

دراسة لعلاقة السم CagA ومواقع فسفرته مع مخرجات الإصابات بسلالات مختلفة من *Helicobacter pylori*

زهرة محمود الخفاجي¹ زينب هاتف الركابي¹ غيث لطفي عارف²

1 معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الحيوية للدراسات العليا، جامعة بغداد، العراق

2 مركز النهريين للتدريب على الحامض النووي العدلي، جامعة النهريين

القبول 2012/5/14

الإستلام 2012/1/10

الخلاصة

تسبب بكتريا *Helicobacter pylori* أمراض مختلفة للجهاز الهضمي، وللبكتريا عدد من عوامل الضراوة ومنها السم CagA الذي يتفسر عند ثمالة التايروسين الواقعة ضمن قطيفات مكونة من خمس حوامض امينية EPIYA التي تكون أعدادها متغايرة في السموم . درست العلاقات بين وجود السم الخالي من القطيفات وعدم وجودها في الحالات المرضية والبلدان المختلفة في التواليات المسجلة في قواعد البيانات العامة ، وكذلك درس عدد مواقع الفسفرة تبين ان العلاقات غير منسجمة، فهي كانت عالية في حالات القرحة المتعددة وعدد مواقع الفسفرة EPIYA وبلغ معامل الارتباط $r = + 0.866$. ولكن الإصابات بالسرطان نجمت عن السموم الحأوية على مواقع فسفرة واخرى خالية منها ، اي علاقة سلبية وكذلك كانت العلاقة سلبية بين عدد مواقع الفسفرة والتهابات الجهاز الهضمي والأمراض غير المعروفة وكانت قيم (r) سالبة (0.421 - ، -0.537 . على التوالي) ويستنتج من ذلك ان وجود القطيفات ومواقع فسفرتها ليست هي المسؤولة الرئيسية عن إستحداث الأمراض وخاصة السرطان .

STUDY OF THE RELATIONSHIP OF CagA TOXIN AND IT'S PHOSPHORYLATION SITES WITH THE OUTPUT OF DIFFERENT STRAINS OF *Helicobacter pylori* INFECTIONS

Zahra M. Al-Khafaji¹

Zainab H. Al-Rikabi¹

Ghaith L. Arif²

¹Genetic Engineering and Biotechnology Institute for post Graduate Studies, Baghdad University.

²Al-Nahrain Forensic DNA Training Center (NFDTC), Al -Nahrain University.

Received 10/1/2012

Accepted 14/5/2012

ABSTRACT

Helicobacter pylori causes different digestive system diseases. *H.pylori* has different virulence factors, among them CagA which is phosphorylated at tyrosine residue located in special motif of five amino acid "EPIYA". CagA toxin may have different number and EPIYS(s). Relationship between the CagA(s) with EPIYA or without and diseases in different countries was used by using the sequences in public databases. The analyses revealed that there is positive correlation between increasing number of EPIYA(s) and different ulcers; the correlation coefficient r reached +0.866 in peptic ulcer. The relation of EPIYA(s) number and cancer(s) showed inverse relationship as well with gastritis and unknown diseases and r values were negative (-0.421,-0.537respectively). It has been concluded that presence of motifs and their phosphorylation sites are not the chief reasons for disease induction such as cancer.

Key words: *Helicobacter pylori*; CagA; EPIYA; Phosphorylation; digestive system diseases.

