

## 헬리코박터 파일로리에서 *fdxA* 유전자에 의한 메트로니다졸 내성 조절 기전 연구

남원희 · 이선미 · 김은실 · 김진호<sup>1</sup> · 정진용\*

울산대학교 의과대학 아산생명과학연구소, <sup>1</sup>서울아산병원 소화기내과

Received April 17, 2007 / Accepted May 11, 2007

**Mechanism of Metronidazole Resistance Regulated by the *fdxA* Gene in *Helicobacter pylori*.** Won Hee Nam, Sun Mi Lee, Eun Sil Kim, Jin Ho Kim<sup>1</sup> and Jin Yong Jeong\*. *Asan Institute for Life Sciences and* <sup>1</sup>*Department of Internal Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul 138-736, Korea* – Resistance to metronidazole in *Helicobacter pylori* results from inactivation of *rdxA* and *frxA*, the chromosomal genes for a nitroreductase that normally converts metronidazole from prodrug to bactericidal agent. Two types of metronidazole susceptible strains had been found distinguishable by their apparent levels of *frxA* expression. Most common in the populations we had studied were strains that required only *rdxA* inactivation to become resistant to moderate levels of metronidazole (type I strains). The second strain type required inactivation of both *frxA* and *rdxA* to become resistance to metronidazole (type II strains); this was linked to a relatively high level of *frxA* gene transcription in the type II strains. The *fdxA* gene regulated *fdxA* as well as *rdxA* gene. Thus, to study the function of *fdxA* as a regulatory gene we constructed a null mutant of *fdxA* in *H. pylori* genome and identified over- and under-expressed proteins by *fdxA* using two-dimensional (2-D) electrophoresis and MALDI-TOP-MS. There were four over-expressed proteins in *fdxA* mutant; nifU-like protein (HP0221), *frxA* (HP0642), nonheme ferritin (HP0653), and hypothetical protein (HP0902). Three under-expressed proteins were also identified in *fdxA* mutant, including 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase (HP0089), (3R)-hydroxymyristoyl ACP dehydratase (HP1376), and thioredoxin (HP1458).

**Key words** – *fdxA*, *Helicobacter pylori*, metronidazole resistance

### 서 론

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)는 1983년 처음으로 사람의 위전정부 점막생검에서 분리 동정된 나선형 간균으로 만성 위염, 십이지장궤양, 위궤양 및 위선암 그리고 위암과종의 발병에 중요한 역할을 하는 병원성세균이다[5,6,8,21]. 이 세균은 전 세계 인구의 반수 이상 감염되어 있으며, 서양보다 한국, 일본을 포함한 동양권에서 높은 감염률을 보인다[1,4]. 특히 한국에서는 *H. pylori* 감염률이 높은 편이며 영, 유아시절에 이미 *H. pylori*에 감염되어 성인의 90% 이상이 보균자가 된다[17,19]. 이런 이유로 한국인은 서구인에 비하여 높은 빈도로 위암을 비롯한 각종 위장질환에 시달리고 있다. 이 세균에 의한 위장질환을 일으키는 발병 요인으로 *H. pylori* 개개의 특성, 숙주의 면역반응, 감염시기, 혹은 환경요인등 많은 인자가 관여한다는 연구보고들이 있다[13,15,16].

병원성 세균인 *H. pylori*를 인류로부터 박멸하기 위해 현재 전 세계의 병원에서 처방하고 있는 항생제로는 metronidazole, amoxicillin, clarithromycin, tetracycline 등이 주로 사용되고 있다[2,7]. *H. pylori* 박멸효과를 극대화하기 위해 위의 항생제 중 2 혹은 3 가지와 bismuth salts 와 proton

pump inhibitors 등을 복합하여 처방하고 있다[7]. 그러나 다른 모든 병원성세균에서도 심각한 문제이듯이 항생제에 내성을 가진 *H. pylori* 의 증가는 매우 심각한 문제로 대두되고 있다. 이들 항생제들 중 특히 metronidazole[3]의 내성은 다른 어떤 항생제 내성보다 높은 빈도로 유발된다[12]. 이러한 이유로 인하여 *H. pylori* 뿐만 아니라 임질균 등의 질병을 치료하기 위해 metronidazole을 사용할 때 약의 효력을 떨어뜨리는 원인이 되기도 한다. 따라서 metronidazole 내성을 유발하는 원인을 밝히는 연구는 새로운 제균 요법의 개발 및 새로운 항생제 표적을 발견하는데 밑거름이 될 수 있다.

