

Urszula Kuklińska¹, Anna Maria Łasica¹, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka^{1*}

¹Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego,
02-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1

Wpłynęło w styczniu 2011 r.

1. Wstęp. 1.1. Historia odkrycia *Helicobacter pylori*. 1.2. Infekcje *H. pylori* – epidemiologia, objawy chorobowe. 1.3. Główne czynniki wirulencji *H. pylori*. 2. CagA – jako czynnik wirulencji. 2.1. Charakterystyka CagA. 2.2. Polimorfizm CagA. 2.3. IV typ sekrecji *H. pylori*. 2.4. Fosforylacja CagA. 2.5. Multimeryzacja CagA. 3. Działanie CagA – droga fosforylacyjno-zależna. 3.1. Interakcja z SHP-2. 3.2. Interakcje z kinazami obecnymi w komórce gospodarza. 4. Działanie CagA – droga fosforylacyjno-niezależna. 4.1. Zaburzenia ścisłych powiązań międzykomórkowych oraz ich polarności. 4.2. Destabilizacja kompleksu E-kadheryna/ β -kateina. 4.3. Deregulacja czynników transkrypcyjnych. 5. CagA – bakteryjna onkoproteina – doświadczenia z wykorzystaniem transgenicznymy myszy. 6. Podsumowanie

***Helicobacter pylori* CagA protein – the first identified bacterial oncoprotein**

Abstract: *Helicobacter pylori* is a gramnegative spiral-shaped ϵ -Proteobacterium, which colonizes the gastric mucosa of humans. Infections caused by *H. pylori* are associated with different symptoms ranging from mild gastritis to ulcers. CagA is a highly immunogenic, polymorphic protein and the main *H. pylori* virulence factor. Infection with cagA-positive *H. pylori* is associated with the risk of development of gastric adenocarcinoma. CagA injected into eukaryotic cells by the type IV transport system apparatus interacts with various host proteins influencing many signal-transduction pathways in a phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent manner. These interactions result in the perturbations of cell morphology, proliferation, differentiation and spreading. All these interactions influence the process of carcinogenesis. Recently conducted experiments on transgenic mice producing CagA documented that CagA is a bacterial oncoprotein. The presented review summarizes the recent achievements concerning the details of CagA interaction with host proteins.

1. Introduction. 1.1. Discovery of *Helicobacter pylori*. 1.2. Epidemiology and disease symptoms. 1.3. Main *H. pylori* virulence factors. 2. CagA as a virulence factor. 2.1. Main CagA features. 2.2. CagA polymorphism. 2.3. *H. pylori* type four secretion system. 2.4. CagA phosphorylation. 2.5. CagA multimerization. 3. CagA phosphorylation-dependent activity. 3.1. Interaction with SHP-2. 3.2. Interaction with cellular kinases. 4. CagA phosphorylation-independent activity. 4.1. Disturbances of cellular tight junctions and cell polarity. 4.2. Destabilisation of E-cadherin/ β -catenin system. 4.4. Deregulation of transcription factor activities. 5. CagA – bacterial oncoproteins – experiments using transgenic mice. 6. Summary

Słowa kluczowe: *Helicobacter pylori* nowotwór żołądka, CagA, onkoproteina, cag-PAI, IV typ sekrecji

Key words: *Helicobacter pylori*, stomach cancer, CagA, oncoprotein, cag-PAI, T4SS (type four secretion system)

1. Wstęp

1.1. Historia odkrycia *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori to Gram-ujemna, mikroaerofilna pałeczka należąca do klasy *Epsilonproteobacteria*, z rzędu *Campylobacteriales* o helikalnym kształcie i długości około 3 μ m. Mikroorganizmy kolonizują powierzchnię komórek nabłonka żołądka. Pierwszym naukowcem który opisał ten mikroorganizm był Włoch Giulio Bizzozero. Zidentyfikował on bakterie o helikalnym kształcie obecne w żołądku psa (1893 rok). W 1899 roku bakterie zostały ponownie zauważone przez Walerego Jaworskiego z Uniwersytetu Jagiellońskiego, który jako pierwszy zasugerował, że mogą one powodować schorzenia górnego odcinka przewodu pokarmowego. Początkowo bakteria otrzymała nazwę

Campylobacter pylori, ze względu na bardzo duże podobieństwo morfologiczne do przedstawicieli rzędu *Campylobacteriales*, ale po zsekwencjonowaniu 16 sRNA w 1989 roku okazało się, że nie należy do tego rzędu i otrzymała nazwę *Helicobacter pylori* [48].

H. pylori został dokładnie scharakteryzowany przez australijskich naukowców: B.J. Marshalla i J.R. Warrena w 1982 roku, którzy wykazali bezpośredni związek między infekcją *H. pylori*, a rozwojem stanu zapalnego błony śluzowej żołądka. Za to odkrycie zostali uhonorowani nagrodą Nobla w 2005 roku w dziedzinie medycyny.

Zakażenie *H. pylori* jest powszechne na całym świecie. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO – World Health Organization) 80% populacji ludzkiej w krajach rozwijających się i 20–50% w krajach rozwiniętych jest zakażona tą bakterią. Rozbieżność

* Adres korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Wydział Biologii, UW; ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

między krajami rozwijającymi się, a rozwiniętymi jest prawdopodobnie spowodowana gorszymi warunkami sanitarnymi w krajach rozwijających się. Według Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii w Polsce zakażone jest 70% społeczeństwa [16]. Zakażenie następuje zazwyczaj na drodze pokarmowej: oralno-oralnej lub fekalno-oralnej. Do infekcji dochodzi najczęściej u dzieci przed 10 rokiem życia, źródłem zakażenia są przeważnie członkowie najbliższej rodziny. Bakteria jest często obecna w układzie pokarmowym do końca życia człowieka, jednak opisano przypadki, w których u dzieci doszło o samoistnego wyleczenia [23].

1.2. Infekcje *H. pylori* – epidemiologia, objawy chorobowe

Zakażenia *H. pylori* najczęściej przebiegają bezobjawowo. Tylko u 10–20% zakażonych osób dochodzi do rozwinięcia objawów chorobowych. Objawem klinicznym infekcji jest zapalenie błony śluzowej. Znane są trzy fenotypy stanów zapalnych jelit: fenotyp łagodnego zapalenia błony śluzowej żołądka, fenotyp wrzodowy i fenotyp raka. Zmianom zapalnym może towarzyszyć atrofia i metaplasja jelitowa oraz spadek wydzielania soku żołądkowego, co w konsekwencji może prowadzić do choroby wrzodowej żołądka i nowotworu tkanki nabłonkowej żołądka. Rozwój chłoniaka MALT (mucosa associated lymphatic tissue) nowotworu tkanki limfatycznej związanej z układem pokarmowym może być zaindukowany długotrwałą stymulacją układu immunologicznego przez ten mikroorganizm. Infekcja *H. pylori* może także skutkować rozwojem choroby wrzodowej dwunastnicy. Ciekawe jest to, że fenotyp wrzodowy i rak żołądka nawzajem się wykluczają, rak żołądka nigdy nie występuje u pacjentów z objawami choroby wrzodowej dwunastnicy. Występowanie wymienionych wyżej objawów chorobowych w populacji jest silnie skorelowane z obecnością *H. pylori* w organizmie. 95% przypadków choroby wrzodowej dwunastnicy i 85% choroby wrzodowej żołądka jest związane z zakażeniem. Z drugiej strony tylko 10–12% pacjentów zainfekowanych *H. pylori* cierpi na chorobę wrzodową żołądka, a u 1–2% dochodzi do rozwoju choroby nowotworowej, reszta przypadków infekcji przebiega łagodnie bądź asymptomatycznie. Światowa Organizacja Zdrowia zaliczyła *H. pylori* do klasy 1 karcynogenów. Różnorodność objawów chorobowych będących skutkiem infekcji *H. pylori* zależy zarówno od genotypu patogenu jak i genotypu organizmu gospodarza, które warunkują przebieg oddziaływań pomiędzy dwoma organizmami [41].

