



- (51) 국제특허분류:
G01N 33/566 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01) C07K 14/21 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/006791
- (22) 국제출원일: 2016년 6월 24일 (24.06.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0090939 2015년 6월 26일 (26.06.2015) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 박영준 (PARK, Young-Jun); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 류충민 (RYU, Choong-Min); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 윤성진 (YOON, Seong Jin); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 안소영 (AHN, So Young); 06632 서울시 서초구 서초대로 344, 4층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

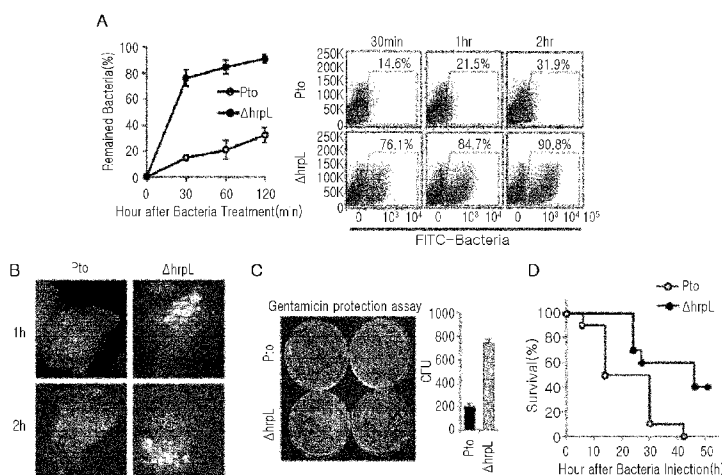
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR SCREENING INHIBITOR AGAINST IMMUNOSUPPRESSION BY HOPQ1 USING INTERACTION OF TYPE III EFFECTOR HOPQ1 AND LIM DOMAIN KINASE 1 (LIMK1) AND COMPOSITION THEREFOR

(54) 발명의 명칭 : 타입 III 에펙터 HOPQ1 및 LIM 도메인 키나아제 1(LIMK1)의 상호작용을 이용한 HOPQ1에 의한 면역억제에 대한 억제제 스크리닝 방법 및 이를 위한 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a method for screening an inhibitor against immunosuppression by HopQ1 using an interaction of type III effector HopQ1 and LIM domain kinase (LIMK1) and a composition therefor. The inhibitor against the interaction of HopQ1, which is the type III effector protein, and LIMK1, which is a binding partner thereof, can be used as a material for controlling intracellular toxin causing shock by regulating the inhibition of phagocytosis by HopQ1.

(57) 요약서: 본 발명은 타입 III 에펙터 HopQ1 및 LIM 도메인 키나아제의 상호작용을 이용한 HopQ1에 의한 면역억제에 대한 억제제 스크리닝 방법 및 이를 위한 조성물에 관한 것으로, 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1과 그의 결합파트너로서의 LIMK1의 상호작용 억제제는 HopQ1에 의한 식균작용의 억제를 조절함으로써 세포내 독소 유발 쇼크 조절용 물질로 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 타입 III 에펙터 HOPQ1 및 LIM 도메인 키나아제1(LIMK1)의 상호작용을 이용한 HOPQ1에 의한 면역 억제에 대한 억제제 스크리닝 방법 및 이를 위한 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 타입 III 에펙터 HopQ1 및 LIM 도메인 키나아제의 상호작용을 이용한 HopQ1에 의한 면역 억제에 대한 억제제 스크리닝 방법 및 이를 위한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] *Pseudomonas syringae* pv. tomato는 식물과 감수성 식물에 질환을 야기하는 병원성 세균 사이의 상호작용에 사용되는 모델 중 하나이다(Xin XF, He SY (2013), *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants, *Annu Rev Phytopathol.* 51:473-98). *P. syringae* pv. tomato (Pto)는 타입 III 분비 시스템을 통하여 숙주 방어 기전을 유도해내고 억제하는 식물 사이토솔(cytosol) 내로 다양한 에펙터(effector) 단백질을 주입하는 것으로 알려져 있다(Block A, Alfano JR (2011), Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets orguarded decoys *Curr.Opin.Microbiol.* 14:39-46, Boller T, He SY (2009), Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324:742-44, Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dangl JL (2006), Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:425-49, Mudgett MB (2005), New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:509-31). Pto DC3000에 있어서, 적어도 28개의 에펙터는 완전히 활성이고 충분히 발현되어 애기장대(*Arabidopsis*) 및 토마토 식물에 있어서의 타입 III 에펙터 전위(translocation) 어세이에 의해 검출되는 것으로 입증되었다(Cunnac S, Lindeberg M, Collmer A (2009), *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr.Opin.Microbiol.* 12:53-60).
- [3] 그런데, 특정 에펙터의 동물세포로의 전위는 계 장벽(kingdom barrier)으로 인하여 조사되지 않았다. 식물 세포와는 달리, 동물 세포는 복잡한 기전 예컨대 식세포 작용에 의해 병원균 및 세포 잔해를 깨끗이 하는데 사용되는 특정 기전인 대식세포를 가져온다. 식세포 작용에 있어서의 필수적인 진행은 대식세포의 표면 수용체에 의한 병원균을 인식하고 그리고 나서 병원균인 포식리소좀(phagolysosome)으로 융합되고 대식세포에 의해 소화되는 것이다(Underhill DM, Goodridge HS (2012), Information processing during

- phagocytosis, *Nat Rev Immunol.* 15;12(7):492-502, Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A (2013), Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(5):283-96).
- [4] [선행기술문헌]
- [5] [비특허문헌]
- [6] (비특허문헌 1) Xin XF, He SY (2013), *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants, *Annu Rev Phytopathol.* 51:473-98
- [7] (비특허문헌 2) Block A, Alfano JR (2011), Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets orguarded decoys *Curr.Opin.Microbiol.* 14:39-46
- [8] (비특허문헌 3) Boller T, He SY (2009), Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324:742-44, Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dangl JL (2006)
- [9] (비특허문헌 4) Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:425-49
- [10] (비특허문헌 5) Mudgett MB (2005), New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:509-31
- [11] (비특허문헌 6) Cunnac S, Lindeberg M, Collmer A (2009), *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr.Opin.Microbiol.* 12:53-60
- [12] (비특허문헌 7) Underhill DM, Goodridge HS (2012), Information processing during phagocytosis, *Nat Rev Immunol.* 15;12(7):492-502
- [13] (비특허문헌 8) Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A (2013), Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(5):283-96

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 이에 본 발명자들은 식물 병원성 박테리아인 *Pseudomonas syringae*의 에펙터 단백질인 HopQ1이 포유동물 세포에 있는 LIMK1의 활성 조절을 통해 대식세포의 식균작용 억제함으로써 포유동물의 면역체계를 교란시키는 역할을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [15] 따라서 본 발명의 목적은 타입 III 에펙터 HopQ1 및 LIM 도메인 키나아제의 상호작용을 이용한 HopQ1에 의한 면역 억제에 대한 억제제 스크리닝 방법 및 이를 위한 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [16] 또한 본 발명의 목적은 타입 III 에펙터인 HopQ1을 포함하는 대식세포의 식균 작용 억제용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

- [17] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1과 그의 결합파트너로서의 LIM 도메인 키나아제 1(LIMK1)에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및
- [18] (b) 상기 시험물질이 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1과 그의 결합파트너로서의 LIMK1의 상호작용을 억제하는 지 여부를 분석하는 단계;
- [19] (c) 상기 시험물질이 상기 상호작용을 억제하면 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1에 의한 면역 억제에 대한 저해제 후보로 선별하는 단계를 포함하는 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1에 의한 면역 억제에 대한 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [20] 본 발명에서 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1은 서열번호 1의 펩티드 서열로 표시될 수 있다.
- [21] HopQ1의 펩티드 서열 (서열번호 1)
- [22] MHRPITAGHTTSSLILDQSKQISRTPESSAQSAALSQQASMSSPVLSKKSAPA
LLTAAQRTMLAQVGACNAHLTSDENMAINELRSHKPLLPKDTWFFTPDNKDP
DDVVTYTLGKQLQAEGFVHITDVVATLGDAEVRSQRAEMAKGVFNKLELHD
VHVSRRGRDYAMNSLQSKEHAKFLLEGHALRAGPGEIHRDSLQDMSRRLARAP
HGVGIVVIAGMSDINALITTCPDMVRERVDDITIMGGVEPLKDADGFVQPDAR
AYNNATDMAARSLYRKAQELGIPLRIVTKEAAYKTAVSPSFYEGIAGSGHPV
GHYLRDVQKSALKGLWEGIQAGLLPGLDDSWFFRTFMPNAQIEAAQLDKNKE
SSFEDIWPKVTKLNLYDPLTLLASVPGAAKLLFKPKAIHTEGFGVVEQVGPDD
VTHPEKAKLLMSALAKSALVQSTVAPD
- [23] 본 발명에서 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1의 핵산서열(mRNA 서열)은 서열번호 2로 표시될 수 있다.
- [24] HopQ1의 핵산분자 서열 (서열번호 2)
- [25] ATGCATCGTCCTATCACCGCAGGCCATACCACCTCACGTCTCATCCTAGA
TCAGTCAAAACAAATATCACGTACCCCATCGGAAAGTAGCGCGCAATCAG
CGCTTTCTCAGCAAGCAAGCATGAGCAGCCCAGTTTTGGAGCGGTTCGAAAA
GTGCGCCAGCTTTATTGACTGCGGCACAGCGCACGATGCTTGCACAAGTGG
GAGCCTGTAACGCTCATCTGACCTCAGATGAAAACATGGCCATCAACGAAC
TGAGATCACACAAGCCCCTTTTACCTAAGGATACGTGGTTTTTCACTGATCC
TAACAAGGACCCAGATGATGTCGTGACCTACACCTTGGGCAAGCAATTGCA
GGCTGAGGGCTTTGTGCACATCACGGATGTAGTGGCGACACTGGGTGATGC
TGAAGTTCGCTCTCAACGTGCCGAGATGGCCAAAGGCGTGTCAACAAGCT
TGAGTTGCATGACGTGCATGTGTGCGGTGGTTCGGGATTACGCAATGAATTC
GCTTCAGTCGAAGGAACATGCCAAATTTTTACTGGAAGGTCATGCTTTAAG
GGCTGGACCTGGTGAAATACACCGCGACAGCTTGCAGGACATGAGCAGGC
GCCTGGCCCGTGCGCCACATGGAGTCGGTATTGTCGTAATTGCAGGCATGA
GTGATATCAATGCGCTCATCACTACCTGCCCCGGATATGGTGCGCGAACGGG

TTGATGACATCACCATCATGGGCGGCGTCGAGCCTTTAAAGGACGCAGATG
 GTTTTGTACAGCCTGATGCACGCGCTTACAACAATGCGACCGACATGGACG
 CTGCGCGCAGTCTTTATCGGAAAGCGCAGGAGCTTGGCATTCCACTTCGTA
 TAGTGACAAAGGAGGCGGCCTATAAAACGGCGGTTTCGCCTTCATTTTACG
 AAGGGATAGCGGGGAGCGGACATCCAGTAGGCCACTACCTGAGAGACGTT
 CAGAAGAGTGCGTTGAAAGGCCTCTGGGAAGGTATTCAAGCTGGATTGCTT
 CCCGGGTTGGATGACTCATGGTTCTTTCGGACGTTTCATGCCGAATGCACAG
 ATTGAAGCAGCACAACTGGATAAAAATAAAGAGAGTTCGTTTGAAGATAT
 CTGGCCTAAGGTGACGAAGCTAAACCTGTATGATCCTCTGACATTACTGGC
 CTCAGTGCCAGGGGCGGCAAACTGCTATTTAAACCAAAAGCTATACACA
 CAGAAGGATTTGGTGTGTAGAGCAAGTAGGTCCAGATGATGTGACGCATC
 CAGAGAAAGCAAAGTTATTGATGTCCGCTTTAGCCAAATCTGCGCTTGTCC
 AGTCGACGGTAGCCCCAGATTGA

[26] 본 발명에서 상기 LIMK1은 서열번호 3의 펩티드 서열로 표시될 수 있다.

[27] LIMK1 펩티드 서열 (서열번호 3)

[28] MRLTLLCCTWREERMGEEGSELPVCASCGQRIYDGQYLQALNADWHADCF
 RCCECSVSLSHQYYEKDQQLFCKKDYWARYGESCHGCSEHITKGLVMVAGEL
 KYHPECFICLACGNFIGDGDYTLVEHSLKLYCGQCYQTVVTPVIEQILPDSPG
 SHLPHTVTLVSIPASAHGKRGLSVSIDPPHGPPGCGTEHSHTVRVQGVDPGCMS
 PDVKNSIHVGDRILEINGTPIRNVPLDEIDLLIQETSRLQLTLEHDPHDSLGHGP
 VSDPSPLSSPVHTPSGQAASSARQKPVLRSCSIDTSPGTSSLASPASQRKDLGRS
 ESLRVVCRPHRIFRPSDLIHGEVLGKGCFGQAIKVTHRETGEVMVMKELIRFDE
 ETQRTFLKEVKVMRCLEHPNVLFKFIGVLYKDKRLNFITEYIKGGTLRGIKNMD
 SQYPWSQRVSFADKDIASGMAYLHSMNIIHRDLNSHNCLVRENRRNVVADFG
 LARLMIDEKNQSEDLRSLKKPDRKKRYTVVGNPYWMAPEMINGRSYDEKVDV
 FSFGIVLCEIIGRVNADPDYLPRTMDFGNLNVRGFLDRYCPNCPSPFFPITVRCC
 DLDPEKRPSFVKLEQWLETLMHLSGHLPLGPQLEQLERGFWEYRRGESSLP
 AHPEVPD

[29] 본 발명에서 상기 LIMK1의 핵산서열(mRNA 서열)은 서열번호 4로 표시될 수 있다.

[30] Limk1 핵산 서열 (서열번호 4)

[31] ATGAGGTTGACGCTACTTTGTTGCACCTGGAGGGAAGAACGTATGGGAG
 AGGAAGGAAGCGAGTTGCCTGTGTGTGCGAGCTGTGGCCAGAGGATCTAT
 GACGGCCAGTACCTCCAGGCCCTGAATGCTGACTGGCATGCAGACTGCTTC
 AGGTGCTGCGAGTGTAGCGTCTCCCTTTCACACCAGTACTACGAGAAGGAT
 GGACAGCTCTTCTGCAAGAAGGACTACTGGGCCCCGCTATGGCGAGTCTTGC
 CACGGGTGCTCCGAGCACATCACCAAAGGGCTGGTCATGGTGGCTGGGGA
 GCTGAAGTACCACCCTGAGTGTTTCATCTGCCTCGCCTGTGGAAACTTCATT

GGCGATGGGGACACCTACACACTGGTGGAGCACTCCAAGCTGTACTGTGG
 CCAGTGCTACTACCAGACCGTGGTAACCTCCAGTCATCGAACAGATCCTACC
 TGA CTCACCCGGCTCCACCTGCCCCACACAGTCACCCCTCGTGTCTATCCCA
 GCCTCTGCCCATGGCAAACGAGGCCTGTCTGTCTCCATCGACCCCCCTCAC
 GGCCCAACCAGGATGTGGCACGGAGCATTTCGCACACTGTCCGAGTCCAAGG
 AGTGGACCCAGGCTGCATGAGCCCAGATGTGAAGAATTCCATCCACGTTGG
 AGACCGGATCTTGGAATCAATGGCACGCCCCATCCGGAATGTGCCGCTGG
 ACGAGATCGACTTGCTGATCCAGGAGACCAGCCGCCTGCTCCAGCTGACCC
 TCGAGCACGACCCCCATGACTCACTGGGCCATGGGGCCGTGTCCGATCCCA
 GCCCCCTGAGCTCCCCGGTGCACACTCCCAGCGGACAGGCAGCCAGCTCTG
 CCCGGCAGAAACCTGTCTTGAGGAGCTGCAGTATTGACACGTCCCCGGGT
 CCAGCTCACTAGCCTCTCCAGCCTCCAGCGCAAGGACCTGGGTGCTCCG
 AATCCCTCCGAGTGGTCTGCCGACCACACCGAATCTTCCGGCCATCTGATC
 TCATCCATGGGGAAGTGCTGGGCAAGGGCTGTTTTGGCCAGGCCATCAAGG
 TGACACACCGAGAAACAGGCGAGGTGATGGTGATGAAGGAACTTATCCGG
 TTTGATGAGGAGACCCAGAGGACATTTCCTCAAGGAGGTAAAGGTCATGCG
 CTGCCTGGAGCACCTAACGTGCTCAAGTTCATCGGAGTGCTCTACAAGGA
 CAAGCGGCTAAACTTCATCACAGAGTACATCAAGGGCGGCACCCTGCGGG
 GCATCATCAAGAACATGGACAGCCAGTACCCGTGGAGTCAGAGGGTCAGC
 TTTGCCAAGGACATTGCATCAGGGATGGCCTACCTCCATTCGATGAACATC
 ATCCACCGAGACCTCAACTCCCACAACCTGTCTGGTCCGTGAGAATAGGAAC
 GTGGTGGTGGCCGACTTTGGGCTGGCTCGACTCATGATCGATGAAAAGAAT
 CAGTCTGAAGACTTACGCAGCCTTAAGAAGCCGGACCGCAAGAAGCGGTA
 CACAGTGGTGGGCAACCCCTACTGGATGGCGCCAGAGATGATCAATGGTC
 GTAGTTATGATGAAAAGGTGGACGTGTTTTCTTTGGAATTGTCCTCTGTGA
 GATTATCGGGCGTGTGAATGCAGACCCTGACTATCTGCCCCGCACTATGGA
 CTTTGGCCTCAATGTAAGGGGTTTCTTGACCGCTACTGTCCACCAAACCTG
 TCCCCCAAGTTTCTTCCCCATCACTGTGCGCTGCTGTGACCTGGATCCTGAA
 AAGAGACCCTCTTTTGTAAAGCTGGAACAATGGCTAGAAACACTTCGCATG
 CACTTGTCTGGTCACCTGCCACTGGGCCCACAACCTGGAACAACCTGGAGCGG
 GGCTTCTGGGAGACCTACCGGCGGGGCGAGAGCTCACTGCCTGCCCACCCC
 GAGGTCCCTGACTGA

- [32] 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시험 물질은 단일 화합물, 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물), 항체 또는 펩타이드이다. 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입

가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다.