최근까지의 연구 결과[9-11,18]에 의하면 metronidazole 내성에 관여하는 주요 인자로서 *rdxA* (HP0954 in the strain 26695 genome sequence; oxygen-insensitive NADPH nitroreductase)와 *frxA* (HP0642; NAD(P)H-flavin oxidoreductase) 유전자가 존재하며, 이들 유전자는 *fdxA* (HP277; ferredoxin) 유전자의 조절 하에서 발현이 이루어진다는 보고가 있다. 본 연구에서는 이러한 metronidazole 내성을 조절하는 유전자인 *fdxA*에 의한 metronidazole 내성 조절 기전을 연구하기 위하여 genome 유전자 해독이 완성된 *H. pylori* 균주인 26695를 이용하여 *fdxA* 유전자에 chloramphenicol 내성 유전자를 삽입하여 결손돌연변이주를 구축하고, two-dimensional (2-D) electrophoresis와 MALDI-TOP-MS를 이용하여 *fdxA* 유전자의 inactivation에 의해 유발되는 over-expressed protein과 under-expressed protein을 검색하고자 하였다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-2-3010-4105, Fax : +82-2-3010-4182

E-mail : jyjeong@amc.seoul.kr

## 재료 및 방법

### 균주 배양조건

*Escherichia coli*는 Luria-Bertani (LB) 액체배지 또는 1.5% agar를 첨가한 고체배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다. *H. pylori*는 Brucellar agar에 10% horse serum과 amphotericin B (8 mg/ml), vancomycin (6 mg/ml), trimethoprim (5 mg/ml)을 첨가한 선택배지를 이용하였으며, 배양 조건은 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다.

### *fdxA* 유전자의 결손돌연변이주 구축

*fdxA* 결손돌연변이주의 구축은 homologous recombination 방법에 의하여 수행하였다[9]. *H. pylori* 26695에서 추출한 DNA를 *fdxA*-F1 (5'-CGC TTG TTC AAG GCT CTG ATG-3')과 *fdxA*-R1 (5'-CGC TAC AAA CTC CAG CCG ATT-3')으로 94°C에서 40초, 58°C에서 40초, 72°C에서 2분간 30 cycle로 PCR을 수행하여 얻은 828 bp의 *fdxA* 유전자를 포함한 PCR 산물을 pBluescript plasmid vector에 cloning 하였다. Vector에 cloning된 *fdxA* 유전자 내의 126 bp를 제거하고 여기에 chloramphenicol 내성(*cat*) 유전자를 삽입하기 위해서 *fdxA*-F2 (5'-GCC TCG TTG CGT GAG CGT AT-3')와 *fdxA*-R2 (5'-CGC ACG CAA TGC ATT CAT CA-3') primers를 이용하여 PCR을 통해 얻은 산물과 *cat* 유전자와 ligation하여 *E. coli* DH5a에 transformation하여, chloramphenicol 내성 유전자가 삽입된 plasmid를 ampicillin (50 mg/ml)과 chloramphenicol(10 mg/ml)가 포함된 배지에서 자라는 colony들을 선별하여 PCR로 chloramphenicol 내성 유전자의 삽입 여부를 확인하였다. 확인 후에 분리된 plasmid는 *H. pylori* 26695로 electroporation하여 chloramphenicol (15 mg/ml)이 포함된 배지에 도말하여 결손돌연변이주를 확인하였다.

### Northern blotting

배양된 *H. pylori* 균주로부터 Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Milan, Italy)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. Total RNA 20 mg은 0.22 M의 formaldehyde가 포함된 1% agarose gel에서 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 formaldehyde를 제거하기 위해 세척한 후 download capillary 방법을 이용하여 Hybond-N<sup>+</sup> membrane으로 transfer하였다. Transfer가 끝난 membrane은 cross-linker를 사용하여 RNA를 안정화시켰으며 *frxA*와 *rdxA*의 probe를 사용하여 hybridization 하였다. 각각의 probe는 PCR을 통해 만들어진 *frxA*와 *rdxA* 산물에 <sup>32</sup>P를 labelling하여 준비하였다. Hybridization이 끝난 membrane은 phosphorimager screen cassette에 노출시키고, Molecular Dynamics Storm 860 phosphorImager system을 이용하여 영상화 하였다.

