creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000265215

2016년 2월

석사학위 논문

The role of Spy in the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

조선대학교 대학원

치의생명공학과

이 화 정

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Salmonella enterica serovar Typhimurium의 병원성 발현에서 Spy 단백질의 역할

The role of Spy in the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

2016년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

이 화 정

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

The role of Spy in the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

salmonella enterica serovar Typhimurium의 병원성발현에서 spy단백질의 역할

지도교수 방 일 수

이 논문을 이학 석사학위 신청 논문으로 제출함

2015년 10월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

이 화 정

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

이화정의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 국 중 기 (인)

위 원 조선대학교 교 수 송 희 상 (인)

위 원 조선대학교 교 수 방 일 수 (인)

2015년 11월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

목 차 ····· i

표 목 차 ····· iv

도 목 차 ····· v

ABSTRACT ····· vii

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 실험 및 재료방법 ····· 4

1. 사용 균주····· 4

2. *S.* Typhimurium *spy* 결손 돌연변이주 제조····· 4

3. *spy* clone 제작 ····· 5

4. 원형질체 (spheroplast) 형성 조건 ····· 5

5. *spy-gfp* transcriptional fusion을 이용한 *spy* 전사 측정
····· 6

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

6. 세균 성장곡선 측정 ·····7

7. Polymyxin B 에 대한 민감성 측정 ·····7

8. Hela cell에 대한 *Salmonella* 침입율 측정 ·····8

9. 대식세포내 *Salmonella* 생존율 측정 ·····8

10. 생쥐에 대한 *Salmonella*병독성 측정·····9

Ⅲ . 결과····· 12

1. *S.* Typhimurium의 *spy* 전사는 다양한 스트레스에 반응하여 유도된다. ·····12

2. 세균 외막 stress에 의해 *spy*가 발현된다. ·····16

3. *spy* 돌연변이주를 제조 하였다. ····· 21

4. *Salmonella*의 외부 스트레스 내성에서 *spy*의 역할이 필요하다. ····· 23

5. *spy*는 Hela cell에 대한 *Salmonella*의 침입율 (Invasion rate)을 증가시킨다. ····· 27

6. *spy*는 *Salmonella*의 대식세포내 침입율 및 대식세포내 증식율을 증가시킨다. ····· 29

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

7. *spy*는 *Salmonella*의 생쥐 병독성에 필요하다. ·····31

Ⅳ. 고찰 ····· 33

Ⅴ. 참고문헌 ····· 35

Ⅵ. 국문초록 ····· 40

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

표 목 차

Table 1. Bacteria strains and plasmids used in this study ····· 10

Table 2. Primers used in this study ····· 11

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

도 목 차

Figure 1. Fluorescence expression of $_p$*spy-gfp* transcription fusion during spheroplast formation. ……13

Figure 2. Induction of $_p$*spy-gfp* expression in H_2O_2- and GSNO- producing cultures. ……15

Figure 3. Induction of $_p$*spy-gfp* expression by treatment of polymyxin B and 4% EtOH. …… 17

Figure 4. Construction of *spy* mutation in *S.* Typhimurium chromosome. ……22

Figure 5. Susceptibilities of *S.* Typhimurium strains to GSNO and hydrogenperoxide. …… 25

Figure 6. Survival rate under polymyxin B of *S.* Typhimurium. ……26

Figure 7. *Spy* promotes of *S.* Typhimurium the invasion rate to Hela cell. …… 28

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 8. Spy is required for invasion and survival of macrophage. ····· 30

Figure 9. Spy is required for *S.* Typhimurium virulence in mice. ·····32

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

The role of Spy (spheroplast protein y) in the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Lee, Hwa-Jeong

Advisor : Prof. Bang, Iel-Soo, PhD

Department of Dental Bioengineering,

Graduate School of Chosun University

Bacterial secretion of proteins into the extracytoplasmic spaces is an essential process for bacterial metabolism in interactions with external environments including host cells during bacterial pathogenesis in host animals. In bacterial maintaining protein homeostasis in extracytoplasmic spaces, molecular chaperon proteins can prevent misfolding of extracytoplasmic proteins from a variety of stresses originated from external environments or from the internal bacterial metabolism. Spheroplast protein y(*Spy*) is known as a chaperone function protein expressed and localized in the periplasm of *Escherichia coli* during spheroplast formation or when exposed to protein denaturing conditions. And structural studies about Spy have predicted that it may assist proper folding of a broad range of proteins in bacterial periplasm.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

However, the physiological relevance of Spy in bacterial pathogenesis has been unexplored. In this study, I show that Spy is required for the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. A *spy* null mutant *S.* Typhimurium showed the reduced invasion into Hela epithelial cells, the impaired replication inside RAW264.7, and the attenuation of virulence in mice. In addition to spheroplast sensing, *spy* transcription was induced when *S.* Typhimurium was exposed to hydrogen peroxide, nitric oxide, and antimicrobial peptide that can be produced by macrophages. The induction of *spy* transcription in *S.* Typhimurium was dependent on regulator proteins for envelope stress responses, BaeR and CpxR. In addition to recapitulate previously observed phenotypes, this study has extended the role of Spy as an essential protein for *S.* Typhimurium pathogenesis, and the conservation in genomes of most enteric bacteria. There findings suggest that Spy may principally contribute to extracytoplasmic fitness of enterobacteria in animal hosts.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅰ. 서론

*Salmonella enterica*는 병원성 장내세균의 일종으로 사람과 동물에 병원성을 나타내어 주로 장 관계와 관련 되어 있는 살모넬라증을 일으키게 된다[1]. 우리 주변에서 *Salmonella*는 흔히 달걀 껍질에 많이 묻어있으며, S*almonella*의 균 형태는 간 균 형태로써 그람 음성균 통성혐기성이며, 주모성 편모가 있고 운동성을 가지고 있다. *Salmonella*에 의해 감염된 티푸스증은 인류의 건강에 문제를 일으키며, 개발도상국 에서는 연간 200,000명의 어린이들이 티푸스에 감염되어 사망 하는 것으로 알려져 있다[2]. 많은 혈청 형 (serovar)이 병원균으로 작용하며 Thyi혈청형 (*Salmonella enterica* serovar Typhi)은 사람에게 티푸스증이나 급성위장염, 식중독을 일으키는 데 원인이 되는 대표적인 균으로, 오염된 음식이나 물 또는 직접적으로 *Salmonella*가 서식하고 있는 동물을 접촉했을 때 발생 된다[3].

Salmonella가 숙주에 감염이 되면 그 숙주는 여러 가지 항 세균 메커니즘을 일으키는데 그 중 하나가 대식세포가 식세포 작용을 일으켜 *Salmonella*를 포식하고, 여러 종류의 항 세균 성분을 생산 한다[4, 5]. 대식세포에 *Salmonella*가 포식될 경우 대식세포에서는 활성 질소종(reactive nitrogen species: RNS)이나 활성 산소종 (reactive oxygen species: ROS) 또는 항 세균 펩타이드등이 생산되는데 이것들은 *S.* Typhimurium의 생존을 억제한다[4, 6]. 활성 산소종은 phagosome 막에 위치한 NADPH oxidase (PhoX) 가 생산 하는 superoxide (O_2^-), 활성 질소종은 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 가 생산하는 nitric oxide (NO) 에 의해 생화학적으로 생성된다[3, 7]. 하지만, 대식 세포에 포식된 *Salmonella*는 대식세포 내 환경 신호를 인지하여 자신을 보호 할 수 있는 보호체계를 갖고 있다. 이들은 대부분 *Salmonella* pathogenicity island(SPI)-1,

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Salmonella pathogenicity island(SPI)-2에 의해서 만들어 지는데 이것은 *Salmonella*의 효과단백질이 세균표면에 분비되어 작동하기 때문이다. 숙주동물세포에 감염 동안 이들 분비 단백질은 영양소 습득, 에너지 생산, 유해물질의 해독, 신호 전달 및 숙주세포와 상호작용하여 세포의 대사 변화에 작용 할 수 있다.

숙주 면역체계는 다양한 항 미생물 성분을 분비하여 그 성분들이 세균 단백질의 구조를 손상시킨다. 대부분의 세균들은 단백질의 활성을 복구할 수 있는 chaperone 기능의 단백질들을 생산하는데, 단백질이 스트레스에 노출되면 그 발현이 크게 증가하여[8, 9], 세균 병원성 발현에 중요한 역할을 한다[10]. Chaperone은 단백질의 접힘과 접히지 않음을 조절하는 거대분자이다. 특히 chaperone 단백질들은 세균 세포 외부 혹은 숙주 세포내로 다양한 병원성 효과단백질(effector protein)을 분비하는 과정을 돕는다[11]. 따라서 그람 음성균의 세포질 외부(extracytoplasm)로 분비되고 발현되는 단백질들은 병독성 세균의 병원성 발현에 필수적인데, 세균은 세포질 외부에 노출되는 다양한 스트레스에 적응하기 위해서 필요 단백질들의 발현과 분비는 항상성을 유지할 수 있는 체계를 갖추고 있는 것으로 알려졌다[9]. 이 필요 단백질들의 구조적 안정성을 위해 많은 chaperone 단백질들이 참여된다. Cytoplast에서 분비된 단백질 들은 SurA, DegP, FkpA, LolA등 chaperone 단백질이 outmembrane에 위치시키고 다른 peripasm chaperone은 분비된 단백질의 적절한 접힘을 촉매한다[12]. 세균 병원성 발병에 chaperone의 역할이 알려졌는데 최근 여러 스트레스에 의해 유도되는 HdeA와 HdeB chaperone 단백질들이 있다[13].

Spheroplasts protein Y (spy)는 138개 아미노산을 가진 작은 세포질 chaperone으로, Spy단백질의 존재는 대장균(*Escherichia coli*)이 다양한 자극에 의해 spheroplast가 형성할 때 세포질에는 존재하지 않고 오직 주변 세포질 공간

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

내(periplasm space)에서만 위치하는 단백질로 알려져 있다[14]. Spy는 two-component regulator (TCR)인 CpxAR과 BaeSR 그리고 Rcs에 의해 조절된다[15, 16].Spheroplasting stress나 extracytoplasmic toxicity 등 특성화된 물질 자극은 *spy*의 발현에 원인이 되며, 이러한 물질적 자극으로 인해 *spy*의 발현을 식별할 수 있다[17]. 생화학적 분석으로는 *spy*가 단백질 응집을 방지하고, 단백질 접힘을 촉진하는 것으로 알려졌다[18]. *spy*는 Cpx regulon의 구성원 중에 하나인 *E.coli*의 alkali-inducibleprotein CpxP와 유사하고[19], CpxP와 아미노산 서열이 30% 동일하다. *spy*는 α-helix 이량체 구조로써, 구조적으로 유연성을 지니고 있기 때문에 접혀지지 않은 형태로 여러 폴리펩티드의 다양한 상호작용을 가능하게 한다[16, 18].