- [33] 시험 물질은 당업계에서 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레스블 패러렐 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909 (1993); Erb et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 11422 (1994); Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37: 2678 (1994); Cho et al., Science 261: 1303 (1993); Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059 (1994); Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37: 1233 (1994) 등에 개시되어 있다.
- [34] 본 명세서에서, 용어 “펩타이드”는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미하며, 통상적으로 아미노산 잔기 4-40개를 포함한다.
- [35] 본 발명의 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1과 그의 결합파트너로서의 LIMK1의 상호작용 억제제로서의 펩타이드는 당업계에서 통상적으로 사용하는 고체상(solid-phase) 합성 방법에 의해 제조된다 (Merrifield, R. B., J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963), Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., Cook, P. I., Anal. Biochem., 34:595-598 (1970)). 즉, α -아미노 및 측쇄 작용기가 보호화된 아미노산을 레진에 결합시킨 후, α -아미노 보호기를 제거하고 남은 α -아미노 및 측쇄 작용기가 보호화된 아미노산을 원하는 순서로 단계적으로 커플링하여 중간체를 얻는다. 상기 본 발명의 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1과 그의 결합파트너로서의 LIMK1의 상호작용 억제제 펩타이드를 제조하기 위한 아미노산 서열은 종래의 방법을 참조하였다(Chen L, Hahn H, Wu G, Chen CH, Liron T, Schechtman D, Cavallaro G, Banci L, Guo Y, Bolli R, Dorn GW, Mochly-Rosen D., Proc. Natl. Acad. Sci., 98, 11114-9 (2001); Phillipson A, Peterman EE, Taormina P Jr, Harvey M, Brue RJ, Atkinson N, Omiyi D, Chukwu U, Young LH., Am. J. Physiol. HeartCirc. Physiol., 289, 898-907 (2005); 및 Wang J, Bright R, Mochly-Rosen D, Giffard RG., Neuropharmacology., 47, 136-145 (2004)).
- [36] 본 명세서에서, 용어 “천연 추출물”은 천연물의 다양한 기관 또는 부분 (예: 잎, 꽃, 뿌리, 줄기, 가지, 껍질 및 과실 등)으로부터 추출하여 얻은 것을 의미하며, 천연 추출물은 (a) 물, (b) 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올 (메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올 및 노말-부탄올 등), (c) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (d) 아세톤, (e) 에틸 아세테이트, (f) 클로로포름, (g) 1,3-부틸렌글리콜, (h) 헥산 (i) 디에틸에테르를 추출 용매로 하여 얻을 수 있다.

- [37] 본 발명에서 시험물질로서 항체가 이용될 수도 있다. 상기 항체는 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ 또는 LIMK1과 특이적으로 결합하는 항체이다. 또는, 본 발명에서 시험물질로서 이용되는 항체는 이중특이성 항체(bispecific antibody)를 포함한다. 예컨대, 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ와 LIMK1에 이중적으로 특이성을 갖는 항체가 이용될 수 있다. 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.
- [38] 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519 (1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628 (1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597 (1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.
- [39] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ 또는 LIMK1은 세포 외(in vitro) 하나의 용액에 포함되어 있다. 즉, 본 발명의 방법은 인 비트로에서 하나의 반응용액으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 정제된 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ 및 LIMK1과 시험물질을 포함하는 반응용액을 이용하여 본 발명의 분석을 할 수 있다.
- [40] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ 또는 LIMK1은 세포 내(in vivo)에 포함되어 있다. 즉, 본 발명의 방법은 세포내에서의 반응을 이용하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ 및 LIMK1을 발현하는 세포에 시험물질을 처리하여 세포 내에서 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ와 LIMK1의 상호작용이 억제되는 지 분석한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 세포는 포유류 대식세포일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 세포는 인간을 제외한 포유류 대식세포일 수 있다.
- [41] 본 발명에서 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ의 결합파트너로서 규명된 단백질은 LIMK1이다. 바람직하게는, 본 발명의 방법에서 이용되는 LIMK1은 LIMK1의 N-말단 LIM1 도메인이다.
- [42] 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ, 그의 결합파트너인 LIMK1 및 시험물질을

접촉시킨 다음, 상기 시험물질이 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ와 그의 결합파트너 LIMK1 사이의 상호작용을 억제하는지 여부를 분석한다.

- [43] 이러한 상호작용 분석은, 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 수행할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 단계 (b)는 투-하이브리드 방법, 공동면역침강 방법(co-immunoprecipitation assay), 공동-국소화 분석(co-localization assay), 섬광 근접 측정법(scintillation proximity assay; SPA), UV 또는 화학적 가교 결합 방법, 이분자 상호작용 분석(bimolecular interaction analysis; BIA), 질량 분석법(mass spectrometry; MS), NMR(nuclear magnetic resonance) 또는 형광 편광 분석법(fluorescence polarization assays; FPA)에 의해 수행된다.
- [44] 본 명세서에서의 용어, “투-하이브리드 방법”은 분할 가능한 DNA-결합 및 활성화 도메인으로 구성된 전사인자의 모듈 특성에 기초한다. 이 경우, 베이트(bait)로서 LIMK1이 이용되고 프레이(pre)로서 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ가 이용될 수 있다. 또한, 이와 반대로 컨스트럭션을 만들 수도 있다. 이 방법에 따르면, 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ와 LIMK1의 상호작용을 억제하는 물질을 스크리닝 할 수 있다. 투-하이브리드 시스템은 간단하게는, 이 분석 방법은 두 가지 DNA 컨스트럭트를 이용한다. 예컨대, 하나의 컨스트럭트에서, LIMK1-코딩 폴리뉴클레오타이드를 공지의 전사 인자의 DNA 결합 도메인-코딩 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다. 만일, 베이트 및 프레이가 인 비보에서 상호작용하여 복합체를 형성하면, 전사인자의 DNA-결합 및 활성화 도메인이 인접하게 되며, 이는 리포터 유전자(예컨대, LacZ)의 전사를 촉발하게 된다. 시험물질이 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ와 LIMK1의 상호작용을 억제한다면, 리포터 유전자의 발현을 방해할 것이며, 결론적으로 HopQ1에 의한 면역 억제에 대한 억제제로 이용될 수 있음을 나타내는 것이다. 상기 투-하이브리드 방법 외에 쓰리-하이브리드 방법을 따라서도 수행할 수 있다(U.S. Pat. No. 5,283,317; Zervos et al., Cell72, 223-232, 1993; Madura et al., J. Biol. Chem. 268, 12046-12054, 1993; Bartel et al., BioTechniques14, 920-924, 1993; Iwabuchi et al., Oncogene8, 1693-1696, 1993; 및 W0 94/10300).
- [45] 본 명세서에서의 용어, “공동면역침강 방법(co-immunoprecipitation assay, Co-IP)”(Harlow and Lane, Eds., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))에 따르면, 배양세포가 생산하는 항원성 물질을 측정할 때, 미량이라 직접 측정이 불가능하면, 우선 배양액에 3H-라이신 등을 첨가하여 표적물질을 표지하여 배양 상층액을 취한다. 이 상층액에 특이항체와 항원항체복합물이 형성될 수 있는 동일한 농도의 비표지표적물질을 첨가하여 침강반응을 일으키면, 배양액 내의 미량 표지된 표적물질도 침강물에 함께 공동침강반응이 일어나기 때문에 침강물의 방사활성으로 표적물질을 측정할 수 있다. 단백질의 큰 복합체의 일원으로 알려진 공지의 단백질을 표적으로 하는 항체를 선별하고, 상기 항체를 가지고 알려진 복합체를 표적으로 하여 총 단백질을

콤플렉스를 용액에 침전시켜 상기 복합체의 알려지지 않은 단백질을 동정한다. 이는 알려지지 않은 물질이 미량인 경우에 직접 측정이 불가능하므로 배양액에 표적물질로 표지하여 배양상층액을 취하고, 상기 상층액에 특이 항체와 단백질복합체가 형성될 수 있는 동일 농도의 비표지표적물질을 첨가하여 침강반응을 일으키도록 하면, 미량 표지된 표적물도 같이 공동 침강 반응이 일어나게 된다. 용액 밖으로 단백질복합체가 빠져 나온다는 개념 때문에 풀다운(pull-down)이라고 언급된다. 공동면역 침강법은 단백질-단백질 상호작용을 분석하기 위해 널리 이용된다.

- [46] 본 명세서에서의 용어, 공동-국소화 분석(co-localization assay)은 형광염색법을 이용하여, 형광 현미경에서 두 개 그 이상의 다른 각각의 차별화된 방출 파장을 가지는 형광 라벨 사이에 공간적 오버랩을 관찰하여, 세포의 같은 공간에 위치하거나 다른 세포와 매우 근접한 위치에 있는 다른 표적을 관찰하는데 이용되는 분석법이다. 다른 2 가지의 형광으로 염색한 단백질들을 컨포컬 현미경으로 스캐닝하고, 특정 위치에 나타난 색깔을 측정하여 2 가지 단백질의 위치가 한 곳에 위치하고 있음을 규명할 수 있으며, 이 단백질들이 상호작용을 하고 있음을, 즉 기능적으로도 결합하고 있다는 점도 유추할 수 있는 장점을 가진다(Manders et al, Journal of Microscopy 169:375-382 (1993); Pawley JB, Handbook of Biological Confocal Microscopy, (2006)).

- [47] 본 명세서에서의 용어, 섬광 근접 측정법(scintillation proximity assay; SPA)은 에너지를 가지는 전자에 의해 형광작용을 일으키는 폴리비닐-톨루엔 플라스틱 신틸레이터 비드(scintillator beads)에 항체를 부착하고, 수용액 상에서 쉽게 에너지를 잃거나 소멸되는 낮은 에너지의 전자를 방출하는 방사성 핵종을 비드(beads)에 부착된 항체에 선택적으로 결합하는 항원에 표지하여 항원-항체 결합의 정도를 발생하는 형광 측정을 통해 관찰하는 방식을 말한다(Alouani, Methods Mol. Biol. 138:135-41 (2000)). 이 방식을 이용하면 일반적으로 방사면역측정법이 가지는 단점인 결합분획과 유리분획의 분리과정이 필요하여 불편적인 시스템의 구축이 어려운 점을 극복가능하고, 민감도가 높고 분리과정이 필요 없다는 특징을 가진다. 방사성 핵종이 표지된 항원과 비드상에 부착된 항체간의 결합이 이루어지면, 항원에 표지된 방사성 핵종이 방출하는 낮은 에너지의 전자가 비드에 도달하여 에너지를 전달하고, 에너지를 받은 비드는 형광을 방출하게 된다. 이 방출된 형광은 액체섬광계수기로 항체-항원의 결합 양에 따른 비례를 보이며 증가되는 것을 측정할 수 있다.

- [48] 본 명세서에서의 용어, 화학적 가교 결합 방법(chemical cross-linking)은 단백질이나 핵산 등의 생체 고분자에 대하여 가교 시약을 이용하여 화학적인 공유결합을 형성시켜, 단백질의 소유닛 구조, 단백질-핵산의 상호작용, 단백질-단백질 상호작용의 해석 등 분자 간 반응에 의해 기능을 발휘되는 특성을 분석하는데 이용되는 방식을 말한다(Fancy, Curr. Opin. Chem. Biol. 4:28-33 (2000)). 또한 단백질 분자의 고정화, 항체의 효소 표식과 같은 공유결합에 의한

단백질 접합체 구조의 안정화에 이용된다. 가교 시약은 일반적으로 동일 분자내 아민기(-NH₂), 티올기(-SH) 및 카복시산기(-COOH) 등의 작용기에 특이적 반응하거나, 광조사에 의한 활성화가 일어날 수 있는 작용기를 양단에 갖는 2가성 가교시약을 이용한다. 단백질 간의 상호 작용을 관찰하기에는 너무 그 결합력이 매우 약하거나 일시적이지만, 화학적 가교결합 방식을 이용하면 단백질 간의 상호결합을 캡처시켜 분석하는데 용이하다는 장점을 가진다.

- [49] 본 명세서에서의 용어, 이분자 상호작용 분석(bimolecular interaction analysis; BIA)은 실시간으로 특이적 상호작용을 분석하는 기술로서, 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 실시할 수 있는 방식을 말한다(예컨대, BIAcore™)(Sjolander & Urbaniczky, Anal. Chem. 63:2338-2345(1991), and Szabo et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705(1995)). 표면 플라즈몬 공명(SPR)에서의 변화는 분자들 사이의 실시간 반응에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다.
- [50] 본 명세서에서의 용어, 형광 편광 분석법(fluorescence polarization assays; FPA)은 C 반응성 단백질(C reactive protein, CRP)에 형광색소인 플루오레세인을 결합시킨 트레서와 CRP에 특이적으로 결합하는 항체를 혼합한 용액에, 측정 대상물로서의 CRP를 포함하는 체액(특히, 혈액)을 첨가하는 방법으로, 혼합 용액 중의 항체에 대한 트레서와 CRP의 결합에 근거하여, CRP를 측정하는 방식을 말한다(Degterev, et al., NatureCellBiology 3:173-182 (2001)).
- [51] 질량 분석법에 의한 방식(McLafferty et al., Science 284:1289-1290 (1999) and Degterev, et al., Nature Cell Biology 3:173-182 (2001)), 또는 핵 자기 공명법에 의한 방식(Shuker et al., Science 274:1531-1534 (1996), Hajduk et al., J. Med. Chem. 42:2315-2317 (1999), and Chen and Shapiro, Anal. Chem. 71:669A-675A (1999))을 이용하여 미지의 시료의 구조를 분석하는데 이용된다.
- [52] 본 발명에서 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1과 LIMK1과의 상호작용은 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1과 LIMK1의 N-말단 LIM1 도메인을 통한 상호작용일 수 있다.
- [53] 본 발명에서 상기 면역 억제제는 분리된 포유동물의 대식세포에서의 식균작용을 억제할 수 있다.
- [54] 본 발명에서 상기 면역 억제제는 인간을 제외한 포유동물의 대식세포에서의 식균작용을 억제할 수 있다.
- [55] 본 발명에서 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1에 의한 면역 억제에 대한 억제제는 세포내 독소 유발 쇼크 조절용 물질일 수 있다.
- [56] 본 발명에서 상기 세포내 독소 유발은 패혈증에 의한 것일 수 있다.
- [57] 본 발명은 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1; 및 그의 결합파트너로서의 LIM 도메인 키나아제 1(LIMK1)을 포함하는 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1에 의한 면역 억제에 대한 억제제 스크리닝용 조성물을 제공한다.
- [58] 또한 본 발명은 또한 타입 III 에펙터인 HopQ1을 포함하는 대식세포의 식균 작용 억제용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 타입 III 에펙터인 HopQ1을

포함하는 대식세포의 식균 작용 억제용 조성물은 동물 세포에서 LIMK1의 조절을 통해 대식세포의 식균 작용을 억제하는 작용 효과를 가진다.

