

Comparison of Proteome Components of *Helicobacter pylori* Before and After Mouse Passage

Kyoung-Ja Lee¹, Bok-Ran Kim¹, Young-A Cho¹, Yun-Gyu Song¹, Jae-Young Song^{1,3},
Kon Ho Lee^{1,3}, Hyung-Lyun Kang^{1,4}, Seung-Chul Baik^{1,3,4}, Myung-Je Cho^{1,3,4},
Kwang-Ho Rhee^{1,4}, Ji-Hyun Seo², Hee-Shang Youn^{2,3} and Woo-Kon Lee^{1,3,4*}

Department of ¹Microbiology, ²Pediatrics and ³Biomedical Center (BK21), Gyeongsang National University
School of Medicine; ⁴Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University, Jinju, Korea

The mouse model is alleged to be a useful tool for understanding of pathophysiological roles of *Helicobacter pylori* in the development of gastric disorders. However, it has been observed that *H. pylori* strains significantly differed in their fitness in mice and even mouse strains differed in their susceptibilities to a *H. pylori* strain. Bacterial components of *H. pylori* which could affect on its fitness in mice have to be elucidated for the establishment of the mouse model for *H. pylori* infections. In the comparison of colonization ability between two *H. pylori* Korean isolates, 51 (isolated from a patient with duodenal ulcer) and 52 (isolated from a patient with gastric cancer), 52 could colonize better than 51 on the gastric mucosa of mouse. Proteome components of *H. pylori* 52, as a good colonizer and *H. pylori* 51, as a poor one were quantitatively compared each other. Five bacterial proteins including catalase, urease subunit alpha/beta, enolase and ferritin, were up-regulated in 52. In addition, the respective proteome components of the two strains were also compared with their mouse-passaged homologous strains. Seven and five proteins, which included catalase, flagellin A/B in common, were up-regulated in mouse-adapted 51 and 52, respectively. Among the fourteen identified proteins, urease subunit alpha/beta, flagellin A/B, catalase, ferritin, superoxide dismutase and neutrophil-activation protein have been previously known to be necessary to gastric colonization of *H. pylori* in animal models. The other up-regulated proteins including enolase, elongation factor Tu and fructose-bisphosphate aldolase have been reported to be associated with acid tolerance of *H. pylori*. These data provide confirmatory evidence for the importance of those proteins in the development of *H. pylori*-associated gastric disorders.

Key Words: *Helicobacter pylori*, Proteome, Colonization, Mouse passage

서 론

*Helicobacter pylori*는 그람 음성의 만곡형 세균으로 인

Received: October 27, 2011 / Revised: November 19, 2011

Accepted: November 29, 2011

*Corresponding author: Woo-Kon Lee, VMD, PhD. Department of Microbiology, Gyeongsang National University School of Medicine, Jinju, Gyeong-Nam 660-751, Korea.

Phone: +82-55-772-8083, Fax: +82-55-772-8089

e-mail: wklee@gnu.ac.kr

**This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (521-2007-1-E00035).

체 위 점막에 감염되어 급·慢성 위염과 위궤양, 십이지장궤양을 유발한다 (1~3). 이 세균은 세계보건기구(WHO)에 의해 제1종 발암원으로 분류된 위암의 일차적 발병 결정인자이다 (4, 5). 전 세계 인구의 절반 가까이가 *H. pylori*에 감염되어 있는 것으로 알려져 있으며, 한국인의 대부분이 이균에 감염되어 일생 동안 보균자가 된다 (6~8). 그리고 감염자 중 일부에서 위궤양, 십이지장궤양 및 위암 등 중증의 위·십이지장 질환으로 진행된다.

*H. pylori*의 의학적 중요성이 높아짐에 따라 이 세균의 감염을 진단하거나 치료 및 예방을 위한 연구가 활발히 수행되고 있다. 그러나 다른 세균에 비해 배양이 까다롭

고 균종 간의 유전적 다양성이 매우 높아 전통적 세균학적 기법에 의한 균주 판별 기준이 아직 마련되어 있지 않다 (9). 또한 *H. pylori* 세포 성분의 생화학적, 분자생물학적 및 면역학적 성상이 규명되어 왔음에도 불구하고, 이 세균의 위점막 감염 및 질환의 발병 기전 등의 병리학적 특성을 설명할 수 있는 자료는 충분히 제시되지 못한 실정이다. 이러한 난제를 극복하기 위해서는 *H. pylori*의 생물학적 성상에 대한 포괄적이고 근원적인 이해가 필요하게 되었고 이에 따라 세균 유전체(genome) 및 단백체(proteome)의 구조에 기초하여 *H. pylori*와 인체의 상호관계를 검토하는 연구가 수행되고 있다.

유전체 연구기법의 급속한 발달에 힘입어 현재 26695, J99, 51, 52 및 HPAG1 균주 등 20개 이상의 *H. pylori* 균주에 대한 유전체 전체의 염기서열이 결정되어 보고되었으며 (10~13) 단백체 연구의 경우에는 *H. pylori*에서 발현되는 전체 단백에 대한 연구를 비롯하여 외막단백과 분비단백 등을 분석한 다양한 연구 결과가 보고되었다 (14~18).

특정 질환의 연구에 있어 실험동물 모델이 마련된다면 숙주-미생물 상호관계를 기초로 발병 기전을 규명할 수 있다. 이와 더불어 진단, 치료, 그리고 예방을 위한 수단을 마련하는 연구를 용이하게 추진할 수 있다. 따라서 인체에 발생하는 감염성 질환에 대한 실험동물 모델의 응용 연구는 그 질환의 대책을 마련하는 초석이 된다. *H. pylori*가 자연 상태에서 사람이나 유인원 이외의 다른 동물에 감염된 예가 없기 때문에, 사람의 경우와 유사한 위십이장 질환을 일으킬 수 있는 진정한 의미의 *H. pylori* 실험동물 모델은 아직 확립되지 않고 있다. 그러나 다수 연구자의 노력에 힘입어 인공 감염 후 인체 위점막에 비하여 *H. pylori* 감염빈도가 낮으며 병리학적 변화도 미약하고 한정적이지만 현재까지 무균자돈 (19), 무균자견 (20), 마우스 (21~23) 및 몽골리안저빌 (24) 등이 *H. pylori*와 인체간의 상호관계를 연구하는 동물모델로 사용되고 있다. 그 중에서도 취급이 비교적 용이하여 통상적인 세균 감염 연구에 흔히 사용되는 마우스 모델이 *H. pylori* 감염 연구에도 보편적으로 사용되고 있다.

