



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](#)

2019 년 2 월

석사학위 논문

**Spy-dependent pathogenic mechanism
identified by comparative secretome
investigation of *Salmonella* Typhimurium**

조선대학교 대학원

치의생명공학과

김 정 성

Spy-dependent pathogenic mechanism identified by comparative secretome investigation of *Salmonella* Typhimurium

Salmonella Typhimurium이 분비하는 단백질체 비교분석을 통
해 확인한 Spy 단백질의 병원성 발현 기전

2019년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

김정성

Spy-dependent pathogenic mechanism identified by comparative secretome investigation of *Salmonella* Typhimurium

Salmonella Typhimurium이 분비하는 단백질체 비교분석을 통
해 확인한 Spy 단백질의 병원성 발현 기전

지도교수 방 일 수

이 논문을 이학 석사학위 신청 논문으로 제출함

2018년 10월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

김 정 성

김정성의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이 성 행 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 태 형 (인)

위 원 조선대학교 교수 방 일 수 (인)

2018 년 11 월

조선대학교 대학원

목 차

목 차.....	i
표 목 차.....	iv
도 목 차.....	v
ABSTRACT	vii
I. 서 론	1
II. 실험 재료 및 방법	5
1. 사용 균주 및 균주 배양조건	5
2. SPI-1, SPI-2 환경에서의 분비 단백질 동정	6
3. Gentamicin protection assay	7
4. Beta-galactosidase assay (β -gal assay)	8
5. SPI-1 환경에서의 이동성 테스트	9
6. RNA 추출과 cDNA 합성 및 qPCR 과 (real-time) RT-PCR.....	9

7. Immunofluorescence microscopy.....	11
8. WT, <i>spy</i> 의 생쥐 독성 테스트.....	12
III. 표.....	13
IV. 결 과.....	17
1. SPI-1 조건에서 <i>spy</i> 돌연변이 균주의 secreteome 분석 결과 WT 에 비해 FljB 는 감소하고 FliC 는 증가하였다.....	17
2. SPI-1 조건에서 <i>spy</i> 돌연변이 균주는 숙주 세포(HeLa Cell)에 대한 침입률에 영향을 주지 않는다.....	20
3. SPI-1 조건에서의 SPI-1 관련 유전자의 전사 수준은 비슷하였다. .	22
4. <i>spy</i> 돌연변이 균주의 Flagellin(FljB, FliC)은 전사 과정에서 조절된다.	24
5. SPI-1 조건에서의 운동성 시험 결과 큰 차이가 보이지 않았다.	26
6. <i>spy</i> 돌연변이에 의한 Flagellar Phase Variation 에 DNA invertase Hin 의 활성과 연관되어 있다.....	28
7. SPI-2 조건에서 <i>spy</i> 돌연변이 균주의 secreteome 분석 결과 많은 SPI-2 관련 단백질의 분비가 줄어들었다.....	30

8. SPI-2 조건에서 <i>spy</i> 돌연변이 균주의 SPI-2 관련 유전자의 전사 수준은 WT 과 비슷하였다.....	33
9. RAW264.7 세포 내에서의 <i>spy</i> 돌연변이 균주의 증식은 WT 에 비해 현저히 감소된다.....	35
10. <i>spy</i> 돌연변이 균주는 WT 에 비해 Sifs 의 형성이 감소된다.....	37
11. <i>spy</i> 돌연변이 균주는 WT 에 비교했을 때 생쥐 병독성이 감소한다.	40
V. 고 찰	42
VI. 참 고 문 헌	45
초 록.....	49

표 목 차

Table 1. Bacteria strains and plasmids used in this study.	13
Table 2. Oligonucleotides used in this study.	15
Table 3. Flagellin and SPI-1 secreted proteins identified by proteomics analysis of WT and <i>spy::cm</i> mutant cultured under SPI-1 condition.	18
Table 4. SPI-2 secreted proteins identified by proteomics analysis of WT and <i>spy::cm</i> mutant cultured under SPI-2 condition.	31

도 목 차

Figure 1. SPI-1 condition secreted proteins were loaded SDS-PAGE Gel and stained by comassie blue.	19
Figure 2. The invasion rate of WT, <i>spy</i> and <i>sipC</i> mutant.	21
Figure 3. WT, <i>spy</i> and <i>hilA</i> mutant transcription level of <i>invF</i> , <i>sipC</i> , <i>sipA-lacZ</i> fusions gene in SPI-1 condition.	23
Figure 4. WT and <i>spy::cm</i> mutant transcription level of <i>fljB</i> , <i>pagC</i> , <i>fliC</i> , <i>sipD</i> gene in SPI-1 condition.	25
Figure 5. The <i>spy</i> mutant strain motility was nothing different with WT.	27
Figure 6. <i>fljB</i> and <i>fliC</i> genes for RT-PCR of WT, <i>spy</i> , <i>hin</i> and <i>spy hin</i> double mutants.	29
Figure 7. SPI-2 condition secreted protein was loaded SDS-PAGE Gel and stained by comassie blue.	32
Figure 8. WT and <i>spy::cm</i> mutant transcription level of <i>sseA</i> , <i>sseJ</i> , <i>pipB</i> , <i>sifA</i> genes in SPI-2 condition.	34
Figure 9. <i>spy</i> mutant proliferation of <i>S.Typhimurium</i> in RAW264.7 cell was decreased compare with WT.	36

Figure 10. Formation of *Salmonella*-induced filaments(Sifs) requires the SPI-2-
encoded T3SS.....38

Figure 11. Forming rate of Sifs(*Salmonella*-induced filament) comparing WT to
spy and *ssaV*.39

Figure 12. Virulence of *S. Typhimurium spy(::cm)* mutant strains.41

ABSTRACT

Spy-dependent pathogenic mechanism identified by comparative secretome investigation of *Salmonella* Typhimurium

Kim, Jung Sung

Advisor : Prof. Bang, Iel-Soo, PhD

**Department of Dental Bioengineering,
Graduate School of Chosun University**

Protein secretion into the extracellular space during bacterial pathogenesis is crucial to bacterial metabolism. Chaperones are proteins that play important roles in stabilizing and activating proteins such as folding, loosening, binding, and membrane permeation of other proteins. Among them, Spy (spheroplast protein y) is known as a chaperone protein expressed in the periplasm when it is in the spheroplast state formed by the partial removal of the cell wall of the gram-negative *Escherichia coli* or when exposed to protein denaturation conditions. Structural studies Spy preview predict that it may be helpful in the proper folding of a wide range of proteins in the bacterial periplasm. However, the physiological relevance of Spy to bacterial pathogens remains unknown. In this study, we will show through analysis of secreted proteins that Spy is necessary for the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. The expression of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 (SPI-1 and SPI-2) through the *Salmonella* strain with the *spy* mutation was analyzed. There was a decrease in the secretory protein necessary for the formation of SIF (*Salmonella* induced filament) necessary

for the proliferation. This indicates that Spy not only helps folding of other proteins, but also affects membrane permeability of secreted proteins and is necessary for the pathogenesis.

I. 서론

*Salmonella enterica*는 간균 형태를 지닌 그람 음성균으로 장내세균계열 병원균의 일종이며 *Escherichia coli*와 유전적으로 밀접한 구조를 가지고 있다. *Salmonella*는 2000종 이상이 존재하는 것으로 알려져 있고 주로 오염된 음식이나 물에 의해 감염이 되며 사람과 동물에게 감염이 되면 식중독이나 티푸스성 전신 감염 등을 일으키게 된다. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium은 생쥐에 대한 전신 감염성 균으로 병원성 발현 연구의 모델 균주로 알려져 있다[1].

*Salmonella*는 숙주세포에 감염이 되면 식세포에 의해 침투되어 장간 막 림프절, 간 및 비장으로 이동하게 되는데 이러한 숙주 세포 내에서 *Salmonella*-containing vacuole(SCV)라는 막을 만들어 생존하고 복제 할 수 있게 된다. 이렇게 많은 수로 복제된 *Salmonella*는 병독성을 일으키고 숙주세포로부터 혈류로 방출되어 병원균의 전신감염이 일어나게 된다[2]. 숙주에 감염된 병원성 그람 음성균은 숙주 세포와 다양한 상호작용을 하게 되는데, 그 과정에서 단백질의 분비가 필수적이다. 이에 필요한 몇 가지 유형의 분비 경로가 있는데 그 중 Type III Secretion System (T3SS)은 세균의 막을 통한 분비 및 진핵 세포의 원 세포막을 통하여 분비되는 단백질의 전위에 대한 경로로서 기능을 한다. 이 T3SS로 만들어진 단백질 부속물은 바늘모양의 구조를 하고 있는데 이러한 구조는 세균의 감각 탐침으로 사용되어 숙주 세포의 존재를 감지하고 감염시키는 역할을 한다[3, 4]. 이렇게 T3SS에 의해 분비된 effectors 단백질은 박테리아 세포에서 숙주 세포로 직접 분비되며 병원균이 숙주 세포에서 부착과 침입을 촉진하고 세포독성, 장벽 기능 장애, 면역 체계 파괴와 같은 병원성 메커니즘을 일으켜 병원균이 숙주 세포 내에서 생존하고 면역 반응을

피할 수 있도록 도와주는 역할을 한다[4, 5]. *Salmonella enterica*의 큰 특징 중 하나는 많은 Pathogenicity Islands(PAI)가 존재한다는 것이다. *Salmonella*의 경우 T3SS는 *Salmonella* Pathogenicity Islands 1과 2 즉, SPI-1과 SPI-2라고 일컫는 유전자성에 암호화 되어있다[2].

세균의 병원성 발생은 숙주 세포 내에 침입하고 복제하는 능력에 달려 있다[6]. SPI-1 T3SS에는 침입 매개, SCV 형성 및 유지 촉진, caspase-3 활성화 등의 역할을 하는 *sipA*, Translocon인 *sipB*, Translocon의 구성 요소이며 액틴 번들을 중재하여 침입을 촉진하는 *sipC*, Translocon의 구성 요소인 *sipD*, Ubiquitin E3 ligase이며 SCV에서 나와 침입하는 것과 호중구에서 번식을 촉진하는 역할을 하는 *sopA* 유전자 등이 있다[7]. SPI-1 T3SS에 의해 장 상피 세포의 침윤을 촉진하고 숙주 세포의 cytokine 합성을 유도하여 장 점막에서 염증 반응을 일으키고 inositol phosphate phosphatase SopB를 통해 상피 세포의 접합부를 느슨하게 만들어 chloride 분비와 수분 손실을 증가시켜 설사를 유발하는 역할을 한다. 결론적으로 SPI-1 T3SS는 숙주 세포의 침입과 염증 반응에 매우 중요한 역할을 한다[8]. 반면, SPI-2의 31개 유전자는 분비 시스템 apparatus(ssa), 분비 시스템 effector(sse) 및 chaperon(ssc) 그리고 이를 조절하는 2-component regulation system(ssrAB)으로 구성되어 있다[2]. SPI-2 T3SS는 *Salmonella*-containing vacuole(SCV) 상태에서 effector 단백질을 세포질로 분비하게 되는데 이는 SCV의 표면을 변형시키고 미세 소관을 따라 핵과 그 주변으로 이동하게

할

수

있

는

생형 균주보다 104배가 높아지게 된다. SPI-2 돌연변이 균주는 숙주 기관 내에서 생존과 증식이 매우 감소한다는 것으로 보아 병독성에 매우 중요한 역할을 하고 있다는 것을 알 수 있다[2].