*E.coli*를 대상으로 한 연구에서는 *spy*의 발현이 CpxR과 BaeSR이 필요로 한다는 사실이 알려졌는데, CpxR은 세균 외막 (envelope) 스트레스을 받았을 때 활성화되는 시스템이고 BaeSR은 금속이온스트레스에 반응하는 세균 외막 항상성 조절 시스템이다[20, 21]. *spy*의 발현이 BaeSR 및 CpxRA에 의존한다는 사실은 *spy*가 주변세포질에 위치해 있는 것을 발견한 것과 함께 *spy*의 기능이 외막에 스트레스를 받음으로 인해 주변세포질 항상성에 기여할 수 있다고 판단된다. 최근에 발견된 Spy의 기능은 세포질 외부 단백질의 구조 안정화에 기여한다고 알려졌으며, 기존에 알려진 세균 주변 세포질 chaperone 단백질들과 함께 세균이 생존하기 위해 세포질 외부 분비 단백질들의 중요성을 보여준다[18].

본 연구에서는 활성 산소 및 활성 질소 종들에 대한 세균의 내성에서 *spy*의 역할과 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *Salmonella*에서 병원성 발병에 extracytoplasm에 존재하는 Spy (spheroplasts protein Y)단백질의 필요성을 조사하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅱ. 실험 및 재료방법

1. 사용균주 및 배양조건

본 연구에서는 쥐에서 장티푸스를 일으키는 야생형균주인 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14082S을 사용하였다. 이 실험에 사용된 plasmid와 돌연변이주는 Table 1에 정리하였다. 균주를 배양하는 배지로는 Luria-Bertani (LB) 영양 배지와 0.2% glucose를 포함하는 E최소배지(1.66 mM $MgSO_4$, 9.5 mM citricacidmonohydrate, 57 mM K_2HPO_4, 16.7 mM $NaNH_3PO_4$)를 사용하였다. 사용한 모든 균주는 37℃, 220 rpm 조건의 진탕 배양기에서 배양하여 사용하였으며 chloramphenicol (50 μg/ml; CM), kanamycin (50 μg/ml; KM)을 배지에 넣어 사용하였다.

2. *S.* Typhimurium *spy* 결손 돌연변이주 제조

*Salmonella*에서 spy 유전자 결손 돌연변이주 제작은 Datsenko와 Wanner[22]의 방법을 이용하였다. 60 mer의 primer (Table 2) 들을 이용하여 chloramphenicol cassette를 가지는 유전자 pKD3 plasmid을 주형으로 이용하여 Flp reconition targer (FRT)-flanked를 포함한 부분을 PCR을 통해 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물에 제한효소인 *Dpn* I 을 처리하고 λ-Red 재조합효소(pTP223)을 발현시킨 균주에 형질전환 시킨 후 chloramphenicol를 포함한 배지에서 target 유전자에 항생제 저항 site을 가지고 있는 군락을 선별하였다. 선별한 군락은 P22를 이용해 파아지를 제작하고 야생형 균주(14028S)에 형질도입을 하였다. 각각의 돌연변이주는 primer을 이용하여 PCR을 수행하여 chloramphenicol cassette의 삽입을 확인 하여 최종 선별하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. *spy* clone 제작

spy clone (850 bp)을 만들기 위해 PCR 증폭을 통해 원하는 유전자 산물을 얻었다. PCR 증폭에 사용된 주형은 *S.* Typhimurium 14028s 염색체를 사용하였고, 프라이머는 14028s 전체 서열에서 spy 촉진유전자(promotor) 부분에 제한효소 *Sac*1과 *Xba*1을 붙여 *spy* linker *Sac*1 FW와 *spy* linker *Xba*1 REV을 사용하였다(Table. 2). 여기에 i-pfu DNA 중합효소(iNtRON Biotechnology Inc, Korea)를 이용해 PCR 증폭을 시켰다. 증폭된 PCR산물은 PCR정제 키트(GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Korea)를 이용해 정제한 후, 클로닝을 위해 제한효소는 primer 부분에 붙인 *Sac*1과 *Xba*1(NEB) 처리하여 산물을 얻었고 gel 정제키트(GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Korea)를 이용해 정제하였다. 정제된 산물은 *Sac*1과 *Xba*1(NEB)으로 처리한 pBAD30 에 결찰시켜 *E.coli* DH10β에 형질전환시켰다. 군락을 분리해 LB배지에 하루 동안 키운 후 plasmid를 분리했다. 순수분리 한 plasmid에 *Bam*H1과 *Xba*1을 처리해 spy gfp 클론(850bp)을 최종 확인했다.

4. 원형질체 (spheroplast) 형성 조건

LB 영양배지에서 하룻밤 배양한 균주를 LB 액체배지에 4:1로 접종하여 37℃ 배양기에서 $O.D_{600nm}$=0.8이 될 때까지 배양한 뒤 25℃ 5,000rpm 에서 20분 원심분리하여 상층액을 버리고 1 M Tris-HCl (pH8.0)을 0.01M로 희석시켜 같은 용량으로 첨가하여 한번 헹궈 주었다. 0.5 M sucrose가 포함된 Tris buffer을 접종한 것과 같은 양만큼 넣어 실온에서 5분 반응시킨 후 lysozyme (Sigma) 2 μg/ml을 첨가하여 10 분 반응시킨 후 Tris-buffer를 1:1 비율로 첨가한다. 거기에 1 mM EDTA를 처리하여 4시간 반응 시킨 후 Axioscope A1(Carl zeiss, Germany) 현미경으로 spheroplast가 형성된 것을 관찰 하였다[23].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5. *spy-gfp* transcriptional fusion을 이용한 spy 전사 측정

Spy-gfp clone (360bp)을 만들기 위해 PCR 증폭을 통해 원하는 유전자 산물을 얻었다. PCR증폭에 사용된 주형은 *S.* Typhimurium 14028s 염색체를 사용하였고, 프라이머는 14028s 전체 서열에서 spy 촉진유전자(promotor) 부분에 제한효소 *Sac*1과 *Bam*H1을 붙여 *spy* linker *Sac*1 FW와 *spy* linker *Bam*H1 REV을 사용하였다(Table. 2). 여기에 i-pfu DNA 중합효소 (iNtRON Biotechnology Inc, Korea)를 이용해 PCR 증폭을 시켰다. 증폭된 PCR산물은 PCR정제 키트(Gene All)를 이용해 정제한 후, 클로닝을 위해 제한효소는 primer 부분에 붙인 *Sac*1과 *Bam*H1 (NEB)을 처리하여 산물을 얻었고 gel 정제키트 (GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Korea)를 이용해 정제하였다. 정제된 산물은 *Sac*1과 *Bam*H1(NEB) 이 처리해서 얻은 벡터 pFPV25에 결찰 시켜 DH10β에 형질전환 시켰다. 군락을 분리해 LB배지에 하루 동안 키운 후 plasmid를 분리했다. 순수분리 한 plasmid에 BamH1과 Sac1을 처리해 spy gfp클론(360bp)을 최종 확인했다. $_{p}$*spy-gfp* 발현을 측정 하기 위해 LB 영양배지에서 16hr동안 배양한 후 돌연변이체들을 LB영양배지에 1:1000으로 희석하여 접종하여 37℃에서 배양한 후 대수기인 $O.D_{600nm}$=0.4에서 4% EtOH (Ethanol) 과 Polymyxin B (1 μg/ml)을 처리한 후 추가로 1hr 더 배양하였다. GFP의 exitation maxima는 495 nm이고 emission maxima는 515 nm이다. 균주는 iCHM1.4 (IMT, Canada) 카메라와 Axioscope A1(Carl zeiss, Germany) 현미경으로 BF (Bright-field)와 FITC (Fluorescein isothiocyanate)으로 관찰했다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

6. 세균 성장곡선 측정

LB 영양배지에 하룻밤 배양한 균주를 PBS (phosphate buffer saline; pH7.0)에 $O.D_{600nm}$=1이 되도록 희석시켰다. GSNO (S-Nitrosoglutathione)을 500 μM, 1 mM, 2 mM 과 H_2O_2 (Hydrogen peroxide)는 250 μM, 500 μM, 1 mM 농도별로 포함된 E 최소배지에 OD_{600}=1로 희석한 균주를 $O.D_{600nm}$=0.02 가 되도록 동일한 양을 microplate에 접종하였다. Microplate 를 Bioscreen C Microbiology Microplate reader에서 37℃를 유지하면서 교반 하여 24시간 동안 배양하였고 30분마다 OD_{600}값을 측정하였다.

7. Polymyxin B 에 대한 민감성 측정

N-minimal media (5 mM KCl, 7.5 mM $(NH_4)_2SO_4$,0.5 mM K_2SO_4, 1 mM KH_2PO_4,0.1 mM Tris-HCl pH 7.4,0.1 mM $MgCl_2$, 0.2% glucose 0.1% Casamino acids)에 하룻밤 배양하고, $O.D_{600nm}$=0.5로 맞춘 다음, N-minimal Media(-$MgCl_2$)로 한번 헹구어 주고 N-minimal media에 1:100으로 접종하여 3시간 더 배양해준다. 3시간 후에 polymyxin B를 2.5 μg/ml 1시간 처리한다. 96well-plate에 PBS로 희석하여 agar plate에 plating하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

8. Hela cell에 대한 *Salmonella*의 침입율 측정

Hela cell를 10% FBS (Fetal bovine serum)가 포함된 RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT)에서 37℃ 5% CO_2 배양기에서 배양시켰다. Hemocytometer를 이용하여 세포 수를 세어 24-well cell culture plate (SPL LIFE SCIENCES)에 $2X10^5$으로 seeding하여 배양하였다. LB배지에서 하룻밤 배양한 균주를 MOI (Multiplicity of infection) 25 ($5X10^6$/well)로 Hela cell에 37℃ 5% CO_2 배양기에서 30분 감염시켰다. 30분 후 gentamycin(10 μg/ml)을 포함한 RPMI 1640 배지를 사용하여 배지를 교환해주고 1시간 후에 1% Triton X-100을 처리하여 LB agar plate에 20 μl식 떨어뜨려 CFU (colony forming units)을 측정하였다.

