

# **ΒΡΑΧΕΙΑ ΔΙΑΛΕΞΗ ΝΕΟΥ ΕΡΕΥΝΗΤΗ**

---



# Παράγοντες παθογένειας του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού και συσχέτιση με την κλινικοπαθολογική εικόνα

Ευφροσύνη Παναγιωτοπούλου

Το *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) είναι ένας Gram-αρνητικός μικροαερόφιλος βάκιλλος ο οποίος αποικίζει τον ανθρώπινο γαστρικό βλεννογόνο σε ποσοστό που ανέρχεται στο 35-70% του παγκόσμιου πληθυσμού.<sup>1</sup> Η λοίμωξη από *H. pylori* αποκτάται νωρίς κατά την παιδική ηλικία όπου εκδηλώνεται συνήθως ως επιφανειακή χρόνια ενεργός γαστρίτιδα με αθροίσεις ηωσινοφίλων. Εφόσον δεν διαγνωστεί η λοίμωξη και δεν χορηγηθεί θεραπεία εκρίζωσης του βακτηρίου, αυτή εμμένει καθ' όλη την ενήλικη ζωή, συνήθως απουσία συμπτωμάτων. Παρόλα αυτά, ένα σημαντικό ποσοστό των ενηλίκων φορέων εμφανίζει γαστρική νόσο ποικίλης κλινικής εκδήλωσης, η οποία συνήθως περιορίζεται σε χρόνια γαστρίτιδα, ενώ 10-15% των φορέων αναπτύσσουν πεπτικό ή δωδεκαδακτυλικό έλκος και σε 0,5-2% παρατηρείται αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης αδενοκαρκινώματος του στομάχου και MALT-λεμφώματος (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma),<sup>2</sup> γεγονός που οδήγησε το 1994 στο χαρακτηρισμό του *H. pylori* από την IARC (International Agency for Research on Cancer) ως «καρκινογόνο πρώτης τάξης». Ο χαρακτηρισμός αυτός βασίστηκε σε αρχικές επιδημιολογικές μελέτες και εν συνεχεία επιβεβαιώθηκε από τα συμπεράσματα μετα-αναλύσεων, όπου

διαπιστώθηκε ότι σε έδαφος *H. pylori* λοίμωξης παρατηρείται διπλάσιος κίνδυνος εμφάνισης γαστρικού καρκίνου, ειδικότερα μη καρδιακού τύπου.<sup>3</sup>

Η πληθώρα κλινικών οντοτήτων της λοίμωξης από *H. pylori* φαίνεται να καθορίζεται από την αλληλεπίδραση βακτηριακών παραγόντων παθογένειας με τον ξενιστή (γενετικό υπόβαθρο, έκταση και διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης στη λοίμωξη) και το περιβάλλον (διατροφικοί παράγοντες, κάπνισμα κ.ά.).<sup>2</sup>

Το γένωμα του *H. pylori*, μεγέθους 1,65 εκατομμυρίων ζευγών βάσεων DNA, κωδικοποιεί περίπου 1500 πρωτεΐνες και βρίσκεται σε μία κατάσταση συνεχούς τροποποίησης κατά τη διάρκεια της χρόνιας λοίμωξης, μέσω ανταλλαγής μικρών τμημάτων DNA μεταξύ συνυπαρχόντων στελεχών *H. pylori* μέσα στον ίδιο ξενιστή.<sup>4</sup> Παρόλα αυτά, οι βακτηριακές προελεύσεις παράγοντες παθογένειας που έχει διαπιστωθεί να καθορίζουν την κλινική εκδήλωση της *H. pylori* λοίμωξης<sup>5,6</sup> περιορίζονται στους παρακάτω:

- (α) Γονίδια τα οποία εκφράζονται σε ορισμένα μόνο στελέχη, όπως τα γονίδια που συγκροτούν το νησίδιο παθογένειας *cag* (*cag* Pathogenicity Island, *cagPAI*), συμπεριλαμβανομένου του *cagA* (cytotoxin-associated gene A), καθώς και ορισμένα γονίδια που εντοπίζονται στη μεταβλητή περιοχή του γενώματος (plasticity region) του *H. pylori*, όπως το γονίδιο *dupA* (duodenal ulcer-promoting gene).
- (β) Γονίδια που εκφράζονται μεν σε όλα τα στελέχη αλλά παρουσιάζουν ποικιλία γονοτύπων, όπως το γονίδιο που κωδικοποιεί την εκκρινόμενη κυτταροτοξίνη *VacA* (Vacuolating cytotoxin A), το οποίο εμφανίζει χαρακτηριστικούς πολυμορφισμούς και στις τρεις υποπεριοχές που συγκροτούν την ώριμη πρωτεΐνη.
- (γ) Γονίδια των οποίων η έκφραση τροποποιείται από το περιβάλλον και την αναπτυξιακή φάση του βακτηρίου, όπως τα *oipA*, *sabA*, *sabB*, *babB*, *babC* και *hopZ*, που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (outer membrane proteins) του *H. pylori* απαραίτητες για την πρόσδεση του βακτηρίου στο γαστρικό επιθηλιακό κύτταρο. Μεταξύ αυτών, οι *OipA* (Outer inflammatory protein A), *SabA* (Sialic acid binding adhesion) και *BabA* (Blood group antigen binding adhesion) έχει αναφερθεί να σχετίζονται με την εμφάνιση πεπτικού έλκους και γαστρικού αδενοκαρκινώματος.<sup>5,6</sup>

Από τους πλέον μελετημένους παράγοντες παθογένειας του *H. pylori* παραμένουν το *cagPAI* και οι πρωτεΐνες *CagA* και *VacA*, των οποίων η έκφραση αλλά και συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί έχει διαπιστωθεί να σχετίζονται με βαρύτερη γαστρική νόσο.

