

**ODDZIAŁYWANIA MOLEKULARNE WYBRANYCH
CZYNNIKÓW WIRULENCJI *HELICOBACTER PYLORI****THE MOLECULAR INTERACTIONS
OF *HELICOBACTER PYLORI* VIRULENCE FACTORS

Ewa Elżbieta HENNIG

Klinika Gastroenterologii i Hepatologii Centrum Medycznego Kształcenia
Podyplomowego w Centrum Onkologii w Warszawie

Streszczenie: *Helicobacter pylori* jest jednym z najczęściej występujących u ludzi patogenów bakteryjnych. Zasiedlenie śluzówki żołądka przez *H. pylori* jest podstawowym czynnikiem etiologicznym rozwoju choroby wrzodowej dwunastnicy i żołądka oraz raka żołądka. Szereg białek bakteryjnych, w tym szczególnie antygen CagA, cytotoksynę VacA i adhezynę BabA, wiąże się ze zwiększoną wirulencją szczepów *H. pylori*. Różnice w aktywności cytotoksyny VacA i antygeny CagA wynikają z polimorfizmów kodujących je genów. W patogenezie zakażenia kluczową rolę mogą jednak odgrywać specyficzne oddziaływania *H. pylori* z komórką nabłonkową żołądka na poziomie molekularnym.

Słowa kluczowe: *Helicobacter pylori*; patogen; wirulencja; choroba wrzodowa; rak żołądka; cytotoksyna wakuolizująca; adhezyny; antygen CagA; interakcje białkowe.

Summary: *Helicobacter pylori* is one of the most frequently observed pathogenic bacterium that colonizes the human stomach. Colonization of gastric mucosa is the main etiologic factor of the development of duodenal and gastric ulcer diseases and gastric adenocarcinoma. The spectrum of bacterial proteins, especially CagA antigen, cytotoxin VacA and BabA adhesin, are correlated with higher virulence of *H. pylori* strains. Differences in activities of cytotoxin VacA and CagA antigen are connected with polymorphisms observed in the genes which coded these proteins. However, the main role in pathogenesis of *H. pylori* infection might play specific interactions between *H. pylori* and gastric epithelial cell on the molecular level.

Key words: *Helicobacter pylori*; pathogen; virulence; ulcer disease; gastric cancer; vacuolization cytotoxin; adhesions; CagA antigen; protein interactions.

*Praca została opublikowana w związku z Nagrodą Nobla przyznaną w 2005 roku R. Warrenowi i B. Marshallowi. Praca była finansowana w ramach grantu KBN (6 PO4A 031 15) oraz projektów CMKP (501-2-2-08-13/01, 501-1-1-09-20/03 i 501-1-1-09-17/04).

WPROWADZENIE

W 1982 roku Robin Warren i Barry Marshall po raz pierwszy wyizolowali spiralną, Gram-ujemną, mikroaerofilną bakterię ze śluzówki pacjentów z przewlekłym zapaleniem błony śluzowej żołądka [93], nazwaną później *Helicobacter pylori*. *H. pylori* jest jednym z najczęściej występujących u ludzi patogenów bakteryjnych. Częstość zakażenia w Polsce należy do najwyższych w Europie i w zależności od wieku sięga nawet 90% (w grupie osób powyżej 60 lat) [48, 49]. U większości osób zakażenie przebiega bezobjawowo, prowadząc do przewlekłego zapalenia błony śluzowej żołądka, jednak u 10–20% zakażonych rozwija się choroba wrzodowa dwunastnicy lub żołądka, a u 1–3% rak żołądka lub chłoniak żołądka o mniejszej złośliwości [12, 51, 85].

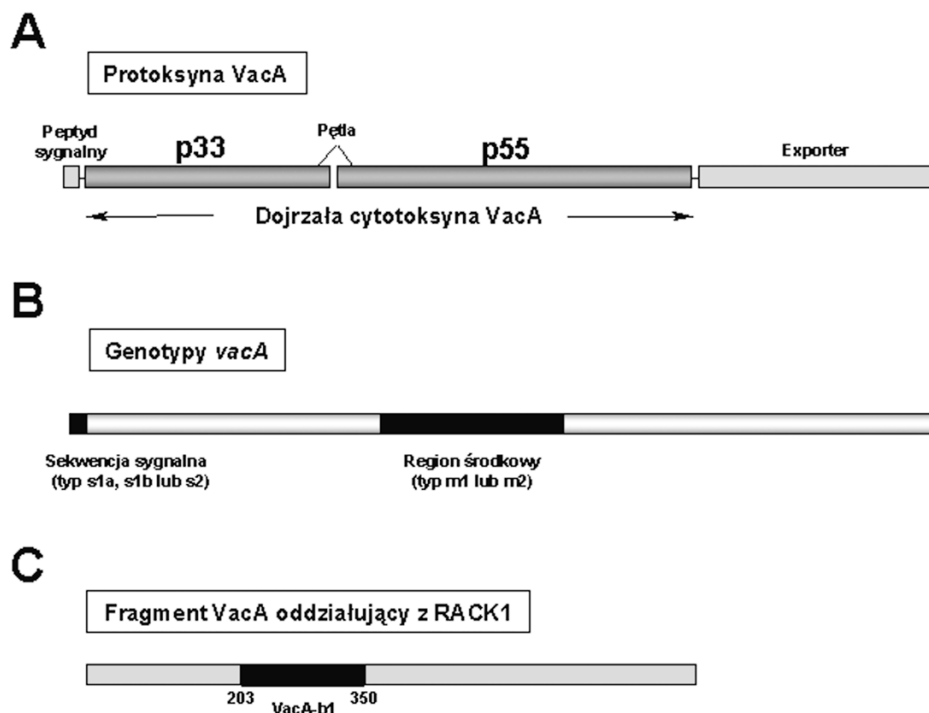
Szczepy *H. pylori* charakteryzuje szereg wspólnych czynników determinujących ich wirulencję; umożliwiającą bakteriom zasiedlenie błony śluzowej żołądka oraz zdolność do przetrwania w kwaśnym środowisku treści żołądkowej [54, 85]. Wszystkie szczepy wytwarzają ureazę, enzym wydzielany przez bakterie w dużych ilościach, który rozkładając obecny w żołądku mocznik z uwolnieniem amoniaku, powoduje zobojętnienie kwaśnego środowiska soku żołądkowego w sąsiedztwie bakterii. Charakterystyczna dla wszystkich szczepów *H. pylori* jest również zdolność do poruszania się. Spiralny kształt bakterii, jak i obecność wici na jednym z biegunów umożliwiają jej przedostanie się przez warstwę śluzu na powierzchnię komórek nabłonkowych. Jako wspólne czynniki wirulencji wyróżnić można również liczne adhezyny, proteazy i fosfolipazy umożliwiające degradację śluzu żołądkowego i błony śluzowej oraz katalazę i dysmutazę nadtlenkową, które zapobiegają zniszczeniu bakterii w fagocytarnych wakuolach granulocytów [54, 85].

Już pierwsze badania nad wirulencją *H. pylori* wskazywały na olbrzymią różnorodność genetyczną tego drobnoustroju. Odkrycie, że niektóre z czynników bakteryjnych produkowane są tylko przez specyficzne szczepy *H. pylori*, rodziło nadzieję, że właśnie tą zmiennością będzie można wytłumaczyć tak zróżnicowany przebieg zakażenia. Wieloletnie i prowadzone w wielu ośrodkach badania potwierdziły słuszność takiego założenia, jednakże wskazały również, że działanie czynników bakteryjnych może być w dużym stopniu modyfikowane przez współwystępujące czynniki gospodarza i wpływy środowiskowe [13, 30, 39]. Obecnie uważa się, że w patogenezie zakażenia *H. pylori* kluczową rolę może odgrywać szczególnie kombinacja osobniczo zmiennych cech gospodarza i szczepowo-specyficznych cech bakterii, warunkująca zaistnienie specyficznych oddziaływań na poziomie molekularnym.

