

레지오넬라 폐렴의 진단용 바이오마커의 발굴: A/J 마우스 감염 모델에서 *Legionella pneumophila*의 독력 유전자들의 발현양상 분석

김승민¹ · 심희선³ · 김희남¹ · 심호기³ · 윤영경² · 김정연² · 박윤선² · 박대원^{2,3} · 손장욱^{2,3} · 김민자^{1,2,3}
고려대학교 의과대학 대학원 BK21 Program¹, 고려대학교 의과대학 감염내과², 고려대학교 신종전염병연구소³

Discovery of Diagnostic Biomarkers for Legionnaires' Disease: Virulence Gene Expression Profiling of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in A/J Mouse Model

Seung Min Kim¹, Hee Sun Sim³, H. Stanley Kim¹,
Ho Ki Shim³, Young Kyung Yoon², Jeong Yeon Kim²,
Yun Sun Park², Dae Won Park^{2,3}, Jang Wook Sohn^{2,3} and
Min Ja Kim^{1,2,3}

Background: *Legionella pneumophila* is the causative agent of Legionnaires' disease, a severe form of pneumonia. After *L. pneumophila* is inhaled through contaminated aerosols, it is phagocytized by alveolar macrophages, multiplies in a specialized phagosome approximately 10 h postinfection, and eventually leads to the death of host cells. Currently available diagnostic tests for *Legionella* pneumonia have some limitations. This study was conducted to find diagnostic biomarkers for *Legionella* pneumonia using virulence gene expression profiling in a murine experimental model.

BK21 Program of Graduate School¹, Division of Infectious Diseases², Korea University College of Medicine, Research Institute of Emerging Infectious Diseases³, Korea University, Seoul, Korea

본 논문은 2008년 대한감염학회 학술대회 초록상을 수상함

Materials and Methods: A/J mice were intranasally inoculated with *L. pneumophila* serogroup 1, and lungs were harvested 4, 8, 24, and 48 h postinfection. The strain grown in buffered yeast extract broth was used as reference samples. Cy-dye labeled cDNA samples were prepared with total RNA from lungs or broth culture, and hybridized on the oligo-microarray slide containing 2,895 genes of *L. pneumophila* serogroup 1. Virulence gene expression patterns were analyzed using a MIDAS software from TIGR (www.tigr.org).

Results: Among a total of 332 virulence genes examined, 17 genes including *sidA*, *lepB*, the genes related to flagella assembly (*fliR* and *fliP*), LPS lipid A biosynthesis, and the enhanced entry protein *EnhA* were up-regulated at all four time points. We further confirmed by quantitative real-time reverse transcription PCR that the expression of *fliP* gene was highly expressed in lung tissue as well as in bronchoalveolar lavage fluids from the mouse infected with *L. pneumophila* serogroup 1.

Conclusions: Through gene expression analysis of *L. pneumophila* in a mouse model, several candidate biomarkers for diagnosing Legionnaires' disease could be identified.

Key Words: *Legionella pneumophila*, Diagnosis, Biomarker, cDNA microarray

Copyright © 2010 by The Korean Society of Infectious Diseases | Korean Society for Chemotherapy

Submitted: October 23, 2009

Accepted: December 21, 2009

Corresponding Author: Min Ja Kim, M.D., Ph.D.

Division of Infectious Diseases, Korea University Medical Center, 126-1, 5ka, Anam-Dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-705, Korea

Tel: +82-2-920-5685, Fax: +82-2-920-5616

E-mail: macropha@korea.ac.kr

서론

Legionella 균은 환경수에 널리 분포하며, 현재까지 동정된 48종 중 약 17종이 인체감염을 유발하는 것으로 알려져 있다(1). 그 중, *Legionella pneumophila*는 지역사회 폐렴과 면역저하자에서 발생하는 급성 치명적 중증 폐렴의 주요 원인균 중 하나로 알려져 있다. *Legionella* 균은 오염된 비말 흡입을 통하여 폐포 내 식균세포로 식균 되고, 약 4시간부터 식포(phagosome) 내에서 증식하며, 약 24시간째에 숙주세포의 괴사를 유발하여 폐렴을 일으킨다(2).

Legionella 폐렴의 진단에 있어서 임상소견은 비특이적이므로 다양한 실험실적 진단방법들이 개발되고 이용되어 왔다. 대표적으로 호흡기 검체 배양으로부터 *Legionella* 균을 분리하는 것이 표준 방법이지만, 특수 배지를 필요로 하고, 3-5일 배양기간이 소요된다. 혈청항체 검사법은 급성기와 회복기 혈청을 수집해야 하며, 초기 진단에 제한이 있다. 현재 노항원 검사법(urinary antigen assay)은 진료실에서 실시할 수 있는 신속한 항원 검출법으로 상품화되어 가장 널리 이용되고 있으나, 제 1 혈청군(serogroup 1, SG1)만을 제한적으로 검출하며, 감염으로부터 회복한 후에도 지속적으로 검출될 수 있는 단점이 있다. 따라서, 이러한 기존 검사방법들의 단점을 해결할 수 있는 신속하고 정확한 진단법 개발이 계속 요구되고 있다. 최근에 특정 유전자 발현을 검출하는 real-time RT-PCR 법은 매우 민감하고 정확하며, 수 시간 내에 결과를 얻을 수 있어 감염병의 원인 미생물 진단에 널리 활용되고 있으며(3), 이 경우 조사 대상 유전자 선정이 중요하다.

