Journal of Bacteriology and Virology 2014. Vol. 44, No. 2 p.177 – 187
http://dx.doi.org/10.4167/jbv.2014.44.2.177

Original Article

Proteome Analysis of a Catalase-deficient Isogenic Mutant of *Helicobacter pylori* 26695

Hyung-Lyun Kang[1,3], Seung-Gyu Lee[1,3], Jin-Sik Park[1], Jae-Young Song[1,3], Myung-Je Cho[1,3], Seung-Chul Baik[1,3], Hee-Shang Youn[2], Ji-Hyun Seo[2], Kwang-Ho Rhee[1,3] and Woo-Kon Lee[1,3*]

[1]Department of Microbiology, School of Medicine, Gyeongsang National University, Gyeongnam; [2]Deaprtment of Pediatrics, School of Medicine, Gyeongsang National University, Gyeongnam; [3]Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University, Gyeongnam, KOREA

Helicobacter pylori, a gram-negative bacterium, is a causative agent of gastroduodenal diseases of human. Human immune system produces harmful reactive oxygen species to kill this bacterium that locates the microaerophilic mucous layer. *H. pylori* harbors various antioxidant enzymes including SodB, KatA and AhpC to protect the oxygen toxicity. We removed the catalase gene (*katA*) from *H. pylori* 26695 genome, and the change of profile of the gene expression of the mutant was analyzed by high resolution 2-DE followed by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), tandem MS and microarray analysis. Eleven and 37 genes were upregulated and downregulated in the mutant respectively, either transcriptionally or translationally. Expression level of *pfr* and *hp1588* that were decreased on protein level in the mutant was confirmed by RT-PCR analysis.

Key Words: *Helicobacter pylori*, Antioxidant, *katA*

INTRODUCTION

*Helicobacter pylori*는 1983년 Warren과 Marshall이 위염 환자의 위점막에서 처음으로 분리 동정하여 위염의 원인균으로 보고되었다 (1). 이 세균은 사람의 위점막에서 서식하며 B형 날문방 위염(type B antral gastritis)과 위십이지장 궤양의 원인균이다 (2, 3). 1994년 세계보건기구(WHO)에서는 *H. pylori*의 감염이 위암의 일차적 발병결정인자라는 것과 명확한 발암원(group I carcinogen)이라고 발표하였다 (4). *H. pylori*는 만곡형의 그람 음성 세균으로 전세계 인구의 절반 이상이 감염되어 있다 (5). 1997년 첫 번째 *H. pylori*의 전체 유전체 염기서열이 보고된 이후 현재까지 54개 균주의 유전체 염기서열이 보고되었고 326개의 염기서열 분석작업이 진행되고 있다 (6, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/169). 분자생물학의 시작과 함께 한 개의 유전자 기능이나 단백질의 특성연구가 생명현상을 설명하는 방법론으로 발전하였고 유전체 시대가 도래하면서 한 생물의 전체 유전체 염기서열을 분석하여 유전자들의 기능연구와 유전자들 간의 상호작용을 분석하는 접근법이 가능해졌다 (7). 또한 이런 다채널 접근법을 이용하여 기능을 모르는 유전자의 역할을 보다 쉽게 예측하고 증명하기 시작하였으며 최근에는 유전체 분석법과 단백체 분석법, 그리고 마이크로어레이를

Received: March 2, 2014/ Revised: May 26, 2014/ Accepted: May 28, 2014
*Corresponding author: Woo-Kon Lee. Department of Microbiology, School of Medicine, Gyeongsang National University, 816-16 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam, 660-751, Korea.
Phone: +82-55-772-8083, Fax: +82-55-772-8089, e-mail: wklee@gnu.kr
**This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2009-0090129).
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/license/by-nc/3.0/).

Table 1. Strains and plasmids used in this study

DNAs and strains	Genotype, phenotype and sequence	Reference
Strains		
H. pylori 26695 wild type		6
H. pylori 26695 *katA*	*katA*-deficient mutant	this study
Plasmids		
pBluescript II	ColEI ori; *bla*	14
pBkatA	pBluescipt II; *katA*	this study
pBkatK	pBluescipt II; *katA*::*ahpA*-III	this study
pBHP489KsK	*E. coli-H. pylori* shuttle vector containing kanamycine marker (*aphA*-III)	15
Oligomers (product size)		
katA (1,513 bp)	F ; aaccatggttaataaagatgtg R ; ctttttgtgtggtgcatgtc	6
pfr (357 bp)	F ; gattatcgctaccggtggta R ; tcgcccttgatttcttccac	6
hp1588 (305 bp)	F ; caacgcaggaaaggaaacca R ; atcaattgatgcaccacgcc	6

이용한 유전자 기능연구가 보편화되어 있다 (8).

*H. pylori*는 미세호기 세균으로 성장에 산소가 필요하나 활성산소에 대한 보호기전이 완전하지 못하다 (9). *H. pylori*가 위점막에 감염되면 숙주세포는 이에 대항하여 활성산소를 생산하여 감염 세균을 공격한다 (10). 이들 활성산소의 피해를 막기 위해서 *H. pylori*는 수퍼옥사이드 디스뮤타제(SodB), 카탈라제(KatA), 퍼옥시다제 등 산소성 세균의 항산화 효소를 생산하며 카탈라제가 돌연변이로 기능을 상실하면 독성산소에 의해 빠르게 사멸한다 (11, 12). 본 연구는 *H. pylori* 26695와 동일한 균주로 제작한 *katA* 유전자 결손 돌연변이주 간의 유전자 발현 변화를 프로테옴과 microarray 분석을 통해 산소대사관련 유전자들의 기능을 확인, 분석함으로써 *H. pylori* 항산화기전을 이해하는 자료를 마련하였다. 카탈라제 유전자의 결손으로 SodB와 AhpC 등 *H. pylori*의 다른 주요 항산화 효소 유전자의 발현 변화는 확인되지 않았으며 이는 서로 다른 산화 스트레스 유발 물질에 대한 각 항산화 효소의 작용이 다를 수 있음을 시사한다고 예측된다.