المقدمة

تسبب بكتريا *Helicobacter pylori* العديد من أمراض الجهاز الهضمي خاصة المعدة والأعضاء القريبة منها (2,1)، وتنتشر في حوالي 50% من المجتمعات وتصل إلى 58% في الشعوب الآسيوية مثل الصين (2,3). وقد صنفت عام 1994 من قبل منظمة الصحة العالمية (WHO) على إنها من الصنف الأول من المسرطنات Class I carcinogen (5,4)، وعيش البكتريا في بيئات غير ملائمة يشير إلى استراتيجيات كبيرة لمرونة جينومها للتأقلم مع الظروف غير الملائمة (6)، لذلك كانت هناك اختلافات كبيرة في جينوماتها حتى في جينات 16S rRNA التي تعد من التواليات الثابتة في العديد من الأحياء. وللبكتريا عدد من عوامل الضراوة تفتوتت في دراستها ومن أهمها السم CagA (Cytotoxic antigen associated toxin) حيث أشارت الدراسات إلى أن CagA⁺ (Type I) أكثر إحصائية في توليد الأمراض من السلالات CagA⁻ (Type II) والتي تكون لها علاقة بشدة المرض (9,8,7,3). ونظراً لتعايشها الطويل مع الإنسان وحصول التطور المترافق Co-evolution بين الإنسان والبكتريا أمكن لبعض الباحثين من إستعمال تواليات الحوامض الأمينية للسم CagA لمعرفة الهجرات البشرية من دراسة عمليات إصطفاف وإيجاد التشابه بين بروتين السم وبعض البروتينات البشرية بإستعمال برامج الإصطفاف مثل BLAST (10,4). تقوم البكتريا بحقن السم في الخلايا الطلائية لبعض أجزاء الجهاز الهضمي بإستعمال النوع الرابع من أنظمة النقل TSS4 الذي تقع جيناته مع جينات تخليق السم في Cytotoxic pathogenicity island (11,3). ويمكن أن تعتمد فعالية السم على فسفرته بعد الحقن إذ يتسفر عند ثمالة التايروسين التي تقع ضمن قطيقات Motifs خاصة مكونة من خمس حوامض أمينية، EPIYA(Glutamicacid)، Isoleucine, Tyrosine, Alanine, Proline الواقعة على الطرف الكاربوكسيلي لبروتين السم، وتكون ثمالة التايروسين (Y) ثابتة اما الثمالات الأخرى فيمكن ان يحصل فيها تغاير (12,11,6,9). وتختلف نوعية جزيئات سم CagA وفقاً للحوامض الأمينية المحيطة بالقطيقات الخماسية EPIYA (5, 13)، ويختلف حجم السم اعتماداً على تكرار القطيقات الخماسية والمناطق المجاورة لها والتي تكون شديدة التغاير (14,8,7). وعلى ضوء نوعية القطيقات الخماسية وما يحيط بها تقسم جزيئات السم ومن وراثها السلالات إلى نمط شرقي أو آسيوي والذي يكون EPIYA ABD والنمط الغربي الذي يكون من نوع EPIYA ABC ومنطقة C يمكن أن تتكرر من 1 - 3 مرات (15)، أما النوع EPIYA AB فيكون عام لجميع السلالات تقريبا، وفي العادة تكون المناطق الفاصلة بين ترادفات القطيقات من 13-44 حامض أميني (16)، ويبدو وكما تشير الدراسات أن زيادة تكرار القطيقات الخماسية تزيد من فسفرة السم وبالتالي زيادة الارتباط مع أحد مكونات الخلية SHP-2 والتي تؤدي إلى تغيرات شكلية واضطراب مسارات نقل الإشارات الخلوية (13,9). فضلاً عن ذلك يحوي السم على قطيقات CMPs (Cyclic-AMP-dependent phosphorylation motifs) التي يقع إثنين منها عند نهاية الأمينية لبروتين السم والباقي تقع في منطقة المكررات (11)، وهناك مناطق أخرى ثابتة CRPIA (Conserved repeat responsible for phosphorylation independent activity) التي يمكن أن تساهم في فعالية السم (17).

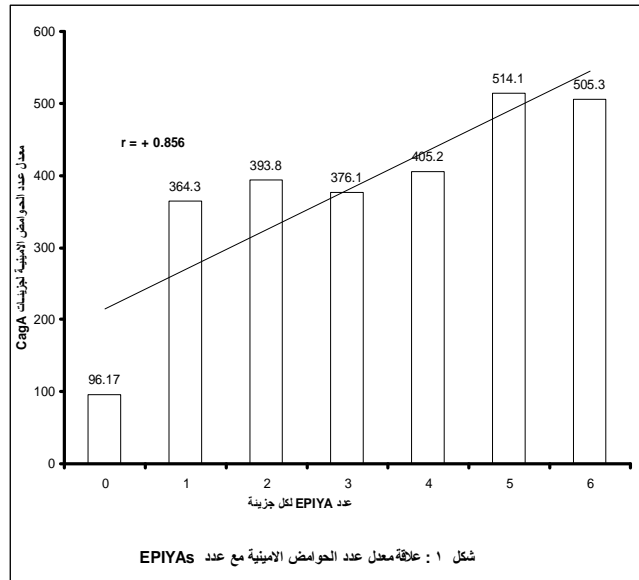
تناولت الدراسة الحالية دراسة للعلاقات بين نوعية CagA بوجود وعدم وجود القطيفات الخماسية EPIYA في سلالات معزولة من مناطق مختلفة وكذلك من الحالات المرضية الناتجة من سلالات مسجلة توالياتها في المراجع والمواقع المعتمدة.

المواد وطرق العمل

إستعملت التواليات المسجلة من قبل Xia وآخرون (18) وبالبالغة 666 من جزيئات CagA والحاوية على 1558 من EPIYA(s) نظراً لأجراء عمليات التصفية Filtering المتكررة عليها، وعدم إستعمال موقع NCBI أو غيره من المواقع أو القواعد البيانات نظراً لوجود التكرار والتشابه التي يضاف بعضها ويحذف بعضها عند تجديد المواقع. تم تعداد EPIYA(s) في السموم بإستعمال بعض خصائص Microsoft Word. تم تحديد مواقع الفسفرة في بروتينات CagA بإستعمال برنامج NetPhos.2.0 تم حساب معامل الارتباط (r) بين المؤشرات المستعملة لكل حالة.

