creative commons

COMMONS DEED

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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]I804:24011-200000267068

2019년 2월

석사학위 논문

Induction and regulation of *spy* transcription in *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum under envelope stress

조선대학교 대학원

치의생명공학과

강 보 경

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Induction and regulation of *spy* transcription in *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum under envelope stress

Salmonella Enteritidis 과 *Salmonella* Gallinarum의 세포막 스트레스에 반응하는 *spy* 유전자 전사의 유도 및 조절에 관한 연구

2019년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

강 보 경

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Induction and regulation of *spy* transcription in *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum under envelope stress

Salmonella Enteritidis 과 *Salmonella* Gallinarum의 세포막 스트레스에 반응하는 *spy* 유전자 전사의 유도 및 조절에 관한 연구

지도교수 방 일 수

이 논문을 이학 석사학위 신청 논문으로 제출함

2018년 10월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

강 보 경

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

강보경의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 국 중 기 (인)

위 원 조선대학교 교 수 안 상 건 (인)

위 원 조선대학교 교 수 방 일 수 (인)

2018년 11월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

목 차 ..... **i**

표 목 차 ..... **iii**

도 목 차 ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

Ⅰ. 서 론 **1**

Ⅱ. 실험 재료 및 방법 **6**

1. 사용 균주 및 균주 배양조건 6

2. *spy-gfp* 클론(Clone) 제작 7

3. 원형질체(spheroplast) 형성 8

4. 형광 현미경 관찰 8

5. 세균 성장 곡선 측정(Bioscreen) 9

6. 녹색 형광 단백질(green fluorescence protein; GFP) 형광 측정 10

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

7. 대식세포 내 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum 생존율 측정 11

Ⅲ. 표 12

Ⅳ. 결 과 14

1. *spy-gfp* fusion 제조. 14

2. *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum 에서 spheroplast 형성 시 *spy* 전사는 유도된다. 17

3. 세균 성장에 영향을 주는 polymyxin B 농도 결정. 20

4. polymyxin B 는 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum 내의 *spy-gfp* 전사를 유도한다. 23

5. *spy* 의 발현은 CpxR 과 BaeR 에 의존적이다. 25

6. Spy 는 대식세포 내부의 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum 생존에 필요하다. 28

Ⅴ. 고 찰 31

Ⅵ. 참 고 문 헌 34

초 록 37

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

표 목 차

Table 1. Bacteria strains and plasmids used in this study 12

Table 2. Primers used for construction of clone in this study 13

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

도 목 차

Figure 1. Overall structure of *E. coli* Spy. 2

Figure 2. Construction of *spy-gfp* fusion 1 and 2. 15

Figure 3. Difference in *spy-gfp* fusion 1 and 2 expression in log phase and stationary phase. 16

Figure 4. *spy* transcription is induced in *S.* Enteritidis upon spheroplast formation. 18

Figure 5. *spy* transcription is induced in *S.* Gallinarum upon spheroplast formation. 19

Figure 6. Growth curves of *S.* Enteritidis/$_p$*spy-gfp* , *S.* Gallinarum/$_p$*spy-gfp* treated with polymyxin B or not. 22

Figure 7. Induction of *spy-gfp* transcription in *S.* Enteritidis, *S.* Gallinarum by exposure to polymyxin B. 24

Figure 8. Induction of *spy-gfp* transcription in *S.* Enteritidis, *S.* Gallinarum by exposure to ethanol and concentration of polymyxin B with the highest expression. 26

Figure 9. Spy is required for infection and survival of macrophage. 29

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Induction and regulation of *spy* transcription in *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum under envelope stress

Kang, Bo-Gyeong

Advisor: Prof. Bang, Iel-Soo, PhD

Department of Dental Bioengineering,

Graduate School of Chosun University

Maintenance of protein conformation is essential for all organisms to sustain their life in earth. The proper folding of translated proteins and the recovering damaged proteins to their functional forms are mediated by chaperone proteins. In eukaryotes, chaperones are acting mostly in cytoplasmic spaces but little is known about the existence and function of chaperones that assist the protein conformation in extracytoplasmic or extracellular spaces, which draw attention to bacterial chaperones acting exclusively in extracytoplasmic spaces. In bacterial periplasmic space, many chaperone proteins are known to assist the proper folding of proteins secreted to extracytoplasmic spaces. While most periplasmic chaperones in bacteria have much narrow substrate ranges, the membrane-stress inducible expression and crystal structure of Spy (spheroplast protein y), a periplasmic chaperone recently identified in *E. coli*, suggests it's binding on a very broad range of substrate proteins under envelope-damaging conditions. However, cognate substrate proteins and the physiological roles of Spy during bacterial pathogenesis have been remained unexplored yet. This study investigated the *spy* gene expression and the role of Spy in intramacrophage survival for the enteric pathogen *Salmonella*

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

enterica. Using the *spy-gfp* operon fusion constructed in two zoonotic serovars, Enteritidis (*S*. Enteritidis) and Gallinarum (*S*. Gallinarum), I found the transcription of *spy* in both serovars was largely induced when *Salmonella* were forming the spheroplast and were treated with ethanol or a membrane-disrupting antibiotic polymyxin B. These induction of *spy* transcription were abrogated in the mutant *Salmonella* lacking either of two two-component signal transduction systems, BaeSR and CpxAR that operate regulons for maintaining the envelope integrity of many gram-negative bacteria. After infection to the macrophage-like RAW 264.7 cell, *spy* mutation in *S*. Enteritidis and *S*. Gallinarum severely reduced *Salmonella* proliferation rates compared with those of their parental WT. These results illustrate that the induction of Spy expression can be efficiently triggered by two-component signal transduction systems sensing envelope stress conditions threatening bacterial survival, and thereby promotes the fitness of protein homeostasis in periplasm for *Salmonella* proliferation inside macrophage producing a variety of antimicrobial factors. This study also suggest that monitoring *spy* transcription by *spy-gfp* operon fusion would be very helpful to determine if developing antimicrobials can target *Salmonella* envelopes, and that the inactivation of Spy can be considered for developing the attenuated vaccine strain to control salmonellosis of zoonotically important *S*. *enterica* serotypes, Enteritidis and Gallinarum.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅰ. 서 론

Chaperone 단백질은 새로 합성된 단백질의 적절한 접힘을 통한 3차원적 구조유지와 응집방지 등 손상된 단백질의 수리까지 포함하여 박테리아 세포에서 다양한 대사 과정에 필수적이다. 모든 생명체는 adenosine 5'triphosphate (ATP)를 에너지단위체로 사용한다. 진핵세포의 경우 대개 세포 내부에서 그 기능을 수행하고, 세포외부로 분비 되는 단백질의 보호 및 수선기능을 하는 chaperone의 존재와 기능은 잘 알려지지 않고 있는 반면, 세균 세포의 경우는 원형질막 외부의 주변세포질(periplasm) 에서만 기능을 하는 chaperone 단백질들이 존재한다. 이들 주변세포질 chaperone 단백질들은 ATP의 공급 없이 원형질막 외부에 존재하는 단백질들의 적절한 구조를 유지한다[1]. 이들은 원형질막 외부로 분비된 초기 단백질에 대한 적절한 접힘 구조의 제공과 보호 뿐 아니라[2], 숙주 세포 내로의 다양한 병원성 효과 단백질(effector protein)을 분비하는 과정에서도 필수적인 역할을 한다[1]. 이들은 또한 세균이 원형질막 외부(extracytoplasm)에 노출되는 여러 스트레스에 적응하기 위해 필요 단백질들의 발현과 분비과정 동안 단백질들의 항상성을 유지할 수 있는 것으로 알려졌다[3]. 하지만 현재까지 알려진 대부분의 원형질막 외부 chaperone 단백질들은 기질이 되는 대상 단백질의 종류가 기능적으로 연관된 한정적인 경우가 대부분이어서, 이들의 존재가 과연 다양한 세포외부 스트레스에 노출되어 변성이 되는 많은 단백질들을 보호할 수 있는지 의문이었다. 최근, *Escherichia coli* (*E. coli*) 연구에서 이러한 의문을 해결할 수 있는 chaperone 단백질로써 Spheroplast protein Y (Spy)의 특성을 확인하였는데, 그 구조적 특성 연구를 통해 기존의 periplasm chaperone 단백질들과 달리 넓은 범위의 기질 단백질들의 구조 안정화에 기여할 것으로 예상된다[4, 5].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Spy는 138개의 아미노산을 가진 작은 periplasm chaperone인데, Spy 단백질은 *E. coli*가 여러 자극에 의해 spheroplast를 형성 할 때 periplasm 내에는 존재하지 않고 반드시 주변 periplasm 공간 내에서만 위치하는 단백질로 확인 되었다[6]. 생화학적인 분석으로는 Spy 단백질이 단백질 응집을 억제하고 단백질 refolding을 돕는 일종의 chaperone 단백질로 규명되었다[7]. Spy는 4개의 α-helix의 긴 hairpin과 같은 구조로 독특한 fold를 가진 이량체를 형성함으로써, 유연성을 지니고 있기 때문에 여러 ligand binding site로 작용할 수 있다고 알려져 있다**(Figure 1)** [7-9].

