

Infection with *Citrobacter rodentium* in μ MT Knockout Mice

Minjeong Jo, Soonjae Hwang and Ki-Jong Rhee[†]

Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences,
Yonsei University at Wonju, Wonju, Gangwon-do 26493, Korea

μ MT knockout mice are genetically deficient in the transmembrane domain of mu chain of the immunoglobulin M (IgM) heavy chain, resulting in the absence of mature B cells. μ MT knockout mice is an *in vivo* model system used to clarify the role of B cells in various diseases. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) induces acute and chronic diarrheal disease, especially in children of developing countries. The formation of attaching and effacing (A/E) lesion is a prominent pathogenic factor in the intestinal epithelium of EPEC infection. The A/E lesion is modulated by genes located on the pathogenic island locus of enterocyte effacement (LEE) which encode a type III secretion system (T3SS) and A/E lesion-related effector proteins. *Citrobacter rodentium* is a murine pathogen utilized in studying the pathogenic mechanisms of EPEC in human infections. *Citrobacter rodentium* produce A/E lesion to attach to intestinal epithelium, thus providing a murine model pathogen to study EPEC. Several studies have investigated the pathogenesis of *Citrobacter rodentium* in the μ MT knockout mice. In this review, we introduce the μ MT murine model in the context of *C. rodentium* pathogenesis and describe in detail the role of B cells and antibodies in this disease.

Key Words: μ MT knockout mice, B lymphocyte, Colitis, Antibodies

서 론

지난 30년 동안, 설사로 인한 사망률은 전 세계적으로 감소하였지만, 설사는 여전히 5세 이하의 소아에서 감염으로 인한 사망원인 중 두 번째로 높은 원인으로 알려져 있다(Lanata et al., 2013). 5세 이하의 소아 사망률은 선진국보다 개발도상국에서 사망률이 높은 실정이다(Lanata et al., 2013). 설사를 야기하는 병원체는 여러 종류가 있으나, 그 중에서도 enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)이 주요한 원인균으로 보고된 바 있다(Ochoa and Contreras, 2011). EPEC 감염 경로는 주로 오염된 음수 및 식품을 통해 전파된다고 알려져 있다(Clements et al., 2012). EPEC 감염증의 대표적인 임상 증상으로는 설사 뿐만 아니라, 발열, 복

통, 구토 등이 흔하게 동반되며, EPEC 감염증의 약 10%에서는 혈액이 포함된 설사를 동반한다고 알려져 있다(Ochoa and Contreras, 2011). 소아에서의 심한 설사는 전해질 불균형 및 수분 손실에 의해 적절한 치료를 받지 못하면 심각한 합병증 및 사망을 초래할 수 있기 때문에 설사 증상의 지속성 유무에 따라 항생제를 추가적으로 처방하기도 하며, 기본적으로는 수분 및 전해질 치료를 수행한다고 알려져 있다(Behiry et al., 2011).

5세 이하 소아에서, 나이가 어릴수록 EPEC 감염증에 의해 임상 증상이 심하게 나타난다고 알려져 있다(Lanata et al., 2013). 소아는 약 4~5세가 되어야 체내에서 항체를 만들어 내기 시작하기 때문에, 산모의 태반으로부터 공급 받은 모체의 항체 보호가 생후 6개월까지만 지속된다. 그러므로, 생후 6개월부터 항체를 만들어내는 시기 사이의

* Received: February 7, 2018 / Revised: February 26, 2018 / Accepted: March 2, 2018

[†] Corresponding author: Ki-Jong Rhee. Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Wonju 26493, Korea. Tel: +82-33-760-2445, Fax: +82-33-760-2195, e-mail: kjrhee@yonsei.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

기간이 EPEC과 같은 외부 미생물 감염으로부터 취약한 것으로 알려져 있다(Lanata et al., 2013). 불완전한 면역체계를 가진 5세 이하 소아에게서 EPEC에 의해 유발되는 설사의 발병 기전을 이해하고, 효과적으로 치료하기 위해 현재까지 미생물, 세포 및 실험 동물을 이용한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행 중에 있다(Croxen and Finlay, 2010). 여러 연구 결과들 중에서도 병원성과 관련된 EPEC의 미생물적 특징, EPEC 감염증을 연구하기 위해 사용되고 있는 대체 미생물-동물 모델 및 항체를 분비하는 면역세포인 B 림프구가 결핍된 마우스를 이용한 동물 실험 결과에 초점을 맞추어 살펴보고자 한다.

