



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

반코마이신에 감수성이 저하된  
황색포도알균의 발병 기전 및  
유전자 발현 정도를 이용한 점수 체계의  
진단적 유용성 평가

**Mechanism of reduced susceptibility to vancomycin of  
*Staphylococcus aureus* and evaluation of diagnostic usefulness  
of scoring system using gene expression**

울산대학교대학원  
의학과  
정지원

반코마이신에 감수성이 저하된  
황색포도알균의 발병 기전 및  
유전자 발현 정도를 이용한 점수 체계의  
진단적 유용성 평가

지도교수    김양수

이 논문을 의학박사 학위 논문으로 제출함

2022년 2월

울산대학교대학원  
의학과  
정지원

정지원의 의학박사학위 논문을 인준함

심사위원	정진용	(인)
심사위원	김양수	(인)
심사위원	이상오	(인)
심사위원	최성호	(인)
심사위원	김민재	(인)

울산대학교대학원

2022년 2월

## 국문 요약

**배경:** 반코마이신 사용이 증가하면서 반코마이신에 감수성이 저하된 메티실린 내성 황색포도알균 - 반코마이신 중증도 내성 황색포도알균(VISA), 반코마이신 불균질 중등도 내성 황색포도알균(hVISA)-이 증가하고 있고, 이러한 균에 의한 감염증은 반코마이신 치료 실패와 관련이 있을 수 있으므로 임상적으로 중요하다. 특히 hVISA는 일반적인 항균제 감수성 검사 방법으로는 검출 민감도가 낮고, 확진 방법인 인구집단 분석-곡선하면적(population analysis profile-area under the curve, PAP-AUC)은 많은 인력과 시간이 소모되어 실제 임상에서 사용하기가 어렵다는 문제가 있다. 또한 아직까지 반코마이신 감수성 저하의 기전이 정확히 규명되지 않았으며, 이러한 반코마이신 감수성 저하에는 다단계의 과정 및 다중 경로가 작용하는 것으로 추정된다. 따라서 반코마이신 감수성 저하의 기전을 파악하기 위하여 세포벽 관련 유전자의 발현 정도 차이를 유전자 기반 연구를 통해 분석하였고, transcriptome 분석 연구를 수행하여 발현의 차이를 나타내는 유전자를 선별하였다. 이후 이러한 유전자 및 표현형의 조합으로 점수 체계를 개발하여 반코마이신에 감수성이 저하된 메티실린 내성 황색포도알균의 진단 유용성을 평가하였다.

**방법:** 반코마이신을 투여함에도 지속적으로 MRSA가 분리되는 감염 환자에서 분리된 초기 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA) 균주와 이후 hVISA로 변화된 균주 즉 isogenic paired strain과 실험실에서 생성한 isogenic paired strain, 그리고 짝이 없는 VSSA, hVISA 임상균주를 대상으로 하였으며, VSSA를 대조균, hVISA를 시험균으로 정의하였다. 세포벽과 관련된 유전자에 대한 실시간 중합효소연쇄반응 검사(RT-PCR)를 시행하여 발현 정도의 차이가 있는 유전자를 선정하였다. 또한 microarray법을 이용한 transcriptome 분석에서 대조균인 VSSA에 비해 시험균인 hVISA에서 발현 정도가 1.5배 이상 차이 나는 유전자를 선별하여 RT-PCR 검사로 발현 차이를 비교하였다. 이후 allele replacement 연구를 시행하여 표적 유전자가 비활성화된 경우 반코마이신 내성이 감소(또는 증가) 하는지 분석하였다. 다음으로 유전자 발현양에 따른 점수 체계의 개발 및 이의 임상적 유용성에 대해 평가하기 위해, 다수의 짝이 없는 임상균주 VSSA와 hVISA를 대상으로 하여 선정된 유전자의 발현 차이를 RT-PCR 검사로 비교 분석하였다. 이후 통계적, 임상적으로 의미있는

유전자를 조합하여 점수를 부여 후 Receiver operating characteristic (ROC) 커브 분석을 통해 민감도와 특이도를 구하여 MLST sequence type별로 민감도와 특이도가 가장 좋은 점수 체계를 개발하였다.

**결과:** 총 24쌍의 isogenic paired strain에서 세포벽과 표면 단백질 관련 유전자의 발현 차이는 *prsA*, *graS*, *graR*, *spa*, *mprF*에서 있었고, 총 4쌍의 isogenic paired strain의 transcriptome 분석에서는 세포벽 합성과 관련되거나 질소 대사, 요소분해효소 생성과 관련된 유전자들 (*capAB*, *ureAB*, *lrgAB*, *splF*, *splC*, *atl*, *thiE*, *opp-2C*, *opp-2B*, *arcC*, *arcD*, *metB*, *gltB*, *adhE*, *norA*, *ilvB*)이 의미있는 발현 증감 양상을 보였다. 이들 유전자에 대한 RT-PCR을 하였을 때 ST5에서는 *capAB*, *atl*, ST72에서는 *ureAB*, *lrgAB* 유전자가 의미있는 발현의 차이가 있었다. Allele replacement 실험 시  $\Delta ureAB$ ,  $\Delta atl$ ,  $\Delta SA1221$ 은 wild type 균주에 비해 약 20% 이상 PAP-AUC를 감소시켰으며,  $\Delta lrgAB$ 는 PAP-AUC에서 의미있는 변화가 없었고 (7-9% 감소), *capAB* 유전자가 비활성화된 돌연변이주는 구축하지 못하였다. 이후 hVISA 및 VSSA 임상균주 (hVISA ST5 30균주, hVISA ST72 16균주, VSSA ST5 30균주, ST72 20균주)에서 상기 유전자들에 대한 발현 정도 차이를 RT-PCR로 분석하였을 때 ST5는 *graS*, *capA*, *capB*, ST72는 *sigB*, *ureAB*, *capA*에서 유의한 차이를 보였다. 이후 ROC 커브 분석을 통하여 유전자/표현형 조합을 고안하였으며, ST5에서는 *graS*, *capB*, vancomycin MIC 값 조합(AUC 0.92)에서 유전자 발현양에 따른 점수가 5점 이상일 때 민감도 86.6%, 특이도 83.0%, 양성예측도 83.8%, 음성예측도 86.2%였으며, ST72에서는 *sigB*, *capA*, *ureB* 유전자 발현양 조합(AUC 0.85)에서 6점 이상시 민감도 81.0%, 특이도 90.0%, 양성예측도 86.6%, 음성예측도 90.0%임을 확인할 수 있었다.

**결론:** 본 연구를 통해 hVISA는 VSSA와 비교하였을 때 세포벽 관련 및 캡슐 형성 유전자, global regulator, 요소 생성 및 질소 대사와 관련 있는 여러 유전자의 발현의 차이가 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 hVISA의 발생은 여러 단계의 경로가 복잡하게 작용하는 것을 시사하며 이러한 유전자들이 반코마이신 감수성 저하에 어떻게 기여하는지 연구가 추후 필요하다. 또한 이러한 유전자의 발현 정도를 기반으로 한 점수 체계는 민감도와 특이도가 우수한 것으로 판단된다. 점수 체계의 실제 임상 현장에서의 진단적 유용성은 추후 평가되어야 할 것으로 생각된다.

**핵심단어:** 반코마이신 불균질 중등도 내성 황색포도알균; 발병 기전; 전사체;  
민감도; 특이도

## 차 례

국문요약.....	i
표 .....	v
그림.....	vi
서론.....	1
연구 방법 .....	3
연구 결과.....	12
고찰.....	38
결론.....	42
참고 문헌.....	43
영문요약.....	48



## 표

표 1. 전사체 분석을 위한 isogenic paired strain의 특성 .....	4
표 2. Microarray시에 사용한 chip의 특징 .....	4
표 3. 표적유전자의 결실로 비활성화된 돌연변이를 구축하기 위한 primer .....	7
표 4. ST5 Clin_IPS와 Lab_IPS에서의 <i>prsA</i> , <i>graS</i> , <i>graR</i> 발현 비교.....	12
표 5. ST5 Clin_IPS와 Lab_IPS에서의 <i>spa</i> , <i>mprF</i> 발현 비교.....	14
표 6. ST5 isogenic paired strain 2쌍과 ST72 2쌍에서 1.5배 이상 발현의 증감이 있었던 유전자의 숫자.....	17
표 7. ST5에서 공통적으로 발현 증가를 나타내는 유전자.....	17
표 8. ST5에서 공통적으로 발현 감소를 나타내는 유전자.....	18
표 9. ST72에서 공통적으로 발현 증가를 나타내는 유전자.....	19
표 10. ST72에서 공통적으로 발현 감소를 나타내는 유전자.....	20
표 11. ROC curve를 이용한 hVISA 진단의 유의성 평가를 할 유전자 후보.....	30
표 12. hVISA 진단에 사용할 유전자.....	33
표 13. ST5 균주에서 유전자와 vancomycin MIC 조합에 따른 AUC 값.....	33
표 14. ST5 균주에서 유전자 발현양에 따른 점수 체계.....	34
표 15. ST72 균주에서 유전자 조합에 따른 AUC 값 .....	35
표 16. ST72 균주에서 유전자 발현양에 따른 점수 체계.....	35

## 그림

그림 1. pKOR1 플라스미드 지도 .....	5
그림 2. 표적 유전자의 upstream과 downstream 부위 PCR 증폭 산물 .....	6
그림 3. 표적 유전자의 결실을 위한 pKOR1 vector를 이용한 cloning .....	6
그림 4. <i>Escherichia coli</i> 내 pKOR1 plasmid에서 결실 돌연변이를 확인하기 위한 Plasmid DNA PCR 산물 .....	7
그림 5. Plasmid DNA가 삽입된 <i>S. aureus</i> RN4220 colony들 .....	8
그림 6. <i>S. aureus</i> RN4220 내 결실 돌연변이 plasmid DNA의 PCR 산물 확인 .....	9
그림 7. 임상균주 내로 표적이 결실된 유전자가 도입되어 비활성화된 돌연변이주를 확인하는 과정 .....	10
그림 8. Antisense <i>secY</i> RNA에 의한 성장 저해 .....	10
그림 9. ST5 임상균주 VSSA와 hVISA 양군의 <i>prsA</i> , <i>graS</i> , <i>graR</i> 발현 분석 비교 .....	13
그림 10. ST5 임상균주 VSSA와 hVISA 양군의 <i>lytR</i> 발현 분석 비교 .....	13
그림 11. ST5 임상균주 VSSA와 hVISA 양군의 <i>spa</i> 및 <i>mprF</i> 발현 분석 비교 .....	14
그림 12. DNA microarray 결과 IPS에서 유전자 발현 차이를 보여주는 heatmap .....	16
그림 13. ST5 균주에서 <i>capA/capB</i> 유전자의 mRNA transcript level .....	22
그림 14. ST5 균주에서 <i>atl</i> 유전자의 mRNA transcript level .....	23
그림 15. ST72 균주에서 <i>ureA/ureB</i> 유전자의 mRNA transcript level .....	24
그림 16. ST72 균주에서 <i>lrgA</i> , <i>lrgB</i> 유전자의 mRNA transcript level .....	25
그림 17. 437 wild type 균주와 $\Delta$ ureAB 돌연변이 균주의 vancomycin 농도에 따른 PAP- AUC비 .....	27

그림 18. AMC11094, YSK2094 wild type균주와 $\Delta ureAB$ 돌연변이 균주의 vancomycin 농도에 따른 PAP-AUC비 .....	27
그림 19. YSK2094 wild type균주와 $\Delta atl$ 돌연변이 균주의 vancomycin 농도에 따른 PAP-AUC비 .....	28
그림 20. 3238 wild type균주와 $\Delta lrgAB$ 돌연변이 균주의 vancomycin 농도에 따른 PAP-AUC비 .....	28
그림 21. Mu3 wild type균주와 $\Delta lrgAB$ 돌연변이 균주의 vancomycin 농도에 따른 PAP-AUC비 .....	29
그림 22. YSK2094 wild type균주와 $\Delta SA1221$ 돌연변이 균주의 vancomycin 농도에 따른 PAP-AUC비 .....	29
그림 23. VSSA와 hVISA에서의 <i>graS</i> , <i>sigB</i> , <i>ureA</i> , <i>ureB</i> , <i>capA</i> , <i>capB</i> mRNA transcript level .....	32
그림 24. ST5에서 <i>graS</i> , <i>capB</i> , vancomycin MIC <sub>x2</sub> 값의 ROC curve.....	34
그림 25. ST72에서 <i>sigB</i> , <i>capA</i> , <i>ureB</i> 값의 ROC curve .....	36
그림 26. 임상에서 hVISA 점수체계의 적용 방안.....	36

## 서 론

메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 이하 MRSA)에 의한 감염은 높은 이환율과 사망률을 보이며<sup>1</sup> 2017년 국내에서 시행한 감시체계에 따르면 황색포도알균 혈액균주의 50% 이상이 MRSA였다.<sup>2</sup> MRSA 치료에는 반코마이신이 일차적으로 사용되는데 반코마이신 사용이 증가하면서 반코마이신에 감수성이 저하된 황색포도알균들이 보고되어 왔다. 반코마이신에 대한 감수성이 저하된 균주는 반코마이신 불균질 중등도내성 황색포도알균(heterogeneous vancomycin-intermediate *S. aureus*, hVISA)/반코마이신 중등도내성 황색포도알균(vancomycin-intermediate *S. aureus*, VISA)과 반코마이신 고도내성 황색포도알균(vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA)의 두 가지 유형이 있다. VRSA는 장구균으로부터 *vanA* gene을 획득하여 발생하지만 전세계적으로 발생이 드물다.<sup>3,4</sup> VISA는 반코마이신 최소억제농도(MIC, minimum inhibitory concentration) 4-8  $\mu\text{g/mL}$ 에 해당되는 균이고,<sup>5</sup> hVISA는 반코마이신 감수성 황색포도알균(vancomycin-susceptible *S. aureus* (VSSA) 사이에서  $1/10^5 \sim 1/10^6$  정도의 드문 빈도로 VISA에 속하는 부분 모집단(subpopulation)이 섞여 있는 경우를 의미한다.<sup>4</sup> hVISA는 VISA와 반코마이신에 감수성이 저하되는 기전이 같고 VISA 발생의 전 단계로 생각된다.<sup>6</sup> VISA는 전세계적으로 200 균주 미만으로 보고되고 있으며, hVISA의 유병률은 분리 지역 및 검사 방법에 따라 차이를 보이는데,<sup>7</sup> 국내에서는 2000년에 처음으로 반코마이신에 감수성이 저하된 황색포도알균(MIC, 8  $\mu\text{g/mL}$ )이 확인되었으며,<sup>8</sup> 2008년부터 2010년까지 단일 병원에서 모집된 260 MRSA 균주 중 hVISA는 37%로 높은 유병률을 보였다.<sup>9</sup> hVISA 균혈증의 경우 VSSA 균혈증에 비해 균혈증이 지속되는 경우가 많고,<sup>10-13</sup> 반코마이신 치료 실패의 위험이 더 높다고 알려져 있다.<sup>7</sup>

hVISA는 일반적으로 임상에서 사용하는 broth-dilution 방법에서는  $5 \times 10^4$  CFU/well의 접종량(inoculum)을 사용하기 때문에 잘 검출되지 않는다. hVISA 진단의 표준 방법은 인구집단 분석-곡선하면적(population analysis profiling-area under the curve, 이하 PAP-AUC)법을 이용하는 것이다.<sup>14</sup> PAP-AUC를 통해 표준주인 Mu3에 비해 시험주의 area under the curve (AUC) ratio가 0.9 이상일 때 hVISA로 진단할 수 있으나,<sup>4</sup> 이 방법은 많은 인력과 시간이 소모되어 실제 임상에서 사용하기는 어렵다. 따라서 임상 현장에서는 hVISA에 대한 신속한 진단 기법이 요구된다.

hVISA/VISA은 세포벽의 변화가 반코마이신 내성의 중요한 기전임이 밝혀지기는 하였지만 특정 유전자의 변이 기전이 아니라 다단계의 과정 및 다중 경로가 작용하는 것으로 추정되며<sup>4</sup> 아직까지 명확한 내성 기전을 파악하지 못했다. 따라서 이번 연구에서는 hVISA/VISA의 내성 기전을 분석하고자 기존의 hVISA/VISA의 기전으로 알려진 세포벽과 표면 단백질 관련 유전자의 발현 정도의 차이를 유전자 기반 연구로 분석하고, genome-wide study를 수행하여 hVISA/VISA에서 발현의 차이를 나타내는 유전자를 알아보고자 하였다. 또한 궁극적으로 hVISA의 신속하고 정확하게 진단하기 위해 이러한 내성 기전에 관여하는 유전자 발현양을 바탕으로 한 점수 체계를 개발하였고, 반코마이신에 감수성이 저하된 메티실린 내성 황색포도알균의 진단 유용성을 평가하고자 하였다.