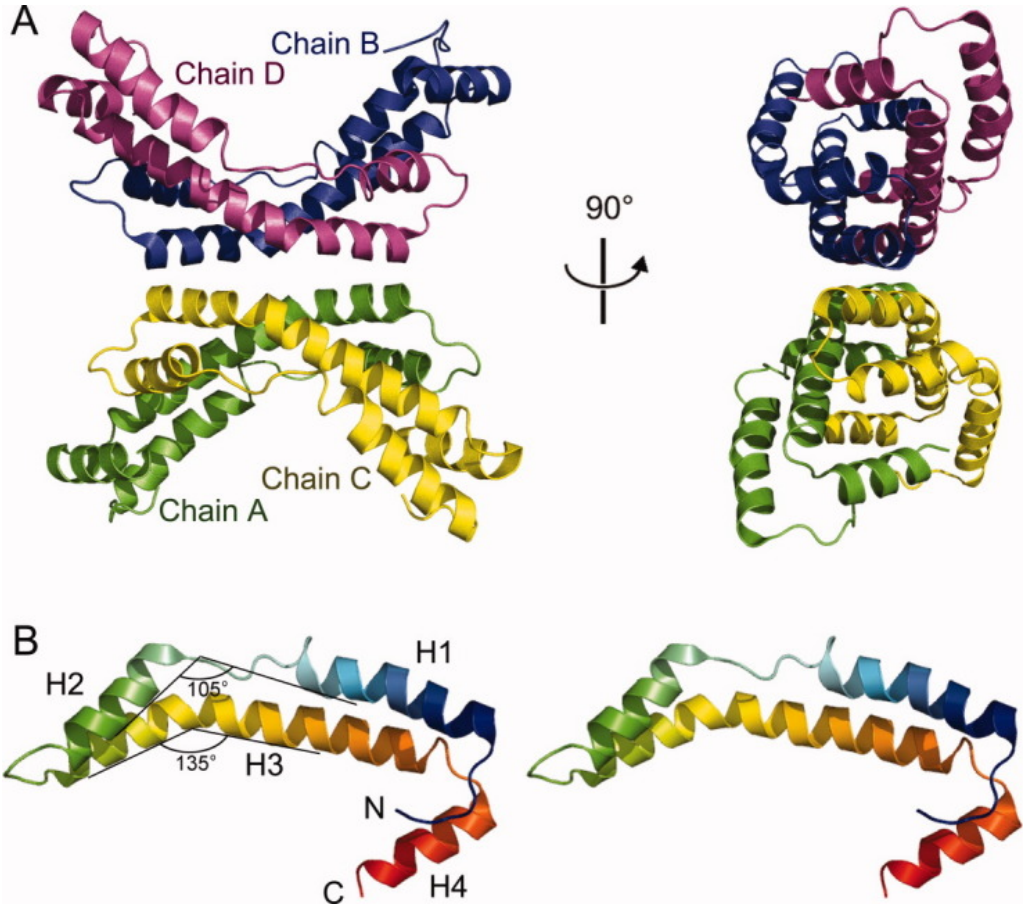


Figure 1. Overall structure of *E. coli* Spy.

Spy 발현은 spheroplasting stress와 extracytoplasmic toxicity 등의 원형질막 외부

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

스트레스에 의해 그 발현이 유도된다[10]. Spy는 연구초기에 *E. coli*의 Cpx regulon의 구성원 중 하나인 alkali-inducible protein CpxP 와 유사하며, Spy와의 아미노산 서열이 30%동일 한 것으로 알려졌다[11]. 따라서 Spy 발현과정에 CpxAR two-component signal transduction system (TCS) 의 관련성이 조사되었으며, CpxAR의 존재가 필수적임을 확인하였다. Cpx 시스템은 또 다른 TCS인 Bae 시스템과 함께 *E. coli*의 외막(envelope) 스트레스를 감지하는 주요 TCS 시스템이다.

*E. coli*의 Bae와 Cpx TCS 시스템은 막 스트레스를 감지하는 히스티딘 인산화 효소로 작용하는 내막 단백질인 BaeS와 CpxA가 스트레스에 의해 활성화 되면, 인산화되고 그들의 인산기를 반응 조절 인자 BaeR 및 CpxR로 각각 전달하여 활성화시킨다. 활성을 띈 BaeR과 CpxR은 고유의 regulon 표적 유전자들의 전사를 활성화시킨다[12-14]. CpxAR은 세균의 외막(envelope) 스트레스를 받을 때, BaeSR은 구리(Cu), 아연(Zn) 등과 같은 금속 이온스트레스에 의해 활성화 된다[15, 16]. Spy의 발현이 이 두 시스템에 의존한다는 사실과 Spy가 periplasm에 국한하여 위치한다는 발견은 Spy의 기능이 envelope 스트레스를 받음으로써 주변 periplasm의 항상성에 기여할 수 있을 것으로 예상케 하였으며, 최근에 알려진 Spy의 분자적 구조 및 chaperone 기능은 세균의 periplasm 내 단백질 구조 안정화에 크게 도움을 줄 것으로 예상된다[7]. 하지만 다른 그람 음성균에서 특히 병원성세균들에 있어 이 Spy의 발현과 조절과정 및 역할은 아직 알려진 바 없다.

본 연구에서는 그람 음성 세균 병독성 연구의 대표적 모델인 *Salmonella enterica*의 두 혈청 형(serovar) Enteritidis 및 Gallinarum을 이용하여 세균의 병원성 발현에서 그 역할을 확인하고자 하였다. *S. enterica*는 장내세균과의 일종으로 현재까지 2,500가지 이상의 혈청 형이 보고되어있고 사람이나 동물 숙주에 침투하여 장염에서 장티푸스성 질환까지 다양한 살모넬라증(salmonellosis)을 일으킨다[17].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Salmonella 감염에 의한 티푸스증은 인류의 건강에 여전한 위협이 되고 있고, 특히 개발도상국에서는 연간 200,000여명의 어린이들이 티푸스로 인한 감염으로 사망하는 것으로 알려져 있다[18]. *Salmonella*는 통성혐기성 그람 음성 간균으로 주모성 편모에 의해 운동성을 가지고 오염된 물이나 음식물을 섭취하여 감염되며 특히 *S. enterica* serovar Gallinarum은 세계적으로 중요한 가금류 병원균으로 문제가 되고 *S. enterica* serovar Enteritidis 및 함께 인간과 동물 모두에게 의학적으로 중요한 인수공통 감염 병원체이다[19, 20].

S. enterica 혈청 형들의 공통된 숙주 내 감염경로는 장 상피세포 침입 후 장간막(mesenteric) 대식세포(macrophage)에 의한 포식과정, 포식한 대식세포 내에서 생존하며, 이동하는 대식세포를 따라 전신으로 감염하는 과정을 포함한다. 따라서, 활성화된 대식세포 내 에서 생존 여부는 *Salmonella* 병독성 여부를 결정지을 수 있는 중요한 사항이다. 선천면역 시스템 중 하나인 식세포는 여러 종류의 항 세균 성분을 이용하여 세균의 증식을 제어한다[21, 22]. 활성화된 대식세포는 활성 질소종(reactive nitrogen species ; RNS), 활성 산소종(reactive oxygen species ; ROS) 및 항 세균 펩타이드 등 여러 종류의 항 미생물 성분을 생산하여 *Salmonella*의 생존을 억제할 수 있다[21, 23]. 반면 식세포 작용에 의해 포식된 *Salmonella*는 대식세포 내 환경 신호를 인지하고 자신을 보호 할 수 있는 보호체계를 갖고 있으며, 이들은 중요한 병독성 요소가 될 수 있다. 특히 *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-1, *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2에 의해서 만들어 지는 type 3 secretion system (TTSS) 과 효과 단백질들은 세균의 표면과 감염된 식세포 내부로 분비되어 주요한 병독성 요소로 작동한다. 숙주세포에 감염 동안 이 분비 단백질들은 숙주세포와 다양한 상호작용하여 세포의 대사 변화에 작용 할 수 있다. 따라서 대식세포 내 항 미생물 환경은 세균 periplasm 내 단백질을 훼손 시킬 수 있고, 이를 복구할 수

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

있는 periplasm chaperone의 존재 및 기능이 필요하며, 또한 많은 TTSS 단백질 및 효과단백질의 효과적인 분비를 위한 periplasm 내 단백질 항상성이 필요할 것으로 예상된다.

