



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

**Λοιμογόνος δράση του παράγοντα CagA του Ελικοβακτηριδίου του
πυλωρού: Μελέτη του ρόλου των θέσεων φωσφορυλίωσης ΕΡΙΥΑ
στην επαγωγή Ιντερλευκίνης-8 και μορφοκινητικών αλλαγών στα
γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Σ. ΠΑΠΑΔΑΚΟΣ
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Λοιμογόνος δράση του παράγοντα CagA του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού:
Μελέτη του ρόλου των θέσεων φωσφορυλίωσης ΕΡΙΥΑ στην επαγωγή
Ιντερλευκίνης-8 και μορφοκινητικών αλλαγών στα γαστρικά επιθηλιακά
κύτταρα**

Παπαδάκος Σ. Κωνσταντίνος
Μοριακός Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Ευστάθιος Χατζηλουκάς, *Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.*

Παναγούλα Κόλλια, *Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστημίου Αθηνών.*

Σγούρας Διονύσιος, *Κύριος Ερευνητής, Εργαστηρίου Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.*

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

Χρυσάνθη Παπαδοπούλου, *Καθηγήτρια, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.*

Ευστάθιος Χατζηλουκάς, *Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.*

Άννα Κούκου, *Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.*

Διονύσιος Σγούρας, *Κύριος Ερευνητής, Εργαστηρίου Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.*

Παναγούλα Κόλλια, *Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστημίου Αθηνών.*

Αμαλία-Σοφία Αφένδρα, *Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.*

Έρα Καραγιάννη, *Λέκτορας, Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.*



**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ**

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 97 265, 97 277
FAX:(26510) 97 064
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ : Άννα Υφαντή

Ιωάννινα 02-11-2007
Αριθμ.Πρωτ. 356

Προς τους κ.κ.

- 1) Δρ. Σγούρας Διονύση, Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
- 2) Κόλλια Παναγούλα, Επ.Καθηγήτρια του Παν/μίου Θεσσαλίας.
- 3) Χατζηλουκά Ευστάθιο, Αν.Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Παν/μίου Ιωαννίνων

Σας πληροφορούμε ότι, μετά από εισήγηση του Επιβλέποντα Επίκουρου Καθηγητή κ. Χατζηλουκά Ευστάθιου και της Σ.Ε.Μ.Σ. του Τμήματος, η Προσωρινή Συνέλευση Ειδικής Σύνοψης, στη Συνεδρίασή της αριθμ. 100/31-10-2007, σας όρισε μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την εκπόνηση της Διδακτορικής Διατριβής του κ. Παπαδάκου Κωνσταντίνου.

Επίσης, ενέκρινε ως θέμα της διδακτορικής διατριβής το εξής: «Λοιμογόνος δράση του παράγοντα CagA του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού: Μελέτη του ρόλου των θέσεων φωσφορυλίωση EPIYA στην επαγωγή μορφοκινητικών αλλαγών στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα.».

Κοινοποίηση:

- κ. Παπαδάκο Κωνσταντίνο

Με εντολή του Προέδρου

Η Γραμματέας του Τμήματος

ANNA YFANTH



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Ιωάννινα, 24 Ιουνίου 2014
Αριθμ. Πρωτ.: 517

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 451 10
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 07265, 07294
FAX: (26510) 07064
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ: Άννα Υφαντή

Προς τους κ.κ.

1. **Χατζηλουκάς** **Ευστάθιος**,
Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος
Βιολογικών Εφαρμογών &
Τεχνολογιών Παν/μίου Ιωαννίνων.
2. **Σγούρας Διονύσιος**, Ερευνητής Β',
Ελληνικό Ινστιτούτο ΠΑΣΤΕΡ.
3. **Κόλλια Παναγούλα**, Επίκουρη
Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας
ΕΚΠΑ.
4. **Παπαδοπούλου Χρυσάνθη**,
Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής
Παν/μίου Ιωαννίνων.
5. **Κούκκου Άννα**, Αναπληρώτρια
Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας
Παν/μίου Ιωαννίνων.
6. **Αφένδρα Αμαλία-Σοφία**, Επίκουρη
Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογικών
Εφαρμογών & Τεχνολογιών Παν/μίου
Ιωαννίνων.
7. **Καραγιάννη Ήρα**, Λέκτορας Τμήματος
Βιολογικών Εφαρμογών &
Τεχνολογιών Παν/μίου Ιωαννίνων.

ΘΕΜΑ: «Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής του κ. Κωνσταντίνου Παπαδάκου.

Σας γνωρίζουμε ότι η Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύνοψης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών στη Συνεδρίασή της αριθμ. 215/13-6-14, σας όρισε μέλη της 7μελούς εξεταστικής επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής που εκπόνησε ο κ. Κωνσταντίνος Παπαδάκος με τίτλο «Λοιμογόνος δράση του παράγοντα CagA του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού: Μελέτη του ρόλου των θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA στην επαγωγή Ιντερλευκίνης-8 και μορφοκινητικών αλλαγών στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα».

Πρόεδρος της Επιτροπής ορίζεται ο Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος κ. Ευστάθιο Χατζηλουκά.

Κοινοποίηση:
- κ. Κωνσταντίνο Παπαδάκο



Με εντολή του Προέδρου
Η Γραμματέας του Τμήματος


ΑΝΝΑ ΥΦΑΝΤΗ

ΠΡΑΚΤΙΚΟ

ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ, ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σήμερα Παρασκευή 10/7/2015 στην Αίθουσα 4, στον πρώτο όροφο του κτηρίου Διοίκησης του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, πραγματοποιείται σύμφωνα με τα άρθρα 12 και 13 του Ν.2083/92, η διαδικασία δημόσιας παρουσίασης, εξέτασης και αξιολόγησης της διδακτορικής διατριβής του υποψηφίου διδάκτορα και Κωνσταντίνου Παπαδάκου.

Την επιταμελή εξεταστική επιτροπή, η οποία συγκροτήθηκε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνοψης (215/13-6-2015) του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών αποτελούν οι:

1. Χατζηλουκάς Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Επιβλέπων).
2. Σγούρας Διονύσιος, Κύριος Ερευνητής, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα.
3. Κόλλια Παναγούλα, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
4. Παπαδοπούλου Χρυσάνθη, Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
5. Κούρκου Άννα-Ειρήνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
6. Αφένδρα Αμαλία-Σοφία, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
7. Καραγιάννη Ήρα, Λέκτορας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Το θέμα της διατριβής την οποία εκπόνησε ο κος Παπαδάκος είναι:
"Λοιμογόνος δράση του παράγοντα CagA του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού: Μελέτη του ρόλου των θέσεων φωσφορυλίωσης ΕΡΙΥΑ στην επαγωγή Ιντερλευκίνης-8 και μορφοκινητικών αλλαγών στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα."

Ο Πρόεδρος της εξεταστικής επιτροπής καλεί τον υποψήφιο να αναπτύξει το θέμα της διδακτορικής διατριβής.

Ακολουθεί ανάπτυξη και παρουσίαση του θέματος από τον υποψήφιο.

Εν συνεχεία, αφού ο υποψήφιος απαντά σε σχετικές ερωτήσεις, η εξεταστική επιτροπή αποσύρεται και εισέρχεται στη διαδικασία αξιολόγησης του υποψηφίου και της τελικής κρίσης της διδακτορικής διατριβής.

Μετά από συζήτηση, η εξεταστική επιτροπή κατέληξε στα ακόλουθα:

1. Διαπιστώνει ότι:

- A) Η παρουσίαση και η ανάπτυξη του θέματος της διδακτορικής διατριβής ήταν άριστη.
- B) Η επιστημονική κατάρτιση του υποψηφίου είναι πλήρης.
- Γ) Η συγγραφή της διατριβής έγινε με τρόπο που δείχνει μεθοδικότητα και ενημέρωση του υποψηφίου πάνω στη βιβλιογραφία τη σχετική με το θέμα της διατριβής.

2. Κρίνει ότι:

- A) Η διατριβή είναι προϊόν μακρόχρονης και εργώδους προσπάθειας και καταλήγει σε σημαντικά αποτελέσματα, τα οποία προάγουν την επιστήμη.
- B) Η επάρκεια του υποψηφίου στο γνωστικό αντικείμενο της διατριβής είναι πλήρης.

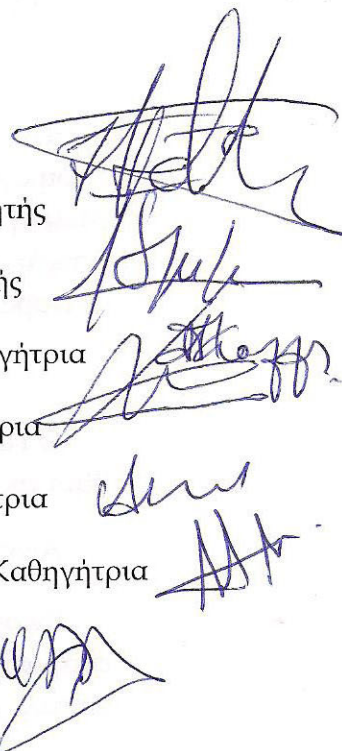
Με βάση τα ανωτέρω, τα μέλη της επιτροπής εγκρίνουν ομόφωνα τη διδακτορική διατριβή του κου **Κωνσταντίνου Παπαδάκου** και εισηγούνται ανεπιφύλακτα και ομόφωνα την απονομή του τίτλου του διδάκτορα με βαθμό **ΑΡΙΣΤΑ (10)**



Χατζηλουκάς Ευστάθιος
Αναπληρωτής Καθηγητής
(Επιβλέπων)

Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

- 1. Χατζηλουκάς Ευστάθιος, Αν. Καθηγητής
- 2. Σγούρας Διονύσιος, Κύριος Ερευνητής
- 3. Κόλλια Παναγούλα, Επίκουρη Καθηγήτρια
- 4. Παπαδοπούλου Χρυσάνθη, Καθηγήτρια
- 5. Κούκκου Άννα-Ειρήνη, Αν. Καθηγήτρια
- 6. Αφένδρα Αμαλία-Σοφία, Επίκουρη Καθηγήτρια
- 7. Καραγιάννη Ήρα, Λέκτορας



Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Μέρος των δαπανών καλύφθηκε από το πρόγραμμα ΚΡΗΓΠΣ (ΕΣΠΑ 2007-2013, MIS 450598)



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Ταμείο
Περιφερειακής Ανάπτυξης



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Υπουργείο Πολιτισμού, Παιδείας & Θρησκευμάτων
Γενική Γραμματεία Έρευνας & Τεχνολογίας



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ
ΥΠΟΔΟΜΩΝ, ΝΑΥΤΙΑΣ & ΤΟΥΡΙΣΜΟΥ



η περιφέρεια στο **επίκεντρο** της ανάπτυξης

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης - Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ), στο πλαίσιο του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα (ΕΠΑΝ ΙΙ) και των Π.Ε.Π. Αττικής, Π.Ε.Π. Μακεδονίας - Θράκης

Αφιερώνεται
στους γονείς μου & στα αδέρφια μου
για την αγάπη & την αμέριστη συμπαράσταση τους

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ζωή αποτελεί κινήγι της ευτυχίας. Ήμουν λοιπόν τυχερός που ανακάλυψα τι μπορεί να συμβάλει αποφασιστικά στην ευτυχία μου και αυτό δεν είναι άλλο από το να κάνεις μια δουλειά που θα την έκανες και για χόμπι. Η επιστήμη και η έρευνα ήρθαν στην ζωή μου σε μια περίοδο που ίσως δεν ήμουν έτοιμος γνωστικά για να αντιμετωπίσω, αλλά αμέσως κατάλαβα ότι φτιάχτηκα για αυτό και προσπάθησα με όλες μου τις δυνάμεις να καλύψω κενά στις γνώσεις μου που θα έπρεπε να κατείχα από το παρελθόν. Μερικές φορές τα κατάφερα και για κάποιες ακόμα προσπαθώ.

Η αφορμή για αυτό το ταξίδι στάθηκαν οι αρχές που πήρα από τους γονείς μου τον κ. Σωτήριο Θ. Παπαδάκο και την κ. Βασιλεία Α. Ρίνη-Παπαδάκου, που τους ευχαριστώ μέσα από τα βάθη τις ψυχής μου. Προσπάθησαν να μου μάθουν από μικρό τι σημαίνει αγάπη, η υπηρεσία προς τον άνθρωπο και αποτέλεσαν πρότυπο για εμένα μέχρι την τελευταία τους ανάσα. Όσο μακριά και να βρισκόμαστε πάντα είναι δίπλα μου και ζουν μαζί μου γιατί φέρω και συμπεριφέρομαι με τις αρχές που μου έδωσαν. Μεγάλη συμβολή ακόμα είχαν και τα αδέρφια μου κ. Θωμάς Σ. Παπαδάκου και κ. Αντιγόνη-Μαρία Σ. Παπαδάκου, πάντα στις δυσκολίες ήταν εκεί δίπλα μου βοηθώντας με, τόσο υλικά όσο πάνω από όλα ηθικά. Επίσης οι Πρόσκοποι συνέβαλαν τα μέγιστα στο να αναπτύξω αρχές και φαντασία που μου χρειάστηκαν όσο τίποτα άλλο κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων. Γιατί μερικές φορές θέλει πολύ φαντασία για να δεις μόρια να αλληλεπιδρούν με πολλούς διαφορετικούς τρόπους μεταξύ τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή για την καθοδήγηση της. Ιδιαίτερα τον Δρ. Διονύσιο Ν. Σγούρα ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω αυτήν την διατριβή στο εργαστήριο του και αποτέλεσε την πατρική φιγούρα που έλειπε από την ζωή μου. Ευχαριστώ επίσης τον Δρ. Ανδρέα Φ. Μεντή για τις επιστημονικές συμβουλές του κατά την διάρκεια της παραμονής μου σε μερικά από τα εργαστήρια που διευθύνει. Ευχαριστώ ακόμα την Δρ. Ευφροσύνη Γ. Παναγιωτοπούλου για την συνεργασία και το ενδιαφέρον της να μου μάθει το μεγαλύτερο μέρος των εργαστηριακών τεχνικών που μέχρι σήμερα γνωρίζω και την Δρ. Beatriz Martinez-Gonzales για την συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κ. Ιωάννα Σ. Σουγλέρη για την συνεργασία και την φιλία της. Τέλος ευχαριστώ όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές που συνεργαστήκαμε κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο καθώς και το σύνολο του προσωπικού του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ για την αμέριστη συνεργασία μας τα τελευταία χρόνια.

Δημοσιεύσεις & Ανακοινώσεις σε Συνέδρια με τα Αποτελέσματα της
Παρούσας Διδακτορικής Διατριβής

Δημοσιεύσεις

- **Konstantinos S. Papadakos**, Ioanna S. Sougleri, Andreas F. Mentis, Efstathios Hatziloukas, Dionyssios N. Sgouras **Presence of phosphorylatable terminal EPIYA phosphorylation motifs in *Helicobacter pylori* CagA contributes to IL-8 secretion, irrespective of the number of repeats.** *PLoS One*, 2013 Febr. 8(2): e56291. doi:10.1371/journal.pone.0056291
- **Papadakos KS**, Sougleri IS, Mentis AF, Sgouras DN. **A Mutagenesis Method for the Addition and Deletion of Highly Repetitive DNA Regions: The Paradigm of EPIYA Motifs in the *cagA* Gene of *Helicobacter pylori*.** *Helicobacter*, 2012 Nov. doi: 10.1111/hel.12029.
- Breurec S, Guillard B, Hem S, **Papadakos KS**, Brisse S, Huerre M, Monchy D, Oung C, Sgouras DN, Tan TS, Thiberge JM, Vong S, Raymond J, Linz B. **Expansion of European *vacA* and *cagA* alleles to East-Asian *Helicobacter pylori* strains in Cambodia.** *Infection, Genetics and Evolution*, 2011 Aug 17. 2011 Dec;11(8):1899-905.

Ανακοινώσεις σε Συνέδρια

- **A modified QuikChange II Site-Directed mutagenesis method for the generation of repetitive gene sequences: The paradigm of the EPIYA-C coding motifs in *cagA*.** **K. Papadakos**, Hatziloukas E., A. F. Mentis, D. N. Sgouras. XXV^d International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer Sep 13-15, 2012 Ljubljana.
- **Involvement of CagA EPIYA phosphorylation in the induction of IL-8 through the activation of TAK1 kinase** **K. Papadakos¹**, E. Hatziloukas, A. F. Mentis, D.N. Sgouras. 10th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infections Helsingør, Denmark July 4-7, 2012.
- **Implication of CagA EPIYA-C phosphorylation in IL-8 induction by gastric epithelial cells.** **Papadakos K.**, Loi A., Martinez-Gonzalez B., Hatziloukas E., Mentis A. F., Sgouras D. N., XXIVnd International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer Sep 11-13, 2011 Dublin.
- **TAK1 plays a central role in NF-κB–dependent IL-8 secretion induced by *Helicobacter pylori* infection of gastric epithelial cells.** **Papadakos K.S.**, Sougleri I., Kotsi E., Mentis A.F., Sgouras D.N 64th National Congress of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology. Athens 6-8 December 2013.

- **Utilizing the FIAsH technology to study the translocation of *Helicobacter pylori* CagA effector protein through the bacterial type IV secretion system.** Papadakos K.¹, Sougleri I.¹, Hatziloukas E.², Mentis A.¹, Sgouras D.¹. 5th National Congress of Hellenic initiative for Mikrobiokosmo. Athens 13-16 December 2012.
- **Phosphorylation of protein of *Helicobacter pylori* CagA activates nuclear factor NF-κB through TAK1 kinase and contributes to the activation of Interleukin-8 (IL-8) from the gastric epithelial cells.** Papadakos K., Sougleri I., Hatziloukas E., A. Mentis and D.N. Sgouras. 32th Annual congress of Gastroenterology. Athens, 29 November- 1 December 2012, Athens
- **Visualizing the secretion of bacterial effector CagA through the Type IV secretion system of *Helicobacter pylori* utilizing FIAsH technology.** Papadakos K., Sougleri I., Mentis A., Sgouras D. 63th National Congress of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology. Heraklion 9-11 November 2012.
- ***Helicobacter pylori* CagA protein phosphorylation on EPIYA-C motifs activates NF-κB through TAK1 kinase and contributes to IL-8 gene activation and chemokine secretion by gastric epithelial cells.** Papadakos K., Martinez B., Hatziloukas E., Mentis A., Sgouras D. 62th National Congress of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology. Athens 9-11 December 2011.
- ***H. pylori* CagA protein phosphorylation on EPIYA motifs triggers IL-8 gene induction and consequent secretion of IL-8 in gastric epithelial cells, by activating NF-κB through TAK1 kinase.** Papadakos K., Martinez B., Hatziloukas E., Mentis A., Sgouras D. 4th National Congress of Hellenic initiative for Mikrobiokosmo. Ioannina 21-23 October 2011.
- **Effect of functional CagA EPIYA motifs in gene activation and secretion of IL-8 in experimental infection with *H. pylori*.** K. Papadakos, E. G. Panayotopoulou, B. Martinez, E. Hantziloukas. A.F. Mentis, D. N. Sgouras. 16th Congress of the Hellenic *Helicobacter pylori* study group, March 2011, Athens.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Κωνσταντίνος Σωτηρίου Παπαδάκος

Ημερομηνία γέννησης : 12 Απριλίου 1982

Διεύθυνση: Αναγεννήσεως 28, 172 37 Υμηττός, Αττική, Ελλάδα

Τηλέφωνο: +306977094313

Ηλεκτρονική διεύθυνση (e-mail): krapadakos@gmail.com

Σταδιοδρομία

- Σύμβαση έργου με το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ.** Στα πλαίσια του προγράμματος: «Λοιμώδη και νευροεμφυλιστικά νοσήματα στον 21ο αιώνα: από τη μελέτη των βασικών μηχανισμών στην ανάπτυξη μεταφραστικής έρευνας και μεθοδολογιών αιχμής με στόχο τη διάγνωση, την πρόληψη και τη θεραπεία, MIS 450598» 2015
- Υπηρεσία στον Ελληνικό Στρατό** στο Σώμα του Υγειονομικού 2012 έως 2013
- Υποτροφία του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ** για την ολοκλήρωση της Διδακτορικής Διατριβής, στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ 2010 έως 2012
- Σύμβαση εργασίας με το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ.** Ανάγνωση αλληλουχιών και φυλογένεση του ιού της Γρίπης στα πλαίσια της επιτήρησης, στο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Γρίπης Νοτίου Ελλάδος (Αναγνωρισμένο από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας WHO) 2007 έως 2010
- Υποψήφιος Διδάκτορας στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ,** άμισθη εργασία. Τίτλος Διδακτορικού: «Λοιμογόνος δράση του παράγοντα CagA του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού: Μελέτη του ρόλου των θέσεων φωσφορλίωσης EPIYA στην επαγωγή Ιντερλευκίνης-8 και μορφοκινητικών αλλαγών στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα.» 2006 έως 2009

Εκπαίδευση

- Επιμορφωτικό σεμινάριο** αλληλεπίδρασης Ξενιστή-Μικροοργανισμών, στο νησί των Σπετσών. EMBO-FEBS Lecture Course on Host-Microbes Interactions 1-9 Σεπτεμβρίου 2010

Πτυχιακή εργασία στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του
Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. «Φωσφορυλίωση του λοιμογόνου
παράγοντα CagA του *Helicobacter pylori* και επίδραση του στην
μεταγωγή σήματος στο εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών
κυττάρων.» Επιβλέποντες: Διονύσιος Σγούρας, Ελληνικό Ινστιτούτου
Παστέρ, Ευστάθιος Χατζηλουκάς, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

2005 έως 2006

Δημοσιεύσεις

1. **Konstantinos S. Papadakos**, Ioanna S. Sougleri, Andreas F. Mentis, Efstathios Hatziloukas, Dionyssios N. Sgouras **Presence of phosphorylatable terminal EPIYA phosphorylation motifs in *Helicobacter pylori* CagA contributes to IL-8 secretion, irrespective of the number of repeats.** *PLoS One*, 2013 Febr. 8(2): e56291. doi:10.1371/journal.pone.0056291
2. **Papadakos KS**, Sougleri IS, Mentis AF, Sgouras DN. **A Mutagenesis Method for the Addition and Deletion of Highly Repetitive DNA Regions: The Paradigm of EPIYA Motifs in the *cagA* Gene of *Helicobacter pylori*.** *Helicobacter*, 2012 Nov . doi: 10.1111/hel.12029.
3. Breurec S, Guillard B, Hem S, **Papadakos KS**, Brisse S, Huerre M, Monchy D, Oung C, Sgouras DN, Tan TS, Thiberge JM, Vong S, Raymond J, Linz B. **Expansion of European vacA and cagA alleles to East-Asian *Helicobacter pylori* strains in Cambodia.** *Infection, Genetics and Evolution*, 2011 Aug 17. 2011 Dec;11(8):1899-905.
4. Panayotopoulou EG, Sgouras DN, **Papadakos KS**, Petraki K, Breurec S, Michopoulos S, Mantzaris G, Papatheodoridis G, Mentis A, Archimandritis A. **CagA and VacA polymorphisms are associated with distinct pathological features in *H. pylori*-infected adults with peptic and non-peptic ulcer disease.** *Journal of Clinical Microbiology*, 2010 Jun;48(6):2237-9
5. Melidou A, Gioula G, Pogka V, Exindari M, Moutoussi A, Sgouras D, **Papadakos K**, Chatzidimitriou D, Karabaxoglou D, Mentis A, Malisiovas N. **Molecular and phylogenetic analysis of Greek measles 2010 strains.** *Epidemiology and Infection*, 2012 Mar;140(3):432-8.
6. Logotheti M, Pogka V, Horefti E, **Papadakos K**, Giannaki M, Pangalis A, Sgouras D, Mentis A. **Laboratory investigation and phylogenetic analysis of enteroviruses involved in an aseptic meningitis outbreak in Greece during the summer of 2007.** *Journal of Clinical Virology*, 2009 Nov;46(3):270-4.
7. Sgouras DN, Panayotopoulou EG, **Papadakos K**, Martinez-Gonzalez B, Roumbani A, Panayiotou J, vanVliet-Constantinidou C, Mentis AF, Roma-Giannikou E. **CagA and VacA polymorphisms do not correlate with severity of histopathological lesions in *Helicobacter pylori*-infected Greek children.** *Journal of Clinical Microbiology*, 2009 Aug;47(8), 2426-34

8. Stavros N. Kokotas, Eugenia Bolanaki, Dionyssios Sgouras, Vasiliki Pogka, Maria Logotheti, Athanasios Kossivakis, Elina Horefti, **Konstantinos Papadakos**, Andreas Mentis. **Cocirculation of genotypes D4 and D6 in Greece during the 2005 to 2006 measles epidemic.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2008; 62(1),58–66
9. Effrosini G. Panayotopoulou, Dionyssios N. Sgouras, **Konstantinos Papadakos**, Antonios Kalliaropoulos, George Papatheodoridis, Andreas Mentis and Athanasios Archimandritis. **Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in H. pylori clinical isolates** *Journal of Clinical Microbiology*. 2007 Feb;45(2), 488–495.

Βραβεία

1. **Πρώτο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 20^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού, Αθήνα Μάρτιος 2013. «Η βακτηριακή πρωτεΐνη CagA συμβάλλει στην επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων στη λοίμωξη με *H. pylori*» I. Σουγλέρη, **Κ. Παπαδάκος**, Α. Μεντής και Δ. Σγούρας
2. **Έπαινος Β' προφορικής ανακοίνωσης.** 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα Φεβρουάριος 2015. «Γενετική ανάλυση στελεχών *Helicobacter pylori* από Έλληνες φορείς ενισχύει την άποψη περί μεταναστευσεως πλυθησμών από την Μεσοποταμία κατά την Νεολιθική περίοδο.» **Κ. Παπαδάκος**, Breurec S, B. Martinez, I. Σουγλέρη, Σ. Μιχόπουλος, Γ. Μάντζαρης Α. Μεντής και Δ. Σγούρας.
3. **Βραβείο καλύτερης αναρτημένης εργασίας «Αναστασία Δημόζη».** 1^ο Πανελλήνιο Forum νέων επιστημόνων. Αθήνα Δεκέμβριος 2013. “Induction of MMP-3/10 (stromelysin-1 and -2) activity in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells may depend on the phosphorylation of the bacterial CagA oncoprotein.” I. Σουγλέρη, **Κ. Παπαδάκος**, Α. Μεντής και Δ. Σγούρας
4. **Ετήσιο Βραβείο της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης του Ελικοβακτηριδίου του Πυλωρού για την σημαντικότερη ξενόγλωσση δημοσίευση Έλληνα ερευνητή για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού.** 18^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού, Αθήνα Μάρτιος 2013. “A Mutagenesis Method for the Addition and Deletion of Highly Repetitive DNA Regions: The Paradigm of EPIYA Motifs in the *cagA* Gene of *Helicobacter pylori*.” **Papadakos KS**, Sougleri IS, Mentis AF, Sgouras DN. *Helicobacter*, 2012 Nov. doi: 10.1111/hel.12029.
5. **Πρώτο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 18^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού, Αθήνα Μάρτιος 2013. «Πειραματική μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων με *Helicobacter pylori* επάγει την ενεργοποίηση μορίων τροποποίησης του εξωκυττάρου χώρου» I. Σουγλέρη, **Κ. Παπαδάκος**, B. Martinez, Α. Μεντής και Δ. Σγούρας
6. **Πρώτο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 32^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας Νοέμβριος 2012. «Ενεργοποίηση Στρομελυσίνης 1 (MMP-3) σε πειραματική λοίμωξη γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων από Ελικοβακτήριο του Πυλωρού (EΠ)» I. Σουγλέρη, **Κ. Παπαδάκος**, Σ. Μιχόπουλος, Μ. Μαυρή-Βαβαγιάννη, Α. Μεντής και Δ. Σγούρας.
7. **Βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Μάρτιος 2012. «Φυλογενετική ανάλυση και έλεγχος αντοχής στα αντιβιοτικά σιενάσματα σε στελέχη του πανδημικού Ιού» Α, Κοσσυβάκης, **Κ. Παπαδάκος**, Β. Πόγκα, Α. Μουτούση, Δ. Σγούρας, Α. Μεντής.
8. **Πρώτο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 17^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2009. «Προσδιορισμός αντοχής στην κλαριθρομυκίνη: Σύγκριση φαινοτυπικής μεθόδου καλλιέργειας και μοριακών τεχνικών Real

- Time PCR.» B. Martinez, **Κ. Παπαδάκος**, Κ. Κωνσταντουλάκη, Σ. Μιχόπουλος, Α. Μεντής και Δ. Σγούρας.
9. **Τρίτο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 17^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2012. «Η μεταγραφική ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα σε πειραματική *H. pylori* λοίμωξη εξαρτάται αποκλειστικά από την πρωτεΐνη CagA» **Κ. Παπαδάκος**, Ι. Σουγλέρη, Β. Martinez, Ε. Χατζηλουκάς, Α. Μεντής Δ. Σγούρας.
 10. **Πρώτο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 16^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2011. «Επίδραση των EPIYA-C θέσεων της πρωτεΐνης CagA στις μορφοκινητικές αλλαγές των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων και στην έκκριση της IL-8» **Κ. Παπαδάκος**, Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, Β. Martinez, Ε. Χατζηλουκάς, Α. Μεντής και Δ. Σγούρας.
 11. **Δεύτερο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 16^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2011. «Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αντοχής στα χορηγούμενα αντιβιοτικά και της παρουσίας παραγόντων παθογένειας σε κλινικά στελέχη *Helicobacter pylori*» Β. Martinez-Gonzalez, Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, **Κ. Παπαδάκος**, Σ. Μιχόπουλος, Ε. Ρώμα, Α. Μεντής, Δ. Σγούρας.
 12. **Πρώτο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 15^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2010. «Συσχέτιση των αντιγόνων Lewis σε στελέχη *Helicobacter pylori* (Hp) από παιδιά με τους παράγοντες παθογένειας CagA, VacA και τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα.» **Κ. Παπαδάκος**, Β. Martinez-Gonzalez, Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, Σ. Μιχόπουλος, Γ. Μάντζαρης, Δ. Σγούρας και Α. Μεντής.
 13. **Δεύτερο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 15^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2010. «3η Πανευρωπαϊκή πολυκεντρική μελέτη της ευαισθησίας του *Helicobacter pylori* στα αντιβιοτικά. Ελληνικά δεδομένα» Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, Β. Martinez-Gonzalez, **Κ. Παπαδάκος**, Σ. Μιχόπουλος, Γ. Μάντζαρης, F. Megraud, Δ. Σγούρας, Α. Μεντής.
 14. **Ετήσιο Βραβείο της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης του Ελικοβακτηριδίου του Πυλωρού για την σημαντικότερη ξενόγλωσση δημοσίευση Έλληνα ερευνητή για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού.** 15^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού, Αθήνα Μάρτιος 2010 “CagA and VacA polymorphisms do not correlate with severity of histopathological lesions in Helicobacter pylori-infected Greek children” Sgouras DN, Panayotopoulou EG, **Papadakos K**, Martinez-Gonzalez B, Roumbani A, Panayiotou J, vanVliet-Constantinidou C, Mentis AF, Roma-Giannikou E. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009 Aug;47(8), 2426-34
 15. **Πρώτο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 14^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2009. «Κλινική σημασία των θέσεων φωσφορύλιωσης EPIYA-C της CagA και των ισοτύπων της VacA στην εκδήλωση της *H. pylori* λοίμωξης στους ενήλικες.» Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, **Κ. Παπαδάκος**, Β. Martinez, Σ. Μιχόπουλος, Γ. Μάντζαρης, Κ. Πετράκη, Α. Μεντής, Δ. Σγούρας και Α. Αρχιμανδρίτης.
 16. **Δεύτερο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 14^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2009. «Επίδραση της πρωτεΐνης CagA στα εκκρινόμενα επίπεδα IL-8 από γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα.» Ε. Παναγιωτοπούλου, **Κ. Παπαδάκος**, Β. Martinez, Ε. Χατζηλουκάς, Α. Μεντής και Δ. Σγούρας.
 17. **Ετήσιο Βραβείο της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης του Ελικοβακτηριδίου του Πυλωρού για την σημαντικότερη ξενόγλωσση δημοσίευση Έλληνα ερευνητή για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού.** 13^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού, Αθήνα Μάρτιος 2008 “Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *H. pylori* clinical isolates” Effrosini G. Panayotopoulou, Dionyssios N. Sgouras, **Konstantinos Papadakos**, Antonios Kalliaropoulos, George Papatheodoridis, Andreas Mentis and Athanasios Archimandritis. *Journal of Clinical Microbiology*. Feb. 2007, 45(2), p. 488–495.
 18. **Απονομή Ειδικού Βραβείου Γεωργίου Παπαευαγγέλου.** 3^ο Εθνικό συνέδριο κλινικής Μικροβιολογίας - 9ο Πανελλήνιο συνέδριο νοσοκομειακών λοιμώξεων & υγιεινής. 6-8

- Φεβρουάριου 2007. «Απομόνωση ισογονιδιακών στελεχών *Helicobacter pylori* με διαφορετικό αριθμό θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης CagA από τον ίδιο ασθενή.» Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, **Κ. Παπαδάκος**, Β. Martinez, Σ. Μιχόπουλος, Ε. Ρώμα, Ε. Κατσιγιαννάκη, Α. Αρχιμανδρίτης, Α. Μεντής και Δ. Σγούρας.
19. **Τρίτο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 13^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2008. «*H. pylori* που αποικίζουν τον θόλο ασθενών εκφράζουν CagA πρωτεΐνη με αυξημένο αριθμό EPIYA-C θέσεων φωσφορυλίωσης έναντι στελεχών από το άντρο.» **Κ. Παπαδάκος**, Β. Martinez-Gonzalez, Ε. Παναγιωτοπούλου, Σ. Μιχόπουλος, Γ. Μάντζαρης, Δ. Σγούρας και Α. Μεντής.
20. **Δεύτερο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 13^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2008. «Κλινικά στελέχη *H. pylori* με περισσότερες επαναλήψεις EPIYA-C στην CagA πρωτεΐνη προκαλούν εντονότερη απορρόθμιση των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων.» Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, Δ.Ν. Σγούρας, **Κ. Παπαδάκος**, Β. Martinez-Gonzalez, Σ. Μιχόπουλος, Γ. Μάντζαρης, Α. Μεντής & Α. Αρχιμανδρίτης.
21. **Τρίτο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 12^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2007. «Ανάπτυξη μεθόδου PCR για τον πολλαπλασιασμό με υψηλή πιστότητα ολοκλήρου του γονιδίου της πρωτεΐνης CagA.» **Κ. Παπαδάκος**, Ε. Παναγιωτοπούλου, Β. Martinez, Σ. Μιχόπουλος, Ε. Χατζηλουκάς, Δ. Σγούρας και Α. Μεντής.
22. **Δεύτερο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 12^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2007. «Ανίχνευση και απομόνωση από τον ίδιο ασθενή ισογονιδιακών στελεχών *Helicobacter pylori* με διαφορετικό αριθμό θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA-C στην πρωτεΐνη CagA.» Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, **Κ. Παπαδάκος**, Β. Martinez, Σ. Μιχόπουλος, Ε. Ρώμα, Ε. Κατσιγιαννάκη, Α. Αρχιμανδρίτης, Α. Μεντής και Δ. Σγούρας.
23. **Πρώτο βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης.** 11^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2006. «Μελέτη της πολυμορφικότητας της 3' μεταβλητής περιοχής της πρωτεΐνης CagA κλινικών στελεχών *Helicobacter pylori*.» Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, **Κ. Παπαδάκος**, Α. Καλλιαρόπουλος, Σ. Μιχόπουλος, Ε. Ρώμα, Ε. Κατσιγιαννάκη, Α. Αρχιμανδρίτης, Α. Μεντής, Δ. Σγούρας.

Εργαστηριακή εμπειρία

1. Εμπειρία στην καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων (HeLa, HepG2, AGS CaCo2, MEFs, e.t.c.)
2. Εμπειρία καλλιέργειας βακτηρίων *Helicobacter pylori*, *E. coli* e.t.c
3. *In vitro* πειράματα μόλυνση
4. Σχεδιασμός, βελτιστοποίηση και αξιολόγηση PCR, Real-time PCR.
5. Γνώσεις και εμπειρία σε βασικές τεχνικές μοριακής βιολογίας όπως: DNA , διαμόλυνση, μοριακές τεχνικές κλωνοποίηση και ανασοσύπωση κατά western.
6. Εμπειρία σε τεχνικές συνιατακρήμνισης πρωτεϊνικών συμπλόκων με ανοσοατακρήμνιση
7. Εκπαιδευμένος χειριστής του γενετικού αναλυτή ανάγνωσης αλληλουχιών CEQ 8000 Genetic analysis system Beckman Coulter

8. Εμπειρία Confocal Microscopy και ανοσοφθορισμού
9. Εμπειρία στην διεξαγωγή πειραμάτων καταγραφής με μικροσκοπία πραγματικού χρόνου (Wide-field Time-lapse Olympus IX-81 Cell-R imaging system).
10. Εμπειρία στο “*in vivo*” πειραματικό μοντέλο μόλυνσης SS1 *Helicobacter pylori* σε C57BL/6 ποντίκια.
11. Εμπειρία σε τεχνικές ζυμογραφίας για την ανάλυση μεταλλοπρωτεϊνών.

Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

1. **Phosphorylation of bacterial effector CagA may be required for the CagA protein induces factors involved in epithelial to mesenchymal transition of gastric epithelial cells in experimental *Helicobacter pylori* infection.** I. S. Sougleri, **K. Papadakos**, A. Mentis, D. Sgouras. (Oral Presentation). 11th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infections. Helsingør 2-5 July 2014.
2. **Bacterial effector CagA induces factors involved in EMT phenotype of gastric epithelial cells in experimental *in vitro* infection with *Helicobacter pylori*.** I. S. Sougleri, **K. Papadakos**, A. Mentis, D. Sgouras. EMBO-FEBS Lecture Course. Paris 30-4 August 2014.
3. **Phosphorylation of bacterial effector CagA may be required for the induction of molecules involved in extracellular matrix remodeling in *Helicobacter pylori* experimental *in vitro* infection of gastric epithelial cells.** Sougleri I., **Papadakos K.**, Mentis A., Sgouras D. EMBO/FEBS Course 'Host-Pathogen Interactions', Spetses (Greece), from the 30th of August until the 7th of September 2013 .
4. **Phosphorylation of bacterial effector CagA may be required for the induction of molecules involved in extracellular matrix remodeling in *Helicobacter pylori* experimental *in vitro* infection of gastric epithelial cells.** I. Sougleri, **K. Papadakos**, A. F. Mentis, D. N. Sgouras. XXVInd International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer Sep 12-14, 2013 Madrid.
5. **A modified QuikChange II Site-Directed mutagenesis method for the generation of repetitive gene sequences: The paradigm of the EPIYA-C coding motifs in *cagA*.** **K. Papadakos**, Hatziloukas E., A. F. Mentis, D. N. Sgouras. XXV^d International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer Sep 13-15, 2012 Ljubljana.
6. **Involvement of CagA EPIYA phosphorylation in the induction of IL-8 through the activation of TAK1 kinase** **K. Papadakos¹**, E. Hatziloukas, A. F. Mentis, D.N. Sgouras. 10th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infections Helsingør, Denmark July 4-7, 2012.
7. **Implication of CagA EPIYA-C phosphorylation in IL-8 induction by gastric epithelial cells.** **Papadakos K.**, Loi A., Martinez-Gonzalez B., Hatziloukas E., Mentis A. F., Sgouras D. N., XXIVnd International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer Sep 11-13, 2011 Dublin.
8. **Primary antibiotic resistance and *Helicobacter pylori* virulence factors - is there an association?** Martinez-Gonzalez B., **Papadakos K.**, Konstantoulaki A., Michopoulos S., Roma E., Sgouras D. N., Mentis A. F., XXIVnd International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer Sep 11-13, 2011

9. **PYK2 interaction with CagA protein is concomitant with PYK2 increased tyrosine phosphorylation and reduced paxillin expression in H-pylori-infected gastric epithelial cells.** Panayotopoulou E. G., Sgouras D. N., **Papadakos K.**, Tzathas C., Mentis A. XXIIInd International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer Sep 16-18, 2010
10. **Characterization of virulence factors CagA, VacA and Lewis Antigens in H-pylori strains isolated from children and lack of correlation with the severity of histological findings.** Panayotopoulou E. G., Harrison B. A., **Papadakos K.**, van Vliet C., Mentis A., Roma E., Chandan V., Sgouras D. N., Altman E. XXIIInd International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer Sep 16-18, 2010
11. **H. pylori interacts with PYK2 and is accompanied by increased PYK2 tyrosine phosphorylation and reduced Paxillin expression.** E. Panayotopoulou, **K. Papadakos**, A. F. Mentis, D. N. Sgouras, A. 9th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infections Helsingør, Denmark July 7-10, 2010.
12. **Distinct presence of cagA-positive strains with higher number of EPIYA-C repeats in the fundus vs. the antrum of H. pylori infected patients.** E. Panayotopoulou, **K. Papadakos**, K. Petraki, B. Martinez-Gonzalez, S. Michopoulos, G. Mantzaris, G. Papatheodoridis, A. F. Mentis, D. N. Sgouras, A. Archimandritis. XXIInd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. Porto, Portugal September 17 - 19, 2009
13. **CagA and VacA polymorphisms are associated with distinct pathological features in H. pylori infected adults with ulcer and non-ulcer disease** E. Panayotopoulou, **K. Papadakos**, K. Petraki, B. Martinez-Gonzalez, S. Michopoulos, G. Mantzaris, G. Papatheodoridis, A. F. Mentis, D. N. Sgouras, A. Archimandritis. XXIInd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. Porto, Portugal September 17 - 19, 2009
14. **H. pylori CagA protein phosphorylation in early infection stages of gastric epithelial cells coincides with FAK dephosphorylation and is compensated by increased Pyk2 activity.** Panayotopoulou Effrosini G, **Papadakos Konstantinos**, Martinez-Gonzalez Beatriz, Michopoulos Spyros, Mantzaris Gerassimos, Archimandritis Athanasios, Mentis Andreas and Sgouras Dionyssios N. 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference. Athens, Greece 28 June-3 July 2008.
15. **CagA protein phosphorylation in H. pylori infected gastric epithelial cells may be related with reduced FAK activation and increased Pyk2 activity** E. G. Panayotopoulou, **K. Papadakos**, S. Michopoulos, G. Mantzaris, G. Papatheodoridis, A.F. Mentis, D. N. Sgouras, A. Archimandritis XXst International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 18 – 20 2008 Riga.
16. **CagA protein diversity with respect to EPIYA phosphorylation motifs in H. pylori infected children - Relation to histopathology.** **K. Papadakos**, E. G. Panayotopoulou, A. Roumbani, B. Martinez Gonzalez, J. Panayiotou, C. Van-Vliet, A. F. Mentis, D. N. Sgouras, E. Roma XXIst International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 18 – 20 2008 Riga.
17. **Naturally occurring isogenic H. pylori strains isolated from the same patient exhibit differential virulent potential with regards to phosphorylation of CagA protein and focal adhesion kinase activity** Panayotopoulou Effrosini G, **Papadakos Konstantinos**, Martinez-Gonzalez Beatriz, Michopoulos Spyros, Mantzaris Gerassimos, Archimandritis Athanasios, Mentis Andreas and Sgouras Dionyssios N 8th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infections Helsingør, Denmark July 2-5, 2008.
18. **Evaluation of resistance to Levofloxacin in Helicobacter pylori strains isolated from Greek patients.** B. Martinez-Gonzalez, E. Panayotopoulou, **K. Papadakos**, E. Roma, G. Mantzaris, S. Michopoulos, D. N. Sgouras, A. Mentis. XXth International Workshop on

Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation. Istanbul, Turkey September 20 - 22 2007

19. **Frequent occurrence of patients harboring isogenic *Helicobacter pylori* strains with different numbers of repeating EPIYA-C motifs in CagA protein.** Sgouras D.N., Panayotopoulou E., **Papadakos K.**, Martinez B., Michopoulos S., Mantzaris G., Roma E., Mentis A., Archimandritis A. 14th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms (CHRO). Rotterdam, Netherlands, 2-5 September 2007.
20. **Characterization of EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *H. pylori* clinical isolates.** Panayotopoulou, K. Petraki, A. Kalliaropoulos, **K. Papadakos**, S. Michopoulos, D. N. Sgouras, A. Mentis and A. Archimandritis. European Helicobacter Study Group XIX International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation. Wroclaw, Poland September 7-9 2006.
21. **Characterization of the Number and Type of Repeating EPIYA Phosphorylation Motifs in the Carboxyl Terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates.** E.G. Panayotopoulou, K. Petraki, A. Kalliaropoulos, **K. Papadakos**, S. Michopoulos, D.N. Sgouras, A.F. Mentis and A. Archimandritis. XIXth International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation. European Helicobacter Study Group. Wroclaw, 7-9 September 2006.
22. **Characterization of the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates.** E. Panayotopoulou, K. Petraki, A. Kalliaropoulos, **K. Papadakos**, S. Michopoulos, D. N. Sgouras, A. Mentis and A. Archimandritis. 7th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infection. LO-skolen, Helsingør, Denmark 1-4 July 2006.
23. **Differences in the Prevalence of EPIYA Tyrosine Phosphorylation Motifs in CagA Protein of *Helicobacter pylori* of Clinical Isolates from Children and Adults.** E. Panayotopoulou, **K. Papadakos**, A. Kalliaropoulos, K. Petraki, S. Karagiannis, F. Dimopoulos, S. Michopoulos, E. Katsiyiannaki, E. Roma, A. Archimandritis, A. Mentis and D.N. Sgouras. XVIIIth International Workshop on Gastrointestinal Pathology and Helicobacter. European Helicobacter Study Group. Copenhagen, October 12-14, 2005.
24. **Positive association between the presence of CagA protein EPIYA motifs in *Helicobacter pylori* clinical strain and the severity of histopathology lesions.** E. Panayotopoulou, K. Petraki, A. Kalliaropoulos, B. Martinez- Gonzales, **K. Papadakos**, S. Karagiannis, F. Dimopoulos, S. Michopoulos, A. Archimandritis, A. Mentis and D.N. Sgouras. XVIIIth International Workshop on Gastrointestinal Pathology and Helicobacter. European Helicobacter Study Group. Copenhagen, October 12-14, 2005.

Ανακοινώσεις σε εθνικά συνέδρια

1. **Πειραματική μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων με *Helicobacter pylori* επάγει την ενεργοποίηση μορίων τροποποίησης του εξωκυττάρου χώρου.** I. Σουγλέρη, **K. Παπαδάκος**, B. Martinez, A. Μεντής και Δ. Σγούρας. 20^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού, Αθήνα Μάρτιος 2015.
2. **Φυλογενετική ανάλυση κλινικών στελεχών *H. pylori* Ελλήνων φορέων τα κατατάσσει στον HPAE2 τύπο προγονικών ευρωπαϊκών στελεχών.** **K. Παπαδάκος**, S. Breurec, B. Martinez, I. Σουγλέρη, Σ. Μιχόπουλος, Γ. Μάντζαρης, Α. Μεντής, Δ. Σγούρας. 18^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού, Αθήνα Μάρτιος 2014.

3. Η TAK1 κινάση συμμετέχει στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κβ και την επαγωγή της έκκρισης Ιντερλευκίνης-8 στην *H. pylori* λοίμωξη. **Κ. Παπαδάκος**, I. Σουγλέρη, B. Martinez-Gonzalez, A. Μεντής, Δ. Σγούρας. 19^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού, Αθήνα Μάρτιος 2014.
4. **TAK1 plays a central role in NF-κB-dependent IL-8 secretion induced by *Helicobacter pylori* infection of gastric epithelial cells.** **Papadakos K.S.**, Sougleri I., Kotsi E., Mentis A.F., Sgouras D.N 64th Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. Αθήνα 6-8 Δεκεμβρίου 2013.
5. **Induction of MMP-3/10 (stromelysin-1 and -2) activity in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells may depend on the phosphorylation of the bacterial CagA oncoprotein** Sougleri I., **Papadakos K.**, Mentis A., Sgouras D. 64th Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. Αθήνα 6-8 Δεκεμβρίου 2013.
6. Πειραματική μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων με *Helicobacter pylori* επάγει την ενεργοποίηση μορίων τροποποίησης του εξωκυττάρου χώρου. I. Σουγλέρη, **Κ. Παπαδάκος**, B. Martinez, A. Μεντής και Δ. Σγούρας. 18^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού, Αθήνα Μάρτιος 2013.
7. **Αξιοποίηση της τεχνολογίας FIAsH για να μελετηθεί η μεταφορά CagA πρωτεΐνης του *Helicobacter pylori* μέσω του τύπου IV εκκριτικού συστήματος.** **Παπαδάκος Κ.**, Σουγλέρη I., Χατζηλουκάς E., Μεντής A. και Σγούρας Δ. 5^ο Πανελλήνιο συνέδριο της Ελληνικής επιστημονικής ένωσης Μικροβιόκοσμος. Αθήνα 13-16 Δεκεμβρίου 2012.
8. **Ενεργοποίηση Στρομελυσίνης 1 (MMP-3) σε πειραματική λοίμωξη γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων από Ελικοβακτήριο του Πυλωρού (ΕΠ)** I. Σουγλέρη, **Κ. Παπαδάκος**, Μιχόπουλος Σ., Μαυρή-Βαβαγιάννη Μ., Α. Μεντής και Δ. Σγούρας. 32^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας Νοέμβριος 2012.
9. **Φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA του *Helicobacter pylori* ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα NF-κB μέσω της κινάσης TAK1 και συμβάλλει στην ενεργοποίηση της Ιντερλευκίνης-8 (IL-8) από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα.** **Κ. Παπαδάκος**, I. Σουγλέρη, E. Χατζηλουκάς, A. Μεντής, Δ. Σγούρας. 32^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Αθήνα 29 Νοεμβρίου- 1 Δεκεμβρίου 2012.
10. **Ενεργοποίηση Στρομελυσίνης 1 (MMP-3) σε πειραματική λοίμωξη γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων από Ελικοβακτήριο του Πυλωρού (ΕΠ)** I. Σουγλέρη, **Κ. Παπαδάκος**, Μιχόπουλος Σ., Μαυρή-Βαβαγιάννη Μ., Α. Μεντής, Δ. Σγούρας. 32^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Αθήνα 29 Νοεμβρίου- 1 Δεκεμβρίου 2012.
11. **Visualizing the secretion of bacterial effector CagA through the Type IV secretion system of *Helicobacter pylori* utilizing FIAsH technology.** **Papadakos K.**, Sougleri I., Mentis A., Sgouras D. 63^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. Ηράκλειο 9-11 Νοεμβρίου 2012.
12. **Phosphorylation of bacterial effector CagA may be required for induction of Matrix metalloproteinase-3 and -9 secretion by gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* experimental *in vitro* infection.** Sougleri I., **Papadakos K.**, Mentis A., Sgouras D. 63^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. Ηράκλειο 9-11 Νοεμβρίου 2012.
13. **Phylogenetic analysis and evaluation of resistance to antiviral drugs in pandemic strains of influenza virus.** A. Kossivakis, **K. Papadakos**, V. Pogka, A. Moutoussi, D. N. Sgouras, A.F. Mentis. 7^ο National Panhellenic Congress of Medical Biopathology. Athens, March 2012.
14. **Προσδιορισμός αντοχής στην κλαριθρομυκίνη: Σύγκριση φαινοτυπικής μεθόδου καλλιέργειας και μοριακών τεχνικών Real Time PCR.** B. Martinez, **Κ. Παπαδάκος**, K. Κωνσταντουλάκη, Σ. Μιχόπουλος, Α. Μεντής και Δ. Σγούρας. 17^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2009.

15. Η μεταγραφική ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα σε πειραματική *H. pylori* λοίμωξη εξαρτάται αποκλειστικά από την πρωτεΐνη CagA. **Κ. Παπαδάκος**, I. Σουγλέρη, B. Martinez, E. Χατζηλουκάς, A. Μεντής Δ. Σγούρας. 17^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2012.
16. *Helicobacter pylori* CagA protein phosphorylation on EPIYA-C motifs activates NF-κB through TAK1 kinase and contributes to IL-8 gene activation and chemokine secretion by gastric epithelial cells. **Papadakos K.**, Martinez B., Hatziloukas E., Mentis A., Sgouras D. 62^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. Αθήνα 9-11 Δεκεμβρίου 2012.
17. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA του *H. pylori* σε θέσεις EPIYA, συμβάλλει μέσω ενεργοποίησης TAK1 και NF-κB, στην ενεργοποίηση και έκκριση της ιντερλευκίνης-8 από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα **Παπαδάκος Κ.**, B. Martinez, E. Χατζηλουκάς, A. Μεντής, Δ. Σγούρας. 4^ο Πανελλήνιο συνέδριο της Ελληνικής επιστημονικής ένωσης Μικροβιόκοσμος. Ιωάννινα 21-23 Οκτώβριος 2011.
18. Επίδραση των EPIYA-C θέσεων της πρωτεΐνης CagA στις μορφοινητικές αλλαγές των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων και στην έκκριση της IL-8. **Κ. Παπαδάκος**, E.Γ. Παναγιωτοπούλου, B. Martinez, E. Χατζηλουκάς, A. Μεντής, Δ. Σγούρας. 16^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2011.
19. Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αντοχής στα χορηγούμενα αντιβιοτικά και της παρουσίας παραγόντων παθογένειας σε κλινικά στελέχη *Helicobacter pylori*; B. Martinez-Gonzalez, E.Γ. Παναγιωτοπούλου, **Κ. Παπαδάκος**, Σ. Μιχόπουλος, E. Ρώμα, A. Μεντής, Δ. Σγούρας. 16^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2011.
20. Ανίχνευση μεταλλάξεων σε στελέχη του πανδημικού ιού της γρίπης A(H1N1)ν στα πλαίσια της εργαστηριακής επιτήρησης. **Κ. Παπαδάκος**, Κοσσυβάκης Α. Πόγκα Β.Δ. Σγούρας και Α. Μεντής. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Αθήνα Απρίλιος 2010.
21. Susceptibility of pandemic influenza strains to neuraminidase inhibitors. A. Κοσσυβάκης, Β. Πόγκα, Α. Καλλιαρόπουλος, **Κ. Παπαδάκος**, Α. Μουτούση, Τ. Παναγιωτόπουλος, Σ. Τσιόδρας, Δ. Σγούρας, Α. Μεντής. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Αθήνα Απρίλιος 2010.
22. Έλεγχος δειγμάτων για παρουσία ιού πανδημικής γρίπης A(H1N1)ν στο εθνικό εργαστήριο αναφοράς γρίπης νοτίου Ελλάδος. Α. Κοσσυβάκης, Β. Πόγκα, Α. Καλλιαρόπουλος, Α. Μουτούση, Μ. Εμμανουήλ, E. Παναγιωτίδου, Α. Βούλγαρη-Κόκοτα, **Κ. Παπαδάκος**, Τ. Παναγιωτόπουλος, Σ. Μπονόβας, Σ. Τσιόδρας, Δ. Σγούρας, Α. Μεντής. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Αθήνα Απρίλιος 2010.
23. 3^η Πανευρωπαϊκή πολυκεντρική μελέτη της ευαισθησίας του *Helicobacter pylori* στα αντιβιοτικά. Ελληνικά δεδομένα. E. Παναγιωτοπούλου, B. Martinez, **Κ. Παπαδάκος**, Σ. Μιχόπουλος, Γ. Μάντζαρης, F. Megraud, Δ. Σγούρας, Α. Μεντής. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Αθήνα Απρίλιος 2010.
24. Ρόλος των λειτουργικών πολυμορφισμών των παραγόντων παθογένειας CagA και VacA στην κλινικοπαθολογική εικόνα της λοίμωξης από *Helicobacter pylori* σε παιδιά και ενήλικες. E. Παναγιωτοπούλου, **Κ. Παπαδάκος**, Κ. Πετράκη, Σ. Μιχόπουλος, Γ. Μάντζαρης, E. Ρώμα, Α. Αρχιμανδρίτης, Α. Μεντής, Δ. Σγούρας. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Αθήνα Απρίλιος 2010.
25. Συσχέτιση των αντιγόνων Lewis σε στελέχη *Helicobacter pylori* (Hp) από παιδιά με τους παράγοντες παθογένειας CagA, VacA και τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα. E. Παναγιωτοπούλου, **Κ. Παπαδάκος**, E. Ρώμα, I. Παναγιώτου, C. Van Vliet, E. Altman, A. Μεντής, Δ. Σγούρας. 15^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2010.
26. 3^η Πανευρωπαϊκή πολυκεντρική μελέτη της ευαισθησίας του *Helicobacter pylori* στα αντιβιοτικά. Ελληνικά δεδομένα. E. Παναγιωτοπούλου, B. Martinez, **Κ. Παπαδάκος**, Σ. Μιχόπουλος, Γ. Μάντζαρης, F. Megraud, Δ. Σγούρας, Α. Μεντής. 15^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2010.

27. **Disruption of focal adhesions in gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* CagA protein may be related to FAK dephosphorylation and concomitant Pyk2 activation.** Panayotopoulou E., **Papadakos K.**, Papatheodoridis G., Archimandritis A., Mentis A., Sgouras D. 60^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. Αθήνα 20-22 Δεκεμβρίου 2009.
28. **Generation of *Helicobacter pylori* strains expressing CagA protein with variable numbers of EPIYA phosphorylation motifs.** **Papadakos K.**, Panayotopoulou E., Hatziloukas E., Mentis A., Sgouras D. 60^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. Αθήνα 20-22 Δεκεμβρίου 2009.
29. **Κλινική σημασία των θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA-C της CagA και των ισοτύπων της VacA στην εκδήλωση της *H. pylori* λοίμωξης στους ενήλικες.** Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, **Κ. Παπαδάκος**, Β. Martinez, Σ. Μιχόπουλος, Γ. Μάντζαρης, Κ. Πετρόκη, Α. Μεντής, Δ. Σγούρας και Α. Αρχιμανδρίτης. 14^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2009.
30. **Επίδραση της πρωτεΐνης CagA στα εκκρινόμενα επίπεδα IL-8 από γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα.** Ε. Παναγιωτοπούλου, **Κ. Παπαδάκος**, Β. Martinez, Ε. Χατζηλουκάς, Α. Μεντής και Δ. Σγούρας. 14^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2009.
31. **Κλινικά στελέχη *H. pylori* με περισσότερες επαναλήψεις EPIYA-C στην CagA πρωτεΐνη προκαλούν εντονότερη απορρύθμιση των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων.** Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, Δ.Ν. Σγούρας, **Κ. Παπαδάκος**, Β. Martinez-Gonzalez, Σ. Μιχόπουλος, Γ. Μάντζαρης, Α. Μεντής & Α. Αρχιμανδρίτης. 13^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2008.
32. **Στελέχη *H. pylori* που αποικίζουν το θόλο ασθενούς εκφράζουν CagA πρωτεΐνη με αυξημένο αριθμό EPIYA-C θέσεων φωσφορυλίωσης έναντι στελεχών από το άντρο.** **Κ. Παπαδάκος**, Β. Martinez-Gonzalez, Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, Σ. Μιχόπουλος, Γ. Μάντζαρης, Δ. Σγούρας & Α. Μεντής. 13^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2008.
33. **Isogenic *H. Pylori* strains present within the same patient exhibit increased virulence potential with reference to CagA protein phosphorylation** Effrosini G. Panayotopoulou, **Konstantinos Papadakos**, Beatriz Martinez-Gonzalez, Spyros Michopoulos, Gerassimos Mantzaris, Eleftheria Roma, Andreas Mentis, Athanasios Archimandritis, Dionyssios N. Sgouras 59^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. Αθήνα 7-9 Δεκεμβρίου 2007.
34. **Ανίχνευση και απομόνωση από τον ίδιο ασθενή ισογονιδιακών στελεχών *H. pylori* (*Hp*) με διαφορετικό αριθμό θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA-C στην πρωτεΐνη CagA.** Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, Δ. Σγούρας, **Κ. Παπαδάκος**, Β. Martinez, Σ. Μιχόπουλος, Γ. Μάντζαρης, Ε. Ρώμα, Α. Μεντής, Α. Αρχιμανδρίτης. 12^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2007.
35. **Ανάπτυξη μεθόδου PCR για τον πολλαπλασιασμό με υψηλή πιστότητα ολόκληρου του γονιδίου της πρωτεΐνης CagA.** **Κ. Παπαδάκος**, Ε. Παναγιωτοπούλου, Β. Martinez, Σ. Μιχόπουλος, Ε. Χατζηλουκάς, Δ. Σγούρας, Α. Μεντής. 12^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος 2007.
36. **Απομόνωση από τον ίδιο ασθενή ισογονιδιακών στελεχών *H. pylori* με διαφορετικό αριθμό θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA-C στην πρωτεΐνη CagA.** Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, **Κ. Παπαδάκος**, Β. Martinez, Σ. Μιχόπουλος, Ε. Ρώμα, Ε. Κατσιγιαννάκη, Α. Αρχιμανδρίτης, Α. Μεντής, Δ. Σγούρας. 3^ο Πανελλήνιο συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας-9ο Παν. Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής, Αθήνα Φεβρουάριος 2007.
37. **Αύξηση του αριθμού των επαναλαμβανόμενων θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA στο C-τελικό άκρο της CagA πρωτεΐνης του *H. pylori* κατά την ενηλικίωση.** Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, **Κ. Παπαδάκος**, Β. Martinez, Σ. Μιχόπουλος, Ε. Ρώμα, Ε. Κατσιγιαννάκη, Α. Αρχιμανδρίτης, Α. Μεντής, Δ. Σγούρας. 3^ο Παν. Συνέδριο Κλ. Μικροβιολογίας-9ο Παν. Συν. Νοσ. Λοιμώξεων και Υγιεινής, Αθήνα Φεβρουάριος 2007.

38. Μελέτη της πολυμορφικότητας της 3' μεταβλητής περιοχής της πρωτεΐνης CagA κλινικών στελεχών *H. pylori*. Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, Κ. Παπαδάκο, Α. Καλλιαρόπουλο, Σ. Μιχόπουλο, Ε. Ρώμα, Ε. Κατσιγιαννάκη, Α. Αρχιμανδρίτη, Α. Μεντή και Δ. Σγούρα 11^ο Ελληνικό Συνέδριο για το Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού. Αθήνα Μάρτιος.
39. Αύξηση των επαναλήψεων των θέσεων φωσφορλίωση ΕΡΙΥΑ στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης CagA του *Helicobacter pylori* κατά την ενήλικη ζωή. Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου, Κ. Παπαδάκος, Β. Martinez, Σ. Μιχόπουλος, Ε. Ρώμα, Ε. Κατσιγιαννάκη, Α. Αρχιμανδρίτης, Α. Μεντής και Δ. Σγούρας. 3^ο Εθνικό συνέδριο κλινικής Μικροβιολογίας-9^ο Πανελλήνιο συνέδριο νοσοκομειακών λοιμώξεων & υγιεινής. 6-8 Φεβρουάριος 2007
40. Συσχέτιση των θέσεων φωσφορλίωσης ΕΡΙΥΑ της πρωτεΐνης CagA κλινικών στελεχών *H. pylori* με τη βαρύτητα των ιστολογικών αλλοιώσεων. Παναγιωτοπούλου Ε, Παπαδάκος Κ, Καλλιαρόπουλος Α, Καραγιάννης Σ, Δημόπουλος Φ, Μιχόπουλος Σ, Ρώμα Ε, Κατσιγιαννάκη Ε, Αρχιμανδρίτης Α, Μεντής Α και Σγούρας Δ. 25^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Θεσσαλονίκη, 5-8 Οκτωβρίου 2005.
41. Ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό θέσεων φωσφορλίωσης ΕΡΙΥΑ της πρωτεΐνης CagA σε κλινικά στελέχη *Helicobacter pylori*. Παναγιωτοπούλου Ε, Παπαδάκος Κ, Καλλιαρόπουλος Α, Καραγιάννης Σ, Δημόπουλος Φ, Μιχόπουλος Σ, Ρώμα Ε, Κατσιγιαννάκη Ε, Αρχιμανδρίτης, Μεντής Α, Σγούρας Δ. 25^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Θεσσαλονίκη, 5-8 Οκτωβρίου 2005.

Ξένες Γλώσσες & άλλες ικανότητες

- Αγγλικά (βασική γνώση)
- Άριστος χειρισμός προγραμμάτων ηλεκτρονικού υπολογιστή (Microsoft Office, Image J, Adobe Photoshop, Lispix, Imaris, βιολογικές βάσεις δεδομένων)

Εθελοντισμός

- 1991 έως σήμερα Σώμα Ελλήνων Προσκόπων. Εκπαιδευτής ενηλίκων του Σώματος Ελλήνων Προσκόπων μέλος του σε πολλές βαθμίδες, με συμμετοχή σε πανελλήνιες δράσεις.
- 2002-2006 Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός Ιωάννινα. Εθελοντής Σαμαρείτης με ειδικευση στην ναυαγοσωστική και εκπαιδευμένος για παροχή πρώτων βοηθειών καθώς και στην διάσωση, με προϋπηρεσία στο τμήμα επειγόντων περιστατικών του Γενικού Νομαρχιακού Νοσοκομείου Χατζηγάστα στα Ιωάννινα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΕΙΜΕΝΟΥ	xxiii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	xxvii
SUMMARY	xxx
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΟΥ <i>Helicobacter pylori</i>	2
1.2. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΦΑΝΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ <i>H. pylori</i>	6
1.2.1. Οξεία γαστρίτιδα	7
1.2.2. Χρόνια γαστρίτιδα.....	7
1.2.3. Πεπτικό έλκος.....	9
1.2.4. Μη ελκωτική δυσπεψία	10
1.2.5. Γαστρικός καρκίνος	11
1.2.6. Λέμφωμα MALT.....	15
1.2.7. Εξωγαστρικές παθήσεις	16
1.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΣΗΣ	17
1.3.1. Επεμβατικές μέθοδοι.....	17
1.3.1.1. Καλλιέργεια	18
1.3.1.2. Ιστολογική διάγνωση	19
1.3.1.3. Ταχεία δοκιμασία ουρεάσης (CLO τεστ).....	20
1.3.1.4. Μοριακές δοκιμασίες.....	20
1.3.2. Μη επεμβατικές μέθοδοι.....	21
1.3.2.1. Τεστ αναπνοής ουρεάσης (urea breath test, UBT)	22
1.3.2.2. Ανίχνευση αντιγόνου στα κόπρανα (<i>H. pylori</i> stool antigen test HpSA).....	22
1.3.2.3. Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι <i>H. pylori</i> στον ορό	23
1.4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ <i>H. pylori</i> ΛΟΙΜΩΣΗΣ	24
1.4.1. Εκρίζωση <i>H. pylori</i> με την χορήγηση σχημάτων αντιβιοτικών	24
1.4.1.1. Κατευθυντήριες οδηγίες για την θεραπεία της <i>H. pylori</i> λοίμωξης στην Ευρώπη	25
1.4.1.2. Κατευθυντήριες οδηγίες για την θεραπεία της λοίμωξης από <i>H. pylori</i> από το American College of Gastroenterology (ACG) & της δεύτερης συνδιάσκεψης συναίνεσης της περιοχής της Ασία & του Ειρηνικού Ωκεανού	26
1.5. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ <i>H. pylori</i>	28
1.5.1. Ταξινόμηση & μορφολογία.....	28

1.5.2. Γονιδίωμα	29
1.6. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ.....	31
1.7. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΟΥ <i>Helicobacter pylori</i> ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΛΟΓΙΚΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	34
1.8. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ	36
1.8.1. Μεμβρανικοί παράγοντες παθογένειας	38
1.8.1.1. Προσκολλητίνη Αντιγόνου Ομάδας αίματος BabA	39
1.8.1.2. Προσκολλητίνη δέσμησης του σιαλικού οξέος SabA.....	40
1.8.1.3. Λιποπρωτεΐνες A και B AfpA/B που συσχετίζονται με προσκόλληση.....	41
1.8.1.4. Παράγοντας προσκολλησεως OipA	42
1.8.1.5. Άλλοι παράγοντες προσκολλησεως.....	44
1.8.2. Εκκρινόμενοι παράγοντες παθογένειας	44
1.8.2.1. Ουρεάση.....	45
1.8.2.2. Πρωτεΐνη θερμικού στρες HtrA.....	46
1.8.2.3. Εξοτοξίνη VacA	48
1.8.3. Μεταφερόμενοι παράγοντες παθογένειας.....	51
1.8.3.1. Νησίδιο παθογένειας <i>cag</i>	51
1.8.3.1.1. Δομή του <i>cag</i> -T4SS	53
1.8.3.1.2. Αλληλεπιδράσεις του <i>cag</i> -T4SS με την κυτταρική μεμβράνη του γαστρικού επιθηλίου.....	55
1.8.3.2. Ενδοτοξίνη CagA	56
1.8.3.2.1. Αλληλεπιδράσεις της CagA εξαρτώμενες από φωσφορυλίωση σε EPIYA θέσεις	60
1.8.3.2.2. Επιδράσεις της CagA στην μεταγωγή σήματος ανεξάρτητες της φωσφορυλίωσης	65
1.9. ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΗΣ IL-8 ΑΠΟ ΓΑΣΤΡΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ <i>H. pylori</i>.....	72
1.9.1. Παράγοντες που επάγουν έκκριση της IL-8, που εξαρτώνται από το λειτουργικό σύστημα <i>cag</i> -T4SS, αλλά είναι ανεξάρτητοι από την δραστηριότητα της CagA	73
1.9.2. Επαγωγή έκκρισης της IL-8 εξαρτώμενη από την έκφραση της πρωτεΐνης CagA.....	76
1.9.3. Ανεξάρτητη του Cag-T4SS επαγωγή έκκρισης της IL-8.....	77
1.10. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	78
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	79

2.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	80
2.1.1. Καλλιέργεια στελεχών <i>H. pylori</i>	80
2.1.2. Απομόνωση κλινικών στελεχών <i>H. pylori</i> από γαστρικές βιοψίες.....	80
2.1.3. Καλλιέργεια <i>E. coli</i>	81
2.1.4. Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών ευκαρυωτικών κυττάρων.	81
2.2. ΚΡΥΟ-ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ	82
2.2.1. Κρύο-συντήρηση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών	82
2.2.2. Κρύο-συντήρηση στελεχών <i>H. pylori</i>	82
2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	82
2.3.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA βακτηρίων	82
2.3.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας	83
2.3.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας	83
2.3.4. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	84
2.3.5. Απομόνωση ολικού RNA από γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα.....	85
2.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΛΥΣΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	85
2.4.1. Προσδιορισμός των θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA στη πρωτεΐνη CagA.....	85
2.4.2. Χαρακτηριστικά εκκινητών για την δημιουργία του μέγα-εκκινητή μεταλλαξιγένεσης... 86	
2.4.3. Κατασκευή του μέγα-εκκινητή της μεταλλαξιγένεσης.....	86
2.4.4. Ανάπτυξη μεθόδου PCR για τον πολλαπλασιασμό του συνόλου του γονιδίου <i>cagA</i>	87
2.4.5. Αντίστροφη μεταγραφή RNA σε DNA.....	88
2.4.6. Ποσοτική αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR)	88
2.5. Κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς	88
2.5.1. Πέψη πλασμιδίων και τμημάτων DNA.....	88
2.5.2. Πλήρωση κολλωδών άκρων και αποφοσφορυλίωση άκρων DNA.....	89
2.5.3. Δεσμοποίηση τμημάτων DNA.....	89
2.5.4. Κατασκευή επιδεικτικών κυττάρων <i>E. coli</i>	90
2.5.5. Μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων <i>E. coli</i>	90
2.5.6. Σάρωση με PCR για την ανίχνευση κλώνων που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο ...	91
2.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗΣ	92
2.6.1. Αντίδραση μεταλλαξιγένεσης για την προσθήκη ή την αφαίρεση EPIYA-C θέσεων.....	92
2.6.2. Αντίδραση μεταλλαξιγένεσης για σημειακές μεταλλάξεις νουκλεοτιδίου	92

2.6.3. Μετασχηματισμός φυσικά επιδεικτικών στελεχών <i>H. pylori</i>	93
2.7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ	93
2.7.1. Μέθοδος προσδιορισμού νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.....	93
2.7.2. Σχεδιασμός εκκινητών για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου <i>cagA</i>	94
2.8. IN VITRO ΜΟΛΥΝΣΗ ΓΑΣΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	94
2.9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	95
2.9.1. Λύση κυττάρων.....	95
2.9.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών.....	95
2.9.3. Μέθοδος ανοσοσύτωσης κατά Western	96
2.9.4. Μέθοδος ELISA για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της IL-8.....	96
2.9.5. Επαγωγή έκφρασης πρωτεϊνών από πλασμιδιακούς φορείς σε βακτήρια <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	97
2.9.6. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών.....	97
2.10. ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ & ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ.....	98
2.10.1. Σήμανση <i>H. pylori</i> με CFDA-SE.....	98
2.10.2. Ανοσοφθορισμός	98
2.10.3. Σήμανση πρωτεϊνών που εκφράζουν το εξαπεπτίδιο Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys (4Cys-tag) με την χρωστική FAsH.....	99
2.10.4. Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής	99
2.11. ΠΙΝΑΚΕΣ ΥΛΙΚΩΝ	100
2.11.1. Αντισώματα	100
2.11.2. Αναστολείς.....	100
2.11.3. Εκκινητές.....	101
2.11.4. Χαρακτηριστικά στελεχών, πλασμιδίων και κυτταρικών σειρών	102
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	103
3.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....	104
3.1.1. Συσχέτιση της πολυμορφίας των θέσεων EPIYA της CagA με τα κλινικό-παθολογικά ευρήματα και την κλινική εξέλιξη της νόσου. Μελέτη ασθενών από τη Καμπότση.....	105
3.1.2. Φυλογενετική ανάλυση κλινικών στελεχών <i>H. pylori</i> Ελλήνων φορέων για τον προσδιορισμό της προγονικής τους προέλευσης, αναφορικά με τις ομάδες προγονικών ευρωπαϊκών στελεχών.....	111

3.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΧΙΜΑΙΡΙΚΗΣ CagA ΑΠΟ ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ <i>H. pylori</i>	116
3.2.1. Επιλογή κλινικών στελεχών <i>H. pylori</i> για την κλωνοποίηση του γονιδίου <i>cagA</i>	117
3.2.2. Καθορισμός γενετικών σχέσεων με την μέθοδο MLST.....	117
3.2.3. Κλωνοποίηση του γονιδίου <i>cagA</i> στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης και σήμανσης πρωτεϊνών pCDNA3.1/Myc-His B.....	119
3.2.4. Έκφραση του κλωνοποιημένου γονιδίου <i>cagA</i>	120
3.2.5. Ανάγνωση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου <i>cagA</i>	122
3.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΣΟΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>Helicobacter pylori</i> 124	
3.3.1. Παραγωγή ισογονιδιακών μεταλλαγμένων στελεχών <i>H. pylori</i> χωρίς ενεργή έκφραση της CagA (στελέχη CagA knock Out).....	125
3.3.2. Σχεδιασμός Μεθόδου για την προσθήκη μοτίβων φωσφορυλίωσης EPIYA-C.	126
3.3.2.1. Κατασκευή του πλασμιδίου pCA2 (Στάδιο I)	128
3.3.2.2. Κατασκευή του μέγα-εγκινητή της μεταλλαξογένεσης (Στάδιο II)	129
3.3.2.3. Τροποποιημένη αντίδραση μεταλλαξογένεσης Quikchange (Στάδιο III).....	131
3.3.2.4. Δημιουργία μη φωσφορυλιώσιμων μοτίβων EPIFA στο γονίδιο <i>cagA</i>	132
3.3.2.5. Μετασχηματισμός στελεχών <i>H. pylori</i> και παραγωγή ισογονιδιακών CagA-θετικών στελεχών (Στάδιο IV)	133
3.4. ΔΙΑΛΟΓΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	135
3.4.1. Διαλογή στελεχών με βάση την ικανότητα έκφρασης της πρωτεΐνης CagA.....	136
3.4.2. Αξιολόγηση του βακτηριακού ρυθμού ανάπτυξης και του ποσοστού επαγωγής κυτταροσκελετικών μεταβολών σε γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα	137
3.4.3. Λειτουργικότητα του τύπου IV εκκριτικού συστήματος, επιτυχής μεταφορά της CagA στο εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων και φωσφορυλίωση της σε θέσεις τυροσίνης	138
3.5. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΜΟΤΙΒΩΝ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΜΕΝΗΣ EPIYA ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ CagA ΤΟΥ <i>H. pylori</i> ΣΥΜΒΑΛΛΕΙ ΣΤΗΝ ΕΚΚΡΙΣΗ IL-8 από ΤΑ ΓΑΣΤΡΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	141
3.5.1. Επίδραση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης CagA σε θέσεις EPIYA-C στην μεταγραφική ενεργοποίηση της IL-8.....	142
3.5.2. Επίδραση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης CagA σε θέσεις EPIYA στην έκκριση της IL-8 από γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα.	143
3.5.3. Η ενεργοποίηση του NF-kB προκαλεί την έκκριση της IL-8 σε συνάρτηση με την φωσφορυλίωση σε EPIYA θέσεις.....	146

3.5.4. Η συμβολή του ERK1/2 στην ενεργοποίηση του NF-kB μετά από φωσφορυλίωση της CagA σε θέσεις EPIYA.....	147
3.5.5. Εμπλοκή της κινάσης AKT στην ενεργοποίηση του NF-kB σε συνάρτηση με την φωσφορυλίωση της CagA.....	148
3.5.6. Η ενεργοποίηση της TAK1 από την φωσφορυλίωση της CagA σε θέσεις EPIYA-C μπορεί να οδηγεί στην έκκριση της IL-8.	150
3.6. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ FLASH ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ της ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ CagA στα γαστρικά επιθηλιακά κυτταρα	155
3.6.1. Κατασκευή χιμαιρικής πρωτεΐνης CagA και του εξαπεπτιδίου σημάσεως πρωτεϊνών Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys.....	156
3.6.2. Χωροταξικός εντοπισμός της πρωτεΐνης CagA με την τεχνολογία φθορισμού FLAsH.....	160
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	163
4.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....	164
4.1.1. Συσχέτιση της πολυμορφικότητας των θέσεων EPIYA της CagA με τα κλινικό-παθολογικά ευρήματα και την κλινική εξέλιξη της νόσου. Μελέτη ασθενών από τη Καμπότζη	165
4.1.2. Φυλογενετική ανάλυση κλινικών στελεχών <i>H. pylori</i> Ελλήνων φορέων για τον προσδιορισμό της προγονικής τους προέλευσης, αναφορικά με τις ομάδες προγονικών ευρωπαϊκών στελεχών.....	169
4.2. Κατασκευή πειραματικών μοντελων για τη μελετη της επιδρασης της πρωτεΐνης CagA	173
4.2.2. Εφαρμογή της τεχνολογίας FLASH στο <i>cag-T4SS</i>	175
4.2.3. Παραγωγή και διαλογή ισογονιδιακών μεταλλαγμένων στελεχών <i>H. pylori</i>	177
4.3. Επιδραση της <i>cagA</i> στην ενεργοποίηση του Nf-kB & την επαγωγή εκκρισης της <i>il-8</i>	180
4.4. Γενική συζήτηση	188
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	192
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	227
6.1. ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ.....	228
6.2. ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	260
6.2.1. Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση MLST.....	261
6.2.2. Νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου <i>cagA</i> των παραχθέντων μεταλλαγμένων ισογονιδιακών στελεχών <i>H. pylori</i>	276
6.2.3. Αριθμοί αναφοράς γονιδίων στην διεθνή βάση δεδομένων PubMLST.....	291

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΕΙΜΕΝΟΥ

4Cys-tag: Tetracysteine Tag
 α -Pix: PAK-interacting guanine nucleotide exchange factor
ADP: Adenosine Diphosphate
AGS: Gastric adenocarcinoma cells
Akt: Protein kinase B (PKB)
AlpA/B: Adherence Associated Lipoprotein A and B
AnkA: Anaplasma Phagocytophilum effector Protein A
AP-1: Activator Protein 1
Arp2/3: Actin-related protein 2/3
ATCC: American Type Culture Collection
BabA: Blood-group-Antigen-Binding Adhesin
BepD: *Bartonella*-translocated effector protein D
BepE: *Bartonella*-translocated effector protein E
BepF: *Bartonella*-translocated effector protein F
BHIB: Brain Heart Infusion Broth
BSA: Bovine Serum Albumin
 β 3GnT5: β 1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase 5
c-Abl: Human abelson murine leukemia kinase
CagA: Cytotoxin-associated gene A
CagL: Cytotoxin-Associated Gene L
cagPAI: Cytotoxin-associated gene-Pathogenicity Island
Cag-T4SS: Cytotoxin-Associated Gene Type IV secretion System
CD74: Cluster of Differentiation 74
Cdc42: Cell division control protein 42 homolog
CFDA-SE: 5-(and-6)-Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester
c-Fos: Human feline osteosarcoma virus protein
CFU: Colony Forming Units
CBA: Columbia Blood Agar Base
CI: Confidence Interval
c-Jun: Human c-Jun Gene Product
CLO: Campylobacter-Like Organism test
CM: Multimerization Motifs
c-Met: Receptor Tyrosine Kinase
c-Myc: Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
Tir (*E. coli*): Translocated Intimin Receptor of *E. coli*
CREB: cAMP Response Element-Binding protein
Crk-L: Creatine Kinase L
Crk-I: Creatine Kinase I
Crk-II: Creatine Kinase II
Csk: Carboxyl-terminal Src kinase
Dlg1: Disks large homolog 1
D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: Dimethylsulfoxide
ECL: Enhanced Chemiluminescence
ECM: Extracellular Matrix
EGFR: Epithelial Growth Factor Receptor

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
 Elk-1: ETS Domain-Containing Protein
 EPEC: Enteropathogenic *Escherichia coli*
 ErbB3: Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3
 Erk1/2: External signal-regulated kinase 1 & 2
 ExoS: Exoenzyme S
 ExoT: Exoenzyme T
 FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter
 FAK: Focal Adhesion tyrosine Kinase
 FBS: Fetal Bovine Serum
 FLAsH: Fluorescein Arsenical Helix Binder
 FoxO: Forkhead box transcription factors O
 GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
 GGT: Gamma-glutamyltransferase
 Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2
 HCV: Hepatitis C Virus
 HDM2: Human Double Minute 2 homolog
 HeLa: Human Cervical Carcinoma Cell Line
 HER3: Heregulin Receptor 3
 HopZ: *Helicobacter pylori* outer membrane protein Z
 HorB: *Helicobacter pylori* outer membrane protein B
 HpSA: *Helicobacter pylori* Stool Antigen test
 H-Ras: Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog
 HtrA: High temperature requirement protein A
 IκBa: Inhibitor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells Alpha
 Iκκ α : Inhibitor of kappa B Kinase Alpha
 IKK β : Inhibitor of kappa B Kinase Beta
 IKKS: Inhibitor of kappa B Kinase S
 IL-1: Interleukin1
 IL-1R: Interleukin-1 receptor
 IL-1 β : Interleukin-1 Beta
 IL-8: Interleukin-8
 ILK: Integrin-Linked Kinase
 IPTG: Isopropyl-Beta-D-Thiogalactoside
 IRAK-1: Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1
 IRAK-4: Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4
 ISRE: Interferon Stimulated Response Element
 JAM-A: Junctional Adhesion Molecule-A
 Kato-III: Gastric Carcinoma Cell line
 LB: Luria Broth
 L-DTT: L-(-)-Dithiothreitol
 LPS: Lipopolysaccharide
 LspA1: Large Supernatant Protein A1
 LspA2: Large Supernatant Protein A2
 MALT: Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma
 MAP3K: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MARK2: Microtubule Affinity-Regulating Kinase 2
MCP-1: Macrophage/Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEF: Mouse Embryonic Fibroblast
MKN45: Gastric Carcinoma Cell line
MLCK: Myosin Light Chain Kinase
MLST: Multilocus Sequence Typing
MMP: Matrix Metalloproteinase
MOI: Multiplicity of Infection
MyD88: Myeloid Differentiation primary response gene 88
NAP-HP: *Helicobacter pylori* Neutrophil-Activating Protein
NFAT: Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-κB: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NIK: NFκ-B Inducing Kinase
NOD1: Nucleotide Oligomerization Domain 1 receptor
NTPases: Nucleoside Triphosphate hydrolase
OipA: Outer Inflammatory Protein A
OMPs: Outer Membrane Proteins
OMVs: Outer Membrane Vesicles
OR: Odds Ratio
p50: Polypeptide of 50K
p53: Tumor Suppressor protein
p65: NF-κB subunit also known as RELA
PAK1: P21-Activated Kinase 1
PAR1B: Partitional defective kinase 1b
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDK1: Phosphoinositide Dependent Kinase-1
PDZ: Postsynaptic Density protein [PSD95], Drosophila disc large tumor suppressor [Dlg1], and Zonula Occludens-1 protein [ZO-1]
PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase
PPIs: Proton-pump inhibitors
PSD95: Postsynaptic Density protein
PVDF: Polyvinylidene Difluoride
PZ1: Plasticity Zone 1
PZ2: Plasticity Zone 2
PZ3: Plasticity Zone 3
QPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction
Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Raf: Rheumatoid Arthritis Factor
Rap1: Repression activator protein 1
RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction
Ras-GTP: Rat sarcoma guanosine triphosphate
Ras GTPase: Rat sarcoma guanosine triphosphate hydrolase
RasGAP: Ras GTPase activating protein
RecA: Recombination Protein A

Rho: Ras homologous protein
RhoA: Ras homologous protein Alpha
Rho-GAP: Ras homologous GTPase activating protein
RIP-2: Receptor Interacting Protein-2
RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer
RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium
SabA: Sialic Acid Binding Adhesion
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SFKs: Src family kinases
SH3: Src Homology 3 Domain
SHP-1: Src Homology Phosphatase-1
SHP-2: Src Homology Phosphatase-2
siRNA: Small Interfering RNA
SOS: Son of Sevenless protein
Src: Sarcoma kinase
SRE: Serum Response Element
SRF: Serum Response Factor
T4SS: Type IV Secretion System
TAK1: TGFbeta Activated Kinase 1
Tarp: Translocated actin-recruiting phosphoprotein
TCEP-HCl: Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
T-DNA: Transfer DNA
TEER: Transepithelial Electrical Resistance
TLR2: Toll-like receptor 2
TLR4: Toll-like receptor 4
TLR5: Toll-like receptor 5
TLRs: Toll-like receptors
TNF- α : Tumor Necrosis Factor-Alpha
TRAF2: TNF Receptor-Associated Factor 2
TRAF6: TNF Receptor-Associated Factor 6
UBT: Urea Breath Test
VacA: Vacuolating cytotoxin toxin A
WAVE: WASP family Verprolin-homologous protein
XerCD: Xer site-specific bacterial recombination system
X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
ZO-1: Zonula Occludens-1 protein

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην Ελλάδα μεσοσταθμικά, 50% του πληθυσμού είναι φορέας λοίμωξης *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) το οποίο αποτελεί τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα εκδήλωσης χρόνιας ενεργού γαστρίτιδας. Το 80-90% των ασθενών παραμένουν ασυμπτωματικοί, το 10-18% θα εκδηλώσουν την νόσου του πεπτικού έλκους, το 1% θα αναπτύξει γαστρικό αδενοκαρκίνωμα ενώ περίπου το ίδιο ποσοστό θα αναπτύξει λέμφωμα MALT. Η έκβαση της λοίμωξης από *H. pylori* καθορίζεται από τους πολυμορφισμούς του ξενιστή, από περιβαλλοντικούς παράγοντες και από παράγοντες παθογένειας του βακτηρίου.

Οι παράγοντες παθογένειας του *H. pylori* μπορούν να καταταχθούν σε τρεις κατηγορίες, στους μεμβρανικούς, στους εκκρινόμενους και στους μεταφερόμενους. Στους τελευταίους ανήκει η ενδοτοξίνη CagA η οποία μεταφέρεται στο εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων μέσω ενός βακτηριακού συστήματος μεταφοράς τύπου IV. Μετά την είσοδο της η CagA φωσφορυλιώνεται στο καρβοξυτελικό της άκρο, από τις κινάσες του κυττάρου c-Abl και c-Src ιεραρχικά, σε κατάλοιπα τυροσίνης που συμμετέχουν σε επαναλαμβανόμενα μοτίβα της μορφής Γλουταμινικό-Προλίνη-Ισολευκίνη-Τυροσίνη-Αλανίνη (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala, EPIYA). Τα μοτίβα αυτά απαντώνται σε Δυτικούς πληθυσμούς (Ευρώπη, Β. Αμερική, Αυστραλία) σε τρεις διακριτούς τύπους (EPIYA-A, EPIYA-B και EPIYA-C). Ο αριθμός των θέσεων EPIYA-A και EPIYA-B παραμένει σταθερός, ενώ των EPIYA-C εμφανίζει υψηλή ποικιλομορφία μεταξύ των στελεχών, καθορίζοντας τα επίπεδα λοιμογονικότητας της πρωτεΐνης CagA, δεδομένου ότι ο κίνδυνος για ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου αυξάνει ευθέως ανάλογα με τον αριθμό των θέσεων EPIYA-C. Μετά την φωσφορυλίωση της, η CagA έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με πλειάδα μορίων του κυττάρου ξενιστή και να διαταράσσει σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τόσο την κυτταρική πολικότητα και την κυτταρική κίνηση, όσο τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Μερικές από αυτές τις αλληλεπιδράσεις εξαρτώνται και ρυθμίζονται από την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης στο καρβοξυτελικό της άκρο και άλλες είναι ανεξάρτητες αυτής.

Βασικό χαρακτηριστικό της λοίμωξης από *H. pylori* αποτελεί η διήθηση στο γαστρικό χόριο ουδετεροφίλων πολυμορφοπύρηνων κυττάρων. Κύριος χημειοτακτικός παράγοντας των ουδετεροφίλων είναι η Ιντερλευκίνη 8 (IL-8). Ο μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου το *H. pylori* επάγει την αύξηση έκκρισης της IL-8 παραμένει ένα ευρύ πεδίο διαφωνίας στην βιβλιογραφία. Αρχικά, υποστηρίχθηκε ότι εξαρτάται από την παρουσία ενός λειτουργικού συστήματος μεταφοράς τύπου IV του βακτηρίου, ανεξαρτήτως της δράσης της πρωτεΐνης CagA, μετέπειτα όμως αποδείχθη ότι η CagA μπορεί να συμβάλλει καθοριστικά στην έκταση της επαγωγής. Επιπλέον, άλλοι εκκρινόμενοι παράγοντες παθογένειας του βακτηρίου, εκτός του

συστήματος μεταφοράς τύπου IV και της CagA, προτάθηκαν να συνεισφέρουν στην επαγωγή Ιντερλευκίνης-8 και επομένως στην ανάπτυξη της χρόνιας ενεργού γαστρικής φλεγμονής.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της εμπλοκής της πρωτεΐνης CagA στους μηχανισμούς επαγωγής της γαστρικής φλεγμονής και διεξήχθη σε δύο στάδια, το πρώτο επιδημιολογικό και το δεύτερο με χρήση συστημάτων πειραματικής λοίμωξης *H. pylori*.

Στο πρώτο στάδιο, έγινε επιδημιολογική ανάλυση κλινικών στελεχών συμπτωματικών ασθενών από την Καμπότζη, όπου αποδείχθη συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφικών χαρακτηριστικών των κύριων παραγόντων παθογένειας CagA και VacA με την βαρύτητα της κλινικής έκβασης της νόσου. Μάλιστα διαπιστώθηκε διείσδυση στελεχών με πολυμορφικά χαρακτηριστικά Δυτικού τύπου, δικαιολογώντας με αυτό τον τρόπο μερικώς, τα μειωμένα επίπεδα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου που παρατηρούνται σε αυτή τη χώρα, σε σύγκριση με τα υψηλότερα επίπεδα, όμορων χωρών. Η μελέτη αυτή αποτέλεσε συνέχεια άλλων παρόμοιων μελετών που πραγματοποιήθηκαν στον Ελληνικό πληθυσμό (Panayotopoulou E. και συν. 2007, Sgouras D. και συν. 2009, Panayotopoulou E. και συν. 2010), των οποίων τα αποτελέσματα δεν αποτελούν μέρος της παρούσας διατριβής, έγιναν όμως και με την συνδρομή του συγγραφέα της παρούσας διατριβής.

Στο δεύτερο στάδιο, μελετήθηκε η επίπτωση των επαναλαμβανόμενων θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA της πρωτεΐνης CagA του *H. pylori* στο μοριακό μηχανισμό επαγωγής της Ιντερλευκίνης-8 και επομένως στην ανάπτυξη της χρόνιας ενεργού γαστρικής φλεγμονής με συστήματα πειραματικής λοίμωξης *H. pylori*. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν μεταλλαγμένα στελέχη που εξέφραζαν την πρωτεΐνη CagA με μεταβλητό αριθμό λειτουργικών θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA-C, και των αντίστοιχων μη-φωσφορυλιώσιμων EPIFA, στο ίδιο ισογονιδιακό γενετικό υπόβαθρο.

Στην συνέχεια τα παραπάνω παραχθέντα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν για να μολύνουν γαστρικές επιθηλιακές κυτταρικές σειρές. Παρατηρήθηκε, ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της IL-8 αλλά και τα επίπεδα της εκκρινόμενης IL-8 ήταν αυστηρά εξαρτώμενα από την λειτουργικότητα των μοτίβων φωσφορυλίωσης EPIYA-C. Επιπλέον, τα επίπεδα της IL-8 και η ενεργοποίηση του γονιδίου της IL-8 ήταν η ίδια, ανεξάρτητα από τον αριθμό των επαναλήψεων EPIYA-C και μέσω ενεργοποίησης του συστήματος NF-kB. Επιπλέον, καταδείχθηκε ότι όσον αφορά τις σηματοδοτικές οδούς που οδηγούν στην ενεργοποίηση του NF-kB, η πρώτη ERK1/2 και AKT ενεργοποίηση, βρέθηκε να είναι ανεξάρτητη από την EPIYA-C φωσφορυλίωση. Αντιθέτως, η αναστολή της TAK1 κινάσης, είτε χημικά με χρήση του ειδικού

αναστολέα 5Z-7-Oxozeaenol, είτε γενετικά, με χρήση TAK1^{-/-} εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού (MEFs) στα εν λόγω συστήματα πειραματικής λοίμωξης *H. pylori*, οδήγησε σε πλήρη αναστολή ενεργοποίησης του NF-κB και επομένως της έκκρισης της IL-8, με έναν δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, ανεξάρτητα από την παρουσία της CagA. Τέλος διαπιστώθηκε ότι η CagA και η TAK1 συμμετέχουν στο ίδιο σύμπλοκο ενεργοποίησης μια και βρέθηκαν να ανοσοαταβυθίζονται μαζί και ότι αυτή η αλληλεπίδραση δεν γινόταν μέσω των περιοχών της πρωτεΐνης που περιείχαν τις επαναλαμβανόμενες θέσεις φωσφορυλίωσης EPIYA.

SUMMARY

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a Gram negative bacteria that infects approximately 50% of the population in Greece. The majority of the carriers (80-90%) develops chronic active gastritis and remain mainly asymptomatic, however, 10-18% will develop gastric or duodenal ulcer and 1-2% will develop gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma. The outcome of *H. pylori* infection is determined by the genetic predisposition of the host, environmental and nutritional factors as well as particular bacterial virulence factors.

H. pylori virulence factors can be classified into three categories, membrane-bound, secreted and injected. The last category encompasses the CagA endotoxin, which is injected inside the gastric epithelial cells via a bacterial type IV secretion system. Once inside CagA is phosphorylated hierarchically at the carboxy terminus, by c-Abl and c-Src intracellular kinases, on tyrosine residues involved in repeating Glutamate-Proline-Isoleucine-Tyrosine- Alanine (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala, EPIYA) motifs. These motifs are found in strains isolated from patients of Western populations (Europe, N. America, and Australia) in three distinct types (EPIYA-A, EPIYA-B and EPIYA-C). The number of EPIYA-A and EPIYA-B usually, remains constant, while the EPIYA-C shows high variability between strains and it has been proposed to determine virulence levels of the CagA protein, since the risk for developing gastric cancer increases in direct proportion to the number of EPIYA -C motifs. Following intracellular phosphorylation of CagA the protein has been reported to interact with a plurality of molecules of the host cell and has been suggested to disrupt a wide number of signaling pathways, which regulate a number of functions relating to cancer development such as, cellular polarity and metastasis, as well as, proliferation and apoptosis. Some of these interactions seem to be linked to CagA EPIYA phosphorylation at the carboxy terminus and others are phosphorylation-independent.

A key manifestation of *H. pylori* infection is the generation of active gastritis, demonstrated by avid infiltration of neutrophils in the gastric lamina propria. The main neutrophil chemotactic factor is Interleukin 8 (IL-8) and the molecular mechanism through which *H. pylori* infection contributes to IL-8 secretion by gastric epithelial cells remains highly controversial. Initially, it has been reported to be dependent on the presence of a functional type IV secretion system, independent of CagA activity, however, much later IL-8 transcriptional activation and secretion has been shown to depend on CagA activity and on other secreted bacterial virulence factors.

The aim of this dissertation was the study of mechanisms by which the CagA protein is involved in the development of gastric inflammatory response and it was conducted in two phases, first an epidemiologic analysis of clinical isolates and secondly with the use of experimental *H. pylori* infection models.

In the epidemiologic study, *H. pylori* clinical isolates from symptomatic patients in Cambodia were analyzed with respect to their polymorphic CagA and VacA elements and correlated to the severity of histopathological lesions and the clinical manifestations of the disease. Through this study, we were able to show that there was an expansion of European Western-type-like vacA and cagA alleles to East-Asian *H. pylori* strains in Cambodia, thereby providing an explanation for the lower gastric cancer levels reported in this country, compared to other neighboring East Asian Countries. This particular study was a continuation of similar studies conducted in the past involving symptomatic Greek patients (Panayotopoulou E. *Et al.* 2007, Sgouras D. *et al.* 2009, Panayotopoulou E. *et al.* 2010), which are not part of this dissertation but were materialized with the help of the author of this dissertation.

In the second phase of the study we analyzed the importance of the repeating EPIYA motifs in the carboxyterminal end of CagA protein in the molecular mechanism, leading to the transcriptional activation of IL-8 and the development of chronic active gastritis, utilizing experimental *H. pylori* infection systems. For this purpose we generated a number of *H. pylori* CagA mutant strains expressing CagA protein with a variable number of functional EPIYA-C, and the respective non-phosphorylatable EPIFA motifs within the same genetic background based on P12 reference *H. pylori* strain.

We then utilized these strains to infect gastric epithelial cell lines and studied the transcriptional activation, as well as, secreted levels of IL-8 which were found to be strictly depended on the functionality of EPIYA-C phosphorylation motifs. Moreover, levels of IL-8 transcriptional activation, as well as, secreted levels of IL-8 were found to be the same regardless of the number of EPIYA-C repeats, following activation of NF-kB. Regarding the signaling pathways leading to NF-kB activation, early ERK1/2 and AKT activation was found to be independent of EPIYA-C phosphorylation. However, inhibition of TAK1 kinase, either chemically through the use of specific TAK1 inhibitor 5Z-7-Oxozeaenol, or genetically, through the use of TAK1^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs), within our experimental *H. pylori* infection models resulted in complete inhibition of the secretion of IL-8, in a dose-dependent manner, regardless of the presence of the CagA. Finally, we were able to

demonstrate that CagA and TAK1 partake within the same activation complex, as they were found to immunoprecipitate together and that this interaction did not involve the protein segments encompassing the EPIYA-C motifs.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

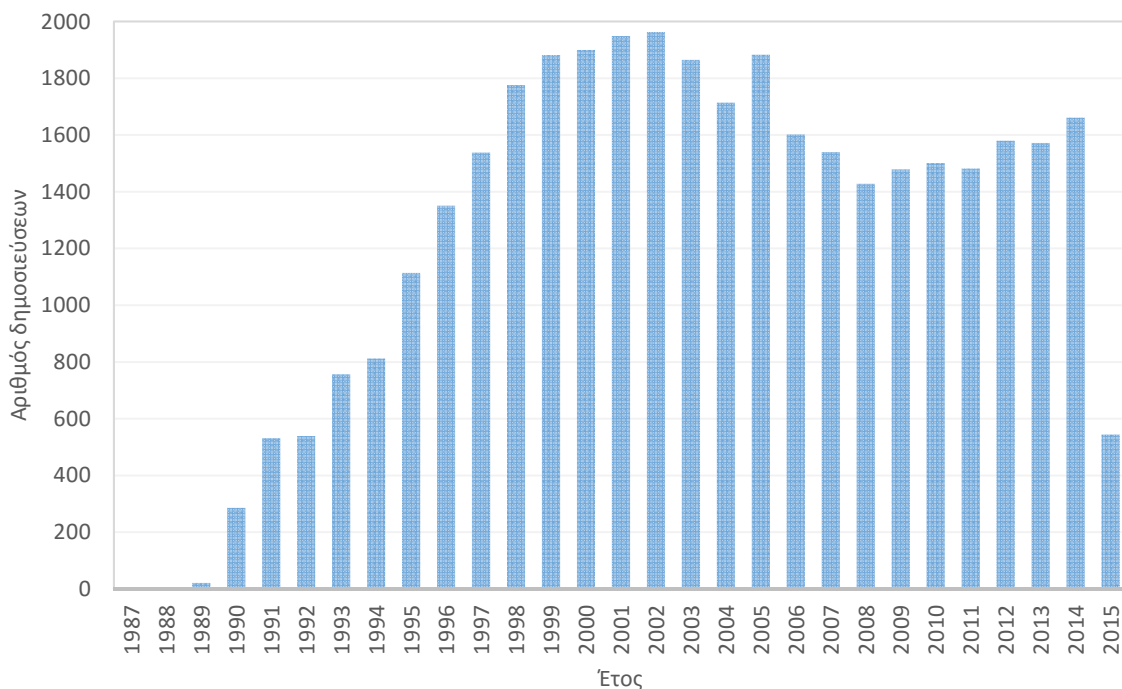
1.1. Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΟΥ *Helicobacter pylori*

Η ανακάλυψη και περιγραφή του *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) το 1982 από τους Marshall και Warren αποτέλεσε επανάσταση στη Γαστρεντερολογία διότι πρότεινε τη λοιμώδη αιτιολογία σαν βάση για την δημιουργία του πεπτικού έλκους. Λίγοι όμως γνωρίζουν ότι ένας από τους πρωτοπόρους, που συστηματικά και με βάση την θεραπευτική του εμπειρία, είχε καταλήξει στα ίδια συμπεράσματα, ήταν ο Έλληνας στρατιωτικός ιατρός Ιωάννης Λυκούδης το 1957, στο Μεσολόγγι [2]. Ο ίδιος, πάσχοντας από πεπτικό έλκος με ιστορικό γαστρορραγίας, παρατήρησε ότι χρήση αντιβιοτικών για τη θεραπεία ενός επεισοδίου αιμορραγικής γαστρεντερίτιδας, είχε σαν αποτέλεσμα την παράλληλη υποχώρηση των συμπτωμάτων του πεπτικού έλκους. Το γεγονός αυτό τον οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το πεπτικό έλκος ενδεχομένως να προκαλείται από τη δράση ενός μικροοργανισμού, η θανάτωση του οποίου με τη χρήση αντιβιοτικών, επέφερε την ύφεση των συμπτωμάτων. Ο ισχυρισμός αυτός ήταν πλήρως αντίθετος με την ως τότε κρατούσα άποψη περί των γενεσιουργών αιτιών του πεπτικού έλκους, το οποίο αποδιδόταν στην υπερέκκριση γαστρικών οξέων και του οποίου η συνήθης θεραπευτική αντιμετώπιση ήταν η χειρουργική μερική γαστρεκτομή. Παρόλα ταύτα ο Λυκούδης εφάρμοσε την θεραπεία του σε αρκετά μεγάλο αριθμό ασθενών της ευρύτερης περιοχής του Μεσολογγίου, χορηγώντας μείγμα φθηνών αντιβιοτικών (5, 7-διωδο-8-οξυκινολίνη 0.125 g, 5-ιωδο-7-χλωρο-8-οξυκινολίνη 0.125 g, Φθαλική Σουλφαθειαζόλη 0.3 g, θειϊκή στρεπτομυκίνη 0.075 g, βιταμίνη Α 10000 UI) αρχικά σε μορφή σκόνης και μετά από την αύξηση της ζήτησης, σε χάπια που παρασκεύαζε ο ίδιος. Το 1961 η συνταγή «για την αντιμετώπιση του έλκους του στομάχου και του δωδεκαδακτύλου καθώς και της κολίτιδος» έλαβε δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από τις ελληνικές αρχές και το όνομα «*Ελγάκο*» από τα αρχικά των λέξεων έλκος, γαστρίτιδα και κολίτιδα. Η προσπάθειά του να πείσει κάποιες φαρμακευτικές εταιρείες να αναλάβουν την παραγωγή του *Ελγάκο* απέτυχε, πιθανότατα επειδή τα συστατικά ήταν συνήθη αντιβιοτικά και κατά συνέπεια δεν θα παρουσίαζε εμπορικό ενδιαφέρον. Απόπειρα για δημοσίευση των αποτελεσμάτων του στο «Journal of the American Medical Association» έτυχε κακής κριτικής και απορρίφθηκε, παρά το γεγονός ότι είχε θεραπεύσει 50.000 ασθενείς και ότι κρατούσε αναλυτικό αρχείο των παρατηρήσεων του, το οποίο διασώζεται έως σήμερα [2,3]. Επιπλέον απόπειρα να πείσει αφενός, τις αρμόδιες κρατικές υπηρεσίες Υγείας και αφετέρου την επιστημονική-ιατρική κοινότητα της εποχής για την ανακάλυψη του, είχε σαν αποτέλεσμα την δημόσια διαπόμπευση του και πρόστιμο 4.000 δραχμών από το πειθαρχικό ιατρικό συμβούλιο. Ακολούθησε ποινική δίωξη του από τον Ιατρικό σύλλογο Αθηνών για

παράνομη διακίνηση φαρμάκων. Όμως, οι καταθέσεις μιας πληθώρας ασθενών του, οι οποίοι ορκίστηκαν ότι θεραπεύτηκαν, και μάλιστα χωρίς αμοιβή στον γιατρό, τον έσωσε από την καταδίκη. Στην συνέχεια αποσύρθηκε στο Μεσολόγγι πεπεισμένος για την ορθότητα της θεωρίας του περιμένοντας να επιβεβαιωθεί από τους συναδέλφους του αργά ή γρήγορα. Το 1980, τον βρίσκει ο θάνατος, δύο χρόνια προτού οι Barry Marshall και ο Robin Warren επιβεβαιώσουν την θεωρία του. Το 2005, όταν οι δύο ερευνητές τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel για την ανακάλυψη τους, ο Ιατρικός Σύλλογος Αθηνών απέσυρε όλα τα διοικητικά μέτρα που είχαν επιβληθεί εναντίον του. Το 2006 η Ελληνική Εταιρία Μελέτης του Ελικοβακτηριδίου του Πυλωρού (ΕΕΜΕΠ) βράβευσε μετά θάνατον τον Ιωάννη Λυκούδη και το βραβείο παρέλαβαν οι συγγενείς του, αναφέροντας ότι τα τελευταία του λόγια απευθυνόμενος στους δικούς του ανθρώπους ήταν «...να μου το φέρετε στον τάφο μου όταν ανακαλυφθεί ότι είχα δίκιο».

Η παρουσία σπειροειδών μικροοργανισμών στο στομάχι ζώων αναφέρεται βιβλιογραφικά από τα τέλη του 19^{ου} και τις αρχές του 20^{ου} αιώνα [4]. Λίγο αργότερα παρόμοια βακτήρια σπειροειδούς σχήματος παρατηρήθηκαν σε γαστρικές βιοψίες ανθρώπων [5-7], μερικοί από τους οποίους, νοσούσαν από πεπτικό έλκος ή γαστρικό καρκίνο. Ο αιτιολογικός ρόλος αυτών των βακτηρίων στην ανάπτυξη της νόσου του πεπτικού έλκους και του γαστρικού καρκίνου λήφθηκε υπόψη την περίοδο εκείνη και κάποιιοι ασθενείς έλαβαν ακόμα και αντιβακτηριακή θεραπεία με υψηλές δόσεις αλάτων βισμούθιου [7]. Η πιθανότητα αυτή αργότερα απορρίφθηκε ως άνευ σημασίας, πιθανώς λόγω της μεγάλης συχνότητας παρατήρησης αυτών των σπειροειδών βακτηρίων σε άτομα χωρίς κλινικά συμπτώματα. Το 1982, οι Warren και Marshall πραγματοποίησαν τα πρωτοποριακά πειράματά τους, που οδήγησαν στην απομόνωση σπειροειδών βακτηρίων σε 58 από τους 100 διαδοχικούς ασθενείς που εξέτασαν, ύστερα από καλλιέργεια γαστρικών βιοψιών που είχαν ληφθεί με γαστροσκόπηση [8]. Στη συνέχεια απέδειξαν και την θεραπεία της λοίμωξης μετά από την χορήγηση αντιβακτηριακής θεραπείας με βισμούθιο και αμοξικιλίνη ή τινιδαζόλη (Tinidazole) [9-12]. Το βακτήριο που απομονώθηκε αρχικά ονομάστηκε «Campylobacter-like organism», «gastric Campylobacter-like organism», «Campylobacter pyloridis» και «Campylobacter pylori», αλλά η σημερινή του ονομασία είναι *Helicobacter pylori* σε αναγνώριση του γεγονότος ότι αυτός ο μικροοργανισμός είναι διακριτός από μέλη του γένους *Campylobacter* [13]. Σύντομα έγινε σαφές ότι ο εν λόγω μικροοργανισμός σχετίζεται στενά με την εκδήλωση χρόνιας ενεργού γαστρίτιδας, η οποία σε μία υποομάδα των ασθενών μπορεί να προχωρήσει υπό διαφορετικές συνθήκες, σε δημιουργία πεπτικού έλκους, γαστρικού αδενοκαρκινώματος, ή Β-κυτταρικού MALT λεμφώματος [14]. Το 2005 το Νόμπελ

Φυσιολογίας ή Ιατρικής απονεμήθηκε από κοινού στους Robin Warren και Barry Marshall για την «ανακάλυψη του βακτηρίου *Helicobacter pylori* και του ρόλου του στην γαστρίτιδα και το πεπτικό έλκος». Στην ιστορία των βραβείων Νόμπελ, αυτή είναι μόνο η τρίτη φορά που η ανακάλυψη ενός βακτηρίου βραβεύεται [15]. Από τότε, ο αριθμός των δημοσιεύσεων σχετικά με το *H. pylori* έχει αυξηθεί, από λιγότερες από 200 το 1990 σε περίπου 1.500 ανά έτος κατά τα τελευταία χρόνια ([PubMed](#)) (Εικόνα 1). Παρά το ευρύ ερευνητικό ενδιαφέρον, σημαντικά θέματα

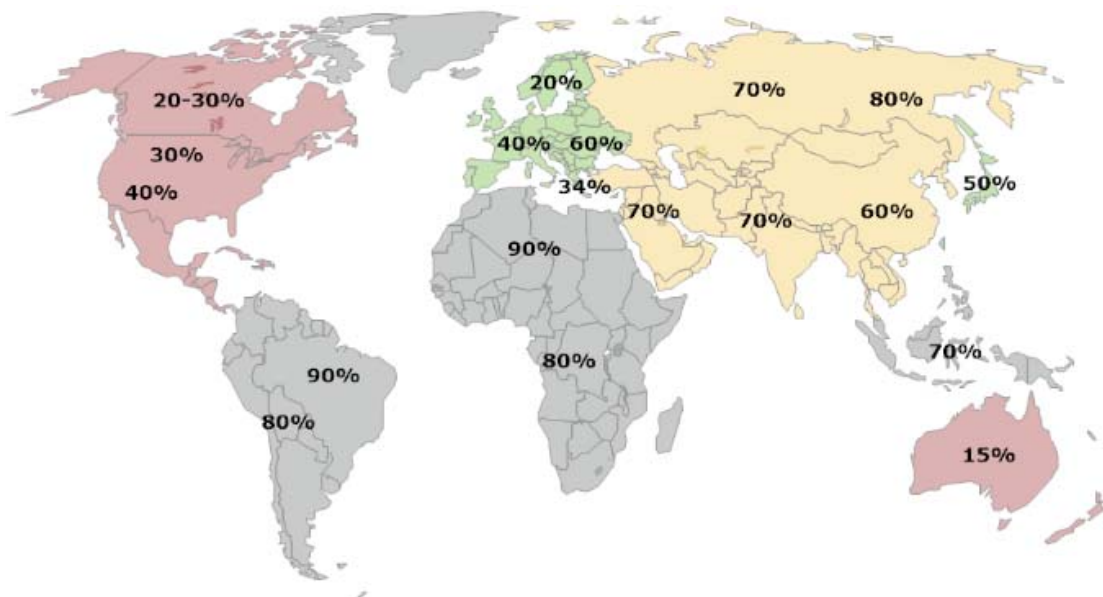


Εικόνα 1: Ραβδόγραμμα του αριθμού δημοσιεύσεων ανά έτος που έχουν καταχωρηθεί στην βάση δεδομένων βιοϊατρικών δημοσιεύσεων PubMed.

σχετικά με την παθογένεια και την βιολογία του *H. pylori* είναι ακόμα ανεπαρκώς κατανοητά.

Παγκοσμίως, η λοίμωξη από το *H. pylori* παρουσιάζει υψηλό επιπολασμό στο 50%, με τα ποσοστά να κυμαίνονται από 20% έως περισσότερο από 80% [16-18]. Ως επιπολασμός ορίζεται ο συνολικός αριθμός των κρουσμάτων μιας ασθένειας σε ένα δεδομένο πληθυσμό ανά χρονική στιγμή. Τα υψηλότερα ποσοστά απαντώνται στην Ανατολική Ευρώπη, την Ασία, και σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες [16] (Εικόνα 2). Ο επιπολασμός της λοίμωξης από *H. pylori* σε μια χώρα συσχετίζεται έντονα με τις κοινωνικοοικονομικές συνθήκες [16]. Στις αναπτυσσόμενες χώρες παρατηρείται να είναι πάνω από 80%, ενώ στις ανεπτυγμένες χώρες το ποσοστό κυμαίνεται από 20 έως 50% [16]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, ο επιπολασμός σε εύπορους Καυκάσιους είναι 20%. Αντίθετα, σε μειονότητες ηλικιωμένων Αφροαμερικανών, στους Λατινοαμερικανούς μετανάστες και στους προερχόμενους από χώρες της Ανατολικής Ευρώπης κυμαίνεται από 40 έως 60%, [16-

18]. Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τις τελευταίες μελέτες, ο επιπολασμός κυμαίνεται στο 34% το 2010 [19] βαινοντας μειούμενος από το 50% που είχε υπολογισθεί το 2002 [20]. Επιπλέον, στη χώρα μας, παρατηρούνται υψηλότερα ποσοστά επιπολασμού σε πληθυσμούς μεταναστών από αναπτυσσόμενες χώρες, όπως σε αυτούς που προέρχονται από την Αλβανία όπου το ποσοστό εκτιμήθηκε στο 54% [19]. Το φαινόμενο της μείωσης του επιπολασμού της λοίμωξης από *H. pylori* είναι κοινό ανάμεσα στις αναπτυγμένες χώρες, αποδιδόμενο στις καλύτερες συνθήκες υγιεινής και αποχέτευσης καθώς και στη μείωση των ενήλικων φορέων της λοίμωξης [21]. Σημαντική παράμετρος της επιδημιολογίας του *H. pylori*, αποτελεί η πρωτολοίμωξη¹ η οποία προκύπτει κατά κανόνα στην παιδική ηλικία και διατηρείται συνήθως εφ' όρου ζωής εκτός και εάν αντιμετωπιστεί [22,23]. Στις αναπτυσσόμενες χώρες ο επιπολασμός αυξάνεται γρήγορα τα πρώτα πέντε χρόνια της ζωής και εν συνεχεία παραμένει σταθερός, σε αντίθεση με τις αναπτυγμένες χώρες όπου ο επιπολασμός παραμένει χαμηλός στις μικρές ηλικίες και βραδέως αυξάνει μαζί με την άνοδο της ηλικίας [23,24].



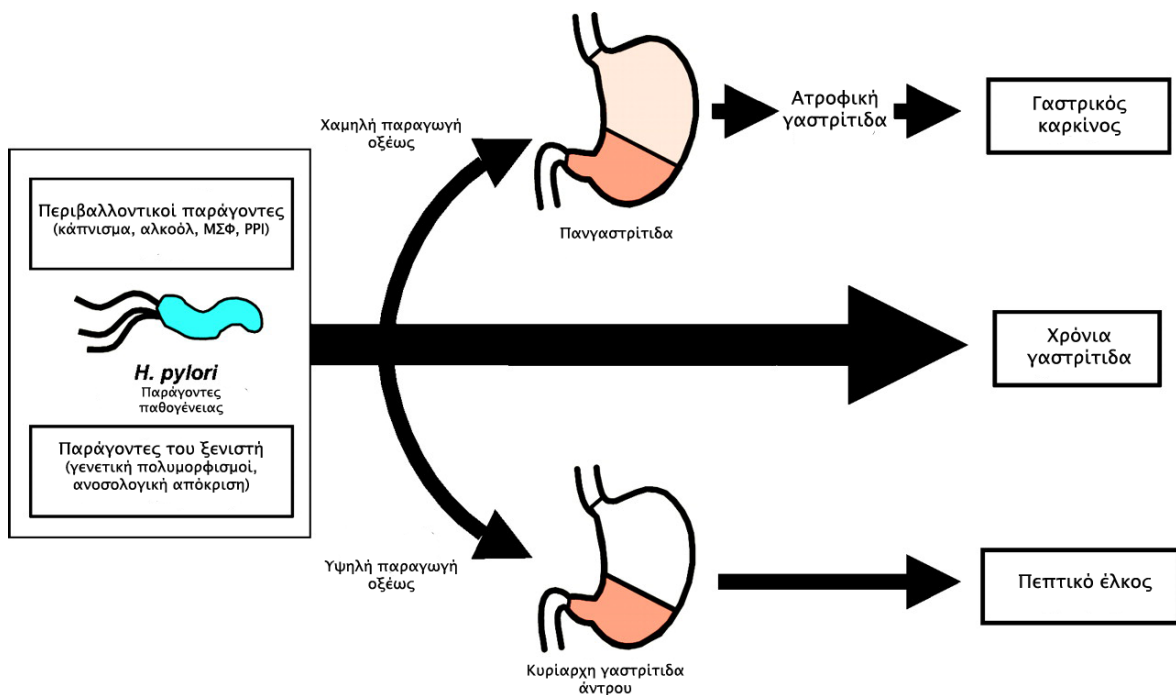
Εικόνα 2: Απεικόνιση της κατανομής του επιπολασμού στις γεωγραφικές περιοχές του κόσμου με βάση τα δημοσιευμένα αποτελέσματα [14-16]

¹ Η πρώτη προσβολή ενός οργανισμού από ένα παθογόνο μικροοργανισμό

1.2. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΦΑΝΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ *H. pylori*

Η λοίμωξη από *H. pylori* δεν οδηγεί στην άμεση εκδήλωση μιας ασθένειας, αλλά αυξάνει τον σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης διαφόρων κλινικών διαταραχών του ανώτερου γαστρεντερικού σωλήνα και ενδεχομένως, της ηπατοχολικής οδού. Παρά το γεγονός ότι ο αποικισμός του στομάχου με *H. pylori* επάγει ιστολογική εικόνα γαστρίτιδας σε όλους τους φορείς, μόνο ένα τμήμα αυτών θα αναπτύξει οποιαδήποτε εμφανή κλινικά συμπτώματα της λοίμωξης [25]. Εκτιμάται ότι οι ασθενείς με *H. pylori* λοίμωξη έχουν 10 έως 20% διά βίου κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου του πεπτικού έλκους και 1 έως 2% κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου [14,26,27]. Ο κίνδυνος ανάπτυξης αυτών των ασθενειών, παρουσία λοίμωξης από *H. pylori* εξαρτάται από μια ποικιλία παραγόντων που συσχετίζονται αφενός με το βακτήριο, το ξενιστή και το περιβάλλον του και αφετέρου με την κατανομή και τη βαρύτητα της γαστρίτιδας (Εικόνα 3).

Ο αποικισμός με *H. pylori* οδηγεί σε ανάπτυξη γαστρικής φλεγμονής που χαρακτηρίζεται από διήθηση του γαστρικού βλεννογόνου, τόσο του άντρου όσο και του σώματος με ουδετερόφιλα και μονοπύρρηνα λεμφοκύτταρα. Η χρόνια ενεργός γαστρίτιδα είναι η πρωταρχική παθολογία σχετιζόμενη με αποικισμό από το *H. pylori* και οι υπόλοιπες παθολογικές καταστάσεις απορρέουν από αυτή τη χρόνια φλεγμονώδη διαδικασία.



Εικόνα 3: Γραφική απεικόνιση των παραγόντων που καθορίζουν την εξέλιξη της νόσου στην *H. pylori* λοίμωξη. (Επεξεργασμένο σχήμα [23])

1.2.1. Οξεία γαστρίτιδα

Δεδομένα για την οξεία φάση της λοίμωξης είναι σπάνια και σε μεγάλο βαθμό προέρχονται από τις αναφορές ατόμων που προχώρησαν εσκεμμένα ή ακούσια στην κατάποση *H. pylori* ή υποβλήθηκαν σε ιατρικές διαδικασίες με μολυσμένα υλικά [10,28-30]. Πρόσφατα παρουσιάστηκε ένα ανθρώπινο πειραματικό μοντέλο πρόκλησης μόλυνσης με *H. pylori*. Σε αυτό επετράπησαν ελεγχόμενες μελέτες της οξείας φάσης της λοίμωξης με την εσκεμμένη μόλυνση υγιών εθελοντών με ένα καλά-χαρακτηρισμένο εργαστηριακό στέλεχος αναφοράς [31]. Συνολικά οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η οξεία φάση του αποικισμού με *H. pylori* μπορεί να σχετίζεται με παροδικά μη ειδικά δυσπεπτικά συμπτώματα, όπως πληρότητα, ναυτία και έμετο, και με σημαντική φλεγμονή τόσο του εγγύς όσο και του άπω βλεννογόνου του στομάχου, ή με πανγαστρίτιδα. Η φάση αυτή συνδέεται συχνά με υποχλωρυδρία, η οποία μπορεί να διαρκέσει για μήνες. Δεν είναι σαφές αν ο αρχικός αυτός αποικισμός μπορεί να ακολουθηθεί από αυτό-ιαση και εξάλειψη της γαστρίτιδας και πόσο συχνά μπορεί αυτό να συμβαίνει. Μελέτες παρακολούθησης (follow-up studies) παιδιών με ορολογικές εξετάσεις ή εξετάσεις αναπνοής πρότειναν ότι η μόλυνση μπορεί να αυτό-ιαθεί σε ορισμένους ασθενείς, αυτής της ηλικιακής ομάδας [32-34]. Αντίστοιχες παρατηρήσεις όμως δεν έχουν γίνει σε ενήλικες, με εξαίρεση μεμονωμένες περιπτώσεις υπό συγκεκριμένες συνθήκες, όπως είναι η ανάπτυξη ατροφικής γαστρίτιδας. Ωστόσο μελέτες σε ομοζυγωτικούς διδύμους έδειξαν μια αντιστοιχία όσον αφορά την παθολογία που προκλήθηκε από την μόλυνση με *H. pylori*, ανεξάρτητα από το αν είχαν μεγαλώσει μαζί ή χώρια, ενώ αντιστοιχία δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των ετεροζυγωτικών διδύμων [35]. Αυτό σημαίνει ότι ορισμένα άτομα μπορεί να είναι επιρρεπή σε αποικισμό με *H. pylori*, ενώ άλλα μπορεί να είναι σε θέση να αποτρέψουν τον αποικισμό ή να αυτο-ιαθούν. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται επίσης από την παρατήρηση ότι σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες, όπου το επίπεδο έκθεσης στο βακτήριο είναι πολύ υψηλό στις νεαρές ηλικίες (δηλαδή $\geq 90\%$), υπάρχουν κάποια άτομα που ποτέ δεν έχουν αναπτύξει χρόνια λοίμωξη από *H. pylori* [25].

1.2.2. Χρόνια γαστρίτιδα

Όταν η λοίμωξη έχει εγκατασταθεί, παρατηρείται μια στενή συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου της έκκρισης γαστρικών οξέων και της κατανομής της γαστρίτιδας (Εικόνα 4). Αυτή η συσχέτιση είναι αποτέλεσμα του λόγου, της αρνητικής επιδράσεως του οξέος στην βακτηριακή

ανάπτυξη εναντίον, της αρνητικής επίδρασης της βακτηριακής ανάπτυξης και της συναφούς φλεγμονής του βλεννογόνου, στην έκκριση και τη ρύθμιση του γαστρικού οξέος [25]. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι ζωτικής σημασίας για τον προσδιορισμό της έκβασης της χρόνιας λοίμωξης από *H. pylori*.

Κατανομή της Γαστρίτιδας	Γαστρική ιστολογία	Δωδεκαδακτυλική ιστολογία	Έκκριση οξέων	Κλινική εικόνα
 <p>Πανγαστρίτιδα</p>	<ul style="list-style-type: none"> Χρόνια γαστρίτιδα Ατροφία Εντερική μεταπλασία 	<ul style="list-style-type: none"> Φυσιολογική 	<ul style="list-style-type: none"> Μειωμένη 	<ul style="list-style-type: none"> Έλκος στομάχου Γαστρικός καρκίνος
 <p>Κυρίαρχη γαστρίτιδα άντρου</p>	<ul style="list-style-type: none"> Χρόνια φλεγμονή Πολυμορφική ενεργότητα 	<ul style="list-style-type: none"> Γαστρική μεταπλασία Χρόνια ενεργή γαστρίτιδα 	<ul style="list-style-type: none"> Αυξημένη 	<ul style="list-style-type: none"> Δωδεκαδακτυλικό έλκος

Εικόνα 4: Συσχέτιση της φλεγμονής με την ιστοπαθολογία, την έκκριση οξέος και την κλινική εκτίμηση. (Επεξεργασμένο σχήμα [25])

Σε άτομα με φυσιολογική έκκριση οξέος το *H. pylori* αποικίζει κυρίως το γαστρικό άντρο, όπου λίγα οξύ-εκκριτικά αδένια είναι παρόντα. Αυτό το μοτίβο αποικισμού συνδέεται με μία χαμηλής δραστηριότητας κυρίαρχη γαστρίτιδα του άντρου. Ιστολογική αξιολόγηση των γαστρικών βιοψιών σώματος στις περιπτώσεις αυτές, αποκαλύπτει περιορισμένη χρόνια ανενεργή φλεγμονή και χαμηλούς αριθμούς επιφανειακών βακτηρίων [36]. Αντίθετα, άτομα στα οποία η έκκριση του οξέος είναι μειωμένη, έχουν μια ομοιόμορφη κατανομή των βακτηρίων σε άντρο και σώμα, όμως τα βακτήρια στο σώμα βρίσκονται σε στενότερη επαφή με το βλεννογόνο οδηγώντας σε μια κυρίαρχη γαστρίτιδα σώματος [37]. Η μειωμένη έκκριση οξέος μπορεί να οφείλεται σε απώλεια των οξύ-εκκριτικών αδενίων, ως αποτέλεσμα της ατροφικής γαστρίτιδας, αλλά μπορεί επίσης να προκύψει και όταν η οξύ-εκκριτική ικανότητα είναι άθικτη, αν η κυτταρική λειτουργία των οξύ-εκκριτικών αδενίων ανασταλεί από βαγοτομή ή από οξύ-κατασταλτικά φάρμακα, ιδίως αναστολείς της αντλίας πρωτονίων (PPIs) [37]. Η προκύπτουσα ενεργός χρόνια φλεγμονή του

βλεννογόνου του σώματος περαιτέρω επαυξάνει την υποχλωρδρία, καθώς τοπικοί φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως οι κυτοκίνες (συμπεριλαμβανομένης της ιντερλευκίνης-1β [IL-1β]), έχουν ισχυρή κατασταλτική επίδραση επί της λειτουργίας των οξύ-εγκριτικών αδενίων [25]. Η αδυναμία παραγωγής γαστρικών οξέων κατά την χρόνια φλεγμονή του βλεννογόνου σώματος υπό λοίμωξη από *H. pylori* καταδεικνύεται από σειρά παρατηρήσεων. Πρώτον, η γαστρίτιδα σώματος από λοίμωξη με *H. pylori* συνδέεται συχνά με υποχλωρδρία με αποτέλεσμα η θεραπεία εκρίζωσης σε αυτά τα άτομα να οδηγεί σε αυξημένη έκκριση οξέος [38,39]. Δεύτερον, η γαστρίτιδα σώματος με *H. pylori* αυξάνει τα οξύ-κατασταλτικά αποτελέσματα των PPIs [40]. Ως αποτέλεσμα οι *H. pylori* θετικοί ασθενείς με νόσο γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης, ανταποκρίνονται κάπως ταχύτερα στη θεραπεία με PPIs, τόσο όσο αφορά την υποχώρηση των συμπτωμάτων, όσο και με την επούλωση της οισοφαγίτιδας [41]. Μια τρίτη παρατήρηση για την υποστήριξη των οξέων-κατασταλτικών, αποτέλεσμα της ενεργούς γαστρίτιδας σώματος, προέρχεται από την σημαντικά πιο πρόσφατη έρευνα που δείχνει ότι τα άτομα με γονότυπους αυξημένης παραγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών, έχουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης κυρίαρχης γαστρίτιδας σώματος, προδιαθέτοντάς τους σε ατροφική γαστρίτιδα, εντερική μεταπλασία και γαστρικό καρκίνο [42].

Σε άτομα με υψηλή παραγωγή οξέος λόγω ελαττωματικού ανασταλτικού ελέγχου της έκκρισης του, τα βακτήρια κυρίως κατανέμονται στο άντρο του στομάχου οδηγώντας σε μια κυρίαρχη γαστρίτιδα του άντρου με ταυτόχρονη διάσωση των οξύ-εγκριτικών αδενίων του βλεννογόνου του σώματος. Συνολικά τα άτομα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλής βαρύτητας φλεγμονή, υψηλή παραγωγή γαστρίνης, σχετικά υγιή βλεννογόνο του σώματος και πολύ υψηλή έκκριση οξέος. Ο συνδυασμός των παθοφυσιολογικών αυτών εκδηλώσεων οδηγεί συνήθως στην ανάπτυξη δωδεκαδακτυλικού ή πυλωρικού έλκους [36].

1.2.3. Πεπτικό έλκος

Τα γαστρικά ή δωδεκαδακτυλικά έλκη (που συνήθως αναφέρονται ως πεπτικά έλκη) ορίζονται ως ασυνέχειες του βλεννογόνου με διάμετρο τουλάχιστον 0,5 cm οι οποίες διεισδύουν μέσα στο μυϊκό βλεννογόνο. Η εξέλιξη ενός έλκους υπό την παρουσία λοίμωξης από *H. pylori* επηρεάζεται από μία ποικιλία παραγόντων του ξενιστή και του βακτηρίου. Έλκη εμφανίζονται κυρίως σε θέσεις όπου η φλεγμονή του βλεννογόνου είναι πιο σοβαρή [43] (Εικόνα 5). Γαστρικά έλκη εμφανίζονται στα άτομα με χαμηλή παραγωγή οξέος κυρίως κατά μήκος της μικρότερης

καμπυλότητας του στομάχου, συγκεκριμένα κατά τη μετάβαση από το βλεννογόνο του σώματος προς τον βλεννογόνο του άντρου [43]. Σε άτομα με φυσιολογική ή υψηλή παραγωγή οξέος, παρατηρούνται δωδεκαδακτυλικά ή πυλωρικά έλκη, με πιο συνηθισμένα αυτά του βολβού του δωδεκαδακτύλου, ο οποίος είναι η περισσότερο εκτεθειμένη στο γαστρικό οξύ ανατομική περιοχή.

Οι παθήσεις του γαστρικού και δωδεκαδακτυλικού έλκους είναι στενά συνδεδεμένες με την λοίμωξη με *H. pylori*. Στις αρχικές μελέτες κατά την πρώτη δεκαετία μετά την ανακάλυψη του *H. pylori*, περίπου το 95% του δωδεκαδακτυλικού έλκους και το 85% των γαστρικών ελκών συσχετίζονται με τη παρουσία λοίμωξης από *H. pylori* [27]. Αρχειές μελέτες κοόρτης (cohort) έχουν αναδείξει ότι ο κίνδυνος για την ανάπτυξη έλκους, σε *H. pylori* φορείς, στη διάρκεια της ζωής τους να είναι 3 έως 10 φορές υψηλότερος [44] και ακόμα ότι το 10 έως 15% των *H. pylori* θετικών φορέων θα αναπτύξουν πεπτικό έλκος [45]. Αυτά τα δεδομένα προήλθαν από μελέτες σε αναπτυγμένες περιοχές του κόσμου και είναι άγνωστο αν φορείς *H. pylori* στις αναπτυσσόμενες χώρες παρουσιάζουν παρόμοιους κινδύνους. Η χρήση σχημάτων εκρίζωσης του *H. pylori* ολοκλήρωσε την απόδειξη για την ύπαρξη αιτιολογικής σχέσης μεταξύ της λοίμωξης *H. pylori* και της ανάπτυξης πεπτικού έλκους, δείχνοντας ότι η εκρίζωση του βακτηρίου μείωσε σημαντικά τον κίνδυνο επανεμφάνισης του [46]. Στο παρελθόν προ της ανακάλυψης των αντιβιοτικών, η ασθένεια αυτή ήταν μια χρόνια, υποτροπιάζουσα διαταραχή με υψηλή νοσηρότητα, όπου συχνά απαιτείτο οξύ-κατασταλτική θεραπεία συντήρησης ή χειρουργική επέμβαση. Περίπου το 50% των ασθενών με λοίμωξη *H. pylori* και πεπτικό έλκος, που δεν εκρίζωσαν την λοίμωξη παρά την χορήγηση της θεραπείας, υπέστη υποτροπή του έλκους εντός ενός έτους [46,47]. Η εκρίζωση αλλάζει δραματικά τη φυσική πορεία της νόσου και σχεδόν προλαμβάνει εντελώς την υποτροπή του έλκους [46-49]. Υποτροπές του έλκους μετά από θεραπεία εκρίζωσης μπορεί να οφείλονται είτε σε επίμονη λοίμωξη, σε επαναλοίμωξη, σε χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων και σε ιδιοπαθή αιτιολογία.

1.2.4. Μη ελκωτική δυσπεψία

Η μη ελκωτική δυσπεψία, ορίζεται ως η παρουσία συμπτωμάτων και ενοχλήσεων του άνω γαστρεντερικού, χωρίς καμία αναγνωρίσιμη δομική ανωμαλία κατά τη διάρκεια του διαγνωστικού ελέγχου, συμπεριλαμβανομένων ιδιαίτερα της ενδοσκόπησης του ανώτερου γαστρεντερικού. Αδιερεύνητη δυσπεψία, ορίζεται ως η παρουσία των συμπτωμάτων δυσπεψίας για την οποία καμία

περαιτέρω διαγνωστική αξιολόγηση δεν έχει πραγματοποιηθεί [25]. Τα δυσπεπτικά συμπτώματα μπορεί να ομοιάζουν είτε με αυτά της γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης έχοντας τον καύσο και την παλινδρόμηση ως κυρίαρχα σημεία, είτε με αυτά της υποκινητικότητας του στομάχου με εκδηλώσεις πρώιμου κορεσμού και ναυτίας, είτε με αυτά του έλκους με εκδηλώσεις όπως ο πόνος και ο εμετός. Όλα τα παραπάνω συμπτώματα είναι πολύ κοινά, συχνά βιώνονται από το 20-40% του ενήλικου πληθυσμού σε χώρες της Δύσης [25]. Το 30-60% των ασθενών με λειτουργική δυσπεψία έχουν λοίμωξη από *H. pylori*, αλλά ο επιπολασμός αυτός δεν είναι πολύ διαφορετικός από ότι ο επιπολασμός στον ασυμπτωματικό πληθυσμό [50]. Τέλος φαίνεται ότι η εκρίζωση της λοίμωξης σε ασθενείς τόσο με μη ελκωτική δυσπεψία όσο και με αδιερεύνητες δυσπεψίες, συσχετίζεται με μείωση του σχετικού κινδύνου επανεμφάνισης συμπτωμάτων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (95% CI, 3% έως 12%) [51]. Παρά ταύτα, παραμένει ακόμη ασαφές κατά πόσον η εκρίζωση του *H. pylori* είναι μια οικονομικά αποδοτική στρατηγική για την αντιμετώπιση ασθενών με μη ελκωτική δυσπεψία όσο και με αδιερεύνητες δυσπεψίες [52,53].

Συνοψίζοντας, το *H. pylori* παίζει ρόλο στην αιτιολογία των δυσπεπτικών συμπτωμάτων [54], έτσι στρατηγικές ανίχνευσης και θεραπείας του *H. pylori* είναι αποτελεσματικές για μια υποομάδα των ασθενών με δυσπεψία. Για τους ασθενείς με αδιερεύνητες δυσπεψίες, οι ίδιες στρατηγικές μπορεί να αποτελέσουν κατάλληλη επιλογή, αν και οι εμπειρικές αντί-εκκριτικές θεραπείες μπορεί να αποβούν πιο αποτελεσματικές σε πληθυσμούς με χαμηλό επιπολασμό [54]. Επίσης, σε ασθενείς με διαπιστωμένη μη-ελκωτική δυσπεψία, η εκρίζωση του *H. pylori* είναι μια ακόμα επιλογή. Εκτός από την έμφαση στην θεραπεία των συμπτωμάτων, η αποδοτικότητα του κόστους είναι επίσης ένα θέμα στην εφαρμογή της θεραπείας σε μεγαλύτερες ομάδες ασθενών [25].

1.2.5. Γαστρικός καρκίνος

Δύο ιστολογικά διακριτές μορφές γαστρικού αδενοκαρκινώματος έχουν περιγραφεί, η κάθε μία από τις οποίες χαρακτηρίζεται από διαφορετικά επιδημιολογικά και παθοφυσιολογικά στοιχεία. Το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα διάχυτου τύπου απαντάται συνηθέστερα σε άτομα νεαρής ηλικίας, ανεξαρτήτως φύλου και χαρακτηρίζεται από διήθηση νεοπλασματικών κυττάρων που δεν συσχετίζονται με εντερική μεταπλασία και δημιουργία αδενίων. Αντίθετα, το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα εντερικού τύπου συχνά εκδηλώνεται σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας, κυρίως σε άνδρες και εξελίσσεται προοδευτικά μέσω διακριτών ιστολογικών σταδίων από επιφανειακή χρόνια γαστρίτιδα του σώματος με εμφάνιση ατροφίας και εντερικής μεταπλασίας, σε δυσπλασία

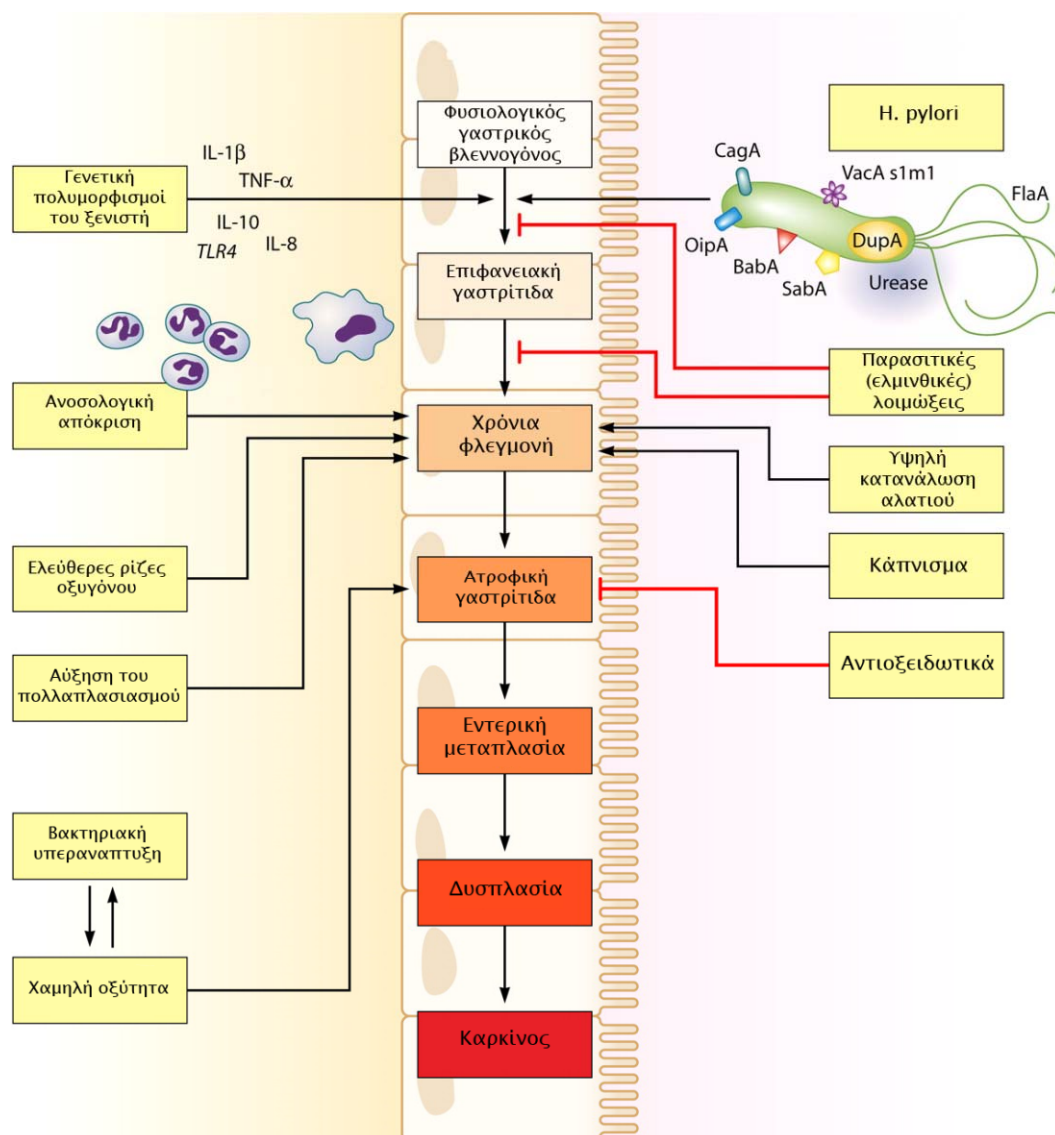
και αδενοκαρκίνωμα [55,56]. Η ανάπτυξη ατροφίας φαίνεται να αποτελεί κομβικό σημείο στην πορεία για την ανάπτυξη εντερικού τύπου γαστρικού αδενοκαρκινώματος, καθώς νεότερα δεδομένα επισημαίνουν ότι η ατροφία μάλλον και όχι η εντερική μεταπλασία είναι πλέον στενότερα συνδεδεμένη με αυτή τη μορφή γαστρικού καρκίνου [57].

Χρόνια φλεγμονή από *H. pylori* μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του γαστρικού βλεννογόνου, με την καταστροφή των γαστρικών αδένων και την αντικατάσταση αυτών από ινώδη και εντερικού τύπου επιθήλιο (Εικόνα 5). Αυτή η διαδικασία της ατροφίας και της εντερικής μεταπλασίας συμβαίνει σε περίπου το ήμισυ του μολυσμένου πληθυσμού, πρώτα σε εκείνους τους ασθενείς και σε εκείνες τις ανατομικές θέσεις του γαστρικού βλεννογόνου, όπου η φλεγμονή είναι πιο σοβαρή [58]. Ο κίνδυνος για ατροφία εξαρτάται από την κατανομή της χρόνιας ενεργού φλεγμονής. Ως εκ τούτου, τα άτομα με μειωμένη παραγωγή οξέος δείχνουν μια ταχύτερη εξέλιξη προς ατροφία [59] (Εικόνα 5). Σε περιοχές με απώλεια αδενίων και εντερική μετάπλαση διευρυνόμενη με το χρόνο σε πολυεστιακή, ο κίνδυνος για καρκίνο του στομάχου αυξάνεται μέχρι 90 φορές, ανάλογα με την έκταση και τη σοβαρότητα της ατροφίας [60]. Αποδεικνύεται ότι η λοίμωξη με *H. pylori* αυξάνει τον κίνδυνο της ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου, μέσω της αλληλουχίας της ατροφίας και της εντερικής μεταπλασίας, προέρχονται από μια σειρά μελετών, όπου έχει αποδειχθεί ότι οι ασθενείς με *H. pylori* λοίμωξη αναπτύσσουν αυτές τις αλλοιώσεις πιο συχνά από ότι οι μη μολυσμένοι [61]. Περαιτέρω υποστήριξη παρέχεται από στοιχεία που υποδεικνύουν γεωγραφική συσχέτιση μεταξύ του υψηλού ποσοστού του επιπολασμού του *H. pylori* και αυξημένων περιστατικών καρκίνου του στομάχου [62,63]. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, εκτιμήθηκε ότι η λοίμωξη από *H. pylori* αυξάνει τον κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου του στομάχου περίπου δέκα φορές, έχοντας σαν αποτέλεσμα το *H. pylori* να καταταγεί σαν καρκινογόνο κατηγορίας Ι από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας [64]. Επιπλέον, μελέτες με ομάδες ελέγχου (case-control) που εξέτασαν ενδελεχώς την πιθανότητα προγενέστερης μόλυνσης με *H. pylori* σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνο ανέφεραν ακόμη υψηλότερα ποσοστά πιθανοτήτων (odds ratios) έως 68, για την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου παρουσία λοίμωξης από *H. pylori* [65].

Τα παραπάνω ενισχύονται από δεδομένα σε ζωικά μοντέλα, κυρίως βάσει του ζωικού μοντέλου λοίμωξης σε γερβίλους Μογγολίας (Mongolian gerbils), όπου παρατηρούνται φαινόμενα ατροφίας και γαστρικού καρκίνου [66-68]. Ο κίνδυνος ανάπτυξης της ατροφίας και καρκίνου παρουσία του *H. pylori* και πάλι σχετίζεται με παράγοντες του ξενιστή και του βακτηρίου, οι οποίοι επηρεάζουν την σοβαρότητα της χρόνιας φλεγμονώδους απόκρισης. Ο

κίνδυνος αυξάνεται σε πειραματόζωα που μολύνθηκαν με CagA²-θετικά στελέχη [69,70], αλλά επίσης και σε πειραματόζωα με γενετική προδιάθεση υψηλότερης παραγωγής ιντερλευκίνης-1 (IL-1) ως απόκριση προς τον αποικισμό [42].

