



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

2010년 8월
박사학위논문

글루코스 존재하에서 GdpS가
extracellular DNAs 조절을 통해
황색포도알균의 biofilm 형성에
영향을 끼친다

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

권 안 성

글루코스 존재하에서 GdpS가
extracellular DNAs 조절을 통해
황색포도알균의 biofilm 형성에
영향을 끼친다

GdpS of *Staphylococcus aureus* affects biofilm formation
in the presence of glucose through regulating
extracellular DNAs

2010년 8월 25일

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

권 안 성

글루코스 존재하에서 GdpS가
extracellular DNAs 조절을 통해
황색포도알균의 biofilm 형성에
영향을 끼친다

지도교수 임 용

이 논문을 이학박사학위신청 논문으로 제출함

2010년 4월

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

권 안 성

권안성의 박사학위 논문을 인준함

위원장 경북대학교 교수 김정민 (인)

위원 성균관대학교 교수 고관수 (인)

위원 질병관리본부 연구사 조성학 (인)

위원 Indiana대학교 교수 배태옥 (인)

위원 조선대학교 교수 임 용 (인)

2010년 6월

조선대학교 대학원

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS.....	I
LIST OF TABLES.....	III
LIST OF FIGURES.....	IV
ABSTRACT.....	VI
I . 서론.....	1
II . 재료 및 방법.....	4
1. Strains, plasmids와 growth conditions.....	4
2. DNA manipulations.....	4
3. <i>gdpS</i> gene의 allele replacement.....	5
4. <i>gdpS</i> mutant의 complementation.....	6
5. Biofilm assay.....	6
6. Biofilm detachment assay.....	7
7. RNA purification과 Real-time PCR.....	7
8. eDNAs 측정.....	8
9. Autolysis assay와 zymogram analysis.....	9
III . 결과.....	11
1. Glucose 존재 하에서 <i>gdpS</i> mutation은 <i>S. aureus</i> 8325-4 strain 및 다른 clinical isolates의 biofilm 형성을 증가시킨다.....	11
2. <i>gdpS</i> gene의 C-terminal domain을 encoding하는 gene의 complementation은 biofilm에 영향을 미치지 못한다.....	12
3. <i>gdpS</i> mutation은 NaCl과 glucose 존재유무에 따라 biofilm 형성에 상반된 영향을 미친다.....	13
4. 0.5% 이상 Glucose 농도에서는 농도에 관계없이, glucose가 존재하는 경우	

<i>gdpS</i> mutant는 24h 배양 후, biofilm 형성이 증가된다.....	14
5. <i>gdpS</i> gene은 NaCl을 넣지 않은 TSB (W/O)-0.5% glucose 배지에서 <i>ica</i> operon을 통한 biofilm 형성에 관여하지 않는다.....	16
6. <i>gdpS</i> mutant의 biofilm 형성 증가는 eDNAs가 관여한다.....	16
7. <i>gdpS</i> mutation은 다양한 cell lysis-related genes의 발현에 영향을 미친다....	17
8. 8325-4 strain에서 <i>gdpS</i> mutant는 <i>cidA</i> 를 통해 biofilm 형성에 관여하지만, 다른 임상 strain들에서는 관여하지 않는다.....	18
9. 8325-4 strain에서는 <i>gdpS</i> 와 <i>cidA</i> double mutation으로 인하여 eDNAs release가 감소되고, YL50 strain에서는 오히려 증가된다.....	19
10. <i>gdpS</i> mutation은 autolysis를 증가시킨다.....	19
11. 8325-4와 YL50 strain의 murein hydrolases profiles은 다르다.....	20
12. <i>gdpS</i> 와 <i>cidA</i> double mutation으로 인한 biofilm 형성의 증가에 <i>sigB</i> 가 관여한다.....	21
13. YL50 strain의 <i>gdpS</i> 와 <i>cidA</i> double mutant에서 <i>at</i> 의 expression이 증가한다.....	22
14. 임상 분리주인 CM01과 CM09 strain의 <i>gdpS</i> mutant는 <i>at</i> 을 통해서 biofilm 형성에 관여한다.....	22
IV. 고찰.....	24
V. 참고문헌.....	51

LIST OF TABLES

Table 1. Strains and plasmids.....30

Table 2. Oligonucleotide primers in this study.....33

LIST OF FIGURES

Figure 1. The effect of the <i>gdpS</i> mutation on biofilm formation in 8325-4 (A) and seven clinical strains (B).....	36
Figure 2. Contribution of GdpS domains to biofilm formation.....	37
Figure 3. Biofilm formation of the <i>gdpS</i> mutant depends on the Media formula.....	38
Figure 4. The effect of glucose concentration on biofilm formation after 4h-incubation (A, C) or 24h-incubation (B, D) in two different strain backgrounds.....	39
Figure 5. The effect of <i>ica</i> operon mutation on biofilm formation by <i>gdpS</i> mutant in strain backgrounds of 8325-4 (A) or YL50 and CM09 (B).....	40
Figure 6. The effect of enzyme or chemical treatments on detachment of mature biofilms by 8325-4 strains (A) and YL50 strains (B).....	41
Figure 7. The effect of <i>gdpS</i> deletion mutation on the release of extracellular DNAs (eDNAs) by 8325-4 strains (A) and YL50 strains (B).....	42
Figure 8. The effect of <i>gdpS</i> deletion mutation on the expression of autolysis-related genes in 8325-4 strains (A) and YL50 strains (B).....	43
Figure 9. The effect of <i>cidA</i> mutation on the biofilm formation by <i>gdpS</i> deletion mutant in 8325-4 strains (A), YL50 strains (B) and other clinical	

isolates (C).....	44
Figure 10. The effect of <i>cidA</i> deletion mutation on the release of eDNAs in 8325-4 strains (A) and YL50 strains (B).....	45
Figure 11. The effect of the mutations of <i>gdpS</i> and <i>cidA</i> on autolysis of 8325-4 (A) and YL50 (B).....	46
Figure 12. Zymogram analysis of cell wall-associated murein hydrolases extracted from the <i>gdpS</i> mutants of the 8325-4 and YL50 strain.....	47
Figure 13. The role of <i>sigB</i> in the biofilm formation by <i>gdpS cidA</i> double mutants in CM75 (A) or YL50 strain background (B).....	48
Figure 14. The effect of <i>gdpS</i> and <i>cidA</i> mutation on the expression of <i>atl</i> in the 8325-4 (A) and YL50 (B) strains.....	49
Figure 15. The effect of <i>atl</i> mutation on biofilm formation by <i>gdps</i> mutant of clinical isolates CM01 (A) or CM09 (B) strains.....	50

ABSTRACT

GdpS of *Staphylococcus aureus* affects biofilm formation in the presence of glucose through regulating extracellular DNAs

Kwon, An-Sung

Advisor : Prof. Lim, Yong, M.D. Ph.D

Department of Bio new drug development

Graduate School of Chosun University

The *gdpS* gene in *Staphylococcus aureus* contains GGDEF domain, which is implied in diguanyl cyclase activity. Recently, the staphylococcal *gdpS* gene was proposed to upregulate biofilm formation via *icaADBC* encoding polysaccharide intercellular adhesin in the presence of NaCl. In this study, deletion of *gdpS* gene in 8325-4 and seven clinical isolates of *S. aureus* enhanced the biofilm formation in the presence of glucose in the dose-independent manner. Neither the *icaADBC* operon nor *sigB* affected the biofilm formation by the *gdpS* mutant. In biofilm detachment assays, while either proteinase K or NaIO₃ treatment did not affect biofilm integrity, DNase I treatment resulted in greatly reduced biofilm, suggesting that extracellular DNAs (eDNAs) is an important component of the biofilm. The importance of eDNAs in biofilm formation was confirmed by the observation that, in a real time PCR analysis, eDNA level was increased in *gdpS* mutants compared with that of the parental strain. Inactivation of *cida*, holin-like autolysis regulator gene, reversed the biofilm formation of the *gdpS* mutant of 8325-4.

On the contrary, the biofilm formation was still enhanced in the *cidA gdpS* double mutants of the clinical isolates including YL50, showing that *cidA* role in biofilm formation depends on the strain background. In addition, autolysis analysis displayed that the *gdpS* mutant of 8325-4 and the *cidA gdpS* double mutant of YL50 were the most susceptible to addition of Triton X-100. Interestingly, the enhanced biofilm formation of the *cidA gdpS* double mutant of CM75 was reversed by disrupting σ^B , which was not found in the other clinical strains, indicating that the effect of GdpS in 8325-4, which is devoid of σ^B activity, on biofilm formation via *cidA* was strain-dependent. Finally, disruption of the *atl* encoding major autolysin in the *gdpS* mutants of CMO1 and CMO9 clinical strains resulted in the lack of the biofilm formation. Collectively, in the presence of glucose, GdpS in *S. aureus* affects biofilm formation through regulating lysis-associated genes including *atl* and *cidA* genes.

I. 서론

Biofilm 이란 planktonic cells 과는 달리 hydrated matrix 에 bacteria 들이 박혀있거나 둘러 싸여있는 bacterial community 이다 (16). 많은 bacteria 들은 체내의 죽은 조직 뿐만 아니라, 다양한 의료가구의 표면에 부착하여 biofilm 을 형성하기도 한다. Biofilms 의 extracellular matrix 는 exopolysaccharides, surface proteins 과 더불어 extracellular DNAs (eDNAs)로 구성되어 있다 (31, 52, 67). Extracellular matrix 에 둘러 쌓인 bacteria 는 체내 면역체계의 공격으로부터 쉽게 제거되지 않는다 (7). 또한, biofilm 을 형성하는 bacteria 의 경우, planktonic 상태의 bacteria 에 비해 약 100 배에서 1000 배 이상 높은 항생제 내성을 보이는데, 이것은 i) 항생제의 biofilm 내로 penetration 이 떨어지기 때문이고, ii) biofilm 내의 bacteria 는 planktonic cells 에 비해 상대적으로 증식이 더딘 상태이기 때문이며, iii) 다양한 gene expression 을 통해 metabolic activity 를 변화시켜 항생제 치료가 어렵게 만들기 때문이다 (44, 50). Biofilm 의 발달 과정은 크게 2 단계의 과정을 통해 형성된다. 첫 번째 단계는 초기 부착 단계로서, 부유하던 부유 세포들이 기질에 달라붙어 부착성 bacteria 를 형성하는 과정이고, 두 번째 단계는 microcolonies 의 집합들이 모여서 보다 성숙한 biofilm 을 형성하는 과정이다 (43).

Staphylococcus aureus 는 sepsis, endocarditis 등과 같은 질병을 유발하는 기회감염균으로 알려져 있고 (3, 15), 특히 병원 감염의 중요한 원인균으로 다양한 의료가구 표면에 biofilm 을 형성하여 만성적이며 지속적인 감염을 일으킨다 (5). *Staphylococcus epidermidis* 와, *S. aureus* 에서는 polysaccharide intercellular adhesin (PIA) 또는 polymeric N-acetyl-glucosamine (PNAG)를 encoding 하는 *icaADBC* operon 이 biofilm 형성에 관여하며, *icaADBC* operon 의 expression 의 조절에는 *icaR*, *sarA* 그리고 *sigB* 가 관여한다 (6, 10, 13, 17, 22). O'Neill 등은 (42) MRSA strains 의 biofilm 형성에는 *icaADBC* operon 이 관여하지 않고, protein, 즉 surface protein 이 관여함을 보고하였다. 대표적인 surface proteins 으로 알려진 microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules

(MSCRAMMs)은 host 의 조직이나, 다양한 표면에 달라붙기 위해 필요한 components 이며, sortase enzyme 이 conserved 된 LPXTG motif 를 인식하여 MSCRAMMs 을 cell wall 에 anchoring 한다 (37). *S. aureus* 는 지금까지 22 개의 LPXTG motif 를 지닌 MSCRAMMs 이 있다고 알려졌고 (37), MSCRAMMs proteins 의 deletion 은 *S. aureus* 의 biofilm 형성을 감소시킨다고 보고되었다 (14, 39, 66).

S. aureus 의 cell lysis 와 death 에 관여하는 genes 은 tight 하게 조절된다. 이에 관여하는 대표적인 genes 은 *atl* (9), *cidA* (52), *IrgA* (21) 등이 있다. Cell lysis 를 통해 release 된 eDNAs 는 biofilm matrix 의 구성성분으로서 중요한 역할을 한다. *S. aureus* 에서 *atl* 의 mutation 은 초기 attachment 를 저해하여 biofilm 형성을 억제한다 (9). Murein hydrolase activity 에 있어서 서로 반대 효과를 보이는 *cid* operon 과, *Irg* operon 에 의해 *S. aureus* 의 cell death 와 cell lysis 가 조절된다 (21, 51). 최근에, Rice 등은 (52) *S. aureus* 에서 murein hydrolase regulator 인 *cidA* 가 cell lysis 에 관여하고, eDNAs release 의 저해를 통해 biofilm 형성을 억제한다고 보고하였다. 반면에 *IrgAB* 의 mutation 은 eDNAs 의 release 를 증가시켜서 biofilm 형성을 증가시킨다고 보고되었다 (36).

Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP)는 최근에 새롭게 알려진 secondary messenger 이며, 처음에는 cellulose synthase 의 allosteric activator 로서 *Gluconacetobacter xylinus* 에서 동정되었다 (55). c-di-GMP 는 두 개의 상반된 activity 를 지니는 enzyme 에 의해 조절된다. 그 중 하나는 c-di-GMP 의 합성에 관여하는 diguanylate cyclase (DGC)이고, 다른 하나는 c-di-GMP 의 degradation 에 관여하는 phosphodiesterase (PDE)다. GGDEF conserved domain 을 포함하는 DGC 는 2 분자의 guanosine triphosphate (GTP)를 c-di-GMP 형태로 catalyze 시키는데 반해 (45), c-di-GMP 는 EAL 이나 HD-GYP 도메인을 포함하는 PDE 에 의해서 가수분해된다 (12). Galperin (19)에 따르면 GGDEF 나 EAL 또는 HD-GYP domain proteins 을 encoding 하는 gene 은 세균에서 다수가 존재한다. 그람 음성세균에서는 세포내의 c-di-GMP 가 농도가 높아질수록 biofilm 형성이 증가하여, c-di-GMP 는 biofilm 형성을 촉진시킨다

(26). 반면에 그람 양성균인 *S. aureus* 의 경우 합성된 c-di-GMP 를 세포 외로 처리해 주면 biofilm 형성이 저해된다 (27). *S. aureus* 에는 DGC 의 활성이 예상되는 GGDEF domain (SA0701)을 갖고 있는 단백질이 하나 있으며, modified GGDEF domain 을 가지고 있는 단백질도 하나 있다 (SA0013). *S. epidermidis* 나 *S. aureus* 의 경우 GGDEF domain 을 지닌 세포내의 gene (GGDEF-containing domain protein from *Staphylococcus*, GdpS)을 mutation 시키면 biofilm 형성이 저해되었으며, 이런 현상은 c-di-GMP 하고는 관련이 없이 일어난다 (23). 하지만, Shang 등은 GdpS 가 *S. aureus* 의 biofilm 형성에 어떠한 영향도 끼치지 않는다고 보고하였다 (57). 이처럼 staphylococci 에서 GdpS 의 biofilm 에 미치는 영향에 관한 기존 보고에는 다소 차이가 있다.

본 연구에서는 대표적인 그람 양성세균인 *S. aureus* 에서 DGC 활성을 보이는 것으로 예상되는 *gdpS* gene 을 deletion 시킨 후, GdpS 가 *S. aureus* 의 biofilm 형성에 미치는 영향을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. Strains, plasmids와 growth conditions

이 연구에 사용된 *Escherichia coli* (*E. coli*)를 포함한 *S. aureus*, plasmids와 primers는 각각 Table 1과 2에 나타냈다. *S. aureus*는 일반적인 배지인 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco Laboratories, REF211825), TSB without Dextrose (TSB, Difco Laboratories, REF286220), Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid REF408009) 또는 Tryptic Soy Agar (TSA)를 사용하였고, DH5 α (NEB, Cat No C29871)는 Luria-Bertani (LB) 배지를 사용하여 배양하였다. 모든 bacteria는 37°C에서 200 revolutions per minute (rpm)으로 shaking culture 하였다. 실험에 사용된 항생제의 농도는 chloramphenicol은 5 또는 10 ug/ml, ampicillin은 50 ug/ml이었다. Restriction 기능이 없고 modification이 가능한 *S. aureus* strain인 RN4220은 electroporation을 위한 recipient cells로 사용되었다.

2. DNA manipulations

Chromosomal DNA는 Reischl 등의 방법을 이용하여 추출하였다 (49). 추출하는 방법은, TSA plate에서 자란 *S. aureus* 1 loopful을 200 μ l의 lysis buffer (1% Triton X-100, 0.5% Tween 20, 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA)에 부유시킨 후, 100°C에서 10분 동안 끓였다. 부유물은 centrifuge를 이용하여 침전시키고 상층액만 새로운 tube로 옮긴 후, 상층액을 polymerase chain reaction (PCR)의 template로써 사용하였다. Plasmid DNA의 추출은 iNtRON사의 plasmid DNA extraction kit (iNtRON, Cat No 17091)를 이용하였다. 이 연구에 이용된 restriction enzymes은 New England Biolabs (NEB), T4 DNA ligase는 Elpisbiotech의 제품을 이용하였다 (Elpisbiotech, Cat No EBT-1025). DH5 α 의 transformation은 Inoue 등의 방법을 이용하였다 (25). RN4220으로의 electroporation은 Cyto Pulse Science사의 방법을 이용하였다. Electroporation 조건은 Cyto Pulse PA-3000 (Cyto Pulse Science) 모델을 이용하여 1mm gap cuvette에 1100 V/cm, pulse width는 1 ms, number of pulses는 2번, interval between pulses는 0.2초를 주었다. Target strain

에 대한 transduction은 bacteriophage 52A (ATCC number 27693-B1™)를 이용하였다.