본 론

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)의 임상적 중요성

*Escherichia coli*는 일반적으로 사람의 장내에 거주하는 무해한 상재균으로 알려져 있으나, 특정 병원성 대장균은 사람에게 복막염, 요로감염 및 설사와 같은 감염증을 유발하는 능력을 가지고 있다(Nataro and Kaper, 1998; Croxen and Finlay, 2010). 많이 연구된 8개의 병원성 대장균 중에서도, EPEC은 유아에서 치명적인 설사를 일으키는 것으로 알려져 있으며, 다른 임상적 증상으로는 구토, 열, 탈수가 동반된다(Goosney et al., 2000; Jenkins et al., 2003). 이때까지 EPEC은 개발도상국에서 주로 어린이들에 대해 보건학적인 문제를 일으키는 원인균으로 주목 받아 왔으나, 북아메리카와 유럽에서 어린이들을 돌봐주는 탁아 시설에서 집단으로 유발하는 설사와 양의 상관관계가 있다고 임상 연구에서 보고된 바 있다(Turner, 2011; MacDonald et al., 2014; Fruth et al., 2015).

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)의 미생물적 특징 및 한계점

EPEC은 장 상피세포의 표면에서 반침대와 같은 구별되는 구조를 형성하는 병리적 특성을 가지고 있는 세포 외 병원균 중에 하나로 알려져 있다(Goosney et al., 2000). 이와 같은 특징적 병변은 attaching and effacing (A/E) lesion이라고 명명되며, EPEC에 감염된 개체의 장내 상피세포가 가진 actin의 운동성이 EPEC 세균이 가진 translocated intimin receptor (Tir)라는 병원성 인자를 통해, 조절받으면서 나타나는 숙주 내 조직에서 야기되는 병변으로 알려진 바 있다(Goosney et al., 2000). EPEC은 일반적으로 비침습적 장내 병원균이며, EPEC 세균의 장 상피세포의 표면에 대

한 근접한 결합은 A/E lesion을 통해 이루어지며, 이는 EPEC 감염의 큰 특징으로 알려져 있다(Chen and Frankel, 2005). 또한, EPEC 세균 외막에 존재하는 Tir 단백질이 분비되는 형태로 작용하여 A/E lesion을 유발하는 것으로 알려져 있다(Chen and Frankel, 2005). EPEC의 effector 단백질은 type III secretion system (T3SS)을 통하여 장 상피세포로 전달된다. T3SS는 locus of enterocyte effacement (LEE)라는 세균의 유전자 부위로, 병원성 island에 존재한다고 알려져 있다(Mcdaniel et al., 1995). LEE는 모든 A/E lesion을 유발하는 미생물에서 발견되는 유전자 부위이며, A/E 과정을 통해 병원성을 야기하는 세균의 감염증의 발병 기전에서 필수적이라고 알려져 있다(Kenny, 2002). LEE 유전자 부위를 통해 만들어지는 단백질들은 T3SS을 구성하는 단백질뿐만 아니라, 조절 인자들, 분비되는 형태로 알려진 7개의 effector 단백질, 분비되는 effector 단백질들과 관련된 chaperones으로 구성되어 있다(Frankel et al., 1998; Deng et al., 2004). Tir말고도, T3SS는 일부 effector 단백질들을 숙주세포로 이동시켜주는 역할을 한다고 알려져 있으며, 이 과정을 통해 숙주세포의 세포생물학적 경로들이 A/E lesion을 촉진하도록 조절한다고 연구된 바 있다(Frankel et al., 1998; Croxen and Finlay, 2010; Wong et al., 2011).

최근에는, LEE 유전자 이외의 부분에서 만들어지는 effector 단백질들도 보고된 바 있으며, 이에 대한 연구가 관련 분야에서 큰 관심을 받고 있는 실정이다(Royan et al., 2010). 예를 들면, prototype 형태의 EPEC 균주인 E2348/69은 23개의 effector 단백질들을 생산해낸다고 알려져 있으며, 반면에 특정 혈청형을 가진 enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)은 최대 41개까지 생산한다고 확인된 바 있다(Iguchi et al., 2009; Deng et al., 2012). 이와 같이 EPEC 세균이 A/E 과정을 통해 감염된 개체의 장 세포에 결합하여 질환을 유발하기 위해서는 effector 단백질들의 도움이 필수적이라고 알려져 있다. EPEC와 관련한 집단 설사 및 보건학적인 문제를 해결하기 위해 많은 연구자들에 의해 기초 및 임상 연구가 진행되고 있는 실정이긴 하나, EPEC는 사람에게만 병을 유발하는 장내 병원균으로 알려져 있고, 실험실 감염을 이유로 높은 안전 등급을 갖춘 연구기관에서만 사용할 수 있으며, 위 EPEC 균주에 의해 감염되면 병리 증상이 뚜렷하게 나타나므로, 이에 대해 높은 수준의 연구 윤리 및 신고 절차가 요구된다고 알려져 있다(Katouli et al., 1990).