Ο κίνδυνος ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου κατά την διάρκεια της ζωής μεταξύ των ατόμων με λοίμωξη εκτιμάται περίπου 1 έως 2% στις Δυτικές χώρες [27]. Στον ανεπτυγμένο κόσμο, το 60% έως το 80% των γαστρικών καρκίνων σχετίζονται με την χρόνια λοίμωξη από *H. pylori*. Ενδιαφέρον είναι ότι η συχνότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου έχει μειωθεί σημαντικά κατά τις τελευταίες δεκαετίες στις αναπτυγμένες χώρες. Η μείωση αυτή είναι παράλληλη με την εν λόγω



Εικόνα 5: Παρουσιάζεται σχηματικά η μέχρι σήμερα ευρέως αποδεκτή θεωρία σταδιακής πρόκλησης γαστρικού καρκίνου οφειλόμενου στην χρόνια φλεγμονή από *H. pylori*, ευρύτερα γνωστό και ως πρότυπο Correa. Παρουσιάζονται επίσης οι βασικοί παράγοντες (περιβάλλον, ξενιστής, βακτήριο) που φαίνεται να παίζουν ρόλο στην έκβαση της λοίμωξης. (Επεξεργασμένο σχήμα [72])

μείωση του επιπολασμού του *H. pylori*, ωστόσο αποτελεί μια αργή διαδικασία για δεκαετίες και γενιές και έτσι δεν επηρεάζει ένα συγκεκριμένο άτομο το οποίο είναι *H. pylori* θετικό. Επιπλέον, παρά τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου στις δυτικές χώρες, ο καρκίνος του στομάχου είναι η τέταρτη πιο κοινή μορφή καρκίνου στον κόσμο, καθώς η συχνότητα εμφάνισης της νόσου παραμένει πολύ υψηλή σε μεγάλες περιοχές του κόσμου, κυρίως στις περιοχές της Ανατολικής Ασίας και Νότιας Αμερικής [71-73]. Ως αποτέλεσμα της επίμονα υψηλής συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου σε αυτές τις χώρες και λόγω την αύξησης των πληθυσμών τους αναμένεται ότι ο σημερινός αριθμός των 850.000 περιστατικών καρκίνου του στομάχου που διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο να αυξηθεί περαιτέρω τα επόμενα 20 χρόνια.

Για αυτούς τους λόγους, μεγάλο μέρος της έρευνας επικεντρώνεται τώρα στο προληπτικό αποτέλεσμα της εκρίζωσης στον καρκίνο, εστιάζοντας τόσο στο γενικό πληθυσμό όσο και σε ασθενείς με προκαρκινικές καταστάσεις, ιδιαίτερα αυτές της ατροφίας και της εντερικής μετάπλασης. Ξεινώνοντας με το τελευταίο, αρκετές ελεγχόμενες με εικονικό φάρμακο τυχαιοποιημένες μελέτες έχουν τώρα καταδείξει ότι η εκρίζωση μπορεί να σταματήσει την πρόοδο αυτών των αλλοιώσεων και ότι ακόμη και σε κάποιο βαθμό επάγουν μια υποχώρηση της ατροφίας [75-79]. Ωστόσο το αποτέλεσμα αυτών των παρεμβάσεων στην πρόληψη του γαστρικού καρκίνου είναι λιγότερο προφανές. Σε αρκετές μελέτες, εκρίζωση *H. pylori* στα πρώτα στάδια της παρακολούθησης δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στην εμφάνιση του καρκίνου του στομάχου [76,78,80]. Σε όλες αυτές τις μελέτες, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων εκρίζωσης και ελέγχου σε σχέση με την συχνότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου στα πρώτα 4 έως 12 έτη μετά τη θεραπεία. Ωστόσο η εντυπωσιακή παρατήρηση σε όλες αυτές τις μελέτες ήταν ότι η εκδήλωση γαστρικού καρκίνου μετά τη θεραπεία εκρίζωσης ήταν ιδιαίτερα περιορισμένη σε εκείνα τα άτομα που είχαν ήδη ατροφική γαστρίτιδα και εντερική μετάπλαση. Αυτό υποδεικνύει ότι το μείζων καρκίνο-προληπτικό αποτέλεσμα της εκρίζωσης του *H. pylori* προκύπτει σε άτομα με απουσία προκαρκινικών αλλοιώσεων, εμφάνιση των οποίων αποτελεί «σημείο μη επιστροφής». Εάν τα αποτελέσματα επιβεβαιωθούν και από άλλες μελέτες, αυτό σημαίνει ότι η παρατηρούμενη υποχώρηση της βαρύτητας της ατροφίας δεν έχει καμία άμεση σχέση με τον κίνδυνο εκδήλωσης του καρκίνου. Στον αντίποδα μόνο μια μελέτη διέφερε, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι εκρίζωση του *H. pylori*, σε ασθενείς με γαστρικό έλκος, έχει σαν αποτέλεσμα την σημαντική μείωση του κινδύνου ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου [81]. Περαιτέρω μελέτες θα αναδείξουν ενδεχομένως το προστατευτικό αποτέλεσμα της θεραπείας εκρίζωσης του *H. pylori* στην ανάπτυξη του γαστρικού καρκίνου και θα βοηθήσουν στον

ακριβέστερο προσδιορισμό του «σημείου μη επιστροφής» όσον αφορά την ανάπτυξη προνεοπλασματικής φύσεως αλλοιώσεων όπως η ατροφία και η εντερική μεταπλασία.

1.2.6. Λέμφωμα MALT

Ο γαστρικός βλεννογόνος δεν περιέχει λεμφικό ιστό, αλλά ειδικός λεμφικός ιστός των βλεννογόνων (MALT³) εμφανίζεται ως απάντηση στον αποικισμό με το *H. pylori*. Σε σπάνιες περιπτώσεις, ένας μονοκλωνικός πληθυσμός Β λεμφοκυττάρων μπορεί να προκύψει από αυτόν τον ιστό και αργά πολλαπλασιάζεται να σχηματίσει ένα λέμφωμα MALT. Τα ιστολογικά κριτήρια για τη διάγνωση του λεμφώματος MALT και την διαφοροποίηση του από τις πολυκλωνικές δραστικές διηθήσεις παραμένουν αμφιλεγόμενα. Η διάγνωση βασίζεται στην ιστολογική παρατήρηση κατά τη διάρκεια ελέγχου ρουτίνας και δέον όπως γίνεται σε συνάρτηση με την επίδειξη κλωνικότητας με ανοσοϊστοχημεία ή μέσω μοριακών τεχνικών, όπως η PCR⁴. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς με λέμφωμα MALT είναι *H. pylori* θετικοί [82] και οι *H. pylori* θετικοί ασθενείς παρουσιάζουν ένα σημαντικά αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη γαστρικού MALT λεμφώματος [83]. Λόγω των διαγνωστικών διαφωνιών και τη σχετική σπανιότητα αυτής της διαταραχής, η ακριβής συχνότητα σε άτομα θετικά για *H. pylori* είναι άγνωστη, αλλά MALT λεμφώματα εμφανίζονται σε λιγότερο από το 1% των *H. pylori* θετικών ατόμων [84]. Οι τυχαίοποιημένες μελέτες για την επίδραση της εκρίζωσης του *H. pylori* σε ασθενείς με MALT λέμφωμα είναι ως εκ τούτου ανέφικτες. Όμως, σειρά μελετών καταδεικνύουν ότι η εκρίζωση μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη ύφεση σε ασθενείς με MALT λέμφωμα το οποίο περιορίζεται στο στομάχι [85-89]. Συνολικά, περίπου το 60 με 80% των ασθενών αυτών φθάνουν σε πλήρη ύφεση μετά την εκρίζωση, περίπου το 10% συνεχίζουν να έχουν σημάδια της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου, και το υπόλοιπο δεν δείχνουν απόκριση ή εξέλιξη της νόσου. Η διακύμανση στην απόκριση μεταξύ διαφορετικών σειρών μπορεί εν μέρει να οφείλεται σε διαφορετικά κριτήρια για τη διάγνωση του MALT λεμφώματος, ενδεχομένως συμπεριλαμβάνονται μερικοί ασθενείς με καλοήγη λεμφοειδή συσσωματώματα. Το 10-35% των ασθενών που φθάνουν αρχικά σε πλήρη ύφεση μετά την εκρίζωση του *H. pylori* παρουσιάζουν υποτροπή της νόσου κατά τη διάρκεια της περαιτέρω παρακολούθησης. Για το λόγο αυτό, η μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών με MALT λέμφωμα είναι υποχρεωτική [90]. Ένα σημαντικός προγνωστικός παράγοντας για την εξέλιξη της νόσου φαίνεται να είναι η παρουσία της χρωμοσωμικής μετατόπισης t(11;18)

³ Mucosa Associated Lymphoid Tissue

⁴ Polymerase Chain Reaction

(q21;q21). Αυτή η μετατόπιση σχετίζεται με τη γονιδιακή σύντηξη *API2-MALT1*, με το πρώτο γονίδιο να συμμετέχει στη ρύθμιση της απόπτωσης και το δεύτερο να προσομοιάζει με μια κασπάση πρωτεΐνη αλλά με ακόμη άγνωστη βιολογική λειτουργία. Ένας αριθμός μελετών έχουν δείξει ότι MALT λεμφώματα με αυτές τις μετατοπίσεις δεν ανταποκρίνονται καθόλου ή μόνο σπάνια στη εκρίζωση [91,92].

1.2.7. Εξωγαστρικές παθήσεις

Το *H. pylori* έχει προταθεί ότι ενδεχομένως συμβάλει σε ένα ιδιαίτερα ευρύ φάσμα εξωγαστρικών παθήσεων. Αυτές περιλαμβάνουν στους ενήλικες, παθήσεις του αιμοποιητικού συστήματος, όπως η σιδηροπενική αναιμία και η ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα, αγγειακά νοσήματα όπως η ισχαιμική καρδιοπάθεια, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, το πρωτοπαθές φαινόμενο Raynaud και η ιδιοπαθής κεφαλαλγία, αυτοάνοσα νοσήματα όπως το σύνδρομο Sjogren, η πορφύρα Henoch-Schonlein, η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, ιδιοπαθείς αρρυθμίες, η νόσος του Parkinson, η οπτική ισχαιμική νευροπάθεια και δερματικά νοσήματα όπως ροδόχρους ακμή. Στα παιδιά αντίστοιχα έχουν προταθεί νοσήματα, όπως η αναστολή αναπτύξεως και το σύνδρομο αιφνίδιου θανάτου των βρεφών, η αυτοάνοση ασθένεια θυρεοειδούς και η θρομβοπενική πορφύρα, αναιμία σιδήρου, το φαινόμενο Raynaud, η σκληροδερμία, ημικρανίες και το σύνδρομο Guillain-Barré [93]. Οι υποκείμενοι υποθετικοί μηχανισμοί πρόκλησης των ασθενειών περιλαμβάνουν την χρόνια χαμηλού βαθμού ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης του αίματος, την επιτάχυνση της αθηροσκλήρωσης και τον αντιγονικό μιμητισμό μεταξύ *H. pylori* και υποδοχέων των επιτόπων που οδηγούν σε αυτοάνοσες διαταραχές [94]. Σημαντική υποστήριξη για την συμβολή της εκρίζωσης του *H. pylori* στην υποστρόφη της νόσου έχει επιτευχθεί μόνο για την σιδηροπενική αναιμία, την ανθρακική σιδηροπενία και την ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα. Στις μελέτες αυτές αποδείχθηκε ότι σε ασθενείς με λοίμωξη από *H. pylori* η θεραπεία εκρίζωσης είχε σημαντική επίδραση έναντι της ομάδας ελέγχου για τη βελτίωση των θρομβοκυττάρων [95-97]. Έτσι ο έλεγχος για *H. pylori* και κατόπιν η θεραπεία εκρίζωσης πρέπει να εξετάζεται για αυτούς τους ασθενείς. Στις υπόλοιπες παθήσεις που αναφέρονται παραπάνω, δεν φαίνεται να υπάρχει μελέτη που να υποστηρίζει εκρίζωση του *H. pylori* και απαιτούνται περαιτέρω επαρκείς, τυχαιοποιημένες μελέτες [98-100].

1.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ

Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται στην διάγνωση του *H. pylori* χωρίζονται σε επεμβατικές και μη επεμβατικές [101]. Η προγνωστική αξία της κάθε μιας εξαρτάται από την ευαισθησία και την ειδικότητα της. Οι μεταβλητές που μπορούν να επηρεάσουν την ερμηνεία μιας δοκιμασίας ανίχνευσης του *H. pylori* είναι ο επιπολασμός της λοίμωξης σε ένα δεδομένο πληθυσμό, τα φάρμακα που λαμβάνει ο ασθενής πριν και κατά την διάρκεια της δοκιμασίας και η φύση του υπό εξέταση κλινικού προβλήματος [101].

1.3.1. Επεμβατικές μέθοδοι

Οι επεμβατικές μέθοδοι ήταν οι πρώτες που χρησιμοποιήθηκαν για την διάγνωση του *H. pylori* και κοινό τους μεθοδολογικό γνώρισμα αποτελεί η λήψη δειγμάτων βιοψιών με την χρήση ενδοσκοπίου οπτικών ινών. Κατά τη διάρκεια της ενδοσκόπησης αξιολογείται η μορφολογία του στομάχου και του δωδεκαδακτύλου. Με την κλασική ενδοσκόπηση δεν είναι δυνατή η άμεση ανίχνευση του *H. pylori*, ενώ πληροφορίες δίνονται από έμμεσα στοιχεία της επισκόπησης του βλεννογόνου όπως η παρουσία ερυθρότητας, οιδήματος, ελκών, πολυπόδων. Εντούτοις, πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις στον τομέα των ενδοσκοπίων, όπως η ενδοσκόπηση περιορισμένου φάσματος (Narrow Band Imaging) [102], η ενδοκυτταροσκόπηση [103] και η συνεστιακή ενδομικροσκοπία [104], μεγεθύνουν πιθανές βλεννογονικές βλάβες κάνοντάς τις ορατές από τον ενδοσκόπο, δίνοντας νέες δυνατότητες στη διαγνωστική του μικροβίου.

Για την αποφυγή της ενδοσκόπησης άλλες λιγότερο επεμβατικές μεθοδολογίες έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόσβαση του στομάχου. Μια επιλογή αποτελεί η συλλογή γαστρικού υγρού μετά την τοποθέτηση ρινογαστρικού καθετήρα και η επακόλουθη ανάλυση του με καλλιέργεια, χρώση, δοκιμασία ουρεάσης και PCR, εντούτοις η αξιοπιστία της εξέτασης του γαστρικού υγρού είναι υποδεέστερη των ιστολογικών δειγμάτων. Ακόμα η χρήση νήματος για την συλλογή δείγματος από τον γαστρικό βλεννογόνο αποτελεί μια επιλογή πλην όμως, με πενιχρά αποτελέσματα [105]. Η πιο αποτελεσματική εναλλακτική μέθοδος έναντι της γαστροσκόπησης φαίνεται να είναι η χρήση γαστρικής βούρτσας (oro-gastric brush). Η βούρτσα μετά από την κατάποση της από τον ασθενή λαμβάνει δείγμα από το στομάχι μέσω βουρτσίσματος του βλεννογόνου και αφαιρείται από τον ασθενή μέσα σε ένα προστατευτικό κέλυφος. Η μέθοδος είναι ταχεία και εμφανίζεται να είναι αξιόπιστη για τη διάγνωση της λοίμωξης από *H. pylori* [106].

1.3.1.1. Καλλιέργεια

Τα καταλληλότερα δείγματα για καλλιέργεια *H. pylori* είναι δείγματα βιοψίας στομάχου που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της ενδοσκόπησης. Ο αριθμός των βιοψιών που απαιτούνται για την καλλιέργεια είναι αμφιλεγόμενος, εντούτοις συνιστάται η λήψη δύο βιοψιών από το άντρο και δύο βιοψιών από το σώμα (πρόσθιο και οπίσθιο τοίχωμα) [107]. Ένα βασικό σημείο προσοχής είναι η μεταφορά των δειγμάτων βιοψίας από το ενδοσκοπικό ιατρείο στο εργαστήριο. Προβλήματα σε αυτό το στάδιο είναι σίγουρα η αιτία πολλών αποτυχιών καλλιέργειας [108-110]. Τα συστατικά των θρεπτικών υλικών περιλαμβάνουν μια αρχική βάση από άγαρ, συμπληρώματα ανάπτυξης, και εκλεκτικό μείγμα αντιβιοτικών. Μία σειρά θρεπτικών μέσων που περιέχουν άγαρ είναι κατάλληλα για την απομόνωση με καλλιέργεια του *H. pylori*, υπό μικροαερόφιλες συνθήκες, όπως τα Brain Heart Infusion, Columbia, και Chalgren Wilkins [111]. Όσον αφορά τα συμπληρώματα ανάπτυξης είναι αναγκαία η προσθήκη αίματος ή ορού που περιέχουν πολυάριθμα θρεπτικά συστατικά (βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, κλπ.) τα οποία αυξάνουν την ανάπτυξη του *H. pylori*. Η χρησιμοποίηση ορού ή αίματος ζών (π.χ. αίμα αλόγου ή προβάτου) είναι δυνατή αλλά η χρήση ανθρώπινου αίματος φαίνεται να προσδίδει ένα επιπλέον πλεονέκτημα [112]. Μείγμα αντιβιοτικών το οποίο ανέπτυξαν οι Dent και συν. (βανκομυκίνη 10,0 mg/lit, τριμεθοπρίμη 5,0 mg/lit, κεφσουλοντίνη 5,0 mg/lit, αμφοτερικίνη Β 5,0 mg/lit) χρησιμοποιείται για την εκλεκτική καλλιέργεια του *H. pylori* [113]. Η βέλτιστη θερμοκρασία καλλιέργειας είναι 37°C, υπό μικροαερόφιλες συνθήκες (90% N₂, 5% CO₂, 5% O₂) [114]. Για καλλιέργεια από βιοψία, οι αποικίες είναι ορατές μετά από 3 ημέρες και είναι στο βέλτιστο σημείο ανάπτυξης μετά από 4 ημέρες. Ωστόσο, στην περίπτωση που το βακτηριακό φορτίο είναι χαμηλό στα δείγματα μπορεί να είναι απαραίτητη η πάροδος έως και επτά ημερών για την εμφάνιση των αποικιών [115]. Η ειδικότητα της καλλιέργειας είναι 100%, ενώ η ευαισθησία μπορεί να φτάσει 95% με κυριότερους λόγους αποτυχίας την ανεπάρκεια του βιοπτικού υλικού, τις συνθήκες μεταφοράς των δειγμάτων και τέλος την κατανάλωση αντιβιοτικών ή PPIs δύο εβδομάδες πριν την λήψη των βιοψιών [101]. Σημαντικό πλεονέκτημα της καλλιέργειας αποτελεί η δυνατότητα διεξαγωγής αντιβιογράμματος παρέχοντας πληροφορίες για την αντοχή του *H. pylori* σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών [101].

1.3.1.2. Ιστολογική διάγνωση

Η παρατήρηση του *H. pylori* σε ιστολογικά παρασκευάσματα από βιοψία στομάχου ήταν που οδήγησε τους Warren και Marshall στην προσπάθεια καλλιέργειας του [116]. Η ιστολογική διάγνωση αποτελεί σήμερα την ποιο διαδεδομένη επεμβατική μέθοδο διάγνωσης της λοίμωξης από *H. pylori* παρέχοντας επιπρόσθετα πληροφορίες για την γαστρική φλεγμονή. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες κατά *Sydney* ο απαραίτητος αριθμός βιοψιών είναι τέσσερις, δύο προερχόμενες από το άντρο και δύο από το σώμα [117,118]. Ακόμα συνιστάται χρήση τουλάχιστον δύο χρώσεων, αιματοξυλίνης-εωσίνης για την εκτίμηση των φλεγμονωδών κυττάρων και Giemsa ή Genta για την ανίχνευση του βακτηρίου [117,118]. Η τυπική μορφολογία του *H. pylori* είναι καμπυλωτό ή σπειροειδές με μέγεθος 2,5-4 μm μήκος και 0,5-1 μm πάχος. Η παρατήρηση τους γίνεται στο παρασκευάσμα με χρήση μεγάλη μεγέθυνσης, να ευρίσκονται προσκολλημένα στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων του βλεννογόνου, είτε ελεύθερα μέσα στην βλέννα, είτε σπανιότερα στον διακυτταρικό χώρο των κυττάρων του βλεννογόνου. Δύο είναι τα κύρια μειονεκτήματα της μεθόδου, πρώτον, απαιτείται η λήψη καλής ποιότητας γαστρικών βιοψιών προϋπόθεση η οποία δεν είναι δυνατή για πολλές κατηγορίες ασθενών. Δεύτερον, η παρατήρηση καθίσταται πολλή δυσχερής όταν το βακτηριακό φορτίο στα δείγματα είναι μικρό και τα βακτήρια δεν παρουσιάζουν την τυπική μορφολογία [101]. Επιπλέον, η μέθοδος εξαρτάται από τις ικανότητες του ιστοπαθολόγου καθώς και από τον χρόνο που θα αφιερώσει στην αξιολόγηση του κάθε παρασκευάσματος, με αποτέλεσμα να υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις ακόμα και μεταξύ εξειδικευμένων κέντρων στην διάγνωση της νόσου [119,120]. Οι ιστολογικές εκθέσεις κατά *Sydney* [118] περιέχουν αφενός πληροφορίες για τον βακτηριακό αποικισμό δηλαδή, την παρουσία των μικροβίων στο άντρο και στο σώμα ημιποσοτικά, σύμφωνα με κλίμακα από το 0 έως το 3. Αφετέρου με χρήση αντίστοιχης κλίμακας, εκτιμούν λεπτομερώς τα ιστολογικά χαρακτηριστικά, δηλαδή τη βαρύτητα της φλεγμονής (βαθμός διήθησης στο χόριο από μονοπύρρηνα λεμφοκύτταρα), τη δραστηριότητα της φλεγμονής (βαθμός διήθησης ουδετεροφίλων πολυμορφοκυττάρων) καθώς και την ύπαρξη ατροφίας (ιαταστροφή οξυντικών επιθηλιακών κυττάρων) και τη εντερική μεταπλασία (αντικατάσταση των οξυντικών επιθηλιακών κυττάρων από αντίστοιχα με εντερικό φαινότυπο) [118].

1.3.1.3. Ταχεία δοκιμασία ουρεάσης (CLO τεστ)

Η ταχεία δοκιμασία ουρεάσης έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως, επειδή είναι απλή, φθηνή και εύκολη στη διεξαγωγή [121,122], μπορεί να διεξαχθεί άμεσα στο ενδοσκοπικό ιατρείο και να δώσει ταχέα αποτελέσματα. Το *H. pylori* παράγει μεγάλες ποσότητες του ενζύμου της ουρεάσης, το οποίο παρουσιάζει την υψηλότερη ειδική δραστηριότητα (36 ± 28 $\mu\text{mol}/\text{min} / \text{mg}$ πρωτεΐνης) μεταξύ των διαφορετικών βακτηριακών ουρεασών [123]. Αποτελεί εξελικτική προσαρμογή του βακτηρίου στο ιδιαίτερο περιβάλλον του γαστρικού βλεννογόνου όπως αναλυτικά περιγράφεται στην §1.8.2.1. Τα υπόλοιπα θετικά σε ουρεάση βακτήρια που υπάρχουν στο γαστρικό βλεννογόνο όπως οι στρεπτόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι, παράγουν μικρότερη ποσότητα της ουρεάσης, η οποία δεν οδηγεί στην γρήγορη ανίχνευση (<2 ώρες), καθιστώντας τη μέθοδο ειδική για το *H. pylori* [101].

Όταν ένα δείγμα βιοψίας που περιέχει *H. pylori* εισάγεται σε ένα μέσο πλούσιο σε ουρία αυτή διασπάται από την ουρεάση σε διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία. Το ιόν αμμωνίου αυξάνει το pH του διαλύματος, έτσι παρουσία ενός χημικού δείκτη, π.χ., ερυθρό της φαινόλης, παρατηρείται αλλαγή του χρώματος του, στην προκειμένη περίπτωση από κίτρινο σε κόκκινο ή ιώδες. Για να βελτιωθεί η ευαισθησία της μεθόδου είναι δυνατόν να μειωθεί ο συνολικός όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος [124], να αυξηθεί η συγκέντρωση της ουρίας από 2 έως 10% [125] και η θερμοκρασία επώασης (37°C) [126,127], ενώ το μέγεθος της βιοψίας δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα [128,129]. Στο εμπόριο υπάρχουν πολλά τεστ ουρεάσης, που περιλαμβάνουν είτε γέλη (CLO test, HpFast), είτε χαρτί (PyloriTek, ProntoDry, HpOne), είτε υγρό (CPtest, EndoscHp). Όλες οι εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες ουρεάσης διαθέτουν ευαισθησία 85-95% και ειδικότητα 95-100% [130,131].

1.3.1.4. Μοριακές δοκιμασίες

Η PCR είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος μοριακής διάγνωσης. Η εφαρμογή της σε γενετικό υλικό που έχει απομονωθεί από γαστρικές βιοψίες επιτρέπει την ανίχνευση του *H. pylori* ακόμα και όταν το βακτηριακό φορτίο είναι πολύ χαμηλό [132,133]. Βασικά της πλεονεκτήματα αποτελούν η ταχύτητα διεξαγωγής της δοκιμασίας καθώς και η δυνατότητα ταυτόχρονης γενετικής ανάλυσης των παραγόντων παθογένειας του βακτηρίου [134,135]. Κρίσιμο στοιχείο για την επιτυχή εφαρμογή της μεθόδου αποτελεί η επιλογή του γονιδίου-στόχου το

οποίο πρέπει να είναι ειδικό για το *H. pylori*, και συντηρημένο σε όλα τα διαφορετικά στελέχη [101]. Συνεπώς, είναι αναγκαίο να γνωρίζουμε την αλληλουχία του γονιδίου-στόχου μεγάλου αριθμού στελεχών *H. pylori* καθώς και πολλών στελεχών άλλων βακτηριακών ειδών [101]. Τα γονίδια που αρχικά χρησιμοποιήθηκαν για διαγνωστικούς σκοπούς ήταν τα γονίδια του οπερονίου της ουρεάσης *ureA* [132] και *glmM* (παλαιότερα γνωστού ως *ureC*) [133] τα οποία όμως απαντώνται και σε άλλα βακτήρια με παρόμοιες αλληλουχίες εγείροντας θέμα ειδικότητας της μεθόδου και το γονίδιο του 16S rRNA [136,137] (Πίνακας 2). Εντούτοις, η ειδικότητα και αυτής της PCR έχει αμφισβητηθεί διότι η 109 bp πολλαπλασιαζόμενη περιοχή λαμβάνεται με εκκινητές οι οποίοι μπορεί να υβριδίζουν και σε δείγματα DNA από ανθρώπινο ιστό [138]. Τέλος άλλα γονίδια με άγνωστη λειτουργία, (π.χ., το γονίδιο που κωδικοποιεί μια 26-kDa πρωτεΐνη που προσδιορίζεται ως γονίδιο *tcaA* [139]), ή τυχαίες αλληλουχίες έχουν χρησιμοποιηθεί [140] για την ανίχνευση του βακτηρίου.

Μεταξύ των μειονεκτημάτων της PCR είναι αφενός η πιθανή ύπαρξη αναστολέων της Ταq πολυμεράσης που μπορεί να μειώσει την ευαισθησία της αντίδρασης [141] και η πιθανή επιμόλυνση του δείγματος με εξωγενές DNA *H. pylori*, η οποία μεταβάλλει την ειδικότητα της μεθόδου, συνήθως λόγω χρήσης μολυσμένων ενδοσκοπίων κατά την λήψη της βιοψίας [142]. Βασικό χαρακτηριστικό των μοριακών μεθόδων διάγνωσης αποτελεί η υψηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με όλες τις άλλες μεθόδους, με δυνατότητα ανίχνευσης έως ένα αντίγραφο του γονιδίου-στόχου. Όμως πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η ευαισθησία της PCR στην διάγνωση του *H. pylori* δεν υπερβαίνει αυτήν της καλλιέργειας, εφαρμοζόμενη σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει θεραπεία [143-148].

Η PCR πραγματικού-χρόνου (Real-Time PCR) αποτελεί τεχνολογική εξέλιξη της PCR και η εφαρμογή της στην διάγνωση του *H. pylori* επιτρέπει όχι μόνο την γρήγορη και ακριβή ανίχνευση του βακτηρίου αλλά επίσης την ποσοτικοποίηση του βακτηριακού φορτίου [149-152] καθώς και την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων οι οποίες συνδέονται με την αντοχή του στελέχους στα αντιβιοτικά [153,154].

1.3.2. Μη επεμβατικές μέθοδοι

Η επεμβατική φύση της γαστροσκόπησης, το υψηλό κόστος, καθώς και η ελάχιστη πιθανότητα επιμόλυνσης με HCV⁵, οδηγεί πολλούς ασθενείς να καταφύγουν σε εναλλακτικές

⁵ Hepatitis C Virus

μεθόδους διάγνωσης της λοίμωξης από *H. pylori* [101]. Για τους παραπάνω λόγους πολλές μη επεμβατικές μέθοδοι που παρακάμπτουν την απαίτηση για γαστροσκοπηση έχουν αναπτυχθεί. Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο ορολογικός έλεγχος αντισωμάτων, αλλά λόγω της χαμηλής ειδικότητας της μεθόδου, άλλες διαγνωστικές μέθοδοι έχουν προταθεί όπως το τεστ αναπνοής ουρεάσης, η ανίχνευση αντιγόνου στα κόπρανα και πιο πρόσφατα, η ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων στα ούρα ή το σάλιο [101].

1.3.2.1. Τεστ αναπνοής ουρεάσης (urea breath test, UBT)

Η διαδικασία εκτέλεσης του τεστ αναπνοής ουρεάσης περιλαμβάνει την κατάποση από τον ασθενή διαλύματος σημασμένης ουρίας η οποία διασπάται ταχέως από την ουρεάση του *H. pylori* σε διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία, εάν το βακτήριο υφίσταται στο στομάχι του ασθενούς. Το σημασμένο διοξείδιο του άνθρακα απορροφάται από το αίμα και αποβάλλεται στον εκπνεόμενο αέρα όπου και ανιχνεύεται. Εάν ο ασθενής δεν έχει μολυνθεί το μεγαλύτερο μέρος του ιστότου αποβάλλεται στα ούρα χωρίς τροποποίηση [101]. Για την σήμανση της ουρίας έχουν χρησιμοποιηθεί τα ισότοπα ^{13}C [155] και ^{14}C [156] με το πρώτο να πλεονεκτεί, λόγω του ότι αποτελεί ένα φυσικό σταθερό ισότοπο χωρίς ραδιενεργούς περιορισμούς, που μπορεί να χορηγηθεί σε παιδιά και σε εγκύους. Η ευαισθησία και η ειδικότητα κυμαίνεται από 95%-97%, εντούτοις τα αποτελέσματα δεν είναι αξιόπιστα όταν ο ασθενής λαμβάνει PPIs ή ρανιτιδίνη [157].

1.3.2.2. Ανίχνευση αντιγόνου στα κόπρανα (*H. pylori* stool antigen test HpSA)

Η πρώτη μελέτη επιτυχούς ανίχνευσης αντιγόνου *H. pylori* σε δείγμα κοπράνων έγινε το 1997 μέσω της χρήσης ELISA⁶ στην οποία χρησιμοποιήθηκαν ακινητοποιημένα πολυκλωνικά αντισώματα για την ανίχνευση του *H. pylori* αντιγόνου. Πολυάριθμες μελέτες που διεξήχθησαν στη συνέχεια, επιβεβαίωσαν την αξία του HpSA ως διαγνωστικού εργαλείου με ευαισθησία 94.1% και ειδικότητα 94,5%. [158-160]. Πρόσφατα δεδομένα μετανάλυσης αναγνωρίζουν την υπεροχή της χρήσης μονοκλωνικού αντισώματος για την ανίχνευση του αντιγόνου σε δείγμα κοπράνων [161]. Σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες το μονοκλωνικό τεστ κοπράνων και η δοκιμασία αναπνοής της ουρίας είναι οι προτεινόμενες δοκιμασίες ελέγχου της επιτυχούς ή ανεπιτυχούς θεραπείας εκρίζωσης του *H. pylori* [162].

⁶ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

1.3.2.3. Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι *H. pylori* στον ορό

Η λοίμωξη με *H. pylori* προκαλεί άμεση ειδική συστηματική ανοσολογική απόκριση η οποία απηχεί τα αντισώματα που παράγονται στο επίπεδο του γαστρικού βλεννογόνου. Η ανοσολογική απόκριση ποικίλει ανάλογα με τον ξενιστή και τα αντιγόνα που εκφράζονται στα στελέχη. Ο προσδιορισμός των αντισωμάτων αυτών στο αίμα γίνεται με ορολογικές μεθόδους ELISA και ανοσοσύτωσης [163,164]. Ωστόσο το 2% των ασθενών αδυνατούν να παρουσιάσουν ορό-μετατροπή [165]. Το *H. pylori* χαρακτηρίζεται από γενετική ποικιλομορφία, με διαφορετικές ομάδες στελεχών να εντοπίζονται μεταξύ της Ασίας και της Δύσης [166,167] με αποτέλεσμα τα χαρακτηριστικά των αντισωμάτων να εμφανίζονται διαφοροποιημένα μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών [168]. Μερικοί συγγραφείς έχουν τονίσει την ανάγκη να χρησιμοποιούνται τοπικά στελέχη ως η πηγή του αντιγόνου για την καλύτερη απόδοση της δοκιμασίας, το οποίο εκτιμάται ότι ισχύει ιδιαίτερα στην Ασία [169,170]. Ωστόσο, άλλοι επιμένουν στη σημασία κοινών αντιγόνων μεταξύ των στελεχών [171] και προτείνουν τη συγκέντρωση και χρήση αντιγόνων από στελέχη που αντιπροσωπεύουν τις διάφορες ομάδες ανά τον κόσμο [172,173].

Έχει προταθεί η επικύρωση του ορίου θετικότητας σε τοπική ομάδα στελεχών αναφοράς ανά διαφορετικό πληθυσμό [174]. Η ευαισθησία κυμαίνεται από 90% έως 97% και η ειδικότητα από 50% έως 96% [175,176]. Πλεονεκτήματα των ορολογικών μεθόδων αποτελεί το γεγονός ότι δεν επηρεάζονται από τη λήψη αντιβιοτικών και PPIs και δεν υπόκεινται σε δειγματοληπτικό έλεγχο [162]. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα των ορολογικών εξετάσεων είναι ότι δε μπορούν να διακρίνουν μεταξύ ενεργού λοίμωξης και προηγούμενης έκθεσης στο *H. pylori*. Αντισώματα μπορεί να ανιχνευθούν στο αίμα ασθενών που έχουν εκριζώσει το μικρόβιο για μεγάλα χρονικά διαστήματα [177]. Μετά από επιτυχή θεραπεία συνήθως ο τίτλος των ειδικών IgG αντισωμάτων ελαττώνεται, αλλά η καθυστέρηση με την οποία γίνεται η ελάττωση αυτή, αποτρέπει τη γενικευμένη εφαρμογή τους στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης μετά από θεραπεία εκρίζωσης [177].

Ειδικά IgG αντισώματα μπορούν να ανιχνευτούν στα ούρα [178,179] και στο σάλιο [180,181] ασθενών με λοίμωξη από *H. pylori* αλλά σε χαμηλές συγκεντρώσεις, μέσω της χρήσης διαγνωστικών δοκιμασιών ELISA. Το πλεονέκτημα των δοκιμασιών αυτών είναι η ευκολία λήψης των δειγμάτων. Για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων σε δείγμα σιέλου η ευαισθησία κυμαίνεται στα 65-94% και η ειδικότητα στα 58-95%, ενώ αντίστοιχα σε δείγμα ούρων κυμαίνεται στα 82-100% και η ειδικότητα στα 68-100% [101].

1.4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ *H. pylori* ΛΟΙΜΩΞΗΣ

1.4.1. Εκρίζωση *H. pylori* με την χορήγηση σχημάτων αντιβιοτικών

Διάφοροι συνδυασμοί διάρκειας θεραπείας, δόσεων και φαρμάκων έχουν μελετηθεί, αλλά καμία δεν έχει φθάσει με συνέπεια στα επιθυμητά ποσοστά εκρίζωση από 90 έως 95%. Οι αιτίες αποτυχίας αφορούν κυρίως την ανεπαρκή τήρηση της θεραπείας, συχνά λόγω των παρενεργειών, και την ύπαρξη υψηλής μικροβιακής αντοχής. Η ανάπτυξη αντοχής είναι συχνή σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε προηγούμενη θεραπεία με αντιβιοτικά για οποιοδήποτε νόσημα [182]. Μολονότι το *H. pylori* είναι ευαίσθητο σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών *in vitro*, όλα αποτυγχάνουν ως μονοθεραπεία *in vivo*. Σε μολυσμένους ασθενείς, το πιο αποτελεσματικό μονό φάρμακο είναι η κλαριθρομυκίνη, η οποία οδηγεί σε ένα περίπου ποσοστό εκρίζωση του 40%, όταν χορηγείται δύο φορές την ημέρα για 10 έως 14 ημέρες [183-185]. Η έλλειψη αποτελεσματικότητας της μονοθεραπείας σχετίζεται με το ενδαιτήμα του *H. pylori* ένα ιξώδες στρώμα βλέννας με χαμηλό pH. Η διπλή θεραπεία, συνδυάζοντας δύο ημερήσιες δόσεις PPI, συνήθως με αμοξικιλίνη, είναι ακόμη σε χρήση σε ορισμένες χώρες, αλλά οι διπλές θεραπείες ως επί το πλείστον έχουν αντικατασταθεί από τριπλές θεραπείες ως θεραπευτικό σχήμα πρώτης γραμμής. Αυτές συνδυάζουν δύο αντιβιοτικά είτε με ενώσεις του βισμούθιου ή PPI. Μία περαιτέρω εναλλακτική λύση παρέχεται από θεραπείες τετραπλού σχήματος, οι οποίες συνδυάζουν ενώσεων βισμούθιου και PPI με δύο αντιβιοτικά. Ο ακριβής τρόπος δράσης των ενώσεων του βισμούθιου είναι άγνωστος, αλλά το *H. pylori* είναι ευαίσθητο σε αυτές τις ενώσεις τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* [186,187]. Τετρακυκλίνη, αμοξικιλίνη, ιμιδαζόλες (κυρίως μετρονιδαζόλη και τινιδαζόλη), και μερικά επιλεγμένα μακρολίδια (ιδίως κλαριθρομυκίνη, ενίοτε αζιθρομυκίνη) είναι πιθανόν τα φάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνται πιο ευρέως για την θεραπεία εκρίζωσης του *H. pylori* [188].

Πρόσφατα, η χρήση της ριφαμπουτίνης [189] και φουραζολιδόνης [190,191] έχει προταθεί. Ωστόσο, καθώς η αποτελεσματικότητά τους είναι περιορισμένη και πολλοί ασθενείς δεν ανέχονται την φουραζολιδόνη, η κύρια χρήση αυτών των δύο αντιβιοτικών είναι σε μια δεύτερης γραμμής θεραπεία διάσωσης των ασθενών που έχουν στελέχη μετρονιδαζόλης ανθεκτικά [192]. Περιστασιακά η χρήση της σιπροφλοξασίνης και συναφών φθοριοκινολόνων [193], και άλλα αντιβιοτικά, όπως η ριφαμπίνη και στρεπτομυκίνη [194] έχουν χρησιμοποιηθεί, αλλά αυτά τα φάρμακα φαίνεται να μην έχουν κανένα σοβαρό πλεονέκτημα έναντι των προαναφερθέντων.

1.4.1.1. Κατευθυντήριες οδηγίες για την θεραπεία της *H. pylori* λοίμωξης στην Ευρώπη

Η Ευρωπαϊκή Ομάδα Μελέτης του Ελικοβακτηριδίου (EHSG), ιδρύθηκε το 1987 και σκοπός της είναι η προώθηση της διεπιστημονικής έρευνας σχετικά με την παθογένεια του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού. Οργανώνει ετήσιες συναντήσεις, διοργανώνει ομάδες εργασίας σχετικά με τα παιδιατρικά ζητήματα και κλινικές μελέτες. Ακόμα συγκαλούνται συναντήσεις Συναίνεσης που έχουν σαν αντικείμενο το ποιος θα πρέπει να θεραπευτεί, πώς και πότε θα λάβουν την θεραπεία οι ασθενείς με λοίμωξη από *H. pylori*. Η τέταρτη διάσκεψη συναίνεσης του Μάαστριχτ συγκλήθηκε για να ενημερώσει τις κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με τη διαχείριση της λοίμωξης [162]. Οι κατευθυντήριες γραμμές αυτές αποτελούν το σημείο αναφοράς για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας από τους γιατρούς για την θεραπεία του στις χώρες της Ευρώπης.

Η τέταρτη διάσκεψη συναίνεσης του Μάαστριχτ [162] όσο αναφορά τις κατευθυντήριες οδηγίες για την θεραπεία της λοίμωξης διαπιστώνει την μείωση της αποτελεσματικότητας του τριπλού σχήματος θεραπείας, (PPI-κλαριθρομυκίνη και αμοξικιλίνη ή μετρονιδαζόλη) στο 70% σε αραιότες περιοχές της Ευρώπης, ποσοστό χαμηλότερο από το 80% που αποτελεί τον στόχο παγκόσμια και πολλή χαμηλότερα από την αποτελεσματικότητα που αναμένεται για μια μολυσματική ασθένεια [195].

Υπάρχουν διάφορες εξηγήσεις για τη μείωση της αποτελεσματικότητας της τριπλής θεραπείας: η συμμόρφωση, η υψηλή οξύτητα του στομάχου, το υψηλό βακτηριακό φορτίο, το είδος των στελεχών, αλλά η πιο σημαντική είναι η αύξηση της αντοχής του *H. pylori* στην κλαριθρομυκίνη [162]. Η μέση τιμή του ποσοστού ανθεκτικότητας στην κλαριθρομυκίνη στην Ευρώπη αυξήθηκε από 9% το 1998 [196] σε 17,6% το 2008-9 [197]. Η αντοχή αυξήθηκε στα περισσότερα μέρη της Ευρώπης, έχει πλέον φτάσει σε επίπεδο μεγαλύτερο του 20% στις περισσότερες χώρες της Κεντρικής, Δυτικής και Νότιας Ευρώπης, το οποίο αποτελεί υψηλό ποσοστό αντοχής. Στις χώρες της Βόρειας Ευρώπης είναι μικρότερο από 10%, το οποίο θεωρείται χαμηλό ποσοστό αντοχής [198]. Προκειμένου να ληφθούν υπόψιν τα διαφορετικά ποσοστά αντοχής στην κλαριθρομυκίνη ανά χώρα της Ευρώπης ένα κατώτατο όριο αντοχής στο 15-20% συστήθηκε για τον διαχωρισμό των περιοχών χαμηλής και υψηλής αντοχής [162].

Στις περιοχές με χαμηλή αντοχή στην κλαριθρομυκίνη ως πρώτη γραμμής θεραπεία συστήνεται η χρήση PPI, κλαριθρομυκίνη και αμοξικιλίνη ή μετρονιδαζόλη. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθούν άλατα βισμούθιου [162]. Μετά την αποτυχία της θεραπείας με το

πρώτο σχήμα συνιστάται η εμπειρική θεραπεία με αντικατάσταση της κλαριθρομυκίνης σε ένα τριπλό σχήμα το οποίο περιλαμβάνει PPI, λεβοφλοξασίνη και αμοξικιλίνη ή μετρονιδαζόλη ή ένα τετραπλό σχήμα των φαρμάκων PPI, άλατα βισμούθιου, τετρακυκλίνη και αμοξικιλίνη ή μετρονιδαζόλη [162]. Σε περίπτωση αποτυχίας και του δεύτερου σχήματος δεν συνιστάται η εμπειρική θεραπεία αλλά η αξιολόγηση της αντοχής με την διεξαγωγή αντιβιογράμματος [162].

Στις περιοχές με υψηλή αντοχή στην κλαριθρομυκίνη κρίνεται κρίσιμη η αποφυγή χρήσης της στα σχήματα θεραπείας. Ως πρώτη γραμμή θεραπεία συστήνεται η χρήση PPI, άλατα βισμούθιου, τετρακυκλίνη και μετρονιδαζόλη. Σε περιοχές όπου τα άλατα βισμούθιου δεν είναι διαθέσιμα μπορούν να αντικατασταθούν από κλαριθρομυκίνη σε διαδοχικής χορήγησης στρατηγική θεραπείας, όπου τα αντιβιοτικά δεν χορηγούνται όλα ταυτόχρονα αλλά διαδοχικά [162]. Αν και η επιλογή αυτή δεν είναι ιδανική επειδή περιέχει κλαριθρομυκίνη, έχει δείχθει ότι η αντοχή στην κλαριθρομυκίνη θα μπορούσε να ξεπεραστεί σε έναν αριθμό περιπτώσεων με ποσοστό επιτυχίας σε κλαριθρομυκίνη-ανθεκτικά στελέχη στο 75% [199]. Τέλος το κλασικό τετραπλό σχήμα με κλαριθρομυκίνη αποτελεί ακόμα μια πιθανή επιλογή. Μετά την αποτυχία θεραπείας με το πρώτο σχήμα συνιστάται η χορήγηση PPI, λεβοφλοξασίνη και αμοξικιλίνη ως σχήμα δεύτερη γραμμής. Σε περίπτωση αποτυχίας και του δεύτερου σχήματος δεν συνιστάται η εμπειρική θεραπεία αλλά η αξιολόγηση της αντοχής με την διεξαγωγή αντιβιογράμματος [162].

1.4.1.2. Κατευθυντήριες οδηγίες για την θεραπεία της λοίμωξης από *H. pylori* από το American College of Gastroenterology (ACG) & της δεύτερης συνδιάσκεψης συναίνεσης της περιοχή της Ασία & του Ειρηνικού Ωκεανού

Η αποστολή της ACG είναι η προώθηση της ιατρικής περίθαλψης και της επιστημονικής μελέτης των γαστρεντερικών διαταραχών στην περιοχή της Αμερικής και περισσότεροι από 12.000 γιατροί από 86 χώρες είναι μέλη της. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ACG στην περιοχή της Βόρειας Αμερικής ως πρώτη γραμμής θεραπεία προτείνεται η χορήγηση PPI, κλαριθρομυκίνη και αμοξικιλίνη ή μετρονιδαζόλη και εναλλακτικά PPI, άλατα βισμούθιου, τετρακυκλίνη και μετρονιδαζόλη. Ακόμα διαδοχική θεραπεία που αποτελείται από PPI και αμοξικιλίνη για 5 ημέρες ακολουθούμενη από PPI, κλαριθρομυκίνη και τινιδαζόλη για επιπλέον 5 ημέρες μπορεί να παρέχει μια εναλλακτική λύση [200]. Σε ασθενείς με εμμένουσα λοίμωξη από *H. pylori*, κάθε προσπάθεια θα πρέπει να γίνει για να αποφευχθούν τα αντιβιοτικά που έχουν ήδη ληφθεί από τον ασθενή. Σαν σχήμα διάσωσης προτείνονται τα: PPI, άλατα βισμούθιου,

τετρακυκλίνη και μετρονιδαζόλη και εναλλακτικά PPI, λεβοφλοξασίνη και αμοξικιλίνη. Λόγω του κόστους και της έλλειψης διαθεσιμότητας της καλλιέργειας και του αντιβιογράμματος συνήθως δεν εφαρμόζεται εκτός εάν ο ασθενής έχει αποτύχει σε τουλάχιστον δύο θεραπείες εκρίζωσης [200]. Ακόμη και σε αυτή την περίπτωση, η χρησιμότητα τέτοιων δοκιμών είναι αμφισβητήσιμες, καθώς δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποδηλώνουν ότι η επιλογή ενός σχήματος διάσωσης βασιζόμενο σε αντιβιογράμμα είναι περισσότερο επιτυχημένο [200].

Η συνδιάσκεψη συναίνεσης στην περιοχή της Ασίας και του Ειρηνικού για την θεραπεία της *H. pylori* λοίμωξης συγκλήθηκε για δύο κύριους λόγους: πρώτον την αλλαγή της επιδημιολογίας και των ενδείξεων για τη θεραπεία της λοίμωξης από *H. pylori* από την τελευταία συνδιάσκεψη συναίνεσης και δεύτερον την ανασκόπηση της θεραπεία της λοίμωξης από *H. pylori* στην περιοχή [201]. Η συνδιάσκεψη συναίνεσης πραγματοποιήθηκε στις 14-15 Ιουνίου 2008 στην Μπανγκόκ της Ταϊλάνδης και χρηματοδοτήθηκε από την Asia-Pacific Association of Gastroenterology (APAGE). Στην Ασία, η συνιστώμενη θεραπεία πρώτης γραμμής για τη λοίμωξη από *H. pylori* είναι η PPI, αμοξικιλίνη και κλαριθρομυκίνη [201]. Ως θεραπεία διάσωσης για την εκρίζωση του *H. pylori* προτείνονται μια από τις παρακάτω: μια επιλογή μετά την αποτυχία της πρώτης γραμμής θεραπείας είναι μια τριπλή θεραπεία που περιέχει ένα αντιβιοτικό που δεν έχει χρησιμοποιηθεί στο πρώτο σχήμα. Στην Ιαπωνία, για παράδειγμα, όπου η αντοχή στην μετρονιδαζόλη είναι χαμηλή, σε περίπτωση αποτυχίας της τριπλή θεραπείας με PPI, αμοξικιλίνη και κλαριθρομυκίνη, η χρήση του σχήματος PPI, αμοξικιλίνη και μετρονιδαζόλη είναι μια βιώσιμη εναλλακτική λύση. Ακόμα μια επιλογή αποτελεί το τετραπλό σχήμα από PPI, άλατα βισμούθιου, τετρακυκλίνη και μετρονιδαζόλη. Επίσης εναλλακτικά μπορεί να χορηγηθεί PPI, λεβοφλοξασίνη και αμοξικιλίνη και τέλος τριπλή θεραπεία των PPI, ριφαμπουτίνη και αμοξικιλίνη [201]. Ο ρόλος του αντιβιογράμματος δεν αξιολογήθηκε, αλλά δηλώνεται ότι θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν για την παρακολούθηση των τάσεων της αντοχής στα αντιβιοτικά, καθώς και σε επιλεγμένες περιπτώσεις ως οδηγός για μια θεραπεία διάσωσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, όμως, δεν συνίσταται να επηρεάζει την επιλογή της δεύτερης ή τρίτης γραμμής θεραπείες [201].

1.5. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ *H. pylori*

1.5.1. Ταξινόμηση & μορφολογία

Το είδος *Helicobacter pylori* ανήκει στο γένος *Helicobacter*, της οικογένειας των *Helicobacteraceae*, της τάξης των *Campylobacterales*, ομοταξία των ε-πρωτεοβακτηρίων (ε-*Proteobacteria*), στη συνομοταξία των πρωτεοβακτηρίων (*Proteobacteria*), του βασιλείου των βακτηρίων (*Bacteria*), της επικράτειας των ευβακτηρίων (*Eubacteria*). Η οικογένεια των *Helicobacteraceae* περιλαμβάνει επίσης τα γένη *Wolinella*, *Flexispira*, *Sulfurimonas*, *Thiomicrospira*, και *Thiovulum*. Μέχρι σήμερα, το γένος *Helicobacter* αποτελείται από περισσότερα από 20 αναγνωρισμένα είδη, με αρκετά ακόμα να αναμένουν την επίσημη αναγνώριση τους [202]. Τα μέλη του γένους *Helicobacter* είναι όλα μικροαερόφιλοι οργανισμοί οι οποίοι στις περισσότερες περιπτώσεις δίνουν θετικές ενζυματικές αντιδράσεις για την παραγωγή καταλάσης, οξειδάσης και ουρεάσης. Το γένος *Helicobacter* μπορεί να διαιρεθεί σε δύο μείζονες καταγωγές (lineages), τα γαστρικά είδη *Helicobacter* και τα εντεροηπατικά (εξωγαστρικά) είδη *Helicobacter*. Και οι δύο ομάδες δείχνουν ένα υψηλό επίπεδο εξειδίκευσης οργάνου, με αποτέλεσμα τα γαστρικά *Helicobacter* σε γενικές γραμμές να μην αποικίζουν το έντερο ή το ήπαρ και το αντίστροφο [203] (Πίνακας 1).

Το *H. pylori* είναι ένα κατά gram-αρνητικό βακτήριο σε σχήμα ελικοειδούς βακίλου, με μήκος 2 έως 4 μm και πλάτος 0,5 έως 1 μm. Ο μικρο-οργανισμός έχει 2 έως 6 μαστίγια περίπου 3 μm σε μήκος, συνήθως μονοπολικά εάν και έχουν αναφερθεί και ετεροπολικά στελέχη, με ιδιαίτερη δομή στις απολήξεις τους [204]. Τα μαστίγια παρέχουν κινητικότητα και επιτρέπουν την ταχεία κίνηση σε ιξώδη διαλύματα, όπως το υπερκείμενο στρώμα βλέννης των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων [204]. Σε αντίθεση με πολλά άλλα παθογόνα του γαστρεντερικού σωλήνα, στερείται ινιδίων προσκόλλησης. Κάτω από συνθήκες στρες, όπως η έλλειψη θρεπτικών υλικών και η παρουσία αντιβιοτικών, το σχήμα του βακτηρίου μπορεί μεταβληθεί σε κοκκώδες [205]. Αυτή η κοκκοειδής μορφή δεν μπορεί να καλλιεργηθεί *in vitro* και πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύει νεκρά βακτήρια [205], αν και έχει προταθεί ότι η κοκκοειδής μορφή μπορεί να αποτελεί μια βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη μορφή του βακτηρίου [206] η οποία εντούτοις μπορεί να συμβάλει στην μετάδοση της λοίμωξης, καθώς εντοπίζεται σε πληθώρα περιβαλλοντικών δειγμάτων [207-210].

Πίνακας 1: Οι βασικές βιολογικές πληροφορίες για το γένος των *Helicobacter*. (Μεταφρασμένος πίνακας [25])

Είδος	Πρωτεύοντα θηλαστικά- ξενιστής	Παθολογία	Ζωικά μοντέλα
Γαστρικά <i>Helicobacter</i> είδη			
<i>H. pylori</i>	Άνθρωπος, πρωτεύοντα	Γαστρίτιδα, πεπτικό έλκος, γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, MALT λέμφωμα	Ποντικού, <i>Mongolian gerbil</i> , ινδικού χοιριδίου, αξενικό χοιρίδιο
<i>H. felis</i>	Γάτα, σκύλος, ποντικός	Γαστρίτιδα, ίσως να προκαλεί πεπτικό έλκος ή γαστρικό αδενοκαρκίνωμα στα ποντίκια	Ποντικού
<i>H. mustelae</i>	Νυφίτσα	Γαστρίτιδα, πεπτικό έλκος, γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, MALT λέμφωμα	Κανένα
<i>H. acinonychis</i>	Τσιτάχ, τίγρης, άλλα μεγάλα αιλουροειδή	Γαστρίτιδα, πεπτικό έλκος	Ποντικού
<i>H. heilmannii</i>	Άνθρωπος, σκυλί, γάτα, πίθηκος, Τσιτάχ, Αρουραίος	Γαστρίτιδα, δυσπεπτικά ενοχλήματα, MALT λέμφωμα	Ποντικού
Εντερικά <i>Helicobacter</i> είδη			
<i>H. hepaticus</i>	Ποντικός, άλλοι τρωκτικά	υπερπλαστική τυφοκοιλίτιδα, Ηπατίτιδα, ηπατοκυτταρικό καρκίνο	Κανένα

Ένα βασικό χαρακτηριστικό του *H. pylori* είναι ότι για την ανάπτυξη του απαιτούνται υποχρεωτικά μικροαερόφιλες συνθήκες, με βέλτιστη ανάπτυξη σε επίπεδα O₂ από 2 έως 5%, πρόσθετη ανάγκη για 5 έως 10% CO₂ και υψηλή υγρασία. Δεν υπάρχει καμία ανάγκη για υδρογόνο, αν και δεν είναι επιζήμιο για την ανάπτυξη του. Πολλά εργαστήρια χρησιμοποιούν πρότυπες μικροαερόβιες συνθήκες που περιλαμβάνουν 85% N₂, 10% CO₂, και 5% O₂ για την καλλιέργεια του και θερμοκρασία ανάπτυξης στους 34 έως 40 °C, με βέλτιστη τους 37 °C. Αν και το φυσικό του ενδιαίτημα είναι ο όξινος γαστρικός βλεννογόνο, το *H. pylori* είναι ουδετερόφιλος οργανισμός. Έτσι ενώ ο οργανισμός επιβιώνει μετά από σύντομη έκθεση σε pH4, αναπτύσσεται μόνο στο σχετικά στενό εύρος τιμών pH από 5,5 έως 8,0, με βέλτιστη ανάπτυξη σε ουδέτερο pH [211,212].

1.5.2. Γονιδίωμα

Το μέγεθος του γονιδιώματος του *H. pylori* είναι περίπου 1,7 Mbp με την περιεκτικότητα σε G+C να κυμαίνεται από 35 έως 40%. Σύγκριση του γονιδιώματος του στελέχους αναφοράς P12 με τα γονιδιώματα άλλων δημοσιευθέντων στελεχών *H. pylori* (στελέχη 26695 [213], J99

[214], HPAG1 [215], Shi470 [216], G27 [217] και B128 [218]) αποκάλυψε την παρουσία 1223 κοινών γονιδίων σε όλα τα στελέχη. Το μέγεθος του βασικού αυτού γονιδιώματος που υπολογίστηκε λαμβάνοντας υπόψιν πέντε πλήρη γονιδιώματα *H. pylori* [218], μπορεί ενδεχομένως να μειωθεί σε περίπου 1100-1150 γονίδια, αν συμπεριληφθούν στην ανάλυση περισσότερα γονιδιώματα [219]. Το παν-γονιδίωμα (pan-genome) *H. pylori*, δηλαδή ο συνολικός αριθμός των διακριτών γονιδίων σε σύγκριση προς τα ορθόλογα⁷ γονίδια, επτά πλήρων αλληλουχιών γονιδιώματος συμπεριλαμβάνει 2.070 γονίδια. Έτσι, 847 γονίδια απουσιάζουν από τουλάχιστον ένα γονιδίωμα και θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως γονίδια στελέχους-ειδικά. Δύο μεμονωμένα στελέχη μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους μέχρι και 13% σε γονιδιακό επίπεδο. Σε κάθε διαφορετικό στέλεχος, ένα κλάσμα της τάξεως 5-12% των αλληλουχιών κωδικοποίησης απουσιάζει από τουλάχιστον τέσσερα άλλα γονιδιώματα στελεχών *H. pylori*. Τέλος, ένα ποσοστό της τάξεως του 2-9% είναι μοναδικό για το κάθε στέλεχος. Ωστόσο, δεδομένου ότι πολλά από τα μοναδικά γονίδια δεν έχουν ορθόλογα⁷ παραπάνω δεν είναι σαφές επί του παρόντος, πόσα από αυτά είναι στην πραγματικότητα ψευδογονίδια. Πολλά στελέχη φέρουν ένα ή περισσότερα κρυπτικά πλασμίδια, τα οποία κατά κανόνα, δεν φέρουν γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά ή γονίδια μολυσματικότητας [220]. Μερικά από αυτά τα πλασμίδια αποτελούν τη βάση των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιούνται για τη μοριακή τροποποίηση στελεχών *H. pylori* [221]. Έχει αναφερθεί [222,223] η ύπαρξη και πολύ πρόσφατα ο χαρακτηρισμός βακτηριοφάγων που προσβάλλουν στελέχη *H. pylori*.

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της γονιδιωματικής οργάνωσης είναι ότι περίπου το 1% του γονιδιώματος του *H. pylori* κωδικοποιεί μία οικογένεια 32 πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης που είναι καλά διατηρημένη μεταξύ των στελεχών [213,224]. Ορισμένα μέλη αυτής της οικογένειας, μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ευαισθησία του *H. pylori* έναντι των αντιβιοτικών [225]. Το δεύτερο χαρακτηριστικό είναι ότι το γονιδίωμα *H. pylori* περιέχει περισσότερα από 20 ορθόλογα γονίδια που συνδέονται με δραστηριότητα περιορισμού και τροποποίησης, που έχουν χαρακτηριστεί σε άλλα βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των τύπου I, II και III συστημάτων περιορισμού [213,214]. Μικρές διαφορές σε αυτά τα συστήματα παρατηρούνται μεταξύ των στελεχών [214].

Τα στελέχη 26695 και J99 ήταν τα δύο πρώτα στελέχη *H. pylori* των οποίων αποικρυπτογραφήθηκε το γονιδίωμα. Η σύγκριση τους αποκάλυψε αριετές περιοχές των οποίων η περιεκτικότητα σε G+C ήταν μικρότερη από εκείνη του υπόλοιπου γονιδιώματος του *H. pylori*

⁷ Γονίδια με μεγάλη νουκλεοτιδική ομολογία που εντοπίζονται σε διαφορετικούς οργανισμούς στις βάσεις δεδομένων

(35% σε σύγκριση με 39%), υποδηλώνοντας οριζόντια μεταφορά DNA από άλλα είδη [213,226]. Η πρώτη σχετική περιοχή είναι το νησίδιο παθογένειας *cag* (αναλύεται στην §1.8.3.1) και η δεύτερη έχει ονομαστεί περιοχή πλαστικότητας δεδομένης της μεταβλητότητας σε περιεχόμενο γονιδίων μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Σχεδόν το ήμισυ (46-48%) των γονιδίων που είναι ειδικά για ένα στέλεχος *H. pylori* βρίσκονται στην περιοχή πλαστικότητας [226]. Το P12 είναι το μόνο μέχρι στιγμής γνωστό στέλεχος που περιέχει δύο πρόσθετες περιοχές πλαστικότητας (PZ1, PZ2 και PZ3) [227]. Τόσο η PZ1 όσο και η PZ3 εδράζουν σε περιοχές του γονιδιώματος όπου τα συστήματα περιορισμού και τροποποίησης γονιδίων είναι απενεργοποιημένα και αμφότερα κωδικοποιούν πλήρη βακτηριακά συστήματα έκκρισης τύπου IV [227]. Επιπροσθέτως τα γονίδια και των δύο περιοχών κωδικοποιούν ομόλογες πρωτεΐνες σύζευξης, ρελαξάσες, και άλλα ένζυμα επεξεργασίας DNA όπως: τοποϊσομεράσες, ελικάσες και XerCD- ανασυνδυάσες (recombinases) τυροσίνης [227].

Τέλος είκοσι έξι γονίδια του γονιδιώματος του *H. pylori* έχει δειχθεί να περιέχουν επαναλήψεις [213,214,228] ομοπολυμερών, δηλαδή μικρά τμήματα αλληλουχίας DNA μικρότερα από 9 bp με διαδοχικά επαναλαμβανόμενο το ίδιο νουκλεοτίδιο και δινουκλεοτίδιο. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας, ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των λιποπολυσακχαριτών και συστήματα περιορισμού και τροποποίησης του DNA. Οι επαναλήψεις αυτές ενδεχομένως ρυθμίζουν την μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων και ως εκ τούτου θα μπορούσαν να συμβάλουν στο μηχανισμό ποικιλομορφίας φάσης (phase variation) του βακτηρίου που αποτελεί μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων για την αντιμετώπιση του ταχέως μεταβαλλόμενου περιβάλλοντος, χωρίς να απαιτείται η μετάλλαξη των γονιδίων [213,228-230]. Όπως έχει μελετηθεί σε άλλα βακτηριακά είδη η διακύμανση της έκφρασης των πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας του *H. pylori* αναμένεται να επηρεάζει την βακτηριακή κινητικότητα, τον επιτυχή αποικισμό και την αλληλεπίδραση του παθογόνου με τον ξενιστή [228].

1.6. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ

Ταυτόχρονα με την ανακάλυψη του *H. pylori*, παρατηρήθηκε ότι το παθογόνο αυτό είχε εξαιρετική γενετική ετερογένεια και ότι σχεδόν κάθε στέλεχος προερχόμενο από μη συνδεδεμένους ξενιστές φαίνεται να έχει ένα μοναδικό γενετικό «δακτυλικό αποτύπωμα» [231-234]. Επιπλέον κατέστη σαφές ότι ένα άτομο μπορεί να αποικιστεί με περισσότερα του ενός στελέχη *H. pylori* [235] και ότι το γονιδίωμα του στελέχους δύναται να μεταβάλλεται ως

αποτέλεσμα της περιβαλλοντικής πίεσης, κατά τη διάρκεια του χρόνιου αποικισμού [236,237]. Η γενετική ετερογένεια του *H. pylori* είναι εξαιρετικά εντυπωσιακή στο επίπεδο των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μια και η ανάλυση της αλληλουχίας μερικών εκατοντάδων ζευγών βάσεων ενός μόνο διατηρημένου γονιδίου ή γονιδίου μολυσματικότητας είναι επαρκής, για να αποκτηθεί μια μοναδική «υπογραφή» για ένα απομονωμένο *H. pylori*, φανερώνοντας μια πρωτοφανή ποικιλομορφία αλληλομόρφων [238,239]. Αυτή η ποικιλομορφία κατέστη σαφής μετά την μελέτη στελεχών από μέλη της ίδιας οικογένειας σε Δυτικού τύπου κοινωνίες ή στελεχών της κοινότητας σε κοινωνίες Ασιατικής ή Αφρικανικής προέλευσης υποδεικνύοντας γενετικό συσχετισμό των στελεχών και κλωνική μετάδοση [240,241].

Η γενετική ποικιλομορφία προκύπτει σε ένα βακτηριακό πληθυσμό με μεταλλάξεις ή με ανασυνδυασμό μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Λόγω του απλοειδούς γονότυπου και τρόπου αντιγραφής, τα βακτήρια είναι εξ ορισμού κλωνικά και η ποικιλομορφία προκύπτει από τη διαδοχική απόκτηση των μεταλλάξεων. Ωστόσο ο ανασυνδυασμός που οφείλεται σε φυσικό μετασχηματισμό με μεταφορά μέσω σύζευξης, είτε μέσω φάγων, ο οποίος μπορεί να μεταθέτει πολυμορφικά νουκλεοτίδια μεταξύ κλώνων διαφορετικής καταγωγής, φαίνεται να επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη δομή των βακτηριακών πληθυσμών [242]. Ο ανασυνδυασμός είναι σε θέση να παράγει ένα μεγάλο αριθμό αλληλομόρφων από σχετικά λίγα πολυμορφικά νουκλεοτίδια. Η πρώτη απόδειξη του κυρίαρχου αποτελέσματος του ανασυνδυασμού για τη δομή του πληθυσμού του *H. pylori* προήλθε από δεδομένα ηλεκτροφορήσεως πολυτοπικών ενζύμων (multilocus enzyme electrophoresis) [243]. Η γενετική πληθυσμιακή ανάλυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών από μικρές συλλογές στελεχών που προέρχονται από την ίδια γεωγραφική περιοχή (δοιμασία Homoplasy [244]) παρέχουν ισχυρές αποδείξεις για τις επιπτώσεις του ανασυνδυασμού επιτρέποντας ταυτόχρονα την ποσοτικοποίηση του. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι η ποικιλομορφία των αλληλομόρφων εντός των πληθυσμών *H. pylori* δημιουργείται κατά κύριο λόγο από ανασυνδυασμό μεταξύ των στελεχών κατά τις μικτές μολύνσεις και ότι στη δομή του πληθυσμού είναι σχεδόν ανύπαρκτη η κλωνική δόμηση [239]. Μια μεγάλη μελέτη που συνέκρινε τα ποσοστά μετάλλαξης και ανασυνδυασμού μεταξύ των διαφόρων παθογόνων βακτηρίων με βάση δεδομένα από ανάγνωση ακολουθιών επιβεβαίωσε ότι το *H. pylori* ξεχωρίζει ως το βακτηριακό είδος με το υψηλότερο ποσοστό ανασυνδυασμού εντός του πληθυσμού [245].

Ο ρυθμός μετάλλαξης του *H. pylori* είναι σημαντικά υψηλότερος από εκείνο πολλών άλλων βακτηρίων. Επί παραδείγματι, σημαντικά υψηλότερα ποσοστά μεταλλάξεων από το μέσο όρο που παρατηρείται στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*, παρατηρήθηκαν σε 26 από 29 στελέχη

H. pylori, στα οποία έγινε προσδιορισμός αντοχής στην ριφαμπικίνη. Επιπλέον δε στα 25% των στελεχών παρατηρήθηκαν ρυθμοί μετάλλαξης μεγαλύτεροι ακόμα και από εκείνο το στέλεχος αναφοράς που χρησιμοποιείται για την τεχνητή πρόκληση μεταλλάξεων του *Escherichia coli* [246]. Η ανάλυση του γονιδιώματος αποκάλυψε ότι το *H. pylori* στερείται πολλών ορθόλογων γονιδίων που συμβάλλουν στην επιδιόρθωση του DNA στο *E. coli*, συμπεριλαμβανομένου του πλήρους μονοπατιού επιδιόρθωσης αναντίστοιχων βάσεων (mismatch repair pathway) (*mutS1/mutL/mutH*) και διάφορα ένζυμα που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση μέσω της εκτομής βάσεων [247]. Η έλλειψη αυτών των ενζύμων θα μπορούσε να εξηγήσει τον συνολικό υψηλότερο ρυθμό μετάλλαξης. Εκτός από το συνολικό υψηλό ρυθμό μετάλλαξης, το *H. pylori* έχει γονίδια [248] που περιέχουν ομοπολυμερικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων ή επαναλήψεις δινουκλεοτιδίων που είναι επιρρεπείς σε συχνές αλλαγές μήκους με τη μεσολάβηση μεταλλαξιγένεσης [249]. Αλλαγές στο μήκος μπορεί να οδηγήσουν σε αναστρέψιμη απενεργοποίηση γονιδίων που οφείλονται σε αλλαγές του πλαισίου μεταγραφής ή στην ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής, εάν οι επαναλήψεις βρίσκονται στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου. Το μεγάλο ρεπερτόριο των υπερ-μεταβλητών γονιδίων συνεπάγεται ότι κάθε μεγάλος πληθυσμός *H. pylori* θα αποτελείται από πολλούς διαφορετικούς υποπληθυσμούς, ο καθένας με έναν ειδικό συνδυασμό των ενεργών και ανενεργών γονιδίων. Αν και η αδρανοποίηση ορισμένων γονιδίων που περιέχουν αλληλουχίες υπερ-ευμεταβλητότητας είναι πιθανόν να επιλεχθούν ξανά *in vivo*, ένα μεγάλος αριθμός αποδεικτικών στοιχείων καταδεικνύει ότι η μεταλλαξιγένεση λόγω εκ παραδρομής αναντιστοιχίας βάσεων της μιας αλυσίδας (slipped-strand mispairing mediated mutagenesis) και ανασυνδυασμού μεταξύ στελεχών (intrastrain) πράγματι παράγουν πολύ διαφορετικούς πληθυσμούς του *H. pylori* σε έναν δεδομένο ξενιστή [236,248,250,251]. Συνεπώς ο βακτηριακός πληθυσμός μπορεί να προσαρμοστεί γρήγορα στις μεταβαλλόμενες συνθήκες μέσω της εξάπλωσης ενός συγκεκριμένου υποπληθυσμού με μεγαλύτερη προσαρμογή. Ο μηχανισμός αυτός θα μπορούσε ακόμη και να επιτρέψει στα βακτήρια να ρυθμίζουν τον ρυθμό μετάλλαξης τους, για παράδειγμα το γονίδιο *mutY* (γονίδιο που συμβάλει στην ρύθμιση του ρυθμού μετάλλαξης), περιέχει μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία η μεταβολή του μήκους της οποίας θα μπορούσε να οδηγήσει στην απενεργοποίηση του γονιδίου [247,251,252].

Τέλος, το γονιδίωμα του *H. pylori* περιέχει πολυάριθμες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες διαφορετικών μηκών που επιτρέπουν ενδογονιδιακές απαλείψεις ή αναδιατάξεις. Έχει μελετηθεί η κατανομή αυτών των επαναλήψεων και έχει αποδειχθεί ότι η διαγραφή των θραυσμάτων στο

ενδιάμεσο των επαναλήψεων, με μήκος έως 100 bp, ήταν ανεξάρτητη από τη δράση της RecA⁸. Σημειωτέον ότι η RecA είναι η κύρια πρωτεΐνη απαραίτητη για την επιδιόρθωση, συντήρηση και ανασυνδυασμό του DNA και η συχνότητα διαγραφής αυξάνεται με την αύξηση του μήκους των επαναλήψεων [253]. Παραδείγματα γονιδίων που δείχνουν ενδο-γονιδιακές συχνές αναδιατάξεις αποτελούν τα *cagY*, *cagA*, *amiA* γονίδια. Αυτά είναι είτε γονίδια που κωδικοποιούν αμιδάση που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση των πεπτιδογλυκάνων [248] είτε γονίδια που εμπλέκονται στην φουκοσυλίωση των λιποπολυσακχαριτών (LPS) [251].

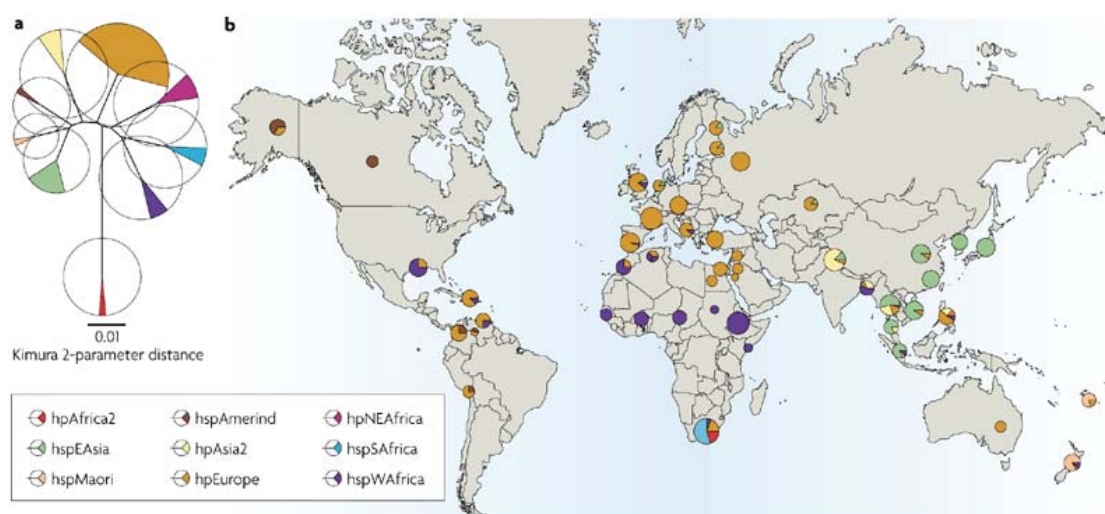
1.7. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΟΥ *Helicobacter pylori* ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΛΟΓΙΚΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Σημαντική πρόοδος στην ανάλυση της δομής του πληθυσμού του *H. pylori* ήρθε με την εφαρμογή της μεθόδου MLST (Multilocus Sequence Typing) [254], που αποτελεί μια μέθοδο σύγκρισης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας για τον χαρακτηρισμό των απομονωθέντων στελεχών μικροοργανισμών. Η μέθοδος περιλαμβάνει την ανάλυση μερικών αλληλουχιών από επτά οικογενή γονίδια. Στις μοναδικές αλληλουχίες που παρατηρούνται για κάθε θραύσμα γονιδίου αποδίδεται ένας αριθμός αλληλόμορφων και ο συνδυασμός των αριθμών των αλληλόμορφων για όλα τα θραύσματα καθορίζει τον τύπο της αλληλουχίας (sequence type ST). Η προσέγγιση αυτή, αναπτύχθηκε αρχικά για τους μηνιγγιδοκόκκους [255] και έκτοτε έχει εφαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων, χρησιμοποιεί δε ένα μικρό αριθμό διατηρημένων γονιδίων σαν αντιπροσωπευτικό δείγμα του γονιδιώματος. Γονίδια που κωδικοποιούν διατηρημένες πρωτεΐνες με λειτουργίες όπως αυτές της βιοσύνθεσης των νουκλεϊνικών οξέων και των πρωτεϊνών που είναι συντηρημένες στα περισσότερα βακτήρια σε σύγκριση με γονίδια μολυσματικότητας, είναι λιγότερο πιθανό να είναι υπό πίεση διαφοροποίησης λόγω θετικής επιλογής [256]. Η MLST σε συνδυασμό με τα σύγχρονα γενετικά εργαλεία ανάλυσης πληθυσμών όπως το Structure [257], έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά ισχυρές μέθοδοι για την ανάλυση των ανασυνδυασμένων πληθυσμών του *H. pylori*. Μια απλοτυπική πολύ-εστιακή ανάλυση του πληθυσμού του *H. pylori* συμπεριλαμβάνει τμηματικές αλληλουχίες από 7 συντηρημένα γονίδια (*atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI* και *yphC*) δίνοντας ένα συνολικό μήκος 3.406 bp. Δύο μεγάλες αναλύσεις της δομής του πληθυσμού των *H. pylori* έχουν δημοσιευθεί, με βάση την MLST αναλύοντας δεδομένα στελεχών από διαφορετικές γεωγραφικές και εθνικές πηγές [231,258].

⁸ Recombination Protein A

Παρά την μεγάλη συχνότητα ανασυνδυασμού, το είδος *H. pylori* μπορεί να υποδιαιρεθεί σε έξι κύριους πληθυσμούς με διαφορετικές γεωγραφικές κατανομές (Εικόνα 6). Τέσσερεις από αυτούς είναι σχετικά ομοιογενείς (hpEurope, hpAsia2, hpAfrica2 και hpNEAfrica) και δύο αποτελούνται από υποπληθυσμούς. Οι υποπληθυσμοί hspWAfrica και hspSAfrica μαζί σχηματίζουν ένα πληθυσμό που ονομάζεται hpAfrica1 και οι υποπληθυσμοί hspEAsia, hspMaori και hspAmerind μαζί αποτελούν τον πληθυσμό hpEastAsia. Αυτοί οι σύγχρονοι πληθυσμοί είναι το αποτέλεσμα των δεκάδων χιλιάδων χρόνων της κοινής συμβίωσης των ανθρώπων και των βακτηρίων, της γεωγραφικής απομόνωσης και του ενδοστελεχειακού βακτηριακού ανασυνδυασμού [259].

Το λογισμικό εργαλείο Structure επιτρέπει επίσης οι πέντε προγονικοί πληθυσμοί από τους οποίους έχουν προκύψει οι σύγχρονοι πληθυσμοί να ανακατασκευαστούν και κάθε στέλεχος μπορεί να αναλυθεί και να εκτιμηθεί πώς η νουκλεοτιδική σύνθεση του σχετίζεται με τους πέντε προγονικούς πληθυσμούς. Ενδιαφέρον είναι ότι κανένα από τα σύγχρονα στελέχη *H. pylori* δεν περιλαμβάνει νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που προέρχονται από ένα μόνο προγονικό πληθυσμό. Όλα τα στελέχη έδειξαν μια νουκλεοτιδική σύνθεση που προέρχεται από ένα μίγμα των



Εικόνα 6: Γεωγραφική γενετική δομή του ανθρώπινου πληθυσμού όπως αυτή έχει προκύψει μετά MLST αναλύσεις του *H. pylori* [252].)

προγονικών πληθυσμών. Η κατανομή των πληθυσμών του *H. pylori* σε όλο τον κόσμο και η κατανομή των πολυμορφισμών σε σχέση με τους πατρογονικούς πληθυσμούς του *H. pylori* είναι σε συμφωνία με τις γνωστές αρχαίες και πιο πρόσφατες ανθρώπινες μεταναστεύσεις. Για παράδειγμα τα στελέχη που απομονώνονται από τους Ιθαγενείς Αμερικανούς στη Βενεζουέλα ή από τους ιθαγενείς Ίνουιτ (Inuit) περιέχουν ένα υψηλό ποσοστό νουκλεοτιδίων των προγόνων της

Ασίας, το οποίο συνάδει με το ιστορικό γεγονός της μετανάστευσης των προγονικών αυτών ανθρώπινων πληθυσμών στην Αμερική, διαμέσου του Βερίγγειου πορθμού, περίπου πριν από 13.000 χρόνια [258]. Ένα υψηλό ποσοστό των *hpAfrica1* στελεχών και στελεχών *hpEurope* περιέχουν μεγάλο ποσοστό νουκλεοτιδίων από το προγονικό *hpAfrica1* το οποίο συνδυάζεται με το εμπόριο σιλάβων μεταξύ της Αφρικής και της Αμερικής. Ομοίως, η κατανομή των στελεχών τόσο του προγονικού *Europe 1* όσο και του προγονικού *Ευρώπη 2*, είναι σύμφωνη με τον αποικισμό της Ευρώπης από μεταναστεύσεις προερχόμενες από την Εγγύς Ανατολή και την Κεντρική Ασία. Αυτές οι μελέτες παρέχουν ισχυρές αποδείξεις ότι η σχέση του *H. pylori* με τους ανθρώπους προηγείται της μετανάστευσης του σύγχρονου ανθρώπου από την Αφρική και ότι το *H. pylori* έχει συνοδεύσει στις μετακινήσεις τους όλες τις ανθρώπινες εθνοτικές ομάδες [231]. Άλλωστε, η γενετική ποικιλομορφία μέσα σε δείγματα πληθυσμών *H. pylori* δείχνει να μειώνεται με την αύξηση της απόστασης από την ανατολική Αφρική, το λίκνο του σύγχρονου ανθρώπου, με ένα εντυπωσιακό τρόπο παρόμοιο με αυτόν που περιγράφεται για τη γενετική ποικιλομορφία των ανθρώπων, δείχνοντας μια παλιά και στενή σχέση μεταξύ των δύο. Προσομοιώσεις από τα υπάρχοντα στοιχεία δείχνουν ότι το *H. pylori* είναι πιθανόν να έχει μεταναστεύσει από την Αφρική πριν από 58.000 ± 3.500 χρόνια, γεγονός που συμπίπτει με τις εκτιμήσεις για την έξοδο του σύγχρονου ανθρώπου από την Αφρική [231].

Η παρατήρηση ότι οι αλληλουχίες του *H. pylori* αντανακλούν στις μεταναστεύσεις πληθυσμών έχει καταδείξει τη δυνατότητα της χρήσης της απλοτυπικής πολύ-εστιακής ανάλυσης στελεχών για την χαρτογράφηση των ανθρώπινων μετακινήσεων ανά τους αιώνες. Πράγματι, ο Wirth και συν. κατέδειξαν ότι η απλοτυπική πολύ-εστιακή *H. pylori* ανάλυση μπορεί να αποβεί πιο κατατοπιστική για τη μελέτη των ανθρώπινων μεταναστεύσεων από ότι άλλοι διαθέσιμοι ανθρώπινοι γενετικοί δείκτες, όπως το μιτοχondριακό DNA και 17 αυτοσωματικοί δείκτες μικροδορυφόρων[260].

1.8. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ

Ο όρος παράγοντας παθογένειας ενός μικροοργανισμού αναφέρεται στα προϊόντα των γονιδίων του που επιτρέπουν την εδραίωση της λοίμωξης στον ξενιστή και της ενίσχυσης στην ικανότητα του να προκαλέσει ασθένεια, σύμφωνα με την βάση δεδομένων παραγόντων παθογένειας

([Virulence Factor Database-VFD](#)) [296]. Στους βακτηριακούς παράγοντες παθογένειας περιλαμβάνονται τοξίνες, πρωτεΐνες κυτταρικής επιφάνειας οι οποίες διαμεσολαβούν για την προσκόλληση στα κύτταρα του ξενιστή, υδατάνθρακες της βακτηριακής κυτταρικής επιφάνειας, πρωτεΐνες προστασίας και υδρολυτικά ένζυμα που μπορούν να συμβάλλουν στην παθογένεια.

Αξιοσημείωτη πρόοδος έχει σημειωθεί στην κατανόηση των παραγόντων παθογένειας του *H. pylori* καθώς και της λειτουργικής τους αλληλεπίδρασης με συστατικά των κυττάρων του γαστρικού επιθηλίου. Οι παράγοντες αυτοί είτε εκκρίνονται, είτε παραμένουν συνδεδεμένοι με την μεμβράνη, είτε μεταφέρονται στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή, όπου μπορούν να

Πίνακας 2: Συνοπτική παράθεση των παραγόντων παθογένειας του *H. pylori* και της επίδρασης τους στην κυτταρική ομοίωση.

Παράγοντες παθογένειας	Αλληλεπιδρών μόριο του ξενιστή	Απορυθμισμένη Κυτταρική λειτουργία
Μεμβρανικοί		
BabA	Lewis B [261], Lewis A[262], Globo H εξαγλυκοσυλκεραμίδιο [263]	Προσκόλληση στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή [261-263]
SabA	Σιαλυλιωμένες μορφές των Lewis X και Lewis A [264]	Προσκόλληση στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή [264], αυξημένη πρόσδεση μέσω επαγωγής της β3GnT5 [265]
AlpA/B	Collagen IV, laminin [266,267]	Προσκόλληση στην ECM [266,267], ενισχύει την ενεργοποίηση NF-κB και MAPK [268]
OipA	Άγνωστο	Προσκόλληση στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή [269-271], επαγωγή φλεγμονώδους απόκρισης [269,270]
HopZ	Άγνωστο	Προσκόλληση στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή
HorB	Άγνωστο	Προσκόλληση στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή
Εκκρινόμενοι		
Urease	Άγνωστο	Επιβίωση υπό όξινο pH [272,273], αποδιοργάνωση στενοσυνδέσμων [274,275]
VacA	EGFR [276,277], RPTPα [278], RPTPβ [279], σφιγκομυελίνη [280], LRP1 [281]	Σχηματισμός κενοτοπίων [282,283], απόπτωση [284,285], διατάραξη των στενοσυνδέσμων [286]
HtrA	E-cadherin [282]	Αποδιοργάνωση των συμφυτικών συνδέσμων [282]
CagL	β1-Ιντεγρίνη [287,288], (β3) β5-Ιντεγρίνη [289]	Διαμεσολαβεί στην μεταφορά της CagA [288], ενεργοποίηση των κινασών του ξενιστή [288,289]
CagA	β1- Ιντεγρίνη [287]	Άγνωστη
Μεταφερόμενοι		
CagA	c-Met, p120, E-κατχερίνη, Grb-2, Par1, PLC-γ, TAK, ZO-1, κ.λ.π. [290]	Διατάραξη διακυτταρικών συνδέσμων και κυτταρικής πολικότητας, του πολλαπλασιασμού και επαγωγή της φλεγμονής [290]
phospho-CagA	Src, SHP-2, Csk, c-Abl, Crk, Grb2, Grb7, PI3K, Ras-GAP, SHP-1, κ.λ.π. [290]	Επαγωγή κυτταρικού φαινοτύπου επιμήκυνσης και διασποράς [290-292], επαγωγή καρτινογένεσης [293]
Peptidoglycan	NOD1 [294,295]	Ενεργοποίηση NF-κB [294], AP-1 και MAPK [295]

παρεμβαίνουν άμεσα σε λειτουργίες του κυττάρου ξενιστή (Πίνακας 2). Συνεπεία του διαφορετικού χωροταξικού εντοπισμού των παραγόντων παθογένειας του βακτηρίου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μόλυνσης, το *H. pylori* είναι σε θέση να εκμεταλλευτεί ένα πλήθος μηχανισμών για την χειραγώγηση των κυτταρικών διεργασιών του ξενιστή και την απορρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών. Η επίδραση του *H. pylori* σε αυτά τα μονοπάτια σηματοδότησης έχει σαν αποτέλεσμα την προσκόλληση του στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή, την επαγωγή των προφλεγμονωδών αποκρίσεων μέσω της απελευθέρωσης κυτοκινών και χημειοκινών, την απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό και την έντονη μιτογονική απόκριση, όπως έχουν χαρακτηριστεί *in vitro* [297].

1.8.1. Μεμβρανικοί παράγοντες παθογένειας

Παρά τις περισταλτικές κινήσεις του στομάχου και τη συνεχιζόμενη μεταφορά του χυλού (chyme), το *H. pylori* εδραιώνει μια ισχυρή αλληλεπίδραση με τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα. Η προσκόλληση του *H. pylori* είναι το πρώτο σημαντικό βήμα της παθογένειας στο στομάχι. Η μεγάλη ομάδα των πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης OMPs⁹ αποτελείται από προσκολλητίνες, όπως η προσκολλητίνη αντιγόνου ομάδας αίματος (Blood group antigen binding Adhesin-BabA), η προσκολλητίνη σιαλικού οξέος (Sialic acid binding Adhesin-SabA), οι λιποπρωτεΐνες προσκόλλησης A και B (Adherence associated lipoprotein A and B-AlpA/B), η εξωτερική πρωτεΐνη φλεγμονής A (outer inflammatory protein A-OipA) οι οποίες διαμεσολαβούν για την πρόσδεση του *H. pylori* στην μεμβράνη του κυττάρου του ξενιστή και από άλλους παράγοντες, όπως ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) και οι μαστιγίνες (flagellin), που είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις στον ξενιστή.

Αν και η βακτηριακή προσκόλληση είναι ζωτικής σημασίας για την παθογένεια του *H. pylori*, δεδομένα που να αποδεικνύουν τις άμεσες επιπτώσεις των ανωτέρω παραγόντων προσκόλλησης στην μεταγωγή σήματος των ενδοκυτταρίων μονοπατιών στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα σπανίζουν. Αυτό δείχνει ότι η προσκόλληση μπορεί να μην ενεργοποιεί άμεσα την κυτταρική σηματοδότηση των κυττάρων του ξενιστή, αλλά μάλλον διαμεσολαβεί για μια στενότερη αλληλεπίδραση ανάμεσα στο *H. pylori* και τα κύτταρα του ξενιστή, πιθανώς δίνοντας την δυνατότητα σε πρόσθετους βακτηριακούς παράγοντες να αλληλεπιδράσουν με τους συγγενείς υποδοχείς τους. Εκτός από OMPs και τις προσκολλητίνες, η φλαγγελίνη (flagellin) και

⁹ Outer Membrane Proteins

οι λιποπολυσακχαρίτες έχουν ευρέως διερευνηθεί για την αποκάλυψη του ρόλου τους στην παθογένεια του *H. pylori*, μια και αποτελούν σημαντικούς παράγοντες παθογένειας σε πολλές άλλες βακτηριακές λοιμώξεις [298]. Σε γενικές γραμμές, η φλαγγελίνη και οι λιποπολυσακχαρίτες είναι σημαντικοί παράγοντες παθογένειας σε πολλές βακτηριακές λοιμώξεις, αλλά δεν είναι σαφές σε ποιο βαθμό οι δύο παράγοντες διεγείρουν την κυτταρική σηματοδότηση στην *H. pylori* λοίμωξη [299]. Η φλαγγελίνη του *H. pylori* έχει μόνο μια πολύ μικρή δυνατότητα να διεγείρει τον υποδοχέα TLR5¹⁰ και να προκαλεί την επαγωγή της έκκρισης της ιντερλευκίνη-8 (IL-8) [300]. Πειραματικά έχει επιβεβαιωθεί ότι η απομονωμένη από *H. pylori* φλαγγελίνη (flagellin) συνδέεται ασθενώς με τον υποδοχέα TLR5 [301]. Σχετικά με τους λιποπολυσακχαρίτες του *H. pylori*, λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες όσον αφορά τις επιπτώσεις αυτών στην φυσιολογική λειτουργία των γαστρικών επιθηλιακών κύτταρων. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι οι λιποπολυσακχαρίτες του *H. pylori* μπορεί να είναι ανταγωνιστές των TLR2¹¹ υποδοχέων, συμβάλλοντας στην ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα NF-κB και επακόλουθα στην επαγωγή έκφραση χημειοκινών [302]. Ακόμα έχει διαπιστωθεί ότι η ενεργοποίηση της έκκρισης των χημειοκινών είναι ανεξάρτητη από την λειτουργία του έως τώρα γνωστού υποδοχέα των λιποπολυσακχαριτών του TLR4¹² [302].

1.8.1.1. Προσκολλητίνη Αντιγόνου Ομάδας αίματος BabA

Η προσκόλληση του *H. pylori* συσχετίστηκε με την παρουσία του φουκοζυλιωμένου (fucosylation) αντιγόνου ομάδος αίματος [303] και στη συνέχεια η BabA (Blood group antigen binding Adhesin) προσδιορίστηκε ως η πρώτη προσκολλητίνη του *H. pylori* που συνδέεται με το φουκοζυλιωμένο αντιγόνο 0 της ομάδας αίματος Lewis B (Le^B) και των σχετικών H1 αντιγόνων στο γαστρικό επιθήλιο [261]. Ωστόσο, η εξιδεικευμένη δέσμευση της BabA με το αντιγόνο 0 της ομάδας αίματος περιορίζεται σε ορισμένα στελέχη του *H. pylori*, ενώ στα περισσότερα στελέχη η Baba μπορεί να δεσμεύεται εξίσου καλά και με το φουκοζυλιωμένο αντιγόνο A της ομάδας αίματος [262]. Πρόσφατα το Globo H εξαγλυκοσυκτεραμίδιο προτάθηκε ως ένας πρόσθετος εταίρος στο σύμπλοκο σύνδεσης της BabA [263]. Ενδιαφέρον είναι ότι τα στελέχη που συνδέονται ειδικά μόνο με το αντιγόνο 0 της ομάδας αίματος βρέθηκαν κυρίως σε χώρες της Νότιας Αμερικής, όπου η ομάδα αίματος 0 αποτελεί τον κυρίαρχο φαινότυπο στον τοπικό πληθυσμό. Η εξελικτική αυτή προσαρμογή στη δεσμευτική ικανότητα της BabA θα μπορούσε να

¹⁰ Toll-like receptor 5

¹¹ Toll-like receptor 2

¹² Toll-like receptor 4

αποδοθεί στην απώλεια της επιλεκτικής πίεσης για δέσμευση με τις ομάδες αίματος Α και Β, αντί της ενεργού εξελικτικής επιλογής των στελεχών αυτών, για την ικανότητα τους να συνδέονται ισχυρότερα στην ομάδα αίματος 0 [262]. Η ανάλυση της γενετικής βάσης της BabA αποκάλυψε δύο γενετικούς τύπους της BabA, *babA1* και *babA2*, εκ των οποίων η μορφή *babA1* δεν εκφράζεται [304] και έναν στενά συνδεδεμένο γονιδιακό παράλογο¹³ γενετικό τύπο *babb* [261]. Έχει προταθεί ότι η έκφραση της BabA ρυθμίζεται μέσω της μεταβολής φάσης (phase variation) και ανασυνδυασμού με το *babb*, καθώς αρκετές μελέτες έχουν δείξει τόσο αύξηση όσο και μείωση της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης μετά από μεταλλάξεις τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [261,305-307]. Επιπλέον, η γενετική διάταξη των γονιδίων *bab* έχειδειχθεί ότι συσχετίζεται με την κατανομή των στελεχών στο στομάχι και επιπλέον οι πολυμορφισμοί το BabA/B έχουν συσχετιστεί με τον υψηλότερο κίνδυνο για την εκδήλωση καρκίνου του στομάχου [308].

Η διαμεσολαβούμενη BabA πρόσφυση του *H. pylori* στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα είναι πιθανόν να ενισχύει την μεταφορά της CagA και την επαγωγή της φλεγμονής [309]. Επιπλέον, κλινικά στελέχη *H. pylori* θετικά για Baba, VacAs1 και CagA εμφανίζουν μεγαλύτερη πυκνότητα εποικισμού, αυξημένα επίπεδα της γαστρικής φλεγμονής και υψηλότερη συχνότητα εντερικής μεταπλασίας σε ασθενείς με *H. pylori* λοίμωξη [310]. Επιδημιολογικά, τα τριπλά-θετικά στελέχη συσχετίζονται με την υψηλότερη συχνότητα του έλκους και γαστρικού καρκίνου [311].

1.8.1.2. Προσκολλητική δέσμευση του σιαλικού οξέος SabA

Η SabA (Sialic acid binding Adhesion) διαμεσολαβεί τη σύνδεση με γλυκοσυζεύγματα που περιέχουν σιαλικό οξύ [264,312]. Η γαστρική φλεγμονή που προκαλείται από το *H. pylori* καθώς και η εμφάνιση γαστρικού καρκίνου, επιδημιολογικά έχουνδειχθεί ότι συνδέονται με την αντικατάσταση των αντιγόνων Lewis από σιαλυλιωμένες μορφές των Le^x και Le^a [264,313,314] υποδηλώνοντας τον σημαντικό ρόλο της SabA στη δημιουργία της χρόνιας φλεγμονής και της ατροφίας [264]. Επιπλέον, η φλεγμονή που προκαλείται από το *H. pylori* οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της γλυκοζυλοτρανσφεράσης β3GnT5¹⁴, η οποία ενεργεί ως ένας σημαντικός παράγοντας στη βιοσύνθεση του σιαλυλιωμένου Le^x αντιγόνου. Η επαγωγή της β3GnT5 έχειδειχθεί ότι εξαρτάται από τον TNF-α¹⁵, αλλά όχι από την IL-8, ενώ κύτταρα που εκφράζουν έκτοπα β3GnT5 δίνουν υψηλότερα ποσοστά πρόσφυσης *H. pylori* στελεχών που εκφράζουν SabA

¹³ Ομόλογα γονίδια που βρίσκονται στον ίδιο οργανισμό και όχι σε διαφορετικό όπως τα ορθόλογα γονίδια

¹⁴ β1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5

¹⁵ Tumor Necrosis Factor-Alpha

[265]. Όπως με τις OipA και BabA, η μεταγραφή της SabA υπόκειται σε ρύθμιση μέσω της μεταβολής φάσης και γονιδιακής αλληλεπίδρασης με το παράλογο *sabb* [315]. Επιπλέον, σηματοδοτικό μονοπάτι του *H. pylori* το οποίο ανταποκρίνεται στην αύξηση του οξέος, δείχνει να περιορίζει την μεταγραφή της SabA, γεγονός που δείχνει ότι η πρόσφυση του *H. pylori* είναι μια δυναμική και οργανωμένη διαδικασία [316,317]. Ανθρώπινα κοκκιοκύτταρα φέρουν επίσης σαλικυλικούς υδατάνθρακες στην επιφάνειά τους και κατά συνέπεια, τα κύτταρα αυτά αναγνωρίζονται ειδικά από την SabA. Η *in vitro* δέσμευση του *H. pylori* σε κοκκιοκύτταρα έχει ως αποτελέσματα την μη οψωνική ενεργοποίησή τους επιτρέποντας πιθανώς το βακτήριο να ελέγχει αυτά τα κύτταρα [318]. Η SabA φαίνεται επίσης να εμπλέκεται στην πρόσδεση με την εξωκυττάρια πρωτεΐνη λαμινίνη [319]. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να προάγεται μια στενότερη επαφή με το κύτταρο ξενιστή που όχι μόνο βοηθά στην παράκαμψη της ανοσολογικής απόκρισης, αλλά μπορεί στην πραγματικότητα να επιτρέπει στο βακτήριο να ελέγχει την ανοσολογική απόκριση, μέσω της άμεσης μεταφοράς και άλλων λοιμογόνων παραγόντων.

1.8.1.3. Λιποπρωτεΐνες A και B AlpA/B που συσχετίζονται με προσκόλληση

Οι AlpA και AlpB (Adherence associated lipoprotein) αρχικά περιγράφησαν ως πρωτεΐνες που διευκολύνουν την σύνδεση του *H. pylori* στην κυτταρική σειρά Kato-III και στην κορυφαία επιφάνεια των γαστρικών κυττάρων [320,321]. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες μοιράζονται ένα υψηλό βαθμό ομολογίας και μεταγράφονται από το ίδιο οπερόνιο. Επιπλέον και οι δύο πρωτεΐνες έχουν δειχθεί ότι είναι απαραίτητες για την προσκόλληση του *H. pylori* σε γαστρικές βιοψίες [321]. Σε αντίθεση με άλλες προσκολλητίνες, οι AlpA και AlpB δεν υπόκεινται σε μεταβολή φάσης (phase variation) και ουσιαστικά όλα τα κλινικά στελέχη τις εκφράζουν [268,322]. Μεταλλάξεις στελεχών στα οποία είχαν απαλείψει τα γονίδια *alpA/B* έδειξαν σοβαρή αδυναμία γαστρικού αποικισμού ποντικών και χοίρων [268,323]. Αντίθετα, πρόσφατη μελέτη σε γερβίλους Μογγολίας καταδεικνύει ότι στελέχη που δεν εκφράζουν AlpA/B οδηγούν σε εκτεταμένη γαστρική φλεγμονή, σε σύγκριση με τα ισογονιδιακά αντίστοιχα στελέχη άγριου τύπου [266]. Ο λόγος για αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα παραμένει ασαφής και αποδίδεται μάλλον στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Είναι ενδιαφέρον ότι περιγράφονται σημαντικές διαφορές στην ενεργοποίηση των επαγόμενων από το *H. pylori* σηματοδοτικών μονοπατιών (MAPKs¹⁶, c-

¹⁶ Mitogen-Activated Protein Kinases

Fos¹⁷, και c-Jun¹⁸, CREB¹⁹, AP-1²⁰, και NF-κB²¹) μετά από την απαλοιφή των *alpA/B* [268]. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι προσκόλληση που διαμεσολαβούν οι πρωτεΐνες AlpA/B επάγει ισχυρότερη ενεργοποίηση ορισμένων οδών μεταγωγής σήματος. Ωστόσο μεταφορά και φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA, καθώς η επαγωγή της IL-8, δεν φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά από την διαγραφή των *alpA/B* [324]. Το *H. pylori* έχει αποδειχθεί ότι προσκολλάται σε συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, ιδιαίτερα στο κολλαγόνο IV και την λαμινίνη [267], τα οποία έχουν προταθεί ως υποψήφιοι παράγοντες του ξενιστή που δρουν ως υποδοχείς πρόσδεσης. Στο πλαίσιο αυτό, οι AlpA/B έχουν εμπλακεί στην προσκόλληση του βακτηρίου στη λαμινίνη [266].

1.8.1.4. Παράγοντας προσκόλλησης OipA

Η OipA (Outer inflammatory protein A) έχει προταθεί ότι ενισχύει την έκκριση IL-8 μέσω των ISRE²² ενεργώντας παράλληλα προς τους μηχανισμούς που φαίνεται να εξαρτώνται από το νησίδιο παθογένειας *cag* [269,270]. Αυτό είναι σε αντίθεση με περαιτέρω μελέτες που δείχνουν ότι κύρια λειτουργία της OipA είναι η προσκόλληση του *H. pylori* σε κύτταρα του ξενιστή, ενώ τα επίπεδα της εκκρινόμενης IL-8 παραμένουν ανεπηρέαστα [271,324]. Ο λόγος για αυτές τις αντιτιθέμενες παρατηρήσεις δεν είναι σαφής.

Η OipA στο *H. pylori* υπόκειται σε έλεγχο έκφρασης μέσω μηχανισμών μεταβολής φάσης (phase variation) και εσφαλμένης συζεύξεως μέσω ολίσθησης αλυσίδας (slipped strand mispairing) κατά τη διάρκεια της αντιγραφής [228,269,325]. Η έκφραση της OipA συνδέεται με την παρουσία των *cagPAI*²³, *VacAs1* και *VacAm1* αλληλόμορφων σε δυτικού τύπου κλινικά στελέχη [271,326,327]. Ως εκ τούτου, είναι δύσκολο να υπάρξουν συσχετίσεις μεταξύ της OipA και της κλινικής εκδήλωσης. Ωστόσο, όπως και με άλλες συγκολλητίνες, η OipA φαίνεται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας μόλυνσης στο πειραματικό μοντέλο γερβίλων Μογγολίας, δεδομένου ότι στελέχη με απενεργοποιημένη OipA απέτυχαν να εγκαθιδρύνουν επιτυχώς μόλυνση, με αποτέλεσμα την απουσία χρόνιας φλεγμονής και γαστρικής μεταπλασίας [328,329].

¹⁷ Human Feline osteosarcoma virus protein

¹⁸ Human c-Jun gene product

¹⁹ cAMP Response Element-Binding protein

²⁰ Activator Protein 1

²¹ Nuclear Factor kappa of activated B cells

²² Interferon Stimulated Response Element

²³ Cytotoxin-associated gene-Pathogenicity Island

Μέχρι σήμερα, κανένας ειδικός υποδοχέας ή μόριο επιφανείας του ξενιστή δεν έχει περιγραφεί ως εταίρος δέσμευσης της OipA.

Παρ' όλα ταύτα, πειράματα μόλυνσης γαστρικών κυττάρων από στελέχη με απενεργοποιημένη OipA καταδεικνύουν ότι αυτή η πρωτεΐνη επάγει φωσφορυλίωση της κινάσης FAK²⁴, που οδηγεί σε ενεργοποίηση της κινάσης Erk1/2²⁵ και τον σχηματισμό ινιδίων ακτίνης (actin stress fibers) [330]. Αυτά τα δεδομένα προϋποθέτουν την ύπαρξη ενός υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή με ικανότητα να προβαίνει στην μεταγωγή σήματος σε απόκριση της ενεργοποίησης της OipA. Επίσης, πειράματα με απενεργοποιημένη OipA δείχνουν ότι η ενεργοποίηση της FAK μπορεί να είναι συνέπεια της σηματοδοτικής τροποποίησης του EGFR²⁶ υποδοχέα [330,331]. Ωστόσο, η ενεργοποίηση του EGFR έχει πειστικά αποδειχθεί ότι απαιτεί την παρουσία ενός λειτουργικού cag-T4SS²⁷ [332] και ακόμα η ανασυνδυασμένη CagI είναι σε θέση από μόνη της να ενεργοποιήσει τον υποδοχέα EGFR [333]. Επιπροσθέτως το *H. pylori* με ανεπάρκεια OipA δεν ήταν σε θέση να προκαλέσει τον EGFR καταρράκτη σηματοδότησης που αφορούν τα μόρια PI3K²⁸→PDK1²⁹→Akt³⁰, ο οποίος έχει προταθεί να συμβάλει στην ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα FoxO [334] και τέλος με την επαγωγή της έκκρισης της IL-8 [331]. Σε μια πρόσφατη μελέτη, προτάθηκε ότι η EGFR/FAK/Akt σηματοδότηση οδηγεί στην φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης των εστιακών συνδέσμων πρόσφυσης paxillin, που προκαλεί κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση και στη συνέχεια επιμήκυνση του κυττάρου [335].

Εν συντομία η OipA είναι μια ενδιαφέρουσα προσκολλητίνη του *H. pylori*, δεδομένου ότι παρεμβαίνει απευθείας σε οδούς μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται κατά κύριο λόγο από παράγοντες Cag-T4SS. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει ότι η OipA συμβάλλει στην Cag-T4SS εξαρτώμενη κυτταρική απόκριση, είτε μέσω της άμεσης ενεργοποίησης ενός ακόμη αγνώστου υποδοχέα ή έμμεσα διαμεσολαβώντας στην στενότερη πρόσφυση μεταξύ *H. pylori* και των κυττάρων του ξενιστή, που οδηγεί σε ισχυρότερη Cag-T4SS σηματοδότηση.

²⁴ Focal Adhesion tyrosine Kinase

²⁵ External signal-regulated kinase 1 & 2

²⁶ Epithelial Growth Factor Receptor

²⁷ Cag Type IV Secretion System

²⁸ Phosphatidylinositol 3-Kinase

²⁹ Phosphoinositide Dependent Kinase-1

³⁰ Protein kinase B (PKB)

1.8.1.5. Άλλοι παράγοντες προσκόλλησης

Εκτός από την προαναφερθείσα ομάδα των μορίων προσκόλλησης, αρκετοί άλλοι παράγοντες έχουν εμπλακεί στην προσκόλληση του *H. pylori* στον γαστρικό βλεννογόνο. Η πρωτεΐνη μεταβαλλόμενης φάσης (phase variable) HopZ³¹ έχει προταθεί να παίζει ρόλο στην βακτηριακή προσκόλληση [336] καθώς, πρόσφατες μελέτες της αποδίδουν σημαντικό ρόλο στην πρώιμη φάση του αποικισμού. Πιο συγκεκριμένα, ξανά-απομονωθέντα στελέχη από υγιείς εθελοντές που μολύνθηκαν αρχικά με *H. pylori* βακτήρια που περιείχαν HopZ σε «off» διαμόρφωση έδειξαν ισχυρή *in vivo* επιλογή για στελέχη HopZ-θετικά σε διαμόρφωση «on» [337]. Μια άλλη πρωτεΐνη που προτείνεται ότι σχετίζεται με την προσκόλληση του βακτηρίου είναι η HorB³² [338]. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη HopQ³³ θα μπορούσε επίσης να έχει επίδραση στην βακτηριακή προσκόλληση. Σε ένα υποσύνολο στελεχών *H. pylori*, όπου το *hopQ* γονίδιο απαλείφθηκε, παρατηρήθηκε αύξηση της ικανότητας προσκόλλησης του *H. pylori* σε AGS κύτταρα οδηγώντας σε έναν υπερ-προσκολλητικό φαινότυπο και κατά συνέπεια σε αυξημένη φωσφορυλίωση της CagA, ενώ η επαγωγή της IL-8 δεν επηρεάστηκε [339]. Αντίθετα, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι δράση της HopQ μπορεί να προκαλέσει σημαντική μείωση της ενιόμενης CagA σε πειράματα συνλοίμωξης γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων [340]. Το ερώτημα αν η HopQ παρεμβαίνει στην λειτουργία άλλων προσκολλητινών σε ορισμένα στελέχη *H. pylori* παραμένει ασαφές. Συνεπώς, πρόσφατα ευρήματα τα οποία δείχνουν ότι απομονωθέντα κλινικά στελέχη *H. pylori* με δυσλειτουργική πρωτεΐνη HopQ δεν παρουσιάζουν πρόβλημα στη βακτηριακή τους προσκόλληση δεν είναι κατά ανάγκη αντιφατικά. Στα στελέχη αυτά, επανέκφραση του *hopQ* γονιδίου έδειξε ότι μπορεί να συμβάλλει στην *cagPAI*-εξαρτώμενη σηματοδότηση και στην μεταφορά της πρωτεΐνης CagA ενδοκυττάρια [341]. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι οι *H. pylori* προσκολλητίνες μπορεί να δράσουν, είτε συνεργατικά τρόπο είτε συμπληρωματικά.

1.8.2. Εικρινόμενοι παράγοντες παθογένειας

Οι εικρινόμενοι παράγοντες παθογένειας έχουν ιδιαίτερη σημασία, δεδομένου ότι μπορούν να δράσουν στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, χωρίς να απαιτείται η άμεση επαφή ή

³¹ *H. pylori* outer membrane protein Z

³² *H. pylori* outer membrane protein B

³³ *H. pylori* outer membrane protein Q

προσκόλληση των βακτηρίων στα κύτταρα του ξενιστή. Σε αναλύσεις του συνόλου του εκκρινόμενου πρωτεϊνικού φορτίου του *H. pylori*, έχει εντοπιστεί ένα ευρύ φάσμα των εκκρινόμενων ή εξωκυτταρικών παραγόντων [342-344]. Αν και οι περισσότεροι εξωκυττάρεις πρωτεΐνες του *H. pylori* παραμένουν σε μεγάλο βαθμό μη χαρακτηρισμένες, η γνώση μας για τους παράγοντες όπως η γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση (GGT), η HP-NAP³⁴, η ουρεάση, η VacA³⁵ και η HtrA³⁶ αυξάνονται σταθερά. Η GGT³⁷ έχει εντοπιστεί στο διαλυτό κλάσμα του *H. pylori* [342], και έχει αποδειχθεί ότι συμβάλει στην ενίσχυση του αποικισμού σε πειραματικά μοντέλα λοίμωξης στα ποντίκια [345]. Είναι ενδιαφέρον ότι ανασυνδυασμένη GGT μπορεί να διεγείρει την απόπτωση και να αναστείλει τον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων AGS [346,347], αλλά ο μοριακός μηχανισμός δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί. Η HP-NAP είναι ένας ισχυρότατος χημειοτακτικός παράγοντας του *H. pylori*, που κατά κύριο λόγο αφενός κατευθύνει την διήθηση των πολυμορφοπύρηνων ουδετεροφίλων στο χόριο και αφετέρου συνεισφέρει στην ενεργοποίηση τους [348]. Ωστόσο δεν φαίνεται να παίζει έναν εξέχοντα ρόλο στην αλληλεπίδραση με τα επιθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον πολλές άμεσες επιδράσεις της ουρεάσης, της VacA και της HtrA στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα έχουν περιγραφεί, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής της κυτταρικής απόπτωσης και της καταστροφής της ακεραιότητας των διακυτταρικών συμφύσεων.

1.8.2.1. Ουρεάση

Το σύμπλεγμα της ουρεάσης έχει συχνά περιγραφεί ως ένας επιφανειακός λοιμογόνος παράγοντας του *H. pylori*. Η πρωταρχική λειτουργία του μοριακού μηχανισμού της ουρεάσης είναι η αλκαλοποίηση του όξινου pH με τη μετατροπή της ουρίας προς CO₂ και αμμωνία, η οποία απαιτείται για την εξουδετέρωση του γαστρικού οξέος περίξ των βακτηρίων. Η κρατούσα υπόθεση είναι ότι η ουρεάση εκκρίνεται ή εντοπίζεται επιφανειακά συμβάλλοντας σημαντικά στην ικανότητα του *H. pylori* να αποικίζει και να παραμένει στο στομάχι, δεδομένου ότι στην πραγματικότητα θεωρείται ότι είναι ένα βακτήριο ευαίσθητο στο όξινο περιβάλλον [272]. Η σημασία της ουρεάσης για τον επιτυχή αποικισμό έχει επισημανθεί σε αρκετές μελέτες [272,349,350] ωστόσο, άλλες αναφέρουν ότι στελέχη *H. pylori* με ανεπάρκεια παραγωγής ουρεάσης εξακολουθούν να είναι σε θέση να αποικίσουν το στομάχι γερβίλων Μογγολίας [351].

³⁴ *H. pylori* Neutrophil-Activating Protein

³⁵ Vacuolating cytotoxin toxin A

³⁶ High temperature requirement protein A

³⁷ Gamma-glutamyltransferase

Επί τη βάση παρατηρήσεων σε μεγάλο αριθμό πλήρως προσδιορισμένων γονιδιωμάτων στελεχών *H. pylori* φαίνεται ότι για την παραγωγή ουρεάσης είναι υπεύθυνο ένα σύμπλεγμα γονιδίων που αποτελείται από επτά συντηρημένα γονίδια (*ureA–B and E–I*). Οι εκφραζόμενες πρωτεΐνες UreA και UreB αντιπροσωπεύουν τις δομικές υπομονάδες ενός Ni²⁺-εξαρτώμενου εξαμερούς ενζυμικού συμπλόκου, ενώ αντίθετα οι UreE, UreF, UreG και UreH είναι βοηθητικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ενσωμάτωση του νικελίου και την συναρμολόγηση του ενζυμικού συμπλόκου. Τέλος σε συνδυασμό με την αργινάση, η UreI είναι υπεύθυνη για την συνεχή παροχή ουρίας κάτω από τις όξινες συνθήκες περιβάλλοντος [273]. Σε αντίθεση με την υπόθεση του επιφανειακού-μεμβρανικού εντοπισμού της ουρεάσης, ένα σύγχρονο μοντέλο προϋποθέτει ότι ο κύριος χώρος δραστηριότητας της ουρεάσης είναι στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα [352].

Εκτός από το ρόλο της στον επιτυχή αποικισμό του *H. pylori*, η ουρεάση μπορεί επίσης έμμεσα να παρεμβαίνει στις λειτουργίες του κυττάρου ξενιστή. Η παραγωγή αμμωνίας που εξαρτάται από την δράση του συστήματος της ουρεάσης συμβάλλει στην απώλεια της ακεραιότητας των στενοσυνδέσμων του επιθηλίου, όπως αποδεικνύεται από μειωμένα επίπεδα τρανς-επιθηλιακής ηλεκτρικής αντίστασης (TEER), καθώς και στην εσωτερικευση (internalization) και περιορισμένη πρωτεολυτική επεξεργασία της πρωτεΐνης occludin σε *in vitro* καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων [274]. Προφανώς, στις παραπάνω μελέτες, η διατάραξη της ακεραιότητας των στενοσυνδέσμων θεωρήθηκε ότι ήταν ανεξάρτητη των πρωτεϊνών VacA και CagA γεγονός που βρίσκεται σε ευθεία αντίθεση με προηγούμενες αναφορές [286,353]. Η επίδραση της ουρεάσης στους στενοσυνδέσμους έχει επιβεβαιωθεί και από δεύτερη έκθεση η οποία έδειξε ότι διαγραφή της UreB ακυρώνει την ικανότητα του *H. pylori* να διαταράσσει τους στενοσυνδέσμους, με μηχανισμό ανεξάρτητο της CagA ή της VacA, μέσω ρύθμισης των κινασών MLCK³⁸ και Rho³⁹ ενώ η έκφραση της UreB φαίνεται να απαιτείται για την φωσφορυλίωση της MLCK [275]. Ακόμη και αν ο λεπτομερής μηχανισμός μέσω του οποίου η ουρεάση του *H. pylori* ενεργοποιεί αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι παραμένει ασαφής, τα δεδομένα αυτά παρέχουν εξήγηση για το πώς η ουρεάση μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία φλεγμονής.

1.8.2.2. Πρωτεΐνη θερμικού στρες HtrA

Ο ρόλος της πρωτεΐνης HtrA (High temperature requirement A) έχει μελετηθεί εκτενώς στο *Escherichia coli*, και έχει δειχθεί ότι αποτελεί μία περιπλασμική πρωτεάση σερίνης η οποία

³⁸ Myocin Light Chain Kinase

³⁹ Ras homologous protein

μπορεί και να δρα και ως συνοδός πρωτεΐνη. Έχει συχνά περιγραφεί ως ένας βακτηριακός παράγοντας που συμβάλλει στην παθογένεια ενός ευρέως φάσματος βακτηρίων μέσω της αύξησης της βιωσιμότητας τους υπό συνθήκες στρες [354]. Η παραγωγή και έκκριση πρωτεΐνης HtrA από το *H. pylori* έχει ανιχνευθεί πάνω από 10 χρόνια τώρα, σε αναλύσεις ολικού εκκριτικού φορτίου [343,344]. Στην πραγματικότητα, η HtrA είναι πολύ σταθερή υπό ακραίες όξινες συνθήκες στρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι θα μπορούσε να συμβάλλει στη δημιουργία παραμένουσας λοίμωξης [355]. Όπως και η HtrA πρωτεάσες άλλων Gram-αρνητικών βακτηρίων, η HtrA του *H. pylori* περιέχει ένα άμινο-τελικό πεπτιδίο σηματοδότησης, ένα τμήμα πρωτεάσης της σερίνης με μία άκρως συντηρημένη καταλυτική τριάδα και δύο τμήματα PDZ⁴⁰. Μολονότι ο εξωκυττάριος εντοπισμός της έχει προσδιοριστεί προ πολλού, ήταν άγνωστο για μεγάλο χρονικό διάστημα εάν η HtrA διαδραμάτιζε ένα λειτουργικό ρόλο στην λοίμωξη από *H. pylori*. Βασική αιτία αυτού ήταν το γεγονός ότι, όλες οι προσπάθειες για να δημιουργηθεί μία απαλοιφή του γονιδίου *htrA* ή μία ανενεργή του μορφή αναφορικά με την δράση της πρωτεάσης στο γονιδίωμα του *H. pylori* έχουν μέχρι σήμερα αποτύχει [356].

Παρά ταύτα πρόσφατα, μια εντελώς νέα λειτουργία της πρωτεΐνης HtrA περιγράφηκε, καθώς εκκρινόμενη εντός του εξωκυττάριου χώρου ως δραστική πρωτεάση σερίνης [357], δείχθηκε ότι είναι ικανή να αποκόπτει το κύριο μόριο της διακυτταρικής προσκόλλησης και αναγνωρισμένο ογκοκατασταλτικό παράγοντα την E-καδερίνη (E-cadherin) [282]. Αυτό που δεν έχει όμως διευκρινιστεί είναι αν η HtrA διαμεσολαβούμενη διάσπαση της E-καδερίνης έχει επίδραση στην ακεραιότητα και την όγκο-κατασταλτική λειτουργία του ενδοκυτταρικού συμπλέγματος σηματοδότησης της E-καδερίνης, το οποίο αποτελείται από την β-κατενίνη (β-catenin) και την P120 κατενίνη (p120 catenin). Η τροποποίηση των δομικών στοιχείων του εξωκυττάριου χώρου κατά την *H. pylori* λοίμωξη έχει δείχθει ότι προϋποθέτει και την ενεργοποίηση ιστικών μεταλλοπρωτεϊνών από τα γαστρικά και τα μακροφάγα κύτταρα του ξενιστή [282,358]. Από την άποψη του μηχανισμού η διάρρηξη των διακυτταρικών δεσμών επιτρέπει την είσοδο των βακτηρίων στο μεσοκυττάριο χώρο [282], γεγονός το οποίο έχει επιβεβαιωθεί και ιστολογικά σε βιοψίες ασθενών με γαστρικό καρκίνο [359].

Η ικανότητα της πρωτεΐνης HtrA να διασπά την E-καδερίνη και σε *in vitro* συστήματα γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων έχει επίσης δείχθει για άλλα παθογόνα του γαστρεντερικού όπως στα εντεροπαθογόνα *E. coli* (EPEC) [360], στη *Shigella flexneri* [360] και στο *Campylobacter jejuni* [360,361], αλλά όχι για το παθογόνο του ουρογεννητικού σωλήνα *Neisseria gonorrhoeae* [360].

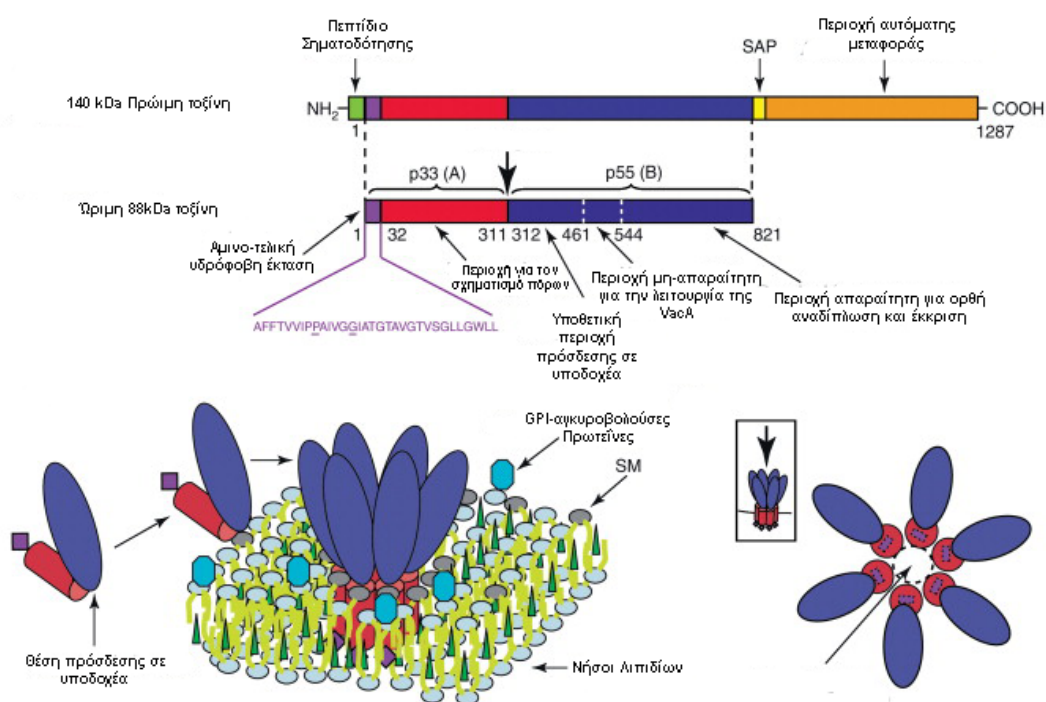
⁴⁰ PDZ: ακρωνύμιο που συνδυάζει τα πρώτα γράμματα 3 πρωτεϊνών P: μετασυναπτική πρωτεΐνη πυκνότητας [PSD95], D: *Drosophila* μεγάλο ογκοκατασταλτικό του δίσκου [Dlg1] και Z: zonula occludens-1 πρωτεΐνη [ZO-1]

Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η διάσπαση της Ε-καδερίνης μέσω της δράσης της HtrA δεν είναι μοναδική για το *H. pylori*, αλλά αντιπροσωπεύει ανά πιο γενικό μηχανισμό βακτηριακής παθογένειας μέσω της συνδυασμένης δράσης πραγματικών παραγόντων παθογένειας που διευκολύνουν την λύση της συνέχειας του επιθηλίου. Έτσι η διαπίστωση ότι η πρωτεΐνη HtrA διασπά την Ε-καδερίνη δείχνει ότι η HtrA δεν επηρεάζει μόνο έμμεσα την μικροβιακή παθογένεια μέσω της βελτίωσης της βακτηριακής προσαρμογής κάτω από συνθήκες στρες, αλλά εμφανίζει επίσης και άμεσες επιπτώσεις στην ομοιοστασία των επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή.

1.8.2.3. Εξοτοξίνη VacA

Αμέσως μετά την ανακάλυψη του *H. pylori* αναφέρθηκε ότι μια πρωτεΐνη από διηθήματα υγρής καλλιέργειας *H. pylori* μπορούσε να προκαλέσει το σχηματισμό μεγάλων ενδοκυτταρικών κενотоπιών σε κυτταρικές σειρές επιθηλιακών κυττάρων θηλαστικών [362]. Η πρωτεΐνη του *H. pylori* υπεύθυνη για την ίδια δράση ονομάστηκε vacuolating cytotoxin (VacA) και αποδείχθηκε ότι κωδικοποιείται από το γονίδιο *vacA* [363-366]. Η αλληλουχία αμινοξέων της VacA δεν εμφανίζει ομοιότητα με οποιαδήποτε άλλη γνωστή βακτηριακή ή ευκαρυωτική πρωτεΐνη. Τα ώριμα μόρια τοξίνης 88-kDa εκκρίνονται ως διαλυτή πρωτεΐνη στον εξωκυττάριο χώρο [363], αλλά μπορεί επίσης να παραμείνουν προσκολλημένα στην επιφάνεια του *H. pylori* [367]. Τα μόρια της εκκρινόμενης τοξίνης έχουν δείχθει ότι μπορούν να συναθροίζονται σε υδατο-διαλυτά ολιγομερή [368-371] τα οποία εισχωρούν σε επίπεδες λιπιδικές διπλοστιβάδες για τον σχηματισμό μεμβρανικών καναλιών τα οποία είναι επιλεκτικά στη δίοδο ανιόντων [372-374].

Η VacA είναι μια τοξίνη που ασκεί πλειοτροπική δράση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, και για τον λόγο αυτό έχει προταθεί ως πρότυπο πολυλειτουργικής τοξίνης [375]. Ωστόσο ένας αυξανόμενος όγκος στοιχείων υποδεικνύει ότι η VacA μπορεί μάλλον να είναι το πρωτότυπο μιας νέας κατηγορίας μονολειτουργικών A-B τοξινών [376]. Δεδομένα πρωτεϊνικής δομής της VacA από μελέτες υψηλής ανάλυσης δεν είναι διαθέσιμα, αλλά μια πρώτη εικόνα έχει αποκτηθεί με μικροσκοπική ανάλυση των ολιγομερών συμπλόκων της [371] (Εικόνα 7). Τα υδατο-διαλυτά ολιγομερή της VacA είναι σχετικά αδρανή σε δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και δημιουργίας κενотоπιών [279]. Όταν όμως εκτεθούν σε όξινες ή αλκαλικές συνθήκες pH, τα ολιγομερή σύμπλοκα δίδονται στα μονομερή συστατικά τους αυξάνοντας ταυτόχρονα σημαντικά την δραστηριότητα της VacA [369,377,378]. Συνεπώς, η κυτταροτοξικότητα της VacA απαιτεί μια αρχική αλληλεπίδραση των μονομερών μορφών της με τα κύτταρα, και ακολούθως ο

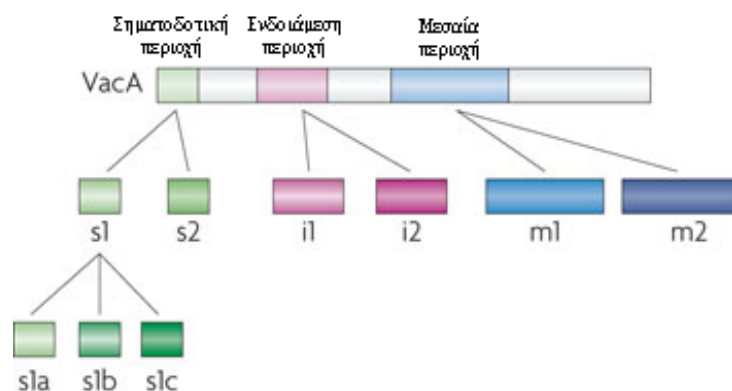


Εικόνα 7: Συνοπτική αποτύπωση των διαφόρων λειτουργικών περιοχών της VacA πρωτεΐνης καθώς και του τρόπος διάταξης και δράσης κατά την επαφή της με την λιπιδική διπλοστιβάδα. (Επεξεργασμένο [357].)

ολιγομερισμός συμβάλλει στην ικανότητα της VacA να σχηματίζει διαύλους στις κυτταρικές μεμβράνες [378].

Η ώριμη, εγκρινόμενη τοξίνη VacA μεγέθους 88-kDa έχει δειχθεί ότι μπορεί να υποβληθεί σε περιορισμένη πρωτεολυτική διάσπαση και να δώσει δύο θραύσματα το p33 και το p55 [365,379-382] (Εικόνα 7). Αυτά τα δύο θραύσματα θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν δύο περιοχές ή υπομονάδες της VacA [383]. Αρχιέτες μελέτες υποδεικνύουν ότι η p55 υπομονάδα έχει ένα σημαντικό ρόλο στη σύνδεση της VacA στο κύτταρο-ξενιστή [383-387]. Επιπλέον, η ώριμη VacA προβλέπεται να περιέχει μόνο μία έντονα υδρόφοβη περιοχή, η οποία εντοπίζεται εντός του τομέα p33 κοντά στο αμινο-τελικό άκρο της VacA [388,389], και περιέχει τρία παράλληλα GXXXG μοτίβα, που ορίζονται από κατάλοιπα γλυκίνης στις θέσεις 14, 18, 22 και 26 [389,390], οι οποίες αποτελούν χαρακτηριστικές διαμεμβρανικές αμινοξικές ακολουθίες διμερισμού πρωτεϊνών. Μεταλλαξογένεση αρκετών κατάλοιπων εντός της αμινο-τελικής υδρόφοβης περιοχής της VacA, συμπεριλαμβανομένων και των Gly14, Gly18, έχουν σαν αποτέλεσμα την αναστολή αφενός της ικανότητας της VacA για τον σχηματισμό διαύλων μεμβράνης σε επίπεδες διπλοστιβάδες λιπιδίων και αφετέρου της ικανότητας δημιουργίας κενотоπίων [380,389,391]. Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μοναδική υδρόφοβη περιοχή στο αμινο-τελικό άκρο της VacA παίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό διαμεμβρανικών διαύλων και ότι ο σχηματισμός τους απαιτείται για την δημιουργία κενотоπίων [376].

Μία σειρά VacA αλληλόμορφων έχουν αναγνωρισθεί, όπως τα *s1*, *s2*, για την *s* περιοχή-σήματος στο 5' άκρο της VacA, τα *m1*, *m2* για την *m* μεσαία-περιοχή του γονιδίου και τα τελευταία χρόνια τα *i1*, *i2* αναφορικά με μια νέα περιοχή γνωστή σαν *i* ενδιάμεση-περιοχή [167,392] (Εικόνα 8). Μόρια VacA του τύπου *s2* δεν επάγουν τον σχηματισμό κενοτοπίων *in vitro* [392-395], οι μορφές τύπου *s1/m1* επάγουν εκτεταμένο σχηματισμό κενοτοπίων σε πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων, ενώ τέλος, μορφές τύπου *s1/m2* επάγουν τον σχηματισμό ανιχνεύσιμων κενοτοπίων σε ένα πιο περιορισμένο φάσμα διαφορετικών κυττάρων [383,385,396,397]. Επιπλέον, το *i1* αλληλόμορφο έχει δειχθεί ότι επάγει τον σχηματισμό σημαντικά περισσότερων κενοτοπίων *in vitro* σε σχέση με το *i2* αλληλόμορφο. Πρωτεΐνες VacA που φέρουν τους *s1/m1* πολυμορφισμούς είναι συνήθως τύπου *i1*, ενώ οι *s2/m2* VacA είναι όλες τύπου *i2*, ενώ η ομάδα *s1/m2* μπορεί να φέρει οποιαδήποτε από τα δύο *i*-αλληλόμορφα. Οι περισσότερες μελέτες για την διαλεύκανση της δράσης *in vitro* της VacA έχουν διεξαχθεί χρησιμοποιώντας εξαιρετικά δραστικές μορφές της τοξίνης της μορφής *s1/i1/m1* [398].



Εικόνα 8: Οι γενετικοί πολυμορφισμοί της VacA. (Επεξεργασμένο σχήμα [377].)

Στελέχη *H. pylori* που περιέχουν VacA αλληλόμορφα του τύπου *s1* έχουν επιδημιολογικά συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη πεπτικού έλκους και γαστρικού καρκίνου σε σύγκριση με στελέχη που φέρουν αλληλόμορφα VacA του *s2* τύπου [167,392,399,400]. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να συσχετισθεί με την αποτυχία των μορφών VacA τύπου *s2* να προκαλέσουν τον σχηματισμό κενοτοπίων *in vitro* [393-395]. Αντίστοιχα, στελέχη που εκφράζουν VacA τύπου *m1* αλληλόμορφα έχουν δειχθεί ότι συνδέονται επιδημιολογικά με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού έλκους και του γαστρικού καρκίνου σε σύγκριση με τα στελέχη που περιέχουν αλληλόμορφα VacA τύπου *m2* [400,401].

1.8.3. Μεταφερόμενοι παράγοντες παθογένειας

Μια άλλη ομάδα παραγόντων παθογένειας του *H. pylori* έχειδειχθεί ότι ενίεται μέσα στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή μέσω ενός επαγόμενου βακτηριακού συστήματος έκκρισης τύπου IV (T4SS). Τα μέχρι σήμερα αναγνωρισθέντα μόρια που έχουνδειχθεί ότι μπορούν να μεταφερθούν ενδοκυττάρια μέσω αυτού του συστήματος είναι η ενδοτοξίνη CagA και οι πεπτιδογλυκάνες του μεμβρανικού τοιχώματος των βακτηρίων. Και τα δύο ανωτέρω μόρια, λόγω της δυνατότητας τους να τροποποιούν και να ρυθμίζουν την ενδοκυττάρια σηματοδότηση στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, έχουν χαρακτηριστεί ως μόρια τελεστές (effectors). Η μεν CagA αρχικά, είχεδειχθεί ότι μπορεί να επεμβαίνει στη ρύθμιση της κυτταρικής πολικότητας και μορφολογίας, με επαγωγή του χαρακτηριστικού φαινοτύπου διασποράς [402,403], οι δε πεπτιδογλυκάνες έχουν αναγνωριστεί ως ο κυριότερος παράγοντας, που επάγει την ενεργοποίηση του κεντρικού διακόπτη της φλεγμονής NF-κB (αναλύεται στην §1.9.1 & 1.9.3), μέσω αναγνώρισης των από τον ενδοκυττάριο υποδοχέα NOD1⁴¹ [294,404].

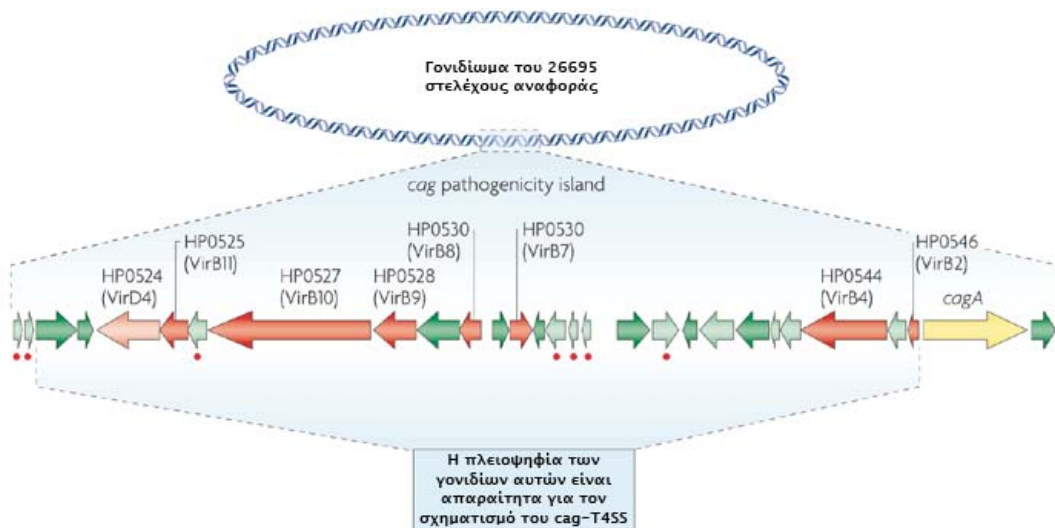
1.8.3.1. Νησίδιο παθογένειας *cag*

Στην πλειονότητα των έμβιων μικρο-οργανισμών συστήματα μεταφοράς έχουνδειχθεί ότι είναι υπεύθυνα για την διαμεμβρανική μεταφορά μακρομορίων κατά μήκος των κυτταρικών μεμβρανών τους, συνήθως με ταυτόχρονη κατανάλωση ενέργειας [405]. Τα βακτήρια χρησιμοποιούν τα συστήματα μεταφοράς για να επιτελέσουν διάφορες σημαντικές λειτουργίες προκειμένου αφενός να προσαρμοστούν στις συνθήκες του περιβάλλοντος του ξενιστή και αφετέρου για να εκδηλώσουν την παθογένεια τους [406]. Σε αντιπαράθεση με τα υπόλοιπα συστήματα μεταφοράς που έχουν περιγραφεί, το πλέον λειτουργικά ευέλικτο έχειδειχθεί ότι είναι το τύπου IV εκκριτικό σύστημα, το οποίο απαντάται σε Gram-θετικά και -αρνητικά βακτήρια και χρησιμεύει αφενός, για την μεταφορά ή την ανταλλαγή γενετικού υλικού με άλλα βακτήρια του ίδιου ή διαφορετικού είδους, μύκητες, φυτικά κύτταρα και κύτταρα θηλαστικών και αφετέρου την μεταφορά πρωτεϊνικής φύσεως παραγόντων παθογένειας στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή [405].

Το *H. pylori* χρησιμοποιεί διαφορετικά τύπου IV εκκριτικά συστήματα για οριζόντια μεταφορά γονιδίων καθώς και το cytotoxin-associated gene (*cag*) τύπου IV εκκριτικό σύστημα

⁴¹ Nucleotide Oligomerization Domain 1 receptor

(Cag-T4SS) για την αλληλεπίδραση του με διάφορους τύπους κυττάρων του ξενιστή. Το Cag-T4SS κωδικοποιείται από τα γονίδια του νησιδίου παθογένειας *cag* (cytotoxin associated gene pathogenicity island-cagPAI). Το *cag*PAI έχει μέγεθος ~37 Kbp και περιέχει περίπου 30 γονίδια (Εικόνα 9) και εάν και παρουσιάζει εξελικτικές ομοιότητες με τα υπόλοιπα τύπου IV εκκριτικά συστήματα, ωστόσο περιέχει μόνο λίγες πρωτεΐνες των οποίων η αλληλουχία μοιάζει με τις αντίστοιχες άλλων τύπου IV εκκριτικών συστημάτων, ενώ πολλά σημαντικά εξαρτήματα που κωδικοποιεί είναι μοναδικά [407].



Εικόνα 9: Τα γονίδια που αποτελούν το *cag*PAI όπως αυτά χαρτογραφήθηκαν από την πρώτη ανάγνωση του πλήρους γονιδιώματος του *H. pylori* στελέχους αναφοράς 26695. (Επεξεργασμένο από [252].

Τα πρωτότυπα T4SS, όπως το T-DNA σύστημα μεταφοράς του *A. tumefaciens*, συνήθως περιέχουν 11 βασικά εξαρτήματα (VirB1-VirB11) και μια πρωτεΐνη σύζευξης (VirD4) η οποία διαμεσολαβεί την αναγνώριση του υποστρώματος [408]. Μόνο λίγα γονίδια του *cag*PAI κωδικοποιούν πρωτεΐνες με σαφείς ομοιότητες αλληλουχιών με γνωστές πρωτεΐνες του T4SS. Εμφανείς ομοιότητες υπάρχουν μόνο για περιορισμένο αριθμό όπως τα CagE (VirB4), CagX (VirB9), CagY (VirB10), CagA (VirB11) και Cagβ (VirD4), αν και ακόμη και αυτές οι πρωτεΐνες, ιδιαίτερα οι CagY και CagX, είναι εντυπωσιακά διαφορετικές από τις αντίστοιχες των πρωτότυπων συστημάτων. Ωστόσο, προβλέψεις της πρωτεϊνικής τοπολογίας, τόσο σε μελέτες εντοπισμού όσο και λειτουργικότητας έδειξαν ότι οι Cagγ (VirB1), CagC (VirB2), CagL (VirB5), CagW (VirB6), CagT (VirB7) και CagV (VirB8) είναι επιπλέον ομόλογα της VirB [409-413] (Εικόνα 9).

Πολλά προϊόντα των γονιδίων του *cag*PAI δεν φαίνεται να έχουν λειτουργία η οποία να σχετίζεται με την λειτουργικότητα του Cag-T4SS [213]. Μπορεί να έχουν άλλες μέχρι στιγμής

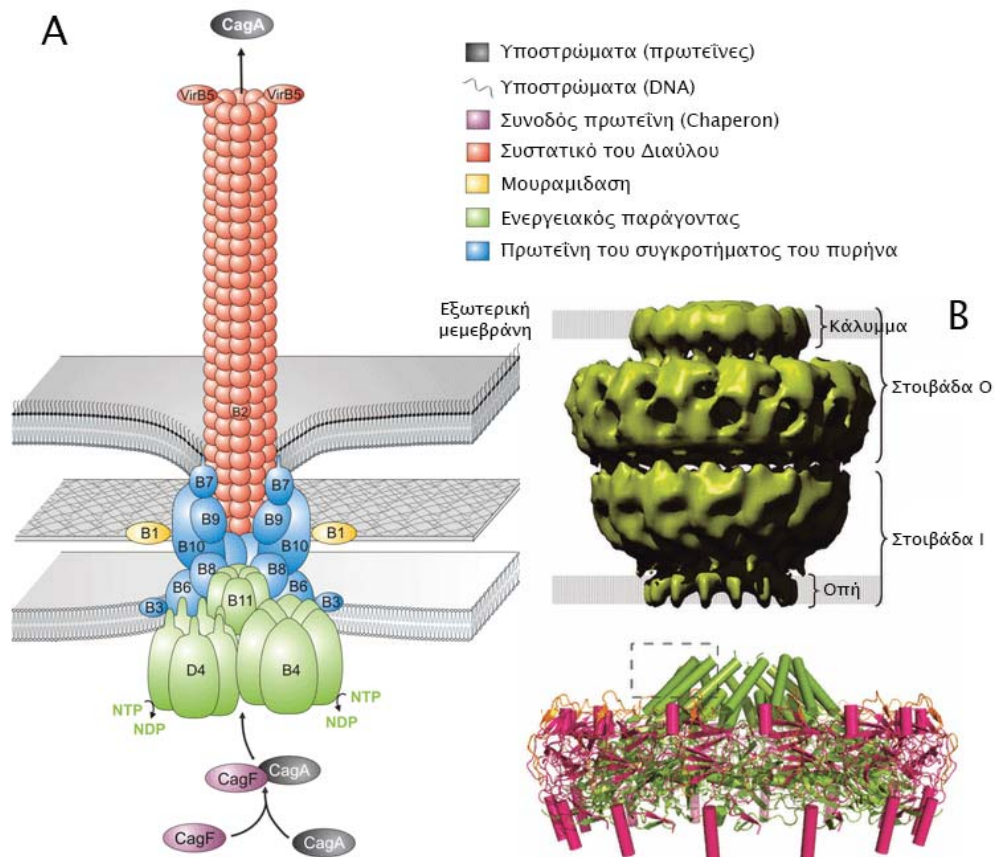
άγνωστες λειτουργίες ή ακόμα ίσως απλά ο τρόπος δράσης τους να είναι άσχετος με το Cag-T4SS. Ενδιαφέρον ωστόσο παρουσιάζει ένα από αυτά τα γονίδια το *cagF*, το οποίο βρέθηκε να είναι μεταξύ των πλέον συχνά μεταγραφόμενων γονιδίων μεταξύ όλων των *cagPAI* γονιδίων *in vitro* και *in vivo*, όπως επίσης έντονα βρέθηκαν να μεταγράφονται και τα γονίδια *cagQ*, *cagS* και *cagP* [414]. Επιπλέον μια πρόσφατη μελέτη προσδιόρισε το πλήρες μεταγράφημα του *H. pylori* εντοπίζοντας ορισμένες θέσεις έναρξης της μεταγραφής επί του *cagPAI*, υποδεικνύοντας τη μεταγραφή του γονιδίου *cagB*, τη μεταγραφή ενός οπερονίου που περιλαμβάνει τα *cagf*, *cage*, *cagd* και *cage*, τη μεταγραφή ενός ακόμα οπερονίου που περιλαμβάνει τα *cagQ*, *cagS* και ενδεχομένως το μικρό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) *hp0533* -το οποίο δεν είναι παρόν σε πολλά κλινικά στελέχη ή στελέχη αναφοράς - και τέλος τη μεταγραφή του γονιδίου *cagP*, πιθανότατα μαζί με ένα μικρό μη κωδικοποιούμενο RNA ανάντη του *cagP* [415]. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι εκφράζονται πολλά μη-ουσιαστικά γονίδια του *cagPAI* και ότι η οργάνωση τους σε οπερόνια καταδεικνύει μια λειτουργική σχέση με το *cag-T4SS* [416].