## 연구 방법

### 1. hVISA 진단 및 MLST 검사

hVISA 진단은 MIC 측정 후 PAP-AUC 방법으로 시행되었다.<sup>15</sup> Multilocus sequence typing (MLST)는 황색포도알균의 7가지 살림 유전자 (housekeeping gene) (*arc*, *aro*, *glp*, *gmk*, *pta*, *toi*, *yqi*)의 염기서열을 분석하여 MLST database (<http://www.mlst.net>)를 사용하여 MLST sequence type을 결정하였다.<sup>16</sup> 우리나라에서 가장 흔한 ST5와 ST72는 분자생물학적 특징이 다르므로 ST5와 ST72로 각각 나누어 연구를 진행하였다.

### 2. 사용 균주

반코마이신을 투여 중에도 지속적 MRSA 균혈증이 있는 환자에서 초기 VSSA 균주 (모균주)와 이후 hVISA로 변화된 균주 (자균주), 즉 isogenic paired strains (IPS) (이하 Clinical isogenic paired strain, Clin\_IPS)와 실험실에서 반코마이신에 노출시켜 VSSA에서 hVISA로 변한 균주 (이하 Laboratory isogenic paired strain, Lab\_IPS)를 이용하였다. 또한 IPS가 아닌 VSSA, hVISA 임상균주도 사용하였다.

### 3. Cell wall stimulon과 표면 단백질(surface protein) 유전자 발현 측정

Cell wall stimulon (cell wall biosynthesis genes)인 *prsA*, *fmtA*, *sigT*, *murZ*, *lytR*, *tcaA*, *vraS*, *graS*, *graR*과 표면 단백질인 *spa* (protein A), *coa* (coagulase), *ebpS* (elastin-binding protein), *fnbA* (fibronectin-binding protein), *fib* (fibrogen-binding protein), *clfA*, *clfB*에 대한 유전자 발현을 RT-PCR (real-time polymerase chain reaction)을 이용하여 측정하였다. RT-PCR을 시행한 뒤 상대정량법으로 분석하였고, *gyrB*를 참조 유전자로 사용하였다. mRNA transcript level은 *gyrB* cycle threshold (Ct)값에 대한 각 gene의 Ct값으로 나타내었고,  $2^{(\text{reference Ct} - \text{target Ct})}$ 으로 나타내었다.

### 4. Transcriptome 분석

#### (1) Microarray를 이용한 유전자 발현 분석

VSSA에서 hVISA로 변화된 4쌍의 균주 (표 1)를 대상으로 RNA를 추출한 다음 cDNA를 합성하여 *S. aureus* MW2 균주의 genome을 바탕으로 제작된 probe와 hybridization을 통해 결과를 도출하였다. 60,000여개의 probe를 이용하여 제작된 chip

(표 2)은 MW2 genome의 97%의 유전자를 발현을 확인할 수 있는 수준의 chip 형태이며 유전자 길이에 따라 probe의 수를 비례적으로 제작하였다. Probe와 sample의 hybridization을 통해 얻어진 이미지들을 스캐닝을 통해 raw data를 수집하고 flag filtering, normalization을 거쳐 통계적으로 유의한 수준의 data로 변환시켜 fold change 값으로 비교하였다. 분석된 유전자들을 clustering하고 DAVID 프로그램을 이용하여 functional annotation 분석을 시행하였다.<sup>17</sup> 이후 VSSA 균주보다 hVISA에서 발현 정도가 1.5배 이상 차이가 나는 유전자들을 대상으로 선별하였고, 유전자 발현이 균주별로 공통적으로 증감을 보이는 유전자를 선별하였다.

**표 1. 전사체 분석을 위한 isogenic paired strain의 특성**

Phenotype change	Isogenic paired strain	Vancomycin MIC (mg/L) 변화	MLST (ST)
VSSA → hVISA	Pair 1	1 → 2	ST5
	Pair 2	1.5 → 2	ST5
	Pair 3	1.5 → 3	ST72
	Pair 4	2 → 3	ST72

**표 2. Microarray시에 사용한 chip의 특징**

Cut off of gene size (bp)	No. of sequence	No. of probe per target	No. of designable probe	Replicate	No. of probe according to gene size
0-400	611	1	585	10	5850
400-1000	1212	2	2422	10	24220
1000-1500	558	3	1674	10	16740
1500-29715	323	4	1280	10	12800
Total	2704	-			59610
<b>Total Number of Features (8x60K)</b>					62976
<b>No. of agilent controls</b>					1319
<b>No. of designable probe</b>					59610
<b>Percentage filled by selected probe groups</b>					96.75%

**(2) RT-PCR 시행**

Microarray에서 선별된 유전자들을 대상으로 다시 RT-PCR을 이용하여 발현 정도의 차이를 측정하였다. 상대정량법으로 분석하였고, *gyrB*를 참조 유전자로 사용하였다. mRNA transcript level은 *gyrB* cycle threshold (Ct)값에 대한 각 gene의 Ct값으로 나타내었고,  $2^{(\text{reference Ct}-\text{target Ct})}$ 으로 나타내었다.

## 5. Allelic replacement

Transcriptome 분석에서 선별된 유전자 중 RT-PCR 연구에서 의미있는 발현 차이를 보였던 유전자, microarray 결과에서 큰 발현 차이를 보였던 일부 유전자를 대상으로 allelic replacement를 시도하였다.

Allelic replacement는 배 등이 개발한 방법을 통하여 시행하였으며,<sup>18</sup> Allelic replacement를 위해 pKOR1, *E. coli*/*S. aureus* shuttle vector (그림 1)를 이용하였다.

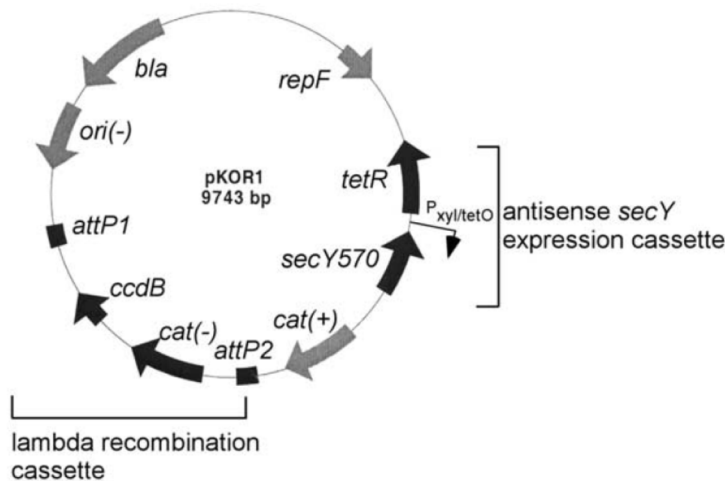


그림 1. pKOR1 플라스미드 지도.<sup>18</sup> *repF* (pE194ts의 replication 유전자), *secY570* (*secY*의 570 nucleotide N terminal기), *cat* (chloramphenicol acetyltransferase), *attP* (phage lambda 부착부위), *ori(-)* (ColE1 plasmid replication origin) 및 *bla* (beta-lactamase)를 나타내며 (+)와 (-)는 gram 양성균과 그람음성균에서의 기능을 나타냄. P<sub>xyl/teO</sub> promotor와 promotor의 transcription 방향을 화살표로 표기함.

Allelic replacement는 다음과 같은 과정으로 진행하였다.

### 1) 표적 유전자의 결실을 위해 pKOR1 vector를 이용한 cloning



표적으로부터 upstream부위와 downstream 부위를 각각의 specific primer를 이용하여 PCR로 증폭하여 아래 그림 2에서 보는 바와 같이 1kb 가량의 PCR산물을 얻을 수 있었다.

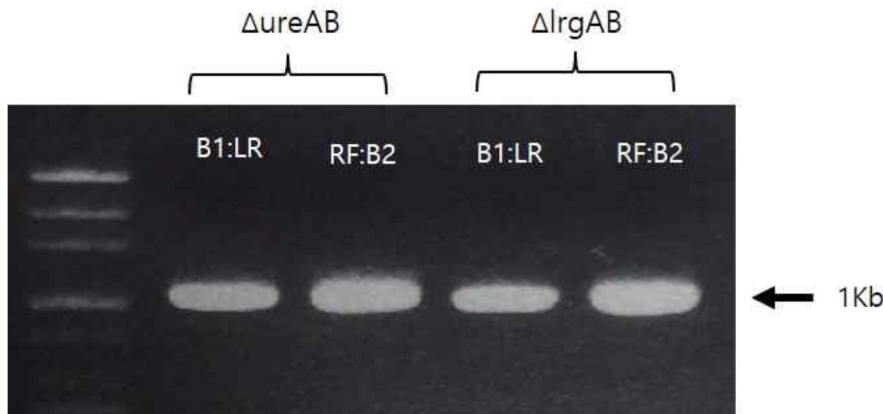


그림 2. 표적 유전자의 upstream과 downstream 부위 PCR 증폭 산물

이를 purification 한 다음 attB1 산물과 attB2 산물을 ligation하였고 이들 ligated DNA와 pKOR1 플라스미드와 혼합하여 BP reaction을 시행한 다음 *Escherichia coli* 속으로 transformation하였다 (그림 3).

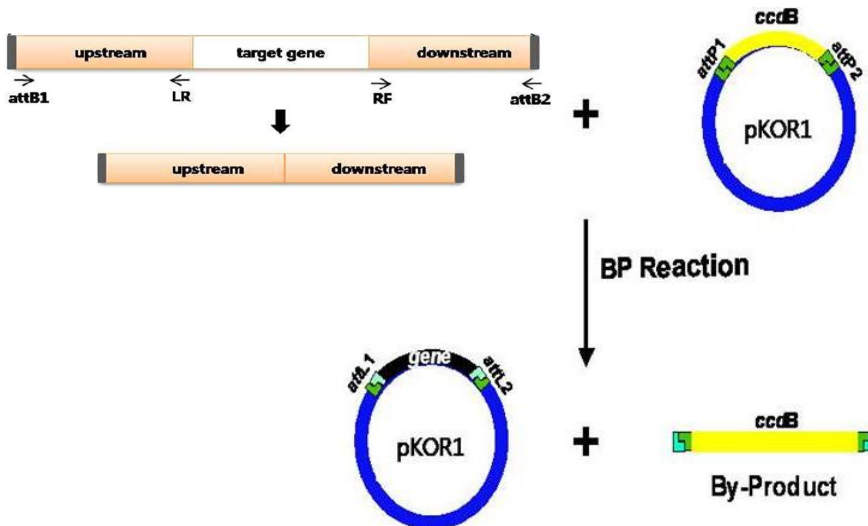


그림 3. 표적 유전자 결실을 위한 pKOR1 vector를 이용한 cloning

결실 돌연변이를 확인하기 위해 플라스미드 DNA를 분리하여 attB1 primer와 attB2 primer를 이용하여 2kb 가량의 PCR 산물을 확인하였다 (그림 4).

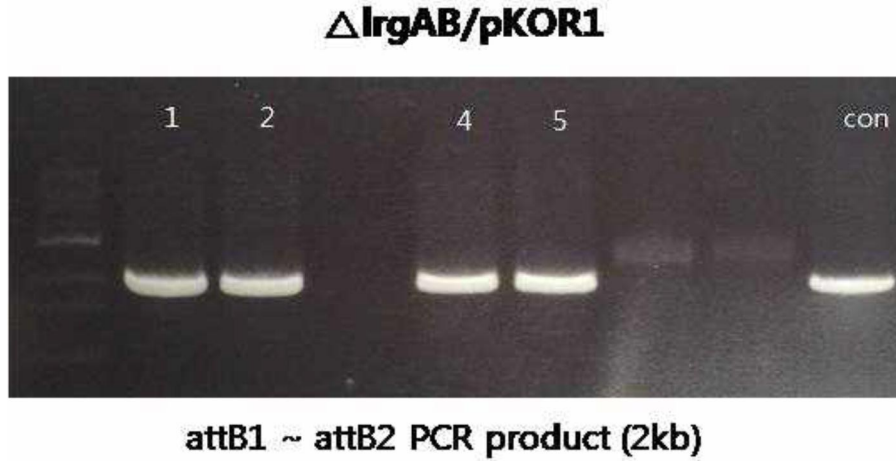


그림 4. *Escherichia coli* 내 pKOR1 plasmid에서 결실 돌연변이를 확인하기 위한 Plasmid DNA PCR 산물

비활성화된 돌연변이를 구축하기 위하여 표적 유전자들의 아래 위치에서 primer를 제작하고 이를 이용하여 비활성화된 돌연변이를 구축하였다 (표 3).

표 3. 표적유전자의 결실로 비활성화된 돌연변이를 구축하기 위한 primer

Target genes	Primer (5'→3')
attB1-capAB	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATACAGGAATGGATGTACTAACG
capAB-LR	ATGACTGGATCCTTCTAATGTAATTTCCATTATTCC
capAB-RF	ATGACTGGATCCATGGAGATGAATAAGTATGATTG
attB2-capAB	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATATTTCCACGCTCGATGATAC
attB1-lrgAB	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTCTAAAGATAAAATGCATTTGTTGGG
lrgAB-LR	ATGACTGGATCCAATGACTTGGTGAAAAAAGTGTGCTGG
lrgAB-RF	ATGACTGGATCCATTCTTCTAAAACGAAAAACCTAAGC
attB2-lrgAB	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTGCATCAACAATGTTTTCGACACC
attB1-atl	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGAATGCAAAAAATATCATATAAGG
atl-LR	ATGACTGGATCCAAGTCGGCAAATACTTCGACATCCC
atl-RF	ATGACTGGATCCTACAAGCGTTAATGCAA CCATTGATGG
attB2-atl	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACAATGAAATCACTAAGCATTCC
attB1-ureAB	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTAATCGCTGTTTTAAATGTATATCC
ureAB-LR	ATGACTGGATCCACTACAATCATTAATTTGTCTTGCTCT
ureAB-RF	ATGACTGGATCCAGGAAAAAGATCATGAGCTTTAAAATGA

attB2-ureAB	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGAATGCGATATCTTCAGGAATA
attB1-pstB	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTGGAGATGCAGTAGACATGACTGAGG
pstB-LR	ATGACTGGATCCAAGGTTTGGTTGATATATAATGGC
pstB-RF	ATGACTGGATCCTTTGCGCCATATTTAAACTCCC
attB2-pstB	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTACTTTCTCAGTGGATTCTAAGCG
attB1-SA1221	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATTTGATCCAAATGTTGCATCACC
SA1221-LR	ATGACTGGATCCTGAAGACAAAAAATAATAAGACGC
SA1221-RF	ATGACTGGATCCTTGCCATTTTTTCATTGAAATATCC
attB2-SA1221	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATCACTTTAACTAAAAAAGGTGG
attB1-SA2095	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACCACCCTG TTCTAACAAG C
SA2095-LR	ATGACTGGATCCAAATGATGGCTTGAAGATAGAAAAGG
SA2095-RF	ATGACTGGATCCAATTGCTATTTTCATAAAACAACCC
attB2-SA2095	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGATGTGCTTGACCTACTAATGC
attB1-SA1787	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTTACACGTATCCTTTTCCTGCG
SA1787-LR	ATGACTGGATCCATGACTATGACATATAACGCGCGC
SA1787-RF	ATGACTGGATCCTTACTGATTACACTCATTATGC
attB2-SA1787	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TACTATCTATTTGATCATGACGGC

---

## 2) 임상 균주에서 표적이 결실되어 비활성화된 돌연변이주 구축

플라스미드 DNA를 modification 시키기 위해 *S. aureus* RN4220으로 transformation시켰다. 각 돌연변이들에서 2개의 콜로니를 선별하여 (그림 5) chloramphenicol이 들어간 배지에서 자란 균으로부터 플라스미드 DNA를 분리한 다음 attB1~attB2 primer를 이용하여 2kb 가량의 사이즈를 확인하였다 (그림 6).