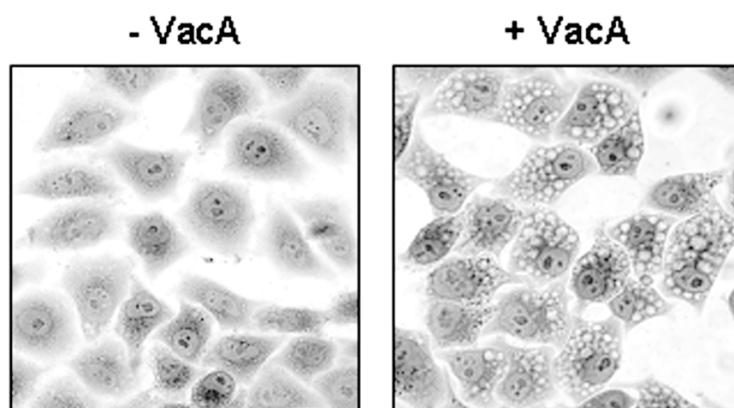
Różnice w wirulencji szczepów *H. pylori* wynikają głównie z obecności różnych alleli genów, a w tym obecności wyspy patogenności *cag* oraz różnych genotypów *vacA* czy *babA*. Produkty dwóch genów, *vacA* i *cagA*, jako pierwsze zaczęto korelować ze zwiększoną wirulencją szczepów *H. pylori*.

CYTOTOKSYNA WAKUOLIZUJĄCA VacA

Cytotoksyna wakuolizująca VacA syntetyzowana jest jako 140-kDa prekursor, a następnie, po proteolitycznym odcięciu 33-aminokwasowego peptydu sekwencji sygnałnej z N-końca oraz ~50-kDa C-końcowej domeny związanej z transportem toksyny przez błonę zewnętrzną, jest wydzielana z komórki bakteryjnej jako 88-kDa dojrzała toksyna [19, 64]. Cytotoksyna wydzielana z komórki składa się z dwóch podjednostek tworzących monomer, 33-kDa N-końcowej (p33) i 55-kDa C-końcowej (p55) (ryc. 1A) [56]. W formie natywnej, VacA występuje w postaci oligomerycznej struktury o sześć- lub siedmio-ramiennej symetrii, utrzymywanej przez oddziaływania podjednostek p33 i p55 z sąsiednich monomerów [56, 89]. Efektywna internalizacja oraz aktywność wakuolizująca VacA zależy od ponownej monomeryzacji toksyny w kwaśnym lub zasadowym pH środowiska i tworzenia anionowo-selektywnych kanałów w błonach komórkowych [50, 87, 95]. Aktywność wakuolizującą VacA wykazano w supernatantach hodowli szczepów *H. pylori*, obserwując powstawanie wakuoli w wielu rodzajach komórek eukariotycznych *in vitro* (ryc. 2) [19, 22].



RYCINA 1. Schemat przedstawiający 140-kDa protoksynę VacA (A), regiony zmienności w *vacA*, determinujące różne genotypy cytotoksyny (B) oraz lokalizację fragmentu VacA-b1, oddziałującego z białkiem RACK 1. p33 (33-kDa) i p55 (55-kDa) oznaczają podjednostki dojrzałej cytotoksyny VacA; cyfry ograniczające fragment VacA-b1 w schemacie (C) odpowiadają kolejności aminokwasów w VacA ze szczepu 60190



RYCINA 2. Wakuolizacja komórek HeLa w obecności cytotoksyny VacA ze szczepu *H. pylori* 60190

Działanie VacA ma istotne znaczenie dla wydajniejszej kolonizacji i pozostawania *H. pylori* w zajmowanej niszy żołądkowej. Tworząc pory w błonie komórkowej, zwiększa jej przepuszczalność dla małych cząsteczek organicznych (w tym mocznika) i jonów (jak Fe^{3+} i Ni^{2+}) niezbędnych do wzrostu bakterii [22]. Podobne znaczenie dla dostarczania składników odżywczych ma również zmniejszenie integracji warstwy nabłonka. Wiążąc się z receptorem dla fosfatazy tyrozynowej RPTP β , VacA prowadzi do zwiększenia fosforylacji białka Git1 (ang. *G protein-coupled receptor kinase-interactor 1*) i odłączania się komórek nabłonkowych od błony podstawnej [19].

VacA może bezpośrednio działać niszcząco na komórkę. Obok wakuolizacji, powoduje apoptozę komórek nabłonkowych, prawdopodobnie w wyniku migracji do mitochondriów, gdzie stymuluje uwalnianie cytochromu c i aktywację kaspazy 3 [22]. VacA jest także toksyną o działaniu silnie modulującym odpowiedź immunologiczną: blokuje dojrzewanie fagosomów w makrofagach, hamuje prezentację antygeny przez limfocyty B, hamuje aktywację i proliferację limfocytów T i moduluje odpowiedź komórkową typu Th1 [19].

1. Genotypy cytotoksyny VacA

Gen *vacA* wykrywany jest w genomach niemal wszystkich izolowanych szczepów *H. pylori*, ale jedynie połowa z nich wykazuje aktywność cytotoksyczną *in vitro* [19, 22, 32, 39, 64]. Przypuszczano, że w pozostałych szczepach gen *vacA* nie ulega ekspresji. Wykazano jednak, że większość szczepów *H. pylori* produkuje cytotoksynę, w supernatantach ich hodowli wykrywano immunopoztywne białka VacA, jednakże różnią się one zasadniczo swą aktywnością [64]. Różnice te wynikają z polimorfizmu genu *vacA* i mozaikowości jego organizacji [6, 64]. Niektóre regiony *vacA* charakteryzują się dużą konserwatywnością sekwencji nukleotydowej, zaś inne – wysoką zmiennością. Różnice obserwowane między szczepami dotyczą głównie dwóch regionów: 50 nukleotydów z 5'-części genu, kodujących drugą połowę sekwencji sygnałnej (allel s – ang. *signal sequence*) oraz 700-nukleotydowego odcinka części środkowej genu (allel m – ang. *middle region*) (ryc. 1B) [6].

Początkowo opisano występowanie trzech typów allelu s (s1a, s1b, s2) i dwóch typów allelu m (m1 i m2) [6]. Najwyższym poziomem cytotoksyczności *in vitro* charakteryzują się szczepy o genotypie s1/m1 (Tox⁺), zaś szczepy s2/m2 praktycznie nie mają aktywności wakuolizującej (Tox⁻). Stwierdzono, że peptyd sygnałny toksyny o allelu s2 zakończony jest 12-aminokwasowym, silnie hydrofilowym segmentem, którego nie ma w allelu s1 [6]. Zastąpienie hydrofobowego końca s1 hydrofilowym fragmentem z końca s2 prowadzi do utraty właściwości wakuolizacji komórek HeLa, AGS i RK-13 [46]. Poza różnicami w sekwencji, szczepy Tox⁺ i Tox⁻ różnią się także poziomem transkrypcji genu *vacA*, która w szczepie s2/m2 była ok. 30-krotnie niższa niż w szczepie s1/m1 [26].