1.8.3.1.1. Δομή του *cag-T4SS*

Η T4SS συσκευή αποτελείται από δώδεκα πρωτεΐνες που ονομάζονται VirB1-11 και VirD4 επί τη βάση της ονοματολογίας που χρησιμοποιείται για το *A. tumefaciens* T4SS. Όλες μαζί συγκροτούνται για να σχηματίσουν τρία αλληλοσυνδεδεμένα τμήματα: ένα κυτταροπλασματικό εσωτερικό σύμπλοκο μεμβράνης, ένα δια-μεμβρανικό πόρο που εκτείνεται κατά μήκος των δύο μεμβρανών του βακτηρίου και ένα εξωτερικό διάυλο (pilus) (Εικόνα 10). Παραλλαγές υφίστανται μεταξύ των διαφόρων τύπων T4SS αλλά η σύνθεση των τμημάτων είναι γενικά διατηρημένη. Το σύμπλεγμα της εσωτερικής κυτταροπλασματικής μεμβράνης αποτελείται από τρεις NTPases (VirB4, VirB11 και VirD4), το VirB6 και το VirB8. Ο δια-μεμβρανικός πόρος αποτελείται από τα VirB7, VirB9 και VirB10 (ονομάζεται επίσης και «το σύμπλοκο πυρήνα») σχηματίζοντας ένα κανάλι από την εσωτερική προς την εξωτερική μεμβράνη και ο εξωτερικός διάυλος αποτελείται κατά κύριο λόγο από τις VirB2 και VirB5 πρωτεΐνες.

Το συγκρότημα του δια-μεμβρανικού πόρου του Cag-T4SS σχηματίζει ένα μεγάλο σύμπλοκο περίπου 1 MDa το οποίο εκτείνεται τόσο στην εσωτερική όσο και στην εξωτερική μεμβράνη περιλαμβάνοντας 14 αντίγραφα κάθε μίας από τις τρεις πρωτεΐνες VirB7, VirB9 και VirB10 [417]. Η δομή είναι κυλινδρική (μήκος 185 Å, διαμέτρου 185 Å), με δύο διακριτές στοιβάδες μία εσωτερική «I» και μία εξωτερική «O», οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με στενούς

συνδέτες και ένα κεντρικό κανάλι που εκτείνεται στο σύνολο της δομής (Εικόνα 10B). Το κανάλι είναι ανοικτό στην κυτταροπλασματική πλευρά (55 Å άνοιγμα), αλλά στενό από την πλευρά της εξωτερικής μεμβράνης (10 Å). Η εσωτερική (I) και εξωτερική (O) στοιβάδα συνδέονται με την εσωτερική και την εξωτερική μεμβράνη αντίστοιχα και οι δυο παρουσιάζουν αρχιτεκτονική διπλών τοιχωμάτων αλλά εμφανίζουν διαφορετική σύνθεση και δομή [417].



Εικόνα 10: (A) Θεωρητικό γραφικό μοντέλο της δομής και λειτουργίας του *cag*-T4SS βασισμένο στα πιο πρόσφατα μοριακά και κρυσταλλογραφικά δεδομένα. (B) Η δομή του συγκροτήματος του δια-μεμβρανικού πόρου (Επεξεργασμένο από [396].)

Ο *Cag*-T4SS εξωτερικός διάυλος (pilus) είναι εξαιρετικά ασυνήθιστος και η σύνθεσή του φαίνεται πιο περίπλοκη σε σύγκριση με τον πρωτότυπο *VirB2/B5* εξωτερικό διάυλο που παράγεται από άλλα T4SS. Ο *Cag*-T4SS διάυλος περιλαμβάνει όχι μόνο τις πρωτεΐνες HP0546 και HP0539, αλλά επίσης τις HP0527 (*VirB10*), HP0528 (*VirB9*), HP0532 (*VirB7*), καθώς και την *CagA*. Σε αντίθεση με άλλα T4SS, δεν υπάρχουν στοιχεία που να δείχνουν ότι η HP0546 (*VirB2* ομόλογο) είναι το κύριο συστατικό της βελονοειδούς δομής που περιγράφεται σε δύο μελέτες [418,419]. Ίσως το πιο ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι ένα μέρος του διαμεμβρανικού πόρου εμπλέκεται επίσης στην εξωτερική δομή του διαύλου. Πράγματι οι πρωτεΐνες HP0527

(VirB10) και HP0532 (VirB7) εντοπίζονται στην βάση του εξωτερικού διαύλου [413]. Η HP0527 (VirB10) είναι σε θέση για ενδο-μοριακές αλληλεπιδράσεις με τον εαυτό της [413]. Η κεντρική περιοχή του HP0527 (VirB10) αλληλεπιδρά με την καρβόξυ-τελική περιοχή και αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να παρέχει ένα μέσο ολιγομερισμού προς σχηματισμό μιας υπερ-δομής σε άμεση συνέχεια του δια-μεμβρανικού πόρου (Εικόνα 10).

1.8.3.1.2. Αλληλεπιδράσεις του *cag-T4SS* με την κυτταρική μεμβράνη του γαστρικού επιθηλίου

Η επαγωγή σχηματισμού του εξωτερικού διαύλου θα μπορούσε να είναι συζευγμένη με κάποιο υποδοχέα δέσμευσης στο ευκαρυωτικό κύτταρο διότι η επαγωγή της συγκρότησης του Cag-T4SS, απαιτεί πρώτα μια επαφή με τα επιθηλιακά κύτταρα [418]. Αυτός ο υποδοχέας οικάζεται ότι είναι η $\alpha 5\beta 1$ ιντεγκρίνη. Πράγματι, πολλές πρωτεΐνες του Cag-T4SS, συμπεριλαμβανομένων των HP0527 (VirB10), HP0539-CagL (VirB5), HP0540 και η ίδια η CagA, δείχθηκαν να συνδέονται σε διαφορετικά μοτίβα της $\alpha 5\beta 1$ ιντεγκρίνης [287,288]. Αυτό υποδηλώνει ότι η HP0540 θα μπορούσε επίσης να εκτίθεται στην επιφάνεια του Cag-T4SS εξωτερικού διαύλου. Μερικά από αυτά τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και μία γενική συναίνεση δεν έχει ακόμη προκύψει. Ωστόσο, όλες οι μελέτες δίνουν έμφαση στο ρόλο των Cag-T4SS πρωτεϊνών του εξωτερικού διαύλου στη διαμεσολάβηση της αλληλεπίδρασης με την $\alpha 5\beta 1$ ιντεγκρίνη [407].

Η καλύτερα χαρακτηρισμένη αλληλεπίδραση εμφανίζεται να είναι αυτή μεταξύ της πρωτεΐνης CagL του Cag-T4SS και της $\alpha 5\beta 1$ -ιντεγκρίνης στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα [288]. Η CagL φιλοξενεί ένα κλασσικό μοτίβο ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης Αργινίνης-Γλυκίνης-Ασπαραγίνης (RGD), το οποίο απαντάται επίσης σε φυσικούς συνδέτες της ιντεγκρίνης, όπως ινωδονεκτίνη (fibronectin) ή βιτρονεκτίνη (vitronectin) [288,420]. Έχει προταθεί ότι η σύνδεση CagL και $\beta 1$ -ιντεγκρίνης οδηγεί στην ενεργοποίηση της $\beta 1$ -ιντεγκρίνης και στη συνέχεια σε ενεργοποίηση άλλων κινασών του ζενιστή συμπεριλαμβανομένων των FAK, c-Src⁴², EGFR και HER3⁴³ /ErbB3⁴⁴ σε μια διαδικασία που εξαρτάται από την σύνδεση μέσω του RGD μοτίβου [288,333]. Ωστόσο, η ρύθμιση αυτών των οδών μεταγωγής σήματος μπορεί να είναι πιο περίπλοκη, δεδομένου ότι έχει πρόσφατα προταθεί ότι μια αλληλεπίδραση CagL/ $\beta 5$ -

⁴² Sarcoma kinase

⁴³ Heregulin Receptor 3

⁴⁴ Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3

integrin/ILK διεγείρει την σηματοδοτική οδό EGFR →Raf→MAPK, ανεξάρτητα από το RGD μοτίβο [289]. Στην ίδια μελέτη, παρατηρήθηκε επίσης μια αδύναμη αλληλεπίδραση μεταξύ CagL και της β3-υπομονάδας της ιντεγκρίνης, αν και δεν έχει μέχρι σήμερα αποδοθεί βιολογική σημασία σε αυτή την αλληλεπίδραση [289]. Τέλος έχει δειχθεί ότι η σύνδεση της CagL με την β1-ιντεγκρίνη είναι απαραίτητη για την επιτυχή ενδοκυττάρια μεταφορά της CagA μέσα στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα [288].

Λαμβάνοντας υπόψη τον *in vivo* εντοπισμό της α5β1-ιντεγκρίνης στην βάση του επιθηλίου, η οποία δεν είναι προσβάσιμη χωρίς ρεαλιστικά την διακοπή της επιθηλιακής ακεραιότητας, η ιδέα μιας πανταχού παρούσας CagA αποτελεί ιδιαίτερα ελκυστική. Ο Murata-Kamiya και συν. παρατήρησαν ότι η σύνδεση της CagA με φωσφατιδυλοσερίνη αποτελεί προϋπόθεση για την μεταφορά της CagA σε όλη την κορυφαία μεμβράνη παλλομένων κυττάρων [421]. Επιπλέον η χοληστερόλη φαίνεται επίσης να είναι ένα κρίσιμο συστατικό της μεμβράνης για τη μεταφορά της CagA. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι το *H. pylori* στοχεύει πλούσιες σε χοληστερόλη σχεδίες λιπιδίων (lipid rafts) [422] και ότι η εξάντληση της χοληστερόλης εξασθενίζει την μεταφορά της CagA [423]. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι σχεδίες λιπιδίων αποτελούν σημεία συγκέντρωσης αVβ5 ιντεγκρίνης [424].

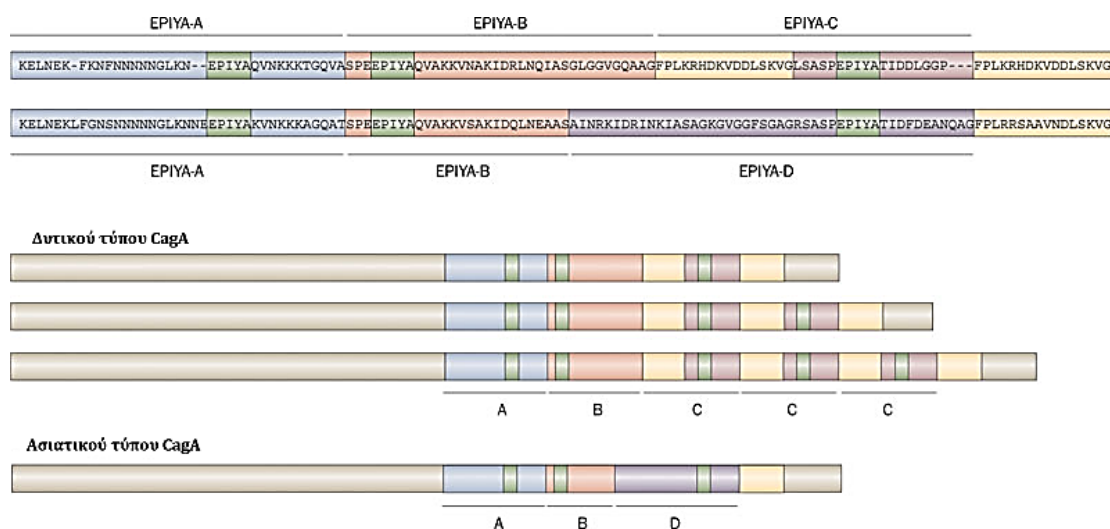
Μια άλλη υπόθεση αναφέρει ότι η CagA κυρίως μετατοπίζεται σε όλη την βασηοπλευρική μεμβράνη πολωμένων κυττάρων, η οποία υποστηρίζεται από την ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης σε κατάλοιπα τυροσίνης CagA (CagApY) στην βασηοπλευρική μεμβράνη σε σημεία όπου εκφραζόταν η β1-ιντεγκρίνη των εστιακών συνδέσμων [288]. Στο πλαίσιο αυτό, η διαπίστωση ότι οι εικρινομένοι παράγοντες παθογένειας του *H. pylori*, ουρεάση, VacA και HtrA μπορούν να διασπάσουν τους στενοσυνδέσμους υποστηρίζει αυτή την υπόθεση, διότι το *H. pylori* αποσυνθέτει έτσι άμεσα το πολωμένο επιθήλιο και επιτρέπει την άμεση επαφή μεταξύ CagL και β1-ιντεγκρίνης στην βασηοπλευρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων.

1.8.3.2. Ενδοτοξίνη CagA

Η CagA αποτελεί τον πιο καλά μελετημένο παράγοντα παθογένειας του *H. pylori*. Τα ιδιαίτερα της μοριακά χαρακτηριστικά [425] καθώς και η επιδημιολογική συσχέτιση των CagA-θετικών στελεχών με την αύξηση της πιθανότητας εκδήλωσης γαστρικού αδeno-καρκινώματος [12] έστρεψαν πολλές ερευνητικές ομάδες στην ενδελεχή μελέτη τόσο του μοριακού τρόπου δράσης της, όσο και της κατανομής των γονοτυπικών πολυμορφισμών της, σε σχέση με την

βαρύτητα των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων. Παρά τις πολλές και καλά σχεδιασμένες μελέτες γύρω από αυτό το ερώτημα ακόμα ο ακριβής μηχανισμός δράσης της CagA παραμένει συγκεχυμένος. Επιπλέον, η χρήση πολλών διαφορετικών πειραματικών προσεγγίσεων, χωρίς ακόμα να έχει συμφωνηθεί κάποιος «πρότυπος» τρόπος σχεδιασμού και διεξαγωγής πειραμάτων, έχει οδηγήσει την έρευνα γύρω από αυτό το μόριο, σε σύγχυση λόγω της υπερπαραγωγής συγκρουόμενων πειραματικών δεδομένων. Στην βιβλιογραφία ήδη έχουν αρχίσει να προτείνονται δόκιμοι τρόποι διεξαγωγής και αξιολόγησης των αποτελεσμάτων σε σχέση με την CagA με σκοπό τα πειραματικά αποτελέσματα να παρουσιάζουν μεγαλύτερη νοηματική συνοχή [404].

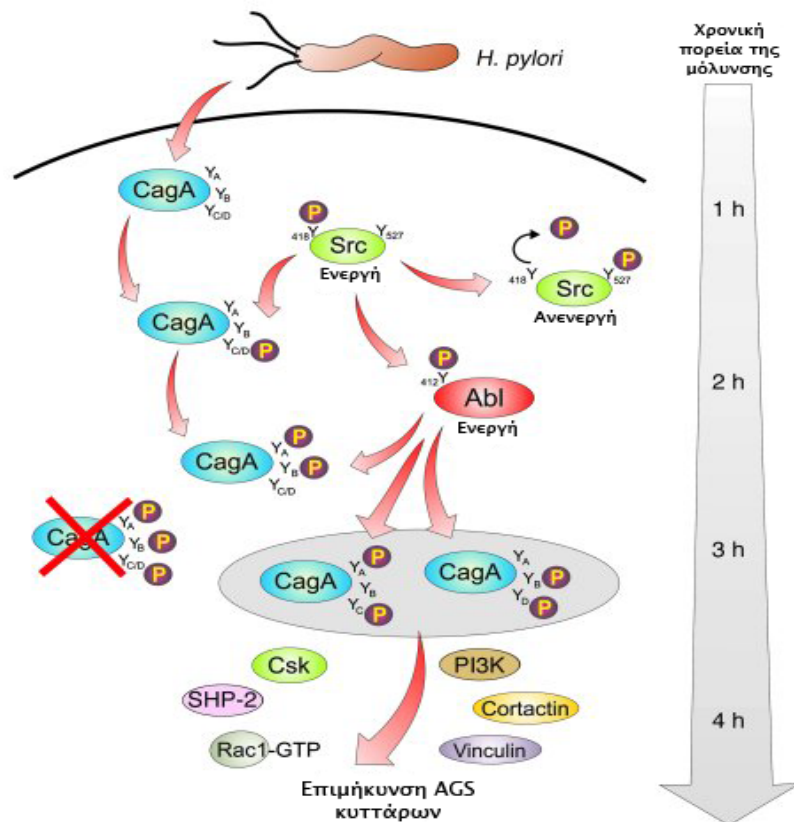
Η CagA (cytotoxin-associated gene A) είναι μια πρωτεΐνη μεγέθους από 120 έως 140 kDa, κωδικοποιείται από ένα γονίδιο το οποίο εδράζεται στο τέλος του *cagPAI* και δια μέσω του Cag-T4SS μεταφέρεται στο εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων [426-428]. Εκεί έχει δειχθεί ότι φωσφορυλιώνεται από κινάσες του κυττάρου ξενιστή σε κατάλοιπα τυροσίνης που εντοπίζονται στην μεταβλητή καρβοξυ-τελική περιοχή της πρωτεΐνης [429]. Τα αμινοξικά κατάλοιπα της τυροσίνης μετέχουν σε επαναλαμβανόμενους πεπτιδικούς σχηματισμούς της μορφής *Γλουταμικό-Προλίνη-Ισολευκίνη-Τυροσίνη-Αλανίνη* (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala, *EPIYA*) [166]. Οι θέσεις αυτές, σε στελέχη από Δυτικούς πληθυσμούς (Ευρώπη, Β. Αμερική, Αυστραλία), διακρίνονται σε τρεις χαρακτηριστικούς τύπους βάσει της αμινοξικής αλληλουχίας που τις περιβάλλει (*EPIYA-A*: ***EPIYAKVNKKK(A/T/V/S)GQ***, *EPIYA-B*: ***EPIY(A/T)(Q/K)VAKKVNAKI***, *EPIYA-C*: ***FPLKRHDKVDDL SKVGRSVSP EPIYATIDDLGGP***) [430].



Εικόνα 11: Η πρωτεΐνη CagA διαθέτει μια μεταβλητή καρβοξυτελική περιοχή. Η περιοχή αυτή αποτελεί από επαναλαμβανόμενες θέσεις φωσφορυλίωσης τυροσίνης. Στο παρόν σχήμα παρουσιάζονται οι διαφορετικοί τύποι των μοτίβων φωσφορυλίωσης καθώς και οι διαφορετικοί πιθανοί συνδυασμοί τους. (Επεξεργασμένο και μεταφρασμένο σχήμα το οποίο έχει ληφθεί από [413].)

Σε στελέχη από την Ανατολική Ασία παρατηρούνται οι ίδιες θέσεις EPIYA-A και -B, όχι όμως οι θέσεις EPIYA-C οι οποίες αντικαθίστανται από μία επανάληψη της μορφής EPIYA-D: AINRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAGRSASP**EPIYATIDF**DEANQAG[431]. Ο αριθμός και τύπος των θέσεων EPIYA-A και -B παραμένει κατά κανόνα σταθερός, ενώ των EPIYA-C, στα Δυτικού τύπου στελέχη, εμφανίζει υψηλή ποικιλομορφία μεταξύ των στελεχών (Εικόνα 11) και συνδέεται άμεσα με την έκταση των φαινοτυπικών κυτταρικών αλλαγών διασποράς του χαρακτηριστικού “ραμφοειδούς φαινοτύπου” (hummingbird phenotype) που επάγονται στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα μετά από *in vitro* πειραματική μόλυνση με CagA-θετικά στελέχη *H. pylori* (Εικόνα 12).

Επιπλέον, ο αριθμός φαίνεται ότι καθορίζει τα επίπεδα τοξικότητας της πρωτεΐνης CagA[432], αλλά και του στελέχους γενικότερα, δεδομένου ότι ο κίνδυνος για ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου αυξάνει ευθέως ανάλογα με τον αριθμό των EPIYA-C θέσεων[433]. Στη χώρα μας έχουν διεξαχθεί εκτεταμένες μελέτες για τη χαρτογράφηση των EPIYA θέσεων φωσφορυλίωσης σε στελέχη που απομονώνονται από ενήλικες και παιδιά με συμπτωματική *H. pylori* λοίμωξη [134,434,435]. Οι μελέτες αυτές κατέδειξαν, ότι CagA-θετικά στελέχη με περισσότερες από δύο επαναλήψεις των θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA-C απομονώνονται αποκλειστικά από ενήλικες και όχι από παιδιά [134]. Επιπλέον, ενώ στα παιδιά η βαρύτητα των ιστοπαθολογικών δεδομένων δεν φαίνεται ότι συσχετίζεται με την πολυμορφικότητα των βακτηριακών λοιμοτοξικών παραγόντων CagA και VacA[435], αντίθετα στους ενήλικες, οι πολυμορφισμοί τόσο της VacA όσο και της CagA επηρεάζουν σημαντικά τη βαρύτητα και τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, αντίστοιχα. Ειδικότερα, οι πολυμορφισμοί της CagA ως προς τις θέσεις EPIYA-C, διαπιστώθηκε ότι σχετίζονται σημαντικά με την κλινική εκδήλωση της γαστρικής νόσου[436]. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία μίας λειτουργικής θέσης EPIYA-C (τύποι ABC) στην CagA διαπιστώθηκε ότι αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη πεπτικού έλκους (OR: 4.647, 95% CI: 2.037-10.602, $P=0.015$), ενώ ο κίνδυνος διπλασιάζεται επί εδάφους μικτών λοιμώξεων από ισογονιδιακά στελέχη *H. pylori* με διαφορετικό αριθμό θέσεων EPIYA-C στην CagA (OR: 9.111, 95% CI: 2.085-39.810, $P<0.001$ αντίστοιχα). Επίσης, σε περιπτώσεις μικτών λοιμώξεων, όπου από το στομάχι ασθενών απομονώνονται δύο ή περισσότερα CagA-θετικά στελέχη με διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων EPIYA-C, παρατηρήθηκε εκλεκτική παρουσία των στελεχών με αυξημένο αριθμό EPIYA-C θέσεων στο σώμα και το θόλο, σε σύγκριση με το γαστρικό άντρο [434]. Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις συντείνουν στην άποψη, ότι CagA-θετικά στελέχη με αυξημένο αριθμό EPIYA-C επαναλήψεων



Εικόνα 12: Αναπαράσταση της χωροχρονικής κατανομής της φωσφορυλίωσης της *CagA* στις διάφορες EPIYA θέσεις από τις κινάσες Src και c-Abl. (Επεξεργασμένο και μεταφρασμένο σχήμα το οποίο έχει ληφθεί από [419].)

απομονώνονται συνηθέστερα στο σώμα και το θόλο και η παρουσία τους συνδέεται με την εμφάνιση πανγαστρίτιδας και αυξανόμενου κινδύνου για γαστρικό καρκίνο, ενώ τα στελέχη με περιορισμένο αριθμό EPIYA-C θέσεων εντοπίζονται κυρίως στο άντρο και η παρουσία τους συσχετίζεται με εμφάνιση δωδεκαδακτυλικού έλκους.

Αρχικά είχε διαπιστωθεί ότι υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση του καταλοίπου τυροσίνης στα EPIYA μοτίβα ήταν η κινάση c-Src, αλλά αργότερα παρατηρήθηκε ότι η αναστολή έκφρασης της κινάσης c-Abl⁴⁵ στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της *CagA*. Εν τέλει δύο ανεξάρτητες μελέτες επιβεβαίωσαν την συμμετοχή της κινάσης c-Abl στην φωσφορυλίωση της *CagA* [437,438]. Μόλις πρόσφατα αποκαλύφθηκε ο συνεργικός μηχανισμός δράσης αυτών των κινασών υποδεικνύοντας τόσο χρονική όσο και ποιοτική ρύθμιση της φωσφορυλίωσης της *CagA* (Εικόνα 12). Πιο συγκεκριμένα, η *CagA* φωσφορυλιώνεται ιεραρχικά από τις δύο αυτές κινάσες, καθόσον στις πρώτες δύο ώρες μετά την μόλυνση, η Src κινάση φαίνεται να φωσφορυλιώνει μόνο τις EPIYA-C και EPIYA-D θέσεις και στη συνέχεια ενεργοποιείται η κινάση c-Abl η οποία δυνητικά μπορεί

⁴⁵ Human abelson murine leukemia kinase

να φωσφορυλιώσει όλους τους τύπους των EPIYA θέσεων[439]. Όμως σύμφωνα με τη μελέτη αυτή κάθε δεδομένη χρονική στιγμή, η CagA δεν μπορεί ποτέ να έχει ταυτόχρονα φωσφορυλιωθεί σε όλες τις διαφορετικές EPIYA θέσεις που διαθέτει. Παρόλα αυτά θολό παραμένει το τοπίο στην περίπτωση ύπαρξης πολλαπλών θέσεων EPIYA-C, σε ένα μόριο CagA πρωτεΐνης, διότι τέτοιου είδους CagA δεν χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή της μελέτης και επιπλέον ο πειραματικός σχεδιασμός δεν ήταν σε θέση να διερευνήσει αυτού του είδους το ερευνητικό ερώτημα. Μετά την ενδοκυττάρια μεταφορά της η CagA έχει δείχθει ότι αλληλεπιδρά με πλειάδα ενδοκυττάρων μορίων του κυττάρου ξενιστή και να μετέχει σε διαδικασίες οι οποίες για χάρην συντομίας μπορούν να χωριστούν σε δυο γενικές κατηγορίες, σε αυτές που εξαρτώνται από την φωσφορυλίωση της CagA και σε αυτές που είναι ανεξάρτητες της φωσφορυλίωσης της [439].

1.8.3.2.1. Αλληλεπιδράσεις της CagA εξαρτώμενες από φωσφορυλίωση σε EPIYA θέσεις

Η πρώτη αλληλεπίδραση της φωσφορυλιωμένης-CagA (pY-CagA) που παρατηρήθηκε ήταν με την φωσφατάση τυροσίνης SHP-2⁴⁶ [430]. Η SHP-2, αποτελεί μια πιθανολογούμενη ογκοπρωτεΐνη, μετά από την αναγνώριση συσώρευσης λειτουργικών μεταλλάξεων στο γονίδιο της σε πολλές διαφορετικές ανθρώπινες κακοήθειες [440]. Ειδική αλληλεπίδραση των SH2 περιοχών της SHP-2 με τις φωσφορυλιωμένες EPIYA-C ή EPIYA-D θέσεις της CagA έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της SHP-2 φωσφατάσης, η οποία επάγει την εκδήλωση του ραμφοειδούς φαινοτύπου διασποράς στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα [441]. Ο συγκεκριμένος φαινότυπος είναι συνδυασμός επαγωγής δύο διαδοχικών διαδικασιών, αφενός κυτταρικής κινητικότητας και αφετέρου κυτταρικής επιμήκυνσης και εκδηλώνεται ενδεχομένως σαν αποτέλεσμα της δυσλειτουργίας των εστιακών κυτταρικών δεσμών, που ελέγχουν την σύνδεση του επιθηλιακού κυττάρου με την θεμέλια ουσία [442,443]. Για τον σταθερό σχηματισμό του συμπλόκου μεταξύ της φωσφορυλιωμένης CagA και της SHP-2 απαιτείται ο σχηματισμός διμερών της CagA (Εικόνα 13) [441]. Μελέτες διαμόλυνσης γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων έδειξαν ότι η δραστηριότητα της SHP-2 φωσφατάσης συμβάλλει στην επιμήκυνση των κυττάρων διεγείροντας την μεταγωγή σήματος της οδού Rap1⁴⁷→Raf⁴⁸→Erk [431] και στην άμεση αποφωσφορυλίωση και αδρανοποίηση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης FAK [444].

⁴⁶ Src Homology Phosphatase-2

⁴⁷ Repression activator protein 1

⁴⁸ Rheumatoid Arthritis Factor

Ωστόσο, η συμβολή της FAK στο φαινοτυπικό αποτέλεσμα δεν είναι ακόμη σαφής. Στην βιβλιογραφία έχουν εμφανιστεί αποκλίνοντα πειραματικά δεδομένα που παρήχθησαν από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες, τα οποία μπορούν να εξηγηθούν είτε λόγω διαφορετικής πειραματικής προσέγγισης είτε λόγω χρήσης διαφορετικών στελεχών *H. pylori*. Η πρώτη μελέτη υποστηρίζει ότι η CagA μειώνει τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης σε κατάλοιπα τυροσίνης FAK κινάσης στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα [444]. Η μείωση αυτή πιθανολογείται ότι οφείλεται σε SHP-2-διαμεσολαβούμενη αποφωσφορυλίωση της FAK η οποία δεν οφείλεται σε Csk-εξαρτώμενη αναστολή των κινάσων της οικογένειας Src (SFKs) οι οποίες φωσφορυλιώνουν την FAK. Συνέκφραση διαρκώς ενεργού FAK μαζί με την CagA, ανέστειλε την έκφραση του ραμφοειδούς φαινοτύπου, ενώ η έκφραση κυρίαρχα αρνητικών κατασιευών της FAK, προκάλεσε ένα χαρακτηριστικό επιμήκεις σχήμα κυττάρων που προσομοίαζε με αυτό του ραμφοειδούς φαινοτύπου διασποράς. Η μελέτη αυτή καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη βαρύτερων γαστρικών βλαβών που σχετίζονται με τη λοίμωξη CagA-θετικών *H. pylori* είναι αποτέλεσμα της διαταραχής στην διακυτταρική συνέχεια και την αυξημένη κινητικότητα των επιθηλιακών κυττάρων υπό την επήρεια της CagA πρωτεΐνης [444].

Η δεύτερη θεωρία καταδεικνύει ότι το *H. pylori* στοχεύει στην κορτακτίνη, μια πρωτεΐνη του κυτταροπλάσματος η ενεργοποίηση της οποίας οδηγεί στην προώθηση του πολυμερισμού της ακτίνης και στην αναδιάταξη του κυτταροσκελετού, από δύο ανεξάρτητες διεργασίες οι οποίες οδηγούν αφενός σε αποφωσφορυλίωση κατάλοιπων τυροσίνης της κορτακτίνης και φωσφορυλίωσης της σε κατάλοιπα σερίνης ρυθμίζοντας έτσι την διασπορά και την επιμήκυνση των κυττάρων [445]. Η φωσφορυλίωση της κορτακτίνης υπαγορεύει τον υποκυτταρικό της εντοπισμός και τα αλληλεπιδρώντα μόρια. Κατά τη μόλυνση η κορτακτίνη αλληλεπιδρά και διεγείρει την δραστηριότητα της κινάσης FAK. Αυτή η αλληλεπίδραση απαιτεί τις SH3 περιοχές και την φωσφορυλίωση της κορτακτίνης στην σερίνη 405 και μιας πλούσιας σε προλίνη αλληλουχίας στην FAK. Χρησιμοποιώντας το *H. pylori* ως πειραματικό μοντέλο, αυτή η μελέτη αναδεικνύει μια νέα οδό ενεργοποίησης της FAK. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή το *H. pylori* στοχεύει στην κορτακτίνη και προστατεύει το γαστρικό επιθήλιο από την υπερβολική κυτταρική αποκόλληση εξασφαλίζοντας την παρατεταμένη λοίμωξη στο στομάχι [445]. Η CagA είναι επίσης ικανή να αλληλεπιδρά με την κινάση Csk⁴⁹ που αποτελεί ένα απαραίτητο ανασταλτικό ρυθμιστικό μόριο για τις κινάσες της οικογένειας Src (SFKs). Όπως και στην περίπτωση της SHP-2, η Csk συνδέεται εκλεκτικά στην φωσφορυλιωμένη CagA μέσω των SH2 περιοχών της [430]. Μετά το

⁴⁹ Carboxyl-terminal Src kinase

σχηματισμό του συμπλόκου η CagA ενεργοποιεί την Csk, η οποία με τη σειρά της δρα ανασταλτικά στις SFK κινάσες [446]. Επειδή οι SFK κινάσες είναι υπεύθυνες για τη φωσφορυλίωση της CagA, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση ο σχηματισμός του CagA-SHP-2 συμπλόκου και η επακόλουθη επαγωγή του ραμφοειδούς φαινοτύπου διασποράς, διότι η αλληλεπίδραση CagA-Csk ρυθμίζει αρνητικά της μεταγωγή σήματος μέσω του CagA-SHP-2 μονοπατιού τόσο αναστέλλοντας ανταγωνιστικά τον σχηματισμό του CagA-SHP-2 συμπλόκου όσο και μειώνοντας τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της CagA [446].

Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από *H. pylori* η φωσφορυλιωμένη σε κατάλοιπα τυροσίνης CagA έχει δείχθει ότι μπορεί να δεσμεύει τις Crk κινάσες (Crk-II, Crk-I, και Crk-L) και η αλληλεπίδραση αυτή βρέθηκε να αποτελεί σημαντική συνθήκη, τόσο για τις αποκρίσεις του ξενιστή στις οποίες διαμεσολαβεί η CagA όσο και για την επαγωγή του ραμφοειδούς φαινοτύπου [447]. Συγκεκριμένα η προκαλούμενη από *H. pylori* διασπορά των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων μπλοκάρεται τόσο από υπερέκφραση κυρίαρχα-αρνητικών Crk μεταλλάξεων όσο και από αναστολή της ενδογενούς Crk με χρήση siRNA⁵⁰ τεχνολογίας. Τα ανωτέρω υποδηλώνουν ότι κυτταροσκελετική αναδιάταξη της ακτίνης, επάγεται είτε λόγω της αποφωσφορυλίωσης πρωτεϊνών όπως η κορτακτίνη, που αλληλοεπιδρούν με την ακτίνη, μέσω CagA εξαρτώμενης αδρανοποίησης των SFK κινάσων [448] ή λόγω ενεργοποίησης της οδού μεταγωγής σήματος Rac1⁵¹/WAVE⁵² μέσω CagA-Crk αλληλεπίδρασης [438,447] που είναι σημαντική για την επιμήκυνση του κυττάρου μέσω της φωσφορυλιωμένης CagA. Η αλληλεπίδραση της φωσφορυλιωμένης CagA με την CrkII επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με πειράματα ταυτόχρονης μόλυνσης του *P. aeruginosa* με το *H. pylori*. Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι η έγχυση των τοξινών ExoT ή ExoS του *P. aeruginosa* εμπόδιζε αποτελεσματικά το *H. pylori* να προκαλέσει την εκδήλωση του ραμφοειδούς φαινοτύπου [449]. Τόσο η Rho-GAP⁵³ όσο και οι ADPRT περιοχές της ExoS⁵⁴ ήταν αναγκαίες για να εμποδίσει τις ανακατατάξεις του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλούνται από το *H. pylori*, ενώ περιοχές της ExoT⁵⁵ ήταν απαραίτητες για την εν λόγω δραστηριότητα [449]. Εντοπίστηκε ότι οι πρωτεΐνες Crk, Rac1 και H-Ras⁵⁶, αλλά όχι RhoA ή Cdc42⁵⁷ αποτελούν βασικές συνιστώσες του επαγόμενου ραμφοειδούς φαινοτύπου διασποράς που σχετίζονται με την δράση της πρωτεΐνης CagA[449]. Επιπλέον η ADP-ριβοζυλίωση των CrkII

⁵⁰ Small Interfering RNA

⁵¹ Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

⁵² WASP family Verprolin-homologous protein

⁵³ Ras homologous GTPase activating protein

⁵⁴ Exoenzyme S

⁵⁵ Exoenzyme T

⁵⁶ Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog

⁵⁷ Cell division control protein 42 homolog

από φωσφορυλιωμένη ExoT μπλοκάρει την ενεργοποίηση της CrkII στην τυροσίνη 221, η οποία είναι επίσης σημαντική για την μεταγωγή σήματος μέσω της CagA. Φαίνεται ακόμα ότι η ενεργοποίηση της c-Abl από την φωσφορυλιωμένη CagA επάγει την φωσφορυλίωση κατάλοιπου τυροσίνης στην θέση 122 της CrkII ([449]. Πράγματι η έκφραση της CrkII με ανεπάρκεια φωσφορυλίωσης στην θέση 122 ανέστειλε την *H. pylori* επαγόμενη κυτταρική επιμήκυνση [449].

Το πεδίο των μελετών πάνω στις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις έχει δημιουργήσει πολλά αντικρουόμενα συμπεράσματα καθώς η πρώτη μελέτη που εντόπισε τις αλληλεπιδράσεις των Crk-II, Crk-I και Crk-L με την CagA βασίστηκε κυρίως στην αναστολή της δράσης των μορίων αυτών είτε μέσω της siRNA τεχνολογίας είτε με χρήση κυρίαρχα-αρνητικών μεταλλάγματων. Όμως η αναστολή πρωτεϊνών όπως οι Crk οι οποίες έχουν επανειλημμένα εμπλακεί στη ρύθμιση μιας ποικιλίας μονοπατιών μεταγωγής σήματος, πρέπει να αξιολογείται με μεγάλη προσοχή [450]. Για παράδειγμα, η Crk διαμεσολαβεί την κυτταρική μετανάστευση στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) μέσω της σύνδεσής της με την οικογένεια πρωτεϊνών εζρίνης (ezrin), ραντιξίνης (radixin) και μοεσίνης (moesin) [451], υποδεικνύοντας ότι η αναστολή της Crk από siRNA ή κυρίαρχα-αρνητικά (dominant negative) μεταλλάγματα μπορεί να προκαλέσει γενική καταστολή της κυτταρικής κίνησης.

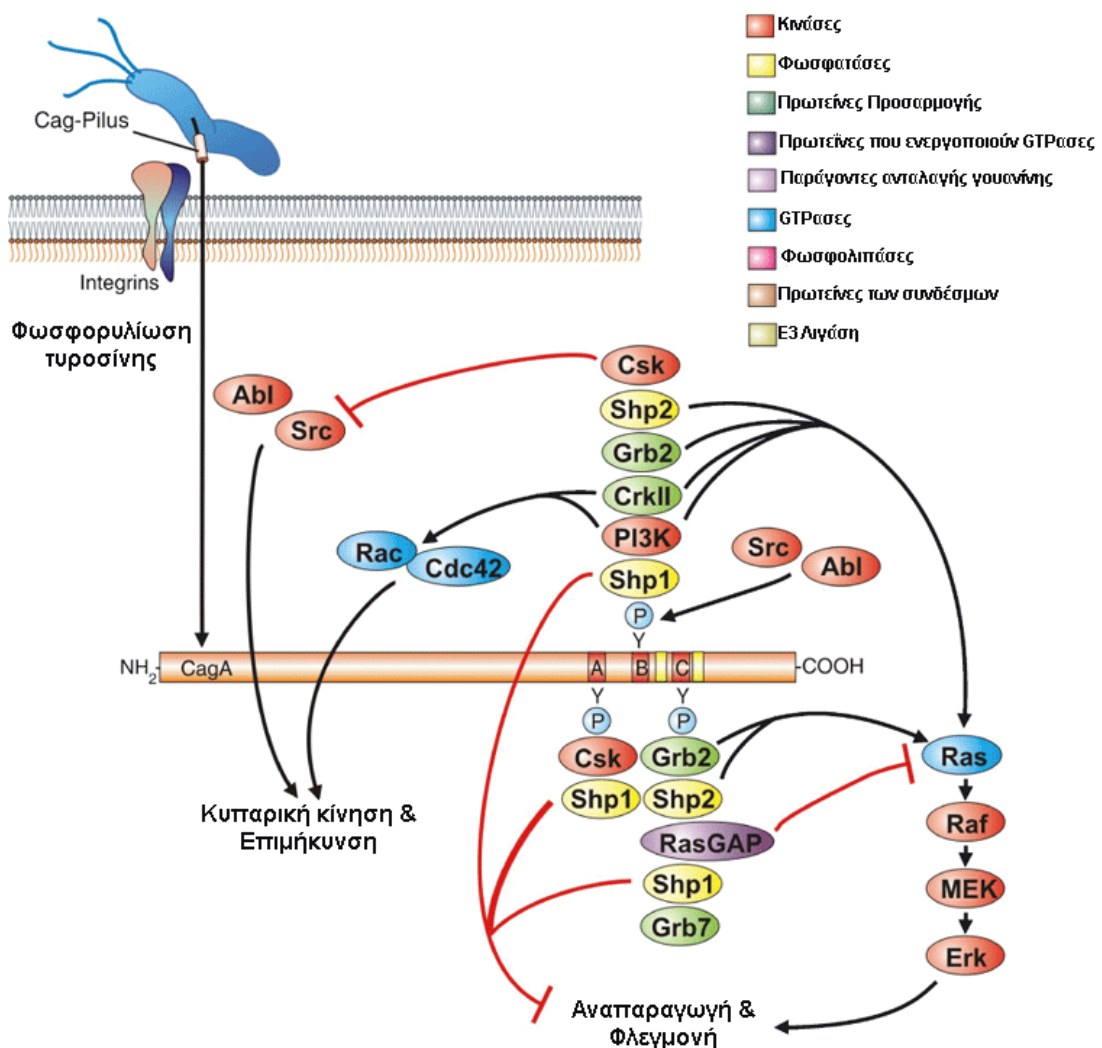
Δύο μελέτες όπου γίνεται λεπτομερής εξέταση της επαγωγής του ραμφοειδούς φαινοτύπου από CagA θετικά στελέχη *H. pylori* με τη χρήση μικροσκοπίας πραγματικού χρόνου υποδεικνύουν ότι οι μορφολογικές αλλαγές του κυττάρου, οφείλονται σε αναστολή της διάσπασης των κυτταρικών εστιακών συμφύσεων, παρά στην δημιουργία προεξεχόντων φιλοποδίων, η οποία επάγεται από την ενεργοποίηση της αλληλεπίδρασης με τις Crk και κατόπιν ενεργοποίησης της Cdc42 ή/και της Rac1 [442]. Σύμφωνα λοιπόν με τις μελέτες αυτές η επαγωγή του ραμφοειδούς φαινοτύπου ούτε εξαρτάται από τις Rac1 ή Cdc42, ούτε απαιτεί την Arp2/3⁵⁸ [431,442] και οφείλεται στην αναστολή της επαντάξξης των περιφερικών άκρων του κυττάρου, λόγω της επιλεκτικής σταθεροποίησης εστιακών συμφύσεων μέσω της FAK [442,444].

Επιπλέον μια πρωτεομική μελέτη πραγματοποιήθηκε για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη CagA και οι οποίες εξαρτώνται από την φωσφορυλίωση της [452]. Για το σκοπό αυτό, φωσφοπεπίδια που αντιστοιχούν στις θέσεις φωσφορυλίωσης της CagA χρησιμοποιήθηκαν ως δόλωμα για να εντοπιστούν αλληλεπιδρούσες πρωτεΐνες σε ολιγά κυτταρολύματα κυττάρων θηλαστικών. Τα ίδια πεπίδια χρησιμοποιήθηκαν επίσης στην μη-φωσφορυλιωμένη μορφή τους ως εσωτερικός έλεγχος για την ειδικότητα της μεθόδου. Ποσοτική

⁵⁸ Actin-related protein 2/3

φασματομετρία μάζας χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που συνδέθηκε με την φωσφορυλιωμένη μορφή του πεπτιδίου, αλλά όχι με την μη φωσφορυλιωμένη μορφή [452].

Τα πειράματα αυτά επαλήθευσαν τις περισσότερες, αλλά όχι όλες τις αναφερόμενες αλληλεπιδράσεις τις φωσφορυλιωμένης CagA. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν νέες αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων των SHP-1⁵⁹, RasGAP⁶⁰, PI3-kinase, Grb2⁶¹ και Grb7⁶² [452]. Η πιθανή συνεισφορά τους στη μοριακή παθογένεια της *H. pylori* λοίμωξης παραμένει άγνωστη και πρέπει να διερευνηθεί σε μελλοντικές μελέτες. Κοινό δομικό στοιχείο των δέκα ενδοκυττάρων παραγόντων που αλληλεπιδρούν με την φωσφορυλιωμένη CagA είναι η παρουσία



Εικόνα 13: Γραφική αποτύπωση των έως τώρα γνωστών από μελέτες αλληλεπιδράσεων της φωσφορυλιωμένης μορφής της CagA με μόρια του ξενιστή. (Επεξεργασμένο και μεταφρασμένο σχήμα το οποίο έχει ληφθεί από [426].)

⁵⁹ Src Homology Phosphatase-1
⁶⁰ Ras GTPase activating protein
⁶¹ Growth factor receptor-bound protein 2
⁶² Growth factor receptor-bound protein 7

θέσεων αλληλεπίδρασης φωσφο-τυροσίνης SH2 (Src homology 2) οι οποίες αποτελούν κύρια δομικά στοιχεία αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς [452].

1.8.3.2.2. Επιδράσεις της CagA στην μεταγωγή σήματος ανεξάρτητες της φωσφορυλίωσης

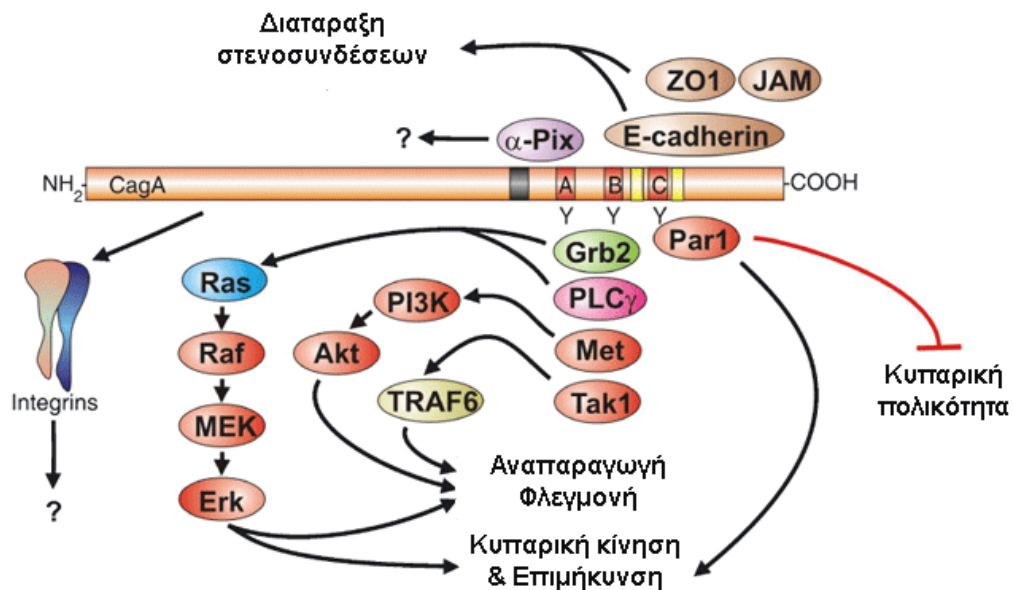
Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 11 αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης CagA με ενδοκυττάρους παράγοντες των επιθηλιακών κυττάρων, χωρίς όμως να προϋποτίθεται φωσφορυλίωση της στις θέσεις EPIYA (Εικόνα 14), αν και αυτή η αλληλεπίδραση περιλαμβάνει το καρβόξυ-τελικό άκρο της CagA που εμπεριέχονται οι θέσεις EPIYA. Καταρχήν, η μη-φωσφορυλιωμένη CagA έχει δείχθει ότι μπορεί να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ZO-1, μία από τις πρωτεΐνες του ικρίωματος των στενοσυνδέσμων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, αλλά και με την διαμεμβρανική πρωτεΐνη των συνεκτικών δεσμών JAM-A⁶³, με αποτέλεσμα τον έκτοπο και ατελή σχηματισμό των στενοσυνδέσμων στο σημείο της επαφής του βακτηρίου με το επιθηλιακό κύτταρο [353].

Η μη-φωσφορυλιωμένη CagA έχει επίσης αναφερθεί να αλληλεπιδρά με την διαμεμβρανική κυτταρική πρωτεΐνη E-cadherin [453]. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να διαταράξει τους διακυτταρικούς δεσμούς μεταξύ πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων με την απελευθέρωση β-κατενίνης από τα συνδετικά σύμπλοκα και προκαλεί αύξηση της πυρηνικής β-κατενίνης που οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση μιτογονικών γονιδίων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση [454]. Πρόσφατη μελέτη κατέδειξε ότι η CagA σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τις E-cadherin, την p120 catenin και το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα c-Met⁶⁴ [455]. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές δεν παρατηρήθηκαν στην ευρέως χρησιμοποιούμενη κυτταρική σειρά γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων AGS, η οποία δεν εκφράζει την e-cadherin [455]. Ωστόσο, το προαναφερθέν πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο παρατηρήθηκε στη κυτταρική σειρά γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων NCI-N87 η οποία εκφράζει ενδογενώς E-cadherin αλλά και σε AGS κύτταρα που εξέφραζαν σταθερά E-cadherin μετά από σταθερή διαμόλυνση τους με το κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα έκφρασης E-cadherin [455]. Φαίνεται ότι όταν το σύμπλοκο CagA/E-cadherin/p120-catenin/c-Met είναι συγκροτημένο, στα επιθηλιακά κύτταρα, καταστέλλεται η διεισδυτικότητα και ο φαινότυπος διασποράς που επάγεται από την μόλυνση *H. pylori* [455]. Ωστόσο τι επακολουθεί όταν ο υποδοχέας c-Met φωσφορυλιωθεί και ενεργοποιηθεί μετά από *H. pylori* λοίμωξη δεν είναι

⁶³ Junctional Adhesion Molecule-A

⁶⁴ Receptor Tyrosine Kinase

ξεκάθαρο, γιατί αν και η ενεργοποίηση του c-Met έχει επανειλημμένα αναφερθεί σε αρκετές κυτταρικές σειρές επιθηλιακών κυττάρων μολυσμένες με *H. pylori* [456,457], μια πιο πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε σε αυτές τις μελέτες, δεν αναγνωρίζει την φωσφορυλιωμένη μορφή του c-Met μεγέθους 135 kDa, αλλά μια κατά 10 kDa μικρότερη πρωτεΐνη, που ταυτοποιήθηκε ως η φωσφορυλιωμένη μορφή της CagA [458]. Επιπλέον



Εικόνα 14: Γραφική αποτύπωση των έως τώρα γνωστών από μελέτες αλληλεπιδράσεων της μη-φωσφορυλιωμένης μορφής της CagA με μόρια του ξενιστή. (Επεξεργασμένο σχήμα [426].)

αλληλεπίδραση αυτή της CagA με τον c-Met μπορεί να οδήγησε εσφαλμένα τους συγγραφείς να παρερμηνεύουν την φωσφορυλιωμένη CagA ως φωσφορυλιωμένο c-Met [458]. Έτσι, ο ρόλος του c-Met στην *H. pylori* επαγόμενη μεταγωγή σήματος δεν είναι απόλυτα σαφής και πρέπει να διερευνηθεί πιο διεξοδικά στο μέλλον.

Η μη-φωσφορυλιωμένη CagA πρωτεΐνη έχει επίσης βρεθεί να αλληλεπιδρά με την Grb2 [459], και η Grb2 είναι ο μόνος παράγοντας του ξενιστή που περιγράφεται να αλληλεπιδρά τόσο με μη φωσφορυλιωμένη όσο και με φωσφορυλιωμένη CagA [452]. Ειδικότερα, η μη-φωσφορυλιωμένη μορφή της CagA δείχθηκε να αλληλεπιδρά με την Grb2 τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, παρέχοντας ένα μηχανισμό αντίστοιχο με αυτό με τον οποίο η πρωτεΐνη Sos αλληλεπιδρά με την Grb2 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη [459]. Το σύμπλοκο CagA/Grb2/SOS⁶⁵ μπορεί να προωθήσει τον σχηματισμό του συμπλόκου Ras-GTP⁶⁶, το οποίο με τη σειρά του διεγείρει την μεταγωγή σήματος Raf→Mek→Erk η οποία οδηγεί στην διασπορά των κυττάρων

⁶⁵Son of Sevenless protein

⁶⁶ Rat sarcoma guanosine triphosphate

καθώς και στην ενεργοποίηση πυρηνικών παραγόντων μεταγραφής, που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [460]. Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε τους Hirata και συν. να συμπεράνουν ότι η έκφραση της CagA μέσω διαμόλυνσης, είχε σαν αποτέλεσμα την μεταγραφική ενεργοποίηση των SRE όσο και των SRF στοιχείων [461]. Σαν αποτέλεσμα αυτού δείχθηκε ότι η έκφραση της CagA μέσω διαμόλυνσης, προκαλεί αύξηση της φωσφορυλίωσης του πυρηνικού παράγοντα μεταγραφής Elk-1 καθώς και αύξηση της σύνδεση του στο DNA. Η ενεργοποίηση του SRE βρέθηκε ότι εξαρτάται από τις αλληλουχίες στο καρβοξυ-τελικό τμήμα της CagA (αμινοξέα 873-1002 στο στέλεχος του *H. pylori* 26695), αλλά ότι είναι ανεξάρτητη της φωσφορυλίωσης της CagA [461]. Ταυτόχρονα η έκφραση των Ras και MEK φαίνεται να είναι απαραίτητη υποδηλώνοντας ότι το σύμπλοκο CagA/Grb2/SOS ενεργοποιεί την μεταγωγή σήματος Ras→Raf→Mek→Erk ανεξάρτητα από την φωσφορυλίωση της CagA πρωτεΐνης. Σε συμφωνία με τα παραπάνω ευρήματα, η CagA δείχθηκε επίσης ότι μπορεί να δρα μιμούμενη πρωτεΐνες προσαρμογείς των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών, όπως η Grb2, σε διαγονιδιακό πρότυπο της *Drosophila melanogaster* το οποίο μπορεί να εξηγήσει πώς η CagA πυροδοτεί αυτή τη μεταγωγή σήματος [462].

Η εξήγηση για το ρόλο της CagA στην επαγωγή της απώλειας της κυτταρικής πολικότητας είναι πιο απλή. Η κινάση PAR1b⁶⁷/MARK2⁶⁸, ένας κεντρικός ρυθμιστής της κυτταρικής πολικότητας, βρέθηκε να παίζει σημαντικό ρόλο στην *H. pylori* επαγόμενη μεταγωγή σήματος [463]. Η μη-φωσφορυλιωμένη CagA δεσμεύει άμεσα την PAR1b και αναστέλλει την δραστηριότητα της ως κινάσης, με αποτέλεσμα την προαγωγή της απώλειας της πολικότητας στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα [463,464]. Η αλληλεπίδραση της CagA με την PAR1b απαιτεί την παρουσία των κατάλοιπων 1009-1086 της CagA Δυτικού τύπου, περιοχής που είναι ευρέως γνωστή ως περιοχή διμερισμού των CagA μορίων, οι οποίες περιβάλλουν τις θέσεις EPIYA [463]. Η CagA στελεχών τύπου Ανατολικής Ασίας, δεσμεύεται επίσης στην PAR1b μέσω της αντίστοιχης περιοχής 922-1012 [463]. Αυτή η περιοχή αλληλεπίδρασης της ανθρώπινης PAR1b και MARK2 χαρτογραφήθηκε με ανάλυση διαγραφής των θέσεων 250-276 της CagA [463]. Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης ότι η CagA όχι μόνον προσδένεται στην PAR1b αλλά επίσης και σε άλλα μέλη αυτής της οικογένειας κινάσων και ότι αυτές οι αλληλεπιδράσεις συμβάλλουν στον χαρακτηριστικό φαινότυπο διασποράς [465]. Σε υγιείς ιστούς, η PAR1b/MARK2 φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων που σχετίζονται με τη ρύθμιση της πολικότητας των κυττάρων [466]. Είναι σημαντικό ότι αυτή η κινάση συμμετέχει επίσης στο σχηματισμό της

⁶⁷ Partitional defective kinase 1b

⁶⁸ Microtubule Affinity-Regulating Kinase 2

μιτωτικής ατράκτου [466]. Έτσι, προτάθηκε ότι η CagA μπορεί να προκαλέσει χρωμοσωμική αστάθεια μέσω της διατάραξης των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου [466]. Πράγματι, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η CagA μπορεί να μεσολαβεί στην αναστολή της PAR1b, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία της ατράκτου που οφείλεται στη διατάραξη των μικροσωληνίσκων, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της μετάβασης από την πρόφαση στην μετάφαση και επακόλουθο αποπροσανατολισμό της ατράκτου [466].

Πιο πρόσφατες μελέτες σε πειραματικά κυτταρικά και ζωικά πρότυπα *H. pylori* λοίμωξης καταδεικνύουν την δυνατότητα της CagA να συνεισφέρει στο μηχανισμό αναστολής της δραστηριότητας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53⁶⁹ κατά την λοίμωξη από *H. pylori* [467]. Ποιο συγκεκριμένα το *H. pylori* φαίνεται ικανό να μειώνει την έκφραση του p53, αυξάνοντας την ουβικιτινίωση του, με αποτέλεσμα την εντονότερη αποικοδόμηση του p53 από το πρωτεάσωμα, μέσω ενεργοποίησης της κινάσης AKT1, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη λιγάση της ουβικιτίνης HDM2. Αυτές οι επιδράσεις διαμεσολαβούνται από την πρωτεΐνη CagA, ανεξάρτητα από την φωσφορυλίωση της στις θέσεις EPIYA. Έκτοπη έκφραση της CagA σε γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, είχε σαν αποτέλεσμα την αυξημένη φωσφορυλίωση της HDM2⁷⁰, μαζί με την εντονότερη ουβικιτινίωση της p53 και αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα [467]. Η μείωση στα επίπεδα δραστηριότητας και έκφρασης της p53 συνοδεύτηκε από ταυτόχρονη αύξηση της επιβίωσης των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων που είχαν υποστεί βλάβη στο DNA [467].

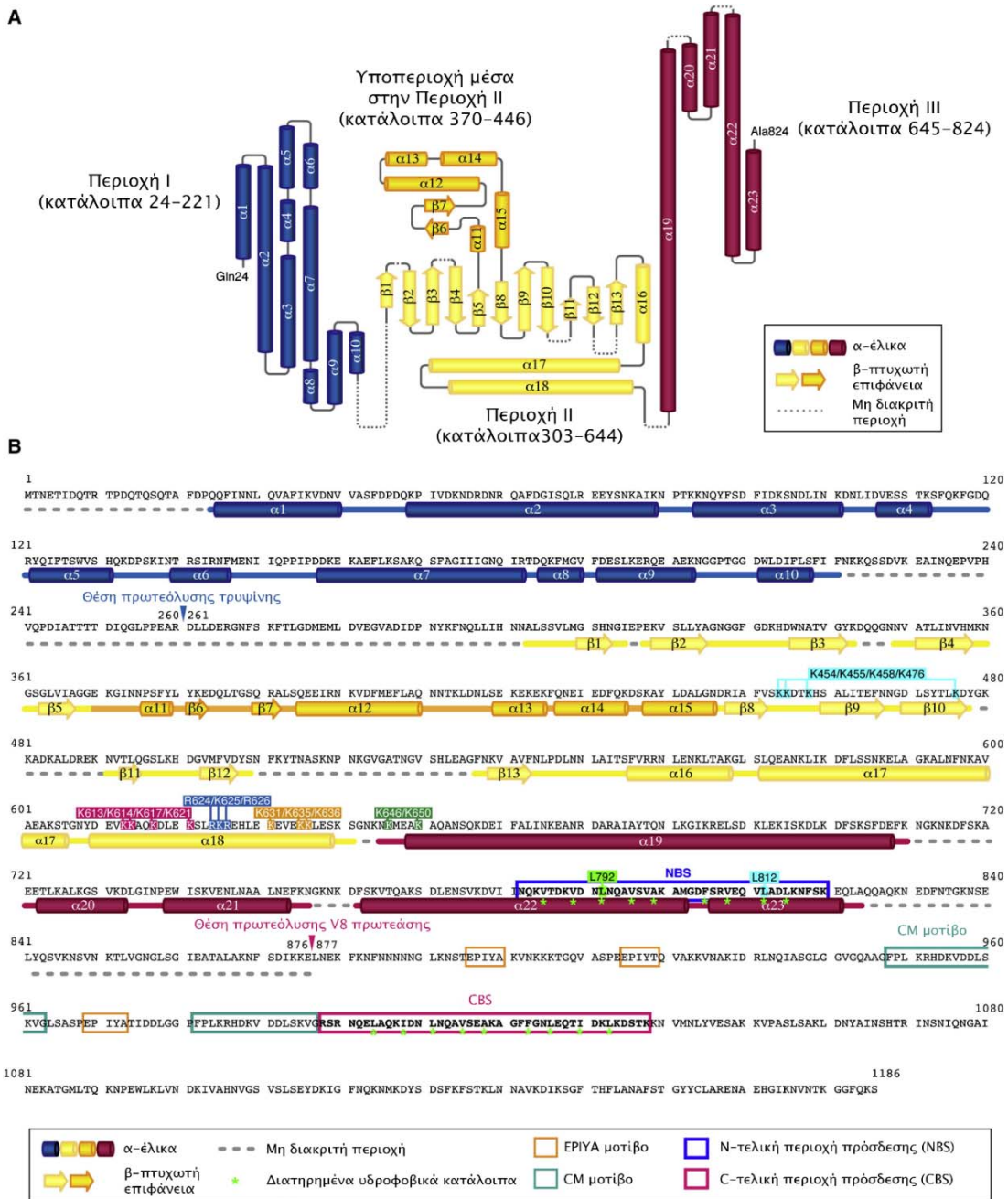
Πρόσφατα αποκαλύφθηκε ότι η άμεση επαφή του *H. pylori* με τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα προκαλεί την εξωκυττάρια προβολή μέρους της φωσφατιδυλοσερίνης που φυσιολογικά εδράζεται στο εσωτερικό στρώμα των φωσφολιπιδίων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του επιθηλιακού κυττάρου [421]. Ακόμα πιο σημαντικά, δείχθηκε ότι κατά τη στιγμή της σύνδεσης του βακτηρίου στο κύτταρο, η πρωτεΐνη CagA εντοπίζεται στην απώτερη βακτηριακή επιφάνεια του βακτηριακού εκκριτικού συστήματος και μέσω της αλληλεπίδρασης με την φωσφατιδυλοσερίνη, πυροδοτεί την είσοδο της στο εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων [421]. Στην μελέτη έγινε προσπάθεια να προσδιοριστεί ποιος γνωστός μοριακός μηχανισμός ενδοκύττωσης διαμεσολαβεί την είσοδο της CagA, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι ενώ η αλληλεπίδραση αυτή απαιτεί την δαπάνη ενέργειας δεν προκύπτει να διαμεσολαβείτε από τους ως τώρα γνωστούς μοριακούς μηχανισμούς ενδοκύττωσης [421]. Πράγματι, χρησιμοποιώντας συστήματα καλλιέργειών πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων, η CagA βρέθηκε να είναι συνδεδεμένη στο εσωτερικό φύλλο της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μέσω της

⁶⁹ Tumor Suppressor protein

⁷⁰ Human Double Minute 2 homolog

αλληλεπίδρασης της με φωσφατιδυλοσερίνη, αποδίδοντας έτσι ιδιαίτερη σημασία στο ρόλο της φωσφατιδυλοσερίνης στον ενδοκυττάριο εντοπισμό και ρόλο της CagA [421].

Πρόσφατα επίσης, αποσαφηνίστηκε ένα μεγάλο μέρος της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης CagA από δύο ανεξάρτητες μελέτες, μιας Ευρωπαϊκής [468] και μιας Ιαπωνικής [469] οι οποίες κατέληξαν σε ταυτόσημα συμπεράσματα. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι το καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης έχει πάρα πολύ ασταθή δομή, που υποδηλώνει ότι αυτή η περιοχή



Εικόνα 15: Η τριτοταγής δομή της CagA (A) όπως αυτή προέκυψε από πειράματα κρυστάλλωσης σε αντιπαραβολή με την αμινοξική της αλληλουχία (B). (Επεξεργασμένο από [449].)

της πρωτεΐνης παραμένει ευέλικτη για τη σύναψη αλληλεπιδράσεων σε σημείο που η κρυστάλλωση της να καθίσταται εξαιρετικά δύσκολη (Εικόνα 15). Στο σύνολο του το μόριο της CagA περιλαμβάνει μία δομημένη άμινο-τελική περιοχή (κατάλοιπα 1-876) της οποίας η δομή αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές. Η περιοχή I (κατάλοιπα 24-221) συνιστά ένα κινούμενο άμινο-τελικό άκρο η δομή του οποίου αποτελείται από δέκα α-έλικες και διαθέτει μια μικρή αλληλεπιδρώσα περιοχή με την περιοχή II, ενώ δεν βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την περιοχή III. Η περιοχή II (κατάλοιπα 303-644) προσδένει την CagA στην μεμβράνη του κυτταροπλάσματος μέσω της αλληλεπιδράσης της με την φωσφατιδυλοσερίνη και δομικά αποτελείται από μια μεγάλη αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια. Η περιοχή III (κατάλοιπα 645-824) δομικά αποτελείται από μια τετράδα α-ελίκων και αλληλεπιδρά ενδομοριακά με την ευέλικτη καρβόξυ-τελική περιοχή όσο και με την περιοχή II, ενισχύοντας την παθολόγο δράση της CagA, μέσω της δημιουργίας ενός βασικού πυρήνα σε σχήμα ικρίωματος/κύφωματος, ο οποίος αποτρέπει την πρωτεόλυση της πρωτεΐνης, προσδίδοντας διαρθρωτική αρχιτεκτονική μια σχήματος N [468,469].

Αναφορικά με την παρουσία των επαναλαμβανόμενων θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA στην CagA, πρέπει να αναφερθεί ότι μέχρι σήμερα μόνο 9 περιπτώσεις αντίστοιχων μορίων τελεστών που περιέχουν EPIYA θέσεις προσδιορίζεται σε άλλα βακτήρια (Πίνακας 3) [470]. Οι πρωτεΐνες αυτές δεν παρουσιάζουν ομολογία αλληλουχίας έξω από το μοτίβο EPIYA, υποδεικνύοντας ότι δεν έχουν προκύψει από κοινούς προγόνους [469,471]. Η παρουσία κινασών στο βακτηριακό πρωτόμα θα μπορούσε ενδεχομένως να οδηγήσει στην φωσφορυλίωση των EPIYA τελεστών στο κυτταρόπλασμα των βακτηρίων [472]. Όμως πρωτεΐνες που να περιέχουν SH2 μοτίβα δεν απαντώνται στα βακτήρια και επιπλέον οι EPIYA τελεστές έχουν βρεθεί να

Πίνακας 3: Οι εννέα βακτηριακές πρωτεΐνες που έχουν ως σήμερα προσδιοριστεί να φέρουν EPIYA μοτίβα φωσφορυλίωσης

Βακτηριακό είδος	EPIYA Τελεστές
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	AnkA
<i>Helicobacter pylori</i>	CagA
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Tarp
<i>Bartonella henselae</i>	BepD, BepE and BepF
<i>Haemophilus ducreyi</i>	LspA1 and LspA2
<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	Tir

αλληλεπιδρούν με μια σειρά παραγόντων των κυττάρων θηλαστικών. Λαμβάνοντας τα παραπάνω υπόψιν δυο βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις έχουν προτείνει ότι οι EPIYA τελεστές μπορούν να δράουν ως προτιμητέοι SH2-συνδέτες [290,470]. Η πρώτη θεωρία προτείνει ότι η αλληλεπιδράση αυτή εξυπηρετεί την

όσο μεγαλύτερη επιρροή από το βακτήριο στην μεταγωγή σήματος μέσω της χρήσης μιας τοξίνης [290]. Η δεύτερη θεωρία αναφέρει ότι οι EPIYA τελεστές των βακτηρίων μπορούν να δουν ως γενικευμένοι αναστολείς των SFKs [470]. Η θεωρία αυτή

βασίζεται στο γεγονός ότι μόνο μία πρωτεΐνη υπάρχει στο πρωτέωμα των θηλαστικών κυττάρων που περιέχει θέσεις EPIYA, η Pragmin [473]. Η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη κυττάρων θηλαστικών και δρα ως μια ψευδοκινάση (pseudokinase) περιέχοντας ένα μοναδικό μοτίβο EPIYA που φωσφορυλιώνεται από SFKs [473]. Η φωσφορυλιωμένη Pragmin συνδέεται με την Csk, μετατοπίζοντας την στο κυτταρόπλασμα, εμποδίζοντας με αυτό το τρόπο τον εντοπισμό της στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με αποτέλεσμα την αναστολή της φυσιολογικής δράσης της που είναι να φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τις SFKs [473]. Συνεπώς η Pragmin εφόσον φωσφορυλιωθεί στις EPIYA θέσεις, δημιουργεί ένα βρόγχο θετικής ανάδρασης της ενεργοποίησης των SFK. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η Csk φαίνεται να είναι συχνά στόχος των βακτηριακών τελεστών EPIYA [446,452] και, μάλιστα, η CagA αναστέλλει ανταγωνιστικά την αλληλεπίδραση Pragmin-Csk οδηγώντας στην στρατολόγηση της Csk στην πλασματική μεμβράνη, όπου φωσφορυλιώνει τις SFKs αναστέλλοντας την δραστηριότητα κινάσης. Φαίνεται λοιπόν, ότι είναι δυνατή η λειτουργική αναστολή των SFK να δίνει ένα σημαντικό πλεονέκτημα στα βακτήρια για την εγκατάσταση επιτυχούς μόλυνσης, πιθανώς καταστέλλοντας αποκρίσεις του έμφυτου ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή όπως προτείνεται στην λοίμωξη από *H. ducreyi* [474].

Όλο και περισσότερα στοιχεία καταδεικνύουν μια λειτουργική σχέση μεταξύ των λοιμογόνων παραγόντων της CagA και της VacA κατά τη διάρκεια της βακτηριακής λοίμωξης, που αποτελεί ενδιαφέρουσα στρατηγική προκειμένου να επιτύχει την καλύτερη αλληλεπίδραση μεταξύ του *H. pylori* και γαστρικού περιβάλλοντος. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η υπερβολική κυτταρική βλάβη και βελτιστοποιούνται οι συνθήκες για την ανάπτυξη του βακτηρίου. Έχει δειχθεί ότι αν και η CagA ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα NFAT⁷¹ η VacA τον αναστέλλει [475]. Παρά το γεγονός ότι η CagA μειώνει την επαγωγή κενοτοπίων από την VacA, η VacA μειώνει την ειδήλωση του ραμφοειδούς φαινοτύπου που προκαλείται από την CagA [476]. Επιπλέον, έχει πρόσφατα δειχθεί ότι η VacA μπορεί να ρυθμίζει ανασταλτικά τις επιδράσεις της CagA παρεμβαίνοντας στην ενεργοποίηση και την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα του EGFR στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα [477]. Αυτό βλάπτει την σηματοδοτική οδό που παίζει βασικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στον σχηματισμό του ραμφοειδούς

⁷¹ Nuclear Factor of Activated T-cells

φαινοτύπου [477]. Επιπλέον έχει δεχθεί ότι η CagA μπορεί να εξουδετερώνει την αποπτωτική δραστηριότητα της VacA, αλλοιώνοντας την ενδοκυττάρια διακίνηση της και ενισχύοντας την έκφραση αντιαποπτωτικών γονιδίων [387]. Τέλος έχει επίσης προταθεί και εμπλοκή της CagA στην αναστολή ενδοκύτωσης της VacA στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα [392]. Σημειωτέον ότι πρόσφατα έχει δειχθεί ότι σε πολωμένη μονοστιβάδα επιθηλιακών κυττάρων οι πρωτεΐνες VacA και CagA μπορούν να ενεργούν από κοινού για να παρέχουν στο *H. pylori*, συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά, όπως ο σίδηρος, κατά την σύνδεση τους στο κορυφαίο πόλο των κυττάρων [390]. Αφενός η CagA δείχνει να αυξάνει στη βασοπλευρική κυτταρική πλευρά, την πρόσληψη τρανσφερίνης που αποτελεί την κυριότερη πρωτεΐνη του πλάσματος για τη μεταφορά σιδήρου και επάγει την πορεία της διαμέσων του κυττάρου (transcytosis) στο κορυφαίο πόλο. Αντίστοιχα, η VacA έχει δειχθεί ότι συμβάλλει στην διατάραξη της ανακύκλωσης της τρανσφερίνης, με την εμπλοκή της στον εντοπισμό του υποδοχέα της τρανσφερίνης στις θέσεις προσκόλλησης των βακτηρίων [390].

1.9. ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΗΣ IL-8 ΑΠΟ ΓΑΣΤΡΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ *H. pylori*

Η παρουσία ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων κυττάρων στο χόριο του γαστρικού βλεννογόνου, σε υπόβαθρο χρόνιας φλεγμονής, αποτελεί το σήμα κατατεθέν της λοίμωξης από *H. pylori*. Πράγματι ιστοπαθολογικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η ουδετεροφιλική δραστηριότητα είναι ένα σχεδόν καθολικό φαινόμενο στην χρόνια γαστρίτιδα από *H. pylori* [117]. Τα ουδετερόφιλα εντοπίζονται σε δείγματα γαστρικών βιοψιών, σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις ασθενών με λοίμωξη από *H. pylori* και είναι ένα πολύ ευαίσθητος δείκτης της παρουσίας ή της απουσίας του βακτηρίου, διότι εξαφανίζονται εντός ημερών μετά από επιτυχή εκρίζωση της λοίμωξης [30,117]. Η ιντερλευκίνη 8 (IL-8) εκκρίνεται από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα και αποτελεί τον κύριο παράγοντα χημειοταξίας των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων στο χόριο. Έχει παρατηρηθεί αύξηση της έκκρισης IL-8 σε ασθενείς με λοίμωξη *H. pylori* [30,478] και συσχετίζεται σε επιδημιολογικές μελέτες με την ιστολογική βαρύτητα της γαστρίτιδας [479].

Στην βιβλιογραφία υπάρχει πλειάδα μελετών που προσπάθησαν να εντοπίσουν τους παράγοντες παθογένειας που είναι υπεύθυνοι για την επαγωγή της έκκρισης IL-8 από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, καθώς στη διαλεύκανση των οδών μεταγωγής σήματος μέσω των οποίων επιτυγχάνεται [404]. Παρά τούτα, η ετερογένεια των αποτελεσμάτων είναι πολύ μεγάλη και πολλά

από αυτά τα αποτελέσματα είναι ευθέως αντικρουόμενα [404]. Οι παράγοντες του *H. pylori* που έχουν αναφερθεί έως σήμερα να επηρεάζουν την έκκριση της IL-8 μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις κατηγορίες, πρώτον, σε αυτούς που προϋποθέτουν την ύπαρξη ενός λειτουργικού *cag-T4SS* και δρουν ανεξάρτητα από την παρουσία της CagA, δεύτερον σε αυτούς που επηρεάζονται από την λειτουργία της CagA και τρίτον, στους παράγοντες που δρουν ανεξάρτητα του βακτηριακού συστήματος μεταφοράς και της CagA.

1.9.1. Παράγοντες που επάγουν έκκριση της IL-8, που εξαρτώνται από το λειτουργικό σύστημα *cag-T4SS*, αλλά είναι ανεξάρτητοι από την δραστηριότητα της CagA

Αρχικές μελέτες κατέδειξαν ότι η παραγωγή IL-8 από αρκίτες επιθηλιακές κυτταρικές σειρές στην *H. pylori* λοίμωξη, εξαρτάτο από την παρουσία ενός λειτουργικού *cag-T4SS* και ήταν ανεξάρτητη άλλων γνωστών παραγόντων παθογένειας του βακτηρίου όπως η CagA, η VacA και η ουρεάση [480-482]. Τα συμπεράσματα αυτά ήταν σε συμφωνία με κλινικές μελέτες οι οποίες κατέδειξαν τη σχέση μεταξύ της έκκρισης της IL-8 και την παρουσία λειτουργικού συστήματος μεταφοράς *cagPAI* [483,484]. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι για την έκκριση της κυτοκίνης ήταν απολύτως αναγκαία η φυσική επαφή μεταξύ *H. pylori* και επιθηλιακών κυττάρων που οδηγούσε σχεδόν ταυτόχρονα σε ταχεία ενεργοποίηση του NF-kB ανεξάρτητα από την έκφραση της πρωτεΐνης CagA [294,480,485,486].

Συστηματική μεταλλαξιγένεση του *cagPAI* αποκάλυψε ότι τα 15 (HP022, HP023, HP025, HP027-033, HP037, HP039, HP041, HP044, HP046) από τα 27 γονίδια του απαιτούνται για την επαγωγή έκκρισης της IL-8 και επίσης υπέδειξε ότι η CagA δεν είναι απαραίτητη για την έκκριση της IL-8 [487]. Η συγκεκριμένη μελέτη αλλά και άλλες [480-482,488,489] απέκλεισαν την υπόθεση ότι υπάρχει ένας παράγοντας που μεταφέρεται διαμέσου του *cag-T4SS* προκαλώντας έκκριση της IL-8, υποδεικνύοντας ότι είτε ο ίδιος ο Cag-T4SS διάυλος (pilus) ή κάποιος παράγοντας που κωδικοποιείται σε μια άλλη περιοχή του χρωμοσώματος προκαλεί την ενεργοποίηση της IL-8. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι τουλάχιστον έξι οδοί μεταγωγής σήματος θα μπορούσαν να συμμετέχουν σε ενεργοποίηση του NF-kB που να εξαρτάται από τη λειτουργικότητα του συστήματος μεταφοράς ανεξάρτητα της δράσης της CagA (Εικόνα 16Α).

Το πρώτο μονοπάτι που περιγράφηκε λεπτομερώς ήταν αυτό της ενεργοποίησης από το *H. pylori* της κινάσης PAK1⁷² και την μετέπειτα ενεργοποίηση του NF-kB [490]. Η PAK1 είναι μια

⁷² P21-Activated Kinase 1

συγγενής πρωτεΐνη της κινάσης επαγωγής του NF-kB NIK⁷³, η οποία κατά την ενεργοποίηση της ρυθμίζει την δραστηριότητα των κινάσων IκappaB (IKKS)⁷⁴ (Εικόνα 16A). Επιπλέον στη συγκεκριμένη μελέτη, η δραστηριοποιούμενη TAK1⁷⁵ πρωτεϊνική κινάση κινάση κινάση (MAP3Ks) αναφερόταν ότι δεν είχε καμία επίδραση στην ενεργοποίηση του NF-kB [491]. Μια επόμενη μελέτη ερευνήσε την *H. pylori* επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-kB, χρησιμοποιώντας δοκιμασίες κινάσης και ενεργοποίησης μορίων μάρτυρα (reporter and kinase assay), καθώς και πειράματα διαμόλυνσης [492]. Πιο συγκεκριμένα σε πειραματικές *H. pylori* λοιμώξεις γαστρικών κυττάρων, η χρήση κυρίαρχα αρνητικών (dominant-negative) μεταλλάξεων των πρωτεϊνών IκBa⁷⁶, Iκκ α ⁷⁷, IKK β ⁷⁸, NIK και των πρωτεϊνών προσαρμογέα TRAF2⁷⁹ και TRAF6⁸⁰, συνέτειναν στην αναστολή της ενεργοποίησης του NF-kB [492] (Εικόνα 16B). Ακόμα μια μελέτη η οποία διερεύνησε την έκκριση της χημειοτακτικής πρωτεΐνης MCP-1⁸¹ από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, ανέφερε ότι μόλυνση από *H. pylori* οδηγούσε στην ειδική ενεργοποίηση συμπλοκών που περιείχαν τις υπομονάδες του NF-kB, p50 και p65 [493]. Επιπροσθέτως με πειράματα παροδικής σίγασης της έκφρασης κινάσων και δοκιμασίες ενεργοποίησης μορίων μάρτυρα (reporter assays) κατέδειξαν ότι η *H. pylori* λοίμωξη προκαλεί την ενεργοποίηση του NF-kB δια μέσω του IKK-NIK συμπλόκου μεταγωγής σήματος, έχοντας ως παράπλευρο αποτέλεσμα την έκφραση της MCP-1 (Εικόνα 17B). Μια μελέτη ορόσημο, από τον Ferrero και συν., πρότεινε ότι μόρια υπεύθυνα για την ενεργοποίηση του NF-kB κατά την *H. pylori* λοίμωξη μπορεί να είναι οι πεπτιδογλυκάνες του κυτταρικού τοιχώματος, οι οποίες προτάθηκε ότι μεταφέρονται ενδοκυττάρια δια μέσου του Cag-T4SS [294]. Εντός του κυττάρου, οι πεπτιδογλυκάνες αναγνωρίζονται από τον ενδοκυττάριο υποδοχέα NOD1 ο οποίος μπορεί άμεσα να ενεργοποιήσει τον NF-kB (Εικόνα 16B). Ωστόσο μετέπειτα δημοσιεύσεις αμφισβήτησαν την εμπλοκή του NOD1 στη ενεργοποίηση του NF-kB καθώς και των υπολοίπων μοντέλων ενεργοποίησης που έχουν περιγραφεί παραπάνω (Εικόνα 16B). Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι ακόμη και μετά την αναστολή της δράσης με siRNAs πολλών σηματοδοτικών μορίων στην οδό μεταγωγής σήματος του NF-kB δεν παρατηρείτο αναστολή στην φωσφορυλίωση του IκBa και την έκκρισή της IL-8 [485]. Σε αντίθεση, μείωση της έκφρασης των

⁷³ NF-kB Inducing Kinase

⁷⁴ Inhibitor of kappa B Kinase S

⁷⁵ TGF β Activated Kinase 1

⁷⁶ Inhibitor of κ Light Polypeptide Enhancer α

⁷⁷ Inhibitor of kappa B Kinase Alpha

⁷⁸ Inhibitor of kappa B Kinase Beta

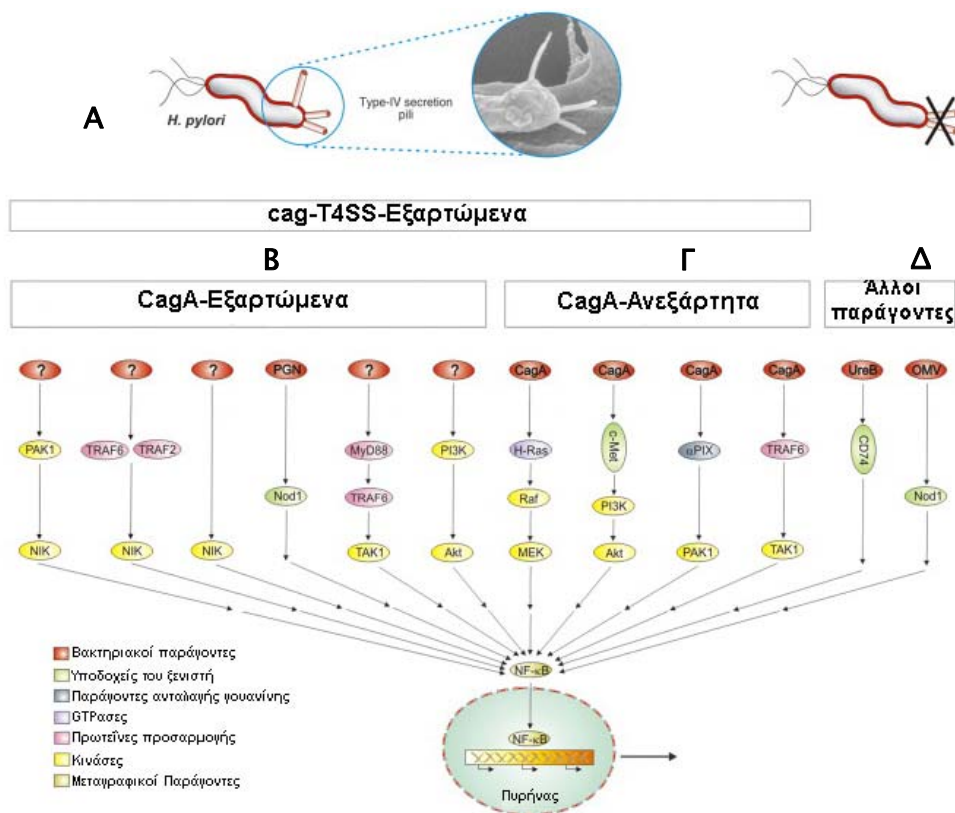
⁷⁹ TNF Receptor-Associated Factor 2

⁸⁰ TNF Receptor-Associated Factor 6

⁸¹ Macrophage Chemoattractant Protein-1

μορίων TAK1, TRAF6 και μιας σημαντικής πρωτεΐνης προσαρμογέα της σηματοδότησης των TLRs, της MyD88⁸², μέσω siRNA μηχανισμών επέφερε σημαντική μείωση στα επίπεδα ενεργοποίησης NF-κB [485], ενώ αντίθετα αναστολή των TRAF2 και IL-1R-συναφών κινασών (IKAK-1 και IRAK-4) με μηχανισμούς siRNA, δεν επηρέασαν τις αποκρίσεις [77]. Είναι ενδιαφέρον ότι αναστολή με siRNA, της έκφρασης του Nod1 υποδοχέα και της κινάσης RIP-2, ενός σημαντικού μορίου το οποίο διαμεσολαβεί στην αλληλεπίδραση των Nod υποδοχέων με το σύμπλοκο των IKK, δεν είχε επίσης κατασταλτικά αποτελέσματα στην ενεργοποίηση του NF-κB [77]. Αντ' αυτού η *H. pylori* λοίμωξη ενίσχυσε σημαντικά το σχηματισμό, δύο πρωτεϊνικών συμπλόκων, των MyD88/TRAF6 και TAK1/TRAF6 σε γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, μέσω ενός Cag-T4SS εξαρτώμενου τρόπου (Εικόνα 16B), με ταυτόχρονη σταθεροποίηση του σχηματισμού του Nod1 και RIP-2 συμπλόκου.

Τέλος μελέτη διερεύνησε το ρόλο του μονοπατιού των κινασών PI3K και Akt στην ενεργοποίηση του NF-κB [493]. Φωσφορυλιωμένη Akt ανιχνεύθηκε κατά τη διάρκεια της μόλυνσης με *cagPAI*-θετικά, αλλά όχι με *cagPAI*-αρνητικά στελέχη. Το *H. pylori* προκάλεσε επίσης φωσφορυλίωση του p65, ενεργοποίηση του NF-κB και έκφραση της IL-8 με ένα



Εικόνα 16: Αποτύπωση όλων των έως τώρα πιθανών μονοπατιών ενεργοποίησης του NF-κB από το *H. pylori* σύμφωνα με βάση τα δεδομένα που έχουν έως τώρα προκύψει από τις μελέτες που έχουν διεξαχθεί (Επεξεργασμένο και μεταφρασμένο σχήμα το οποίο έχει ληφθεί από [382].)

μηχανισμό που φάνηκε ότι εξαρτάται από την ενεργοποίηση των PI3K και Akt [494] (Εικόνα 16B). Συνοψίζοντας, οι παραπάνω αναφορές είναι είτε πολύ αμφιλεγόμενες ή δεν επιτρέπουν μια λογική μοριακή εξήγηση των δεδομένων με βάση ένα μόνο γνωστό μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-kB. Για παράδειγμα, δεν είναι σαφές για ποιο λόγο η MyD88 αλλά όχι οι κινάσες IRAK1⁸³ και IRAK4⁸⁴ που κλασικά συνδέονται με την MyD88 [485] θα πρέπει να είναι απαραίτητες για την *H. pylori* επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-kB.

1.9.2. Επαγωγή έκκρισης της IL-8 εξαρτώμενη από την έκφραση της πρωτεΐνης CagA

Επειδή ισογονιδιακά στελέχη που δεν εκφράζουν CagA πρωτεΐνη, προκαλούν την έκκριση σημαντικών ποσοτήτων της IL-8, η CagA θεωρήθηκε για μεγάλο χρονικό διάστημα να παίζει επουσιώδη ρόλο στην επαγωγή των προφλεγμονωδών απαντήσεων [481,482,487,495]. Ωστόσο, πολλές μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι η CagA είτε μέσω φυσικής λοίμωξης είτε διαμόλυνσης είχε την δυνατότητα να επάγει την ενεργοποίηση του NF-kB και την έκκριση της IL-8 σε γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα AGS και άλλους τύπους κυττάρων [496]. Η διαμόλυνση των κατασκευασμάτων της CagA οδήγησε στην μετατόπιση της υπομονάδας p65 του NF-kB εντός του πυρήνα, την ενεργοποίηση του προαγωγέα του γονιδίου της *IL-8* και μετέπειτα την έκκριση IL-8 [496]. Μελέτες με αναστολές και μια σειρά κυρίαρχα-αρνητικών (dominant negative) κατασκευών πρότειναν ότι η επαγόμενη απελευθέρωση της IL-8 που σχετίζεται με την ύπαρξη της CagA, φαίνεται να ρυθμίζεται κυρίως από το σηματοδοτικό μονοπάτι H-Ras→Raf→MEK (Εικόνα 16Γ). Η έκφραση μη-φωσφορυλιωμένων μεταλλαγών της CagA οδήγησε επίσης στην ενεργοποίηση του NF-kB, υποδηλώνοντας ότι η επαγωγή και έκφραση της IL-8, είναι ανεξάρτητη της φωσφορυλίωσης της CagA [496,497]. Επιπλέον, μη-φωσφορυλιωμένη CagA αποδείχθηκε ότι αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα c-Met [455-457] που οδηγεί σε διαρκή ενεργοποίηση της κινάσης PI3K/Akt και NF-kB ενεργοποίηση σε απόκριση της *H. pylori* μόλυνσης [457]. Επιπρόσθετα, αναλύσεις συν-κατακρήμνισης και μελέτες φασματομετρίας μάζας έδειξαν ότι η ενιόμενη CagA αλληλεπιδρά με τον α-Pix, έναν παράγοντα γουανίνης για την ανταλλαγή μικρών GTPασών Rho [497,498]. Ακόμα, καταστολή της α-Pix⁸⁵ με siRNA-μηχανισμό κατέδειξε σημαντική αναστολή της ενεργοποίησης των PAK1, ERK1/2 και NF-kB [124], υποδηλώνοντας ότι ο α-Pix απαιτείται για αυτές τις *H. pylori* μεσολαβούμενες αποκρίσεις

⁸³ Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1

⁸⁴ Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4

⁸⁵ PAK-interacting exchange factor

(Εικόνα 16Γ). Εκτός από την αλληλεπίδραση με α -Pix, η ενδοκυττάρια έκφραση της CagA είτε μετά από φυσική λοίμωξη είτε διαμόλυνση δείχθηκε να δεσμεύει και να ενεργοποιεί την κινάση TAK1 [499]. Η CagA δεσμεύεται στην TAK1 και μπορεί να διεγείρει την ενεργοποίηση της μέσω TRAF-6 και ουμπικιτινίωσης στο κατάλοιπο Lys63 της TAK1 έχοντας σαν συνέπεια την ενεργοποίηση του NF-kB (Εικόνα 16Γ). Συνολικά οι παραπάνω μελέτες αποδεικνύουν ότι ενδοκυττάρια έκφραση της CagA μπορεί να ενεργοποιήσει τον NF-kB και να συμβάλει στις προφλεγμονώδεις αποκρίσεις, αλλά ενδεχομένως με έναν έμμεσο τρόπο.

1.9.3. Ανεξάρτητη του Cag-T4SS επαγωγή έκκρισης της IL-8

Εκτός της έντονης ενεργοποίησης του NF-kB με μηχανισμούς που προϋποθέτουν ένα λειτουργικό σύστημα Cag-T4SS, έχει παρατηρηθεί ότι βασικά επίπεδα της φλεγμονής επίσης επάγονται από cagPAI αρνητικά στελέχη, υποδηλώνοντας την παρουσία εναλλακτικών μηχανισμών οι οποίοι μπορούν να ενεργοποιήσουν την οδό του NF-kB ανεξάρτητα του Cag-T4SS [484]. Ένας από αυτούς τους ανεξάρτητους παράγοντες φαίνεται να είναι η ουρεάση, καθώς έχει βρεθεί να συνκαταβυθίζεται με τον υποδοχέα επιφανείας CD74⁸⁶, που ρυθμίζει την ενδοκυτταρική μεταφορά [500]. Στη συγκεκριμένη μελέτη, με χρήση μεταλλαγμάτων ουρεάσης και ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, δείχθηκε ότι η αλληλεπίδραση της ουρεάσης με τον CD74 επάγει την ενεργοποίηση του NF-kB και την παραγωγή της IL-8 (Εικόνα 16Δ) [500]. Διέγερση του συστήματος NF-kB έχει επίσης παρατηρηθεί μέσω του συστήματος αναγνώρισης των πεπτιδογλυκάνων από τον ενδοκυττάριο υποδοχέα NOD1 *in vitro* μέσω ενός νέου μηχανισμού στον οποίο συμμετέχουν τα κυστιδία εξωτερικής μεμβράνης (OMVs) τα οποία απελευθερώνονται συνεχώς από τα βακτήρια (Εικόνα 16Δ) [501]. Ανεξάρτητη μελέτη έχει καταδείξει ότι ενδογαστρική χορήγηση OMVs σε ποντικούς μπορεί να προκαλεί έμφυτες και επίκτητες ανοσολογικές απαντήσεις μέσω ενός μηχανισμού εξάρτησης από τον NOD1 αλλά ανεξάρτητου από το σύστημα TLR [501]. Οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι άλλοι παράγοντες ανεξάρτητα από την λειτουργία του cagPAI θα μπορούσαν επίσης να συμβάλουν στην ενεργοποίηση του NF-kB.

⁸⁶ Cluster of Differentiation 74

1.10. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διαλεύκανση του ρόλου των επαναλαμβανόμενων EPIYA θέσεων φωσφορυλίωσης της CagA πρωτεΐνης στην ενεργοποίηση μηχανισμών πρόκλησης φλεγμονής στο γαστρικό επιθήλιο στην λοίμωξη από *H. pylori*. Στο πρώτο μέρος, περιγράφεται μία επιδημιολογικού περιεχομένου μελέτη για τη συσχέτιση της πολυμορφίας των θέσεων EPIYA της CagA με τα κλινικό-παθολογικά ευρήματα ασθενών. Η εν λόγω μελέτη διεξήχθη σε κλινικά στελέχη που απομονώθηκαν από ασθενείς Ασιατικών (Καμπότζη) και Αφρικανικών (Σενεγάλη) πληθυσμών, μέσω του Παγκόσμιου Δικτύου των Ινστιτούτων Παστέρ (RIIP), στηρίχθηκε σε τεχνογνωσία παρόμοιων ερευνών που διεξήγαγε το Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας στον Ελληνικό πληθυσμό [134,434,435] και για τις ανάγκες της αναπτύχθηκε νέα στρατηγική για την χαρτογράφηση των πολυμορφισμών EPIYA CagA. Στο δεύτερο μέρος της παρούσας μελέτης, διερευνήθηκε η ενδεχόμενη εμπλοκή της πρωτεΐνης CagA, μέσω της φωσφορυλίωσης στις θέσεις EPIYA, στην επαγωγή της Ιντερλευκίνης-8 και των μορφοινητικών αλλαγών επιθηλιακού σε μεσεγχυματικό τύπο στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα στη λοίμωξη από *H. pylori*. Το φαινόμενο μελετήθηκε μετά από *in vitro* πειραματική μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυτταρικών σειρών με γενετικά τροποποιημένα στελέχη *H. pylori*, που εξέφραζαν CagA πρωτεΐνη με μεταβλητό αριθμό μοτίβων EPIYA και των αντίστοιχων μη φωσφορυλιώσιμων μεταλλαγμένων μορφών τους (EPIFA). Τα στελέχη αυτά κατασκευάστηκαν μετά από γενετική τροποποίηση του στελέχους αναφοράς *H. pylori* P12. Αρχικά κλωνοποιήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CagA σε καταλλήλους πλασμιδιακούς φορείς και δημιουργήθηκαν οι μεταλλαγμένες μη φωσφορυλιώσιμες μορφές της. Κατόπιν έγινε μετασχηματισμός του στελέχους αναφοράς με τους παραπάνω πλασμιδιακούς φορείς για την παραγωγή των νέων ισογονιδιακών στελεχών με μεταβλητό αριθμό μοτίβων EPIYA (P12AB, P12ABC, P12ABCC, P12ABCCC) και των αντίστοιχων μη φωσφορυλιώσιμων μεταλλαγμένων μορφών τους (P12ABF, P12ABFF, P12ABFFF). Για περαιτέρω μελέτες αναφορικά με τον χωροταξικό εντοπισμό της πρωτεΐνης CagA χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία φθορισμού FAsH [502]. Συγκεκριμένα, η CagA εκφράστηκε σε σύνδεση με ένα έξα-πεπτίδιο Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys τετρακυστεΐνης το οποίο μπορεί να επάγει φθορισμό της δι-αρσενικής οργανομεταλλικής ουσίας FAsH, επιτρέποντας τον εντοπισμό της CagA, με συνεστιακή μικροσκοπία αλλά και μικροσκοπία πραγματικού χρόνου.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

2.1.1. Καλλιέργεια στελεχών *H. pylori*

Η καλλιέργεια των στελεχών *H. pylori* που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη, πραγματοποιήθηκε σε στερεό θρεπτικό Columbia Blood Agar Base (CBA) (Oxoid) εμπλουτισμένο με 7% αίμα αλόγου και 1% Vitox (Oxoid), παρουσία αντιβιοτικών: 10 µg/ml βανκομυκίνη, 10 µg/ml τριμεθοπρίμη, 10⁴ IU/liter πολυμυξίνη Β, 2 µg/ml αμφοτερινίνη Β, 10 µg/ml ναλιδιξικό οξύ, 30 µg/ml βασιτρασίνη, 5 µg/ml φθοροκυτοσίνη (όλα προμηθευόμενά από Sigma). Αναλυτικά, τα τρυβλία με το παραπάνω θρεπτικό υπόστρωμα (CBA πλήρες) τα οποία φυλάσσονταν στους 4°C, τοποθετούνταν σε κλίβανο θερμοκρασίας 65°C για 20 min με ελαφρά ανασηκωμένα τα καπάκια, έτσι ώστε να εξατμιστεί η τυχόν υγρασία που περιείχαν. Κατόπιν γινόταν ενοφθαλμισμός 150 µl διαλύματος βακτηρίου που μόλις είχε αποψυχθεί από τους -80 °C. Οι βακτηριακές καλλιέργειες στην συνέχεια τοποθετούνταν μέσα σε ειδικά επωαστικά δοχεία, παρουσία καταλύτη ανάπτυξης μικροαερόφιλων συνθηκών (90% N₂, 5% CO₂, 5% O₂) (Campygen, Oxoid) και επωάζονταν σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας στους 37 °C για 24 ή 48 ώρες.

2.1.2. Απομόνωση κλινικών στελεχών *H. pylori* από γαστρικές βιοψίες.

Βιοπτικό υλικό που είχε συλλεχθεί ενδοσκοπικά από το στομάχι ασθενών (άντρο, σώμα ή αμφότερα) μεταφερόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, εντός 2-4 ωρών στο εργαστήριο από τις συνεργαζόμενες Γαστρεντερολογικές κλινικές των Νοσοκομείων Ευαγγελισμός και Αλεξάνδρα, μέσα σε αποστειρωμένο διάλυμα μεταφοράς θειογλυκολικού οξέος (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) περιεκτικότητας 29,5 gr/L. Ακολουθούσε μερική λύση του ιστού και αποκόλληση των βακτηρίων με ισχυρή ανάδευση, παρουσία αποστειρωμένων γυάλινων σφαιριδίων. Ακολούθως, 180µl εναιωρήματος επιστρωνόταν σε τρυβλίο (CBA πλήρες) για καλλιέργεια *H. pylori*, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Για κάθε δείγμα βιοψίας φυλάσσονταν δύο τρυβλία, τα οποία επωάζονταν έως εφτά ημέρες σε μικροαερόφιλες συνθήκες. Μετά τον μακροσκοπικό εντοπισμό αποικιών που έμοιαζαν με *H. pylori*, γινόταν ανά-καλλιέργεια και ενζυμική δοκιμασία ουρεάσης για επιβεβαίωση της υπάρξεως *H. pylori*. Όλα τα νέα στελέχη καταψύχονταν στους -80°C όπως περιγράφεται αναλυτικά στην §2.2.2.

2.1.3. Καλλιέργεια *E. coli*.

Η καλλιέργεια των *E. coli* πραγματοποιήθηκε σε στερεό ή υγρό θρεπτικό υλικό Luria Broth Lenox modification (Becton, Dickinson B.D.) παρουσία των ανάλογων με το πειραματικό πρωτόκολλο κατάλληλων αντιβιοτικών: (α) αμπικιλίνης (100 µg/ml), (β) καναμυκίνης (50 µg/ml) και (γ) χλωραμφαινικόλης (20 µg/ml). Για τις καλλιέργειες σε στερεό θρεπτικό υλικό, τα τρυβλία, τα οποία φυλάσσονταν στους 4°C, τοποθετήθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 65°C για 20 min με ελαφρά ανασηκωμένα τα καπάκια, έτσι ώστε να εξατμιστεί τυχόν υγρασία που περιείχαν. Στην συνέχεια, έγινε ενοφθαλμισμός διαλύματος βακτηρίου έως 200µl και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας στους 37 °C για 16 ώρες. Για τις υγρές καλλιέργειες, σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 50 ml χρησιμοποιήθηκαν 5ml υγρού θρεπτικού LB και εν συνεχεία έγινε εμβολιασμός με 10 µl διαλύματος βακτηρίου που μόλις είχε αποψυχθεί από τους -80 °C. Στη συνέχεια, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας στους 37 °C, υπό σταθερή ανάδευση (200 rpm) για 16 ώρες.

2.1.4. Καλλιέργειες κυτταριών σειρών ευκαρυωτικών κυττάρων.

Οι κυτταριές σειρές των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων AGS και MKN45 πραγματοποιήθηκαν με θρεπτικό υλικό RPMI 1640 Glutamax I (Gibco) και των εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικών (Mouse embryonic fibroblast, MEF) σε D-MEM με γλουταμίνη, εμπλουτισμένα με 10% βόειο ορό (Gibco) παρουσία αντιβιοτικών (πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης 1% της Gibco) στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα CO₂ περιεκτικότητας 5%. Ειδικότερα, οι καλλιέργειες πραγματοποιούνταν σε φλάσκες των 75 cm² έως ότου τα κύτταρα να καλύψουν το 90% της επιφάνειας καλλιέργειας. Για την επανα-καλλιέργεια τους, τα προσκολλημένα κύτταρα ξεπλένονταν με 5ml PBS (Gibco) και χρησιμοποιούνταν 2 ml τρυψίνης περιεκτικότητας 0.05% (Gibco), για να αποκολληθούν από την πλαστική επιφάνεια. Κατόπιν τα κύτταρα μεταφέρονταν σε νέες φλάσκες με θρεπτικό υλικό και ορό σε συνολικό όγκο 20ml, σε αραιώσεις σύμφωνες με τις οδηγίες της ATCC για την κάθε κυτταρική σειρά.

2.2. ΚΡΥΟ-ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

2.2.1. Κρύο-συντήρηση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών

Η συντήρηση των ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών πραγματοποιείται σε βαθιά κατάψυξη. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα αποκολλιούνταν από το πλαστικό υπόστρωμα της φλάσκας επιφάνειας 75 cm² με την διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω. Κατόπιν, τα κύτταρα αραιώνονταν σε τελική συγκέντρωση 4x10⁶ κύτταρα/ml σε θρεπτικό υλικό RPMI, περιεκτικότητας 20% σε ορό και 5% σε DMSO. Το συνολικό εναιώρημα διαμοιραζόταν ανά 1.8 ml σε αμπούλες κρύο-συντήρησης (cryotubes) της εταιρίας NUNC. Η διαδικασία της κατάψυξης πραγματοποιούνταν εντός 24h στους -80 °C, με την χρήση ειδικών δοχείων που επέτρεπαν την αργή και σταδιακή ψύξη των κυττάρων και στην συνέχεια ακολουθούσε η τοποθέτηση τους στη βαθιά κατάψυξη σε δοχεία υγρού αζώτου στους -180°C.

2.2.2. Κρύο-συντήρηση στελεχών *H. pylori*

Η φύλαξη των στελεχών *H. pylori* με κατάψυξη στους -80°C πραγματοποιείται σε αμπούλες κρύο-συντήρησης σε θρεπτικό υλικό Brain Heart Infusion Broth (BHIB), παρουσία 20% γλυκερόλης. Το σύνολο της βιομάζας ενός τρυβλίου εικοσιτετράωρης καλλιέργειας επαναιωρείτο σε BHIB με γλυκερόλη και κατόπιν διαμοιραζόταν ανά 1,8 ml σε αμπούλες κρύο-συντήρησης.

2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.3.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA βακτηρίων

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA έγινε με το DNeasy Blood & Tissue kit της Qiagene. Εν συντομία, η βιομάζα μισής εικοσιτετράωρης καλλιέργειας επαναιωρείτο σε 1ml PBS. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση των βακτηρίων στις 13,000rpm για 1min και πλύση τους με 1ml PBS (x2 φορές), καταβύθισή τους πάλι με τις ίδιες συνθήκες φυγοκέντρησης, επαναιώρηση σε 200μl διαλύματος κυτταρικής λύσης ATL του kit, το οποίο περιείχε 20μl πρωτεϊνάση K και επώαση κατά την διάρκεια της νύχτας στους 56 °C. Την επόμενη ημέρα προθέτονταν 200 μl AL

διαλύματος του κιτ και 200μl απόλυτης αιθανόλης για την καταβύθιση του DNA. Ο συνολικός όγκος των 600μl τοποθετείται σε μια στήλη πυριτίου και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 8.000rpm, προκειμένου το DNA να προσκολληθεί στη στήλη. Ακολουθούσαν πλύσεις του DNA με 500μl διαλύματος AW1 και με 500μl διαλύματος AW2. Η τελική έκλουση του γονιδιωματικού DNA πραγματοποιείται σε 200μl διαλύματος AE (10 mM TrisHCl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0).

2.3.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας

Η απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA (έως 20 μg) από βακτηριακές καλλιέργειες *E. coli* γινόταν με χρήση του QIAprep Miniprep kit της Qiagene. Περιληπτικά, βιομάζα από δεκαεξάωρες βακτηριακές καλλιέργειες όγκου 5 ml, καταβυθιζόταν με φυγοκέντρηση για 3min σε 13.000 rpm, επαναιωρείτο σε 250μl διαλύματος P1, και ακολουθούσε προσθήκη 250μl διαλύματος P2 και 350μl διαλύματος N3, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η λύση των βακτηριακών μεμβρανών. Κατόπιν φυγοκέντρησης για 10min σε 13.000 rpm, ακολουθούσε η μεταφορά του υπερκλειμένου σε μια στήλη πυριτίου και προσκόλληση του DNA σε αυτή μετά από φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm, και έκπλυση με 750μl διαλύματος PE. Τέλος, η τελική έκλουση του DNA πραγματοποιείται σε 200 μl διαλύματος EB (10 mM TrisHCl, pH 8,5).

2.3.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας

Η απομόνωση μεγάλης κλίμακας πλασμιδιακού DNA (έως 100μg) γινόταν με τη χρήση QIAfilter Plasmid Midi kit της Qiagene. Εν συντομία, βακτήρια από δεκαεξάωρες καλλιέργειες *E. coli* συνολικού όγκου 25ml, συλλέγονταν με φυγοκέντρηση σε 6000xg για 15 min στους 4 °C, και επαναιωρούντο σε 4 ml διαλύματος P1. Ακολουθούσε προσθήκη 4ml διαλύματος P2 και 350μl διαλύματος N3, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η λύση των βακτηριακών μεμβρανών. Στην συνέχεια, γινόταν διαχωρισμός του διαλύματος από το ίζημα μέσω φιλτραρίσματος και μεταφορά του υπερκλειμένου σε μια στήλη πυριτίου, προκειμένου το πλασμιδιακό DNA να προσκολληθεί στη στήλη. Ακολουθούσαν δύο πλύσεις με 10ml διαλύματος QC. Κατόπιν, γινόταν έκλουση του πλασμιδιακού DNA σε 5ml διαλύματος QF και ακολούθως καταβύθιση του DNA με την προσθήκη 3.5ml απόλυτης ισοπροπανόλης και φυγοκέντρηση σε 15,000xg για

30min στους 4°C. Η τελική επαναδιαλυτοποίηση του DNA γινόταν σε 1ml AE (10 mM TrisHCl, pH 8,5).

2.3.4. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Για την απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης για κατασκευαστικούς λόγους, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System. Εν συντομία, η μέθοδος περιελάμβανε την αποκοπή της ζώνης DNA από πήκτωμα αγαρόζης, με χρήση αποστειρωμένης λεπίδας, ζύγιση του και προσθήκη 10 μl εμπορικού διαλύματος Membrane Binding Solution για κάθε 10 mg πηκτώματος. Ακολουθούσε επώαση στους 50–65 °C μέχρι την πλήρη διάλυση όλων των στερεών υπολειμμάτων. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείτο σε μια στήλη πυριτίου και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm, προκειμένου το DNA να προσκολληθεί στη στήλη. Ακολουθούσαν πλύσεις του DNA με 700 μl εμπορικού διαλύματος (Membrane Wash Solution) και κατόπιν με 500 μl εμπορικού διαλύματος AW2 (Membrane Wash Solution). Η τελική έκλυση του DNA πραγματοποιείτο σε 40 μl απιονισμένου νερού.

Εναλλακτικά, για την απομόνωση ζώνης DNA από πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (Low melting Agarose), μετά τη ζύγιση του, ακολουθούσε προσθήκη 50μl εμπορικού διαλύματος LMT (20mM Tris-HCl pH8,0, 1mM EDTA pH8,0) για κάθε 10mg πηκτώματος αγαρόζης και επώαση στους 65°C, μέχρι την πλήρη διάλυση του πηκτώματος. Στη συνέχεια, το διάλυμα αφηρόταν να φθάσει σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούσε απομόνωση του DNA από την υδατική στοιβάδα με διαδοχική διαδικασία εκχύλισης με προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης, φαινόλης : χλωροφόρμιου (1:1) και τελικά χλωροφόρμιου. Ο διαχωρισμός υδατικής και της εκάστοτε οργανικής στοιβάδας γινόταν με φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm. Κατόπιν, ακολουθούσε καταβύθιση του DNA με προσθήκη 0,2 όγκων 10M οξικού αμμωνίου και 2 όγκων απόλυτης παγωμένης αιθανόλης και επώαση του διαλύματος για 10 min στους -20°C. Ακολουθούσε καταβύθιση με φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 20 min στους 4 °C, απόρριψη της αιθανόλης, δύο πλύσεις του καταβυθισμένου DNA με 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 20 min στους 4 °C, στέγνωμα του DNA στους 37 °C για 1 ώρα και τελική επαναδιάλυση σε 40 μl TE.

2.3.5. Απομόνωση ολικού RNA από γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα

Η απομόνωση ολικού RNA έγινε με το RNeasy Mini kit της Qiagene. Περιληπτικά, γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα πληθυσμού μικρότερου από 5×10^6 λύνονταν με την προσθήκη 350μl εμπορικού διαλύματος κυτταρικής λύσης RTL, και κατόπιν ομογενοποίησης προστίθεντο 350μl αιθανόλης περιεκτικότητας 70%. Το σύνολο του όγκου (700μl) διοχετευόταν σε στήλη πυριτίου και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 8.000rpm, προκειμένου το RNA να προσκολληθεί στη στήλη. Ακολουθούσε πλύση του RNA με 350μl εμπορικού διαλύματος RW1, επώαση για 15min με 80μl DNase της Qiagene, προκειμένου να αποφευχθούν επιμολύνσεις από γονιδιωματικό DNA, και τελικές εκπλύσεις με 350μl εμπορικού διαλύματος RW1 και 500μl RPE. Η τελική έκλουση του RNA γινόταν σε 40μl νερού το οποίο είχε υποστεί διαδικασία επεξεργασίας με DEPC.

2.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΛΥΣΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

2.4.1. Προσδιορισμός των θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA στη πρωτεΐνη CagA

Ο προσδιορισμός του αριθμού και του τύπου των θέσεων EPIYA στην CagA έγινε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *cagA2530S* και *cagA3000AS* (Πίνακας 2) όπως περιγράφηκε στην εν λόγω δημοσίευση της μεθόδου [134]. Συνοπτικά, η αντίδραση διεξαγόταν σε διάλυμα αντίδρασης που περιείχε 10 mM Tris, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl, 0.01 % gelatin, 1U Taq πολυμεράση (Fermentas), 200μM Δεόξυ-τριφωσφονουκλεοτίδια, 0.5μM εκκινητών και 50ng από το μικροβιακό γονιδιωματικό DNA. Η διαδικασία της PCR αποτελούνταν από ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης του DNA στους 94°C για 5min, ακολουθούμενο από 35 διαδοχικούς κύκλους αποδιάταξης στους 94°C για 30sec, ειδικού υβριδισμού στους 50°C για 40sec και επιμήκυνσης της αλυσίδας στους 72°C για 45sec, ακολουθούμενες από τελικό βήμα επιμήκυνσης στους 72°C για 7min.

2.4.2. Χαρακτηριστικά εκκινητών για την δημιουργία του μέγα-εκκινητή μεταλλαξιγένεσης.

Σχεδιάστηκαν συνολικά πέντε εκκινητές για την δημιουργία του μέγα-εκκινητή της μεταλλαξιγένεσης, τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω, ενώ οι αλληλουχίες αποτυπώνονται στον Πίνακα 6.

- Ο εκκινητής F1 είχε αλληλουχία ομόλογη με την αρχή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που κωδικοποιεί την συνολική επαναλαμβανόμενη περιοχή EPIYA-C και δεν διέθετε επιπλέον θέσεις περιοριστικών ενζύμων.
- Ο εκκινητής R1, η αλληλουχία του οποίου ήταν ομόλογη με το τέλος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που κωδικοποιεί την συνολική επαναλαμβανόμενη περιοχή του EPIYA-C, περιλάμβανε επιπλέον τις πέντε πρώτες βάσεις από την αλληλουχία που κωδικοποιεί το επόμενο EPIYA-C, προκειμένου να δημιουργηθεί μία θέση περιορισμού *SmaI* και στον οποίον επιπλέον είχε συμπεριληφθεί κατάντη αλληλουχία αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου *XbaI*.
- Ο εκκινητής F2 είχε αλληλουχία ομόλογη με την περιοχή, η οποία ξεκινά πέντε νουκλεοτίδια μετά από την αρχή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που κωδικοποιεί την περιοχή EPIYA-C και δεν διέθετε επιπλέον θέσεις περιοριστικών ενζύμων.
- Ο εκκινητής R2 είχε αλληλουχία ομόλογη με την περιοχή του γονιδίου *cagA*, η οποία εκτείνεται για 140 bp μετά το τέλος του EPIYA-C και κωδικοποιούσε μια θέση περιορισμού για το περιοριστικό ένζυμο *XbaI*.
- Τέλος, ο εκκινητής R3 ήταν ακριβώς ίδιος με τον R2 με την μόνη διαφορά ότι δεν διέθετε θέση περιορισμού.

2.4.3. Κατασκευή του μέγα-εκκινητή της μεταλλαξιγένεσης

Για τον πολλαπλασιασμό με PCR των αντίστοιχων τμημάτων DNA που απαιτούνταν για την κατασκευή του μέγα-εκκινητή της μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιήθηκαν 25 μ l διαλύματος αντίδρασης, τα οποία περιείχαν 0.5U Vent DNA πολυμεράση (NEB) 0,5 μ M των αντίστοιχων εκκινητών F1, F2, R1, R2 και R3, 1 μ l DNA, 200 μ M δεόξυ-τριφωσφονουκλεοτίδια (Fermentas), 20 mM Tris-HCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 0,1 % Triton X-100, pH 8,8 και 50ng DNA. Η διαδικασία πολλαπλασιασμού αποτελούνταν από ένα αρχικό

βήμα αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 5min, ακολουθούμενο από 35 διαδοχικούς κύκλους αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, ειδικού υβριδισμού στους 53°C για 30sec και επιμήκυνσης στους 75°C για 30sec και ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης στους 75°C για 7min.

2.4.4. Ανάπτυξη μεθόδου PCR για τον πολλαπλασιασμό του συνόλου του γονιδίου *cagA*

Για τον πιστό πολλαπλασιασμό του συνόλου του γονιδίου *cagA* χρησιμοποιήθηκε η υψηλής πιστότητας DNA πολυμεράση Vent (New England Biolabs) και σχεδιάστηκαν εκκινητές βάσει της δημοσιευμένης αλληλουχίας του γονιδίου *cagA* του πρότυπου στελέχους *H. pylori* 26695. Κατά τον σχεδιασμό του πρόσθιου εκκινητή *cagAKpnI* (Πίνακας 2), συμπεριελήφθη θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *KpnI* και προσθήκη αλληλουχίας Kozak ενώ στον αντίστροφο εκκινητή *cagAraI* προβλέφθηκε η ύπαρξη θέσης αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου *AraI*, προσθήκη κωδικονίου, με το οποίο παραβλέπετε το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης και προσθήκη δύο επιπλέον νουκλεοτιδίων, ούτως ώστε στο καρβόξυ-τελικό άκρο της εκφραζόμενης πρωτεΐνης CagA να προστεθεί το ειδικό πεπτίδιο σήμανσης πρωτεϊνών *c-myc* προερχόμενο από τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pcDNA3.1/Myc-His B (Πίνακας 6). Επίσης, για τον πολλαπλασιασμό ολοκλήρου του γονιδίου *cagA*, χωρίς την προσθήκη αλληλουχιών αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, χρησιμοποιήθηκε δημοσιευμένο ζευγάρι εκκινητών [503]. Η αντίδραση της PCR περιείχε 20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 8 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0,5U Vent polymerase, 200 μM δεόξυ-τριφωσφονουκλεοτιδία, 0,5 μM εκκινητών και 10 ng DNA. Αποσκοπώντας σε ελαχιστοποίηση των παραπροϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών αναφορικά με τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (50-70°C), την συγκέντρωση MgSO₄ (2, 4, 6 και 8 mM) και εκκινητών (100-1000μM) με χρήση του κυκλοποιητή Mastercycler Gradient (Eppendorf). Οι συνθήκες, κάτω από τις οποίες έγινε ο τελικός πολλαπλασιασμός του επιθυμητού τμήματος ήταν 35 διαδοχικοί κύκλοι αποδιάταξης των 10sec στους 96°C, ειδικού υβριδισμού για 10sec στους 59°C και επιμήκυνσης για 4min στους 72°C με μία τελική επιμήκυνση του προϊόντος για 7min στους 72°C. Για τον πιστό πολλαπλασιασμό του συνόλου του γονιδίου *cagA* χρησιμοποιήθηκε η υψηλής πιστότητας DNA πολυμεράση Vent (New England Biolabs).

2.4.5. Αντίστροφη μεταγραφή RNA σε DNA

Για την αντίστροφη μεταγραφή RNA σε DNA χρησιμοποιήθηκαν 50 μ l διαλύματος αντίδρασης, τα οποία περιείχαν 20 mM Tris (pH 8,4), 50 mM KCl, 3,75 mM MgCl₂, 500 μ M δεόξυ-τριφωσφονουκλεοτιδία, 0,4 μ M εξαμερείς εκκινητές τυχαίου υβριδισμού (Invitrogen, Life Technologies), 80 U RNaseOUT ανασυνδυασμένου αναστολέα της ριβονουκλεάσης (Invitrogen, Life Technologies) και 22,2 μ l RNA. Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής αποτελούνταν από μια επώαση στους 25°C για 10min, ακολουθούμενη από μια επώαση στους 37°C για 60 δευτερόλεπτα και μια τελική επώαση στους 95°C για 5 λεπτά.

2.4.6. Ποσοτική αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR)

Η ποσοτική αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Agilent Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies). Χρησιμοποιήθηκαν 25 μ l διαλύματος αντίδρασης, τα οποία περιείχαν Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Invitrogen, Life Technologies) 0,5 μ M εκκινητές και 5 μ l cDNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, έχουν στο παρελθόν περιγραφεί στην βιβλιογραφία τόσο για το ανθρώπινο γονίδιο της Ιντερλευκίνης-8 (IL-8) [480], όσο και για το γονίδιο της GAPDH [504]. Οι κύκλοι πολλαπλασιασμού αποτελούνταν από ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης του DNA στους 95 °C για 10min, ακολουθούμενο από 40 διαδοχικούς κύκλους αποδιάταξης στους 95 °C για 30 sec, ειδικού υβριδισμού στους 60 °C για 30 sec και επιμήκυνσης στους 72 °C για 30 sec. Μετά τον πολλαπλασιασμό ακολούθησε η μέτρηση της καμπύλης τήξης, αποτελούμενη από 95 °C για 1 min, ψύξη στους 55 °C για 30 sec και τελικά μια αργή άνοδος της θερμοκρασίας στους 95 °C με συνεχή μέτρηση του φθορισμού.

2.5. Κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς

2.5.1. Πέψη πλασμιδίων και τμημάτων DNA

Η πέψη των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης και των ενθεμάτων με το περιοριστικό ένζυμο *KpnI* (10Units) έγινε στους 37°C για 1 ώρα σε διάλυμα 10 mM Bis-Tris-Propane-HCl,

10 mM MgCl₂, 1mM διθειοθρεϊτόλης, pH 7,0 στους 25⁰C (New England Biolabs) και η πέψη με ApaI (50Units) στους 25⁰C για 1 ώρα, σε διάλυμα 20 mM οξικού-Tris, 50 mM οξικού καλίου, 10 mM οξικού μαγνησίου, 1 mM διθειοθρεϊτόλης, pH 7,9 (New England Biolabs). Όπου απαιτήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο SmaI (10U), αυτή πραγματοποιήθηκε στους 25 °C για 1 ώρα, σε διάλυμα 33 mM οξικού-Tris, 66 mM οξικού καλίου, 10 mM οξικού μαγνησίου, 0,5 mM διθειοθρεϊτόλης, pH 7,9 (Roche) ενώ η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο SmaI (10U) έγινε στους 37 °C για μία ώρα, σε διάλυμα 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml βόειας αλβουμίνης του ορού pH 7,5 (Fermentas).

2.5.2. Πλήρωση κολλωδών άκρων και αποφωσφυλίωση άκρων DNA

Η πλήρωση των κολλωδών άκρων έγινε με χρήση της DNA πολυμεράσης I (Klenow) (5U) στους 25 °C για μισή ώρα, σε διάλυμα 200 μM δεόξυ-τριφωσφονουκλεοτιδίων, 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM διθειοθρεϊτόλης, pH 7,9 (New England Biolabs). Για την αποφωσφυλίωση των ακραίων ολιγονουκλεοτιδίων πραγματοποιήθηκε επώαση με το ένζυμο φωσφατάση της Ανταρκτηκής (5U) στους 25 °C για μισή ώρα, σε διάλυμα 50 mM διυδροχλωρικού-προπανο-Tris, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, pH 6,0 (New England Biolabs).

2.5.3. Δεσμοποίηση τμημάτων DNA

Η αντίδραση σύνδεσης πλασμιδιακού φορέα και ένθεση παρουσία κολλωδών άκρων έγινε με προσθήκη τους σε αναλογία 1:1 (30 fmoles έκαστο), η δε σύνδεσή τους παρουσία τυφλών άκρων με προσθήκη πλασμιδιακού φορέα και ένθεσης σε αναλογία 1:6 (30 fmoles και 180 fmoles αντίστοιχα), σε διάλυμα 400 Units λιγάσης (NEB), 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM διθειοθρεϊτόλης, pH 7,5 (New England Biolabs). Ο υπολογισμός των moles DNA βασίστηκε στον τύπο:

$$\mu\text{g DNA} = \text{fmoles DNA} \times (1 \mu\text{g}/3000 \text{ fmol}) \times (\text{μέγεθος DNA σε bp}/1000 \text{ bp}).$$

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης DNA των ενθεμάτων και των πλασμιδιακών φορέων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση της έντασης των ζωνών των καθαρισμένων προϊόντων στο ηλεκτροφόρημα με το ειδικό λογισμικό ανάλυσης εικόνων Quantity One (BIO-RAD). Η αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη όλων των τμημάτων DNA σε νερό,

επώαση στους 45°C για πέντε λεπτά, ψύξη σε πάγο, προσθήκη του διαλύματος λιγάσης και επώαση στους 16°C για δεκαέξι ώρες.

2.5.4. Κατασκευή επιδεικτικών κυττάρων *E. coli*

Το κατάλληλο στέλεχος *E. coli* (DH5a, JM110, BL21(DE3)pLysS) προς ανάπτυξη ενοφθαλμιζόταν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό LB και αφηνόταν να αναπτυχθεί για 16 ώρες, δύο ημέρες πριν από την ημέρα του πειράματος. Αρχικά, μια αποικία επωζόταν σε 5ml υγρού θρεπτικού υλικού LB σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 50ml, οι οποίοι τοποθετούνταν σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας στους 37 °C υπό σταθερή ανάδευση 200 rpm για 16 ώρες. Στην συνέχεια, 2,5 ml από την παραπάνω υγρή καλλιέργεια εμβολιάζονταν σε 250 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB σε κωνική φιάλη του 1L. Ακολουθούσαν μετρήσεις θολερότητας της καλλιέργειας με δείγματα ανά τακτά διαστήματα 1 ώρας, σε μήκος κύματος 600nm έως ότου η θολερότητα να φτάσει στα 0,500. Εν συνεχεία όλος ο όγκος της καλλιέργειας φυγοκεντρείτο στις 5.000 rpm για 10 min στους 4 °C, γινόταν απόρριψη του υπερκειμένου και διαδοχική επαναιώρηση του βακτηριακού ιζήματος σε 250ml χλωριούχου ασβεστίου 0,1M, φυγοκέντρηση στις 5.000 rpm για 10min στους 4°C, επαναιώρηση του βακτηριακού ιζήματος σε 250ml χλωριούχου ασβεστίου 0,1M και επώαση στους 4°C για 3h. Κατόπιν ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 5.000rpm για 10min στους 4°C, επαναιώρηση της βακτηριακής βιομάζας σε 10ml 0.1M χλωριούχου ασβεστίου με 14% γλυκερόλη. Για την τελική φύλαξη γινόταν διαμοιρασμός 200 μl του βακτηριακού αιωρήματος σε αμπούλες κρύο-συντήρησης και κατάψυξη στους -80 °C. Μετά την πάροδο 4 ημερών, γινόταν έλεγχος της επιδεικτικότητας των βακτηρίων για μετασχηματισμό χρησιμοποιώντας 10 pg pUC19 για κάθε 50 μl *E. coli*, όπως περιγράφεται παρακάτω (§ 2.5.5), μέτρηση των αποικιών και υπολογισμός της απόδοσης του μετασχηματισμού (Transformation Efficiency TE) χρησιμοποιώντας τον τύπο: TE = αποικίες *E. coli* ανά μg pUC19. Σε κάθε περίπτωση η απόδοση δεν ήταν μικρότερη των 10⁶ cfu/μg.

2.5.5. Μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων *E. coli*

Τα κλωνοποιημένα ενθέματα χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* DH5a και BL21 (DE3) pLysS. Τα βακτηριακά στελέχη

κατέστησαν επιδεικτικά μετασχηματισμού μετά από χημική κατεργασία με CaCl_2 . Για την αντίδραση μετασχηματισμού τα βακτηριακά κύτταρα επωάστηκαν αρχικά με το κατάλληλο κλωνοποιημένο ένθεση σε πάγο για 30 min και ακολούθησε θερμικό σοκ στους 42°C για 45 sec, προσθήκη υγρού θρεπτικού LB, Lennox και επώαση των υγρών καλλιέργειών για 1 h στους 37°C υπό ανάδευση. Εν συνεχεία, οι βακτηριακές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό στερεού θρεπτικού LB Agar, Lennox με κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής, παρουσία 5-βρώμο-4-χλώρο-3-indolyl β -D-γαλακτοζίτη (X-gal), στην περίπτωση πλασμιδιακών φορέων που φέρουν το πεπτίδιο α του τμήματος *lacZa* του γονιδίου *lacZ* στη θέση κλωνοποίησης. Ως αντιβιοτικά επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* χρησιμοποιήθηκαν: (α) αμπικιλίνη (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), (β) καναμυκίνη (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) και (γ) χλωραμφενικόλη (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), μόνα ή σε συνδυασμό. Οι καλλιέργειες αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 24 h στους 37°C και ακολούθησε συλλογή των μετασχηματισμένων αποικιών.

2.5.6. Σάρωση με PCR για την ανίχνευση κλώνων που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

Ο εντοπισμός των κλώνων *E. coli* που περιείχαν στο πλασμίδιο τους το ένθεση, γινόταν με εξέταση 16 έως 24 αποικιών *E. coli*. Αναλυτικά, τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό LB χωρίζονταν σε 8 πεδία και σε καθένα από αυτά ανακαλλιεργούνταν με κρίκο μιας χρήσεως μια αποικία. Κατόπιν ο κρίκος βυθιζόταν σε έτοιμο διάλυμα αντίδρασης PCR. Το διάλυμα PCR περιείχε ειδικούς για την περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης. Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν 25 μl διαλύματος της αντίδρασης, τα οποία περιείχαν 10 mM Tris, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 0.01% ζελατίνη, 2,5 U Taq DNA πολυμεράση, 200 μM δεόξυ-τριφωσφορουκλεοτίδια, 0,5 μM ειδικών. Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού αποτελούνταν από ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης του DNA στους 94°C για 5 min, ακολουθούμενο από 35 διαδοχικούς κύκλους αποδιάταξης στους 94°C για 30 sec, ειδικού υβριδισμού 50°C για 30 sec και επιμήκυνσης στους 72°C για 30 sec και από ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης στους 72°C για 7 min.

2.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗΣ

2.6.1. Αντίδραση μεταλλαξιγένεσης για την προσθήκη ή την αφαίρεση EPIYA-C θέσεων

Προκειμένου να προσθέσουμε ή να αφαιρέσουμε μοτίβα EPIYA-C στο *cagA* χρησιμοποιήθηκε το QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. Ένας μέγα-εκινητής κατασκευάστηκε, όπως περιγράφεται αναλυτικά στα αποτελέσματα (§3.2.2.2) [500]. Κατόπιν, ο μέγα-εκινητής απομονώθηκε από πηκτωμα αραρόζης, όπως περιγράφεται παραπάνω (§2.3.4). Η αντίδραση μεταλλαξιγένεσης είχε συνολικό όγκο 50 μ l και περιείχε 250 ng από το πλασμίδιο pCA2, 75 ng μέγα-εκινητή, 200 μ M δεόξυ-τριφωσφονουκλεοτίδια (Fermentas), 2.5 U *Pfu* DNA πολυμεράση, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100, 0,5 mg/ml BSA. Οι κύκλοι πολλαπλασιασμού αποτελούνταν από ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης του DNA στους 95 °C για 30 sec ακολουθούμενο από 18 κύκλους στους 95 °C για 30 sec, 55 °C για 1 min και 68 °C για 8 min. Στην συνέχεια 10 U από το περιοριστικό ένζυμο *DpnI* προστέθηκε στην αντίδραση και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 3 h. 10 μ l από την αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκαν, για να μετασχηματίσει επιδεικτικά κύτταρα DH5a *E.coli*. Κατόπιν 24 κλώνοι εξετάστηκαν με PCR για τον προσδιορισμό των θέσεων φωσφορύλιωσης EPIYA του *cagA*, όπως περιγράφεται παραπάνω (§2.4.1) [134].

2.6.2. Αντίδραση μεταλλαξιγένεσης για σημειακές μεταλλάξεις νουκλεοτιδίου

Για την κατευθυνόμενη σημειακή μεταλλαξιγένεση χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό προϊόν QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές μεταλλαξιγένεσης σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Η αντίδραση έγινε σε συνολικό όγκο 50 μ l και περιείχε 250 ng από το πλασμίδιο pCA2, 75 ng μέγα-εκινητή, 200 μ M δεόξυ-τριφωσφονουκλεοτίδια (Fermentas), 2,5 U πολυμεράσης *Pfu*, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100, 0,5 mg/ml BSA. Οι κύκλοι πολλαπλασιασμού αποτελούνταν από ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης του DNA στους 95 °C για 30 sec ακολουθούμενο από 18 διαδοχικούς κύκλους αναδιάταξης στους 95 °C για 30 sec, ειδικού υβριδισμού στους 55 °C για 1 min και τελικής επιμήκυνσης στους 68 °C για 8 min. Στην συνέχεια 10 U από το περιοριστικό ένζυμο *DpnI* προστέθηκαν στην αντίδραση και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 3 h. Για τον

μετασχηματισμό, 10μl από την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν για να μετασχηματιστούν επιδεικτικά κύτταρα *E.coli* DH5a. Για την επιλογή των κατάλληλων κλώνων, εξετάστηκαν με PCR 24 κλώνοι από κάθε αντίδραση για τον προσδιορισμό των θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA του *ragA*, όπως περιγράφεται παραπάνω (§2.4.1) [134] και επακολούθησε προσδιορισμός της αλληλουχίας για την εξακρίβωση της πιστότητας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

2.6.3. Μετασχηματισμός φυσικά επιδεικτικών στελεχών *H. pylori*

Λόγω της ικανότητας των στελεχών *H. pylori* να προσλαμβάνουν DNA από το περιβάλλον χωρίς να απαιτείται η μετατροπή τους σε επιδεικτικά κύτταρα με μηχανικό τρόπο, ο μετασχηματισμός τους πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως, σε στερεό θρεπτικό υλικό CBA το οποίο ενοφθαλμίστηκε σε μικρές περιοχές εμβαδού περί το 1cm² με 24 ώρες καλλιέργειες *H. pylori*. Τα βακτήρια αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 4 h στους 37 °C υπό μικροαερόφιλες συνθήκες, ακολούθησε προσθήκη σε κάθε εμβόλιο 1,5 έως 2 μg DNA (ένθεση κλωνοποιημένη σε βακτηριακό φορέα) και τέλος επώαση στους 37 °C υπό μικροαερόφιλες συνθήκες για 24 h. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων με ανακαλλιέργεια των εμβολίων σε τρυβλία CBA παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού επιλογής (50 μg/ml καναμυκίνη ή/και 20 μg/ml χλωραμφαινικόλης) και επώασή τους μέχρι την εμφάνιση αποικιών στους 37 °C υπό μικροαερόφιλες συνθήκες.

2.7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

2.7.1. Μέθοδος προσδιορισμού νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Λόγω της αυξημένης ευαισθησίας που απαιτεί η αντίδραση ανάγνωσης αλληλουχίας, προηγήθηκε καθαρισμός όλων των προς ανάλυση τμημάτων DNA για την απομάκρυνση τυχόν αναστολέων, με κατάλληλα εμπορικά διαθέσιμα κιτ, ανάλογα με το είδος του προϊόντος. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν, για μεν τον καθαρισμό μονοσήμαντων τμημάτων DNA προερχόμενων από PCR το QIAquick PCR Purification Kit), για δε τμήματα DNA που αποκόπηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως, το MiniElute gel extraction Kit, ενώ για πλασμιδιακούς φορείς χρησιμοποιήθηκε το QIAprep Spin Miniprep Kit. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των τμημάτων DNA που αναλύθηκαν, έγινε είτε με

φωτομέτρηση στα 260 /280 nm, είτε με ανάλυση της έντασης των ζωνών ενδιαφέροντος στο ηλεκτροφόρημα με το ειδικό λογισμικό ανάλυσης εικόνων Quantity One. Η ανάγνωση αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το αυτοματοποιημένο σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης Genetic Analyzer CEQ 8000 (Beckman Coulter).

2.7.2. Σχεδιασμός εκκινητών για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *cagA*

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάγνωση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του συνόλου του γονιδίου *cagA*, σχεδιάστηκαν λαμβάνοντας υπόψη πλήρεις αλληλουχίες του γονιδίου δημοσιευμένες στη διεθνή βάση γενετικών δεδομένων GenBank. Οι αλληλουχίες προέρχονταν αφενός από κλινικά στελέχη *H. pylori* απομονωμένα από ασθενείς στην Ευρώπη και την Αμερική, δεδομένου ότι στελέχη που απαντούν σε Ασιατικούς πληθυσμούς διαφέρουν σημαντικά από τα Δυτικής προέλευσης στελέχη, και αφετέρου από τα πρότυπα στελέχη *H. pylori* 26695, J99 και HPAG1. Μετά από ευθυγράμμιση των αλληλουχιών εντοπίστηκαν οι διατηρημένες περιοχές και σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές, ούτως ώστε τα πολλαπλασιαζόμενα τμήματα του γονιδίου να αλληλεπικαλύπτονται. Βάσει των παραπάνω, για την ανάγνωση αλληλουχίας του γονιδίου *cagA* σχεδιάστηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές ScagA898F, ScagA1614F, ScagA2354F, ScagA3183F, ScagA787R, ScagA1533R, ScagA2410R, *cagA*3000AS.

2.8. *IN VITRO* ΜΟΛΥΝΣΗ ΓΑΣΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα (AGS, MKN-45) μολύνθηκαν με *H. pylori* σε MOI⁸⁷ 100. Αναλυτικά 4×10^5 κύτταρα διαμοιράστηκαν σε πιάτα των 6 κυψελίδων και αφέθηκαν να προσκολληθούν στην πλαστική επιφάνεια κατά την διάρκεια της νύχτας, όπως περιγράφεται παραπάνω (§2.1.3). Την επόμενη ημέρα και δύο ώρες πριν την μόλυνση, το υπερκείμενο απορρίφθηκε, τα κύτταρα πλύθηκαν με 1ml PBS, προστέθηκαν 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού (RPMI 1640, 10%FBS) χωρίς αντιβιοτικά και τα πιάτα μεταφέρθηκαν στον κλίβανο μέχρι τη χρήση τους (§2.1.3). Τα στελέχη *H. pylori* επαναιωρούνταν σε πλήρες θρεπτικό υλικό (RPMI 1640, 10% FBS) χωρίς αντιβιοτικά, σε συγκέντρωση περίπου 10^8 cfu/ml μέσω ρύθμισης της

⁸⁷ MOI: Multiplicity of Infection, ο λόγος του αριθμού των βακτηρίων προς τον αριθμό των κυττάρων

θολερότητας του βακτηριακού εναιωρήματος μετά από μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 600nm στα 0,740 και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37 °C υπό ανάδευση σε 200 rpm, προκειμένου να προσαρμοστούν στο νέο θρεπτικό υλικό. Βακτηριακό εναιώρημα όγκου 100 μl χρησιμοποιήθηκε, για κάθε κυψελίδα των πιάτων 6 κυψελίδων.

2.9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

2.9.1. Λύση κυττάρων

Η λύση των επιμολυσμένων γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων γινόταν αναλόγως της περιπτώσεως είτε σε συνθήκες πλήρως αποδιατακτικές για τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών είτε σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν, το πλήρως αποδιατακτικό διάλυμα RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH7.2, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 2 mM L-διθειοθρεϊτόλης) και το μη αποδιατακτικό διάλυμα NP-40 (50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH8.0, 1% NP-40, 2 mM L-DTI) παρουσία και στα δύο αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών (Πίνακας 5). Αναλυτικά, μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού ακολούθησε πλύση των κυττάρων με PBS (1 ml για πιάτο 6-κυψελίδων, 2 ml για φλάσκα των 25 cm² και 5 ml για φλάσκα των 75 cm²) και προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας διαλύματος λύσης (200 μl για πιάτο 6-κυψελίδων, 300μl για φλάσκα των 25cm² και 500μl για φλάσκα των 75cm²). Ακολούθησε αποκόλληση του συνόλου των κυττάρων με χρήση ειδικού πλαστικού αποξέστη (plastic scraper), μεταφορά σε καθαρό μικροσωλήνα, επώαση για 30 min πάνω σε πάγο, για την πλήρη λύση των κυττάρων, φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 30 min, προκειμένου να καθιζάνουν τα νουκλεϊνικά οξέα και τελική μεταφορά του υπερκειμένου σε νέους κενούς μικροσωλήνες για φύλαξη στους -20°C.

2.9.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης κυτταρολυμάτων χρησιμοποιήθηκε η εμπορική μέθοδος Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce). Συνοπτικά, σε πιάτο 96 κυψελίδων γίνονταν υποδιπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις δείγματος ολικής πρωτεΐνης σε απεσταγμένο νερό, μετά από αρχική αραιώση του δείγματος κατά 1:10. Μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων

του εμπορικού κιτ ακολουθούσε επώαση των δειγμάτων στους 37 °C για δύο ώρες και φωτομέτρηση τους σε φασματοφωτόμετρο ανάγνωσης πλακών 96-κυψελίδων στα 540nm. Σε κάθε προσδιορισμό για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιείτο πρότυπο δείγμα αλβουμίνης γνωστής συγκέντρωσης 2,0 mg/ml.

2.9.3. Μέθοδος ανοσοσύτωσης κατά Western

Ολική πρωτεΐνη προερχόμενη από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα ή ευκαρυωτικά κύτταρα που υπέστησαν μόλυνση, διαχωρίστηκε στις επιμέρους πρωτεΐνες με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) [505]. Ακολούθησε μεταφορά τους σε μεμβράνη PVDF και ανοσοεντόπιση με επώαση με πρωτοταγή αντισώματα (Πίνακας 4) και δευτεροταγή αντισώματα συνδεδεμένα με υπεροξειδάση του ραδικιού (Πίνακας 4). Οι υβριδισμένες πρωτεΐνες οπτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (enhanced chemiluminescence, ECL) και το παραγόμενο φθορίζον σήμα αποτυπώθηκε με την χρήση φιλμ ραδιογραφίας (Fuji RX films).

2.9.4. Μέθοδος ELISA για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της IL-8

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της εκκρινόμενης IL-8 στα υπερκείμενα γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων χρησιμοποιήσαμε το εμπορικά διαθέσιμο ELISA κιτ (eBioscience). Υπερκείμενα καλλιέργειας κυττάρων AGS μολυσμένων με στελέχη *H. pylori* σε αναλογία 1:100, συλλέχθηκαν σε επιλεγμένες χρονικές στιγμές και τα διάφορα στερεά κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της εταιρίας. Εν συντομία έγινε προσρόφηση του πρωτοταγούς αντισώματος (100 μl διαλύματος, 5 μg/ml σε PBS) σε ειδικά πιάτα ELISA 96-κυψελίδων υψηλής προσροφητικής ικανότητας, μετά από ολονύκτια επώαση. Την επόμενη ημέρα ακολούθησε πλύσιμο του πιάτου με 300 μl διαλύματος αντίδρασης (PBS και 0,05% v/v Tween 20) και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος αποκλεισμού μη-ειδικών αλληλεπιδράσεων (blocking buffer: PBS, 0,05% v/v Tween 20, 0,5% w/v BSA) για δύο ώρες. Ακολούθησε πλύση του πιάτου δύο φορές με 300 μl διαλύματος αντίδρασης και ακολούθησε επώαση με προσθήκη 50 μl διαλύματος αντίδρασης, 50 μl δείγματος και 50 μl διαλύματος βιοτίνης σε κάθε κυψελίδα για 2 ώρες. Μετά από πλύση του πιάτου δύο φορές με 300 μl διαλύματος αντίδρασης γινόταν προσθήκη 100 μl

διαλύματος στρεπταβιδίνης συνδεδεμένης με υπεροξειδάση του ραδιουίου σε αναλογία 1:10.000 σε διάλυμα αποκλεισμού μη-ειδικών αλληλεπιδράσεων, επώαση για μια ώρα και πλύση του πιάτου δύο φορές με 300 μl διαλύματος αντίδρασης. Η εμφάνιση γινόταν με προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος 100μl διαλύματος TMB (Pierce). Για τον τερματισμό της αντίδρασης χρησιμοποιείται ίση ποσότητα (100 μl) διαλύματος H₂SO₄ 2M. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γινόταν σε φασματοφωτόμετρο στα 450 nm.

2.9.5. Επαγωγή έκφρασης πρωτεϊνών από πλασμιαδικούς φορείς σε βακτήρια *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Για να πιστοποιηθεί κατά πόσον η κλωνοποιημένη ένθεση οδηγεί στην έκφραση λειτουργικής πρωτεΐνης CagA, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* BL21(DE3)pLysS με πλασμιαδικούς φορείς έκφρασης που φέρουν τον υποκινητή του γονιδίου 10 του βακτηριοφάγου T7 (T7 RNA Polymerase Promoter). Η επαγωγή έκφρασης της πρωτεΐνης CagA έγινε με προσθήκη 1 mM ισοπροπυλ-β-D-θειογαλακτοπυρανοσιδίου (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) σε υγρές καλλιέργειες βακτηρίων που βρισκόνταν σε εκθετική φάση ανάπτυξης (OD_{600nm} ≈ 0,5) και επώαση για 1 ώρα στους 37 °C υπό ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση μέρους της καλλιέργειας για 5 min στις 13.000 rpm και λύση των βακτηριακών κυττάρων (Laemmli buffer) για την εξαγωγή ολικής πρωτεΐνης.

2.9.6. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών

Η διαμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων AGS και HeLa (10⁶ κύτταρα) με τους κατάλληλους πλασμιαδικούς φορείς πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο κρυστάλλων φωσφορικού ασβεστίου. Προ της μόλυνσης το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με νέο θρεπτικό παρουσία 10 mM Hepes. Οι κρυστάλλοι φωσφορικού ασβεστίου δημιουργήθηκαν με προσθήκη 10μg DNA (πλασμιαδικός φορέας έκφρασης και DNA-μεταφορέας) και 67 mM CaCl₂ σε πολύ κρύο ρυθμιστικό διάλυμα (10,66 mM KCl, 0,88 mM H₂PO₄, 275,86 mM NaCl, 0,67 mM Na₂PO₄, 4 mM Hepes, pH 7,2). Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με τους κρυστάλλους για 4 ώρες, ωσμωτικό σοκ με διάλυμα γλυκερόλης για 1min (5,33 mM KCl, 0,44 mM H₂PO₄, 137,93 mM NaCl, 0,33 mM Na₂PO₄, 2 mM Hepes, 15% γλυκερόλη, pH 7,2), προσθήκη του κατάλληλου

θρεπτικού υλικού παρουσία 10% βόειου ορού και επώαση στους 37 °C για 24h σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.

Η απομόνωση ολικής πρωτεΐνης από τα ευκαρυωτικά κύτταρα πραγματοποιήθηκε μετά από λύση με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (RIPA buffer: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH7.2, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 2 mM L-διθειοθρεϊτόλης) παρουσία αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών (Πίνακας 5).

2.10. ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ & ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ

2.10.1. Σήμανση *H. pylori* με CFDA-SE

Η επισήμανση των βακτηρίων με CFDA-SE έγινε με την μέθοδο των Nolan και συν. [1]. Βακτηριακό εναιώρημα (10⁸ cfu/ml) μετά από πλύση με PBS επώαστηκε στους 37 °C για 20 min με διάλυμα CFDA-SE 5 mM (Fluka-Sigma). Κατόπιν, τα βακτήρια καταβυθίστηκαν με ήπια φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε 1 ml RPMI 1640 περιεκτικότητας σε FBS 10% για την χρήση τους σε πειράματα κυτταρικής προσκόλλησης.