MATERIALS AND METHODS

세균과 배양조건

H. pylori 26695 균주를 헬리코박터파이로리분리균주은행(*H. pylori* Korean Type Culture Collection, HpKTCC, 경상대학교)에서 제공받아 사용하였다. 세균은 5% O_2, 10% CO_2, 85% N_2, 100% 상대습도 조건에서 배양하였다 (13). 연구에 사용된 균주와 플라스미드 그리고 DNA 등은 Table 1에 표시하였다. *H. pylori* 26695와 *katA* 결손 돌연변이주를 5% O_2와 10% CO_2 조건에서 40시간 박층액체배양법을 이용하여 배양하면서 각각 16, 24, 32 그리고 40시간에 흡광도(OD_{600})를 측정하였다. 이차원 전기영동과 마이크로어레이 분석을 위해 세균의 지수 성장기에 해당되는 24시간에 세균체를 수집하여 단백질과 RNA를 분리하였다.

H. pylori 26695 결손 돌연변이주의 제조

*H. pylori*의 *katA* 유전자(*hp0875*)를 PCR로 증폭하고 *Sma*I과 *Hinc*II로 자른 pBluescript II 벡터에 클로닝하여 pBkat을 만들었다 (14) (Table 1, Fig. 1). *katA* 유전자의 내부

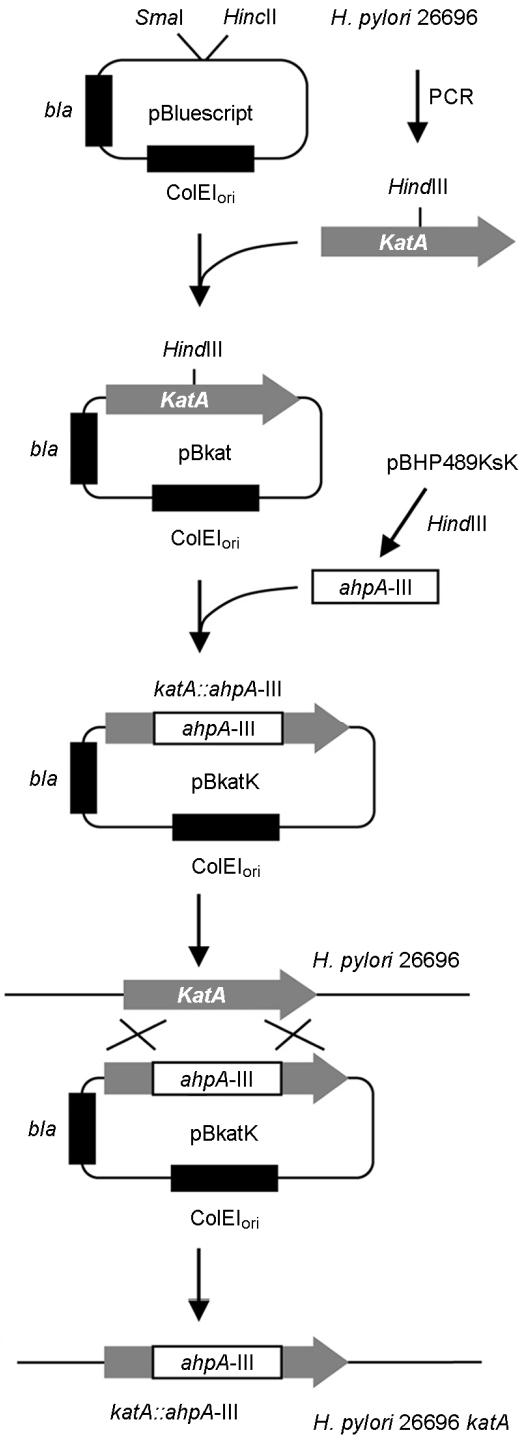

Figure 1. Construction of plasmids for knock-out mutant.

에 있는 *Hind*III 자리를 자르고 pBHP489KsK에서 *Hind*III로 잘라서 추출한 카나마이신 저항성 유전자(*aphA*-III)를

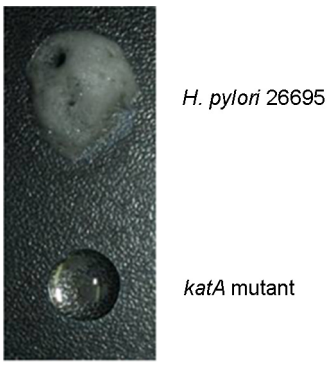

Figure 2. Confirmation of *katA* deficiency. top, *H. pylori* 26695; bottom, *katA* mutant.

삽입하여 *katA* 결손 플라스미드 pBkatK를 제작하였다 (15). *H. pylori* 26695를 pBkatK으로 형질전환하여 *katA* 결손 돌연변이주를 만들었다 (16).

H. pylori 단백질의 용출

세균 1.2 g을 10 ml의 TE buffer (40 mM Tris-HCl [pH 7.2], 1 mM EDTA)로 2회 세척하였다. 세균을 O'Farell의 방법으로 용해하였다 (17). 세균을 600 μl의 용해액(9.5 M urea, 4% CHAPS, 35 mM Tris [pH 7.2])에 부유시켜서 20분간 진탕하고, 얼음에 20분 간 정치하였다. 이를 10℃에서 12,000 rpm으로 30분 간 원심분리하여 상층액을 새 튜브로 옮겼다. Bradford 방법으로 상층액의 단백질을 정량하였다 (18).