숙주가 세균에 감염이 되면 여러 가지 항균성 기작이 일어나는데 그 중 하나가 대식세포의 식세포 작용이며 *Salmonella*를 포식하게 되면 Reactive Nitrogen Species (RNS)와 Reactive Oxygen Species (ROS), 항균성 단백질체 등이 생산되어 *Salmonella*의 생존과 번식을 억제시킨다. 그러나, 대식세포에 먹힌 *Salmonella*는 RNS나 ROS, 항균성 단백질체와 같은 환경신호를 인지해서 자신을 보호하는 체계를 가지고 있다[10-12]. 숙주의 면역시스템에 의해 분비된 항균성 물질들은 세균의 단백질 구조를 손상시키게 된다. 세균은 이러한 단백질 손상을 복구하기 위해 chaperone이라는 기능 단백질을 생산한다[13, 14]. 여러 가지 단백질들이 이러한 스트레스에 노출이 되게 되면 chaperone의 발현이 증가하게 된다. 그들 중 일부는 그람 음성 세균의 세포질외부인 periplasm으로 분비되어 세포질 외부에 노출되는 여러 가지 스트레스에 적응할 수 있게 해주는 중요한 단백질이다[14]. LolA, DegP, SurA, FkpA등과 같은 chaperon 단백질은 periplasm에서 다른 단백질들의 접힘, 풀림, 단백질끼리의 합체 또는 분해 그리고 단백질들이 막을 통과하는 과정 등을 돕는 역할을 한다[15-17]. 특히 chaperone 단백질의 중요한 역할 중 하나는 세균의 세포 밖으로 분비되어 숙주 세포에 영향을 미치는 effectors 단백질을 분비하는 과정을 돕는 것이다. 이 중 병원성 발병에 도움이 되는 chaperone으로는 HdeA와 HdeB가 알려져 있다[18].

Spheroplast Protein Y (Spy)는 138개의 아미노산으로 구성된 작은 Chaperone 단백질로, *E.coli*에서 처음 발견 되었고 lysozyme같은 효소의 처리로 세포벽의

일부가 제거된 상태인 spheroplast가 형성 되었을 때 periplasm에 존재하는 단백질이다[19]. Spy단백질은 Two Component Regulator(TCR)인 CpxAR, BaeSR 그리고 Rcs Pathway에 의해 조절 된다는 것이 알려져 있다[20, 21]. 그리고 spheroplasting stress가 대표적인 *spy* 유전자 발현 요소이고, extracytoplasmic toxicity 등 여러 가지 독성화 물질은 *spy* 유전자 발현을 촉진시킨다[22]. 생화학적인 분석을 통해 Spy 단백질이 다른 단백질 응집을 방지하고, 단백질 접힘을 촉진하는 역할을 한다는 것이 밝혀졌다[21]. 또한 α -helix dimer 구조로써, 구조적 유연성이 높아 접히지 않은 형태로 여러 다양한 폴리펩타이드와 상호작용이 가능하다는 것이다[21, 23]. 이러한 점에 착안해 이 논문에서는 그람 음성 병원성 세균의 대표적 모델인 *Salmonella*의 Spy단백질이 병원성 발병에 어떠한 영향을 미치는가에 대해 알아보았다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 사용 균주 및 균주 배양조건

이 연구에서 사용한 균주는 야생형균주인 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s를 사용하였고, 이 실험에 사용된 plasmid와 돌연변이 균주는 Table 1에 정리하였다. 균주를 배양하는 배지는 Luria-Bertani(LB) broth 또는 LB agar를 사용하였다. SPI-1 유전자 발현을 위해서 0.3 M NaCl LB broth(LBN)을 사용하였고, SPI-2 유전자 발현을 위해서 Magnesium minimal Medium (MgM, 170 mM MES, 5 mM KCl, 7.5 mM (NH₄)₂SO₄, 0.5 mM K₂SO₄, 1 mM KH₂PO₄, 8 μM MgCl₂, 3.8 mM glycerol, 0.1% casamino acids, pH5.8)을 사용하였다[4, 24]. 사용한 모든 균주는 37°C, 220 rpm 조건의 진탕 배양기에서 배양하여 사용했으며 항생제로는 chloramphenicol (20 μg/ml ; CM), kanamycin (50 μg/ml ; KM), ampicillin (200 μg/ml ; AP), tetracycline (20 μg/ml ; TC)을 배지에 넣어 사용하였다.

2. SPI-1, SPI-2 환경에서의 분비 단백질 동정

LB broth 37°C에서 O/N한 각 strains을 SPI-1 condition인 LBN(LB+0.3 M NaCl) 20 ml에 1:100으로 접종하고 3시간 동안 키워서 O.D~1.3을 맞췄다. 4°C, 4,000 rpm에서 40분 동안 centrifuge시키고 상등액 10 ml을 conical tube에 옮겨준 후 0.45 µM filter로 필터 시켜줬다. Normalize를 위해 β-lactoglobulin을 최종 농도가 2.5 mg/ml이 되도록 넣어주고 섞은 후에 각각 6개의 1.5 ml tube에 1.35 ml씩 나눠 담고 100% TCA 150 µl(10%)를 넣어주고 inverting을 10번 해주고 4°C에서 O/N 시켜줬다. 다음 날 4°C, 12,000 rpm으로 15분간 centrifuge시킨 후 상등액을 버리고 Acetone Precipitation을 위해 100% Acetone 1 ml을 넣어 vortexing한 후 다시 한 번 centrifuge하여 단백질 pellet을 얻어내었다. Pellet을 상온에서 15~20분간 말려 준 후 80 mM Tris-HCl (pH8.0) buffer 60 µl에 녹이고 5X sample buffer와 섞어서 95°C에서 5분간 끓이고 SDS-PAGE gel에서 전기 영동 해줬다. LB Broth에서 O/N culture한 cell을 MgM 배지로 2번 세척한 후 1:50의 비율로 0.1% Casamino acids를 첨가한 MgM 배지에 접종하여 O/N culture했다. 4000 rpm으로 4°C에서 30분간 cell down시키고 상등액을 옮겨 Coring사의 0.20 µm pore size syringe filter로 남아있는 bacteria를 제거했다. Normalize를 위해 β-lactoglobulin를 최종 농도가 2.5 mg/ml이 되도록 넣고 섞어줬다. β-lactoglobulin은 각 배양한 상등액에 넣어 분비된 단백질의 양을 비교하기 위해 normalization control로 같이 침전시켰다. 필터한 분비 단백질 샘플의 부피를 줄이기 위해 Millipore사의 Stirred Ultrafiltration Cells 8200을 사용하여 10,000 NMWL pore Ultrafiltration Membranes으로 10KDa이상인 단백질만 남기고 필터 해줬다. 남은 5 ml가량의 상등액을 EtOH 침전법(EtOH 73% Acetammonium sulfate 2% sample 25%)으로 -20°C O/N했다. 12,000 rpm으로 4°C에서 15분간 centrifuge해서 down시킨 후 상등액을

버리고 100% Acetone 1 ml을 넣어 vortexing한 후 다시 한 번 centrifuge하여 pellet을 얻어냈다. 80 mM Tris-HCl (pH8.0) buffer에 pellet을 녹이고 5X sample buffer와 함께 95°C에 5분간 끓여서 SDS-PAGE gel에 로딩했다[4, 25].

로딩한 gel의 단백질 분석을 위해 in-gel digestion (Choi *et al.*, 2014)과 LC-MS/MS(Moon *et al.*, 2012) 방법을 통한 단백질 동정은 한국기초과학지원 연구원 오창센터에서 진행하였다. 간략히 설명하자면 증류수로 깨끗이 세척한 gel을 tryptic digestion방법으로 50mM ammonium bicarbonate, 37°C에서 12~16시간 처리하였다. Digestion을 최적화하기 위해 마지막 trypsin농도를 10ng/ml로 하였다. Trypsin peptide의 추출을 위해 50mM ammonium bicarbonate, 5% trifluoroacetyl acid가 들어간 50% acetonitrile 용액을 사용하였다. 생성된 peptide 추출물을 모아 동결 건조 시키고 0.5% trifluoroacetyl acid에 녹여 LC-MS/MS기법을 사용하여 분석하였다.

3. Gentamicin protection assay

HeLa cell에 대한 *Salmonella*의 감염은 참조한 논문과 같이 진행하였다[26]. 간단히 말해서, *Salmonella* cell을 0.3M NaCl을 함유 한 37°C LB broth에서 O.D ~1.0이 되도록 배양 하였다. 그리고 각 strains의 bacteria를 MOI가 10이 되도록 HeLa cell에 넣어주고 37°C 5 % CO₂ incubator에서 15분간 배양했다. Infection 후, PBS로 2회 세척하여 세포 외 박테리아를 제거하고 10% FBS 및 Gentamicin(최종 농도 50µg/ml)을 함유하는 RPMI1640에서 추가로 배양 하였다. Gentamicin을 처리하고 1시간과 3시간이 지난 시점에 HeLa cell을 PBS로 3번 세척 후 0.1% Triton X-100을 사용하여 용해시켰다. 세포 용해물을 serial dilution하고 LB plate에 drop하여 cfu를 통해 1시간과 3시간의 Time point에서 Invasion Rate를 WT을 100% 기준으로 계산하였다.

RAW264.7 cells을 사용하여 한 실험은 24hr동안 24-well cell culture plate(SPL 사)에서 1×10^5 의 cell농도로 10% FBS를 포함한 RPMI1640 media와 함께 37°C 5 % CO₂ incubation하였다. 그리고 각 strains의 bacteria를 MOI가 10이 되도록 RAW264.7 cell에 30분간 37°C 5 % CO₂ incubator에서 Infection시켰다. 다음 방법은 HeLa cell과 같았고 2시간과 16시간의 Time point에서 cell을 용해하여 serial dilution하였고 LB plate에 drop한 cfu를 통해 Survival Rate 결과를 WT을 100% 기준으로 계산 하였다.

4. Beta-galactosidase assay (β-gal assay)

LB broth 37°C Shaking O/N으로 culture한 각 strains을 LBN에 1:100으로 재접종하여 O.D~1.3까지 키우고 얼음에 20분 넣어두었다. 2ml EP tube에 1ml의 Cell을 down한 다음 상등액을 버리고 같은 volume의 Z-buffer를 넣어 다시 녹여줬다. Z-buffer에 녹아있는 cell의 O.D를 기록한 후 새로운 2ml EP tube에 500μl의 Z-buffer와 Z-buffer에 녹인 cell 500μl를 섞어준 후 10μl의 0.1% SDS와 30μl의 chloroform을 넣고 10초간 vortexing했다. 37°C에서 5분 동안 incubation한 다음 ONPG(4mg/ml) 200μl를 넣는 동시에 시간을 측정했다. 색깔이 노란색으로 변하면 500μl의 NaCO₃를 넣어주고 걸린 시간 측정을 했다. Cell이 섞여있는 800μl를 cuvette에 옮겨서 UV spectrometer로 흡광도 420nm, 550nm를 측정했다. 모든 결과값을 Miller Units공식 $1000 \times [(OD_{420} - 1.75 \times OD_{550})] / (T \times V \times OD_{600})$ 에 대입해 계산하여 나타낸 결과였다[27, 28].

5. SPI-1 환경에서의 이동성 테스트

LB broth 에서 37°C overnight 로 배양한 cell 을 0.3 M LBN 에 접종하고 3 시간 동안 shaking incubation 시킨 후 0.4% Bacto agar 0.3 M LBN plate 에 1 µl 씩 drop 하고 37°C incubator 에서 6 시간 후 지름을 측정했다[29].

