

Comparison of Gene Expression Patterns between *Helicobacter pylori* 26695 and its Superoxide Dismutase Isogenic Mutant

Myung-Je Cho^{1,3}, Seung-Gyu Lee¹, Kon-Ho Lee¹, Jae-Young Song^{1,3}, Woo-Kon Lee^{1,3},
Seung-Chul Baik^{1,3}, Kwang-Ho Rhee^{1,3}, Hee-Shang Youn²,
Ji-Hyun Seo² and Hyung-Lyun Kang^{1,3*}

¹Department of Microbiology, School of Medicine, Gyeongsang National University 816-15 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam; ²Department of Pediatrics, School of Medicine, Gyeongsang National University 816-15 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam; ³*Helicobacter pylori* Korean Type Culture Collection, Gyeongsang National University 816-15 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam, Korea

Helicobacter pylori, a causative agent of gastroduodenal diseases, is a Gram-negative microaerophilic bacterium. Although *H. pylori* locates in the microaerophilic mucous layer, the bacteria would come into contact harmful reactive oxygen species generated by host immune system. It has been reported that *H. pylori* harbors various defense mechanisms which can protect bacterial cells from oxygen exposure. The change of the gene expression profile of *sodB*-negative isogenic mutant of *H. pylori* 26695 was analyzed by high resolution 2-DE followed by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and tandem MS and microarray analysis. Eighteen genes and 41 genes were upregulated and downregulated respectively, either transcriptionally or translationally. Expression levels of three genes including *trxB*, *yxjE* and *ribE* that were changed both on a mRNA level and on a protein level were confirmed by RT-PCR analysis. However, change of expression levels of other major antioxidants such as KatA, AhpC and NapA were not detected, which means Sod is regulated by different way from that of KatA and AhpC. Mutant study of other antioxidant proteins may give us better understanding for the regulation of stress response in *H. pylori*.

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

서론

*Helicobacter pylori*는 호주의 Royal Perth Hospital의 Warren과 Marshall이 1983년 위염환자의 위점막에서 처음으로 분리하여 보고하였다 (1). 이 세균은 사람의 위점막에서 서식하며 B형 날문방 위염(type B antral gastritis)과 위십이지장 궤양이 원인균이며 1994년 세계보건기구(WHO)에서는 *H. pylori*를 명확한 제 1종 발암원(group I

carcinogen)으로 발표하였다 (2). *H. pylori*는 미호기성, 그람 음성의 만곡형 세균으로 전세계 인구의 절반 이상이 이 세균에 감염되어 있지만 현재까지 이 세균의 감염을 효과적으로 치료하거나 예방할 수 있는 방법이 마련되어 있지 않다 (3).

*H. pylori*는 1997년 전체 유전체 염기서열이 보고된 이후로 지금까지 45균주의 염기서열이 공개되었으며 최근에는 유전자의 기능을 밝히는 연구로 기능유전체학이 시작되었다 (4, 5). 유전자의 생물학적 기능연구나 발현연

Received: November 3, 2013/ Revised: November 22, 2013/ Accepted: November 28, 2013

*Corresponding author: Hyung-Lyun Kang, Department of Microbiology, Gyeongsang National University School of Medicine, 816-15 Jinju-Daero, Jinju, Gyeongsangnam-do 660-751, KOREA.

Phone: +82-55-772-8085, Fax: +82-55-772-8089, e-mail: kangssi@gnu.kr

**This Work (RPP-2009-053) was supported by the fund of Research Promotion Program, Gyeongsang National University, 2009.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

Table 1. Strains and plasmids used in this study

DNAs and strains	Genotype, phenotype and sequence	Reference
Strains		
<i>H. pylori</i> 26695 wild type		4
<i>H. pylori</i> 26695 <i>sodB</i>	<i>sodB</i> -defective mutant	this study
Plasmids		
pBluescript II	ColEI ori; <i>bla</i>	16
pBsod	pBluescript II, <i>sodB</i>	this study
pBsodC	pBluescript II, <i>sodB::cat</i>	this study
pBHP489CM16	Kanamycine marker in pBHP489K was replaced by chloramphenicol acetyltransferase (<i>cat</i>)	17
Oligomers (product size)		
<i>sodB</i> (630 bp)	F; atgtttacattacgagagttgcct	4
	R; atgcaccaactcattgatgtagt	
<i>trxB</i> (305 bp)	F; gattatcgctaccgggtgta	4
	R; tcgcccttgattctccac	
<i>yxjE</i> (314 bp)	F; caacgcaggaaaggaaacca	4
	R; atcaattgatgcaccacgcc	
<i>ribE</i> (306 bp)	F; categcgcttcaatcatatc	4
	R; atattgtccgtggtcagcac	

구의 방법론으로는 DNA 칩을 사용한 마이크로어레이 (microarray) 등의 기법이 많이 이용되고 있다 (6).

최근 연구에 의하면 *H. pylori* 감염에 대하여 숙주세포의 방어기전 사이에 연관된 heat shock protein들을 포함한 스트레스에 관련된 단백질 연구가 되고 있다 (7~11). *H. pylori*가 위벽의 점막에 감염되어 정착되면, 숙주는 면역반응과 염증반응을 유발하여 감염균을 없애기 위한 활성산화물질(reactive oxygen species, ROS)을 만든다. ROS는 세균을 공격할 뿐만 아니라 주변의 위 점막세포를 손상시킨다. 이런 ROS에 저항하기 위해서 *H. pylori*는 방어 작용으로 여러 항산화 효소를 생산한다 (12). *H. pylori*는 미산소성 세균으로 세균의 성장에 산소가 꼭 필요하지만 산소이용에 따른 활성산소에 대한 보호기전이 불완전하다 (13). 대부분의 산소성 및 미세산소성 세균은 superoxide dismutase (SodB), catalase (KatA), 그리고 peroxidases 생산이 산소 존재 하에서 성장에 필수 요소이며 *H. pylori*도 이들 효소들을 가지고 있다 (4, 5). 본 연구에서는 *H. pylori* 26695와 동일한 균주로 제작한 산소 대사 관련 유전자

결손 돌연변이주(*sodB*)와의 발현변화를 프로테옴 분석과 마이크로어레이 분석을 통해 유전자들의 발현변화를 살펴보았다.

