creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

**저작자표시**. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

**비영리**. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

**변경금지**. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

**저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.**

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

[UCI]I804:11046-000000522566

# Tricarboxylic acid (TCA) 회로가 녹농균 elastase 생산에 미치는 영향 규명

연세대학교 대학원

의과학과

김 동 근

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

# Tricarboxylic acid (TCA) 회로가 녹농균 elastase 생산에 미치는 영향 규명

연세대학교 대학원

의과학과

김 동 근

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

# Tricarboxylic acid (TCA) 회로가 녹농균 elastase 생산에 미치는 영향 규명

지도교수 윤 상 선

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2019년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

김 동 근

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

김동근의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 윤 상 선

심사위원 박 순 정

심사위원 용 동 은

연세대학교 대학원

2019년 12월

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

# 감사의 글

실험에 대해 아는 것 없는 제가 실험실 생활을 시작한지 2년 반이 지난 지금 졸업을 앞두고 있습니다. 길다면 길고 짧다면 짧을 수 있는 시간이었는데 이 시간 동안 너무나 좋은 분들을 만났고, 많은 도움을 받았습니다. 많은 분들이 도와주셨기에 무사히 석사과정을 마칠 수 있게 되었습니다.

먼저 2년이 넘는 시간 동안 많은 것을 배울 수 있게 기회를 주시고 알려주신 윤상선 교수님께 감사드립니다. 교수님께서 기회를 주셨기에 좋은 사람들이 있고 좋은 환경이 갖춰진 곳에서 많은 것들을 배울 수 있었습니다. 또한 제가 결정한 길에 대해 최대한 지원해주시고, 응원해 주셔서 다시 한 번 감사드립니다.

또한 여러 박사님과 선생님의 도움이 있었기에 무사히 졸업을 할 수 있게 되었습니다. 실험뿐만 아니라 실험실 생활에 있어서도 많은 도움을 주셨던 이강무 박사님, 따뜻한 조언을 많이 해 주신 윤미영 박사님, 실험이 잘 마무리될 수 있도록 도와주신 김지은 박사님께도 감사드립니다. 실험에 대해 하나도

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

모르던 저에게 실험의 기본적인 것부터 가르쳐 주셨던 이기훈 박사님께도 감사드립니다. 2년동안 실험실에서 함께 생활했던 경배 선생님, 화영이, 모하메드, 원태, 진선이, 광희 선생님, 지현이, 다현이, 그리고 찬민 선생님과 소원 선생님께도 감사드립니다.

그리고 바쁘신 와중에 시간을 내주셔서 논문이 완성될 수 있도록 조언해주신 심사위원이신 박순정 교수님과 용동은 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

# 차례

국문요약……1

Ⅰ. 서론……4

II. 재료 및 방법 ……9

1. 사용 균주, plasmids 및 미생물 배양……9

2. PAO1 transposon mutant 제작 ……12

3. Arbitrary PCR……12

4. Elastase 발현 측정 ……13

5. In-frame deletion mutant 제작……14

6. RNA Sequencing……15

7. *gltA* complementation ……16

8. Quantitative Real-Time PCR ……16

9. 통계적 분석 방법 ……17

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

III. 결과 ……18

1. PAO1 transposon insertion mutant 제작 및 Elastase 과 발현 돌연변이 선별 ……18

2. Elastin-congo red를 이용한 elastase 정량적 비교 ……20

3. TCA회로에 관여하는 효소에 transposon이 삽입된 돌연변이체 ECR assay 결과……22

4. in-frame deletion mutant 제작 및 transposon mutant와의 비교 ……25

5. △*gltA* complementation ……28

6. RNA sequencing data & 대체 경로……31

7. Citrate 농도에 따른 elastase 발현 정도의 변화 ……35

IV. 고찰 ……37

V. 결론 ……40

참고문헌……41

ABSTRACT……45

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

# 그림 차례

Fig 1. Screening of elastase overexpression mutant ·····19

Fig 2. Growth curve and Elastin-Congo red assay result ···21

Fig 3. TCA cycle of *P. aeruginosa*·····23

Fig 4. Confirmation of *gltA* in-frame deletion·····26

Fig 5. Compare the growth and elastase expression level among PAO1, △*gltA*, and *gltA*::Tn·····27

Fig 6. Growth curve in M9 media ·····29

Fig 7. Genetic complementation·····30

Fig 8. Autonomously induced transcription of genes (PA0878 ~PA0883) that constitute an operon in the △*gltA* mutant under malfunctional TCA cycle ·····34

Fig 9. Growth and elastase expression level according to citrate concentration·····36

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

# 표 차례

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study‥11

Table 2. Transposon mutants related with TCA cycle·····24

Table 3. Transcript levels of major genes, whose expressions were significantly altered in the △*gltA* mutant ·····33

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

국문요약

# Tricarboxylic acid (TCA) 회로가 녹농균 elastase 생산에 미치는 영향 규명

지도교수 윤 상 선

연세대학교 대학원 의과학과

김 동 근

녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 만성 및 급성 감염을 유발할 수 있는 기회 감염성 세균이다. *P. aeruginosa*는 quorum sensing (QS)이라는 세포 밀도 의존적 방식으로 유전자 발현을 조절하는 박테리아 통신 시스템을 가지고 있다. *P. aeruginosa*는 많은 병원성 인자를 생산하며, 그중 다수의 병원성 인자는 QS에 의해 발현이 조절되고 있다. 주요 QS에 의해 조절되는 병원성 인자 중 하나는 *lasB* 유전자에 의해 암호화되는 elastase이다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

많은 연구에서 기능 손실 돌연변이가 보고되었으며, 이러한 돌연변이에서 elastase 생성이 줄어들어 있거나 또는 생성되지 않는다. 기존의 연구와 달리 우리는 더 높은 수준의 elastase를 생성하는 돌연변이를 찾고자 하였다. 우리는 elastase 과 발현 돌연변이를 통해 elastase 생산, 조절에 대한 새로운 관점을 제공할 수 있을 것을 기대하였다.

이를 위해, 우리는 random transposon mutagenesis를 통해 돌연변이를 제작하고, elastase 과 발현 돌연변이를 선별하였다. 선별된 돌연변이에서 transposon이 삽입된 위치를 arbitrary PCR을 통해 확인하였다. 이를 통해 tricarboxylic acid (TCA) 회로의 여러 효소 중 하나인 구연산 합성효소를 코딩하는 *gltA* 유전자에 transposon이 삽입된 돌연변이체(*gltA*::Tn)에서 elastase 발현이 증가하였다는 것을 알 수 있었다. *gltA*::Tn 돌연변이는 천천히 자라지만 야생형 균주인 PAO1보다 많은 양의 elastase를 생성한다. 우리는 *gltA* 유전자를 제거한 돌연변이(△*gltA*)를 제작하였고, *gltA*::Tn 돌연변이와 △*gltA* 돌연변이가 동일한 elastase 발현 수준을 보이는 것을 확인하였다.

또한 *gltA* 유전자가 결실되었을 때 어떠한 유전자의 발현이 달라지는지를 전반적으로 확인하기 위해 PAO1과 △*gltA*에 대해

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

RNA sequencing을 수행하였고, 흥미롭게도 비정상 TCA 회로를 보상하기 위해 TCA 회로를 우회하는 대안적인 경로에 관여할 것으로 예상되는 유전자들이 △*gltA* 돌연변이에서 크게 증가되어 있음을 확인하였다.

이러한 결과는 (i) TCA cycle 활성이 elastase를 생산하는 박테리아의 능력과 관련되어 있고, (ii) QS에 의해 조절되는 elastase 생산이 야생형 균주에 비해 낮은 세포 밀도에서 이루어질 수 있음을 시사한다. 우리는 *P. aeruginosa*에서 TCA 회로에 의해 매개되는 에너지 대사가 어떠한 메커니즘을 통해 elastase 발현을 조절할 수 있는지에 대해 밝히고자 한다.

**핵심되는 말 :** 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), elastase, 물질대사, TCA 회로(tricarboxylic acid cycle)

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

# Tricarboxylic acid (TCA) 회로가 녹농균 elastase 생산에 미치는 영향 규명

지도교수 윤 상 선

연세대학교 대학원 의과학과

김 동 근

## Ⅰ. 서론

*P. aeruginosa*는 그람 음성 세균으로 다양한 환경에 존재하며, 기회감염균으로 정상적인 면역력을 가진 사람에게 감염되었을 때에는 큰 문제를 일으키지 않지만 낭포성 섬유증(Cystic fibrosis) 환자에게는 심각한 폐질환을 일으켜 조기에 사망에 이르게 할 수 있을 뿐만 아니라 면역력이 떨어진 사람에게 급성, 만성의 심각한 감염을 일으켜 사망에 이르게 할 수 있다[1]. 또한 *P. aeruginosa*는 병원 내 2차 감염(hospital-acquired infection)의 주요 원인 균으로 알려져 있다. 인공호흡기를 사용하고 있는 환자에게 폐렴을 일으키는 주요 원인 중의

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

하나가 *P. aeruginosa*에 의한 감염이기도 하다[2].