발명의 효과

- [59] 본 발명은 타입 III 에펙터 HopQ1 및 LIM 도메인 키나아제의 상호작용을 이용한 HopQ1에 의한 면역 억제에 대한 억제제 스크리닝 방법 및 이를 위한 조성물에 관한 것으로, 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1과 그의 결합파트너로서의 LIMK1의 상호작용 억제제는 HopQ1에 의한 식균작용의 억제를 조절함으로써 세포내 독소 유발 쇼크 조절용 물질로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [60] 도 1의 A의 그래프는 유세포 분석결과를 정리한 그래프이고, *Pta*는 GFP-발현 *P. syringae* pv. *tabaci*, *Pto*는 *P. syringae* pv. *tomato* 및 *E. coli*는 *E. coli* DH5 α 의 표시하고, 도 1의 B의 좌측 그래프는 유세포 분석결과를 정리한 그래프이고 우측은 유세포 분석결과를 보여주는 도이며, 도 1의 C의 이미지는 지시된 시간(1시간(h), 2시간, 4시간) 동안 각각의 박테리아 (녹색)로 감염된 마우스 복막 대식세포에 있어서의 대식작용 패턴을 보여주고, 도 1의 D는 겐타마이신(gentamiin) 보호 어세이 결과를 보여주는 도로서 각각 *P. syringae* pv. *tabaci*(*Pta*), *P. syringae* pv. *tomato*(*Pto*), 또는 *E. coli* DH5 α (*E. coli*)에 대한 결과를 나타내며, 도 1의 E는 마우스에서 *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *tomato*, 또는 *E. coli* DH5 α 를 감염시킬 경우의 생존율을 보여주는 그래프이다.
- [61] 도 2는 *Pto*, *Pta* 또는 *E. coli*의 접종 후 대식세포의 사이토카인을 보여주는 도이며, 도 2에서 A, B 및 C는 각각 바이러스 *Pto*, *Pta* 또는 *E. coli*의 접종 후 TNF- α , B는 IL-1 β , C는 IL-6 발현량을 보여주는 도이고, D는 *Pto*, *Pta* 또는 *E. coli*의 접종 후 MAPK 신호 및 NF- κ B 활성을 보여주는 단백질 흡입법(western blotting)의 결과를 보여주는 도이다.
- [62] 도 3의 A의 좌측 그래프는 유세포 분석결과를 정리한 그래프이고 우측은 유세포 분석결과를 보여주는 도이고, 도 3의 B의 이미지는 1 및 2시간 동안 *Pto* DC3000 또는 Δ *hrpL* (녹색)으로 감염된 복막 대식세포에 있어서의 식균작용 억제를 보여주는 도이고, 도 3의 C는 겐타마이신(gentamiin) 보호 어세이 결과를 보여주는 도로서 각각 *Pto* DC3000(*Pto*) 또는 Δ *hrpL*에 대한 결과를 나타내며, 도 3의 D는 마우스에서 *Pto* DC3000(*Pto*) 또는 Δ *hrpL* 돌연변이체를 감염시킬 경우의 생존율을 보여주는 그래프이다.
- [63] 도 4의 A의 도는 *Pto* DC3000(*Pto*) 또는 Δ *hrpL* 돌연변이체를 감염시킨 후의 박테리아의 감염정도를 보여주는 유세포 분석 결과를 정리한 도이고, 도 4의 B의 도는 *Pto* 및 *Pta*에 대하여 조기 엔도솜 마커(early endosome marker), Eea1, 플렉스트린(pleckstrin) 및 Rab 5 및 후기 엔도솜(late endosome), Rab7 및 Lamp1의 마커를 측정한 단백질 흡입법(western blotting) 결과를 보여주는 도이다.
- [64] 도 5는 *Pto* 또는 Δ *hrpL* 돌연변이체의 접종 후 대식세포의 사이토카인을

보여주는 도이며, 도 2에서 A, B 및 C는 각각 바이러스 *Pto* 또는 $\Delta hrpL$ 돌연변이체의 접종 후 TNF- α , B는 IL-1 β , C는 IL-6 발현량을 보여주는 도이고, D는 *Pto* 또는 $\Delta hrpL$ 돌연변이체의 접종 후 MAPK 신호 및 NF- κ B 활성을 보여주는 단백질 흡입법(western blotting)의 결과를 보여주는 도이다.

[65] 도 6은 겐타마이신 (gentamiin) 보호 어세이 결과를 보여주는 도이다.

[66] 도 7의 A는 식물 HopQ1은 포유류 LIMK1과 상호작용함을 확인하기 위한 단백질 흡입법(western blotting)의 결과를 보여주는 도이고, 도 7의 B는 293T 세포에서의 코필린1(cofilin1) 및 LIMK1의 인산화 및 발현을 보여주는 단백질 흡입법(western blotting)의 결과의 도이고, 도 7의 C는 HopQ1은 LIMK1의 N-말단 LIM1 도메인을 통해 LIMK1과 상호작용함을 보여주는 GST 풀-다운 어세이(GST pull-down assay)의 결과의 도이고, 7의 D의 왼쪽 이미지는 3T3-L1 세포에 있어서 LIMK1 및 HopQ1 모두의 공동-국소화를 보여주는 도이고, 도 7의 D 오른쪽 도는 HopQ1-형질감염된 3T3-L1 세포에 있어서의 HopQ1 수준을 보여주는 도이고 도 7의 E는 HopQ1-발현 *P.fluorescens*에 의한 복막 대식세포의 감염 동안의 LIMK1 및 cofilin1의 인산화 여부를 보여주는 단백질 흡입법(western blotting)의 결과의 도이다.

[67] 도 8의 A는 *Pto* DC3000 또는 *Pto* $\Delta hrpL$ -접종된 마우스로부터의 복막강, 혈액, 비장 및 간의 박테리아의 수를 보여주는 도이고, 도 8의 B는 *Pto* 또는 $\Delta hrpL$ 를 RAW 264.7 세포주에 감염시킨 후의 식세포 컵 형성 여부를 분석한 그래프이고, 도 8의 C는 GFP-발현 *E.cloacae* 또는 DsRed 및 HopQ-발현 *E.cloacae*의 유세포 분석 결과를 보여주는 도이고, 도 8의 D의 왼쪽 도는 HopQ1를 함유하는 플라스미드를 가지거나 가지지 않는 *E.cloacae*가 10-12주령의 마우스로부터의 복막강, 혈액, 비장 및 간의 박테리아 콜로니 형성을 보여주는 도이고 오른쪽 도는 HopQ1를 함유하는 플라스미드를 가지거나 가지지 않는 *E.cloacae*가 10-12주령의 마우스로부터의 복막강, 혈액, 비장 및 간의 박테리아의 수를 보여주는 도이다.

[68] 도 9는 *Pto* 또는 $\Delta hrpL$ 를 RAW 264.7 세포주에 감염시킨 후의 식세포 컵 형성 여부를 보여주는 현미경 이미지이다.

[69] 도 10은 GFP-발현 *E.cloacae* 또는 DsRed 및 HopQ-발현 *E.cloacae*의 유세포 분석 결과를 보여주는 도이다.

[70] 도 11은 GFP-발현 *E.cloacae* 또는 DsRed 및 HopQ-발현 *E.cloacae*의 유세포 분석 결과를 보여주는 현미경 사진이다.

[71] 도 12는 *P. syringae* pv. *tomato* 의 대식세포에 의한 phagocytosis 억제 결과를 보여주는 현미경 이미지이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[72] 이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기

위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

[73] 실시예 1. 식물 병원균 *P. syringae* tomato DC3000에 의한 포유류 면역 시스템 조절 여부 확인

[74] 도 1의 A 관련 실험

[75] 본 실시예에서 본 발명자들은 식물 병원균이 대식세포에 의한 포유류 면역 시스템을 조절하는지 여부를 결정하도록 *P. syringae* tomato DC3000 (Pto DC3000)의 감염 중에 식균작용 수준을 평가하였다.

[76] 복강 대식세포와 세포주 배양 방법

[77] 마우스의 복강 대식세포를 얻기 위하여 C57BL/6 마우스의 복강에 3% 티오글리콜레이트(thioglycollate)를 주입하고 4일 후에 마우스의 복강에 RPMI media를 10ml을 넣어 복강 대식세포를 얻어 낸 후에 세포배양접시에 2시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양 후에 배양접시에 붙지 않은 세포들을 제거하고 10% FBS가 들어간 RPMI 배지를 넣어서 37°C, 5% CO₂ 배양기 배양하여 준비하였다.

[78] GFP-발현 플라스미드가 도입된 *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *tomato*, 또는 *E. coli* DH5α의 준비

[79] GFP-발현 플라스미드가 도입된 박테리아를 준비하기 위하여 *P. syringae* pv. *tabaci*와 *P. syringae* pv. *tomato* 균주를 King's B 배지 200ml에 30°C에서 배양을 하고 *E. coli* DH5α는 LB 배지 200ml에 37°C에서 배양을 하였다. 600nm의 흡광도에서 흡광도가 0.4에서 0.6 사이까지만 균주를 배양 한 다음 4°C에서 3,000rpm으로 15분 동안 원심 분리하여 박테리아의 배지를 제거하고 차가운 300mM 수크로오스 (Sucrose) 200ml을 첨가하여 침전된 균주를 혼합한 후 다시 원심 분리를 진행하여 여분의 박테리아 배지를 제거하였다. 이와 같은 방법을 반복적으로 네 차례 진행 후 차가운 300mM 수크로오스 (Sucrose)를 400ul를 넣어서 박테리아를 혼합하였다. 이 후 pDSK-GFPuv 벡터를 1ul (100 ng/ul)를 첨가한 후에 0.2cm 큐벳(cuvette)에 넣은 후 2.5 kV, 25 F, 200 Ω의 조건에서 전기천공법(electroporation)으로 GFP-발현 플라스미드가 각 균주에 도입 되도록 하였다. 전기천공법을 실시 한 후 *P. syringae* pv. *tabaci*와 *P. syringae* pv. *tomato* 균주(*P. syringae* pv. *tabaci* (NCPBP 2504)와 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (NCPBP 4369)는 NCPBP(National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, York, UK)으로부터 취득하였다.)는 50ug/ml의 카나마이신이(kanamycin) 포함 된 King's B 배지 1ml을 첨가하여 30°C에서 2시간 동안 배양을 하고 동일한 방법으로 *E. coli* DH5α균주(*E. coli* DH5α(KCTC 2466)는 KCTC(Korean Collection for Type Cultures, Daejeon, Korea)으로부터 취득하였다) 또한 50ug/ml의 카나마이신이(kanamycin) 포함 된 LB 배지 1ml을 첨가하여 37°C에서 배양을 하였다.

[80] 식균작용 확인

[81] 마우스의 복강에서 얻어낸 복막 대식세포에 전기천공법 (electroporation)으로

GFP-발현 플라스미드가 도입된 *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *tomato*, 또는 *E. coli* DH5 α (multiplicity of infection; MOI, 20:1)로 감염시키기 위하여 복막 대식세포 배양 배지(10% FBS가 들어간 RPMI 배지)에 박테리아를 혼합한 후에 도 1의 A에 지시된 시간 동안 감염 시킨 후 인산완충식염수 (phosphate buffered saline)로 세척하고 긁어냈다. 좀 더 구체적으로 복막 대식세포를 1×10^6 세포 기준으로 12-well 배양 접시에 배양한 후에 GFP를 발현하는 *P. syringae* *tabaci*, *P. syringae* *tomato* 및 *E. coli* DH5 α 를 2.0×10^7 CFU수로 시간 별로 세포에 감염시켰다. 감염 후 배양 배지를 제거한 후에 차가운 인산완충생리식염수 (phosphate buffered saline, PBS)를 1ml 씩 세 번 세척하여 세포 주변에 남아 있는 박테리아를 제거하였다. 유세포측정 완충용액 (1% FBS가 포함된 인산완충생리식염수)을 400ul 첨가 후에 스크레이퍼(scraper)로 세포를 긁어냈다. 감염된 복막 대식세포에 4% 포르말알데하이드 (formaldehyde)로 고정하여 남아있는 박테리아는 유세포 분석기에 통해 복막 대식세포 안에서 GFP 형광을 나타내는 정도를 측정한 후에 분석하였다. 도 1의 A의 그래프는 유세포 분석결과를 정리한 그래프이고, *Pta*는 GFP-발현 *P. syringae* pv. *tabaci*, *Pto*는 *P. syringae* pv. *tomato* 및 *E. coli*는 *E. coli* DH5 α 의 표시한다. 도 1의 A의 결과를 통해, *Pto* DC3000에 의해 접종될 때 대식세포에 있어서 식균작용 수준이 극적으로 감소됨을 확인할 수 있었다.

[82] 도 1의 B 관련 실험

[83] 식물 병원균이 대식세포에 의한 식포 성숙 (phagosome maturation)에 영향을 미치는 지 여부를 평가하도록, 도 1의 A와 동일하게 준비된 GFP-발현 *P. syringae* pv. *tabaci*(*Pta*), *P. syringae* pv. *tomato*(*Pto*), 또는 *E. coli* DH5 α (*E. coli*)를 대식세포 배양 배지(10% FBS가 들어간 RPMI 배지)에 박테리아를 혼합한 후에 마우스 복강에서 분리한 대식세포에 처리하여 1시간 동안 전-감염(pre-infected)시킨 후, 인산완충식염수 (phosphate buffered saline)로 세척하여 감염되지 않은 박테리아를 제거하였다. 복막 대식세포 안에 감염되어 제거되는 박테리아를 확인하기 위하여, 4% 포르말알데하이드 (formaldehyde)로 고정하여 남아있는 박테리아의 GFP형광을 유세포 분석법을 이용하여 박테리아가 제거된 정도를 지시된 시간에 따라 측정하여 분석하였다. 데이터는 각 시점에 대한 세 개의 웰로부터 계산된 평균 $\pm$ 표준편차이다(*P. syringae* pv. *tabaci*에 비교한 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). 도 1의 B의 좌측 그래프는 유세포 분석결과를 정리한 그래프이고 우측은 유세포 분석결과를 보여주는 도이다. 도 1의 B의 결과를 통해, 마우스 복막 대식세포에서 *Pto*에 대한 식균작용 수준이 극적으로 감소되었음을 확인할 수 있었다.

[84] 도 1의 C 관련 실험

[85] 복막 대식세포에서의 식균작용 수준은 면역형광을 수행함으로써 결정되었다. 도 1의 A와 동일하게 준비된 GFP-발현 *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *tomato*, 또는 *E. coli* DH5 α -처리된 대식세포를 4% 포르말알데하이드

(formaldehyde)로 고정하였고, 세포막 투과성(permeability)을 가지는 핵 염색 시약인 DAPI를 처리하여 세포 핵을 염색한 후에, 공초점 레이저 현미경 (Carl Zeiss, LSM510)을 이용하여 복막 대식세포 안에서 GFP 형광을 나타내는 박테리아를 분석하였다. 구체적으로, 24-well 배양접시에 둥근 커버글라스를 집어 넣은 후에 세포를 2.0×10^5 세포 수로 배양한 후 GFP를 발현하는 *P. syringae tabaci*, *P. syringae tomato* 그리고 *E. coli DH5 α* 를 2.0×10^6 CFU 수로 시간 별로 감염시켰다. 감염 시킨 후 배양 배지를 제거한 후에 차가운 인산완충생리식염수 (phosphate buffered saline, PBS)를 1ml씩 세 번 세척하여 세포 주변에 남아 있는 박테리아를 제거하였다. 다음으로 4% 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde)가 포함된 PBS를 첨가하여 실온에서 20분 동안 고정을 시킨 후에 DAPI 염료를 5분 동안 첨가하여 핵을 염색 후에 차가운 인산완충생리식염수 (phosphate buffered saline, PBS)로 세 번 세척하여 남아있는 DAPI를 제거한 하여 면역 염색 샘플을 준비하였다. 준비된 면역염색 샘플은 공초점형광현미경인 LSM510 confocal microscope (Carl Zeiss)을 이용하여 형광 이미지를 분석하였다.