9. 대식세포 내 *Salmonella* 생존율 측정

대식세포인 Raw 264.7 cell (ATCC TIB-7)을 10% FBS (Fetal bovine serum)가 포함된 RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT)에서 37℃ 5% CO_2 조건에서 배양시켰다. Hemocytometer를 이용하여 수를 세어 24-well cell culture plate (SPL LIFE SCIENCES) 에 1 X 10^5으로 seeding하였다. LB영양배지에서 하룻밤 배양한 균주를 LB 영양배지에 1:100으로 접종하여 배양기에서 4시간 키운 후 정지기에 들어선 균주를 $O.D_{600nm}$=1이 되도록 PBS로 희석하여 MOI (Multiplicity of infection) 10 이 되게 Raw 264.7 cell 에 30분 감염시켰다. 30분 후 gentamycin (10 μg/ml)을 포함한 RPMI 1640 배지를 사용하여 배지를 교환해주고 30분 (0시간), 18시간 후에 PBS에 희석시킨 0.05% Triton X-100을 처리 하고 LB agar plate에 20 μl식 떨어뜨려 CFU (colony forming units)를 측정하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

10. 생쥐에 대한 *Salmonella* 병독성 측정

생쥐(C57BL/6)에 *S.* Typhimurium을 접종 하였다. 입에 주사 접종을 위해 세균은 LB영양배지에 하룻밤 배양하고 PBS로 희석하여 구강을 통해 주사하여 15일간 쥐의 생존을 관찰 하였다. 병든 쥐는 안락사 시켰고, 10 마리씩 두 번 실험을 반복 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. Bacteria strains and plasmids used in this study

	Genotype	Source
Strains		
IB1	*Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s	ATCC
IB3	△*hmp*::KM	[24]
IB1006	△*rpoS*::Tn10dCm	[25]
IB1026	△*spy* :: CM	This study
FB127	pTP223	[22]
Plasmid		
pKD3	*cat* cassette	[22]
pFPV25	gfp fusion vector	[26]
$_p$*spy-gfp*	*spy* promotor-gfp fusion	This study

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. Primers used in this study

Primer name	primer DNA sequence
Spy FW-P1	5-gttgcctcta ccctggcgat gggtgctgcg aatctcgctc gtgtaggctg gagctgcttc -3
spy REV-P1	5-ttccgtcaga cgcttctcaa aattagcgtt atattgcttt catatgaata tcctccttag-3
spy FW	5- ttaatcacga caacacggcg-3
spy REV	5-aggacggcta tagaattct ctg-3
spy linker *Sac*1 FW	5- tatgagctct gctatatcat gctgttgta -3
spy linker *Xba*1 REV	5- tattctagaa ggacggctat aagattctc -3
spy FW linker *Sac*1	5- tatgagctcc tgtaagctca cgttaggat -3
spy REV linker *Bam*H1	5- tatggatcct agaggcaac aaatagagca -3
qRT-PCR	
gyrB FW	5- tgactgccgt gctgctcttt -3
gyrB REV	5- agccaactct gaccgaagcc -3
spy FW	5- gcgcaaatta cgaaaatgga -3
spy REV	5- ccgtcagacg cttctcaaaa -3

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

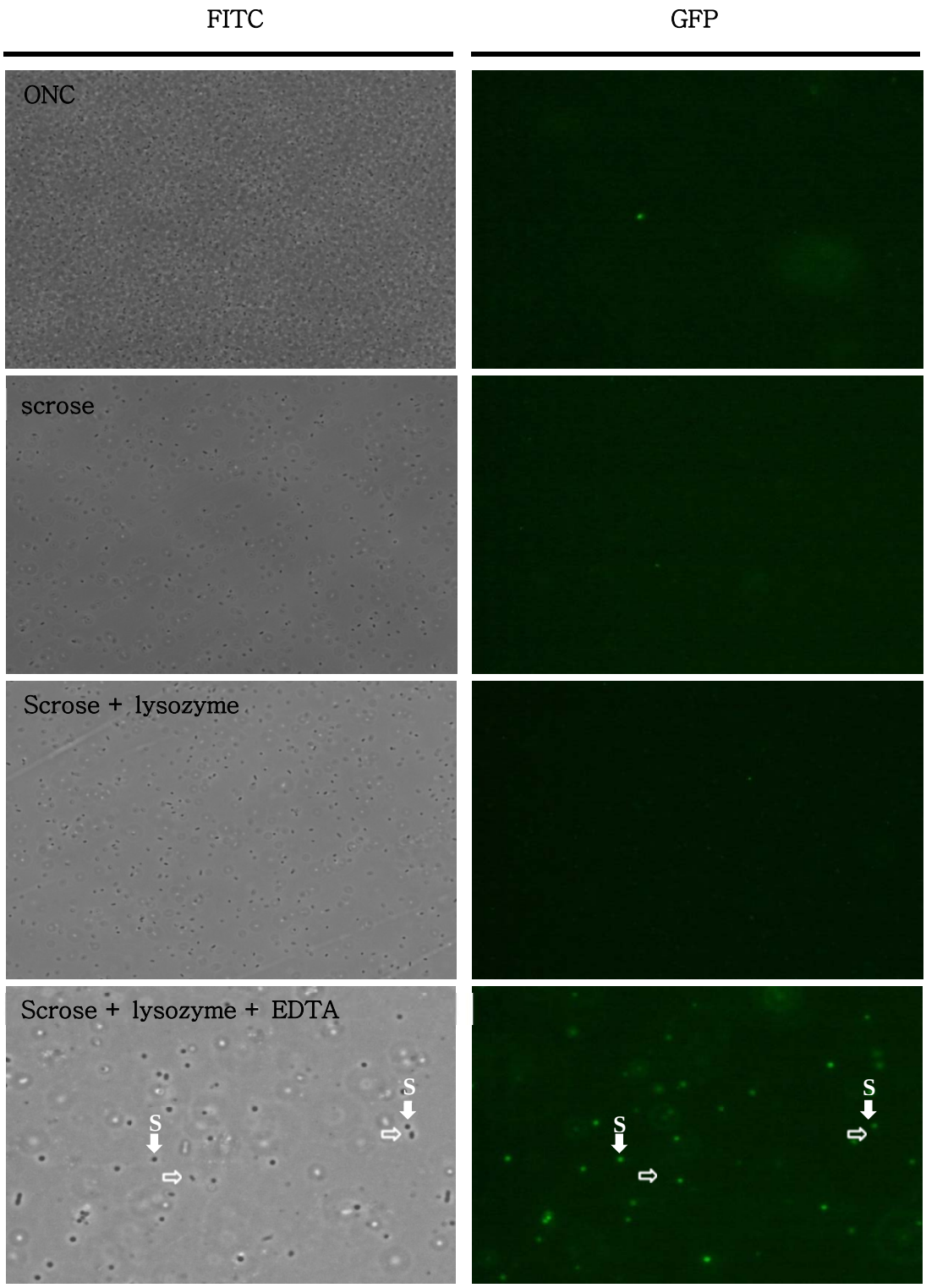
Ⅲ. 결과

1. *S.* Typhimurium의 *spy* 전사는 다양한 스트레스에 반응하여 유도된다.

*Spy*가 *E.coli*에서 spheroplasts을 형성할 때 많이 발현이 된다고 알려져 있다[14]. 그렇다면 *Salmonlla*에서도 spheroplast를 형성할 때 *spy*의 발현이 되는지 확인하기 위해 야생형 균주에 $_p$*spy*-gfp을 형질전환시켜 GFP의 발현을 확인 하였다(Fig. 1). Spheroplast는 sucrose와 lysozyme을 처리하였을 경우에는 형성이 안되고, sucrose, lysozyme, EDTA를 모두 처리하였을 때 spheroplast가 형성이 되는 것을 확인 하였고, WT/$_p$*spy-gfp* 의 경우 spheroplast을 형성한 균주에서만 발현이 되는 것을 확인 하였다. 이 결과는 *salmonella*에서도 spheroplast가 형성 될 때 *spy* transcription이 발현됨을 보여준다. 그렇다면 WT/$_p$*spy-gfp*의 발현을 확인하기 위해 다양한 스트레스를 주었다(Fig. 2). LB 영양 배지에서 하룻밤 배양한 균주를 PBS에 GSNO (S -Nitrosoglutathione) 1 mM, H_2O_2 (hydrogen peroxide) 500 μM, 약 6시간 처리 하였다. GSNO처리하였을 경우 아무것도 처리하지 않은 대조군 보다는 조금 발현이 되었고, H_2O_2는 대조군에 비해 발현이 많이 되는 것을 확인하였다. 이 결과 다양한 스트레스를 주었을 때 *spy*가 발현이 되는 것을 알 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 1. Fluorescence expression of $_{p}$*spy-gfp* transcription fusion during spheroplast formation.

WT/$_{p}$*spy-gfp* cultured aerobically for 16hr at 37℃ in LB broth. cell into 4ml of Fresh LB broth 16 ml incubation with shaking(O.D$_{600nm}$=0.8). At given times of incubation, culture were harvested by centrifugation at room temperature, washed once with an equal volume of 0.01M tris (hydroxymethyl) amino-methane (Tris)-chloride (pH8.0), and suspended to a final cell density of approximately 5X10^{8} cells permilliliter in the same buffer supplemented to contain 0.5M sucrose. To prepare lysozyme spheroplasts, lysozyme (sigma chemical Co., St. Louis, Mo.) was added to a concentration of 20 μg/ml; in the cells were incubated at room temperature for 10 min, and diluted 1:1 with Tris buffer. For preparation of EDTA-lysozyme spheroplasts, EDTA to a final concentration of 10^{-3} M was added to lysozyme spheroplast suspensions. Formation of spheroplasts was complete within 15min as determined by Axioscope A1 Fluorescence Microscopy[23].