본 연구에서는 인수공통 감염 균주인 *Salmonella* Enteritidis 및 *Salmonella* Gallinarum을 상대로 세포막에 주어지는 다양한 스트레스 조건에서 Spy 발현과정의 유전자 전사 유도 여부와 조절과정의 존재를 규명하고자 하였으며, 또한 대식세포 내 *Salmonella* 생존 및 증식과정에 Spy의 chaperone 기능의 필요성을 검증하고자 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅱ. 실험 재료 및 방법

1. 사용 균주 및 균주 배양조건

본 연구에서는 인수공통 감염을 일으키는 *S. enterica* serovar Enteritidis (*S.* Enteritidis)와 *S. enterica* serovar Gallinarum (*S.* Gallinarum)을 사용하였고, *spy* promoter부분에 GFP 리포터 유전자를 함유하는 promoter 조사 벡터 플라스미드인 pFPV25를 사용하여 만든 $_{p}$*spy-gfp*를 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum 에 형질전환 시켜 이용하였다. 이 실험에 사용된 돌연변이 균주는 Table. 1에 정리하였다. 균주 배양을 위한 배지로는 Luria-Bertani (LB) 영양배지를 사용하였다. 사용한 모든 균주는 모두 진탕 배양기(HST, Korea)에서 37℃, 220 rpm 조건으로 배양하여 사용하였으며 항생제는 ampicillin (200 μg/ml; AP), chloramphenicol (20 μg/ml; CM)을 배지에 넣어 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. *spy-gfp* 클론(Clone) 제작

spy-gfp clone (333bp)을 만들기 위해 먼저 PCR 증폭을 통해 원하는 유전자 산물을 얻었다. PCR 증폭에 사용된 주형은 *S.* Typhimurium 14028s 염색체이고, 전체 핵산염기 서열의 *spy* 촉진유전자(promoter) 부분에 제한효소를 붙여 *spy* linker *Sac*I Forward-2 프라이머와 *spy* linker *Bam*HI Reverse-2 프라이머를 사용하였다(Table.2). i-pfu DNA 중합효소(iNtRON Biotechnology Inc., Korea)를 이용해 PCR 증폭을 시켰다. 증폭된 PCR 산물은 PCR 정제키트(GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Korea)를 사용하여 정제하였고, 프라이머 부분에 붙인 *Sac*I과 *BamH*I (NEB Inc., USA) 부위를 제한효소를 이용하여 잘라냈다. *Sac*I 과 *BamH*I 제한효소 처리를 한 pFPV25 벡터와 함께 정제키트(GeneAll)로 정제 후 T4 DNA ligase (NEB)를 이용하여 결찰시켜 *E. coli* DH5α에 형질전환 시켰다. 군락을 분리하여 LB 영양배지에 하룻밤 배양 후 플라스미드를 순수분리 하여 *Sac*I과 *BamH*I을 처리하여 *spy-gfp* clone (333bp)을 최종 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 원형질체(spheroplast) 형성

spy-gfp 융합 플라스미드를 보유하는 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum을 LB 영양배지에서 밤새 배양 한 다음, 새로운 LB 영양배지에 4:1로 접종하여 37℃, 220 rpm의 진탕 배양기에서 $O.D_{600\ nm}$=0.8이 될 때까지 배양한 후 25℃, 5,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 버리고 1 M Tris-HCl (PH8.0)을 0.01M로 희석시킨 용액으로 같은 양을 첨가하여 한번 세척 시켰다. 다시 한 번 원심분리하여 상층액을 제거 후 0.5 M sucrose (Bioshop, Canada)가 포함된 Tris-buffer로 같은 양으로 첨가하여 실온에서 10분 반응시킨 후 lysozyme (Sigma Aldrich Inc., Germany) 200 μg/ml을 첨가하고 10분 반응시킨 후 Tris-buffer을 1:1 비율로 첨가한 후에 20 mM의 EDTA (Welgene, Korea)를 처리하여 37℃에서 4시간동안 반응시킨다. 그 후에 Axioscope A1 (Carl Zeiss, Germany) 현미경으로 spheroplast가 형성된 결과를 관찰하였다[24].

4. 형광 현미경 관찰

spy-gfp 오페론 융합 플라스미드를 보유하는 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum의 세포를 분석 하기 위해 0.01 M Tris-HCl (PH8.0)로 1회 세척 하였다. 세포액을 소량 덜어 1% agarose 로 코팅한 후 오일을 첨가하여 100X 의 Axioscope A1 (Carl Zeiss, Germany) 현미경으로 관찰 하였고 이미지는 결합 장치 카메라로 촬영 하였다[25].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5. 세균 성장 곡선 측정(Bioscreen)

LB 영양배지에서 하룻밤 배양한 *spy-gfp* 오페론 융합 플라스미드를 보유하는 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum 균주를 PBS (phosphate buffer saline, pH 7.0)에 $O.D_{600\ nm}$=1.0이 되도록 희석시켰다. 그리고 8 μg/ml, 6 μg/ml, 4 μg/ml, 2 μg/ml의 polymyxin B (Sigma Aldrich Inc., Germany)가 포함되거나 포함되지 않은 LB 영양배지에 $O.D_{600\ nm}$=1.0으로 희석시켰던 균주를 $O.D_{600\ nm}$=0.02가 되도록 동일한 양으로 Microplate (Honey comb)에 접종하였다. Microplate는 Bioscreen C Microplate Reader (Transgalactic Ltd, Europe)에서 37℃의 온도에서 24시간 동안 교반하여 배양하였고 30분 간격으로 $O.D_{600\ nm}$ 값을 측정하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

6. 녹색 형광 단백질(green fluorescence protein; GFP) 형광 측정

spy-gfp 융합 플라스미드를 보유하는 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum을 LB 영양배지에서 밤새 배양 한 다음, 새로운 LB 영양배지에서 1:1000으로 희석해 접종하여 37℃, 220 rpm의 진탕 배양기에서 대수기인 $O.D_{600\ nm}$=0.4 이 될 때까지 배양한 후, 세포를 4% 에탄올(ethanol)과 각 균주에서 가장 높은 *spy-gfp*유도를 보여주는 농도로 *S.* Enteritidis는 polymyxin B (2 μg/ml), *S.* Gallinarum는 polymyxin B (6 μg/ml)을 처리 후 1시간 추가로 더 배양하였다. PBS (phosphate buffer saline, pH 7.0)로 2번 세척 후 Black 96-well plate (SPL, Korea)에서 $OD_{600\ nm}$=1.0의 형광 강도를 DTX 880 microplate reader (Beckman Coulter, USA)로 GFP는 485 nm excitation과 535 nm emission으로 측정하였다[25].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

7. 대식세포 내 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum 생존율 측정

대식세포인 Raw 264.7 cell (ATCC TIB-7)를 10% FBS (Fetal bovine serum) 가 포함된 RPMI 1640 (Welgene, Korea)에서 37℃ 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. Hemocytometer (Neubauer-improved, Germany)를 이용하여 세포의 수를 센 후 24-well cell culture plate (SPL, Korea) 에서 1well당 1 X 10^5 cell/ml으로 seeding하여 배양하였다. LB 영양배지에서 하룻밤 배양한 균주를 3 ml의 새로운 LB 배지에서 1:100으로 희석해 접종하여 37℃, 220 rpm의 진탕 배양기에서 3시간 키운 후 3 ml의 균주를 모두 13,000 g, 1분의 조건으로 원심분리 후 $O.D_{600\ nm}$=1.0이 되도록 아무것도 포함되지 않은 RPMI 1640으로 희석하여 *S.* Enteritidis는 MOI (Multiplicity of infection) 10 이 되게끔, *S.* Gallinarum은 100 이 되게끔 Raw 264.7 cell 에 30분 동안 감염시켰다. 30분 후에 PBS로 1번 세척 해주고 10% FBS 와 gentamicin (10 μg/ml)을 포함한 RPMI 1640 배지로 교환하여 1시간, 3시간, 18시간 후에 PBS로 희석한 1% Triton X-100 (Sigma Aldrich Inc., Germany)을 처리하여 LB 고체배지 (LB agar plate)에 20 μl씩 떨어뜨려 CFU (colony forming units)를 관찰하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅲ. 표

Table 1. Bacteria strains and plasmids used in this study

Strains	Genotype	Source
FB248	*Salmonella enterica* serovar Gallinarum (*S*. Gallinarum)	ATCC
FB254	*Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S*. Enteritidis)	ATCC
IB2126	*S*. Gallinarum/*spy-gfp* :: AP	This study
IB2129	*S*. Enteritidis/*spy-gfp* :: AP	This study
IB2203	*S*. Gallinarum/*spy-gfp* :: AP Δ*cpxR* :: CM	This study
IB2204	*S*. Enteritidis/*spy-gfp* :: AP Δ*cpxR* :: CM	This study
IB2205	*S*. Gallinarum/*spy-gfp* :: AP Δ*baeR* :: CM	This study
IB2206	*S*. Enteritidis/*spy-gfp* :: AP Δ*baeR* :: CM	This study
IB2209	*S*. Gallinarum Δ*spy* :: CM	This study
IB2210	*S*. Enteritidis Δ*spy* :: CM	This study
Plasmid	**Genotype**	**Source**
pFPV25	*gfp* fusion vector	[26]
$_P$spy-gfp	*spy* promoter containing the entire gene-*gfp* fusion, *spy* promoter-*gfp* fusion	[25], This study

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. Primers used for construction of clone in this study

Primer name	Primer sequence (5’ – 3’)
***spy-gfp* 1 clone**	
***spy* linker *Sac*I Fw-1**	TATGAGCTCTGCTATATCATGCTGTTGTA
***spy* linker *BamH*I Rev-1**	TATGGATCCAGGACGGCTATAGAATTCTCTG
***spy-gfp* 2 clone**	
***spy* linker *Sac*I Fw-2**	TATGAGCTCTGCTATATCATGCTGTTGTA
***spy* linker *BamH*I Rev-2**	TATGGATCCTACCTTTATGCTG CATCATT

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅳ. 결 과

1. *spy-gfp* fusion 제조.

*Salmonella*에서 *spy* 기능을 조사하기 위한 *spy-gfp* clones를 제작하였다. *spy-gfp* fusion 1은 *Salmonella* 균 염색체에서 1,388,351~1,389,202번 째 염기까지 총 852 bp의 *spy* 유전자의 promoter 부위와 구조유전자 전체가 포함된 반면, *spy-gfp* fusion 2는 1,388,351~1,388,683번 째 염기까지 총 333 bp의 *spy* 유전자의 promoter 부위만이 포함되었다**(Figure 2)**.

