Korean Journal of Microbiology (2014) Vol. 50, No. 4, pp. 281-284
DOI http://dx.doi.org/10.7845/kjm.2014.4063
Copyright ⓒ 2014, The Microbiological Society of Korea

| 보 문 |

Bradykinin Receptor의 발현에 미치는 녹농균유래 Nucleoside Diphosphate Kinase 및 Flagellin의 효과

김용재[1] · 신희성[1] · Shouguang Jin[2] · 하운환[1*]

[1]고려대학교 생명정보공학과, [2]플로리다대학교 분자유전학 및 미생물학과

Upregulaton of Bradykinin Receptor Mediated by Nucleoside Diphosphate Kinase and Flagellin from *Pseudomonas aeruginosa*

Yong-Jae Kim[1], Hee-Sung Shin[1], Shouguang Jin[2], and Un-Hwan Ha[1*]

[1]*Department of Biotechnology and Bioinformatics, Korea University, Sejong 339-700, Republic of Korea*
[2]*Department of Molecular Genetics and Microbiology, University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA*

(Received September 5, 2014 / Accepted October 8, 2014)

Immune defense responses against *Pseudomonas aeruginosa* infection play an important role in maintaining homeostasis in the human body. Previously, we reported that expression of the bradykinin receptor (BR) is induced in response to *P. aeruginosa* infection. However, the factors responsible for the induction was uncertain. Here, we found that the type III secretion system (T3SS) is responsible for the induction of BR expression, and nucleoside diphosphate kinase (Ndk), as a novel T3SS effector, mediates the upregulation. The Ndk-mediated expression of BR was not induced by *fliC* mutant treatment, indicating the involvement of flagellin, one of the well-known pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Taken together, this study demonstrated that Ndk cooperates with flagella in the development of defense responses against *P. aeruginosa* infection.

***Keywords*:** *Pseudomonas aeruginosa*, bradykinin receptor, flagellin, nucleoside diphosphate kinase

녹농균은 기회감염성 병원성 균주로서, 다양한 녹농균 유래 세균인자들이 보고되었으며, 이에 대응한 면역체계 반응에 대한 많은 연구가 진행되었다. 녹농균은 다양한 세균인자의 분비에 관여하는 분비체계가 잘 발달되어 있는데, 이 중에서 숙주와의 접촉으로 바늘구조를 형성하여 숙주내부로 Exoenzyme S, T, Y와 같은 활성효소를 주입하는 type III secretion system (T3SS)은 녹농균의 병원성에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다(Engel and Balachandran, 2009; Galle *et al.*, 2012). 또한 녹농균의 lipopolysaccharide (LPS)나 flagella는 잘 알려진 pathogen-associated molecular pattern (PAMP)으로서 염증반응 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다(Kronborg, 1995, Kumar, *et al.*, 2007).

7-Transmembrane domain을 가지는 G protein-coupled receptor family에 속하는 Bradykinin Receptor (BR)는 9개의 아미노산 (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg)으로 구성된 bradykinin과의 상호작용으로 염증반응을 일으킨다(Hall, 1992). Bradykinin 1 Receptor (B1R)는 LPS, 다양한 사이토카인(IL-1β, TNF-α, IL-6) 등에 의해 발현이 촉진되는 것으로 알려져 있다. B1R은 주로 급성 통증 유발과 관련이 있으며, B1R-리간드 반응에 의해 CXCL5와 같은 케모카인의 발현을 유도하여 neutrophil을 감염부위로 침윤시킬 수 있다(Duchene *et al.*, 2007). Bradykinin 2 Receptor (B2R)는 여러 조직에 널리 분포하고 있으며, 활성화되면 혈관 팽창을 통해 염증반응을 돕는 것으로 알려져 있다(Hall, 1997). B1R의 리간드는 B2R 활성에 필요한 BK가 angiotensin converting enzyme (ACE)에 의해 des-Arg^{9}BK로 대사되면서 생성되어 B1R과 복합체를 형성함으로서 활성을 갖게 되며, 감염 부위에서 염증반응이 더 잘 일어날 수 있도록 한다. 황색 포도상구균이나 리스테리아균의 감염 시, BR의 발현이 유도됨이 알려져 있으며, 본 연구팀은 녹농균 감염으로 BR의 발현이 증가함을 보고하였으나 관련 세균인자에 대해서는 알려진 바가 없다 (Bengtson *et al.*, 2006; Kaman *et al.*, 2009; Shin and Ha, 2011a, 2011b).

