



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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](#)

이학석사 학위논문

담배연기 추출물에 의한 황색포도상구균  
분비 단백질 연구

Effects of cigarette smoke extract exposure on  
the secretion of pro-allergic proteins  
from *Staphylococcus aureus*

울산대학교 대학원

의과학과

이 지원

담배연기 추출물에 의한 황색포도상구균  
분비 단백질 연구

지도교수 송 우 정

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2022년 2월

울산대학교 대학원  
의과학과  
이 지원

이지원의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원장 조 유 숙 (인)

심사위원 권 혁 수 (인)

심사위원 송 우 정 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2022년 2월

## 국문 요약

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 급성 감염병의 주요 원인 병원체이지만, 만성 알레르기 질환과도 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 특히, 황색 포도상구균이 분비하는 병원성 독소 및 단백질 중 staphylococcal enterotoxins (SEs)과 serine protease-like proteins (Spl)는 2형 염증반응을 유발하거나 악화시킬 수 있으며, SE-IgE (Staphylococcus aureus enterotoxin immunoglobulin E) 감작은 성인 천식의 유병률과 중증도와 밀접히 관련되어 있다. 특이한 점은 SE-IgE 감작이 비흡연자에 비해 흡연자에서 2배가량 흔하게 관찰된다는 점이다. 집먼지 진드기 등 알레르겐의 경우, 흡연 또는 담배 성분이 기도 상피세포를 자극하여 알레르기 감작을 유도하거나, 알레르겐의 항원성을 증가시키는 등의 기전이 실험연구를 통해 알려져 있다.

본 연구에서는 담배연기가 포도상구균에 직접 작용하여 2형 염증반응 및 IgE 감작을 유도할 수 있는 Spl 등 세균 단백 분비를 증가시킬 가능성에 대해 실험 연구 방법을 통해 조사하였다. 가설을 검증하기 위해 질량 분석법 기반의 단백질체 분석을 수행하여 *in vitro* 세균 배양 조건에서 담배연기추출물(CSE: cigarette smoke extract) 자극 전후 포도상구균 분비 단백질체(secretome)의 프로파일의 차이를 조사하였다.

사람의 비강에서 면봉 도말 방법으로 천식이 없는 대조군 12명과 천식환자 14명의 포도상구균을 분리, 동정했다. 분리된 포도상구균은 CSE 자극 유무에 따라 배지에 성장단계별로 3시간, 10시간 배양하여 원심분리 후 상층액만을 얻어 단백질체 분석을 수행했고 그 결과 총 487개 단백질이 동정되었다.

분비 단백질체 분석 결과, CSE 자극 후 황색포도상구균 분비 단백질체의 프로파

일은 다양한 방향으로 변화하는 양상이 관찰되었고, 대조군과 환자에서 얻은 균주는 정도는 다르지만 비슷한 방향으로 변화하였다. 또한, 대조군에서 분리한 균의 단백질체와 환자의 균에서 분리한 단백질체 프로파일은 CSE 자극 전에도 구별되었다. 본 연구의 주요 관심 대상인 Spls의 경우, 건강 대조군의 균주와는 달리 천식 환자의 포도상구균에서는 CSE 처리 전에도 관찰되었고, CSE 처리 후 유의하게 발현이 증가하였다.

본 연구 결과는 담배연기 추출물이 황색포도상구균에 직접 작용하여 Spl 등의 분비를 유도할 수 있음을 시사하며, 이 결과는 흡연력이 있는 환자에서 SE-IgE 레벨이 더 높다는 기존 역학 연구 결과에 부합된다. 나아가 흡연으로 인한 천식 중증도 및 악화 기전에 Spls 단백질이 기여할 수 있음을 시사한다.

## 차 례

인준서	0
국문요약	1
차례	3
1) 서론	4
2) 연구 재료 및 방법	7
3) 실험결과	13
4) 고찰	42
5) 참고문헌	46
영문요약	51

## 1) 서론

황색포도상구균은 일반적으로는 급성 감염질환에 중요한 병원체로 알려져 있지만,<sup>1</sup> 지역사회 인구 집단의 30% 정도에서 피부와 코 점막 등에 상재 하고 있으며,<sup>2</sup> 최근에는 만성 염증 질환인 알레르기질환과의 관련성도 부각되기 시작했다.<sup>3-5</sup> 중증 천식과 만성 부비동염 등 중증 기도 알레르기 질환은 유병률 관점에서 전체 기도 알레르기 환자군 가운데 약 5-15%에 불과하지만, 사회 경제적 질병 부담 관점에서는 약 50% 정도를 차지하고 있다. 이러한 높은 질병 부담은 기존 치료제에 대한 불응성과 약제 부작용에 기인한다. 최근 중증 알레르기 질환에 대한 표적치료제들이 개발되고 있으나,<sup>6</sup> 이들 질환을 예방하기 위한 병태생리 지식은 여전히 부족하며 효과적인 예방적 중재법도 아직 없는 실정이다.

황색포도상구균 IgE 감작(Staphylococcal IgE sensitization)은 천식과 만성 부비동염 환자에서 유병률이 40-60% 정도로 빈번하며, 질환 발생 및 중증도와 밀접히 관련되는 등 임상적으로 중요한 문제이다.<sup>7,8</sup> 황색포도상구균은 초항원(superantigen) 및 알레르기 염증 촉진(pro-allergic) 기능을 하는 단백질과 독소를 분비하는데, 그 중에서 staphylococcal enterotoxin B (SEB), Spls 등이 IgE 감작 및 알레르기 염증을 증가시키는 것으로 비교적 잘 알려져 있다.<sup>9,10</sup> 포도상구균 IgE 감작은 집먼지 진드기, 꽃가루 등 흡입 알레르겐 IgE 감작과 달리 아토피가 없는 고령층에서 유병률이 높고 노년기 알레르기 질환과 중요하게 관련되어 향후 인구 고령화에 따라 노인 알레르기 질환 원인으로서의 역학적 중요성이 증가할 것으로 예상된다. 또한 특이하게



포도상구균 IgE 감작은 아토피가 없는 흡연자에서 유병률이 높게 관찰 된다.<sup>11</sup> 포도상구균 IgE 에 감작된 천식 환자 가운데 흡연자는 특히 IgE-비감작군과 비흡연군에 비해 중증 천식, 천식악화 발생, 비가역적 기도 폐색 발생 등 질병 중증도 지표들이 높게 관찰된다.<sup>7,12</sup> 일반인구집단의 코 점막 포도상구균 상재율이 약 30%이며 한국 성인 남성 평생 흡연 경험 비율이 약 40%인 점을 고려할 때, 현재 상당히 많은 인구가 포도상구균 관련 알레르기 질환 발생 잠재 위험군으로 추정해볼 수 있다.

포도상구균 IgE 감작과 흡연의 상관성 기전은 아직 알려져 있지 않다. 과거에는 집먼지 진드기 등 일반적인 흡입 알레르겐 IgE 감작 기전 연구에서처럼 담배 자극이 인체의 기도상피세포 결합력(airway epithelial integrity)을 저하시킴으로써 포도상구균에 대한 IgE 감작 형성을 촉진하는 작용을 할 것으로 추정되었다.<sup>9,13</sup> 담배연기는 직접적으로 상피세포에 영향을 미쳐 점액을 필요이상 생성하게 하고 염증 유발성 사이토카인과 케모카인들을 분비하게 만든다.<sup>14-16</sup> 이로 인해 호중구나 호산구가 모여들고 림프구의 균형이 무너지게 된다는 연구들이 진행되었다.<sup>17,18</sup> 이와 같이 다수의 흡연과 질병 관련성 연구에서는 흡연이 인체 내에서 파괴적인 변화를 가져오고 그로 인해 질병이 악화되는 작용에 대해 밝히고 있다. 천식환자 에서도 흡연하는 환자가 증상이 심하거나 염증세포의 침윤이 많이 관찰되고 기도과민성도 더 높은 편이다.<sup>19</sup> 하지만, 최근 보고된 대기오염물질과 포도상구균의 직접적 상호작용 연구사례에서는 담배연기가 황색포도상구균을 좀더 증가된 병원성을 갖게 만든다.<sup>20</sup> 담배연기를 직접 포도상구균에 접촉시키면 산화적 스트레스를 통해 생물막(biofilm) 형성이 촉진됨을 관찰한 연구가 있으며<sup>21</sup> 포도상구균의 생물막 형성은 일반적으로 좀더 숙주에 부착되기 쉬운 구조로 생각되고, 부착성

증가는 질병의 발생과 지속에 중요한 요인으로 알려져 있다.<sup>22</sup> 이와 같이 담배연기가 세균에 직접적으로 기능적 변화를 유도할 가능성이 있을 것으로 예상할 수 있기 때문에 본 연구에서는 담배연기 추출 물질이 황색포도상구균에 직접 작용하여 Spls 등 알레르기 염증 촉진 단백질 분비를 유도할 수 있는지 연구하고자 한다.

## 2) 연구 재료 및 방법

### 2.1. 포도상구균 분리 및 동정

천식 환자와 정상 대조군의 비강내 점막을 면봉(BD BBL Culture Swab)으로 긁어 검체를 채취하였다. 검체 채취용 면봉은 습도가 유지되도록 설계되어있으나 사용 후 점차 수분이 증발하므로 채취 후 상온 6시간 이내에 실험실에서 후속 처리를 진행하였다. 비강 면봉 샘플은 오염없이 관리되도록 하고 클린벤치에서 Mannitol Salt Agar (MSA)에 도말하여 최장 48시간까지 37°C에서 평판 배양하였다. 48시간 내에 육안으로 확인 가능한 균 집락이 자라면서 MSA를 노란색으로 변색시키는 경우에 포도상구균 양성으로 판정하였다(표 1). 양성으로 판정된 균 집락은 추가로 blood agar에서 배양되는지 확인하였으며 포도상구균 영양 배지인 BD™ Tryptic Soy Broth (TSB)에서 37°C, 200rpm에서 16시간 교반 배양 후, 20% glycerol이 포함되도록 하여 -80°C 초저온 냉동고에 보관하였다. 모아진 포도상구균 테스트 양성 샘플들을 16s RNA gene sequencing 진행하였고 기존에 알려진 유전 정보와 비교하여 동정하였다(표 2). 대부분의 샘플이 Sequence가 99%이상 일치하여 황색포도상구균으로 판단되었으나 이 과정에서 황색포도상구균이 아니거나 조금이라도 의심되는 경우 분석에서 제외하고 실험을 진행하였다.

### 2.2. 담배연기추출물 제작

담배연기 추출물은 기존에 알려진 방법을 참고하여<sup>14</sup> 약간의 수정을 거쳐

만들었다. 일정 속도로 공기의 흐름을 만들 수 있는 동력 펌프를 사용하였다(C.B.S Scientific, CA, USA). 동력 펌프에 실리콘 튜빙으로 25ml 플라스틱 피펫을 연결하고 다른 한쪽에는 필터를 제거한 연구용 담배를 연결한다(3R4F, Lexington, KY, USA). 담배에 불을 붙이고 담배연기를 빨아들이는 흡기방향으로 동력 펌프를 가동시켰다. 피펫 안에는 10ml 의 차가운 PBS 를 넣고 10 개의 담배를 한 개피당 약 8 분에 전소하도록 속도를 조절하였다. 전체 과정에서 PBS 가 차갑게 유지되도록 한다. 10ml 에 10 개피의 담배를 태워 기체를 포집한 용액을 100% CSE 라고 정의하고 0.2 $\mu$ m 필터를 이용하여 여과 후 적절한 농도로 배지에 희석하여 사용하였다. -80°C 초저온 냉동고에 소분하여 보관하였으며 한번 녹인 담배추출물은 재사용하지 않았다.

