

요로감염에 관여하는 카테터 내 박테리아의 Quorum Sensing 관련 autoinducer 합성 유전자의 발현분석

이미혜 · 서필수¹ · 이지열² · 백경란³ · 이상섭*

경기대학교 생명공학과, ¹경기대학교 생물자원 특성화 사업단,

²가톨릭대학교 비뇨기과, ³성균관대학교 감염내과

본 연구에서는 신경인성 방광으로 요도 카테터를 유치하고 있는 환자의 카테터로부터 카테터 내 요로감염(Catheter-Associate Urinary Tract Infection; CA-UTI)에 관여하는 박테리아인 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 그리고 *Staphylococcus aureus*를 순수 분리, 동정하였다. 이 균주들을 대상으로 하여 quorum sensing mechanism을 규명하는 기초 연구로 각 균주의 quorum sensing 신호물질인 autoinducer (AIs)를 합성하는 유전자의 mRNA 발현을 확인하고, 정량 분석하였다. 각 세 균주를 단일과 세 균주의 혼합으로 24시간, 30일 동안 배양하며 일정 시간 간격으로 sample을 얻었다. 이 중 24시간 배양한 sample을 가지고 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 수행하여 각 AIs 합성 유전자가 발현되는 최초 박테리아 밀도를 확인하였다. 단일배양에서 *E. coli*와 *S. aureus*의 AIs 합성 유전자(*ygaG*와 *luxS*)의 mRNA가 발현되는 최초 박테리아 밀도는 2.4×10^5 CFU/ml, 5.4×10^6 CFU/ml이었으며 *P. aeruginosa*의 *rhlI*와 *lasI*의 경우 6.9×10^4 CFU/ml로 나타났다. 세 균주의 혼합배양에서 *ygaG*와 *luxS*의 mRNA가 발현되는 최초 박테리아 밀도는 7.3×10^5 CFU/ml, 1.6×10^7 CFU/ml이었으며 *rhlI*와 *lasI*의 경우 2.1×10^5 CFU/ml로 나타났다. 또한 30일 배양한 sample의 RT-PCR 결과, 배양초기부터 각 AIs 합성 유전자들의 mRNA가 30일 동안 일정한 양만큼 지속적으로 발현됨을 확인하였다. Real-time RT-PCR을 이용한 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현을 정량 분석한 결과 각 균주에서 단일배양보다 혼합배양 시 AIs 합성 유전자의 발현이 더 많았다. 가장 많은 발현량의 차이를 보인 경우 *E. coli ygaG*의 mRNA 발현량은 단일배양보다 세 균주의 혼합배양시 최고 약 30배 이상이 증가하였고, *P. aeruginosa rhlI*의 경우 단일배양보다 혼합배양시 최고 약 40배, *P. aeruginosa lasI*의 경우 최고 약 250배 그리고 *S. aureus luxS*의 경우는 단일배양보다 혼합배양시 최고 약 5배 이상 mRNA 발현량이 증가하였다. 또한 세 균주의 4가지 유전자 중 *P. aeruginosa*의 *rhlI*와 *lasI*의 mRNA가 가장 많은 양으로 발현됨을 확인 하였다.

Key words □ autoinducer (AIs), biofilm, catheter-associated urinary tract infection (CA-UTI), quorum sensing (QS), real-time RT-PCR

카테터(catheter)는 체강(늑막강 · 복막강) 또는 관상(管狀) · 낭상(囊狀) 기관(소화관 · 방광 등)의 내용액의 배출을 측정하기 위해 사용되는 고무 또는 금속제의 가는 관을 말하며, 카테터가 계속적인 배설에 사용될 때는 유치 도뇨관(indwelling urethral catheter)이 사용된다. 이러한 요도 카테터는 병원 등에서 치료목적으로 많이 사용되고 있으며 Rumbaugh 등(20)의 연구에 따르면 카테터 관련 요로감염(Catheter-Associated Urinary Tract Infection; CA-UTI)은 전체 병원감염의 40%를 차지하는 요로감염 중 80%를 차지하는 것으로 보고하고 있다. 카테터 관련 요로감염은 카테터 내 박테리아에 의해 발생되며 숙주의 단백질과 미생물의 삼출물로 이루어진 바이오필름에 의한 것으로 'Quorum sensing (QS)'이라 불리는 박테리아의 신호기전에 의해 생성된다.

QS는 박테리아들이 일정 세포농도에 도달했을 때 autoinducer (AIs)를 이용한 세포간의 신호전달을 통해 특정 유전자의 발현을

조절하며, 이와 같이 유전자의 발현이 세포 밀도에 의존하는 현상을 말한다(8, 27). QS의 주된 신호 물질인 AIs는 중간 특이적인 신호물질로 autoinducer-1 (AI-1)이 있으며, 대표적 물질로 그람 음성 박테리아는 *N-acyl-homoserine lactone* (AHL) 계열의 화합물을 이용하고, 그람 양성 박테리아는 신호물질로 올리고펩타이드를 주로 이용하며, 두 종류의 박테리아에 공통적으로 존재하여 종 특이성이 없는 'universal signal'로 알려진 autoinducer-2 (AI-2)가 있다고 보고되어 있다(16, 21, 23, 24).

박테리아들은 이러한 QS를 통하여 발병력(virulence)(11) 뿐만 아니라 생체발광(bioluminescence)(10, 17), 바이오필름 형성(6), DNA 수용능(competence)(14), 항생제 생산(2) 및 접합에 의한 Ti plasmid의 전달 등(9)과 같은 다양한 생리 현상을 조절한다고 보고되어 있으나 아직 카테터 내 요로감염에서는 그 기전이 밝혀진 바 없다. 이 중 QS에 의해 형성된 바이오필름은 탐식세포, 항체, 보체 등의 숙주 방어 기전과 항생제에 대한 저항성을 가지므로 항생제 처리에 의한 CA-UTI의 임상치료에는 한계가 있다(18). 그러므로 카테터 내 바이오필름을 형성하는 박테리아와 QS

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-249-9568, Fax: 031-251-4721
E-mail: sslee@kyonggi.ac.kr

mechanism 규명에 관한 연구의 필요성이 더욱더 대두되고 있다.

