

2010년 8월
석사학위 논문

**A Survival Mechanism of
Salmonella enterica serovar
Typhimurium against the Synergistic
Antimicrobial Activity of Acid pH and
Reactive Nitrogen Species(RNS)**

조선대학교 대학원

치의생명공학과

박 희 정

**A Survival Mechanism of
Salmonella enterica serovar
Typhimurium against the Synergistic
Antimicrobial Activity of Acid pH and
Reactive Nitrogen Species(RNS)**

(산성 pH와 활성질소종 조합의 항균 활성에
대항하는 살모넬라 생존 메카니즘)

2010년 8월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

박 희 정

**A Survival Mechanism of
Salmonella enterica serovar
Typhimurium against the Synergistic
Antimicrobial Activity of Acid pH and
Reactive Nitrogen Species(RNS)**

(산성 pH와 활성질소종 조합의 항균 활성에
대항하는 살모넬라 생존 메카니즘)

지도교수 방 일 수

이 논문을 이학 석사학위 신청 논문으로 제출함

2010년 4월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

박 희 정

목 차

목 차	i
표목차	iii
도목차	iv
ABSTRACT	vi
I. 서 론	1
II. 실험 재료 및 방법	4
1. 사용균주	4
2. 균주배양조건	4
3. RNS 처리	5
4. 세균 성장 곡선 측정	5
5. 산성 RNS에 대한 세균 생존률 측정	5
6. RNA 추출	6
7. 정량 PCR	6
8. Microarray 분석	6
9. Western blotting	7

III . 결과.....	9
1. S. Typhimurium의 rpoS 돌연변이주에서 산성 RNS에 대한 감수성.....	9
2. RNS 저항성에서 ROS 해독과정에 관여하는 RpoS Regulon의 역할	12
3. 산성 RNS에 의한 새로운 RpoS-의존적 유전자들의 전사	14
4. 산성 RNS에 의한 RpoS 단백질의 발현	16
5. <i>Staphylococcus aureus</i> 의 rpoS (<i>sigB</i>)돌연변이주에서 산성 RNS에 대한 감수성	18
IV . 고찰	19
V . 참고문헌	22
VI . 표	26
VII . 그림	29
VIII . 국문초록	42

표목차

Table 1. Bactrial strains and plasmids	26
Table 2. Primer used for the construction of mutations and qRT-PCR analysis	27
Table 3. Result of microarray analysis	28

도목차

Figure 1. ARNS(Acid pH-mediated Reactive Nitrogen Species)	29
Figure 2. The effect of acidified nitrite (ACN) on the growth of <i>S.Typhimurium</i> strains	30
Figure 3. Growth curves of WT and <i>rpoS</i> mutant in the media containing 2mM ACN or spermine NONOate(SperNO;500uM)	31
Figure 4. Survival rate of <i>S.Typhimurium</i> cells after 3mM ACN(A) and 1mM sperNO(B) challenge	32
Figure 5. The effect of superoxide and RpoS-dependent reactive oxygen species (ROS) scavenger enzymes on ACN challenge	33
Figure 6. Effect of <i>SodC</i> , <i>KatE</i> , <i>KatN</i> and GSH for ACN survival.....	34
Figure 7. Condition for cDNA microarray analysis of	

RpoS-dependent ACN-inducible genes	35
Figure 8. RpoS dependent transcription of ACN inducible genes	36
Figure 9. Regulation of transcription of RpoS dependent ACN-inducible genes (qRT-PCR analysis)	37
Figure 10. Phenotype of the RpoS-dependent ACN-inducible gene mutants	38
Figure 11. Oxidative and acidifide nitrite induction of RpoS	39
Figure 12. Survival rate of RpoS overexpression in ACN stress condition	40
Figure 13. Survival rate of <i>S.aureus</i> cells after 3mM ACN.....	41

ABSTRACT

A Survival Mechanism of Salmonella enterica serovar Typhimurium against the Synergistic Antimicrobial Activity of Acid pH and Reactive Nitrogen Species(RNS)

Park, Hee-Jeong

Advisor : Prof. Bang, Iel-Soo, PhD

Department of Dental Bioengineering,
Graduate School of Chosun University

Many kinds of pathogenic bacteria can infect animal hosts including human. Against bacterial infection, animal host produce antimicrobial factors. Reactive nitrogen species (RNS) are potent antimicrobial factors to be detoxified for successful virulence of pathogens. RNS are produced mainly by chemical transformation of nitric oxide(NO) from inducible nitric oxide synthase(iNOS) of phagocytic cells and from dietary nitrate. However, bacterial protection strategy against RNS remains largely unknown. In this paper, I show that an alternative sigma factor, RpoS

promotes growth and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in RNS-producing conditions. The growth rate of *rpoS* mutant *S. Typhimurium* was decreased in the acidic culture media containing nitric oxide congeners. Moreover, the survival rate of *rpoS* mutant was also greatly reduced by exposure to acidified nitrite (ACN) which can generate a variety of RNS. Transcriptional profiling by cDNA microarray analysis revealed novel ACN-inducible genes regulated by RpoS. RpoS protein, which is maintained at very low level in normal growth conditions, was highly increased by ACN treatment. Growth of most mutant strains lacking each RpoS-dependent ACN-inducible gene was defected in ACN-containing media. These results demonstrate that RNS induces of RpoS expression, which can trigger expression of genes needed for the *Salmonella* resistance against RNS.

I. 서론

*Salmonella*는 약 2,500여종 이상의 혈청형을 가진 장내세균으로 숙주에 패혈증이나 장염 등을 일으키며 돼지나 닭과 같은 동물숙주 안에서도 증식이 가능하여 축산물을 통한 인간감염도 문제시 되고 있다. 연구모델로 사용된 *Salmonella* Typhimurium은 쥐에서 장티푸스와 같은 살모넬라증을 일으키는 혈청형으로 *Salmonella* Enteritidis와 함께 축산물에서 전파되는 식중독의 주요 원인균이다. *Salmonella*에 오염된 음식을 섭취하거나 대변, 구강 경로를 통해 다른 숙주에게 전파함으로써 감염된다.

*Salmonella*가 숙주동물 내에서 생존하기 위해서는 동물면역체계로부터 적응할 수 있어야 한다. 음식을 통해 구강으로 들어온 *Salmonella*는 숙주의 위로 이동하고, pH2정도의 강산성 위액은 세균의 pH 항상성을 파괴시켜 세포 내부 pH를 급격히 감소시킨다. 이로 인해 단백질 및 DNA가 손상되고 대부분의 세균이 죽게 된다. 하지만 많은 종류의 장내세균들은 위액의 강산성에서도 살아남을 수 있는 메커니즘을 갖고 있으며 *Salmonella*의 경우 약산(pH5~6) 유도 조절 체계인 산 적응 반응을 통해 강산성의 위액에서 생존 할 수 있는 것으로 알려져 있다(1). 위에서 생존한 *Salmonella*는 장으로 이동하여 *Salmonella* Pathogenicity island(SPI)-1에 의해 발현되는 단백질들에 의해 장 상피세포를 변형시킴으로써 침투한다. 이 후 활성화된 대식세포에 포식되어 pH4~5의 약산성 *Salmonella* containing vacuole(SCV)에 둘러 싸이게 된다. *Salmonella*는 SCV의 phagocyte respiratory burst에 의해 분비되는 superoxide(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2) 등 다량의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 superoxide dismutase(SOD)와 catalase(Kat)의 해독작용에 의해 H_2O 나 O_2 로 분해하여 생존할 수 있다(2). 그 다음 식세포의

iNOS에 의해 생성되는 NO에 노출되며 이는 *Salmonella*의 지질 막을 통과해 쉽게 확산 될 수 있다(2, 3). 식세포를 따라 이동하는 *Salmonella*는 숙주에 염증반응을 일으키며 숙주동물에 따라 간이나 비장, 쓸개로 이동하여 보균상태로 남아있거나 지속적인 감염을 일으킨다. *Salmonella*의 증식은 동물숙주의 T 세포에서 분비되는 싸이토카인에 의해 대량 생산되는 NO로 부터 억제된다. NO로부터 매개되는 ONOO⁻(peroxynitrite), NO₃⁻(nitrate), NO₂⁻(nitrite) 와 같은 RNS(Reactive nitrogen species)는 amino acid L-arginine 과 oxygen 분자의 합성, NO와 O₂⁻의 합성, ONOO⁻에서 NO₃⁻로의 전환, NO₃⁻에서 NO₂⁻로의 환원에 의해 주로 생성된다(2). 세균의 단백질, 핵산, 세포막 등에 손상을 주어(4) 치사를 유도할 수 있는 ROS와 달리 NO는 주로 세균의 생장을 억제할 수 있는 정균 기능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. NO는 DNA 복제와 호흡 과정을 방해 함으로써 세균의 증식을 억제하는 것으로 알려지고 있다.

중성 pH에서는 Flavohemoglobin Hmp가 *Salmonella*에 들어오는 대부분의 NO를 해독하여 식세포 내에서 증식을 도움으로써 병독성 발현에 기여한다(5). Hmp는 O₂-의존성 denitrosylase mechanism으로 호기성 또는 미세호기성 조건하에서 생성된 NO를 NO₃⁻로 해독시키고, 혐기성 조건에서는 O₂-독립적 deoxygenase mechanism에 의해 NO를 N₂O로 reduction 시킨다(5).

RNS는 Figure.1에서 나타낸 것처럼 산성 pH에서 HNO₂형성에 의해 NO⁺와 N₂O₃, NO·의 생성이 증폭된다(3). 산성의 위액뿐 아니라 음식물에 포함되어 들어온 NO₃⁻는 NO₂⁻로 환원되고 H⁺에 의해 HNO₂로 전환될 수 있다. 동물숙주의 주요 NO 공급원인 식세포도 세균 포식 후 pH가 산성으로 변하므로, 이곳에서도 산성 pH에 의한 RNS 증폭 현상이 나타날 수 있다. 하지만 아직까지 산성 pH 환경에서 세균의 RNS 해독기작은 거의 알려지지 않았다.

이 과정에 관여하는 세균 유전자를 찾기 위하여 *Salmonella* Typhimurium을 이용하여 야생형 균주를 치사 시킬 수 없는 정도의 산성 RNS를 처리한 후

random transposon mutation screening 하였다. 이 과정에서 대체 sigma factor, RpoS 유전자 돌연변이를 발견하였다.