Analiza sekwencji sygnałnej *vacA* wskazywała na znamienne częstsze występowanie allelu s1a u pacjentów z chorobą wrzodową niż z zapaleniem śluzówki żołądka [6, 30, 32, 39, 71, 75, 84, 91]. Wydawało się, że oznaczanie genotypu *vacA* w szczepach *H. pylori* izolowanych od pacjentów może mieć ważne znaczenie praktyczne, pozwalające na określenie ryzyka rozwoju choroby wrzodowej i być może nowotworowej. Okazało się jednak, że krążące w różnych regionach geograficznych szczepy *H. pylori* różnią się genetycznie, a tym samym ocena ryzyka rozwoju choroby na podstawie genotypu *vacA*, jeśli w ogóle ma znaczenie, to jedynie ograniczone do lokalnej populacji.

2. Oddziaływania VacA z białkami gospodarza

Wykazano, że VacA oddziałuje z komórkami docelowymi, wiążąc się z takimi białkami powierzchniowymi, jak: receptor dla nabłonkowego czynnika wzrostu EGF czy receptor dla fosfatazy tyrozynowej RPTPβ [79, 94, 95]. W wiązaniu VacA do komórki zaangażowana jest podjednostka p55; ona również determinuje specyficzność komórkową cytotoksyny [22, 64]. Internalizacja VacA prowadzi do tworzenia w komórkach dużych wakuoli, powstających w wyniku masowego pęcznienia składników błonowych komórki, w późnych stadiach endocytozy [19, 22]. Badania nad wewnątrzkomórkową ekspresją *vacA* sugerowały, że tworzenie wakuoli jest konsekwencją oddziaływania podjednostki p33 (wraz ze 150-aminokwasowym fragmentem z N-końca podjednostki p55) z cytozolowymi białkami komórek gospodarza [21, 97].

Celem kolejnych badań stało się zatem poszukiwanie białek ludzkich wchodzących w bezpośrednie interakcje białko-białko z cytotoksyną VacA *H. pylori*. Zidentyfikowano białko RACK1, receptor dla aktywowanej kinazy białkowej C (PKC), jako oddziałujące z VacA w komórkach drożdży, w systemie dwu-hybrydowym [33]. W badaniach tych użyto fragmentów VacA do przeszukiwania biblioteki cDNA, uzyskanej z RNA izolowanego ze śluzówki żołądka pacjenta z objawową infekcją *H. pylori*. Fragment VacA-b1, wchodzący w interakcje z RACK1, obejmuje C-końcową część podjednostki p33 i 6 reszt aminokwasowych z podjednostki p55, a więc mieści się w obrębie minimalnego fragmentu VacA wykazującego działanie wakuolizujące wewnątrzkomórkowo (ryc. 1C) [21, 97]. Masa cząsteczkowa białka RACK1 wynosi 37-kDa i składa się ono z 317 aminokwasów, tworzących 7 powtórzeń zwanych motywami WD (Trp-Asp) [73]. Wykazano, że z białkiem VacA oddziałuje C-końcowy fragment RACK1, obejmujący powtórzenia WD5-WD7 [33].

RACK1 wiąże aktywną formę PKC β II i działa jako jej wewnątrzkomórkowy receptor [74]. Wiązanie to powoduje wzrost fosforylacji substratów PKC *in vivo*, prawdopodobnie przez stabilizowanie aktywnej formy kinazy [73]. Oprócz PKC, RACK1 wiąże szereg innych białek komórkowych, między innymi kinazę tyrozynową Src i podjednostkę β receptorów integrynowych [17, 47, 76]. Pokazano również, że po związaniu, RACK1 i PKC β II przemieszczają się razem do tej samej części komórki [74] oraz że różne białka mogą być jednocześnie wiązane z RACK1 [76]. Wydaje się więc, że to wielo-domenowe białko pełni funkcję białka wahadłowego (ang. *shuttle*), które doprowadza PKC w pobliże jej substratów, warunkując ich wydajniejszą fosforylację. Ponadto, RACK1 może służyć jako rodzaj platformy umożliwiającej kontakt i oddziaływanie pomiędzy białkami tworzącymi kompleksy sygnałne w komórce. Jak na razie, funkcjonalne znaczenie wiązania VacA z RACK1 nie jest znane. Jednakże, z racji pełnionej przez białko RACK1 funkcji w komórce, można spekulować, że stanowi ono centrum dla przekazywania sygnału uruchamianego w wyniku wewnątrzkomórkowego działania VacA.

W utrzymaniu spójności i integralności warstwy nabłonka zasadniczą rolę pełnią oddziaływania pomiędzy receptorami integrynowymi komórki i białkami adhezyjnymi macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), takimi jak laminina czy fibronektyna (FN) [24, 40]. FN wiąże się z integrynami głównie przez sekwencję zawierającą motyw RGD (Arg-Gly-Asp) [63]. Jej klasycznym receptorem jest integryna $\alpha_5\beta_1$. Aktywacja receptora integrynowego przez związanie z FN prowadzi do uruchomienia szlaków przekazywania sygnału w komórce, w których uczestniczą takie kinazy, jak: PKC, FAK (ang. *focal adhesion kinase*), Src i paksylina oraz Rho GTPaza [24, 44, 55]. Procesy te prowadzą do utworzenia kompleksów przylegania (ang. *focal adhesions*), polimeryzacji aktyny i przegrupowania cytoszkieletu aktynowego komórki.

Działanie VacA, wespół z innymi czynnikami wirulencji *H. pylori*, prowadzi do zniszczenia ciągłości i stabilności warstwy komórek nabłonka oraz narusza homeostazę śluzówki, zwiększając jej przepuszczalność, zmieniając potencjał błonowy, a także indukując apoptozę i odłączanie się komórek nabłonka od błony podstawnej [3, 22, 64, 66]. W konsekwencji dochodzi do przerwania bariery ochronnej, jaką stanowi nabłonek, i wyeksponowania białek ECM na bezpośredni kontakt z bakteriami.

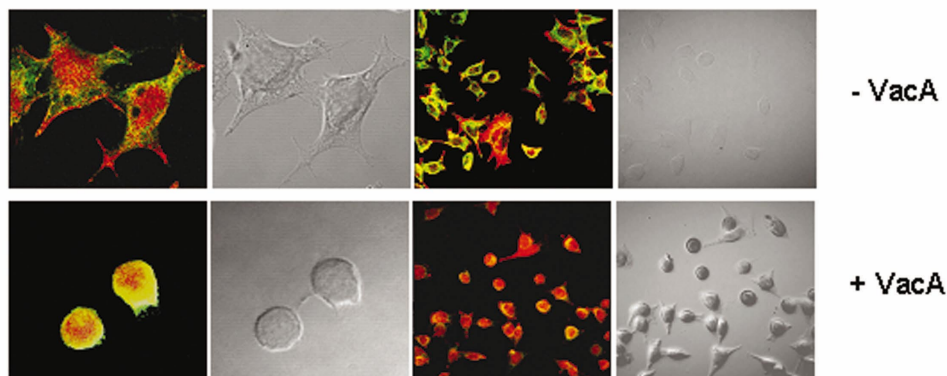
Wykazano, że VacA hamuje adhezję komórek HeLa do fibronektyny [34]. Cytotoksyna bezpośrednio wiąże się z FN *in vitro* [34], co w konsekwencji *in vivo* może prowadzić do ograniczenia dostępności FN dla receptorów integrynowych. Szereg patogenów bakteryjnych ma zdolność wiązania się z FN i wykorzystania jej interakcji z integryną $\alpha_5\beta_1$ do inwazji komórek gospodarza [77, 81]. Chociaż generalnie *H. pylori* uznawany jest za bakterię nieinwazyjną, wykazano, że z pewną wydajnością może wchodzić do komórek nabłonkowych żołądka i że proces ten jest zależny od podjednostki β_1 integryny oraz aktywności PKC [43, 67]. Zdolność do inwazji komórek nabłonka żołądka może mieć istotne znaczenie w patogenezie *H. pylori*, bowiem umożliwia ona bakteriom uniknięcie eliminacji przez układ immunologiczny gospodarza, co z kolei może skutkować ustanowieniem infekcji chronicznej. Wydaje się, że w procesie inwazji *H. pylori* uczestniczy VacA, jako że szczepy cytotoksyczne wykazują większe zdolności

inwazyjne i lepszą przeżywalność wewnątrz komórki niż szczepy nie mające tej aktywności [68, 77].