본 연구에서는 카테터 내 QS mechanism을 규명하기 위해 환자가 사용하였던 유치 카테터에서 바이오필름 형성의 주 원인균인 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*와 *Staphylococcus aureus*를 분리, 동정하였다. 그 후 각 균주를 *in vitro*상에서 단일 배양 및 세 균주의 혼합배양을 실시한 후 RT-PCR과 real-time RT-PCR을 이용하여 QS 신호물질인 AIs 합성에 관여하는 유전자들, *E. coli* *ygaG* (AI-2), *P. aeruginosa* *rhII* (AI-1)와 *lasI* (AI-1) 그리고 *S. aureus* *luxS* (AI-2)의 mRNA가 발현되는 최초 박테리아 밀도와 시간변화에 따른 각 균주의 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현량 비교를 통하여 QS에 의한 균주간의 상호작용을 연구 하였다.

재료 및 방법

유치 카테터로부터 박테리아의 분리 및 동정

카테터 내 바이오필름 형성의 주 원인균인 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*와 *Staphylococcus aureus*를 신경인성 방광으로 요도 카테터를 유치한 환자의 카테터 내에서 분리하였다. 카테터는 풍선 부분의 1 cm 상방에서 절단하였고(Fig. 1), 절단부위 아래의 카테터 내부에서 바이오필름을 채취하여 Luria-Bertani (LB, Difco, USA) broth에 접종한 후 37°C, 24시간 배양하였다. 배양액을 *E. coli* 선별배지인 *E. coli* direct agar (Merck, Germany), *Pseudomonas* 선별배지인 cetrimide agar (Scharlau, Spain) 및 *Staphylococci* 선별배지인 mannitol salt agar (Scharlau, Spain)에 streak하여 순수 분리하였다. 분리한 균주는 그람 염색과 형태학적 관찰을 하였고 API 20 kit (20E, 20NE, 20STAPH, bioMeriux, Marcy-l'Etoile, France)를 사용 후 이에 따른 분석결과와 Bergey's manual of Systematic Bacteriology (3)를 참고하여 동정 하였다.

PCR을 이용한 AIs 합성 유전자 검출 및 cloning

E. coli, *P. aeruginosa*와 *S. aureus*의 chromosomal DNA는

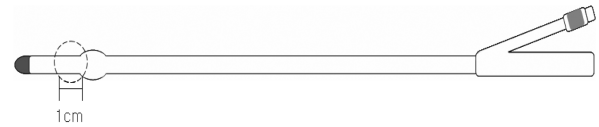


Fig. 1. A schematic of the foley catheter used in this study. Dotted circle means the isolation region of *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*.

Silhavy 등(22)의 방법에 따라 추출하였으며, 추출된 DNA는 Genbank로부터 AIs 합성 유전자인 *E. coli*의 *ygaG*, *P. aeruginosa*의 *rhII*와 *lasI*, 그리고 *S. aureus*의 *luxS* DNA 염기서열을 확인한 뒤 각각의 primer (Table 1)를 제작하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 iCycler thermal cycler (Bio-Rad, USA)를 이용하여 95°C에서 5분 동안 열변성후에 95°C에서 1분간 열변성, 48°C(54°C, 56°C)에서 1분 30초 합성, 72°C에서 1분간 신장반응을 30회 반복 수행 후, 최종적으로 72°C에서 10분 동안 final elongation으로 증폭하였다. PCR 산물은 1.0% agarose gel에 전기영동 하였으며 전기영동을 통해서 분리된 각 PCR 산물은 Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 각 PCR 산물은 pGEM-T vector (Promega, USA)에 삽입하였으며 이를 *E. coli* DH5α에 형질전환 시킨 후 blue/white screening을 통하여 clone을 선별하였다. 독립적인 세 개의 선별된 clone은 플라스미드를 정제한 후 제한효소 *EcoRI*과 *NotI*으로 절단하여 각 target 유전자의 삽입을 확인하고, 각 플라스미드에 삽입된 유전자의 염기서열을 분석하였다. 분석된 서열은 NCBI의 Blast Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 프로그램과 CLUSTAL X를 이용하여 상동성 조사를 실시하였다.

각 균주의 단일배양 및 혼합배양의 시간에 따른 균주 sampling

E. coli, *P. aeruginosa*와 *S. aureus*를 LB배지에 접종한 후, OD₆₀₀에서 1.0이 될 때까지 배양하였다. 그 후 각 균주의 단일배양(*E. coli* 단독배양; EC, *P. aeruginosa* 단독배양; PA, *S. aureus*

Table 1. A list of oligonucleotide primers used in this study

Primer specificity	GenBank accession no.	Gene	Direction	Primer sequence
<i>E. coli</i>	NC_00913	<i>ygaG</i>	forward	5'-cactgactagatgtcgattc-3'
			reverse	5'-gtggctaaatgccgttgtag-3'
		16S rDNA	forward	5'-caggtgtagcgggtgaaatgc-3'
			reverse	5'-gggcacacacccaagtgc-3'
<i>S. aureus</i>	BA000018	<i>luxS</i>	forward	5'-ggagggaattcaaatgac-3'
			reverse	5'-agtgttctcaagaattcgg-3'
		16S rDNA	forward	5'-ccgaactgagaacaactttatggg-3'
			reverse	5'-cgtgtcataatggacaatacaag-3'
<i>P. aeruginosa</i>	NC_002516	<i>rhII</i>	forward	5'-cgaggacttggtcatgatcg-3'
			reverse	5'-aaatgtctgacgacctcacac-3'
		<i>lasI</i>	forward	5'-gggtccggatccaccgaaatc-3'
			reverse	5'-ccgacggatccccgtcatgaa-3'
		16S rDNA	forward	5'-tgggtgtccttctatatctacgc-3'
			reverse	5'-gtggttcagcaagttggatgtg-3'

단독배양; SA)액과 세 균주의 혼합(혼합배양) 배양액을 새 LB배지에 0.001%가 되도록 접종하여 37°C, 150 rpm으로 배양하였다. 각 AIs 합성 유전자의 mRNA가 발현되는 최초 박테리아 밀도를 확인하기 위하여 0시간에서 5시간까지 30분 간격으로, 5시간에서 24시간까지 2시간 간격으로 EC, PA, SA배양액과 혼합배양액으로부터 sampling하였다. 또한 배양 초기부터 30일까지의 장기 배양은 이틀 간격으로 sampling을 수행하였다. Sampling한 배양액은 원심분리하여 균체를 회수하였고, phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 washing하여 배지성분을 제거하였다. 그 후 균주의 성장도를 관찰한 후 -20°C에서 보관하여 RT-PCR과 real-time RT-PCR을 이용한 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현 확인과 정량분석 실험에 사용하였다.