S. enterica serovar Typhimurium 14028s에 *spy-gfp* fusion 1 또는 *spy-gfp* fusion 2를 형질전환시켜 이들의 대수기와 정지기에서 *spy-gfp* 전사의 발현량의 차이를 형광측정을 통해 확인 하였다. *spy-gfp* 1에 비해 *spy-gfp* 2는 균주의 대수기와 정지기 모두 발현량이 큰 것으로 확인되었다**(Figure 3)**. 이 결과로 *spy-gfp* fusion 2가 포함된 균주는 대수기와 정지기에서 큰 발현량을 나타내기 때문에 *spy-gfp* 전사 분석을 위한 실험균주로 이용하기에는 어려움이 있다고 판단되어 *spy-gfp* fusion 1을 사용하였다. *spy-gfp* fusion 1 또는 *spy-gfp* fusion 2로 형질전환된 *S. Enteritidis* 및 *Salmonella* Gallinarum에서도 같은 결과를 얻을 수 있었다(data not shown).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

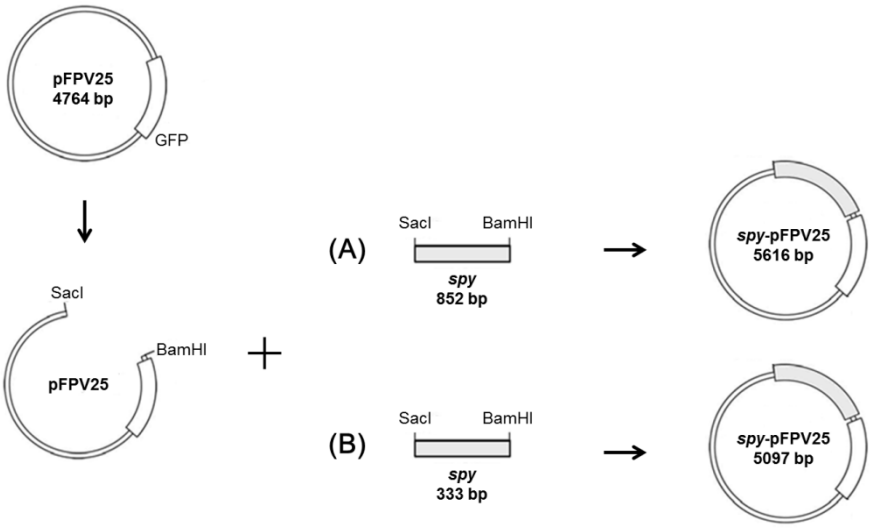


Figure 2. Construction of *spy-gfp* fusion 1 and 2.

To construct *spy* transcriptional fusion, I used a promoter probe vector plasmid pFPV25. **(A)** A DNA fragment containing the *spy* promoter region was amplified from *S. typhimurium* chromosomal DNA by PCR using i-pfu polymerase with primer pairs *spy* linker *Sac*I Fw-1, *spy* linker *BamH*I Rev-1. The purified PCR products were digested with *Sac*I and *BamH*I, and then ligated with *Sac*I/*BamH*I-digested pFPV25 and transformed into the DH10β.

(B) A DNA fragment containing the *spy* promoter region was amplified from *S.* typhimurium chromosomal DNA by PCR using i-Pfu polymerase with primer pairs *spy* linker *Sac*I Fw-2, *spy* linker *BamH*I Rev-2. The purified PCR products were digested with *Sac*I and *BamH*I, and then ligated with *Sac*I/*BamH*I-digested pFPV25 and transformed into the DH5α.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

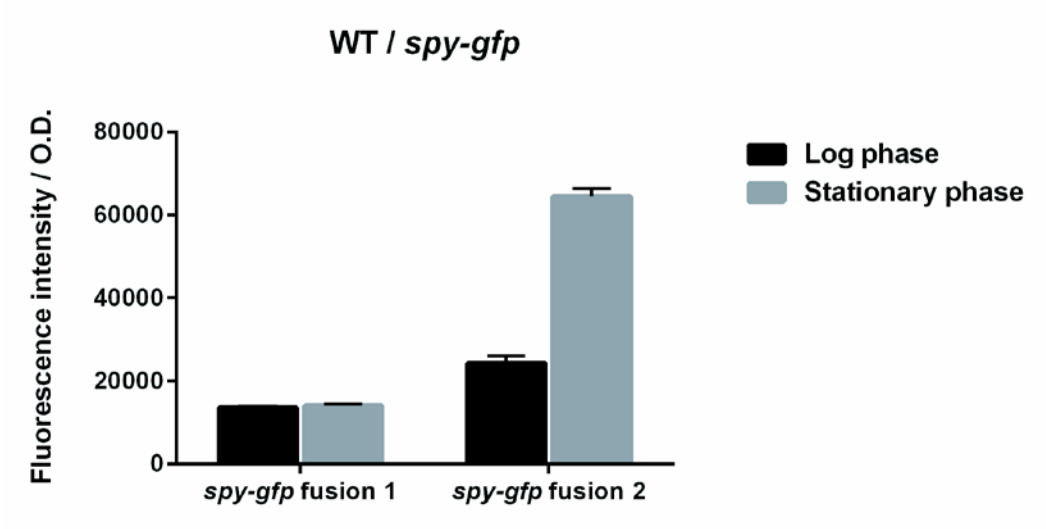


Figure 3. Difference in *spy-gfp* fusion 1 and 2 expression in log phase and stationary phase.

Fluorescence was measured to determine the induction of *spy* between *spy-gfp* fusion including the promoter containing the entire gene and *spy-gfp* fusion including the short promoter. Cells were re-inoculated at 1:1000 and grown to log phase and stationary phase. After dilution with PBS, $O.D_{600\ nm}$=1.0 was adjusted and fluorescence was measured.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. *S*. Enteritidis 및 *S*. Gallinarum 에서 spheroplast 형성 시 *spy* 전사는 유도된다.

실제로 *S*. Enteritidis 및 *S*. Gallinarum 균주 에서도 spheroplast를 형성 할 때 Spy의 발현이 유도되는지 확인 하기 위해 *spy-gfp* 오페론 융합 플라스미드를 보유하는 *S*. Enteritidis 및 *S*. Gallinarum을 이용하여 GFP의 발현을 확인 하였다. Sucrose와 lysozyme 처리까지 하였을 때는 spheroplast가 뚜렷하게 형성 되지 않았고, sucrose, lysozyme, EDTA를 모두 처리한 경우 spheroplast가 형성되었으며, 이때 GFP 발현을 확인 할 수 있었다**(Figure 4A and 5A)**. 이 결과는 sucrose에 의한 삼투압에 대한 노출, lysozyme에 의한 펩티도글리칸의 용해 그리고 EDTA에 의한 세포막의 약화를 통한 spheroplast형성이 완성될 때 *S*. Enteritidis과 *S*. Gallinarum에서도 *spy*전사가 유도됨을 확인하였다.

반면 *cpxR*과 *baeR* 결손 돌연변이를 형질도입시킨 균주에서는 GFP 발현을 확인 할 수 없었고**(Figure 4B and 5B),** 이는 spheroplasting stress를 통한 Spy 발현과정에 관여하는 TCS인 BaeS 및 CpxR가 관련됨을 보여준다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

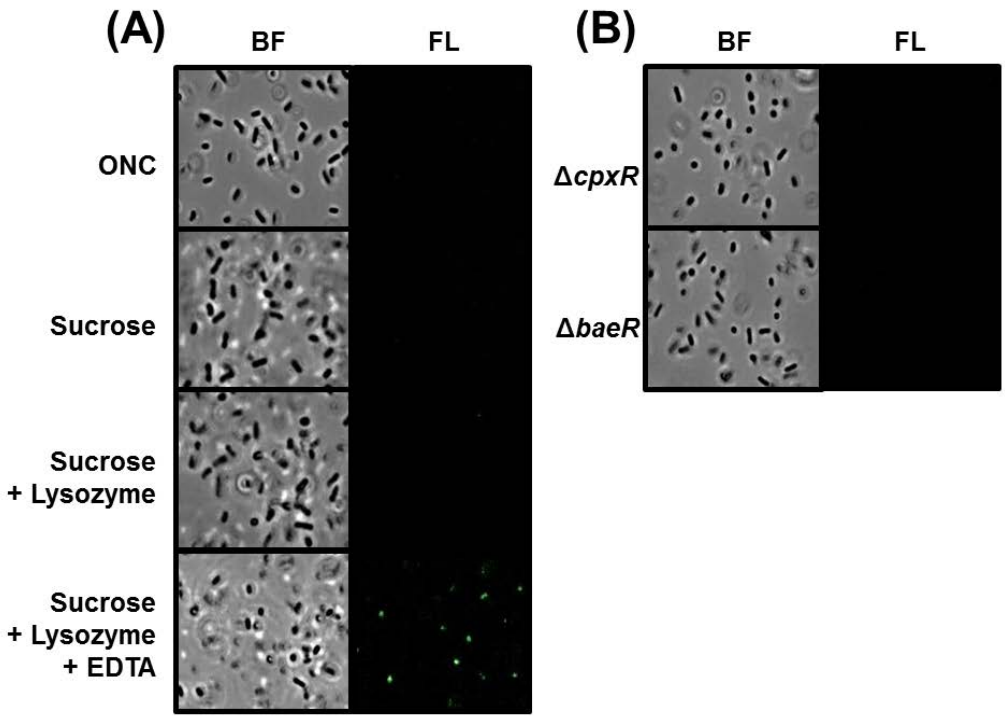


Figure 4. *spy* transcription is induced in *S*. Enteritidis upon spheroplast formation.