3. *gdpS* gene의 allele replacement

*gdpS*의 deletion mutant construction을 위해 Bae 등이 고안한 pKOR1 Gateway recombination system을 이용하였다 (4). 먼저 *gdpS* gene의 open reading frame (ORF) upstream에 있는 ~1.1 kilo base pairs (kbp)를 attB1_gdpS_F와 gdpS_sacII_R primer로, downstream에 있는 ~1.2 kbp를 gdpS_sacII_F와 attB2_gdpS_R primer를 이용하여 각각 증폭하였다. 증폭된 두 개의 PCR fragments는 SacII enzyme (NEB, Cat No R0157)을 이용해서 restriction 시킨 후, T4 DNA ligase를 이용하여 ligation 시켰다. ligation된 fragments를 template로 하여 attB1_gdpS_F primer와 attB2_gdpS_R primer로 다시 한번 PCR 하여 증폭시킨 후, PCR products를 pKOR1 vector와 함께 Gateway BP clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen, Cat No 11789-020)를 이용하여 상온에서 recombination 시켰다. Recombination된 plasmid는 DH5α로 42°C에서 30초간 heating하여 transformation시켰다. Mini-prep을 통해 맞는 것이 확인된 plasmid는 pGdpS1으로 명명하여 RN4220으로 electroporation시킨 후, bacteriophage 52A를 이용하여 target strains으로 transduction 시켰다. pKOR1을 이용한 allele replacement는 non-permissive 조건에서 염색체 안으로 plasmid가 insertion 하는 과정과, permissive 조건에서 plasmid의 loss를 일으키는 2 step을 거쳤다. 간략히 설명하자면, 처음에는 상동재조합 (homologous recombination)을 통해 염색체 안으로 끼어들어갈 수 있는 세포를 선별하기 위해서 chloramphenicol 5 ug/ml TSB에서 non-permissive 온도인 43°C로 하루 동안 키웠다. 그 다음 날에는 chloramphenicol 5 ug/ml TSA plate에 streaking한 후, 43°C에서 하루 동안 키웠다. 다음날, plasmid의 추출을 용이하게 하기 위해서 plate에 형성된 1 colony를 항생제가 없는 TSB에 접종해서 30°C에서 하루 동안 키웠다. 다음 날, 100 ng/ml의 anhydrotetracycline이 들어있는 TSA plate에 도말 하였고, plasmid loss는 chloramphenicol 5 ug/ml이 첨가된 TSA plating을 통해서 확인하였다. *gdpS*가

deletion된 strain은 chromosomal DNA를 추출한 후, *gdpS* gene 내부의 primers를 이용하여 한번 더 확인하였다. 실험에 이용된 다른 genes의 mutation은 *gdpS* mutant를 만드는 것과 동일한 방법으로 시행하였다. 모든 mutant는 먼저 각각의 gene 내부 primers를 이용해서 PCR로 확인 하였고, sequencing을 통하여 deletion 되었음을 최종 확인하였다.

4. *gdpS* mutant의 complementation

gdpS gene의 promoter region을 포함한 전체 *gdpS* gene의 complementation은 NCTC8325의 sequence를 바탕으로 *gdpS_C_EcoRI_F*와 *gdpS_C_BamHI_R* primers를 이용하여 PCR로 증폭시켰고, *gdpS* gene의 N-terminal complementation은 promoter region과 함께 175번 amino acid (a.a)까지를 *gdpS_C_EcoRI_F*와 *gdpS_C_N term_BamHI_R* primers를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. C-terminal complementation은 먼저 *gdpS_C_EcoRI_F*와 *gdpS_C_R_KpnI*으로 promoter region을 PCR한 후, *gdpS_C_F_KpnI*과 atg 염기를 첨가해 준 *gdpS_C_BamHI_R* primers로 176번부터 마지막 a.a 까지 PCR로 증폭시킨 후, KpnI enzyme으로 각각의 fragments를 restriction 시키고 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation 시켰다. 마지막으로, ligates를 template로 해서 다시 한번 *gdpS_C_EcoRI_F*와 *gdpS_C_BamHI_R* primers를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. 각각의 complementation을 위해 증폭된 PCR product는 EcoRI과 BamHI enzyme으로 restriction 시킨 후, EcoRI과 BamHI으로 restriction된 pLI50 vector에 ligation 시켰다. DH5 α 에 transformation 시킨 후, positive로 확인된 clones은 sequencing을 통하여 한번 더 확인하였다. 최종 확인된 clones의 plasmid DNA는 RN4220으로 electroporation 하고 bacteriophage 52A를 이용하여 8325-4 strain의 wild type 이나 *gdpS* mutant에 transduction 시켰다.

5. Biofilm assay

Biofilm assay는 96 well polystyrene microtiter plate (SPL, Cat No 30096)에서 Kwon 등이 사용한 방법을 수정해서 사용하였다 (30). 간략히 보자면, 하루 동안

배양된 각각의 세균은 0.5% glucose가 첨가된 TSB (W/O)-0.5% glucose 배지에 200배 희석을 시켜서 각 well마다 200 ul씩 triplicate로 넣어 주었다. 24h 동안 37°C incubator에서 standing culture한 후, Phosphate Buffered Saline (PBS)로 3회 세척을 하고 공기 중에서 말린 후, 0.25% crystal violet (C.V)로 1분간 염색하였다. 염색이 끝나면 다시 PBS로 3회 세척한 후, microplate reader (Sunrise™; Tecan Co)를 이용하여 590nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Biofilm detachment assay

gdpS mutant에서 증가된 biofilm matrix가 무엇인지 알아보기 위해서 실시한 biofilm detachment assay는 Toledo-Arana 등에 의한 방법을 변형하여 사용하였다 (63). Biofilm 형성은 위에서 설명한 biofilm assay 방법과 동일하게 시행하였고 24h이 지난 후, 각각의 wells에 10 mM sodium meta-periodate (Sigma, Cat No S1878) 또는 100 ug/ml proteinase K (Invitrogen, Cat No 25530-015)를 첨가하여 2h 동안 더 37°C에서 배양하였다. eDNAs에 대한 효과를 알아보기 위해서는 Rice 등(52)의 방법을 이용하였다. 24h 동안 biofilm을 형성시킨 wells에 5 U/ml RNase-free DNase I (Takara, Cat No 2270A)을 첨가하여 2h 동안 37°C에서 배양했다. 아무것도 넣지 않은 배지를 negative control로 사용하였고, 배양이 끝나면 PBS로 3회 세척한 후, C.V로 염색을 하고, 590nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. RNA purification과 Real-time PCR

하룻 동안 배양한 각각의 bacteria 세포들을 6 well plate에 200배 희석하여 24h 동안 standing culture 하였다. 배양이 끝나면 상층액은 버리고, 각각의 세포는 한 곳에 모아 PBS로 3회 세척 하였다. Total RNA는 7.5 µg의 lysostaphin (Sigma, Cat No L7386)이 첨가된 50 mM EDTA buffer 100 ul에 세포들을 부유시킨 후, 37°C에서 10분간 incubation시킨 후, TRIzol Reagent (Invitrogen, Cat No 15596-026)의 manual에 따라서 분리했다. Total RNA에 존재하는 여분의 genomic DNA는 RNase-free DNase I (Takara, Cat No 2270A) 처리를 통해서 없애고, 순수한 Total RNA의 정제는 acid phenol:chloroform (Ambion, Cat No 9720)을 이용했

다. 일반적으로 사용되는 reverse transcription PCR (RT-PCR) 이나 Real-time PCR을 위한 cDNA 합성은 M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Cat No 28025-013)의 manual을 따라서 reverse transcription 시켰다. RT-PCR 이나 Real-time PCR을 위한 각각의 genes, internal control인 *16S ribosomal RNA*의 발현을 확인하기 위한 primer sequences는 Table 2에 나타났다. Real-time PCR은 Mx3000P™ (Stratagene)를 이용하였고, 모든 gene들의 상대적인 발현을 측정하기 위해서 SYBR *Premix Ex Taq*™ (Takara, Cat No RR041)으로 PCR하고 expression 양상을 Livak 등 (33)의 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 방법을 이용하여 분석하였다. 각각의 실험은 적어도 3번 이상 반복하였고, 대표적인 평균값과 표준편차를 결과로 나타내었다.

8. eDNAs 측정

세포외로 방출된 eDNAs는 Rice 등의 방법을 변형하여 정량화 하였다 (52). 각각의 strains은 96 well plate에 triplicate로 접종하여 24h 동안 standing culture 하였다. 24h이 지난 후, plate는 4°C 냉장고에서 1h 동안 chilling 시켰고 1 ul의 0.5M EDTA를 각각의 wells에 첨가하였다. 상층액은 버린 후, 세척되지 않은 biofilm은 원심분리 후 TES buffer (50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, 500 mM NaCl, pH8.0)로 부유시키고 차갑게 cooling된 새로운 tube로 옮겼다. 4°C에서 13,000 rpm으로 5분간 원심분리 하여 각각의 상층액 100 ul씩을 300 ul가 들어있는 TE buffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) tube로 옮겼다. Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, Sigma, Cat No P2069)를 이용하여 eDNAs를 추출하였고, chloroform으로 한번 더 정제하였다. 상층은 3배 부피의 차가운 100% ethanol과 1/10 부피의 3M sodium-acetate를 이용하여 mix한 후, -20°C에서 하루 동안 보관하였다. 침전된 eDNAs는 4°C에서 13,000 rpm으로 20분간 원심분리 하여 얻었고, 70% ethanol로 세척하였다. 공기 중에서 eDNAs를 건조 시킨 후, 30 ul의 D.W를 첨가하였다. eDNAs 정량에 사용한 4개의 real-time PCR용 primers는 Table 2에 나타났다. PCR에 사용된 방법은 SYBR *Premix Ex Taq*™의 manual대로 시행하였고, Mx3000P™의 다음과 같은 조건을 이용하여 상대적인 정량을 하였다: 1단계 95도 10초, 2단계 (95도 5초, 60도 20초로 해서 40 cycles). 상대적인 발현 비교는

real-time PCR과 마찬가지로 Livak 등의 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 방법을 이용하여 분석하였다.

9. Autolysis assay와 zymogram analysis

Triton X-100을 처리한 autolysis assay는 Ingavale 등의 방법을 이용하였다 (24). 하루 동안 배양된 각각의 bacteria 세포들은 0 또는 0.01, 0.1% Triton X-100이 첨가된 TSB (W/O)-0.5% glucose에 100배 희석을 시켰다. 37°C에서 shaking culture 하였고, 매 시간마다 650nm에서 흡광도를 측정하였다.

Murein hydrolase의 detection을 위해서는, Mani 등의 방법을 이용하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 바탕으로 하는 zymogram analysis를 시행하였다 (35). 간략히 설명하면, 먼저 crude cell walls의 peptidoglycan 추출을 위해 하룻 밤 배양한 RN4220 cells을 새로운 12.5 ml의 TSB (W/O)-0.5% glucose 배지에 1:200으로 희석하여 exponential phase에 도달할 때까지 배양했다. 원심 분리 후, PBS로 3회 세척하고 4% SDS 0.5 ml을 첨가하여 90분간 37°C에서 incubation 시켰다. 100°C에서 10분간 heating 시킨 후, 원심분리 하여 pellet만 사용하기 직전까지 -70°C에 보관하였다. Autolysin을 함유한 murein hydrolase fraction의 추출을 위해 하룻 밤 배양한 8325-4와 YL50 strains을 새로운 12.5 ml의 TSB (W/O)-0.5% glucose 배지에 1:200으로 희석하여 exponential phase에 도달할 때까지 배양했다. 원심 분리 후, PBS로 3회 세척하고 125 μ l의 SDS-PAGE sample buffer를 원심분리 된 pellet에 첨가하여 부유시켰다. 부유물은 100°C에서 3분간 heating 시킨 후, 15,000g로 원심분리 하여 상층액만 사용하기 직전까지 -70°C에 보관하였다. SDS-PAGE에서 lytic activity의 측정을 위해서 RN4220의 crude cell walls peptidoglycan을 12% resolving gel에 첨가하여서 gel을 완성한 후, autolysin fraction이 함유된 각 samples의 murein hydrolase를 loading 했다. 100V로 전기영동을 한 후, 전기영동이 끝난 gel은 D.W를 이용하여 10분 간격으로 1h 동안 세척하였다. Proteins의 renaturation을 위해 1% Triton X-100을 함유한 Tris-HCl (pH8.0)에 gel을 12-16h 동안 incubation 시켰다. Incubation이 끝난 gel은 0.01% KOH를 함유한 1% methylene blue를 이용하여 1h 동안 상온에서 염색시켰고, 10분마다 세척하였다. Lytic activity를 보이는 band들은

gel상에서 clear zones으로 관찰되었다.

III. 결과

1. Glucose 존재 하에서 *gdpS* mutation 은 *S. aureus* 8325-4 strain 및 다른 clinical isolates 의 biofilm 형성을 증가시킨다.

Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP)는 세균에 있어 secondary messenger로서 biofilm, virulence, motility 등에 관여한다 (55, 61, 62). c-di-GMP에 대한 연구는 *Vibrio cholerae*나 *Pseudomonas aeruginosa* 등과 같은 그람 음성 세균에서 활발히 연구되었으나, 그람 양성세균에서 c-di-GMP에 대한 연구는 상대적으로 부족하다. 따라서, 본 연구에서는 대표적인 그람 양성세균인 *S. aureus*에서 diguanylate cyclases (DGC) 활성을 보이는 것으로 예상되는 GGDEF-containing domain protein from *Staphylococcus* (GdpS, SA0701 in *S. aureus* N315) gene을 deletion시킨 후, GdpS가 *S. aureus*의 biofilm 형성에 미치는 영향을 확인하였다. 8325-4 strain을 사용하여 *gdpS* gene을 deletion한 YL84 ($\Delta gdpS$) strain과 8325-4, wild-type, complemented strain인 YL84 (pKAS1)을 TSB (W/O) (Difco, Lot No. 286220) 배지에 0.5% glucose를 첨가한 TSB (W/O)-0.5% glucose에서 배양 후, biofilm assay를 시행하였다. Fig. 1A에서 볼 수 있듯이, YL84 ($\Delta gdpS$) strain의 경우 wild-type에 비해 약 2.5배 biofilm을 더 형성하였다. 또한, complemented strain인 YL84 (pKAS1)의 biofilm 형성은 wild-type보다 비슷하거나 오히려 감소하는 것을 확인하였다. Clinical isolates에서 *gdpS* gene의 mutation이 biofilm 형성에 미치는 영향을 확인하고자, 8325-4 strain에서 했던 동일한 방법으로 methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) strain인 YL50, CM75 strain과 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strain인 CM01, CM09, CM10, CM62, CM67 등 모두 7 strains의 *gdpS* gene을 deletion시킨 후, biofilm assay를 시행하였다. 본 배양조건에서는 실험에 사용한 모든 clinical isolates의 경우에서도 역시 각각의 *gdpS* mutant에서 biofilm 형성이 증가되는 것을 확인하였다 (Fig. 1B). 이러한 결과를 통해서 *gdpS* gene이 *S. aureus* biofilm 형성에 관여하며, *gdpS* gene의 mutation이 glucose 존재 하에서 *S. aureus* biofilm 형성을 촉진하는 것을 확인할 수 있었다.

2. *gdpS* gene 의 C-terminal domain 을 encoding 하는 gene 의 complementation 은 biofilm 에 영향을 미치지 못한다.