RT-PCR을 이용한 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현 확인

상등액을 제거하여 -20°C에 보관한 균주의 균체에 lysozyme (Sigma, USA)을 처리하여 37°C에서 2시간 동안 lysis 시켜 RNA를 추출하였다. Lysozyme을 이용한 lysis에서 lysozyme은 TE buffer (pH 8.0)에 1 mg/ml가 되도록 녹여 사용하였으며, lysis 반응시 400 U ribonuclease inhibitor (Takara, Korea)를 첨가하였다. 사용한 모든 증류수와 실험 도구는 RNase free water (BIO BASIC, Canada)를 처리 하였다. cDNA 합성은 RNA 10 µl에 각 AIs 합성 유전자의 20 pmol reverse primer를 넣은 후 70°C 5분간 반응, ice 5분간 반응시킨 후, 5× reaction buffer (250 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl₂, pH 8.3) 5 µl, 5 mM deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs), 4 U ribonuclease inhibitor, 200 U M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Korea)를 첨가하여 총 20 µl로 만든 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. cDNA를 합성한 후 각각의 primer (Table 1)를 사용하여 PCR법으로 세 균주의 AIs 합성 유전자들을 증폭시켰다. PCR 반응은 iCycler thermal cycler (Bio-Rad, USA)를 이용하여 95°C에서 5분 동안 열변성 후 95°C 1분, 48°C (*ygaG*) (54°C; *lasI*, *luxS*, 56°C; *rhlI*) 1분 30초, 72°C 1분을 30회 반복하였으며, 마지막으로 72°C 10분 동안 final elongation으로 증폭하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 *E. coli*의 *ygaG*, *P. aeruginosa*의 *rhlI*와 *lasI*, *S. aureus*의 *luxS*의 mRNA 발현 정도를 확인하였다.

Real-time RT-PCR을 이용한 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현량 분석

(1) RNA 추출 및 cDNA 합성

30일 동안 일정한 시간 간격으로 sampling한 각 박테리아 및 혼합배양한 박테리아 균체를 ice에서 녹인 후 그 중 5 mg (w/w)을 취하여 easy-BLUE™ Total RNA Extraction kit (Intron, Korea)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 증류수에 녹인 후 spectrophotometer (Gene Quant pro, Amersham bioscience, USA)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 총 RNA의 양과 순도를 확인하였다. cDNA합성은 RNA 500 ng에 target 유전자의 20 pmol

reverse primer를 넣은 후 70°C 5분간 반응, ice 5분간 반응시킨 후 5× reaction buffer (250 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl₂, pH 8.3), 5 mM dNTPs, 4 U ribonuclease inhibitor, 200 U M-MLV Reverse Transcriptase (Bioneer, Korea)를 첨가하여 총 20 µl로 만든 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. cDNA를 합성한 후 real-time PCR법으로 각각의 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현량을 정량 하였다.

(2) Real-time RT-PCR

mRNA 발현량의 정량을 위한 real-time PCR (MiniOpticon, Bio-Rad, USA) 반응의 조성은 다음과 같다. 5 pmol target 유전자의 forward primer 1 µl, reverse primer 1 µl, cDNA 1 µl, iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA) 10 µl를 첨가하여 총 20 µl를 만들었다. Real-time PCR을 이용한 증폭 조건은 각 sample에서 동일했으며 95°C에서 5분 동안 열변성 후 95°C 30초, 54°C 20초, 72°C 30초를 40회 반복하였으며, 이 과정이 끝난 후 PCR 산물을 95°C로 가열하고 55°C로 식힌 후 60°C에서 95°C로 가열하여 melting curve를 측정 하였다. Real-time PCR 반응에 syber green (SYBR)을 사용한 경우 특이적인 증폭산물과 함께 형성될 수 있는 primer-dimer나 다른 비특이적인 증폭산물에도 SYBR이 결합할 수 있으므로 melting curve 분석을 통하여 PCR 산물의 특이성을 확인 하였다.

(3) Real-time RT-PCR data의 분석

본 실험에서는 target 유전자의 mRNA 발현량을 측정하기 위하여 상대정량 방법을 사용하였으며 2^{-ΔΔCt} 방법(13)에 의해 *ygaG*, *rhlI*, *lasI*와 *luxS*의 mRNA 발현량을 상대정량 하였다.

결과 및 고찰

카테터 내 바이오필름 형성 균주의 분리 및 동정

카테터 내 주요 출현 균주로는 *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Edwardsiella*, *Morganella* 속의 일부 균종과 *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteuse mirabilis* 등이 알려져 있다(1, 12, 15, 25). 본 연구에서는 환자의 유치 카테터로부터 바이오필름 형성의 주 원인균인 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*와 *Staphylococcus aureus*에 초점을 맞추어 이들을 분리, 동정하였다. *E. coli* 선별배지인 *E. coli* direct agar (Merck, Germany)에서 성장을 보인 MH1은 그람 염색 결과 음성이었으며 형태는 rod였다. API 20E kit를 사용하여 생리·생화학적 특성 결과를 확인하였고, 이를 API 20E V6.0으로 분석한 결과, MH1은 *E. coli*로 동정되었다. *Pseudomonas* 선별배지인 cetrimide agar (Scharlau, Spain)에서 성장을 보인 MH2는 그람 염색 결과 음성이었으며 형태는 rod였다. API 20NE kit를 사용하여 생리·생화학적 특성 결과를 확인하였고, 이를 API 20NE V6.0으로 분석한 결과, MH2는 *P. aeruginosa*로 동정되었다. *Staphylococci* 선별배지인 mannitol salt agar (Scharlau, Spain)에서 성장을 보인 MH3은 그람 염색 결과

양성이었으며 형태는 cocci였다. API 20 STAPH kit를 사용하여 생리·생화학적 특성 결과를 확인하였고 이를 API 20 STAPH V6.0으로 분석한 결과, MH3은 *S. aureus*로 동정되었다(자료 미제시).

