

Photodynamic Therapy에 의한 산화적 스트레스 조건에서 *Helicobacter pylori*의 Fur 단백질의 역할

박유나¹ · 김지훈¹ · 최성숙^{2*}

¹삼육대학교 동물과학부, ²삼육대학교 약학대학

The Role of *Helicobacter pylori*'s Fur Protein in the Oxidative Stress Induced by Photodynamic Therapy

YuNa Park¹, HiJoon Kim¹, and SungSook Choi^{2*}

¹Division of Animal Science, ²College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Republic of Korea

(Received April 20, 2011 / Accepted June 15, 2011)

The role of the ferric uptake regulator (Fur) of *Helicobacter pylori* in the oxidative stress was investigated in this study. A *fur* knockout mutant of *H. pylori* was constructed by replacing the *fur* gene with an *aphA* (kanamycin resistant marker) gene. Photodynamic therapy using methylene blue (MB) and 660 nm light was chosen to induce oxidative stress. The bactericidal effect of photodynamic therapy (PDT) was compared between wild type *H. pylori* and *fur* knockout mutant *H. pylori*. The degree of oxidative damage of DNA was confirmed using alkaline gel electrophoresis and an assay of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG). In control groups, the number of viable cells was maintained constantly during experiment. After PDT, the mutant *H. pylori* showed 10,000 times decreased viable cell number compared with wild type *H. pylori*. Depending on the exposure time of 660 nm light, the 3-fold increase in the concentration of 8-OHdG was observed in mutant *H. pylori*. The results of this study showed that *H. pylori*'s Fur protein may play a role in oxidative stress induced by PDT.

Keywords: 8-OHdG, *fur*, *Helicobacter pylori*, oxidative stress, photodynamic therapy, viable cells

*Helicobacter pylori*는 미호기성(microaerobe), 그람 음성 간균으로 선진국의 경우 인구의 약 20%, 개도국의 경우 약 80% 이상이 만성적으로 감염되어 있으며 위궤양, 위염 및 위암의 원인균으로 주목 받고 있는 균이다(13, 24, 31). 미호기성 균인 *H. pylori*는 대기 중의 산소농도(약 20%)에는 견디지 못하지만 최소한 2% 이상의 산소는 존재하여야 생존이 가능하며 최적의 성장을 위해서는 5-8% 농도의 산소가 필요하다. *H. pylori* 균주가 숙주인 사람의 위점막 세포에 감염하여 위염을 일으키는 과정은 호중구, 단핵구, 림포사이트 등 염증반응에 관여하는 세포들의 침윤을 동반하는 것을 특징으로 한다(7, 10). 이러한 염증세포는 방어기작으로 강력한 염증반응을 일으키며 이 과정에서 다량의 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 발생한다(23, 25). *H. pylori*가 세포내에 질병을 유발하기 위하여 감염하는 과정에서 유도된 다량의 ROS는 *H. pylori* 균주에게 치명적인 산화적 스트레스로 작용한다.

그러나 이러한 ROS의 생성에도 불구하고 *H. pylori*는 숙주의 위점막에 반영구적으로 정착하여 질병을 유발할 수 있다는 것은 *H. pylori* 균주가 산화적 스트레스에 대항하는 방어기전을 갖고 있기에 가능하며 이 기능을 담당하는 주요 단백질로는 catalase (KatA), hydroperoxide reductase (AhpC), iron-cofactored superoxide dismutase (SodB) 등이 알려져 있다(17, 18). 철분은 모든 미생물의 생존에 필수적인 영양소로서 호흡과 전자전달계에 관여하고 여러 가지 효소의 조효소로서 기능을 하는 것으로 알려졌으나 철 이온은 산소의 존재하에서 Fenton 반응을 통해 매우 독성이 강한 ROS를 생성한다(30). 따라서 일반적으로 세균들은 세포내 철분 농도의 항상성을 유지하기 위하여 전사반응을 조절하거나 mRNA 분해반응 등을 이용하며 세균의 경우 ferric uptake regulator (Fur) 단백질을 이용해 철분의 항상성을 유지하는 것으로 알려졌다(1, 3). *H. pylori*는 사람이 섭취하는 음식물에 따라 다양한 농도의 철분에 노출될 수밖에 없으며 따라서 *H. pylori*의 경우 세포내 철분 농도의 항상성을 유지하여 산화적 스트레스로부터 스스로

* For correspondence. E-mail: sschoi@syu.ac.kr; Tel: +82-2-3399-1606; Fax: +82-2-3399-1617