6. RNA 추출과 cDNA 합성 및 qPCR 과 (real-time) RT-PCR

LB Broth에서 O/N culture한 cell을 SPI-1 condition에서는 0.3 M LBN에서 culture SPI-2 condition에서는 MgM배지로 2번 세척한 후 3ml의 0.1% Casamino acids를 첨가한 MgM배지에 bacteria를 1:50의 비율로 접종하여 O/N culture했다. 5% Phenol을 넣고 vortexing 후 30분간 얼음에 넣어 전사를 멈추게 했다. 모든 균을 centrifuge시킨 후 상등액을 버리고 Lysozyme(10 mg/ml) 100 µl를 넣고 5분 마다 vortexing해주면서 30분간 상온에서 세포벽을 깬다. RNA iso Plus (Takara Biomedical Inc, Japan) 1 ml을 넣고 5분간 상온에서 반응 후 chloroform 200 µl를 넣고 Pink milky색으로 변하도록 10초간 vortexing하고 5분간 상온에 정치시켰다. 12,000 rpm으로 4°C에서 15분간 cold centrifuge시킨 후 투명한 상등액 600µl를 1ml EP tube에 옮긴 후 iso-prophanol 600µl를 넣고 상온에서 10분간 정치시키고 다시 12,000 rpm, 4°C로 15분간 cold centrifuge시켰다. 상등액을 버리고 Pellet이 된 RNA를 -20°C에 넣어둔 70% EtOH 600µl를 넣고 inverting하여 씻어주었다. 7,500 rpm, 4°C에서 5분간 cold centrifuge한 후

상등액을 버리고 20분간 상온에서 말려준 후, 35 μ l의 RNase Free Water (Promega)를 넣고 NEB사의 Reaction Buffer 4 μ l와 DNaseI을 1 μ l 넣어 30분간 RT에서 digestion시키고 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 heat inactivation했다. Prep한 RNA를 rpoD primer를 사용하여 DNA contamination이 되었는지 PCR로 확인 후 Promega사의 Reverse Trascripton Kit를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 60분 반응하여 cDNA를 만들었다. real-time RT-PCR은 Promega사의 Gotaq $^{\circ}$ qPCR Master Mix를 사용하여 진행하였으며 Qiagen사의 Rotor-Gene Q 기계를 이용해 95 $^{\circ}$ C 5분동안 가열 후 95 $^{\circ}$ C 3초와 60 $^{\circ}$ C 30초 45cycles의 조건으로 진행하였다. SYBR Green 510nm으로 측정하였고 그 결과 값에서 Rotor-Gene Q series Software를 사용하여 Auto-threshold로 기준을 잡은 후 SPI-1 condition에서는 *spy*, *hin*, *spy hin* double mutant를 WT의 Ct값과 비교해 얼마큼의 Fold값이 나오는지 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 로 나타내었고 이와 같은 방법으로 SPI-2 condition에서는 *spy*, *ssrAB*, WT(pH8.0)의 Ct값을 WT(pH5.8)의 Ct값과 비교해 얼마큼의 Fold값이 나오는지 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 로 나타낸 결과였다. 사용된 Primer는 Table 2에 정리하였고 Standard가 된 control primer는 housekeeping 유전자인 *rpoD*를 사용하였다. 그리고 사용된 Primer는 Mbiotech사에서 합성하여 이용했다[29, 30].

7. Immunofluorescence microscopy

HeLa cell을 WelGene사의 10%(vol/vol) fetal bovine serum(FBS)와 1% streptomycin(vol/vol)이 들어간 RPMI 1640 배지에서 37°C 5% CO₂ incubator에서 O/N culture 했다. Seeding을 위해 HeLa cell을 24-Well cell culture plate에 Marlenfeld사의 12mm coverslips을 넣고 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지에 1 X 10⁵ cells/well의 밀도가 되도록 1ml씩 분주해 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 O/N culture해줬다. 각 strains의 bacteria를 3ml의 LB broth에 재접종하여 3시간 동안 키웠다. 재접종한 Cell을 2ml의 EP tube에 centrifuge down시키고 상등액을 버린 후 RPMI로 2번 세척한 후 O.D~0.10이 되도록 희석시켰다. Seeding된 HeLa cell에 Multiplicity of infection(MOI)값 10의 비율로 bacteria를 접종하고 30분간 infection시켰다. PBS로 2번 세척 후 1% gentamycin(100 µg/ml)을 첨가한 10% FBS RPMI 1640으로 배지를 바꿔서 HeLa cell 밖에 있는 bacteria를 제거했다. 6시간 동안 37°C, CO₂ incubator에서 culture해줬다[4, 31].

Immunofluorescence 분석방법을 위해 각 Well에 있는 배지를 제거해 주고 coverslips에 붙어있는 HeLa cell을 3% paraformaldehyde로 15분간 fixation시키고 PBS로 3번 씻어냈다. 그 후에 0.1% riton-X 100으로 5분간 처리해서 Antibody가 투과할 수 있도록 구멍을 뚫어주고 PBS로 3번 세척해 주었다. 3% BSA(4% sucrose in PBS)로 30분간 상온에서 Blocking해 준 후 Santa Cruz biotechnology사의 LAMP-1 (H4A3):sc-20011 (1:500)로 3% BSA에 희석한 1st-antibody로 1시간 동안 상온에서 incubation시켰다. PBS로 5분간 3번씩 씻어낸 후 Dark condition에서 3% BSA용액에 1:500으로 희석한 Thermo Fisher사의 Goat anti-Mouse IgG1 Alexa Fluor 594(red) 2nd-antibody로 1시간 동안 상온에서 incubation시켜줬다. PBS로 5분간 3번씩 씻어준 후

슬라이드 글라스에 invitrogen사의 prolong gold anti-fade reagent with DAPI Mounting 용액을 사용하여 마운팅 시켜줬다. Confocal microscope로 관찰하고 사진을 찍었다[4, 31]

8. WT, *spy* 의 생쥐 독성 테스트

LB에서 37°C Shaking incubator에서 O/N 배양한 *Salmonella* Typhimurium WT과 *spy*의 O.D를 측정하고 PBS로 O.D~4를 맞춘 후 PBS로 한번 세척 해주었다. 여러 번의 희석을 위해서 WT과 *spy*를 각각 500 μ l의 PBS를 사용해 2번 희석하여 O.D~1을 맞추고 100:900으로 cfu가 1×10^5 이 되도록 4번 희석해주었다. 200 μ l안에 WT과 *spy*가 1×10^4 이 되도록 PBS 160 μ l와 WT 20 μ l, *spy* 20 μ l의 비율로 8개를 만들면 PBS 1280 μ l + WT 160 μ l + *spy* 160 μ l로 총 1600 μ l의 주입할 샘플을 만들고 5~6마리의 6주간 키운 암컷 C57BL/6 mice의 복강 내 경로로 200 μ l 주입하였다. 그리고 주입 양을 계산하기 위해 100:900으로 3번 희석해 낸 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 의 샘플을 각각 LB, CM plate에 200 μ l씩 spreading했다. 생쥐는 감염 4일 후 간과 비장을 적출했다. 각 생쥐에서 적출한 간과 비장의 무게를 재고 간은 1ml, 비장은 200 μ l의 차가운 PBS를 넣고 균질화했다. 균질화한 간과 비장을 1/10 dilution으로 2번 희석시켰다. 각 10배, 100배 희석한 균질화한 샘플을 LB와 CM plate에 200 μ l씩 drop해서 spreading했다. 각 plate에서 나온 colony의 수를 계산해서 WT과 *spy*의 감염 비율을 나타내었다[32].

III. 표

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

Strains	Genotype	Source or References
IB1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium 14028s	ATCC
IB1026	$\Delta spy :: CM$	[10]
IB1894	$\Delta spy :: CM / pBAD30-spy :: AP$	[14]
IB2186	WT $\Delta sipC :: Tn5 lacZYA :: TC$	This study
IB2187	WT $\Delta sipA :: Tn5 lacZYA :: TC$	This study
IB2188	WT $\Delta invF :: Tn5 lacZYA :: TC$	This study
IB2190	$\Delta spy :: CM \Delta sipC :: Tn5 lacZYA :: TC$	This study
IB2191	$\Delta spy :: CM \Delta sipA :: Tn5 lacZYA :: TC$	This study
IB2192	$\Delta spy :: CM \Delta invF :: Tn5 lacZYA :: TC$	This study
IB2213	$\Delta hilA :: CM \Delta sipC :: Tn5 lacZYA :: TC$	This study
IB2214	$\Delta hilA :: CM \Delta sipA :: Tn5 lacZYA :: TC$	This study
IB2215	$\Delta hilA :: CM \Delta invF :: Tn5 lacZYA :: TC$	This study
IB2193	$\Delta fljB :: KM$	This study
IB2198	$\DeltafliGHI :: TC$	This study
IB2194	$\Delta hin :: KM$	This study
IB2195	$\Delta spy :: CM \Delta hin :: KM$	This study
IB2211	$\Delta hilA :: CM$	This study
IB2182	$\Delta ssaV :: CM$	This study

Strains	Genotype	Source or References
IB2163	WT / <i>psts-gfp(ova)</i> :: AP	This study
IB2183	Δ <i>spy</i> :: CM / <i>psts-gfp(ova)</i> :: AP	This study
IB2184	Δ <i>ssaV</i> :: CM / <i>psts-gfp(ova)</i> :: AP	This study
EE638	SL1344 <i>sipC</i> :: Tn5 <i>lacZYA</i> :: TC	[11]
EE633	SL1344 <i>sipA</i> :: Tn5 <i>lacZYA</i> :: TC	[11]
EE637	SL1344 <i>invF</i> :: Tn5 <i>lacZYA</i> :: TC	[11]
M587	SL1344 <i>fliGHI</i> :: Tn10 :: TC	[13]
YKJ227	UK-1 <i>fjB</i> :: KM	[8]
YKJ289	UK-1 <i>hin</i> :: KM	[8]

Plasmids	Characteristics	Source or References
pIB1902	<i>katG-gfp(ova)</i> :: AP	Lab collection
pIB2162	<i>pstS-gfp(ova)</i> :: AP (<i>xbal</i> , <i>sphI</i>)	Lab collection
pIB1891	pBAD30- <i>spy</i> (<i>sacI</i> , <i>xbal</i>)	Lab collection

Table 2. Oligonucleotides used in this study.

Primer name	Primer sequence(5'-3')
Clone	
<i>spy</i> Fw	TATGAGCTCCTGTAAGCTCACGTTAGGAT
<i>spy</i> Rev	TATGGATCCTAGAGGCAACAAATAGAGCA
<i>psts gfp</i> Fw sphI	TATGCATGCCAGGCTGGTCTGGTGTC
<i>psts gfp</i> Rev xbaI	TATTCTAGAGGCAGAGAACGCGCTCATCG
qRT, real-time PCR	
<i>rpoD</i> Fw	GTGAAATGGGCACTGTTGAACTG
<i>rpoD</i> Rev	TTCCAGCAGATAGGTAATGGCTTC
<i>fliC</i> Fw	ACAACACCCTGACCATCCAG
<i>fliC</i> Rev	TTCAGCGTATCCAGACCCAG
<i>fljB</i> Fw	ATCTGGGTGCGGTACAAAAC
<i>fljB</i> Rev	TCGGAATCTTCGATACGGCT
<i>pagC</i> Fw	GGGTGTACAGATGAATCCGC
<i>pagC</i> Rev	AACCCCGACGTTGAAGCC
<i>pipB</i> Fw	TATTTCTGGAGGATGTCAAC
<i>pipB</i> Rev	CCATTTTTGTTCACTTCAAT
<i>sifA</i> Fw	ATATCCGAAAGTACTCAGCA
<i>sifA</i> Rev	CAATAGGTATGTGGGTATGC
<i>sipD</i> Fw	CACAGAACATCGCGGTACAG
<i>sipD</i> Rev	TTCAGAGATCGGTGGCGTT

Primer name	Primer sequence(5'-3')
<i>sseA</i> Fw	GAGGGGAATGATGATAAAGAAA
<i>sseA</i> Rev	GGGGCTTGAGCATTAAAGTT
<i>sseJ</i> Fw	CTTTACCACCCACCATGCAG
<i>sseJ</i> Rev	TGGGCTTGGGATGTGATTTA
Mutation	
<i>hilA</i> -P1 Fw	GTTCTGTATCGAATAAAAAATTCGTCTTT GATGATTTTCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>hilA</i> -P2 Rv	ATCCTGTTTCCATCTTTTGAACCAAATATT GTCTTCGTTTCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>hilA</i> Fw	CCGTTAGTACTAACAGCAGA
<i>hilA</i> -XbaI Rev	GCTAAGCATCTAGAGTACGA
<i>ssaV</i> -P1 Fw	CGACCTGGATGGTTGATATCCTGATTACTA TCAACCTTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>ssaV</i> -P2 Rv	CGGGTGTGACAGAAGTGACAATGAATAA TTTGGCTGACTCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>ssaV</i> Fw	GCAATGAGTTGTTCTCCACC
<i>ssaV</i> Rev	GCGCTGACAAGCTTAATTCG

IV. 결 과

1. SPI-1 조건에서 *spy* 돌연변이 균주의 **secreteome** 분석 결과 WT 에 비해 **FliB** 는 감소하고 **FliC** 는 증가하였다.

Salmonella Pathogenicity Islands 1 condition인 0.3 M NaCl LB에 재접종하여 3시간 동안 키운 WT과 *spy* 돌연변이 균주의 secretion protein의 분석을 위해 SDS-PAGE Gel에 걸었고 그 Gel을 LC-MS 분석을 의뢰하여 결과를 얻었다. 그 결과 WT에 비해 *spy*에서 FliB는 약 17배 감소하였고 FliC는 약 2배 증가하였다. 반면에 SPI-1 effector protein인 SipA, SipB, SipC등에는 큰 변화가 없었다(**Table 3**). 이 데이터는 LC-MS분석법을 통해 3번 진행하여 얻은 평균값이다.