재료 및 방법

세균과 배양조건

H. pylori 26695 균주를 헬리코박터파이로리분리균주은행(*H. pylori* Korean Type Culture Collection, HpKTCC, 경상대학교)에서 제공받아 사용하였다. *H. pylori*는 부루셀라 우무배지에서 배양하거나 박층배양법(thin-layer liquid culture)으로 배양하였다 (14, 15). *H. pylori* 26695 *sodB* 결손 돌연변이주는 소 혈청이 10% 첨가된 브루셀라 액체 배지 3 ml에 접종하고 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂, 100% 습도가 유지되는 37°C 배양기(Sanyo, Osaka, Japan)에서 3일간 박층액체배양법으로 계대배양 하였다. 대수성장기의 균체를 수집하여 RNA를 추출하였다. 연구에 사용한 균주와 DNA는 Table 1에 표시하였다.

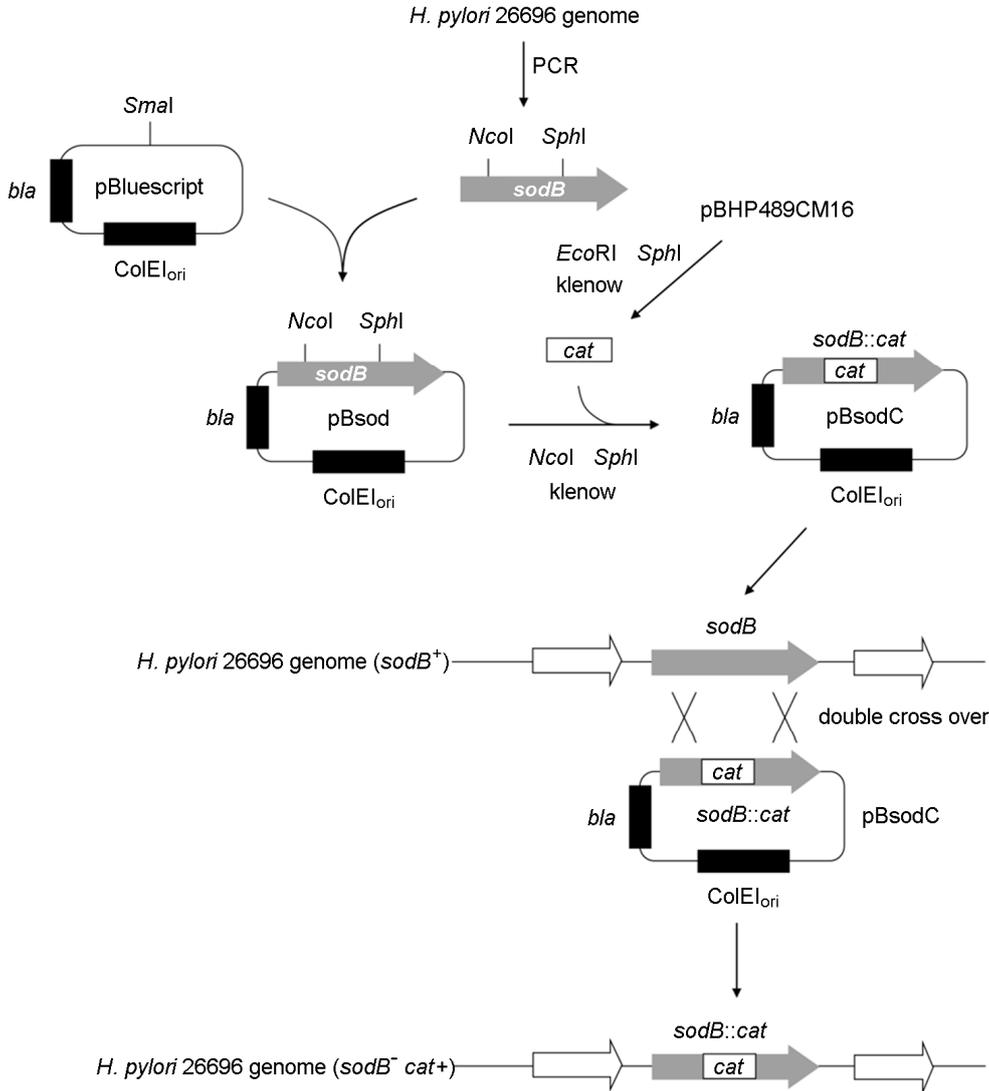


Figure 1. Strategy for construction of plasmid for knock-out mutant

H. pylori 26695의 *sodB* 결손 돌연변이주의 제조

한 쌍의 프라이머 세트를 이용하여 *H. pylori* 26695 게놈 DNA에서 *sodB* 유전자를 PCR법으로 증폭하고 *SmaI*으로 절단한 pBluescript II에 클로닝하여 pBsod를 제작하였다(Fig. 1, Table 1) (16). 플라스미드 pBsod를 *NcoI*과 *SphI*으로 절단하고 Klenow fragment를 처리하여 평활말단으로 만들었다. pBHP489CM16을 제한효소 *EcoRI*과 *SphI*으로 절단하고 Klenow fragment로 처리하여 클로람페니콜 저항성 유전자(*cat*)를 추출하였다 (17). 제한효소로 절단한 pBsod에 *cat* 유전자를 삽입하여 pBsodC를 제작하였

다. *H. pylori* 26695를 pBsodC로 형질전환시켜 *sodB* 결손 돌연변이주를 만들었다 (18).