단백질의 이차원 전기영동과 분석

H. pylori 단백질의 이차원 전기영동은 O'Farrel의 방법을 사용하였다 (17). *H. pylori* 26695 *katA* 결손 돌연변이주의 KatA 단백질 발현을 확인하기 위하여 세균에서 추출한 단백질을 IPG strip (pH 7~10)을 사용하여 12.5% 아크릴아마이드겔로 이차원 전기영동 하였다. 대조군으로 같은 조건에서 배양한 *H. pylori* 26695를 사용하였다. 젤의 염색은 Heukeshoven 등의 방법을 사용하였고 (19). Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectroscopy (MALDI-TOF) 분석은 Park 등의 방법을 사용하였다 (20).

H. pylori 26695 *katA* 결손 돌연변이주 확인

카탈라제 돌연변이의 확인은 슬라이드 유리 위에서 과

산화수소를 분해하여 생산하는 산소기포의 유무로 확인하였다(Fig. 2).

마이크로어레이를 이용한 유전자의 발현 분석

*H. pylori*의 RNA는 hot phenol 법으로 분리하였고 (21) 마이크로어레이 분석은 *H. pylori* Microarray AR-HPGS-1 (Eurogentek, Belgium)를 사용하였다 (8). RT-PCR을 이용한 유전자의 발현 분석은 Cho 등의 방법을 사용하였다 (13). 기능이 알려지지 않은 가상유전자의 기능 예측은 클러스터링(clustering) 방법으로 수행하여 가상유전자들을 클러스터(clusters of orthologous groups, COG)로 분류하였다(www.ncbi.nlm.nih.gov/COG) (22).

RESULTS

H. pylori 26695 *katA* 결손 돌연변이주 확인

H. pylori 26695 *katA* 결손 돌연변이주와 야생형 세균을 슬라이드 유리 위에서 과산화수소를 분해하는 카탈라제 효소 활성 검사를 한 결과 카탈라제에 의한 산소기포의

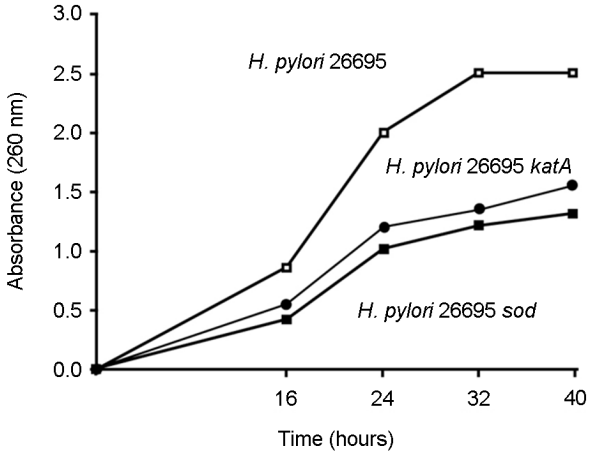

Figure 3. Growth curve of *H. pylori* 26695 and isogenic mutants at thin layer culture condition.

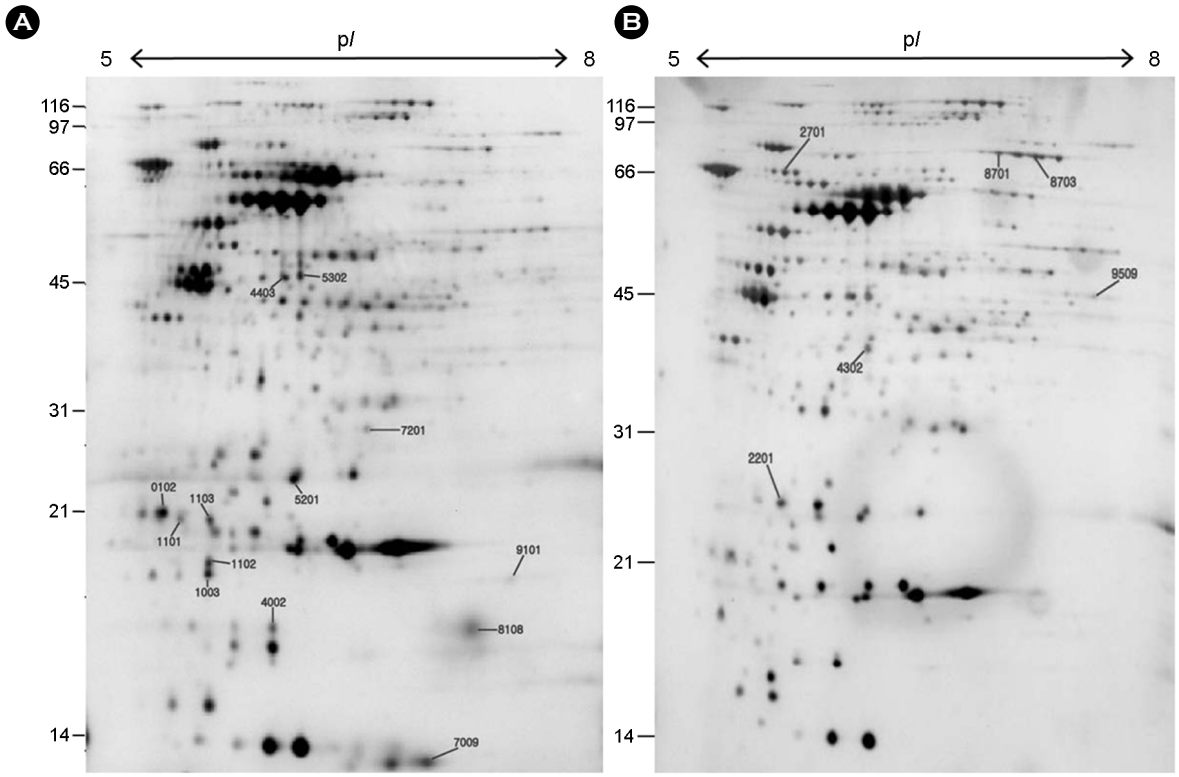

Figure 4. Comparison of normalized gel images of wild type and *kat* isogenic mutant. The proteins were separated on an IPG strip of pH 5.0~8.0 and subsequently on a 12.5% SDS-PAGE and then detected by silver staining. The original gel size was 18×20×0.15. (A) Wild type. (B) *kat* isogenic mutant.