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) 기초 연구를 위한 *Citrobacter rodentium*

EPEC는 숙주에 대한 특이성이 높은 편이며, 주로 사람에게 감염하는 병원균으로 인식되고 있지만, 마우스 EPEC 감염 모델이 보고된 바 있다(Goosney et al., 2000). Hecht 그룹에 의해 발표된 연구에서는, C57BL/6 마우스에 EPEC를 감염시키면, EPEC의 우점화(colonization)가 야기되며, 장 상피세포에 EPEC가 결합할 뿐만 아니라, 장 상피세포의 미세융모(microvilli) 구조 왜곡 및 손실을 관찰한 바 있다(Savkovic et al., 2005). 마우스를 이용한 다른 연구에 의하면, EPEC 감염에 의해 마우스의 장 상피세포의 장벽의 기능 및 밀착연접(tight junction)의 형태 변화를 야기하였으며, 염증반응 또한 같이 수반되었다고 보고된 바 있다(Zhang et al., 2012). 하지만, 이와 반대로, 몇몇 EPEC 균주들은 Swiss NIH 마우스에서는 우점화가 불가능하다고 보고된 바 있으며(Frankel et al., 1996), Williams 그룹에 의해 진행된 연구에 의하면, EPEC은 C57BL/6 마우스에 감염시켜주어도, 빠르게 장에서 제거되며 A/E 병변의 형성도 관찰되지 않는다고 보고한 바 있다(Klapproth et al., 2005). 이와 유사하게도, C3H/HeJ 마우스와 C57BL/6 마우스에서 EPEC의 우점화를 비교한 논문에서도 장내 병리를 유발하는 명백한 실험 결과를 얻을 수 없다고 보고된 바 있다(Mundy et al., 2006). 이렇게 일관되지 못한 마우스에서의 EPEC 감염과 동물 실험의 재현 및 그 결과들 때문에 EPEC를 연구하고자 하는 연구자들에게 연구에 대한 접근성을 떨어트리고 있다. 이와 같은 실험적 배경 때문에, 많은 연구자들은 EPEC와 같이 A/E 병변을 야기하지만, 사람에게서 장염 및 설사를 유발하지 않으며 마우스에 특이적으로 감염되어 질병을 야기하는 *Citrobacter rodentium*을 사용하고 있는 실정이다(Mundy et al., 2006). *C. rodentium*이 가진 LEE는 EPEC와 유사하며, 마우스의 장 상피세포에서 A/E 병변을 야기하는 LEE가 필요하다고 연구된 바 있다(Schauer and Falkow, 1993; Deng et al., 2001). EPEC와 비교하여, *C. rodentium*은 Tir과 intimin 단백질이 기능적으로 잘 보존되어 있으므로, *C. rodentium*-마우스 모델은 사람에서 EPEC에 감염되었을 때의 질병 발병 기전을 이해하고 치료하기 위한 물질을 평가하는데, 연구적 유용성 및 편리성을 제공하였을 뿐만 아니라, 실험자의 안전도 지킬 수 있는 EPEC를 연구할 대체 세균으로 인식되어 왔다. 하지만, EPEC에 감염된 사람의 주요 증상으로는, 설사가 대표적인 반면에, *C. rodentium*은 장내 염증 및 과증식을 주로

유도하는 차이점이 있기 때문에(Barthold et al., 1978), 사람에게서 병을 야기하는 EPEC 균주를 이용하여 만성 감염이 가능한 마우스 모델을 구축하려는 실험적 연구 결과도 보고된 바 있다. 예를 들자면 최근 발표된 다른 연구 결과에서는 나이가 어린 마우스에서 감염된 EPEC 세균 수가 비교적 잘 유지되는 편이며, 고령의 마우스는 EPEC 감염에 대한 감수성이 달라진다고 보고된 바 있다(Dupont et al., 2016).

μ MT knockout mice

B 림프구가 결핍되어 있는 마우스로 μ MT knockout mice, CD19⁻ mice, J_H⁻ mice 등이 있다. 가장 보편적으로 사용되고 있는 μ MT knockout mice는 IgM의 heavy chain인 μ chain의 transmembrane 부분의 유전자 결손으로 만들어지는 유전자 변형 마우스이다(Kitamura and Rajewsky, 1992). 이러한 μ MT knockout mice는 성숙한 B 림프구가 결핍되어 있다고 알려져 있다. 그 이유를 알기 위해 우선 B 림프구의 성숙 과정을 간단하게 살펴보도록 하겠다. 우선 B 림프구의 성숙 과정은 pre-pro B cell \rightarrow pro B cell \rightarrow pre B cell \rightarrow immature B cell \rightarrow mature B cell과 같은 과정으로 진행된다. 이러한 B 림프구의 성숙은 골수에서부터 비장과 같은 2차 림프기관에서 이루어진다(Nagasawa, 2006). 특히 pre B cell의 경우에는 large pre B cell과 small pre B cell로 나누어 지는데, 각각의 B 림프구 성숙 과정에서는 특이적인 표면 marker가 나타나게 된다(Hardy et al., 2000). 발현되는 marker들을 각각의 단계에 따라 살펴보면, pre-pro B cell의 경우 B220의 발현은 낮으며 다른 marker인 CD19, CD2, IgM, IgD 모두 발현되어 있지 않다. Pro B cell에서는 CD19가 발현되며, large pre B cell의 경우에는 CD19와 더불어 μ heavy chain과 surrogate light chain으로 이루어진 pre B cell receptor가 surface marker로 나타나게 된다. Small pre B cell에서부터는 B220과 CD2 marker가 나타나며 immature B cell에서는 IgM이, mature B cell에서는 IgM과 IgD 모두 B cell의 표면에 나타나게 된다(Melchers et al., 2000). 이러한 B cell의 성숙 과정 중 μ MT knockout mice의 특징인 성숙한 B cell의 결핍을 초래하는 단계는 large pre B cell 단계이다. B 림프구가 성숙해 나아가기 위해서는 각 단계별로 나타나는 표면 marker가 제대로 형성이 되어야 하는데, μ MT knockout mice는 IgM의 heavy chain인 μ chain의 transmembrane 부분의 유전자 결손이 야기된 마우스이다. 따라서 large pre B cell 표면에 surrogate light chain과 함께 μ chain이 발현되지 못하게 되면서 μ MT knockout