바이오필름 형성 박테리아에서 AIs 합성 유전자의 cloning

E. coli, *P. aeruginosa*와 *S. aureus* 세 균주의 chromosomal

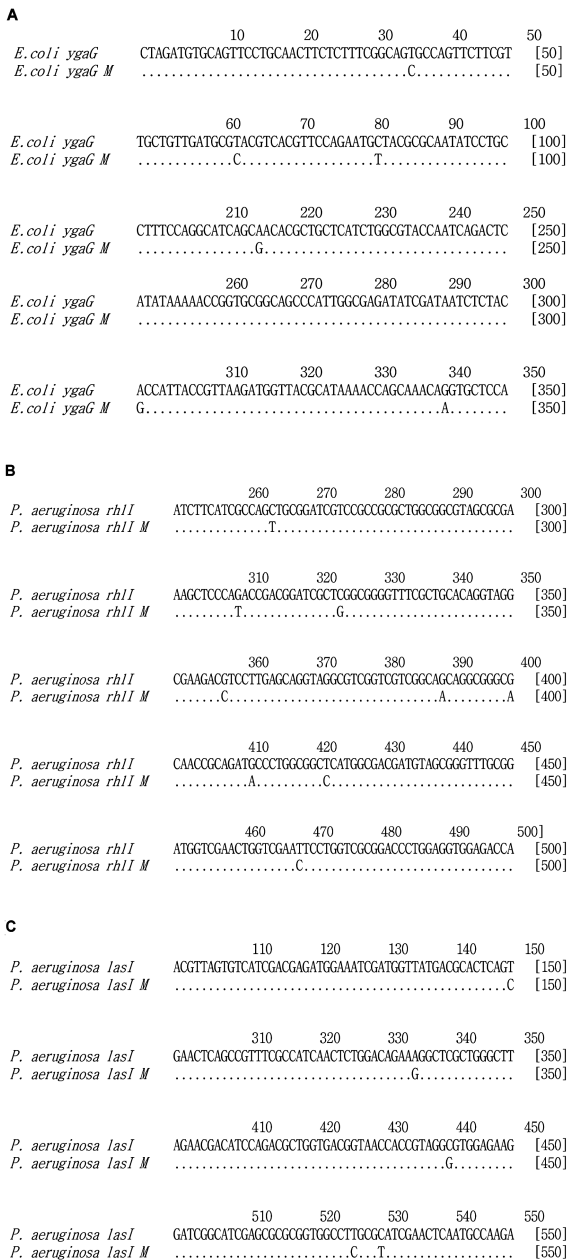


Fig. 2. Multiple alignments of nucleotide sequences of *E. coli ygaG*, and *P. aeruginosa rhII* and *lasI*. (A) The target gene sequence of *E. coli ygaG* NC_00913 was compared with that of *E. coli ygaG M* which was isolated in this study. (B) and (C) In addition, the sequences from *P. aeruginosa rhII* and *lasI* NC_002516 were aligned with those from *P. aeruginosa M* of the isolate strain.

DNA를 분리하였고 PCR을 통해 증폭반응 시킨 결과 530 bp (*E. coli ygaG*), 630 bp (*P. aeruginosa rhII*), 710 bp (*P. aeruginosa lasI*) 그리고 640 bp (*S. aureus luxS*) 길이의 AIs 합성 유전자의 DNA 단편을 확인할 수 있었다. 증폭된 DNA 단편은 정제하여 각각 pGEM-T 벡터에 cloning 하였으며, 이 후 각각의 플라스미드를 정제하여 제한효소 *EcoRI*과 *NotI*으로 절단하여 3 kb의 vector와 530 bp의 *ygaG*, 630 bp의 *rhII*, 710 bp의 *lasI* 그리고 640 bp의 *luxS*로 분리되는 것을 확인하였다(자료 미제시). 확인된 플라스미드들은 삽입된 유전자의 DNA 염기서열을 분석한 후 NCBI의 Blast Search 프로그램과 CLUSTAL X를 이용하여 기존에 알려진 각 균주들의 AIs 합성 유전자들과 상동성이 99% 이상인 것을 확인하였다(Fig. 2).

RT-PCR을 이용한 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현 분석

Fuqua 등(8)에 따르면 QS mechanism은 각 박테리아의 밀도에 크게 의존하며, 일정 세포밀도 이상에서 AIs를 이용한 박테리아 간의 상호 신호전달을 통해 유전자의 발현을 조절한다고 보고하고 있다. 본 연구에서는 카테터 내 바이오필름을 형성하는 주된 요인을 quorum sensing이라 판단하고 이를 규명하기 위한 기초 연구로서 QS 신호물질인 AIs를 합성하는 유전자의 mRNA 발현 양상을 분석하였다. 24시간 동안 배양하며 일정 시간 간격으로 sampling한 EC, PA, SA배양액과 혼합배양한 배양액에서 균체를

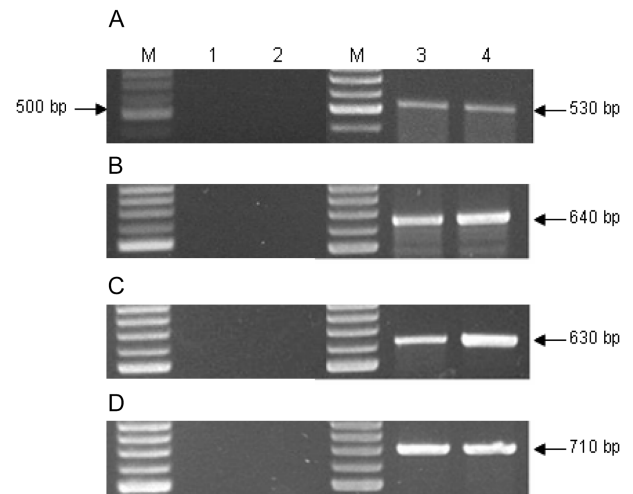


Fig. 3. RT-PCR products of *ygaG* (*E. coli*), *luxS* (*S. aureus*), *rhII* and *lasI* (*P. aeruginosa*) in 24 hr culture samples. The amplified RT-PCR products were analyzed on 2% agarose gel. RT-PCR products of *ygaG*, *luxS*, *rhII*, and *lasI* genes, were amplified using cDNAs as template. Lane M: molecular size marker. Lane 1: RT-PCR results of single culture before reaching minimum cell density of initial mRNA expression. Lane 2: RT-PCR results of mixed culture before reaching minimum cell density of initial mRNA expression. Lane 3: RT-PCR results of single culture at minimum cell density of initial mRNA expression. Lane 4: RT-PCR results of mixed culture at minimum cell density of initial mRNA expression. (A) *E. coli ygaG* 530 bp, (B) *S. aureus luxS* 640 bp, (C) *P. aeruginosa rhII* 630 bp, (D) *P. aeruginosa lasI* 710 bp.

언어 AIs 합성 유전자의 mRNA가 발현되는 최초 박테리아 밀도를 RT-PCR을 통하여 확인하였다(Fig. 3). RT-PCR 결과 *E. coli*의 *ygaG*, *S. aureus*의 *luxS*의 경우 AIs 합성 유전자의 mRNA가 발현되는 최초 박테리아 밀도는 2.4×10^5 CFU/ml, 5.4×10^6 CFU/ml (1.5시간 배양)이었으며 *P. aeruginosa*의 *rhlI*와 *lasI*의 경우 6.9×10^4 CFU/ml (2시간 배양)로 확인되었다. 혼합배양의 경우 *ygaG*, *luxS*의 AIs 합성 유전자의 mRNA가 발현되는 최초 박테리아 밀도는 7.3×10^5 CFU/ml, 1.6×10^7 CFU/ml (2시간 배양), *rhlI*와 *lasI*의 경우 2.1×10^5 CFU/ml (2.5시간 배양)로 나타났다(Fig. 3).