세균의 유전자 발현 조절 시스템은 RNA polymerase holoenzyme에 의해 진행되며, *Escherichia coli*와 *Salmonella* Typhimurium과 같은 장내세균은 6종류의 sigma factor를 가지고 있다(6). 각각 고유한 환경에서 이 sigma factor들을 선택하여 특정한 유전자 그룹의 유전자 전사를 개시한다. Housekeeping 유전자인 $\delta^{D/70}$ (RpoD)는 정상적인 내/외부 환경에서 필요한 유전자의 전사를 유도하고 $\delta^{E/24}$ (RpoE)는 세포질 외부 환경, $\delta^{H/32}$ (RpoH)는 heat shock, $\delta^{FliA/28}$ (FliA)는 편모 합성, $\delta^{N/54}$ (RpoN)는 질소 대사, 마지막으로 $\delta^{S/38}$ (RpoS)는 stationary-phase 생존에 필요한 유전자들의 전사에 관여한다(6). Sigma factor RpoS는 δ^S , δ^{38} , KatF라고도 알려져 있다. RpoS 유전자는 *Salmonella*의 병독성 발현에 관여하는 global stationary-phase 조절자로서 일반적으로 stationary-phase에서 유도되며 log-phase의 경우 거의 발현되지 않는다(7, 8, 9). 그러나 UV, oxidative damage, starvation, ethanol 등과 같은 다양한 스트레스 조건이 주어지면 log-phase에서 RpoS의 단백질 수준이 눈에 띄게 증가된다(10). 또한 δ^S 는 *Salmonella* virulence plasmid인 spv 유전자의 발현을 조절한다(11, 12). spvRABCD cluster는 *Salmonella*의 생장률을 조절하여 동물과 사람에게 전신감염과 패혈증을 일으킨다(11). *Salmonella rpoS* 돌연변이주는 생쥐의 비장에 감염 시 colonization 능력이 손상되며 병독성 발현이 낮게 나타난다(9). 따라서 RpoS는 global stationary-phase 조절자로서 병독성 발현을 위해 반드시 필요한 유전자이다. 이 논문에서는 RNS와 산성 스트레스가 복합적으로 *Salmonella*에 주는 영향과 산성 RNS 저항성을 위한 global 조절자로서 RpoS의 역할을 알아보려고 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1) 사용균주

본 연구에서 사용된 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 야생형 균주는 생쥐에 장티푸스를 일으키는 14028s이다. 실험에 사용된 돌연변이주와 plasmid는 Table1에 서술하였다. 돌연변이주 제작은(22) Kirill A. Datsenko의 방법으로 수행하였다. chloramphenicol 저항성 유전자(pKD3) plasmid를 주형으로 Flp recognition target(FRT)-flanked를 포함한 부분을 PCR을 통해 증폭하였다. PCR 산물에 제한효소 *Dpn I*을 처리하여 λ -Red 재조합 효소(pTP2223)를 발현시키는 균주에 형질전환을 하였다. Chloramphenicol이 들어있는 배지에서 target 유전자에 항생제 저항 site를 갖고 있는 colony를 분리하여 P22를 이용해 phage를 제작하고 14028s에 형질도입을 하였다. 각각의 돌연변이주는 PCR을 통해 항생제 저항 site의 삽입을 확인하였다.

2) 균주배양조건

실험에 사용된 균주의 성장을 위해 배지는 Luria-Bertani(LB) 영양배지와 0.2% glucose를 포함한 최소배지(2g/L $H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$, 0.1g/L $MgSO_4$, 13g/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 3.5g/L $NaNH_4HPO_4 \cdot H_2O$)를 사용하였다. 산성조건의 배지를 위해 LB에 MES 50mM을 첨가하여 pH5로 맞춘 뒤 멸균하여 사용하였다. 호기성 조건의 경우 37°C incubator에서 220rpm으로 교반하였고, 혐기성 조건의 경우 Sheldon Manufacturing사의 anaerobic chamber에서 37°C로 standing culture하였다. Ampicillin(100 μ g/ml)과 kanamycin(50 μ g/ml), chloramphenicol(50 μ g/ml) 항생제를 배지에 넣어 배양하였다.

3) RNS 처리

활성 질소 공여체로써 sodium nitrite(NaNO_2)와 spermine NONOate(sperNO)를 처리 하였다. sodium nitrite(아질산염)는 Sigma-Aldrich사로부터 구입하였고 사용할 때마다 1M sodium nitrite를 만든 후 필요한 농도로 희석하여 사용했다. Spermine-NONOate(sperNO)와 ONOO^- 공여체로써 사용된 SIN-1 chloride는 cayman chemical company로 부터 구입하였다. sperNO와 SIN-1 chloride는 500mM로 -80°C 에 보관하였다.

4) 세균 성장 곡선 측정

산성 조건에서 RNS(sodium nitrite, sperNO) 농도 별 *Salmonella*의 성장 속도를 측정하기 위해 LB 배지에서 16시간 동안 배양한 균주를 PBS에 $\text{OD}_{600}=1$ 이 되도록 희석하였다. RNS를 포함한 배지에 $\text{OD}_{600}=1$ 로 희석한 균주를 $\text{OD}_{600}=0.02$ 가 되도록 동일량을 microplate에 접종하였다. microplate를 Bioscreen C Microbiology Microplate reader에서 37°C , 교반하여 24시간 동안 배양하였고 30분마다 OD_{600} 값을 측정하였다.

5) 산성 RNS 에 대한 세균 생존률 측정

LB 배지에 하룻밤 배양한 균주를 PBS MES(pH5)에 $\text{OD}_{600}=0.01$ 이 되도록 희석시킨 후 sodium nitrite 3mM과 sperNO 1mM을 처리하였다. SOD(Sigma)의 경우 300unit/ml을 처리하였다. 37°C incubator에서 standing culture하여 2시간마다 CFU(colony forming unit)를 측정하여 균주의 생존률을 보았다. CFU는 37°C 에서 16시간 배양 후 colony 수를 측정하였다. 모든 세균의 생존률

측정 실험은 3번 반복하여 실험하였다.

6) RNA 추출

하룻밤 배양한 세균을 1:1000으로 희석하여 37°C, 220rpm으로 LB MES 배지에서 OD₆₀₀ 값이 0.4가 되도록 키운 뒤 sodium nitrite를 처리하지 않은 세균 15ml과 sodium nitrite 3mM을 처리한 후 1시간 째 세균 15ml을 회수하였다. 15ml의 세균을 5% phenol(95% EtOH) 3ml을 넣고 10초 이상 vortexing 후 ice에서 20분간 incubation 하였다. 4000rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. Phenol을 완전히 제거한 세균 pellet을 TE buffer(lysozyme 50mg/ml)에 풀어서 사용하였다. 37°C에 20분간 incubation 하면서 5분마다 vortexing하였다. RNA는 Qiagen사의 RNasey mini kit를 이용하여 추출하였다. DNA를 제거하기 위해 Qiagen사의 RNase-free DNase를 2시간 동안 처리하였고, RNA 전기영동을 통해 DNA에 오염되지 않은 RNA를 확인하였다.

7) 정량 PCR

Qiagen사의 RNasey mini kit로 RNA를 분리한 후 Promega사의 Random primer, RNasin, Invitrogen사의 Superscript II RTase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Solgent사의 e-taq을 사용하였고, PCR 조건은 95°C;5min, 95°C;40sec, 50~55°C;30sec, 72°C;1min(20cycles), 72°C;7min으로 하였다. Primer는 IDT와 Bioneer사에서 제작하여 사용하였고, 16s rRNA를 기준으로 표준화하였다.

8) Microarray 분석

LB 배지에서 16시간 배양한 야생형과 *rpoS* 돌연변이주를 LB MES pH5배지에 1:1000으로 희석한 후 $OD_{600}=0.4$ 가 될때까지 키운 뒤 sodium nitrite 3mM을 1시간 처리한 균주와 처리하지 않은 control 균주를 준비하여 위의 방법으로 RNA를 추출하였다. 50 μ g의 고농도의 RNA에 Amersham사의 Cy3-dUTP, Cy5-dUTP를 이용하여 labeling하고 superscript II RTase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. *Salmonella* 균주의 모든 ORF유전자 DNA가 포함된 microarray chip에 각 균주의 total RNA로부터 형광 label된 cDNA를 Salmon sperm DNA를 넣고 5분간 끓인 후 pre-hybridization시킨 chip에 도말하여 커버글라스를 덮고 빛을 차단하여 42 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 hybridization하였다. Chip은 scanning을 위해 2XSSC와 0.1%SDS를 포함한 용액에 5분 동안 1회(42 $^{\circ}$ C), 0.1XSSC와 0.1%SDS를 포함한 용액에 10분간 1회, 0.1XSSC 용액에 1분씩 4회 세척하였다. ebiogen사로부터 microarray scanning을 하여 각 균주의 유전자 전사 양을 비교 분석 하였다.

9) Western blotting

야생형 균주를 LB에서 하룻동안 배양한 균주를 1:1,000으로 희석하여 LB MES(pH5)에 OD_{600} 값이 0.4가 될 때까지 키운 뒤 sodium nitrite 3mM 또는 sperNO, spermine 1mM을 처리 전, 후 세균을 사용했다. 세균을 4 $^{\circ}$ C, 4000rpm으로 10분간 원심분리 후 50ug/ml의 chloramphenicol을 포함한 PBS로 2회 세척하였다. Sample은 0.01% SDS를 포함한 PBS에 resuspension 후 Sonicator 이용하여 세균을 깬다. BIO-RAD사의 DC protein assay reagent를 이용하여 단백질을 정량하여 15ug의 total cellular 단백질을 12% polyacrylamide-SDS gel에 전기영동 하였다. 전기영동 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였으며 Ponceaus S(Sigma)염색을 통해 일정하게 전기영동 된 단백질 밴드를 확인하였다. Membrane은 RpoS 항체를 1:2000으로

0.05% skim milk 포함한 TBST에 상온에서 4시간 이상 또는 4℃에서 하룻밤 동안 교반하였다. TBST 용액에서 10분씩 3번 세척하였다. Secondary anti-mouse-HRP conjugated antibody는 1:5000으로 TBST에 희석 후 상온에서 2시간 이상 교반하였다. TBST 용액에서 10분씩 3번 세척하였다. Anigen사의 PowerOpti-ECL western blotting Detection reagent를 사용하여 X-ray 필름에 현상하였다.

III. 결 과

S. Typhimurium의 *rpoS* 돌연변이주에서 산성 RNS에 대한 감수성

산성 RNS를 제공하기 위해 산성 pH 조건 (pH 5.0) 의 배지 혹은 버퍼에 NO donor인 sodium nitrite와 sperNO를 처리하여 사용하였다. 이 조건은 세균의 replication을 억제시킬 수 있다. Random mutagenesis를 통하여 *rpoS* 돌연변이주를 screening하였고, 하룻밤 배양한 세균을 LB MES pH5.0 배지에 1:100으로 희석하여 sodium nitrite를 2mM을 처리하여 37°C에서 220rpm으로 20시간 동안 배양하였다(Figure. 2). Sodium nitrite를 처리 하지 않은 야생형, *rpoS*, *hfq* 돌연변이주의 OD₆₀₀ 값은 각각 4.1, 3.27, 3.98로 크게 차이를 보이지 않았다(Figure. 2). 야생형은 sodium nitrite 처리 20시간 후 OD₆₀₀ 값이 3이였으며, 이에 비해 *rpoS* 돌연변이주의 OD₆₀₀ 값은 0.17정도로 생장이 급격히 감소하는 것을 볼 수 있었다(Figure. 2). *hfq* 돌연변이주 역시 sodium nitrite 처리 시 OD₆₀₀ 값이 0.04로 생장이 억제 되는 결과가 나왔다(Figure. 2). Hfq 단백질은 *rpoS* mRNA에 결합하여 RpoS 번역을 도와준다(18). 따라서 *hfq* 돌연변이주는 RpoS 단백질을 합성할 수 없으므로 *hfq* 돌연변이주의 표현형은 *rpoS*의 돌연변이의 효과로 볼 수 있다. 산성조건의 sodium nitrite는 농도가 높아질수록 *Salmonella*의 성장 또는 치사에 영향을 주는 것을 확인 하였다. 특히 *rpoS* 돌연변이주의 경우 야생형에 비해 2mM 농도에서 높은 ACN 감수성을 확인 할 수 있었다(Figure. 2).