*P. aeruginosa*는 호흡을 통해서만 에너지 대사를 하는 것으로 알려져 있다. 산소를 최종 전자 수용체로 사용하여 에너지 대사를 하는데, 산소가 없는 환경에서는 $NO_3^-$, $NO_2^-$를 대체 전자 수용체로 이용하여 탈질화 작용(denitrification)을 거쳐 에너지 대사를 할 수 있음이 밝혀져 있다[3]. *P. aeruginosa*에서 TCA 회로는 에너지 대사의 측면에서 중요할 뿐만 아니라 지방산, 아미노산, 탄수화물 합성을 위한 전구물질을 생성하는데 있어 중요한 역할을 하고 있다[4].

*P. aeruginosa*는 다양한 병원성 인자(virulence factor)를 생산하는 것으로 알려져 있다. *P. aeruginosa*가 생산하는 병원성 인자로는 type Ⅳ pili, pyocyanin, pyoverdine, rhamnolipid, elastase, alkaline protease 등이 있다[5]. 이러한 병원성 인자 중 많은 부분은 세포 밀도에 의존적 신호 조절인 QS에 의해 조절되고 있다[6]. QS에 의해 조절되는 많은 병원성 인자는 *P. aeruginosa*가 숙주에 감염되었을 때 숙주에 집락화(colonization)하는 것에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다. *P. aeruginosa*의 QS 시스템은 현재까지 Las, Rhl, PQS, 그리고 최근에 밝혀진 IQS (integrated QS)까지 총 4가지가 밝혀져 있고, 이 4가지 시스템은 서로 상호조절을 하고 있는 것으로 알려져 있다[7]. QS 시스템에 돌연변이가 생긴 균주에서는 *P. aeruginosa* 감염에 의해 숙

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

주에서 나타나는 병원성이 크게 약화되어 있다는 연구도 있다[8]. QS 시스템은 기본적으로 세포 밀도에 의존적으로 조절된다고 알려져 있지만 인 결핍, 산소 결핍, 영양 결핍 등의 다양한 환경 요인에 의해 조절될 수 있다고 보고되었다[9].

*P. aeruginosa*가 생산하는 병원성 인자 중 protease로는 LasA, LasB (elastase), alkaline protease, protease IV 등이 있는 것으로 알려져 있다. Elastase는 *lasB* 유전자의 발현산물로 여러 병원성 인자와 마찬가지로 QS에 의해 발현이 조절되고 있다[10, 11]. 활성을 가지는 형태의 elastase는 약 33 kDa 크기로 숙주 조직을 파괴할 수 있다. *P. aeruginosa*가 분비한 elastase에 의해 밀착 연접(tight junction)이 파괴되고 이로 인해 숙주 상피세포의 투과성이 증가한다[12]. Elastase는 또한 *P. aeruginosa* 감염을 통한 동물실험 결과에서 쥐의 사망률에 영향을 주는 주요 인자임을 밝힌 연구 결과도 발표되었다[13]. 따라서 elastase에 대한 연구가 많이 진행되어왔는데 기존의 elastase에 대한 많은 연구들은 QS 시스템에 초점을 두었다. QS 시스템을 억제하여 elastase 발현을 하지 못하는 돌연변이를 찾는 방향으로 진행되어 왔다[14].

기존에 elastase는 QS 시스템에 의해 조절된다는 사실을 바탕으로 많은 연구가 QS 시스템과 elastase 발현을 연관 지어 연구를 해

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

왔다. 또한 elastase는 병원성 인자로 알려져 있었기에 elastase 발현을 억제하는 쪽에 관심을 두고 연구가 진행되었다.

이와 달리 본 연구에서는 elastase의 발현이 증가하는 돌연변이를 찾아 elastase의 조절에 대한 새로운 메커니즘을 찾고자 시작되었다. 만약 어떤 특정 유전자의 돌연변이가 생겼을 때 이로 인해 elastase의 발현이 증가한다면 *P. aeruginosa*가 elastase 발현을 증가시키는 메커니즘만 가지고 있는 것이 아니라 이를 억제하고 있는 메커니즘도 가지고 있다고 볼 수 있다고 생각하였다. 따라서 이러한 메커니즘을 밝힐 수 있다면 이를 이용해 *P. aeruginosa*가 가지고 있는 주요한 병원성 인자인 elastase 발현을 억제할 수 있을 것으로 기대하고 본 연구를 수행하였다.

*P. aeruginosa*가 elastase 발현을 억제하고 있는 메커니즘을 가질 수 있다는 가설을 증명하기 위해 우선적으로 transposon random mutagenesis를 통해 PAO1에 transposon이 무작위로 삽입된 돌연변이를 확보하였다. 이 돌연변이들 중 elastase의 발현이 증가한 돌연변이를 선별하였으며, arbitrary PCR을 통해 transposon이 삽입된 위치를 확인하였다. 그 결과 TCA 회로의 가장 첫 번째 산물인 시트르산을 합성하는 효소인 구연산 합성효소(citrate synthase)를 코딩하고 있는 *gltA* 유전자에 transposon이 삽입된 돌연변이에서 elastase의

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

위의 결과를 통해 본 연구에서는 *P. aeruginosa*의 물질대사(metabolism)와 병원성 인자 사이에 연관성이 있을 수 있다는 가설을 세우게 되었다. 특히 여러 물질 대사 중 가장 중심에 있다고 할 수 있는 TCA 회로와 elastase의 발현 사이의 관련성에 대해 알아보고자 하였다. 이 둘이 어떻게 상호작용하고 있는지에 대한 연구를 토대로 elastase 발현에 대한 새로운 메커니즘을 통해 elastase의 발현을 조절할 수 있는 새로운 가능성을 제시하는 것을 목표로 연구를 진행하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

## Ⅱ. 재료 및 방법

### 1. 사용 균주, plasmids 및 미생물 배양

*P. aeruginosa* 중 PAO1이 표준 균주(reference statin)로 사용되었으며 실험에 사용된 transposon mutants와 in-frame deletion mutant 제작에 이용되었다. *Escherichia coli* SM10/λpir pBTK30이 transposon mutant 제작을 위한 conjugation에 사용되었다. *E. coli* DH5α는 plasmid를 제작하는데 이용되었으며, *E. coli* SM10/λpir는 in-frame deletion mutant 제작을 위해 만들어진 vector를 PAO1에 conjugation을 통해 전달하기 위해 사용되었다.

실험에 사용된 균주인 *P. aeruginosa* 및 *E. coli* 배양에는 Luria-Bertani broth (LB: 1 % [w/v] tryptone, 0.5 % [w/v] yeast extract, 1 % [w/v] sodium chloride) 또는 LB plate (1 % [w/v] tryptone, 0.5 % [w/v] yeast extract, 1 % [w/v] sodium chloride, 1.5 % [w/v] agar)가 사용되었다. M9 meida의 조성은 다음을 참고하였다[15].