최근 다수의 병원성 세균의 유전체 분석이 완성됨에 따라 genome-wide 마이크로어레이 기법을 사용하여 특정 병원균의 유전자 발현 양상을 분석할 수 있는 진단용 또는 치료용 biomarker 발굴에 대한 연구들이 활발히 이루어지고 있다(4). 특히, in vivo 감염모델에서 병원체 유전자 발현양상을 근거로 한 바이오마커 개발은 병원체가 집락화에서부터 숙주 내로 침습하는 과정에서 어떻게 숙주 세포의 기능을 파괴하는지 또는 숙주와 상호작용하는지 등을 반영할 수 있으므로 임상적으로 유용한 접근법의 하나로 사료된다.

본 연구의 목적은 *L. pneumophila* 유전체의 cDNA 마이크로어레이 기법을 사용하여 *Legionella* 폐렴 실험동물 모델에서 생체 내 독력 인자들의 유전자 발현양상 분석을 통하여 임상 진단용 biomarker를 발굴하고자 하였다.

재료 및 방법

1. *Legionella* 균의 배양과 A/J 마우스의 감염

L. pneumophila SG1 (Philadelphia 1, ATCC 33152)은 buffered charcoal yeast extract α -ketoglutarate (BCYE- α) 평판배지에 접종하고 37°C, 5% CO₂ 항은 배양기에서 48시간 배양한 것을 사용하였다. 7 주령 암컷 A/J 마우스는 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구입하여 실험 전 1주일 동안 안정화시켰다. *Legionella* 균은 무균 식염수에 풀어준 후, 광학밀도(optical density; OD₅₃₀=0.4)를 측정하여 A/J 마우스 한 마리당 30 IU of Opacity (McFarland standard no.10)를 비강으로 흡입 접종하였다(5). A/J 마우스는 감염 후 4, 8, 24, 48 시

간에 폐를 적출하였다. 적출된 폐의 일부는 *Legionella* 균 정량을 위하여 균질기(homogenizer)를 이용하여 분쇄한 후 무균 식염수로 10 배 연속 희석하여 BCYE- α 평판배지에 접종하였으며, 나머지 시료는 마이크로어레이 실험 전까지 액체질소 탱크에 보관하였다.

2. 전체 RNA 추출

대조군 전체 RNA 시료는 *L. pneumophila* SG1 (strain Philadelphia 1)을 buffered yeast extract 액체배지에서 37°C, 16-18시간 동안 180 r.p.m.으로 OD₆₀₀에 1.0 될 때까지 교반 배양하여 수확하였고, RNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)와 RNeasy Mini Kit (QIAGEN)를 사용하여 추출하였다. 실험군 전체 RNA는 액체질소 탱크 하에 보관된 감염된 마우스 폐 조직에 Trizol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)을 넣고 균질기를 이용하여 추출하였다.

3. cDNA 마이크로어레이 실험

cDNA 마이크로어레이는 2,895개의 *L. pneumophila* (strain Philadelphia 1) 유전자들이 점적되어 있는 *Legionella* 칩을 자체 제작하여 사용하였다. 대조군과 실험군의 전체 RNA를 각각 2 μ g과 30 μ g을 사용하였고 역전사 과정을 통하여 3 μ g/ μ L random primers (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA), 200 units의 M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase (Intron, Korea), 25X aminoallyl-dNTP mix (Invitrogen), 0.1M DTT, 40 U/ μ L RNase inhibitor (Intron)와 전체 RNA를 42°C에서 3시간 동안 반응시켜서 cDNA를 합성하였다. 탐지자 표지(probe labeling)을 위하여 대조군과 실험군 cDNA는 각각 NHS-cy3, MHS-cy5 dye (GE Healthcare, UK)로 표지시키고 혼합한 후, YM-10 Microcon (Millipore, Billerica, USA)을 사용해 농축하여 준비하였다. 혼성화 전 반응으로 칩은 42°C에서 1시간 동안 5 X SSC, 10% SDS, 1% bovine serum albumin 혼합용액에서 반응시켰고, 이어서 형광을 띤 탐지자들은 50% formamide, 5X SSC, 0.1% SDS의 혼성화 용액으로 용해시킨 후 칩 위에 올려져 42°C에서 16-20시간 동안 혼성화 반응을 하였다. 다음 단계에서 칩은 42°C에서 low stringency wash buffer (1X SSC, 0.2% SDS)와 high stringency wash solution (0.1X SSC)로 세척 후 건조시키고, Axon GenePix 4000B 마이크로어레이 scanner (Molecular Devices, Canada)를 이용하여 스캔하였다.

