



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0040905
(43) 공개일자 2016년04월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/19 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0134415

(22) 출원일자 2014년10월06일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김형표

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 (신촌동)

(74) 대리인

특허법인충현

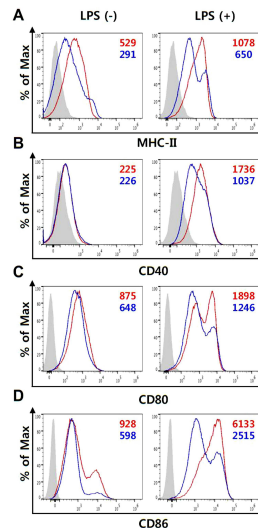
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 트리코모나스 바지날리스로부터 유래하는 단백질 인자를 포함하는 면역 질환의 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 트리코모나스 바지날리스로부터 유래하는 단백질 인자를 포함하는 면역 질환의 치료적 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012M3A9B4028272
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	성균관대학교
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	조혈줄기세포 유래 수지상세포 분화관련 후성유전인자 탐색 및 기능연구
기 여 율	50/100
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2012.06.01 ~ 2017.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	NRF-2011-0030086
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	연세대학교
연구사업명	선도연구센터지원사업
연구과제명	만성대사질환 특이적 후성유전학적 바이오마커 발굴 및 제어연구
기 여 율	25/100
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2011.09.01 ~ 2018.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	NRF-2013R1A1A2008812
부처명	교육부
연구관리전문기관	연세대학교
연구사업명	일반연구자지원사업
연구과제명	알레르기성 면역질환에서 항알레르기 사이토카인 IL-31의 생체 내 발현 및 기능 연구
기 여 율	25/100
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2013.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

트리코모나스 바지날리스로부터 유래하는 단백질 인자를 포함하는 면역 질환의 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질 인자는 수지상 세포를 조절하는 것을 특징으로 하는 면역 질환의 치료용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 단백질 인자는 수지상 세포의 성숙 또는 활성화에 영향을 주는 사이토킨 또는 공-자극 분자를 조절하는 것을 특징으로 하는 면역 질환의 치료용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 공-자극 분자는 MHC-II, CD80, CD86 및 CD40에서 선택되는 하나 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는 면역 질환의 치료용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 사이토킨은 IL-10 또는 IL-12인 것을 특징으로 하는 면역 질환의 치료용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 단백질 인자는 *I112a*, *I112b*, *I110*, *Tnf*와 *I16*의 mRNA 수준을 조절하는 것을 특징으로 하는 면역 질환의 치료용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 단백질 인자는 IL-12의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 면역 질환의 치료용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 단백질 인자는 IL-10의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 면역 질환의 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 트리코모나스 바지날리스로부터 유래하는 단백질 인자를 포함하는 면역 질환의 치료용 조성물에 관한

[0001]

것이다.

배경 기술

- [0002] 수지상 세포(DC)는 외부환경과 적응성 면역반응 간에 핵심적인 연관성을 제공하는 전문적인 항원-제시 세포이다(1). DC의 성숙과 활성화는 면역반응의 유형과 강도에 영향을 미치는 사이토킨의 방출과 맞물려 주요 조직적합 복합체 II(MHC-II), CD80, CD86과 CD40과 같은 항원 제시와 공-자극에 있어서 핵심적인 역할을 하는 여러 분자의 발현 증강을 수반한다(2). DC에 의해 유도된 면역반응은 침입하는 병원체를 구제하고 제거하는데 매우 중요한 동시에, DC는 건강한 조직에 대한 파괴적 자가 면역반응을 막는 면역관용을 유지하는 역할을 한다(3). 또한 기생균이 이들의 숙주 안에서 생존을 허용하는 환경을 촉진하기 위해 DC 활성을 방해할 수 있음을 입증하는 보고가 있었다(4).
- [0003] 트리코모나스 바지날리스(*Trichomonas vaginalis*, *T. vaginalis* 라고도 함)는 여성과 남성 모두의 생식기의 편평상피를 감염시키는 세포외 편모 원생 기생균이다(5). 트리코모나스 바지날리스는 전 세계에서 성적 접촉으로 전염되는 가장 흔한 비-바이러스성 질환 중 하나인 질 트리코모나스증의 원인균이다(6). 감염된 여성에서 나타나는 전형적인 증상으로는 소양증이 동반된 화농성이면서 거품이 있는 질 분비물을 포함한다(7). 질 감염은 임신 부작용(8), 자궁경부암의 발병 증가(9)와 인체면역결핍 바이러스(HIV)의 전파 증가(10)를 동반한다.
- [0004] 트리코모나스 바지날리스의 감염은 여성에게서 질 상피의 염증과 남성의 요도 염증과 함께 악성의 국소 세포 면역반응으로 이어진다(11, 12). 트리코모나스 바지날리스는 점막의 점상 출혈을 빈번하게 일으켜 감염에 대한 물리적 장벽이 손실될 가능성이 있다(13). 또한 살아있는 트리코모나스 바지날리스에 의해 자극된 인간 호중구와 대식세포는 면역세포를 구성함으로써 케모킨 IL-8 및 감염에 대한 면역반응 개시를 담당하는 급성 전-염증성 사이토킨 IL-6, TNF- α 와 IL-1 β 를 생산한다(14, 15). 그러나 상기 숙주 면역반응은 계속하여 트리코모나스 바지날리스를 제거할 수 없어 만성 감염이 나타난다. 트리코모나스 바지날리스 감염은 세균성 리포다당류(LPS)에 의한 후속 자극에 대해 비-반응성 상태를 유도할 수 있다는 증거가 있다(16). 대식세포를 트리코모나스 바지날리스와 접촉하였더니 전염증성 사이토킨 생산이 억제되었고(NF- κ B 활성화 억제에 의해)(16) 인간 DC에 의한 면역 억제 사이토킨 IL-10 생산이 유도되었다(17). 또한 트리코모나스 바지날리스는 p38 질소-활성화된 단백질(MAP) 키나아제의 인산화를 통해 대식세포 사멸을 유도할 수 있음이 보고되었다(18).
- [0005] 트리코모나스 바지날리스의 병원성은 상피세포와의 접촉에 의해 영향을 받지만; 트리코모나스 바지날리스로부터 분비되는 각종 가용성 인자 또한 숙주 면역반응을 조절하는 것으로 밝혀졌다. 최근의 연구를 통해 트리코모나스 바지날리스는 호중구와 비만세포 상의 류코트리엔 B₄ 수용체 BLT1과 BLT2에 결합하여 IL-8을 생산하는 류코트리엔 B₄를 분비할 수 있는 것으로 밝혀졌다(19, 20). 그러나 선천성과 적응성 면역반응 모두에 있어서 DC의 결정적인 역할을 고려할 때 매우 중요한 DC의 분화와 성숙에 트리코모나스 바지날리스-유래 분비 산물(TvSP)이 어떻게 영향을 미치는지 명확하게 설명하는 정보는 거의 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 트리코모나스 바지날리스로부터 분리된 단백질 인자와 각종 면역질환과의 상관 관계 및 그 작용 기전을 밝힘으로써, 상기 단백질 인자를 각종의 면역질환 치료제로서 사용할 수 있는 수단을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 이에, 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 일 구체예로서, 트리코모나스 바지날리스로부터 유래하는 단백질 인자를 포함하는 면역 질환의 치료적 조성물을 제공하고자 한다.
- [0008] 상기 단백질 인자는 수지상 세포를 조절하는 것을 특징으로 한다.