### 2.3. 황색포도상구균 생장 곡선 및 담배 추출물 농도 결정

생장 곡선을 이용한 담배 추출물 농도 결정 실험에 표준 균주인 ATCC29213을 사용하였다. 황색포도상구균의 기본 배양 배지로 Tryptic soy agar (TSA), Tryptic soy broth (TSB)를 사용하였다. 균을 TSA에 하루 키운 뒤 TSB 10ml에 단일 집락을 37 °C에서 16시간 이상 200rpm으로 교반 배양하였다. 이 균 배양액을 새 TSB와 2.5, 5, 10, 20, 30%까지 각 농도로 CSE를 첨가한 CSE-TSB (cigarette smoke extract-Tryptic soy broth) 10ml에 600nm에서 흡광도가 0.1-0.15 가 되도록 희석하여 매시간 흡광도의 변화를 관찰하였다. 담배추출물을 넣지 않은 대조군 포함 각 조건의 배양 배지는 30% CSE-TSB에 맞추어 PBS를 첨가하여 배양하는 것으로 영양 조건을 동일하게 하였다.

## 2.4. CFU 측정

측정하려는 균의 배양액을 1/10씩 계속 희석하여  $10^{-9}$ 까지 희석한 뒤 각 희석액을 3장의 Blood agar plate에 100ul씩 도말하였다. 37°C에서 24시간 평판 배양 후 자란 단일 집락의 수를 세어 한 플레이트에 300개 이하가 되는 희석 농도를 정하고 3장의 집락 수 평균으로 CFU를 계산하여 결정하였다. 두 번 이상 반복하여 동일한 결과가 나오는지 확인하였다.

## 2.5. 단백질 정량

브래드포드 단백질 정량법(Bradford Protein Assay)으로 흡광도를 측정하여 포도상구균 배양 상층액의 총 단백질 양을 정량 하였다.

## 2.6. 사람 기도 폐 상피세포주 배양

사람 기도 폐 상피세포주인 BEAS2b (CRL-9609, American Type Culture Collection) 세포를 콜라겐으로 코팅한(bovine collagen type I, 0.03 mg/mL) 배양 접시에 BEBM배지(BEGM Kit No. CC-3170, Lonza) 로 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2-3일에 한번 계대 배양하였다. 80%정도 자란시점에서 세포들을 분리하여 24well에  $2 \times 10^5$  cell/ml, 500ul로 가득 차게 배양 후 황색포도상구균의 배양 상층액을 1:100으로 처리하였다. 황색포도상구균의 배양 상층액은 대조군 배지와 CSE를 포함한 배지(CSE-TSB)에서 16시간 이상 교반 배양 후 원심분리하여 상층액 만을 얻었고 사람 기도 폐 상피세포주에 처리하기 전에 0.2µm 필터를 통과시켜 균이 혼입되지 않게 했다.

## 2.7. Cytokine ELISA

황색포도상구균의 대조군 배양 상층액과 담배추출물이 10% 포함된 배양 상층액을 상피세포 배지에 부피 비 1:100으로 처리 후 24시간 뒤 세포 주의 상층액에서 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (DY206, DY208, R & D Systems)을 사용하여 IL-6와 8을 측정하였다. 비교를 위해 세포 주 배지에 담배추출물만 동일한 농도로 처리한 균(부피 비 1:1000) 과 대조군 배양 상층액에 단순 담배추출물을 혼합하여 처리한 균을 만들어 함께 실험하였다. 또한 균 배양 상층액을 100°C heat block에서 30분간 가열하여 단백질활성을 잃게 한 뒤 상피세포주에 처리하여 동일하게 실험하였고 사이토카인의 분비를 측정하였다. 모든 실험에서 균 배양 상층액은 0.2µm필터로 여과하여 사용하였다.

## 2.8. 코 점막에서 채취한 황색포도상구균의 단백질 분석

환자와 건강한 대조군으로부터 분리, 동정한 황색포도상구균을 Blood Agar Plate (BAP)에서 하루 동안 평판 배양 후 단일 집락을 TSB에 16시간 이상 교반 배양한다. 배양한 균을 새 액체영양배지에 흡광도(OD<sub>600nm</sub>) 측정할 때 0.1-0.15가 되도록 희석하고 담배연기추출물을 10%처리하여 3시간, 10시간 동안 교반 배양하였다. 각 시간포인트에서 4°C, 4,000rpm, 10분간 원심 분리로 상층액을 얻고 0.2µm필터로 여과하여 사용하였다. 상층액에서 Bicinchoninic acid (BCA) assay로 농도를 재어 샘플 당 100µg의 단백질을 건조하여 사용하였다.

## 2.9. LC-MS분석

LC-MS 분석을 위해 Thermo사의 Ultimate 3000 LC system과 Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer system을 사용하였다. Peptide separation을 위해 건조된 peptide 혼합체를 0.1% formic acid 30 ul로 reconstitution하여 auto sampler를 이용하여 4.0 ul를 injection했다. Peptide 분리는 Analytical column: C18, 3um bead particle, 75 um ID, 360 um ID, Length 20cm를, Trapping column: C18, 3um bead particle, 150 um ID, 360 um ID, Length 2cm를 사용했고 Sample loading flow rate는 10ul /min, Sample loading time은 10분, Gradient flow rate는 분당 400nl이며 Total gradient time은 180분이었다. (SolA: 0.1% formic acid, SolB: 0.1% formic acid, 100% acetonitrile)

MS1분석시 조건은 최대주입시간이 30ms이고 분해능은 m/z 400에서 70,000 이었다. MS2에 대한 Top 10 peptide ion picking에 최대주입시간이 55ms이고 분해능이 17,500이며 Normalized collision energy는 26%, Auto Gain Control target은 3e5 로 설정되었다. Dynamic exclusion은 15s동안 적용되었고 각 샘플에 대해 기술적으로 세 번 반복 수행하였다.

## 2.10. 단백질 동정과 데이터베이스 분석 및 통계

각 시료 군별로 획득된 RAW파일들을 Proteome Discoverer (ver. 2.2)를 이용하여 분석을 수행하였다. Digestion mode는 trypsin을 이용하였고 Fixed modification을 Cysteine carbamidomethylation으로 하여 Acetylation at protein N-term, Methionine oxidation, Gly-Gly at lysine, Phosphorylation at Serine, Threonine, Tyrosine, Acetylation at lysine 과 같은 다양한 modification과 최대

2개의 miscleavage를 기본으로 하였다. Intensity threshold는 500, Maximum peptide mass는 1,500Da이었고 PSM false positive rate는 0.01, Protein false positive rate는 0.01이었다. 유전형에 맞는 Staphylococcus aureus sequence 정보를 이용하여 Sequence database 분석을 수행, 단백질들을 동정하였다.

각 단백질들의 abundance값으로 군별 증감을 계산하였고 Fold change 2이상, P값은 0.05이하를 의미 있는 변화로 상정하였다. 의미 있는 변화를 보인 단백질들은 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 Database를 이용하여 기능적으로 관계 있는 그룹으로 분류하고 통계적으로 의미 있는 생물학적 pathway를 탐색하였다.

### **2.11. Regulator mRNA 역 전사 증합효소 연쇄반응**

단백체 분석 조건과 동일하게 실험을 진행하되 지수 생장기인 4시간에서 멈추고 원심 분리로 상층액과 균을 분리하였다. 펠렛 상태의 황색포도상구균에 Trizol 용액을 넣고 isopropyl alcohol 침전하여 전체 RNA를 분리하였다. 추출한 RNA에 random primer와 역전사효소를 함께 반응시켜 cDNA를 합성하였다(cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems). 만들어진 cDNA와 regulator gene의 primer를 섞고 dNTP와 DNA중합효소를 넣어 증폭시켰다. 이때 중합효소연쇄반응 산물은 SYBR green dye를 이용하여 Roche Light Cycler 480 system으로 측정하였다(Light Cycler 480 SYBR Green I Master, Roche).



### 3) 실험 결과

#### 3.1. 코 점막 상재 황색포도상구균 채취

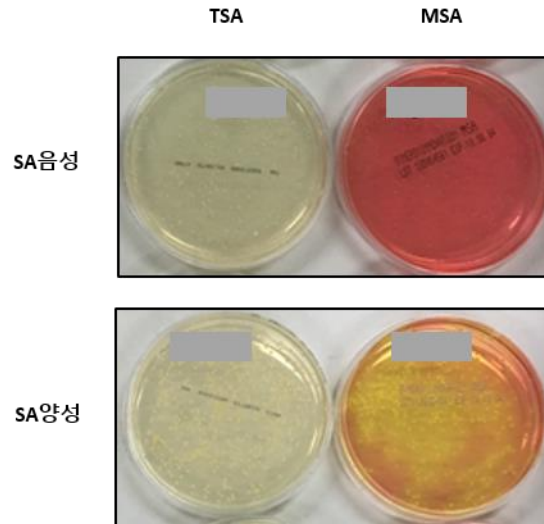
천식으로 내원한 환자들을 대상으로 SE-IgE 감작이 있는 중증 천식 환자를 모집하여 Nasal swab방법으로 코 점막 상재균 샘플을 얻었다. 대조군은 천식, 비염 등 알레르기 질환의 병력과 현재 증상이 없는 건강 대조군을 전향적으로 모집하여 환자군과 동일한 방법으로 코 점막 상재균을 채취하였다. 환자 및 대조군의 비강 면봉 시료를 채취한 즉시 MSA배지로 옮겨 24시간에서 최대 48시간까지 배양하여 배지의 컬러 변화로 SA양성을 판별한다(그림 1). 비강 면봉 시료는 채취 후 6시간을 넘기지 않았으며 전체 대상자 가운데 양성률은 20%였다. 48시간 내에 MSA가 변색된 환자 14명과 대조군 13명의 시료가 실험에 사용되었다(표 1).

#### 3.2. 황색포도상구균 동정

환자로부터 배양 검사로 분리한 균주에 대해 16s rRNA를 capillary electrophoresis sequencing분석하였다. primer 16S-785F (5'-GGATTAGATACCCTGGTA -3'), 16S-907R (5'- CCGTCAATTCMTTTRAGTTT -3')를 이용하여 16S rRNA 유전자 절편을 증폭한 후 염기서열을 결정하여 1,400~1,500bp의 염기서열을 얻었고 이를 NCBI blastn database에서 비교하여 99%이상 *S. aureus* (*staphylococcus aureus subsp. aureus* DSM20231)와

**표 1. 대상군의 기저 특징**

	환자군	대조군
대상수(N)	14	13
여성(%)	50	58.3
나이(세)	55.5±13.7	42.3±15.7
흡연력(%)		
평생 비흡연	57.3	83.3
과거 흡연	35.7	16.7
현재 흡연	7	0
만성 부비동염(%)	83.3	0
천식(%)	100	0



### 그림 1. 비강 면봉 시료의 양성 판정

코 점막에서 면봉 시료를 얻어 각 배지에 도말하여 24 시간에서 최대 48 시간 까지 배양한다. 48 시간 내에 TSA 배지에서 자라고 MSA 에서도 자라며 MSA 배지를 변색시키는 경우 *S. aureus* (SA) 양성으로 판정한다.

상동성을 가지는 것을 확인하였다(표 2). MSA 배양 검사 양성으로 확인된 환자 14명중 sequencing분석결과가 staphylococcus의 다른 strain일 가능성이 있으면 이후 실험에서 제외하였다.

### 3.3. 생장 곡선을 통한 담배연기추출물 농도 결정

담배연기에는 4800여 가지 이상의 화학물질들이 포함되어 있으며 그중 일부는 생장을 저해하는 능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 흡연자에게서 황색포도상구균이 더 적은 확률로 발견되지 않는기 때문에 생장에는 방해가 되지 않을 정도의 농도가 실험에 적합할 것이라 생각하였다. 특정 농도의 담배연기에 노출되었을 때 황색포도상구균의 생장이 얼마나 저해되는지 알아보기 위해 여러 농도의 담배연기추출물을 포함한 배지에서 표준 균주(ATCC29213) 생장을 관찰하였다. 실험에 사용된 담배연기 추출물 원액을 여러 농도로(0%, 2.5%, 5%, 10%, 20%, 30%) 배양 배지(TSB)에 희석한 뒤 24시간 이상 키우며 일정시간 간격으로 OD<sub>600nm</sub>를 측정하였다. 그 결과 초기 생장에서는 5%이상의 CSE 농도에 의해 O.D가 감소하여 생장 저해를 보였다(그림 2A). 그러나 시간이 지날수록 생장 저해 정도는 줄어들며 생장이 exponential phase를 지나 stationary phase로 접어드는데 8시간 정도 걸리는데 이때는 배지 내의 담배 추출물 농도가 10%까지는 생장에 큰 차이가 없다(그림 2B). 따라서 stationary phase에 도달했을 때 생장 저해가 10%미만으로 일어나는 최대 농도인 10%CSE-TSB를 실험 조건으로 결정하였다.