를 보호하는 것은 이 균주의 생존에 매우 중요하다. 이 과정에서 *E. coli*와 마찬가지로 *H. pylori* 균주도 Fur 단백질이 중요한 역할을 담당한다(11, 16). Fur 단백질은 *H. pylori* 균주에서 여러 유전자의 전사조절인자(Transcriptional regulator)로서의 기능을 하는 것으로 알려졌으며 특히 철분대사, 산화적 스트레스에 대한 방어기전 등에 관여하는 유전자의 전사조절을 담당한다(14). 본 연구자 등은 최근 내시경 램프의 빛과 methylene blue를 이용한 photodynamic therapy (PDT)를 *H. pylori* 제균에 임상 적용할 목적으로 *in-vitro* PDT법에 의한 *H. pylori* 균주의 제균 효과를 발표한 바 있다(4). PDT법은 악성 종양이나 국소적 감염질환을 치료하기 위해 photosensitizer와 특정파장의 빛을 이용하는 방법으로 이 과정에서 발생한 ROS가 세포벽, 세포막 또는 핵산의 손상을 초래함으로써 살균 효과 및 항 종양효과를 나타내는 전통적인 치료법이다(32). 연구결과 *in-vitro* PDT법에 의한 *H. pylori*의 제균 효과가 매우 우수함을 알 수 있었으며 PDT법의 작용기전은 ROS 생성 및 그에 따른 DNA의 산화적 손상에 기인함을 확인하였다. 본 연구에서는 *fur* 유전자의 기능 중 산화적 손상에 대한 방어 기전을 확인하고자 산화적 스트레스환경을 PDT법으로 유도하고 wild type *H. pylori* 균주와 *fur* 유전자를 knockout 한 돌연변이체를 사용하여 산화적 스트레스에 대한 두 균주의 생존력과 기타 산화적 손상의 marker를 비교하여 *fur* 유전자의 기능과 산화적 스트레스와의 관계를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에는 KCTC (Korean Culture Type Collection)에서 구입한 *H. pylori* 26695 표준균주를 사용하였으며 균주의 배양은 기본적으로 brain heart infusion agar (Difco, USA) 배지에 laked horse blood (Oxoid, UK) 7%, isovitalax (BBL) 0.4%, vancomycin (6 µg/ml), amphotericin B (8 µg/ml), trimethoprim (5 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다(이하 BHI 배지). 균주의 배양환경은 37°C 배양기에 5% O₂, 10% CO₂ 및 85% N₂ 가스를 공급하여 미호기성 상태를 유지하며 균주를 배양하였다. *H. pylori fur* 유전자 돌연변이체($\Delta fur::aphA$)의 배양에는 kanamycin을 10 µg/ml 농도로 함유한 BHI 배지를 사용하였으며 *fur* 유전자를 회복한 wt *fur-cat* 균주의 배양에는 chloramphenicol을 15 µg/ml 농도로 함유한 BHI 배지를 사용하였다.

시약 및 기자재

실험에 사용한 endonuclease III는 New England Biolab (NEB) 제품을, photosensitizer인 methylene blue 및 agarose 등의 일반 시약은 Sigma 제품(Sigma Chemica Co., USA)을 사용하였으며 또한 광선을 조사하기 위한 광원장치로는 methylene blue의 최적 파장인 660 nm 파장의 빛을 내는 식물 LED 광원장치(42 W/60 Hz, 다인바이오, Korea)를 사용하였다.