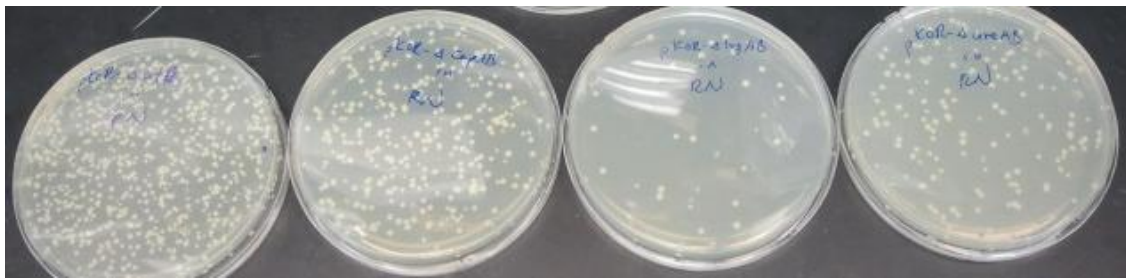


그림 5. Plasmid DNA가 삽입된 *S. aureus* RN4220 colony들

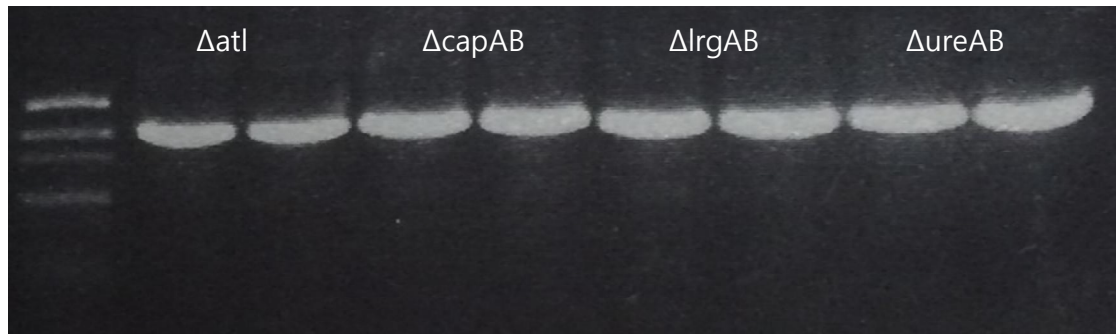


그림 6. *S. aureus* RN4220내 결실 돌연변이 plasmid DNA의 PCR 산물 확인

*S. aureus* RN4220으로부터 얻어진 plasmid DNA를 wild-type strain으로 electroporation 시킨 후 ch10 plate에서 자란 콜로니를 ch10 액체배지에서 30℃ 조건에서 배양한 다음 plasmid를 여부를 확인하고, 42℃에서 배양하였다 (그림 7). 이때 plasmid가 chromosome내로 integration 되고, 42℃에서 배양된 균액 100 $\mu$ l를 Ch5 TSA plate에 도말한 후 42℃에서 큰 콜로니가 자랄 때까지 배양하였다. 이 콜로니를 항생제가 없는 TSB 배지에 넣어 30℃ 조건에서 배양하였다. 이때는 plasmid가 rolling circle replication을 통해 chromosome으로부터 excision이 되는 단계이다. 콜로니가 자란 배양액을 10<sup>-4</sup> dilution하여 anhydrotetracycline (ATc)이 0, 1, 2  $\mu$ g/ml이 들어간 TSA 배지에 도말하여 30℃에서 배양하였다. 이때 plasmid가 포함된 콜로니일 경우 antisense *secY*의 발현으로 성장에 저해가 오게 된다 (그림 8). 이후 표적이 결실된 돌연변이를 가진 콜로니가 예상되는 큰 콜로니를 15개 선택하여 콜로니 PCR로 확인하였다.

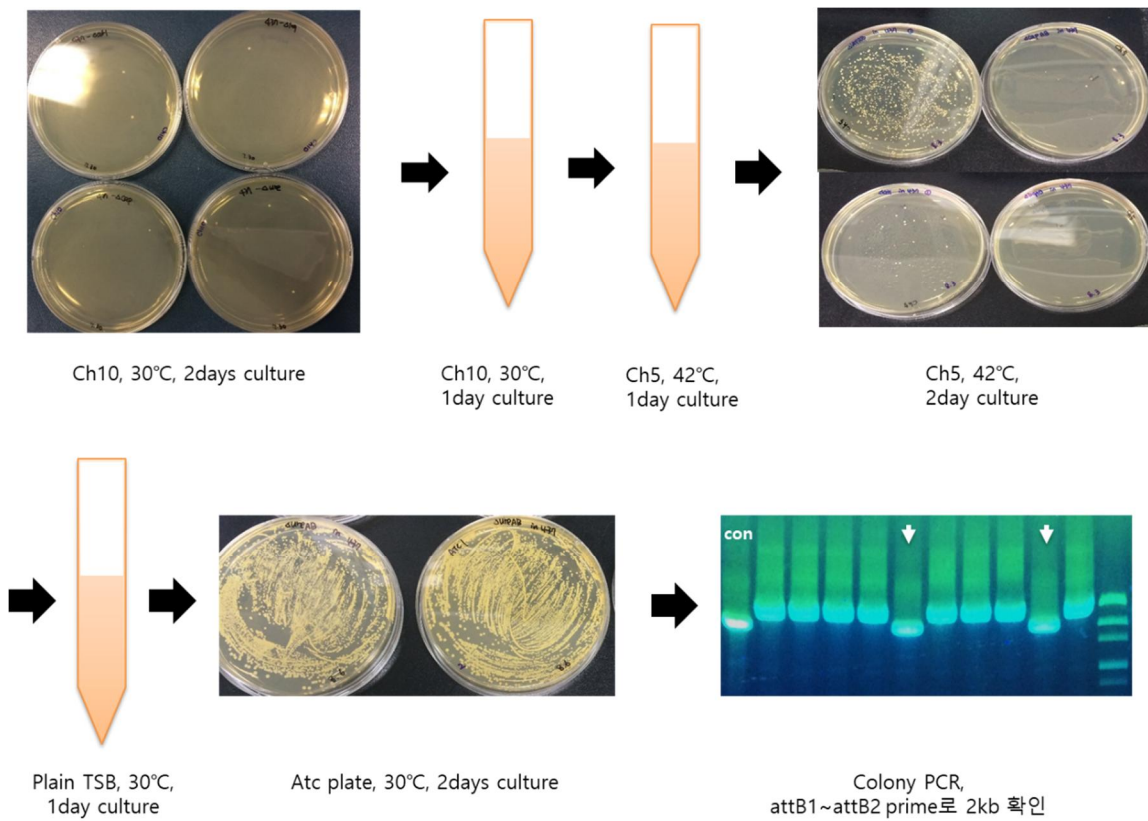


그림 7. 임상균주 내로 표적이 결실된 유전자가 도입되어 비활성화된 돌연변이주를 확인하는 과정

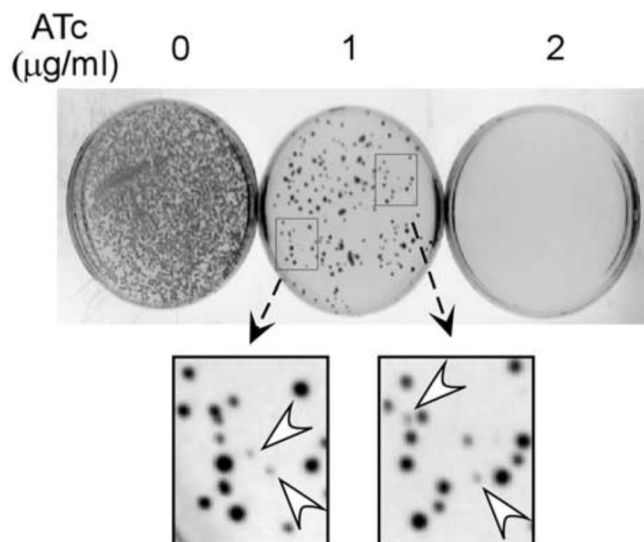


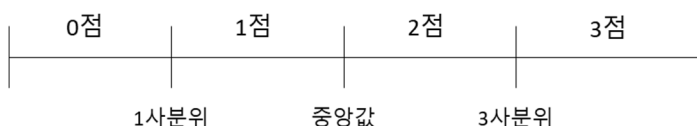
그림 8. Antisense *secY* RNA에 의한 성장 저해. 표적유전자가 결실된 pKOR1가 chromosome에 integration된 *Staphylococcus aureus*는 성장이 저해됨 (화살표로 표기)

표적유전자가 비활성화된 돌연변이주는 반코마이신 내성에 대한 영향을 확인하기 위해 PAP-AUC로 확인하였고, wild-type주에 대한 돌연변이 주의 AUC 비를 측정하였다.

## 6. 점수 체계의 개발

임상균주 VSSA, hVISA 에서 mRNA 전사수준을 비교 분석한 결과를 IBM SPSS Statistics for Windows, version 21 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하여 ROC (Receiver Operating Characteristic) curve로 나타내었다. 유전자의 단독, 조합의 형태로 나누어 분석하였다. hVISA가 하나의 유전자나 표현형에 의하여 발생하는 것이 아니기 때문에 다양한 유전자와 표현형을 조합하여 ROC curve를 작성하고 각각의 민감도와 특이도를 구하였다. 또한 ST5와 ST72는 임상역학적, 분자유전학적, 분자생물학적 특성이 다르기 때문에 ST5와 ST72로 구분하여 분석하였다. 유전자들의 조합뿐만 아니라 표현형인 vancomycin MIC도 포함하여 조합하였다.

개별 유전자마다 모든 균주의 유전자 발현량을 아래 그림과 같이 중앙값 (median)과 1사분위 (25%지점) 값, 3사분위 (75%지점) 값을 기준으로 나눈 뒤, scoring system (점수 체계)를 도입하여 4등분된 결과들에 각각 0, 1, 2, 3 점을 부여하였다. 유전자들이나 표현형 (반코마이신 MIC)의 점수를 더하여 만들어진 ROC curve를 분석하여, 다양한 조합의 진단적 유의성을 평가하였다.



## 7. 통계적 분석

연속변수에 대해서 Student T test 또는 Mann-Whitney U test를 이용하여 통계적 분석을 시행하였고, P값이 0.05 이하일 때 통계적으로 의미있다고 간주하였다.

## 연구 결과

### 1. 세포벽 관련 유전자 연구

IPS에서 ST5와 S72로 각각 나누어 cell wall stimulon (*prsA*, *fmtA*, *sgtB*, *murZ*, *lytR*, *tcaA*, *vraA*, *graS*, *graR*)의 전사 수준을 비교하였고, 임상균주에서 전사 수준을 비교하였다. Clin\_IPS ST5 3쌍, Lab\_IPS ST5 8쌍, 임상균주 ST5 VSSA 10균주, hVISA 10균주와 Clin\_IPS ST72 2쌍, Lab\_IPS ST72 11쌍, 임상균주 ST72 VSSA 13균주, hVISA 5균주를 이용하였다.

#### (1) *prsA*, *graS*, *graR*

Clin\_IPS ST5 3쌍 중 2쌍에서, Lab\_IPS ST5 8쌍 중 7쌍에서 *prsA* 발현 감소가 있었다 (표 4). 임상균주 ST5 hVISA에서도 VSSA에 비해 유의하게 *prsA* 발현 감소가 있었다 (P=0.005) (그림 9).

Clin\_IPS ST5 3쌍 및 Lab\_IPS ST5 8쌍 모두에서 *graS* 및 *graR* 발현 감소가 있었으며 (표 4), 임상균주 hVISA에서도 VSSA에 비해 유의하게 *graS* 및 *graR* 발현 감소가 있었다 (P=0.006 for *graS*, P=0.005 for *graR*) (그림 9).

**표 4. ST5 Clin\_IPS와 Lab\_IPS에서의 *prsA*, *graS*, *graR* 발현 비교**

균주	<i>prsA</i> mRNA	<i>graS</i> mRNA	<i>graR</i> mRNA
	transcript level	transcript level	transcript level
Fold change			
Clin_IPS_1	-1.92	-1.31	-1.54
Clin_IPS_2	1.12	-1.56	-1.24
Clin_IPS_3	-1.36	-1.28	-1.00
Lab_IPS_1	-1.09	-1.93	-2.31
Lab_IPS_2	-7.65	-12.47	-5.93
Lab_IPS_3	-2.98	-1.88	-2.45
Lab_IPS_4	-1.55	-1.80	-1.62
Lab_IPS_5	-1.45	-2.43	-1.81
Lab_IPS_6	-3.05	-2.75	-3.74
Lab_IPS_7	-1.37	-1.93	-2.90
Lab_IPS_8	1.02	-2.28	-2.12

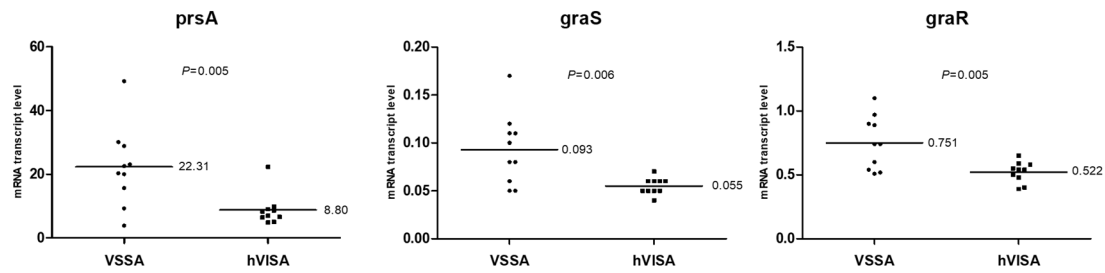


그림 9. ST5 임상균주 VSSA와 hVISA 양군의 *prsA*, *graS*, *graR* 발현 분석 비교

ST72 균주들에서도 ST5와 발현 양상이 동일하였다.

(2) *fmtA*, *sgtB*, *murZ*, *tcaA*, *lytR*, *vraS*

*fmtA*, *sgtB*, *murZ*, *tcaA*, *vraS*는 Clin\_IPS와 Lab\_IPS, 임상균주들에서 일관성 있는 변화가 없었으며, *lytR*는 IPS에서 일관성 있는 발현 감소가 있었으나 임상균주에서 발현 차이가 없었다 (그림 10).

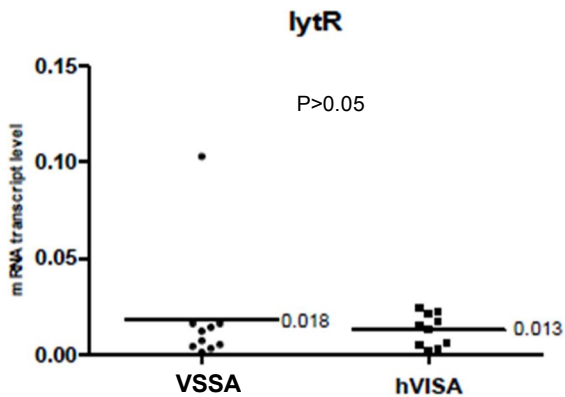


그림 10. ST5 임상균주 VSSA와 hVISA 양군의 *lytR* 발현 분석 비교

2. 표면 단백질 발현 비교

표면 단백질 유전자 (*spa*, *coa*, *ebps*, *fnA*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *mprF*)에 대한 발현을 IPS와 임상균주에서 비교하였다. Clin\_IPS ST5 3쌍, Lab\_IPS ST5 8쌍, 임상균주 ST5 VSSA 10균주, hVISA 10균주와 Clin\_IPS ST72 2쌍, Lab\_IPS ST72 11쌍, 임상균주 ST72 VSSA 13균주, hVISA 5균주를 이용하였다.