- [0009] 상기 단백질 인자는 수지상 세포의 성숙 또는 활성화에 영향을 주는 공-자극 분자와 사이토킨을 조절하는 것을 특징으로 한다.
- [0010] 상기 사이토킨은 IL-12 또는 IL-10 인 것을 특징으로 한다.
- [0011] 상기 공-자극 분자는 MHC-II, CD80, CD86 및 CD40를 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명에 따른 트리코모나스 바지날리스로부터 유래하는 단백질 인자는, 면역 질환의 치료적 조성물로 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 BDMC상에 표면 분자의 발현에 미치는 TvSP의 영향을 나타내는 그래프이다. DC는 TvSP의 존재 또는 부존재 하에서 BM 전구체로부터 GM-CSF와 함께 분화되었다. 10일째에, DC는 LPS 100 ng/ml로 24시간동안 처리하여 성숙을 유도하고, MHC-II(A), CD40(B), CD80(C) 및 CD86(D)의 발현을 플로우 시메트리에 의하여 분석하였다. 이소타입 대조군은 회색으로 나타내었고, 대조군 BMDC는 적색 선, TvSP처리된 BMDC는 파란선으로 나타내었다.
- 도 2는 BDMC의 사이토킨 생성에 미치는 TvSP의 영향을 보여주는 그래프이다. DC는 TvSP의 존재 또는 부존재 하에서 BM 전구체로부터 GM-CSF와 함께 분화되었다. 미성숙 DC를 6시간동안 LPS 100 ng/ml로 자극하여, I112a (A), I112b (B), I110 (C), Tnf (D), 및 I16 (E)의 mRNA 수준을 qRT-PCR에 의하여 측정하였다(A-E). 미성숙 DC를 24시간동안 LPS 100 ng/ml로 자극하여, IL-12 (F), IL-10 (G), TNF- α (H), 및 IL-6 (I)의 발현을 사이토메트릭 비드 어레이에 의하여 측정하였다. 모든 데이터는 mean \pm SD로 표현되었고, 통계 유의(*P<0.05, or **P<0.01)가 대조군과 비교하여 처리되었다.
- 도 3은 프로티나아제 K로 처리함으로써 사라지는 TvSP의 DC-조절 활성을 나타내는 그래프이다. DC는 mock-처리되거나 또는 프로티나제 K-처리된 TvSP의 존재 하에서 BM 전구체로부터 GM-CSF와 함께 분화되었다. 10일째에, DC는 LPS 100 ng/ml로 24시간동안 처리하여 성숙을 유도하고, MHC-II(A), CD40(B), CD80(C) 및 CD86(D)의 발현을 플로우 시메트리에 의하여 분석하였다. 이소타입 대조군은 회색으로 나타내었고, 대조군 BMDC는 적색 선, TvSP처리된 BMDC는 파란선으로 나타내었다. LPS 유도에 의하여 사이토킨 IL-12(E) 및 IL-10(F)의 생성이 사이토메트릭 비드 어레이에 의하여 측정되었다.
- 도 4는 I112a 유전자의 프로모터 영역에서 히스톤 개질의 변형에 의하여 TvSP는 후성 조절을 보여준다. DC는 TvSP의 존재 또는 부존재 하에서 BM 전구체로부터 GM-CSF와 함께 분화되었다. 10일째에, LPS를 배양물에 1시간 동안 첨가하고, I112a (A), I112b (B), I110 (C), Tnf (D), I16 (E) 및 Gapdh(F) 유전자의 프로모터 영역에서 H3K4me3 수준을 ChIP 에세이에 의하여 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 본 발명을 상세히 설명하고자 한다.
- [0015] 본 발명의 면역 질환 치료용 조성물은 트리코모나스 바지날리스로부터 유래하는 단백질 인자를 유효 성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명의 조성물이 치료가능한 면역 질환의 예는 특별히 한정되지는 않으나, 바람직하게는 염증성 장질환 (inflammatory bowel disease), 류마티스 관절염 (Rheumatoid arthritis), 다발성 경화증 (Multiple Sclerosis)과 같은 자가면역질환 (autoimmune disease)을 포함한다.
- [0017] 상기 트리코모나스 바지날리스로부터 유래하는 단백질 인자는 수지상 세포의 성숙 및 활성화를 조절한다. 수지상 세포는 면역 시스템을 관장하는 주요 세포로서, 상기 단백질 인자는 공-자극 분자와 특정 사이토킨을 조절함으로써 수지상 세포의 성숙 또는 활성화에 영향을 준다.