### 2-D eletrophoresis and MALDI-TOF-MS

2일간 배양한 wild type과 *fdxA* 결손돌연변이주를 harvest하여 PBS로 washing 후 sonicator를 이용하여 lysis하였다. 4°C에서 13000 rpm으로 30 분간 centrifuge하여 얻은 상층액을 Bradford method를 이용하여 단백질을 정량하였다. 각각 50 mg의 protein을 immobilized pH gradient (IPG) strips pH 3-10 (18 cm, Amersham biosciences)을 이용하여 isoelectric focusing을 수행하였다. Protein sample은 8 M urea, 2% CHAPS, 20 mM DTT, 0.5% IPG buffer (pH 3-10)에 녹여 rehydration loading을 하였다. Total 28 kVh로 focusing을 수행한 후 6 M urea, 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2% SDS, 30% glycerol, 0.002% bromophenol blue, 2% DTT로 equilibration 하였다. SDS-PAGE는 12% polyacrylamide gel을 사용하였으며, 4°C에서 5 mA/gel에서 1시간, 10 mA/gel에서 overnight으로 running 한 후, silver staining 하였다. 두 균주 사이에 농도의 차이를 보이는 spot들을 잘라 1.5 ml tube에 옮기고, 30 mM potassium ferricyanide와 100 mM sodium thiosulfate를 1:1로 섞은 용액 100 ml를 넣고 destaining 하였다. Destaining solution을 제거하고 증류수로 3번 세척하여 반응을 중지시키고, 용해된 silver를 제거하였다. 100 mg의 100 mM Ammonium bicarbonate를 넣고 5 분간 반응시킨 후 용액을 버리고 200 mg의 100% acetonitrile (ACN)을 넣어 gel을 탈수시켰다. 상등액을 버리고 speed-vac을 이용하여 gel을 말렸다. Ice에서 12.5 ng/ml의 trypsin solution으로 gel을 rehydration 시킨 후 37°C에서 overnight incubation 하였다. Gel slice에 25 ml의 elution buffer (50% ACN/5% trifluoroacetic acid (TFA))를 넣고 shaking하는 과정을 반복하여 peptides를 추출하였다. 이렇게 얻어진 peptides는 speed-vac을 통해 완전히 말린 후, 50% ACN/0.1% TFA로 녹여 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid로 구성된 matrix solution과 1:1로 섞어 plate에 올려 상온에서 건조시켜 Voyager MALDI-TOF (Applied Biosystems)를 이용하여 분석하였다. Peptide mass fingerprint는 UCSF Mass Spectrometry Faculty에서 개발된 MS-FIT program을 사용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

*rdxA* 혹은 *frxA* 유전자에 돌연변이가 형성되어 비활성화된 *H. pylori*는 metronidazole에 내성을 가지게 된다[9]. 현재까지의 연구보고[10,11,18]에 의하면 metronidazole 감수성 *H. pylori*는 두 가지 타입으로 나누어 볼 수 있다. type I은 오직 *rdxA* 유전자만 비활성화 되면 metronidazole에 저항성을 나타내며 *frxA*의 비활성화는 metronidazole 저항성에 그다지 큰 영향을 미치지 못한다. 그러나 *rdxA*와 *frxA* 두 gene이 동시에 inactivation되면 고농도의 metronidazole에 내성을