Table 2. List of up or down-regulated proteins of *katA* isogenic mutant of *H. pylori* 26695 by using tandem MS

SSP no	Protein name	Accession no	mw	p*I*	Amino acid seq	Score	HP no
0102[b]	Urease accessory protein (UreG)	gi:15644698	21,824	4.7	R.AKEGLDDVIAWIK.R	33	0068
					K.IDLAPYVGADLK.V	55	
0903[b]	Histidine kinase (CheA)	gi:15645020	89,704	4.7	R.EAFNLIFKPGFSTAK.V	45	0903
					K.NGDKIPDAILVDIEMPK.M	26	
					K.ITPDIMDVVLR.S	26	
					K.VNITTLMNESENTK.S	27	
1003[b]	Biotin carboxyl carrier protein (FabE)	gi:15644999	17,122	5.2	K.VVSVEVGDAQPVEYGTK.L	75	0371
					K.EDFVLSPMVGTFYHAPSPGAEPYVK.V	19	
1101[b]	Adenylate kinase (Adk)	gi:15645243	21,230	5.0	K.GIILIDGYPR.S	39	0618
					R.VFLDPLGEIQNFYK.N	53	
1102[b]	Biotin carboxyl carrier protein (FabE)	gi:15644999	17,122	5.2	K.VVSVEVGDAQPVEYGTK.L	64	0371
					K.EDFVLSPMVGTFYHAPSPGAEPYVK.V	44	
1103[b]	Adenylate kinase (Adk)	gi:15645243	21,230	5.0	K.GIILIDGYPR.S	49	0618
					R.VFLDFLGEIQNFYK.N	66	
2201[a]	Hydrogenase expression/ formation protein (HypB)	gi:15645518	27,179	5.2	K.ADMVEVFNFR.V	37	0900
					K.TTMLENLADFK.D	17	
					K.EGLYVLNFMSSPGSGK.T	68	
2701[a]	GTP-binding protein, fusA-homolog (YihK)	gi:15645108	66,634	5.0	R.GTLFINPQTK.V	19	0480
					K.INIIDTPGHADFGGEVER	42	
					K.QLDFPVVYAAAR.D	55	
4302[a]	Recombinase A (RecA)	gi:15644782	37,555	5.5	K.ALADEITLK.I	30	0153
					R.SGGIDLVVVDSVAALTPK.A	59	
					K.AEIDGDMGDQHVGLQAR.L	75	
5201[b]	Hypothetical protein HP1588	gi:15646195	28,287	5.2	R.GLSLAGNQVLTR.T	63	1588
					R.QALSAATLTLFK.M	46	
					R.SSSQLLYSEIIVAGR.V	67	
8701[a]	Hydantoin utilization protein A (HyuA)	gi:15645318	78,483	6.9	K.LLPGNEVIGPAIVESDATTFVIPK.G	33	0695
					R.TIVSGPIGGVIGSK.L	31	
					R.LVLSLPLVAMDSVGAGAGSFVR.I	26	
					K.IIQDAWDELTLK.V	24	
8703[a]	Hydantoin utilization protein A (HyuA)	gi:15645318	78,483	6.9	R.GVVATQKPVIPVEK.E	24	0695
					K.YDDPLIPLKR.I	44	
					R.TIVSGPIGGVIGSK.L	59	

[a] Increased protein spots in *katA* isogenic mutant. [b] Decreased protein spots in *kat* isogenic mutant. SSP no, standard spot number; mw, molecular weight; p*I*, ; HP no, gene number of *H. pylori* 26695.

발생이 야생형에서는 확인되었으나 돌연변이주에서는 확인되지 않았다(Fig. 2).

본 연구에서는 *sodB* 결손 돌연변이주를 이용한 연구와 비교하기 위하여 야생형과 카탈라제 돌연변이주를 5% 산소하에서 배양하였다 (13). KatA 결손 돌연변이주는 10% 산소에서도 야생형의 60% 수준으로 성장하였다 (Fig. 3). *H. pylori* 26695는 32시간까지 600 nm 파장에서의 흡광도가 2.5까지 성장하였고 그 이후는 변화가 거의 없었다. KatA 결손 돌연변이주는 40시간까지 흡광도가 1.6까지 성장하였다. 지수 성장기에 해당되는 24시간에 세균체를 수집하여 단백질과 RNA를 분리하였다(Fig. 3).

결손 돌연변이주에서 발현의 차이를 보이는 단백질

단백질 분석을 위한 시료는 *H. pylori* 26695와 *katA* 결손 돌연변이주가 대수성장을 할 때까지(24시간) 배양해서 추출하였다. 단백질 시료를 3회 이차원 전기영동하여 이미지 분석하였다.

katA 결손 돌연변이주에서 발현 차이를 보인 단백질 스팟을 이차원 전기영동 젤에 표시하였고(Fig. 4), 표시한 각 단백질 스팟을 동정하였다(Table 2, 3). 젤 상에서 단백질 스팟이 큰 것은 MALDI-TOF 법을 사용하였고 스팟이 작거나 MALDI-TOF법에 의해 분석되지 않는 것은 Tandem MS 분석법을 사용하였다.