마우스에 대한 *H. pylori* 감염은 한 종류의 균주에 대하여 여러 종의 마우스가 서로 다른 감수성을 나타내며 한 종류의 마우스에 대하여서도 여러 균주가 서로 다른 감염능을 나타낸다고 알려져 있다 (23, 25, 26). 이러한 현상에 기초하여 마우스 위점막 감염에 영향을 주는 이 세

균이 보유한 인자를 규명하는 것이 *H. pylori*의 숙주-미생물 상호관계를 이해하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다. 이에 따라 본 연구에서는 단백체 분석기법을 이용하여 마우스 모델에서 위점막 감염에 관여하는 *H. pylori* 측 인자를 조사하고자 하였으며 이를 위해 정착능 (colonization ability)이 서로 다른 *H. pylori* 균주를 상호 비교하는 한편 마우스 감염 전후의 동일 균주를 상호 비교하는 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

*H. pylori*의 배양

H. pylori 51, 52를 국가지정연구소재은행인 헬리코박터파이로리 분리균주은행(*H. pylori* Korean Type Culture Collection, 경상대학교)에서 제공받아 사용하였다. 액체질소에 냉동 보관중인 *H. pylori* 균주를 37°C에서 해동한 후 amphotericin B (8 µg/ml), nalidixic acid (10 µg/ml), vancomycin (6 µg/ml)과 소 혈청이 10% 첨가된 브루셀라 한천평판배지에 접종하여 10% CO₂를 유지시켜 주면서 37°C 배양기(Sanyo, Japan)에서 배양하였다.

마우스 감염의 정량적 분석

마우스는 5~6주령 C57BL/6N 및 FVB 마우스(Koatech, Korea)를 암수 구분 없이 사용하였다. 브루셀라 한천배지에서 하룻밤 키운 *H. pylori*를 인산완충액에 부유하여 600 nm에서 흡광도 10 (4×10^9 cfu/ml)이 되도록 조정하였다. 3시간 동안 절식시킨 마우스에 마리당 0.5 ml의 세균부유액(2×10^9 cfu)을 경구용 존데(sonde)를 사용하여 위내에 투여하였다. 세균 감염은 2일간 연속으로 2회 반복 시행하였다.

감염 2주 후 경추탈골법으로 마우스를 희생시키고 무균적으로 위장을 적출하였다. 위장에서 전위(forestomach) 부분을 제거한 다음 날문부에서 들문부까지 소만곡(lesser curvature)을 따라 수직으로 절개하였다. 전개한 위점막 표면에 남아 있는 위 내용물을 조심스럽게 제거한 뒤 날문방(antrum)과 위몸통(corpus) 부분으로 나누어 절단하였다. 펀셋을 사용하여 각각의 위점막 부분을 trimethoprim (5 µg/ml), polymyxin B (10 µg/ml), bacitracin (200 µg/ml), amphotericin B (8 µg/ml), nalidixic acid (10 µg/ml) 및 vancomycin (6 µg/ml)과 소 혈청이 10% 첨가된 Mueller-Hinton 한천평판배지의 표면에 고르게 문질러 도말하고

이를 37°C, 10% CO₂ 조건에서 5일 이상 배양하면서 세균의 발육 유무와 세균집락의 수를 육안으로 측정하여 감염균수를 정량하였다. 배지 당 집락의 수가 500개 이하인 경우 집락계수기를 사용하여 산정하였으며 그보다 숫자가 많을 경우 한천평판배지와 크기가 동일한 원형의 종이에 집락과 유사한 크기의 점을 500, 1,000, 2,000 및 4,000 개로 고르게 분산표기한 조견표를 제작하고 이를 목적으로 실제 집락 숫자와 비교하여 균수를 산정하였다.

이차원전기영동(two-dimensional gel electrophoresis)

브루셀라 한천평판배지에서 배양한 *H. pylori* 균체를 50 mM tris 완충액(pH 8.0)으로 3회 세척한 후 이차원전기영동 샘플용해완충액[9.5 M urea, 4% CHAPS, and 35 mM Tris-HCl (pH 7.2)]을 이용하여 단백 시료를 추출하였다. 추출한 단백 100 µg을 재수화완충액(GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)과 혼합하여 최종 용적을 320 µl로 맞추고 re-swelling tray (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 옮겼다. IPG strip (17 cm; pH 3~10, Bio-Rad)을 단백 시료에 담가 20°C에서 15~16시간 동안 재수화시킨 다음 Protein Isoelectric Focusing (IEF) Cell (Bio-Rad)에서 등전점전기영동(isoelectric focusing)을 실시하였다. Protein IEF Cell의 프로그램은 다음과 같이 작동시켰다. 15분 동안 250 V에서 charged contaminants와 염을 제거하는 conditioning 단계, 3시간 동안 전압을 10,000 V까지 올리는 선형전압 단계, 마지막은 focusing 단계로 90,000 V/h가 될 때까지 최대의 전압을 걸어주었다. 등전점전기영동이 완료된 strip은 사용 전까지 -70°C에 냉동 보관하였다.

등전점전기영동이 완료된 strip을 평형화완충액 I [37.5 mM Tris buffer (pH 8.8), 6 M urea, 20% SDS, 20% glycerol, 2% DTT, and 0.01% bromophenol]로 20분간 진탕한 후 평형화완충액 II [37.5 mM Tris buffer (pH 8.8), 6 M urea, 20% SDS, 20% glycerol, 2.5% idoacetamide, and 0.01% bromophenol]로 다시 20분간 진탕하여 평형화시켰다. 이 strip을 중류수로 씻고 건조시킨 후 12% SDS-PAGE 겔 위에 중층시켰다. 나머지 공간은 전기영동완충액에 녹인 0.7% low melting agarose로 충전하였다. 전기영동완충액을 채운 후 28 mA에서 bromophenol blue가 겔의 제일 아래에 닿을 때까지 하룻밤 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 겔은 은염색을 위해 고정액에 담가 두었다.

은염색은 Heukeshoven 등의 방법을 변형하여 시행하였다 (27). 겔을 고정액(50% methanol, 12% acetic acid, 2.5 µl/

ml of 37% HCOH)에서 1시간 30분 동안 고정한 다음 치오황산나트륨용액(200 mg/ml)에서 1분간 전처리하고 질산은용액(200 mg/ml)에서 30분 동안 교반한 후 발색용액 (Na₂CO₃, 24 mg/ml, Na₂S₂O₃ · 5H₂O, 0.2 mg/ml, 2.5 µl/ml 37% HCOH)에 옮겨 단백 반점을 발색하였다.

이차원전기영동 겔 이미지 분석

이차원전기영동 겔의 이미지는 Fluor-S Multi Imager (Bio-Rad)를 사용하여 스캔하였고 PDQUEST Version 8.0 프로그램(Bio-Rad)을 사용하여 단백 반점의 정위적 및 정량적 분석을 시행하였다.

단백 반점의 처리

은염색한 겔로부터 단백 반점을 잘라내고 탈색완충액(15 mM potassium ferricyanide, 50 mM sodium thiosulfate)에서 은을 화학적 환원제로 탈색시킨 다음 200 mM 중탄산나트륨용액 내에서 30분 동안 교반하였다. 아세토니트릴을 첨가하여 겔 조각이 불투명한 흰색이 될 때까지 진탕하여 탈수시키고 겔 조각을 30분 동안 진공 건조시켰다.