Plasmid를 가지고 있는 균주의 경우 가지고 있는 항생제 마커에 따라 항생제를 사용하였으며, 사용한 항생제의 농도는 다음과 같다: gentamicin (Duchefa, Haarlem, The Netherlands), 100 *μg/ml*;

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

ampicillin (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) 100 *μg/ml*; irgasan (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) 20 *μg/ml*

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

| Strain / plasmid | Description | Reference |
|---|---|---|
| **Bacteria strains** | | |
| *Pseudomonas aeruginosa* | | |
| PAO1 | Wild type | ATCC 10145 |
| *gltA*::Tn | Transposon insertion mutant derived from PAO1, $Gm^R$ | This study |
| △*gltA* | In-frame deletion mutant derived from PAO1 | This study |
| △*gltA* pJN105::*gltA* | *gltA* complemented △*gltA*,, $Gm^R$ | This study |
| *Escherichia coli* | | |
| DH5α | *E. coli* K12 strain | Lab collection |
| SM10/λpir | Donor strain | Lab collection |
| **Plasmids** | | |
| pBTK30 | Transposon vector for the construction of a random mutant library, $Gm^R$ | Lab collection |
| pCVD442 | *sacB* suicide vector generated from pUM24, $Amp^R$ | Lab collection |
| pCVD442::*gltA* | pCVD442 with franking 5' and 3' region of *gltA* gene | This study |
| pJN105 | *araC*-pBAD cloned in pBBR1 MCS-5 | Lab collection |
| pJN105::*gltA* | pJN105 with ORF of *gltA* and its own promoter. | This study |

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

## 2. PAO1 transposon mutant 제작

*P. aeruginosa* PAO1을 LB broth에 접종하여 37 ℃에서 5 시간 배양한다. *E. coli* pBTK30을 gentamicin이 들어있는 LB broth에 접종하여 37 ℃에서 5 시간 배양한다. 각각의 배양액을 LB plate와 gentamicin이 들어있는 LB plate에 100 ul씩 spreading하여 37 ℃에서 16 시간 배양한다. PAO1과, *E. coli* pBTK30이 자란 plate에서 scraper를 이용하여 균을 회수하여 새 LB plate에서 섞어주고 37 ℃에서 6 시간동안 conjugation이 일어날 수 있도록 배양해준다.

Conjugation 후 10 ml의 LB broth를 이용해 plate에 있는 균을 회수한다. Transposon이 삽입된 PAO1만 선별하기 위해 gentamicin과 irgasan이 들어있는 LB plate에 spreading하여 37 ℃에서 16 시간 배양하여 transposon이 삽입된 PAO1 돌연변이를 얻었다.

## 3. Arbitrary PCR

Arbitrary PCR을 수행하기 위해 transposon 삽입 돌연변이로부터 G-spin for bacteria (iNtRON, biotechnology, Seongnam-si, South Korea)를 이용해 genomic DNA를 추출하였다. Arbitrary PCR은 두 단계로 구성되어 있으며, 첫 번째 단계에서는 arbitrary primer인 Rnd1-ARB1(5′-GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNAGA

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

G-3′)과 Rnd1-TnM30(5′-CACCGCTGCGTTCGGTCAA GGTTC-3′)을 이용해 PCR을 수행하였다. AccuPrep PCR/Gel purification kit (Bioneer, Daejeon, South Korea)를 이용해 1단계 PCR 산물을 정제하였다. 정제한 PCR 산물을 주형으로 하여 2단계 PCR을 수행하였다. 2단계 PCR은 transposon-specific primer인 Rnd2-ARB(5′-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3′)와 Rnd2-TnM30 (5′-CGAACCGAACAGGCTTATGTCAATTC-3′)을 이용해 수행하고, 2단계 PCR 산물 또한 PCR purification kit를 이용해 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 이용해 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열 분석은 Macrogen을 통해 이루어졌다. Sequencing 결과를 NCBI의 BLASTn을 통해 annotation함으로써 transposon이 삽입된 위치를 확인하였다.

### 4. Elastase 발현 측정

(1) Elastin LB plate를 이용한 elastase 활성도 측정

Elastase 활성을 측정하기 위해 elastin (3 g/100 ml)이 첨가된 LB plate를 사용하였다. Single colony를 멸균된 이쑤시개를 이용하여 plate에 일정한 간격을 두고 찍는다. Single colony를 찍은 elastin LB plate를 37 ℃에서 48 시간 배양해준 뒤 elastin이 분해되면서 형성

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

된 cleared zone의 크기를 통해 elastase 발현 정도를 측정할 수 있다.

(2) Elastin-Congo red assay를 이용한 elastase 활성도 측정

*P. aeruginosa*를 LB broth에 접종하고 37 ℃에서 230 rpm으로 흔들어주며 16 시간 배양을 한다. Overnight culture를 새 LB broth에 100배 희석하여 본배양을 한다. 2, 4, 6, 8, 10 시간 째에 샘플링하여 $OD_{600}$을 측정함으로써 성장을 확인하고, 4 ℃ 13,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 배양 상층액을 확보한다.

Elastin-Congo red가 10 mg/ml 들어있는 30 mM Tris buffer (pH 7.2)를 준비한다. Tris buffer와 culture supernatant와 각각 2:1 비율로 넣고 6 시간동안 흔들어주면서 배양한다. 이 때 6 시간 째 샘플링한 배양 상층액은 2배, 8 시간 째 샘플링한 배양 상층액은 4배, 10 시간 째 샘플링한 배양 상층액은 8배 희석하여 사용한다.

원심분리를 통해 분해되지 않은 Elastin-Congo red를 제거하고 상층액의 $OD_{495}$를 측정하여 elastase의 발현정도를 확인한다.

## 5. In-frame deletion mutant 제작

*gltA*의 5' upstream region (444 bp)과, 3' downstream region (496 bp)을 증폭하였다. 증폭된 두 flanking region을 하나로 붙여

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

940 bp로 만들어주고, 5' upstream region을 포함한 forward primer와 3' downstream region을 포함한 reverse primer를 이용해 증폭한다. 이를 vector로 사용될 pCVD442에 삽입하여 pCVD442::*gltA*를 제작한다. 이 plasmid를 *E. coli* SM10/λpir에 전기천공법을 통해 형질전환(transformation)하였다.

*E. coli* SM10/λpir pCVD442::*gltA*와 PAO1을 LB plate에서 6 시간동안 conjugation을 해준다. pCVD442::*gltA*와 single crossover가 일어난 PAO1을 선별하기 위해 gentamicin과 irgasan이 들어있는 배지에서 선별한다. single crossover가 일어난 PAO1을 8% sucrose가 들어있는 LB plate에 spreading하여 상온에서 24 시간 이상 배양하여 double crossover를 유도한다. Sucrose가 포함된 배지에서 자란 colony에 대해 PCR을 수행하여, 야생형 균주인지 *gltA* 유전자가 결실된 돌연변이 균주인지 확인함으로써 △*gltA* 균주를 얻는다.

### 6. RNA Sequencing

전배양을 위해 PAO1과 △*gltA* 균주를 LB broth에 접종하고 37 ℃에서 16 시간 배양하였으며, 새 LB broth 100배 희석하여 37 ℃에서 $OD_{600}$ 0.7까지 배양하여 RNA를 추출하였다. 이후 분석은 Macrogen을 통해 진행되었다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

### 7. *gltA* complementation

△*gltA* 균주에서 나타난 표현형이 *gltA* 유전자의 결실로 인한 것인지 확인하고자 △*gltA* 균주에 *gltA* 유전자를 complementation하여 확인하는 과정을 거쳤다. 프로모터를 포함한 *gltA* 유전자 ORF를 증폭하여 pJN105에 삽입하였다. Cloning된 plasmid를 *E. coli* DH5α에서 amplification하였으며, plasmid extraction kit (Bioneer, Daejeon, South Korea)를 이용해 추출하였다. 추출한 plasmid는 △*gltA*에 전기천공법을 통해 형질전환 하였다. 대조군으로 pJN105를 PAO1과 △*gltA*에 동일한 방법으로 형질전환 하였다.

### 8. Quantitative real-time PCR

LB broth에 *P. aeruginosa*를 접종하고 37 ℃에서 230 rpm으로 흔들어주며 16 시간 배양한다. Overnight culture를 DPBS (welgene, gyeongsan-si, South Korea)를 이용해 세척하고, 10 mM glucose 또는 10 mM citrate가 첨가된 M9 media에 100배 희석한 뒤 37 ℃에서 $OD_{600}$ 0.7까지 배양을 한다. 이 후 RNA를 추출한다. 추출한 RNA는 RT PCR을 통해 cDNA로 역전사 되였다. qRT PCR은 SYBR을 이용하여 이루어졌으며, PA0879가 타겟 유전자로, 16S rRNA가 endogenous control로 사용되었다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

### 9. 통계적 분석 방법

실험 결과는 세 번의 실험에서 얻은 평균과 표준편차를 이용해 error bar를 표현하였다. 또한 Student-test로 분석하여 $p<0.05$일 때 통계적 의미가 있는 것으로 판단하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

# Ⅲ. 결과

## 1. PAO1 transposon insertion mutant 제작 및 elastase 과 발현 돌연변이 선별

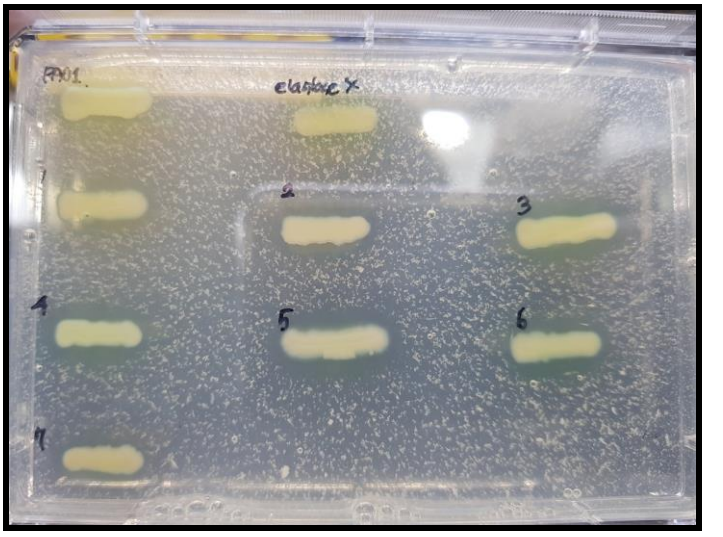
elastase 과 발현 돌연변이를 선별하기 위해 transposon insertion mutant pool을 제작하였다. *P. aeruginosa*의 transposon mutant는 *E. coli* SM10/λpir pBTK30과 PAO1의 conjugation 과정에서 transposon이 PAO1의 genome에 랜덤하게 삽입되어 만들어졌다.