- [86] 도 1의 C의 이미지는 지시된 시간(1시간(h), 2시간, 4시간) 동안 각각의 박테리아 (녹색)로 감염된 마우스 복막 대식세포에 있어서의 대식작용 패턴을 보여준다. 도 1의 C에서 기준자는 $20\mu\text{m}$ 이다. 도 1의 C의 결과를 통해, 마우스 복막 대식세포에서 *Pto*에 대한 식균작용 수준이 극적으로 감소되었음을 확인할 수 있었다.

[87] 도 1의 D 관련 실험

- [88] 도 1의 A와 동일하게 준비된 C57BL/6 마우스로의 복강으로부터 분리한 복막 대식세포에 *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *tomato*, 또는 *E. coli* DH5 α 를 감염시키기 복막 대식세포에 50배에 해당하는 수의 박테리아를 대식세포 배지(10% FBS가 들어간 RPMI 배지)에 혼합하여 1시간 동안 처리를 해준다. 내재화된 박테리아 수준은 겐타마이신(gentamiin) 보호 어세이에 의해 측정되었다. 겐타마이신 (gentamiin) 보호 어세이는 복막 대식세포에 박테리아를 1시간 동안 감염(구체적으로 복막 대식세포를 1×10^6 세포 기준으로 12-well 배양 접시에 배양한 후에 박테리아를 5.0×10^7 CFU수로 한 시간 동안 세포에 감염)시킨 후에 주변에 감염되지 않은 박테리아를 세척을 한 후에 복막 대식세포 주변에 남아있는 박테리아를 완벽히 제거하기 위하여 겐타마이신(gentamiin)을 100ug/ml의 농도로 1시간 동안 처리한 후 2% 트리톤 엑스-100(Triton X-100)이 포함된 인산완충식염수 (phosphate buffered saline)로 복막 대식세포 안에 남아있는 박테리아를 용출하여 Agar 플레이트에 도말하여 30°C에서 박테리아를 24시간 동안 배양 후 박테리아의 복제수를 확인 하였다. 박테리아 복제는 집락형성단위(colony-forming unit; CFU)를 결정함으로써 측정되었다. 데이터는 각 시점에 대한 세 개의 웰로부터 계산된 평균 $\pm$ 표준편차이다(*P. syringae* pv. *tabaci*에 비교한 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 도 1의 D의 결과를 통해, 마우스 복막 대식세포에서 *Pto*에 대한 식균작용 수준이 극적으로 감소되었음을 확인할 수

있었다.

[89] 도 1의 E 관련 실험

[90] 본 발명자들은 식물병원균이 포유동물의 생체내에서의(in vivo) 감염에 대한 사망률 패턴에 영향을 미칠 것인지 여부를 결정하고자 실험을 수행하였다. 마우스(n=10) 복강내로 박테리아 수가 10^8 CFU/ml가 되도록 인산완충식염수(phosphate buffered saline)로 녹여 0.2ml을 마우스 복강내로 주입하여 *P. syringae* pv. tabaci, *P. syringae* pv. tomato, 또는 *E. coli* DH5 α 를 감염시켰다. 생존율은 매 2시간 평가되었다. 좀 더 구체적으로 10주에서 12주령의 C57BL/6 마우스에 *P. syringae* DC3000와 *P. syringae* DC3000 Δ HrpL를 복강으로 1.0×10^8 CFU로 감염시킨 뒤 박테리아에 의한 마우스의 치사율을 확인하기 위하여 *P. syringae* pv. tabaci, *P. syringae* pv. tomato, 또는 *E. coli* DH5 α 를 마우스 복강으로 1.0×10^8 CFU로 감염시킨 후에 매 2시간 마다 마우스의 죽는 정도를 체크하여 치사율을 결정하였다.

[91] 도 1의 E의 결과를 통해, *Pto* 감염에 의해 야기된 마우스의 생존에 대한 상당한 감소는 *Pto*로부터의 일부 발병력 인자(virulence factor)가 시험관내(in vitro) 식균작용 예방 뿐만 아니라 마우스의 생존을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것을 암시한다는 것을 확인하였다.

[92] 실시예 2. 숙주 인자가 운동성(motility)에 기여하는지 여부를 결정

[93] 숙주 인자가 운동성(motility)에 기여하는지 여부를 결정하도록, 본 발명자들은 *Pto*, *Pta* 또는 *E. coli*의 접종 후 대식세포의 사이토카인을 확인하기 위하여 감염된 대식세포의 배지를 수집하여 13,000rpm에서 원심분리하여 상층액을 수집한 후에 효소결합면역흡착검사(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)방법을 이용하였다. 세포 배양 배지와 마우스의 혈액 그리고 조직에서 사이토카인의 양을 측정하기 위하여 DuoSet antibody pairs (R&D Systems) 방법을 이용하여 TNF- α , IL-1 β 그리고 IL-6를 확인하였다. 우선 96웰 플레이트에 1차 capture 항체를 12시간 동안 실온에서 반응시킨 후에 비특이적결합을 방지하기 위해 1% BSA가 포함된 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응을 진행하였다. 0.1% 트윈20(Tween20)이 포함된 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)으로 세 번 세척 후에 측정하고자 하는 샘플을 실온에서 2시간 동안 반응 시켰다. 샘플 반응이 끝난 후 0.1% 트윈20(Tween20)이 포함된 PBS로 세 번 세척 후 2차 Detection 항체를 첨가하여 2시간 동안 실온에서 반응을 시킨 후 0.1% 트윈20(Tween20)이 포함된 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)으로 세 번 세척하였다. 2차 항체 반응까지 끝낸 후 Streptavidin-HRP 용액을 넣어 실온에서 20분 동안 반응 후 앞선 방법과 동일하게 세 번 세척 후에 TMB 기질 시약(BD Biosciences)을 첨가한 후에 microtiter plate reader (Emax; Molecular Devices) 장비에서 450nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 사이토카인의 양을 분석하였다. MAPK 신호 및 NF- κ B 활성의 실험은 감염된 대식 세포에 세포용해버퍼(RIPA lysis buffer)를

첨가하여 대식 세포내 단백질을 수확한 후에 단백질 흡입법(western blotting)을 이용하여 지시된 각각의 단백질의 항체(Rabbit IgG 항P65항체, Rabbit IgG 항pP65항체, Rabbit IgG 항JNK항체, Rabbit IgG 항pJNK항체, Rabbit IgG 항P38항체, Rabbit IgG 항pP38항체, Rabbit IgG 항ERK항체 그리고 Rabbit IgG 항pERK항체, Cell Signaling Technology에서 구매)를 붙여 확인을 하였다. 그리고 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 나타낸 바와 같이, 사이토카인의 농도, MAPK 신호 및 NF- κ B 활성화는 대식세포의 각각의 군에서 유사하였다. 도 2의 결과를 통해, 이러한 현상이 대식세포-매개된 식균작용을 억제하는 박테리아 스텔스 기전(stealth mechanism)으로 예상됨을 확인할 수 있었다.

[94] 실시예 3. *Pto*에 대한 대식세포의 식균작용을 감소시키거나 방해시키는 특정 에펙터의 역할 확인

[95] *Pto*는 식물세포로 발병력 에펙터(virulence effector)를 분비하는 타입 III 분비 시스템을 이용한다. *Pto*에 대한 대식세포의 식균작용을 감소시키거나 방해시키는 특정 에펙터의 역할을 시험하기 위하여, 본 발명자는 에펙터의 분비를 없애는 것을 야기하는 타입 III 분비 시스템의 시그마 인자를 결여하는 야생형 *Pto* DC3000의 $\Delta hrpL$ 돌연변이체와 비교한 야생형 *Pto* DC3000을 분석하였다.

[96] 도 3의 A 관련 실험

[97] 마우스 복강에서 얻어낸 복막 대식세포를 지시된 시간(30분, 1시간 및 2시간)동안 GFP-발현 *Pto* DC3000 또는 $\Delta hrpL$ (MOI, 20:1)를 대식세포 배지(10% FBS가 들어간 RPMI 배지)에 혼합하여 감염시키고, 인산완충식염수 (phosphate buffered saline)로 세척하고 긁어냈다. 복강 대식세포 안에 감염되어 제거되는 박테리아를 확인하기 위하여, 4% 포름알데하이드 (formaldehyde)로 고정하여 남아있는 박테리아의 GFP 형광을 도 1의 A와 같은 유세포 분석법을 이용하여 박테리아가 제거된 정도를 지시된 시간에 따라 측정하여 분석하였다. 세포는 고정되고 남아있는 박테리아를 유세포 분석에 의해 분석했다. 도 3의 A의 좌측 그래프는 유세포 분석결과를 정리한 그래프이고 우측은 유세포 분석결과를 보여주는 도이다. 데이터는 각 시점에 대한 세 개의 웰로부터 계산된 평균 $\pm$ 표준편차이다(**P<0.01). 도 3A의 결과를 통해, 식균작용 수준은 $\Delta hrpL$ 에 의해 감염된 마우스 복막 대식세포에서 식균작용 수준이 극적으로 증가함을 확인할 수 있었다.

[98] 도 3의 B 관련 실험

[99] 마우스로부터의 복막 대식세포에서의 식균작용 수준은 식물 박테리아가 처리된 복막 대식세포에 4% 포름알데하이드 (formaldehyde)로 고정하였고, 0.2% 트리톤 엑스-100 (Triton X-100)이 포함된 인산완충식염수 (phosphate buffered saline)으로 세포막 투과(permeabilization)을 유도한 후에 액틴(actin)에 특이적인 항체(붉은색 염료 Alexa Fluor 546(Alexa 546)로 컨주게이트된)를 염색한 후 세포핵을 염색하기 위하여 핵 염색 시약인 DAPI를 처리하여 세포 핵을 염색하여

공초점 레이저 현미경 (Carl Zeiss, LSM510)를 이용하여 복막 대식 세포에서 GFP 형광을 가지는 박테리아를 측정하고 분석하였다. 도 3의 B의 이미지는 1 및 2시간 동안 *Pto* DC3000 또는 $\Delta hrpL$ (녹색)으로 감염된 복막 대식세포에 있어서의 식균작용 억제를 보여준다. 도 3의 B에서 기준자는 $1\mu m$ 이다. 도 3B의 결과를 통해, 식균작용 수준은 $\Delta hrpL$ 에 의해 감염된 마우스 복막 대식세포에서 식균작용 수준이 극적으로 증가함을 확인할 수 있었다.

[100] 도 3의 C 관련 실험

[101] 마우스 복막 대식세포는 *Pto* DC3000 또는 $\Delta hrpL$ 로 감염되었다. 박테리아 복제는 도 1의 D의 겐타마이신(gentamycin) 보호 어세이와 동일한 방법을 이용하여 집락형성단위(CFU)를 결정함으로써 측정되었다. 데이터는 각 시점에 대한 세 개의 웰로부터 계산된 평균 $\pm$ 표준편차이다(** $P < 0.01$). 도 3C의 결과를 통해, 내재화된 박테리아의 숫자는 $\Delta hrpL$ 로 감염된 대식세포에서 훨씬 더 큼을 확인할 수 있었다.

[102] 도 3의 D 관련 실험

[103] *Pto* DC3000 또는 $\Delta hrpL$ (10^8 CFU의 살아있는 박테리아)는 인산완충식염수(phosphate buffered saline)로 녹여 0.2ml을 마우스 복강내로 주입하여 마우스(n=10)에 감염되었다. 생존율은 매 2시간 평가되었다. 도 3의 D의 결과를 통해, *Pto* DC3000 또는 $\Delta hrpL$ 돌연변이체에 의한 마우스의 사망률은 *Pto* DC3000 감염된 대다수의 마우스가 죽어 사망률이 매우 높은 반면, $\Delta hrpL$ 접종된 마우스의 약 절반이 생존하여 상대적으로 사망률이 낮은 것을 확인할 수 있었다.

[104] 도 4의 A 관련 실험

[105] 마우스 대식세포인 RAW264.7에 감염되는 박테리아를 확인하기 위하여, RAW264.7 세포에 지시된 시간별로 박테리아를 처리한 후, 4% 포르말데하이드(formaldehyde)로 고정하여 남아있는 박테리아의 GFP 형광을 1의 A와 같은 유세포 분석법을 이용하여 박테리아가 감염된 정도를 측정하여 분석하였다.

[106] 도 4의 A의 그래프는 유세포 분석 결과를 정리한 그래프로, 도 4의 A의 결과를 통해, 식균작용에 대하여 관찰된 결과가 감염 후 RAW264.7 세포에 있어서 식균작용 수준을 측정했을 때 *Pto* DC3000(*Pto*)에 비해 $\Delta hrpL$ 에서 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다.

[107] 도 4의 B 관련 실험

[108] 본 발명자들 대식세포의 식포 성숙 진행이 식물 병원균 *Pto*에 의해 조절되는지 여부를 분명히 밝히도록 *Pto* 및 *Pta*에 대하여 조기 엔도솜 마커(early endosome marker), Eea1, 플렉스트린(pleckstrin) 및 Rab 5 및 후기 엔도솜(late endosome), Rab7 및 Lamp1의 마커를 측정하기 위하여, 감염된 대식 세포에 세포용해버퍼(RIPA lysis buffer)를 첨가하여 대식 세포내 단백질을 수확한 후에 단백질 흡입법(western blotting)을 이용하여 지시된 각각의 단백질의 항체(Rabbit IgG 항Eea1 항체, Rabbit IgG 항Pleckstrin 항체, Rabbit IgG 항Rab5 항체, Rabbit IgG 항Rab7 항체, Rabbit IgG 항Lamp1 항체, 그리고 Rabbit IgG 항 β -액틴 항체, Cell

Signaling Technology에서 구매)를 붙여 확인을 하였다.

[109] 도 4의 B의 결과를 통해, 상기 언급된 마커들이 *Pto* 및 *Pta* 모두에서 유사한 수준으로 유지됨을 확인할 수 있었다.

[110] **도 5 관련 실험**

[111] 본 발명자들은 야생형 *Pto* DC3000 또는 $\Delta hrpL$ 중 어느 하나의 접종 후 대식세포의 사이토카인을 확인하기 위하여 감염된 대식세포의 배지를 수집하여 13,000rpm에서 원심분리하여 상층액을 수집한 후에 효소결합면역흡착검사(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)방법을 이용하였다. 세포 배양 배지와 마우스의 혈액 그리고 조직에서 사이토카인의 양을 측정하기 위하여 DuoSet antibody pairs (R&D Systems) 방법을 이용하여 TNF- α , IL-1 β 그리고 IL-6를 확인하였다. 우선 96웰 플레이트에 1차 capture 항체를 12시간 동안 실온에서 반응시킨 후에 비특이적결합을 방지하기 위해 1% BSA가 포함된 인산완충생리식염수 (phosphate buffered saline, PBS)를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응을 진행하였다. 0.1% 트윈20(Tween20)이 포함된 인산완충생리식염수 (phosphate buffered saline, PBS)으로 세 번 세척 후에 측정하고자 하는 샘플을 실온에서 2시간 동안 반응 시켰다. 샘플 반응이 끝난 후 0.1% 트윈20(Tween20)이 포함된 PBS로 세 번 세척 후 2차 Detection 항체를 첨가하여 2시간 동안 실온에서 반응을 시킨 후 0.1% 트윈20(Tween20)이 포함된 인산완충생리식염수 (phosphate buffered saline, PBS)으로 세 번 세척하였다. 2차 항체 반응까지 끝낸 후 Streptavidin-HRP 용액을 넣어 실온에서 20분 동안 반응 후 앞선 방법과 동일하게 세 번 세척 후에 TMB 기질 시약 (BD Biosciences)을 첨가한 후에 microtiter plate reader (Emax; Molecular Devices) 장비에서 450nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 사이토카인의 양을 분석하였다. MAPK 신호 및 NF- κ B 활성의 실험은 감염된 대식 세포에 세포용해버퍼 (RIPA lysis buffer)를 첨가하여 대식 세포내 단백질을 수확한 후에 단백질 흡입법(western blotting)을 이용하여 지시된 각각의 단백질의 항체(Rabbit IgG 항IkB α 항체, Rabbit IgG 항pIkB α 항체, Rabbit IgG 항pP65항체, Rabbit IgG 항pJNK항체, Rabbit IgG 항pP38항체 그리고 Rabbit IgG 항pERK항체, Cell Signaling Technology에서 구매)를 붙여 확인을 하였다. 그리고 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서 나타낸 바와 같이, 사이토카인의 농도, MAPK 신호 및 NF- κ B 활성은 야생형 *Pto* DC3000 또는 $\Delta hrpL$ 감염된 대식세포의 각각의 군에서 유사한 수준으로 증가했다. 도 5의 결과를 통해, 이러한 현상이 대식세포-매개된 식균작용을 억제하는 박테리아 스텔스 기전(stealth mechanism)으로 예상됨을 확인할 수 있었다. 이들 데이터는 대식세포에 대한 *Pto* DC3000의 감소된 식균작용은 타입 III 분비 시스템을 통한 특정 에펙터의 주입의 결과이다.