Polimeryzacja aktyny i reorganizacja cytoszkieletu komórki, zachodzące w wyniku stymulacji receptorów integrynowych, warunkują ruch i migrację komórek [10, 55]. Wykazano, że VacA hamuje tworzenie charakterystycznych wypustek błony komórkowej i lamelipodii, umożliwiających komórce poruszanie się, oraz prowadzi do zahamowania procesów polimeryzacji aktyny i tworzenia kompleksów przylegania (ryc. 3) [34]. Wyniki te sugerują, że działanie VacA, prowadzące do zahamowania reorganizacji cytoszkieletu i tworzenia wypustek komórkowych, może znacząco wpływać na procesy związane z odnową spójności uszkodzonego nabłonka czy zaleczaniem wrzodów, w których podstawową rolę pełni ruch komórki.

Jak dotąd, nie rozstrzygnięto jednoznacznie wpływu *H. pylori* na organizację cytoszkieletu zakażonych komórek. Podobnie jak w komórkach HeLa, VacA hamuje tworzenie włókien aktynowych również w komórkach Hep-2 i RGM1 [5, 60]. W innych badaniach, obserwowano co prawda wzrost liczby komórek o okrągłej morfologii i zaburzenia w organizacji ich cytoszkieletu, w obecności nadsączy hodowli *H. pylori*, jednakże efekt ten nie był wiązany z ekspresją *vacA* [11]. Natomiast w komórkach AGS zakażanych *H. pylori* stwierdzano indukcję polimeryzacji aktyny i tworzenia lamelipodii, niezależnie od cytotoksyczności zakażających szczepów [61, 86]. Wydaje się, że różnice w wynikach tych badań mogą być związane tak z użytą linią komórkową, szczepem *H. pylori*, jak i protokołem przeprowadzonych doświadczeń. Ważnym czynnikiem modyfikującym może być obecność surowicy cielejącej (FBS) w podłożu [61]. FBS oddziałuje z kompleksami sygnałnymi na brzegach komórki [42], może więc znacząco wpływać na wiązanie VacA z jej receptorami.

Ostatnio wykazano, że RACK1 jest ważnym czynnikiem regulującym organizację kompleksów przylegania oraz adhezję komórek do ECM, zależną od receptorów integrynowych [23, 36]. Nadprodukcja RACK1 prowadzi do zwiększenia ilości ognisk



RYCINA 3. Reorganizacja cytoszkieletu i zmiana morfologii komórek HeLa w obecności VacA ze szczepu *H. pylori* 60190. Podwójne barwienie immunologiczne i analiza pod mikroskopem konfokalnym; identyfikacja kompleksów przylegania paksyliną (zielony); barwienie filamentów aktynowych (czerwony)

przylegania, ilości włókien aktynowych, tworzenia wypustek komórkowych, a w konsekwencji do migracji komórek, czemu towarzyszy zwiększona fosforylacja FAK i paksyliny [36]. RACK1 lokalizuje się w tworzących się ogniskach przylegania w wypustkach komórkowych i reguluje adhezję i migrację komórek przez oddziaływanie z kinazą Src [20]. Do oddziaływania z VacA wystarczający jest fragment RACK1 obejmujący trzy C-końcowe motywy WD (WD5-WD7) tego białka [33]. Te same trzy motywy zaangażowane są w wiązanie domeny cytoplazmatycznej β podjednostki receptorów integrynowych [47], a w WD6 mapują się miejsca wiązania kinazy Src i PKC [17, 74]. Można więc spekulować, że oddziaływanie VacA z RACK1 będzie prowadziło do istotnych zaburzeń w adhezji komórek, tworzeniu ognisk przylegania i organizacji cytoszkieletu aktynowego.

Oprócz RACK1, w komórkach HeLa zidentyfikowano 54-kDa białko VIP54 jako potencjalnie oddziałujące z VacA w cytoplazmie [23]. Później okazało się, że VIP54 jest fragmentem 90-kDa białka WISH (ang. *WASP interacting SH3 protein*), wiążącego się z N-WASP (ang. *Wiskott-Aldrich syndrome protein*) przez swą domenę SH3 [14, 27]. WISH bierze udział w polimeryzacji aktyny oraz tworzeniu filopodii [22]. W komórce lokalizuje się w pobliżu połączeń międzykomórkowych w nabłonku, co może być istotne dla działania VacA w tym regionie zważywszy, że tak VacA, jak i CagA, inny czynnik wirulencji *H. pylori*, może prowadzić do dezintegracji kompleksów tworzących połączenia międzykomórkowe (ang. *tight junctions*) [3, 22], naruszając ciągłość warstwy nabłonkowej.

Adhezja komórek do FN indukuje rekrutację integryn β 1, kinaz FAK, PKC i Src oraz innych białek związanych z aktywacją integryn, do mikrodomen lipidowych w błonie komórkowej [44]. Uważa się, że mikrodomeny te służą jako rodzaj platform koordynujących przekazywanie sygnału od integryn do wnętrza komórki. Wykazano, że VacA wiąże się do mikrodomen lipidowych, co umożliwia jej internalizację do wnętrza komórki w procesie endocytozy [72]. Wydaje się więc, że VacA może wpływać na procesy przekazywania sygnału indukowanego przez aktywację receptorów integrynowych tak z zewnątrz, poprzez interakcję z fibronektyną, jak i z wnętrza komórki, oddziałując z białkami cytozolowymi, takimi jak RACK1 czy WISH. Działanie to prowadzi do zahamowania polimeryzacji aktyny i zmian w organizacji cytoszkieletu komórkowego. Można więc przypuszczać, że VacA będzie wpływać na funkcje komórki związane z jej cytoszkieletem, takie jak: ruch, migracja i proliferacja.

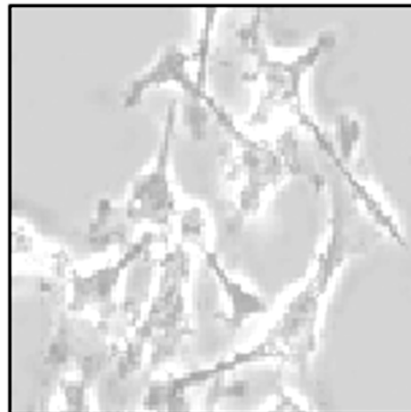
IMMUNODOMINUJĄCY ANTYGEN CagA

Początkowo aktywność VacA wiązano z występowaniem immunodominującego antygeny CagA (stąd też pochodzi jego nazwa; ang. *cytotoxin-associated antigen*) [18]. Obecnie wiadomo jednak, że chociaż występowanie obu białek jest wysoce skorelowane, ekspresja CagA nie jest konieczna dla indukcji wakuolizacji [90]. Gen *cagA* lokalizuje się w obrębie tzw. wyspy patogenności *cag* i służy m.in. jako marker obecności tego odcinka DNA, wielkości 35–40 tys. par zasad, w genomie *H. pylori*

[1, 16]. Pełna wyspa patogenności *cag* zawiera ok. 30 genów [16]. Oprócz CagA, kodowane są tu także inne białka związane ze zwiększoną wirulencją *H. pylori*. Wśród nich, białka odpowiedzialne za aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i pobudzanie komórek nabłonkowych do zwiększonego wydzielania interleukiny-8 (IL-8) oraz białka wchodzące w skład systemu sekrecji typu IV (SST4), biorącego udział w transporcie CagA do komórek gospodarza [1, 29, 59, 83]. Ostatnio wykazano, że obecność fragmentów peptydoglukanu *H. pylori* może prowadzić do aktywacji białka Nod1, będącego wewnątrzkomórkowym białkiem receptorowym, w sposób zależny od obecności wyspy patogenności *cag*. Indukcja białek NOD prowadzi do aktywacji NF- κ B i indukcji wydzielania IL-8. Przypuszcza się, że SST4 jest odpowiedzialny za transport także fragmentów peptydoglukanu do komórek gospodarza [92].

