



저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학석사 학위논문

Mycobacterium massiliense hsp65
유전자형의 Glycopeptidolipid 성분
차이에 기반한 선천성 면역 반응
기전 연구

2013 년 2 월

서울대학교 대학원
의학과 미생물학전공
이 수 연

의학석사 학위논문

Mycobacterium massiliense hsp65
유전자형의 Glycopeptidolipid 성분
차이에 기반한 선천성 면역 반응
기전 연구

2013 년 2 월

서울대학교 대학원
의학과 미생물학전공
이 수 연

A thesis of the Master's degree

**Comparison of Innate Immune Response
based on the Glycopeptidolipid between
2 *hsp65* Genotypes within
*Mycobacterium massiliense***

February, 2013

The Department of Microbiology and Immunology
Seoul National University
College of Medicine
Yi Su-Yeon

Mycobacterium massiliense hsp65

유전자형의 **Glycopeptidolipid** 성분
차이에 기반한 선천성 면역 반응
기전 연구

지도교수 황 응 수

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함
2012 년 10 월

서울대학교 대학원
의학과 미생물학전공
이 수 연

이수연의 석사 학위논문을 인준함
2012 년 12 월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

**Comparison of Innate Immune Response
based on the Glycopeptidolipid between
2 *hsp65* Genotypes within
*Mycobacterium massiliense***

by Su-Yeon Yi
(Supervised by Prof. Eung-Soo Hwang)

A thesis submitted to the Department of Medicine in partial
fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science
in Medicine (Microbiology and Immunology) at Seoul National
University College of Medicine

December, 2012

Approved by Thesis Committee

Professor _____ Chairman

Professor _____ Vice Chairman

Professor _____

학위논문 원문제공 서비스에 대한 동의서

본인의 학위논문에 대하여 서울대학교가 아래와 같이 학위논문 저작물을 제공하는 것에 동의합니다.

1. 동의사항

- ① 본인의 논문을 보존이나 인터넷 등을 통한 온라인 서비스 목적으로 복제할 경우 저작물의 내용을 변경하지 않는 범위 내에서의 복제를 허용합니다.
- ② 본인의 논문을 디지털화하여 인터넷 등 정보통신망을 통한 논문의 일부 또는 전부의 복제·배포 및 전송 시 무료로 제공하는 것에 동의합니다.

2. 개인(저작자)의 의무

본 논문의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락하는 등 동의 내용을 변경하고자 할 때는 소속대학(원)에 공개의 유보 또는 해지를 즉시 통보하겠습니다.

3. 서울대학교의 의무

- ① 서울대학교는 본 논문을 외부에 제공할 경우 저작권 보호장치(DRM)를 사용하여야 합니다.
- ② 서울대학교는 본 논문에 대한 공개의 유보나 해지 신청 시 즉시 처리해야 합니다.

논문제목 : *Mycobacterium massiliense hsp65* 유전자형의 Glycopeptidolipid 성분 차이에 기반한 선천성 면역 반응 기전 연구

학위구분 : 석사 · 박사

학 과 : 의학과

학 번 : 2011-21895

연 락 처 : gotosejyuro@gmail.com

저 작 자 : 이 수 연 (인)

제 출 일 : 2013 년 2 월 6일

서울대학교총장 귀하

초 록

미코박테리움 속 균종은 임상적으로 다양한 질병을 일으키는 병원성균으로 토양과 물 등의 주변환경에 흔히 존재하는 것으로 알려져 있다. 이들은 병원성 정도에 따라 절대병원성균인 결핵균과 기회감염성균인 비결핵항산성균 (이하 NTM) 으로 구분할 수 있는데 최근 NTM에 의한 감염 보고가 증가하고 있는 추세이다. NTM은 폐기도에 집락을 형성하는 특성을 가졌고, 이는 균막 형성이 동반되면서 더욱 가속화되는 경향을 띄어 낭포성 섬유증과 같은 폐의 구조적 이상을 유발한다. 많은 종류의 NTM 중에서 *Mycobacterium abscessus*는 가장 병원성이 강하고 대부분의 폐 감염 질환의 원인균으로 알려져 있다. 특히 국내 환자로부터 분리된 신속발육 NTM의 분자역학적 연구 결과 *M. abscessus*와 *Mycobacterium massiliense*가 가장 큰 비중을 차지함이 밝혀졌다. 하지만 *M. abscessus*와 가깝게 연관된 균종으로 최근에 명명된 *M. massiliense*에 대한 연구는 부족한 실정이다. 이에 본 연구에서는 *M. massiliense*의 임상분리주들을 대상으로 이 균종의 유전적 다양성과 선천성 면역반응을 설명하고자 하였다.

첫째로 *M. massiliense* 균주 간 유전적 다양성을 밝혀내기 위해 서울 아산병원으로부터 제공받은 149개의 임상분리주들의 heat-shock protein 65kDa (이하 *hsp65*) 유전자 절편을 표적으로 하는 직접염기서열 분석방법을 이용하여 계통분류학적 연구를 수행하였다. 그 결과, 국내 분리 *M. massiliense*는 각각 86주 (56.95%), 63주 (41.72%)의 서로 다른 2 개의 유전자형인 Type I 과 Type II 로 구별되었다. 또한 *hsp65* 분석법에 의해 구분되는 유전자형은 집락의 형태학적 특성과 강하게 연관되어있음을 확인할 수 있었다. 일부의 예외 [Type I 평활집락 vs. Type I 거친집락; 61/86균주 (70.9%) vs. 25/86균주 (29.1%)] 를 제외하고선 Type I 과 Type II 는 각기 활면형과 거친형의 집락을 나타내었다.

또한 박층 크로마토그래피를 수행한 결과 두 가지 유전자형은 완전히 다른 지질성분의 구성 비율을 보여줬다. 따라서 지질성분 비율의 차이가 두 유전자형을 구분할 수 있는 기준이 될 것이라는 가정하에 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight를 이용해 두 유전자형이 갖는 지질성분들의 가스질량을 측정하였다. 그 결과 *M. massiliense*의 GPL 성분함량이 높을 때 집락이 평활 표현형을 가짐을 확인하였고 이는 숙주의 면역반응을 피하는 특이적 방어기전을 획득할 수 있을 것으로 추측할 수 있었다.

이에 미코박테리아에 반응하는 proinflammatory mediator인 TNF- α 의 방출량과 사람 단핵세포로부터 TNF- α 의 방출을 특이적으로 유도하는 TLR2의 작동, 마지막으로 TLR들의 참여로 유발되는 미코박테리아의 ERK 경로의 활성도를 확인하였다. 그 결과 Type I 보다 TNF- α 와 같은 시토카인의 방출이 많았던 Type II는 TLR2에 의해 선택적으로 억제되었고, ERK 경로가 상대적으로 더욱 인산화되는 경향을 보였다.

결론적으로 본 논문에서는 *M. massiliense*의 2 개의 *hsp65* 유전자형은 지질성분의 차이와 집락의 표현형 모두에서 서로 구분될 수 있다는 것을 확인하였다. 또한 국내 특이적인 유전형으로 사료되는 *M. massiliense* Type II 유전형은 (거친 집락형태) 세포벽의 가장 바깥층에 존재하는 GPL이 Type I 보다 적은 양으로 존재하여 숙주의 선천성 면역반응을 상대적으로 높은 정도로 자극하는 것으로 사료된다.

주요어 : 미코박테리아, *Mycobacterium massiliense*, *hsp65*, glycopeptidolipid

학 번 : 2011-21895

LIST OF ABBREBATION AND SYMBOL

ADC : Albumin-Dextrose-Catalase
AMC : ASAN Medical Center
ATCC : American Type Culture Collection
CFU : Colony Forming Unit
ERK : Extracellular-signal-related kinase
FBS : Fetal Bovin Serum
GPL : Glycopeptidolipid
hsp65 : Heat-Shock Protein 65kDa
ISOP : Isopropanol
LPS : Lipopolysaccharide
MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
MAP kinase : Mitogen-Activated Protein kinase
NTM : Non-Tuberculosis Mycobacteria
OADC : Oleate-Albumin-Dextrose-Catalase
PBS : Phosphate Buffer Saline
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR : Polymerase Chain Reaction
p-ERK : Phosphorylated Extracellular-signal-related kinase
PRA : PCR-Restriction Analysis
RGM : Rapidly Growing Mycobacteria
rpoB : RNA polymerase β subunit
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SGM : Slowly Growing Mycobacteria
TLC : Thin Layer Chromatography
TLR : Toll-Like Receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha

목 차

| | |
|--|-----|
| 초록 | i |
| List of Abbrevation and Symbol | iii |
| 목차 | iv |
| List of Table | vi |
| List of Figure | vii |
| I. 서론 | 1 |
| II. 연구재료 및 방법 | 6 |
| 2.1 미코박테리아 균주 | 6 |
| 2.2 세포주와 배양 | 6 |
| 2.3 DNA 추출과 PCR | 7 |
| 2.4 <i>hsp65</i> 유전자를 표적으로 하는 <i>HinfI</i> PCR restriction fragment length polymorphism analysis | 8 |
| 2.5 염기서열분석 | 9 |
| 2.6 지질추출과 TLC 분석 | 9 |
| 2.7 <i>M. massiliense</i> 로부터 표면 GPL 성분의 제거 ... | 10 |

| | |
|---|----|
| 2.8 MALDI-TOF 질량분광분석 | 11 |
| 2.9 ELISA를 이용한 TNF- α 활성도 측정 | 11 |
| 2.10 ERK assay | 12 |
| | |
| III. 연구 결과 | 13 |
| 3.1 PCR과 직접 염기서열분석에 의한 <i>M. massiliense</i> 의 동정결과와 <i>hsp65</i> 유전자형과 집락 표현형과의 관계 | 13 |
| 3.2 <i>Hinf</i> I PRA에 의해 구분되는 <i>M. massiliense</i> 의 2가지 <i>hsp65</i> 유전자형 간의 차이 | 19 |
| 3.3 TLC를 통해 확인한 <i>M. massiliense</i> 의 2가지 <i>hsp65</i> 유전자형 간 지질성분 차이 | 23 |
| 3.4 MALDI-TOF를 통해 확인한 <i>M. massiliense</i> 의 2가지 <i>hsp65</i> 유전자형 간 GPL성분의 차이 | 26 |
| 3.5 <i>M. massiliense</i> 의 2가지 <i>hsp65</i> 유전자형 간 TNF- α 방출과 TLR2의 자극정도 차이 | 29 |
| 3.6 ERK의 인산화를 통해 확인한 <i>M. massiliense</i> 의 2가지 <i>hsp65</i> 유전자형의 신호전달 활성 차이 | 33 |
| | |
| IV. 고찰 | 38 |
| | |
| V. 결론 | 41 |
| | |
| 참고문헌 | 42 |
| | |
| Abstract | 51 |

LIST OF TABLE

Table 1. Classification of 275 *M. abscessus* related Korean strains into species or genotype level by sequence analysis based on the partial *hsp65* gene sequence (603 bp). 15

Table 2. The frequency of the two *hsp65* genotypes (Type I and Type II) determined by *hsp65* sequence analysis and *Hinf* I PRA methods, and the two colony morphotypes (rough and smooth) among 149 *M. massiliense* clinical strains. 20

LIST OF FIGURE

Figure 1. Sequence polymorphisms between the 3 *hsp65* sequevars of *M. massiliense* Type I, Type II-1, and Type II-2. Type I strains have the same sequence as the *M. massiliense* type strain; however, Type II-1 and Type II-2 strains differed from the *M. massiliense* type strain by 2-bp (T261A and C531A) and 1-bp (T261A), respectively. The nucleotide numbers correspond to those from the complete sequence of the *hsp65* gene of *M. abscessus* ATCC 19977 (GenBank no. EF486338.1). 16

Figure 2. Phylogenetic trees based on the *hsp65* gene (603 bp) sequences from *M. massiliense* clinical isolates, *M. massiliense* CIP 108297^T, *M. bolletii* CIP 108541^T, *M. chelonae* ATCC 19237, and *M. abscessus* ATCC 19977. These trees were constructed using the neighbor-joining method. The bootstrap values were calculated from 1,000 replications. Bootstrap values of <50% are not shown. The bars indicate numbers of substitutions per nucleotide position. 17

Figure 3. Colony morphology (right panel) and the growth patterns on 7H9 broth medium (left panel) of (A) *M. massiliense* CIP 108297^T (B) *M. massiliense* Type I (51843), and (C) *M. massiliense* Type II strain (50594). 18

Figure 4. Identification of *M. massiliense* Type I and Type II strains by *hsp65* PRA (*Hinf* I) method. (A) *Hinf* I PRA algorithm for differentiating of *M. massiliense* Type I and Type II strains. (B) Agarose gel electrophoresis after *Hinf* I PRA. Lanes: M, 100-bp ladder; 1, *M. abscessus* (uncut); 2, *M.*

abscessus (*Hinf* I cut); 3, *M. bolletii* (*Hinf* I cut); 4, *M. chelonae* (*Hinf* I cut); 5, *M. fortuitum* (*Hinf* I cut); 6, *M. massiliense* (*Hinf* I cut); 7, 51843 (Type I, uncut); 8, 51843 (Type I, *Hinf* I cut); 9, 52444 (Type I, *Hinf* I cut); 10, 50375 (Type I, *Hinf* I cut); 11, 56631 (Type I, *Hinf* I cut); 12, 50594 (Type II, uncut); 13, 50594 (Type II, *Hinf* I cut); 14, 52693 (Type II, *Hinf* I cut); 15, 53410 (Type II, *Hinf* I cut); 16, 55461 (Type II, *Hinf* I cut). 21

Figure 5. Comparison of lipids profiles between two genotypes of *M. massiliense*. (A) Equal weights of total lipid extracts from *M. massiliense* Type I (51843) and II (50594). (B) Equal weights of GPL extracts from *M. massiliense* Type I (51843) and II (50594). (C) Equal weights of total lipid extracts from isopropanol-stripped, PBS-stripped cell wall lipid of *M. massiliense* Type I (51843) and II (50594). TDM, trehalose dimycolate; PIM, phosphatidyl-*myo*-inositol mannoside; DG, diglycosylated GPL; TG, triglycosylated GPL. 24