(ONC : overnight cell, compacted arrow : spheroplast, hellowed arrow : rod)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

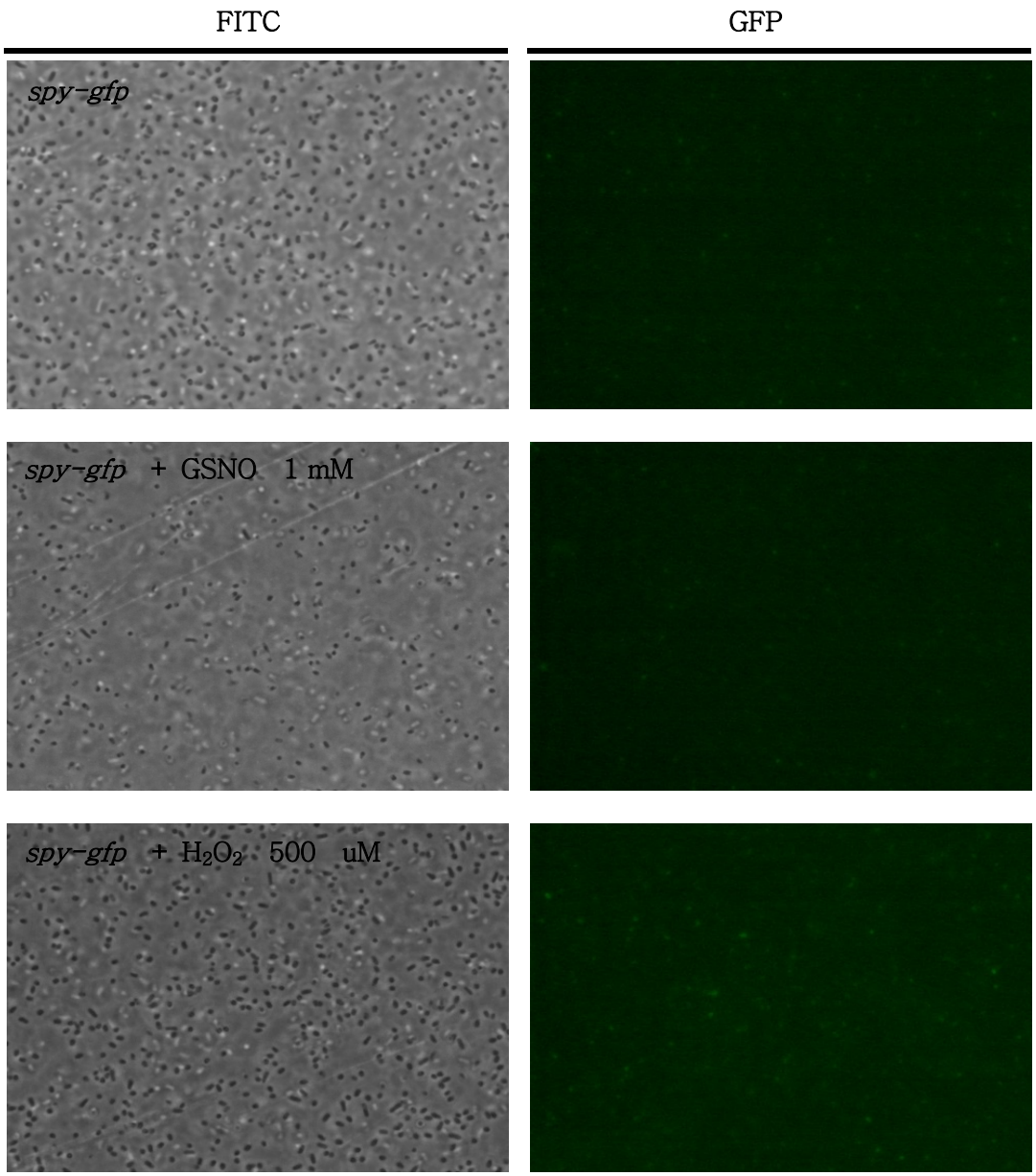


Figure 2. Induction of $_p$*spy-gfp* expression in H_2O_2- and GSNO- producing cultures. Cell were overnight cultured in LB broth. Washed of 1 X PBS and treated with GSNO (S-Nitrosoglutathione) and H_2O_2 (hydrogen peroxide), respectively, for approximately 6hr. spy induction is determined by Axioscope A1 Fluorescence Microscopy.

Collection @ chosun

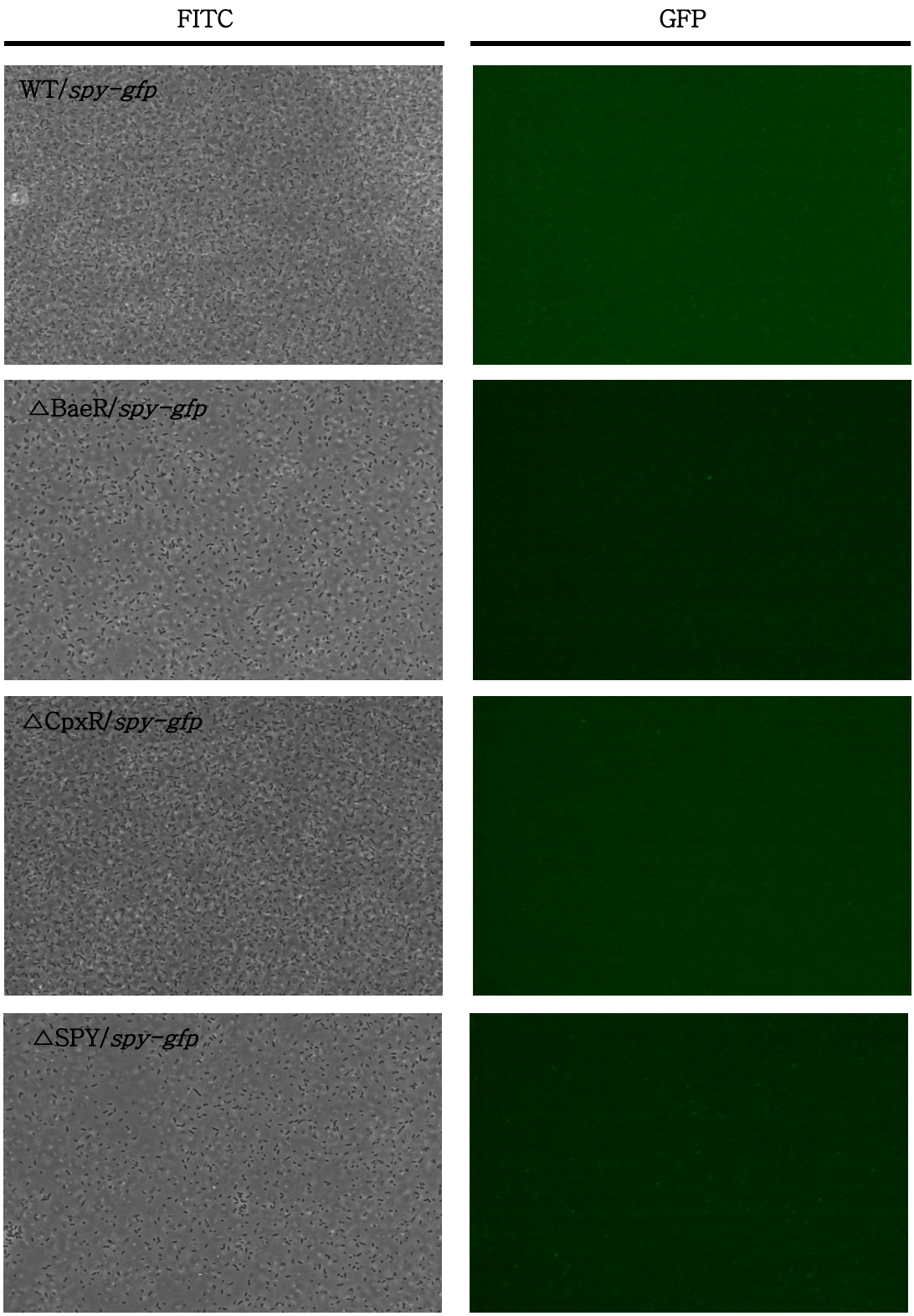
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 세균 외막 stress에 대한 *spy*가 발현된다.

세균 외막 stress에 *spy*발현이 유도 되는지 확인하기 위해 첫 번째로 4% EtOH 를 처리하였고, 두 번째로는 항 세균 펩타이드의 polymyxin B (1 μg/ml)를 각각 처리하여 관찰 하였다(Fig. 3). Fig. 3 에서 LB영양배지에 접종하여 대수기에서 stress을 주지 않은 WT/$_{p}$*spy-gfp*균주에서는 spy발현이 되지 않음을 확인하였고, polymyxin B 와 4% EtOH를 처리하였을 경우에는 WT/$_{p}$*spy-gfp*가 발현이 되는 것을 확인 하였다. 서론에서 기술한 바와 같이 Spy는 BaeSR, CpxRA에 의해 조절되는데 그렇다면 *salmonella*에서 CpxR과 BaeR이 돌연 변이된 균주에서 WT/$_{p}$*spygfp*가 발현이 되는지 확인 하였는데 CpxR과 BaeR이 결손 된 돌연변이 균주에서는 stress을 주어도 발현되지 않음을 확인 하였다. 이 결과 항 세균 펩타이드 polymyxin B과 4% EtOH를 처리하였을 경우 membrane에 stress에 의해 *spy gfp*가 발현이 되고, 이것은 CpxR과 BaeR에 의존하여 발현되는 것을 알 수 있었다.