Secreteome 데이터의 확인 결과 FliB 와 FliC 에서의 확연한 차이가 있어 SDS-PAGE Gel 을 comassie blue 로 staining 한 결과 Gel 상에서의 패턴을 본 결과 제일 눈에 띄는 변화는 52~53KDa 의 Flagellin 단백질인 FliB 와 FliC 였다(**Figure 1**). 그리고 complement strain 인 *spy clone* 에서는 ~17KDa 의 Spy 단백질과 함께 여러 가지 더 많은 단백질들이 분비 되었음을 확인 할 수 있었다.

Table 3. Flagellin and SPI-1secreted proteins identified by proteomics analysis of WT and *spy::cm* mutant cultured under SPI-1 condition.

Accessions	Protein name	Protein Description	Differentially Expressed Protein (WT/ <i>spy</i>)
gb ACY89758.1	FljB	flagellin	17.46671975
gb ACY88831.1	FliC	flagellin	0.458571671
gb ACY87983.1	PagC	virulence membrane protein PAGC precursor	2.382739212
gb ACY89895.1	SipA	secreted effector protein	0.876260136
sp Q56019.1	SipB	pathogenicity island 1 effector protein SipB	0.817224654
sp D0ZV21.1	SipC	pathogenicity island 1 effector protein SipC	1.356607939
sp Q56026.1	SipD	<i>Salmonella</i> invasion protein D	0.446576008
sp D0ZMG9.1	SopA	E3 ubiquitin-protein ligase SopA	0.521341463
gb ACY88707.1	SopE2	type III-secreted effector protein	1.274300932
gb ACY87374.1	TolB	translocation protein TolB	2.757575758

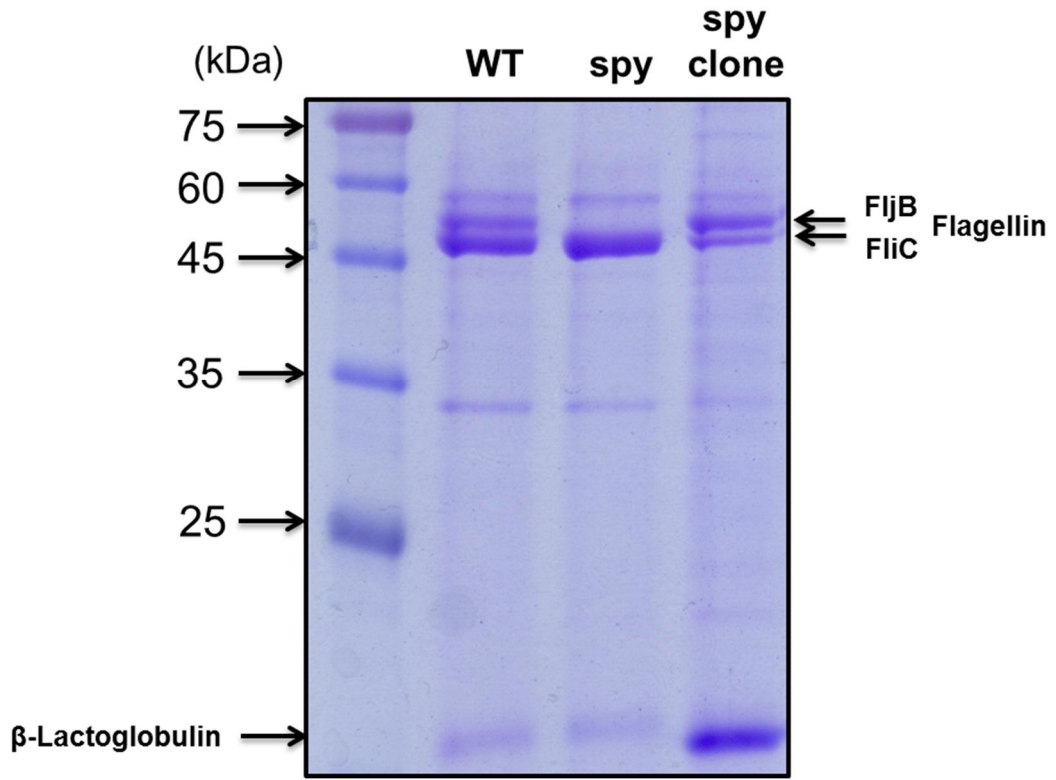


Figure 1. SPI-1 condition secreted proteins were loaded SDS-PAGE Gel and stained by comassie blue.

S. enterica serovar Typhimurium 14028s (WT), IB1026 (*spy::CM*), IB1894 (*spy clone::AP*) was cultured O/N in LB broth. These strains were subcultured at SPI-1 condition(0.3M LBN) for 3 hours. Proteins from the culture supernatants were precipitated as described under “Materials and Methods”, and proteins were separated by SDS-PAGE. The *arrows* indicate previously identified proteins that were present that *spy* mutant was faint in FljB Flagellin. β-lactoglobulin was added as positive internal control of protein precipitation.

2. SPI-1 조건에서 *spy* 돌연변이 균주는 숙주 세포(HeLa Cell)에 대한 침입률에 영향을 주지 않는다.

WT 과 비교해 *spy* 가 돌연변이 되었을 경우의 HeLa cell 에 대한 침입률을 확인하기 위해서 0.3M LBN 에서 3 시간동안 키운 WT 과 *spy*, *sipC* 를 HeLa cell 에 감염시킨 후 1 시간과 3 시간으로 나누어 Gentamicin protection assay 후 serial dilution 을 통해 LB plate 에 drop 한 cfu 를 확인하고 접종에 들어간 input 값으로 나누어 침입률을 계산하였다. WT 을 100% 기준으로 *spy* 와 *sipC* 의 감염 비율을 비교하여 나타낸 결과 *spy* 돌연변이 균주는 1 시간과 3 시간 모두 WT 과 비슷한 결과를 나타내었고, *sipC* 돌연변이 균주는 negative control 로 WT 에 비해 침입률이 현저히 감소 하였음을 알 수 있었다(**Figure 2**). 이를 통해 SPI-1 조건에서 *spy* 돌연변이 균주가 HeLa Cell 에 대한 침입률에는 별 다른 영향을 끼치지 않는다는 것을 확인하였다.

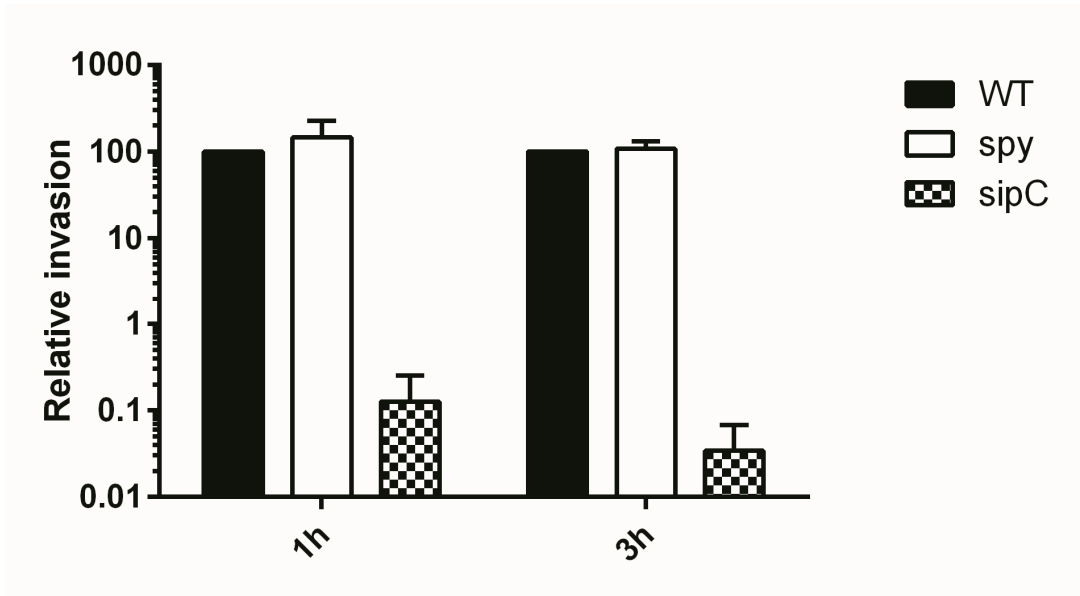


Figure 2. The invasion rate of WT, *spy* and *sipC* mutant.

HeLa cells were infected with each strains for 15min at an MOI of 10. Relative bacterial invasion was determined by the gentamicin protection assay at 1hr, 3hr time points. This graph shows that WT and *spy* mutant were same invasion rate. *sipC* mutant was used invasion negative control. These data were obtained by three independent experiments.

3. SPI-1 조건에서의 SPI-1 관련 유전자의 전사 수준은 비슷하였다.

spy 돌연변이 균주에 의해 SPI-1 관련 유전자에 대한 전사 변화가 있는지를 확인하기 위한 실험을 하였다. WT, *spy*, *hilA*에 *sipC-lacZ*, *sipA-lacZ*, *invF-lacZ*를 P22 phage를 통해 각 strains에 Transduction시켜 각 균주를 만들었다. 그리고 O/N한 각 균주를 SPI-1 조건인 0.3 M LBN에 재접종하여 3시간 배양하고 beta-galactosidase assay로 각 균주에 대한 *sipC*, *sipA*, *invF* 유전자 전사 수준을 알아본 결과이다. WT과 *spy*는 negative control인 *hilA*와 비교해 보면 SPI-1 관련 유전자의 전사가 활성화되어 많은 전사가 일어났으며 그 수준은 서로 비슷하였다(**Figure 3**). 이를 통해 *spy* 돌연변이 균주에 의한 SPI-1 effector 단백질의 분비에는 전사적인 영향이 없다는 것을 확인 하였다.

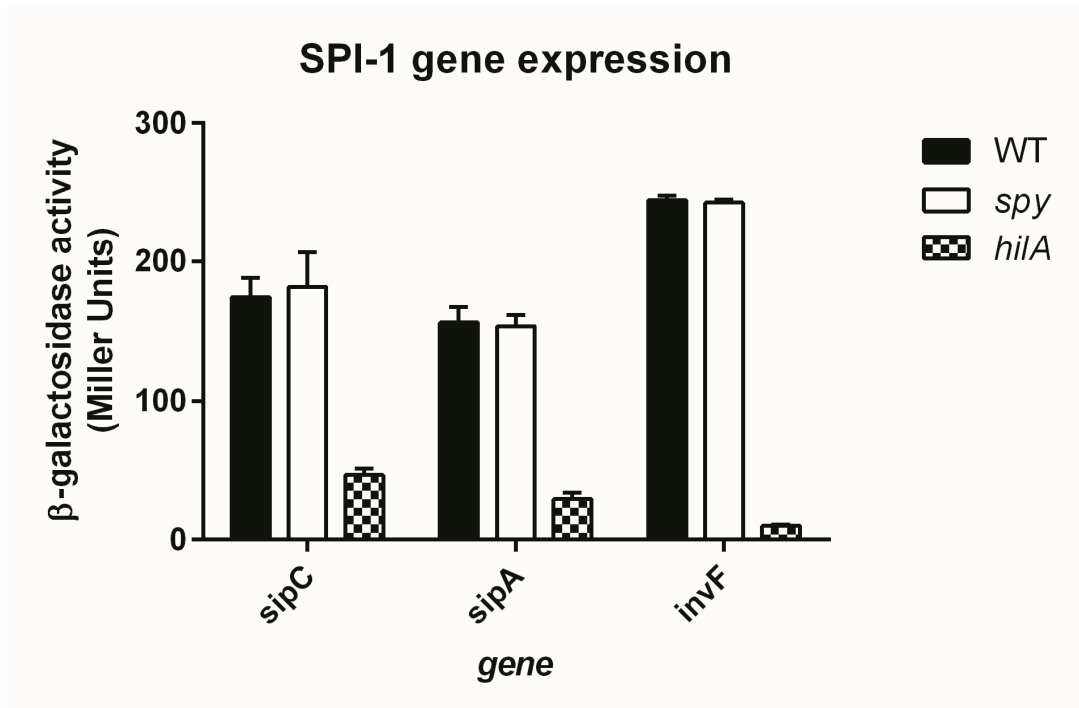


Figure 3. WT, *spy* and *hilA* mutant transcription level of *invF*, *sipC*, *sipA* –*lacZ* fusions gene in SPI-1 condition.