2.10.2. Ανοσοφθορισμός

Γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα AGS (1.5x10⁵) χρησιμοποιήθηκαν για την επικάλυψη πιάτων 24-κυψελίδων, στα οποία προηγουμένως είχαν τοποθετηθεί στρογγυλές καλυπτρίδες διαμέτρου 11 mm. Μετά από επιμόλυνση με *H. pylori*, σημασμένων ή μη με CFDA-SE σε αναλογία μόλυνσης 100, τα κύτταρα πλένονταν δύο φορές με PBS και μονιμοποιούντο με διάλυμα παραφορμαλδεύδης 4% και σακχαρόζης 4% σε PBS. Ακολουθούσε κατεργασία με διάλυμα Triton X-100 0.1% σε PBS. Τα πρωτοταγή και δευτεροταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι αναλογίες χρήσης, περιγράφονται παρακάτω (Πίνακας 4). Η μικροσκοπική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP κάνοντας χρήση μεγεθυντικού φακού 63X.

2.10.3. Σήμανση πρωτεϊνών που εκφράζουν το εξαπεπίδιο Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys (4Cys-tag) με την χρωστική FAsH

Στελέχη *H. pylori*, τα οποία εξέφραζαν χιμαιρική πρωτεΐνη CagA με 4Cys-tag εναιωρούνταν σε πλήρες θρεπτικό υλικό (RPMI 1640, 10%FBS) χωρίς αντιβιοτικά σε συγκέντρωση περίπου 10^8 cfu/ml μέσω ρύθμισης της θολερότητας του βακτηριακού διαλύματος μετά από μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 600nm στα 0,740. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37 °C υπό ανάδευση σε 200 rpm, προκειμένου τα βακτήρια να προσαρμοστούν στο νέο θρεπτικό υλικό. Στην συνέχεια στο βακτηριακό εναιώρημα προστίθετο για 20 min η χρωστική FAsH, σε τελικές συγκεντρώσεις από 2-10 μ M μαζί με 1 μ M TCEP-HCl, το οποίο δρούσε ως προστατευτικό αντιοξειδωτικό μέσω της χρωστικής. Ακολουθούσε απομόνωση των βακτηρίων με φυγοκέντρηση για 3 min σε 3.000 rpm, και πλύση τρεις φορές με PBS για την απομάκρυνση της χρωστικής η οποία δεν είχε προσδεθεί ειδικά με το 4Cys-tag. Η τελική επαναιώρηση των βακτηρίων για χρήση σε *in vitro* μόλυνση γαστρικών κυττάρων γινόταν σε πλήρες θρεπτικό υλικό (RPMI 1640, 10%FBS) χωρίς αντιβιοτικά.

2.10.4. Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής

Γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα AGS (9×10^5), τα οποία προηγουμένως είχαν μολυνθεί με σημασμένα με CFDA-SE βακτήρια *H. pylori*, για διάστημα έως 1 ώρα στις κατάλληλες χρονικές στιγμές αποκολλώντο από τα τρυβλία με χρήση 1ml τρυφίνης-EDTA 0.5% ανά κυψελίδα, μετά από πλύση τρεις φορές με 1ml PBS. Η απενεργοποίηση του ενζύμου γινόταν με προσθήκη 1ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Η απομόνωση των βακτηρίων γινόταν με φυγοκέντρηση για 5min στις 13,000 rpm και τελική επαναιώρηση σε 1 ml PBS. Τα δείγματα αναλύθηκαν στον κυτταρομετρητή ροής FACS Calibur (Becton Dickinson) αναλύοντας 10.000 κύτταρα ανά δείγμα.

2.11. ΠΙΝΑΚΕΣ ΥΛΙΚΩΝ

2.11.1. Αντισώματα

Πίνακας 4: Συγκεντρωτικός πίνακας των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή.

Αντίσωμα	Ξενιστής	Εφαρμογές	Συγκέντρωση	Εταιρία
α -phospho-I κ B α Ser32/36	Ποντίκι	W.B.	1:2.000	Cell Signaling
α -I κ B α	Ποντίκι	W.B.	1:2.000	Cell Signaling
α -Akt	Κουνέλι	W.B.	1:2.000	Cell Signaling
α -phospho-Akt Ser473	Κουνέλι	W.B.	1:4.000	Cell Signaling
α -phospho-Erk1/2 Thr202/Tyr204	Κουνέλι	W.B.	1:2.000	Cell Signaling
α -TAK1	Κουνέλι	W.B.	1:1.000	Cell Signaling
α -phospho-TAK1 Thr187	Κουνέλι	W.B.	1:1.000	Cell Signaling
α -GAPDH	Ποντίκι	W.B.	1:60.000	Merck-Millipore
α -CagA (Polyclonal)	Κουνέλι	W.B.	1:6.000	Austral Biologicals
α -CagA-pY972	Ποντίκι	W.B.	1:500	-*
α -rabbit IgG Alexa Fluor 546	Αίγα	IF-IC	1:1000	Invitrogen
α -rabbit IgG HRP	Αίγα	W.B.	1:40.000	Jackson Lab.
α -mouse IgG HRP	Αίγα	W.B.	1:40.000	Jackson Lab.

*Ευγενική προσφορά Καθηγητή Steffen Backert

2.11.2. Αναστολείς

Πίνακας 5: Οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή

Αναστολέας	Δρασιμότητα	Συγκέντρωση εργασίας
Sodium orthovanadate Na ₃ VO ₄	Γενικός αναστολέας φωσφατασών	2 mM
β -glycerolphosphate	Γενικός αναστολέας φωσφατασών	1mM
NaF	Γενικός αναστολέας φωσφατασών	10mM
Leupeptin	Γενικός αναστολέας πρωτεασών	10 μ g/ml
Aprotinin	Γενικός αναστολέας πρωτεασών	10 μ g/ml
Pefabloc SC	Γενικός αναστολέας πρωτεασών	250 μ g/ml
5Z-7- Oxozeaenol	Ειδικός αναστολέας κινάσης TAK1	30nM-300nM

2.11.3. Εκκινητές

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην διατριβή

Όνομα	Αλληλουχία	Θέσεις Πέψης
F1	5'-TTCCCTTTGAAAAGGCATGATAAAAGTT-3'	
F2	5'-TTTGAAAAGGCATGATAAAAGTTGATGA-3'	
R1	5'-GATCTCGGCGGACCTTT CCCGG ACTAAT CTAGACT GAT-3'	SmaI και XbaI
R2	5'-TGCTCTAGATTGCCAAAAAACCT TCTAGACT GAT-3'	XbaI
R3	5'-TGCTCTAGATTGCCAAAAAACCT-3'	
ScagA898F	5'-CACAAATAACGCTCTGTCTTCTGTG-3'	
ScagA1614F	5'-CAAGGTAGCTGTCTTTAAATTTGCC-3'	
ScagA2354F	5'-TAACGGATAAAAGTTGACAATCTCAAT-3'	
ScagA3183F	5'-CAGCCACACACGCATTAATAGC-3'	
ScagA787R	5'-TTAGAAAAATTACCCCTTTCATCAAG-3'	
ScagA1533R	5'-TCTTGGAGGCGTTGGTGTATTTG-3'	
ScagA2410R	5'-CTTGCTCTACCCTACTGAAATC-3'	
cagA3000AS	5'-TTTAGCTTCTGATACCGC-3'	
cagA2530S*	5'- GTTAARAATRGTGTRAAYGG-3'	
cagA3000AS	5'-TTTAGCTTCTGATACCGC-3'	
cagAKpnI	5'-TATAGGGTACCGCCACCATGACTAACGAAACCATTAACCAACAA-3'	
cagApaI	5'-CCTTAGGGCCCAAAGATTTTGGAAACCACCTTTTGTATTA-3'	
cagSmaI	5'-ATATA CCCGG AAGATTTTGGAAACCACCTTTTGTATTAAC-3'	SmaI
atp1964	5'-GGACTAGCGTTAAACGCACG-3'	
atp1965	5'-CTTGAAACCGACAAGCCCAC-3'	
efp2044	5'-GGCAATTTGGATGAGCGAGCTC-3'	
efp2045	5'-CTTCACCTTTTCAAGATACTC-3'	
mut1979*	5'-GTGGTTGTAGYTGGAACTTTACAC-3'	
mut1982*	5'-CTTAAGCGTGTGTYTCTTAGG-3'	
ppa3238	5'-GGAGATTGCAATGAATTTAGA-3'	
ppa3241*	5'-GTGGGGTTAARATCGTTAAAATTG-3'	
trp1370	5'-TAGAATGCAAAAAAGCATCGCCCTC-3'	
trp1372	5'-TAAGCCCGCACACTTATTTTCGCC-3'	
ure2356	5'-AAGTTATTCGTAAGGTGCG-3'	
ure3151	5'-GTTTAAATCCCTTAGATTGCC-3'	
yph1960	5'-CACGCCTATTTTTTGGACTAAAAAAC-3'	
yph1963*	5'-CATTYACCCGCCCAATGATGC-3'	
EPIFA-F	5'- CCTGAACCCATTTTGGCTACGATGAT-3'	
EPIFA-R	5'-ATCAATCGTAGCAAAAATGGGTTTCAGG-3'	

*όπου R= A ή G, και όπου Y= T ή C

2.11.4. Χαρακτηριστικά στελεχών, πλασμιδίων και κυτταρικών σειρών

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην διατριβή

Στέλεχος	Κασέτες Αντοχής	Χιμαιρικά γονίδια
P12CagΔKO	Χλωραφενικόλη	<i>cagA</i> (knock out)
P12CagEKO	Χλωραφενικόλη	<i>cagE</i> (knock out)
P12AB	Καναμυκίνη	<i>cagA</i> (AB)
P12ABC	Καναμυκίνη	<i>cagA</i> (ABC)
P12ABCC		Αγρίου τύπου
P12ABCCC	Καναμυκίνη	<i>cagA</i> (ABCCC)
P12ABF	Καναμυκίνη	<i>cagA</i> (ABF)
P12ABFF	Καναμυκίνη	<i>cagA</i> (ABFF)
P12ABFFF	Καναμυκίνη	<i>cagA</i> (ABFFF)
P12AB+4Cys	Καναμυκίνη	<i>cagA</i> (AB+4Cys)
P12ABC+4Cys	Καναμυκίνη	<i>cagA</i> (ABC+4Cys)
P12ABCC+4Cys	Καναμυκίνη	<i>cagA</i> (ABCC+4Cys)
P12ABCCC+4Cys	Καναμυκίνη	<i>cagA</i> (ABCCC+4Cys)
P12ABF+4Cys	Καναμυκίνη	<i>cagA</i> (ABF+4Cys)
P12ABFF+4Cys	Καναμυκίνη	<i>cagA</i> (ABFF+4Cys)
P12ABFFF+4Cys	Καναμυκίνη	<i>cagA</i> (ABFFF+4Cys)

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην διατριβή

Όνομα Πλασμιδίου	Πλασμιδιακός φορέας	Ένθεση
pCA0	pBCSK+	<i>cagA</i> (AB), alpha cassette, metacagA
pCA1	pBCSK+	<i>cagA</i> (ABC), alpha cassette, metacagA
pCA2	pBCSK+	<i>cagA</i> (ABCC), alpha cassette, metacagA
pCA3	pBCSK+	<i>cagA</i> (ABCCC), alpha cassette, metacagA
pCA1.1	pBCSK+	<i>cagA</i> (ABF), alpha cassette, metacagA
pCA2.2	pBCSK+	<i>cagA</i> (ABFF), alpha cassette, metacagA
pCA3.3	pBCSK+	<i>cagA</i> (ABFFF), alpha cassette, metacagA
pCA0+4Cys	pBCSK+	<i>cagA</i> (AB+4cys), alpha cassette, metacagA
pCA1+4Cys	pBCSK+	<i>cagA</i> (ABC+4cys), alpha cassette, metacagA
pCA2+4Cys	pBCSK+	<i>cagA</i> (ABCC+4cys), alpha cassette, metacagA
pCA3+4Cys	pBCSK+	<i>cagA</i> (ABCCC+4cys), alpha cassette, metacagA
pCA1.1+4Cys	pBCSK+	<i>cagA</i> (ABF+4cys), alpha cassette, metacagA
pCA2.2+4Cys	pBCSK+	<i>cagA</i> (ABFF+4cys), alpha cassette, metacagA
pCA3.3+4Cys	pBCSK+	<i>cagA</i> (ABFFF+4cys), alpha cassette, metacagA

Πίνακας 9: Βασικά χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στην διατριβή

Κυτταρική σειρά	Προέλευση	Ιστός	Μορφολογία
AGS	<i>Homo sapiens</i>	Γαστρικό επιθήλιο	Προσκολλώμενα
MKN45	<i>Homo sapiens</i>	Γαστρικό επιθήλιο	Προσκολλώμενα & αιωρούμενα
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Επιθήλιο τραχήλου της μήτρας	Προσκολλώμενα
TAK1 ^{-/-} MEF	<i>Mus musculus</i>	Εμβρυϊκοί Ινοβλάστες	Προσκολλώμενα

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

3.1.1. Συσχέτιση της πολυμορφίας των θέσεων EPIYA της CagA με τα κλινικό-παθολογικά ευρήματα και την κλινική εξέλιξη της νόσου. Μελέτη ασθενών από τη Καμπότζη

Ο Γαστρικός καρκίνος (GC) είναι η τέταρτη πιο κοινή μορφή καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο και αποτελεί τη δεύτερη κύρια αιτία θανάτου που σχετίζεται με καρκίνο, καθώς περίπου 700.000 άνθρωποι ετησίως υποκλύπτον από γαστρικό αδενοκαρκίνωμα [73]. Η επίπτωση του γαστρικού καρκίνου διορθωμένη με βάση την ηλικία (GC-ASR⁸⁸) είναι υψηλότερη στην Ανατολική Ασία, βαίνοντας μειούμενη σε όλο και νοτιότερα γεωγραφικά πλάτη. Οι διακυμάνσεις της GC-ASR δεν αντιστοιχούν στις αντίστοιχες διακυμάνσεις των ποσοστών επιπολασμού της λοίμωξης, με εξαίρεση την περιοχή της Μαλαισίας [506], υποδεικνύοντας ότι και άλλοι παράγοντες εμπλέκονται επίσης στην έκβαση της λοίμωξης. Η Μογγολία, η Ιαπωνία, η Κορέα, η Κίνα και το Βιετνάμ έχουν ταξινομηθεί ως χώρες με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου (GC-ASR 18,9-41,4, ανά 100.000 ανθρώπους), ενώ η Καμπότζη (Νοτιοανατολική Ασία) έχει χαρακτηριστεί ως μια χώρα με ένα ενδιάμεσο κίνδυνο (GC-ASR 9,8), μαζί με τη Μιανμάρ (GC-ASR 11,0) και τη Σιγκαπούρη (GC-ASR 10,9). Ο κίνδυνος για GC είναι χαμηλός στο Μπαγκλαντές, το Λάος, την Ταϊλάνδη και την Ινδία (GC-ASR 3,5 έως 5,2). Η Καμπότζη συνορεύει με την Ταϊλάνδη στα δυτικά και βορειοδυτικά και το Βιετνάμ στα ανατολικά και νοτιοανατολικά, και ως εκ τούτου, βρίσκεται μεταξύ περιφερειών με χαμηλό και υψηλό κίνδυνο για την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου. Ο πληθυσμός της Καμπότζης αποτελείται κυρίως από Khmer και ομιλεί τη γλώσσα των Khmer που σχετίζεται με τη γλώσσα του Βιετνάμ (Vietnam), ανήκει συγκεκριμένα στην γλωσσική υπό-οικογένεια Mon-Khmer της Αυστραλό-ασιατικής γλώσσας [507]. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν κλινικά στελέχη *H. pylori* από την Καμπότζη σε σχέση με την ποικιλομορφία του γονιδίου της *cagA* στην καρβόξυ-τελική μεταβλητή περιοχή της πρωτεΐνης αλλά και τα αλληλόμορφα *s*, *m*, και *i* του γονιδίου της *vacA*, προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή συμβολή των παραγόντων αυτών στις γεωγραφικές διαφορές που παρατηρούνται όσον αφορά στη συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου σε περιοχές της Ανατολικής και της Νοτιοανατολικής Ασίας. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Διεθνές Δίκτυο των Ινστιτούτων Παστέρ (RIIP)

Μελετήθηκαν 66 στελέχη *H. pylori* απομονωμένα από γαστρικές βιοψίες 66 διαφορετικών ασθενών από την Καμπότζη (36 άντρες, μέση ηλικία 44,7 χρόνια, μέση απόλυτη απόκλιση 46,0 χρόνια και εύρος 18-76 έτη). Με βάση τα ενδοσκοπικά ευρήματα, 60 ασθενείς διαγνώστηκαν με

⁸⁸Gastric Cancer Age-standardised rate

γαστρίτιδα, πέντε με ελκωτικές βλάβες και ένας είχε ενδείξεις νεοπλασίας. Ο γαστρικός καρκίνος για τον συγκεκριμένο ασθενή επιβεβαιώθηκε μέσω ιστολογικής διάγνωσης αργότερα [508].

Το γονίδιο *cagA* εντοπίστηκε σε 61 από τα 66 συνολικά απομονωθέντα στελέχη (92,4%) και η συχνότητα εμφάνισης του ήταν μεγαλύτερη στα hpEAsia στελέχη (100%) από ότι στα hpEurope στελέχη (85,3%), όπως έχει περιγραφεί στο παρελθόν [509]. Για τα 5 στελέχη που δεν ανιχνεύτηκε γονίδιο *cagA* έγινε επαλήθευση του αποτελέσματος με τη χρήση ειδικής PCR που ανιχνεύει την έλλειψη του συγκεκριμένου τμήματος που κωδικοποιεί το νησίδιο παθογένειας *cagPAI* [510]. Επιπλέον, αναλύθηκε η πολυμορφία των θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης CagA και στα 61 απομονωθέντα στελέχη *H. pylori*, μέσω PCR και εν συνεχεία ανάγνωση της αλληλουχίας. Παρατηρήθηκε παρουσία και των τεσσάρων διαφορετικών μοτίβων EPIYA, ήτοι EPIYA-A (EPIYAQVNK), EPIYA-B (EPIYAQVAK), EPIYA-C (EPIYATIDD/E) για τα στελέχη Δυτικού τύπου και EPIYA-D (EPIYATIDF) για τα στελέχη Ανατολικού τύπου. Οι κυρίαρχοι συνδυασμοί EPIYA μοτίβων στη πρωτεΐνη CagA, στα αναλυθέντα στελέχη ήταν ABC (n=30, 45,5%) που μαρτυρά ύπαρξη στελεχών Δυτικού τύπου

και

Πίνακας 10: Κατάταξη στελεχών *H. pylori*, με βάση τους πολυμορφισμούς των θέσεων EPIYA στο καρβόξυ-τελικό άκρο του γονιδίου της *cagA* και των πολυμορφισμών του γονιδίου της *vacA* στις περιοχές s, m, και i σε στελέχη Ευρωπαϊκής (hpEurope) και Νότιο-Ασιατικής προέλευσης (hspEAsia) προερχόμενα από ασθενείς της Καμπότζης

	hpEurope (n = 34)	hspEAsia (n = 32)	Σύνολο (n = 66)
<i>cagA</i>			
Θετικά	29 (85.3)	32 (100.0)	61 (92.4)
Αρνητικά	5 (14.7)	0	5 (7.6)
Θέσεις EPIYA			
AB	1 (2.9)	0	1 (1.5)
BC	2 (5.9)	0	2 (3.0)
ABC	23(67.7)	7(21.9)	30(45.5)
ABCC	2(5.9)	2(6.2)	4(6.1)
ABBD	0	1(3.1)	1(1.5)
ABD	1(2.9)	22(68.8)	23(34.8)
<i>vacA s</i>			
s1	31(91.2)	32(100.0)	63(95.5)
s1a	27(79.4)	11(34.4)	38(57.6)
s1c	4(11.8)	21(65.6)	25(37.9)
s2	3(8.8)	0	3(4.5)
<i>vacA m</i>			
m1	13(38.2)	19(59.4)	32(48.5)
m2	21(61.8)	13(40.6)	34(51.5)
<i>vacA i</i>			
i1	30(88.2)	32(100.0)	62(93.9)
i2	4(11.8)	0	4(6.1)
<i>vacA smi</i>			
s1a/i1/m1	13(38.2)	8(25.0)	21(31.8)
s1a/i1/m2	13(38.2)	3(9.4)	16(24.2)
s1a/i2/m2	1(3.0)	0	1(1.5)
s1c/i1/m1	0	11(34.4)	11(16.7)
s1c/i1/m2	4(11.8)	10(31.2)	14(21.2)
s2/i2/m2	3(8.8)	0	3(4.6)

ABD (n=23, 34,8%) που παραπέμπει σε στελέχη Ασιατικής προέλευσης. Όλα τα στελέχη με EPIYA-D μοτίβο δεν περιείχαν επανάληψη του μοτίβου αυτού, επιβεβαιώνοντας έτσι παλαιότερες μελέτες [489] που δείχνουν ότι σε στελέχη Ανατολικής Ασίας η πρωτεΐνη CagA περιέχει μόνο μία επανάληψη της συγκεκριμένης EPIYA-D μορφής. Τα υπόλοιπα στελέχη που αναλύθηκαν βρέθηκαν να είναι της μορφής AB (n=1), ABBD (n=1), BC (n=2) και ABCC (n=4), αναφορικά με τον συνδυασμό των θέσεων EPIYA (Πίνακας 10).

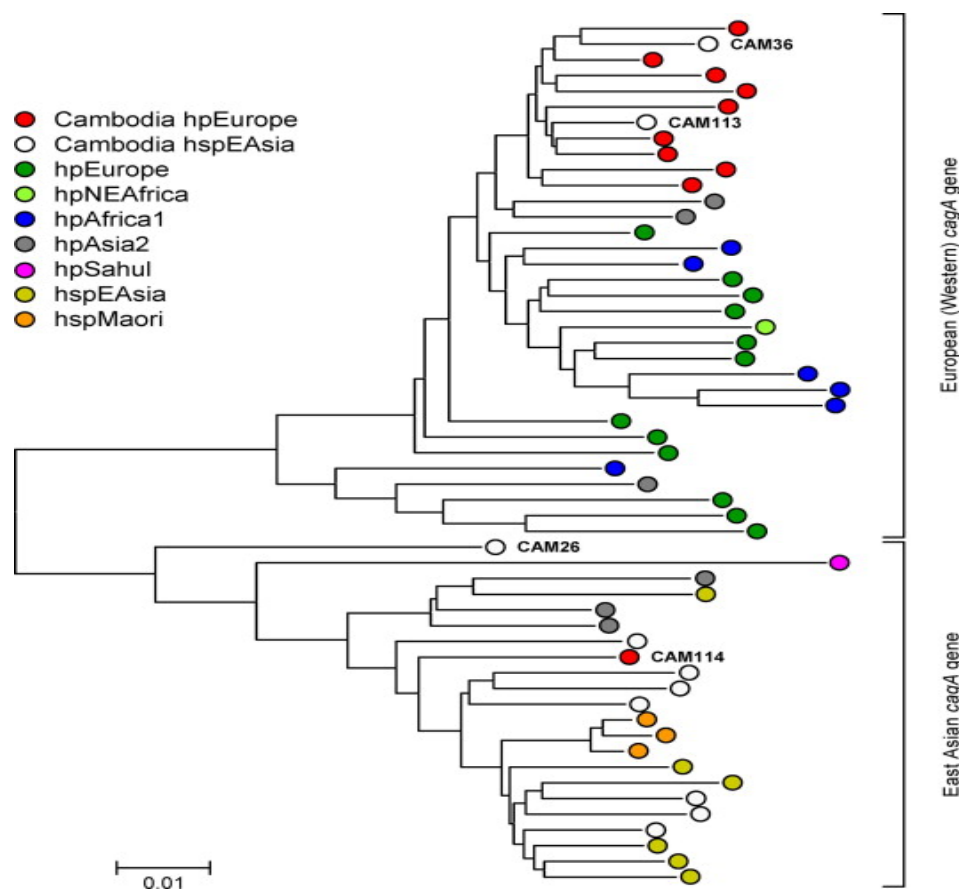
Προκειμένου να μελετηθεί η γενετική δομή του πληθυσμού όσον αφορά το γονίδιο της CagA σε στελέχη *H. pylori* απομονωθέντα από ασθενείς της Καμπότζης, επιλέχθηκαν τυχαία 10 CagA-θετικά στελέχη hrEurope, προερχόμενα από συμπτωματικούς ασθενείς Ευρωπαϊκής προέλευσης και 10 hrEAsia στελέχη από αντίστοιχους ασθενείς από την Ανατολική Ασία. Ακολούθησε ανάγνωση της αλληλουχίας όλου του γονιδίου της CagA πρωτεΐνης (Πίνακας 11). Πέντε στελέχη (4 hrEAsia, 1 hrEurope) από τα 10 hrEAsia στελέχη είχαν γονίδια *cagA*, στα οποία παρατηρήθηκε μια διαγραφή έκτασης 18 ζευγών βάσεων, η οποία έχει περιγραφεί προηγουμένως για στελέχη προερχόμενα από ασθενείς του Βιετνάμ [511], ενώ στα υπόλοιπα 5 hspEAsia στελέχη παρατηρήθηκε διαγραφή έκτασης 39 ζευγών βάσεων, η οποία ανιχνεύεται συνήθως σε στελέχη τα οποία προέρχονται από πληθυσμούς της Ανατολικής Ασίας [512]. Και οι δύο διαγραφές εντοπίζονται σε απόσταση περίπου 300 ζεύγη βάσεων ανάντη της αλληλουχίας του EPIYA-A μοτίβου. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για τον προσδιορισμό της οργάνωσης αυτών των υποτύπων.

Οι 20 απλότυποι του *cagA* (Accession number GenBank: JF798688-JF798748) συγκρίθηκαν με 35 μοναδικούς απλότυπους του *cagA* προερχόμενοι από ένα παγκόσμιο σύνολο αντιπροσωπευτικών και καλά χαρακτηρισμένων στελεχών *H. pylori* από όλους τους γενετικούς πληθυσμούς, οι οποίοι φέρουν το νησίδιο παθογένειας *cagPAI* (hrAfrica1, hrNEAfrica, hrEurope, hrSahul, hrAsia2, hspEAsia, hspMaori) [509]. Στην συνέχεια κατασκευάστηκε γενετικό δέντρο με βάση τις αλληλουχίες του γονιδίου *cagA* με την χρήση του ειδικού αλγόριθμου Neighbor-joining, στο οποίο εμφανίζονται δύο ομαδοποιήσεις στελεχών, οι οποίες αντιστοιχούν είτε στο δυτικό τύπο CagA ή στο τύπο που συναντάται στην Ανατολική Ασία (Εικόνα 17). Το 100% των στελεχών δυτικού τύπου περιλάμβαναν EPIYA-C μοτίβα στη πρωτεΐνη CagA (hrAfrica1, hrNEAfrica, hrEurope) καθώς και μερικά hrAsia2 στελέχη (Πίνακας 11) μετά από ανασυνδυασμό. Αντίστοιχα παρατηρήθηκε το EPIYA-D μοτίβο στην CagA σε στελέχη τύπου Ανατολικής Ασίας (hspEAsia, hspMaori) και σε μερικά hrAsia2

Πίνακας 11: Γενετικά χαρακτηριστικά των 20 στελεχών στα οποία έγινε ανάγνωση της αλληλουχίας ολοκλήρου του γονιδίου *cagA*.

Στελέχη	Αλγόριθμος: Structure no linkage model		Αλγόριθμος: Structure linkage model	Θέσεις EPIYA	Μέγεθος γονιδίου <i>cagA</i> (bp)	Διαγραφές (bp)	Τύπος <i>vacA</i>
	(Υπό) πληθυσμός	Τύπος <i>CagA</i>	Τύπος <i>CagA</i>				
CAM22	hpEurope	Δυτικού	Ευρωπαϊκής καταγωγής	ABC	3540	None	s1a/i1/m1
CAM23	hpEurope	Δυτικού	Ευρωπαϊκής καταγωγής	ABC	3543	None	s1a/i1/m1
CAM40	hpEurope	Δυτικού	Ευρωπαϊκής καταγωγής	ABC	3555	None	s1a/i1/m1
CAM27	hpEurope	Δυτικού	Ευρωπαϊκής καταγωγής	ABC	3543	None	s1a/i1/m1
CAM46	hpEurope	Δυτικού	Ευρωπαϊκής καταγωγής	ABC	3543	None	s1a/i1/m1
CAM25	hpEurope	Δυτικού	Ευρωπαϊκής καταγωγής	ABCC	3642	None	s1a/i1/m1
CAM114	hpEurope	Ανατολικού	Ευρωπαϊκής καταγωγής	ABD	3552	18	s1a/i1/m1
CAM17	hpEurope	Δυτικού	Ευρωπαϊκής καταγωγής	ABC	3480	None	s1a/i1/m2
CAM14	hpEurope	Δυτικού	Ευρωπαϊκής καταγωγής	ABC	3543	None	s1c/i1/m2
CAM15	hpEurope	Δυτικού	Ευρωπαϊκής καταγωγής	ABC	3537	None	s1c/i1/m2
CAM113	hspEAsia	Δυτικού	Ευρωπαϊκής καταγωγής	ABC	3549	None	s1a/i1/m1
CAM36	hspEAsia	Δυτικού	ntb 1 to 91 Ασιατικής καταγωγής nt 92 to 3558 Ευρωπαϊκής καταγωγής	ABC	3558	None	s1a/i1/m1
CAM16	hspEAsia	Ανατολικού	Ανατολικής Ασίας καταγωγή	ABD	3546	18	s1a/i1/m2
CAM29	hspEAsia	Ανατολικού	Ανατολικής Ασίας καταγωγή	ABD	3492	39	s1c/i1/m1
CAM47	hspEAsia	Ανατολικού	Ανατολικής Ασίας καταγωγή	ABD	3528	39	s1c/i1/m1
CAM32	hspEAsia	Ανατολικού	Ανατολικής Ασίας καταγωγή	ABD	3531	18	s1c/i1/m1
CAM26	hspEAsia	Ανατολικού	nt 1 to 147 Ευρωπαϊκής καταγωγής nt 148 to 370 Ανατολικής Ασίας καταγωγή nt 371 to 1159 Ευρωπαϊκής καταγωγής nt 1160 to 3537 Ανατολικής Ασίας καταγωγή	ABD	3537	18	s1c/i1/m1
CAM112	hspEAsia	Ανατολικού	Ανατολικής Ασίας καταγωγή	ABD	3549	18	s1c/i1/m2
CAM33	hspEAsia	Ανατολικού	Ανατολικής Ασίας καταγωγή	ABD	3531	39	s1c/i1/m2
CAM37	hspEAsia	Ανατολικού	Ανατολικής Ασίας καταγωγή	ABD	3531	39	s1c/i1/m2

στελέχη. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Structure, [257] για να προσδιορισθεί το ποσοστό των νουκλεοτιδίων τα οποία προέρχονται από τον αντίστοιχο προγονικό πληθυσμό (Ευρωπαϊκό ή από την Ανατολική Ασία) για καθεμιά από τις *cagA* αλληλουχίες. Στα 18 από τα 20 γονίδια *cagA* απομονωμένα από ασθενείς της Καμπότζης περιέχονται σε ποσοστό 100% νουκλεοτίδια, τα οποία προέρχονται είτε από Ευρωπαϊκές προγονικές πηγές είτε της Ανατολικής Ασίας ενώ σε δύο στελέχη εμφανίζεται εκτεταμένος ανασυνδυασμός εντός του γονιδίου *cagA* (Πίνακας 11). Το ένα από τα δύο στελέχη αποτελούνταν από αλληλουχία προερχόμενη από προγονική προέλευση Ανατολικής Ασίας έως το νουκλεοτίδιο 91 ενώ τα υπόλοιπα προέρχονταν από Ευρωπαϊκής καταγωγής προέλευση. Το δεύτερο στέλεχος περιείχε επάλληλες αλληλουχίες Ευρωπαϊκής καταγωγής (από 1-147 ζεύγη βάσεων και από 371-1159 ζεύγη βάσεων) και αντίστοιχα καταγωγής Ανατολικής Ασίας (από 148-370 ζεύγη βάσεων και 1160-τέλος). Βάσει αλληλουχιών διατηρημένων γονιδίων (MLST) και τα δύο παραπάνω στελέχη κατατάχθηκαν στη κατηγορία



Εικόνα 17: Δένδρο γενετικών αποστάσεων 55 αλληλουχιών του γονιδίου της *cagA* με βάση τον αλγόριθμο Neighbor-joining, στελεχών *H. pylori* προερχόμενα από ασθενείς της Καμπότζης.

hspEAsia, γεγονός που υποδηλώνει ένα υποείδος γονιδίου *cagA* στελεχών Ανατολικής Ασίας, το οποίο έχει μετασχηματιστεί με DNA από *cagA* δυτικού τύπου (hrEurope). Αυτά τα ευρήματα, μαζί με την σχετικά υψηλού ποσοστού εμφάνιση του Δυτικού τύπου *cagA* σε hspEAsia στελέχη (28,1%), σε αντίθεση με τα ελάχιστα ποσοστά εμφάνισης προσμίξεων τύπου Ανατολικής Ασίας *cagA* σε Δυτικού τύπου (hrEurope) στελέχη, παρέχουν αποδείξεις για την εξάπλωση της Δυτικού τύπου *cagA* μεταξύ των στελεχών της Ανατολικής Ασίας σε ασθενείς από την Καμπότζη. Το γεγονός αυτό έχει μεγάλη σημασία, καθώς η CagA αλληλεπιδρά, μέσω συγκεκριμένων περιοχών της πρωτεϊνικής της αλληλουχίας, με ένα μεγάλο αριθμό ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών του ξενιστή [452]. Έτσι, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη CagA πιθανώς αντανακλά τη λειτουργική προσαρμογή ή διαφοροποίησή της ως απάντηση στους πολυμορφισμούς των πρωτεϊνών του ξενιστή [509].

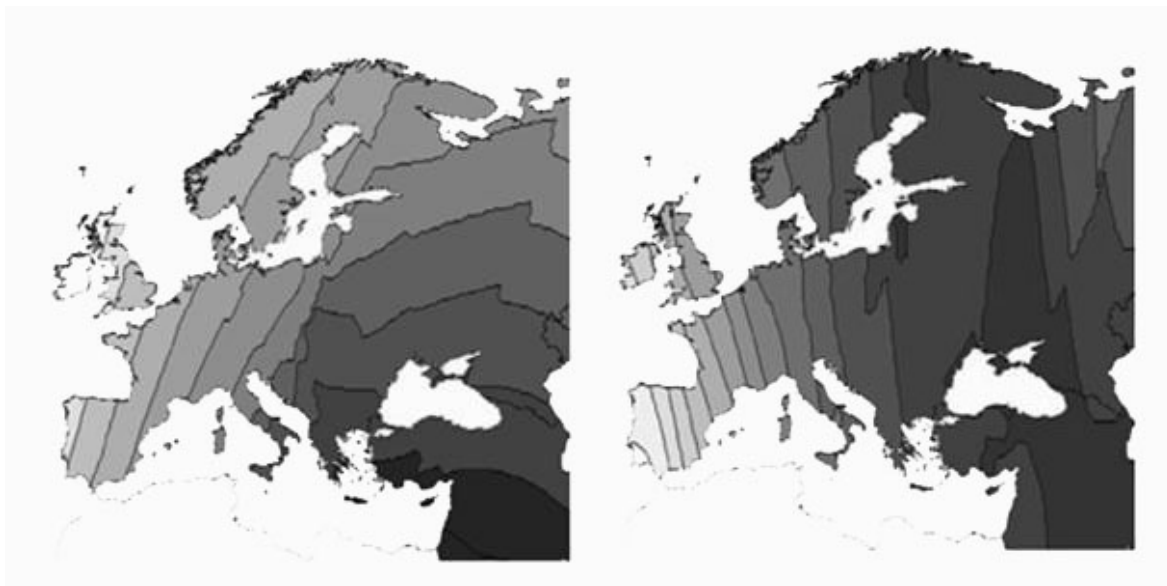
Η τυποποίηση των στελεχών ως προς τους γενετικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου της *vacA* έδειξε ότι 63 στελέχη (95,5%) επί συνόλου 66 έφεραν το αλληλόμορφο s1, 32 (48,5%) το αλληλόμορφο m1 και 62 (93,9%) το αλληλόμορφο i1 (Πίνακας 10). Όλα τα στελέχη με *vacA* s1/m1 πολυμορφισμούς, έφεραν το αλληλόμορφο i1 ενώ όλα τα στελέχη *vacA* s2/m2 έφεραν το αλληλόμορφο i2. Επίσης τα CagA αρνητικά στελέχη ήταν *vacA* s2/m2/i2 διαμόρφωσης. Η πλειονότητα των στελεχών παρουσίασε τον γονότυπο *vacA* s1/i1/m1 (n=32, 48,5%) που συνδέεται με αυξημένη ικανότητα σχηματισμού κενοτοπιών (high vacuolation) ή *vacA* s1/i1/m2 (n=30, 45,4%). Το αλληλόμορφο s1 έχει αναγνωριστεί ως καθοριστικός παράγοντας πρόκλησης γαστρικού καρκίνου σε άτομα από χώρες του δυτικού κόσμου [513], ενώ στελέχη με *vacA* i1 αλληλόμορφο έχουν συσχετισθεί στενά με την εμφάνιση γαστρικού αδενοκαρκινώματος σε Ιρανούς ασθενείς [398]. Επειδή τα επίπεδα γαστρικού καρκίνου στη Καμπότζη παραμένουν χαμηλά σε σχέση με άλλες χώρες της Ανατολικής Ασίας και στη πλειονότητα των στελεχών παρατηρήθηκαν τα *vacA* s1/i1 αλληλόμορφα, γεγονός που ισχύει και για ασθενείς από άλλες χώρες της Νοτιοανατολικής και Ανατολικής Ασίας [513], σημαίνει ότι αυτά τα αλληλόμορφα δεν πρέπει να αποτελούν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση γαστρικού καρκίνου, σε ασθενείς προερχόμενους από την Καμπότζη.

Ενδελεχής τυποποίηση των s1 αλληλόμορφων του γονιδίου *vacA* αποκάλυψε την παρουσία τόσο του s1a (38 στελέχη, 57,6%) όσο και του s1c (25 στελέχη, 37,9%) μεταξύ των στελεχών προερχόμενα από την Καμπότζη. Η πλειονότητα των hrEurope στελεχών από την Καμπότζη (27/34, 79,4%) κατείχαν το αλληλόμορφο s1a, (Πίνακας 10), το οποίο απαντάται συχνά στην βιβλιογραφία μεταξύ των ευρωπαϊκών στελεχών (hrEurope) [167] ενώ τα υπόλοιπα

στελέχη ήταν s1c (4/34, 11,8%) ή s2 (3/34, 8,8%). Το αλληλόμορφο s1c είχε προηγουμένως αποδειχθεί ότι συνδέεται με στελέχη *H. pylori* προερχόμενα από την Ανατολική Ασία, [514] όπου ως s1 χαρακτηρίστηκαν τα 449 από τα 474 (94,7%) στελέχη προερχόμενα από την Ανατολική Ασία και μόνο 4,7% ως s1a. Ωστόσο, το ποσοστό των αλληλομόρφων σε στελέχη από την Καμπότζη με διαμόρφωση s1c Ανατολικής Ασίας (hspEAsia) ήταν πολύ χαμηλότερο (21/32 στελέχη, 65,6%), ενώ το υπόλοιπο 34,4% (11/32 στελέχη) τυποποιήθηκε ως s1a. Ο παρατηρούμενος υψηλός επιπολασμός των αλληλόμορφων s1a μεταξύ hspEAsia στελεχών από την Καμπότζη αντανάκλα την συχνότητα, με την οποία τα ευρωπαϊκής προέλευσης αλληλόμορφα του *vacA* γονιδίου διεισδύουν στα στελέχη Ανατολικής Ασίας, η οποία συχνότητα είναι παρόμοια με αυτή της επέκτασης των ευρωπαϊκής καταγωγής γονιδίων της CagA.

3.1.2. Φυλογενετική ανάλυση κλινικών στελεχών *H. pylori* Ελλήνων φορέων για τον προσδιορισμό της προγονικής τους προέλευσης, αναφορικά με τις ομάδες προγονικών ευρωπαϊκών στελεχών.

Παγκοσμίως και όπως περιγράφεται στην εισαγωγή της παρούσας διατριβής, έχουν προσδιοριστεί 5 προγονικοί τύποι στελεχών *H. pylori* που αντανάκλουν στην κοινή πορεία και έξοδο του ανθρώπου και του συγκεκριμένου βακτηρίου από την Αφρική στη πορεία της εξέλιξης. Αυτοί είναι οι τύποι Αφρικής 1 και 2 (Ancestral Africa 1 & 2), Ανατολικής Ασίας (Ancestral East Asia) και Ευρώπης 1 & 2 (Ancestral European 1 & 2) [231,258], από τους οποίους



Εικόνα 18: Γεωγραφική απεικόνιση των δύο, κύριων ενδοευρωπαϊκών μεταναστεύσεων πληθυσμών με βάση γενετική ανάλυση στελεχών *H. pylori*.

προέρχονται τα σύγχρονα στελέχη *H. pylori*. Τα ευρωπαϊκά στελέχη *H. pylori* χαρακτηρίζονται κυρίως από την ύπαρξη δύο προγονικών υποπληθυσμών των hpAE1 και hpAE2 [258]. Τα στελέχη που προέρχονται από το hpAE1 ανήκουν στους προγονικούς νομαδικούς πληθυσμούς που ξεκινώντας από την κεντρική Ασία και περνώντας την Κασπία και τις Στέπες αποίκισαν κυρίως περιοχές της βόρειας Ευρώπης (Εικόνα 18). Τα hpAE2 στελέχη κατατάσσονται στους προγονικούς γεωργικούς πληθυσμούς που ξεκινώντας από την Μέση Ανατολή μέσω της Τουρκίας αποίκισαν κυρίως την Νότια Ευρώπη κατά την Νεολιθική εποχή [231]. Στα στελέχη που απομονώνονται από ευρωπαϊκούς πληθυσμούς δεν έχει εντοπιστεί κανένα που να περιέχει κατ'επίτηδες, περισσότερο από 80% καταγωγή από οποιαδήποτε από αυτούς τους δύο προγονικούς πληθυσμούς [258]. Αντιθέτως, κάθε γονιδίωμα αποτελεί ένα μωσαϊκό από πολλαπλά μικρά κομμάτια από προγονικούς πληθυσμούς τόσο των δύο ευρωπαϊκών όσο και του συνόλου των προγονικών πληθυσμών.

Για τον προσδιορισμό της προγονικής προέλευσης στελεχών *H. pylori* Ελλήνων φορέων επιλέχθηκαν 40 στελέχη από ενήλικες Έλληνες ασθενείς, με μέσο όρο ηλικίας τα 54 έτη. Σε αυτά έγινε ανάλυση με βάση την μέθοδο MLST (multi-locus sequence tagging) [258], η οποία περιλάμβανε την απομόνωση ολικού DNA και στην συνέχεια πολλαπλασιασμό με ειδικούς εκκινητές (Πίνακας 6) των περιοχών εφτά διατηρημένων γονιδίων (*atpA*, *efb*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI* και *gpbC*). Ακολούθως, έγινε ανάγνωση της αλληλουχίας των περιοχών αυτών για κάθε στέλεχος και τελική βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων.

Πίνακας 12: Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από την κατανομή των στελεχών ανά προγονική ομάδα με χρήση του λογισμικού STRUCTURE

Στέλεχος	Χώρα προέλευσης	Κατανομή πιθανοτήτων					
		hpAsia2	hpEastAsia	hpAfrica2	hpAfrica1	hpEurope	hpNEAfrica
bask8130	Ισπανία	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
Bf10A	Μπουρξίνα Φάσο	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
CAM101	Καμπότζη	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
D1a	Σενεγάλη	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
L79	Ινδία	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
501.9	Βόρ. Αφρική	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
E108	Εσθονία	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
G1005	Ελλάδα	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
G1006	Ελλάδα	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
G1009	Ελλάδα	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
G1013	Ελλάδα	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
G1061	Ελλάδα	0,000	0,000	0,000	0,000	0,445	0,555

Στην πρώτη φάση της βιοπληροφορικής ανάλυσης των δεδομένων, με χρήση του λογισμικού STRUCTURE [257], έγινε αρχική βασική κατάταξη των απομονωθέντων στελεχών μετά από σύγκριση των αλληλουχιών τους με αλληλουχίες άλλων 448 κλινικών στελεχών που έχουν ήδη καταταχθεί αναφορικά με την ομάδα προέλευσης τους, σε παγκόσμια κλίμακα (hpAsia2, hpEurope, hpEastAsia, hpAfrica1 and hpAfrica2, hpNEAfrica) [231,258]. Από τους πίνακες των πιθανοτήτων για την κατάταξη των στελεχών προκύπτει ότι 37 από τα 40 Ελληνικά στελέχη κατατάσσονται στην ομάδα Ευρωπαϊκού τύπου (hpEurope), με πιθανότητα 0,984-1,000 (Πίνακας 12). Επιπλέον, 2 στελέχη κατετάγησαν στην ομάδα προέλευσης Βόρειο-Ανατολικής Αφρικής (hpNEAfrica) και συγκεκριμένα, το G1013 με πιθανότητα 1,000 και το G1061 με οριακή πιθανότητα 0,555 (Πίνακας 12).

Πίνακας 13: Κατανομή των πιθανοτήτων κατάταξης των στελεχών

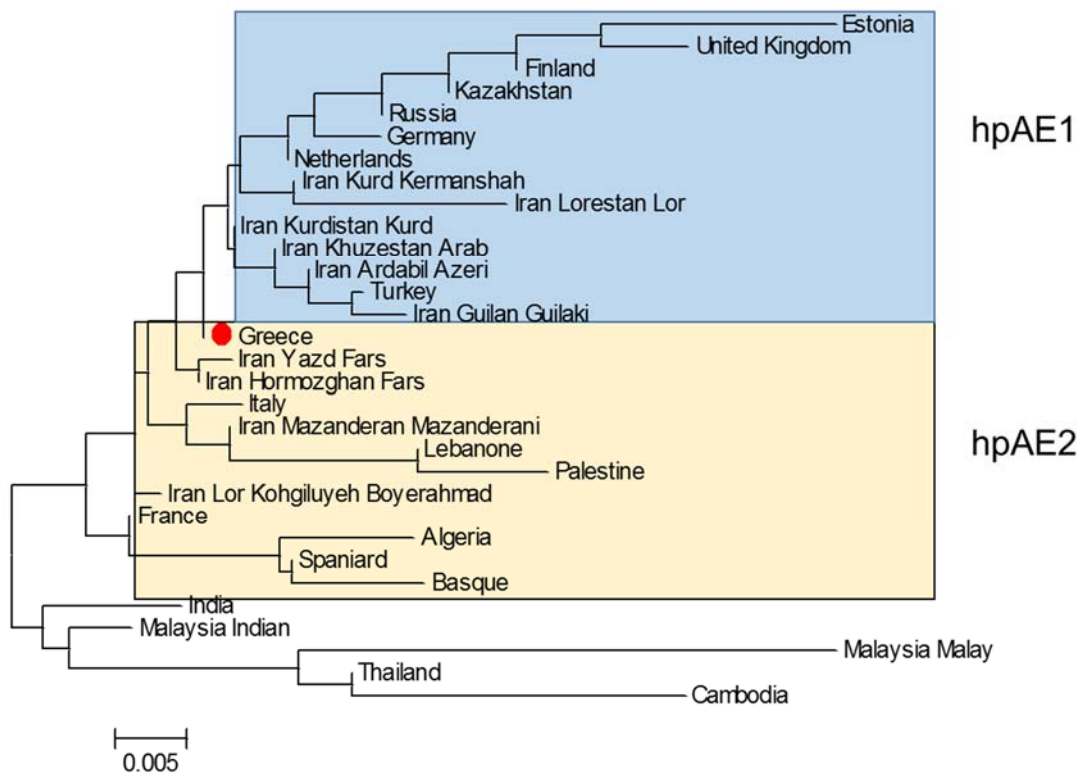
Στέλεχος	Χώρα προέλευσης	Κατανομή πιθανοτήτων				
		Ancestral Africa 2	Ancestral Africa 1	Ancestral East Asia	Ancestral Europe 1	Ancestral Europe 2
bask8130	Ισπανία	0,004	0,259	0,012	0,282	0,442
Bf10A	Μπουρκίνα Φάσο	0,007	0,686	0,015	0,032	0,260
CAM101	Καμπότζη	0,002	0,004	0,679	0,168	0,146
D1a	Σενεγάλη	0,003	0,774	0,004	0,003	0,215
L79	Ινδία	0,013	0,005	0,525	0,433	0,023
501.9	Βόρ. Αφρική	0,900	0,050	0,012	0,030	0,008
E108	Εσθονία	0,008	0,096	0,058	0,416	0,422
G1005	Ελλάδα	0,004	0,008	0,056	0,491	0,441
G1006	Ελλάδα	0,004	0,006	0,012	0,413	0,565
G1009	Ελλάδα	0,003	0,007	0,005	0,318	0,667
G1013	Ελλάδα	0,003	0,052	0,007	0,178	0,761
G1061	Ελλάδα	0,004	0,013	0,011	0,206	0,766

Στην δεύτερη φάση της ανάλυσης έγινε επεξεργασία των αλληλουχιών των απομονωμένων στελεχών με το λογισμικό STRUCTURE και τον αλγόριθμο μοντέλου συσχέτισης (The linkage model) που έχει την ικανότητα να διακρίνει τις πατρογονικές καταγωγές των πληθυσμών, ακόμη και μετά από σημαντική γενετική μείξη [257]. Από τους πίνακες των πιθανοτήτων για την κατάταξη των στελεχών προκύπτει ότι τα στελέχη της μελέτης παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό καταγωγής από τον προγονικό πληθυσμό hpAE2 (Πίνακας 13). Συγκεκριμένα, 38 από το σύνολο των στελεχών παρουσίασαν hpAE2 χαρακτήρα σε αντίθεση με μόλις 2 που είχαν αυξημένο hpAE1 χαρακτήρα. Στην συνέχεια χρησιμοποιώντας στελέχη προερχόμενα από την

Ευρώπη και από πληθυσμούς γειτονικούς της Ελλάδας, κατασιευάσθηκε δενδρογράμμα χρησιμοποιώντας το λογισμικό MEGA και τον αλγόριθμο Neighbor Joining. Από το δενδρογράμμα διαπιστώθηκε ότι τα στελέχη του Ελληνικού πληθυσμού, ομαδοποιούνται με πληθυσμούς που παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό συγγένειας με τους hrAE2 προγονικούς πληθυσμούς, όπως αυτοί της Νότιας Ευρώπης και ειδικότερα της Ισπανίας, της Ιταλίας, της Γαλλίας και της χώρας των Βάσκων. Στην ίδια ομάδα κατατάχθηκαν και πληθυσμοί στελεχών που παρατηρούνται στην Παλαιστίνη, το Λίβανο και την Αλγερία. Αντίθετα, στελέχη που προέρχονταν από χώρες της Βορείου Ευρώπης, όπως Γερμανία, Εσθονία, Φιλανδία, Μεγάλη Βρετανία, Ρωσία, Καζακιστάν και Ολλανδία ομαδοποιήθηκαν μαζί αφού εξέφραζαν μεγαλύτερο ποσοστό συγγένειας με τα προγονικά στελέχη hrAE1. Με τα παραπάνω αποτελέσματα παρέχονται για πρώτη φορά οι ενδείξεις ότι η προέλευση στελεχών που απομονώθηκαν από Έλληνες ασθενείς κατατάσσονται στην ομάδα προγονικού χαρακτήρα hrAE2 που απαντάται και στις υπόλοιπες χώρες της Νοτίου Ευρώπης, όπως Ισπανία, Ιταλία κ.λπ.

Ακολούθησε περαιτέρω συγκριτική ανάλυση συμπεριλαμβάνοντας στελέχη από το Ιράν, τα οποία προέρχονται από διαφορετικές φυλές με διαφορετική προγονική προέλευση (Εικόνα 19). Τα συγκεκριμένα στελέχη προέρχονταν από Ιρανούς συμπτωματικούς ασθενείς και ανήκαν σε 5 διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες.[515] Τρεις από αυτές τις ομάδες περιείχαν μη-Ιρανικά γενετικά χαρακτηριστικά, η πρώτη, στελέχη που προέρχονταν από Ιρανό-Αραβικούς πληθυσμούς και κατατάσσονταν μεταξύ Παλαιστινιακών και Ισραηλινών στελεχών, αλλά και Κουρδικής προέλευσης, από το Sanandaj στο Βορειοδυτικό Ιράν. Η δεύτερη ομάδα συμπεριελάμβανε τόσο στελέχη Κούρδων από το Kermanshah και Lor από Khorramabad (δυτικό και κεντρικό Ιράν) όσο και στελέχη από την Τουρκία. Η τρίτη ομάδα μη-Ιρανικών χαρακτηριστικών αποτελείτο από στελέχη πληθυσμών Sari και Mashhad από το Βορειοανατολικό Ιράν, καθώς και στελεχών από το Ουζμπεκιστάν. Επίσης συμπεριελήφθησαν δύο άλλες ομάδες Ιρανικών στελεχών που έχουν χαρακτηριστεί από το εσωτερικό του Ιράν και πιο συγκεκριμένα, η πρώτη ομάδα που περιελάμβανε τρεις πληθυσμούς, ένα από τα Δυτικά του Ιράν (Lor) και δύο από το βορειότερο τμήμα της χώρας (Azeri και Guilaki) και η δεύτερη ομάδα με στελέχη προερχόμενα από τον Ιρανικό Νότο (Yazd Fars και Hormozgan Fars). Τα Ελληνικά στελέχη που αναλύθηκαν στην παρούσα διατριβή κατατάχθηκαν στενά με στελέχη προερχόμενα από αυτή την τελευταία Ιρανική πληθυσμιακή ομάδα στελεχών (Fars) και ειδικότερα με τους υπό-πληθυσμούς Yazd και Hormozghan από το νότιο Ιράν (Εικόνα 19) και όχι με τα υπόλοιπα στελέχη Ιρανικής και εξω-

Ιρανικής προέλευσης. Τα εν λόγω αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα Ελληνικά στελέχη σε σύγκριση με τα Ιρανικά έχουν πολύ εντονότερο προγονικό χαρακτήρα hpAE2, έναντι του ασθενέστερου AE2 χαρακτήρα των Ιρανικών στελεχών.



Εικόνα 19: Φυλογενετικό δένδρο γενετικών αποστάσεων στελεχών προερχόμενα από την Ευρώπη και από πληθυσμούς γειτονικούς της Ελλάδας.

***3.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΧΙΜΑΙΡΙΚΗΣ CagA ΑΠΟ ΚΛΙΝΙΚΑ
ΣΤΕΛΕΧΗ H. pylori***

3.2.1. Επιλογή κλινικών στελεχών *H. pylori* για την κλωνοποίηση του γονιδίου *cagA*

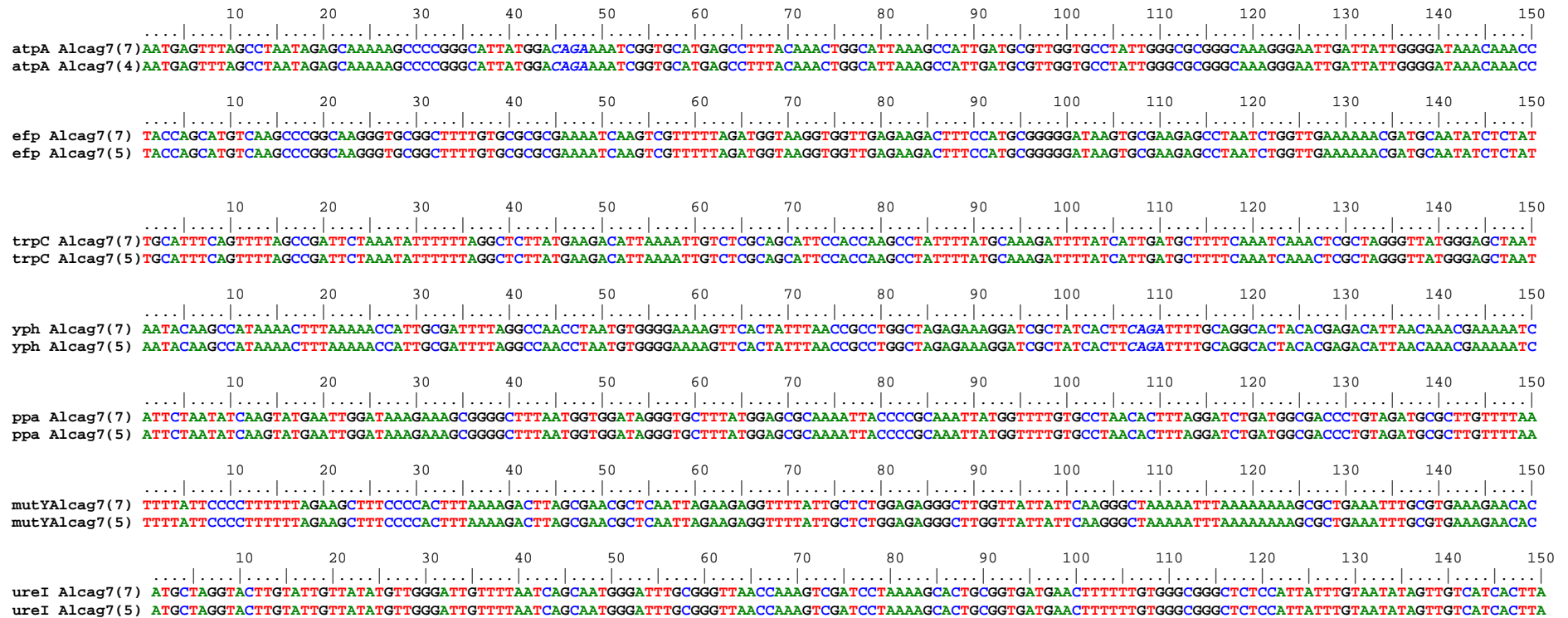
Επιλέχθηκαν τέσσερα ζεύγη κλινικών στελεχών *H. pylori* (Πίνακας 14), τα οποία είχαν απομονωθεί ανά ζεύγος, από τον ίδιο ασθενή σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου [134]. Τα στελέχη αυτά μετά από ανάλυση με την μέθοδο RAPD PCR βρέθηκαν να είναι απόλυτα ισογονιδιακά, με μοναδική διαφορά τον διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων των θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA-C στη πρωτεΐνη CagA. Στην επιλογή λήφθηκε επίσης υπόψη και η ικανότητα των συγκεκριμένων στελεχών να επάγουν έντονες μορφολογικές αλλαγές σε επιμολυσμένα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, σαν κριτήριο της καλής λειτουργίας του συστήματος έκκρισης τύπου IV και της ενδοκυττάριας μεταφοράς της CagA. Επιπλέον συμπεριελήφθησαν τα πρότυπα στελέχη *H. pylori* 26695 (NC_000915.1) και P12 (NC_011498.1).

Πίνακας 14: Χαρακτηριστικά των επιλεγμένων κλινικών στελεχών *H. pylori*

Περιστατικό	Στελέχη	Accession No	EPIYA Status
Alcag4	alcag4-1	AM292554	ABC
	alcag4-4	AM292555	ABCCC
Alcag7	alcag7-5	AM295791	ABC
	alcag7-7	AM295790	ABCC
Alcag40	alcag40-2	AM292577	ABC
	alcag40-4	AM292578	ABCC
Hp77	Hp77-2	AM292594	AB
	Hp77-5	AM292595	ABC

3.2.2. Καθορισμός γενετικών σχέσεων με την μέθοδο MLST

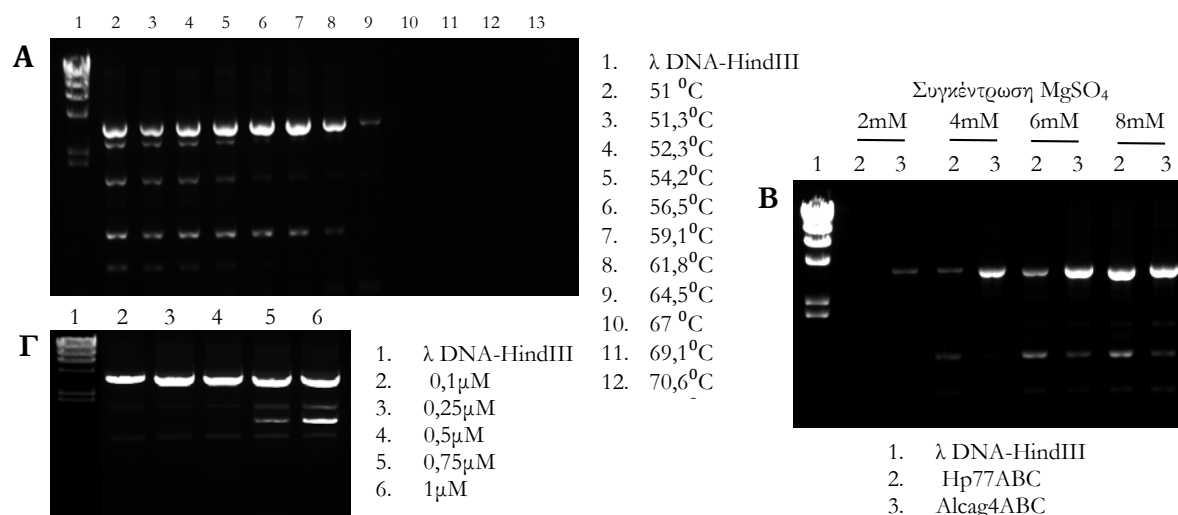
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί περαιτέρω ότι τα επιλεγθέντα ζεύγη στελεχών που απομονώθηκαν από τον ίδιο ξενιστή είναι ισογονιδιακά, πραγματοποιήθηκε καθορισμός γενετικών σχέσεων μεταξύ των στελεχών με την μέθοδο αναφοράς MLST (multi-locus sequence tagging) [258]. Διαπιστώθηκε ότι πράγματι αυτά αποτελούν ισογονιδιακές μορφές του ίδιου αρχικού κλώνου, καθώς οι αλληλουχίες των επτά διατηρημένων γονιδίων (*atpA*, *efp*, *mutY*, *pfa*, *trpC*, *ureI* και *gpbC*) βρέθηκαν να είναι ταυτόσημες μεταξύ τους ανά ζεύγος (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Παράθεση των πρώτων 150 bp των 7 διατηρημένων γονιδίων (*atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI* και *yphC*) βάση των οποίων πραγματοποιήθηκε η ανάλυση MLST για τον καθορισμό των γενετικών σχέσεων στελεχών *H. pylori*. Διακρίνονται οι ταυτόσημες αλληλουχίες για το ζεύγος των στελεχών Alcaag 7 (7) & (5) για όλα τα γονίδια υποδηλώνοντας ότι τα κλινικά αυτά στελέχη που απομονώθηκαν από τον ίδιο ξενιστή προήλθαν από ένα κοινό πρόγονο.

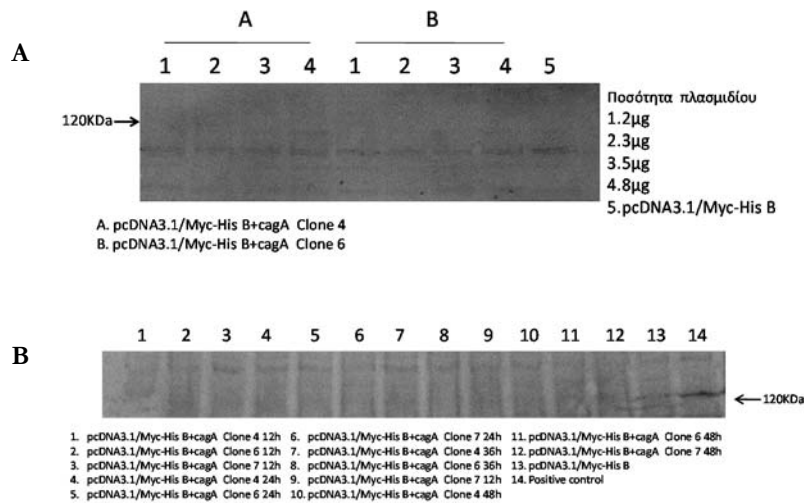
3.2.3. Κλωνοποίηση του γονιδίου *cagA* στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης και σήμανσης πρωτεϊνών pcDNA3.1/Myc-His B

Για να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός του συνόλου του γονιδίου *cagA* των επιλεγμένων στελεχών μετά τον σχεδιασμό των εκκινητών, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Μέθοδοι και υλικά §2.4.3), ακολούθησε βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR, αναφορικά με τη συγκέντρωση $MgSO_4$, τη θερμοκρασία υβριδισμού και τη συγκέντρωση των εκκινητών. Τα πειράματα βελτιστοποίησης οδήγησαν στην επιλογή των συνθηκών αυτών, υπό τις οποίες τα παρατηρούμενα παραπροϊόντα, αν και δεν εξαλείφθηκαν, ελαττώθηκαν σημαντικά, ήτοι συγκέντρωση $MgSO_4$ 8mM, θερμοκρασία υβριδισμού $59^{\circ}C$ και συγκέντρωση εκκινητών $0,25\mu M$



Εικόνα 21: Βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης PCR πολλαπλασιασμού του γονιδίου *cagA* αναφορικά με (Α) θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητών, (Β) συγκέντρωση $MgSO_4$ και (Γ) συγκέντρωση εκκινητών.

(Εικόνα 21). Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε πέψη των προς κλωνοποίηση τμημάτων και του επιλεγμένου πλασμιδιακού φορέα έκφρασης (pcDNA3.1/Myc-His B) με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα (*KpnI*, *ApaI*) και ακολούθησε κλωνοποίηση του ενθέματος και μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* DH5a. Η επιλογή των περιοριστικών ενζύμων έγινε έτσι, ώστε: (α) να μην αναγνωρίζουν αλληλουχίες μέσα στο γονίδιο *cagA*, (β) τα επιλεγμένα ένζυμα να έχουν την ικανότητα να προκαλούν πέψη κοντά σε άκρες ολιγονουκλεοτιδίων και (γ) το παραχθέν πεπτίδιο να εκφράζει στο καρβοξυτελικό άκρο το ειδικό πεπτίδιο σήμανσης c-Myc. Αρχικά, οι αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων που επιλέχθηκαν, ταυτοποιήθηκαν με PCR [516] για την ύπαρξη του γονιδίου *cagA*. Στην περίπτωση θετικών αποικιών ακολούθησε απομόνωση

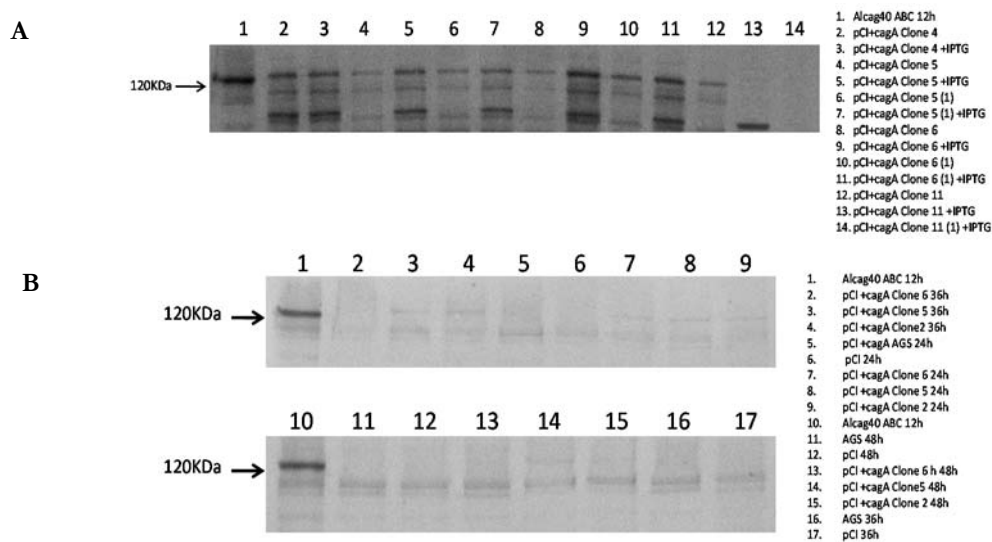


Εικόνα 23: Ανίχνευση πρωτεϊνών *CagA* σε κυτταρολύματα διαμολυσμένων (A) γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων AGS (B) κυττάρων HeLa με τη μέθοδο της ανοσοσύτωσης κατά Western μετά από απομόνωση ολικής πρωτεΐνης.

Για τους παραπάνω λόγους επιλέχθηκε η χρήση του πλασμιδιακού φορέα pCI, ο οποίος αφενός είναι απλούστερος στο σχεδιασμό του, καθώς δεν περιέχει κάποιο ειδικό πεπτιδίο σήμανσης πρωτεϊνών και αφετέρου διαθέτει τον ίδιο υποκινητή με το φορέα pCDNA3.1/Myc-His B. Διαθέτει επίσης, τις κατάλληλες θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων για την κλωνοποίηση του γονιδίου *cagA*. Επιπλέον, αμέσως μετά τον υποκινητή ακολουθεί χιμαιρικό εσώνιο σταθεροποίησης του προς έκφραση γονιδίου, προερχόμενο από το γονίδιο της ανθρώπινης β-σφαιρίνης, το οποίο επιτρέπει μεγαλύτερη παραγωγή της πρωτεΐνης. Για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου *cagA* χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθιος εκκινητής ο *cagAKpnI* και ως αντίστροφος ο *cagAL2(-)* [503], ο οποίος δεν οδηγεί σε κατάργηση του κωδικονίου λήξης της μετάφρασης, ενώ ως μήτρα DNA χρησιμοποιήθηκε γονιδιωματικό DNA προερχόμενο από το πρότυπο στέλεχος *H. pylori* 26695.

Προ της κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα pCI με τα περιοριστικά ένζυμα *KpnI* και *SmaI* και του ενθέματος με *KpnI*, ώστε να είναι εφικτή η κατευθυνόμενη κλωνοποίησή του (directional cloning). Η λειτουργικότητα των κλωνοποιημένων ενθεμάτων πιστοποιήθηκε με μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, τα οποία επιτρέπουν την έκφραση πρωτεϊνών από πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης (T7 RNA Polymerase Promoter) μετά από επαγωγή τους με IPTG. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε επαγωγή του γονιδίου *cagA* με προσθήκη IPTG και ανίχνευση της παραγόμενης πρωτεΐνης στα βακτηριακά κύτταρα με τη μέθοδο της ανοσοσύτωσης κατά Western, μέσω της οποίας διαπιστώθηκε έκφραση της *CagA* (Εικόνα 24A).

Οι κλωνοποιημένοι φορείς που οδηγούσαν σε υψηλότερη παραγωγή πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων AGS. Μετά από επώαση 24, 36 και 48 ωρών λήφθηκαν δείγματα ολικής πρωτεΐνης από τα διαμολυσμένα κύτταρα, στα οποία πραγματοποιήθηκε ανίχνευση εκφραζόμενης πρωτεΐνης CagA. Διαπιστώθηκε παραγωγή μεν της πρωτεΐνης από όλους τους κλώνους αλλά σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα, ανεξαρτήτως του χρόνου επώασης (Εικόνα 24B).

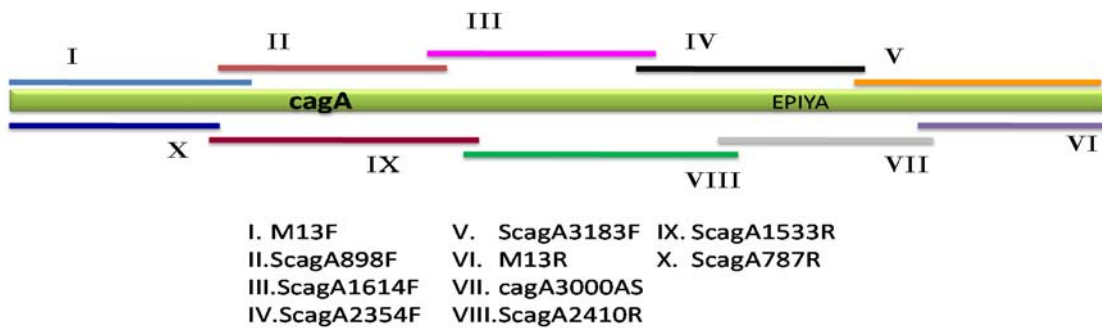


Εικόνα 24: Ανίχνευση πρωτεϊνών *CagA* σε κυτταρολύματα, από (A) βακτήρια *E. coli* B21 (DE3) rLysS που φέρουν κατάλληλα πλασμίδια έκφρασης και από (B) AGS που έχουν διαμολυνθεί με τα αντίστοιχα πλασμίδια, με τη μέθοδο της ανοσοσύτωσης κατά Western μετά από διαχωρισμό ολικής πρωτεΐνης.

3.2.5. Ανάγνωση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *cagA*

Παρόλο που στη διεθνή βιβλιογραφία, καθώς και σε ποικίλες βάσεις δεδομένων, είναι διαθέσιμος μεγάλος αριθμός νουκλεοτιδικών αλληλουχιών της 3' μεταβλητής περιοχής του γονιδίου *cagA*, οι περιπτώσεις πλήρων αλληλουχιών του γονιδίου είναι ιδιαίτερα περιορισμένες, καθώς και των μεθόδων για την επιτυχή ανάγνωσή του με την μέθοδο Sanger, κυρίως λόγω της μεγάλης προόδου τις τεχνολογίας στον τομέα της ανάγνωσης αλληλουχιών μεγάλης κλίμακας (High-throughput sequencing) και της διατηρημένης 5' περιοχής του γονιδίου. Με αφορμή την έλλειψη αυτή, πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός μιας νέας μεθόδου ανάγνωσης της πλήρους νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *cagA*, (Εικόνα 25) όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «Μέθοδοι και υλικά» (§2.7.2). Στη συνέχεια, οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες εισήχθησαν στο

λογισμικό seqMan του πακέτου DNASTAR, το οποίο επιτρέπει το χειρισμό μεγάλων αλληλουχιών, καθώς αναγνωρίζει την κατεύθυνση μιας αλληλουχίας σε σχέση με μία αλληλουχία αναφοράς, στοιχίζει, κάνει ποιοτική αξιολόγηση των αλληλουχιών και επισημαίνει τις ανακολουθίες μεταξύ τους. Η παραπάνω μέθοδος εφαρμόστηκε για την ανάγνωση του γονιδίου *cagA* του στελέχους P12 κλωνοποιημένου στον πλασμιδιακό φορέα pUC19 (Παράρτημα σελ. 276.). Η ανάγνωση έγινε με επιτυχία για όλα τα επιμέρους τμήματα του γονιδίου αποδεικνύοντας την ορθότητα του σχεδιασμού. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε παρακάτω για την ανάγνωση του γονιδίου *cagA*, όπου απαιτήθηκε.



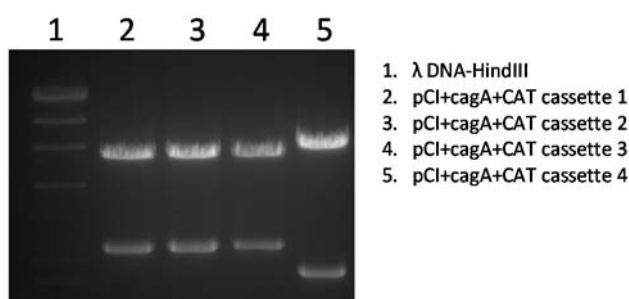
Εικόνα 25: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλοεπικάλυψης των αναγνωσμένων περιοχών από τους αντίστοιχους εκκινητές.

***3.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΣΟΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ
ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *Helicobacter pylori****

3.3.1. Παραγωγή ισογονιδιακών μεταλλαγμένων στελεχών *H. pylori* χωρίς ενεργή έκφραση της CagA (στελέχη CagA knock Out)

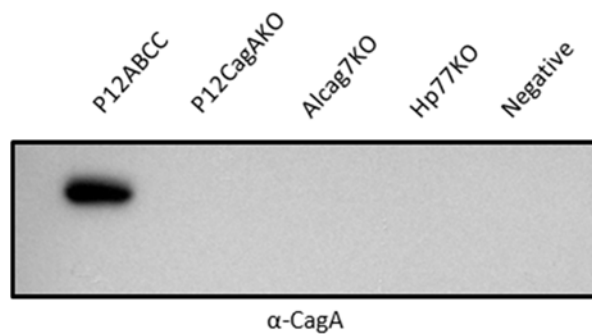
Για την παραγωγή των μεταλλαγμένων στελεχών το γονίδιο *cagA* κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pUC19. Ο πολλαπλασιασμός πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές *cagAKpnI* (πρόσθιος) και *cagAL2(-)* (αντίστροφος) και ως μήτρα DNA χρησιμοποιήθηκε το γονιδιωματικό DNA του στελέχους, στο οποίο επρόκειτο να προκληθούν οι μεταλλάξεις. Ακολούθησε πέψη του πλασμιδιακού φορέα με το περιοριστικό ένζυμο *XbaI*, απενεργοποίηση του ενζύμου, δημιουργία τυφλών άκρων με το ένζυμο DNA πολυμεράση I (κλάσμα Klenow) και τέλος, πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *KpnI*. Η ένθεση κόπηκε με το ένζυμο *KpnI*, ούτως ώστε να εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα με ορισμένη κατεύθυνση και ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* DH5a, στα οποία η παρουσία του γονιδίου *cagA* πιστοποιήθηκε με PCR σε επιλεγμένες αποικίες. Για την επιβεβαίωση της ορθής εισαγωγής των ενθεμάτων στο φορέα κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τους κλώνους που έφεραν το γονίδιο *cagA* και αναγνώστηκε η αλληλουχία στα σημεία σύνδεσης ενθέματος-πλασμιδιακού φορέα.

Για την απενεργοποίηση του γονιδίου *cagA* των επιλεγμένων κλωνικών στελεχών επιλέχθηκε το κατάλληλο κλωνοποιημένο ένθεση, στο μέσο του οποίου εισήχθη κασέτα αντοχής σε αντιβιοτικό επιλογής. Ο φορέας υπέστη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *SwaI*, το οποίο αναγνωρίζει αλληλουχία νουκλεοτιδίων στο μέσον περίπου του γονιδίου *cagA* χωρίς να επηρεάζει το φορέα pUC19 ενώ δημιουργεί, μετά την πέψη, τυφλά άκρα. Αναλόγως με την αντοχή σε αντιβιοτικά των αγρίων στελεχών επιλέχθηκε η χρήση δύο διαφορετικών κασετών αντοχής, οι οποίες προήλθαν από τα πλασμίδια pAV35 (αντοχή σε Χλωραμφαινικόλη) και pJMK30 (αντοχή



Εικόνα 26: Χαρτογράφηση περιοριστικών ενζύμων *BstXI* και *NotI* μετά από διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Διακρίνεται καθαρά το διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο μεταξύ των πλασμιδίων στα οποία το ένθεση έχει εισαχθεί κατά την ορθή κατεύθυνση (δείγματα 1-4) και σε αυτό όπου το ενθεμα έχει εισαχθεί με αντίστροφη κατεύθυνση (δείγμα 5).

σε Καναμυκίνη) [517]. Οι κασέτες εισήχθησαν στο μέσον του γονιδίου *cagA* διαταράσσοντας την αλληλουχία του και συνεπακόλουθα την παραγωγή της πρωτεΐνης. Η επιλογή των πλασμιδίων που έφεραν ορθώς κλωνοποιημένα ενθέματα, πραγματοποιήθηκε με χαρτογράφηση με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων (Εικόνα 26), η οποία οδήγησε στην επιλογή των κατάλληλων πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό των στελεχών *H. pylori* μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Η πιστοποίηση της απενεργοποίησης του γονιδίου *cagA* πραγματοποιήθηκε με ανίχνευση της έκφρασης της CagA σε δείγματα ολικής πρωτεΐνης, προερχόμενα από τα μετασχηματισμένα βακτήρια με ανοσοσύτρωση κατά Western, όπου και διαπιστώθηκε η παντελής αδυναμία έκφρασης της πρωτεΐνης CagA (Εικόνα 27).



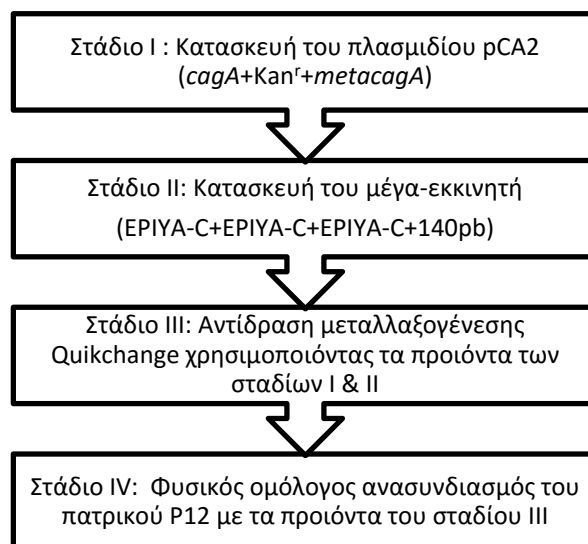
Εικόνα 27: Ανοσοσύτρωση κατά western κυτταρολυμάτων AGS κυττάρων μετά από μόλυνση με μεταλλαγμένα ισογονιδιακά στελέχη που δεν εκφράζουν πρωτεΐνη CagA με αντίσωμα α-CagA.

3.3.2. Σχεδιασμός Μεθόδου για την προσθήκη μοτίβων φωσφορυλίωσης EPIYA-C.

Η διατάραξη πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών του κυττάρου-ξενιστή, τα οποία ελέγχουν την δυναμική της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, τις διακυτταρικές συνδέσεις, την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού, τον πολλαπλασιασμό καθώς και την ενεργοποίηση προ-φλεγμονωδών και αντιαποπτωτικών πυρηνικών παραγόντων, έχουν συνδεθεί με την δράση της πρωτεΐνης CagA καθώς και με την φωσφορυλίωση της στα EPIYA μοτίβα [290]. Οι περισσότερες από τις μελέτες αυτές έχουν βασιστεί σε σύγκριση κλινικών στελεχών που έχουν απομονωθεί από διαφορετικούς ξενιστές, λόγω όμως της εξαιρετικής γενετικής πολυμορφικότητας των στελεχών *H. pylori*, οι συγκρίσεις αυτές είναι ατελείς. Για να ξεπεραστούν αυτού του είδους τα προβλήματα και για να υπάρξουν συγκρίσιμα αποτελέσματα, σε ένα ισογονιδιακό υπόβαθρο στελεχών, κατασκευάστηκαν *H. pylori* ισογονιδιακά μεταλλαγμένα στελέχη, τα οποία εξέφραζαν πρωτεΐνη CagA με μεταβλητό αριθμό EPIYA-C επαναλήψεων (AB, ABC, και ABCCC) και των

ομολόγων τους μη-φωσφορυλιώσιμων (AB, ABF , ABFF και ABFFF) με αντικατάσταση της τυροσίνης με φαινυλαλανίνη χρησιμοποιώντας ως πατρικό στέλεχος το στέλεχος αναφοράς P12.

Η κατασκευή περιελάμβανε τέσσερα στάδια (Εικόνα 28). Στο στάδιο I, κλωνοποιήθηκε το γονίδιο *cagA* μαζί με την κασέτα αντοχής στην καναμυκίνη στο 5' άκρο του, ακολουθούμενη κατόπιν από ένα τμήμα DNA 1200bp, το οποίο περιελάμβανε την αλληλουχία αμέσως μετά το γονίδιο της *cagA* (*metacagA* περιοχή) του γονιδιώματος του P12. Στο στάδιο II κατασκευάστηκε ένας μέγα-εκκινητής, ο οποίος αποτελείται από τρία συνεχόμενα αντίγραφα της EPIYA-C αλληλουχίας του γονιδίου της *cagA*, ακολουθούμενα στο 5' άκρο του από ένα τμήμα 140bp του γονιδίου της *cagA*, η οποία εκτεινόταν μετά το δεύτερο EPIYA-C. Στο στάδιο III

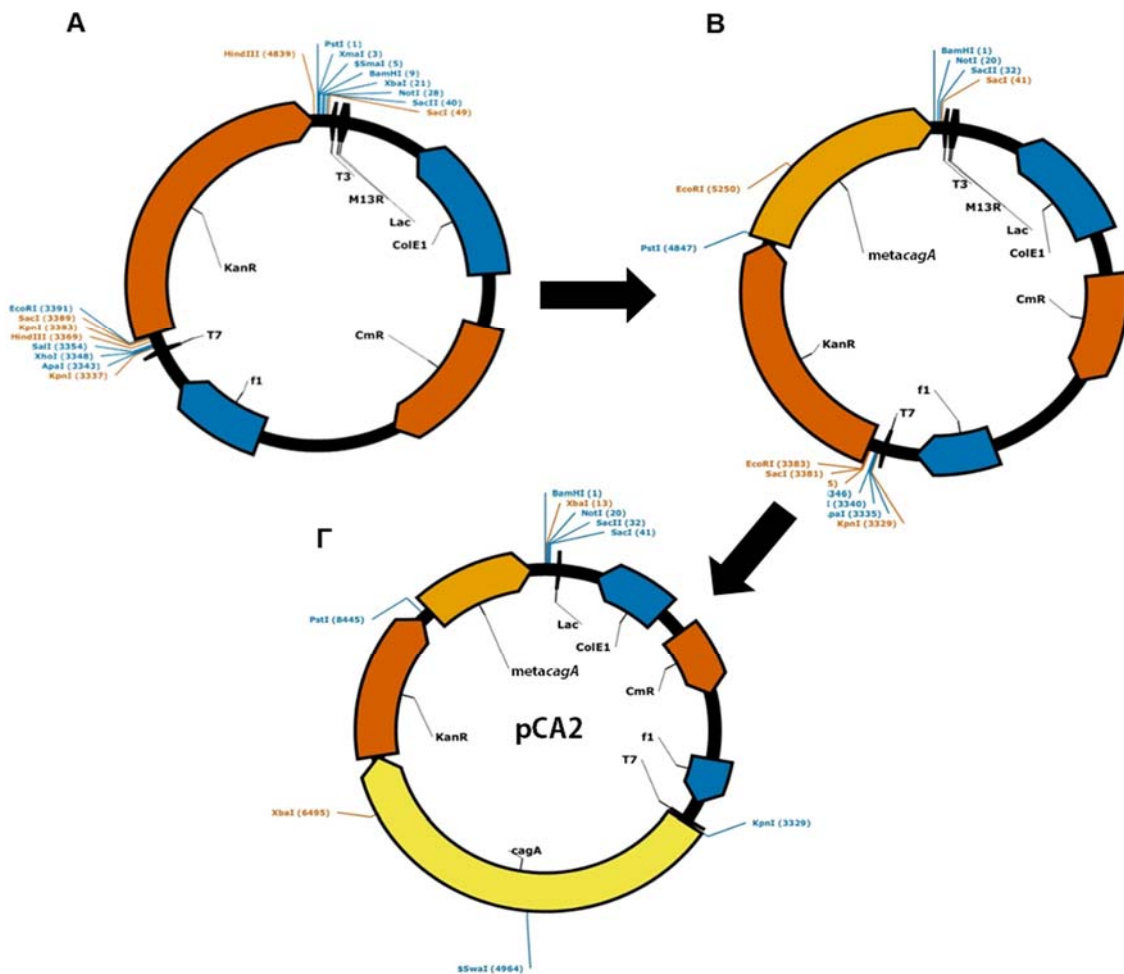


Εικόνα 28: Σχηματική παρουσίαση της πορείας κατασκευής των ισογονιδιακών στελεχών *H. pylori* τα οποία εκφράζουν πρωτεΐνη *CagA* με μεταβλητό αριθμό EPIYA-C μοτίβων.

χρησιμοποιήθηκαν τα προϊόντα των σταδίων I και II μαζί, σε μια αντίδραση μεταλλαξογένεσης του Quikchange και επιτυγχάνοντας με τον τρόπο αυτό να παραχθούν όλοι οι επιθυμητοί συνδυασμοί των EPIYA-C μοτίβων του γονιδίου της *cagA* σε μία αντίδραση, ακολουθούμενα από την κασέτα αντοχής Kan^r και αμέσως κατόπιν την *metacagA* περιοχή. Στο τελικό στάδιο IV χρησιμοποιήθηκαν αυτές οι κατασκευές, για να τροποποιηθεί με φυσικό κατευθυντήριο ομόλογο ανασυνδιασμό το πατρικό στέλεχος αγρίου τύπου P12.

3.3.2.1. Κατασκευή του πλασμιδίου pCA2 (Στάδιο I)

Η κασέτα ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (Kan^r) κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pBCSK+, μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και PstI (πλασμίδιο A). Κατόπιν, η επιτυχής ένθεση επιβεβαιώθηκε με μετασχηματισμό *E. coli* σε θρεπτικό υλικό LB, το οποίο περιείχε καναμυκίνη (50μg/ml) (Εικόνα 29A). Εν συνεχεία πολλαπλασιάστηκε με PCR η περιοχή *metacagA*, μία αλληλουχία DNA 1194bp (θέσεις 589226 έως 590419bp με βάση το γονιδίωμα του στελέχους αναφοράς P12), η οποία περιλαμβάνει το πρώτο νουκλεοτίδιο αμέσως κατόπιν από το τέλος της αλληλουχίας του γονιδίου της *cagA* έως και 1194 bp κατόπιν του γονιδίου της *cagA*. Η *metacagA* περιοχή πολλαπλασιάστηκε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *MetacagA*F και *MetacagA*R. Στον εκκινητή *MetacagA*R έχει περιληφθεί μια θέση περιορισμού για το ένζυμο BamHI, έτσι ώστε να ήταν δυνατή η κατευθυνόμενη κλωνοποίηση του θραύσματος



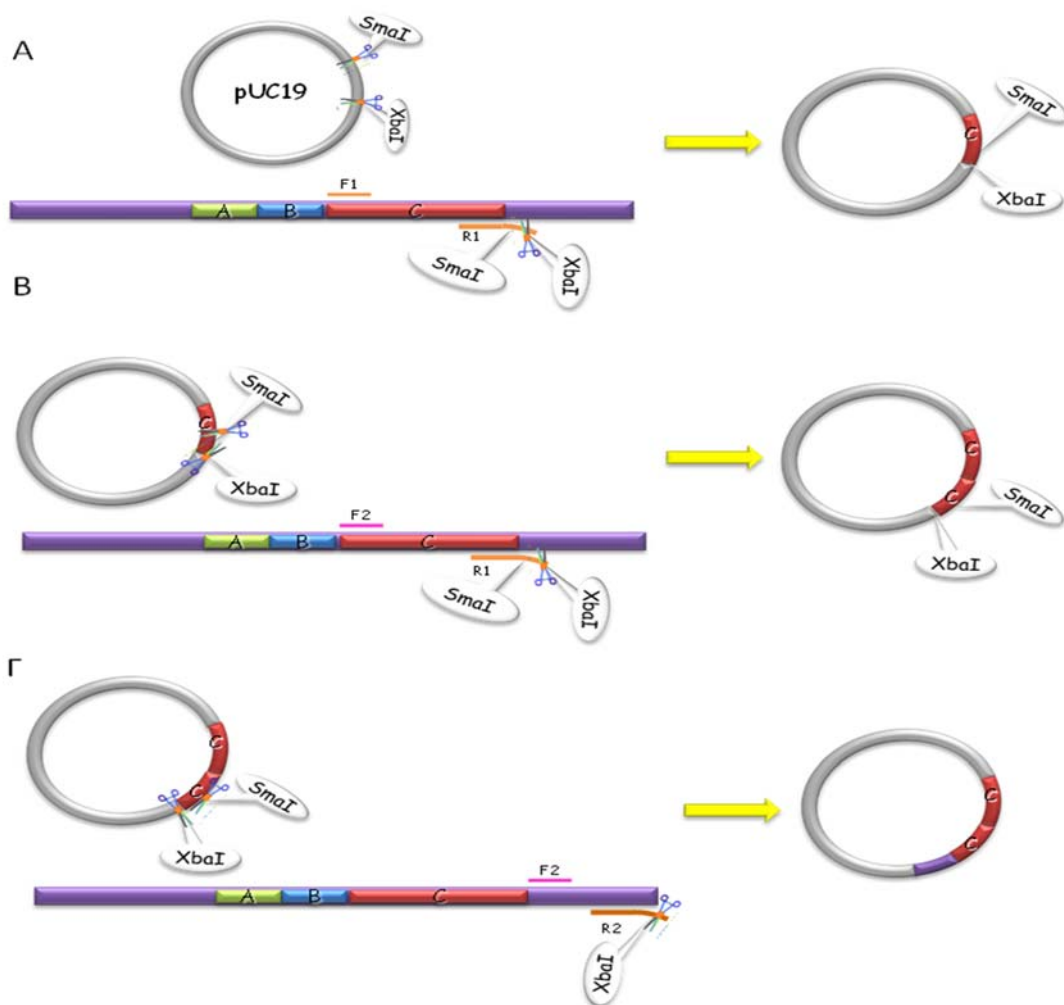
Εικόνα 29: Χάρτες των πλασμιδίων για τη σταδιακή κατασκευή του πλασμιδίου pCA2. Διακρίνεται με κίτρινο το γονίδιο της CagA, με πορτοκαλί η κασέτα αντοχής στην καναμυκίνη και με λαδί το θραύσμα *metacagA*, καθώς και οι θέσεις των περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία της κατασκευής.

metacagA στο πλασμίδιο Α, το οποίο είχε προηγουμένως υποστεί πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *SmaI* και *BamHI*. Μετά το μετασχηματισμό οι κλώνοι υποβλήθηκαν σε διαλογή με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *MetacagAF* και *MetacagAR*. Τέσσερις θετικοί κλώνοι αναλύθηκαν περαιτέρω, με ανάγνωση της αλληλουχίας, χρησιμοποιώντας στην αντίδραση τους εκκινητές *MetacagAF* και *M13R*, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ορθή εισαγωγή του *metacagA* θραύσματος (πλασμίδιο Β) (Εικόνα 29B). Ακολούθως, πολλαπλασιάστηκε το σύνολο της αλληλουχίας του γονιδίου *cagA* χρησιμοποιώντας πρόσθιο εκκινητή τον *cagAKpnI*, ο οποίος είναι ομόλογος με τα πρώτα 27 νουκλεοτίδια του γονιδίου της *cagA* μετά το κωδικόνιο έναρξης ενώ περιλάμβανε μια τεχνητή θέση περιορισμού του περιοριστικού ενζύμου *KpnI* στο 5'-άκρο του. Ο ανάστροφος εκκινητής *cagAraI* ήταν ομόλογος με τα τελευταία 33 νουκλεοτίδια του γονιδίου της *cagA* και περιλάμβανε μια τεχνητή θέση περιορισμού *ApaI*. Το παραχθέν προϊόν απομονώθηκε από πύκτωμα αγαρόζης και συνδέθηκε με το πλασμίδιο Β μετά από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *KpnI* και *ApaI* (Εικόνα 29Γ). Έπειτα, ακολούθησε μετασχηματισμός επιδεικτικών *E. coli* και οι κλώνοι που προέκυψαν, υποβλήθηκαν σε διαλογή με την EPIYA PCR [134]. Η τελική κατασκευή που αποτελείτο από *CagA*-*kan^r*-*metacagA* κλωνοποιημένα στον πλασμιδιακό φορέα *pBCSK+*, ονομάστηκε *pCA2*.

3.3.2.2. Κατασκευή του μέγα-εκκινητή της μεταλλαξογένεσης (Στάδιο II)

Στο παρόν στάδιο δημιουργήθηκε μια κατασκευή στον πλασμιδιακό φορέα *pUC19*, η οποία αποτελείτο από τρία διαδοχικά αντίγραφα της EPIYA-C αλληλουχίας του γονιδίου *cagA*, έκτασης 102 bp, ακολουθούμενη αμέσως κατόπιν από μια περιοχή 140 bp (θέσεις 588608 έως 588748 του P12 γονιδιώματος), η οποία εκτείνεται αμέσως κατόπιν της δεύτερης EPIYA-C κωδικεύουσας περιοχής στο γονίδιο της *cagA* (πλασμίδιο III) (Εικόνα 31). Για να επιτευχθεί το αναφερόμενο, κλωνοποιήθηκε πρώτα μια EPIYA-C κωδικεύουσα περιοχή στον πλασμιδιακό φορέα *pUC19* (πλασμίδιο I), μετά τον πολλαπλασιασμό της με PCR χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το *pCA2* πλασμίδιο (στάδιο I) και τους εκκινητές *F1* και *R1* (πλασμίδιο I) (Εικόνα 30A). Ο εκκινητής *R1* σχεδιάστηκε έτσι, ώστε να περιλαμβάνει τα τελευταία 15 νουκλεοτίδια του πρώτου EPIYA-C και στην συνέχεια να συμπεριλαμβάνει τα πρώτα 5 νουκλεοτίδια του δεύτερου EPIYA-C (Εικόνα 31), προκειμένου να αξιοποιηθούν τα τρία τελευταία 5'-CCC- 3' αυτής της αλληλουχίας, για να παραχθεί μια τεχνητή θέση περιορισμού *SmaI*, κατόπιν στο 3' άκρο περιλαμβάνεται επίσης μία θέση περιορισμού *XbaI* (Εικόνα 31). Ο πολλαπλασιασμός οδήγησε

στην παραγωγή δύο προϊόντων που περιείχαν είτε μία ή δύο EPIYA-C κωδικεύουσες περιοχές εν συνεχεία, το μικρότερου μοριακού βάρους προϊόν απομονώθηκε με πήκτωμα αγαρόζης, υποβλήθηκε σε πέψη με XbaI και κλωνοποιήθηκε στον pUC19 πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος προηγουμένως είχε υποστεί πέψη με τα ένζυμα SmaI και XbaI (πλασμίδιο I) (Εικόνα 30B). Για να προστεθεί μια δεύτερη και μια τρίτη EPIYA-C κωδικεύουσα περιοχή, επαναλήφθηκε ο πολλαπλασιασμός με PCR από το πλασμίδιο pCA2 αυτή τη φορά, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές F2 και R1 (Εικόνα 31). Σε αυτήν την περίπτωση το μεγαλύτερο προϊόν (200bp), το οποίο περιέχει δύο εν συνεχεία EPIYA-C μοτίβα, υπέστη πέψη με το ένζυμο XbaI και

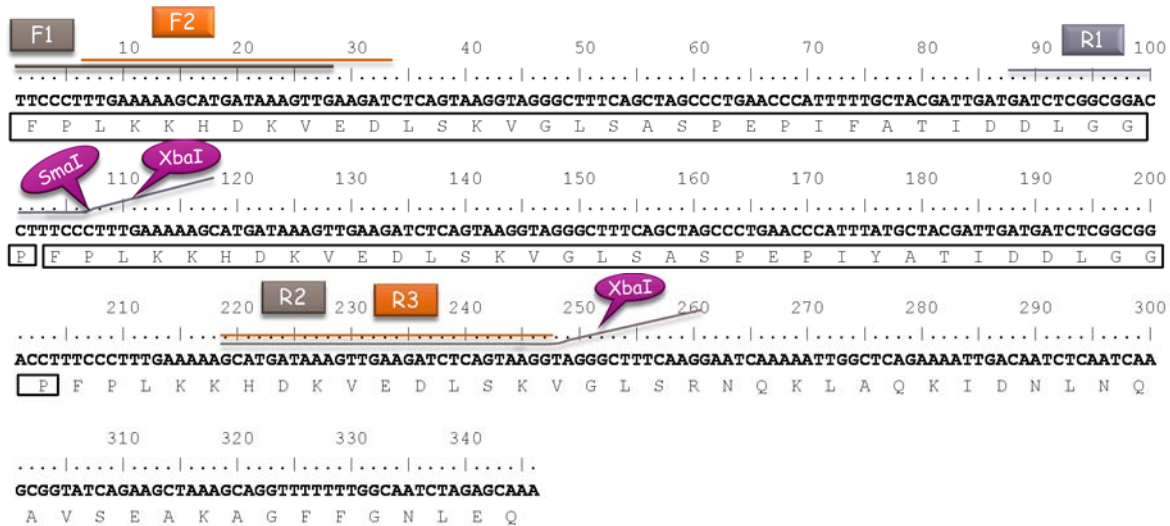


Εικόνα 30: Σχηματική αναπαράσταση της στρατηγικής κατασκευής του μέγα-εκκινητή της μεταλλαξογένεσης. (Α) Πολλαπλασιασμός με PCR ολόκληρης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που κωδικοποιεί την EPIYA-C θέση φωσφορυλίωσης μαζί με πέντε νουκλεοτίδια από το επόμενο EPIYA-C, πέψη με XbaI και κλωνοποίηση στον κομμένο με XbaI και SmaI pUC19. (Β) Το πλασμίδιο που προέκυψε από το στάδιο Α κόπηκε με XbaI και SmaI και σε αυτό κλωνοποιήθηκε PCR προϊόν το οποίο περιλαμβάνει την περιοχή της EPIYA-C θέση φωσφορυλίωσης χωρίς την παρουσία των πέντε πρώτων νουκλεοτιδίων και στο τέλος περιέχει και πέντε νουκλεοτίδια από το επόμενο EPIYA-C. (Γ) Τέλος προστέθηκε αλληλουχία περίπου 104bp η οποία περιλαμβάνει την περιοχή αμέσως μετά το τέλος της αλληλουχίας του EPIYA-C.

κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο I που προηγουμένως είχε υποστεί πέψη με τα ένζυμα περιορισμού SmaI και XbaI (πλασμίδιο II) (Εικόνα 30Γ).

Για να παραχθεί το τελικό πλασμίδιο III, η περιοχή που εκτείνεται 140bp αμέσως μετά το τέλος της EPIYA-C κωδικεύουσας περιοχής, πολλαπλασιάστηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές F1 και R2 (Εικόνα 31). Το προϊόν υποβλήθηκε σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού XbaI και κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο II, το οποίο είχε προηγουμένως υποστεί πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα XbaI και SmaI. Κατά τη διάρκεια ολόκληρης της διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε διαλογή των θετικών κλώνων με PCR, ενώ η τελική πιστοποίηση των κατασκευασμάτων επιβεβαιώθηκε με ανάγνωση της αλληλουχίας χρησιμοποιώντας τους εκκινητές M13F και M13R σε όλες τις περιπτώσεις.

Τέλος, ο μέγας-εκκινητής πολλαπλασιάστηκε με PCR από το πλασμίδιο III



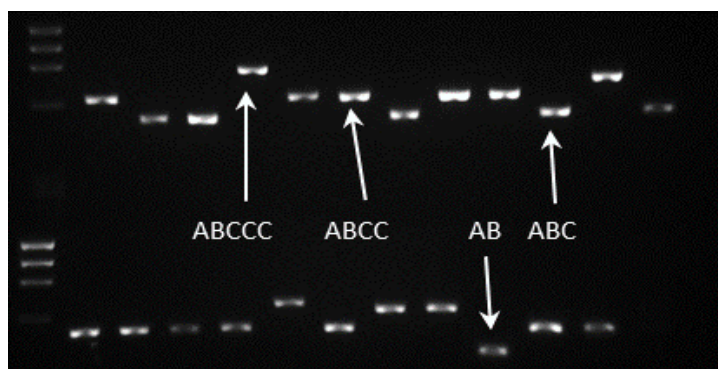
Εικόνα 31: Νουκλεοτιδική αλληλουχία του στελέχους αναφοράς P12 (588404 έως 588748 bp) τα οποία συμμετέχουν στην παραγωγή του μέγα-εκκινητή της μεταλλαξιγένεσης κατά τη διάρκεια του σταδίου II. Απεικονίζεται η θέση των εκκινητών που χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό των θραυσμάτων DNA στην παραγωγή του μέγα-εκκινητή.

χρησιμοποιώντας τους εκκινητές F1, R3 και την Vent DNA πολυμεράση. Το μεγαλύτερο προϊόν (443bp) απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης.

3.3.2.3. Τροποποιημένη αντίδραση μεταλλαξογένεσης Quikchange (Στάδιο III)

Χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο pCA2 ως εικαγείο και το μέγα-εκκινητή πραγματοποιήθηκε μια τροποποιημένη αντίδραση μεταλλαξογένεσης QuikChange. Στην συνέχεια οι κλώνοι που προέκυψαν ελέγχθηκαν για τον αριθμό των EPIYA-C επαναλήψεων που

έφεραν στο *cagA* με την μέθοδο της EPIYA PCR. Διαπιστώθηκε ότι ήταν κατορθωτό σε μία αντίδραση να παραχθούν όλοι οι επιθυμητοί συνδυασμοί EPIYA-C επαναλήψεων. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν οι εξής συνδυασμοί: AB, ABC και ABCCC (Εικόνα 32). Η ορθότητα των αλληλουχιών σε όλες τις περιπτώσεις επαληθεύτηκε μετά από ανάγνωση της αλληλουχίας DNA των προϊόντων της EPIYA PCR (Παράρτημα σελ. 276). Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν κλωνοποιημένες σε πλασμιδιακό φορέα, γονιδιακές αλληλουχίες του P12 γονιδίου της *cagA*, οι οποίες περιείχαν τους αντίστοιχους EPIYA συνδυασμούς ως εξής: AB (πλασμίδιο pCA0), ABC (πλασμίδιο pCA1) και ABCCC (πλασμίδιο pCA3).



Εικόνα 32: Διαλογή κλώνων με βάση τον αριθμό των EPIYA-C μοτίβων φωσφορυλίωσης στο πλασμίδιο pCA2 μετά από την πραγματοποίηση αντίδρασης μεταλλαξογένεσης στο στάδιο III. DNA από κλώνους *E. coli* υποβλήθηκαν σε EPIYA PCR [1] και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πήκτωμα περιεκτικότητας 1,5% σε αгарόζη.

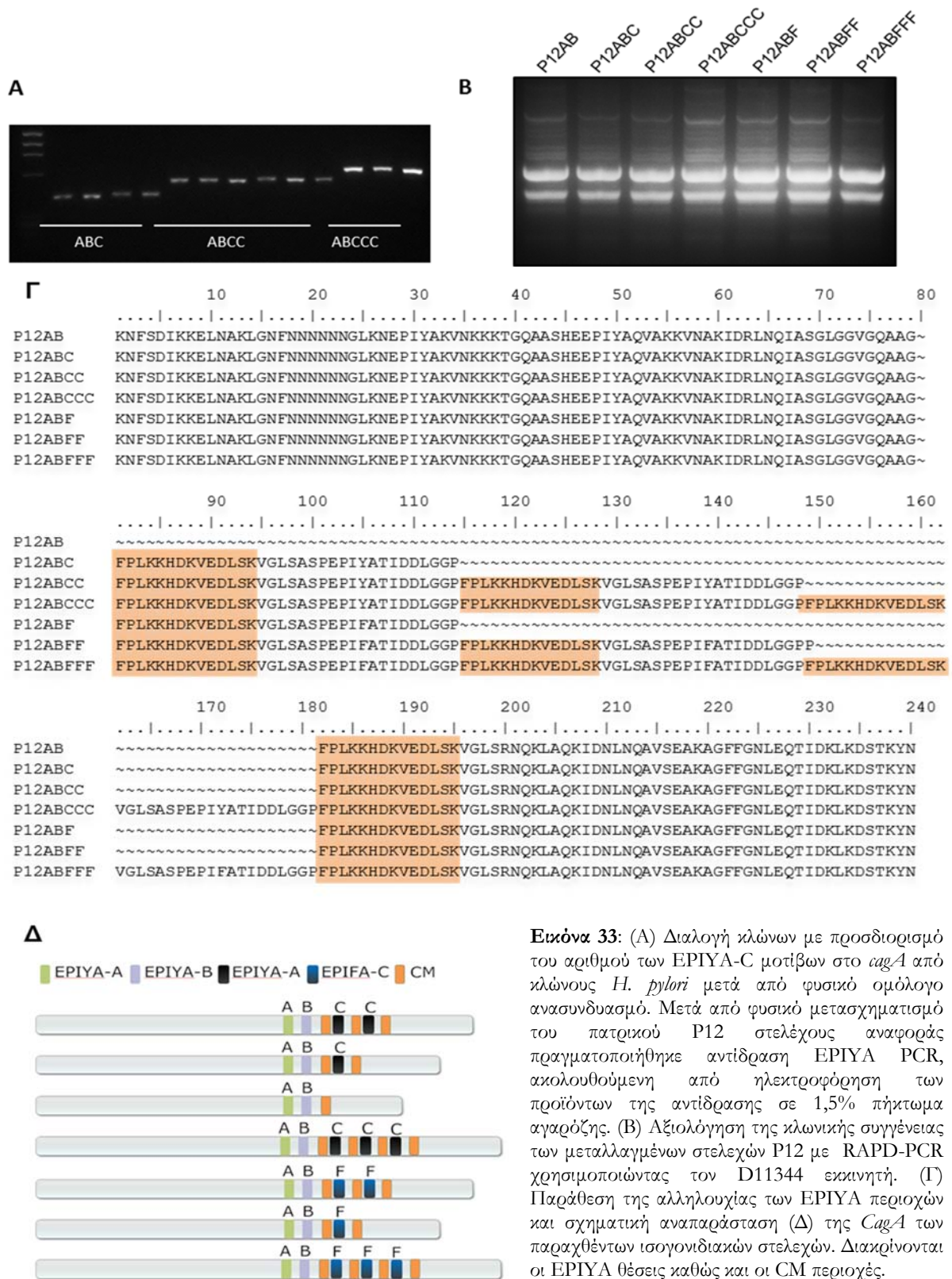
3.3.2.4. Δημιουργία μη φωσφορυλιώσιμων μοτίβων EPIFA στο γονίδιο *cagA*.

Για την δημιουργία μη φωσφορυλιώσιμων μοτίβων (EPIFA) στο γονίδιο *cagA* πραγματοποιήθηκε σημειακή μετάλλαξη του κωδικόνιου που αντιστοιχεί στο αμινοξύ τυροσίνη σε κωδικόνιο φαινυλαλανίνης. Αυτό επετεύχθη αντικαθιστώντας το δεύτερο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου τυροσίνης, από αδενίνη σε θυμίνη με αποτέλεσμα να προκύπτει το κωδικόνιο αμινοξέος φαινυλαλανίνης (TAT→TTT). Για την πραγματοποίηση της σημειακής αυτής μετάλλαξης ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit και με βάση αυτές σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι για την μέθοδο εκκινητές (EPIFA-F και EPIFA-R). Η ορθότητα των αλληλουχιών σε όλες τις περιπτώσεις επαληθεύτηκε μετά από ανάγνωση της αλληλουχίας DNA (Παράρτημα σελ. 276). Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν κλωνοποιημένες σε πλασμιδιακό φορέα, γονιδιακές αλληλουχίες του P12 γονιδίου της *cagA*, οι οποίες περιείχαν

τους αντίστοιχους EPIFA συνδυασμούς ως εξής: ABF (πλασμίδιο pCA1.1), ABFF (πλασμίδιο pCA2.2), ABFFF (πλασμίδιο pCA3.3)

3.3.2.5. Μετασχηματισμός στελεχών *H. pylori* και παραγωγή ισογονιδιακών CagA-θετικών στελεχών (Στάδιο IV)

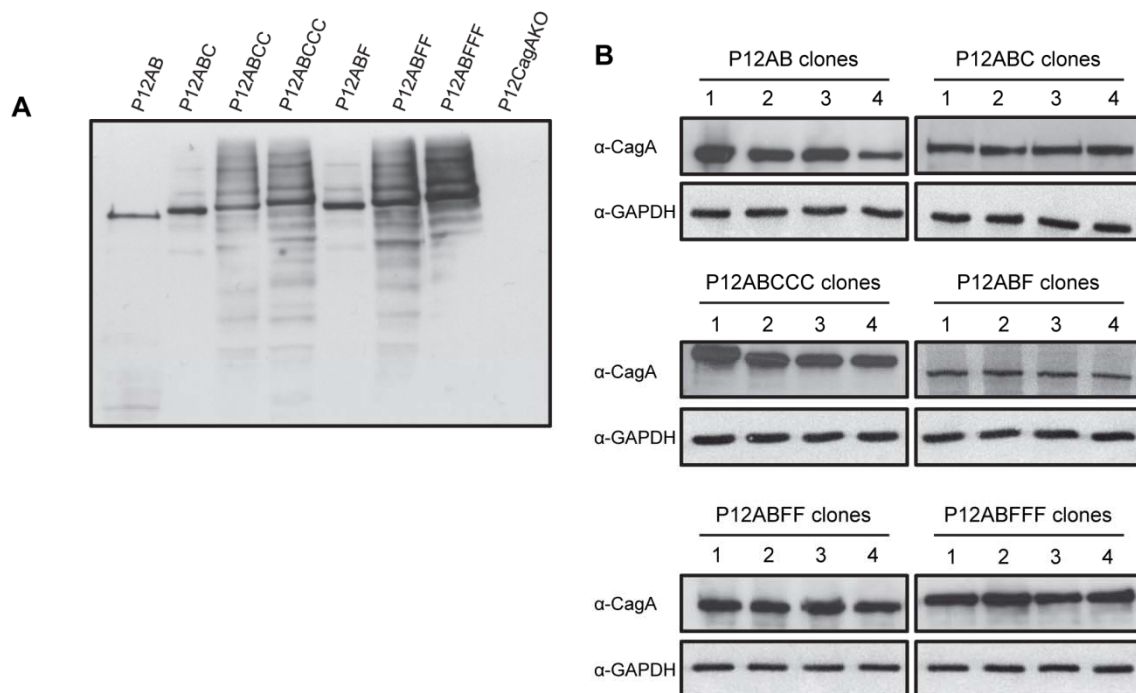
Όλα τα κατασκευασμένα πλασμίδια (pCA0, pCA1, PCA3, pCA1.1, pCA2.2 και pCA3.3) τροποποίησαν επιτυχώς το *cagA* στο πατρικό P12 στέλεχος, μέσω φυσικού ομόλογου ανασυνδυασμού. Περισσότερες από 150 αποικίες παρατηρήθηκαν σε κάθε περίπτωση μετασχηματισμού. Από αυτές οκτώ κλώνοι ελήφθησαν από κάθε περίπτωση, για περαιτέρω αξιολόγηση με την μέθοδο της EPIYA PCR (Εικόνα 16Α). Όλα τα μεταλλαγμένα *H. pylori* στελέχη παρουσίασαν ταυτόσημη κλωνικότητα σε σχέση με το πατρικό P12 στέλεχος, όπως αποδείχθηκε από τα αποτελέσματα της RAPD PCR [233] (Εικόνα 16Β). Η ορθότητα της διαδικασίας μεταλλαξογένεσης επαληθεύτηκε σε όλες τις περιπτώσεις με ανάγνωση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων των γονιδίων *cagA* στα γενετικά μεταλλαγμένα ισογονιδιακά στελέχη (Εικόνα 16Γ, Δ & Παράρτημα σελ. 276)



***3.4. ΔΙΑΛΟΓΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ***

3.4.1. Διαλογή στελεχών με βάση την ικανότητα έκφρασης της πρωτεΐνης CagA

Μετά την παραγωγή των γενετικά μεταλλαγμένων ισογονιδιακών βακτηρίων *H. pylori* πραγματοποιήθηκε σειρά λειτουργικών δοκιμασιών σε όλους τους διαφορετικούς απομονωθέντες κλώνους, προκειμένου να επιλεγεί ο καταλληλότερος για κάθε μεταλλαγμένο στέλεχος. Εξετάστηκαν τουλάχιστον 8 κλώνοι ανά συνδυασμό EPIYA της *cagA* και προσδιορίστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης CagA με ανοσοσύτωση κατά western, αρχικά σε βακτηριακά κυτταρολύματα (Εικόνα 34A) και κατόπιν σε ολικά κυτταρολύματα γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων AGS μετά από μόλυνσή τους με όλους τους υπό εξέταση κλώνους (Εικόνα 34B). Η έκφραση της πρωτεΐνης CagA στα βακτηριακά στελέχη βρέθηκε να είναι συγκρίσιμη με εκείνη του πατρικού στελέχους (Εικόνα 34A). Παρατηρήθηκαν ακόμα, διαβάθμιση μεγέθους, η οποία ήταν ανάλογη με το διαφορετικό αριθμό EPIYA-C μοτίβων στο γονίδιο της *cagA* (Εικόνα 34A). Στην συνέχεια, επιλέχθηκε ένας κλώνος από κάθε διαφορετικό μεταλλαγμένο βακτήριο με βάση το υψηλότερο ποσοστό έκφρασης της CagA πρωτεΐνης, μετά από μόλυνση AGS κυττάρων (Εικόνα 34B).



Εικόνα 34: Ανοσοσύτωση κατά western με α-CagA και α-GAPDH αντισώματα σε (A) κυτταρολύματα όλων των μεταλλαγμένων ισογονιδιακών βακτηρίων και (B) κυτταρολύματα AGS κυττάρων τα οποία έχουν μολυνθεί με όλους τους κλώνους των μεταλλαγμένων στελεχών

3.4.2. Αξιολόγηση του βακτηριακού ρυθμού ανάπτυξης και του ποσοστού επαγωγής κυτταροσκελετικών μεταβολών σε γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα

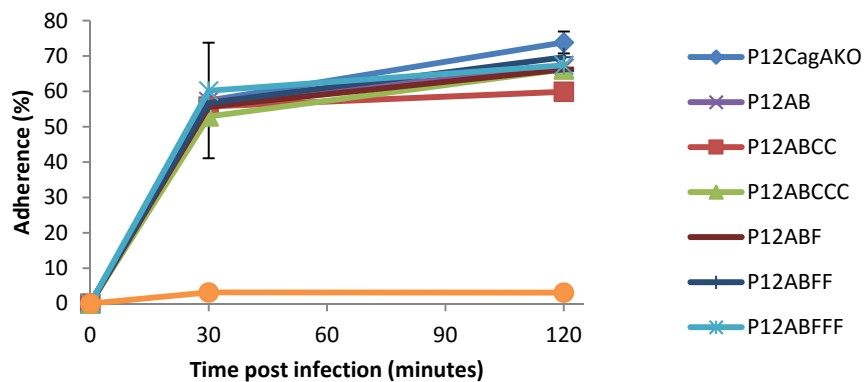
Μετά την επιλογή ενός κλώνου ανά συνδυασμό EPIYA της CagA, επιδιώχθηκε να προσδιορισθεί εάν οι κλώνοι αυτοί εμφάνιζαν τους ίδιους ρυθμούς ανάπτυξης σε σχέση με το πατρικό P12 στέλεχος. Για να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες *H. pylori* υπό μικροαερόφιλες συνθήκες και συνεχή ανάδευση και προσδιορίστηκε ο αριθμός των βακτηρίων σε επιλεγμένες χρονικές στιγμές. Οι ρυθμοί ανάπτυξης (k) υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τον τύπο $N=N_0e^{kt}$, όπου N_0 ήταν το αρχικό βακτηριακό εμβόλιο (σε CFU) και N ο αριθμός των βακτηρίων (σε cfu) στο επιλεγμένο χρονικό σημείο t (Πίνακας 15). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στους προσδιοριζόμενους ρυθμούς ανάπτυξης μεταξύ του πατρικού στελέχους P12 και των μεταλλαγμένων στελεχών P12, τόσο στη λογαριθμική όσο και στην στατική φάση ανάπτυξης (Πίνακας 15).

Πίνακας 15: Οι ρυθμοί ανάπτυξης των μεταλλαγμένων στελεχών *H. pylori*

	Ρυθμός Ανάπτυξης*	
	5h	10h
P12AB	2.22	0.00
P12ABC	2.16	0.02
P12ABCC	2.25	0.01
P12ABCCC	2.12	0.00
P12ABF	2.20	0.03
P12ABFF	2.19	0.02
P12ABFFF	2.26	-0.07

* $N=N_0e^{kt}$

Επιπλέον, για να αποκλεισθούν διαφορές στην ικανότητα προσκόλλησης των παραχθέντων βακτηρίων στα AGS κύτταρα, πραγματοποιήθηκε σήμανση των μεταλλαγμένων *H. pylori* στελεχών με χρώση CFDA-SE και στην συνέχεια με ανάλυση FACS προσδιορίστηκε το ποσοστό προσκόλλησης των *H. pylori* στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα AGS [1]. Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ του πατρικού στελέχους P12, του P12CagAKO και των διαφορετικών CagA μεταλλαγμένων στελεχών (Εικόνα 35). Το ποσοστό προσκόλλησης όλων των στελεχών *H. pylori* υπολογίστηκε ότι είναι πάνω από 55% μέσα στην πρώτη μισή ώρα μετά τη μόλυνση.

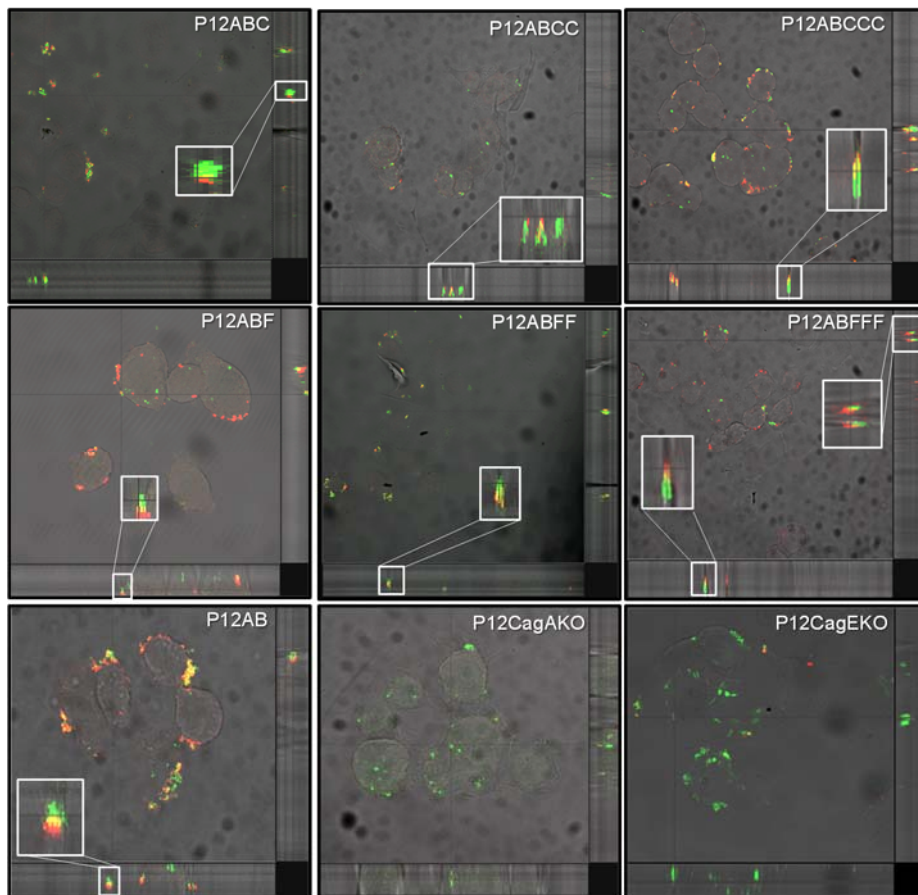


Εικόνα 35: Η προσκόλληση των CFDA-SE-σημασμένων *H. pylori* μεταλλαγμένων στελεχών στην επιφάνεια των κυττάρων AGS προσδιορίστηκε με ανάλυση FACS [1]. Η προσκόλληση (%) αναφέρεται στο ποσοστό των κυττάρων AGS τα οποία ανιχνεύθηκαν να φέρουν δεσμευμένο επάνω τους φθορίζοντα βακτήρια.

3.4.3. Λειτουργικότητα του τύπου IV εκκριτικού συστήματος, επιτυχής μεταφορά της CagA στο εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων και φωσφορυλίωση της σε θέσεις τυροσίνης

Επιβεβαιώθηκε κατόπιν η λειτουργικότητα του τύπου IV εκκριτικού συστήματος. Σημάνθηκαν τα βακτήρια με χρώση CFDA-SE, η οποία φθορίζει στο πράσινο, ταυτόχρονα προσδιορίστηκε με ανοσοφθορισμό η πρωτεΐνη CagA με χρήση Alexa Fluor 546 goat α -rabbit IgG αντισώματος που φθορίζει στο κόκκινο, και ακολούθησε ανάλυση με συνεστιακή μικροσκοπία. Μετά από ανασυγκρότηση (reconstruction) της εικόνας στον z-άξονα εμφανίστηκαν χαρακτηριστικές κίτρινες προεκβολές στα προσκολλημένα σε κύτταρα AGS βακτήρια, υποδηλώνοντας την δόμηση ενός λειτουργικού T4SS, το οποίο επιτυχώς μετέφερε την πρωτεΐνη CagA στο εσωτερικό των κυττάρων (Εικόνα 36). Η παρατήρηση αυτή κατέστη εφικτή για όλα τα διαφορετικά ισογονιδιακά μεταλλαγμένα στελέχη, τα οποία εξέφραζαν CagA με μεταβλητό αριθμό μοτίβων EPIYA και EPIFA. Αντιθέτως, καμία τέτοια κίτρινη προεκβολή δεν ανιχνεύθηκε στα προσκολλημένα σε κύτταρα AGS βακτήρια, τόσο στην περίπτωση του στελέχους P12 CagEKO, το οποίο εξέφραζε ένα μη λειτουργικό T4SS όσο και του P12CagAKO στελέχους που στερείτο έκφραση της πρωτεΐνης CagA (Εικόνα 36).

Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA προσδιορίστηκε μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιώντας το αντίσωμα αντί-τυροσίνης PY20 και ακόλουθη ανοσοανίχνευση της CagA με ειδικό α -CagA αντίσωμα (Εικόνα 37A), Επιπλέον ανίχνευση φωσφορυλιωμένης CagA έγινε και με

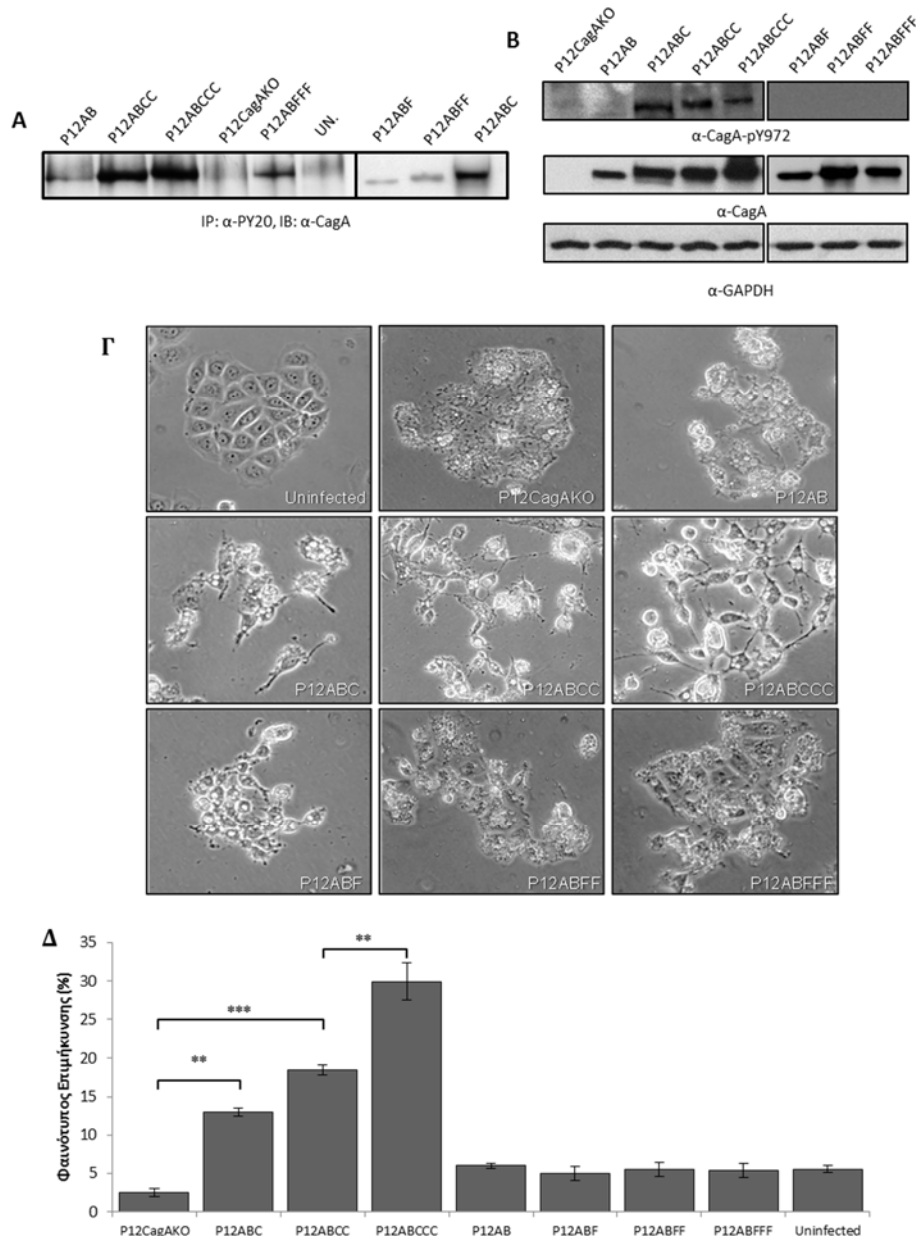


Εικόνα 36: Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας μετά από ανάλυση ανασυγκρότησης εικόνας. Η πρωτεΐνη *CagA* έχει σημειωθεί με το αντίσωμα Alexa Fluor 546 goat α -rabbit IgG (κόκκινο) ενώ τα βακτήρια με CFDA-SE (πράσινο). Στον z-άξονα παρατηρούνται χαρακτηριστικές κίτρινες προεκβολές υποδηλώνοντας την δόμηση ενός λειτουργικού T4SS.

τη χρήση ειδικού αντισώματος α -phospho-CagA Tyr972 (Εικόνα 37B), που αναγνώριζε μόνο *CagA* πρωτεΐνη φωσφορυλιωμένη στη συγκεκριμένη θέση τυροσίνης. Σε όλες τις περιπτώσεις ήταν εφικτό να ανιχνευτεί πρωτεΐνη *CagA* φωσφορυλιωμένη στα κατάλοιπα τυροσίνης στο αναμενόμενο μοριακό βάρος, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη είχε με επιτυχία μεταφερθεί στο εσωτερικό των κυττάρων (Εικόνα 37A και B).

Επιπροσθέτως, αξιολογήθηκε η ικανότητα των μεταλλαγμένων στελεχών να επάγουν κυτταροσκελετικές μεταβολές σε γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 37Γ). Παρατηρήθηκε εξάρτηση της εμφάνισης κυτταροσκελετικών μεταβολών σε σχέση με τον αριθμό των EPIYA-C θέσεων και με την ικανότητα φωσφορυλίωσής τους (Εικόνα 37Δ). Πιο συγκεκριμένα, κυτταροσκελετικές μεταβολές, ανάλογες προς τον αριθμό των EPIYA-C μοτίβων φωσφορυλίωσης, παρατηρήθηκαν μόνο για τα βακτηριακά στελέχη P12ABC, P12ABCC (στελέχος άγριου τύπου) και P12ABCCC (Εικόνα 37Γ, Δ). Αντιθέτως, τα στελέχη P12CagAKO,

P12AB, τα οποία στερούντο λειτουργικών EPIYA-C μοτίβων, ή τα P12ABF, P12ABFF και P12ABFFF μεταλλαγμένα στελέχη με μη φωσφορυλιώσιμες EPIFA-C μορφές μοτίβων, απέτυχαν να επάγουν κυτταροσκελετικές μεταβολές στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα AGS (Εικόνα 37 Γ, Δ).

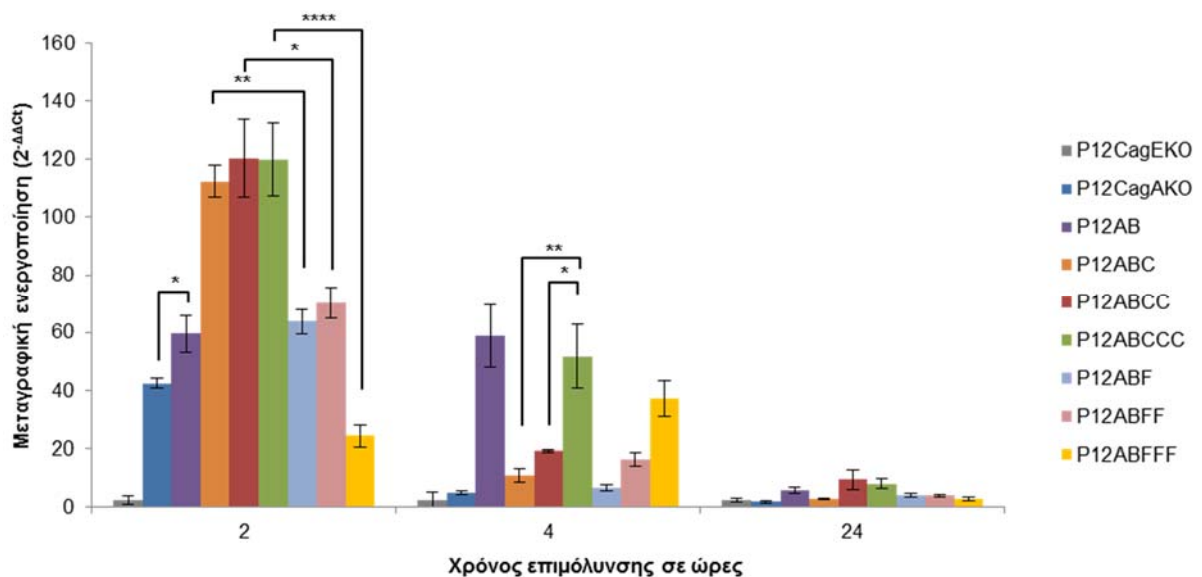


Εικόνα 37: (Α) Ανοσοκατακρήμνιση όλων των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών και ανοσοσύτωση κατά western με α -CagA αντίσωμα. (Β) Ανοσοσύτωση κατά western κυτταρολυμάτων AGS κυττάρων μετά από μόλυνση με όλα τα μεταλλαγμένα ισογονιδιακά στελέχη με τα αντισώματα α -CagA-pY972, α -CagA και α -GAPDH. (Γ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες AGS κυττάρων τα οποία έχουν μολυνθεί με όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη. (Δ) Εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων που εκφράζουν τον ραμφοειδή φαινότυπο.

**3.5. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΜΟΤΙΒΩΝ
ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΜΕΝΗΣ ΕΡΙΥΑ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ
CagA ΤΟΥ *H. pylori* ΣΥΜΒΑΛΛΕΙ ΣΤΗΝ ΕΚΚΡΙΣΗ
IL-8 ΑΠΟ ΤΑ ΓΑΣΤΡΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

3.5.1. Επίδραση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης CagA σε θέσεις EPIYA-C στην μεταγραφική ενεργοποίηση της IL-8.

Για την μελέτη της επίδρασης της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης CagA σε θέσεις EPIYA-C στην μεταγραφή του γονιδίου της IL-8, χρησιμοποιήθηκε *in vitro* μοντέλο πειραματικής λοίμωξης *H. pylori* στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα (AGS). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένα ισογονιδιακά στελέχη *H. pylori*, τα οποία είτε εξέφραζαν την πρωτεΐνη CagA με διαφορετικό αριθμό λειτουργικών θέσεων EPIYA-C (P12AB, P12ABC, P12ABCC, P12ABCCC) είτε των αντιστοιχών μη φωσφορυλιώσιμων αναλόγων τους (P12ABF, P12ABFF, P12ABFFF) είτε τέλος, δεν εξέφραζαν καθόλου CagA (P12CagAKO). Στην συνέχεια έγινε απομόνωση RNA σε χρονικές στιγμές 2, 4 και 24 ωρών μετά την επιμόλυνση και μετρήθηκε η ενεργοποίηση του γονιδίου της IL-8 με μέθοδο ποσοτικής Real Time PCR [480]. Τα στελέχη P12ABCCC, P12ABCC και P12ABC επήγαγαν, στις 2 ώρες μετά τη μόλυνση, εξίσου τα υψηλότερα επίπεδα μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της IL-8 (120-, 120- και 112- φορές, αντίστοιχα) σε σύγκριση με μη μολυσμένα κύτταρα (Εικόνα 38). Αντιθέτως, το στέλεχος P12AB, το οποίο στερείται αλληλουχιών φωσφορυλίωσης EPIYA-C στην πρωτεΐνη CagA, επήγαγε την μεταγραφική ενεργοποίηση της IL-8 σε επίπεδα 60-πλάσια σε σύγκριση με εκείνα που επάγονται από τα στελέχη P12ABCCC ($p=0,006$), P12ABCC ($p=0,007$) και P12ABC

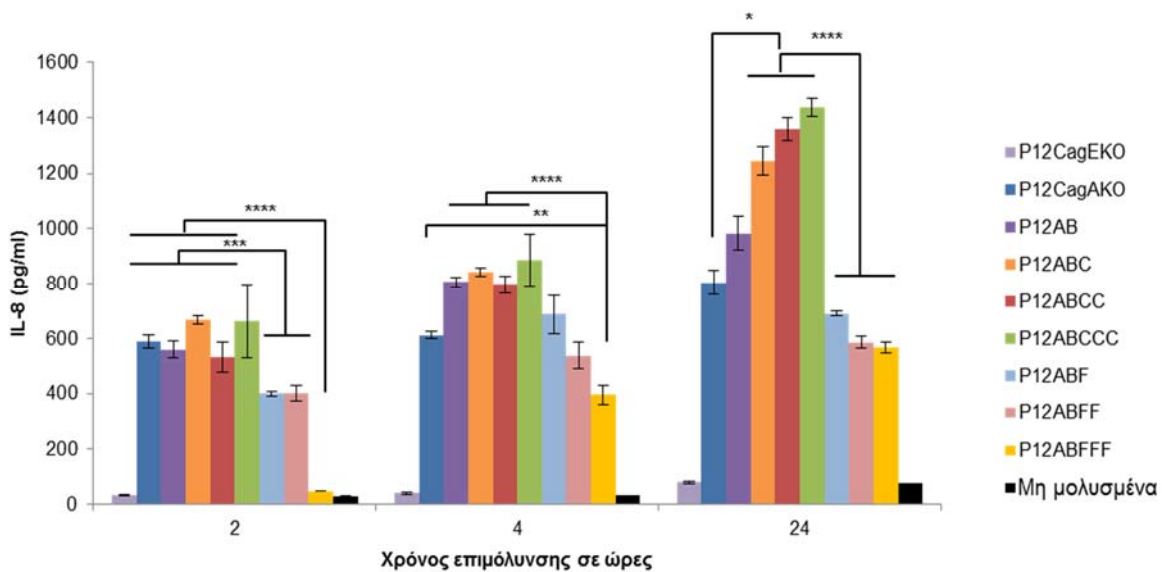


Εικόνα 38: Μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της IL-8 σε AGS κύτταρα τα οποία έχουν μολυνθεί με τα μεταλλαγμένα στελέχη. Η μεταγραφική ενεργοποίηση καθορίστηκε με την χρήση ποσοτικής Real Time PCR στις 2, 4 και 24h ώρες μετά την μόλυνση. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το Student t-test και τα επίπεδα σημαντικότητας συμβολίζονται ως εξής * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 , **** <0.0001 .

($p=0,002$), μια στατιστικά σημαντική μείωση. Επιπλέον, η προκληθείσα ενεργοποίηση της IL-8 από τα στελέχη που εξέφραζαν CagA με μη-φωσφορυλιωμένα μοτίβα EPIFA-C, παρατηρήθηκε ότι μειώθηκε περίπου κατά 50% για τα στελέχη P12ABF και P12ABFF (64- και 70-φορές σε σχέση με τα αντίστοιχα λειτουργικά στελέχη) και μειώθηκε ακόμη περισσότερο για το στέλεχος P12ABFFF (24-φορές), σε επίπεδα χαμηλότερα από εκείνα που παρατηρήθηκαν ακόμα και για το στέλεχος P12CagAKO (42-φορές). Στις 4 ώρες μετά την μόλυνση, η ενεργοποίηση της IL-8 που προκλήθηκε από το στέλεχος P12ABCCC, διατηρήθηκε σε πολύ υψηλότερο επίπεδο (50-φορές) σε σύγκριση με εκείνα που παρατηρήθηκαν για τα στελέχη P12ABCC ($p=0,001$) και P12ABC ($p=0,0009$, Εικόνα 38). Τα προαναφερθέντα στελέχη μαζί με τα P12CagAKO, P12ABFF και P12ABF δεν επήγαγαν το γονίδιο της IL-8 στις 4 ώρες μετά την μόλυνση. Αρκετά ενδιαφέρουσα είναι και η παρατήρηση ότι, αν και η ενεργοποίηση της IL-8 από το στέλεχος AB παρέμεινε αμετάβλητη μεταξύ 2 και 4 ωρών, το στέλεχος P12ABFFF συνέβαλε στην οριακή αύξηση της ενεργοποίησης της IL-8 μεταξύ 2 και 4 ωρών ($p=0,05$). Στις 24 ώρες μετά την μόλυνση, η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της IL-8 στα μολυσμένα κύτταρα μειώθηκε στα επίπεδα υποβάθρου (background) (Εικόνα 38).

3.5.2. Επίδραση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης CagA σε θέσεις EPIYA στην έκκριση της IL-8 από γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα.

Για την μελέτη της επίδρασης της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης CagA σε θέσεις

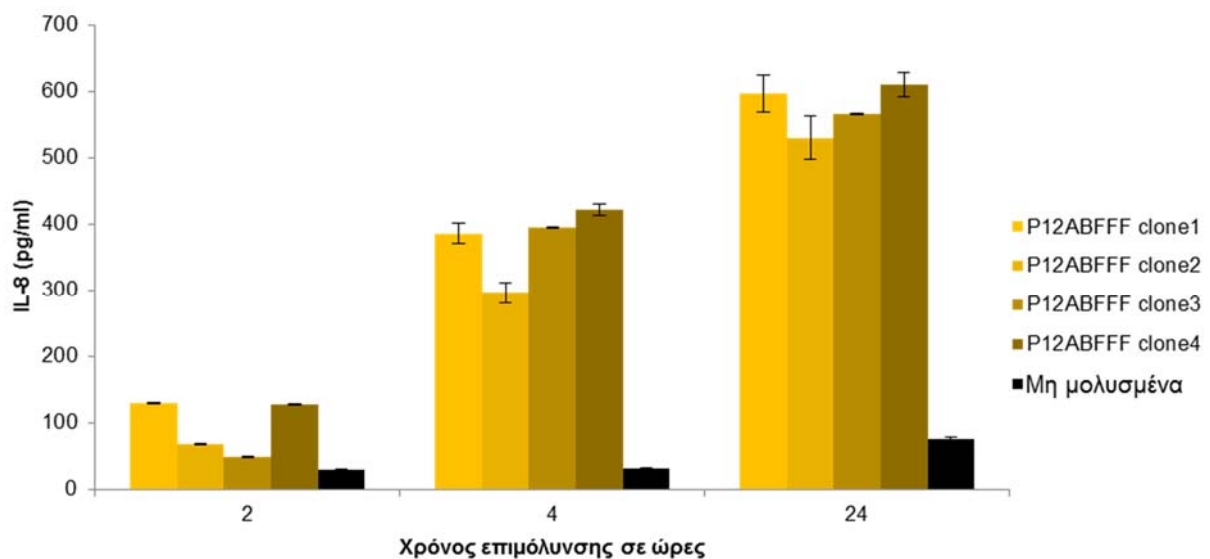


Εικόνα 39: Επαγωγή της έκκρισης της IL-8 σε υπερχείμιστα AGS κυττάρων τα οποία έχουν μολυνθεί με *H. pylori* τα οποία εκφράζουν πρωτεΐνη CagA με μεταβλητό αριθμό EPIYA-C επαναλήψεων. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το Student t-test και τα επίπεδα σημαντικότητας συμβολίζονται ως εξής * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$, **** $<0,0001$.

EPIYA-C στα επίπεδα της εκκρινόμενης IL-8, γαστρικές επιθηλιακές κυτταρικές σειρές AGS και MKN-45 μολύνθηκαν με όλα τα μεταλλαγμένα ισογονιδιακά στελέχη *H. pylori* (P12CagAKO, P12CagEKO P12AB, P12ABC, P12ABCC, P12ABCCC, P12ABF, P12ABFF, P12ABFFF) και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της εκκρινόμενης IL-8 πρωτεΐνης στα υπερκείμενα των καλλιέργειών (Εικόνα 38 & Εικόνα 41).

Στις 2 ώρες μετά την μόλυνση όλα τα στελέχη προκάλεσαν την έκκριση παρόμοιων ποσοτήτων IL-8 πρωτεΐνης, (600 pg/ml) με εξαίρεση τα στελέχη P12ABF και P12ABFF, τα οποία εμφάνισαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα IL-8 (400pg/ml), ενώ στην περίπτωση του P12ABFFF τα επίπεδα της εκκρινόμενης πρωτεΐνης IL-8 ήταν αμελητέα και συγκρίσιμα με τα επίπεδα ελέγχου στα μη μολυσμένα κύτταρα (Εικόνα 39). Επιπλέον, το στέλεχος P12ABFFF επήγαγε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα της εκκρινόμενης IL-8 σε σύγκριση με όλα τα άλλα στελέχη στις 4 ώρες ($p=0,001$), καθώς και στις 24 ώρες ($p=0,004$) μετά την μόλυνση (Εικόνα 39). Αυτή η χαρακτηριστική καθυστέρηση στην έκκριση της IL-8 που προκαλείται από το στέλεχος P12ABFFF, ήταν εμφανής σε όλα τα επαναλαμβανόμενα διαφορετικά πειράματα, στα οποία τα επίπεδα της εκκρινόμενης IL-8 βρέθηκαν να είναι σταθερά χαμηλότερα από εκείνα που παρατηρήθηκαν ακόμα και για το στέλεχος που δεν εκφράζει την πρωτεΐνη CagA (P12CagAKO).