mice에서는 large pre B cell 단계에서 세포자멸(apoptosis)이 일어나게 된다. 결국 μ MT knockout mice에는 미성숙한 B 림프구 분화 초기 단계의 세포는 존재하지만 성숙한 B 림프구가 존재하지 않게 된다(Kitamura et al., 1991).

하지만 이렇듯 성숙한 B 림프구가 결핍되어 있다고 알려져 있는 μ MT knockout mice에서도 항체는 생성이 된다고 알려져 있다(Macpherson et al., 2001). 항체에는 IgM, IgA, IgE, IgG, IgD와 같이 다섯 가지의 종류가 있으며 각각의 항체는 아형(subtype)을 가지고 있다(Hoffman et al., 2016). Macpherson 등에 따르면 C57BL/6 기반의 μ MT knockout mice의 혈청을 이용하여 ELISA 실험을 통해 각각의 항체의 양을 검사한 결과에서는 IgM, IgE, IgG, IgD는 검출이 되지 않았지만 IgA는 검출이 되었다. 하지만 검출된 IgA의 양은 모든 μ MT knockout mice가 유사한 양으로 가지고 있는 것이 아니라 검출한도 미만부터 wild-type mice 혈청의 IgA 양과 유사한 10^2 μ g/mL까지 각 개체마다 양적 차이가 나타났다. 특히 이러한 μ MT knockout mice에서의 IgA는 μ MT knockout mice의 젖먹이가 끝나는 시점부터 그 양이 증가하며, 장의 Peyer's patch에서 다량 존재한다고 알려져 있다(Macpherson et al., 2001). 이러한 μ MT knockout mice는 각각의 감염성 질병에 대한 B 림프구의 면역반응 또는 항체의 생성 및 역할과 관련된 연구에 주로 사용되고 있다(Shen et al., 2014; Wang et al., 2015; Pylayeva-Gupta et al., 2016; Tang et al., 2016).

Citrobacter rodentium 감염과 B 림프구

*C. rodentium*에 의해 발생하는 장염에서의 B 림프구 또는 항체의 역할을 밝히기 위해 B 림프구가 결핍되었다고 알려져 있는 μ MT knockout mice를 이용하여 *C. rodentium* 감염으로 유발되는 장염에 대한 연구가 진행된 바 있다. *C. rodentium*에 대한 장내 면역반응에는 $CD4^+$ T cell이 특징적이라고 알려져 있다(Spahn et al., 2008). 하지만 $TCR-\beta^-$ mice와 $CD4^-$ mice에서 보다 B 림프구가 결핍되어 있는 μ MT knockout mice에서 *C. rodentium*의 구강 내 감염으로 인해 유도되는 대장염이 치명적이라고 보고된 바 있다(Bry and Brenner, 2004). Maaser 그룹에 의한 연구에서는 3×10^9 CFU의 *C. rodentium*을 μ MT knockout mice와 wild-type mice에 감염시켰을 때, μ MT knockout mice의 대변(feces)에서의 *C. rodentium* 수가 약 1×10^9 CFU로 6주까지 높게 유지되는 것을 확인한 반면 *C. rodentium*이 감염된 wild-type mice의 대변에서는 감염 1주차에는 μ MT knockout mice와 마찬가지로 1×10^9 CFU가 검출되었지만 시간

이 지날수록 *C. rodentium*의 수가 점차 감소하여, 감염 6주차에는 최소한으로 검출할 수 있는 수치인 1×10^3 CFU 미만으로 *C. rodentium*의 CFU가 감소하는 것을 확인했다. 또한 염색을 통해 조직학적으로 확인한 결과 *C. rodentium*을 감염시킨 μ MT knockout mice에서 wild-type mice보다 crypt의 길이가 증가해 있었으며, 염증 부위에 침윤되어 있는 면역세포의 수 또한 증가해 있을 뿐만 아니라 비장에서 wild-type mice의 경우 marginal zone과 단핵세포(mononuclear cells)의 증가를 확인할 수 있었으며 호중구(neutrophils) 수의 변화는 나타나지 않았다. 반면 μ MT knockout mice의 경우에는 wild-type mice와 같은 증상이 6주까지 진행되며, 호중구의 수가 증가하고, neutrophilic microabscesses를 확인하였다(Maaser et al., 2004).