GdpS 를 8325-4 strain 의 gene sequence 를 바탕으로 *S. aureus* 의 다른 strain 들 (TW20, USA300, Newman, COL, USA300 FPR3757, 04-02981, ED98, Mu3, JH1, JH9, MU50, N315, MSSA476, MW2, RF122, ST398, MRSA252)과 차이를 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 검색 한 결과, MRSA252 strain 에서 최대 10 개의 base pair (bp) 차이를 보였지만 검색한 *S. aureus* strains 의 GdpS protein 서열은 모두 동일하였다. SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)를 이용한 amino acid (a.a) 서열 검색결과, GdpS 는 전체 356 개의 a.a 를 가지고 있으며 이중 N-terminal domain 에는 3 개의 transmembrane domain (각각 5-24, 124-146, 153-175 번째 a.a)과 1 개의 5 transmembrane receptors of the Lyts-Yhck type (5TMR-LYT) domain (30-116 번째 a.a)을 가졌고, C-terminal domain 에는 GGDEF domain (177-351 번째 a.a)을 가지고 있다 (Fig. 2A). N-terminal 의 5TM-5TMR-LYT domain 은 세포벽 metabolism 의 조절에 관여하는 LytS/LytT two-component system 의 sensor 에 해당하는 LytS 의 transmembrane region 을 대표한다고 알려졌고 (2), C-terminal 에 conserved 된 GGDEF domain 은 c-di-GMP 를 합성하는 DGC 를 encoding 하는 protein 들에서 highly conserved 되어 있는 domain 이다 (19). 본 실험에서는 *gdpS* mutant 인 YL84(Δ *gdpS*) strain 에서 biofilm 형성이 증가되는 현상이 c-di-GMP 를 합성한다고 알려진 GGDEF domain 에 의해 complementation 되는지 확인하고자 하였다. 그러기 위해서 먼저 full-length protein 을 encoding 하는 *gdpS* gene 을 pLI50 에 포함한 pKAS1, *gdpS* gene 의 N-terminal domain 을 encoding 하는 *gdpS* gene 이 pLI50 에 포함된 pKAS2, C-terminal domain 을 encoding 한 *gdpS* gene 을 pLI50 에 포함한 pKAS3 를 확립하였다. 이후 이들 plasmid 를 wild-type 또는 YL84 (Δ *gdpS*) strain 에 각각 complementation 시켰다. TSB (W/O)-0.5% glucose 배지에서 24h-incubation 후, biofilm assay 를 시행한 결과, YL84 (Δ *gdpS*) strain 에 full-length gene 을 complementation 시킨 YL84 (pKAS1)

strain 에서는 기존의 결과와 동일하게 wild-type 수준으로 biofilm 형성이 감소된 반면에, YL84 ($\Delta gdpS$) strain 에 *gdpS* gene 의 N-terminal 또는 C-terminal domain 을 complementation 시킨 YL84 (pKAS2) 그리고 YL84 (pKAS3) strain 의 biofilm 형성은 YL84 ($\Delta gdpS$) strain 의 biofilm 형성과 차이가 없었다 (Fig. 2B). 이러한 결과를 통해서 GdpS protein 의 N-terminus 혹은 GGDEF motif 가 있는 C-terminal domain 으로는 YL84 ($\Delta gdpS$) strain 을 complementation 시킬 수 없으며, 전체 *gdpS* gene 의 complementation 을 통해서만 complementation 되는 것을 알 수 있었다.

3. *gdpS* mutation 은 NaCl 과 glucose 존재유무에 따라 biofilm 형성에 상반된 영향을 미친다.

최근에 Holland 등은 (23) *S. epidermidis* 에서 *gdpS* mutant strain 을 BHI (Oxoid) 와 4% NaCl 이 첨가된 BHI 배지에 각각 24h-incubation 한 후, biofilm assay 를 실시한 결과, BHI 에서는 큰 차이가 없었지만 4% NaCl 을 첨가한 BHI 배지에서는 *gdpS* mutant 의 경우 biofilm 형성이 wild-type 에 비해 감소하였고, complemented strain 에서는 wild-type 에 비해 3 배 정도 증가하였음을 보고하였다. 또한, Shang 등은 (57) NCTC8325 에서 *gdpS* mutant 를 만들어서 BHI 또는 BHI 에 4% NaCl 이 첨가된 배지와 TSB (soybean-casein digest medium USP; Oxoid) 또는 4% NaCl 이 첨가된 TSB 배지에서 24h-incubation 한 후, biofilm assay 를 실시하였지만 *gdpS* mutant 와 wild-type 의 biofilm 형성은 동일하다고 보고하였다. 기존 보고자들의 서로 상이한 결과가 사용한 배지와 배지조성의 차이로 인한 것인지를 확인하기 위해서 이번 실험에서는 서로 다른 배지 즉, BHI 와 TSB 그리고 이들 배지에 glucose, NaCl 첨가 유무에 따라 *gdpS* gene 에 의한 biofilm 형성이 차이를 보이는 지 확인하였다. 본 연구에서는 이미 기본 배지로 사용한 0.5% glucose 를 넣은 TSB (W/O)-0.5% glucose, 배지 조성에 0.25% glucose 가 포함된 TSB (W) (Difco, Lot No. 211825), 4% NaCl 을 첨가한 TSB (W)-4% NaCl, 배지 조성에 0.2% glucose 가 포함된 BHI (Oxoid, Lot No. 408009) 그리고 BHI 에 4% NaCl 을 첨가한 BHI-4% NaCl 배지에서 biofilm

형성을 확인하였다. 그 결과 TSB (W/O)-0.5% glucose 에서는 YL84 ($\Delta gdpS$) strain 은 wild-type, 8325-4 strain 에 비해 biofilm 형성이 약 6 배 정도 증가하였다. 하지만, BHI-4% NaCl 을 첨가한 배지에서는 Holland 등의 (23) 보고와 동일하게 YL84 ($\Delta gdpS$) strain 의 biofilm 형성이 감소함을 확인하였으며, TSB (W)-4% NaCl 배지에서도 BHI-4% NaCl 배지에서 배양한 경우와 동일하게 YL84 ($\Delta gdpS$) strain 의 biofilm 형성이 감소하였다 (Fig. 3). 즉 *gdpS* mutant 는 0.5% glucose 가 있는 배지에서는 wild-type 에 비해서 biofilm 형성이 증가하였고, 4% NaCl 이 있는 배지에서는 이와 반대로 biofilm 형성이 억제되었다. NaCl 과 glucose 를 첨가하지 않은 TSB (W)와 BHI 에서는 YL84 ($\Delta gdpS$) strain 과 wild-type strain 모두 biofilm 이 형성되지 않았다. 이러한 결과는 배지내의 0.25% 이하의 glucose 농도에서는 GdpS 가 biofilm 형성에 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합해보면, *gdpS* gene 이 TSB 와 BHI 배지에 상관없이 배양 배지내의 4% NaCl 혹은 0.5% glucose 존재 유무에 따라 biofilm 형성에 있어 서로 반대의 결과를 유도하는 것으로 판단되었다. 이후, 본 실험에서는 TSB (W/O)-0.5% glucose 를 기본배지로 사용하여 *S. aureus* 에서 *gdpS* gene 이 biofilm 형성에 미치는 영향과 그 기전을 확인하고자 하였다.

4. 0.5% 이상 Glucose 농도에서는 농도에 관계없이, glucose 가 존재하는 경우 *gdpS* mutant 는 24h 배양 후, biofilm 형성이 증가된다.

본 연구에서는 서로 다른 environmental factor 에 따라 *gdpS* mutation 이 biofilm 형성에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. Chan 등은 (11) *S. aureus* 의 environmental stress 가 sigma factor B (*sigB*)에 의해 조절된다고 보고하였다. 본 실험에서 사용한 8325-4 strain 의 경우 *rsbU* gene 의 11bp deletion 으로 인해 *sigB* 에 이상이 있음이 알려져 있기 때문에 (29), sequencing 을 통해서 *rsbU* gene sequence 에 이상이 없고, *sigB* 에 의해 조절된다고 알려진 *asp23* gene expression 에 이상이 없음을 확인한 YL50 strain 을 8325-4 strain 과 함께 실험에 사용하였다 (20, 56). 이들 wild-type strains, *gdpS* mutants, complemented strains 을 glucose 농도를 0.5%에서 4%까지 2 fold 증가시켜 각각 넣은 서로

다른 glucose 농도의 TSB (W/O) 배지에서 4h-incubation 그리고 24h-incubation 후, 각각 biofilm assay 를 시행하였다. *sigB* 에 이상이 있는 8325-4 strain 의 YL84 ($\Delta gdpS$) strain 은, glucose 를 0.5%에서 4%까지 넣은 TSB (W/O) 배지에서 4h-incubation 시, glucose 를 넣지 않은 control 과 동일하게 biofilm 을 형성하지 않았다. 그러나 8325-4, wild-type 은 glucose 농도가 증가할수록 biofilm 형성이 감소하였으며, complemented strain 인 YL84 (pKAS1)은 glucose 가 존재하는 경우 농도에 관계없이 control 에 비해 biofilm 형성이 증가 되었으나 농도에 따른 변화는 없었다 (Fig. 4A). 그러나, 24h-incubation 후 실시한 biofilm assay 결과에서는 YL84 ($\Delta gdpS$)는 wild-type 과 complemented strain 인 YL84 (pKAS1)에 비해 2 배 이상 biofilm 을 더 많이 형성하였으며 glucose 농도에 따른 biofilm 형성의 차이점은 없었다 (Fig. 4B). *sigB* 가 intact 한 YL50 wild-type strain 과 YL81 ($\Delta gdpS$) mutant, complemented strain 인 YL81 (pKAS1)의 biofilm assay 결과 역시, 0.5%에서 4%까지 glucose 농도 하에서 8325-4 와 그 derivatives 와 동일한 biofilm 형성 결과를 확인하였다 (Fig. 4C and 4D). 또한, NaCl 과 ethanol 을 0.5%에서 4%까지 각각 넣은 서로 다른 농도의 TSB (W/O) 배지에서 wild-type, 8325-4 strain, YL84 ($\Delta gdpS$) mutant, complemented strain 인 YL84 (pKAS1) strain 간의 biofilm 형성 정도를 확인한 결과, control로서 NaCl, ethanol 을 넣지 않은 TSB (W/O) 배지에서 biofilm 형성과 차이가 없었다 (data not shown). YL50 strain 의 경우 wild-type, YL81 ($\Delta gdpS$), complemented strain 인 YL81 (pKAS1)의 NaCl, ethanol 농도를 달리한 TSB (W/O) 배지에서의 biofilm 형성 결과는, 8325-4 strains 의 경우와 역시 동일하게 strain 간의 차이가 없었다 (data not shown). 본 실험의 결과에서 *gdpS* gene 의 경우 *sigB* 이상 유무와 관계없이 그리고, 0.5% 이상 glucose 농도에서는 농도에 관계없이, 오직 glucose 존재 유무에 따라 biofilm 형성에 관여함을 알 수 있었다. 또한 *gdpS* gene mutation 은 log phase 인 4h 때는 biofilm 형성을 억제하며, stationary phase 인 24h 에 biofilm 형성을 증가시키는 것을 알 수 있었다.

5. *gdpS* gene 은 NaCl 을 넣지 않은 TSB (W/O)-0.5% glucose 배지에서 *ica* operon 을 통한 biofilm 형성에 관여하지 않는다.

S. aureus 의 *icaADBC* operon 은 Polysaccharide intracellular adhesion (PIA)를 encoding 하며, *S. aureus* 의 biofilm 형성에 PIA 가 기여를 한다고 잘 알려져 있다 (34). 따라서 *gdpS* mutant 에서 biofilm 형성이 증가하는 것이 PIA 생산과 관련이 있는 지를 확인하기 위해서, 8325-4, YL50, CM09 strains 에 각각 *gdpS* *icaADBC* double mutants 를 만들어서 TSB (W/O)-0.5% glucose 배지에서 배양 후, biofilm assay 를 시행하여 *gdpS* mutant 에서 증가된 biofilm 형성이 *ica* operon 과 관련되었는지 여부를 알아보고자 하였다. 그 결과, 8325-4 strain 의 *gdpS* *icaADBC* double mutant 인 YL440 strain 과, *sigB* activity 가 intact 한 YL50 또는 CM09 strains 의 *gdpS* *icaADBC* double mutant 인 YL478, YL474 strain 의 biofilm phenotype 은 모두 각각의 *gdpS* mutant phenotype 과 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 5). 이러한 결과는 TSB (W/O)-0.5% glucose 배지에서 배양 시 *gdpS* mutant 에서 biofilm 형성의 증가에 PIA 를 encoding 하고 있는 *icaADBC* operon 이 관여하지 않고, *sigB* 의 activity 와는 무관함을 시사하고 있다.

6. *gdpS* mutant 의 biofilm 형성 증가는 eDNAs 가 관여한다.

eDNAs 는 surface protein, PIA 와 더불어 biofilm 의 세포외기질을 형성하는 하나의 factor 로 알려졌다, 최근에 들어서 biofilm 형성이 eDNAs 의 양에 의존적으로 이루어진다는 일련의 보고들이 발표되었다 (36, 52). 본 실험에서는 *gdpS* mutant 에서 biofilm 형성이 wild-type 에 비해 증가하는 것이 protein 과 PIA 외의 다른 factor, 즉 eDNAs 와 관련되는 지를 확인하고자 biofilm detachment assay 를 시행하였다. TSB (W/O)-0.5% glucose 배지에서 하룻밤 배양 후, 형성된 mature biofilm 상태의 8325-4 strain 과 YL50 strain 에 proteinase K, DNase I, sodium meta-periodate (NaIO₃)를 각각 처리하고, 2h 동안 37°C에서 배양 한 후 세척하였다. 그 결과, 8325-4 와 YL50 strain 의 mature biofilm 에 proteinase K 와 NaIO₃ 를 처리한 군에서는 어떤 처리도 하지 않은 control 과 비교하여 큰 차이가 없었지만, 8325-4 strain 과 YL50 strain 모두 특이하게 DNase I 을 처리한 경우

gdpS mutants 에서는 biofilm 형성이 약 6 배 정도 감소하였다 (Fig. 6 A, B). 이 결과는 *gdpS* mutant 에서 biofilm 형성이 증가하는 현상이 eDNAs 와 관련된 것임을 강력히 시사한다. 이를 다시 확인하기 위해서 본 실험에서는 eDNAs marker 로서 *gyrA*, *fhuA*, *lysA*, *leuA* genes 을 이용하여 분비된 eDNAs 의 양을 real-time PCR 로 비교하였다 (52). Fig. 7 에서 볼 수 있듯이, YL84 ($\Delta gdpS$) 와 YL81 ($\Delta gdpS$) strain 에서 상대적인 eDNAs production ratio 가 wild-types 에 비해 약 3 배 이상 증가하였다. 또한, complemented strains 인 YL84 (pKAS1)와 YL81 (pKAS1) strain 의 eDNAs production ratio 는 wild-types 수준으로 감소하였다. 이 결과는 *gdpS* mutant 의 biofilm 형성이 주로 DNase I 처치에 의해 감소된 Fig. 6 의 결과와 일치하며, *gdpS* mutant 에서 biofilm 형성이 증가하는 이유는 *gdpS* mutant 는 wild-type 이나 complemented strain 에 비해 상대적으로 많은 양의 eDNAs 를 분비하기 때문임을 다시 확인할 수 있었다.

7. *gdpS* mutation 은 다양한 cell lysis-related genes 의 발현에 영향을 미친다.

Rice 등은 (52) 최근에 *cidA* gene 이 biofilm 발달 과정에서 cell lysis 와 DNA release 를 촉진한다고 보고하였다. 따라서, Fig. 7 의 결과처럼 *gdpS* mutants 에서 wild-types 이나 complemented strains 에 비해 상대적인 eDNAs 의 양이 증가하는 기전에 *cidA* 를 비롯하여 autolysis 를 조절 한다고 알려진 *cidR*, *gcp*, *sle1*, *lrgA*, *mgrA* 와 autolysin 을 encoding 하는 *atl*, *lytM*, *lytN* genes 이 관여 하는 지를 확인하고자, 정량적 RT-PCR 을 이용하여 이들 gene expression 을 서로 비교하였다. 그 결과, 8325-4 strain 의 경우, *gdpS* mutant 에서 autolysis positive regulators 인 *cidR*, *cidA*, *gcp*, *sle1* 의 expression 이 각각 1.7 배씩 증가하였다. Negative regulator 인 *lrgA* 와 *mgrA* 는 각각 28 배 감소하거나 1.5 배 증가하였다. 하지만, autolysin 을 encoding 하는 *atl*, *lytM*, *lytN* genes 의 expression 은 wild-type 이나 complemented strain 에 비해 큰 차이가 없었다 (Fig. 8A). 반면에 YL50 strain 의 경우, *gdpS* mutant 에서는 *atl*, *lytM*, *lytN* genes 의 expression 이 wild-type 에 비해 각각 1.8 배, 1.6 배, 그리고 2.5 배 증가하였으며, *cidA*, *gcp*, *sle1* 의 expression 도 각각 1.6 배, 8.4 배, 1.6 배 증가하였다. 또한, *lrgA* 와 *mgrA* 는 각각

3.4 배 감소하거나 1.2 배 증가하였다 (Fig. 8B). 위의 결과에서 보듯이 8325-4 와 YL50 strain 모두에서 *gdpS* mutation 에 의하여 *cidA* 와 *sle1* gene expression 은 증가하였고, *IrgA* 의 expression 은 감소하였다. 이들 중에서 autolysis positive regulator 이며 *IrgA* 의 counterpart 로 알려진 *cidA* 를 선택하여, *cidA* 가 *gdpS* mutant 에서 eDNAs release 증가에 관여하는 지 확인하기 위해서, $\Delta gdpS \Delta cidA$ double mutant 를 만들어 이들 2 strain 의 biofilm assay 를 시행하였다.