Zmienność CagA wiąże się z długością kodującego go genu. W zależności od szczepu *H. pylori*, masa białka CagA waha się od 128-kDa do 140-kDa. Różnice te wynikają z obecności różnej liczby powtórzeń 102 nukleotydów w regionie 3'-końca genu *cagA* [18]. W komórkach nabłonka CagA ulega fosforylacji przez kinazy tyrozynowe z rodziny Src [82]. Główny motyw fosforylacji, EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala), lokalizuje się w 3'-części genu oraz w obrębie powtórzeń [82]. Stąd, liczba motywów EPIYA w genie waha się od 1 do 5 kopii. Ufosforylowane CagA, poprzez motywy fosforylacji oddziałuje z fosfatazą tyrozynową SHP-2 (ang. *Src homology 2 domain containing*), prowadząc do jej aktywacji [37, 38]. Dochodzi do uruchomienia przekazywania sygnału w szlaku kinazy MAP (ang. *mitogen-activated protein kinase*), co prowadzi do nieprawidłowej proliferacji komórek nabłonkowych żołądka, przegrupowania cytoszkieletu aktynowego komórki i w konsekwencji pojawienia się charakterystycznych zmian jej morfologii (fenotyp 'hummingbird' – ryc. 4) [9, 52, 78, 82].

Przyjęto uważać obecność genu *cagA* w genomie *H. pylori* za marker zwiększonej wirulencji szczepu, czy to przez bezpośrednie działanie białka CagA, czy też pośrednio jako wyznacznik obecności wyspy patogenności *cag* [9, 57]. Wykazano wysoką korelację między obecnością zakażenia szczepem *H. pylori cagA*⁺ a chorobą wrzodową i rakiem żołądka [15, 30, 32, 39, 58, 65, 71, 75, 84]. Zależności tej nie obserwowano w populacji azjatyckiej, ze względu na niezwykle rzadkie w tym regionie występowanie szczepów *cagA*⁻ [45, 62]. Ostatnio wykazano, że *cagA* w szczepach izolowanych w Azji Wschodniej różni się sekwencją nukleotydów w obrębie powtórzeń od izolowanych w krajach Europy Zachodniej, Ameryki Północnej i Australii [96, 99]. Po ufosforylowaniu, CagA o sekwencji specyficznej dla szczepów z Azji Wschodniej silniej wiązało SHP-2. Ponadto, wśród CagA ze szczepów z krajów Zacho-



Fenotyp "hummingbird"

RYCINA 4. Zmieniona morfologia komórek HeLa w obecności szczepu *H. pylori* produkującego białko CagA (ang. *hummingbird phenotype*)

dnich, o sile wiązania z SHP-2 i stopniu indukowanych zmian morfologicznych decydowała liczba miejsc fosforylacji [8, 18]. Tak więc ostatecznie, to polimorfizm w obrębie miejsca fosforylacji *cagA*, decydujący o poziomie wiązania SHP-2, może okazać się ważnym czynnikiem determinującym kliniczną manifestację zakażeń różnymi szczepami *H. pylori*.

ADHEZYNA BabA

Jednym z czynników niezbędnych do zasiedlania błony śluzowej żołądka przez *H. pylori* jest zdolność do przylegania tej bakterii do komórek nabłonka. Przyleganie to wymaga z jednej strony obecności adhezyn na powierzchni komórki bakteryjnej, a z drugiej strony obecności swoistych receptorów, znajdujących się na powierzchni komórek gospodarza.

Antygen grupy krwi Lewis^b, obecny na powierzchni komórek nabłonkowych żołądka, jest jednym z receptorów komórkowych dla adhezyn *H. pylori* [41]. Zidentyfikowano dwa geny *H. pylori*: *babA* i *babB*, na podstawie podobieństwa produktów tych genów do białka wiążącego antygen Lewis^b [41]. Kodowane przez nie białka są niemal identyczne w swych N- i C-końcowych fragmentach, jednakże jedynie produkt genu *babA* jest niezbędny do wiązania Lewis^b [69]. Szczep *H. pylori* CCUG 17875 zawiera dwie kopie genu *babA*: *babA1* i *babA2* [41]. Funkcjonalnie aktywne białko BabA, o masie cząsteczkowej 78 kDa, kodowane jest przez gen *babA2*. Allel *babA1* różni się od *babA2* delecją 10 nukleotydów w obrębie sekwencji sygnałnej, która prowadzi do utraty kodonu inicjacji translacji [41]. Natomiast szczepy *H. pylori* 26695 i J99, których sekwencje nukleotydowe pełnych genomów zostały poznane, zawierają po jednej kopii *babA* [2, 88].

Wraz z BabB, BabA należy do rodziny białek powierzchniowych OMP (ang. *outer membrane proteins*), charakteryzujących się wysoką homologią N- i C-końcowych regionów oraz zmiennością w regionie centralnym [69]. Uważa się, że właśnie ten region decyduje o specyficzności w wiązaniu odpowiednich ligandów. Przy użyciu przeciwciał anti-BabA ScFv (ang. *single-chain fragment variable*) stwierdzono, że immunoreaktywne białko BabA produkowane jest przez blisko połowę szczepów *H. pylori* [35]. Szczepy te jednak, znacznie różnią się między sobą poziomem wiązania do antygeny Lewis^b *in vitro*. Jedną z hipotez tłumaczących te różnice zakłada zmienność sekwencji aminokwasowej BabA w regionie uczestniczącym w wiązaniu Lewis^b. Zgodnie z oczekiwaniami, wykazano obecność wielu polimorfizmów, głównie w regionie kodującym centralną część białka [35]. Jak dotąd jednak, nie udało się określić regionów białka odpowiedzialnych za aktywność adhezyjną BabA.

Obecność *babA2* jest silnie związana z obecnością *cagA* i allelu *s1m1* genu *vacA* w szczepie [28, 35, 98]. Wykazano, że geny te działają synergistycznie [98], a zakażenie tzw. „potrójnie-pozytywnym” szczepem *H. pylori* (*babA2/cagA⁺/vacA s1*) istotnie koreluje z wystąpieniem choroby wrzodowej dwunastnicy oraz raka żołądka [28]. Przypuszcza się, że dokładniejsze przyleganie bakterii do komórek nabłonka umożliwia

ich kolonizację z większą gęstością, a tym samym w większym stopniu naraża komórki na bezpośrednie działanie czynników wirulencji *H. pylori* [70, 80].