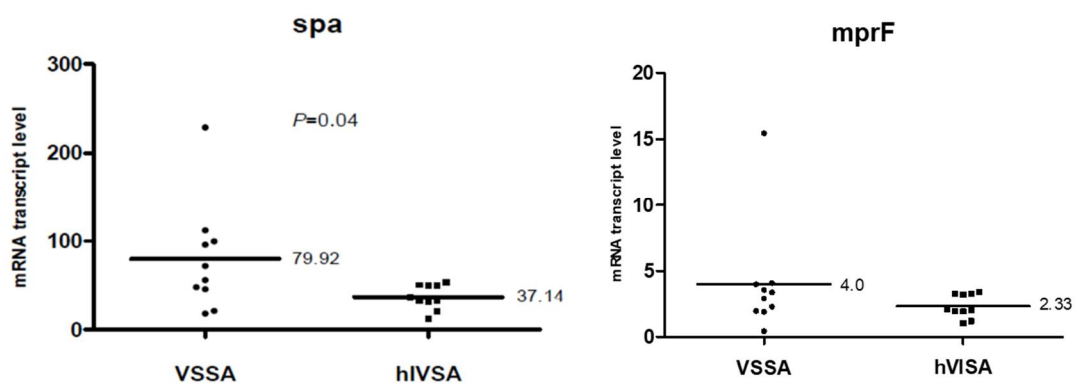
**(1) *spa*, *mprF***

*spa*는 Clin\_IPS ST5 3쌍 중 2쌍에서 발현의 감소가 있었고 Lab\_IPS ST5 8쌍에서도 모두 발현이 감소되었다 (표 5). ST5 임상균주에서도 hVISA에서 유의하게 *spa* 유전자 발현이 감소하였다 (그림 11) (P=0.04).

*mprF*는 Clin\_IPS ST5 3쌍 중 2쌍에서 발현 감소가 있었고 Lab\_IPS ST5 8쌍에서는 모두 발현이 감소하였다 (표 5). *mprF*는 임상균주에서는 발현의 유의한 차이는 없었다 (그림 11).

**표 5. ST5 Clin\_IPS와 Lab\_IPS에서의 *spa*, *mprF* 발현 비교**

균주	<i>spa</i> mRNA transcript level	<i>mprF</i> mRNA transcript level
	Fold change	
Clin_IPS_1	-1.51	-1.73
Clin_IPS_2	3.62	-1.00
Clin_IPS_3	-1.12	-1.04
Lab_IPS_1	-4.05	-6.00
Lab_IPS_2	-84.08	-16.40
Lab_IPS_3	-9.56	-4.45
Lab_IPS_4	-6.29	-2.70
Lab_IPS_5	-201.30	-3.16
Lab_IPS_6	-73.61	-5.71
Lab_IPS_7	-14.40	-9.77
Lab_IPS_8	-1.44	-1.57



**그림 11. ST5 임상균주 VSSA와 hVISA 양군의 *spa* 및 *mprF* 발현 분석 비교**

ST72 균주들에서도 ST5와 발현 양상이 동일하였다.

**(2) *coa*, *ebps*, *fnbA*, *fib*, *clfA*, *clfB*,**

*coa*는 IPS에서 전반적으로 발현 감소의 양상이 관찰되었으나, 임상균주에서는 hVISA에서 통계적으로 유의하게 발현이 증가하는 불일치 소견을 보였다 (VSSA 전사양 평균 0.04, hVISA 전사양 평균 0.08; P=0.04). *ebps*, *fnbA*, *fib*, *clfB*는 IPS에서 전반적으로 발현 감소의 양상이 관찰되었으나, 임상균주에서는 통계적 차이가 없었다. *clfA*는 IPS에서 일관성 있는 변화가 관찰되지 않았고 임상균주에서도 발현에 차이가 없었다.

**3. Transcriptome 분석 결과**

ST5 IPS 2쌍과 ST72 IPS 2쌍에 대하여 microarray를 시행하였고 (그림 12), 1.5배 이상 발현의 증감이 있었던 유전자의 숫자는 표 6에 나타내었다.

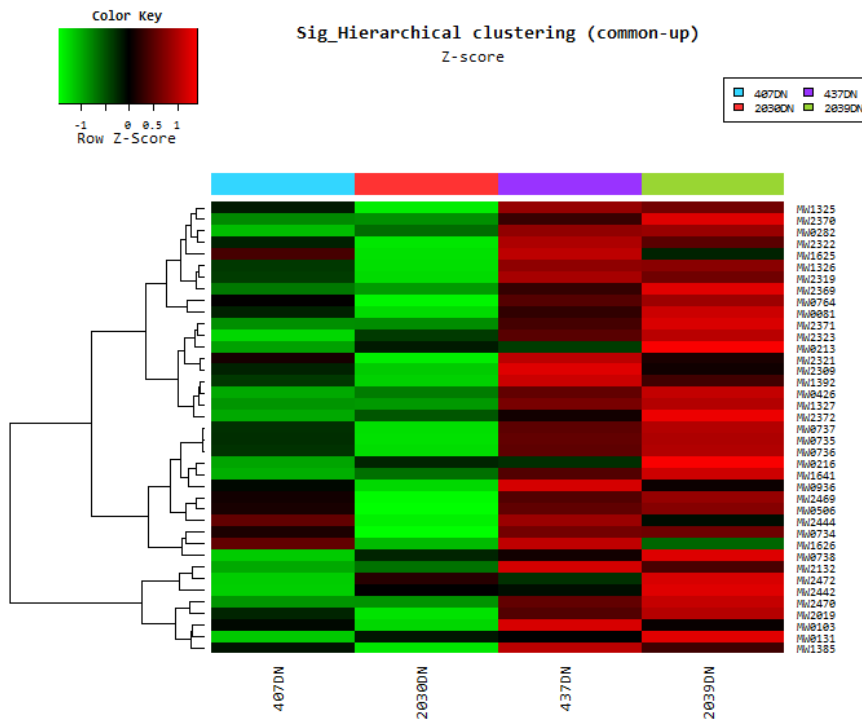
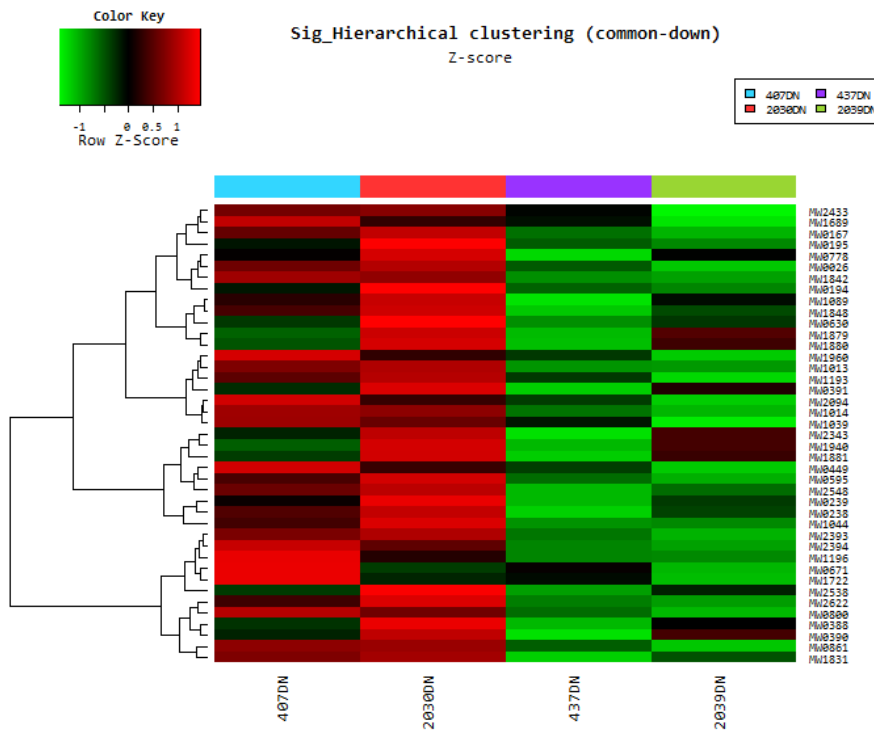


그림 12. DNA microarray 결과 IPS에서 유전자 발현 차이를 보여주는 heatmap

표 6. ST5 isogenic paired strain 2쌍과 ST72 2쌍에서 1.5배 이상 발현의 증감이 있었던 유전자의 숫자

	ST5		ST72	
	Pair 1	Pair 2	Pair 3	Pair 4
발현 증가	102	372	114	246
발현 감소	182	482	127	306
총계	284	854	241	552

(1) ST5 공통적인 발현 증가를 나타내는 유전자군 분석

ST5 2쌍에서 1.5배 이상 발현의 증가를 보이는 유전자는 pair 1의 경우 102개이고, pair 2의 경우 372개였다. 이들 2쌍에 있어 공통적으로 발현이 증가되는 유전자는 28개였다. 대표적으로 세포벽 생성과 직접 관련 있는 유전자인 *capA*, *capB*, *atl*과 표면 단백질인 *sdrE*, *clfB*, *coa*의 유전자들이 공통적으로 증가하였다. 세포벽과 관련이 있을 것으로 여겨지는 유전자군으로서 arginine catabolic pathway에 있는 *arcC*, *arcD*, *arcB*, *arcA* 유전자 또한 의미 있게 증가하였다 (표 7).

표 7. ST5에서 공통적으로 발현 증가를 나타내는 유전자

ORF ID	Gene	Description	Isolate pair	
			1	2
<b>Metabolic and cellular process</b>				
MW0415	<i>metB</i>	cystathionine gamma synthase	1.53	5.50
MW0426	<i>gltB</i>	glutamate synthase large subunit	1.60	2.54
MW2132	<i>alsS</i>	acetolactate synthase	1.56	1.69
MW2537	<i>nrdD</i>	anaerobic ribonucleoside triphosphate	1.94	1.63
MW2553	<i>arcC</i>	carbamate kinase	1.55	2.31
MW2554	<i>arcD</i>	arginine/ornithine antiporter	1.68	2.29
MW2555	<i>arcB</i>	ornithine carbamoyltransferase	1.95	1.85
MW2556	<i>arcA</i>	arginine deiminase	1.61	1.62
<b>Polysaccharide metabolism</b>				
MW0124	<i>capA</i>	capsular polysaccharide biosynthesis protein capA	1.52	15.14
MW0125	<i>capB</i>	capsular polysaccharide biosynthesis protein capB	1.51	15.32
MW0936	<i>atl</i>	bifunctional autolysin	1.59	1.73

<b>Cell adhesion</b>				
MW0518	<i>sdrE</i>	Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein	1.80	3.09
MW2551	<i>clfB</i>	clumping factor B	1.82	3.47
<b>Cell death and pathogenesis</b>				
MW0206	<i>coa</i>	staphylocoagulase precursor	1.74	6.97
<b>Transport and localization</b>				
MW1274	<i>pstB</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	2.12	2.70
MW2082	<i>mtlF</i>	PTS system lactose-specific IIBC component	2.01	1.61

### (2) ST5 공통적인 발현 감소를 나타내는 유전자군 분석

ST5 2쌍에서 1.5배 이상 발현의 감소를 보이는 유전자는 pair 1의 경우 182개이고, pair 2의 경우 482개였다. 이들 2쌍에 있어 공통적으로 발현이 감소되는 유전자는 22개였다. Cell death 및 pathogenesis와 연관된 *set20*, *eutD*, *sec4*, *ssp*, *isdB*, *recX* 유전자가 공통적으로 감소하였다 (표 8).

표 8. ST5에서 공통적으로 발현 감소를 나타내는 유전자

ORF ID	Gene	Description	Isolate pair	
			1	2
<b>Cell death and pathogenesis</b>				
MW0386	<i>set20</i>	superantigen-like protein 5	-1.61	-3.05
MW0543	<i>eutD</i>	phosphotransacetylase	-1.57	-1.62
MW0759	<i>sec4</i>	enterotoxin type C precursor	-1.57	-3.90
MW0767	<i>ssp</i>	extracellular ECM and plasma binding protein	-1.61	-3.10
MW1011	<i>isdB</i>	hypothetical protein MW1011	-1.59	-2.58
<b>Regulation of metabolic process</b>				
MW1813	<i>recX</i>	recombination regulator	-1.51	-2.45

### (3) ST72 공통적인 발현 증가를 나타내는 유전자군 분석

ST72 2쌍에서 1.5배 이상 발현의 증가를 보이는 유전자는 pair 3의 경우 114개이고, pair 4의 경우 246개였다. 이들 2쌍에 있어 공통적으로 발현이 증가되는 유전자는 24개였다. 대표적으로 세포벽 생성과 직접 관련 있는 유전자인 *capA*, *capB* 유전자가 ST5에서와 마찬가지로 공통적으로 증가하였다. 특히 ST72에서는 nitrogen

metabolism과 urease production에 관련된 *ureA*, *ureB*, *ureC*, *ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureD* 의 유전자가 동일하게 발현이 증가하였고, VitB1 metabolism과 연관되어 carbohydrate metabolism을 촉진시키는 *thiE*, *thiM*, *thiD* 유전자도 증가하였다. 또한 nitrogen nutrition/Ni transport에 연관된 *opp-2C*, *opp-2B* 유전자도 증가하였다 (표 9).

표 9. ST72에서 공통적으로 발현 증가를 나타내는 유전자

ORF ID	Gene	Description	Isolate pair	
			3	4
<b>Metabolic and cellular process</b>				
MW0123	<i>adhE</i>	bifunctionalacetaldehyde-CoA/alcoholdehydrogenase	1.58	1.66
MW2014	<i>thiE</i>	thiamine-phosphate pyrophosphorylase	2.01	3.19
MW2015	<i>thiM</i>	hydroxyethylthiazole kinase	1.91	3.83
MW2016	<i>thiD</i>	phosphomethylpyrimidine kinase	1.68	4.34
MW2198	<i>narQ</i>	formate dehydrogenase accessory protein	1.54	4.76
MW2469	<i>clpL</i>	ATP-dependent Clp proteinase chain clpL	1.59	1.52
MW2531	<i>betA</i>	choline dehydrogenase	1.56	2.27
<b>Nitrogen metabolism</b>				
MW2206	<i>ureA</i>	urease, gamma subunit	2.22	11.55
MW2207	<i>ureB</i>	urease, alpha subunit	2.54	10.87
MW2208	<i>ureC</i>	urease subunit alpha	2.01	8.75
MW2209	<i>ureE</i>	urease accessory protein ureE	1.81	7.71
MW2210	<i>ureF</i>	urease accessory protein ureF	1.85	8.30
MW2211	<i>ureG</i>	urease accessory protein ureG	1.61	7.61
MW2212	<i>ureD</i>	urease accessory protein ureD	1.81	7.24
<b>Polysaccharide metabolism</b>				
MW0124	<i>capA</i>	capsular polysaccharide biosynthesis protein capA	1.51	1.58
MW0125	<i>capB</i>	capsular polysaccharide biosynthesis protein capB	1.52	1.50
<b>Cell death and pathogenesis</b>				
MW1940	<i>hlyB</i>	beta-hemplysin, partial	1.53	2.18
<b>Transport and localization</b>				
MW1269	<i>opp-2C</i>	oligopeptide transporter permease 2C	1.97	2.05
MW1270	<i>opp-2B</i>	oligopeptide transporter permease 2B	1.69	2.27

(4) ST72 공통적인 발현 감소를 나타내는 유전자군 분석

ST72 2쌍에서 1.5배 이상 발현의 증가를 보이는 유전자는 pair 3의 경우 127개였고, pair 4의 경우 306개였다. 이들 2쌍에 있어 공통적으로 발현이 증가되는 유전자는 29개였다. 표면 단백질의 stability와 연관된 serine protease를 encoding 하는 *splF*, *splC*, *splB*, *splA* 유전자의 발현이 감소하였다. 또한 peptidoglycan turnover와 관련된 murein hydrolase를 encoding 하는 *lrgA*, *lrgB*의 유전자 발현이 감소하였다 (표 10).

**표 10. ST72에서 공통적으로 발현 감소를 나타내는 유전자**

ORF ID	Gene	Description	Isolate pair	
			3	4
<b>Metabolic and cellular process</b>				
MW0364	<i>xprT</i>	xanthine phosphoribosyltransferase	-1.56	-2.38
MW0694	<i>nrdF</i>	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	-1.50	-2.07
MW0843	<i>argG</i>	argininosuccinate synthase	-1.62	-3.03
MW0857	<i>clpB</i>	hypothetical protein	-1.58	-1.80
MW1626	<i>thrS</i>	threonyl-tRNA syntetase	-1.76	-6.71
MW1752	<i>splF</i>	serine protease splF	-1.57	-2.75
MW1753	<i>splC</i>	serine protease splC	-2.34	-2.94
MW1754	<i>splB</i>	serine protease splB	-2.54	-2.91
MW1755	<i>splA</i>	serine protease splA	-3.23	-3.51
<b>Cell death and pathogenesis</b>				
MW0084	<i>spa</i>	IgG binding protein A precursor	-22.05	-10.27
MW0238	<i>lrgA</i>	murein hydrolase regulator LrgA	-1.67	-4.37
MW0239	<i>lrgB</i>	antiholin-like protein LrgB	-1.78	-4.14
MW1378	<i>lukF</i>	Panton-Valentine leukocidin chain F precursor	-2.04	-2.88
MW1767	<i>lukD</i>	leukotoxin	-1.51	-2.65
<b>Regulation of metabolic process</b>				
MW0085	<i>sarH1</i>	hypothetical protein	-2.46	-2.69

#### 4. Transcriptome 분석에서 선별된 유전자의 RT-PCR을 이용한 발현 차이 분석

Transcriptome 분석을 통해 의미있는 다음 유전자를 선별하여 RT-PCR을 시행하였다.