단백 반점의 in-gel digestion은 O'Connel과 Stults의 방법(28)으로 시행하였다. 트립신이 포함된 효소반응액에서 겔 조각을 재수화시킨 후 효소반응액을 제거하고 소화완충액(50 mM, NH₄HCO₃, 5 mM CaCl₂) 20 µl를 넣어 겔 조각이 잠긴 상태로 37°C 배양기에서 하룻밤 동안 정지하였다. 이후 아세토니트릴 100 µl를 튜브에 넣은 후 30분간 교반하고 원침 후 상층액을 취하였다. 이 상층액을 진공건조기로 완전히 건조시켰다.

MALDI-TOF-MS를 이용한 단백의 동정

매트릭스용액(40 mg/ml α -cyano-4-hydrix cinnamic acid, 50% acetonitrile, 0.1% TFA)에 녹인 시료를 target plate well에 점적한 후 건조 및 세척을 실시하였다. 웨타이드 질량 분석은 20 kV accelerating voltage, 65% grid voltage, 0.02% guide wire voltage 및 150 ns delay의 조건으로 MALDI-TOF-MS (VoyagerTM DEST, PE Biosystems, USA)를 사용하여 시행하였으며 800에서 3,500 KDa 사이의 질량을 측정하였다.

Protein Prospector Package Program MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu>, USA)를 이용하여 측정된 웨타이드의 질량을 National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) 데이터베이스 자료를 바탕으로 분석하여 최종적으

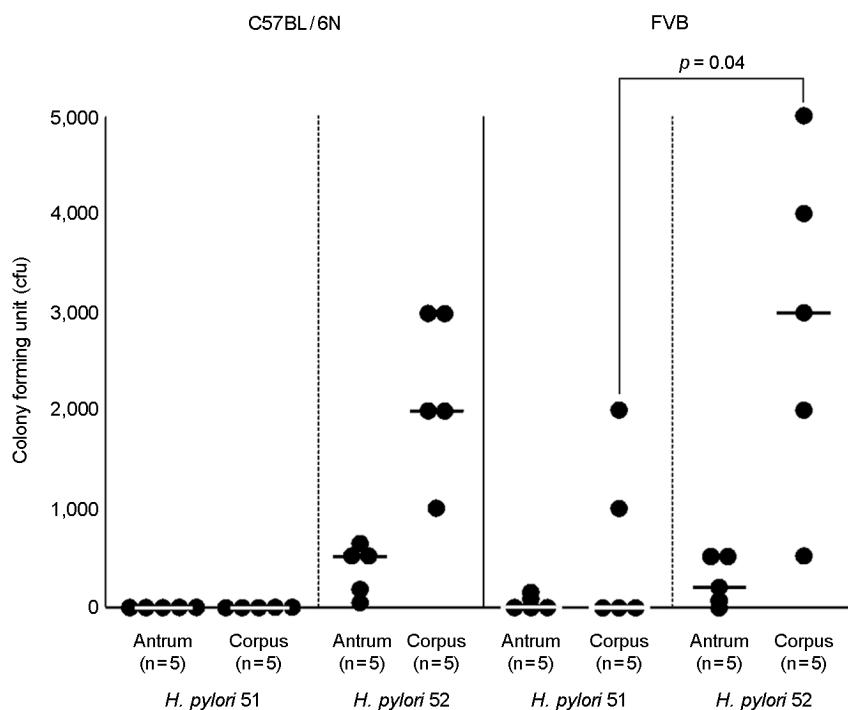


Figure 1. Mouse colonization abilities of *H. pylori* 51 and 52. Mice were inoculated with *H. pylori* twice for two consecutive days with a dose of 2×10^9 cells. Mice were sacrificed 2 weeks later, antrum and corpus were separated and *H. pylori* was examined from each tissue by plate counts. Each spot represents the CFU count from one mouse. According to Mann-Whitney U test analysis, there is a significant difference between 51 and 52 in FVB corpus colonization ability ($p = 0.04$). The horizontal bars within each group represent the median value.

로 단백을 동정하였다.

결과

마우스 감염능 분석

H. pylori 51, 52를 각각 5마리의 C57BL/6N 마우스에 감염시킨 결과 *H. pylori* 52는 5마리 모두의 위점막으로부터 세균이 분리된 반면 *H. pylori* 51은 5마리 모두에 대하여 감염능을 나타내지 않았다(Fig. 1). *H. pylori* 52의 감염된 세균수는 날문방이 평균 370 cfu/mouse, 위몸통이 평균 2,200 cfu/mouse였다.

FVB 마우스에 *H. pylori* 52를 투여한 경우 C57BL/6N에서와 동일하게 5마리 모두에서 감염이 확인되었다. 감염된 세균수는 날문방에서 평균 240 cfu/mouse, 위몸통에서 평균 2,900 cfu/mouse로서 C57BL/6N에서 관찰된 결과와 비교할 때 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p = 0.33$ 및 $p = 0.52$, Mann-Whitney U test). *H. pylori* 51을 감염시킨 경우 C57BL/6N에서와는 달리 5마리의 FVB 마우스 중 2마리에서 균이 분리되었다(Fig. 1). 감염된 세균수는 날문방에서 평균 16 cfu/mouse, 위몸통에서 평균 600 cfu/mouse였다. FVB 마우스에 대한 *H. pylori*의 감염능은 52가 51에 비하여 위몸통에서 통계적으로 유의하게 높게 관찰되

었다($p = 0.04$, Mann-Whitney U test). 이와 같은 결과를 토대로 본 연구에서는 *H. pylori* 52를 감염능이 높은 균주, *H. pylori* 51을 감염능이 낮은 균주로 결정하였다.

H. pylori 51과 52의 단백체 비교

감염능이 낮은 *H. pylori* 51과 감염능이 높은 52의 이차원전기영동 겔 이미지(proteome map)를 상호 비교한 결과 밸현강도가 서로 다른 다수의 단백 반점이 확인되었다(Fig. 2). PDQUEST를 이용하여 총 216개의 반점을 상호 비교하였으며 단백 밸현강도가 2배 이상 차이를 나타내는 반점을 동정 대상 단백으로 선택하였다. MALDI-TOF-MS를 통해 동정이 성공적으로 이루어진 단백 반점은 *H. pylori* 51에서 밸현이 증가한 4종 단백과 *H. pylori* 52에서 밸현이 증가한 5종의 단백이었다(Table 1). Urease subunit alpha, urease subunit beta, catalase, enolase 및 ferritin 등이 마우스 감염능이 높은 *H. pylori* 52에서 51에 비하여 상대적으로 밸현강도가 높았다. 반면 마우스 감염능이 낮은 *H. pylori* 51에서는 superoxide dismutase, ATP-dependent protease binding subunit, glutamine synthetase, neutrophil activating protein 등이 52에 비해 상대적으로 높은 밸현강도를 보였다.