Strains were grown under 0.3 M LBN(SPI-1 condition) about 3hr. The expression of SPI-1 reporter gene fusions were measured by beta-galactosidase assay. WT and *spy* showed similar transcription level of SPI-1 reporter gene. *hilA* mutant was used negative control. Data were obtained by duplicate two independent experiments.

4. *spy* 돌연변이 균주의 Flagellin(FljB, FliC)은 전사 과정에서 조절된다.

앞서서 SPI-1 조건에서 키운 *spy* 돌연변이 균주의 secretion protein의 패턴 변화를 알아본 결과 그 중 Flagellin인 FljB와 FliC가 크게 변화한 것을 확인하였는데 이러한 변화가 전사적 수준에서 조절되는가를 알아보기 위하여 WT과 *spy*의 RNA를 추출하여 cDNA를 만들어 Flagellin과 SPI-1 관련 유전자에 대한 primer를 사용하여 real-time PCR을 한 결과이다 (Figure 4). 그 결과 WT과 비교했을 때 *spy*에서 *fljB* 유전자 전사가 4배가량 줄어들었고 *fliC* 유전자 전사는 10배가 증가하였다. 이를 통해 *spy* 돌연변이 균주가 되면 Flagellin의 Phage variation인 *fljB*와 *fliC*의 전사가 조절 되는 것을 알 수 있었다.

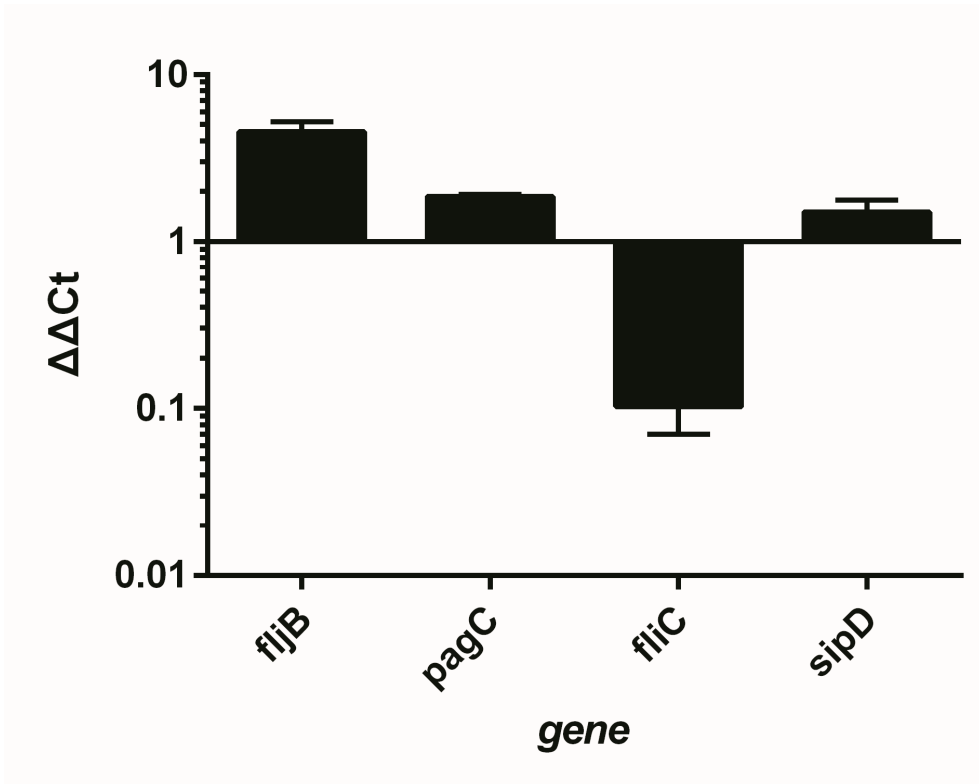


Figure 4. WT and *spy::cm* mutant transcription level of *fljB*, *pagC*, *fliC*, *sipD* gene in SPI-1 condition.

Strains were grown under 0.3 M LBN(SPI-1 condition) about 3hr. WT and *spy* show similar transcription level of SPI-1 related *pagC*, *sipD* gene. Compare with WT, *fljB* transcription was reduced and *fliC* transcription was increased in *spy* mutant. *rpoD* was used control as housekeeping gene. Data was obtained duplication two independent experiment.

5. SPI-1 조건에서의 운동성 시험 결과 큰 차이가 보이지 않았다.

spy 돌연변이 균주에서 Flagellin의 전사 조절에 의한 운동성이 변화가 되는지 알아보기 위하여 0.3M LBN semisolid agar에서 6시간 culture하고 그 지름을 자로 재서 비교해 보았다. 그 결과 WT은 2.7cm *spy*와 *fljB* 돌연변이 균주는 2.3cm로 큰 차이는 없었다(**Figure 5**). 이로 미루어보아 *spy* 돌연변이 균주에 의한 FljB 단백질 감소에 따른 *Salmonella*의 운동성은 큰 영향을 받지 않는다는 결과를 볼 수 있었다.

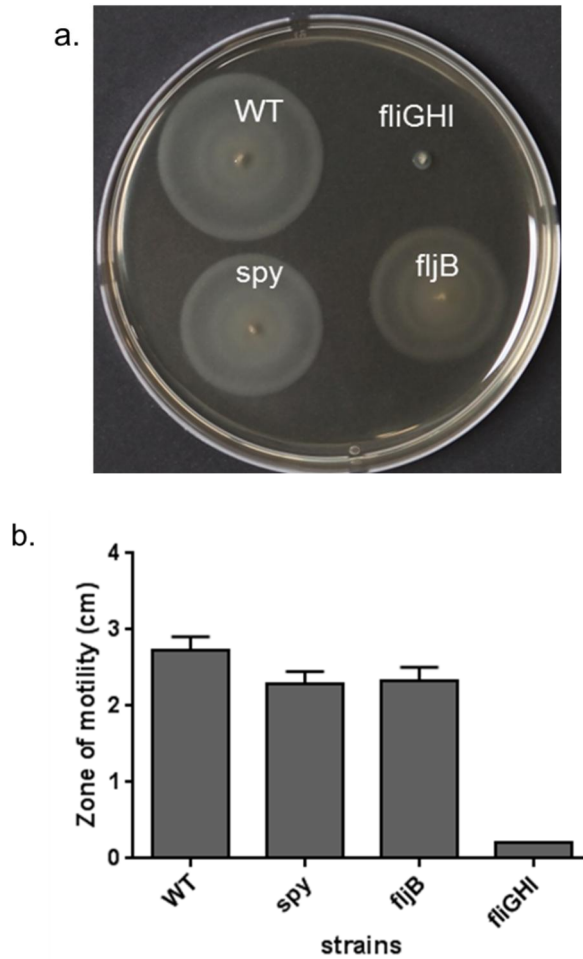


Figure 5. The strains motility showed no significant changes between WT and *spy* mutant.

After incubation for 6hr at 37°C on semisolid agar, the zones of motility were measured for the WT, *spy*, *fljB* and *fliGHI* mutant strains. a. The picture of WT, *spy*, *fljB*, *fliGHI*. b. Measurement of WT, *spy*, *fljB*, *fliGHI* zone. The *fliGHI* mutant was used as a non-motile control.

6. *spy* 돌연변이에 의한 Flagellar Phase Variation 에 DNA invertase *Hin* 의 활성화와 연관되어 있다.

spy 돌연변이 균주에 의한 단백질 FliB 와 FliC 의 변화가 DNA invertase *Hin* 과 관련이 있는가 알아보기 위하여 WT, *spy*, *hin*, *spy hin* 이중 돌연변이 균주를 사용하여 SPI-1 조건으로 배양 후 RNA 를 추출하여 cDNA 를 만들어 *fliB* 와 *fliC* RT-primer 를 사용하여 real-time PCR 을 해본 결과이다. 각 돌연변이 균주를 WT 과 비교하여 $\Delta\Delta Ct$ 값으로 나타낸 결과 *spy* 와 *hin* 그리고 *spy hin* 이중 돌연변이 균주 모두 같은 패턴을 나타내었다. 이로써 *spy* 도 *hin* 돌연변이 균주와 같이 flagellar phase variation 에 대한 전사적 조절을 한다는 것을 알 수 있었다. *Salmonella* Typhimurium 은 유전적으로 2 가지 flagellin subunit 을 가지고 있는데 하나는 phase 1 flagellin 인 FliC 이고 다른 하나는 phase 2 flagellin 인 FliB 이다[29]. 그런데 phase 1 에서 2 로 DNA 역전 과정에 관여하는 유전자가 *hin* 이다. *spy* 는 이와 같은 DNA 역전 과정에 관여하는 것과 같은 결과가 나왔다.

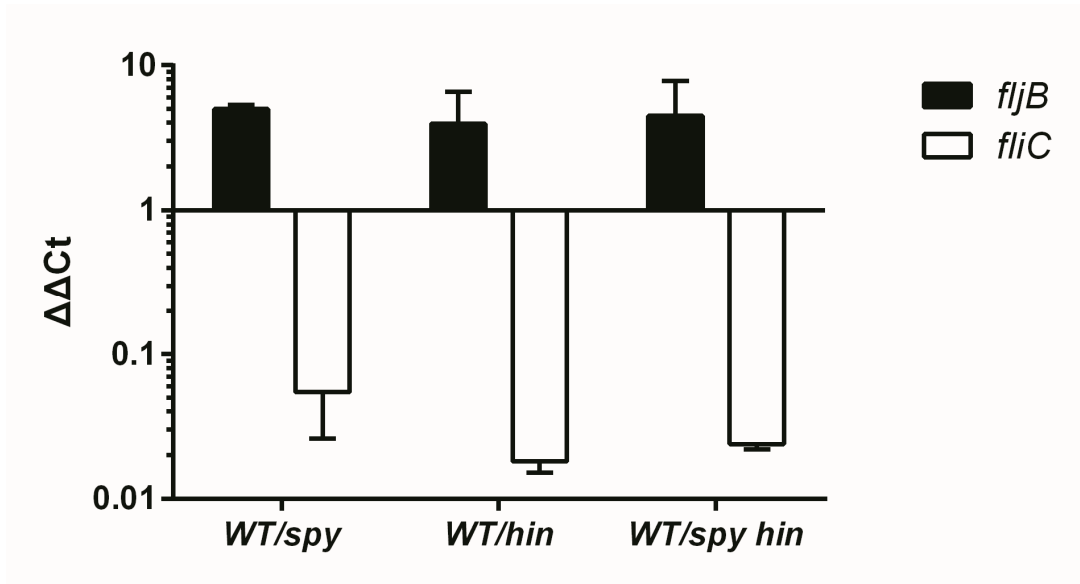


Figure 6. Transcription level of *fljB* and *fliC* genes in WT, *spy*, *hin* and *spy hin* double mutants.

WT, *spy*, *hin*, *spy hin* double mutants grown in SPI-1 condition. For real-time PCR, RNA extract followed material and methods. *spy* mutation affect transcription level of *fljB* and *fliC* genes similar with *hin* mutant.

7. SPI-2 조건에서 *spy* 돌연변이 균주의 *secreteome* 분석 결과 많은 SPI-2 관련 단백질의 분비가 줄어들었다.

Salmonella Pathogenicity Islands 2 condition인 MgM에 WT과 *spy*를 재접종하여 6시간 동안 키워 supernatant에 분비된 단백질의 분석을 위해 모든 bacteria를 filter를 통해 제거하였고 상등액을 Millipore사의 Stirred Ultrafiltration Cells 8200를 사용해 10KDa 이상의 단백질을 농축시키고 EtOH 침전방법을 통해 수집하였다. 이렇게 분비된 단백질을 SDS-PAGE Gel에 걸었고 그 Gel을 LC-MS 분석을 의뢰하여 결과를 얻었다. 그 결과 WT에 비해 *spy*에서 SPI-2 관련 effector 단백질들의 양이 감소하였다(**Table 4**). 이 데이터는 LC-MS분석법을 통해 3번 진행하여 얻은 평균값이다.