Simmons 그룹에 의한 연구에서는 $RAG1^-$ mice, μ MT knockout mice, wild-type mice 각각에 3×10^9 CFU의 *C. rodentium*을 감염시켜주었을 때, $RAG1^-$ mice와 μ MT knockout mice의 feces에서 *C. rodentium* 수가 약 1×10^9 CFU로 30일까지 유지되는 것을 확인하였다(Simmons et al., 2003). 이러한 결과를 통해 *C. rodentium*의 우점화는 T 림프구보다는 B 림프구에 의해 감소되는 것을 알 수 있다. 또한 wild-type mice와는 달리 μ MT knockout mice의 경우에는 비장과 간에서도 약 1×10^3 CFU 이하의 *C. rodentium*이 검출되었다(Bry and Brenner, 2004). 그 후 *C. rodentium* 감염에 있어 항체가 주요한 역할을 하는지 확인하기 위해 과거 *C. rodentium*에 노출되었었던 wild-type mice의 혈청을 μ MT knockout mice에 넣어주었을 때, 비장과 간에서는 *C. rodentium* 수가 약 100배 정도 감소하였지만 대장의 *C. rodentium* 수에는 변화가 나타나지 않았다(Simmons et al., 2003). 반면, wild-type mouse 내에 활성화되는 면역세포들 중에서 naïve B 림프구가 아닌 *C. rodentium*에 노출된 적이 있던 immune B 림프구를 *C. rodentium*에 감염된 μ MT knockout mice에 이식을 해주게 되면, μ MT knockout mice의 *C. rodentium*에 대한 면역성이 높아졌다는(Maaser et al., 2004) 연구 결과가 있다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 Maaser 그룹 등에 의한 연구에서는 $CD4^+$ T 림프구 뿐만 아니라 B 림프구 또한 *C. rodentium*에 대한 숙주의 면역에 기여한다고 말하고 있다.

Citrobacter rodentium 감염과 항체

면역반응에서 B 림프구의 주된 역할에는 항원제시세포(antigen presenting cell)로서의 역할과 항원 특이성을 갖는 항체 생성이 있다. 보통 장내에서의 주된 항체는 Immuno-

globulin A (IgA)라고 알려져 있으며(Hooper and Macpherson, 2010), 따라서 장내에 병원성 세균이 감염될 경우 여러 종류의 항체 중 IgA의 분비가 증가하게 되는데(Cerutti et al., 2011; Gutzeit et al., 2014) *C. rodentium*에 감염되었을 때에도 마찬가지로 장액 속에 IgA의 양이 증가하게 된다(Harrington et al., 2008). Wild-type C57BL/6 mouse에 *C. rodentium*을 감염시켜주게 되면, 1주 후에 마우스의 대장과 분변에서 가장 높은 수치의 *C. rodentium* 수가 나타나며, 3~4주 후에는 *C. rodentium*이 마우스의 대장과 분변에서 발견되지 않는다고 하였다(Simmons et al., 2003). 하지만 Maaser 그룹에 의한 연구에 따르면 IgA 또는 분비형의 IgM이 결핍된 마우스와 생성된 항체를 장의 내강에 전달(transcytosis)하기 위해 필요한 막단백질인 polymeric Ig receptor (pIgR)가 결핍된 마우스에 *C. rodentium*을 감염시켰을 때에는 wild-type mice에 *C. rodentium*을 감염시켜주었을 때와 같은 결과를 확인하였다. 따라서 IgA와 분비형의 IgM은 *C. rodentium* 감염에서 주된 면역작용을 하지 않는다고 생각된다(Maaser et al., 2004). 반면 μ MT knockout mice에 *C. rodentium*을 감염시켜주었을 경우에는 초기 반응의 경우 wild-type mice에 *C. rodentium*을 감염시켜주었을 때와 유사하지만 세균의 수가 감염 후 6주까지도 높은 수로 유지되며, 감염 2주 후에도 장염이 지속되었으며, 따라서 *C. rodentium* 감염에 대한 면역반응에는 IgA 또는 분비형의 IgM 보다는, B 림프구 자체가 주된 역할을 한다고 보고되었다(Maaser et al., 2004).