Tandem MS와 MAIDI-TOF 분석법에 의해 각각 Hydrogenase expression/formation protein (HypB, HP0900), GTP-binding protein, fusA-homolog (YihK, HP0480), Recombinase A (RecA, HP0153), Hydantoin utilization protein A (HyuA, HP0695) 등 4개의 단백질과 Fumarase (FumC, HP1325) 등 1개의 단백질 발현의 증가가 확인되었다. 이 중 YihK와 RecA는 SodB 결손 돌연변이주에서도 발현이 증가되는 단백질들이었다 (13). 발현이 감소한 단백질은 Tandem MS 분석법으로 Urease accessory protein (UreG, HP0068), Histidine kinase (CheA, HP0903), Biotin carboxyl carrier protein (FabE, HP0371), Adenylate kinase (Adk, HP0618), Hypothetical protein HP1588, Urease accessory protein (UreH, HP0067) 등 6개와 MALDI-TOF 분석법으로 Nonheme

Table 3. List of up or down-regulated proteins under *katA* isogenic mutant of *H. pylori* 26695 by using MALDI-TOF

SSP no	Protein name	Accession no	mw	p*I*	HP no
4002[b]	Nonheme iron-containing ferritin (Pfr)	gi:15645277	19,155	5.49	0653
4403[b]	Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase, alpha Subunit (PorA)	gi:15645724	44,613	5.81	1110
5302[b]	GTP-binding protein (Gtp1)	gi:15645194	40,444	5.53	0569
7009[b]	Co-chaperone (GroES)	gi:15644644	12,860	6.59	0011
8108[b]	Adhesin-thiol peroxidase (TagD)	gi:15645018	18,161	8.18	0390
9509[a]	Fumarase (FumC)	gi:15645938	50,844	7.29	1325

[a)] Increased protein spots in *katA* isogenic mutant. [b)] Decreased protein spots in *kat* isogenic mutant.SSP no, standard spot number; mw, molecular weight; p*I*, ; HP no, gene number of *H. pylori* 26695.

Table 4. List of genes whose expression was increased over two-fold in *kat* isogenic mutant compared with wild type *H. pylori* 26695

HP No.	Increasing level (fold)*	Gene name
HP0686	2.018	Iron (III) dicitrate transport protein (*fecA*)
HP0810	2.056	Conserved hypothetical protein
HP0865	2.452	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (*dut*)
HP0870	2.457	Flagellar hook (*flgE*)
HP0871	3.109	CDP-diglyceride hydrolase (*cdh*)
HP1174	2.982	Glucose/galactose transporter (*gluP*)

*Genes of which increasing level was not higher than 2 folds were not shown in this list. Bold, also increased in *sodB*-deficient mutant.

Table 5. List of genes whose expression was decreased over two-fold in *katA* isogenic mutant compared with wild type *H. pylori* 26695

HP No.	Decreasing level (fold)*	Gene name
HP0004	0.392	Carbonic anhydrase (*icfA*)
HP0102	0.330	Conserved hypothetical protein
HP0119	0.431	Hypothetical protein
HP0373	0.481	Conserved hypothetical protein
HP0408	0.450	Hypothetical protein
HP0415	0.463	Conserved hypothetical integral membrane protein
HP0439	0.442	Hypothetical protein
HP0503	0.162	Hypothetical protein
HP0513	0.431	Hypothetical protein
HP0653	0.543	Nonheme iron-containing ferritin (Pfr)
HP0587	0.377	Aminodeoxychorismate lyase (*pabC*)
HP0600	0.351	Multidrug resistance protein (*spaB*)
HP0603	0.469	Hypothetical protein
HP0614	0.466	Hypothetical protein
HP0689	0.397	Hypothetical protein
HP0702	0.365	Hypothetical protein
HP0704	0.440	Hypothetical protein
HP0712	0.185	Hypothetical protein
HP0767	0.499	Hypothetical protein
HP0784	0.490	Hypothetical protein
HP0889	0.397	Iron (III) dicitrate ABC transporter permease protein (*fecD*)
HP0981	0.481	Exonuclease VII-like protein (*xseA*)
HP1142	0.420	Hypothetical protein
HP1227	0.477	Cytochrome c553
HP1238[a]	0.421	Aliphatic amidase (*amiE*)
HP1390	0.287	Hypothetical protein
HP1426	0.478	Conserved hypothetical protein
HP1534	0.469	IS605 transposase (*tnpB*)
HP1588	0.577	Hypothetical protein

*Genes of which decreasing level was not lower than 0.6 were not shown in this list. Bold, also decreased in *sodB*-deficient mutant. a, increased in *sodB*-deficient mutant.