Secreteome 데이터의 확인 결과 많은 SPI-2 관련 단백질의 분비가 줄어든 것을 확인하고 SDS-PAGE Gel을 comassie blue로 staining한 결과 Gel 상에서의 패턴을 본 결과 WT에 비해 *spy*에서 많은 단백질들이 줄어들었고 패턴의 변화가 있었다. 그리고 complement strain인 *spy clone*에서는 ~17KDa의 Spy 단백질과 함께 여러 가지 더 많은 단백질들이 분비되었음을 확인 할 수 있었다(**Figure 7**). 이를 통해 *spy* 돌연변이 균주에 의해 SPI-2 effector 단백질의 분비가 줄어들었다는 결과를 알 수 있었다.

Table 4. SPI-2 secreted proteins identified by proteomics analysis of WT and *spy::cm* mutant cultured under SPI-2 condition.

Accessions	Protein name	Protein Description	Differentially Expressed Protein (WT/ <i>spy</i>)
gb ACY87725.1	pipB	secreted effector protein	5.707762557
sp Q8ZMM8.1	pipB2	Secreted effector protein pipB2	1.172314158
sp Q56061.1	sifA	Secreted effector protein SifA	2.95154185
gb ACY89963.1	sopD	secreted effector protein	0.03127 / 0
gb ACY87592.1	sopD2	SopD-like protein	2.391452345
sp D0ZIB5.1	steC	Secreted effector kinase SteC	3.337028825
gb ACY88172.1	sseA	translocation machinery component	4.522460857
gb ACY88174.1	sseB	translocation machinery component	2.490795217
sp Q8ZQ79.1	sseI	Secreted effector protein SseI	1.428571429
sp Q9FD10.1	sseJ	Secreted effector protein SseJ	7.688888889

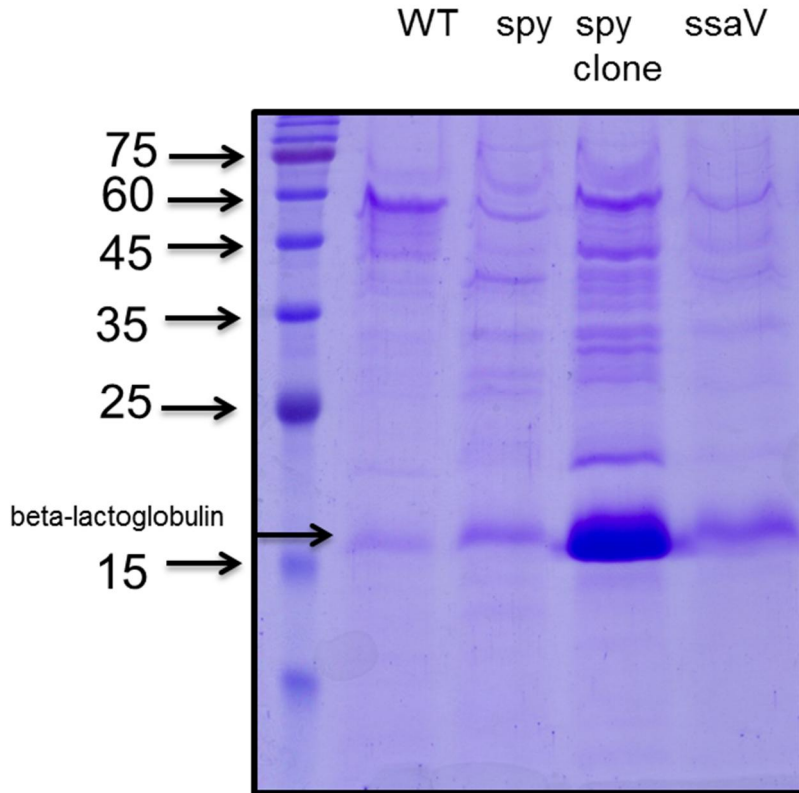


Figure 7. SPI-2 condition secreted protein was loaded SDS-PAGE Gel and stained by comassie blue.

S. enterica serovar Typhimurium 14028s (WT), IB1026 (*spy*::CM), IB1894 (*spy clone*::AP), IB2182 (*ssaV*::CM) was cultured O/N in LB broth. These strains were subcultured O/N at SPI-2 condition (MgM). WT and *spy* of pattern were different. *spy clone* overexpressed Spy proteins and other many proteins also secreted. The *ssaV* strain defective in the SPI-2-encoded T3SS as a negative control. β -lactoglobulin was added as positive internal control of protein precipitation.

8. SPI-2 조건에서 *spy* 돌연변이 균주의 SPI-2 관련 유전자의 전사 수준은 WT 과 비슷하였다.

spy 돌연변이 균주에 의해 SPI-2 관련 유전자의 전사가 조절되는가를 확인하기 위해 SPI-2 induction condition인 MgM 배지에서 6시간 동안 culture한 WT, *spy*, *ssrAB*의 RNA를 추출하여 cDNA를 만들고 *sseA*, *sseJ*, *pipB*, *sifA* RT-primer를 사용하여 real-time PCR을 한 결과이다. WT과 *spy*를 비교한 $\Delta\Delta C_t$ 값이 *sseA*는 0.72, *sseJ*는 0.60, *pipB*는 1.23, *sifA*는 0.67로 1에 가까운 값으로 전사량은 거의 비슷하므로 SPI-2 관련 유전자의 전사 조절에는 크게 관여하지 않는다는 것을 알 수 있었다. 반면 SPI-2 관련 유전자를 조절하는 negative control인 *ssrAB* 돌연변이 균주는 WT가 $\Delta\Delta C_t$ 값이 *sseA*는 164.13, *sseJ*는 3.32, *pipB*는 43.06, *sifA*는 20으로 큰 차이가 났다. 또한 SPI-2는 pH에 따라 전사 조절이 되는데 pH8.0에서는 SPI-2 유전자의 induction이 되지 않아 WT과 $\Delta\Delta C_t$ 값이 *sseA*는 150.34, *sseJ*는 21.10, *pipB*는 31.13, *sifA*는 115.09로 큰 차이가 났다(**Figure 8**)[30]. 이를 통해 WT과 *spy* 돌연변이 균주는 SPI-2 관련 effector 단백질에 대한 유전자 전사 수준이 비슷하다는 결과를 알 수 있었다.

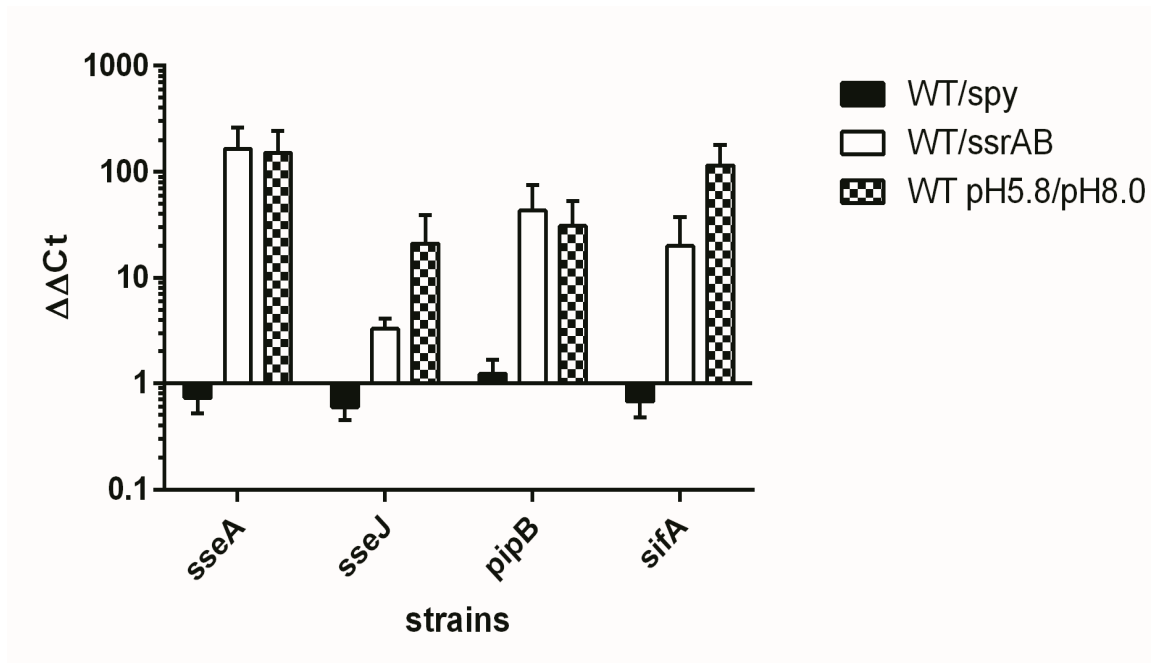


Figure 8. WT and *spy::cm* mutant transcription level of *sseA*, *sseJ*, *pipB*, *sifA* genes in SPI-2 condition.

Quantitative real-time PCR was performed using SPI-2 related genes *sseA*, *sseJ*, *pipB*, *sifA* primers. WT, *spy*, *ssrAB* were cultured under SPI-2(MgM) or MgM pH8.0 conditions and RNA was isolated. *spy* mutant was not so different in expression of SPI-2 related genes. *rpoD* was used control as housekeeping gene. Data was obtained duplication two independent experiment.

9. RAW264.7 세포 내에서의 *spy* 돌연변이 균주의 증식은 WT에 비해 현저히 감소된다.

spy 돌연변이 균주의 SPI-2 관련 단백질의 분비가 줄어드는 것을 확인하고 대식세포인 RAW264.7 세포 내에서의 증식에도 영향을 미치는지 확인하기 위해 2시간과 16시간으로 나누어 Gentamicin Protection Assay를 진행 하였다. 16시간 동안 culture한 bacteria의 cfu를 Invasion이 완료된 2시간의 cfu로 나누었는데 이를 통해 대식세포 내에서의 생존 및 증식이 어느 정도 되었는지 확인 할 수 있었다. 또한 그 값을 WT을 100%기준으로 나타내었다. *spy*는 8%의 생존률을 나타내었고 negative control인 *ssaV*는 5%의 생존률을 나타내었다. Complement strain인 *spy clone* 같은 경우에는 아마도 *Spy*의 과다한 분비로 SPI-2 관련 단백질의 분비 조성이 변화하여 WT보다 적은 36%의 생존률을 나타내는 것이라 생각된다(**Figure 9**). 이를 통해 *spy* 돌연변이 균주는 RAW cell 내에서 WT에 비해 생존과 증식이 감소한다는 것을 알 수 있었다.

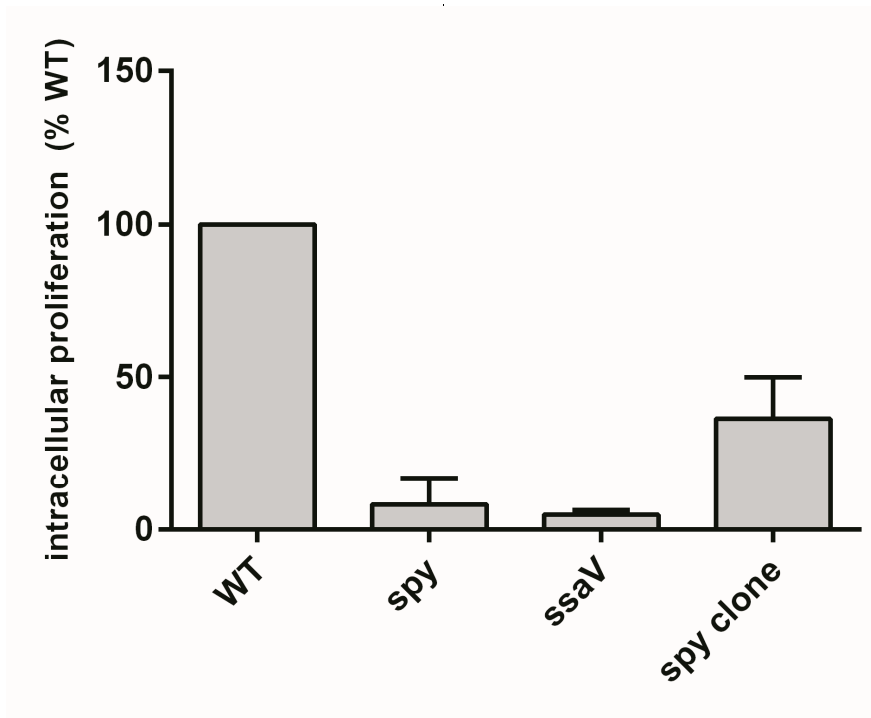


Figure 9. *spy* mutant proliferation of *S.Typhimurium* in RAW264.7 cell was decreased compared to WT.