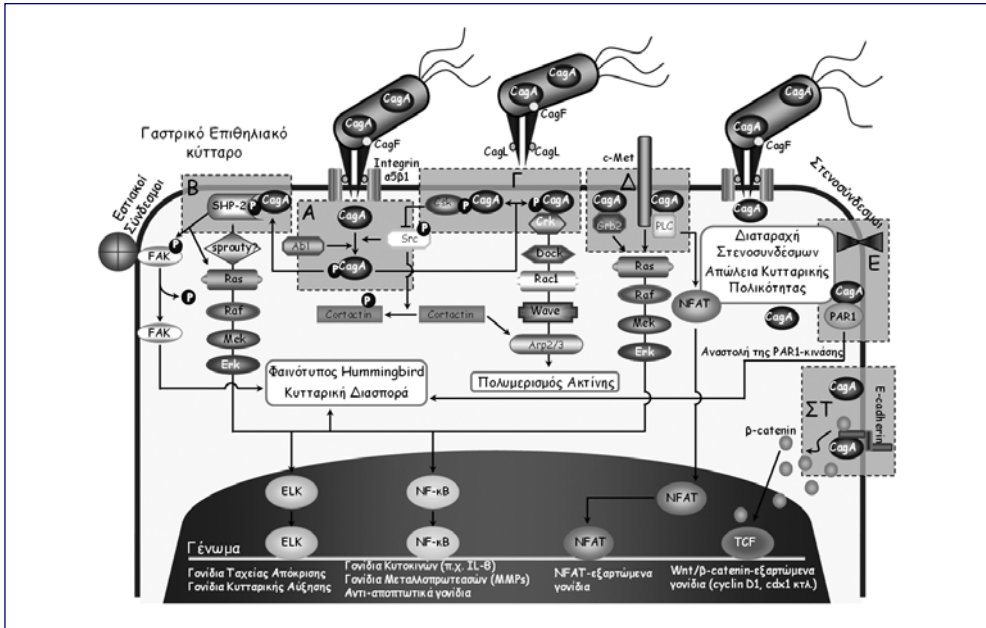
Το *cagPAI* αποτελεί ένα χρωμοσωμικό τμήμα 40 χιλιάδων βάσεων DNA που συνίσταται από μία ομάδα 31 γονιδίων και έχει εισαχθεί στο γένωμα του *H. pylori* με οριζόντια μεταφορά κατά την εξελικτική πορεία του βακτηρίου από κάποιο άγνωστο μέχρι τώρα προκαρυωτικό οργανισμό.<sup>7</sup> Η παρουσία του *cagPAI* έχει αναφερθεί να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πεπτικού έλκους και γαστρικού αδενοκαρκινώματος, αν και ο μέχρι τώρα αποδεδειγμένος βιολογικός του ρόλος *in vitro* και *in vivo* έγκειται ουσιαστικά στην επαγωγή φλεγμονώδους απόκρισης στο γαστρικό

βλεννογόνο, μέσω του μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Nuclear Factor-κB) και την ακόλουθη παραγωγή και έκκριση της προφλεγμονώδους χημειοκίνης IL-8 (Interleukin-8) από το προσβεβλημένο κύτταρο.<sup>4,5,7,8</sup> Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια του *cagPAI* συγκροτούν στο σύνολό τους ένα σύστημα μεταφοράς τύπου IV (type IV secretion system, T4SS), το οποίο δρα ως μοριακή σύριγγα μέσω της οποίας μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων η πρωτεΐνη CagA, πεπτιδογλυκάνες και πιθανόν άλλα μη ταυτοποιημένα μέχρι τώρα βακτηριακά μακρομόρια.<sup>8-10</sup> Η μεταφορά της CagA στο γαστρικό επιθηλιακό κύτταρο *in vitro* έχει συσχετιστεί με απορρύθμιση μονοπατιών μεταγωγής σήματος τα οποία παραδοσιακά εμπλέκονται σε διεργασίες σχετιζόμενες με κακοήγη εξαλλαγή,<sup>9,10</sup> ενώ η παρουσία της έχει συσχετιστεί επιδημιολογικά με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ατροφικής γαστρίτιδας, πεπτικού έλκους και γαστρικού καρκίνου.<sup>11-13</sup>

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη CagA (*cag26*) εδράζει στο άκρο του *cagPAI* και κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 120-145kDa με υψηλή μεταβλητότητα στην καρβοξυτελική περιοχή,<sup>14</sup> στην οποία εντοπίζονται επαναλαμβανόμενες θέσεις φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα τυροσίνης συνιστώμενες από τα πέντε αμινοξέα Γλουταμικό-Προλίνη-Ισολευκίνη-Τυροσίνη-Αλανίνη (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala, *EPIYA*). Οι θέσεις αυτές σε Δυτικής προέλευσης στελέχη *H. pylori*, που απαντούν στην Ευρώπη, Βόρεια Αμερική και Αυστραλία, διακρίνονται σε τρεις χαρακτηριστικούς τύπους βάσει της αμινοξικής αλληλουχίας που τις περιβάλλει (*EPIYA-A*: **EPIYAKVNKKK(A/T/V/S)GQ**, *EPIYA-B*: **EPIY(A/T)(Q/K)VAKKVNAKI**, *EPIYA-C*: **FPLKRHDKVDDLKVGSRVSP**EPIYATIDDLG**GP**).<sup>15</sup> Ο αριθμός και τύπος των θέσεων *EPIYA*, ειδικότερα των *EPIYA-C*, εμφανίζει υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των στελεχών *H. pylori* και πιθανόν αντικατοπτρίζει τα επίπεδα λοιμογονικότητας της πρωτεΐνης CagA αλλά και του στελέχους γενικότερα.<sup>15</sup> Σε στελέχη τα οποία απομονώνονται από Ασιατικούς πληθυσμούς συναντώνται θέσεις φωσφορυλίωσης *EPIYA* τύπου A και B, ενώ απουσιάζουν εντελώς οι θέσεις τύπου C, οι οποίες έχουν αντικατασταθεί από μία συνήθως επανάληψη της θέσης *EPIYA-D* (AINRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAGRSAS**EPIYATIDFDEANQAG**).<sup>9</sup>