Figure 6. MALDI-TOF MS analysis of extracted GPLs from (A) *M. massiliense* Type I (51843), (B) *M. masseilinese* Type II (50594). (C) *M. massiliense* Type I (51843) that had been treated with isopropanol (ISOP). DG, diglycosylated GPLs; TG, triglycosylated GPLs. 27

Figure 7. TNF- α response *M. massiliense* variants and involvement of TLR2. Data represent the means of two experiments done in duplicate \pm SEM. (A) PBMC were infected with *M. massiliense* Type I (51843), Type II (50594). Culture supernatants were collected at various intervals after addition of bacteria and assayed by ELISA for TNF- α . *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$ for Type I vs Type II. (B) PBMC were infected with *M. massiliense* GPLs from Type I (51843), II (50594). *, $p < 0.05$, ***,

p<0.001 comparing Type I and Type II. (C) PBMC were preincubated with Ab to TLR2 or isotype control Ab or no treats. And then challenged with *M. massiliense* Type I (51843), II (50594). Culture supernatants were collected at 2h after addition of bacteria and assayed by ELISA for TNF- α . *, p<0.05 compared with No treat and anti-TLR2 Ab, anti-TLR4 Ab. (D) PBMC were preincubated with Ab to TLR2 or isotype control Ab or no treats. And then challenged with *M. massiliense* GPLs from Type I (51843), II (50594). *, p<0.05 for No treat compared with anti-TLR2 Ab and anti-TLR4 Ab. (E) PBMC were infected with heat-killed *M. massiliense* Type I (51843) that had been treated (PBS) or treated with isopropanol (ISOP). ***, p<0.001 comparing Type I to Type II and Type (ISOP) and Type I (PBS). 31

Figure 8. *M. massiliense* isolates induce ERK activation *in vitro*. Relative densities of p-ERK bands were analyzed by densitometry. Data represent the means of five experiments done in triplicate \pm SEM. (A) Immunoblot analysis of ERK phosphorylation (p-ERK) performed on J774 macrophages in presence of *M. massiliense* Type I (51843), Type II (50594) or no treats for 10min, 30min and 2hr. *, p<0.05 comparing no treats to Type I and Type II. (B) J774 macrophages in presence of *M. massiliense* GPLs from Type I (51843), II (50594) or no treats. *, p<0.05, ***, p<0.001 for Type I and Type II vs no treats. (C) J774 macrophage were preincubated with Ab to TLR2 or isotype control Ab or no treats. And then challenged with *M. massiliense* Type I (51843), Type II (50594) for 30min. ***, p<0.001 compared with No treat and anti-TLR2 Ab, anti-TLR4 Ab. (D) J774 macrophage were preincubated with Ab to TLR2 or no treats. And then challenged with *M. massiliense* GPLs from Type I (51843), Type II (50594) for 2h. ***, p<0.001 for No treat compared with anti-TLR2 Ab and anti-TLR4 Ab. (E) J774 macrophage were infected with

heat-killed *M. massiliense* Type I (51843), Type II (50594) that had been treated (PBS) or treated with isopropanol (ISOP). *, p<0.05, **, p<0.01 comparing treated with ISOP to treated with PBS. 35

I. 서론

결핵은 여러 종류의 미코박테리움에 감염되어 발병하는 흔하지만 치명적인 전신 감염증이다. 이 질환은 폐에 잘 발생하지만 혈류나 임파관을 따라 몸의 어느 기관에나 전파되어 영향을 미칠 수 있기에 매우 위험하다. 현재 전 세계 인구의 1/3이 결핵에 감염되어 있고 2010년을 기준으로 추정한 바에 따르면 연간 약 880만 명의 환자가 새로 발생하고, 약 110만 명이 결핵으로 사망하는 것으로 보고되었다 (WHO 2011).

이들 환자 대부분이 사회경제적으로 어려운 환경에 있는 후진국에 몰려 있기 때문에 결핵은 대표적인 후진국 병으로 인식되고 있다. 국내의 경우 보건의료수준의 향상과 사회경제적 발전으로 인해 결핵환자 수가 많이 줄어들기는 했지만, 여전히 전체 국민의 1/3이 결핵균에 감염되어 있는 것으로 추정된다. 2011년 한 해 동안 새로 발견되어 보고된 결핵환자 수는 39,557명, 2010년 결핵으로 인한 사망자 수는 2,365명이다 (통계청 2010). 또한 국내 결핵 발생률과 사망률은 OECD 가입국 중 가장 높은 수준을 보이고 있다. 따라서 대한민국은 아직도 결핵이 심각한 상황이므로, 이 질병의 퇴치를 위한 관리 방안과 투자에 각별한 관심을 가져야 한다.

이러한 결핵의 원인이 되는 병원체는 결핵균군 (*Mycobacterium tuberculosis* complex)이다. 이 중 주된 원인균인 결핵균 (*M. tuberculosis*)과 나균 (*M. leprae*)에 해당하는 절대병원성균을 제외하고도 약 150여개에 이르는 균종이 있는데, 이들은 통칭 비결핵항산균 (이하 NTM) 으로 불리고 있다. 이러한 NTM은 대부분 병원성이 없거나 또는 기회감염균이라고 알려져 있지만, 도리어 결핵이 감소하면서 임상적으로 문제가 되고 있는 실정이다. NTM은 토양과 물 등의 생활환경에 널리 분포하고 있고 임상가검물로부터 분리되어도 병원성 여부를 판단하기 힘들어 진단이 쉽지 않다. 또한 대부분

면역저하 환자나 노약자에서 병을 일으키며 재발율도 높은 것으로 알려져 있다. 국내의 경우 *M. avium* complex 가 가장 흔한 감염 원인균이며, *M. fortuitum*과 *M. abscessus*도 임상적으로 중요한 NTM으로 보고되고 있다 (Jeon, Koh et al. 2005), (Koh, Kwon et al. 2005), (Koh, Kwon et al. 2006).

NTM은 성장 속도에 따라 지연 발육 항산균 (이하 SGM)과 신속 발육 항산균 (이하 RGM)으로 분류된다. SGM은 배지에서 집락이 형성되는 기간이 일주일에서 수 주가 걸리는 반면 RGM은 3-7일 내에 집락을 형성한다 (Thomas, Herrera-Rimann et al. 2006). RGM은 *M. fortuitum*군, *M. chelonae*-*M. abscessus*군, *M. smegmatis*군으로 분류되며, 이들에 의한 호흡기 감염과 파종성 감염이 낭포성 섬유증 환자나 면역력이 저하된 상태의 환자에서 주로 나타나는 반면 (Sermet-Gaudelus, Le Bourgeois et al. 2003), (Oh, Ko et al. 2005) 상처나 주사 등에 의한 연부 조직 감염은 면역력이 정상인 사람에게서도 나타나며 공공 시설에서의 집단 감염도 보고되고 있어 문제가 되고 있다 (Dytoc, Honish et al. 2005), (Brantley, Readinger et al. 2006). 국내에서도 RGM의 감염 사례가 자주 보고되고 있으며 (Lee, Kim et al. 2000), (Song, Sohn et al. 2006) 그 중 가장 높은 비율을 차지하는 균은 *M. chelonae*-*M. abscessus*군에 속하는 *M. abscessus*이다 (Jeon, Koh et al. 2005), (Koh, Kwon et al. 2005), (Koh, Kwon et al. 2006).

*M. abscessus*는 *M. chelonae*의 아종으로 분류되다가 1992년에 Kusunoki와 Ezaki에 의해 새로운 균종으로 분류되었고 (Kusunoki and Ezaki 1992), 최근에는 환자로부터 분리된 *M. abscessus*와 유사한 균이 Adékambi 연구팀에 의해 새로운 균종인 *M. massiliense*로 분류되었다 (Adékambi, Reynaud-Gaubert et al. 2004). 다좌위 염기서열분석을 이용한 최근의 연구들을 살펴보면 *M. abscessus*에 비해 가깝게 연관된 *M. massiliense*가 더욱 다양한 유전성 이질성을 갖는 균들로 구성되어있다고 밝혀졌다 (Zelazny, Root et al. 2009). 또한 heat-shock protein 65kDa (이하 *hsp65*) 를 이용한 염기서열분석을 수행했을 때

국내의 경우 *M. abscessus*보다 *M. massiliense*가 더욱 우세하게 존재한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 역학적 양상은 *M. massiliense*의 대한민국 특이적 균종이 존재한다는 가능성을 보여줬기에 이들에 관련된 연구의 필요성이 증가된 상태다 (Kim, Kook et al. 2008).

이러한 NTM들의 대표적 특징은 침습성 폐 질환이 발병하기 전 폐 기도에 발생하는 균의 집락화이다 (Griffith, Aksamit et al. 2007). 만성 폐쇄성 폐질환과 낭포성 섬유증과 같은 기관지 확장증의 원인에 균의 집락화가 질병으로 인한 사망률에 큰 기여를 하고 있다. 이러한 균의 집락화는 균막 형성에 의해 촉진된다 (Singh, Schaefer et al. 2000). 특히 *M. massiliense*를 포함하는 NTM에서 glycopeptidolipid (이하 GPL) 는 세포막의 가장 바깥층에서 균막 형성에 중요한 역할을 한다 (Howard, Rhoades et al. 2006), (Recht and Kolter 2001). GPL은 평활 집락 형성능을 가져 이들의 발현양상에 따라 평활 또는 거친 표현형으로 갈리게 된다 (Fregnan and Smith 1962), (Eckstein, Inamine et al. 2000). GPL이 다량 발현되는 평활 표현형은 균막을 형성하는 능력과 폐 기도 표면에 균들이 집락을 형성하게 하는 능력을 갖지만 대식세포 내에서 증식하거나 만성 감염에는 큰 기여를 하지 못한다. 반면 거친 표현형은 GPL이 적어 반대의 경향을 갖는다 (Howard, Rhoades et al. 2006).

또한 병원균이 폐 기도에 균막과 집락을 형성하기 위해선 숙주의 방어 기전이 반드시 약화되어있어야 한다. 폐의 방어 기전 중 하나는 점액섬모청소로 이것이 약화되었을 시 *M. massiliense*와 같이 균막 형성능을 갖는 병원균에 의해 폐 감염에 걸리기 쉬운 상태가 되어 낭포성 섬유증이나 원발섬모운동이상증과 같은 질병에 걸리게 된다 (Gibson, Burns et al. 2003), (Noone, Leigh et al. 2004). 또 다른 방어기전은 선천성 면역반응에 포함되어있는데 이 기전에서 주요역할을 담당하는 Toll-like receptor (이하 TLR) 은 폐포 식세포, 수지상세포, 점막 상피세포와 같이 폐기도의 세포에 존재하는 것으로 알려져있다 (Bals and Hiemstra 2004), (van Crevel, Ottenhoff et al. 2002). 이러한

TLR은 pathogen-associated molecular pattern을 인식해 고등 진핵생물이 아닌 미생물에 의해 conserved motif를 발현한다 (van Crevel, Ottenhoff et al. 2002). TLR의 발현양상은 *M. tuberculosis*-derived ligand를 주제로 광범위하게 연구되어왔다 (Krutzik and Modlin 2004).

본 연구에서는 이 같이 *M. chelonae*-*M. abscessus*군으로 동정된 국내분리 균주들에 대하여 분자 유전학적인 방법으로 정확히 분석-동정하고 그 특성을 살피고자 하였다. 미코박테리아는 150종이 넘는 균종이 보고되고 있고 이들은 숙주 편향성, 표현형, 병원성 등에서 다소 차이가 있긴 하지만 임상적으로 유사한 유의성을 갖기 때문에 이들의 생화학적 특성 비교를 통해 동정하는 것에는 무리가 있다. 따라서 신속하며 정확한 분자 유전학적인 동정방법이 주로 이용되는데 미코박테리움의 경우 미생물학적으로 뉴클레오티드의 99.9%가 유사할 뿐 아니라 유전학적 분석의 표적으로 가장 보편적으로 이용되는 16S rRNA 유전자가 일반 세균에 비해 잘 보존되어 종간의 분류가 명확하지 않은 경우가 있다 (Adékambi, Reynaud-Gaubert et al. 2004). 반면 DNA-dependent RNA polymerase의 β subunit을 코딩하는 house-keeping 유전자인 *rpoB*는 잘 보존되어 있으면서도 균종 간에는 차이가 있어 이를 표적으로 한 동정법이 미코박테리아 뿐 아니라 많은 균종의 동정에 이용된 바가 있다 (Kim, Lee et al. 1999), (Lee, Kim et al. 2000), (Kim, Ko et al. 2006), (Ko, Kim et al. 2003), (Lim, Lee et al. 2003), (Hong, Kim et al. 2004), (Kim, Kim et al. 2004), (Ko, Kim et al. 2004), (Adékambi and Drancourt 2004), (Alves, Dias et al. 2006). 또한 *hsp65*는 65kDa의 heat-shock protein을 코딩하는 유전자이며, 미코박테리아의 균종 동정에 이용되는 유전자 표적으로 많은 연구에서 유용하게 이용하였다 (Devallois, Goh et al. 1997), (Ringuet, Akoua-Koffi et al. 1999), (McNabb, Eisler et al. 2004), (Adékambi and Drancourt 2004).