**표 2. 배양 검사로 분리한 균주의 16s rRNA sequencing 분석**

	No.	Subject	Length	Match	Total	Pct.(%)
Healthy control	1	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1476	1476	100
	2	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1476	1476	100
	3	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1473	1474	99
	4	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1473	1474	99
	5	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1475	1476	99
	6	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1473	1477	99
	7	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1473	1475	99
	8	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1476	1476	100
	9	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1475	1476	99
	10	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1473	1473	100
	11	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1474	1474	100
	12	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1475	1476	99
	13	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1473	1474	99
Patient	1	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1475	1476	99
	2	Staphylococcus warneri strain AW 25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1470	1469	1470	99
	3	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1476	1476	100
	4	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1474	1474	100
	5	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1474	1474	100
	6	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1476	1476	100
	7	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1476	1476	100
	8	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1475	1476	99
	9	Staphylococcus haemolyticus strain JCM 2416 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1473	1472	1473	99
	10	Staphylococcus warneri strain AW 25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1470	1468	1470	99
	11	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1475	1476	99
	12	Staphylococcus aureus strain ATCC 12260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1476	1475	1481	99

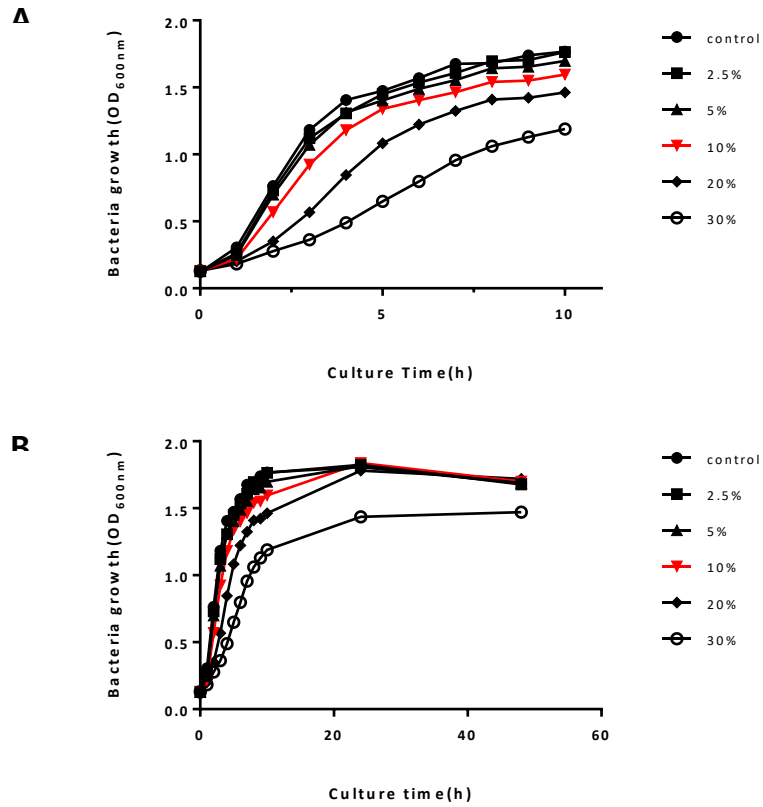


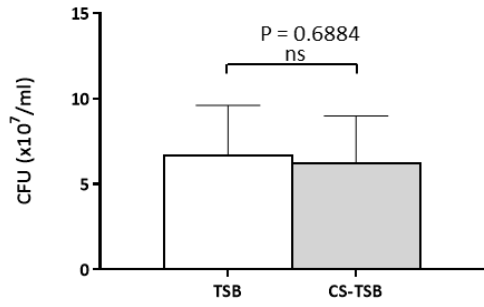
그림 2. 담배추출물이 포함된 배지에서 표준 균주의 성장 곡선

담배추출물을 배지에 2.5-30%까지 각 농도로 포함시켜 *S. aureus* (ATCC29213)를 배양한다. (A) 매시간마다 흡광도를 측정하여 더 이상 증가하지 않는 성장 정체기 까지를 확대하여 나타내고, (B) 총 48 시간까지 배양한 성장곡선으로 그려 담배추출물이 없는 대조군 배지 상태의 성장과 비교하였다. 성장정체기에 도달했을 때 흡광도가 10%이상 차이 나지 않으면서 최대 농도인 CSE 10% (red line)를 차후 실험에 사용할 농도로 결정하였다.

### 3.4. 사람 기도 폐 상피세포주에서 황색포도상구균 단백질의 염증유도반응

비강으로 들어와 집락을 형성하는 균으로부터 분비하는 물질이 기도로 유입되어 영향을 준다고 가정하였다. 그리고 흡연자의 경우 담배연기에 상재균이 지속적으로 노출되며 분비하는 단백질 물질이 흡연하지 않는 사람의 상재균의 단백질 물질과 구성이 다를 것이라 예상하였다. 사람 기도 폐 상피세포주인 BEAS2B에 CSE-TSB로 키운 표준 균주의 배양액을 처리해 주었을 때 CSE 없는 기본 배지에서 자란 균의 배양액을 처리한 것과 어떻게 다른지 상피세포의 염증성 사이토카인 분비 능력을 비교해 보고자 했다. 그 결과 CSE-TSB로 키운 균의 배양액을 처리한 균에서 CSE 없이 키운 배양액을 처리한 균보다 IL-6가 유의미하게 증가하였고, 이현상은 단순히 CSE를 균의 배양액과 혼합해 세포에 처리해 준 것과는 달랐다(그림 3C, D). 균을 키운 후 배양액의 전체 단백질 농도와 생균 수를 측정해 보았을 때 CSE 유무에 의해 차이를 보이지 않았으므로 단순히 분비하는 단백질의 양 보다는 단백질의 종류가 달라진 것이라 예상하였다(그림 3A, B). 또한 이 배양액을 가열하여 단백질과 효소 등을 열 변성 시켜 활성을 없애고 동일한 실험을 진행하였을 때 IL-6의 분비량이 감소한 것을 관찰하였다(그림 3E). 균의 배양액에는 죽은 세포의 여러가지 당류 등 세포벽 구성물질 포함 항원물질들이 섞여 있을 것이지만 가열로 인한 사이토카인의 감소가 보여주는 것은 IL-6 증가 요인에 효소 활성 단백질 물질이 일정부분 기여하고 있다고 생각 할 수 있다.

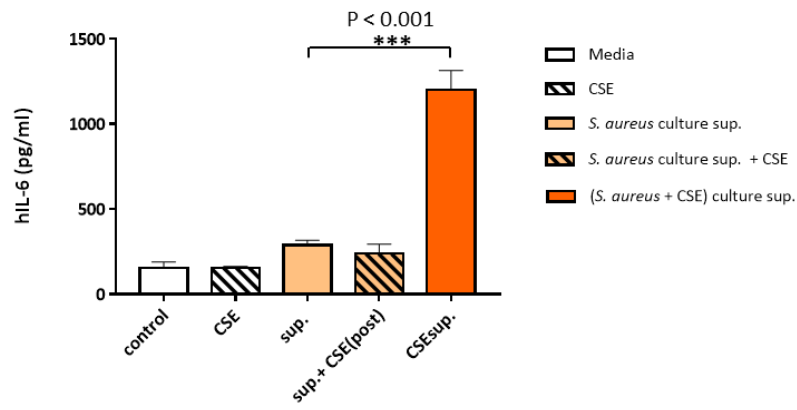
**A**



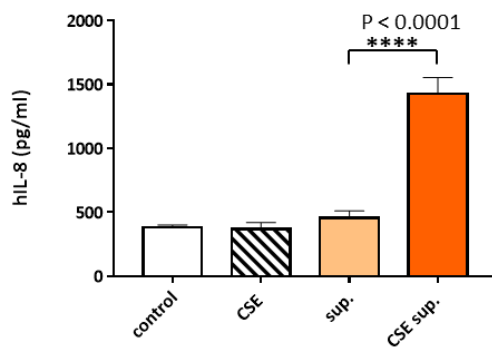
**B**

	TSB control	TSB	CS-TSB (10%)
Sup. Protein (mg/ml)	5.524	4.675	4.976
OD <sub>600nm</sub>		1.65 1.62 1.63	1.57 1.58 1.58

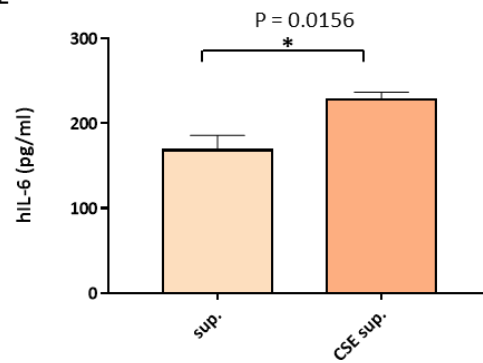
**C**



**D**



**E**





**그림 3. 사람기도상피세포에 담배추출물이 포함된 배지에서 자란 포도상구균 배양액처리시 염증 촉진 반응**

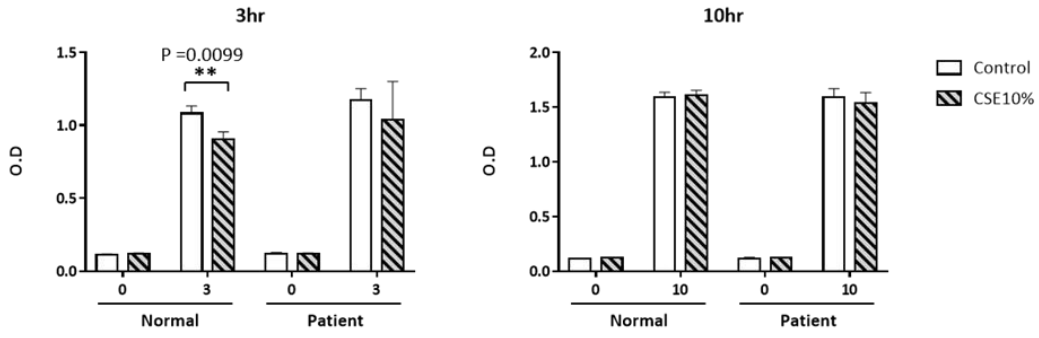
(A) *S. aureus* (ATCC29213)를 TSB와 CSE 10%함유된 TSB에서 각 6시간 배양하여 배양액을 얻고 그때의 집락 형성 계수(cfu)를 평판계수법으로 측정하였다. (B) 균을 배양한 배양액의 전체 단백질 농도를 정량 하였을 때 CSE 유무와 상관없이 유사하다. (C-D) A-B에서 얻은 균의 배양액을 0.2um 필터로 균의 혼입을 방지하고 BEAS2b cell에 균 배양액 : BEGM (bronchial epithelium growth media) 비율을 1:100(v/v) 으로 처리하여 24시간 뒤 IL-6와 IL-8을 ELISA로 측정하였고 CSE를 포함한 배지에서 키운 배양액을 처리한 기도상피세포가 더 많은 사이토카인 을 분비한다. (E)균을 배양한 배양액을 100°C에서 30분간 가열하여 활성단백질을 불활성화 시킨 뒤 동일한 실험을 진행할 때에는 CSE에 의한 차이가 줄어들을 관찰하였다.