Στην Εικόνα 1 συνοψίζονται πρόσφατα *in vitro* δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία αναφορικά με τη δράση της πρωτεΐνης CagA, εξαρτώμενη ή μη από τη φωσφορυλίωσή της στις θέσεις *EPIYA*, μετά την είσοδό της στο γαστρικό επιθηλιακό κύτταρο (προσαρμογή από την επισκόπηση των Hatakeyama et al, 2008).<sup>10</sup>

Περιληπτικά, μετά την είσοδό της στο κυτταρόπλασμα του γαστρικού επιθηλιακού κυττάρου μέσω του T4SS, η CagA υφίσταται ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση στα κατάλοιπα τυροσίνης των θέσεων *EPIYA* (Εικόνα 1.A) από κινάσες τυροσίνης της οικογενείας Src<sup>16</sup> και Abl.<sup>17</sup> Η φωσφορυλιωμένη πλέον CagA μπορεί να αναγνωρισθεί και να ενεργοποιήσει σημαντικά σηματοδοτικά μόρια του κυττάρου, με κυριότερη τη φωσφατάση τυροσίνης SHP-2 (SRC homology 2 (SH2)-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2, Εικόνα 1.B).<sup>18</sup> Με τον τρόπο αυτό, η CagA επηρεάζει στη συνέχεια τη φυσιολογική ροή σημάτων που διασφαλίζουν την επαφή του κυττάρου



**Εικόνα 1.** Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης CagA, εξαρτώμενες ή μη από τη φωσφορυλίωσή της στις θέσεις EPIYA, μετά την είσοδό της στο κυτταρόπλασμα του γαστρικού επιθηλιακού κυττάρου.

με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (εστιακοί σύνδεσμοι) και την ομοιοστασία του κυτταροσκελετού ακτίνης και συνεπώς την κυτταρική μορφολογία, τροποποιώντας τη λειτουργικότητα μορίων-κλειδιά όπως η κινάση FAK (Focal Adhesion Kinase)<sup>19</sup> και η δομική πρωτεΐνη κορτακτίνη (cortactin).<sup>20</sup> Επιπρόσθετα, η CagA έχει διαπιστωθεί ότι επηρεάζει με τρόπο ανεξάρτητο της φωσφορυλίωσής της (Εικόνα 1.Δ-1.ΣΤ) τη λειτουργία μορίων που είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της διακυτταρικής επικοινωνίας (στενοσύνδεσμοι, σύνδεσμοι πρόσδεσης) όπως οι δομικές πρωτεΐνες ZO-1 (zonula occludens-1) και E-καδερίνη και οδηγεί σε απώλεια της κυτταρικής πολικότητας μέσω αναστολής της κινάσης PAR1/MARK2.<sup>21-23</sup> Στο σύνολό τους οι αλληλεπιδράσεις αυτές καταλήγουν σε χαρακτηριστική αλλαγή της επιθηλιακής μορφολογίας προς ένα μεσεγχυματικού τύπου φαινότυπο (ραμφοειδής φαινότυπος, hummingbird phenotype), στην επαγωγή προφλεγμονωδών (ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ και NFAT) και μιτογόνων αποκρίσεων (επαγωγή των μεταγραφικών παραγόντων ELK, TCF) από το προσβεβλημένο επιθηλιακό κύτταρο.<sup>10</sup>

Ένας ακόμη καλά μελετημένος παράγοντας παθογένειας του *H. pylori* είναι η μοριακού βάρους 87-95 kDa εκκρινόμενη κυτταροτοξίνη VacA, η οποία αρχικά αναγνωρίστηκε

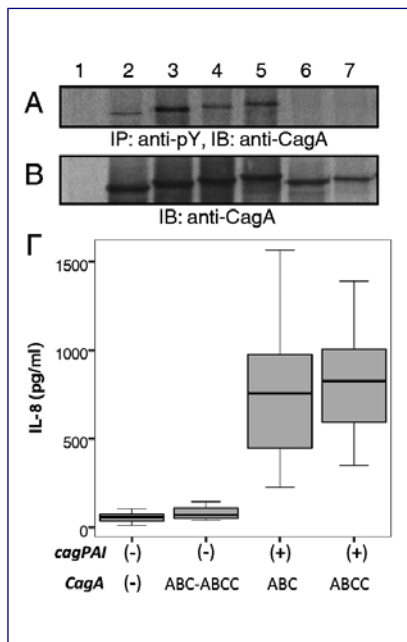
από την ικανότητά της να επάγει τη δημιουργία κενοτοπιών σε κύτταρα θηλαστικών παρουσία υπερκειμένων από καλλιέργειες *H. pylori*.<sup>24</sup> Στην πορεία διαπιστώθηκε ότι η VacA είναι μία πρωτεΐνη με πολυλειτουργικό χαρακτήρα, η οποία επηρεάζει την κυτταρική διαπερατότητα, υπεισέρχεται στη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης *in vitro*, επάγει τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, διαταράσσει το φραγμό των στενοσυνδέσμων και αναστέλλει την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων.<sup>24-26</sup> Το γονίδιο που κωδικοποιεί την VacA είναι παρόν σε όλα τα στελέχη *H. pylori*, αλλά όπως προαναφέρθηκε εμφανίζει ποικιλία γονοτύπων, ως απόρροια σημαντικών πολυμορφισμών στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των τριών επιμέρους περιοχών του, την περιοχή σήματος (signal region, s), τη μέση (middle region, m) και την πρόσφατα χαρακτηρισθείσα ενδιάμεση περιοχή (intermediate region, i), οι οποίες παρουσιάζονται με τη μορφή δύο κυρίως αλληλίων.<sup>27,28</sup> Ο μωσαϊκισμός που εμφανίζει το γονίδιο φαίνεται να καθορίζει την παραγωγή ή μη της κυτταροτοξίνης (πολυμορφισμοί s περιοχής), την αναγνώριση από συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (πολυμορφισμοί m περιοχής) και την έκταση της κυτταροτοξικότητας (πολυμορφισμοί i περιοχής) και συνεπακόλουθα το βαθμό παθογένειας του στελέχους.<sup>27-29</sup> Ειδικότερα, η παρουσία των αλληλίων s1, i1 και m1 έχει σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πεπτικού έλκους και γαστρικού αδενοκαρκινώματος.<sup>27,28,30,31</sup> Από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνει κανείς ότι η μελέτη της δράσης της VacA είναι σημαντικό να βασίζεται σε μία συναξιολόγηση των επιμέρους πολυμορφισμών της, ώστε να διαπιστωθεί η πραγματική κλινική σημασία τους.