따라서 본 논문에서는 *M. abscessus*로부터 재동정된 *M. massiliense*들이 숙주 면역 반응을 피하는 특이적 방어 기전에 대한 증거를 제시하고자 한다. 이는 특히 미코박테리아의 병원성을 결정하는 주요인자인 세포벽을 대상으로 하는 실험기법들에 중점을 맞춰 진행되었다. 우선 *hsp65*를 표적으로 하는 *M. massiliense*의 계통분류학적 연구를 통해 이들이 두 가지의 집락 표현형으로 구분될 수 있는 분자역학적 증거를 밝히고자 한다. 또한 두 번째로 *M. massiliense*의 두 가지 유전형이 갖는 집락의 형태학적인 특성이 숙주의 선천적 면역 반응을 조절하는데 어떻게 다른 영향을 미치는지를 알아보하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

2.1 미코박테리아 균주

본 논문에서는 서울 아산병원 (이하 AMC) 에서 제공받은 275주의 임상 분리 주와 *M. abscessus* 표준 균주 (ATCC 19977), *M. massiliense* 표준 균주 (CIP 108297) 를 사용하였다. AMC 에서 제공받은 균주는 *rpoB* 유전자를 표적으로 한 PCR-restriction analysis (이하 PRA) 방법으로 *M. abscessus* complex임이 확인된 균주들이다. 이후, 균액 상태의 AMC 균주들을 OADC가 첨가된 7H10 우무평판에 3-5일동안 계대 배양하였다. 또한 실험에 사용될 균주들은 5-7일 전, ADC가 첨가된 7H9 액체배지에 1×10^4 CFU/ml로 접종한 뒤 배양해 이용하였다.

2.2 세포주와 배양

생체 외 세포 배양 실험을 위해 마우스 대식세포주인 J774를 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) 으로부터 구입하여 사용하였고, peripheral blood mononuclear cell (이하 PBMC) 유래 단핵세포는 성인남자의 혈액으로부터 분리하여 사용하였다.

J774 : 세포는 입수 후 ATCC 제공 정보에 따라 세포 농도가 1×10^6 cells/ml이 넘지 않도록 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. 세포 배양액은 10% fetal bovin serum (이하 FBS; Thermo, Utah, USA), 1% penicillin-streptomycin (WelGENE, Deagu, South Korea) 이 첨가된 DMEM/HIGH GLUCOSE (ATCC, Manassas, VA) 를 이용하였으며, 이 DMEM/HIGH GLUCOSE는 4500mg/l glucose, 4mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate을 포함하는 것으로 이용하였다.

PBMC 유래 단핵세포 : 헤파린을 처리한 건강한 성인 남자의 말초혈액 10ml에 동량의 인산염완충식염수 (이하 PBS) 을 섞고 5ml씩 나누어 3ml의 Biocoll Separating Solution (BIOCHROM AG)위에 조심스럽게 중층한 후, 400xg에서 30분간 밀도기울기원심분리를 시행하였다. 분리 후 혈장과 Biocoll 사이에 생기는 단핵세포층을 파스퇴르 파이펫을 이용해 거둬 모은 후 PBS로 2회 세척하였다. 세척 후 세포를 RPMI-1640 배양액과 serum이 8 : 2의 비율로 섞인 용액에 부유시켜 37°C에서 2시간 동안 배양해 대식세포로 분화시킨 뒤 실험에 이용하였다 (IRB No. C-1210-015-430). 이 때, 세포배양액으로 사용한 RPMI-1640은 4500mg/l glucose, 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 10mM HEPES, 0.005mM을 포함하는 것으로 사용하였다. 또한 여기에 10% FBS (Thermo, Utah, USA), 1% penicillin-streptomycin (WelGENE, Deagu, South Korea)를 추가로 첨가하였다.

2.3 DNA 추출과 PCR

AMC에서 제공받은 균액 100 μ l를 2.0ml의 screw-cap microcentrifuge tube에 주입한 뒤 TEN buffer (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, NaCl 100mM: pH 8.0) 300 μ l를 첨가해 희석하였다. 여기에 직경 0.1mm 초자구 (G1145-100G, diameter 150-212 μ m; Glass beads, acid-washed, Sigma, U.S.A) 200 μ l와 Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (25:24:1, Saturated with 10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA) 용액 (P3808-400ml, Sigma U.S.A) 400 μ l를 섞어준 뒤 Bead beater phenol 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다 (Kim, Lee et al. 1999), (Yun, Lee et al. 2005). Bead beater로 60초간 진탕하여 균체를 파쇄하고 균 파쇄액을 13000rpm에서 10분간 원심분리한 뒤, 상층액 400 μ l를 새로운 1.5ml 크기의 튜브에 옮겼다. 여기에 60%만큼의 아이소프로필 알코올을 넣어 잘 섞어준 뒤 다시 한번 13000rpm에서 30분간 원심분리하였다. 침전물은 -20°C의 70% 에탄올 700 μ l를 이용해 세척한 뒤 TE buffer

(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA: pH 8.0) 50 μ l에 용해시켜 DNA를 회수하였다.

이렇게 추출한 DNA를 주형으로 중합효소 연쇄반응 (이하 PCR)을 수행하였다. 여기서 *hsp65* 유전자 절편을 표적으로 하기 위해 PCR 프라이머로 *M. tuberculosis* (Genbank No. M15467)의 *hsp65* 부분 염기서열 중 163번째 뉴클레오티드 부분으로부터 806번째까지 총 644bp를 주형으로 제작된 증폭 프라이머 (HSPF3, 5'-ATC GCC AAG GAG ATC GAG CT-3'; HSPR4, 5'-AAG GTG CCG CGG ATC TTG TT-3') (Kim, Kim et al. 2005)를 이용하였다. PCR을 수행하기 위해 2U의 Taq 중합효소, 10mM dNTP, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5mM MgCl₂를 포함하는 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 이용하였다. 이 실험에 앞서 *hsp65* 부위에 대한 정방향 및 역방향 프라이머 세트를 총 20pmol의 농도가 되도록 제작한 뒤, 주형 DNA 50ng와 증류수를 최종 부피 20 μ l가 되도록 첨가하여 혼합물을 만들었다. PCR은 Thermocycler (Cetus, Model 9700)를 이용해 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 DNA를 변성시킨 뒤 denaturation을 95 $^{\circ}$ C 60초, annealing을 62 $^{\circ}$ C 45초, extension을 72 $^{\circ}$ C 10분간 수행하였다. 증폭 산물은 1.5% 아가로스 젤에 100V로 30분간 전기영동하여 Ethidium Bromide로 염색한 뒤 UV를 조사시켜 증폭여부를 확인하였다.

2.4 *hsp 65* 유전자를 표적으로 하는 *Hinf* I PCR restriction fragment length polymorphism analysis.

Hinf I 효소를 이용한 PRA algorithm은 MapDraw (Window version 3.14e; DNASTAR, Madison, Wis, U.S.A) program을 수행하여 Type I 과 다른 *M. massiliense* 관련 균주들 (*M. abscessus*, *M. bolletii*, *M. chelonae*, 그리고 *M. fortuitum*) 로부터 Type II를 분리하는데 사용되었다. 이를 확인하기 위해 5개의 표준 균주 (*M. abscessus* ATCC 19977^T, *M. bolletii* CIP 108541^T, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M.*

massiliense CIP 108297^T) 들과 서울 아산병원으로부터 제공받은 149개의 *M. massiliense* 임상 균주에 PRA algorithm을 적용하였다. 이때 표준균주를 제외한 모든 샘플의 균주정보는 미리 제공되지 않은 상태에서 블라인드 테스트로 진행되었다. 644bp의 *hsp65* PCR 증폭산물 10 μ l, *Hinf* I 제한효소 2U, 제한효소 완충액을 1.5ml의 튜브에 섞은 뒤 최종 20 μ l가 될때까지 증류수를 첨가한 다음 37 $^{\circ}$ C 수조에 2시간동안 보온하였다. 이 후 이 혼합액을 2% 아가로스 젤에 100bp ladder DNA 마커와 함께 전기영동을 수행하였다.

2.5 염기서열분석

HSPF3과 HSPR4 프라이머를 이용하여 증폭된 PCR 산물은 Qiaex II gel extraction kits (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용해 정제한 뒤 Applied Biosystems automated sequencer (model 377)과 BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystem, Warrington, United Kingdom) 으로 정방향과 역방향의 프라이머를 이용해 직접염기서열분석을 수행하였다. 염기서열 분석 결과는 DNASTAR program의 MegAlign (Window version 3.12e; DNASTAR, Madison, Wis, U.S.A) 을 통해 Clustal W algorithm 로 다정렬 분류를 실시하고 MEGA version 4.0을 이용하여 Neighbor-Joining method (1000 bootstrap replications) 로 계통수 확인 후 Maximum-Parsimony method를 통하여 최종 완성하였다.

2.6 지질추출과 TLC 분석

5ml의 7H9 액체배지에 Type I (51843) 과 Type II (50594) 를 37 $^{\circ}$ C, 150rpm으로 3일간 배양 후 100ml의 7H9 액체배지에 접종하여 이전과 같은 조건에서 3일간 배양하였다. 이후 실온에서 4000rpm에 15분간 원

심분리한 후 상층액을 버리고 침전물 1g당 10ml의 CHCl₃ /CH₃ OH (2:1, v/v) 을 첨가하였다. 15분간의 음파처리 (1분 음파처리 후 10초 정지) 를 2회 수행한 뒤 4℃에서 24시간 배양한 후 4℃에서 4000rpm으로 15분간 원심분리하여 균체를 제거하였다. 이 때 GPL성분만을 추출하기 위해선 여기에 동량의 0.2M 수산화나트륨을 첨가해 37℃에서 45분간 배양하고 아세트산을 떨어뜨려 중화한 뒤 공기 건조해 용매를 제거한다. 반면 전체 지질성분을 추출하기 위해선 중화와 공기 건조 과정은 생략하였다. 이후 동량의 CHCl₃ /CH₃ OH/H₂ O (4:2:1, v/v) 을 첨가하여 4℃에서 3000rpm로 10분간 원심분리하여 아래층에 위치한 유기용매를 취한 뒤 공기 건조 후 CHCl₃ /CH₃ OH (2:1, v/v) 에 10µg/µl로 녹여냈다. 체임버에 CHCl₃ /CH₃ OH/H₂ O (100:14:0.8 v/v) 용액을 1cm 채운 후, 추출한 지질 50µl (5.0µl x 10) 을 박층크로마토그래피 (이하 TLC) 평판의 실리카 젤 면에 떨어뜨린 뒤 체임버 안에 비스듬히 세웠다. 약 2시간정도 방치한 후 체임버에서 TLC 평판을 꺼내 퓨움 배출 후드에서 30분동안 공기 건조 한 후 10% 황산을 평판에 골고루 분사한 뒤 hot plate에서 지질 때가 보일 때까지 가열하였다.

2.7 *M. massiliense*로부터 표면 GPL성분의 제거

5ml의 7H9 액체배지에 Type I (51843) 과 Type II (50594) 를 37℃, 150rpm으로 6일간 배양 후 이를 PBS/Tween80 (0.01%) 로 씻어낸 뒤 glass tube에 2개씩 분주 후 원심분리하였다. 균 침전물들을 아이소프로판올 (이하 ISOP) (또는 음성 대조군으로서의 PBS) 로 10분간 추출해낸 뒤 다시 한번 원심분리하여 상층액을 TLC분석에 이용하였다. TLC분석을 수행할 때, ISOP처리균과 PBS처리균들의 전체 지질성분을 추출하기 위해 CHCl₃ /CH₃ OH (2:1, v/v) 를 사용하였다.

2.8 MALDI-TOF 질량분광분석.

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (이하 MALDI-TOF) 질량분광분석을 수행하기 위해 Type I (51843) 과 Type II (50594) 의 GPL을 사용하였다. 이들을 Voyager DE-STR MALDI-TOF instrument (Perseptive Biosystems) 와 pulse nitrogen laser emitting at 337 nm을 이용해 MALDI-TOF 질량분광분석을 수행하였다 (Pérez, Constant et al. 2004).

2.9 ELISA를 이용한 TNF- α 활성도 측정

Human tumor necrosis factor-alpha (이하 TNF- α ; R&D Systems) 측정용 ELISA kit를 사용해 실험을 수행하였다. PBMC를 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 배양액에 1×10^6 /well의 농도로 100 μ l씩 96-well micotiter plate에 넣은 뒤 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 항온기에서 하루 동안 배양하여 세포를 바닥에 부착시켰다. 이후 4 μ l/ml 농도의 지질다당질 (이하 LPS), 지질단백질, Type I (51843) 과 Type II (50594) 를 100 μ l/well씩 주입한 후 2시간, 4시간, 8시간 간격으로 상층액을 채취해 -70 $^{\circ}$ C에서 냉동 보관하였다. 실험에 앞서 PBS에 녹인 capture antibody를 96-well microtiter plate에 100 μ l/well씩 주입해 하루 동안 37 $^{\circ}$ C에 밀봉한 뒤 wash buffer 400 μ /well로 2번씩 씻어낸 뒤 96-well microtiter plate 에 용액이 남지 않도록 깨끗이 털어냈다. 이후 reagent diluent를 300 μ l/well 주입하고 1시간동안 37 $^{\circ}$ C에 밀봉한 뒤 wash buffer 400 μ /well로 2번씩 씻어낸 뒤 96-well microtiter plate 에 용액이 남지 않도록 깨끗이 털어냈다. 여기에 -70 $^{\circ}$ C에서 냉동보관 하였던 상층액을 100 μ l씩 추출해 well 에 주입 후 adhesive strip을 덮고 37 $^{\circ}$ C에 2시간동안 밀봉하였다. 이후 detection antibody (100 μ l/well), streptavidin-HRP (100 μ l/well), substrate solution (100 μ l/well), stop solution (50 μ l/well) 을 차례로 주입 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.10 ERK assay

10% FBS가 함유된 RPMI-1640에서 배양한 J774 세포를 6-well microtiter plate에 5×10^5 /well로 주입한 뒤 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 하루 동안 배양하여 세포를 바닥에 잘 부착시켰다. 이에 anti-TLR2 antibody, anti-TLR4 antibody (InvivoGen) 를 4µg/ml의 농도로 주입해 1시간동안 전향온처리한 뒤 100µl/well의 Type I (51843) 과 Type II (50594), 100ng/well의 Type I GPL (51843), Type II GPL (50594) 을 주입한 후 10분, 30분, 2시간동안 배양하였다. 이후 상층액에서 단백질을 정제한 뒤 Qubit fluorometer (Invitrogen) 을 이용해 정량해 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 50µg의 단백질을 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (이하 SDS-PAGE)에 내려 분리한 뒤 단백질 용해물을 니트로셀룰로스막에 전달시켰다. 각 니트로셀룰로스막을 1시간동안 37도에서 5%의 skim milk powder가 포함된 PBS에 배양한 후 1차항체 (1:1000 dilution, 1시간), 2차항체 (1:2000 dilution, 30분) 를 첨가해 배양하였다. 분석에 사용된 항체에는 Extracellular-signal-related kinase 2 (이하 ERK 2), phosphorylated ERK (이하 p-ERK) 이 있으며 이들의 immunoreactive signal들은 LAS-3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) 을 사용하는 WEST-one™ Western Blot Detection System (iNtRON, kyungkido, Republic of Korea) 을 통해 확인하였다.