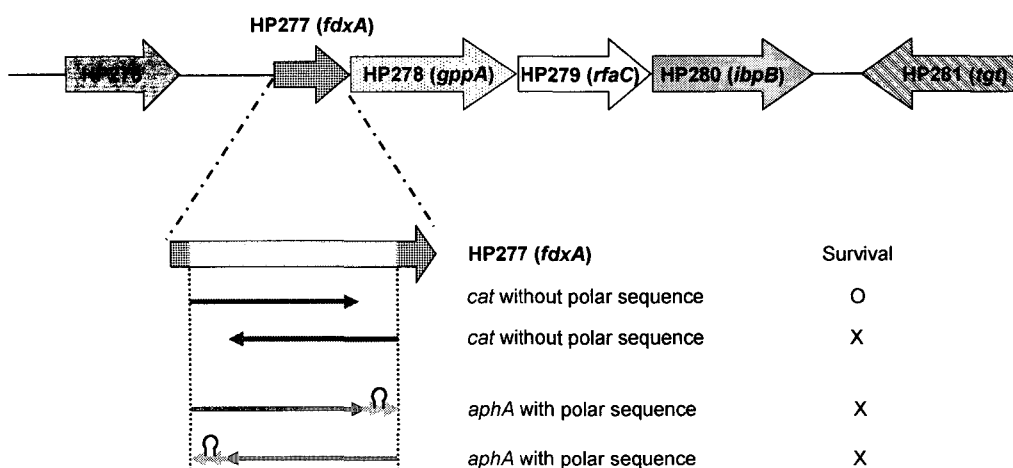


Fig. 1. The *fdxA* gene cluster in strain 26695. The *cat* (the gene responsible for chloramphenicol resistance) or *aphA* (the gene responsible for kanamycin resistance) genes were introduced into *fdxA* gene by homologous recombination.

보인다. 반면 type II의 경우는 *rdxA* 혹은 *frxA*가 비활성화 되어도 metronidazole에 내성을 보이지 않는다. 오직 *rdxA*와 *frxA*가 동시에 비활성화 되어야 만이 metronidazole에 고농도 내성을 나타낸다. 이 원인은 *frxA* 유전자의 발현과 직접적인 관계가 있으며, *H. pylori*의 genome 상에 있는 *fdxA* (ferredoxin) 유전자의 비활성화에 의해 유발된다. 이러한 metronidazole 내성을 조절하는 유전자인 *fdxA*에 의한 metronidazole 내성 조절 기전을 연구하기 위해 먼저 *fdxA* 결손돌연변이주를 구축하였다.

***fdxA* 유전자의 결손돌연변이주 구축**

*fdxA* 유전자는 [Fe, S]<sub>4</sub>-type ferredoxin [20]을 encode 하며, 주요 대사과정에서 전자를 저장 및 전달하는데 관여한다. 최근 한 연구팀에서 *fdxA* 결손돌연변이주를 구축하려 하였으나 *fdxA* 유전자가 결손된 형질전환체를 얻지 못하였기 때문에 *fdxA*가 생존에 필수적인 유전자라고 하였다[14]. 그러나 본 연구팀에서 genome 유전자 해독이 완성된 *H. pylori* 균주인 26695에서 *fdxA* 유전자의 downstream 영역을 살펴본 결과 *gppA* (HP278; guanosine pentaphosphate pyrophosphatase), *rfaC* (HP279; lipopolysaccharide heptosyltransferase)와 *ibpB* (HP280; lipid A acyltransferase) 유전자들이 *fdxA* 유전자와 같은 방향으로 놓여있다는 사실을 알았다(Fig. 1). 항생제 내성 유전자의 삽입을 통한 *fdxA* 유전자의 비활성화가 downstream 유전자에 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 Fig. 1에서와 같이 chloramphenicol 내성 (*cat*) 유전자와 kanamycin 내성 (*aphA*) 유전자에 transcription pause sites (polar sequence)를 제거한 것과 wild-type을 가지고 결손돌연변이주 구축을 시도한 결과, 오직 downstream 유전자의 발현에 영향을 주지 않는 polar sequence가 제거된 것만 mutant를 얻을 수 있었다. 본 실험의 결과로 *fdxA* 유전자 (HP277)의 downstream에 존재하는 3개의 유전자들 중에 적어도 하나

는 *H. pylori*의 생존에 중요하다는 것을 알 수 있었고, *fdxA* 자체는 생존에 영향을 미치지 않는다는 사실을 확인하였다. type I 균주인 *H. pylori* 26695에 homologous recombination 방법을 사용하여 *fdxA* 유전자에 chloramphenicol 내성 유전자(*cat*)를 삽입하여 얻은 colony를 6개 획득하여 PCR로 확인한 결과 Fig. 2와 같이 *fdxA*의 유전자내에 *cat* 유전자가 정상적으로 삽입되었다는 것을 확인하였다.