RpoS 는 다양한 스트레스조건에서 발현되며, *rpoS* 돌연변이주는 이러한 스트레스 조건에서 높은 감수성을 갖는다. 지금까지 알려진 ROS 를 포함한 스트레스 조건 외에 산성조건의 RNS 가 야생형과 *rpoS* 돌연변이주에 어떤 표현형을 보이는지 알아보기 위한 실험을 하였다. pH5.0 배지에 OD₆₀₀ 값이 0.2 가 되도록 희석한 후 야생형, *rpoS* 돌연변이주에 sodium nitrite 2mM,

sperNO 500uM 을 처리하여 24 시간 동안 30 분 마다 세균 OD₆₀₀ 값을 측정하였다(Figure. 3). 이 결과 야생형에 비해 sodium nitrite 와 sperNO 를 처리 했을 때 *rpoS* 돌연변이주의 생장이 지연되는 것을 볼 수 있다(Figure. 3). sodium nitrite 와 sperNO 를 처리하지 않은 균주의 경우 즉시 log-phase 에 들어가는 것에 반해 sodium nitrite 의 경우 야생형은 5 시간, *rpoS* 돌연변이주는 16 시간 정도로 lag-phase 가 길어지는 결과를 보였다(Figure. 3). sperNO 의 경우 야생형은 6 시간, *rpoS* 돌연변이주는 10 시간이 지나서야 log-phase 에 접어드는 것을 알 수 있다.

Sodium nitrite 가 *Salmoenlla* 의 성장 억제 이외에 살균작용을 하는데 RpoS 가 관여하는지 알아보기 위해 RpoS 의 발현이 많은 stationary phase 세균을 이용해 ACN killing test 를 하였다. 호기성과 혐기성 조건 모두 *rpoS* 돌연변이주에 ACN 3mM 처리시 2 시간 정도에 거의 죽는 것을 볼 수 있었다(Figure. 4A, B). 호기성과 혐기성 조건의 결과를 비교했을 때 호기성 killing test 의 결과에서는 야생형과 *rpoS* 돌연변이주의 6 시간 째 생존률이 10000fold 이상 차이가 났다(Figure. 4A). 혐기성 killing test 에서도 100fold 정도 차이를 보였다(Figure. 4B). Sodium nitrite 는 산소가 많이 존재하는 조건에서 *rpoS* 돌연변이주의 생존률을 더 크게 감소 시키는 결과를 볼 수 있다(Figure. 4A, B). *rpoS* clone 을 *rpoS* 돌연변이 주에 도입한 경우 야생형과 비슷하게 감수성이 회복되는 것을 확인 하였다(Figure. 4A, B). 산성 sperNO 1mM 처리 시 앞의 실험과 비슷하게 야생형에 비하여 *rpoS* 돌연변이주의 경우 생존률이 크게 감소하는 것을 볼 수 있었다(Figure. 4C). *rpoS* 돌연변이주에 SperNO 를 처리한 경우 2 시간 이내에 거의 모든 세균들이 죽었다. Data 에는 나타나지 않았지만 pH7 조건에서는 *rpoS* 돌연변이주의 sodium nitrite 에 대한 감수성이 전혀 나타나지 않았다. NO 는 정균 작용 만을 한다고 알려져 있는 것과는 달리 산성 pH 와 동시에 NO 스트레스가 주어졌을 때 야생형 균주에서

생존율이 감소하는 것으로 보아 살균작용도 갖고 있는 것을 알 수 있다. 이 결과로 RpoS 는 지금까지 알려진 스트레스 외에 산성 RNS 스트레스에도 관련된 기능을 하는 것을 확인하였다.

RNS 저항성에서 ROS 해독과정에 관여하는 RpoS Regulon 의 역할

식세포의 NADPH phagocyte oxidase가 생산하는 O_2^- 는 ROS로서 박테리아의 세포에 oxidative 스트레스를 준다. 이는 superoxide dismutase(SOD)에 의해 H_2O_2 로 전환된 후 catalase에 의해 H_2O 로 해독된다. O_2^- 는 NO와 결합하여 $ONOO^-$ 를 형성할 수 있으며, 이는 세균의 생존에 큰 손상을 준다. *rpoS* 돌연변이주에 산성 RNS를 처리했을 때 생존률이 낮게 나타나는 것이 산성 RNS가 아닌 O_2^- 효과일 수 있다. SOD를 처리하면 O_2^- 가 H_2O_2 로 전환되기 때문에 O_2^- 에 의한 $ONOO^-$ 의 생성이 감소하게 된다. SOD를 처리 하여 O_2^- 와 $ONOO^-$ 를 제거한 후 산성 RNS에 대한 *rpoS*의 감수성을 보았다(Figure. 5). 호기성과 혐기성 조건 모두 산성 RNS를 처리한 상태에서 *rpoS* 돌연변이주에 SOD를 처리했을 때 야생형만큼은 아니지만 1% 정도로 SOD를 처리하지 않은 *rpoS* 돌연변이주에 비해 100fold 정도의 산성 RNS에서 회복효과를 보였다(Figure. 5). 따라서 *rpoS* 돌연변이주는 O_2^- 나 $ONOO^-$ 에 의해 생존율이 감소하지만 SOD 처리시 야생형만큼 회복 되지 않은 부분도 있어 $ONOO^-$ 이외에 산성 RNS가 생존율 감소를 생존율 감소의 주요 원인임을 알 수 있다.

RpoS regulon으로 알려진 SOD(SodC II)와 catalase(KatE, KatN) 유전자의 돌연변이를 제작하여 O_2^- 와 H_2O_2 를 분해하지 못하게 한 후 ACN 3mM을 처리하여 CFU를 측정하였다. ACN 3mM 처리 시 6시간 후 *sodC*, *sodCkatE*, *sodCkatEkatN* 돌연변이주는 야생형과 유사한 생존율을 보였다(Figure. 6A). O_2^- 와 H_2O_2 를 분해하지 못하는 이들 돌연변이주들은 여전히 산성 RNS에 저항성을 갖고 있는 것으로 볼 수 있다. 따라서 현재까지 알려진 ROS-반응 RpoS-regulon 유전자들은 산성 RNS와는 무관한 것으로 확인되었다.

Glutathione(L-g-glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH)는 거의 모든 생물체 내에서 합성되며, 강력한 전자 공여 능력을 가지고 있으며 산화된 세포 내부 환경을 환원시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(13). GSH가 산성 RNS 스트레스에

대해 *Salmonella*의 보호기작에 어떠한 영향을 주는지 실험하였다. GSH 5mM을 ACN과 함께 처리한 후 2시간마다 살아있는 세균 수를 측정 하였다. GSH와 ACN을 함께 처리한 경우 ACN만 처리한 *rpoS* 돌연변이주에 비해 ACN 감수성이 10-fold정도 감소하였다(Figure. 6B). *rpoS* 돌연변이주에 GSH를 처리 한 결과 1% 이하의 생존률을 보여 산성 RNS에 대한 회복 효과가 미미한 것으로 결론 내릴 수 있다(Figure. 6B). 이 결과로 *Salmonella*의 ROS 스트레스 내성에 관여하는 것으로 알려진 RpoS가 지금까지 알려지지 않은 메커니즘으로 *Salmonella*의 RNS-특이적으로 산성 RNS 내성에 기여한다는 것을 알 수 있다(Figure. 6A, B).

산성 RNS에 의한 새로운 RpoS-의존적 유전자들의 전사

앞의 모든 실험에서는 산성조건에서 NO 스트레스를 주었다. *Salmonella*의 ACN 감수성이 단순히 산성 pH 또는 sodium nitrite에 의한 결과는 아니었는지 확인하기 위해 pH5와 pH7의 배지에서 야생형 균주를 OD₆₀₀값이 0.4가 될 때까지 키운 뒤 sodium nitrite 3mM을 처리하였다. pH7의 배지에서는 sodium nitrite를 처리 한 것과 처리 하지 않은 배지에서 동일한 성장을 보였다. pH5 배지에서는 sodium nitrite 처리 시 눈에 띄게 생장이 억제되며 아무것도 처리 하지 않은 균주의 경우 pH7의 조건에서 성장한 것과 동일하게 성장하는 것을 볼 수 있다(Figure. 7). 따라서 *Salmonella*의 ACN 감수성은 산성 조건과 sodium nitrite가 복합적으로 *Salmonella*의 성장을 억제 하는 것을 알 수 있다. 산성 RNS에 반응하는 RpoS 의존적 유전자들을 확인하기 위해 Figure. 7의 결과를 바탕으로 pH5의 산성 조건에서 sodium nitrite를 처리하여 cDNA microarray를 수행하였다.

지금까지 RpoS-dependent 유전자로 알려진 유전자들로는 sod, katE, otsA, poxB, ycgB, yeaG등이 있다(8, 14, 15). 유전자 전사체 분석 결과 *Salmonella*의 4600여 개의 유전자 중 ACN에 의해 유도 되고 RpoS에 의존적인 유전자의 induction fold를 나타냈다. ACN처리 전 후 sample을 비교한 결과 약 180개 정도의 유전자의 전사가 ACN에 의해 5배 이상 유도되는 것을 확인하였다(Figure. 9, Table. 3). 이 중 ACN에 의해 10배 이상 유도되며 RpoS-의존도가 5배 이상인 유전자들을 상대로 qRT-PCR을 하였다(Figure. 9). yfiA(ribosome associated factor), ycgB, yliH, yhaK, yhc0, yeaH (putative cytoplasmic 단백질), yecG(putative universal 스트레스 단백질), STM3688, ybfA(putative periplasmic 단백질), yqjl(putative transcriptional 조절자), ychH(putative inner membrane 단백질), dps(스트레스 반응 DNA-binding 단백질; starvation induced resistance to H₂O₂), ygaU(putative LysM domain),

acpD(acyl carrier 단백질 phosphodiesterase), ybaY(glycoprotein / polysaccharide metabolism), otsB(trehalose-6-phosphate phosphatase, biosynthetic), hcp(hybrid cluster 단백질; similar to prismane-protein homolog), STM1324, uspA(universal 스트레스 단백질 A), blc(outer membrane lipoprotein) 모두 ACN 3mM 처리시 전사가 증가되었으며 이 전사유도는 RpoS가 조절하였다(Figure. 9). Microarray 결과와 qRT-PCR을 통해 전사가 증가함을 확인한 대부분의 유전자들은 NO와 관련되어 연구되어 지지 않았으며 정확한 기능 또한 잘 알려지지 않았다. Figure. 9의 결과를 토대로 ACN에 의해 유도되고 RpoS에 의존적인 유전자의 돌연변이주를 제작하여 ACN 2mM과 sperNO 500uM을 포함한 배지에서 30분마다 생장을 측정하였다. 16개의 돌연변이주 가운데 5개의 돌연변이주가 산성 RNS 처리시 야생형보다 약간 생장이 억제되는 것을 확인하였다(Figure. 10). 따라서 ACN-유도, RpoS-의존적 유전자의 돌연변이주는 산성 RNS에 대한 감수성을 갖는 것으로 보인다. 이 결과는 아마도 RpoS regulon 각각의 유전자 기능보다는 전체 RpoS regulon 유전자의 공동 역할이 중요한 것임을 보여준다.

산성 RNS에 의한 RpoS 단백질의 발현

RpoS는 oxidative 스트레스 조건에서 유도되는 것으로 알려져 있다(8). 그 중 H_2O_2 와 SIN-1 chloride 처리 시 RpoS 단백질의 발현이 어떤 양상을 보이는지 알아보았다. SIN-chloride는 NO와 O_2^- 공여체로써 ONOO⁻를 생성한다(Figure. 5). OD₆₀₀=0.3~0.4 정도의 log-phase 균주에 H_2O_2 1mM과 SIN-1 chloride 750uM을 한 시간 동안 처리 한 후 RpoS 단백질의 발현을 보았다(Figure. 11A). H_2O_2 와 SIN-1 chloride를 처리 하지 않은 균주에서 RpoS는 전혀 발현 되지 않았다(Figure. 11A). 그러나 H_2O_2 처리 시 RpoS의 발현이 눈에 띄게 증가하는 결과가 나왔으며 SIN-1 chloride 처리 한 균주의 경우 H_2O_2 만큼은 아니지만 RpoS의 발현이 증가하였다(Figure. 11A). 이 결과로 보아 RpoS는 oxidative 스트레스에서 발현이 증가하는 것을 알 수 있다.