(A) *S*. Enteritidis/$_p$*spy-gfp* was visualized at each step for spheroplast formation, including during cumulative treatments with sucrose, lysozyme, and EDTA, as described in the Materials and Methods. Notably, to normalize the incubation time for all samples taken throughout the 4-h process, all cells at each stage of spheroplast formation were partly isolated and incubated for 4h prior to microscopy. **(B)** *cpxR*, *baeR* transduced strain into *S*. Enteritidis/$_p$*spy-gfp* were visualized after completion of spheroplasting process. All paired images for bright field (BF) and fluorescence (FL) microscopy were taken from the same samples.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

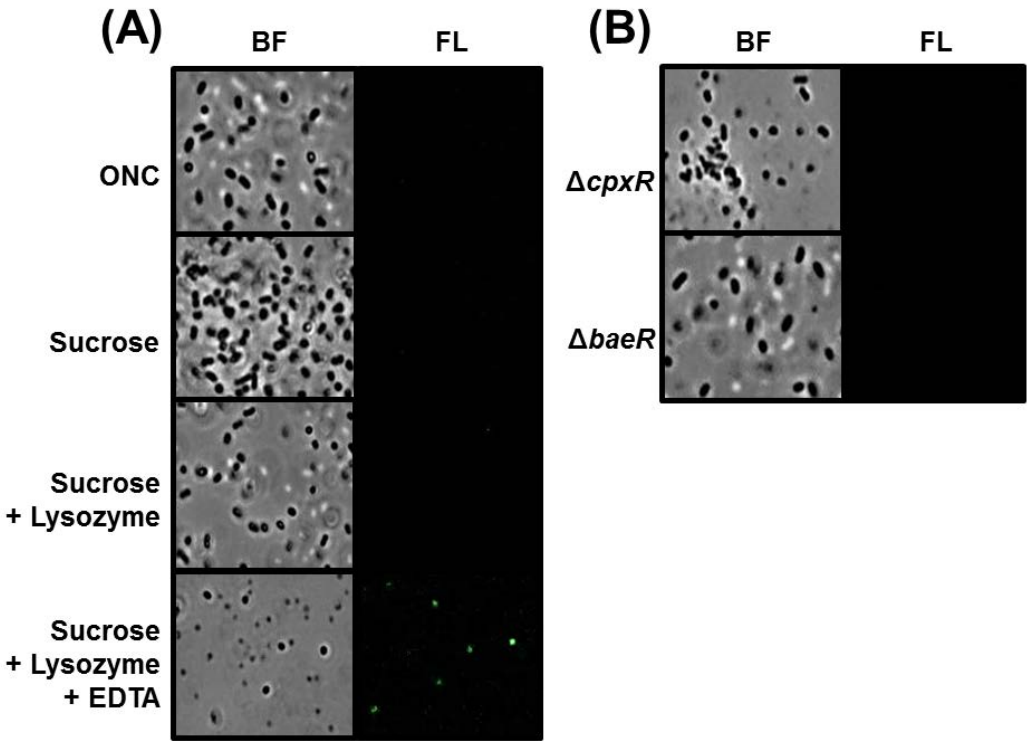


Figure 5. *spy* transcription is induced in *S*. Gallinarum upon spheroplast formation.

(A) *S*. Gallinarum/$_p$*spy-gfp* was visualized at each step for spheroplast formation, including during cumulative treatments with sucrose, lysozyme, and EDTA, as described in the Materials and Methods. Notably, to normalize the incubation time for all samples taken throughout the 4-h process, all cells at each stage of spheroplast formation were partly isolated and incubated for 4h prior to microscopy. **(B)** *cpxR*, *baeR* transduced strain into *S*. Gallinarum/$_p$*spy-gfp* were visualized after completion of spheroplasting process. All paired images for bright field (BF) and fluorescence (FL) microscopy were taken from the same samples.

Collection @ chosun

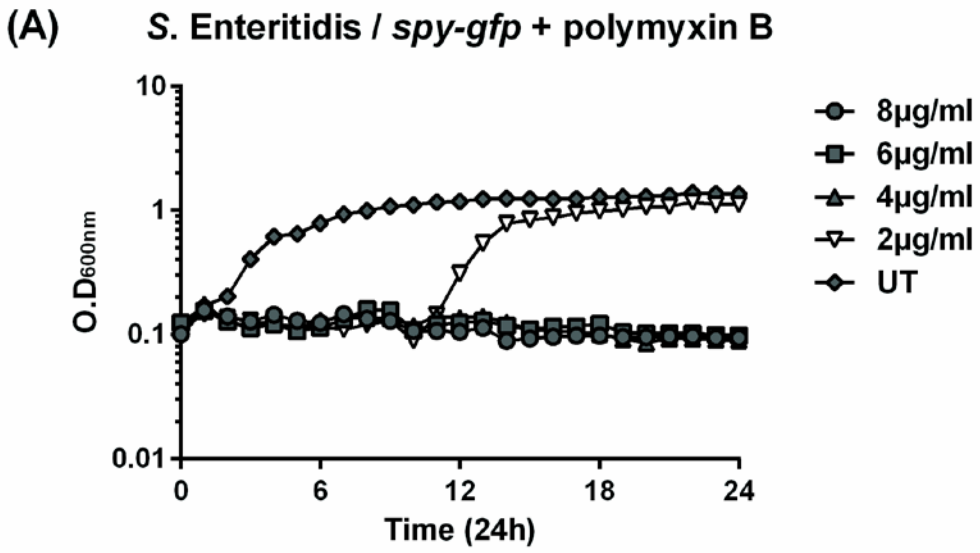
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

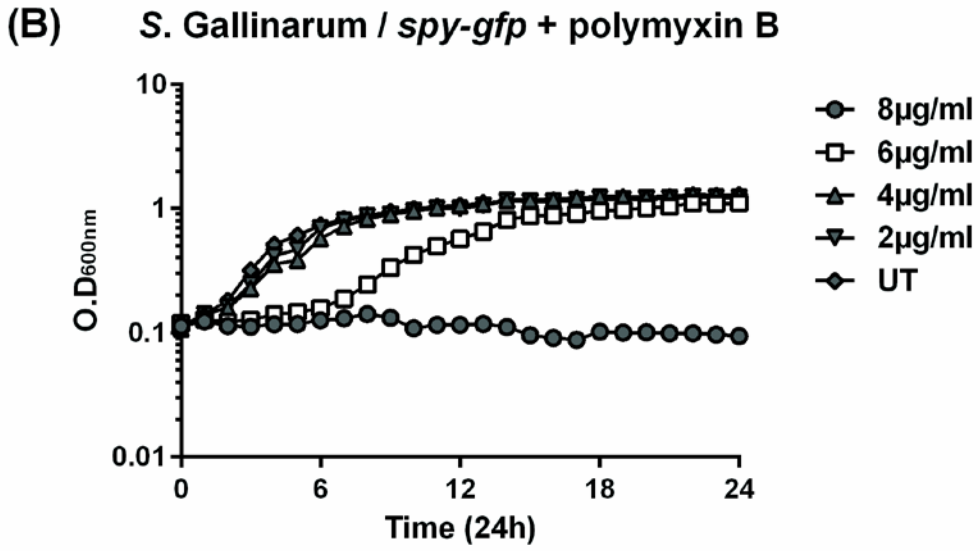
3. 세균 성장에 영향을 주는 polymyxin B 농도 결정.

세균 막을 훼손하는 항생제인 polymyxin B에 대한 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum *spy* 유전자의 전사유도를 측정하기 위해 *spy-gfp* 오페론 융합 플라스미드를 가진 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum 균주들의 polymyxin B에 대한 감수성을 측정하였다. LB 영양배지에서 polymyxin B 를 농도 별로 처리하여 성장 곡선을 관찰하였고 그 결과 균주별로 성장이 지연되는 농도가 달랐다. *S.* Enteritidis 는 2 μg/ml에서**(Figure 6A)** *S.* Gallinarum에서는 6 μg/ml의 농도로 처리하였을 때**(Figure 6B)**, 균주의 성장률이 크게 감소하는 것을 확인하였고, 이 농도를 *spy* 유전자 전사량 측정에 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 6. Growth curves of *S*. Enteritidis/$_p$*spy-gfp* , *S*. Gallinarum/$_p$*spy-gfp* treated with polymyxin B or not.

(A) *S*. Enteritidis/$_p$*spy-gfp* was treated with polymyxin B containing LB media at 0, 2, 4, 6 and 8 μg/ml. It was measured in $O.D_{600\ nm}$ at 37℃ for 24 hours. **(B)** *S*. Enteritidis/$_p$*spy-gfp* was treated with polymyxin B containing LB media at 0, 2, 4, 6 and 8 μg/ml. It was measured in $O.D_{600\ nm}$ at 37℃ for 24 hours.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. polymyxin B는 *S*. Enteritidis 및 *S*. Gallinarum 내의 *spy-gfp* 전사를 유도한다.