Eradykacja *H. pylori* skutkuje znaczącym obniżeniem ryzyka rozwoju raka żołądka, lecz terapia może być stosowana tylko w uzasadnionych przypadkach. Polskie Towarzystwo Gastroenterologiczne podaje dokładne

wskazania do leczenia infekcji. W wytycznych PTG znalazło się stwierdzenie, że u osób bez objawów klinicznych (i bez czynników ryzyka raka żołądka) nie ma wskazań do leczenia przeciwbakteryjnego [16].

1.3. Główne czynniki wirulencji *H. pylori*

H. pylori produkuje wiele czynników wirulencji – białek umożliwiających bakterii przetrwanie w kwaśnym środowisku żołądka, adhezję do komórek gospodarza, modulowanie przemian metabolicznych komórek gospodarza oraz przezwyciężenie obronnych mechanizmów układu immunologicznego. Ich działanie umożliwia ustanowienie chronicznej, trwającej całe życie człowieka infekcji. Istotnym czynnikiem wirulencji *H. pylori* jest wakuolizująca cytotoksyna VacA. Aktywność tego białka hamuje proliferację komórek epitelium, indukuje zmiany w cytoskieletcie komórek oraz indukuje proces apoptozy poprzez stymulację uwalniania cytochromu c z mitochondriów. Dodatkowo białko wpływa na poziom odpowiedzi immunologicznej: hamuje proliferację limfocytów T, blokuje proces fagocytozy, blokuje prezentację antygenów limfocytom T oraz obniża efektywność działania limfocytów Th co skutkuje niezbyt wysokim poziomem odpowiedzi immunologicznej organizmu. VacA wpływa także na rozluźnienie ścisłych połączenia międzykomórkowych komórek nabłonkowych żołądka [12]. Innym czynnikiem wirulencji jest ureaza, która rozkładając mocznik do amoniaku i dwutlenku węgla powoduje alkalizację kwasowego środowiska żołądka. Rozmieszczone biegunowo rzęski umożliwiają ruch i przemieszczanie komórek patogenu do warstwy podśluzowej w żołądku. Wytwarzane enzymy będące antyoksydantami takie jak katalaza, czy dysmutaza ponadtlenkowa neutralizujące wolne rodniki pozwalając mikroorganizmowi przezwyciężyć antybakteryjne działanie neutrofilii [46, 73].

W genomie *H. pylori* występuje obszar DNA nabyty drogą horyzontalnego transferu – wyspa patogenności cag-PAI długości około 40 kbp. Cag-PAI zawiera około 40 genów i podzielona jest na dwa segmenty: I i II. Pomiędzy dwoma segmentami występuje nukleotydowa sekwencja insercyjna IS605 [7]. Analiza transkryptomu komórek gospodarza (linia komórkowa T84) po infekcji *H. pylori* udokumentowała zmianę poziomu ekspresji 670 genów zainfekowanych komórek nabłonka, z czego 92% było uzależnione od aktywności genów wyspy cag-PAI [16]. Do najważniejszych produktów genów wyspy patogenności zaliczamy: białka budujące układ sekrecyjny typu IV TFSS (type four secretion system) odpowiedzialny za przekazywanie czynników efektorowych do wnętrza komórek gospodarza oraz białko CagA – produkt genu *cagA* (cytotoxin associated gene) [47].

Praca przeglądowa dotyczy charakterystyki białka CagA i opisuje skomplikowany mechanizm jego oddzia-

ływań na procesy fizjologiczne komórki gospodarza. Jego aktywność jest bezpośrednio związana z procesem nowotworzenia. Na modelach mysich udokumentowano, że CagA jest onkoproteiną [55].

2. CagA – jako czynnik wirulencji

2.1. Charakterystyka CagA

CagA (cytotoxin associated protein A), jest to duże 120–145 kDa silnie immunogenne białko, kodowane przez gen *cagA* znajdujący się w obrębie wyspy patogenności *cag* PAI. Gen kodujący to białko jest obecny w genomach około 60% szczepów *H. pylori* izolowanych od pacjentów [73].

Białko CagA zostało odkryte w latach dziewięćdziesiątych poprzedniego wieku równocześnie przez trzy zespoły naukowe. Eksperymenty koncentrowały się na identyfikacji genu odpowiedzialnego za produkcję tego silnie immunogennego białka o aktywności cytotoksycznej, oznaczeniu jego sekwencji nukleotydowej oraz analizie polimorfizmów w obrębie nukleotydowej sekwencji kodującej [10, 13, 73]. Te pionierskie badania umożliwiły dalszą analizę funkcji CagA. Silna immunogenność białka CagA sugerowała, że może być ono użyteczne do produkcji szczepionek przeciw *H. pylori*. Wytwarzanie przeciwciał przeciwko CagA przez organizm gospodarza jest silnie skorelowane z występowaniem choroby wrzodowej żołądka u pacjentów, co sugeruje, że CagA jest istotnym czynnikiem wirulencji [11]. CagA w komórkach gospodarza oddziałuje z wieloma białkami, zaangażowanymi w różne szlaki sygnałowe regulujące proliferację, ruchliwość i polarność komórek, co skutkuje zmianą fenotypu komórek eukariotycznych. Białko może oddziaływać z innymi białkami na dwa różne sposoby: sposób zależny od fosforylacji co doprowadza do zmian w cytoszkieletcie oraz adhezji między komórkami epitelium i deregulacji ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne. Nieufosforylowane CagA wpływa na osłabienia ścisłych połączeń między komórkowych, utratę polarności komórek jak również poziom czynników transkrypcyjnych [24]. Szczegółowo mechanizmy tych oddziaływań opisano w dalszych fragmentach pracy.