Ⅲ. 연구결과

3.1 PCR과 직접 염기서열분석에 의한 *M. massiliense*의 동정 결과와 *hsp65* 유전자형과 집락 표현형간의 관계

AMC에서 *rpoB* PRA로 동정된 *M. abscessus* complex 균주들의 *hsp65* 부위를 PCR 증폭하여 비교하였다. 그 결과, 실험에 쓰인 275개의 균주들이 크게 *M. abscessus* 균종에 속하는 그룹 126주 (45.8%) 와 *M. massiliense* 균종에 속하는 그룹 149주 (54.2%) 로 분류되었다 (Table 1). 또한 149개의 *M. massiliense* 균종을 HSPF3-HSPR4 프라이머를 이용하여 *hsp65*의 603 bp 부분으로 계통발생학적 분류를 한 결과 2개의 계통발생학적 그룹 (Type I, Type II) 으로 나뉘었다. 86명의 환자 (56.95%) 로부터 분리된 Type I 균주들은 *M. massiliense* 표준 균주 (CIP 108297) 와 동일한 하나의 sequevar를 가졌다. 반면 63명의 환자 (41.72%) 로부터 분리된 Type II 균주들은 2개의 상이한 sequevar를 포함했다 (Figure 1, Figure 2).

*hsp65*의 직접염기서열분석법을 통해 분석된 149개의 *M. massiliense*와 *M. massiliense* 표준 균주 (CIP 108297) 의 계대배양된 집락을 7H10 우무평판에서 확인하였다. 이때 2개의 *hsp65* 유전자형 (Type I, Type II) 간에 집락의 표현형 차이가 나타났다. Type II에 속하는 63개의 균주들은 모두 거친집락을 가진 반면 Type I에 속하는 86개의 균주들은 평활집락과 거친집락이 혼재된 양상을 보였다. 이 때 Type I의 경우 *M. massiliense* 표준 균주 (CIP 108297) 와 같이 평활집락을 형성하는 균주들이 거친집락을 형성하는 균주들 보다 많았다 [평활집락 vs. 거친집락; 61/86균주 (70.9%) vs. 25/86균주 (29.1%)] (Table 2). 7H10 우무평판에서의 집락 표현형 차이와 더불어 7H9

액체배지에서도 Type I 과 II 간의 다른 성장패턴을 나타냈다. 평활 표현형을 가진 Type I 과 *M. massiliense* 표준 균주 (CIP 108297) 는 액체배지 내에서 분산되어 자라는 성장 패턴을 보이는 반면, Type II 균주들은 *M. tuberculosis* 균주와 같이 배지의 표면에서 흡착성 박막을 형성하는 성장 패턴을 보였다. 또한 거친집락의 표현형을 가진 Type I 균주들은 액체배지에서 Type II 균주들과 같은 성장패턴을 보였다 (Figure 3).

Table 1. Classification of 275 *M. abscessus* related Korean strains into species or genotype level by sequence analysis based on the partial *hsp65* gene sequence (603 bp).

| Species and group | No. (%) of strains |
|-----------------------|--------------------|
| <i>M. abscessus</i> | 126 (45.8) |
| <i>M. massiliense</i> | 149 (54.2) |
| Type I | 86 (31.3) |
| Type II | 63 (22.9) |
| Total | 275 (100.0) |

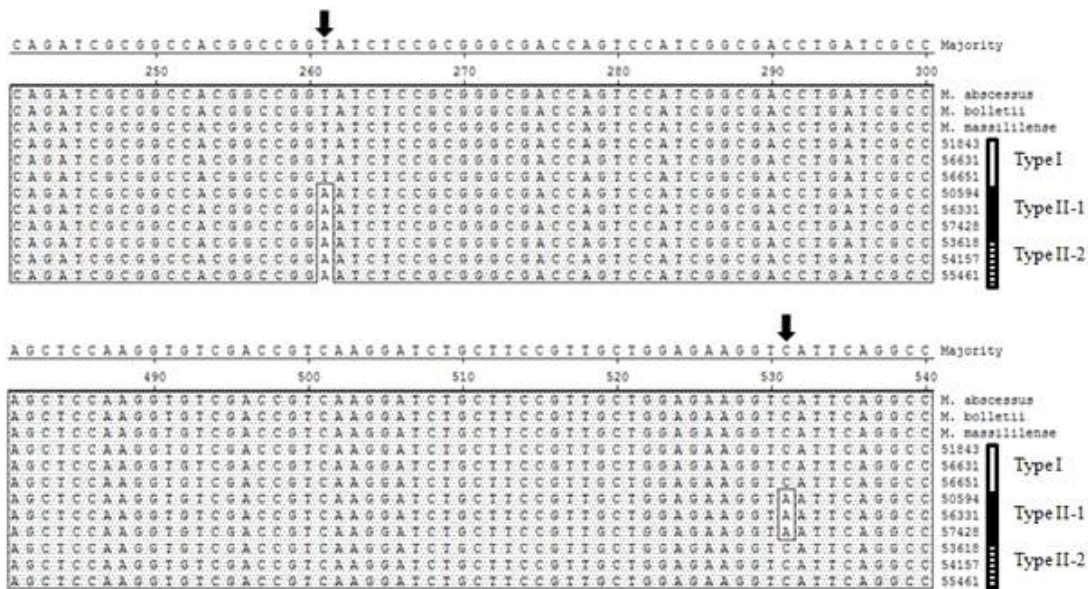


Figure 1. Sequence polymorphisms between the 3 *hsp65* sequvars of *M. massiliense* Type I, Type II-1, and Type II-2. Type I strains have the same sequence as the *M. massiliense* type strain; however, Type II-1 and Type II-2 strains differed from the *M. massiliense* type strain by 2-bp (T261A and C531A) and 1-bp (T261A), respectively. The nucleotide numbers correspond to those from the complete sequence of the *hsp65* gene of *M. abscessus* ATCC 19977 (GenBank no. EF486338.1).

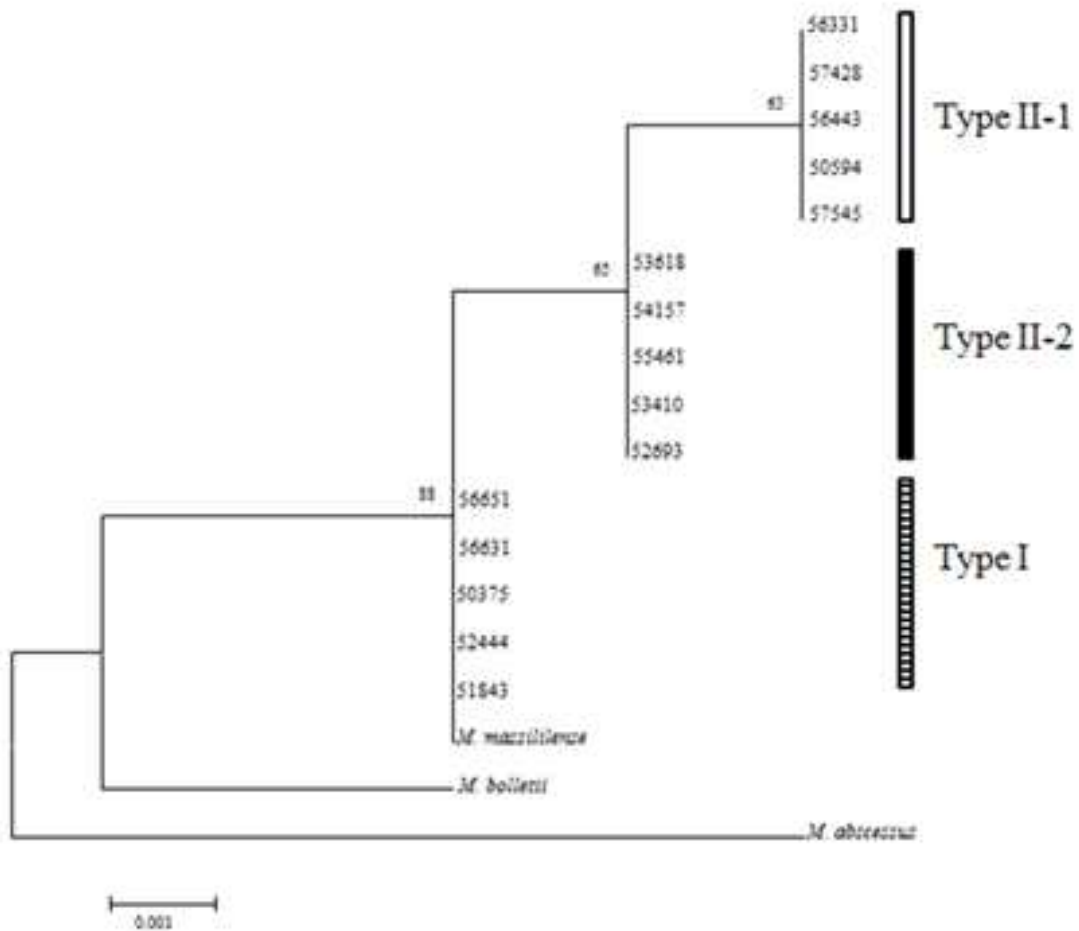
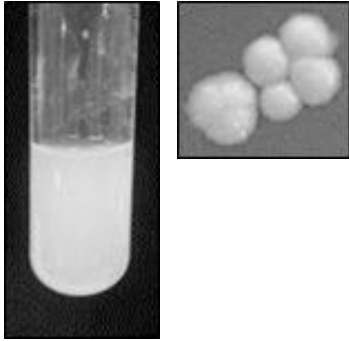
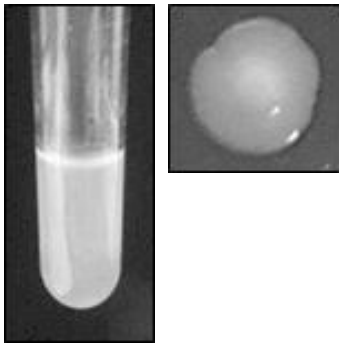


Figure 2. Phylogenetic trees based on the *hsp65* gene (603 bp) sequences from *M. massiliense* clinical isolates, *M. massiliense* CIP 108297^T, *M. bolletii* CIP 108541^T, *M. chelonae* ATCC 19237, and *M. abscessus* ATCC 19977. These trees were constructed using the neighbor-joining method. The bootstrap values were calculated from 1,000 replications. Bootstrap values of <50% are not shown. The bars indicate numbers of substitutions per nucleotide position.

(A) *M. massiliense* CIP 108297^T



(B) *M. massiliense* Type I (51843)



(C) *M. massiliense* Type II (50594)

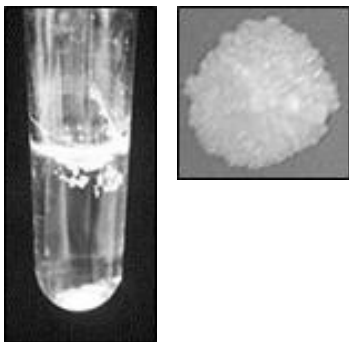


Figure 3. Colony morphology (right panel) and the growth patterns on 7H9 broth medium (left panel) of (A) *M. massiliense* CIP 108297^T (B) *M. massiliense* Type I (51843), and (C) *M. massiliense* Type II strain (50594).

3.2 *Hinf* I PRA에 의해 구분되는 *M. massiliense*의 2가지 *hsp65* 유전자형 간의 차이

연관된 다른 NTM들로부터 *M. massiliense* Type II를 쉽게 분리해내기 위해 새로운 *Hinf* I PRA algorithm을 사용하였다. 149개의 *M. massiliense* 균주와 5개의 reference 균주들에 *Hinf* I enzyme을 사용한 PRA 방법을 적용하였더니 이전 결과에서 예상할 수 있듯이 Type II는 Type I을 포함하는 다른 연관된 NTM으로부터 명백히 구분되는 PRA 패턴 (280, 278, 그리고 86bp) 을 나타냈다. 이 때, 280과 278bp에 해당하는 밴드는 너무 가까워 젤 상에서 두 개의 밴드로 구별되지 않아 보인다. 반면 Type I은 *M. massiliense* 균주와 같이 366bp, 278bp로 구분되는 PRA 패턴을 보였다. 이러한 *Hinf* I PRA 결과와 *hsp65* 직접염기서열분석의 결과들을 비교했을 때, *Hinf* I PRA 방법이 *M. massiliense*의 2가지 유전자형을 100% 구별해 낼 수 있는 민감도와 특이성을 가졌음을 확인하였다 (Table 2, Figure 4).