*H. pylori*의 *fur* 돌연변이체 및 복귀돌연변이체의 제조

본 실험에 사용한 $\Delta fur::aphA$ (kanamycin resistance marker) 돌연변이체는 Tan (9, 28) 등의 *ΔureAB::cat* 제조와 유사한 방법을 이용하여 제한효소를 사용하지 않고 PCR 기법을 이용하여 제조한 것이며 Choi 등(5)의 논문에 언급된 것으로 Douglas E. Berg 교수(Washington University, USA)로부터 DNA를 받아서 사용하였다. *H. pylori*의 형질전환은 다음과 같이 Israel 등(19)의 방법을 변형하여 자연형질전환을 실시하였다. -70°C에 보관하고 있던 recipient 균주(*H. pylori* 26695)를 BHI agar에 도말하고 미호기성 상태에서 3일간 배양하였다. 잘 자란 균주를 새로운 배지에 옮기고 하룻밤 전배양하였다. 다음날 전배양한 균주를 loop으로 긁어 모은 후 새로운 BHI agar plate의 중앙에 4-5 cm 직경 크기로 도말 후 4-6시간 정도 배양하여 exponential phase까지 배양 후 mutated DNA ($\Delta fur::aphA$) ~0.1 µg을 competent cell과 잘 혼합 후 over night 배양하였다. 다음날 균주를 kanamycin 10 µg/ml 농도로 함유한 선택 배지에 도말 후 2-3일 정도 배양하면서 형질전환체 집락의 생성을 관찰하였다. 이때 생성된 kanamycin 내성 집락을 선택하여 genomic DNA를 분리하여 *fur* flanking region에 해당하는 primer 로 증폭 후 증폭된 DNA 크기를 확인하였고(*fur* 450 bp, *aphA* 1,200 bp) DNA 시퀀싱하여 *fur* 유전자의 knockout 및 *aphA* 유전자의 삽입을 확인하였다. 한편 *fur* knockout mutant 균주를 다시 wild type *fur* 균주로 복귀시킨 돌연변이체를 만들기 위해 wild type *fur* 유전자 말단에 chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) 유전자를 붙인 DNA를 Douglas E. Berg 교수로부터 받아서 사용하였다(5). 위와 설명한 동일한 방법으로 $\Delta fur::aphA$ 균주를 wt *fur-cat* 유전자로 형질전환 후 chloramphenicol을 15 µg/ml 농도로 함유한 배지에서 자란 형질전환체중 kanamycin을 10 µg/ml 농도로 함유한 배지에서는 자라지 못하는 균을 선택하여 wild type *fur* 유전자를 회복한 균주로 사용하였다. 본 실험에 사용한 primer sequence는 Table 1에 표시하였다.

Table 1. Oligonucleotide sequence used for this study

Target site	Primer name	Pylori gene coordinates (5'→3')	Sequence (5'→3')
<i>fur</i> Flanking region	x5k-F	1089716-1089740	ccctaatttagccgcttctgttg
	x4-R	1091135-1091115	ctgtagagttgcctgaattgtca
Sequencing	1027	1090019-1090040	ccctttagaatggcttgataag

Photodynamic therapy에 의한 항균력 측정

MB와 660 nm 파장의 빛에 의한 PDT법에 의한 항 미생물 효과를 두 균주에서 비교하기 위하여 Tegos 등(29)의 방법을 변형하여 다음과 같이 실험 하였다. MB는 660 nm 파장의 빛에 의해 활성화 되는 전형적인 photosensitizer로서 이 과정에서 생성된 ROS가 핵산에서 guanine 염기에 작용하여 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)을 형성하여 DNA 가닥의 해체 및 분해를 유도하는 물질로 알려져 있으며(2, 15, 26) 본 실험에서는 photosensitizer로 MB를 사용하여 산화적 스트레스를 유도하였다. -70°C에 보관 중인 *H. pylori* 26695 wt 균주 및 Δfur mutant 균주를 BHI 배지에 접종하여 3일간 배양 후 다시 새로운 BHI 배지에 계대하여 2일간 배양하였다. 배양 후 세균을 cell scrapper로 모아 PBS에 10^8 cells/ml 농도로 현탁 후 methylene blue를 0.005%, 및 0.01% 농도로 처리하고 미호기성 배양기에서 30분간 배양하여 MB가 충분히 세포내로 침투하게 한 후 PBS로 2회 세척하여 과량의 MB를 제거하였다. 과량의 MB 제거 후 다시 균을 PBS에 현탁 후 이 현탁액에 660 nm 광원의 빛을 시간 별로 조사하면서(2분, 5분 및 10분간) 시간대별로 각 균액을 취하여 10배 계열 희석하여 BHI plate에 접종하고 37°C 미호기성 상태에서 3일간 배양 후 생성된 집락의 갯수를 세어서 CFU를 결정하였다. 이때 0.01% MB 처리하고 광선 조사를 하지 않은 균을 대조군으로 하였으며 빛에 의한 사멸효과를 고려하여 MB 처리하지 않고 동일한 시간 동안 실온에서 660 nm 파장의 빛만 조사한 군도 함께 실험하였다. 한편 PDT로 유도한 산화적 스트레스에 의한 두 종류의 *H. pylori* 균주의 사멸효과 차이가 *fur* 유전자에 기인한 결과임을 증명하고자 $\Delta fur::aphA$ 균주를 숙주로 wt *fur-cat* 유전자로 재형질전환하여 *fur* 유전자를 회복시킨 wt *fur-cat* 돌연변이체도 동일한 조건에서 PDT법에 의한 사멸효과를 관찰하였다.