- [0018] 본 발명에 따르면, 수지상 세포의 활성 지표인 공-자극 분자는 MHC-II, CD80, CD86 및 CD40를 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [0019] 본 발명은 트리코모나스 바지날리스로부터 유래하는 단백질 인자에 의하여 면역 활성 유도 사이토카인인 IL-12의 발현 감소와 면역 억제 유도 사이토카인인 IL-10의 발현 증가를 유도하는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 트리코모나스 바지날리스로부터 유래하는 단백질 인자에 의하여 *I112a*, *I112b*, *I110*, *Tnf*와 *I16*의 mRNA 수준을 조절하는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 면역질환 치료제에 포함되는 기타 성분으로서, 당업자에게 알려진 성분이라면 어떠한 것이라도 포함될 수 있음은 당연하다.
- [0022] 이하, 본 발명을 구체적인 실시예를 통하여 더욱 상세하게 설명한다
- [0023] 본 연구에서 체외 쥐 골수-유래 수지상 세포(BMDC) 모델을 이용하여 DC의 표면 분자 발현과 사이토킨 분비 양상에 대한 TvSP의 효과를 조사하였다.
- [0024] **재료 및 방법**
- [0025] ***T. vaginalis*의 배양과 TvSP의 준비**
- [0026] *T. vaginalis*의 T016 균주(26)를 10% 열-불활성화 말 혈청(Life Technologies)과 0.5% 페니실린/스트렙토마이신(Life Technologies)을 가진 Diamond's 트립티카아제-효모 추출물-말토오스(TYM) 배지 중 37 °C에서 무균으로 계대 배양하였다. TvSP를 이전에 기재한 바대로 준비하였다(20).
- [0027] **BMDC의 생성**
- [0028] 6 내지 8주령의 자성 C57BL/6 마우스를 연세대학교의 무병균 동물 관리시설에서 관리하였다. 이전에 기재한 바대로, 20 ng/ml 재조합 쥐의 GM-CSF(Peprotech)가 존재하는 상태에서 BM 전구세포로부터 BMDC를 생성하였다(27). 성숙을 위해, 10일 째에 BMDC를 100 ng/ml LPS(Sigma-Aldrich)로 자극하였다.
- [0029] **유세포 분석**
- [0030] CD11c-PE, MHC-II-FITC(I-A/I-E), CD40-PerCP-eFluor710, CD80-APC와 CD86-PE-Cy7(e-Bioscience)에 대한 항-마우스 항체로 세포 표면 염색을 수행하였다. 이전에 기재한 바대로 세포사멸을 정량화하였다(28). FACSverse(BD Biosciences)에 의해 형광을 측정하고 FlowJo 소프트웨어(Treestar)로 데이터를 분석하였다.
- [0031] **정량적 실시간 PCR**
- [0032] TRIzol(Life Technologies)을 이용하여 전체 RNA를 분리하고 제작사 지침에 따라 PrimeScript RT Kit(Takara)를 이용하여 제1-가닥 cDNA를 제작하였다. StepOnePlus™ Real-Time PCR System(Life Technologies)에서 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 프라이머의 서열은 다음과 같았다: 마우스 *I112a*, 5' -GGCCATCAACGCAGCACTTC-3' , 5' -CACAGGAGGTTTCTGGCGCA-3' ; 마우스 *I112b*, 5' -CCTGAAGTGTGAAGCACCAA-3' , 5' -GTCAGGGGAAGTCTACTGC-3' ; 마우스 *I110*, 5' -CCCTTGCTATGGTGTCTT-3' , 5' -TGTTTCTCTTCCAAGACC-3' ; 마우스 *Tnf*, 5' -ATGTCCATTCTGAGTTCTG-3' , 5' -AATCTGGAAGGTCTGAAGG-3' ; 마우스 *I16*, 5' -CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3' , 5' -TTGCCATTGCACAACCTTT-3' ; 마우스 *Rp17*, 5' -ATGTGCCCGCAGAACCAA-3' , 5' -GACGAAGGAGCTGCAGAACCT-3' .
- [0033] **사이토킨의 측정**
- [0034] DC로부터 상청액을 수거하여 멸균-여과하고, 제작사 지침에 따라 마우스 염증성 사이토킨 Cytometric Bead Array 키트(BD PharMingen)를 이용하여 IL-12, IL-10, TNF-α와 IL-6의 수준을 결정하였다.