이전의 실험 결과에서 볼 수 있듯이 *rpoS* 돌연변이주는 산성 RNS에 높은 감수성을 나타낸다(Figure. 2, 3, 4A). 따라서 이러한 *rpoS* 돌연변이주의 감수성은 RpoS가 NO와 관련된 스트레스 조건에서 *Salmonella*의 생존을 위해 어떠한 역할을 하고 있을 것이라는 짐작을 할 수 있다. 이 논문에서는 western blot를 통해 RpoS 단백질의 발현 양이 pH에 따라 어떤 차이를 보이는지 실험하였다. pH7 조건에서 야생형 균주에 sodium nitrite 처리 시 RpoS 단백질은 sodium nitrite 처리 1시간 후 조금 발현되었다(data not shown). 그러나 pH5 조건에서는 sodium nitrite 처리 30분 후에도 급격히 RpoS발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Figure. 11B). 따라서 RpoS 단백질은 ACN 스트레스 하에서 유도 되는 것을 알 수 있다. sperNO 1mM을 처리 한 경우도 마찬가지로 log-phase에서 RpoS 단백질의 발현이 증가하였다.

Hnr은 RpoS 조절자로서 mutation 시 RpoS를 과다 발현 시킨다. 결과에서도 볼 수 있듯이 *hnr* 돌연변이주에서는 log-phase에서 sodium nitrite 처리와 관련 없이 하룻밤 배양한 야생형 균주와 비슷하게 RpoS 단백질이 과다 발현되는

것을 볼 수 있으며(Figure. 11C), 야생형 균주의 경우 sodium nitrite를 처리 하였을 때 RpoS 단백질이 증가하는 것을 볼 수 있다. 산성 RNS 스트레스에서 *Salmonella*가 살아남기 위해 RpoS가 어떤 역할을 한다는 가정하에 RpoS의 발현이 증가되는 *hnr* 돌연변이주의 log-phase 상태에서 ACN killing test를 해보았다. OD₆₀₀값이 0.5가 되었을 때 ACN 3mM을 처리 한 후 2시간마다 생존률을 보았다(Figure. 12). 4시간 때 야생형의 경우 1%, *rpoS* 돌연변이주의 경우 생존률이 0.04% 정도로 감소하였고, *hnr* 돌연변이주는 4시간 때는 7%정도로 6시간 후에 1% 이하로 감소 하였다(Figure. 12). 야생형의 경우 log-phase에서는 RpoS의 발현이 거의 없기 때문에 ACN에 대한 감수성이 하룻밤 배양한 균주의 killing test결과에 비해 높아진 것을 볼 수 있다(Figure. 12). *hnr* 돌연변이주는 야생형이나 *rpoS* 돌연변이주에 비해 생존률이 높은 것을 보아 이는 RpoS의 과다발현으로 인한 결과임을 예측할 수 있다. 따라서 RpoS가 발현되는 정도에 따라 산성 RNS 감수성에 영향을 주는 것으로 확인되었다.

*Staphylococcus aureus*의 *rpoS* (*sigB*) 돌연변이주에서 산성 RNS에 대한 감수성

*S. aureus*는 그람 양성균으로써 우리나라에서 *Salmonella*와 *Vibrio* 다음으로 식중독을 많이 일으키며 이외에 패혈증, 화농성 염증 등을 유발하는 고병원성 세균이다. *S. aureus*에는 *S. Typhimurium*, *E. coli*, *Vibrio* spp.와 같은 그람 음성균의 RpoS와 같은 역할을 하는 SigB가 존재한다. SigB 역시 RpoS와 같은 대체 sigma factor로써 heat shock, ethanol, high osmolarity와 같은 스트레스 조건에서 발현이 증가된다(16). *S. aureus* 균주에서 *S. Typhimurium*과 같은 방법으로 산성 RNS에 대한 killing assay를 실험 해 본 결과 호기성 조건에서 야생형 균주에 비해 *sigB* 돌연변이주의 생존률이 10배 이상 낮게 나타났다(Figure. 13). 이 결과로 보아 산성 RNS는 그람 음성균 뿐만 아니라 그람 양성균에도 세균의 생존에 영향을 주며 이에 대한 저항성에 RpoS(SigB)가 관여함을 알 수 있다.

IV. 고 찰

동물숙주는 식세포를 통해 NO_3^- , NO_2^- 와 같은 RNS를 생성하여 세균의 병독성 발현에 대항한다. 식세포의 iNOS로부터 생성되는 NO는 세균에 대항하기 위한 선천성 면역물질로 숙주에 반드시 필요하다. 그러나 세균은 이러한 항균요소인 RNS로부터 생존하여 숙주에 감염을 시키기 위해 이에 대항하는 보호 기작을 갖고 있다. NO_3^- , NO_2^- 는 우리가 섭취하는 채소와 같은 음식물에 의해 체내로 흡수되거나 여러 가지 방법에 의해 동물숙주 내에 존재하지만(4) 이 논문에서는 식세포에서 분비 되는 RNS에 중점을 두었다. ROS와는 달리 RNS는 세균과 숙주간의 상호작용에 대한 연구가 미흡한 실정이다. NO, NO_3^- , NO_2^- 는 산성화 된 SCV에 의해 HNO_2 형성할 수 있다. 이 후 NO의 화학적 구조변화에 의해 생성되는 여러 종류의 RNS는 산성 pH와 복합적으로 세균의 생장에 더 큰 손상을 주며 *Salmonella*는 이러한 스트레스 조건에서 생존하여 숙주감염을 위해 살아남기 위한 메커니즘을 갖고 있다.

Hfq는 *E. coli*와 *S. Typhimurium*에서 *rpoS* mRNA의 번역을 위해 필요한 유전자이다. 정상적인 조건에서는 OxyS에 의해 *rpoS* mRNA의 번역이 억제되며 이는 RprA와 DsrA sRNAs(small non-coding mRNAs)로부터 번역이 증가하게 된다(10, 17, 18). DsrA sRNAs는 Shine-Dalgarno(SD)와 상보적인 염기서열을 갖고 있으며 3'-말단에 stem-loop를 형성하여 RpoS의 번역을 억제한다(17). 그러나 Oxidative 스트레스와 같은 환경적인 스트레스가 주어지면 Hfq에 의해 DsrA sRNAs와 SD의 수소결합이 풀리면서 DsrA-RpoS complex가 형성되어 RpoS의 번역이 촉진된다(18). 정상적인 환경의 stationary phase 상태의 균주에서는 RpoS 수준이 높게 나타나지만 *hfq* deletion 돌연변이주에서는 RpoS 번역의 감소에 의해 RpoS 수준이 급격히 감소한다(19).

Hnr (RssB)은 RpoS의 단백질 분해 조절자로서 *hnr* 돌연변이주는 RpoS를 과다 발현 시킨다. Phosphorylated-Hnr (Hnr-P)은 δ^S 와 1:1로 결합할 수 있으며 Hnr-P complex는 ClpXP를 인식하여 결합함으로써 ATP를 이용하여 δ^S 의 proteolysis로 인한 degradation을 증가시킨다(20). Figure.11C를 통해 *hnr* mutation시 δ^S 의 degradation이 급격히 감소되어 RpoS 단백질이 과다발현 되는 것을 확인 하였다. δ^S 는 ClpXP를 인식할 수 없어 반드시 Hnr-P와 complex를 형성할 경우에만 δ^S 의 degradation이 일어난다. Western blot을 통해 산성 RNS에 의해 RpoS의 발현이 증가하며(Figure. 11B) log-phase 균주의 산성 RNS killing test결과 야생형에 비해 *hnr* 돌연변이주의 생존률이 1000-fold 이상 높게 나타남을 확인하였다(Figure. 12). 이 결과는 *hnr* mutation시 δ^S 의 proteolysis가 억제되어 RpoS의 과다 발현으로 인해 산성 RNS에 대한 저항성을 갖게 되는 것으로 보인다.

RpoS는 병독성 발현 관련 유전자인 *spv*의 발현은 조절하여 숙주의 전신감염에 영향을 준다(11). In vivo와 in vitro상에서 실제 *rpoS* 돌연변이주의 virulence가 급격히 감소한다. 최근 밝혀진 RpoS-dependent 유전자로는 스트레스와 관련된 *gadA*, *katE*, *osmY*가 있으며 이외에 arginine degradation : *astCADBE* putrescine degradation : *puuABCD*, fatty acid oxidation : *fadBA*, *fadE*, virulence : *ler*, *espl*, *cesF* 등이 있다(21). 이러한 유전자들은 *rpoS* 돌연변이주에서 발현이 적게 나타난다(21). 현재 RpoS 연구는 oxidative 스트레스에서 활발히 진행되었으면 현재까지 산성 RNS에 관련된 연구는 거의 없다. 이 논문을 통해 산성 RNS는 *Salmonella*의 생장을 억제시키고 치사시키는 것을 확인 하였다. 특히 이러한 표현형은 *rpoS* 돌연변이주에서 현저하게 나타나며 *rpoS* clone을 삽입한 균주의 경우 산성 RNS에 대한 감수성이 회복되는 결과를 확인하였다. 그리고 호기성과 혐기성 조건에서 SOD를 처리하여 RNS감수성을 비교한 실험을 통해 ROS에 의한 oxidative

스트레스와 다른 메커니즘을 갖고 있음을 짐작할 수 있다. 이렇듯 RpoS가 oxidative 스트레스 이외에 nitrosative 스트레스와 관련되어 중요한 역할을 하고 있는 것을 알 수 있다.

결론적으로 이 논문에서는 산성 RNS는 *Salmonella*의 생존에 큰 손상을 줄 수 있지만 RpoS-의존적 RNS 유도 유전자들에 의해 생존할 수 있다는 사실을 확인하였다. RpoS는 ROS와는 다른 RNS-특이적 보호 메커니즘을 갖고 있으며 산성 RNS에 직면 할 때 log-phase 상태의 균주에서 단백질 발현이 증가한다. 또한 수많은 RNS-반응 유전자들의 전사를 증가 시킴으로써 RpoS는 RNS에 대한 세균의 저항성을 향상시킨다. RpoS는 *Salmonella* 뿐만 아니라 그람 양성균인 *Staphylococcus*에서도 산성 RNS에 감수성을 갖는 것이 확인 되었다. 따라서 앞으로 세균과 동물숙주간의 상호작용 연구에서 RpoS에 대한 역할을 재조명 할 필요가 있다.