Alkaline gel 전기 영동법에 의한 DNA 손상의 확인

본 연구자의 연구 결과에 따르면(4) MB를 사용한 PDT법의 살균작용이 ROS의 발생과 그에 따른 DNA의 산화적 손상에 기인한 것을 확인 할 수 있었으며, 따라서 DNA의 산화적 손상 정도를 두 균주에서 비교하고자 Kozmin 등(21)의 방법을 변형하여 *H. pylori* 균주에 산화적 DNA 손상을 유발하였다. Wild type 및 돌연변이체 균주에 photosensitizer인 MB를 0.01% 농도로 처리 후 10분간 660 nm 파장의 빛을 조사 후 바로 균을 수확하여 GeneAll (Korea) 사의 Cell SV system을 이용하여 genomic DNA를 분리하고 DNA를 소분하여 -20°C 보관 후 일부를 사용하였다. Endonuclease III 반응은 $10\times$ endonuclease buffer 2 μ l, $10\times$ acetylated BSA 2 μ l, endonuclease 1 μ l (1 U, NEB), genomic DNA 200 ng을 합하여 최종 부피가 20 μ l가 되게 하고 37°C에서 1시간 반응하였다. 이렇게 처리한 DNA를 alkaline gel 전기영동 후 DNA의 분해 정도를 확인하였다.

8-Hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)의 정량

DNA의 산화적 손상의 대표적인 biomarker인 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)의 생성의 정도를 두 균주에서 비교하기 위하여 Northwest Life Science Specialties (USA) 사의 8-OHdG ELISA kit을 사용하여 정량하였다(20, 22). 앞의 방법에서 설명한대로 MB와 660 nm 파장의 빛을 쬐인 *H. pylori* 세포로부터 DNA를 분리하고 260/280 nm에서 DNA의 농도를 정량하였다. 정량 후 대조군과 시험군의 DNA 2 μ g을 취하여 nuclease P1 (Sigma Co., USA) 1 unit을 처리하고 37°C에서 30분 반응 후 60°C 열처리를 하여 효소를 불활성화하고 이 반응액 50 μ l (2 μ g of *H. pylori* DNA)를 취하여 8-OHdG 정량에 사용하였다. 50 μ l의 DNA 시료를 96 well plate에 취한 후 primary antibody를 50 μ l 가하고 충분히 혼합한 후 adhesive strip으로 sealing하여 4°C에서 하룻밤 반응하였다. 반응 내용물을 버린 후 250 μ l washing soln.으로 3회 충분히 세척 후 실험직전에 조제한 secondary antibody 100 μ l를 가하고 실온에서 1시간 반응 후 washing soln.으로 3회 세척하였다. 발색제인 substrate 용액 100 μ l를 가하고 실온, 암소에서 15분 반응하고 반응 종결액 100 μ l를 가하여 반응을 종결하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 8-OHdG 표준액으로 작성한 standard curve를 이용하여 각 시료별 8-OHdG양을 정량하였으며 이때 primary antibody를 첨가하지 않은 well을 blank로 하였으며 모든 실험을 3회 반복하여 평균값을 계산하였다.

결과 및 고찰

Photodynamic therapy에 의한 항균력 비교

Methylene blue (MB) 및 660 nm 파장의 빛을 이용한 photodynamic therapy (PDT) 의한 항균력을 측정된 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 MB와 660 nm 파장의 빛을 조사한 경우 현저한 살균효과를 확인할 수 있었다. Wt 균주와 Δfur 균주 모두 대조군의 균수는 시간이 지나도 거의 변화가 없었다. 한편 660 nm 파장에 빛에 의한 살균력도 존재할 가능성이 있어

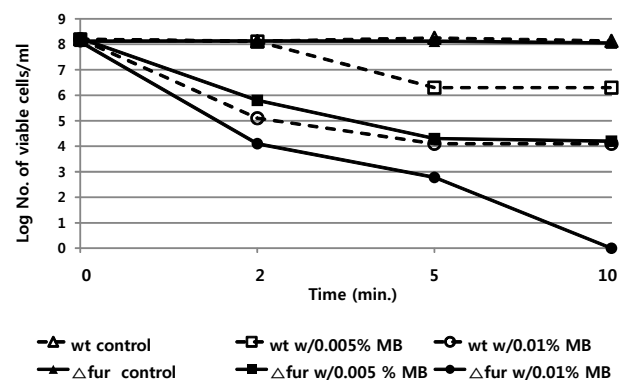


Fig. 1. Responses of *H. pylori* 26695 wild type and *H. pylori* 26695 $\Delta fur::aphA$ mutant to oxidative stress induced by photodynamic therapy. MB, methylene blue