Nucleoside diphosphate kinase (Ndk)는 ATP를 사용하여 UDP를 UTP로 전환시켜 DNA와 RNA를 합성하는데 사용할 수 있도록 해주는 역할을 하며, 대부분의 종에서 잘 보존되어 있는 효소이다. 하지만 Ndk의 연구에 따르면 박테리아 유래 Ndk가 숙주에 작용함으로써 숙주의 생존에 영향을 주거나 면역반응을 조절함으로써 박테리아의 생존율을 높이기도 하는 것으로 알려

*For correspondence. E-mail: haunhwan@korea.ac.kr; Tel.: +82-44-860-1418; Fax: +82-44-860-1411

져 있다(Kolli *et al.*, 2008). 본 연구에서는, 녹농균에 의한 BR 발현 증가에 Ndk가 관여하며, 이러한 효과는 주요 PAMP로 알려진 flagella가 함께 필요함을 규명하였다.

재료 및 방법

사용 배지 및 재료

본 연구에서 사용한 녹농균은 PAK wild-type 균주와 *fliC* 돌연변이 균주(Ha and Jin, 2001)이며, 나머지 돌연변이 균주는 *pscF*, *exoSTY*, △7 및 △8 돌연변이 균주이다(Neeld *et al.*, 2014). LB 배지(yeast extract, 0.5%; tryptone, 1%; and NaCl, 1%; all w/v)를 사용하여 37℃에서 배양하였으며, flagellin은 InvivoGen 회사로부터 구입하였다.

동물세포배양

A549 (human alveolar epithelial) 세포를 10%의 fetal bovine serum (FBS, HyClone, USA)과 1% penicillin/streptomycin이 첨가 된 RPMI-1640 배지(HyClone)에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양한 후, 상층액을 제거하고 PBS로 washing하였다. 이 후 RPMI-1640을 새로 첨가하여 3시간 동안 배양한 후, 녹농균을 4시간 동안 처리하였다.

플라스미드와 형질전환

본 연구에 사용한 플라스미드는 진핵세포에서의 발현을 위해 pcDNA 3.1(+) 벡터를 이용하여 제작된 pDNNDK를 사용하였으며(Neeld *et al.*, 2014), 형질전환을 위한 플라스미드 준비에 Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, USA)를 사용하였다. 준비된 플라스미드는 pipette-type microporator (NeonTM transfection system, Invitrogen, USA)를 이용하여 전기천공법을 통해 숙주에 전달하였다. 플라스미드가 삽입된 숙주세포는 RPMI-1640에 10%로 FBS를 첨가한 배지에 37℃에서 48시간 동안 배양하였다.

q-PCR Analysis

전체 RNA는 TRIzol® Reagent를 사용하여 분리하였으며, ReverTra Ace qPCR RT kit (Toyobo, Japan) 사용으로 cDNA를 합성하였다. SYBR Green PCR Master Mix (KAPA Biosystems, USA)를 사용하여 q-PCR을 시행하였으며, 분석 시 사용한 프라이머는 다음과 같다: (hB1R) 5′-CAACTGAACGTGGCAGAAATCTAC-3′과 5′-CAAGCCCAAGACAAACACCAG-3′, hB2R 5′-GGGCACACTGCGGACCT-3′과 5′-GCGTTTGCTCACTGTCTGCTC-3′. q-PCR은 CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad, USA)을 사용하여 시행하였고, 1단계 50℃에서 2분, 이후 95℃에서 10분, 2단계는 95℃에서 15초 이후 60℃에서 1분으로 시행하였으며, 2단계를 40회 반복하였다. mRNA의 정량은 hGAPDH (5′-CCCTCCAAAATCAAGTGG-3′와 5′-CCATCCACAGTCTTCTGG-3′)를 이용하여 CT값을 비교, 표준화하여 분석하였다.

Statistics

모든 실험은 최소 3번의 반복에 의해 얻은 결과로서, mean ± standard deviation (SD)으로 표시되었다. 통계처리를 위해 Student *t* test를 사용하였으며, $P < 0.05$는 통계적 유의성을 나타내는 것으로 본다.

결과 및 고찰

녹농균은 바늘 구조를 이용하여 숙주에 직접적으로 활성효소들을 삽입하는 T3SS를 이용하여 숙주의 면역체계에 영향을 미친다(Engel and Balachandran, 2009; Galle *et al.*, 2012). 녹농균의 T3SS에서 바늘구조를 구성하는 주요 구조단백질 중 하나인 PscF가 결핍된 pscF mt는 숙주 감염 시, 낮은 세포독성을 보이는 것으로 알려져 있다(Pastor *et al.*, 2005). 이러한 pscF mt를 A549에 처리한 결과, 대조군에 비해 BR의 발현이 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1A). 이는 녹농균 감염 시 유도되는 BR의 발현에 T3SS가 관여함을 의미한다. 이에 따라 T3SS에 의해 전달되는 활성효소로 보고된 ExoSTY 결핍 균주인 STY mt를 A549에 처리한 결과, 여전히 높은 BR의 발현을 확인하였다(Fig. 1B). 이로 보아 기존에 알려져 있는 ExoSTY가 아닌 다른 세균인자가 영향을 미치는 것으로 보인다.