[0035] **프로테이나아제 K 처리**

[0036] TvSP를 1시간 동안 37℃에서 50 μg/ml 프로테이나아제 K(Sigma-Aldrich)와 함께 배양하여 프로테이나아제 K로 처리한 후, 10분간 98℃로 가열하여 상기 효소를 불활성화하였다.

[0037] **염색질 면역침강**

[0038] 이전에 기재한 바대로 ChIP 분석을 수행하였다(29). 포름알데히드-처리 핵 용해물을 H3K4me3 항체(Abcam)에 특이적인 항체로 면역침강 처리하였다. 상기 단백질을 제거하기 위한 프로테이나아제 K 처리와 교차결합의 역전(reversal of cross-links) 후, 선택된 DNA 서열의 양을 실시간 PCR에 의해 분석하였다. 프라이머의 서열은 다음과 같았다: 마우스 *I112a* 프로모터, 5' -GGGGTAGTGGGGCAGGACAG-3' , 5' -CCCGTTTGAGGAGATTCGGG-3' ; 마우스 *I112b* 프로모터, 5' -GCCTCCTTCCTTTTCCACACC-3' , 5' -CCTTGCTCCCTGAGTGCAT-3' ; 마우스 *I110* 프로모터, 5' -CAAAAACCTTTGCCAGGAAG-3' , 5' -TGTGGCTTTGGTAGTGAAG-3' ; 마우스 *Tnf* 프로모터, 5' -GCCTCTTCTCATTCCTGCTT-3' , 5' -GAATAAGGGTTGCCAGACA-3' ; 마우스 *I16* 프로모터, 5' -AATGTGGGATTTCCCATGA-3' , 5' -AGCGGTTTCTGGAATTGACT-3' ; 마우스 *Gapdh* 프로모터, 5' -AATCTCAGCTCCCTCCCCC-3' , 5' -TACGTGCACCCGTAAGCCG-3' .

[0039] **통계**

[0040] 독립표본 스튜던트 양측 t-검정법(unpaired Student 2-tailed t-test)으로 데이터를 분석하였다.

[0041] **결과**

[0042] **TvSP는 MHC-II와 공-자극 분자의 발현을 하향-조절한다.**

[0043] TvSP가 BMDC의 분화와 기능에 영향을 주는지 시험하기 위해서, TvSP의 존재 또는 부재 상태에서 과립구 대식세포 콜로니-자극인자(GM-CSF)와 함께 골수(BM) 세포를 10일간 배양한 다음, LPS로 18 시간 자극하여 DC의 성숙을 유도하였다. TvSP는 GM-CSF-매개 분화 중에 BMDC에서 세포사멸을 일으키지 않았다(보충자료 그림 1). TvSP가 없는 상태에서, BM 세포는 미성숙 DC와 성숙 DC의 전형적인 표면 표현형을 나타낸 DC로 분화되었다(도 1).

[0044] 그러나 TvSP가 존재하는 상태에서 BM 세포가 분화될 때, MHC-II 및 CD40, CD80과 CD86과 같은 공-자극 분자의 발현은 미성숙 BMDC에서 하향-조절되거나 또는 적어도 바뀌지 않는다(도 1). TvSP에 의한 MHC-II와 공-자극 분자의 하향-조절은 LPS에 의해 DC가 자극될 때 더욱 더 분명하였다(도 1). 이들 결과가 시사하는 바는 TvSP가 MHC-II와 공-자극 분자의 발현을 약화시킴으로써 DC 분화 중에 DC의 항원-제시능을 손상시킨다는 점이다.

[0045] **TvSP 존재 상태에서 분화된 BMDC에 의한 사이토킨 생산**

[0046] TvSP가 DC 분화 중에 BMDC의 사이토킨 생산능에 영향을 주는지 여부를 조사하기 위해서, 본 저자들은 TvSP의 부재 또는 존재 상태에서 10일간 분화한 다음, LPS로 자극한 BMDC를 이용하여 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)을 수행하였다. 이 분석을 통해 *I112a*, *I112b*, *I110*, *Tnf*와 *I16*의 mRNA 수준이 대조군 BMDC에서 LPS 자극에 의해 현저하게 증가하였음을 증명한바, 종전의 보고(2)와 일치하였다. 흥미로운 점은, LPS에 대응한 *I112a*과 *I112b* mRNA 발현의 유도는 TvSP 부재 상태에서 분화된 BMDC에 비해 TvSP 존재 상태에서 분화된 BMDC에서 유의적으로 더 낮았다(도 2A와 2B). 이에 반해, TvSP 존재 상태에서 BMDC의 분화 결과, 대조군 BMDC에 비해 면역억제 사이토킨 *I110*의 발현이 더 높았다(도 2C). TvSP는 *Tnf*와 *I16*와 같은 다른 전염증성 사이토킨들의 mRNA 발현에 대해 최소한의 효과를 발휘하였다(도 2D와 2E).