4. 데이터 분석

마이크로어레이 스캐너를 이용하여 칩의 스캐닝은 TIFF 이미지로 변환되고 TIGR Spotfinder (TIGR, Rockville, MD, USA)를 통해 상대적인 발현 정도가 측정되었으며, TIGR MIDAS (Microarray Data Analysis System)와 MeV (Multiexperiment Viewer) 소프트웨어를 이용하여 분석하였다(www.tigr.org).

마이크로어레이 실험은 각 시료당 3회 반복하여 실시하였으며, 각 유전자 signal intensity의 log₂ ratio (Cy5/Cy3)가 1.0 이상인 유전자들을 상향 조절, -1.0 이하인 유전자들을 하향 조절되었다고 정의하였고, fold change는 2 log₂ ratio (Cy5/Cy3) 로 나타내었다.

5. 마이크로어레이 데이터의 검증

Microarray 데이터상의 유전자 발현을 검증하기 위하여 독립 유전자들 중에서 감염 후 4, 8, 24, 48시간에서 높게 발현한 유전자들 중 *fliP* 유전자를 선택하여 iQ SYBR Green SuperMix (Bio-Rad Lab, Hercules, CA, USA)를 사용하여 quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR)을 실시하였다. *fliP* 유전자 primer 서열은 Forward primer: 5'-TGCC(G/T)ATTAATATTTGATTGGTAGGC-3' 와 Reverse primer: 5'-TTGACCGTATTGCCAGG(G/C/T)TTGC-3' 을 사용하였다. 대조 유전자로 *L. pneumophila*의 5S rRNA 유전자를 사용하였으며, primer 서열은 Forward: 5'-TCCTGGCGACTATAGCGATT-3' 와 Reverse: 5'-ACCCTGGCGATGACCTACTTT-3'이었다. *fliP* 유전자의 계산된 threshold cycle (Ct)은 5S rRNA의 Ct에 의해 표준화하였으며, *fliP* gene의 fold change는 $\Delta\Delta Ct$ 방법을 이용하여 계산하였다(6).

6. 기관지폐포 세척액 수집과 quantitative real-time RT-PCR을

이용한 *fliP* 발현 확인

위에서 기술한 같은 방법으로, *Legionella* 균을 준비하여 A/J 마우스를 감염시킨 후, 24, 48, 72시간에 CO₂ 가스를 흡입시켜 희생시켰다. 폴리에틸렌 튜브(Jeungdo bio & plant Co., Korea)에 31 gauge의 1 mL insulin syringe (Becton Dickinson and Company, CA, USA)를 연결하여 마우스 기도내 삽관하였고, 1회당 0.7 mL의 1X PBS를 가하여 폐를 세척하여 마우스 당 총 3 mL 기관지폐포 세척액을 수집하였다(7). 세척액 시료 100 μ L를 취하여 BCYE- α 평판배지에 접종한 후 감염여부를 확인하였다. 나머지 시료에 RNeasy Protect™ Bacteria Reagent (QIAGEN)을 가하였고, RNeasy Mini Kit (QIAGEN)를 사용하여 전체 RNA를 추출한 후, 위에서 기술한 대로 5S rRNA와 *fliP* primer들을 사용하여 qRT-PCR을 시행하였다.

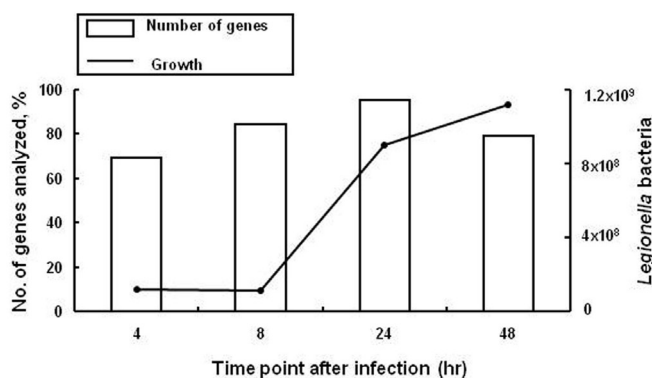


Figure 1. Growth kinetics of *Legionella pneumophila* strain in lung tissue of A/J mouse and the number of genes with measurable expression by cDNA microarray analysis according to the postinfection time points. Total number of *Legionella* bacteria recovered from the lung was expressed as colony-forming units (cfu/lung). Number of gene analyzed was expressed as percentage of total number of genes examined.

결과

1. 감염 후 시간 경과에 따른 A/J 마우스 폐 조직 내 *Legionella* 균의 성장 양상

A/J 마우스에 *L. pneumophila*를 비강 흡입을 통하여 감염시킨 후 폐 조직에서 분리되는 *Legionella* 균 수를 정량하였을 때 감염 후 4 시간과 8 시간에서 각각 1.19×10^8 cfu/lung와 1.1×10^8 cfu/lung로 분리되어 큰 차이가 없었으나, 감염 후 24 시간에서부터 9.0×10^8 cfu/lung로 급격히 성장이 증가하는 양상을 보였으며, 48 시간 시점에서 1.12×10^9 cfu/lung로 최고에 달하였다(Fig. 1).