2.2. Polimorfizm białka CagA

Motywy EPIYA Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala są zlokalizowane na C-terminalnym końcu białka CagA i występują w różnej liczbie powtórzeń. Po przekazaniu do komórek eukariotycznych przez aparat sekrecji typu IV białko lokalizuje się w błonie komórki eukariotycznej a tyrozyna motywów EPIYA jest fosforylowana przez kinazę komórkową. Funkcją motywów EPIYA jest

interakcja z białkami komórki gospodarza zawierającymi domeny fosfataz tyrozynowych (SHP-2 protein tyrosine phosphatase). Segmenty zawierające motywy EPIYA różnią się długością i składem aminokwasów otaczających poszczególne motywy EPIYA. Wykazano występowanie w białkach CagA czterech różnych rodzajów segmentów z motywami: EPIYA: -A, -B, -C, -D. W szczepach izolowanych od pacjentów w Europie, Ameryce, Australii i Afryce występuje odmiana zachodnia białka CagA z segmentami typu EPIYA-A-B, po nich występuje od 0 do 3 powtórzeń segmentu EPIYA-C. W szczepach izolowanych od pacjentów krajów azjatyckich (Korea, Japonia, Chiny) po segmencie EPIYA-A-B występuje segment EPIYA-D. W rzadkich przypadkach występują nietypowe kombinacje rodzajów segmentów [22]. Także liczba motywów aminokwasowych odpowiedzialnych za proces multimeryzacji CagA (CM) również może być różna w różnych szczepach, co wpływa na poziom zmian fenotypowych komórek poprzez deregulację β -kanteniny oraz zmianę oddziaływania CagA z SHP-2. Wśród szczepów izolowanych od pacjentów z Japonii wykazano występowanie polimorfizmu genu PTPN11 kodującego SHP-2 (w obrębie domeny SH) co również wpływa na siłę wiązania SHP-2 z CagA, a tym samym warunkuje ryzyko wystąpienia zmian atroficznych i w konsekwencji rozwój choroby nowotworowej [52].

2.3. IV typ sekrecji *H. pylori*

CagA jest przekazywane do komórek epitelialnych poprzez jednoetapowy system transportu T4SS (czwarty system transportu), kodowany przez geny wyspy patogenności *cag*-PAI. Wprowadza on cząsteczki efektorowe, w wypadku *H. pylori* białko CagA i produkty rozpadu peptydoglikanu, bezpośrednio z cytozolu komórki bakteryjnej do komórek gospodarza z pominięciem przestrzeni peryplazmatycznej [41]. Przeprowadzono badania polegające na systematycznej mutagenizie genów wyspy *cag*-PAI, udokumentowały, że aktywność 17 z 27 genów wyspy patogenności jest niezbędna do translokacji CagA do komórek eukariotycznych. Architektura T4SS jest morfologicznie podobna do biorących udział w procesie koniugacji pili). Typowy aparat sekrecyjny typu czwartego T4SS jest zbudowany z 11 białek VirB i białka VirD4. Białka budujące aparat sekrecyjny można podzielić na 3 grupy: (i) białka budujące rdzeniowe części kanału (CagT, CagX, CagY homologiczne białkom VirB-7, VirB-9 i VirB-10), (ii) białka „energetyczne” (VirB4-CagE, VirB11) (iii) białka budujące elementy zewnętrzne aparatu transportu – pili (VirB2, VirB3, VirB5). Kotwiczenie aparatu sekrecyjnego w ścianie komórkowej bakterii zachodzi dzięki aktywności białka homologicznego do VirB1: transglikozylazie, która warunkuje proces lizy mureiny.

Wyspa patogenności *cag*-PAI zawiera prawie wszystkie geny kodujące białka homologiczne do białek VirB i VirD4 [19]. W transporcie typu IV biorą też udział białka opiekuńcze, w przekazywaniu CagA taką funkcję spełnia CagF łączące się z C-terminalnym fragmentem jego substratu (złożony z 20 aminokwasów odcinek niezbędny do zajścia translokacji) i transportujące CagA do T4SS [56]. Badania z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego wykazały, że w skład T4SS wychodzą pili wystające z powierzchni bakterii. Na ich końcu odnajdywana jest mała ilość białka CagA, które oddziałuje za pomocą N-terminalnego końca z podjednostką $\beta 1$ integryny obecnej na powierzchni zainfekowanych komórek. Interakcja ta doprowadza do przemian w cytoszkielecie aktywnym komórek eukariotycznych i odgrywa kluczową rolę w translokacji CagA [36]. Na końcu pili lokuje się również adhezyjne białko CagL oraz CagY, które także oddziałują z integrynami obecnymi na powierzchni komórek gospodarza. Łączą się one z integrynami $\alpha 1\beta 1$ (receptor dla kolagenu i lamininy) oraz integrynami $\alpha 5\beta 1$ (receptor dla fibronektyny) za pomocą motywu arginina-glicyna-asparagina (RGD). Oba rodzaje oddziaływań warunkują adhezję obu komórek pro- i eukariotycznej, przetransportowanie CagA do komórek oraz aktywację kinaz FAK (focal adhesion kinase) i Src [36, 42]. Dodatkowo IV aparat sekrecyjny aktywuje wydzielanie interleukiny 8 przez komórki nabłonkowe. Proces ten nie jest związany z aktywnością białka CagA lecz z cząsteczkami peptydoglikanu, które są wprowadzane do komórek gospodarza także za pomocą tego samego transportera.

2.4. Fosforylacja CagA

CagA po wprowadzeniu do komórek gospodarza jest fosforylowane przez dwa rodzaje współdziałających ze sobą kinaz komórkowych: kinazy SFKs (Src-family protein tyrosine kinases) oraz kinazy Abl (Abelson tyrosine kinase). Fosforylacji ulega tyrozyna motywu EPIYA, który, jak wspomniano wyżej, jest powtarzany wielokrotnie w C-końcowym fragmencie CagA. Polimorfizm sekwencji aminokwasowych tych odcinków białka determinuje siłę fosforylacji, ponieważ różne rodzaje segmentów EPIYA wykazują różne powinowactwo do kinaz fosforylujących CagA [25]. „Wschodnio-azjatyckie” typy CagA zawierające na C-terminalnym końcu sekwencję aminokwasową EPIYA-D charakteryzują się wyższym powinowactwem do kinazy Src, co powoduje indukcję bardziej znaczących zmiany fenotypowych zainfekowanych komórek w porównaniu do tych indukowanych przez CagA ze szczepów typu „zachodniego”. Badania dowiodły, że 100% osób zbadanych w Korei Południowej, u których wystąpiła choroba nowotworowa żołądka była zainfekowana *H. pylori* produkującym białko CagA zawierające

motyw EPIYA-A-B-D. Jednakże infekcja „szczepem wschodnim” nie jest równoznaczna z zachorowaniem na nowotwór, ponieważ wystąpienie objawów chorobowych zależy również od środowiska życia, diety oraz genotypu organizmu pacjenta. Infekcja tymi szczepami jest jednak powiązana z wysokim prawdopodobieństwem zachorowania na chorobę wrzodową żołądka (90% pacjentów zainfekowanych „wschodnim szczepem”) i dwunastnicy (82% pacjentów zainfekowanych „wschodnim szczepem”) [37]. W „szczepach zachodnich” zaobserwowano korelację pomiędzy poziomem fosforylacji CagA a liczbą powtórzeń sekwencji aminokwasowej EPIYA-C. Szczepy izolowane od pacjentów z rakiem żołądka zawierają przeważnie kilka takich powtórzeń [28, 45]. Kinazy, które odpowiadają za fosforylację CagA są powszechnie znane jako białka onkogenne kontrolujące przemiany cytoszkieletu, proliferację i różnicowanie się komórek [41]. Aktywność obu kinaz wobec CagA jest zależna od czasu infekcji [68]. Fosforylacja CagA odgrywa istotną rolę w modulacji szlaków przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych. Ufosforylowane segmenty EPIYA-C są motywem dokującym dla domeny SH w fosfatazy SHP-2, dlatego ich liczba determinuje siłę i czas oddziaływania SHP-2 CagA, co w dalszej konsekwencji moduluje aktywność fosfatazy [27]. Ufosforylowane CagA oddziałuje także z kinazami Csk (C terminal Src kinase) i Crk (Adapter molecule crk) [24].