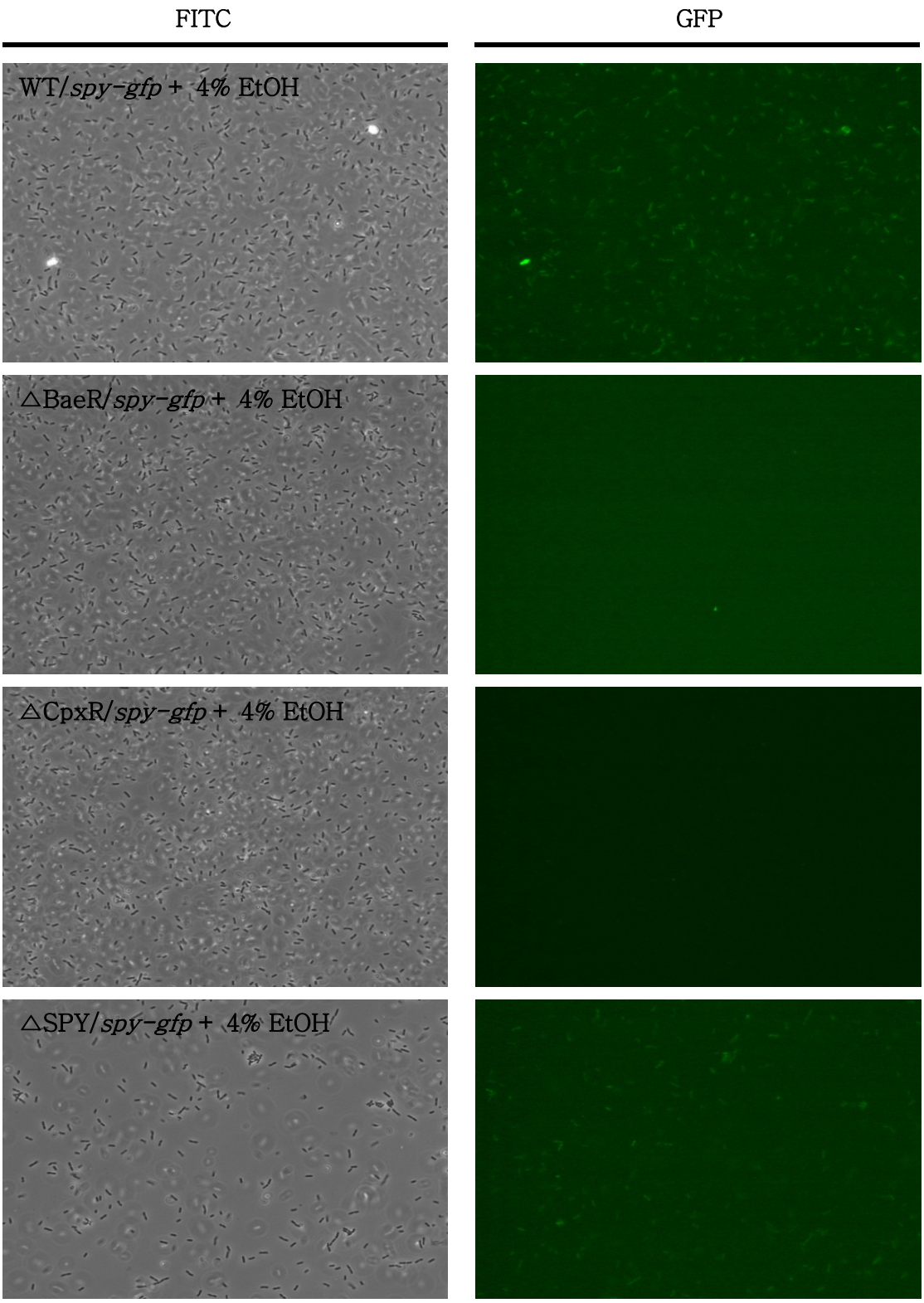
Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



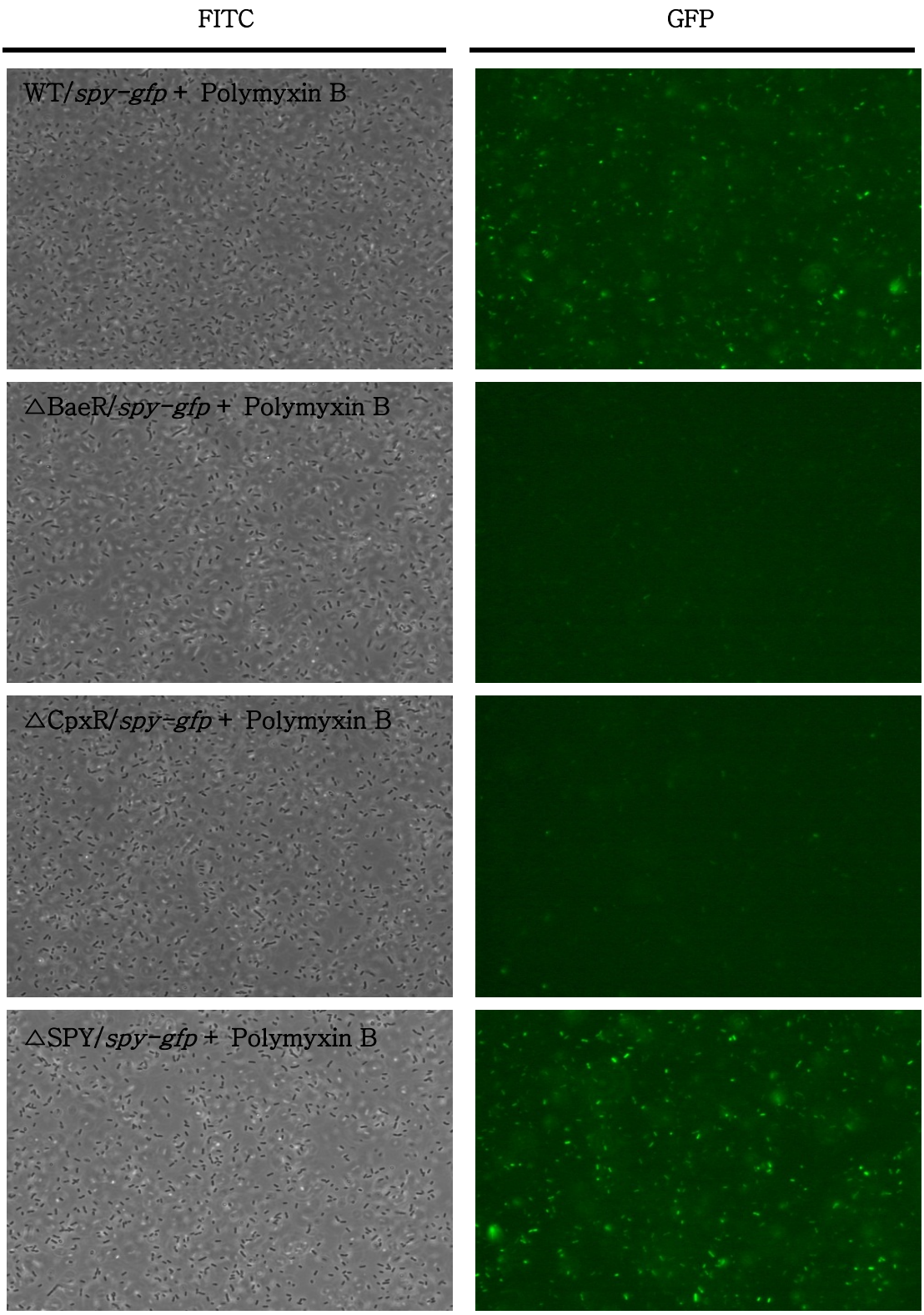
Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 3. Induction of $_{p}$*spy-gfp* expression by treatment of polymyxin B and 4% EtOH.

WT/$_{p}$*spy-gfp* strain were cultured to log phase (O.D_{600nm}=0.4) in the LB broth, and then treated with 4% EtOH or Polymyxin B (1 μg/ml) for 1hour at 37℃, Bacterial cells were observed with Axioscope A1 Fluorescence Microscopy.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. *Spy* 돌연변이주를 제조하였다.

*Salmonella*에서 *spy*의 기능을 조사 하기위해 *spy* 결손 돌연변이 주 를 제조하였다. *Salmonella*균 염색체에서 *spy* 유전자는 1388541번째 염기부터 1389042번째 염기까지 501 bp의 염기를 가진다. 파아지λ Red recombinase를 이용한 단일 단계 유전자 돌연변이 방법을 사용하여, *spy* 유전자를 결손 시켜 *spy* 유전자의 N-말단 부위 300 bp가 결손 되고 그 자리에 약 1 kbp 크기의 chloramphenicol cassette를 삽입하였다(Fig. 4B). 삽입된 항생제 저항성 유전자를 확인하기 위해 *spy* 유전자를 포함하는 외부 DNA primer (Table1)를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR결과, 그 크기가 야생형균주는 850 bp이며 *spy*결손 돌연변이 주는 약 1.6 kb의 PCR 산물을 생산하는 것을 확인하였다(Fig. 4A). 이 결과는 *spy*가 결핍된 *Salmonella* 돌연변이주가 정상적으로 만들어졌음을 보여준다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

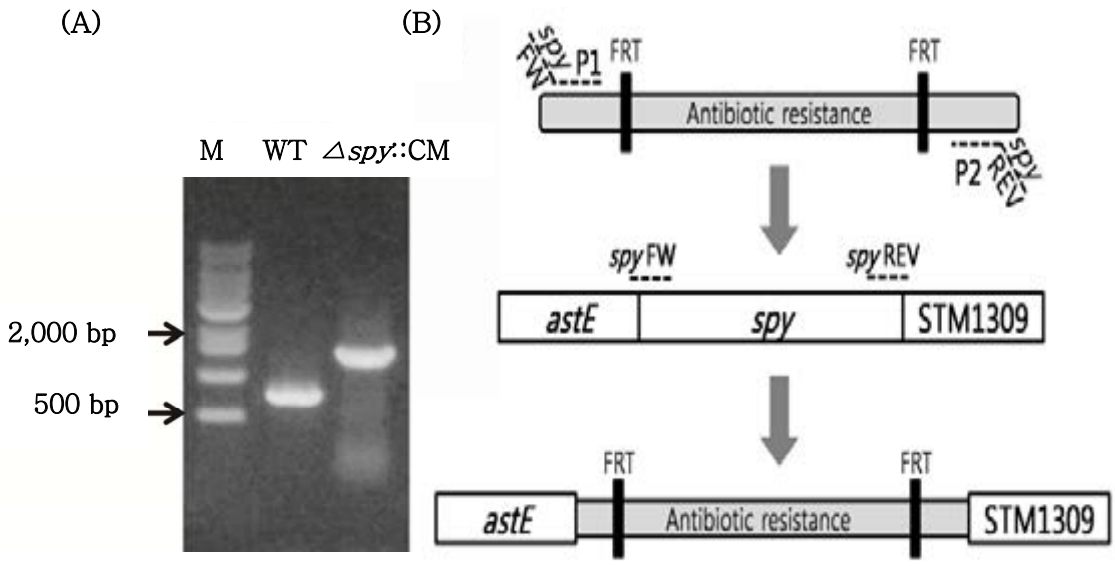


Figure 4. Construction of *spy* mutation in *S.* Typhimurium chromosome.

(A) PCR products were obtained after PCR reaction with chromosomal DNA from WT and spy mutant using DNA oligomers as described in Materials and Method. The representative result was visualized after PCR products were electrophoresed in an 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. M; a molecular size marker. (B) The strategy used for the construction of spy mutation. P1 and P2 refer to priming sites for PCR to obtain DNA product containing antibiotic cassette and FRT (FLP recombinase recognition target). The figure was modified from the paper of [19].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. *Salmonella*의 외부 스트레스 내성에서 Spy의 역할이 필요하다.