- ST5에서 발현이 증가한 유전자: *capA*, *capB* (cell wall biosynthesis), *atl* (autolysin), *arcC/arcD* (arginine catabolic pathway), *metB*, *gltB*, *adhE*, *norA*, *ilvB* (기타 유전자)
- ST5에서 발현이 감소한 유전자: *set20*, *isdB* (pathogenesis)
- ST72에서 발현이 증가한 유전자: *capA*, *capB* (cell wall biosynthesis), *ureA*, *ureB* (urease production), *thiE* (VitB1 metabolism), *opp-2B/opp-2C* (Nitrogen nutrition/Ni transport), *adhE*, *norA*, *ilvB* (기타 유전자)
- ST72에서 발현이 감소한 유전자: *lrgA*, *lrgB* (peptidoglycan turnover), *splF/splC* (surface protein stability)

**(1) *capA*, *capB***

ST5 Clin\_IPS와 Lab\_IPS 에서 *capA*, *capB* 유전자는 11쌍 중 7쌍에서 발현 증가 양상을 보였고 (그림 13), VSSA, hVISA 임상균주 사이의 상대정량 값의 차이가 1.5배 이상인 균주는 6쌍 (54.5%, 6/11)이었다.

그림 13의 B, D에서 보는 바와 같이 임상균주를 대상으로 한 분석에서 hVISA에서 *capA*, *capB* 발현이 유의하게 증가하였다 (P=0.01). 즉, IPS와 임상균주에서 공통적으로 *capA*, *capB* 유전자의 발현이 유의한 수준으로 증가함을 확인하였다.



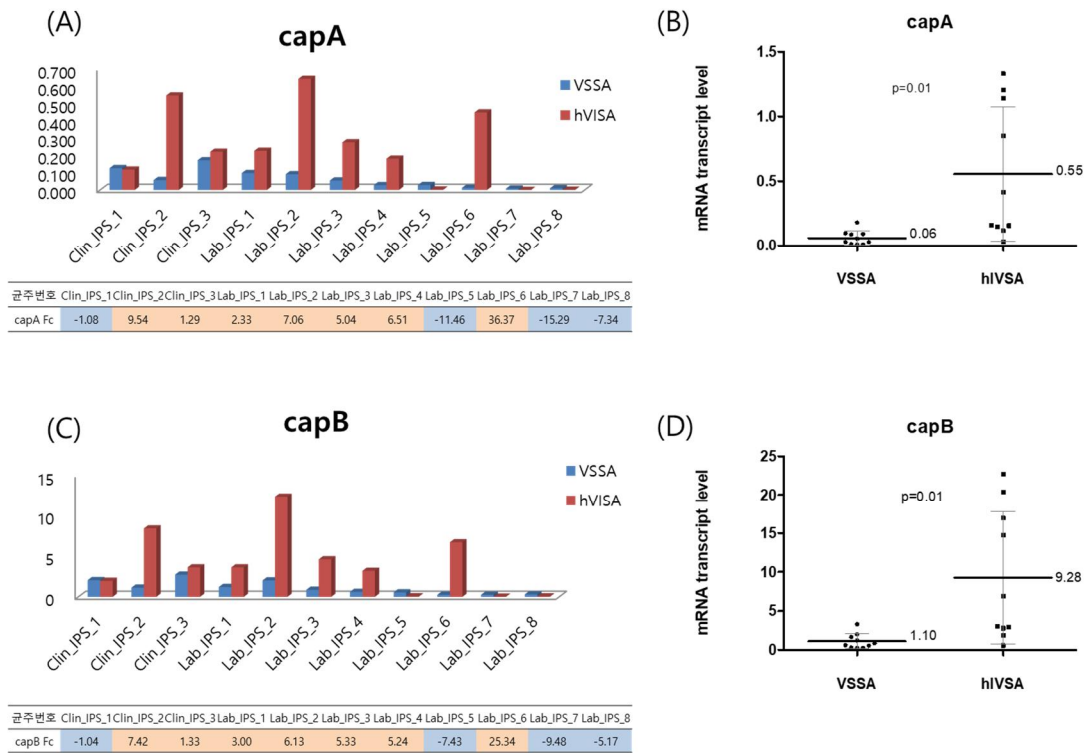


그림 13. ST5 균주에서 *capA/capB* 유전자의 mRNA transcript level. (A) IPS내에서 VSSA와 hVISA의 *capA* mRNA transcript level (B) 임상균주들의 *capA* 유전자들의 mRNA transcript의 분포도 (C) IPS내에서 VSSA와 hVISA의 *capB* mRNA transcript level (D) 임상균주들의 *capB* 유전자들의 mRNA transcript의 분포도

ST72의 경우 IPS에서 microarray 결과와는 달리 감소 경향이 두드러졌으며, VSSA, hVISA 임상균주를 대상으로 발현 분석을 한 결과에서는 hVISA가 VSSA에 비해 유의하게 증가했다 (*capA*, P=0.02; *capB*, P=0.01).

(2) *atl*

ST5 Clin\_IPS\_1, Clin\_IPS\_2의 경우 VSSA에 비해 hVISA에서 *atl* 유전자 mRNA transcript의 상대정량 값이 1.5배 이상 차이가 나며 의미 있는 발현증가 양상을 보였다. 그러나 Clin\_IPS에서와는 반대로 Lab\_IPS에서 *atl*은 hVISA에서 발현이 감소하는 결과를 보였다 (그림 14). 본 실험의 결과로 볼 때 *atl*과 같은 일부 유전자는 환자로부터 직접 분리한 Clin\_IPS와 Lab\_IPS 사이에서 발현의 차이를 보인다는 것을 알 수 있었다. VSSA, hVISA 임상균주를 대상으로 발현 분석을 한

결과에서도 mRNA transcript의 분포를 살펴보면 hVISA에서 유의하게 증가하였다 (P=0.04).

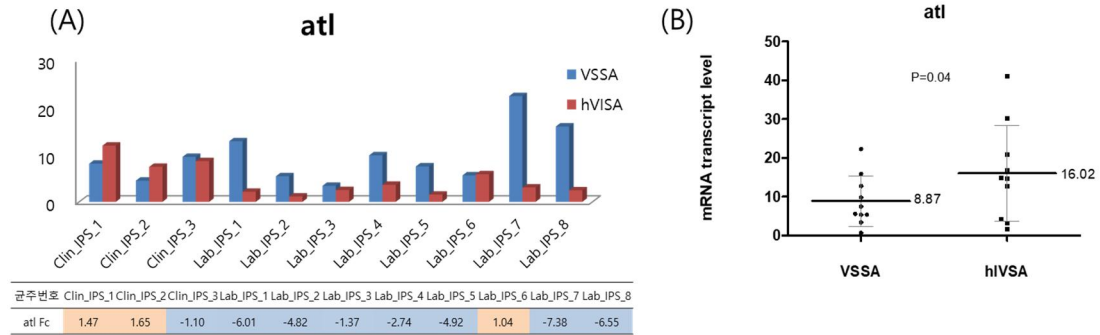


그림 14. ST5 균주에서 *atl* 유전자의 mRNA transcript level. (A) IPS 내에서 VSSA와 hVISA의 *atl* mRNA transcript level (B) 임상균주들의 *atl* 유전자들의 mRNA transcript의 분포도

ST72의 경우, Clin\_IPS에서 발현이 증가 양상이었고, ST5과 동일하게 Lab\_IPS에서는 감소 경향을 보였다. 그러나 hVISA 임상균주에서 VSSA 임상균주에 비해 유의하게 증가하였다 (P=0.02).

### (3) *ureA*, *ureB*

ST72 Clin\_IPS 2쌍 모두에서 hVISA의 *ureA*, *ureB* 유전자 발현증가 양상을 보였다 (그림 15A,C). Lab\_IPS의 11쌍 중 6쌍 (54.5%)에서 *ureA*, *ureB* 유전자의 발현이 높게 나타났으나, 3쌍 (27%)에서는 hVISA에서 발현이 감소하는 결과를 보였다 (그림 15A, C).

VSSA, hVISA 임상균주를 대상으로 하였을 때 *ureA*, *ureB* 유전자의 발현이 hVISA에서 유의하게 증가되었다 (P=0.05) (그림 15B, D).

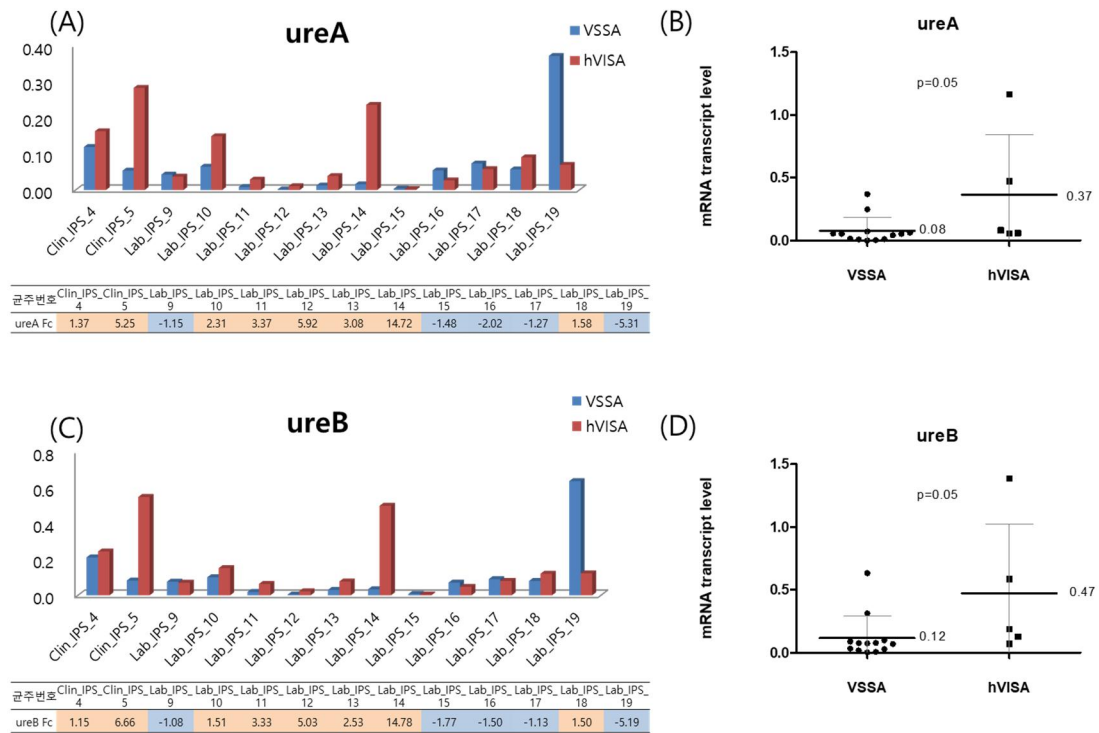


그림 15. ST72 균주에서 *ureA/ureB* 유전자의 mRNA transcript level. (A) IPS내에서 VSSA와 hVISA의 *ureA* mRNA transcript level (B) 임상균주들의 *ureA* 유전자들의 mRNA transcript의 분포도 (C) IPS내에서 VSSA와 hVISA의 *ureB* mRNA transcript level (D) 임상균주들의 *ureB* 유전자들의 mRNA transcript의 분포도

ST5 그룹의 경우, Clin\_IPS에서 *ureA/ureB* 유전자 발현증가 양상이 보였으나, Lab\_IPS의 경우 5쌍 (62%, 5/8)이 발현감소 경향이였다. VSSA, hVISA 임상균주에서 공통적으로 *ureA/ureB* 유전자의 발현증가를 확인하였다.

#### (4) *lrgA, lrgB*

ST72 Clin\_IPS\_5에서 *lrgA, lrgB* 유전자의 뚜렷한 발현 감소가 나타났다. 특히 Clin\_IPS\_5에서 *lrgA, lrgB*의 상대정량값이 VSSA와 비교하여 6배 이상 감소하였다. Lab\_IPS의 11쌍 중 10쌍(90.9%)에서 *lrgA, lrgB* 유전자의 발현이 감소하였고, VSSA와 비교한 상대정량 값이 3배에서 30배 이상 발현이 감소하는 결과를 보였다 (그림 16).

VSSA, hVISA 임상균주를 대상으로 발현 분석을 하였을 때, hVISA에서 VSSA에 비해 유의하게 *lrgA, lrgB* 발현 정도가 낮았다 (*lrgA*, P=0.02; *lrgB*, P=0.04). 즉,

ST72균주들에서는 IPS 균주와 임상균주들에서 공통적으로 hVISA의 유의한 *lrgA*, *lrgB* 유전자의 발현 감소를 확인하였다.

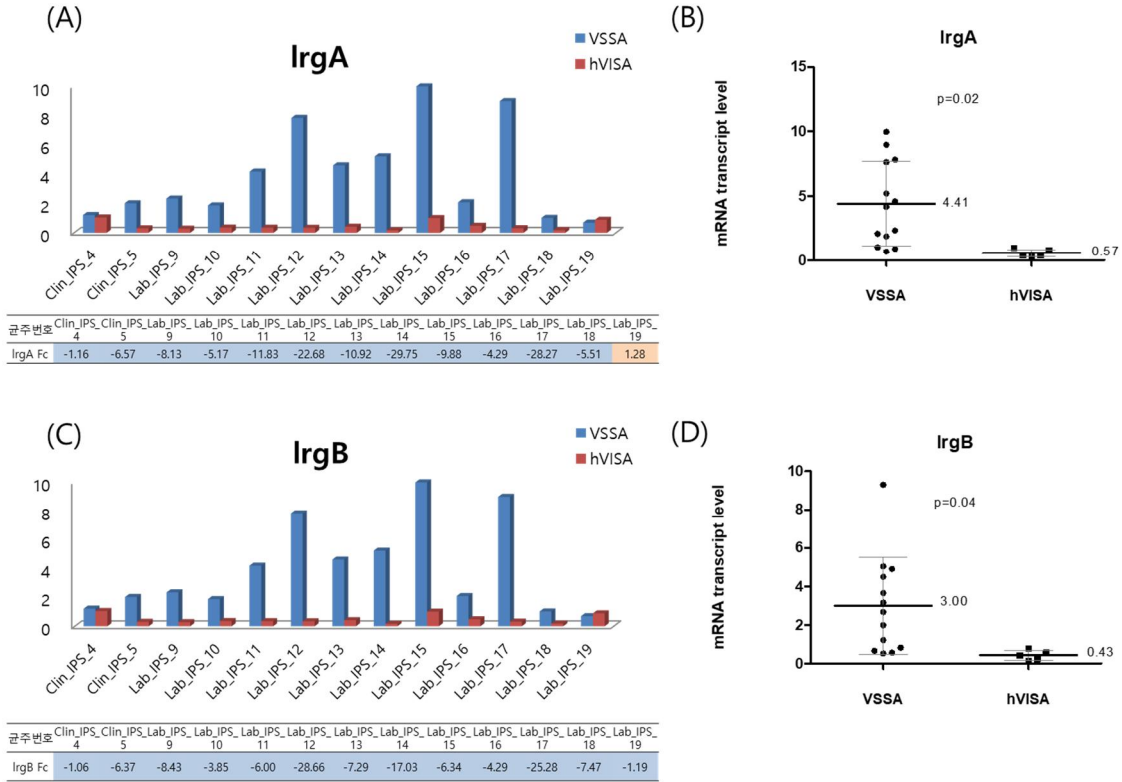


그림 16. ST72 균주에서 *lrgA*, *lrgB* 유전자의 mRNA transcript level. (A) IPS내에서 VSSA와 hVISA의 *lrgA* mRNA transcript level (B) 임상균주들의 *lrgA* 유전자들의 mRNA transcript의 분포도 (C) IPS내에서 VSSA와 hVISA의 *lrgB* mRNA transcript level (D) 임상균주들의 *lrgB* 유전자들의 mRNA transcript의 분포도

ST5의 경우, IPS의 11쌍 모두에서 ST72와 동일하게 *lrgA/lrgB* 유전자의 발현이 감소 양상이었으나, 임상균주에서는 유의한 차이가 없었다 (*lrgA*, P=0.24; *lrgB*, P=0.45).