### 3.5. 황색포도상구균의 단백질 분석

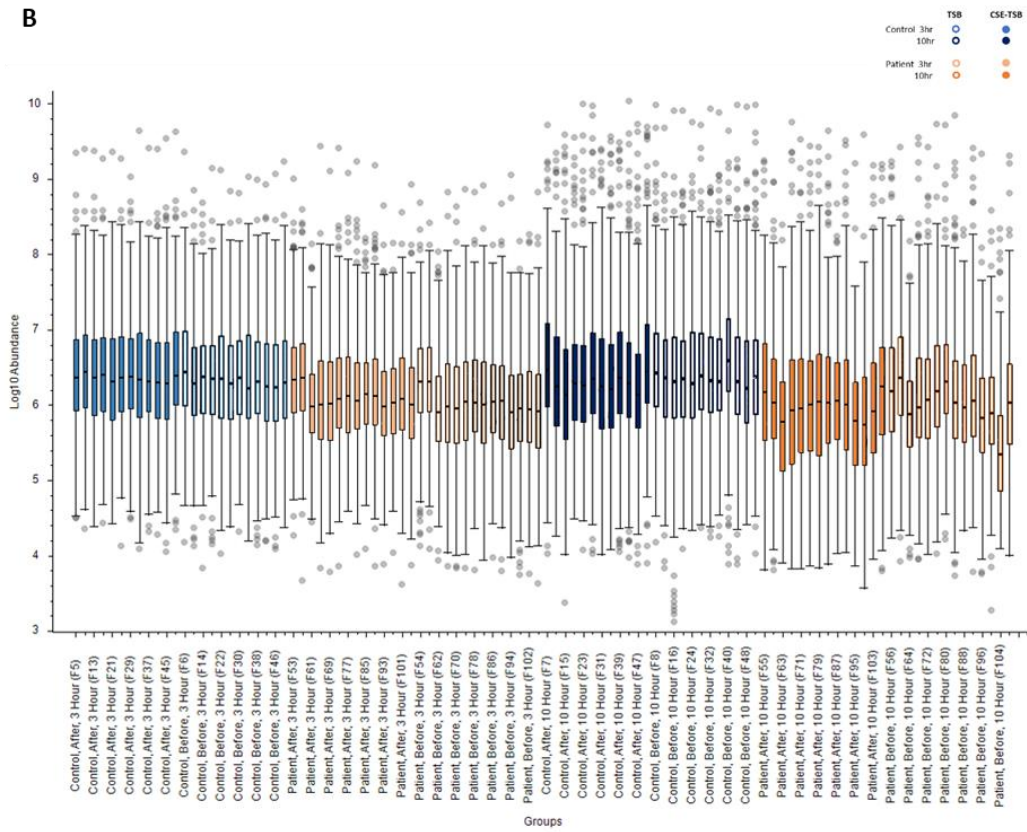
균이 세포 밖으로 분비하는 단백질 물질에 CSE가 어떤 변화를 가져왔는지 알아보기 위해 배양액 내의 단백질 분석을 진행하였다. 담배에 노출된 포도상구균은 그렇지 않을 때와 다른 구성의 단백질을 분비할 것으로 예상되고 천식환자의 상재 포도상구균과 정상인 상재균이 분비하는 단백질이 다를 가능성을 고려하여 정상 대조군도 함께 실험하였다. 표준 균주로 한 테스트가 사람으로부터 얻은 균주와 완전히 같을 수 없기 때문에 환자와 대조군에서 얻은 포도상구균으로, 앞서 실험한 표준 균주 실험과 동일하게 10% CSE-TSB에서 10시간까지 배양 후 흡광도를 측정하였다. 배양 3시간째 측정된 흡광도는 대조군에서 약간의 차이를 보이나 10시간 배양 시에는 환자와 대조군의 차이, 담배추출물의 유무에 따른 흡광도의 차이가 없었다(그림 4A).

환자로부터 분리. 동정한 균과 정상인에게서 분리한 균을 10% CSE-TSB, TSB에서 10시간 동안 배양하여 얻은 배양액의 전체 단백질을 질량분석법으로 단백질 분석하였다. 10시간 배양은 지수성장기(exponential phase)를 지나 완전히 정체기(stationary phase)에 접어든 상황을 대표한다. 균을 원심분리하여 배양액을 얻고 균의 혼입을 방지하기 위하여 배양액을 0.2 $\mu$ m 필터로 거른다. 이렇게 얻어진 배양액으로 Thermo사의 Ultimate 3000 LC system과 Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer system을 사용하여 LC-MS분석을 진행하였다(그림 4B). 각 시료 균별로 획득된 RAW 파일들을 Proteome Discoverer (ver. 2.2)을 이용하여 분석을 수행하였으며 *Staphylococcus aureus* (strain NCTC 8325) pan proteome정보를 이용하여 Sequence database 분석을 수행했다. 환자와 대조군의 균주 배양 상층액에서 총 487개의 단백질이 동정 되었고 이 단백질들을 환자와 대조군,

**A**



**B**



#### **그림 4A, B. 환자와 대조군으로부터 얻은 황색포도상구균의 단백질체 분석**

(A) 환자와 대조군으로부터 얻은 포도상구균 균주를 단백질체 분석을 위해 10% CSE-TSB 배지에 3 시간, 10 시간 배양 후 흡광도를 측정했다. 환자와 대조군 사이에 통계적 차이가 없어 성장 저해가 없는 상태임을 확인했다. (B) 균 배양액의 전체 단백질체에 대해 Thermo 사의 Ultimate 3000 LC system 과 Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer system 을 사용하여 LC-MS 분석을 진행하였고 측정된 abundance 값을 바탕으로 샘플들이 분석에 적절한 분포를 가지고 있음을 확인하였으며 기준에 미치지 못한 샘플은 이후 분석에서 제외하였다.

담배추출물의 유무에 따라 principal component analysis 결과 동일한 실험조건에서 환자와 대조군의 분비 단백질체 프로파일에 상당한 차이가 있음을 관찰하였다. 대조군으로부터 얻은 황색포도상구균의 단백질체 프로파일은 비교적 균질한 반면 환자균 균주 사이에는 개인간 편차가 큰 편이었다(그림 4C). 10시간 동안 대조군과 환자의 균을 담배추출물과 함께 배양할 때와 담배 없이 배지에서 배양할 때 각각 동정된 단백질들의 abundance 값을 volcano plot을 이용하여 분포를 한눈에 볼 수 있게 나타냈다(그림 4D-G). 의미 있는 변화는 fold change  $\pm 2$ , p value < 0.05를 기준으로 하였다.

담배추출물에 의한 통계적으로 의미 있는 변화를 보이는 단백질들을 대상으로 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 Database에서 functional annotation tool을 이용하여 Gene Ontology 분석을 진행하였다. 황색포도상구균이 분비하는 단백질체(secretome) 중심으로 분석하고자 균을 배제하고 배양 후 상층액만 사용했기 때문에 Cellular component (CC)에 의한 분류기준으로 extracellular region으로 그룹화 되는 단백질들이 가장 많았다(표 3, 5). 담배 추출물 유무에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보이는 분비된 단백질들은 표에 log<sub>2</sub> fold change 값이 큰 순서대로 나타내었다. 환자균과 대조군에서 담배추출물로 인해 증가한 단백질은 spls, leukotoxinD, chemotaxis-inhibiting protein (CHIP), Lipase,  $\alpha$ -hemolysin 등으로 나타났으며 abundance에서 양적 차이는 있지만 환자와 대조군 간의 단백질체 변화의 방향이 유사하다(표 4, 6). 그러나 Biological process (BP)로 분류하였을 때 대조군에 비해 환자균에서 병태생리에 관련된 더 많은 종류의 단백질이 높은 유의성을 보였다. 담배 추출물 없이 기본적인 상태에서 배양한 환자의

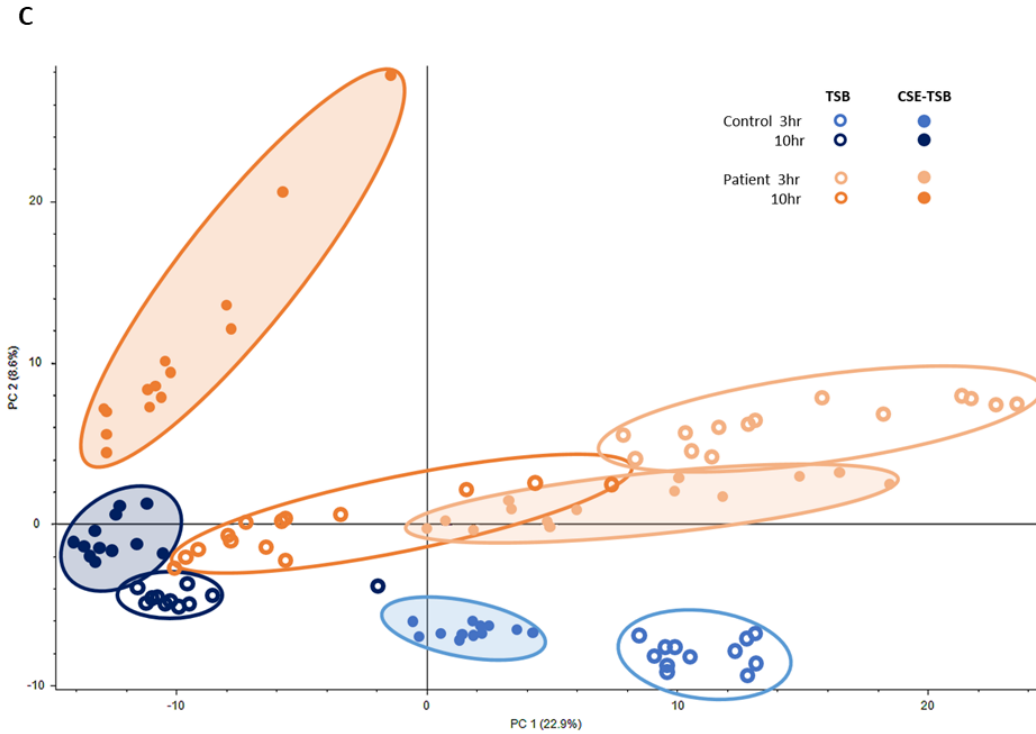
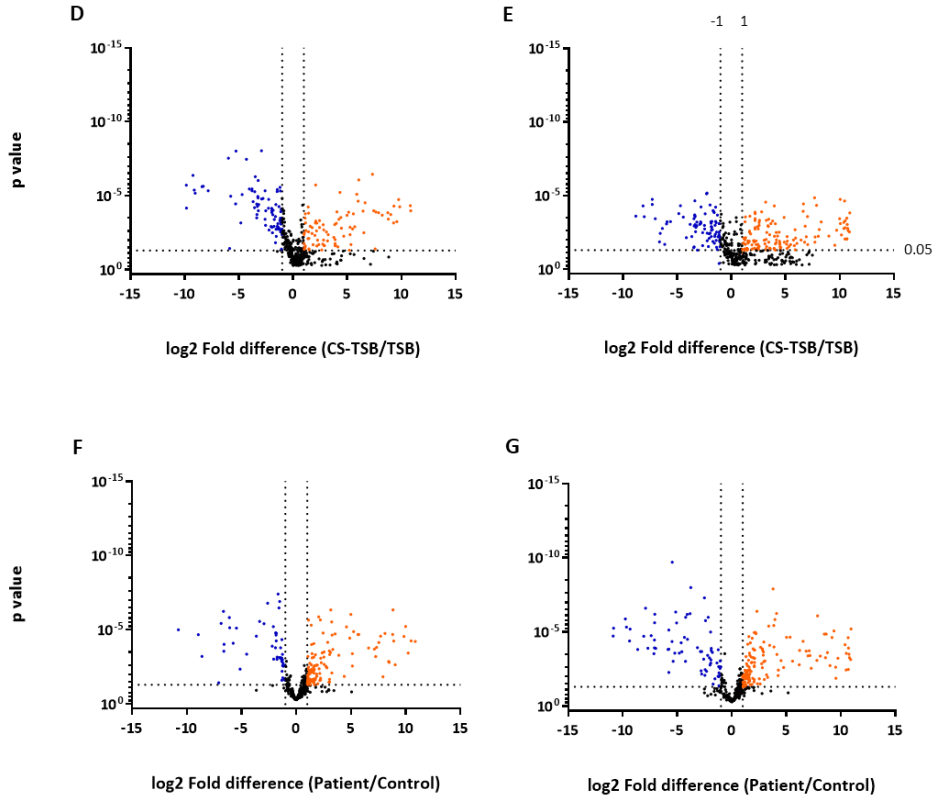


그림 4C. 환자와 대조군으로부터 얻은 황색포도상구균의 단백질 분석

LC-MS분석으로 획득된 RAW파일을 Proteome Discoverer(ver. 2.2)를 이용하여 분석하였다. (C) 환자와 대조군, 담배추출물의 유무, 시간에 따라 분비된 단백체를 principal component analysis plot으로 나타내어 각 시료 군 별 프로파일의 차이를 나타내었다.



