. Expression of toll-like receptors on breast tumors: taking a toll on tumor microenvironment. *Int J Breast Cancer* 2012;2012:716564.
- Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001;166:249-55.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;2:675-80.
- Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:979-87.
- Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, Scumpia PO, Moldawer LL, Mochizuki H. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock* 2008;29:315-21.
- Liu G, Yang Y, Yang S, Banerjee S, De Freitas A, Friggeri A, et al. The receptor for urokinase regulates TLR2 mediated inflammatory responses in neutrophils. *PLoS One* 2011;6:e25843.
- Lancioni CL, Li Q, Thomas JJ, Ding X, Thiel B, Drage MG, et al. Mycobacterium tuberculosis lipoproteins directly regulate human memory CD4(+) T cell activation via Toll-like receptors 1 and 2. *Infect Immun* 2011;79:663-73.
- Wang Q, Dziarski R, Kirschning CJ, Muzio M, Gupta D. Micrococci and peptidoglycan activate TLR2→MyD88→IRAK→TRAF→NIK→IKK→NF-kappaB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. *Infect Immun* 2001;69:2270-6.
- Huang CY, Tan TH. DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell Biosci* 2012;2:24.
- Ananieva O, Darragh J, Johansen C, Carr JM, McIlrath J, Park JM, et al. The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 2008;9:1028-36.
- Ralph JA, Morand EF. MAPK phosphatases as novel targets for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12:795-808.
- Zhang Y, Blattman JN, Kennedy NJ, Duong J, Nguyen T, Wang Y, et al. Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5. *Nature* 2004;430:793-7.
- Dickinson RJ, Keyse SM. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J Cell Sci* 2006;119:4607-15.
- Jeffrey KL, Brummer T, Rolph MS, Liu SM, Callejas NA, Grumont RJ, et al. Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. *Nat Immunol* 2006;7:274-83.
- Ueda K, Arakawa H, Nakamura Y. Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. *Oncogene* 2003;22:5586-91.
- Woods DC, Johnson AL. Phosphatase activation by epidermal growth factor family ligands regulates extracellular regulated kinase signaling in undifferentiated hen granulosa cells. *Endocrinology* 2006;147:4931-40.
- Lang R, Hammer M, Mages J. DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *J Immunol* 2006;177:7497-504.
- Hammer M, Mages J, Dietrich H, Schmitz F, Striebel F, Murray PJ, et al. Control of dual-specificity phosphatase-1 expression in activated macrophages by IL-10. *Eur J Immunol* 2005;35:2991-3001.
- Kondo T, Kawai T, Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol* 2012;33:449-58.
- Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol* 2007;19:24-32.
- MacLeod H, Bhasin N, Wetzler LM. Role of protein tyrosine kinase and Erk1/2 activities in the Toll-like receptor 2-induced cellular activation of murine B cells by neisserial porin. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:630-7.
- Kogut MH, Iqbal M, He H, Philbin V, Kaiser P, Smith A. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. *Dev Comp Immunol* 2005;29:791-807.
- Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 2006;31:268-75.

24. Cagnol S, Rivard N. Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition. *Oncogene* 2013;32:564-76.
25. Cornell TT, Fleszar A, McHugh W, Blatt NB, Le Vine AM, Shanley TP. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2, MKP-2, regulates early inflammation in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;303:L251-8.
26. Yu M, Li G, Lee WW, Yuan M, Cui D, Weyand CM, et al. Signal inhibition by the dual-specific phosphatase 4 impairs T cell-dependent B-cell responses with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:E879-88.
27. Lawan A, Torrance E, Al-Harathi S, Shweash M, Alnasser S, Neamatallah T, et al. MKP-2: out of the DUSP-bin and back into the limelight. *Biochem Soc Trans* 2012;40:235-9.
28. Waha A, Felsberg J, Hartmann W, von dem Knesebeck A, Mikeska T, Joos S, et al. Epigenetic downregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP-2 relieves its growth suppressive activity in glioma cells. *Cancer Res* 2010;70:1689-99.
29. Lubos E, Kelly NJ, Oldebeken SR, Leopold JA, Zhang YY, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 deficiency augments proinflammatory cytokine-induced redox signaling and human endothelial cell activation. *J Biol Chem* 2011;286:35407-17.
30. Lee HK, Park DW, Bae JH, Kim HJ, Shin DG, Park JS, et al. RGS2 is a negative regulator of STAT3-mediated Nox1 expression. *Cell Signal* 2012;24:803-9.
31. Huang J, Canadien V, Lam GY, Steinberg BE, Dinauer MC, Magalhaes MA, et al. Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:6226-31.