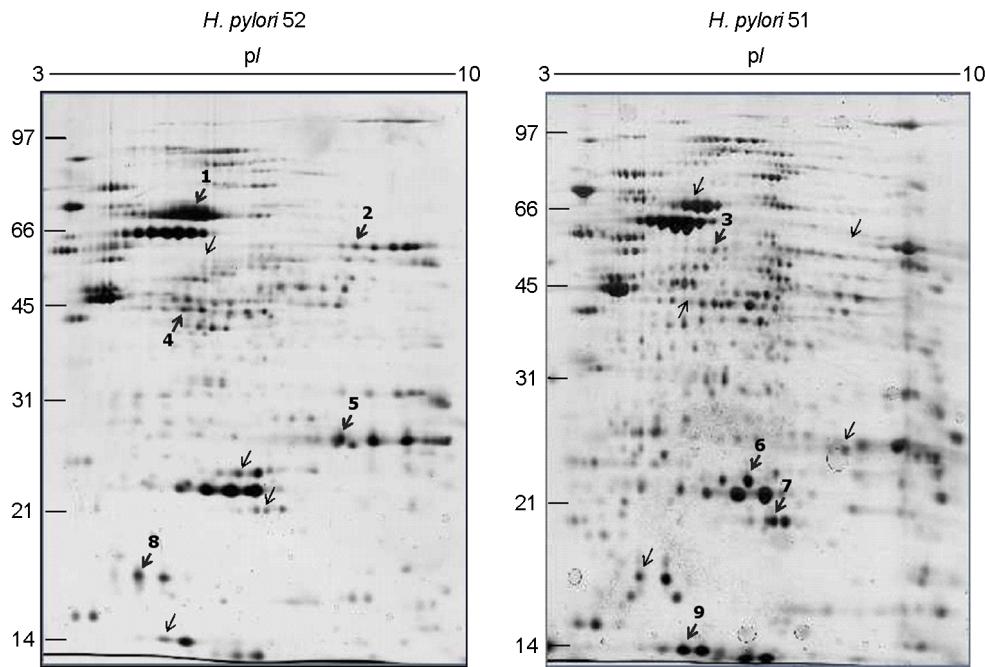


Figure 2. Two-dimensional gel electrophoresis profiles of *H. pylori* 51 and 52. A total 100 μ g of whole-cell protein of each strain was applied on 170-mm IPG strips with a range of pH 3-10, followed by 12% SDS-PAGE, and visualized by silver staining. The bold numbers with thick arrows represent proteins that are strong in spot intensity compared to the other strain.

Table 1. Identification of differentially expressed proteins in the whole-cell protein fractions of *H. pylori* 51 and 52

Spot No.*	Protein description	Gene codes	MW (Da) / pI	Spot intensity (n=3, mean \pm SD)		Strain with up-regulation (fold variation)
				51	52	
1	Urease subunit beta	HP0072	61,683/5.9	498.40 \pm 376.97	1367.38 \pm 1013.2	52 (2.21)
2	Catalase	HP0875	58,630/8.7	57.14 \pm 59.41	185.74 \pm 51.35	52 (3.31)
4	Enolase	HP0154	46,562/5.5	18.63 \pm 32.26	180.33 \pm 18.31	52 (9.68)
5	Urease subunit alpha	HP0073	26,539/8.9	203.61 \pm 352.66	509.02 \pm 194.70	52 (2.50)
8	Ferritin	HP0653	1,9286/5.6	150.12 \pm 134.92	667.72 \pm 298.33	52 (4.45)
3	Glutamine synthetase	HP0512	54,513/6.0	67.55 \pm 28.73	3.91 \pm 6.78	51 (17.28)
6	Superoxide dismutase	HP0389	24,518/6.0	863.13 \pm 53.83	417.63 \pm 64.16	51 (2.07)
7	ATP-dependent protease binding subunit	HP0264	96,638/6.2	298.51 \pm 163.37	43.08 \pm 74.61	51 (6.93)
9	Neutrophil activating protein	HP0243	16,933/5.8	1404.04 \pm 309.76	324.69 \pm 283.82	51 (4.09)

*Spot numbers are shown in Fig. 2.

마우스 감염 전후 단백체 비교

FVB 마우스에 감염시킨 후 위 점막으로부터 재분리한 *H. pylori* 52균주와 감염 이전의 동일 균주를 대상으로 이차원전기영동 겔 이미지를 상호 비교하였다(Fig. 3). 총 181개의 단백 반점을 상호 비교하여 감염 전에 비해 감

염 후 발현량이 2배 이상 증가한 반점 중 MALDI-TOF-MS를 통해 동정이 이루어진 단백은 5종으로 catalase와 flagellin A, flagellin B 및 3-dehydroquinate dehydratase, neutrophil activating protein[△]다(Table 2).

마우스에 대한 감염능이 낮았던 *H. pylori* 51 역시 FVB 마우스 감염 전후의 단백체를 분석하여 총 205개의 단백

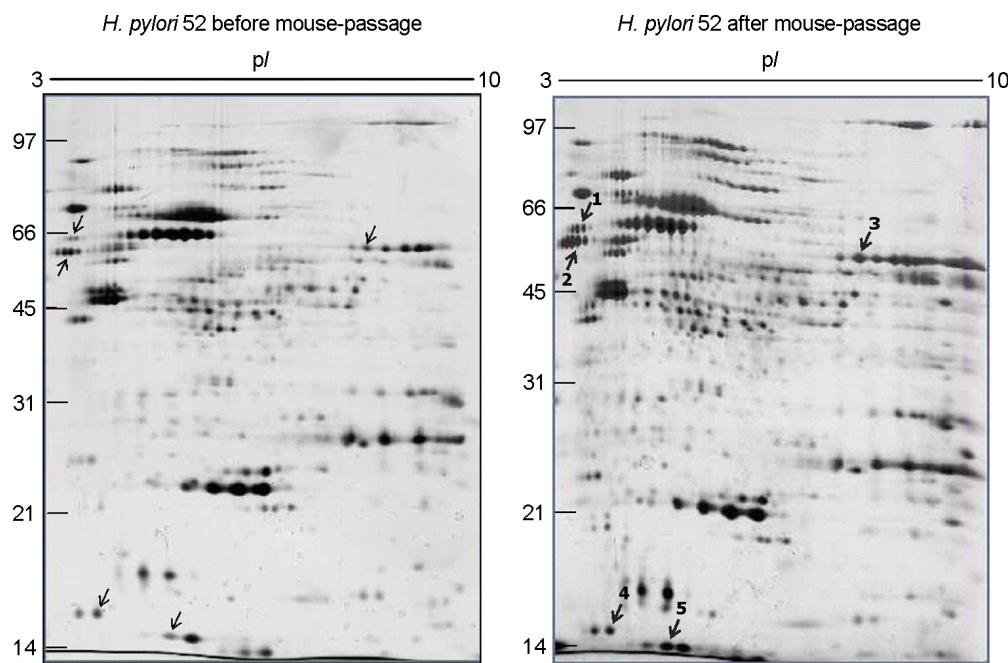


Figure 3. Comparison of two-dimensional gel electrophoresis profiles of *H. pylori* 52 before and after FVB mouse passage. 100 µg of whole-cell protein of each strain was applied on 170-mm IPG strips with a range of pH 3~10, followed by 12% SDS-PAGE, and visualized by silver staining. The bold numbers with thick arrows represent proteins that are up-regulated after mouse passage.