2.5. Multimeryzacja CagA3

W komórkach gospodarza białko CagA ulega multimeryzacji (homodimeryzacja) w procesie niezależnym od jego fosforylacji. Bierze w nim udział silnie konserwowana 16-aminokwasowa sekwencja (CM), która znajduje się w obrębie segmentu EPIYA-C lub w pobliżu segmentów EPIYA-C i EPIYA-D na C-terminalnym końcu białka. Multimeryzacja CagA warunkuje interakcję między ufosforylowanym CagA i SHP-2. tak więc jego zahamowanie potencjalnie powinno uniemożliwić patofizjologiczną aktywność CagA [57]. Motyw CM jest dodatkowo niezbędny do zainicjowania oddziaływania CagA z kinazami PAR1b/MARK2 (partitioning-defective-1/microtubule-affinity-regulating-kinases), co skutkuje rozluźnieniem połączeń międzykomórkowych ale też dodatkowo wzmacnia aktywność kompleksu CagA-SHP-2 co wpływa na zmianę kształtu komórek tzw. fenotyp kolibra. Dodatkowo multimeryzacji CagA jest zaangażowana w deregulację aktywności β -kanteniny [40]. W tzw. „szczepach zachodnich” *H. pylori* CagA może mieć kilka powtórzeń sekwencji aminokwasowej EPIYA-C w obrębie, którego znajduje się sekwencja CM co powoduje, że białko to stosunkowo łatwo ulega multimeryzacji. Motyw biorący udział w multimeryzacji CagA (CM) również charakteryzuje się polimorfizmem.

CagA obecne w większości tzw. szczepach azjatyckich silniej wiąże się z PAR1b/MARK niż białko obecne w „szczepach zachodnich”. Z drugiej strony w CagA ze „szczepów zachodnich” motyw multimerizacji może być wielokrotnie powtarzany, ponieważ znajduje się w obrębie segmentu EPIYA-C, co również zwiększa powinowactwo białka do odpowiednich kinaz [44]. Dodatkowo multimeryzacja CagA jest zaangażowana w deregulację aktywności β -kanteniny [40]. Szczegóły tych procesów opisano w dalszych fragmentach pracy przeglądowej.

3. Działanie CagA – droga fosforylacyjno-zależna

3.1. Interakcja z SHP-2

Po fosforylacji tyrozyny motywu EPIYA białka CagA przez kinazy SFKs uzyskuje ono zdolność do wiązania się z cytoplazmatyczną fosfatazą SHP-2 posiadającą dwie tandemowo powtórzone domeny SH2 (Src Homology 2) [28]. SH2 łączy się z CagA poprzez ufosforylowany motyw EPIYA [27]. W naturalnych warunkach poziom aktywności fosfatazy SHP-2 w komórkach jest niski. Interakcja domen SH2 z CagA skutkuje zmianą jego konformacji, podwyższeniem aktywności domeny PTP (protein tyrosine phosphatase) zlokalizowanej w N-terminalnym końcu białka [27, 31]. Fosfataza SHP-2 bierze udział w transdukcji sygnałów szlaków regulacji proliferacji i różnicowania się komórek, wpływa również na receptory cytokin znajdujące się na komórkach nabłonka oraz na poziom odpowiedzi układu immunologicznego [53]. Interakcja CagA-SHP-2 pełni kluczową rolę w zmianach fenotypu komórek nabłonka a rozregulowanie jej aktywności potencjalnie może indukować powstawanie zmian nowotworowych [60]. Patofizjologiczna aktywność SHP-2 związana jest z aktywacją kinaz Erk/MAP (Extracellular signal-regulated protein kinases) na drodze zależnej lub niezależnej od białek Ras (Rat Sarcoma) [53]. Wzmocniona aktywność Erk wpływa na fazy G1, G2, S cyklu komórkowego co skutkuje rozregulowaniem wzrostu komórek nabłonka. Za pomocą analizy mikroskopowej wykazano, że kinaza Erk ma wpływ również na kształt (wydłużanie się – fenotyp kolibra) i ruchliwość komórek (wzrost rozproszony – cell scattering) [29]. Nadmierna aktywność fosfatazy SHP-2 powoduje także defosforylację kinazy FAK (Focal Adhesion Kinase) będącej także regulatorem ruchliwości i kształtu komórki. Dodatkowo C-terminalny koniec (FAT) białka poprzez oddziaływanie z białkiem odpowiedzialnym za adhezję komórek, paksyliną, wpływa na procesy adhezji komórek nabłonka do siebie oraz rearanżacje cytoszkieletu aktywnego. Spadek poziomu aktywnego (ufosforylowanego) białka FAK dodatkowo wzmacnia zmiany w fenotypie komórek nabłonka [72].

3.2. Interakcje z kinazami obecnymi w komórce gospodarza

Białko Crk pełni istotne funkcje w procesach proliferacji, adhezji i migracji komórek. Wpływa na szlaki apoptotyczne, regulacyjne, fagocytarne i endocytarne jak również na regulację ekspresji genów [12]. Crk podobnie jak SHP-2 aktywuje kinazy Erk/MAP znane aktywatory czynników transkrypcji genów, między innymi czynnika transkrypcyjnego ELK1 (E-26 like protein 1) odpowiedzialnego za ekspresję genów promujących wzrost komórki. Ufosforylowane białko CagA oddziałując z Crk zaburza proliferację komórek co może skutkować zmianami nowotworowymi. Rozluźnianie ścisłych połączeń międzykomórkowych indukowane przez receptor dla HGF/c-Met (hepatocyte growth factor) wymaga aktywacji białka Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) oraz aktywacji białka WAVE (WASP family Verprolin-homologous protein). Białko Crk oddziałując z Rac1 i WAVE powoduje rozluźnienie połączeń między komórkami nabłonka a regulacja poziomu Rac1 poprzez kompleks CagA/Crk może pełnić kluczową rolę w reorganizacji cytoszkieletu aktywnego w komórkach nabłonka. Infekcje *H. pylori* powodują również uwolnienie β -kanteniny z kompleksów Ajs (adherence junctions) tworzących ścisłe połączenia międzykomórkowe i przetransportowanie jej do jądra komórkowego gdzie aktywuje transkrypcję genów powodujących postępy zmian nowotworowych. Uwolnienie β -kanteniny z kompleksów Ajs również jest kontrolowane poprzez kompleks CagA/Crk [67].

Aktywność CagA podczas infekcji *H. pylori* prowadzi też do apoptozy komórek nabłonka żołądka i choroby wrzodowej żołądka, co „z punktu widzenia” *H. pylori* jest niekorzystne, ponieważ pożądana jest długotrwała kolonizacja tej niszy ekologicznej. Aby opóźnić te procesy patogen wypracował system regulujący ilość ufosforylowanego CagA. Kinaza Csk działa na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Inaktywuje ona kinazy Src fosforylujące białko CagA uniemożliwiając przyłączenie się SHP-2 do ufosforylowanych motywów EPIYA co opóźnia zmiany fenotypowe komórek i ich apoptozę. Csk jest aktywowana przez małą część CagA wprowadzonego do komórki, co wskazuje, że kinaza Csk konkuruje z fosfatazą SHP-2 o łączenie się z CagA. Białka CagA zawierające dużą liczbą powtórzeń odmian segmentów EPIYA-A-B powodują inhibicję wiązania się kompleksu CagA-SHP-2 tym samym zmniejszając zmiany fenotypowe zainfekowanych komórek nabłonka żołądka [37].