[0047] 또한 BMDC의 사이토킨 생산 양상에 대한 TvSP의 효과를 단백질 수준에서 분석하였다. IL-12의 LPS-매개 유도는 TvSP-처리 BMDC에서 크게 약화된 반면에(도 2F), IL-10의 생산은 TvSP에 의해 증가하였다(도 2G). TNF-α와 IL-6의 생산은 BMDC 분화 중에 TvSP 처리와는 관계가 없었다(도 2H와 2I).

[0048] **TvSP의 DC-조절 활성은 프로테이나아제 K로 처리함으로써 없어진다.**

- [0049] 표면 분자 발현과 사이토킨 생산을 조절하는 역할을 하는 TvSP의 성분을 이해하기 위해서, 본 저자들은 프로테아나아제 K로 TvSP를 처리하였고 BMDC에 대한 효과를 조사하였다. 특히 BMDC를 LPS로 처리하였을 때 MHC-II, CD40, CD80과 CD86의 발현을 하향-조절하는 모의-처리(mock-treated) TvSP에 비해, 프로테아나아제 K에 의해 TvSP를 처리하였더니 상기 표면 분자들의 발현에 대한 TvSP의 억제 활성이 사라졌다(도 3A-3D). TvSP에 의한 IL-12 생산의 하향-조절과 IL-10 발현의 상향-조절 또한 프로테아나아제 K 처리에 의해 없어졌다(도 3E와 3F). 이들 결과는 TvSP의 단백질성 성분이 GM-CSF에 의한 분화 중에 BMDC의 조절 기능을 담당한다는 것을 밝히고 있다.
- [0050] **BMDC에서 LPS-매개 신호전달에 대한 TvSP의 효과**
- [0051] 다음, 본 저자들은 BMDC에서 LPS에 의해 활성화된 신호전달 경로에 대한 TvSP의 효과를 조사하였다. ERK, p38 MAPK와 JNK를 포함하는 3개의 주요 계열의 MAP 키나아제들이 LPS-유도 DC 활성화 중에 신호전달에 관여하는 것으로 보고되어 있다(21, 22). 프로테아나아제 K-처리 PBS, 모의-처리 TvSP와 프로테아나아제 K-처리 TvSP가 존재하는 상태에서 분화된 BMDC에서 LPS 처리에 의해 유도된 이들 키나아제의 인산화는 대조군 BMDC에서의 인산화와 유사하였다. 본 저자들은 또한 NF- κ B 활성화에 대한 TvSP의 효과를 조사하였지만, TvSP의 부재 또는 존재 상태에서 분화된 BMDC 간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 이들 데이터를 통해 TvSP가 존재하는 상태에서 분화된 BMDC에서 표면 분자의 하향-조절과 사이토킨 생산 양상 변화는 ERK, p38 MAPK, JNK 또는 NF- κ B 활성화에 있어서 결함 때문이 아닐 수 있음을 알 수 있다.
- [0052] **BMDC에서 사이토킨 유전자의 염색질 구조에 대한 TvSP의 효과**
- [0053] 열린 염색질 영역은 전형적으로 전사 인자에 대한 접근성과 병행되는 전사 허용적인 히스톤 변형과 관련이 있다(23). 본 저자들은 염색질 면역침강(ChIP) 분석을 수행하여 활성 또는 안정한(poised) 전사 개시 부위에 특이적으로 풍부한 히스톤 변형인 트리메틸-히스톤 H3 Lys4(H3K4me3)를 검출하였다. 대조군 BMDC에 비해, H3K4me3의 농도(enrichment)는 TvSP-처리 BMDC에서 *I112a* 유전자의 프로모터 영역에서 분명하게 감소하였다(도 4A). 이에 비해, TvSP 처리와 무관하게 *I112b*, *I110*, *Tnf*, *I16*과 *Gapdh*의 프로모터 영역에서는 H3K4me3 수준에 있어 유의적인 차이가 없었다(도 4B-4F). 이들 데이터로부터 TvSP-처리 BMDC에서 IL-12p35를 코딩하는 *I112a* 유전자의 전사 억제가 염색질 수준에서 일어나고 BMDC 분화 중에 TvSP를 처리하면 염색질 구조를 바꿔 유전자 발현을 위해 필요한 전사 인자에 덜 접근하게 한다는 것이 입증되었다.
- [0054] [참고문헌]
- [0055] 1. Steinman, R. M. (2012) Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annual review of immunology* **30**, 1-22.
- [0056] 2. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. and Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* **18**, 767-811.
- [0057] 3. Morelli, A. E. and Thomson, A. W. (2007) Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature reviews. Immunology* **7**, 610-621.
- [0058] 4. Terrazas, C. A., Terrazas, L. I. and Gomez-Garcia, L. (2010) Modulation of dendritic cell responses by parasites: a common strategy to survive. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**, 357106.
- [0059] 5. Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R. and Garber, G. (1998) Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology reviews* **11**, 300-317.
- [0060] 6. Gerbase, A. C., Rowley, J. T., Heymann, D. H., Berkley, S. F. and Piot, P. (1998) Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs. *Sexually transmitted infections* **74 Suppl 1**, S12-16.
- [0061] 7. Landers, D. V., Wiesenfeld, H. C., Heine, R. P., Krohn, M. A. and Hillier, S. L. (2004) Predictive value of the clinical diagnosis of lower genital tract infection in women. *American journal of obstetrics and gynecology* **190**, 1004-1010.