단백질의 분석

*H. pylori*의 단백질의 이차원 전기영동은 O'Farrel의 방법을 사용하였고 (19), 전기영동 후 젤의 염색은 Heukeshoven 등의 은염색법(silver staining)을 사용하였다 (20). Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectroscopy (MALDI-TOF) 분석은 Kim 등의 방법을 사용하였다 (21).

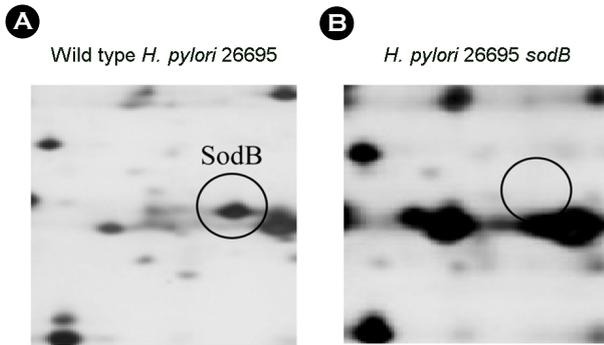


Figure 2. Localization of SodB spot on the 2-DE gel

*H. pylori*의 RNA 정제, 마이크로어레이 분석 그리고 RT-PCR

배양한 *H. pylori*에서 RNA 정제는 hot phenol법을 사용하였다 (22). 정제된 RNA는 Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 순도와 양을 결정하였다. 야생형 *H. pylori* 26695와 돌연변이 균주의 유전자 발현은 마이크로어레이 분석으로 확인하였다(*H. pylori* Microarray AR-HPGS-1, Eurogentek, Belgium). 발현이 달라진 유전자는 random primer를 이용한 RT-PCR 분석으로 확인하였다. *H. pylori*에서 분리한 전체 RNA 2 µg에 random primer와 dNTP 혼합물을 최종농도가 각각 10 pM과 1 mM이 되도록 첨가하고 diethylpyrocarbonate (DEPC)-처리 증류수를 최종 부피 13 µl가 되도록 첨가하였다. 65°C에서 5분간 반응시킨 후 4°C에 5분간 보관하였다. 5X first-strand 완충용액 4 µl와 0.1 M DTT (dithiothreitol) 2 µl를 넣고 25°C에서 2분간 반응시키고 SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 200 unit를 첨가하여 다시 25°C에서 10분, 42°C에 50분, 70°C에서 15분간 반응시키고, RNaseH 2 unit를 넣어 37°C에서 2분간 반응시켰다. 만들어진 first-strand cDNA 5 µl를 *Taq* DNA polymerase (Invitrogen)와 primer (Table 1)를 사용하여 유전자를 증폭하였다. PCR 산물은 1% 아가로스 겔에서 전기영동하였다. DNA 양의 측정은 아가로스 겔을 ethidium bromide로 염색한 후 Fluor-S 이미지 스캐너(Bio-rad, Hercules, CA, USA)로 이미지화하고 Quantity One 프로그램(Bio-rad)을 사용하여 분석하였다.

가상단백질의 기능 예측

기능이 알려지지 않은 가상유전자의 기능 예측은 클러

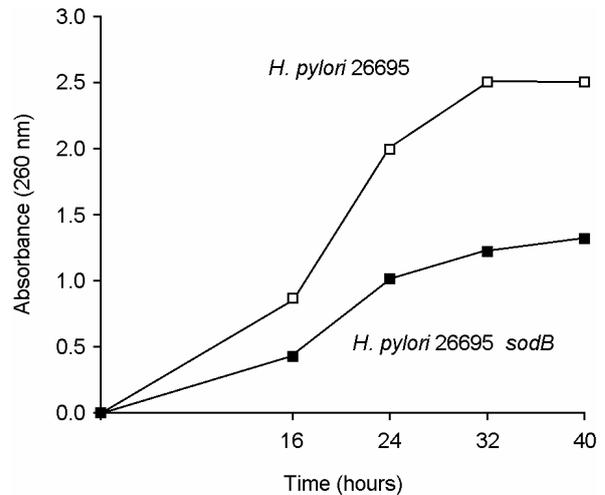


Figure 3. Growth of *H. pylori* 26695 and its isogenic mutant at thin layer culture condition

스터링(clustering) 방법으로 수행하여 가상유전자들을 클러스터(clusters of orthologous groups, COG)로 분류하였다(www.ncbi.nlm.nih.gov/COG) (23).

결 과

H. pylori 26695 *sodB* 결손 돌연변이주 확인

H. pylori 26695와 *sodB* 결손 돌연변이주에서 추출한 단백질을 이차원 전기영동으로 SodB 단백질을 분석하였다. *H. pylori* 26695에서는 SodB 단백질이 약 25 Da 크기로 확인되었지만 *sodB* 결손 돌연변이주에서는 SodB 단백질이 확인되지 않았다(Fig. 2).