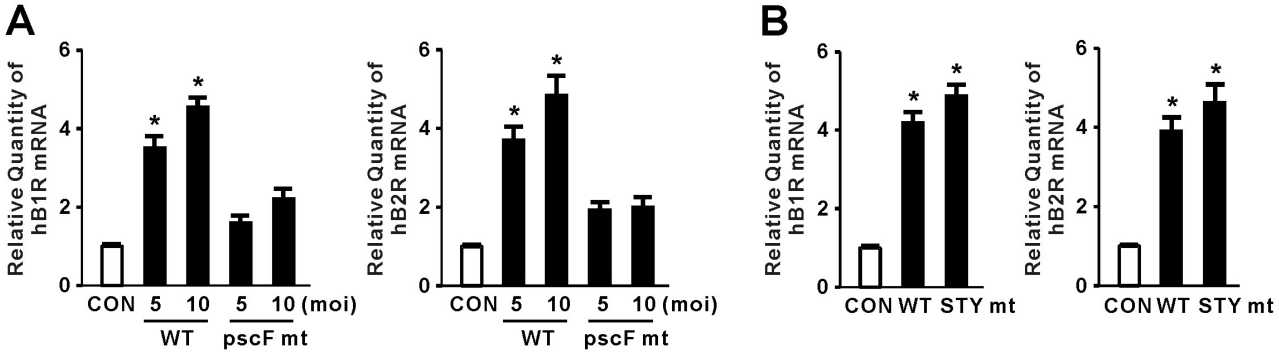

Fig. 1. The expressions of BRs are not mediated by T3SS system. (A) A549 cells were treated for 4 h with either PAK wild-type (WT) or isogenic *pscF*-deficient mutant (pscF mt) strains at an MOI of 5 or 10. (B) A549 cells were treated for 4 h with either PAK wt or isogenic *exoSTY*-deficient mutant (STY mt) strains at an MOI of 10. Data in (A, B) are expressed as mean ± SD (n = 3). *, $P < 0.05$ vs. group treated with mt (A) or control (B). moi, multiplicity of infection.

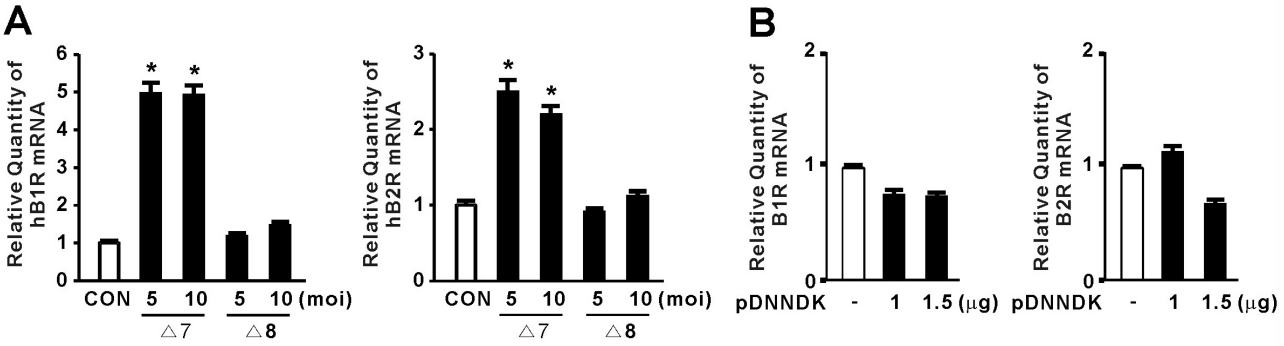

Fig. 2. The expressions of BRs are mediated by Ndk. (A) A549 cells were treated for 4 h with either PAK-derived △7 or isogenic *ndk*-deficient mutant (△8) strains at an MOI of 5 or 10. (B) A549 cells were transfected with pDNNDK at either 1 or 1.5 μg. Data in (A, B) are expressed as mean ± SD (n = 3). *, $P < 0.05$ *vs*. group treated with △8. moi, multiplicity of infection.