하지만 최근의 연구에서는 *C. rodentium* 감염으로 유발된 숙주의 면역반응에 있어, 항체가 중요한 역할을 한다고 하였다(Eckmann and Stappenbeck, 2015). 장내의 주된 항체는 IgA로 알려져 있지만, 최근 IgG의 일부가 장의 내강으로 분비된다고 보고하였다(Kamada et al., 2015). 특히, 장의 내강으로 분비된 IgG는 세균에 감염되었을 때, 장내 세균이 장의 내강에 붙어 증식하는 것에 관여하는 A/E lesion에 결합하여 세균이 장 상피세포 표면에 우점화하는 것을 방해한다고 알려져 있으며, 이러한 IgG가 세균의 A/E lesion에 분비되어, 세균에 결합하게 되면 호중구(neu trophil)가 세균에 결합되어 있는 IgG를 인지하여 세균이 제거된다고 연구된 바 있다(Cleary et al., 2004). *C. rodentium* 역시 장내 내강에서 군집(colony) 형성을 하기 위해 A/E lesion을 생성한다고 알려져 있기 때문에, B 림프구에서 생성되는 IgG가 *C. rodentium* 감염 시에 A/E lesion에 분비 및 세균에 결합하여 *C. rodentium*의 장내 우점화를 방해할 뿐만 아니라, 호중구에 의한 *C. rodentium*를 제

거하는 탐식작용을 촉진한다고 보고된 바 있으며, 따라서 *C. rodentium* 감염으로 유도되는 숙주의 면역반응에는 B 림프구 자체의 기능뿐만 아니라, 여러 항체 중 IgG가 주된 역할을 한다고 여겨지고 있다(Eckmann and Stappenbeck, 2015; Kamada et al., 2015).

결론

B 림프구가 결핍되었다고 알려진 μ MT knockout mice에 *C. rodentium*을 이용하여 세균성 감염을 유도하면 wild-type 마우스와 비교하여 μ MT knockout mice의 장에서 세균의 수가 높게 검출되며, 균의 제거 또한 지연된다고 밝혀졌다(Maaser et al., 2004). 또한 $CD4^{-/-}$ mice에 *C. rodentium*을 감염시켰을 때 보다 μ MT knockout mice에 *C. rodentium*을 감염시켰을 때, 장염의 정도가 심하게 나타나며 *C. rodentium*의 급성 감염에 의한 사망률 또한 높게 나타났다(Bry and Brenner, 2004). 따라서 *C. rodentium*에 의한 장염에서 B 림프구가 장염을 완화시키는데 필요하다는 것을 알 수 있으며, B 림프구의 역할이 마우스가 살아남는데 있어 중요하다고 사료된다.

μ MT knockout mice는 면역반응에 주요하다고 알려져 있는 성숙한 B 림프구가 결핍되어 있는 마우스이다. 따라서 μ MT knockout mice는 특정 세균 혹은 특정 화학물질에 의해 유발되는 질병에서의 B 림프구의 역할을 규명하는 것에 있어 *in vivo* 모델로서 활용될 수 있을 것이라고 사료된다. 뿐만 아니라 흉선이 없어 T 림프구의 성숙이 억제된 nude 마우스와 같이 다른 면역세포가 결여되어 있다고 알려진 마우스를 μ MT knockout mice와 함께 실험에 이용함으로써, 특정 질병에 있어 B 림프구와 T 림프구가 각 질환에서 매개하는 효과 및 역할을 연구하는데 활용할 수 있을 것이라고 사료된다.

μ MT knockout mice는 B 림프구의 결핍으로 memory B cell과 항원에 특이적인 항체를 스스로 생성하지 못한다. 따라서 이러한 μ MT knockout mice의 특징에 따라, μ MT knockout mice는 백신과 같은 능동면역을 평가하기 위해 활용되는 것 보다는 수동면역 즉, 특정 병원성 세균에 대한 항체 치료제의 효용성 평가에 활용될 수 있을 것이라고 사료된다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by NRF (National Research Foundation of Korea) Grant funded by the Korean Government

(2017R1D1A1A02018088) and NRF-2017-Fostering Core Leaders of the Future Basic Science Program/Global Ph.D. Fellowship Program (2017H1A2A1045727). In addition, this research was supported by the Bio & Medical Technology Development Program of the NRF funded by the Korean government, the Ministry of Science, ICT & Future Planning (2016M3A9B4919711).

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to disclose.