2. 감염 후 시간 경과에 따른 A/J 마우스 폐 조직 내 *L. pneumophila* 유전자 발현 양상

L. pneumophila SG 1의 2,895개 유전자들 중 106개 유전자 발현이 감염 후 4, 8, 24, 48시간에서 공통적으로 상향 조절되었으며, 33개 유전자들은 하향 조절되었음을 확인하였다. 감염 후 시간대에 따라 분석이 가능하였던 유전자 수는 4시간에서 2,014개 (69.5%), 8시간에서 2,439개(84.2%), 24시간에서 2,755개(95.1%), 그리고 48시간에서 2,300개(79.4%)이었다. 감염 후 시간에 따라 분석된 유전자 수와 A/J 마우스 폐에서 분리된 *Legionella* 균 수를 비교하였을 때, 감염 후 24 시간에 발현되는 유전자수는 가장 많았으나, 폐에 존재하는 균 수와 상응하지 않았다(Fig. 1).

조사된 전체 332개 독력 유전자(virulence gene)들 중에서 분석이 가능하였던 유전자 수는 감염 후 8 시간에 90개, 24 시간에 87개, 48 시간에 86개이었고, 34개 유전자는 감염 후 모든 시간에 공통적으로 분석이 가능하였다(Fig. 2).

3. 마우스 감염 후 4, 8, 24, 48시간에서 지속적으로 높게 발현한 독력 유전자 분석

조사된 *L. pneumophila* SG1의 총 332개 독력 유전자들 중 17

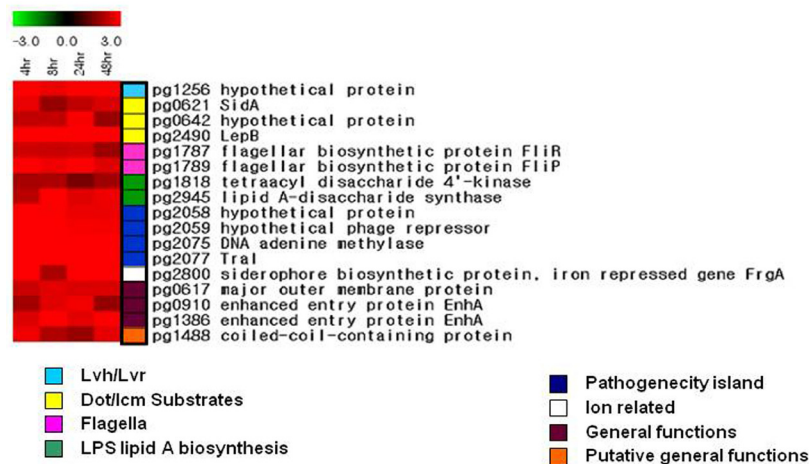


Figure 2. Venn diagram showing number of virulence genes of *Legionella pneumophila* serogroup 1 expressed at postinfection 8, 24, 48 hr time points. Each of the 90, 87, and 86 genes were analyzed using microarray at 8, 24, 48 hrs after infection, respectively. Thirty-four genes were analyzed at all 3 time points.

Table 1. The Highly Up-regulated Genes among the Virulence Genes at All Time Points after Infection of A/J Mice with *L. pneumophila* Serogroup 1

Gene	Description	4 hr p.i. [†]		8 hr p.i.		24 hr p.i.		48 hr p.i.	
		Mean*	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
lpg1256	hypothetical protein	3.71	1.09	2.73	2.06	3.76	1.85	2.99	2.14
lpg0621	SidA	2.70	0.99	1.78	0.67	2.25	0.79	2.55	0.14
lpg0642	hypothetical protein	2.27	0.40	2.29	0.92	2.88	2.53	1.80	0.81
lpg2490	LepB	4.51	-	5.02	0.66	4.55	0.98	4.36	0.94
lpg1787	flagellar biosynthetic protein FliR	2.40	0.22	2.35	0.48	2.43	1.60	1.87	0.37
lpg1789	flagellar biosynthetic protein FliP	3.32	0.32	2.78	1.15	3.17	1.10	2.59	1.06
lpg1818	tetraacyl disaccharide 4'-kinase	1.97	0.12	2.03	-	1.45	0.21	1.90	0.04
lpg2945	lipid A-disaccharide synthase	2.18	-	4.36	-	2.6	0.98	2.77	-
lpg2058	hypothetical protein	3.29	2.46	2.90	1.10	2.72	0.83	2.74	0.43
lpg2059	hypothetical phage repressor	4.06	0.43	3.14	1.45	2.86	0.74	2.84	0.44
lpg2075	DNA adenine methylase	3.88	1.43	4.45	0.88	4.17	0.23	3.75	1.00
lpg2077	TraI	3.44	1.89	4.91	0.76	3.69	1.98	2.99	1.80
lpg2800	siderophore biosynthetic protein, iron repressed gene FrgA	5.15	-	2.03	0.22	3.01	2.11	5.46	-
lpg0617	major outer protein EnhA	2.36	1.78	2.65	2.60	2.52	1.36	2.55	0.58
lpg0910	enhanced entry protein EnhA	1.92	0.48	2.63	0.23	2.79	0.91	1.77	1.63
lpg1386	enhanced entry protein EnhA	2.57	2.05	3.02	0.81	2.65	0.20	2.90	0.82
lpg1488	coiled-coil-containing protein	2.80	0.61	2.07	-	1.81	1.40	2.68	1.06

*Mean values represent mean log₂ ratios (*in vivo/in vitro*) calculated from three replicates, [†] p.i., postinfection

**Figure 3.** Expression profiles of the highly up-regulated virulence genes of *L. pneumophila* serogroup 1 at postinfection 4, 8, 24 and 48 hr time points by using TIGR-MeV software. A total of 17 virulence genes were up-regulated at all time points. Each of the proteins was categorized according to the square with certain color, which presents the function of the protein.