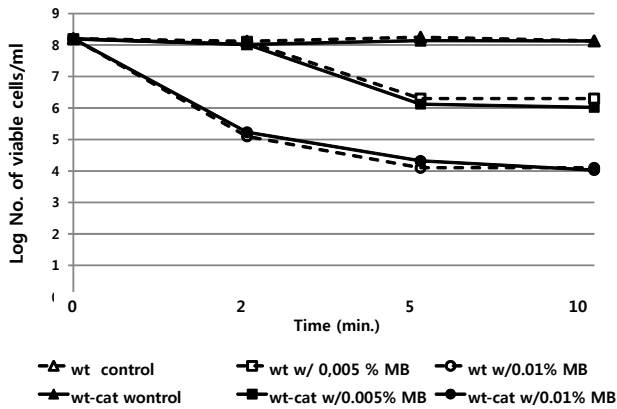


Fig. 2. Responses of *H. pylori* 26695 wild type and 26695 wt *fur*-cat mutant to oxidative stress induced by photodynamic therapy. MB, methylene blue

MB 처리하지 않고 동일한 조건에서 빛만 조사한 균의 경우에도 균수는 실험하는 시간 동안에는 초기 균수를 유지하여 변화가 거의 없었다(자료 미제시). 따라서 실험하는 과정인 10분 동안의 대기중 노출은 *H. pylori* 균주의 생존력에 크게 영향을 미치지 못한 것을 알 수 있었다. Wt *fur* 균주의 경우 0.005% MB에 노출시킨 후 광선을 조사하였을 경우 처음 2분까지는 균수의 감소를 관찰할 수 없었으나 5분 이후 약 100배 가량 균수가 감소하였다. 또한 좀더 높은 농도인 0.01% MB와 광선 조사를 한 경우에는 2분 후에 균수가 약 1,000배 정도 감소하였고 10분간의 광선 조사로 10,000배 가량의 균수가 감소하였다. 한편 Δfur 균주의 경우 control균은 wt *fur*과 동일한 양상을 나타내었으나 0.005% MB와 광선을 조사한 결과 2분 후에 약 1,000배의 생존수가 감소하였다. 0.01% MB와 광선을 조사한 경우 2분만에 균수가 10,000배 정도 감소하였고 10분 조사하였을 때는 모든 균이 사멸된 것을 알 수 있었다. MB와 660 nm 파장의 광선을 사용한 항균력실험에서 wt 및 Δfur 균주 모두 효과적으로 살균됨을 알 수 있었다. 특히 *fur* 유전자가 knockout된 Δfur 균주가 wt 균주에 비하여 100-10,000배 이상 더 감수성을 보이는 것을 알 수 있었다. 한편 PDT법에 의한 두 균주 사이의 살균효과의 차이가 *fur* 유전자에 기인한 것임을 증명하기 위하여 Δfur 균주에 다시 wt *fur* 유전자를 회복시킨 돌연변이체에 대하여도 동일한 항균력 실험

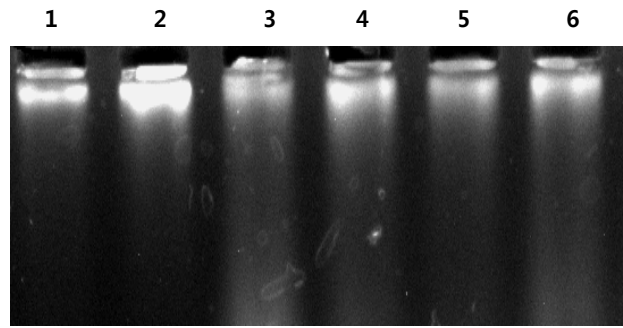


Fig. 3. Alkaline gel electrophoresis of *H. pylori* DNA exposed to 660 nm and methylene blue. Lanes: 1, Wild type control; 2, delta fur control; 3, wt w/ 0.005% MB for 10 min; 4, wt w/ 0.01% MB for 10 min; 5, delta fur w/ 0.005% MB for 10 min; 6, delta-fur w/0.01% MB for 10 min. MB, methylene blue.