***fdxA*의 비활성화에 의한 *frxA* 유전자의 발현 조사**

*fdxA* 유전자의 비활성화가 *frxA*와 *rdxA* 유전자의 발현에 어떤 영향을 미치는지를 보기 위하여 northern hybridization을 수행하였다. Fig. 3A에서 보는바와 같이 wide-type 26695에서는 *frxA* 유전자가 거의 발현되지 않지만, 이 균주에서 *fdxA* 유전자가 비활성화되면 발현양이 증가함을 볼 수 있었다. *rdxA* 유전자 또한 wide-type 26695에서 이미 발현되고 있지만 *fdxA*의 비활성화에 의하여 발현양이 많이 증가함을 볼 수 있었다(Fig. 3B). 이는 *fdxA*가 *frxA*와 *rdxA* 유전자의 발현을 조절하여 metronidazole 내성에 영향을 미친다는 중요한 자료이다. *fdxA* 유전자의 비활성화가 metronidazole 내



Fig. 2. PCR test that show replacement of *fdxA* gene by insertion of *cat* gene. 1-6: chloramphenicol resistant transformant. C: wild-type. M: 1 kb DNA ladder

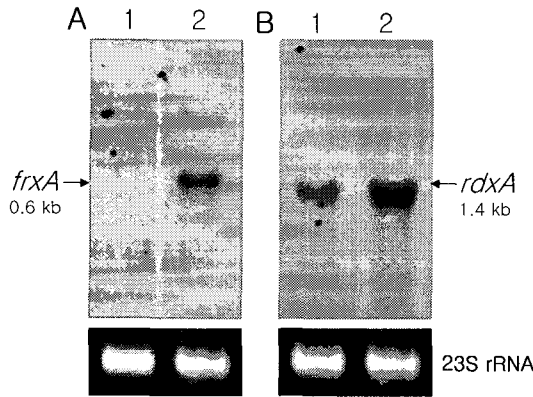


Fig. 3. Northern hybridization of *frxA* and *rdxA* mRNA of strain 26695. lane 1, wild-type; lane 2, *fdxA* null mutant.

성에 미치는 영향을 보기 위하여 항생제 내성 정도(minimal inhibitory concentration (MIC))를 측정 한 결과 wild-type은 MIC가 3 mg/ml을 나타낸 반면 *fdxA* 비활성화된 균주의 MIC는 1 mg/ml을 보여 주었다(data not shown). 이는 *fdxA*의 비활성화로 metronidazole에 hyper-susceptible하게 된 것으로 Fig. 3A에서 보는 것과 같이 *frxA*의 발현이 증가하여 나타나는 현상으로 생각된다.

***fdxA* 유전자의 비활성화에 의해 조절 받는 유전자의 검색**

*fdxA* 유전자의 *H. pylori* 내에서의 역할 규명 및 유전자 발현 조절에 대한 연구를 위하여, 그리고 *fdxA* 유전자에 의해 조절 받으며 metronidazole 내성에 관여하는 새로운 유전자를 검색하기 위해서 2-D electrophoresis와 MALDI-TOP-MS을 이용하여 *fdxA* 유전자의 비활성화에 의해 over-expressed protein과 under-expressed protein을 검색하고자 하였다. Fig. 4는 2-D electrophoresis의 결과를 나타낸 것이며 그림 A에서 원으로 나타낸 spot (1-3번)은 *fdxA* 유전자의 비활성화에 의해 under-expressed protein이며 그림 B에서 원으로 나타낸 spot (4-7번)은 *fdxA* 유전자의 비활성화에 의해 over-

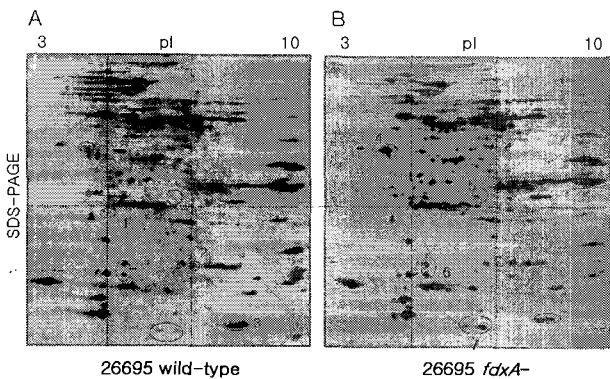


Fig. 4. 2-D electrophoresis pattern of *H. pylori* 26695. (A) wild-type; (B) *fdxA* null mutant.