약 3,000개의 transposon mutant를 확보하였으며, 1,600개의 mutant에 대해 elastin LB plate를 이용해 elastase 발현을 확인하였다. Elastase에 의해 elastin이 분해되면서 생성된 cleared zone의 크기를 통해 각 돌연변이가 생산하는 elastase의 양을 간접적으로 확인할 수 있다 (Figure 1A).

Elastin이 포함된 LB plate에서 선별된 elastase 과 발현 돌연변이에서 transposon이 삽입된 위치를 확인하기 위해 arbitrary PCR을 수행하였다. Arbitrary PCR 수행결과 선별된 돌연변이에서 transposon이 *gltA* 유전자에 삽입되었음을 확인할 수 있었다 (Figure 1B).

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

A




B

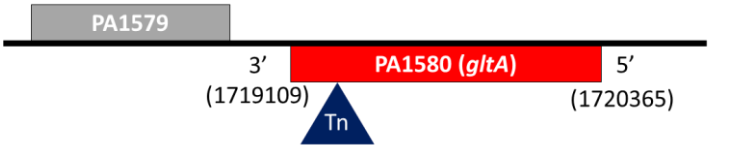



**Fig 1. Screening of elastase overexpression mutant.** (A) Elastase overexpression mutants were screened using elastin containing LB plate. As bacteria grow, Cleared zones are formed by secreted *P. aeruginosa* elastase. Those selected mutants secreted more elastase than PAO1. (B) Transposon insertion site is located between 1719157 and 1719158.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

## 2. Elastin-congo red를 이용한 elastase 정량적 비교

Elastin이 포함된 LB plate에서 elastase의 발현 정도를 확인하는 것은 빠르게 많은 수의 colony에 대한 확인이 가능하다는 장점은 있지만, 정량적인 비교는 가능하지 않다는 단점이 있어 elastin LB plate에서 elastase를 과 발현하는 것으로 보이는 돌연변이에 한해 elastin-congo red를 이용해 elastase의 양을 정량적으로 비교하고자 하였다. 음성 대조군으로 elastase를 생산하지 못하는 *lasB* 돌연변이 (△*lasB)* 균주를 이용하였다.

우선 *P. aeruginosa*의 성장을 측정하였는데, PAO1과 △*lasB* 균주는 동일한 성장곡선을 나타냈지만, *gltA*::Tn 돌연변이에서는 이 둘에 비해 느린 성장곡선을 나타냄을 확인할 수 있었다 (Figure 2A).

이 후 elastin-congo red assay (ECR assay)를 통해 정량적으로 elastase 양을 비교하였다. 세포밀도 의존적으로 발현되는 것으로 알려진 elastase가 동일한 세포 밀도일 때 *gltA*::Tn에서 PAO1에 비해 많은 양이 생성된 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2B).

이를 통해 *gltA*::Tn이 PAO1에 비해 느린 성장을 나타내지만, 동일한 세포밀도에서 비교하였을 때 많은 elastase 발현하고 있다는 결론을 내릴 수 있었다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

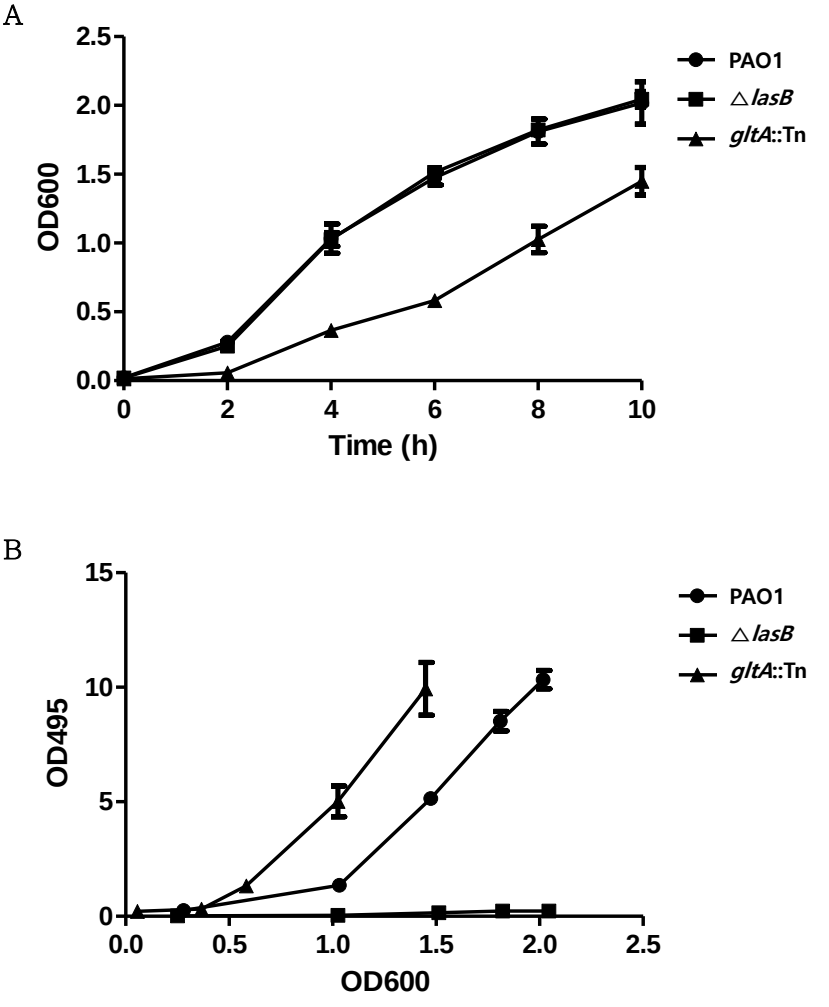



Fig 2. Growth curve and elastin-congo red assay result. (A) Growth of PAO1 and △*lasB* strains (B) elastin-congo red assay result.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

### 3. TCA회로에 관여하는 효소에 transposon 이 삽입된 돌연변이체 ECR assay 결과

*gltA*는 TCA 회로의 가장 첫 단계에 관여하는 구연산 합성효소를 암호화하고 있다. *gltA*::Tn에서 elastase 발현이 증가한 것을 확인하였기에 TCA 회로에 관여하는 다른 효소 또한 elastase 발현에 영향을 주는지 확인해보고자 하였다. University of Washington의 *P. aeruginosa* transposon mutant library를 통해 TCA 회로에 관여하는 효소에 Transposon이 삽입된 돌연변이 균주를 확보하였다 (Table 1).

ECR assay를 통해 elastase 발현정도를 확인하였으며, 그 결과 앞서 transposon mutagenesis를 통해 선별된 elastase 과 발현 균주인 *gltA*::Tn과 동일한 유전자에 transposon이 삽입된 *gltA* 돌연변이만 PAO1과 다른 elastase 발현을 보였으며, 나머지 돌연변이에서는 elastase의 발현 정도의 차이를 확인할 수 없었다 (data not shown).