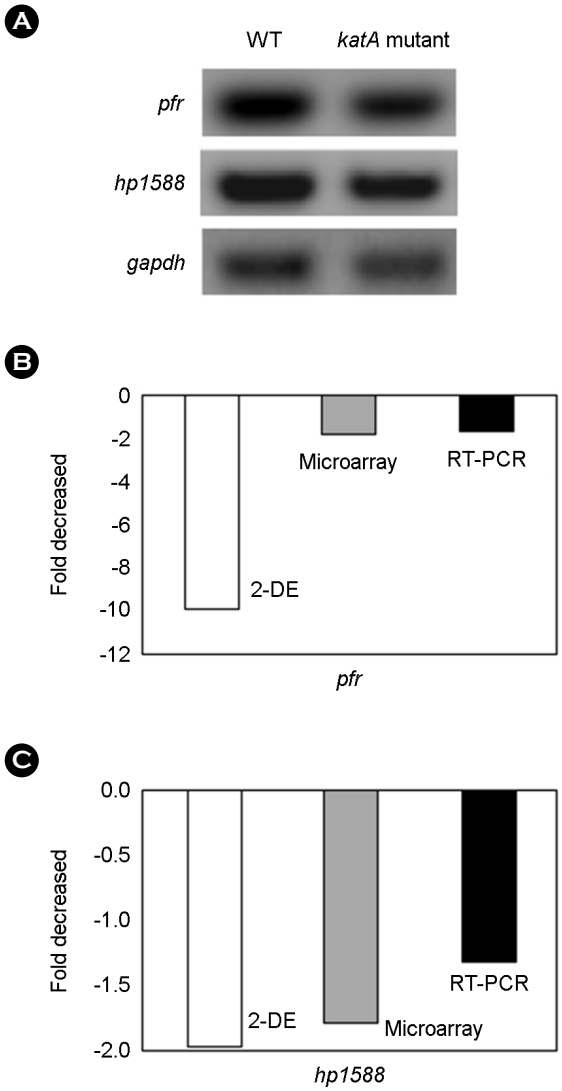

Figure 5. Comparison of expression of genes in wild type *H. pylori* and in *kat*A mutant. (A) RT-PCR analysis of *pfr* and hp1588. (B, C) expression of two genes. Levels were measured by 2-DE, microarray and RT-PCR.

iron-containing ferritin (Pfr, HP0653), Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (PorA, HP1110), GTP-binding protein (Gtp1, HP0569), Co-chaperone (GroES, HP0011), Adhesin-thiol peroxidase (TagD, HP0390) 등 5개가 확인되었다. 발현 감소가 확인된 UreG, Adk, GroES, TagD 등 4개는 *H. pylori*에서 *sodB* 유전자가 결손되었을 때 발현이 감소하는 단백질이다 (13).

Table 6. Clusters of orthologous groups of genes (COGs) of 32 genes 2-fold changes in expression levels of *katA* mutants compared with wild type *H. pylori* 26695.

Gene function classification	Gene code				
Cell envelope biogenesis, outer membrane proteins	HP0102	HP0415			
Cell motility and secretion	**HP0870**				
Inorganic ion transport and metabolism	**HP0686**	HP0889			
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	HP0439				
Defense mechanisms	HP0600				
DNA replication, recombination and repair	HP0689	**HP0810**	HP0981	HP1534	
Energy production and conversion	HP1227				
General function prediction only	HP1238				
Carbohydrate transport and metabolism	**HP1174**				
Function unknown	HP0513	HP0712	HP1142	HP1426	HP1588
Not in COGs	HP0004	HP0119	HP0373	HP0408	HP0503
	HP0587	HP0603	HP0614	HP0702	HP0704
	HP0767	HP0784	HP1390		

H. pylori 26695와 *kat* 결손 돌연변이주의 마이크로어레이 분석

마이크로어레이 분석 결과, 야생형에 비하여 *katA* 결손 돌연변이주에서 발현이 두 배 이상 증가한 유전자는 iron (III) dicitrate transport protein (*fecA*, *hp0686*), conserved hypothetical protein (*hp0810*), deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (*dut*, *hp0865*), flagellar hook (*flaE*, *hp0870*), CDP-diglyceride hydrolase (*cdh*, *hp0871*), glucose/galactose transporter (*gluP*, *hp1174*) 등 6개였고(Table 4) 이 중 *hp1174*는 *sodB*가 결손되어도 발현이 증가하는 단백질이다 (13). Carbonic anhydrase (*icfA*, *hp0004*), aminodeoxychorismate lyase (*pabC*, *hp0587*), multidrug resistance protein (*spaB*, *hp0600*), iron (III) dicitrate ABC transporter permease protein (*fecD*, *hp0889*), exonuclease VII-like protein (*xseA*, *hp0981*), cytochrome c553, aliphatic amidase (*amiE*, *hp1238*), IS605 transposase (*tnpB*, *hp1534*)와 18개 가상단백질 유전자 등 28유전자의 발현이 절반 이하로 감소하였다(Table 5). 발현이 감소하는 유전자들 중 *spaB*, *fecD*, *tnpB*, *hp0102*, *hp0119*, *hp0408*, *hp0415*, *hp0439*, *hp0503*, *hp0513*, *hp0603*, *hp0614*, *hp0702*, *hp0712*, *hp1142*, *hp1227*, *hp1390*, *hp1426*, *hp1588* 등 19개는 *H. pylori*에서 *sodB* 유전자가 결손된 돌연변이주에서도 발현이 감소하였으나 *hp1238*은 반대로 증가했다 (13). 돌연변이주에서 유전자 발현이 마이크로어레이와 2-DE 분석으로 동시에 확인된 유전자들 중 *pfr*와 *hp1588*을 RT-PCR 방법으로 RNA 수준에서의 발현 감소를 확인하였다(Fig. 5).

Table 7. Tentative annotation of 7 hypothetical proteins by the clustering analysis.

HP No.	Tentative annotation
HP0439	Ribosomal protein
HP0102	tRNA synthetase
HP0689	tRNA synthetase
HP0712	Purine-nucleoside phosphorylase
HP0810	Lipid A disaccharide synthetase
HP1142	Signal recognition particle protein
HP1588	Riboflavin synthase beta chain

kat 결손 돌연변이주에서 발현이 변화한 유전자 NCBI COGs 분류

H. pylori 26695 야생형 대조군과 비교하여 결손 돌연변이주에서 2배 이상(또는 50% 이하)의 발현 변화가 있는 가상유전자 31개를 NCBI database를 이용하여 유전자의 기능별로 분류한 결과 14개 단백질은 외막 단백질 등

9개 그룹으로 분류되었다(Table 6). *hp0513*, *hp0712*, *hp1142*, *hp1426*, *hp1588* 등 5개 단백질은 기능분류가 되지 않았으며 13개는 COG로 분류되지 않는 기능확인이 어려운 유전자였다.