*Salmonella*가 병독성을 일으키기 위해서는 대식세포 내 생존이 필수 적이다. 세균 주변 세포질 내 공간에 존재하는 많은 단백질들의 안정화에 도움이 될 것으로 예상되는 단백질인 *spy*가 대식세포 내 대표적 항 세균 성분인 활성 산소종과 활성 질소종 및 항 세균 펩타이드 에 대한 내성에 어느 정도의 역할을 하는지*spy* 결손 돌연변이주의 활성 산소/질소 종들에 대한 감수성을 확인하였다(Fig. 5). 활성 질소 종에 대한 *spy* 결손 돌연변이주의 성장률을 확인하기 위해 E 최소배지(0.2% glucose)에 GSNO를 농도 별로 처리하여 성장곡선을 측정하였다. 활성 질소종의 경우, 실험 대조군으로 세균 내부 산화질소를 대부분 해독하는 효소인 Flavohemoglobin Hmp가 결핍된 돌연변이주를 사용하였다. Hmp가 결여된 *hmp* 돌연변이주의 경우 NO를 해독하지 못하므로 GSNO가 첨가된 배지에서 성장이 억제되는 것을 확인 하였다. *spy* 돌연변이주의 경우 야생형균주과 비교하였을 때 대수기에서 정지기로 들어가는 시간이 한 시간 가량 지연되는 것으로 보아 GSNO에 비교적 민감한 것으로 볼 수 있다(Fig. 5A). 활성 산소종에 대한 성장률을 확인하기 위해 LB 영양배지에 H_2O_2를 농도 별로 첨가하여 성장 곡선을 측정하였다. 활성 질소종에 대한 실험 대조군으로는*salmonella*의 활성 산소종에 대한 내성과 관련된 것으로 확인된 시그마인자인 RpoS가 결여된 *rpoS*유전자 돌연변이주를 사용하였다. RpoS는 superoxide dismutase 및 catalse등의 효소 유전자 발현을 활성화시킨다[27]. 야생형균주에 비해 *rpoS* 돌연변이주의 경우 적은 농도의 H_2O_2에도 성장이 제한되는 것을 볼 수 있으나, *spy*돌연변이주는야생형균주와 비교하였을 때 그

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

성장률이 같은 것으로 확인되어, *spy* 돌연변이 주의 활성 산소종에 대한 민감성은 거의 없는 것으로 확인 되었다(Fig. 5B).

Fig. 4에서 *spy*발현이 항 세균 펩타이드 Polymyxin B에 의해 발현 되는것을 확인하였다. *spy*가 결손 된 돌연변이주 에 항 세균 펩타이드 Polymyxin B를 처리하였다. 실험 대조군으로는 polymyxin B에 민감한 phoP를 사용하였다(Fig. 6).균주는 모두 N-minimal media에서 하룻밤 배양하여 사용하였으며 polymyxin B를 1시간 처리하였다. Polymyxin B에 민감한 phoP는 가장 낮은 성장률을 보였고 *spy* 돌연변이 균주는 야생형균주에 비해 polymyxin B를 처리하면 생존율이 거의 반으로 감소 되고, *spy* 돌연변이 균주에 *spy* clone을 형질전환한 균주에서는 다시 생존율이 증가 되는 것을 확인 하였다. 이 결과는 *spy*의 발현유도가 polymyxin B 저항성에 필요한 것으로 보여 진다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

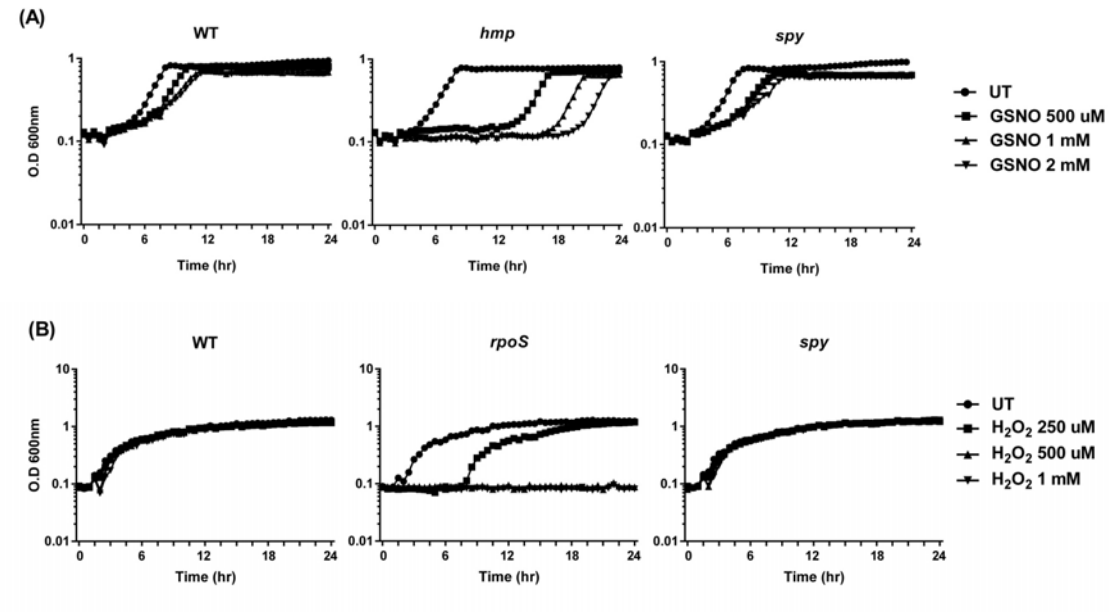


Figure 5. Susceptibilities of *S.* Typhimurium strains to GSNO and hydrogenperoxide.

The growth of *S.* Typhimurium was measured by the Bioscreen C microplate reader observing optical density ($O.D_{600nm}$) of bacterial culture in minimal E media containing 0.2% glucose treated with varying concentrations of GSNO (A) and in the LB media treated with varying concentrations of H_2O_2 (B). A representative out of three independent experiments is shown.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

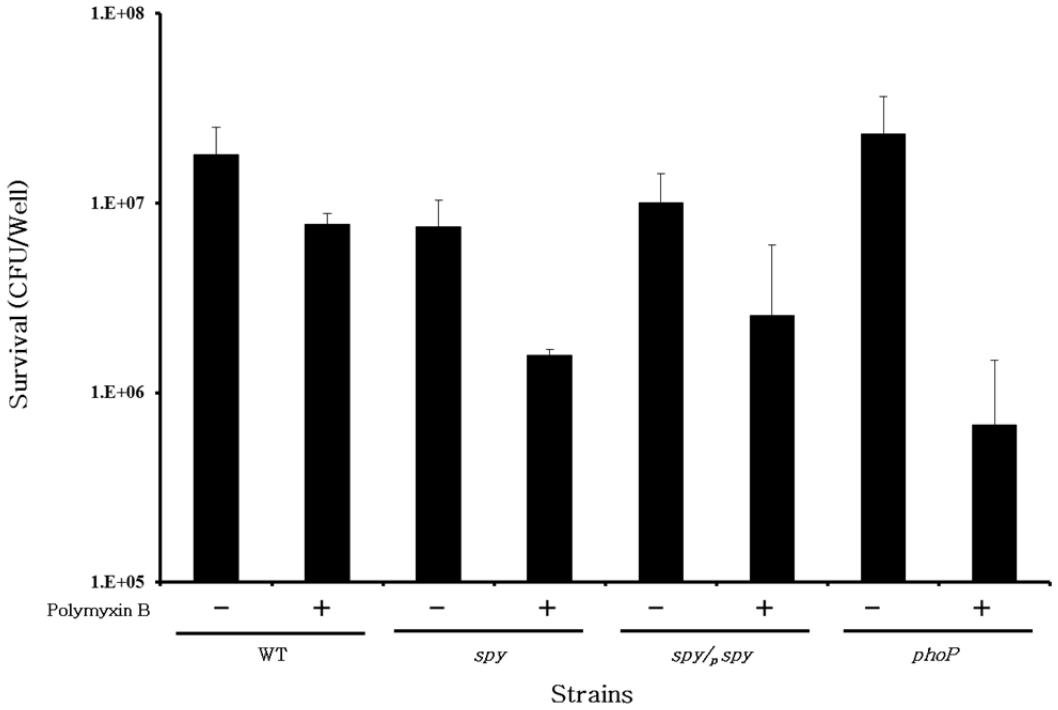


Figure 6. Survival rate under polymyxin B of *S.* Typhimurium.

Overnight-cultured bacteria cell on N-minimal media containing 10 mM $MgCl_2$ were exposed to polymyxin B (2.5 μg/ml) for 4hr (WT, spy, spy/$_p$ spy, phoP). The pH of the medium was buffered with 100 mM Tris-HCl (pH 7.4). Stationary phase cultures were harvested and washed three times in N-minimal medium, and incubated for 3h ant 37℃ with aeration. Approximately 5.0 X 10^4 - 1.0 x 10^5 bacteria from each culture were then inoculated in to N-minimal media containing Polymyxin B and grown further for 1h at 37℃ with aeration. Serial dilutions of each culture were made in PBS and plated on selective agar[28]. The experiment was repeated two times with essentially identical results.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5. *spy*는 Hela cell에 대한 *Salmonella*의 침입율 (invasion rate)을 증가 시킨다.

*Salmonella*의동물세포 침입 능력에 Spy가 영향을 주는지 확인 하기 위해 *Salmonella*가 침입이 잘 되는 상피세포 Hela cell을 사용하여 *spy* 결손 돌연변이주의 침입율을 조사하였다(Fig. 8). 실험 대조군으로 Hela cell에 침입이 안 되는 것으로 알려진 *sipC*를 사용하였다. Hela cell에 *Salmonella*를 침입 시켰을 때 *spy* 결손 돌연변이는 야생형균주와 비교 해 보았을 때 침입율이 조금 감소하는 것을 확인 하였고, *spy* clone을 포함하는 균주의 경우에는 야생형균주 보다 더 Hela cell 에 침입이 잘 되는 것을 확인 하였다. sipC의 경우 예상대로 다른 균주 들에 비해 거의 침입이 안 되는 것을 확인하였다. 이 결과 Hela cell에 *Salmonella* 가 침입되기 위해서는*spy*가 어느 정도는 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

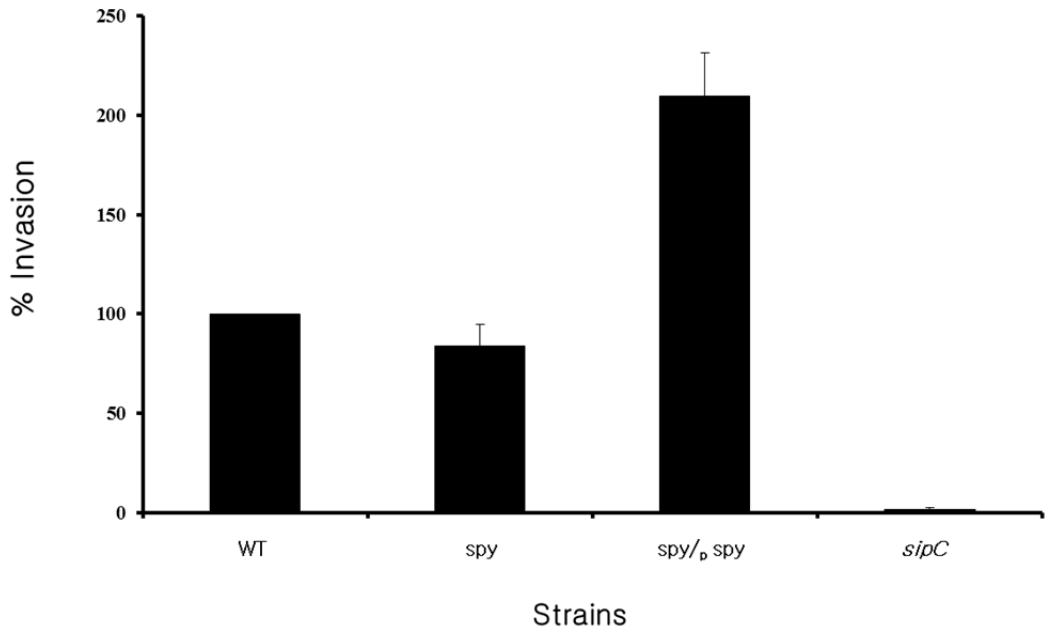


Figure 7. *spy* promotes of the invasion rate *S.* Typhimurium to Hela cell.