[112] **도 6 관련 실험**

[113] 본 발명자들은 에펙터를 찾기 위하여 DC3000로부터의 28 에펙터 중에서 개별적인 18 에펙터가 *Pto*에 대하여 그러나 타입 III 분비 시스템 기구의 유전자

클러스터를 발현하는 *Pseudomonas fluorescens*에를 도입하였고, 식균작용 억제를 평가했다(Alfano JR, Charkowski AO, Deng WL, Badel JL, Petnicki-Ocwieja T, et al. 2000. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:4856.61, Kvitko BH, Park DH, Velasquez AC, Wei CF, Russell AB, et al. 2009. Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. PLoS Pathog. 5:e1000388).

- [114] 도 6의 결과를 확인하기 위하여 겐타마이신 (gentamiin) 보호 어세이는 복막 대식세포에 박테리아를 1시간 동안 감염시킨 후에 주변에 감염되지 않은 박테리아를 세척을 한 후에 복막 대식세포 주변에 남아있는 박테리아를 완벽히 제거하기 위하여 겐타마이신을 100ug/ml의 농도로 1시간 동안 처리한 후 2% 트리톤 엑스-100(Triton X-100)이 포함된 인산완충식염수 (phosphate buffered saline)로 복막 대식세포 안에 남아있는 박테리아를 용출하여 박테리아의 복제수를 확인 하였다.
- [115] 도 6의 결과를 통해, 대식세포에서의 식균작용 억제를 입증하기 위한 겐타마이신 보호 어세이는 HopQ1-발현 *P.fluorescens*만 야생형 수준과 유사한 낮은 식균작용 수준을 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [116] 실시예 4. HopQ1과 LIMK1과의 상호작용에 의한 식균작용 억제 확인
- [117] HopQ1이 어떻게 식균작용을 제한하는지 이해하기 위하여, 플래그-태그된 HopQ1를 293T 세포주에 도입시켜 포유류 세포에 있어서의 결합 파트너 단백질을 찾았다.
- [118] 도 7의 A 관련 실험
- [119] 클로닝 (Cloning)과 형질주입 (Transfection)
- [120] HopQ1 gene을 Flag표지 단백질 발현 vector인 pBICEP vector에 클로닝 하기 위하여 다음과 같이 프라이머를 준비하였다. HopQ1 (full) 정방향 5'-GACAAGCTTGC GGCCCATCGTCCTATCACCGCA-3' (서열번호 5) (NotI) 및 역방향 5'-ATGCCACCCGGGATCTCAATCTGGGGCTACCGT-3' (서열번호 6) (BamHI). 다음으로 PCR(Denaturation 98°C 10초, Annealing 55°C에서 15초, extension 72°C에서 30초, 총 25 cycle 조건으로 실행)을 이용하여 HopQ1을 증폭시킨 후에 agarose 겔에 로딩하여 사이즈를 확인 후 겔에서 정제한 후에 DNA정량법으로 100ng/ul의 농도로 맞추어주었다. 다음으로 pBICEP vector 1μg을 제한효소인 NotI과 BamHI을 이용하여 vector를 절단한 후에 agarose 겔에 로딩하여 사이즈를 확인하여 겔에서 정제한 후에 DNA 정량법으로 정량하여 50ng에 맞춘다. 위와 같이 준비된 HopQ 100ng와 절단된 pBICEP vector를 INFUSION HD enzyme(Clontech Laboratories)으로 ligation을 수행하여 Flag표지 HopQ1 발현 시스템을 준비하였다. 동일한 방법으로 mCherry 형광을 발현시키는

vector인 pLVX-mCherry-N1 vector를 이용하여 mCherry표지 HopQ1을 준비하였다. mCherry vector에 클로닝시 제한 효소는 XhoI과 BamHI을 이용하여 절단된 vector를 준비하고 HopQ1의 PCR을 위한 프라이머는 다음과 같이 준비하였다. mCherry-HopQ1

정방향 5'-GGACTCAGATCTCGAGATGCATCGTCCTATCACC-3' (서열번호 7) (XhoI) 및 역방향 5'-CATGACCGGTGGATCATCTGGGGCTACCGTCGA-3' (서열번호 8) (BamHI). 마우스 기원 Limk1 유전자를 GST 표지 단백질 발현 벡터인 pEBG에 클로닝하기 위하여 각 도메인 별로 다음과 같이 프라이머를 준비하였다. 마우스 LIMK1 (full), 정방향

5'-GCGTGGATCCACTAGTATGAGGTTGACGCTACTTT-3' (서열번호 9) (SpeI) 및 역방향 5'-TCTAGAGTCGCGGCCTCAGTCAGGGACCTCGGG-3' (서열번호 10) (NotI); 마우스 LIMK1 (Δ Lim1),

정방향 5'-GCGTGGATCCACTAGTGGCGAGTCTTGCCACGG-3' (서열번호 11) (SpeI) 및 역방향 5'-TCTAGAGTCGCGGCCTCAGTCAGGGACCTCGGG-3' (서열번호 12) (NotI); 마우스 LIMK1 (Δ Lim2) 정방향

5'-GCGTGGATCCACTAGTGAACAGATCCTACCTGAC-3' (서열번호 13) (SpeI) 및 역방향 5'-TCTAGAGTCGCGGCCTCAGTCAGGGACCTCGGG-3' (서열번호 14) (NotI); 마우스 LIMK1 (Δ Kinase) 정방향

5'-GCGTGGATCCACTAGTATGAGGTTGACGCTACTTT-3' (서열번호 15) (SpeI) 및 역방향 5'-TCTAGAGTCGCGGCCCGCCAGCACTTCCCCATG-3' (서열번호 16) (NotI) ; 마우스 LIMK1 (Lim1,2) 정방향

5'-GCGTGGATCCACTAGTATGAGGTTGACGCTACTTT-3' (서열번호 17) (SpeI) 및 역방향 5'-TCTAGAGTCGCGGCCGATGACTGGAGTTACCACG-3' (서열번호 18) (NotI); 마우스 LIMK1 (Lim1) 정방향

5'-GCGTGGATCCACTAGTATGAGGTTGACGCTACTTT-3' (서열번호 19) (SpeI) 및 역방향 5'-TCTAGAGTCGCGGCCGCAAGACTCGCCATAGCG-3' (서열번호 20) (NotI). HopQ1과 동일한 방법을 이용하여 Limk1을 100ng를 준비하고 pEBG 벡터 또한 pBCIEP 벡터와 동일한 방법으로 50ng를 준비한 후에 INFUSION HD

enzyme(Clontech Laboratories) 으로 ligation을 수행하여 GST 표지 Limk1 발현 시스템을 준비하였다. 준비된 발현 vector들을 형질 주입하기 위하여 293T 세포주를 1×10^6 세포 기준으로 6-well 배양접시(10% FBS가 포함된 DMEM 배지)에 배양한 후에 항생제가 첨가 되지 않은 10% FBS가 포함된 DMEM 배지 2ml을 배양접시에 공급하였다. 준비된 벡터는 1ug을 TransIT-X2Dynamic Delivery System (Mirus)시약과 1:3 비율로 250ul의 opti-MEM 배지에 혼합하여 30분 정도 실온 (24°C)에서 반응 시킨 후에 준비된 293T 세포주에 첨가하여 24시간 후에 발현 양을 확인하여 실험에 이용하였다.

- [121] 293 세포에 대조군 항-DYKDDDDK {플래그(Flag)}만 발현하는 pBICEP 벡터 또는 항-DYKDDDDK {플래그(Flag)} 태그된 HopQ1 유전자를 함유하는

pBICEP로 형질감염되었다. 형질 감염 후 24 시간 후에, 세포를 세포용해버퍼(RIPA lysis buffer)로 단백질을 용출하였고 동일한 양의 단백질을 회전 장치 상에서 4°C에서 2시간 동안 항-DYKDDDDK {플래그(Flag)} 태그된 자성 비드와 함께 배양 후 자성을 가지는 컬럼을 이용하여 항-DYKDDDDK {플래그(Flag)}에 결합된 단백질들 복합체를 분리한 후에 결합된 단백질을 내인성 Limk1, Cdc42, Wasp, Rac1, Pak1, 칼시뉴린(Calcineurin) 및 코필린(Cofilin)과 HopQ1의 연합이 항-플래그 면역침전 이어서 각각의 단백질 흡입법(western blotting)을 이용하여 각각에 대한 항체로 검출하여 나타내졌다. 구체적으로 면역침강법을 위해 Flag 표지 HopQ1이 형질주입 (Transfection)된 293T 세포주를 프로테아제 억제제(proteinase inhibitor)가 포함된 세포 용해 버퍼(RIPA lysis buffer)로 세포를 용해시킨 후에 BCA법을 이용하여 단백질 정량을 한 후에 동일한 단백질 샘플에 안티-DYKDDDDK(Flag) 표지 마그네틱 비드를 첨가하여 4°C에서 2시간 동안 선회장치(rotating apparatus)에서 반응 시킨 후에 자성 컬럼을 이용하여 마그네틱 비드에 결합되지 않은 단백질을 제거하기 위하여 차가운 세포용해버퍼(RIPA lysis buffer)로 3번 세척한다. 세포용해버퍼(RIPA lysis buffer)를 제거한 후에 2배의 Laemmli 샘플 버퍼로 비드에 결합된 단백질 샘플을 얻어 낸 후에 단백질 흡입법을 통하여 Flag 표지 HopQ1과 결합된 단백질을 확인하기 위하여, Rabbit IgG 항 Limk1 항체, Rabbit IgG 항 Wasp 항체, Rabbit IgG 항 Calcineurin 항체, Rabbit IgG 항 pCofilin1 항체, Rabbit IgG 항 Cofilin1 항체, Rabbit IgG 항 Pak1 항체, Rabbit IgG 항 Cdc42 항체, Rabbit IgG 항 Rac1 항체 (상기 항체들은 Cell Signaling Technology에서 구매)를 이용하여 분석하였다.

[122] 도 7의 A의 결과를 통해, 식물 HopQ1은 포유류 LIMK1과 상호작용함을 확인할 수 있었다.

[123] 도 7의 B 관련 실험

[124] LIM 도메인 키나아제 1(LIMK1)은 다양한 키나아제에 의해 인산화되고, 그리고 나서 활성화되는 세린/트레오닌 키나아제이다. 인산화된 LIMK1은 액틴의 중합 및 해중합을 조절하는 코필린1(cofilin1)의 인산화 및 불활성화를 유도한다(Bravo-Cordero JJ, Magalhaes MA, Eddy RJ, Hodgson L, Condeelis J (2013), Functions of cofilin in cell locomotion and invasion, Nat Rev Mol Cell Biol. 14(7):405-15). 이들 사건은 세포내로의 입자의 흡입을 예방하고, 이는 식세포 컵 폐쇄(phagocytic cup closure)의 억제를 야기한다(HBierne, Edith Gouin, Pascal Roux, Pico Caroni, Helen L. Yin, and Pascale Cossart(2001), A role for cofilin and LIM kinase in Listeria-induced phagocytosis, J. Cell Biol. 155:101-112).

[125] 293 세포에 대조군 항-DYKDDDDK {플래그(Flag)}만 발현하는 pBICEP 벡터 또는 항-DYKDDDDK {플래그(Flag)} 태그된 HopQ1 유전자를 함유하는 pBICEP로 형질감염되었다. 형질 감염 후 24 시간 후에, 세포를 세포용해버퍼(RIPA lysis buffer)로 단백질을 수확하였고 동일한 양의 단백질을 HopQ1 발현에 의한 pLimk1, Limk1, pCofilin1, Cofilin1, Ssh1, 크로노핀(chronophin) 및 β -액틴의

수준은 도 7의 A와 같이 단백질 흡입법(western blotting)을 이용하여 각각에 대한 항체로 검출하여 결정되었다. 이때 사용한 항체 정보는 다음과 같다(Rabbit IgG 항 pLimk1 항체, Rabbit IgG 항 Limk1 항체, Rabbit IgG 항 pCofilin1 항체, Rabbit IgG 항 Cofilin1 항체, Rabbit IgG 항 Ssh1 항체, Rabbit IgG 항 크로노핀(chronophin)항체 및 Rabbit IgG 항 β -액틴 항체, Cell signaling에서 구매).

[126] HopQ1에 대한 웨스턴 블롯 분석은 항-플래그 항체를 이용하여 수행되었다.

[127] 도 7의 B의 결과를 통해, 293T 세포에서의 코필린1(cofilin1) 및 LIMK1의 인산화 및 발현을 분석하여 HopQ1은 Limk1에 결합하고 그리고나서 Limk1 및 코필린1(cofilin1) 모두의 인산화를 활성화시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[128] 도 7의 C 관련 실험

[129] LIMK1은 두 개의 LIM 도메인, PDZ 도메인, 및 키나아제 도메인으로 이루어진다. 어떻게 HopQ1이 LIMK1과 상호작용하는지 밝히기 위해, 본 발명자들은 LIMK1의 도메인 결실 돌연변이체를 생성하였다. HopQ1 (플래그 발현 pBICEP)- 및 Limk1 (GST 발현 pEBG)-인코딩 벡터가 293T에 공동 형질감염되었다. 단백질 복합체를 GST 풀-다운 어세이(GST pull-down assay)를 이용하여 확인하기 위하여 294T 세포를 세포용해버퍼 (RIPA lysis buffer)로 단백질을 수확한 후에 BCA법을 이용하여 단백질 정량을 한 후에 동일한 양의 단백질에 glutathione-agarose beads를 동일한 양을 첨가하여 회전 장치 상에서 4°C에서 2시간 동안 배양한 후에 glutathione-agarose beads 침전시킨 후 상층액을 제거한 후 세포용해버퍼(RIPA lysis buffer)를 첨가 한 후 다시 glutathione-agarose beads 침전 시켜 상층액을 제거하여 GST에 결합하지 않는 단백질을 충분히 제거한 후에 침전된 glutathione-agarose beads를 수확하여 HopQ1 및 Limk1 구축물에 대한 단백질 흡입법(western blotting) 분석이 항-플래그, 항-GST 항체, β -액틴 항체, Cell Signaling Technology(Rabbit IgG 항 플래그 항체 그리고 Rabbit IgG 항-GST 항체, Rabbit IgG 항 β -액틴 항체는 각각 Sigma-Aldrich 와 Santa Cruz Biotechnology 및 Cell Signaling Technology에서 구매)를 이용하여 수행되었다.

[130] 도 7의 C의 결과를 통해, HopQ1은 LIMK1의 N-말단 LIM1 도메인을 통해 LIMK1과 상호작용함을 확인할 수 있었다.

[131] 도 7의 D 관련 실험

[132] 3T3-L1 세포는 GST-Limk1(녹색) 또는 세포내에서 내인성으로 붉은 형광을 나타내는 mCherry-HopQ1(붉은색) 중 어느 하나로 형질감염되었고 4% 포름알데하이드 (formaldehyde)로 고정한 후, 0.2% 트리톤 엑스-100 (Triton X-100)이 포함된 인산완충식염수 (phosphate buffered saline)으로 세포막 투과(permeabilization)을 유도한 후에 GST를 검출하는 항-GST 항체를 12시간 동안 배양 후에 항-GST 항체를 특이적으로 인식하는 2차 항체(녹색 염료 Alexa Fluor 488(Alexa 488)로 컨주게이트된)로 1시간 동안 배양(10% FCS (fetal calf serum)이 포함된 DMEM 배지)하여 LIMK1(녹색)이 염색되었다. 세포핵을 염색하기 위하여 핵 염색 시약인 DAPI를 처리하여 세포 핵을 염색한 후 공초점

레이저 현미경 (Carl Zeiss, LSM510)를 이용하여 복막 대식 세포안에서 GFP(녹색) 형광과 mCherry (붉은색) 형광을 가지는 단백질을 측정하고 분석하였다. 도 7의 D의 왼쪽 이미지는 3T3-L1 세포에 있어서 LIMK1 및 HopQ1 모두의 공동-국소화를 보여준다. 도 7의 D에서 기준자는 10 μ m이다. HopQ1 발현은 세포에 있어서의 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정되었다. 도 7의 D 오른쪽 도는 HopQ1-형질감염된 3T3-L1 세포에 있어서의 HopQ1 수준을 보여준다.