녹농균유래 Ndk는 T1SS을 통해 외부로 분비되며, 분비된 Ndk는 세포독성을 유발하는 것으로 알려져 있다(Kamath *et al.*, 2000). 하지만 최근 발표된 논문에 의하면 Ndk가 T3SS에 의해 숙주 내부로 전달되는 것으로 보고되었다(Neeld *et al.*, 2014). 이에 따라 녹농균의 Ndk가 BR의 발현에 미치는 미치는 효과를 조사하기 위해, Ndk를 생산하는 녹농균 △7과 Ndk가 저해된 녹농균 △8을 A549에 처리하여 BR의 발현을 조사한 결과, △7을 처리하였을 경우에 BR의 발현이 증가함을 볼 수 있지만, 대조군인 △8을 처리하였을 경우에는 BR의 발현증가를 볼 수 없었다(Fig. 2A). 녹농균의 Ndk만으로도 BR발현이 증가하는지 조사하기 위해 pDNNDK를 A549에 transfection 시킨 후, BR의 발현을 관찰해 보았지만 Ndk만으로는 BR의 발현이 증가하지 않음을 확인하였다(Fig. 2B). 이로 보아 녹농균의 Ndk에 의한 BR의 발현유도는 Ndk가 관여하기는 하지만, Ndk만으로는 충분하지 않으며, 이로 보아 녹농균에서 유래된 다른 세균인자가 필요한 것으로 보인다.

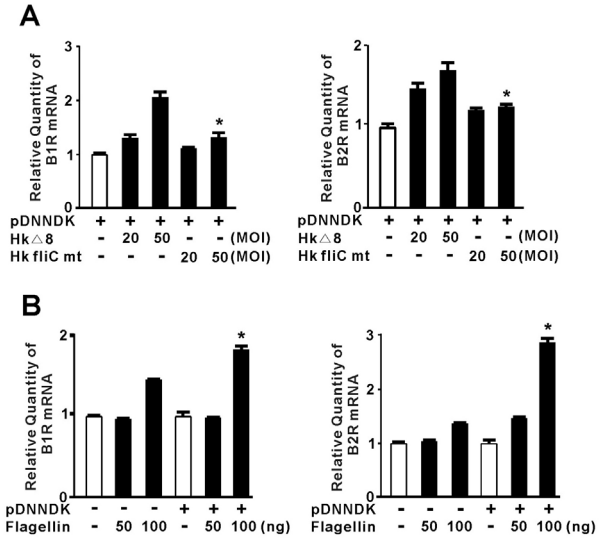

Fig. 3. The expressions of BRs require flagellin. (A) A549 cells transfected with pDNNDK were treated for 4h with either PAK-derived Heat-killed △8 (Hk△8) or Heat-killed *fliC*-deficient mutant (Hk fliC mt) strains at an MOI 20 or 50. (B) A549 cells transfected with pDNNDK were treated for 4 h with flagellin at either 50 or 100 ng. Data in (A, B) are expressed as mean ± SD (n = 3). *, $P < 0.05$ *vs*. group treated with Hk △8 (A) or group transfected with vector only (B). moi, multiplicity of infection.

녹농균의 외막에는 숙주의 면역반응유도에 관여하는 PAMP들이 존재하며, 이중에는 flagella가 포함되어 있다(Kumar *et al.*, 2007; Raoust *et al.*, 2009). Flagella가 BR 발현에 미치는 효과를 조사하기 위하여 열처리(65℃, 10분)로 사멸시킨 녹농균 △8균주와 flagella 합성이 저해된 녹농균 fliC mutant (mt) 균주를 pDNNDK이 transfection된 A549에 처리하였다. 그 결과, △8 사멸균을 처리한 경우, BR의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었지만, fliC mt 사멸균을 처리한 경우, BR의 발현이 증가하지 않는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3A). 이러한 결과를 확인하기 위하여 정제된 flagellin을 pDNNDK가 transfection된 A549에 처리하여 조사한 결과, flagellin의 처리된 세포에서 BR의 발현이 증가함을 볼 수 있었다(Fig. 3B). 이는 BR의 발현유도에 녹농균의 Ndk와 flagella가 모두 관여함을 의미한다.

녹농균 감염 시, BR의 발현이 유도된다는 선행연구 보고(Shin and Ha, 2011a, 2011b)에 이어, 본 연구에서는 BR 발현에 관여하는 녹농균 유래인자가 Ndk임을 규명하였으며, 특히 Ndk에 의한 BR 발현유도에 flagella가 함께 작용하여야 함을 제시하였다.