Table 2. Identification of up-regulated proteins in the whole-cell protein fractions of *H. pylori* 52 after FVB mouse passage

Spot No.	Protein description	Gene codes	MW (Da) / pI	Spot intensity (n=3, mean ± SD)		Fold variation
				before passage	after passage	
1	Flagellin B	HP0115	53,882/6.1	9.05±15.68	21.82±18.90	2.41
2	Flagellin A	HP0601	53,284/6.3	54.44±49.15	175.89±152.20	3.23
3	Catalase	HP0875	58,630/8.7	185.74±51.35	404.71±282.79	2.18
4	3-dehydroquinate dehydratase	HP1038	18,483/4.9	35.25±61.05	154.76±134.09	4.39
5	Neutrophil activating protein	HP0243	16,933/5.8	324.69±283.82	965.66±836.30	2.98

*Spot numbers are shown in Fig. 3.

반점을 상호 비교하였다(Fig. 4). 감염 후에 2배 이상 발현량이 증가한 반점 중 동정이 완료된 단백은 flagellin A, flagellin B, urease subunit alpha, urease subunit beta, catalase, fructose bisphosphate aldolase 및 elongation factor Tu 등 총 7종이었으며(Table 3) 이 중 flagellin A와 flagellin B, catalase 등 3종의 단백은 두 균주에서 마우스 감염 후 공통적으로 발현량이 증가하였다.

고찰

현재까지 *H. pylori*의 인공 감염 실험을 위한 동물모델로는 마우스가 가장 일반적이며 특히 C57BL/6 마우스가 주로 사용된다. 이는 Lee 등 (23)이 동물실험을 위한 표준균주 개발을 위해 SS1 (Sidney strain) 균주를 여러 종의 마우스에 감염시킨 연구에서 BALB/c, DBA/2 및 C3H/He에 비해 C57BL/6로부터 가장 많은 감염 균수(cfu)가 관찰된 결과에 기인한다. 한편 van Doorn 등 (25)은 SS1과

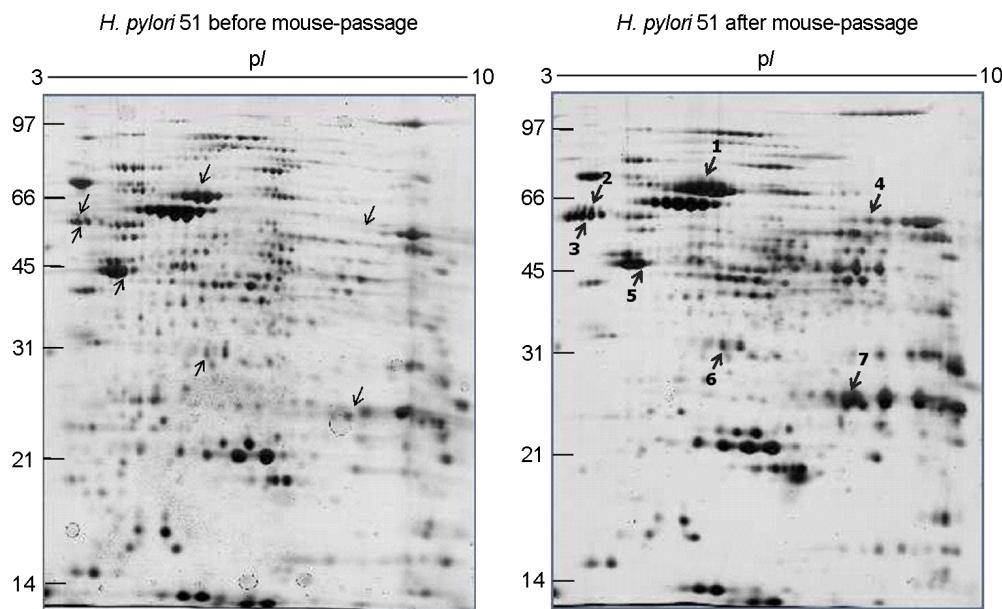


Figure 4. Comparison of two-dimensional gel electrophoresis profiles of *H. pylori* 51 before and after FVB mouse passage. 100 μ g of whole-cell protein of each strain was applied on 170-mm IPG strips with a range of pH 3~10, followed by 12% SDS-PAGE, and visualized by silver staining. The bold numbers with thick arrows represent proteins that are up-regulated after mouse passage.

Table 3. Identification of up-regulated proteins in the whole-cell protein fractions of *H. pylori* 51 after FVB mouse passage

Spot No.	Protein description	Gene codes	MW (Da) / pI	Spot intensity (n=3, mean \pm SD)		Fold variation
				Before passage	After passage	
1	Urease subunit beta	HP0072	61,683/5.9	498.40 \pm 376.97	1029.54 \pm 827.08	2.06
2	Flagellin B	HP0115	53,882/6.1	16.98 \pm 25.50	61.41 \pm 13.54	3.62
3	Flagellin A	HP0601	53,284/6.3	168.68 \pm 111.58	336.54 \pm 159.49	2.00
4	Catalase	HP0875	58,630/8.7	57.14 \pm 59.41	212.16 \pm 139.34	3.71
5	Elongation factor Tu	HP1205	43,648/5.2	46.50 \pm 11.78	151.06 \pm 22.60	3.25
6	Fructose-bisphosphate aldolase	HP0176	33,772/6.2	12.28 \pm 21.27	117.30 \pm 47.24	9.55
7	Urease subunit alpha	HP0073	26,539/8.9	203.61 \pm 352.66	880.33 \pm 535.57	4.33

*Spot numbers are shown in Fig. 4.

SPM326/IL-8⁺ 및 자연돌연변이 균주인 SPM326/IL-8⁻을 두 종류의 마우스에 감염시킨 결과 C57BL/6에서는 SS1에 비해 나머지 두 균주가 낮은 감염능을 보였고 BALB/c의 경우 SPM326/IL-8⁻는 SS1보다 낮은 감염능을, SPM326/IL-8⁺는 전혀 감염능을 보이지 않았다고 보고하였다. 이러한 연구 결과는 특정 마우스종에 대한 *H. pylori*의 감염능이 균주마다 다를 수 있으며 특정 *H. pylori* 균주에 대한 감수성 또한 마우스종에 따라 달라질 수 있는 복잡한 숙주-미생물 상호관계의 가능성을 의미한다. 이와 같

은 독특한 *H. pylori*와 마우스의 상호관계는 이 세균이 가진 높은 유전적 다양성 (12, 13)과 무관하지 않을 것으로 추정되며 복잡한 상호관계를 이해하기 위해서는 마우스 위점막 감염에 영향을 주는 세균 측 인자를 포괄적으로 조사하는 연구가 선행되어야 할 것이다.