[133] 도 7의 E 관련 실험

[134] 본 발명자들은 이 에펙터가 식균작용-관련된 신호를 변화시키는지 여부를 결정하기 위해 HopQ1-발현 *P.fluorescens*에 의한 복막 대식세포의 감염 동안의 LIMK1 및 cofilin1의 인산화를 평가하였다. 복막 대식세포는 도 1의 A와 동일한 방법으로 *P. fluorescens* 및 HopQ1 발현된 *P. fluorescens*는 지시된 시간에 마우스 대식세포에 감염되었다. 박테리아를 감염 시킨 후에 지시된 시간별로 세포용해버퍼 (RIPA lysis buffer)를 첨가하여 세포내 단백질을 수확한 후에, Limk1, pLimk1, p코필린1(pCofilin1) 및 코필린1(Cofilin1), 크로노핀(chronophin), Ssh1, 및 β -액틴의 수준은 도 7의 A와 같이 단백질 흡입법(western blotting)을 이용하여 각각에 대한 항체로 검출하여 결정되었다. 이때 사용한 항체 정보는 다음과 같다(Rabbit IgG 항 pLimk1 항체, Rabbit IgG 항 Limk1항체, Rabbit IgG 항 p코필린1(pCofilin1)항체 그리고 Rabbit IgG 항 코필린1(Cofilin1)항체, Cell signaling에서 구매).

[135] 도 7의 E의 결과를 통해, Limk1 및 cofilin1의 인산화 수준은 벡터 대조군에 비해 HopQ1-발현 *P.fluorescens*로 감염된 마우스 복막 대식세포에서 증가하였음을 확인할 수 있었다. 그러므로, 도 7의 E의 결과를 통해, HopQ1은 LIMK1 및 코필린1(Cofilin1)의 상승된 인산화에 의한 식균작용 경로를 억제하는데 기여할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[136] 도 8의 A 관련 실험

[137] 포유류에서 박테리아 감염에 의해 유도되는 심각한 질환 중 하나인 균혈증(Bacteremia)은 혈청 또는 조직에 남아 패혈증 및 패혈증 쇼크를 유도한다. 생체 내에서(*in vivo*), HopQ1에 의한 식균작용의 조절을 확인하기 위하여, 마우스는 *Pto* DC3000 또는 $\Delta hrpL$ 로 주입되었다. *Pto* DC3000 또는 *Pto* $\Delta hrpL$ (10^8 CFU의 살아있는 박테리아) 10-12주령의 C57BL/6 마우스에 인산완충식염수 (phosphate buffered saline)로 녹여 0.2ml을 마우스 복강내로 주입되었다. 24시간 후, 마우스의 간, 비장을 적출하여 무게를 측정한 후에 70 μ m의 스트레이너를 King's Media 넣고 갈아 조직을 파쇄 후 총 볼륨을 10ml로 맞추고 후에 Agar 플레이트에 도말 후 30°C에서 배양하여 박테리아의 콜로니 수를 확인하였다. 혈액의 경우 King's media에 10배 희석하여 Agar 플레이트에 도말 후 30°C에서 배양하여 박테리아의 콜로니 수를 확인 하였다. 박테리아 복제는 집락형성단위(CFU)를 결정함으로써 측정되었다. 데이터는 각 시점에 대한 세 개의 웰로부터 계산된 평균 $\pm$ 표준편차이다(**P<0.01, ***P<0.001). 도 8의 A의

결과를 통해, $\Delta hrpL$ -접종된 마우스로부터의 복막강, 혈액, 비장 및 간이 DC3000-접종된 마우스에 비해 극적으로 더 많은 박테리아의 수를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[138] **도 8의 B 및 도 9 관련 실험**

[139] 액틴 세포골격의 리모델을 위한 식세포 컵 형성은 실시간영상분석 현미경(time-lapse microscope)에 의해 분석되었다. *Pto* DC3000 또는 $\Delta hrpL$ 돌연변이체가 RAW 264.7 세포에 처리되었고, 그리고 나서 매 15초마다 이미지를 캡처함으로써 30분의 기간에 걸쳐 모니터링되었다. 구체적으로, RAW 264.7 세포주를 35mm리 유배양접시 (μ -dish)에 1×10^5 세포 수로 24시간 동안 10% FBS가 포함된 RPMI 배지로 배양한 후에 배양접시를 형광현미경 fluorescence microscope (Olympus, IX81-ZDC)이 설치된 실시간 세포 배양 챔버에 옮긴 후에 *P.syringae* DC3000와 *P.syringae* DC3000 $\Delta HrpL$ 를 2×10^6 콜로니 수로 RAW 264.7 세포주에 감염시킨 후에 식세포 컵이 형성 되는 것을 15초 간격으로 30분 동안 실시간 이미지를 촬영한 후에 Metamorph 7.1 프로그램으로 이미지 데이터를 분석하였다. 세 개의 독립적인 실험으로부터의 형성 숫자 및 빈도의 정량 데이터는 그래프로 나타내졌다. * $P < 0.05$. 현미경 이미지는 도 9에 나타냈다. 도 8의 B 및 도 9의 결과를 통해, RAW 264.7 세포 내로 $\Delta hrpL$ 처리는 식세포 컵 형성 숫자 및 빈도를 유의하게 증가시킴을 확인할 수 있었다.

[140] **도 8의 C, 도 10 및 도 11 관련 실험**

[141] 식균작용의 억제에 대한 HopQ1의 기능을 알아내도록, 본 발명자들은 많은 인간의 정상 장내 세균총(normal gut flora)의 일원이고 타입 III 분비 시스템을 함유하는 *Enterobacter cloacae*를 사용하였다(Kvitko BH, Park DH, Velasquez AC, Wei CF, Russell AB, et al. 2009. Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. PLoS Pathog. 5:e1000388).

[142] 도 1의 b와 동일한 방법으로 마우스 복막 대식세포는 GFP-발현 *E.cloacae* (pDSK-GFPuv 벡터와 동일한 벡터에 HopQ를 클로닝 후 각 벡터를 형질전환 시켜 녹색 형광을 발현하는 균주, *E.cloacae* (KCTC 2361)는 KCTC(Korean Collection for Type Cultures, Daejeon, Korea)으로부터 수득하였다) 또는 DsRed 및 HopQ-발현 *E.cloacae* (pBBRBB-DsRED 벡터와 동일한 벡터에 HopQ를 클로닝 후 각 벡터를 형질전환 시켜 적색 형광을 발현하는 균주)로 1시간동안 감염되었고 그리고 나서 인산완충식염수 (phosphate buffered saline)로 세척하고 긁어내고, 4% 포르말데하이드 (formaldehyde)로 고정하여 남아있는 박테리아의 GFP형광을 측정하여 박테리아가 제거된 정도를 확인하기 위하여 1의 A와 같은 유세포 분석법이 사용되었다. 유세포 분석이 제거된 박테리아의 확인을 위해 사용되었다. 현미경 이미지는 도 11에 나타내졌다. 도 8의 C, 도 10 및 도 11의 결과를 통해, 플라스미드 상의 HopQ1은 *E. cloacae* 내에 도입되어 감염동안 RAW 264.7 및 복막 대식세포의 식균작용이 성공적으로 예방할 수 있음을

확인할 수 있었다.

[143] 도 8의 D 관련 실험

[144] 추가적으로, 생체내에서(in vivo) HopQ1에 의한 식균작용의 조절을 확인하기 위하여, 10^8 CFU/ml로 HopQ1를 함유하는 플라스미드를 가지거나 가지지 않는 *E. cloacae*가 10-12주령의 마우스에 인산완충식염수 (phosphate buffered saline)로 녹여 0.2ml을 마우스 복강내로 주입되었다. 24시간 후, 혈액, 비장 및 간 시료를 수확한 후에 균질화하여 한천 플레이트 상에 플레이트되었고 그리고나서 24시간동안 배양되었다. 24시간 후, 마우스의 간, 비장을 적출하여 무게를 측정한 후에 70um의 스트레이너를 King's Media 넣고 갈아 조직을 파쇄 후 총 볼륨을 10ml로 맞추는 후에 Agar 플레이트에 도말 후 30°C에서 배양하여 박테리아의 콜로니 수를 확인하였다. 박테리아 복제는 집락형성단위(CFU)를 결정함으로써 측정되었다. 데이터는 각 시점에 대한 세 개의 웰로부터 계산된 평균±표준편차이다(**P<0.01). 도 8의 D의 결과를 통해, HopQ1-발현 *E. cloacae* 주입된 마우스로부터의 혈액, 비장 및 간은 대조군 *E. cloacae* 주입된 마우스에 비해 극적으로 더 높은 CFU를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[145] 실시예 5. *P. syringae* pv. *tomato*의 대식세포에 의한 phagocytosis 억제 확인

[146] 도 12 관련 실험

[147] *P. syringae* pv. *tabaci*와 *E. coli*의 경우에 대식세포에 의한 phagocytosis가 원활하게 이루어지지만, *P. syringae* pv. *tomato*는 대식세포에 의한 phagocytosis가 억제를 받음을 confocal image를 이용해서 확인하였다. 대식세포에 의한 각 균주의 식균작용을 테스트하기 위해서, 형광이 발현되는 각각의 박테리아를 대식세포에 infection 시킨후 타겟 분자와 박테리아의 양상을 confocal 이미지로 검사하였다. early phagosome maturation에 관여하는 EEA1과 형광을 나타내는 박테리아의 location(도 12의 A)과 lysosome의 마커를 이용해서 박테리아의 위치(도 12의 B)를 confocal image를 이용해서 확인하였다.

[148] 도 12의 A에서 확인되는 바와 같이, 대식세포에 의한 정상적인 phagocytosis의 발생시 early phagosome maturation에 관여하는 EEA1과 박테리아의 co-localization을 확인할 수 있으나, *P. syringae* pv. *tomato*의 경우는 이러한 현상이 나타나지 않음이 확인되었다. 도 12의 B의 결과는 phagocytosis의 마지막 단계인 라이소좀과의 원활한 결합에 의한 박테리아의 degradation을 보여주는 그림인데, *P. syringae* pv. *tomato*의 경우는 초기 phagocytosis의 억제에 의한 영향으로 극소량의 박테리아만 대식세포내로 들어오는 것을 보여주었다.

[149] 즉, 도 12의 A 및 B에서 확인되는 바와 같이, *P. syringae* pv. *tabaci*와 *E. coli*는 흰색 화살표로 나타냈듯이 co-localization(노란색으로 표기된 부분)되지만, *P. syringae* pv. *tomato*는 박테리아의 수 자체(또는 초록색)가 감소되는 것이 확인되었다.

[150] 또한, z stack images (x-z plane)를 확인한 결과를 도 12의 C에 나타내었다. 도 12의 C에서 확인되는 바와 같이, *P. syringae* pv. *tabaci*는 대식세포의 내부에

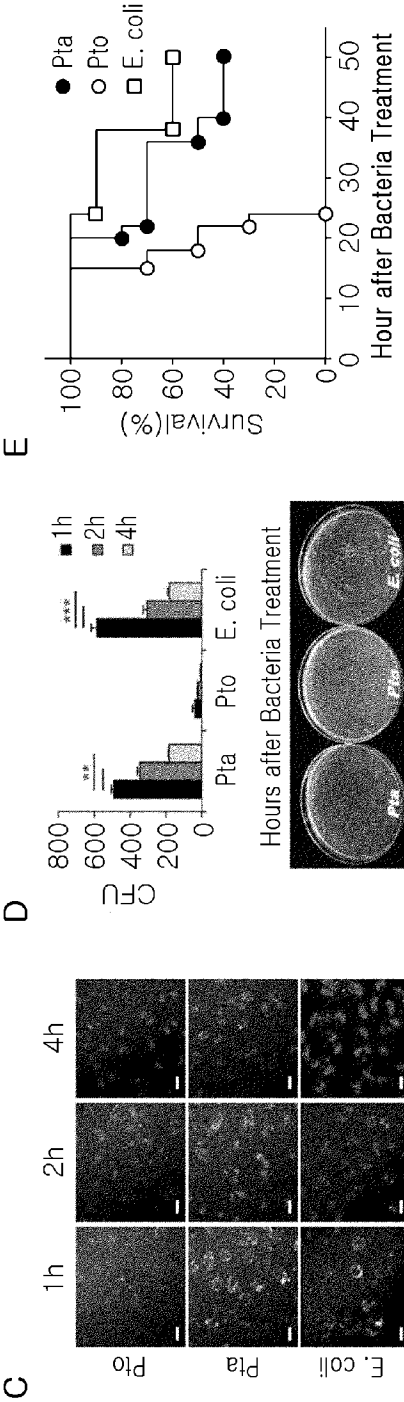
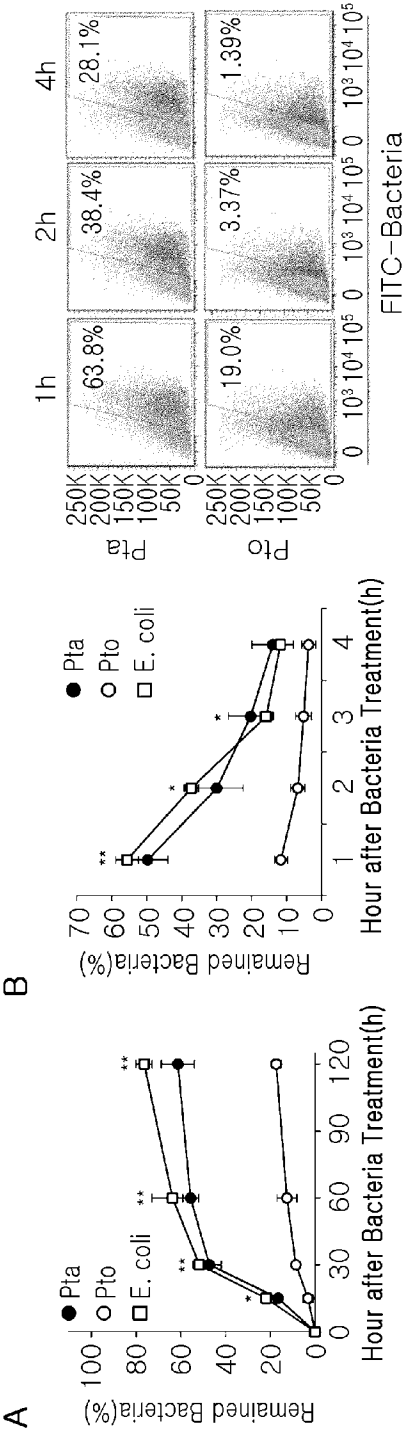
존재하지만, *P. syringae* pv. *tomato*는 대식세포의 표면에 단순히 붙어 있는 것을 확인함으로써, *P. syringae* pv. *tomato*는 대식세포의 phagocytosis가 원활하게 이루어지지 못하도록 억제하는 기능을 갖고 있는 것이 확인되었다.

- [151] 상기 실시예들의 실험결과들은 고려하면, 본 발명자들은 식물 병원균 박테리아 Pto로부터의 HopQ1 에펙터는 LIMK1과 특이적으로 상호작용하고 비활성형인 과도하게 인산화된 코필린1(cofilin1)을 야기하는 인산화된 LIMK1을 생산하는 키나아제로서 사용함에 의해 포유류 방어 시스템에서의 식균작용을 억제한다는 것을 최초로 입증하였다. HopQ1에 의한 Limk1의 인산화는 코필린(cofilin)의 인산화를 유지하고, 액틴 필라멘트의 조립 및 분해를 조절하고, 과도한 인산화에 의한 코필린의 억제는 돌출(protrusion), 세포 극성(cell polarity) 및 화학주성(chemotaxis)에 있어서의 결함을 야기한다(Bravo-Cordero JJ, Magalhaes MA, Eddy RJ, Hodgson L, Condeelis J (2013), Functions of cofilin in cell locomotion and invasion, Nat Rev Mol Cell Biol. 14(7):405-15). 결론적으로, 본 발명자들은 *Pseudomonas syringae*의 HopQ1 에펙터가 세포 이동에 연루된 LIMK1를 직접적으로 표적화함으로써 코필린의 인산화를 통해 숙주 식균작용을 제한하는 특별한 역할을 규명하였다.