H. pylori 26695와 *sodB* 결손 돌연변이주의 성장곡선

H. pylori 26695와 *sodB* 결손 돌연변이주를 5% O₂와 10% CO₂ 조건에서 40시간 동안 박층액체배양법으로 배양하며 600 nm의 흡광도를 측정하였다. *H. pylori* 26695는 32시간 동안 OD₆₀₀이 2.5까지 성장하였고 그 이후는 변화가 거의 없었다. *sodB* 결손 돌연변이주는 40시간까지 OD₆₀₀이 1.2까지 성장하였다(Fig. 3). 대수성장기에 해당되는 24시간 배양한 균체를 수집하여 단백질과 RNA를 분리하였다.

sodB 유전자 결손으로 발현이 달라지는 단백질

24시간 동안 배양한 *H. pylori* 26695와 *sodB* 결손 돌연

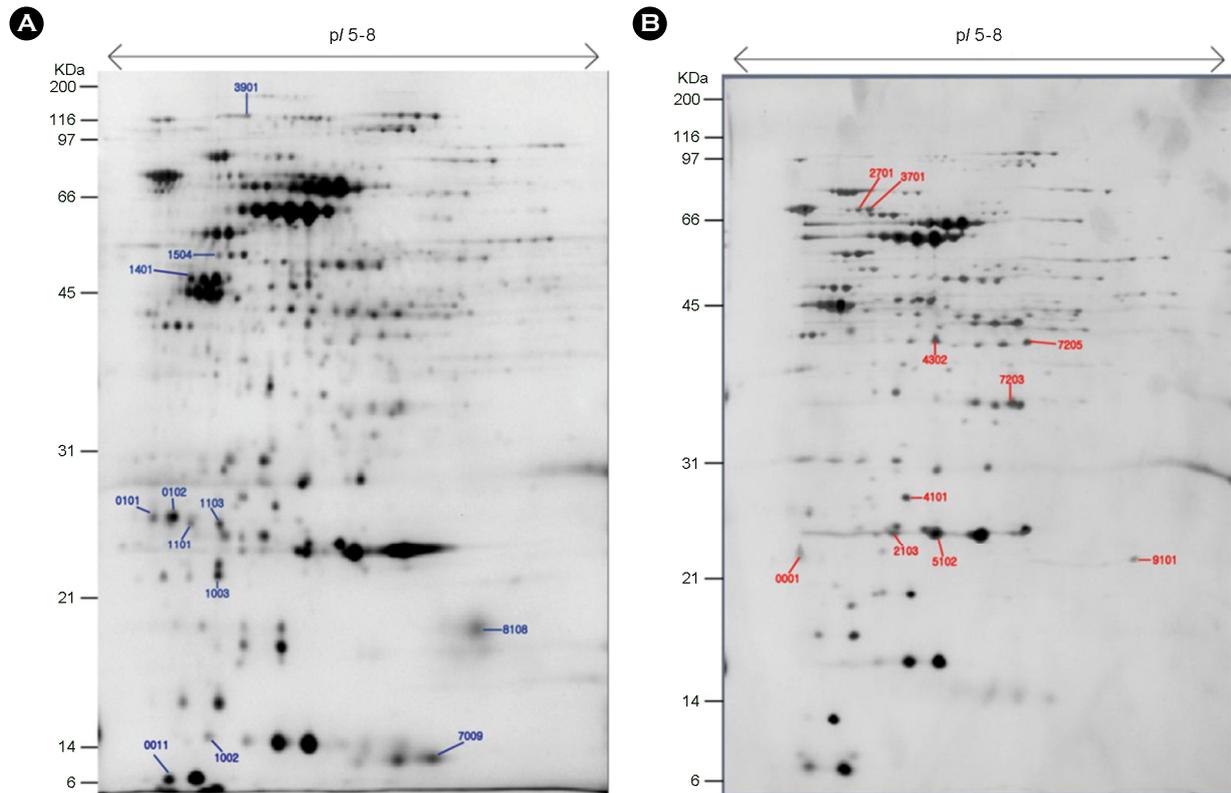


Figure 4. Comparative proteome analysis of wild type and *sodB* isogenic mutant of *H. pylori* 26695. (A) wild type (B) *sodB* mutant. Numbers on the gel are spot numbers.

변이주에서 추출한 200 µg의 단백질을 각각 3회 이차원 전기영동하였다(Fig. 4). 이차원 전기영동 젤에서 농도가 달라진 스팟을 MALDI-TOF와 tandem MS로 분석하여 동정하였다(Table 2, 3). *sodB* 결손 돌연변이 균주에서 Inorganic pyrophosphatase (Ppa), GTP-binding protein Fushomolog (YihK), Elongation factor P (Ef-P), Recombinase A (RecA), Ferredoxin oxidoreductase gamma subunit (OorC), Modulator of drug activity (Mda66) 등 9개 단백질의 발현 증가가 MALDI-TOF로 확인되었고, 3-oxoadipate coA-transferase subunit B (YxjE), Thioredoxin reductase (TrxB), Translation elongation factor EF-Ts (Tsf) 등 3개의 단백질의 발현증가가 tandem MS 분석으로 확인되었다.

MALDI-TOF와 tandem MS 분석법으로 발현감소가 확인된 단백질은 각각 Urease accessory protein (UreG), Adenylate kinase (Adk), ATP synthase subunit B (AtpF) 등 3개와 50S ribosomal protein L7/L12, Riboflavin synthase beta chain (RibE), Adenylate kinase (Adk), ATP synthase F1, subunit beta (AtpD), NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO3

subunit (Nqq3), Co-chaperone (GroES), Adhesin-thiol peroxidase (TagD) 등 7개였다. 이들 중 Adk는 MALDI-TOF와 tandem MS의 두 가지 방법으로 확인되었다.

마이크로어레이를 이용한 유전자 발현변화 확인

H. pylori 26695와 *sodB* 결손 돌연변이주에서 유전자의 발현변화를 마이크로어레이로 분석하였다. *sodB* 결손 돌연변이 균주에서 mRNA 양이 두 배 이상 증가한 유전자는 conserved hypothetical protein (hp1182), N-methyl hydantoinase (hp0696), aliphatic amidase (*amiE*) 등 9개였으며 절반 이하로 감소한 유전자는 hypothetical protein (hp1397), iron(III) dicitrate ABC transporter permease protein (*fecD*), cytochrome c553 (hp1227) 등 33개였다(Table 4).