Hela cell cultured in FBS containing RPMI1640 media were infected with WT, △*spy* mutant, △*spy*/$_p$*spy*, △*sipC* mutant *S.* Typhimurium strains. Cells were cultured in LB broth. Hela cells were infected with *S.* Typhimurium at MOI (Mutiplicity of infection) 25, 1hour after infection, *Salmonella* cells were isolated by treating with 1% Triton X-100 to Hela cells.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

6. *spy*는 *Salmonella*의 대식세포 내 침입율 및 대식세포내 증식율을 증가시킨다.

S. Typhimurium이 macrophage에 감염 되었을 때 생존하기 위해 spy가 필요한지 알아 보기 위해서 대식세포에 침입시켜 증식율을 조사 하였다(Fig. 7). 대식세포는 Raw 264.7 cell 을 사용 하였고, 대식세포가 활성화 되어 항 세균 성분들이 증가됨으로 대식세포 내 항 세균 성분들을 증가시키기 위해 INF-γ를 사용하였다. 실험 대조군으로는 대식세포 내 생존율이 감소 하는 것으로 알려진 Rpos를 사용하였다. 대식세포에 침입시켰을 때(0시간) 침입율은 야생형균주에 비해 *spy* 돌연변이 균주가 감염이 안되고 18시간 이 후 증식율의 생존능력 또한 야생형균주에 비해 감소 됨을 확인하였다. 이 결과는 *spy*는 *S.* Typhimurium이 macrophage에서 침입하고 생존 하기 위해 필요함을 알 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

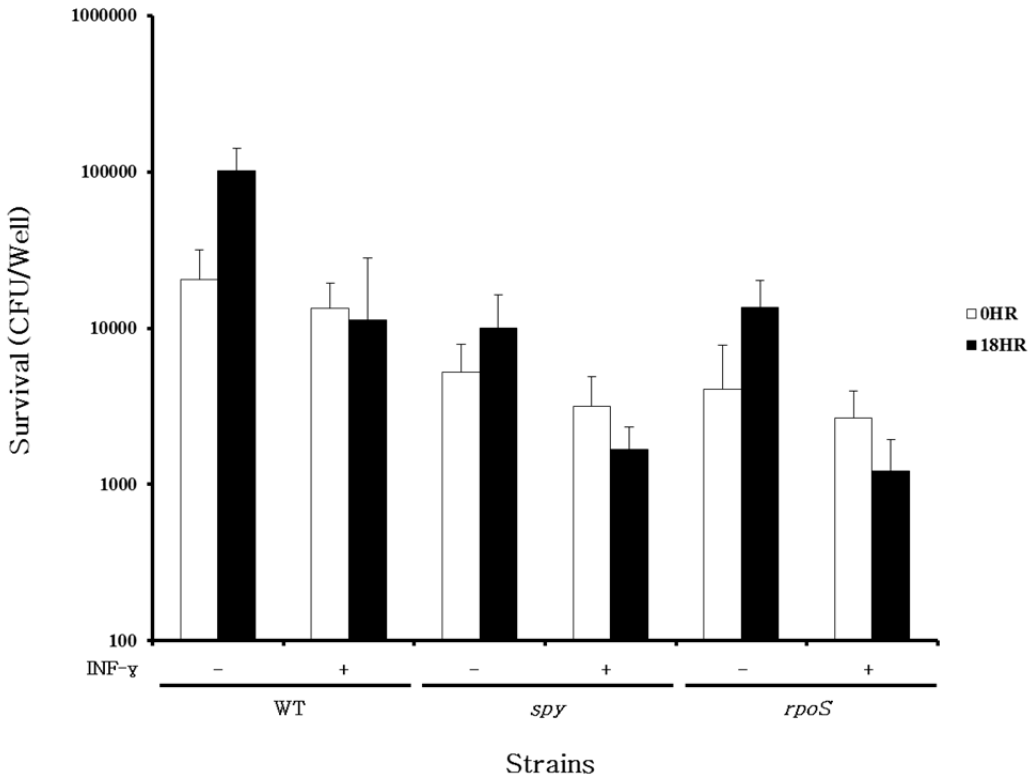


Figure 8. Spy is required for invasion and survival of macrophage.

INF- γ -primed or naïve Raw 264.7 cell cultured in FBS containing RPMI1640 media are infected with WT, △*spy* mutant, △r*poS* mutant *S.* Typhimurium strains. Raw 264.7 cell were infected with *S.* Typhimurium at MOI (Mutiplicity of infection) 10, 18hour after infection, *Salmonella* cells were isolated by treating with 0.05% Triton X-100 to Raw 264.7 cell. The experiment was repeated three times with essentially identical results.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

7. Spy 는 *Salmonella*의 생쥐 병독성에 필요하다.

생쥐(C57BL/6)에 *Salmonella*를 감염 시켰을 때 *spy*가 병독성 발현에 필요한지 조사 하기 위해 생쥐에 *Salmonella*를 감염시켜서 생쥐의 생존율을 확인 하였다(Fig. 9). *Salmonella*감염 15일 동안 관찰 한 결과 야생형균주는 7일 동안에 생쥐 절반이 죽었고, 15일 까지 생존율을 관찰 하였을 때 *spy* 결손 돌연변이주에 감염된 쥐는 모두 생존 한 것을 확인 하였다. 이 결과는 *spy*는 *Salmoenlla*가 생쥐에서 병독성을 발현에 필요함을 보여준다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

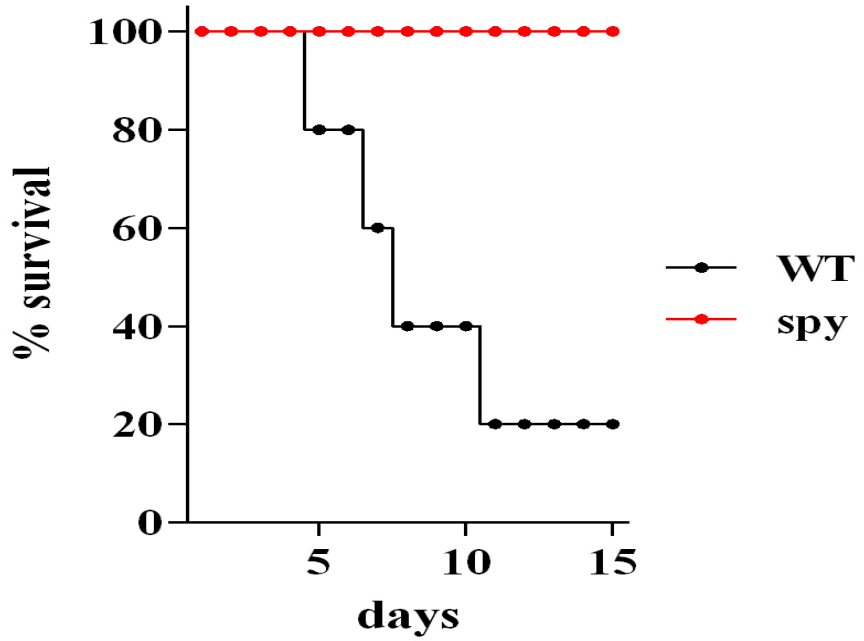


Figure 9. Spy is required for *S.* Typhimurium virulence in mice.

Salmonella cells were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth (Difco). The inoculum was diluted in PBS and injected orally, and mice were observed during 15day. The sick mice were euthanized. In two independent experiments, 10 mice for WT and spy deletion mutant were used, respectively. The representative data were shown.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅳ. 고찰

숙주 동물 내에서 병원성 세균에 병독성은 많은 수의 세포질 외부(extracytoplasm)단백질 분비를 필요로 한다. *Salmonella* 병원성에서 periplasm 내 발현이 유도되는 chaperone단백질 *spy*의 역할을 조사하였다. *Salmonella*균은 활성산소종이나 활성 질소종에 저항성을 가지며 활성 질소종은 많은 세포적 대사과정을 통해서 해독되는데, *Salmonella*의 활성 산소/질소 종에 대한 내성에서*spy*의 결손 효과는 거의 없는 것으로 확인되었다(fig. 5). 다만, 활성 질소종에서 야생형균주에 비교 하였을 때 대수기에서 정지기로 들어가는 시간이 한 시간 가량 지연 되는 것으로 보아 GSNO에 비교적 민감한 것으로 볼 수 있다(fig. 5A). *spy*의 기능이 결손 되어 있는 *spy* 돌연변이주 내의 다른 주변세포질 chaperone들의 역할이 이 스트레스들에 대한 단백질 항상성을 유지하는데 충분하며, 이는 *spy*를 포함하는 chaperone 단백질의 기능적인 과잉 현상일 가능성이 있다. 특히, 세균세포 외막 스트레스에 반응하는 대체 시그마 인자 RpoE의 발현이 활성 산소종에 대한 살모넬라균의 내성에 필수적이고, 이것은 또한 RpoS의 발현에 필요하다고 생각된다[29, 30].