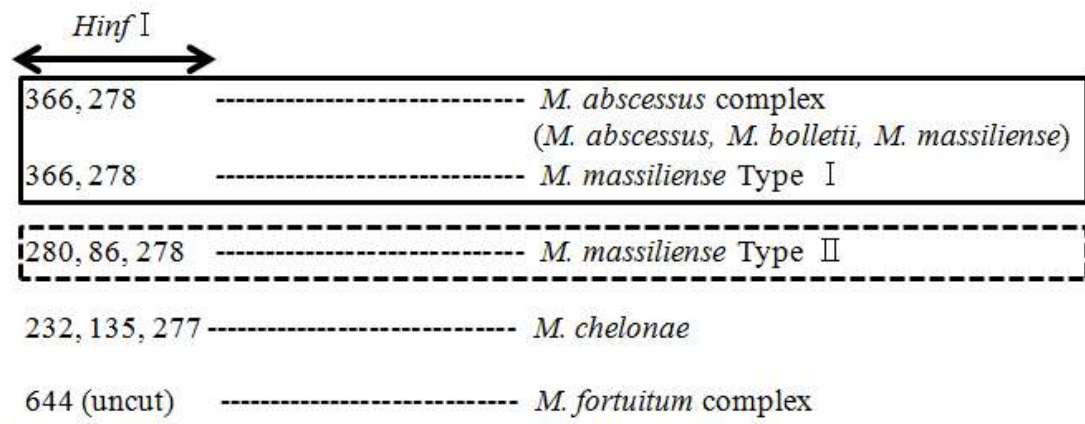
Table 2. The frequency of the two *hsp65* genotypes (Type I and Type II) determined by *hsp65* sequence analysis and *Hinf* I PRA methods, and the two colony morphotypes (rough and smooth) among 149 *M. massiliense* clinical strains.

| <i>hsp65</i> genotype ^a | No. (%) ^b | <i>Hinf</i> I PRA | | Colony morphotype | |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------|
| | | 366, 278 | 280, 86, 278 | Rough | Smooth |
| Type I | 86 (31.3) | 86 (100.0) | 0 (0.0) | 25 (29.1) | 61 (70.9) |
| Type II | 63 (22.9) | 0 (0.0) | 63 (100.0) | 63 (100.0) | 0 (0.0) |

^a The *hsp65* genotypes were determined by *hsp65* sequence analysis (603-bp).

^b The percentage was calculated among *M. massiliense* strains.

(A) *Hinf*I PRA algorithm



(B) Gel electrophoresis result after *Hinf*I PRA

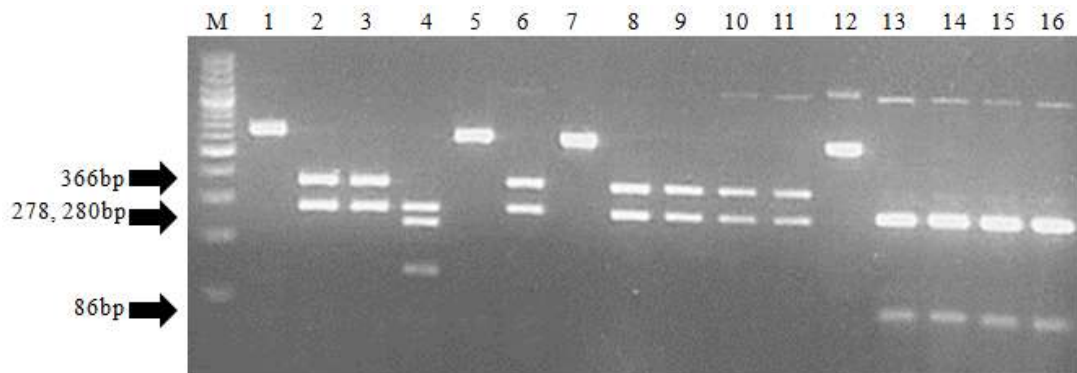


Figure 4. Identification of *M. massiliense* Type I and Type II strains by *hsp65* PRA (*Hinf* I) method. (A) *Hinf* I PRA algorithm for differentiating of *M. massiliense* Type I and Type II strains. (B) Agarose gel electrophoresis after *Hinf* I PRA. Lanes: M, 100-bp ladder; 1, *M. abscessus* (uncut); 2, *M. abscessus* (*Hinf* I cut); 3, *M. bolletii* (*Hinf* I cut); 4, *M. chelonae* (*Hinf* I cut); 5, *M. fortuitum* (*Hinf* I cut); 6, *M. massiliense* (*Hinf* I cut); 7, 51843 (Type I, uncut); 8, 51843 (Type I, *Hinf* I cut); 9, 52444 (Type I, *Hinf* I cut); 10, 50375 (Type I, *Hinf* I cut); 11, 56631 (Type I, *Hinf* I cut); 12, 50594 (Type II, uncut); 13, 50594 (Type II, *Hinf* I cut); 14, 52693 (Type II, *Hinf* I cut); 15, 53410 (Type II, *Hinf* I cut); 16, 55461 (Type II, *Hinf* I cut).

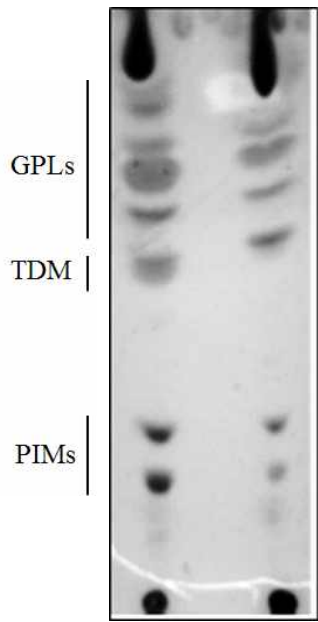
3.3 TLC를 통해 확인한 *M. massiliense*의 2가지 유전자형 간 지질성분 차이.

TLC를 이용해 *M. massiliense*의 2가지 유전자형간의 지질성분 차이를 확인하는 3 가지 실험을 수행하였다. 우선 전체 지질 성분의 차이를 확인하기 위해 $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3 \text{OH}$ (2:1, v/v) 에 추출한 Type I (51843) 과 Type II (50594) 의 전체 지질을 $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3 \text{OH} / \text{H}_2 \text{O}$ (100:14:0.8 v/v) 용매를 이용한 TLC를 수행하였다. 이 실험은 지질들이 특정 용매에 의해 이동성과 특이적 색깔 (purple, brown-orange, yellow) 에 따라 구분이 되는 원리를 이용한 것이다 (Rhoades et al., 2003). 그 결과 전체 지질 분포상에 trehalose dimycolate, GPL, phosphatidy-*myo*-inositol mannoside을 포함하는 다양한 인지질들이 들어있음을 확인하였다. 또한 Type II 균주들은 Type I 균주들에 비해 상대적으로 지질 띠가 가늘고 적게 나타남을 확인할 수 있었다 (Figure 5A).

두 번째로 $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3 \text{OH}$ (2:1, v/v) 에 추출한 Type I (51843) GPL과 Type II (50594) GPL을 $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3 \text{OH} / \text{H}_2 \text{O}$ (100:14:0.8 v/v) 용매를 이용해 TLC를 수행하였다. 이 경우, Type I 에서 보여지는 Diglycosylated GPL과 Triglycosylated GPL 모두 Type II 의 결과에는 나타나지 않아 2가지 유전자형 간의 좀 더 확연한 차이를 볼 수 있었다 (Figure 5B).

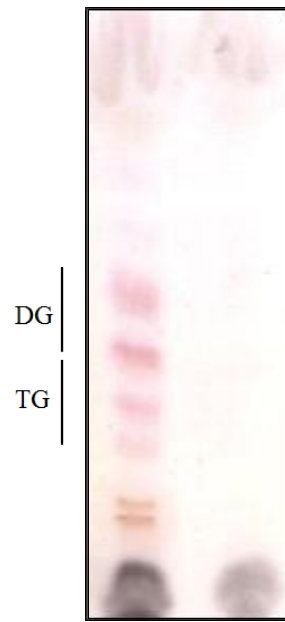
세 번째로는 *M. massiliense*의 세포벽에서 선택적으로 GPL를 제거할 수 있는 아이소프로파놀을 사용하여 실험을 수행하였다 (Rhoades, Archambault et al. 2009). 그 결과 Type II 균주의 경우 ISOP 처리에 큰 영향을 받지 않았지만 Type I 균주의 경우 ISOP처리 시 GPL 지질띠가 극명하게 줄었음을 확인할 수 있었다 (Figure 5C).

(A) Total lipid



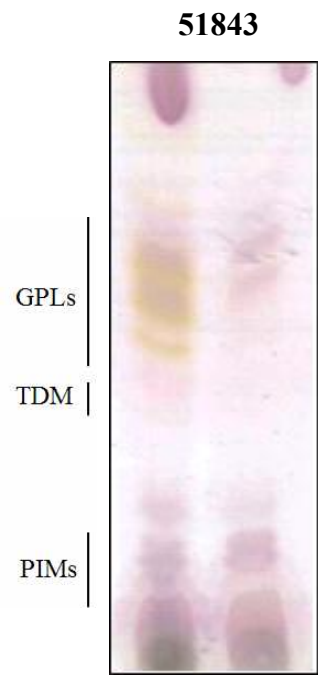
51843 50594

(B) GPL



51843 50594

(C) Total lipid



(PBS) (ISOP)



(PBS) (ISOP)

Figure 5. Comparison of lipids profiles between two genotypes of *M. massiliense*. (A) Equal weights of total lipid extracts from *M. massiliense* Type I (51843) and II (50594). (B) Equal weights of GPL extracts from *M. massiliense* Type I (51843) and II (50594). (C) Equal weights of total lipid extracts from isopropanol-stripped, PBS-stripped cell wall lipid of *M. massiliense* Type I (51843) and II (50594). TDM, trehalose dimycolate; PIM, phosphatidyl-*myo*-inositol mannoside; DG, diglycosylated GPL; TG, triglycosylated GPL.

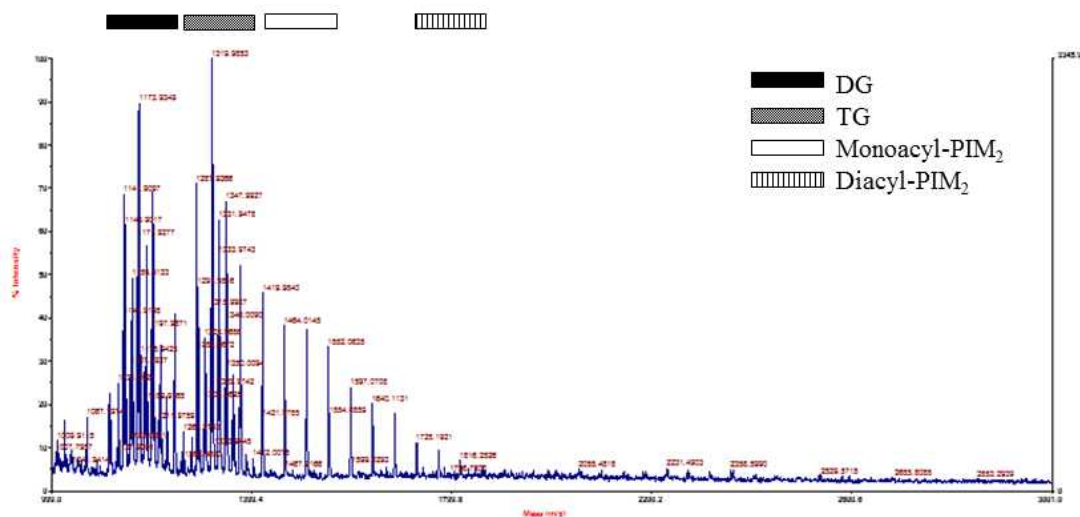
3.4 MALDI-TOF를 통해 확인한 *M. massiliense*의 2가지 *hsp65* 유전자형 간 GPL성분 차이

*M. massiliense*의 2가지 유전자형 간 GPL 성분 차이를 확인하기 위해 Type I (51843), Type II (50594) 균주의 GPL을 추출해 MALDI-TOF 가스질량 측정법을 수행, 비교하였다. 이를 통해 확인된 지질들의 분포상을 살펴보면 2개의 구별되는 최고점 클러스터가 m/z 1101부터 m/z 1245까지, m/z 1287부터 m/z 1419까지의 범위에서 나타났다. 첫 번째와 두 번째 최고점 클러스터는 각각 diglycosylated GPL과 triglycosylated GPL을 나타낸다 (Ripoll, Deshayes et al. 2007). Type I 은 2개의 최고점 클러스터 모두 전형적인 *M. massiliense*의 지질 분포상을 보였다 (Figure 6A).

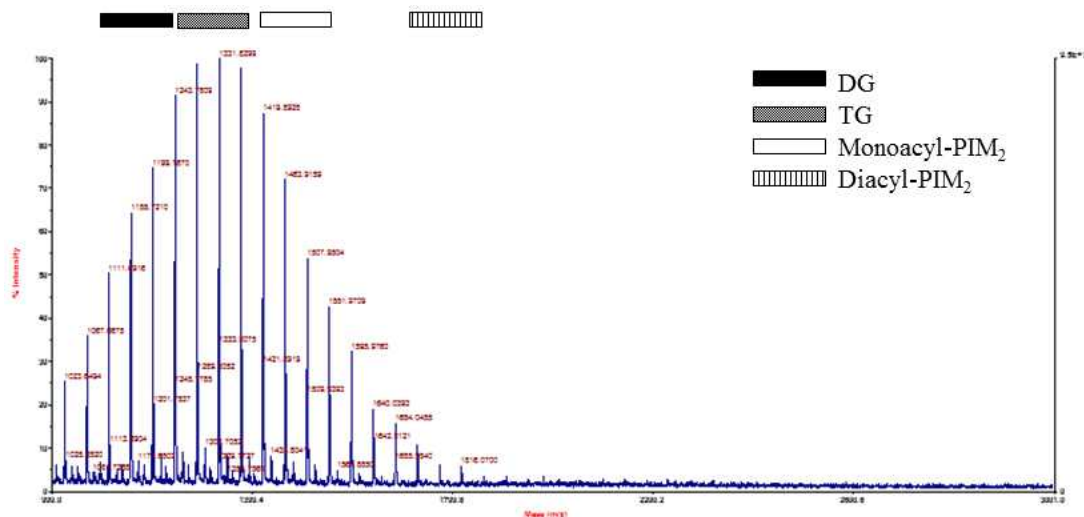
반면 Type II는 diglycosylated GPL로 추정되는 클러스터의 강도가 상대적으로 낮고 m/z 1023부터 m/z 1772까지 높은 강도의 폭이 넓은 클러스터를 보였다. 이러한 결과는 두 균주가 갖고 있는 GPL성분 정도의 차이를 나타냈다 (Figure 6B).