V . 참고문헌

1. Lee IS, Lin J, Hall HK, Bearson B, Foster JW. The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* 17(1):155-67, 1995.
2. Fang, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol.* 2(10):820-32, 2004.
3. Lundberg JO, Weitzberg E, Cole JA, Benjamin N. Nitrate, bacteria and human health. *Nat Rev Microbiol.* 2(7):593-602, 2004.
4. Hébrard M, Viala JP, Méresse S, Barras F, Aussel L. Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *J Bacteriol.* 191(14):4605-14, 2009.
5. Bang IS, Liu L, Vazquez-Torres A, Crouch ML, Stamler JS, Fang FC. Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the *Salmonella* flavohemoglobin Hmp. *J Biol Chem.* 281:28039-47, 2006.
6. Gruber TM, Gross CA. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol.* 57:441-66, 2003.
7. Hughes KT, Mathee K. The anti-sigma factors. *Annu Rev Microbiol.* 52:231-86, 1998.
8. Ibanez-Ruiz M, Robbe-Saule V, Hermant D, Labrude S, Norel F. Identification of RpoS-regulated gene in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 182:5749-56, 2000

9. Alam MS, Zaki MH, Yoshitake J, Akuta T, Ezaki T, Akaike T. Involvement of *Salmonella enteric* serovar *Typhi* RpoS in resistance to NO-mediated host defense against serovar *Typhi* infection. *Microb Pathog.* 40(3):116-25, 2006.
10. Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the RpoS subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(3):373-95, 2002.
11. Fang FC, Libby SJ, Buchmeier NA, Loewen PC, Switala J, Harwood J, Guiney DG. The alternative sigma factor KatF(RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(24):11978-82, 1992.
12. Norel F, Robbe-Saule V, Popoff MY, Coynault C. The putative sigma factor KatF(RpoS) is required for the transcription of the *Salmonella typhimurium* virulence gene *spvB* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 78(2-3):271-6, 1992.
13. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta.* 333(1):19-39, 2003.
14. Fang FC, Chen CY, Guiney DG, Xu Y. Identification of RpoS-regulated genes in *Salmonella typhimurium*: complementary regulatory interactions between δ^S and cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* 178(17):5112-20, 1996.
15. Heithoff DM, Conner CP, Hanna PC, Julio SM, Hentschel U, Mahan MJ. Bacterial infection as assessed by *in vivo* gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(3):934-9, 1997.
16. van Schaik W, Abee T. The role of δ^B in the stress response of Gram-positive bacteria – targets for food preservation and safety. *Curr Opin Biotechnol.* 119(3):223-9, 2007.

17. Valentin-Hansen P, Eriksen M, Udesen C. The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol.* 51(6):1525-33, 2004.
18. Soper TJ, Woodson SA. The *rpoS* mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA. *RNA.* 14:1907–1917, 2008.
19. Sittka A, Pfeiffer V, Tedin K, Vogel J. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* 63(1):193-217, 2007.
20. Hengge R. Proteolysis of sigmaS (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* 160(9):667-76, 2009.
21. Dong T, Schellhorn HE. Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *BMC Genomics.* 10:349, 2009.
22. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(12):6640-5, 2000.
23. Farrell MJ, Finkel SE. The growth advantage in stationary-phase phenotype conferred by *rpoS* mutations is dependent on the pH and nutrient environment. *J bacteriol.* 185(24):7044-7052, 2003.
24. Dunkley KD, Callaway TR, Chalova VI, Anderson RC, Kundinger MM, Dunkley CS, Nisbet DJ, Ricke SC. Growth and genetic responses of *Salmonella typhimurium* to pH-shifts in an anaerobic continuous culture. *Anaerobe.* 14(1):35-42, 2008.
25. Majdalani N, Chen S, Murrow J, St John K, Gottesman S. Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol.* 39(5):1382–94, 2001.
26. Sledjeski DD, Whitman C, Zhang A. Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA. *J Bacteriol.* 183(6):1997-2005, 2001

27. Pruteanu M, Hengge-Aronis R. The cellular level of the recognition factor RssB is rate-limiting for δ^S proteolysis: implications for RssB regulation and signal transduction in RpoS turnover in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 45(6):1701-13.
28. Poole RK, Anjum MF, Membrillo-Hernández J, Kim SO, Hughes MN, Stewart V. Nitric Oxide, Nitrite, and Fnr Regulation of *hmp* (Flavo-hemoglobin) Gene Expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 178(18):5487-92, 1996.
29. Beuzón CR, Banks G, Deiwick J, Hensel M, Holden DW. pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 33(4): 806–16, 1999
30. Rathman M, Sjaastad MD, Falkow S. Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infect Immun* 64(7): 2765–73, 1996
31. Alpuche Aranda CM, Swanson JA, Loomis WP, Miller SI. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(21): 10079–83, 1992.
32. Bang IS, Frye JG, McClelland M, Velayudhan J, Fang FC. Alternative sigma factor interactions in *Salmonella*: sigma and sigma promote antioxidant defences by enhancing sigma levels. *Mol Microbiol.* 56(3):811-23, 2005
33. Bourret TJ, Porwollik S, McClelland M, Zhao R, Greco T, Ischiropoulos H, Vázquez-Torres A. Nitric oxide antagonizes the acid tolerance response that protects *Salmonella* against innate gastric defenses. *PLoS One.* 3(3):e1833, 2008.

VI. II

Table 1. Bacterial strains and plasmids.

strain NO	genotype	Source
IB1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium 14028s	ATCC
IB316	<i>hfq</i>	Bang et al., 2005
IB1006	<i>rpoS::Tn10dcm</i>	J. W. Foster
IB1020	<i>rpoS::Tn10dcm/prpoS</i>	J. W. Foster
IB1025	$\Delta yhhA::CM$	This study
IB1030	$\Delta yeaG::CM$	This study
IB1149	$\Delta ybaY::CM$	This study
IB1150	$\Delta yeaH::CM$	This study
IB1151	$\Delta uspA::CM$	This study
IB1152	$\Delta yhcO::CM$	This study
IB1153	$\Delta STM1324::CM$	This study
IB1154	$\Delta yqjI::CM$	This study
IB1156	$\Delta yecG::CM$	This study
IB1157	$\Delta otsB::CM$	This study
IB1158	$\Delta STM3688::CM$	This study
IB1159	$\Delta yliH::CM$	This study
IB1160	$\Delta ycgB::CM$	This study
IB1161	$\Delta ygaU::CM$	This study
IB1168	$\Delta dps::CM$	This study
IB1170	$\Delta wraB::CM$	This study
FB127	pTP2223	K. A. Datsenko

Table 2. Primer used for the construction of mutations and qRT-PCR analysis.

primer name	primer DNA sequence	primer name	primer DNA sequence
16srRNA FWD	tttacggcgtggactaccag	yhcO FWD	cgcagttatcaggcagggtg
16srRNA REV	atctggaggaaataccgtgg	yhcO REV	gggctaaaagcgtttctgga
YeaG FWD	accatattaggctcgcgat	yehH FWD	gcgcaacggtttgcatagt
YeaG REV	ctatgccagcgttacgaag	yehH	gtaacgtgctgatgggttg
YhhA FWD	gcagattcagcagcagggtg	glgS FWD	ttagtgttctaattctaaccttttcg
YhhA REV	ggaatggtttagcatccggt	glgS REV	taaataatttcgatttctggcg
yfiA FWD	attactccggcaatccgc	dps FWD	ggaatttatcagagctcgct
yfiA REV	gacgaagctggcatcttca	dps REV	tcatgagatgctggatggct
STM2699 FWD	gcaagcaccgactcttcaa	ygaU FWD	aaaactgactttcagccgcc
STM2699 REV	cgcgccagatattcattaaca	ygaU REV	caagcgaggtgaatatggga
ycgB FWD	ttatccgcagaaacagacgc	acpD FWD	ctggcgctgtctgatgaact
ycgB REV	ggcaatatccggaaccagt	acpD REV	cgccaagacaaaattcacg
yecG FWD	catattctgtcgccttgc	ybaY FWD	actcgtgcacatgtaagtg
yecG REV	ccgcaaatgaccagatcaac	ybaY REV	atgggttaaaccgcaacaca
yliH FWD	cgftgacagactgagaaccga	otsB FWD	cagacatcgggtacgcttc
yliH REV	aaggtcggacaatcatggtg	otsB REV	caggctccggaacatgaag
STM3688 FWD	ccgccgttaacctcttctt	hcp FWD	aatgcacttgccttcagtcg
STM3688 REV	gggccacatggagatcta	hcp REV	ctgctgtgctctgacggct
ybfA FWD	ttttgtccgtcgtgcttc	STM1324 FWD	gttgccaagaataaacgca
ybfA REV	aagtcgaggtggcttttc	STM1324 REV	tttaagcgagcaagtcgggtg
wraB FWD	ttgatccaggaaagtacgca	uspA FWD	aacgcgaaaatctccctcat
wraB REV	tggcaagattctgtgctc	uspA REV	tgtaacgtgaacggtgtg
yqjI FWD	tctaataagcaggaggcaatg	STM3774 FWD	acgtcgacaggtctacact
yqjI REV	ccccctcaggtttctatc	STM3774 REV	aatatgctgctggtcccct
yeaH FWD	cgcgccagagagttttag	blc FWD	atcgataaaagctcgggat
yeaH REV	ccagaatgatgcattgagc	blc REV	ggctgggtgagtaccgact

Table 3. Result of microarray analysis.

STM Gene	WT/<i>rpoS</i> mutant	t-test P-value
yfiA	40.2	0.002
ycgB	34.1	0.000
yecG	15.7	0.031
yliH	15.4	0.002
STM3688	14.0	0.010
yhhA	12.2	0.005
ybfA	11.5	0.058
wraB	11.2	0.001
yhaK	10.3	0.011
yhcO	10.0	0.000
yeaG	9.3	0.000
ybfA	9.1	0.071
ychH	8.5	0.119
ndh	8.5	0.077
glgS	8.4	0.056
dps	7.5	0.000
ygaU	7.0	0.002
ybaR	6.5	0.020
yhhW	6.3	0.025
otsA	6.3	0.003
acpD	6.1	0.013
ybaY	6.0	0.001
otsB	6.0	0.011
hcp	5.9	0.004
yjbJ	5.7	0.000
STM1324	5.5	0.005
uspA	5.4	0.007
STM3774	5.4	0.000
blc	5.3	0.000
ygiD	5.3	0.029
yeaH	5.2	0.000
yqjI	5.1	0.025

VII. 그림

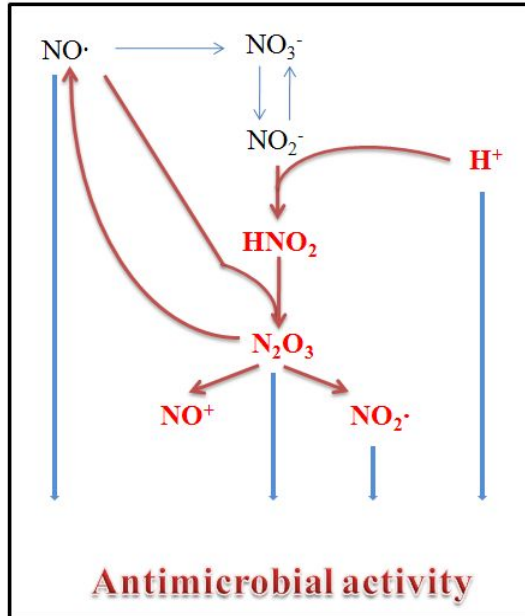


Figure 1. ARNS (Acid pH-mediated Reactive Nitrogen Species).

Animal hosts produce NO as an antimicrobial factor. NO and NO-derived reactive nitrogen species (RNS) are generated mainly by the inducible nitric oxide synthase (iNOS) of phagocytic cells and chemical synthesis in the stomach from dietary nitrate.