RT-PCR로 확인한 유전자 발현의 증감

이차원 전기영동과 마이크로어레이로 분석한 결과에서 공통적으로 증감이 확인된 *txb*, *yjxJ*, *ribE* 등 3개 유전자의 mRNA 양을 *gapdh* 유전자를 대조구로 사용하는

Table 2. Lists of up or down-regulated proteins of *H. pylori* 26695 *sodB* defective mutant identified by MALDI-TOF

SSP no	Protein	Accession no	Mol wt	pI	Amino acid sequence	Score	HP no
Increased							
0001	Inorganic pyrophosphatase (Ppa)	gi:15645244	19,260	4.8	KYELDKESGALMVDR.V	70	0620
					R.LVGVLNMEDESGMDEK.L	74	
2701	GTP-binding protein, FusA-homolog (YihK)	gi:15645108	66,634	5.0	R.GTLFINPQTK.V	19	0480
					K.INIIDTPGHADFGGEVER	42	
4101	Elongation factor P (Ef-P)	gi:15644806	20,657	5.3	K.QLDFPVVYAAAR.D	55	0177
					K.IELGGVPYR.I	33	
4302	Recombinase A (RecA)	gi:15644782	37,555	5.5	K.AISVDVPQVVALK.I	53	0153
					K.ALADEITLK.I	30	
5102	Ferredoxin oxidoreductase, gamma subunit (OorC)	gi:2313709	20,244	5.3	R.SGGIDLVVVDSVAALTPK.A	59	0591
					K.AEIDGDMGDQHVGLQAR.L	75	
9101	Modulator of drug activity (Mda66)	gi:15645254	21,474	7.1	K.VDILLDRDEIIFPYAK.E	32	0630
					K.QGGIVVIDPNLVTPTK.E	45	
					R.FTGVGGQGVLAGEILAEAK.I	77	
					K.QGLPGLDLIIFPEYSTHGIMYDR.Q	44	
					K.NPQVEQYLNLSLTTHLR.Q	24	
Decreased							
0101	Urease accessory protein (UreG)	gi:15644698	21,824	4.7	K.TALIEALTR.H	45	0068
					R.EDASMNLEAVEEMHGR.F	52	
					K.IDLAPYVGADLK.V	50	
0102	Urease accessory protein (UreG)	gi:15644698	21,824	4.7	K.DYDMAVITNDIYTK.E	47	0068
					R.AKEGLDDVIAWIK.R	33	
					K.IDLAPYVGADLK.V	55	
1103	Adenylate kinase (Adk)	gi:15645243	21,230	5.0	K.GIILIDGYPR.S	49	0618
					R.VFLDFLGEIQNFYK.N	60	
1401	ATP synthase subunit B (AtpF)	gi:15645746	51,446	5.0	R.AIAMDMTTEGLVR.N	30	1132

RT-PCR로 확인하였다. 이차원 전기영동과 마이크로어레이 결과, *sodB* 결손 돌연변이주에서 발현이 증가한 *yxjE*와 *trxB* 유전자가 RT-PCR에서도 증가하였고, *sodB* 결손 돌연변이주에서 발현이 감소한 유전자 *ribE*는 RT-PCR에서도 감소하였다(Fig. 5).

가상단백질의 기능 예측

마이크로어레이 분석 결과 돌연변이주에서 발현변화가 확인된 기능이 알려지지 않은 가상유전자는 26개였

다(Table 4). 가상유전자 산물을 클러스터링한 결과 세포 외막 합성과 관련된 기능 등 7개의 기능을 가질 것으로 유추되는 그룹에 24개의 가상단백질이 분류되었다. 특히 DNA 복제(DNA replication), 세포분열(cell division), 조효소 대사(cofactor metabolism), 그리고 지방대사(lipid metabolism)와 관련된 가상단백질들이 특히 Sod 결핍 돌연변이주에서 증가하는 것으로 나타났다(Table 5)

가상단백질 HP1182의 clustering 결과 NADH-ubiquinone oxidoreductase (HP1266, HP1267, HP1268), 그리고 iron-

Table 3. Lists of up or down-regulated proteins of *H. pylori* 26695 *sodB*-defective mutant identified by tandem MS

SSP no	Protein	Accession no	Mol wt	pI	HP no
Increased					
3910	3-oxoadipate coA-transferase subunit B (YxjE)	gi:15645880	94,099	5.1	HP1266
7203	Thioredoxin reductase (TrxB)	gi:15645444	33,407	6.2	HP0825
7205	Translation elongation factor EF-Ts (Tsf)	gi:15646162	39,564	6.5	HP1555
Decreased					
0011	50S ribosomal protein L7/L12	gi:15645813	13,182	4.9	HP1199
1002	Riboflavin synthase beta chain (RibE)	gi:15644636	16,912	4.9	HP0002
1101	Adenylate kinase (Adk)	gi:15645243	21,230	5.0	HP0618
1504	ATP synthase F1, subunit beta (AtpD)	gi:15645746	51,347	5.0	HP1132
2103	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO3 subunit (Nqq3)	gi:15645315	22,132	5.3	HP0692
7009	Co-chaperone (GroES)	gi:15644644	12,860	6.5	HP0011
8108	Adhesin-thiol peroxidase (TagD)	gi:15645018	18,161	8.1	HP0390

sulfur 단백질(HP0138) 등 산화-환원에 관련된 단백질과 연관이 있는 것으로 분류되었으며, 기능상 세포분열과 염색체 분할과 관련이 있는 것으로 나타났다.