개 유전자가 감염 후 4, 8, 24, 48시간에서 지속적으로 높게 발현함을 확인하였다. 상향조절된 유전자들과 관련된 단백질들은 type IVA secretion system의 Lvh/Lvr (*Legionella* vir homologs/*Legionella* vir region)에 속하는 hypothetical protein lpg1256와 *L. pneumophila* Icm/Dot (Intracellular multiplication/Defective organelle trafficking) secretion system에서만 유일하게 확인되는 type IVB protein substrates SidA (8, 9), hypothetical protein lpg0642와 LepB, 그리고 flagella biosynthesis에 관련된 단백질 FliP와 FliR, 그 외 LPS lipid A biosynthesis에 관련된 tetraacyl disaccharide synthase와 lipid A-disaccharide synthase,

pathogenicity islands에 속하는 hypothetical protein lpg2058, hypothetical phage repressor, DNA adenine methylase, TraI, iron과 관련된 siderophore biosynthetic protein, 그리고 일반적인 기능을 가지는 major outer membrane protein, enhanced entry protein EnhA, coiled-coil-containing protein 등이 포함되었다(Fig. 3, Table 1). 마이크로어레이 분석 결과에서 상향 발현된 유전자들에 대한 검증은 flagella basal body 부분의 단백질 생성에 관여하는 *fliP* 유전자를 대표적으로 선택하여 qRT-PCR를 실시하였다. 마이크로어레이 결과 *fliP* 유전자는 4, 8, 24, 48시간에서 지속적으로 상향 발현하였으며, qRT-PCR 결과에서도 계산된 *fliP* 유전자의 fold change 값으로, 유

전자의 상향 발현을 확인하였다(Fig. 4).

4. 마우스 감염 후 4, 8, 24, 48시간에서 지속적으로 하향 조절된 독력 유전자 분석

조사된 *L. pneumophila* SG1의 총 332개 독력 유전자들 중에서 감염 후 4, 8, 24, 48시간에서 모두 하향 조절된 18개 유전자를 확인하였다. 이 유전자의 관련된 단백질에는 *L. pneumophila* SG1이 거의 유일하게 가지는 type IVB secretion system인 IcmR, IcmC, IcmD, IcmJ, DotA protein (10), flagellar basal body rod 형성에 관련된

FlgB, FlgD, LPS lipid A biosynthesis에 관련된 UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase, pathogenicity islands에 속하는 24 kDa macrophage-induced major protein, type IV pili assembly에 관련된 Tfp pilus assembly protein인 major type IV pilin class A, 그 외 일반적인 기능을 가지는 단백질인 hypothetical virulence protein, transmission trait enhancer LetE (11), 60K heat shock protein HtpB, stationary phase specific sigma factor RpoS, GTP binding elongation factor LepA, major outer membrane protein, 24 kDa macrophage-induced major protein들이 포함되었다(Fig. 5, Table 2).

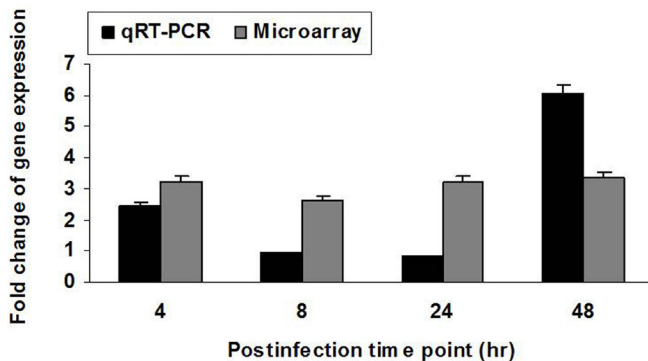


Figure 4. Validation of microarray results on the *fliP* expression. The *fliP* gene expression profiles of microarray analysis and a quantitative real-time RT-PCR assay at postinfection 4 time points were compared. Microarray data was considered to be valid if the fold change calculated by the qRT-PCR was in the same direction as determined by microarray results.