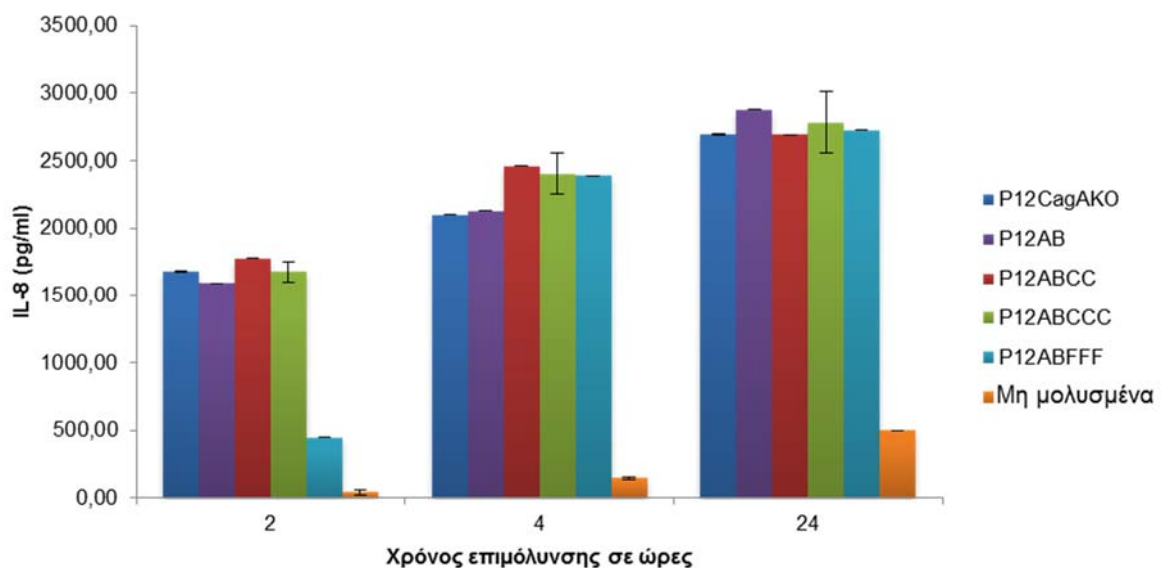
Για την περαιτέρω μελέτη του φαινομένου, χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον κλώνοι P12ABFFF, οι οποίοι είχαν απομονωθεί κατά την κατασκευή, όπως περιγράφεται παραπάνω § 3.3.1 (Εικόνα 40).



Εικόνα 40: AGS κύτταρα μολυσμένα με διαφορετικούς κλώνους του στελέχους P12ABFFF, οι οποίοι εκφράζουν *CagA* πρωτεΐνη με τρία συνεχόμενες EPIYA-C μη-φωσφορυλιώσιμα μοτίβα. Δείγματα συλλέχθηκαν στις 2, 4 και 24 ώρες μετά τη μόλυνση εις τριπλούν

Πράγματι, σε όλη την διάρκεια των πρώτων 4 ωρών μετά την μόλυνση, όλοι οι διαφορετικοί P12ABFFF επήγαγαν σταθερά χαμηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης IL-8 σε σύγκριση με το στέλεχος P12CagAKO, καθώς και με τα μη-φωσφορυλίωση ομόλογα στελέχη P12ABF και P12ABFF. Στις 24 ώρες μετά την μόλυνση όλα τα στελέχη με λειτουργικά μοτίβα EPIYA-C (P12ABC, P12ABCC, P12ABCCC) προκάλεσαν την έκκριση περίπου των ίδιων επιπέδων της IL-8 (Εικόνα 39), αλλά σε κάθε περίπτωση σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ($p=0,011$) από αυτά που παρατηρήθηκαν για το στέλεχος P12AB.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω το παρατηρούμενο φαινόμενο της αργοπορημένης και σε χαμηλότερα επίπεδα έκκρισης της IL-8 μετά από μόλυνση με το στέλεχος P12ABFFF, επαναλήφθηκε η μόλυνση, με όλα τα διαφορετικά στελέχη χρησιμοποιώντας όμως την κυτταρική σειρά γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων MKN-45 (Εικόνα 41). Το συγκεκριμένο είδος κυττάρων μεγαλώνουν ως μερικώς προσκολλημένα και εκκρίνουν πολύ υψηλότερα επίπεδα IL-8 ανταποκρινόμενα πιο γρήγορα από τα κύτταρα AGS, όπως έχει ήδη περιγραφεί [518]. Στις 2 ώρες μετά την μόλυνση, τα επαγόμενα επίπεδα IL-8 πρωτεΐνης από το στέλεχος P12ABFFF ήταν σχεδόν 4,5 φορές χαμηλότερα, από εκείνα που παρατηρήθηκαν για τα υπόλοιπα στελέχη συμπεριλαμβανομένων των P12CagAKO (450pg/ml για το P12ABFFF σε σύγκριση με 1500-2000pg/ml για το P12CagAKO). Σε 4 ώρες μετά την μόλυνση, το P12ABFFF επήγαγε επίπεδα έκκρισης της IL-8 παρόμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν για τα υπόλοιπα στελέχη (Εικόνα 41). Στις 24 ώρες μετά την μόλυνση, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα της εκκρινόμενης

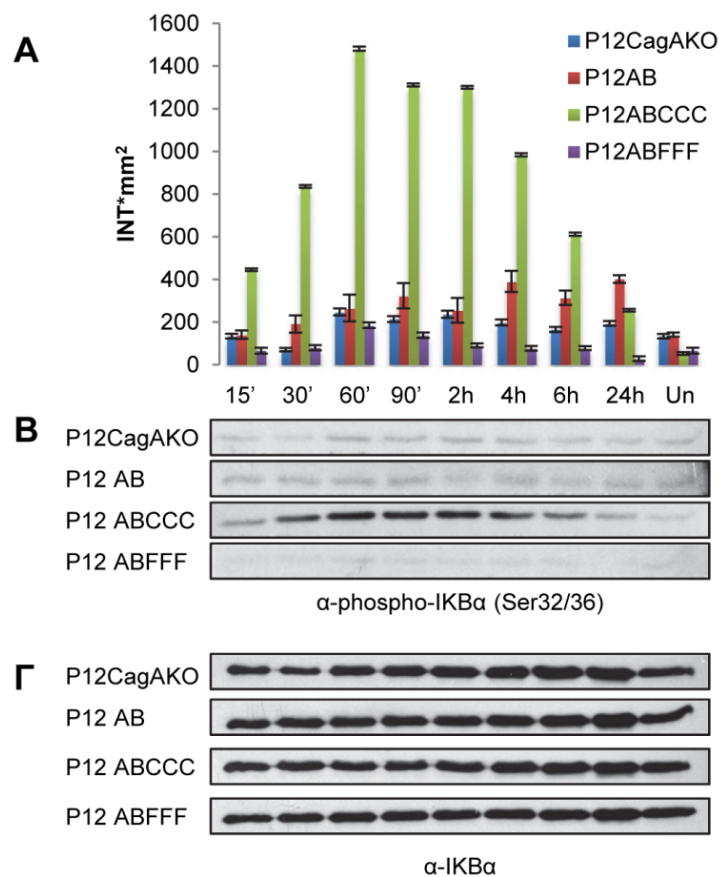


Εικόνα 41: Οι συγκεντρώσεις της IL-8 προσδιορίστηκαν με ELISA σε υπερκείμενα των MKN-45 κυττάρων που έχουν μολυνθεί με στελέχη που εκφράζουν πρωτεΐνη *CagA* με μεταβλητό αριθμό EPIYA θέσεων φωσφορυλίωσης στις 2, 4 και 24 ώρες μετά τη μόλυνση.

IL-8 για όλα τα στελέχη *H. pylori*.

3.5.3. Η ενεργοποίηση του NF-kB προκαλεί την έκκριση της IL-8 σε συνάρτηση με την φωσφορυλίωση σε EPIYA θέσεις.

Η επαγωγή της έκκρισης της IL-8 μετά από λοίμωξη *H. pylori* των επιθηλιακών κυττάρων του στομάχου έχει αποδοθεί στην ενεργοποίηση του NF-kB [496,499,519-522]. Προκειμένου να προσδιορισθεί η ενεργοποίηση NF-kB, μελετήσαμε την φωσφορυλίωση του αναστολέα του IKBa στις θέσεις Ser32/36, που τον οδηγεί σε πέψη από το πρωτεάσωμα. Καθώς η μεταγραφική ενεργοποίηση και έκκριση της IL-8 αποδείχτηκε ότι είναι ανεξάρτητη από τον αριθμό των EPIYA-C επαναλήψεων, διεξήχθησαν πειράματα, χρησιμοποιώντας τα μεταλλαγμένα στελέχη P12ABCCC και το αντίστοιχο μη-φωσφορυλίσιμο του P12ABFFF, καθώς και τα στελέχη P12AB, P12CagAKO. Μετά την μόλυνση των AGS κυττάρων για περίοδο 24 ωρών, το στέλεχος



Εικόνα 42: (A) Στο διάγραμμα εμφανίζεται η ποσοτικοποίηση της έντασης της ζώνης με την χρήση ειδικού λογισμικού υπολογισμού για την φωσφορυλίωση του IKBa (B) και ολική έκφραση της πρωτεΐνης (C) στα AGS κύτταρα μετά από μόλυνση από τα *CagA* μεταλλαγμένα στελέχη *H. pylori*.

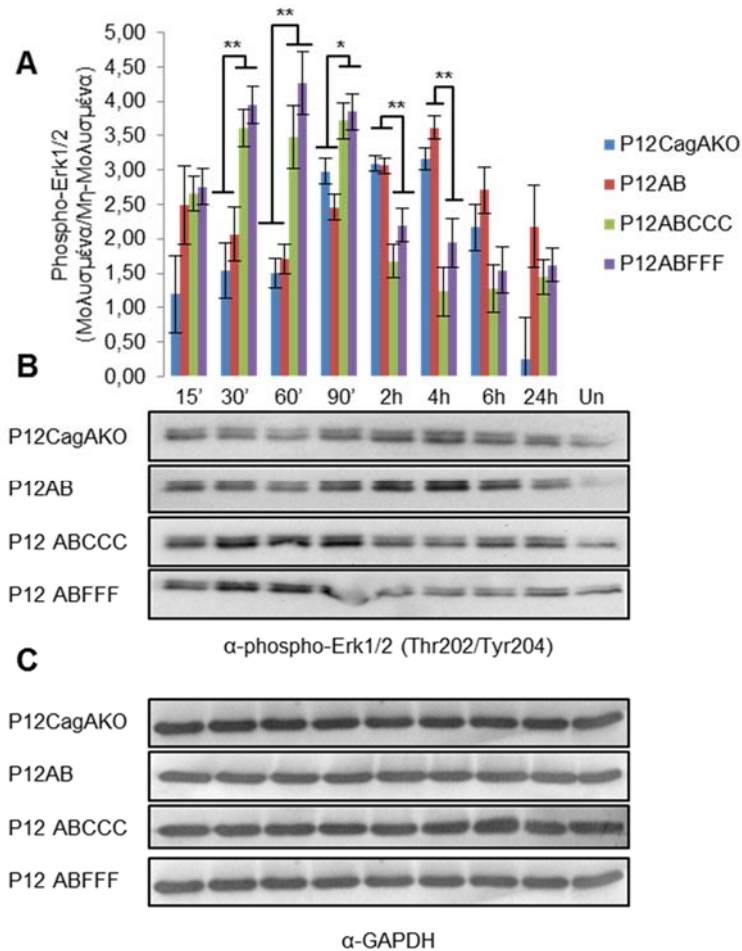
P12ABCCC προκάλεσε την υψηλότερη φωσφορυλίωση του IKBα μεταξύ των στελεχών (Εικόνα 42). Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση της φωσφορυλίωσης του IKBα ήταν εμφανής ήδη από τα 15 λεπτά μετά τη μόλυνση, κορυφώθηκε περίπου 1-1,5 ώρες μετά την μόλυνση και ακολούθως μειώθηκε, έως ότου να φτάσει στα επίπεδα υποβάθρου στις 24 ώρες. Συνακόλουθα, μία οριακή μείωση στα επίπεδα έκφρασης IKBα ήταν εμφανής κατά τα πρώιμα στάδια μετά τη μόλυνση (15-90min) σε σύγκριση με τα τέλη αυτής (2-24 ώρες). Παρόμοια κινητική επαγωγή της φωσφορυλίωσης του IKBα παρατηρήθηκε για τα στελέχη P12CagAKO και P12AB, μολονότι τα επίπεδα ήταν σαφώς χαμηλότερα από εκείνα που παρατηρήθηκαν για το στέλεχος P12ABCCC (Εικόνα 25). Αντιθέτως, το P12ABFFF στέλεχος που εκφράζει CagA με μη-φωσφορυλίωσιμα μοτίβα, επέδειξε τα χαμηλότερα επίπεδα φωσφορυλίωσης του IKBα ενώ η έκφραση του IKBα παρέμεινε σταθερή καθ' όλη την περίοδο της μόλυνσης (Εικόνα 42).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι, μετά την μόλυνση των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων με τα ισογονιδιακά μεταλλαγμένα στελέχη *H. pylori*, υψηλότερη ενεργοποίηση του NF-kB είναι εμφανής παρουσία φωσφορυλιώσιμων EPIYA-C μοτίβων. Ο NF-kB ενεργοποιείται επίσης, σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα, στην περίπτωση απουσίας της έκφρασης CagA πρωτεΐνης (P12CagAKO), απουσίας φωσφορυλίωσης στην CagA (P12ABFFF) και στις περιπτώσεις, όπου οι EPIYA-C αλληλουχίες είναι εντελώς απύσες (P12AB).

3.5.4. Η συμβολή του ERK1/2 στην ενεργοποίηση του NF-kB μετά από φωσφορυλίωση της CagA σε θέσεις EPIYA.

Μελέτες έχουν συνδέσει την ενεργοποίηση του παράγοντα ERK1/2 με την ενεργοποίηση του NF-kB και την επαγωγή έκκριση της IL-8 [496,510]. Προκειμένου να μελετηθεί η ενεργοποίηση του ERK1/2 σε σχέση με την φωσφορυλίωση της CagA σε θέσεις EPIYA, εξετάσαμε την κινητική της φωσφορυλίωσης του στις θέσεις Thr202/Tyr204, μετά από μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων AGS με τα στελέχη P12ABCCC, P12ABFFF, P12AB και P12CagAKO [523]. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι στα μολυσμένα κύτταρα με τα στελέχη P12ABCCC και P12ABFFF, η ενεργοποίηση ERK1/2 ήταν παρόμοια στα αρχικά στάδια της λοίμωξης (15-90min), υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση του ERK1/2 είναι ανεξάρτητη από την φωσφορυλίωση του σε EPIYA-C θέσεις (Εικόνα 43). Επιπλέον, τα στελέχη P12AB και P12CagAKO επήγαγαν παρόμοια επίπεδα ενεργοποίησης του ERK1/2 πολύ αργότερα κατά την μόλυνση, μετά από τα πρώτα 90min, υποδηλώνοντας ότι η πρώιμη ενεργοποίηση του ERK1/2

μπορεί να εξαρτάται από την παρουσία των ακολουθιών που περιβάλλουν τις EPIYA-C θέσεις, μια υπόθεση που επίσης έχει διατυπωθεί και στο παρελθόν [510].



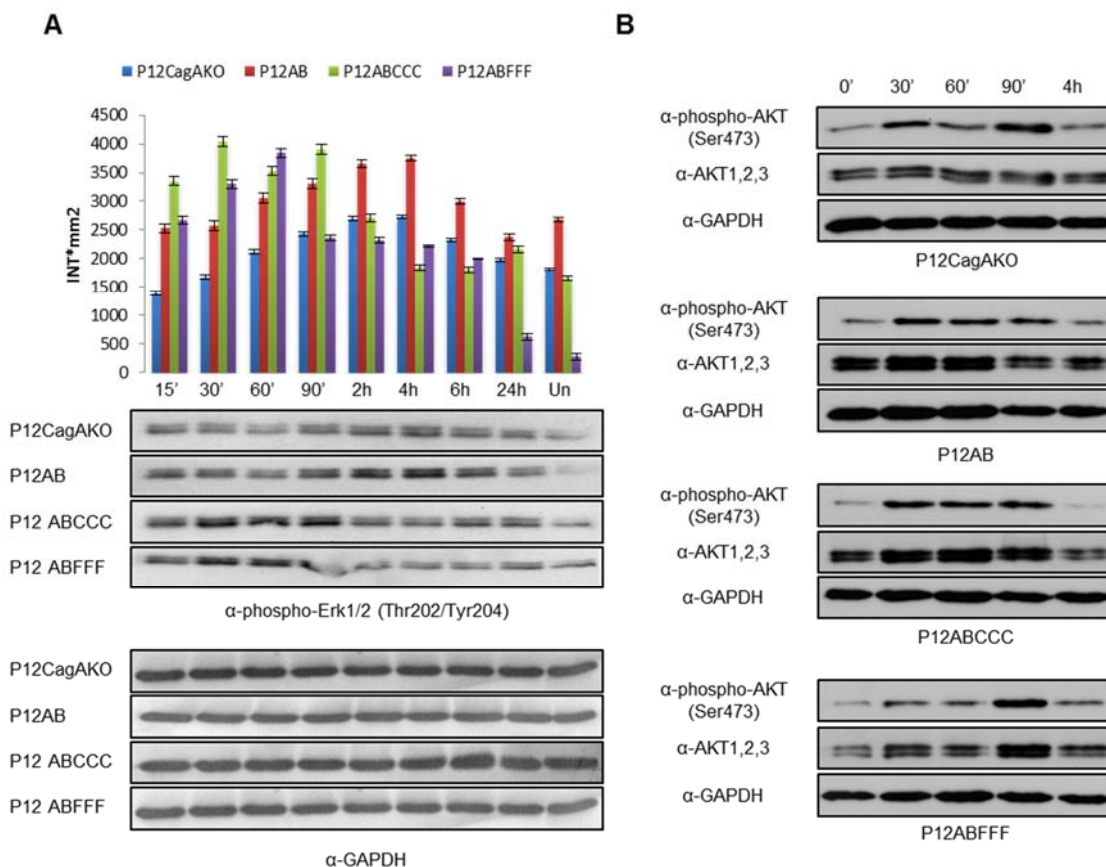
Εικόνα 43: Ποσοτικοποίηση της ERK1/2 φωσφορυλίωσης σε θέσεις Thr202/Tyr204 με πυκνομέτρηση των ζωνών σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. (A) Στην γραφική παράσταση απεικονίζεται ο phospho-ERK1/2 (αναλογία μολυσμένα με μη μολυσμένα κύτταρα) για κάθε χρονική στιγμή. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το Student t-test και τα επίπεδα σημαντικότητας που απεικονίζονται είναι $* < 0,05$ και $** < 0,01$. (B) Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ανάλυση με ανοσοσύτρωση κατά western της φωσφορυλίωσης του ERK1/2 σε θέσεις Thr202/Tyr204 και (Γ) η αντίστοιχη έκφραση της GAPDH.

3.5.5. Εμπλοκή της κινάσης AKT στην ενεργοποίηση του NF-κB σε συνάρτηση με την φωσφορυλίωση της CagA.

Πρόσφατα, η συντηρημένη αλληλουχία αμινοξέων CRPIA στην πρωτεΐνη CagA προτάθηκε να παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του NF-κB μέσω της ενεργοποίησης της κινάσης AKT και ανεξάρτητα από την φωσφορυλίωση της CagA σε θέσεις EPIYA [457]. Ως εκ τούτου, εξετάστηκε η επίδραση της CagA στην ενεργοποίηση της AKT, στη μόλυνση

κυττάρων AGS με τα στελέχη P12ABCCC, P12ABFFF, P12AB και P12CagAKO. Στην συνέχεια, εκτιμήθηκε τόσο η ενεργοποίηση της κινάσης όσο και η έκφρασή της με ανοσοσύτωση κατά western χρησιμοποιώντας α -phospho-AKT/Ser473 και α -AKT αντισώματα. Αρχικά, πραγματοποιώντας πειράματα, παρουσία ορού στο θρεπτικό υλικό κατά την διάρκεια της μόλυνσης, παρατηρήθηκε μια μεγάλη αστάθεια στο μοντέλο ενεργοποίησης της AKT, το οποίο παρουσίαζε διακυμάνσεις είτε ως προς τον χρόνο ενεργοποίησης της κινάσης μετά την λοίμωξη, όσο και μεταξύ των πολλών διαφορετικών πειραμάτων που διεξαγάγαμε (Εικόνα 44). Παρόλα αυτά, κανένα από τα διαφορετικά μοντέλα ενεργοποίησης της AKT που έχουν ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία δεν συμφωνούσε με το μοντέλο ενεργοποίησης του NF-kB που παρατηρείται με στο σύστημα μας.

Στην συνέχεια επαναλήφθηκαν τα ίδια πειράματα, απουσία ορού στο θρεπτικό υλικό κατά την διάρκεια της μόλυνσης, γεγονός που είχε σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της ενεργοποίησης της AKT έτσι ώστε να είναι δυνατή η αναπαραγωγή αποτελεσμάτων σε όλα τα



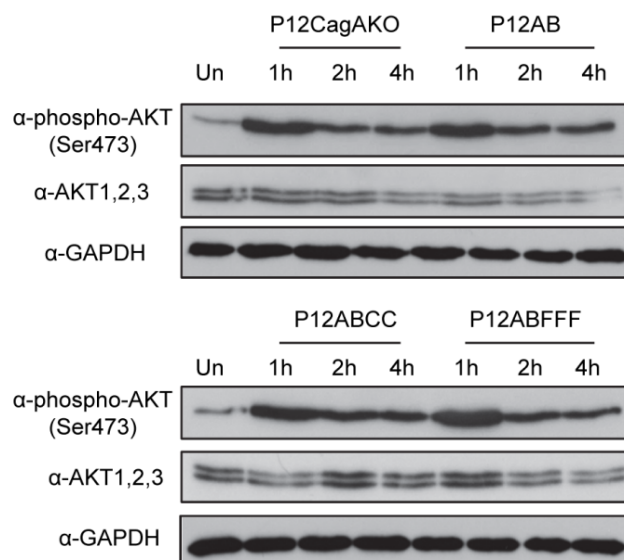
Εικόνα 44: Προσδιορισμός της φωσφορυλίωσης του AKT στην θέση Ser473 και της ολική έκφραση της πρωτεΐνης μετά από μόλυνση από τα *CagA* μεταλλαγμένα στελέχη *H. pylori*, παρουσία ορού στο θρεπτικό υλικό κατά την διάρκεια της μόλυνσης. Παρουσιάζονται δύο ανεξάρτητα πειράματα.

διαφορετικά ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι στο πειραματικό μοντέλο της *in vitro* λοίμωξης που χρησιμοποιήσαμε, η ενεργοποίηση της AKT μέσω Ser473 φωσφορυλίωσής της, δεν σχετίζεται ούτε με την φωσφορυλίωση της CagA σε θέσεις EPIYA ούτε και με την έκφραση της (Εικόνα 45). Είναι όμως πιθανόν το φαινόμενο να εξαρτάται από την παρουσία του *H. pylori* και πιθανότατα οφείλεται στην δράση άλλων παραγόντων του βακτηρίου.

Συνοψίζοντας τις παρατηρήσεις, για την ενδεχόμενη εμπλοκή AKT στην ενεργοποίηση του NF-kB, φαίνεται ότι το χρονικό ενεργοποίησης της AKT δεν ταιριάζει ούτε με αυτό της ενεργοποίησης NF-kB αλλά ούτε και με αυτό της μεταγραφικής ενεργοποίησης IL-8 (Εικόνα 38).

3.5.6. Η ενεργοποίηση της TAK1 από την φωσφορυλίωση της CagA σε θέσεις EPIYA-C μπορεί να οδηγεί στην έκκριση της IL-8.

Σε πρόσφατες μελέτες αναφέρθηκε η συμμετοχή της κινάσης TAK1 στην ενεργοποίηση του NF-kB διαμέσου της επαφής της με την πρωτεΐνη CagA μετά την αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη TRAF6 [499]. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η συμμετοχή της TAK1 στην ενεργοποίηση του NF-kB, μολύνθηκαν κύτταρα AGS με τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσία του αναστολέα 5Z-7-Oxozeaenol, ο οποίος έχει αναφερθεί ότι αποτελεί ειδικό αναστολέα της TAK1

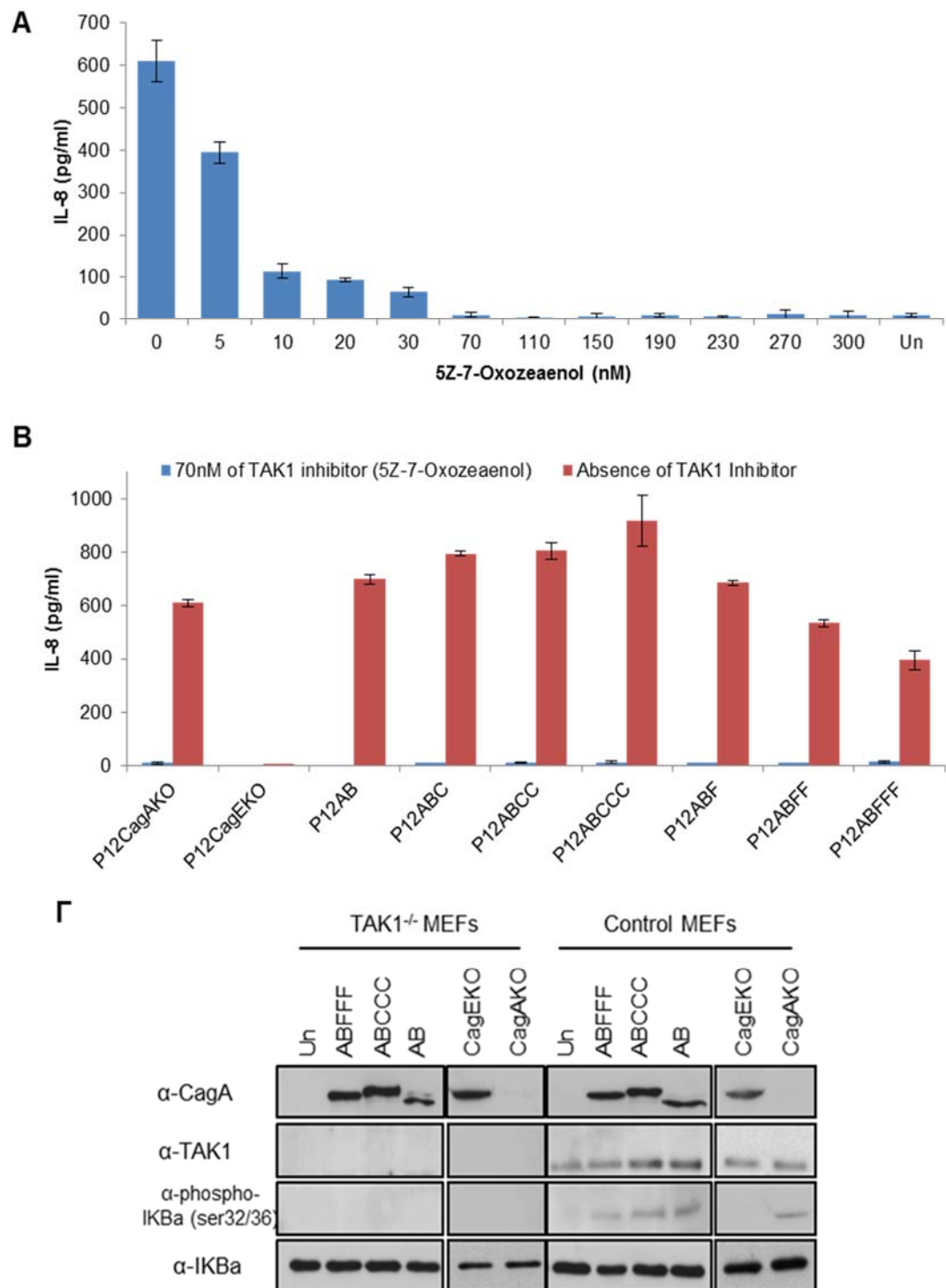


Εικόνα 45: Προσδιορισμός της φωσφορυλίωσης του AKT στην Ser473 και της ολικής έκφρασης της πρωτεΐνης μετά από μόλυνση από τα *CagA* μεταλλαγμένα στελέχη *H. pylori*, απουσία ορού από το θρεπτικό υλικό κατά την διάρκεια της μόλυνσης.

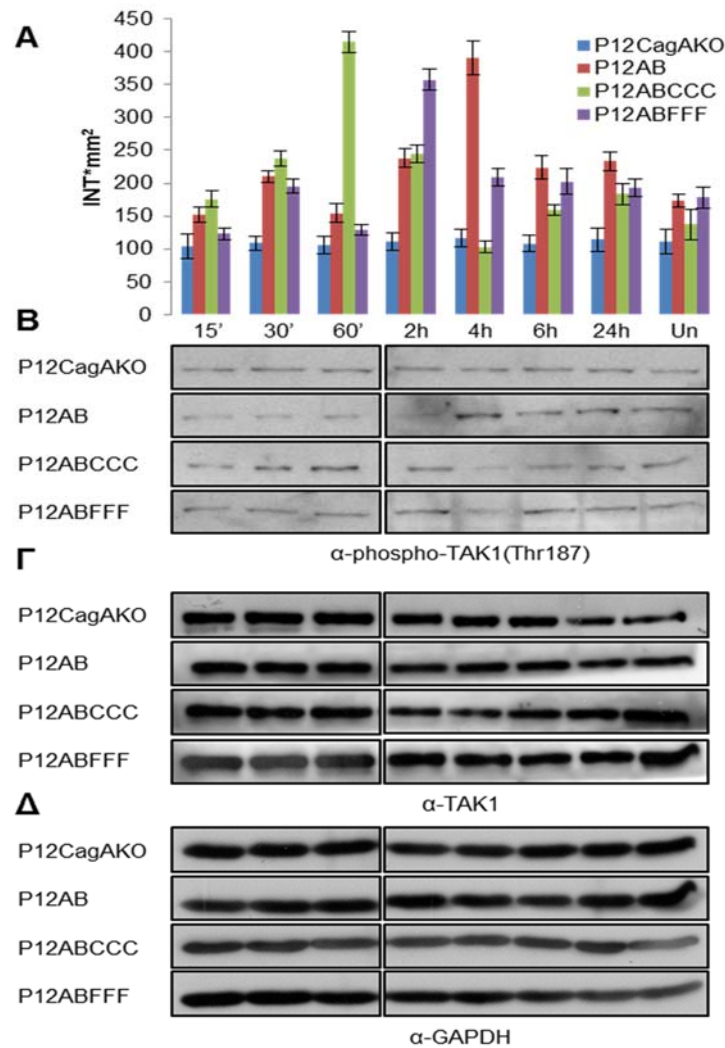
σε αρκετές μελέτες [524-528]. Στην συνέχεια έγινε προσδιορισμός των επιπέδων της εκκρινόμενης IL-8 στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών στις 4 ώρες μετά την μόλυνση. Σε πρώτη φάση χρησιμοποιήθηκε για την μόλυνση μόνο το στέλεχος P12ABCCC, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του αναστολέα και διαπιστώθηκε μια δόσο-εξαρτώμενη μείωση της έκκρισης της IL-8 από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 46Α). Κατόπιν, ακολούθησε πειραματική λοίμωξη AGS κυττάρων με όλα τα διαφορετικά ισογενή στελέχη, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του αναστολέα 5Z-7-Oxozeaenol στα 70nM. Παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή της παραγωγής της IL-8 από τα AGS κύτταρα σε όλες τις περιπτώσεις, ανεξάρτητα από την έκφραση της CagA, την ικανότητα φωσφορυλίωσης της σε EPIYA-C θέσεις καθώς και από την παρουσία ή απουσία των EPIYA αλληλουχιών (Εικόνα 46B).

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί περαιτέρω η συμμετοχή της TAK1 στην επαγόμενη από το *H. pylori* ενεργοποίηση του NF-kB, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μόλυνσης εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικών (MEFs), τα οποία είχαν τεχνητά απωλέσει την ικανότητα έκφρασης της TAK1 πρωτεΐνης (TAK1^{-/-}), καθώς και τα αντίστοιχων φυσιολογικών κυττάρων ελέγχου [529] με τα μεταλλαγμένα στελέχη P12ABCCC, P12ABFFF, P12AB, P12CagAKO και P12CagEKO. Παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του NF-kB μετά από μόλυνση με *H. pylori*, μόνο παρουσία έκφρασης της TAK1 στους φυσιολογικούς ινοβλάστες και όχι στους TAK1^{-/-} (Εικόνα 46Γ). Όπως ήταν αναμενόμενο, το στέλεχος P12CagEKO δεν επήγαγε την ενεργοποίηση του NF-kB είτε σε φυσιολογικά είτε σε TAK1^{-/-} MEFs. Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η NF-kB εξαρτώμενη IL-8 επαγωγή σε μολυσμένα με *H. pylori* γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, μπορεί ενδεχομένως να μεσολαβεί εξ' ολοκλήρου μέσω της TAK1, ανεξάρτητα από την πρωτεΐνη CagA.

Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της EPIYA-C φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης CagA στην ενεργοποίηση της TAK1, προσδιορίστηκε η ενεργοποίηση της TAK1 μέσω της ανίχνευσης της φωσφορυλίωσης της στην θέση Thr187, καθώς και η έκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα AGS μολυσμένα με τα προαναφερθέντα στελέχη *H. pylori*. Στα κύτταρα AGS μολυσμένα με το P12ABCCC στέλεχος, εντοπίστηκε μια οριακή αύξηση της phospho-Thr187-TAK1 σε σύγκριση με αυτή που ανιχνεύτηκε στα μη μολυσμένα κύτταρα. Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε να συμβαίνει γρήγορα, στα πρώτα 60 λεπτά μετά την μόλυνση, ακολουθούμενη από μία μείωση της ενεργοποίησης (Εικόνα 47). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν περιγραφεί προηγουμένως [499], με ένα εξίσου ασθενές σήμα για την ενεργοποιημένη phospho-Thr187-TAK1, ένα πρόβλημα που παρουσιάζεται επίσης και σε άλλες μελέτες [530]. Αντίθετα,



Εικόνα 46: (Α) Δόσο-εξαρτώμενη αναστολή έκκριση της IL-8, παρουσία του ειδικού αναστολέα TAK1 5Z-7-Oxozeaenol (5-300 nM), μετά από 4 ώρες μόλυνση των κυττάρων AGS με το P12ABCCC στέλεχος *H. pylori*. (Β) Έκκριση της IL-8 στα υπερκείμενα των AGS κυττάρων μετά από 4 ώρες μόλυνσης από τα αντίστοιχα *CagA* μεταλλαγμένα στελέχη *H. pylori*, απουσία ή παρουσία των 70nM 5Z-7-Oxozeaenol. (Γ) Η έκφραση των *CagA*, TAK1, φωσφορυλιωμένης IKBa σε Ser32/36 και ολικής IKBa προσδιορίστηκε με ανοσοσύστυψη κατά Western, ολικών κυτταρολυμάτων TAK1^{-/-} MEF και των αντίστοιχων φυσιολογικών κυττάρων ελέγχου μολυσμένα με *H. pylori* τα οποία εκφράζουν πρωτεΐνη *CagA* με μεταβλητό αριθμό EPIYA-C επαναλήψεων για 4 ώρες.

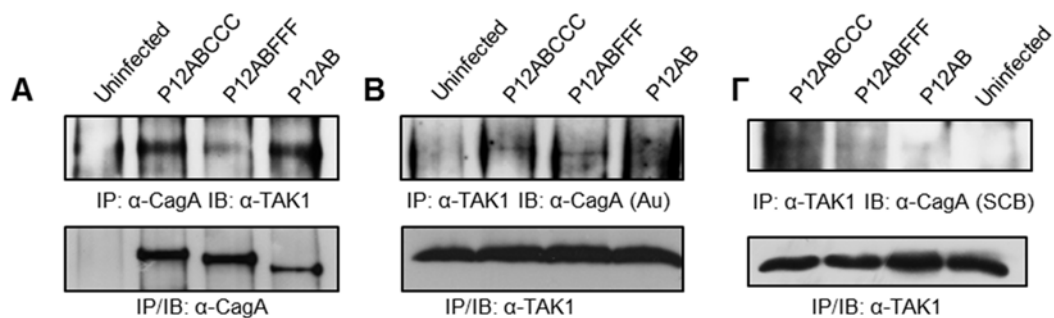


Εικόνα 47: (Α) Ποσοτική εκτίμηση της φωσφορυλιωμένης TAK1 στην θέση Thr187 με πυκνομέτρηση ζωνών. (Β) Φωσφορυλίωση της TAK1 στην θέση Thr187, (Γ) η αντίστοιχη έκφραση της πρωτεΐνης TAK1 και (Δ) η έκφραση της πρωτεΐνης ελέγχου GAPDH σε ολικά κυτταρολύματα πρωτεϊνών AGS κυττάρων μολυσμένων με τα ισογονιδιακά στελέχη *H. pylori*.

τα μολυσμένα κύτταρα με το στέλεχος P12ABFFF εμφάνισαν μια οριακή αύξηση phospho-Thr187-TAK1 μετά από τις πρώτες 2 ώρες μετά τη μόλυνση. Η καθυστερημένη ενεργοποίηση της TAK1 παρατηρείται και στην περίπτωση μόλυνσης με το στέλεχος P12AB, ενώ καμία ενεργοποίηση της TAK1 δεν παρατηρήθηκε σε κύτταρα μολυσμένα με το στέλεχος P12CagAKO.

Τέλος, έγινε προσπάθεια επιβεβαίωσης προηγούμενων παρατηρήσεων, οι οποίες έδειχναν φυσική αλληλεπίδραση της CagA και της TAK1 στη λοίμωξη από *H. pylori* [499]. Η κυτταρική σειρά AGS μολύνθηκε με τα στελέχη P12AB, P12ABCCC, P12ABFFF και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με χρήση είτε α -CagA είτε με α -TAK1 αντισωμάτων και ανοσο-ανίχνευση με την χρήση ειδικών αντισωμάτων με ανοσοσύτωση κατά western των πρωτεϊνών TAK1 (Εικόνα 48Α)

και CagA (Εικόνα 48B&Γ) αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε συνεντοπισμός των δύο πρωτεϊνών στο σύμπλοκο άνοσο-κατακρήμνισης Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν, ότι η CagA συμμετέχει στο ίδιο σύμπλοκο πρωτεϊνών μαζί με την TAK1, ανεξάρτητα από την παρουσία ή την κατάσταση φωσφορυλίωσης των EPIYA-C θέσεων στην πρωτεΐνη CagA.

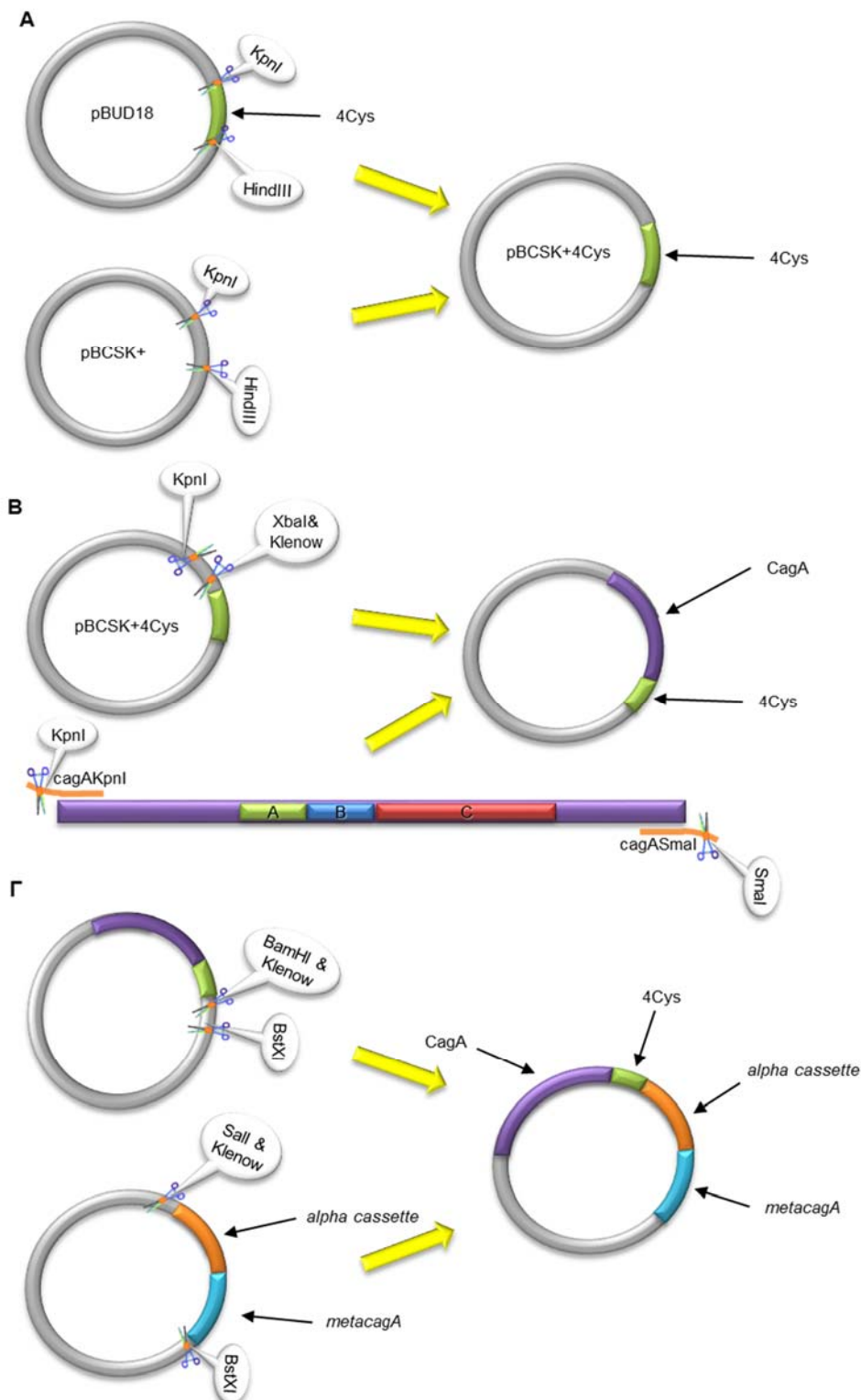


Εικόνα 48: (A) TAK1 και (B) CagA, σε α-CagA ή α-TAK1 αντίστοιχο άνοσο-κατακρήμνιση προϊόντα λύσης προερχόμενα από AGS μολυσμένα κύτταρα με στελέχη *H. pylori*, σε 1 ώρα μετά τη μόλυνση.

***3.6. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ FLASH ΓΙΑ
ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ CagA ΣΤΑ ΓΑΣΤΡΙΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ***

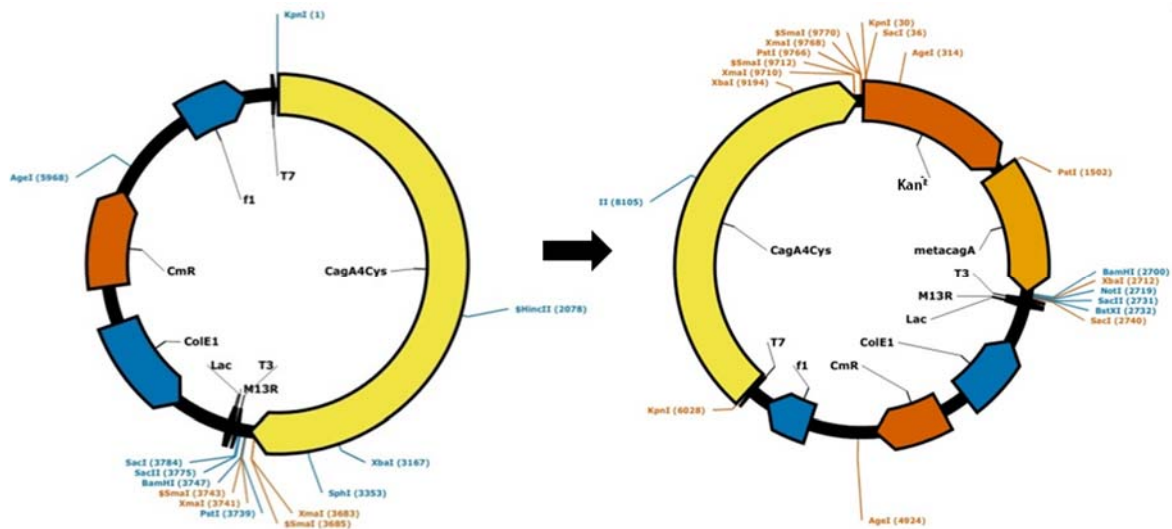
3.6.1. Κατασκευή χιμαιρικής πρωτεΐνης CagA και του εξαπεπτιδίου σημάσεως πρωτεϊνών Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys.

Για την πραγματοποίηση πειραμάτων σχετικά με τον χωροταξικό εντοπισμό της πρωτεΐνης CagA μετά από *in vitro* μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων, κρίθηκε απαραίτητη η χρησιμοποίηση της τεχνολογίας FIASH. Για να καταστεί δυνατή η εφαρμογή της τεχνολογίας, κατασκευάστηκε χιμαιρική CagA πρωτεΐνη με το εξαπεπτιδίο σημάσεως πρωτεϊνών Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys (tetracysteine tag [4Cys]). Αναλυτικά, το γενετικό θραύσμα του εξαπεπτιδίου απομονώθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης, μετά από πέψη του πλασμιδίου pBUD18 [502] με τα περιοριστικά ένζυμα *KpnI* και *HindIII*. Στην συνέχεια, το γενετικό θραύσμα του εξαπεπτιδίου κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pBCKS+, ο οποίος είχε ήδη υποστεί κατεργασία με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα (πλασμίδιο 1) (Εικόνα 49A). Το γονίδιο *cagA* πολλαπλασιάστηκε με PCR από τους εκκινητές *cagAKpnI* και *cagASmaI* (Πίνακας 6) χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο ολικό γονιδιωματικό DNA από το πατρικό στέλεχος P12. Στην συνέχεια έγινε πέψη του προϊόντος με τα περιοριστικά ένζυμα *KpnI* και *SmaI* και ακολούθησε κλωνοποίηση στο πλασμίδιο 1, του οποίου το 5' άκρο είχε υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *KpnI* και το 3' είχε καταστεί τυφλό μετά από κατεργασία με το περιοριστικό ένζυμο *XbaI* και την μεσόφιλη πολυμεράση Klenow (Πλασμίδιο 2) (Εικόνα 49B). Η επιλογή των κλώνων *E. coli* που περιέχουν το πλασμίδιο 2, έγινε με την χρήση της EPIYA PCR [134] και κατόπιν η ορθή ένθεση του γονιδίου επιβεβαιώθηκε με ανάγνωση της αλληλουχίας ολοκλήρου του γονιδίου (Παράρτημα σελ. 276). Με τον τρόπο αυτό αποδείχθηκε ότι το κλωνοποιημένο γονίδιο *cagA* δεν έφερε σημειακές μεταλλάξεις, ότι το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης είχε αντικατασταθεί με επιτυχία και τέλος ότι η εκφραζόμενη CagA πρωτεΐνη θα περιείχε στο καρβοξύ-τελικό της άκρο συνδεδεμένο το εξαπεπτιδίο Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys. Το πλασμίδιο B της παραγράφου §3.3.2.1 (Εικόνα 29) (το οποίο περιέχει εν σειρά κλωνοποιημένα στο πλασμίδιο pBCSK+ κασέτα αντοχής στην καναμυκίνη και το θραύσμα *metacagA*) υπέστη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *SalI*, πλήρωση των άκρων με την χρήση της μεσόφιλης πολυμεράσης Klenow για την δημιουργία τυφλού άκρου στο 5' και μετέπειτα πέψη του 3' άκρου με το ένζυμο *BstXI*. Το κομμάτι DNA μοριακού βάρους περίπου 3 Kbp, το οποίο περιέχει συνδεδεμένα εν σειρά την κασέτα αντοχής στην καναμυκίνη με την *metacagA* περιοχή, απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης και ύστερα κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο 2, το οποίο είχε



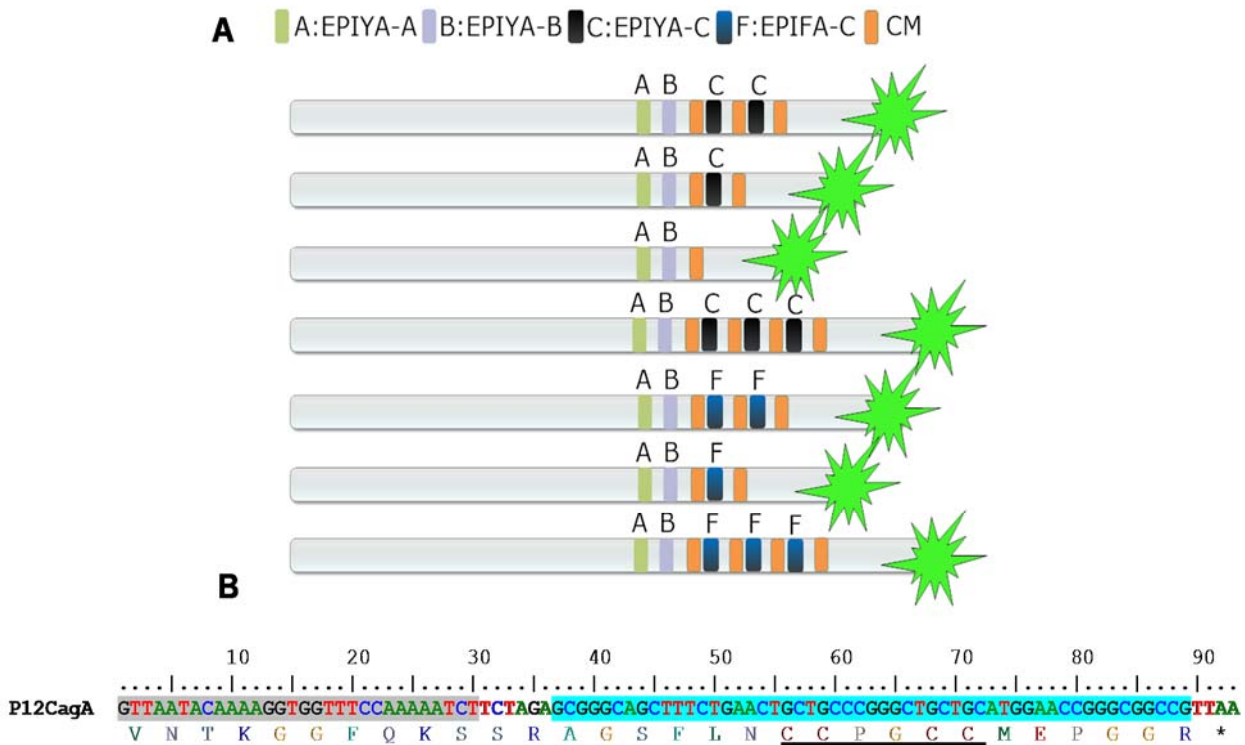
Εικόνα 49: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας κατασκευής του πλασμιδίου pCA2+4Cys (Α) Αποκοπή και ένθεση του εξαπεπτιδίου (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys) σημασης της τετρακυστεΐνης στον πλασμιδιακό φορέα pBCSK+. (Β) Το πλασμίδιο που προέκυψε από το στάδιο Α κόπηκε με KpnI και XbaI-Klenow και σε αυτό κλωνοποιήθηκε το *cagA*. (Γ) Τέλος προστέθηκε κασέτα ανθεκτικότητας ναυαμυκίνης και το γενετικό θραύσμα *metacagA*.

υποστεί στο 5' άκρο πέψη με BamHI και πλήρωση με Kleenow και στο 3' άκρο πέψη με το ένζυμο BstXI (Εικόνα 49Γ). Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκε το πλασμίδιο pCA2+4Cys (Εικόνα 50).



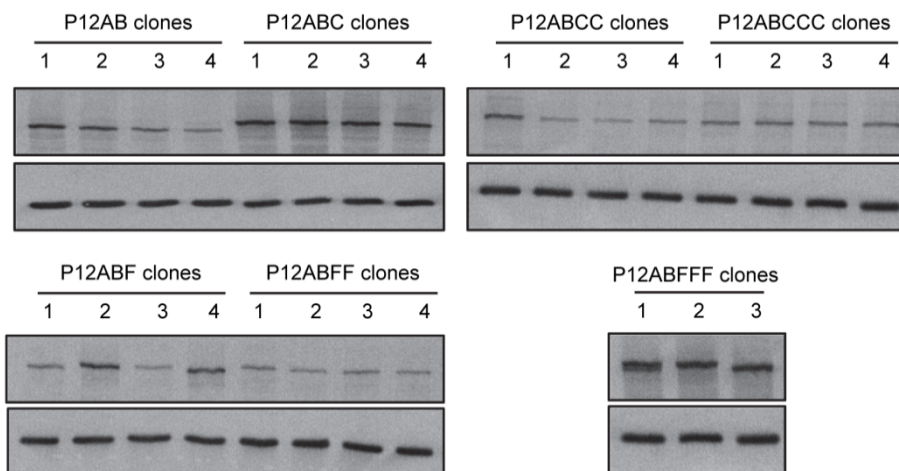
Εικόνα 50: Χάρτες των πλασμιδίων για τη σταδιακή κατασκευή του πλασμιδίου pCA2+4Cys. Διακρίνεται με κίτρινο η θέση του γονιδίου *cagA*, με πορτοκαλί η κασέτα ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη καθώς και με λαδί χρώμα το θραύσμα *metacagA*.

Χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο με παραπάνω, όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.3.1, κατασκευάστηκε όλη η γκάμα των πιθανών EPIYA-C συνδυασμών στο γονίδιο της *cagA* (Εικόνα 51). Εν συντομία, το πλασμίδιο pCA2+4Cys μαζί με τον μέγα-εικινητή (§3.3.2.3) χρησιμοποιήθηκαν μαζί, σε μια τροποποιημένη αντίδραση μεταλλαζογένεσης QuikChange και ήταν κατορθωτό σε μία αντίδραση, να παραχθούν όλοι οι επιθυμητοί συνδυασμοί EPIYA-C μοτιβων. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν κλωνοποιημένα σε πλασμιδιακό φορέα γονδιακές αλληλουχίες του P12 χιμαιρικού γονιδίου *cagA*, οι οποίες περιέχουν τους αντίστοιχους EPIYA συνδυασμούς ως εξής: AB (πλασμίδιο pCA04+Cys), ABC (πλασμίδιο pCA14+Cys), ABCC (πλασμίδιο pCA24+Cys) και ABCCC (πλασμίδιο pCA34+Cys), καθώς και τους αντίστοιχους μη-φωσφορυλιωμένους συνδυασμούς, με την μέθοδο που περιγράφεται στην §3.3.2.4, ως εξής: ABF (πλασμίδιο pCA1.1+4Cys), ABFF (πλασμίδιο pCA2.2+4Cys), και ABFFF (πλασμίδιο pCA3.3+4Cys) (Εικόνα 51). Τέλος, όλα τα παραπάνω πλασμίδια μετασχημάτισαν επιτυχώς το γονίδιο της *cagA* στο πατρικό P12 στέλεχος (§3.3.2.5).



Εικόνα 51: Σχηματική παρουσίαση (A) των κατασκευασμένων χιμαιρικών πρωτεϊνών CagA. Σημειώνονται οι EPIYA θέσεις, οι αλληλουχίες CM καθώς και με πράσινο το εξαπεπτιδίο σήμανσης πρωτεϊνών tetracysteine-tag. (B) Η αλληλουχία στο καρβόξυ-τελικό άκρο του χιμαιρικού γονιδίου της *cagA*. Με γκρι επισημαίνεται η καταληκτική αλληλουχία του *cagA*, ενώ με μπλε η αλληλουχία του εξαπεπτιδίου.

Η ορθότητα της όλης διαδικασίας μεταλλαξογένεσης επαληθεύτηκε σε όλες τις περιπτώσεις με προσδιορισμό της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων των γονιδίων *cagA* στα γενετικά μεταλλαγμένα ισογονιδιακά στελέχη. Με σκοπό την επιλογή των στελεχών *H. pylori* που εκφράζουν την χιμαιρική CagA, εξετάστηκαν τουλάχιστον 8 κλώνοι ανά συνδυασμό EPIYA της *cagA* και προσδιορίστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης με ανοσοσύτωση κατά western σε κυτταρολύματα γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων AGS, μετά από μόλυνσή τους με όλους τους κλώνους των διαφορετικών μεταλλαγμένων βακτηρίων (Εικόνα 52). Η έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης CagA, ανιχνεύτηκε σε όλους τους προς εξέταση κλώνους. Παρατηρήθηκαν ακόμα διαφορές μεγέθους, οι οποίες ήταν ανάλογες με τον διαφορετικό αριθμό EPIYA-C μοτίβων στην *cagA*.

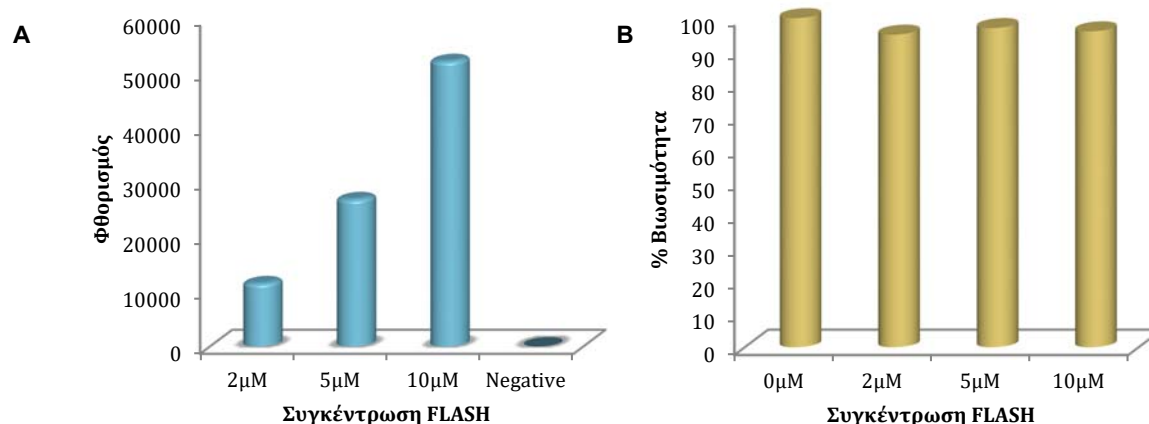


Εικόνα 52: Ανοσοσύτπωση κατά western με α -CagA και α -GAPDH αντισώματα κυτταρολυμάτων AGS κυττάρων τα οποία έχουν μολυνθεί με όλους τους κλώνους των μεταλλαγμένων στελεχών χιμαιρικής CagA πρωτεΐνης με το εξαπεπτίδιο 4Cys.

3.6.2. Χωροταξικός εντοπισμός της πρωτεΐνης CagA με την τεχνολογία φθορισμού FIAsh

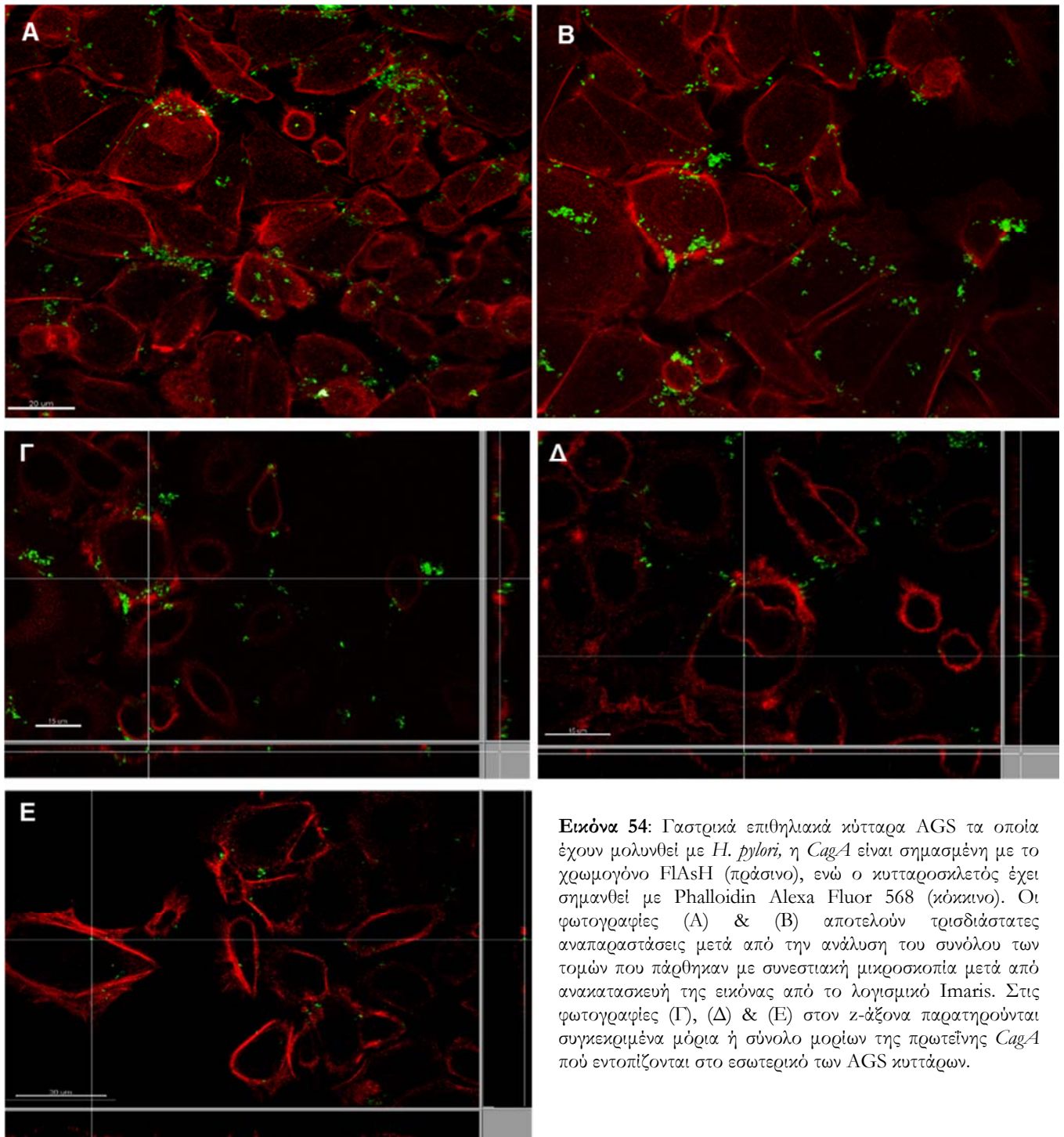
Για να πραγματοποιηθεί χωροταξικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης CagA στο εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία FIAsh. Η συγκεκριμένη τεχνολογία δεν έχει στο παρελθόν χρησιμοποιηθεί με το *H. pylori*, αλλά γενικότερα ούτε με ένα εκκριτικό σύστημα τύπου IV. Αφού κατασκευάστηκαν τα στελέχη, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω με μεταβλητό αριθμό EPIYA-C θέσεων, στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες βελτιστοποίησης, όσον αφορά την συγκέντρωση του χρωμογόνου και του φθορισμού των βακτηρίων (Εικόνα 53A). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το μεταλλαγμένο στέλεχος P12, το οποίο εκφράζει την χιμαιρική πρωτεΐνη CagA της μορφής ABCC μαζί με την 4Cys. Κατόπιν διεξήχθησαν δοκιμασίες σχετικές με την επιβίωση των βακτηρίων μετά την συνεπάωση του με την χρωστική FIAsh (Εικόνα 53B). Χρησιμοποιήθηκαν 2 μ M, 5 μ M και 10 μ M χρωστικής FIAsh, η οποία συνεπάστηκε για 30 min με το στέλεχος P12ABCC+4Cys και στην συνέχεια προσδιορίστηκε το ποσοστό επιβίωσης των βακτηρίων σε σχέση με τα βακτήρια ελέγχου, μετρώντας τις μονάδες σχηματισμού αποικίας (CFUs). Σε κάθε περίπτωση η επιβίωση των βακτηρίων ήταν σχεδόν 100% (Εικόνα 53B). Κατόπιν για τις ίδιες συγκεντρώσεις FIAsh και μετά από δύο πλύσεις με PBS των βακτηρίων έγινε μέτρηση του φθορισμού. Διαπιστώθηκε αύξηση της έντασης του φθορισμού σε συνάρτηση με την αύξηση της συγκέντρωσης της χρωστικής (Εικόνα 53A). Επιλέχθηκε βέλτιστη συγκέντρωση (5 μ M) για την υπόλοιπη πειραματική διαδικασία, επί τη βάση της επάρκειας του

φθορισμού, καθώς και βιβλιογραφικών αναφορών για ενδεχόμενη αναστολή της μεταφοράς πρωτεϊνών μέσω εκκριτικών συστημάτων τύπου III με χρήση υψηλότερων συγκεντρώσεων της χρωστικής [502].



Εικόνα 53: (A) Φθορισμός των *H. pylori* τα οποία έχουν σημειωθεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις του χρωμογόνου FLASH οι μετρήσεις έγιναν σε φθορισμόμετρο (B) Η βιωσιμότητα του *H. pylori* αξιολογήθηκε μετά την επώαση του με διαφορετικές συγκεντρώσεις του χρωμογόνου FLASH.

Χρησιμοποιώντας το στέλεχος P12ABCC+4Cys και αφού σημειώθηκε με την χρωστική FLASH η CagA, μολύθηκαν γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα AGS. Μετά την πάροδο 4 ωρών από την μόλυνση, προχωρήσαμε σε μονιμοποίηση των δειγμάτων, χρώση της ακτίνης με Alexa Fluor 568 Phalloidin (κόκκινο) και ανάλυση με την βοήθεια συνεστιακής μικροσκοπίας (Εικόνα 54). Διαπιστώθηκε ότι η ένταση του φθορισμού της πρωτεΐνης ήταν ικανοποιητική στην συγκεκριμένη συγκέντρωση. Μετά από την τρισδιάστατη ανασύνθεση των εικόνων και ανάλυση τους με το λογισμικό Imaris κατέστη δυνατός ο εντοπισμός της χιμαιρικής CagA τόσο εντός των βακτηρίων όσο και στο εσωτερικό των AGS κυττάρων (Εικόνα 54). Αυτό το γεγονός κατέδειξε την συμβατότητα εφαρμογής της μεθόδου για την περαιτέρω αξιολόγηση του χωροταξικού εντοπισμού της πρωτεΐνης CagA καθώς και της οπτικοποίησης της μεταφοράς πρωτεϊνών διαμέσου εκκριτικών συστημάτων τύπου IV.



Εικόνα 54: Γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα AGS τα οποία έχουν μολυνθεί με *H. pylori*, η *CagA* είναι σημασμένη με το χρωμογόνο FLAsH (πράσινο), ενώ ο κυτταροσκελετός έχει σημανθεί με Phalloidin Alexa Fluor 568 (κόκκινο). Οι φωτογραφίες (Α) & (Β) αποτελούν τρισδιάστατες αναπαραστάσεις μετά από την ανάλυση του συνόλου των τομών που πάρθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία μετά από ανακατασκευή της εικόνας από το λογισμικό Imaris. Στις φωτογραφίες (Γ), (Δ) & (Ε) στον z-άξονα παρατηρούνται συγκεκριμένα μόρια ή σύνολο μορίων της πρωτεΐνης *CagA* που εντοπίζονται στο εσωτερικό των AGS κυττάρων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

4.1.1. Συσχέτιση της πολυμορφικότητας των θέσεων EPIYA της CagA με τα κλινικό-παθολογικά ευρήματα και την κλινική εξέλιξη της νόσου. Μελέτη ασθενών από τη Καμπότζη

Οι χώρες Μιανμάρ (Βιρμανία), Ταϊλάνδη, Λάος, Καμπότζη και το Βιετνάμ αποτελούν την ηπειρωτική Νοτιοανατολική Ασία με πληθυσμό περίπου 200 εκατομμυρίων. Μοιράζονται πολλά όσον αφορά τον πολιτισμό και αυτό αντικατοπτρίζεται σε κάποιο βαθμό στις εμφανιζόμενες μορφές καρκίνου. Φυσικά, παρουσιάζουν κοινωνικοοικονομική ποικιλομορφία και αυτό επιτρέπει να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τους αιτιολογικούς παράγοντες εκδήλωσης τους [531]. Όπως έχει περιγραφεί λεπτομερώς στην εισαγωγή, ο γαστρικός καρκίνος (GC) αποτελεί την τέταρτη πιο συχνή μορφή καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο και είναι η δεύτερη αιτία θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνου [73]. Όσο αναφορά τον επιπολασμό του γαστρικού καρκίνου σε χώρες της Ανατολικής Ασίας, αυτές που παρουσιάζουν υψηλό κίνδυνο εκδήλωσης γαστρικού καρκίνου είναι η Μογγολία, η Ιαπωνία, η Κορέα, η Κίνα και το Βιετνάμ (ASR 18,9 έως 41.4/100.000), ενώ η Καμπότζη (ASR 9.8 / 100.000) μαζί με τη Μιανμάρ (ASR 11.0/100 000) και τη Σιγκαπούρη (ASR 10.9/100 000) έχουν χαρακτηριστεί ως χώρες με ένα ενδιάμεσο κίνδυνο. Ο κίνδυνος είναι χαμηλός στο Μπαγκλαντές, το Λάος, την Ταϊλάνδη και την Ινδία (ASR 3,5 έως 5.2/100 000).

Η κλινική έκβαση της λοίμωξης από *H. pylori* εξαρτάται από παράγοντες του ξενιστή, του βακτηρίου και του περιβάλλοντος όπως έχει αναφερθεί διεξοδικά στην εισαγωγή § 1.2. Ως εκ τούτου γεωγραφικές διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου δεν μπορούν να εξηγηθούν μόνο βάσει του τύπου της πρωτεΐνης CagA (Δυτικού τύπου είτε τύπου Ανατολικής Ασίας) που εκφράζεται από τα στελέχη. Στην Ανατολική και Νοτιοανατολική Ασία, όπου η ανθρώπινη γενετική ποικιλομορφία είναι σχετικά περιορισμένη, η συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου συμφωνεί σαφώς με τα ποσοστά επιπολασμού των στελεχών που εκφράζουν CagA τύπου Ανατολικής Ασίας [513]. Δεδομένου ότι, η γενετική δομή των σύγχρονων ανθρώπινων πληθυσμών του Βιετνάμ και της Καμπότζης είναι παρόμοια [532], οι δυο αυτές χώρες είναι κατάλληλες για τη συγκριτική μελέτη της επίδρασης του τύπου της CagA, στην συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου. Υπενθυμίζεται, ότι τα διορθωμένα με βάση την ηλικία επίπεδα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου (ASRGC, Age-Standardized Rates of Gastric Cancer) στην Καμπότζη είναι το ήμισυ σε σύγκριση με αυτά που παρατηρούνται στο Βιετνάμ (9,8 έναντι 18,9 ανά 100.000 άτομα), όπου το 97% των απομονωθέντων στελεχών εκφράζουν CagA τύπου Ανατολικής Ασίας [512].

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν κλινικά στελέχη *H. pylori* από την Καμπότζη σε σχέση με την ποικιλομορφία του γονιδίου της *cagA* στην καρβόξυ-τελική μεταβλητή περιοχή της πρωτεΐνης. Το γονίδιο *cagA* εντοπίστηκε στο 92,4% των απομονωθέντων στελεχών και η συχνότητα εμφάνισης του ήταν μεγαλύτερη στα στελέχη hpEAsia (100%) από ότι στα στελέχη hpEurope (85,3%). Οι κυρίαρχοι συνδυασμοί EPIYA μοτίβων στη πρωτεΐνη CagA, στα αναλυθέντα στελέχη ήταν ABC (45,5%) που μαρτυρά ύπαρξη στελεχών Δυτικού τύπου και ABD (34,8%) που παραπέμπει σε στελέχη Ασιατικής προέλευσης. Τα υπόλοιπα στελέχη που αναλύθηκαν βρέθηκαν να είναι της μορφής AB, ABBD, BC και ABCC, αναφορικά με τον συνδυασμό των θέσεων EPIYA.

Κατόπιν στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η γενετική δομή του πληθυσμού με βάση το γονίδιο της CagA σε στελέχη *H. pylori* απομονωθέντα από ασθενείς της Καμπότζης. Επιλέχθηκαν τυχαία 20 στελέχη, (10 hpEurope και 10 hpEAsia) σε 5 στελέχη (4 hpEAsia, 1 hpEurope) παρατηρήθηκε μια απαλοιφή έκτασης 18 ζευγών βάσεων στο γονίδιο της *cagA*, η οποία έχει περιγραφεί προηγουμένως για στελέχη προερχόμενα από ασθενείς του Βιετνάμ [511], σε 5 στελέχη hspEAsia παρατηρήθηκε μια διαγραφή έκτασης 39 ζευγών βάσεων, η οποία ανιχνεύεται συνήθως σε στελέχη τα οποία προέρχονται από πληθυσμούς της Ανατολικής Ασίας [512]. Το 100% των στελεχών δυτικού τύπου περιλάμβαναν EPIYA-C μοτίβα στη πρωτεΐνη CagA καθώς και μερικά hpAsia2 στελέχη. Στα 18 από τα 20 γονίδια *cagA* απομονωμένα από ασθενείς της Καμπότζης περιέχονται σε ποσοστό 100% νουκλεοτίδια, τα οποία προέρχονται είτε από Ευρωπαϊκές προγονικές πηγές είτε της Ανατολικής Ασίας, ενώ σε δύο στελέχη εμφανίζεται εκτεταμένος ανασυνδυασμός εντός του γονιδίου *cagA*. Τα δύο παραπάνω στελέχη κατατάχθηκαν στη κατηγορία hspEAsia, γεγονός που υποδηλώνει ένα υποείδος γονιδίου *cagA* στελεχών Ανατολικής Ασίας, το οποίο έχει μετασχηματιστεί με DNA από *cagA* δυτικού τύπου.

Όσον αφορά την σχέση του γαστρικού καρκίνου και την κατανομή του τύπου της CagA σε άλλες χώρες τις ευρύτερης περιοχής της Ανατολικής Ασίας, τα επίπεδα γαστρικού καρκίνου είναι χαμηλά στην Ταϊλάνδη και τη Μαλαισία, ενώ επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι μεγάλες κινεζικές κοινότητες, στο εσωτερικό αυτών των χωρών, εμφανίζουν ένα σημαντικό ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για εκδήλωση γαστρικού καρκίνου [533,534]. Ο παράγοντας αυτός δεν ήταν δυνατόν έως τώρα να συσχετισθεί με τον ρόλο της πρωτεΐνης CagA τύπου Ανατολικής Ασίας στην εκδήλωση του γαστρικού καρκίνου, λόγω της υψηλής συχνότητας εμφάνισης αυτού του τύπου CagA μεταξύ των ασθενών της κινεζικής καταγωγής και της χαμηλής συχνότητας εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου στις υπόλοιπες φυλετικές ομάδες που διαμένουν στις χώρες αυτές [534,535]. Υπενθυμίζεται ότι, ο επιπολασμός του γαστρικού καρκίνου είναι

υψηλός στην Ιαπωνία (ASRGC 31,1 ανά 100.000), ενώ στην Οκινάουα, μια ομάδα νησιών στη νότια Ιαπωνία με ισχυρή αμερικανική επιρροή, παρατηρείται πολύ χαμηλότερο ποσοστό. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης στελεχών με CagA Δυτικού τύπου (42%) προερχόμενα από ασθενείς της Οκινάουα [503] σε σύγκριση με την Ιαπωνία [513]. Στην Κορέα και στο Βιετνάμ, όπου κυριαρχούν τα στελέχη *H. pylori* με CagA πρωτεΐνη τύπου Ανατολικής Ασίας (89%) [536], η συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου είναι διπλάσια από εκείνη που παρατηρείται στο Βιετνάμ, δείχνοντας ότι η CagA τύπου Ανατολικής Ασίας δεν είναι ο μόνος κύριος καθοριστικός παράγοντας εκδήλωσης γαστρικού καρκίνου [536]. Όλα αυτά τα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η ενδημική κυκλοφορία των στελεχών *H. pylori* που φέρουν CagA τύπου Ανατολικής Ασίας συμβάλλει σημαντικά στην υψηλή συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού καρκίνου σε χώρες της Ανατολικής Ασίας. Επομένως, η σπανιότερη επικράτηση CagA-θετικών στελεχών τύπου Ανατολικής Ασίας στην Καμπότζη και, κατ' επέκταση, στη Νοτιοανατολική Ασία (εκτός από το Βιετνάμ), μπορεί να εξηγήσει εν μέρει τα χαμηλότερα επίπεδα γαστρικού καρκίνου που παρατηρούνται σε αυτές τις χώρες σε σύγκριση με τις άλλες χώρες της Ανατολικής Ασίας.

Επίσης στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε τυποποίηση των απομονωθέντων στελεχών από ασθενείς της Καμπότζη, με βάση τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο της πρωτεΐνης VacA (m, s και i), οι οποίοι και καθορίζουν την τοξικότητα της, όπως έχει αναλυθεί στην εισαγωγή §1.8.2.3. Το 95,5% έφεραν το αλληλόμορφο s1, το 48,5% το αλληλόμορφο m1 και το 93,9% το αλληλόμορφο i1. Όλα τα στελέχη με πολυμορφισμούς *vacA* s1/m1, έφεραν το αλληλόμορφο i1 ενώ όλα τα στελέχη *vacA* s2/m2 έφεραν το αλληλόμορφο i2. Επίσης τα CagA αρνητικά στελέχη ήταν *vacA* s2/m2/i2. Το 48,5% των στελεχών παρουσίασε τον γονότυπο *vacA* s1/i1/m1 που συνδέεται με αυξημένη ικανότητα σχηματισμού κενοτοπιών (high vacuolation) και το 45,4% ήταν *vacA* s1/i1/m2. Όσον αφορά το s1 αλληλόμορφο του γονιδίου *vacA* το 57,6% ήταν s1a και το 37,9% ήταν s1c. Η πλειονότητα των hpEurope στελεχών από την Καμπότζη (79,4%) κατείχαν το αλληλόμορφο s1a, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη ήταν s1c (11,8%) ή s2 (8,8%). Το ποσοστό των αλληλομόρφων σε στελέχη από την Καμπότζη με διαμόρφωση s1c Ανατολικής Ασίας ήταν πολύ χαμηλότερο 65,6%, ενώ το υπόλοιπο 34,4% τυποποιήθηκε ως s1a. Ο παρατηρούμενος υψηλός επιπολασμός των αλληλομόρφων s1a μεταξύ hspEAsia στελεχών από την Καμπότζη αντανάκλα την συχνότητα, με την οποία τα ευρωπαϊκής προέλευσης αλληλόμορφα του *vacA* γονιδίου διεισδύουν στα στελέχη Ανατολικής Ασίας, η οποία συχνότητα είναι παρόμοια με αυτή της επέκτασης των ευρωπαϊκής καταγωγής γονιδίων της CagA.

Ο πρωτικός ρυθμός των στελεχών που φέρουν m1 αλληλόμορφα που παρατηρείται στη Νότια Κορέα (95%) και το Βιετνάμ (37%) έχει δείχθει ότι συμφωνεί με τη διαβάθμιση της συχνότητας του γαστρικού καρκίνου [513]. Στο Βιετνάμ, η επίπτωση του γαστρικού καρκίνου είναι υψηλότερη στο Βορρά (ASRGC 27,0 ανά 100.000 άνδρες στη πρωτεύουσα Ανόι) από ότι στο Νότο (ASRGC 18,7 ανά 100.000 άνδρες στη πρώην πρωτεύουσα Χο Τσι Μινχ), γεγονός που συμφωνεί με την κατανομή των συχνοτήτων των στελεχών με m1 αλληλόμορφα (50% στο Ανόι και 25% στη Χο Τσι Μινχ) [512]. Τα περισσότερα στελέχη στην περιοχή αυτή ανήκουν στον υπό-πληθυσμό στελεχών Ανατολικής Ασίας (hspEAsia), και έτσι το συγκεκριμένο αλληλόμορφο της m περιοχής της VacA μπορεί να αποτελέσει ένα δείκτη λοιμογόνου ικανότητας για αυτόν τον υπό-πληθυσμό. Πράγματι, ο συσχετισμός αυτός δεν βρίσκεται σε άλλες χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας [537-539], οι οποίες εμφανίζουν υψηλή συχνότητα των στελεχών hpAsia2 και hpEurope [231,540]. Στην Καμπότζη, η συχνότητα των στελεχών με m1 αλληλόμορφο μεταξύ των στελεχών hspEAsia (59,4%) είναι παρόμοια με αυτή που αναφέρθηκε στο Βόρειο Βιετνάμ, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα εν λόγω στελέχη hspEAsia είναι λιγότερο λοιμογόνα από τα στελέχη από την Ιαπωνία και την Κορέα.

Η ταυτόχρονη επέκταση τόσο των ευρωπαϊκών VacA όσο και των CagA αλληλομόρφων σε επτά από τα 32 στελέχη hspEAsia (21,9%) που εξετάσαμε, μπορεί να σχετίζεται με πλεονέκτημα λόγω προσαρμογής στον ανθρώπινο πληθυσμό ή/και στον ξενιστή, και αντικατοπτρίζει μια σταθερή ισορροπία των επιπτώσεων των VacA και CagA στα επιθηλιακά κύτταρα. Πράγματι, όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή § 1.8.3.2.2 οι πρωτεΐνες VacA και CagA μπορούν να δρουν είτε συνεργικά ή ανταγωνιστικά για την επίτευξη της χρόνιας λοίμωξης από *H. pylori* [541-543] και η απορρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών με την επίδραση είτε της μίας είτε της άλλης είναι πιθανό, να συμβάλει στην διαφορετική έκβασης της νόσου. Έτσι, οι αλλαγές στη σύνθεση του γονιδιώματος των στελεχών *H. pylori* με μετασχηματισμό του DNA από διαφορετικά στελέχη μπορεί να διαταράξει τα αποτελέσματα της εξισορροπημένης δραστηριότητας της VacA και της CagA στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρές συνέπειες για την απόκριση του ξενιστή και τον κίνδυνο εκδήλωσης γαστρικού καρκίνου. Ως εκ τούτου, η παρατηρούμενη διείσδυση των ευρωπαϊκών VacA και CagA αλληλομόρφων μεταξύ των στελεχών hspEAsia μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στη μελλοντική επίπτωση του γαστρικού καρκίνου στην Καμπότζη.

Συμπληρωματικά, θα πρέπει να αναφερθεί, η δεδομένη δυσκολία διεξαγωγής τέτοιων μελετών σε χώρες με ανεπαρκή συστήματα υγειονομικής περιθάλψης, όπως είναι η Καμπότζη. Αν και τα ευρήματά μπορεί να μην θεωρηθούν αντιπροσωπευτικά της συνολικής εικόνας της

χώρας, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μελέτη έλαβε χώρα σε μία από τις κύριες τριτοβάθμιες νοσοκομειακές μονάδες στην Καμπότζη, με μια μεγάλη γεωγραφική κάλυψη ασθενών. Τα στελέχη που απομονώθηκαν χαρακτηρίζονται από χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης χαρακτηριστικών hspEAsia που φέρουν την Ασιατικού τύπου CagA και το m1 τύπο αλληλόμορφου της VacA (10 από 66, 15,2%) από ότι αναφέρεται στις υπόλοιπες χώρες της Ανατολικής Ασίας. Το γεγονός αυτό, μπορεί να εξηγήσει εν μέρει τη χαμηλή συχνότητα του γαστρικού καρκίνου στην Καμπότζη και κατ' επέκταση, στη Νοτιοανατολική Ασία. Παρατηρήθηκε η επέκταση του φάσματος των ευρωπαϊκών VacA και CagA αλληλόμορφων μεταξύ hspEAsia στελεχών τα οποία ενδέχεται να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στη μελλοντική επίπτωση του γαστρικού καρκίνου στην Καμπότζη. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για να επιβεβαιώσουν τα ευρήματα σε μεγαλύτερο και πιο αντιπροσωπευτικό αριθμό ασθενών, προκειμένου να ληφθούν υπόψη ταυτόχρονα οι διάφοροι παράγοντες που δυνητικά εμπλέκονται στην γαστρική καρκινογένεση όπως ο ρυθμός επέκτασης της *H. pylori* λοίμωξης, οι παράγοντες προδιάθεσης του ξενιστή, οι λοιμογόνιοι παράγοντες του βακτηρίου και η επίδραση της διατροφής και του περιβάλλοντος.

4.1.2. Φυλογενετική ανάλυση κλινικών στελεχών *H. pylori* Ελλήνων φορέων για τον προσδιορισμό της προγονικής τους προέλευσης, αναφορικά με τις ομάδες προγονικών ευρωπαϊκών στελεχών.

Η ευρηματική εκμετάλλευση της γενετικής πλαστικότητας του γονιδιώματος του *H. pylori*, σε συνδυασμό με σύγχρονες τεχνικές μοριακής γενετικής, όπως η τυποποίηση με ανάλυση πολλαπλών γενετικών τόπων (MLST) και η ανάπτυξη λογισμικών ανάλυσης γενετικής δομής, έχουν αναδείξει την γενετική μελέτη του *H. pylori* ως ένα αξιόπιστο εργαλείο έρευνας της δομής του ανθρώπινου πληθυσμού και της χαρτογράφησης των μετακινήσεων ανθρώπινων πληθυσμών, παρέχοντας ταυτόχρονα χρήσιμες πληροφορίες για την καταγωγή των φύλων που αποίκισαν την υδρόγειο [231,258,259].

Τα ερωτήματα αυτά δεν έχουν αντιμετωπιστεί μέχρι σήμερα κατά αναμφισβήτητο τρόπο, παρόλο που οι δυνατότητες των πολυμορφικών δεικτών του DNA στην ανασυγκρότηση της ανθρώπινης μετανάστευσης και φυλογεωγραφίας [544,545] χρησιμοποιείται εδώ και καιρό. Ακόμη και προσεκτικά σχεδιασμένες γονιδιωματικές μελέτες σε μεγάλο βαθμό παρέμειναν ανακριβείς, γεγονός που οφείλεται στην έλλειψη μιας καθολικά αποδεκτής πρότυπης μεθόδου. Αυτό οφείλεται στο ότι οι κλασσικοί δείκτες του μιτοχονδριακού DNA προσφέρουν πολύ λίγες

χρήσιμες πληροφορίες λόγω της έλλειψης πολυμορφισμών, ενώ οι πρόσφατα αναπτυχθέντες δείκτες του χρωμοσώματος Y είναι ακόμη λιγότερο πολυμορφικοί από τις μιτοχονδριακές περιοχές [545,546]. Τον τελευταίο καιρό, νέα γενετικά μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία τα οποία βασίζονται σε παράσιτα, ιούς και βακτήρια που πιθανόν να έχουν συνοδεύσει τον ανθρώπινο ξενιστή τους κατά τη διάρκεια της εξέλιξης και σε ένα μεγάλο μέρος της ανθρώπινης ιστορίας, συμπεριλαμβανομένων των μεταναστεύσεων και των εξαπλώσεων [546-548] σε διαφορετικές ηπείρους. Οι προσεγγίσεις αυτές αποτελούν μια ελκυστική εναλλακτική λύση για την ανακατασκευή της προέλευσης των ανθρώπινων πληθυσμών.

Σε σχέση με τους ιούς, έχει επιχειρηθεί η χαρτογράφηση μετακίνησης ανθρωπίνων πληθυσμών, χρησιμοποιώντας τόσο DNA ιούς όπως ο ανθρωπίνος ιός των θηλωμάτων (HPV⁸⁹) και ο ιός JCV⁹⁰, όσο και RNA ιούς όπως ο HTLV⁹¹, GBV-C⁹² και ο HIV⁹³ [546]. Πλέον αξιόπιστα αποτελέσματα φαίνεται να έχουν ληφθεί από την ανάλυση των ιών HPV και JCV. Περισσότεροι από 100 τύποι του HPV έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα, εκ των οποίων δύο, ο τύπος 16 (HPV-16) και ο τύπος 18 (HPV-18), φαίνεται να αντανάκλουν πολύ στενά το ανθρώπινο παρελθόν των μεταναστεύσεων. Ο HPV-16 είναι διαβόητος, λόγω της σύνδεσής του με την νεοπλασία των επιθηλίων των γεννητικών οργάνων και του ρόλου του στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας [549]. Ο HPV-16 είναι τόσο διαδεδομένος που αποτελεί το κυρίαρχο τύπο που απομονώνεται ανά τον κόσμο [550]. Ο JCV είναι ένας DNA ιός και έχει αξιολογηθεί εκτενώς η χρησιμότητά του σε σχέση με την διάρθρωση των ανθρώπινων μεταναστεύσεων [551,552]. Ο JCV συνήθως απαντάται ως μια ασυμπτωματική, επίμονη χρόνια λοίμωξη των νεφρών και προκαλεί σε ασθενείς με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, θανατηφόρα προοδευτική πολύεστιακή λευκό-εγκεφαλοπάθεια [553]. Μετά την αρχική μόλυνση, ο JCV παραμένει στους νεφρικούς ιστούς [554] και δείγματα θετικά της παρουσίας του μπορούν να συλλεγούν εύκολα από τα ούρα. Η νεφρική λοίμωξη συνήθως αποκτάται κατά τη διάρκεια της εφηβείας, η οδός μετάδοσης είναι σε μεγάλο βαθμό κάθετη, από τους γονείς στα παιδιά, η οποία ενισχύει επίσης την χρησιμότητα του JCV για τη διερεύνηση των μετακινήσεων των ανθρώπινων πληθυσμών [555,556].

Όσο αφορά τα παράσιτα έχουν χρησιμοποιηθεί από το βασίλειο των πρωτόζωων, το παράσιτο *Plasmodium falciparum* το οποίο αποτελεί ένα σημαντικό ανθρώπινο παθογόνο καθώς ευθύνεται για 200-300 εκατομμύρια περιπτώσεων ελονοσίας και 1-3 εκατομμύρια θανάτων κάθε

⁸⁹ Human Papilloma Virus

⁹⁰ John Cunningham Virus

⁹¹ Human T-lymphotropic Virus

⁹² Hepatitis G Virus

⁹³ Human Immunodeficiency Virus

χρόνο, σε παγκόσμιο επίπεδο [557,558]. Ακόμα από την συνομοταξία των μετάζωων έχουν χρησιμοποιηθεί οι κοινές ψείρες οι οποίες αποτελούν υποχρεωτικά εξωπαράσιτα των θηλαστικών που ολοκληρώνουν ολόκληρο τον κύκλο ζωής τους στο σώμα του ξενιστή. Δεν μπορούν να επιβιώσουν περισσότερο από μερικές ώρες ή ημέρες μακριά από τον ξενιστή. Στους ανθρώπους παρασιτούν δύο είδη ψειρών: στο κεφάλι και στο σώμα το *Pediculus humanus* και ψείρες του εφηβαίου *Phthirus pubis* [559,560]. Κανένα όμως από τα παραπάνω παράσιτα δεν έχει ως σήμερα δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα διότι δεν έχουν εντοπιστεί περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά [559].

Μέχρι στιγμής η πιο ακριβής αναπαράσταση της μετακίνησης των ανθρώπινων πληθυσμών φαίνεται να προέρχεται από την ανάλυση του βακτηρίου *H. pylori* όπως αναλυτικά έχει περιγραφεί στην εισαγωγή της παρούσας διατριβής. Εντούτοις αποτελεσματικά έχουν χρησιμοποιηθεί και τα βακτήρια *S. aureus* [561], *S. pneumoniae* [562], *V. Cholerae* [563], *S. sonnei* [564], *C. difficile* [565], *Y. pestis* [566] και *M. tuberculosis* [567]. Μια πρόσφατη μελέτη χρησιμοποιώντας το *M. tuberculosis* και τεχνολογία προσδιορισμού νουκλεοτιδίων επόμενης γενιάς (NGS) προχώρησε στην ανάγνωση της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος 259 στελεχών μυκοβακτηρίου προερχόμενα από διαφορετικά μέρη της υδρογείου [567], ανασυνθέτοντας με αυτό τον τρόπο τις παγκόσμιες ανθρώπινες μετακινήσεις ανά του αιώνες. Φαίνεται λοιπόν ότι, η δυνατότητα αποκρυπτογράφησης ολόκληρου του γονιδιώματος στελεχών βακτηρίων σε μικρό χρονικό διάστημα μέσω τεχνικών προσδιορισμού νουκλεοτιδίων επόμενης γενιάς θα αποτελέσει ένα πανίσχυρο εργαλείο για τη μελέτη των ανθρώπινων μετακινήσεων ανά του αιώνες. Επιπλέον, σημαντικές επιπτώσεις για τη μελέτη των παγκόσμιων ανθρώπινων μετακινήσεων αναμένονται από την περαιτέρω ανάπτυξη αλγορίθμων και μεθόδων ανάλυσης του ανθρώπινου μικροβιώματος, ειδικότερα για πληθυσμούς με εξαιρετική ποικιλομορφία στην ανθρώπινη γενετική σύνθεση, διατροφικές συνήθειες και γεωγραφική κατανομή [568].

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε ανάλυση MLST σε στελέχη *H. pylori* προερχόμενα από Έλληνες συμπτωματικούς ασθενείς με σκοπό να διερευνηθεί αν η γενετική δομή του βακτηρίου στον Ελληνικό πληθυσμό, συμφωνεί με αυτή των στελεχών που έχουν χαρτογραφηθεί στις άλλες χώρες της Νότιας Ευρώπης. Τα ευρωπαϊκά στελέχη *H. pylori* χαρακτηρίζονται κυρίως από την ύπαρξη δύο προγονικών υποπληθυσμών των hrAE1 και hrAE2 [258]. Τα στελέχη που προέρχονται από το hrAE1 ανήκουν σε προγονικούς νομαδικούς πληθυσμούς που ξεινώνοντας από την κεντρική Ασία και περνώντας μέσω των Ουραλίων Όρων, την Κασπία και τις Στέπες αποίκησαν κυρίως περιοχές της βόρειας Ευρώπης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ότι στελέχη που απομονώνονται από σύγχρονες Ευρωπαϊκές χώρες του Βορρά έχουν

ισχυρότερο προγονικό χαρακτήρα hrAE1. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας, επιβεβαίωσαν αυτές τις παρατηρήσεις αφού στελέχη με προέλευση τη Γερμανία, Εσθονία, Φιλανδία, Μεγάλη Βρετανία, Ρωσία, Καζακιστάν και Ολλανδία έδειξαν ότι κατατάσσονται στον εντονότερο χαρακτήρα hrAE1. Αντίθετα, τα στελέχη με προγονικό χαρακτήρα hrAE2 φαίνεται ότι συσχετίζονται με πληθυσμούς γεωργών που αποίκισαν μέσω Μεσοποταμίας, κυρίως την Νότια Ευρώπη, κατά την Νεολιθική εποχή [231]. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα Ελληνικά στελέχη έχουν εντονότερο χαρακτήρα HrAE2 που συμφωνεί με τις παρατηρήσεις που έχουν γίνει για τις γειτονικές Ευρωπαϊκές χώρες της Μεσογείου (Ιταλία, Ισπανία) [231].

Σε μια προσπάθεια να διευκρινιστεί περαιτέρω αν ο εντονότερος χαρακτήρας hrAE2 που παρατηρείται στα Ελληνικά στελέχη πράγματι οφείλεται σε μετακίνηση γεωργικών πληθυσμών κατά την νεολιθική εποχή τα συγκρίναμε με στελέχη που απομονώθηκαν από το Ιράν. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα Ελληνικά στελέχη ομαδοποιήθηκαν με συγκεκριμένες ομάδες στελεχών που προέρχονται από τον Ιρανικό Νότο και συγκεκριμένα από τους πληθυσμούς του Νοτιοανατολικού Ιράν, Yazd Fars και Hormozgan Fars (από τα στενά του Χορμούζ). Η σημασία αυτής της παρατήρησης ενδεχομένως να αντιτίθεται στην κρατούσα θεώρηση περί του προγονικού αποικισμού της Ευρασίας μέσω της Μεσοποταμίας και της Μέσης Ανατολής, αλλά υποστηρίζει τον Ευρασιατικό αποικισμό μέσω του Ευρωπαϊκού Νότου. Επιπλέον αυτό καταδεικνύεται από το γεγονός ότι τα Ιρανικά στελέχη έχουν απόλυτα μοιρασμένο τον προγονικό χαρακτήρα μεταξύ hrAE1 και 2, σε αντίθεση με τα Ελληνικά στελέχη τα οποία έχουν έντονο hrAE2 χαρακτήρα. Για την διαλεύκανση του ανωτέρω ερωτήματος απαιτείται πολύ μεγαλύτερης κλίμακας μελέτη που θα συμπεριλαμβάνει περισσότερα στελέχη (απομονώσεις) από χώρες της Νότιας Ευρώπης καθώς και της Αφρικής και Μέσης Ανατολής, και η οποία ξεφεύγει από τις δυνατότητες της παρούσης διδακτορικής διατριβής.

*4.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΓΙΑ
ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ CagA*

4.2.1. Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων έκφρασης χιμαιρικής CagA από κλινικά στελέχη *H. pylori*

Για την μελέτη της επίδρασης των θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA της πρωτεΐνης CagA στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα κρίθηκε σκόπιμη η έκφραση της πρωτεΐνης με μεταβλητό αριθμό EPIYA-C μέσω συστημάτων πρωτεϊνικής έκφρασης. Αρχικά, για την κλωνοποίηση του γονιδίου *cagA*, επιλέχθηκαν κλινικά στελέχη *H. pylori* τα οποία είχαν απομονωθεί από τον ίδιο ασθενή και είχαν χαρακτηριστεί ως απόλυτα κλωνικά συσχετισμένα με την μέθοδο της RAPD-PCR ενώ, η μόνη διαφορά που είχε παρατηρηθεί σε αυτά, αφορούσε την έκφραση πρωτεΐνης CagA με διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων θέσεων EPIYA-C [434]. Τα συγκεκριμένα στελέχη επίσης επιλέχθηκαν επί τη βάση της επαγωγής του φαινοτύπου διασποράς και επιμήκυνσης, καθώς και των επιπέδων Ιντερλευκίνης-8 που παρατηρούνταν στο υπερκείμενο καλλιιεργειών κυττάρων AGS μετά από πειραματική μόλυνση με τα εν λόγω στελέχη [434,435].

Από αυτά τα στελέχη, πολλαπλασιάστηκε και κλωνοποιήθηκε με επιτυχία το γονίδιο *cagA* σε δύο διαφορετικούς πλασμιδιακούς φορείς πρωτεϊνικής έκφρασης στον pcDNA3.1/Myc-His B+ και στον pCI. Δυστυχώς παρ' όλη την προσπάθεια δεν κατέστη δυνατή η έκφραση της πρωτεΐνης με τον pcDNA3.1/Myc-His B+ τόσο μετά από διαμόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων AGS όσο και HeLa. Όσον αφορά τον πλασμιδιακό φορέα pCI, ακολουθήθηκε διαφορετική στρατηγική, πρώτα πραγματοποιήθηκε επιτυχής έκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα *E.coli* BL21(DE3) pLysS, και στην συνέχεια έγινε διαμόλυνση, με τα ίδια πλασμίδια, γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων AGS, όπου υπήρξε επιτυχής έκφραση της CagA, ωστόσο η ποσότητα της εκφρασμένης πρωτεΐνης ήταν πολύ χαμηλή. Επιπλέον δεν παρατηρήθηκε διαφορετική έκφραση της πρωτεΐνης σε σχέση με τον χρόνο συλλογής του δείγματος μετά από την διαμόλυνση AGS κυττάρων στις 12, 24 και 36 ώρες. Όσον αφορά τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της CagA στα κύτταρα *E.coli* BL21(DE3) pLysS μπορεί να οφείλονται σε τυχόν τοξική δράση της πρωτεΐνης. Επιπλέον αναφορικά με την κυτταρική σειρά των AGS το πιθανότερο είναι ότι ο υποκινητής CMV στο πλασμίδιο έκφρασης να μην προκαλεί αρκετά αποτελεσματική έκφραση της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα την χαμηλή παραγωγή της.

Τόσο ο pcDNA3.1/Myc-His B+ όσο και ο pCI φέρουν τον ίδιο υποκινητή πρωτεϊνικής έκφρασης CMV, η διαφορά τους όμως έγκειται στο γεγονός ότι ο pCI φέρει αμέσως μετά τον υποκινητή ένα χιμαιρικό εσώνιο της β-γλοβίνης το οποίο πιθανότατα σταθεροποιεί το RNA με αποτέλεσμα την πιο αποτελεσματική έκφραση των πρωτεϊνών [569,570]. Ακόμα συγκριτική μελέτη των κοινώς χρησιμοποιούμενων υποκινητών σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης πρωτεϊνών κατέδειξε μια μεγάλη διακύμανση της αποτελεσματικής έκφρασης του υποκινητή

CMV, η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον κυτταρικό τύπο, τόσο των ανθρώπινων κυττάρων, όσο και αυτών που προέρχονται από άλλα θηλαστικά [571]. Τέλος στην βιβλιογραφία επιτυχής κλωνοποίηση και έκφραση της πρωτεΐνης CagA σε πλασμιδιακούς φορείς πρωτεϊνικής έκφρασης έχει δημοσιευθεί από λίγες ομάδες, καταδεικνύοντας την δυσκολία του εγχειρήματος και επιπλέον ο κύριος όγκος των δημοσιευμένων μελετών προέρχεται από την ίδια Ιαπωνική ομάδα ερευνητών [444,453,463,469,473], η οποία χρησιμοποιεί το πλασμίδιο pSP65SRa το οποίο φέρει έναν υποκινητή SRa [572]. Επειδή το συγκεκριμένο πλασμίδιο δεν είναι εμπορικά διαθέσιμο δεν ήταν δυνατή η προμήθεια του από την αγορά, ούτε η απόκτηση του μετά από συνεννόηση με την Ιαπωνική ομάδα.

4.2.2. Εφαρμογή της τεχνολογίας FLASH στο cag-T4SS

Νέες τεχνικές σήμανσης πρωτεϊνών και μικροσκοπίας, που επιτρέπουν την οπτικοποίηση μοριακών λειτουργιών του κυττάρου σε τρεις διαστάσεις, σε πραγματικό χρόνο και όχι σε μεμονωμένες χρονικές στιγμές έχουν αρχίσει να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες οι οποίες θα βοηθήσουν στο μέλλον στην χωροχρονική διαλεύκανση διάφορων βασικών μοριακών αλληλεπιδράσεων. Μια τέτοια τεχνική είναι η μέθοδος σήμανσης πρωτεϊνών με τον χημικό παράγοντα FLAsH [573]. Η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα εξαπεπτίδιο πλούσιο σε κυστεΐνες (CCPGCC) το οποίο προστίθεται στο ένα άκρο της πρωτεΐνης συνήθως στο καρβοξυτελικό, του οποίου η μετέπειτα σύνδεση με ένα διαρσενικό χρωμογόνο καταλήγει σε φθορισμό. Η ιδιότητα του διαρσενικού χρωμογόνου να φθορίζει μόνο μετά από την πρόσδεση του πάνω στην χημικώς σεσημασμένη πρωτεΐνη καθιστά την μέθοδο κατάλληλη για την χρησιμοποίηση της σε μικροσκοπία πραγματικού χρόνου [502]. Ένα ερευνητικό ερώτημα που μπορεί να απαντηθεί με αυτού του είδους τις τεχνικές είναι και ο χωροχρονικός προσδιορισμός των μοριακών συμβάντων κατά την μεταφορά μιας βακτηριακής πρωτεΐνης στο εσωτερικό των επιθηλιακών κυττάρων μέσω ενός συστήματος έκκρισης τύπου IV.

Για τον λόγο αυτό στην παρούσα διατριβή κατασκευάσθηκαν στελέχη *H. pylori* τα οποία εξέφραζαν χημικώς σεσημασμένη πρωτεΐνη CagA με μεταβλητό αριθμό EPIYA-C με προσδεμένο στο καρβοξυτελικό τους άκρο το εξαπεπτίδιο της τετρακυστεΐνης. Στα στελέχη που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε σχολαστική διαλογή των κλώνων με μια σειρά γενετικών, πρωτεϊνικών και λειτουργικών μεθόδων. Όπως αυτές σχολιάζονται και τεκμηριώνονται αναλυτικά παραπάνω στο κεφάλαιο 4.2. Μια επιπλέον παράμετρος που εξετάστηκε στην παρούσα μεθοδολογία ήταν η ενδεχόμενη τοξική επίδραση του διαρσενικού χρωμογόνου στην βιωσιμότητα του *H. pylori*. Η

παρουσία στην ένωση του χρωμογόνου του στοιχείου αρσενικό, ενός γνωστού δηλητηρίου, λόγω της απορρυθμιστικής του δράσης στην παραγωγή ATP, εγείρει πάντα την αμφιβολία της επίδρασης του στην επιβίωση των οργανισμών που χρησιμοποιούνται κατά την πειραματική διαδικασία [502]. Επιπλέον, επειδή η τεχνική αυτή δεν έχει ποτέ εφαρμοστεί για την μελέτη εκκριτικών παραγόντων του *H. pylori* δεν υπάρχουν καταγραφές για την επιτυχή εφαρμογή της στο συγκεκριμένο πειραματικό σύστημα. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή αποδεικνύεται ότι το FISH είναι κατ' αρχήν καλά ανεκτό από το *H. pylori* χωρίς να επηρεάζεται η βιωσιμότητά του. Επιπλέον, δεν παρουσιάστηκαν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της CagA σε πειραματική λοίμωξη γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων με τα παραπάνω στελέχη. Είναι η πρώτη φορά που η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε ένα βακτηριακό εκκριτικό σύστημα τύπου IV με επιτυχία, αποτέλεσμα το οποίο δείχνει ότι το μέγεθος του εξαπεπτιδίου CCPGCC ενδεχομένως δεν αποτελεί εμπόδιο για την μεταφορά των πρωτεϊνών μέσω του διαύλου του εκκριτικού συστήματος ούτε δημιουργεί οποιαδήποτε διαταραχή της δομής της πρωτεΐνης τέτοιας ώστε να διαταράσσεται η μεταφορά της.

Περαιτέρω λειτουργικά πειράματα πρέπει να διεξαχθούν ώστε να διαπιστωθεί εάν επηρεάζεται η λειτουργικότητα της CagA, μετά την είσοδο της στο εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων, όπως τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της CagA μετά την μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων και τα επίπεδα της εκκρινόμενης IL-8 σε σύγκριση με τα μεταλλαγμένα στελέχη *H. pylori* που δεν φέρουν το εξαπεπτίδιο CCPGCC στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Βιβλιογραφικές αναφορές καταδεικνύουν ότι προσκόλληση μεγάλων πολυπεπτιδίων πρωτεϊνικής σήμανσης όπως η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη⁹⁴ στο καρβοξυτελικό άκρο της CagA παρεμποδίζει ενεργά την διέλευση της CagA μέσω του διαύλου του T4SS [574]. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο μεγάλο μέγεθος του πολυπεπτιδίου σήμανσης στην προκειμένη περίπτωση, καθώς η GFP έχει μεγάλο μοριακό βάρος της τάξης των 27 kDa, είτε λόγω της διατάραξης της ευέλικτης τριτοταγούς δομής του καρβοξυτελικού άκρου [468,469]. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι ο φθορισμός είναι επαρκής για την διαλεύκανση βασικών ερευνητικών ερωτημάτων σχετικά με την ταχύτητα μεταφοράς της πρωτεΐνης, την ροή κίνησης της (συνεχής ή διακοπτόμενη ή ρυθμιζόμενη από κάποιο μοριακό μηχανισμό), ο χωροταξικός εντοπισμός της στο εσωτερικό των κυττάρων στα πρώτα στάδια της μόλυνσης και τέλος εάν όλα τα παραπάνω επηρεάζονται από την φωσφορυλίωση της CagA στις θέσεις EPIYA. Ήδη στην βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές ότι η φωσφορυλίωση της CagA επηρεάζει τον περαιτέρω χωροταξικό εντοπισμό της στο εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων, καθώς η

⁹⁴ Green Fluorescent Protein, GFP

φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης, βρέθηκε να συν-εντοπίζεται με την VacA στα μιτοχόνδρια, ενώ η μη φωσφορυλιωμένη μορφή της, στα κυστίδια μεταφοράς της VacA, αναστέλλοντας και στις δύο θέσεις την αποπτωτική δράση της VacA [575].

Συνοψίζοντας στην παρούσα διατριβή εφαρμόστηκε με επιτυχία για πρώτη φορά η τεχνολογία σήμανσης πρωτεϊνών FLAsH σε ένα εκκριτικό σύστημα τύπου IV και δείχθηκε ότι η μέθοδος είναι συμβατή για την εφαρμογή της με το *H. pylori*.

4.2.3. Παραγωγή και διαλογή ισογονιδιακών μεταλλαγμένων στελεχών *H. pylori*

Λόγω της χαρακτηριστικής ποικιλομορφίας του γονιδιώματος του *H. pylori*, τα κλινικά στελέχη που απομονώνονται από διαφορετικούς ασθενείς και εκφράζουν πρωτεΐνη CagA με μεταβλητό αριθμό και είδη των μοτίβων EPIYA, μπορούν να προσφέρουν μόνο ευκαιριακά πληροφορίες σχετικά με την λειτουργία αυτών των διαφορετικών μοτίβων. Για το λόγο αυτό, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αποφασίστηκε να σχεδιασθεί μια απλή και σχετικά γρήγορη μέθοδος, για την παραγωγή μεταλλαγμένων ισογονιδιακών στελεχών *H. pylori* που θα εξέφραζαν πρωτεΐνη CagA με μεταβλητό αριθμό μοτίβων EPIYA-C μέσω του φυσικού μετασχηματισμού και αξιοποιώντας τον κατευθυνόμενο ομόλογο ανασυνδυασμό, χρησιμοποιώντας όμως ένα στέλεχος αναφοράς *H. pylori* με γνωστή γονιδιακή αλληλουχία. Ως εκ τούτου κατασκευάστηκαν CagA θετικά μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία εκφράζοντας CagA πρωτεΐνη με μεταβλητό αριθμό των EPIYA-C μοτίβων (AB, ABC, και ABCCC) και μη-φωσφορυλιωμένα ομόλογα τους (AB, ABF, ABFF και ABFFF) βασισμένα στο πατρικό στέλεχος αναφοράς P12 [576]. Το στέλεχος *H. pylori* P12 επιλέχθηκε διότι έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί σε πρωτοποριακές μελέτες στον τομέα της παθογένειας του *H. pylori* [227,324,325,332,341,455,475] και διότι ολόκληρη η αλληλουχία του γονιδιώματος έχει δημοσιευθεί [227].

Το τελικό σχέδιο κατασκευής αποτελείτο από τέσσερις διακριτές φάσεις και η δυσκολία στον σχεδιασμό είχε να κάνει με τις συχνές ταυτόσημες επαναλαμβανόμενες περιοχές που περιλαμβάνουν και κωδικοποιούν τις θέσεις EPIYA στο καρβόξυ-τελικό άκρο της CagA. Στο στάδιο I, κλωνοποιήθηκε, το πλήρες μήκος του γονιδίου της CagA, εν σειρά με κασέτα αντοχής στην καναμυκίνη του *C. jejuni* στο 5' άκρο του, ακολουθούμενη κατάντη από ένα τμήμα DNA 1.200bp το οποίο περιλάμβανε την αλληλουχία αμέσως μετά το γονίδιο *cagA* στο γονιδίωμα του P12. Για να επιτευχθεί ο αξιόπιστος πολλαπλασιασμός του *cagA* γονιδίου καθ' όλο το μήκος του, σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές οι οποίοι χαρτογραφούσαν τις άκρες της αλληλουχίας του γονιδίου και επίσης χρησιμοποιήθηκε η Vent DNA πολυμεράση για να εξασφαλιστεί η πιστότητα του

πολλαπλασιασμού [227]. Επιπλέον, οι συνθήκες του πολλαπλασιασμού ήταν προσαρμοσμένες έτσι ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αδιάκοπη επιμήκυνση του συνόλου του *cagA* γονιδίου. Για την επαλήθευση της ορθότητας της πολλαπλασιασμένης αλληλουχίας της CagA σχεδιάσαμε ένα αριθμό νέων εκκινητών επικαλυπτόμενης αλληλουχίας λαμβάνοντας υπόψη την πλήρη αλληλουχία του γονιδιώματος του P12 καθώς και άλλων Δυτικής προέλευσης στελεχών αναφοράς (26695, G27 και HPAG1). Αναφορικά με την επιλογή του κατάλληλου μεγέθους της αλληλουχίας μετά το τέλος του γονιδίου *cagA*, επιλέχθηκε ένα κατά προσέγγιση μήκος 1.200bp λαμβάνοντας υπόψη προηγούμενες παρατηρήσεις σχετικά με τις βέλτιστες συνθήκες για τον ομόλογο ανασυνδυασμό του *H. pylori* [577] και τις προηγούμενες εκθέσεις για τον επιτυχή κατευθυνόμενο ανασυνδυασμό [578]. Στο στάδιο II δημιουργήσαμε έναν μέγα-εκκινητή, ο οποίος αποτελείται από τρία συνεχόμενα αντίγραφα της EPIYA-C αλληλουχίας του γονιδίου της CagA ακολουθούμενα στο 5' άκρο τους από ένα τμήμα 140bp του γονιδίου της CagA, το οποίο εκτεινόταν μετά το δεύτερο και τελευταίο EPIYA-C. Ένα κρίσιμο σημείο σε αυτό το στάδιο ήταν ο έλεγχος της πιστότητας των πολλαπλασιασμένων αλληλουχιών, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές επικαλυπτόμενης αλληλουχίας που σχεδιάστηκαν. Στο στάδιο III, χρησιμοποιήσαμε τα προϊόντα των σταδίων I και II σε μια αντίδραση μεταλλαξιγένεσης Quikchange με σκοπό την παραγωγή όλων των επιθυμητών συνδυασμών μοτίβων EPIYA-C (1, 2, και 3) των τμημάτων που κωδικοποιούσαν την περιοχή μοτίβων EPIYA-C στο γονίδιο της CagA, την κασέτα αντοχής στην καναμυκίνη και την περιοχή 1.200 βάσεων κατάντη του γονιδίου *cagA* σε μία αντίδραση. Η εν λόγω μεθοδολογία επιλέχθηκε λόγω της ευκολίας της [579-581] και εκ του γεγονότος ότι μπορούσε εύκολα να τροποποιηθεί ώστε να ανταποκρίνεται στις πειραματικές ανάγκες [579]. Δεδομένου του γεγονότος ότι ένα σημαντικό εμπόδιο ήταν η επαναλαμβανόμενη φύση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας η οποία περιλάμβανε τόσο την περιοχή διμερισμού του μορίου όσο και την EPIYA-C κωδικεύουσα περιοχή, το τροποποιημένο πρωτόκολλο μεταλλαξιγένεσης [579], με χρήση ενός μέγα-εκκινητή επέτρεψε να προσθέσουμε κομμάτια DNA μήκους έως και 1117 bp. Παρόμοια μεθοδολογία έχει επίσης χρησιμοποιηθεί επιτυχώς και στο παρελθόν για να εισαχθούν μεταλλάξεις στο γονίδιο της CagA [166,578,582]. Στο τελικό στάδιο IV χρησιμοποιήσαμε αυτές τις κατασκευές, για να τροποποιήσουμε το πατρικό στέλεχος P12 αγρίου τύπου, με φυσικό κατευθυνόμενο ομόλογο ανασυνδυασμό, καθώς αυτή είναι η πλέον ευρέως αποδεκτή μέθοδος και για την ενσωμάτωση μεταλλάξεων στο γονιδίωμα του *H. pylori* [583-586].

Μια άλλη πτυχή αυτής της διατριβής ήταν να αποδείξει ότι η όλη διαδικασία της μετάλλαξης της CagA και η εισαγωγή της στο στέλεχος P12 δεν επηρέασε το βακτηριακό

γονιδίωμα με τέτοιο τρόπο ώστε να παραχθούν εσφαλμένα πειραματικά αποτελέσματα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε σχολαστική διαλογή μεταλλαγμένων στελεχών με μια σειρά γενετικών, πρωτεϊνικών και λειτουργικών μεθόδων. Πιο συγκεκριμένα, σε σύγκριση με το πατρικό στέλεχος άγριου τύπου, αποδείχθηκε ότι τα μεταλλαγμένα *H. pylori* στελέχη, είχαν αντίστοιχα την σωστή νουκλεοτιδική αλληλουχία στο γονίδιο *cagA*, παρουσίασαν συγκρίσιμους ρυθμούς ανάπτυξης και την ίδια ικανότητα να προσκολλώνται στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων και εξέφραζαν ένα λειτουργικό σύστημα έκκρισης τύπου IV, ικανό να μεταφέρει την CagA στο εσωτερικό των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων. Όσον αφορά τη πρωτεΐνη CagA τα αποτελέσματα αναφορικά με τη φωσφορυλίωση της και την επαγωγή του φαινοτύπου κυτταρικής επιμήκυνσης και διασποράς σε πειραματική λοίμωξη γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων κατέδειξε ότι ο γενετικός χειρισμός των στελεχών δεν επηρέασε τη γονιδιακή δραστηριότητα του νησιδίου παθογένειας *cagPAI* όσον αφορά την κωδικοποίηση λειτουργικού συστήματος μεταφοράς τύπου IV, αλλά και την ικανότητα των άλλων μεμονωμένων θέσεων EPIYA, όπως τα EPIYA-A, EPIYA-B να φωσφορυλιώνονται. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι ο γενετικός χειρισμός δεν επηρέασε τη λειτουργικότητα του λειτουργικού συστήματος μεταφοράς τύπου IV, σε συμφωνία με την άποψη που εκφράζεται σε άλλες μελέτες ότι εφόσον γονίδιο *cagA* είναι μονοϊστρονικό (monocistronic) και μεταγράφεται στην αντίθετη κατεύθυνση, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα γονίδια του *cagPAI*, είναι απίθανο ότι η πολικότητα έκφρασης του γονιδίου θα έχει επιπτώσεις σε άλλα γονίδια μέσα στο νησίδιο παθογένειας [482,486,587]. Όσον αφορά στην φωσφορυλίωση της CagA, τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με την καθιερωμένη άποψη ότι η επαγωγή κυτταροσκελετικών μεταβολών οφείλεται αποκλειστικά στην φωσφορυλίωση της CagA σε EPIYA-C μοτίβα [292,431,432,438,439,442-445,447-449,451].

Σε αυτή τη διατριβή σχεδιάστηκε μια μέθοδος μεταλλαξογένεσης που παρήγαγε σε μια αντίδραση, όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των EPIYA-C μοτίβων στη πρωτεΐνη CagA. Με τον τρόπο αυτό παρήχθησαν ισογονιδιακά στελέχη *H. pylori* που εξέφρασαν πρωτεΐνη CagA με μεταβλητούς αριθμούς μοτίβων EPIYA-C, ικανή να μεταφέρεται στο εσωτερικό γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων, χωρίς την εμφάνιση πολικών φαινομένων σε γειτονικά γονίδια του νησιδίου παθογένειας.

***4.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CagA ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ
ΤΟΥ NF- κ B & ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΤΗΣ IL-8***

Το *H. pylori* επάγει την ενεργοποίηση ενός πολύπλοκου δικτύου κυτταροκινών και χημειοκινών στο γαστρικό βλεννογόνο [404]. Διαφορετικοί βακτηριακοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες, καθώς και το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή υπαγορεύουν την ισορροπία μεταξύ της ανοχής και της προ-φλεγμονώδους απόκρισης κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από *H. pylori* [117]. Η πρωτεΐνη CagA εκδηλώνει τον παθογόνο ρόλο της τόσο μέσω EPIYA-εξαρτώμενων όσο και EPIYA-ανεξάρτητων αλληλεπιδράσεων, απορρυθμίζοντας μια σειρά ενδοκυττάρων οδών μεταγωγής σήματος, όπως αναλυτικά έχει περιγραφεί στην εισαγωγή §1.8.3.2. Αυτές οι σηματοδοτικές οδοί ρυθμίζουν μηχανισμούς επαγωγής του χαρακτηριστικού κυτταρικού φαινοτύπου διασποράς και επιμήκυνσης στη λοίμωξη από *H. pylori*, εντείνοντας τόσο την καταστροφή των διακυτταρικών συνδέσμων όσο και τη διαταραχή της κυτταρικής πολικότητας και επιδρώντας με ποικίλους τρόπους στον ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στην επαγωγή μηχανισμών φλεγμονής στο επιθήλιο κατά τη διάρκεια της λοίμωξης [290]. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι περισσότερες από αυτές τις σηματοδοτικές οδούς έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη της κυτταρικής κακοήθειας, υπάρχει αυξανόμενη υποστήριξη ότι η πρωτεΐνη CagA, κάτω από επίμονη λοίμωξη με *H. pylori* μπορεί να λειτουργήσει ως μια βακτηριακή ογκοπρωτεΐνη [588,589].

Η ύαρξη χρόνιας ενεργού φλεγμονώδους απόκρισης στο γαστρικό χόριο είναι το σήμα κατατεθέν της λοίμωξης από *H. pylori* και οι κύριοι ρυθμιστές αυτής της φλεγμονώδους απόκρισης είναι οι χημειοκίνες [479]. Το *H. pylori* διεγείρει τη παραγωγή IL-8 από το γαστρικό επιθήλιο, μίας ουσίας που αποτελεί ισχυρό χημειοτακτικό παράγοντα των ουδετερόφιλων [30] και η δραστηριότητα του οποίου συσχετίζεται με την ιστολογική βαρύτητα σε περιπτώσεις επαγόμενης από *H. pylori* γαστρίτιδας του άντρου [479]. Ενώ αρχικές μελέτες κατέτειναν ότι βασικό προαπαιτούμενο για την επαγωγή και την έκκριση της IL-8 από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα αποτελούσε η λειτουργικότητα του συστήματος μεταφοράς τύπου IV [487], μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν πέραν πάσης αμφιβολίας, ότι το φαινόμενο αυτό ενισχύεται και από την έκφραση της πρωτεΐνης CagA [496]. Πιο συγκεκριμένα, μια μελέτη έδειξε ότι με την ανταλλαγή γονιδίων CagA, από στελέχη *H. pylori* υψηλής πρόκλησης έκκρισης της IL-8 με στελέχη χαμηλής έκκρισης ήταν δυνατόν να μετατρέψουν τα τελευταία σε στελέχη *H. pylori* υψηλής πρόκλησης έκκρισης της IL-8 και το αντίστροφο [496]. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση της IL-8 δεν εξαρτάται από την φωσφορυλίωση της σε EPIYA-C μοτίβα αλλά σε μία εξαιρετικά διατηρημένη αλληλουχία αμινοξέων γύρω από τις θέσεις EPIYA γνωστής ως CRPIA [457], η οποία έχει χαρακτηριστεί επίσης ως ένα μοτίβο αλληλεπίδρασης μορίων CagA μεταξύ τους [441]. Επιπλέον, δείχθηκε ότι η ενιόμενη CagA μπορεί να αλληλεπιδρά με τον

παράγοντα a-Pix, [497,498], καταστολή έκφρασης του οποίου, είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κB [124]. Άλλη μελέτη έδειξε ότι η ενδοκυττάρια έκφραση της CagA είτε μετά από φυσική λοίμωξη είτε διαμόλυνση μπορεί να ενεργοποιεί την κινάση TAK1 [499]. Η κινάση TAK1 ή αλλιώς MAP3K7 είναι κινάση σερίνης-θρεονίνης [590] η οποία ενέχεται στη μεταγωγή σήματος του παράγοντα TGF beta και της μορφογενετικής πρωτεΐνης BMP και φαίνεται ότι ελέγχει μία σειρά κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων της μεταγραφικής ρύθμισης και της απόπτωσης. Σαν κυτταρική απόκριση σε έκθεση IL-1, η εν λόγω κινάση συμμετέχει ένα σύμπλοκο φωσφορυλίωσης που περιλαμβάνει τους παράγοντες TRAF-6, MAP3K7P1/TAB1 και MAP3K7P2/TAB2 και αποτελεί απαραίτητη συνθήκη για την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-kB [591]. Η CagA δείχθηκε ότι μπορεί να δεσμεύεται στην TAK1 και έτσι να μπορεί να διεγείρει την ενεργοποίηση της μέσω ουβικιτινίωσης της από την TRAF-6 στο κατάλοιπο Lys63 οδηγώντας στην ενεργοποίηση του NF-kB [499]. Εν κατακλείδι, η περιοχή αυτή του μορίου της CagA, έχει προταθεί ότι δύναται να λειτουργεί και σαν γενική αλληλουχία «πασπαρτού» για την αναγνώριση κυτταρικών κινασών, οι οποίες εν συνεχεία, αφού φωσφορυλιώσουν το μόριο της CagA στις θέσεις EPIYA, δεσμεύονται επάνω του και συνεπώς αδρανοποιούνται [33]. Πιο πρόσφατα, εκτός της CagA, το *H. pylori* έχει προταθεί ότι μπορεί να επάγει την έκκριση της IL-8 μέσω της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης του συστήματος μεταφοράς τύπου IV CagL με τον υποδοχέα ιντεγκρίνης β1 των γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα την επακόλουθη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών οδών MAP κινασών και του πυρηνικού παράγοντα NF-kB [592].

Στην παρούσα διατριβή αναφέρθηκε, ότι η φωσφορυλίωση σε EPIYA-C μοτίβα της CagA συμβάλλει στην επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου IL -8 στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού του NF-kB και ενδεχομένως μέσω της αλληλεπίδρασης της με την κινάση TAK1. Λαμβάνοντας υπόψη την πιθανή γενετική ποικιλομορφία των κλινικών στελεχών, χρησιμοποιήθηκαν ισογονιδιακά στελέχη *H. pylori* με βάση το στέλεχος αναφοράς P12, τα οποία έφεραν κατάλληλες μεταλλάξεις στο γονίδιο *cagA* εκφράζοντας πρωτεΐνη με μεταβλητό αριθμό τερματικών EPIYA-C θέσεων φωσφορυλίωσης (0: P12AB, 1: P12ABC, 2: P12ABCC, 3: P12ABCCC) και των αντίστοιχων τους μη-φωσφορυλιώσιμων αναλόγων (P12ABF, P12ABFF, P12ABFFF), μετά από αντικατάσταση της τυροσίνης με φαινυλαλανίνη, διατηρώντας ανέπαφα τις EPIYA-A και B θέσεις [576]. Μια σειρά από προηγούμενες μελέτες βασίζονται τις παρατηρήσεις τους σε διαμολυνθέντα κύτταρα από συστήματα πρωτεϊνικής έκφρασης CagA τα οποία, αν και αναμφίβολα πολύτιμα για τη μελέτη των βακτηριακών παθογόνων παραγόντων, μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα

λόγω της δυναμικά έκτοπης υπέρ-έκφρασης της βακτηριακής πρωτεΐνης, υπό μελέτη. Επιπλέον, αποτελέσματα που προκαλούν σύγχυση έχουν αποδοθεί στη χρήση κλινικών στελεχών που εκφράζουν CagA με διαφορετικό αριθμό EPIYA-C μοτίβων, λόγω της γενετικής ποικιλομορφίας του κάθε νέου απομονωθέντος στελέχους [404].

Στην παρούσα διατριβή, τα επίπεδα έκκρισης της IL-8 δεν φαίνεται να εξαρτώνται από τον αριθμό των EPIYA-C επαναλήψεων εντός της CagA, καθώς όλα τα στελέχη με λειτουργικά EPIYA-C μοτίβα ήταν ικανά να επάγουν περίπου τα ίδια επίπεδα της IL-8 εκκρινόμενης πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες παρατηρήσεις μας στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικά ζεύγη ισογονιδιακών κλινικών στελεχών που απομονώθηκαν από τον ίδιο ασθενή και εξέφραζαν CagA με μεταβλητούς αριθμούς EPIYA-C μοτίβων και στις οποίες δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα της πρωτεΐνης IL-8 που εκκρίθηκε [434,435]. Στις ίδιες μελέτες, CagA-θετικά κλινικά απομονωμένα στελέχη με μεγαλύτερο αριθμό EPIYA-C μοτίβων δεν βρέθηκαν να συσχετίζονται με τη βαρύτητα ή τη δραστηριότητα της φλεγμονώδους απόκρισης στο γαστρικό χόριο των ασθενών. Αντίθετα, η παρουσία λειτουργικών EPIYA-C θέσεων φαίνεται να συμβάλει σημαντικά στην εξαρτώμενη από την πρωτεΐνη CagA μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της IL-8, αφού αποδείξαμε ότι η διαγραφή αυτών των θέσεων, όπως στην περίπτωση του P12AB, ή η μετάλλαξη τους σε μη-φωσφορυλιώσιμες EPIYA θέσεις, όπως στα P12ABF και P12ABFF στελέχη, είχε σαν αποτέλεσμα τη δραματική μείωση των επιπέδων μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της IL-8, σε πειραματική λοίμωξη *in vitro* γαστρικών επιθηλιακών κυτταρικών σειρών. Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η χαρακτηριστική καθυστέρηση στα αρχικά στάδια ενεργοποίησης του γονιδίου της IL-8 από όλους τους διαφορετικούς P12ABFFF κλώνους σε σύγκριση με όλα τα άλλα μεταλλαγμένα στελέχη. Μια τέτοια αναστολή μπορεί να σχετίζεται με την παρουσία εντός της CagA καρβόξυ-τελικής περιοχής των τεσσάρων επαναλήψεων της αλληλουχίας αναγνώρισης και αναστολής κινασών FPLKRHDKVDDLK [471], οι οποίες δύνανται ενδεχομένως να αναστέλλουν την ιεραρχική φωσφορυλίωση της CagA [439].

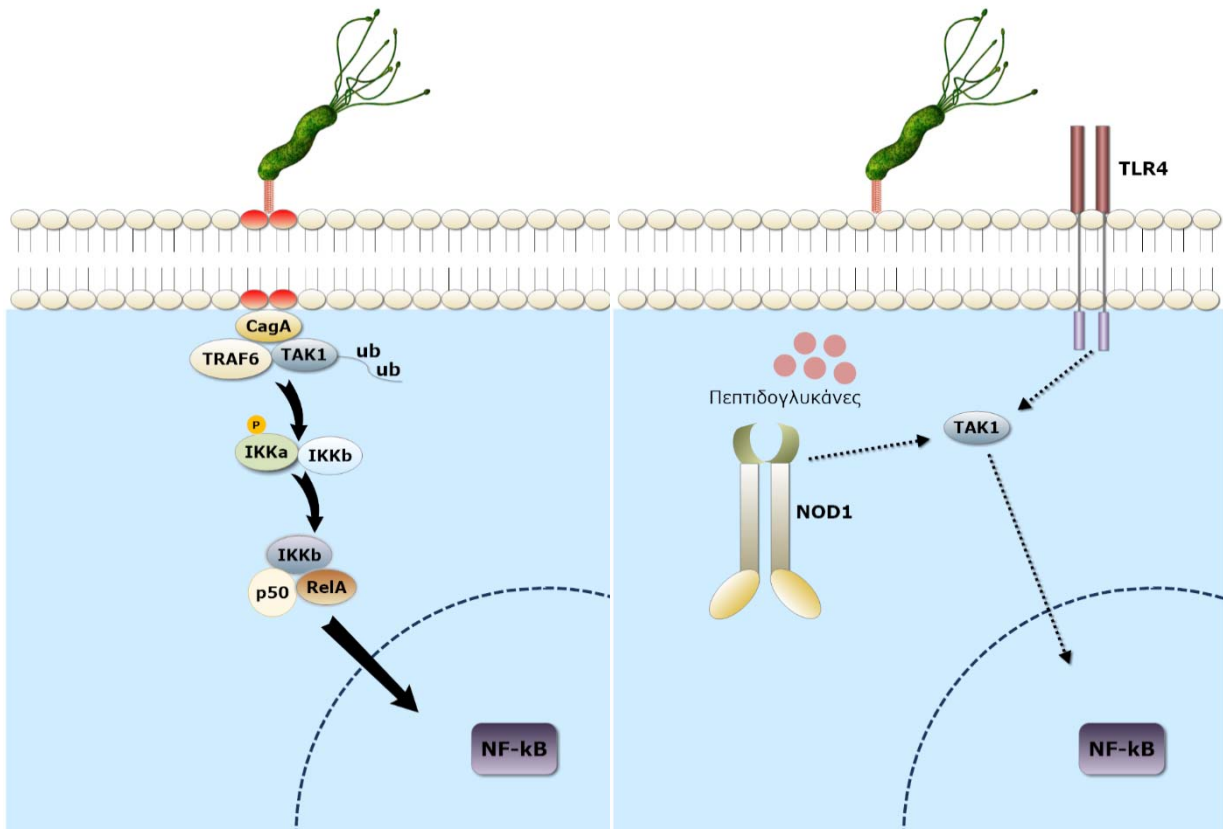
Εκτός από τα αποτελέσματα για τις EPIYA-C θέσεις, τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η παρουσία των EPIYA-A και EPIYA-B μπορεί επίσης να συμβάλουν οριακά στην επαγωγή της IL-8, καθώς το στέλεχος που εκφράζει πρωτεΐνη CagA με διαμόρφωση P12AB ήταν σε θέση να επάγει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της IL-8 σε σύγκριση με το knock-out στέλεχος P12CagAKO, αλλά και παρόμοια με εκείνα που παρατηρούνται μετά την μόλυνση με τα στελέχη P12ABF και ABFF. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί επίσης να υποδεικνύει ότι ο αριθμός των περιοχών αλληλεπίδρασης μορίων CagA μεταξύ

τους (αλληλουχίες CM) δεν παίζει ρόλο στην επαγωγή της IL-8 καθώς τα στελέχη AB, ABF και ABFF τα οποία φέρουν 1, 2 ή 3, τέτοιες αλληλουχίες, αντίστοιχα, επάγουν παρόμοια επίπεδα μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της IL-8 στις 2 ώρες μετά την μόλυνση. Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματα μετά από μόλυνση με το στέλεχος P12CagAKO, είναι σύμφωνα με τις παρατηρήσεις ότι υπάρχει μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου και έκκριση της IL-8, ανεξάρτητα από τη δράση του μορίου της CagA, είτε μέσω της αναγνώρισης των πεπτιδογλυκανών από τον ενδοκυττάριο υποδοχέα Nod1 [294], είτε μέσω αναγνώρισης των λιποπολυσακχαριτών του *H. pylori* από τους TLRs [521,593] είτε μέσω της σύνδεσης της βακτηριακής πρωτεΐνης CagL με την ιντεγκρίνη β1 [592]. Σε κάθε περίπτωση, τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η συνεισφορά μέσω της φωσφορυλίωσης σε EPIYA-C θέσεις της CagA πρωτεΐνης, μπορεί να είναι εξίσου σημαντική για την πλήρη ενεργοποίηση και μεταγραφική δραστηριότητα της IL-8.

Στην παρούσα διατριβή επιχειρήθηκε η διαλεύκανση της ενεργοποίησης της μοριακής σηματοδοτικής οδού του NF-kB μέσω της φωσφορυλίωσης των θέσεων EPIYA-C της CagA στη λοίμωξη από *H. pylori*. Μέχρι πρόσφατα, η ενεργοποίηση του NF-kB στη λοίμωξη με *H. pylori* θεωρείτο ότι είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των κινασών ERK και AKT [457,459,496] όπως διεξοδικά έχει περιγραφεί στην εισαγωγή §1.1.1. Στην παρούσα διατριβή, παρέχονται δεδομένα τα οποία δείχνουν ότι η ενεργοποίηση των κινασών ERK και AKT στα πρώιμα στάδια της λοίμωξης γίνεται ανεξάρτητα από την φωσφορυλίωση των EPIYA-C θέσεων φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, τα στοιχεία δείχνουν ότι η ενεργοποίηση των κινασών ERK και AKT δεν συμπίπτει χρονικά με την ταχύτερη πρώιμη ενεργοποίηση του NF-kB που παρατηρείται στη *H. pylori* πειραματική λοίμωξη των γαστρικών επιθηλιακών κυτταρικών σειρών. Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία των αλληλουχιών που περιβάλλουν τις θέσεις EPIYA-C, όπως στην περίπτωση των P12ABCCC και P12ABFFF στελεχών, επάγουν την ενεργοποίηση ERK1/2, στα πρώτα 30' μετά τη μόλυνση, ανεξάρτητα από την EPIYA φωσφορυλίωση. Αντιθέτως, απουσία EPIYA-C θέσεων όπως στα στελέχη P12AB και P12CagAKO, η ενεργοποίηση του ERK1/2 ήταν εμφανής σε πολύ μεταγενέστερο στάδιο μετά τη μόλυνση (2-4 ώρες). Στην περίπτωση της κινάσης AKT, παρατηρήθηκε φωσφορυλίωση της στην θέση Ser473, κατά τη διάρκεια της πειραματικής λοίμωξης από *H. pylori* η οποία όμως ήταν καθαρά ανεξάρτητη του αριθμού και της φωσφορυλίωσης της βακτηριακής πρωτεΐνης CagA. Το αποτέλεσμα αυτό συνηγορεί ότι ένας μεγαλύτερος αριθμός σηματοδοτικών οδών συνεισφέρει στον έλεγχο της ισορροπίας μεταξύ πολλαπλασιασμού και απόπτωσης στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα στην *H. pylori* λοίμωξη [594]. Περαιτέρω λοιπόν μελέτες θα απαιτηθούν, προκειμένου να

κατανοηθεί πλήρως ο μηχανισμός με τον οποίο η φωσφορυλίωση της CagA στις EPIYA-C θέσεις μπορεί να συμβάλλει στην ενεργοποίηση αυτών των δύο βασικών μορίων.

Τα δεδομένα δείχνουν ότι η TAK1 παίζει πράγματι έναν κρίσιμο κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση της IL-8, διότι μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων με όλα τα CagA-μεταλλαγμένα στελέχη *H. pylori*, υπό την παρουσία ειδικού αναστολέα της TAK1 [524-528], είχε σαν αποτέλεσμα την παντελή αναστολή της έκκρισης της IL-8, ακόμη και στην περίπτωση του knock-out στελέχους P12CagAKO. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν μολύνθηκαν TAK1^{-/-} ινοβλάστες εμβρυϊκών ποντιών με τα CagA-θετικά μεταλλαγμένα στελέχη *H. pylori*, συμπεριλαμβανομένου του knock-out στελέχους P12CagAKO, όπου και εκεί παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ μόνο παρουσία έκφρασης της TAK1 και όχι στα κύτταρα που στερούντο TAK1 έκφρασης. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η TAK1 μπορεί να είναι ένα μόριο που παίζει κεντρικό ρόλο για την ενεργοποίηση του NF-κΒ κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από *H. pylori*, με τη συμμετοχή της κομβικά και στις οδούς ενεργοποίησης μέσω των υποδοχέων TLR και των ενδοκυττάρων υποδοχέων NOD1, όπως έχει προταθεί πρόσφατα [595] (Εικόνα 55).



Εικόνα 55: Γραφική αναπαράσταση του πιθανού μοριακού μηχανισμού ενεργοποίησης του NF-κΒ. Στην αριστερή εικόνα ο μοριακός μηχανισμός εξαρτάται από την φωσφορυλίωση της CagA και περιλαμβάνει αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καθώς και των Lamb και συν [494]. Στην δεξιά εικόνα ο μηχανισμός σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της TAK1 και πιθανολογείται η συμμετοχή υποδοχέων τόσο διαμεμβρανικών όσο και του κυτταροπλάσματος [589].

Επιπλέον, τα στοιχεία δείχνουν ότι στην περίπτωση των CagA θετικών στελεχών, η κινάση TAK1 και η βακτηριακή πρωτεΐνη CagA μπορούν να συμμετέχουν στο ίδιο σύμπλοκο πρωτεϊνών, επιβεβαιώνοντας προηγούμενες παρατηρήσεις που δείχνουν ότι η CagA μπορεί να αλληλεπιδρά άμεσα με τις TAK1 και TRAF6 [499] (Εικόνα 55). Παρ' όλα αυτά, μια ολόκληρη σειρά από πειράματα που περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και ανάλυση μεταλλαξιγένεσης πρέπει να πραγματοποιηθούν με σκοπό να διερευνηθεί περαιτέρω αυτή η μοριακή αλληλεπίδραση, τα οποία ξεφεύγουν από τα όρια αυτής της διατριβής. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν, ότι μέσα στην πρώτη ώρα μετά τη μόλυνση, η κινάση TAK1 μπορεί να δεσμεύεται από την πρωτεΐνη CagA, ανεξαρτήτως από την φωσφορυλίωση της στις θέσεις EPIYA-C, ωστόσο επειδή επακόλουθη ενεργοποίηση της CagA φαίνεται να εξαρτάται από την ιεραρχική φωσφορυλίωση της πρώτα σε EPIYA-C θέσεις από τις κινάσες c-Src και μετά από τις κινάσες Abl σε όλες τις EPIYA θέσεις (A, -B και -C), η κινάση TAK1 ενδέχεται να ενεργοποιείται πολύ πιο γρήγορα, παρουσία της CagA. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί ενδεχομένως από το γεγονός ότι οι διαφορετικοί τύποι θέσεων EPIYA φαίνεται ότι φωσφορυλιώνονται από τις κυτταρικές κινάσες Abl και Src, σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά από την ενδοκυττάρια παροχή της CagA από το σύστημα έκκρισης τύπου IV. Πράγματι, έχει δειχθεί ότι οι EPIYA-C θέσεις φωσφορυλιώνονται στα πρώιμα στάδια της λοίμωξης πρώτα από την κινάση Src, και ακολουθεί σε δεύτερο στάδιο η φωσφορυλίωση από την κινάση Abl των θέσεων EPIYA-A, -B ή και EPIYA-C θέσεων [439]. Βέβαια, επειδή οι συγκεκριμένες μελέτες έγιναν με την χρήση CagA-θετικών στελεχών με EPIYA ABC διαμόρφωση χρειάζεται περαιτέρω μελέτη προκειμένου να διερευνηθεί αν οι πολλαπλές επαναλήψεις EPIYA-C θέσεων επάγουν συντομότερη ενεργοποίηση της TAK1 κινάσης.

Εν κατακλείδι, η παρουσία των λειτουργικών EPIYA-C θέσεων στην πρωτεΐνη CagA, φαίνεται να συμβάλλει σημαντικά στην μεταγραφική ενεργοποίηση της IL-8, μέσω της ενεργοποίησης του NF-κB στην *H. pylori* λοίμωξη. Αυτή η επίδραση φαίνεται ότι είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση των κινασών AKT και ERK που επάγονται στη λοίμωξη *H. pylori* με άλλους μηχανισμούς και περιλαμβάνει ως κεντρικό μόριο τη κινάση TAK1. Αυτή είναι η πρώτη συστηματική διερεύνηση του ρόλου των θέσεων EPIYA-C επί της CagA σε ισογονιδιακό γενετικό υπόβαθρο με χρήση μεταλλαγμένων στελεχών, σε σύστημα πειραματικής λοίμωξης γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων. Οι προηγούμενες μελέτες διερεύνησης του ρόλου των θέσεων EPIYA-C της πρωτεΐνης CagA, στην επαγωγή μηχανισμών φλεγμονής στο χόριο και στην έκβαση της νόσου βασιζόνταν στη σύγκριση της επίπτωσης διαφορετικών είτε κλινικών *H. pylori* στελεχών είτε στελεχών αναφοράς. Οι συγκρίσεις αυτές, ωστόσο, έχουν δειχθεί ότι πάσχουν

από το γεγονός ότι το *H. pylori* είναι εξαιρετικά γενετικά πολυμορφικό βακτήριο, καθιστώντας τις μελέτες αυτού του τύπου εν δυνάμει, ανακριβείς. Αντιθέτως, η παρούσα είναι η πρώτη συστηματική μελέτη η οποία δεν υποφέρει από τα προαναφερθέντα προβλήματα.

4.4. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη του *H. pylori* αποτελεί ακόμα και σήμερα, 32 χρόνια μετά την ανακάλυψη του ένα συναρπαστικό πεδίο έρευνας. Αποτελεί ίσως το μόνο βακτήριο που μέσω επαγωγής των μηχανισμών της χρόνιας γαστρικής φλεγμονής στην διάρεια της παιδικής αλλά και της ενήλικης ζωής μας, συσχετίζεται με την πρόκληση και την εκδήλωση γαστρικού καρκίνου σε ηλικίες άνω των 65 ετών [14,26,27]. Έτσι η ενδελεχής μελέτη των μηχανισμών παθογένειας του βακτηρίου στα διάφορα στάδια της λοίμωξης, είτε στην οξεία, είτε στην χρόνια φάση, που συνδέονται με την εξαλλαγή στο χόριο συνδυάζει γνωστικά αντικείμενα από πολλές διαφορετικές ειδικότητες, όπως της επιδημιολογίας, ιστολογίας, γαστρεντερολογίας, ογκολογίας, σύγχρονης μικροβιολογίας με ανάλυση του μικροβιώματος, καθώς και πτυχές της μοριακής βιολογίας και της βιοχημείας.

Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα και ίσως μοναδικά στην φύση μόρια του *H. pylori* είναι η πρωτεΐνη CagA, μια τοξίνη που φαίνεται να αποσυντονίζει ένα μεγάλο αριθμό μοριακών ενδοκυττάρων οδών μεταγωγής σήματος των γαστρικών και όχι μόνο κυττάρων, με ενδεχόμενες συναρπαστικές μελλοντικές ανακαλύψεις. Έως σήμερα, έχει υποθεθεί ότι η CagA μπορεί να παίζει τον ρόλο ενός κλειδιού «πασπαρτού», κυρίως μέσω του ρυθμιστικού καρβόξυ-τελικού της άκρου, όπου εδράζουν οι θέσεις φωσφορύλιωσης τυροσίνης EPIYA. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να δρα ενδεχομένως σαν ένα κομβικό μόριο πρόσδεσης κινασών όπως SFKs μέσω μίμησης περιοχών αλληλεπίδρασης SH2 [470]. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι το καρβόξυ-τελικό της άκρο δεν φαίνεται να έχει συγκεκριμένη τριτοταγή δομή από τις έως τώρα μελέτες [468,469]. Εάν αυτό όντως ισχύει, τότε ενδεχομένως αποτελεί εξαιρετικά ενδιαφέρον πεδίο, η κατασκευή πεπτιδίων που μιμούνται την δομή της CagA στο καρβόξυ-τελικό της άκρο και η μελέτη της δράσης των αναφορικά με την πιθανή αναστολή κομβικών μορίων κινασών όπως η οικογένεια των SFKs, η οποία έχει δειχθεί ότι διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση μηχανισμών καρκινογένεσης γενικότερα και στο γαστρικό επιθήλιο, καθιστώντας τα έτσι ένα πιθανά χρήσιμο θεραπευτικό εργαλείο.