이외 다른 유전자 (*spiFC*, *thiE*, *opp2C*, *2B*, *arcCD*, *metB*, *gltB*, *adhE*, *norA*, *ilvB* 등)에서는 Clin\_IPS와 Lab\_IPS에서 공통적인 발현의 차이가 없고, VSSA, hVISA 임상균주에서 유의한 발현의 차이가 없었다.

결론적으로 RT-PCR을 이용한 transcriptome 분석에서 ST5는 cell wall 형성에 관여하는 유전자인 *capA*, *capB* 및 autolysis에 관여하는 유전자인 *atl*이 의미 있는 발현 차이를 보였다. ST72는 urease production & amino acid metabolism에 관여하는 유전자인 *ureA*, *ureB* 및 peptidoglycan turnover에 관여하는 유전자인 *lrgA*, *lrgB*가 의미 있는 발현 차이를 보였다. 따라서 ST5는 *capA*, *capB*, *atl*에 대하여, ST72는 *ureA*, *ureB*, *lrgA*, *lrgB*에 대하여 다수의 hVISA, VSSA 임상균주를 대상으로 진단적 유의성을 평가하기로 하였다.

## 5. Allelic replacement

Transcriptome 분석에서 선별된 유전자 중 RT-PCR 연구에서 의미 있는 발현 차이를 보였던 유전자를 대상으로 하였으며, allelic replacement이 기술적으로 어렵고, 성공률이 낮기 때문에 microarray 결과에서 큰 발현 차이를 보였던 일부의 유전자를 추가하였다.

즉, allelic replacement 대상 유전자는 다음과 같았다.

가. Transcriptome 분석하여 선별된 유전자 중 RT-PCR에서 의미 있는 발현의 차이를 보였던 유전자

- Cell wall 형성에 관여: *capA*, *capB*
- Autolysis에 관여: *atl*
- Urease production & amino acid metabolism에 관여: *ureA*, *ureB*
- Peptidoglycan turnover에 관여: *lrgA*, *lrgB*

나. RT-PCR에서는 유의하지 않았지만 transcriptome 분석에서 발현 차이가 매우 컸던 유전자

- Thioredoxin reductase: SA1221
- Phosphate ABC transporter ATP-binding protein: *pstB*
- Hypothetical protein: SA2095

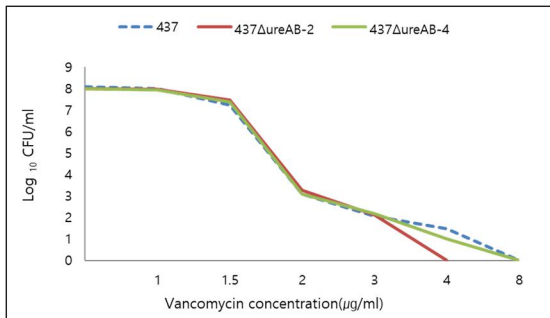
Allelic replacement 대상 균주는 다음과 같았다.

- 가. ST5: VSSA 4주, hVISA 4주, VISA 2주, VRSA 2주
- 나. ST72: hVISA 4주

**(1) ureAB**

비활성화된 돌연변이주를 구축하기 위해 VSSA, hVISA, VISA, VRSA 균주들에 도입을 시도하였다. 비활성화된 돌연변이주는 세 균주에서만 성공이 되었고 vancomycin 내성에 대한 영향을 확인하기 위해 PAP-AUC로 확인하였다.

- 437[VSSA] 균주의 경우 AUC값이 wild type 균주에 비해 5-16% 감소하였다

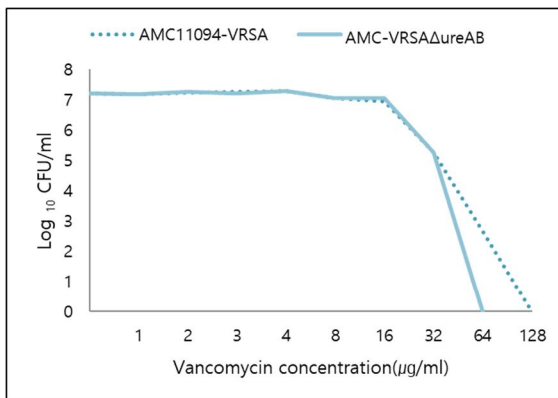


	Vancomycin MIC	AUC	AUC ratio
437	1	21.72	1.0
437ΔureAB-2	1	18.27	0.84
437ΔureAB-4	1	20.65	0.95

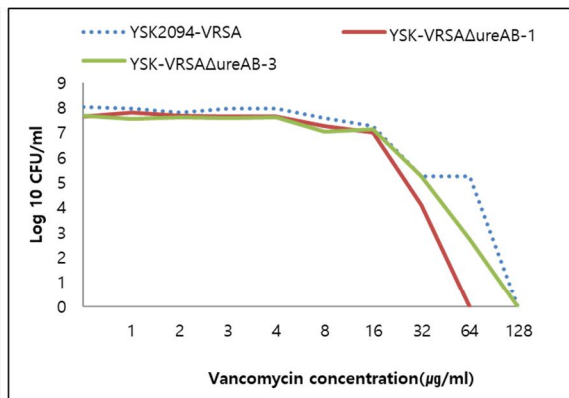
그림 17. 437 wild type균주와 ΔureAB 돌연변이 균주의 vancomycin 농도에 따른 PAP-AUC비

- AMC11094[VRSA]의 경우 AUC값이 wild type 균주에 비해 30% 감소하였다

- YSK2094[VRSA]의 경우 AUC값이 wild type 균주에 비해 23~51% 감소하였다



	AUC	AUC ratio
AMC11094-VRSA	423.94	1.0
AMC-VRSAΔureAB	296.84	0.70

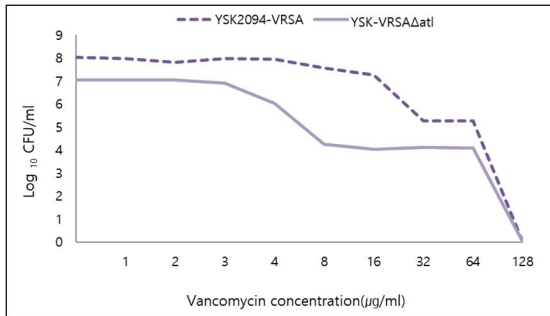


	AUC	AUC ratio
YSK2094-VRSA	559.57	1.00
YSK-VRSAΔureAB-1	272.64	0.49
YSK-VRSAΔureAB-3	431.24	0.77

그림 18. AMC11094, YSK2094 wild type균주와 ΔureAB 돌연변이 균주의 vancomycin 농도에 따른 PAP-AUC비

**(2) *atl***

비활성화 된 돌연변이주를 구축하기 위해 VSSA, hVISA, VISA, VRSA 균주들에 도입을 시도하였고, YSK2094-VRSA 균주에서만 비활성화된 돌연변이주를 구축할 수 있었다. 돌연변이주의 경우 AUC 값이 wild type 균주에 비해 27% 감소하였다.

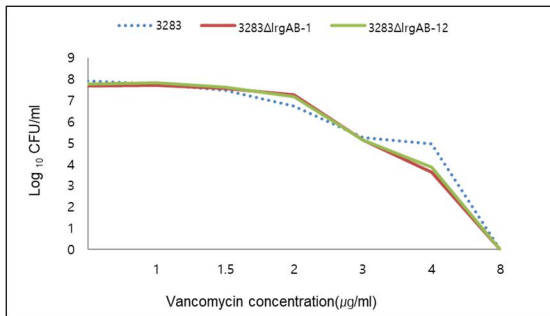


	Vancomycin MIC	AUC	AUC ratio
YSK2094-VRSA	48	559.57	1.0
YSK-VRSAΔatl	24	408.87	0.73

**그림 19. YSK2094 wild type균주와 Δatl 돌연변이 균주의 vancomycin 농도에 따른 PAP-AUC비**

**(3) *lrgAB***

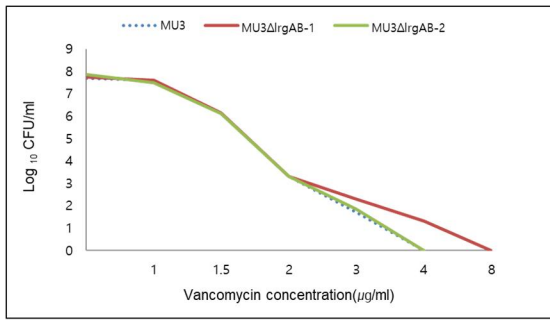
hVISA 균주들 중에서 PAP-AUC 값이 높은 3283[hVISA]의 경우에는 *lrgAB* 유전자가 비활성화 된 돌연변이주에서 PAP-AUC 값이 7-9% 감소하였다.



	Vancomycin MIC	AUC	AUC ratio
3283	3	36.27	1.00
3283ΔlrgAB-1	3	33.10	0.91
3283ΔlrgAB-2	3	33.77	0.93

**그림 20. 3283 wild type균주와 ΔlrgAB 돌연변이 균주의 vancomycin 농도에 따른 PAP-AUC비**

또한 hVISA 표준 균주인 MU3 돌연변이주에서는 PAP-AUC 값이 23% 증가하였다.

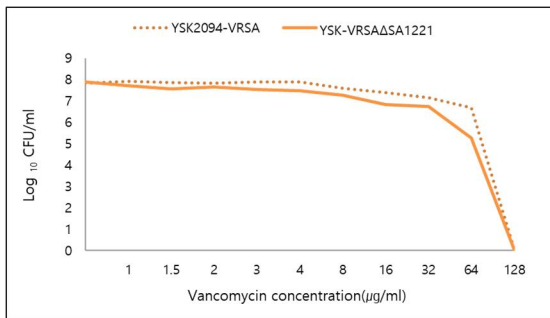


	Vancomycin MIC	AUC	AUC ratio
MU3	2	16.78	1.00
MU3ΔlrgAB-1	1.5	20.68	1.23
MU3ΔlrgAB-2	2	16.91	1.01

그림 21. Mu3 wild type균주와 ΔlrgAB 돌연변이 균주의 vancomycin 농도에 따른 PAP-AUC비

### (5) SA1221

SA1221 유전자가 비활성화 된 돌연변이주는 YSK2094-VRSA에서 확인되었고 WT 균주에 비해 비활성화 된 돌연변이주는 38% 감소하였다.



	Vancomycin MIC	AUC	AUC ratio
YSK2094-VRSA	48	673.06	1.00
YSK-VRSAΔSA1221	32	416.68	0.62

그림 22. YSK2094 wild type균주와 ΔSA1221 돌연변이 균주의 vancomycin 농도에 따른 PAP-AUC비

### (6) 비활성화된 돌연변이주의 구축이 어려웠던 유전자

*capAB* 유전자가 비활성화 된 돌연변이는 pKOR1 플라스미드를 437[VSSA], MU3[hVISA], MU50[VISA] 균주 내에 도입은 성공하였으나 *capAB* 유전자가 비활성화된 돌연변이주는 구축하지 못하였다. 즉, 균주별로 최종 스크리닝 단계에서 50여개의 콜로니를 확인했으나 비활성화된 돌연변이주를 찾지 못하였다. SA2095, *pstB* 유전자가 비활성화 된 돌연변이주의 경우에도 pKOR1 플라스미드 형태로



임상균주로 도입은 성공되었으나 비활성화된 돌연변이주를 구축하지 못하였다. 비활성화된 돌연변이주의 성공이 어려울 뿐만 아니라 이러한 유전자들이 비활성화될 경우 박테리아의 성장이나 fitness에 영향을 받아 생존이 어려울 것으로 판단하였다.

## 6. 유전자 발현 정도에 따른 점수 체계의 hVISA 진단 유의성 평가

다수의 hVISA, VSSA 임상균주 (hVISA: ST5 30균주, ST72 16균주, VSSA: ST5 30균주, ST72 20균주)를 대상으로 발현 차이를 RT-PCR을 통해 검증하기로 하였다.

대상 유전자는 선행 실험 결과를 토대로 하여 다음 표와 같이 선정하였다 (표 11). RT-PCR을 이용하여 발현 차이가 유의하게 있었던 세포벽 관련 유전자 (*prsA*, *graS*, *graR*), 표면 단백질 유전자 (*spa*, *mprF*), 그리고 transcriptome 분석에서 의미가 있었던 *capAB* 유전자, 또한 transcriptome 분석 및 allelic replacement 연구에서 유의했던 *atl*, *ureAB* 유전자를 선정하였으며, 이번 실험에서 발현 차이는 없었지만 이전 문헌에서 hVISA에서 변이가 있는 것으로 확인되었거나 (*walk*, *wakR*,<sup>19</sup> *sarA*,<sup>20</sup> *agr*<sup>21</sup> 등), *S. aureus*의 중요한 global regulator (*sigB*, *saeSR*) 등을 포함하여 유전자를 선정하였다.

표 11. ROC curve를 이용한 hVISA 진단의 유의성 평가를 할 유전자 후보

	유전자	기능
<b>Gene-based study</b>	<i>prsA</i> , <i>graS</i> , <i>graR</i>	Cell wall stimulon
	<i>spa</i> , <i>mprF</i>	Surface protein
	<i>walk</i> , <i>walR</i> , <i>saeS</i> , <i>saeR</i>	Two-component regulatory system
	<i>agr</i> , <i>sarA</i> , <i>sigB</i>	Global regulator
<b>Transcriptome 분석</b>	<i>ureA</i> , <i>ureB</i>	Urea production & NO2 metabolism
	<i>atl</i>	Autolysis
	<i>capA</i> , <i>capB</i>	Cell wall의 capsule 형성

hVISA (시험균)과 VSSA (대조균)을 대상으로 유전자의 발현 차이를 분석한 결과 *prsA*, *graR*, *spa*, *mprF*, *walk*, *walR*, *saeS*, *saeR*, *agr*, *sarA*, *atl*은 ST5, ST72에서 모두 유의한

발현의 차이가 없었다. 반면, *graS*는 ST5 hVISA에서 VSSA에 비해 발현이 유의하게 감소하였다 (P=0.027)(그림 23). *sigB*는 ST72 균주들에서 hVISA에서 발현이 유의하게 감소하였다 (P=0.01). ST72에서 *ureAB* 유전자 발현을 비교한 결과 hVISA에서 발현이 유의하게 증가하였다 (*ureA*, P=0.01; *ureB*, P=0.014). 또한 *capA*의 유전자의 발현은 ST5와 ST72 hVISA에서 유의하게 증가하였고 (ST5, P=0.03; ST72, P=0.007), *capB*는 ST5에서 유의한 증가, ST72에서는 증가하는 경향성이 있었다 (ST5, P=0.02; ST72 =0.06).