**그림 4D-G. 환자와 대조군으로부터 얻은 황색포도상구균의 단백질체 분석**

(D-G) *S. aureus* (strain NCTC8325) 의 pan proteome정보를 이용하여 Sequence data분석결과 배양 상층액에서 총 487개의 단백질이 동정 되었고, 10시간 동안 각 조건에서 배양한 포도상구균 단백질들의 abundance 값 분포를 volcano plot으로 나타냈다. 각 그래프는 대조군에서 분리한 균주 단백질의 담배 추출물 유무에 따른 변화 (D), 환자균에서 분리한 균주 단백질의 담배 추출물 유무에 따른 변화 (E), 기본 상태 배지에서 대조군과 환자로부터 얻은 균주가 분비하는 단백질의 변화 (F), 담배추출물을 함유한 배지에서 배양할 때 대조군과 환자로부터 얻은 균주가 분비하는 단백질의 변화 (G)를 나타내며 의미 있는 변화는 fold change  $\pm 2$ , p value $<0.05$ 를 기준으로 하였다.

표 3. 담배 추출물에 의해 변화된 대조군 포도상구균의 단백질 유전자 ontology 분석

CATEGORY	TERM	COUNT	%	P-VALUE	BENJAMINI
GOTERM_BP_DIRECT	'de novo' IMP biosynthetic process	6	3.5	1.80E-03	2.10E-01
	protein folding	5	2.9	1.80E-02	5.90E-01
	purine nucleotide biosynthetic process	3	1.8	1.90E-02	5.90E-01
	lipid catabolic process	3	1.8	1.90E-02	5.90E-01
	translation	11	6.5	2.80E-02	6.70E-01
	hemolysis in other organism	3	1.8	5.80E-02	1.00E+00
	pathogenesis	12	7.1	6.00E-02	1.00E+00
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular region	23	13.5	4.20E-09	9.10E-08
	cytosolic large ribosomal subunit	8	4.7	7.70E-04	8.40E-03
	cell wall	6	3.5	3.00E-03	2.20E-02
	membrane	8	4.7	1.60E-02	8.80E-02
	cytoplasm	32	18.8	9.00E-02	3.90E-01
GOTERM_MF_DIRECT	zinc ion binding	12	7.1	3.60E-03	4.70E-01
	structural constituent of ribosome	11	6.5	5.80E-03	4.70E-01
	serine-type endopeptidase activity	5	2.9	1.40E-02	7.50E-01
	rRNA binding	7	4.1	4.70E-02	1.00E+00
	DNA-directed RNA polymerase activity	3	1.8	5.00E-02	1.00E+00
	protein disulfide oxidoreductase activity	3	1.8	9.60E-02	1.00E+00



**표 4. 담배 추출물에 의해 변화하는 대조군 포도상구균의 세포 외 분비 단백질**

UNIPROT_ ACCESSION	PROTEIN	GENE NAME	Log2 (FC)	P value
Q2FXC2	serine protease SplA	SAOUHSC_01942	7.907	1.38E-04
Q2FXB1	leukotoxin LukD	SAOUHSC_01954	6.072	8.24E-07
Q2FXC4	serine protease SplC	SAOUHSC_01939	6.026	2.24E-05
Q2FVW5	chemotaxis-inhibiting protein CHIPS	SAOUHSC_02169	4.424	2.90E-04
Q2FZE9	Iron-regulated surface determinant protein A	SAOUHSC_01081	3.896	8.88E-03
Q2FZB2	superantigen-like protein	SAOUHSC_01125	2.464	1.35E-03
Q8KQR1	Iron-regulated surface determinant protein C	SAOUHSC_01082	2.394	1.92E-02
Q2G1Q2	1-phosphatidylinositol phosphodiesterase	SAOUHSC_00051	2.207	6.85E-04
Q2FXC3	serine protease SplB	SAOUHSC_01941	2.089	1.85E-06
Q2FXC5	serine protease SplD	SAOUHSC_01938	2.024	4.67E-03
Q2G155	lipase2	SAOUHSC_00300	1.776	1.40E-03
Q2G2R8	staphopain thiol proteinase	SAOUHSC_02127	1.600	1.13E-03
Q2FUU5	lipase1	SAOUHSC_03006	1.413	5.57E-05
Q2FXC7	serine protease SplE	SAOUHSC_01936	1.204	2.16E-03
Q2G1X0	alpha-hemolysin	SAOUHSC_01121	1.030	4.05E-03
Q2FUX3	immunodominant antigen B	SAOUHSC_02972	-1.359	1.31E-03
Q2G1T5	fibronectin binding protein B	SAOUHSC_02802	-1.744	1.13E-03
Q2FUY2	clumping factor B	SAOUHSC_02963	-1.963	6.96E-05
Q59801	hyaluronate lyase	SAOUHSC_02463	-3.247	1.07E-05
Q2G0L5	fibrinogen-binding protein SdrC	SAOUHSC_00544	-3.318	1.82E-04
Q2FXB0	leukotoxin Luke	SAOUHSC_01955	-4.690	8.10E-06
Q2FXJ2	Iron-regulated surface determinant protein H	SAOUHSC_01843	-5.261	9.36E-09
Q2FUW1	Serine-rich adhesin for platelets	SAOUHSC_02990	-9.028	6.46E-06

**표 5. 담배 추출물에 의해 변화된 환자균 포도상구균의 단백질 유전자 ontology 분석**

CATEGORY	TERM	COUNT	%	P-VALUE	BENJAMINI
GOTERM_BP_DIRECT	pathogenesis	20	9.3	3.10E-04	3.80E-02
	cell adhesion	6	2.8	5.10E-04	3.80E-02
	translation	16	7.4	1.10E-03	5.70E-02
	cytolysis in other organism	3	1.4	3.00E-02	1.00E+00
	tetrahydrofolate interconversion	3	1.4	5.70E-02	1.00E+00
	signal peptide processing	3	1.4	5.70E-02	1.00E+00
	ribosomal large subunit assembly	3	1.4	8.80E-02	1.00E+00
	hemolysis in other organism	3	1.4	8.80E-02	1.00E+00
	cellular response to oxidative stress	3	1.4	8.80E-02	1.00E+00
	sulfate assimilation	3	1.4	8.80E-02	1.00E+00
	glycerol ether metabolic process	3	1.4	8.80E-02	1.00E+00
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular region	23	10.7	9.10E-07	2.60E-05
	cell wall	7	3.3	1.60E-03	2.30E-02
	cytosolic large ribosomal subunit	8	3.7	4.00E-03	3.70E-02
	membrane	9	4.2	2.30E-02	1.60E-01
	cytosol	20	9.3	4.00E-02	2.20E-01
	cytosolic small ribosomal subunit	4	1.9	7.90E-02	3.70E-01
GOTERM_MF_DIRECT	structural constituent of ribosome	16	7.4	6.30E-05	1.20E-02
	rRNA binding	12	5.6	2.30E-04	2.10E-02
	metal ion binding	20	9.3	1.30E-03	8.20E-02
	protein disulfide oxidoreductase activity	4	1.9	2.20E-02	1.00E+00
	oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donors, disulfide as acceptor	3	1.4	4.80E-02	1.00E+00
	tRNA binding	5	2.3	8.50E-02	1.00E+00

**표 6. 담배 추출물에 의해 변화하는 환자균 포도상구균의 세포 외 분비 단백질**

UNIPROT_ ACCESSION	PROTEIN	GENE NAME	Log2 (FC)	P value
Q2FXC2	serine protease SplA	SAOUHSC_01942	10.005	3.59E-04
Q2FXB1	leukotoxin LukD	SAOUHSC_01954	4.872	2.99E-04
Q59801	hyaluronate lyase	SAOUHSC_02463	3.463	1.39E-02
Q2FXC8	serine protease SplF	SAOUHSC_01935	3.238	4.62E-04
Q2FWP0	Uncharacterized leukocidin-like protein 1	SAOUHSC_02241	2.611	4.69E-04
Q2FXC3	serine protease SplB	SAOUHSC_01941	2.574	2.71E-02
Q2FZE9	Iron-regulated surface determinant protein A	SAOUHSC_01081	2.452	3.40E-02
Q2FWN9	Uncharacterized leukocidin-like protein 2	SAOUHSC_02243	2.305	2.03E-02
Q2FWV5	chemotaxis-inhibiting protein CHIPS	SAOUHSC_02169	2.122	1.39E-02
Q2G1X0	alpha-hemolysin	SAOUHSC_01121	1.439	3.73E-02
Q2G155	lipase2	SAOUHSC_00300	1.328	6.96E-03
Q2FVK3	gamma-hemolysin h-gamma-II subunit	SAOUHSC_02708	1.269	4.01E-02
Q2FUY2	clumping factor B	SAOUHSC_02963	1.110	1.61E-02
Q2G1T5	fibronectin binding protein B	SAOUHSC_02802	-1.065	1.28E-02
Q2G015	clumping factor A	SAOUHSC_00812	-1.217	6.10E-03
Q2FWM8	delta-hemolysin	SAOUHSC_02260	-1.435	5.93E-05
Q2FXB0	leukotoxin LukE	SAOUHSC_01955	-1.669	1.02E-04
Q2G107	hypothetical protein	SAOUHSC_00354	-1.796	5.42E-04
P14738	fibronectin-binding protein A	SAOUHSC_02803	-2.243	6.44E-06
Q8KQR1	Iron-regulated surface determinant protein C	SAOUHSC_01082	-3.347	9.20E-04
Q2G0L5	fibrinogen-binding protein SdrC	SAOUHSC_00544	-3.429	2.93E-02
Q2FWF8	transglycosylase SceD	SAOUHSC_02333	-3.787	8.69E-04
Q2FUW1	Serine-rich adhesin for platelets	SAOUHSC_02990	-8.019	2.62E-04

표 7. 기본 배양 조건에서 대조군과 환자군 포도상구균 사이에 차이를 보이는 단백질 유전자 ontology 분석

CATEGORY	TERM	COUNT	%	P-VALUE	BENJAMINI
GOTERM_BP_DIRECT	pathogenesis	19	11.4	2.80E-05	3.10E-03
	'de novo' IMP biosynthetic process	6	3.6	1.60E-03	8.80E-02
	translation	12	7.2	8.60E-03	3.20E-01
	cell adhesion	4	2.4	2.10E-02	5.90E-01
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular region	26	15.7	7.60E-11	2.20E-09
	cell wall	10	6	2.60E-07	3.70E-06
	membrane	10	6	1.80E-03	1.70E-02
	cytosolic large ribosomal subunit	7	4.2	6.50E-03	4.70E-02
GOTERM_MF_DIRECT	structural constituent of ribosome	12	7.2	6.50E-04	8.80E-02
	rRNA binding	7	4.2	2.90E-02	1.00E+00
	serine-type endopeptidase activity	4	2.4	5.50E-02	1.00E+00
	zinc ion binding	8	4.8	9.90E-02	1.00E+00