세균의 성장을 지연시키는 농도를 이용하여 세균의 외막 스트레스를 주었을 때, *spy*의 발현이 유도되는지 확인해보았다. *spy-gfp* 오페론 융합 플라스미드를 가진 *S*. Enteritidis/$_p$*spy-gfp* 와 *S*. Gallinarum/$_p$*spy-gfp* 에서 형광 측정 진행하였는데, *S*. Enteritidis 는 2 μg/ml로 *S*. Gallinarum에서는 6 μg/ml의 농도로 처리하여 결과를 확인하였다. 각 LB 영양배지에서 대수기인 $OD_{600\ nm}$=0.4에서 발현하지 않는 것을 확인하였고 아무것도 처리하지 않은 균주(untreated; UT)에 비해서 polymyxin B 스트레스를 주었을 때 *spy-gfp*의 발현이 크게 증가하는 것을 하였다**(Figure 7)**.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

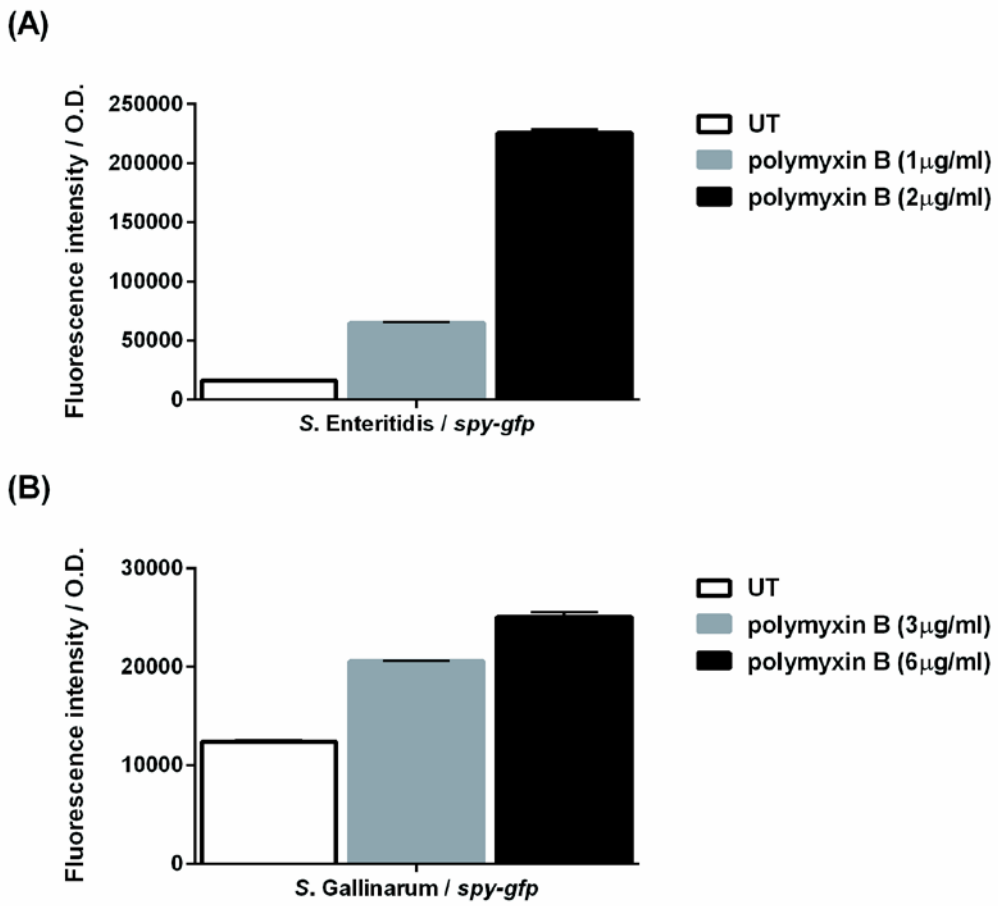


Figure 7. Induction of *spy-gfp* transcription in *S*. Enteritidis, *S*. Gallinarum by exposure to polymyxin B.

(A) *S*. Enteritidis/$_p$*spy-gfp* fusion was cultured to O.D$_{600\ nm}$=0.4 and polymyxin B (1 μg/ml, 2 μg/ml) was treated for 1 hour and fluorescence was measured compared to untreated control (UT). **(B)** *S*. Gallinarum/$_p$*spy-gfp* fusion was cultured to O.D$_{600\ nm}$=0.4 and polymyxin B (3 μg/ml, 6 μg/ml) was treated for 1 hour and fluorescence was measured compared to untreated control (UT).

Collection @ chosun

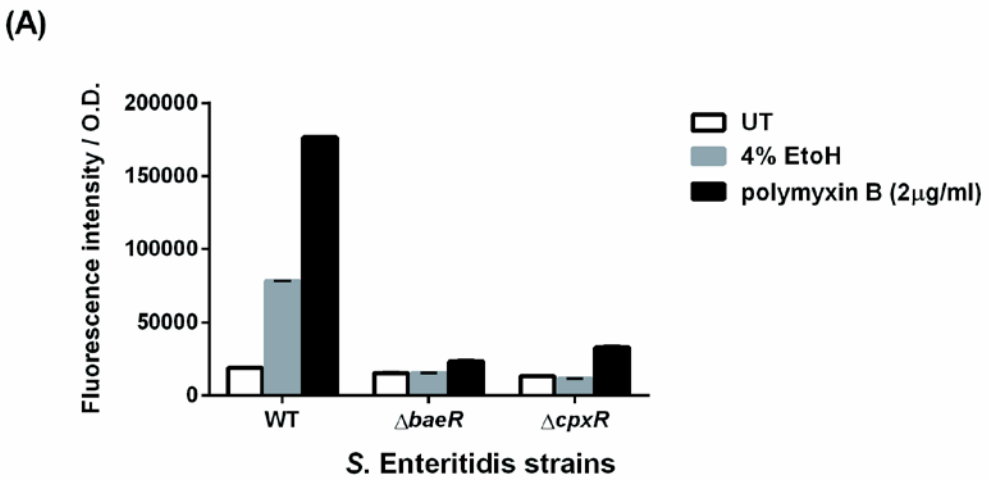
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5. *spy*의 발현은 CpxR과 BaeR에 의존적이다.

세균 외막에 스트레스를 주는 두 번째 요인으로 4% 에탄올도 처리하여 *spy-gfp* 오페론 융합 플라스미드를 가진 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum에서 형광 측정 진행하였다. *E. coli*의 *spy* 유전자 전사 유도는 CpxRA과 BaesR 에 의해서 조절이 되는데[27], *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum에서도 CpxR과 BaeR이 관련되는지 확인하였다. *cpxR*과 *baeR*이 결손 된 돌연변이를 형질도입시킨 균주에서 4% 에탄올이나 polymyxin B를 처리했을 때 대조군(WT)에 비해서 발현이 거의 되지 않는 것을 확인하였다**(Figure 8)**. 이 결과는 polymyxin B, 4% 에탄올의 외막 스트레스를 주는 요인들로 인해 *spy-gfp*가 발현이 되고, 이 유도과정은 CpxR과 BaeR에 의존적인 것을 보여준다. 결국 *spy*의 발현에 있어 BaeR 및 CpxR을 통한 세포막 스트레스 신호 전달 과정이 필수적임을 확인할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



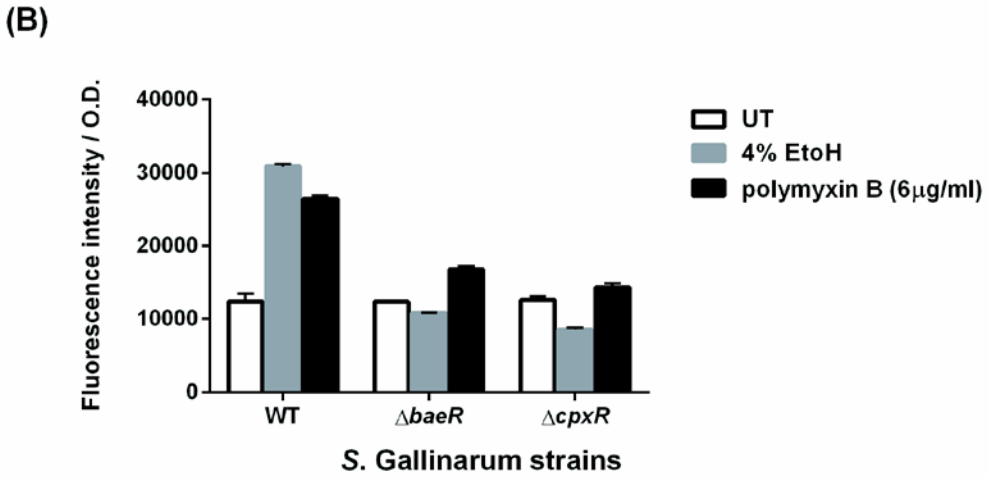


Figure 8. Induction of *spy-gfp* transcription in *S*. Enteritidis, *S*. Gallinarum by exposure to ethanol and concentration of polymyxin B with the highest expression.

(A) *S*. Enteritidis/$_p$*spy-gfp* fusion were cultured up to O.D$_{600\ nm}$=0.4 and then treated with 4% ethanol or with a concentration of polymyxin B, which causes high expression in cells, for 1 hour and then fluorescence intensity was measured. with untreated control (UT) was also

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

included. **(B)** *S*. Gallinarum/$_{p}$*spy-gfp* fusion were cultured up to $O.D_{600\ nm}$=0.4 and then treated with 4% ethanol or with a concentration of polymyxin B, which causes high expression in cells, for 1 hour and then fluorescence intensity was measured. with untreated control (UT) was also included.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

6. Spy는 대식세포 내부의 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum 생존에 필요하다.

S. Enteritidis인 야생형 균주(WT)와 함께 *spy* 결손 돌연변이 *S.* Enteritidis 균주를 사용하여 *S.* Enteritidis가 대식세포 내에서 생존하기 위해 Spy가 필요한지 알아 보기 위해서 대식세포에 감염시켜 증식률을 조사하였다**(Figure 9)**.