이 때, ISOP를 처리한 Type I 균주의 GPL을 추출해 MALDI-TOF 가스질량을 측정했을 때, Type I 과 같이 2개의 구별되는 최고점 클러스터를 확인할 수 있었다. 하지만 이들은 m/z 1384부터 m/z 1441까지, m/z 1640부터 m/z 1710까지의 다른 범위를 갖고 클러스터의 강도가 낮고 폭도 좁게 나타났다. 첫 번째와 두 번째 최고점 클러스터는 각각 Monoacyl-PIM₂ 과 Diacyl-PIM₂ 로써 Type I 과 Type II 결과에서도 존재했지만 ISOP로 인한 GPL제거로 도드라져 나타난 것으로 나타났다 (Figure 6C).

(A) *M. massiliense* Type I (51843)



(B) *M. massiliense* Type II (50594)



(C) *M. massiliense* Type I (51843) ISOP

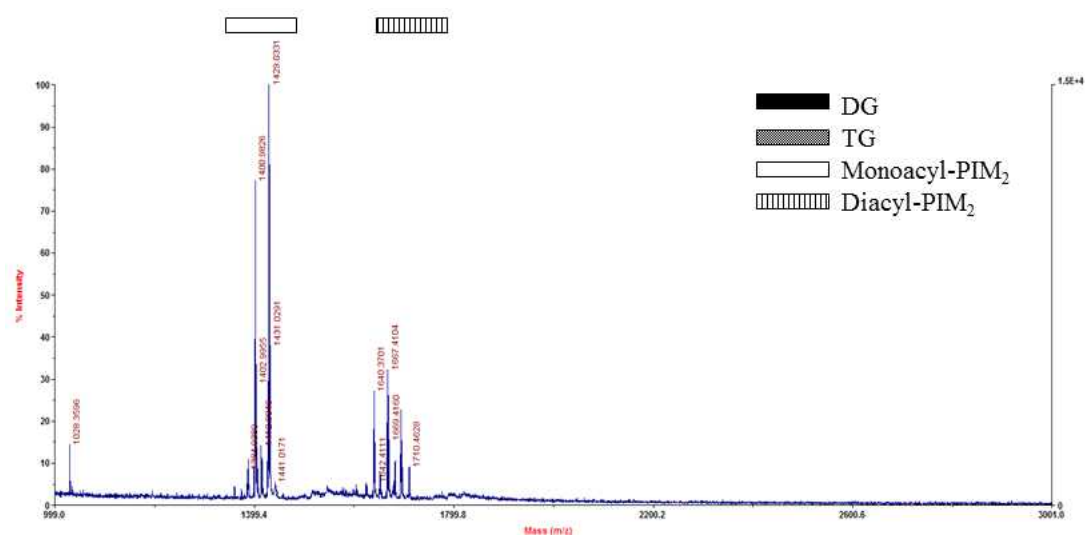


Figure 6. MALDI-TOF MS analysis of extracted GPLs from (A) *M. massiliense* Type I (51843), (B) *M. massiliense* Type II (50594). (C) *M. massiliense* Type I (51843) that had been treated with isopropanol (ISOP). DG, diglycosylated GPLs; TG, triglycosylated GPLs.

3.5 *M. massiliense*의 2가지 *hsp65* 유전자형 간 TNF- α 방출과 TLR2의 자극정도 차이.

Type I (51843), Type II (50594) 균주 간 대식세포로부터 방출되는 TNF- α 유도능을 비교하는 3 가지 실험을 수행하였다. 이 실험들은 모두 균을 직접 세포에 접종하는 방법과 균의 GPL만을 추출해 세포에 접종하는 방법으로 진행되었다.

우선 대식세포에 접종된 지 얼마의 시간이 흘러야 TNF- α 방출량에 변화가 나타내는지 알아보기 위해 수행된 첫 번째 실험 결과 균 접종 시 2시간에서, GPL 접종 시 4시간에서 가장 유의성 있는 방출량을 나타내었다. 또한 이 시간대에서 균과 GPL 접종 모두 Type II가 Type I 보다 많은 TNF- α 를 유도해냄을 확인할 수 있었다 [균 2시간; Type I 방출량 vs. Type II 방출량; 189.15 vs. 468.24], [GPL 4시간; Type I 방출량 vs. Type II 방출량; 69.14 vs. 263.65]. 이 때, TNF- α level은 선천성 면역 반응 정도를 평가하면서 혼란변수를 피하기 위해 *M. massiliense*의 대식세포 접종 후 4시간 동안만 측정하였다. 4시간 이후에는 상당수의 균의 증식이 발생하거나 (Type II) 균의 분해와 청소가 발생한다 (Type I), (Figure 7A, 7B).

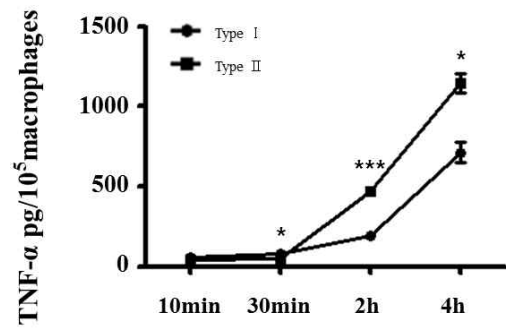
두 번째로 anti-TLR2 항체와 이와 동형항체인 anti-TLR4가 참여했을 때 TNF- α 방출량에 변화가 있는지 여부를 확인하는 실험을 진행했다. 대식세포에 균이나 GPL 접종 1시간 전에 anti-TLR2 항체를 처리한 경우, 둘 다 Type II 방출량의 감소가 Type I 보다 많이 발생했다 [균; Type I 감소량 vs. Type II 감소량; 2.1% vs. 17.0%], [GPL; Type I 감소량 vs. Type II 감소량; 21.2% vs. 54.6%]. 이러한 결과들은 Type II가 TLR2에 더 높은 특이성을 갖는다는 것을 보여주었다. 반면 균이나 GPL 접종 1시간 전에 anti-TLR4 항체를 처리한 경우 Type I 과 Type II 모두 방출량에 큰 변화가 없었다 (Figure 7C, 7D).

세 번째로 이전 실험에서 GPL을 화학적으로 제거한다고 알려진 ISOP를 처리한 Type I 과 이에 대한 대조군으로써 PBS를 처리한

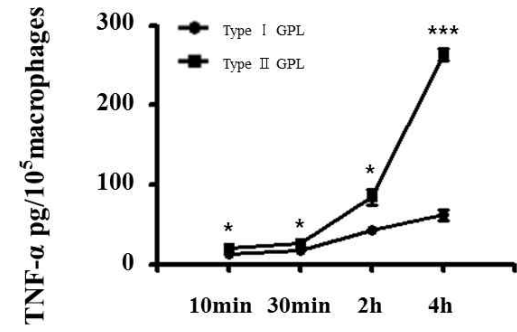
Type I 의 TNF- α 방출량 정도를 측정하였다. 그 결과 Type I 에 ISOP를 처리하면 Type II와 비슷한 정도의 TNF- α 를 방출함을 확인할 수 있었다 (Figure 7E).

이와 같은 Type I 대비 Type II의 TNF- α 방출량의 상대적인 증가는 세포벽의 GPL 함유량 감소에서 기인했다는 것을 시사한다.

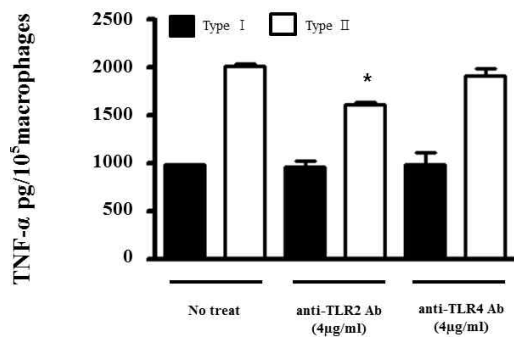
(A)



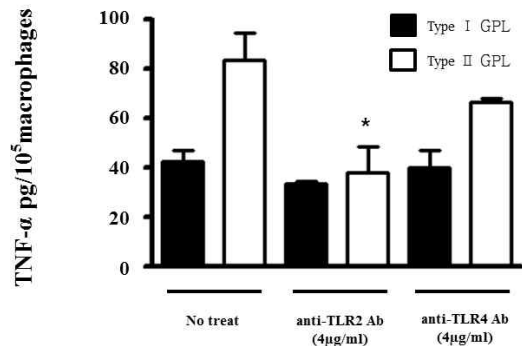
(B)



(C)



(D)



(E)

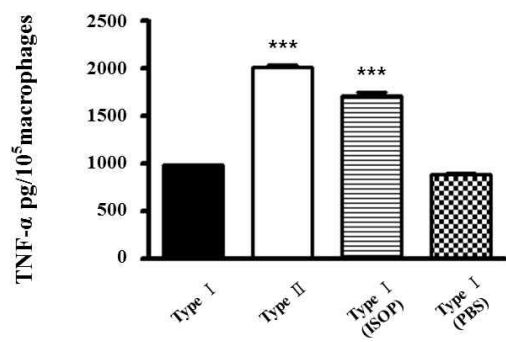


Figure 7. TNF- α response *M. massiliense* variants and involvement of TLR2. Data represent the means of two experiments done in duplicate \pm SEM. (A) PBMC were infected with *M. massiliense* Type I (51843), Type II (50594). Culture supernatants were collected at various intervals after addition of bacteria and assayed by ELISA for TNF- α . *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$ for Type I vs Type II. (B) PBMC were infected with *M. massiliense* GPLs from Type I (51843), II (50594). *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$ comparing Type I and Type II. (C) PBMC were preincubated with Ab to TLR2 or isotype control Ab or no treats. And then challenged with *M. massiliense* Type I (51843), II (50594). Culture supernatants were collected at 2h after addition of bacteria and assayed by ELISA for TNF- α . *, $p < 0.05$ compared with No treat and anti-TLR2 Ab, anti-TLR4 Ab. (D) PBMC were preincubated with Ab to TLR2 or isotype control Ab or no treats. And then challenged with *M. massiliense* GPLs from Type I (51843), II (50594). *, $p < 0.05$ for No treat compared with anti-TLR2 Ab and anti-TLR4 Ab. (E) PBMC were infected with heat-killed *M. massiliense* Type I (51843) that had been treated (PBS) or treated with isopropanol (ISOP). ***, $p < 0.001$ comparing Type I to Type II and Type (ISOP) and Type I (PBS).

3.6 ERK의 인산화를 통해 확인한 *M. massiliense*의 2가지 *hsp65* 유전자형의 신호전달 활성 차이

Type I (51843), Type II (50594)가 세포 생존 및 증식에 중요한 신호 전달 경로로 알려진 ERK의 인산화에 차이를 나타내는지 관찰하기 위해 3 가지 실험을 진행하였다. 이 실험도 마찬가지로 균을 직접 세포에 접종하는 방법과 균의 GPL만을 추출해 세포에 접종하는 방법을 수행하였다.

우선 대식세포에 접종된 지 얼마의 시간이 흘러야 활성을 나타내는지 알아보기 위해 수행된 첫 번째 실험 결과 균 접종 시 30분에서, GPL 접종 시 2시간에서 가장 유의성 있는 인산화 정도를 확인하였다. 또한 이 시간대에서 균을 처리하지 않은 경우, Type I 을 처리한 경우, Type II 를 처리한 경우 순으로 pERK의 활성도가 증가함을 확인할 수 있었다. [균 30분; Type I 증가량 vs. Type II 증가량; 99% vs. 227%], [GPL 2시간; Type I 증가량 vs. Type II 증가량; 58% vs. 93%], (Figure 8A, 8B).

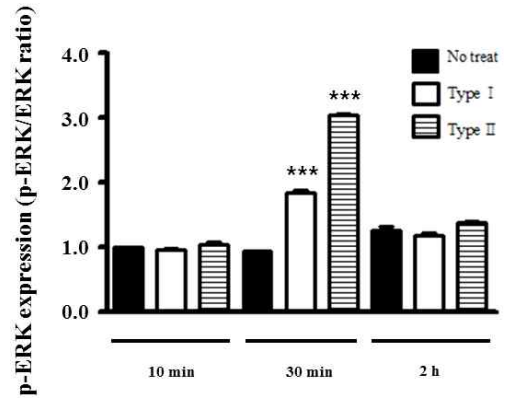
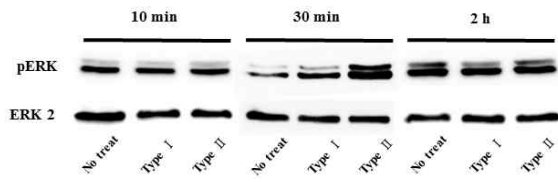
이에 가장 유의성 있는 활성을 보인 시간대에서 anti-TLR2 항체와 이와 동형항체인 anti-TLR4 항체가 참여했을 때 pERK의 활성도가 변화하는지 여부를 확인하는 실험을 진행했다. 그 결과 균과 GPL 접종 모두의 경우 anti-TLR2 Ab 처리 시 Type I 균주와 Type II 균주 모두 pERK 활성이 감소했다. 특히 Type II의 감소량이 Type I 보다 많음이 확인되었다 [균; Type I 감소량 vs. Type II 감소량; 36.5% vs. 52.0%], [GPL; Type I 감소량 vs. Type II 감소량; 38.0% vs. 60.7%]. 이러한 결과들은 Type II가 TLR2에 더 높은 특이성을 갖는다는 것을 보여주었다. 반면 균이나 GPL 접종 1시간 전에 anti-TLR4 항체를 처리한 경우 Type I 과 Type II 모두 방출량에 큰 변화가 없었다 (Figure 8C, 8D).