본 연구에 사용된 *H. pylori* 51과 52는 본 경상의대 미생물학교실 연구팀이 십이지장궤양 환자 및 위암 환자로부터 각각 분리하여 국내 표준균주로 사용하고 있으며 유전체 염기서열 분석을 완료한 균주이다. 두 균주

간에 마우스 감염능의 차이가 있는지를 알아보기 위하여 일차적으로 C57BL/6N 마우스에 감염시킨 결과에서 51은 전혀 감염능을 나타내지 않았다(Fig. 1). 이에 따라 타 마우스종에 비해 *H. pylori* 임상분리균주의 감염에 비교적 높은 감수성을 나타낸다고 알려진 FVB 마우스(personal communication with Dr. Douglas E. Berg, Washington University in St. Louis, USA)를 대상으로 동일한 감염실험을 반복 수행하였고 두 균주 모두 FVB에 감염능이 있으며 두 균주 간에 유의한 감염능의 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 52가 5마리의 마우스에 모두 감염을 일으킨 것과는 달리 51은 5마리 중 2마리에서만 세균이 분리되었고 위점막으로부터 측정된 세균수(cfu)도 52에 비해 날문방에서 3~13%, 몸통에서는 25~40%에 그치는 낮은 수준이었다(Fig. 1). 이상의 감염실험을 토대로 *H. pylori* 52를 마우스 감염능이 높은 균주, *H. pylori* 51을 감염능이 낮은 균주로 결정하였으며 이들을 이용하여 마우스 위점막 감염에 관여하는 세균 측 인자를 규명하기 위해 먼저 감염능이 서로 다른 두 균주 간 단백체를 비교 분석하였고 다음은 각 균주 별로 마우스 감염 전 후의 단백체를 비교 분석하였다.

단백체 분석기법을 활용한 단백의 발현수준 비교는 균주 간 표현형의 다양성을 나타내는 지표로 사용될 수 있다(29, 30). 따라서 단백체 비교를 통한 균주 간의 다양성 분석 시 유념해야 할 사항은 단백 시료의 준비에서부터 이차원전기영동, 염색 그리고 이미지의 획득 등의 전 과정에서 발생될 수 있는 실험 오차를 최소화하여야 한다는 점이다(31). 따라서 본 연구에서는 각 균주의 단백 시료 당 최소 5회 이상 이차원전기영동을 반복 시행하였으며 여기서 얻어진 젤 이미지 중 전반적인 단백 반점 발현강도가 균일하고 일관성 있는 3개의 이미지를 최종 선택한 다음 각 단백 반점의 강도를 평균값으로 산출하여 다른 단백 시료 분석 결과와 비교하였다.

51과 52간의 단백체 비교 분석에서는 총 216개의 단백 반점 발현강도를 비교하였는데 이들 중 52에서 2배 이상 상대적으로 높은 발현강도를 나타내는 반점은 14개였고 51에서 상대적으로 2배 이상 발현강도가 높은 반점은 24개였다. 이들 중에서 다시 MALDI-TOF-MS를 통한 단백의 동정에 실패한 반점과 이성체(isomer) 단백으로 동정된 반점의 중복 숫자를 제외하면 52와 51에서 최종 확인된 단백의 종류는 각각 5종과 4종으로서 동정이 이루어진 비율은 다소 낮은 편이었다. 한편 51과 52의 마우스

감염 전후 비교 분석에서는 각각 205개와 181개의 단백 반점을 대상으로 발현강도를 비교하였다. 51의 경우 감염 후 2배 이상 발현이 증가한(up-regulated) 반점은 28개, 2배 이상 발현이 감소한(down-regulated) 반점은 8개였으며 52에서는 감염 후 증가한 반점이 16개, 감소한 반점이 10개였다. 두 균주 모두 감염 후 발현이 증가한 단백의 수가 감소한 단백보다 많았으며 특히 마우스 감염능이 낮은 51에서 52보다 발현이 증가한 반점의 수가 약 1.8배 더 많이 관찰된 사실은 후속 연구를 통해 논리적 근거를 유추할 수 있는 연구 결과라고 판단된다.

본 연구에서는 발현이 증가한 반점을 대상으로 MALDI-TOF-MS를 시행하였으며 이를 통해 51에서 7종, 52에서 5종의 단백을 최종 동정하였다. 이들 중 두 균주에서 공통적으로 발현이 증가한 단백은 flagellin A, B와 catalase 이었다. 한편 감염 전 두 균주 간 비교에서 52보다 51에서 2배 이상 발현강도가 낮게 관찰된 5종의 단백 중 마우스 감염 후 51에서 발현이 증가한 단백은 urease subunit alpha, beta 및 catalase 등 3가지였는데 후술하는 바와 같이 이들 모두 감염 성립에 필요한 세균 측 인자라는 점에서 발현 변화의 타당성을 유추할 수 있다. 반대로 51에 비해 52에서 2배 이상 발현강도가 낮았던 4종의 단백 중 마우스 감염 후에 발현이 증가한 단백은 neutrophil activating protein 한 종류뿐이었다.

마우스 감염 이전의 51과 52의 상호비교(Table 1)와 51, 52 각각의 마우스 감염 전후 비교(Table 2, 3) 등 3가지 실험 결과에서 모두 발현이 증가하였던 단백은 catalase 가 유일하다. Harris 등 (32)은 C57BL/6 마우스에 감염시킨 catalase 유전자 결손 SS1 변이균주가 정상 대조균주에 비해 감염기간이 길수록 감염능이 저하되는 현상을 관찰하였다. 또한 Harris 등은 정상 균주가 100 mM의 과산화수소에 견디는데 비하여 변이균주는 쉽게 사멸된다고 보고하였다 (33). 사람의 위점막에 감염된 *H. pylori*가 지속적으로 인체 면역반응을 유발함에도 세균이 쉽게 제거되지 않는 이유는 면역세포가 직접 도달하지 못하는 위점막 상피세포 표면과 점액층이라는 감염부위의 특성에 기인한다 (9). 그러나 대치 상태의 면역세포가 생성하는 활성산소에 노출되기 때문에 *H. pylori*는 이에 대한 방어체계로서 catalase를 비롯하여 superoxide dismutase, alkylhydroperoxide reductase, thiol-linked thiol peroxidase 등의 산화적 스트레스 저항성 관련 단백을 구축하고 있다 (32). 본 연구 결과는 이들 단백 중에서도 catalase가 *H.*

*pylori*의 마우스 위점막 감염에 핵심적인 역할을 담당할 가능성이 있음을 시사하는 자료이다.