8. 8325-4 strain 에서 *gdpS* mutant 는 *cidA* 를 통해 biofilm 형성에 관여하지만, 다른 임상 strain 들에서는 관여하지 않는다.

cid operon 은 extracellular murein hydrolase activity 를 증가시키고, 특히 CidA protein 은 bacteriophage holin proteins 이 가진 일반적인 몇 가지 특징을 공유하고 있다 (51). *gdpS* mutation 이 *cidA* 를 통해 cell lysis 와 eDNAs 의 positive regulation 을 하고, 이를 통해 biofilm 형성에 관여함을 확인하기 위해서, 8325-4 strain 과 YL50 strain 의 *gdpS cidA* double mutant 를 각각 만들어서, biofilm assay 를 통해 그 phenotype 을 확인하였다. 그 결과, 8325-4 strain 의 YL171 ($\Delta gdpS \Delta cidA$)의 biofilm 형성은 YL161 ($\Delta cidA$) 그리고 wild-type 수준으로 biofilm 형성이 감소하였다 (Fig. 9A). 이러한 결과를 통해서, 8325-4 의 *gdpS* mutant 에서 biofilm 형성의 증가에 *cidA* 가 관여함을 알 수 있었다. 그러나, YL50 strain 의 YL173 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant 는 8325-4 strain 과는 다르게, YL81 ($\Delta gdpS$) strain 의 biofilm 형성과 차이가 없었다 (Fig. 9B). 이러한 8325-4 strain 과 YL50 strain 간의 *gdpS cidA* double mutant 의 서로 상이한 결과를 다른 clinical isolates 에서 확인하기 위해서, 5 clinical isolates (CM75, CM09, CM10, CM62, CM67)에서 *gdpS cidA* gene 을 double mutation 시킨 후, 이들 double mutants 의 biofilm 형성 여부를 확인하였다. 그 결과, 5 clinical isolates 의 *gdpS cidA* double mutant 는 각각의 *gdpS* mutant 의 biofilm 형성 정도와 차이가 없었다 (Fig. 9C). 이러한 결과를 통해서 8325-4 strain 의 경우, *gdpS* gene mutation 에 의한 biofilm 형성의 증가는 *cidA* gene 이 관련됨을 알 수 있었으며, YL50 strain 을 비롯한 6 clinical isolates 의 경우, *gdpS* gene

mutation 에 의한 biofilm 형성의 증가에 *cidA* gene 이 관여하지 않고 또 다른 알려지지 않은 기전을 통한 것임을 알 수 있었다.

9. 8325-4 strain에서는 *gdpS* 와 *cidA* double mutation 으로 인하여 eDNAs release 가 감소되고, YL50 strain 에서는 오히려 증가된다.

Fig. 9 의 결과에서, YL50 strain 의 YL173 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant 에서 증가된 biofilm 형성이 eDNAs 의 증가에 의한 것인 지를 확인하기 위해서, 8325-4 strain 과 YL50 strain 각각의 derivatives 의 eDNAs production ratio 를 real-time PCR 을 통해 확인하였다. 그 결과, 8325-4 strain 의 YL171 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant 에서는 eDNAs production ratio 가 wild-type 과 YL161 ($\Delta cidA$) mutant 수준으로 감소한 반면 (Fig. 10A), YL50 strain 의 YL173 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant 에서는 YL81 ($\Delta gdpS$) strain 보다 오히려 증가된 eDNAs production ratio 를 보였다 (Fig 10B). 이러한 결과를 통해서 8325-4 strain 의 경우, YL84 ($\Delta gdpS$) mutant 에 비해 YL171 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant 의 biofilm 이 감소하는 이유는 eDNAs release 의 감소 때문인 것으로 판단되었다. 그러나 YL50 strain 의 경우, YL173 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant 에서 YL81 ($\Delta gdpS$)와 비슷하게 biofilm 이 여전히 증가되는 것은 *cidA* gene 이 관여하지 않고 오히려 *gdpS* 와 *cidA* 의 double mutation 이 *cidA* gene 보다는 또 다른 lysis 에 관여되는 genes 을 통해서 eDNAs release 를 유발하는 것으로 생각되었다.

10. *gdpS* mutation 은 autolysis 를 증가시킨다.

본 실험에서는 autolysis assay 를 사용하여, 8325-4 와 YL50 strain 각각의 *gdpS* mutant, *cidA* mutant, *gdpS cidA* double mutant strain 간의 lysis 정도의 차이를 확인하였다. 8325-4 strain 은 오직 YL84 ($\Delta gdpS$) strain 에서 lysis 가 증가되었고, YL171 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant strain 과 wild-type 은 Triton X-100 에 의한 lysis 가 일어나지 않았다 (Fig. 11A). 반면에 YL50 strain 의 YL81 ($\Delta gdpS$)은 5h 까지는 autolysis 가 증가하는 양상을 보였지만, 그 이후의 시간에는 Triton X-100 에 의해서 lysis 가 감소하였다. 그러나, YL173 ($\Delta gdpS$

$\Delta cidA$) double mutant에서는 측정된 7h 시간까지 계속해서 Triton X-100에 의한 autolysis가 증가되었다 (Fig. 11B). 이러한 결과는 Fig. 9A와 Fig. 10A의 결과에서 확인하였듯이 8325-4 strain의 YL171 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant에서 biofilm 형성이 wild-type 수준으로 감소한 이유는, autolysis가 감소하여 eDNAs가 감소되기 때문임을 알 수 있었다. 반대로 YL50 strain의 경우, YL173 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant의 biofilm 형성이 wild-type에 비해서 증가한 이유는 Fig. 9B와 Fig. 10B의 결과에서 확인할 수 있듯이 YL173 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant의 경우 lysis가 증가되어 release되어 나오는 eDNAs 양이 증가되기 때문임을 다시 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 8325-4 strain과 YL50 strain 간의 *gdpS* mutant에 의해 유도되는 autolysis의 기작이 서로 다른 것임을 알 수 있었다.

11. 8325-4와 YL50 strain의 murein hydrolases profiles은 다르다.

Fig. 11의 결과에서 8325-4와 YL50 strain 간의 Triton X-100을 포함한 배지에서 autolysis 양상이 차이가 있었다. 따라서, 8325-4와 YL50 strain의 *gdpS* mutant가 서로 다른 murein hydrolase profiles을 가지고 있는지 zymogram을 통해서 murein hydrolases activity를 확인하였다. 그 결과, YL84 ($\Delta gdpS$) strain의 경우 wild-type, 8325-4 strain과 YL84 ($\Delta pKAS1$) complemented strain에 비해서 25~35kDa 크기의 murein hydrolases가 증가된 반면 (Fig. 12, lane 2), YL50 strain의 YL81 ($\Delta gdpS$) strain은 wild-type, YL50과 complemented strain인 YL81 ($pKAS1$)에 비해 주로 70~140kDa의 murein hydrolases가 증가되었다 (Fig. 12, lane 5). 또한, 8325-4 strain의 경우 YL161 ($\Delta cidA$) strain과 YL171 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant는 YL84 ($\Delta gdpS$) strain에서 증가된 murein hydrolases가 모두 감소하는 결과를 보였다 (Fig. 12, lane 7 and 8, respectively). YL50 strain의 경우 YL162 ($\Delta cidA$) strain은 YL81 ($\Delta gdpS$) strain에서 증가된 주요 murein hydrolases가 감소한 반면에, YL173 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant는 YL81 ($\Delta gdpS$) strain과 유사한 murein hydrolase activity를 보였다 (Fig. 12, lane 9 and 10, respectively). 이 결과를 통해서, 8325-4 strain과 YL50 strain의 *gdpS*

mutant 는 각각 서로 다른 murein hydrolases 가 cell wall lysis 에 관여하는 것을 알 수 있었다.

12. *gdpS* 와 *cidA* double mutation 으로 인한 biofilm 형성의 증가에 *sigB* 가 관여한다.

8325-4 와 YL50 strain 각각의 *gdpS cidA* double mutant 는 biofilm 형성 (Fig. 9), matrix-associated eDNAs 양 (Fig. 10) 그리고 Triton X-100-mediated autolysis (Fig. 11)에서 상이한 결과를 보였다. 이러한 결과가 8325-4 strain 의 알려진 *rsbU*, *tcaR* gene 의 기능의 defect 와 관련이 있는 지 확인하고자 하였다 (29, 38). Clinical isolates 중 *rsbU*, *tcaR* gene 이 intact 한 YL50 strain 과 더불어 CM75, CM09, CM10 strain 을 이용하여 각각의 *gdpS cidA sigB* triple mutants 를 만들어 biofilm 형성을 확인하였다. Fig. 13 에서 볼 수 있듯이, CM75 strain 의 YL239 ($\Delta gdpS \Delta cidA \Delta sigB$) triple mutant 는 YL222 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant 에 비해 biofilm 형성이 현저히 감소하였다 (Fig. 13A). 반면에 YL50 strain 의 YL244 ($\Delta gdpS \Delta cidA \Delta sigB$) triple mutant 는 YL173 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant 에 비해서 biofilm 형성의 차이가 없었다 (Fig. 13B). 다른 clinical isolates 의 *gdpS cidA sigB* triple mutants 의 경우도 YL50 strain 의 YL244 ($\Delta gdpS \Delta cidA \Delta sigB$) triple mutant 와 동일한 결과를 확인 할 수 있었다 (data not shown). 이러한 결과를 통해서, CM75 strain 에서 *gdpS cidA* double mutation 에 의해 증가되는 biofilm 형성은 *sigB* gene 이 관련되어 있음을 알 수 있었다. 그러나, YL50 strain 과 다른 clinical isolates 의 *gdpS cidA sigB* triple mutants 의 biofilm 형성이 각각 *gdpS cidA* double mutants 의 biofilm 형성과 차이를 보이지 않는 것은 *sigB* mutation 의 strain-dependent effect 때문임을 알 수 있었다. 또한, 8325-4 strain 에 이상이 있는 *tcaR* gene 이 8325-4 와 YL50 strain 의 *gdpS cidA* double mutant 의 biofilm 형성의 서로 다른 결과와 관련이 있는 지를 확인하기 위해서, YL50 을 비롯한 CM75, CM09, CM10 clinical isolates 의 *gdpS cidA* double mutants 에 *tcaR* gene 을 각각 deletion 시켜 만든 *gdpS cidA tcaR* triple mutant 의 biofilm 형성은 각각의 *gdpS cidA* double

mutant 와 차이가 없었다 (data not shown). 이러한 결과를 통해서 8325-4 strain 의 YL171 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant 의 biofilm 형성이 YL50 strain 의 YL173 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) double mutant 의 biofilm 형성의 감소에 *tcaR* gene 이 관련이 없음을 확인 할 수 있었다.

13. YL50 strain 의 *gdpS* 와 *cidA* double mutant 에서 *atl* 의 expression 이 증가한다.

Atl 은 *S. aureus* 에서 알려진 bifunctional peptidoglycan hydrolase 로서 138 kDa 의 크기를 가지고 있으며, cell wall 합성 과정에서 51 kDa 의 glucosaminidase 와 62 kDa 의 amidase 를 생산한다고 알려졌다 (60). Fig. 12 의 zymogram 결과에서 YL81 ($\Delta gdpS$) strain 에서 증가된 것으로 추정되는 *atl* genes expression 이 8325-4 와 YL50 strain 각각의 *gdpS cidA* double mutant 에서 차이가 나는 지를 정량적 RT-PCR 로 확인하였다. 그 결과, 8325-4 strain 의 경우, wild-type strain 과 YL84 ($\Delta gdpS$), YL171 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) strain 간의 *atl* gene expression 은 차이를 보이지 않았다 (Fig. 14A). 반면에, YL50 strain 의 경우, YL81 ($\Delta gdpS$) 그리고 YL173 ($\Delta gdpS \Delta cidA$) strain 에서 wild-type strain 에 비해 *atl* gene expression 이 증가하였다 (Fig. 14B). 이러한 결과를 바탕으로 본 실험에서는 8325-4 strain 을 제외한 6 clinical strains 의 *gdpS* gene 의 biofilm 작용 기전을 확인하기 위해서 major autolysin 인 *atl* gene 을 deletion 시킨 mutant 를 만들어 biofilm 관련여부를 확인하고자 하였다.

14. 임상 분리주인 CM01과 CM09 strain의 *gdpS* mutant는 *atl*을 통해서 biofilm 형성에 관여한다.

gdpS mutant 에서 biofilm 이 증가되는 현상이 *atl* gene 을 통한 기작에 의해 관여되는 지를 알아보기 위해서 CM01 과 CM09 strain 을 이용하여 각각 YL485 ($\Delta gdpS \Delta atl$) double mutant 와 YL473 ($\Delta gdpS \Delta atl$) double mutant 를 만들었다. TSB (W/O)-0.5% glucose 배지에서 24h-incubation 후 biofilm assay 를 시행한 결과, 두 strains 모두의 $\Delta gdpS \Delta atl$ double mutants biofilm 형성은 $\Delta gdpS$ mutants 와 비교하여 급격하게 감소되었다 (Fig. 15). 이러한 결과는

CM01 과 CM09 strain 의 *gdpS* mutation 에 의한 biofilm 형성의 증가에 *atl* 이 관여하는 것을 알 수 있었다.

IV. 고찰

c-di-GMP는 secondary messenger로서 그람 음성세균의 생활사를 motile에서 sessile 상태로 전환 시켜주는 분자로 알려졌다. c-di-GMP의 metabolism이나 기능 및 역할에 대한 연구는 주로 *P. aeruginosa*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*와 같은 그람 음성세균에서 이루어졌고 (8, 41, 64), biofilm 형성과 exopolysaccharide 생산 등은 촉진하는 반면, virulence나 motility 등은 억제한다고 보고되었다 (54). c-di-GMP 분자는 GGDEF (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe) conserved domain을 지닌 효소인 DGC에 의해 합성되며, EAL (Glu-Ala-Leu) conserved domain이 있는 PDE 단백질에 의해 분해된다.

그람 양성세균에서는 현재까지 c-di-GMP의 역할에 대한 연구가 그람 음성세균에 비해 상대적으로 많이 이루어지지 않았다. 그람 양성세균인 *Staphylococci*는 genome 상에 DGC 활성이 예상되는 GGDEF domain containing protein (GdpS, SA0701 in N315 genome)이 1개 존재한다. Holland 등의 (23) 보고에 의하면 GdpS는 NaCl 존재 하에서 *icaADBC* operon을 upregulation하여 biofilm 형성을 증가시킨다고 보고하였다. 본 연구에서도 NaCl 존재 하에서는 Holland 등의 보고와 동일하게 *gdpS* mutant에서 biofilm 형성이 감소함을 보였으나, 흥미롭게도 NaCl이 없는 0.5% glucose가 존재하는 배지에서는 *gdpS* mutation을 통해 *S. aureus*에서 biofilm 형성이 증가하는 상반된 결과를 얻었다 (Fig. 3). 본 연구의 결과와 Holland 등의 보고를 종합해보면, GdpS는 NaCl이 있는 조건에서 biofilm 형성을 촉진하는 반면, NaCl이 없고 0.5% glucose가 존재하는 조건에서는 오히려 biofilm 형성을 억제하고, GdpS가 NaCl을 포함한 다양한 environmental factors에 따라 biofilm 형성에 관여할 수 있음을 보여준다고 판단된다.

Shang 등은 NCTC8325 strain에 TSB나 BHI 배지 또는 이들 배지에 4% NaCl을 첨가하여 biofilm assay로 확인한 결과, NaCl의 첨가여부와 관계없이 GdpS가 biofilm 형성에 차이가 없다고 보고하였다 (57). 본 연구에서는, Shang 등의 보고처럼 0.25% glucose가 기본적으로 포함된 TSB (W) 또는 0.2% glucose가 기본으로 포함된 BHI 배지에서의 biofilm assay는 차이를 보이지 않았지만, 4%

NaCl이 첨가된 동일한 배지 조건에서 *gdpS* mutant의 biofilm 형성은 감소되었다 (Fig. 3). 4% NaCl 하에서 biofilm 형성의 차이점을 보이는 것은 본 연구에서 사용된 8325-4 strain은 Shang 등이 사용한 NCTC8325 strain과는 달리 NCTC8325 strain의 prophages가 cured된 strain이므로 prophages의 유무로 인해 NaCl이 없는 0.5% glucose 배지에서 이와 같은 차이를 보일 수도 있을 것이라고 추정된다. 또한, NaCl이 없는 0.5% glucose 존재 하에서 실험에 사용된 7 clinical isolates 모두 *gdpS* mutation에 의해 biofilm 형성을 증가시키는 것으로 보아 (Fig. 1), GdpS가 MRSA나 MSSA에 관계없이 *S. aureus*의 biofilm 형성에 관여한다고 판단된다.

NaCl을 첨가하지 않은 0.25% glucose가 기본으로 포함된 TSB 배지나 0.2% glucose가 기본으로 포함된 BHI 배지에서는 8325-4 strain의 wild-type과 *gdpS* mutant간의 biofilm 형성에 차이가 없었고 (Fig. 3), NaCl이 없이 glucose 농도를 0.5%에서 4%까지 2배씩 증가시켜 넣은 서로 다른 glucose 농도의 배지에서 biofilm assay로 확인한 결과, 0.5% 이상의 glucose 농도에서 8325-4 strain과 YL50 strain 모두 *gdpS* mutants의 biofilm 형성이 증가하였다 (Fig. 4). 이 결과는 GdpS가 NaCl이 없는 조건에서는 기본적인 0.25% glucose를 포함한 TSB 배지에서 biofilm 형성의 차이가 없었던 것으로 미루어 보아 적어도 0.5% 이상의 glucose가 있어야 GdpS의 biofilm 형성에 관여하며, 0.5% 이상의 glucose 농도 하에서는 glucose 농도와는 무관하게 biofilm 형성에 관여하고 있음을 보여준다. 또한, Fig. 4에서 보이는 바와 같이 *gdpS* mutants는 4h-incubation에서는 biofilm 형성이 억제되는 반면에, 24h-incubation에서는 biofilm 형성이 증가되는 결과를 보였다. 이는 GdpS가 log phase인 4h때는 biofilm 형성을 증가시키며, stationary phase인 24h때는 biofilm 형성을 억제하는 growth phase-dependent manner로 biofilm 형성에 관여한다고 판단된다. 이상의 결과를 통해 GdpS는 0.5% glucose 농도 이상에서는 glucose 농도와 무관하게 그리고, growth phase에 따라 biofilm 형성에 영향을 미친다고 판단된다. 또한, glucose 존재 하에서 GdpS가 biofilm 형성에 미치는 영향은 *rsbU* gene의 11 bp가 결손되어 SigB activity에 결함이 있는 8325-4 strain이나 *rsbU* gene이 온전한 YL50 strain 모두에서 동일하게 관찰되어서 GdpS는 SigB activity와는 무관하게 *S. aureus*의 biofilm 형성에 관여하는 것으

로 판단된다.