COG 클러스터링으로 기능확인이 되지 않은 가상단백질들은 각 가상단백질을 기준으로 다시 클러스터링을 한 결과 7개 단백질의 기능이 예측되었다(Table 7). HP0102와 HP0689는 tRNA synthetase, HP0439는 ribosomal protein으로 예측되었다. HP0712, HP0810, HP1142 그리고 HP1588은 각각 purine-nucleoside phosphorylase, lipid A disaccharide synthetase, signal recognition particle protein, riboflavin synthase beta chain으로 기능이 예측되었다.

DISCUSSION

카탈라제는 산소와 접촉하는 생물이 호흡하는 과정 등에서 생성된 과산화수소를 제거하여 산소 스트레스를 없애는 중요한 효소이다. KatA 결손 돌연변이주는 10% 산소에서도 야생형의 60% 수준으로 성장하였다(Fig. 3). 이전의 보고에서 유사한 기능을 하는 SodB의 경우, SodB가 결손된 *H. pylori* 돌연변이주가 일반적인 *H. pylori* 배양에서 공급해주는 10% 산소에서 자라지 못하고 5% 산소에서 자랐다 (13). 이는 *kat*A가 결손된 *H. pylori*가 고농도의 산소에서도 성장할 수 있다는 이전의 보고와도 일치하며 *H. pylori*가 자라면서 산소호흡의 결과 스스로 생산하는 내인성의 과산화수소는 *H. pylori*의 성장에 영향이 크지 않음을 의미하는 것이다 (23). 이것은 KatA가 제거하는 과산화수소가 SodB가 제거하는 수퍼옥사이드에 비해 *H. pylori*에서의 독성이 적다는 의미가 될 수 있다. 본 연구에서는 *sodB* 결손 돌연변이주를 이용한 연구와 비교하기 위하여 야생형과 돌연변이주를 5% 산소하에서 배양하였다.

단백체 분석 결과, KatA 결손 돌연변이주에서 발현이 증가하거나 감소한 단백질은 각각 5개와 11개였다. 돌연변이주에서 발현 증가를 보이는 YihK와 RecA, 발현 감소를 보이는 UreG, Adk, GroES, TagD 등은 *sodB* 결손 돌연변이주에서도 같은 증가 또는 감소양상을 보였다. 이들 6개 단백질은 항산화 효소의 결손에 의해 증가된 산소 스트레스에 견디기 위해 합성이 증가되는 단백질로 예상된다.

HyuA는 D-, L- form 아미노산 생산에 필요한 효소이며 cyclic amidase로 분류된다 (24). 본 연구의 결과에서 HyuA는 2개의 단백질 스팟에서 확인되었는데 이는 단백질의 일부 아미노산 잔기가 번역 후 수식(posttranslational modification)으로 생기는 다른 여러 단백질의 예에서 공통적으로 발견된다 (25).

Dut는 deoxyuridine triphosphate (dUTP)를 deoxyuridine monophosphate (dUMP)와 피로인산(pyrophosphate)로 분해하는 효소로, 세포 내 dUPT 농도가 증가하면 DNA의 손상을 야기한다 (26). Dut의 발현 증가는 이런 손상된 DNA의 수복에 도움을 주며 세포의 생존에 중요하다. 이 효소는 원생동물 *Entamoeba histolytica*에서 과산화수소에 의해 과발현된다고 보고되었다 (27). KatA가 결손된 *H. pylori*에서 Dut가 과발현된 것은 KatA 결손으로 제거되지 못한 과산화수소에 의해 야기되는 DNA의 손상을 막기 위한 세균의 생존반응으로 해석된다 (28). DNA 재조합 과정은 산화적 손상을 받은 DNA의 복구에 작용한다 (29). 본 연구에서도 KatA 결손으로 발현이 증가된 RecA가 산화 스트레스에 의한 DNA 피해를 복구할 것으로 판단된다.

AmiE는 *H. pylori*에 존재하는 urease가 기여하는 것과 유사하며, IcfA는 중탄산염에서 이산화탄소의 가역 수화작용을 위해 효율적인 촉매작용을 하는 아연 효소이다. 이 두 효소 AmiE와 IcfA는 항산화 기능을 가지지만 KatA가 결손되면 발현이 감소하는 것으로 보고되었다 (30, 31). 이는 KatA가 SodB나 AhpC 등 주요 항산화 효소의 항산화 기전과는 다른 특성을 보일 것이라는 예측을 가능케 한다.

반면, *katA* 결손 돌연변이주에서 발현이 감소한 *H. pylori*의 주요 철 저장 단백질인 Pfr은 철 항상성에는 중요하나 산소 스트레스는 방어하지 못한다 (32). 본 연구에서 KatA 결손 돌연변이주에서의 Pfr과 UreG의 감소는 항산화 효소인 KatA의 결손으로 산소 스트레스가 증가되면 *H. pylori*가 coccoid body 형태로 변하면서 히드록실 라디칼이 많이 생성되고 요소분해효소의 생산이 크게 감소한다는 이전의 보고와 일치한다 (33). 산소 스트레스를 주면 *H. pylori* 세포 내 철 이온 농도가 크게 상승하며 (34) 증가된 철이온은 독성이 강한 히드록실 이온을 생산하는데 Pfr mutant는 세포 내 철 농도를 낮춰서 산소 스트레스를 줄이는 작용을 하는 것으로 생각된다 (35).