한편 Seyler 등 (34)은 superoxide dismutase 유전자를 결손시킨 SS1 변이주와의 C57BL/6J 마우스에 대한 감염능이 뚜렷하게 감소하였다고 보고하였는데 본 연구에서는 superoxide dismutase가 감염능이 낮은 51에서 52 보다 2배 정도 높은 강도로 발현되었다. 이러한 연구 결과의 차이를 해석하기 위해서는 추후 보완 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Urease 효소는 *H. pylori*가 서식하는 장소가 인체 위점막이라는 점에서 오래 전부터 그 중요성이 인식되어 온 이 세균의 대표적 발병결정인자이다. *H. pylori*가 위점막에 감염이 되기 위해서는 위산이 분비되는 낮은 pH 환경에서 살아갈 수 있는 기작이 필요하다. Urease는 요소를 분해하여 암모니아를 생성함으로써 위점막 감염 초기의 집락 형성과 세균의 생존을 도와준다 (35~37). 따라서 이 효소가 결손된 돌연변이 균주는 위점막에 집락화하지 못한다는 사실이 마우스를 이용한 감염실험에서 증명되었다 (38). Flagellin A와 B는 이 세균의 편모를 구성하는 구조 단백이다. *H. pylori*가 위점막의 점액층을 투과하여 상피세포 표면이나 상피세포 간 접합부에 서식할 수 있는 능력은 대장균보다 10배 이상 강력한 운동성에서 기인한다 (39). 편모 결손균주와 야생균주의 FVB 마우스에 감염 실험에서 편모 결손균주가 야생균주에 비해 감염능이 현저하게 저하된다는 사실이 무균자돈 (40)과 마우스 (41) 실험을 통해 확인되었다.

51에 비해 52에서 더 높은 발현강도를 나타낸 ferritin은 *H. pylori* 철대사의 필수적인 단백으로서 이 단백 유전자를 결손시킨 변이균주가 몽골리안저빌 위점막에서 감염능을 나타내지 못한다는 연구 결과가 보고되었다 (42). 또한 감염 전 52에 비해 51에서 발현강도가 높았으며, 52에서는 마우스 감염 후 발현이 증가하였던 neutrophil activating protein은 *H. pylori*가 감염된 위점막에 호중구를 활성화시키고 활성산소 생성을 유발하는 염증유발인자로서 해당 유전자 결손 변이균주를 마우스에 감염시켰을 때 정상 대조균주에 비해 감염능이 저하된다는 사실이 보고된 바 있다 (43).

이상에서 논의된 *H. pylori*의 발병결정인자들은 위점막 감염능과의 밀접한 연관성이 생체 내(*in vivo*)에서 이미 확인된 단백이지만 단백체 분석(*in vitro*)을 통해서 그 연관성을 방증하는 자료를 제시하였다는 점에서 본 연구의

가시적 성과를 평가할 수 있다.

그 밖에 감염 전 51보다 52에서 발현강도가 높았던 enolase (44) 및 51에서 마우스 감염 후 발현이 증가하였던 elongation factor Tu (45), fructose-bisphosphate aldolase (46) 등은 *H. pylori*의 산 저항성(acid tolerance)과 밀접한 관련이 있다고 알려진 단백이다. 이들이 낮은 pH 환경의 위 내에서 생존하는데 필요한 세균인자라는 간접적인 증거를 본 연구에서 단백체 비교 분석을 통해 확인하였다고 판단된다. 52에서 감염 후 발현이 증가한 3-dehydroquinate dehydratase의 경우 아직 이 단백과 *H. pylori*의 감염 기전 또는 위십이지장 질환의 발병 기전과 관련된 연구보고가 없어 추후 연구를 통해 숙주-미생물 상호관계에서의 역할을 규명해야 할 연구대상이다.

최근 Zhang 등 (47)은 위암 환자 분리주(YN8)와 위염 및 십이지장궤양 환자 분리주(YN14) 간에 단백체를 비교한 결과 YN8에서만 발현되는 3종의 단백과 YN14에서만 발현되는 4종의 단백, YN8에서 발현이 증가된 2종의 단백을 확인하였다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 동일한 단백 시료에 대한 3장의 이차원전기영동 겔 이미지(triplicate images)를 서로 비교해 보았으나 51과 52 상호 간에 완전히 배타적으로 발현되는 단백 반점은 관찰할 수 없었다. 이차원전기영동 겔의 은염색 과정은 실험 오차를 최소화하기 위해 동일한 조건 하에서 세심한 주의를 기울여야 하지만 최적의 발색에 필요한 시간은 매번 실험자가 발색 단계를 육안으로 관찰하면서 조정하기 때문에 약간의 차이가 있을 수 있으며 이러한 염색시간 차이에 따라 상대적으로 발현강도가 낮은 반점은 경우에 따라서 겔 이미지 상에서 전혀 보이지 않거나 매우 희미하게 관찰될 수 있다. 따라서 이와 같은 실험 오차를 보정하기 위해 전술한 바와 같이 통상 동일한 시료에 대하여 이차원전기영동을 반복 실시하고 여러 장의 이미지로부터 측정한 해당 단백 반점의 발현강도 평균값을 단백체 분석 자료로 제시하게 된다. Zhang 등 (47)의 보고에서 동일 시료에 대한 이차원전기영동 반복 수행 여부나 반복 횟수를 확인할 수는 없으나 본 연구에서는 발현강도가 매우 낮게 관찰된 fructose bisphosphate aldolase, glutamine synthetase 및 flagellin B 등의 경우 동일 단백 시료에 대한 3장의 이차원전기영동 이미지 중에서도 하나 또는 두 장의 이미지 상에서 해당 단백 반점이 관찰되지 않았던 사실을 고려하면 *H. pylori* 균주 간에 배타적으로 발현되는 단백의 유무에 관한 결론은 충분한 반복 검토를 통해

보다 신중하게 내려져야 할 것으로 사료된다. 한편 Zhang 등 (47)이 보고한 두 균주 간 상호배타적 또는 발현강도의 차이를 보인 9종의 단백과 본 연구에서 두 균주 간 발현강도의 차이를 나타낸 9종의 단백 간에 공통적인 것은 ATP-dependent protease binding subunit 한 종류였다. 그런데 Zhang 등 (47)이 위암 분리주인 YN8에서만 이 단백이 발현된다고 보고한 것과는 달리 본 연구에서는 위암 분리주인 52 보다 십이지장궤양 분리주인 51에서 발현강도가 7배 높은 것으로 확인되어 서로 다른 결과를 보였다.

본 연구를 통해 마우스 위점막 감염과 관련이 있을 것으로 추정되는 총 14종의 *H. pylori* 단백이 확인되었다. 이들 단백에 관한 기존의 연구보고를 검토해보면 이 중 catalase를 포함한 8종은 위점막 감염과 관련 단백이고 fructose bisphosphate aldolase를 포함한 3종은 산 저항성 관련 단백임이 확인되었다. 따라서 본 연구 결과는 *H. pylori*의 발병 기전 및 생물학적 특성에 관한 기존 연구 결과의 타당성을 뒷받침한다고 판단된다. ATP-dependent protease binding subunit, 3-dehydroquinate dehydratase, glutamine synthetase 등 나머지 3가지 단백은 현재까지 *H. pylori*의 감염이나 발병 기전과 관련된 연구 결과가 확인되지 않은 단백으로서 추후 연구를 통해 마우스 감염과 연관된 생물학적 특성을 조사할 필요가 있다.