Οι μέχρι τώρα αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία για το ρόλο που διαδραματίζουν οι διάφοροι πολυμορφισμοί των πρωτεϊνών CagA και VacA στη βαρύτητα και την κλινική εκδήλωση της *H. pylori* λοίμωξης περιορίζονται σε εκτίμηση μεμονωμένων γονοτύπων χωρίς να εξετάζεται το κατά πόσον αυτοί οδηγούν στην παραγωγή ή μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Ως «λειτουργικοί πολυμορφισμοί» στην περίπτωση της CagA, αναφέρονται οι γονοτυπικές διαφορές που δυνητικά επηρεάζουν το βαθμό παθογένειας του μορίου, δηλαδή η ποικιλομορφία του τύπου και του αριθμού των θέσεων EPIYA με την προϋπόθεση ότι το στέλεχος διαθέτει λειτουργικό T4SS ικανό να ενέσει την CagA στο κυτταρόπλασμα του γαστρικού επιθηλιακού κυττάρου. Αντίστοιχα στην περίπτωση της VacA, δεδομένου ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται σε όλα τα στελέχη, αυτό που είναι σημαντικό για τον καθορισμό της παθογένειάς της είναι τα επίπεδα της κυτταροτοξικότητάς της.

Υπό αυτό το πρίσμα και σε συνέχεια προηγούμενων μελετών μας,<sup>32</sup> έγινε προσπάθεια εκτίμησης της κλινικής σημασίας των λειτουργικών πολυμορφισμών αναφορικά με τις θέσεις EPIYA της πρωτεΐνης CagA και των γονοτύπων s/i/m της VacA σε στελέχη *H. pylori* που απομονώθηκαν από Έλληνες ασθενείς, εκ των οποίων 98 παιδιά (μέση ηλικία: 10,7±3,07 έτη, 49 άρρενα) με συμπτωματολογία γαστρικής νόσου (επιγαστραλγία, έμετος) και 144 ενήλικες ασθενείς (μέση ηλικία: 52,6±13,7 έτη, 78 άρρενες) με πεπτικό έλκος ή μη ελκωτικές αλλοιώσεις. Σε 70 περιστατικά ενηλίκων

υπήρχαν επιπλέον διαθέσιμες βιοψίες από το σώμα του στομάχου, γεγονός που επέτρεψε τη μελέτη τυχόν διαφορών μεταξύ των στελεχών που αποικίζουν τις δύο αυτές θέσεις του γαστρικού βλεννογόνου.

Αρχικά εκτιμήθηκε, μέσω *in vitro* επιμόλυνσης γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων με κλινικά στελέχη *H. pylori*, η παρουσία φωσφορυλιωμένης CagA στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή (Εικόνα 2) και η έκκριση IL-8 από τα προσβεβλημένα κύτταρα, απόδειξη ύπαρξης λειτουργικού T4SS στο εξεταζόμενο στέλεχος. Οι πολυμορφισμοί της VacA εκτιμήθηκαν τόσο ως μεμονωμένα αλληλία για τις s, i και m περιοχές του γονιδίου, όσο και ως συνδυασμός αυτών, αποσκοπώντας στο χαρακτηρισμό πρωτεϊνών υψηλής (τύποι s1/i1/m1) και μέσης (τύποι s1/i1/m2) τοξικότητας και μη τοξικών μορφών (s1 ή s2/i2/m1 ή m2). Η κατηγοριοποίηση που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στο γεγονός ότι (α) η παρουσία του αλληλίου vacA s2 οδηγεί σε ανενεργή πρωτεΐνη, (β) οι τύποι s1/m1 είναι έντονα κυτταροτοξικοί σε πληθώρα κυτταρικών τύπων και (γ) οι s1/m2 είναι μεν ενεργοί αλλά αναγνωρίζονται από συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, ενώ η δραστηριότητά τους ή μη φαίνεται να καθορίζεται από την παρουσία του αλληλίου vacA i1.<sup>24,27-29</sup> Η εξεύρεση τυχόν κλωνικών σχέσεων μεταξύ διαφορετικών στελεχών που απομονώθηκαν από τον ίδιο ασθενή πραγματοποιήθηκε με MLST (Multi Locus Sequence Tagging). Η συσχέτιση των *in vitro* ευρημάτων με την κλινική εικόνα των ασθενών πραγματοποιήθηκε με ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης.