대식세포는 Raw 264.7을 이용하였고, 대식세포의 활성화를 위해서 IFN-γ를 처리하였다. 대식세포에 감염시키고 3시간 후 야생형 균주에 비해서 *spy* 결손 돌연변이 *S.* Enteritidis 균주가 증식률이 감소하는 것을 확인하였고, 18시간 이후에는 그 격차가 더 크게 증가하는 것을 확인 하였다.

같은 방법으로 *S.* Gallinarum의 야생형 균주(WT)와 함께 *spy* 결손 돌연변이 S. Gallinarum 균주를 사용하여 대식세포 내 감염시켜 증식률을 조사하였다. *S.* Gallinarum는 대식세포에 감염되었을 때 전체적인 생존율이 감소되는 추세를 보여주긴 하지만 3시간에서 18시간 모두 *spy* 결손 돌연변이 균주의 생존율이 야생형 균주에 비해 감염이 감소됨을 확인하였다. 이 결과는 Spy가 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum이 대식세포 내에서 생존하고 증식하기 위해 필요함을 알 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

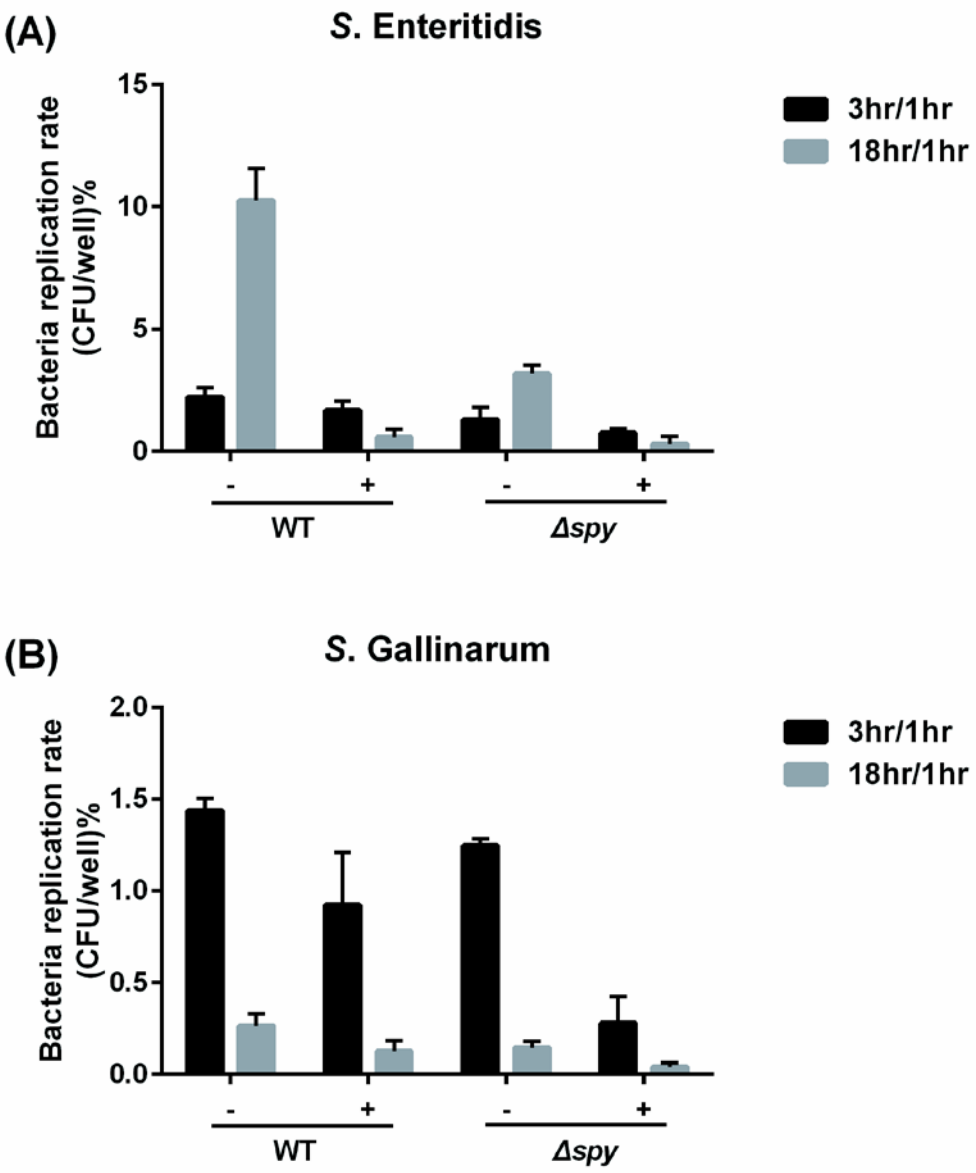


Figure 9. Spy is required for infection and survival of macrophage.

(A) In the RPMI 1640 medium containing FBS, IFN-γ treated or untreated Raw 264.7 cells were infected with *S*. Enteritidis (WT), Δ*spy* mutant transduced strain into WT at MOI

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(Multiplicity of infection) 10. **(B)** and In the same medium, IFN-γ treated or untreated Raw 264.7 cells were infected with *S*. Gallinarum (WT), Δ*spy* mutant transduced strain into WT at MOI 100.

(A), **(B)** 1 hour, 3 hour, 18hour after infection, all strain cells were counted for CFU (colony forming units) by treating with 1% Triton X-100 in Raw 264.7 cells. The experiment was repeated three times with essentially identical results.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

V. 고 찰

본 연구에서는 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum의 Spy 발현과정에서 *spy* 유전자 전사의 유도에 외막 스트레스의 필요성 및 유전자 전사 유도에 참여하는 조절 단백질의 필요성을 확인하였으며, 더 나아가 대식세포 내 *Salmonella* 생존 및 증식에 Spy의 필수적인 역할이 존재함을 규명하여, *Salmonella*의 병원성 발현과정에 Spy 발현을 유도하는 막 스트레스 유발 성분의 존재 가능성과 *Salmonella* 병독성 발현과정에서 Spy의 chaperone 기능을 필요로 하는 periplasm 단백질들의 중요성을 확인할 수 있었다.

spy 유전자 전사의 유도를 확인하기 위해 제조한 *spy-gfp* 융합체들 중 promoter 부위만을 포함한 것은 promoter뿐 아니라 *spy* 구조유전자 전체를 포함한 것에 비해서 대수기와 정지기에서 모두 발현량이 크게 나타나는 것으로 나타났다 **(Figure 2 and 3)**. 이 결과는 예상치 못한 것으로서 *spy* 유전자 전사 유도과정에 있어서 *E. coli* 에서 알려진 Cpx와 Bae시스템 이외에 다른 조절 인자의 존재가능성을 시사하지만, 후속연구를 통해 밝혀야 할 것으로 생각된다. *spy* 유전자의 전사는 세균이 spheroplast를 형성했을 때와 antimicrobial peptide 인 polymyxin B를 처리했을 때 크게 증가되는 것을 확인하였다**(Figure 4 and 5 and 7)**. 특히 polymyxin B의 농도를 증가시켜 세포의 성장을 지연시킬수록 *spy* 전사량이 증가하는 것을 할 수 있었고, 에탄올을 처리하여 stress를 주는 조건에서도 polymyxin B 와 비슷하게 *spy*의 전사가 유도 되는 것을 알 수 있었다**(Figure 8)**. *E. coli*에서 Spy의 발현은 Cpx과 Bae 두 가지 스트레스 반응 시스템에 의해 전사적으로 조절 되는데[12-14], *S. Enteritidis 및 S.* Gallinarum에서도 이 두 시스템이

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

spy 전사 유도에 필요한 것으로 확인되었다. 다만 *S.* Gallinarum의 경우 *cpxR*과 *baeR*의 결손 돌연변이 균주에서도 polymyxin B에 대한 *spy*의 유전자 전사가 일정 부분 남아 있었다**(Figure 8B)**. 이는 아마도 *S.* Gallinarum의 polymyxin B 반응성의 차이로 판단되며, 더 정교한 조절 시스템의 존재가능성 또한 배제할 수 없다.

숙주 동물 면역체계의 다양한 항 미생물 성분들은 세균 단백질의 구조를 손상시킬 수 있다. 대부분 세균들은 단백질의 활성을 복구할 수 있는 chaperone 단백질들을 생산하는데, 보통 이 단백질들은 세균이 스트레스에 노출되었을 때 발현이 크게 증가하고[3, 28] 세균 병원성 발현에도 중요한 역할을 한다[29]. periplasm chaperone 단백질들은 세균의 세포 외부, 숙주 세포 내의 다양한 환경에서 병원성 효과 단백질(effector protein)을 분비하는 과정을 돕는다[1]. LolA, SurA, Skp, DegP 등의 chaperone 단백질이 periplasm 단백질들의 구조 안정화에 기여하는 것으로 알려졌다. 하지만 세균 병원성 발현에서 이들의 역할은 미미한 것으로 알려졌는데, 이는 아마도 이 chaperone들이 작용하는 기질 단백질들의 범위가 한정적이기 때문일 것으로 판단된다. 하지만 단백질 구조 연구를 통해 확인한 Spy의 구조는 광범위한 기질 단백질들의 구조 안정화에 기여할 가능성이 클 것으로 예상된다. 실제로, *E. coli*의 필수 외막 단백질인 LptD는 Skp와 FkpA chaperone 단백질들에 의해서 특이적으로 그 구조가 안정되는 것으로 알려졌는데, Skp와 FkpA가 결손된 균주에서도 Spy가 LptD의 기능적인 구조를 복원하는 데 충분하게 작용하는 것으로 보고되었다[30].