참 고 문 헌

- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;1:1311-5.
- Warren JR. Spiral bacteria of the gastric antrum. *Med J Aust* 1984;141:477-8.
- Marshall BJ, Armstrong JA, McGechie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust* 1985;142:436-9.
- World Health Organization. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human 1994. p.177-240.
- Baik SC, Youn HS, Chung MH, Lee WK, Cho MJ, Ko GH, et al. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res* 1996;56:1279-82.
- Baik SC, Kim JB, Cho MJ, Kim YC, Park CK, Ryou HH, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among normal Korean adults. *J Korean Soc Microbiol* 1990;25:455-62.
- Rhee KH, Youn HS, Baik SC, Lee WK, Cho MJ, Choi HJ, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Korea. *J Korean Soc Microbiol* 1990;25:475-90.
- Youn HS, Baik SC, Lee WK, Cho MJ, Ryou HH, Choi HJ, et al. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Korean Soc Microbiol* 1990;25:463-74.
- Youn HS, Ko GH, Chung MH, Lee WK, Cho MJ, Rhee KH. Pathogenesis and prevention of stomach cancer. *J Korean Med Sci* 1996;11:373-85.
- 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.
- 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.
- Kawai M, Furuta Y, Yahara K, Tsuru T, Oshima K, Handa N, et al. Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: *Helicobacter pylori* East Asian genomes. *BMC Microbiol* 2011;11:104.
- Oh JD, Kling-Bäckhed H, Giannakis M, Xu J, Fulton RS, Fulton LA, et al. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9999-10004.
- 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. Erratum in: *J Bacteriol* 2005;187:1541.
- Bumann D, Aksu S, Wendland M, Janek K, Zimny-Arndt U, Sabarth N, et al. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2002;70: 3396-403.
- Cho MJ, Jeon BS, Park JW, Jung TS, Song JY, Lee WK, et al. Identifying the major proteome components of *Helicobacter pylori* strain 26695. *Electrophoresis* 2002;23:1161-73.
- Park JW, Song JY, Lee SG, Jun JS, Park JU, Chung MJ, et al. Quantitative analysis of representative proteome components and clustering of *Helicobacter pylori* clinical strains. *Helicobacter* 2006;11:533-43.
- Park JW, Lee SG, Song JY, Joo JS, Chung MJ, Kim SC, et al. Proteomic analysis of *Helicobacter pylori* cellular proteins fractionated by ammonium sulfate precipitation. *Electrophoresis*

2008;29:2891-903.

19) Krakowka S, Morgan DR, Kraft WG, Leunk RD. Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. *Infect Immun* 1987;55:2789-96.

20) Radin MJ, Eaton KA, Krakowka S, Morgan DR, Lee A, Otto G, *et al.* *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. *Infect Immun* 1990;58:2606-12.

21) Karita M, Kouchiyama T, Okita K, Nakazawa T. New small animal model for human gastric *Helicobacter pylori* infection: success in both nude and euthymic mice. *Am J Gastroenterol* 1991;86:1596-603.

22) Marchetti M, Aricò B, Burroni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 1995;267:1655-8.

23) Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 1997;112:1386-97. Erratum in: *Gastroenterology* 1997;113:732.

24) Matsumoto S, Washizuka Y, Matsumoto Y, Tawara S, Ikeda F, Yokota Y, *et al.* Induction of ulceration and severe gastritis in Mongolian gerbil by *Helicobacter pylori* infection. *J Med Microbiol* 1997;46:391-7.

25) van Doorn NE, Namavar F, Sparrius M, Stoof J, van Rees EP, van Doorn LJ, *et al.* *Helicobacter pylori*-associated gastritis in mice is host and strain specific. *Infect Immun* 1999;67:3040-6.

26) Akada JK, Ogura K, Dailidiene D, Dailide G, Cheverud JM, Berg DE. *Helicobacter pylori* tissue tropism: mouse-colonizing strains can target different gastric niches. *Microbiology* 2003;149:1901-9.

27) 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.

28) O'Connell KL, Stults JT. Identification of mouse liver proteins on two-dimensional electrophoresis gels by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of in situ enzymatic digests. *Electrophoresis* 1997;18:349-59.

29) Kim YH, Han KY, Lee K, Heo JH, Kang HA, Lee J. Comparative proteome analysis of *Hansenula polymorpha* DL1 and A16. *Proteomics* 2004;4:2005-13.

30) Shaw AC, Gevaert K, Demol H, Hoorelbeke B, Vandekerckhove J, Larsen MR, *et al.* Comparative proteome analysis of *Chlamydia trachomatis* serovar A, D and L2. *Proteomics* 2002;2:164-86.

31) Hunt SM, Thomas MR, Sebastian LT, Pedersen SK, Harcourt RL, Sloane AJ, *et al.* Optimal replication and the importance of experimental design for gel-based quantitative proteomics. *J Proteome Res* 2005;4:809-19.

32) Harris AG, Wilson JE, Danon SJ, Dixon MF, Donegan K, Hazell SL. Catalase (KatA) and KatA-associated protein (KapA) are essential to persistent colonization in the *Helicobacter pylori* SS1 mouse model. *Microbiology* 2003;149:665-72.

33) 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.

34) 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.

35) Hu LT, Foxall PA, Russell R, Mobley HL. Purification of recombinant *Helicobacter pylori* urease apoenzyme encoded by ureA and ureB. *Infect Immun* 1992;60:2657-66.

36) Krishnamurthy P, Parlow M, Zitzer JB, Vakil NB, Mobley HL, Levy M, *et al.* *Helicobacter pylori* containing only cytoplasmic urease is susceptible to acid. *Infect Immun* 1998;66:5060-6.

37) Bauerfeind P, Garner R, Dunn BE, Mobley HL. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut* 1997;40:25-30.

38) Tsuda M, Karita M, Morshed MG, Okita K, Nakazawa T. A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect Immun* 1994;62:3586-9.

39) Hazell SL, Lee A, Brady L, Hennessy W. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis* 1986;153:658-63.

40) Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* 1996;64:2445-8.

41) Ottemann KM, Lowenthal AC. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun* 2002;70:1984-90.

42) 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.

43) Rieder G, Einsiedl W, Hatz RA, Stolte M, Enders GA, Walz A. Comparison of CXC chemokines ENA-78 and interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Infect Immun* 2001;69:81-8.

44) Thompson SA, Blaser MJ. Isolation of the *Helicobacter pylori* recA gene and involvement of the recA region in resistance to low pH. *Infect Immun* 1995;63:2185-93.

45) Dong Q, Hyde D, Herra C, Kean C, Murphy P, O'Morain CA, et al. Identification of genes regulated by prolonged acid exposure in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 196:245-9.

46) Slonczewski JL, McGee DJ, Phillips J, Kirkpatrick C, Mobley HL. pH-dependent protein profiles of *Helicobacter pylori* analyzed by two-dimensional gels. *Helicobacter* 2000;5:240-7.

47) Zhang YN, Ding SG, Huang LH, Zhang J, Shi YY, Zhong LJ. Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori* clinical strains by two-dimensional gel electrophoresis. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011;12:820-7.