험을 실시하였다. 그 결과 Δfur 균주에 다시 wt *fur*-cat 유전자를 발현시킨 균주에 대한 PDT법의 살균효과는 wt *fur* 균주와 동일함을 알 수 있었으며(Fig. 2) 이는 PDT법에 의한 살균효과의 차이가 *fur* 유전자에 기인함을 간접적으로 증명하는 결과이다. Harris 등(17)의 연구 결과에 따르면 *fur* 유전자가 과산화수소수로 유도된 산화적 스트레스에 기여하는 것을 알 수 있다. *Fur* 유전자가 결여된 균주를 98 mM 농도의 과산화수소수에 노출시켰을 때 약 4분만에 wild type보다 생존수가 10,000배 가량 감소한다고 보고하였다. 즉 이 연구결과는 *fur* 유전자가 산화적 손상에 대한 방어기능을 하는 catalase (KatA)의 발현에 직·간접적으로 관여함을 나타내고 있다. 산화적 스트레스를 유도하기 위해 본 연구에서는 MB와 660 nm 파장의 빛을 사용하였으며 그 결과 *fur* 유전자가 제거된 돌연변이체가 wt *H. pylori*에 비하여 생존수가 현저하게 감소함을 알 수 있었다. 이는 *H. pylori fur* 유전자가 PDT법에 의해 유도된 산화적 스트레스로부터 균주를 보호하는 방어 기작에도 관련이 있는 것으로 사료된다.

Alkaline gel 전기영동에 의한 DNA 손상

Photosensitizer인 MB와 660 nm 파장의 빛에 의한 DNA의 손상의 정도를 확인하기 위하여 DNA에 endonuclease III 처리를 한 후 alkaline gel 전기영동을 실시하였다. Figure 3에

Table 2. Quantificational analysis of 8-OHdG in DNA of *H. pylori* 26695 exposed to methylene blue and 660 nm light

Sample	Control	1	2	3	4
	Concentration (ng/ml/ μ g of DNA)				
Wt	0.112±0.03	0.122±0.04	0.138±0.05	0.152±0.06	0.321±0.08
Δfur	0.117±0.04	0.131±0.05	0.149±0.04	0.423±0.04	0.988±0.04

Control, DNA isolated from *H. pylori* 26695 incubated in normal microaerobic condition
 1, DNA isolated from *H. pylori* exposed to 0.02% MB and light for 2 min.
 2, DNA isolated from *H. pylori* exposed to 0.02% MB and light for 5 min.
 3, DNA isolated from *H. pylori* exposed to 0.02% MB and light for 10 min.
 4, DNA isolated from *H. pylori* exposed to 0.02% MB and light for 15 min.
 MB, methylene blue

서 보는 바와 같이 wt과 Δfur 대조군에서는 DNA의 손상을 관찰 할 수 없었으나 MB와 광선을 조사한 경우 10분 후에는 DNA가 손상되어 smearing된 DNA band를 확인할 수 있었다.

8-Hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)의 정량

Alkaline gel 전기영동법으로는 두 균주간의 DNA 손상을 정량적으로 비교하는데 어려움이 있어 DNA 손상을 정량적으로 보기 위해 DNA의 산화적 손상의 대표적인 marker 인 8-OHdG 정량을 하였다. 항균력을 실험한 MB 농도에서 유의적인 8-OHdG 양의 차이를 확인할 수 없어 MB 농도를 0.02%로 증가시키고 빛 조사시간도 15분까지 연장하여 실험하였다. 그 결과 대조군의 경우 차이가 없었으나 빛의 조사 시간이 길어 지면서 모두 8-OHdG의 생성을 확인할 수 있었으며 특히 Δfur 균주에서 10분 조사하였을 때 약 2.4배, 15분 조사하였을 때 약 3배 정도 8-OHdG이 더 생성된 것을 확인할 수 있었다(Table 2). 이는 photosensitizer와 해당 파장의 빛에 의한 산화적 손상에 대해 wt *H. pylori* 균주 보다는 *fur* 유전자가 결여된 균주의 DNA가 더 많이 손상됨을 보여주는 결과로서 *fur* 유전자가 산화적 스트레스와 연관이 있음을 알려주는 결과이다. PDT법은 악성 종양이나 국소적 감염질환을 치료하기 위해 photosensitizer와 특정파장의 빛을 이용하는 방법으로 이 과정에서 발생한 ROS가 세포벽, 세포막 또는 핵산의 손상을 초래함으로써 살균 효과 및 항 종양효과를 나타내는 전통적인 치료법이다(32). 대부분 방향족화합물인 photosensitizer 중에서 대표적인 물질로는 MB가 있으며 고농도인 1% (30 mM)에서도 인체 독성이 없는 것으로 보고되어 있다(8, 27). MB는 핵산에서 guanine 염기에 작용하여 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)을 형성하여 DNA 가닥의 해체 및 분해를 유도하는 작용기전을 갖고 있다(2, 15, 26). 본 실험 결과에서도 PDT법에 의하여 8-OHdG의 형성을 확인할 수 있었으며 특히 *fur* 유전자가 제거된 균주에서 더 많은 양의 8-OHdG 생성을 나타낸 것은 *fur* 유전자와 산화적 스트레스와 연관성을 보여주는 결과이다. *H. pylori* 균주에 대한 산화적 스트레스와 그에 따른 *H. pylori* 전체 유전자 발현의 변화를 microarray 방법으로 확인한 data는 아직 없지만 몇몇 연구 결과들을 살펴보면(6, 12, 16, 17) 주로 산화적 스트레스로부터 방어하는 기작을 나타내는 단백질로는 superoxidase dismutase (SodB), catalase (KatA), peroxiredoxin (AhpC), thioredoxin (Trx), NADPH quinone reductase (MdaB), Neutrophil-activating protein (NapA) 등이 있다. 이 유전자 중 전사조절 인자인 Fur 단백질의 조절을 받는 것이 확인된 HP 균주의 항산화 시스템을 구성하는 유전자로는 *sodB*, *kata* 및 *napA* 등이 확인되었다(33). 본 실험조건인 PDT법에 의한 산화적 스트레스 조건에서 *fur* 유전자가 어떤 항산화 유전자 발현과 밀접하게 관계되었는지 앞으로 더 연구를 진행하여서 밝혀내야 할 것으로 판단되며, 본 실험을 통해 *fur* 유전자가 다양한 산화적 스트레스에 중요한 역할을 담당하는 유전자인 것을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