**표 8. 기본 배양 조건에서 대조군과 환자군 포도상구균이 차이를 보이는 세포 외 분비 단백질**

UNIPROT_ ACCESSION	PROTEIN	GENE NAME	Log2 (FC)	P value
Q2FZB2	superantigen-like protein ssl13	SAOUHSC_01125	8.114	1.69E-05
Q2FXC5	serine protease SplD	SAOUHSC_01938	7.923	1.42E-02
Q2FXB1	leukotoxin LukD	SAOUHSC_01954	3.895	5.00E-04
P02976	immunoglobulin G-binding protein A	SAOUHSC_00069	3.253	7.77E-03
Q8KQR1	Iron-regulated surface determinant protein C	SAOUHSC_01082	3.051	4.56E-04
Q2FXC4	serine protease SplC	SAOUHSC_01939	3.030	2.55E-04
Q2G0L5	fibrinogen-binding protein SdrC	SAOUHSC_00544	2.999	3.21E-02
Q2FZF0	Iron-regulated surface determinant protein B	SAOUHSC_01079	2.880	6.84E-05
Q2FXJ2	Iron-regulated surface determinant protein H	SAOUHSC_01843	2.551	2.09E-03
Q59801	hyaluronate lyase	SAOUHSC_02463	2.550	3.04E-04
Q2FXC7	serine protease SplE	SAOUHSC_01936	2.208	2.11E-06
Q2FWV6	Staphylococcal complement inhibitor(SCIN)	SAOUHSC_02167	2.161	2.46E-02
Q2G1Q2	1-phosphatidylinositol phosphodiesterase	SAOUHSC_00051	2.086	4.03E-03
Q2FZE9	Iron-regulated surface determinant protein A	SAOUHSC_01081	1.734	2.28E-02
Q2G260	hypothetical protein	SAOUHSC_00094	1.579	3.31E-03
Q2FXC3	serine protease SplB	SAOUHSC_01941	1.331	2.85E-02
Q2G2R8	staphopain A	SAOUHSC_02127	1.291	6.19E-03
Q2G0L4	fibrinogen-binding protein SdrD	SAOUHSC_00545	1.231	4.60E-02
Q2FWV5	chemotaxis-inhibiting protein CHIPS	SAOUHSC_02169	1.205	1.98E-02
Q2G2B2	surface protein G	SAOUHSC_02798	1.134	8.85E-03
Q2G093	lipoteichoic acid synthase	SAOUHSC_00728	1.125	2.20E-06
Q2FZK7	bifunctional autolysin	SAOUHSC_00994	1.106	4.18E-02
Q2G015	clumping factor A	SAOUHSC_00812	1.088	1.08E-02
Q2FUW1	serine-rich adhesin for platelets	SAOUHSC_02990	-1.074	2.44E-03
Q2FUX3	immunodominant antigen B	SAOUHSC_02972	-1.080	2.16E-02
Q2FUY2	clumping factor B	SAOUHSC_02963	-1.310	8.08E-04

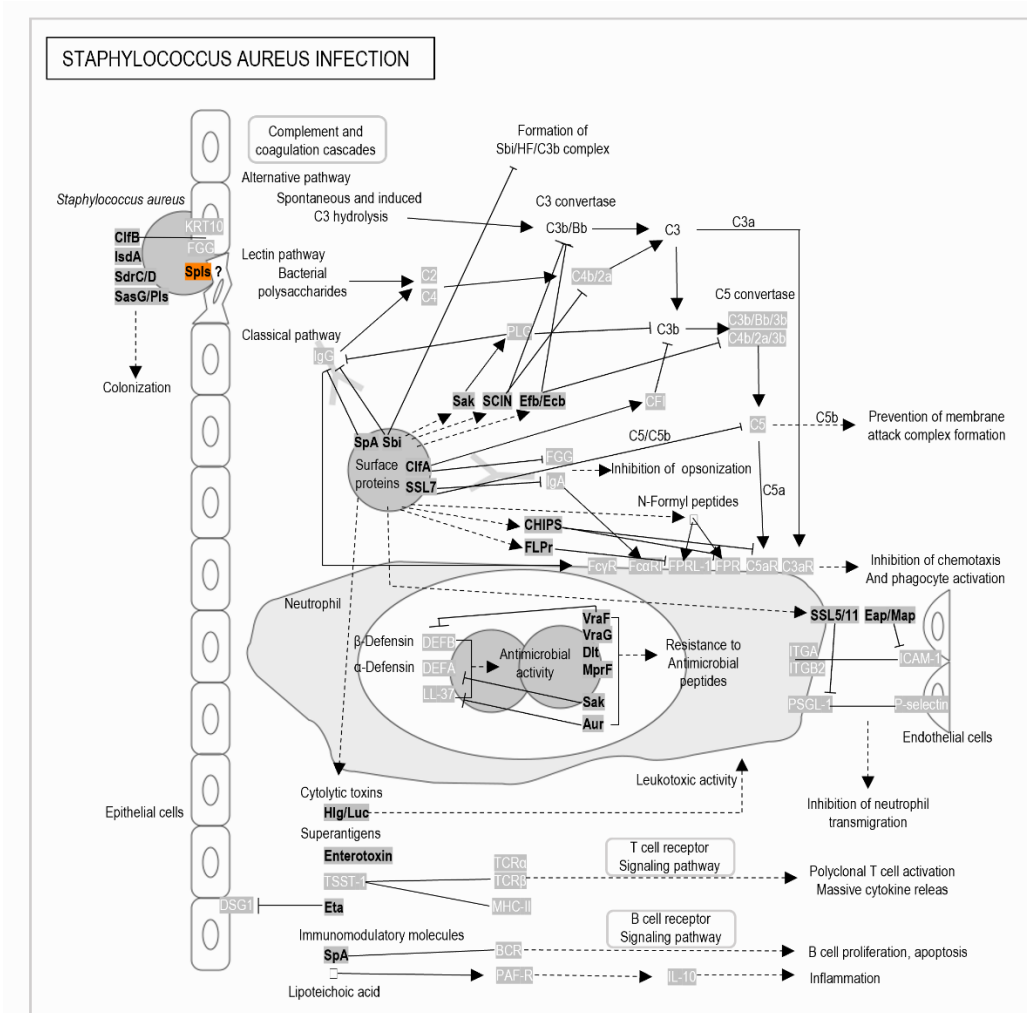


그림 7. 담배 추출물에 의해 차이 나는 단백질들의 KEGG database pathway 분석

담배 추출물에 의해 통계적으로 의미 있는 변화를 보이는 단백질을 대상으로 KEGG pathway database 분석을 수행하였을 때 대조군과 환자군의 포도상구균은 공통적으로 숙주 세포 감염 과정에 관여하는 단백질들이 변화하였다.

균과 대조균의 균이 분비한 단백질도 같은 방법으로 GO분석하였다(표 7). 담배추출물이 없는 상태임에도 불구하고 BP측면에서 대조균 보다 환자균에서 병태생리에 관련된 더 많은 단백질들이 증가되어 있는 것으로 나타났다(표 8). 담배추출물로 인해 의미 있게 차이 나는 단백질들로 KEGG database에서 pathway분석시 변화의 폭과 pathway에 관여하는 단백질의 가짓수는 환자가 더 많지만 환자와 대조균 균주 공통적으로 숙주세포 감염 과정에 관여하는 단백질들이 변화했음을 확인할 수 있다(그림 7).

### 3.6. 담배 추출물에 의한 serine protease-like proteins의 증가

본 단백질 분석에서 기존 유전체 연구들 에서와 유사하게 담배추출물에 의해 biofilm formation과 adhesion에 관여하는 단백질들이 증가하였고 이런 현상은 몇몇 실험연구에서도 직접 biofilm형성이 촉진되는 결과를 관찰한 적이 있다. 이때 증가하는 유전자의 상당수는 virulence 단백질로 분류되는데 단백질 분석 시 그중 protease들이 높은 비율로 발견되었다. Spls는 현재까지 A-F까지 총 여섯 가지 종류가 알려져 있으며,<sup>23</sup> 그중 splD가 최근에서야 알레르기 염증 발생 관련 작용기전이 비교적 구체적으로 연구되었다.<sup>24-26</sup> Spl은 serine계 단백질분해효소와 구조적으로 유사하지만 영양에 관여하기 보다는 숙주와의 상호작용 시 특정 단백질에 대해 특이적인 분해 활성을 나타내는 것으로 생각된다.<sup>27</sup> 본 실험에서 실험균과 대조균의 배양 조건에 따라서 다양한 종류의 spl단백질이 검출되었는데 대부분의 spl이 담배추출물에 의해 증가하는 경향성을 보이나 환자와 대조균의 양상이 완전히 일치하지는 않았다(그림 8A). splA는 대조균과 환자균이 모두 유의하게 증가하는 결과를

보이는데 *spID*의 경우 대조군에서는 관찰되지 않으며 환자군에서만 기본 배양상태에서부터 분비하고 있고, 담배 추출물 자극에 의해 큰 폭으로 증가함이 관찰되었다(그림 8B).

### 3.7. 담배연기 추출물에 의한 Regulator gene 발현 변화

황색포도상구균을 포함한 여러 미생물 균주에서 병원성 단백질 유전자의 발현을 직, 간접적으로 조절하는 것으로 알려진 대표적인 조절 유전자 들에 대한 정량적 역 전사 효소 연쇄 중합반응실험(qRT-PCR)을 수행하였다.<sup>28-30</sup> 분석에 사용된 primer의 서열은 표 11에 나타내었다. 단백질 분석 실험에서와 동일한 실험 방법에서 단백질이 분비되기 전 유전자 발현을 측정하고자 함이므로 담배연기추출물 반응 4시간째인 지수 성장기에서 RNA를 추출하여 regulator gene 발현을 확인하였다(그림 9). 대부분의 virulence gene regulator 들이 담배추출물에 의해 증가하는 경향성이 관찰되었고 그중 통계적으로도 유의성이 있게 증가한 유전자는 대조군 균주의 경우 *agr* (accessory gene regulator), *sae* (staphylococcus aureus exoprotein expression), *sar* (staphylococcus aureus accessory regulatory) 였다. 환자군의 균주에서는 *sae*만 통계적으로 의미 있게 증가하였다.



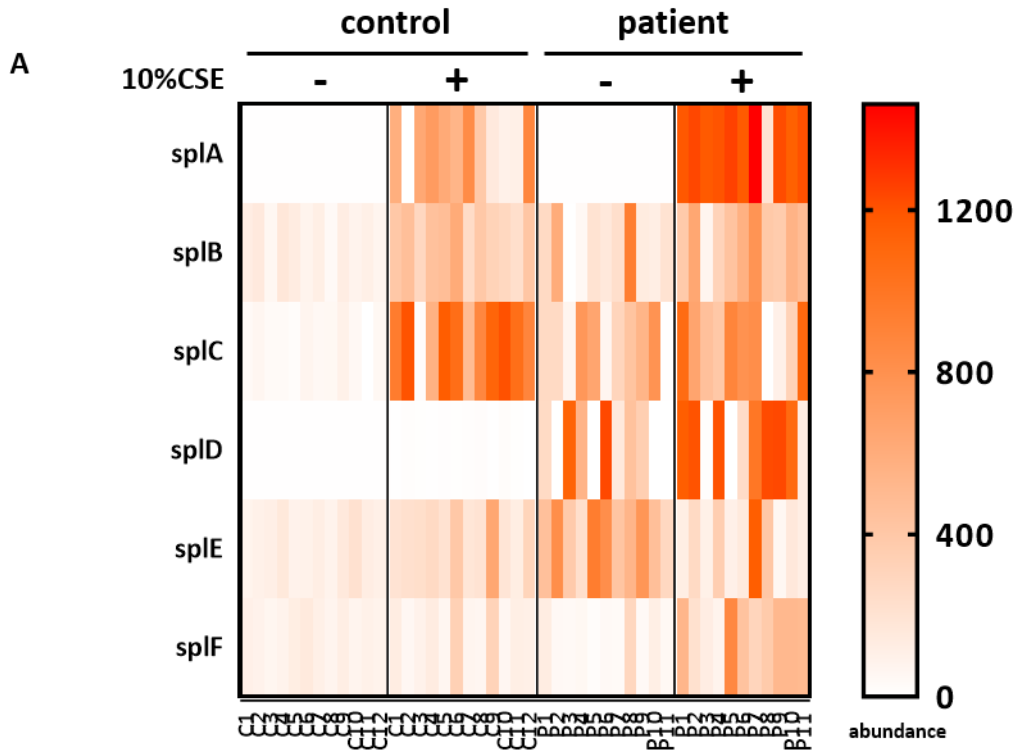


그림 8A. 각 비교군에서 Serine protease-like proteins 의 변화

대조군(C1-C12)과 환자군(P1-P11)의 배양 조건에 따라서 다양한 spls 단백질들이 검출되었으며 일부 spls 타입은 담배 추출물에 의해 통계적으로 유의한 증가를 보이기도 하였다. (A) Spls 의 abundance 값을 이용하여 Heat map 으로 나타냈고 색이 진할수록 높은 abundance 로 관찰된 단백질이다.