적 요

병원성 균주인 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 감염에 대응하여 나타나는 면역반응은 인체의 항상성 유지에 중요하다. 선행 연구에서 녹농균의 감염에 대응하여 bradykinin receptor (BR)의 발현이 증가됨을 보고하였지만, 발현유도에 관여하는 녹농균 유래인자에 대해서는 보고한 바가 없었다. 이번 연구에서는 녹농균에 의한 BR의 발현은 Type III secretion system (T3SS)이 관여하지만, 기존에 알려진 T3SS인자가 아닌 nucleoside diphosphate kinase (Ndk)에 의한 것으로 조사되었다. 하지만 pDNNDK를 이용한 transfection 실험 결과, Ndk 만으로는 BR의 발현이 유도되지 않았으며, Ndk와 함께 flagella가 필요함을 발견

하였다. 이러한 결과는 기존에 보고된 주요 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)인 flagella와 더불어 감염대응에 관여하는 Ndk를 발굴한 의미가 있으며, 녹농균에 의한 질병기전을 이해하는데 도움을 줄 수 있다.

감사의 말

이 논문은 2013년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받은 기초연구사업(NRF-2013R1A1A2059846) 및 BK21 plus 프로그램(교육부)의 지원으로 수행되었다.

References

Bengtson, S.H., Phagoo, S.B., Norrby-Teglund, A., Pahlman, L., Morgelin, M., Zuraw, B.L., Leeb-Lundberg, L.M., and Herwald, H. 2006. Kinin receptor expression during *Staphylococcus aureus* infection. *Blood* **108**, 2055-2063.

Duchene, J., Lecomte, F., Ahmed, S., Cayla, C., Pesquero, J., Bader, M., Perretti, M., and Ahluwalia, A. 2007. A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: Role for the kinin B1 receptor and the chemokine CXCL5. *J. Immunol.* **179**, 4849-4856.

Engel, J. and Balachandran, P. 2009. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 61-66.

Galle, M., Carpentier, I., and Beyaert, R. 2012. Structure and function of the type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 831-842.

Ha, U. and Jin, S. 2001. Growth phase-dependent invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and its survival within HeLa cells. *Infect. Immun.* **69**, 4398-4406.

Hall, J.M. 1992. Bradykinin receptors: Pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.* **56**, 131-190.

Hall, J.M. 1997. Bradykinin receptors. *Gen. Pharmacol.* **28**, 1-6.

Kaman, W.E., Wolterink, A.F., Bader, M., Boele, L.C., and van der Kleij, D. 2009. The bradykinin B2 receptor in the early immune response against Listeria infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **198**, 39-46.

Kamath, S., Chen, M.L., and Chakrabarty, A.M. 2000. Secretion of nucleoside diphosphate kinase by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* 8821: Involvement of a carboxy-terminal motif in secretion. *J. Bacteriol.* **182**, 3826-3831.

Kolli, B.K., Kostal, J., Zaborina, O., Chakrabarty, A.M., and Chang, K.P. 2008. Leishmania-released nucleoside diphosphate kinase prevents ATP-mediated cytolysis of macrophages. *Mol. Biochem. Parasitol.* **158**, 163-175.

Kronborg, G. 1995. Lipopolysaccharide (LPS), LPS-immune complexes and cytokines as inducers of pulmonary inflammation in patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *APMIS Suppl.* **50**, 1-30.

Kumar, A., Yin, J., Zhang, J., and Yu, F.S. 2007. Modulation of corneal epithelial innate immune response to *Pseudomonas* infection by flagellin pretreatment. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 4664-4670.

Neeld, D., Jin, Y., Bichsel, C., Jia, J., Guo, J., Bai, F., Wu, W., Ha, U.H., Terada, N., and Jin, S. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* injects ndk into host cells through a type III secretion system. *Microbiology* **160**, 1417-1426.

Pastor, A., Chabert, J., Louwagie, M., Garin, J., and Attree, I. 2005. Pscf is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**, 95-101.

Raoust, E., Balloy, V., Garcia-Verdugo, I., Touqui, L., Ramphal, R., and Chignard, M. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS One* **4**, e7259.

Shin, H.S. and Ha, U.H. 2011a. Up-regulation of bradykinin B2 receptor by *Pseudomonas aeruginosa* via the NF-kappaB pathway. *Curr. Microbiol.* **63**, 138-144.

Shin, H.S. and Ha, U.H. 2011b. Up-regulation of human bradykinin B1 receptor by secreted components of *Pseudomonas aeruginosa* via a NF-kappaB pathway in epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **63**, 418-426.