결론

*Helicobacter pylori*균의 ferric uptake regulator (Fur) 단백질의 산화적 손상에 대한 역할을 연구하였다. *H. pylori*균의 *fur* 유전자를 제거한 돌연변이체를 만들고 wild type *H. pylori* 균과 돌연변이체 균의 산화적 스트레스에 대한 반응을 비교하였다. 산화적 스트레스는 methylene blue와 660 nm 파장의 빛을 이용하는 광역학적 치료방법으로 유도하였다. 산화적 스트레스를 가한 실험조건에서 wt *H. pylori*와 돌연변이체의 생존력, DNA 손상의 정도를 비교·검토하였다. 그 결과 *fur* 유전자가 제거된 돌연변이체의 생존수가 wt에 비해 10,000배 가량 감소한 것을 알 수 있었으며 DNA의 산화적 손상의 marker 인 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)의 양도 *fur* 유전자 제거된 돌연변이에서 wild type에 비해 3배 정도 더 생성됨을 확인하였다. 따라서 본 실험결과 *H. pylori*균의 *fur* 유전자가 PDT법으로 유도한 산화적 스트레스에 방어 기작을 하는 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 2010년도 삼육대학교 교비 연구비 지원에 의해 진행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Andrew, S.C., A.K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 215-237.
- Bachmann, B., J. Knüver-Hopf, B. Lambrecht, and H. Mohr. 1995. Target structures for HIV-1 inactivation by methylene blue and light. *J. Med. Virol.* 47, 172-178.
- Bagg, A. and J.B. Neidland. 1987. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26, 5471-5477.
- Choi, S.S., H.K. Lee, and H.S. Chae. 2010. *In vitro* photodynamic antimicrobial activity of methylene blue and endoscopic white light against *Helicobacter pylori* 26695. *J. Photochem. Photobiol. B.* 101, 206-209.
- Choi, S.S., P.T. Chivers, and D.E. Berg. 2011. Point mutations in *Helicobacter pylori*'s *fur* regulatory gene that alters resistance to Metronidazole, a prodrug activated by chemical reduction. *PLoS ONE* 6, e18236.
- Cooksley, C., P.J. Jenks, A. Green, A. Cockayne, R.P. Logan, and K.R. Hardie. 2003. NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator. *J. Med. Microbiol.* 52, 461-469.
- Crabtree, J.E. 1996. Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 215, 3-10.
- Creagh, T.A., M. Gleeson, D. Travis, R. Grainger, T.E. McDermott, and M.R. Butler. 1995. Is there a role for *in vivo* methylene blue staining in the prediction of bladder tumor recurrence? *Br. J. Urol.* 75, 477-479.
- Dailidien, D., S. Tan, O.K. Zhang, A.H. Lee, K. Severinor, and D.E. Berg. 2007. Urea sensitization caused by separation of *Helicobacter pylori* RNA polymerase beta and beta' subunit.