각 EC, PA, SA배양액과 혼합배양한 배양액에서 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현은 각 최초 박테리아 밀도 이전에서는 detection 되지 않았다. 각 EC, PA, SA배양액과 혼합배양한 배양액의 생장곡선은 배양초기부터 5시간까지 대수성장(exponential growth)을 보였고, 그 후 안정기(stationary phase)에 접어들어 24 시간까지 지속되었으며, 단일배양과 혼합배양에서 큰 차이는 보이지 않았다. 또한 환자가 장시간 카테터를 유지할 경우 보통 약 30일 가량 유지하므로 이에 착안하여 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현 양상을 확인하기 위하여 30일간 장기 배양하였으며, 30일간 지속적으로 mRNA가 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이를 통하여 AIs 합성 유전자가 발현되는 적정 박테리아 밀도만 유지한다면 생장의 전 과정에서 지속적으로 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현이 유지됨을 알 수 있었다.

바이오필름 형성 균주들 간의 QS에 의한 상호작용 연구

(1) Real-time RT-PCR을 이용한 AIs 합성 유전자들의 mRNA 발현량의 상대정량

30일 동안 단일 및 세 균주의 혼합 상태로 배양하여 기간별로 sampling한 균주들에서 target 유전자의 mRNA 발현을 RT-PCR로 확인한 결과 일정한 수준으로 30일간 발현이 지속되는 것을 확인하였다. 이렇게 mRNA 발현이 지속적으로 유지되는 결과를 바탕으로 각 배양 기간에 따른 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현량 측정을 통하여 QS에 의한 *E. coli*, *P. aeruginosa*와 *S. aureus* 세 균주간의 상호작용을 확인하기 위해 real-time RT-PCR을 이용하여 실험을 수행한 결과 Fig. 5와 같았다.

Real-time PCR에서 증폭산물의 양을 측정하는 방법에는 상대정량(relative quantification)과 절대정량(absolute quantification)이 있으며 본 실험에서는 이 중, AIs 합성 유전자의 mRNA 발현량을 측정하기 위하여 상대정량 방법을 사용하였다. 상대정량은 기준 유전자(reference gene)와 대상 유전자를 사용하여 PCR간의 변이를 보상하기 위하여 기준 유전자의 발현량에 대한 대상 유전자의 발현비율을 계산하여 이루어지며 이때 사용되는 기준 유전자로는 GAPDH, β -actin, β_2 -microglobulin, rRNA를 많이 사용한다(4, 19). 본 실험에서는 기준 유전자로 각 박테리아의 16S rRNA를 사용하였으며 각 균주의 16S rRNA는 *E. coli* 7, *P. aeruginosa* 4 그리고 *S. aureus*는 5 copies로 알려져 있다(26). 이를 사용하여 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 방법(13)에 의해 *E. coli*의 *ygaG*, *P. aeruginosa*의 *rhlI*와 *lasI* 그리고 *S. aureus*의 *luxS* mRNA 발현량을 상대정량 하였다.

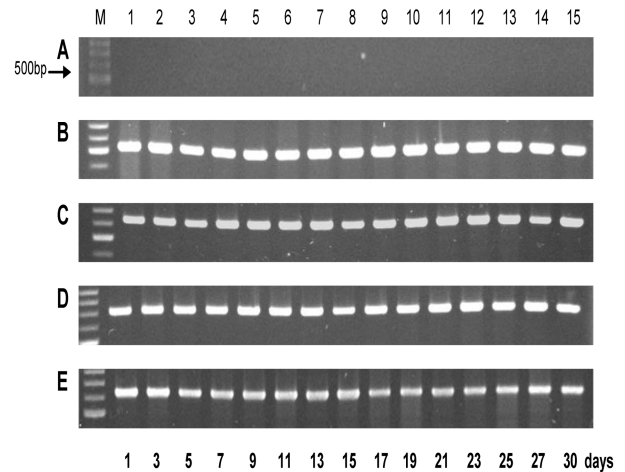


Fig. 4. RT-PCR products of *ygaG* (*E. coli*), *luxS* (*S. aureus*), *rhlI* and *lasI* (*P. aeruginosa*) in 30 days culture samples. The amplified RT-PCR products were analyzed on 2% agarose gel. RT-PCR products of *ygaG*, *luxS*, *rhlI*, and *lasI* genes, were amplified using cDNAs as template. Lane 1-15: RT-PCR products amplified from the sample of single culture (A; controls without reverse transcriptase, B; *E. coli ygaG* 530 bp, C; *S. aureus luxS* 640 bp, D; *P. aeruginosa rhlI* 630 bp, E; *P. aeruginosa lasI* 710 bp).

(2) *E. coli* 단일배양 및 세 균주의 혼합배양에서 *E. coli ygaG*의 mRNA 발현량 비교분석

*E. coli*의 *ygaG*는 EC 배양시 1일부터 9일까지 mRNA 발현량이 증가하였고, 그 후 감소하여 30일까지 지속되었으나 혼합배양에서는 mRNA 발현량이 1일부터 17일까지 증가하다 감소하는 추세를 보였다. EC 배양과 혼합배양 상태에서의 발현을 비교했을 경우 초기에는 EC 배양한 sample에서 *ygaG*의 mRNA 발현량이 더 많았으나 13일 이후부터 혼합배양 한 sample에서 더 많이 발현되기 시작하였다. 혼합배양 시 EC배양보다 초기 접종량이 더 적었음에도 불구하고[단일배양 시 OD 1.0 일 때 균체 30 mg(w/w), 혼합배양시 각 균주의 OD 1.0일 때 각 균체 10 mg씩 총 30 mg이 되도록 접종] 19일에는 최고 약 30배 이상의 mRNA 발현량 증가를 보였으며 30일까지 혼합배양 상태에서 발현량이 더 많은 경향이 지속됨을 알 수 있었다(Fig. 5A).