5. *Legionella*에 감염된 마우스 기관지폐포 세척액 시료에서 real-time RT-PCR을 이용하여 진단용 바이오마커 *fliP*의 타당성 검증

A/J 마우스 감염에서 지속적으로 높게 발현된 독력 유전자 중 *fliP* 유전자를 선정하여 *Legionella* 폐렴 동물 모델에서 진단용 바이오마커의 타당성을 다음과 같이 검증하였다. 즉, 감염 후 24, 48, 72시간에 수집한 기관지폐포 세척액 시료에서 *fliP* 유전자 발현을 qRT-PCR을 실시하여 확인하였다. 뿐만 아니라, *fliP* 유전자 발현 정도는 대조 유전자 5S rRNA를 사용하였을 때 얻은 Ct값과 *fliP* Ct값을 $\Delta\Delta Ct$ 값으로 계산하였을 때, 감염 후 24시간에 7.73, 48시간에 3.73, 그리고 72시간에 6.4 값을 나타내어, 72시간에 가장 높게 발현하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 결과적으로, *L. pneumophila fliP* 유전자는 감염된 호흡기 검체에서 qRT-PCR을 이용한 진단용 바이오마커로서 타당성을 검증하였다.

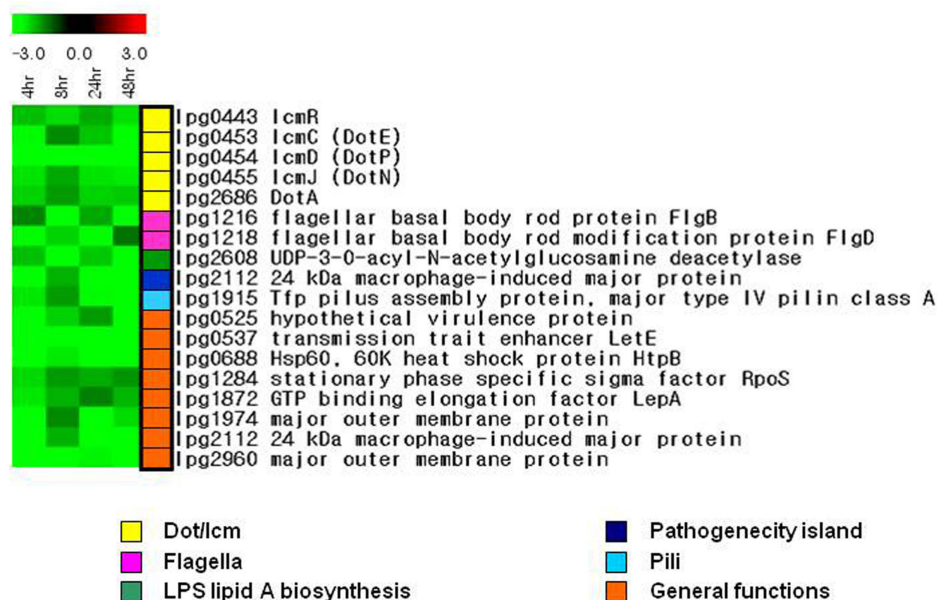


Figure 5. Expression profiles of the highly down-regulated virulence genes of *L. pneumophila* serogroup 1 at postinfection 4, 8, 24 and 48 h time points by using TIGR-MeV software. A total of 18 virulence genes were down-regulated at all time points. Each of the squares having colors represents was categorized according to the functions of proteins. Each of the proteins was categorized according to the square with certain color, which presents function of the protein.

Table 2. The Highly Down-regulated Genes among the Virulence Genes at All Time Points after the A/J Mice have been Infected with *L. pneumophila* Serogroup 1

Gene	Description	4 hr p.i. †		8 hr p.i.		24 hr p.i.		48 hr p.i.	
		Mean*	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
lpg0443	lcmR	-2.03	0.41	-2.28	1.49	-1.88	0.96	-2.31	2.10
lpg0453	lcmC (DotE)	-2.52	1.58	-1.62	1.13	-2.09	0.84	-3.08	2.40
lpg0454	lcmD (DotP)	-3.27	1.70	-3.67	1.45	-3.48	1.57	-4.38	1.22
lpg0455	lcmJ (DotN)	-2.34	0.99	-1.85	0.39	-2.33	1.57	-2.42	-
lpg2686	DotA	-2.19	0.87	-1.73	0.14	-2.20	0.12	-2.14	0.62
lpg1216	flagellar basal body rod protein FlgB	-1.56	0.36	-2.61	0.53	-1.85	1.41	-2.66	2.86
lpg1218	flagellar basal body rod modification protein FlgD	-2.55	0.07	-2.21	1.31	-2.71	1.38	-1.41	-
lpg2608	UDP-3-O-acetyl-N-acetylglucosamine deacetylase	-2.05	1.06	-3.02	0.95	-2.11	1.05	-3.13	2.10
lpg2112	24kDa macrophage-induced major protein	-2.91	0.90	-1.94	0.67	-2.61	1.20	-3.83	3.10
lpg1915	Tfp pilus assembly protein, major type IV pilin class A	-2.37	0.93	-1.76	0.86	-2.53	1.27	-3.04	0.71
lpg0525	hypothetical virulence protein	-2.59	0.14	-2.19	0.89	-1.76	1.20	-2.64	1.21
lpg0537	transmission trait enhancer LetE	-2.59	1.81	-2.69	1.76	-3.81	1.82	-3.34	2.29
lpg0688	Hsp60, 60 K heat shock protein HtpB	-4.97	2.58	-2.39	-	-3.97	1.34	-4.65	1.83
lpg1284	stationary phase specific sigma factor RpoS	-2.24	1.31	-1.73	0.23	-1.89	0.60	-1.69	0.67
lpg1872	GTP binding elongation factor LepA	-2.36	0.93	-1.94	1.18	-1.53	0.84	-1.96	2.26
lpg1974	major outer membrane protein	-3.63	2.11	-1.59	0.73	-3.04	1.15	-2.26	0.91
lpg2112	24kDa macrophage-induced major protein	-2.91	1.90	-1.94	0.67	-2.61	1.20	-3.83	3.10
lpg2960	major outer membrane protein	-2.99	2.50	-2.80	0.58	-2.46	1.19	-3.57	2.58