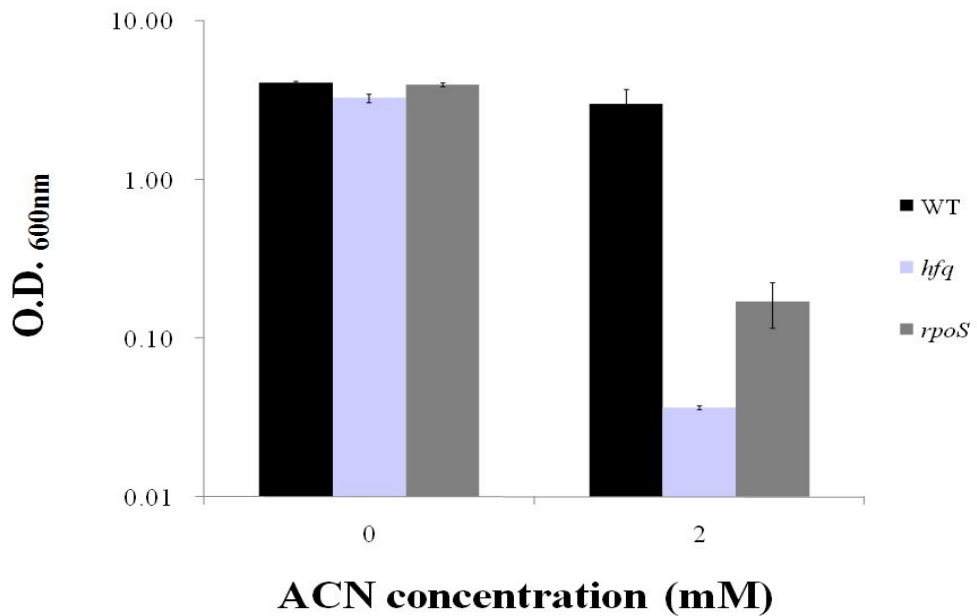


Figure 2. The effect of acidified nitrite (ACN) on the growth of *S. Typhimurium* strains.

Wild-type, *hfq*, *rpoS* mutant *S. Typhimurium* cells were cultured in the media containing 0, 1, 2mM ACN for 24 hours. (WT:black bar, *hfq* mutant:gray bar, *rpoS* mutant:dark gray bar) The experiment was repeated three times with essentially identical results.

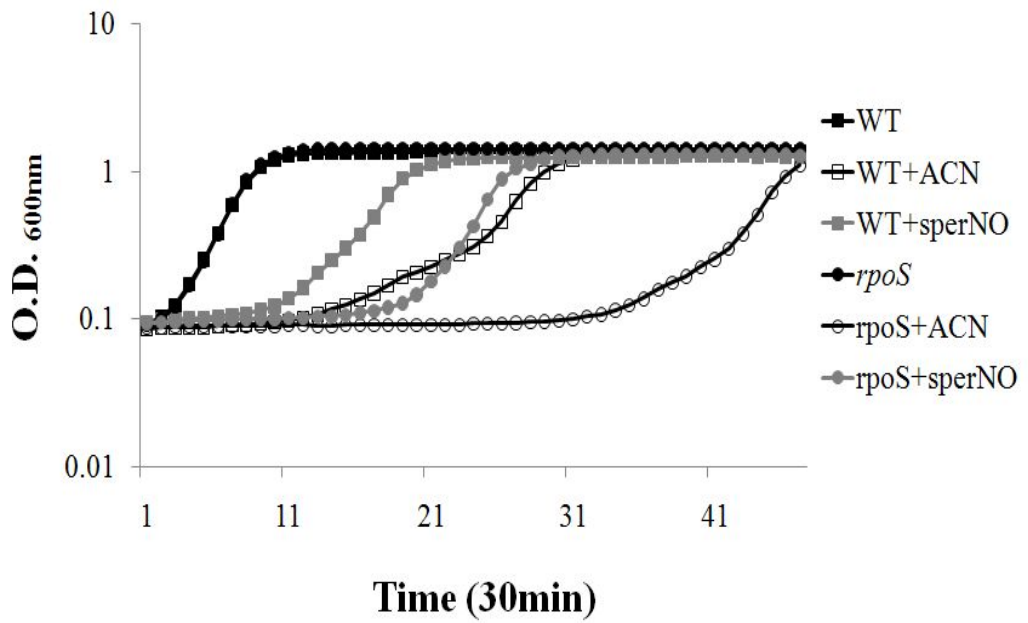
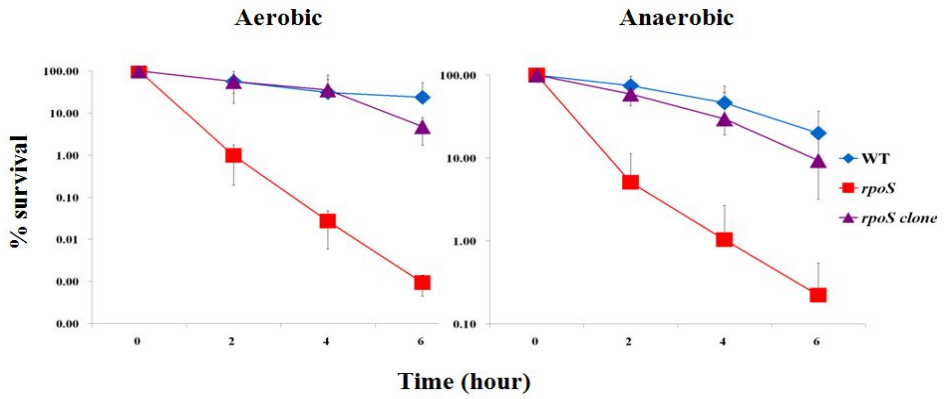


Figure 3. Growth curves of WT and *rpoS* mutant in the media containing 2mM ACN or spermine NONOate (SperNO; 500uM).

Growth of WT(square), *rpoS* mutant(circle) salmonella in presence or absence of sodium nitrite(2mM) and sperNO(500uM) at pH5.

(A)

ACN



(B)

sperNO

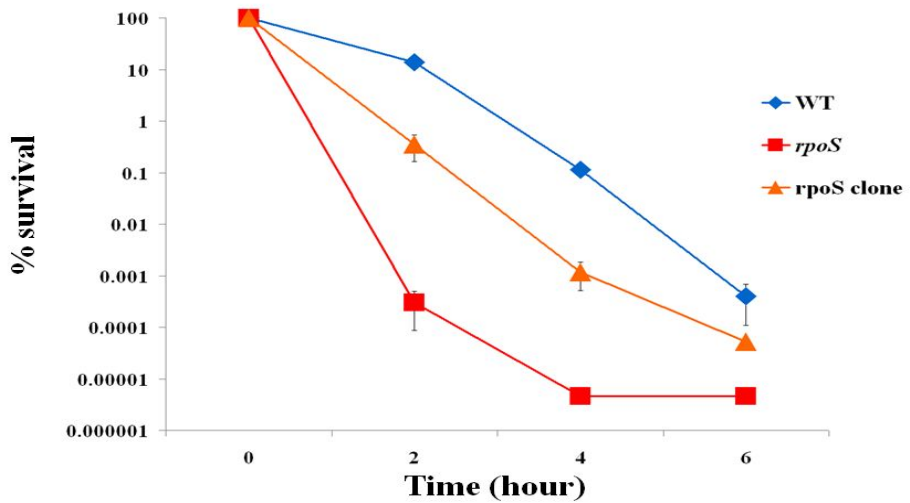


Figure 4. Survival rate of *S. Typhimurium* cells after 3mM ACN(A) and 1mM sperNO(B) challenge.

Overnight-cultured bacterial cells were exposed to ACN in aerobic and anaerobic conditions(WT;rhombus, *rpoS* mutant;square, *rpoS* clone;triangle). The experiment was repeated three times with essentially identical results.

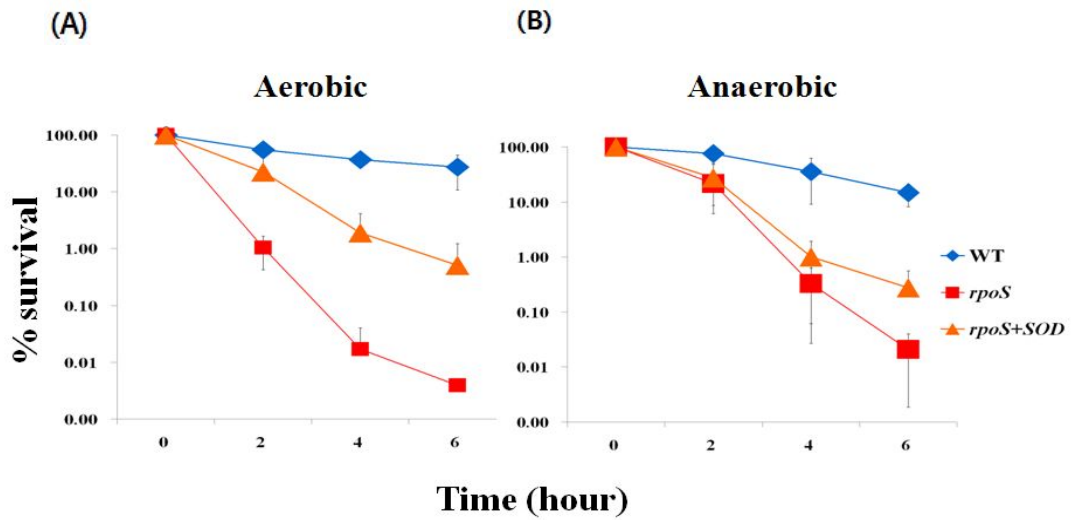


Figure 5. The effect of superoxide and RpoS-dependent reactive oxygen species (ROS) scavenger enzymes on ACN challenge.

(A) and (B) The effect of SOD (300units/ml) in aerobic (A) and anaerobic (B) ACN challenges. The experiment was repeated three times with essentially identical results.

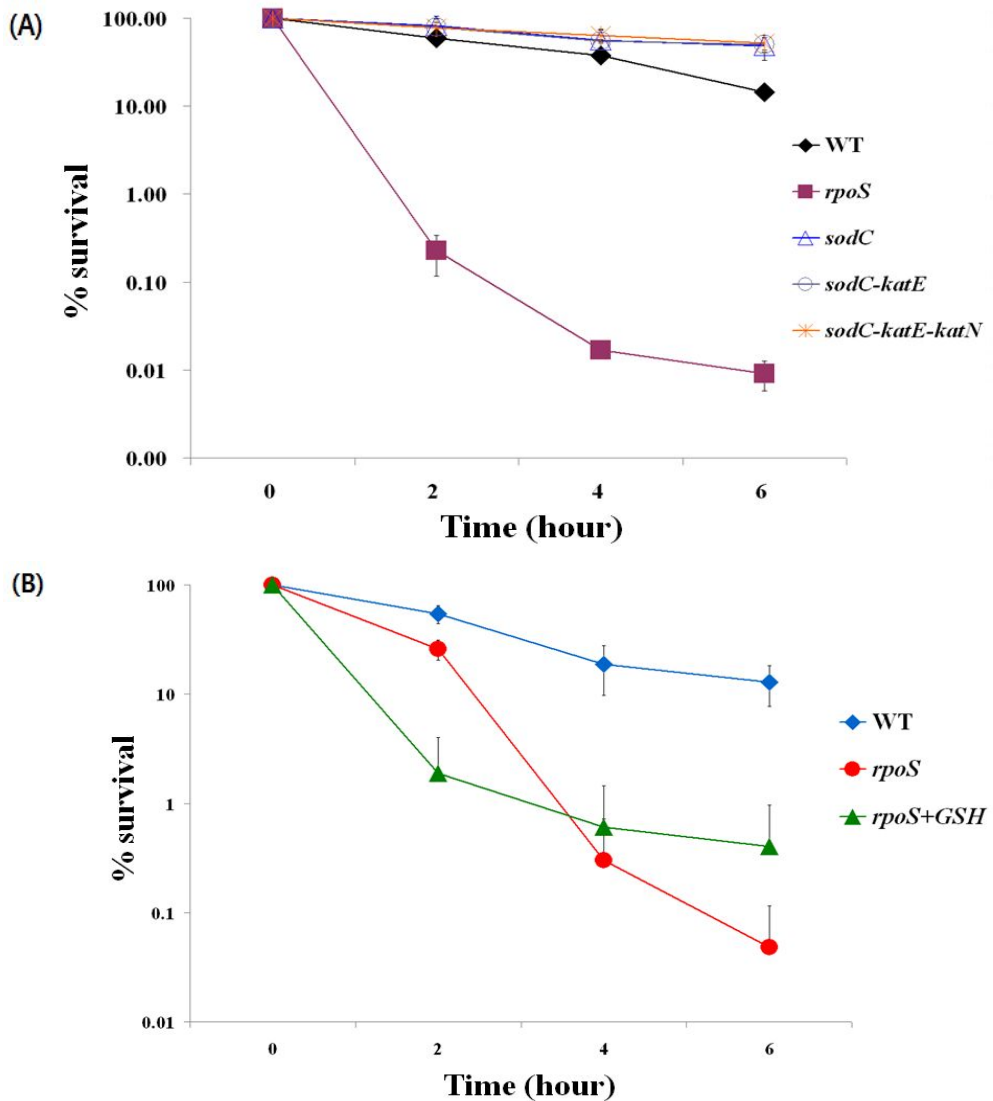


Figure 6. Effect of *SodC*, *KatE*, *KatN* and GSH for ACN survival.