**Εικόνα 2.** Έκφραση φωσφορυλιωμένης (A) και ολικής (B) πρωτεΐνης CagA σε γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα AGS μετά από *in vitro* επιμόλυνση με κλινικά στελέχη *H. pylori*, όπου (1): cagA-αρνητικό στέλεχος, (2-5): CagA-θετικά στελέχη με 2 (AB), 3 (ABC), 4 (ABCC) και 5 (ABCCC) θέσεις EPIYA αντίστοιχα και λειτουργικό cagPAI, λόγω της παρουσίας φωσφορυλιωμένης CagA και (6-7): CagA-θετικά στελέχη με 3 (ABC) και 4 (ABCC) θέσεις EPIYA με μη λειτουργικό cagPAI, όπου δεν ανιχνεύεται φωσφορυλιωμένη CagA (A). (Γ) Επίπεδα εκκρινόμενης IL-8 στα υπερκείμενα επιμολυσμένων γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων με στελέχη *H. pylori* (από αριστερά προς τα δεξιά): (α) CagA- και cagPAI-αρνητικά, (β) CagA-θετικά με 3 ή 4 θέσεις EPIYA και μη λειτουργικό cagPAI, CagA-θετικά με λειτουργικό cagPAI και (γ) 3 (ABC) και (δ) 4 (ABCC) θέσεις EPIYA. Παρατηρείται ότι η έκκριση IL-8 εξαρτάται αποκλειστικά από την παρουσία λειτουργικού cagPAI και δεν επηρεάζεται από τον αριθμό των θέσεων EPIYA-C.



Η κατανομή των λειτουργικών ή μη θέσεων EPIYA στην CagA σε στελέχη *H. pylori* τα οποία απομονώθηκαν από παιδιά και ενήλικες παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.<sup>33</sup> Τα ποσοστά των cagPAI-αρνητικών στελεχών στα παιδιά εμφανίζονται αυξημένα συγκριτικά με αυτά που παρατηρούνται στους ενήλικες, ενώ δεν υπάρχουν διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης στελεχών με μη λειτουργικό cagPAI. Στην περίπτωση CagA-EPIYA θετικών στελεχών με λειτουργικό cagPAI, διαπιστώνεται ότι στην πλειοψηφία τους και στις δύο ηλικιακές ομάδες φέρουν τρεις θέσεις EPIYA (ABC). Παρόλα αυτά, τα ποσοστά στελεχών με δύο θέσεις EPIYA-C εμφανίζονται ελαττωμένα στα παιδιά συγκριτικά με τους ενήλικες, ενώ στελέχη με 3 ή περισσότερες θέσεις, οι οποίες απαντούν σε ιδιαίτερα χαμηλές συχνότητες μεταξύ των ενηλίκων, απουσιάζουν εντελώς από τον παιδικό πληθυσμό. Η διαφορά αυτή είναι έκδηλη στην περίπτωση μικτών λοιμώξεων από ισογονιδιακά στελέχη με διαφορετικό αριθμό θέσεων EPIYA-C που ανιχνεύθηκαν στον ίδιο ασθενή, καθώς στα παιδιά αυτές αφορούν ζεύγη στελεχών με 2 έως 4 θέσεις EPIYA, ενώ στους ενήλικες ο αριθμός των θέσεων EPIYA-C κυμαί-

**Πίνακας 1.** Κατανομή θέσεων EPIYA στην CagA στελεχών *H. pylori* που απομονώθηκαν από το άντρο παιδιών και το άντρο και θόλο ενηλίκων.

Στελέχη <i>H. pylori</i> - Θέσεις EPIYA	Παιδιά (Άντρο) N (%) <sup>1</sup>	Ενήλικες	
		Άντρο N (%) <sup>2</sup>	Σώμα N (%) <sup>2</sup>
<i>cagPAI</i> -αρνητικά	35 (35,7)	38 (26,4)	20 (28,6)
<i>Μη λειτουργικό cagPAI</i>			
AB	-	1 (0,7)	-
ABC	9 (9,2)	12 (8,3)	6 (8,6)
ABCC	2 (2,1)	2 (1,4)	1 (1,4)
<i>Λειτουργικό cagPAI</i>			
AC	-	1 (0,7)	-
ABC	33 (33,7)	57 (39,6)	22 (31,4)
ABABC	-	1 (0,7)	-
ABBC	1 (1,0)	-	-
ACC	1 (1,0)	-	-
ABCC	10 (10,2)	19 (13,2)	13 (18,6)
ABCCC	-	2 (1,4)	-
AB/ABC	1 (1,0)	1 (0,7)	-
ABC/ABCC	6 (6,1)	8 (5,6)	7 (10,0)
ABC/ABCCC	-	1 (0,7)	1 (1,4)
ABC/ABCCCC	-	1 (0,7)	-

<sup>1</sup>Τα αναγραφόμενα ποσοστά έχουν υπολογιστεί σε 98 βιοψίες από το άντρο του στομάχου παιδιών.

<sup>2</sup>Τα αναγραφόμενα ποσοστά έχουν υπολογιστεί σε 144 βιοψίες από το άντρο και 70 βιοψίες από το σώμα του στομάχου ενηλίκων.