*Mean values represent mean log₂ ratios (*in vivo/in vitro*) calculated from three replicates, † p.i., postinfection

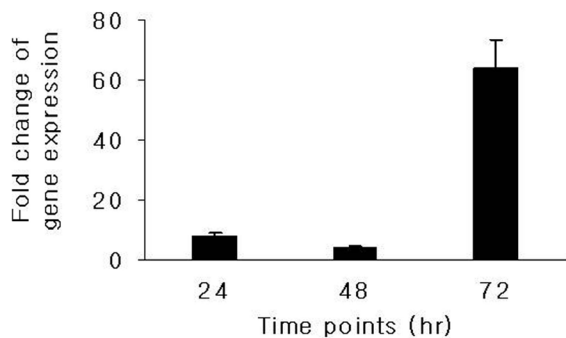


Figure 6. Gene expression of the *flpP* gene in BAL fluids collected from A/J mice at 24, 48, 72 hr after infection with *Legionella pneumophila* serogroup 1. Bars represent $2^{-\Delta\Delta Ct}$ values of the *flpP* in BAL fluids at each postinfection time point and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ct value using $\Delta\Delta Ct$ confers the level of the *flpP* gene expression. The fold change was the highest value at postinfection 72 hr time point.

고찰

병원체가 감염병을 유발하는 능력을 병원성(pathogenicity)이라고 하며, 균의 독력은 병원성의 양적인 정도를 나타내고, 균의 독력 인자는 숙주 내에서 미생물 자체의 생존을 가능하게 하고, 질병을 유발하는 잠재력을 증가시킨다. 독력 인자는 일반적으로 세균의 독소, 숙주 세포 표면에 부착하도록 매개하는 표면 단백질, 표면 탄수화물 성분과 세균을 보호하는 단백질 그리고, 세균의 병독성에 기여하는 가수분해 효소들을 포함하므로, 이러한 독력 유전자들은 감염병에 걸린 환자의 상태에 대한 지표가 될 수 있다(12, 13).

본 연구는 *Legionella* 폐렴의 진단용 바이오마커 발굴을 위한 전략으로 *L. pneumophila* Philadelphia 1 유전체 정보를 근거로 하여 총

2,895개 유전자의 마이크로레이 분석을 통하여 발현 양상을 분석하였다. A/J 마우스를 *L. pneumophila* Philadelphia 1로 감염시켰을 때, 감염 후 4, 8, 24, 48시간에서 지속적으로 높게 발현된 유전자들은 총 106개이었고, 독력 인자들과 관련된 유전자의 발현양상의 분석에 초점을 맞추었다.

총 332개의 독력 유전자 중에서 마우스 감염 후 4, 8, 24, 48시간 모두에서 지속적으로 유전자 발현이 상향 조절되는 유전자와 하향 조절되는 유전자는 각각 17개와 18개이었다. 감염 후 48시간까지 지속적으로 상향 조절된 유전자 17개의 발현 정도는 log₂ ratio로 나타내었을 때 1.45~5.46를 보였으며, 이들을 진단용 바이오마커 개발을 위한 후보 유전자로 선정하였다. *Legionella* 균은 인체 감염 후 폐포 식균세포 내에서 사멸되지 않고 지속적으로 증식하여 감염된 세포를 파괴하고, 주변 세포를 감염시키면서 24~48시간 내에 폐렴을 유발할 수 있으므로(8) 감염 후 시간 경과에 따른 유전자 발현양상을 분석하는 time course experiment를 이용한 접근은 중요하다. 따라서, 본 연구에서 감염 후 4개의 시간대에서 모두 분석이 가능하면서 지속적으로 높게 발현된 유전자들을 선정하였다.

본 연구에서 확인된 *Legionella*의 독력인자와 관련된 단백질 중에서 *L. pneumophila*에서만 유일하게 확인되며, viability에 필수적인 type IVB protein secretion system의 type IVB protein substrates (14), 세포 내 증식 후 *Legionella*의 방출과 관련된 LepB, 그리고 중요한 독력인자로서 *Legionella*의 운동성을 위한 flagella biosynthesis에 관련된 Flp 단백질 등과 관련된 유전자들이 가장 높게 발현하는 것으로 확인하였다. 한편, 생체 내 감염 후 지속적으로 하향 조절을 보이는 총 18개의 유전자와 관련된 단백질에는 세포 내 증식에 필요한 IcmD, flagellin 유전자인 *fliC*의 발현을 증가시킴으로 *Legionella*의 운동성을 촉진시키는 transmission trait enhancer LetE, 60K heat shock protein인 HtpB, 폐포 대식세포(alveolar macrophage