REFERENCES

- Barthold SW, Coleman GL, Jacoby RO, Livestone EM, Jonas AM. Transmissible murine colonic hyperplasia. *Veterinary Pathology*. 1978. 15: 223-236.
- Behiry IK, Abada EA, Ahmed EA, Labeeb RS. Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with diarrhea in children in Cairo, Egypt. *The Scientific World Journal*. 2011. 11: 2613-2619.
- Bry L, Brenner MB. Critical role of t cell-dependent serum antibody, but not the gut-associated lymphoid tissue, for surviving acute mucosal infection with *Citrobacter rodentium*, an attaching and effacing pathogen. *The Journal of Immunology*. 2004. 172: 433-441.
- Cerutti A, Chen K, Chorny A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annual Review of Immunology*. 2011. 29: 273-293.
- Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005. 29: 83-98.
- Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg MS, Frankel G, Knutton S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology*. 2004. 150: 527-538.
- Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*. 2012. 3: 71-87.
- Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. 2010. 8: 26-38.
- Deng W, Li Y, Vallance BA, Finlay BB. Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infection and Immunity*. 2001. 69: 6323-6335.
- Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vazquez A, Barba J, Ibarra JA, O'Donnell P, Metalnikov P, Ashman K, Lee S, Goode D, Pawson T, Finlay BB. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004. 101: 3597-3602.
- Deng W, Yu HB, de Hoog CL, Stoyanov N, Li Y, Foster LJ, Finlay BB. Quantitative proteomic analysis of type III secretome of enteropathogenic *Escherichia coli* reveals an expanded effector repertoire for attaching/effacing bacterial pathogens. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012. 11: 692-709.
- Dupont A, Sommer F, Zhang K, Repnik U, Basic M, Bleich A, Kuhnel M, Backhed F, Litvak Y, Fulde M, Rosenshine I, Hornef MW. Age-dependent susceptibility to enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection in mice. *PLoS Pathogens*. 2016. 12: e1005616.
- Eckmann L, Stappenbeck TS. IgG "detoxes" the intestinal mucosa. *Cell Host & Microbe*. 2015. 17: 538-539.
- Frankel G, Phillips AD, Novakova M, Field H, Candy DC, Schauer DB, Douce G, Dougan G. Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* restores murine virulence to a *Citrobacter rodentium* eaeA mutant: induction of an immunoglobulin A response to intimin and EspB. *Infection and Immunity*. 1996. 64: 5315-5325.
- Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Molecular Microbiology*. 1998. 30: 911-921.
- Fruth A, Prager R, Tietze E, Rabsch W, Flieger A. Molecular epidemiological view on shiga toxin-producing *Escherichia coli* causing human disease in Germany: diversity, prevalence, and outbreaks. *International Journal of Medical Microbiology*. 2015. 305: 697-704.
- Goosney DL, DeVinney R, Pfuertner RA, Frey EA, Strynadka NC, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with α -actinin. *Current Biology*. 2000. 10: 735-738.
- Goosney DL, Gruenheid S, Finlay BB. Gut feelings: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) interactions with the host. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2000. 16: 173-189.
- Gutzeit C, Magri G, Cerutti A. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunology Reviews*. 2014. 260: 76-85.
- Hardy RR, Li YS, Allman D, Asano M, Gui M, Hayakawa K. B-cell commitment, development and selection. *Immunology*

- Reviews. 2000. 175: 23-32.
- Harrington L, Srikanth CV, Antony R, Rhee SJ, Mellor AL, Shi HN, Cherayil BJ. Deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances commensal-induced antibody responses and protects against *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Infection and Immunity*. 2008. 76: 3045-3053.
- Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B cells, antibodies, and more. *Clinical Journal of American Society of Nephrology*. 2016. 11: 137-154.
- Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*. 2010. 10: 159-169.
- Iguchi A, Thomson NR, Ogura Y, Saunders D, Ooka T, Henderson IR, Harris D, Asadulghani M, Kurokawa K, Dean P, Kenny B, Quail MA, Thurston S, Dougan G, Hayashi T, Parkhill J, Frankel G. Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127: H6 strain E2348/69. *Journal of Bacteriology*. 2009. 191: 347-354.
- Jenkins C, Lawson AJ, Cheasty T, Willshaw GA, Wright P, Dougan G, Frankel G, Smith HR. Subtyping intimin genes from enteropathogenic *Escherichia coli* associated with outbreaks and sporadic cases in the United Kingdom and Eire. *Molecular and Cellular Probes*. 2003. 17: 149-156.
- Kamada N, Sakamoto K, Seo SU, Zeng MY, Kim YG, Cascalho M, Vallance BA, Puente JL, Nunez G. Humoral immunity in the gut selectively targets phenotypically virulent attaching-and-effacing bacteria for intraluminal elimination. *Cell Host & Microbe*. 2015. 17: 617-627.
- Katouli M, Kuhn I, Mollby R. Evaluation of the stability of biochemical phenotypes of *Escherichia coli* upon subculturing and storage. *Journal of General Microbiology*. 1990. 136: 1681-1688.
- Kenny B. Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. *International Journal of Medical Microbiology*. 2002. 291: 469-477.
- Kitamura D, Rajewsky K. Targeted disruption of μ chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature*. 1992. 356: 154-156.
- Kitamura D, Roes J, Kuhn R, Rajewsky K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin μ chain gene. *Nature*. 1991. 350: 423-426.
- Klaproth JMA, Sasaki M, Sherman M, Babbitt B, Sonnenberg MS, Fernandes PJ, Scaletsky ICA, Kalman D, Nusrat A, Williams IR. *Citrobacter rodentium* *lifA/efa1* is essential for colonic colonization and crypt cell hyperplasia *in vivo*. *Infection and Immunity*. 2005. 73: 3196.
- Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE, Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health O, Unicef. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One*. 2013. 8: e72788.
- Maaser C, Housley MP, Iimura M, Smith JR, Vallance BA, Finlay BB, Schreiber JR, Varki NM, Kagnoff MF, Eckmann L. Clearance of *Citrobacter rodentium* requires B cells but not secretory immunoglobulin A (IgA) or IgM antibodies. *Infection and Immunity*. 2004. 72: 3315-3324.
- MacDonald E, Dalane PK, Aavitsland P, Brandal LT, Wester AL, Vold L. Implications of screening and childcare exclusion policies for children with shiga-toxin producing *Escherichia coli* infections: lessons learned from an outbreak in a daycare centre, norway, 2012. *BMC Infectious Diseases*. 2014. 14: 673.
- Macpherson AJ, Lamarre A, McCoy K, Harriman GR, Odermatt B, Dougan G, Hengartner H, Zinkernagel RM. Iga production without μ or δ chain expression in developing B cells. *Nature Immunology*. 2001. 2: 625-631.
- McDaniel TK, Jarvis KG, Sonnenberg MS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995. 92: 1664-1668.
- Melchers F, ten Boekel E, Seidl T, Kong XC, Yamagami T, Onishi K, Shimizu T, Rolink AG, Andersson J. Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunology Reviews*. 2000. 175: 33-46.
- Mundy R, Girard F, FitzGerald AJ, Frankel G. Comparison of colonization dynamics and pathology of mice infected with enteropathogenic *Escherichia coli*, enterohaemorrhagic *E. coli* and *Citrobacter rodentium*. *FEMS Microbiology Letter*. 2006. 265: 126-132.
- Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature Reviews Immunology*. 2006. 6: 107-116.
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998. 11: 142-201.
- Ochoa TJ, Contreras CA. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2011. 24: 478-483.