Παραμένουν όμως ακόμα βασικά αναπάντητα ερευνητικά ερωτήματα σχετικά με τον τρόπο λειτουργίας της CagA, ολόκληρου του νησίδιου παθογένειας *cag* καθώς και του λειτουργικού συστήματος έκκρισης τύπου IV του βακτηρίου. Πιο συγκεκριμένα, τελευταίες μελέτες προτείνουν ότι η ακριβής λειτουργία του συστήματος έκκρισης τύπου IV, μοιάζει περισσότερο με αυτή ενός ροοστάτη με διαβάθμιση στην δραστηριότητα με αποτέλεσμα τη «λεπτή» ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης με σκοπό την επιτυχή παραμένουσα λοίμωξη *H. pylori* [596]. Σχετικά με το νησίδιο παθογένειας *cag* εκκρεμούν ερωτήσεις για το ποιος είναι ο ακριβής μοριακός-γενετικός μηχανισμός μέσω του οποίου το νησίδιο παθογένειας μεταφέρεται από βακτήριο σε βακτήριο και ποιες οι συνθήκες κάτω από τις οποίες συμβαίνει. Αναφορικά με

την πρωτεΐνη CagA εκκρεμεί η διαλεύκανση του μηχανισμού μέσω του οποίου CagA-θετικά στελέχη στο στομάχι ενός ασθενούς μπορούν και εκφράζουν την εν λόγω πρωτεΐνη με αυξανόμενο αριθμό θέσεων EPIYA με την παρέλευση της ενήλικης ζωής. Τέλος το πιο ενδιαφέρον ερώτημα είναι πως οι EPIYA-C θέσεις στην CagA ρυθμίζουν την κυτταρική διασπορά και επιμήκυνση στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, ένα φαινόμενο που προσομοιάζει με αυτό της επιθηλιακής-προς-μεσεγχυματικού-τύπου μετατροπής [597,598] και συνδυάζεται με την ενεργοποίηση μορίων που ενέχονται στην αναδόμηση και αναδιάρθρωση του εξωκυττάρου χώρου [599-602].

Επιπρόσθετα, ένα πεδίο με αντικρουόμενα αποτελέσματα είναι και ο μηχανισμός μέσω του οποίου το *H. pylori* επάγει την έκκριση της IL-8 από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα και βασικό πεδίο διαφωνίας είναι κατά πόσο η CagA παίζει μικρό ή σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό αυτό. Εδώ θα πρέπει να επισημανθεί, ότι όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή ικανός αριθμός μελετών υποστηρίζουν τόσο την συμμετοχή της πρωτεΐνης όσο και το αντίθετο [404]. Βασική αιτία διαφωνίας των αναφορών αυτών αποτελεί, αφ' ενός το γεγονός ότι υπάρχει διαφορά στον τρόπο πειραματικής προσέγγισης, καθώς άλλοι ερευνητές χρησιμοποιούν μόλυνση επιθηλιακών κυττάρων με βακτήρια και άλλοι συστήματα διαμόλυνσης με πλασμιδιακούς φορείς πρωτεϊνικής έκφρασης [404] και αφ' ετέρου η χρήση, για τα πειράματα, μορίων που προέρχονται από διαφορετικά κλινικά στελέχη ή στελέχη αναφοράς *H. pylori*. Επιπλέον, διαφορές εντοπίζονται και στις μετρήσεις τελικού σημείου όσον αφορά την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα NF-kB ή της έκκρισης IL-8 [404]. Από τα πειράματα που διεξήχθησαν στην παρούσα διατριβή φαίνεται να υπάρχουν τουλάχιστον δύο μηχανισμοί οι οποίοι συμβάλλουν στην έκκριση της IL-8 ένας εξαρτώμενος της CagA και της παρουσίας των θέσεων φωσφορυλίωσης EPIYA-C, αλλά ανεξάρτητος του αριθμού των επαναλήψεων και ένας ανεξάρτητος της CagA, αλλά εξαρτώμενος από την παρουσία του *cagT4SS*. Και στους δύο αυτούς μηχανισμούς κύριο και κοινό ρόλο παίζει η κινάση TAK1, αναστολή δράσης της οποίας σε κάθε περίπτωση οδηγεί στην πλήρη αναστολή του φαινομένου της επαγωγής έκκρισης της IL-8 και της ενεργοποίησης του NF-kB από το *H. pylori*. Για το λόγο αυτό θα ήταν εξαιρετικά χρήσιμη η μελέτη της εξέλιξης και βαρύτητας της φλεγμονής σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα λοίμωξης διαγονιδιακών ζώων εργαστηρίου αναφορικά με την έκφραση της κινάσης TAK1, ή με την ταυτόχρονη χορήγηση αναστολέα της TAK1.

Το μέλλον της έρευνας στους μηχανισμούς παθογένειας του *H. pylori* είναι σαφές ότι περιλαμβάνει και άλλα μόρια τα οποία ακόμα δεν έχουν μελετηθεί ενδελεχώς αν και ήδη υπάρχει πληθώρα γνωστών πλήρων γονιδιωμάτων στελεχών *H. pylori*, που καταδεικνύουν ότι υπάρχει ένας ελάχιστος αριθμός γονιδίων του βακτηρίου που αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα του ξενιστή για

ένα επιτυχημένο βακτηριακό αποικισμό στο αφιλόξενο χώρο του γαστρικού βλεννογόνου [227]. Για παράδειγμα προσφάτως έχουν ανακαλυφθεί μεταθετά βακτηριακά στοιχεία RNA που φαίνεται να μεταφέρονται οριζόντια από βακτήριο σε βακτήριο [603]. Συγκεκριμένα σε διερευνήσεις για βραχεία RNA (sRNA) στα νησίδα παθογένειας του *S. enterica*, ανακαλύφθηκε αριθμός τέτοιων ρυθμιστικών sRNAs [604], όπως επίσης sRNAs έχουν ανακαλυφθεί και σε νησίδα παθογένειας του *S. aureus* [605] και είναι πιθανό να είναι παρόντα και σε άλλα παθογόνα. Ακόμα ένας αριθμός sRNAs είναι παρόντα δίπλα σε περιοχές όπου φάγοι ή μεταθετά στοιχεία εδράζουν στο βακτηριακό γονιδίωμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι είτε ενσωματώθηκαν στα μεταθετά αυτά στοιχεία όταν αυτά αποκολλήθηκαν από το βακτήριο-δότη, είτε ότι αποτελούν αναπόσπαστο μέρος των μεταθετών αυτών στοιχείων [606]. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αντινοσηματικά (antisense) sRNAs εμπλέκονται άμεσα στην ρύθμιση τόσο του αριθμού των πλασμιδίων όσο και στην πλασμιδιακή σύζευξη και αντιγραφή [607,608]. Επιπλέον είναι πιθανό ότι, όπως και στα ευκαρυωτικά κύτταρα, όπου το iRNA διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στον περιορισμό της εξάπλωσης των μεταθετών στοιχείων, έτσι και τα τραπεζοζόνια των βακτηρίων μπορεί να περιορίζονται από την δραστηριότητα των antisense RNAs [603] και από το σύστημα CRISPR-Cas [609]. Με την διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού της μεταφοράς των μεταθετών αυτών στοιχείων ίσως δοθεί η ευκαιρία για την διερεύνηση της πιθανότητας να υπάρχουν στα βακτήρια τμήματα RNA που να δρουν ως παθογόνοι παράγοντες. Άλλωστε το πεδίο της βιολογικής δράσης του RNA των βακτηρίων μόλις έχει αρχίσει να διερευνάται σε βάθος.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Logan RP, Robins A, Turner GA, Cockayne A, Borriello SP, et al. (1998) A novel flow cytometric assay for quantitating adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. *J Immunol Methods* 213: 19-30.
2. Marshall B (2005) *Helicobacter Pioneers: Firsthand Accounts from the Scientists who Discovered Helicobacters 1892 - 1982*: Wiley-Blackwell. 244 p.
3. Rigas B, Feretis C, Papavassiliou ED (1999) John Lykoudis: an unappreciated discoverer of the cause and treatment of peptic ulcer disease. *Lancet* 354: 1634-1635.
4. Bizzozero G (Bizzozero, G. 1893) Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. Dritte mittheilung. *Archiv Mikroskopische Anat* 43.
5. Krienitz W (1906) Ueber das auftreten von mageninhalten bei carcinoma ventriculi. 22:872.
6. Luger A (1917) Ueber spirochaeten und fusiforme bazillen im darm, mit einer beitrage zur frage der lamblien-enteritis. *Wien Klin Wochenschr* 52: 1643-1647.
7. Pel PK (1899) *Diseases of the stomach*. De Erven Bohn, Amsterdam, The Netherlands. (In Dutch).
8. Marshall BJ, Warren JR (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-1315.
9. Marshall BJ, Armstrong JA, Francis GJ, Nokes NT, Wee SH (1987) Antibacterial action of bismuth in relation to *Campylobacter pyloridis* colonization and gastritis. *Digestion* 37 Suppl 2: 16-30.
10. Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ (1985) Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust* 142: 436-439.
11. Marshall BJ, McGeachie DB, Rogers PA, Glancy RJ (1985) Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease. *Med J Aust* 142: 439-444.
12. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1: 1273-1275.
13. GOODWIN CS, ARMSTRONG JA, CHILVERS T, PETERS M, COLLINS MD, et al. (1989) Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., Respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 397-405.
14. Ernst PB, Gold BD (2000) The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 54: 615-640.
15. Megraud F (2005) A humble bacterium sweeps this year's Nobel Prize. *Cell* 123: 975-976.
16. Go MF (2002) Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 16 Suppl 1: 3-15.
17. Calvet X, Ramirez Lazaro MJ, Lehours P, Megraud F (2013) Diagnosis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 18 Suppl 1: 5-11.
18. Tonkic A, Tonkic M, Lehours P, Megraud F (2012) Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 17 Suppl 1: 1-8.
19. Katsanos KH, Tatsioni A, Tsakiris V, Christodoulou D, Tsianos EV (2010) *Helicobacter pylori* is a major public health priority in western Balkans: an endoscopy referral center experience. *Eur J Intern Med* 21: 306-309.
20. Apostolopoulos P, Vafiadis-Zouboulis I, Tzivras M, Kourteas D, Katsilambros N, et al. (2002) *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection in Greece: the changing prevalence during a ten-year period and its antigenic profile. *BMC Gastroenterol* 2: 11.
21. Genta RM (2002) Review article: after gastritis--an imaginary journey into a *Helicobacter*-free world. *Aliment Pharmacol Ther* 16 Suppl 4: 89-94.

22. Fiedorek SC, Malaty HM, Evans DL, Pumphrey CL, Casteel HB, et al. (1991) Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Pediatrics* 88: 578-582.
23. Homan M, Hojsak I, Kolacek S (2012) *Helicobacter pylori* in pediatrics. *Helicobacter* 17 Suppl 1: 43-48.
24. Roosendaal R, Kuipers EJ, Buitenwerf J, van Uffelen C, Meuwissen SG, et al. (1997) *Helicobacter pylori* and the birth cohort effect: evidence of a continuous decrease of infection rates in childhood. *Am J Gastroenterol* 92: 1480-1482.
25. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 19: 449-490.
26. Kuipers EJ (1999) Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 13 Suppl 1: 3-11.
27. Kuipers EJ, Thijs JC, Festen HP (1995) The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther* 9 Suppl 2: 59-69.
28. Graham DY, Alpert LC, Smith JL, Yoshimura HH (1988) Iatrogenic *Campylobacter pylori* infection is a cause of epidemic achlorhydria. *Am J Gastroenterol* 83: 974-980.
29. Morris A, Nicholson G (1987) Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol* 82: 192-199.
30. Sobala GM, Crabtree JE, Dixon MF, Schorah CJ, Taylor JD, et al. (1991) Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut* 32: 1415-1418.
31. Graham DY, Opekun AR, Osato MS, El-Zimaity HM, Lee CK, et al. (2004) Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut* 53: 1235-1243.
32. Granstrom M, Tindberg Y, Blennow M (1997) 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.
33. Malaty HM, Graham DY, Wattigney WA, Srinivasan SR, Osato M, et al. (1999) Natural history of *Helicobacter pylori* infection in childhood: 12-year follow-up cohort study in a biracial community. *Clin Infect Dis* 28: 279-282.
34. Perez-Perez GI, Sack RB, Reid R, Santosham M, Croll J, et al. (2003) Transient and persistent *Helicobacter pylori* colonization in Native American children. *J Clin Microbiol* 41: 2401-2407.
35. Malaty HM, Engstrand L, Pedersen NL, Graham DY (1994) *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann Intern Med* 120: 982-986.
36. el-Omar EM, Penman ID, Ardill JE, Chittajallu RS, Howie C, et al. (1995) *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 109: 681-691.
37. Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Pena AS, Hazenberg HJ, Bloemena E, et al. (1995) Increase of *Helicobacter pylori*-associated corpus gastritis during acid suppressive therapy: implications for long-term safety. *Am J Gastroenterol* 90: 1401-1406.
38. El-Omar EM, Oien K, El-Nujumi A, Gillen D, Wirz A, et al. (1997) *Helicobacter pylori* infection and chronic gastric acid hyposecretion. *Gastroenterology* 113: 15-24.
39. Ruiz B, Correa P, Fontham ET, Ramakrishnan T (1996) Antral atrophy, *Helicobacter pylori* colonization, and gastric pH. *Am J Clin Pathol* 105: 96-101.
40. Verdu EF, Armstrong D, Fraser R, Viani F, Idstrom JP, et al. (1995) Effect of *Helicobacter pylori* status on intragastric pH during treatment with omeprazole. *Gut* 36: 539-543.

41. Holtmann G, Cain C, Malfertheiner P (1999) Gastric *Helicobacter pylori* infection accelerates healing of reflux esophagitis during treatment with the proton pump inhibitor pantoprazole. *Gastroenterology* 117: 11-16.
42. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, et al. (2000) Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404: 398-402.
43. Van Zanten SJ, Dixon MF, Lee A (1999) The gastric transitional zones: neglected links between gastroduodenal pathology and helicobacter ecology. *Gastroenterology* 116: 1217-1229.
44. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Perez-Perez GI, Blaser MJ (1994) *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann Intern Med* 120: 977-981.
45. Sipponen P, Varis K, Fraki O, Korri UM, Seppala K, et al. (1990) Cumulative 10-year risk of symptomatic duodenal and gastric ulcer in patients with or without chronic gastritis. A clinical follow-up study of 454 outpatients. *Scand J Gastroenterol* 25: 966-973.
46. Rauws EA, Tytgat GN (1990) Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 335: 1233-1235.
47. Hentschel E, Brandstatter G, Dragosics B, Hirschl AM, Nemeč H, et al. (1993) Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. *N Engl J Med* 328: 308-312.
48. van der Hulst RW, Rauws EA, Koycu B, Keller JJ, ten Kate FJ, et al. (1997) *Helicobacter pylori* reinfection is virtually absent after successful eradication. *J Infect Dis* 176: 196-200.
49. Treiber G, Lambert JR (1998) The impact of *Helicobacter pylori* eradication on peptic ulcer healing. *Am J Gastroenterol* 93: 1080-1084.
50. Talley NJ, Hunt RH (1997) What role does *Helicobacter pylori* play in dyspepsia and nonulcer dyspepsia? Arguments for and against *H. pylori* being associated with dyspeptic symptoms. *Gastroenterology* 113: S67-77.
51. Moayyedi P, Soo S, Deeks J, Delaney B, Harris A, et al. (2006) Eradication of *Helicobacter pylori* for non-ulcer dyspepsia. *Cochrane Database Syst Rev*: CD002096.
52. Chiba N, Van Zanten SJ, Sinclair P, Ferguson RA, Escobedo S, et al. (2002) Treating *Helicobacter pylori* infection in primary care patients with uninvestigated dyspepsia: the Canadian adult dyspepsia empiric treatment-*Helicobacter pylori* positive (CADET-Hp) randomised controlled trial. *BMJ* 324: 1012-1016.
53. Chiba N, Veldhuyzen Van Zanten SJ, Escobedo S, Grace E, Lee J, et al. (2004) Economic evaluation of *Helicobacter pylori* eradication in the CADET-Hp randomized controlled trial of *H. pylori*-positive primary care patients with uninvestigated dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther* 19: 349-358.
54. Delaney B, Ford AC, Forman D, Moayyedi P, Qume M (2009) Initial management strategies for dyspepsia. *Cochrane Database Syst Rev*: CD001961.
55. Correa P (1992) Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-- First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 52: 6735-6740.
56. Correa P, Schneider BG (2005) Etiology of gastric cancer: what is new? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 1865-1868.
57. Fox JG, Wang TC (2007) Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest* 117: 60-69.
58. Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Pena AS, Roosendaal R, Pals G, et al. (1995) Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet* 345: 1525-1528.

59. Kuipers EJ, Lundell L, Klinkenberg-Knol EC, Havu N, Festen HP, et al. (1996) Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis treated with omeprazole or fundoplication. *N Engl J Med* 334: 1018-1022.
60. Sipponen P, Kekki M, Haapakoski J, Ihamaki T, Siurala M (1985) Gastric cancer risk in chronic atrophic gastritis: statistical calculations of cross-sectional data. *Int J Cancer* 35: 173-177.
61. Kuipers EJ (1998) Review article: Relationship between *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 12 Suppl 1: 25-36.
62. Forman D, Sitas F, Newell DG, Stacey AR, Boreham J, et al. (1990) Geographic association of *Helicobacter pylori* antibody prevalence and gastric cancer mortality in rural China. *Int J Cancer* 46: 608-611.
63. (1993) An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. The EUROGAST Study Group. *Lancet* 341: 1359-1362.
64. (1994) Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 61: 1-241.
65. Ekstrom AM, Held M, Hansson LE, Engstrand L, Nyren O (2001) *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology* 121: 784-791.
66. Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, et al. (1998) Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res* 58: 4255-4259.
67. Rieder G, Merchant JL, Haas R (2005) *Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 128: 1229-1242.
68. Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M (1998) *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* 115: 642-648.
69. Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ (1995) *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the cagA status. *J Natl Cancer Inst* 87: 1777-1780.
70. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H (1997) Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 40: 297-301.
71. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, et al. (2012) Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 13: 607-615.
72. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, et al. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893-2917.
73. Parkin DM (2001) Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2: 533-543.
74. Wroblewski LE, Peek RM, Jr., Wilson KT (2010) *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev* 23: 713-739.
75. Kuipers EJ, Nelis GF, Klinkenberg-Knol EC, Snel P, Goldfain D, et al. (2004) Cure of *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux oesophagitis treated with long term omeprazole reverses gastritis without exacerbation of reflux disease: results of a randomised controlled trial. *Gut* 53: 12-20.
76. Leung WK, Lin SR, Ching JY, To KF, Ng EK, et al. (2004) Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomised trial on *Helicobacter pylori* eradication. *Gut* 53: 1244-1249.
77. Ley C, Mohar A, Guarner J, Herrera-Goepfert R, Figueroa LS, et al. (2004) *Helicobacter pylori* eradication and gastric preneoplastic conditions: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13: 4-10.

78. Mera R, Fontham ET, Bravo LE, Bravo JC, Piazuolo MB, et al. (2005) Long term follow up of patients treated for *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 54: 1536-1540.
79. Schenk BE, Kuipers EJ, Nelis GF, Bloemena E, Thijs JC, et al. (2000) Effect of *Helicobacter pylori* eradication on chronic gastritis during omeprazole therapy. *Gut* 46: 615-621.
80. Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, et al. (2004) *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 291: 187-194.
81. Take S, Mizuno M, Ishiki K, Nagahara Y, Yoshida T, et al. (2005) The effect of eradicating *Helicobacter pylori* on the development of gastric cancer in patients with peptic ulcer disease. *Am J Gastroenterol* 100: 1037-1042.
82. Eidt S, Stolte M, Fischer R (1994) *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol* 47: 436-439.
83. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, et al. (1994) *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 330: 1267-1271.
84. Parsonnet J, Isaacson PG (2004) Bacterial infection and MALT lymphoma. *N Engl J Med* 350: 213-215.
85. de Mascarel A, Ruskone-Fourmestraux A, Lavergne-Slove A, Megraud F, Dubus P, et al. (2005) Clinical, histological and molecular follow-up of 60 patients with gastric marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Virchows Arch* 446: 219-224.
86. Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Dragosics B, Greiner A, Stolte M (2004) Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive *Helicobacter pylori* eradication therapy: experience from a large prospective series. *Gut* 53: 34-37.
87. Nakamura S, Matsumoto T, Suekane H, Matsumoto H, Esaki M, et al. (2005) Long-term clinical outcome of *Helicobacter pylori* eradication for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with a reference to second-line treatment. *Cancer* 104: 532-540.
88. Nakamura S, Sugiyama T, Matsumoto T, Iijima K, Ono S, et al. (2012) Long-term clinical outcome of gastric MALT lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori*: a multicentre cohort follow-up study of 420 patients in Japan. *Gut* 61: 507-513.
89. Wundisch T, Thiede C, Morgner A, Dempfle A, Gunther A, et al. (2005) Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Oncol* 23: 8018-8024.
90. Raderer M, Streubel B, Woehrer S, Poespoek A, Jaeger U, et al. (2005) High relapse rate in patients with MALT lymphoma warrants lifelong follow-up. *Clin Cancer Res* 11: 3349-3352.
91. Inagaki H, Nakamura T, Li C, Sugiyama T, Asaka M, et al. (2004) Gastric MALT lymphomas are divided into three groups based on responsiveness to *Helicobacter Pylori* eradication and detection of API2-MALT1 fusion. *Am J Surg Pathol* 28: 1560-1567.
92. Liu H, Ye H, Ruskone-Fourmestraux A, De Jong D, Pileri S, et al. (2002) T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to *H. pylori* eradication. *Gastroenterology* 122: 1286-1294.
93. Banic M, Franceschi F, Babic Z, Gasbarrini A (2012) Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 17 Suppl 1: 49-55.
94. Gasbarrini A, Carloni E, Gasbarrini G, Chisholm SA (2004) *Helicobacter pylori* and extragastric diseases--other *Helicobacters*. *Helicobacter* 9 Suppl 1: 57-66.

95. Gasbarrini A, Franceschi F (2005) Does H. Pylori infection play a role in idiopathic thrombocytopenic purpura and in other autoimmune diseases? *Am J Gastroenterol* 100: 1271-1273.
96. Jackson S, Beck PL, Pineo GF, Poon MC (2005) Helicobacter pylori eradication: novel therapy for immune thrombocytopenic purpura? A review of the literature. *Am J Hematol* 78: 142-150.
97. Suzuki T, Matsushima M, Masui A, Watanabe K, Takagi A, et al. (2005) Effect of Helicobacter pylori eradication in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura-a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 100: 1265-1270.
98. Bamford JT, Tilden RL, Blankush JL, Gangness DE (1999) Effect of treatment of Helicobacter pylori infection on rosacea. *Arch Dermatol* 135: 659-663.
99. Kusters JG, Kuipers EJ (1999) Helicobacter and atherosclerosis. *Am Heart J* 138: S523-527.
100. Leontiadis GI, Sharma VK, Howden CW (1999) Non-gastrointestinal tract associations of Helicobacter pylori infection. *Arch Intern Med* 159: 925-940.
101. Megraud F, Lehours P (2007) Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 20: 280-322.
102. Kim S, Harum K, Ito M, Tanaka S, Yoshihara M, et al. (2004) Magnifying gastroendoscopy for diagnosis of histologic gastritis in the gastric antrum. *Dig Liver Dis* 36: 286-291.
103. Inoue H, Kazawa T, Sato Y, Satodate H, Sasajima K, et al. (2004) *In vivo* observation of living cancer cells in the esophagus, stomach, and colon using catheter-type contact endoscope, "Endo-Cytoscopy system". *Gastrointest Endosc Clin N Am* 14: 589-594, x-xi.
104. Kiesslich R, Goetz M, Burg J, Stolte M, Siegel E, et al. (2005) Diagnosing Helicobacter pylori *in vivo* by confocal laser endoscopy. *Gastroenterology* 128: 2119-2123.
105. Perez-Trallero E, Montes M, Alcorta M, Zubillaga P, Telleria E (1995) Non-endoscopic method to obtain Helicobacter pylori for culture. *Lancet* 345: 622-623.
106. Graham DY, Kudo M, Reddy R, Opekun AR (2005) Practical rapid, minimally invasive, reliable nonendoscopic method to obtain Helicobacter pylori for culture. *Helicobacter* 10: 1-3.
107. Bayerdorffer E, Oertel H, Lehn N, Kasper G, Mannes GA, et al. (1989) Topographic association between active gastritis and Campylobacter pylori colonisation. *J Clin Pathol* 42: 834-839.
108. Meunier O, Walter P, Chamouard P, Piemont Y, Monteil H (1997) [Isolation of Helicobacter pylori: necessity of control of transport conditions]. *Pathol Biol (Paris)* 45: 82-85.
109. Grove DI, McLeay RA, Byron KE, Koutsouridis G (2001) Isolation of Helicobacter pylori after transport from a regional laboratory of gastric biopsy specimens in saline, Portagerm pylori or cultured on chocolate agar. *Pathology* 33: 362-364.
110. Heep M, Scheibl K, Degrell A, Lehn N (1999) Transport and storage of fresh and frozen gastric biopsy specimens for optimal recovery of Helicobacter pylori. *J Clin Microbiol* 37: 3764-3766.
111. Goodwin CS, Blincow ED, Warren JR, Waters TE, Sanderson CR, et al. (1985) Evaluation of cultural techniques for isolating Campylobacter pyloridis from endoscopic biopsies of gastric mucosa. *J Clin Pathol* 38: 1127-1131.
112. Hutton ML, Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL (2012) The use of AlbuMAX II((R)) as a blood or serum alternative for the culture of Helicobacter pylori. *Helicobacter* 17: 68-76.

113. Dent JC, McNulty CA (1988) Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7: 555-558.
114. Megraud F, Bonnet F, Garnier M, Lamouliatte H (1985) Characterization of "*Campylobacter pyloridis*" by culture, enzymatic profile, and protein content. *J Clin Microbiol* 22: 1007-1010.
115. van der Hulst RW, Verheul SB, Weel JF, Gerrits Y, ten Kate FJ, et al. (1996) Effect of specimen collection techniques, transport media, and incubation of cultures on the detection rate of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 211-215.
116. Warren JR, Marshall BJ (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1: 1273-1275.
117. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P (1996) Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 20: 1161-1181.
118. Price AB (1991) The Sydney System: histological division. *J Gastroenterol Hepatol* 6: 209-222.
119. MacOni G, Vago L, Galletta G, Imbesi V, Sangaletti O, et al. (1999) Is routine histological evaluation an accurate test for *Helicobacter pylori* infection? *Aliment Pharmacol Ther* 13: 327-331.
120. Molyneux AJ, Harris MD (1993) *Helicobacter pylori* in gastric biopsies--should you trust the pathology report? *J R Coll Physicians Lond* 27: 119-120.
121. Prince MI, Osborne JS, Ingoe L, Jones DE, Cobden I, et al. (1999) The CLO test in the UK: inappropriate reading and missed results. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11: 1251-1254.
122. Binek J, Fantin AC, Meyenberger C (1999) Attitude to *Helicobacter pylori* infection among Swiss gastroenterologists. *Schweiz Med Wochenschr* 129: 441-445.
123. Mobley HL, Cortesia MJ, Rosenthal LE, Jones BD (1988) Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 26: 831-836.
124. Arvind AS, Cook RS, Tabaqchali S, Farthing MJ (1988) One-minute endoscopy room test for *Campylobacter pylori*. *Lancet* 1: 704.
125. Boyanova L, Stancheva I, Todorov D, Kumanova R, Petrov S, et al. (1996) Comparison of three urease tests for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 8: 911-914.
126. Yousfi MM, El-Zimaity HM, Cole RA, Genta RM, Graham DY (1996) Does using a warmer influence the results of rapid urease testing for *Helicobacter pylori*? *Gastrointest Endosc* 43: 260-261.
127. Laine L, Estrada R, Lewin DN, Cohen H (1996) The influence of warming on rapid urease test results: a prospective evaluation. *Gastrointest Endosc* 44: 429-432.
128. Yousfi MM, El-Zimaity HM, Cole RA, Genta RM, Graham DY (1996) Detection of *Helicobacter pylori* by rapid urease tests: is biopsy size a critical variable? *Gastrointest Endosc* 43: 222-224.
129. Laine L, Chun D, Stein C, El-Beblawi I, Sharma V, et al. (1996) The influence of size or number of biopsies on rapid urease test results: a prospective evaluation. *Gastrointest Endosc* 43: 49-53.
130. Laine L, Lewin D, Naritoku W, Estrada R, Cohen H (1996) Prospective comparison of commercially available rapid urease tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Gastrointest Endosc* 44: 523-526.
131. Puetz T, Vakil N, Phadnis S, Dunn B, Robinson J (1997) The Pyloritek test and the CLO test: accuracy and incremental cost analysis. *Am J Gastroenterol* 92: 254-257.
132. Clayton C, Kleanthous K, Tabaqchali S (1991) Detection and identification of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 44: 515-516.

133. De Reuse H, Labigne A, Mengin-Lecreulx D (1997) The *Helicobacter pylori* ureC gene codes for a phosphoglucosamine mutase. *J Bacteriol* 179: 3488-3493.
134. Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakos K, Kalliaropoulos A, Papatheodoridis G, et al. (2007) Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 45: 488-495.
135. van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, van Asbroek M, et al. (1998) Typing of *Helicobacter pylori* vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol* 36: 1271-1276.
136. Ho SA, Hoyle JA, Lewis FA, Secker AD, Cross D, et al. (1991) Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol* 29: 2543-2549.
137. Hoshina S, Kahn SM, Jiang W, Green PH, Neu HC, et al. (1990) Direct detection and amplification of *Helicobacter pylori* ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 13: 473-479.
138. Chong SK, Lou Q, Fitzgerald JF, Lee CH (1996) Evaluation of 16S rRNA gene PCR with primers Hp1 and Hp2 for detection of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 34: 2728-2730.
139. Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadstrom T, O'Toole PW (1992) Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 54-58.
140. Valentine JL, Arthur RR, Mobley HL, Dick JD (1991) Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 689-695.
141. Thoreson AC, Borre M, Andersen LP, Jorgensen F, Küllerich S, et al. (1999) *Helicobacter pylori* detection in human biopsies: a competitive PCR assay with internal control reveals false results. *FEMS Immunol Med Microbiol* 24: 201-208.
142. Roosendaal R, Kuipers EJ, van den Brule AJ, Pena AS, Uytterlinde AM, et al. (1994) Importance of the fiberoptic endoscope cleaning procedure for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 32: 1123-1126.
143. Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE (1993) Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J Med Microbiol* 39: 338-344.
144. Fabre R, Sobhani I, Laurent-Puig P, Hedef N, Yazigi N, et al. (1994) Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests. *Gut* 35: 905-908.
145. Lehours P, Ruskone-Fourmestreaux A, Lavergne A, Cantet F, Megraud F, et al. (2003) Which test to use to detect *Helicobacter pylori* infection in patients with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma? *Am J Gastroenterol* 98: 291-295.
146. Monteiro L, de Mascarel A, Sarrasqueta AM, Bergey B, Barberis C, et al. (2001) Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. *Am J Gastroenterol* 96: 353-358.
147. Valentine JL, Arthur RR, Mobley HL, Dick JD (1991) Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29: 689-695.
148. van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AM, Schirm J, Snijder JA (1993) Sensitivity of culture compared with that of polymerase chain reaction for detection of *Helicobacter pylori* from antral biopsy samples. *J Clin Microbiol* 31: 1918-1920.

149. Liu H, Rahman A, Semino-Mora C, Doi SQ, Dubois A (2008) Specific and sensitive detection of *H. pylori* in biological specimens by real-time RT-PCR and in situ hybridization. *PLoS One* 3: e2689.
150. Kobayashi D, Eishi Y, Ohkusa T, Ishige, Suzuki T, et al. (2002) Gastric mucosal density of *Helicobacter pylori* estimated by real-time PCR compared with results of urea breath test and histological grading. *J Med Microbiol* 51: 305-311.
151. Lascols C, Lamarque D, Costa JM, Copie-Bergman C, Le Glaunec JM, et al. (2003) Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 41: 4573-4577.
152. Diouf A, Martinez-Gomis J, Miquel M, Quesada M, Lario S, et al. (2009) [Comparison of four different primer sets for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies and oral samples by using real-time PCR]. *Pathol Biol (Paris)* 57: 30-35.
153. Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, et al. (2003) Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 41: 397-402.
154. Glocker E, Kist M (2004) Rapid detection of point mutations in the *gyrA* gene of *Helicobacter pylori* conferring resistance to ciprofloxacin by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR approach. *J Clin Microbiol* 42: 2241-2246.
155. Graham DY, Klein PD, Evans DJ, Jr., Evans DG, Alpert LC, et al. (1987) *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ¹³C-urea breath test. *Lancet* 1: 1174-1177.
156. Marshall BJ, Surveyor I (1988) Carbon-14 urea breath test for the diagnosis of *Campylobacter pylori* associated gastritis. *J Nucl Med* 29: 11-16.
157. Gisbert JP, Pajares JM (2004) Review article: ¹³C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection -- a critical review. *Aliment Pharmacol Ther* 20: 1001-1017.
158. Makristathis A, Pasching E, Schutze K, Wimmer M, Rotter ML, et al. (1998) Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 36: 2772-2774.
159. Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, Axon AT, Deltenre M, et al. (1999) Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. HpSA European study group. *Lancet* 354: 30-33.
160. Gisbert JP, Pajares JM (2004) Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. *Helicobacter* 9: 347-368.
161. Gisbert JP, de la Morena F, Abaira V (2006) Accuracy of monoclonal stool antigen test for the diagnosis of *H. pylori* infection: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 101: 1921-1930.
162. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, et al. (2012) Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* 61: 646-664.
163. Marshall BJ, McGeachie DB, Francis GJ, Utley PJ (1984) Pyloric campylobacter serology. *Lancet* 2: 281.
164. Jones DM, Lessells AM, Eldridge J (1984) *Campylobacter* like organisms on the gastric mucosa: culture, histological, and serological studies. *J Clin Pathol* 37: 1002-1006.
165. Kuipers EJ, Pena AS, van Kamp G, Uytterlinde AM, Pals G, et al. (1993) Seroconversion for *Helicobacter pylori*. *Lancet* 342: 328-331.
166. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, et al. (2002) Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14428-14433.

167. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, Pena S, Midolo P, et al. (1999) Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 116: 823-830.
168. Mayo K, Pretolani S, Gasbarrini G, Ghironzi G, Megraud F (1998) Heterogeneity of immunoglobulin G response to *Helicobacter pylori* measured by the unweighted pair group method with averages. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 70-73.
169. Hoang TT, Wheeldon TU, Bengtsson C, Phung DC, Sorberg M, et al. (2004) Enzyme-linked immunosorbent assay for *Helicobacter pylori* needs adjustment for the population investigated. *J Clin Microbiol* 42: 627-630.
170. Obata Y, Kikuchi S, Miwa H, Yagyu K, Lin Y, et al. (2003) Diagnostic accuracy of serological kits for *Helicobacter pylori* infection with the same assay system but different antigens in a Japanese patient population. *J Med Microbiol* 52: 889-892.
171. Andersen LP, Espersen F (1992) Immunoglobulin G antibodies to *Helicobacter pylori* in patients with dyspeptic symptoms investigated by the western immunoblot technique. *J Clin Microbiol* 30: 1743-1751.
172. Hook-Nikanne J, Perez-Perez GI, Blaser MJ (1997) Antigenic characterization of *Helicobacter pylori* strains from different parts of the world. *Clin Diagn Lab Immunol* 4: 592-597.
173. Marchildon PA, Sugiyama T, Fukuda Y, Peacock JS, Asaka M, et al. (2003) Evaluation of the effects of strain-specific antigen variation on the accuracy of serologic diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Microbiol* 41: 1480-1485.
174. Jensen AK, Andersen LP, Wachmann CH (1993) Evaluation of eight commercial kits for *Helicobacter pylori* IgG antibody detection. *APMIS* 101: 795-801.
175. Zhang QB, Zhang SJ, Jia BQ (1990) [Enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of *Campylobacter pylori* infection]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 29: 457-460, 509.
176. Feldman RA, Deeks JJ, Evans SJ (1995) Multi-laboratory comparison of eight commercially available *Helicobacter pylori* serology kits. *Helicobacter pylori Serology Study Group*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14: 428-433.
177. Kosunen TU, Seppala K, Sarna S, Sipponen P (1992) Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 339: 893-895.
178. Alemohammad MM, Foley TJ, Cohen H (1993) Detection of immunoglobulin G antibodies to *Helicobacter pylori* in urine by an enzyme immunoassay method. *J Clin Microbiol* 31: 2174-2177.
179. Katsuragi K, Noda A, Tachikawa T, Azuma A, Mukai F, et al. (1998) Highly sensitive urine-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 3: 289-295.
180. Lizza F, Maletta M, Imeneo M, Marcheggiano A, Iannoni C, et al. (1995) Salivary-specific immunoglobulin G in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. *Am J Gastroenterol* 90: 1820-1823.
181. Patel P, Mendall MA, Khulusi S, Molineaux N, Levy J, et al. (1994) Salivary antibodies to *Helicobacter pylori*: screening dyspeptic patients before endoscopy. *Lancet* 344: 511-512.
182. Megraud F (2004) Basis for the management of drug-resistant *Helicobacter pylori* infection. *Drugs* 64: 1893-1904.
183. Graham DY, Opekun AR, Klein PD (1993) Clarithromycin for the eradication of *Helicobacter pylori*. *J Clin Gastroenterol* 16: 292-294.
184. Megraud F (1995) Rationale for the choice of antibiotics for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 7 Suppl 1: S49-54.

185. Peterson WL, Graham DY, Marshall B, Blaser MJ, Genta RM, et al. (1993) Clarithromycin as monotherapy for eradication of *Helicobacter pylori*: a randomized, double-blind trial. *Am J Gastroenterol* 88: 1860-1864.
186. Lambert JR, Midolo P (1997) The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 11 Suppl 1: 27-33.
187. Vogt K, Warrelmann M, Hahn H (1989) The minimum inhibitory concentrations of various bismuth salts against *Campylobacter pylori*. *Zentralbl Bakteriol* 271: 304-310.
188. Megraud F, Lamouliatte H (2003) Review article: the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 17: 1333-1343.
189. Perri F, Festa V, Clemente R, Quitadamo M, Andriulli A (2000) Rifabutin-based 'rescue therapy' for *Helicobacter pylori* infected patients after failure of standard regimens. *Aliment Pharmacol Ther* 14: 311-316.
190. Ebrahimi-Dariani N, Mirmomen S, Mansour-Ghanaei F, Noormohammadpoor P, Sotodehmanesh R, et al. (2003) The efficacy of furazolidone-based quadruple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection in Iranian patients resistant to metronidazole-based quadruple therapy. *Med Sci Monit* 9: PI105-108.
191. Guo CY, Wu YB, Liu HL, Wu JY, Zhong MZ (2004) Clinical evaluation of four one-week triple therapy regimens in eradicating *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 10: 747-749.
192. Fakheri H, Merat S, Hosseini V, Malekzadeh R (2004) Low-dose furazolidone in triple and quadruple regimens for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 19: 89-93.
193. Forsmark CE, Wilcox CM, Cello JP, Margaretten W, Lee B, et al. (1990) Ciprofloxacin in the treatment of *Helicobacter pylori* in patients with gastritis and peptic ulcer. *J Infect Dis* 162: 998-999.
194. Sanaka M, Kuyama Y, Yamanaka M, Iwasaki M (1999) Decrease in serum concentrations of *Helicobacter pylori* IgG antibodies during antituberculosis therapy: the possible eradication by rifampicin and streptomycin. *Am J Gastroenterol* 94: 1983-1984.
195. Graham DY, Fischbach L (2010) *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut* 59: 1143-1153.
196. Glupczynski Y, Megraud F, Lopez-Brea M, Andersen LP (2001) European multicentre survey of *in vitro* antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 820-823.
197. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, et al. (2013) *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut* 62: 34-42.
198. Megraud F (2007) *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Gut* 56: 1502.
199. Gisbert JP, Calvet X, O'Connor A, Megraud F, O'Morain CA (2010) Sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a critical review. *J Clin Gastroenterol* 44: 313-325.
200. Chey WD, Wong BC, Practice Parameters Committee of the American College of G (2007) American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 102: 1808-1825.
201. Fock KM, Katelaris P, Sugano K, Ang TL, Hunt R, et al. (2009) Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 24: 1587-1600.
202. Fox JG (2002) The non-H pylori helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut* 50: 273-283.
203. Solnick JV, Schauer DB (2001) Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev* 14: 59-97.

204. O'Toole PW, Lane MC, Porwollik S (2000) *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect* 2: 1207-1214.
205. Kusters JG, Gerrits MM, Van Strijp JA, Vandenbroucke-Grauls CM (1997) Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun* 65: 3672-3679.
206. Enroth H, Wreiber K, Rigo R, Risberg D, Uribe A, et al. (1999) *In vitro* aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, intracellular composition and surface properties. *Helicobacter* 4: 7-16.
207. Azevedo NF, Almeida C, Cerqueira L, Dias S, Keevil CW, et al. (2007) Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. *Appl Environ Microbiol* 73: 3423-3427.
208. Cellini L, Grande R, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Di Giulio M, et al. (2008) Characterization of an *Helicobacter pylori* environmental strain. *J Appl Microbiol* 105: 761-769.
209. Giao MS, Azevedo NF, Wilks SA, Vieira MJ, Keevil CW (2010) Effect of chlorine on incorporation of *Helicobacter pylori* into drinking water biofilms. *Appl Environ Microbiol* 76: 1669-1673.
210. Quaglia NC, Dambrosio A, Normanno G, Parisi A, Patrono R, et al. (2008) High occurrence of *Helicobacter pylori* in raw goat, sheep and cow milk inferred by *glmM* gene: a risk of food-borne infection? *Int J Food Microbiol* 124: 43-47.
211. Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Sachs G (2002) Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 123: 187-195.
212. Stingl K, Altendorf K, Bakker EP (2002) Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol* 10: 70-74.
213. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, et al. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388: 539-547.
214. Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, et al. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397: 176-180.
215. Oh JD, Kling-Backhed H, Giannakis M, Xu J, Fulton RS, et al. (2006) The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9999-10004.
216. Kersulyte D, Kalia A, Gilman RH, Mendez M, Herrera P, et al. (2010) *Helicobacter pylori* from Peruvian amerindians: traces of human migrations in strains from remote Amazon, and genome sequence of an Amerind strain. *PLoS One* 5: e15076.
217. Baltrus DA, Amieva MR, Covacci A, Lowe TM, Merrell DS, et al. (2009) The complete genome sequence of *Helicobacter pylori* strain G27. *J Bacteriol* 191: 447-448.
218. McClain MS, Shaffer CL, Israel DA, Peek RM, Jr., Cover TL (2009) Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. *BMC Genomics* 10: 3.
219. Gressmann H, Linz B, Ghai R, Pleissner KP, Schlapbach R, et al. (2005) Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. *PLoS Genet* 1: e43.
220. Heuermann D, Haas R (1995) Genetic organization of a small cryptic plasmid of *Helicobacter pylori*. *Gene* 165: 17-24.
221. Heuermann D, Haas R (1998) A stable shuttle vector system for efficient genetic complementation of *Helicobacter pylori* strains by transformation and conjugation. *Mol Gen Genet* 257: 519-528.
222. Uchiyama J, Takeuchi H, Kato S, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, et al. (2012) Complete genome sequences of two *Helicobacter pylori* bacteriophages isolated from Japanese patients. *J Virol* 86: 11400-11401.

223. Schmid EN, von Recklinghausen G, Ansorg R (1990) Bacteriophages in *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori*. *J Med Microbiol* 32: 101-104.
224. Hancock RE, Alm R, Bina J, Trust T (1998) *Helicobacter pylori*: a surprisingly conserved bacterium. *Nat Biotechnol* 16: 216-217.
225. Exner MM, Doig P, Trust TJ, Hancock RE (1995) Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 63: 1567-1572.
226. Alm RA, Trust TJ (1999) Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J Mol Med (Berl)* 77: 834-846.
227. Fischer W, Windhager L, Rohrer S, Zeiller M, Karnholz A, et al. (2010) Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res* 38: 6089-6101.
228. Saunders NJ, Peden JF, Hood DW, Moxon ER (1998) Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome. *Mol Microbiol* 27: 1091-1098.
229. Appelmek BJ, Shiberu B, Trinks C, Tapsi N, Zheng PY, et al. (1998) Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 66: 70-76.
230. Berg DE, Hoffman PS, Appelmek BJ, Kusters JG (1997) The *Helicobacter pylori* genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol* 5: 468-474.
231. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, et al. (2007) An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445: 915-918.
232. Majewski SI, Goodwin CS (1988) Restriction endonuclease analysis of the genome of *Campylobacter pylori* with a rapid extraction method: evidence for considerable genomic variation. *J Infect Dis* 157: 465-471.
233. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE (1992) DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 20: 5137-5142.
234. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Berg DE (1992) PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* 20: 6221-6225.
235. Taylor NS, Fox JG, Akopyants NS, Berg DE, Thompson N, et al. (1995) Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 33: 918-923.
236. Kuipers EJ, Israel DA, Kusters JG, Gerrits MM, Weel J, et al. (2000) Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis* 181: 273-282.
237. Kersulyte D, Chalkauskas H, Berg DE (1999) Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol Microbiol* 31: 31-43.
238. Kansau I, Raymond J, Bingen E, Courcoux P, Kalach N, et al. (1996) Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res Microbiol* 147: 661-669.
239. Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, et al. (1998) Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12619-12624.
240. Miehke S, Genta RM, Graham DY, Go MF (1999) Molecular relationships of *Helicobacter pylori* strains in a family with gastroduodenal disease. *Am J Gastroenterol* 94: 364-368.
241. Raymond J, Thiberg JM, Chevalier C, Kalach N, Bergeret M, et al. (2004) Genetic and transmission analysis of *Helicobacter pylori* strains within a family. *Emerg Infect Dis* 10: 1816-1821.
242. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG (1993) How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4384-4388.

243. Go MF, Kapur V, Graham DY, Musser JM (1996) Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol* 178: 3934-3938.
244. Maynard Smith J, Smith NH (1998) Detecting recombination from gene trees. *Mol Biol Evol* 15: 590-599.
245. Perez-Losada M, Browne EB, Madsen A, Wirth T, Viscidi RP, et al. (2006) Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data. *Infect Genet Evol* 6: 97-112.
246. Bjorkholm B, Sjolund M, Falk PG, Berg OG, Engstrand L, et al. (2001) Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14607-14612.
247. Kang J, Blaser MJ (2006) Bacterial populations as perfect gases: genomic integrity and diversification tensions in *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol* 4: 826-836.
248. Aras RA, Fischer W, Perez-Perez GI, Crosatti M, Ando T, et al. (2003) Plasticity of repetitive DNA sequences within a bacterial (Type IV) secretion system component. *J Exp Med* 198: 1349-1360.
249. Salaun L, Linz B, Suerbaum S, Saunders NJ (2004) The diversity within an expanded and redefined repertoire of phase-variable genes in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 150: 817-830.
250. Nilsson C, Skoglund A, Moran AP, Annuk H, Engstrand L, et al. (2006) An enzymatic ruler modulates Lewis antigen glycosylation of *Helicobacter pylori* LPS during persistent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2863-2868.
251. Israel DA, Salama N, Krishna U, Rieger UM, Atherton JC, et al. (2001) *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14625-14630.
252. Huang S, Kang J, Blaser MJ (2006) Antimutator role of the DNA glycosylase *mutY* gene in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 188: 6224-6234.
253. Aras RA, Kang J, Tschumi AI, Harasaki Y, Blaser MJ (2003) Extensive repetitive DNA facilitates prokaryotic genome plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13579-13584.
254. Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, et al. (1999) Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol* 32: 459-470.
255. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, et al. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3140-3145.
256. Maiden MC (2006) Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60: 561-588.
257. Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
258. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, et al. (2003) Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 299: 1582-1585.
259. Suerbaum S, Josenhans C (2007) *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol* 5: 441-452.
260. Wirth T, Wang X, Linz B, Novick RP, Lum JK, et al. (2004) Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: lessons from Ladakh. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4746-4751.
261. Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, et al. (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279: 373-377.

262. Aspholm-Hurtig M, Dailide G, Lahmann M, Kalia A, Ilver D, et al. (2004) Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science* 305: 519-522.
263. Benktander J, Angstrom J, Breimer ME, Teneberg S (2012) Redefinition of the carbohydrate binding specificity of *Helicobacter pylori* BabA adhesin. *J Biol Chem* 287: 31712-31724.
264. Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, et al. (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 297: 573-578.
265. Marcos NT, Magalhaes A, Ferreira B, Oliveira MJ, Carvalho AS, et al. (2008) *Helicobacter pylori* induces beta3GnT5 in human gastric cell lines, modulating expression of the SabA ligand sialyl-Lewis x. *J Clin Invest* 118: 2325-2336.
266. Senkovich OA, Yin J, Ekshyyan V, Conant C, Traylor J, et al. (2011) *Helicobacter pylori* AlpA and AlpB bind host laminin and influence gastric inflammation in gerbils. *Infect Immun* 79: 3106-3116.
267. Trust TJ, Doig P, Emody L, Kienle Z, Wadstrom T, et al. (1991) High-affinity binding of the basement membrane proteins collagen type IV and laminin to the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 59: 4398-4404.
268. Lu H, Wu JY, Beswick EJ, Ohno T, Odenbreit S, et al. (2007) Functional and intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesin from Western and East Asian strains. *J Biol Chem* 282: 6242-6254.
269. Yamaoka Y, Kudo T, Lu H, Casola A, Brasier AR, et al. (2004) Role of interferon-stimulated responsive element-like element in interleukin-8 promoter in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 126: 1030-1043.
270. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY (2000) A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7533-7538.
271. Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, et al. (2006) *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms. *J Infect Dis* 194: 1346-1355.
272. Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S (1991) Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 59: 2470-2475.
273. Zanotti G, Cendron L (2010) Functional and structural aspects of *Helicobacter pylori* acidic stress response factors. *IUBMB Life* 62: 715-723.
274. Lytton SD, Fischer W, Nagel W, Haas R, Beck FX (2005) Production of ammonium by *Helicobacter pylori* mediates occludin processing and disruption of tight junctions in Caco-2 cells. *Microbiology* 151: 3267-3276.
275. Wroblewski LE, Shen L, Ogden S, Romero-Gallo J, Lapierre LA, et al. (2009) *Helicobacter pylori* dysregulation of gastric epithelial tight junctions by urease-mediated myosin II activation. *Gastroenterology* 136: 236-246.
276. Pai R, Wyle FA, Cover TL, Itani RM, Domek MJ, et al. (1998) *Helicobacter pylori* culture supernatant interferes with epidermal growth factor-activated signal transduction in human gastric KATO III cells. *Am J Pathol* 152: 1617-1624.
277. Seto K, Hayashi-Kuwabara Y, Yoneta T, Suda H, Tamaki H (1998) Vacuolation induced by cytotoxin from *Helicobacter pylori* is mediated by the EGF receptor in HeLa cells. *FEBS Lett* 431: 347-350.
278. Yahiro K, Wada A, Nakayama M, Kimura T, Ogushi K, et al. (2003) Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *J Biol Chem* 278: 19183-19189.

279. Yahiro K, Niidome T, Kimura M, Hatakeyama T, Aoyagi H, et al. (1999) Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta. *J Biol Chem* 274: 36693-36699.
280. Gupta VR, Patel HK, Kostolansky SS, Ballivian RA, Eichberg J, et al. (2008) Sphingomyelin functions as a novel receptor for *Helicobacter pylori* VacA. *PLoS Pathog* 4: e1000073.
281. Yahiro K, Satoh M, Nakano M, Hisatsune J, Isomoto H, et al. (2012) Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) mediates autophagy and apoptosis caused by *Helicobacter pylori* VacA. *J Biol Chem* 287: 31104-31115.
282. Hoy B, Lower M, Weydig C, Carra G, Tegtmeyer N, et al. (2010) *Helicobacter pylori* HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBO Rep* 11: 798-804.
283. Catrenich CE, Chestnut MH (1992) Character and origin of vacuoles induced in mammalian cells by the cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 37: 389-395.
284. Calore F, Genisset C, Casellato A, Rossato M, Codolo G, et al. (2010) Endosome-mitochondria juxtaposition during apoptosis induced by *H. pylori* VacA. *Cell Death Differ* 17: 1707-1716.
285. Jain P, Luo ZQ, Blanke SR (2011) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin A (VacA) engages the mitochondrial fission machinery to induce host cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 16032-16037.
286. Papini E, Satin B, Norais N, de Bernard M, Telford JL, et al. (1998) Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Clin Invest* 102: 813-820.
287. Jimenez-Soto LF, Kutter S, Sewald X, Ertl C, Weiss E, et al. (2009) *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathog* 5: e1000684.
288. Kwok T, Zabler D, Urman S, Rohde M, Hartig R, et al. (2007) *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* 449: 862-866.
289. Wiedemann T, Hofbauer S, Tegtmeyer N, Huber S, Sewald N, et al. (2012) *Helicobacter pylori* CagL dependent induction of gastrin expression via a novel alphavbeta5-integrin-integrin linked kinase signalling complex. *Gut* 61: 986-996.
290. Backert S, Tegtmeyer N, Selbach M (2010) The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis. *Helicobacter* 15: 163-176.
291. Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14559-14564.
292. Backert S, Moese S, Selbach M, Brinkmann V, Meyer TF (2001) Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 42: 631-644.
293. Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, et al. (2008) Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1003-1008.
294. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, et al. (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 5: 1166-1174.
295. Allison CC, Kufer TA, Kremmer E, Kaparakis M, Ferrero RL (2009) *Helicobacter pylori* induces MAPK phosphorylation and AP-1 activation via a NOD1-dependent mechanism. *J Immunol* 183: 8099-8109.

296. Chen L, Xiong Z, Sun L, Yang J, Jin Q (2012) VFDB 2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res* 40: D641-645.
297. Posselt G, Backert S, Wessler S (2013) The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Commun Signal* 11: 77.
298. Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1: 135-145.
299. Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2: 675-680.
300. Lee SK, Stack A, Katzowitsch E, Aizawa SI, Suerbaum S, et al. (2003) *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect* 5: 1345-1356.
301. Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SL, Cookson BT, et al. (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9247-9252.
302. Smith MF, Jr., Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, et al. (2003) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 278: 32552-32560.
303. Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S (1993) Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 262: 1892-1895.
304. Yamaoka Y (2008) Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. *World J Gastroenterol* 14: 4265-4272.
305. Backstrom A, Lundberg C, Kersulyte D, Berg DE, Boren T, et al. (2004) Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16923-16928.
306. Solnick JV, Hansen LM, Salama NR, Boonjakuakul JK, Syvanen M (2004) Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2106-2111.
307. Styer CM, Hansen LM, Cooke CL, Gundersen AM, Choi SS, et al. (2010) Expression of the BabA adhesin during experimental infection with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 78: 1593-1600.
308. Sheu SM, Sheu BS, Chiang WC, Kao CY, Wu HM, et al. (2012) *H. pylori* clinical isolates have diverse babAB genotype distributions over different topographic sites of stomach with correlation to clinical disease outcomes. *BMC Microbiol* 12: 89.
309. Ishijima N, Suzuki M, Ashida H, Ichikawa Y, Kanegae Y, et al. (2011) BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *J Biol Chem* 286: 25256-25264.
310. Rad R, Gerhard M, Lang R, Schoniger M, Rosch T, et al. (2002) The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol* 168: 3033-3041.
311. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, et al. (1999) Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12778-12783.
312. Roche N, Angstrom J, Hurtig M, Larsson T, Boren T, et al. (2004) *Helicobacter pylori* and complex gangliosides. *Infect Immun* 72: 1519-1529.

313. Ota H, Nakayama J, Momose M, Hayama M, Akamatsu T, et al. (1998) *Helicobacter pylori* infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. *Virchows Arch* 433: 419-426.
314. Sakamoto S, Watanabe T, Tokumaru T, Takagi H, Nakazato H, et al. (1989) Expression of Lewis_a, Lewis_b, Lewis_x, Lewis_y, sialyl-Lewis_a, and sialyl-Lewis_x blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. *Cancer Res* 49: 745-752.
315. Talarico S, Whitefield SE, Fero J, Haas R, Salama NR (2012) Regulation of *Helicobacter pylori* adherence by gene conversion. *Mol Microbiol* 84: 1050-1061.
316. Goodwin AC, Weinberger DM, Ford CB, Nelson JC, Snider JD, et al. (2008) Expression of the *Helicobacter pylori* adhesin SabA is controlled via phase variation and the ArsRS signal transduction system. *Microbiology* 154: 2231-2240.
317. Sheu BS, Odenbreit S, Hung KH, Liu CP, Sheu SM, et al. (2006) Interaction between host gastric Sialyl-Lewis X and *H. pylori* SabA enhances *H. pylori* density in patients lacking gastric Lewis B antigen. *Am J Gastroenterol* 101: 36-44.
318. Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergstrom J, Boren T, et al. (2005) The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem* 280: 15390-15397.
319. Walz A, Odenbreit S, Mahdavi J, Boren T, Ruhl S (2005) Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays. *Glycobiology* 15: 700-708.
320. Odenbreit S, Till M, Hofreuter D, Faller G, Haas R (1999) Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol* 31: 1537-1548.
321. Odenbreit S, Faller G, Haas R (2002) Role of the *alpAB* proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Int J Med Microbiol* 292: 247-256.
322. Odenbreit S, Swoboda K, Barwig I, Ruhl S, Boren T, et al. (2009) Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Infect Immun* 77: 3782-3790.
323. de Jonge R, Durrani Z, Rijpkema SG, Kuipers EJ, van Vliet AH, et al. (2004) Role of the *Helicobacter pylori* outer-membrane proteins AlpA and AlpB in colonization of the guinea pig stomach. *J Med Microbiol* 53: 375-379.
324. Odenbreit S, Kavermann H, Puls J, Haas R (2002) CagA tyrosine phosphorylation and interleukin-8 induction by *Helicobacter pylori* are independent from *alpAB*, HopZ and *bab* group outer membrane proteins. *Int J Med Microbiol* 292: 257-266.
325. de Vries N, Duinsbergen D, Kuipers EJ, Pot RG, Wiesenekker P, et al. (2002) Transcriptional phase variation of a type III restriction-modification system in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 184: 6615-6623.
326. Markovska R, Boyanova L, Yordanov D, Gergova G, Mitov I (2011) *Helicobacter pylori* *oipA* genetic diversity and its associations with both disease and *cagA*, *vacA* *s*, *m*, and *i* alleles among Bulgarian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 71: 335-340.
327. Ando T, Peek RM, Pride D, Levine SM, Takata T, et al. (2002) Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with *cagA* status. *J Clin Microbiol* 40: 239-246.
328. Sugimoto M, Ohno T, Graham DY, Yamaoka Y (2011) *Helicobacter pylori* outer membrane proteins on gastric mucosal interleukin 6 and 11 expression in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol Hepatol* 26: 1677-1684.

329. Akanuma M, Maeda S, Ogura K, Mitsuno Y, Hirata Y, et al. (2002) The evaluation of putative virulence factors of *Helicobacter pylori* for gastroduodenal disease by use of a short-term Mongolian gerbil infection model. *J Infect Dis* 185: 341-347.
330. Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y (2008) OipA plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal re-organization. *Cell Microbiol* 10: 1008-1020.
331. Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y (2009) *Helicobacter pylori* activate epidermal growth factor receptor- and phosphatidylinositol 3-OH kinase-dependent Akt and glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation. *Cell Microbiol* 11: 70-82.
332. Saha A, Backert S, Hammond CE, Gooz M, Smolka AJ (2010) *Helicobacter pylori* CagL activates ADAM17 to induce repression of the gastric H, K-ATPase alpha subunit. *Gastroenterology* 139: 239-248.
333. Tegtmeyer N, Hartig R, Delahay RM, Rohde M, Brandt S, et al. (2010) A small fibronectin-mimicking protein from bacteria induces cell spreading and focal adhesion formation. *J Biol Chem* 285: 23515-23526.
334. Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y (2012) *Helicobacter pylori*-associated regulation of forkhead transcription factors FoxO1/3a in human gastric cells. *Helicobacter* 17: 193-202.
335. Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y (2011) Paxillin is a novel cellular target for converging *Helicobacter pylori*-induced cellular signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301: G601-611.
336. Peck B, Ortkamp M, Diehl KD, Hundt E, Knapp B (1999) Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* 27: 3325-3333.
337. Kennemann L, Didelot X, Aebischer T, Kuhn S, Drescher B, et al. (2011) *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5033-5038.
338. Snelling WJ, Moran AP, Ryan KA, Scully P, McGourty K, et al. (2007) HorB (HP0127) is a gastric epithelial cell adhesin. *Helicobacter* 12: 200-209.
339. Loh JT, Torres VJ, Algood HM, McClain MS, Cover TL (2008) *Helicobacter pylori* HopQ outer membrane protein attenuates bacterial adherence to gastric epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 289: 53-58.
340. Jimenez-Soto LF, Clausen S, Sprenger A, Ertl C, Haas R (2013) Dynamics of the Cag-type IV secretion system of *Helicobacter pylori* as studied by bacterial co-infections. *Cell Microbiol* 15: 1924-1937.
341. Belogolova E, Bauer B, Pompaiah M, Asakura H, Brinkman V, et al. (2013) *Helicobacter pylori* outer membrane protein HopQ identified as a novel T4SS-associated virulence factor. *Cell Microbiol* 15: 1896-1912.
342. Backert S, Kwok T, Schmid M, Selbach M, Moese S, et al. (2005) Subproteomes of soluble and structure-bound *Helicobacter pylori* proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 5: 1331-1345.
343. Bumann D, Aksu S, Wendland M, Janek K, Zimny-Arndt U, et al. (2002) Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 70: 3396-3403.
344. Smith TG, Lim JM, Weinberg MV, Wells L, Hoover TR (2007) Direct analysis of the extracellular proteome from two strains of *Helicobacter pylori*. *Proteomics* 7: 2240-2245.
345. McGovern KJ, Blanchard TG, Gutierrez JA, Czinn SJ, Krakowka S, et al. (2001) gamma-Glutamyltransferase is a *Helicobacter pylori* virulence factor but is not essential for colonization. *Infect Immun* 69: 4168-4173.

346. Kim KM, Lee SG, Park MG, Song JY, Kang HL, et al. (2007) Gamma-glutamyltranspeptidase of *Helicobacter pylori* induces mitochondria-mediated apoptosis in AGS cells. *Biochem Biophys Res Commun* 355: 562-567.
347. Kim KM, Lee SG, Kim JM, Kim DS, Song JY, et al. (2010) *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase induces cell cycle arrest at the G1-S phase transition. *J Microbiol* 48: 372-377.
348. D'Elia MM, Amedei A, Cappon A, Del Prete G, de Bernard M (2007) The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) as an immune modulating agent. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50: 157-164.
349. Kavermann H, Burns BP, Angermuller K, Odenbreit S, Fischer W, et al. (2003) Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J Exp Med* 197: 813-822.
350. Tsuda M, Karita M, Mizote T, Morshed MG, Okita K, et al. (1994) Essential role of *Helicobacter pylori* urease in gastric colonization: definite proof using a urease-negative mutant constructed by gene replacement. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 6 Suppl 1: S49-52.
351. Mine T, Muraoka H, Saika T, Kobayashi I (2005) Characteristics of a clinical isolate of urease-negative *Helicobacter pylori* and its ability to induce gastric ulcers in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 10: 125-131.
352. Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Lee A, Melchers K, et al. (2000) Expression of the *Helicobacter pylori* ureI gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease. *Infect Immun* 68: 470-477.
353. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, et al. (2003) Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 300: 1430-1434.
354. Ingmer H, Brondsted L (2009) Proteases in bacterial pathogenesis. *Res Microbiol* 160: 704-710.
355. Hoy B, Brandstetter H, Wessler S (2013) The stability and activity of recombinant *Helicobacter pylori* HtrA under stress conditions. *J Basic Microbiol* 53: 402-409.
356. Salama NR, Shepherd B, Falkow S (2004) Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 186: 7926-7935.
357. Lower M, Weydig C, Metzler D, Reuter A, Starzinski-Powitz A, et al. (2008) Prediction of extracellular proteases of the human pathogen *Helicobacter pylori* reveals proteolytic activity of the Hp1018/19 protein HtrA. *PLoS One* 3: e3510.
358. Schirrmester W, Gnad T, Wex T, Higashiyama S, Wolke C, et al. (2009) Ectodomain shedding of E-cadherin and c-Met is induced by *Helicobacter pylori* infection. *Exp Cell Res* 315: 3500-3508.
359. Necchi V, Candusso ME, Tava F, Luinetti O, Ventura U, et al. (2007) Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 132: 1009-1023.
360. Hoy B, Geppert T, Boehm M, Reisen F, Plattner P, et al. (2012) Distinct roles of secreted HtrA proteases from gram-negative pathogens in cleaving the junctional protein and tumor suppressor E-cadherin. *J Biol Chem* 287: 10115-10120.
361. Boehm M, Hoy B, Rohde M, Tegtmeyer N, Baek KT, et al. (2012) Rapid paracellular transmigration of *Campylobacter jejuni* across polarized epithelial cells without affecting TER: role of proteolytic-active HtrA cleaving E-cadherin but not fibronectin. *Gut Pathog* 4: 3.
362. Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR (1988) Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 26: 93-99.

363. Cover TL, Blaser MJ (1992) Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 267: 10570-10575.
364. Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ (1994) Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 269: 10566-10573.
365. Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burrioni D, et al. (1994) Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 179: 1653-1658.
366. Schmitt W, Haas R (1994) Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol* 12: 307-319.
367. Ilver D, Barone S, Mercati D, Lupetti P, Telford JL (2004) *Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. *Cell Microbiol* 6: 167-174.
368. Lupetti P, Heuser JE, Manetti R, Massari P, Lanzavecchia S, et al. (1996) Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol* 133: 801-807.
369. Cover TL, Hanson PI, Heuser JE (1997) Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol* 138: 759-769.
370. Lanzavecchia S, Bellon PL, Lupetti P, Dallai R, Rappuoli R, et al. (1998) Three-dimensional reconstruction of metal replicas of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Struct Biol* 121: 9-18.
371. Adrian M, Cover TL, Dubochet J, Heuser JE (2002) Multiple oligomeric states of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin demonstrated by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* 318: 121-133.
372. Czajkowsky DM, Iwamoto H, Cover TL, Shao Z (1999) The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2001-2006.
373. Tombola F, Carlesso C, Szabo I, de Bernard M, Reytrat JM, et al. (1999) *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. *Biophys J* 76: 1401-1409.
374. Iwamoto H, Czajkowsky DM, Cover TL, Szabo G, Shao Z (1999) VacA from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett* 450: 101-104.
375. Cover TL, Blanke SR (2005) *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 3: 320-332.
376. Boquet P, Ricci V (2012) Intoxication strategy of *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Trends Microbiol* 20: 165-174.
377. de Bernard M, Papini E, de Filippis V, Gottardi E, Telford J, et al. (1995) Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. *J Biol Chem* 270: 23937-23940.
378. Molinari M, Galli C, de Bernard M, Norais N, Ruyschaert JM, et al. (1998) The acid activation of *Helicobacter pylori* toxin VacA: structural and membrane binding studies. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 334-340.
379. Nguyen VQ, Caprioli RM, Cover TL (2001) Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect Immun* 69: 543-546.
380. Ye D, Blanke SR (2002) Functional complementation reveals the importance of intermolecular monomer interactions for *Helicobacter pylori* VacA vacuolating activity. *Mol Microbiol* 43: 1243-1253.

381. Willhite DC, Ye D, Blanke SR (2002) Fluorescence resonance energy transfer microscopy of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin within mammalian cells. *Infect Immun* 70: 3824-3832.
382. Torres VJ, McClain MS, Cover TL (2004) Interactions between p-33 and p-55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA). *J Biol Chem* 279: 2324-2331.
383. Wang WC, Wang HJ, Kuo CH (2001) Two distinctive cell binding patterns by vacuolating toxin fused with glutathione S-transferase: one high-affinity m1-specific binding and the other lower-affinity binding for variant m forms. *Biochemistry* 40: 11887-11896.
384. Garner JA, Cover TL (1996) Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect Immun* 64: 4197-4203.
385. Pagliaccia C, de Bernard M, Lupetti P, Ji X, Burroni D, et al. (1998) The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10212-10217.
386. Wang HJ, Wang WC (2000) Expression and binding analysis of GST-VacA fusions reveals that the C-terminal approximately 100-residue segment of exotoxin is crucial for binding in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 278: 449-454.
387. Reyrat JM, Lanzavecchia S, Lupetti P, de Bernard M, Pagliaccia C, et al. (1999) 3D imaging of the 58 kDa cell binding subunit of the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *J Mol Biol* 290: 459-470.
388. Vinion-Dubiel AD, McClain MS, Czajkowsky DM, Iwamoto H, Ye D, et al. (1999) A dominant negative mutant of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) inhibits VacA-induced cell vacuolation. *J Biol Chem* 274: 37736-37742.
389. McClain MS, Iwamoto H, Cao P, Vinion-Dubiel AD, Li Y, et al. (2003) Essential role of a GXXXG motif for membrane channel formation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Biol Chem* 278: 12101-12108.
390. McClain MS, Cao P, Cover TL (2001) Amino-terminal hydrophobic region of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) mediates transmembrane protein dimerization. *Infect Immun* 69: 1181-1184.
391. Ye D, Blanke SR (2000) Mutational analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin amino terminus: identification of amino acids essential for cellular vacuolation. *Infect Immun* 68: 4354-4357.
392. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Jr., Tummuru MK, Blaser MJ, et al. (1995) 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.
393. McClain MS, Cao P, Iwamoto H, Vinion-Dubiel AD, Szabo G, et al. (2001) A 12-amino-acid segment, present in type s2 but not type s1 *Helicobacter pylori* VacA proteins, abolishes cytotoxin activity and alters membrane channel formation. *J Bacteriol* 183: 6499-6508.
394. Letley DP, Rhead JL, Twells RJ, Dove B, Atherton JC (2003) Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 278: 26734-26741.
395. Letley DP, Atherton JC (2000) Natural diversity in the N terminus of the mature vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* determines cytotoxin activity. *J Bacteriol* 182: 3278-3280.
396. Ji X, Fernandez T, Burroni D, Pagliaccia C, Atherton JC, et al. (2000) Cell specificity of *Helicobacter pylori* cytotoxin is determined by a short region in the polymorphic midregion. *Infect Immun* 68: 3754-3757.
397. Tombola F, Pagliaccia C, Campello S, Telford JL, Montecucco C, et al. (2001) How the loop and middle regions influence the properties of *Helicobacter pylori* VacA channels. *Biophys J* 81: 3204-3215.

398. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, et al. (2007) A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 133: 926-936.
399. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, et al. (1998) Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 115: 58-66.
400. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, et al. (2002) *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 94: 1680-1687.
401. Atherton JC, Peek RM, Jr., Tham KT, Cover TL, Blaser MJ (1997) Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 112: 92-99.
402. Backert S, Clyne M, Tegtmeyer N (2011) Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun Signal* 9: 28.
403. Wessler S, Gimona M, Rieder G (2011) Regulation of the actin cytoskeleton in *Helicobacter pylori*-induced migration and invasive growth of gastric epithelial cells. *Cell Commun Signal* 9: 27.
404. Backert S, Naumann M (2010) What a disorder: proinflammatory signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol* 18: 479-486.
405. Fronzes R, Christie PJ, Waksman G (2009) The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 7: 703-714.
406. Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* 59: 451-485.
407. Fischer W (2011) Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion apparatus. *FEBS J* 278: 1203-1212.
408. Alvarez-Martinez CE, Christie PJ (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 775-808.
409. Zahrl D, Wagner M, Bischof K, Bayer M, Zavec B, et al. (2005) Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* 151: 3455-3467.
410. Andrzejewska J, Lee SK, Olbermann P, Lotzing N, Katzowitsch E, et al. (2006) 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.
411. Backert S, Fronzes R, Waksman G (2008) VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems? *Trends Microbiol* 16: 409-413.
412. Buhrdorf R, Forster C, Haas R, Fischer W (2003) Topological analysis of a putative virB8 homologue essential for the *cag* type IV secretion system in *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 293: 213-217.
413. Kutter S, Buhrdorf R, Haas J, Schneider-Brachert W, Haas R, et al. (2008) Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *J Bacteriol* 190: 2161-2171.
414. Boonjakuakul JK, Canfield DR, Solnick JV (2005) Comparison of *Helicobacter pylori* virulence gene expression *in vitro* and in the Rhesus macaque. *Infect Immun* 73: 4895-4904.
415. Sharma CM, Hoffmann S, Darfeuille F, Reignier J, Findeiss S, et al. (2010) The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 464: 250-255.

416. Cendron L, Zanotti G (2011) Structural and functional aspects of unique type IV secretory components in the *Helicobacter pylori* cag-pathogenicity island. *FEBS J* 278: 1223-1231.
417. Fronzes R, Schafer E, Wang L, Saibil HR, Orlova EV, et al. (2009) Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* 323: 266-268.
418. Rohde M, Puls J, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R (2003) A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Mol Microbiol* 49: 219-234.
419. Tanaka J, Suzuki T, Mimuro H, Sasakawa C (2003) Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 5: 395-404.
420. Ruoslahti E (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 697-715.
421. Murata-Kamiya N, Kikuchi K, Hayashi T, Higashi H, Hatakeyama M (2010) *Helicobacter pylori* exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein. *Cell Host Microbe* 7: 399-411.
422. Wunder C, Churin Y, Winau F, Warnecke D, Vieth M, et al. (2006) Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. *Nat Med* 12: 1030-1038.
423. Lai CH, Chang YC, Du SY, Wang HJ, Kuo CH, et al. (2008) Cholesterol depletion reduces *Helicobacter pylori* CagA translocation and CagA-induced responses in AGS cells. *Infect Immun* 76: 3293-3303.
424. Hutton ML, Kaparakis-Liaskos M, Turner L, Cardona A, Kwok T, et al. (2010) *Helicobacter pylori* exploits cholesterol-rich microdomains for induction of NF- κ B-dependent responses and peptidoglycan delivery in epithelial cells. *Infect Immun* 78: 4523-4531.
425. Stein M, Ruggiero P, Rappuoli R, Bagnoli F (2013) CagA: From Pathogenic Mechanisms to Its Use as an Anti-Cancer Vaccine. *Front Immunol* 4: 328.
426. Segal ED, Falkow S, Tompkins LS (1996) *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1259-1264.
427. Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, et al. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287: 1497-1500.
428. Backert S, Ziska E, Brinkmann V, Zimny-Arndt U, Fauconnier A, et al. (2000) Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2: 155-164.
429. Stein M, Rappuoli R, Covacci A (2000) Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1263-1268.
430. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, et al. (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 295: 683-686.
431. Higashi H, Nakaya A, Tsutsumi R, Yokoyama K, Fujii Y, et al. (2004) *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J Biol Chem* 279: 17205-17216.
432. Argent RH, Kidd M, Owen RJ, Thomas RJ, Limb MC, et al. (2004) Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 127: 514-523.

433. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, et al. (2008) Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology* 135: 91-99.
434. Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakos KS, Petraki K, Breurec S, et al. (2010) CagA and VacA polymorphisms are associated with distinct pathological features in *Helicobacter pylori*-infected adults with peptic ulcer and non-peptic ulcer disease. *J Clin Microbiol* 48: 2237-2239.
435. Sgouras DN, Panayotopoulou EG, Papadakos K, Martinez-Gonzalez B, Roumbani A, et al. (2009) CagA and VacA polymorphisms do not correlate with severity of histopathological lesions in *Helicobacter pylori*-infected Greek children. *J Clin Microbiol* 47: 2426-2434.
436. Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakos KS, Petraki K, Breurec S, et al. CagA and VacA polymorphisms are associated with distinct pathological features in *Helicobacter pylori*-infected adults with peptic ulcer and non-peptic ulcer disease. *J Clin Microbiol* 48: 2237-2239.
437. Poppe M, Feller SM, Romer G, Wessler S (2007) Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* 26: 3462-3472.
438. Tammer I, Brandt S, Hartig R, Konig W, Backert S (2007) Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* 132: 1309-1319.
439. Mueller D, Tegtmeyer N, Brandt S, Yamaoka Y, De Poire E, et al. (2012) c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Invest* 122: 1553-1566.
440. Mohi MG, Neel BG (2007) The role of Shp2 (PTPN11) in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17: 23-30.
441. Ren S, Higashi H, Lu H, Azuma T, Hatakeyama M (2006) Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells. *J Biol Chem* 281: 32344-32352.
442. Bourzac KM, Botham CM, Guillemin K (2007) *Helicobacter pylori* CagA induces AGS cell elongation through a cell retraction defect that is independent of Cdc42, Rac1, and Arp2/3. *Infect Immun* 75: 1203-1213.
443. Moese S, Selbach M, Brinkmann V, Karlas A, Haimovich B, et al. (2007) The *Helicobacter pylori* CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin. *Cell Microbiol* 9: 1148-1161.
444. Tsutsumi R, Takahashi A, Azuma T, Higashi H, Hatakeyama M (2006) Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol Cell Biol* 26: 261-276.
445. Tegtmeyer N, Wittelsberger R, Hartig R, Wessler S, Martinez-Quiles N, et al. (2011) Serine phosphorylation of cortactin controls focal adhesion kinase activity and cell scattering induced by *Helicobacter pylori*. *Cell Host Microbe* 9: 520-531.
446. Tsutsumi R, Higashi H, Higuchi M, Okada M, Hatakeyama M (2003) Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol Chem* 278: 3664-3670.
447. Suzuki M, Mimuro H, Suzuki T, Park M, Yamamoto T, et al. (2005) 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.
448. Selbach M, Moese S, Hurwitz R, Hauck CR, Meyer TF, et al. (2003) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J* 22: 515-528.

449. Brandt S, Shafikhani S, Balachandran P, Jin S, Hartig R, et al. (2007) Use of a novel coinfection system reveals a role for Rac1, H-Ras, and CrkII phosphorylation in *Helicobacter pylori*-induced host cell actin cytoskeletal rearrangements. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50: 190-205.
450. Hatakeyama M (2008) SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 11: 30-37.
451. Tsuda M, Makino Y, Iwahara T, Nishihara H, Sawa H, et al. (2004) Crk associates with ERM proteins and promotes cell motility toward hyaluronic acid. *J Biol Chem* 279: 46843-46850.
452. Selbach M, Paul FE, Brandt S, Guye P, Daumke O, et al. (2009) Host cell interactome of tyrosine-phosphorylated bacterial proteins. *Cell Host Microbe* 5: 397-403.
453. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, et al. (2007) *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.
454. Franco AT, Israel DA, Washington MK, Krishna U, Fox JG, et al. (2005) Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10646-10651.
455. Oliveira MJ, Costa AM, Costa AC, Ferreira RM, Sampaio P, et al. (2009) CagA associates with c-Met, E-cadherin, and p120-catenin in a multiproteic complex that suppresses *Helicobacter pylori*-induced cell-invasive phenotype. *J Infect Dis* 200: 745-755.
456. Churin Y, Al-Ghoul L, Kepp O, Meyer TF, Birchmeier W, et al. (2003) *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J Cell Biol* 161: 249-255.
457. Suzuki M, Mimuro H, Kiga K, Fukumatsu M, Ishijima N, et al. (2009) *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host Microbe* 5: 23-34.
458. Snider JL, Cardelli JA (2009) *Helicobacter pylori* induces cancer cell motility independent of the c-Met receptor. *J Carcinog* 8: 7.
459. Mimuro H, Suzuki T, Tanaka J, Asahi M, Haas R, et al. (2002) Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol Cell* 10: 745-755.
460. Gale NW, Kaplan S, Lowenstein EJ, Schlessinger J, Bar-Sagi D (1993) Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature* 363: 88-92.
461. Hirata Y, Maeda S, Mitsuno Y, Tateishi K, Yanai A, et al. (2002) *Helicobacter pylori* CagA protein activates serum response element-driven transcription independently of tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology* 123: 1962-1971.
462. Botham CM, Wandler AM, Guillemin K (2008) A transgenic *Drosophila* model demonstrates that the *Helicobacter pylori* CagA protein functions as a eukaryotic Gab adaptor. *PLoS Pathog* 4: e1000064.
463. Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, et al. (2007) *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* 447: 330-333.
464. Zeaiter Z, Cohen D, Musch A, Bagnoli F, Covacci A, et al. (2008) 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.
465. Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, Ohba Y, Takahashi M, et al. (2009) *Helicobacter pylori* CagA causes mitotic impairment and induces chromosomal instability. *J Biol Chem* 284: 22166-22172.

466. Lu H, Murata-Kamiya N, Saito Y, Hatakeyama M (2009) Role of partitioning-defective 1/microtubule affinity-regulating kinases in the morphogenetic activity of *Helicobacter pylori* CagA. *J Biol Chem* 284: 23024-23036.
467. Wei J, Nagy TA, Vilgelm A, Zaika E, Ogden SR, et al. Regulation of p53 tumor suppressor by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 139: 1333-1343.
468. Kaplan-Turkoz B, Jimenez-Soto LF, Dian C, Ertl C, Remaut H, et al. (2012) Structural insights into *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA interaction with beta1 integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 14640-14645.
469. Hayashi T, Senda M, Morohashi H, Higashi H, Horio M, et al. (2012) Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA. *Cell Host Microbe* 12: 20-33.
470. Hayashi T, Morohashi H, Hatakeyama M (2013) Bacterial EPIYA effectors--where do they come from? What are they? Where are they going? *Cell Microbiol* 15: 377-385.
471. Nesic D, Miller MC, Quinkert ZT, Stein M, Chait BT, et al. (2010) *Helicobacter pylori* CagA inhibits PAR1-MARK family kinases by mimicking host substrates. *Nat Struct Mol Biol* 17: 130-132.
472. Grangeasse C, Cozzone AJ, Deutscher J, Mijakovic I (2007) Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem Sci* 32: 86-94.
473. Safari F, Murata-Kamiya N, Saito Y, Hatakeyama M (2011) Mammalian Pragmin regulates Src family kinases via the Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) motif that is exploited by bacterial effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14938-14943.
474. Mock JR, Vakevainen M, Deng K, Latimer JL, Young JA, et al. (2005) *Haemophilus ducreyi* targets Src family protein tyrosine kinases to inhibit phagocytic signaling. *Infect Immun* 73: 7808-7816.
475. Kuck D, Kolmerer B, Iking-Konert C, Krammer PH, Stremmel W, et al. (2001) Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun* 69: 5080-5087.
476. Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM, Jr. (2003) Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res* 63: 951-957.
477. Nakayama M, Kimura M, Wada A, Yahiro K, Ogushi K, et al. (2004) *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. *J Biol Chem* 279: 7024-7028.
478. Gionchetti P, Vaira D, Campieri M, Holton J, Menegatti M, et al. (1994) Enhanced mucosal interleukin-6 and -8 in *Helicobacter pylori*-positive dyspeptic patients. *Am J Gastroenterol* 89: 883-887.
479. Crabtree JE, Wyatt JI, Trejdosiewicz LK, Peichl P, Nichols PH, et al. (1994) Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J Clin Pathol* 47: 61-66.
480. Sharma SA, Tummuru MK, Miller GG, Blaser MJ (1995) Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation *in vitro*. *Infect Immun* 63: 1681-1687.
481. Crabtree JE, Xiang Z, Lindley IJ, Tompkins DS, Rappuoli R, et al. (1995) Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a *cagA* negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 48: 967-969.
482. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, et al. (1996) *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14648-14653.
483. Shibayama K, Arakawa Y (2004) [*Helicobacter pylori* infection and epithelial cell signaling in gastric pathogenesis]. *Nihon Saikingaku Zasshi* 59: 415-424.

484. Atherton JC, Blaser MJ (2009) Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest* 119: 2475-2487.
485. Hirata Y, Ohmae T, Shibata W, Maeda S, Ogura K, et al. (2006) MyD88 and TNF receptor-associated factor 6 are critical signal transducers in *Helicobacter pylori*-infected human epithelial cells. *J Immunol* 176: 3796-3803.
486. Schweitzer K, Sokolova O, Bozko PM, Naumann M (2010) *Helicobacter pylori* induces NF-kappaB independent of CagA. *EMBO Rep* 11: 10-11; author reply 11-12.
487. Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, et al. (2001) 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.
488. Nozawa Y, Nishihara K, Peek RM, Nakano M, Uji T, et al. (2002) Identification of a signaling cascade for interleukin-8 production by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 64: 21-30.
489. Argent RH, Hale JL, El-Omar EM, Atherton JC (2008) Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *J Med Microbiol* 57: 1062-1067.
490. Foryst-Ludwig A, Naumann M (2000) p21-activated kinase 1 activates the nuclear factor kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase-Ikappa B kinases NF-kappa B pathway and proinflammatory cytokines in *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem* 275: 39779-39785.
491. Neumann M, Foryst-Ludwig A, Klar S, Schweitzer K, Naumann M (2006) The PAK1 autoregulatory domain is required for interaction with NIK in *Helicobacter pylori*-induced NF-kappaB activation. *Biol Chem* 387: 79-86.
492. Maeda S, Yoshida H, Ogura K, Mitsuno Y, Hirata Y, et al. (2000) *H. pylori* activates NF-kappaB through a signaling pathway involving IkappaB kinases, NF-kappaB-inducing kinase, TRAF2, and TRAF6 in gastric cancer cells. *Gastroenterology* 119: 97-108.
493. Mori N, Ueda A, Geleziunas R, Wada A, Hirayama T, et al. (2001) Induction of monocyte chemoattractant protein 1 by *Helicobacter pylori* involves NF-kappaB. *Infect Immun* 69: 1280-1286.
494. Takeshima E, Tomimori K, Kawakami H, Ishikawa C, Sawada S, et al. (2009) NF-kappaB activation by *Helicobacter pylori* requires Akt-mediated phosphorylation of p65. *BMC Microbiol* 9: 36.
495. Sharma SA, Tummuru MK, Blaser MJ, Kerr LD (1998) Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J Immunol* 160: 2401-2407.
496. Brandt S, Kwok T, Hartig R, Konig W, Backert S (2005) NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9300-9305.
497. Lim JW, Kim KH, Kim H (2009) alphaPix interacts with *Helicobacter pylori* CagA to induce IL-8 expression in gastric epithelial cells. *Scand J Gastroenterol* 44: 1166-1172.
498. Baek HY, Lim JW, Kim H (2007) Interaction between the *Helicobacter pylori* CagA and alpha-Pix in gastric epithelial AGS cells. *Ann N Y Acad Sci* 1096: 18-23.
499. Lamb A, Yang XD, Tsang YH, Li JD, Higashi H, et al. (2009) *Helicobacter pylori* CagA activates NF-kappaB by targeting TAK1 for TRAF6-mediated Lys 63 ubiquitination. *EMBO Rep* 10: 1242-1249.
500. Watanabe T, Asano N, Fichtner-Feigl S, Gorelick PL, Tsuji Y, et al. (2010) NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. *J Clin Invest* 120: 1645-1662.

501. Kaparakis M, Turnbull L, Carneiro L, Firth S, Coleman HA, et al. (2010) Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cell Microbiol* 12: 372-385.
502. Enninga J, Mounier J, Sansonetti P, Tran Van Nhieu G (2005) Secretion of type III effectors into host cells in real time. *Nat Methods* 2: 959-965.
503. Satomi S, Yamakawa A, Matsunaga S, Masaki R, Inagaki T, et al. (2006) Relationship between the diversity of the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* and gastric cancer in Okinawa, Japan. *J Gastroenterol* 41: 668-673.
504. Lesouhaitier O, Chiappe A, Rossier MF (2001) Aldosterone increases T-type calcium currents in human adrenocarcinoma (H295R) cells by inducing channel expression. *Endocrinology* 142: 4320-4330.
505. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
506. Fock KM, Ang TL (2010) Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol Hepatol* 25: 479-486.
507. Lewis MP (2009) *Ethnologue: Languages of the World, Sixteenth edition.*: Dallas, Texas: SIL International.
508. Breurec S, Guillard B, Hem S, Papadakos KS, Brisse S, et al. (2011) Expansion of European *vacA* and *cagA* alleles to East-Asian *Helicobacter pylori* strains in Cambodia. *Infect Genet Evol* 11: 1899-1905.
509. Olbermann P, Josenhans C, Moodley Y, Uhr M, Stamer C, et al. (2010) A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *PLoS Genet* 6: e1001069.
510. Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, et al. (1998) Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 28: 37-53.
511. Truong BX, Mai VT, Tanaka H, Ly le T, Thong TM, et al. (2009) Diverse characteristics of the *CagA* gene of *Helicobacter pylori* strains collected from patients from southern vietnam with gastric cancer and peptic ulcer. *J Clin Microbiol* 47: 4021-4028.
512. Uchida T, Nguyen LT, Takayama A, Okimoto T, Kodama M, et al. (2009) Analysis of virulence factors of *Helicobacter pylori* isolated from a Vietnamese population. *BMC Microbiol* 9: 175.
513. Yamaoka Y (2010) Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7: 629-641.
514. Yamaoka Y, Orito E, Mizokami M, Gutierrez O, Saitou N, et al. (2002) *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Lett* 517: 180-184.
515. Latifi-Navid S, Ghorashi SA, Siavoshi F, Linz B, Massarrat S, et al. (2010) Ethnic and geographic differentiation of *Helicobacter pylori* within Iran. *PLoS One* 5: e9645.
516. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Blaser MJ, Quint WG (1999) Distinct variants of *Helicobacter pylori* *cagA* are associated with *vacA* subtypes. *J Clin Microbiol* 37: 2306-2311.
517. van Vliet AH, Rock JD, Madeleine LN, Ketley JM (2000) The iron-responsive regulator *Fur* of *Campylobacter jejuni* is expressed from two separate promoters. *FEMS Microbiol Lett* 188: 115-118.
518. Lee IO, Lee KH, Pyo JH, Kim JH, Choi YJ, et al. (2007) Anti-inflammatory effect of capsaicin in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Helicobacter* 12: 510-517.
519. Nomura AM, Perez-Perez GI, Lee J, Stemmermann G, Blaser MJ (2002) Relation between *Helicobacter pylori* *cagA* status and risk of peptic ulcer disease. *Am J Epidemiol* 155: 1054-1059.

520. Witherell HL, Hansen S, Jellum E, Orentreich N, Vogelmann JH, et al. (1997) Risk for gastric lymphoma in persons with CagA+ and CagA- *Helicobacter pylori* infection. *J Infect Dis* 176: 1641-1644.
521. Maeda S, Akanuma M, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, et al. (2001) Distinct mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells. *J Biol Chem* 276: 44856-44864.
522. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, et al. (1995) Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 55: 2111-2115.
523. Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 320-344.
524. Ninomiya-Tsuji J, Kajino T, Ono K, Ohtomo T, Matsumoto M, et al. (2003) A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase. *J Biol Chem* 278: 18485-18490.
525. Wang Z, Yang Y, Yang H, Capo-Aponte JE, Tachado SD, et al. (2011) NF-kappaB feedback control of JNK1 activation modulates TRPV1-induced increases in IL-6 and IL-8 release by human corneal epithelial cells. *Mol Vis* 17: 3137-3146.
526. Pera T, Sami R, Zaagsma J, Meurs H (2011) TAK1 plays a major role in growth factor-induced phenotypic modulation of airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301: L822-828.
527. Merlin J, Evans BA, Csikasz RI, Bengtsson T, Summers RJ, et al. (2010) The M3-muscarinic acetylcholine receptor stimulates glucose uptake in L6 skeletal muscle cells by a CaMKK-AMPK-dependent mechanism. *Cell Signal* 22: 1104-1113.
528. Ayers S, Graf TN, Adcock AF, Kroll DJ, Matthew S, et al. (2011) Resorcylic acid lactones with cytotoxic and NF-kappaB inhibitory activities and their structure-activity relationships. *J Nat Prod* 74: 1126-1131.
529. Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, et al. (2005) Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6: 1087-1095.
530. Scholz R, Sidler CL, Thali RF, Winssinger N, Cheung PC, et al. (2010) Autoactivation of transforming growth factor beta-activated kinase 1 is a sequential bimolecular process. *J Biol Chem* 285: 25753-25766.
531. Moore MA, Attasara P, Khuhaprema T, Le TN, Nguyen TH, et al. (2010) Cancer epidemiology in mainland South-East Asia - past, present and future. *Asian Pac J Cancer Prev* 11 Suppl 2: 67-80.
532. Hill C, Soares P, Mormina M, Macaulay V, Clarke D, et al. (2007) A mitochondrial stratigraphy for island southeast Asia. *Am J Hum Genet* 80: 29-43.
533. Goh KL, Cheah PL, Md N, Quek KF, Parasakthi N (2007) Ethnicity and *H. pylori* as risk factors for gastric cancer in Malaysia: A prospective case control study. *Am J Gastroenterol* 102: 40-45.
534. Vilaichone RK, Mahachai V, Tumwasorn S, Wu JY, Graham DY, et al. (2004) Molecular epidemiology and outcome of *Helicobacter pylori* infection in Thailand: a cultural cross roads. *Helicobacter* 9: 453-459.
535. Schmidt HM, Andres S, Nilsson C, Kovach Z, Kaakoush NO, et al. (2010) The cag PAI is intact and functional but HP0521 varies significantly in *Helicobacter pylori* isolates from Malaysia and Singapore. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29: 439-451.
536. Jones KR, Joo YM, Jang S, Yoo YJ, Lee HS, et al. (2009) Polymorphism in the CagA EPIYA motif impacts development of gastric cancer. *J Clin Microbiol* 47: 959-968.

537. Chomvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, et al. (2008) Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA and babA2 genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int J Infect Dis* 12: 30-36.
538. Linpisarn S, Suwan W, Lertprasertsuk N, Koosirirat C, Steger HF, et al. (2007) *Helicobacter pylori* cagA, vacA and iceA genotypes in northern Thai patients with gastric disease. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 38: 356-362.
539. Tan HJ, Rizal AM, Rosmadi MY, Goh KL (2005) Distribution of *Helicobacter pylori* cagA, cagE and vacA in different ethnic groups in Kuala Lumpur, Malaysia. *J Gastroenterol Hepatol* 20: 589-594.
540. Tay CY, Mitchell H, Dong Q, Goh KL, Dawes IW, et al. (2009) Population structure of *Helicobacter pylori* among ethnic groups in Malaysia: recent acquisition of the bacterium by the Malay population. *BMC Microbiol* 9: 126.
541. Argent RH, Thomas RJ, Letley DP, Rittig MG, Hardie KR, et al. (2008) Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors VacA and CagA. *J Med Microbiol* 57: 145-150.
542. Tegtmeyer N, Zabler D, Schmidt D, Hartig R, Brandt S, et al. (2009) Importance of EGF receptor, HER2/Neu and Erk1/2 kinase signalling for host cell elongation and scattering induced by the *Helicobacter pylori* CagA protein: antagonistic effects of the vacuolating cytotoxin VacA. *Cell Microbiol* 11: 488-505.
543. Yokoyama K, Higashi H, Ishikawa S, Fujii Y, Kondo S, et al. (2005) 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 U S A* 102: 9661-9666.
544. Cavalli-Sforza LL (1998) The DNA revolution in population genetics. *Trends Genet* 14: 60-65.
545. Cavalli-Sforza LL, Feldman MW (2003) The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. *Nat Genet* 33 Suppl: 266-275.
546. Wirth T, Meyer A, Achtman M (2005) Deciphering host migrations and origins by means of their microbes. *Mol Ecol* 14: 3289-3306.
547. Pavesi A (2005) Utility of JC polyomavirus in tracing the pattern of human migrations dating to prehistoric times. *J Gen Virol* 86: 1315-1326.
548. Holmes EC (2004) The phylogeography of human viruses. *Mol Ecol* 13: 745-756.
549. zur Hausen H (1989) Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res* 49: 4677-4681.
550. Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, et al. (1992) Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* 66: 2057-2066.
551. Sugimoto C, Hasegawa M, Kato A, Zheng HY, Ebihara H, et al. (2002) Evolution of human Polyomavirus JC: implications for the population history of humans. *J Mol Evol* 54: 285-297.
552. Yogo Y, Sugimoto C, Zheng HY, Ikegaya H, Takasaka T, et al. (2004) JC virus genotyping offers a new paradigm in the study of human populations. *Rev Med Virol* 14: 179-191.
553. Astrom KE, Mancall EL, Richardson EP, Jr. (1958) Progressive multifocal leukoencephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. *Brain* 81: 93-111.
554. Chesters PM, Heritage J, McCance DJ (1983) Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis* 147: 676-684.

555. Kunitake T, Kitamura T, Guo J, Taguchi F, Kawabe K, et al. (1995) Parent-to-child transmission is relatively common in the spread of the human polyomavirus JC virus. *J Clin Microbiol* 33: 1448-1451.
556. Suzuki M, Zheng HY, Takasaka T, Sugimoto C, Kitamura T, et al. (2002) Asian genotypes of JC virus in Japanese-Americans suggest familial transmission. *J Virol* 76: 10074-10078.
557. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, et al. (2000) Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* 17: 1467-1482.
558. Joy DA, Feng X, Mu J, Furuya T, Chotivanich K, et al. (2003) Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science* 300: 318-321.
559. Kittler R, Kayser M, Stoneking M (2003) Molecular evolution of *Pediculus humanus* and the origin of clothing. *Curr Biol* 13: 1414-1417.
560. Reed DL, Smith VS, Hammond SL, Rogers AR, Clayton DH (2004) Genetic analysis of lice supports direct contact between modern and archaic humans. *PLoS Biol* 2: e340.
561. Harris SR, Feil EJ, Holden MT, Quail MA, Nickerson EK, et al. (2010) Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science* 327: 469-474.
562. Croucher NJ, Harris SR, Fraser C, Quail MA, Burton J, et al. (2011) Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* 331: 430-434.
563. Mutreja A, Kim DW, Thomson NR, Connor TR, Lee JH, et al. (2011) Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature* 477: 462-465.
564. Holt KE, Baker S, Weill FX, Holmes EC, Kitchen A, et al. (2012) *Shigella sonnei* genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe. *Nat Genet* 44: 1056-1059.
565. He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, et al. (2013) Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat Genet* 45: 109-113.
566. Bos KI, Schuenemann VJ, Golding GB, Burbano HA, Waglechner N, et al. (2011) A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Nature* 478: 506-510.
567. Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, et al. (2013) Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet* 45: 1176-1182.
568. Shetty SA, Marathe NP, Shouche YS (2013) Opportunities and challenges for gut microbiome studies in the Indian population. *Microbiome* 1: 24.
569. Huang MT, Gorman CM (1990) Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Res* 18: 937-947.
570. Buchman AR, Berg P (1988) Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. *Mol Cell Biol* 8: 4395-4405.
571. Qin JY, Zhang L, Clift KL, Hular I, Xiang AP, et al. (2010) Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One* 5: e10611.
572. Takebe Y, Seiki M, Fujisawa J, Hoy P, Yokota K, et al. (1988) SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol* 8: 466-472.
573. Adams SR, Campbell RE, Gross LA, Martin BR, Walkup GK, et al. (2002) New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling *in vitro* and *in vivo*: synthesis and biological applications. *J Am Chem Soc* 124: 6063-6076.
574. Pattis I, Weiss E, Laugks R, Haas R, Fischer W (2007) 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.

575. Oldani A, Cormont M, Hofman V, Chiozzi V, Oregioni O, et al. (2009) *Helicobacter pylori* counteracts the apoptotic action of its VacA toxin by injecting the CagA protein into gastric epithelial cells. *PLoS Pathog* 5: e1000603.
576. Papadakos KS, Sougleri IS, Mentis AF, Sgouras DN (2013) A mutagenesis method for the addition and deletion of highly repetitive DNA regions: the paradigm of EPIYA motifs in the *cagA* gene of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 18: 229-241.
577. Mattila P, Korpela J, Tenkanen T, Pitkanen K (1991) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase--an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. *Nucleic Acids Res* 19: 4967-4973.
578. Pyndiah S, Menard A, Zerbib F, Megraud F (2005) Evaluation of the homologous recombination in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 10: 185-192.
579. Geiser M, Cebe R, Drewello D, Schmitz R (2001) Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase. *Biotechniques* 31: 88-90, 92.
580. Kurashima Y, Murata-Kamiya N, Kikuchi K, Higashi H, Azuma T, et al. (2008) Deregulation of beta-catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA requires the CagA-multimerization sequence. *Int J Cancer* 122: 823-831.
581. Makarova O, Kamberov E, Margolis B (2000) Generation of deletion and point mutations with one primer in a single cloning step. *Biotechniques* 29: 970-972.
582. Wang W, Malcolm BA (1999) Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques* 26: 680-682.
583. Hofreuter D, Odenbreit S, Henke G, Haas R (1998) Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: identification and genetic characterization of the *comB* locus. *Mol Microbiol* 28: 1027-1038.
584. Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, Higashi H, Onoe K, et al. (2006) Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology* 130: 1181-1190.
585. Haas R, Meyer TF, van Putten JP (1993) Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol Microbiol* 8: 753-760.
586. Hofreuter D, Odenbreit S, Haas R (2001) Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol Microbiol* 41: 379-391.
587. Ferrero RL, Cussac V, Courcoux P, Labigne A (1992) Construction of isogenic urease-negative mutants of *Helicobacter pylori* by allelic exchange. *J Bacteriol* 174: 4212-4217.
588. Hatakeyama M (2008) Linking epithelial polarity and carcinogenesis by multitasking *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Oncogene* 27: 7047-7054.
589. Hatakeyama M (2006) The role of *Helicobacter pylori* CagA in gastric carcinogenesis. *Int J Hematol* 84: 301-308.
590. Kondo M, Osada H, Uchida K, Yanagisawa K, Masuda A, et al. (1998) Molecular cloning of human TAK1 and its mutational analysis in human lung cancer. *Int J Cancer* 75: 559-563.
591. Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, et al. (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398: 252-256.
592. Gorrell RJ, Guan J, Xin Y, Tafreshi MA, Hutton ML, et al. (2012) A novel NOD1- and CagA-independent pathway of interleukin-8 induction mediated by the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Cell Microbiol*.

593. Kumar Pachathundikandi S, Brandt S, Madassery J, Backert S (2011) Induction of TLR-2 and TLR-5 expression by *Helicobacter pylori* switches cagPAI-dependent signalling leading to the secretion of IL-8 and TNF-alpha. *PLoS One* 6: e19614.
594. Wei J, Nagy TA, Vilgelm A, Zaika E, Ogden SR, et al. (2010) Regulation of p53 tumor suppressor by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 139: 1333-1343.
595. Lamb A, Chen LF (2010) The many roads traveled by *Helicobacter pylori* to NFkappaB activation. *Gut Microbes* 1: 109-113.
596. Barrozo RM, Cooke CL, Hansen LM, Lam AM, Gaddy JA, et al. (2013) Functional plasticity in the type IV secretion system of *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog* 9: e1003189.
597. Stein M, Ruggiero P, Rappuoli R, Bagnoli F (2013) *Helicobacter pylori* CagA: From Pathogenic Mechanisms to Its Use as an Anti-Cancer Vaccine. *Front Immunol* 4: 328.
598. Bessede E, Staedel C, Acuna Amador LA, Nguyen PH, Chambonnier L, et al. (2013) *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Oncogene*.
599. Pillinger MH, Marjanovic N, Kim SY, Scher JU, Izmirly P, et al. (2005) Matrix metalloproteinase secretion by gastric epithelial cells is regulated by E prostaglandins and MAPKs. *J Biol Chem* 280: 9973-9979.
600. Varro A, Kenny S, Hemers E, McCaig C, Przemack S, et al. (2007) Increased gastric expression of MMP-7 in hypergastrinemia and significance for epithelial-mesenchymal signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G1133-1140.
601. Wroblewski LE, Noble PJ, Pagliocca A, Pritchard DM, Hart CA, et al. (2003) Stimulation of MMP-7 (matrilysin) by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells: role in epithelial cell migration. *J Cell Sci* 116: 3017-3026.
602. Krueger S, Hundertmark T, Kalinski T, Peitz U, Wex T, et al. (2006) *Helicobacter pylori* encoding the pathogenicity island activates matrix metalloproteinase 1 in gastric epithelial cells via JNK and ERK. *J Biol Chem* 281: 2868-2875.
603. Gottesman S, Storz G (2011) Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
604. Padalon-Brauch G, Hershberg R, Elgrably-Weiss M, Baruch K, Rosenshine I, et al. (2008) Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella typhimurium* show host-induced expression and role in virulence. *Nucleic Acids Res* 36: 1913-1927.
605. Pichon C, Felden B (2005) Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14249-14254.
606. De Lay N, Gottesman S (2009) The Crp-activated small noncoding regulatory RNA CyaR (RyeE) links nutritional status to group behavior. *J Bacteriol* 191: 461-476.
607. Wagner EG, Altuvia S, Romby P (2002) Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv Genet* 46: 361-398.
608. Brantl S (2007) Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol* 10: 102-109.
609. Hsu PD, Lander ES, Zhang F (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157: 1262-1278.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.1. ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ

Presence of Terminal EPIYA Phosphorylation Motifs in *Helicobacter pylori* CagA Contributes to IL-8 Secretion, Irrespective of the Number of Repeats

Konstantinos S. Papadakos¹, Ioanna S. Sougleri¹, Andreas F. Mentis¹, Efstathios Hatziloukas², Dionyssios N. Sgouras^{1*}

¹Laboratory of Medical Microbiology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece, ²Laboratory of Molecular Biology, Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina, Ioannina, Greece

Abstract

CagA protein contributes to pro-inflammatory responses during *H. pylori* infection, following its intracellular delivery to gastric epithelial cells. Here, we report for the first time in an isogenic background, on the subtle role of CagA phosphorylation on terminal EPIYA-C motifs in the transcriptional activation and expression of IL-8. We utilized isogenic *H. pylori* mutants of P12 reference strain, expressing CagA with varying number of EPIYA-C motifs and the corresponding phosphorylation defective EPIFA-C motifs while preserving intact the CM multimerization motifs. These mutants had been previously closely scrutinized in terms of type IV secretion system functionality, CagA translocation and its subsequent phosphorylation. Following infection of gastric epithelial cell lines, transcriptional activation of IL-8 gene and secreted IL-8 levels were found to be strictly dependent upon the functionality of the EPIYA-C phosphorylation motifs, as EPIFA-C phosphorylation-deficient CagA expression failed to induce full IL-8 transcriptional activity. Interestingly, levels of IL-8 gene activation and of secreted IL-8 were the same, irrespective of the number of EPIYA-C terminal repeats. We monitored IκBα phosphorylation and confirmed CagA involvement in NF-κB activation. Furthermore, we observed that presence of EPIYA-C functional phosphorylation motifs contributed to NF-κB activation. NF-κB upstream signaling events, such as early ERK1/2 and AKT activation were confirmed to be independent of EPIYA-C phosphorylation. On the contrary, use of TAK1 specific inhibitor 5Z-7-Oxozeaenol resulted in complete arrest of IL-8 secretion, in a dose-dependent manner, irrespective of CagA status. *H. pylori*-infected TAK1^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) failed to induce NF-κB activity, unlike the respective control MEFs. CagA and TAK1 were found to immunoprecipitate together, irrespective of CagA EPIYA-C status, thus confirming earlier reports of TAK1 and CagA protein interaction. Our data suggest that CagA may potentially interfere with TAK1 activity during NF-κB activation for IL-8 induction in early *H. pylori* infection.

Citation: Papadakos KS, Sougleri IS, Mentis AF, Hatziloukas E, Sgouras DN (2013) Presence of Terminal EPIYA Phosphorylation Motifs in *Helicobacter pylori* CagA Contributes to IL-8 Secretion, Irrespective of the Number of Repeats. PLoS ONE 8(2): e56291. doi:10.1371/journal.pone.0056291

Editor: Niyaz Ahmed, University of Hyderabad, India

Received: November 3, 2012; **Accepted:** January 7, 2013; **Published:** February 7, 2013

Copyright: © 2013 Papadakos et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Study was supported mainly by a Hellenic Pasteur Institute grant (HPI-922616) and in part by ANR 2006 ERANET Pathogenomics ANR-06-PATHO-007-01. KSP was supported throughout his studies by a Hellenic Pasteur Institute Ph.D. studentship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: sgouras@pasteur.gr

Introduction

Helicobacter pylori (*H. pylori*) colonize the gastric mucosa of 35–70% of people worldwide and remain the main etiologic factor for development of chronic active gastritis and peptic ulcer [1,2]. However, infection is usually asymptomatic in the vast majority of hosts, as virtually all carriers develop superficial chronic active gastritis, whereas only about 10% will suffer gastric or duodenal ulceration and 0.5–2% will develop gastric adenocarcinoma or B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) [3]. The presence of neutrophil polymorphs in a background of chronic inflammation remains the hallmark of *H. pylori* infection, because neutrophil activity is an almost universal phenomenon in *H. pylori* gastritis [4]. Neutrophils can be found in biopsy specimens, in virtually all cases of *H. pylori*-positive patients and they are a very sensitive indicator of the presence or absence of *H. pylori* because they disappear within days of cure of infection [4,5]. Interleukin 8 (IL-8), a CXC chemokine specific for neutrophil

granulocyte chemotaxis, has been shown to be upregulated in *H. pylori* infected patients [5,6] and to correlate with histological severity of gastritis [7]. Early reports have linked elevated inflammatory response and cytokine expression *in vivo*, to *cagA*-positive *H. pylori* strains [8]. CagA protein is a major *H. pylori* virulence factor which has gained much interest from a clinical point of view, as a marker of *H. pylori*-associated disease, having been shown to confer increased risk for development of atrophic gastritis, peptic ulcer, gastric cancer and lymphoma [1,3,9,10]. From a mechanistic standpoint, CagA activity in gastric epithelial cells has been shown to be associated with disruption of intercellular junctions and of gastric epithelial cell polarity, increased cell motility and elongation cellular phenotypes, as well as propagation of signaling pathways relating to proliferation and inflammation in the gastric epithelium [11]. To this effect, CagA has been reported to interact with a number of intracellular key molecules, such as Shp2, Ras GTPase activating protein (Ras-

GAP), phosphoinositide-3 (PI3)-kinase, and the adaptor proteins Crk, Grb2 and Crb7 [2, 15].

The gene coding for CagA resides at the end of the *cag* Pathogenicity Island (*cagPAI*), a gene cluster of 40 Kbps that altogether codes for a type IV secretion system (T4SS), via which CagA, is translocated from the epithelium-adhered bacteria into gastric epithelial cells [16]. Early reports clearly correlate IL-8 induction in gastric epithelial cells to a functional *cagPAI* [17]. Once inside the cell, CagA is phosphorylated by host cellular kinases Src [18,19] and Abl [20,21], on repeating Glutamic Acid-Proline-Isoleucine-Tyrosine-Alanine (EPIYA) tyrosine phosphorylation motifs located at the carboxyl terminus of the protein. EPIYA motifs found in *H. pylori* strains of Western origin constitute three distinct types according to the surrounding amino acid sequence, namely EPIYA-A (EPIYAKVNKKK(A/T/V/S)GQ), EPIYA-B (EPIYA/T(Q/K)YAKKVNAKI) and terminal EPIYA-C (EPIYATIDDLG) [22]. These motifs vary considerably among strains regarding both the type and number, which may account for the differences observed in the pathogenic potential of *H. pylori* [23]. Hierarchic intracellular phosphorylation of CagA has been recently demonstrated, with c-Src only phosphorylating EPIYA-C motifs, whereas c-Abl phosphorylating EPIYA-A, EPIYA-B, and EPIYA-C [24]. Moreover, further analysis revealed that CagA molecules were phosphorylated on 1 or 2 EPIYA motifs, but never simultaneously on 3 motifs [24]. The number of EPIYA-C motifs has been suggested to determine the levels of CagA phosphorylation [25], to induce increasing levels *H. pylori*-related cytoskeletal rearrangements in epithelial cells *in vitro* [25,26], and to confer oncogenic potential [22]. However, we have reported that in children [27] and in adult patients [28] the number of CagA EPIYA-C motifs does not correlate to more severe inflammatory response in the lamina propria. Moreover, in adults the presence of one CagA EPIYA-C site was found to be an independent risk factor for presence of gastro-duodenal ulceration [28].

In early studies involving *in vitro H. pylori* infection of gastric epithelial cells, proteins encoded by the *cagPAI*, with the exception of CagA, were shown to be required for IL-8 secretion and that IL-8 induction was regulated by the NF- κ B pathway [9,10]. In addition, *H. pylori* peptidoglycans delivered through the type IV secretion system, identified by intracellular Nod1 receptor were also reported responsible for activating NF- κ B leading to IL-8 induction [29]. It was later that CagA protein, was also recognized to contribute to the induction of IL-8 in gastric epithelial cells, through the activation of NF- κ B pathway [30]. Others suggested that IL-8 activation was not dependent upon CagA phosphorylation on EPIYA-C motifs but on the highly conserved amino acid sequence FPLKRRHDKVDDLSK termed as CRPIA [31], earlier identified as CagA multimerization (CM) motif [32] which has since been identified as a MARK2-protein kinase inhibitor (MKI) [33]. CagA has also been suggested to stimulate NF- κ B induction and transcriptional activation of IL-8, through interaction and subsequent activation of TAK1 and this was mediated by TRAF6-I κ B 63-ubiquitination [34]. However, *H. pylori*-induced pro-inflammatory responses remain a controversial issue, due to emerging contradictory reports [35]. Very recently CagL, has been suggested to induce secretion of interleukin-3 (IL-3) independently of CagA translocation and peptidoglycan-sensing nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) signaling [36].

The aim of this study was to investigate CagA involvement in the secretion of IL-8 and more specifically to explore the molecular pathway by which phosphorylation on CagA terminal EPIYA-C motifs could potentially contribute to IL-8 gene induction. For this purpose, and in order to study CagA expression

inside the epithelial cells through an infection, rather than transfection system, a series of *H. pylori* isogenic mutants based on P12 reference strain were produced, expressing CagA protein with varying numbers of phosphorylation-functional (EPIYA-C) and phosphorylation-deficient EPIYA motifs, while keeping the CM motifs intact. These strains were meticulously evaluated beforehand for their ability to adhere equally well on gastric epithelial cells, induce pilus formation and functionally translocate CagA protein inside epithelial cells [37]. Utilizing these strains we were able to show that CagA EPIYA-C phosphorylation is required for full transcriptional activation of IL-8 gene, irrespective of the number of these repeating units at the carboxyl-terminus of CagA. Moreover, our data suggest that CagA protein may contribute to NF- κ B activation, potentially through interference with TAK1 and independently of ERK1/2 and AKT mediated NF- κ B activation.

Materials and Methods

H. pylori strains

Based upon *H. pylori* P12 reference strain, which possesses CagA with an EPIYA-ABCC combination, a number of isogenic *H. pylori* mutants expressing CagA protein with a variable number of EPIYA-C motifs such as AB, ABC, ABCCC and the respective phosphorylation-deficient EPIYA mutants (Figure 1A and Figure 1B) were constructed. A CagA knock out (P12CagAKO) strain was constructed by interruption of *cagA* gene sequence following insertion of a chloramphenicol cassette [38]. A T4SS-defective *cagE* knock-out mutant of P12 (P12CagEKO) was kindly provided by Professor R. Haas. These strains were meticulously characterized in terms of growth rates and adhesion rates to AGS gastric epithelial cells (ATCC CRL 1739), as well as T4SS functionality, CagA expression and phosphorylation and the ability to induce scattering and elongation phenotype [37].

Culture of *H. pylori* and cell lines

H. pylori strains were cultured on Columbia Blood Agar (Oxoid) plates containing antibiotics, supplemented with 5% v/v horse blood and 1% v/v Vitox (Oxoid) under microaerophilic conditions (CampyGen, Oxoid) at 37°C, as described before [27].

AGS gastric epithelial cell line (ATCC CRL 1739) were cultured in 75 cm² flasks (Corning) in RPMI 1640 medium (Life Technologies) containing antibiotics (penicillin 10 U/ml, streptomycin 10 mg/ml) and supplemented with 10% FBS (Life Technologies).

TAK1^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and the respective control MEFs [39] were kindly provided by Professor S. Akira and were cultured as described in their publication.

In vitro infection and protein immunodetection

Gastric epithelial cell lines (AGS) were infected with *H. pylori* at MOI 100. Briefly, 4 × 10⁵ cells were seeded in 6-well plates and were left to adhere overnight. On the following day, two hours prior to infection, cells were washed with PBS (1x) and the medium was replaced with fresh, antibiotic free, RPMI 1640 containing 10% FBS. *H. pylori* strains were suspended in antibiotic free RPMI 1640 containing 10% FBS, adjusted to a concentration of approximately 10⁸ cfu/ml (OD_{600nm} = 0.740) and left for an hour to recover. Bacterial suspensions (100 μ l) were used to infect gastric epithelial cells within 2 ml total volume. At collection times, total protein lysates were obtained in ice-cold lysis RIPA buffer as described before [27]. Equal protein amounts of lysates were separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes (Immobilon P, Merck Millipore). Antibodies against

CagA EPIYA-C Motifs Contribute to IL-8 Activation

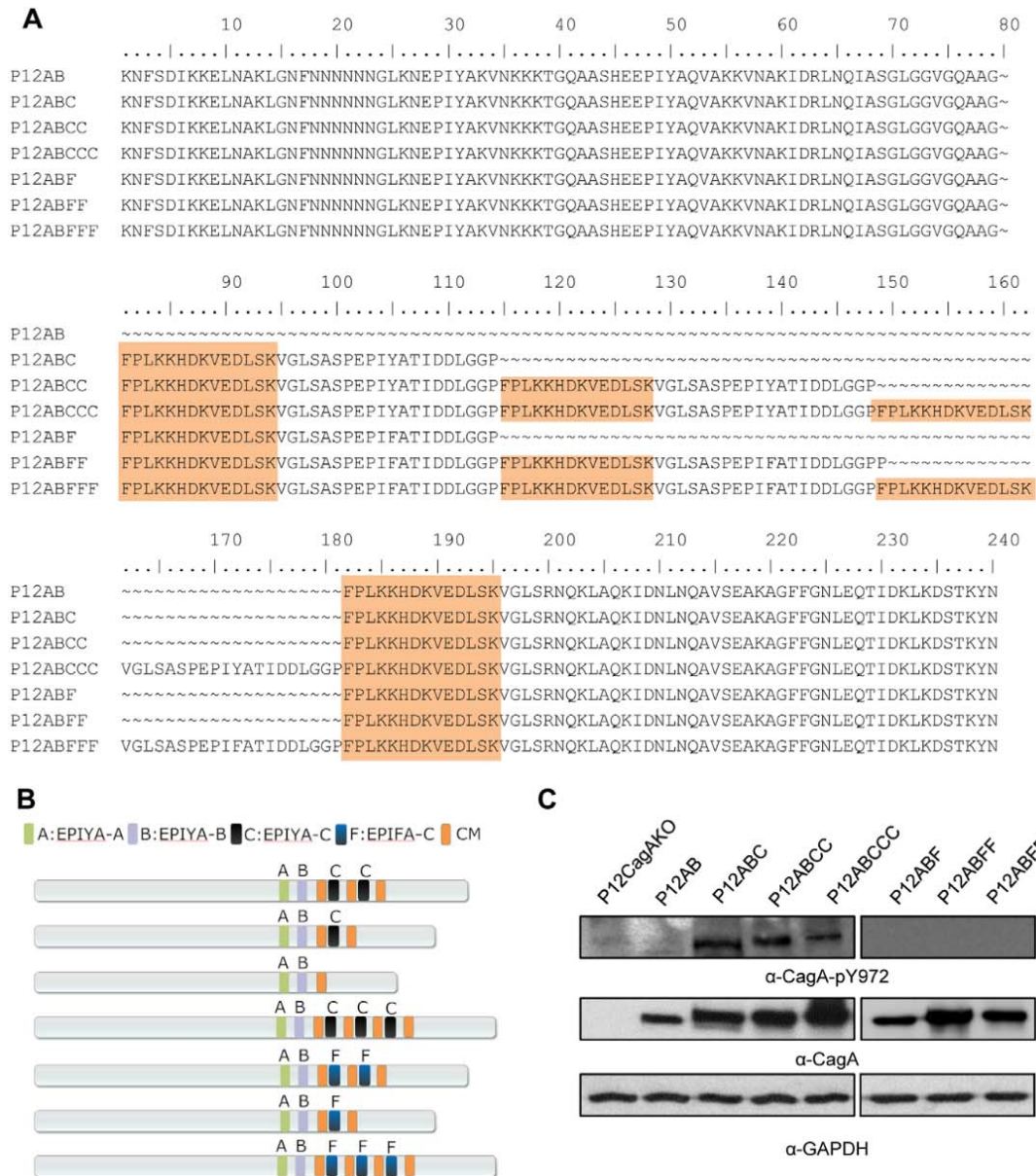


Figure 1. CagA EPIYA-C phosphorylation-functional and -defective *H. pylori* mutant strains. (A) Deduced CagA amino acid sequences, following nucleotide sequencing, depicting the EPIYA and EPIYA mutant motifs, as well as the MARK2-kinase inhibitor (CM) (shaded region). (B) Schematic representation of CagA protein expressed by the corresponding mutants. (C) Determination of CagA tyrosine phosphorylation by western blot utilizing α -CagA-pY972 antibody, which recognizes phosphorylated EPIYA-C motifs. CagA and GAPDH expression is also depicted, for control purposes.
doi:10.1371/journal.pone.0056291.g001

IKKa, phospho-IKBa (Ser32/36), phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), TAK1, phospho-TAK1 (Thr187), AKT, phospho-AKT (Ser473) (all purchased from Cell Signaling), CagA (polyclonal,

Austral Biologicals) and GAPDH (Merck Millipore), were used according to suppliers' instructions. Specific antibody phospho-CagA (Tyr 972), which recognizes specifically phosphorylated

CagA at EPIYA-C motifs, was kindly provided by Professor S. Backert [40]. Quantity One software package (Bio-Rad) was utilized for band densitometry.

Immunoprecipitation

AGS cells (1×10^6) were seeded in 25 cm² flasks and were infected with *H. pylori* mutant strains at MOI 100. Following 1h of infection, cells were lysed by addition of 500 μ l of NP40 lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors as described before [27]. Lysates were pre-cleared following incubation with 30 μ l of Protein A-Sepharose from *Staphylococcus aureus* (Sigma). Respective immunoprecipitations were performed by addition of CagA polyclonal antibody (Austral Biologicals) or TAK1 monoclonal antibody (Cell Signaling) and consequent capture of the protein complex using 30 μ l of Protein A-Sepharose. CagA detection by western blot was performed utilizing an anti-CagA monoclonal antibody supplied by Austral Biologicals or an anti-CagA monoclonal antibody raised against amino acids 1–300 supplied by Santa Cruz Biotechnology.

Quantification of IL-8 gene expression in *H. pylori* infected cells

Quantification of IL-8 gene expression relative to GAPDH, in *H. pylori*-infected (MOI 100) and uninfected AGS cells, was determined by the comparative Ct method [41]. RNA samples were collected at 2, 4 and 24 hours post infection in triplicates using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). DNA sample contamination was eliminated with the use of RNase-Free DNase Set (Qiagen). cDNA was synthesized with M-MLV (Promega) reverse transcriptase (30U) in a reaction that contained 20 mM Tris (pH 8.4), 50 mM KCl, 3.75 mM MgCl₂, 500 μ M dNTPs, 0.4 μ M, random hexamers primers (Life Technologies), 80 U RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Life Technologies) and 22.2 μ l RNA. Quantitative Real Time PCR amplification was carried out in a Stratagene Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies), within 25 μ l reaction mixtures of Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Life Technologies), 0.5 μ M primers and 5 μ l cDNA. Previously described PCR primers for human IL-8 [42], and GAPDH [43] were used. Three independent experiments were conducted involving three replicates for each individual sample time point.

Determination of IL-8 levels and inhibitors

Culture supernatants collected at selected time points from *H. pylori*-infected AGS cells (MOI 100), were collected following centrifugation at 13,000 rpm [27]. IL-8 levels were determined by commercial ELISA (eBioscience) according to manufacturer's protocol. Experiments in the presence of 5Z-7-Oxozeanol (Merck) TAK1 specific inhibitor were carried out by addition of the inhibitor 2h prior to infection. Culture supernatants were collected at 4h post-infection. Initial experiments were conducted at a concentration range of 5–300 nM to determine the optimal concentration for TAK1 inhibition and then at 70nM thereof.

Results

Effect of EPIYA-C phosphorylation on IL-8 transcriptional activation and IL-8 secretion

In order to quantify potential effect of EPIYA-C phosphorylation on IL-8 induction we infected AGS cells with the whole range of mutant P12 strains, namely P12AB, P12ABC, P12ABCC (*wt*), P12ABCCC, P12ABF, P12ABFF, P12ABFFF, P12CagEKO and P12CagAKO. Expression of CagA protein as well as EPIYA-C

intracellular phosphorylation was observed at 2 hours post-infection (Figure 1C). IL-8 gene transcriptional activation was quantified at 2, 4, and 24 hours post-infection. Strains P12ABCCC, P12ABCC and P12ABC equally induced the highest levels of IL-8 transcription (20-, 20- and 12-fold respectively) compared to the uninfected control at 2 hours post-infection (Figure 2A). On the contrary, P12AB strain lacking the EPIYA-C phosphorylation sequences on CagA, induced IL-8 activation levels at 60-fold, a statistically significant reduction, compared to those induced by the strains P12ABCCC ($p=0.006$), P12ABCC ($p=0.007$) and P12ABC ($p=0.002$). Moreover, IL-8 induced activation by the strains expressing CagA with phosphorylation-deficient EPIYA-C, was approximately halved for strains P12ABF and P12ABFF (64- and 70-fold) and even further reduced for the P12ABFFF (24-fold) strain at levels lower than those observed even for the P12CagAKO strain (42-fold). At 4 hours post-infection, IL-8 activation induced by the P12ABCCC strain was maintained at much higher level (50-fold) compared to those observed for P12ABCC ($p=0.001$) and P12ABC strains ($p=0.0009$, Figure 2A). These strains as well as P12CagAKO, P12ABFF and P12ABF induced background levels. Interestingly, IL-8 activation induced by P12AB strain remained unaltered between 2 and 4 hours, a result repeatedly obtained in over 5 repetitions of the experiment, for which we can offer no explanation. In contrast P12ABFFF strain contributed to a marginal increment between 2 and 4 hours ($p=0.05$). At 24 hours post-infection IL-8 transcriptional activation in infected cells was at background levels for all strains (Figure 2A).

For the same experimental layout, we proceeded to determine IL-8 concentration in the supernatants of infected AGS gastric epithelial cell lines (Figure 2B). At 2 hours post-infection all strains induced similar amounts of IL-8 protein in the range of 600 pg/ml, with the exception of strains P12ABF or P12ABFF which exhibited significantly decreased levels (400 pg/ml) and P12ABFFF, for which levels of IL-8 protein were negligible and comparable to those observed for uninfected control cells (Figure 2B). Furthermore, P12ABFFF strain induced significantly lower levels of secreted IL-8 compared to all other strains, at 4 hours ($p=0.001$) as well as 24 hours ($p=0.004$) post-infection (Figure 2B). This characteristic delay in IL-8 secretion induced by strain P12ABFFF was apparent in all replicate experiments in which IL-8 levels secreted were found to be consistently lower than those observed even for the P12CagAKO strain. Similar results were obtained with another four independent P12ABFFF clones isolated during production (data not shown). At 24h all strains with functional EPIYA-C motifs (P12ABC, P12ABCC, P12ABCCC) induced approximately the same levels of IL-8 (Figure 2B), in any case significantly higher ($p=0.011$) than those levels observed for the strain P12AB.

Collectively, these results suggest that phosphorylation of CagA in terminal EPIYA-C motifs contributes to IL-8 secretion by gastric epithelial cells. Most specifically, mutation of these EPIYA-C motifs, while keeping the CM motifs intact, leads to a characteristic delay in the initial transactivation of IL-8 gene, which consequently results to lower levels (approximately 2-fold reduction) of secreted IL-8, compared to the fully functional counterparts. Furthermore, secreted levels of IL-8 protein were observed not to be dependent upon the number of CagA EPIYA-C motifs, as similar levels were secreted by strains with one, two or three EPIYA-C motifs.

CagA EPIYA-C Motifs Contribute to IL-8 Activation

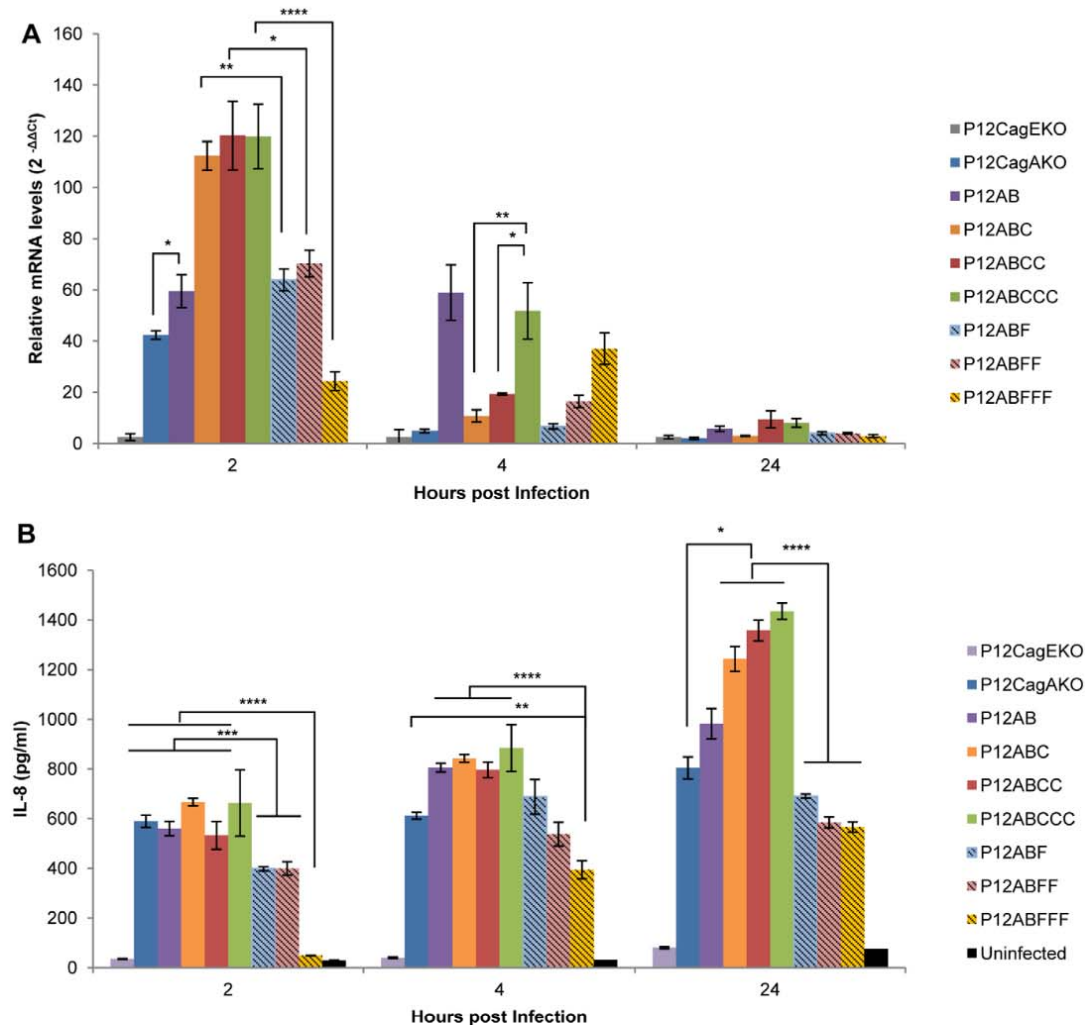


Figure 2. Effect of *H. pylori* infection on the induction and secretion of IL-8 by gastric epithelial cells. (A) Transcriptional activation of IL-8 gene in AGS cells, infected by the corresponding *H. pylori* mutant strains, expressing CagA with variable numbers of functional (EPIYA-C) or defective (EPIFA-C) phosphorylation motifs. IL-8 gene transcriptional activation was determined by a Quantitative Real Time PCR at 2, 4 and 24h post-infection. Statistical analysis was done by Student t-test and levels of significance depicted are * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 , **** <0.0001 . (B) IL-8 concentration levels determined by ELISA, in the supernatants of AGS cells, infected by *H. pylori* mutant strains. Statistical analysis and levels of significance as in (A). doi:10.1371/journal.pone.0056291.g002

NF-κB activation triggers the IL-8 induction with respect to EPIYA phosphorylation

Induction of IL-8 following *H. pylori* infection of gastric epithelial cells has been attributed to NF-κB activation [9,10,30,34,44,45]. In our study, we monitored NF-κB activation by determination of the kinetics of the Ser32/36 phosphorylation of its inhibitor IκBα, leading it to proteasome degradation [23]. As transcriptional activation and production of IL-8 proved to be independent of the number of EPIYA-C motifs, we proceeded to conduct the experiments utilizing P12ABCCC and the respective P12ABFFF mutant, as well as P12AB and the P12CagAKO

strains. Following infection of AGS cells over 24 hours, P12ABCCC strain induced the highest phosphorylation of IκBα amongst all strains, in a time-dependent manner (Figure 3). Most specifically, increased IκBα phosphorylation was evident as early as 15 min post-infection, reaching a peak at about 1.5 hours and decreasing thereof to reach background levels at 24 hours. Concomitantly, a marginal decrease in IκBα expression levels was evident during the early stages post-infection (15-90 min) compared to the late ones (2-24 hours). Similar induction kinetics of IκBα phosphorylation was observed for strains P12CagAKO and P12AB, although levels were lower than those observed for

P12ABCCC (Figure 3). On the contrary, strain P12ABFFF expressing CagA with phosphorylation-deficient motifs, exhibited the lowest IκBα phosphorylation levels while IκBα expression remained constant, throughout the experimental period (Figure 3). Collectively, these results illustrate that following infection of gastric epithelial cells with *H. pylori* strains, a higher activation of NF-κB is evident in the presence on phosphorylated EPIYA-C motifs. NF-κB is also activated, yet at considerably lower levels, in the absence of CagA expression or CagA phosphorylation and in the cases where EPIYA-C motifs are totally absent. Moreover, kinetics of IκBα phosphorylation (Figure 3) and hence NF-κB activation, appear to be in absolute agreement with the observed IL-8 transcriptional activation patterns (Figure 2A).

ERK1/2 and AKT contribution to the activation of NF-κB following phosphorylation of CagA on EPIYA motifs

ERK1/2 activation in the CagA-dependent induction of IL-8 through NF-κB activation has been illustrated before [30]. In our study, we have monitored the kinetics of ERK1/2 activation by determination of phosphorylation at Thr202/Tyr204 [46]. Our results showed that in cells infected by P12ABCCC, as well as the

corresponding P12ABFFF phosphorylation-deficient mutant, ERK1/2 activation occurred at similar significantly higher levels compared to strains P12AB and P12CagAKO, during the initial stages of infection (mean difference at 30 min of 1.97 and 95%CI 0.80 to 3.14 [$P=0.006$], mean difference at 60 min of 1.06 and 95%CI of 0.27 to 1.84 [$P=0.004$], mean difference at 90 min of 1.140 and 95%CI of 0.48 to 1.79 [$P=0.016$]), suggesting that ERK1/2 activation is EPIYA-C motif phosphorylation-independent (Figure 4A and Figure 4B). On the contrary, strains P12AB and P12CagAKO induced similar significantly higher ERK1/2 activation levels much later, after the initial 90 min post-infection (mean difference at 2 hours of 1.80 and 95%CI of 0.83 to 2.77 [$P=0.005$], mean difference at 4 hours of 1.03 and 95%CI -0.13 to 2.18 [$P=0.004$]), suggesting that early ERK1/2 activation may depend upon the presence of sequences surrounding the EPIYA-C motifs. Recently, the CagA protein conserved amino acid sequence CRPIA was suggested to play a significant role in the activation of NF-κB via AKT kinase [31]. Our observations with regards to potential involvement of AKT in the activation of NF-κB suggest that the activation pattern of AKT does not match with this of NF-κB activation. More specifically, following *H. pylori* infection of AGS cells, we determined that activation of AKT Ser473-phosphorylation is independent of CagA EPIYA-C motif status (Figure 4D).

Activation of NF-κB possibly through TAK1 activation following CagA EPIYA-C phosphorylation

Recently, TAK1 was reported to be involved in *H. pylori*-induced NF-κB activation following its interaction with CagA protein and TRAF6 [34]. More specifically, it was suggested that CagA physically associates with TAK1 in vitro and in vivo and thereby enhances TAK1 activation which also requires TRAF6-mediated Lys63 ubiquitination. Furthermore, another study suggested that phosphorylated CagA can lead to activation of NF-κB and consequently transcriptional activation of IL-8, through p38 phosphorylation [47], whose upstream regulator is TAK1 [48,49].

To confirm TAK1 involvement, we infected AGS cells with our CagA phosphorylation-functional and -deficient mutants in the presence of 5Z-7-Oxozeaenol which is reported to be a specific inhibitor of TAK1 in a number of studies [50–54] and determined the levels of secreted IL-8 in the culture supernatants (Figure 5A and Figure 5B), at 4h post infection, due to the labile nature of the inhibitor. Utilizing the P12ABCCC strain to infect AGS cells we observed that in the presence of TAK1 inhibitor IL-8 production was abrogated in a concentration-dependent manner (Figure 5A). Moreover, in the presence of 70 nM 5Z-7-Oxozeaenol we observed a complete arrest of IL-8 production by AGS cells infected with the whole range of CagA phosphorylation-functional as well as phosphorylation-deficient strains, P12CagAKO and the P12CagEKO (Figure 5B). In order to further clarify TAK1 involvement in *H. pylori* induced NF-κB activation we infected TAK1^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and the respective normal control MEFs with P12ABCCC, P12ABFFF, P12AB, P12CagAKO and P12CagEKO mutants. We observed NF-κB activation following *H. pylori* infection, only in the presence of TAK1 expression in control MEFs and not in the TAK1^{-/-} cells (Figure 5C). As expected, unlike P12CagAKO which contributed to NF-κB activation in control MEFs, P12CagEKO did not induce NF-κB activation either in control or TAK1^{-/-} MEFs. Collectively these results suggest that NF-κB-dependent IL-8 induction in *H. pylori* infected gastric epithelial cells may possibly be mediated altogether through TAK1, irrespective of the CagA protein status.

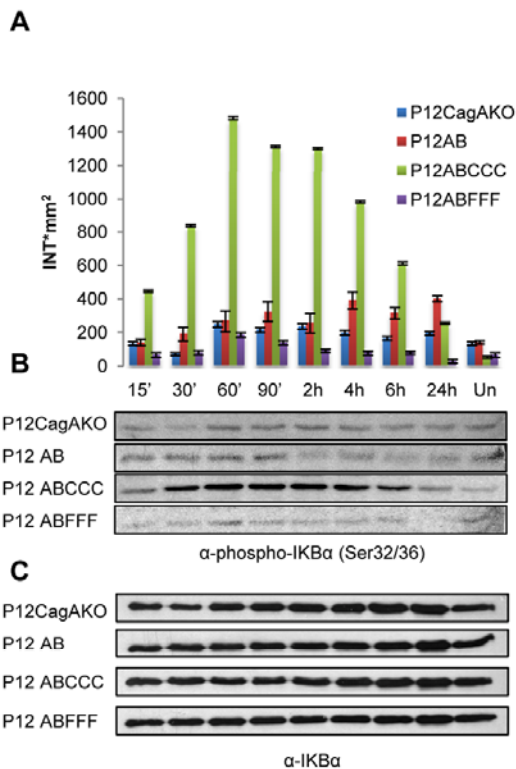


Figure 3. NF-κB activation in AGS cells following *H. pylori* infection. IκBα phosphorylation at Ser32/36 in AGS cells infected with *H. pylori* mutants, expressing CagA with phosphorylation-functional (EPIYA-C) or -defective (EPIYA-C) motifs. (A) Quantification of IκBα phosphorylation determined by band densitometry utilizing Quantity One software package. (B) Phosphorylation of IκBα and (C) Expression of total IκBα. Un: uninfected cells. doi:10.1371/journal.pone.0056291.g003

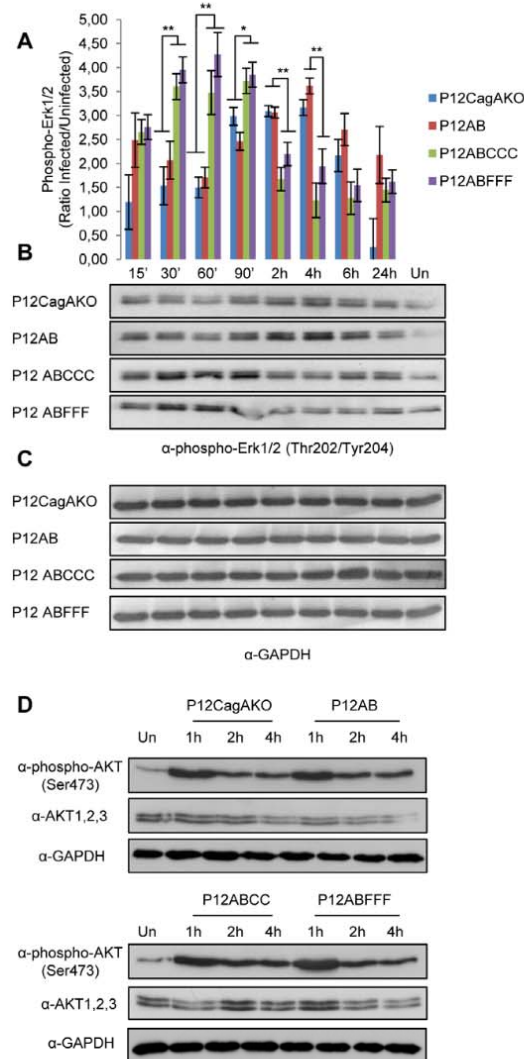


Figure 4. ERK1/2 and AKT activation in AGS cells upon infection with *H. pylori* mutant strains expressing CagA with phosphorylation-functional (EPIYA-C) or -defective (EPIYA-F) motifs. (A) Quantification of ERK1/2 phosphorylation at Thr202/Tyr204 by band densitometry in two independent experiments is depicted by plotting phospho-ERK1/2 (ratio infected to uninfected cells) for each time point. Statistical analysis was done by Student t-test and levels of significance depicted are * <0.05 and ** <0.01 . (B) Representative ERK1/2 phosphorylation at Thr202/Tyr204 and (C) the corresponding GAPDH expression. (D) Phosphorylation of AKT at Ser473 determined in total protein lysates from AGS cells infected with corresponding AKT1, 2, 3 and GAPDH expression. Un: uninfected cells. doi:10.1371/journal.pone.0056291.g004

We proceeded to confirm by immunoprecipitation earlier observations which suggest that CagA may interact with TAK1 [34], in total lysates of AGS cells infected with the P12ABCCC,

P12ABFFF and P12AB strains. We were able to identify TAK1 (Figure 6A) in anti-CagA immunoprecipitated protein complexes in total lysates of AGS cells infected with all three strains (P12ABCCC, P12ABFFF and P12AB). Equally we were able to detect CagA proteins utilizing a C-terminal specific CagA antibody (Figure 6B), as well as, an N-terminal specific anti-CagA antibody (Figure 6C) within the monoclonal TAK1 antibody-immunoprecipitated protein complex. Our results suggest that CagA may participate in the same protein complex along with TAK1, irrespective of the presence or the phosphorylation status of EPIYA-C motifs in CagA. We also observed that following α -TAK1 immunoprecipitation, the α -CagA monoclonal antibody raised against the C-terminal (Austral Biologicals) failed to detect the P12AB CagA variant (Figure 6B) possibly because it maps exactly on the EPIYA-C domains. On the contrary, utilizing an N-terminal specific anti-CagA antibody (Figure 6C) we were able to detect CagA, suggesting that sequences following immediately after the EPIYA-C motif, such as the CM motif present in the P12AB CagA protein (Figure 1A and Figure 1B) may also possibly be implicated in the CagA-TAK1 interaction. This motif has been suggested to be a putative kinase anchor [33], however, further work is required to demonstrate this in our case. Finally, in order to clarify potential role of CagA protein EPIYA-C phosphorylation on TAK1 activation, we attempted to determine TAK1 phosphorylation on Thr187 as well as TAK1 protein expression in *H. pylori* infected AGS cells. However, we detected a very marginal increase in pThr187-TAK1 in P12ABCCC strain infected AGS cells, at 60 min post infection, compared to that observed in uninfected cells, followed by a decrease thereof (Figure S1A and S1B). Similar results were also observed for the P12ABFFF and P12AB strain-infected AGS cells, delayed for two hours, whereas no such TAK1 activation could be detected for cells infected with P12CagAKO strain. Such weak observations have been described before [34], with an equally weak signal for activated TAK1, a problem that is also presented in other studies [55].

Discussion

H. pylori induces activation of a complex cytokine and chemokine network in the gastric mucosa and different bacterial and environmental factors, as well as host genetics seem to dictate the balance between tolerance and pro-inflammatory response in the course of *H. pylori* infection. CagA protein has been suggested to manifest its pathogenic role through EPIYA-dependent and EPIYA-independent interactions, in a number of intracellular signaling pathways, regulating cell motility and elongation, disruption of intercellular junctions and cellular polarity, as well as proliferation and inflammation mechanisms invoked by gastric epithelial cells [11]. Moreover, since most of these pathways have been implicated in the development of cellular malignancy there is increasing support that CagA protein, under persistent *H. pylori* infection may function as a bacterial oncoprotein [56,57]. Presence of chronic active inflammatory response in the lamina propria is the hallmark of *H. pylori* infection and the main regulators of this inflammatory response are chemokines. *H. pylori* stimulates the gastric epithelium to produce IL-8, a potent neutrophil chemokine [5] and its activity was shown to correlate to histological severity in cases of *H. pylori*-induced antral gastritis [7]. Although early reports suggested that cagPAI functionality was a prerequisite for IL-8 induction and secretion by gastric epithelial cells [58], later studies proved beyond doubt, that this phenomenon was also potentiated by the expression of CagA protein [30]. Moreover, others suggested that IL-8 activation was not dependent upon the phosphorylation on EPIYA-C motifs but

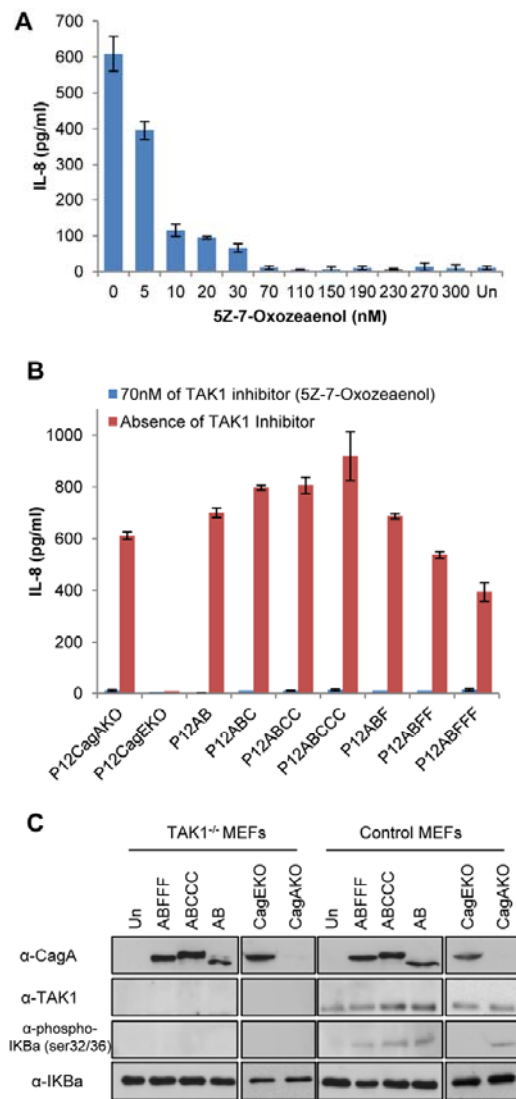


Figure 5. Potential involvement of TAK1 in IL-8 secretion following *H. pylori* infection. (A) Dose-dependent inhibition of IL-8 secretion, in the presence of the specific TAK1 inhibitor 5Z-7-Oxozeanol (5–300 nM), following 4 hour infection of AGS cells with *H. pylori* P12ABCCC strain. (B) IL-8 secretion in the supernatants of AGS cells following 4 hour infection by the corresponding *H. pylori* CagA mutants, in the absence or presence of 70 nM 5Z-7-Oxozeanol. (C) Expression of CagA, TAK1, IκBα phosphorylation at Ser32/36 and total IκBα determined by western blot, in total lysates of TAK1^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and respective control MEFs infected with *H. pylori* mutant strains for 4 hours. Un: uninfected MEFs. doi:10.1371/journal.pone.0056291.g005

on a highly conserved amino acid sequence around EPIYA termed as CRPIA [31], also recognized to be a CagA multimerization motif [32], implicated in kinase anchoring and inhibition [33].