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

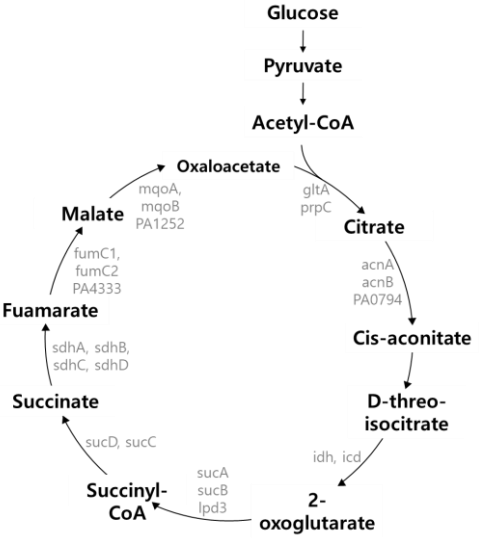



Fig 3. TCA cycle of *P. aeruginosa.* TCA cycle of *P. aeruginosa* and enzymes required in each step are listed.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Table 2. Transposon mutants related with TCA cycle

| Locus Tag | Gene Symbol | Product | Position in ORF |
|---|---|---|---|
| PA1580 | *gltA* | citrate synthase | 125(1287) |
| PA0795 | *prpC* | citrate synthase 2 | 474(1128) |
| PA1562 | *acnA* | aconitate hydratase 1 | 1477(2733) |
| PA1787 | *acnB* | aconitate hydratase 2 | 469(2610) |
| PA0794 | | probable aconitate hydratase | 610(2607) |
| PA2623 | *icd* | Isocitrate dehydrogenase | 479(1257) |
| PA2624 | *idh* | Isocitrate dehydrogenase | 1308(2226) |
| PA1589 | *sucD* | succinyl-CoA synthetase alpha chain | 879(888) |
| PA4470 | *fumC1* | fumarate hydratase | 494(1377) |
| PA0854 | *fumC2* | fumarate hydratase | 688(1395) |
| PA3452 | *mqoA* | malate:quinone oxidoreductase | 663(1572) |
| PA4640 | *mqoB* | malate:quinone oxidoreductase | 120(1524) |
| PA1252 | | probable L-malate dehydrogenase | 735(1005) |

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

### 4. in-frame deletion mutant 제작 및 transposon mutant와의 비교

*gltA* in-frame deletion mutant 제작하고자 *gltA*의 5' franking, 3' franking 부위를 증폭하여, pCVD442 vector에 cloning하였다. 이 후 pCVD442::*gltA*와 homologous recombination을 통해 PAO1에서 *gltA* 유전자가 결실된 △*gltA* 균주를 제작하고자 하였다. 7개의 colony에 대해 PCR을 수행하였으며, 4개의 colony가 *gltA* 유전자가 결실된 △*gltA* 균주임을 확인하였다. 야생형 PAO1에서는 약1.5 kbp 크기의 밴드가 나타나는 반면, △*gltA* 균주에서는 1.2 kbp가 줄어든 300 bp 크기의 밴드가 관찰되는 것을 통해 △*gltA* 균주임을 확인할 수 있었다 (Figure 4).

PAO1과 *gltA*::Tn, △*gltA*의 성장 및 elastase 발현정도를 확인하였다. PAO1과 비교하였을 때 *gltA*::Tn 돌연변이와, △*gltA* 의 성장은 느리게 진행되었으며, 두 돌연변이 균주 간의 성장은 동일하게 진행되었다 (Figure 5A). elastase 발현 정도를 비교하였을 때 PAO1에 비해 *gltA*::Tn과 △*gltA*에서 높은 elastase 발현을 보임을 확인하였고, *gltA*::Tn과 △*gltA*에서 같은 발현 패턴을 보이는 것 또한 확인하였다 (Figure 5B). 이러한 결과를 통해 *gltA*::Tn과 △*gltA*가 동일한 표현형을 보임을 확인하였다. 따라서 이후 실험은 △*gltA*를 이용해 진행하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

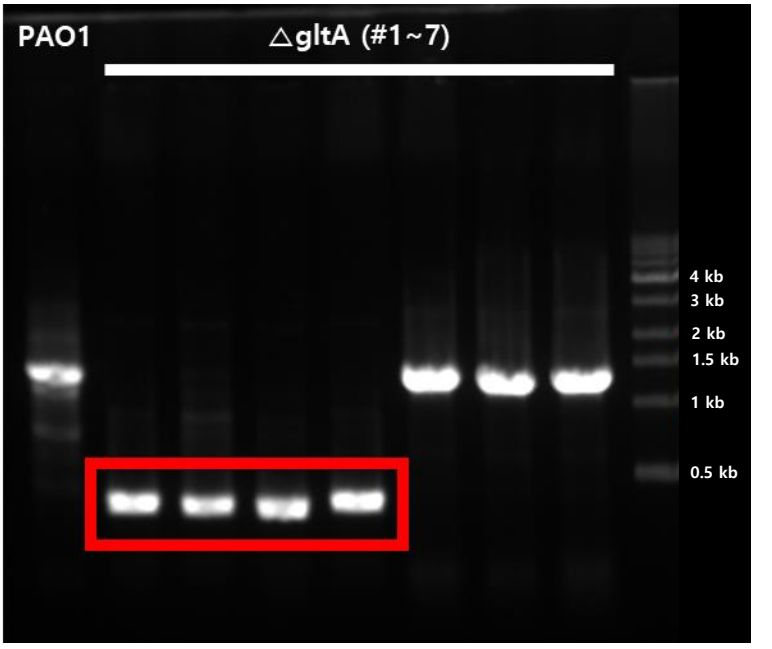



**Fig 4. Confirmation of *gltA* in-frame deletion.** 7 candidates were tested. First lane is PAO1 and others are △*gltA* candidates. Wild type PAO1 shows 1.5 kbp PCR product, but PCR product of △*gltA* strains show 300 bp.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

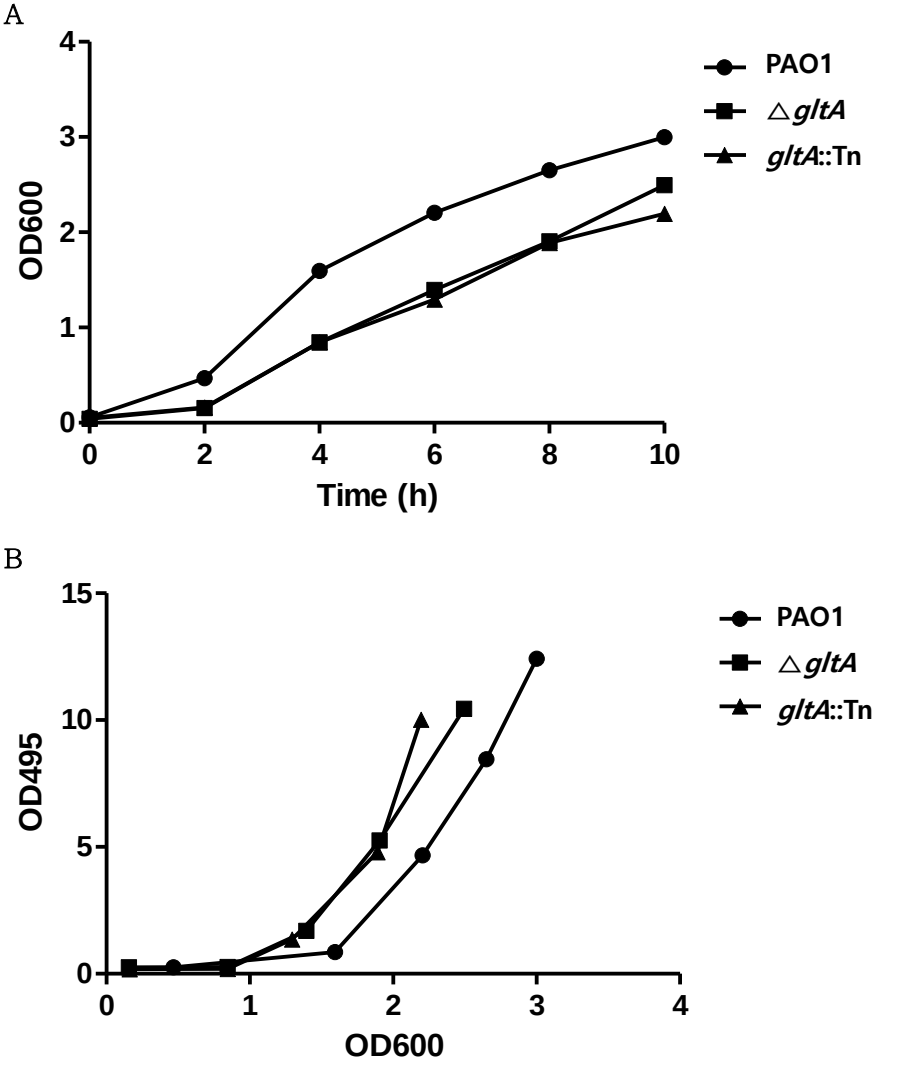



Fig 5. Compare the growth and elastase expression level among PAO1, △*gltA*, and *gltA*::Tn. (A) Growth curves of PAO1, △*gltA* strains, and *gltA*::Tn. (B) Elastase expression levels of PAO1, △*gltA* strains, and *gltA*::Tn.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

### 5. △*gltA* complementation

*gltA* 돌연변이는 acetyl-CoA와 oxaloacetate를 이용해 citrate를 합성하지 못한다. 따라서 citrate를 배지에 첨가해준 뒤 배양했을 때 △*gltA* 성장에 어떠한 변화가 나타나는지 확인해보고자 하였다.