Zaobserwowano też drugi proces regulujący poziom ufosforylowanego CagA w komórce. Kinaza Src powoduje fosforylację CagA, z kolei ufosforylowane CagA reguluje fosforylację i defosforylację kinazy Src. Obaj procesy to klasyczny przypadek sprzężenia zwrotnego ujemnego. Ufosforylowane białko CagA powoduje

zmianę konformacji kinazy Src co uniemożliwia dalsza fosforylację CagA [63].

Kortaktyna to białko oddziałujące z aktywną odgrywającą rolę w polimeryzacji i przebudowie szkieletu aktynowego. Defosforylacja kortaktyny powoduje istotne zmiany w szkielecie aktynowym komórki co doprowadza do rozluźnienia ścisłych połączeń międzykomórkowych i rozproszenia się komórek [58]. Kinaza Src o prawidłowej konformacji odpowiedzialna jest za fosforylację kortaktyny lecz zmiana konformację Src przez ufosforylowane CagA skutkuje defosforylacją kortaktyny. *H. pylori* jest jedynym znanym patogenem indukującym proces defosforylację kortaktyny [63].

4. Działanie CagA – droga fosforylacyjno-niezależna

4.1. Zaburzenia ścisłych powiązań międzykomórkowych oraz ich polarności

Badania z wykorzystaniem komórek MDCK (Madin-Darby canine kidney) wykazały, że po infekcji *H. pylori* komórki te tracą polarność oraz zaburzone są połączenia między nimi [47]. Kinazy PAR1b/MARK2, warunkują powstawanie ścisłych połączeń międzykomórkowych oraz wpływają na polarność komórek, co umożliwia powstawanie zwartego, jednowarstwowego nabłonka, którego komórki są spolaryzowane [43]. Połączenie tych dwóch faktów sugerowało istnienie interakcji CagA z kinazami serynowo-treoninowymi PAR1b podczas infekcji *H. pylori* [78]. Udokumentowano, że rzeczywiście CagA w formie homodimeru łączy się z kinazą PAR1b za pomocą motywu CM [44]. Na powierzchni szczytowej komórki znajduje się kompleks aPKC (atypical protein kinase C) pełniący kluczową rolę w polaryzacji, podczas gdy kinaza PAR1b będąca regulatorem aktywności kompleksu aPKC, zlokalizowana jest w części lateralnej komórek. PAR1b zapobiega aktywności kompleksu aPKC w lateralnej części komórki, z kolei kompleks aPKC pośredniczy w fosforylacji PAR1b powodując aktywację tego białka, co w efekcie uniemożliwia przemieszczanie się PAR1b z części lateralnej komórki zachowując jej polarność [33]. Ścisłe połączenia międzykomórkowe tworzą się na granicy występowania kompleksu aPKC (część szczytowa) i kinazy PAR1b (część lateralna). Białko CagA powoduje zaburzenia w funkcjonowaniu tego mechanizmu poprzez interakcję z PAR1b i przetransportowanie go spod bocznej błony komórkowej do części szczytowej, powodując zaburzenia powiązań międzykomórkowych oraz polarności komórek, zahamowanie biogenezy mikrotubul oraz zmiany w różnicowaniu się komórek [78]. Przypuszcza się również, że interakcja CagA z kinazą PAR1b powoduje deregulację aktywności β -kanteniny [40], choć nie jest to jedyny mechanizm

rozregulowujący szlak sygnalizacyjny Wnt/ β kantenina indukowany przez CagA (patrz niżej). CagA na drodze niezależnej od fosforylacji oddziałuje również z białkiem Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2). Białko to powoduje aktywację szlaku kinaz Ras/MAP, których działanie warunkuje zmiany w proliferacji komórek oraz ich ruchliwości, głównie poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NFAT (nuclear factor of activated T-cells) [49].

Dodatkowo CagA doprowadza do rozluźnienia ścisłych połączeń międzykomórkowych nabłonka na drodze niezależnej od kinaz PAR1b/MARK2, oddziałując z białkami tworzącymi ścisłe połączenia międzykomórkowe: ZO1 (zonula occludens) i JAM (junctional adhesion molecule) znajdującymi się pod powierzchnią błony komórkowej gospodarza [47].

CagA oddziałuje również z fosfolipazą C-gamma (PLC γ), która jest kluczowym czynnikiem powodującym aktywację kinaz Erk powodujących zmiany w polimeryzacji aktyny skutkujące rozpraszaniem się ściśle powiązanych ze sobą komórek. Inhibicja fosfolipazy C-gamma może zapobiegać rozpraszaniu się komórek, co potencjalnie może zostać wykorzystane w strategii zapobiegania rozwojowi nowotworu [20].

Kontrowersyjne są dane dotyczące oddziaływania CagA z receptorem C-met dla HGF (hepatocyte growth factor) stymulującym mitozę, ruchliwość komórek oraz ich morfogenezę. Początkowe badania wskazywały, że CagA powoduje aktywację tego receptora, poprzez pośrednią indukcję jego fosforylacji [8]. Jednakże badania z 2009 roku, prowadzone na komórkach z unieczynionym genem C-met nie potwierdziły tych obserwacji. Autorzy sugerują, że infekcja *H. pylori* wpływa na sygnalizację związaną z c-met indukującą ruchliwość komórek ale w sposób niezależny od białka CagA [65].

4.2. Destabilizacja kompleksu E-kadheryna/ β -kantenina

Deregulacja poziomu β -kantenina może także odbywać się na drodze niezależnej od kinaz PAR1b. Multimer CagA bezpośrednio oddziałuje E-kadheryną powodując obniżenie stabilności kompleksu E-kadheryna/ β -kantenina w błonie komórkowej [66]. Proces ten skutkuje translokacją β -kanteniny z błony komórkowej do cytoplazmy oraz jądra komórkowego i aktywacją transkrypcji niektórych genów, kodujących czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za ekspresję genów warunkujących różnicowanie się komórek [40]. W konsekwencji ten rodzaj oddziaływań może doprowadzać do rozwoju metaplastji oraz zmian przednowotworowych. Zmiany w aktywności i lokalizacji β -kanteniny mogą być także indukowane poprzez interakcję CagA-Crk, o czym wspomniano w podrozdziale 3.2, co dowodzi, że zmiany te mogą być powodowane zarówno

poprzez mechanizmy fosforylacyjno-zależne jak również fosforylacyjno-niezależne [67, 40, 50]. Aktywność β -kanteniny jest istotnym czynnikiem w procesie nowotworzenia. Dowiodły tego badania przeprowadzone na modelu mysim, u których unieczynniono gen kodujący β -kanteninę, co skutkowało wzrostem częstości występowania zmian nowotworowych wątroby, trzustki oraz odbytu. Dodatkowo translokacja β -kanteniny do jądra komórkowego doprowadza do podwyższenia poziomu czynnika transkrypcyjnego Lef/TCF (T-cell factor) stymulującego proliferację komórek, co wpływa na proces onkogenezy [22].