νεται από 2 έως 6. Οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις σε συνδυασμό με τη διαφορετική ανοσολογική απόκριση στην *H. pylori* λοίμωξη που αναπτύσσεται στα παιδιά, δεδομένου ότι η δράση της CagA καθορίζεται εν μέρει από τη φωσφορυλίωσή της στις θέσεις EPIYA, μπορεί σε ένα βαθμό να εξηγούν τις σημαντικές διαφορές στην κλινική εκδήλωση της *H. pylori* λοίμωξης που παρατηρούνται μεταξύ παιδιών και ενηλίκων. Ειδικότερα, η παρουσία υψηλότερων συχνοτήτων *cagA*- και *cagPAI*-αρνητικών στελεχών στα παιδιά πιθανά αντικατοπτρίζει μία εξελικτική προσαρμογή η οποία ευνοεί τον επιτυχή αποικισμό του γαστρικού βλεννογόνου κατά τη μετάδοση. Η διαπίστωση αυτή υποστηρίζεται από ευρήματα πειραματικής επιμόλυνσης μυών, όπου παρατηρήθηκε ότι στελέχη στα οποία το *cagPAI* απουσίαζε εντελώς ή ήταν μη λειτουργικό εποίκιζαν πιο αποτελεσματικά τον ξενιστή, υποδηλώνοντας ότι η επιτυχία του αρχικού αποικισμού κατά την *H. pylori* λοίμωξη πιθανά απαιτεί την απώλεια ορισμένων παθογενετικών χαρακτήρων.<sup>34</sup> Επιπλέον, η απουσία στελεχών με περισσότερες από 2 θέσεις EPIYA-C στην CagA στα παιδιά μπορεί να σχετίζεται, όπως έχει προταθεί,<sup>35</sup> με μειωμένη επιβίωση του συγκεκριμένου τύπου στελεχών υπό συνθήκες υψηλής οξύτητας και μπορεί σε ένα βαθμό να εξηγεί την περιορισμένη βαρύτητα των κλινικών και παθολογικών γνωρισμάτων της *H. pylori* λοίμωξης στα παιδιά εν συγκρίσει με τους ενήλικες.

Αναφορικά με τις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των στελεχών *H. pylori* που αποικίζουν το άντρο και το σώμα του στομάχου στην περίπτωση ενηλίκων ασθενών, παρατηρήθηκε ότι στη πλειοψηφία των ασθενών ο γαστρικός βλεννογόνος αποικίζεται από το ίδιο στέλεχος. Παρόλα αυτά διαπιστώθηκε τάση αύξησης της εμφάνισης στελεχών με περισσότερες θέσεις EPIYA-C στο σώμα συγκριτικά με το άντρο (Πίνακας 1). Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε αύξηση των στελεχών με 2 θέσεις EPIYA-C και ταυτόχρονος περιορισμός των συχνοτήτων στελεχών με 1 θέση EPIYA-C, ενώ ειδικότερα η παρουσία μικτών λοιμώξεων από ισογονιδιακά στελέχη με διαφορετικό αριθμό θέσεων EPIYA-C στην CagA φαίνεται να παρουσιάζεται συχνότερα στο σώμα παρά το μικρό αριθμό περιστατικών. Η διαφορά αυτή μπορεί να υποδηλώνει διαφορές στο μικροπεριβάλλον των δύο ανατομικά διακριτών θέσεων του στομάχου, όπως λόγω χάρη διαφορές οξύτητας, που θα μπορούσαν δυνητικά να ευνοήσουν την επιβίωση συγκεκριμένων κλώνων στελεχών.<sup>35</sup> Λόγω του περιορισμένου αριθμού περιστατικών με διαθέσιμες βιοψίες από το άντρο και το σώμα του στομάχου δεν ήταν δυνατή η πραγματοποίηση αξιόπιστης στατιστικής επεξεργασίας των συγκεκριμένων δεδομένων. Για το λόγο αυτό τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη και τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω αφορούν στελέχη που απομονώθηκαν από το άντρο.

Για τις ανάγκες της στατιστικής εκτίμησης των πιθανών συσχετίσεων μεταξύ των πολυμορφισμών των πρωτεϊνών CagA και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων της γαστρικής νόσου, τα στελέχη *H. pylori* χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες: 1) απουσία θέσεων EPIYA (*cagA*-αρνητικά στελέχη και *cagA*-θετικά στελέχη με μη λειτουργικό *cag*-

PAI, 2) *cagA*- και *cagPAI*-θετικά στελέχη με 1 θέση EPIYA-C, 3) *cagA*- και *cagPAI*-θετικά στελέχη με 2 ή περισσότερες θέσεις EPIYA-C και 4) μικτές λοιμώξεις. Αντίστοιχα, οι επιμέρους ισότυποι για τις *s*, *i* και *m* περιοχές της *VacA* συνδυάστηκαν σε τρεις ομάδες γονοτύπων όπως αναφέρεται παραπάνω.

Από τη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε, τόσο στα παιδιά όσο και στους ενήλικες, ότι η παρουσία μεγαλύτερου αριθμού λειτουργικών θέσεων EPIYA-C στην *CagA* παρατηρείται σε στελέχη που εκφράζουν *VacA* τοξικού τύπου ( $P < 0,001$ ).<sup>33</sup> Ενδεικτικά, στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται η κατανομή των πολυμορφισμών EPIYA-C στην *CagA* σε συνδυασμό με τους γονοτύπους της *VacA* σε ενήλικες ασθενείς.

Παρά τη συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ των υψηλής παθογένειας μορφών των δύο πρωτεϊνών και στις δύο ηλικιακές ομάδες, η σημασία τους αναφορικά με τη βαρύτητα της γαστρικής νόσου παρουσιάστηκε να διαφέρει σημαντικά. Ειδικότερα στα παιδιά δεν παρατηρήθηκε οποιαδήποτε συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών των δύο παραγόντων παθογένειας με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους της συνοδού γαστρίτιδας. Οι μόνες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις που προέκυψαν αφορούν τη λοίμωξη από στελέχη *H. pylori* που φέρουν *VacA* υψηλής τοξικότητας σε παιδιά μεγαλύτερης ηλικίας ( $P = 0,026$ ), καθώς και σε περιπτώσεις παρουσίας οζώδους γαστρίτιδας (*nodular gastritis*) κατά την ενδοσκόπηση ( $P = 0,034$ ).