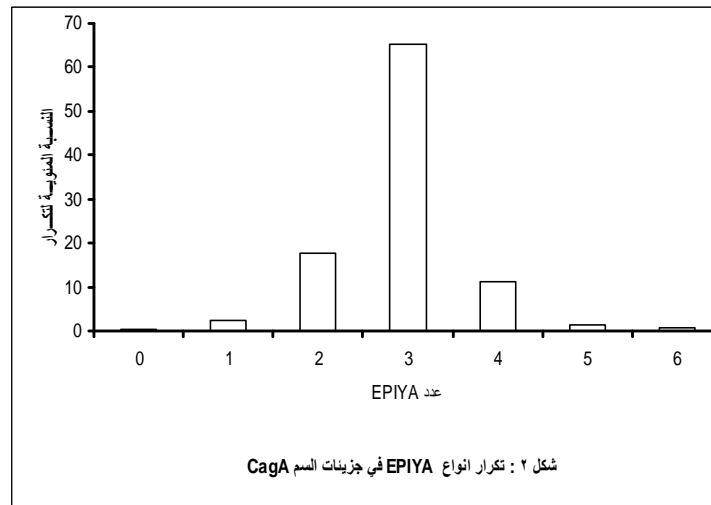
النتائج والمناقشة

أستعمل 666 توالي لسوم CagA تعود إلى سلالات مختلفة وتسبب أمراض مختلفة ومن أقطار مختلفة، احتوت على 1558 من القطيفات الخماسية EPIYA (18)، إختلفت جزيئات السم من حيث عدد الحوامض الأمينية المكونة لها إذ إنها تمثل الجزء المشفر Partial CDS وإمتدت من جزيئة مكونة من 68 حامض أميني وهي الأقصر مسجلة برقم التسجيل Accession number (CAA49632) والتي تسبب مرض غير معروف (X) مسجلة في إيطاليا، وجزيئه مكونة من 1320 حامض أميني وهي الأطول برقم تسجيل (AAR03939) وتسبب أيضاً مرض غير معروف مسجلة في السويد. ويوضح الشكل (1) العلاقة الموجبة بين معدل عدد الحوامض الأمينية وتكرار عدد القطيفات الخماسية وقد بلغ معامل الارتباط $r = +0.856$ ، ويلاحظ ان أعداد كبيرة جداً من جزيئات CagA مودعة في قواعد البيانات العامة المتاحة للإستعمال وإجراء التحليلات عليها (10) وعموم الجزيئات المسجلة تُشير إلى وجود السم في حوالي 50-75% وتكاد تصل هذه النسبة إلى 80-100% في السلالات الآسيوية (6)، وإعتماداً على ما يحتويه السم من تكرار للقطيفات الخماسية يمكن أن يحدد حجمه نظراً لإن تكرار القطيفات وما يجاورها من الحوامض الأمينية يزيد من حجم جزيئه السم (13) وتحديد نوع EPIYA وعددها يمكن ان يوضح إلى حد ما أمراضية السلالات كما أشارت بعض الدراسات (13,14)، ولكن بعض السموم يمكن أن تحوي على قطيفات غير فعالة نتيجة لإستبدال بعض الحوامض الأمينية (11)، فضلاً عن إن بعض السلالات الممرضة لا تحوي على CagA أو تحوي السم دون تسجيل لوجود مواقع مفسفرة فيه أي وجود EPIYA.



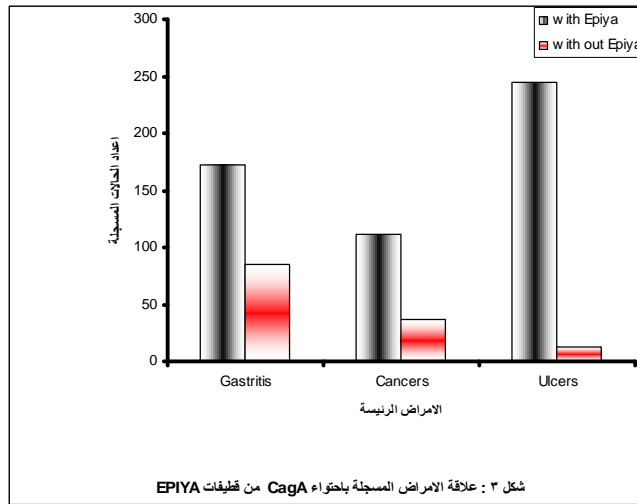
شكل(1):علاقة معدل عدد الحوامض الأمينية مع عددEPIYAs

وقد وجد أن نسبة عالية من جزيئات السم تحوي على ثلاث مكررات من القطيقات الخماسية كما موضح في الشكل (2)، وبغض النظر عن التواليات تحت المسح في هذه الدراسة، سجل التكرار الثلاثي في عدد من المرضى الإيرانيين في حين لم تسجل هذه في مناطق شمال العراق (20)، ومن الجدير بالذكر إن العديد من سموم البكتريا ذات التكرار الثلاثي عزلت من مرضى السرطان كما مسجل في بعض الدراسات (5)، ويمكن ان تعزل سلالات بعدد مختلف من القطيقات من المريض الواحد وهذه تساعد البكتريا للهروب من الجهاز المناعي(14,23).