Table 1. Over-expressed proteins in *fdxA* null mutant of strain 26695

Spot	Locus	Protein identified	Protein MW (Da)	pI
4	HP0221	nifU-like protein	36350	4.9
5	HP0642	NAD(P)H-flavin oxidoreductase	25293	6.4
6	HP0653	Nonheme iron-containing ferritin ( <i>pfr</i> )	19302	5.4
7	HP0902	Hypothetical protein	11030	6.2

Table 2. Under-expressed proteins in *fdxA* null mutant of strain 26695

Spot	Locus	Protein identified	Protein MW (Da)	pI
1	HP0089	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	25209	5.0
2	HP1376	(3R)-hydroxymyristoyl ACP dehydratase	18196	6.6
3	HP1458	thioredoxin	11745	7.7

expressed protein을 나타내었다. MALDI-TOP-MS의 결과 over-expressed protein으로 nifU-like protein (HP0221), *frxA* (HP0642), nonheme ferritin (HP0653)과 아직 기능이 밝혀지지 않은 hypothetical protein (HP0902)등이 발견되었다(Table 1). 그리고 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase (HP0089), (3R)-hydroxymyristoyl ACP dehydratase (HP1376) 과 thioredoxin (HP1458)등이 under-expressed protein으로 발견되었다(Table 2). 본 실험의 결과로 *fdxA*는 *rdxA*와 *frxA* 뿐만 아니라 다른 주요 대사과정에 필요한 유전자들의 발현도 조절하고 있다는 것을 알았다.

**요 약**

본 연구는 *H. pylori*에서 metronidazole 내성에 관여하는 유전자를 발견하고 이들 유전자들의 상호 조절 기전을 밝힘으로써 위장질환의 원인균인 *H. pylori*를 퇴치하기 위한 기본바탕을 마련하고자 수행되었다. 우선적으로 metronidazole 내성을 조절하는 유전자인 *fdxA* (ferredoxin)에 의한 metronidazole 내성 조절 기전을 밝히기 위하여 다음의 연구를 수행하였다. Type I 균주인 26695균주의 *fdxA* 유전자에 chloramphenicol 내성 유전자를 삽입하여 결손돌연변이주를 구축하였다. *fdxA*의 비활성화에 의한 *rdxA* 및 *frxA* 유전자의 발현을 알아보기 위하여 2-D electrophoresis와 MALDI-TOP-MS을 이용하여 *fdxA* 유전자의 비활성화에 의해 over-expressed protein과 under-expressed protein을 검색하였다. 본 실험의 결과로 type

I 균주인 26695에서 *fdxA* 유전자를 비활성화시킨 결과 *frxA* 유전자의 발현양이 증가함을 northern으로 확인하였으며, 또한 *fdxA* 유전자의 downstream에 위치한 유전자들이 *H. pylori*의 생존에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 또한 2-D electrophoresis와 MALDI-TOF-MS를 이용하여 *fdxA* 유전자의 inactivation에 의해 over-expressed protein으로 nifU-like protein (HP0221), *frxA* (HP0642), nonheme ferritin (HP0653)와 아직 기능이 밝혀지지 않은 hypothetical protein (HP0902) 등이 발견되었다. 그리고 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase (HP0089), (3R)-hydroxymyristoyl ACP dehydratase (HP1376)과 thioredoxin (HP1458) 등이 under-expressed protein으로 발견되었다.

### 감사의 글

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2004-003-E00046).