Intracellular replication of WT, *spy*, *ssaV*, *spy clone* strains in RAW264.7 cells was determined by gentamicin protection assay. Infected cells were lysed at 2hr and 16hr and serial dilution were plated on LB agar for determination of cfu. Intracellular proliferation is calculated as the ratio of cfu at 16hr/2hr. WT strain was set as 100% and another strains was expressed as a percentage of the value for the WT. *spy* mutant proliferation was decreased similar with *ssaV*. *spy clone* also reduced compare with WT. The *ssaV* strain defective in the SPI-2-encoded T3SS as a negative control. Experiments were performed in triplicates, 2-set.

10. *spy* 돌연변이 균주는 WT에 비해 Sifs의 형성이 감소된다.

spy 돌연변이 균주가 되었을 때 Sifs의 형성에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해 HeLa cell을 이용해 감염시켰다. 그 결과 WT은 Sifs가 형성이 정상적으로 잘 되는 반면, *spy*도 형성이 되었으나 아주 짧게 형성되거나 거의 형성이 되지 않은 것이 비교적 많이 있었다. Negative control인 *ssaV*는 Sifs의 형성이 거의 되지 않았다(**Figure 10**). 각 strains의 Sifs형성 비율을 확인 하기 위하여 3번의 실험마다 임의의 20개 감염원을 관찰하여 결과를 내었다. 그 결과 WT의 경우 약 71%의 확률로 Sifs가 형성되었으나 *spy*는 26%, *ssaV*는 8%의 비율로 형성되었다(**Figure 11**). 이를 통해 *spy* 돌연변이 균주는 숙주세포 내 병독성 발현에 대표적인 예인 Sifs형성에 있어서 WT에 비해 감소한다는 결과를 알 수 있었다.

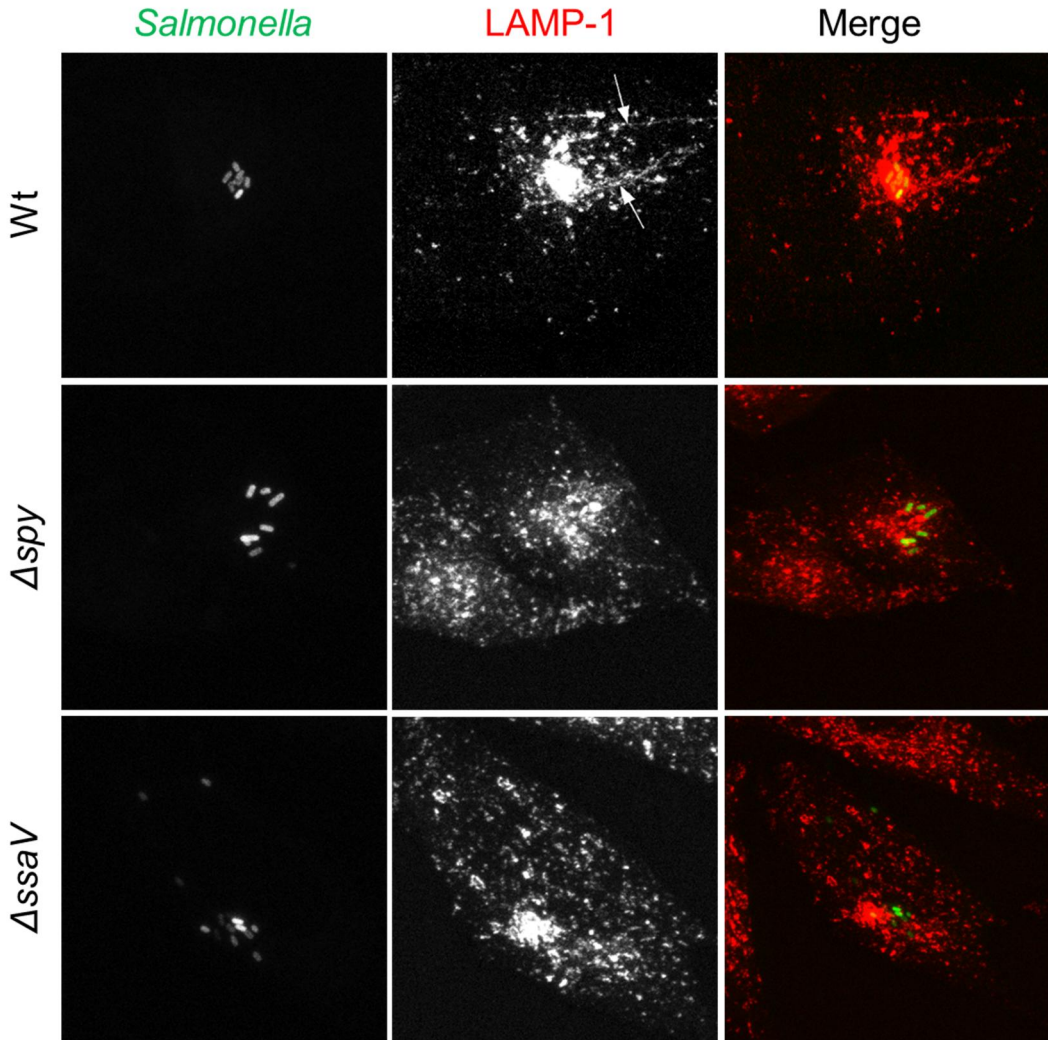


Figure 10. Formation of *Salmonella*-induced filaments(Sifs) requires the SPI-2-encoded T3SS.

HeLa cells were infected for 30min with WT, *spy*, *ssaV* and incubated for 6hr in the presence of gentamicin. Cells were fixed, immunostained by LAMP-1 (red) and *Salmonella* marked by *psts-gfp* (green) fluorescence. Arrow indicate the Sifs formation. Confocal immunofluorescence representative image of three experiment.

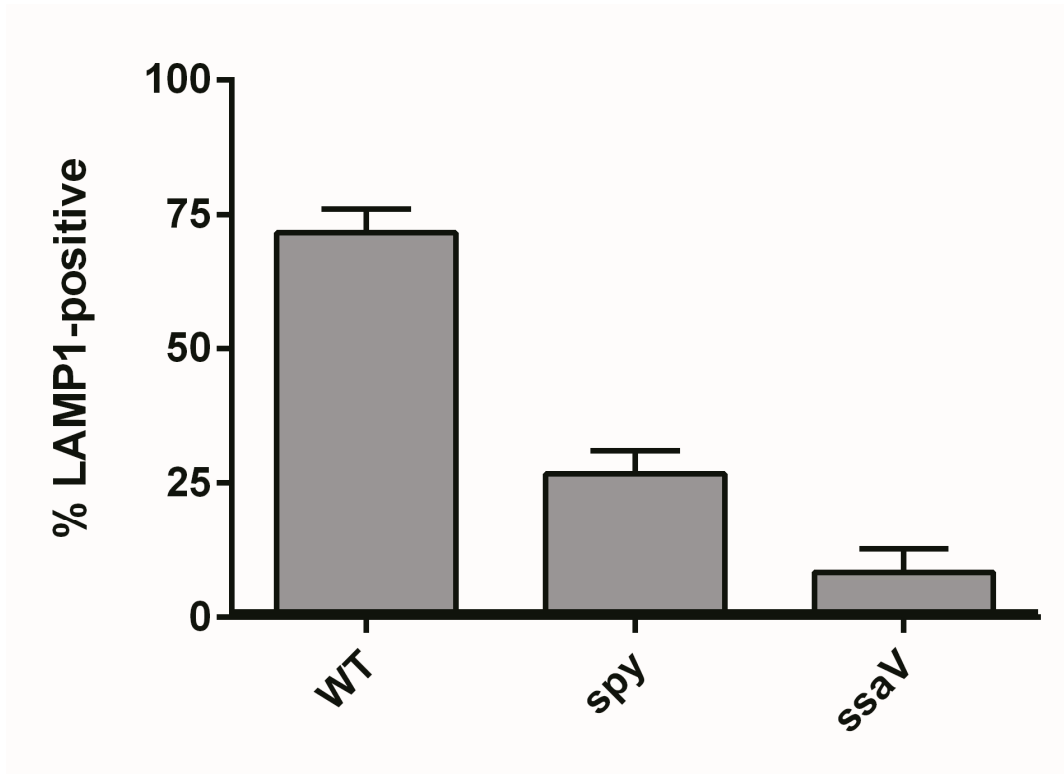


Figure 11. Forming rate of Sifs(*Salmonella*-induced filament) comparing WT to *spy* and *ssaV*.

To determine the rate of Sifs formation in WT, *spy*, *ssaV* strains, each experiment randomly observed 20 infected HeLa cells. Data was obtained three independent experiments.

11. *spy* 돌연변이 균주는 WT 에 비교했을 때 생쥐 병독성이 감소한다.

spy 돌연변이 균주의 *in vivo*에서의 역할을 알아보기 위해서 생쥐에 $\sim 1 \times 10^4$ cfu로 WT과 *spy*를 같은 비율로 섞은 PBS를 복강 내 경로로 주입하였다. 그 결과 4일 후 감염된 생쥐에서 적출한 비장과 간을 통해 감염된 세균의 숫자를 통해 결과를 냈다. 각 생쥐에서 검출된 LB와 CM plate에서 나온 colony의 숫자를 통해 WT과 *spy*의 감염되어 증식된 비율을 알 수 있었다. *spy*는 CI값(*spy*/WT)이 0.29, 비장에서 0.22로 WT보다 적은 증식률을 보였다(**Figure 12**). 이를 통해 WT과 *spy*를 비교했을 때 생쥐에서 주로 병독성을 일으키는 균주는 WT이었고 *spy*는 비교적 적은 비율로 살아 남아있는 것을 알 수 있었다. 결론적으로 *spy*가 돌연변이 되었을 경우 *in vivo*에서 병독성이 감소한다는 것을 알 수 있었다.

V. 고찰

작은 단백질인 Spy는 periplasmic chaperone이다. Spy의 과발현은 다른 단백질들의 접힘에 도움을 주고 tannin에 의해 유도되는 단백질 응집으로부터 박테리아를 방어하는 역할을 해준다[17]. Spy는 요람모양의 이량체를 형성하여 유연한 결합을 통해 더 큰 단백질을 둘러싸며 다양한 단백질의 보호, 재생과 응집을 방지할 수 있는 구조를 가지고 있는 것이다[23]. Skp는 OMPs 생합성에 관여하는 분자적 periplasmic chaperon이다[33]. FkpA는 periplasm chaperon으로서 *E.coli*에서 발현된 periplasm 단백질의 접힘을 도와주는 단백질이다[34]. LptD는 LptE와 함께 lipopolysaccharide를 outer membrane으로 옮겨주는 역할을 하는 단백질이다. Spy가 다양한 단백질에 대한 chaperon으로 작용할 수 있다는 예로 Skp나 FkpA가 결여된 돌연변이 균주에서, Spy의 과발현에 의해 LptD assembly를 복원하기에 충분하다는 결과가 있었다[35]. *spy* 유전자는 대부분의 그람 음성 세균이 보존하고 있는 유전자이다. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium은 병원성 발현 연구에 모델이 되는 균주로 *spy* 유전자가 *Salmonella*의 병독성 발병기전에 필요한 periplasmic chaperon으로서 effector 단백질의 분비에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 이 실험을 진행하였다. 우선 숙주세포의 침투에 필요한 SPI-1 관련 effector 단백질의 분비를 확인하였다. Flagellin인 FljB와 FliC 단백질 발현의 패턴 변화가 있었고, 숙주세포에 침입하기 위해 필요한 T3SS complex를 형성하는 SipA, SipB, SipC 등과 같은 SPI-1 effector 단백질의 분비에는 큰 변화가 없었다(**Table 3, Figure 1**). 이러한 결과가 숙주세포에 대한 침입률에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위해 HeLa cell을 이용하여 비교해 보았으나 WT과 *spy*의 침입률에는 차이가

없었다(**Figure 2**). 또한 SPI-1 관련 유전자의 전사 수준에서도 WT과 *spy*의 차이가 없다는 것도 확인 하였다(**Figure 3**). 따라서, SPI-1에 대한 effector 단백질의 분비에 있어서 *spy* 돌연변이는 영향을 주지 않았다. 그렇다면 *spy* 돌연변이 균주에 의하여 Flagellin(FljB, FliC)의 유전자 전사가 조절되어 변화되었는가 알아 보았다. SPI-1 조건에서 키운 결과 *fljB*의 유전자 전사는 줄어들었고 *fliC*의 전사가 증가하였다(**Figure 4**). 이러한 Flagellin의 변화는 DNA 역전 기작인 flagellar phase variation에 일어나는 것으로 알려져 있다[29, 36]. phase 1인 FliC에서 phase 2인 FljB로 변환 역할을 하는 *hin* 유전자의 돌연변이 균주와 비교를 해봄으로써 *spy* 돌연변이 균주도 *hin*과 같은 기작에 영향을 미친다는 것을 확인 하였다(**Figure 6**). 그리고 이러한 Flagellin의 변화는 침입률과 관련된 운동성에 영향을 주는지 알아보기 위하여 Motility test를 하였으나 큰 차이가 없었다(**Figure 5**). 이러한 Flagella의 변화가 virulence에 대한 직접적인 영향이 있는지는 아직 밝혀진 바가 없다. 그러나 이 실험에서는 FljB와 FliC의 변화는 침입에는 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.