شكل(2):تكرار أنواع EPIYAs في جزيئات السم CagA

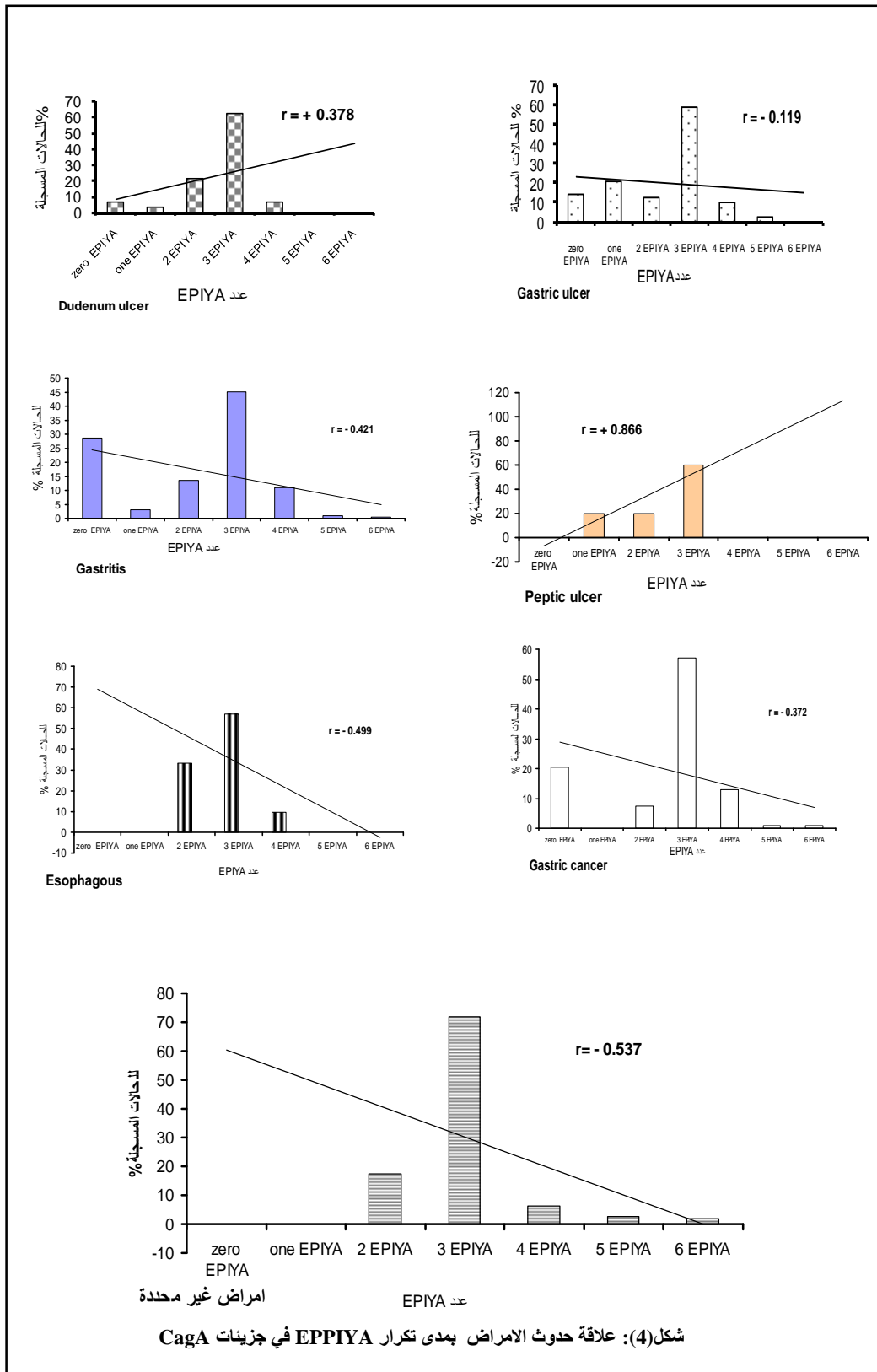
وهناك العديد من الحالات المرضية التي وجدت فيها جزيئات CagA خالية من EPIYA كما موضح في الشكل (3) الذي يوضح مجمل الحالات المرضية المسجلة مثل أنواع مختلفة من السرطان وكذلك أنواع مختلفة من القرحة التي تصيب أجزاء مختلفة من الجهاز الهضمي وكذلك الأنواع المختلفة من الإلتهابات سواء كانت الحادة أو المزمنة.



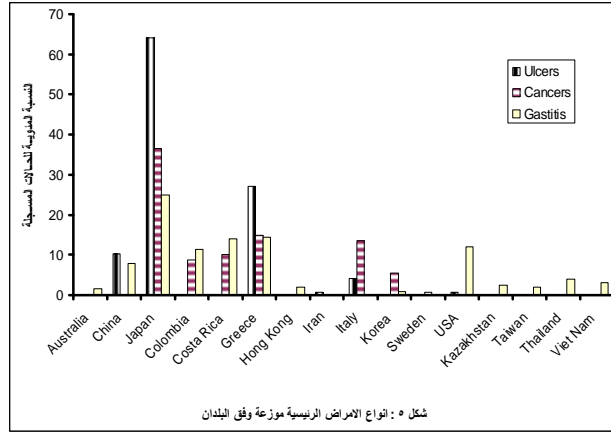
شكل(3):علاقة الأمراض المسجلة بإحتواء CagA من قطيقات EPIYAS

ويتضح من الشكل ان الحالات التي توجد فيها القطيقات الخماسية هي المتغلبة في حالة الأمراض، ويشير البعض أن التغيرات في CagA ربما يؤثر في الفعالية البايولوجية للسم (21). وقد صنفت السلالات إلى النوع الأول التي تكون $CagA^+, VacA^+$ والنوع الثاني $CagA^-, VagA^-$ ومجموعة أخرى تقع بين الإثنين ويمكن أن يكون التعبير عن جينات السمين مستقل (7)، ولكن بعض الدراسات أشارت الى ان $CagA^+$ تسبب السرطان بمستوى الضعف عما عليه $CagA^-$ ولكن دون الإشارة الى مواقع الفسفرة أو أعدادها (23،5)، ولكن يبدو أن الأشخاص المصابين بسلالات $CagA^+$ لهم استعداد للإصابة بنوع من السرطانات Gastricadeno carcinoma (24،6)، ومن الواضح إن وجود CagA لوحده غير كاف لحدث الأمراض وإنما القابلية تعتمد على تخريب وظائف الخلايا والتي تنطلق من الارتباط الى SHP-2 والتي تعتمد بدورها على عدد وتوالي مواقع فسفرة التايروسين (5)، (13) ولكن هذا ليس هو واقع الحال وذلك من ارتباط الأمراض بوجود CagA الخالي من مواقع الفسفرة EPIYA(s) وإنما تعود إلى أسباب أخرى.