의 receptor)를 통해 *Legionella*의 uptake를 매개하는 major outer membrane protein 등이 포함되었다. 이는 특정 구조 혹은 기능과 관련된 독력 유전자의 발현 양상이 시간에 따라 다양하게 상향 혹은 하향 조절되고 있음을 제시하는 것이며, 결과적으로 지속적으로 높게 상향 발현하는 유전자들을 진단용 바이오마커 후보 유전자로서 선정하는 전략을 지지할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 *Legionella*의 성장과 운동성에 관련된 17개의 진단용 biomarker 후보 유전자들 중에서 *fliP* 유전자를 선정하였으며, qRT-PCR을 이용하여 *Legionella* 폐렴의 마우스 모델에서 얻은 기관지폐포 세척액 검체에서 감염 후 24, 48, 72시간에서 *fliP* 유전자가 상향 발현함을 성공적으로 확인하였으며, 이는 감염된 마우스 폐조직에서 관찰된 조건과 합당함을 확인하였고, 결과적으로 *fliP* 유전자를 *Legionella* 폐렴의 진단용 biomarker로 개발할 수 있었다.

한편, 본 연구에서 3회의 반복실험을 실시한 경우에도 각 시간대 별로 분석이 가능한 유전자 수는 매우 제한적이었는데 향후 분석이 가능한 유전자 수를 보다 많이 확보하기 위해서는 마우스 폐조직으로부터 *Legionella* 균의 RNA를 보다 효율적으로 얻을 수 있는 다양한 전략이 필요할 것이다. 그러나, 본 연구에서 관찰한 바와 같이 A/J 마우스 감염 후 시간 경과에 따른 마우스 폐 조직의 *Legionella* 집락수 변화와 마이크로어레이 실험에서 분석이 가능한 유전자 수들이 서로 상응하지 않았다.

결론적으로, 본 연구는 유전체 마이크로어레이 기법을 적용하여 *L. pneumophila* 폐렴의 진단용 바이오마커로서 *fliP* 유전자를 성공적으로 발굴하였으며, 동물 감염모델을 이용한 호흡기 검체를 통하여 검증하였다. 향후, *L. pneumophila*의 여러 serogroup들과 non-pneumophila *Legionella* species들에서 *fliP* 유전자가 공통적으로 분포하는 지 확인이 필요하며, *Legionella* 균 이외 세균들의 *fliP* 유전자들에 대한 조사를 통하여 특이성을 검토하는 것이 요구된다. 또한 전향적인 임상연구를 통하여 유용성을 확인하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 국제과학기술협력재단(KICOS : Korea Foundation for International Cooperation of Science & Technology)의 재정 지원을 받아 수행하였음.

References

- Diederer BM. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. J Infect 56:1-12, 2008
- Steinert M, Heuner K, Buchrieser C, Albert-Weissenberger C, Glöckner G. *Legionella* pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. Int J Med Microbiol 297:577-87, 2007
- Logan J, Edwards K, Saunders N. Real-time PCR: current technology and applications. 1st ed. P176, London, Caister Academic Press, 2009
- Ilyin SE, Belkowski SM, Plata-Salamán CR. Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. Trends Biotechnol 22:411-6, 2004
- Brieland J, Freeman P, Kunkel R, Chrisp C, Hurley M, Fantone J, Engleberg C. Replicative *Legionella pneumophila* lung infection in intratracheally inoculated A/J mice. A murine model of human Legionnaires' disease. Am J Pathol 145:1537-46, 1994
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). Methods 25(4):402-8, 2001
- Aoki S, Hirakata Y, Miyazaki Y, Izumikawa K, Yanagihara K, Tomono K, Yamada Y, Tashiro T, Kohno S, Kamihira S. Detection of *Legionella* DNA by PCR of whole-blood samples in a mouse model. J Med Microbiol 52:325-9, 2003
- Brüggemann H, Cazalet C, Buchrieser C. Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. Curr Opin Microbiol 9:86-94, 2006
- Segal G, Feldman M, Zusman T. The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. FEMS Microbiol 29:65-81, 2005
- De Buck E, Anné J, Lammertyn E. The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. Microbiology 153:3948-53, 2007
- Bachman MA, Swanson MS. The LetE protein enhances expression of multiple LetA/LetS-dependent transmission traits by *Legionella pneumophila*. Infect Immun 72:3284-93, 2004
- Brassinga AK, Hiltz MF, Sisson GR, Morash MG, Hill N, Garduno E, Edelstein PH, Garduno RA, Hoffman PS. A 65-kilobase pathogenicity island is unique to Philadelphia-1 strains of *Legionella pneumophila*. J Bacteriol 185:4630-7, 2003
- Brüggemann H, Hagman A, Jules M, Sismeiro O, Dillies MA, Gouyette C, Kunst F, Steinert M, Heuner K, Coppée JY, Buchrieser C. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. Cell Microbiol 8:1228-40, 2006
- Shin S, Roy CR. Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. Cell Microbiol 10:1209-20, 2008