(3) *P. aeruginosa* 단일배양 및 세 균주의 혼합배양에서 *P. aeruginosa rhlI*와 *lasI*의 mRNA 발현량 분석

*P. aeruginosa*의 *rhlI*와 *lasI*는 PA 배양시 1일부터 13일까지 mRNA 발현량이 증가하였고, 그 후 감소하여 30일까지 지속되었으나 혼합배양에서는 mRNA 발현량이 1일부터 17일까지 증가하다 감소하는 추세를 보였다. PA 배양과 혼합배양 상태에서의 발현을 비교했을 때 혼합배양시 PA 배양보다 초기 접종량이 더 적었음에도 불구하고 *rhlI*는 초기부터 PA 배양보다 혼합배양 한 sample에서 mRNA 발현량이 증가되기 시작하였다. 7일에는 최고 약 40배 이상의 mRNA 발현량 증가를 보였으며 30일까지 혼합배양 상태에서 발현량이 많은 경향이 지속되었다. *lasI* 또한 초

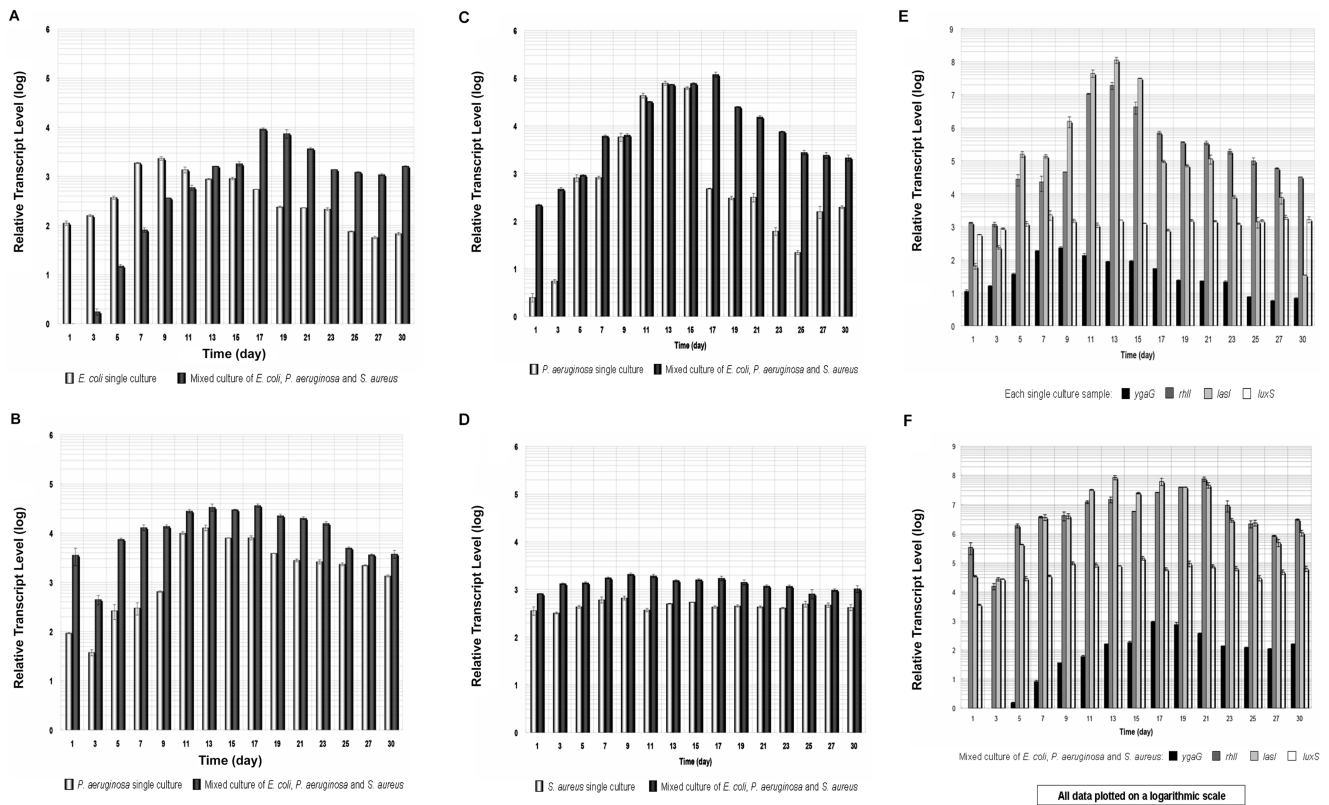


Fig. 5. mRNA expression level from single culture which was inoculated with *E. coli* or *P. aeruginosa* or *S. aureus* and mixed culture which was inoculated with *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* during 30 days. Results of real-time quantitative RT-PCR of equal amounts of total RNA (500 ng) isolated from each culture sample. The relative mRNA input is calculated from the threshold cycle (Ct) values obtained from real-time quantitative RT-PCR based on the modified comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (13). All data presented are an average of three independent experiments with the standard deviation, indicated by the error bar and plotted on a logarithmic scale. (A) Transcript expression level of *E. coli* *ygaG*, (B) transcript expression level of *P. aeruginosa* *rhlI*, (C) transcript expression level of *P. aeruginosa* *lasI*, (D) transcript expression level of *S. aureus* *luxS*. (E) Pure culture of each single strain transcript expression level of *ygaG*, *rhlI*, *lasI* and *luxS*, (F) pure culture of mixed species transcript expression level of *ygaG*, *rhlI*, *lasI* and *luxS*

기부터 PA배양보다 혼합배양한 sample에서 mRNA가 더 많이 발견되기 시작하여 17일에는 최고 약 250배 이상의 mRNA 발현량 증가를 보였으며 30일까지 혼합배양 상태에서 발현량이 많은 경향이 지속되었다(Fig. 5B, C).

(4) *S. aureus* 단일배양 및 세 균주의 혼합배양에서 *S. aureus* *luxS*의 mRNA 발현량 분석

*S. aureus*의 *luxS*는 SA 배양과 혼합배양한 sample에서 모두 1일부터 9일까지 mRNA 발현량이 증가하였으며 11일부터 30일까지 그 양이 감소되었으나 발현은 지속되었다. 또한 혼합배양시 SA 배양보다 초기 접종량이 더 적었음에도 불구하고 SA 배양과 혼합배양에서 mRNA의 발현량을 비교하면 전반적으로 혼합배양한 sample에서 mRNA가 더 많이 발현되었으며 11일에서 최고 약 5배 이상의 mRNA 발현량 증가를 보였다. 또한 SA 배양시 *luxS*의 mRNA 발현 양상을 다른 target 유전자인 *ygaG*, *rhlI*와 *lasI*의 mRNA 발현량과 비교했을 때, 이들에 비해 지속적으로 mRNA 발현이 크게 증가되거나 감소되지 않았다(Fig. 5D).