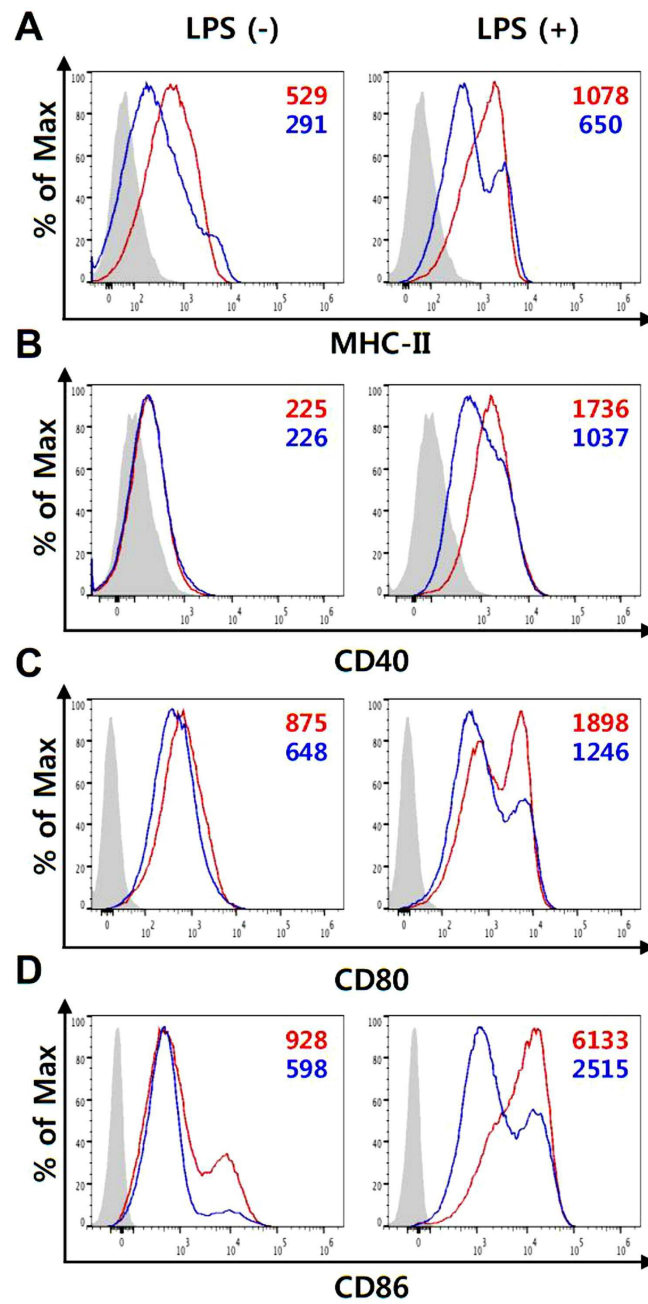
- [0062] 8. Cotch, M. F., Pastorek, J. G., 2nd, Nugent, R. P., Hillier, S. L., Gibbs, R. S., Martin, D. H., Eschenbach, D. A., Edelman, R., Carey, J. C., Regan, J. A., Krohn, M. A., Klebanoff, M. A., Rao, A. V. and Rhoads, G. G. (1997) *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Sexually transmitted diseases* **24**, 353-360.
- [0063] 9. Kharsany, A. B., Hoosen, A. A., Moodley, J., Bagaratee, J. and Gouws, E. (1993) The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. *Genitourinary medicine* **69**, 357-360.
- [0064] 10. Shafir, S. C., Sorvillo, F. J. and Smith, L. (2009) Current issues and considerations regarding trichomoniasis and human immunodeficiency virus in African-Americans. *Clinical microbiology reviews* **22**, 37-45, Table of Contents.
- [0065] 11. Kiviat, N. B., Paavonen, J. A., Brockway, J., Critchlow, C. W., Brunham, R. C., Stevens, C. E., Stamm, W. E., Kuo, C. C., DeRouen, T. and Holmes, K. K. (1985) Cytologic manifestations of cervical and vaginal infections. I. Epithelial and inflammatory cellular changes. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **253**, 989-996.
- [0066] 12. Sardana, S., Sodhani, P., Agarwal, S. S., Sehgal, A., Roy, M., Singh, V., Bhatnagar, P. and Murthy, N. S. (1994) Epidemiologic analysis of *Trichomonas vaginalis* infection in inflammatory smears. *Acta cytologica* **38**, 693-697.
- [0067] 13. Fouts, A. C. and Kraus, S. J. (1980) *Trichomonas vaginalis*: reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. *The Journal of infectious diseases* **141**, 137-43.
- [0068] 14. Ryu, J. S., Kang, J. H., Jung, S. Y., Shin, M. H., Kim, J. M., Park, H. and Min, D. Y. (2004) Production of interleukin-8 by human neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Infection and immunity* **72**, 1326-1332.
- [0069] 15. Han, I. H., Goo, S. Y., Park, S. J., Hwang, S. J., Kim, Y. S., Yang, M. S., Ahn, M. H. and Ryu, J. S. (2009) Proinflammatory cytokine and nitric oxide production by human macrophages stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *The Korean journal of parasitology* **47**, 205-212.
- [0070] 16. Chang, J. H., Ryang, Y. S., Morio, T., Lee, S. K. and Chang, E. J. (2004) *Trichomonas vaginalis* inhibits proinflammatory cytokine production in macrophages by suppressing NF-kappaB activation. *Molecules and cells* **18**, 177-185.
- [0071] 17. Scott, K., Manunta, M., Germain, C., Smith, P., Jones, M., Mitchell, P., Dessi, D., Branigan Bamford, K., Lechler, R. I., Fiori, P. L., Foster, G. R. and Lombardi, G. (2005) Qualitatively distinct patterns of cytokines are released by human dendritic cells in response to different pathogens. *Immunology* **116**, 245-254.
- [0072] 18. Chang, J. H., Kim, S. K., Choi, I. H., Lee, S. K., Morio, T. and Chang, E. J. (2006) Apoptosis of macrophages induced by *Trichomonas vaginalis* through the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase that locates at downstream of mitochondria-dependent caspase activation. *The international journal of biochemistry & cell biology* **38**, 638-647
- [0073] 19. Nam, Y. H., Min, A., Kim, S. H., Lee, Y. A., Kim, K. A., Song, K. J. and Shin, M. H. (2012) Leukotriene B(4) receptors BLT1 and BLT2 are involved in interleukin-8 production in human neutrophils induced by *Trichomonas vaginalis*-derived secretory products. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* **61**, 97-102.
- [0074] 20. Nam, Y. H., Min, D., Kim, H. P., Song, K. J., Kim, K. A., Lee, Y. A., Kim, S. H. and Shin, M. H. (2011) Leukotriene B4 receptor BLT-mediated phosphorylation of NFkappaB and CREB is involved in IL-8 production in human mast cells induced by *Trichomonas vaginalis*-derived secretory products. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **13**, 1211-1220.
- [0075] 21. Cobb, M.H. and Goldsmith, E. J. (1995) How MAP kinases are regulated. *The Journal of biological*