Staphylococci에서는 PIA를 encoding하는 *icaADBC* operon이 biofilm 형성에 관여한다고 알려져 있다 (6). Holland 등은 (23) GdpS가 *icaADBC* operon의 upregulation을 통해 biofilm 형성에 관여한다고 보고하였다. 본 연구의 NaCl이 없는 0.5% glucose 배지에서 *gdpS* mutant의 biofilm 형성이 증가된 것이 *icaADBC* operon을 통한 것인지를 확인하기 위해서, 8325-4, YL50, CM09 strains에서 *gdpS icaADBC* double mutation 시켜서 0.5% glucose 배지 하에서 biofilm 형성을 확인한 결과, 실험에 사용한 8325-4 strain을 포함한 3 strains의 *gdpS icaADBC* double mutants와 *gdpS* mutants간의 biofilm 형성은 차이가 없었다 (Fig. 5). 이 결과는 GdpS가 NaCl이 없는 0.5% glucose 존재 하에서는 *icaADBC* operon이 아닌 다른 기전을 통해서 biofilm 형성에 관여하고 있음을 의미한다.

eDNAs는 *P. aeruginosa*와 같은 그람 음성세균의 biofilm matrix의 주요한 구성 성분이다 (1, 59, 68). Streptococci와 같은 그람 양성세균에도 eDNAs는 biofilm matrix의 주요 구성성분으로 알려졌으며, 초기 biofilm 형성단계인 adherence에 관여한다 (40, 46, 47). 본 연구에서는 0.5% glucose 존재 하에서 *gdpS* mutants에서 증가된 biofilm의 matrix의 주요한 구성성분 여부를 확인하기 위해서, 8325-4와 YL50 strains의 *gdpS* mutants를 대상으로 biofilm detachment assay를 실시하였다. 그 결과, proteinase K와 NaIO₃를 처리한 경우, *gdpS* mutants의 biofilm 형성은 변화가 없었지만, DNase I을 처리한 경우 *gdpS* mutants의 biofilm 형성이 특이적으로 감소하였다 (Fig. 6). 이 결과는 0.5% glucose 존재 하에서 *gdpS* mutants의 biofilm 형성이 증가되는 이유가 eDNAs와 관련된 기전을 통해서임을 보여주는 것이라고 판단된다. 또한, 정량적 RT-PCR을 이용하여 *gyrA*, *fhuA*, *lysA*, *leuA* genes의 expression을 통해 eDNAs production ratio를 서로 비교한 결과 0.5% glucose 존재 하에서 *gdpS* mutants의 상대적 eDNAs 생산이 wild-types 이나 complemented strains에 비해 증가되었고, 이 결과는 Fig. 6의 결과를 뒷받침 할 수 있었다 (Fig. 7). 다음 단계로, *gdpS* mutant에서 상대적인 eDNAs의 양이 증가하는 기전에 autolysis와 관련된 어떠한 genes이 관여하는 지 여부를 8325-4와 YL50 strain과 그 *gdpS* mutants를 0.5% glucose 존재 하에서 하룻 밤

배양하여, 정량적 RT-PCR로 *cidR*, *cidA*, *gcp*, *sle1*, *lrgA*, *mgrA*, *atl*, *lytM*, *lytN* 등의 expression을 확인하였다. 그 결과, 8325-4와 YL50 strain의 *gdpS* mutation에 의하여 *cidA*, *gcp*, *sle1*의 genes expression은 증가한 반면, *lrgA* expression은 감소하였다 (Fig. 8). 이러한 결과는 *gdpS* gene이 다양한 lysis-related gene과 관련이 있음을 알 수 있었다.

Rice 등은 (52) *S. aureus*에서 *cidA* mutation에 의해 eDNAs release가 감소되며, 이를 통해 biofilm 형성이 감소된다고 보고하였다. 이 보고를 바탕으로 우선적으로 *cidA*를 선택하여 8325-4, YL50, CM75, CM62, CM67, CM09, CM10 총 7 strains을 대상으로 *gdpS*와 *cidA*를 double mutation을 시켜 이들 double mutants의 biofilm 형성을 확인하였다. 그 결과, 흥미롭게도 8325-4 strain의 경우에는 *gdpS cidA* double mutant는 *cidA* mutant와 wild-type 수준으로 biofilm 형성이 감소한 반면에, YL50을 비롯한 clinical isolates의 경우에는 *gdpS* mutant의 biofilm 형성과 차이가 없었다 (Fig. 9). 또한, 8325-4 strain과 YL50을 비롯한 clinical isolate의 *gdpS cidA* double mutants의 biofilm assay의 차이가 eDNAs의 증가에 의한 것인지를 확인하기 위해서, 0.5% glucose 존재 하에서 *gyrA*, *fhuA*, *lysA*, *leuA* genes의 eDNAs production ratio를 8325-4와 YL50 strain과 그 *gdpS cidA* double mutant를 대상으로 정량적 RT-PCR로 확인한 결과, 8325-4 strain의 *gdpS cidA* double mutant는 wild-type 수준으로 eDNAs 생산이 감소한 반면에, YL50 strain의 *gdpS cidA* double mutant는 *gdpS* mutant보다 오히려 증가된 eDNAs 생산을 보였다 (Fig. 10). 이상의 결과를 통해 0.5% glucose 존재 하에서, 8325-4 strain의 경우 *gdpS* mutation에 의한 biofilm 형성의 증가에는 *cidA* gene이 관련되고, YL50 strain을 비롯한 clinical isolates의 경우 *gdpS* mutation에 의한 biofilm 형성의 증가에 *cidA* gene이 관여하지 않고, *cidA*가 아닌 또 다른 lysis 기전을 통해서 biofilm 형성에 관여할 것이라고 생각되었다.

*S. aureus*의 8325-4 strain은 SigB activity를 조절하는 gene인 *rsbU*의 11 bp가 deletion된 laboratory strain으로 잘 알려져 있다 (29). 따라서, 8325-4 strain과 YL50을 포함한 clinical isolates의 *gdpS cidA* double mutants의 biofilm 형성이 차이가 나는 이유가 SigB activity 차이 때문인지를 확인하고자, YL50, CM75, CM09,

CM10 strains을 대상으로 *gdpS cidA sigB* triple mutant를 만들어서 biofilm phenotype을 확인한 결과, CM75 strain의 triple mutant에서 유일하게 biofilm 형성이 급격히 감소되었다 (Fig. 13). 이 결과는 8325-4 strain의 *gdpS* mutant는 CidA를 통해 eDNAs 유출이 증가하고, 이를 통한 biofilm 형성의 증가에는 SigB activity의 결손이 이유임을 알 수 있었다. 그리고, CM75 strain의 *gdpS cidA sigB* triple mutant에서만 biofilm 형성이 감소되는 것으로 보아 8325-4 strain과 CM75 strain은 서로 유사한 genetic background를 갖는 것으로 생각된다.

AtI은 staphylococci에서 가장 잘 알려진 murein hydrolase로서, amidase domain과 glucosaminidase domain을 가지고 있는 138 kDa의 bifunctional protein이고, cell wall 합성 과정 중에 51 kDa의 glucosaminidase와 62 kDa의 amidase로 나누어진다 (60). Zymogram 분석을 통해 YL50 strain의 *gdpS* mutant에서는 8325-4 strain의 *gdpS* mutant와는 다르게 100 kDa 이상의 분자량이 큰 murein hydrolases가 증가되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 12). 분자량이 크고 major autolysin인 *atl*이 *gdpS*와 관련이 있는 지 확인하기 위해서, 정량적 RT-PCR을 이용하여 8325-4 strain과 YL50 strain의 *gdpS* mutants와 *gdpS cidA* double mutants에서 *atl*의 expression을 확인하였다. 그 결과, 8325-4 strain의 *gdpS cidA* double mutant의 *atl* expression은 wild-type과 차이가 없었지만, YL50 strain의 *gdpS cidA* double mutant의 *atl* expression은 wild-type에 비해 증가하였다 (Fig. 14). 8325-4 strain과는 다르게 YL50 strain을 비롯한 다른 clinical isolates의 *gdpS* mutant에서 cell lysis가 증가하는 이유가 *atl*에 의한 것인 지를 확인하기 위해서, *gdpS cidA* double mutant에서 여전히 biofilm 형성이 증가하는 CM09 strain을 대상으로 *gdpS atl* double mutation을 시켜 biofilm assay로 확인한 결과, CM09 strain의 *gdpS atl* double mutant에서 *gdpS* mutant에 비해 biofilm 형성이 급격히 감소되었음을 확인하였다. 이러한 CM09 strain의 *gdpS atl* double mutant에서의 동일한 결과를 CM01 strain의 double mutant에서 역시 확인할 수 있었다 (Fig. 15). 이상의 결과는, 0.5% glucose 존재 하에서 8325-4 strain을 제외한 CM01, CM09 clinical strain 뿐만 아니라, 나머지 실제 대부분의 clinical isolates에서도 GdpS가 *atl*과 관련될 수 있음을 예상할 수 있었다. 그러나 본 연구결과는 8325-4 strain의

경우, *gdpS* mutant에서의 biofilm 형성의 증가가 이미 확인된 CidA를 통한 eDNAs의 증가 때문인지 아니면 CidA와 더불어 *atl*에 의한 lysis 증가가 관여하는 지를 배재 할 수 없다. 따라서, 앞으로의 연구는 8325-4와 CM75 strain의 *gdpS atl* double mutants를 만들어, biofilm assay를 통해 GdpS가 *atl*을 통해 biofilm 형성에 관계가 있는 지를 확인 할 필요가 있다고 생각된다. 또한, 차후 실험에서는 *gdpS* mutants에서 8325-4나 YL50 strain에 상관없이 expression이 증가된 *gcp*, *sle10*이나 expression이 감소된 *lrgA* genes이 GdpS의 biofilm 형성에 관여하는 지 여부를 확인해야 될 필요가 있을 것으로 생각된다.

Holland 등은 (23) NaCl 존재 하에서 GdpS가 c-di-GMP 생산과는 무관하게 biofilm 형성에 관여한다고 보고하였다. 하지만, 본 연구에서는 glucose 존재하의 biofilm 상태에서 8325-4 strain의 nucleotide extraction을 통해 c-di-GMP 생산을 HPLC로 확인한 결과, *gdpS* mutant에서 wild-type이나 complemented strain에 비해 c-di-GMP 생산이 감소하였음을 preliminary 실험을 통해 확인하였다 (data not shown). 이렇듯 본 연구의 예비실험 결과와 Holland 등의 결과의 차이를 보이는 원인으로 다음과 같은 두 가지 가능성을 고려해 볼 수 있다. 첫 번째는 0.5% glucose 존재 하에서 GdpS가 c-di-GMP를 생산해내는 DGC로서 function을 하는 반면에, NaCl 존재 하에서는 DGC로서의 function을 하지 못해서 c-di-GMP를 생산하지 못할 가능성이 있다. 두 번째는 배양 배지 내의 NaCl 존재 여부와 관계없이 GdpS가 DGC로서의 function을 해서 c-di-GMP를 합성한다면, 본 연구에서 사용한 배양 조건에서는 *gdpS*가 c-di-GMP를 통해서 autolysis에 관련된 *cidA*나 *atl*의 조절을 통해 biofilm 형성에 관여할 수 있고, NaCl 존재 하에서는 Holland 등의 보고에서 diguanylate cyclase activity assay를 통해 GTPase activity가 detection된 것으로 보아, 많은 그람 음성세균들에서 보고된 것처럼 micromolar 미만 농도의 (58) c-di-GMP가 생산되어서 그들의 방법으로 c-di-GMP를 detection 하지 못했을 가능성이 있을 수 있다. 따라서, 앞으로의 연구는 기존의 방법보다 예민도가 높은 c-di-GMP 측정법을 사용하여 *S. aureus*의 GdpS가 DGC로서의 활성이 있는 지 확인하고, 실제 *gdpS* mutant에서 c-di-GMP 생산의 감소 여부를 증명하는 것이 필요하다고 생각된다.

Table 1. Strains and plasmids

Strain or plasmid	Description	Source or reference
<i>S. aureus</i> strains		
8325-4	Prophage-free laboratory strain	J. landolo
RN4220	8325-4r ⁻ (restriction deficient)	
YL75	8325-4 (pLI50)	This study
YL429	8325-4 (pKAS1)	This study
YL84	8325-4 Δ <i>gdpS</i> (pLI50)	This study
YL85	8325-4 Δ <i>gdpS</i> (pKAS1)	This study
YL76	YL50 (pLI50)	This study
YL81	YL50 Δ <i>gdpS</i> (pLI50)	This study
YL82	YL50 Δ <i>gdpS</i> (pKAS1)	This study
YL124	CM75 (pLI50)	This study
YL198	CM75 Δ <i>gdpS</i> (pLI50)	This study
YL214	CM75 Δ <i>gdpS</i> (pKAS1)	This study
YL125	CM01 (pLI50)	This study
YL227	CM01 Δ <i>gdpS</i> (pLI50)	This study
YL228	CM01 Δ <i>gdpS</i> (pKAS1)	This study
YL69	CM09 (pLI50)	This study
YL194	CM09 Δ <i>gdpS</i> (pLI50)	This study
YL224	CM09 Δ <i>gdpS</i> (pKAS1)	This study
YL70	CM10 (pLI50)	This study
YL195	CM10 Δ <i>gdpS</i> (pLI50)	This study
YL212	CM10 Δ <i>gdpS</i> (pKAS1)	This study
YL98	CM62 (pLI50)	This study
YL196	CM62 Δ <i>gdpS</i> (pLI50)	This study

YL213	CM62 $\Delta gdpS$ (pKAS1)	This study
YL112	CM67 (pLI50)	This study
YL113	CM67 $\Delta gdpS$ (pLI50)	This study
YL114	CM67 $\Delta gdpS$ (pKAS1)	This study
YL241	8325-4 $\Delta icaADBC$ (pLI50)	This study
YL440	8325-4 $\Delta gdpS \Delta icaADBC$ (pLI50)	This study
YL478	YL50 $\Delta gdpS \Delta icaADBC$ (pLI50)	This study
YL474	CM09 $\Delta gdpS \Delta icaADBC$ (pLI50)	This study
YL161	8325-4 $\Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL171	8325-4 $\Delta gdpS \Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL162	YL50 $\Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL173	YL50 $\Delta gdpS \Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL188	CM75 $\Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL222	CM75 $\Delta gdpS \Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL229	CM01 $\Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL186	CM09 $\Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL221	CM09 $\Delta gdpS \Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL187	CM10 $\Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL236	CM10 $\Delta gdpS \Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL197	CM62 $\Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL223	CM62 $\Delta gdpS \Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL166	CM67 $\Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL170	CM67 $\Delta gdpS \Delta cidA$ (pLI50)	This study
YL244	YL50 $\Delta gdpS \Delta cidA \Delta sigB$ (pLI50)	This study
YL239	CM75 $\Delta gdpS \Delta cidA \Delta sigB$ (pLI50)	This study
YL485	CM01 $\Delta gdpS \Delta atl$ (pLI50)	This study
YL473	CM09 $\Delta gdpS \Delta atl$ (pLI50)	This study

E. coli strain

DH5 α	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	NEB
--------------	---	-----

Plasmids

pGEM-T Easy	Cloning vector	Promega
pKOR1	<i>E. coli-S. aureus</i> thermosensitive shuttle vector for allele replacement; Ap ^r (<i>E. coli</i>) Cm ^r (<i>Staphylococcus</i>)	(5)
pLI50	<i>E. coli-S. aureus</i> shuttle cloning vector	(23)
pKAS1	~2kb fragment containing <i>gdpS</i> in pLI50	This study
pKAS2	~1.3kb fragment containing <i>gdpS</i> N-terminal domain in pLI50	This study
pKAS3	~1.4kb fragment containing <i>gdpS</i> C-terminal domain in pLI50	This study
pGdpS	pKOR1 with deleted <i>gdpS</i> ORF in RN4220	This study
pIcaADBC	pKOR1 with deleted <i>icaADBC</i> ORF in RN4220	This study
pCidA	pKOR1 with deleted <i>cidA</i> ORF in RN4220	This study
pAtl	pKOR1 with deleted <i>atl</i> ORF in RN4220	This study
pSigB	pKOR1 with deleted <i>sigB</i> ORF in RN4220	This study