PODSUMOWANIE

Podsumowując dotychczasowy stan badań nad wirulencją *H. pylori* niewątpliwie można stwierdzić, że ryzyko rozwoju poważniejszych schorzeń górnego odcinka przewodu pokarmowego, towarzyszących zakażeniu *H. pylori*, rośnie wraz z liczbą czynników wirulencji akumulowanych w zakażającym szczepie. Brak uniwersalnego genotypu bakterii, który byłby związany z daną manifestacją kliniczną infekcji, można częściowo tłumaczyć obecnością mieszanych zakażeń, czyli jednoczesnej kolonizacji kilkoma szczepami *H. pylori*. W populacjach o wysokiej częstości zakażenia zjawisko to może dotyczyć nawet 70% zakażonych [25, 31, 32, 53]. Ponadto, *H. pylori* nieustannie zmienia swój genom w procesie adaptacji do warunków gospodarza [4, 7]. Szczególnie duże znaczenie przypisuje się obecnie indywidualnej zdolności gospodarza do odpowiedzi na infekcję. Tak więc, dla zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw zróżnicowanej klinicznej manifestacji zakażenia, począwszy od zapalenia śluzówki, poprzez chorobę wrzodową do raka żołądka, konieczne stało się prowadzenie badań nad zależnościami między *H. pylori* i komórką nabłonkową, na poziomie molekularnym.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AKOPYANTS NS, CLIFTON SW, KERSULYTE D, CRABTREE JE, YOUREE BE, REECE A, BUKANOV NO, DRAZEK ES, ROE BA, BERG DE. Analysis of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 1998; **28**: 37–53.
- [2] ALM RA, LING LS, MOIR DT, KING BL, BROWN ED, DOIG PC, SMITH DR, NOONAN B, GUILD BC, DE JONGE BL, CARMEL G, TUMMINO PJ, CARUSO A, URIA-NICKELSEN M, MILLS DM, IVES C, GIBSON R, MERBERG D, MILLS SD, JIANG Q, TAYLOR DE, VOVIS GF, TRUST TJ. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; **397**: 176–180.
- [3] 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.
- [4] ARAS RA, LEE Y, KIM S-K, ISRAEL D, PEEK RM, BLASER MJ. Natural variation in populations of persistently colonizing bacteria affect human host cell phenotype. *J Infect Dis* 2003; **188**: 486–498.
- [5] ASHRON M, CANTET F, MAYO K, MEGRAUD F. Cytoskeletal rearrangements induced by *Helicobacter pylori* strains in epithelial cell culture: possible role of the cytotoxin. *Dig Dis Sci* 2000; **45**: 1774–1780.
- [6] ATHERTON JC, CAO P, PEEK RM, TUMMURU MKR, BLASER M, COVER TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1995; **270**: 17771–17777.
- [7] AVILES-JIMENEZ F, LETLEY DP, GONZALEZ-VALENCIA G, SALAMA N, TORRES J, ATHERTON JC. Evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in a human stomach. *J Bacteriol* 2004; **186**: 5182–5185.
- [8] AZUMA T. *Helicobacter pylori* CagA protein variation associated with gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol* 2004; **39**: 97–103.

- [9] BACKERT S, SCHWARZ T, MIEHLKE S, KIRSCH C, SOMMER C, KWOK T, GERHARD M, GOEBEL UB, LEHN N, KOENIG W, MEYER TF. Functional analysis of the *cag* pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *Infect Immun* 2004; **72**: 1043–1056.
- [10] BALLESTREM C, WEHRLE-HALLER B, HINZ B, IMHOF BA. Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-direct cell migration. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 2999–3012.
- [11] BEBB JR, LETLEY DP, RHEAD JL, ATHERTON JC. *Helicobacter pylori* supernatants cause epithelial cytoskeletal disruption that is bacterial strain and epithelial cell line dependent but not toxin VacA dependent. *Infect Immun* 2003; **71**: 3623–3627.
- [12] BLASER MJ, BERG DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 2001; **107**: 767–773.
- [13] BLASER M, ATHERTON JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004; **113**: 321–333.
- [14] BOQUET P, RICCI V, GALMICHE A, GAUTHIER NC. Gastric cell apoptosis and *H. pylori*: has the main function of VacA finally been identified? *Trends Microbiol* 2003; **11**: 410–413.
- [15] BRITO CA, SILVA LM, JUCA N, LEAL NC, de SOUZA W, QUEIROZ D, CORDOBA F, SILVA NL. Prevalence of *cagA* and *vacA* genes in isolates from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastrointestinal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Gru* 2003; **98**: 817–821.
- [16] CENSINI S, LANGE C, XIANG Z, CRABTREE JE, GHIARA P, BORODOVSKY M, RAPPUOLI R, COVACCI A. *Cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type 1-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 14648–14653.
- [17] CHANG BY, CHIANG M, CARTWRIGHT CA. The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1. *J Biol Chem* 2001; **276**: 20346–20356.
- [18] COVACCI A, CENSINI S, BUGNOLI M, PETRACCA R, BURRONI D, MACCHIA G, MASSONE A, PAPINI E, XIANG Z, FIGURA N, RAPPUOLI R. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 5791–5795.
- [19] COVER TL, BLANKE SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature Rev Microbiol* 2005; **3**: 320–332.
- [20] COX EA, BENNIN D, DOAN AT, O'TOOLE T, HUTTENLOCHER A. RACK1 regulates integrin-mediated adhesion, protrusion, and chemotactic cell migration via its Src-binding site. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 658–669.
- [21] de BERNARD M, BURRONI D, PAPINI E, RAPPUOLI R, TELFORD J, MONTECUCCO C. Identification of the *Helicobacter pylori* VacA toxin domain active in the cell cytosol. *Infect Immun* 1998; **66**: 6014–6016.
- [22] de BERNARD M, CAPPON A, DEL GIUDICE G, RAPPUOLI R, MONTECUCCO C. The multiple cellular activities of the VacA cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2004; **293**: 589–597.
- [23] de BERNARD M, MOSCHIONI M, NAPOLITANI G, RAPPUOLI R, MONTECUCCO C. The VacA toxin of *Helicobacter pylori* identifies a new intermediate filament-interacting protein. *EMBO J* 2000; **19**: 48–56.
- [24] DEFILIPPI P, OLIVO C, VENTURINO M, DOLCE L, SILENGO L, TARONE G. Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. *Microsc Res Tech* 1999; **47**: 67–78.
- [25] FIGUEIREDO C, VAN DOORN, NOGUEIRA LJ, SOARES JM, PINHO C, FIGUEIRA P. *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. *Scand J Gastroenterol* 2001; **36**: 128–135.
- [26] FORSYTH MH, ATHERTON JC, BLASER MJ. Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun* 1998; **66**: 3088–3094.
- [27] FUKUOKA M, SUETSUGU S, MIKI H, FUKAMI K, ENDO T, TAKENAWA T. A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42. *J Cell Biol* 2001; **152**: 471–482.
- [28] GERHARD M, LEHN N, NEUMAYER N, BOREN T, RAD R, SCHEPP W, MIEHLKE S, CLASSEN M, PRINZ C. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 12778–12783.