chemistry **270**, 14843-14846.

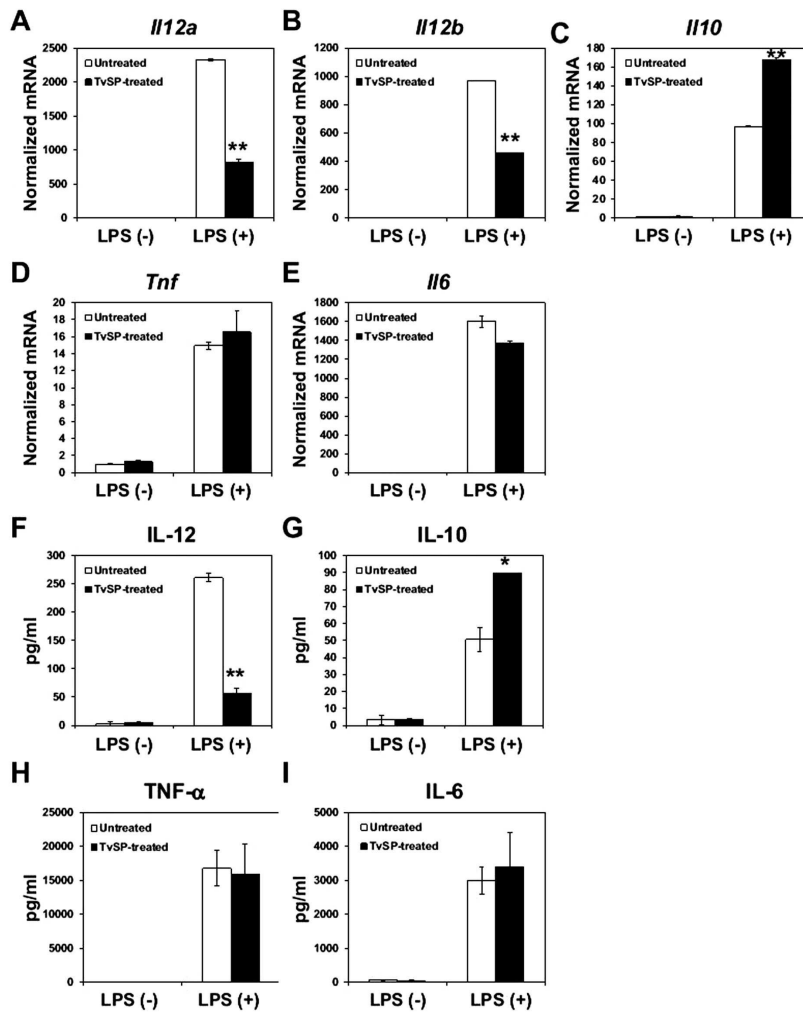
- [0076] 22. Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R. and Ricciardi-Castagnoli, P. (1998) Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *The Journal of experimental medicine* **188**, 2175-2180.
- [0077] 23. Sproul, D., Gilbert, N. and Bickmore, W. A. (2005) The role of chromatin structure in regulating the expression of clustered genes. *Nat Rev Genet* **6**, 775-781.
- [0078] 24. Kanno, Y., Vahedi, G., Hirahara, K., Singleton, K. and O'Shea, J. J. (2012) Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity. *Annual review of immunology* **30**, 707-731.
- [0079] 25. Fisher, C. L. and Fisher, A. G. (2011) Chromatin states in pluripotent, differentiated, and reprogrammed cells. *Current opinion in genetics & development* **21**, 140-146.
- [0080] 26. Pereira-Neves, A. and Benchimol, M. (2007) Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **99**, 87-101.
- [0081] 27. Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N. and Schuler, G. (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of immunological methods* **223**, 77-92.
- [0082] 28. Lee, J. J., Park, K., Shin, M. H., Yang, W. J., Song, M. J., Park, J. H., Yong, T. S., Kim, E. K. and Kim, H. P. (2011) Accessible chromatin structure permits factors Spl and Sp3 to regulate human TGFBI gene expression. *Biochemical and biophysical research communications* **409**, 222-228.
- [0083] 29. Park, K., Park, J. H., Yang, W. J., Lee, J. J., Song, M. J. and Kim, H. P. (2012) Transcriptional activation of the IL31 gene by NFAT and STAT6. *Journal of leukocyte biology* **91**, 245-257.