Table 2. Oligonucleotide primers in this study

Name of gene (use)	Primer name	Sequence (5'-3')
<i>16S</i> rRNA (Real time-PCR)	16S rRNA_QT_F	CACGTGGATAACCTACCTATAAGACTG
	16S rRNA_QT_R	GATCCATCTATAAGTGACAGCAAGAC
<i>gdpS</i> (Real time-PCR)	<i>gdpS</i> _QT_F	ATTCGTTTCGGGTGTTGAAAA
	<i>gdpS</i> _QT_R	TACGCTGTGATTTTGGATCG
<i>cidR</i> (Real time-PCR)	<i>cidA</i> _QT_F	TGGTGCATTCCATCAACAAT
	<i>cidA</i> _QT_R	ATTTTGCAGATCGATGCTCT
<i>cidA</i> (Real time-PCR)	<i>cidA</i> _QT_F	GGGTAGAAGACGGTGCAAAC
	<i>cidA</i> _QT_R	TTTAGCGTAATTTTCGGAAGCA
<i>gcp</i> (Real time-PCR)	<i>gcp</i> _QT_F	GTGCAATTAGCGGGAATGTT
	<i>gcp</i> _QT_R	CTCTAGGGGATGCCGATGTA
<i>sle1</i> (Real time-PCR)	<i>sle1</i> _QT_F	CAAGTAACGCTGCGAGCAAT
	<i>sle1</i> _QT_R	TGTTGCAGATCCTGAGTTTCG
<i>lrgA</i> (Real time-PCR)	<i>lrgA</i> _QT_F	CCAGCACACTTTTTTTCACC
	<i>lrgA</i> _QT_R	GGTGCTTGGCTAATGACACC
<i>mgrA</i> (Real time-PCR)	<i>mgrA</i> _QT_F	GCTGAAGCGACTTTGTGTCAGA
	<i>mgrA</i> _QT_R	GGGATGAATCTCCTGTAAACG
<i>atl</i> (Real time-PCR)	<i>atl</i> _QT_F	ATAAAGCCGCAGCACCTAAA
	<i>atl</i> _QT_R	ACCTACGCCGTTACGGTATG
<i>lytM</i> (Real time-PCR)	<i>lytM</i> _QT_F	ACATTTACAATGGCGCATCA
	<i>lytM</i> _QT_R	TGCGTATGTCCTTGAGCATC
<i>lytN</i> (Real time-PCR)	<i>lytN</i> _QT_F	TGGGTATGTCGAACAAAGCA
	<i>lytN</i> _QT_R	TTTCCGTTTCAAATTGCTGA
<i>gyrA</i> (eDNA)	<i>gyrA</i> _QT_F	GCCGTCAGTCTTACCTGCTC
	<i>gyrA</i> _QT_R	AATAACGACACGCACACCAG

<i>fhuA</i> (eDNA)	fhuA_QT_F	ATGAATCGTTTGCATGGACA
	fhuA_QT_R	GTAACCTCCATTGCCCAATC
<i>lysA</i> (eDNA)	lysA_QT_F	AAATGGCGAATTAACAATGGATGG
	lysA_QT_R	TACCATGGAAATGGATGCGA
<i>leuA</i> (eDNA)	leuA_QT_F	TTTTGATACGACACTAAGAGACGG
	leuA_QT_R	GCGTATGTGACATGTTCTTTAATAG
<i>gdpS</i> (deletion mutant)	attB1_gdpS_F	GGGG <u>ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> CCCACAAATCCACATGCTAC
	gdpS_sacII_R	GGACCT <i>CCGCGG</i> CAACGACAAAAGCTGTTAAT
	attB2_gdpS_R	GGGG <u>ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> TGGGAAGAACAATGCAATAA
	gdpS_sacII_F	GGACCT <i>CCGCGG</i> GTCTGAATCGACTCCTTTA
<i>icaADBC</i> (deletion mutant)	attB1_icaADBC_F	GGGG <u>ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> CCAAATTTTTGCGAAAAGGA
	icaADBC_sacII_R	GGACCT <i>CCGCGG</i> TTCCTTTACCTACCTTTCG
	attB2_icaADBC_R	GGGG <u>ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> GCAACGCACAAAGCATTAAA
	icaADBC_sacII_F	GGACCT <i>CCGCGG</i> TTATTAAGCTATGTTAAAA
<i>cidA</i> (deletion mutant)	attB1_cidA_F	GGGG <u>ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> GTTTCTTGGAATGCTTTCGT
	cidA_sacII_R	GGACCT <i>CCGCGG</i> TTACGTGCAAGCCTTATTA
	attB2_cidA_R	GGGG <u>ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> GGCATGACTAATGCTTCCAA
	cidA_sacII_F	GGACCT <i>CCGCGG</i> GGGCGCCATCCCTTTCTAA
<i>atl</i> (deletion mutant)	attB1_atl_F	GGGG <u>ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> GACAACGCACGGATATCACA
	atl_sacII_R	GGACCT <i>CCGCGG</i> GCAACATGAACATAGGAT

	attB2_atl_R	GGGG <u>ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> CGTCCCTGAGGAAAGTGAAA
	atl_sacII_F	GGACCT <i>CCGCGG</i> TCTATTTATTACTCCTAAC
<i>sigB</i> (deletion mutant)	attB1_sigB_F	GGGG <u>ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> GTCTTTTTCTTTTGTTTAAA
	sigB_sacII_R	GGACCT <i>CCGCGG</i> AATTTGTTTATTAATGATAC
	attB2_sigB_R	GGGG <u>ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> CTTAATATAGAAACAACCAC
	sigB_sacII_F	GGACCT <i>CCGCGG</i> TATTTTCGCACCTGCTCTTT

The attB1 or attB2 site is underlined and the *italic* (*CCGCGG*) indicates SacII digestion site

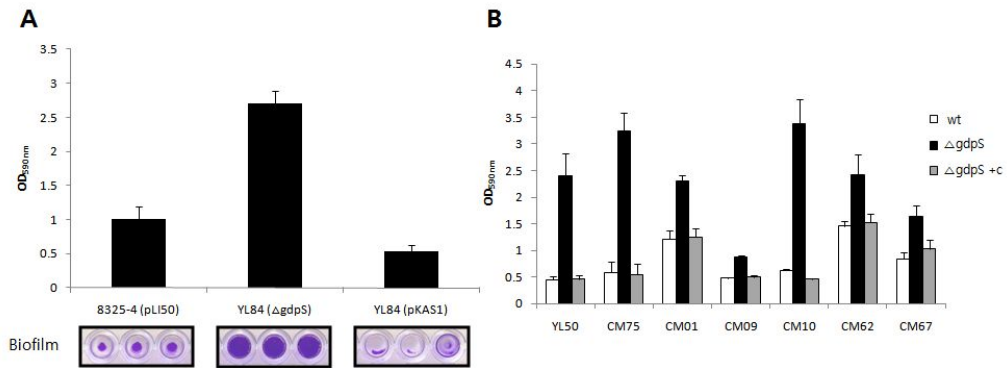


Fig. 1. The effect of the *gdpS* mutation on biofilm formation in 8325-4 (A) and seven clinical strains (B). (A) 8325-4 and its derivative strains were grown in TSB (W/O)-0.5% glucose in 96-well plates for 24h and stained with crystal violet. Biofilm formation was quantified by measuring optical density at 590 nm. Biofilm images are shown under each graph. pLI50, a vector control; Δ gdpS, deletion of *gdpS*; pKAS1, *gdpS* complementation plasmid. (B) Biofilm formation of seven clinical isolates and their derivative strains was measured as described for 8325-4 strains. Strain names are shown under the corresponding graphs. The results are representative of three independent experiments performed in triplicate. Error bars indicate the standard deviations. White bar, wild type; black bar, *gdpS* deletion mutant (Δ gdpS); gray bar, complemented strain (Δ gdpS+c).

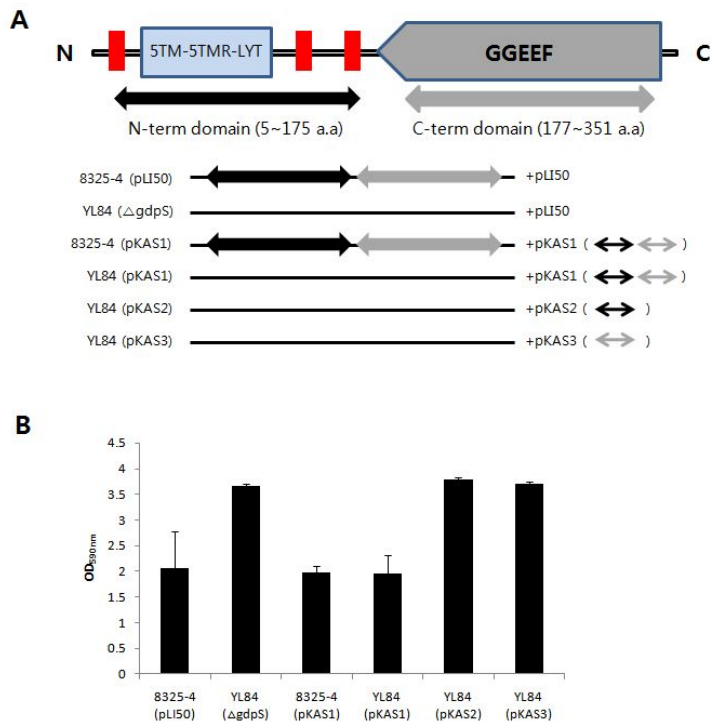


Fig. 2. Contribution of GdpS domains to biofilm formation. (A) Structural organization of GdpS from *S. aureus* 8325-4 and an illustration of plasmid constructs used in the complementation of the *gdpS* deletion mutant. The three transmembrane domains at the N-terminus are shown by red rectangles while other domains are indicated either by a blue rectangle or by a gray pentagon with the domain name in it. A black arrow indicates the N-terminal domain of GdpS, while a gray arrow indicates the C-terminal domain of the protein. (B) Biofilm development of *gdpS* deletion mutant of 8325-4 complemented by the plasmids encoding either the entire (pKAS1) or N-terminal (pKAS2) or C-terminal (pKAS3) domain of GdpS. The results are representative of three independent experiments performed in triplicate. Error bars indicate the standard deviations.

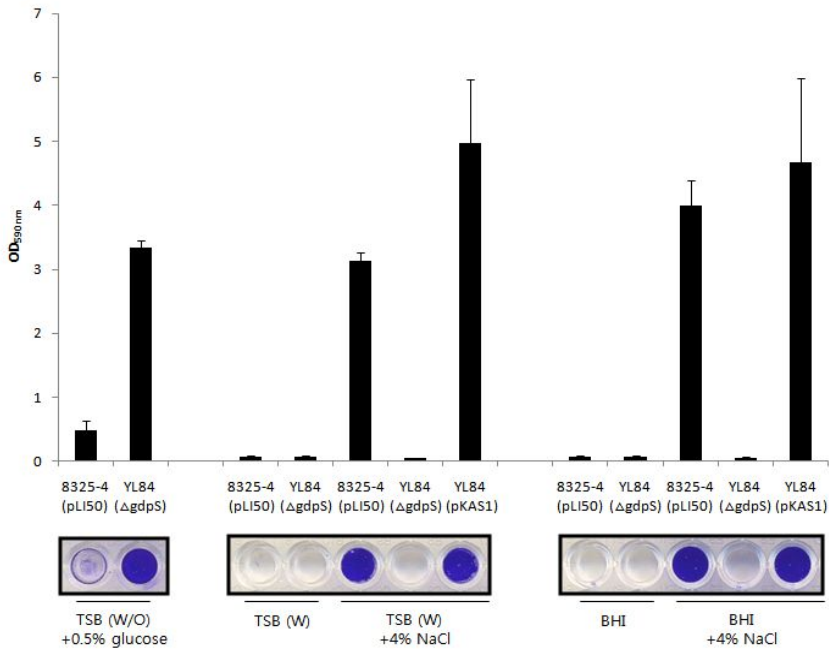


Fig. 3. Biofilm formation of the *gdpS* mutant depends on the media formula. Biofilm formation of 8325-4, YL84 ($\Delta gdpS$) and YL84 (pKAS1) strains were compared in TSB (W/O)+0.5% glucose [TSB (W/O) supplemented with 0.5% glucose], TSB (W), TSB (W)+4% NaCl [TSB (W) supplemented with 4% NaCl], BHI, or BHI+4% NaCl [BHI supplemented with 4% NaCl] medium in a 96-well plate as described in Materials and Methods. The results are representative of three independent experiments performed in triplicate. Error bars indicate the standard deviations.

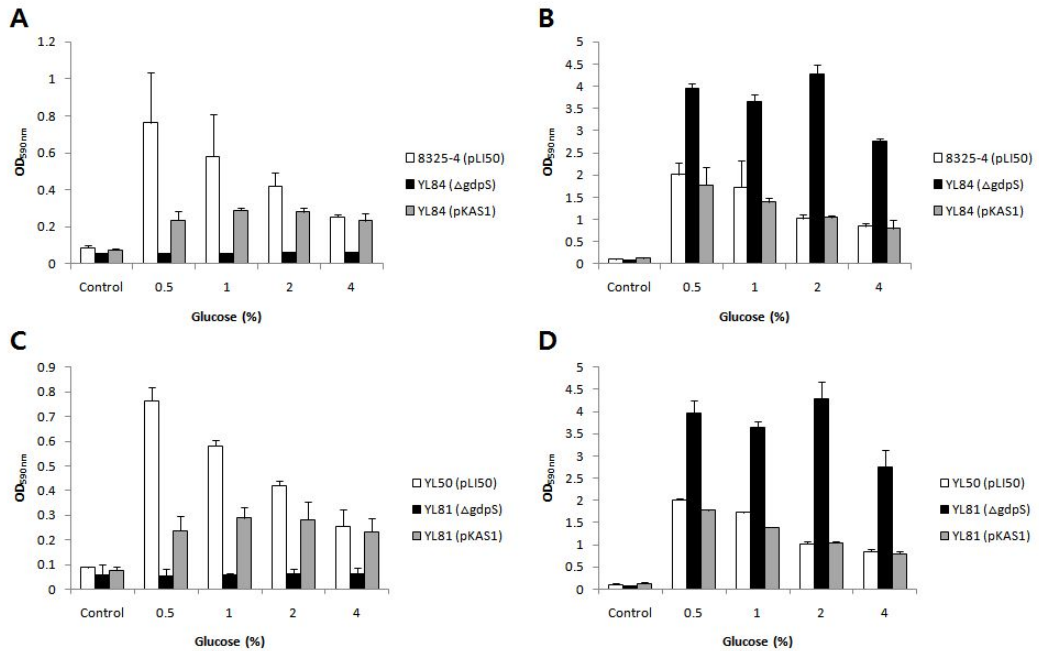


Fig. 4. The effect of glucose concentration on biofilm formation after 4h-incubation (A, C) or 24h-incubation (B, D) in two different strain backgrounds. The culture in TSB (W/O) without glucose was used as a control and the biofilm assay was performed as described in Materials and Methods. Strains are shown to the left of each graph. The white bar represents biofilm formation by wild type strains while black and gray bars indicate biofilm formation by *gdpS* mutants and complemented strains, respectively. The results are representative of three independent experiments performed in triplicate. Error bars indicate the standard deviations. pLI50, a vector control; Δ *gdpS*, deletion of *gdpS*; pKAS1, *gdpS* complementation plasmid.

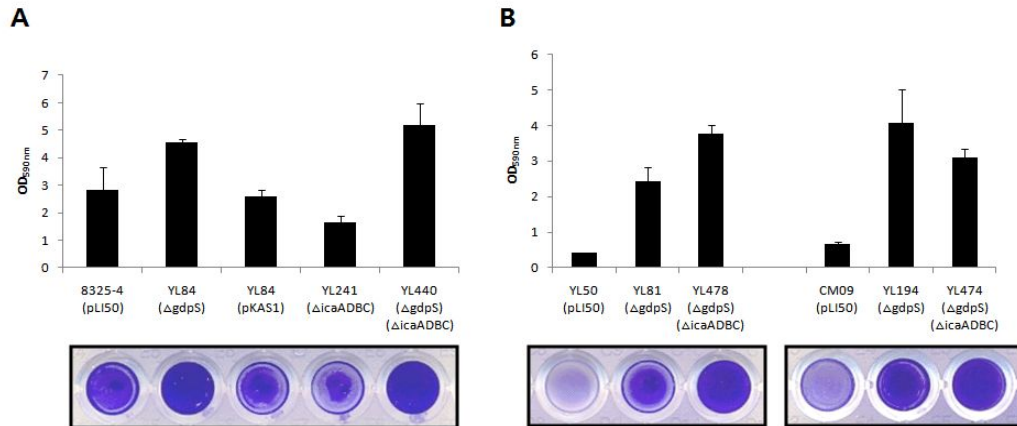


Fig. 5. The effect of *ica* operon mutation on biofilm formation by *gdpS* mutant in strain backgrounds of 8325-4 (A) or YL50 and CM09 (B). Cells were grown in TSB (W/O)-0.5% glucose at 37°C for 24h and the biofilm assay was performed as described in Materials and Methods. The results are representative of three independent experiments performed in triplicate. Error bars indicate the standard deviations. pLI50, a vector control; Δ *gdpS*, deletion of *gdpS*; pKAS1, *gdpS* complementation plasmid; Δ *icaADBC*, deletion of *icaADBC*; Δ *gdpS* Δ *icaADBC*, double deletion of *gdpS* and *icaADBC*.