Spy는 *S.* Typhimurium에서 다양한 스트레스에 의해 유도가 되는 것을 *spy* 유전자 promoter를 GFP 유전자와 결합시킨 transcriptional fusion을 제조하여 현미경으로 *spy-gfp*를 확인하였고(Fig. 2), *spy*가 오직 extracytoplam에 존재하기 때문에 그 중에서도 막에 스트레스를 주었을 때 발현이 되고, 혹은 항 미생물 펩타이드 polymyxin B를 처리하면 더 많은 *spy* 유전자 전사가 증가되는 것을 알 수 있었다. 막에 stress을 주는 조건에서도 항 세균 펩타이드 polymyxin B의 경우는 *Salmonella*의 생존율에도 영향을 미친다. 즉, polymyxin B를 처리하면 *spy*가 결손된 돌연변이의 경우에는 야생형균주에 비해 성장을 하지 못하고, *spy* clone의 경우에는 다시 성장율이 증가 된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Salmonella 균의 숙주세포 내 기생능력은 이 세균의 병독성을 결정하는데 아주 중요하며, 특히 장 상피세포를 침입한 후 만나는 대식세포(marcrophage)에 포식된 후, 이 안에서 대식세포가 생산하는 많은 종류의 항생물질에 대해 적응 하거나 혹은 내성을 갖는 능력은 이 세균의 질병 유발능력과 높은 상관관계가 있다[31]. 이 논문에서는 대식세포에 야생형균주와 *spy* 결손 돌연변이를 침입 시켜 생존율을 본 결과(Fig. 7,8) s*py*는 *Salmonella*가 대식세포에 침입하고 생존하기 위해 필요로 하는 것으로 보인다. 이 결과는 *spy* 결손 돌연변이주는 가 대식세포에서 야생형에 비해 성장률을 감소 시키므로 *spy*는 병원성을 나타내는 것으로 확인 하였다. 실제로 마우스에 *salmonella*를 감염시켜 마우스가 *salmonella*증에 감염되었을 때 병독성 유발에 *spy*가 필요로 되어지는지 15일간 관찰 하였다(Fig. 9). 15일간 관찰 한 결과 *spy*가 결손 돌연변이주가 감염된 쥐 에서는 15일 후에도 모두다 생존 하지만, 야생형균주를 감염 시킨 쥐는 7일만에 반절이 병독성을 일으켰고, 15일 후에는 거의 대부분의 쥐가 병독성을 일으켰다. 이 결과 *spy*는 *Salmonella*의 병원성 발현에 중요한 역할을 할 것으로 확인되었다. 이 결과를 통해서 *Salmonella spy*가 병독성 발현에 역할을 하는 것을 확인 하였다. 향후 연구에서 세균 주변세포질 내 chaperone으로 알려진 유전자들과 *spy* 유전자의 중복 돌연변이주들의 표현형을 조사하고, primery cell에 감염시켜*spy* 유전자의 발현을 관찰 해 볼 것이다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅴ. 참고문헌

1. Grassl, G.A. and B.B. Finlay, *Pathogenesis of enteric Salmonella infections.* Curr Opin Gastroenterol, 2008. **24**(1): p. 22-6.

2. Song, J., et al., *A mouse model for the human pathogen Salmonella typhi.* Cell Host Microbe, 2010. **8**(4): p. 369-76.

3. Vazquez-Torres, A. and F.C. Fang, *Oxygen-dependent anti-Salmonella activity of macrophages.* Trends Microbiol, 2001. **9**(1): p. 29-33.

4. Lahiri, A., P. Das, and D. Chakravortty, *The LysR-type transcriptional regulator Hrg counteracts phagocyte oxidative burst and imparts survival advantage to Salmonella enterica serovar Typhimurium.* Microbiology, 2008. **154**(Pt 9): p. 2837-46.

5. Richardson, A.R., et al., *The Base Excision Repair system of Salmonella enterica serovar typhimurium counteracts DNA damage by host nitric oxide.* PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000451.

6. Lahiri, A., P. Das, and D. Chakravortty, *Arginase modulates Salmonella induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophages and is required for Salmonella pathogenesis in mice model of infection.* Microbes Infect, 2008. **10**(10-11): p. 1166-74.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

7. Fang, F.C., *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies.* Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(10): p. 820-32.

8. Ramos, J.L., et al., *Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors.* Curr Opin Microbiol, 2001. **4**(2): p. 166-71.

9. Rowley, G., et al., *Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens.* Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(5): p. 383-94.

10. Henderson, B., E. Allan, and A.R. Coates, *Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection.* Infect Immun, 2006. **74**(7): p. 3693-706.

11. Burkinshaw, B.J. and N.C. Strynadka, *Assembly and structure of the T3SS.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(8): p. 1649-63.

12. Goemans, C., K. Denoncin, and J.F. Collet, *Folding mechanisms of periplasmic proteins.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(8): p. 1517-28.

13. Hong, W., et al., *Chaperone-dependent mechanisms for acid resistance in enteric bacteria.* Trends Microbiol, 2012. **20**(7): p. 328-35.

14. Hagenmaier, S., Y.D. Stierhof, and U. Henning, *A new periplasmic protein of Escherichia coli which is synthesized in spheroplasts but not in intact cells.* J Bacteriol, 1997. **179**(6): p. 2073-6.

15. Bury-Mone, S., et al., *Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in*

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Escherichia coli. PLoS Genet, 2009. **5**(9): p. e1000651.

16. Merdanovic, M., et al., *Protein quality control in the bacterial periplasm.* Annu Rev Microbiol, 2011. **65**: p. 149-68.

17. Garbe, T.R., M. Kobayashi, and H. Yukawa, *Indole-inducible proteins in bacteria suggest membrane and oxidant toxicity.* Arch Microbiol, 2000. **173**(1): p. 78-82.

18. Quan, S., et al., *Genetic selection designed to stabilize proteins uncovers a chaperone called Spy.* Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(3): p. 262-9.

19. Danese, P.N. and T.J. Silhavy, *CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon.* J Bacteriol, 1998. **180**(4): p. 831-9.

20. Raivio, T.L., et al., *Tethering of CpxP to the inner membrane prevents spheroplast induction of the cpx envelope stress response.* Mol Microbiol, 2000. **37**(5): p. 1186-97.

21. Appia-Ayme, C., et al., *ZraP is a periplasmic molecular chaperone and a repressor of the zinc-responsive two-component regulator ZraSR.* Biochem J, 2012. **442**(1): p. 85-93.

22. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6640-5.

23. Birdsell, D.C. and E.H. Cota-Robles, *Production and ultrastructure of lysozyme*

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

and ethylenediaminetetraacetate-lysozyme spheroplasts of Escherichia coli. J Bacteriol, 1967. **93**(1): p. 427-37.

24. Bang, I.S., et al., *Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the salmonella flavohemoglobin hmp.* J Biol Chem, 2006. **281**(38): p. 28039-47.

25. Lee, I.S., et al., *The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent Salmonella typhimurium.* Mol Microbiol, 1995. **17**(1): p. 155-67.

26. Valdivia, R.H. and S. Falkow, *Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of Salmonella typhimurium acid-inducible promoters by differential fluorescence induction.* Mol Microbiol, 1996. **22**(2): p. 367-78.

27. Chiang, S.M. and H.E. Schellhorn, *Regulators of oxidative stress response genes in Escherichia coli and their functional conservation in bacteria.* Arch Biochem Biophys, 2012. **525**(2): p. 161-9.

28. Detweiler, C.S., et al., *virK, somA and rcsC are important for systemic Salmonella enterica serovar Typhimurium infection and cationic peptide resistance.* Mol Microbiol, 2003. **48**(2): p. 385-400.

29. Bang, I.S., et al., *Alternative sigma factor interactions in Salmonella: sigma and sigma promote antioxidant defences by enhancing sigma levels.* Mol Microbiol, 2005. **56**(3): p. 811-23.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

30. Testerman, T.L., et al., *The alternative sigma factor sigmaE controls antioxidant defences required for Salmonella virulence and stationary-phase survival.* Mol Microbiol, 2002. **43**(3): p. 771-82.

31. Hurley, D., et al., *Salmonella-host interactions - modulation of the host innate immune system.* Front Immunol, 2014. **5**: p. 481.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅵ. 국문초록

Salmonella enterica serovar typhimurium의 병원성발현에서 Spy단백질의 역할

이 화 정

조선대학교 대학원

치의생명공학과

지도교수 : 방 일 수

박테리아가 extracytoplasm 공간에 분비하는 단백질들은 숙주 동물 내에서 병원성 세균과 숙주내 외부 환경과 상호작용 하는동안 세균의 신진대사에 필수적인 과정이다. 이때, 박테리아는 세포질외부(extracytoplasm) 공간에서 단백질 항상성을 유지하여야 하는데, 분자 chaperone 단백질들은 외부 환경이나 박테리아 내부 대사 과정으로부터 유래된 다양한 스트레스로부터 세포질 외부 단백질의 안정화에 기여한다. Spy (spheroplast protein y)는 *E.coli* 에서 speroplast 를 형성하는 동안 외막 내막 사이 periplasm 에 위치하고 단백질 변성 조건에 노출 되었을 때 chaperone 기능 단백질로 표현 되는 것으로 알려져 있다. 그리고 *spy* 에 관한 구조적 연구는 박테리아 extracytoplasm 에서 많은 종류의 단백질의 안정적 구조 유지에 일정한 기능을 할 것으로 예상하고 있다. 그러나, 박테리아 병원성에서 *spy* 의 생리적 역할은 아직 알려지지 않고 있다. 본 연구에서는, Spy 가 *salmonella enterica* serovar

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Typhimurium 의 병원성에 필요한 것을 발견 하였다. *spy* 결손 돌연변이 *S.* Typhimurium 은 Hela 상피 세포에 대한 침입능력이 감소되고, Raw 264.7 대식 세포 내부에서 증식률이 감소하였으며, 쥐에서 병독성이 감소되었다. Spheroplast 형성과정 뿐 아니라 *spy* 유전자 전사는 과산화수소, 산화질소 및 대식세포에서 생산될 수 있는 항균펩타이드에 노출 되었을 때 크게 증가하였다. 이러한 spy 전사의 유도는 envelope 스트레스 반응에 대한 조절 단백질인 BaeR, CpxR 에 의존하는 것을 확인 하였다. 이전에 관찰 된 표현형을 되풀이 하는 것 뿐만 아니라 본 연구는 *Salmonella* pathogenesis 를 위해 필수적인 단백질로써 Spy 의 역할을 확장 하였으며, 대부분의 장내세균의 genomes 에서 보존되어 있는 것으로 동물숙주세포 장내세균의 extracytoplasm 단백질 항상성에 기여할 수 있을 것으로 예상된다.

Collection @ chosun