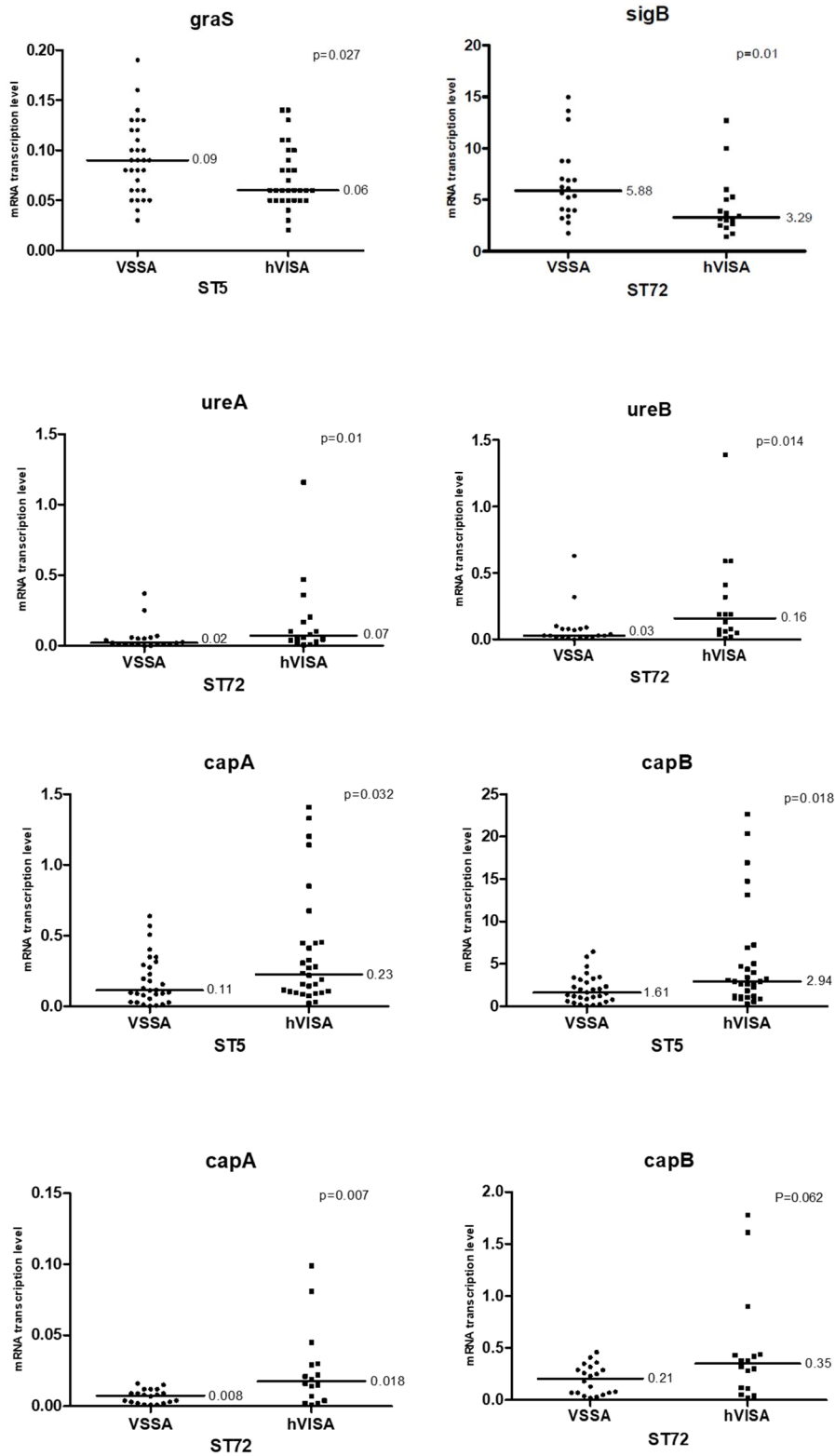


그림 23. VSSA와 hVISA에서의 *graS*, *sigB*, *ureA*, *ureB*, *capA*, *capB* mRNA transcript level

위 결과를 바탕으로 hVISA 진단에 사용할 유전자 후보는 다음 표와 같았다.

**표 12. hVISA 진단에 사용할 유전자**

	다수의 hVISA, VSSA 임상 균주에서 의미있는 발현 차이를 보였던 유전자	
	ST5	ST72
Cell wall 관련 선정 유전자	<i>graS</i>	<i>sigB</i>
Genome-wide 선정 유전자	<i>capA, capB</i>	<i>ureA, ureB, capA</i>

ST5 균주들(hVISA, VSSA)에서 ROC curve를 그렸을 때, *graS*, *capA*, *capB* 유전자 단독으로는 AUC값이 0.66-0.68로 충분치 않았다. hVISA가 하나의 유전자나 표현형에 의하여 발생하는 것이 아니기 때문에 단독 유전자의 민감도, 특이도가 충분하지 않음은 충분히 설명할 수 있다. 따라서 여러 유전자를 조합하여 ROC curve를 확인하였으며, hVISA의 형질과 vancomycin MIC가 밀접한 관계가 있으므로 표현형인 vancomycin MIC를 포함하여 유전자와 표현형을 조합하여 AUC를 확인하였다 (표 13). *capA*, *capB*, vancomycin MICx2 조합이 가장 높은 AUC값 (0.92)을 보여주었다 (그림 24).

**표 13. ST5 균주에서 유전자와 vancomycin MIC 조합에 따른 AUC 값**

ST5	ROC curve의 AUC
<i>graS</i>	0.67
<i>capA</i>	0.66
<i>capB</i>	0.68
<i>graS</i> + <i>capA</i>	0.73
<i>graS</i> + <i>capB</i>	0.77
<i>capA</i> + <i>capB</i>	0.64
<i>graS</i> + vancomycin MIC	0.81
<i>capA</i> + vancomycin MIC	0.79
<i>capB</i> + vancomycin MIC	0.84
<i>graS</i> + <i>capA</i> + vancomycin MIC	0.86
<i>graS</i> + <i>capB</i> + vancomycin MIC	0.88

<i>capA</i> + <i>capB</i> + vancomycin MIC	0.76
<i>capA</i> + <i>capB</i> + vancomycin MICx2	0.92

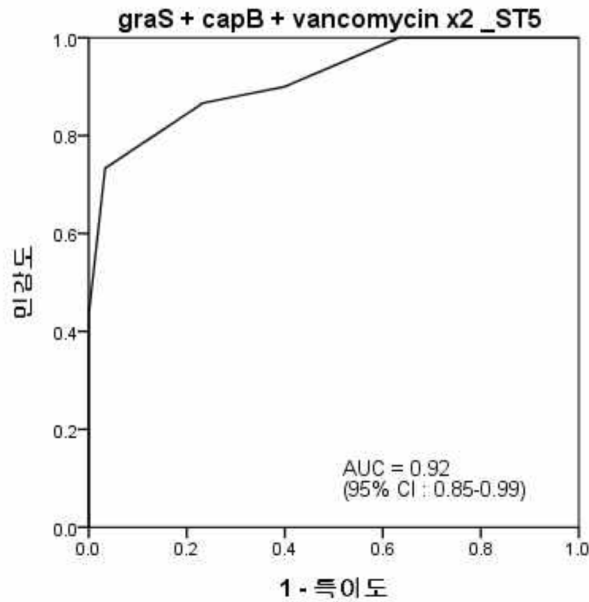


그림 24. ST5에서 *graS*, *capB*, vancomycin MICx2 값의 ROC curve (AUC=0.92)

또한 ST5 균주에서 유전자 발현양에 따른 점수 체계를 다음과 같이 고안하였다 (표 14).

표 14. ST5 균주에서 유전자 발현양에 따른 점수 체계

Score	<i>graS</i>	<i>capA</i>	<i>capB</i>	Vancomycin MIC
0	0.103-0.19	0.00-0.09	0.07-1.05	≤1
1	0.075-0.102	0.10-0.16	1.06-2.25	1.5
2	0.055-0.074	0.17-0.35	2.26-3.47	≥2
3	0.022-0.054	0.36-1.41	3.48-22.67	

*graS*, *capB*, vancomycin MICx2를 합산한 값이 5점 이상일 때 hVISA 진단의 민감도는 86.6%, 특이도 83.0%, 양성 예측도 83.8%, 음성 예측도 86.2%로 확인할 수 있었다.

다음으로 ST72 균주들 (hVISA, VSSA)에서 유전자의 조합으로 ROC curve를 그렸을 때 AUC값은 다음과 같았다 (표 15).

표 15. ST72 균주에서 유전자 조합에 따른 AUC 값

ST72	ROC curve의 AUC
<i>sigB</i>	0.75
<i>capA</i>	0.76
<i>ureA</i>	0.75
<i>ureB</i>	0.74
<i>sigB</i> + <i>capA</i>	0.83
<i>sigB</i> + <i>ureA</i>	0.81
<i>sigB</i> + <i>ureB</i>	0.83
<i>capA</i> + <i>ureA</i>	0.75
<i>ureA</i> + <i>ureB</i>	0.73
<i>sigB</i> + <i>capA</i> + <i>ureA</i>	0.85
<i>sigB</i> + <i>capA</i> + <i>ureB</i>	0.85
<i>sigB</i> + <i>ureA</i> + <i>ureB</i>	0.80
<i>capA</i> + <i>ureA</i> + <i>ureB</i>	0.76

ST72 균주에서 유전자 발현양에 따른 점수체계를 다음과 같이 고안하였다 (표 16).

표 16. ST72 균주에서 유전자 발현양에 따른 점수 체계

Score	<i>sigB</i>	<i>capA</i>	<i>ureA</i>	<i>ureB</i>
0	6.93-14.97	0.00-0.003	0.00-0.013	0.00-0.02
1	5.02-6.92	0.003-0.009	0.014-0.04	0.03-0.07
2	3.16-5.01	0.009-0.016	0.05-0.08	0.08-0.018
3	1.42-3.03	0.017-0.099	0.09-1.16	0.19-1.39

*sigB* + *capA* + *ureA* 조합에서 AUC 0.85 이었으며, 6점 이상일 때 민감도 81%, 특이도 75%였다. *sigB* + *capA* + *ureB* 조합에서는 AUC 0.85 (그림 25)이었으며, 6점 이상일 때, 민감도 81.0%, 특이도 90.0%, 양성 예측도 86.6%, 음성 예측도 90.0%로 확인할 수

있었다. 따라서, *sigB + capA + ureB* 유전자 발현양 조합이 ST72 hVISA 검출에 진단적 유의성이 있다고 판단하였다.

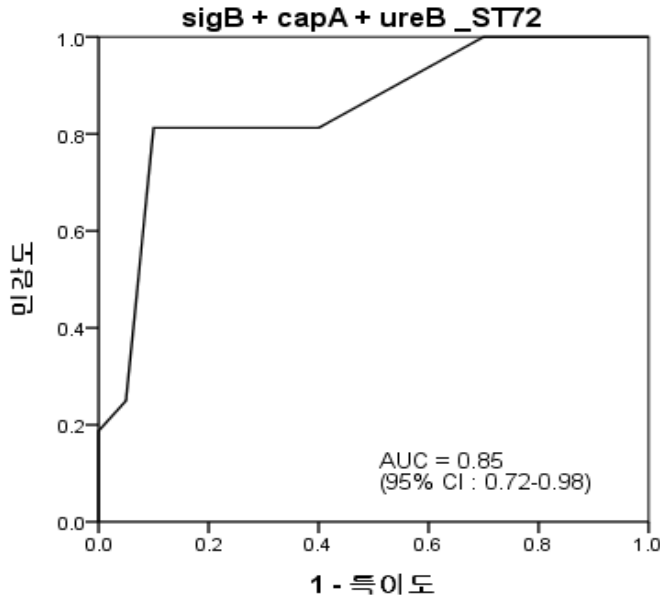


그림 25. ST72에서 *sigB, capA, ureB*값의 ROC curve

상기 유전자, 표현형 조합을 이용한 점수 체계를 향후 임상에서 사용하게 된다면 적용 방안은 다음 그림과 같다. (그림 26)

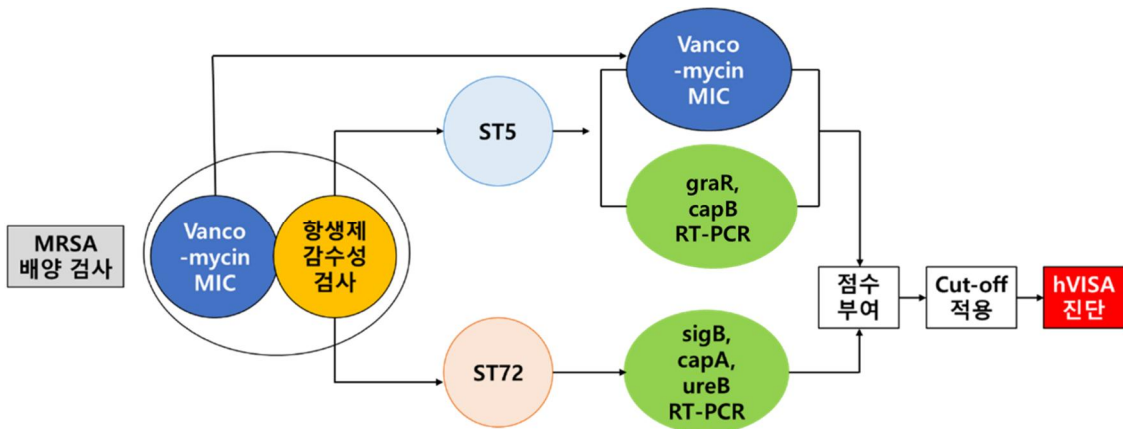


그림 26. 임상에서 hVISA 점수체계의 적용 방안

배양 검사에서 보고된 항생제 감수성 검사 결과를 보면 ST5와 ST72를 쉽게 감별할 수 있고 vancomycin MIC 또한 항생제 감수성 검사 보고 시에 동시에

보고된다. 따라서 ST5의 경우 vancomycin MIC에 대한 점수와 *graS*, *capB* 유전자의 RT-PCR을 시행하여 유전자 발현양에 따른 점수를 합산하여 5점 이상일 경우 hVISA로 진단할 수 있겠다. ST72의 경우 *sigB*, *capA*, *ureB* 유전자에 대한 RT-PCR을 시행하여 부여한 점수를 합산하여 6점 이상일 경우 hVISA로 진단할 수 있겠다.



## 고찰

본 연구를 통하여 hVISA에서 cell wall stimulon 중 *prsA*, *graS*, *graR*의 발현이 감소하고, 표면 단백질 중 *spa*, *mprF*의 발현이 감소하는 것을 RT-PCR을 통해 알 수 있었다. 또한 microarray를 통한 transcriptome 분석을 통하여 hVISA에서 캡슐 합성과 관련된 *capA*, *capB* 발현이 증가하고 urease와 관련된 *ureA*, *ureB* 발현 증가, *atl* (autolysin) 발현 증가, *thiE* 발현 감소, nitrogen transport와 관련있는 *opp-2C*, *opp-2B*의 발현 증가, arginine 대사와 관련된 *arcC*, *arcD*의 발현 증가 등을 확인할 수 있었다. 또한 allelic replacement 실험을 통해 *ureAB*, *atl*, SA1221가 비활성화된 돌연변이는 vancomycin 내성에 대한 영향을 확인하였을 때 PAP-AUC가 wild type에 비해 감소하는 것을 관찰하였다. 앞선 실험 결과를 토대로 최종적으로 임상균주들을 대상으로 유전자의 발현 차이를 RT-PCR로 확인하였을 때 ST5 hVISA에서는 ST5 VSSA에 비하여 *graS* 발현 감소, *capA*, *capB* 발현 증가가 있었고, ST72에서는 *sigB*의 유의한 발현 감소, *ureA*, *ureB*, *capA*의 발현 증가를 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 ST5 균주에서는 *graS*, *capB*의 발현 정도와 vancomycin MIC에 따른 점수가 5점 이상일 때 hVISA 검출의 민감도 86.6%, 특이도 83.0%, 양성 예측도 83.8%, 음성 예측도 86.2%로 우수하였다 ST72에서는 *sigB*, *capA*, *ureB*의 발현 정도에 따른 점수가 6점 이상일 때 hVISA 검출의 민감도 81.0%, 특이도 90.0%, 양성 예측도 86.6%, 음성 예측도 90.0%로 우수하였다.

본 연구를 통해 hVISA는 세포벽 관련 유전자 (*graS*), 세포벽에서 캡슐 형성에 관련있는 유전자 (*capA*, *capB*), global regulator (*sigB*), 요소대사와 관련있는 유전자 (*ureA*, *ureB*) 등에서 발현의 차이가 있는 것을 알 수 있었다. 이는 hVISA의 발생에 있어 여러 단계의 경로가 복잡하게 작용하는 것을 시사한다. 이번 연구는 hVISA/VISA의 기전을 파악하기 위해 다수의 Clin\_IPS 및 Lab\_IPS 그리고 임상균주를 대상으로 RT-PCR, microarray, allelic replacement 등 다단계의 실험을 통하여 이를 증명하고자 하였는데 강점이 있다. 또한 유전자 발현의 차이를 우리나라 MRSA 중 가장 흔한 ST5와 S72로 각각 나누어 분석한 점에 의의가 있다.