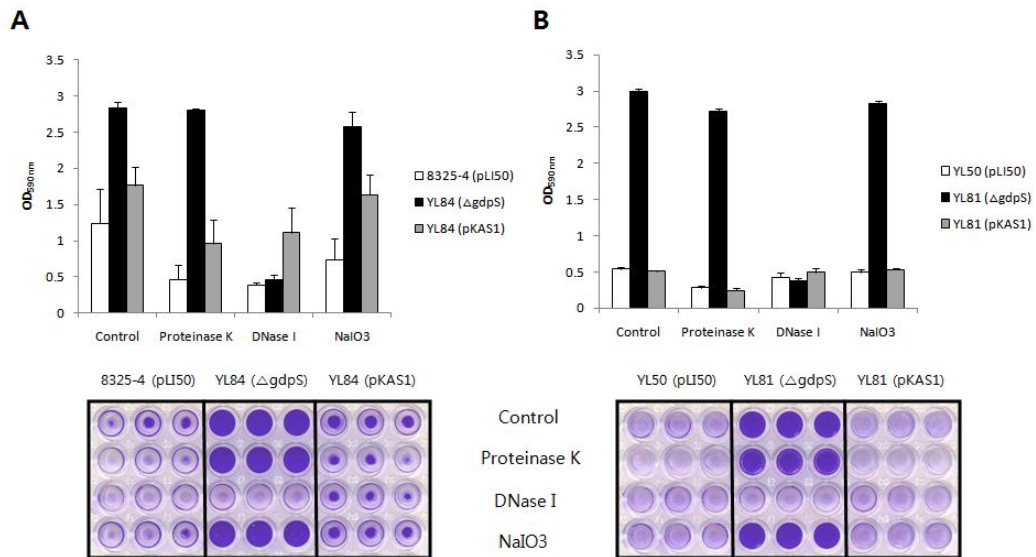


Fig. 6. The effect of enzyme or chemical treatments on detachment of mature biofilms by 8325-4 strains (A) and YL50 strains (B). The cells were grown in TSB (W/O)-0.5% glucose at 37°C for 24h in a 96-well plate and then treated for 2h at 37°C with proteinase K (100 μ g/ml), RNase-free DNase I (5 U/ml), or sodium meta-periodate (NaIO₃) (10 mM). The bacteria that remained to be attached to the 96-well plates were stained with 0.25% crystal violet. The untreated group was used as a control. The results are representative of three independent experiments performed in triplicate. Error bars indicate the standard deviations. pLI50, a vector control; Δ *gdpS*, *gdpS* deletion; pKAS1, *gdpS* complementation plasmid.

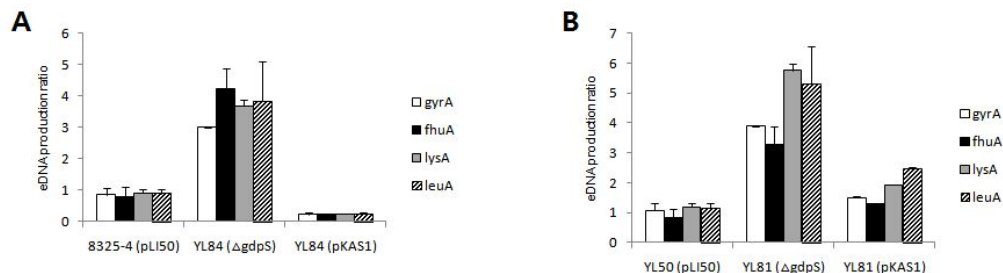


Fig. 7. The effect of *gdpS* deletion mutation on the release of extracellular DNAs (eDNAs) by 8325-4 strains (A) and YL50 strains (B). eDNAs of all the tested strains were isolated from 24h-developed biofilms as described in Materials and Methods. The total eDNAs present in each biofilm were quantified by real-time PCR, using primer pairs specific for *gyrA* (encoding gyrase A; white bar), *fhuA* (encoding ferrichrome transport ATP-binding protein A; black bar), *lysA* (encoding diaminopimelate decarboxylase A; gray bar), *leuA* (encoding 2-isopropylmalate synthase; striped bar). Real-time PCR was performed at least three times and relative quantities of eDNAs was measured by $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. The results represent the average of three independent experiments. Error bars indicate the standard deviations.

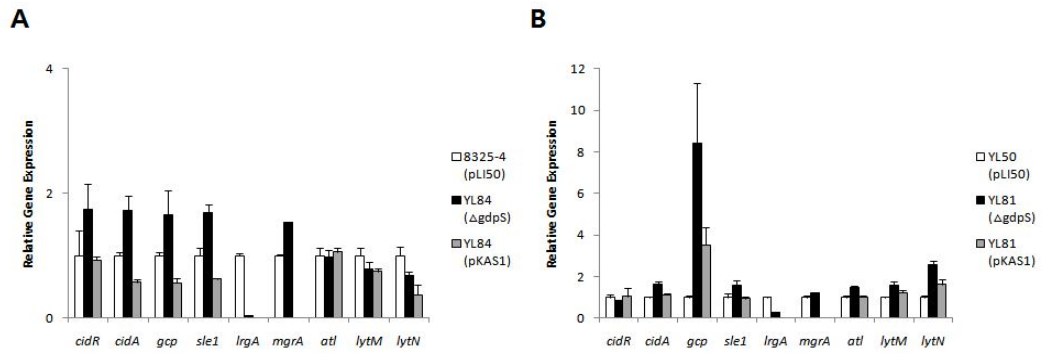


Fig. 8. The effect of *gdpS* deletion mutation on the expression of autolysis-related genes in 8325-4 strains (A) and YL50 strains (B). Total RNAs were extracted from cells grown in TSB (W/O)-0.5% glucose for 24h in a 6-well plate at 37°C and the cDNA synthesis was performed as described in Materials and Methods. The expression of autolysis-related genes (*cidR*, *cidA*, *gcp*, *sle1*, *IrgA*, *mgrA*, *atl*, *lytM*, and *lytN*) was measured by quantitative RT-PCR and compared by $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. Error bars indicate the standard deviations. pLI50, a vector control; $\Delta gdpS$, *gdpS* deletion; pKAS1, *gdpS* complementation plasmid.

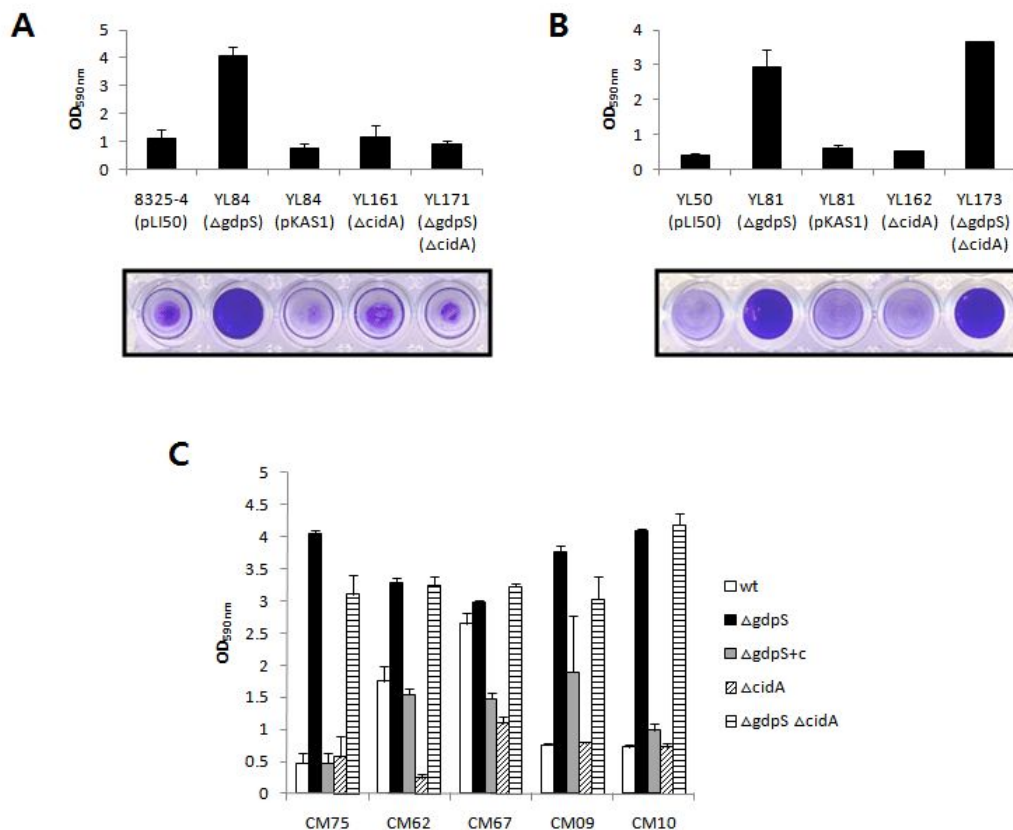


Fig. 9. The effect of *cidA* mutation on the biofilm formation by *gdpS* deletion mutant in 8325-4 strains (A), YL50 strains (B) and other clinical isolates (C). Cells were grown in TSB (W/O)-0.5% glucose for 24h at 37°C in a 96-well plate and the biofilm assay was performed as described in Materials and Methods. The results are representative of three independent experiments performed in triplicate. Error bars indicate the standard deviations. pLI50, a vector control; Δ *gdpS*, deletion of *gdpS*; pKAS1, *gdpS* complementation plasmid; Δ *gdpS*+c, *gdpS* deletion mutation complemented with pKAS1; Δ *cidA*, deletion of *cidA*; Δ *gdpS* Δ *cidA*, double deletion of *gdpS* and *cidA*.

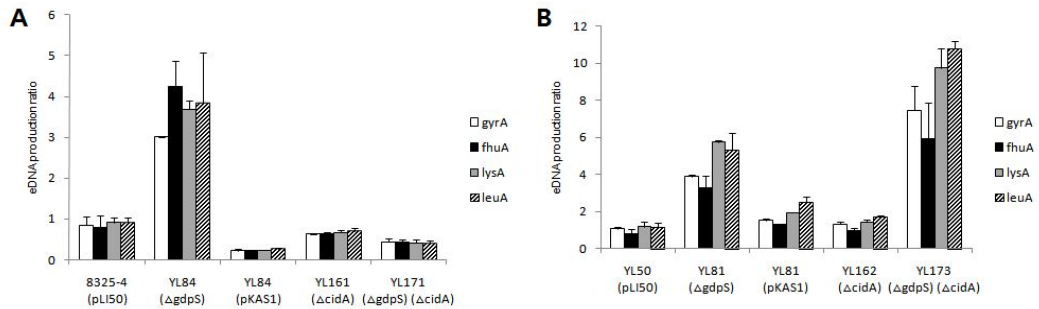


Fig. 10. The effect of *cidA* deletion mutation on the release of eDNAs in 8325–4 strains (A) and YL50 strains (B). eDNAs of all the test strains were isolated from 24h–developed biofilms as described in Materials and Methods. The total eDNAs present in each biofilm were quantified by real–time PCR, using primer pairs specific for *gyrA* (encoding gyrase A; white bar), *fhuA* (encoding ferrichrome transport ATP–binding protein A; black bar), *lysA* (encoding diaminopimelate decarboxylase A; gray bar), *leuA* (encoding 2–isopropylmalate synthase; striped bar). Relative quantity of eDNAs was measured by $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. The results represent the average of three independent experiments. Error bars indicate the standard deviations. pLI50, a vector control; $\Delta gdpS$, deletion of *gdpS*; pKAS1, *gdpS* complementation plasmid; $\Delta gdpS+c$, *gdpS* deletion mutation complemented with pKAS1; $\Delta cidA$, deletion of *cidA*; $\Delta gdpS\Delta cidA$, double deletion of *gdpS* and *cidA*.

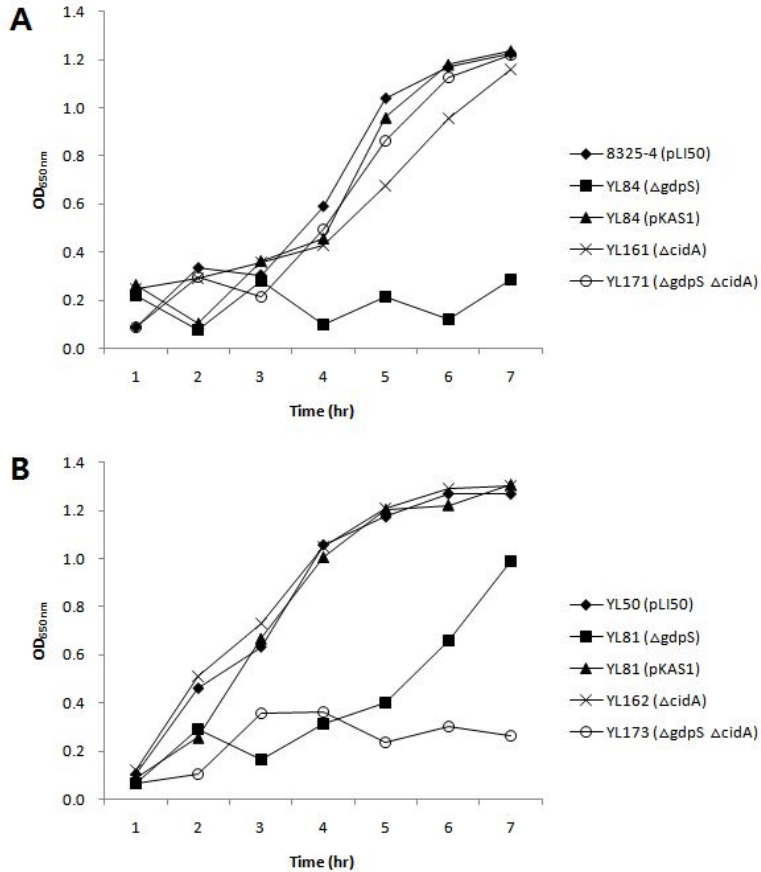


Fig. 11. The effect of the mutations of *gdpS* and *cidA* on autolysis of 8325-4 (A) and YL50 (B). Test strains were grown in TSB (W/O)-0.5% glucose containing 0.01% Triton X-100 at 37°C and optical density at 650nm was recorded hourly for 7h. Data are representative of results obtained from three independent experiments. pLI50, a vector control; Δ *gdpS*, deletion of *gdpS*; pKAS1, *gdpS* complementation plasmid; Δ *cidA*, deletion of *cidA*; Δ *gdpS* Δ *cidA*, double deletion of *gdpS* and *cidA*.

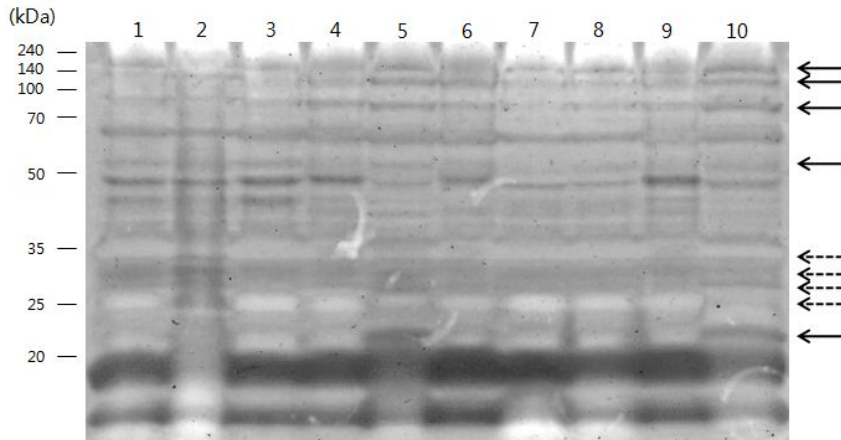


Fig. 12. Zymogram analysis of cell wall-associated murein hydrolases extracted from the *gdpS* mutants of the 8325-4 and YL50 strain. Equal amounts of proteins prepared from the intracellular fractions of the test strains were loaded and separated in 12% SDS-PAGE gels containing heat-killed *S. aureus* RN4220 cells. Although, on the original gel lytic bands appear as clear zones with opaque background, in the scanned image shown above, they appear as dark zones. Lane 1, 8325-4; lane 2, YL84 ($\Delta gdpS$); lane 3, YL84 (pKAS1); Lane 4, YL50; lane 5, YL81 ($\Delta gdpS$); lane 6, YL81 (pKAS1)); lane 7, YL161 ($\Delta cidA$); lane 8, YL171 ($\Delta gdpS \Delta cidA$); lane 9, YL162 ($\Delta cidA$); lane 10, YL173 ($\Delta gdpS \Delta cidA$). Major changes in murein hydrolases are indicated either by dotted arrows (8325-4 strains) or by arrows (YL50 strains).