وعليه ووفقاً للدراسات المنشورة يفترض أن تكون الزيادة في تكرار القطيفات الخماسية يؤدي الى نشاط السلالات في توليد الأمراض ولكن الدراسة المسحية الحالية تشير الى عكس ذلك إلا في بعض الحالات، فمثلاً في حالة أنواع القرع المختلفة كانت العلاقة موجبة ولكن قد لا تصل إلى المعنوية الإحصائية الكبيرة كما موضح في الشكل (4)، ويبدو ان هذه العلاقة الموجبة ترتبط بنواحي أخرى، فقد وجد أن زيادة عدد القطيفات الخماسية في السم لها علاقة بإفراز IL-8 والذي يؤدي الى إصابات مزمنة وتجمع أكثر من دراسة الى إن وجود EPIYA A ترتبط بقرحة المعدة أو المناطق القريبة منها والتي يدعمها إن الغالبية العظمى من تواليات السم تكون من نوع EPIYA AB ثم تبدأ بالإختلاف بعد ذلك لتكون النمط الاسيوي والغريبي (5)، وقد أعتبر إن السم CagA أحد عوامل الخطورة للإصابة بـ (PU) Peptic Ulcer وقرحة المعدة (GU) Gastric Ulcer ونظراً لما تسببه الإصابة بالسلالات الحاوية عليه من زيادة في افراز IL-8 و Chemokine وغيرها من المواد (25)، فضلاً عن إرتباط حدوث القرع بالحمل Load من البكتريا وخاصة (DU)DuodenalUlcer (26).