Εν αντιθέσει στους ενήλικες διαπιστώθηκε ότι οι πολυμορφισμοί τόσο της *CagA* όσο και της *VacA* αν και υπεισέρχονται σε διαφορετικές παραμέτρους της *H. pylori*-σχετιζομένης γαστρικής νόσου, επηρεάζουν σημαντικά τη βαρύτητα και την κλινική εκδήλωσή της. Ειδικότερα, η λοίμωξη με στελέχη με *VacA* τοξικού τύπου διαπιστώθηκε να αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης χρόνιας ενεργού γαστρίτιδος με υψηλότερη βαρύτητα [Odds Ratio (OR): 3.467, 95% Confidence Interval (CI): 1.563-7.690,  $P = 0.002$ ] και δραστηριότητα (OR: 3.070, 95% CI: 1.411-6.681,  $P = 0.005$ ), ενώ η παρουσία του

**Πίνακας 2.** Κατανομή λειτουργικών πολυμορφισμών τύπου EPIYA-C στην *CagA* σε συνδυασμό με τους γονοτύπους της *VacA* σε Έλληνες ενήλικες με *H. pylori* λοίμωξη.

Κυτταροτοξικότητα <i>VacA</i>	Γονότυπος <i>VacA</i>	Λειτουργικοί πολυμορφισμοί EPIYA-C στην <i>CagA</i>				Μικτές Λοιμώξεις N (%)
		Απουσία N (%)	1 EPIYA-C N (%)	≥2 EPIYA-C N (%)		
<b>Απουσία</b>	s1/i2/m2	3 (2,1)	6 (4,2)	2 (1,4)	0 (0,0)	
	s1/i2/m1	1 (0,7)	1 (0,7)	1 (0,7)	0 (0,0)	
	s2/i2/m2	30 (20,8)	3 (2,1)	3 (2,1)	2 (1,4)	
	s2/i1/m2	1 (0,7)	3 (2,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>Ενδιάμεση</b>	s1/i1/m2	10 (6,9)	16 (11,1)	2 (1,4)	6 (4,2)	
<b>Υψηλή</b>	s1/i1/m1	8 (5,5)	30 (20,8)	13 (9,0)	3 (2,1)	

αλληλίου i1 στη συγκεκριμένη σειρά στελεχών χαρακτηρίστηκε ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη γαστρικής νόσου υψηλότερης βαρύτητας και δραστηριότητας (OR: 3.862, 95% CI: 1.728-8.632,  $P=0.001$  και OR: 5.310, 95% CI: 2.295-12.287,  $P=0.001$ ). Εν αντιθέσει, οι πολυμορφισμοί της CagA αναφορικά με τις θέσεις EPIYA-C, διαπιστώθηκε να σχετίζονται σημαντικά με την κλινική εκδήλωση της γαστρικής νόσου και όχι τη φλεγμονώδη απόκριση. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία μίας λειτουργικής θέσης EPIYA-C (τύποι ABC) στην CagA διαπιστώθηκε να αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη πεπτικού έλκους (OR: 4.647, 95% CI: 2.037-10.602,  $P=0.015$ ), ενώ ο κίνδυνος διπλασιάζεται στο έδαφος μικτών λοιμώξεων στον ίδιο ασθενή από ισογονιδιακά στελέχη *H. pylori* με διαφορετικό αριθμό θέσεων EPIYA-C στην CagA (OR: 9.111, 95% CI: 2.085-39.810,  $P<0.001$  αντίστοιχα).

Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις από παράλληλα πειράματα in vitro επιμόλυνσης γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων με επιλεγμένα ζεύγη ισογονιδιακών κλινικών στελεχών *H. pylori* με διαφορετικό αριθμό θέσεων EPIYA-C και μεταλλαγμένων στελεχών που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη (ΔcagA στελέχη). Σκοπός των συγκεκριμένων πειραμάτων ήταν η μελέτη των επιπέδων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης CagA και η διερεύνηση της επίπτωσής τους στα επίπεδα εκκρινόμενης IL-8 και στην έκταση των μορφολογικών αλλαγών τύπου hummingbird. Από τα πειράματα αυτά διαπιστώθηκε ότι αν και ο αριθμός των θέσεων EPIYA-C στην CagA καθορίζει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης και επάγει εντονότερες αλλαγές στον κυτταροσκελέτο του γαστρικού επιθηλιακού κυττάρου, δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα IL-8 που εκκρίνονται από αυτό. Τα δεδομένα αυτά πιθανόν καταδεικνύουν ότι η δράση της φωσφορυλιωμένης CagA και των θέσεων EPIYA-C ειδικότερα φαίνεται να υπεισέρχονται μάλλον στο βαθμό των επιθηλιακών αλλοιώσεων και όχι τη βαρύτητα της φλεγμονής, η οποία στη μελέτη μας διαπιστώνεται να επηρεάζεται από την πρωτεΐνη VacA, όπως έχει παρατηρηθεί in vitro.<sup>24-26</sup>

Συμπερασματικά, οι πρωτεΐνες CagA και VacA συμμετέχουν στην εκδήλωση της παθογένειας του *H. pylori* με διακριτό αλλά συντονισμένο τρόπο, επηρεάζοντας την κλινική εκδήλωση της γαστρικής νόσου και την ανοσολογική απόκριση αντίστοιχα. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η παρουσία μικτών λοιμώξεων από ισογονιδιακά στελέχη στον ίδιο ασθενή, τα οποία έχουν προκύψει κατά την εξέλιξη της λοίμωξης από το ίδιο αρχικό στέλεχος, πιθανά αντικατοπτρίζει στελέχη *H. pylori* με συγκεκριμένα παθογενετικά γνωρίσματα, τα οποία μπορεί να καθορίζουν την ανάπτυξη διακριτών κλινικών οντοτήτων. Διαφαίνεται επίσης, η αναγκαιότητα μελλοντικών μελετών πάνω σε λειτουργικούς πολυμορφισμούς των διαφόρων παραγόντων παθογένειας σε αγρίου τύπου στελέχη ώστε να αποσαφηνιστεί η πραγματική βιολογική σημασία της έντονης μεταβλητότητας που παρατηρείται στο γένωμα του *H. pylori* αναφορικά με την κλινική εκδήλωση της λοίμωξης.