- Pylayeva-Gupta Y, Das S, Handler JS, Hajdu CH, Coffre M, Koralov SB, Bar-Sagi D. IL35-producing B cells promote the development of pancreatic neoplasia. *Cancer Discovery*. 2016. 6: 247-255.
- Royan SV, Jones RM, Koutsouris A, Roxas JL, Falzari K, Weflen AW, Kim A, Bellmeyer A, Turner JR, Neish AS, Rhee KJ, Viswanathan VK, Hecht GA. Enteropathogenic *E. coli* non-LEE encoded effectors NleH1 and NleH2 attenuate NF- κ B activation. *Molecular Microbiology*. 2010. 78: 1232-1245.
- Savkovic SD, Villanueva J, Turner JR, Matkowskyj KA, Hecht G. Mouse model of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infection and Immunity*. 2005. 73: 1161-1170.
- Schauer DB, Falkow S. The *eae* gene of *Citrobacter freundii* biotype 4280 is necessary for colonization in transmissible murine colonic hyperplasia. *Infection and Immunity*. 1993. 61: 4654-4661.
- Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, Ries S, Dang VD, Jaimes Y, Daridon C, Li R, Jouneau L, Boudinot P, Wilantri S, Sakwa I, Miyazaki Y, Leech MD, McPherson RC, Wirtz S, Neurath M, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*. 2014. 507: 366-370.
- Simmons CP, Clare S, Ghaem-Maghami M, Uren TK, Rankin J, Huett A, Goldin R, Lewis DJ, MacDonald TT, Strugnell RA, Frankel G, Dougan G. Central role for B lymphocytes and CD4⁺ T cells in immunity to infection by the attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infection and Immunity*. 2003. 71: 5077-5086.
- Spahn TW, Ross M, von Eiff C, Maaser C, Spiekler T, Kannengiesser K, Domschke W, Kucharzik T. CD4⁺ T cells transfer resistance against *Citrobacter rodentium*-induced infectious colitis by induction of Th 1 immunity. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2008. 67: 238-244.
- Tang A, Dadaglio G, Oberkampf M, Di Carlo S, Peduto L, Laubreton D, Desrues B, Sun CM, Montagutelli X, Leclerc C. B cells promote tumor progression in a mouse model of HPV-mediated cervical cancer. *Int J Cancer*. 2016. 139: 1358-1371.
- Turner M. Microbe outbreak panics Europe. *Nature*. 2011. 474: 137.
- Wang L, Ray A, Jiang X, Wang JY, Basu S, Liu X, Qian T, He R, Dittel BN, Chu Y. T regulatory cells and B cells cooperate to form a regulatory loop that maintains gut homeostasis and suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis. *Mucosal Immunology*. 2015. 8: 1297-1312.
- Wong AR, Pearson JS, Bright MD, Munera D, Robinson KS, Lee SF, Frankel G, Hartland EL. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Molecular Microbiology*. 2011. 80: 1420-1438.
- Zhang Q, Li Q, Wang C, Li N, Li J. Redistribution of tight junction proteins during EPEC infection *in vivo*. *Inflammation*. 2012. 35: 23-32.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2018.24.1.1>

Cite this article as: Jo MJ, Hwang SJ, Rhee KJ. Infection with *Citrobacter rodentium* in μ MT Knockout Mice. *Biomedical Science Letters*. 2018. 24: 1-8.