4.3. Deregulacja czynników transkrypcyjnych

Aktywacja wielu szlaków sygnalizacyjnych przez CagA zarówno na drodze zależnej jak i niezależnej od fosforylacji prowadzi do indukcji ekspresji genów kodujących kilku czynników transkrypcyjnych takich jak: ELK, NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), NFAT, czy TCF. Ekspresja genu kodującego czynnik ELK1 jest aktywowana poprzez interakcję CagA z fosfatazą SHP-2 oraz z białkiem Grb2. Zatem zmiany w poziomie ELK1 są skutkiem działania CagA zarówno na drodze zależnej jak i niezależnej od fosforylacji [30]. NF- κ B jest aktywowany głównie poprzez szlaki kinaz Ras/MAP i dodatkowo przez mechanizm niezależny od CagA, poprzez wprowadzenie przez IV system sekrecji fragmentów rozpadu peptydoglikanu oddziałujących na receptory NOD1 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1). NF- κ B indukuje ekspresję genów odpowiedzialnych za wytwarzanie interleukiny 8 (cytokiny prozapalnej), metaloproteaz oraz genów anty-apoptotycznych [46, 74]. Infekcja *H. pylori* poprzez interakcję CagA z fosfolipazą gamma, powodującą gromadzenie się w komórce jonów wapniowych doprowadza także do podwyższenia poziomu kalcyneuryny – fosfatazy serynowo-teroninowej, wpływającej na poziom czynnika transkrypcyjnego NFAT, aktywującego limfocyty T. NFAT doprowadza do zahamowania proliferacji komórek, co jest procesem antagonistycznym do procesu aktywacji proliferacji poprzez kinazy Ras/MAP [8, 77]. Cytotoksyna VacA również powoduje aktywację tego czynnika transkrypcyjnego, sekrecja VacA jest zsynchronizowana z wprowadzeniem CagA do komórek nabłonka co dowodzi, że obie cytotoksyny wzajemnie ze sobą oddziałują [3].

5. CagA jest onkoproteiną – doświadczenia z wykorzystaniem transgenicznym myszy

Wyżej przedstawiono skomplikowane przemiany szlaków metabolicznych indukowane przez białko CagA *H. pylori* dostarczane do komórek gospodarza przez

IV system sekrecji. Wiele z nich, co wykazano w eksperymentach prowadzonych z wykorzystaniem różnych linii komórkowych może odgrywać kluczową rolę w procesach nowotworzenia. Doświadczenia na modelu zwierzęcym (mongolskich myszokoczkach) zakażonych *H. pylori* wykazały korelację pomiędzy interakcją komórek nabłonkowych z CagA, a rozwojem nowotworu przewodu pokarmowego, co potwierdza hipotezę o onkogenym działaniu tego białka [59, 64]. Dalsze eksperymenty przeprowadzono z wykorzystaniem transgenicznym myszy wytwarzających dwa rodzaje CagA: typ dziki oraz białko zmutowane – nieulegające procesowi fosforylacji. U myszy produkujących dziką formę CagA powstawały zmiany fenotypu tkanek nabłonkowych przewodu pokarmowego prowadzące do rozwoju hiperplazji oraz nowotworu żołądka i jelita cienkiego oraz nowotwory układu odpornościowego. U myszy, które produkowały CagA nieulegające fosforylacji nie zaobserwowano takich zmian. Badania te bezspornie potwierdziły, że CagA jest onkoproteiną oraz dowiodły jak ważną rolę w zmianach fenotypowych komórek odgrywa proces fosforylacji [55].

Na bezpośredni wpływ białka CagA na procesy nowotworzenia wskazuje także wyniki eksperymentów *in vitro* (co-immunoprecypitacja oraz eksperymenty typu „pull-down”) w których wykazano bezpośrednie oddziaływanie CagA z białkiem RUNX3, obecnym w wielu tkankach supresorem nowotworów, często nieaktywnym w komórkach raka żołądka. Oddziaływanie pomiędzy domeną WW CagA a motywem PY RUNX3 indukuje ubikwitynację białka supresorowego i kieruje go na drogę degradacji [70].

Poznanie podstaw rozwoju choroby nowotworowej zaindukowanej aktywnością CagA może być podstawą do zrozumienia generalnych mechanizmów warunkujących procesy nowotworzenia związane z infekcjami lub reakcjami zapalnymi organizmu [21, 75]. Doświadczenia badające stabilność CagA w komórkach nabłonkowych żołądka dowiodły, że CagA jest białkiem „krótko żyjącym”, a jego degradacja jest procesem niezależnym od proteosomu 26S. Oprócz tego udokumentowano, że zablokowanie oddziaływania CagA z kinazą PAR1b skutkuje kierowaniem CagA na drogę degradacji. Fakt ten może być wykorzystany w opracowaniu nowych metod profilaktycznych – zapobieganiu powstawaniu nowotworu, polegającym na hamowaniu oddziaływania białka CagA z kinazą PAR1b [34].

6. Podsumowanie

Rozwój nowotworu jest to proces wieloetapowy wymagający zmian w ekspresji onkogenów oraz genów supresorów nowotworowych komórek gospodarza. Wprowadzone CagA oddziałuje z białkami gospodarza

na drodze zależnej i niezależnej od fosforylacji powodując zmiany w ruchliwości, proliferacji komórek oraz osłabiając połączenia między nimi, tym samym powodując zmiany w architekturze nabłonka żołądka. Dobrze udokumentowano, że aktywność CagA powoduje rozwój metaplastji, dysplazji, a w efekcie nowotworu tkanki nabłonkowej żołądka. Główną rolę w tym procesie odgrywa interakcja CagA z SHP-2 – wewnątrzkomórkowym onkogenem, choć zdumienie budzą możliwości interakcji z wieloma białkami komórek nabłonkowych prowadzące w konsekwencji do kilku procesów – ustanowienia chronicznego stanu infekcji i powolnych zmian w ruchliwości, proliferacji i polarności komórek nabłonka. Rozwój procesu nowotworzenia bez wątpienia związany jest z polimorfizmem dwu podstawowych czynników wirulencji białek VacA i CagA. Analizując polimorfizm tych genów patogenu będziemy mogli choć w przybliżeniu określić poziom ryzyka rozwoju choroby nowotworowej u konkretnego pacjenta.

Eradykacja *H. pylori* obniża prawdopodobieństwa wystąpienia nowotworu żołądka, aczkolwiek może ona prowadzić do powstawania choroby refluksowej przełykowej żołądka, która również stwarza ryzyko powstania nowotworu (w tym przypadku nowotworu przełyku). Poznawanie podłoża molekularnego działania CagA może doprowadzić do opracowania rewolucyjnych metod zapobiegania rozwojowi choroby nowotworowej nawet bez konieczności usuwania infekcji.