- [29] GLOCKER E, LANGE C, COVACCI A, BERESWILL S, KIST M, PAHL HL. Proteins encoded by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF- κ B activation. *Infect Immun* 1998; **66**: 2346–2348.
- [30] GONZALES CA, PENA S, CAPELLA G. Clinical usefulness of virulence factors of *Helicobacter pylori* as predictors of the outcome of infection. What is the evidence? *Scand J Gastroenterol* 2003; **9**: 905–915.
- [31] GONZALES-VALENCIA G, ATHERTON JC, MUNOZ O, DEHASA M, MADRANA DE LA GARZA A, TORRES J. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in Mexican adults and children. *J Infect* 2000; **182**: 1450–1454.
- [32] HENNIG E, TRZECIAK L, REGUŁA J, BUTRUK E, OSTROWSKI J. *VacA* genotyping directly from gastric biopsies and estimation of mixed *Helicobacter pylori* infections in patients with duodenal ulcer and gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1999; **34**: 743–749.
- [33] HENNIG EE, BUTRUK E, OSTROWSKI J. RACK1 protein interacts with *Helicobacter pylori* *VacA* cytotoxin – the yeast two-hybrid approach. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **289**: 103–110.
- [34] HENNIG EE, GODLEWSKI MM, BUTRUK E, OSTROWSKI J. *Helicobacter pylori* *VacA* cytotoxin interacts with fibronectin and alters HeLa cell adhesion and cytoskeletal organization *in vitro*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; **44**: 143–150.
- [35] HENNIG EE, MERNAUGH R, EDL J, CAO P, COVER TL. Heterogeneity among *Helicobacter pylori* strains in expression of the outer membrane protein BabA. *Infect Immun* 2004; **72**: 3429–3435.
- [36] HERMANTO U, ZONG CS, LI W, WANG L-H. RACK1, an insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor-interacting protein, modulates IGF-I-dependent integrin signaling and promotes cell spreading and contact with extracellular matrix. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 2345–2365.
- [37] HIGASHI H, NAGAYA A, TSUTSUMI R, YOKOYAMA K, FUJII Y, ISHIKAWA S, HIGUCHI M, TAKAHASHI A, KURASHIMA Y, TEISHIKATA Y, TANAKA S, AZUMA T, HATAKEYAMA M. *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J Biol Chem* 2004; **279**: 17205–17216.
- [38] HIGASHI H, TSUTSUMI R, MUTO S, SUGIYAMA T, AZUMA T, ASAKA M, HATAKEYAMA M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 2002; **295**: 683–686.
- [39] HOCKER M, HOHENBERGER P. *Helicobacter pylori* virulence factors—one part of a big picture. *Lancet* 2003; **362**: 1231–1233.
- [40] HYNES RO. Integrins: bidirectional allosteric signaling machines. *Cell* 2002; **110**: 673–687.
- [41] ILVER D, ARNQVIST A, OGREN J, FRICK I-M, KERSULYTE D, INCECIK ET, BERG DE, COVACCI A, ENGSTRAND L, BOREN T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998; **279**: 373–377.
- [42] KIMURA T, WADA A, NAKAYAMA M, OGUSHI K-I, NISHI Y, DE GUZMAN BB, MOSS J, HIRAYAMA T. High molecular weight factor in FCS inhibits *Helicobacter pylori* *VacA*-binding to its receptor, RPTP β , on AZ-521. *Microbiol Immunol* 2003; **47**: 105–107.
- [43] KWOK T, BACKERT S, SCHWARZ H, BERGER J, MEYER TF. Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism. *Infect Immun* 2002; **70**: 2108–2120.
- [44] LACALLE RA, MIRA E, GOMEZ-MOUTON C, JIMENEZ-BARANDA S, MARTINEZ AC, MANES S. Specific SHP-2 partitioning in raft domains triggers integrin-mediated signaling via Rho activation. *J Cell Biol* 2002; **157**: 277–289.
- [45] LAI C-H, KUO C-H, CHEN Y-C, CHAO F-Y, POON S-K, CHANG C-S, WANG W-C. High prevalence of *cagA*- and *babA2*-positive *Helicobacter pylori* clinical isolates in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 3860–3862.
- [46] LETLEY DP, ATHERTON JC. Natural diversity in the N-terminus of the mature vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* determines cytotoxin activity. *J Bacteriol* 2000; **182**: 3278–3280.
- [47] LILIENTAL J, CHANG, DD. Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin β subunit. *J Biol Chem* 1998; **273**: 2379–2383.
- [48] ŁASZEWICZ W. Wyniki badań nad zakażeniem *Helicobacter pylori* (materiały wdrożeniowe). W: Koźłowska-Świątkowska E [red.]. Białystok, *Trans Humana* 2004.
- [49] MATYSIAK-BUDNIK T, KNAPIK Z, MEGRAUD F, LUBCZYŃSKA-KOWALSKA W, GOŚCINIAK G, BOUCHARD S, PRZONDO-MORDARSKA A, PONIEWIERKA E, HELEMEJKO M, KLEMPOUS J. *Helicobacter pylori* infection in Eastern Europe. Seroprevalence in the Polish population of Lower Silesia. *Am J Gastroenterol* 1996; **91**: 2513–2515.

- [50] McCLAIN MS, SCHRAW W, RICCI V, BOQUET P, COVER TL. Acid activation of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 2000; **37**: 433–442.
- [51] MEGRAUD F. Impact of *Helicobacter pylori* virulence on the outcome of gastroduodenal diseases: lessons from the microbiologist. *Dig Dis* 2001; **19**: 99–103.
- [52] MeYER-TER-VEHN T, COVACCI A, KIST M, PAHL HL. *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes *c-fos* and *c-jun*. *J Biol Chem* 2000; **275**: 16064–16072.
- [53] MOMYNALIEV K, SMIRNOVA O, KUDRYAVTSEVA L, GOVORUM V. *Helicobacter pylori* genotypes in Russia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; **22**: 573–574.
- [54] MONTECUCCO C, RAPPUOLI R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 457–466.
- [55] MOSTAFAVI-POUR Z, ASKARI JA, PARKINSON SJ, PARKER PJ, Ng TTC, HUMPHRIES MJ. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J Cell Biol* 2003; **161**: 155–167.
- [56] NGUYEN VQ, CAPRIOLI RM, COVER TL. Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect Immun* 2001; **69**: 543–546.
- [57] NILSSON C, SILLEN A, ERIKSSON L, STRAND ML, ENROTH H, NORMARK S, FALK P, ENGSTRAND L. Correlation between *cag* pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. *Infect Immun* 2003; **71**: 6573–6581.
- [58] NOMURA AM, PEREZ-PEREZ GI, LEE J, STEMMERMAN G, BLASER MJ. Relationship between *H. pylori cagA* status and risk of peptic ulcer disease. *Am J Epidemiol* 2002; **155**: 1054–1059.
- [59] ODENBREIT S, PULS J, SEDLMAIER B, GERLAND E, FISCHER W, HAAS R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000; **287**: 1497–1500.
- [60] PAI R, COVER TL, TARNAWSKI AS. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) disorganizes the cytoskeletal architecture of gastric epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **262**: 245–250.
- [61] PALOVUORI R, PERTTU A, YAN Y, KARTTUNEN R, ESKELINEN S, KARTTUNEN TJ. *Helicobacter pylori* induces formation of stress fibers and membrane ruffles in AGS cells by rac activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **269**: 247–253.
- [62] PAN ZJ, van der HULST RWM, FELLER M, XIAO SD, TYTGAT GNJ, DANKERT J, van der ENDE A. Equally high prevalences of infection with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 1344–1347.
- [63] PANKOV R, YAMADA KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 2002; **115**: 3861–3863.
- [64] PAPINI E, ZORATTI M, COVER TL. In search of the *Helicobacter pylori* VacA mechanism of action. *Toxicin* 2001; **39**: 1757–1767.
- [65] PARK CY, KWAK M, GUTIERREZ O, GRAHAM DY, YAMAOKA Y. Comparison of genotyping *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens and genotyping from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 3336–3338.
- [66] PEEK RM. Intoxicated cells and stomach ulcers. *Nature Genetics* 2003; **33**: 328–330.
- [67] PETERSEN AM, KROGFELT KA. *Helicobacter pylori*: an invading microorganism? A review. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; **36**: 117–126.
- [68] PETERSEN AM, SORENSEN K, BLOM J, KROGFELT KA. Reduced intracellular survival of *Helicobacter pylori vacA* mutants in comparison with their wild-types indicates the role of VacA in pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; **30**: 103–108.
- [69] PRIDE DT, MEINERSMANN RJ, BLASER MJ. Allelic variation within *Helicobacter pylori babA* and *babB*. *Infect Immun* 2001; **69**: 1160–1171.
- [70] RAD R, GERHARD M, LANG R, SCHONIGER M, ROSCH T, SCHEPP W, BECKER I, WAGNER H, PRINZ C. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol* 2002; **168**: 3033–3041.
- [71] REGUŁA J, HENNIG E, BURZYKOWSKI T, ORŁOWSKA J, PRZYTULSKI K, DZIURKOWSKA-MAREK A, MAREK T, LEWANDOWSKA M, NOWAK A, BUTRUK E, OSTROWSKI J. Multivariate analysis of risk factors for development of duodenal ulcer in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Digestion* 2003; **67**: 25–31.