- Helicobacter* 12, 103-111.
10. Ernst, P.B. 1999. The role of inflammation in the pathogenesis of gastric cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther. Suppl* 1, 13-18.
 11. Ernst, F.D., S. Bereswill, B. Waidner, J. Stoof, U. Mäder, J.G. Kusters, E.J. Kuipers, M. Kist, A. H. van Vliet, and G. Homuth. 2005. Transcriptional profiling of *Helicobacter pylori* Fur- and iron-regulated gene expression. *Microbiology* 151, 533-546.
 12. Ernst, F.D., G. Homuth, J. Stoof, U. Mäder, B. Waidner, E.J. Kuipers, M. Kist, J.G. Kusters, S. Bereswill, and A.H. van Vliet. 2005. Iron-responsive regulation of the *Helicobacter pylori* iron-cofactored superoxide dismutase SodB is mediated by Fur. *J. Bacteriol.* 187, 3687-3692.
 13. Feldman, R.A., A.J.P. Eccersley, and J.M. Hardie. 1997. Transmission of *Helicobacter pylori*. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 13 S1, 8-12.
 14. Hall, H.K. and J.W. Foster. 1996. The role of Fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically separable from its role in iron acquisition. *J. Bacteriol.* 178, 5683-5691.
 15. Hamblin, M.R., J. Viveiros, C. Yang, A. Ahmadi, R.A. Ganz, and M.J. Tolkoff. 2005. *Helicobacter pylori* accumulates photoactive porphyrins and is killed by visible light. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2822-2827.
 16. Hantke, K. 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 172-177.
 17. Harris, A.G., F.E. Hinds, A.G. Beckhouse, T. Kolesnikow, and S.L. Hazell. 2002. 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* 148, 3813-3825.
 18. Hazell, S.L., A.G. Harris, and M.A. Trend. 2001. Evasion of the toxic effects of oxygen, pp. 167-175. *Helicobacter pylori*; physiology and genetics. In H.L.T. Mobley, G.L. Mendz, and S.L. Hazell (eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
 19. Israel, D.A., A.S. Lou, and M.J. Blaser. 2000. Characteristics of *Helicobacter pylori* natural transformation. *FEMS Microbiol. Lett.* 186, 275-280.
 20. Kanaya, S., M. Ikeya, K. Yamamoto, T. Moriya, K. Furuhashi, M. Sonoda, K. Gotto, and H. Ochi. 2004. Comparison of an oxidative stress biomarker "urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine," between smokers and non-smokers. *Biofactors* 22, 255-258.
 21. Kozmin, S., G. Slezak, and A. Reynaud-Angelin. 2005. UVA radiation is highly mutagenic in cells that are unable to repair 7, 8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13538-13593.
 22. Matsubasa, T., T. Uchino, S. Karashima, Y. Kondo, K. Maruyama, M. Tanimura, and F. Endo. 2002. Oxidative stress in very low birth weight infants as measured by urinary 8-OHdG. *Free Radic. Res.* 36, 189-193.
 23. Nardone, G., A. Rocco, and P. Malfertheiner. 2001. *Helicobacter pylori* and molecular events in precancerous gastric lesions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20, 261-270.
 24. Parsonnet, J. 1999. *Helicobacter* and gastric adenocarcinoma, pp. 372-408. In J. Parsonnet (ed.). *Microbes and malignancy: Infection as a cause of human cancer*. Oxford University Press, New York, NY, USA.
 25. Ramarao, N., S.D. Gray-Owen, and T.F. Meyer. 2000. *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radical from professional phagocytes using catalase activity. *Mol. Microbiol.* 38, 103-113.
 26. Schneider, J.E., S. Price, L. Maidt, J.M. Gutteridge, and R.A. Floyd. 1990. Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. *Nucleic Acids Res.* 18, 631-635.
 27. Soukos, N.S., M. Wilson, T. Burns, and P.M. Speight. 1996. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated *in vitro*. *Lasers Surg. Med.* 18, 253-259.
 28. Tan, S. and D.E. Berg. 2004. Motility of urease-deficient derivatives of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 186, 885-888.
 29. Tegos, G.P. and M.R. Hamblin. 2006. Phenothiazine antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 196-203.
 30. Tourati, D. 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 1-8.
 31. Uemura, N., S. Okamoto, S. Yamamoto, N. Matsumura, S. Yamaguchi, M. Yamakido, K. Taniyama, N. Sasaki, and R.J. Schlemper. 2001. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N. Engl. J. Med.* 345, 784-789.
 32. Wainwright, M. 1998. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 42, 13-28.
 33. Wang, G., P. Alamuri, and R.J. Maier. 2006. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 61, 847-860.