B

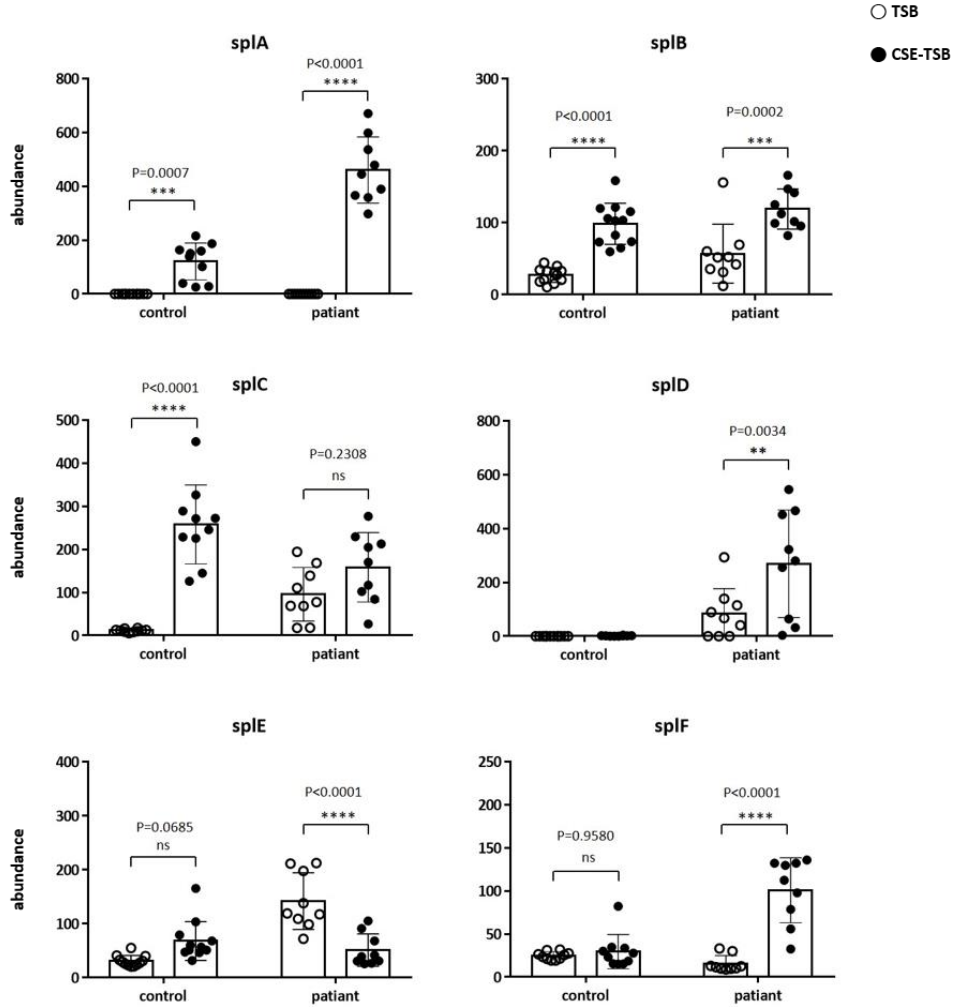
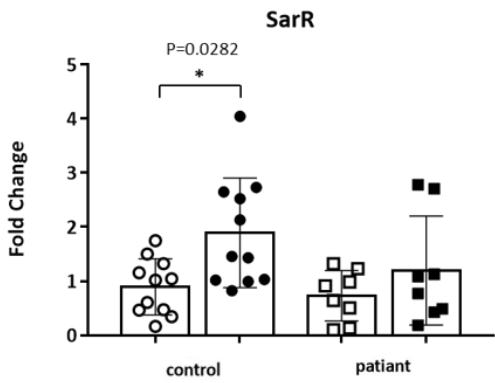
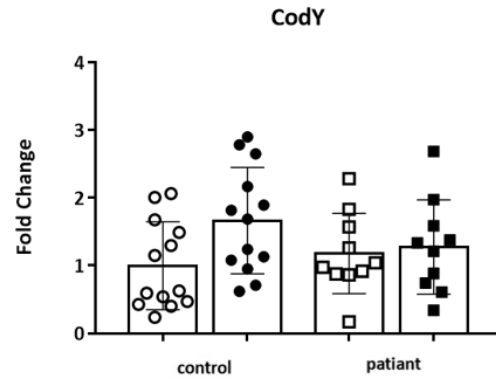
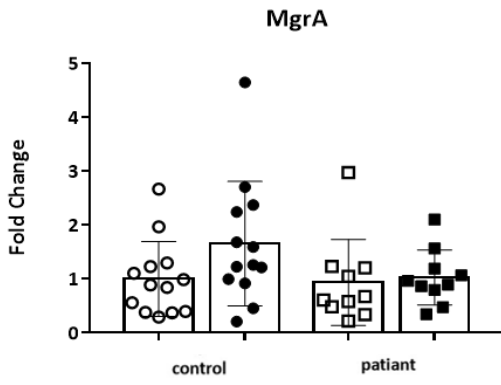
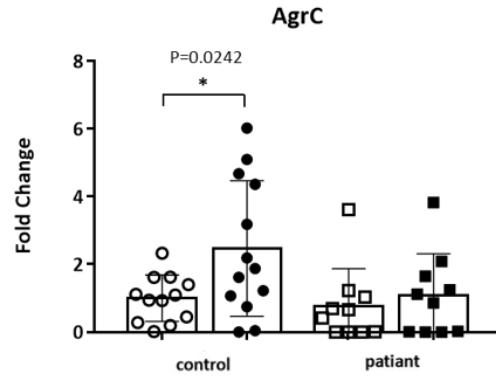
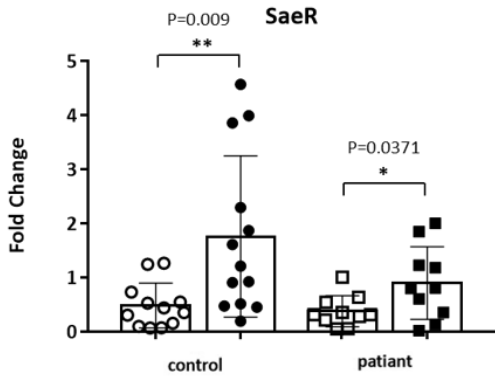


그림 8B. 각 비교군에서 Serine protease-like proteins 의 변화

대조군과 환자군의 배양 조건에 따라서 다양한 Spls 단백질들이 검출되었으며 일부 spls 타입은 담배추출물에 의해 통계적으로 유의한 증가를 보이기도 하였다. (B) 각 타입 별로 spls abundance 변화를 그래프로 나타냈다. ○은 기본 배양배지에서, ●은 담배추출물이 함유된 배지에서 얻은 단백체를 나타낸다.



○ TSB  
● CSE-TSB

### 그림 9. spls를 조절할 것으로 추정되는 regulator유전자의 발현 변화

포도상구균을 포함한 여러 균주에서 virulence 단백질 유전자의 발현을 직, 간접적으로 조절하는 것으로 알려진 regulator gene들에 대한 qRT-PCR을 수행했다. 대조군과 환자군에서 얻은 포도상구균을 기본 배지와 담배 추출물을 함유한 배지에서 단백질 분석과 동일한 조건으로 배양하여 RNA를 추출하고 reverse transcription으로 cDNA합성 후 각 regulator에 대한 primer를 이용하여 PCR했으며,  $\Delta\Delta Ct$ 값으로 fold change를 그래프에 나타내었다. ○은 기본 배양배지에서, ●은 담배 추출물이 함유된 배지에서 얻은 단백체를 나타낸다.

**표 11. regulator gene qPCR 에 사용된 primer sequence**

Gene	F Primer Sequence(5' to 3')	R Primer Sequence(5' to 3')
MgrA	F- GGGATGAATCTCCTGTAAACG	R- GAAGCTGAAGCGACTTTGTC
CodY	F- GGTGGAGGGGAAAGATTAGG	R- GCGCGCTTCTTTTCTACTT
SeaR	F- CCAAGGGAACCTGTTTTACG	R- GCATAGGGACTTCGTGACC
AgrC	F- TGATGACCCTATCATTGCGGT	R- ACCACGACCTTCACCTTTAGT
SarR	F- AGTCAACGCAACATTTCAAG	R- GGTTTGAACCTGAGCACTTAGC
16s	F- CCGCCTGGGGAGTACG	R- AAGGGTTGCGCTCGTTGC

#### 4) 고찰

본 연구에서는 황색포도상구균이 담배연기 추출물에 직접 노출되었을 때 세포 외부로 분비하는 분비 단백질의 구성이 어떻게 달라지는지 단백질 분석을 통해 비교하였다. 정상대조군과 천식환자의 비강에서 분리한 황색포도상구균에 담배추출물을 각각 노출시켰을 때 Spls, LeukotoxinD, CHIPs, Lipase,  $\alpha$ -hemolysin, Iron-regulated surface determinant proteins 등이 공통적으로 유의미하게 증가하였다. 이 단백질 들은 포도상구균이 숙주에 감염되는 단계에서 필요하여 활성 또는 분비가 증가하는 단백질로, 대부분 병원성 단백질로도 분류된다.<sup>31</sup> 또한 기본 배양 상태에서부터 대조군 보다 환자군에서 분리한 포도상구균의 단백질체에 더 많은 병원성 단백질들이 의미 있게 증가되어 있었다. 특이한 점은 유의미한 차이를 보이는 단백질 중 spls의 차이가 두드러져 아직 생물학적 기전이 잘 알려져 있지는 않지만 중요한 역할을 할 가능성이 있다고 생각된다.

기존 연구들에 의하면 흡연자의 천식 중증도 지표가 비흡연자 보다 높게 관찰되어 흡연이 천식의 중요한 위험인자로 여겨지고 있으며, 특정 천식 유형에 있어서는 천식의 발생에도 관여할 것으로 생각된다.<sup>32</sup> 또 흡연력이 있거나 흡연중인 천식환자가 비흡연자 천식 환자에 비해 SE-IgE 감작이 더 빈번하게 관찰된다.<sup>33</sup> 이 같은 현상은 담배연기가 기도 상피세포의 결합을 파괴하여 포도상구균의 군집 형성을 증가시키고 상피하층으로 SEs를 침투시키기 쉽게 만들기 때문이라고 생각된다. 이와 같이 담배연기가 숙주의 환경을 변화시켜 질병의 중증도를 높이는 것에 대한 연구가 일부 이루어져

있는 반면 황색포도상구균이 직접적으로 담배연기추출물에 노출되었을 때 균이 일으키는 변화에 대한 연구는 주로 유전자 레벨에서의 연구로 단백질 연구는 찾기 어렵다. 또한 황색포도상구균은 상재균 이자 기회감염균의 특성이 있어 건강한 대조군에서 분리한 균과 중증 천식환자에서 분리한 균은 이미 숙주와의 상호작용으로 인해 단백질의 구성에 변화가 나타날 수 있다고 예상된다.