마지막으로 이전 실험에서 GPL을 화학적으로 제거한다고 알려진 ISOP를 처리한 균주와 이에 대한 대조군으로써 PBS를 처리한 균주들이

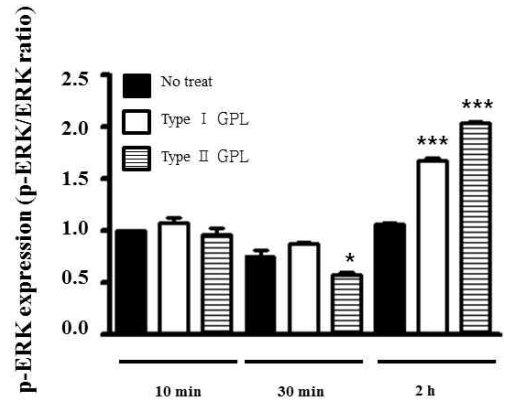
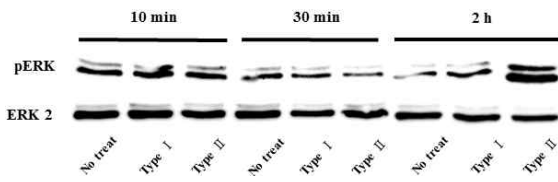
pERK를 활성화시키는 정도를 비교하는 실험을 진행하였다. 그 결과 Type I 에 ISOP를 처리하면 Type II에 ISOP를 처리했을 때 보다 pERK활성 증가도가 많음을 확인할 수 있었다 [ISOP 처리; Type I 증가량 vs. Type II 증가량; 38.0% vs. 14.9%] (Figure 7E).

이와 같은 Type I 대비 Type II의 ERK활성도의 상대적인 증가는 세포벽의 GPL 함유량 감소에서 기인했다는 것을 시사한다.

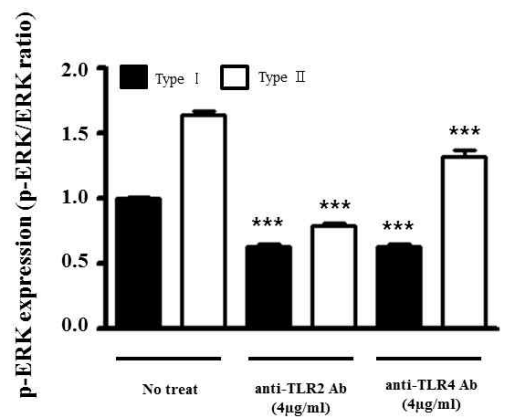
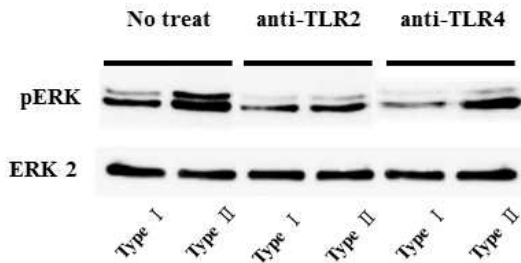
(A)



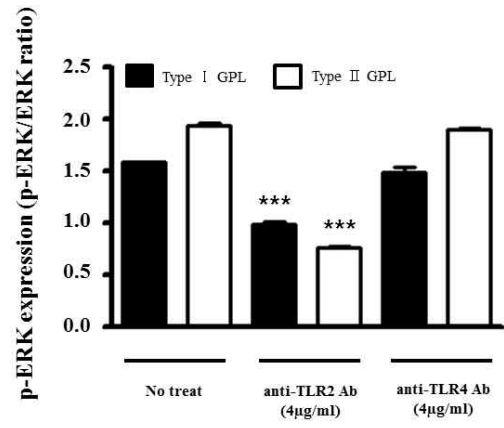
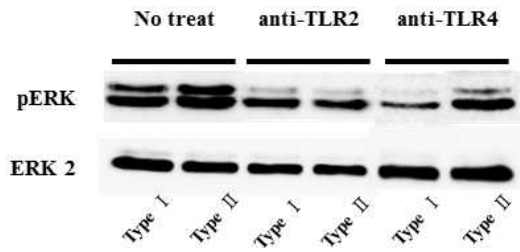
(B)



(C)



(D)



(E)

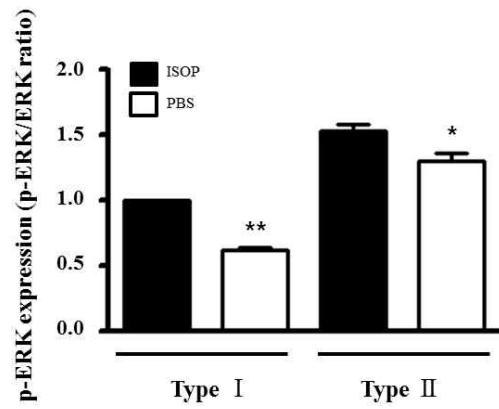
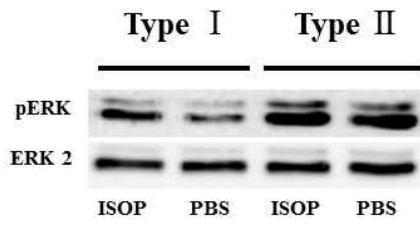


Figure 8. *M. massiliense* isolates induce ERK activation *in vitro*. Relative densities of p-ERK bands were analyzed by densitometry. Data represent the means of five experiments done in triplicate \pm SEM. (A) Immunoblot analysis of ERK phosphorylation (p-ERK) performed on J774 macrophages in presence of *M. massiliense* Type I (51843), Type II (50594) or no treats for 10min, 30min and 2hr. *, $p < 0.05$ comparing no treats to Type I and Type II. (B) J774 macrophages in presence of *M. massiliense* GPLs from Type I (51843), II (50594) or no treats. *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$ for Type I and Type II vs no treats. (C) J774 macrophage were preincubated with Ab to TLR2 or isotype control Ab or no treats. And then challenged with *M. massiliense* Type I (51843), Type II (50594) for 30min. ***, $p < 0.001$ compared with No treat and anti-TLR2 Ab, anti-TLR4 Ab. (D) J774 macrophage were preincubated with Ab to TLR2 or no treats. And then challenged with *M. massiliense* GPLs from Type I (51843), Type II (50594) for 2h. ***, $p < 0.001$ for No treat compared with anti-TLR2 Ab and anti-TLR4 Ab. (E) J774 macrophage were infected with heat-killed *M. massiliense* Type I (51843), Type II (50594) that had been treated (PBS) or treated with isopropanol (ISOP). *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ comparing treated with ISOP to treated with PBS.

IV 고찰

*hsp65*를 표적으로 하는 직접 염기서열분석에 기반한 계통분류학적 연구를 수행한 결과, 국내 *M. abscessus* complex 분리주 중 *M. massiliense*가 다른 지역에 비해 상대적으로 높은 빈도로 분포함을 확인하였다. 특히 국내 *M. massiliense* 환자 중 46.2%의 높은 비율로 존재하는 Type II *hsp65* 유전자형의 염기서열이 NCBI의 데이터베이스 내 존재하지 않는 것으로 판단해 볼 때, Type II 유전자형은 국내에만 독자적으로 존재하는 *M. massiliense* 균종인 것으로 추측된다.

이러한 새로운 유전자형을 가진 균종과 기존의 균종을 쉽게 구별해낼 수 있는 특징을 밝혀내고자 *hsp65* 유전자 표적의 다양한 분자분류학적 연구를 수행하였다. 그 결과 집락의 형태학적 특성과 유전형이 강하게 서로 연관되어있음을 대표적 특징으로 확인할 수 있었다. 특히 10번 이상의 계대를 거친 후에도 Type II 집락의 거친 표현형이 평활형으로 되돌아가지 않는 것으로 미루어 보아 Type II의 거친 표현형은 생체 내 감염 중에 유도된 돌연변이화로 얻어진 특성이 아니라 평활형을 가진 균주로부터 새롭게 변형되어 나온 선천적 특성이라고 추측해 볼 수 있었다.

그렇다면 *M. massiliense*의 2가지 *hsp65* 유전자형이 갖는 집락의 표현형 차이가 균주의 어떠한 성분차이로 인한 결과인지를 확인하기 위해 TLC를 수행하였다. TLC는 흡착제를 부착시킨 유리판 위에 구성 성분을 알아내고자 하는 복합 물질을 떨어뜨려 적절한 용매로 용출하면 각 구성 성분의 고유한 성질에 따라 용매에 용해되는 정도, 흡착제에 흡착하는 정도의 차이에 따라 각각 일정한 위치로 분리가 일어나게 되는 실험이다. 이를 통해 Type I, Type II 균주간의 집락 표현형의 차이가 지질성분으로부터 유래되었고 특히나 GPL의 발현여부가 가장 결정적 요소임을 확인할 수 있었다. 또한 ISOP를 처리함으로써 GPL이 제거된 Type I 균주의 배양액이 Type II 균주의 배양액과 같이 흡착성 박막을 형성함을 확인함으로써 당화된 GPL들이 균의 외막에 존재하고

더 많은 소수성 지질을 덮어 흡착된 상태를 변화시킨다는 가정과 일치한다.

이렇듯 두 유전자형 간의 차이에 결정적 역할을 하는 것으로 보여지는 미코박테리아 세포벽의 지질성분은 숙주의 선천적 면역 반응을 조절함으로써 병원성을 결정하는 주요인자로 인식되어 왔다. 이제까지 NTM들은 집락의 성상이 평활형과 거친형 모두를 동시에 지니는 것으로 알려져왔는데, 여러 연구결과에서 집락이 거친 표현형을 가질수록 더욱 큰 병원성을 갖는다는 것을 밝혀냈다 (Kansal, Gomez-Flores et al. 1998). 이러한 사실에 근거해 두 표현형간의 차이에 가장 큰 영향을 미칠 것이라 가정했던 GPL의 발현정도 여부에 따라 미코박테리아에 반응하는 proinflammatory mediator인 TNF- α 의 방출정도를 확인했다. 그 결과 대식세포에 Type II의 균주를 접종하거나 Type II에서 추출한 GPL을 접종했을 때 Type I의 경우보다 많은 TNF- α 의 방출이 있었다. 또한 TNF- α 의 방출은 대식세포 TLR에 의해 유도되는데 특히 TLR2는 다중 미코박테리아 리간드를 갖고 있다 (Bhatt and Salgame 2007). 즉 미코박테리아에 반응하는 대식세포의 선천성 면역 반응은 TLR2를 통해 중재된다고 할 수 있다. 따라서 이를 확인하기 위한 실험을 추가로 진행했을 때 anti-TLR4 항체를 처리했을 때 보다 anti-TLR2 항체 존재 시 두 가지 유전자형간의 특이적 차이점이 줄어들었다. 이는 *M. massiliense* 평활 표현형 균주 세포벽의 가장 바깥쪽에 존재하는 GPL이 TLR2를 통해 중재되는 대식세포 선천성 면역 반응을 방해한다는 것을 증명하였다. 따라서 GPL 발현양이 많아 생물막 형성능을 갖는 병원성이 강한 균종일수록 cellular effector 기전의 활성도가 낮아 초기 제거과정을 피하고 감염을 수월하게 한다는 것을 증명할 수 있었다.

이에 *M. massiliense*가 숙주의 신호전달과정에 어떠한 영향을 미쳐 감염성을 높이는지 확인하기 위해 MAP kinase 경로 중 세포성장인자, 시토카인 등을 인지하여 세포 내로 증식, 생존에 관련한 신호를 전달하는 것으로 알려진 ERK 경로의 활성도를 확인하였다 (Pearson et al., 2001) 이전의 연구들에서 미코박테리아는 TLR들의 참여로 인해

MAP kinase와 같은 신호전달경로를 유발한다고 알려져 왔다 (Hasan, Shah et al. 2003), (Trinchieri and Sher 2007), (Lee and Schorey 2005), (Yadav, Clark et al. 2006). 따라서 ERK 활성화에는 미코박테리아에 의해 유발된 시토카인의 방출이 요구되기 때문에 특이적으로 많은 방출이 일어난 Type II에서 더 많은 활성화가 나타날 것이라 예상하였다. 실험 결과 Type II의 균주나 Type II에서 추출한 GPL을 접종했을 시 Type I의 경우보다 더 많은 ERK의 활성화가 관찰되었다. 또한 TLR2 리간드에 대한 특이성을 확인하기 위한 실험 결과도 anti-TLR4 항체를 처리했을 때 보다 anti-TLR2 항체 존재 시 두 가지 유전자형간의 특이적 차이점이 줄어들어 확인됐다. 이러한 결과들을 토대로 GPL 발현정도의 차이에 의해 다르게 발현하는 시토카인의 양이 ERK 경로에 큰 영향을 미친다고 추론할 수 있었다.

V 결론

hsp65 유전자에 기반한 계통분류학적 연구를 통하여 국내 특이적 *M. massiliense*, 즉 Type II에 해당하는 새로운 *hsp65* 유전자형이 국내 *M. massiliense* 환자 중 46.2%의 높은 비율로 존재한다는 것을 확인하였다.

또한, PBMC 유래 단핵세포와 J774 세포에서의 선천면역활성의 지표인 TNF- α 와 ERK의 활성도를 2 개의 *M. massiliense hsp65* 유전형간 비교 분석해본 결과, 거친 집락의 표현형을 갖는 신규 Type II 유전자형이 평활 집락의 표현형을 갖는 Type I 유전자형에 비해 높은 선천면역 활성을 유발하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 두 유전형간의 활성도의 차이는 세포벽의 GPL 함유와 연관이 있음을 증명할 수 있었다.

미코박테리아종의 임상정도가 선천면역의 활성화와 밀접한 관계가 있다는 사실은 고려할 때, 이번 연구로 발견된 국내 특이적인 *M. massiliense hsp65* 유전자형 Type II는 기존의 Type I에 비해 높은 병원성을 가질 개연성이 높다고 추정할 수 있다.

따라서 두 유전자형간의 병원성의 차이와 기전은 향후 마우스를 이용한 생체 내 실험을 통하여 규명될 필요가 있다고 사료된다.

참고문헌

Adékambi, T. and M. Drancourt (2004). "Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing." International journal of systematic and evolutionary microbiology **54**(6): 2095-2105.