VISA, hVISA에서 세포벽이 두꺼워지는 것은 공통적인 현상으로 세포벽 합성이 활성화되고, 비정상적인 muropeptide (PBP2나 PBP2'의 과발현)의 생성이 증가된다.<sup>4</sup>

세포벽이 두꺼워져서 반코마이신이 active site인 cytoplasmic membrane으로 확산(diffusion)되는 것을 막는 것으로 추정한다.<sup>22,23</sup> 하지만 세포벽이 두꺼워지는 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았다. hVISA에서는 세포벽 합성에 관련된 유전자들이 과발현되고, *vraSR* two component regulatory system과 이 regulon에 의한 유전자들이 과발현되는 현상이 보고되었다.<sup>24-27</sup> 반코마이신이 세포벽 stress stimulon을 활성화시키고, VISA가 된 이후에 vancomycin 사용을 하지 않아도 이 활성화가 남아있는 것으로 추정하지만, *vraSR*이나 다른 cell wall stimulon의 과발현 없이도 반코마이신 내성은 발생하는 것을 관찰한 연구도 있다.<sup>11</sup> 즉 cell stimulon의 지속적인 유도가 없이도 hVISA나 VISA가 발생할 수 있다는 것을 의미한다. 본 연구에서는 hVISA에서 cell wall stimulon중 *prsA*, *graS*, *graR*의 발현이 오히려 감소하는 현상을 확인하였다. 아마도 VSSA가 hVISA로 변화하는 과정 중에는 과발현이 있을 수 있지만 실제 hVISA 임상균주에서는 발현이 감소한 상태로 유지될 가능성이 있겠다.

*graS*는 IPS에서 RT-PCR을 시행하였을 때 hVISA에서 발현이 유의하게 감소하였고 임상균주를 대상으로 발현 차이를 분석하였을 때도 ST5 hVISA에서 발현이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. *GraRS*는 two-component regulatory system으로 *GraR*이나 *GraS*의 과발현은 vancomycin MIC 증가와 관련있다고 보고되었다.<sup>28</sup> 또한 *GraRS* two-component regulatory system은 다른 많은 유전자 (특히 세포벽 합성과 관련된 유전자)의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.<sup>29</sup> 하지만 이번 연구에서처럼 hVISA에서 발현이 감소한 연구는 아직까지 없었으며, 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

그리고, 캡슐의 polysaccharide 생합성과 관련된 *capA*, *capB*의 발현이 증가되는 것을 관찰하였다. Capsular polysaccharide biosynthesis 유전자의 up-regulation되는 현상은 Howden 등도 관찰하였다.<sup>24,28,30</sup> 이는 여러 이유가 있을 수 있는데 아마도 VISA가 되면서 조절 단백질을 encoding하는 여러 유전자의 변이가 일어나면서 캡슐 형성이 함께 증가하고 반코마이신 내성도 발생하는 것으로 생각된다.<sup>4</sup> 캡슐 형성 증가가 직접적으로 반코마이신 내성에 관여하는지에 대해서는 추가 연구가 필요하겠다.

*sigB* regulon은 *S. aureus*에서 glycopeptide 내성에 기여할 것으로 생각된다.<sup>31</sup> *sigB*에 의해 조절받는 SpoVG에 deletion이 일어나게 되면 캡슐 형성이 되지 않고 glycopeptide 내성이 감소된다는 보고가 있었으며<sup>32</sup> VSSA에서 *sigB*의 과발현이 되면

반코마이신 내성이 증가한다는 보고도 있었다.<sup>28</sup> 이번 연구에서는 ST72 hVISA 임상균주들에서 오히려 *sigB*의 발현이 감소한 것을 알 수 있었는데 아마도 반코마이신 내성이 증가된 hVISA상태에서는 발현이 감소하는 것으로 추정된다.

본 연구에서 hVISA는 urease와 관련된 *ureA*, *ureB*의 발현이 증가하였다. urease는 ureABCEFGD 유전자 클러스터에 의해 encoded되며, 요소를 NH<sub>3</sub>와 CO<sub>2</sub>로 가수분해를 촉매하는 효소이며, 아미노산 대사와 퓨린 대사에도 관여한다.<sup>33</sup> 최근 *S. aureus* biofilm 형성시 urease 생산이 up-regulation 된다는 보고들이 있고<sup>34,35</sup> 이는 산이 많은 환경에서 암모니아가 많이 필요하기 때문에 urease가 up-regulation되는 것으로 추정한다. 이번 연구 결과와 유사하게 microarray를 이용한 transcriptome 분석에서 hVISA에서 urease 생산과 nitrogen metabolism에 관여하는 gene들 (*ureABCDEFG* 및 *narGH*, *nirD*)등이 발현이 증가한다는 연구가 있었다.<sup>30</sup> 아마도 hVISA/VISA는 에너지 요구량이 많고 대사산물이 많으며, 아미노산 (aspartate) 생합성 등의 증가되어 urease 과발현이 발생하는 것으로 추정한다. 이러한 urease 발현 증가가 hVISA/VISA 표현형과 어떻게 관련있는지 기전을 파악하기 위한 후속 연구가 필요하다.

이러한 유전자의 발현 정도를 기반으로 한 점수 체계를 개발하였고, 점수 체계에 따른 hVISA 진단 방법은 ST5에서는 민감도가 87%, 특이도 83%, ST72에서는 민감도 81%, 특이도 90%로 우수한 것으로 판단된다. 이러한 유전자의 발현양에 따른 hVISA 진단의 민감도, 특이도 평가는 이전에 연구된 적이 없다. 각 표적 유전자에 대한 RT-PCR을 시행하고 발현 정도를 측정하여야 임상에서 사용할 수 있기 때문에 각 병원에 상기 유전자에 대한 RT-PCR을 구축하여야 하고, RT-PCR 검사에 비용이 소모되기 때문에 실제 임상 현장에서의 진단적 유용성과 cost-effectiveness에 대해서는 추후 평가되어야 할 것으로 사료된다. 하지만 hVISA의 표준 진단인 PAP-AUC 보다는 RT-PCR이 인력과 시간이 덜 소모되고, hVISA를 진단하지 못하여 발생하는 치료 실패로 인한 비용을 고려하면 이러한 점수 체계를 통한 진단법은 가치 있을 것으로 보인다.

이번 연구의 제한점으로는 Clin\_IPS 균주의 수가 상대적으로 적었다는 점이 있다. 또한 allelic replacement study에서 *capAB*, SA2095, *pstB* 유전자가 비활성화된 돌연변이주는 구축하지 못하였다. 실제 비활성화된 돌연변이주를 구축하는데 성공율은 10-40%로 알려져 있으며<sup>18</sup> 각각의 균주로부터 competent cell의 효율이

높도록 만들어야하고, electroporation 효율 또한 allelic replacement에 영향을 미치므로 여러 변수로 인한 어려움이 많았다.

## 결 론

본 연구를 통해 hVISA는 VSSA와 비교하였을 때 세포벽 관련 (*graS*) 및 캡슐 형성 유전자 (*capA*, *capB*), global regulator (*sigB*), 요소 생성 및 질소 대사와 관련 있는 여러 유전자(*ureA*, *ureB*)들의 발현의 차이가 있는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 유전자들이 반코마이신 감수성 저하에 어떻게 기여하는지 기전에 대한 연구가 추후 필요하다. 또한 유전자의 발현 정도와 반코마이신 MIC를 기반으로 한 점수 체계를 개발하였고, 점수체계에 따른 hVISA 진단에 있어, ST5에서는 민감도가 87%, 특이도 83%, ST72에서는 민감도 81%, 특이도 90%로 우수한 것으로 판단된다. 점수 체계의 임상적 유용성에 대해 추후 더 많은 균주를 대상으로 실제 임상에서 사용 검증이 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Holland TL, Arnold C, Fowler VG, Jr. Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a review. *JAMA* 2014; **312**(13): 1330-41.
2. Liu C, Yoon EJ, Kim D, et al. Antimicrobial resistance in South Korea: A report from the Korean global antimicrobial resistance surveillance system (Kor-GLASS) for 2017. *J Infect Chemother* 2019; **25**(11): 845-59.
3. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med* 2003; **348**(14): 1342-7.
4. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 2010; **23**(1): 99-139.
5. Tenover FC, Moellering RC, Jr. The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2007; **44**(9): 1208-15.
6. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; **350**(9092): 1670-3.
7. van Hal SJ, Paterson DL. Systematic review and meta-analysis of the significance of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**(1): 405-10.
8. Kim MN, Pai CH, Woo JH, Ryu JS, Hiramatsu K. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J Clin Microbiol* 2000; **38**(10): 3879-81.

9. Park KH, Kim ES, Kim HS, et al. Comparison of the clinical features, bacterial genotypes and outcomes of patients with bacteraemia due to heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-susceptible *S. aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**(8): 1843-9.
10. Charles PG, Ward PB, Johnson PD, Howden BP, Grayson ML. Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2004; **38**(3): 448-51.
11. Howden BP, Johnson PD, Ward PB, Stinear TP, Davies JK. Isolates with low-level vancomycin resistance associated with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**(9): 3039-47.
12. Howden BP, Ward PB, Charles PG, et al. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. *Clin Infect Dis* 2004; **38**(4): 521-8.
13. Moore MR, Perdreau-Remington F, Chambers HF. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**(4): 1262-6.
14. van Hal SJ, Wehrhahn MC, Barbagiannakos T, et al. Performance of various testing methodologies for detection of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in bloodstream isolates. *J Clin Microbiol* 2011; **49**(4): 1489-94.
15. Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother* 2001; **47**(4): 399-403.

16. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; **38**(3): 1008-15.
17. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; **4**(1): 44-57.
18. Bae T, Schneewind O. Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection. *Plasmid* 2006; **55**(1): 58-63.
19. Wang Y, Li X, Jiang L, et al. Novel Mutation Sites in the Development of Vancomycin-Intermediate Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 2016; **7**: 2163.
20. Trotonda MP, Xiong YQ, Memmi G, Bayer AS, Cheung AL. Role of mgrA and sarA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* autolysis and resistance to cell wall-active antibiotics. *J Infect Dis* 2009; **199**(2): 209-18.
21. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Fowler VG, Jr., et al. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin and platelet microbicidal protein correlates with defective autolysis and loss of accessory gene regulator (agr) function. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**(7): 2687-92.
22. Pfeltz RF, Singh VK, Schmidt JL, et al. Characterization of passage-selected vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of diverse parental backgrounds. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**(2): 294-303.
23. Sieradzki K, Tomasz A. Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2003; **185**(24): 7103-10.
24. McAleese F, Wu SW, Sieradzki K, et al. Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibiting vancomycin-intermediate-*S. aureus*-type resistance to vancomycin. *J Bacteriol* 2006; **188**(3): 1120-33.



25. Kuroda M, Kuwahara-Arai K, Hiramatsu K. Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **269**(2): 485-90.
26. Kuroda M, Kuroda H, Oshima T, Takeuchi F, Mori H, Hiramatsu K. Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2003; **49**(3): 807-21.
27. Scherl A, François P, Charbonnier Y, et al. Exploring glycopeptide-resistance in *Staphylococcus aureus*: a combined proteomics and transcriptomics approach for the identification of resistance-related markers. *BMC Genomics* 2006; **7**: 296.
28. Cui L, Lian JQ, Neoh HM, Reyes E, Hiramatsu K. DNA microarray-based identification of genes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**(8): 3404-13.
29. Herbert S, Bera A, Nerz C, et al. Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in staphylococci. *PLoS Pathog* 2007; **3**(7): e102.
30. Howden BP, Smith DJ, Mansell A, et al. Different bacterial gene expression patterns and attenuated host immune responses are associated with the evolution of low-level vancomycin resistance during persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *BMC Microbiol* 2008; **8**: 39.
31. Bischoff M, Berger-Bächi B. Teicoplanin stress-selected mutations increasing sigma(B) activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**(6): 1714-20.
32. Schulthess B, Meier S, Homerova D, et al. Functional characterization of the sigmaB-dependent yabJ-spoVG operon in *Staphylococcus aureus*: role in methicillin and glycopeptide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**(5): 1832-9.

33. Zhou C, Bhinderwala F, Lehman MK, et al. Urease is an essential component of the acid response network of *Staphylococcus aureus* and is required for a persistent murine kidney infection. *PLoS Pathog* 2019; **15**(1): e1007538.
34. Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Götz F. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol* 2005; **71**(5): 2663-76.
35. Gaupp R, Schlag S, Liebeke M, Lalk M, Götz F. Advantage of upregulation of succinate dehydrogenase in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 2010; **192**(9): 2385-94.

## Summary

**Background:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with reduced susceptibility to vancomycin including vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) and heterogeneous vancomycin-intermediate *S. aureus* (hVISA) has emerged as a serious clinical problem. Infection due to VISA or hVISA is associated with vancomycin treatment failure. Antimicrobial susceptibility test usually used has low sensitivity for detection of hVISA, and population analysis profile-area under the curve (PAP-AUC), which is confirmatory method for hVISA is labor-intensive and time-consuming, so it is difficult to use in clinical practice. Therefore, rapid diagnostic technique for hVISA is required. In addition, the mechanism of reduced vancomycin susceptibility in hVISA has not yet been precisely elucidated, and it is presumed that a multi-step process, and multiple pathways are involved. Therefore, in order to understand the mechanism of the reduced vancomycin susceptibility, I performed gene-based study and transcriptome analysis to determine the difference in the expression of various genes. A scoring system was developed using a combination of gene expression and phenotypes to evaluate the diagnostic usefulness of MRSA with reduced susceptibility to vancomycin.

**Methods:** I used isogenic paired strains in patients with bacteremia; clinical isogenic paired strain (Clin\_IPS) including mother strain that was initial vancomycin-susceptible *S. aureus* (VSSA) and daughter strain that was transformed into hVISA during vancomycin administration; and isogenic paired strains generated in the laboratory (Lab\_IPS). In addition, unpaired VSSA and hVISA from patients (clinical strain) were also used in this study. I performed real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) for cell wall related and surface protein genes to select genes with different expression between hVISA and VSSA. Using microarray, transcriptome analysis was performed; genes with more than 1.5 times fold change were considered significant and analysis of the difference in expression by RT-PCR was performed again. Afterwards, allelic replacement study was conducted to figure out whether vancomycin resistance decreased or increased in mutant.

Finally, a scoring system was developed for each ST type by combining statistically and clinically meaningful genes and evaluated the sensitivity and specificity using Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis

**Results:** In a total of 24 pairs of IPS, differences in the expression of cell wall-related genes were found in *prsA*, *graS*, *graR*, *spa*, and *mprF*. In the transcriptome analysis of a total of 4 pairs of IPS, genes related with cell wall synthesis, nitrogen metabolism, and urease production (*capAB*, *ureAB*, *lrgAB*, *splF*, *splC*, *atl*, *thiE*, *opp-2C*, *opp-2B*, *arcC*, *arcD*, *metB*, *gltB*, *adhE*, *norA*, *ilvB*) showed different expression in hVISA compared to VSSA. When RT-PCR for these genes was performed, there was a significant difference in the expression of *capAB* and *atl* genes in ST5 and *ureAB* and *lrgAB* genes in ST72. In allelic replacement experiment,  $\Delta ureAB$ ,  $\Delta atl$ , and  $\Delta SA1221$  significantly reduced PAP-AUC ( $\geq 20\%$ ) compared to wild type,  $\Delta lrgAB$  had no significant change in PAP-AUC, and a mutant in which the *capAB* gene was inactivated could not be constructed. After analyzing the difference in expression levels using RT-PCR for the genes in hVISA and VSSA clinical strains, ST5 had significant differences in *graS*, *capA*, *capB*, and ST72 had significant differences in *sigB*, *ureAB*, and *capA*. The score system was developed using a combination of *graS*, *capB* expression level and vancomycin MIC values in ST5 strains, and showed the sensitivity of 86.6%, specificity 83.0%, positive predictive value 83.8%, and negative predictive value 86.2%. In ST72, score system using a combination of *sigB*, *capA*, *ureB* expression level showed the sensitivity of 81.0%, specificity of 90.0%, positive predictive value 86.6%, and negative predictive value 90.0%.

**Conclusion:** hVISA had difference in expression of genes of cell wall related, capsule forming, global regular, urea production and nitrogen metabolism when compared to VSSA. This suggest that several pathways are involved, and further research is needed on how these genes contribute to the reduced vancomycin susceptibility. In addition, the scoring system based on the expression

of these genes had optimal sensitivity and specificity. Further study is needed to validate the clinical usefulness of this scoring system.

**Keywords:** Heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, pathogenesis, transcriptome, sensitivity, specificity