고찰

H. pylori 26695의 항산화 관련 효소의 유전자 결손 돌연변이를 상동성재조합 방법으로 만들었다. 일반적인 *H. pylori*의 배양에는 산소분압을 10%로 유지시키지만 *sodB* 유전자를 결손시킨 경우 10% 산소분압에서는 돌연변이주가 만들어지지 않았다. 이 세균은 미세호기성 특성으로 대기압 산소분압보다 낮은 산소분압에서 성장하지만, 항산화 관련 효소가 만들어지지 않으면 그보다 낮은 산소분압에서만 자랄 수 있으므로 일반적인 *H. pylori* 배양조건보다 낮은 산소분압 하에서 형질전환을 수행하여 돌연변이주를 만들었다. *SodB*가 결핍된 돌연변이주가 낮은 산소분압에서만 자라는 현상은 이전의 보고와도 일치한다 (13). 이후의 *sodB* 유전자 돌연변이 균주의 배양은 5% O₂, 10% CO₂ 조건에서 수행하였다.

sodB 결손 돌연변이 균주는 야생형에 비해서 성장속도가 50% 정도로 감소하였다. 이는 5% 산소분압에서 성장하는데 필요한 항산화 효소 *SodB*의 결핍으로 *KatA* (catalase) 등의 항산화 효소만으로는 야생형만큼의 성장이 어렵기 때문인 것으로 판단된다 (13).

*H. pylori*는 공인된 최적 액체배양법이 확립되어 있지 않다. 일반적으로 *H. pylori* 배양 시에는 우무배지(agar plate)에 도말한다. 그러나 이 세균이 서식하는 위치는 점도가 높은 위 점액이기 때문에 이러한 조건과 유사한 액체배양법이 필요하다. 본 연구에서는 박층액체배양법을 사용하여 *H. pylori*를 배양하였다. *H. pylori* 26695 균주를 박층액체배양법으로 OD₆₀₀에서 0.01 농도로 접종하여 5% O₂, 10% CO₂ 조건에서 하룻밤 배양한 결과 OD₆₀₀에서 2.0으로 200배 성장하였다. 또한 동일한 방법으로 *sodB* 결손 돌연변이주를 배양한 결과 32시간까지는 지수성장하고 그 이후에는 느린 성장을 보였다(Fig. 3).

돌연변이체에서 발현이 달라지는 단백질은 이차원 전기영동으로 확인하였고 유전자 수준의 발현변화는 마이크로어레이 분석법을 사용하였다. *sodB* 결손 돌연변이주에서 Ppa, YihK, Efp, RecA, OorC, Mda66, YxjE, TrxB, Tsf의 발현이 증가하였다. 이들 중 마이크로어레이 결과와 동일한 발현 양상을 보인 TrxB, YxjE는 RT-PCR에서도 같은 결과를 확인하였다. *sodB* 결손 변이주에서 UreG, Adk, AtpF, 50S ribosomal protein L7/L12, RibE, AtpD, Nqq, TagD 단백질이 발현이 감소하였다. 이들 중 RibE는 RT-PCR을 통하여 동일한 발현 양상을 확인하였다. *SodB* 결손으로 항산화 기능이 줄어든 결과로 효소분해효소의 일부인 UreG가 감소하였다. 효소분해효소는 이 세균이 위점막속에서 산-저항성에 필요한 핵심 요소로서 전체 세균 단백

Table 4. List of genes of which expression is increased or decreased over 2-fold in *sodB* isogenic mutant compared with *H. pylori* 26695

HP no	Fold	Gene
Increased		
HP0294	3.773	Aliphatic amidase (<i>amiE</i>)
HP0650	2.189	Hypothetical protein
HP0693	2.425	Conserved hypothetical integral membrane protein
HP0696	2.166	N-methylhydantoinase
HP0874	2.118	Hypothetical protein
HP1174	2.900	Glucose/galactose transporter (<i>gluP</i>)
HP1182	2.471	Conserved hypothetical protein
HP1291	2.286	Conserved hypothetical protein
HP1407	2.003	Conserved hypothetical integral membrane protein
Decreased		
HP0004	0.379	Carbonic anhydrase (<i>icfA</i>)
HP0101	0.472	Hypothetical protein
HP0102	0.348	Conserved hypothetical protein
HP0119	0.435	Hypothetical protein
HP0297	0.479	Ribosomal protein L27 (<i>rpl27</i>)
HP0408	0.370	Hypothetical protein
HP0415	0.459	Conserved hypothetical integral membrane protein
HP0439	0.378	Hypothetical protein
HP0503	0.127	Hypothetical protein
HP0513	0.395	Hypothetical protein
HP0531	0.444	cag pathogenicity island protein (<i>cag11</i>)
HP0537	0.480	cag pathogenicity island protein (<i>cag16</i>)
HP0600	0.337	Multidrug resistance protein (<i>spaB</i>)
HP0603	0.455	Hypothetical protein
HP0614	0.448	Hypothetical protein
HP0698	0.386	Hypothetical protein
HP0702	0.310	Hypothetical protein
HP0712	0.183	Hypothetical protein
HP0889	0.490	iron(III) dicitrate ABC transporter permease protein (<i>fecD</i>)
HP0937	0.366	Hypothetical protein
HP0989	0.449	<i>IS605</i> transposase (<i>tmpB</i>)
HP1142	0.464	Hypothetical protein

Table 4. Continued

HP no	Fold	Gene
HP1227	0.480	Cytochrome c553
HP1334	0.485	Hypothetical protein
HP1390	0.261	Hypothetical protein
HP1397	0.419	Hypothetical protein
HP1426	0.435	Conserved hypothetical protein
HP1469	0.477	Outer membrane protein (<i>omp31</i>)
HP1530	0.465	Purine nucleoside phosphorylase (<i>punB</i>)
HP1534	0.432	<i>IS605</i> transposase (<i>tmpB</i>)
HP1557	0.476	Flagellar basal-body protein (<i>fliE</i>)
HP1588	0.435	Conserved hypothetical protein