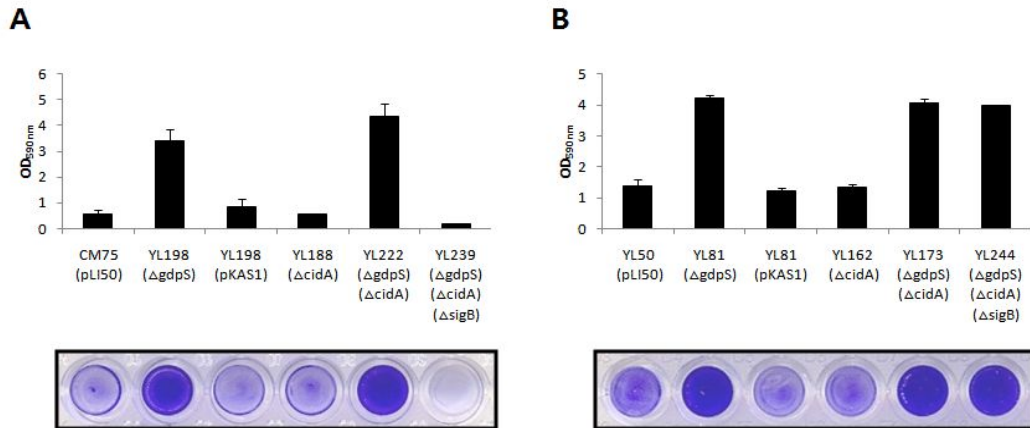


Fig. 13. The role of *sigB* in the biofilm formation by *gdpS cidA* double mutants in CM75 (A) or YL50 strain background (B). Cells were grown in TSB (W/O)-0.5% glucose at 37°C for 24h in a 96-well plate and the biofilm assay was performed as described in Materials and Methods. The results are representative of three independent experiments performed in triplicate. Error bars indicate the standard deviations. pLI50, a vector control; $\Delta gdpS$, deletion of *gdpS*; pKAS1, *gdpS* complementation plasmid; $\Delta cidA$, deletion of *cidA*; $\Delta gdpS \Delta cidA$, double deletion of *gdpS* and *cidA*; $\Delta gdpS \Delta cidA \Delta sigB$, triple deletion of *gdpS*, *cidA*, and *sigB*.

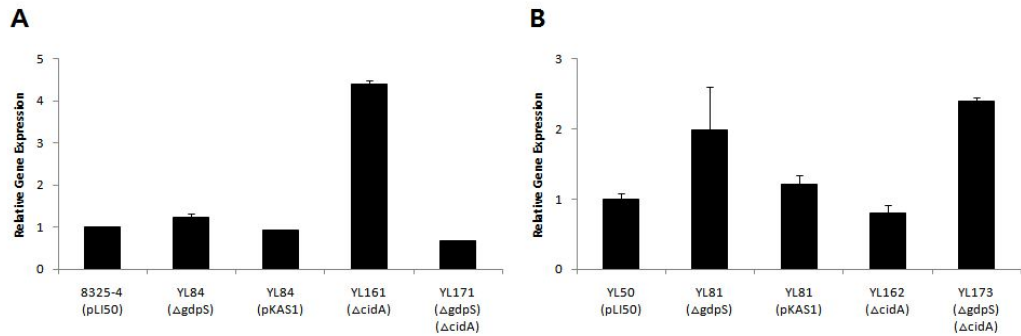


Fig. 14. The effect of *gdpS* and *cidA* mutation on the expression of *atI* in the 8325-4 (A) and YL50 (B) strains. Cells were grown in TSB (W/O)-0.5% glucose at 37°C for 24h in a 6-well plate. From the cultures, total RNAs were extracted, cDNA was synthesized, and quantitative RT-PCR was carried out as described in Materials and Methods. The gene expression was compared by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. Error bars indicate the standard deviations. pLI50, a vector control; $\Delta gdpS$, deletion of *gdpS*; pKAS1, *gdpS* complementation plasmid; $\Delta cidA$, deletion of *cidA*; $\Delta gdpS\Delta cidA$, double deletion of *gdpS* and *cidA*.

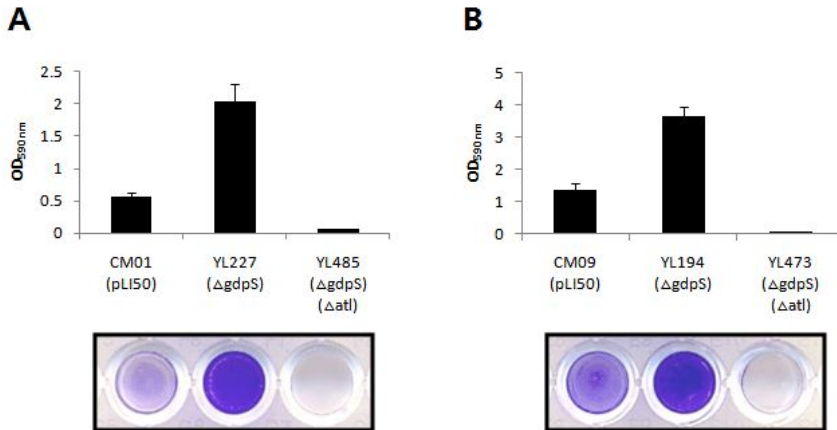


Fig. 15. The effect of *atl* mutation on biofilm formation by *gdpS* mutant of clinical isolates CM01 (A) or CM09 (B) strains. Cells were grown in TSB (W/O)–0.5% glucose at 37°C for 24h in a 96–well plate and the biofilm assay was performed as described in Materials and Methods. The results are representative of three independent experiments performed in triplicate. Error bars indicate the standard deviations. pLI50, a vector control; $\Delta gdpS$, deletion of *gdpS*; $\Delta gdpS\Delta atl$, double deletion of *gdpS* and *atl*.

V. 참고문헌

1. **Allesen-Holm, M., K. B. Barken, L. Yang, M. Klausen, J. S. Webb, S. Kjelleberg, S. Molin, M. Givskov, and T. Tolker-Nielsen.** 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* **59**:1114–28.
2. **Anantharaman, V., and L. Aravind.** 2003. Application of comparative genomics in the identification and analysis of novel families of membrane-associated receptors in bacteria. *BMC Genomics* **4**:34.
3. **Arnow, P. M., E. M. Quimosing, and M. Beach.** 1993. Consequences of intravascular catheter sepsis. *Clin Infect Dis* **16**:778–84.
4. **Bae, T., and O. Schneewind.** 2006. Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection. *Plasmid* **55**:58–63.
5. **Baltch, A. L., W. J. Ritz, L. H. Bopp, P. Michelsen, and R. P. Smith.** 2008. Activities of daptomycin and comparative antimicrobials, singly and in combination, against extracellular and intracellular *Staphylococcus aureus* and its stable small-colony variant in human monocyte-derived macrophages and in broth. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1829–33.
6. **Beenken, K. E., J. S. Blevins, and M. S. Smeltzer.** 2003. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect Immun* **71**:4206–11.
7. **Begun, J., J. M. Gaiani, H. Rohde, D. Mack, S. B. Calderwood, F. M. Ausubel, and C. D. Sifri.** 2007. Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS Pathog* **3**:e57.
8. **Beyhan, S., L. S. Odell, and F. H. Yildiz.** 2008. Identification and characterization of cyclic diguanylate signaling systems controlling rugosity in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **190**:7392–405.

9. **Biswas, R., L. Voggu, U. K. Simon, P. Hentschel, G. Thumm, and F. Gotz.** 2006. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol Lett* **259**:260–8.
10. **Cerca, N., J. L. Brooks, and K. K. Jefferson.** 2008. Regulation of the intercellular adhesin locus regulator (icaR) by SarA, sigmaB, and IcaR in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **190**:6530–3.
11. **Chan, P. F., S. J. Foster, E. Ingham, and M. O. Clements.** 1998. The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor sigmaB controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J Bacteriol* **180**:6082–9.
12. **Christen, M., B. Christen, M. Folcher, A. Schauerte, and U. Jenal.** 2005. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* **280**:30829–37.
13. **Conlon, K. M., H. Humphreys, and J. P. O'Gara.** 2002. icaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **184**:4400–8.
14. **Corrigan, R. M., D. Rigby, P. Handley, and T. J. Foster.** 2007. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology* **153**:2435–46.
15. **Costa, G. M., C. Pizzi, C. Leone, A. Borghi, E. Cordioli, and R. Bugiardini.** 1999. Thrombosis of a mitral valve prosthesis resulting from *Staphylococcus epidermidis* endocarditis. *Cardiologia* **44**:675–8.
16. **Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318–22.
17. **Cramton, S. E., C. Gerke, N. F. Schnell, W. W. Nichols, and F. Gotz.** 1999. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus*

- and is required for biofilm formation. *Infect Immun* **67**:5427–33.
18. Finn, R. D., J. Mistry, B. Schuster–Bockler, S. Griffiths–Jones, V. Hollich, T. Lassmann, S. Moxon, M. Marshall, A. Khanna, R. Durbin, S. R. Eddy, E. L. Sonnhammer, and A. Bateman. 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* **34**:D247–51.
 19. Galperin, M. Y. 2004. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* **6**:552–67.
 20. Gertz, S., S. Engelmann, R. Schmid, K. Ohlsen, J. Hacker, and M. Hecker. 1999. Regulation of sigmaB–dependent transcription of sigB and asp23 in two different *Staphylococcus aureus* strains. *Mol Gen Genet* **261**:558–66.
 21. Groicher, K. H., B. A. Firek, D. F. Fujimoto, and K. W. Bayles. 2000. The *Staphylococcus aureus* IrgAB operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J Bacteriol* **182**:1794–801.
 22. Heilmann, C., C. Gerke, F. Perdreau–Remington, and F. Gotz. 1996. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect Immun* **64**:277–82.
 23. Holland, L. M., S. T. O'Donnell, D. A. Ryjenkov, L. Gomelsky, S. R. Slater, P. D. Fey, M. Gomelsky, and J. P. O'Gara. 2008. A staphylococcal GGDEF domain protein regulates biofilm formation independently of cyclic dimeric GMP. *J Bacteriol* **190**:5178–89.
 24. Ingavale, S. S., W. Van Wamel, and A. L. Cheung. 2003. Characterization of RAT, an autolysis regulator in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **48**:1451–66.
 25. Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23–8.
 26. Jenal, U., and J. Malone. 2006. Mechanisms of cyclic–di–GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* **40**:385–407.
 27. Karaolis, D. K., M. H. Rashid, R. Chythanya, W. Luo, M. Hyodo, and Y.

- Hayakawa.** 2005. c-di-GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1029-38.
28. **Kreiswirth, B. N., S. Lofdahl, M. J. Betley, M. O'Reilly, P. M. Schlievert, M. S. Bergdoll, and R. P. Novick.** 1983. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* **305**:709-12.
29. **Kullik, I., P. Giachino, and T. Fuchs.** 1998. Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J Bacteriol* **180**:4814-20.
30. **Kwon, A. S., G. C. Park, S. Y. Ryu, D. H. Lim, D. Y. Lim, C. H. Choi, Y. Park, and Y. Lim.** 2008. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* **32**:68-72.
31. **Lasa, I., and J. R. Penades.** 2006. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* **157**:99-107.
32. **Lee, C. Y., S. L. Buranen, and Z. H. Ye.** 1991. Construction of single-copy integration vectors for *Staphylococcus aureus*. *Gene* **103**:101-5.
33. **Livak, K. J., and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-8.
34. **Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, and R. Laufs.** 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* **178**:175-83.
35. **Mani, N., P. Tobin, and R. K. Jayaswal.** 1993. Isolation and characterization of autolysis-defective mutants of *Staphylococcus aureus*

- created by Tn917–lacZ mutagenesis. *J Bacteriol* **175**:1493–9.
36. **Mann, E. E., K. C. Rice, B. R. Boles, J. L. Endres, D. Ranjit, L. Chandramohan, L. H. Tsang, M. S. Smeltzer, A. R. Horswill, and K. W. Bayles.** 2009. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One* **4**:e5822.
 37. **Marraffini, L. A., A. C. Dedent, and O. Schneewind.** 2006. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:192–221.
 38. **McCallum, N., M. Bischoff, H. Maki, A. Wada, and B. Berger-Bachi.** 2004. TcaR, a putative MarR-like regulator of sarS expression. *J Bacteriol* **186**:2966–72.
 39. **Merino, N., A. Toledo-Arana, M. Vergara-Irigaray, J. Valle, C. Solano, E. Calvo, J. A. Lopez, T. J. Foster, J. R. Penades, and I. Lasa.** 2009. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **191**:832–43.
 40. **Moscoso, M., E. Garcia, and R. Lopez.** 2006. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J Bacteriol* **188**:7785–95.
 41. **Nakhamchik, A., C. Wilde, and D. A. Rowe-Magnus.** 2008. Cyclic-di-GMP regulates extracellular polysaccharide production, biofilm formation, and rugose colony development by *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol* **74**:4199–209.
 42. **O'Neill, E., C. Pozzi, P. Houston, D. Smyth, H. Humphreys, D. A. Robinson, and J. P. O'Gara.** 2007. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol* **45**:1379–88.
 43. **Otto, M.** 2008. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**:207–28.

44. **Pantanello, F., P. Valenti, A. Frioni, T. Natalizi, L. Coltella, and F. Berlutti.** 2008. BioTimer Assay, a new method for counting *Staphylococcus* spp. in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm. *J Microbiol Methods* **75**:478–84.
45. **Paul, R., S. Weiser, N. C. Amiot, C. Chan, T. Schirmer, B. Giese, and U. Jenal.** 2004. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev* **18**:715–27.
46. **Petersen, F. C., D. Pecharki, and A. A. Scheie.** 2004. Biofilm mode of growth of *Streptococcus intermedius* favored by a competence-stimulating signaling peptide. *J Bacteriol* **186**:6327–31.
47. **Petersen, F. C., L. Tao, and A. A. Scheie.** 2005. DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation. *J Bacteriol* **187**:4392–400.
48. **Ray, B., A. Ballal, and A. C. Manna.** 2009. Transcriptional variation of regulatory and virulence genes due to different media in *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog* **47**:94–100.
49. **Reischl, U., M. Pulz, W. Ehret, and H. Wolf.** 1994. PCR-based detection of mycobacteria in sputum samples using a simple and reliable DNA extraction protocol. *Biotechniques* **17**:844–5.
50. **Resch, A., R. Rosenstein, C. Nerz, and F. Gotz.** 2005. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol* **71**:2663–76.
51. **Rice, K. C., B. A. Firek, J. B. Nelson, S. J. Yang, T. G. Patton, and K. W. Bayles.** 2003. The *Staphylococcus aureus* *cidAB* operon: evaluation of its role in regulation of murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J Bacteriol* **185**:2635–43.
52. **Rice, K. C., E. E. Mann, J. L. Endres, E. C. Weiss, J. E. Cassat, M. S.**

- Smeltzer, and K. W. Bayles.** 2007. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:8113–8.
53. **Rice, K. C., T. Patton, S. J. Yang, A. Dumoulin, M. Bischoff, and K. W. Bayles.** 2004. Transcription of the *Staphylococcus aureus* *cid* and *lrg* murein hydrolase regulators is affected by sigma factor B. *J Bacteriol* **186**:3029–37.
54. **Romling, U., M. Gomelsky, and M. Y. Galperin.** 2005. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol* **57**:629–39.
55. **Ross, P., H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Weinberger–Ohana, R. Mayer, S. Braun, E. de Vroom, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, and M. Benziman.** 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**:279–81.
56. **Senn, M. M., P. Giachino, D. Homerova, A. Steinhuber, J. Strassner, J. Kormanec, U. Fluckiger, B. Berger–Bachi, and M. Bischoff.** 2005. Molecular analysis and organization of the *sigmaB* operon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **187**:8006–19.
57. **Shang, F., T. Xue, H. Sun, L. Xing, S. Zhang, Z. Yang, L. Zhang, and B. Sun.** 2009. The *Staphylococcus aureus* GGDEF domain-containing protein, GdpS, influences protein A gene expression in a cyclic diguanylic acid-independent manner. *Infect Immun* **77**:2849–56.
58. **Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz, and U. Romling.** 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* **53**:1123–34.
59. **Steinberger, R. E., and P. A. Holden.** 2005. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol* **71**:5404–10.
60. **Takahashi, J., H. Komatsuzawa, S. Yamada, T. Nishida, H. Labischinski, T.**

- Fujiwara, M. Ohara, J. Yamagishi, and M. Sugai. 2002. Molecular characterization of an *atl* null mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* **46**:601–12.
61. Tischler, A. D., and A. Camilli. 2004. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol* **53**:857–69.
62. Tischler, A. D., and A. Camilli. 2005. Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect Immun* **73**:5873–82.
63. Toledo-Arana, A., N. Merino, M. Vergara-Irigaray, M. Debarbouille, J. R. Penades, and I. Lasa. 2005. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. *J Bacteriol* **187**:5318–29.
64. Ueda, A., and T. K. Wood. 2009. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, *pel* polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase *TpbA* (PA3885). *PLoS Pathog* **5**:e1000483.
65. Ulrich, L. E., E. V. Koonin, and I. B. Zhulin. 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* **13**:52–6.
66. Vergara-Irigaray, M., J. Valle, N. Merino, C. Latasa, B. Garcia, I. Ruiz de Los Mozos, C. Solano, A. Toledo-Arana, J. R. Penades, and I. Lasa. 2009. Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. *Infect Immun* **77**:3978–91.
67. Vuong, C., and M. Otto. 2008. The biofilm exopolysaccharide polysaccharide intercellular adhesin—a molecular and biochemical approach. *Methods Mol Biol* **431**:97–106.
68. Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas, and J. S. Mattick. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**:1487.

저작물 이용 허락서

학 과	바이오신약개발	학 번	20077443	과 정	박사
성 명	한글:권안성 한문 :權安成 영문 :Kwon An Sung				
주 소	광주시 북구 두암 3 동 부영 APT 101-705				
연락처	E-MAIL : kwona@hanmail.net				
논문제목	한글 : 글루코스 존재하에서 GdpS 가 extracellular DNAs 조절을 통해 황색포도알균의 biofilm 형성에 영향을 끼친다 영어 : GdpS of <i>Staphylococcus aureus</i> affects biofilm formation in the presence of glucose through regulating extracellular DNAs				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 -조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB 구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·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 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대()

2010 년 08 월 일

저작자: 권안성 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하