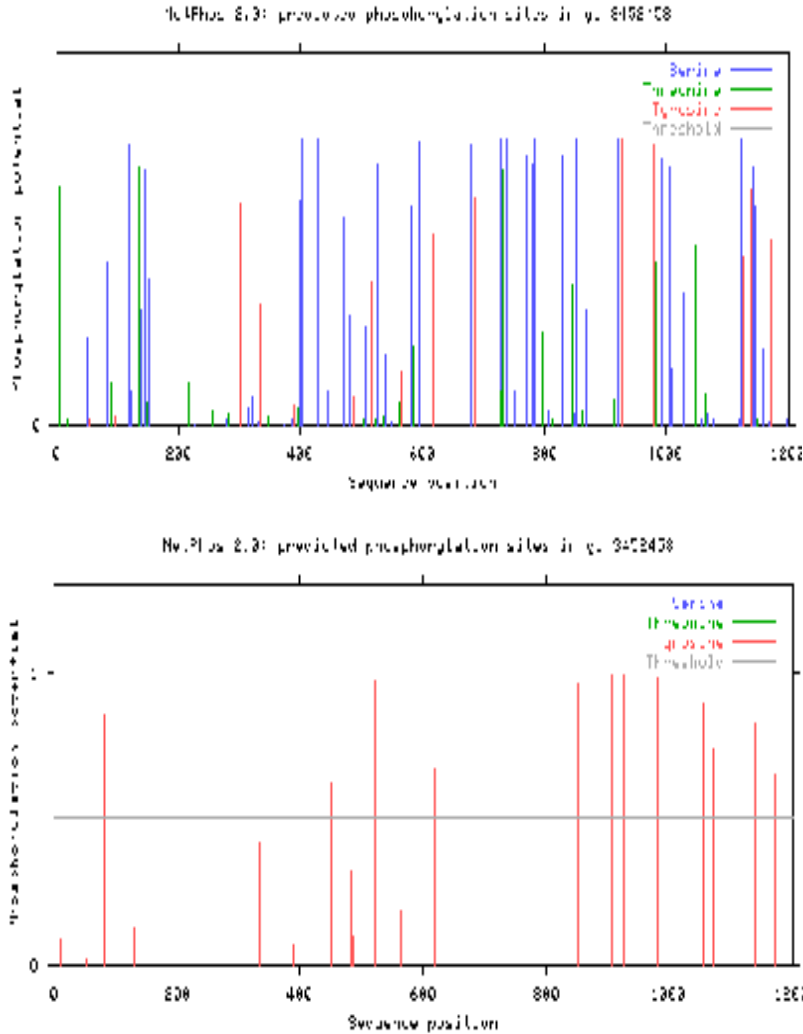


ومن جهة ثانية يشير الشكل الى علاقات سلبية أخرى فمثلاً في حالة الأمراض غير المعروفة (X) بلغ معامل الارتباط $r=-0.537$ ، فضلاً عن وجود العلاقات السلبية في حالة السرطانات ، ويفترض أن حقن السم يؤدي الى تنشيط proto-oncogenes مثل *c-fos* و *c-jun* وإنتاج المحركات الخلوية Cytokines والمحركات الكيميائية Chemokines (27)، فضلاً عن تسجيل تدمير للـ DNA في الخلايا المصابة (28). وتشير الدراسات الى أن الأعداد المتزايدة من EPIYA(s) لها علاقة بقرحة المعدة (14,15)، ولكن حقيقة الأمر ترتبط بنوع القطيفات فزيادة تكرار EPIYA C هو الذي يرتبط بزيادة حدوث المرض وليس زيادة EPIYA(s) لأنها قد تكون من أنواع أخرى، فالنوع (C) مسجل لمرضى السرطان في الدول الغربية أما النوع EPIYA ABD فقد وجدت في 100% من مرضى السرطان الآسيويين (5)، ولكن نتائج الدراسة الحالية أشارت إلى عدم ترابط حدوث السرطانات مع زيادة تكرار عدد EPIYA(s) (بشكل مطلق) وهذا قد يتفق مع تفسير إن زيادة عدد القطيفات الخماسية يساعد في لوي جزيئة السم وتغيير الشكل التركيبي لها مما يقلل ثبوتها وقابليتها للارتباط مع SHP-2 (5) وبالتالي تقليل شدة الإصابة. ويتفق هذا مع الحقيقة من أن هناك مناطق في العالم يكون انتشار الإصابة بالبكتريا عالياً ولكن مستوى الإصابة بالسرطانات يكون منخفضاً (28). ومن هنا يتضح ان نوع القطيفة هو المؤثر وليس أعدادها وزيادة مناطق فسفرتها وإنما الالفة تعتمد على النوع، فضلاً عن إنه في حالة السرطانات تتداخل العديد من العوامل والظروف المحيطة مثل المضيف وعوامل الضراوة الاخرى للبكتريا غير السم CagA، بالإضافة الى ان تغيير شكل سم البروتين المحقون يمكن ان تؤثر في إحداث السرطان (6,9)، كما ان زيادة تكرار القطيفات ممكن ان تؤثر بشكل سلبي (كما ذكر آنفاً) بإيجاد Negative feedback loops تعطل عائلة Src family kinases المسؤولة عن الفسفرة وتقلل من السم المفسفر (5) وبالتالي التقليل من حدة المرض والتأثير في نوعيته. وفضلاً عن ما ذكر أعلاه يلاحظ ان مخرجات الإصابة بالبكتريا تعتمد على العرق ولذلك اختلفت أنواع الإصابات في البلدان المختلفة ويلاحظ من الشكل (5)، إن اليابان تنصدر البلدان الأخرى من حيث الإصابة بأنواع قرح الجهاز الهضمي ثم بسرطانات الجهاز الهضمي (وبدأ قد تكون قلة الدراسات وراء الاتجاه لبعض النتائج)، من جهة ثانية يلاحظ أن EPIYA D تكون ذات الفئة عالية نحو SHP-2 وهي النوع المنتشر في الدول الآسيوية واليابان على وجه الخصوص (5).



شكل (5): أنواع الأمراض الرئيسية موزعة وفق البلدان

وتتفاوت نسب حدوث السرطان نتيجة الإصابة بالبكتريا، فمثلاً ويعيداً عن الدراسة المسحية الحالية وجد أن الإصابة بالسرطان تكون بحدود $10^5/69-38$ من المرضى الإيرانيين والتي تكثر عندهم جزيئات CagA الحاوية على ثلاث من القطيقات الخماسية في حين تتخفف النسبة في البلد المجاور العراق (شمال العراق) الى $10^5/5$ من تعداد المصابين (13,20). ويلاحظ ان العلاقة الوثيقة بين الإصابة بالبكتريا وحدث السرطان في بعض المناطق ولكن هذه العلاقة في العموم تكون واطئة الارتباط ، وتختلف من بلد لآخر فعلى سبيل المثال سجلت في كولومبيا أن الفروق تصل الى 25 مرة ، وان كوريا الجنوبية سجلت فيها أعلى الإصابات بسرطان المعدة (5,11,28) وباستعمال الطرق الجزيئية باعتماد واسمات خاصة تبين ان هناك علاقة وثيقة بين النمط الجيني للبكتريا والجماعات العرقية المختلفة. وعدم وجود صورة واضحة لمخرجات الإصابة بالبكتريا يعود إلى ان جينومات البكتريا تعاني من حدوث طفرات نقطية أو موضعية Point mutation وكذلك حصول عمليات تآشب مختلفة Inter- and Intra - recombination مرتبطة بالمضيف والبيئة (23,28). ونظراً لإشارة العديد من الدراسات إلى أن عملية الفسفرة هي محرك الأساسي لفعاليات سم CagA، لذلك أخضعت التواليات المستعملة في الدراسة لبرنامج تحديد مواقع الفسفرة المتوفر على شبكة الانترنت (19)NetPhos.2.0 والننتائج موضحة لاحد الجزئيات في الشكل (6) (والتي كانت متشابهة النمط لباقى التواليات).