- [72] RICCI V, GALMICHE A, DOYE A, NECCHI V, SOLCIA E, BOQUET P. High cell sensitivity to *Helicobacter pylori* VacA toxin depends on a GPI-anchored protein and is not blocked by inhibition of the clathrin-mediated pathway of endocytosis. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 3897–3909.
- [73] RON D, CHEN C-H, CALDWELL J, JAMIESON L, ORR E, MOCHLY-ROSEN D. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the β subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 839–843.
- [74] RON D, JIANG Z, YAO L, VAGTS A, DIAMOND I, GORDON A. Coordinated movement of RACK1 with activated β IPKC. *J Biol Chem* 1999; **274**: 27039–27046.
- [75] SARIBASAK H, SALIH BA, YAMAOKA Y, SANDER E. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 1648–1651.
- [76] SCHECHTMAN D, MOCHLY-ROSEN D. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene* 2001; **20**: 6339–6347.
- [77] SCHWARZ-LINEK U, WERNER JM, PICKFORD AR, GURUSIDDAPPA S, KIM JH, PILKA ES, BRIGGS JAG, GOUGH TS, HOOK M, CAMPEL ID, POTTS JR. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem β -zipper. *Nature* 2003; **423**: 177–181.
- [78] 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* 2002; **22**: 515–528.
- [79] SETO K, HAYASHI-KUWABARA Y, YONETA T, SUDA H, TAMAKI H. Vacuolation induced by cytotoxin from *Helicobacter pylori* is mediated by the EGF receptor in HeLa cells. *FEBS Lett* 1998; **431**: 347–350.
- [80] SHEU B-S, SHEU S-M, YANG H-B, HUANG A-H, WU J-J. Host gastric expression determines the bacterial density of *Helicobacter pylori* in *babA2* genopositive infection. *Gut* 2003; **52**: 927–932.
- [81] STEBBINS CE, GALAN JE. Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* 2001; **412**: 701–705.
- [82] STEIN M, BAGNOLI F, HALENBECK R, RAPPUOLI R, FANTI WJ, COVACCI A. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* 2002; **43**: 971–980.
- [83] STEIN M, RAPPUOLI R, COVACCI A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after *cag*-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 1263–1268.
- [84] STEPHENS JC, STEWART JA, FOLWELL AM, RATHBONE B. *Helicobacter pylori cagA* status, *vacA* genotypes and ulcer disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; **10**: 381–384.
- [85] STOICOV C, SAFFARI R, CAI X, HASYAGAR C, HOUGHTON JM. Molecular biology of gastric cancer: *Helicobacter* infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. *Gene* 2004; **341**: 1–17.
- [86] SU B, CEPONIS JM, SHERMAN PM. Cytoskeletal rearrangements in gastric epithelial cells in response to *Helicobacter pylori* infection. *J Med Microbiol* 2003; **52**: 861–867.
- [87] SZABO I, BRUTSCHE S, TOMBOLA F, MOSCHIONI M, SATIN B, TELFORD JL, RAPPUOLI R, MONTECUCCO C, PAPINI E, ZORATTI M. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J* 1999; **18**: 5517–5527.
- [88] TOMB J-F, WHITE O, KERLAVAGE AR, CLAYTON RA, SUTTON GG, FLEISCHMANN RD, KETCHUM KA, KLENK HP, GILL S, DOUGHERTY BA, NELSON K, QUACKENBUSH J, ZHOU L, KIRKNESS EF, PETERSON S, LOFTUS B, RICHARDSON D, DODSON R, KHALAK HG, GLODEK A, MCKENNEY K, FITZGERALD LM, LEE N, ADAMS MD, HICKEY EK, BERG DE, GOCAYNE JD, UTTERBACK TR, PETERSON JD, KELLEY JM, COTTON MD, WEIDMAN JM, FUJII C, BOWMAN C, WATTHEY L, WALLIN E, HAYES WS, BORODOVSKY M, KARP PD, SMITH HO, FRASER CM, VENTER JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; **388**: 539–547.
- [89] TORRES VJ, MCCLAIN MS, COVER TL. Interactions between p-33 and p-55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA). *J Biol Chem* 2004; **279**: 2324–2331.
- [90] TUMMURU MKR, COVER TL, BLASER MJ. Mutation of the cytotoxin-associated *cagA* gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994; **62**: 2609–2613.
- [91] van DOORN LJ, FIGUEIREDO C, SANNA R, PENA S, MIDOLO P, NG EK, ATHERTON JC, BLASER MJ, QUINT W. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 2597–2603.

- [92] VIALA J, CHAPUT C, BONECA IG, CARDONA A, GIRARDIN SE, MORAN AP, ATHMAN R, MEMET S, HUERRE MR, COYLE AJ, DISTEFANO PS, SANSONETTI PJ, LABIGNE A, BERTIN J, PHILPOTT DJ, FERRERO RL. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004; **5**: 1166–1174.
- [93] WARREN JR, MARSHALL BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; **1**: 1273–1275.
- [94] YAHIRO K, NIIDOME T, HATAKEYAMA T, AOYAGI H, KURAZONO H, PADILLA PI, WADA A, HIRAYAMA T. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin binds to the 140-kDa protein in human gastric cancer cell lines, AZ-521 and AGS. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **238**: 629–632.
- [95] YAHIRO K, NIIDOME T, KIMURA M, HATAKEYAMA T, AOYAGI H, KURAZONO H, IMAGAWA KI, WADA A, MOSS J, HIRAYAMA T. Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase β . *J Biol Chem* 1999; **274**: 36693–36699.
- [96] YAMAOKA Y, KODAMA T, KASHIMA K, GRAHAM DY, SEPULVEDA AR. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 2258–2263.
- [97] YE D, WILLHITE DC, BLANKE SR. Identification of the minimal intracellular vacuolating domain of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Biol Chem* 1999; **274**: 9277–9282.
- [98] ZAMBON C-F, NOVAGLIA F, BASSO D, RUGGE M, PLEBANI M. *Helicobacter pylori* *babA2*, *cagA*, and *s1 vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J Clin Pathol* 2003; **56**: 287–291.
- [99] ZHOU J, ZHANG J, XU C, HE L. *cagA* genotype and variants in Chinese *Helicobacter pylori* strains and relationships to gastroduodenal diseases. *J Med Microbiol* 2004; **53**: 231–235.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 30.01.2006 r.

Przyjęto: 22.02.2006 r.

2-781 Warszawa, ul. Roentgena 5

e-mail: hennige@coi.waw.pl