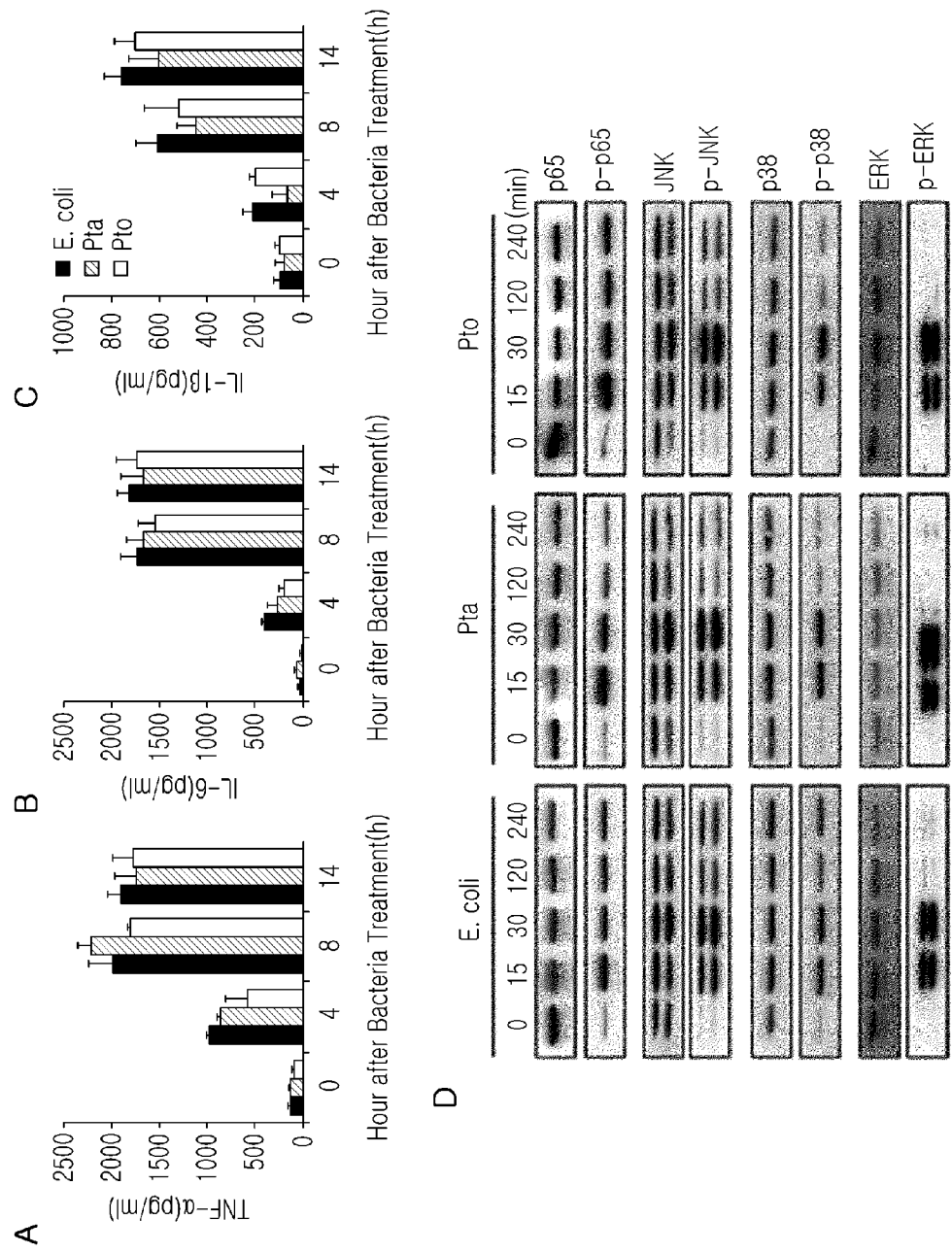
청구범위

- [청구항 1] (a) 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1과 그의 결합파트너로서의 LIM 도메인 키나아제 1(LIMK1)에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및
(b) 상기 시험물질이 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1과 그의 결합파트너로서의 LIMK1의 상호작용을 억제하는 지 여부를 분석하는 단계;
(c) 상기 시험물질이 상기 상호작용을 억제하면 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1에 의한 면역 억제에 대한 저해제 후보로 선별하는 단계를 포함하는 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1에 의한 면역 억제에 대한 억제제 스크리닝 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1은 서열번호 1의 펩티드 서열로 표시되는 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 LIMK1은 서열번호 3의 펩티드 서열로 표시되는 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 단계 (b)는 투-하이브리드 방법, 공동면역침강 방법(co-immunoprecipitation assay), 공동-국소화 분석(co-localization assay), 섬광 근접 측정법(scintillation proximity assay; SPA), UV 또는 화학적 가교 결합 방법, 이분자 상호작용 분석(bimolecular interaction analysis; BIA), 질량 분석법(mass spectrometry; MS), NMR(nuclear magnetic resonance) 또는 형광 편광 분석법(fluorescence polarization assays; FPA)에 의해 수행되는 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1과 LIMK1과의 상호작용은 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1과 LIMK1의 N-말단 LIM1 도메인을 통한 상호작용인 것인 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 면역 억제는 분리된 포유동물의 대식세포에서의 식균작용을 억제하는 것인 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 면역 억제는 인간을 제외한 포유동물의 대식세포에서의 식균작용을 억제하는 것인 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1에 의한 면역 억제에 대한 억제제는 세포내 독소 유발 쇼크 조절용 물질인 것인 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 세포내 독소 유발은 패혈증에 의한 것인 방법.
- [청구항 10] 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1; 및 그의 결합파트너로서의 LIM 도메인 키나아제 1(LIMK1)을 포함하는 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1에 의한 면역 억제에 대한 억제제 스크리닝용 조성물.
- [청구항 11] 타입 III 에펙터 단백질인 HopQ1을 포함하는 대식세포의 식균 작용 억제용 조성물.

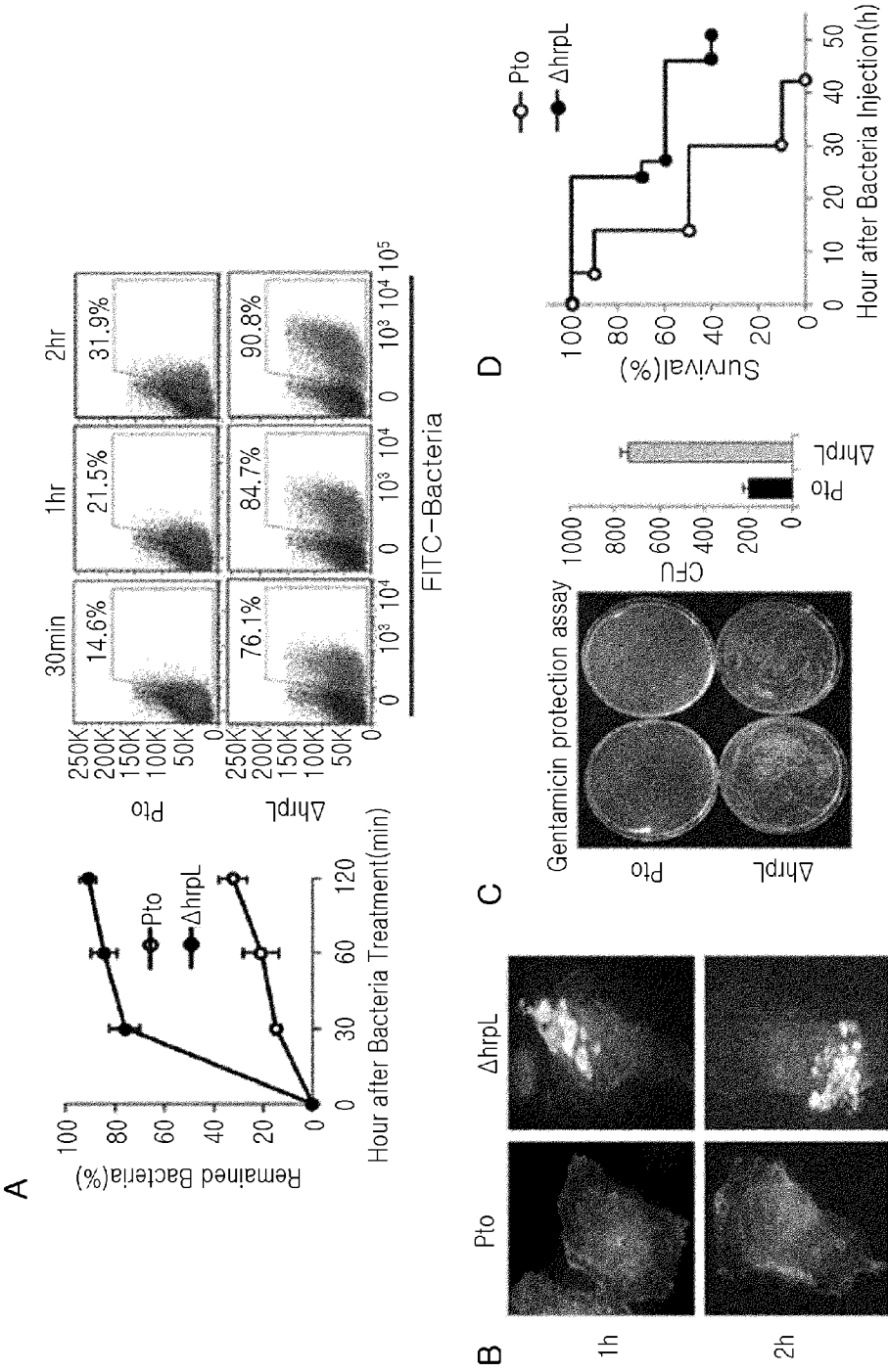
[도1]



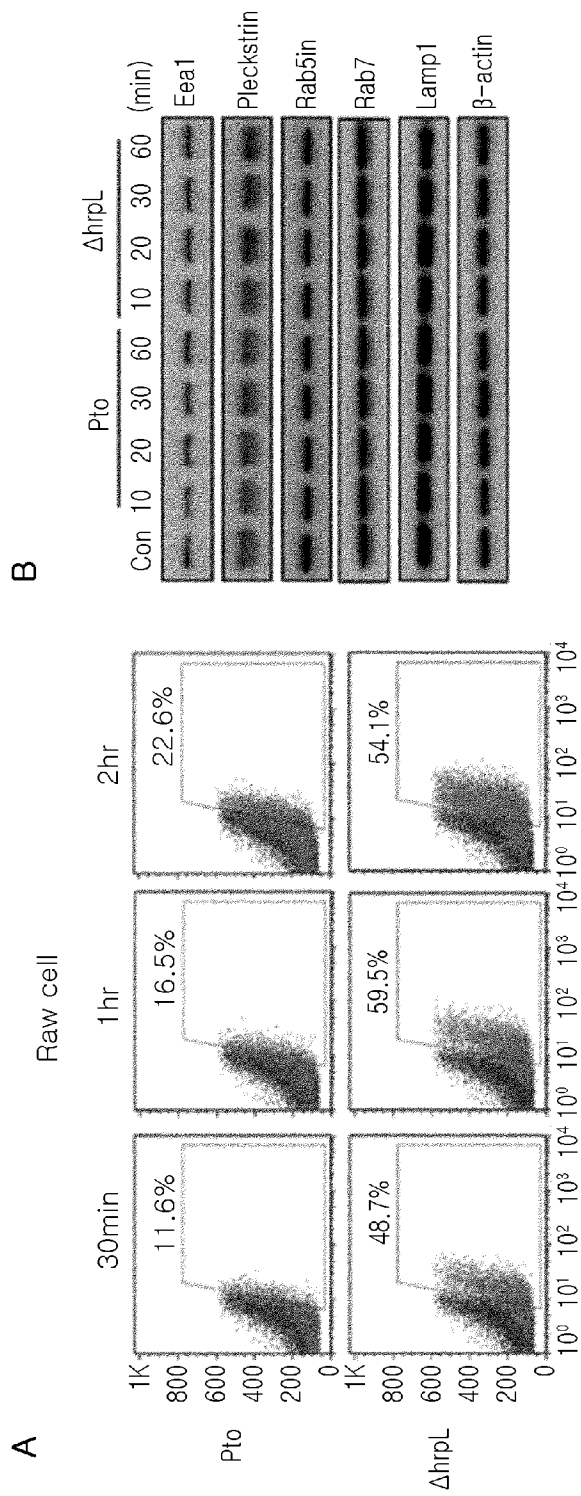
[도2]



[도3]

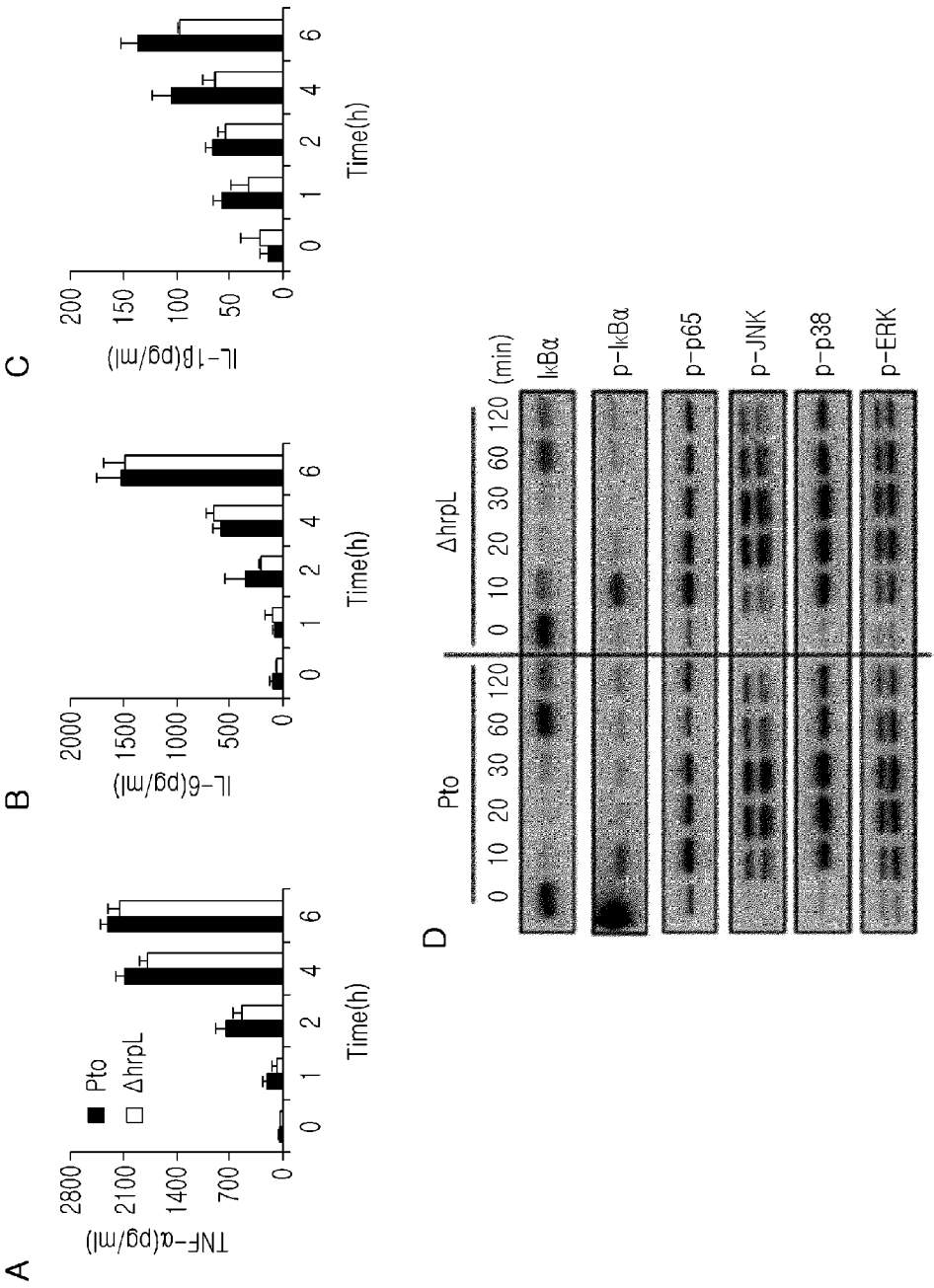


[54]