Very recently, *H. pylori* has been shown to induce IL-8 via interaction of its T4SS constituent CagL with the host receptor integrin β1 and the subsequent activation of MAPKs and NF-κB [36]. In this study we report that CagA phosphorylation on EPIYA-C motifs contributes to the induction of IL-8 gene in gastric epithelial cells, through activation of the NF-κB pathway, possibly via TAK1 interaction. Given the potential diversity of clinical strains, we utilized isogenic *H. pylori* CagA mutants based on the reference *H. pylori* strain P12, expressing CagA protein with variable numbers of EPIYA-C phosphorylation motifs (P12AB, P12ABC, P12ABCC, P12ABCCC) and their respective EPIYA-C phosphorylation deficient counterparts (P12ABF, P12ABFF, P12ABFFF), while maintaining intact the EPIYA-A and B motifs [37]. We carefully screened our *H. pylori* mutant strains with regards to growth rates, adhesion rates to gastric epithelial cells and for polar effects to other *cagPAI* genes, pilus formation, type IV secretion system functionality, as well as CagA expression and phosphorylation [37]. We demonstrated that induction of the scattering and elongation phenotype, was as expected, dependent upon the number of motifs and phosphorylation status of the EPIYA-C motifs [37]. A number of previous reports have been based upon observations from transfected CagA-expressing species which, although undoubtedly very valuable for the study of bacterial virulence factors, may lead to erroneous results due to potentially ectopic over-expression of the bacterial protein under study. Furthermore, confusing results due to individual strain genetic variability, have also been attributed to the use of clinical isolates expressing CagA with differential number of EPIYA-C motifs [35]. In our study, IL-8 induction and secreted levels do not appear to be dependent upon the number of EPIYA-C repeats within CagA, as all our strains with functional EPIYA-C motifs were capable of inducing the same levels of IL-8 transcriptional activity and chemokine. These results on IL-8 secretion, are in line with previous observations reported by our group utilizing 4 different pairs of isogenic clinical strains isolated from the same patient, expressing CagA with variable numbers of EPIYA-C motifs [27,28]. In the same studies, CagA-positive clinical isolates with higher numbers of EPIYA-C motifs were not found to be associated with the severity of inflammatory response in the patient lamina propria. On the other hand, presence of phosphorylation-functional EPIYA-C motifs seems to contribute significantly to the *cagA*-dependent IL-8 induction, because deletion of these motifs, as in the case of P12AB, or mutation to the phospho-deficient EPIYA, in P12ABF and P12ABFF strains, dramatically reduced the levels of IL-8 induction. Most intriguingly, all P12ABFFF clones showed a characteristic delay in early IL-8 induction compared to all the other mutants, consistent of a potential transient inhibition of the T4SS, although earlier work has proven successful pilus formation and CagA translocation [37]. Alternatively, such an inhibition in IL-8 induction by the P12ABFFF strains may be associated with the presence within the CagA carboxyl-terminal region of four repeats of the putative kinase inhibitor motif FPLKRHDKVDDLSK [33], in the absence of any EPIYA-C functional domains, which dictate the hierarchic phosphorylation-dependent CagA activity [24].

In addition to the EPIYA-C effect, our data suggest that presence of EPIYA-A and EPIYA-B may marginally also contribute to IL-8 induction, because the CagA P12AB strain was able to induce significantly higher levels of IL-8 transcriptional activation compared to the P12CagAKO, yet similar to those observed following infection with the P12ABF and ABFF strains. This may also suggest that the number of CM does not seem to play a role in the induction of IL-8, as AB, ABF and ABFF have 1, 2 or 3 such motifs, respectively, and they all induce equal levels of

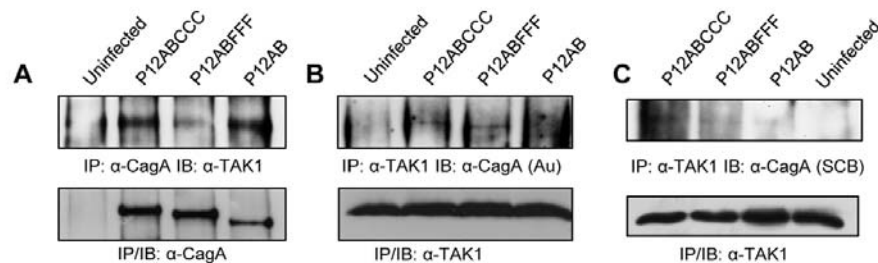


Figure 6. Immunodetection of TAK1 and CagA in α -CagA or α -TAK1 respective immunoprecipitated lysates derived from AGS cells infected with *H. pylori* CagA mutant strains, at 1 hour post infection. (Panel A) Immunoprecipitation utilizing polyclonal α -CagA antibody (Austral Biologicals) and TAK1 western blot immunodetection utilizing monoclonal α -TAK1 antibody. Immunoprecipitation utilizing monoclonal α -TAK1 antibody and CagA immunodetection utilizing an α -CagA monoclonal antibody raised against the C-terminal (Panel B) or the N-terminal (Panel C) end of CagA protein. Note that the α -CagA monoclonal antibody raised against the C-terminal (Austral Biologicals) maps exactly on the EPIYA-C domains and fails to detect the P12AB CagA variant in panel B. doi:10.1371/journal.pone.0056291.g006

IL-8 transcription at 2 hours, as well as NF- κ B activation (data not shown). Furthermore, our results following infection with the P12CagAKO strain, are in line with observations suggesting *cagA*-independent IL-8 gene transcriptional activation and secretion, following recognition of peptidoglycans, by the intracellular Nod1 receptor [29] or *H. pylori* lipopolysaccharide by TLRs [45,59] or CagL binding to integrin β 1 [36]. In any case, our data suggest that *cagA*-dependent contribution through EPIYA-C phosphorylation may be equally significant for full activation of IL-8 transcriptional activity.

Another aim of this work was to shed light on the molecular pathway by which NF- κ B is activated following EPIYA-C phosphorylation. Until recently, activation of NF- κ B following *H. pylori* infection was shown to be a result of ERK and AKT activation [14,30,31]. Here we provide evidence that activation of ERK and AKT during the early stages post-infection may be influenced by the presence of EPIYA-C motifs, albeit in a phosphorylation-independent manner. In addition, our data suggest that activation of ERK and AKT does not exactly coincide to NF- κ B activation. More specifically, we observed that in the presence of sequences surrounding EPIYA-C motifs, as in the case of P12ABCCC and P12ABFFF strains, induction of ERK1/2 was evident at early stages as quickly as 30' post-infection irrespective of EPIYA phosphorylation. On the contrary, in the absence of EPIYA-C motifs as in the P12AB and P12CagAKO strains, ERK1/2 activation was evident at much later stages post-infection (2 - 4h). In the case of AKT, we observed a CagA-independent effect of *H. pylori* infection on AKT phosphorylation at Ser473. That is most likely consistent with its contribution to the control of survival and apoptosis, rather than that of other signaling pathways [60]. Further work needs to be done in order to understand how phosphorylation of CagA in EPIYA-C motifs may contribute to the activation of these two key molecules.

Finally, our data suggest that TAK1 may indeed play a critical central role in the activation of IL-8, because infection of gastric epithelial cells with all our *H. pylori* CagA mutants, in the presence of a TAK1 specific inhibitor [50-54], totally abrogated IL-8 secretion, even in the case of the P12CagAKO. Identical results were obtained when we infected TAK1^{-/-} mouse embryonic fibroblasts with our *H. pylori* CagA mutant strains including the CagA negative mutant and observed NF- κ B activation only in the presence of TAK1 expression in control MEFs and not in the TAK1^{-/-} cells (Figure 5C). This suggests that TAK1 may be the converging molecule playing a central role for NF- κ B activation

during *H. pylori* infection, involving as well pathways activated by TLRs or NOD1 receptors as recently proposed [13]. Moreover, our data suggest that in the case of CagA-positive strains, TAK1 and CagA may participate in the same protein complex, confirming earlier observations showing that CagA can directly interact with TAK1 and TRAF6 [34]. Our results suggest that this TAK1-CagA interaction is independent of EPIYA-C-phosphorylation and may involve the CM motif preceding the EPIYA-C motif. Nevertheless, a whole range of experiments involving protein-protein interactions and mutational analysis needs to be performed in order to further dissect this interaction. We speculate that within the first hour post-infection, TAK1 may be recruited on CagA irrespective of EPIYA-C phosphorylation, however its consequent activation may depend upon EPIYA-C phosphorylation by c-Src and therefore TAK1 may be activated much faster in the presence of CagA-positive compared to CagA-negative strains. A possible explanation is that the different types of EPIYA phosphorylation motifs become phosphorylated by cellular kinases Abl and Src, at different time points following the delivery of CagA by the type IV secretion system. Indeed, EPIYA-C motifs are the first to be phosphorylated by Src, followed by Abl phosphorylation of EPIYA-A or EPIYA-B motifs [24], although more work is needed in order to explore this phenomenon with strains expressing CagA with multiple EPIYA-C motifs. Our results however, failed to show convincing TAK1 activation in the presence of functional EPIYA-C motifs in CagA compared to other CagA species examined in this study and further investigation is needed in order to prove this argument.

In conclusion, presence of functional EPIYA-C motifs in CagA protein, seem to contribute significantly in the transcriptional activation of IL-8, through NF- κ B activation. This effect looks to be independent from *H. pylori*-dependent activation of AKT and ERK and may involve TAK1. This is the first systematic investigation of the role of EPIYA-C motifs in CagA in an isogenic background. Previous reports investigating their role in inflammation and disease outcome are based on comparison of different isolates. These comparisons however, suffer from the fact that *H. pylori* is genetically variable and has other phase-variable and mosaic genes. On the contrary, this is a systematic investigation and does not suffer from the aforementioned problems.

Supporting Information

Figure S1 TAK1 activation following infection of AGS cells with *H. pylori* CagA mutant strains. (A) Quantification of TAK1 phosphorylation at Thr187 by band densitometry. (B) Expression of phospho-TAK1 (Thr187) in total protein lysates and corresponding (C) TAK1 protein expression and (D) control GAPDH expression in total protein lysates from AGS cells infected with *H. pylori* CagA mutant strains as indicated. (TIFF)

References

- Blaser MJ, Atherton JC (2004) Helicobacter pylori persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 113: 321–333.
- Amieva MR, El-Omar EM (2006) Host-bacterial interactions in Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology* 131: 306–323.
- Atherton JC (2006) The pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol* 1: 63–96.
- Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P (1996) Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 20: 1161–1181.
- Sobala GM, Crabtree JE, Dixon MF, Schorah CJ, Taylor JD, et al. (1991) Acute Helicobacter pylori infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut* 32: 1415–1419.
- Gionchieri P, Vaira D, Campieri M, Holton J, Menegatti M, et al. (1994) Enhanced mucosal interleukin-6 and -8 in Helicobacter pylori-positive dyspeptic patients. *Am J Gastroenterol* 89: 883–887.
- Crabtree JE, Wyan JL, Trejdosiewicz LK, Peichl P, Nichols PH, et al. (1994) Interleukin 8 expression in Helicobacter pylori-infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J Clin Pathol* 47: 61–66.
- Ando T, Kasugami K, Ono S, Shinoda M, Sakakibara M, et al. (1996) Interleukin-8 activity correlates with histological severity in Helicobacter pylori-associated atrophic gastritis. *Am J Gastroenterol* 91: 1150–1156.
- Nomura AM, Perez-Perez GI, Lee J, Stemmermann G, Blaser MJ (2002) Relation between Helicobacter pylori cagA status and risk of peptic ulcer disease. *Am J Epidemiol* 155: 1094–1099.
- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleinman H, Cover TL, Peek RM, et al. (1995) Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 55: 2111–2115.
- Backert S, Tegunover N, Selbach M (2010) The versatility of Helicobacter pylori CagA effector protein functions: The master key hypothesis. *Helicobacter* 15: 163–176.
- Nagy TA, Frey MR, Yan F, Israel DA, Folk DB, et al. (2009) Helicobacter pylori regulates cellular migration and apoptosis by activation of phosphatidylinositol 3 kinase signaling. *J Infect Dis* 199: 641–651.
- Lamb A, Chen LF (2010) The many roads traveled by Helicobacter pylori to NF-kappaB activation. *Cult Microbes* 1: 199–213.
- Mizuno H, Suzuki T, Tanaka J, Asahi M, Haas R, et al. (2002) Grb2 is a key mediator of Helicobacter pylori CagA protein activities. *Mol Cell* 10: 745–755.
- Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, et al. (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. *Science* 295: 683–686.
- Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, et al. (2000) Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287: 1497–1500.
- Peek RM Jr, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Ziao X, et al. (1995) Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ Helicobacter pylori strains. *Lab Invest* 73: 760–770.
- Selbach M, Moese S, Hauck GR, Meyer TF, Backert S (2002) Src is the kinase of the Helicobacter pylori CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 277: 6775–6778.
- Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fanfani WJ, et al. (2002) c-Src/Lyn kinases activate Helicobacter pylori CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* 43: 971–980.
- Pogge M, Feller SM, Romer G, Wessler S (2007) Phosphorylation of Helicobacter pylori CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* 26: 3462–3472.
- Tammer J, Brandt S, Hartig R, König W, Backert S (2007) Activation of Abl by Helicobacter pylori: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* 132: 1309–1319.
- Hatakeyama K (2004) Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein. *Nat Rev Cancer* 4: 688–694.
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. *Annu Rev Immunol* 18: 621–663.
- Mueller D, Tegunover N, Brandt S, Yamaoka Y, De Paire E, et al. (2012) c-Src and c-Abl kinases control hierarchical phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian Helicobacter pylori strains. *J Clin Invest* 122(4): 1533–1566.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Arnold van Vliet and Professor Steffen Backert for their insightful comments during manuscript preparation.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KSP DNS. Performed the experiments: KSP ISS. Analyzed the data: KSP ISS DNS. Contributed reagents/materials/analysis tools: EH AFM. Wrote the paper: KSP ISS AFM EH DNS.

- Argent RH, Kidd M, Owen RJ, Thomas RJ, Limb MC, et al. (2004) Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 127: 514–525.
- Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, et al. (2002) Biological activity of the Helicobacter pylori virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14428–14433.
- Sgouras DN, Panayotopoulou EG, Papadakis K, Martinez Gonzalez B, Rountzani A, et al. (2009) CagA and VacA polymorphisms do not correlate with severity of histopathological lesions in Helicobacter pylori-infected Greek children. *J Clin Microbiol* 47: 2426–2434.
- Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakis KS, Petzaki K, Breurec S, et al. (2010) CagA and VacA polymorphisms are associated with distinct pathological features in Helicobacter pylori infected adults with peptic ulcer and non peptic ulcer disease. *J Clin Microbiol* 48: 2237–2239.
- Viale J, Chagnut C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, et al. (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 5: 1166–1174.
- Brandt S, Kwok T, Hartig R, König W, Backert S (2005) NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the Helicobacter pylori CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9300–9305.
- Suzuki M, Mizuno H, Kiga K, Fukunatsu M, Ishijima N, et al. (2009) Helicobacter pylori CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Clin Host Microbe* 5: 23–34.
- Ren S, Higashi H, Lu H, Azuma T, Hatakeyama M (2006) Structural basis and functional consequence of Helicobacter pylori CagA multimerization in cells. *J Biol Chem* 281: 32344–32352.
- Nesic D, Müller MG, Quinzert ZT, Stein M, Ghait BT, et al. (2010) Helicobacter pylori CagA inhibits PARI-MARK family kinases by mimicking host substrates. *Nat Struct Mol Biol* 17: 130–132.
- Lamb A, Yang XD, Tsang YH, Li JD, Higashi H, et al. (2009) Helicobacter pylori CagA activates NF-kappaB by targeting TAK1 for TRAF6-mediated Lys 63 ubiquitination. *EMBO Rep* 10: 1242–1249.
- Backert S, Nazmann M (2010) What a disorder: proinflammatory signaling pathways induced by Helicobacter pylori. *Trends Microbiol* 18: 479–486.
- Gorell RJ, Guan J, Xiu Y, Tafreshi MA, Harton ML, et al. (2012) A novel NOD1- and CagA-independent pathway of interleukin-8 induction mediated by the Helicobacter pylori type IV secretion system. *Cell Microbiol* 10.1111/j.12055.
- Papadakis KS, Sougleri IS, Mentis AF, Sgouras DN (2012) A Mutagenesis Method for the Addition and Deletion of Highly Repetitive DNA Regions: The Paradigm of EPIYA Motifs in the cagA Gene of Helicobacter pylori. *Helicobacter* 10.1111/hel.12029.
- van Vliet AH, Wooldridge KG, Kerley JM (1998) Iron responsive gene regulation in a campylobacter jejuni fliC mutant. *J Bacteriol* 180: 5291–5296.
- Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, et al. (2005) Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6: 1937–1945.
- Backert S, Moese S, Selbach M, Brinkmann V, Meyer TF (2001) Phosphorylation of tyrosine 972 of the Helicobacter pylori CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 42: 631–644.
- Schnitzgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3: 1101–1108.
- Sharma SA, Tunumuru MK, Miller GG, Blaser MJ (1995) Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to Helicobacter pylori stimulation in vitro. *Infect Immun* 63: 1681–1687.
- Lesouhaitier O, Chiappe A, Rossier MF (2001) Aldosterone increases T-type calcium currents in human adrenocorticotinoma (H295K) cells by inducing channel expression. *Endocrinology* 142: 4320–4330.
- Witherell HL, Hansen S, Jellum E, Orentlich N, Vogelstein JI, et al. (1997) Risk for gastric lymphoma in persons with CagA+ and CagA- Helicobacter pylori infection. *J Infect Dis* 176: 1641–1644.
- Masuda S, Aizawa M, Mizuno Y, Hata Y, Ogura X, et al. (2001) Distinct mechanism of Helicobacter pylori-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells. *J Biol Chem* 276: 44856–44864.

CagA EPIYA-C Motifs Contribute to IL-8 Activation

46. Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 320–344.
47. Gobert AP, Verriere T, de Sable T, Peek RM, Chaturvedi R, et al. (2012) Heme oxygenase-1 inhibits phosphorylation of the *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA in gastric epithelial cells. *Cell Microbiol* 10: 1111/emi.12039.
48. Sorrentino A, Thakur N, Grimsby S, Marcsson A, von Zuluov V, et al. (2008) The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase independent manner. *Nat Cell Biol* 10: 1199–1207.
49. Ma Y, Gudey SK, Landstrom M (2012) Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res* 347: 11–20.
50. Ninomiya Tsuji J, Kajino T, Ono K, Ohtomo T, Matsumoto M, et al. (2002) A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase. *J Biol Chem* 278: 18485–18490.
51. Wang Z, Yang Y, Yang H, Capó Aponte JE, Tachado SD, et al. (2011) NF- κ B feedback control of JNK1 activation modulates TRPV1-induced increases in IL-6 and IL-8 release by human corneal epithelial cells. *Mol Vis* 17: 3137–3146.
52. Pera T, Sami R, Zaagana J, Meurs H (2011) TAK1 plays a major role in growth factor-induced phenotypic modulation of airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301: L822–828.
53. Meriin J, Evans BA, Gsikasz RI, Bergelson TJ, Summers RJ, et al. (2010) The M2-muscarinic acetylcholine receptor stimulates glucose uptake in L6 skeletal muscle cells by a G α MKK-AMPK-dependent mechanism. *Cell Signal* 22: 1104–1113.
54. Ayers S, Graf TN, Adcock AF, Krol DJ, Matthew S, et al. (2011) Resorcylic acid lactones with cytotoxic and NF- κ B inhibitory activities and their structure-activity relationships. *J Nat Prod* 74: 1126–1131.
55. Scholz R, Sailer C, Thali RF, Wunsinger N, Cheung PC, et al. (2010) Autoactivation of transforming growth factor beta-activated kinase 1 is a sequential bimolecular process. *J Biol Chem* 285: 25753–25765.
56. Hatakeyama M (2006) Linking epithelial polarity and carcinogenesis by multitasking *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Oncogene* 27: 7047–7054.
57. Hatakeyama M (2006) The role of *Helicobacter pylori* CagA in gastric carcinogenesis. *In: J Hemato* 84: 301–308.
58. Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, et al. (2001) 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: 1337–1346.
59. Kumar Fachathandikandi S, Braadt S, Madassery J, Backert S (2011) Induction of TLR-2 and TLR-5 expression by *Helicobacter pylori* switches cagPAI-dependent signalling leading to the secretion of IL-8 and TNF- α . *PLoS One* 6: e19614.
60. Wei J, Nagy TA, Vilgelm A, Zaika E, Ogden SR, et al. (2010) Regulation of p53 tumor suppressor by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 139: 1333–1343.

A Mutagenesis Method for the Addition and Deletion of Highly Repetitive DNA Regions: The Paradigm of EPIYA Motifs in the *cagA* Gene of *Helicobacter pylori*

Konstantinos S. Papadakos, Ioanna S. Sougleri, Andreas F. Mentis and Dionyssios N. Sgouras

Laboratory of Medical Microbiology, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas. Sofias Avenue, 11521, Athens, Greece

Keywords

Helicobacter pylori, *cagA*, EPIYA, mutagenesis, homologous recombination.

Reprint requests to: Dionyssios N. Sgouras, Laboratory of Medical Microbiology, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas. Sofias Avenue, 11521 Athens, Greece. E-mail: sgouras@pasteur.gr

Abstract

Background: CagA protein of Western origin *Helicobacter pylori* isolates contains at its carboxyl-terminal end repeating types of EPIYA motifs, depending on the surrounding sequence, which dictate hierarchic tyrosine phosphorylation. To produce, in an isogenic background, mutant strains expressing CagA protein with variable numbers of EPIYA-C terminal motifs, we have adopted a mutagenesis assay using a megaprimer approach.

Materials and Methods: The *H. pylori* P12 reference strain containing two terminal EPIYA-C motifs was utilized. Initially, we cloned, full-length *cagA* gene, next to the *Campylobacter jejuni* kanamycin-resistance cassette, followed by the 1200-bp region located immediately after *cagA* gene (metacagA region). Then, we generated a megaprimer consisting of three consecutive copies of the EPIYA-C coding sequence of *cagA* gene, followed by the 140-bp region of the *cagA* genomic sequence present immediately after the second EPIYA-C repeat. We utilized these two products to perform a QuikChange mutagenesis assay and were able to obtain all desired combinations of EPIYA-C motifs, followed by *Kan^r* cassette and metacagA region. These constructions were used to perform natural transformation of the P12 parental strain, by directional homologous recombination.

Results: We produced isogenic *H. pylori* strains that express CagA with variable number of EPIYA-C motifs (AB, ABC, ABCCC) and their phosphorylation-deficient counterparts. They exhibited similar growth characteristics to the parental strain, adhered equally well to gastric cells and successfully translocated CagA, following pilus induction.

Conclusions: Our method can be used in other cases where highly repetitive sequences need to be reproduced.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is the main cause for the development of chronic gastritis and peptic ulceration and has been identified as a major risk factor for the development of gastric cancer [1]. One of the main characteristics of *H. pylori* is its genetic variability, generated by a combination of mutagenesis and recombination phenomena. As a result of that, every infected person harbors their own individual strain [2]. *H. pylori* mutation rates are significantly higher than that of other bacteria [3], and this may partly be explained from the fact that *H. pylori* lacks apparent homologs of genes contributing to DNA repair, compared to other model organisms such as *Escherichia coli* [4]. As far as increased intraspecific recombination is concerned, presence of comB type IV secretion system in *H. pylori*

[5] has been suggested to play a crucial role in horizontal gene transfer allowing acquisition of traits from genetically distinct organisms [6]. Based on this natural transformation competence, a number of methods have been developed for the addition or deletion of variable genetic elements into *H. pylori* genome [7].

Epidemiological studies in patients and in vivo CagA expression studies in rodents have identified CagA protein as one of the main *H. pylori* virulence factors, as it confers increased risk for development of atrophic gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer [8–11]. The gene encoding for CagA protein is located at the end of the *cag* pathogenicity island (*cagPAI*), a gene cluster of approximately 40 kbps that altogether codes for a type IV secretion system (T4SS), via which CagA is translocat-

ed from the adhered bacteria inside the gastric epithelial cells [12]. Once inside the cell, CagA protein is tyrosine phosphorylated hierarchically, by host cellular kinases Src and Abl [13], on repeating EPIYA (glutamic acid–proline–isoleucine–tyrosine–alanine) phosphorylation motifs located at the carboxyl terminus of the protein. These motifs have been classified in four distinct types, depending on the amino acid residues in the surrounding sequences, namely EPIYA-A (EPIYAKVNKKK(A/T/V/S)GQ), EPIYA-B (EPIY(A/T)(Q/K)VAKKVNAKI), EPIYA-C (EPIYATIDDLGGP), and EPIYA-D(EPIYATIDF-DEAN) [14]. There is a considerable variability among cagA-positive clinical isolates with regard to the number and combination of EPIYA motifs at the carboxyl-terminal of the protein. In clinical isolates of Western origin (Europe, North America, and Australia), CagA harbors one EPIYA-A and one EPIYA-B motif, usually followed by one or two EPIYA-C motifs (combinations of ABC, ABCC) [15]. Addition of a third EPIYA-C motif (ABCCC combination) has been also observed in 1–2% of clinical cases, in adults [16]. Prevalence of these combinations varies in infected symptomatic patients and between adults and children [17,18]. Higher numbers of these EPIYA motifs have been postulated to induce higher CagA phosphorylation levels resulting in more severe cytoskeletal changes to epithelial cells [19] and have been correlated with increased risk for gastric cancer [20]. East Asian CagA isoforms harbor EPIYA-A, EPIYA-B motifs followed by the East Asian-specific EPIYA-D motif in the order of ABD or ABDD, and such isomorphs have been postulated to be biologically more active, due to stronger interaction and deregulation of SHP-2 phosphatase [21]. Independently, we have shown that, in adult patients, presence of one CagA EPIYA-C site may be an independent risk factor for gastroduodenal ulceration [16] but that the number of EPIYA-C motifs is not related to the severity of histopathologic lesions in infected children [18]. A number of host cell signaling cascades, which control the induction of membrane dynamics, actin cytoskeletal rearrangements and the disruption of cell-to-cell junctions as well as proliferative, pro-inflammatory and anti-apoptotic nuclear responses, have been linked to EPIYA phosphorylation dependent and independent CagA activity [15]. However, most of these studies have been based on comparison of different clinical isolates and as *H. pylori* is so genetically variable and has other phase-variable and mosaic genes, this makes comparisons imperfect. To overcome such problems and work in an isogenic background, we embarked upon the construction of cagA-positive mutants, expressing CagA protein with variable numbers of EPIYA-C motifs (AB, ABC, and ABCCC) and their nonphosphorylated counterparts (AB, ABF, ABFF, and ABFFF) based

upon parental P12 reference strain. Construction involved four separate stages (Fig. 1). At stage I, we cloned, full-length cagA gene, adjoined at its 5' end to the *Campylobacter jejuni* kanamycin-resistance cassette (Kan^r cassette), followed by the 1200-bp region present immediately after cagA gene (metacagA region) in the P12 *H. pylori* genome. At stage II, we generated a megaprimer consisting of three consecutive copies of the 102-bp EPIYA-C coding sequence of cagA gene of P12, followed at its 5' end by the 140-bp region of the cagA genomic sequence present immediately after the second EPIYA-C repeat in P12 reference strain genome. At stage III, we utilized the products of stages I and II to perform a QuikChange mutagenesis assay and were able to obtain all desired combinations of EPIYA-C motifs, followed by the Kan^r cassette and the 1200-bp region downstream of cagA gene in one reaction. At the final stage IV, we used these constructions to perform natural transformation of the P12 parental strain, by directional homologous recombination. Screening and final selection of *H. pylori* clones were based upon comparison to the parental P12 strain, on the basis of growth rates, adherence rates to gastric epithelial cells, successful pilus induction, translocation of CagA protein and finally induction of the scattering phenotype, in an EPIYA-C phosphorylation-dependent manner.

Methods

Culture Conditions of Bacterial Strains and Cell Lines

H. pylori P12 reference strain (NC_011498) was cultured on Columbia Blood Agar (CBA, provided by Oxoid, Cambridge, UK) supplemented with 5% v/v horse blood and 1% v/v Vitox (Oxoid) under microaerophilic conditions (CampyGen; Oxoid) at 37 °C as

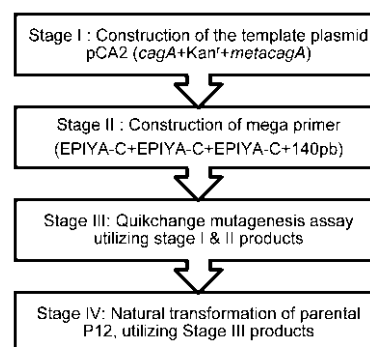


Figure 1 Stages for the production of the CagA isogenic mutants.

described before [17]. *E. coli* DH5a strain was cultured on Luria broth (LB) or Luria broth Lennox agar plates (Becton Dickinson, Bergen County, NJ, USA) containing the appropriate antibiotic as required for clone selection (100 µg/mL ampicillin, 20 µg/mL chloramphenicol, 50 µg/mL kanamycin). A *cagE* knock out mutant of *H. pylori* P12 reference strain, designated as P12CagEKO, was a kind gift of Professor Rainer Haas.

Sequencing

Sequencing was performed in-house, using a Beckman Coulter (Brea, CA, USA) CEQ8000 genetic analyzer system according to the manufacturer's protocol. Primers used for reading the entire sequence of *cagA* gene (Table 1) were designed so that the amplified parts of the *cagA* gene were overlapping, taking into account the complete genome *H. pylori* sequences of P12 as well as other Western origin reference strains (26695, G27, and HPAG1).

Plasmids and Genetic Manipulations

Plasmid vectors pBCSK- (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) and pUC19 were utilized for all

construction described in this work. The kanamycin-resistance cassette (*Kan^r* cassette) from *Campylobacter jejuni* in pJMK30 plasmid was a kind gift of Dr. Arnold van Vliet [22]. Digestion of plasmids and DNA fragments was performed with restriction enzymes *Apal*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI*, *SmaI*, and *XbaI*, following manufacturer's procedures, all purchased from New England Biolabs (NEB). Ligation was performed overnight at 16 °C, in 20-µL total volume reaction mixture containing 1 µL of T4 ligase (NEB; Ipswich, MA, USA), 30 nmol of insert and vector DNA (1:1 ratio), 50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L ATP, and 10 mmol/L dithiothreitol pH 7.5. Full-length *cagA* gene was amplified from P12 reference strain, in a PCR (50 µL total volume), containing 0.5 U Vent DNA polymerase (NEB), 0.5 µmol/L primers, 20 ng DNA, 200 µmol/L dNTPs (Fermentas, Waltham, MA, USA), 20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 10 mmol/L KCl, 8 mmol/L MgSO₄, 0.1 % Triton X-100, pH 8.8. Conditions included an initial denaturation step at 95 °C for 5 minutes, followed by 35 cycles (10 seconds at 95 °C, 10 seconds at 58 °C, 4 minutes at 75 °C) and a final extension at 75 °C for 7 minutes. All other amplification reactions for the generation of DNA fragments required for construction were performed within

Table 1 Sequences of primers used in the construction and sequencing

Name	Sequences (5' to 3' direction)	Used in ^a
cagAKpnI ^b	TAIAGGGIACCGCCACCAIAGCAAGCGAAACCAI ^b AACCAACAA	Con
cagApal ^b	CCITACCGCCCAAAACATTTCGAAACCACCTTTGTATTA	Con
MetacagAF	AGGATTAAGGAA ^b ACCAAAAACG	Con, seq
MetacagAR	ATATGGA ^b CCACTAAGAGCCCCACCAC	Con
E-21-A F	CCIGAACCCA ^b TTGGIACGA ^b TGAT	Con, mut
F21-A R	ATCAA ^b TGGTAGCAAAAATGGGTTCCAGG	Con, mut
F1	TTCCCTTTGAAAAGCAI ^b GA ^b AAAGT	Con
F2	TTTGAAAAGCATGATAAAGTTGAAGA	Con
R1 ^c	ATCACTCTAGATTAGTCCCGGGAAGGTCGGCCGAGATC	Con
R2 ^c	ATCACTCTAGAAGAATCTTTGAGCTGTCTATCG	Con
R3	TCCTCTAGATTCCCAAAAACCT	Con
ScagA898F	CACAATAACGCTCTGTCTGTG ^c	Seq
ScagA16-4F	CAACGTAGCTGTCTTAATTGCG	Seq
ScagA23b4F	TAACCGATAAAGTGGCAAACTCAA ^b	Seq
ScagA3-83F	CAGCCACACAGGCATTAATAGC	Seq
ScagA/8/R	TAAGAAAA ^b IACCCCTTTCAI ^b CAAG	Seq
ScagA1533R	TC ^b TGAGGCGTGTGTG ^b TT ^c G	Seq
ScagA24 ^c OR	CT ^b ECT ^b ACCC ^b ACT ^b GAAATC	Seq
cagA3000AS	TTTAGCTTCTGATACCGC	Seq
M ^c 3forward	GIAAAACGACGGCCAG	Con, seq
M ^c 3reverse	CAGGAACAGCTATGAC	Con, seq

^aKpnI restriction site underlined.

^bApal restriction site underlined.

^cSmaI, XbaI restriction sites underlined.

^dXbaI restriction site underlined.

^eAbbreviations for the type of reactions in which they were used: con: construction, seq: sequencing, mut: mutagenesis.

25- μ L total volume reaction mixtures, as described above, utilizing the appropriate primers (Table 1). Conditions included an initial denaturation step at 95 °C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 30 seconds at 95 °C, 30 seconds at 53 °C (for F1, F2, R1, R2, and R3 primers) or 63 °C (for MetacagaF, MetacagaR primers) and 30 seconds (for F1, F2, R1, R2, and R3 primers) or 1 minute (for MetacagaF, MetacagaR) at 75 °C and a final extension step at 75 °C for 7 minutes. Screening and sequencing of clones involving constructs in pUC19 (stage II) were performed by M13 reference primers.

Cloning of *H. pylori* P12 wt *cagA*-*kan*^r-*metacaga* Fragment

Kan^r cassette was cloned in pBCSK⁻, following HindIII and PstI digestion (plasmid A), and successful insertion was confirmed by *E. coli* transformation in kanamycin-containing LB medium (50 μ g/mL) (Fig. 2). The *metacaga* region, a 1194-bp DNA sequence (positions 589226–590419 bp with reference to *H. pylori* P12 genome), which included the first nucleotide immediately downstream from the end of the *cagA* sequence, was amplified using primers MetacagaF and MetacagaR (Table 1) (Fig. 2A). Primer MetacagaR included an artificial BamHI site to allow directional cloning of the *metacaga* fragment to plasmid A, previously digested with SmaI and BamHI restriction enzymes. Following transformation, clones were screened by PCR using the MetacagaF and MetacagaR primers, and four positive clones were further sequenced for the confirmation of the insertion, using primers MetacagaF and M13R (plasmid B) (Fig. 2A). Full-length *cagA* gene was amplified, using *cagA*KpnI primer spanning the first 27 nucleotides of *cagA* gene, including an artificial KpnI restriction site at the 5'-end and the reverse *cagA*Apal primer, spanning the last 33 nucleotides of *cagA* gene, including an artificial Apal restriction site at its non-*cagA*-homologous region (Table 1). The amplified product was purified from an agarose gel and ligated to plasmid B following digestion with KpnI and Apal restriction enzymes (Fig. 2A). Following transformation in *E. coli*, clones were screened with an EPIYA PCR method [17]. The final construct containing full-length *cagA*-*kan*^r-*metacaga* in pBCSK⁺ was named pCA2.

Production of Mutagenesis Megaprimer

We generated a construct in pUC19 vector, expressing three consecutive copies of the 102-bp EPIYA-C coding sequence of *cagA* gene, followed by the 140-bp region (positions 588608–588748 of P12 genome) of the *cagA* genomic sequence present immediately after the second

EPIYA-C coding region (plasmid III). To accomplish this, we first cloned one 102-bp individual EPIYA-C coding region in pUC19 vector (plasmid I), following its amplification from PCA2 plasmid (stage I) using primers F1 and R1. Primer R1 was particularly designed to span the last 15 nucleotides of the first EPIYA-C coding motif including the first five nucleotides of the second EPIYA-C coding region (Fig. 2B), to utilize the last three 5'-CCC-3' of this sequence to produce an artificial SmaI restriction site. It also included a XbaI restriction site at the 3' end (Fig. 2B, Table 1). Amplification resulted in two products containing either one or two adjoined EPIYA-C coding motifs, and the smaller fragment was gel purified, digested with the XbaI, and cloned in pUC19 vector previously digested with SmaI and XbaI restriction enzymes (plasmid I). To add a second and a third EPIYA-C coding motif, we repeated amplification of plasmid pCA2 this time, with primers F2 and R1 (Table 1 and Fig. 2B), and the larger product (200 bp) containing two adjoined EPIYA-C coding motifs, digested with the XbaI, was cloned into plasmid I previously digested with SmaI and XbaI restriction enzymes (plasmid II). To produce the final plasmid III, the 140-bp region spanning immediately after the end of EPIYA-C coding motif was amplified using F1 and R2 primers (Table 1 and Fig. 2B). The product was digested with XbaI restriction enzyme and cloned in plasmid II, previously digested with XbaI and SmaI restriction enzymes. During the whole process, screening was performed by PCR amplification and final fidelity of constructs was confirmed by sequencing utilizing M13F and M13R primers (Table 1) in all cases.

The megaprimer was amplified from plasmid III utilizing primers F1, R3 using Vent DNA polymerase, and the largest product (443 bp) was gel purified with the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA).

Mutagenesis

A modified QuikChange II site-directed mutagenesis protocol was utilized as described before [23], using as template the *cagA*-*kan*^r-*metacaga* fragment and the megaprimer. The mutagenesis process reaction carried out in a final volume of 50 μ L within a reaction mixture containing 250 ng of template, 75 ng megaprimer, 2.5 U Pfu, 200 μ mol/L dNTPs, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 2 mmol/L MgSO₄, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100, and 0.5 mg/mL BSA. Conditions included an initial denaturation step at 95 °C for 30 seconds followed by 18 cycles of 30 seconds at 95 °C, 1 minute at 55 °C, and 8 minutes at 68 °C. Following the addition of 10 U of DpnI, the reaction mixture was incubated at 37 °C for 3 hours and was then

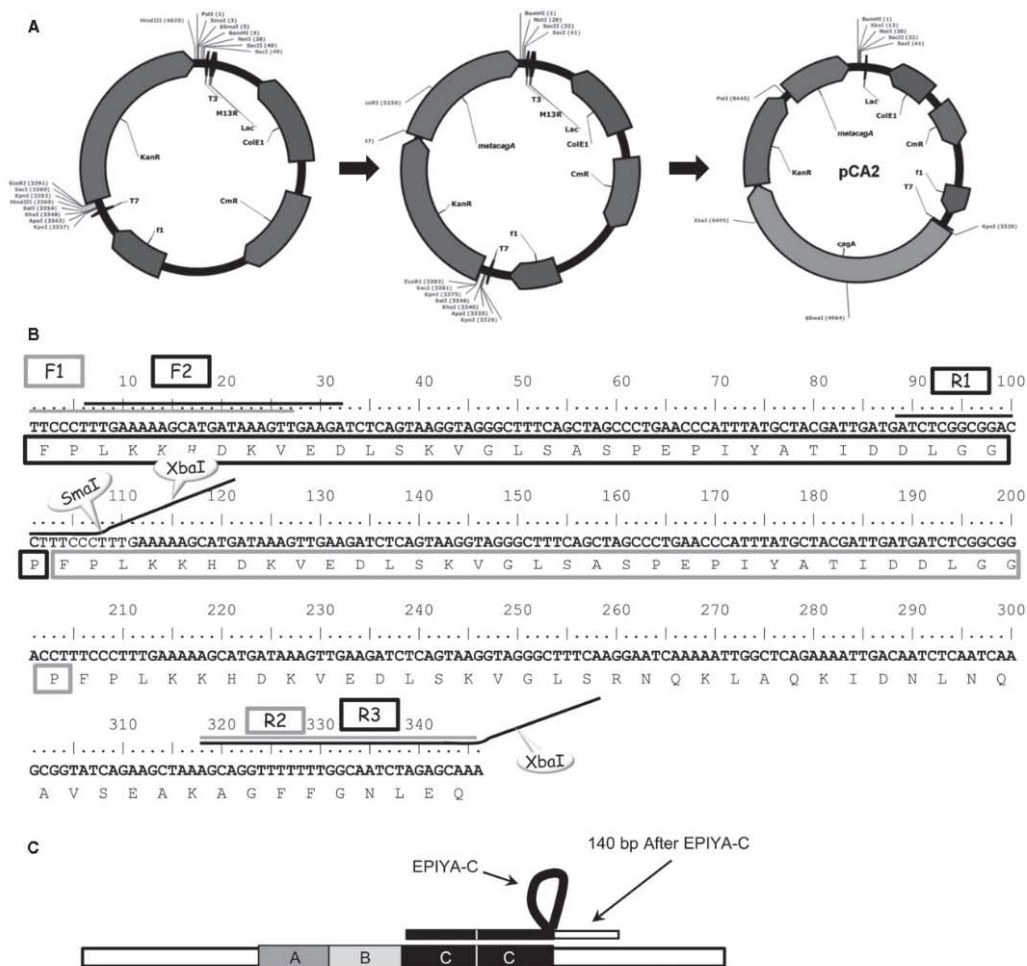


Figure 2 (A) Maps of plasmids for the progressive construction of pCA2 plasmid, at stage I. (B) P12 reference strain nucleotide sequence (588404-588748 bp) involved in the production of the megaprimer during stage II. The primers used to amplify fragments for the production of the megaprimer and the corresponding enzyme restriction sites are depicted. (C) Graphic representation of megaprimer potential hybridization at the EPIYA-C *cagA* region, during stage III mutagenesis assay.

used (10 µL) for transformation of competent DH5a *E. coli* strains. Clones were screened utilizing EPIYA PCR as described earlier [17].

To produce phosphorylation-deficient mutants by substitution of tyrosine with phenylalanine in the EPIYA-C coding motifs, we utilized the QuikChange II mutagenesis kit and mutagenesis primers EPIFA F and EPIFA R (Table 1). Clones were screened by EPIYA PCR [17], and mutations were confirmed by sequencing.

Natural Transformation of *H. pylori*

We utilized the protocol for *H. pylori* natural transformation through homologous recombination kindly provided by Dr. Hilde de Reuse of Institut Pasteur, Paris. Briefly, patches of *H. pylori* P12 strain (approximately 1 cm²) were prepared on CBA plates and were left to grow for 4 hours. On each patch, approximately 10 µL of corresponding DNA was added and the plates were left to incubate overnight. On the following day, each

patch was subcultured on CBA plates, supplemented with 20 µg/mL kanamycin and cultures were left to incubate for at least 5 days, under microaerophilic conditions at 37 °C, until colonies were visible. Clones were collected individually and screened by PCR for the correct number of EPIYA-C coding motifs in *cagA* gene as described before [17]. Clonal relatedness between the parental P12 *H. pylori* and the produced isogenic mutants was assessed by RAPD-PCR [24].

Liquid Cultures and Growth Rates

For the determination of growth rates, P12 mutant clones and the parental strain were first cultured in CBA plates for 48 hours, then suspended in brain heart infusion broth (BHIB) liquid cultures at an initial $OD_{600} = 0.2$, and at selected time points, viable numbers were determined. Liquid cultures of *H. pylori* were performed at 37 °C under microaerophilic conditions, in 10 mL of BHIB supplemented with 10% FBS (Gibco, Carlsbad, CA, USA), under agitation. Growth rates (k) were calculated using formula $N = N_0 e^{kt}$, where N_0 was the initial bacterial inoculum (in cfu) and N the bacterial numbers (in cfu) at the selected time point t .

In Vitro Infection of Gastric Epithelial Cells, CagA Immunoprecipitation, Immunodetection, and Evaluation of Scattering Phenotype

Gastric epithelial cell AGS (CRL-1739 from ATCC, Manassas, VA, USA; 4×10^5) were seeded in six-well plates and were infected with *H. pylori* at MOI 100 [17]. Total protein lysates were collected at 4 hours post-infection, and CagA immunodetection was performed utilizing polyclonal anti-CagA antibody (Austral Biologicals) [17,18]. Tyrosine-phosphorylated CagA protein was detected following phosphotyrosine immunoprecipitations [17]. For the evaluation of scattering phenotype, AGS cells were infected with *H. pylori* mutant strains (MOI 100) as described above. At 24 hours, infected cells were photographed on an inverted Zeiss microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). For every well, 10 different photographs were obtained, starting always at the top left of the well and moving to the right and down. Approximately 1000 cells per well were analyzed for their phenotypic characteristics as described before [5].

Determination of Bacterial Adherence to AGS Cells

Bacterial adherence to AGS cells plated in six-well plates was quantified by flow cytometry utilizing CFDA-SE labeled bacteria [25]. Briefly, bacterial suspensions (10^8 cfu/mL) were stained utilizing 5 µmol/L

CFDA-SE: 6-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (Fluka-Sigma, St. Louis, MI, USA) at 37 °C for 20 minutes. Bacteria were harvested by gentle centrifugation, resuspended in 1 mL of RPMI 1640 containing 10% FBS (complete medium), and incubated at 37 °C for 30 minutes. Following the infection procedure at MOI 100, AGS cells with adhered bacteria were washed thrice with PBS, detached with 1 mL trypsin EDTA (Gibco), and harvested in 1 mL of PBS. FACS analysis was performed on a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson) at the Hellenic Pasteur Institute Flow Cytometry Unit as described before [25].

Immunofluorescence and Confocal Microscopy

AGS cells (1.5×10^5 per well) were seeded in 24-well plates containing coverslips and were infected with CFDA-SE-labeled *H. pylori* at MOI 100. At collection time, cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde and 4% sucrose in PBS, and were made permeable with 0.1% Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Germany) in PBS. α -CagA antibody was used at a concentration of 1 µg/mL (Austral Biologicals, San Ramon, CA, USA) and the secondary Alexa Fluor 546 goat α -rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at a concentration of 2 µg/mL. Microscopic analysis of samples was performed on a Leica (Wetzlar, Germany) TCS SP confocal microscope using a 63 \times Apochromat lens.

Results

Modified QuikChange Mutagenesis Assay

Using pCA2 plasmid as a template and the megaprimer, we performed a modified QuikChange II mutagenesis assay and we were able in one reaction, to obtain all desired EPIYA combinations, namely the AB, ABC, and ABCCC (Fig. 3A). We validated the fidelity of sequences in all cases by DNA sequencing (data not shown). In this way, we generated plasmid-cloned P12 *cagA* gene sequences coding for the respective EPIYA combinations of AB (pCA0), ABC (pCA1), and ABCCC (pCA3). Utilizing plasmids pCA1-3, we also generated the respective phosphorylation-deficient EPIYA-C combinations, namely ABF (pCA1.1), ABFF (pCA2.2), and ABFFF (pCA3.3). The mutated sequences were confirmed by sequencing (data not shown).

Natural Transformation of Parental P12 Strain by Homologous Recombination

All plasmids (pCA0, pCA1, pCA3, pCA1.1, pCA2.2, and pCA3.3) were successful in transforming the parental

Papadakos et al.

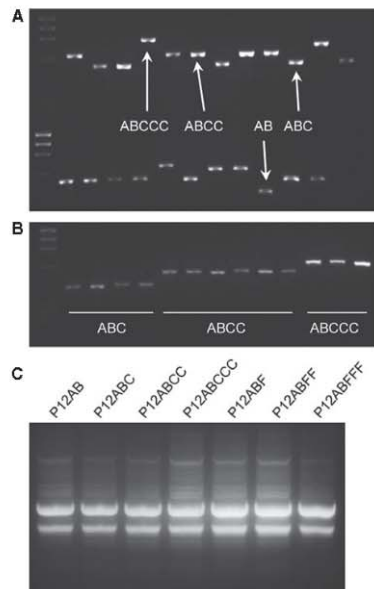
Generation of *H. pylori* Mutants with Polymorphic CagA

Figure 3 (A) Screening of representative clones for the determination of the number of EPIYA-C motifs in pCA2 plasmid following mutagenesis assay at stage III. DNA from *Escherichia coli* expressed clones was subjected to EPIYA PCR [17] followed by electrophoresis of PCR products in 1.5% agarose gel. The combination of EPIYA-C motifs obtained is depicted. (B) Screening of representative clones for the determination of the number of EPIYA-C motifs in *Helicobacter pylori* clones following homologous recombination. Isolated bacterial DNA from *H. pylori* clones following natural transformation of P12 parental reference strain was subjected to EPIYA PCR, followed by electrophoresis of PCR products in 1.5% agarose gel. Respective combinations of EPIYA-C motifs in the corresponding *H. pylori* clones are depicted. (C) Clonal relatedness of representative P12 CagA mutants assessed by RAPD-PCR utilizing D11344 primer.

P12 strain. More than 150 colonies were observed in each case. Eight clones were obtained from each transformation for further evaluation by EPIYA PCR (Fig. 3B). All *H. pylori* mutant strains revealed identical clonal relatedness to the parental P12 strain as demonstrated by RAPD-PCR (Fig. 3C) [24]. The correctness of the whole mutagenesis process was verified in all cases by nucleotide sequencing of the specific *cagA* regions in the mutant strains (data not shown).

Selection of Clones on the Basis of CagA Expression

To select the most suitable functional *H. pylori* strains, we screened at least eight clones per CagA EPIYA combination and determined the expression of CagA

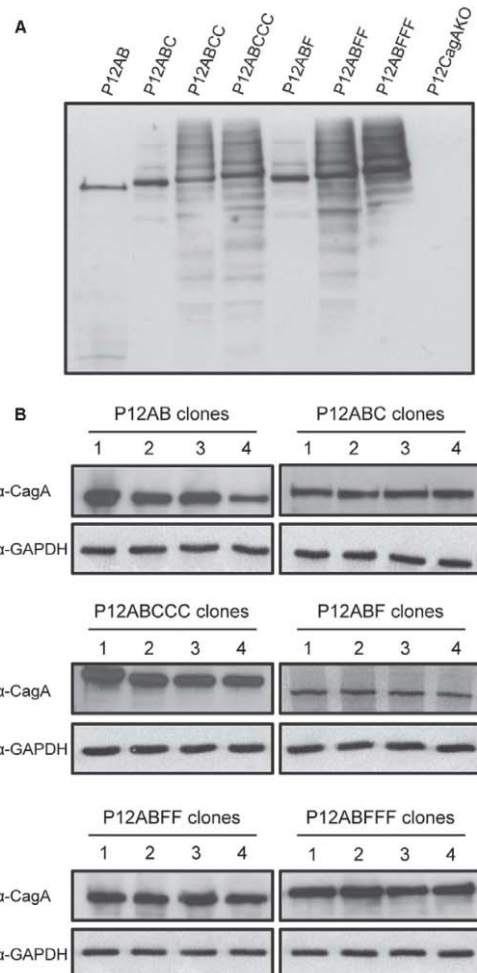


Figure 4 (A) CagA protein expression in total bacterial lysates utilizing α -CagA polyclonal antibody. A number of CagA protein species with masses between 40 and 120 kDa were detected, with the top bands corresponding to the full-length protein. (B) CagA protein expression in AGS cells following infection with *Helicobacter pylori* mutant clones expressing CagA with variable numbers of EPIYA-C or the corresponding phosphorylation-defective (EPIYA-C) motifs. CagA expression was determined in total cell lysates by Western blot, using polyclonal anti-CagA antibody. For GAPDH expression, a monoclonal anti-GAPDH antibody was used. Selection of clones was based on the amount of expressed CagA protein.

protein by Western blot initially, in total bacterial lysates (Fig. 4A) and then in total cell lysates following infection of AGS gastric epithelial cells (Fig. 4B). CagA protein expression in the bacterial strains was found to

be comparable to that of the parental strain (Fig. 4A). Size differences due to the varying number of EPIYA-C motifs were evident (Fig. 4A). Clones giving the highest expression rates of CagA protein species following AGS infection were chosen (Fig. 4B).

Bacterial Growth Rates and Adherence Rates to Gastric Epithelial Cells

Following the selection of one clone per CagA EPIYA combination, we sought to determine that these clones exhibit the same growth rates as the parental P12 strain. To accomplish that, we utilized liquid *H. pylori* cultures, under microaerophilic conditions and continuous agitation, and we determined bacterial numbers at selected time points. No significant difference in determined growth rates was observed between the parental P12 strain and the mutant P12 strains, in the logarithmic and the stationary growth phases (Table 2).

Moreover, no differences between the parental P12, the P12CagAKO, and the CagA mutant strains, with regard to binding potential to AGS cells, were observed following determination of the percentage of AGS cells with adhered *H. pylori* (Fig. 5). Adherence of all *H. pylori* strains was determined to be over 55% within the first half hour post-infection.

T4SS Functionality, CagA Translocation, and Tyrosine Phosphorylation

The ability to induce functional T4SS and successful translocation of CagA protein by our mutant strains labeled by CFDA-SE (in green) was verified by immunodetection of CagA (in red), utilizing confocal microscopy. Characteristic yellow protrusions, in the z-projections, appearing in the cell-adhered bacteria, suggestive of a functional pilus formation translocating CagA, were observed for all CagA and mutants harboring EPIYA or EPIFA motifs. To the contrary, no such

Table 2 Growth rates of *Helicobacter pylori* mutant strains

Bacterial strain	Growth rate ^a	
	5 hours	10 hours
P12AB	2.22	0.00
P12ABC	2.16	0.02
P12ABCC	2.25	0.01
P12ABCCC	2.12	0.00
P12ABF	2.20	0.03
P12ABFF	2.19	0.02
P12ABFFF	2.26	0.07

^a $N = N_0 e^{rt}$.

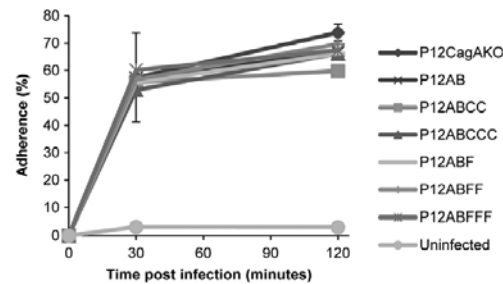


Figure 5 Adherence of *Helicobacter pylori* strains to AGS gastric epithelial cell line. Adherence of CFDA-SE-stained *H. pylori* mutant strains on AGS cells was determined by FACS analysis [25]. Adherence (%) refers to the percentage of AGS cells with bound fluorescent bacteria detected.

yellow protrusions, in the cell-adhered bacteria, were detected in the case of the *cagPAI*-defective P12CagEKO strain and the P12CagAKO (Fig. 6). Phosphorylation status of CagA protein was determined following immunoprecipitation utilizing antityrosine antibody PY20, followed by CagA immunodetection. In all cases, we were able to detect tyrosine-phosphorylated CagA protein at the expected molecular weight, a fact that indicates that the protein was successfully translocated (Fig. 7A). Cellular scattering phenotype was observed only in the case of CagA harboring EPIYA-C motifs. More specifically, cellular scattering proportional to the number of EPIYA-C phosphorylation motifs was observed only for the P12ABC, P12ABCC (wt), and P12ABCCC bacterial strains (Fig. 7B,C). On the contrary, strains P12CagAKO, P12AB, lacking functional EPIYA-C motifs, or dominant negative EPIFA-C phosphorylation mutant strains P12ABF, P12ABFF, and P12ABFFF, failed to induce cell motility and elongation characteristic phenotypes (Fig. 7B,C).

Discussion

The type and the number of EPIYA motifs at the carboxyl-terminal end of CagA seem to dictate cellular effects, which converge toward the deregulation of several cellular molecular mechanisms. Due to the characteristic *H. pylori* genome variability, clinical isolates from different patients expressing CagA protein with variable number and types of EPIYA motifs can only offer occasional information on the effect of such different motifs. In this study, our goal was to design a simple and relatively fast method, to produce isogenic mutant strains expressing CagA protein with variable numbers of added or deleted EPIYA-C motifs in *H. pylori* reference strains with known genomic sequence, through natural

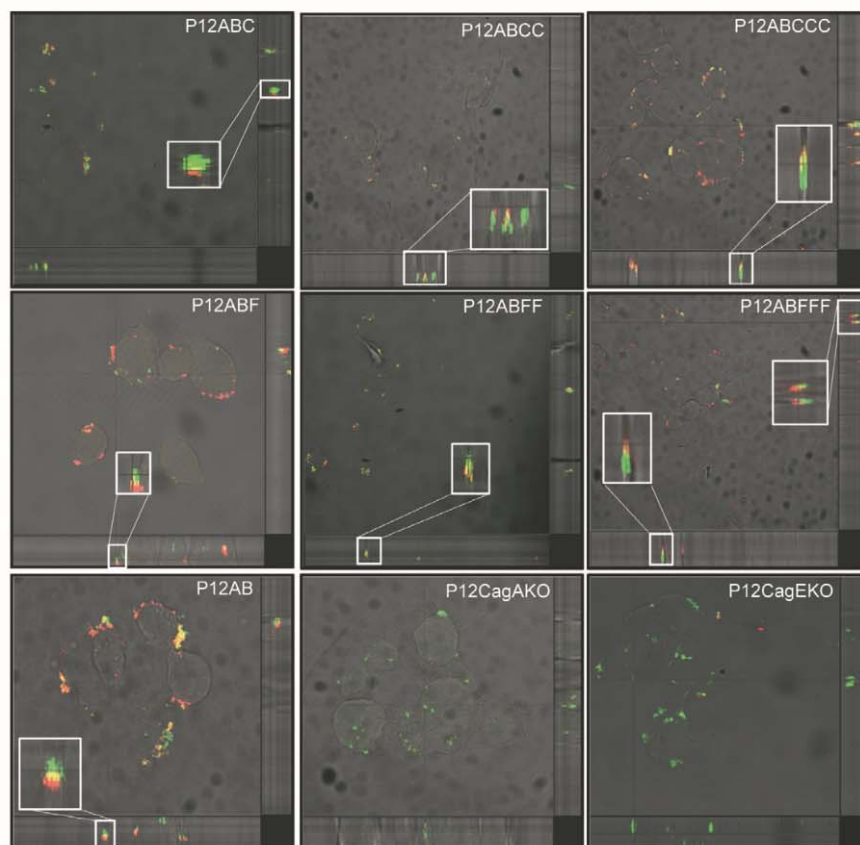


Figure 6 Functionality of Type IV Secretion System in the produced *Helicobacter pylori* mutants. *H. pylori* mutant strains were stained by CFDA-SE (green) and were used to infect AGS cells plated on coverslips. Samples were subjected to confocal microscopy. CagA was detected by immunofluorescence utilizing primary α -CagA antibody and secondary Alexa Fluor 546 goat α -rabbit IgG antibody (red). In z-projections, characteristic yellow protrusions appearing in the cell membrane adhered bacteria, suggestive of a functional pilus formation translocating CagA, were observed for all mutant *H. pylori* strains, except in the cases of P12CagEKO and P12CagAKO.

transformation, utilizing targeted homologous recombination. To overcome such problems and work in an isogenic background, we embarked upon the construction of cagA-positive mutants, expressing CagA protein with variable numbers of EPIYA-C motifs (AB, ABC, and ABCCC) and their nonphosphorylated counterparts (AB, ABF, ABFF, and ABFFF) based upon parental P12 reference strain. We selected the *H. pylori* P12 strain as it has been widely utilized in pioneering studies in the field of *H. pylori* pathogenesis and because the whole genome sequence has been published [26]. Construction involved four separate stages. At stage I, we cloned, full-length cagA gene, adjoined at its 5' end to the *C. jejuni* kanamycin-resistance cassette (*Kan^r* cassette) and

followed by the 1200-bp region immediately following after cagA gene (metacagA region) in the P12 *H. pylori* genome. To accomplish reliable full-length cagA gene amplification, we designed novel primers mapping the edges of the P12 gene sequence and utilized Vent polymerase to ensure fidelity of amplification [27]. Furthermore, conditions of amplification were adjusted so as to accomplish uninterrupted full cagA amplification of the whole gene. To verify the amplified cagA sequence, we designed a number of novel overlapping sequencing primers taking into account the complete genome *H. pylori* sequences of P12 as well as other Western origin reference strains (26695, G27, and HPAG1). With reference to the appropriate size of the metacagA

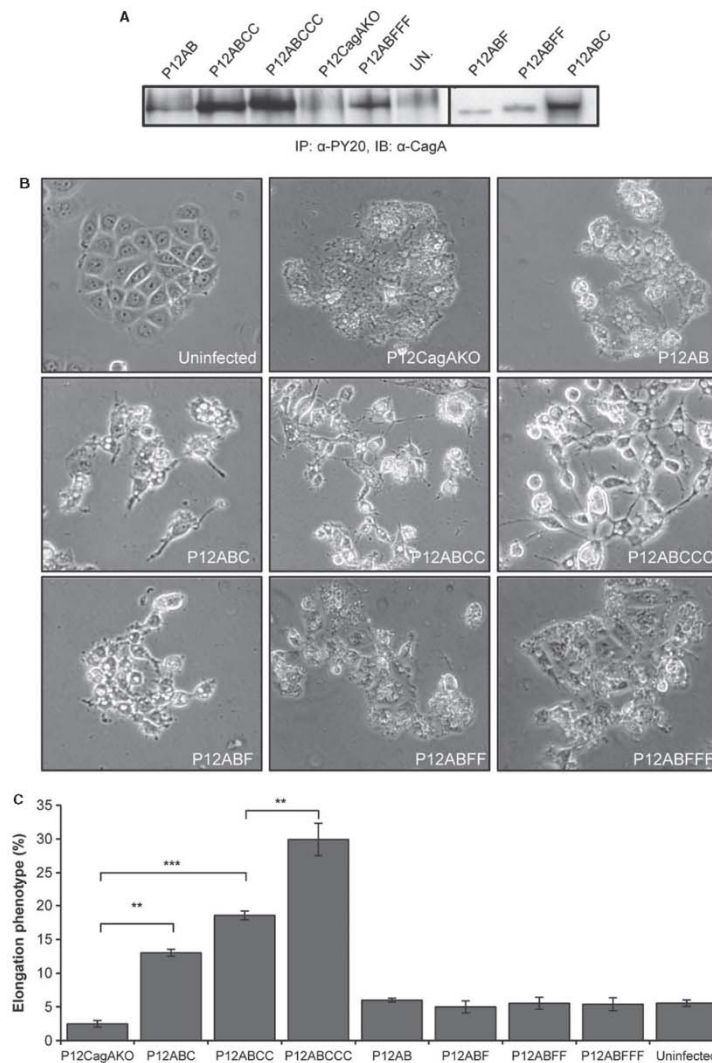


Figure 7 CagA phosphorylation and induction of elongation and scattering phenotype. AGS cells were infected for 24 hours at MOI 100, with *Helicobacter pylori* mutants expressing CagA with phosphorylation-functional EPIYA-C or phosphorylation-defective (EPIFA-C) motifs. (A) Determination of phosphorylation status of expressed CagA protein, following immunoprecipitation of tyrosine-phosphorylated proteins, utilizing anti-PY-20 antibody followed by Western blot with polyclonal anti-CagA antibody. (B) Representative phase-contrast microscopy images, depicting induction of elongation and scattering phenotypes induced. (C) Percentage of AGS cells expressing elongation and scattering phenotypes following *H. pylori* infection at 24 hours post-infection. Statistical analysis was performed by Student's *t*-test (P12CagAKO vs P12ABCC $p = .001$; P12ABCC vs. P12ABCCC $p = .002$). Levels of significance depicted are * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 .

sequence, we selected an approximate length of 1200 bp based upon earlier observations about the optimum conditions for homologous recombination in *H. pylori* [28] and previous reports for successful targeted recombination [29]. At stage II, we generated a megaprimer consisting of three consecutive copies of the EPIYA-C coding sequence of *cagA* gene of P12, followed at its 5' end by the 140-bp region of the *cagA* genomic sequence present immediately after the second EPIYA-C repeat in P12 reference strain genome. A critical point at this stage was controlling and checking the fidelity of the amplified sequences, utilizing the overlapping sequencing primers we designed. At stage III, we utilized the products of stages I and II to perform a QuickChange mutagenesis assay to obtain all desired combinations of EPIYA-C motifs, followed by the *Kan^r* cassette and the 1200-bp region downstream of *cagA* gene in one reaction. We selected this very well-documented methodology [23,30,31] for its ease and the fact that it could easily be modified to suit our needs [23]. Because a major obstacle was the highly repetitive nature of the nucleotide sequence including the MKI region and the EPIYA-C coding region, the modified mutagenesis protocol [23], using a megaprimer approach enabled us to introduce DNA fragments as long as 1117 bp. In addition, design of a suitable megaprimer ensured that, under the appropriate hybridization and annealing temperature conditions [23], all the desired insertion and deletion combinations of EPIYA-C in the *cagA* could be obtained, within a single reaction. Similar methodology has also been utilized before to introduce single nucleotide mutations or deletions in *cagA* gene [21,29,32], although addition of EPIYA-C-coding regions was not documented. At the final stage IV, we used these constructions to perform natural transformation of the P12 parental strain, by directional homologous recombination, as this is the most widely accepted and adopted method to incorporate mutation to the *H. pylori* genome [6,33–35].

Another aspect of this study was to prove that the whole process of *cagA* mutation and introduction in the P12 strain did not influence the bacterial genome in such a way that could produce polar effects and erroneous experimental results. For this purpose, we proceeded to screen our mutant strains meticulously with a serial of genetic, protein, and functional screening methods. More specifically, in comparison with the wild-type parental strain, we proved that our *H. pylori* mutants had the correct corresponding *cagA* nucleotide sequence, exhibited the same ability to grow and adhere to the surface of epithelial cells and expressed a functional type IV secretion system, capable of translocating CagA inside the gastric epithelial cells. In terms of CagA protein tyrosine phosphorylation and the consequent effects of cellu-

lar elongation and scattering, our data prove that genetic manipulation did not affect *cagPAI* gene activity and the ability of individual motifs such as EPIYA-A and EPIYA-B to be phosphorylated in the EPIYA-C mutants. Moreover, our genetic manipulation did not affect *cagPAI* functionality in agreement with the view expressed elsewhere that because *cagA* gene is monocistronic and transcribed in the opposite direction, compared to other genes of the *cagPAI*, it is unlikely that polar effects on other genes within the *cagPAI* would be possible [36–38]. With reference to CagA phosphorylation, our results are in agreement with the accepted view that induction of the cellular scattering phenotype involves phosphorylation of CagA at EPIYA-C motifs exclusively and that this is proportional to the number of EPIYA-C motifs. Furthermore, another well-studied region within the EPIYA-C coding sequence is the CM region required for PAR1b interaction [39,40]. Structural analysis suggests that this region can act as a molecular anchor [41] and a kinase-binding region [42] and was suggested to play a role in the activation of NF- κ B and the secretion of IL-8 [13]. For this reason, the EPIYA mutants, generated within this study, can be viewed as the perfect dominant negative controls, as they contain intact CM regions capable of inducing kinase binding.

In this study, we established a mutagenesis method by which, within one single reaction, we were able to generate additions and deletions of EPIYA-C coding motifs in all possible combination numbers in the *cagA*. In this way, we produced *H. pylori* isogenic strains that express CagA protein with variable numbers of EPIYA-C motifs, capable of translocation to gastric epithelial cells, without the presence of polar effects in neighboring *cagPAI* genes.

Acknowledgements and Disclosures

The authors would like to thank Dr. Armond van Vliet and Dr. Hilde De Rense for their support and most valuable technical expert consultations and also the members of the Light microscopy and Flow Cytometry Units of the Hellenic Pasteur Institute for their useful technical advice. This study was supported in part by a Hellenic Pasteur Institute grant (HPI-922616), and ANR 2006 ERANET «Pathogenomics» ANR 06 PATHO 007 01. **Competing interests:** the author have no competing interests.

References

- 1 Bouvard V, Baar K, Straif K, et al. A review of human carcinogens Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009;10:321–2.
- 2 Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:441–52.
- 3 Björkholm B, Sjölund M, Falk PG, Berg OG, Engstrand L, Andersson DI. Mutation frequency and biological cost of antibi-

- otic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:14607–12.
- 4 Kang J, Blaser MJ. Bacterial populations as perfect gases: genomic integrity and diversification tensions in *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:826–36.
 - 5 Karnholz A, Hoefler C, Odenbreit S, Fischer W, Hofreuter D, Haas R. Functional and topological characterization of novel components of the comB DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 2006;188:582–93.
 - 6 Hofreuter D, Odenbreit S, Henke G, Haas R. Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: identification and genetic characterization of the comB locus. *Mol Microbiol* 1998;28:1027–38.
 - 7 Ge Z, Taylor DE. *H. pylori* DNA transformation by natural competence and electroporation. *Methods Mol Med* 1997;8:145–52.
 - 8 Nomura AM, Perez-Perez G, Lee J, Siemmermann G, Blaser MJ. Relation between *Helicobacter pylori* cagA status and risk of peptic ulcer disease. *Am J Epidemiol* 2002;155:1054–9.
 - 9 Blaser MJ, Perez-Perez G, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Stremmelmann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995;55:2111–5.
 - 10 Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004;113:521–33.
 - 11 Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol* 2006;1:63–96.
 - 12 Odenbreit S, Puls J, Sedlmair B, Getland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000;287:1497–500.
 - 13 Mueller D, Tegtmeyer N, Brandt S, Yanakaoka Y, De Pointe E, Sgouras D, Wessler S, Torres J, Smolka A, Backert S. c-Src and c-Abi kinases control hierarchical phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Invest* 2012;122:1553–66.
 - 14 Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer* 2004;4:688–91.
 - 15 Backert S, Tegtmeyer N, Sellach M. The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein: functions: The master key hypothesis. *Helicobacter* 2010;15:163–76.
 - 16 Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakis KS, Petraki K, Breurec S, Michopoulos S, Mantzaris G, Papatheodoridis G, Mentis A. Archimandritis A. CagA and VacA polymorphisms are associated with distinct pathological features in *Helicobacter pylori*-infected adults with peptic ulcer and non-peptic ulcer disease. *J Clin Microbiol* 2010;48:2237–9.
 - 17 Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakis K, Kalihopoulos A, Papatheodoridis G, Mentis AF, Archimandritis AJ. Strategy to characterize the number and type of repeating EPTYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2007;45:488–95.
 - 18 Sgouras DN, Panayotopoulou EG, Papadakis K, Martinez-Gonzalez B, Rounbani A, Panayiotou J, vanVliet-Constantinidou C, Mentis AF, Roma-Giannikou E. CagA and VacA polymorphisms do not correlate with severity of histopathological lesions in *Helicobacter pylori*-infected Greek children. *J Clin Microbiol* 2009;47:2426–34.
 - 19 Argent RE, Kidd M, Owen RJ, Thomas RJ, Lin MC, Atherton JC. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2005;127:311–23.
 - 20 Basso D, Zamboni CB, Letley DP, et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008;135:91–9.
 - 21 Higashi H, Tsubomi 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* 2002;99:14428–33.
 - 22 van Vliet AH, Wooldridge KG, Kettle JM. Iron-responsive gene regulation in a campylobacter jejuni tur mutant. *J Bacteriol* 1998;180:5291–8.
 - 23 Geiser M, Cebe R, Drewello J, Schmitz R. Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase. *Biochemistry* 2001;31:88–90.
 - 24 Akopyanz N, Bukharov NO, Westblom TU, Krcovich S, Berg DE. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by Pcr-based rapid fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1992;20:5137–42.
 - 25 Fogar RP, Robins A, Turner GA, Cockayne A, Borriello SP, Hawkey CJ. A novel flow cytometric assay for quantitating adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. *J Immunol Methods* 1998;213:19–30.
 - 26 Fischer W, Windhager T, Rohrer S, Zeller M, Karnholz A, Hoffmann R, Zimmer R, Haas R. Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res* 2010;38:6089–101.
 - 27 Matula P, Korpela J, Tenkanen T, Pitkanen K. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase: an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. *Nucleic Acids Res* 1991;19:4967–73.
 - 28 Pydiab S, Menard A, Zerbib E, Megraud F. Evaluation of the homologous recombination in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2005;10:185–92.
 - 29 Kurashina Y, Murata-Kamiya N, Kikuchi K, Higashi E, Azuma T, Kondo S, Hatakeyama M. Deregulation of beta-catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA requires the CagA-multimerization sequence. *Int J Cancer* 2008;122:823–31.
 - 30 Makareva O, Kamberov E, Margolis B. Generation of deletion and point mutations with one primer in a single cloning step. *Biochemistry* 2000;29:970–2.
 - 31 Wang W, Malcolm BA. Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using quickChange Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry* 1999;26:680–2.
 - 32 Naito M, Yanzaki T, Tsubomi R, Higashi H, Onoe K, Yamazaki S, Azuma T, Hatakeyama M. Influence of EPTYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology* 2006;130:1181–90.
 - 33 Haas R, Meyer TF, van Putten JP. Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol Microbiol* 1993;8:753–60.
 - 34 Hofreuter D, Odenbreit S, Haas R. Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol Microbiol* 2001;41:379–91.
 - 35 Ferrero RL, Cussac V, Courcoux P, Lahigne A. Construction of isogenic urease-negative mutants of *Helicobacter pylori* by allelic exchange. *J Bacteriol* 1992;174:2212–7.

Papadakos et al.

Generation of *H. pylori* Mutants with Polymorphic CagA

- 36 Schweitzer K, Sokolova O, Bozko EM, Nautmann M. *Helicobacter pylori* induces NF- κ B independent of CagA. *EMBO Rep* 2010;11:10 1; author reply 1–2.
- 37 Cersini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. *cagA*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type 1-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14648–53.
- 38 Tamò A, Li J-D, Hatakeyama M, Peek RM, Blanke SR, Chen L-F. Response: strain-specific activation of NF- κ B by *Helicobacter pylori* CagA. *EMBO Rep* 2010;11:11 2.
- 39 Saadat I, Higashi H, Ouse C, et al. *Helicobacter pylori* CagA targets PARI/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* 2007;447:330–3.
- 40 Ren S, Higashi H, Li H, Azuma T, Hatakeyama M. Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells. *J Biol Chem* 2006;281:32344–52.
- 41 Lu ES, Saito Y, Umeda M, Mura-Kamiya N, Zhang HM, Higashi H, Hatakeyama M. Structural and functional diversity in the PARI/MARK2-binding region of *Helicobacter pylori* CagA. *Cancer Sci* 2008;99:2004–11.
- 42 Nesić D, Miller MC, Quirkkeri ZT, Stein M, Chait BT, Stebbins CE. *Helicobacter pylori* CagA inhibits FARI-MARK family kinases by mimicking host substrates. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:130–2.
- 43 Székely M, Mincuro E, Kiga K, et al. *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host Microbe* 2009;5: 23–34.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Expansion of European *vacA* and *cagA* alleles to East-Asian *Helicobacter pylori* strains in Cambodia

Sebastien Breurec^{a,b,*}, Bertrand Guillard^b, Sopheak Hem^b, Konstantinos S. Papadakos^c, Sylvain Brisse^d, Michel Huerre^e, Didier Monchy^{b,f}, Chakravuth Oung^g, Dionyssios N. Sgouras^c, Tek Sreng Tan^h, Jean-Michel Thiberge^d, Sirenda Vongⁱ, Josette Raymond^j, Bodo Linz^k

^a Unité de Bactériologie Médicale et Environnementale, Institut Pasteur, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal

^b Unité de Biologie Médicale, Institut Pasteur, 5 Boulevard Monivong, BP 983, Phnom Penh, Cambodia

^c Laboratory of Medical Microbiology, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas. Sofias Avenue, Athens 11521, Greece

^d Plate-forme Génomique des Pathogènes et Santé Publique, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

^e Unité de Recherche et d'Expertises en Histotechnologie et Pathologie, Institut Pasteur, Paris, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

^f Laboratoire de Biologie médicale, Institut Pasteur, BP923, Bangui, République Centrafricaine, France

^g Gastroenterology and Liver Unit, Calmette Hospital, 3 boulevard Monivong, Phnom Penh, Cambodia

^h Private Medical Center, No. 29 street 288, Boeng Kengkang 1, Chamkamon, Phnom Penh, Cambodia

ⁱ Unité d'Epidémiologie et de Santé Publique, Institut Pasteur, 5 Boulevard Monivong, BP 983, Cambodia

^j Unité Postulante Pathogénèse de *Helicobacter*, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

^k Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, 312 Wartik Lab, University Park, PA 16802, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2011

Received in revised form 4 August 2011

Accepted 7 August 2011

Available online 17 August 2011

Keywords:

H. pylori

cagA

vacA

Recombination

Genetic population

Cambodia

ABSTRACT

Helicobacter pylori infection is associated with gastric cancer (GC). The highest incidence rates have been described in Asia, but regional variations exist that do not match the distribution of infection prevalence rates. The aim of the study was to examine the possible contribution of *H. pylori* virulence factors to geographic differences in the incidence of GC across East and Southeast Asia. We studied 66 isolates from Cambodian patients that had previously been assigned to two genetic populations based on sequences of seven housekeeping genes, namely hpEurope ($n = 34$, 51.5%) and hpEastAsia, subpopulation hspEAsia ($n = 32$, 48.5%). These strains were characterized with respect to *vacA* polymorphism and *cagA* status by PCR, and the CagA C-terminal region was sequenced. We also sequenced the complete *cagA* gene from 10 hpEurope and 10 hspEAsia strains chosen at random. The *cagA* gene was present in 92.4% of the 66 isolates and was mainly of Western type ($n = 36$, 59.0%). hspEAsia strains carrying East-Asian CagA and the m1-type *vacA* allele (15.2%) were less frequent among the 66 Cambodian isolates than reported in East Asian countries, a finding that might partly explain the intermediate incidence of GC in Cambodia, and by extension, in Southeast Asia (except for Vietnam). The observed high prevalence of s1a alleles (34.4%) and Western CagA (28.1%) among hspEAsia strains indicates frequent introgression of European *vacA* and *cagA* alleles into East Asian *H. pylori* strains. This expansion might have severe consequences for individual disease outcome.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Helicobacter pylori infects the gastric mucosa of more than half the world population. Although all infected individuals develop *H. pylori*-associated gastritis, only a small percentage of colonized

individuals develop severe gastroduodenal diseases such as gastric and duodenal ulcer (10%), or gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma (1–4%) (Hatakeyama, 2009). Outcome of the infection is dependent on host, environmental and *H. pylori* virulence factors.

H. pylori isolates have been subdivided into distinct (sub-) populations on the basis of sequence differences in seven core genes, with specific geographic distributions that reflect ancient human migrations (Falush et al., 2003b; Linz et al., 2007; Moodley et al., 2009; Tay et al., 2009): hpEurope (present in Europe, the Middle East, India and Iran), hpNEAfrica (present in Northeast Africa), hpAfrica1 (present in Western Africa and South Africa), hpAfrica2

Abbreviations: *cag* PAI, *cag* pathogenicity island; EPIYA, Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala; GC, Gastric carcinoma; SH2, cytoplasmic Src homology 2; SHP-2, Src homology 2 phosphatase; NFAT, nuclear factor of activated T cells.

* Corresponding author at: Unité de Bactériologie Médicale et Environnementale, Institut Pasteur, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal. Tel.: +221 33 839 92 30; fax: +221 33 822 70 52.

E-mail address: sbreurec@pasteur.sn (S. Breurec).

1567-1348/\$ - see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.meegid.2011.08.007

(present in South Africa), hpAsia2 (present in Northern India, Bangladesh, Thailand and Malaysia), hpSahul (from Australian Aboriginals and Papua New Guineans) and hpEastAsia with the subpopulations hspEAsia (from East Asians), hspMaori (from Taiwanese Aboriginals, Melanesians and Polynesians) and hspAmerind (Native Americans).

The CagA protein, one of the most extensively studied *H. pylori* virulence factors, is delivered into gastric epithelial cells by the type IV secretion system, which is encoded by genes present in the *cag* pathogenicity island (*cag* PAI) (Hatakeyama, 2009). Translocated CagA undergoes tyrosine phosphorylation by multiple Src family kinases on specific tyrosine residues within repeating Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) motifs. EPIYA segments are designated EPIYA-A, -B -C and -D according to the amino acid sequence that surrounds the EPIYA motif (Hatakeyama, 2009). The EPIYA-A and -B motifs are found in almost all *H. pylori* strains worldwide. In addition, the EPIYA-C segment is found in “Western CagA” in hpAfrica1, hpEurope, hpNEAfrica strains and some hpAsia2 strains from Southeast Asia, while the EPIYA-D segment is characteristic for “East-Asian CagA” in hpEastAsia strains and in some hpAsia2 strains from Ladakh in Northern India. The only available to date *cagA* sequence of a hpSahul strain possessed the EPIYA-A and EPIYA-B motifs but neither EPIYA-C nor EPIYA-D. In addition, none of the hpAfrica2 strains possessed the *cag* PAI (Olbermann et al., 2010). Once phosphorylated, CagA binds to a cytoplasmic Src homology 2 (SH2) domain of the Src homology 2 phosphatase (SHP-2) and deregulates SHP-2. CagA also binds to and inhibits PAR1b/MARK2 polarity-regulating kinase, which leads to disruption of apical junctions and epithelial-basolateral polarity (Isomoto et al., 2010). Together, these CagA activities may contribute to neoplastic transformation of gastric epithelial cells.

A second major virulence factor is the cytotoxin VacA, a protein that can promote cell death through apoptosis, suppress the local immune system, disrupt endocytic trafficking in host cells, and induce vacuolisation of human epithelial cells *in vitro* (Isomoto et al., 2010). Virtually all strains carry a functional *vacA* gene but not all encoded VacA proteins induce vacuolisation, thus pointing to *vacA* genetic variability. Three major polymorphic VacA protein regions have been identified: the signal region (s1 and s2), the intermediate region (i1 and i2) and the middle region (m1 and m2). s1/i1/m1-or-m2 VacA isotypes generally induce high levels of vacuolisation, whereas s1-or-s2/i2/m1-or-m2 strains induce little if any vacuolisation (Rhead et al., 2007).

Gastric carcinoma (GC), the fourth most common cancer worldwide, is the second cause of cancer-related deaths (Parkin, 2004). Age-standardized incidence rates (ASR) are highest in East Asia, but they decline at increasingly southerly latitudes (Ferlay et al., 2010). Variations of ASRs do not match variations of infection prevalence rates, except in Malays (Fock and Ang, 2010), indicating that other factors are also involved. Mongolia, Japan, Korea, China and Vietnam are classified as countries with a high risk of GC (ASR 18.9 to 41.4/100 000), while Cambodia (South East Asia) is classified as a country with an intermediate risk of GC (ASR 9.8/100 000), along with Myanmar (ASR 11.0/100 000) and Singapore (ASR 10.9/100 000). The risk is low in Bangladesh, Laos, Thailand and India (ASR 3.5 to 5.2/100 000).

Cambodia borders Thailand to the west and northwest and Vietnam to the east and southeast, and is therefore situated between regions with low and high risks of GC. Cambodia's population is mainly of Khmer origin and speaks the Khmer language related to the Vietnamese language (Vietnam) in the sub-family Mon-Khmer of the Austro-Asiatic language family (Lewis, 2009). Here we characterized *H. pylori* clinical isolates from Cambodia with respect to their *cagA* status, the diversity of the *cagA* gene 3' region, and *vacA* s, m, and i region polymorphisms, in order to examine the possible contribution of these factors to geographic differences in

the incidence of GC across East and South-East Asia. We also examined the *cagA* population genetic structure of 20 randomly selected strains.

2. Materials and methods

2.1. Patients

We studied isolates from patients presenting with upper abdominal pain to the Gastroenterology Department of Calmette Hospital ($n = 37$) or a private medical center ($n = 29$), both located in Phnom Penh, Cambodia, in 2004 and 2007. All the patients were of Cambodian origin, and none had received proton pump inhibitors or antibiotics within 4 weeks before endoscopy. Three biopsy samples each were taken from the antrum and the fundus during upper gastrointestinal tract endoscopy. One biopsy from each site was cultured for *H. pylori* isolation, and the four others were fixed and processed for histological analysis. All endoscopes and accessory devices were decontaminated after every endoscopy according to local written procedures. Written informed consent was obtained from all the patients and the study protocol was approved by the Cambodian national medical ethics committee for Health Research under ethics certificate 017/03NECHR.

2.2. Histology

Gastric biopsies were fixed then embedded and studied after usual staining. The classification of gastritis and other lesions was performed according to the criteria of updated Sydney system (Fenoglio-Preiser et al., 1999).

2.3. *H. pylori* isolation, genomic DNA extraction, and determination of *cagA* status and *cagA* and *vacA* polymorphism

H. pylori culture was performed using Wilkins Chalgren agar plates with 7% (v/v) defibrinated horse blood and *H. pylori* selective antibiotic supplement (Oxoid, Basingstoke, UK) as previously described. DNA was extracted from a single colony grown from an antrum or fundus biopsy using a QIAmp™ kit (Qiagen, Courtabouff, France). Polymorphism of *vacA* regions s, m, and i, and *cagA* status, were determined as described elsewhere (Breurec et al., in press; Panayotopoulou et al., 2007; Panayotopoulou et al., 2010).

To amplify the variable 3' region of the *cagA* gene, we designed a new forward primer after initial alignment of Genbank *cagA* sequences of *H. pylori* isolates from Asian patients: primer 2551*cagA*-F (5'-GGAACCTAGTCGGTAAYGGG-3', where Y = T or C) was designed to recognize positions 582473 to 582491 of the *H. pylori* 26695 genome. The reverse primer 3189*cagA*-R (5'-GCGTATGGCTGTTAGTAGCG-3') was previously described by Uchida et al (Uchida et al., 2009). PCR amplification was carried out in 50- μ l reaction mixtures containing 2.5 μ l of 10 \times PCR buffer (Eurobio), 1.5 U of Taq (Eurobluetaq, Eurobio), 200 μ M deoxynucleoside triphosphates, 0.5 μ M each primer, and 50 ng of microbial genomic DNA. The PCR conditions included an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 45 s, and 72 °C for 45 s, and then an extension step at 72 °C for 5 min. PCR products were analyzed on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Amplified DNA fragments were purified with Microspin S-400 HR columns (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Uppsala, Sweden), and direct sequencing was performed with the ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) on an ABI 3700 DNA sequencer (PE Applied Biosystems). The number and type of EPIYA segments were inferred as previously described (Panayotopoulou et al., 2007).

2.4. Sequencing and analysis of the complete *cagA* gene

The full-length *cagA* gene was amplified by PCR as previously described (Yamazaki et al., 2005). PCR products were analyzed on 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Amplified DNA fragments were purified with Microspin S-400 HR columns (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Uppsala, Sweden), and direct sequencing was performed with the ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) on an ABI 3700 DNA sequencer (PE Applied Biosystems). The full *cagA* gene was sequenced by primer-walking using the primers listed in Table 1.

Full-length sequences of the *cagA* gene were aligned using the ClustalW program (Larkin et al., 2007). The neighbor-joining tree was obtained with MEGA v4 (Tamura et al., 2007), using a distance matrix calculated with the Kimura 2 parameter model of sequence evolution. *cagA* population assignment was based on the approach described by Falush et al (Falush et al., 2003b) using the “no admixture” model of STRUCTURE (Falush et al., 2003a). The linkage model in STRUCTURE was used to estimate the proportion of nucleotides derived from each ancestral population (Falush et al., 2003b; Linz et al., 2007).

2.5. GenBank accession numbers

The nucleotide sequences have been deposited in Genbank under accession numbers JF798688–JF798748.

2.6. Statistical analysis

Microsoft Access 2003 was used for data entry, and Stata Version 10 (StataCorp, College Station, TX, USA) for statistical analysis. A Fisher's exact test was used to identify determinants of ulcerated lesions and GC. *P*-values <0.05 were considered to denote a significant association.

3. Results and discussion

3.1. *H. pylori* isolates from Cambodians, Cambodia

We studied 66 *H. pylori* isolates recovered from gastric biopsies of 66 different patients (36 males, 30 females, mean 44.7 years,

median 46.0 years, range 18–76 years). Based on endoscopic findings, 60 patients had gastritis only, five had ulcerated lesions, and one signs of neoplasia. GC was histologically confirmed in the latter patient. The number of cases was too small to identify risk factors for severe gastroduodenal disease (data not shown).

The genetic background of the 66 *H. pylori* isolates studied here has been described elsewhere based on sequences of seven house-keeping genes (Breurec et al., 2011a). These isolates belonged to the genetic populations hpEurope (*n* = 34, 51.5%), and hpEastAsia, subpopulation hspEAsia (*n* = 32, 48.5%).

As *H. pylori* is a bacterial genetic marker of human migrations, we provided evidence that at least three ancient human migrations introduced distinct genetic populations carrying specific virulence factors into Southeast Asia: (i) a migration of Austro-Asiatic speaking people about 4000 years ago from China into Vietnam and Cambodia carrying hspEAsia bacteria, (ii) a migration from India introducing hpEurope bacteria into Thailand, Cambodia and Malaysia within the last 2000 years, (iii) a migration of the ancestors of the Thai people from Southern China into Thailand carrying *H. pylori* of population hpAsia2 during the early second millennium AD (Breurec et al., 2011a). The distribution of *H. pylori* populations in East and Southeast Asia is closely related to the distribution of gastric cancer (Falush et al., 2003b; Ferlay et al., 2010; Linz et al., 2007; Tay et al., 2009). Countries where hspEAsia predominates (Japan, China, Korea, and Vietnam) exhibit a high incidence of GC, while the incidence is low in countries where hpAsia2 predominates, such as Thailand, Cambodia, which displays a mixture of hpEurope and hspEAsia strains, is classified as a country with an intermediate risk of GC. Then, the genetic population might be a marker for virulence factors directly involved in the outcome of *H. pylori* infection.

3.2. *cagA* status, EPIYA diversity, and gastric cancer incidence

The *cagA* gene was present in 61 (92.4%) of the 66 isolates, and was significantly more frequent in hspEAsia strains (100%) than in hpEurope strains (85.3%), as previously described (Olbermann et al., 2010). The empty site was successfully amplified in the 5 *cag* PAI-negative strains with primers derived from the *cag* PAI flanking regions. The EPIYA diversity of the 61 *cagA* genes was analysed, revealing the presence of all four EPIYA motifs, namely

Table 1
List of oligonucleotides primers used for the full *cagA* sequencing.

Primer	Primer sequence (5'–3')	Corresponding DNA sequence*	Reference
<i>cagA</i> L2 (+)	AAGGAGAAACAATGACTAACGAAACTATTG	–11–19	40
<i>cagA</i> L2 (–)	TCCTTTAAGATTTTTGGAAACCCACCTTTTG	+4–3536	40
<i>cagA</i> A1-F (+)	CTGCCAARCAATCTTTTCAGG R = A/G	499–520	This study
<i>cagA</i> A1-R (–)	TCITTTGASATCRGAMGATTG S = C/G, R = A/G, M = C/A	691–672	This study
<i>cagA</i> 2-F (+)	CCGTTGGTTATAAARACCAACAAGG R = A/G	1015–1039	This study
<i>cagA</i> 4-R (–)	TGCTTCYAAATGRGAACGCCATT Y = T/C, R = A/G	1604–1581	This study
<i>cagA</i> 3-F (+)	TYACTGAGTTTGGTAATGGGGA Y = T/C	1387–1408	This study
<i>cagA</i> 12-R (–)	GGAACCTAGTCGGTAAYGGTT Y = T/C	2572–2552	This study
<i>cagA</i> 4-F (+)	GCRAAAKCTCAAGCTAACAGC K = G/T	1947–1964	This study
3189 <i>cagA</i> -R (–)	GCGTGTGGCTGTTAATAGC	3209–3189	This study
2551 <i>cagA</i> -F (+)	GGAACCTAGTCGGTAAYGGG Y = T/C	2550–2571	This study
<i>cagA</i> A11-F (+)	GTARRGTAGGCTTTCAAGG R = A/G	2878–2894	This study

* Nucleotide positions in the HP0547 (*cagA*) gene of *H. pylori* 26695 (GenBank accession no. AE000569).

EPIYA-A (EPIYAQVNK), EPIYA-B (EPIYAQVAK), EPIYA-C (EPIYA-TIDD/E), and EPIYA-D (EPIYATIDF). The predominant EPIYA combinations in our strains were ABC ($n = 30$, 45.5%) and ABD ($n = 23$, 34.8%). None of the strains with an EPIYA-D segment exhibited duplication, in keeping with a previous report (Argent et al., 2008a). The remaining strains were AB ($n = 1$), ABBD ($n = 1$), BC ($n = 2$), and ABCC ($n = 4$) (Table 2).

CagA protein EPIYA segment diversity has been described as a major determinant of *H. pylori* pathogenicity. SHP-2 specifically binds to the tyrosine-phosphorylated EPIYA-C or EPIYA-D segment of CagA, thus stimulating SHP-2 activity. This type of deregulation has been implicated in a variety of human malignancies (Hatakeyama, 2009). In contrast to the EPIYA-C segment, the sequence flanking the tyrosine phosphorylation site of the EPIYA-D segment perfectly matches the consensus high-affinity binding sequence for the SH2 domains of SHP2. As a result, the EPIYA-D segment (East-Asian CagA) interacts more strongly with SHP-2 than does the EPIYA-C segment (Western CagA), and is more closely associated with precancerous lesions and GC (Argent et al., 2008a). Furthermore, East-Asian CagA has been described as more carcinogenic than Western CagA in epidemiological studies (Jones et al., 2009), and also in transgenic mice, although malignancies occurred in these animals' non gastric organs (Miura et al., 2009).

The clinical outcome of *H. pylori* infection depends on host, bacterial and environmental factors, and geographic differences in the incidence of GC cannot be explained solely by the distribution of Western and East-Asian CagA. In East and South East Asia, where human genetic diversity is relatively limited, the incidence of GC clearly matches the prevalence rates of East-Asian CagA (Yamaoka, 2010), albeit with some inconsistencies. As the genetic structure of the modern human populations of Vietnam and Cambodia are similar (Hill et al., 2007), these countries are suitable for studying the influence of the CagA type on the incidence of GC. The GC ASR in

Cambodia is half that in Vietnam (9.8 versus 18.9 per 100,000), where 97% of isolates harbor the East-Asian CagA (Uchida et al., 2009). The ASR is low in Thailand and Malaysia compared with East Asian countries, but the large Chinese communities in these countries appear to have a significant independent risk factor for GC (Goh et al., 2007; Vilaichone et al., 2004). It has not previously been possible to establish the role of the East-Asian CagA as a determinant of GC, owing to the high frequency of this CagA type among patients of Chinese ethnicity and the low incidence of GC in other ethnic groups (Schmidt et al., 2010; Vilaichone et al., 2004). The overall incidence of GC is high in Japan (ASR 31.1 per 100,000), but a far lower rate is observed in Okinawa, a group of islands in southern Japan, with a strong American influence. This low incidence might be explained by the higher frequency of Western CagA (42%) in *H. pylori* strains in Okinawa (Satomi et al., 2006) than in other parts of Japan (Yamaoka, 2010). In Korea, where East-Asian CagA *H. pylori* strains predominate (89%), as in Vietnam (Jones et al., 2009), the incidence of GC is twice that observed in Vietnam, showing that the East-Asian CagA is not the only major determinant of GC (Jones et al., 2009). All these data suggest that endemic circulation of *H. pylori* strains harboring the East-Asian CagA contributes substantially to the high incidence of GC in East Asian countries. Thus, the low prevalence of East-Asian CagA in Cambodia and, by extension, in Southeast Asia (except for Vietnam), might partly explain the lower incidence of GC than in other East Asian countries.

3.3. vacA gene diversity and gastric cancer incidence rates

vacA typing showed that 63 (95.5%) of the 66 strains were s1, 32 (48.5%) were m1 and 62 (93.9%) were i1 (Table 2). All s1/m1 strains were type i1, whereas all s2/m2 strains were i2. The s2/m2/i2 strains were all cagA-negative. Most strains possessed presumed high vacuolation isotypes, namely s1/i1/m1 ($n = 32$, 48.5%) or s1/i1/m2 ($n = 30$, 45.4%). The s1 allele has been identified as a determinant of GC in Western countries (Yamaoka, 2010), and i1-type strains are strongly associated with gastric adenocarcinoma in Iranian patients (Rhead et al., 2007). As the majority of our strains harbored s1 and i1 alleles, similar to other countries in Southeast and East Asia (Yamaoka, 2010), these alleles seem not appear to be major risk factors for GC in Cambodia.

The decreasing gradient of m1-type strains observed from South Korea (95%) to Vietnam (37%) has been shown to match the GC incidence gradient (Yamaoka, 2010). In Vietnam, the GC incidence is higher in the North (Hanoi; ASR 27.0 per 100,000 males) than in the South (Ho Chi Minh, 18.7 per 100,000 males), matching the frequency distribution of m1-type strains (50% in Hanoi vs 25% in Ho Chi Minh) (Uchida et al., 2009). As most strains in this region are assigned to the hspEAsia subpopulation, the m region of vacA might be a virulence marker in this subpopulation. Indeed, this correlation is not found in other countries in South East Asia (Chomvarin et al., 2008; Linpisarn et al., 2007; Tan et al., 2005) which display a high frequency of hpAsia2 and hpEurope strains (Linz et al., 2007; Tay et al., 2009). In Cambodia, the frequency of m1-type strains among hspEAsia strains (59.4%) is similar to that reported in Northern Vietnam, suggesting that those hspEAsia strains are less virulent than strains from Japan and Korea.

3.4. Expansion of European vacA and cagA alleles among hspEAsia strains

Interstrain recombination is critically dependent on the frequent infection with multiple strains, which is common in developing countries (Ghose et al., 2005). In addition, recombination events during mixed infection have been identified as a major driving force behind allelic diversity in *H. pylori*. The phylogeny of the

Table 2
cagA status, diversity of the EPIYA motifs, and the vacA s, m, and i region polymorphisms in hpEurope and hspEAsia strains from Cambodia.

	hpEurope (n = 34)	hspEAsia (n = 32)	Total (n = 66)
cagA			
Present	29 (85.3)	32 (100.0)	61 (92.4)
Absent	5 (14.7)	0	5 (7.6)
EPIYA motif			
AB	1 (2.9)	0	1 (1.5)
BC	2 (5.9)	0	2 (3.0)
ABC	23 (67.7)	7 (21.9)	30 (45.5)
ABCC	2 (5.9)	2 (6.2)	4 (6.1)
ABBD	0	1 (3.1)	1 (1.5)
ABD	1 (2.9)	22 (68.8)	23 (34.8)
vacA s			
s1	31 (91.2)	32 (100.0)	63 (95.5)
	s1a	11 (34.4)	38 (57.6)
	s1c	21 (65.6)	25 (37.9)
s2	4 (11.8)	0	3 (4.5)
vacA m			
m1	13 (38.2)	19 (59.4)	32 (48.5)
m2	21 (61.8)	13 (40.6)	34 (51.5)
vacA i			
i1	30 (88.2)	32 (100.0)	62 (93.9)
i2	4 (11.8)	0	4 (6.1)
vacA smi			
s1a/i1/m1	13 (38.2)	8 (25.0)	21 (31.8)
s1a/i1/m2	13 (38.2)	3 (9.4)	16 (24.2)
s1a/i2/m2	1 (3.0)	0	1 (1.5)
s1c/i1/m1	0	11 (34.4)	11 (16.7)
s1c/i1/m2	4 (11.8)	10 (31.2)	14 (21.2)
s2/i2/m2	3 (8.8)	0	3 (4.6)

cag PAI largely reflects that of *H. pylori*'s housekeeping genes, with only a limited number of genes being under diversifying selection (Olbermann et al., 2010). Accordingly, hpEurope and hspEAsia strains are expected to carry a Western and an East-Asian CagA, respectively. Although we did not find CagA sequences containing both segment C and segment D, we observed that recombination involving the *cagA* gene is not a rare event, as one out of 34 (2.9%) Cambodian hpEurope strains possessed a CagA with an East Asian EPIYA motif (ABD) while 9/32 (28.1%) hspEAsia strains contained a Western CagA with the EPIYA motifs ABC or ABCC (Table 2).

In order to study the population genetic structure of the *cagA* gene in *H. pylori* isolates from Cambodian patients, we randomly selected 10 hpEurope and 10 hspEAsia *cagA*-positive strains for complete *cagA* sequencing (Table 3). Five (4 hspEAsia, 1 hpEurope) of the 10 East-Asian *cagA* genes in Cambodian strains had the 18 bp deletion in the *cagA* gene that was previously described for Vietnamese strains (Truong et al., 2009), while the remaining 5 hspEAsia isolates possessed the 39 bp deletion common in other East Asian strains (Uchida et al., 2009). Both deletions are located ca. 300 bp upstream of the EPIYA-A segment. Further studies are needed to determine the oncogenic influence of these subtypes.

The 20 unique *cagA* haplotypes were compared to 35 unique haplotypes of *cagA* sequences from a globally representative and well characterized strain collection from all bacterial genetic populations possessing the *cag*PAI (hpAfrica1, hpNEAfrica, hpEurope, hpSahul, hpAsia2, hspEAsia, hspMaori) (Olbermann et al., 2010). A Neighbor-joining tree constructed from the *cagA* sequences displayed two strain clusters that corresponded to the Western and East-Asian CagA (Fig. 1), with 100% assignment of EPIYA-C motif to the Western CagA (hpAfrica1, hpNEAfrica, hpEurope, some hpAsia2 strains) and of the EPIYA-D motif to East Asian CagA (hspEAsia, hspMaori, some hpAsia2 strains). We used the linkage model of Structure (Falush et al., 2003a) to estimate the proportion of nucleotides derived from European and East Asian ancestral populations in the individual *cagA* sequences. While 18/20 *cagA* genes from Cambodian strains have derived 100% of their nucleotides from either European or East Asian ancestral sources, two strains dis-

played extensive recombination within the *cagA* gene (Table 3). One strain was of East Asian ancestry up to nucleotide 91, and of European ancestry thereafter, whereas the second strain was of European ancestry up to nucleotide 147, of East Asian ancestry from nucleotide 148 to nucleotide 370, followed by European ancestry from nucleotide 371 to nucleotide 1159, and of East Asian ancestry thereafter. Based on housekeeping gene sequences, both strains were assigned to hspEAsia, suggesting subversion of an East-Asian *cagA* gene by transformation with DNA from a Western (hpEurope) *cagA*. These findings, together with the relatively high proportion (28.1%) of Western CagA in hspEAsia strains, in contrast to only 1/34 EastAsian CagA in hpEurope strains, provides evidence for the spread of Western CagA among East Asian strains in Cambodia. This is of major importance as CagA interacts, through individual domains, with a large number of host intracellular proteins such as SH2 proteins (SHP-2, Csk, Grb2, Crk, PI3K, SHP-1, Ras-GAP1 and Grb7) and protein kinases (Src, Abl, MARK2/PAR1b kinase family) (Selbach et al., 2009). Thus, the recombinant CagA protein probably reflects functional adaptation or modulation in response to host protein polymorphism (Olbermann et al., 2010).

Fine typing of *vacA* s1 alleles revealed the presence of both s1a (38 strains, 57.6%) and s1c (25 strains, 37.9%) alleles among the Cambodian strains. The majority of the Cambodian hpEurope strains (27/34, 79.4%) possessed the s1a allele (Table 2) which is found frequently among European (hpEurope) strains (Van Doorn et al., 1999), while the remaining strains were s1c (4/34, 11.8%) or s2 (3/34, 8.8%). The s1c allele was previously shown to be associated with East Asian *H. pylori* strains (Yamaoka et al., 2002) as 449/474 (94.7%) strains from East Asia were described as s1c and only 4.7% as s1a. However, the rate of s1c alleles among East Asian (hspEAsia) strains from Cambodia was much lower (21/32 strains, 65.6%) while the other 34.4% (11/32 strains) were typed as s1a. The observed high prevalence of s1a alleles among Cambodian hspEAsia strains indicates frequent introgression of European *vacA* gene alleles into East Asian *H. pylori* strains, which is similar to the expansion of European *cagA* genes.

The simultaneous expansion of both European *cagA* and *vacA* alleles in seven of the 32 hspEAsia strains (21.9%) might be associ-

Table 3
Genetic features of the 20 strains investigated by complete *cagA* sequencing.

Strains	Structure no linkage model		Structure linkage model	EPIYA motif	Size of <i>cagA</i> gene (bp)	Deletion ^a (bp)	<i>vacA</i> type
	(sub) population	CagA type					
CAM22	hpEurope	Western	European ancestry	ABC	3540	None	s1a/i1/m1
CAM23	hpEurope	Western	European ancestry	ABC	3543	None	s1a/i1/m1
CAM40	hpEurope	Western	European ancestry	ABC	3555	None	s1a/i1/m1
CAM27	hpEurope	Western	European ancestry	ABC	3543	None	s1a/i1/m1
CAM46	hpEurope	Western	European ancestry	ABC	3543	None	s1a/i1/m1
CAM25	hpEurope	Western	European ancestry	ABCC	3642	None	s1a/i1/m1
CAM114	hpEurope	East Asian	East Asian ancestry	ABD	3552	18	s1a/i1/m1
CAM17	hpEurope	Western	European ancestry	ABC	3480	None	s1a/i1/m2
CAM14	hpEurope	Western	European ancestry	ABC	3543	None	s1c/i1/m2
CAM15	hpEurope	Western	European ancestry	ABC	3537	None	s1c/i1/m2
CAM113	hspEAsia	Western	European ancestry	ABC	3549	None	s1a/i1/m1
CAM36	hspEAsia	Western	nt ^b 1 to 91 East Asian ancestry nt 92 to 3558 European ancestry	ABC	3558	None	s1a/i1/m1
CAM16	hspEAsia	East Asian	East Asian ancestry	ABD	3546	18	s1a/i1/m2
CAM29	hspEAsia	East Asian	East Asian ancestry	ABD	3492	39	s1c/i1/m1
CAM47	hspEAsia	East Asian	East Asian ancestry	ABD	3528	39	s1c/i1/m1
CAM32	hspEAsia	East Asian	East Asian ancestry	ABD	3531	18	s1c/i1/m1
CAM26	hspEAsia	East Asian	nt 1 to 147 European ancestry nt 148 to 37 East Asian ancestry nt 371 to 1159 European ancestry nt 1160 to 3537 East Asian ancestry	ABD	3537	18	s1c/i1/m1
CAM112	hspEAsia	East Asian	East Asian ancestry	ABD	3549	18	s1c/i1/m2
CAM33	hspEAsia	East Asian	East Asian ancestry	ABD	3531	39	s1c/i1/m2
CAM37	hspEAsia	East Asian	East Asian ancestry	ABD	3531	39	s1c/i1/m2

^a Deletion located ca. 300 bp upstream of the EPIYA-A segment.

^b nt, nucleotide.

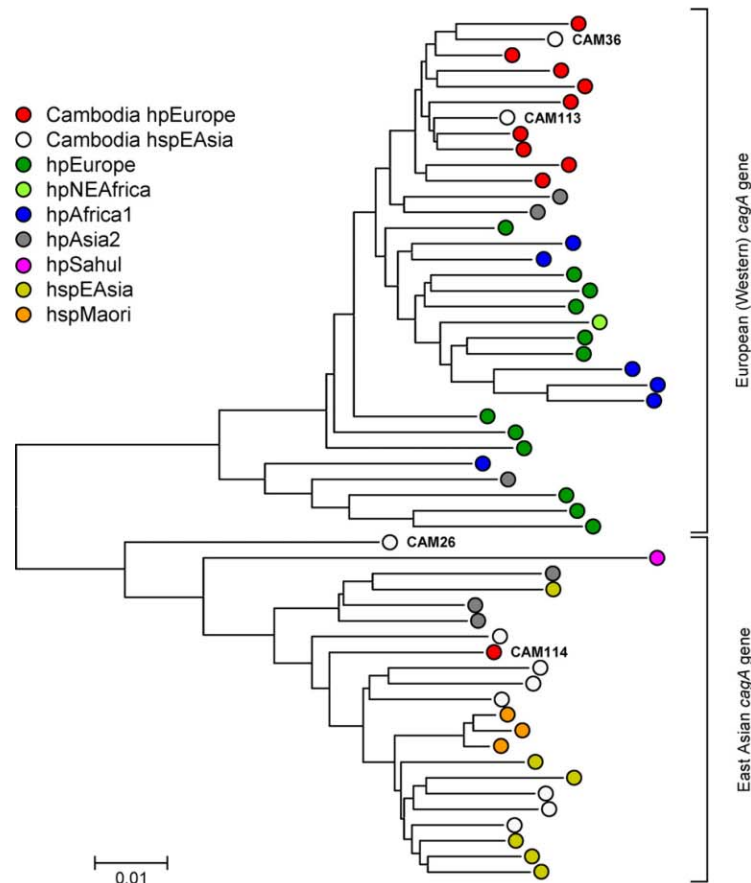


Fig. 1. Neighbor-joining (NJ) tree of 55 *cagA* sequences color-coded according to population assignment of *H. pylori* housekeeping genes by Structure into the populations hpEurope, hpNEAfrica, hpAfrica1, hpAsia2, hpSahul and hpEastAsia (subpopulations hspMaori and hspEAsia). The NJ tree displays the phylogenetic relationship of 20 *cagA* sequences from Cambodia and 35 *cagA* sequences that are representative for the worldwide *cagA* diversity. Strains that showed introgression of European *cagA* alleles into East Asian strains (CAM26, CAM36, CAM113) or import of East Asian *cagA* into a hpEurope strain (CAM 114) are indicated. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

ated with fitness advantage in the human host population and/or reflect selection for a stable equilibrium of the effects of CagA and VacA on epithelial cells. Indeed, VacA and CagA compete for multiple cell signalling pathways (Argent et al., 2008b; Tegtmeyer et al., 2009; Yokoyama et al., 2005) and deregulation of any of the pathways by either CagA or VacA is likely to contribute to the various disease outcome. Thus, changes in the genomic composition of *H. pylori* strains by transformation of DNA from unrelated strains may disrupt the balancing effects of VacA and CagA activities on epithelial cells which might result in severe consequences for host response and GC risk. Therefore, the observed range expansion of European *vacA* and *cagA* alleles among hspEAsia strains may have a significant impact on the future incidence of GC in Cambodia.

4. Conclusions

These findings are particularly important, especially given the difficulty of carrying out such studies in countries with inadequate healthcare systems. Even though our findings may not be repre-

sentative of the overall situation, it should be noted that the study took place in one of the main tertiary hospitals in Cambodia with a large geographical recruitment of patients. Our isolates were characterized by a lower frequency of hspEAsia strains carrying the East-Asian CagA and the m1-type *vacA* allele (10 out of 66, 15.2%) than reported in East Asian countries, which may partly explain the low incidence of GC in Cambodia and, by extension, in Southeast Asia. We observed the range expansion of European *vacA* and *cagA* alleles (hpEurope strains) among hspEAsia strains which may have a significant impact on the future incidence of GC in Cambodia. Further investigations are needed to confirm our findings based on large cohort of patients in order to take account simultaneously the different factors potentially involved in gastric carcinogenesis: *H. pylori* infection rate and host, environmental and *H. pylori* virulence factors.

Acknowledgements

We thank all the patients and clinicians who participated in this study. We thank also Fatou Bintou Dieye (Institut Pasteur, Dakar,

Senegal) for her technical help. This work was supported by grants from the Pasteur Institute (ACIP 2003 and 2006) and the ERA-NET PathoGenoMics (Project HELDIVNET).

References

- Argent, R.H., Hale, J.L., El-Omar, E.M., Atherton, J.C., 2008a. Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *J. Med. Microbiol.* 57, 1062–1067.
- Argent, R.H., Thomas, R.J., Letley, D.P., Rittig, M.G., Hardie, K.R., Atherton, J.C., 2008b. Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors VacA and CagA. *J. Med. Microbiol.* 57, 145–150.
- Breurec, S., Guillard, B., Hem, S., Brisse, S., Dieye, F.B., Huerre, M., Oung, C., Tan, T., Thiberge, J., Raymond, J., Vong, S., Monchy, D.B.L., 2011a. Evolutionary history of *Helicobacter pylori* sequences reflect past human migrations in Southeast Asia. *PLoS One* 6, e22058.
- Breurec, S., Michel, R., Seck, A., Brisse, S., Côme, D., Dieye, F.B., Garin, B., Huerre, M., Mbengue, M., Fall, C., Sgouras, D.N., Thiberge, J.M., Dia, D., Raymond, J., in press. Clinical Relevance of *cagA* and *vacA* Gene Polymorphisms in *Helicobacter pylori* Isolates from Senegalese Patients. *Clin. Microbiol. Infect.*
- Chomvarin, C., Namwai, W., Chaicumpar, K., Mairiang, P., Sangchan, A., Sripa, B., Tor-Udom, S., Vilaichone, R.K., 2008. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int. J. Infect. Dis.* 12, 30–36.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2003a. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567–1587.
- Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J.K., Stephens, M., Kidd, M., Blaser, M.J., Graham, D.Y., Vacher, S., Perez-Perez, G.I., Yamaoka, Y., Megraud, F., Otto, K., Reichard, U., Katzowitsch, E., Wang, X., Achtman, M., Suerbaum, S., 2003b. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 299, 1582–1585.
- Fenoglio-Preiser, C.M., Noffsinger, A.E., Lantz, P.E., 1999. *Gastrointestinal Pathology: an Atlas and Text*, second ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Ferlay, J., Shin, H., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D., 2010. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Fock, K.M., Ang, T.L., 2010. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 479–486.
- Ghose, C., Perez-Perez, G.I., van Doorn, L.J., Dominguez-Bello, M.G., Blaser, M.J., 2005. High frequency of gastric colonization with multiple *Helicobacter pylori* strains in Venezuelan subjects. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2635–2641.
- Goh, K.L., Cheah, P.L., Md, N., Quek, K.F., Parasakthi, N., 2007. Ethnicity and *H. pylori* as risk factors for gastric cancer in Malaysia: a prospective case control study. *Am. J. Gastroenterol.* 102, 40–45.
- Hatakeyama, M., 2009. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J. Gastroenterol.* 44, 239–248.
- Hill, C., Soares, P., Mormina, M., Macaulay, V., Clarke, D., Blumbach, P.B., Vizuete-Forster, M., Forster, P., Bulbeck, D., Oppenheimer, S., Richards, M., 2007. A mitochondrial stratigraphy for island southeast Asia. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 29–43.
- Isomoto, H., Moss, J., Hirayama, T., 2010. Pleiotropic actions of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA. *Tohoku J. Exp. Med.* 220, 3–14.
- Jones, K.R., Joo, Y.M., Jang, S., Yoo, Y.J., Lee, H.S., Chung, I.S., Olsen, C.H., Whitmore, J.M., Merrell, D.S., Cha, J.H., 2009. Polymorphism in the CagA EPIYA motif impacts development of gastric cancer. *J. Clin. Microbiol.* 47, 959–968.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Lewis, P., 2009. *Ethnologue: Languages of the World*, 16 ed. SIL International, Dallas.
- Linpisarn, S., Suwan, W., Lertprasertsuk, N., Koosirirat, C., Steger, H.F., Prommuangyong, K., Phornphutkul, K., 2007. *Helicobacter pylori cagA, vacA* and *iceA* genotypes in northern Thai patients with gastric disease. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 38, 356–362.
- Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., Falush, D., Stamer, C., Prugnolle, F., van der Merwe, S.W., Yamaoka, Y., Graham, D.Y., Perez-Trallero, E., Wadstrom, T., Suerbaum, S., Achtman, M., 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445, 915–918.
- Miura, M., Ohnishi, N., Tanaka, S., Yanagiya, K., Hatakeyama, M., 2009. Differential oncogenic potential of geographically distinct *Helicobacter pylori* CagA isoforms in mice. *Int. J. Cancer.* 125, 2497–2504.
- Moodley, Y., Linz, B., Yamaoka, Y., Windsor, H.M., Breurec, S., Wu, J.Y., Maady, A., Bernhoft, S., Thiberge, J.M., Phuanukoonnon, S., Jobb, G., Siba, P., Graham, D.Y., Marshall, A.C., 2007. The peopling of the Pacific from a bacterial perspective. *Science* 323, 527–530.
- Olbermann, P., Josenhans, C., Moodley, Y., Uhr, M., Stamer, C., Vauterin, M., Suerbaum, S., Achtman, M., Linz, B., 2010. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island. *PLoS Genet.* 6, e1001069.
- Panayotopoulou, E.G., Sgouras, D.N., Papadakis, K., Kalliaropoulos, A., Papatheodoridis, G., Mentis, A.F., Archimandritis, A.J., 2007. Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45, 488–495.
- Panayotopoulou, E.G., Sgouras, D.N., Papadakis, K.S., Petraki, K., Breurec, S., Michopoulos, S., Mantzaris, G., Papatheodoridis, G., Mentis, A., Archimandritis, A., 2010. CagA and VacA polymorphisms are associated with distinct pathological features in *H. pylori*-infected adults with peptic and non-peptic ulcer disease. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2237–2239.
- Parkin, D.M., 2004. International variation. *Oncogene* 23, 6329–6340.
- Rhead, J.L., Letley, D.P., Mohammadi, M., Hussein, N., Mohagheghi, M.A., Eshagh Hosseini, M., Atherton, J.C., 2007. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 133, 926–936.
- Satomi, S., Yamakawa, A., Matsunaga, S., Masaki, R., Inagaki, T., Okuda, T., Suto, H., Ito, Y., Yamazaki, Y., Kuriyama, M., Keida, Y., Kutsuni, H., Azuma, T., 2006. Relationship between the diversity of the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* and gastric cancer in Okinawa. *Jpn. J. Gastroenterol.* 41, 668–673.
- Schmidt, H.M., Andres, S., Nilsson, C., Kovach, Z., Kaakoush, N.O., Engstrand, L., Goh, K.L., Fock, K.M., Forman, D., Mitchell, H., 2010. The *cag* PAI is intact and functional but HP0521 varies significantly in *Helicobacter pylori* isolates from Malaysia and Singapore. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 439–451.
- Selbach, M., Paul, F.E., Brandt, S., Guye, P., Daumke, O., Backert, S., Dehio, C., Mann, M., 2009. Host cell interactome of tyrosine-phosphorylated bacterial proteins. *Cell Host Microbe* 5, 397–403.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Tan, H.J., Rizal, A.M., Rosmadi, M.Y., Goh, K.L., 2005. Distribution of *Helicobacter pylori cagA, cagE* and *vacA* in different ethnic groups in Kuala Lumpur, Malaysia. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20, 589–594.
- Tay, C.Y., Mitchell, H., Dong, Q., Goh, K.L., Dawes, I.W., Lan, R., 2009. Population structure of *Helicobacter pylori* among ethnic groups in Malaysia: recent acquisition of the bacterium by the Malay population. *BMC Microbiol.* 9, 126.
- Tegtmeier, N., Zabler, D., Schmidt, D., Hartig, R., Brandt, S., Backert, S., 2009. Importance of EGF receptor, HER2/Neu and Erk1/2 kinase signalling for host cell elongation and scattering induced by the *Helicobacter pylori* CagA protein: antagonistic effects of the vacuolating cytotoxin VacA. *Cell Microbiol.* 11, 488–505.
- Truong, B.X., Mai, V.T., Tanaka, H., Ly, T., Thong, T.M., Hai, H.H., Van Long, D., Furumatsu, K., Yoshida, M., Kutsuni, H., Azuma, T., 2009. Diverse characteristics of the CagA gene of *Helicobacter pylori* strains collected from patients from southern Vietnam with gastric cancer and peptic ulcer. *J. Clin. Microbiol.* 47, 4021–4028.
- Uchida, T., Nguyen, L.T., Takayama, A., Okimoto, T., Kodama, M., Murakami, K., Matsuhisa, T., Trinh, T.D., Ta, L., Ho, D.Q., Hoang, H.H., Kishida, T., Fujioka, T., Moriyama, M., Yamaoka, Y., 2009. Analysis of virulence factors of *Helicobacter pylori* isolated from a Vietnamese population. *BMC Microbiol.* 9, 175.
- Van Doorn, L.J., Figueiredo, C., Megraud, F., Pena, S., Midolo, P., Queiroz, D.M., Carneiro, F., Vanderborght, B., Pegado, M.D., Sanna, R., De Boer, W., Schneeberger, P.M., Correa, P., Ng, E.K., Atherton, J., Blaser, M.J., Quint, W.G., 1999. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 116, 823–830.
- Vilaichone, R.K., Mahachai, V., Tumwasorn, S., Wu, J.Y., Graham, D.Y., Yamaoka, Y., 2004. Molecular epidemiology and outcome of *Helicobacter pylori* infection in Thailand: a cultural cross roads. *Helicobacter* 9, 453–459.
- Yamaoka, Y., 2010. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 629–641.
- Yamaoka, Y., Orito, E., Mizokami, M., Gutierrez, O., Saitou, N., Kodama, T., Osato, M.S., Kim, J.G., Ramirez, F.C., Mahachai, V., Graham, D.Y., 2002. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Lett.* 517, 180–184.
- Yamazaki, S., Yamakawa, A., Okuda, T., Ohtani, M., Suto, H., Ito, Y., Yamazaki, Y., Keida, Y., Higashi, H., Hatakeyama, M., Azuma, T., 2005. Distinct diversity of *vacA, cagA*, and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3906–3916.
- Yokoyama, K., Higashi, H., Ishikawa, S., Fujii, Y., Kondo, S., Kato, H., Azuma, T., Wada, A., Hirayama, T., Aburatani, H., Hatakeyama, M., 2005. 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.

6.2. ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

6.2.1. Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση MLST.

Στελέχη Alcag4

```

      10      20      30      40      50      60      70
atpA Alcag4(4)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
atpA Alcag4(1)  AATGAATTTAGCCTAATAGAGCAAAAAGCCCCAGGCATTATGGACAGGAAATCTGTGCATGAGCCTTTGC

      80      90      100     110     120     130     140
atpA Alcag4(4)  AAACAGGCATTAAAGCCATTGATGCGTTGGTGCCTATTGGGCGCGGACAAAGGGAATTGATCATTGGGGA
atpA Alcag4(1)  AAACAGGCATTAAAGCCATTGATGCGTTGGTGCCTATTGGGCGCGGACAAAGGGAATTGATCATTGGGGA

      150     160     170     180     190     200     210
atpA Alcag4(4)  TAAACAAACCGGTAAAACCAACCGTAGCGATCGATGCGATCATTAACCAAAAAGGGCAAATGTGATCTGC
atpA Alcag4(1)  TAAACAAACCGGTAAAACCAACCGTAGCGATCGATGCGATCATTAACCAAAAAGGGCAAATGTGATCTGC

      220     230     240     250     260     270     280
atpA Alcag4(4)  AGTCTATGTGGCTATTGGGCAAAAAGAATCCACTGTCGCGCAAGTGGTCCGCAAGATTAGAAGAAATACGG
atpA Alcag4(1)  AGTCTATGTGGCTATTGGGCAAAAAGAATCCACTGTCGCGCAAGTGGTCCGCAAGATTAGAAGAAATACGG

      290     300     310     320     330     340     350
atpA Alcag4(4)  GCGCATGGAAATACAGCGTCGTGATCAACGCTTCGGCTTCAGATTAGCTGCGATGCAATATTTAGCCCT
atpA Alcag4(1)  GCGCATGGAAATACAGCGTCGTGATCAACGCTTCGGCTTCAGATTAGCTGCGATGCAATATTTAGCCCT

      360     370     380     390     400     410     420
atpA Alcag4(4)  TATTCAGGTGTGGCTATGGGGGAATACTTTAGAGATCATGCCCGCCATGCCCTTAAATCGTTTATGATGATT
atpA Alcag4(1)  TATTCAGGTGTGGCTATGGGGGAATACTTTAGAGATCATGCCCGCCATGCCCTTAAATCGTTTATGATGATT

      430     440     450     460     470     480     490
atpA Alcag4(4)  TGAGTAAGCATGCTGTTCGCTTACAGAGAGATTTCTTTGATTTTGAGAAGACCCCCAGGTAGGGAGGCTTT
atpA Alcag4(1)  TGAGTAAGCATGCTGTTCGCTTACAGAGAGATTTCTTTGATTTTGAGAAGACCCCCAGGTAGGGAGGCTTT

      500     510     520     530     540     550     560
atpA Alcag4(4)  TCCTGGAGATGTGTTTTATATCCACTCACGGCTTTTGAAGAGAGCGGCTAAACTTTGCGATGACAAAGGT
atpA Alcag4(1)  TCCTGGAGATGTGTTTTATATCCACTCACGGCTTTTGAAGAGAGCGGCTAAACTTTGCGATGAAACGGGT

      570     580     590     600     610     620
atpA Alcag4(4)  GCCGGCTCTTTGACCGCGCTCCCTATTGTGGAAGACTCAAGCGGGCGATGTTTCAGCCTATATCCCTACG
atpA Alcag4(1)  GCCGGCTCTTTGACCGCGCTCCCTATTGTGGAAGACTCAAGCGGGCGATGTTTCAGCCTATATCCCTACG

      10      20      30      40      50      60      70
mutY Alcag4(1)  TTTTATTCGCCCTTTTATAGAAAGCTTTCCCACTTTAAAAGACTTAGCGAACGCTCCATTAGAAGAGGTTT
mutY Alcag4(4)  TTTTATTCGCCCTTTTATAGAAAGCTTTCCCACTTTAAAAGACTTAGCGAACGCTCCATTAGAAGAGGTTT

      80      90      100     110     120     130     140
mutY Alcag4(1)  TATTGCTCTGGCGAGGGCTTGGCTATTAATCAAGGGCTAAAAATTTAAAAAAAAGTGTGAAATTTGCGT
mutY Alcag4(4)  TATTGCTCTGGCGAGGGCTTGGCTATTAATCAAGGGCTAAAAATTTAAAAAAAAGTGTGAAATTTGCGT

      150     160     170     180     190     200     210
mutY Alcag4(1)  GAAAGAACATAATTACAGCTACCCAATGACTATCAAAGCCTGTTAAAACTCCCTGGGATTGGCGCATAC
mutY Alcag4(4)  GAAAGAACATAATTACAGCTACCCAATGACTATCAAAGCCTGTTAAAACTCCCTGGGATTGGCGCATAC

      220     230     240     250     260     270     280
mutY Alcag4(1)  ACGGCTAATGCGATCTTGTGTTTTGGTTTTAGGGAAGAACCGCATGCGTGGATGCTAATATCAAGCGCG
mutY Alcag4(4)  ACGGCTAATGCGATCTTGTGTTTTGGTTTTAGGGAAGAACCGCATGCGTGGATGCTAATATCAAGCGCG

```

		290	300	310	320	330	340	350	
	mutY Alcag4(1)							
	mutY Alcag4(4)	TGCTTTTAAGGCTTTTGGTTGGATCCTAAATCCACGCTAAAGACTTACAAATTAAGGCGAATGACTT							
420		360	370	380	390	400	410		
	mutY Alcag4(1)							
	mutY Alcag4(4)	TCTTAATTC TAATGAAAGCTTTAATCACAACCAAGCCCTAATTGATCTAGGGCTTTAATCTGCTCCCCT							
70		10	20	30	40	50	60		
	efp Alcag4(1)							
	efp Alcag4(4)	TACCAGCATGTCAAGCCCAGGGTGC GGCTTTGTGCGTGCGAAAAACAAGTCGTTTTTAGATGGTA							
140		80	90	100	110	120	130		
	efp Alcag4(1)							
	efp Alcag4(4)	AGGTGATTGAGAAGACTTTCCATGCGGGGATAAGTGC GAAGAGCCTAATCTGGTTGAAAAACGATGCA							
210		150	160	170	180	190	200		
	efp Alcag4(1)							
	efp Alcag4(4)	ATACCTTTATCATGATGGCGATACATACCAATTCATGGATATAGAGAGCTATGAGCAAATCGCTTTGAAC							
280		220	230	240	250	260	270		
	efp Alcag4(1)							
	efp Alcag4(4)	GACTCTCAAGTGGGTGAGGCTTCTAAATGGATGCTAGACGGCATGCAAGTGCAGGTTTTATTGCATAATG							
350		290	300	310	320	330	340		
	efp Alcag4(1)							
	efp Alcag4(4)	ACAAGGCGATTTTCAGTGGATGTACCGCAAGTTGTGGCTTTAAAGATTGTGGAAACGGCTCCTAATTTTAA							
420		360	370	380	390	400	410		
	efp Alcag4(1)							
	efp Alcag4(4)	GGGCGATACCTTCCAGTGCAGCAAAAAACGAGCACTTTAGAAACCGGTGCGGTCTGCA							
70		10	20	30	40	50	60		
	ppa Alcag 4(1)							
	ppa Alcag 4(4)	ATTCTAATATCTAGTATGAAATTGGATAAAGAAAGCGGGCTTTAATGGTGGATAGGGTGCCTTATGGGGC							
140		80	90	100	110	120	130		
	ppa Alcag 4(1)							
	ppa Alcag 4(4)	GCAAAATTACCCCGCAAATTACGGCTTTGTGCCTAACACTTTAGGATCTGATGGCGACCCTGTAGATGCA							
210		150	160	170	180	190	200		
	ppa Alcag 4(1)							
	ppa Alcag 4(4)	CTGGTTTTAAGCGATGTGGCTTTTCAAGCCGGAAGCGTAGTGAAAGCGCGCTTGGTTGGGGTGTGAAACA							
280		220	230	240	250	260	270		
	ppa Alcag 4(1)							
	ppa Alcag 4(4)	TGGAAGATGAAAGCGGGATGGATGAAAAATTACTCGCTCTACCCATAGATAAGATCGATCCCACGCATTC							

	290	300	310	320	330	340	
350						
ppa Alcag 4(1)	CTATGTCAAAGATATTGATGATTTATCCAAACACACTTTGGATAAAATCAAACATTTTTTTGAAACTTAC						
ppa Alcag 4(4)	CTATGTCAAAGATATTGATGATTTATCCAAACACACTTTGGATAAAATCAAACATTTTTTTGAAACTTAC						
	360	370	380	390			
						
ppa Alcag 4(1)	AAGGATTTAGAGCCTAATAAATGGGTGAAAGTCAAGGGTTTGAAAAC						
ppa Alcag 4(4)	AAGGATTTAGAGCCTAATAAATGGGTGAAAGTCAAGGGTTTGAAAAC						
	10	20	30	40	50	60	70
						
trpC Alcag4(1)	TGCGTTTCAGTTTTAGCTGATTCCTAAAATTTTTTAGGCTCTTATGAAAACATTAAGATCGTTTCGCAGC						
trpC Alcag4(4)	TGCGTTTCAGTTTTAGCTGATTCCTAAAATTTTTTAGGCTCTTATGAAAACATTAAGATCGTTTCGCAGC						
	80	90	100	110	120	130	140
						
trpC Alcag4(1)	ATTCACCTAAGCCCATTTTGTGTAAGATTTTATCATCGATGCTTTTCAGATCAAACCTCGCTAGAATGAT						
trpC Alcag4(4)	ATTCACCTAAGCCCATTTTGTGTAAGATTTTATCATCGATGCTTTTCAGATCAAACCTCGCTAGAATGAT						
	150	160	170	180	190	200	210
						
trpC Alcag4(1)	GGGGGCGAATGCGGTGCTTTTAAATGCTAAGCGTGTAGATGATAAAAATTTATTTAGAGCTTTTCAACCTC						
trpC Alcag4(4)	GGGGGCGAATGCGGTGCTTTTAAATGCTAAGCGTGTAGATGATAAAAATTTATTTAGAGCTTTTCAACCTC						
	220	230	240	250	260	270	280
						
trpC Alcag4(1)	GCTAAATCCTTAAACATGAGCGTGTAACTGAAGTTTCCAAACAAGCAAGAAATTTAGCGCTTGCTCAAAC						
trpC Alcag4(4)	GCTAAATCCTTAAACATGAGCGTGTAACTGAAGTTTCCAAACAAGCAAGAAATTTAGCGCTTGCTCAAAC						
	290	300	310	320	330	340	350
						
trpC Alcag4(1)	TCCAATACGACATTATAGGCATCAATAACAGGGATTTACACCCCTAACAAACCGACATTAAACAACAGCT						
trpC Alcag4(4)	TCCAATACGACATTATAGGCATCAATAACAGGGATTTACACCCCTAACAAACCGACATTAAACAACAGCT						
	360	370	380	390	400	410	420
						
trpC Alcag4(1)	CAAATTACGCCCTTATTGCCTAAAGACGCGCTCGTGGTGAGTGAGTCCGGTATTATTTCGATGCGCAA						
trpC Alcag4(4)	CAAATTACGCCCTTATTGCCTAAAGACGCGCTCGTGGTGAGTGAGTCCGGTATTATTTCGATGCGCAA						
	430	440	450				
						
trpC Alcag4(1)	ATCAAAGCCCTAGCCCCTTATGTGAATGGCTTTTTA						
trpC Alcag4(4)	ATCAAAGCCCTAGCCCCTTATGTGAATGGCTTTTTA						
	10	20	30	40	50	60	70
						
ureI Alcag4(1)	ATGCTATGACTTGTATTGTTATATGTTGGGATTGTTTTAATCAGCAACGGGATTTGCGGATTAACCAAAG						
ureI Alcag4(4)	ATGCTATGACTTGTATTGTTATATGTTGGGATTGTTTTAATCAGCAACGGGATTTGCGGATTAACCAAAG						
	80	90	100	110	120	130	140
						
ureI Alcag4(1)	TCGATCCTAAGAGCACTGCGGTGATGAACTTTTTGTGGGTGGGCTCTCCATTATTTGTAATATAGTTGT						
ureI Alcag4(4)	TCGATCCTAAGAGCACTGCGGTGATGAACTTTTTGTGGGTGGGCTCTCCATTATTTGTAATATAGTTGT						
	150	160	170	180	190	200	210
						
ureI Alcag4(1)	CATCACTTATTCTGCACTCCACCCTACAGCCCCTGTAGAAGGTGCCGAAGATATTGCTCAAGTATCGCAC						
ureI Alcag4(4)	CATCACTTATTCTGCACTCCACCCTACAGCCCCTGTAGAAGGTGCCGAAGATATTGCTCAAGTATCGCAC						
	220	230	240	250	260	270	280
						
ureI Alcag4(1)	CATTTGACTAGTATACTATGGGCCAGCGACTGGGTTATTGTTGGTTTTACCTACTTGTATGCGGCTATC						
ureI Alcag4(4)	CATTTGACTAGTATACTATGGGCCAGCGACTGGGTTATTGTTGGTTTTACCTACTTGTATGCGGCTATC						
	290	300	310	320	330	340	350
						
ureI Alcag4(1)	AACCACACTTTTGGTTTGGATTGGAGGCCCTTATTCCTGGTATAGCTTATTCGTAGCGATCAACACTGTTTC						
ureI Alcag4(4)	AACCACACTTTTGGTTTGGATTGGAGGCCCTTATTCCTGGTATAGCTTATTCGTAGCGATCAACACTGTTTC						

```

          360      370      380      390      400      410      420
ureI Alcag4(1)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ureI Alcag4(4)  CTGCTGCGATTTTATCCCACTATAGCGATATGCTTGATGACCACAAAGTGTAGGCATCACTGAAGGCCGA

          430      440      450      460      470      480      490
ureI Alcag4(1)  TTGGTGGGCGATCATTGGTTGGCTTGGGGTGTTTTGTGGCTTACCGCTTTCATTGAAAAACATCTTGAAA
ureI Alcag4(4)  TTGGTGGGCGATCATTGGTTGGCTTGGGGTGTTTTGTGGCTTACCGCTTTCATTGAAAAACATCTTGAAA

          500      510      520      530      540      550      560
ureI Alcag4(1)  ATCCCTTAGGGAAATTCACTCCATGGCTTGCTATCATTTAGGGTATTTTAACCGCTTGGATCCCTGCTT
ureI Alcag4(4)  ATCCCTTAGGGAAATTCACTCCATGGCTTGCTATCATTTAGGGTATTTTAACCGCTTGGATCCCTGCTT

          570      580
ureI Alcag4(1)  GGTTACTCCTTATCCAACACTGGGTG
ureI Alcag4(4)  GGTTACTCCTTATCCAACACTGGGTG

          10      20      30      40      50      60
70
yph Alcag 4(1)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
yph Alcag 4(4)  AATACAAGCCATAAAACTTTAAAAACCATTGCGATTTTAGGCCAGCCTAATGTGGGGAAAAGCTCGTTAT

          80      90      100     110     120     130
140
yph Alcag 4(1)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
yph Alcag 4(4)  TTAACCGCTTAGCTAGAGAAAGGATCGCTATCACTTACAGATTTTGCAGGCACCTACACGAGACATTAACAA

          150     160     170     180     190     200
210
yph Alcag 4(1)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
yph Alcag 4(4)  ACGAAAAATCGCGTTGAATGGCCATGAAGTGAATTATTAGATACAGGGGGCATGGCTAAAGACGCTCTT

          220     230     240     250     260     270
280
yph Alcag 4(1)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
yph Alcag 4(4)  TTGTCTAAAGAAATCAAAGCCCTTAAATTTAAAAAGCCGCTCAAATGAGCGATTTGATTTTATATGTTGTGG

          290     300     310     320     330     340
350
yph Alcag 4(1)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
yph Alcag 4(4)  ATGGCAAGTCTATCCCTAGCGATGAAGATCTTAAGCTTTTTAGAGAGGTTTTTAAAGATCAACCCCTAAT

          360     370     380     390     400     410
420
yph Alcag 4(1)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
yph Alcag 4(4)  GCTTTTATGATCAATAAAATTGATAACGACAAAGAAAAGAGCGAGCTTATGCGTTTTCTCTTTTGG

          430     440     450     460     470     480
490
yph Alcag 4(1)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
yph Alcag 4(4)  CATTCCAAAAAGTTTTAACATCTCCGTTTCGCACAATAGGGGCATTAGCGCATAAATTGATGCTATATTG

          500     510
yph Alcag 4(1)  ....|....|....|....|....|
yph Alcag 4(4)  AACGCGCTGAATTTAAACCAA
AACGCGCTGAATTTAAACCAA

```

Στελέχη Alcag7

	10	20	30	40	50	60	70
atpA Alcag7(5)						
atpA Alcag7(7)						
atpA Alcag7(5)	AAATGAGTTTAGCCTAATAGAGCAAAAAGCCCCGGGCATTATGGACAGAAAATCGGTGCATGAGCCTTTAC						
atpA Alcag7(7)	AAATGAGTTTAGCCTAATAGAGCAAAAAGCCCCGGGCATTATGGACAGAAAATCGGTGCATGAGCCTTTAC						
	80	90	100	110	120	130	140
atpA Alcag7(5)						
atpA Alcag7(7)						
atpA Alcag7(5)	AAACTGGCATTAAAGCCATTGATGCGTTGGTGCCTATTGGGCGCGGGCAAAGGGAAATTGATTATTGGGGA						
atpA Alcag7(7)	AAACTGGCATTAAAGCCATTGATGCGTTGGTGCCTATTGGGCGCGGGCAAAGGGAAATTGATTATTGGGGA						
	150	160	170	180	190	200	210
atpA Alcag7(5)						
atpA Alcag7(7)						
atpA Alcag7(5)	TAAACAAACCGGTAAAACCACCGTAGCGATCGATGCGATCATTAAACCAAAAAGGGCAAATGTGATCTGT						
atpA Alcag7(7)	TAAACAAACCGGTAAAACCACCGTAGCGATCGATGCGATCATTAAACCAAAAAGGGCAAATGTGATCTGT						
	220	230	240	250	260	270	280
atpA Alcag7(5)						
atpA Alcag7(7)						
atpA Alcag7(5)	ATCTATGTGGCTATTGGGCAAAAAGAATCCACTGTCGCGCAAGTGGTCCGCAAATTAGAAGAATACGGAG						
atpA Alcag7(7)	ATCTATGTGGCTATTGGGCAAAAAGAATCCACTGTCGCGCAAGTGGTCCGCAAATTAGAAGAATACGGAG						
	290	300	310	320	330	340	350
atpA Alcag7(5)						
atpA Alcag7(7)						
atpA Alcag7(5)	CGATGGAATACAGCGTCGTGATCAACGCTTCGGCTTCAGATTCAGCTGCAATGCAATATTTAGCCCCTTA						
atpA Alcag7(7)	CGATGGAATACAGCGTCGTGATCAACGCTTCGGCTTCAGATTCAGCTGCAATGCAATATTTAGCCCCTTA						
	360	370	380	390	400	410	420
atpA Alcag7(5)						
atpA Alcag7(7)						
atpA Alcag7(5)	TTCAGGTGTGGCTATGGGGGAATACTTTAGAGATCATGCACGCCATGCCCTAATTTATTTATGATGATTTG						
atpA Alcag7(7)	TTCAGGTGTGGCTATGGGGGAATACTTTAGAGATCATGCACGCCATGCCCTAATTTATTTATGATGATTTG						
	430	440	450	460	470	480	490
atpA Alcag7(5)						
atpA Alcag7(7)						
atpA Alcag7(5)	AGTAAGCATGCTGTGCTTACAGAGAAATGCTTTTGAATTTGAGAAGACCCCAAGTAGGGAGGCCTTTTC						
atpA Alcag7(7)	AGTAAGCATGCTGTGCTTACAGAGAAATGCTTTTGAATTTGAGAAGACCCCAAGTAGGGAGGCCTTTTC						
	500	510	520	530	540	550	560
atpA Alcag7(5)						
atpA Alcag7(7)						
atpA Alcag7(5)	CTGGAGATGTGTTTTATATTCACTCACGGCCTTTAGAAAGAGCGGCTAAGCTATGCCATGAACAAGGGAT						
atpA Alcag7(7)	CTGGAGATGTGTTTTATATTCACTCACGGCCTTTAGAAAGAGCGGCTAAGCTATGCCATGAACAAGGGAT						
	570	580	590	600	610		
atpA Alcag7(5)						
atpA Alcag7(7)						
atpA Alcag7(5)	GCCCCGGCTCTTTGACTGCACCTGGCTATTGTGGAACCTCAAGCGGGCGA						
atpA Alcag7(7)	GCCCCGGCTCTTTGACTGCACCTGGCTATTGTGGAACCTCAAGCGGGCGA						
	10	20	30	40	50	60	70
efp Alcag7(5)						
efp Alcag7(7)						
efp Alcag7(5)	TACCAGCATGTCAAGCCCGGCAAGGGTGGCGCTTTTGTGCGCGCAAAAATCAAGTCGTTTTTAGATGGTA						
efp Alcag7(7)	TACCAGCATGTCAAGCCCGGCAAGGGTGGCGCTTTTGTGCGCGCAAAAATCAAGTCGTTTTTAGATGGTA						
	80	90	100	110	120	130	140
efp Alcag7(5)						
efp Alcag7(7)						
efp Alcag7(5)	AGGTGGTTGAGAAGACTTTCCATGCGGGGATTAAGTGCGAAGAGCCTAATCTGGTTGAAAAACGATGCA						
efp Alcag7(7)	AGGTGGTTGAGAAGACTTTCCATGCGGGGATTAAGTGCGAAGAGCCTAATCTGGTTGAAAAACGATGCA						
	150	160	170	180	190	200	210
efp Alcag7(5)						
efp Alcag7(7)						
efp Alcag7(5)	ATATCTCTATCATGATGGCGATACATACCAATTTATGGACATAGAGAGCTATGAGCAAAATCGCTTTGAAC						
efp Alcag7(7)	ATATCTCTATCATGATGGCGATACATACCAATTTATGGACATAGAGAGCTATGAGCAAAATCGCTTTGAAC						
	220	230	240	250	260	270	280
efp Alcag7(5)						
efp Alcag7(7)						
efp Alcag7(5)	GACTCTCAAGTGGGTGATGCTTCTAAATGGATGCTAGACGGCATGCAAGTGCAGGTTTTATTGCATAATG						
efp Alcag7(7)	GACTCTCAAGTGGGTGATGCTTCTAAATGGATGCTAGACGGCATGCAAGTGCAGGTTTTATTGCATAATG						
	290	300	310	320	330	340	350
efp Alcag7(5)						
efp Alcag7(7)						
efp Alcag7(5)	ACAAGGCATTTTCAGTGGATGTGCCCGCAAGTTGTGGCTCTAAAGATTGTAGAAACAGCCCCAATTTTAA						
efp Alcag7(7)	ACAAGGCATTTTCAGTGGATGTGCCCGCAAGTTGTGGCTCTAAAGATTGTAGAAACAGCCCCAATTTTAA						

```

efp Alcag7(7)  ACAAGGCGATTTCAAGTGGATGTGCCGCAAGTTGTGGCTCTAAAGATTGTAGAAACAGCCCCTAATTTTAA
                360      370      380      390      400      410
efp Alcag7(5)  GGGCGATACCTTCAAGCGGAGCAAAAAACCAGCGACTTTAGAAACCGGTGCGGTCTGTGCA
efp Alcag7(7)  GGGCGATACCTTCAAGCGGAGCAAAAAACCAGCGACTTTAGAAACCGGTGCGGTCTGTGCA
                10      20      30      40      50      60      70
mutY Alcag7(5) TTTTATTCCTTTTGAAGCTTTCCCCACTTTAAAAGACTTAGCGAACGCTCAATTAGAAGAGGTTT
mutY Alcag7(7) TTTTATTCCTTTTGAAGCTTTCCCCACTTTAAAAGACTTAGCGAACGCTCAATTAGAAGAGGTTT
                80      90      100     110     120     130     140
mutY Alcag7(5) TATTGCTCTGGAGAGGGCTTGGTTATTATTCAAGGGCTAAAAATTTAAAAAAAAGCGCTGAAATTTGCGT
mutY Alcag7(7) TATTGCTCTGGAGAGGGCTTGGTTATTATTCAAGGGCTAAAAATTTAAAAAAAAGCGCTGAAATTTGCGT
                150     160     170     180     190     200     210
mutY Alcag7(5) GAAAGAACCACTCACAGCTACCCAATGACTATCAAAGCCTGTTGAAACTCCCAGGGAATTGGCGCATAC
mutY Alcag7(7) GAAAGAACCACTCACAGCTACCCAATGACTATCAAAGCCTGTTGAAACTCCCAGGGAATTGGCGCATAC
                220     230     240     250     260     270     280
mutY Alcag7(5) ACGGCTAATGCGATTTTATGTTTTGGCTTTAGAGAAAAGAGCGCATGCGTGGACGCTAACATCAGGCGCG
mutY Alcag7(7) ACGGCTAATGCGATTTTATGTTTTGGCTTTAGAGAAAAGAGCGCATGCGTGGACGCTAACATCAGGCGCG
                290     300     310     320     330     340     350
mutY Alcag7(5) TGCTTTTAAGGCTTTTTGGTTTGGATCCTAATATCCACGCTAAAGACTTACAAATTAAGCGAATGGCTT
mutY Alcag7(7) TGCTTTTAAGGCTTTTTGGTTTGGATCCTAATATCCACGCTAAAGACTTACAAATTAAGCGAATGGCTT
                360     370     380     390     400     410     420
mutY Alcag7(5) TCTCAATCCTAATGAAAGCTTTAATCATAAACCAGCCCTAATTGATCTAGGGGCTTTAATCTGCTCCCTT
mutY Alcag7(7) TCTCAATCCTAATGAAAGCTTTAATCATAAACCAGCCCTAATTGATCTAGGGGCTTTAATCTGCTCCCTT
                10      20      30      40      50      60      70
ppa Alcag7(4)  ATTCTAATATCAAGTATGAATTGGATAAAGAAAGCGGGCTTTAATGGTGGATAGGGTGCTTTATGGAGC
ppa Alcag7(7)  ATTCTAATATCAAGTATGAATTGGATAAAGAAAGCGGGCTTTAATGGTGGATAGGGTGCTTTATGGAGC
                80      90      100     110     120     130     140
ppa Alcag7(4)  GCAAAAATACCCCGCAAATTAATGGTTTTGTGCCTAACACTTTAGGATCTGATGGCGACCCTGTAGATGCG
ppa Alcag7(7)  GCAAAAATACCCCGCAAATTAATGGTTTTGTGCCTAACACTTTAGGATCTGATGGCGACCCTGTAGATGCG
                150     160     170     180     190     200     210
ppa Alcag7(4)  CTTGTTTTAAGCGATGTGGCTTTTCAAGCTGGGAGCGTGGTGAAGCGCGCTTGGTTGGGGTTTTAAACA
ppa Alcag7(7)  CTTGTTTTAAGCGATGTGGCTTTTCAAGCTGGGAGCGTGGTGAAGCGCGCTTGGTTGGGGTTTTAAACA
                220     230     240     250     260     270     280
ppa Alcag7(4)  TGGAGGATGAAAGCGGGATGGATGAAAAATTACTCGCTTACCCATAGATAAGATCGATCCCACGCATAC
ppa Alcag7(7)  TGGAGGATGAAAGCGGGATGGATGAAAAATTACTCGCTTACCCATAGATAAGATCGATCCCACGCATAC
                290     300     310     320     330     340     350
ppa Alcag7(4)  CTATGTCAAAGATATTGATGATTTATCCAACACACTTTAGACAAAATCAAACATTTTTTTGAAACTTAC
ppa Alcag7(7)  CTATGTCAAAGATATTGATGATTTATCCAACACACTTTAGACAAAATCAAACATTTTTTTGAAACTTAC
                360     370     380     390
ppa Alcag7(4)  AAGGATTTAGAGCCTAATAAATGGGTGAAAGTCAAGGGTTTGAAAAC
ppa Alcag7(7)  AAGGATTTAGAGCCTAATAAATGGGTGAAAGTCAAGGGTTTGAAAAC