### 참고 문헌

- Andersen, L. P., S. Holck, C. O. Povlsen, L. Elsborg and T. Justesen. 1987. *Campylobacter pyloridis* in peptic ulcer disease. I. Gastric and duodenal infection caused by *C. pyloridis*: histopathologic and microbiologic findings. *Scand. J. Gastroenterol.* **22**, 219-224.
- Chiba, N., B. V. Rao, J. W. Rademaker and R. H. Hunt. 1992. Meta-analysis of the efficacy of antibiotic therapy in eradicating *Helicobacter pylori*. *Am. J. Gastroenterol.* **87**, 1716-1727.
- Edwards, D. I. 1993. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. II. Mechanisms of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**, 201-210.
- Goodwin, C. S., J. A. Armstrong and B. J. Marshall. 1986. *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration. *J. Clin. Pathol.* **39**, 353-365.
- Graham, D. Y. 1997. *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. *Gastroenterology* **113**, 1983-1991.
- Graham, D. Y. and Y. Yamaoka. 1998. *H. pylori* and *cagA*: relationships with gastric cancer, duodenal ulcer, and reflux esophagitis and its complications. *Helicobacter* **3**, 145-151.
- Harris, A. 1998. Current regimens for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Br. Med. Bull.* **54**, 195-205.
- Isaacson, P. G. and J. Spencer. 1993. Is gastric lymphoma an infectious disease? *Hum. Pathol.* **24**, 569-570.
- Jeong, J. Y., A. K. Mukhopadhyay, D. Dailidienė, Y. Wang, B. Velapatio, R. H. Gilman, A. J. Parkinson, G. B. Nair, B. C. Y. Wong, S. K. Lam, R. Mistry, I. Segal, Y. Yuan, H. Gao, T. Alarcon, M. L. Brea, Y. Ito, D. Kersulyte, H.-K. Lee, Y. Gong, A. Goodwin, P. S. Hoffman and D. E. Berg. 2000. Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) nitroreductase genes cause moderate and high level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **182**, 5082-5090.
- Jeong, J. Y., A. K. Mukhopadhyay, J. K. Akada, D. Dailidienė, P. S. Hoffman and D. E. Berg. 2001. Roles of FrxA and RdxA nitroreductases of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to metronidazole. *J. Bacteriol.* **183**, 5155-5162.
- Jeong, J. Y. and D. E. Berg. 2000. Mouse-colonizing *Helicobacter pylori* SS1 is unusually susceptible to metronidazole due to two complementary reductase activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3127-3132.
- Kim, J. J., R. Reddy, M. Lee, J. G. Kim, F. A. El-Zaatari, M. S. Osato, D. Y. Graham and D. H. Kwon. 2001. Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isolates from Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 459-461.
- Knipp, U., S. Birkholz, W. Kaup and W. Opferkuch. 1993. Immune suppressive effects of *Helicobacter pylori* on human peripheral blood mononuclear cells. *Med. Microbiol. Immunol.* **182**, 63-76.
- Kwon, D. H., F. A. El-Zaatari, M. Kato, M. S. Osato, R. Reddy, Y. Yamaoka and D. Y. Graham. Analysis of *rdxA* and involvement of additional genes encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (FrxA) and ferredoxin-like protein (FdxB) in metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2133-42.
- Lingwood, C. A., G. Wasfy, H. Han and M. Huesca. 1993. Receptor affinity purification of a lipid-binding adhesin from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **61**, 2474-2478.
- Malaty, H. M., L. Engstrand, N. L. Pedersen and D. Y. Graham. 1994. *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann. Intern. Med.* **120**, 982-986.
- Moss, S. and J. Calam. 1992. *Helicobacter pylori* and peptic ulcers: the present position. *Gut.* **33**, 289-92.
- Mukhopadhyay, A. K., J. Y. Jeong, D. Dailidienė, P. S. Hoffman and D. E. Berg. 2003. The *fdxA* ferredoxin gene can down-regulate *frxA* nitroreductase gene expression and is essential in many strains of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **185**, 2927-2935.
- Rhee, K. H., H. S. Youn, S. C. Baik, W. K. Lee, M. J. Cho, H. J. Choi, K. Y. Maeng and K. W. Ko. 1990. Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in Korea. *J. Korean Soc. Microbiol.* **25**, 475-490.
- Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. Ketchum, H. Klenk, S. Gill, B. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. Fitzgerald, N. Lee, M. Adams, E. Hickey, D. Berg, J. Gocayne, T. Utterback, J. Peterson, J. Kelley, M. Cotton, J. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Wathley, E. Wallin, W. Hayes, M. Borodovsky, P. Karp, H. Smith, C. Fraser and J. Venter. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539-547.
- Wotherspoon, A. C. Gastric MALT lymphoma and *Helicobacter pylori*. *Yale J. Biol. Med.* **69**, 61-68.