Piśmiennictwo

- Amieva M.R., Vogelmann R., Covacci A., Tompkins L.S., Nelson W.J., Falkow S.: Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*, **300**, 1430–1434 (2003)
- Andrzejewska J., Lee S.K., Olbermann P., Lotzing N., Katzowitsch E., Linz B., Achtman M., Kado C.I., Suerbaum S., Josenhans C.: Characterization of the pilin ortholog of the *Helicobacter pylori* type IV cag pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection. *J. Bacteriol.* **188**, 5865–5877 (2006)
- Atherton J.C., Cao P., Peek R.M., Jr., Tummuru M.K., Blaser M.J., Cover T.L.: Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* **270**, 17771–17777 (1995)
- Backert S., Selbach M.: Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol.* **10**, 1573–1581 (2008)
- Birge R.B., Kalodimos C., Inagaki F., Tanaka S.: Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. *Cell Commun. Signal.* **7**, 13 (2009)
- Brandt S., Kwok T., Hartig R., Konig W., Backert S.: NF-kappa B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9300–9305 (2005)
- Censini S., Lange C., Xiang Z., Crabtree J.E., Ghiara P., Borodovsky M., Rappuoli R., Covacci A.: Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14648–14653 (1996)
- Churin Y., Al-Ghoul L., Kepp O., Meyer T.F., Birchmeier W., Naumann M.: *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the mitogenic response. *J. Cell. Biol.* **161**, 249–255 (2003)
- Correa P.: Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process – First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer. Res.* **52**, 6735–6740 (1992)
- Covacci A., Censini S., Bugnoli M., Petracca R., Burrone D., Macchia G., Massone A., Papini E., Xiang Z., Figura N. i wsp.: Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5791–5795 (1993)
- Cover T.L., Dooley C.P., Blaser M.J.: Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect. Immun.* **58**, 603–610 (1990)
- Cover T.L., Blanke S.R.: *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 320–332 (2005)
- Crabtree J.E., Taylor J.D., Wyatt J.I., Heatley R.V., Shallcross T.M., Tompkins D.S., Rathbone B.J.: Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet*, **338**, 332–335 (1991)
- Ding S.Z., Fischer W., Kaparakis-Liaskos M., Liechti G., Merrell D.S., Grant P.A., Ferrero R.L., Crowe S.E., Haas R., Hatakeyama M. i wsp.: *Helicobacter pylori*-induced histone modification, associated gene expression in gastric epithelial cells, and its implication in pathogenesis. *PLoS One*, **5**, e9875 (2010)
- Dziesięszewski J.J.M.P.: Postępowanie w zakażeniu *Helicobacter pylori*. Wytyczne opracowane przez Grupę Roboczą Polskiego Towarzystwa gastroenterologicznego ds. zakażenia *Helicobacter pylori*. *Gastroenterologia Polska*, **5**, 323–331 (2008)
- El-Etr S.H., Mueller A., Tompkins L.S., Falkow S., Merrell D.S.: Phosphorylation-independent effects of CagA during interaction between *Helicobacter pylori* and T84 polarized monolayers. *J. Infect. Dis.* **190**, 1516–1523 (2004)
- Ferrasi A.C., Pinheiro N.A., Rabenhorst S.H., Caballero O.L., Rodrigues M.A., de Carvalho F., Leite C.V., Ferreira M.V., Barros M.A., Pardini M.I.: *Helicobacter pylori* and EBV in gastric carcinomas: methylation status and microsatellite instability. *World J. Gastroenterol.* **16**, 312–319 (2010)
- Fincham V.J., Frame M.C.: The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during cell motility. *EMBO J.* **17**, 81–92 (1998)
- Fischer W., Puls J., Buhrdorf R., Gebert B., Odenbreit S., Haas R.: Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol. Microbiol.* **42**, 1337–1348 (2001)
- Franke R., Muller M., Wundrack N., Gilles E.D., Klamt S., Kahne T., Naumann M.: Host-pathogen systems biology: logical modelling of hepatocyte growth factor and *Helicobacter pylori* induced c-Met signal transduction. *BMC Syst. Biol.* **2**, 4 (2008)
- Fukase K., Kato M., Kikuchi S., Inoue K., Uemura N., Okamoto S., Terao S., Amagai K., Hayashi S., Asaka M.: Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of meta-chronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, **372**, 392–397 (2008)

22. Giles R.H., van Es J.H., Clevers H.: Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1653**, 1–24 (2003)
23. Granstrom M., Tindberg Y., Blennow M.: Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 468–470 (1997)
24. Hatakeyama M., Higashi H.: *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci.* **96**, 835–843 (2005)
25. Hatakeyama M. SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 30–37 (2008)
26. Hatakeyama M.: Linking epithelial polarity and carcinogenesis by multitasking *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Oncogene*, **27**, 7047–7054 (2008)
27. Higashi H., Tsutsumi R., Fujita A., Yamazaki S., Asaka M., Azuma T., Hatakeyama M.: Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14428–14433 (2002)
28. 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*, **295**, 683–686 (2002)
29. Higashi H., Nakaya A., Tsutsumi R., K., Fujii Y., Ishikawa S., Higuchi M., Takahashi A., Kurashima Y., Teishikata Y. i wsp.: *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J. Biol. Chem.* **279**, 17205–17216 (2004)
30. Hirata Y., Maeda S., Mitsuno Y., Tateishi K., Yanai A., Akanuma M., Yoshida H., Kawabe T., Shiratori Y., Omata M. *Helicobacter pylori* CagA protein activates serum response element-driven transcription independently of tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology*, **123**, 1962–1971(2002)
31. Hof P., Pluskey S., Dhe-Paganon S., Eck M.J., Shoelson S.E.: Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell*, **92**, 441–450 (1998)
32. Houghton J., Stoicov C., Nomura S., Rogers A.B., Carlson J., Li H., Cai X., Fox J.G., Goldenring J.R., Wang T.C.: Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*, **306**, 1568–1571 (2004)
33. Hurov J.B., Watkins J.L., Piwnicka-Worms H.: Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. *Curr. Biol.* **14**, 736–741 (2004)
34. Ishikawa S., Ohta T., Hatakeyama M.: Stability of *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein in human gastric epithelial cells. *FEBS Lett.* **583**, 2414–2418 (2009)
35. Jagusztyn-Krynicka E.K., Godlewska R.: New approaches for *Helicobacter* vaccine development-difficulties and progress. *Pol. J. Microbiol.* **57**, 3–9 (2008)
36. Jimenez-Soto L.F., Kutter S., Sewald X., Ertl C., Weiss E., Kapp U., Rohde M., Pirch T., Jung K., Retta S.F. i wsp.: *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathog.* **5**, e1000684 (2009)
37. Jones K.R., Joo Y.M., Jang S., Yoo Y.J., Lee H.S., Chung I.S., Olsen C.H., Whitmire J.M., Merrell D.S., Cha J.H.: Polymorphism in the CagA EPIYA motif impacts development of gastric cancer. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 959–968 (2009)
38. Kaise M., Yamasaki T., Yonezawa J., Miwa J., Ohta Y., Tajiri H.: CpG island hypermethylation of tumor-suppressor genes in *H. pylori*-infected non-neoplastic gastric mucosa is linked with gastric cancer risk. *Helicobacter*, **13**, 35–41 (2008)
39. Kang G.H., Lee H.J., Hwang K.S., Lee S., Kim J.H., Kim J.S.: Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am. J. Pathol.* **163**, 1551–1556 (2003)
40. Kurashima Y., Murata-Kamiya N., Kikuchi K., Higashi H., Azuma T., Kondo S., Hatakeyama M.: Deregulation of beta-catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA requires the CagA-multimerization sequence. *Int. J. Cancer.* **122**, 823–831 (2008)
41. Kusters J.G., van Vliet A.H., Kuipers E.J.: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 449–490 (2006)
42. Kwok T., Zabler D., Urman S., Rohde M., Hartig R., Wessler S., Misselwitz R., Berger J., Sewald N., Konig W. i wsp.: *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*, **449**, 862–866 (2007)
43. Li C.X., Poznansky M.J.: Characterization of the ZO-1 protein in endothelial and other cell lines. *J. Cell. Sci.* **97 (Pt 2)**, 231–237 (1990)
44. Lu H.S., Saito Y., Umeda M., Murata-Kamiya N., Zhang H.M., Higashi H., Hatakeyama M.: Structural and functional diversity in the PAR1b/MARK2-binding region of *Helicobacter pylori* CagA. *Cancer Sci.* **99**, 2004–2011 (2008)
45. Maekita T., Nakazawa K., Mihara M., Nakajima T., Yanaoka K., Iguchi M., Arii K., Kaneda A., Tsukamoto T., Tatematsu M. i wsp.: High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin. Cancer Res.* **12**, 989–995 (2006)
46. Malfertheiner P., Bornschein J., Selgrad M.: Role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer pathogenesis: a chance for prevention. *J. Dig. Dis.* **11**, 2–11 (2010)
47. Marshall B.: *Helicobacter pylori*: past, present and future. *Keio J. Med.* **52**, 80–85 (2003)
48. Matsumoto Y., Marusawa H., Kinoshita K., Endo Y., Kou T., Morisawa T., Azuma T., Okazaki I.M., Honjo T., Chiba T.: *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat. Med.* **13**, 470–476 (2007)
49. Mimuro H., Suzuki T., Tanaka J., Asahi M., Haas R., Sasaki C.: Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol. Cell*, **10**, 745–755 (2002)
50. Murata-Kamiya N., Kurashima Y., Teishikata Y., Yamahashi Y., Saito Y., Higashi H., Aburatani H., Akiyama T., Peek R.M., Jr., Azuma T. i wsp.: *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene*, **26**, 4617–4626 (2007)
51. Nakajima T., Enomoto S., Yamashita S., Ando T., Nakanishi Y., Nakazawa K., Oda I., Gotoda T., Ushijima T.: Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after *Helicobacter pylori* eradication. *J. Gastroenterol.* **45**, 37–44 (2010)
52. Narumi Y., Isomoto H., Shiota M., Sato K., Kondo S., Machida H., Yanagihara K., Mizuta Y., Kohno S., Tsukamoto K.: Polymorphisms of PTPN11 coding SHP-2 as biomarkers for ulcerative colitis susceptibility in the Japanese population. *J. Clin. Immunol.* **29**, 303–310 (2009)
53. Neel B.G., Gu H., Pao L. The „Shp’ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 284–293 (2003)
54. Nguyen L.T., Uchida T., Murakami K., Fujioka T., Moriyama M.: *Helicobacter pylori* virulence and the diversity of gastric cancer in Asia. *J. Med. Microbiol.* **57**, 1445–1453 (2008)
55. Ohnishi N., Yuasa H., Tanaka S., Sawa H., Miura M., Matsuhi A., Higashi H., Musashi M., Iwabuchi K., Suzuki M. i wsp.: Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1003–1008 (2008)