기존 담배연기와 균의 상호작용에 관한 연구들에서는 담배연기추출물에 의한 생존율이나 성장 저해능 또는 표면 전하와 부착력 변화 같은 물리적 특성을 서술하거나<sup>20</sup> 유전자 레벨에서 독성 유전자의 증가,<sup>34</sup> 정족수감지에 의한 조절유전자의 변화를 관찰하였다.<sup>21</sup> 그러나 본 연구에서는 담배연기에 의해 직접적으로 황색포도상구균이 분비하는 단백질에 어떤 차이가 있는지 단백질 레벨에서 비교 분석하였고 Spls와 같이 질병에서의 중요성이 인식되나 생물학적 기전이 잘 알려지지 않은 새로운 단백질의 의미 있는 변화를 관찰하였다.

또 흥미로운 점은 담배연기에 의해 변화한 단백질 구성 외에 기본 배양 상태에서의 정상 대조군과 환자군에서 분리한 균의 분비 단백질에서도 차이가 나타난 것인데, 환자군에서 분리한 균주들이 정상 대조군에 비해 개인차가 크고 독성단백질도 더 다양하게 분비하고 있다. 그리고 담배연기에 의해서는 변화의 방향이 유사한데 환자군의 균주가 정상 대조군의 균주에 비해 병원성 단백질과 세포 부착에 관여하는 단백질들의 증가 폭이 더 크게 나타났다. 이는 대조군의 포도상구균도 비강에 상재 해 있지만 환자군의 포도상구균이 상대적으로 숙주 면역계와 상호작용을 더 많이 하고 있을 것이라 사료된다.

하지만 본 연구에는 여러 제한점이 있는데 첫번째는 전체 분비단백체에서 잘 알려진 병원성 분비 물질인 SEs들이 측정되지 않은 것이다. SE는 매우 적은 양으로도 림프구에 지속적이고 큰 효과를 줄 수 있기 때문에 상대적으로 적은 양 때문에 실험적으로 검출되지 못했을 수 있다고 생각되며 모든 황색포도상구균 균주가 SE를 분비하는 것은 아니기 때문에 분비하지 않는 균주 일 가능성도 추측할 수 있다. 두번째는 단백질 분석 실험에 사용한 담배추출물의 농도 결정에 표준 균주를 사용한 것인데, 사람으로부터 분리한 균주 샘플이 표준 균주와 그리고 사람 간의 차이가 이 정도로 클 줄 예상치 못한 것에 기인한다. 단백질 분석 실험에 일괄적인 10%의 담배연기추출물을 사용한 결과 일부 샘플에서 제대로 성장하지 못하는 경우가 있었고 이는 분석에서 제외시킬 수밖에 없었다. 세번째는 측정 레벨 이하의 또는 특정 상황에서 유도되는 단백질의 경우 기본 상태 abundance값이 0으로 나타나는 부분을 담배연기추출물에 의한 변화를 fold change로 나타내기 위해 매우 작은 특정 값(0.5)으로 치환하여 계산했다. 따라서 유도되는 단백질의 경우 FC값이 고평가 되는 경향이 있으며 FC값 자체를 양적인 의미로 비교, 해석하는데에는 주의를 기울여야한다.

본 연구는 담배연기 추출물이 황색포도상구균과 접촉하여 병원성 단백질의 분비를 촉진하는 결과를 관찰하였고 건강 대조군의 균주보다 중증 천식 환자의 균주에서 더 다양하고 많은 병원성 단백질이 증가하는 경향을 보이는 것으로 나타났다. 담배연기추출물에 의해 증가한 병원성 단백질들은 숙주세포에 부착하거나 침투할 때 주로 필요한 단백질 들인 것으로 분석되었고 전체적으로는 기존 유전체 연구에서의 결과들과 일맥상통하면서도 새롭게는 세균의 기능적 차이가 질병 발생과 관련될 가능성을 시사하였다. 또 두드러진 증가를



보이는 단백질 물질 중 알레르기 질환과의 임상적 관련성과 병인론적 기전이 비교적 잘 알려진 Spls가 포함되어 있으며 그중 splD는 최근 직접적인 알레르기 염증 촉진 효과를 나타낼 수 있음이 알려져 있다. 본 실험에서 흡연하는 천식 환자군에서만 담배 추출물에 의해 유의한 증가가 관찰되었고 다른 타입의 Spls들도 천식환자군에서 증가하거나 담배추출물에 의해 증가하는 경향을 보였다. 이 같은 결과로 볼 때 흡연 자극이 Spls과 같은 알레르기 염증 촉진 단백질 분비를 직접 증가시킬 수 있을 것으로 생각되며 나아가 이전 역학 연구들에서 흡연력 있는 천식 환자의 SE-IgE가 높게 관찰되었던 현상을 설명할 근거가 된다. 또한 황색포도상구균의 담배연기와와의 직접 상호작용이 흡연 연관 천식의 중증도 기전과 천식의 임상 결과 해석에 기여할 것으로 생각된다.

## 5) 참고문헌

1. Lowy FD. et al. Staphylococcus aureus infections *N Engl J Med* 1998 339: 520–532.
2. Kim YC et al. Staphylococcus aureus Nasal Colonization and Asthma in Adults: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019 7(2): 606-615.e9
3. Bachert C. et al. Staphylococcus aureus enterotoxins: a key in airway disease? *Allergy* 2002 57(6): 480–7
4. Liam O'Mahony et al. Recent developments and highlights in mechanisms of allergic diseases: Microbiome. *Allergy* 2018 73: 2314–2327
5. Abdurrahman G. et al. Allergy—A New Role for T Cell Superantigens of Staphylococcus aureus? *Toxins* 2020 12(3): 176
6. Lee J H et al. Novel Drugs for Asthma Treatment: Immunomodulatory Therapy. *Korean J Med* 2012 83:190-196
7. Tomassen P. et al. Inflammatory endotypes of chronic rhinosinusitis based on cluster analysis of biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 2016 137(5):1449-1456.e4.
8. Bachert C. et al. Specific IgE against Staphylococcus aureus enterotoxins:

- An independent risk factor for asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2012 130(2): 376-381.e8
9. Teufelberger A. et al. Staphylococcus aureus Orchestrates Type 2 Airway Diseases *Trends in Molecular Medicine* 2019 25(8) :696-707
  10. Stentzel S. et al. Staphylococcal serine protease-like proteins are pacemakers of allergic airway reactions to Staphylococcus aureus. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2017 139(2):492-500.e8
  11. Song W J et al. Staphylococcal enterotoxin sensitization in a community-based population: A potential role in adult-onset asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 2014 44(4): 553-562
  12. Song W J et al. Risk factors of fixed airway obstruction in elderly patients with asthma. *European Respiratory Journal* 2016 48 (suppl 60): PA576
  13. Bachert C. et al. Staphylococcus aureus and its IgE-inducing enterotoxins in asthma: Current knowledge. *European Respiratory Journal* 2020 55(4)
  14. Schamberger A. C. et al. Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. *Scientific Reports* 2015 5:1-9
  15. Li Fen-fen et al. Shp2 Plays an Important Role in Acute Cigarette Smoke-Mediated Lung Inflammation. *The Journal of Immunology* 2012 189(6): 3159-3167
  16. Ma Libing et al. Cigarette and IL-17A synergistically induce bronchial

epithelial-mesenchymal transition via activating IL-17R/NF- $\kappa$ B signaling. *BMC Pulmonary Medicine* 2020 20(1): 1-7

17. L. Q. C. Siew. et al. Cigarette smoking increases bronchial mucosal IL-17A expression in asthmatics, which acts in concert with environmental aeroallergens to engender neutrophilic inflammation. *Clinical and Experimental Allergy* 2017 47(6): 740-750
18. Nakamura Y. et al. Cigarette smoke extract induces thymic stromal lymphopoietin expression, leading to TH2-type immune responses and airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008 122(6): 1208-1214
19. Chaudhuri R. et al. Role of symptoms and lung function in determining asthma control in smokers with asthma. *Allergy* 2008 63(1): 132-135
20. McEachern and Elisa K. et al. Analysis of the effects of cigarette smoke on staphylococcal virulence phenotypes. *Infection and Immunity* 2015 83(6): 2443-2452
21. Kulkarni R. et al. Cigarette smoke increases *Staphylococcus aureus* biofilm formation via oxidative stress, *Infection and Immunity*. 2021 80(11): 3804-3811
22. . Josse J. et al. Staphylococcal adhesion and host cell invasion: Fibronectin-binding and other mechanisms. *Frontiers in Microbiology* 2017 8(DEC): 1-8

23. Nordengrün M. et al. Allergic Reactions to Serine Protease-Like Proteins of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Immunology* 2021 12(Mar): 1-7
24. Arundhasa Chandrabalan et al. *Staphylococcus aureus*-serine protease-like protein B (SplB) activates PAR2 and induces endothelial barrier dysfunction. *bioRxiv* 2021 55(1): 164-176
25. Stach Natalia et al. Unique Substrate Specificity of SplE Serine Protease from *Staphylococcus aureus*. *Structure* 2018 26(4): 572-579. e4
26. Teufelberger A. R. et al. The IL-33/ST2 axis is crucial in type 2 airway responses induced by *Staphylococcus aureus*-derived serine protease-like protein D. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2018 141(2): 549-559. e7
27. Pietrocola G. et al. *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 7:166.
28. Reed S. B. et al. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* serine protease operon. *Infection and Immunity* 2001 69(3): 1521-1527
29. Gomes-Fernandes M. et al. Accessory gene regulator (Agr) functionality in *Staphylococcus aureus* derived from lower respiratory tract infections. *PLoS One.* 2017 12(4): e0175552
30. Lacombe A. et al. Cigarette smoke exposure redirects *Staphylococcus*

aureus to a virulence profile associated with persistent infection. *Scientific Reports* 2019 9(1): 1-15

31. Archer NK et al. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2011 2(5):445-59.
32. N.C. Thomson et al. Asthma and cigarette smoking. *European Respiratory Journal* 2004 24(5): 822-833
33. Nagasaki T. et al. Sensitization to Staphylococcus aureus enterotoxins in smokers with asthma. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 2017 119(5): 408-414.e2
34. Shi Le et al. Effect of nicotine on Staphylococcus aureus biofilm formation and virulence factors. *Scientific Reports* 2019 9(1): 1-13

## 영문 요약

*Staphylococcus aureus* (SA) colonization is positively associated with prevalence or severity of chronic allergic diseases. SA can drive type 2 inflammation by producing staphylococcal enterotoxins (SEs) and serine protease-like proteins (Spl); but these toxins and proteins may also act like allergens in patients with specific IgE. Interestingly, SE-specific IgE levels are significantly higher in more severe asthmatic patients with smoking history than mild asthmatics without smoking history.

We hypothesize that cigarette smoke exposure may directly interact with SA and increase the release of pro-allergic proteins. This study examined differences in SA secretome profiles before and after cigarette smoke extract (CSE) stimulation *in vitro*, using proteomic analyses.

We isolated SA in the nasal swabs obtained from 12 non-asthmatic controls and 14 asthmatic patients. SA was cultured *in vitro* for 3 or 10 hours, with or without CSE stimulation. Culture supernatants were analyzed for SA secretome using high resolution LC-MS/MS system Label-free MS1 quantification (Proteome Discoverer 2.2).

A total of 487 *S. aureus* proteins were identified. Principal component analyses showed that secretome profiles were distinct between patients and controls, but also markedly different according to CSE stimulation. Secreted SA proteins were up-regulated by CSE treatments (defined by p value < 0.05 and > 2-fold change) and belonged to different domains, including structure, metabolism, or virulence

of the bacteria. Of note, SplD, a recently identified protein with pro-allergic effects, was only found in the supernatants of SA obtained from severe smoking asthmatics and were significantly increased by CSE treatment. Levels of other Spls, such as SplA, SplB, SplC, and SplF, were also similarly higher in the bacterial supernatants obtained asthmatics, or increased by CSE treatments.

These findings indicate the potential that cigarette smoke exposure may directly induce the release of pro-allergic proteins, such as Spls, from SA, which might help to explain previous epidemiological observations that SE-IgE levels were significantly higher in patients with smoking history. Furthermore, this suggests that the interactions between cigarette smoke exposure and SA may be involved in smoking-related severity or clinical outcomes of asthma.