M9 media에 탄소원으로 citrate와 glucose를 각각 10mM씩 첨가하여 배양하였을 때, glucose만 제공해준 M9 media에서는 PAO1과 △*gltA*에서 성장에 큰 차이를 보였지만, citrate를 첨가해준 M9 media에서는 PAO1과 △*gltA*가 동일한 성장패턴을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 △*gltA* 돌연변이에서 나타나는 성장 지연은 citrate를 합성하지 못해 나타나며, 외부에서 citrate를 첨가하여 주었을 때 성장을 회복할 수 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 6).

또한 △*gltA* 균주에 *gltA* 유전자를 complementation하였을 때 △*gltA* 돌연변이 균주의 성장과 elastase 발현 정도가 어떻게 변하는지 확인하고자 하였다. 이를 위해 pJN105를 vector를 이용해 *gltA* 유전자의 ORF와 프로모터를 클로닝하여 △*gltA* 균주에 형질전환 하였다. 이 때 △*gltA* 균주의 성장이 PAO1 수준으로 회복되는 것을 확인하였으며 (Figure 7A), elastase 발현 정도 또한 PAO1과 동일하게 나타남을 확인하였다 (Figure 7B).

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

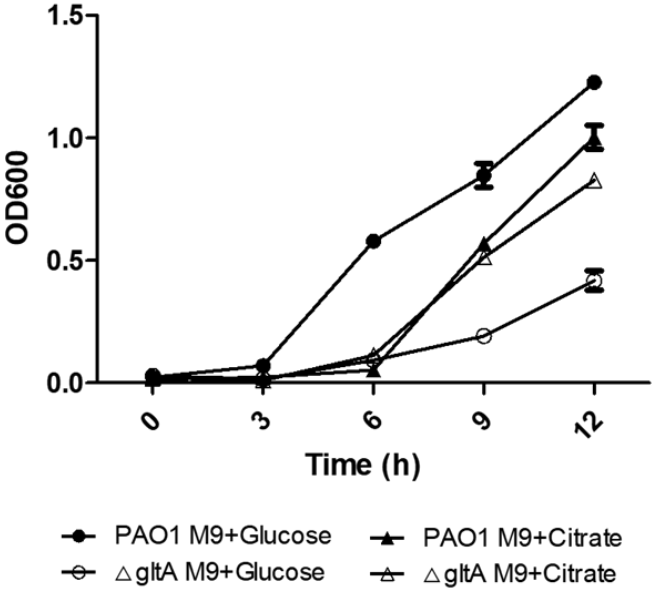



**Fig 6. Growth curve in M9 media.** All bacteria were cultured in M9 media. Concentration of glucose or citrate was 10mM.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

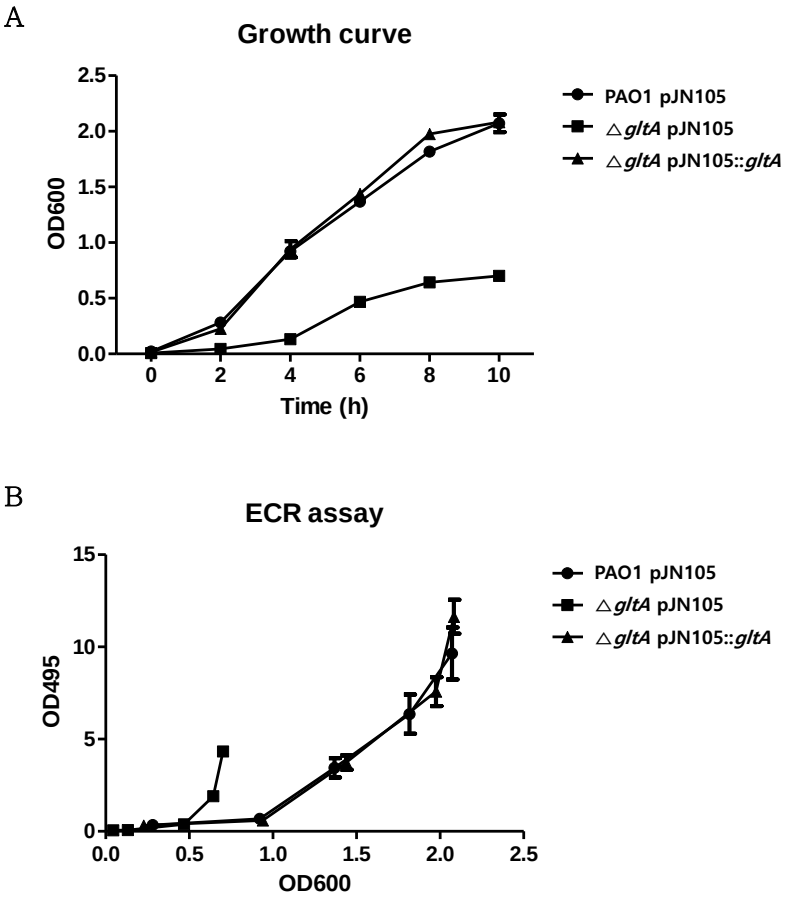



Fig 7. Genetic complementation. (A) *gltA* complemented by cloning using pJN105 vector. As a control PAO1 was transformed pJN105 (closed square). △*gltA* was transformed pJN105 (open circle) and pJN105::*gltA* (closed circle) respectively. (B) Elastase expression level.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

### 6. RNA sequencing data. & 대체 경로

PAO1과 △*gltA* 균주에서 어떠한 유전자의 발현의 변화로 elastase의 발현이 증가하였는지 확인하고자 RNA sequencing을 통해 두 균주에서 전체적인 RNA 발현의 차이를 확인하고자 하였다. △*gltA* 균주에서 발현이 2배 이상증가한 유전자는 1,001개였으며, 2배 이상 감소한 유전자는 1,121개였다. 발현이 가장 많이 증가한 유전자 10개, 가장 많이 감소한 유전자 10개를 표로 나타내었다 (Table 3).

발현이 가장 많이 증가한 유전자는 PA0878에서 PA0883으로 이루어진 오페론이다. Kegg pathway를 통해 이 오페론에 존재하는 유전자가 관여하는 경로에 대해 알아보았고 C5-branched dibasic acid metabolism에 관여하는 유전자임을 확인할 수 있었다. 우리는 이 오페론과 TCA 회로의 관련성에 대해 주목하였다. △*gltA* 균주에서 비정상적인 TCA 회로에 대한 우회경로로 pyruvate를 이용해 cis-aconitate를 우회적으로 합성함으로써 citrate를 합성하지 못하는 것을 보상하고자 하는 것이 아닐까 하는 가설을 세우게 되었다 (Figure 8A).

우리는 △*gltA* 균주에 *gltA* 유전자를 complementation하지 않고, *gltA* 유전자에 의해 암호화되는 구연산 합성효소가 합성하는 citrate를 배지에 첨가해주었을 때 이 오페론의 발현이 어떻게 변하는지 확

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

인해보고자 이 오페론의 여러 유전자 중 PA0879 유전자를 타겟으로 하여 qRT PCR을 수행하였다. M9 media에 glucose 첨가하였을 경우 △*gltA*에서 PA0879 유전자의 발현이 크게 증가하였으나, citrate를 첨가해주었을 경우 PAO1과 비슷한 발현 수준을 보임을 확인할 수 있었다 (Figure 8B).