Adékambi, T., M. Reynaud-Gaubert, G. Greub, M. J. Gevaudan, B. La Scola, D. Raoult and M. Drancourt (2004). "Amoebal coculture of "Mycobacterium massiliense" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia." Journal of clinical microbiology **42**(12): 5493-5501.

Alves, M. S., R. C. S. Dias, A. C. D. De Castro, L. W. Riley and B. M. Moreira (2006). "Identification of Clinical Isolates of Indole-Positive and Indole-Negative Klebsiella spp." Journal of clinical microbiology **44**(10): 3640-3646.

Bals, R. and P. Hiemstra (2004). "Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens." European Respiratory Journal **23**(2): 327-333.

Bhatt, K. and P. Salgame (2007). "Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*." Journal of clinical immunology **27**(4): 347-362.

Brantley, J. S., A. L. Readinger and E. S. Morris (2006). "Cutaneous infection with *Mycobacterium abscessus* in a child." Pediatricdermatology **23**(2): 128-131.

Devallois, A., K. S. Goh and N. Rastogi (1997). "Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species." Journal of clinical microbiology **35**(11): 2969-2973.

Dytoc, M. T., L. Honish, C. Shandro, P. T. Ting, L. Chui, L. Fiorillo, J. Robinson, A. Fanning, G. Predy and R. P. Rennie (2005). "Clinical, microbiological, and epidemiological findings of an outbreak of *Mycobacterium abscessus* hand-and-foot disease." Diagnostic microbiology and infectious disease **53**(1): 39-45.

Eckstein, T. M., J. M. Inamine, M. L. Lambert and J. T. Belisle (2000). "A Genetic Mechanism for Deletion of the *theser2* Gene Cluster and Formation of Rough Morphological Variants of *Mycobacterium avium*." Journal of bacteriology **182**(21): 6177-6182.

Fregnan, G. and D. Smith (1962). "Description of various colony forms of mycobacteria." Journal of bacteriology **83**(4): 819-827.

Gibson, R. L., J. L. Burns and B. W. Ramsey (2003). "Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis." American journal of respiratory and critical care medicine **168**(8): 918-951.

Griffith, D. E., T. Aksamit, B. A. Brown-Elliott, A. Catanzaro, C. Daley, F. Gordin, S. M. Holland, R. Horsburgh, G. Huitt and M. F. Iademarco (2007). "An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and

prevention of nontuberculous mycobacterial diseases." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **175**(4): 367-416.

Hong, S. K., B. J. Kim, Y. J. Yun, K. H. Lee, E. C. Kim, E. M. Park, Y. G. Park, G. H. Bai and Y. H. Kook (2004). "Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR-linked reverse hybridization using specific *rpoB* oligonucleotide probes." Journal of microbiological methods **59**(1): 71-79.

Howard, S. T., E. Rhoades, J. Recht, X. Pang, A. Alsup, R. Kolter, C. R. Lyons and T. F. Byrd (2006). "Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype." Microbiology **152**(6): 1581-1590.

Jeon, K., W. Koh, O. Kwon, G. Suh, M. Chung, H. Kim, N. Lee, Y. Park and G. Bai (2005). "Recovery rate of NTM from AFB smear-positive sputum specimens at a medical centre in South Korea." The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease **9**(9): 1046-1051.

Kansal, R. G., R. Gomez-Flores and R. T. Mehta (1998). "Change in colony morphology influences the virulence as well as the biochemical properties of the *Mycobacterium avium* complex." Microbial pathogenesis **25**(4): 203-214.

Kim, B. J., C. J. Kim, J. Chun, Y. H. Koh, S. H. Lee, J. W. Hyun, C. Y. Cha and Y. H. Kook (2004). "Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) sequences." International journal of systematic and evolutionary microbiology **54**(2): 593-598.

Kim, B. J., S. H. Lee, M. A. Lyu, S. J. Kim, G. H. Bai, S. J. Kim, G. T. Chae, E. C. Kim, C. Y. Cha and Y. H. Kook (1999). "Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*)." Journal of Clinical Microbiology **37**(6): 1714-1720.

Kim, H., S. H. Kim, T. S. Shim, M. Kim, G. H. Bai, Y. G. Park, S. H. Lee, C. Y. Cha, Y. H. Kook and B. J. Kim (2005). "PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644 bp Heat Shock Protein 65 (*hsp65*) gene for differentiation of *Mycobacterium* spp." Journal of microbiological methods **62**(2): 199-209.

Kim, H. Y., Y. Kook, Y. J. Yun, C. G. Park, N. Y. Lee, T. S. Shim, B. J. Kim and Y. H. Kook (2008). "Proportions of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* strains among Korean *Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus* group isolates." Journal of clinical microbiology **46**(10): 3384-3390.

Kim, K. S., K. S. Ko, M. W. Chang, T. W. Hahn, S. K. Hong and Y. H. Kook (2006). "Use of *rpoB* sequences for phylogenetic study of *Mycoplasma* species." FEMS microbiology letters **226**(2): 299-305.

Ko, K. S., J. M. Kim, J. W. Kim, B. Y. Jung, W. Kim, I. J. Kim and Y. H. Kook (2003). "Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* sequence analysis and multiplex PCR." Journal of clinical microbiology **41**(7): 2908-2914.

Ko, K. S., J. W. Kim, J. M. Kim, W. Kim, S. Chung, I. J. Kim and Y. H. Kook (2004). "Population structure of the *Bacillus cereus* group as

determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene." Infection and immunity **72**(9): 5253-5261.

Koh, W. J., O. J. Kwon, K. Jeon, T. S. Kim, K. S. Lee, Y. K. Park and G. H. Bai (2006). "Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens in Korea." CHEST Journal **129**(2): 341-348.

Koh, W. J., O. J. Kwon and K. S. Lee (2005). "Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases: a Korean perspective." Journal of Korean medical science **20**(6): 913-925.

Krutzik, S. R. and R. L. Modlin (2004). The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria, [Philadelphia,PA] : WBSaunders, [c1989-.

Kusunoki, S. and T. Ezaki (1992). "Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and Elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. abscessus (Kubica et al.) to Species Status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov." International journal of systematic bacteriology **42**(2): 240-245.

Lee, S. B. and J. S. Schorey (2005). "Activation and mitogen-activated protein kinase regulation of transcription factors ets and NF- κ B in mycobacterium-infected macrophages and role of these factors in tumor necrosis factor alpha and nitric oxide synthase 2 promoter function." Infection and immunity **73**(10): 6499-6507.

Lee, S. H., B. J. Kim, J. H. Kim, K. H. Park, S. J. Kim and Y. H. Kook (2000). "Differentiation of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato on the Basis of

RNA Polymerase Gene (*rpoB*) Sequences." Journal of clinical microbiology **38**(7): 2557-2562.

Lee, W. J., T. W. Kim, K. B. Shur, B. J. Kim, Y. H. Kook, J. H. Lee and J. K. Park (2000). "Sporotrichoid dermatosis caused by *Mycobacterium abscessus* from a public bath." The Journal of dermatology **27**(4): 264.

Lim, C. Y., K. H. Lee, M. J. Cho, M. W. Chang, S. Y. Kim, N. H. Myong, W. K. Lee, K. H. Rhee and Y. H. Kook (2003). "Detection of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of patients with gastroduodenal diseases by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase gene (*rpoB*)." Journal of clinical microbiology **41**(7): 3387-3391.

McNabb, A., D. Eisler, K. Adie, M. Amos, M. Rodrigues, G. Stephens, W. A. Black and J. Isaac-Renton (2004). "Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources." Journal of clinical microbiology **42**(7): 3000-3011.

Noone, P. G., M. W. Leigh, A. Sannuti, S. L. Minnix, J. L. Carson, M. Hazucha, M. A. Zariwala and M. R. Knowles (2004). "Primary ciliary dyskinesia diagnostic and phenotypic features." American journal of respiratory and critical care medicine **169**(4): 459-467.

Oh, W. S., K. S. Ko, J. H. Song, M. Y. Lee, S. Y. Ryu, S. Heo, K. T. Kwon, J. H. Lee, K. R. Peck and N. Y. Lee (2005). "Catheter-associated bacteremia by *Mycobacterium senegalense* in Korea." BMC infectious diseases **5**(1): 107.

Pérez, E., P. Constant, A. Lemassu, F. Laval, M. Daffé and C. Guilhot (2004). "Characterization of three glycosyltransferases involved in the biosynthesis of the phenolic glycolipid antigens from the *Mycobacterium tuberculosis* complex." Journal of Biological Chemistry **279**(41): 42574-42583.

Recht, J. and R. Kolter (2001). "Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*." Journal of bacteriology **183**(19): 5718-5724.

Ringuet, H., C. Akoua-Koffi, S. Honore, A. Varnerot, V. Vincent, P. Berche, J. Gaillard and C. Pierre-Audigier (1999). "*hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria." Journal of clinical microbiology **37**(3): 852-857.

Sermet-Gaudelus, I., M. Le Bourgeois, C. Pierre-Audigier, C. Offredo, D. Guillemot, S. Halley, C. Akoua-Koffi, V. Vincent, V. Sivadon-Tardy and A. Ferroni (2003). "*Mycobacterium abscessus* and children with cystic fibrosis." Emerging infectious diseases **9**(12): 1587.

Singh, P. K., A. L. Schaefer, M. R. Parsek, T. O. Moninger, M. J. Welsh and E. Greenberg (2000). "Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms." Nature **407**(6805): 762-764.

Song, J. Y., J. W. Sohn, H. W. Jeong, H. J. Cheong, W. J. Kim and M. J. Kim (2006). "An outbreak of post-acupuncture cutaneous infection due to *Mycobacterium abscessus*." BMC infectious diseases **6**(1): 6.

Thomas, V., K. Herrera-Rimann, D. S. Blanc and G. Greub (2006). "Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network." Applied and environmental microbiology **72**(4): 2428-2438.

Trinchieri, G. and A. Sher (2007). "Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence." Nature Reviews Immunology **7**(3): 179-190.

van Crevel, R., T. H. M. Ottenhoff and J. W. M. van der Meer (2002). "Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*." Clinical Microbiology Reviews **15**(2): 294-309.

WHO (2011). "Global tuberculosis control 2011."

Yadav, M., L. Clark and J. S. Schorey (2006). "Macrophage's proinflammatory response to a mycobacterial infection is dependent on sphingosine kinase-mediated activation of phosphatidylinositol phospholipase C, protein kinase C, ERK1/2, and phosphatidylinositol 3-kinase." The Journal of Immunology **176**(9): 5494-5503.

Yun, Y. J., K. H. Lee, L. Haihua, Y. J. Ryu, B. J. Kim, Y. H. Lee, G. H. Baek, H. J. Kim, M. S. Chung and M. C. Lee (2005). "Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* in joint biopsy specimens by *rpoB* PCR cloning and sequencing." Journal of clinical microbiology **43**(1): 174-178.

Zelazny, A. M., J. M. Root, Y. R. Shea, R. E. Colombo, I. C. Shamputa, F. Stock, S. Conlan, S. McNulty, B. A. Brown-Elliott and R. J. Wallace (2009). "Cohort study of molecular identification and typing of

Mycobacterium abscessus, *Mycobacterium massiliense*, and *Mycobacterium bolletii*." Journal of clinical microbiology 47(7): 1985-1995.

통계청 (2010). "사망원인통계연보."

Abstract

**Comparison of Innate Immune
Response based on the
Glycopeptidolipid between 2 *hsp65*
Genotypes within
*Mycobacterium massiliense***

Su-yeon, Yi

Department of Microbiology and Immunology

The Graduate School

Seoul National University

Mycobacterium are ubiquitous environmental organisms increasingly recognized to cause chronic lung disease in patients with apparently normal immune function. They can be categorized into the *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculosis mycobacteria (NTM). NTM causes disease in patients with structural abnormalities of the lung, and it is emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. Especially *M. abscessus* is considered to be the most virulent and is responsible for most pulmonary infections of rapidly growing NTMs (RGMs). A recent molecular

epidemiologic study using NTM isolates from Korean patients also showed that *M. abscessus* and *M. massiliense* were responsible for most of the infections. But *M. massiliense* which was newly reported and was very closely related to *M. abscessus*, has rarely been studied. So, the present study aims to elucidate the genetic diversity and to investigate host innate immune response in terms of *M. massiliense* genotype difference.

To investigate the genetic diversity among the *M. massiliense*, we conducted phylogenetic analysis based on *hsp65* sequences (603bp) from 149 *M. massiliense* Korean isolates. We found that *hsp65* sequence analysis could clearly differentiate them into two distinct genotype, Type I and Type II, which were isolated from 86(56.95%) and 63(41.72%), respectively. Interestingly, strong correlation was discovered in the colony morphology between the two *hsp65* genotypes. Despite some exceptions [smooth Type I vs. rough Type I; 61/86 strains (70.9%) vs. 25/86 strains (29.1%)], Type I and II correlated with smooth and rough colonies, respectively. Also, both types were completely different from one another in terms of MALDI-TOF MS and TLC profiles of GPL or whole lipid.

To investigate whether there may be the difference in the capacity evoking the host innated immune response between the two genotypes with different colony morphotypes, we compared TNF- α inducing and ERK activating effects between 2 genotypes with viable cells or extracted GPLs. Our data showed that *M. massiliense* Type II strain with a rough colony morphotype possibly due to the low level of glycopeptidolipid (GPL) induced higher level of TNF- α production in human monocytes and ERK activation in mouse J774 cell line than Type I strain in a TLR2 dependent manner.

In conclusion, two distinct *hsp65* genotypes, Type I and Type II exist within *M. massiliense* strains from Korean patients, which differ from one another in terms of both colony morphology and host innate immune

inducing capacity. Considering the positive correlation between strong innate immune response and disease severity in mycobacteria pathogenesis, it suggests the higher virulence of *M. massiliense* Type II strains than Type I

Key word : Mycobacteria, *Mycobacterium massiliense*, *hsp65*, glycopeptidolipid

Student Number : 2011-21895