56. Pattis I., Weiss E., Laugks R., Haas R., Fischer W.: The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein. *Microbiology*, **153**, 2896–2909 (2007)
57. Ren S., Higashi H., Lu H., Azuma T., Hatakeyama M.: Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 32344–32352 (2006)
58. Ren G., Crampton M.S., Yap A.S.: Cortactin: Coordinating adhesion and the actin cytoskeleton at cellular protrusions. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **66**, 865–873 (2009)
59. Rieder G., Merchant J.L., Haas R.: *Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils. *Gastroenterology*, **128**, 1229–1242 (2005)
60. Roovers K., Assoian R.K.: Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays*, **22**, 818–826 (2000)
61. Saadat I., Higashi H., Obuse C., Umeda M., Murata-Kamiya N., Saito Y., Lu H., Ohnishi N., Azuma T., Suzuki A. i wsp.: *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*, **447**, 330–333 (2007)
62. Schneider B.G., Peng D.F., Camargo M.C., Piazuolo M.B., Sicinschi L.A., Mera R., Romero-Gallo J., Delgado A.G., Bravo L.E., Wilson K.T. i wsp.: Promoter DNA hypermethylation in gastric biopsies from subjects at high and low risk for gastric cancer. *Int. J. Cancer*. **127**, 2588–2597 (2010)
63. Selbach M., Moese S., Hurwitz R., Hauck C.R., Meyer T.F., Backert S.: The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J.* **22**, 515–528 (2003)
64. Shibata W., Hirata Y., Maeda S., Ogura K., Ohmae T., Yanai A., Mitsuno Y., Yamaji Y., Okamoto M., Yoshida H. i wsp.: CagA protein secreted by the intact type IV secretion system leads to gastric epithelial inflammation in the Mongolian gerbil model. *J. Pathol.* **210**, 306–314 (2006)
65. Snider J.L., Cardelli J.A.: *Helicobacter pylori* induces cancer cell motility independent of the c-Met receptor. *J. Carcinog.* **8**, 7 (2009)
66. Sokolova O., Bozko P.M., Naumann M.: *Helicobacter pylori* suppresses glycogen synthase kinase 3beta to promote beta-catenin activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 29367–29374 (2008)
67. Suzuki M., Mimuro H., Suzuki T., Park M., Yamamoto T., Sasakawa C.: Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J. Exp. Med.* **202**, 1235–1247 (2005)
68. Tammer I., Brandt S., Hartig R., König W., Backert S.: Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology*, **132**, 1309–1319 (2007)
69. Tanaka J., Suzuki T., Mimuro H., Sasakawa C.: Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell. Microbiol.* **5**, 395–404 (2003)
70. Tsang Y.H., Lamb A., Romero-Gallo J., Huang B., Ito K., Peek R.M., Jr., Ito K., Chen L.F.: *Helicobacter pylori* CagA targets gastric tumor suppressor RUNX3 for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*, **29**, 5643–5650 (2010)
71. Tsutsumi R., Higashi H., Higuchi M., Okada M., Hatakeyama M.: Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 3664–3670 (2003)
72. 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.* **26**, 261–276 (2006)
73. Tummuru M.K., Cover T.L., Blaser M.J.: Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun.* **61**, 1799–1809 (1993)
74. Viala J., Chaput C., Boneca I.G., Cardona A., Girardin S.E., Moran A.P., Athman R., Memet S., Huerre M.R., Coyle A.J. i wsp.: Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat. Immunol.* **5**, 1166–1174 (2004)
75. Wong B.C., Lam S.K., Wong W.M., Chen J.S., Zheng T.T., Feng R.E., Lai K.C., Hu W.H., Yuen S.T., Leung S.Y. i wsp.: *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA*, **291**, 187–194 (2004)
76. Yamaoka Y., El-Zimaity H.M., Gutierrez O., Figura N., Kim J.G., Kodama T., Kashima K., Graham D.Y.: Relationship between the cagA 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology*, **117**, 342–349 (1999)
77. Yokoyama K., Higashi H., Ishikawa S., Fujii Y., Kondo S., Kato H., Azuma T., Wada A., Hirayama T., Aburatani H. i wsp.: Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9661–9666 (2005)
78. Zeaiter Z., Cohen D., Musch A., Bagnoli F., Covacci A., Stein M.: Analysis of detergent-resistant membranes of *Helicobacter pylori* infected gastric adenocarcinoma cells reveals a role for MARK2/Par1b in CagA-mediated disruption of cellular polarity. *Cell Microbiol.* **10**, 781–794 (2008)