شكل (6): مواقع فسفرة أحد بروتينات CagA باستعمال برنامج NetPhos.2.0

ويتضح من الشكل أن نتائج البرنامج وغيره من البرامج التي جربت تكون غير مفيدة لان مثل هذه البرامج تعتمد على الطاقة وترتيب الثمالات، كما أن مخرج البرنامج Output للمؤشرات الأصلية Default يشير إلى فسفرة أكثر من ثمالة مثل السيرين والثريونين وهي العاملة ضمن أنظمة نقل الإشارات داخل الخلايا، وعند إجراء عملية تصفية وإبقاء الحدس لثمالات التايروسين يلاحظ من الشكل (الجزء الأسفل) إن هناك العديد من ثمالات التايروسين والتي حسبت مهمة من النواحي الإحصائية للبرنامج وقيم حدسها تعدت حد العتبة Threshold، لذلك فإن هذه البرامج لاتساعد في مثل هذه المهمة وتكون الحاجة ماسة لبرامج حدس الفسفرة وربما تكون خاصة بكتريا *H.pylori* وذلك لان الفسفرة المعينة في هذه الحالة هي لثمالات تايروسين في المنطقة خاصة (EPIYA).

وقد أشارت الدراسات الصينية الى أن الفسفرة تحدث لثمالة تايروسين واحدة بعد تتبع السم في خلايا طلائية مصابة، ولكن دون تحديد أي من القطيقات التي نفسفر ثمالاتها (16). ولكن الدراسات التي أجريت بعد هذا الاستنتاج أوضحت أن جزيئات السم الحأوية على EPIYA تعاني من الفسفرة أما الجزيئات التي لا تحوي عليها تكون حاوية على CRPIA المارة الذكر وهذه تكون مهمة في السلالات الممرضة والتي تكون سمومها (CagA) غير حأوية على EPIYA (17)، وكذلك إحتواء سم CagA على CMPs التي تتوزع على مناطق مختلفة منه (11)، فضلاً عن أن بعض الجزيئات المفسفرة يمكن أن تفقد مجموعة الفوسفات، وكل من السم المفسفر وغير المفسفر (وبالتالي احتمال وجود أو عدم وجود EPIYA) تؤثر في وظائف الخلايا وحث الاستجابات فيها، وهذا يشير الى أن وجود CagA غير المفسفر يمكن أن يؤدي الى حث السرطان (كما ذكر آنفا/شكل 3) وغيرها من الأمراض (2,13,16). ومن المناقشة أعلاه تبين إن وجود CagA قد يزيد من ضراوة السلالات (21)، ولكن ليس هو المسؤول الوحيد عن ذلك لان ضراوة البكتريا مسجلة في عدد من السلالات التي يغيب فيها CagA وان حوالي 50% من السلالات تحوي على CagA، فالاختلافات التركيبية بعيداً عن عدد أو وجود EPIYA أو نوعها هي التي تكون ذات التأثير الكبير (13). كما أن وجود تشكيلة من أنواع EPIYA(s) له تأثير في توليد السرطانات وكذلك وجودها مع عوامل ضراوة أخرى، فمثلاً أثبت أن النمط الجيني CagA⁺ مع وجود نمط السم المكون للفجوات VacA S₁m₁ له علاقة وثيقة بتوليد وتطور السرطانات عند وجود المؤهلات الأخرى في المضيف (28). فضلاً عن ذلك تدخل العرقيات الموجودة حتى في البلد الواحد وكذلك الظروف البيئية ونمط الحياة (21) خاصة إذا ما عرف أن السرطان (كأحد أسوأ معطيات الإصابة بالبكتريا) هو متعدد الاسباب وأن CagA أحد هذه الاسباب (11). والملاحظ والمتوقع أن الدراسات تستمر والاختلافات مستمرة ولا توجد علاقة واضحة بين وجود CagA وعدد قطيقات EPIYA والأمراض التي تنتج نظراً لوجود عوامل متداخلة لذلك ظهرت توجهات جديدة لتوضيح الإصابة بهذه البكتريا التي يكون جينومها غير ثابت وبالتالي معطيات الإصابة بها مختلفة، ومنها قياس مستوى PepsinogenI في مصل المصاب (15) على الاقل لتحديد الإصابة خاصة وان نسبة كبيرة من المصابين لا تظهر عليهم الأعراض، ولكن يبقون مصدراً لإصابة الآخرين، ومحاولة أخرى نتجه نحو إستعمال Entropy وحسابه لثمالات CagA كأحد الواسمات للإصابة بسرطان المعدة وتصنف على ضوءه السلالات الى مسرطنة وأخرى غير حاتة للسرطان (27).

المصادر

- 1- Covacci, A.; Censini, S.; Bugnoli, M.; Petracca, R., Burrioni, D.; Macchia, G. (1993). Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proceeding of the National Academic Science USA, 90:5791-5795.
- 2- Atherton, J. (2006). The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annual Review of Pathology*, 1: 63-96.
- 3- Swanston, T.; Haakensen, M.; Deneer, H. and Walker, E. (2011). The characterization of *Helicobacter pylori* DNA associated with ancient human remains recovered from a Canadian Glacier. *PLoS ONE* 6(2):e16864. Doi: 10.1371/journal.pone.0016864.
- 4- Falush, D.; Wirth, T.; Linz, B. (2003). Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, 299:1582-1585.