질의 6%를 차지하지만 유전자가 결손이 되어도 인공배지에서 세균의 성장에는 산의 영향이 없다. 이런 단백질의 발현 감소는 이 세균이 새로운 산소대사 체계를 형성하는데 필요한 단백질 발현에 많은 에너지를 필요로 하기 때문에 발현량을 줄여도 성장에 큰 피해를 주지 않는 단백질의 합성을 양을 줄여서 나타나는 결과로 해석된다.

mRNA 수준의 유전자 발현의 증감은 마이크로어레이를 통한 분석으로 수행하였다. 대조군과 비교했을 때 *sodB* 결손 돌연변이 균주에서 signal intensity가 2배 이상 강하게 나타나는 유전자는 N-methylhydantoinase (*hp0696*), glucose/galactose transporter (*gluP*) 그리고 aliphatic amidase (*amiE*)와 6개의 가상단백질 유전자를 포함한 9개였고, 절반 이하로 감소한 유전자는 carbonic anhydrase (*icfA*), ribosomal protein (*rpl27*)와 20개의 가상단백질의 유전자를 포함한 39개였다(Table 4).

가상단백질의 기능은 아미노산 서열이나 그 유전자의 염기서열의 상동성 검색으로 유추가 가능하지만 알려진 유전자나 단백질과 염기/아미노산 서열의 상동성이 없는 유전자는 클러스터링을 사용하였다(Table 5). 가상단백질 HP1182는 clustering 결과 NADH-ubiquinone oxidoreductase (HP1266, HP1267, HP1268), 그리고 iron-sulfur 단백질 (HP0138) 등 산화-환원에 관련된 단백질과 연관이 있는 것으로 분류되었으며 기능상 세포분열과 염색체 분할과 관련이 있는 것으로 나타났다. HP1182의 발현 증가는 SodB의 결핍으로 증가된 산화 스트레스를 줄이기 위하여 여러 가지 산화환원효소가 과발현된 것으로 해석된다. 둘

Table 5. Clusters of orthologous groups of genes (COGs) of 24 genes 2-fold changes in expression levels of *sodB* mutants compared with wild type *H. pylori* 26695.

Gene function classification	Gene code			
Cell envelope biogenesis, outer membrane proteins	HP0102	HP0415		
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	HP0439			
DNA replication, recombination and repair	HP0650 ↑			
Cell division and chromosome partitioning	HP1182 ↑			
Coenzyme metabolism	HP1291 ↑			
Lipid metabolism	HP0693 ↑			
Function unknown	HP0513	HP1407 ↑	HP1142	HP1334
	HP1397	HP1426	HP1588	
Not in COGs	HP0101	HP0119		
	HP0408	HP0503	HP0937	
	HP0537	HP0603		
	HP0698	HP0702	HP1390	

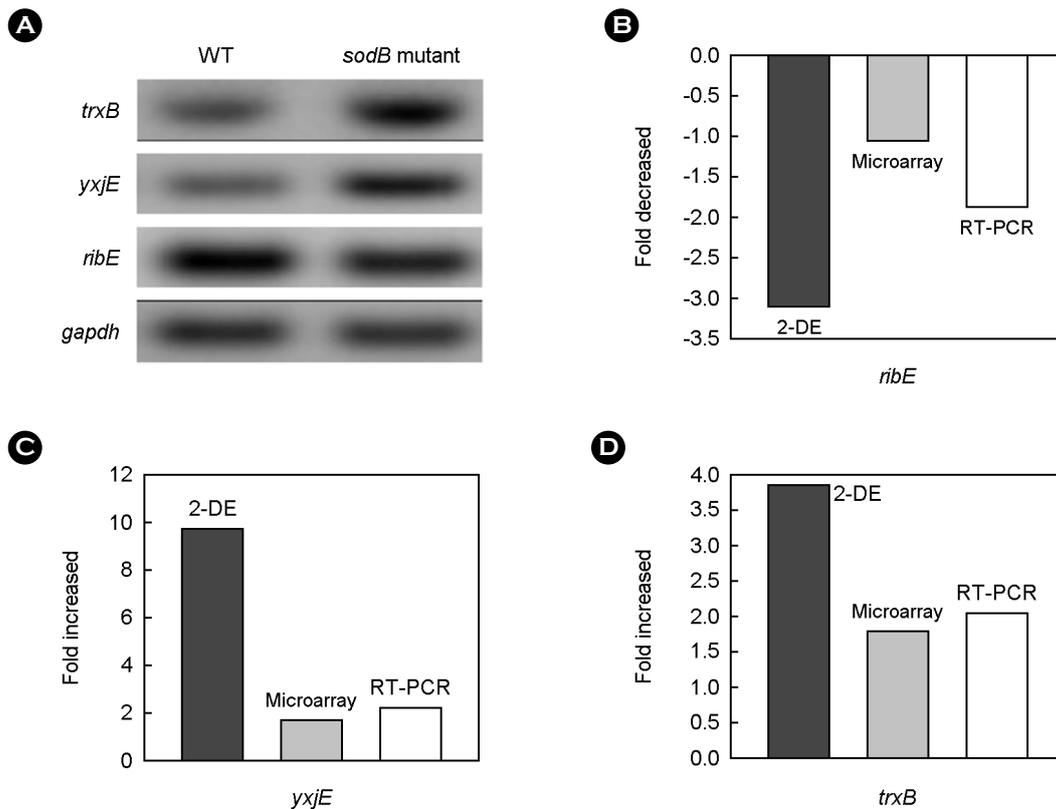


Figure 5. Comparison of expression of genes in wild type and *sodB* mutant. (A) RT-PCR analysis of *trxB*, *yxjE*, *ribE* (B) (C) (D) expression of three genes. Expression levels were measured by either 2-DE analysis or microarray. RT-PCR was used to confirm the results.