(A) ACN challenge of *S. Typhimurium* cells lacking RpoS-dependent superoxide dismutase (*SodCII*) and catalases (*KatE* and *KatN*). *sodCII*, *katE* and *katN* are currently known as RpoS regulon genes for ROS detoxification. (B) WT; rhombus, *rpoS* mutant; squar, *rpoS* mutant+GSH 5mM; triangle. The experiment was repeated three times with essentially identical results.

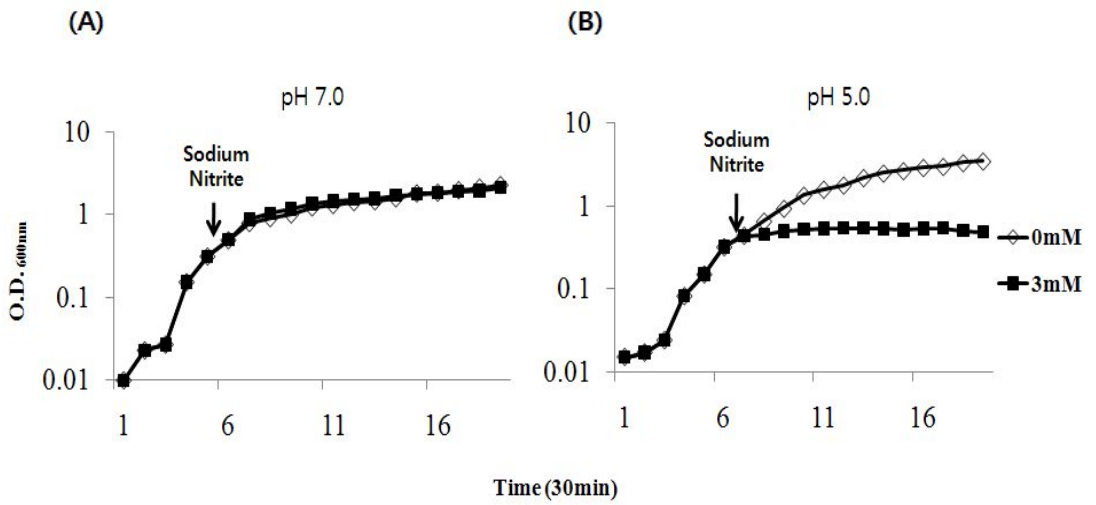


Figure 7. Condition for cDNA microarray analysis of RpoS-dependent ACN-inducible genes.

(A) and (B) The growth of the WT *S. Typhimurium* in presence(■) or absence(□) of sodium nitrite at pH7 (A) and pH5 (B). The growth rate was decreased after treatment with sodium nitrite at pH5, while unaffected at pH7.

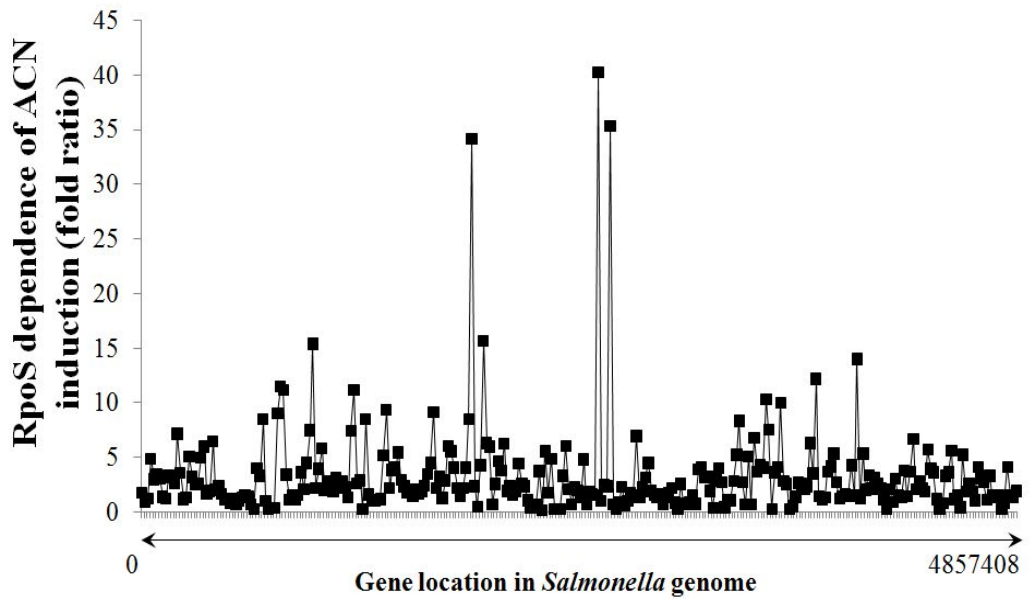


Figure 8. RpoS dependent transcription of ACN inducible genes.

Cells incubated 1 hour after sodium nitrite treatment were collected. cDNA was labeled from total RNA and subjected to *Salmonella* cDNA microarray analysis. Data represents fold ratio of RpoS dependence of transcription of ACN inducible genes [fold induction of ACN (intensity of pH5/ intensity of pH7) in wt versus *rpoS* mutants].

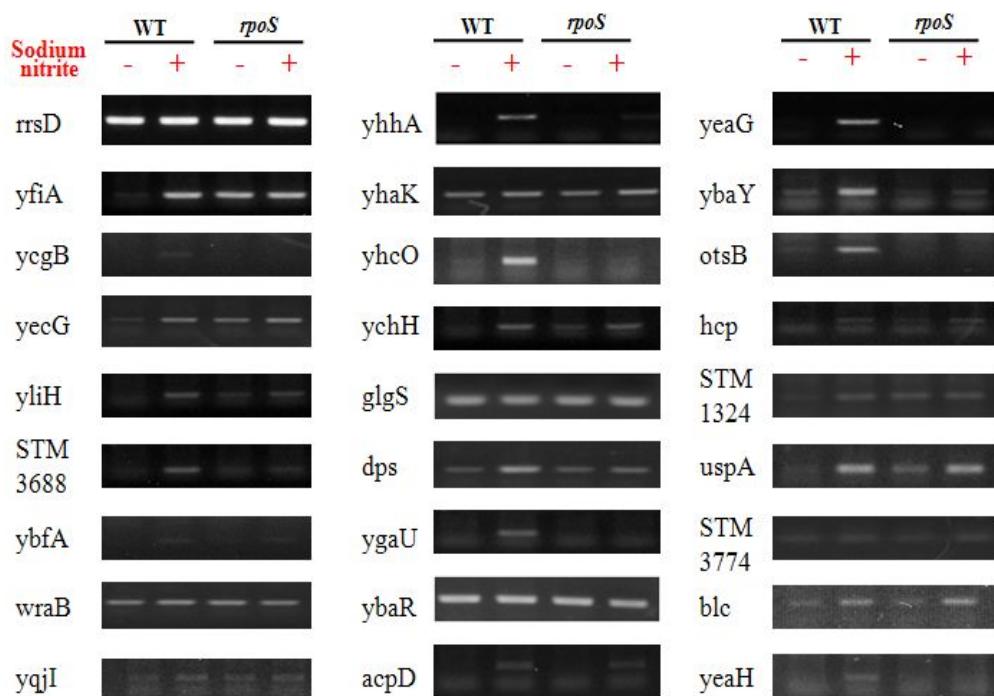


Figure 9. Regulation of transcription of RpoS dependent ACN-inducible genes (qRT-PCR analysis).

Transcription of exponential-phase cells in the absence(-) or presence(+) of 3mM ACN. ACN induces RpoS target gene transcription in ACN stress condition. *rrsD*(16S rRNA) was control housekeeping gene.

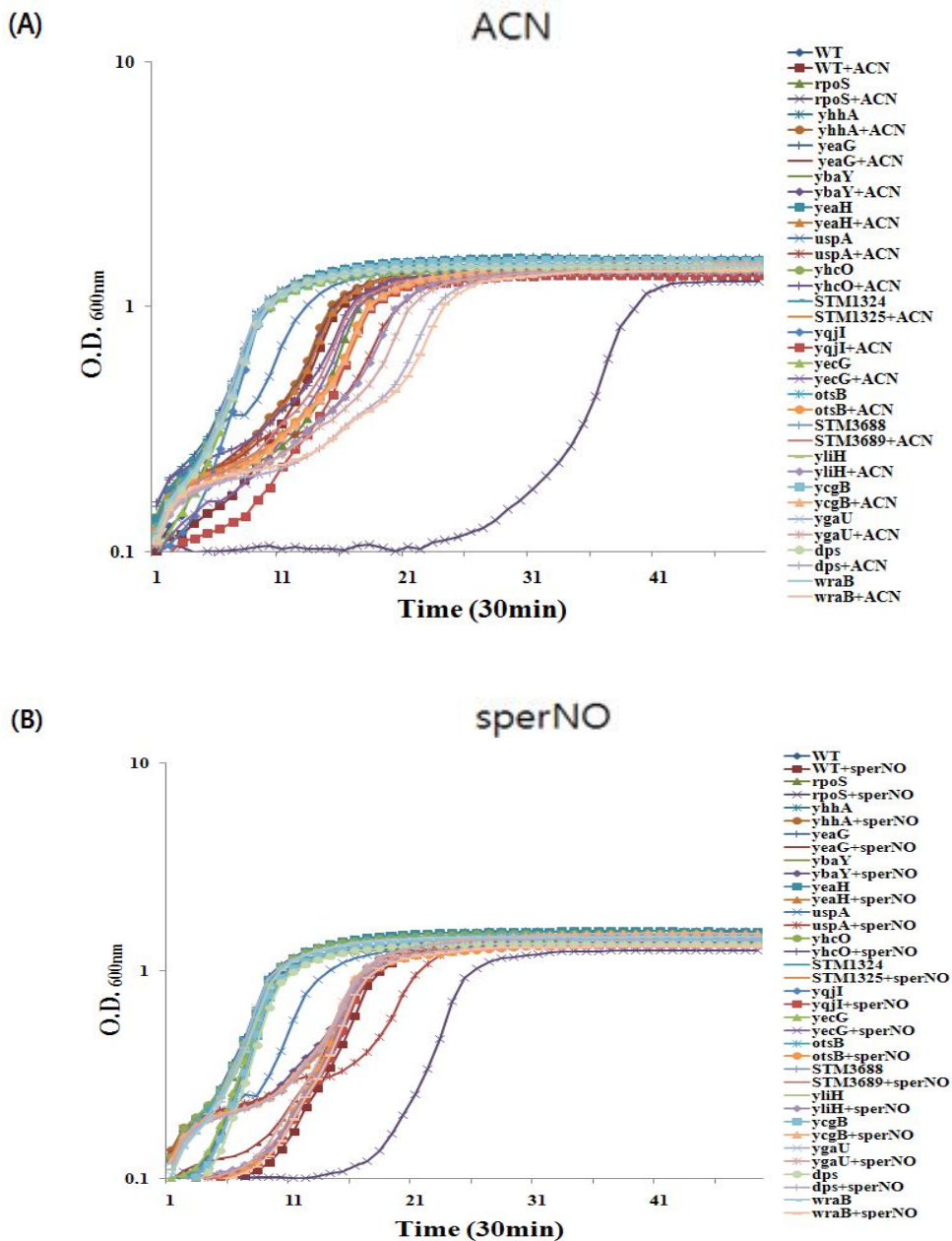


Figure 10. Phenotype of the RpoS-dependent ACN-inducible gene mutants.