이를 통해 △*gltA*에서 PA0878~PA0883으로 구성된 오페론이 증가한 것은 citrate가 제대로 합성되지 않기 때문에 이를 보상하고자 증가하였을 것이라는 결론을 내릴 수 있었다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

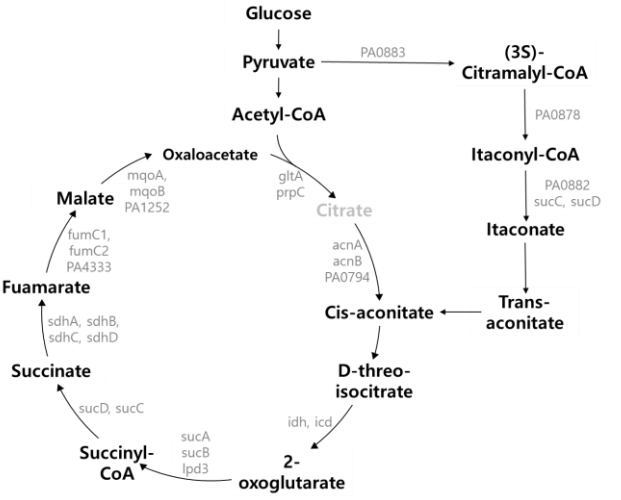
Table 3. Transcript levels of major genes, whose expressions were significantly altered in the △*gltA* mutant

| Locus Tag | Gene Symbol | Product | gltA/PAO1 fold change |
|---|---|---|---|
| **Fc<-2** | | | |
| PA1580 | *gltA* | citrate synthase | -710.97 |
| PA0277 | PA0277 | hypothetical protein | -76.69 |
| PA2252 | PA2252 | AGCS sodium/alanine/glycine symporter | -42.64 |
| PA5440 | PA5440 | peptidase | -40.82 |
| PA1791 | PA1791 | hypothetical protein | -34.93 |
| PA1421 | *gbuA* | guanidinobutyrase | -33.55 |
| PA1228 | PA1228 | hypothetical protein | -28.41 |
| PA5507 | PA5507 | hypothetical protein | -24.61 |
| PA4277.2 | PA4277.2 | tRNA-Gly | -22.71 |
| PA0045 | PA0045 | hypothetical protein | -21.13 |
| **Fc>2** | | | |
| PA0883 | PA0883 | acyl-CoA lyase subunit beta | 1612.30 |
| PA0879 | PA0879 | acyl-CoA dehydrogenase | 805.71 |
| PA0880 | PA0880 | ring-cleaving dioxygenase | 642.33 |
| PA0881 | PA0881 | hypothetical protein | 554.91 |
| PA0882 | PA0882 | hypothetical protein | 540.47 |
| PA0878 | PA0878 | hypothetical protein | 367.68 |
| PA2664 | *fhp* | flavohemoprotein | 326.94 |
| PA1249 | *aprA* | alkaline metalloproteinase | 302.69 |
| PA2000 | *dhcB* | dehydrocarnitine CoA transferase subunit B | 295.67 |
| PA0523 | *norC* | nitric oxide reductase subunit C | 220.95 |

Top 10 genes with the most changed expression from the RNA sequencing result.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

A




B

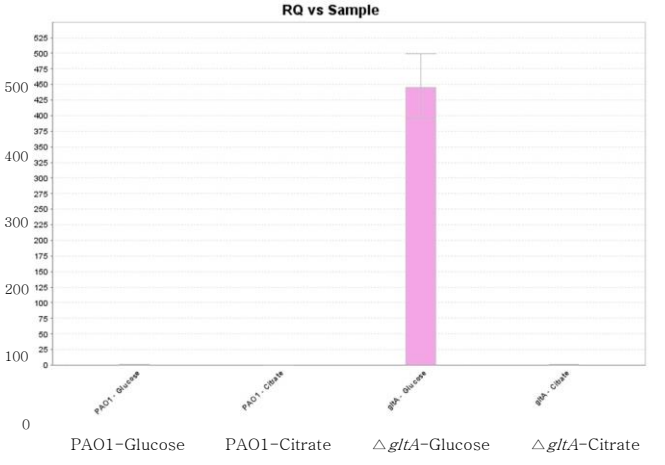



**Fig 8. Autonomously induced transcription of genes (PA0878~PA0883) that constitute an operon in the △*gltA* mutant under malfunctional TCA cycle.** (A) Probable alternative pathway when citrate synthesis is blocked by a mutation in *gltA* gene. (B) Target gene is PA0879 and endogenous control is 16s rRNA.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

### 7. Citrate 농도에 따른 elastase 발현 정도의 변화

△*gltA*에서 elastase 발현이 증가한 원인이 citrate가 부족하기 때문이라면, 반대로 citrate를 첨가해주면 elastase의 발현에 어떠한 변화가 나타날지 확인해보고자 하였다. 이를 확인하기 위해 LB broth에 citrate를 농도별로 첨가하여 배양하였다. Citrate 첨가에 따른 pH 차이에 의한 영향을 배제하고자 NaOH를 이용해 배양액의 초기 pH 농도는 7로 맞추고 실험하였다.

10 시간 배양 후 $OD_{600}$ 값을 통해 PAO1의 성장을 측정하였을 때 citrate 농도에 따른 PAO1의 성장에는 큰 차이를 확인할 수 없었다 (Figure 9A). elastase 발현 정도를 확인하고자 ECR assay 결과를 $OD_{600}$값으로 보정하였고, elastase 발현 정도는 성장과 달리 citrate를 첨가해줌에 따라 차이를 보였다. citrate를 첨가해주었을 때 그렇지 않았을 때에 비해 elastase의 발현이 감소하였으며, 첨가해준 citrate의 농도가 증가할수록 elastase 발현이 감소하는 경향을 확인할 수 있었다 (Figure 9B).

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

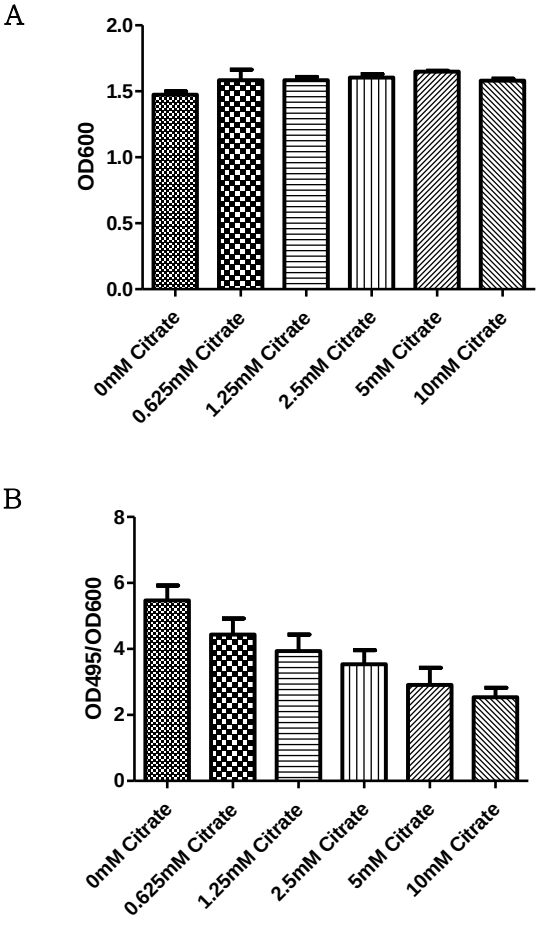



**Fig 9. Growth and elastase expression level according to citrate concentration.** Every media was buffered to pH7 to prevent the growth inhibition by low pH. (A) Growth of PAO1 in different concentration of citrate. (B) Elastase expression level in different concentration of citrate.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

# Ⅳ. 고찰

*P. aeruginosa*는 그람 음성 세균으로, 기회감염균으로 잘 알려져 있다. 특히나 낭포성 섬유증 환자나, 면역력이 약해진 중환자에게 문제를 일으킨다. *P. aeruginosa*는 다양한 병원성 인자를 생성하며, 그 중 주요한 병원성 인자는 QS에 의해 발현이 조절되는 elastase이다. 이는 마우스 실험을 통해서도 입증되었다[13].

많은 연구가 elastase의 발현을 감소시키고자 하는 방향으로 진행되어왔으며, 본 연구에서 또한 elastase의 발현을 조절할 수 있는 방법을 찾고자 하였다. 하지만 이전의 연구에서 접근하던 방식과 달리 elastase 발현을 증가시키는 돌연변이를 찾음으로써 elastase 발현 조절에 대한 새로운 방법을 찾고자 하였다.