도면

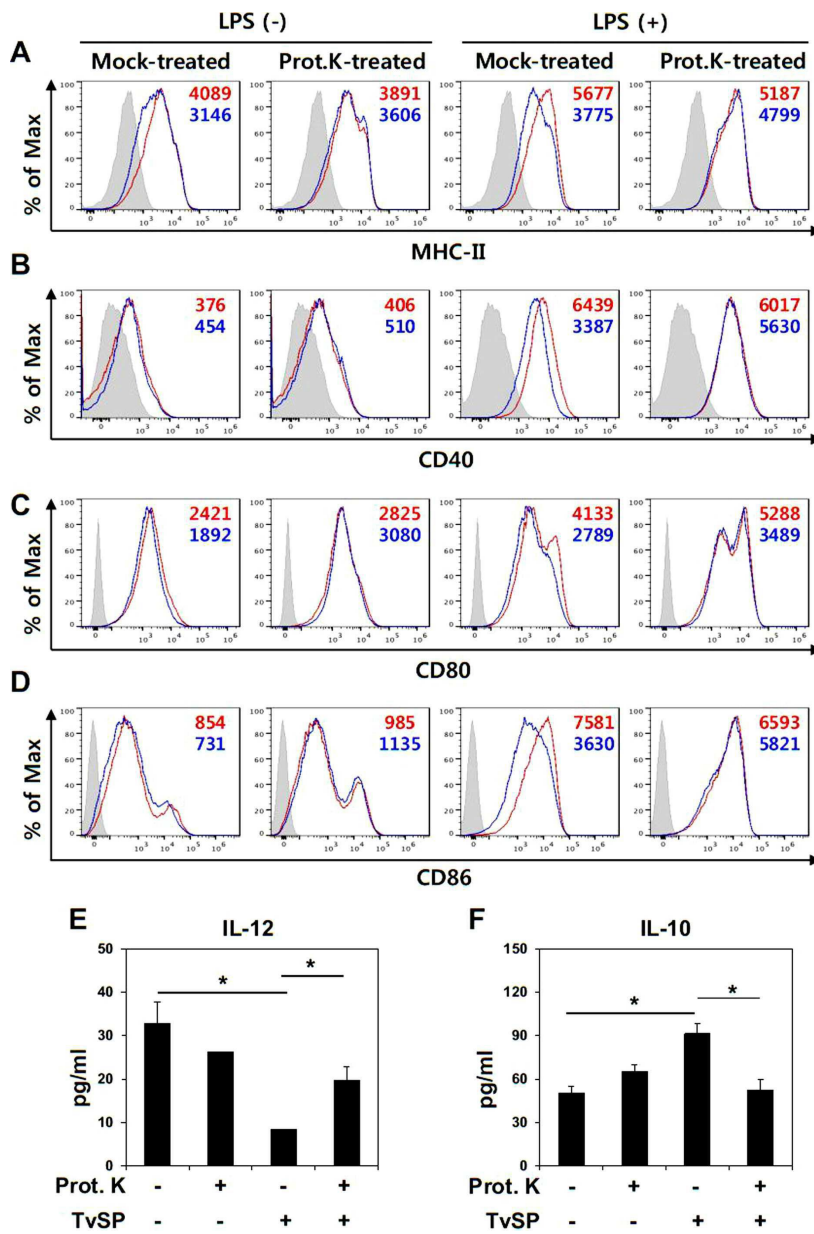
도면1



도면2



도면3



도면4