(5) 각 세 균주의 단일 배양과 세 균주의 혼합배양에서 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현량 분석

Fig. 5A, B와 C에서 확인한 *E. coli*의 *ygaG*와 *P. aeruginosa*의 *rhlI*와 *lasI*의 mRNA 발현양상은 Eberhard (7)와 Nealson (17)의 연구결과와 유사하였다. 그들의 연구에 따르면 AIs의 발현은 낮은 박테리아 농도에서는 고농도에 도달하기까지 지속적으로 발현량이 증가되고 일정이상 고농도에 이르면 저해를 받아 발현량이 줄어든다고 보고 하였다.

EC, PA 및 SA 배양한 sample에서 *ygaG*, *rhlI*, *lasI*와 *luxS*의 mRNA 발현량을 비교했을 때 *P. aeruginosa*의 *rhlI*와 *lasI*가 가장 많은 발현량을 보였다. 초기부터 *rhlI*와 *lasI*가 가장 많은 발현량을 보였으며, *lasI*의 mRNA 발현은 15일까지 가장 많은 발현량을 보였으며 17일에는 *lasI*보다 *rhlI*의 mRNA 발현이 더 많아져서 30일까지 가장 많은 발현량을 보였다(Fig. 5E).

혼합배양 상태에서 각 균주의 분포를 16S rRNA copy수로 보정 후 상대정량을 통하여 비교하였을 때 30일 동안 약 40%로 *E. coli*와 *P. aeruginosa* 분포 비율이 높았으며 *S. aureus*는 20%

로 나타났다(Fig. 6). 혼합배양한 sample에서 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현량을 비교했을 때 *E. coli*와 *P. aeruginosa*가 비슷한 비율로 존재 했음에도 불구하고, 초기부터 *P. aeruginosa*의 *rhlI*와 *lasI*가 가장 많이 발현되었으며, *E. coli*의 *ygaG*가 가장 적게 발현되었고 *S. aureus*의 *luxS*의 mRNA 발현량은 30일 동안 큰 차이 없이 유지되었다(Fig. 5F).

Real-time RT-PCR 실험 결과, 흥미롭게도 배양시간과 단일 및 혼합균주 배양에 따른 AIs의 합성 유전자의 mRNA 발현양상에서 주목할 만한 차이점이 나타났다. 전반적으로 EC, PA 및 SA 배양보다 혼합배양시 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현이 더 많음을 확인할 수 있었다. 3개 균주의 4개 유전자의 mRNA 발현량을 비교 하였을 때 혼합배양 sample에서 *P. aeruginosa*의 *lasI*는 제일 적은 발현량을 보인 *E. coli*의 *ygaG*에 비해 최고 10,000배 이상의 mRNA 발현량의 차이를 보였다. 또한 균주 배양시간이 길어지면 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현이 일정수준으로 지속될 것이라 생각했던 것과는 달리 초기부터 발현이 시작되어 증가되었다가 일정 시간이 지나면 다시 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5). 이러한 현상은 QS를 통한 각 균주들간의 상호작용에 의한 것으로 생각된다.

Miller 등(16)에 따르면 QS의 신호물질 중 이 종간의 박테리아 사이에서도 전달이 가능한 'universal signal'로 알려진 Autoinducer-2 (AI-2)가 존재하며, 최근에 furanosyl borate diester 구조로 밝혀졌다(5, 21). AI-2를 생산하는 유전자를 가진 박테리아로는 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria meningitidis*, *Yersinia pestis*, *Camphylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae* 등이 있다고 보고되어 있다(16). AI-2는 그람양성과 음성 박테리아에서 모두 존재하기 때문에 박테리아의 global한 신호물질로서

서로 다른 박테리아들 간 신호전달에 관여할 것으로 추정하고 있으나, AI-2의 기능에 대해서는 아직 많은 논란이 있으며 확실히 밝혀져 있지 않다(5). 이러한 보고는 이종의 박테리아들에서도 서로 다른 박테리아의 AIs 합성 유전자의 발현에 영향을 끼칠 수 있다는 가능성을 제시하며, 본 실험에서 사용한 박테리아 중 *E. coli*와 *S. aureus*가 AI-2를 생산한다고 알려져 있다. 그러나 *P. aeruginosa*의 경우에는 AI-2를 생산하지 않으며 AIs로 종간 특이성을 지닌 *N*-acyl-homoserine lactone (AHL)을 생산한다고 알려져 있다(28). 따라서 각 균주의 단독배양시 보다 세 균주의 혼합배양시 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현이 증가되었던 것은 QS에 의해 자신이 생산하는 AIs 외에 이 종의 박테리아들에서도 신호전달이 가능한 다른 박테리아의 AIs의 영향을 함께 받아 각 균주의 AIs 합성 유전자의 mRNA 발현량이 더 높았던 것으로 생각된다. 특히, 혼합배양시 *P. aeruginosa*의 *rhlI*와 *lasI*의 발현이 가장 많았던 것은 자신이 생산하는 AIs인 AHL 외에 *E. coli*와 *S. aureus*가 생산하는 AI-2의 영향을 받아 세 가지의 AIs 작용에 의한 것으로 추정된다.

본 연구에서는 카테터 관련 요로감염에서 바이오필름을 형성하는 박테리아인 *E. coli*, *P. aeruginosa* 및 *S. aureus*에서 quorum sensing 기작에 관여하는 AIs 합성 유전자인 *ygaG*, *rhlI*, *lasI*와 *luxS*의 발현과 그들의 상호 작용을 *in vitro*에서 확인하였으며, 추후 이들의 바이오필름 형성에 관한 연구를 통해 CAUTI 발생에 관여하는 quorum sensing의 기전을 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 과학기술부 기초과학연구사업의 지원을 받아 수행하였으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 송소연, 이지열, 고준성, 길성호, 이상섭, 정희태 등. 2005. 항생제 도포 요도카테터의 바이오필름 형성에 대한 장기간 효과. 대한비뇨기학회지 46, 730-736.
2. Bainton, N.J., P. Stead, S.R. Chhabra, B.W. Bycroft, G.P. Salmond, G.S. Stewart, and P. Williams. 1992. *N*-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem. J.* 288, 997-1004.
3. Brenner, D.J., N.R. Krieg, and J.T. Staley. 2005. "Bergey's manual of systematic bacteriology," Second Edition
4. Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193.
5. Chen, X., S. Schauder, N. Potier, A. Van Dorsselaer, I. Pelczar, B.L. Bassler, and F.M. Hughson. 2002. Structural identification of a bacterial quorum sensing signal containing boron. *Nature* 415, 545-549.
6. Davies, D.G., M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton, and E.P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295-298.