```

		10	20	30	40	50	60	70																
trpC	Alcag7 (5)																						
		TGCATTT	CAGTTT	TAGCCG	ATTCTAA	ATATTTT	TAGGCT	CTTATGA	AAGACAT	TAAAA	TGTC	TCG	CAGC											
trpC	Alcag7 (7)	TGCATTT	CAGTTT	TAGCCG	ATTCTAA	ATATTTT	TAGGCT	CTTATGA	AAGACAT	TAAAA	TGTC	TCG	CAGC											
		80	90	100	110	120	130	140																
trpC	Alcag7 (5)																						
		ATTCCA	CCAAGC	CTATTT	TATGCA	AAGATTT	TATCATT	GATGCT	TTTTCAA	ATCAA	CTCG	CTAG	GGGTT	AT										
trpC	Alcag7 (7)	ATTCCA	CCAAGC	CTATTT	TATGCA	AAGATTT	TATCATT	GATGCT	TTTTCAA	ATCAA	CTCG	CTAG	GGGTT	AT										
		150	160	170	180	190	200	210																
trpC	Alcag7 (5)																						
		GGGAGC	TAATG	CGGTG	CTTTA	ATGTTA	AGCGG	TTAGAT	GATAAAA	ATTATT	TAGAG	CTTT	CAAC	CTC										
trpC	Alcag7 (7)	GGGAGC	TAATG	CGGTG	CTTTA	ATGTTA	AGCGG	TTAGAT	GATAAAA	ATTATT	TAGAG	CTTT	CAAC	CTC										
		220	230	240	250	260	270	280																
trpC	Alcag7 (5)																						
		GCCAAA	TCCTTA	AAACAT	GAGCG	TGTTAA	CTGAAG	TTTCCA	ACCAG	CAAGAA	TTGAG	CGCT	TGCT	CAAAC										
trpC	Alcag7 (7)	GCCAAA	TCCTTA	AAACAT	GAGCG	TGTTAA	CTGAAG	TTTCCA	ACCAG	CAAGAA	TTGAG	CGCT	TGCT	CAAAC										
		290	300	310	320	330	340	350																
trpC	Alcag7 (5)																						
		TCCAAT	ACGAC	ATTAT	AGGCAT	CAATA	AACAGG	ATTTAC	ACACCT	TAAAA	ACC	GATAT	TAA	CCAC	ACGCT									
trpC	Alcag7 (7)	TCCAAT	ACGAC	ATTAT	AGGCAT	CAATA	AACAGG	ATTTAC	ACACCT	TAAAA	ACC	GATAT	TAA	CCAC	ACGCT									
		360	370	380	390	400	410	420																
trpC	Alcag7 (5)																						
		GGAAAT	ACGCC	CCCTG	TGCTT	AAAGC	ACGCT	CATTAT	CAGTG	AGTCC	GGTAT	TTAT	TCG	CAT	CGCAA									
trpC	Alcag7 (7)	GGAAAT	ACGCC	CCCTG	TGCTT	AAAGC	ACGCT	CATTAT	CAGTG	AGTCC	GGTAT	TTAT	TCG	CAT	CGCAA									
		430	440	450																				
trpC	Alcag7 (5)																						
		ATCAA	AGCC	CTAG	CCCTT	ATGT	GAAT	GGCT	TTTTTA															
trpC	Alcag7 (7)	ATCAA	AGCC	CTAG	CCCTT	ATGT	GAAT	GGCT	TTTTTA															
		10	20	30	40	50	60	70																
ureI	Alcag7 (5)																						
		ATGCT	AGGTAC	TTGTA	TGTTAT	GTGTT	GGGAT	TGTTT	TAATC	AGCA	ATGG	ATTTG	CGGGT	TAA	CCAAA									
ureI	Alcag7 (7)	ATGCT	AGGTAC	TTGTA	TGTTAT	GTGTT	GGGAT	TGTTT	TAATC	AGCA	ATGG	ATTTG	CGGGT	TAA	CCAAA									
		80	90	100	110	120	130	140																
ureI	Alcag7 (5)																						
		GTCG	ATCCT	AAAAG	CAC	TGCG	GTGAT	GAAC	TTTTTT	TGTGG	CGGG	CTC	CCAT	TATTT	GTA	ATAG	TTG							
ureI	Alcag7 (7)	GTCG	ATCCT	AAAAG	CAC	TGCG	GTGAT	GAAC	TTTTTT	TGTGG	CGGG	CTC	CCAT	TATTT	GTA	ATAG	TTG							
		150	160	170	180	190	200	210																
ureI	Alcag7 (5)																						
		TCAT	CAC	TTATT	CTG	CACT	CCAC	CCCTA	CAG	CCCTG	TAGA	AGGT	GCC	GA	AGAT	ATTG	CTCA	AGTAT	CACA					
ureI	Alcag7 (7)	TCAT	CAC	TTATT	CTG	CACT	CCAC	CCCTA	CAG	CCCTG	TAGA	AGGT	GCC	GA	AGAT	ATTG	CTCA	AGTAT	CACA					
		220	230	240	250	260	270	280																
ureI	Alcag7 (5)																						
		CCATTT	GACT	AGTTT	CTAT	GGG	CCAG	CGACT	GGG	TATT	GTTT	GGTTT	ACCT	ACTT	GAT	GC	GGCT	ATC						
ureI	Alcag7 (7)	CCATTT	GACT	AGTTT	CTAT	GGG	CCAG	CGACT	GGG	TATT	GTTT	GGTTT	ACCT	ACTT	GAT	GC	GGCT	ATC						
		290	300	310	320	330	340	350																
ureI	Alcag7 (5)																						
		AA	CCAC	ACTTTT	GGTTT	GGATT	GGAG	CCCTA	TTCTT	GGTAT	AGCTT	ATTC	G	TAG	CGAT	CA	AC	CTG	TT					
ureI	Alcag7 (7)	AA	CCAC	ACTTTT	GGTTT	GGATT	GGAG	CCCTA	TTCTT	GGTAT	AGCTT	ATTC	G	TAG	CGAT	CA	AC	CTG	TT					
		360	370	380	390	400	410	420																
ureI	Alcag7 (5)																						
		CTG	CTG	CGATTT	TAT	CCCA	CTA	TAG	CGAT	ATG	CTT	GAT	G	ACC	CAA	-GT	TT	AG	GC	AT	CACT	G	AGG	CGA
ureI	Alcag7 (7)	CTG	CTG	CGATTT	TAT	CCCA	CTA	TAG	CGAT	ATG	CTT	GAT	G	ACC	CAA	-GT	TT	AG	GC	AT	CACT	G	AGG	CGA
		430	440	450	460	470	480	490																
ureI	Alcag7 (5)																						
		TTGG	TGGG	CGAT	CA	TTT	GGTT	GGCTT	GGGG	TGTTT	TAT	GGCT	TAC	CG	CTT	CA	TTT	G	AAAA	CA	CTT	G		
ureI	Alcag7 (7)	TTGG	TGGG	CGAT	CA	TTT	GGTT	GGCTT	GGGG	TGTTT	TAT	GGCT	TAC	CG	CTT	CA	TTT	G	AAAA	CA	CTT	G		


```

                    500      510      520      530      540      550      560
ureI Alcag7(5)   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ureI Alcag7(7)   AAATCCCTTTAGGGAAATTCACCTCCATGGCTTGCTATCATTGAGGGTATTTTAAACCGCTTGGATCCCTGC
                    570      580
ureI Alcag7(5)   TTGGTTACTCTTTATCCAACACTGGGTG
ureI Alcag7(7)   TTGGTTACTCTTTATCCACCACTGGGTG

                    10      20      30      40      50      60      70
yph Alcag7(5)   AATACAAGCCATAAAACTTTAAAAACCATTGCGATTTTAGGCCAACCTAATGTGGGGAAAAGTTCACAT
yph Alcag7(7)   AATACAAGCCATAAAACTTTAAAAACCATTGCGATTTTAGGCCAACCTAATGTGGGGAAAAGTTCACAT

                    80      90      100     110     120     130     140
yph Alcag7(5)   TTAAACCGCCTGGCTAGAGAAAGGATCGCTATCACCTCAGATTTTGCAAGCCTACACGAGACATTAACAA
yph Alcag7(7)   TTAAACCGCCTGGCTAGAGAAAGGATCGCTATCACCTCAGATTTTGCAAGCCTACACGAGACATTAACAA

                    150     160     170     180     190     200     210
yph Alcag7(5)   ACGAAAAATCGCATTGAACGGCCATGAAGTGGAGCTATTAGACACAGGGGCATGGCTAAAGACGCCTTT
yph Alcag7(7)   ACGAAAAATCGCATTGAACGGCCATGAAGTGGAGCTATTAGACACAGGGGCATGGCTAAAGACGCCTTT

                    220     230     240     250     260     270     280
yph Alcag7(5)   TTGTCTAAAGAAATCAAAGCCCTTAATTTAAAAGCCGCTCAAATGAGCGATTTGATTTTATATGTTGTGG
yph Alcag7(7)   TTGTCTAAAGAAATCAAAGCCCTTAATTTAAAAGCCGCTCAAATGAGCGATTTGATTTTATATGTTGTGG

                    290     300     310     320     330     340     350
yph Alcag7(5)   ATGGCAAGTCTATCCCTAGCGATGAAGACATCAAGCTTTTATAGAGAGGTTTTTAAGATCAAACCTTAAGT
yph Alcag7(7)   ATGGCAAGTCTATCCCTAGCGATGAAGACATCAAGCTTTTATAGAGAGGTTTTTAAGATCAAACCTTAAGT

                    360     370     380     390     400     410     420
yph Alcag7(5)   CTTTTTAGTGATCAATAAGATTGATAACGACAAAGAAAAAGAGCGAGCTTATGCGTTTTTCCTTTTGGC
yph Alcag7(7)   CTTTTTAGTGATCAATAAGATTGATAACGACAAAGAAAAAGAGCGAGCTTATGCGTTTTTCCTTTTGGC

                    430     440     450     460     470     480     490
yph Alcag7(5)   ATTCCCAAGAGTTTTAATAATTCCTGTTTCGCACAATAGAGGCATTAGCGCATTAATTGATGCGGTATTGA
yph Alcag7(7)   ATTCCCAAGAGTTTTAATAATTCCTGTTTCGCACAATAGAGGCATTAGCGCATTAATTGATGCGGTATTGA

                    500     510
yph Alcag7(5)   ACGCATTGAATTTAAACCAA
yph Alcag7(7)   ACGCATTGAATTTAAACCAA

```

Στελέχη Alcag 40

```

                    10      20      30      40      50      60      70
atpA Alcag40(2)  AATGAGTTCAGTCTCATCGAGCAAAAAGCCCCAGGCATTATGGACAGAAAAATCGGTGCATGAGCCTTTGC
atpA Alcag40(4)  AATGAGTTCAGTCTCATCGAGCAAAAAGCCCCAGGCATTATGGACAGAAAAATCGGTGCATGAGCCTTTGC

                    80      90      100     110     120     130     140
atpA Alcag40(2)  AAAACAGGCATTTAAAGCCATTGATGCATTGGTGCCTATTGGGCGCGGGCAAAGGGAATTGATTTATGGGGA
atpA Alcag40(4)  AAAACAGGCATTTAAAGCCATTGATGCATTGGTGCCTATTGGGCGCGGGCAAAGGGAATTGATTTATGGGGA

                    150     160     170     180     190     200     210
atpA Alcag40(2)  TAAACAAAACCGGTAAAAACACCGTAGCGATCGATGCGATCATTAAACCAAAAAGGGCAAAAATGTGATCTGT
atpA Alcag40(4)  TAAACAAAACCGGTAAAAACACCGTAGCGATCGATGCGATCATTAAACCAAAAAGGGCAAAAATGTGATCTGT

```

```

                220      230      240      250      260      270      280
atpA Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
atpA Alcag40(4)  ATCTATGTGGCTATTGGGC AAAAAGAAATCCACTGTCGCGCAAGTGGTCCGCAAATTAGAAAGAAATACGGAG

                290      300      310      320      330      340      350
atpA Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
atpA Alcag40(4)  CGATGGAATACAGCGTCGTGATCAACGCTTCGGCTTCGATTGAGCTGCAATGCAATATTTAGCCCCCTTA

                360      370      380      390      400      410      420
atpA Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
atpA Alcag40(4)  TTCAGGTGGCTATGGGGAAATACTTAGAGATCATGCCGCCATGCCCTAATCATTATGATGATTG

                430      440      450      460      470      480      490
atpA Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
atpA Alcag40(4)  AGTAAGCATGCTGTCGCTTACAGAGAGATTTCTTTGATTTTGAAGAGACCCCAAGGTAGGGAGGCTTTTC

                500      510      520      530      540      550      560
atpA Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
atpA Alcag40(4)  CTGGAGATGTGTTTTATCCACTCACGGCTTTTAGAAAGAGCGGCTAAACTTTGCGATGAAAAGGGTGC

                570      580      590      600      610      620
atpA Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
atpA Alcag40(4)  CGGCTCTTTGACCGCACTCCCTATTGTGAAACTCAAGCGGGCGATGTTTCAGCTAATATCCCTACG

                10      20      30      40      50      60      70
efp Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
efp Alcag40(4)  TACCAGCATGTCAAGCCCGCAAGGGTGC GGCTTTGTGCGTGCGAAAATCAAGTCGTTTTTAGATGGTA

                80      90      100     110     120     130     140
efp Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
efp Alcag40(4)  AGGTGATTGAGAAGACTTTCCATGCGGGGATAAGTGCGAAGAGCCTAATCTGGTTGAAAAACGATGCA

                150     160     170     180     190     200     210
efp Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
efp Alcag40(4)  ATACCTTTATCACGATGGCGATACATACCAATTCATGGATATAGAGAGCTATGAGCAAATCGCTTTAAAC

                220     230     240     250     260     270     280
efp Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
efp Alcag40(4)  GACTCTCAAGTGGGCGAGGCTTCTAAGTGGATGCTAGATGGCATGCAAGTGCAGGTTTTATTGCAATAATG

                290     300     310     320     330     340     350
efp Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
efp Alcag40(4)  ACAAGGCGATTTCAAGTGGATGTGCCGCAAGTTGTGGCTTTAAAGATTGTAGAAACGGCTCCTAAATTTTA

                360     370     380     390     400     410
efp Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
efp Alcag40(4)  AGGGCGATACTTCAAGCGCGAGCAAAAAACAGCAACTTTGGAAAACGGTGC GGTCGTGCA

                10      20      30      40      50      60      70
mutY Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
mutY Alcag40(4)  TTTTATCCCTTTTTTAGAAGCTTTCCCACTTTAAAAGACTTAGCAAACGCTCAATTAGAAGAGGTTT

                80      90      100     110     120     130     140
mutY Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
mutY Alcag40(4)  TATTGCTCTGGCGAGGGCTTGGCTATTATTCAAGGGCTAAAAATTTAAAAAAAAGCGCTGAAATTTGCGT

```

```

      150      160      170      180      190      200      210
mutY Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
mutY Alcag40(4)  GAAAGAACCCACTCACAGCTACCCAATGACTATCAAAGCCTGTTAAAACCTCCCGGTATTGGCGTATAC

      220      230      240      250      260      270      280
mutY Alcag40(2)  ACGGCTAATGCGATCTTGTTGTTTGGTTTTAGGGAAAAGAGCGCATGCGTGGACGCTAACATCAGGCGCG
mutY Alcag40(4)  ACGGCTAATGCGATCTTGTTGTTTGGTTTTAGGGAAAAGAGCGCATGCGTGGACGCTAACATCAGGCGCG

      290      300      310      320      330      340      350
mutY Alcag40(2)  TGCTTTTAAGGCTTTTGGATTAGATCCCAACATTCACGCTAAAGACTTACAAATTAAGCGAATGACTT
mutY Alcag40(4)  TGCTTTTAAGGCTTTTGGATTAGATCCCAACATTCACGCTAAAGACTTACGAATTAAGCGAATGACTT

      360      370      380      390      400      410      420
mutY Alcag40(2)  TCTCAATCTTGATGAAAGCTTTAATCATTACCAAGCCCTAATTGATCTAGGGGCTTTAATCTGCTCCCT
mutY Alcag40(4)  TCTCAATCTTGATGAAAGCTTTAATCATTACCAAGCCCTAATTGATCTAGGGGCTTTAATCTGCTCCCT

      10       20       30       40       50       60       70
ppa Alcag40(2)  ATTCTAATATCAAGTATGAATTGGATAAAGAAAGCGGGCTTTAATGGTGGATAGGGTGCTTTATGGGGC
ppa Alcag40(4)  ATTCTAATATCAAGTATGAATTGGATAAAGAAAGCGGGCTTTAATGGTGGATAGGGTGCTTTATGGGGC

      80       90       100      110      120      130      140
ppa Alcag40(2)  GCAAAATTACCCCGCAAATTACGGCTTTGTGCTAACACTTTGGGATCTGATGGCGACCTGTAGATGCA
ppa Alcag40(4)  GCAAAATTACCCCGCAAATTACGGCTTTGTGCTAACACTTTGGGATCTGATGGCGACCTGTAGATGCA

      150      160      170      180      190      200      210
ppa Alcag40(2)  CTTGTTTTAAGCGATGTGGCTTTTCAAGCCGGAAGCGTAGTGAAAGCGCGCTAGTTGGGGTTTTAAACA
ppa Alcag40(4)  CTTGTTTTAAGCGATGTGGCTTTTCAAGCCGGAAGCGTAGTGAAAGCGCGCTAGTTGGGGTTTTAAACA

      220      230      240      250      260      270      280
ppa Alcag40(2)  TGGAAGATGAAAGCGGGATGGATGAAAAATTACTCGCTCTGCCATAGATAAGATCGATCCCACGCATTC
ppa Alcag40(4)  TGGAAGATGAAAGCGGGATGGATGAAAAATTACTCGCTCTGCCATAGATAAGATCGATCCCACGCATTC

      290      300      310      320      330      340      350
ppa Alcag40(2)  CTATGTCAAAGATATTGATGATTTATCCAAACACACTTTAGATAAAAATCAAACATTTTTTTGAAACTTAC
ppa Alcag40(4)  CTATGTCAAAGATATTGATGATTTATCCAAACACACTTTAGATAAAAATCAAACATTTTTTTGAAACTTAC

      360      370      380      390
ppa Alcag40(2)  AAGGATTTAGAGCCTAATAAATGGGTGAAAGTCAAGGGGTTTGAAAAC
ppa Alcag40(4)  AAGGATTTAGAGCCTAATAAATGGGTGAAAGTCAAGGGGTTTGAAAAC

      10       20       30       40       50       60       70
trpC Alcag40(2)  TGCATTTTCGGTTTTAGCCGATTCTAAACATTTTTTAGGCTCTTATGAAAACATTAAGATCGTTTCGCAAC
trpC Alcag40(4)  TGCATTTTCGGTTTTAGCCGATTCTAAACATTTTTTAGGCTCTTATGAAAACATTAAGATCGTTTCGCAAC

      80       90       100      110      120      130      140
trpC Alcag40(2)  GTTCCACTAAGCCTGTTTTATGTAAGAATTTATCATTGACGCTTTTCAAATTAACCTCGCTAGAATGAT
trpC Alcag40(4)  GTTCCACTAAGCCTGTTTTATGTAAGAATTTATCATTGACGCTTTTCAAATTAACCTCGCTAGAATGAT

      150      160      170      180      190      200      210
trpC Alcag40(2)  GGGGGCTAATGCGGTGCTTTTAATGTTAAGCGTGTAGATGATAAAAATTTAGAGCTTTTCAACCTC
trpC Alcag40(4)  GGGGGCTAATGCGGTGCTTTTAATGTTAAGCGTGTAGATGATAAAAATTTAGAGCTTTTCAACCTC

      220      230      240      250      260      270      280
trpC Alcag40(2)  GCTAAATCCTTAAACATGAGCGTGTAACTGAAGTTTCCAACCAGCAAGAAATTGAGCGCTTGCTCAAAC
trpC Alcag40(4)  GCTAAATCCTTAAACATGAGCGTGTAACTGAAGTTTCCAACCAGCAAGAAATTGAGCGCTTGCTCAAAC

```

```

                290      300      310      320      330      340      350
trpC Alcag40(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
trpC Alcag40(4)  TCCAATACGACATTATAGGCATCAATAACAGGGATTTACACACCTTAAAAACCGATATTTAAACAACAGCT

                360      370      380      390      400      410      420
trpC Alcag40(2)  CAAATTACGCTCTCTCTTGCCTAAAGACGCGCTCGTGGTGAGCGAGTCCGGTATTTATTCGCATGCACAA
trpC Alcag40(4)  CAAATTACGCTCTCTCTTGCCTAAAGACGCGCTCGTGGTGAGCGAGTCCGGTATTTATTCGCATGCACAA

                430      440      450
trpC Alcag40(2)  ATCAAAGCCCTAGCCCCTTATGTGAATGGCTTTTTTA
trpC Alcag40(4)  ATCAAAGCCCTAGCCCCTTATGTGAATGGCTTTTTTA

                10       20       30       40       50       60       70
ureI Alcag40(2)  ATGCTAGGACTTGATATTGTTATATGTTGGGATTGTTTTAATCAGCAATGGGATATTGCGGGTTAACCAA
ureI Alcag40(4)  ATGCTAGGACTTGATATTGTTATATGTTGGGATTGTTTTAATCAGCAATGGGATATTGCGGGTTAACCAA

                80       90       100      110      120      130      140
ureI Alcag40(2)  AGTCGATCCTAAAAGCACTGCGGTGATGAACTTTTTTGTGGGTGGGCTCTCCATTGTTTGTAAATGTGGTG
ureI Alcag40(4)  AGTCGATCCTAAAAGCACTGCGGTGATGAACTTTTTTGTGGGTGGGCTCTCCATTGTTTGTAAATGTGGTG

                150      160      170      180      190      200      210
ureI Alcag40(2)  GTCATCACCTTATTCGGCTCTCCACCCCTACAGCCCTGTAGAAGGCGCCGAAGATATTGCTCAAGTATCGC
ureI Alcag40(4)  GTCATCACCTTATTCGGCTCTCCACCCCTACAGCCCTGTAGAAGGCGCCGAAGATATTGCTCAAGTATCGC

                220      230      240      250      260      270      280
ureI Alcag40(2)  ACCATTTGACTAGTATTACTATGGGCCAGCGACTGGGTTATTGTTGGTTTTACCTACTTGTATGCGGCT
ureI Alcag40(4)  ACCATTTGACTAGTATTACTATGGGCCAGCGACTGGGTTATTGTTGGTTTTACCTACTTGTATGCGGCT

                290      300      310      320      330      340      350
ureI Alcag40(2)  ATCAACCACACTTTTGGTTTGGATTGGAGGCCCTTATTCCTTGGTATAGCTTATTCGTAGCGATCAACACTG
ureI Alcag40(4)  ATCAACCACACTTTTGGTTTGGATTGGAGGCCCTTATTCCTTGGTATAGCTTATTCGTAGCGATCAACACTG

                360      370      380      390      400      410      420
ureI Alcag40(2)  TTCCTGCTGCGATTTTATCCCACATAGCGATATGCTTGATGACCACAAAGTGTAGGCATCACTGAAGG
ureI Alcag40(4)  TTCCTGCTGCGATTTTATCCCACATAGCGATATGCTTGATGACCACAAAGTGTAGGCATCACTGAAGG

                430      440      450      460      470      480      490
ureI Alcag40(2)  CGATTGGTGGGCGATCATATGGTTGGCTTGGGGTGTGTTTGTGGCTTACCGCTTTCATTGAAAACATCTTG
ureI Alcag40(4)  CGATTGGTGGGCGATCATATGGTTGGCTTGGGGTGTGTTTGTGGCTTACCGCTTTCATTGAAAACATCTTG

                500      510      520      530      540      550      560
ureI Alcag40(2)  AAAATCCCCTTAGGGAAATTCACCTCCATGGCTTGCTATCATTGATGGTATTTTAAACCGCTTGGATCCCTG
ureI Alcag40(4)  AAAATCCCCTTAGGGAAATTCACCTCCATGGCTTGCTATCATTGATGGTATTTTAAACCGCTTGGATCCCTG

                570      580
ureI Alcag40(2)  CTTGGTTGCTCTTAATCCAACACTG
ureI Alcag40(4)  CTTGGTTGCTCTTAATCCAACACTG

                10       20       30       40       50       60       70
yphC Alcag40(2)  AATAACAAGCCCTTAAACTTTAAAAACCAATGCGATTTTAGGCCAGCCTAATGTGGGAAAAGCTCGTTAT
yphC Alcag40(4)  AATAACAAGCCCTTAAACTTTAAAAACCAATGCGATTTTAGGCCAGCCTAATGTGGGAAAAGCTCGTTAT

                80       90       100      110      120      130      140
yphC Alcag40(2)  TTAACCGCTTAGCTAGAGAAAGGATCGCTATCACTTCAGATTTTGCAGGCACTACACGAGACATTAACAA
yphC Alcag40(4)  TTAACCGCTTAGCTAGAGAAAGGATCGCTATCACTTCAGATTTTGCAGGCACTACACGAGACATTAACAA

```

```

      150      160      170      180      190      200      210
yphC Alcag40(2)  ACGAAAAATCGCATTGAATGGCCATGAAGTGGAAATTGCTAGATACAGGGGGCATGGCTAAAGACGCCTTT
yphC Alcag40(4)  ACGAAAAATCGCATTGAATGGCCATGAAGTGGAAATTGCTAGATACAGGGGGCATGGCTAAAGACGCCTTT

      220      230      240      250      260      270      280
yphC Alcag40(2)  TTGTCTAAAGAAATCAAAGCCCTTAATTTAAAAGCCGCTCAAATGAGCGATTGATTTTATACGTTGTGG
yphC Alcag40(4)  TTGTCTAAAGAAATCAAAGCCCTTAATTTAAAAGCCGCTCAAATGAGCGATTGATTTTATACGTTGTGG

      290      300      310      320      330      340      350
yphC Alcag40(2)  ATGGCAAGTCTATCCCTAGCGATGAAGACATCAAGCTTTTTAGAGAGGTTTTTAAGATCAACCCCTAACTG
yphC Alcag40(4)  ATGGCAAGTCTATCCCTAGCGATGAAGACATCAAGCTTTTTAGAGAGGTTTTTAAGATCAACCCCTAACTG

      360      370      380      390      400      410      420
yphC Alcag40(2)  CTTTTTAGTGATCAATAAGATTGATAACGCACAAAGAAAAGAGCGGGCTTATGCGTTTTCTTCTTTTGGC
yphC Alcag40(4)  CTTTTTAGTGATCAATAAGATTGATAACGCACAAAGAAAAGAGCGGGCTTATGCGTTTTCTTCTTTTGGC

      430      440      450      460      470      480      490
yphC Alcag40(2)  ATGCCAAAGAGTTTTAATATTTCCGTTTCGCACAACAGGGGCATTAGCGCATAAATTGATGCAATATTGA
yphC Alcag40(4)  ATGCCAAAGAGTTTTAATATTTCCGTTTCGCACAACAGGGGCATTAGCGCATAAATTGATGCAATATTGA

      500      510
yphC Alcag40(2)  ACGCACTGGATTTAAATCAA
yphC Alcag40(4)  ACGCACTGGATTTAAATCAA

```

Στελέχη Hp77

```

      10      20      30      40      50      60      70
atpA Hp77(2)  AATGAATTTAGTCTCATCGAGCAAAAAGCCCCAGGCATTATGGACAGAAAAATCGGTGCATGAGCCTTTGC
atpA Hp77(5)  AATGAATTTAGTCTCATCGAGCAAAAAGCCCCAGGCATTATGGACAGAAAAATCGGTGCATGAGCCTTTGC

      80      90      100     110     120     130     140
atpA Hp77(2)  AAACAGGCATTTAAAGCCATTGATGCGTTGGTGCCTATTGGGCGTGGGCAAAGGGAAATTGATCATTGGGGA
atpA Hp77(5)  AAACAGGCATTTAAAGCCATTGATGCGTTGGTGCCTATTGGGCGTGGGCAAAGGGAAATTGATCATTGGGGA

      150     160     170     180     190     200     210
atpA Hp77(2)  TAAACAAACCGGTAAAACCAACCGTAGCGATCGATGCGATCATTAAACAAAAGGGCAAATATGTGATCTGT
atpA Hp77(5)  TAAACAAACCGGTAAAACCAACCGTAGCGATCGATGCGATCATTAAACAAAAGGGCAAATATGTGATCTGT

      220     230     240     250     260     270     280
atpA Hp77(2)  ATCTATGTGGCTATTGGGCAAAAGAATCCACTGTGCGCAAGTGGTCCGCAAGATTAGAAAGAAATATGGG
atpA Hp77(5)  ATCTATGTGGCTATTGGGCAAAAGAATCCACTGTGCGCAAGTGGTCCGCAAGATTAGAAAGAAATATGGG

      290     300     310     320     330     340     350
atpA Hp77(2)  GCGATGGAATACAGCGTCGTGATCAACGCTTCGGCTTCAGATTTCAGCTGCGATGCAATATTTAGCCCCTT
atpA Hp77(5)  GCGATGGAATACAGCGTCGTGATCAACGCTTCGGCTTCAGATTTCAGCTGCGATGCAATATTTAGCCCCTT

      360     370     380     390     400     410     420
atpA Hp77(2)  AATCAGGTGTGGCTATGGGGAAACTTTAGAGATCATGCCCGCCATGCCCTAATCATTTATGATGATTT
atpA Hp77(5)  AATCAGGTGTGGCTATGGGGAAACTTTAGAGATCATGCCCGCCATGCCCTAATCATTTATGATGATTT

      430     440     450     460     470     480     490
atpA Hp77(2)  GAGTAAGCATGCTGTGCGTTACAGAGAGATGCTTTGATTTTGAAGAAGACCCCCAGGTAGGGAGGCTTTT
atpA Hp77(5)  GAGTAAGCATGCTGTGCGTTACAGAGAGATGCTTTGATTTTGAAGAAGACCCCCAGGTAGGGAGGCTTTT

      500     510     520     530     540     550     560
.....

```

atpA Hp77(2) CCTGGAGATGTGTTTTATATCCACTCCCGCTTTTAGAAAGAGCGGCTAAACTTTGCGATGAAAACGGTGC
atpA Hp77(5) CCTGGAGATGTGTTTTATATCCACTCCCGCTTTTAGAAAGAGCGGCTAAACTTTGCGATGAAAACGGTGC

570 580 590 600 610 620
atpA Hp77(2) CGGTTCTTTGACTGCGCTCCCTATTGTGAAACTCAAGCGGGCGATGTTTCAGCCTATATCCCTACG
atpA Hp77(5) GGGTTCTTTGACTGCGCTCCCTATTGTGAAACTCAAGCGGGCGATGTTTCAGCCTATATCCCTACG

10 20 30 40 50 60 70
efp Hp77(2) TACCAGCATGTCAAGCCCGGCAAGGGTGC GGCTTTTGTACGCGCGAAAATCAAGTCGTTTTTAGATGGTA
efp Hp77(5) TACCAGCATGTCAAGCCCGGCAAGGGTGC GGCTTTTGTACGCGCGAAAATCAAGTCGTTTTTAGATGGTA

80 90 100 110 120 130 140
efp Hp77(2) AGGTGATTGAAAAGACTTTCATGCGGGGATTAAGTGTGAAGAGCCTAATTTGGTTGAAAAACGATGCA
efp Hp77(5) AGGTGATTGAAAAGACTTTCATGCGGGGATTAAGTGTGAAGAGCCTAATTTGGTTGAAAAACGATGCA

150 160 170 180 190 200 210
efp Hp77(2) ATACCTTTATCATGATGGCGATACATACCAATTCATGGACATAGAGAGCTATGAGCAAATCGCTTTGAAC
efp Hp77(5) ATACCTTTATCATGATGGCGATACATACCAATTCATGGACATAGAGAGCTATGAGCAAATCGCTTTGAAC

220 230 240 250 260 270 280
efp Hp77(2) GACTCTCAAGTGGGTGATGCTTCTAAATGGATGCTAGACGGCATGCAAGTGCAGGTTTTATTGCATAATG
efp Hp77(5) GACTCTCAAGTGGGTGATGCTTCTAAATGGATGCTAGACGGCATGCAAGTGCAGGTTTTATTGCATAATG

290 300 310 320 330 340 350
efp Hp77(2) ACAAGGCGATTTTCAAGTGGATGTGCCGCAAGTTGTGGCTCTAAAGATTGTAGAAACGGCTCCTAATTTTAA
efp Hp77(5) ACAAGGCGATTTTCAAGTGGATGTGCCGCAAGTTGTGGCTCTAAAGATTGTAGAAACGGCTCCTAATTTTAA

360 370 380 390 400 410
efp Hp77(2) GGGCGATACTTCCAGCGCGAGCAAAAAACCAGCGACTTTAGAAAACCGGTCCGGTTCGTGCA
efp Hp77(5) GGGCGATACTTCCAGCGCGAGCAAAAAACCAGCGACTTTAGAAAACCGGTCCGGTTCGTGCA

10 20 30 40 50 60 70
mutY Hp77(2) TTTTATTCCCCTTTTTGAAGCTTTCCCCACTTTAAAAGACTTGGCGAACGCTCAATTAGAGAAGGTTT
mutY Hp77(5) TTTTATTCCCCTTTTTGAAGCTTTCCCCACTTTAAAAGACTTGGCGAACGCTCAATTAGAGAAGGTTT

80 90 100 110 120 130 140
mutY Hp77(2) TATTGCTCTGGCGAGGGCTTGGCTATTATTC AAGGGCTAAAAATTTAAAAAAAAGCGCTGAAATTTGCGT
mutY Hp77(5) TATTGCTCTGGCGAGGGCTTGGCTATTATTC AAGGGCTAAAAATTTAAAAAAAAGCGCTGAAATTTGCGT

150 160 170 180 190 200 210
mutY Hp77(2) TAAAGAACATAATTCACAATTACCTAATGATTATCAAAGCCTATTGAAACTCCCAGGGATTGGCGCATAC
mutY Hp77(5) TAAAGAACATAATTCACAATTACCTAATGATTATCAAAGCCTATTGAAACTCCCAGGGATTGGCGCATAC

220 230 240 250 260 270 280
mutY Hp77(2) ACGGCTAATGCGATTTTATGTTTTGGCTTTAGAGAAAAGAGCGCATGCGTGGACGCTAATATCAAGCGCG
mutY Hp77(5) ACGGCTAATGCGATTTTATGTTTTGGCTTTAGAGAAAAGAGCGCATGCGTGGACGCTAATATCAAGCGCG

290 300 310 320 330 340 350
mutY Hp77(2) TGCTTTTAAGGCTTTTTGGTTTGGATCCTAATATCCAAGCTAAAGACTTACAAATTAAGGCGAATGACTT
mutY Hp77(5) TGCTTTTAAGGCTTTTTGGTTTGGATCCTAATATCCAAGCTAAAGACTTACAAATTAAGGCGAATGACTT

360 370 380 390 400 410 420
mutY Hp77(2) TCTTAATCCTAATGAAAAGCTTTAATCACAACCAAGCCCTAATTGATCTAGGGGCTTTAATCTGCTCCCT
mutY Hp77(5) TCTTAATCCTAATGAAAAGCTTTAATCACAACCAAGCCCTAATTGATCTAGGGGCTTTAATCTGCTCCCT

```

          10      20      30      40      50      60      70
ppa Hp77(2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ppa Hp77(5)  ATTCTAATATCAAGTATGAATTGGATAAAGAAAGCGGGCTTTAATGGTGGATAGGGTGCTTTATGGGGC

          80      90      100     110     120     130     140
ppa Hp77(2)  GCAAAAATACCCTGCGAATTATGGCTTTGTCCTAAACCTTAGGATCTGATGGCGACCCTGTAGATGCG
ppa Hp77(5)  GCAAAAATACCCTGCGAATTATGGCTTTGTCCTAAACCTTAGGATCTGATGGCGACCCTGTAGATGCG

          150     160     170     180     190     200     210
ppa Hp77(2)  CTTGTTTTAAGCGATGTGGCTTTTCAAGCCGGAAGCGTGGTGAAAGCGCGCTTGGTTTGGGGTTTTAAACA
ppa Hp77(5)  CTTGTTTTAAGCGATGTGGCTTTTCAAGCCGGAAGCGTGGTGAAAGCGCGCTTGGTTTGGGGTTTTAAACA

          220     230     240     250     260     270     280
ppa Hp77(2)  TGGAAGATGAAAGCGGGATGGATGAAAATTACTCGCTCACCCATAGATAAGATCGATCCACGCATTCT
ppa Hp77(5)  TGGAAGATGAAAGCGGGATGGATGAAAATTACTCGCTCACCCATAGATAAGATCGATCCACGCATTCT

          290     300     310     320     330     340     350
ppa Hp77(2)  CTATGTTAAAGATATTGATGATTTATCCAAACACACTTTAGATAAAATCAAACATTTTTTTGAAACTTAC
ppa Hp77(5)  CTATGTTAAAGATATTGATGATTTATCCAAACACACTTTAGATAAAATCAAACATTTTTTTGAAACTTAC

          360     370     380     390
ppa Hp77(2)  AAGGATTTAGAGCCTAATAAATGGGTGAAAGTCAAGGGTTTGAAAAAC
ppa Hp77(5)  AAGGATTTAGAGCCTAATAAATGGGTGAAAGTCAAGGGTTTGAAAAAC

          10      20      30      40      50      60      70
trpC Hp77(2)  TGCATTTCAGTTTTAGCCGATGCTAAATTTTTTTAGGCTCTTATGAAAACATTAAGATTGTTTCGCAGC
trpC Hp77(5)  TGCATTTCAGTTTTAGCCGATGCTAAATTTTTTTAGGCTCTTATGAAAACATTAAGATTGTTTCGCAGC

          80      90      100     110     120     130     140
trpC Hp77(2)  ATTCCACCAAGCCATTTTTGTGTAAAGATTTTATCATTGATGCTTCCAGATCAAACTCGCTAGAATGAT
trpC Hp77(5)  ATTCCACCAAGCCATTTTTGTGTAAAGATTTTATCATTGATGCTTCCAGATCAAACTCGCTAGAATGAT

          150     160     170     180     190     200     210
trpC Hp77(2)  GGGAGCTGATGCGGTGCTTTTAAATGTTAAGCGCGTTAGATGATAAAATTATTTAGAGCTTTTCAACCCTC
trpC Hp77(5)  GGGAGCTGATGCGGTGCTTTTAAATGTTAAGCGCGTTAGATGATAAAATTATTTAGAGCTTTTCAACCCTC

          220     230     240     250     260     270     280
trpC Hp77(2)  GCCAAATCCTTAAACATGAGCGTGTAACTGAAGTTTCCAACAAGCAAGAAATTGAGCGCTTGCTCAAAC
trpC Hp77(5)  GCCAAATCCTTAAACATGAGCGTGTAACTGAAGTTTCCAACAAGCAAGAAATTGAGCGCTTGCTCAAAC

          290     300     310     320     330     340     350
trpC Hp77(2)  TCCAATACGACATTATAGGCATCAATACAGGGATTTACACCCCTAACCACCGACATTAACAACACGCT
trpC Hp77(5)  TCCAATACGACATTATAGGCATCAATACAGGGATTTACACCCCTAACCACCGACATTAACAACACGCT

          360     370     380     390     400     410     420
trpC Hp77(2)  CAAATTACGCTCTCTCTTGCCTAAAGACGCACTCGTGGTGAGTGAGTCCGGTATTTATTCGCATGTGCAA
trpC Hp77(5)  CAAATTACGCTCTCTCTTGCCTAAAGACGCACTCGTGGTGAGTGAGTCCGGTATTTATTCGCATGTGCAA

          430     440     450
trpC Hp77(2)  ATCAAAGCCCTAGCCCTTATGTGAATGGCTTTTTA
trpC Hp77(5)  ATCAAAGCCCTAGCCCTTATGTGAATGGCTTTTTA

          10      20      30      40      50      60      70
ureI Hp77(2)  ATGCTAGGACTTGTATCGTTATATGTTGGGATTGTTTTAATCAGCAATGGGATTTGCGGGTTAACCAAAG
ureI Hp77(5)  ATGCTAGGACTTGTATCGTTATATGTTGGGATTGTTTTAATCAGCAATGGGATTTGCGGGTTAACCAAAG

```



```

      80      90      100     110     120     130     140
ureI Hp77 (2)  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ureI Hp77 (5)  TCGATCCTAAAAGCACTGCGGTGATGAACTTTTTGTGGGCGGACTTTCATTATTGTAATATAGTTGT

      150     160     170     180     190     200     210
ureI Hp77 (2)  CATCACTTATTCTGCTCTCCACCCTACAGCCCCTGTAGAAGGTGCCGAAGATATTGCTCAAGTATCGCAC
ureI Hp77 (5)  CATCACTTATTCTGCTCTCCACCCTACAGCCCCTGTAGAAGGTGCCGAAGATATTGCTCAAGTATCGCAC

      220     230     240     250     260     270     280
ureI Hp77 (2)  CATTTGACTAGTATTACTATGGGCCAGCGACTGGGTATTGTTGGTTTCACCTACTGTATGCGGCTAT
ureI Hp77 (5)  CATTTGACTAGTATTACTATGGGCCAGCGACTGGGTATTGTTGGTTTCACCTACTGTATGCGGCTAT

      290     300     310     320     330     340     350
ureI Hp77 (2)  CAACCACACTTTTGGTTGGATTGGAGGCCCTATTCCTGGTATATTCCTATTCTAGCGATCAACACTG
ureI Hp77 (5)  CAACCACACTTTTGGTTGGATTGGAGGCCCTATTCCTGGTATAGTCTTATTCCTAGCGATCAACACTGT

      360     370     380     390     400     410     420
ureI Hp77 (2)  TTCCTGCTGCGATTTTATCCCACTATAGCGATATGCTTGATGACCACAAAGTGTAGGCATCACTGAAGG
ureI Hp77 (5)  TTCCTGCTGCGATTTTATCCCACTATAGCGATATGCTTGATGACCACAAAGTGTAGGCATCACTGAAGG

      430     440     450     460     470     480     490
ureI Hp77 (2)  CGATTGGTGGGCGATCATTGGTTGGCTTGGGGTGTTTTGTGGCTTACCGCTTTCATTGAAAACATCTTG
ureI Hp77 (5)  CGATTGGTGGGCGATCATTGGTTGGCTTGGGGTGTTTTGTGGCTTACCGCTTTCATTGAAAACATCTTG

      500     510     520     530     540     550     560
ureI Hp77 (2)  AAAATCCCTTTAAGGAAATTCACCTCCATGGCTTGCTATCATTGAGGGTATTTTAACCGCCTTGGATCCCT
ureI Hp77 (5)  AAAATCCCTTTAAGGAAATTCACCTCCATGGCTTGCTATCATTGAGGGTATTTTAACCGCCTTGGATCCCT

      570     580     590
ureI Hp77 (2)  GCCTTGGTTACTCTTTATCCAACACTGGGTG
ureI Hp77 (5)  GCCTTGGTTACTCTTTATCCAACACTGGGTG

      10      20      30      40      50      60      70
yphC Hp77 (2)  AATACAAGCCATAAAACTTTAAAAACCATTGCGATTTTAGGCCAGCCTAATGTGGGGAAAAGCTCGTTAT
yphC Hp77 (5)  AATACAAGCCATAAAACTTTAAAAACCATTGCGATTTTAGGCCAGCCTAATGTGGGGAAAAGCTCGTTAT

      80      90      100     110     120     130     140
yphC Hp77 (2)  TTAACCGCTTGGCTAGAGAAAGGATCGCTATCACTTCAGATTTTGCAGGCACACACGAGACATTAACAA
yphC Hp77 (5)  TTAACCGCTTGGCTAGAGAAAGGATCGCTATCACTTCAGATTTTGCAGGCACACACGAGACATTAACAA

      150     160     170     180     190     200     210
yphC Hp77 (2)  ACGAAAAATCGCGTTGAATGGCCATGAAGTGGAACTTAGATACAGGGGGCATGGCTAAAGACGCTCTTT
yphC Hp77 (5)  ACGAAAAATCGCGTTGAATGGCCATGAAGTGGAACTTAGATACAGGGGGCATGGCTAAAGACGCTCTTT

      220     230     240     250     260     270     280
yphC Hp77 (2)  TTGTCTAAAGAAATCAAAGCCCTTAATTTAAAAGCCGCTCAAATGAGCGATTTGATTTTATACATTGTGG
yphC Hp77 (5)  TTGTCTAAAGAAATCAAAGCCCTTAATTTAAAAGCCGCTCAAATGAGCGATTTGATTTTATACATTGTGG

      290     300     310     320     330     340     350
yphC Hp77 (2)  ATGGCAAGTCTATCCCTAGCGATGAAGATCTTAAAGCTTTTATAGAGAGATTTTAAAGATCAACCCTAACCTG
yphC Hp77 (5)  ATGGCAAGTCTATCCCTAGCGATGAAGATCTTAAAGCTTTTATAGAGAGATTTTAAAGATCAACCCTAACCTG

      360     370     380     390     400     410     420
yphC Hp77 (2)  CTTTTTAGTGATCAATAAAATTGATAACGACAAAAGAAAAGAGCGAGCTTATGCGTTTTTCTCTTTT
yphC Hp77 (5)  CTTTTTAGTGATCAATAAAATTGATAACGACAAAAGAAAAGAGCGAGCTTATGCGTTTTTCTCTTTT

```

```

                430      440      450      460      470      480      490
yphC Hp77(2)  TGGCATGCCAAAGAGTTTTAACATCTCCGTTTCGCACAACCAAAATAAGAAGGGGCCATTTTGTAAATTGA
yphC Hp77(5)  TGGCATGCCAAAGAGTTTTAACATCTCCGTTTCGCACAACCAAAATAAGAAGGGGCCATTTTGTAAATTGA

                500      510      520
yphC Hp77(2)  TGGCGTATTGAGGGCGCTGAATTTAAACAAA
yphC Hp77(5)  TGGCGTATTGAGGGCGCTGAATTTAAACAAA

```

6.2.2. Νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *cagA* των παραχθέντων μεταλλαγμένων ισογονιδιακών στελεχών *H. pylori*.

```

                10      20      30      40      50      60      70      80
P12wt  ATGACTAACGAAACCATTAAACCAACAACCAACAACCGAAGCGGCTTTTAAACCCGCAGCAATTTATCAATAACTTTCAGT
P12AB  ATGACTAACGAAACCATTAAACCAACAACCAACAACCGAAGCGGCTTTTAAACCCGCAGCAATTTATCAATAACTTTCAGT
P12ABC  ATGACTAACGAAACCATTAAACCAACAACCAACAACCGAAGCGGCTTTTAAACCCGCAGCAATTTATCAATAACTTTCAGT
P12ABCCC ATGACTAACGAAACCATTAAACCAACAACCAACAACCGAAGCGGCTTTTAAACCCGCAGCAATTTATCAATAACTTTCAGT
P12ABF  ATGACTAACGAAACCATTAAACCAACAACCAACAACCGAAGCGGCTTTTAAACCCGCAGCAATTTATCAATAACTTTCAGT
P12ABFF ATGACTAACGAAACCATTAAACCAACAACCAACAACCGAAGCGGCTTTTAAACCCGCAGCAATTTATCAATAACTTTCAGT
P12ABFFF ATGACTAACGAAACCATTAAACCAACAACCAACAACCGAAGCGGCTTTTAAACCCGCAGCAATTTATCAATAACTTTCAGT

                90      100     110     120     130     140     150     160
P12wt  GGCTTTTCTTAAAGTTAATAACGCTGTCGCTTCATACGATCCTGATCAAAAAACCAATCGTTGATAAGAACGATAGGGATA
P12AB  GGCTTTTCTTAAAGTTAATAACGCTGTCGCTTCATACGATCCTGATCAAAAAACCAATCGTTGATAAGAACGATAGGGATA
P12ABC  GGCTTTTCTTAAAGTTAATAACGCTGTCGCTTCATACGATCCTGATCAAAAAACCAATCGTTGATAAGAACGATAGGGATA
P12ABCCC GGCTTTTCTTAAAGTTAATAACGCTGTCGCTTCATACGATCCTGATCAAAAAACCAATCGTTGATAAGAACGATAGGGATA
P12ABF  GGCTTTTCTTAAAGTTAATAACGCTGTCGCTTCATACGATCCTGATCAAAAAACCAATCGTTGATAAGAACGATAGGGATA
P12ABFF GGCTTTTCTTAAAGTTAATAACGCTGTCGCTTCATACGATCCTGATCAAAAAACCAATCGTTGATAAGAACGATAGGGATA
P12ABFFF GGCTTTTCTTAAAGTTAATAACGCTGTCGCTTCATACGATCCTGATCAAAAAACCAATCGTTGATAAGAACGATAGGGATA

                170     180     190     200     210     220     230     240
P12wt  ACAGGCAAGCTTTTGATGGAATCTCGCAATTAAGGAAGAATACTCCAATAAAGCGATCAAAAAATCCTACCAAAAAGAAAT
P12AB  ACAGGCAAGCTTTTGATGGAATCTCGCAATTAAGGAAGAATACTCCAATAAAGCGATCAAAAAATCCTACCAAAAAGAAAT
P12ABC  ACAGGCAAGCTTTTGATGGAATCTCGCAATTAAGGAAGAATACTCCAATAAAGCGATCAAAAAATCCTACCAAAAAGAAAT
P12ABCCC ACAGGCAAGCTTTTGATGGAATCTCGCAATTAAGGAAGAATACTCCAATAAAGCGATCAAAAAATCCTACCAAAAAGAAAT
P12ABF  ACAGGCAAGCTTTTGATGGAATCTCGCAATTAAGGAAGAATACTCCAATAAAGCGATCAAAAAATCCTACCAAAAAGAAAT
P12ABFF ACAGGCAAGCTTTTGATGGAATCTCGCAATTAAGGAAGAATACTCCAATAAAGCGATCAAAAAATCCTACCAAAAAGAAAT
P12ABFFF ACAGGCAAGCTTTTGATGGAATCTCGCAATTAAGGAAGAATACTCCAATAAAGCGATCAAAAAATCCTACCAAAAAGAAAT

                250     260     270     280     290     300     310     320
P12wt  CAGTATTTTTCAGACTTTATCAATAAGAGCAACGATTTAATCAACAAAGACAATCTCATTGATGTAGAATCTTCCACAAA
P12AB  CAGTATTTTTCAGACTTTATCAATAAGAGCAACGATTTAATCAACAAAGACAATCTCATTGATGTAGAATCTTCCACAAA
P12ABC  CAGTATTTTTCAGACTTTATCAATAAGAGCAACGATTTAATCAACAAAGACAATCTCATTGATGTAGAATCTTCCACAAA
P12ABCCC CAGTATTTTTCAGACTTTATCAATAAGAGCAACGATTTAATCAACAAAGACAATCTCATTGATGTAGAATCTTCCACAAA
P12ABF  CAGTATTTTTCAGACTTTATCAATAAGAGCAACGATTTAATCAACAAAGACAATCTCATTGATGTAGAATCTTCCACAAA
P12ABFF CAGTATTTTTCAGACTTTATCAATAAGAGCAACGATTTAATCAACAAAGACAATCTCATTGATGTAGAATCTTCCACAAA
P12ABFFF CAGTATTTTTCAGACTTTATCAATAAGAGCAACGATTTAATCAACAAAGACAATCTCATTGATGTAGAATCTTCCACAAA

                330     340     350     360     370     380     390     400
P12wt  GAGCTTTCAGAAATTTGGGGATCAGCGTTACCAAAATTTTCAAGTTGGGTGTCCCATCAAAACGATCCGTCTAAAAATCA
P12AB  GAGCTTTCAGAAATTTGGGGATCAGCGTTACCAAAATTTTCAAGTTGGGTGTCCCATCAAAACGATCCGTCTAAAAATCA
P12ABC  GAGCTTTCAGAAATTTGGGGATCAGCGTTACCAAAATTTTCAAGTTGGGTGTCCCATCAAAACGATCCGTCTAAAAATCA
P12ABCCC GAGCTTTCAGAAATTTGGGGATCAGCGTTACCAAAATTTTCAAGTTGGGTGTCCCATCAAAACGATCCGTCTAAAAATCA
P12ABF  GAGCTTTCAGAAATTTGGGGATCAGCGTTACCAAAATTTTCAAGTTGGGTGTCCCATCAAAACGATCCGTCTAAAAATCA
P12ABFF GAGCTTTCAGAAATTTGGGGATCAGCGTTACCAAAATTTTCAAGTTGGGTGTCCCATCAAAACGATCCGTCTAAAAATCA
P12ABFFF GAGCTTTCAGAAATTTGGGGATCAGCGTTACCAAAATTTTCAAGTTGGGTGTCCCATCAAAACGATCCGTCTAAAAATCA

```

	410	420	430	440	450	460	470	480
P12wt	ACACCCGATCGATCCGAAATTTTATGGAAAATATCATACAACCCCTATCCCTGATGATAAAAGAAAAGCAGAGTTTTTG							
P12AB	ACACCCGATCGATCCGAAATTTTATGGAAAATATCATACAACCCCTATCCCTGATGATAAAAGAAAAGCAGAGTTTTTG							
P12ABC	ACACCCGATCGATCCGAAATTTTATGGAAAATATCATACAACCCCTATCCCTGATGATAAAAGAAAAGCAGAGTTTTTG							
P12ABCCC	ACACCCGATCGATCCGAAATTTTATGGAAAATATCATACAACCCCTATCCCTGATGATAAAAGAAAAGCAGAGTTTTTG							
P12ABF	ACACCCGATCGATCCGAAATTTTATGGAAAATATCATACAACCCCTATCCCTGATGATAAAAGAAAAGCAGAGTTTTTG							
P12ABFF	ACACCCGATCGATCCGAAATTTTATGGAAAATATCATACAACCCCTATCCCTGATGATAAAAGAAAAGCAGAGTTTTTG							
P12ABFFF	ACACCCGATCGATCCGAAATTTTATGGAAAATATCATACAACCCCTATCCCTGATGATAAAAGAAAAGCAGAGTTTTTG							
	490	500	510	520	530	540	550	560
P12wt	AAATCTGCCAAACAATCTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAGTTTCATGGGCGTGTTTGA							
P12AB	AAATCTGCCAAACAATCTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAGTTTCATGGGCGTGTTTGA							
P12ABC	AAATCTGCCAAACAATCTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAGTTTCATGGGCGTGTTTGA							
P12ABCCC	AAATCTGCCAAACAATCTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAGTTTCATGGGCGTGTTTGA							
P12ABF	AAATCTGCCAAACAATCTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAGTTTCATGGGCGTGTTTGA							
P12ABFF	AAATCTGCCAAACAATCTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAGTTTCATGGGCGTGTTTGA							
P12ABFFF	AAATCTGCCAAACAATCTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAGTTTCATGGGCGTGTTTGA							
	570	580	590	600	610	620	630	640
P12wt	TGAATCCTTGAAGAAAAGGCAAGAAGCAGAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATTTTTTATCAT							
P12AB	TGAATCCTTGAAGAAAAGGCAAGAAGCAGAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATTTTTTATCAT							
P12ABC	TGAATCCTTGAAGAAAAGGCAAGAAGCAGAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATTTTTTATCAT							
P12ABCCC	TGAATCCTTGAAGAAAAGGCAAGAAGCAGAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATTTTTTATCAT							
P12ABF	TGAATCCTTGAAGAAAAGGCAAGAAGCAGAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATTTTTTATCAT							
P12ABFF	TGAATCCTTGAAGAAAAGGCAAGAAGCAGAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATTTTTTATCAT							
P12ABFFF	TGAATCCTTGAAGAAAAGGCAAGAAGCAGAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATTTTTTATCAT							
	650	660	670	680	690	700	710	720
P12wt	TTATATTTGACAAAAACAGTCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACAGTTCCTCATGTCCAACAGATATA							
P12AB	TTATATTTGACAAAAACAGTCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACAGTTCCTCATGTCCAACAGATATA							
P12ABC	TTATATTTGACAAAAACAGTCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACAGTTCCTCATGTCCAACAGATATA							
P12ABCCC	TTATATTTGACAAAAACAGTCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACAGTTCCTCATGTCCAACAGATATA							
P12ABF	TTATATTTGACAAAAACAGTCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACAGTTCCTCATGTCCAACAGATATA							
P12ABFF	TTATATTTGACAAAAACAGTCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACAGTTCCTCATGTCCAACAGATATA							
P12ABFFF	TTATATTTGACAAAAACAGTCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACAGTTCCTCATGTCCAACAGATATA							
	730	740	750	760	770	780	790	800
P12wt	GCCACTACCACCACCGACATACAAGGCTTACCCTGAAGCTAGAGATTTACTTGATGAAAGGGGTAATTTTTCTAAATT							
P12AB	GCCACTACCACCACCGACATACAAGGCTTACCCTGAAGCTAGAGATTTACTTGATGAAAGGGGTAATTTTTCTAAATT							
P12ABC	GCCACTACCACCACCGACATACAAGGCTTACCCTGAAGCTAGAGATTTACTTGATGAAAGGGGTAATTTTTCTAAATT							
P12ABCCC	GCCACTACCACCACCGACATACAAGGCTTACCCTGAAGCTAGAGATTTACTTGATGAAAGGGGTAATTTTTCTAAATT							
P12ABF	GCCACTACCACCACCGACATACAAGGCTTACCCTGAAGCTAGAGATTTACTTGATGAAAGGGGTAATTTTTCTAAATT							
P12ABFF	GCCACTACCACCACCGACATACAAGGCTTACCCTGAAGCTAGAGATTTACTTGATGAAAGGGGTAATTTTTCTAAATT							
P12ABFFF	GCCACTACCACCACCGACATACAAGGCTTACCCTGAAGCTAGAGATTTACTTGATGAAAGGGGTAATTTTTCTAAATT							
	810	820	830	840	850	860	870	880
P12wt	CACCTTTGGCGATATGGAATGTTAGATGTTGAGGGCGTCGCCGACATTGATCCTAATTAACAAGTTCAACCAATTATTGA							
P12AB	CACCTTTGGCGATATGGAATGTTAGATGTTGAGGGCGTCGCCGACATTGATCCTAATTAACAAGTTCAACCAATTATTGA							
P12ABC	CACCTTTGGCGATATGGAATGTTAGATGTTGAGGGCGTCGCCGACATTGATCCTAATTAACAAGTTCAACCAATTATTGA							
P12ABCCC	CACCTTTGGCGATATGGAATGTTAGATGTTGAGGGCGTCGCCGACATTGATCCTAATTAACAAGTTCAACCAATTATTGA							
P12ABF	CACCTTTGGCGATATGGAATGTTAGATGTTGAGGGCGTCGCCGACATTGATCCTAATTAACAAGTTCAACCAATTATTGA							
P12ABFF	CACCTTTGGCGATATGGAATGTTAGATGTTGAGGGCGTCGCCGACATTGATCCTAATTAACAAGTTCAACCAATTATTGA							
P12ABFFF	CACCTTTGGCGATATGGAATGTTAGATGTTGAGGGCGTCGCCGACATTGATCCTAATTAACAAGTTCAACCAATTATTGA							
	890	900	910	920	930	940	950	960
P12wt	TTCACAATAACACTCTGTCTTCTGTGTTAATGGGGAGTCATGATGGCATAGAACCCTGAAAAAGTTTCATTATTGTATGCC							
P12AB	TTCACAATAACACTCTGTCTTCTGTGTTAATGGGGAGTCATGATGGCATAGAACCCTGAAAAAGTTTCATTATTGTATGCC							
P12ABC	TTCACAATAACACTCTGTCTTCTGTGTTAATGGGGAGTCATGATGGCATAGAACCCTGAAAAAGTTTCATTATTGTATGCC							
P12ABCCC	TTCACAATAACACTCTGTCTTCTGTGTTAATGGGGAGTCATGATGGCATAGAACCCTGAAAAAGTTTCATTATTGTATGCC							
P12ABF	TTCACAATAACACTCTGTCTTCTGTGTTAATGGGGAGTCATGATGGCATAGAACCCTGAAAAAGTTTCATTATTGTATGCC							
P12ABFF	TTCACAATAACACTCTGTCTTCTGTGTTAATGGGGAGTCATGATGGCATAGAACCCTGAAAAAGTTTCATTATTGTATGCC							
P12ABFFF	TTCACAATAACACTCTGTCTTCTGTGTTAATGGGGAGTCATGATGGCATAGAACCCTGAAAAAGTTTCATTATTGTATGCC							


```

1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
P12wt    ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
P12wt    ATACACCAACGCCTCCAAGAATCCCAATAAGGGTGTAGGCGTTACGAATGGCGTTTCCCATTTAGAAAGCAGGCTTTGACA
P12AB    ATACACCAACGCCTCCAAGAATCCCAATAAGGGTGTAGGCGTTACGAATGGCGTTTCCCATTTAGAAAGCAGGCTTTGACA
P12ABC    ATACACCAACGCCTCCAAGAATCCCAATAAGGGTGTAGGCGTTACGAATGGCGTTTCCCATTTAGAAAGCAGGCTTTGACA
P12ABCCC  ATACACCAACGCCTCCAAGAATCCCAATAAGGGTGTAGGCGTTACGAATGGCGTTTCCCATTTAGAAAGCAGGCTTTGACA
P12ABFF   ATACACCAACGCCTCCAAGAATCCCAATAAGGGTGTAGGCGTTACGAATGGCGTTTCCCATTTAGAAAGCAGGCTTTGACA
P12ABFFF  ATACACCAACGCCTCCAAGAATCCCAATAAGGGTGTAGGCGTTACGAATGGCGTTTCCCATTTAGAAAGCAGGCTTTGACA

1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
P12wt    ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
P12wt    AGGTAGCTGTCTTTAATTTGCCGATTTAAATAATCTCGCTATCACTAGTTTCGTAAGGCGGAAATTTAGAGGATAAACTA
P12AB    AGGTAGCTGTCTTTAATTTGCCGATTTAAATAATCTCGCTATCACTAGTTTCGTAAGGCGGAAATTTAGAGGATAAACTA
P12ABC    AGGTAGCTGTCTTTAATTTGCCGATTTAAATAATCTCGCTATCACTAGTTTCGTAAGGCGGAAATTTAGAGGATAAACTA
P12ABCCC  AGGTAGCTGTCTTTAATTTGCCGATTTAAATAATCTCGCTATCACTAGTTTCGTAAGGCGGAAATTTAGAGGATAAACTA
P12ABFF   AGGTAGCTGTCTTTAATTTGCCGATTTAAATAATCTCGCTATCACTAGTTTCGTAAGGCGGAAATTTAGAGGATAAACTA
P12ABFFF  AGGTAGCTGTCTTTAATTTGCCGATTTAAATAATCTCGCTATCACTAGTTTCGTAAGGCGGAAATTTAGAGGATAAACTA

1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750      1760
P12wt    ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
P12wt    GTCACTAAAGGATTGTCCATACAAGAAGCTAATAAGCTTATCAAAGACTTTTTGAATAGCAACAAGAAATGGTTGGAAA
P12AB    GTCACTAAAGGATTGTCCATACAAGAAGCTAATAAGCTTATCAAAGACTTTTTGAATAGCAACAAGAAATGGTTGGAAA
P12ABC    GTCACTAAAGGATTGTCCATACAAGAAGCTAATAAGCTTATCAAAGACTTTTTGAATAGCAACAAGAAATGGTTGGAAA
P12ABCCC  GTCACTAAAGGATTGTCCATACAAGAAGCTAATAAGCTTATCAAAGACTTTTTGAATAGCAACAAGAAATGGTTGGAAA
P12ABFF   GTCACTAAAGGATTGTCCATACAAGAAGCTAATAAGCTTATCAAAGACTTTTTGAATAGCAACAAGAAATGGTTGGAAA
P12ABFFF  GTCACTAAAGGATTGTCCATACAAGAAGCTAATAAGCTTATCAAAGACTTTTTGAATAGCAACAAGAAATGGTTGGAAA

1770      1780      1790      1800      1810      1820      1830      1840
P12wt    ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
P12wt    AGCTTTAAACTTCAATAAAGCTGTAGCTGACGCTAAAAACACAGGCAACTATGATGAAGTGAAAAAAGCTCAGAAAGATC
P12AB    AGCTTTAAACTTCAATAAAGCTGTAGCTGACGCTAAAAACACAGGCAACTATGATGAAGTGAAAAAAGCTCAGAAAGATC
P12ABC    AGCTTTAAACTTCAATAAAGCTGTAGCTGACGCTAAAAACACAGGCAACTATGATGAAGTGAAAAAAGCTCAGAAAGATC
P12ABCCC  AGCTTTAAACTTCAATAAAGCTGTAGCTGACGCTAAAAACACAGGCAACTATGATGAAGTGAAAAAAGCTCAGAAAGATC
P12ABFF   AGCTTTAAACTTCAATAAAGCTGTAGCTGACGCTAAAAACACAGGCAACTATGATGAAGTGAAAAAAGCTCAGAAAGATC
P12ABFFF  AGCTTTAAACTTCAATAAAGCTGTAGCTGACGCTAAAAACACAGGCAACTATGATGAAGTGAAAAAAGCTCAGAAAGATC

1850      1860      1870      1880      1890      1900      1910      1920
P12wt    ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
P12wt    TTGAAAAATCTCTAAAGAAACGAGAGCATTTAGAGAAAGAAGTAGCGAAAAATTTGGAGAGCAAAAAGTGGCAACAAAAAC
P12AB    TTGAAAAATCTCTAAAGAAACGAGAGCATTTAGAGAAAGAAGTAGCGAAAAATTTGGAGAGCAAAAAGTGGCAACAAAAAC
P12ABC    TTGAAAAATCTCTAAAGAAACGAGAGCATTTAGAGAAAGAAGTAGCGAAAAATTTGGAGAGCAAAAAGTGGCAACAAAAAC
P12ABCCC  TTGAAAAATCTCTAAAGAAACGAGAGCATTTAGAGAAAGAAGTAGCGAAAAATTTGGAGAGCAAAAAGTGGCAACAAAAAC
P12ABFF   TTGAAAAATCTCTAAAGAAACGAGAGCATTTAGAGAAAGAAGTAGCGAAAAATTTGGAGAGCAAAAAGTGGCAACAAAAAC
P12ABFFF  TTGAAAAATCTCTAAAGAAACGAGAGCATTTAGAGAAAGAAGTAGCGAAAAATTTGGAGAGCAAAAAGTGGCAACAAAAAC

1930      1940      1950      1960      1970      1980      1990      2000
P12wt    ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
P12wt    AAAATGGAAGCGAAATCTCAAGCTAACAGCCAAAAAGATGAGATTTTTGCGTTGATCAATAAAGAGGCTAATAGGGACGC
P12AB    AAAATGGAAGCGAAATCTCAAGCTAACAGCCAAAAAGATGAGATTTTTGCGTTGATCAATAAAGAGGCTAATAGGGACGC
P12ABC    AAAATGGAAGCGAAATCTCAAGCTAACAGCCAAAAAGATGAGATTTTTGCGTTGATCAATAAAGAGGCTAATAGGGACGC
P12ABCCC  AAAATGGAAGCGAAATCTCAAGCTAACAGCCAAAAAGATGAGATTTTTGCGTTGATCAATAAAGAGGCTAATAGGGACGC
P12ABFF   AAAATGGAAGCGAAATCTCAAGCTAACAGCCAAAAAGATGAGATTTTTGCGTTGATCAATAAAGAGGCTAATAGGGACGC
P12ABFFF  AAAATGGAAGCGAAATCTCAAGCTAACAGCCAAAAAGATGAGATTTTTGCGTTGATCAATAAAGAGGCTAATAGGGACGC

2010      2020      2030      2040      2050      2060      2070      2080
P12wt    ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
P12wt    AAGAGCAATCGCTTACGCTCAGAATCTTAAAGGCATCAAAATGGAATTGCTGTATAAATTTGAAAAATGTCAACAAGAAAT
P12AB    AAGAGCAATCGCTTACGCTCAGAATCTTAAAGGCATCAAAATGGAATTGCTGTATAAATTTGAAAAATGTCAACAAGAAAT
P12ABC    AAGAGCAATCGCTTACGCTCAGAATCTTAAAGGCATCAAAATGGAATTGCTGTATAAATTTGAAAAATGTCAACAAGAAAT
P12ABCCC  AAGAGCAATCGCTTACGCTCAGAATCTTAAAGGCATCAAAATGGAATTGCTGTATAAATTTGAAAAATGTCAACAAGAAAT
P12ABFF   AAGAGCAATCGCTTACGCTCAGAATCTTAAAGGCATCAAAATGGAATTGCTGTATAAATTTGAAAAATGTCAACAAGAAAT
P12ABFFF  AAGAGCAATCGCTTACGCTCAGAATCTTAAAGGCATCAAAATGGAATTGCTGTATAAATTTGAAAAATGTCAACAAGAAAT

```



```

                2650      2660      2670      2680      2690      2700      2710      2720
P12wt      ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
P12AB      AACAAATAACAATAATGGACTCAAAAACGAACCCATTTATGCTAAAGTTAATAAAAAAGAAAACAGGGCAAGCAGCTAGCCA
P12ABC      AACAAATAACAATAATGGACTCAAAAACGAACCCATTTATGCTAAAGTTAATAAAAAAGAAAACAGGGCAAGCAGCTAGCCA
P12ABCCC    AACAAATAACAATAATGGACTCAAAAACGAACCCATTTATGCTAAAGTTAATAAAAAAGAAAACAGGGCAAGCAGCTAGCCA
P12ABFF     AACAAATAACAATAATGGACTCAAAAACGAACCCATTTATGCTAAAGTTAATAAAAAAGAAAACAGGGCAAGCAGCTAGCCA
P12ABFFF    AACAAATAACAATAATGGACTCAAAAACGAACCCATTTATGCTAAAGTTAATAAAAAAGAAAACAGGGCAAGCAGCTAGCCA

                2730      2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800
P12wt      ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
P12AB      TGAAGAAGCCCATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGTAATGCAAAAATTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGG
P12ABC      TGAAGAAGCCCATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGTAATGCAAAAATTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGG
P12ABCCC    TGAAGAAGCCCATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGTAATGCAAAAATTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGG
P12ABFF     TGAAGAAGCCCATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGTAATGCAAAAATTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGG
P12ABFFF    TGAAGAAGCCCATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGTAATGCAAAAATTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGG

                2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870      2880
P12wt      ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
P12AB      GTGGTGTAGGGCAAGCAGCGGGCTTCCCTTTGAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGCT
P12ABC      GTGGTGTAGGGCAAGCAGCGGGCTTCCCTTTGAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGCT
P12ABCCC    GTGGTGTAGGGCAAGCAGCGGGCTTCCCTTTGAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGCT
P12ABFF     GTGGTGTAGGGCAAGCAGCGGGCTTCCCTTTGAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGCT
P12ABFFF    GTGGTGTAGGGCAAGCAGCGGGCTTCCCTTTGAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGCT

                2890      2900      2910      2920      2930      2940      2950      2960
P12wt      ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
P12AB      AGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCT
P12ABC      AGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCT
P12ABCCC    AGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCT
P12ABFF     AGCCCTGAACCCATTTTGTCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAGCAT
P12ABFFF    AGCCCTGAACCCATTTTTGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCT

                2970      2980      2990      3000      3010      3020      3030      3040
P12wt      ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
P12AB      CAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGCTAGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAA
P12ABC      CAGTAAGGTAGGGCTTTTCA
P12ABCCC    CAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGCTAGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAA
P12ABFF     -----
P12ABFFF    CAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGCTAGCCCTGAACCCATTTTTGCTACGATTGATGATCTCGGCGGA--TTCCCTTTGAAA

                3050      3060      3070      3080      3090      3100      3110      3120
P12wt      ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
P12AB      AGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCA
P12ABC      -----
P12ABCCC    AGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGCTAGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTC
P12ABFF     -----
P12ABFFF    GATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGCTAGCCCTGAACCCATTTTGTACGATTGATGATCTC
P12ABFFF    AGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGCTAGCCCTGAACCCATTTTTGCTACGATTGATGATCTC

                3130      3140      3150      3160      3170      3180      3190      3200
P12wt      ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
P12AB      -----
P12ABC      -----
P12ABCCC    GGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGGAATCAAAAATTGGC
P12ABFF     -----
P12ABFFF    GATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGGAATCAAAAATTGGC
P12ABFFF    GGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGGAATCAAAAATTGGC
P12ABFFF    GGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAAGGAATCAAAAATTGGC

```


	3210	3220	3230	3240	3250	3260	3270	3280
P12wt	TCAGAAAATTGACAACTCTCAATCAAGCGGTATCAGAAGCTAAAGCAGGTTTTTTGGCAATCTAGAGCAAACGATAGACA							
P12AB	TCAGAAAATTGACAACTCTCAATCAAGCGGTATCAGAAGCTAAAGCAGGTTTTTTGGCAATCTAGAGCAAACGATAGACA							
P12ABC	TCAGAAAATTGACAACTCTCAATCAAGCGGTATCAGAAGCTAAAGCAGGTTTTTTGGCAATCTAGAGCAAACGATAGACA							
P12ABCCC	TCAGAAAATTGACAACTCTCAATCAAGCGGTATCAGAAGCTAAAGCAGGTTTTTTGGCAATCTAGAGCAAACGATAGACA							
P12ABF	TCAGAAAATTGACAACTCTCAATCAAGCGGTATCAGAAGCTAAAGCAGGTTTTTTGGCAATCTAGAGCAAACGATAGACA							
P12ABFF	TCAGAAAATTGACAACTCTCAATCAAGCGGTATCAGAAGCTAAAGCAGGTTTTTTGGCAATCTAGAGCAAACGATAGACA							
P12ABFFF	TCAGAAAATTGACAACTCTCAATCAAGCGGTATCAGAAGCTAAAGCAGGTTTTTTGGCAATCTAGAGCAAACGATAGACA							
	3290	3300	3310	3320	3330	3340	3350	3360
P12wt	AGCTCAAAGATTCTACAAAATACAATCCTGTGAATCTATGGTTGAAAGTGCAAAAAAAGTACCTGCTAGTTTGTACGCG							
P12AB	AGCTCAAAGATTCTACAAAATACAATCCTGTGAATCTATGGTTGAAAGTGCAAAAAAAGTACCTGCTAGTTTGTACGCG							
P12ABC	AGCTCAAAGATTCTACAAAATACAATCCTGTGAATCTATGGTTGAAAGTGCAAAAAAAGTACCTGCTAGTTTGTACGCG							
P12ABCCC	AGCTCAAAGATTCTACAAAATACAATCCTGTGAATCTATGGTTGAAAGTGCAAAAAAAGTACCTGCTAGTTTGTACGCG							
P12ABF	AGCTCAAAGATTCTACAAAATACAATCCTGTGAATCTATGGTTGAAAGTGCAAAAAAAGTACCTGCTAGTTTGTACGCG							
P12ABFF	AGCTCAAAGATTCTACAAAATACAATCCTGTGAATCTATGGTTGAAAGTGCAAAAAAAGTACCTGCTAGTTTGTACGCG							
P12ABFFF	AGCTCAAAGATTCTACAAAATACAATCCTGTGAATCTATGGTTGAAAGTGCAAAAAAAGTACCTGCTAGTTTGTACGCG							
	3370	3380	3390	3400	3410	3420	3430	3440
P12wt	AAACTAGATAATTATGCTACTAACAGCCACACACGCATTAATAGCAATATCAAAAATGGAGCAATCAATGAAAAAGCGAC							
P12AB	AAACTAGATAATTATGCTACTAACAGCCACACACGCATTAATAGCAATATCAAAAATGGAGCAATCAATGAAAAAGCGAC							
P12ABC	AAACTAGATAATTATGCTACTAACAGCCACACACGCATTAATAGCAATATCAAAAATGGAGCAATCAATGAAAAAGCGAC							
P12ABCCC	AAACTAGATAATTATGCTACTAACAGCCACACACGCATTAATAGCAATATCAAAAATGGAGCAATCAATGAAAAAGCGAC							
P12ABF	AAACTAGATAATTATGCTACTAACAGCCACACACGCATTAATAGCAATATCAAAAATGGAGCAATCAATGAAAAAGCGAC							
P12ABFF	AAACTAGATAATTATGCTACTAACAGCCACACACGCATTAATAGCAATATCAAAAATGGAGCAATCAATGAAAAAGCGAC							
P12ABFFF	AAACTAGATAATTATGCTACTAACAGCCACACACGCATTAATAGCAATATCAAAAATGGAGCAATCAATGAAAAAGCGAC							
	3450	3460	3470	3480	3490	3500	3510	3520
P12wt	CGGCATGCTAGCGCAAAAAAACCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGCGCATAATGTGGGAAGCGTTC							
P12AB	CGGCATGCTAGCGCAAAAAAACCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGCGCATAATGTGGGAAGCGTTC							
P12ABC	CGGCATGCTAGCGCAAAAAAACCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGCGCATAATGTGGGAAGCGTTC							
P12ABCCC	CGGCATGCTAGCGCAAAAAAACCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGCGCATAATGTGGGAAGCGTTC							
P12ABF	CGGCATGCTAGCGCAAAAAAACCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGCGCATAATGTGGGAAGCGTTC							
P12ABFF	CGGCATGCTAGCGCAAAAAAACCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGCGCATAATGTGGGAAGCGTTC							
P12ABFFF	CGGCATGCTAGCGCAAAAAAACCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGCGCATAATGTGGGAAGCGTTC							
	3530	3540	3550	3560	3570	3580	3590	3600
P12wt	CTTTGTTAGAGTATGATAAAATTGGCTTCAACCCAGAGAATATGAAAAGATTATTCGATTGTTCAAGTTTTCCACCAAC							
P12AB	CTTTGTTAGAGTATGATAAAATTGGCTTCAACCCAGAGAATATGAAAAGATTATTCGATTGTTCAAGTTTTCCACCAAC							
P12ABC	CTTTGTTAGAGTATGATAAAATTGGCTTCAACCCAGAGAATATGAAAAGATTATTCGATTGTTCAAGTTTTCCACCAAC							
P12ABCCC	CTTTGTTAGAGTATGATAAAATTGGCTTCAACCCAGAGAATATGAAAAGATTATTCGATTGTTCAAGTTTTCCACCAAC							
P12ABF	CTTTGTTAGAGTATGATAAAATTGGCTTCAACCCAGAGAATATGAAAAGATTATTCGATTGTTCAAGTTTTCCACCAAC							
P12ABFF	CTTTGTTAGAGTATGATAAAATTGGCTTCAACCCAGAGAATATGAAAAGATTATTCGATTGTTCAAGTTTTCCACCAAC							
P12ABFFF	CTTTGTTAGAGTATGATAAAATTGGCTTCAACCCAGAGAATATGAAAAGATTATTCGATTGTTCAAGTTTTCCACCAAC							
	3610	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680
P12wt	TTGAACAATGCTGTAAAAGACATTAAGTCTGGCTTTACGCAATTTTTAGCCAATGCATTTTCTACAGGATATTAAGTCTT							
P12AB	TTGAACAATGCTGTAAAAGACATTAAGTCTGGCTTTACGCAATTTTTAGCCAATGCATTTTCTACAGGATATTAAGTCTT							
P12ABC	TTGAACAATGCTGTAAAAGACATTAAGTCTGGCTTTACGCAATTTTTAGCCAATGCATTTTCTACAGGATATTAAGTCTT							
P12ABCCC	TTGAACAATGCTGTAAAAGACATTAAGTCTGGCTTTACGCAATTTTTAGCCAATGCATTTTCTACAGGATATTAAGTCTT							
P12ABF	TTGAACAATGCTGTAAAAGACATTAAGTCTGGCTTTACGCAATTTTTAGCCAATGCATTTTCTACAGGATATTAAGTCTT							
P12ABFF	TTGAACAATGCTGTAAAAGACATTAAGTCTGGCTTTACGCAATTTTTAGCCAATGCATTTTCTACAGGATATTAAGTCTT							
P12ABFFF	TTGAACAATGCTGTAAAAGACATTAAGTCTGGCTTTACGCAATTTTTAGCCAATGCATTTTCTACAGGATATTAAGTCTT							
	3690	3700	3710	3720	3730	3740		
P12wt	GGCGAGGGGAAAAATGCAGAGCATGGAATCAAGAATGTTAATACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTAA							
P12AB	GGCGAGGGGAAAAATGCAGAGCATGGAATCAAGAATGTTAATACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTAA							
P12ABC	GGCGAGGGGAAAAATGCAGAGCATGGAATCAAGAATGTTAATACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTAA							
P12ABCCC	GGCGAGGGGAAAAATGCAGAGCATGGAATCAAGAATGTTAATACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTAA							
P12ABF	GGCGAGGGGAAAAATGCAGAGCATGGAATCAAGAATGTTAATACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTAA							
P12ABFF	GGCGAGGGGAAAAATGCAGAGCATGGAATCAAGAATGTTAATACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTAA							
P12ABFFF	GGCGAGGGGAAAAATGCAGAGCATGGAATCAAGAATGTTAATACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTAA							

Αλληλουχίες χειμερικού γονιδίου *cagA* συνδεδεμένου με 4Cys

	10	20	30	40	50	60	70
P12AB+4Cys	ATGACTAACGAAACCAATTAA	CAACAACCAAAA	CCGAAGCGGCTTTTAA	CCCGCAGCAATTTATCAATA			
P12ABC+4Cys	ATGACTAACGAAACCAATTAA	CAACAACCAAAA	CCGAAGCGGCTTTTAA	CCCGCAGCAATTTATCAATA			
P12ABCC+4Cys	ATGACTAACGAAACCAATTAA	CAACAACCAAAA	CCGAAGCGGCTTTTAA	CCCGCAGCAATTTATCAATA			
P12ABCCC+4Cys	ATGACTAACGAAACCAATTAA	CAACAACCAAAA	CCGAAGCGGCTTTTAA	CCCGCAGCAATTTATCAATA			
P12ABFF+4Cys	ATGACTAACGAAACCAATTAA	CAACAACCAAAA	CCGAAGCGGCTTTTAA	CCCGCAGCAATTTATCAATA			
P12ABFFF+4Cys	ATGACTAACGAAACCAATTAA	CAACAACCAAAA	CCGAAGCGGCTTTTAA	CCCGCAGCAATTTATCAATA			
	80	90	100	110	120	130	140
P12AB+4Cys	ATCTTCAAGTGGCTTTTCTTAAAGT	TAAATAACGCTGTCGCTT	CATACGATCCTGATCAAAA	ACCAATCGT			
P12ABC+4Cys	ATCTTCAAGTGGCTTTTCTTAAAGT	TAAATAACGCTGTCGCTT	CATACGATCCTGATCAAAA	ACCAATCGT			
P12ABCC+4Cys	ATCTTCAAGTGGCTTTTCTTAAAGT	TAAATAACGCTGTCGCTT	CATACGATCCTGATCAAAA	ACCAATCGT			
P12ABCCC+4Cys	ATCTTCAAGTGGCTTTTCTTAAAGT	TAAATAACGCTGTCGCTT	CATACGATCCTGATCAAAA	ACCAATCGT			
P12ABFF+4Cys	ATCTTCAAGTGGCTTTTCTTAAAGT	TAAATAACGCTGTCGCTT	CATACGATCCTGATCAAAA	ACCAATCGT			
P12ABFFF+4Cys	ATCTTCAAGTGGCTTTTCTTAAAGT	TAAATAACGCTGTCGCTT	CATACGATCCTGATCAAAA	ACCAATCGT			
	150	160	170	180	190	200	210
P12AB+4Cys	TGATAAGAACGATAGGGATAACAGG	CAAGCTTTTGATGGAATCTCGCAAT	TAAAGGAAGAACTCCAAT				
P12ABC+4Cys	TGATAAGAACGATAGGGATAACAGG	CAAGCTTTTGATGGAATCTCGCAAT	TAAAGGAAGAACTCCAAT				
P12ABCC+4Cys	TGATAAGAACGATAGGGATAACAGG	CAAGCTTTTGATGGAATCTCGCAAT	TAAAGGAAGAACTCCAAT				
P12ABCCC+4Cys	TGATAAGAACGATAGGGATAACAGG	CAAGCTTTTGATGGAATCTCGCAAT	TAAAGGAAGAACTCCAAT				
P12ABFF+4Cys	TGATAAGAACGATAGGGATAACAGG	CAAGCTTTTGATGGAATCTCGCAAT	TAAAGGAAGAACTCCAAT				
P12ABFFF+4Cys	TGATAAGAACGATAGGGATAACAGG	CAAGCTTTTGATGGAATCTCGCAAT	TAAAGGAAGAACTCCAAT				
	220	230	240	250	260	270	280
P12AB+4Cys	AAAGCGATCAAAAATCCTACCAAAA	AAGAATCAGTATTTTTTCAGACTTTT	ATCAATAAGAGCAACGATTTAA				
P12ABC+4Cys	AAAGCGATCAAAAATCCTACCAAAA	AAGAATCAGTATTTTTTCAGACTTTT	ATCAATAAGAGCAACGATTTAA				
P12ABCC+4Cys	AAAGCGATCAAAAATCCTACCAAAA	AAGAATCAGTATTTTTTCAGACTTTT	ATCAATAAGAGCAACGATTTAA				
P12ABCCC+4Cys	AAAGCGATCAAAAATCCTACCAAAA	AAGAATCAGTATTTTTTCAGACTTTT	ATCAATAAGAGCAACGATTTAA				
P12ABFF+4Cys	AAAGCGATCAAAAATCCTACCAAAA	AAGAATCAGTATTTTTTCAGACTTTT	ATCAATAAGAGCAACGATTTAA				
P12ABFFF+4Cys	AAAGCGATCAAAAATCCTACCAAAA	AAGAATCAGTATTTTTTCAGACTTTT	ATCAATAAGAGCAACGATTTAA				
	290	300	310	320	330	340	350
P12AB+4Cys	TCAACAAAGACAAATCTCATTTGAT	GTAGAACTTTCCACAAGAGCTTT	CAGAAATTTGGGGATCAGCGTTA				
P12ABC+4Cys	TCAACAAAGACAAATCTCATTTGAT	GTAGAACTTTCCACAAGAGCTTT	CAGAAATTTGGGGATCAGCGTTA				
P12ABCC+4Cys	TCAACAAAGACAAATCTCATTTGAT	GTAGAACTTTCCACAAGAGCTTT	CAGAAATTTGGGGATCAGCGTTA				
P12ABCCC+4Cys	TCAACAAAGACAAATCTCATTTGAT	GTAGAACTTTCCACAAGAGCTTT	CAGAAATTTGGGGATCAGCGTTA				
P12ABFF+4Cys	TCAACAAAGACAAATCTCATTTGAT	GTAGAACTTTCCACAAGAGCTTT	CAGAAATTTGGGGATCAGCGTTA				
P12ABFFF+4Cys	TCAACAAAGACAAATCTCATTTGAT	GTAGAACTTTCCACAAGAGCTTT	CAGAAATTTGGGGATCAGCGTTA				
	360	370	380	390	400	410	420
P12AB+4Cys	CCAAATTTTCAACAGTTGGGTG	TCCCATCAAAACGATCCGTCT	AAAAATCAACACCCGATCGATCCGAAAT				
P12ABC+4Cys	CCAAATTTTCAACAGTTGGGTG	TCCCATCAAAACGATCCGTCT	AAAAATCAACACCCGATCGATCCGAAAT				
P12ABCC+4Cys	CCAAATTTTCAACAGTTGGGTG	TCCCATCAAAACGATCCGTCT	AAAAATCAACACCCGATCGATCCGAAAT				
P12ABCCC+4Cys	CCAAATTTTCAACAGTTGGGTG	TCCCATCAAAACGATCCGTCT	AAAAATCAACACCCGATCGATCCGAAAT				
P12ABFF+4Cys	CCAAATTTTCAACAGTTGGGTG	TCCCATCAAAACGATCCGTCT	AAAAATCAACACCCGATCGATCCGAAAT				
P12ABFFF+4Cys	CCAAATTTTCAACAGTTGGGTG	TCCCATCAAAACGATCCGTCT	AAAAATCAACACCCGATCGATCCGAAAT				
	430	440	450	460	470	480	490
P12AB+4Cys	TTTATGGAAAATATCATACAACCC	CCCTATCCCTGATGATAAAGAAA	AAGCAGAGTTTTTGAATCTGCCA				
P12ABC+4Cys	TTTATGGAAAATATCATACAACCC	CCCTATCCCTGATGATAAAGAAA	AAGCAGAGTTTTTGAATCTGCCA				
P12ABCC+4Cys	TTTATGGAAAATATCATACAACCC	CCCTATCCCTGATGATAAAGAAA	AAGCAGAGTTTTTGAATCTGCCA				
P12ABCCC+4Cys	TTTATGGAAAATATCATACAACCC	CCCTATCCCTGATGATAAAGAAA	AAGCAGAGTTTTTGAATCTGCCA				
P12ABFF+4Cys	TTTATGGAAAATATCATACAACCC	CCCTATCCCTGATGATAAAGAAA	AAGCAGAGTTTTTGAATCTGCCA				
P12ABFFF+4Cys	TTTATGGAAAATATCATACAACCC	CCCTATCCCTGATGATAAAGAAA	AAGCAGAGTTTTTGAATCTGCCA				

P12ABFFF+4Cys	TTTATGGAAAATATCATACACCCCTATCCCTGATGATAAAGAAAAGCAGAGTTTTTGAATCTGCCA

P12AB+4Cys	AACAACTTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAAGTTTCATGGGCGTGTGTTGA
P12ABC+4Cys	AACAACTTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAAGTTTCATGGGCGTGTGTTGA
P12ABCC+4Cys	AACAACTTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAAGTTTCATGGGCGTGTGTTGA
P12ABCCC+4Cys	AACAACTTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAAGTTTCATGGGCGTGTGTTGA
P12ABF+4Cys	AACAACTTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAAGTTTCATGGGCGTGTGTTGA
P12ABFF+4Cys	AACAACTTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAAGTTTCATGGGCGTGTGTTGA
P12ABFFF+4Cys	AACAACTTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAAGTTTCATGGGCGTGTGTTGA

P12AB+4Cys	TGAATCCTTGAAGAAAGGC AAGAAGCAGAAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATT
P12ABC+4Cys	TGAATCCTTGAAGAAAGGC AAGAAGCAGAAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATT
P12ABCC+4Cys	TGAATCCTTGAAGAAAGGC AAGAAGCAGAAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATT
P12ABCCC+4Cys	TGAATCCTTGAAGAAAGGC AAGAAGCAGAAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATT
P12ABF+4Cys	TGAATCCTTGAAGAAAGGC AAGAAGCAGAAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATT
P12ABFF+4Cys	TGAATCCTTGAAGAAAGGC AAGAAGCAGAAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATT
P12ABFFF+4Cys	TGAATCCTTGAAGAAAGGC AAGAAGCAGAAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATT

P12AB+4Cys	TTTTTATCAATTTATATTTGACAAAAACAGTCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACCAGTTC
P12ABC+4Cys	TTTTTATCAATTTATATTTGACAAAAACAGTCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACCAGTTC
P12ABCC+4Cys	TTTTTATCAATTTATATTTGACAAAAACAGTCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACCAGTTC
P12ABCCC+4Cys	TTTTTATCAATTTATATTTGACAAAAACAGTCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACCAGTTC
P12ABF+4Cys	TTTTTATCAATTTATATTTGACAAAAACAGTCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACCAGTTC
P12ABFF+4Cys	TTTTTATCAATTTATATTTGACAAAAACAGTCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACCAGTTC
P12ABFFF+4Cys	TTTTTATCAATTTATATTTGACAAAAACAGTCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACCAGTTC

P12AB+4Cys	CTCATGTCCAACCAGATATAGCCACTACCACCACCGACATACAAGGCTTACC GCCTGAAGCTAGAGATTT
P12ABC+4Cys	CTCATGTCCAACCAGATATAGCCACTACCACCACCGACATACAAGGCTTACC GCCTGAAGCTAGAGATTT
P12ABCC+4Cys	CTCATGTCCAACCAGATATAGCCACTACCACCACCGACATACAAGGCTTACC GCCTGAAGCTAGAGATTT
P12ABCCC+4Cys	CTCATGTCCAACCAGATATAGCCACTACCACCACCGACATACAAGGCTTACC GCCTGAAGCTAGAGATTT
P12ABF+4Cys	CTCATGTCCAACCAGATATAGCCACTACCACCACCGACATACAAGGCTTACC GCCTGAAGCTAGAGATTT
P12ABFF+4Cys	CTCATGTCCAACCAGATATAGCCACTACCACCACCGACATACAAGGCTTACC GCCTGAAGCTAGAGATTT
P12ABFFF+4Cys	CTCATGTCCAACCAGATATAGCCACTACCACCACCGACATACAAGGCTTACC GCCTGAAGCTAGAGATTT

P12AB+4Cys	ACTTGATGAAAGGGGTAAATTTTTCTAAATTCACCTCTGGCGATATGGAATGTTAGATGTTGAGGGCGTC
P12ABC+4Cys	ACTTGATGAAAGGGGTAAATTTTTCTAAATTCACCTCTGGCGATATGGAATGTTAGATGTTGAGGGCGTC
P12ABCC+4Cys	ACTTGATGAAAGGGGTAAATTTTTCTAAATTCACCTCTGGCGATATGGAATGTTAGATGTTGAGGGCGTC
P12ABCCC+4Cys	ACTTGATGAAAGGGGTAAATTTTTCTAAATTCACCTCTGGCGATATGGAATGTTAGATGTTGAGGGCGTC
P12ABF+4Cys	ACTTGATGAAAGGGGTAAATTTTTCTAAATTCACCTCTGGCGATATGGAATGTTAGATGTTGAGGGCGTC
P12ABFF+4Cys	ACTTGATGAAAGGGGTAAATTTTTCTAAATTCACCTCTGGCGATATGGAATGTTAGATGTTGAGGGCGTC
P12ABFFF+4Cys	ACTTGATGAAAGGGGTAAATTTTTCTAAATTCACCTCTGGCGATATGGAATGTTAGATGTTGAGGGCGTC

P12AB+4Cys	GCCGACATTGATCCTAATTACAAGTTCAACCAATTTATTGATTCACAATAACACTCTGTCTTCTGTGTTAA
P12ABC+4Cys	GCCGACATTGATCCTAATTACAAGTTCAACCAATTTATTGATTCACAATAACACTCTGTCTTCTGTGTTAA
P12ABCC+4Cys	GCCGACATTGATCCTAATTACAAGTTCAACCAATTTATTGATTCACAATAACACTCTGTCTTCTGTGTTAA
P12ABCCC+4Cys	GCCGACATTGATCCTAATTACAAGTTCAACCAATTTATTGATTCACAATAACACTCTGTCTTCTGTGTTAA
P12ABF+4Cys	GCCGACATTGATCCTAATTACAAGTTCAACCAATTTATTGATTCACAATAACACTCTGTCTTCTGTGTTAA
P12ABFF+4Cys	GCCGACATTGATCCTAATTACAAGTTCAACCAATTTATTGATTCACAATAACACTCTGTCTTCTGTGTTAA
P12ABFFF+4Cys	GCCGACATTGATCCTAATTACAAGTTCAACCAATTTATTGATTCACAATAACACTCTGTCTTCTGTGTTAA

P12AB+4Cys	TGGGGAGTCATGATGGCATAGAACCTGAAAAAGTTTCATTATTGATATCGGGCAATGGTGGTTTTGGAGC
P12ABC+4Cys	TGGGGAGTCATGATGGCATAGAACCTGAAAAAGTTTCATTATTGATATCGGGCAATGGTGGTTTTGGAGC
P12ABCC+4Cys	TGGGGAGTCATGATGGCATAGAACCTGAAAAAGTTTCATTATTGATATCGGGCAATGGTGGTTTTGGAGC
P12ABCCC+4Cys	TGGGGAGTCATGATGGCATAGAACCTGAAAAAGTTTCATTATTGATATCGGGCAATGGTGGTTTTGGAGC
P12ABF+4Cys	TGGGGAGTCATGATGGCATAGAACCTGAAAAAGTTTCATTATTGATATCGGGCAATGGTGGTTTTGGAGC
P12ABFF+4Cys	TGGGGAGTCATGATGGCATAGAACCTGAAAAAGTTTCATTATTGATATCGGGCAATGGTGGTTTTGGAGC
P12ABFFF+4Cys	TGGGGAGTCATGATGGCATAGAACCTGAAAAAGTTTCATTATTGATATCGGGCAATGGTGGTTTTGGAGC

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 P12AB+4Cys CAAGCACGATTGGAAACGCCACCGTTGGTTATAAAGACCAACAAGGTAACAATGTGGCTACAATAATTAAT
 P12ABC+4Cys CAAGCACGATTGGAAACGCCACCGTTGGTTATAAAGACCAACAAGGTAACAATGTGGCTACAATAATTAAT
 P12ABCC+4Cys CAAGCACGATTGGAAACGCCACCGTTGGTTATAAAGACCAACAAGGTAACAATGTGGCTACAATAATTAAT
 P12ABCCC+4Cys CAAGCACGATTGGAAACGCCACCGTTGGTTATAAAGACCAACAAGGTAACAATGTGGCTACAATAATTAAT
 P12ABF+4Cys CAAGCACGATTGGAAACGCCACCGTTGGTTATAAAGACCAACAAGGTAACAATGTGGCTACAATAATTAAT
 P12ABFF+4Cys CAAGCACGATTGGAAACGCCACCGTTGGTTATAAAGACCAACAAGGTAACAATGTGGCTACAATAATTAAT
 P12ABFFF+4Cys CAAGCACGATTGGAAACGCCACCGTTGGTTATAAAGACCAACAAGGTAACAATGTGGCTACAATAATTAAT

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 P12AB+4Cys GTGCATATGAAAAACGGCAGTGGCTTAGTCATAGCAGGTGGTGAGAAAGGGATTAAATAACCCCTAGTTTTT
 P12ABC+4Cys GTGCATATGAAAAACGGCAGTGGCTTAGTCATAGCAGGTGGTGAGAAAGGGATTAAATAACCCCTAGTTTTT
 P12ABCC+4Cys GTGCATATGAAAAACGGCAGTGGCTTAGTCATAGCAGGTGGTGAGAAAGGGATTAAATAACCCCTAGTTTTT
 P12ABCCC+4Cys GTGCATATGAAAAACGGCAGTGGCTTAGTCATAGCAGGTGGTGAGAAAGGGATTAAATAACCCCTAGTTTTT
 P12ABF+4Cys GTGCATATGAAAAACGGCAGTGGCTTAGTCATAGCAGGTGGTGAGAAAGGGATTAAATAACCCCTAGTTTTT
 P12ABFF+4Cys GTGCATATGAAAAACGGCAGTGGCTTAGTCATAGCAGGTGGTGAGAAAGGGATTAAATAACCCCTAGTTTTT
 P12ABFFF+4Cys GTGCATATGAAAAACGGCAGTGGCTTAGTCATAGCAGGTGGTGAGAAAGGGATTAAATAACCCCTAGTTTTT

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 P12AB+4Cys ATCTCTCAAAGAAGACCAACTCACAGGCTCACAAACGAGCATTGAGTCAAGAAGAGATCCGAAACAAAAAT
 P12ABC+4Cys ATCTCTCAAAGAAGACCAACTCACAGGCTCACAAACGAGCATTGAGTCAAGAAGAGATCCGAAACAAAAAT
 P12ABCC+4Cys ATCTCTCAAAGAAGACCAACTCACAGGCTCACAAACGAGCATTGAGTCAAGAAGAGATCCGAAACAAAAAT
 P12ABCCC+4Cys ATCTCTCAAAGAAGACCAACTCACAGGCTCACAAACGAGCATTGAGTCAAGAAGAGATCCGAAACAAAAAT
 P12ABF+4Cys ATCTCTCAAAGAAGACCAACTCACAGGCTCACAAACGAGCATTGAGTCAAGAAGAGATCCGAAACAAAAAT
 P12ABFF+4Cys ATCTCTCAAAGAAGACCAACTCACAGGCTCACAAACGAGCATTGAGTCAAGAAGAGATCCGAAACAAAAAT
 P12ABFFF+4Cys ATCTCTCAAAGAAGACCAACTCACAGGCTCACAAACGAGCATTGAGTCAAGAAGAGATCCGAAACAAAAAT

1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 P12AB+4Cys AGATTTTCATGGAACTTCTTGACAAAAACAATGCTAAATTAAGACAACCTTGAGCGAGAAAGAGAAAGAAAAA
 P12ABC+4Cys AGATTTTCATGGAACTTCTTGACAAAAACAATGCTAAATTAAGACAACCTTGAGCGAGAAAGAGAAAGAAAAA
 P12ABCC+4Cys AGATTTTCATGGAACTTCTTGACAAAAACAATGCTAAATTAAGACAACCTTGAGCGAGAAAGAGAAAGAAAAA
 P12ABCCC+4Cys AGATTTTCATGGAACTTCTTGACAAAAACAATGCTAAATTAAGACAACCTTGAGCGAGAAAGAGAAAGAAAAA
 P12ABF+4Cys AGATTTTCATGGAACTTCTTGACAAAAACAATGCTAAATTAAGACAACCTTGAGCGAGAAAGAGAAAGAAAAA
 P12ABFF+4Cys AGATTTTCATGGAACTTCTTGACAAAAACAATGCTAAATTAAGACAACCTTGAGCGAGAAAGAGAAAGAAAAA
 P12ABFFF+4Cys AGATTTTCATGGAACTTCTTGACAAAAACAATGCTAAATTAAGACAACCTTGAGCGAGAAAGAGAAAGAAAAA

1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 P12AB+4Cys TTCCAAAATGAGATTAAGGATTTCCAAAAAGACTCTAAGGCTTATTTAGACGCCCTAGGGAATGATCGTA
 P12ABC+4Cys TTCCAAAATGAGATTAAGGATTTCCAAAAAGACTCTAAGGCTTATTTAGACGCCCTAGGGAATGATCGTA
 P12ABCC+4Cys TTCCAAAATGAGATTAAGGATTTCCAAAAAGACTCTAAGGCTTATTTAGACGCCCTAGGGAATGATCGTA
 P12ABCCC+4Cys TTCCAAAATGAGATTAAGGATTTCCAAAAAGACTCTAAGGCTTATTTAGACGCCCTAGGGAATGATCGTA
 P12ABF+4Cys TTCCAAAATGAGATTAAGGATTTCCAAAAAGACTCTAAGGCTTATTTAGACGCCCTAGGGAATGATCGTA
 P12ABFF+4Cys TTCCAAAATGAGATTAAGGATTTCCAAAAAGACTCTAAGGCTTATTTAGACGCCCTAGGGAATGATCGTA
 P12ABFFF+4Cys TTCCAAAATGAGATTAAGGATTTCCAAAAAGACTCTAAGGCTTATTTAGACGCCCTAGGGAATGATCGTA

1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 P12AB+4Cys TTGCTTTTGTTCCTAAAAAAGACACAAAAACATTCAGCTTTAATTAAGTGGTAAATGGGGATTTGAG
 P12ABC+4Cys TTGCTTTTGTTCCTAAAAAAGACACAAAAACATTCAGCTTTAATTAAGTGGTAAATGGGGATTTGAG
 P12ABCC+4Cys TTGCTTTTGTTCCTAAAAAAGACACAAAAACATTCAGCTTTAATTAAGTGGTAAATGGGGATTTGAG
 P12ABCCC+4Cys TTGCTTTTGTTCCTAAAAAAGACACAAAAACATTCAGCTTTAATTAAGTGGTAAATGGGGATTTGAG
 P12ABF+4Cys TTGCTTTTGTTCCTAAAAAAGACACAAAAACATTCAGCTTTAATTAAGTGGTAAATGGGGATTTGAG
 P12ABFF+4Cys TTGCTTTTGTTCCTAAAAAAGACACAAAAACATTCAGCTTTAATTAAGTGGTAAATGGGGATTTGAG
 P12ABFFF+4Cys TTGCTTTTGTTCCTAAAAAAGACACAAAAACATTCAGCTTTAATTAAGTGGTAAATGGGGATTTGAG

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 P12AB+4Cys CTACACTCTCAAAGATTAATGGGAAAAAAGCAGATAAAGCTTTAGATAGGGAGAAAAATGTTACTCTTCAA
 P12ABC+4Cys CTACACTCTCAAAGATTAATGGGAAAAAAGCAGATAAAGCTTTAGATAGGGAGAAAAATGTTACTCTTCAA
 P12ABCC+4Cys CTACACTCTCAAAGATTAATGGGAAAAAAGCAGATAAAGCTTTAGATAGGGAGAAAAATGTTACTCTTCAA
 P12ABCCC+4Cys CTACACTCTCAAAGATTAATGGGAAAAAAGCAGATAAAGCTTTAGATAGGGAGAAAAATGTTACTCTTCAA
 P12ABF+4Cys CTACACTCTCAAAGATTAATGGGAAAAAAGCAGATAAAGCTTTAGATAGGGAGAAAAATGTTACTCTTCAA
 P12ABFF+4Cys CTACACTCTCAAAGATTAATGGGAAAAAAGCAGATAAAGCTTTAGATAGGGAGAAAAATGTTACTCTTCAA
 P12ABFFF+4Cys CTACACTCTCAAAGATTAATGGGAAAAAAGCAGATAAAGCTTTAGATAGGGAGAAAAATGTTACTCTTCAA

1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 P12AB+4Cys GGTAGCCTAAAAATGATGGCGTGATGTTTGTGATTATTCTAATTTCAAATACACCAACGCTCCAAAGA
 P12ABC+4Cys GGTAGCCTAAAAATGATGGCGTGATGTTTGTGATTATTCTAATTTCAAATACACCAACGCTCCAAAGA
 P12ABCC+4Cys GGTAGCCTAAAAATGATGGCGTGATGTTTGTGATTATTCTAATTTCAAATACACCAACGCTCCAAAGA
 P12ABCC+4Cys GGTAGCCTAAAAATGATGGCGTGATGTTTGTGATTATTCTAATTTCAAATACACCAACGCTCCAAAGA
 P12ABFF+4Cys GGTAGCCTAAAAATGATGGCGTGATGTTTGTGATTATTCTAATTTCAAATACACCAACGCTCCAAAGA
 P12ABFFF+4Cys GGTAGCCTAAAAATGATGGCGTGATGTTTGTGATTATTCTAATTTCAAATACACCAACGCTCCAAAGA

1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 P12AB+4Cys ATCCCAATAAGGGGTAGGCGTTACGAATGGCGTTTCCCATTTAGAAGCAGGCTTTGACAAGGTAGCTGT
 P12ABC+4Cys ATCCCAATAAGGGGTAGGCGTTACGAATGGCGTTTCCCATTTAGAAGCAGGCTTTGACAAGGTAGCTGT
 P12ABCC+4Cys ATCCCAATAAGGGGTAGGCGTTACGAATGGCGTTTCCCATTTAGAAGCAGGCTTTGACAAGGTAGCTGT
 P12ABCC+4Cys ATCCCAATAAGGGGTAGGCGTTACGAATGGCGTTTCCCATTTAGAAGCAGGCTTTGACAAGGTAGCTGT
 P12ABFF+4Cys ATCCCAATAAGGGGTAGGCGTTACGAATGGCGTTTCCCATTTAGAAGCAGGCTTTGACAAGGTAGCTGT
 P12ABFFF+4Cys ATCCCAATAAGGGGTAGGCGTTACGAATGGCGTTTCCCATTTAGAAGCAGGCTTTGACAAGGTAGCTGT

1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 P12AB+4Cys CTTTAATTTGCCTGATTTAAATAATCTCGCTATCACTAGTTTCGTAAAGCGGAATTTAGAGGATAAACTA
 P12ABC+4Cys CTTTAATTTGCCTGATTTAAATAATCTCGCTATCACTAGTTTCGTAAAGCGGAATTTAGAGGATAAACTA
 P12ABCC+4Cys CTTTAATTTGCCTGATTTAAATAATCTCGCTATCACTAGTTTCGTAAAGCGGAATTTAGAGGATAAACTA
 P12ABCC+4Cys CTTTAATTTGCCTGATTTAAATAATCTCGCTATCACTAGTTTCGTAAAGCGGAATTTAGAGGATAAACTA
 P12ABFF+4Cys CTTTAATTTGCCTGATTTAAATAATCTCGCTATCACTAGTTTCGTAAAGCGGAATTTAGAGGATAAACTA
 P12ABFFF+4Cys CTTTAATTTGCCTGATTTAAATAATCTCGCTATCACTAGTTTCGTAAAGCGGAATTTAGAGGATAAACTA

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 P12AB+4Cys GTCACATAAAGGATTTCCATACAAGAACTAATAAGCTTATCAAAGACTTTTTGAATAGCAACAAAGAAAT
 P12ABC+4Cys GTCACATAAAGGATTTCCATACAAGAACTAATAAGCTTATCAAAGACTTTTTGAATAGCAACAAAGAAAT
 P12ABCC+4Cys GTCACATAAAGGATTTCCATACAAGAACTAATAAGCTTATCAAAGACTTTTTGAATAGCAACAAAGAAAT
 P12ABCC+4Cys GTCACATAAAGGATTTCCATACAAGAACTAATAAGCTTATCAAAGACTTTTTGAATAGCAACAAAGAAAT
 P12ABFF+4Cys GTCACATAAAGGATTTCCATACAAGAACTAATAAGCTTATCAAAGACTTTTTGAATAGCAACAAAGAAAT
 P12ABFFF+4Cys GTCACATAAAGGATTTCCATACAAGAACTAATAAGCTTATCAAAGACTTTTTGAATAGCAACAAAGAAAT

1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 P12AB+4Cys TGGTTGGAAGGCTTTAAACTTCAATAAAGCTGTAGCTGACGCTAAAAACACAGGCAACTATGATGAAGT
 P12ABC+4Cys TGGTTGGAAGGCTTTAAACTTCAATAAAGCTGTAGCTGACGCTAAAAACACAGGCAACTATGATGAAGT
 P12ABCC+4Cys TGGTTGGAAGGCTTTAAACTTCAATAAAGCTGTAGCTGACGCTAAAAACACAGGCAACTATGATGAAGT
 P12ABCC+4Cys TGGTTGGAAGGCTTTAAACTTCAATAAAGCTGTAGCTGACGCTAAAAACACAGGCAACTATGATGAAGT
 P12ABFF+4Cys TGGTTGGAAGGCTTTAAACTTCAATAAAGCTGTAGCTGACGCTAAAAACACAGGCAACTATGATGAAGT
 P12ABFFF+4Cys TGGTTGGAAGGCTTTAAACTTCAATAAAGCTGTAGCTGACGCTAAAAACACAGGCAACTATGATGAAGT

1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 P12AB+4Cys GAAAAAAGCTCAGAAAGATCTTGAATAATCTTAAAGAAACGAGAGCATTTAGAGAAAGAAGTAGCGAAA
 P12ABC+4Cys GAAAAAAGCTCAGAAAGATCTTGAATAATCTTAAAGAAACGAGAGCATTTAGAGAAAGAAGTAGCGAAA
 P12ABCC+4Cys GAAAAAAGCTCAGAAAGATCTTGAATAATCTTAAAGAAACGAGAGCATTTAGAGAAAGAAGTAGCGAAA
 P12ABCC+4Cys GAAAAAAGCTCAGAAAGATCTTGAATAATCTTAAAGAAACGAGAGCATTTAGAGAAAGAAGTAGCGAAA
 P12ABFF+4Cys GAAAAAAGCTCAGAAAGATCTTGAATAATCTTAAAGAAACGAGAGCATTTAGAGAAAGAAGTAGCGAAA
 P12ABFFF+4Cys GAAAAAAGCTCAGAAAGATCTTGAATAATCTTAAAGAAACGAGAGCATTTAGAGAAAGAAGTAGCGAAA

1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 P12AB+4Cys AATTTGGAGAGCAAAAGTGGCAACAAAAACAAAATGGAAGCGAAATCTCAAGCTAACAGCCAAAAAGATG
 P12ABC+4Cys AATTTGGAGAGCAAAAGTGGCAACAAAAACAAAATGGAAGCGAAATCTCAAGCTAACAGCCAAAAAGATG
 P12ABCC+4Cys AATTTGGAGAGCAAAAGTGGCAACAAAAACAAAATGGAAGCGAAATCTCAAGCTAACAGCCAAAAAGATG
 P12ABCC+4Cys AATTTGGAGAGCAAAAGTGGCAACAAAAACAAAATGGAAGCGAAATCTCAAGCTAACAGCCAAAAAGATG
 P12ABFF+4Cys AATTTGGAGAGCAAAAGTGGCAACAAAAACAAAATGGAAGCGAAATCTCAAGCTAACAGCCAAAAAGATG
 P12ABFFF+4Cys AATTTGGAGAGCAAAAGTGGCAACAAAAACAAAATGGAAGCGAAATCTCAAGCTAACAGCCAAAAAGATG

1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030
 P12AB+4Cys AGATTTTTGCGTTGATCAATAAAGAGGCTAATAGGGACGCAAGAGCAATCGCTTACGCTCAGAATCTTAA
 P12ABC+4Cys AGATTTTTGCGTTGATCAATAAAGAGGCTAATAGGGACGCAAGAGCAATCGCTTACGCTCAGAATCTTAA
 P12ABCC+4Cys AGATTTTTGCGTTGATCAATAAAGAGGCTAATAGGGACGCAAGAGCAATCGCTTACGCTCAGAATCTTAA
 P12ABCC+4Cys AGATTTTTGCGTTGATCAATAAAGAGGCTAATAGGGACGCAAGAGCAATCGCTTACGCTCAGAATCTTAA
 P12ABF+4Cys AGATTTTTGCGTTGATCAATAAAGAGGCTAATAGGGACGCAAGAGCAATCGCTTACGCTCAGAATCTTAA
 P12ABFF+4Cys AGATTTTTGCGTTGATCAATAAAGAGGCTAATAGGGACGCAAGAGCAATCGCTTACGCTCAGAATCTTAA
 P12ABFFF+4Cys AGATTTTTGCGTTGATCAATAAAGAGGCTAATAGGGACGCAAGAGCAATCGCTTACGCTCAGAATCTTAA

2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 P12AB+4Cys AGGCATCAAAATGGAATTGTCTGATAAACTTGAAAATGTCAACAAGAAATTTGAAAGACTTTAGTAAATCT
 P12ABC+4Cys AGGCATCAAAATGGAATTGTCTGATAAACTTGAAAATGTCAACAAGAAATTTGAAAGACTTTAGTAAATCT
 P12ABCC+4Cys AGGCATCAAAATGGAATTGTCTGATAAACTTGAAAATGTCAACAAGAAATTTGAAAGACTTTAGTAAATCT
 P12ABCC+4Cys AGGCATCAAAATGGAATTGTCTGATAAACTTGAAAATGTCAACAAGAAATTTGAAAGACTTTAGTAAATCT
 P12ABF+4Cys AGGCATCAAAATGGAATTGTCTGATAAACTTGAAAATGTCAACAAGAAATTTGAAAGACTTTAGTAAATCT
 P12ABFF+4Cys AGGCATCAAAATGGAATTGTCTGATAAACTTGAAAATGTCAACAAGAAATTTGAAAGACTTTAGTAAATCT
 P12ABFFF+4Cys AGGCATCAAAATGGAATTGTCTGATAAACTTGAAAATGTCAACAAGAAATTTGAAAGACTTTAGTAAATCT

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170
 P12AB+4Cys TTTGATGAATTCAAAAATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGCAAGGCAGAAGAAACACTAAAAGCCCTTAAAG
 P12ABC+4Cys TTTGATGAATTCAAAAATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGCAAGGCAGAAGAAACACTAAAAGCCCTTAAAG
 P12ABCC+4Cys TTTGATGAATTCAAAAATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGCAAGGCAGAAGAAACACTAAAAGCCCTTAAAG
 P12ABCC+4Cys TTTGATGAATTCAAAAATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGCAAGGCAGAAGAAACACTAAAAGCCCTTAAAG
 P12ABF+4Cys TTTGATGAATTCAAAAATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGCAAGGCAGAAGAAACACTAAAAGCCCTTAAAG
 P12ABFF+4Cys TTTGATGAATTCAAAAATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGCAAGGCAGAAGAAACACTAAAAGCCCTTAAAG
 P12ABFFF+4Cys TTTGATGAATTCAAAAATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGCAAGGCAGAAGAAACACTAAAAGCCCTTAAAG

2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240
 P12AB+4Cys GTTCGGTGAAAGATTTAGGTATCAATCCAGAATGGATTTCAAAAGTTGAAAACCTTAATGCAGCTTTGAA
 P12ABC+4Cys GTTCGGTGAAAGATTTAGGTATCAATCCAGAATGGATTTCAAAAGTTGAAAACCTTAATGCAGCTTTGAA
 P12ABCC+4Cys GTTCGGTGAAAGATTTAGGTATCAATCCAGAATGGATTTCAAAAGTTGAAAACCTTAATGCAGCTTTGAA
 P12ABCC+4Cys GTTCGGTGAAAGATTTAGGTATCAATCCAGAATGGATTTCAAAAGTTGAAAACCTTAATGCAGCTTTGAA
 P12ABF+4Cys GTTCGGTGAAAGATTTAGGTATCAATCCAGAATGGATTTCAAAAGTTGAAAACCTTAATGCAGCTTTGAA
 P12ABFF+4Cys GTTCGGTGAAAGATTTAGGTATCAATCCAGAATGGATTTCAAAAGTTGAAAACCTTAATGCAGCTTTGAA
 P12ABFFF+4Cys GTTCGGTGAAAGATTTAGGTATCAATCCAGAATGGATTTCAAAAGTTGAAAACCTTAATGCAGCTTTGAA

2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310
 P12AB+4Cys TGAATTCAAAAATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGCAAGGTAGCGCAAGCAAAAAGCGACCTTGAAAATTC
 P12ABC+4Cys TGAATTCAAAAATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGCAAGGTAGCGCAAGCAAAAAGCGACCTTGAAAATTC
 P12ABCC+4Cys TGAATTCAAAAATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGCAAGGTAGCGCAAGCAAAAAGCGACCTTGAAAATTC
 P12ABCC+4Cys TGAATTCAAAAATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGCAAGGTAGCGCAAGCAAAAAGCGACCTTGAAAATTC
 P12ABF+4Cys TGAATTCAAAAATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGCAAGGTAGCGCAAGCAAAAAGCGACCTTGAAAATTC
 P12ABFF+4Cys TGAATTCAAAAATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGCAAGGTAGCGCAAGCAAAAAGCGACCTTGAAAATTC
 P12ABFFF+4Cys TGAATTCAAAAATGGCAAAAATAAGGATTTTCAGCAAGGTAGCGCAAGCAAAAAGCGACCTTGAAAATTC

2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380
 P12AB+4Cys GTTAAAGATGTGATCATCAATCAAAAAGATAACGGATAAAGTTGATAATCTCAATCAAGCGGTATCAGTGG
 P12ABC+4Cys GTTAAAGATGTGATCATCAATCAAAAAGATAACGGATAAAGTTGATAATCTCAATCAAGCGGTATCAGTGG
 P12ABCC+4Cys GTTAAAGATGTGATCATCAATCAAAAAGATAACGGATAAAGTTGATAATCTCAATCAAGCGGTATCAGTGG
 P12ABCC+4Cys GTTAAAGATGTGATCATCAATCAAAAAGATAACGGATAAAGTTGATAATCTCAATCAAGCGGTATCAGTGG
 P12ABF+4Cys GTTAAAGATGTGATCATCAATCAAAAAGATAACGGATAAAGTTGATAATCTCAATCAAGCGGTATCAGTGG
 P12ABFF+4Cys GTTAAAGATGTGATCATCAATCAAAAAGATAACGGATAAAGTTGATAATCTCAATCAAGCGGTATCAGTGG
 P12ABFFF+4Cys GTTAAAGATGTGATCATCAATCAAAAAGATAACGGATAAAGTTGATAATCTCAATCAAGCGGTATCAGTGG

2390 2400 2410 2420 2430 2440 2450
 P12AB+4Cys CTAAGCAACGGGTGATTTTCAGTAGGGTAGAGCAAGCGTTAGCCGATCTCAAAAACCTTCTCAAAGGAGCA
 P12ABC+4Cys CTAAGCAACGGGTGATTTTCAGTAGGGTAGAGCAAGCGTTAGCCGATCTCAAAAACCTTCTCAAAGGAGCA
 P12ABCC+4Cys CTAAGCAACGGGTGATTTTCAGTAGGGTAGAGCAAGCGTTAGCCGATCTCAAAAACCTTCTCAAAGGAGCA
 P12ABCC+4Cys CTAAGCAACGGGTGATTTTCAGTAGGGTAGAGCAAGCGTTAGCCGATCTCAAAAACCTTCTCAAAGGAGCA
 P12ABF+4Cys CTAAGCAACGGGTGATTTTCAGTAGGGTAGAGCAAGCGTTAGCCGATCTCAAAAACCTTCTCAAAGGAGCA
 P12ABFF+4Cys CTAAGCAACGGGTGATTTTCAGTAGGGTAGAGCAAGCGTTAGCCGATCTCAAAAACCTTCTCAAAGGAGCA
 P12ABFFF+4Cys CTAAGCAACGGGTGATTTTCAGTAGGGTAGAGCAAGCGTTAGCCGATCTCAAAAACCTTCTCAAAGGAGCA

2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 P12AB+4Cys ATTGGCTCAACAAGCTCAAAAAAATGAAGATTTCAATACTGGAAAAAATTTCTGCACATATACCAATCCGTT
 P12ABC+4Cys ATTGGCTCAACAAGCTCAAAAAAATGAAGATTTCAATACTGGAAAAAATTTCTGCACATATACCAATCCGTT
 P12ABCC+4Cys ATTGGCTCAACAAGCTCAAAAAAATGAAGATTTCAATACTGGAAAAAATTTCTGCACATATACCAATCCGTT
 P12ABCC+4Cys ATTGGCTCAACAAGCTCAAAAAAATGAAGATTTCAATACTGGAAAAAATTTCTGCACATATACCAATCCGTT
 P12ABFF+4Cys ATTGGCTCAACAAGCTCAAAAAAATGAAGATTTCAATACTGGAAAAAATTTCTGCACATATACCAATCCGTT
 P12ABFFF+4Cys ATTGGCTCAACAAGCTCAAAAAAATGAAGATTTCAATACTGGAAAAAATTTCTGCACATATACCAATCCGTT

2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 P12AB+4Cys AAGAAATGGTGTGAATGGAAACCCCTAGTCGGTAATGGGTTATCTAAAGCAGAGCCCAACTCTTTCCTAAAA
 P12ABC+4Cys AAGAAATGGTGTGAATGGAAACCCCTAGTCGGTAATGGGTTATCTAAAGCAGAGCCCAACTCTTTCCTAAAA
 P12ABCC+4Cys AAGAAATGGTGTGAATGGAAACCCCTAGTCGGTAATGGGTTATCTAAAGCAGAGCCCAACTCTTTCCTAAAA
 P12ABCC+4Cys AAGAAATGGTGTGAATGGAAACCCCTAGTCGGTAATGGGTTATCTAAAGCAGAGCCCAACTCTTTCCTAAAA
 P12ABFF+4Cys AAGAAATGGTGTGAATGGAAACCCCTAGTCGGTAATGGGTTATCTAAAGCAGAGCCCAACTCTTTCCTAAAA
 P12ABFFF+4Cys AAGAAATGGTGTGAATGGAAACCCCTAGTCGGTAATGGGTTATCTAAAGCAGAGCCCAACTCTTTCCTAAAA

2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 P12AB+4Cys ACTTTTCGGACATCAAGAAAGAGTTGAATGCAAAAACCTGGAAATTTCAATAACAATAACAATAATGGACT
 P12ABC+4Cys ACTTTTCGGACATCAAGAAAGAGTTGAATGCAAAAACCTGGAAATTTCAATAACAATAACAATAATGGACT
 P12ABCC+4Cys ACTTTTCGGACATCAAGAAAGAGTTGAATGCAAAAACCTGGAAATTTCAATAACAATAACAATAATGGACT
 P12ABCC+4Cys ACTTTTCGGACATCAAGAAAGAGTTGAATGCAAAAACCTGGAAATTTCAATAACAATAACAATAATGGACT
 P12ABFF+4Cys ACTTTTCGGACATCAAGAAAGAGTTGAATGCAAAAACCTGGAAATTTCAATAACAATAACAATAATGGACT
 P12ABFFF+4Cys ACTTTTCGGACATCAAGAAAGAGTTGAATGCAAAAACCTGGAAATTTCAATAACAATAACAATAATGGACT

2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 P12AB+4Cys CAAAAACGAACCCATTTATGCTAAAGTTAAATAAAAAGAAAAAGGGCAAGCAGCTAGCCATGAAGAACCC
 P12ABC+4Cys CAAAAACGAACCCATTTATGCTAAAGTTAAATAAAAAGAAAAAGGGCAAGCAGCTAGCCATGAAGAACCC
 P12ABCC+4Cys CAAAAACGAACCCATTTATGCTAAAGTTAAATAAAAAGAAAAAGGGCAAGCAGCTAGCCATGAAGAACCC
 P12ABCC+4Cys CAAAAACGAACCCATTTATGCTAAAGTTAAATAAAAAGAAAAAGGGCAAGCAGCTAGCCATGAAGAACCC
 P12ABFF+4Cys CAAAAACGAACCCATTTATGCTAAAGTTAAATAAAAAGAAAAAGGGCAAGCAGCTAGCCATGAAGAACCC
 P12ABFFF+4Cys CAAAAACGAACCCATTTATGCTAAAGTTAAATAAAAAGAAAAAGGGCAAGCAGCTAGCCATGAAGAACCC

2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 P12AB+4Cys ATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGTAATGCAAAAATTTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGG
 P12ABC+4Cys ATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGTAATGCAAAAATTTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGG
 P12ABCC+4Cys ATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGTAATGCAAAAATTTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGG
 P12ABCC+4Cys ATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGTAATGCAAAAATTTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGG
 P12ABFF+4Cys ATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGTAATGCAAAAATTTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGG
 P12ABFFF+4Cys ATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGTAATGCAAAAATTTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGG

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 P12AB+4Cys GTGGTGTAGGGCAAGCAGCGGGCTTCCCTTTGAAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGG
 P12ABC+4Cys GTGGTGTAGGGCAAGCAGCGGGCTTCCCTTTGAAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGG
 P12ABCC+4Cys GTGGTGTAGGGCAAGCAGCGGGCTTCCCTTTGAAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGG
 P12ABCC+4Cys GTGGTGTAGGGCAAGCAGCGGGCTTCCCTTTGAAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGG
 P12ABFF+4Cys GTGGTGTAGGGCAAGCAGCGGGCTTCCCTTTGAAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGG
 P12ABFFF+4Cys GTGGTGTAGGGCAAGCAGCGGGCTTCCCTTTGAAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGG

2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 P12AB+4Cys ---TTC---
 P12ABC+4Cys GCTTTCAGCTAGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAAG
 P12ABCC+4Cys GCTTTCAGCTAGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAAG
 P12ABCC+4Cys GCTTTCAGCTAGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAAG
 P12ABFF+4Cys GCTTTCAGCTAGCCCTGAA
 P12ABFFF+4Cys GCTTTCAGCTAGCCCTGAACCCATTTTGTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAAG
 P12ABFFF+4Cys GCTTTCAGCTAGCCCTGAACCCATTTTGTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAAG


```

                2950      2960      2970      2980      2990      3000      3010
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
P12AB+4Cys
P12ABC+4Cys      CATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTCA
P12ABCC+4Cys     CATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAGCTAGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTG
P12ABCC+4Cys     CATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAGCTAGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTG
P12ABF+4Cys
P12ABFF+4Cys     CATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAGCTAGCCCTGAA
P12ABFF+4Cys     CATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTCAGCTAGCCCTGAACCCATTTTTGCTACGATTG

                3020      3030      3040      3050      3060      3070      3080
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
P12AB+4Cys
P12ABC+4Cys
P12ABCC+4Cys     ATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTC
P12ABCC+4Cys     ATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTC
P12ABF+4Cys
P12ABFF+4Cys
P12ABFF+4Cys     ATGATCTCGGCGGA -- TTCCCTTTGAAAAAGCATGATAAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTTC

                3090      3100      3110      3120      3130      3140      3150
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
P12AB+4Cys
P12ABC+4Cys
P12ABCC+4Cys     A
P12ABCC+4Cys     AGCTAGCCCTGAACCCATTTATGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAAGCATGAT
P12ABF+4Cys     -----CCCATTTTTGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAAGCATGAT
P12ABFF+4Cys     -----CCCATTTTTGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAAGCATGAT
P12ABFF+4Cys     AGCTAGCCCTGAACCCATTTTTGCTACGATTGATGATCTCGGCGGACCTTTCCCTTTGAAAAAGCATGAT

                3160      3170      3180      3190      3200      3210      3220
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
P12AB+4Cys
P12ABC+4Cys
P12ABCC+4Cys     AAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTCAAGGAATCAAAAATTGGCTCAGAAAATTGACAAATCTCA
P12ABCC+4Cys     -----AGGAATCAAAAATTGGCTCAGAAAATTGACAAATCTCA
P12ABCC+4Cys     AAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTCAAGGAATCAAAAATTGGCTCAGAAAATTGACAAATCTCA
P12ABF+4Cys     AAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTCAAGGAATCAAAAATTGGCTCAGAAAATTGACAAATCTCA
P12ABFF+4Cys     AAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTCAAGGAATCAAAAATTGGCTCAGAAAATTGACAAATCTCA
P12ABFF+4Cys     AAAGTTGAAGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTCAAGGAATCAAAAATTGGCTCAGAAAATTGACAAATCTCA

                3230      3240      3250      3260      3270      3280      3290
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
P12AB+4Cys
P12ABC+4Cys     ATCAAGCGGTATCAGAAGCTAAAGCAGGTTTTTTTTGGCAATCTAGAGCAAACGATAGACAAGCTCAAAGA
P12ABCC+4Cys     ATCAAGCGGTATCAGAAGCTAAAGCAGGTTTTTTTTGGCAATCTAGAGCAAACGATAGACAAGCTCAAAGA
P12ABCC+4Cys     ATCAAGCGGTATCAGAAGCTAAAGCAGGTTTTTTTTGGCAATCTAGAGCAAACGATAGACAAGCTCAAAGA
P12ABF+4Cys     ATCAAGCGGTATCAGAAGCTAAAGCAGGTTTTTTTTGGCAATCTAGAGCAAACGATAGACAAGCTCAAAGA
P12ABFF+4Cys     ATCAAGCGGTATCAGAAGCTAAAGCAGGTTTTTTTTGGCAATCTAGAGCAAACGATAGACAAGCTCAAAGA
P12ABFF+4Cys     ATCAAGCGGTATCAGAAGCTAAAGCAGGTTTTTTTTGGCAATCTAGAGCAAACGATAGACAAGCTCAAAGA

                3300      3310      3320      3330      3340      3350      3360
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
P12AB+4Cys
P12ABC+4Cys     TTCTACAAAATACAAATCCTGTGAATCTATGGGTTGAAAGTGCAAAAAAAGTACCTGCTAGTTTGTGACGCG
P12ABCC+4Cys     TTCTACAAAATACAAATCCTGTGAATCTATGGGTTGAAAGTGCAAAAAAAGTACCTGCTAGTTTGTGACGCG
P12ABCC+4Cys     TTCTACAAAATACAAATCCTGTGAATCTATGGGTTGAAAGTGCAAAAAAAGTACCTGCTAGTTTGTGACGCG
P12ABF+4Cys     TTCTACAAAATACAAATCCTGTGAATCTATGGGTTGAAAGTGCAAAAAAAGTACCTGCTAGTTTGTGACGCG
P12ABFF+4Cys     TTCTACAAAATACAAATCCTGTGAATCTATGGGTTGAAAGTGCAAAAAAAGTACCTGCTAGTTTGTGACGCG
P12ABFF+4Cys     TTCTACAAAATACAAATCCTGTGAATCTATGGGTTGAAAGTGCAAAAAAAGTACCTGCTAGTTTGTGACGCG

                3370      3380      3390      3400      3410      3420      3430
                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
P12AB+4Cys
P12ABC+4Cys     AAACCTAGATAAATTATGCTACTAACAGCCACACACGCATTAAATAGCAATATCAAAAATGGAGCAATCAATG
P12ABCC+4Cys     AAACCTAGATAAATTATGCTACTAACAGCCACACACGCATTAAATAGCAATATCAAAAATGGAGCAATCAATG
P12ABCC+4Cys     AAACCTAGATAAATTATGCTACTAACAGCCACACACGCATTAAATAGCAATATCAAAAATGGAGCAATCAATG
P12ABF+4Cys     AAACCTAGATAAATTATGCTACTAACAGCCACACACGCATTAAATAGCAATATCAAAAATGGAGCAATCAATG
P12ABFF+4Cys     AAACCTAGATAAATTATGCTACTAACAGCCACACACGCATTAAATAGCAATATCAAAAATGGAGCAATCAATG
P12ABFF+4Cys     AAACCTAGATAAATTATGCTACTAACAGCCACACACGCATTAAATAGCAATATCAAAAATGGAGCAATCAATG

```

```

          3440      3450      3460      3470      3480      3490      3500
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P12AB+4Cys  AAAAAAGCGACCGGCATGCTAGCGCAAAAAAACCCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGC
P12ABC+4Cys  AAAAAAGCGACCGGCATGCTAGCGCAAAAAAACCCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGC
P12ABCC+4Cys AAAAAAGCGACCGGCATGCTAGCGCAAAAAAACCCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGC
P12ABCCC+4Cys AAAAAAGCGACCGGCATGCTAGCGCAAAAAAACCCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGC
P12ABF+4Cys  AAAAAAGCGACCGGCATGCTAGCGCAAAAAAACCCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGC
P12ABFF+4Cys AAAAAAGCGACCGGCATGCTAGCGCAAAAAAACCCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGC
P12ABFFF+4Cys AAAAAAGCGACCGGCATGCTAGCGCAAAAAAACCCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGC

```

```

          3510      3520      3530      3540      3550      3560      3570
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P12AB+4Cys  GCATAATGTGGGAAGCGTTCCCTTTGTTAGAGTATGATAAAAATTGGCTTCAACCAGAGAATATGAAAGAT
P12ABC+4Cys  GCATAATGTGGGAAGCGTTCCCTTTGTTAGAGTATGATAAAAATTGGCTTCAACCAGAGAATATGAAAGAT
P12ABCC+4Cys GCATAATGTGGGAAGCGTTCCCTTTGTTAGAGTATGATAAAAATTGGCTTCAACCAGAGAATATGAAAGAT
P12ABCCC+4Cys GCATAATGTGGGAAGCGTTCCCTTTGTTAGAGTATGATAAAAATTGGCTTCAACCAGAGAATATGAAAGAT
P12ABF+4Cys  GCATAATGTGGGAAGCGTTCCCTTTGTTAGAGTATGATAAAAATTGGCTTCAACCAGAGAATATGAAAGAT
P12ABFF+4Cys GCATAATGTGGGAAGCGTTCCCTTTGTTAGAGTATGATAAAAATTGGCTTCAACCAGAGAATATGAAAGAT
P12ABFFF+4Cys GCATAATGTGGGAAGCGTTCCCTTTGTTAGAGTATGATAAAAATTGGCTTCAACCAGAGAATATGAAAGAT

```

```

          3580      3590      3600      3610      3620      3630      3640
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P12AB+4Cys  TATTCGTGATTCGTTCAAGTTTTCCACCAACTTGAACAATGCTGTAAAAGACATTAAGTCTGGCTTTACGC
P12ABC+4Cys  TATTCGTGATTCGTTCAAGTTTTCCACCAACTTGAACAATGCTGTAAAAGACATTAAGTCTGGCTTTACGC
P12ABCC+4Cys TATTCGTGATTCGTTCAAGTTTTCCACCAACTTGAACAATGCTGTAAAAGACATTAAGTCTGGCTTTACGC
P12ABCCC+4Cys TATTCGTGATTCGTTCAAGTTTTCCACCAACTTGAACAATGCTGTAAAAGACATTAAGTCTGGCTTTACGC
P12ABF+4Cys  TATTCGTGATTCGTTCAAGTTTTCCACCAACTTGAACAATGCTGTAAAAGACATTAAGTCTGGCTTTACGC
P12ABFF+4Cys TATTCGTGATTCGTTCAAGTTTTCCACCAACTTGAACAATGCTGTAAAAGACATTAAGTCTGGCTTTACGC
P12ABFFF+4Cys TATTCGTGATTCGTTCAAGTTTTCCACCAACTTGAACAATGCTGTAAAAGACATTAAGTCTGGCTTTACGC

```

```

          3650      3660      3670      3680      3690      3700      3710
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P12AB+4Cys  AATTTTTAGCCAATGCATTTTCTACAGGATATTACTGCTTGGCGAGGGGAAAATGCAGAGCATGGAATCAA
P12ABC+4Cys  AATTTTTAGCCAATGCATTTTCTACAGGATATTACTGCTTGGCGAGGGGAAAATGCAGAGCATGGAATCAA
P12ABCC+4Cys AATTTTTAGCCAATGCATTTTCTACAGGATATTACTGCTTGGCGAGGGGAAAATGCAGAGCATGGAATCAA
P12ABCCC+4Cys AATTTTTAGCCAATGCATTTTCTACAGGATATTACTGCTTGGCGAGGGGAAAATGCAGAGCATGGAATCAA
P12ABF+4Cys  AATTTTTAGCCAATGCATTTTCTACAGGATATTACTGCTTGGCGAGGGGAAAATGCAGAGCATGGAATCAA
P12ABFF+4Cys AATTTTTAGCCAATGCATTTTCTACAGGATATTACTGCTTGGCGAGGGGAAAATGCAGAGCATGGAATCAA
P12ABFFF+4Cys AATTTTTAGCCAATGCATTTTCTACAGGATATTACTGCTTGGCGAGGGGAAAATGCAGAGCATGGAATCAA

```

```

          3720      3730      3740      3750      3760      3770      3780
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P12AB+4Cys  GAATGTTAATACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTCTAGAGCGGGCAGCTTTCTGAACCTGCTGCCCGGGC
P12ABC+4Cys  GAATGTTAATACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTCTAGAGCGGGCAGCTTTCTGAACCTGCTGCCCGGGC
P12ABCC+4Cys GAATGTTAATACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTCTAGAGCGGGCAGCTTTCTGAACCTGCTGCCCGGGC
P12ABCCC+4Cys GAATGTTAATACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTCTAGAGCGGGCAGCTTTCTGAACCTGCTGCCCGGGC
P12ABF+4Cys  GAATGTTAATACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTCTAGAGCGGGCAGCTTTCTGAACCTGCTGCCCGGGC
P12ABFF+4Cys GAATGTTAATACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTCTAGAGCGGGCAGCTTTCTGAACCTGCTGCCCGGGC
P12ABFFF+4Cys GAATGTTAATACAAAAGGTGGTTTCCAAAAATCTTCTAGAGCGGGCAGCTTTCTGAACCTGCTGCCCGGGC

```

```

          3790      3800
    ....|....|....|....|....|....|...
P12AB+4Cys  TGCTGCATGGAACCGGGCGGCCGTTAA
P12ABC+4Cys  TGCTGCATGGAACCGGGCGGCCGTTAA
P12ABCC+4Cys TGCTGCATGGAACCGGGCGGCCGTTAA
P12ABCCC+4Cys TGCTGCATGGAACCGGGCGGCCGTTAA
P12ABF+4Cys  TGCTGCATGGAACCGGGCGGCCGTTAA
P12ABFF+4Cys TGCTGCATGGAACCGGGCGGCCGTTAA
P12ABFFF+4Cys TGCTGCATGGAACCGGGCGGCCGTTAA

```

6.2.3. Αριθμοί αναφοράς γονιδίων στην διεθνή βάση δεδομένων PubMLST.

Στελέχη	ST	atpA	efp	mutY	ppa	trpC	ureI	ypbC
G1005	1950	1710	1619	1735	1672	1768	1000	1806
G1006	1951	1711	1621	1736	1673	1769	1808	1808
G1009	1952	1712	71	1737	1674	1770	1809	1809
G1013	1953	1713	1622	1738	1675	1771	1810	1810
G1017	1954	1714	1623	1739	1676	1772	1811	1811
G1020	1955	1715	1624	1740	1677	1773	1812	1812
G1021	1956	1716	1625	1741	1678	1774	1813	1813
G1022	1957	1717	1625	1742	1679	1775	1814	1814
G1023	1958	1340	1626	1743	1680	1776	1815	1815
G1025	1959	1718	1627	1744	1681	1777	1816	1816
G1028	1960	1719	1628	1745	1682	1778	1817	1817
G1034	1961	1720	1629	1746	1683	1779	1818	1818
G1037	1962	1721	1630	1747	1684	1780	1819	1819
G1038	1963	1722	1631	1748	1685	1781	113	1820
G1040	1964	1723	1632	1749	1686	1782	1820	1821
G1042	1965	1724	1633	1750	1687	1782	1821	1822
G1044	1966	1725	1634	1751	1688	1783	1822	1823
G1046	1967	1726	1635	883	1689	1784	1823	1824
G1048	1968	1727	1636	1752	1690	1785	1824	1825
G1049	1969	1728	1637	1753	1691	1786	1825	1826
G1051	1970	1729	1638	1754	1692	1787	1826	1827
G1052	1971	1730	1639	1755	1693	1788	1827	1828
G1058	1972	1731	1640	1756	1694	1789	1824	1829
G1061	1973	1732	1641	1757	1695	1790	1828	1830
G1065	1974	1733	1642	1758	1658	1790	1829	1831
G1066	1975	736	1643	1759	1696	1791	1830	1832
G1068	1976	1734	1644	1760	1697	1792	1817	1833
G1070	1977	1735	1645	1761	1698	1793	1831	1834
G1073	1978	1736	1646	1762	1699	1794	1832	1835
G1075	1979	1737	1647	1763	1700	1795	1833	1836
G2011	1980	1738	1648	1764	1701	1796	1834	1837
G2012	1981	1739	1625	1765	1702	1797	1835	1838
G2023	1982	1740	1649	1766	1703	1798	1836	1839
G2028	1983	1741	1650	1767	1704	1799	1837	1840
G2030	1984	1742	1024	1768	1705	1800	1838	651
G2034	1985	1743	1651	1769	1706	1800	1839	1841
G2037	1986	1744	1652	1770	1707	1801	1840	1842
G2041	1987	1745	1653	1771	1708	1802	1841	1843
G2043	1988	1746	1654	1772	1709	1803	1842	1844
G2048	1989	1747	1620	1773	1710	1768	1807	1807