- 5- Jones, K.; Joo, Y.; Jang, S.; Yoo, Y.; Lee, H.; Chung, I. (2009). Polymorphism in the CagA EPIYA motif impacts development of gastric cancer. *J. of Clin. Microbiol.*, 47: 959-968.
- 6- Truong, B.; Mai, V.; Tanaka, H.; Ly, L.; Thong, T.; Hai, H.; Long, D. (2009). Diverse characteristics of the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* strains collected from patients from Southern Vietnam with gastric cancer and peptic ulcer. *J. of Clin. Microbiol.*, 47: 4021-4028.
- 7- Xiang, Z.; Censini, S.; Bayeli, P.; Telford, J.; Figura, N.; Rappuoli, R. and Covacci, A. (1995). Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect. and Immun.*, 63 : 94-98.
- 8- Azuma, T.; Yamakawa, A.; Yamazaki, S.; Fukuta, K.; Ohtani, M.; Ito, Y. (2002). Correlation between variation of the 3' region of the "*cagA*" gene in "*Helicobacter pylori*" and disease outcome in Japan. *J. of Infect. Dis.*, 186: 1621-1630.
- 9- Stein, M.; Bagnoli, F.; Halenbeck, R.; Rappuoli, R.; Fantl, W. and Covacci, A. (2002). c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol. Microbiol.*, 43: 971-980.
- 10- Altschul, S.; Madden, T.; Schäffer, A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. and Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST, a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
- 11- Evans, D. and Evans, D. (2001). *Helicobacter pylori* CagA: Analysis of sequence diversity in relation to phosphorylation motifs and Implications for the role of CagA as a virulence factor. *Helicobacter*, 6:187-98.
- 12- Zhou, w.; Yamakawa, A.; Ito, Y.; Ohtani, M.; Higashi, H.; Hatakeyama, M. and Azuma, T. (2003). The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *J. of Infect. Dis.*, 187:334-337.
- 13- Higashi, H.; Tsutsumi, R.; Fujita, A.; Yamazaki, S.; Asaka, M.; Azuma, T. and Hatakeyama, M. (2002). Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proceeding of the Nat. Acade. of Sci., USA*. 99:14428-14433.
- 14- Argent, R.; Zhang, Y. and Atherton, J. (2005). Simple method for determination of the number of *Helicobacter pylori* CagA variable-region EPIYA tyrosine phosphorylation motifs by PCR. *J. of Clin. Microbiol.*, 43: 791-795.
- 15- Batista, S.; Rocha, G.; Rocha, A.; Saraiva, E.; Cabral, M.; Oliveira, R. and Queiroz, D. (2011). High number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiology*, 11:61-73.
- 16- Zhu, Y.; Zheng, S.; Qian, K. and Fang, P. (2004). Biological activity of the virulence factor CagA of *Helicobacter pylori*. *Chinese Medical Journal*, 117: 1330-1333.
- 17- Suzuki, M.; Mimuro, H.; Kiga, K.; Fukumatsu, M.; Ishijima, N.; Morikawa, H. (2009). *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host and Microb*, 5:23-34.

- 18- Xia, Y.; Yamaoka, Y.; Zhu, Q.; Matha, I. and Gao, X. (2009). A Comprehensive sequence and disease correlation analyses for the C-terminal region of CagA protein of *Helicobacter pylori*. *PLoS ONE*, 4(11) : e7736. doi: 10.1371/journal.pone.0007736.
- 19- Blom, N .; Gammeltoft, S. and Brunak, S.(1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. of Mol. Biolo*,294:1351-1361.<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>
- 20- Hussein, N.; Mohammadi, M.; Talebkhan, Y.; Doraghi, M.; Letley, D.; Muhammad, M. (2008). Differences in virulence markers between *Helicobacter pylori* strains from Iraq and those from Iran: potential importance of regional differences in *H. pylori* -associated disease. *J. of Clin. Microbiol*, 46: 1774–1779.
- 21- Yamaoka, Y.;Kodama, T.; Kashima, K.; Graham, D.a nd Sepulveda,A. (1998). Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. *J. of Clin. Microbiol.*, 36: 2258 – 2263.
- 22- Gwack, J.; Shin, A.; Kim, K.; Ko, K.; Kim, Y.; Jun, J. (2006). CagA-producing *Helicobacter pylori* and increased risk of gastric cancer: a nested case–control study in Korea. *Brit. J. of Cancer*, 95: 639 – 641.
- 23- Parsonnet, J.; Friedman, G.; Orentreich, N. and Vogelman, H. (1997). Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 40: 297-301.
- 24- Blaser, M.; Perez-Perez, G.; Kleantous, H.; Cauer, T.; Peek, R.; Chyou, P.(1995). Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing CagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Resear.*, 55: 2111-2115.
- 25- Hamlet, A.; Thoreson, A.; Nilsson, O.; Svennerholm, A. and Olbe, L. (1999). Duodenal *Helicobacter pylori* infection differs in *cagA* genotype between asymptomatic subjects and patients with duodenal ulcers. *Gastroenterolo*,116: 259-268.
- 26- Meyer-ter-Vehn, T.; Covacci, A.; Kist, M. (2000). *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *J. of Biol. Chemistry*, 275: 16064-16072.
- 27- Sablet, T.; Piazuolo, M.; Shaffer, C.; Schneider, B.; Asim, M.; Chaturvedi, R. (2011). Phylogeographic origin of *Helicobacter pylori* is a determinant of gastric cancer risk. *Gut*,60:1189 -1195.
- 28- Zhan, C.; Xu, S. and Xu, D.(2011). Detection and application of CagA sequence markers for assessing risk factor of gastric cancer caused by *Helicobacter pylori*. *Bioinformatics and Biomedicine (BIBM)*, Intern. Conference (18-21 Dec), 2010.Hong Kong.