Growth of WT and RpoS-dependent ACN-inducible gene mutants bacteria was measured in LB MES(pH5) medium or in the presence of 2mM ACN(A), 500uM sperNO.

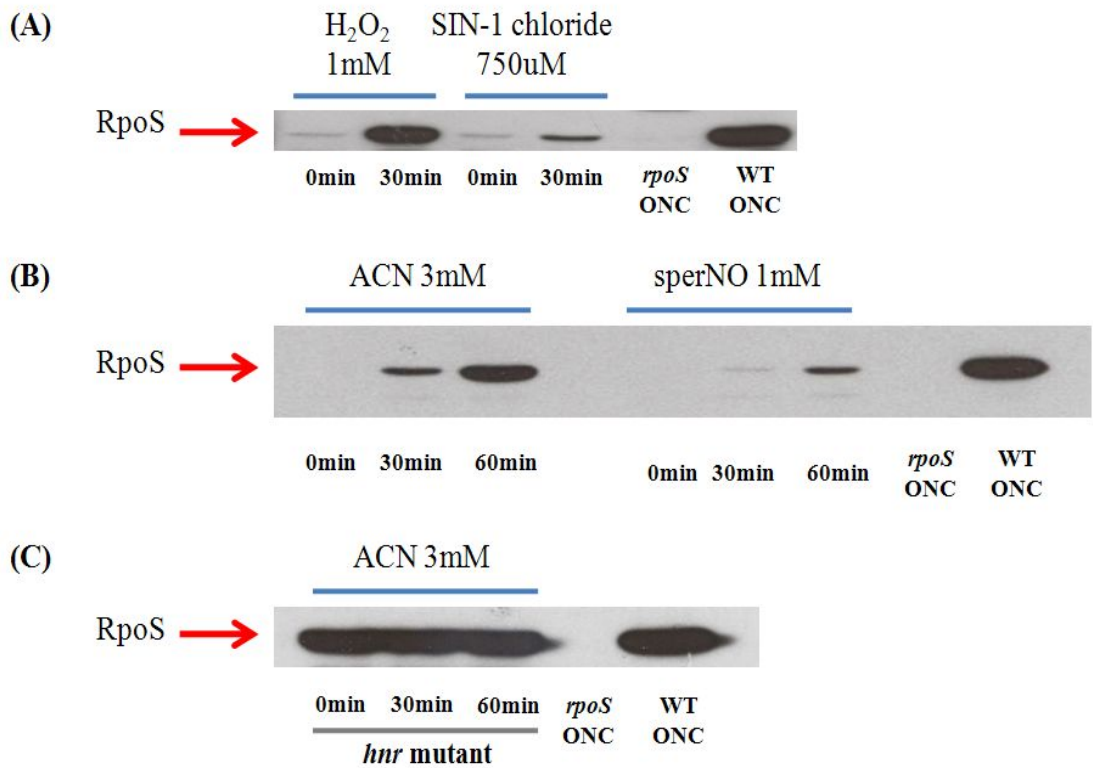


Figure 11. Oxidative and acidifide nitrite induction of RpoS.

Early log-phase cells (O.D.600nm~0.4) cultured in LB-MES media (pH 5.0) were treated 3mM sodium nitrite. Cells were harvested at the times indicated and processed for immunoblot analysis using an anti-RpoS monoclonal antibody.

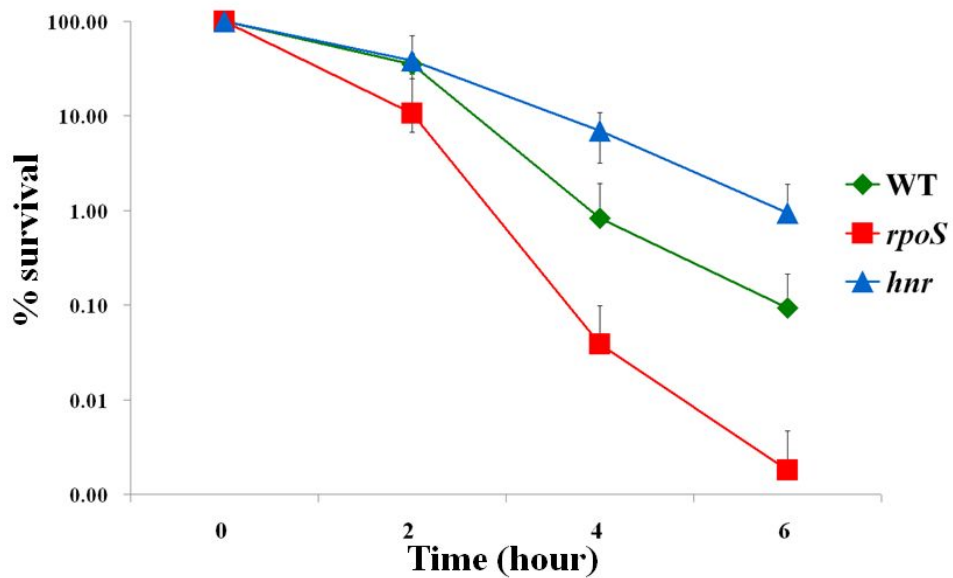


Figure 12. Survival rate of RpoS overexpression in ACN stress condition.

Log-phase bacterial cells were exposed to 3mM ACN in aerobic condition (WT ; rhombus, *rpoS* mutant ; square, *hnr* mutant ; triangle). The experiment was repeated three times with essentially identical results.

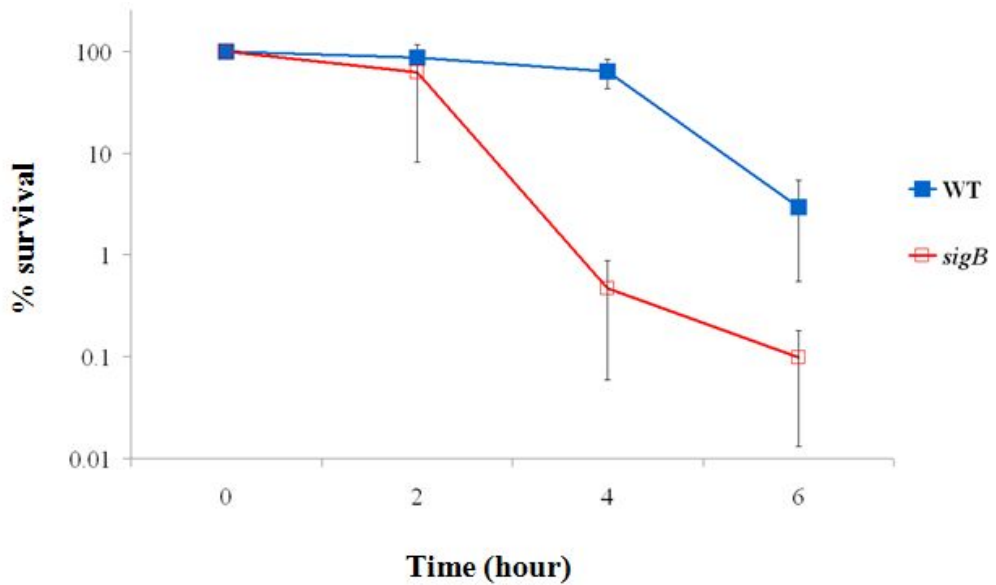


Figure 13. Survival rate of *S.aureus* cells after 3mM ACN.

Overnight-cultured bacterial cells were exposed to ACN in aerobic condition(WT ; dark square, *sigB* mutant ; clear square). The experiment was repeated three times with essentially identical results.

VIII. 국문초록

산성 pH와 활성질소종 조합의 항균 활성에 대항하는 살모넬라 생존 메커니즘

박 희 정

조선대학교 대학원

치의생명공학과

지도교수 : 방 일 수

많은 종류의 병원성 세균들은 사람을 포함한 동물숙주에 감염을 일으킬 수 있다. 세균감염에 대항하기 위해 동물숙주는 항균요소를 생산한다. 활성 질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 병원성 세균의 병독성을 제어할 수 있는 강력한 항균요소 중 하나이다. RNS는 식세포의 inducible nitric oxide synthase(iNOS)로부터 생성되는 NO와 음식물 섭취를 통해 생성되는 NO₃⁻의 화학적 변형에 의해 주로 생성된다. 그러나 RNS에 대항하는 세균의 보호기작은 잘 알려지지 않았다. 이 논문에서는 대체 sigma factor RpoS가 RNS 생성 조건에서 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 의 성장과 생존을 촉진하는 것을 확인하였다. NO congener를 포함한 산성 배지에서 *S.*

Typhimurium *rpoS* 돌연변이주의 성장률은 감소된다. 게다가 다양한 RNS가 발생할 수 있는 acidified nitrite (ACN)에 노출되면 *rpoS* 돌연변이의 생존률 또한 급격히 감소된다. cDNA microarray 분석을 통한 유전자 전사체 분석에서 RpoS로부터 조절되는 새로운 ACN-유도 유전자를 발견하였다. 정상적인 환경에서는 매우 낮은 수준으로 유지되는 RpoS 단백질은 ACN을 처리함으로써 크게 증가된다. ACN을 포함한 배지에서 RpoS-의존적, ACN-유도 유전자가 각각 결핍된 대부분의 돌연변이주의 생장이 억제되었다. 이러한 결과는 RNS가 RpoS의 생성을 유도하고, 증가된 RpoS는 *Salmonella*의 RNS 저항을 위해 필요한 유전자들의 발현을 유도한다는 사실을 보여준다.

저작물 이용 허락서

학 과	치의생명공학과	학 번	20087520	과 정	석사
성 명	한글 박 희 정 한문 朴 希 正 영문 Park Hee Jeong				
주 소	서울시 동작구 사당동 89-58번지				
연락처	e-mail : luxuryphj@naver.com				

	(한글) 산성 pH와 활성질소종 조합의 항균 활성에 대항하는 살모넬라 생존 메카니즘
논문제목	(영문) A Survival Mechanism of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium against the Synergistic Antimicrobial Activity of Acid pH and Reactive Nitrogen Species(RNS)

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함 (다만, 저작물의 내용변경은 금지함)
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함

동의여부 : 동의(0) 반대()

2010 년 8 월

저작자 : 박 희 정 (인)

조선대학교 총장 귀하