Καταλήγοντας θα θέλαμε να κάνουμε μία σύντομη αναφορά σε πρώιμα αποτελέσματα μελέτης που βρίσκεται εν εξελίξει και αποτελεί προσπάθεια αποσαφήνισης του

ρόλου των πολυμορφισμών EPIYA-C της CagA στη διαταραχή της δομής και λειτουργίας των εστιακών συνδέσμων, οι οποίοι αποτελούν τα σημεία επαφής του κυττάρου με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και φαίνεται να επηρεάζονται έντονα σε κύτταρα προσβεβλημένα από το *H. pylori* in vitro, συμμετέχοντας στη δημιουργία του φαινότυπου hummingbird. Μόριο κλειδί τόσο αναφορικά με τη δομή όσο και τη μεταγωγή σήματος από και προς τους εστιακούς συνδέσμους είναι η κινάση FAK, αν και ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζεται από την πρωτεΐνη CagA δεν είναι απόλυτα αποσαφηνισμένος.<sup>19,36</sup> Από τη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι η φωσφορυλίωση της CagA συνοδεύεται από απενεργοποίηση της FAK και παράλληλη επαγωγή της ενεργοποιημένης μορφής της συγγενούς της FAK κινάσης Pyk2, καθώς επίσης από φυσική αλληλεπίδραση των CagA και Pyk2 κατά τα πρώιμα στάδια in vitro λοίμωξης με ισογονιδιακά στελέχη *H. pylori*. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πιθανή συμμετοχή της Pyk2 στον παθογενετικό μηχανισμό της *H. pylori* λοίμωξης με τρόπο που απομένει να διερευνηθεί περαιτέρω, δεδομένης της απουσίας αναφορών στη διεθνή βιβλιογραφία για τη δράση της κατά την *H. pylori* λοίμωξη. Συνοψίζοντας, τα παραπάνω in vitro δεδομένα καταδεικνύουν ότι η CagA μετά από φωσφορυλίωσή της στα κατάλοιπα τυροσίνης των θέσεων EPIYA και κατά τρόπο που εν μέρει εξαρτάται από τον αριθμό των θέσεων EPIYA-C, μπορεί και τροποποιεί τη δράση σημαντικών μορίων που εμπλέκονται στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που καθορίζουν την πρόσφυση του επιθηλιακού κυττάρου με το υπόστρωμα οδηγώντας με τον τρόπο αυτό σε αυξημένο μεταναστευτικό δυναμικό των κυττάρων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Blaser, MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J Clin Invest 2004;113:321-333
2. Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. Annu Rev Pathol 2006;1:63-96.
3. Lochhead P, El-Omar EM. Gastric cancer. Br Med Bull 2008;85:87-100.
4. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med 2002;347:1175-1186.
5. Lu H, Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence factors: facts and fantasies. Curr Opin Gastroenterol 2005;21:653-659.
6. Yamaoka Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. J Med Microbiol 2008;57:545-553.
7. Naumann M. Pathogenicity island-dependent effects of *Helicobacter pylori* on intracellular signal transduction in epithelial cells. Int J Med Microbiol 2005;295:335-341.
8. Viala J, Chaput C, Boneca IG, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. Nat Immunol 2004;5:1166-1174.
9. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. Nat Rev Cancer 2004;4:688-694.

10. Hatakeyama M. SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2008;11:30-37.
11. Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the cagA status. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1777-1780.
12. Nomura AM, Perez-Perez GI, Lee J, Stemmermann G, Blaser MJ. Relation between *Helicobacter pylori* cagA status and risk of peptic ulcer disease. *Am J Epidemiol* 2002;155:1054-1059.
13. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997;40:297-301.
14. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90:5791-5795.
15. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, et al. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14428-14433.
16. Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* 2002;43:971-980.
17. Tammer I, Brandt S, Hartig R, Konig W, Backert S. Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* 2007;132:1309-1319.
18. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 2002;295:683-686.
19. Tsutsumi R, Takahashi A, Azuma T, Higashi H, Hatakeyama M. Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol Cell Biol* 2006;26:261-276.
20. Selbach M, Moese S, Hurwitz R, Hauck CR, Meyer TF, Backert S. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *Embo J* 2003;22:515-528.
21. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 2003;300:1430-1434.
22. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, et al. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* 2007;26:4617-4626.
23. Saadat I, Higashi H, Obuse C, et al. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* 2007;447:330-333.
24. Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:320-332.
25. Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 2003;301:1099-1102.
26. Molinari M, Salio M, Galli C, et al. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med* 1998;187:135-140.

27. Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995;270:17771-17777.
28. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 2007;133:926-936.
29. Pagliaccia C, de Bernard M, Lupetti P, et al. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10212-10217.
30. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah, P, et al. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1680-1687.
31. Basso D, Zambon CF, Letley DP, et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008;135:91-99.
32. Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakos K, et al. J. Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2007;45:488-495.
33. Sgouras DN, Panayotopoulou EG, Papadakos K, et al. CagA and VacA polymorphisms do not correlate with severity of histopathological lesions in *Helicobacter pylori*-infected Greek children. *J Clin Microbiol* 2009;47:2426-2434.
34. Philpott DJ, Belaid D, Troubadour P, et al. Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted *Helicobacter pylori* isolates. *Cell Microbiol* 2002;4:285-296.
35. Yamaoka Y, El-Zimaity HM, Gutierrez O, et al. Relationship between the cagA 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology* 1999;117:342-349.
36. Kwok T, Zabler D, Urman S, et al. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* 2007;449:862-866.