이와 같은 유전자들은 산소대사관련 유전자들의 결손에 의해 그 기능을 대신해 주거나 산소대사관련 유전자

들과 같은 맥락으로, 즉 산소대사관련 유전자들이 기능을 할 수 없으므로 같이 기능을 상실하는 유전자들로 생각된다.

본 연구의 결과는 *H. pylori* 유전체의 전체 발현을 이해하고 기능을 모르는 hypothetical genes의 기능을 규명하는 한편, 산화적 손상에 대한 세균의 방어기전에 관련된 유전자를 탐색하는 실마리를 제공하는 자료라고 사료된다.

REFERENCES

1) Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984;1:1311-5.
2) Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Perez-perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. Ann Intern Med 1994;120: 977-81.
3) Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. N Engl J Med 1991;325:1132-6.
4) No authors listed. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC monogr eval carcinog risks hum 1994;61:1-241.
5) Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. Science 1999;284:1328-33.
6) Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, *et al*. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1997;388:539-47.
7) Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, *et al*. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1999;397:176-80.
8) Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. Nat Genet 1999;21:33-7.
9) Seyler RW Jr, Olson JW, Maier RJ. Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. Infect Immun 2001;69:4034-40.
10) Ramarao N, Gray-Owen SD, Meyer TF. *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity. Mol Microbiol 2000;38:103-13.
11) Basu M1, Czinn SJ, Blanchard TG. Absence of catalase reduces long-term survival of *Helicobacter pylori* in macrophage phagosomes. Helicobacter 2004;9:211-6.
12) Wang G, Alamuri P, Maier RJ. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol 2006;61:847-60.
13) Cho MJ, Lee SG, Lee KH, Song JY, Lee WK, Baik SC, *et al*. Comparison of gene expression patterns between *Helicobacter pylor* 26695 and its superoxide dismutase isogenic mutant. J Bacteriol Virol 2013;43:279-89.
14) Alting-Mees MA, Short JM. pBluescript II: gene mapping vectors. Nucleic Acids Res 1989;17:9494.
15) Song JY, Park SG, Kang HL, Lee WK, Cho MJ, Park JU, *et al*. pHP489, a *Helicobacter pylori* small cryptic plasmid, harbors a novel gene coding for a replication initiation protein. Plasmid 2003;50:236-41.
16) Wang Y, Roos KP, Taylor DE. Transformation of *Helicobacter pylori* by chromosomal metronidazole resistance and by a plasmid with a selectable chloramphenicol resistance marker. J Gen Microbiol 1993;139:2485-93.
17) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 1975;250:4007-21.
18) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
19) Heukeshoven J, Dernick R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. Electrophoresis 1988;9:28-32.
20) Park JW, Song JY, Hwang HR, Park HJ, Youn HS, Seo JH, *et al*. Proteomic analysis of thiol-active proteins of *Helicobacter pylori* 26695. J Bacteriol Virol 2012;42:211-23.
21) Chuang SE, Daniels DL, Blattner FR. Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1993;175:2026 -36.
22) Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ. A genomic perspective on protein families. Science 1997;278:631-7.
23) Harris AG, Hinds FE, Beckhouse AG, Kolesnikow T, Hazell SL. Resistance to hydrogen peroxide in *Helicobacter pylori*: role of catalase (KatA) and Fur, and functional analysis of a novel gene product designated 'KatA-associated protein', KapA (HP0874). Microbiology 2002;148:3813-25.
24) Yamada H, Shimizu S, Shimada H, Tani Y, Takahashi S, Ohashi T. Production of D-phenylglycine-related amino acids by

immobilized microbial cells. Biochimie 1980;62:395-9.
25) Baik SC, Kim KM, Song SM, Kim DS, Jun JS, Lee SG, *et al*. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Helicobacter pylori* strain 26695. J Bacteriol 2004; 186:949-55.
26) Hochhauser SJ, Weiss B. *Escherichia coli* mutants deficient in deoxyuridine triphosphatase. J Bacteriol 1978;134:157-66.
27) Vicente JB, Ehrenkaufer GM, Saraiva LM, Teixeira M, Singh U. *Entamoeba histolytica* modulates a complex repertoire of novel genes in response to oxidative and nitrosative stresses: implications for amebic pathogenesis. Cell Microbiol 2009;11: 51-69.
28) Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989.
29) Slade D, Radman M. Oxidative Stress Resistance in *Deinococcus radiodurans*. Microbiol Mol Biol Rev 2011;75: 133-91.
30) Skouloubris S, Labigne A, De Reuse H. Identification and characterization of an aliphatic amidase in *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol 1997;25:989-98.
31) Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clin Chem 2006;52:601-23.
32) Bereswill S, Waidner U, Odenbreit S, Lichte F, Fassbinder F, Bode G, *et al*. Structural, functional and mutational analysis of the *pfr* gene encoding a ferritin from *Helicobacter pylori*. Microbiology 1998;144:2505-16.
33) Nakamura A, Park A, Nagata K, Sato EF, Kashiba M, Tamura T, *et al*. Oxidative cellular damage associated with transformation of *Helicobacter pylori* from a bacillary to a coccoid form. Free Radic Biol Med 2000;28:1611-8.
34) Wang G, Maier RJ. An NADPH quinone reductase of *Helicobacter pylori* plays an important role in oxidative stress resistance and host colonization. Infect Immun 2004;72:1391 -6.
35) Waidner B, Greiner S, Odenbreit S, Kavermann H, Velayudhan J, Stähler F, *et al*. Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonization. Infect Immun 2002;70:3923-9.