연변이주에서 발현이 증가된 aliphatic amidase는 짧은 사슬 aliphatic amide를 가수분해하여 유기산과 암모니아를 생산한다. 이는 *H. pylori*의 urease가 기여하는 것과 유사하게 산 스트레스에 저항하는 역할을 수행할 것으로 판단된다.

TrxB (HP7203)는 화학적, 생물학적 스트레스와 산소 스트레스와 같은 환경 스트레스에 반응해 이 세균의 생존과 성장을 위해 thiol-특이적인 산화-환원 시스템으로 기능을 수행한다. 이 세균은 glutaredoxin과 같은 thiol-환원제와 glutathione을 조절하는 효소가 부족하며 이를 보충하기 위한 TrxB에 의한 산화 스트레스 조절과 HP1182 등 oxidoreductase들이 과발현되어 부족한 스트레스 방어를 수행하는 것으로 판단된다. *H. pylori*는 SodB, KatA, AhpC 등 20여 종류의 항산화 효소들의 산화 스트레스에 대응하여 작용한다 (24). 이 연구에서 이들 *H. pylori*의 항산화 효소 중 하나인 SodB의 기능을 제거하였으나 다른 항산화 효소들의 두드러진 변화는 관찰되지 않았다. 이것이 SodB의 작용과 다른 항산화 효소들의 기능이 서로 영향을 주지 않는 독립적인지는 불명확하다. 이에 대한 설명을 위해서는 KatA, AhpC 등 다른 항산화 효소의 유전자를 제거시킨 돌연변이주의 연구나 두 가지 항산화 효소의 결손 돌연변이주를 통한 연구가 필요하다고 판단된다 (25).

본 연구에서 미호기성 *H. pylori*와 항산화 단백질인 Sod를 결손시킨 돌연변이주의 유전자 발현변화를 연구하였다. MALDI-MS와 tandem MS 방법으로 Sod 결손 돌연변이주의 단백질을 분석한 결과 12개 단백질이 증가하고 10개 단백질이 감소하였다. 마이크로어레이 분석법으로 전사수준의 유전자 발현을 분석한 결과 9개 유전자가 증가하고 33개 유전자가 감소하였다. *H. pylori*의 다른 주요 항산화 효소인 KatA, AhpC, NapA 등의 발현변화는 전사수준과 해독수준 모두에서 전혀 확인되지 않았다. 이는 Sod에 의한 항산화 반응이 다른 항산화 효소들과는 다른 기전으로 조절될 수 있음을 예측하게 한다. 이런 특징은 이 세균이 다른 세균들에 비해서 산소 스트레스를 조절하는 OxyR 등이 없는 특징에서 기인했을 것으로 판단된다 (24). 추후 KatA나 AhpC 등 다른 항산화 효소의 결손 돌연변이주를 연구하는 것으로 *H. pylori*의 특이한 항산화 기전을 이해할 수 있을 것으로 기대된다.

REFERENCES

- 1) Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;16:1311-5.
- 2) International Agency for Research on Cancer. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC monogr eval carcinog risks hum 1994;61:1-241.
- 3) Seo JH, Koo SI, Youn HS, Jun JS, Lim JY, Park CH, et al. Comparison of the antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated in Jinju over a 15-year period. *J Bacteriol Virol* 2012; 42:305-12
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 1999;21:33-7.
- 7) Bukau B. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol* 1993;9:671-80.
- 8) 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.
- 9) Homuth G, Domm S, Kleiner D, Schumann W. Transcriptional analysis of major heat shock genes of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 2000;182:4257-63.
- 10) Huesca M, Goodwin A, Bhagwansingh A, Hoffman P, Lingwood CA. Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (*hsp70*), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1998;66:4061-7.
- 11) Matsukawa Y, Asai Y, Kitamura N, Sawada S, Kurosaka H. Exacerbation of rheumatoid arthritis following *Helicobacter pylori* eradication: disruption of established oral tolerance against heat shock protein? *Med Hypotheses* 2005;64:41-3.
- 12) Chuang MH, Wu MS, Lin JT, Chiou SH. Proteomic analysis of proteins expressed by *Helicobacter pylori* under oxidative stress. *Proteomics* 2005;5:3895-901.
- 13) 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.
- 14) Joo JS, Park KC, Song JY, Kim DH, Lee KJ, Kwon YC, *et al.* A thin-layer liquid culture technique for the growth of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2010;15:295-302.
- 15) Park JW, Lee KJ, Kim KM, Joo JS, Kwon YC, Youn HS, *et al.* Analysis of low molecular weight proteome from *H. pylori* cell extract using the high performance liquid chromatography. *J Bacteriol Virol* 2010;40:67-75.
- 16) Altung-Mees MA, Short JM. pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res* 1989;17:9494.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007-21.
- 20) 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.
- 21) Kim KM, Lee SG, Joo JS, Kwon YC, Bae DW, Song JY, *et al.* Proteomic analysis of *Helicobacter pylori* J99 outer membrane protein by tandem mass spectrometry. *J Bacteriol Virol* 2008; 38:53-60.
- 22) Chuang SE, Daniels DL, Blattner FR. Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1993;175: 2026-36.
- 23) Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ. A genomic perspective on protein families. *Science* 1997;278:631-7.
- 24) Wang G, Alamuri P, Maier RJ. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 2006;61:847-60.
- 25) Olczak AA, Seyler RW Jr, Olson JW, Maier RJ. Association of *Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency. *Infect Immun* 2003;71:580-3.
-