숙주세포 내에서 생존 및 번식에 필요한 SPI-2 관련 effector 단백질의 분비에는 어떤 영향을 미치는가 알아보기 위해 SPI-2 발현 조건에서 단백질의 분비를 확인하였다(**Table 4, Figure 7**). 여러 SPI-2 관련 effector 단백질들의 분비가 *spy* 돌연변이 균주에서 확연히 감소되었고 패턴 또한 변화하였다. complement strain인 *spy clone*같은 경우에는 WT보다 더 많은 단백질들이 분비되었다. 이러한 변화를 통해 숙주세포 내에서의 생존과 번식에 영향이 있을 것을 예상하고 대식세포인 RAW264.7 cells에 감염시켜 생존률을 WT과 비교해 본 결과 *spy* 돌연변이 균주에서 낮은 생존율을 보였다(**Figure 8**). *spy clone*은 WT보다 더 많은 SPI-2 관련 effector 단백질들이 과분비 되어 균형이 붕괴 되었을 것으로 사려된다. 그렇다면 *spy* 돌연변이 균주가 SPI-2 관련 유전자의 전사 조절에 관여하여 분비 단백질이 감소된

것이 아니었는가를 확인하기 위하여 WT과 비교해 본 결과 유전자 전사는 비슷한 수준에서 일어났다(**Figure 9**). 이를 통해 chaperon 단백질인 Spy가 T3SS SPI-2 관련 effector 단백질의 분비 과정의 기작에 있어서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 세울 수 있다. 감염된 숙주 세포 내에서 *Salmonella*가 서로 network를 형성하여 생존과 번식에 기여하는 *Salmonella*-induced filaments(Sifs) 형성을 통해 병독성 발현에 중요한 역할을 한다는 결과가 있다[37, 38]. 이러한 결과를 토대로 *spy* 돌연변이 균주가 Sifs 형성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기로 하였다. WT은 약 70%가 형성되는 반면 *spy*는 약 25%가 형성되었다(**Figure 10, 11**). 이를 통해 SPI-2 관련 effector 단백질의 분비가 *spy* 돌연변이 균주에 의해 감소하여 *Salmonella*의 생존과 번식률이 줄어들게 되어 병원성에도 영향을 미칠 것이라는 것을 예상할 수 있다. 이러한 사실이 *in vivo*에서도 입증 가능한가를 확인 해보기 위하여 mice에 같은 양의 WT과 *spy*를 감염시켜 보았다. 그 결과 *spy*의 복제 비율이 WT에 비해 낮은 수준으로 나타났다(**Figure 12**). 이로써 생쥐 내에서 *spy* 돌연변이 균주가 된 *salmonella*의 병원성이 감소한다는 것을 확인 할 수 있었다. 아직 Spy 단백질이 periplasm내에서 어떠한 기작으로 SPI-2 관련 effector 단백질들과 상호작용 하는지 구체적으로 밝혀진 바가 없다. 앞으로의 연구에서 Spy 단백질이 SPI-2 관련 effector 단백질의 분비에 있어서 어떤 메커니즘으로 작용하는지는 밝혀내야 할 과제이다.

VI. 참고 문헌

1. Dandekar, T., et al., *Software applications toward quantitative metabolic flux analysis and modeling*. Brief Bioinform, 2014. **15**(1): p. 91-107.
2. Kuhle, V. and M. Hensel, *Cellular microbiology of intracellular Salmonella enterica: functions of the type III secretion system encoded by Salmonella pathogenicity island 2*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(22): p. 2812-26.
3. Blocker, A., et al., *Structure and composition of the Shigella flexneri "needle complex", a part of its type III secreton*. Mol Microbiol, 2001. **39**(3): p. 652-63.
4. Miki, T., N. Okada, and H. Danbara, *Two periplasmic disulfide oxidoreductases, DsbA and SrgA, target outer membrane protein SpiA, a component of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34631-42.
5. Srikanth, C.V., et al., *Salmonella effector proteins and host-cell responses*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(22): p. 3687-97.
6. Eng, S.K., et al., *Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance*. Frontiers in Life Science, 2015. **8**(3): p. 284-293.
7. Agbor, T.A. and B.A. McCormick, *Salmonella effectors: important players modulating host cell function during infection*. Cell Microbiol, 2011. **13**(12): p. 1858-69.
8. Hallstrom, K. and B.A. McCormick, *Salmonella Interaction with and Passage through the Intestinal Mucosa: Through the Lens of the Organism*. Front Microbiol, 2011. **2**: p. 88.
9. Fabrega, A. and J. Vila, *Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation*. Clin Microbiol Rev, 2013. **26**(2): p. 308-41.
10. Lahiri, A., P. Das, and D. Chakravorty, *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.

11. 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.
12. Lahiri, A., P. Das, and D. Chakravorty, *Arginase modulates Salmonella induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophages and is required for Salmonella pathogenesis in mice model of infection*. Microbes and Infection, 2008. **10**(10-11): p. 1166-1174.
13. Ramos, J.L., et al., *Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors*. Curr Opin Microbiol, 2001. **4**(2): p. 166-71.
14. Rowley, G., et al., *Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(5): p. 383-94.
15. 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.
16. Burkinshaw, B.J. and N.C. Strynadka, *Assembly and structure of the T3SS*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(8): p. 1649-63.
17. Goemans, C., K. Denoncin, and J.F. Collet, *Folding mechanisms of periplasmic proteins*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(8): p. 1517-28.
18. Hong, W.Z., et al., *Chaperone-dependent mechanisms for acid resistance in enteric bacteria*. Trends in Microbiology, 2012. **20**(7): p. 328-335.
19. 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.
20. Bury-Mone, S., et al., *Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in Escherichia coli*. PLoS Genet, 2009. **5**(9): p. e1000651.
21. Merdanovic, M., et al., *Protein quality control in the bacterial periplasm*. Annu Rev Microbiol, 2011. **65**: p. 149-68.
22. 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.
23. 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.

24. Beuzon, C.R., et al., *pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol, 1999. **33**(4): p. 806-16.
25. Viala, J.P., et al., *Acylation of the Type 3 Secretion System Translocon Using a Dedicated Acyl Carrier Protein*. PLoS Genet, 2017. **13**(1): p. e1006556.
26. Wang, L., et al., *InvS Coordinates Expression of PrgH and FimZ and Is Required for Invasion of Epithelial Cells by Salmonella enterica serovar Typhimurium*. J Bacteriol, 2017. **199**(13).
27. Bajaj, V., et al., *Co-ordinate regulation of Salmonella typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hilA expression*. Mol Microbiol, 1996. **22**(4): p. 703-14.
28. Deiwick, J., et al., *Environmental regulation of Salmonella pathogenicity island 2 gene expression*. Mol Microbiol, 1999. **31**(6): p. 1759-73.
29. Eom, J.S., et al., *Effect of iacP mutation on flagellar phase variation in Salmonella enterica serovar typhimurium strain UK-1*. J Bacteriol, 2012. **194**(16): p. 4332-41.
30. Walthers, D., et al., *The response regulator SsrB activates expression of diverse Salmonella pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS*. Mol Microbiol, 2007. **65**(2): p. 477-93.
31. Domingues, L., D.W. Holden, and L.J. Mota, *The Salmonella effector SteA contributes to the control of membrane dynamics of Salmonella-containing vacuoles*. Infect Immun, 2014. **82**(7): p. 2923-34.
32. Elhadad, D., et al., *Differences in Host Cell Invasion and Salmonella Pathogenicity Island 1 Expression between Salmonella enterica Serovar Paratyphi A and Nontyphoidal S. Typhimurium*. Infect Immun, 2016. **84**(4): p. 1150-1165.
33. Chen, R. and U. Henning, *A periplasmic protein (Skp) of Escherichia coli selectively binds a class of outer membrane proteins*. Mol Microbiol, 1996. **19**(6): p. 1287-94.
34. Bothmann, H. and A. Pluckthun, *The periplasmic Escherichia coli peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. I. Increased functional expression of antibody fragments with and without cis-prolines*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 17100-5.

35. Schwalm, J., et al., *Role for Skp in LptD assembly in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2013. **195**(16): p. 3734-42.
36. Horstmann, J.A., et al., *Flagellin phase-dependent swimming on epithelial cell surfaces contributes to productive Salmonella gut colonisation*. Cell Microbiol, 2017. **19**(8).
37. Brumell, J.H., et al., *SifA permits survival and replication of Salmonella typhimurium in murine macrophages*. Cell Microbiol, 2001. **3**(2): p. 75-84.
38. Zhao, W., et al., *The Salmonella effector protein SifA plays a dual role in virulence*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12979.

초 록

Salmonella Typhimurium이 분비하는 단백질체 비교분석을 통해 확인한 Spy 단백질의 병원성 발현 기전

김 정 성

지도교수 : 방 일 수

조선대학교 대학원

치의생명공학과

세균의 숙주 동물에 대한 병원성 발병 과정에서 세포 외 공간으로의 단백질 분비는 세균 대사에 있어서 필수적인 과정이다. 샤페론은 다른 단백질의 접힘, 폴림, 결합 그리고 단백질의 막 투과와 같은 단백질의 안정화와 활성화를 돕는 중요한 역할을 하는 단백질이다. 그 중 Spy (spheroplast protein y)는 그람 음성균인 *Escherichia coli* 의 세포벽의 부분적 제거에 의해 형성되는 스페로플라스트 상태일 때 또는 단백질 변성 조건에 노출 된 경우 주변세포질에서 발현되는 샤페론 단백질로 알려져 있다. 그리고 Spy에 대한 구조 연구는 세균성 주변세포질에서 광범위한 단백질의 적절한 접힘에 대한 도움을 줄 수 있다고 예측한다. 그러나 세균성 병원체에 대한 Spy의 생리적 연관성은 아직 밝혀지지 않았다. 이 연구에서는 Spy가 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium의 발병기전에 필요하다는 것을 분비된 단백질의 분석을 통해 보여주려고 한다. *spy* 돌연변이 균주를 갖는 *Salmonella* 균주를 통해 *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 (SPI-1 and SPI-2)의 발현

조건에서 분비 단백질을 분석한 결과 SPI-1 조건에서는 단순히 Flagella의 변화가 있었고 SPI-2 조건에서는 *Salmonella*의 증식에 있어서 필요한 Sifs(*Salmonella*-induced filaments)의 형성에 필요한 분비 단백질의 감소가 있었다. 이를 통해 Spy가 단순히 다른 단백질의 접힘에 도움을 주는 것뿐만 아니라 분비 단백질의 막 투과에도 영향을 미쳐 발병기전에 필요하다는 것을 보여준다.