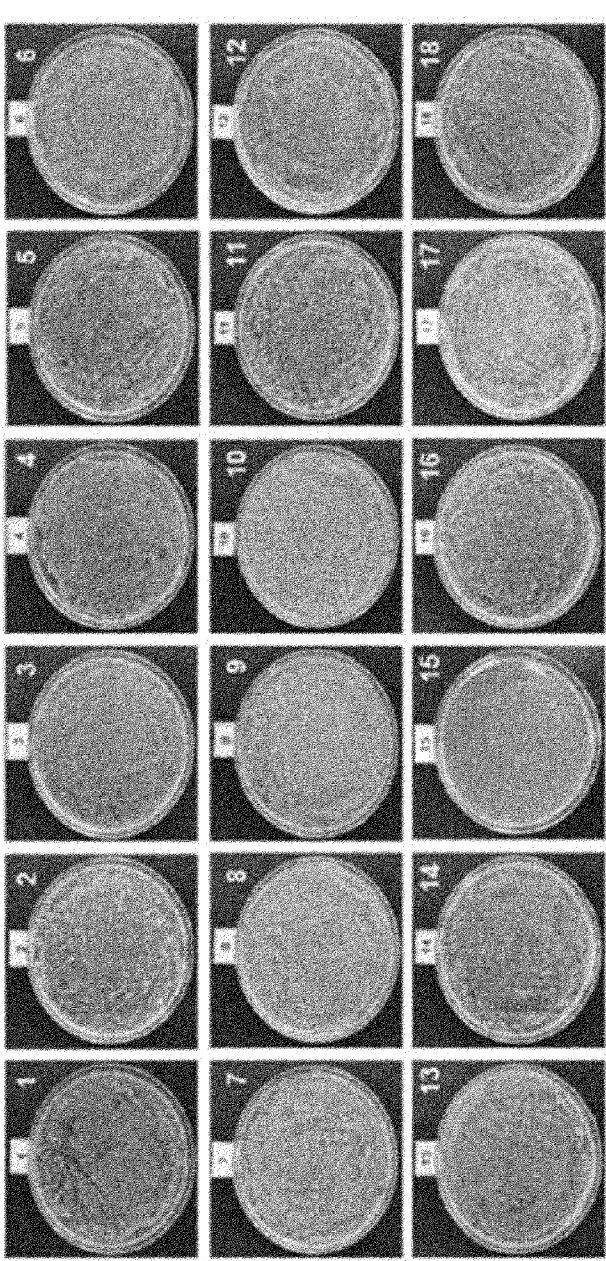
A

[도5]



[도6]

Gentamycin protection assay



- | | | | | | |
|--------------------------|-----------|------------|-----------|------------|--------------|
| 1. <i>P. fluorescens</i> | 2. +EV | 3. +EtHAn | 4. +HopC | 5. +HopAB2 | 6. +HopAm1-1 |
| 7. +HopA | 8. +HopAF | 9. +HopY | 10. +HopX | 11. +HopP | 12. +HopO1-1 |
| 13. +HopF2 | 14. +AvrE | 15. +HopQ1 | 16. +HopE | 17. +HopM1 | 18. +AvrPto |

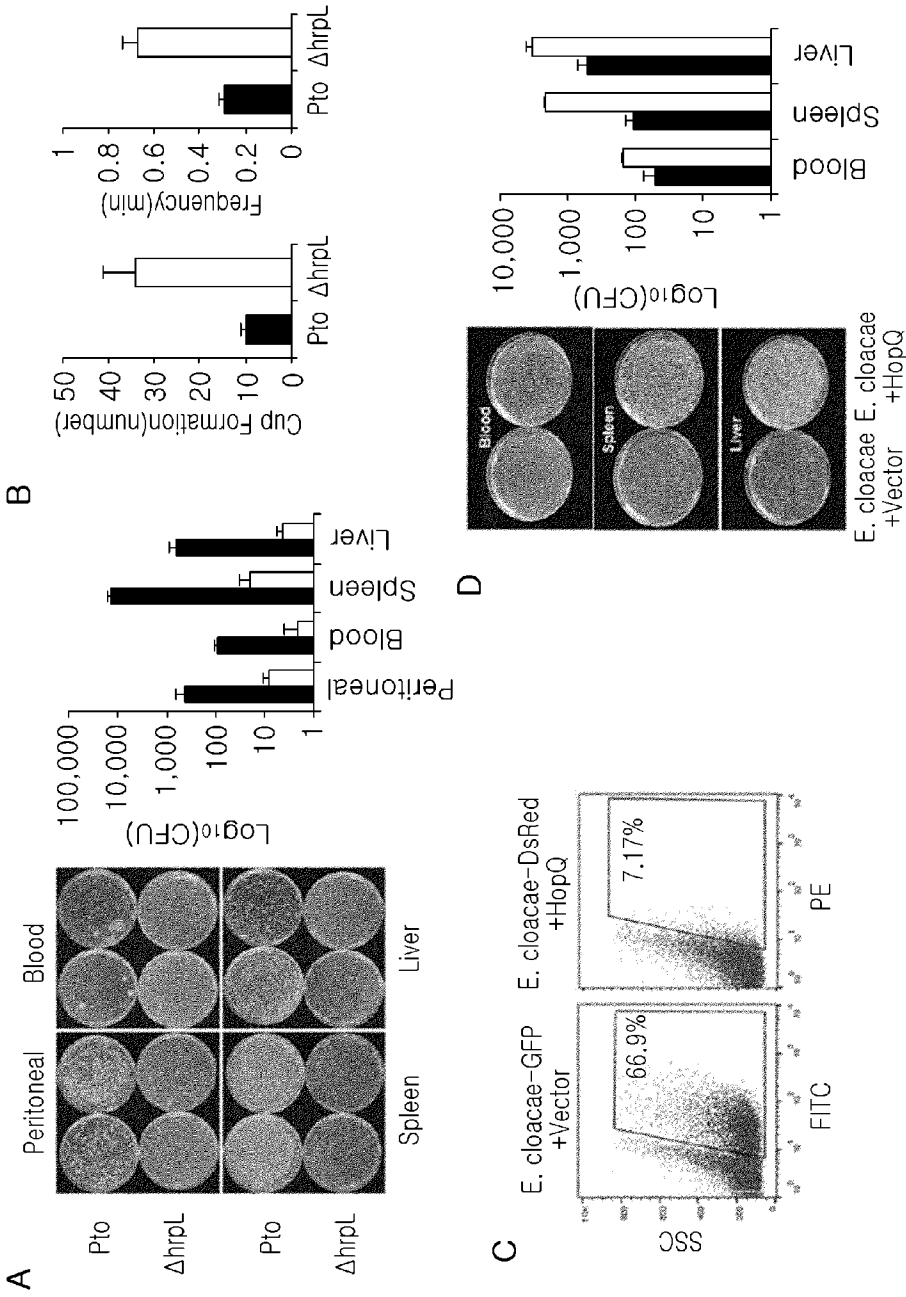
D

	mCherry	Limk1	DAPI	Merge
mCherry				
mCherry + HopQ				

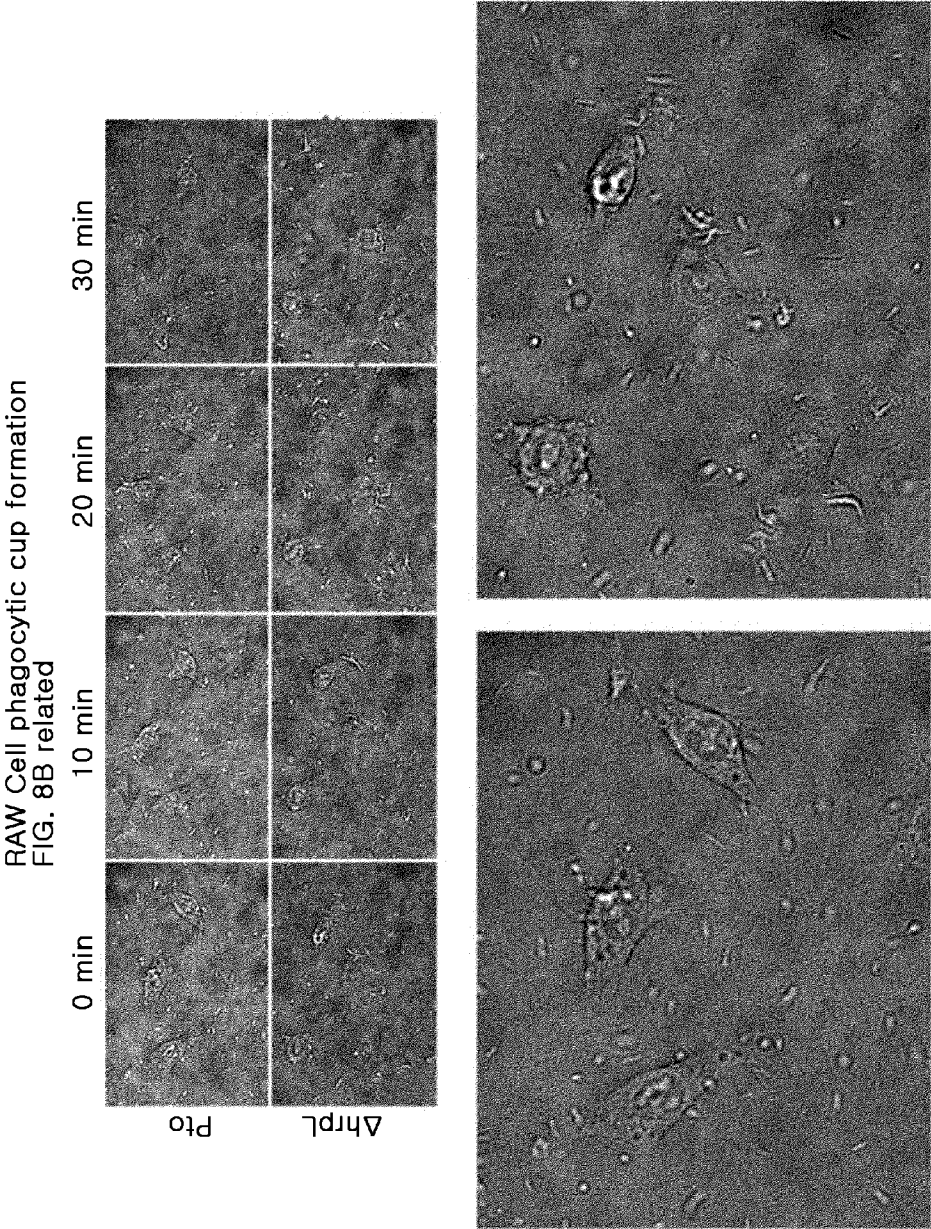
E

	P. fluorescens +vector					P. fluorescens +HopQ				
	Con	10	30	60	120	Con	10	30	60	120
LIMK1										
p-Cofilin										
Cofilin										

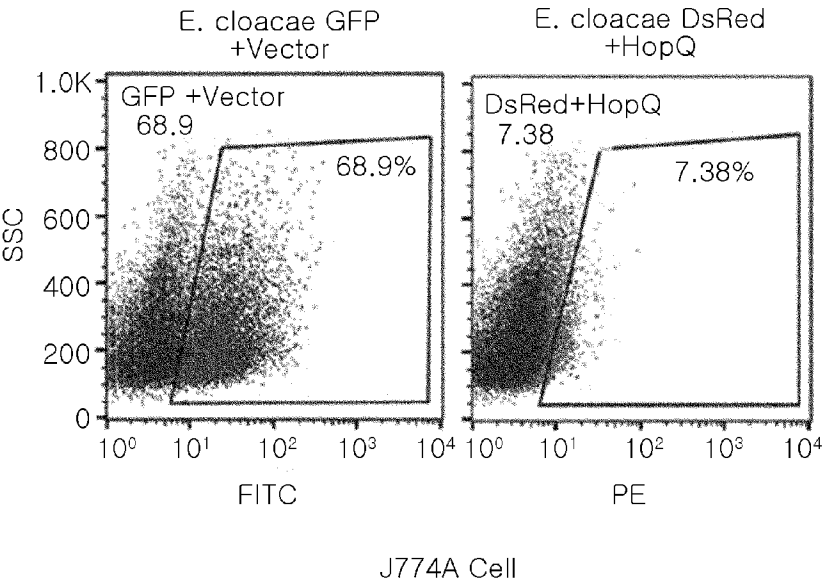
[85]



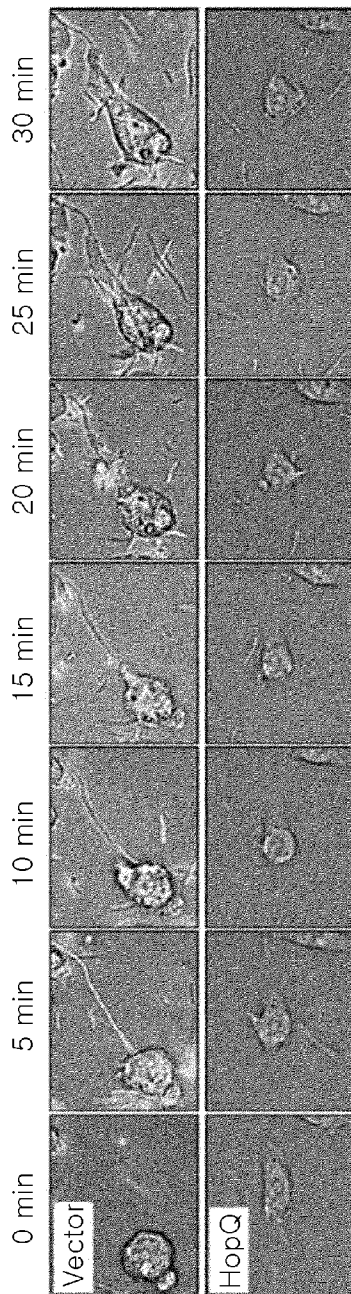
[도9]



[도10]

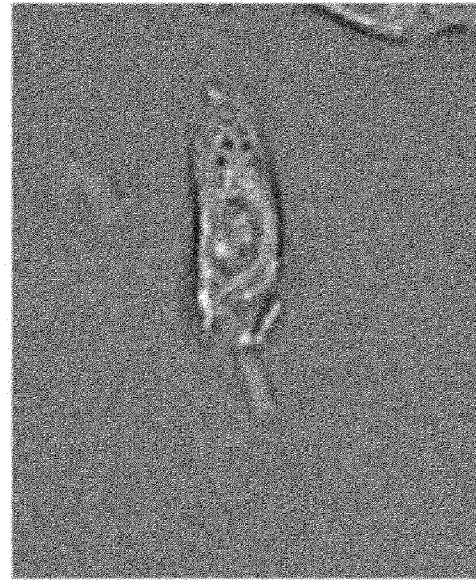
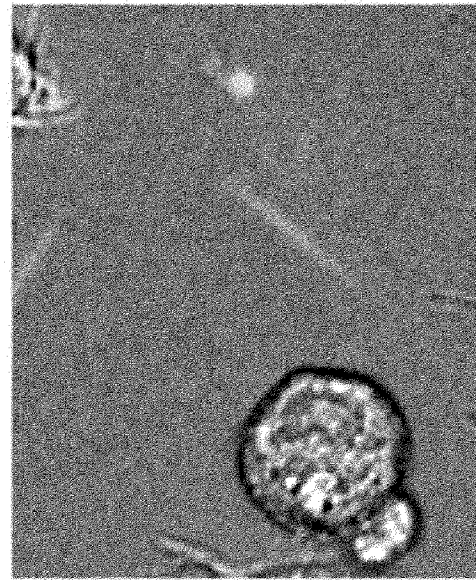


[도11]

RAW cell phagocytic cup formation
Fig. 8C related

Vector

HopQ



[도12]