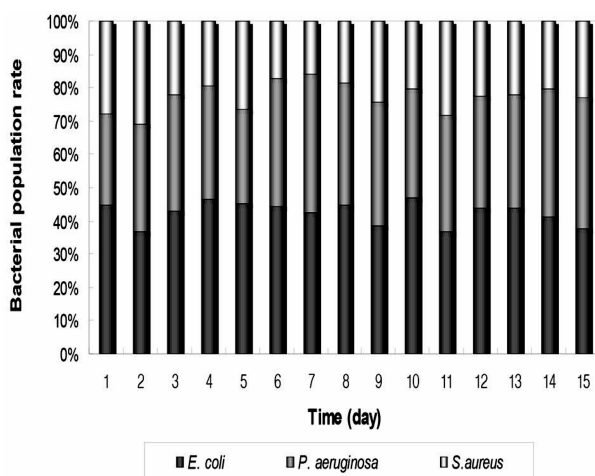


Fig. 6. Bacterial population rate of the mixed culture of three species at 37°C in LB broth with shaking for 30 days. Bacterial population rate of *E. coli* (■), *P. aeruginosa* (▒), and *S. aureus* (□) were measured by real-time RT-PCR.

7. Eberhard, A. 1972. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.* 109, 1101-1105.
8. Fuqua, W.C. and S.C. Winans. 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* 176, 2796-2806.
9. Fuqua, W.C., S.C. Winans, and E.P. Greenberg. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269-275.
10. Hastings, J.W. and K.H. Nealson. Bacterial bioluminescence. 1997. *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 549-595.
11. De Kievit, T.R. and B.H. Iglewski. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* 68, 4839-4849.
12. Kumon, H., H. Hashimoto, M. Nishimura, K. Monden, and N. Ono. 2001. Catheter-associated urinary tract infections: impact of catheter materials on their management. *Int. J. Urol.* 17, 311-316.
13. Livark, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25, 402-408.
14. Magnuson, R., J. Solomin, and A.D. Grossman. 1994. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell* 77, 207-216.
15. Merle, V., J.M. Germain, H. Bugel, M. Nouvellon, J.F. Lemeland, and P. Czernichow. 2002. Nosocomial urinary tract infections in urologic patients: assessment of a prospective surveillance program including 10,000 patients. *Eur. Urol.* 41, 483-489.
16. Miller, M.B. and B.L. Bassler. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 55, 165-99.
17. Nealson, K.H. and J.W. Hastings. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43, 495-518.
18. Parsek, M.R. and E.P. Greenberg. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in association with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8789-8793.
19. Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
20. Rumbaugh, K.P., J.A. Griswold, and A.N. Hamood. 2000. The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect.* 2, 1721-1731.
21. Schaefer, A.L., D.L. Val, B.L. Hanzelka, J.E. Crona, and E.P. Greenberg. 1996. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9505-9509.
22. Silhavy, T.J., M.L. Berman, and L.W. Enquist. 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.
23. Surette, M.G. and B.L. Bassler. 1998. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7046-7050.
24. Surette, M.G., M.B. Miller, and B.L. Bassler. 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1639-1644.
25. Tambyah, P.A. 2004. Catheter-associated urinary tract infections: diagnosis and prophylaxis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 24, S44-48.
26. Tourova, T.P. 2003. Copy number of ribosomal operon in prokaryotes and its effect on phylogenetic analyses. *Microbiol.* 72, 389-402.
27. Whitehead, N.A., A.M. Barnard, H. Slater, N.J. Simpson, and G.P. Salmond. 2001. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 365-404.
28. Williams, S.C., E.K. Patter, N.L. Carty, J.A. Griswold, A.N. Hamood, and K.P. Rumbaugh. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer enters and fuctions in mammalian cells. *J. Bacteriol.* 186, 2281-2287.

(Received November 9, 2006/Accepted December 22, 2006)

ABSTRACT : The Analysis of Expression of Autoinducer Synthesis Genes Involved in Quorum Sensing among Catheter Associated Bacteria

Mi-Hye Lee, Pil-Soo Seo¹, Ji-youl Lee², Kyong-Ran Peck³, and Sang-Seob Lee* (Department of Biological Engineering, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea and ¹Department of Korea Biological Resource Center, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea ²Department of Urology, School of Medicine, The Catholic University, Bucheon 420-717, Korea, ³Division of Infectious Diseases, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul 135-710, Korea)

The most biofilm forming bacteria in catheter, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* were isolated and identified from a patient's catheter occurring catheter-associated urinary tract infection (CA-UTI). We examined mRNA expression and its quantification of AIs synthetic genes encoding signal substance of quorum sensing from each bacterial species in order to elucidated quorum sensing mechanism. Both pure cultures for each bacterial strains and a mixed cultures with three were grown for 24 hr and 30 days. Initial densities to be able to detect mRNA expression on single strains culture were shown at 2.4×10^5 CFU/ml, 5.4×10^6 CFU/ml of *E. coli* for *ygaG* and *S. aureus* for *luxS*, and at 6.9×10^4 CFU/ml of *P. aeruginosa* for *rhII* and *lasI*. Also, in mixed culture of three, initial cell densities of mRNA expression were appear to at 7.3×10^5 CFU/ml, 1.6×10^7 CFU/ml of *E. coli* for *ygaG* and *S. aureus* for *luxS*, and at 2.1×10^5 CFU/ml of *P. aeruginosa* for *rhII* and

lasI. Each AIs synthetic gene was expressed in initial cell density and the mRNA expression of the genes were detected continuously during 30 days. And then, the quantification of mRNA expression level of *ygaG*, *rhII*, *lasI*, and *luxS* which were related AIs synthesis was done each time point by real-time RT-PCR. Interestingly, the mRNA levels of *ygaG*, *rhII*, *lasI*, and *luxS* from the mixed culture was higher than those from each single strain culture. In the case of *E. coli ygaG*, the amount of transcript from the mixed culture was at least 30 times for that from single culture. In the case of *P. aeruginosa rhII* and *lasI*, the amount of transcript from the mixed culture was at least 40 times and 250 times for that from single strain culture. In the case of *S. aureus luxS*, the amount of transcript from the mixed culture was at least 5 times for that from single strain culture. And specially, the mRNA expression of *rhII* and *lasI* of *P. aeruginosa* showed the highest efficiency among four AIs synthetic genes.