본 연구에서는 transposon mutagenesis를 통해 elastase 과 발현 돌연변이를 선별하였으며, 이를 통해 구연산 합성효소를 코딩하는 *gltA*에 돌연변이가 발생하였을 때 균의 성장속도는 느려지지만, elastase가 과 발현된다는 사실을 밝혔다. *gltA*는 TCA 회로에 첫번째 단계인 citrate합성에 관여하는 효소를 암호화하는 유전자이다. *P. aeruginosa*는 발효를 통해 에너지를 얻지 못하는 균으로, 에너지를 얻기 위해 반드시 세포호흡을 필요로 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 *P. aeruginosa*의 생존에는 TCA 회로가 중요한 역할을 할 것으로

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

추측할 수 있다. 또한 우리는 박테리아의 물질대사와 병원성인자 발현 사이의 상관이 있을 것으로 가설을 세우고 이를 확인해보고자 하였다.

이를 위해 우선 TCA회로에 여러 단계에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자에 transposon이 삽입된 돌연변이 균주를 이용해 ECR assay를 수행하였으나, *gltA* 유전자 외의 다른 유전자의 돌연변이에 의해서는 elastase의 발현에 변화가 나타나지 않았다. 이에 따라 elastase 발현은 TCA 회로의 여러 단계 중 *gltA* 유전자가 관여하는 단계에 의해서만 일어날 수 있다는 사실을 확인하였고, *gltA* 유전자에 의해 코딩되는 구연산 합성효소가 citrate합성에 관여하는 것 외에 다른 역할이 있는지, 아니면 구연산 합성효소에 의해 합성된 citrate에 의한 효과인지 확인하고자, *gltA* 유전자를 클로닝하여 형질전환 하는 실험과, 배지에 citrate를 첨가하여 배양하는 실험을 수행하였다. 이를 통해 △*gltA*에서의 elastase 발현 증가는 citrate 농도에 의한 효과일 것이라고 추측하게 되었다.

또한 *gltA* 유전자에 돌연변이가 생겼을 때 elastase 발현이 증가하는 현상에 대한 원인을 찾기 위해 PAO1과 △*gltA*에서의 전반적인 RNA 전사 수준 차이를 확인하고자 하였고, RNA sequencing을 수행하였다. 우리는 이를 통해 △*gltA*에서 크게 증가한 오페론을 찾을 수

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

있었으며, 이를 통해 TCA 회로에 이상이 생겼을 때, 이를 우회하는 새로운 경로를 제안할 수 있게 되었다. 이 오페론의 한 유전자인 PA0879에 대한 quantitative real-time PCR을 수행하였고, 유일한 탄소원으로 glucose를 첨가해주었을 땐 PAO1에 비해 △*gltA*에서 발현이 크게 증가한 반면 citrate가 유일한 탄소원으로 첨가되었을 때 발현이 PAO1 수준으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과를 토대로 박테리아의 물질대사와 병원성 인자의 발현 조절이 별개의 것이 아니라 서로 연관되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 병원성 인자의 발현 조절을 위해 박테리아의 물질대사 또는 그에 따른 대사산물을 이용할 수 있을 것이라는 가능성을 확인할 수 있었다. 이에 대한 근거로 PA0878에서 PA0883에 이르는 오페론이 관여하는 TCA 회로에 대한 우회경로를 제시하였다. 하지만 이 둘이 어떠한 메카니즘에 의해 서로 조절되고 있는지에 대해 정확히 밝히지 못하였기 때문에, 이에 대해 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

## Ⅴ. 결론

1. TCA 회로와 관련된 효소에 대한 유전자 중 *gltA* 유전자의 돌연변이에 의해서 성장이 느려지고, elastase 발현이 증가한다.

2. TCA 회로에 관여하는 다른 효소에 대한 유전자의 돌연변이는 elastase 발현에 영향을 주지 않는다.

3. △*gltA*에서 elastase 발현 증가는 *gltA* 유전자를 complementation해 주었을 때와 citrate를 첨가해주었을 때 모두 원래의 수준으로 회복되었다.

4. elastase 발현은 TCA회로의 중간 대사물질인 citrate에 의해 조절될 수 있는 것으로 생각된다.

5. 비정상적인 TCA 회로에 대응하는 새로운 경로가 존재할 수 있으며 이 경로에 관여하는 유전자의 발현 증가와 elastase의 발현에 상관관계가 있을 수 있다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

## 참고문헌

1. Soto-Aceves, M. P., Cocotl-Yañez, M., Merino, E., Castillo-Juárez, I., Cortés-López, H., González-Pedrajo, et al. (2019) Inactivation of the quorum-sensing transcriptional regulators LasR or RhlR does not suppress the expression of virulence factors and the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

2. Wang, K., Chen, Y.-Q., Salido, M. M., Kohli, G. S., Kong, J.-L., Liang, H.-J., et al. (2017) The rapid in vivo evolution of *Pseudomonas aeruginosa* in ventilator-associated pneumonia patients leads to attenuated virulence. *Open biology* **7**, 170029.

3. Borrero-de Acuña, J. M., Timmis, K. N., Jahn, M., and Jahn, D. (2017) Protein complex formation during denitrification by *Pseudomonas aeruginosa. Microbial biotechnology* **10**, 1523-1534.

4. Tatke, G., Kumari, H., Silva-Herzog, E., Ramirez, L., and Mathee, K. (2015) *Pseudomonas aeruginosa* MifS-MifR Two-Component System Is Specific for α-Ketoglutarate

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Utilization. *PloS one* **10**, e0129629-e0129629.

5. Pearson, J. P., Pesci, E. C., and Iglewski, B. H. (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. **179**, 5756-5767.

6. Ahmed, S. A. K. S., Rudden, M., Smyth, T. J., Dooley, J. S. G., Marchant, R., Banat, I. M. J. A. M., and Biotechnology. (2019) Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors.

7. Papenfort, K., and Bassler, B. L. (2016) Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 576.

8. Smith, R. S., and Iglewski, B. H. (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 56-60.

9. Lee, J., and Zhang, L. (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell* **6**, 26-41.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

10. Janda, J. M., and Bottone, E. J. (1981) *Pseudomonas aeruginosa* enzyme profiling: predictor of potential invasiveness and use as an epidemiological tool. *Journal of clinical microbiology* **14**, 55-60.

11. Peters, J. E., and Galloway, D. R. (1990) Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity. *Journal of bacteriology* **172**, 2236-2240.

12. Nomura, K., Obata, K., Keira, T., Miyata, R., Hirakawa, S., Takano, K., et al. (2014) *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respiratory research* **15**, 21-21.

13. Gi, M., Jeong, J., Lee, K., Lee, K.-M., Toyofuku, M., Yong, D. E., et al. (2014) A drug-repositioning screening identifies pentetic acid as a potential therapeutic agent for suppressing the elastase-mediated virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**, 7205-7214.

14. Szamosvári, D., Reichle, V. F., Jureschi, M., and Böttcher, T.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

(2016) Synthetic quinolone signal analogues inhibiting the virulence factor elastase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemical Communications* **52**, 13440-13443.

15. *M9 minimal medium (standard).* 2010. **2010**(8): p. pdb.rec12295.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

# ABSTRACT

## Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase production by tricarboxylic acid cycle

Donggeun KIM

*Department of Medical Science*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Sang Sun Yoon)

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that can cause both chronic and acute infections. Quorum sensing is a bacterial communication system that regulates gene expression in a cell density-dependent manner. *P. aeruginosa* produces many virulence factors, many of which are regulated by QS. One of the major QS-regulated virulence factors is elastase, encoded by *lasB*.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Many studies reported loss-of-function mutations that resulted in reduced or abrogated elastase production. Herein, we sought to identify a mutant that produces higher level of elastase. We postulated that identification of such mutants may provide novel insights into the regulation of elastase production. To this end, we performed a transposon (Tn) mutagenesis screen and isolated a mutant with elevated elastase production. Tn insertion occurred in the coding region of *gltA* gene encoding a TCA cycle enzyme, citrate synthase. The *gltA*::Tn mutant grows slowly but produces more amount of elastase than PAO1, its parental strain. We constructed in-flame deletion *gltA*(△*gltA*) mutant and confirmed that both *gltA*::Tn mutant and △*gltA* mutant show same elastase expression level. We conducted RNA sequencing and interestingly alternative pathway is extremely increased in △*gltA* mutant which might for compensating the abnormal TCA cycle.

Together, these results suggest that (i) TCA cycle activity is associated with bacterial capability to produce elastase and (ii) elastase production can be achieved at low cell density. We are expecting to figure out how TCA cycle-mediated energy

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

metabolism can regulate elastase expression in *P. aeruginosa*.

Key words : *Pseudomonas aeruginosa*, elastase, metabolism, tricarboxylic acid cycle