대식세포 내에서 *S.* Enteritidis 및 *S.* Enteritidis 의 생존 및 증식률을 확인한 결과 이 과정에서도 Spy의 중요성을 확인할 수 있었다**(Figure 9)**. 항 세균 성분 증가를 위해 IFN-γ를 처리 하여 대식세포를 활성화시키면 세균의 증식률이 감소한다. IFN-γ을 처리하지 않은 대식세포에서도 야생형 *S.* Gallinarum은 생존율이 줄어드는

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

것으로 알려져 있지만[31], *spy* 결손 돌연변이 *S.* Gallinarum균주는 야생형에 비해 생존율이 더욱 감소하였다. 반면, *S.* Enteritidis 의 야생형은 Typhimurium과 같은 다른 혈청 형 세균과 마찬가지로 IFN-γ을 처리하지 않은 대식세포에서 증식률이 크게 증가 하였으며, IFN-γ을 처리한 대식세포에서 생존율이 감소하였다. *spy* 돌연변이 *S.* Enteritidis의 증식률과 생존율은 두 조건의 대식세포 내에서 야생형 균주에 비해 크게 감소하였다. 이 결과들은 대식세포 내 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum의 periplasm 단백질들의 구조 안정화에 관여하는 Spy의 기능이 이들 균주의 병원성 발현에도 필요하다는 사실을 확실히 보여준다.

본 연구에서 사용한 균주들은 인수공통 감염 균주들로써 의약보건분야나 축산업 및 축산가공업에서 이들의 감염을 제어 하기 위한 많은 노력과 경제적 비용을 요구한다. 본 연구 에서 사용한 *spy-gfp* 오페론 융합체는 이들 균주의 제어를 목표로 하여 개발되는 항 미생물 제제나 또는 항생제의 효능을 모니터링 하기 위한 바이오센서 개발에 사용될 수 있을 것이며, 대식세포 내 *spy* 결손 돌연변이 균주의 병독성 감소 결과는 이들 균주에 대한 예방 백신 제조에 있어서 *spy* 돌연변이의 효용성이 매우 높음을 보여준다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅵ. 참 고 문 헌

1. Burkinshaw, B.J. and N.C. Strynadka, *Assembly and structure of the T3SS*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(8): p. 1649-63.
2. Hartl, F.U., *Molecular chaperones in cellular protein folding*. Nature, 1996. **381**: p. 571.
3. Rowley, G., et al., *Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(5): p. 383-94.
4. Powers, E.T. and W.E. Balch, *Protein folding: Protection from the outside*. Nature, 2011. **471**(7336): p. 42-3.
5. Yamamoto, K. and A. Ishihama, *Characterization of copper-inducible promoters regulated by CpxA/CpxR in Escherichia coli*. Biosci Biotechnol Biochem, 2006. **70**(7): p. 1688-95.
6. 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.
7. 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.
8. Merdanovic, M., et al., *Protein quality control in the bacterial periplasm*. Annu Rev Microbiol, 2011. **65**: p. 149-68.
9. Kwon, E., et al., *The crystal structure Escherichia coli Spy*. Protein Sci, 2010. **19**(11): p. 2252-9.
10. 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.
11. Danese, P.N. and T.J. Silhavy, *CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon*. J Bacteriol, 1998. **180**(4): p. 831-9.
12. MacRitchie, D.M., et al., *Two-component signaling and gram negative envelope stress response systems*. Adv Exp Med Biol, 2008. **631**: p. 80-110.
13. Nagasawa, S., K. Ishige, and T. Mizuno, *Novel members of the two-component signal transduction genes in Escherichia coli*. J Biochem, 1993. **114**(3): p. 350-7.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

14. Vogt, S.L. and T.L. Raivio, *Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response*. FEMS Microbiol Lett, 2012. **326**(1): p. 2-11.
15. 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.
16. 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.
17. Grassl, G.A. and B.B. Finlay, *Pathogenesis of enteric Salmonella infections*. Curr Opin Gastroenterol, 2008. **24**(1): p. 22-6.
18. Song, J., et al., *A mouse model for the human pathogen Salmonella typhi*. Cell Host Microbe, 2010. **8**(4): p. 369-76.
19. Sannat, C., et al., *Characterization of Salmonella Gallinarum from an outbreak in Raigarh, Chhattisgarh*. Vet World, 2017. **10**(2): p. 144-148.
20. Andino, A. and I. Hanning, *Salmonella enterica: survival, colonization, and virulence differences among serovars*. ScientificWorldJournal, 2015. **2015**: p. 520179.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Birdsell, D.C. and E.H. Cota-Robles, *Production and ultrastructure of lysozyme and ethylenediaminetetraacetate-lysozyme spheroplasts of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1967. **93**(1): p. 427-37.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

25. Jeong, S.M., et al., *Inducible spy Transcription Acts as a Sensor for Envelope Stress of Salmonella typhimurium*. Korean J Food Sci Anim Resour, 2017. **37**(1): p. 134-138.
26. 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.
27. Bury-Mone, S., et al., *Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in Escherichia coli*. PLoS Genet, 2009. **5**(9): p. e1000651.
28. Ramos, J.L., et al., *Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors*. Curr Opin Microbiol, 2001. **4**(2): p. 166-71.
29. 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.
30. Goemans, C., K. Denoncin, and J.F. Collet, *Folding mechanisms of periplasmic proteins*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(8): p. 1517-28.
31. 임정주, et al., *RAW 264.7세포에 감염시킨 Salmonella gallinarum에 대한 나트륨염 복합조성물의 항균효과*. Korean Journal of Veterinary Public Health, 2011. **35**(3): p. 189-193.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

초 록

Salmonella Enteritidis 과 *Salmonella* Gallinarum의 세포막 스트레스에 반응하는 *spy* 유전자 전사 유도 및 조절에 관한 연구

강 보 경

지도교수: 방 일 수

조선대학교 대학원

치의생명공학과

모든 생물체가 지구에서 생명을 유지하기 위해서는 단백질 구조의 유지가 필수적이다. 변성된 단백질의 적절한 접힘과 손상된 단백질을 기능성 형태로 회복시키는 것은 chaperone 단백질에 의해 매개된다. 진핵세포에서 chaperone은 주로 세포질 공간에서 작용하지만, 세포 외 공간에서 단백질 형성을 돕는 chaperone의 존재와 기능에 대해 알려진 것은 거의 없다. 반면 박테리아는 세포질 외부에서 기능하는 chaperone 단백질들을 가지고 있다. 최근 *E. coli*에서 확인된 주변세포질(periplasm) chaperone인 Spheroplast protein Y (Spy)의 세포질 외부로 분비되는 외막 스트레스 유도성 발현특성과 결정 구조는 막 손상 조건 하에서, 매우 광범위한 기질단백질에 작용할 것으로 예상된다. 그러나 박테리아의 병원성 발현 과정 중 Spy의 생리적 역할은 아직 밝혀지지 않고 있다.

본 연구는 장내 병원균인 *Salmonella*에서 *spy* 유전자의 발현과 대식세포 내

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

생존에 있어서 Spy의 역할을 조사하였다. *Salmonella enterica*의 두 혈청 형 Enteritidis 및 Gallinarum에서 *spy-gfp* 오페론 융합체를 사용하여, *Salmonella*가 spheroplast를 형성하고 ethanol 또는 막 파괴 항생제인 polymyxin B를 처리했을 때 *spy* 전사가 크게 유도된다는 것을 발견했다. 이러한 *spy* 전사의 유도는 많은 그람 음성균의 세포막 항상성을 유지하기 위한 regulon을 작동시키는 two-component signal transduction system (TCS) 인 BaeSR 혹은 CpxAR이 결손 된 돌연변이 *Salmonella* 균주에서는 현저히 감소하였다. 대식세포인 Raw 264.7 에 감염된 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum의 *spy* 결손 돌연변이 균주는 야생형 균주에 비해 *Salmonella* 증식률이 크게 감소하였다. 이러한 결과는 Spy 발현의 유도가 박테리아 생존을 위협하는 막 스트레스인 조건을 인지하는 two-component signal transduction system (TCS)에 의해 효율적으로 유발 될 수 있음을 보여주며 다양한 항 세균 성분 인자를 생성하는 대식세포 내에서 *Salmonella* 증식에 필요한 주변세포질에서 단백질 항상성 유지를 촉진할 수 있음을 보여준다. 이 연구는 인수공통 감염 균주로써 중요한 *S. enterica*의 혈청 형인 *S.* Enteritidis 및 *S.* Gallinarum의 *spy-gfp* 오페론 융합체에 의한 *spy* 전사를 모니터링 하는 것이 *Salmonella* 외막을 표적으로 하는 항균제 개발의 효능을 쉽게 결정할 수 있게 하고 Spy의 비 활성화가 살모넬라증(salmonellosis)을 감소시키기 위한 백신균주 개발에 매우 유용 할 수 있음을 보여준다.

Collection @ chosun